

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590684

研究課題名(和文) ループスアンチコアグラント測定法の標準化に関する研究

研究課題名(英文) Standardization of the measuring method for lupus anticoagulant (LA)

研究代表者

家子 正裕 (Ieko, Masahiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50250436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：強力な血栓リスクであるループスアンチコアグラント(LA)の測定方法の標準化を検討した。LA活性は残存血小板数が1,200/ $\mu$ L以上の血漿で有意な変動を示すため、1500 g、15分間以上の遠心分離を行いパフイーコートより5mm上までを採取した血漿(残存血小板数：3,000/ $\mu$ L未満)が推奨される。一方、APTT試薬のLA感受性は活性化剤に影響されず、リン脂質の種類、濃度、配合比率が重要と思われた。APTT交差混合試験では、患者血漿10、20%がLAに、50%が内因系凝固因子の欠損症やインヒビターの検出に有用であり、これらの5ポイントによる測定が推奨される。

研究成果の概要(英文)：Standardization of the measuring method for lupus anticoagulant (LA), which is a risk factor of thrombosis, was investigated. The plasma (residual platelets: less than 3,000/ $\mu$ L) obtained by single centrifugation at 1500 x g for 15 minutes, is quite useful for LA tests, because LA activity was significantly changed in plasma with more than 1,200/ $\mu$ L of residual platelets. On the other hand, the sensitivity of APTT reagents for LA is dependent on phospholipid concentration and not the activator, according to our results of LA activity using APTT reagents with same phospholipid condition and silica or ellagic acid as a activator. In an APTT cross-mixing test, 10% and 20% ratio of LA plasma and a 50% ratio of factor or VIII deficient plasma or inhibitor positive plasma produced optimum results. Therefore, it is recommended to carry out the mixing test on 5 different mixing ratios of 0, 10, 20, 50, 100% of patient plasma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ループスアンチコアグラント 抗リン脂質抗体 血栓症 交差混合試験

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は、後天性血栓性素因の代表的疾患であり、術前検査等では抗リン脂質抗体 (aPL) の測定は避けて通れない監査になっている。APS の診断的検査所見は抗カルジオリピン抗体 (aCL)、抗  $\beta 2$ -GPI 抗体 (a $\beta 2$ GPI) およびループスアンチコアグラント (LA) の測定が必須である。aCL および a $\beta 2$ GPI は ELISA で測定されるため比較的測定しやすいが、LA はリン脂質依存性凝固時間の延長で測定されるものである。これらの aPL は、現在独立した血栓リスクとされており、正確な測定が望まれている。

LA 測定は国際血栓止血学会標準化委員会 (ISTH-SSC) の推奨する方法に従って行われる。すなわち、リン脂質依存性凝固時間 (APTT および希釈ラッセル蛇毒時間: dRVVT) の延長でスクリーニングする。その延長が凝固因子欠損によるものではないことを交差混合試験で確認する。凝固時間延長が過剰なリン脂質の添加により改善されること。凝固時間の延長を引き起こすような抗凝固薬等の混入がない事を確認できる。さらに、近年のガイドラインでは、APTT 試薬はシリカ活性化剤を推奨し、また交差混合試験では患者血漿 0, 50, 100% の三点での測定を勧めている。しかし、実臨床の間では aPL、特に LA 測定は測定試薬、測定方法、その判定方法など混乱している状況である。

2. 研究の目的

最大の血栓リスクである LA の測定方法の標準化を最終目的とし、今回は、サンプル調整、APTT 試薬の選択、交差混合試験の標準化、を検討した。

3. 研究の方法

1) サンプル調整法: 北海道医療大学関連医療機関に通院中の APS 患者、全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫性疾患患者および健康人より、インフォームドコンセントを得た後、クエン酸採血を行った。これを用いて、次の 5 種類の血漿サンプルを作成した。1500 G, 15 分で遠心分離した血漿 (一回遠心処理血漿: S サンプル)、1500 G, 15 分で遠心分離後、上清を再度 1500 G, 15 分で遠心分離した血漿 (自家製法による二重遠心処理血漿: D-H サンプル)、2000 G, 15 分で遠心分離後、上清を再度 2500 G, 10 分で遠心分離した血漿 (ISTH 推奨二重遠心処理血漿: D-ISTH サンプル)、1500 G, 15 分で遠心分離後、上清を 0.2  $\mu$ m filter (DISMIC-25CS, ADVANTEC, Tokyo) で処理した血漿 (F サンプル) および 800G, 5 分間遠心分離後採取した血漿 (Q サンプル)。まず、各サンプルの残存血小板数を測定した。次に、LA 患者より血小板多血漿 (PRP) と血小板乏血漿 (PPP) を作成し、組み合わせる事により、残存血小板数が 0.2, 0.6, 1.2, 2.4, 6.0 および

12 万/ $\mu$ L の血漿を作成し、それぞれを LA 試薬 (PTT-LA (ロシュ社)、Staclot LA (ロシュ社)、LA テストグラディポア (MBL 社)) で測定した。

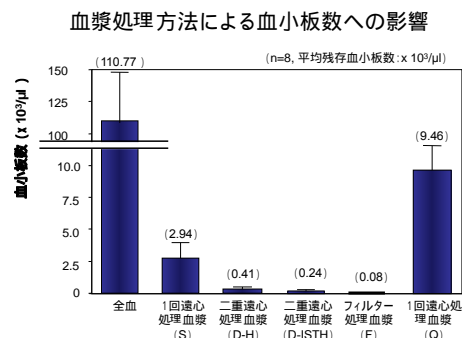
2) APTT 試薬の選択: リン脂質の種類、濃度、配合比は同じで活性化剤をシリカ (Home-SL) およびエラグ酸 (Home-EA) による自家製の APTT 試薬を作成した。Home-SL, Home-EA と APTT-LA (ロシュ社)、APTT-SP (IL 社)、Actin FSL (Siemens 社)、APTT-SLA (Sysmex 社) を用いて 22 名の LA 陽性血漿を測定し、LA 感受性を circulating anticoagulant activity (ICA) で検討した。

3) 交差混合試験の標準化: LA 陽性血漿を 8 サンプル、後天性血友病 A を 6 サンプル、および血友病 A などの内因系凝固因子欠損症を 6 サンプル用いて、患者血漿混合比率 0, 10, 20, 50, 80, 90, 100% の混合サンプルを作成し、作成後即時に APTT を測定する即時反応および作成後 37 で 2 時間インキュベーションしたのち APTT を測定する遅延反応を測定した。混合比率、混合サンプルのポイント数、判定方法を確認した。

4. 研究成果

1) サンプル調整法: 健康人サンプルの残存血小板数は、S サンプル 2900/ $\mu$ L、D-H サンプル 410/ $\mu$ L、ISTH-D サンプル 240/ $\mu$ L、F サンプル 80/ $\mu$ L、および Q サンプル 9460/ $\mu$ L だった (図 1)。

(図 1)

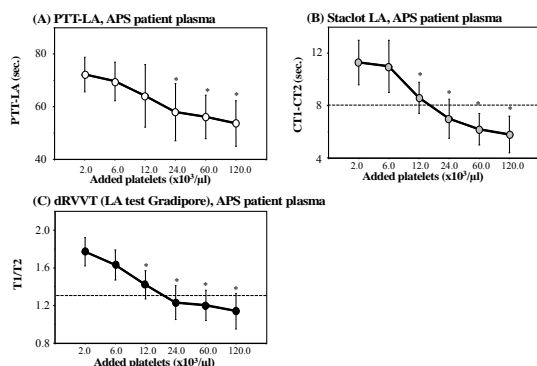


一方、LA 陽性者から作成したサンプルを用いた検討では、PTT-LA では残存血小板数 0.2 万/ $\mu$ L と比較し 2.4 万/ $\mu$ L で、また Staclot LA および LA テストグラディポアでは残存血小板数 1.2 万/ $\mu$ L で有意に変動した。さらに Staclot LA および LA テストグラディポアでは残存血小板数 2.4 万/ $\mu$ L 以上では偽陰性を示した (図 2)。

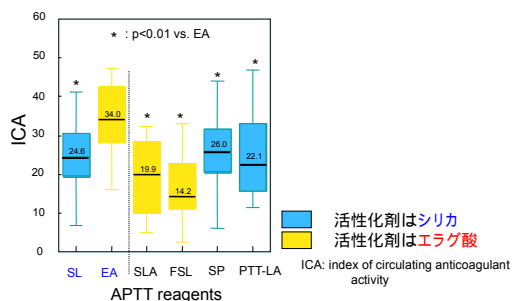
2) APTT 試薬の選択: APTT スクリーニングにおいて、ISTH ではシリカ活性化剤の APTT 試薬を薦めているが、我々が作成したエラグ酸を活性化剤 (Home-EA) とする APTT 試薬はシリカによる試薬 (Home-SL) よりも LA 感度は良好であった (図 3)。LA

感受性は、活性化剤ではなく配合されているリン脂質の種類や濃度によって影響されるものと思われた。

( 図 2 ) 残存血小板数の LA 活性に及ぼす影響

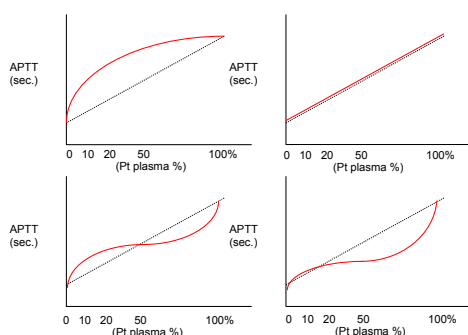


( 図 3 ) APTT 試薬の活性化剤が LA 感度に及ぼす影響



3) 交差混合試験の標準化: 患者血漿混合比率二関する検討: 患者血漿 0%と 100%を無ずぶ直線からどれだけ延長(または短縮)したかを変化率として計算すると、LA サンプルでは混合比率 10 および 20%が最も変化率が大きく、また後天性血友病 A または凝固因子欠損症サンプルにおいては 50%の変化率が最も大きかった。以上より、交差混合試験の混合比は、即時反応では患者血漿 0, 10, 20, 50, 100%の 5 ポイント、遅延反応では 0, 50, 100%の 3 ポイントが有用と思われた。また、即時型における LA パターンは直線または上に凸(どこか一部が上に凸であれば LA と判断可能)を示し、10~20%の混合比率が LA 判定に有用であった( 図 4 )。

( 図 4 ) 交差混合試験における LA パターン



## 5. 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

1. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N, Aoki T. Index of circulating anticoagulant cut-off value establishment in activated partial thromboplastin time mixing test for lupus anticoagulant diagnosis. J Thromb Haemost. 2013; 11: 1919-1922. ( 査読あり )
2. Hara Y, Makita M, Ishikawa T, Saeki K, Yamamoto K, Imajo K, Shima M, Ieko M. Lupus anticoagulant hypoprothrombinemia syndrome in Bence-Jones protein  $\kappa$ -type multiple myeloma patient with phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody. Ann Hematol. 2013; 92: 563-564. ( 査読あり )
3. Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. J Thromb Haemost. 2012; 10: 2338-2343. ( 査読あり )
4. Shimura H, Imai Y, Ieko M, Shiseki M, Mori N, Teramura M, Motoji T. Transient lupus anticoagulant with a prolonged activated partial thromboplastin time secondary to cytomegalovirus-related infectious mononucleosis. Ann Hematol. 2013; 92: 143-144. ( 査読あり )
5. 家子正裕: クロスミキシング試験を臨床に生かすには. 医療と検査機器・試薬. 2012; 35: 867-872. ( 査読なし )
6. 吉田美香, 家子正裕. クロスミキシング試験におけるサンプル採取法の注意点. 医療と検査機器・試薬. 2012; 35: 841-847. ( 査読なし )
7. 内藤済悦, 家子正裕. ループスアンチコアグラント (Lupus anticoagulant: LA) の臨床と交差混合試験 (Cross mixing test) の有用性. 医療と検査機器・試薬. 2012; 35: 854-860. ( 査読なし )
8. 家子正裕, 福武勝幸, 内藤済悦, 吉田美香, 表美香, 静怜子, 安藤秀実, 下村大樹, 西脇圭子, 片岡美香, 山野智子, 中野かおり, 矢島智志, 矢後弘和. 交差混合試験における混合比率およびコントロール血漿に関する検討. 日本検査血液学雑誌. 2011; 12: 312-322. ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 13 件 )

1. Masahiro Ieko. Investigation and management of Antiphospholipid

- Syndrome. 4 th International Sysmex Scientific Seminar. 2013 年 10 月 8 日. Malaysia.
2. 熊野 穰、家子正裕、内藤澄悦、吉田美香、高橋伸彦、青木 隆 . APTT による LA 感度の指標に用いられる ICA のカットオフ値の検討 . 第 47 回日本臨床検査医学会北海道支部総会、2013 年 9 月 21 日、札幌 .
  3. 吉田 美香、内藤澄悦、高橋伸彦、家子正裕 . ループスアンチコアグラントの責任抗体に関する検討 . 第 14 回日本検査血液学会学術集会 . 2013 年 7 月 27 日、東京 .
  4. 内藤澄悦、吉田美香、家子正裕 . ループスアンチコアグラント検査の信頼性 . 第 14 回日本検査血液学会学術集会、2013 年 7 月 27 日、東京 .
  5. 内藤澄悦、家子正裕、吉田美香、森川千鶴、鈴木健史、高橋伸彦、伊藤喜久 . Lupus anticoagulants 検出における Cross Mixing Test の新たな判定方法の評価と有用性 . 第 35 回日本血栓止血学会学術集会、2013 年 5 月 31 日 . 山形 .
  6. 内藤澄悦、家子正裕、吉田美香、森川千鶴、鈴木健史、高橋伸彦、伊藤喜久 . スコアリングを用いた Cross Mixing Test による Lupus anticoagulant の検出 . 第 13 回 TTM フォーラム 2013 年 3 月 9 日 . 東京 .
  7. 熊野 穰、内藤澄悦、家子正裕 . APTT 試薬の活性化剤が LA 感度に与える影響 . 第 7 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム . 2013 年 1 月 12 日 . 東京 .
  8. 吉田 美香、内藤澄悦、家子正裕 . ループスアンチコアグラント測定用の血漿サンプル作製について . 第 7 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム . 2013 年 1 月 12 日 . 東京 .
  9. 内藤 澄悦、家子正裕、吉田美香、森川千鶴、鈴木健史、高橋伸彦、伊藤喜久 . 交差混合試験の新たな判定方法による LA 検出の評価と有用性 . 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会 . 2012 年 11 月 30 日 . 京都 .
  10. 内藤澄悦、家子正裕、福武勝幸 . 交差混合試験における混合比率およびコントロール血漿に関する検討 : コアプレスタミキシングテスト研究会結果報告 ( 第 2 報 ) . 第 13 回日本検査血液学会学術集会 . 2012 年 7 月 28 日 . 大阪 .
  11. 鈴木健史、家子正裕、油井知雄、岡和也、内藤澄悦、吉田美香、高橋伸彦 .  $\beta_2$ GP1 依存性抗カルジオリピン抗体 ( aCL ) による LA 活性測定法の基礎的検討 . 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 . 2012 年 6 月 8 日 . 東京 .
  12. 吉田美香、内藤澄悦、鈴木健史、高橋伸彦、家子正裕 . 血漿サンプルの残存血小

- 板がループスアンチコアグラント測定に及ぼす影響について . 第 12 回 TTM フォーラム . 2012 年 3 月 10 日 . 東京 .
13. 吉田美香、内藤澄悦、家子正裕、渥美達也 . 抗リン脂質抗体検査の標準化—LA 測定用サンプルの調整法に関する検討 ( 第 3 報 ) - . 第 6 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム . 2012 年 1 月 21 日、東京

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

家子 正裕 ( IEKO Masahiro )  
北海道医療大学歯学部内科学分野・教授  
研究者番号 : 50250436

### (2) 研究分担者

高橋 伸彦 ( TAKAHASHI Nobuhiko )  
北海道医療大学歯学部内科学分野・准教授  
研究者番号 : 20372279