

症 例

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 検査部¹⁾, 血液内科²⁾

荻原 紀子¹⁾, 佐々木 駿¹⁾, 高橋 綾香¹⁾, 小野瑛朱香¹⁾,
平松成奈美¹⁾, 赤木 直美¹⁾, 小川 明美¹⁾, 丹下 雅貴¹⁾,
岡崎 守弘¹⁾, 藤井総一郎²⁾, 竹内 誠²⁾

(令和元年9月9日受稿)

要 旨

PT や APTT の凝固時間が延長した場合に、当院ではクロスミキシング試験 (cross mixing test : CMT) で検出した波形パターンの目視判定により、原因の精査を行っている。しかし、当院ではそのパターンが直線や逆S字を示した場合に非典型的や判定困難と診断されることがあった。そこで、近年報告された Index of circulating anticoagulant (ICA) を算出し、併用の有用性を検討した。11症例において、ICA が欠乏型とする感度は67%、特異度は80%、非欠乏型とする感度は80%、特異度は67%であり、CMT も同様となった。ICA は CMT を上回るものではなかったが、CMT に ICA を併用することは、CMT では判定が難しい正常血漿での補正割合の検出が可能となり、詳細な病態判定を行えるため有用と考えられた。

Key words : Cross mixing test, Index of circulating anticoagulant, Heparin, Pseudo-positiveness

緒 言

クロスミキシング試験 (CMT) は、凝固時間の延長が凝固因子欠乏によるのか、凝固因子に対するインヒビター (inhibitor : INH) やループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant : LA) 等の存在によるのかを、検出した波形パターンの目視判定により鑑別する検査である¹⁾。しかし当院ではパターンが直線や逆S字を示した場合に、非典型的や判定困難と診断されることがあった。

近年、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) の CMT の定量化指標として Index of circulating anticoagulant (ICA) の有用性が報告された²⁾³⁾。

ICA は、CMT 実施時に検出される被検血漿と正常血漿およびそれらの等量混合血漿の凝固時間を用いて簡単に計算で算出することができ、インキュベーションも不要である。

そこで今回、われわれは CMT における ICA 併用の有用性を検討した。

対 象

2016年5月から2019年4月までに CMT を実施した症例のうち、委託した検査センター (BML と SRL) への追加検査で凝固時間延長の原因が特定できた11例。

機 器 ・ 試 薬

機器は全自動血液凝固測定装置 CS-5100。試薬はデイドイノビン、トロンボチェック APTT-SLA。正常血漿はコアグトロール N。(いずれもシスメックス社)

方 法

被検血漿は2000×gで10分間、室温で2回遠心分離処理⁴⁾して得た3.2%クエン酸ナトリウム加血漿を使用した。

被検血漿に正常血漿を各種比率で混合し、混合直後 (即時反応) と37℃ 2時間インキュベーション後 (遅延反応) にプロトロンビン時間

(prothrombin time : PT) や APTT を測定した。被検血漿比率は、0, 20, 50, 80, 100%で行った。

CMT の判定は、後天性血友病 A 診療ガイドライン2017年改訂版¹⁾に従い、下に凸, 上に凸, 直線の3種類に分類した。ガイドラインで、直線は LA の可能性を示唆しているため、今回の検討では、即時反応と遅延反応ともに下に凸を欠乏型、即時反応と遅延反応の一方もしくは両方が上に凸や直線を示した場合を非欠乏型とした。

ICA は (50%混合血漿の凝固時間 - 正常血漿の凝固時間) / 被検血漿の凝固時間 × 100とした⁵⁾。カットオフ値は12.4を使用し⁶⁾、12.4未満を欠乏型、12.4以上を非欠乏型と判定した。

結 果

結果を表1と表2に示す。

症例1～3のICAはそれぞれ1.4, 8.8, 3.2となり欠乏型、CMTは下に凸を示し欠乏型であった。結果はそれぞれ第Ⅶ因子欠乏、第Ⅹ因子と第Ⅻ因子のやや低値症例、ビタミンK欠乏症例であった。

症例4のPTのICAは10.7、APTTのICAは8.6で欠乏型、CMTは下に凸を示し欠乏型であった(図1)。結果は、第Ⅴ因子活性1.0%、第Ⅴ因子INH 1 BU/mLの第Ⅴ因子INH症例であった。

症例5のICAは10.7で欠乏型、CMTはほぼ直線でわずかに下に凸を示した(図2)。非典型的でインキュベーション後も変化なくINHパターンではないと診断され、結果は第Ⅷ因子低値症例であった。

症例6のICAは12.5で非欠乏型、CMTは下に凸を示し(図3)欠乏型であった。結果は血友病Aであった。希釈ラッセル蛇毒時間(diluted

表1 CMTとICAの比較

症例	凝固検査		ICA (カットオフ値12.4)	CMT		結果		
	種類	結果(秒)		波形パターン	診断	凝固異常の原因	結果	基準値
1	PT	13.8	1.4	下に凸	因子欠乏パターン	第Ⅶ因子	34.6%	54~162
2	APTT	43.0	8.8	下に凸	わずかに下に凸の波形のため欠乏パターンが疑われるが、これだけでは判断できない	第Ⅹ因子	34.3%	58~200
						第Ⅻ因子	29.4%	36~152
3	APTT	65.2	3.2	下に凸	凝固因子欠乏パターン	ビタミンK欠乏	凝固因子未検査。ビタミンK投与でAPTT改善	—
4	PT	30.8	10.7	下に凸	下に凸	第Ⅴ因子INH	1 BU/mL (SRL)	検出せず
	APTT	99.7	8.6	下に凸				
5	APTT	41.9	10.7	ほぼ直線でやや下に凸	非典型的。インキュベーション後も変化なく、INHパターンではない。	第Ⅷ因子	46.7%	78~165
6	APTT	54.1	12.5	下に凸	下に凸のカーブ。凝固因子欠乏の可能性	第Ⅷ因子	6.0%	78~165
7	APTT	39.6	12.4	即時はほぼ直線、遅延は下に凸	凝固因子欠乏パターン	第Ⅻ因子	31.7%	36~152
8	APTT	66.9	18.9	即時はほぼ直線、遅延はやや下に凸	直線的な回復で凝固因子欠乏ともLAとも判断がつかない	dRVVT	1.9	0~1.2
9	APTT	55.2	30.4	逆S字	直線的であり、上に凸でも下に凸でもない	dRVVT	1.8	0~1.2
						抗CL-IgG抗体	16U/mL	0~10
10	APTT	42.7	18.5	逆S字	INHパターン	dRVVT	1.3	0~1.2
11	APTT	61.9	37.3	上に凸	上に凸、即時と遅延の差がないLAパターン	第Ⅷ因子INH	9.3BU/mL (BML)	0~1.0
						第Ⅸ因子INH	7.6BU/mL (BML)	0~1.0

基準値

PT 10.2~12.7秒
APTT 26.9~38.1秒

表2 CMTとICAの併用

ICA 12.4→	非 欠 乏 型	症例6 (血友病A) ICA12.5	症例8 (LA) ICA18.9 症例7 (第XII因子やや低値) ICA12.4	症例9 (LA) 症例10 (LA) 症例11 (第VIII因子INH・第IX因子INH)
	欠 乏 型	症例1 (第VII因子欠乏) 症例2 (第X・第XII因子やや低値) 症例3 (ビタミンK欠乏) 症例4 (第V因子INH)	症例5 (第VIII因子低値) ICA10.7	
		下に凸 (欠乏型)	直線 (非欠乏型と判定困難)	上に凸 (非欠乏型: LA・INH)

CMT

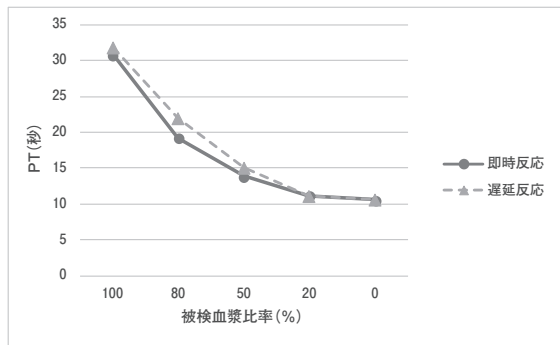


図1 症例4 PTのCMT
第V因子INH症例. ICAは10.7となり欠乏型を示した.

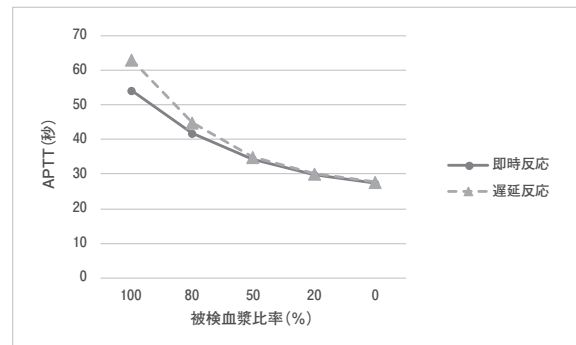


図3 症例6 APTTのCMT
血友病A. ICAは12.5となり非欠乏型を示した.

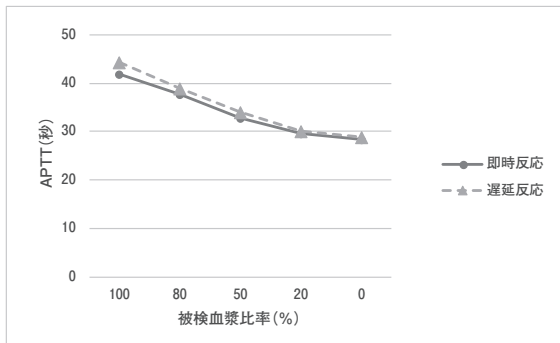


図2 症例5 APTTのCMT
第VIII因子低値症例. ICAは10.7となり欠乏型を示した.

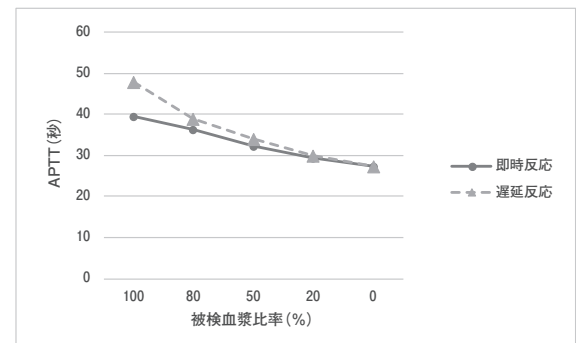


図4 症例7 APTTのCMT
第XII因子やや低値症例. ICAは12.4となり非欠乏型を示した.

Russell's viper venom time : dRVVT) や抗カルジオリピン (cardiolipin : CL) -IgG 抗体および抗 CL-β₂グリコプロテイン (glycoprotein : GP) 1 抗体は陰性であった.

症例7のICAは12.4で非欠乏型, CMTの即時反応はほぼ直線を示し, 遅延反応は被検血漿のAPTTが延長したことにより下に凸を示した(図4). 凝固因子欠乏パターンと診断され, 結果は第XII因子のやや低値症例であった. dRVVTや抗

CL-IgG 抗体および抗 CL-β₂GP1 抗体は陰性であった.

症例8のICAは18.9で非欠乏型, CMTの即時反応はほぼ直線を示し, 遅延反応は被検血漿のAPTTが延長したことにより, やや下に凸を示した. 直線的な回復で判定困難と診断された. 結果はLA症例であった.

症例9~10のICAは30.4, 18.5で非欠乏型, CMTはインキュベーション前後で差がない逆S

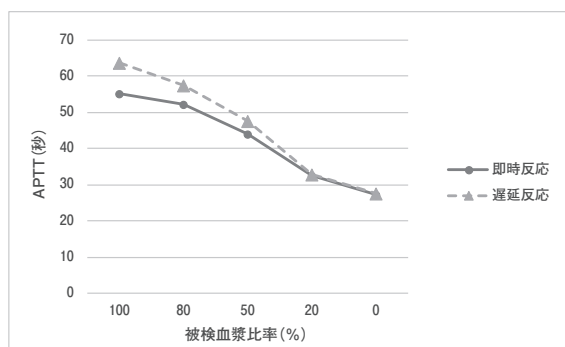


図5 症例9 APTTのCMT

LA症例。ICAは30.4となり非欠乏型を示した。

字を示した。それぞれ、上に凸でも下に凸でもない直線的(図5)、およびINHパターンと診断された。結果はLA症例であった。

症例11のICAは37.3で非欠乏型、CMTはインキュベーション前後で差がない上に凸を示した。LAパターンと診断され、結果は第Ⅷ因子と第Ⅸ因子のINH症例であった。

以上の結果より少数例ではあるが、ICAが欠乏型とする感度は67%、特異度は80%、非欠乏型とする感度は80%、特異度は67%であり、CMTも同様となった。

考 察

ICAは、LA検出を目的にRosnorらによって考案された指標である⁷⁾。国際血栓止血学会標準化委員会が勧告したLA検出改訂ガイドライン⁵⁾には、循環抗凝血素インデックスとして記載されている。ICAのカットオフ値は試薬によって異なるため⁸⁾、今回の検討では、当院と同じAPTT-SLA試薬(シスメックス社)を使用して算出した熊野らの報告⁶⁾から12.4を引用した。

ICAが欠乏型を示した症例1~3は、いずれも凝固因子欠乏もしくはやや低値症例であり、少数例ではあるがPTのICAも正しく判定できた。

ICAが欠乏型を示した症例4は、CMTも欠乏型を示した。結果は第Ⅴ因子INH症例であり、ICA、CMTともに偽陰性となった。内藤ら²⁾はCMTの即時反応が下に凸を示しINH5BU/mLであった症例のICAは13.5の非欠乏型を示したと報告している。また、CMTの即時反応が下に凸を示しLA陽性で複数の凝固因子活性の低下が認められた症例のICAは14.1の非欠乏型を示したと報告している。今回の症例4の第Ⅴ因子活性

は1.0%と微量で、第Ⅴ因子INH1BU/mLは、正常血漿1mL中に存在する凝固因子活性を50%阻害する力価で低値であったため、ICA、CMTともに偽陰性になったと考えられた。

ICAが欠乏型を示した症例5のCMTはほぼ直線で明らかな下に凸ではなかったため、CMTの判定は困難であった。本症例は第Ⅷ因子が46.7%と低値であり、ICAは正しく判定できた。

ICAが非欠乏型を示した症例6~11のうち、症例6と症例7のICAは12.5、12.4で、カットオフ値に近似した。この症例は凝固因子の欠乏もしくはやや低値症例であり、ICAは偽陽性となった。症例8~10はLA症例、症例11はINH症例であり、ICAは正しく判定できた。

ICAが偽陽性となった症例6のCMTは欠乏型を示し、第Ⅷ因子が6%の血友病A軽症例の結果と一致した。本症例は右視床出血と診断後、血腫拡大のため緊急搬送された患者であり、ICUでAラインから採血していた。ICAはヘパリン混入により偽高値になる事が報告されている⁸⁾。採血時にヘパリン混入を防ぐための逆血は十分行われていたが、少量混入したヘパリンによりICAが偽高値となった可能性が考えられた。

ICAが偽陽性となった症例7のCMTは、即時反応がほぼ直線で遅延反応は下に凸を示した。被検血漿のAPTTが即時反応よりも遅延反応で延長したのは、梶浦らの報告⁹⁾と同様に、インキュベーションにより第Ⅴ因子や第Ⅷ因子の一部が失活した可能性も考えられた。結果は第Ⅻ因子が31.7%とやや低値であり、APTTは39.6秒と延長が軽度であった。下村らは、APTTが39.7秒と軽度延長したLA症例のICAは11.9の欠乏型を示し、CMTは直線になったと報告している¹⁰⁾。APTTの軽度延長症例は、被検血漿と正常血漿の凝固時間の差が小さいために、正常血漿添加による凝固時間の補正が波形パターンに反映されにくく、CMTはほぼ直線になると考えられた。またICAは、被検血漿の凝固時間を分母とした計算式から算出されるため、APTTの軽度延長症例ではICAの分母の値が小さくなり、カットオフ値に近似する値になると考えられた。

これらのことから、ICAを併用するときは抗凝固剤が未使用であることを確認し、APTTの軽度延長症例ではICAの判定を保留にする必要があると考えられた。

結 論

ICA は感度や特異度が CMT と同じであり，抗凝固剤の影響を鋭敏に受け，APTT 軽度延長時に偽陽性や偽陰性となる点で目視法を上回るものではなかった。しかし，CMT で判定が難しいほぼ直線や逆 S 字などのパターンを示す症例において，正常血漿での補正割合の検出が可能となり，より詳細な病態判定を行えるため，CMT に ICA を併用することは有用と考えられた。

文 献

- 1) 酒井道生, 天野景裕, 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.
- 2) 内藤澄悦, 家子正裕, 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.
- 3) 徳永尚樹, 森さゆり, 他: APTT クロスミキシングテスト数値判定方法の考案 ~ 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.
- 4) 家子正裕, 小宮山豊, 他: 凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス. 日本検査血液学会雑誌 **17**(2): 149—155, 2016.
- 5) Pengo V, Tripodi A, et al: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J. Thromb. Haemost.* **7**(10): 1737—1740, 2009.
- 6) Kumano O, Ieko M, 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.
- 7) Rosner E, Pazner R, et al: Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb. Haemost.* **57**(2): 144—147, 1987.
- 8) Kumano O, Ieko M, 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.
- 9) 梶浦谷子, 山本ゆか子, 他: クロスミキシングテストにおける37°C インキュベーション付加が APTT 測定に与える影響. 日本臨床検査自動化学会誌 **39**(4): 669, 2014.
- 10) 下村大樹, 上田香織, 他: クロスミキシングテスト用正常血漿としてのコアグトロール N の評価. *Sysmex Journal* **18**(1): 1—16, 2017.

<Abstract>

Investigation of the usefulness of ICA in combination with cross-mixing test

Noriko Ogihara¹⁾, Shun Sasaki¹⁾, Ayaka Takahashi¹⁾, Asuka Ono¹⁾,
Nanami Hiramatsu¹⁾, Naomi Akagi¹⁾, Akemi Ogawa¹⁾, Masaki Tange¹⁾,
Morihiro Okazaki¹⁾, Soichiro Fujii²⁾ and Makoto Takeuchi²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, ²⁾Department of Hematology,
Japanese Red Cross Okayama Hospital

In our hospital, when a patient has a prolonged coagulation time of PT or APTT, the cause is carefully investigated by visual judgment of the waveform pattern detected by the cross-mixing test (CMT). However, some straight lined or inverted S-shaped patterns were diagnosed as atypical or difficult to judge. Therefore, this study calculated the index of circulating anticoagulant (ICA) reported in recent years and examined the usefulness of the index in combination with CMT. In 11 cases, the sensitivity of ICA for detecting

the coagulation deficient pattern was 67%, and the specificity was 80%; the sensitivity for detecting the coagulation inhibitor pattern was 80%, and the specificity was 67%. Similar results were found in CMT. ICA was not superior to CMT; however, use of ICA in combination with CMT made it possible to detect the correction rate in normal plasma, which is difficult to judge using CMT; hence, it was considered to be useful in determining the condition of coagulopathy in detail.