

〈特集：凝固検査の標準化と現状〉

APTTの現状と標準化に向けた課題

山崎 哲¹⁾、鈴木 典子¹⁾、後藤 宏実¹⁾、高山 成伸²⁾

Current conditions of activated partial thromboplastin time and a strategy for standardization

Satoshi Yamazaki¹⁾, Noriko Suzuki¹⁾, Hiromi Goto¹⁾ and Shigenobu Takayama²⁾

Summary Activated partial thromboplastin time (APTT) as well as prothrombin time are among the most common tests for screening blood coagulation disorders and monitoring anticoagulant therapy, such as the inhibitors of coagulation factors, lupus anticoagulants and unfractionated heparin therapy. APTT reagent consists of procoagulant phospholipids and a contact factor activator, the former being derived from animals, plants, or synthetic phospholipids while the latter is made from silica, ellagic acid, celite, or other suitable negatively charged substances. APTT is generally measured by a variety of optical or mechanical methods using automated devices. Therefore, various combinations of both APTT reagent and an instrument are being currently utilized. We attempted to evaluate the differences between APTT reagents and the instruments, using 13 APTT reagents and 2 automated devices involving different principles. As a result, the variances of each combination in plasmas from those in normal individuals were not so different, though the sensitivity to the unfractionated heparin and factor VIII activity varied greatly among the 13 APTT reagents. For the standardization of APTT under such current conditions, further examinations would be necessary.

Key words: Activated partial thromboplastin time (APTT), Unfractionated heparin, Factor VIII activity

I. はじめに

活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) は、プロトロンビン時間 (PT) と共に最も一般的に行われている凝固検査である。従来その検

査目的は、内因系凝固機能のスクリーニングや未分画ヘパリン療法のモニタリングが中心となっていたが、近年では、ループスアンチコアグラント (LA) や凝固因子に対するインヒビターなど、様々な凝固異常も対象となるため多様化

¹⁾聖マリアンナ医科大学病院 臨床検査部
〒216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1

²⁾大東文化大学スポーツ・健康科学部

¹⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Hospital,
2-16-1 Sugao, Miyamae-Ku, Kawasaki, Kanagawa 216-8511, Japan

²⁾Faculty of Health Science, Daito Bunka University

している。さらに、日常的なスクリーニング検査としてだけでなく、凝固因子活性測定や凝固因子インヒビター測定の際の基盤的測定法としても使用されることから以前よりその標準化が求められてきた。

APTT試薬はシリカ、エラジン酸、セライトなどの活性化剤と、動・植物由来または合成由来のリン脂質との組合せによって構成されるが、前述した多様な内因系凝固異常を検出するための試薬として、近年では組成の内容や濃度を調整して疾患感受性を賦与したAPTT試薬も種々開発されている^{1),2)}。

したがって、APTT試薬といっても一様では無く、今日では凝固第 XII 因子および第 XI 因子の試験管内活性化を主目的としたいわゆる古典的なAPTT試薬から、疾患感受性を持つ指向性のあるAPTT試薬に至るまで様々な試薬が混在し、日常的な臨床検査項目としての“APTT”を単一の凝固時間のみで扱うことの難しさを感じることも少なくない。加えて、自動分析装置による測定が一般的となった今日では、分析装置とAPTT試薬の組合せという更に多様性を増大させる要因もあることを鑑みると、測定結果を受け取る臨床サイドに対してこの複雑化したAPTTの現状について理解を求めることは極めて困難なことと思われる。

APTTの標準化については国内外を問わず以前より検討されてきたが、未だ標準化には至っておらず^{3),4)}、わが国においては、昨年、日本検査血液学会の血栓止血検査標準化小委員会においてAPTTの標準化に向けた方針が策定されたところで、現在は調査結果をもとに基礎検討を進めている段階にある。そこで本稿では、APTTの現状の問題点を整理し、標準化に向けた課題を提示したい。

II. 現状の問題点

APTT測定に関しては、Clinical and laboratory standards institute (CLSI) よりガイドライン⁵⁾が示されているが、その内容は試薬の構成や測定技術が主で、数値目標として具体的に示されているものは「第Ⅷ因子 (FⅧ)、第Ⅸ因子および第 XI 因子活性が30%未満の場合において、凝固時間延長として検出されるべき」と記載されて

いるだけで、ヘパリン感受性やLAに関しての基準等は示されておらず、施設ごとの検討評価が必要となる。また、わが国の体外診断用医薬品の認証基準も、「従来法との比較において50検体以上の検体を用いた相関係数が0.9以上、回帰直線傾きが0.9~1.1」と規定されているだけで、これらの条件に当てはまれば新規のAPTT試薬となり得る状況となっている。

APTT標準化に向けた問題点を表1に示したが、現状に適応した標準試薬や標準物質の設定は困難であり、PTでのINR；International Normalized Ratio評価の様な標準物に基づいた評価法は実現できていない。したがって、現在もなお単なる凝固時間による表現が用いられ、さらに、得られたAPTT値がどのような特性を持った試薬によるものかを明確に理解されないままに評価されている可能性も危惧される。

このような多様化したAPTTの現状を鑑みると、APTT測定の標準化は極めて困難であると思われる、現実はその入り口にすら到達していないと言っても過言ではない。

III. APTT試薬および測定機器の使用状況

現在、国内において入手可能なAPTT試薬は20種前後存在し、活性化剤としてエラジン酸とシリカがその多くを占めているが、リン脂質との組合せと相まってその内容は多様なものとなっている。各APTT試薬の使用頻度は、2008年度の日本医師会サーベイ⁶⁾とCAPサーベイ⁷⁾の施設数比率を比較すると (図1)、その約75%を占める上位3試薬を見ても国内と海外とで全く異なっている状況にある。同様に分析装置につい

表1 APTT標準化に向けた問題点

1. 試薬
・ リン脂質・活性化剤の組合せや濃度が多様である
・ ロット間差
2. 分析方法
・ 自動分析装置の測定原理 (光学的、力学的) など多様である
・ 用手法
3. 検査対象
凝固因子欠乏、未分画ヘパリン療法、ループスアンチコアグラント、凝固因子インヒビターなど多様である
4. 表現方法
一律に秒数のみで表現されるのが一般的である

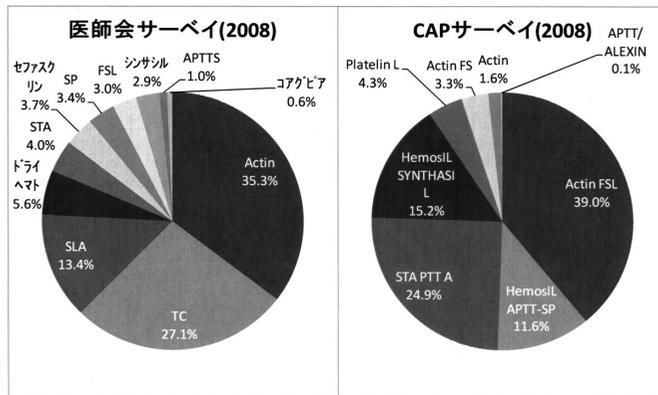


図1 APTT試薬使用状況（20年度日本医師会サーベイ，CAPサーベイより）
平成20年度の日本医師会（左）とCAP（右）のサーベイより，APTT試薬の使用状況を集計した。両者共に上位3試薬で全体の約75%を占めているが，共通の試薬はなく両者の使用率は大きく異なっていた。

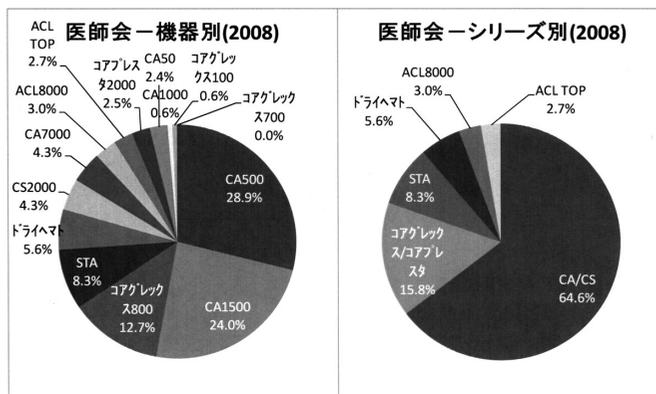


図2 機器別，シリーズ別分析装置使用状況（平成20年度日本医師会サーベイより）
平成20年度の日本医師会サーベイより，分析装置の使用状況を集計した。左に機器別の使用状況を示し，右にシリーズ別の使用状況を示した。上位3シリーズで約90%を占めており，上位2機種は光学的，3位は力学的測定原理に基づく装置であった。

ては，2008年度日本医師会サーベイの集計より機器別、シリーズ別の使用頻度を示した（図2）。その約90%を3シリーズの機種が占め、光学のおよび力学的検出を測定原理とする機器となっている。そして実際のAPTT試薬と分析装置との組合せに関しては、各メーカー内での組合せが主流となっているがそれでも複数の組合せが存在している。

IV. APTT試薬間差

使用状況の調査結果に基づいて、13種のAPTT試薬（表2）と測定原理の異なる2機種を選択し、同一条件下での試薬間差について比較検討を試みた結果を示す（図3）。尚、試薬は、使用率が高くかつ汎用性の高い試薬であること、活性化剤、リン脂質ともに多様な組合せを含んでいることなどを選択条件とし、また、分析装

生物試料分析

表2 対象とした13試薬

試薬名	略称	リン脂質	活性化剤	販売メーカー
データファイ・APTT	Actin	ウサギ脳由来セファリン	エラジン酸	シスメックス
トロンボチェックAPTT	TC	ウサギ脳由来セファリン	エラジン酸	シスメックス
データファイ・APTT(FS)	FS	大豆由来リン脂質	エラジン酸	シスメックス
トロンボチェックAPTT(S)	APTT(S)	大豆由来リン脂質	エラジン酸	シスメックス
アクチンFSL	FSL	ウサギ脳+大豆由来リン脂質	エラジン酸	シスメックス
トロンボチェックAPTT-SLA	SLA	合成リン脂質	エラジン酸	シスメックス
PTT LA試薬	PTTLA	セファリン	シリカ	ロシュ・ダイアグノスティックス
ヒーモスILシンサシルAPTT	シンサシル	合成リン脂質	シリカ	三菱化学メディエンス
ヒーモスIL APTT-SP	SP	合成リン脂質	シリカ	三菱化学メディエンス
コアグピアAPTT-S	コアグピア	合成リン脂質	シリカ	積水メディカル
プラテリンLS II	プラテリン	ニワトリ+ブタ由来リン脂質	シリカ	協和メディックス
STA試薬APTT	STA	セファリン	セライト	ロシュ・ダイアグノスティックス
セファスクリーンAPTT	セファスクリン	セファリン	ポリフェノール化合物	ロシュ・ダイアグノスティックス

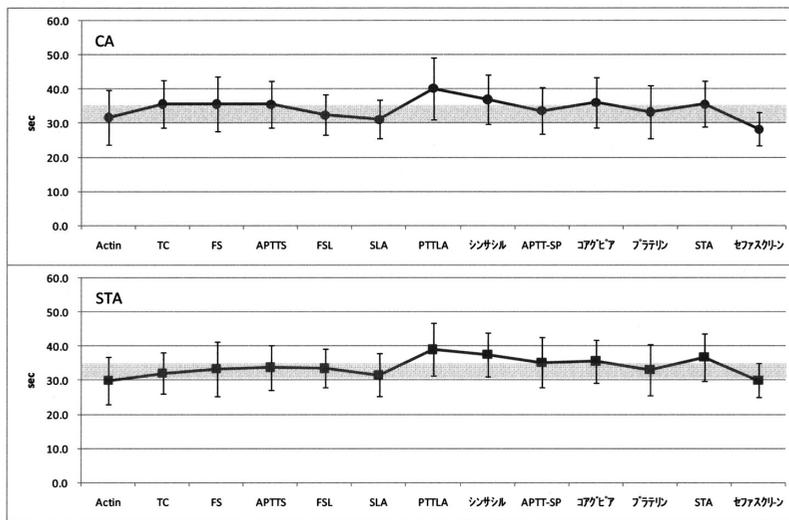


図3 健常人平均値の比較
13試薬の健常人平均値および±2SDを示した。グレーバックの部分が30～35秒の範囲を示しており、この範囲にほとんどの試薬の平均値が入る結果となった。2機種間での大きな差異は認めなかった。

置についても、使用率が高く測定原理の異なる機種を含むことを条件として、光学的な原理に基づくCA-7000 (CA; シスメックス) と物理的な原理に基づくSTA-Compact (STA; ロシュ・ダイアグノスティックス) の2機種を選択した。この結果は、当院職員ボランティアより得られた血漿を健常人血漿として行ったときのデータであるが、多くの試薬は健常人平均値が30～35秒の範囲内を示し、2機種間でも顕著な差異は認められず概ね一致した結果となった。

次に、未分画ヘパリンの感受性について検討を行った。未分画ヘパリン療法のモニタリング法としては、APTTの秒数が基準値の1.5～2.5倍

となる様コントロールする方法が従来から行われており⁸⁾、また、日本血栓止血学会の肺血栓塞栓症/深部静脈血栓症 (静脈血栓塞栓症) 予防ガイドラインでは、用量調節未分画ヘパリン療法として、正常上限で維持管理するとした記載がなされている。したがって、今回の検討ではこれらを考慮し0～0.3 U/ml濃度における未分画ヘパリンの添加試験を実施した。図4に示した様に各試薬間のヘパリン感受性は大きく異なっており、0.3 U/mlでの延長度 (0.3 U/ml秒数/0 U/ml秒数) はCAで1.7～3.5倍、STAで1.7～3.7倍となり、同じヘパリン濃度であるにもかかわらずその延長度は約2倍程度の差違を認めた。未分画

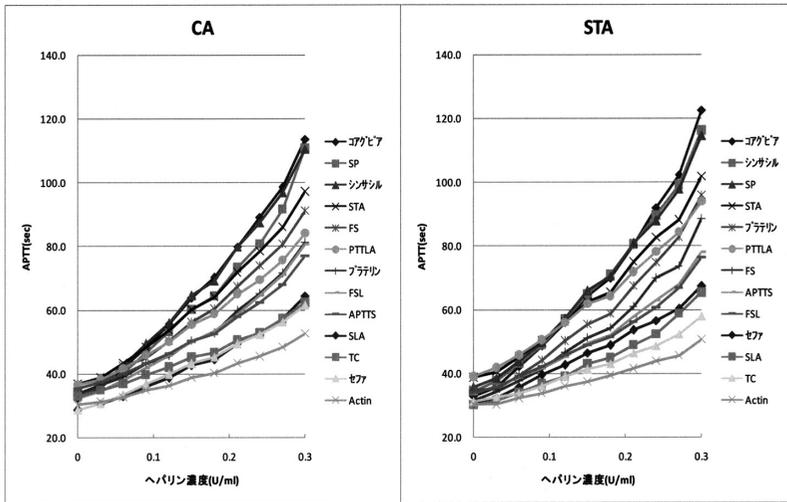


図4 ヘパリン添加試験
未分画ヘパリンを0.0～0.3 U/mlの範囲で添加し、APTTを測定した。左がCA、右がSTAの結果で、未分画ヘパリンに対する感度は試薬間で大きく異なった。

ヘパリン療法の治療域に関しては、ヘパリン投与中の患者血漿を使用して検討することがCLSIのガイドラインに記載されているが、今回の添加試験結果は各試薬の特性を理解する上で一つの指標となると考えられた。

現在、凝固因子感受性やLA感受性についてもさらに検討を進めているが、その一部としてFⅧ因子感受性についての検討データをここに提示する(図5)。FⅧ欠乏血漿(三菱化学メディエンス)に対して、遺伝子組換え型第Ⅷ因子製剤Kogenate(バイエル薬品)を種々の濃度で添加して作成したFⅧ因子濃度勾配を伴う血漿サンプルをFⅧ低下モデル血漿として、同様に13試薬2機種で測定した。より均等な評価とするために、各試薬のFⅧ活性100%における秒数を「1.0」として、濃度勾配に伴うその延長度を比較した。また、異常値の設定については、健常人平均値+2SDを正常上限としたときの各試薬における秒数が、全て約1.2倍(平均値秒数+2SD/平均値秒数)の延長度に相当したことから、1.2倍の延長度を示したときのFⅧ活性%で比較した。

その結果、少なくともFⅧ活性が30%未満では全ての試薬が両分析装置において異常値を示した。しかし、1.2倍の延長度を示したときの各試薬のFⅧ活性はCAで35.2%～46.1%、STAでは

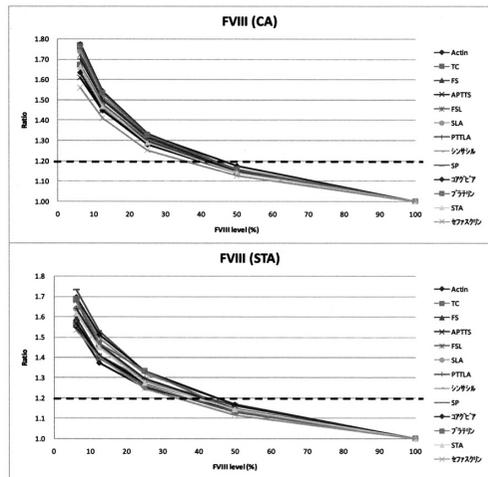


図5 第Ⅷ因子感受性
FⅧ欠乏血漿に遺伝子組換えFⅧ因子製剤を種々の濃度で添加しAPTTを測定した。上段がCA、下段がSTAで、1.2倍の延長度を異常値境界とし点線で示した。両分析装置ともに全ての試薬で少なくともFⅧ活性30%では異常値となる結果となった。しかし、異常値となる活性値には試薬間差が認められた。

33.8%～45.0%となり、試薬により異常値を示すFⅧ活性値に差違が認められた。

実際の臨床検体では、複合した凝固因子低下も存在するため、一つの特化した因子欠乏によるこの評価法は凝固因子低下例のほんの一端を示すものにすぎないが、少なくとも以上の結果は各試薬間の特性差の一部を表現した結果と考えられ、今後は他の凝固因子低下例やLAなど循環抗凝血素についても試薬間差を明らかにした上で分類し整理する必要があると思われる。そして、まずは“使用している試薬がどのような特性を持つ試薬であるのか”を十分に認識することが現状において必要であると思われる。

V. APTT標準化に向けて

ここまで示した成績は未だ検討の過程にすぎず、APTT標準化に向けてはさらなる検討や吟味を重ねて各APTT試薬の持つ特性を明確に示すことの出来る手段を絶えず模索する必要がある、そして、APTT測定に求められる性能を、よりきめの細かい基準を設定することで明確に示す必要があると思われる。

今回の検討でも確認された未分画ヘパリンに関する顕著な感受性の差違についても、いったい感度が高いことを良しとするのか、或いは、従来のモニタリングに合致するような感度、すなわち、0.2~0.4 U/mlで1.5~2.5倍となる感度にあわせるべきなのかを明確に意義付けするといった必要性も生じてくるであろう。

また一方では、例えば、ヘパリンについては感度が低い、FVIIIの感受性は高いといった試薬の場合では、FVIII活性測定には問題なく使用できるが、通常のスクリーニングとしては注意を要することとなるため、各試薬の特性を十分に理解した上での使い分け等も必要になるかもしれない。

しかしながら、検査室においては目的別にAPTT試薬を使い分けることは現実には不可能であり、ゆえにスクリーニング検査としてのAPTTを第一とする中においては、多岐にわたる凝固異常症を可能な限り網羅した試薬がその条件として求められる。そのためには、多種多様に存在するAPTT試薬や分析装置の組合せに対して、標準化という一定の評価が可能となる方法の確

立が必須と思われる。

今回の成績は、個々の健常人血漿をはじめプール血漿や市販の欠乏血漿を使用して得られたものであるが、これは、施設規模や各施設の倫理規定などによって患者血漿の利用が困難な状況も想定されたため、一定の規格に基づいて比較可能な「パネル血漿」等の標品開発も望まれるところである。

最後に、PT測定はINR標記で表現するという標準化の方向が示され、感度指数 (ISI) がより1.0に近いPT試薬を使用することが求められてきたが、普及までにある程度の年月を必要とした経緯がある。このことから、明確な方向性が示された以後も実際の標準化にはさらに時間を要することが予想される。そして何よりも、APTTに関わる以上の様々な課題を解決するためには、関連学会、関係各社ならびに実際に測定を行っている各検査室など多方面からの協力が不可欠なことは言うまでも無く、今回標準化に向けその一端を示したが、まずはその現状についての十分な理解が重要であると思われる。

文献

- 1) 奥田昌宏, 菊川紀弘, 上村八尋: 合成リン脂質を用いた新しいAPTT試薬の開発. 日本検査血液学会雑誌, 3: 124-131, 2001.
- 2) 鈴木典子, 山崎 哲, 井本清美, 安室洋子, 瀧 正志: 合成リン脂質を用いたAPTT試薬の評価. 日本検査血液学会雑誌, 4: 136-141, 2003.
- 3) 香川和彦, 福武勝幸: プロトロンビン時間(PT)と活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)測定の現状と標準化に向けての課題. 臨床病理, 47: 431-437, 1999.
- 4) 鈴木節子, 島津千里, 安室洋子, 桜井典子, 風間睦美: PT, APTTの標準化の現状と将来. 日本検査血液学会雑誌, 3: 13-21, 2002.
- 5) One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test; Approved guideline-second edition. CLSI, 2008.
- 6) 平成20年度 第42回臨床検査精度管理調査結果報告書. 日本医師会, 2008.
- 7) Surveys 2008, CGL-C Limited Coagulation. Participant Summary Report. College of American Pathologists, 2008.
- 8) Hirsh J, Fuster V: Guide to anticoagulant therapy. Part 1: Heparin. Circulation, 89: 1449-1468, 1994.