第3回　血液検査機器技術セミナー
平成25年10月10日

「凝固検査標準化の現状」

クロスミキシングテスト

ー 標準化における課題と現状 ー

北海道医療大学病院・歯科内科クリニック　臨床検査部

内藤澄悦

クロスミキシングテストを行なう背景

活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）あるいはプロトロンビン時間（PT）が延長した際には，凝固因子の低下または凝固抑制物質（インヒビター）の存在が考えられる．治療上その鑑別は重要であり、一般的には患者血漿に正常血漿を添加して補正効果をみるミキシングテスト（混合試験）が用いられる．

APTTが延長する疾患，病態

1．内因系凝固因子活性の低下：
凝固第VIII、IX、XI、XII因子活性低下症
（血友病，von Willebrand病，インヒビター(後天性血友病)を含む）

2．ループスアンチコアグラント(LA)：抗リン脂質抗体症候群（APS）

3．共通系凝固因子活性の低下：

凝固第V，X因子低下症、プロトロンビン低下症，
フィブリノゲン低下症（インヒビターを含む）

4．肝障害

5．抗凝固療法，ビタミンK欠乏症の一部

6．播種性血管内凝固（DIC）

クロスミキシングテスト

1. APTT延長例の鑑別診断が可能

   ① 内因系凝固因子欠損

   ② 内因系凝固因子インヒビター

   ③ ループスアンチコアグラント（LA）

2. 保険点数の収載あり（100点）

クロスミキシングテストの測定原理

APTTなどで延長を示した患者血漿と各凝固因子活性が正常である健常人（正常）血漿を混合すると，凝固因子の欠乏により凝固時間が延長している場合には凝固因子が補充され凝固時間の延長が改善される．しかし，凝固時間の延長が改善されない場合には患者血漿中の凝固阻止因子（抗体）の存在を示す．

クロスミキシングテストの実際

（日本検査血液学会，スタンダード検査血液液学　第2版より）

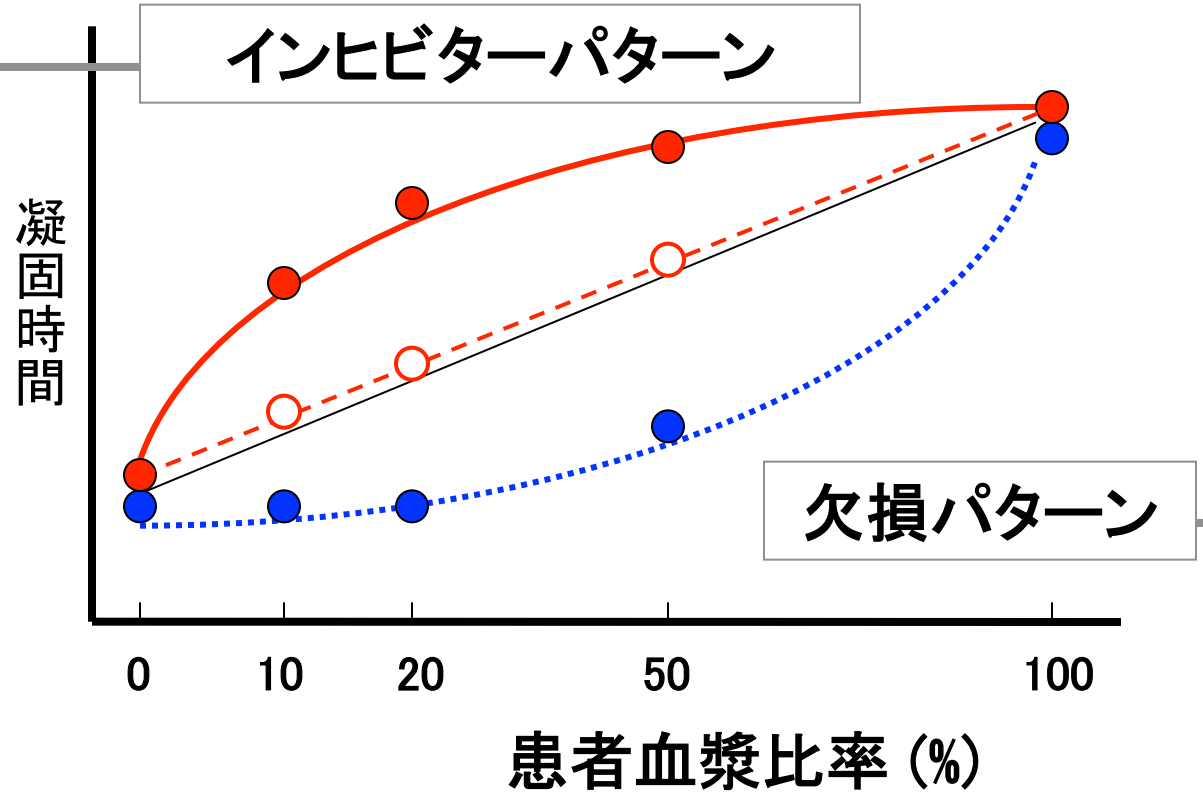
少量の患者血漿の混入で凝固時間が延長する.

①血漿混合後，即時に測定

即時反応：LA

②血漿混合後，2時間加温した後測定

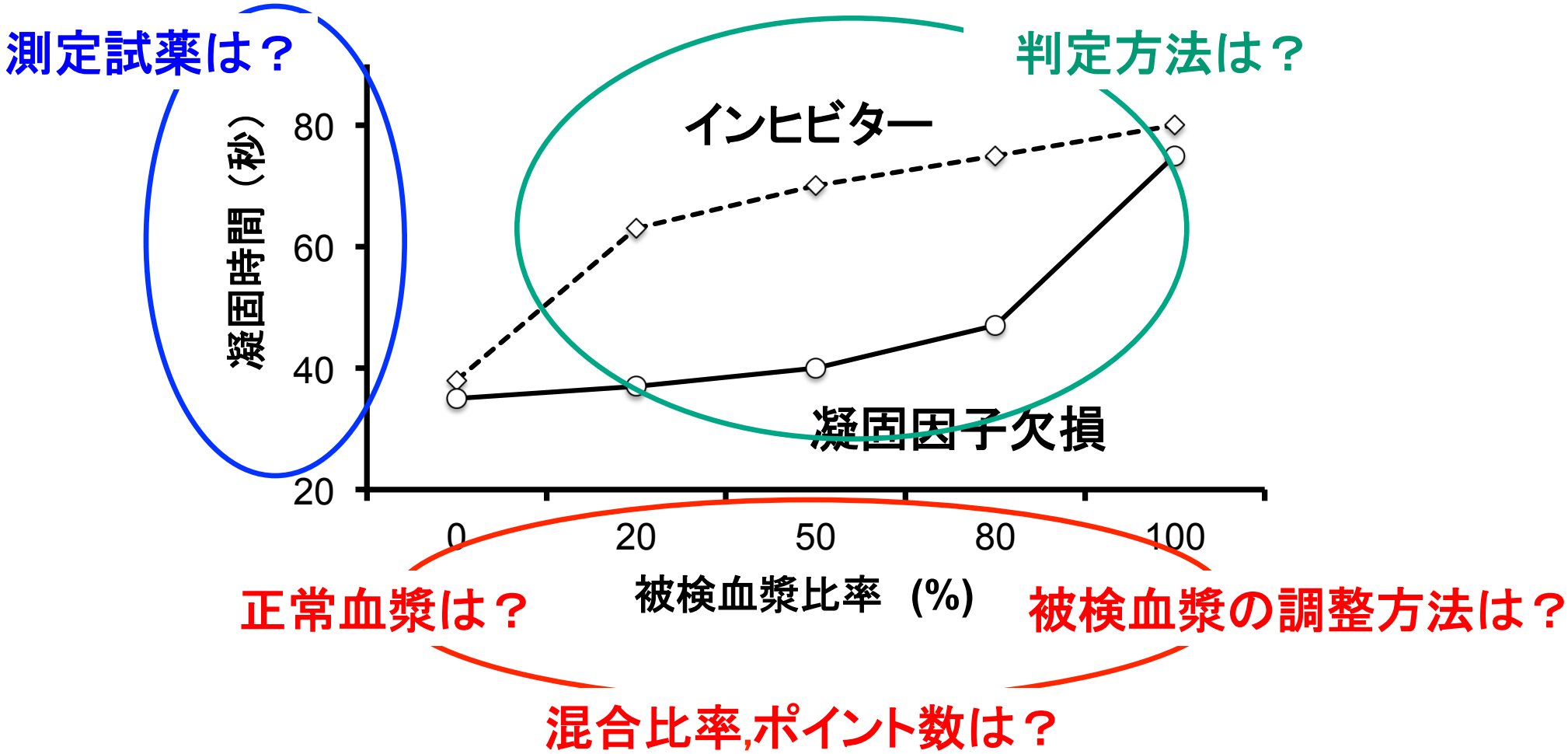
遅延反応：抗凝固因子抗体
（後天性血友病）



正常血漿の混和で
凝固時間が補正される.

S.Naito : Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

クロスミキシングテストの問題点



S.Naito : Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

クロスミキシングテストの課題

1. 患者血漿と正常血漿の比率と測定ポイント数.
2. 最適な試薬の選択は？
3. 最適な血漿検体の調整は？
4. 正常血漿が標準化されていない.
5. 判定方法が明確でない.

クロスミキシングテストの課題

1. 患者血漿と正常血漿の比率と測定ポイント数.
2. 最適な試薬の選択は？
3. 最適な血漿検体の調整は？
4. 正常血漿が標準化されていない.
5. 判定方法が明確でない.

コアプレスタミキシングテスト研究会

―第1回サーベイ―

（2009年）

Sample：

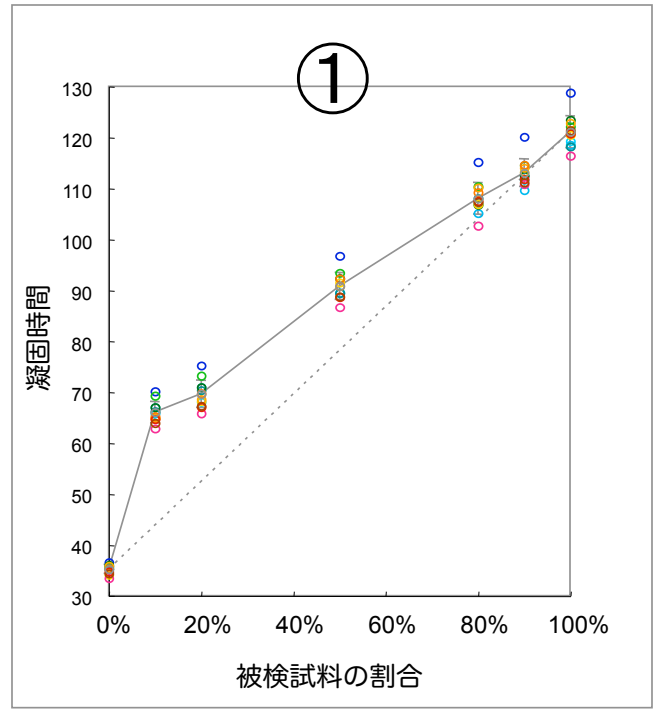
① LA強陽性血漿
② LA弱陽性血漿
③ 第VIII因子欠乏血漿
④ 第VIII因子インヒビター血漿

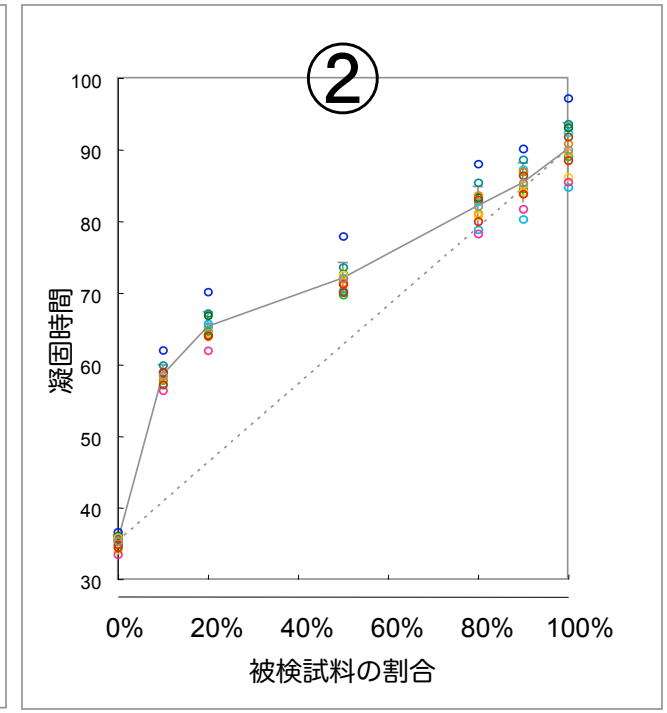
APTT試薬:

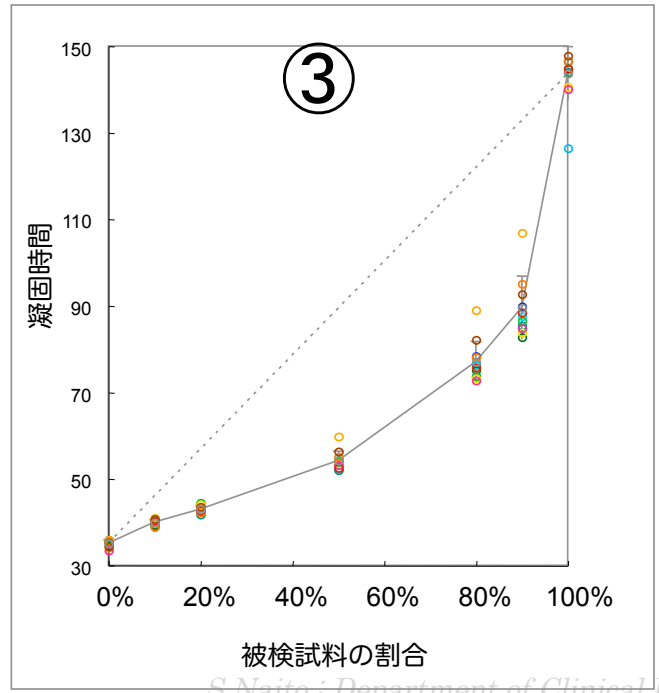
PTT-LA®（ロシュ）

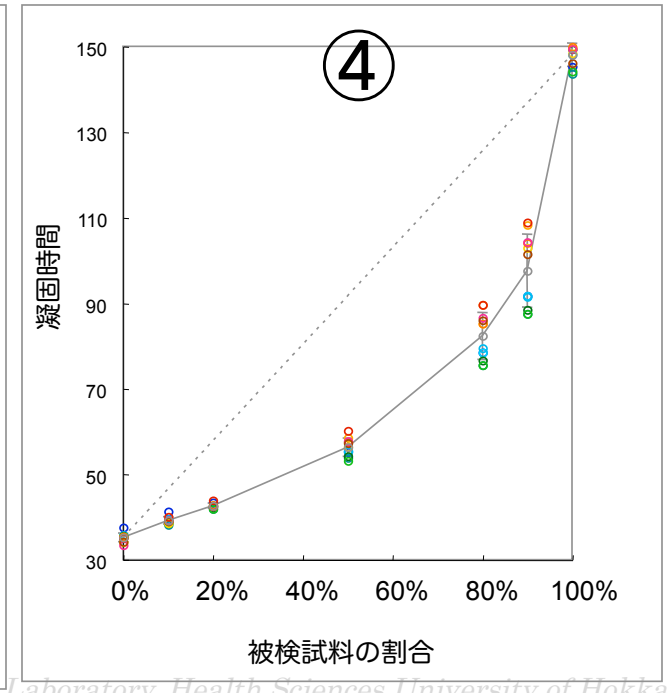
正常血漿:

市販コントロール血漿（PBI社製）



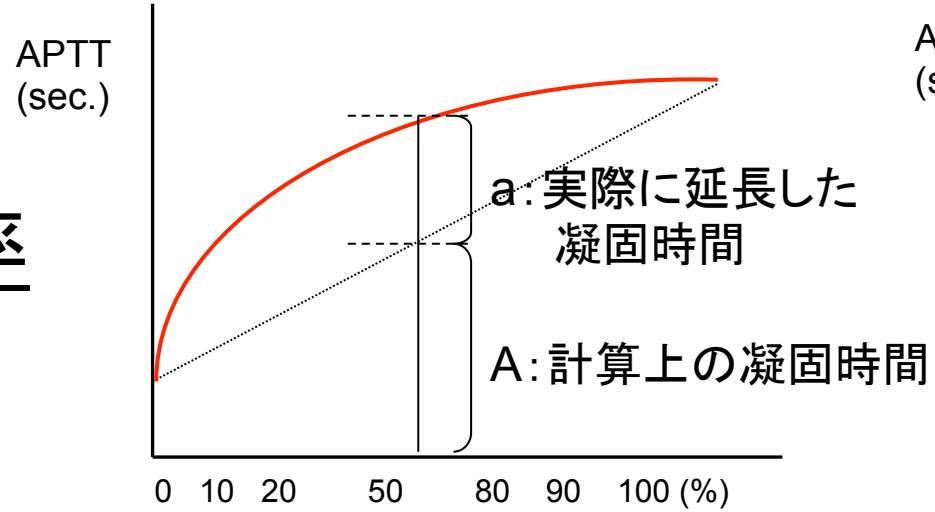


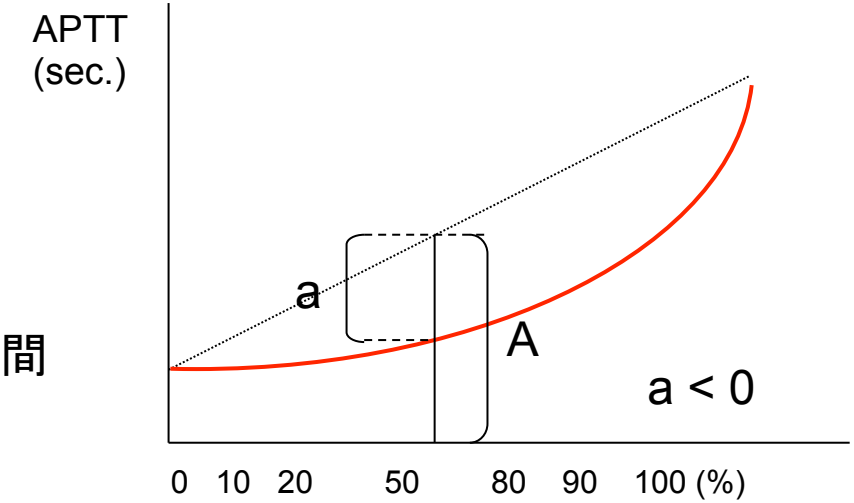




S Naito : Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

延長率
（a/A）





LA強陽性血漿

被検血漿(%)	10	20	50	80	90
A	43.8	52.4	78.1	103.9	112.5
a	22.2	17.3	12.7	4.2	0.6
a/A (%)	50.7	33.0	16.3	4.0	0.5

LA弱陽性血漿

被検血漿(%)	10	20	50	80	90
A	40.8	46.3	62.8	79.3	84.8
a	17.7	18.9	9.2	2.9	0.7
a/A (%)	43.4	40.8	14.6	3.7	0.9

第VIII因子欠乏血漿

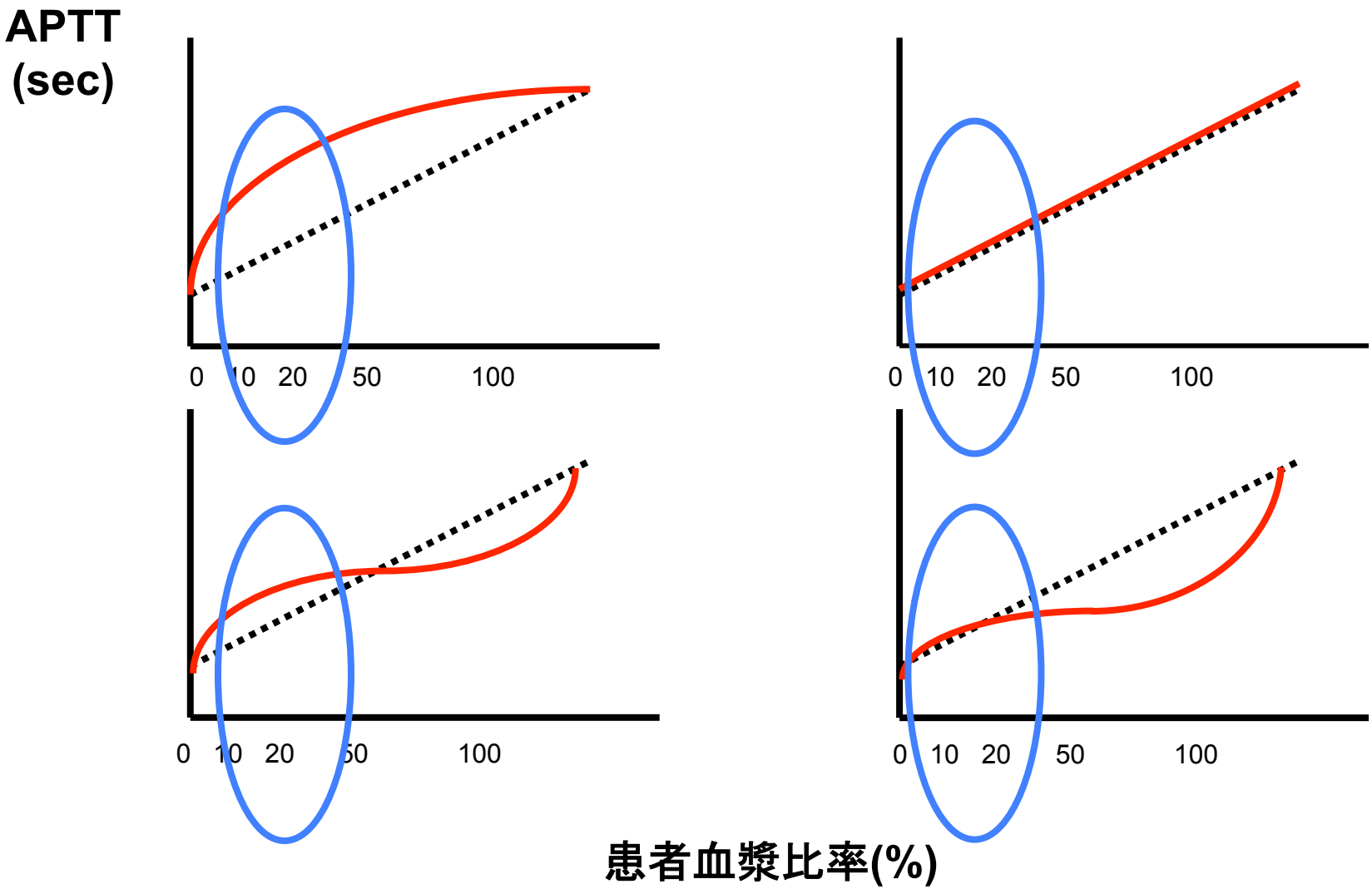
被検血漿(%)	10	20	50	80	90
A	46.0	56.8	89.4	121.9	132.8
a	-6.0	-13.6	-35.1	-44.8	-43.7
a/A (%)	-13.0	-23.9	-39.3	-36.8	-32.9

第VIII因子インヒビター血漿

被検血漿(%)	10	20	50	80	90
A	46.5	57.8	91.6	125.5	136.7
a	-7.3	-15.1	-35.4	-43.3	-39.4
a/A (%)	-15.7	-26.1	-38.6	-34.5	-28.8

（家子　正裕、他：日本検査血液学会雑誌 12(3): 312-322, 2011. 一部改変して引用）

LA症例における種々のミキシングテストパターン



S Naito : Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

クロスミキシングテストの課題

1. 患者血漿と正常血漿の比率と測定ポイント数.
2. 最適な試薬の選択は？
3. 最適な血漿検体の調整は？
4. 正常血漿が標準化されていない.
5. 判定方法が明確でない.

ＡＰＴＴ試薬の選定

Lupus anticoagulantおよび内因系凝固因子欠損症における種々のAPTT試薬の有効性

試　薬 （リン脂質、 活性化剤）	コントロール*	内因系凝固因子欠損				LA			
		測定値*	感度（%）	特異度（%）	有効度（%）	測定値*	感度（%）	特異度（%）	有効度（%）
APTT 1 （ウサギ脳抽出、 エラグ酸）	1.00 ± 0.09	1.27 ± 0.47	54.5	83.1	79.3	1.57 ± 0.54	57.1	90.2	81.7
APTT 2 （合成リン脂質、 エラグ酸）	1.00 ± 0.11	1.19 ± 0.31	45.5	71.8	68.3	1.82 ± 0.78	90.5	90.2	90.2
APTT 3 （合成リン脂質、 シリカ）	1.00 ± 0.09	1.22 ± 0.26	54.5	69.0	67.1	2.42 ± 1.25	100.0	88.5	91.5
APTT 4 （合成リン脂質、 無水ケイ酸）	1.00 ± 0.10	1.16 ± 0.25	45.5	73.2	69.5	1.80 ± 0.73	85.7	90.2	89.0
APTT 5 （ウサギ脳抽出、 エラグ酸）	1.00 ± 0.15	1.17 ± 0.34	36.4	88.7	81.7	1.52 ± 0.59	28.6	90.2	74.4
APTT 6 （ウサギ脳抽出、 シリカ）	1.00 ± 0.11	1.16 ± 0.29	45.5	87.3	81.7	1.51 ± 0.53	42.9	91.8	79.3
PTT-LA （ウサギ脳抽出、 シリカ）	1.00 ± 0.10	1.32 ± 0.33	54.5	69.0	67.1	2.37 ± 0.82	100.0	88.5	91.5

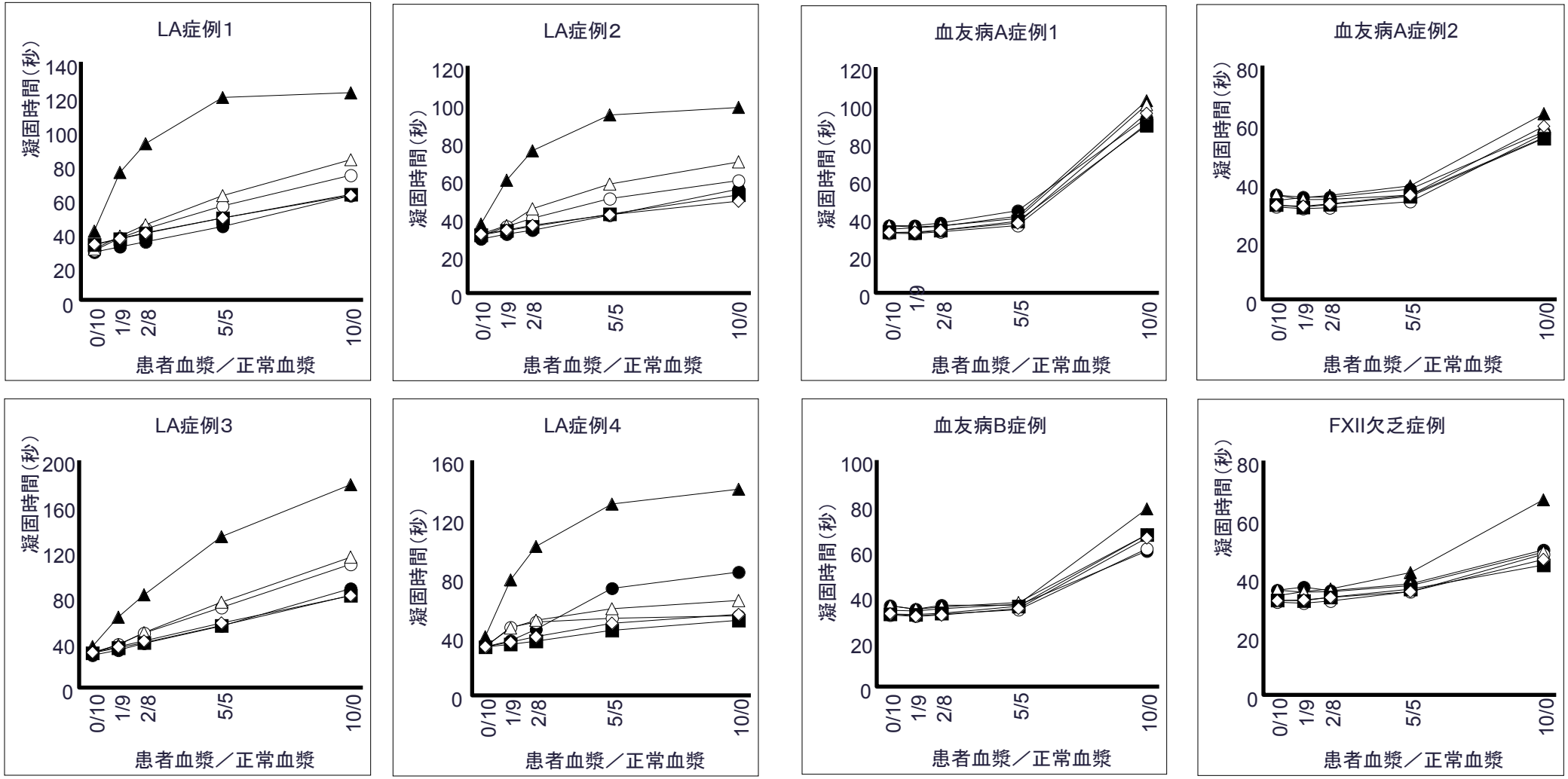
（内藤　澄悦、他：機器・試薬　35(6): 854-860, 2012. 一部改変して引用）

＊各試薬のコントロールから得た平均凝固時間に対する比で示した.
感度, 特異度, 有効度は全群に対するそれぞれの疾患群の値を示した.

クロスミキシングテストの結果

LA陽性血漿

凝固因子欠乏血漿



試薬1、 試薬2、 試薬3、 試薬4、 試薬5、 試薬6、

（内藤　澄悦、他：医療と検査機器・試薬　35(6): 854-860, 2012.）

S Naito：Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

2. APTT試薬

- 検査に用いているAPTT試薬の基本性能・特性の十分な理解.
- インヒビターの性状にあった感受性の高い試薬の選択.
- 特にLAではAPTT試薬の選択が判定に大きく影響する可能性が高い.

クロスミキシングテストの課題

1. 患者血漿と正常血漿の比率と測定ポイント数.
2. 最適な試薬の選択は？
3. 最適な血漿検体の調整は？
4. 正常血漿が標準化されていない.
5. 判定方法が明確でない.

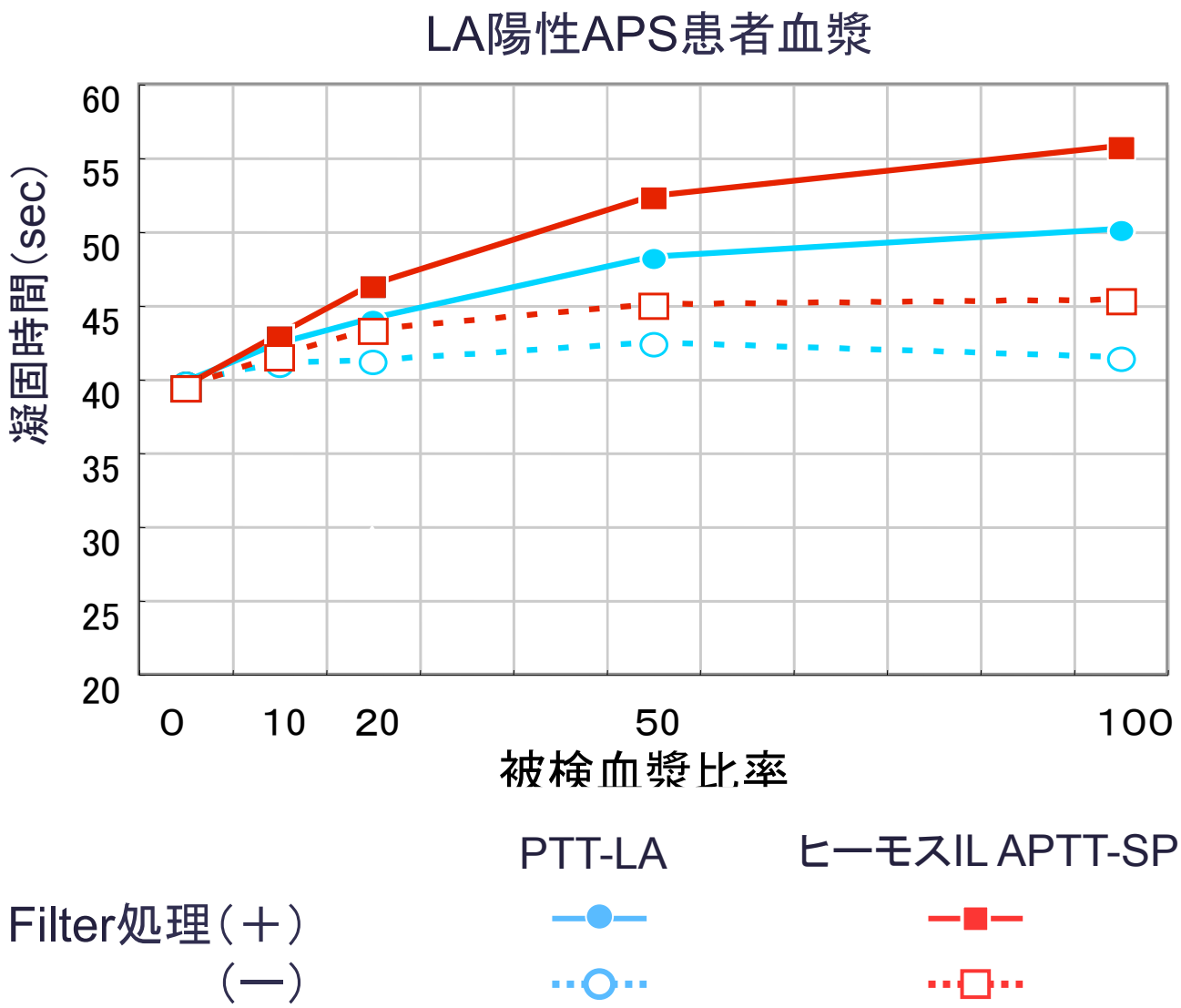
クロスミキシングテストにおけるサンプル採取法の注意点

LA活性とサンプル中混入血小板数

サンプル	異常な所見	LA試薬		
		PTT-LA	スタクロットLA	LAテスト「グラディポア」
健常人血漿（新鮮血漿）	有意な低下（vs. 0.3 × 10^4/μl） 逆転現象	7.0 × 10^4/μl以上 —	1.4 × 10^4/μl以上 7.0 × 10^4/μl以上	0.7 × 10^4/μl以上 7.0 × 10^4/μl以上
健常人血漿（凍結血漿）	有意な低下（vs. 0.3 × 10^4/μl） 逆転現象	7.0 × 10^4/μl以上 —	1.4 × 10^4/μl以上 1.4 × 10^4/μl以上	7.0 × 10^4/μl以上 2.8 × 10^4/μl以上
APS患者血漿（凍結融解血漿）	有意な低下（vs. 0.2 × 10^4/μl） 陽性 → 陰性	2.4 × 10^4/μl以上 —	1.2 × 10^4/μl以上 2.4 × 10^4/μl以上	1.2 × 10^4/μl以上 2.4 × 10^4/μl以上
許容できる混入血小板数		2.4 × 10^4/μl未満	1.2 × 10^4/μl未満	0.7 × 10^4/μl未満

（吉田　美香、他：医療と検査機器・試薬　35(6): 841-847, 2012. 一部改変して引用）

Filter処理および未処理血漿におけるクロスミキシングテスト



（内藤　澄悦、他：日本検査血液学会雑誌 11(1): 140-147, 2010. 一部改変して引用）

3. 被検血漿の調整

- 一回遠心処理：凝固採血管を1500G，15分間以上で遠心分離し，バフィーコートより5mmまでの上清を採取.
- 二重遠心処理：凝固採血管を1500G、15分間以上で遠心分離し血漿を分離したのち，再度1500G，15分間以上で遠心分離し採取.
- フィルター法：所定のフィルター（ポアサイズ0.22μm）を用いて残存血小板を除去する.

LA鑑別を考慮するならば残存血小板数を10,000/μl以下にする.

クロスミキシングテストの課題

1. 患者血漿と正常血漿の比率と測定ポイント数.
2. 最適な試薬の選択は？
3. 最適な血漿検体の調整は？
4. 正常血漿が標準化されていない.
5. 判定方法が明確でない.

4. 正常血漿

(A) <u>正常プール血漿</u>

いずれかの方法で処理した健常人のクエン酸Na加血漿を20名以上より採取し，プールし，正常（プール）血漿として用いる．保存は小分けし-70℃以下で凍結保存する．

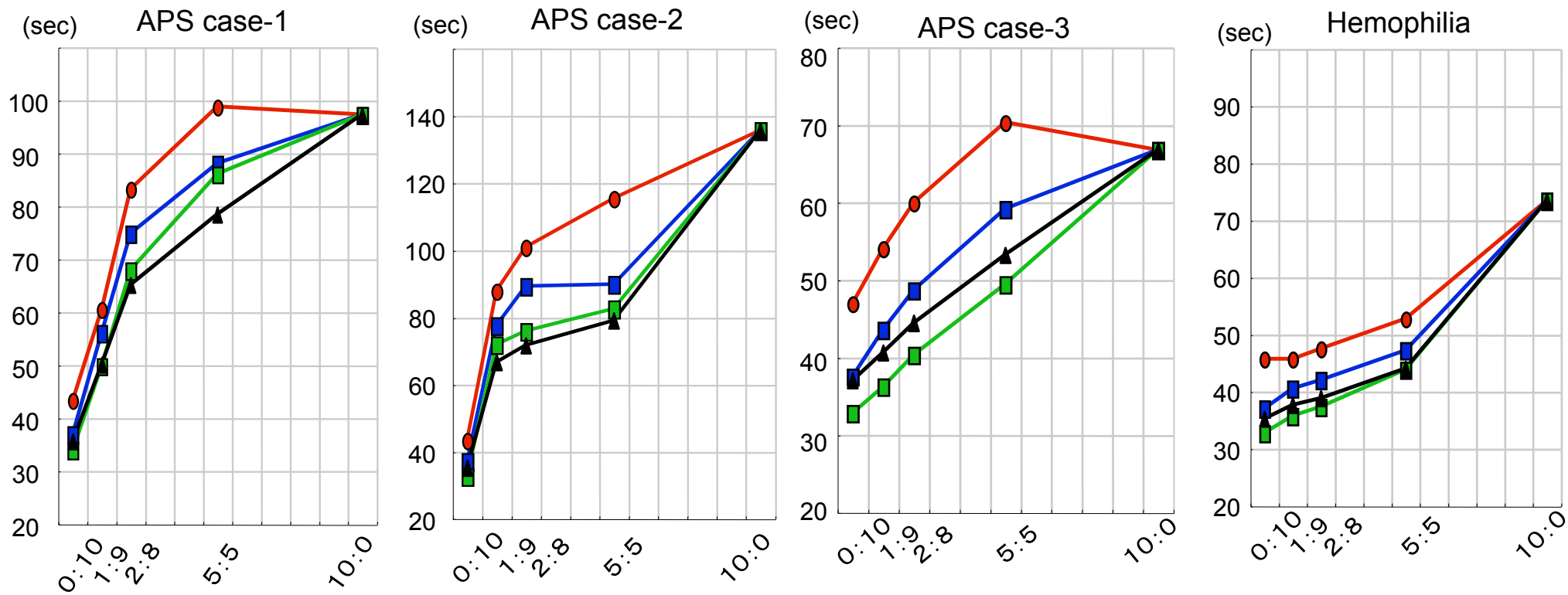
- 一回遠心処理：凝固採血管を1500G，15分間以上で遠心分離し，バフィーコートより5mmまでの上清を採取．
- 二重遠心処理：凝固採血管を1500G、15分間以上で遠心分離し血漿を分離したのち，再度1500G，15分間以上で遠心分離し採取．
- フィルター法：所定のフィルター（ポアサイズ0.22μm）を用いて残存血小板を除去する．

(B) 市販正常血漿

検査に適切なもの（自家製血漿と同様の条件を満たし，LA検査に有効であること）ならば，市販の凍結乾燥血漿もしくは凍結血漿を使用することも可．

LA鑑別を考慮するならば残存血小板数を10,000/μl以下にする．

クロスミキシングテストにおける種々の正常血漿の比較



（Pt：control）

正常血漿：自家製プール血漿，P社製，ST社製，SY社製

APTT試薬：PTT-LA

（内藤　澄悦、他：日本検査血液学会雑誌 11(1): 140-147, 2010. 一部改変して引用）

クロスミキシングテストの課題

1. 患者血漿と正常血漿の比率と測定ポイント数.
2. 最適な試薬の選択は？
3. 最適な血漿検体の調整は？
4. 正常血漿が標準化されていない.
5. 判定方法が明確でない.

クロスミキシングテストの判定方法

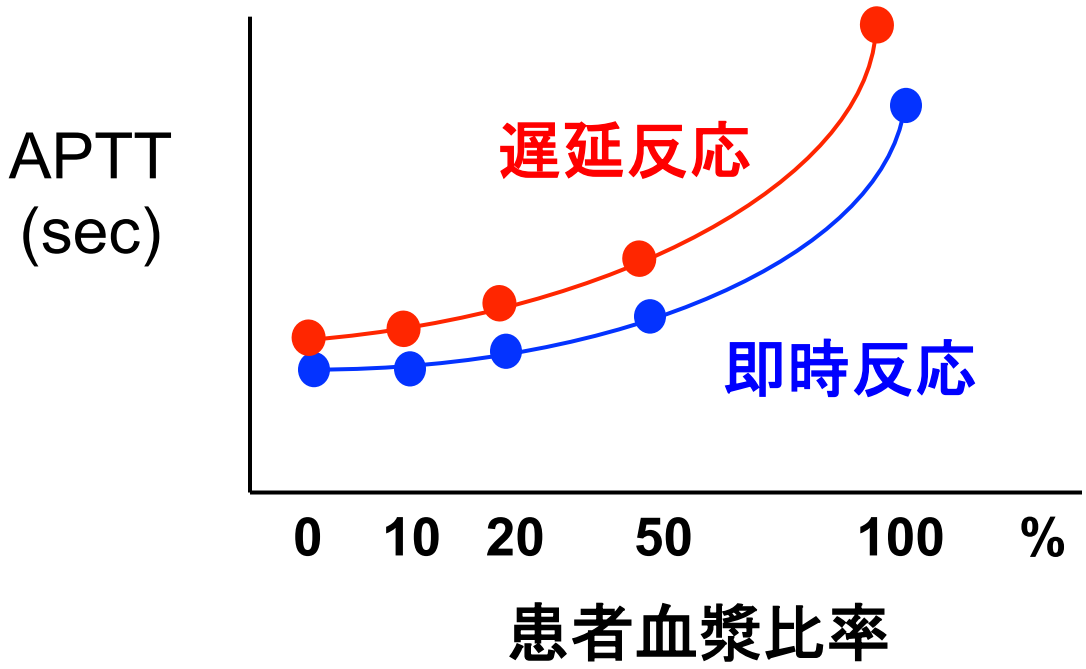
- 測定結果をグラフ化し，被検血漿比率0%と100%を結ぶ直線を基準として，それよりも「上に凸=インヒビター」あるいは「下に凸=凝固因子欠損」を視覚的に判断.

- ISTH-SSCではICA(Rosner　Index)を算出し，健常人の99パーセンタイルをカットオフ値として判断することを推奨.

血友病Aにおけるクロスミキシングテストの特徴

✓ 即時反応：第VIII因子活性の補正を反映し下に凸の曲線・・・
典型例な因子欠損パターン

✓ 遅延反応：インキュベーションしても下に凸の形状は変化なし.

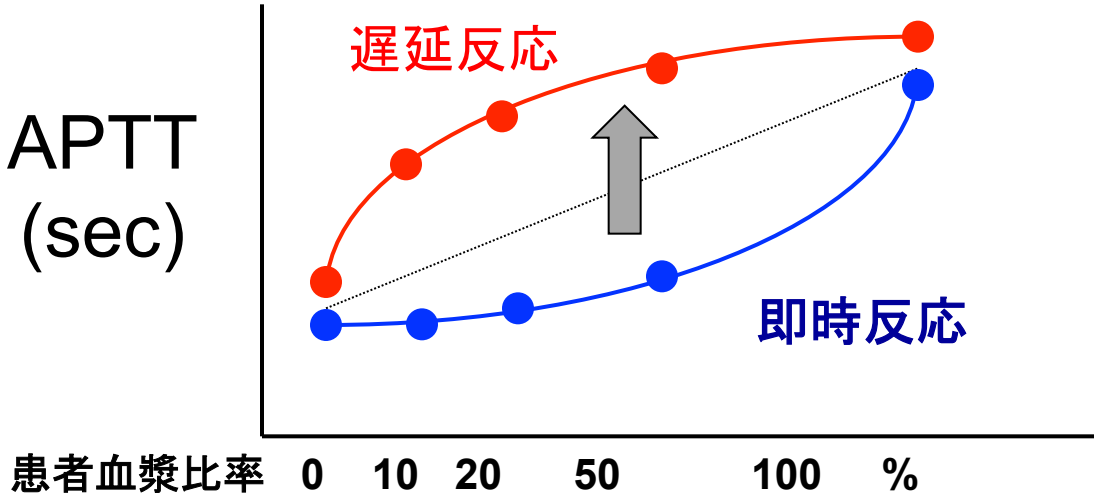


S.Naito：Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

後天性血友病におけるミキシングテストの特徴

✓ 即時反応：その時点で残存する第VIII因子活性を示す・・・
典型例では凝固因子欠損パターン

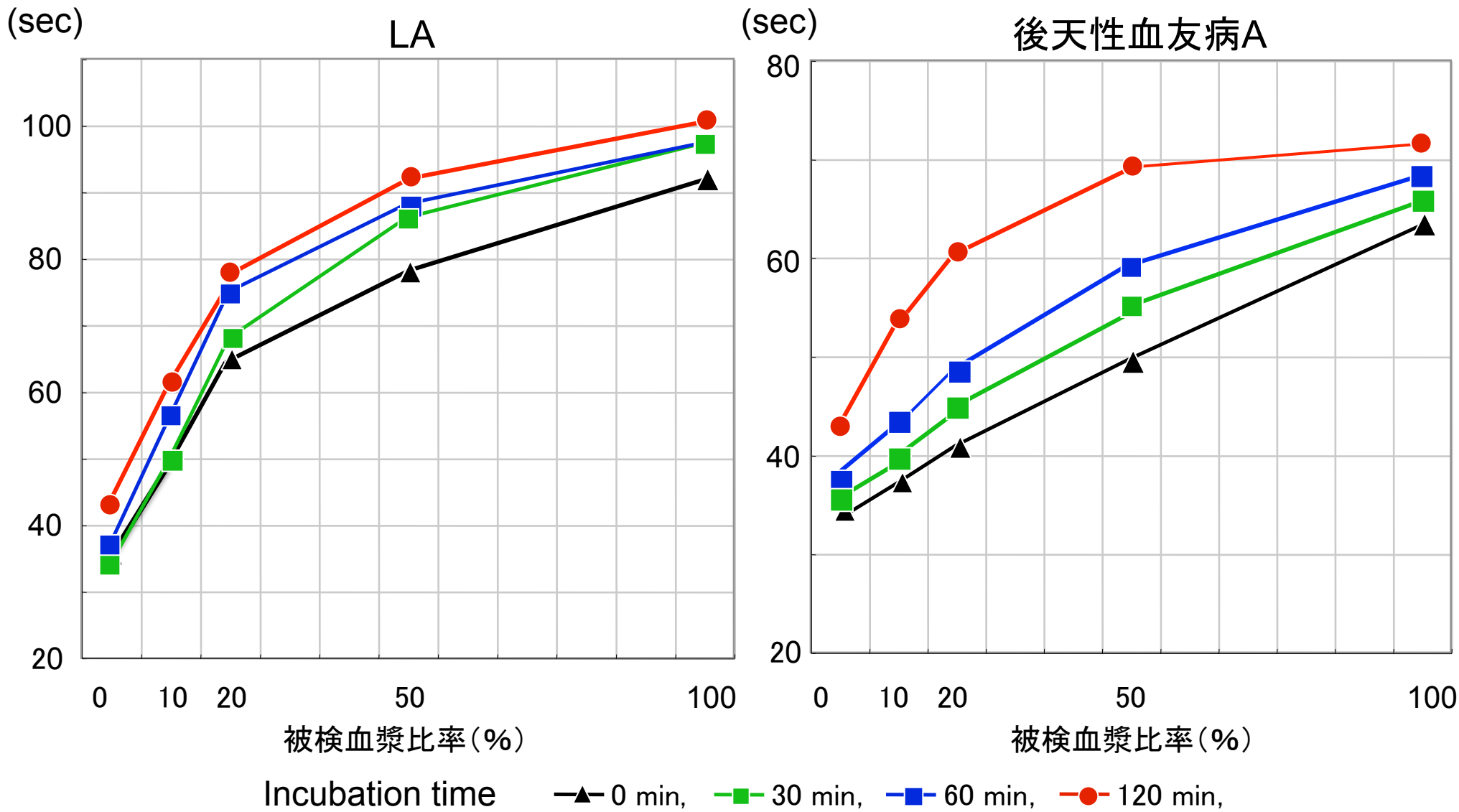
✓ 遅延反応：加温中にインヒビターが抗原である凝固第VIII因子に結合し，その活性基を阻害する・・・
典型例ではインヒビターパターン



＊加温2時間後の反応が**より上に凸**であることが必須条件

S.Naito：Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

加温時間の違いによるクロスミキシングテスト反応曲線の変化

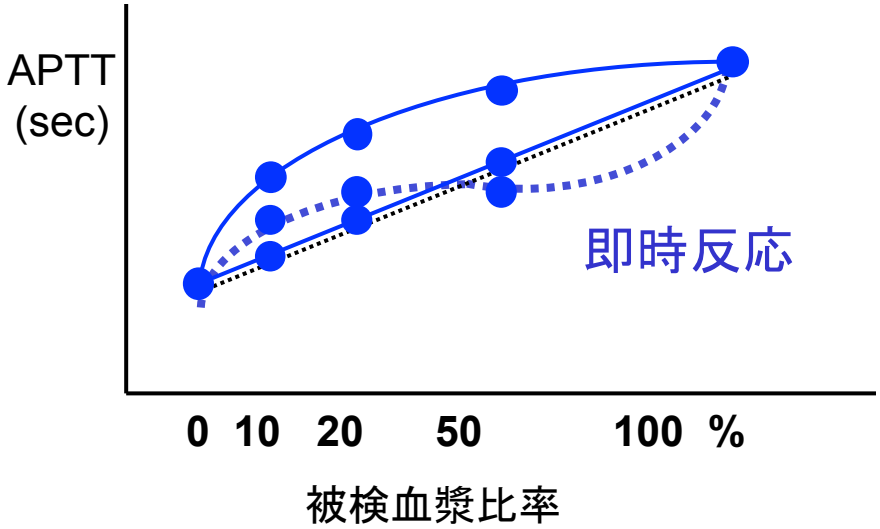


（家子　正裕：機器・試薬　35(6): 867-872, 2012. 一部改変して引用）

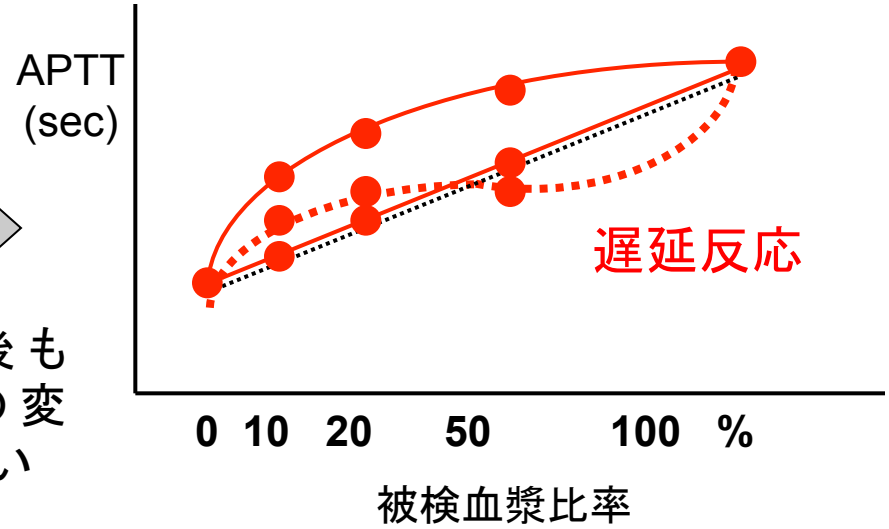
S Naito: Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

LAにおけるクロスミキシングテストの特徴

- ✓ 即時反応：上に凸あるいは直線
  - LA感受性の高いAPTT試薬ではきれいな<u>上に凸</u>の曲線
  - LA感受性の低いAPTT試薬では<u>直線</u>（下に凸はない）
  - LA＋凝固因子欠損では、<u>逆S字状</u>
  - 被検血漿比率は0，10，20，50，100%がベスト
- ✓ 遅延反応：2時間インキュベーションしても不変



加温後も形状の変化はない



S.Naito：Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

クロスミキシングテスト判定のまとめ

臨床症状	即時反応	遅延反応	判定
出血傾向/無症状	下に凸	下に凸*	凝固因子の欠乏
	下に凸	上に凸 直線	凝固因子インヒビター
	直線～ やや上に凸	さらに 上に凸	
血栓傾向/無症状	上に凸 直線	上に凸* 直線*	ループス アンチコアグラント

＊即時反応と同様の形状を示す.

S.Naito：Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

クロスミキシングテストの問題点における現状対応

1. 患者血漿比率およびポイント数は 0, 10, 20, 50, 100%の5ポイントがLAおよび凝固因子欠損の検出に有用かつ被検血漿の必要量を抑えられる.

2. APTT試薬の特性を理解して用いる. 特にLA検出においては試薬の感受性が異なり, その反応曲線の形状に影響し判断に苦慮する場合がある.

3. 正常(プール)血漿および患者血漿は, 残存血小板に注意し作製する*. 特にLA検出の考慮や凍結保存する場合は1万/μl未満とする.

4. 判定方法は, 現時点では視覚判定が望ましい.

＊ ミキシングテストにおける血漿の作製方法は一回遠心, 二重遠心およびフィルター処理などであるが, 1500G, 15分間以上の条件で遠心分離し, バフィーコートより5mmまでの上清の採取であれば一回遠心でも可能である.

S.Naito : Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido

おわりに

クロスミキシングテストは実施上の問題点も多く，その標準化も容易ではない．しかしながら，凝固因子欠損，凝固因子インヒビターそしてLAなどの鑑別診断に極めて有用な検査方法であり，APTTやPTの測定を行なっている施設であれば測定可能な検査である．

多くの検査室でクロスミキシングテストが施行され，多くの症例検討が蓄積されることで，より正確で利便性の高いクロスミキシングテストの方法が考案され，標準化につながるものと考えている．