

# 当院におけるループスアンチコアグラント検査の現状と問題点について

○原田あゆみ 奥野 広子 吉井 三幸 堀之内晶子  
白川 綾香 中西 良太 吉田 孝

滋賀医科大学医学部附属病院 検査部

The present status and the problems of the examination for lupus anticoagulant in our hospital

Ayumi HARADA Hiroko OKUNO Miyuki YOSHII Akiko HORINOUCI  
Ayaka SHIRAKAWA Ryota NAKANISHI Takashi YOSHIDA

Department of Clinical Laboratory, Shiga University of Medical Science Hospital (Seta Tsukinowa-cho, Otsu-shi, Shiga, 〒520-2192, JAPAN)

**【Key words】** LA (ループスアンチコアグラント)、dAPTT (希釈APTT)、dRVVT (希釈ラッセル蛇毒時間)、cut-off値、正常血漿

## 【要旨】

我々は当院におけるlupus anticoagulant (LA) 検査の最近の実施状況の変遷とそれに起因する問題点について検証したので報告する。2005年1月から2013年1月の間にLA検査の依頼があった1062例を対象とし、その内、測定機種あるいは試薬Lotが異なった629例を3期に分け希釈APTT法 (dAPTT) と希釈ラッセル蛇毒法 (dRVVT) によるLA検査の結果を比較検討した。3期のデータからcut-off値の変動要因となる測定機種や試薬Lotの変更によってmann-whitney U検定で有意差がみられたが、それらの有意差は正常血漿を用いた補正dAPTTや補正dRVVTで是正された。これらの結果から外来患者正常血漿 (ONP) や正常プール血漿 (NPP) を利用する補正式の活用はcut-off値を適正管理するために有用であると考えられた。また、dAPTTとdRVVT両法でのLA陽性率は7.3%であった。

## 【はじめに】

1980年代にHughesらによって提唱された抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid Syndrome: APS)<sup>1)</sup> は、自己抗体である抗リン脂質抗体を有し、動静脈血栓症や習慣性流産などが起こる疾患群であり、後天性血栓性素因の重要な病態の一つと考えられている<sup>2)</sup>。抗リン脂質抗体の検出法の一つであるlupus anticoagulant (LA) 検査は、スクリーニング検査としてAPTTを利用した凝固時間法や確認検査としてラッセル蛇毒法が汎用されている。

今回、我々は当院におけるLA検査の現状とその問題点について検証を行ったので報告する。

## 【対象および方法】

### 1. 対象

2005年1月から2013年1月までにLA検査を実施した1062例の内、比較検討時期に依頼のあったI期282、II期100、III期247の合計629例を対象とした。

### 2. 方法

#### 1) LA検査法 (表1)

3.13%クエン酸ナトリウム加血液を2000G、10分で2回遠心分離した血漿を-80℃で凍結保存した検体を使用し、以下の測定方法で検査を行った。

- (1) スクリーニング検査：希釈APTT法 (dAPTT)、試薬：アクチン (sysmex社)

表1 LA検査法

LA検査法		
検査方法	項目	計算方法
dAPTT	dAPTT比	希釈APTT (sec) / APTT(sec)
	補正dAPTT比	$\frac{(\text{患者希釈APTT (sec)} / \text{正常希釈APTT (sec)})}{(\text{患者APTT (sec)} / \text{正常APTT (sec)})}$
dRVVT	dRVVT比	低濃度リン脂質RVVT(sec) / 高濃度リン脂質RVVT(sec)
	補正dRVVT比	$\frac{(\text{患者低濃度リン脂質RVVT (sec)} / \text{正常低濃度リン脂質RVVT (sec)})}{(\text{患者高濃度リン脂質RVVT (sec)} / \text{正常高濃度リン脂質RVVT (sec)})}$

(2) 確認検査：希釈ラッセル蛇毒時間法 (dRVVT)、試薬：グラディポア (MBL社)

(3) 補正式によるdAPTT法 (補正dAPTT) およびdRVVT法 (補正dRVVT)

## 2) 比較検討時期と測定機種 (sysmex社)

I期:2005年1月4日から2006年4月16日 CA6000

II期:2008年4月1日から2009年7月1日 CS2000i

III期:2011年11月4日から2013年1月29日 CS2000i

## 3) 検討事項

(1) dAPTTとdRVVTの測定値分布 (n=629)

(2) 測定機種および試薬Lot間差について

(3期は別Lotを使用)

箱ひげ図 (dAPTTと補正dAPTTおよびdRVVTと補正dRVVT) で比較し、有意差検定 (mann-whitney U検定) を行った。

(3) 補正式利用時の正常血漿の選択について

outpatient normal plasma (ONP: 外来患者正常血漿) と normal pool plasma (NPP: 正常プール血漿) を比較した。

(4) dAPTTおよびdRVVTのLA陽性率

比較検討時期に提出された皮膚科121、母子女性診療科269、腎臓内科98、その他 (血液内科、循環器内科、消化器内科、神経内科、脳外科、精神科、小児科など) 141の合計629例で検討した。

## 4) 統計解析

解析にはspss statistics19を使用した。箱ひげ図では、median、4分位範囲 (75%タイル—25%タイル)、外れ値を表示した。

## 【結 果】

### 1. dAPTTとdRVVTの測定値分布 (箱ひげ図: 図1)

629例での2法の測定値分布 (比: mean ± SD) は、それぞれdAPTT 1.127 ± 0.141 (median 1.108, 4分位範囲0.145)、dRVVT 1.229 ± 0.179 (1.194, 0.150) であった。

### 2. 測定機種および試薬Lot間差について

(箱ひげ図: 図2、検定: 図3)

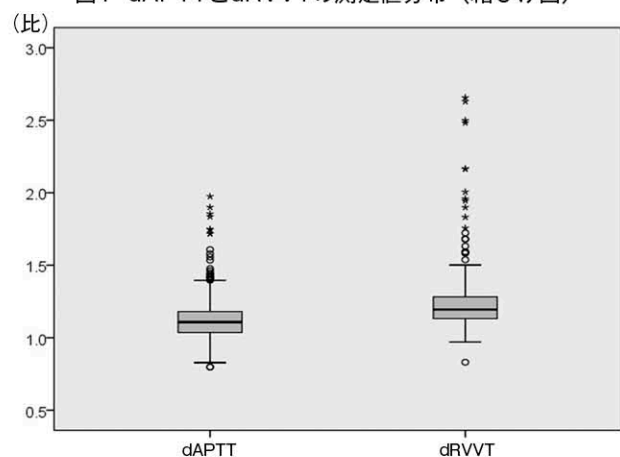
図2に示す3期の比較 (比: mean ± SD) にお

いて、dAPTTでは各々1.203 ± 0.131 (median 1.168, 4分位範囲0.119)、1.014 ± 0.063 (1.011, 0.079)、1.101 ± 0.133 (1.080, 0.124)、dRVVTは1.277 ± 0.195 (1.247, 0.164)、1.185 ± 0.089 (1.178, 0.118)、1.202 ± 0.174 (1.170, 0.115) であり、dAPTTではdRVVTと比べ、いずれの2期間でも明らかにばらつきが認められた。一方、補正dAPTTでは1.005 ± 0.109 (0.976, 0.100)、0.996 ± 0.062 (0.992, 0.08)、1.021 ± 0.123 (1.001, 0.115)、補正dRVVTでは1.000 ± 0.153 (0.977, 0.128)、0.981 ± 0.073 (0.974, 0.098)、1.027 ± 0.147 (0.999, 0.098) となり、補正dAPTTではそのばらつきは明らかに軽減された。各LA測定法による3期間の検定結果を図3に示したが、dAPTTにおいて試薬Lotが異なるI期～III期のすべての2期間で有意差 (p < 0.001) がみられた。同様にdRVVTでI期とII期、I期とIII期で有意差がみられたが、II期とIII期の間には有意差は認めなかった。正常血漿を用いた補正dAPTTや補正dRVVTでは測定機種や試薬Lot間差是正の傾向がみられた。

### 3. 補正式利用時の正常血漿の選択について (表2)

正常血漿の選択として補正dAPTTおよび補正dRVVTで使用した外来患者正常血漿 (ONP) および正常プール血漿 (NPP) について検証を行った。表2に検査実施日に管理血漿として使用したONPあるいはNPPのdAPTTおよびdRVVT、補

図1 dAPTTとdRVVTの測定値分布 (箱ひげ図)



○: 箱の長さの1.5倍以上3倍以下の範囲内の外れ値  
\*: 箱の長さの3倍より大きい値を示す外れ値 (極値)

図2 測定機種および試薬Lot差について (箱ひげ図)

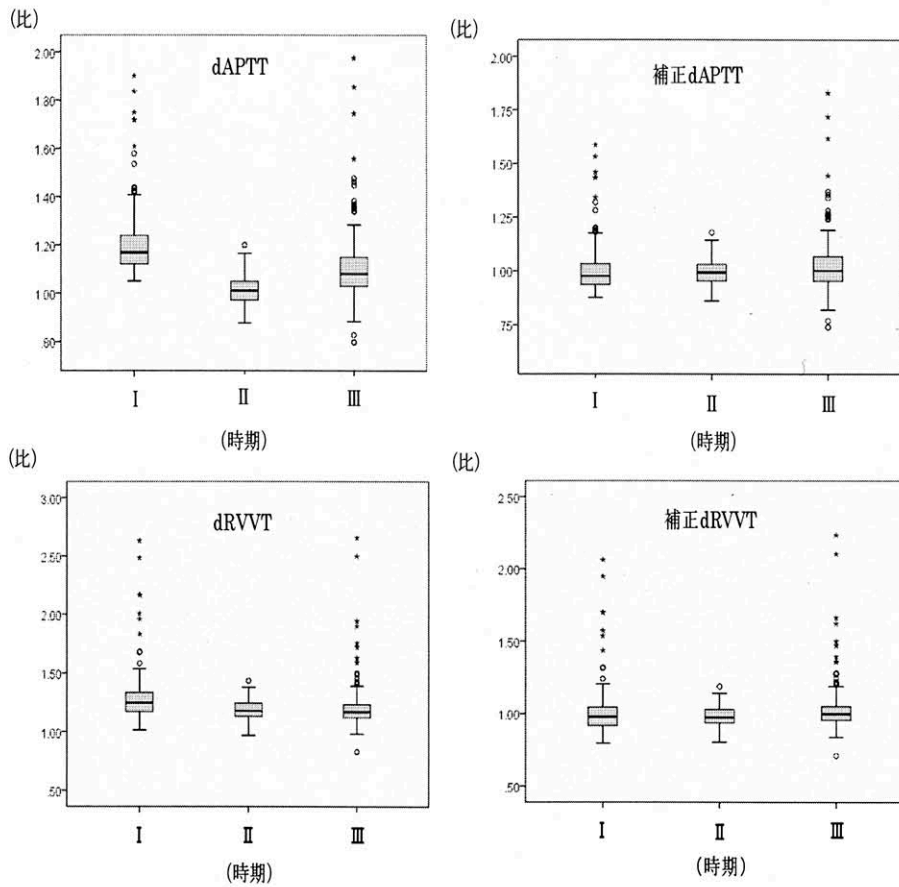


図3 各LA測定法による3期間のMann-Whitney U検定の結果

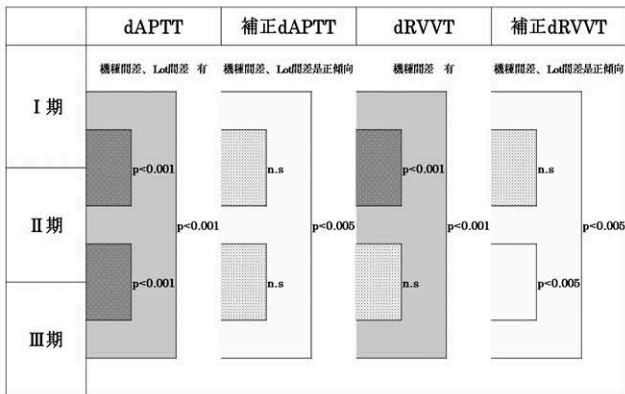


表2 補正dAPTTおよび補正dRVVTにおける正常血漿の選択

			outpatient normal plasma (ONP)			
	periods of data collection	equipment name	dAPTT	correct dAPTT	dRVVT	correct dRVVT
I 期	2005/1/4~2006/4/16	CA6000	1.20±0.08	0.99±0.07	1.27±0.09	1.00±0.07
II 期	2008/4/1~2009/7/1	CS2000i	1.02±0.07	1.00±0.06	1.21±0.06	1.00±0.05
III 期	2011/11/4~2013/1/29	CS2000i	1.08±0.08	1.01±0.09	1.17±0.08	1.00±0.07
			normal pool plasma (NPP)			
	periods of data collection	equipment name	dAPTT	correct dAPTT	dRVVT	correct dRVVT
I 期	2005/1/4~2006/4/16	CA6000	1.16±0.08	1.02±0.07	1.17±0.06	1.09±0.08
II 期	2008/4/1~2009/7/1	CS2000i	1.03±0.03	0.99±0.06	1.17±0.03	1.00±0.08
III 期	2011/11/4~2013/1/29	CS2000i	1.01±0.02	1.08±0.10	1.12±0.02	1.04±0.07

\* outpatient normal plasma (ONP)= 外来患者正常血漿、normal pool plasma(NPP)=正常プール血漿

\*\* dAPTTおよびdRVVTは、毎回検査実施日に測定したONPあるいはNPPのmean±SD (比) を表示

correct dAPTTおよびdRVVTは、ONPあるいはNPPの秒数の平均値を正常値とし、補正式にて比を算出

正dAPTTおよび補正dRVVTの結果を表示した。ONPを正常血漿として選択した場合には、補正dAPTTおよび補正dRVVTともに全期を通じてその比 (mean) は1.00に収束したが、NPPではばらつきがみられた。また、3期の患者群に正常血

漿としてNPPを用い補正dRVVTを算出した場合、そのcut-off値 (mean±2.6SD) が1.30 (I期: 1.33) を超えるケースがみられたが、補正dRVVTのcut-off値は能書どおり概ね1.30に推移した。

## 4. dAPTTおよびdRVVTのLA陽性率（表3）

ONPを含むLA実施例のデータを3SDで切断後、I～III期の各々のmean+2.6SDの結果をcut-off値（dAPTT：1.20～1.40、dRVVT：1.42～1.52）とした場合、629例の2法によるLA陽性率は7.3%であった。なお、同時に実施した補正dAPTTおよび補正dRVVTでの陽性率もほぼ同様の結果であった。

表3 dAPTTおよびdRVVTのLA陽性率

	dAPTT (+)	dAPTT (-)
dRVVT (+)	20 (3.2%)	14 (2.2%)
dRVVT (-)	12 (1.9%)	583 (92.7%)

## 【考 察】

抗リン脂質抗体の測定意義は、APSおよび抗リン脂質抗体関連疾患を診断することであり、APSと診断するためには抗カルジオリピン抗体、抗 $\beta$ 2-グリコプロテインI抗体やLAの証明が必須である<sup>2)</sup>。とくに簡易な凝固反応によってLAを検出できる検査（APTTやdRVVTなど）は、病院の検査部でも多用されている。しかし、試薬の選択や測定方法によってもLAに対する感度や特異性が異なることが報告され、その標準化も急務となっている。現在、試薬Lot間差が少ない合成リン脂質の開発や家子らによるISTH-SCCのガイドラインを尊重しながらAPSの最良の診断的臨床検査の実施方法を確立する努力が行われている<sup>3) 4) 5)</sup>。今回、我々は当院におけるLA検査の現状と問題点についての検証を行った。

検証に用いた現行ルーチンでLA検査実施した629例のdAPTTとdRVVTの測定値の分布（比：図1）について、dAPTTおよびdRVVTのmedian、4分位範囲（75%タイル—25%タイル）は、それぞれ1.127、0.145（1.181—1.036）と1.194、0.150（1.282—1.132）であり、確認検査として使用しているdRVVTの方がLAの力価に比例した変化を捉えて

いると考えられた。次に測定機種および試薬Lot間差の影響を時期別に比較検討（図2）したが、dAPTTは、dRVVTと比べ明らかに各期間でのばらつきがみられ、補正dAPTTではそのばらつきは明らかに軽減された。また、各LA測定法による3期間の検定結果（図3）において、dAPTTでは2期間全てで有意な差（いずれも $p<0.001$ ）がみられ、測定機種間差のほか、試薬Lotの要因が関与しているものと判断された。dRVVTでは測定機種が異なるI期とII期、I期のIII期で有意な差（いずれも $p<0.001$ ）がみられ、試薬Lot間差に比し測定機種間差がより大きく関与していることが示唆された。なお、正常血漿を用いた補正dAPTTや補正dRVVTではそれらの間差が是正される傾向（それぞれ $n.s$ もしくは $p<0.005$ ）にあった。これらの事実から、測定機種や試薬Lot間差がLA検査法によって度合いが異なるもののその精度に影響することが示唆された。

さらに補正dAPTTや補正dRVVTに用いる正常血漿の選択の是非についての検証（表2）では、ONPを正常血漿として選択した場合には補正dAPTTおよび補正dRVVTともに全期でその比（mean）は1.00に収束したのに対しNPPではばらつきがみられた。また、3期の患者群を使用して正常血漿としてONPあるいはNPPを用いた場合の補正dRVVTのcut-off値（ $1.30\leq$ 陽性）の比較でもNPPでは1.30（I期：1.33）を超えるケースがみられた。この原因は、当院で作製したNPPの差（batch間差）に起因しているものと推察された。すなわち、NPP作製に使用した健常者の人数（5～10名）が少ないためにばらつきが出たものと判断され、NPPを使用する場合にはプールする健常者血漿の人数を十分に確保（できれば50名以上）できれば支障はないと思われた。

今回の検証から補正dAPTTおよび補正dRVVTを用いることで測定機種や試薬Lot間差を極力抑えることができcut-off値（ $1.30\leq$ 陽性）の設定も比較的容易になると考えられた。なお、今後の課題としてcut-off値のより適正管理するための取り組み（たと

えば、低力価の陽性コントロール血漿の活用)も必要であると考えられた。今回、比較検討した629例におけるdAPTTおよびdRVVTのLA陽性率は7.3%であり、その内訳は、2法陽性3.2%、dAPTTのみ陽性1.9%、dRVVTのみ陽性2.2%であった。依頼診療科の構成に違いがあるもののdRVVT陽性率は既報の報告<sup>6)</sup>とほぼ同様の結果であった。

## 【まとめ】

今回、我々は当院におけるLA検査の現状と問題点についての検証を行った。その結果、cut-off値の変動要因となる測定機種や試薬間差を是正することの重要性が示唆され、その是正にはONPやNPPを利用した補正dAPTTと補正dRVVTが有用であると考えられた。なお、dAPTTとdRVVTの両方でのLA陽性率は7.3%であった。

## 【参考文献】

1) Hughes GR, Harris NN, Gharavi AE : The anticardiolipin syndrome. *J Rheumatol*, 13 ( 3 ) : 1986,486-9.

- 2) 渥美達也 : 抗リン脂質抗体症候群の診断. *血栓止血誌*, 19 ( 3 ) : 2008,329-332.
- 3) Okuda M, Yamamoto Y : Usfulness of synthetic phospholipid in measurement of activated partial thromboplastin time : a new preparation procedure to reduce batch difference. *Clin Lab Haem*, 26 : 2004,215-223.
- 4) 内藤澄悦, 家子正裕, 吉田美香 など : Lupus anticoagulant診断に有用な試薬の検討. *JJCLA*, 34 ( 5 ) : 2009,833-838.
- 5) 家子正裕, 吉田美香, 内藤澄悦 : 抗リン脂質抗体症候群と臨床検査. *臨床病理*, 58 ( 4 ) : 2010,343-351.
- 6) 表 美香, 吉田知孝, 朝倉英策 など : 基礎疾患別にみたループスアンチコアグラント陽性率の検討—当院における依頼検体の現状—. *臨床病理*, 54 ( 9 ) : 2006,903-909.

## 【abstract】

We report the result of our analysis on the data of current 1062 cases who received routine lupus anticoagulant examination using dAPTT and dRVVT in our hospital during January 2005 to January 2013 to find out the influence of alteration in the assay system to the accuracy of these data. Based on the difference of instruments and lot of reagents, 629 of them were divided into three groups, and the exchange of instruments and lot of reagent, which are the major factors for the variation of cut-off value, were shown to induce significant influence on the values of Mann-whitney U test. However, the problem of these significant differences was solved by calculation of corrected dAPTT and dRVVT using normal plasma. For this calculation, use of out-patient normal plasma or normal plasma pool seems to be efficient. Continuous effort on the appropriate management of cut off value is needed for the further improvement, and use of low titer positive control plasma seems to be effective for this purpose. LA was positive in 7.3 % of cases either by one or both of these methods.