

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K16977  
研究課題名（和文）凝固波形解析による血中フィブリノゲン解析を応用した新規出血リスク評価法の開発

研究課題名（英文）Development of qualitative analysis for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis

研究代表者  
鈴木 敦夫（Atsuo, Suzuki）  
名古屋大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師

研究者番号：80835398  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：フィブリノゲンの検査はClauss法と呼ばれる手法が標準的であるが、フィブリノゲンの「質」を評価することは困難であり、追加の解析が必要であった。これまでに、研究代表者らは、凝固波形解析（CWA）技術を用いてフィブリノゲンの質的異常と量的異常を区別する手法（Clauss-CWA法）を開発した。本研究では、臨床検査としての実用化に向けた自動解析ソフトウェアの構築と臨床検体を用いたバリデーションを行い、Clauss-CWA法が従来法と比較して同等以上の性能を有していることを明らかにした。今後、広く検査室へと普及し、フィブリノゲン異常症の診断に寄与できることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
フィブリノゲン異常症は量的異常と質的異常に区分されるが、特に質的異常は通常の臨床検査で診断することが困難であり、無症候症例も多いことからその診断や実態（有病率）の把握は困難であった。本研究成果は、追加コストが不要で、一般的な検査室へと普及が可能な検査法を確立できたことにあり、医療経済的にも高い意義を有していると考えられる。また、今後、多くの施設にて本検査法（Clauss-CWA法）を用いることで、正確な有病率の掌握ならびにフィブリノゲン異常症の診断が容易になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we adopted the Clauss-CWA method for an autoanalyzer to automatically measure the antigenic estimate (eAg) of fibrinogen in addition to the functional amount (Ac), and to thus provide the Ac/eAg ratio as a qualitative indicator. Performance was validated by receiver operating characteristics (ROC) and precision recall (PR) curve analyses using a patient cohort. We obtained an optimal cutoff of 0.65 for Ac/eAg by ROC curve analysis of the training cohort, offering superior sensitivity ( $> 0.9661$ ) and specificity (1.000). This cutoff was validated in the validation cohort, providing positive predictive value  $> 0.933$  and negative predictive value  $> 0.998$ . PR curve analysis also showed that Clauss-CWA provided excellent performance for detecting qualitative fibrinogen anomalies. The Clauss-CWA method may represent a useful approach for detecting qualitative fibrinogen abnormalities in routine laboratory testing.

研究分野：血栓止血学

キーワード：フィブリノゲン 凝固波形解析

## 1. 研究開始当初の背景

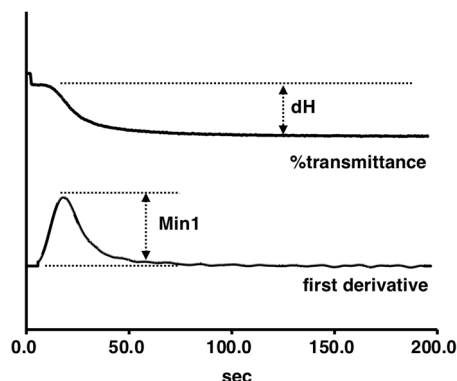
フィブリノゲンは血液凝固反応の最終過程において、止血のための“糊”となる重要なタンパク質である。その検査法の一つである Clauss 法は、1957 年に Von A Clauss により発明されたフィブリノゲン測定法で、現在もフィブリノゲン検査として最も広く活用されている。通常、Clauss 法で得られるフィブリノゲン量は、フィブリンへと転化することができる機能的な量であり、いわゆる“活性値”を示す。例えばフィブリノゲン機能異常症などの質的フィブリノゲン異常症では、活性値が低下する一方で絶対量としての抗原量は保たれており、活性値と抗原量の間に乖離があるかどうかはフィブリノゲン異常症における鑑別のポイントとなる。すなわち Clauss 法のみでの測定ではフィブリノゲンの低下が量的なものであるのか、あるいは質的なものであるのかを区別することはできない。研究代表者は、凝固波形解析 (Clot Waveform Analysis: CWA) とよばれる技術に着目し、フィブリノゲンの質的異常を検出可能な検査法の構築を試みた。CWA とは、凝固反応におけるフィブリン生成までの反応過程をモニタリングし、その濁度変化を凝固波形として描出したものを、数学的に微分を行うことで反応速度や反応加速度、反応減速度といった指標を数値で算出する解析手法である (図 1)。CWA は、基本的に追加コストが不要であるという医療経済上優れた利点をもっている。

研究代表者は、この CWA を応用して世界で初めてフィブリノゲン異常症の新しい分類検査法 (Clauss-CWA 法) を考案した (Suzuki A et al. *Thromb Res*, 2019)。Clauss-CWA 法では、Clauss 法の測定にて描出される凝固波形をもとに、この凝固波形を数学的に微分して得られる最大速度 (Min1) 値を使用する。Min1 値は検体中のフィブリノゲン抗原量と相関することが明らかとなり、Min1 を元に検体中のフィブリノゲン抗原量を推定できることが示された。すなわち、通常は Clauss 法による活性値の測定と、免疫学的手法による抗原量測定が必要であるところ、Clauss 法の測定のみで活性値 (Ac) と推定抗原量 (eAg) を得ることができ、フィブリノゲンの質を示す推算比活性 (Ac/eAg, 抗原量に対する活性値の割合) を推定することが可能となった。

図 1. 凝固波形解析概要 (右)

上: 凝固波形 (フィブリンの析出反応) で、dH は透過光量を反映する。

下: 凝固波形を一次微分した波形で、反応速度を示す。反応速度ピーク値 (最大速度) を Min1 と称する。



## 2. 研究の目的

新たに考案した Clauss-CWA 法は、フィブリノゲンの質的異常を検出することができる新たなスクリーニング検査となることが期待された。しかし、実臨床への応用に向けてはその性能の検証データが十分でないなど、解決すべき課題が存在していた。そこで本研究では、先行研究で考案した Clauss-CWA 法について、その臨床応用を目指したバリデーションと、さらなる発展を目指した改良法の構築を目的とし、研究を遂行した。

具体的には、先行研究における検査法の構築時においては、少数の臨床検体のみを用いた小規模の解析であったことから、本研究ではより大型の臨床検体を用いてその性能を評価することとした。実際的目標症例数は 1,000 件に設定し、臨床検査としての実用化に向けた妥当性確認を行うことを目的とした。また、オリジナルの手法は、データ解析がやや煩雑であることから、分析装置に解析ソフトウェアを組み込むことで、より簡便かつ迅速に解析結果を得ることが可能なシステムを構築することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 自動解析ソフトウェアの構築

2019 年に発表した原法は、次の手順による解析が必要であった。まず、Clauss 法により活性値を測定し、フィブリノゲン低下症と考えられる場合は別途、凝固波形解析を行い Min1 を得たのち、eAg 算出のための検量線を作成して Ac/eAg を算出していた。これらの作業は時間的コストを要するほか、追加の検量線作成などの測定コストもかかるため、必ずしも実用的ではなかった。そこで、通常活性値 (Ac) 測定に必要な検量線作成時に、同時に Min1 値から eAg の検量線を作成して分析装置内に保持する機能を開発し、これを分析装置に搭載することで、Ac のすべての測定と同時に eAg および Ac/eAg を算出できるようなソフトウェアを構築した (シスメツ

クス株式会社の協力による)。本ソフトウェアのベータ版を全自動血液凝固測定装置 CN-6000(シスメックス株式会社)に搭載し、その性能を(2)の方法で評価した。

## (2) 臨床検体を用いた自動分析法のバリデーション

構築したソフトウェアを用いて、Clauss-CWA法のバリデーションを実施した。Clauss法の測定試薬には、シスメックス社の『トロンボチェックFib(L)』および『デイトロンビン試薬』の2種類の試薬を使用した。Clauss-CWA法の性能を評価するにあたり、従来法(eAg算出の対照法)としてファクターオートフィブリノゲン(キューメイ研究所)を用いた抗原量(Ag)測定を実施した。評価用の臨床検体には、名古屋大学医学部生命倫理委員会承認のもと(承認番号:2010-1038)、2020年6月から10月に提出された血液凝固検査の残検体(3.2%クエン酸ナトリウム加血漿)を使用した。このうち、まず2020年6月から7月に提出された検体のうち、無作為に抽出された530件の検体を用いて、AcおよびAgを測定し、Ac/Ag比が0.70未満のフィブリノゲン機能異常が疑われる検体および患者重複を除外した504名分の検体をフィブリノゲン正常検体として使用した。ここに異常フィブリノゲン血症と診断された15名の患者血漿をシャッフルして総検体数519件のトレーニングコホート(Training cohort)を準備した(図2)。このTraining cohortに含まれる検体のAc/eAgを求め、ROC解析を実施して異常フィブリノゲン血症検出のための至適カットオフ値をYouden's indexを使用して求めた。

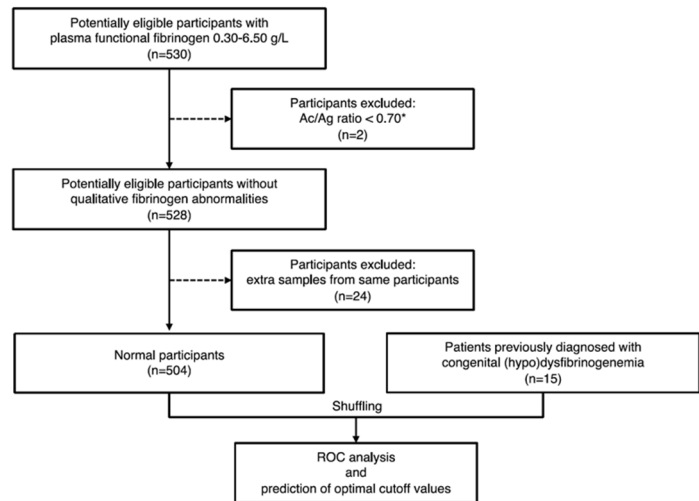


図2. トレーニングコホートを用いた分析フロー(右)

一方で、2020年8月から10月までに提出された検体のうち、無作為に抽出された558件の検体を用いて検証コホート(Validation cohort)を作成した。558件の検体のうち、患者重複を除いた509件の検体に、Training cohortとは別の異常フィブリノゲン血症患者14名の検体をシャッフルし、総数523件のValidation cohortを準備した。Validation cohortでは、従来法とClauss-CWA法の両者による解析を実施し、異常フィブリノゲン血症検出性能を比較した(図3)。従来法ではトロンボチェックFib(L)(以下:TCFibL)あるいはデイトロンビン試薬(以下:Dade)によりAcを測定し、ファクターオートフィブリノゲンにより求めたAgの値に対する比活性(Ac/Ag)をそれぞれ求めた。Ac/Agのカットオフ値は既報に倣い0.70とした。他方、Clauss-CWA法により求めたAc/eAgのカットオフ値は、Training cohortでのROC解析により求めた数値を使用した。

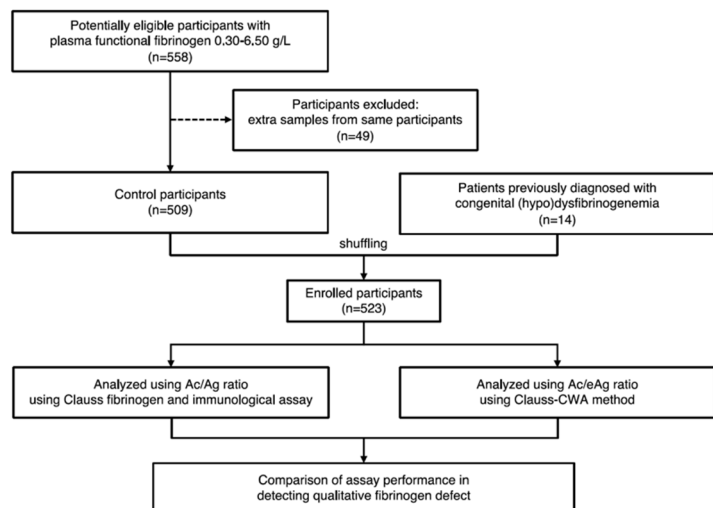


図3. 検証コホートを用いた分析フロー(右)

## 4. 研究成果

### (1) 自動解析ソフトウェアを用いた至適カットオフ値の設定

トレーニングコホートによる解析から、異常フィブリノゲン血症検出のためのAc/eAg至適カットオフ値はTCFibLで0.62-0.66、Dadeで0.60-0.68となった。このときのROC曲線下面積(AUROC)はTCFibLで0.9661、Dadeで0.9962であり、感度・特異度および陽性尤度比(+LR)も良好な結果を示した(表1)。

表 1. トレーニングコホートをを用いた ROC 解析結果

	TCFibL	Dade
Predictive cutoff for Ac/eAg ratio	0.62-0.66	0.60-0.68
AUROC (95% CI)	0.9661 (0.9018-1.000)	0.9962 (0.9890-1.000)
Sensitivity (95% CI)	0.9286 (0.6853-0.9963)	0.9333 (0.7018-0.9960)
Specificity (95% CI)	1.000 (0.9925-1.000)	1.000 (0.9925-1.000)
+ LR (95% CI)	Infinity	Infinity
- LR (95% CI)	0.071 (0.01-0.5)	0.067 (0.01-0.4)

(2) 検証コホートをを用いた Clauss-CWA 法の臨床検査としての性能評価

得られた至適カットオフ値の範囲から、両試薬に共通の数値として 0.65 を採用し、これを Clauss-CWA 法における Ac/eAg のカットオフ値に設定した。検証コホートにおける従来法および Clauss-CWA 法の解析結果を図 4 および表 2 に示す。Clauss-CWA 法において、カットオフ値 0.65 を使用した場合、使用する試薬による大きな差はなく、どちらも同程度に異常フィブリノゲン血症を鑑別できることが示唆された。また、従来法との比較においては、感度・特異度および PR 解析 (図 5) の結果、Clauss-CWA 法でより優れている可能性が示唆された。

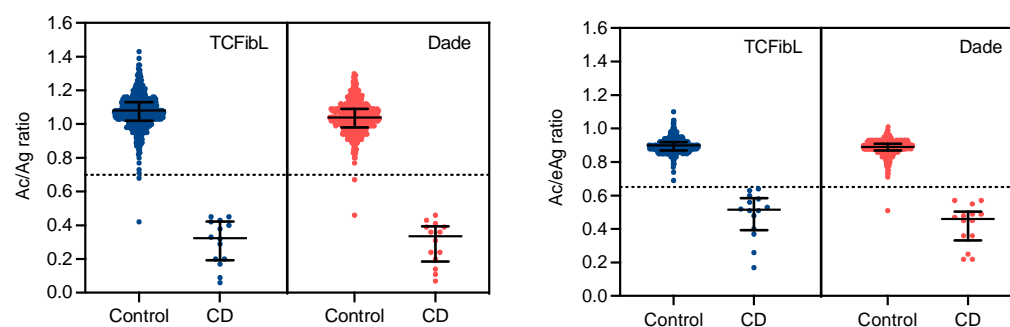


図 4. 従来法 (左) と Clauss-CWA 法 (右) による検証コホートの解析結果

表 2. 各カットオフ値を用いた性能評価結果

Index	Reagent	AUROC	Cutoff	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	PPV	NPV
Ac/eAg ratio	TCFibL	1.000 (1.000-1.000)	0.65	1.000 (0.7847-1.000)	1.000 (0.9925-1.000)	1.000	1.000
	Dade	0.9996 (0.9986-1.000)	0.65	1.000 (0.7847-1.000)	0.9961 (0.9858-0.9993)	0.933	0.998
Ac/Ag ratio	TCFibL/FAFbg	0.9995 (0.9984-1.000)	0.70 <sup>†</sup>	1.000 (0.7847-1.000)	0.9941 (0.9828-0.9984)	0.875	0.996
			0.55 <sup>‡</sup>	1.000 (0.7847-1.000)	0.9980 (0.9890-0.9999)	0.933	0.998
	Dade/FAFbg	0.9999 (0.9996-1.000)	0.70 <sup>†</sup>	1.000 (0.7847-1.000)	0.9961 (0.9858-0.9993)	0.875	0.996
			0.55 <sup>‡</sup>	1.000 (0.7847-1.000)	0.9980 (0.9890-0.9999)	0.933	0.998

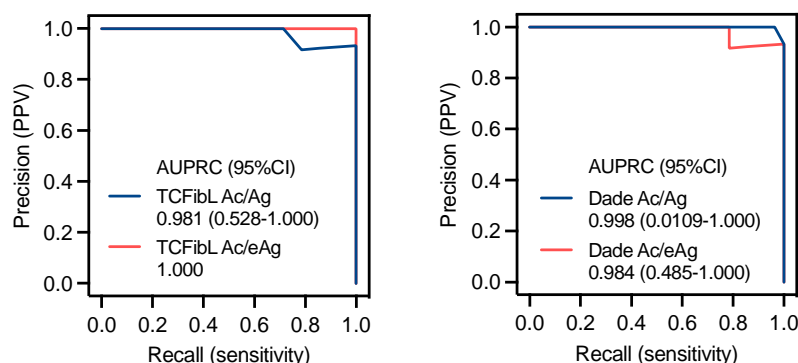


図 5. PR 解析と PR 曲線の比較

左: TCFibL、右: Dade

青線: 従来法、桃線: Clauss-CWA 法

なお、従来法における Ac/Ag カットオフ値については、既報の 0.70 を用いたものの、本研究では 0.55 がより至適である可能性が考えられた。特に、DIC などの凝固線溶系が異常に活性化した病態では、生じた FDP がトロンピンによるフィブリノゲンの転化反応を阻害することがある

ため、活性値が見かけ上低くなり、Ac/Ag 比が偽低値となることが考えられた。この点、Clauss-CWA 法は FDP による阻害を受けにくいことが示唆され、この点については従来法よりも優れていると考えられる。

以上より、Clauss-CWA 法の性能は従来法と比して遜色なく、臨床検査として極めて実用的であることが明らかとなった。Ac/eAg のカットオフ値については 0.65 を用い、今後、実臨床へと応用しながらその妥当性を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Atsuo, Suzuki Nobuaki, Kanematsu Takeshi, Shinohara Sho, Kurono Hiroshi, Arai Nobuo, Okamoto Shuichi, Suzuki Naruko, Tamura Shogo, Kikuchi Ryosuke, Katsumi Akira, Kojima Tetsuhito, Matsushita Tadashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development and validation of a novel qualitative test for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04464-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木敦夫、篠原翔、新井信夫、安藤善孝、松下正
2. 発表標題 フィブリノゲンの質的異常を検出する新たな自動分析技術 -凝固波形解析に基づくフィブリノゲン定性分析法のバリデーション-
3. 学会等名 第70回日本医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木敦夫、鈴木伸明、篠原翔、黒野浩司、新井信夫、兼松毅、岡本修一、鈴木奈瑠子、田村彰吾、加藤千秋、小嶋哲人、松下正
2. 発表標題 フィブリノゲンの新しい質的分析法の構築とバリデーション
3. 学会等名 第70回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木敦夫、鈴木伸明、篠原翔、黒野浩司、新井信夫、兼松毅、岡本修一、鈴木奈瑠子、田村彰吾、小嶋哲人、松下正
2. 発表標題 凝固波形解析を用いたフィブリノゲン質的分析法の自動解析ソフトウェア構築とバリデーション
3. 学会等名 第44回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木敦夫、鈴木伸明、兼松毅、岡本修一、鈴木奈瑠子、田村彰吾、松下正
2. 発表標題 CN-6000に搭載したフィブリノゲン異常症検出ソフトウェアのバリデーションと日常検査における活用
3. 学会等名 第24回日本検査血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 伸明  (Suzuki Nobuaki)	名古屋大学・医学部附属病院 輸血部・講師  (13901)	
研究協力者	松下 正  (Matsushita Tadashi)	名古屋大学・医学部附属病院 輸血部・教授  (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------