止血系検査を用いたコンサルテーションの実際 —ルーチン検査に院内実施のADAMTS13, HIT抗体などを加え—

小宮山 豊*

Consultation with use of laboratory diagnosis
—routine laboratory test with some special tests such as HIT antibody and ADAMTS13—

Yutaka KOMIYAMA*

Key words: laboratory test, thrombocytopenia, HIT, ADAMTS13, laboratory information

1. はじめに

臨床検査を担当者はその専門家であり、止血系臨床検査の場合、表記の2項目以外も診断に直結するものが多いにもかかわらず、一方で多くの一般臨床医に苦手意識がある。筆者はPhDとして病院検査部の中で止血系臨床検査成績に関する教育と研究および止血検査を基礎とした情報提供を行っており、本稿では臨床検査の専門家として止血系臨床検査を用いたコンサルテーションの実際を、特にルーチン検査、例えばPT異常延長時とビタミンK欠乏や血拴症の原因検索と、研究室で実施しているADAMTS13活性測定やヘパリン起因性血小板減少症(HIT)抗体検査の院内実施による臨床との連携について私見を交えながら紹介する。臨床検査実務家およびPhDの立場から解説するため、血拴止血を専門とする医師の方々には違和感がある内容となるが、研修医やより広くの医療スタッフを対象にした解説としてご容赦をお願いしたい。

2. 止血系スクリーニング検査とその解釈

止血系スクリーニング検査は、プロトロンビン

時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、D-dimerがあり、これらの検査原理、異常となる疾患とバランス、さらに疾患とは無関係な検査異常についての知識と、それらの例示能力が必要である(図1)。なお、止血系スクリーニング検査における採血手技の重要性については、本学会編集のわかりやすい血拴と止血の臨床に書いているので参照していただきたい¹⁾。

例えば、止血検査の基礎となる血友病の患者に定期補充療法がおこなわれるようになり、様々な話題提供があるが、その基礎から学んでみたい^{2) 3)}。さて、第VIII因子が1%以下で関節内出血など重篤な出血症状が発生する患者の治療に用いる第VIII因子製剤の投与量は、とてつもない大量を毎日投与するわけではない。急性出血が著しい時はガイドラインに応じて相当量投与し、目標ピーク値を出血部位ごとに設定地に持っていく、12~24時間の間隔で出血症状が消失するまで追加投与する必要がある。定期補充療法では、方式によりそれぞれ異なる。例えば、スウェーデン方式の場合は、凝固因子を最低1%以上に保つことを目標に週に3回の25~40単位/kg/回投与である。個人差があるが、半減期はおおよそ8~12時間である。3日開けば $1/2^3=1/512$ となり投与

*関西医科大学臨床検査医学講座〔〒570-8506 守口市文園町10-15〕

Department of Clinical Sciences and Laboratory Medicine Kansai Medical University
[10-15 Fumizono-cho, Moriguchi, Osaka 570-8506, Japan]

Tel: 06-6992-1001 Fax: 06-6998-5872 e-mail: komiyama@takii.kmu.ac.jp

図1 血液凝固経路概略とスクリーニング検査の PT, APTT に関する疾患

した第 VIII 因子はトラフでほとんど消えている。単純にはそのような少量に減少する方法で効果あるのか疑問となるが、別の考え方をしたい。軽症血友病の患者は関節内出血など重篤な出血をほとんど認めないが、第 VIII 因子量は最低で 5% でそれほど多くない。中等症の血友病では第 VIII 因子が 1~5% である。定期補充療法は重症血友病の患者を軽症や中等症の血友病患者と同程度の出血リスクに変えて長期にわたり繰り返す関節内などの重篤な出血症状を軽減することで関節の変形などによる患者の QOL 低下を防止するものである。もちろん出血がある急性期には別の目標設定がある^{2) 3)}。いずれにせよ、我々は止血に必要な凝固因子が 100% 必要としていないことを実験

的に知っている。このような知識を大切にしたい。

一方、PT はプロトロンビン時間国際標準比 (PT-INR) の利用が普及し、施設間格差が少なくなっていると言われているが、実際にはいまだ ISI が高い試薬を利用している施設が存在し、国内での PT-INR によるワルファリン投与量決定に若干の誤差があることが報告されている⁴⁾。今後急速に改善されると考えるが、図 2 に ISI の平均値に地域差がある。最も大きな問題はこの ISI が高い地域は低い地域に比してワルファリン投与量に有意差があることで、これは医師がその検査データをそのまま治療に反映させているため、検査情報提供者として見過ごすことができない問題である。ISI が 1.5 以上の試薬 (兎腦由来

図2 PT-INR 計算に用いる試薬の ISI 値の地区格差

のトロンボチェック PT, トロンボプラスチン C プラス) 使用率が 50% 以上の地域は, すでに長尾が報告しているようにワルファリン投与量を規定する PT-INR を正確に ISI が 1 付近の試薬で測定しなければ, INR を用いた治療が出血あるいは再梗塞のリスクを高める可能性を強く意識して対処すべきである⁵⁾. 従来使っていたものと異なるという理由だけで ISI が 1.5 以上の試薬を続けることは検査情報提供者としてあまりに力不足である. なお, 2009 年から大手検査センターは PT 試薬として ISI が高い試薬使用を停止, ウサギ由来の PT 試薬の中には製造を 2013 年から中止と発表している⁶⁾. さらに肝臓移植などを視野に入れた MELD スコアでは INR が重要で肝臓専門の INR liver の提唱があるが, 本邦でいまだ一般的な認識に至っていない⁷⁾. これを理解し標準化し知識共有することは今後の課題である. なお, APTT 試薬の標準化については現在努力がなされ, 近い将来大きく改善されていくものと考えられる.

3. 基礎的実験手技と止血検査

筆者は, 上記に加え原因不明の APTT 延長に, クロスマキシング試験の解説や LA 検査, さらに抗プロトロンビン抗体検査などのツールを用いて対応している. さらに基礎的なタンパク科学の手法や, 凝固検査や ELISA などの検査技術の実施法の詳細を理解して説明することがある種の中途半端な検査成績の解説に役立つ場合があり, 重要である.

例えば, APTT は重症血友病では延長するが, 凝固因子含量が 50% あるとほとんど延長せず, 特に最近の試薬は延長を認めない. 理由は第 VIII 因子含量が 30% 以下となった際に延長することが確認できていることが試薬を作成し申請する際の REGULATION であるからと考えられる. その結果として, 例えば, 新規の抗凝固薬で若干の凝固因子活性の低下があっても APTT や PT では検出できない事実が挙げられている. 一方で, ダビガトラン副作用報告で明らかにされた死亡症例の報告では APTT 延長が明確に認められている. 従って, 薬物の血中濃度が最高濃度に達したピーク値では新規抗凝固薬でも APTT のような

汎用止血検査で過量投与の疑いを明示できることなどの情報を我々はいち早く院内に提供し, 準備を怠らないようにしなければならない. 投与直前値で最低濃度となるトラフ値の付近では, APTT では検出感度が不十分である.

また, 図 1 に戻るとわかるが, ワルファリン投与の患者であっても PT のみが減少すると限らず, APTT も延長するが, 教科書にそれほど書いていない. その結果, 若い先生方から, 「ワルファリン投与中の患者さんに内視鏡的手術をしたいが, APTT が 50 秒. なぜ? どう検査する? 治療との関係でワルファリンを安易に切ることはできない.」との問い合わせがある時に検査部はどのように対応するか. 例えば, 第 VII 因子の半減期を含め, 注意深く, 容易に理解できるよう説明し, ヘパリンの変更する可能性などを含め, PhD あるいは検査部として研修医の理解を容易にする努力が必要である.

4. HIT 検査の院内実施

HIT で診断学的価値がある検査法は, 血小板が活性化したことを示す方法論とその刺激がヘパリンによること, HIT 抗体によることを示し得ることで, 本邦では宮田らが成功している機能検査があるが, 一般的な臨床検査の場でこれを実施することは極めて難しい⁸⁾. HIT の問題点はここに起因し, 臨床検査の場で比較的容易に利用できる EIA の手法を用いた HIT 抗体検出法で得た結果をどの程度うまく・説得力を持って, 解説できるかである. 具体的には HIT 抗体検査で得た吸光度により, HIT である可能性についての説明を変える必要がある. 図 3 に最近の Warkentin の図を検査に特化し改変したものを提示する⁹⁾. 前提として我々が入手できる HIT 抗体検査情報で外注検査から得られるものはすべてこの図の MIX (IgG/IgA/IgM) の EIA であり, 診断特異性が IgG のみを測定するものより劣る点がある. さらに SRL 社が受注している HIT 抗体検査は Stago 社のキットで Warkentin らや松尾らを取り上げているキットとは異なるため, 傾向のみ同様程度に考えねばならない. しかし, 少なくとも GTI 社の検査を用いるレベルでは, EIA の結果

図3 HITの氷山 model による検査信頼度

で1.5~2.0あれば、約半分の症例でHITである可能性があり、2.0を超えると9割の患者がHITであることになる。IgG型のみを検出するGTIのシステムではさらに特異度が上がり、当研究室ではIgG型のHIT抗体検査をMIXに併用している。なお、HIT抗体検査をする前に、実際にヘパリン使用後どの程度の期間があり、また、血小板数が本当に下がっているかを確認したい。さらに、様々な要因で血小板数は低下するため、これらの可能性を検査受託時には確認したい。日常的な入院患者の血小板減少の原因は、敗血症、DIC、抗リン脂質抗体症候群、特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性、紫斑病、心臓手術後等実に様々である。これらを踏まえ、筆者が担当医に聞くことは、1) 血小板減少の時期・程度、2) 血小板減少の他の要因の可能性、3) 特に循環器で冠動脈インターベンションの場合、直近にヘパリン暴露なしで血小板減少が認められ、HIT抗体検査を依頼してくる場合があり、陽性になることが関西医大では少ない。そこでヘパリン暴露【透析などの治療に伴うヘパリン投与、バスキュラーアクセスのヘパリンロックなど】の期間が5~10日あるかを確認する。ただ、これも一朝一夕ではない。最近関西医大で経験した症例はCCUから電話であったが、実はもともと透析患者であり、他院でヘパリンを使用していたことが解った。結果は強陽性であった。よく考えれば、心臓と腎臓の関連は最近の話題である。いずれにせよ、HIT

抗体検査を院内で実施し速やかに結果を臨床医に提供することは透析、CHDFなど、および他の外科的処置における抗凝固剤使用の安全性を高め、院内実施の臨床的意義は極めて高い。

5. ADAMTS13 検査の院内実施

ADAMTS13活性の測定や本邦での状況については、藤村らのグループから詳細な報告が出ており、ここでは一般の病院で院内実施する際の注意点について述べたい。

さて、血友病研究に従事したことがある方々には常識でも他では常識でない検査に、インヒビター力価（ベセスダ単位）の算出に関する具体的方法がある。最近、TMA（TTP）の病態解析にADAMTS13に対するインヒビターの力価が必要となり、活性を半分にする力価を1ベセスダ単位とするという文言だけで、希釈列の作り方が不十分であると、結果が安定しないことを招くことを見聞きする。ADAMTS13のインヒビター測定では、凝固因子のインヒビター測定法を参考になる¹⁰⁾。具体的には、カイノスのADAMTS13測定キットを用い、当研究室ではまず検体中のADAMTS13活性をキャンセルするため、56℃1時間の熱処理を行い得た白濁液は遠心分離し、その上清（図4左）を熱処理しない血漿と混和し37℃で2時間インキュベートする。この際、非動化被検血漿を初回は1/1、1/2、1/4に正常

図4 ADAMTS13 およびそのインヒビター活性測定の実例

血漿由来の非動化血漿で希釈したものを用いる。コントロールに2時間のインキュベートで低下するADAMTS13活性を明確にするため、ADAMTS13活性を非動化で失活させた正常血漿と熱処理しない正常血漿の混合物の37℃2時間後のADAMTS13活性を測定し、これに対する熱処理患者血漿によるADAMTS13活性低下能力を明らかにする。図4右に示すようにAの患者血漿はほとんど黄色に発色せずADAMTS13活性が非常に低いことを示し、さらにBのコントロールに比してCの患者血漿は黄色が薄いことでもわかるように正常血漿中のADAMTS13を非動化患者血漿中の抗体が失活させたことが見える。さらにこれを倍希釈した際はそのインヒビター活性が弱いことが解る。この結果でインヒビターが存在することを速報し、その後にベセスダ単位を明示する目的で、希釈列3系列を作成し、25～75%程度に低下させる適正な希釈列を探し、活性を半減させるものを1ベセスダ単位として示す方法を基礎に計算する。さらなる詳細は血友病のインヒビター計算法を参照していただきたい¹⁰⁾。

6. 止血系臨床検査のスタッフを取り巻く 環境と院内での立場の確立

臨床検査医学の世界ではR-CPCによる訓練で解析力をアップし、その結果を臨床に活かす努力

がなされている。すなわち、臨床検査の専門家たちがデータを詳細に読み込んで、臨床検査技師は臨床医の非専門領域を支援する支援集団として働き、臨床検査専門医は解析面での介入を行うと考えられている。基本的にはこのとおりである。注意したいのは臨床医との適切な会話ができるよう例えば、基本的事項として栄養状態というか患者が今元気か重症でアップアップしているかを見る指標として肝臓でのタンパク合成能もひとつであるが、蛋白なら何でもよいとしてアルブミンやコリンエステラーゼに加え総タンパクを挙げると、その時点で一般の臨床医からふつうは総タンパクを入れないだろうと臨床検査担当者に対する疑問が出てしまう。このような場合、できるだけフランクに指摘していただける仲間としての臨床医を探したい。そして臨床検査技師でありPhDでもある場合、自身の得意分野を活かしつつ、日々の解読できない臨床病態に何らかの答えを、あるいは議論の基礎を提供することができるよう努力したい。臨床の現場ではPhDは最終的な臨床医の判断に対して参考意見を述べるにとどまる立場である。このことは重要で、PhDはその範囲を超えてはならないが、自身が提出する検査結果やその解釈は参考文献、症例報告、解説などを添付し、自身の考えを誤解させることなく伝えることが重要である。

院内での原因不明の血小板減少にHITや

TTP, すなわち, HIT 抗体検査や ADAMTS13 活性検査の検索にかかる場合, 症例の背景にもよるが DIC などのより発生頻度が高い血小板減少の要因が除外されてから相談に来ることが多い。しかし相談を受ける側の我々もこれを確認することも重要である。特に HIT 抗体検査はその診断特異度が高くなく, 背景を担当医とよく議論してから検査結果を考える必要がある。そのため, 血栓止血領域の疾患に関する最低限度の臨床の, すなわち内科研修医の一年目, 的知識を身に着けることが必要である。

一方で, PhD としての基礎的実験手技, 研究手法などの経験に基づく検査手技や結果の解釈は臨床医に PhD や臨床検査技師が積極的に説明すべき部分である。著者の場合は, ELISA とその関連手技としての抗体作成, 蛋白分離などの蛋白科学と, HPLC による分析手技が身に着けた実験・研究手技である。それぞれの個性で様々な手技を身に着け, 解析に利用していただきたい。

7. あとがきに代えて

検査技師や薬剤師など医師でないスタッフも症例検討会に参加し, それによって臨床の議論・勉強を進めるようにきいたことがある。筆者が注意したいのは臨床検査技師や PhD は臨床検査と実験・研究技術が専門で, 医師の内科や外科が専門

ではない。あくまで自身の立場からの助言を求められていることを逸脱しないよう心掛けている。様々なグラントにアプライし, 得た研究費で医療に貢献できる検査を進める情報提供能力を高めたい。

臨床検査技師などの医療技術職で PhD を取得した方々が今後増える時代が来た。本稿の情報提供・交換のプラクティカルなあるいは技術的な部分が何らかの助けになれば幸いである。

文 献

- 1) 小宮山豊：臨床検査室から臨床へ, 日本血栓止血学会 編, わかりやすい血栓と止血の臨床。東京, 南江堂, 2011, 6-9.
- 2) 鈴木伸明, 松下正：プライマリ・ケア医に必要な血液疾患の知識 血友病 (特集血液疾患の見方 —血液専門医以外のための血液疾患対応マニュアル—, 治療 **92** : 2387-2392, 2010.
- 3) 田中一郎, 吉岡章：血友病の診断と治療, 日本血栓止血学会 編, わかりやすい血栓と止血の臨床。東京, 南江堂, 2011, 81-83.
- 4) 小谷英太郎, 奥村謙, 井上博, 他：我が国で用いられている INR 測定用試薬の ISI 値とその問題点 —J-RHYTHM Registry からの検討—, 心電図 **31**, 225-233, 2011.
- 5) 長尾毅彦：抗血栓薬の不应性 ワルファリンレジスタンス, 脳卒中 **32** : 735-739, 2010.
- 6) 小松親義, 井関治和, 佐藤浩充：トロンボプラスチン試薬の感度 (ISI) による PT-INR 値の変動及び CoagChek-XS 法との比較検討, 日本心臓病学会誌 **5** : 93-101, 2010.
- 7) Tripodi A, Chantarangkul V, Mannucci PM : The international normalized ratio to prioritize patients for liver transplantation : problems and possible solutions. J Thromb Haemost **6** (2) : 243-248, 2008.
- 8) Kawano H, Yamamoto H, Miyata S et al. : Prospective multicentre cohort study of heparin-induced thrombocytopenia in acute ischaemic stroke patients. Br J Haematol **154** : 378-386, 2011.
- 9) Warkentin TE : Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2011, 143-149.
- 10) 福武勝幸：凝固因子特異抗体, 藤巻道男, 福武勝幸編, 血液凝固検査ハンドブック。東京, 宇宙堂八木書店, 1992, 309-312.