凝固波形解析と第 VIII 因子微量測定への応用

松本 智子, 嶋 緑 倫

Clot Waveform Analysis and its Application to the Detection of Very Low Levels of Factor VIII Activity

Tomoko MATSUMOTO, Midori SHIMA

Key words : clotting assay, clot waveform, clot acceleration, factor VIII, hemophilia A

はじめに

凝血的検査は通常フィブリン析出までの凝固時間の測定を基本とする。しかしながら凝固時間は、必ずしも各検体の凝固機能を反映しているわけではない。最近、凝固時間の測定のみならず、凝固波形をリアルタイムにモニタリングしてさまざまな凝固パラメーターを算定できる全自動凝固測定分析装置が開発され、我が国でも各施設において使用されている。そこで本稿では MDA-II (全自動多項目分析装置; BIOMERIEUX 社) を用いた凝固波形解析の現状と、第 VIII 因子微量測定への応用について解説する。

1. 凝固波形解析

MDA-II は多項目の凝固検査や合成基質法、免疫検査などを施行できる全自動分析装置である。本測定器は部分活性化トロンボプラスチン時間 (aPTT) やプロトロンビン時間 (PT) など凝固時間の測定に加えて、凝固過程における透過度をリアルタイムにモニタリングすること

図 1 正常血漿における aPTT の凝固波形
①は凝固波形で x 軸は時間, y 軸は透過度を示す。
②は①の透過度の 1 次微分 (dT/dt) を示す。
③は①の 2 次微分 (d^2T/dt^2) を示す。
a 点は CaCl_2 添加 8 秒後で, b 点は 2 次微分の最大値 (最大凝固加速度: $|\text{min } 2|$) で凝固開始時点である。c 点は 1 次微分の最大値 (最大凝固速度: $|\text{min } 1|$) である。a-b は凝固前相, b-d は凝固相, d-e は凝固後相とする。

により、凝固波形パターンを描出することができる (図 1)。凝固波形は S 字状の曲線を示すが、さらにこの凝固波形を kinetic algorithm によってコンピューター処理し、任意のポイントにおける透過度を 1 次微分さらに 2 次微分す

* 奈良県立医科大学小児科 [〒 634-8522 奈良県橿原市四条町 840]

Department of Pediatrics, Nara Medical University [840 Shijyo-Cho, kashiharaNara 634-8522, Japan]
Tel : +81-744-29-8881 Fax : +81-744-24-9222 E-mail : mshima@naramed-u.ac.jp

表 1 MDA-II による凝固パラメーター

Phase	Parameter	Units	Description
Pre-Coagulation (a-b)	slope 1	%T/Sec	Initial slope of line to data from point a to b.
	delta 1	%T	Amplitude of signal change from point a to b.
Coagulation (b-d)	index min 2	Sec	Time at point b (onset of coagulation, clot time).
	min 2	%T/Sec ²	Minimum value of second derivative (coagulation acceleration at point b).
	index min 1	Sec	Time at point c (coagulation mid-point).
	min 1	%T/Sec	Minimum value of first derivative (rate of change at point c ; coagulation velocity or slope at coagulation mid-point).
	index max 2	Sec	Time at point d (end of coagulation phase).
	max 2	%T/Sec ²	Maximum value of the second derivative (coagulation deceleration at point d).
Post-Coagulation (d-e)	slope 3	%T/Sec	Post-coagulation slope, slope of line fit from point d to e.
	delta	%T	Amplitude of total signal change between point a and e.

ることにより変化の速度や加速度を算定することができる。これにより凝固開始後の凝固速度や凝固加速度が求められる。現在、凝固波形から得られる計 10 種類のパラメーターが算定できる(表 1)¹⁾。min 1 は透過度の 1 次微分の最小値でこの絶対値は最大凝固速度を示す (|min 1|)。また、min 2 は透過度の 2 次微分の最小値で絶対値は最大凝固加速度を示す (|min 2|)。

2. 凝固波形解析の意義

凝固時間の測定のみならず凝固波形をモニタリングすることにより、凝固異常を検出することが可能である。最も代表的なものは播種性血管内凝固症候群 (DIC) にみられるフィブリン形成前にすでに透過度の低下がみられる凝固前相 2 相性の凝固波形である (図 2)²⁾。最近の研究により 2 相性パターンは DIC に特異的にみられる現象で、スロープの傾斜が高いほど DIC の的中率が上がることで、スロープ 1 の傾きの変

図 2 DIC 患者血漿における 2 相性凝固波形
DIC 患者血漿の aPTT の凝固波形を示す。

化 (%T/sec) が臨床的重症度と相関していることが明らかにされた³⁾。トロンビン抑制物質の存在下で患者血漿と正常血漿との混合物に Ca を添加すると濁度が上昇し沈殿物が析出する。この析出物の解析から、沈殿物が超低比重リポ蛋白 (VLDL) と C 反応性蛋白 (CRP) が単離され DIC の 2 相性パターンはこの Ca²⁺ 依存性 CRP-VLDL 複合体であることが最近

図3 正常プール血漿と重症血友病A患者5症例の血漿におけるaPTT凝固波形凝固時間と最大凝固加速度および第VIII因子活性測定値を示す⁸⁾。

判明した⁴⁾。このほかaPTT凝固波形によるフィブリン濃度の評価、抗リン脂質抗体症候群⁵⁾、さらに、最近は凝固亢進状態のモニタリング⁶⁾などへの応用性について報告されている。

3. 第VIII因子微量測定への応用の意義

第VIII因子活性の正確な測定は血友病Aの診断に必須である。血友病Aにおける出血症状の臨床的軽重は第VIII因子活性にきわめて良く相関する。通常、第VIII因子活性<1.0国際単位 (IU)/dlを重症、1.0-5.0 IU/dlを中等症、>5.0 IU/dlを軽症型と分類されている。特に重症型の診断は血友病の临床上重大な問題である抗第VIII因子同種抗体 (インヒビター)の発生を予測するうえに非常に重要である。通常、第VIII因子活性は第VIII因子欠乏血漿を用いたaPTT測定を基本とした凝固1段法により測定されている。本方法の測定限界は1 IU/dlと考えられてきた。しかしながら、同じ重症型の血友病A患者においても臨床軽重に個人差があることは日常経験することであり、1.0

IU/dl未満の微量な第VIII因子の存在の可能性については不明であった。最近、相次いで血友病A、Bの遺伝子治療の臨床研究が実施されたが、きわめて微量な第IX因子活性の上昇で臨床的症状が改善されたことが報告された⁷⁾。したがって、微量な第VIII因子の存在についての評価は、正確な血友病Aの診断のみならず、今後遺伝子治療のモニタリング法としてもきわめて重要である。

4. 重症血友病Aの凝固波形

奈良医大小児科に通院中で従来の凝固1段法にて<1.0 IU/dlと診断された5名の患者血漿をaPTTモードでMDA-IIにより凝固波形を解析した。凝固パラメーターとしては凝固時間とb点の最大凝固加速度 (表1)を算定した (図3)。正常プール血漿では凝固時間が31.2秒、最大凝固加速度は241であった。症例はいずれも重症型の患者であるが、凝固波形はそれぞれ異なることがわかる。凝固時間は86.9~162.3秒、最大凝固加速度は9~30と

図 4 微量第 VIII 因子標準血漿の aPTT 凝固波形
第 VIII 因子欠乏血漿に rFVIII を終濃度 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0 IU/dl になるように添加して作成した微量第 VIII 因子の標準血漿希釈列の凝固波形を解析した。凝固時間と最大凝固加速度を示す⁸⁾。

らつきがみられた。この検討で同じ <1.0 IU/dl の重症型患者でも凝固波形が異なることが判明した。この原因として第 VIII 因子以外の凝固因子の影響および <1.0 IU/dl の第 VIII 因子活性の存在などが考えられる。そこで最大凝固加速度と第 VIII 因子活性の関連性についてより厳密に評価するために第 VIII 因子欠乏血漿に、遺伝子組み換え型第 VIII 因子 (γ FVIII; Kogenate, バイエル社, 大阪) を終濃度 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 1.0 IU/dl になるように添加して作成した微量第 VIII 因子標準血漿希釈列の凝固波形解析から b 点の凝固時間と最大凝固加速度を求めた (図 4)。本実験では第 VIII 因子活性と凝固波形の変化は良く相関していた。したがって、他の凝固因子の影響は否定できないが、少なくとも重症血友病 A では最大凝固加速度が異なる原因として <1.0 IU/dl の第 VIII 因子の存在が強く示唆された。

5. 第 VIII 因子微量測定の可能性

1) MDA-II による第 VIII 因子活性測定と合成発色基質法との比較

MDA-II による第 VIII 因子活性測定は従来の第 VIII 因子欠乏血漿を用いる凝固 1 段法と基本的には同じである。しかし、凝固開始時点に最大凝固加速度を示す点 (b 点) に設定して凝固開始時点の検出精度を向上させた。さらに、第 VIII 因子活性測定の標準曲線を低濃度 (Log/Log プロット) および高濃度域 (Log/Linear プロット) の 2 曲線を複合することにより測定精度も上げる工夫がされている。0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 IU/dl の微量第 VIII 因子を含有する標準血漿を用いて添加第 VIII 因子の終濃度と MDA-II で 10 回測定した第 VIII 因子活性実測値について T 検定を行うと MDA-II による第 VIII 因子測定の測定限界は 0.2 IU/dl であった (図 5)。第 VIII 因子活性測

図5 MDA-IIによる第VIII因子活性測定の実測限界の検定
0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 IU/dlの第VIII因子を含有する標準血漿の第VIII因子活性を10回測定し、T-検定を実施した⁸⁾。

図6 重症血友病A患者37例の第VIII因子活性の分布
第VIII因子活性<1.0 IU/dlと診断された重症血友病Aの患者血漿の第VIII因子活性実測値の分布を示す。

図7 重症血友病A患者の第VIII因子活性測定値と凝固パラメーター⁸⁾

- (a) 第VIII因子活性測定値とaPTTの凝固時間との相関を示す。
(b) 第VIII因子活性測定値とaPTTの最大凝固加速度の相関を示す。

定法には凝固1段法以外に、S-2222を用いた合成発色基質法も使用されている。そこで、同様の標準血漿を用いて両者の比較検討を行ったところ、合成発色基質法では ≥ 1.0 IU/dlの測定の再現性は高いものの<1.0 IU/dlの第VIII因子活性測定は困難であることが判明した⁸⁾。

2) 重症血友病A患者血漿の第VIII因子活性

すでに従来の凝固1段法で第VIII因子活

性<1.0 IU/dlと診断されている重症血友病A患者37名について患者血漿の第VIII因子活性をMDA-IIで測定した(図6)。重症型37名中<0.2 IU/dlが24名で、イントロン22における逆位がみられた11名は全例<0.2 IU/dlであった。

3) 血友病A患者の第VIII因子活性測定値と凝固パラメーター

37名の患者のなかで第VIII因子活性<0.2

IU/dl の症例を除いた 13 症例における第 VIII 因子活性測定値と aPTT 凝固時間との相関は $r=0.363$ ($y=-43.769x+119.38$) と有意ではなかった (図 7a)。一方, 最大凝固加速度とは $r=0.720$ ($y=63.351x+0.3777$) と明らかな相関がみられた (図 7b)。したがって, aPTT における最大凝固加速度は第 VIII 因子活性と良く相関していることが確認された。

ま と め

MDA-II の第 VIII 因子活性測定により 0.2 IU/dl までの微量測定が可能であること, また, 最大凝固加速度が微量第 VIII 因子活性に良く相関したことが判明した。重症血友病 A 患者を第 VIII 因子活性測定値により <0.2 IU/dl の第 VIII 因子の欠損する真の重症型と ≥ 0.2 IU/dl の微量ながらも有意の第 VIII 因子活性を有する準重症型の 2 タイプに細分できることが明らかになった。また, 遺伝子逆位を有する重症型は全例完全欠損タイプであったことは本遺伝子異常が真の重症型の遺伝子異常として重要であることが再確認された。今後, 準重症型および真の重症型と臨床病型の比較検討が必要であるが, 凝固波形解析により微量第 VIII 因子の存在が確認されたことは血友病 A のより精度の高い診断においてきわめて重要なものと考えられる。今回の検討では凝固パラメーターとしては最大凝固加速度に焦点をおいたが, 他のパラメーターについても総合して検討する必要がある。今後, 凝固波形により第 VIII 因子活性へのモニタリングやインヒビター症例の止血モニタリングにも応用が期待される。

文 献

- 1) Braun PJ, Givens TB, Stead AG, Beck LR, Gooch SA, Swan RJ, Fischer TJ. Properties of optical data from activated partial thromboplastin time and prothrombin time assays. *Thromb Haemost* **78**: 1079-1087, 1997.
- 2) Downey C, Kazmi R, Toh CH. Novel and diagnostically applicable information from optical waveform analysis of blood coagulation in disseminated intravascular coagulation. *Br J haematol* **98**: 68-73, 1997.
- 3) Downey C, Kazmi R, Toh CH. Early identification and prognostic implications in disseminated intravascular coagulation through transmittance waveform analysis. *Thromb Haemost* **80**: 65-69, 1998.
- 4) Toh CH, Samis J, Downey C, Walker J, Becker L, Brufatto N, Tejidor L, Jones G, Houdijk W, Giles AR, Koschinsky M, Ticknor LO, Paton R, Wenstone R, Nesheim M. Biphasic transmittance waveform in the APTT coagulation assays is due to the formation of a Ca^{++} -dependent complex of C-reactive protein with very-low-density lipoprotein and is a novel marker of impending disseminated intravascular coagulation. *Blood* **100**: 2522-2529, 2002.
- 5) Su Z, Braun PJ, Klemp KF, Baker KR, Thames EH, Ortel TL. Abnormal optical waveform profiles in coagulation assays from patients with antiphospholipid antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis* **13**: 7-17, 2002.
- 6) Tejidor L, Fischer T, Doobay H, Givens T, Manares C, Carroll T, Luddington R, Baglin T. Assessment of global coagulability and hemostatic potential using waveform analysis on the MDA® system. Supplement to the journal *Thrombosis and Haemostasis*, July 2001 (ISSN 0340-6245).
- 7) Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**: 257-261, 2000.
- 8) Shima M, Matsumoto T, Fukuda K, Kubota Y, Tanaka I, Nishiya K, Giles AR, Yoshioka A. The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of factor VIII activity (FVIII: C). *Thromb Haemost* **87**: 436-441, 2002.