

[原著]

## 学内における交差混合試験理解のための Rivaroxaban の応用

登尾 一平<sup>1</sup>      山本 隆敏<sup>1</sup>      平野 京介<sup>1</sup>  
佛淵 悠大<sup>1</sup>      渡邊 一史<sup>1</sup>      田邊 香野<sup>1</sup>  
川口 辰哉<sup>1</sup>      上妻 行則<sup>1\*</sup>

Application of Rivaroxaban for student's understanding of cross mixing test.

Ippei NOBORUO, Takatoshi YAMAMOTO, Kyosuke HIRANO, Yudai HOTOKEBUCHI  
Kazufumi WATANABE, Kano TANABE, Tatsuya KAWAGUCHI, Yukinori KOZUMA

## 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行われる凝固検査である。APTT の延長は、凝固因子欠乏や凝固因子インヒビター、またはループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant; LA) の存在など血液凝固疾患の存在が示唆され、このような凝固時間が延長した際のスクリーニングとして交差混合試験 (cross mixing test; CMT) がある。しかしながら、これまで学内実習においては CMT の意義や技術を含め十分には教育できていなかった。そこで我々は、学内実習での CMT の実施を目指し基礎的検討を行い、direct oral anti-coagulant (DOAC) である Rivaroxaban が CMT における凝固因子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。そこで本研究では、学内実習で利用可能な Rivaroxaban の至適濃度および APTT 試薬を決定することを目的とした。APTT は正常血漿と Rivaroxaban を様々な比率で混和し、コアプレスタ<sup>®</sup>2000を使用し測定した。その結果、3,200 ng/mL の Rivaroxaban 濃度では様々な APTT 試薬存在下においてもインヒビターパターンを示したことから、Rivaroxaban 3,200 ng/mL が至適濃度であり、学内実習におけるインヒビター疑似検体として使用できる可能性が示唆された。なかでも、データファイ・APTT (FS) を用いた際において、最も典型的なインヒビターパターンを示したことから、データファイ・APTT (FS) が学内実習の CMT において最適な APTT 試薬であることが明らかとなった。

キーワード : cross mixing test, Rivaroxaban, DOAC, 凝固因子インヒビター, 学内実習

## I はじめに

凝固因子インヒビターの存在や凝固因子欠損、ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant;

LA) の存在などにより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) が延長するケースがあり、このような凝固時間の異常を鑑別す

所属

<sup>1</sup>熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

\*責任著者 : kozuma18@kumamoto-hsu.ac.jp

るスクリーニング法として交差混合試験 (cross mixing test; CMT) がある。しかし、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、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、診療現場や患者にとって有益であると考えられる。

これまで本学の学内実習においては、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、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 延長の原因が凝固因子欠損によるものなのか、インヒビターの存在によるものであるか、CMT の意義・重要性も含め十分に理解できていなかった。そこで我々は、直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants; DOACs) である Dabigatran, Apixaban, Rivaroxaban に着目し、CMT における凝固因子インヒビター疑似検体として使用可能か基礎検討を行った結果、Rivaroxaban が凝固因子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<sup>1)</sup>。さらに、Rivaroxaban とバリウム吸着血漿を用いて CMT の学内実習を実施したところ、バリウム吸着血漿単独での実習と比較して CMT が理解できたと回答した学生が大幅に増加し、凝固因子インヒビター疑似検体としての Rivaroxaban の使用は学生実習において極めて有用であることを報告した<sup>2)</sup>。

一方、我々は、積水メディカル社製コアグピア<sup>®</sup> APTT-N を使用して学内実習を実施してきたが、APTT 測定や CMT の実施においては臨床検査技師養成施設によって使用する APTT 試薬は様々である。つまり、Rivaroxaban を凝固因子インヒビター疑似検体として用いても、使用する APTT 試薬により結果が異なる可能性があり、試薬の違いによる検討は重要であると考えられる。さらに CMT

では混和直後に凝固時間を測定する即時反応と混和後37℃、2時間インキュベーション後に凝固時間を測定する遅延反応を実施することは重要である<sup>3)</sup>。一般的に即時反応の異常は凝固因子欠損、LA が示唆されるのに対して、凝固因子インヒビターは遅延反応の異常を示す。しかしながら、これまで Rivaroxaban 添加疑似検体における遅延反応に関する検討は行っておらず、Rivaroxaban が遅延反応にどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで今回我々は、Rivaroxaban 添加疑似検体が様々な APTT 試薬を用いた CMT において有用であるか否か検討し、さらには CMT 実習における最適な APTT 試薬を決定することを目的として研究を行った。

## II 方法

### 1. 機器および試薬

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 (APTT-N, 積水メディカル)、トロンボチェック APTT (APTT-S, sysmex)、データファイ・APTT (APTT-A, SIEMENS)、データファイ・APTT (FS) (APTT-FS, SIEMENS)、HemosIL SynthASil APTT (Hemos, Instrumentation Laboratory) を使用した (表1)。

### 2. 検体

検体は研究に同意を得ることのできた健常人ボランティアより採血 (3.2% クエン酸 Na: 血液 = 1: 9) し、3,400rpm 10分間遠心分離し、乏血小板血漿 (platelet poor plasma; PPP) を分離した。

本研究は、熊本保健科学大学 人を対象とする医学系研究に関する倫理審査において、承認済みである (承認番号: 18055)。

表1 APTT 試薬の特徴

		リン脂質	活性化剤
1	コアグピア <sup>®</sup> APTT-N (APTT-N)	ウサギ脳由来リン脂質	エラグ酸
2	トロンボチェック試薬 APTT (APTT-S)	ウサギ脳由来セファリン	エラグ酸
3	データファイ・APTT (APTT-A)	ウサギ脳由来セファリン	エラジン酸
4	データファイ・APTT (FS) (APTT-FS)	大豆由来セファリン	エラジン酸
5	HemosIL SynthASil APTT (Hemos)	合成リン脂質	シリカ

### 3. 第 X a 因子阻害剤 ; Rivaroxaban の調整

Rivaroxaban (Chemscene 社, Monmouth Junction, NJ, USA) に dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加し, 50 mg/mL の Rivaroxaban の各溶液を調整した。

### 4. 凝固因子インヒビター疑似検体の作製

Rivaroxaban を DMSO で希釈し, 低濃度: 1,600, 中濃度: 3,200, 高濃度: 4,800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の各溶液を調整した。調整した Rivaroxaban 溶液を正常血漿で希釈し, 最終濃度が 1,600, 3,200, 4,800 ng/mL となる凝固因子インヒビター疑似検体を作製した。

### 5. クロスミキシングテスト

4. で作製した凝固因子インヒビター疑似検体と正常血漿を任意の比率 (100, 80, 50, 20, 0%) で混合し, 混合直後または 37°C, 2 時間インキュベーション後の APTT を測定した。横軸を正常血漿濃度 (%), 縦軸を凝固時間としてグラフを作成した。本研究では波形パターン法と 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 (疑似血漿比率 0%) と凝固因子インヒビター疑似検体 (疑似血漿比率 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。基準値は, 15 % 以上でインヒビター, 15 % 以下で凝固因子欠損と定義されている。被験血漿と正常血漿の 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,  $\text{ICA}(\%) = (a - b) / c \times 100$  を算出した。<sup>4-6)</sup>

### 6. 統計処理

今回の検討で行った APTT 測定は, 同時再現性を考慮し, 全て 5 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。

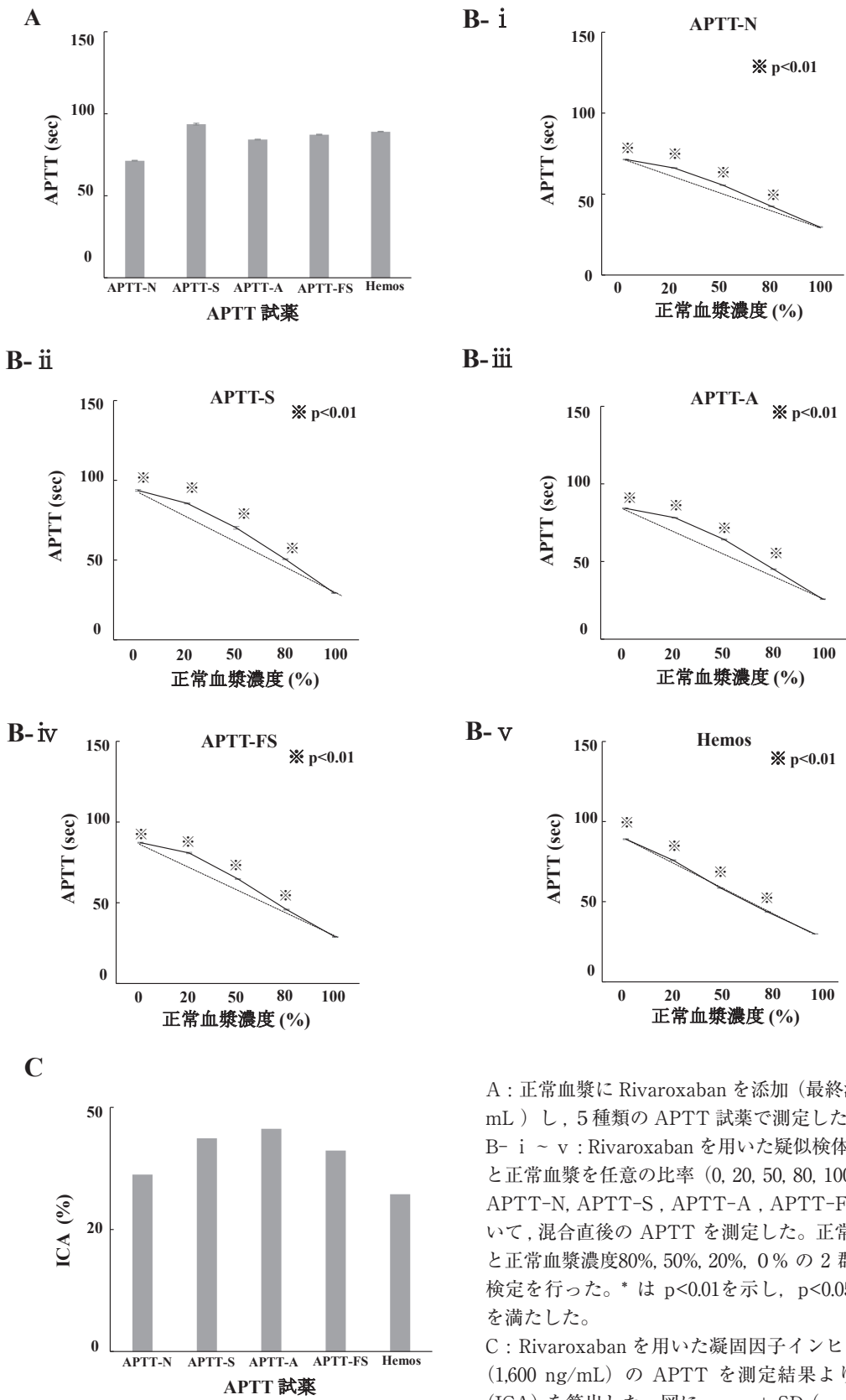
## III 結果

### 1. Rivaroxaban 1,600 ng/mL における CMT

本学の学内実習における凝固系検査においてはコアプレスタ® 2000 を使用している。そこで最初に, 様々な APTT 試薬を用いて疑似検体 (Rivaroxaban 1,600 ng/mL) の APTT をコアプレスタ® 2000 で測定したところ, APTT-N では  $71.4 \pm 0.22$  秒であったのに対して, その他の APTT 試薬ではさらに凝固時間が延長していた (APTT-S:  $93.6 \pm 0.55$  秒, APTT-A:  $84.2 \pm 0.22$  秒, APTT-FS:  $87.2 \pm 0.25$  秒, Hemos:  $89.0 \pm 0.23$  秒) (図 1 A)。一方, APTT-N を用いた CMT では, 正常血漿濃度 0% での APTT は  $71.4 \pm 0.22$  秒, 20% で  $66.1 \pm 0.15$  秒, 50% で  $55.5 \pm 0.14$  秒, 80% で  $42.5 \pm 0.08$  秒, 100% では  $29.7 \pm 0.19$  秒となり, グラフパターンは上に凸となった (図 1 B-i)。このグラフパターンは, APTT-S, APTT-A, APTT-FS を使用した際にも認められた (図 1 B-ii-iv)。一方, Hemos を使用した際には他の APTT 試薬と比較して上に凸の傾向は認められるものの典型的なグラフパターンではなかった (図 1 B-v)。さらに ICA は APTT-N では 36.3%, APTT-S では 43.7%, APTT-A では 45.6%, APTT-FS では 41.2%, Hemos では 32.2% であり, いずれにおいても 15% 以上であった (図 1 C)。

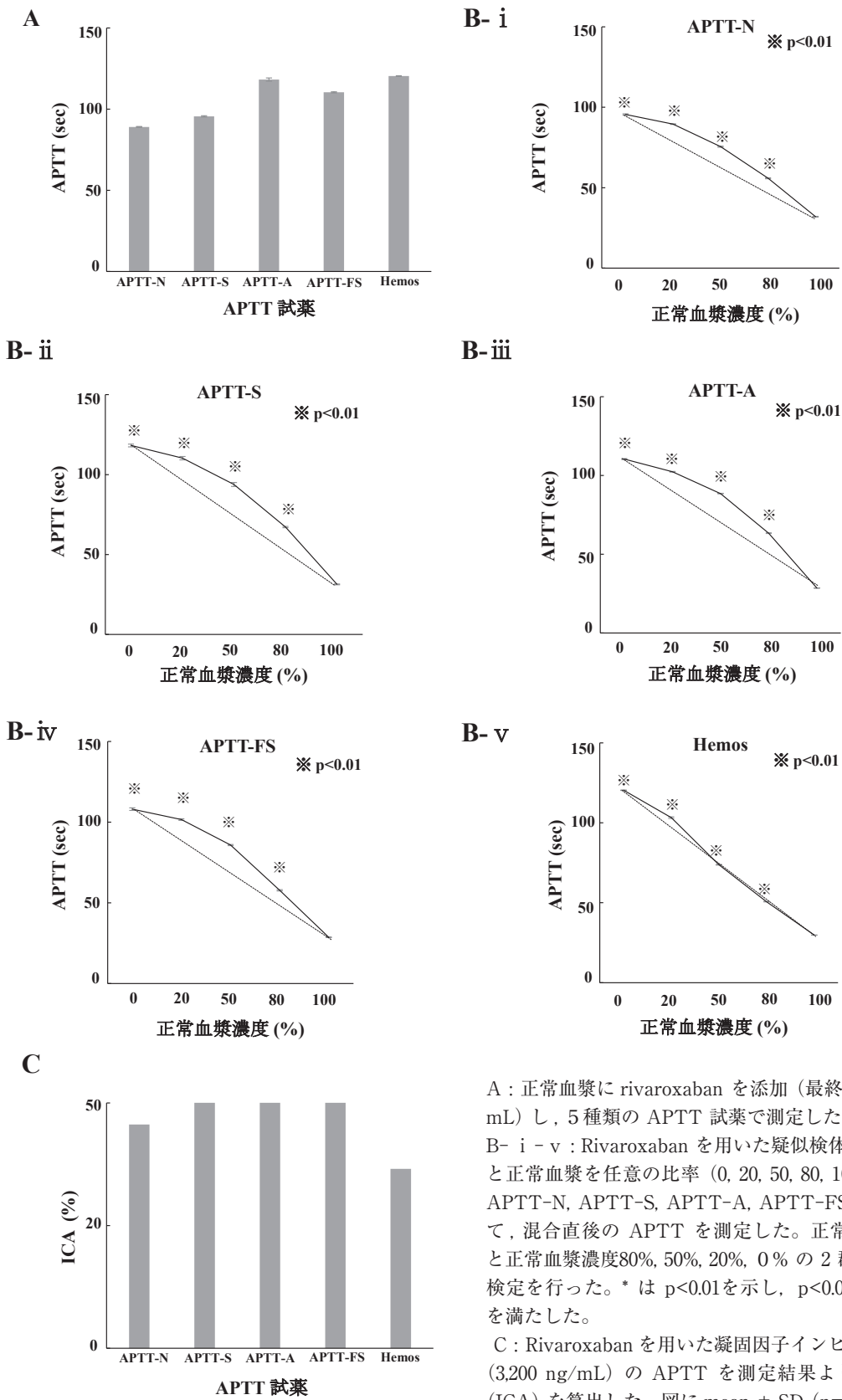
### 2. Rivaroxaban 至適濃度の検討

学内における APTT 測定実習では, 用手法で 5 秒ごとにフィブリン析出を確認するため, 測定結果に 5-10 秒の誤差が生じる可能性がある。本研究の最終目標は, 学生が CMT における典型的なグラフパターンを確認し, その意義を理解することにある。従って, 用手法による CMT において典型的な上に凸のパターンとなる Rivaroxaban の至適濃度を決定することは重要である。そこで, Rivaroxaban の至適濃度を決定するために Rivaroxaban 3,200 または 4,800 ng/mL での CMT を実施したところ, APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS ではいずれの濃度においても Rivaroxaban 1,600 ng/mL よりも上に凸のパターンが顕著となり (図 2 A, B, 図 3 A, B), ICA も 15% 以上となった (図 2 C, 図 3 C)。しかしながら, Hemos では 1,600 ng/mL の際のグラフパターンと大きな変化はなく,



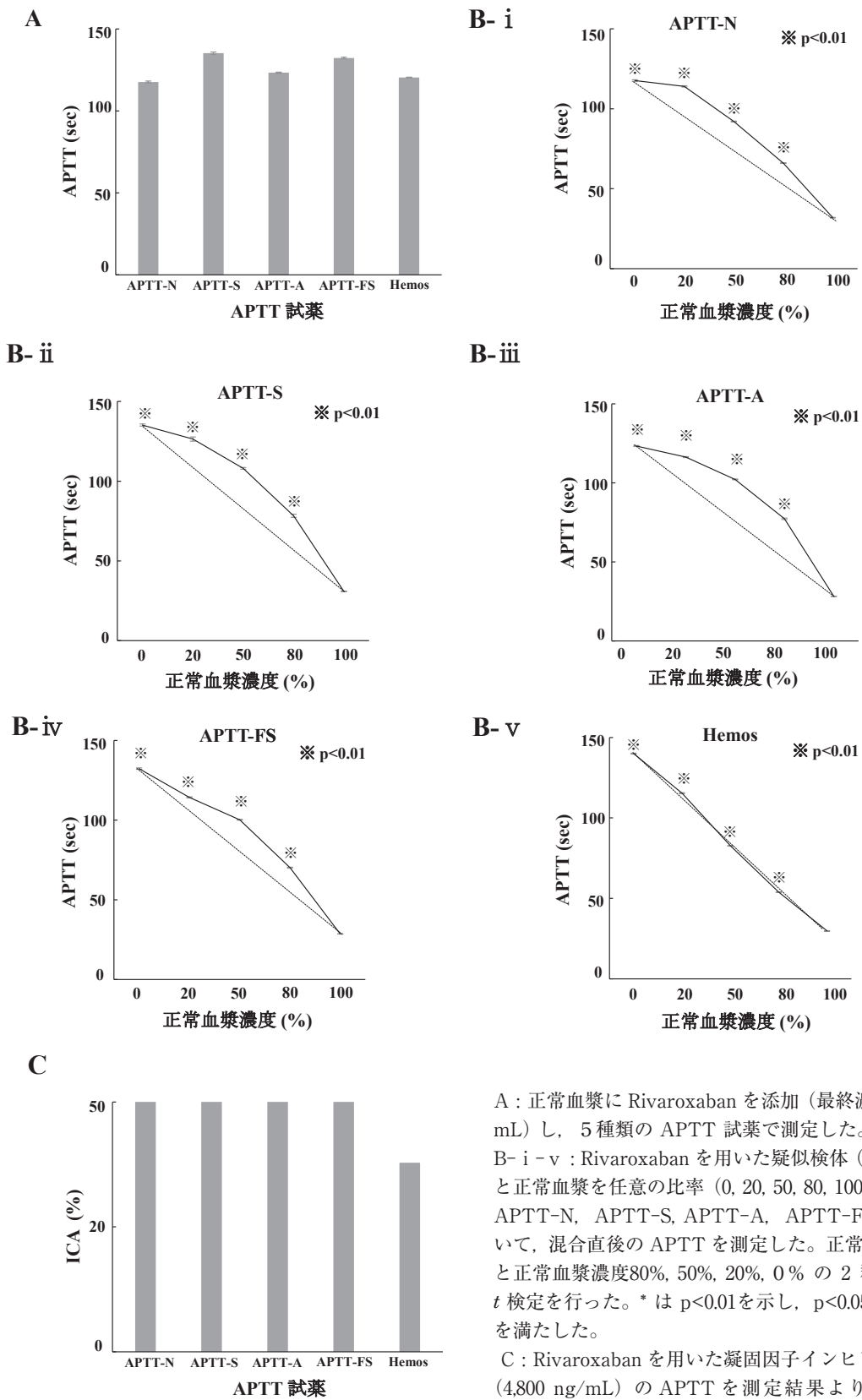
A : 正常血漿に Rivaroxaban を添加 (最終濃度 : 1,600 ng/mL) し, 5 種類の APTT 試薬で測定した。  
 B- i ~ v : Rivaroxaban を用いた疑似検体 (1,600 ng/mL) と正常血漿を任意の比率 (0, 20, 50, 80, 100%) で混合し, APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS, Hemos を用いて, 混合直後の APTT を測定した。正常血漿濃度 100% と正常血漿濃度 80%, 50%, 20%, 0% の 2 群間で Student *t* 検定を行った。\* は  $p < 0.01$  を示し,  $p < 0.05$  統計学的有意を満した。  
 C : Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体 (1,600 ng/mL) の APTT を測定結果より Rosner index (ICA) を算出した。図に mean  $\pm$  SD (n = 5) を示す。

図 1. Rivaroxaban を用いた疑似検体 (1,600 ng/mL) の検討



A : 正常血漿に rivaroxaban を添加 (最終濃度 : 3,200 ng/mL) し, 5 種類の APTT 試薬で測定した。  
 B- i - v : Rivaroxaban を用いた疑似検体 (3,200 ng/mL) と正常血漿を任意の比率 (0, 20, 50, 80, 100%) で混合し, APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS, Hemos を用いて, 混合直後の APTT を測定した。正常血漿濃度 100% と正常血漿濃度 80%, 50%, 20%, 0% の 2 群間で Student *t* 検定を行った。\* は p<0.01 を示し, p<0.05 統計学的有意を満たした。  
 C : Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体 (3,200 ng/mL) の APTT を測定結果より Rosner index (ICA) を算出した。図に mean ± SD (n= 5) を示す。

図2. Rivaroxaban を用いた疑似検体 ( 3,200 ng/mL ) の検討



A : 正常血漿に Rivaroxaban を添加 (最終濃度 : 4,800 ng/mL) し, 5 種類の APTT 試薬で測定した。  
 B- i - v : Rivaroxaban を用いた疑似検体 (4,800 ng/mL) と正常血漿を任意の比率 (0, 20, 50, 80, 100%) で混合し, APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS, Hemos を用いて, 混合直後の APTT を測定した。正常血漿濃度 100% と正常血漿濃度 80%, 50%, 20%, 0% の 2 群間で Student *t* 検定を行った。\* は  $p < 0.01$  を示し,  $p < 0.05$  統計学的有意を満たした。  
 C : Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体 (4,800 ng/mL) の APTT を測定結果より Rosner index (ICA) を算出した。図に mean  $\pm$  SD (n = 5) を示す。

図 3. Rivaroxaban を用いた疑似検体 (4,800 ng/mL) の検討

直線傾向を示した (図 2B-v, 図 3B-v)。

### 3. 遅延反応による Rivaroxaban 濃度の検証

一般的に即時反応の異常は凝固因子欠損, LA の存在が示唆されるのに対して, 凝固因子インヒビターの存在では遅延反応が異常を示すことが多い。そこで次に, Rivaroxaban 3,200 または 4,800 ng/mL の疑似検体を 37°C, 2 時間インキュベーションした後に CMT を実施したところ, Rivaroxaban 3,200 ng/mL では即時反応と比較して APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS でグラフパターンがより上に凸となり, 特に APTT-N, APTT-A, APTT-FS の 3 試薬で顕著であった (図 4A-i-v)。一方, Rivaroxaban 4,800 ng/mL では APTT-FS においては即時反応と比較してグラフパターンがより上に凸となったものの, その他の試薬では即時反応

と差が認められなくなった (図 5A-i-v)。ICA に関しては, Rivaroxaban 3,200 または 4,800 ng/mL 共に 15% 以上となった (図 4B, 図 5B)。

### 4. Rivaroxaban 3,200 ng/mL における APTT-N, APTT-A, APTT-FS を用いた用手法による CMT の検討

これまでの結果から, Rivaroxaban 3,200 ng/mL が至適濃度であり, 波形パターン法及び ICA による評価から APTT-N, APTT-A, APTT-FS の 3 試薬が APTT 試薬として有用であると考えられた。そこで最後に, 実際に学内実習と同様の用手法で CMT を実施した。その結果, APTT-N では正常血漿濃度 0% での APTT は  $104.6 \pm 2.8$  秒, 20% では  $91.1 \pm 10.3$  秒, 50% では  $82.6 \pm 3.9$  秒, 80% では  $59.4 \pm 1.6$  秒, 100% では  $30.9 \pm 1.3$  秒となり,

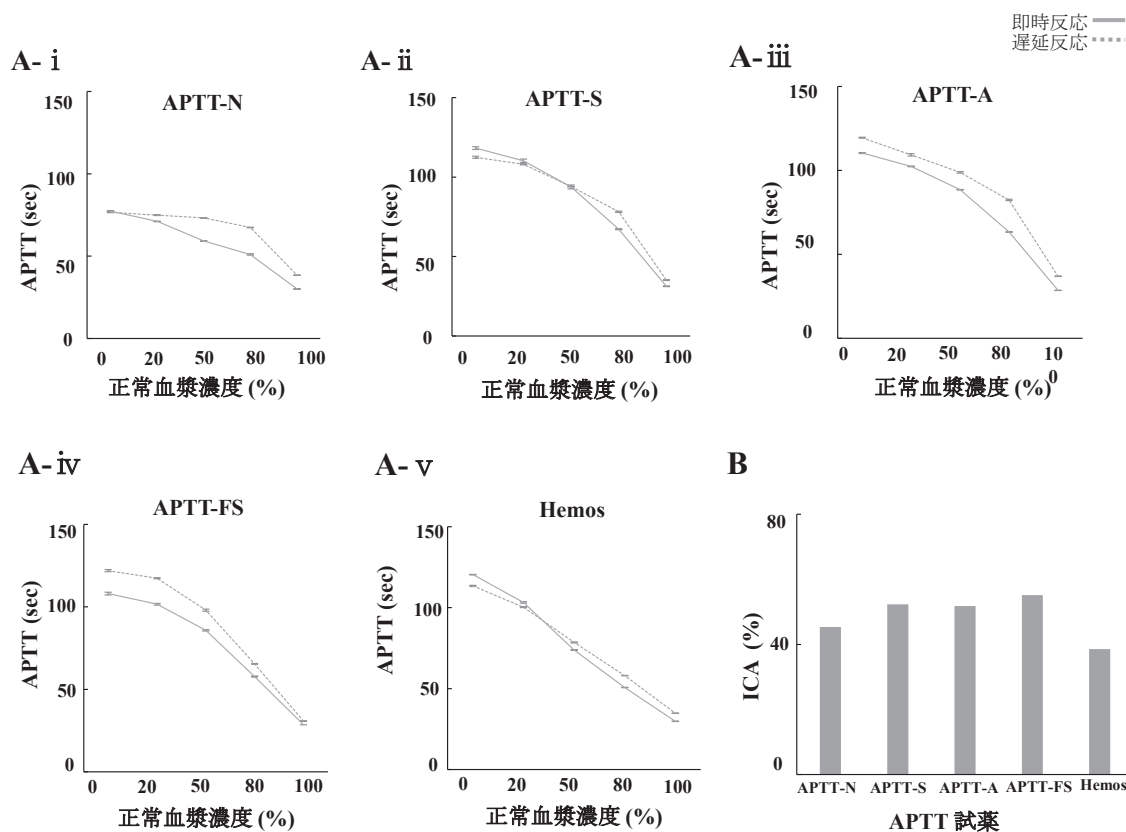


図 4. Rivaroxaban を用いた疑似検体 (3,200 ng/mL) の検討 (遅延反応)

A-i-v: 正常血漿に Rivaroxaban を添加 (最終濃度: 3,200 ng/mL) し, 正常血漿と任意の比率 (0, 20, 50, 80, 100%) で混合し, APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS, Hemos を用いて, 37°C, 2 時間インキュベーション後の APTT を測定した。

B: Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体 (3,200 ng/mL) の APTT の測定結果より Rosner index (ICA) を算出した。図に mean  $\pm$  SD (n=5) を示す。

上に凸のパターンを示した (図 6 A-i)。この傾向は、APTT-A, APTT-FS でも認められ (図 6 A-ii-iii), さらに ICA も 3 試薬とも 15% 以上となった (図 6 B)。

CMT のグラフパターン及び ICA より学内実習における凝固因子インヒビター疑似検体の候補として有用であると考えられた。

#### IV 考察

CMT は、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り、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ものの、実際の診療現場では CMT が十分に活用されていない。その理由として、①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が挙げられる。一方、臨床検査技師教育においては、凝固因子インヒビター含有検体の入手が難しく CMT に関する実習が十分に実施できていないことが問題であった。そこで近年は、様々な養成施設において凝固因子インヒビター疑似検体の作製が試みられており、2018 年に山口らはノバスタン HI やミニヘパなどを使用し、簡単かつ安価な疑似検体の作製に成功している<sup>7)</sup>。一方、我々は DOAC に着目し、凝固因子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重ねた結果、Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体が学内実習用の疑似検体として有用である可能性を見出した<sup>1)</sup>。さらに、実際に Rivaroxaban 添加疑似検体を用いて学生実習を実施したところ、学生の CMT に関する理解は大幅

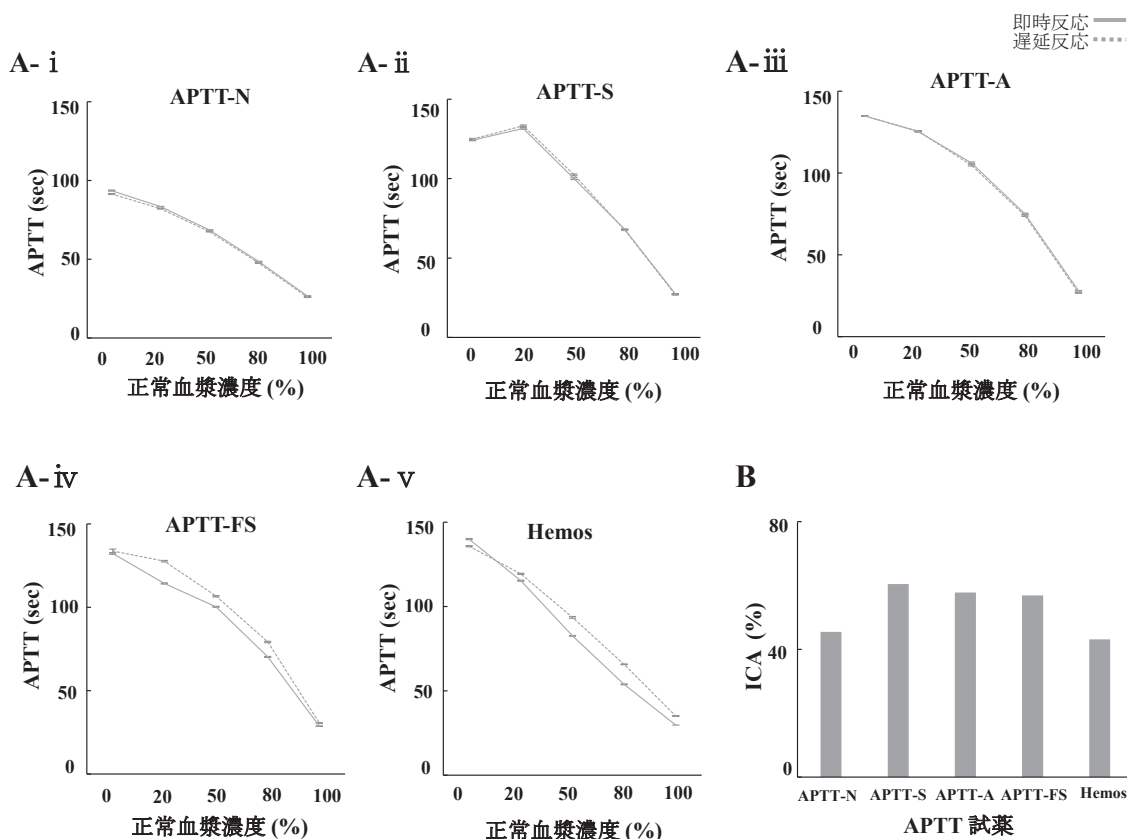


図 5. Rivaroxaban を用いた疑似検体 (4,800 ng/mL) の検討 (遅延反応)

A-i-v: 正常血漿に Rivaroxaban を添加 (最終濃度: 4,800 ng/mL) し、正常血漿と任意の比率 (0, 20, 50, 80, 100%) で混合し、APTT-N, APTT-S, APTT-A, APTT-FS, Hemos を用いて、37°C、2 時間インキュベーション後の APTT を測定した。

B: Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体 (4,800 ng/mL) の APTT の測定結果より Rosner index (ICA) を算出した。図に mean  $\pm$  SD (n = 5) を示す。



に向上した<sup>2)</sup>。しかしながら、これまでの検討では、本学の学内実習で使用する APTT 試薬 (APTT-N; コアグピア® APTT-N) のみを使用したものであり、APTT 試薬が異なると Rivaroxaban 添加疑似検体が学生実習に有用でない可能性が示唆された。さらに、CMT では即時反応と 37°C、2 時間インキュベーション後に凝固時間を測定する遅延反応を実施することが重要であるが、Rivaroxaban 添加疑似検体における遅延反応への影響は検討していなかった。そこで本研究では、Rivaroxaban 添加疑似検体がインヒビター疑似検体として全国の臨床検査技師養成施設で使用されることを目指し、様々な APTT 試薬を用いて CMT を実施し、最適な APTT 試薬を検討するとともに、遅延反応への影響、さらには Rivaroxaban の至適濃度についても検証した。

現在、市販の APTT 試薬はリン脂質や活性化剤

で構成されており<sup>8,9)</sup>、APTT 試薬に用いられるリン脂質の種類には天然由来リン脂質および合成リン脂質がある (表 1)。近年、臨床感度や疾患鑑別、品質向上の観点から複数種の合成リン脂質を混合して用いている。合成リン脂質の種類としては、ホスファチジルエタノールアミン (PE) 及びホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルセリン (PS) の 3 種類を混合して試薬に含むことが主流となっている。このような APTT 試薬を用いた測定において LA が含まれていた場合、LA が血液凝固に必要なリン脂質を阻害し、凝固時間が延長する。従って、近年では、LA によるリン脂質への阻害反応を表れやすくするために低濃度リン脂質の APTT 試薬を用いて LA のスクリーニング検査が行われている<sup>10, 11)</sup>。一方、今回の検討で用いた Rivaroxaban は、FXa の S1 ポケットに結合し、直接的あるいは

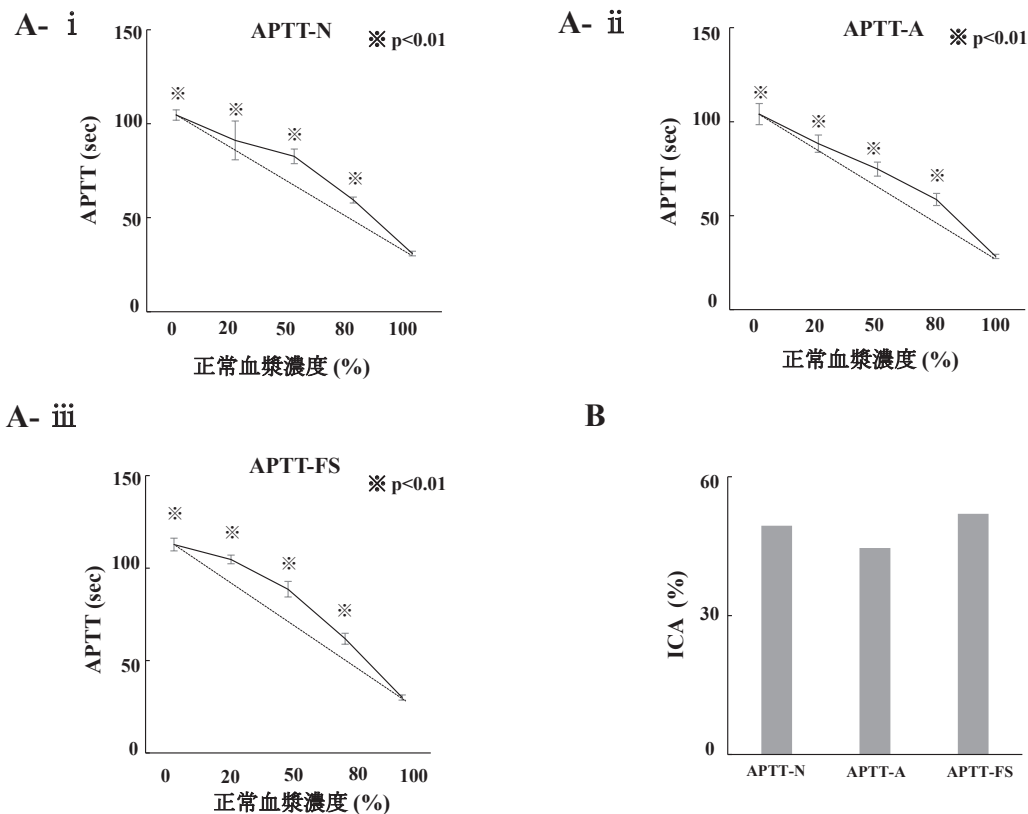


図6. Rivaroxaban を用いた疑似検体 (3,200 ng/mL) の検討 (用手法)

A- i -iii: 正常血漿に Rivaroxaban を添加 (最終濃度: 3,200 ng/mL) し、正常血漿と任意の比率 (0, 20, 50, 80, 100%) で混合し、APTT-N, APTT-A, APTT-FS を用いて、混和直後の APTT を用手法で測定した。正常血漿濃度 100% と正常血漿濃度 80%, 50%, 20%, 0% の 2 群間で Student *t* 検定を行った。\* は p<0.01 を示し、p<0.05 統計学的有意を満たした。

B: Rivaroxaban を用いた凝固因子インヒビター疑似検体 (3,200 ng/mL) の混和直後の APTT の測定結果 (用手法) より Rosner index (ICA) を算出した。図に mean ± SD (n= 9) を示す。

拮抗的に活性を阻害する Xa 阻害剤である。またプロトロンビナーゼ複合体の Xa 因子も阻害することでより効果的にトロンビンの生成を阻害する<sup>12)</sup>。LA のようにリン脂質を阻害することはないため APTT 試薬のリン脂質の種類の違いが影響を及ぼさないはずであるが、APTT 試薬によって測定結果にばらつきがみられた (図 1 A, 図 2 A, 図 3 A)。このようなばらつきが生じた原因として、各 APTT 試薬に含まれるリン脂質の種類及び濃度の違いが考えられる。

Okuda らは、APTT 試薬中のリン脂質はウサギ脳由来リン脂質または大豆由来リン脂質、合成リン脂質を用いて APTT におけるリン脂質の影響を詳細に検証し、リン脂質の種類によるばらつきは、ウサギ脳由来で CV 11.5-13.0%、大豆由来が 8.6-32.3% であったのに対して、CV 1.1-5.3% とばらつきが少なく、合成リン脂質が最も安定していたと報告している<sup>13)</sup>。今回我々が使用した Hemos には合成リン脂質が含まれており、リン脂質の濃度はロットに依存することがほとんどないことから、Rivaroxaban 添加疑似検体による CMT を実施した際最も結果が安定し、学生実習に最も適した APTT 試薬になることが予想された。しかしながら、APTT-S, APTT-A, APTT-FS を使用した CMT では、上に凸の典型的なインヒビターパターンを示したにもかかわらず、Hemos では上に凸の傾向は認められるものの典型的なグラフパターンとならなかった (図 1 B, 図 2 B, 図 3 B)。このように Hemos で典型的なインヒビターパターンのグラフが得られなかった原因として Hemos のリン脂質濃度が他の試薬と比較して低いことが考えられる。APTT の種類によっては、Rivaroxaban によって阻害しきれていない微量の Xa が APTT 試薬に含まれるリン脂質とテンナーゼ複合体、プロトロンビナーゼ複合体を形成し、凝固時間が促進され、リン脂質濃度が高いほどテンナーゼ複合体やプロトロンビナーゼ複合体を形成されやすく、APTT 延長が軽度になってしまう可能性が考えられるものの、試薬メーカーはリン脂質濃度を提示していないため、その原因は明らかでない。

今回の検討では全ての APTT 試薬において、上に凸の波形パターンを示した。従って、測定機器を用いた APTT 測定であれば、臨床現場で遭遇するデータに近い値を示す濃度の疑似検体の作成及び準

備が必要である。しかしながら、学内実習では用手法にて CMT を行うため、5-10 秒の誤差が容易に起こることが予想される。従って本研究成果から、APTT のデータが臨床現場で遭遇する 100 秒未満であるとともに、より上に凸のパターンを示す濃度である Rivaroxaban 3,200 ng/mL が至適濃度であると考えられた。また、APTT-N, APTT-A, APTT-FS の 3 試薬での用手法の結果より、APTT-FS (データファイ・APTT (FS)) が臨床に近いデータであり、かつ用手法で確認しやすい波形パターンを呈し、2 時間インキュベーション後の結果も典型的な上に凸のパターンを示したため、学内実習の CMT において最も適した APTT 試薬であることが示唆された。さらには、CMT における遅延反応は学内実習においては時間的に実施が難しいものの、Rivaroxaban 3,200 ng/mL の疑似検体では遅延反応においても即時反応との差が顕著であったため (図 4)、遅延反応の重要性を理解する上では有用な検体であることが示唆された。

## V 結語

学内実習における CMT 実施において、データファイ・APTT (FS) 試薬と Rivaroxaban 3,200 ng/mL の凝固因子インヒビター検体を使用することは、臨床現場で遭遇する可能性の高い異常検体のデータに近い結果を出すことが可能となり、学生の理解がより深まると考えられる。

## 文献

- 1) 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. 熊本保健科学研究所誌. 2018 ; 16 : 131-140.
- 2) 登尾 一平, 山本隆敏, 坂本亜里紗, 他. : 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凝固因子インヒビター疑似検体の可能性. 臨床検査学教育 2018 ; 11: 175-181.
- 3) 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 : 867-872.
- 4) Pengo V, Tripodi A, Reber G et al. : Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection, J Thromb Haemost. 2009 ; 7: 1737-

- 1740.
- 5) Rosner E, Pauzner R, Lusky A et al. : Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity, *Thrombo Haemost.* 1987 ; 57 : 144-147.
- 6) Umer Usman MH,Raza S, Ezekowits M et al. : Advancement in antithrombotics for stroke prevention in atrial fibrillation, *J Interv Card Electrophysiol.* 2008 ; 22 : 129-137.
- 7) 山口航, 瀬川美桜, 瀧口響子, 他. : 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 : 14-18.
- 8) Pengo V. : ISTH guidelines on Lupus Anticoagulant testing, *Thromb Res.* 2012 ; 130 : S76-S77.
- 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, *日本臨床検査自動化学会誌.* 2010 ; 35 : 201-204.
- 10) Ts'ao C, Neofotistos D, Oropeza M, et al. : Performance characteristics of a new synthetic APTT reagent. *Clin Lab Haematol* 1998 ; 20 : 307- 313.
- 11) 奥田昌宏, 菊川紀宏, 上村八尋. : 合成リン脂質を用いた新しい APTT 試薬の開発. *日本検査血液学会雑誌* 2001 ; 3 : 124-131.
- 12) De Caterina R, Husted S, Wallentin L, et al. : New oral anticoagulants in atrial fibrillation and acute coronary syndromes : ESC Working Group on Thrombosis-Task Force on Anticoagulants in Heart Disease position paper. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59 : 1413-1425.
- 13) Okuda M, Yamamoto Y. : Usefulness of activated partial thromboplastin time ; a new preparation procedure to reduce batch difference, *Clin Lab Haem* 2004 ; 26 : 215-223.
- (令和2年1月6日受理)

## Application of Rivaroxaban for student's understanding of cross mixing test.

Ippei NOBORUO, Takatoshi YAMAMOTO, Kyosuke HIRANO,  
Yudai HOTOKEBUCHI, Kazufumi WATANABE, Kano TANABE,  
Tatsuya KAWAGUCHI, Yukinori KOZUMA

Activated partial thromboplastin time (APTT) as well as prothrombin time (PT) is among the most common tests for blood coagulation. APTT prolongation suggests blood coagulation disorders that includes coagulation factor deficiencies, inhibitors of coagulation factors and lupus anticoagulant (LA). Recently, a cross mixing test (CMT) has been proposed as a useful laboratory examination as a screening test when APTT is prolonged. Critical knowledge and skills of CMT, however, have been insufficiently educated in practical training for students. In the previous study, we reported that Rivaroxaban is a useful tool as a coagulation inhibitor used for CMT in practical training. In this study, we aimed to clarify the most appropriate concentration of Rivaroxaban in practical training for students. APTT was assayed by using coapresta 2,000 after a mixture of normal plasma and Rivaroxaban at various ratios. A representative pattern of the inhibitor was exhibited in the presence of Rivaroxaban (3,200 ng/mL). As well, this pattern was observed by using various APTT reagents, especially in the use of Data-Fi APTT (FS). These results suggested that ① Rivaroxaban is a useful tool as a coagulation inhibitor of CMT and ② Data-Fi APTT (FS) is the best of APTT reagent in practical training for students.