

症例から学ぶ凝固検査～知識と技術から信頼を得られる検査室を目指して～

1. 「DOAC」

◎菅崎 幹樹¹⁾国立大学法人 徳島大学病院¹⁾

1920年代に北アメリカでウシが突然内出血を起こし、止血できずに死亡する奇病が発生した。その後の研究でウシの餌であるスイートクローバーが腐敗し、それを食べたウシがトロンビン低下を引き起こすことがわかった。さらに研究が進むとスイートクローバー中のクマリンが腐敗により変化し、ジクマロールという物質がビタミンKを阻害することが原因と判明した。これがワルファリン開発に繋がり、経口抗凝固薬ワルファリンは1954年頃に医薬品として承認された。半世紀以上にわたり、経口抗凝固薬はワルファリン一強の時代が続いたが、2011年のダビガトランやエドキサバンを皮切りに、2012年にはリバーロキサバン、アピキサバンが次々と承認され、瞬く間に世界中で使用されるようになった。これらは直接経口抗凝固薬（Direct Oral Anticoagulants : DOACs）と呼ばれ、ダビガトランはトロンビンを、エドキサバン、リバーロキサバン、アピキサバンは活性化凝固第X因子（FXa）を直接阻害することで抗凝固作用を発揮する。DOACsでは食事のビタミンKの影響がなく、これはDOACsの大きな特徴のひとつである。さらに、ワルファリンでは食事の影響に加えて、薬物相互作用による影響や薬物代謝酵素（CYP2C9）活性の個人差が大きいとされており、PT-INR等を指標としたモニタリングが必要となる。一方、DOACsでは疾患毎に投与量が決まっており、一部体重や腎機能に応じて減量基準は存在するが基本的に投与量は一定であり、モニタリングは不要とされている。このモニタリング必要・不必要に関しては意見が別れるところではあるが、使用するPTやAPTT試薬によってDOACsの反応性は異なっており、そもそも一般的な凝固検査ではモニタリングを行うことは困難である。自験例ではあるが、ヒーモスアイエルリコンビプラスチン2G（アイエルジャパン株式会社）とDOACs血中濃度の相関に関して、PT（秒）とリバーロキサバン血中濃度は相関係数 $r = 0.83$ と良好であったのに対し、アピキサバン血中濃度では相関係数 $r = 0.37$ と低く、血中濃度が高い場合でもPTが必ずしも延長しないことが示唆されている。さらにDOACsは薬剤ごとに投与量、半減期、投与方法もそれぞれの薬剤で異なっており、このことも凝固検査によるモニタリングをさらに困難にしている要因のひとつである。

もちろんDOACs投与中にPTが過度に延長している場合、すぐに臨床医への連絡が必要であるが、凝固検査のみにとらわれず、薬剤排泄に関わる腎機能や肝機能などの臨床化学項目にも注意しなければならない。

また、我々臨床検査技師はDOACsが凝固検査に与える影響も知っておかなければならない。なぜならば、希釈ラッセル蛇毒時間（dRVVT）やプロテインS活性など、多くの凝固検査は凝固時間ベースに算出されており、DOACsが検体中に存在すれば偽高値または偽低値となることがあり、時に誤診へとつながってしまうためである。

今回、私の発表では改めてDOACsの概要とそれぞれの薬剤が凝固検査に与える影響について解説したい。今回の内容が皆様の今後の業務に関して少しでも役立つば幸いである。

症例から学ぶ凝固検査～知識と技術から信頼を得られる検査室を目指して～

2. 「DIC」

◎竹内 彰浩¹⁾、甲藤 理和²⁾、山岡 源治²⁾、多田 智紀²⁾、森 亮輔²⁾、八木 弘文²⁾、木内 洋之²⁾、村尾 孝児²⁾
香川大学医学部附属病院¹⁾、香川大学医学部附属病院²⁾

DIC（播種性血管内凝固症候群）は癌、白血病や感染症などの基礎疾患に合併する重篤な病態です。凝固系の活性化がおり全身性に細小血管内に微小血栓が多発し、凝固の活性化とともに線溶の活性化もおり、その程度は基礎疾患によって異なります。

（DIC の診断基準）

現在まで、様々な診断基準が知られています。1988年に旧厚生省診断基準改定版、2001年に国際血栓止血学会(ISTH)overtDIC診断基準、2005年に急性期診断基準、2017年には、日本血栓止血学会 DIC 診断基準 2017年版が発表されました。また、新生児、産科疾患は別に診断基準が存在します。以下に主に使用されている診断基準について概説したいと思います。

（旧厚生省 DIC 診断基準）

1988年に公開され長年使用されてきた本基準は、基礎疾患の有無で1点加算されます。DICには必ず基礎疾患が存在し、全例に1点加算されます。その後、発表された診断基準には、基礎疾患の項目は使用されなくなっています。血小板減少がみられる白血病およびその類縁疾患や肝硬変では別のスコアリングが使用されています。除外規定として、新生児、産科領域には適用されません。また、劇場肝炎も同様です。検査項目については、FDPは、現在広く使用されている血漿FDPとは異なり血清FDPでの値が採用されています。また、数値については、作成当時に使用されていた半定量の試薬が用いられています。

（ISTH overt DIC 診断基準）

発表された論文の引用文献には、旧厚生省診断基準はありませんが、旧厚生省診断基準を基に作成されたといわれています。作成には日本の研究者も関わっています。旧厚生省診断基準にあった臨床症状の項目がなく、検査値だけで構成されています。また、DICの基礎疾患があるときのみ、この診断基準を用いることができます。

（急性期 DIC 診断基準）

多くの施設で検査可能な項目を用いて感度よく診断できることを目的に作成されました。旧厚生省診断基準で用いられていたフィブリン濃度が診断基準から除外されています。感染症を合併したDICでは、フィブリノゲン濃度は下がることは少なく、むしろ増加するこ

とが大半です。血小板数については、絶対数だけでなく、減少割合もスコアリングされています。また、SIRS（全身性炎症反応症候群）の概念が取り入れられました。

（日本血栓止血学会 DIC 診断基準 2017年版）

診断基準の適用アルゴリズムを用いて、「基本型」、「造血障害型」および「感染型」のうち、どの診断基準を用いるか判断します。「造血障害型」では、骨髄抑制により血小板減少がおこるため、スコアリング表には血小板の項目が除外されています。「感染症型」では、フィブリノゲンが項目として使用されていません。造血障害、感染症がともにない場合は「基本型」を使用します。感染症を合併した固形腫瘍など複数の基礎疾患が存在する場合や基礎疾患を特定できないような場合にも「基本型」を使用します。

（新生児 DIC 診断基準:新生児 DIC 診断・治療指針 2016年版）

原因となる基礎疾患が感染症か、それ以外によってアルゴリズムが分けられています。検査項目としては、血小板数、フィブリノゲン濃度、PT-INR（プロトロンビン時間国際標準比）、FDPあるいはDダイマーが用いられています。これらの検査項目は出生時の体重が1500g以上が未満でスコアリングが分けられています。

（産科 DIC スコア）

旧厚生省DIC診断基準よりも早く、1984年に作成されました。産科におけるDICは、線溶系が亢進することが多くFDPが重要視されています。また、フィブリノゲン濃度を150mg/dL以上にキープすることが重視されています。また、検査項目には赤沈や出血時間が採用されています。

最後に、シンポジウム当日は、検査データをみながら会場の皆さんと一緒に考えていきたいと思ひます。

連絡先 087-898-5111（内線3675）

症例から学ぶ凝固検査～知識と技術から信頼を得られる検査室を目指して～

3. 「後天性血友病」

◎足立 絵里加¹⁾、石原 智子¹⁾、定方 智美¹⁾、藤原 宇志¹⁾、兒玉 るみ¹⁾、矢野 彰三¹⁾、井上 政弥²⁾、竹谷 健²⁾

島根大学医学部附属病院¹⁾、島根大学医学部附属病院輸血部²⁾

【はじめに】血友病とは通常は先天性出血性素因を指しており、伴性潜性遺伝するため原則として男性の疾患である。それに対して、後天性血友病は従来出血性素因がみられない個人において、後天性に凝固第VIII因子(FVIII)に対するインヒビターが出現した結果、FVIII活性が著しく低下して、突発的な皮下出血や筋肉内出血などの出血症状を呈する疾患であり、重篤な出血もまれではない。その本態は膠原病や悪性腫瘍、分娩などを背景にFVIIIに対する自己抗体が産生される自己免疫疾患であり、男女ともに発生する。非常にまれな疾患で、発生率は年間100万人に対して1.48人である。多くの場合、インヒビターが消失するまで常に出血リスクを伴い死因の約半数を出血が占めるとされているため、迅速な診断、治療が求められる。

【スクリーニング検査】出血傾向に対して血液検査を行った場合、後天性血友病はAPTT延長が認められ、その他の出血関連スクリーニング検査(出血時間、血小板数、PT、フィブリノーゲン、FDP、Dダイマー)はすべて正常である。ただし、出血量が多い場合はFDP、Dダイマーが上昇することがある。

【確定診断のための検査】後天性血友病の鑑別すべき病態として、内因系凝固因子の先天性欠乏および抗リン脂質抗体症候群である。したがって、FVIII活性を含めた凝固因子およびFVIIIインヒビター力価

(Bethesda法)とともに、フォンヴィレブランド因子(VWF)活性としてリストセチンコファクター活性(Rcof)を測定する。また、ループスアンチコアグラント(LA)を否定する必要がある。FVIII活性が低下しており、VWF活性の低下がなく、LAが否定された場合に、FVIIIインヒビター力価が1Bethesda単位/mL(BU/mL)以上であれば、後天性血友病と診断する。しかし凝固因子活性、FVIIIインヒビター力価が自施設で測定できる施設は限られており、結果を得るために長時間かかる場合は簡便な方法としてAPTTクロスミキシング試験が参考となる。

APTTクロスミキシング試験はAPTT延長が凝固因子欠乏によるものか、インヒビターの存在によるのかを鑑別することができる。先天性血友病Aのような凝固因子欠乏では、即時反応も遅延反応も正常血漿の添加によりAPTT延長は容易に補正され、下に凸のパター

ンを示す。一方、後天性血友病の場合は即時反応ではAPTT延長が補正されても、37°C2時間インキュベーション後の遅延反応では上に凸もしくは直線的に低下するパターンを示す。典型的には即時反応と比較して遅延反応で、上に凸がより明確になることが多い。特に、50%混合血漿での即時反応と遅延反応に凝固時間の開きが認められるとされている。LAの場合は即時反応で上に凸のパターンもしくは直線を示し、遅延反応でもほぼパターンは変わらない。後天性血友病を疑う場合は必ず37°C2時間インキュベーションを行い、遅延反応で判定することが重要になる。

【検査室での注意点】検体にヘパリンなど抗凝固剤の混入があるとAPTT延長をきたすため、検体採取に留意する必要がある。また、後天性血友病はFVIII活性が特異的に低下するが、極めて力価の高いインヒビターが存在する場合、ほかの凝固因子もアーチファクティックに低下して測定される場合がある。

クロスミキシング試験はPTやAPTTの測定を行っている医療機関であれば、どこでも簡単に行うことができ、保険収載もされている検査である。クロスミキシング試験(即時反応、遅延反応)を行うことで、検査の方向性が大きく変わり最終的には治療開始までのスピードを早めることができる。今回のシンポジウムでは実際の症例データを使い解説を行う。基本的な内容ではあるが知識の確認をしていただき、何らかの基礎疾患があり、突然の出血傾向やAPTTの延長を認めたら後天性血友病を疑い検査を進め臨床への迅速な情報提供を行う一助になれば幸いである。

連絡先-0853-20-2417

基調講演 抗リン脂質抗体症候群の検査診断

—ループスアンチコアグラント判定の重要性—

◎野島 順三¹⁾

山口大学大学院医学系研究科・生体情報検査学¹⁾

抗リン脂質抗体症候群 (APS) の診断には、抗リン脂質抗体の検出が必須であり、臨床検査の役割は極めて大きい。抗リン脂質抗体検査では、患者血液中に混在する複数種の抗リン脂質抗体：抗カルジオリピン抗体 (aCL)、抗 β 2-グリコプロテイン I 抗体 (a β 2GPI)、抗ホスファチジルセリン/プロトロンビン抗体

(aPS/PT) を各々適切な免疫測定法で検出することに加え、ループスアンチコアグラント (LA) 活性を複数の凝固学的検査法を組み合わせることで判定しなければならず、臨床検査としては複雑且つ煩雑な検査の一つである。実際の臨床現場では、リン脂質依存性凝固時間

(特に APTT) の延長の原因精査により、しばしば抗リン脂質抗体の存在が疑われる。これは、リン脂質あるいはリン脂質と血漿蛋白の複合体に対する抗リン脂質抗体が、リン脂質濃度の限られた試験管内において、リン脂質を介する血液凝固反応を阻害することにより凝固時間を延長させる現象であり、LA 活性と呼ぶ。

国際血栓止血学会の LA 診断ガイドラインでは、LA 活性の判定には、スクリーニング検査→クロスミキシングテスト→確認試験と 3 段階のステップを要求している。スクリーニング検査では希釈ラッセル蛇毒試験

(dRVVT) と APTT の 2 法が推奨されている。

dRVVT 試薬として、①LA テスト「グラディポア」、②ヒーモスアイエル dRVVT、③コアグピア®LA、④LA1 SR/ LA2 CR が市販されており、これらの判定用試薬では、リン脂質低濃度試薬 (screen 試薬) とリン脂質高濃度試薬 (confirm 試薬) を使い、スクリーニング検査と確認試験が実施できるのが利点である。APTT は測定試薬により LA に対する感受性が異なるため、LA 検出に高感度で特異性の高い検査試薬を選択することが重要となる。LA 検出に適した試薬として①PTT-LA、②トロンボチェック APTT-SLA、③ヒーモス IL APTT-SP、④コアグピア®APTT-N などが推奨される。LA 検出にあたり dRVVT と APTT は、それぞれ一長一短がある為、一方が陰性の場合には必ず他方も実施しなければならない。つまり APTT が正常、且つ dRVVT の S/C ratio が 1.2 未満である場合には、LA の存在を否定できる。スクリーニング検査で凝固時間の延長が確認された場合、その延長が、①凝固因子欠損症、②凝固因子インヒビター、③LA を鑑別す

るためにクロスミキシングテストを実施する。クロスミキシングテストとは、被検血漿と正常血漿を種々の割合で混和し、即時反応 (混和血漿を作成後速やかに APTT 測定) と遅延反応 (混和血漿を 37°C・2 時間インキュベーション後に APTT 測定) 両方の凝固時間をグラフ上にプロットして、そのパターンから上記 3 病態を鑑別する検査法である。クロスミキシングテストで LA を含むインヒビターの存在が疑われたサンプルに関しては、被検血漿に過剰なリン脂質を添加する確認試験を実施し、延長していた凝固時間がある一定レベル短縮した場合に LA 陽性と判定する。APTT 系の確認試験として保険収載されているキットは Staclot LA である。

LA の多くは APS における動・静脈血栓症発症の強力なリスク因子であり、その病因抗体として aCL、a β 2GPI、さらに aPS/PT があげられる。実際に高力価の抗リン脂質抗体が複数種混在する患者、特に LA 活性、aCL、a β 2GPI が全て陽性、あるいは LA 活性、aCL、a β 2GPI が全て陽性の症例では、血栓症の発症 (再発) 率が際立って高いことが分かっている。従って APS 検査診断では、LA 活性検査に加えて免疫測定法による aCL、a β 2GPI、aPS/PT の定量が患者のリスク管理に重要である。一方、APS 症例以外でも LA-hypoprothrombinemia syndrome (LAHPS) のように出血傾向を呈する LA 陽性症例も少なからず存在している。プロトロンビン (PT) に対する自己抗体が検出されるケースが多く、血漿 PT 活性の顕著な低下を伴う。PT 活性低下の機序としては、PT-自己抗体複合体が細網内系によりクリアランスされる場合と、抗 PT 抗体による直接的な PT 活性阻害などが考えられている。このように LA 活性の検出は APS あるいは LAHPS を疑うきっかけとなる重要な検査である。

本講演では、APS の検査診断における LA 検査の手順と判定方法について、APS および LAHPS 症例データを提示しながら解説する。

山口大学大学院医学系研究科・生体情報検査学
0836-22-2824