

クロスミキシングテスト実施に あたり押さえておくべきポイント

大阪医科大学病院 中央検査部

柳谷 亮太

COI（利益相反）の開示

筆頭発表者名： 桜谷 亮太

- 本発表演題に関連して開示すべき
COI関係にある企業等はありません

背景

クロスミキシング試験（以下CMT）はループスアンチコアグラント（以下LA）をはじめとする凝固時間延長例の鑑別に有用である。一方、検査手順が標準化されておらず、結果の判定方法が明確でない、など課題も多い。

2021年12月時点の関西圏におけるCMTの院内実施率は53.4%（63/118）であり院内実施率の向上が望まれる。

APTTによるCMTは用いる試薬や正常血漿の選択によって
結果判定に誤差が生じることが知られている。

特にLA陽性検体では上記の影響を受けやすく、結果の判定
に苦慮することもある。

本講演では、LAパターンの結果判定に影響する要因と押さ
えておくべきポイントについて解説する。

CMT実施にあたり押さえておくべきポイント



- ① 検体と正常血漿の混合比率
- ② 2時間インキュベーションの方法
- ③ CMTにおける試薬の選択
- ④ CMTにおける正常血漿の選択

CMT実施にあたり押さえておくべきポイント



① 検体と正常血漿の混合比率

② 2時間インキュベーションの方法

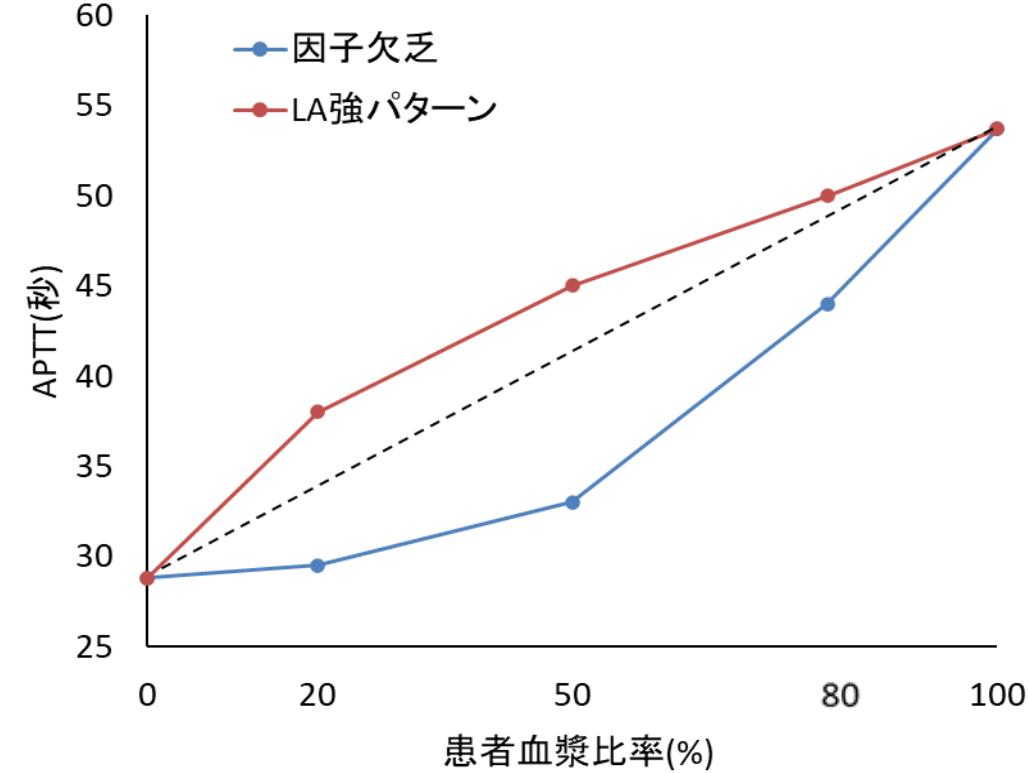
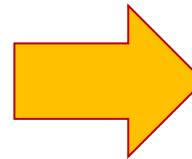
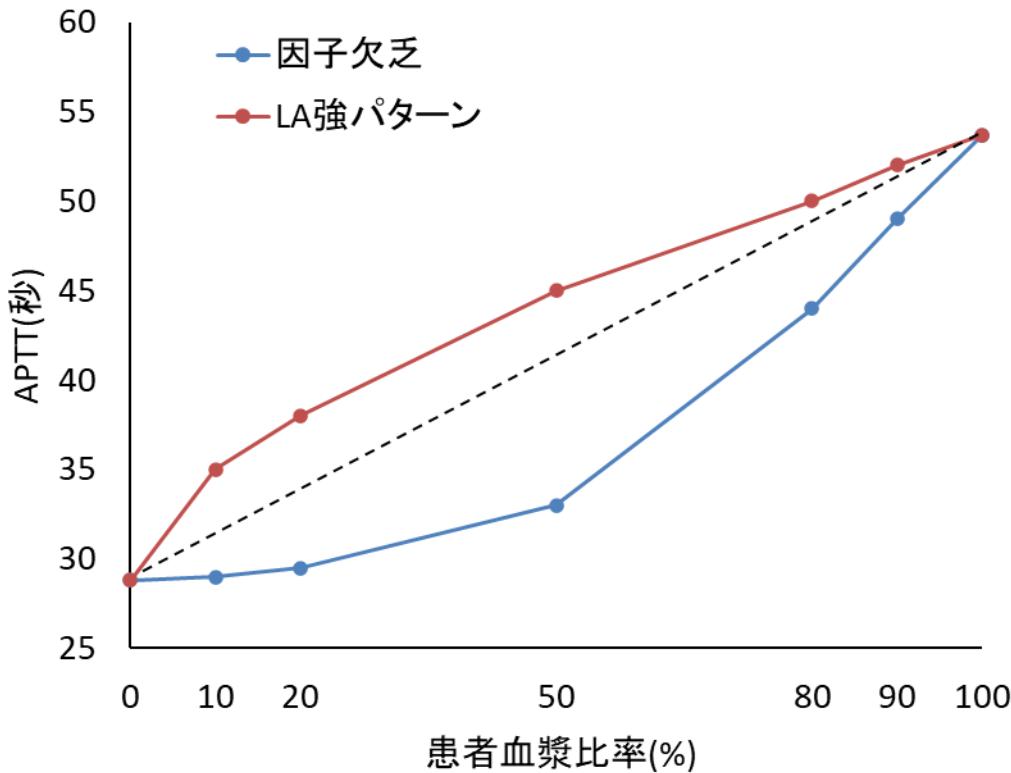
③ CMTにおける試薬の選択

④ CMTにおける正常血漿の選択

検体と正常血漿の混合比率

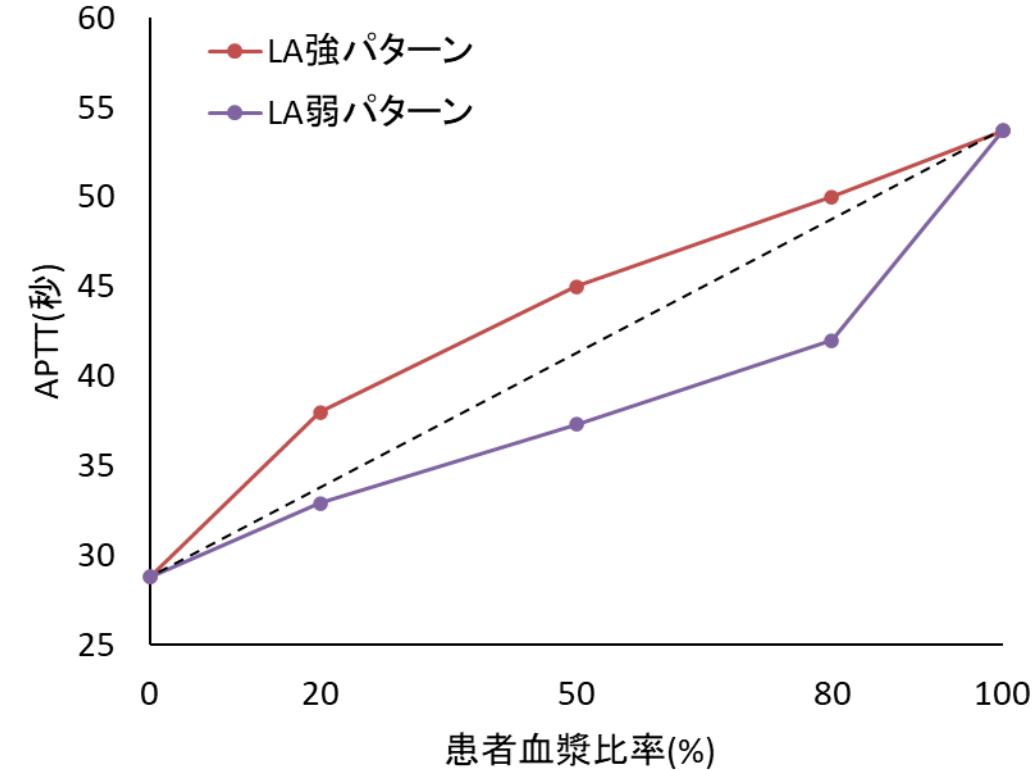
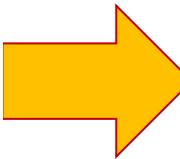
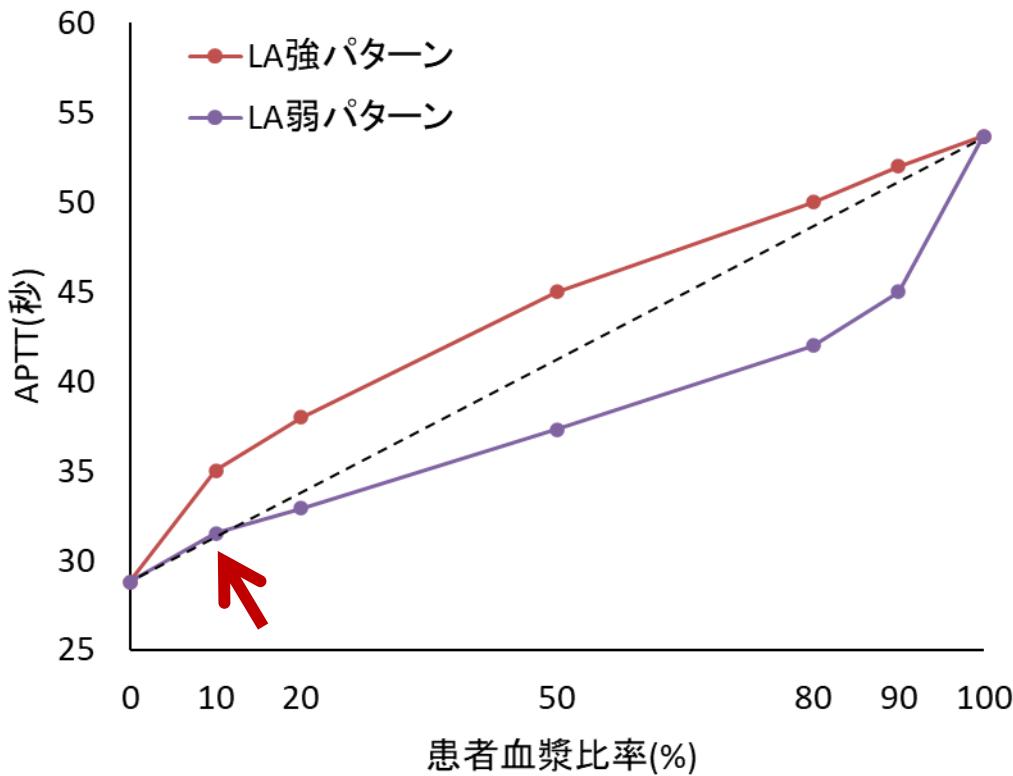
CMTにおける混合血漿の比率および測定ポイント数は標準化されていないが、LAの検出を目的とした場合、即時反応は患者血漿比率 0, 10, 20, 50, 100% の**5ポイント**遅延反応は患者血漿比率 0, 50, 100% の**3ポイント**で行うことが推奨されている。

混合比率の違いと波形パターンの違い（典型例）



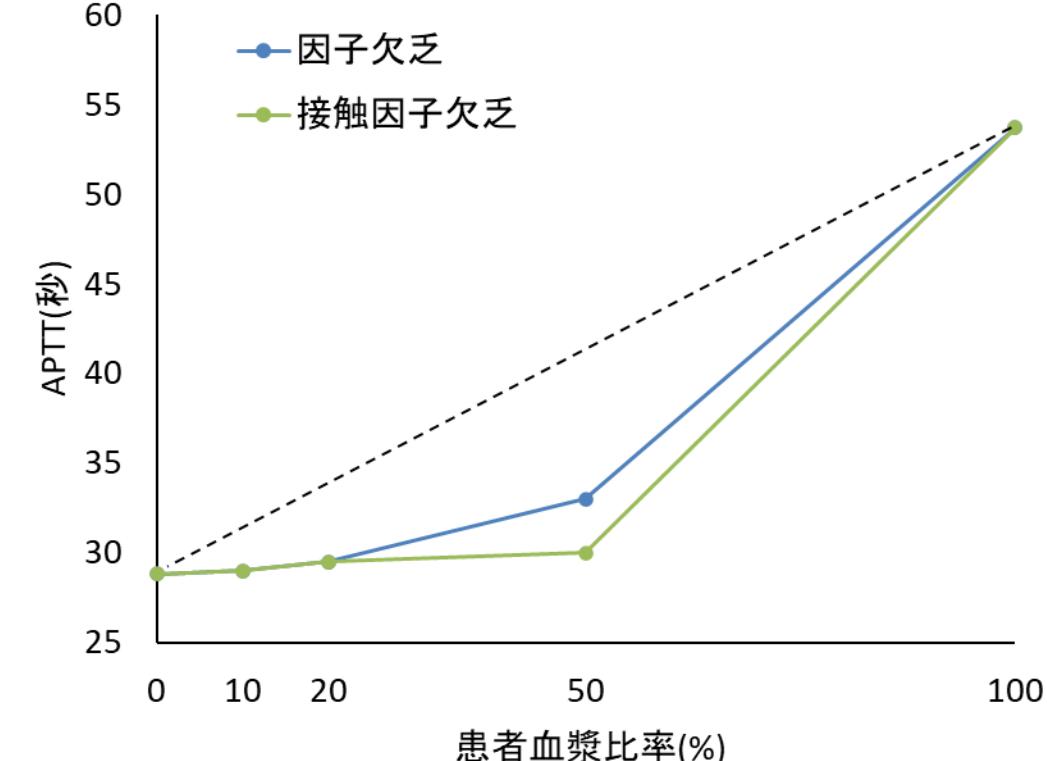
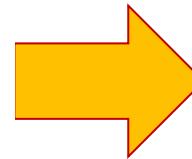
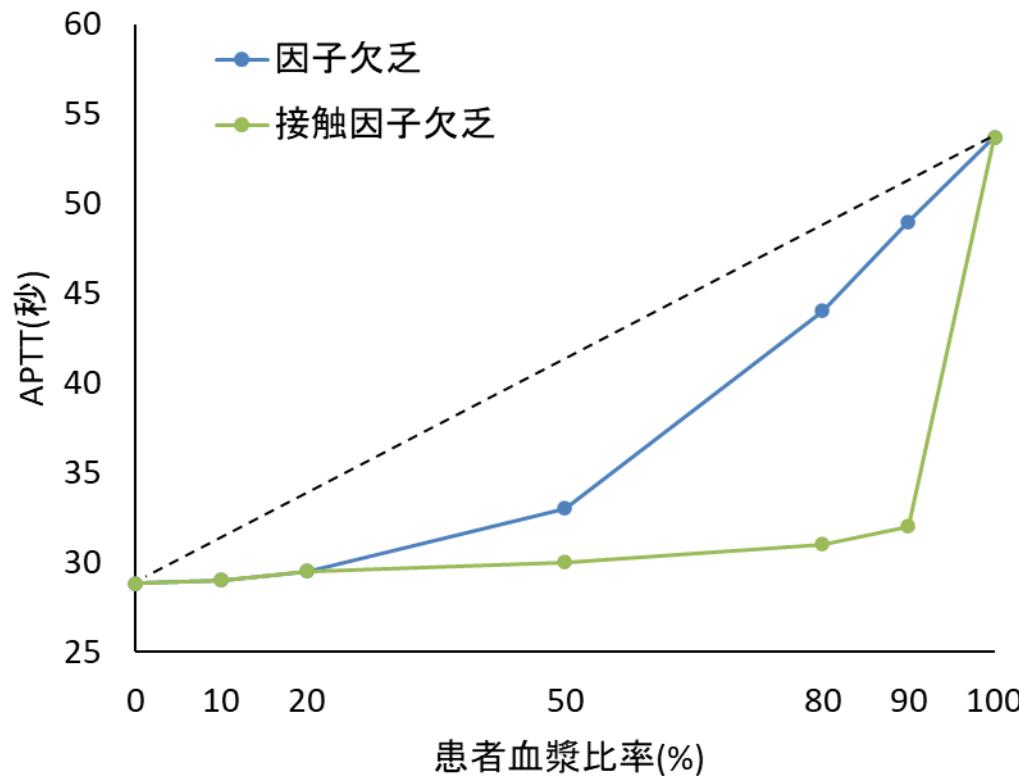
典型例では特に比率による差は認めない

混合比率の違いと波形パターンの違い（LA陽性例）



LA陽性例で10%の比率が鑑別に有用となる症例がある

混合比率の違いと波形パターンの違い（接触因子欠乏例）



80%や90%の比率が鑑別に有用となる症例がある

検体と正常血漿の混合比率

一方、凝固因子欠乏では、80%のポイントが有用となることが多いため、本セミナーでは即時反応では患者血漿比率が0, 10, 20, 50, 80, 100%の**6ポイント**で、遅延反応は患者血漿比率が0, 50, 100%の**3ポイント**でを行うことを推奨したい。



即時反応：0, 10, 20, 50, (80), 100%
遅延反応：0, 50, 100%

CMT実施にあたり押さえておくべきポイント



① 検体と正常血漿の混合比率

② 2時間インキュベーションの方法

③ CMTにおける試薬の選択

④ CMTにおける正常血漿の選択

2時間インキ

インキュベ
れている。
しており、
の原因であ
極力空気と

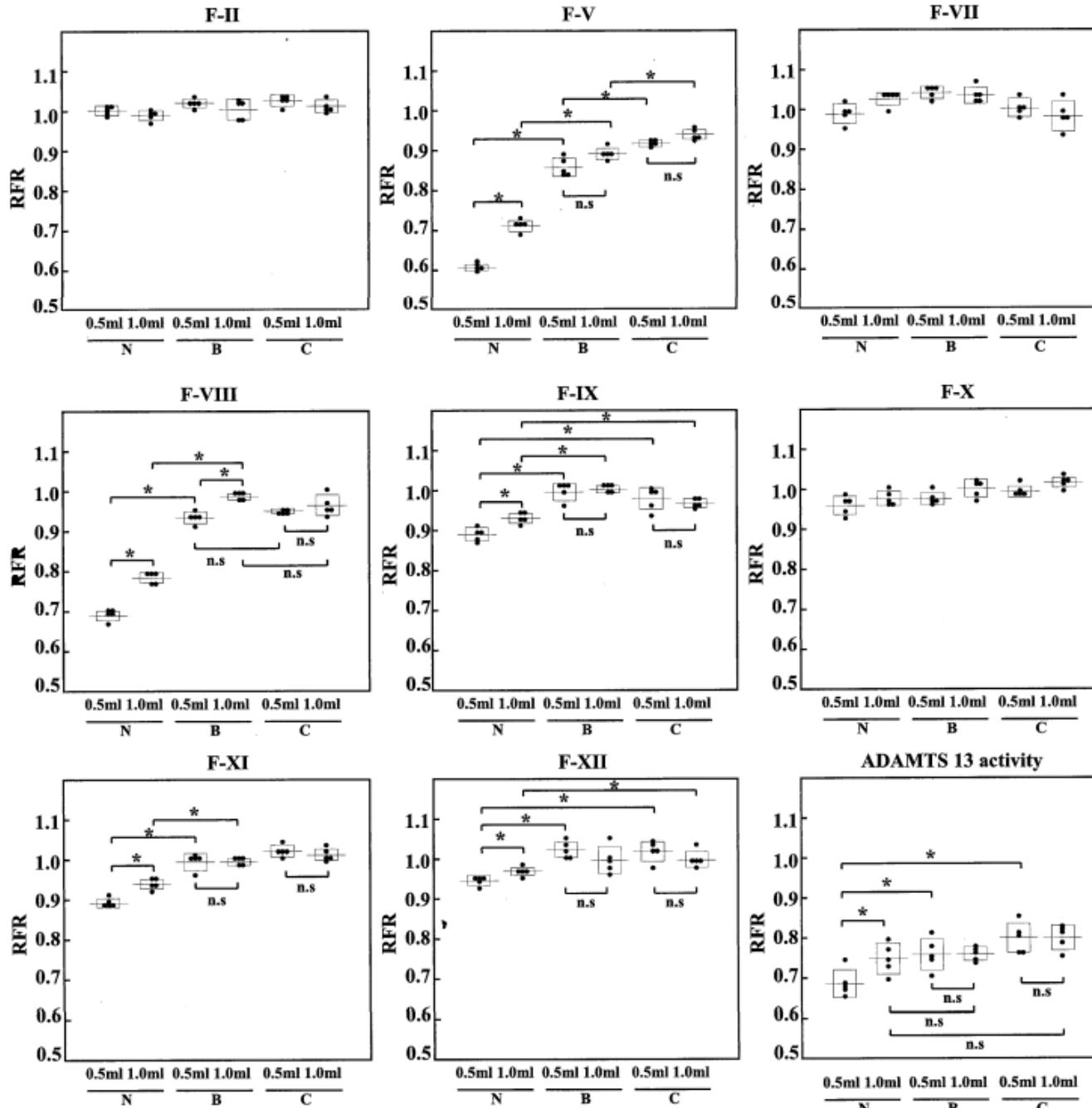


図 2. 37°C 2 時間加温後の凝固因子および ADAMTS13 活性安定化の検討

ことが報告さ
容積が関係
上昇が失活
を巻くなど
が望ましい

2時間インキュベート



空気を遮断してインキュベート

CMT実施にあたり押さえておくべきポイント



① 検体と正常血漿の混合比率

② 2時間インキュベーションの方法

③ CMTにおける試薬の選択

④ CMTにおける正常血漿の選択

APTTは試薬の組成、特に活性化剤の種類やリン脂質の濃度が大きく異なるため、凝固因子感受性やLA感受性などに対する感度・特異度による試薬間差が課題である。

特にLAにおける感受性の差は反応パターンや結果の解釈に影響を与える可能性があるため留意する必要がある。

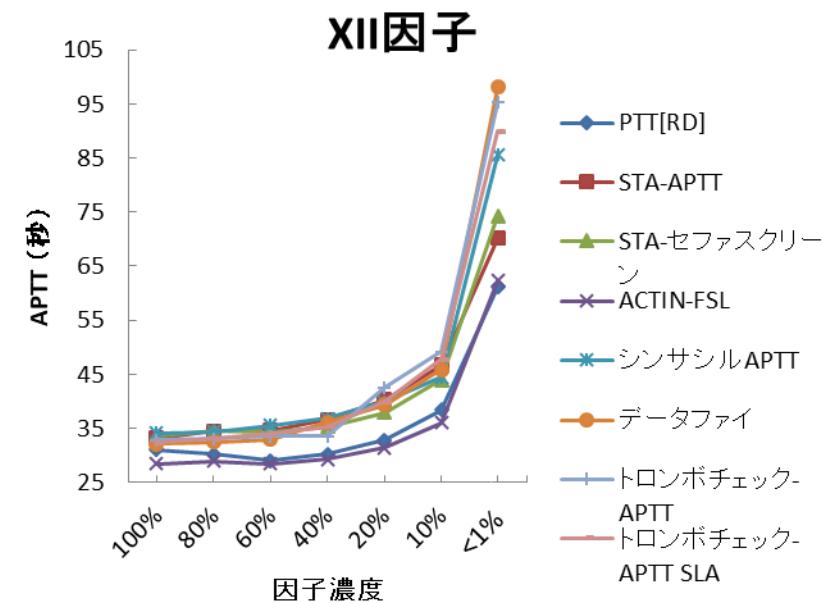
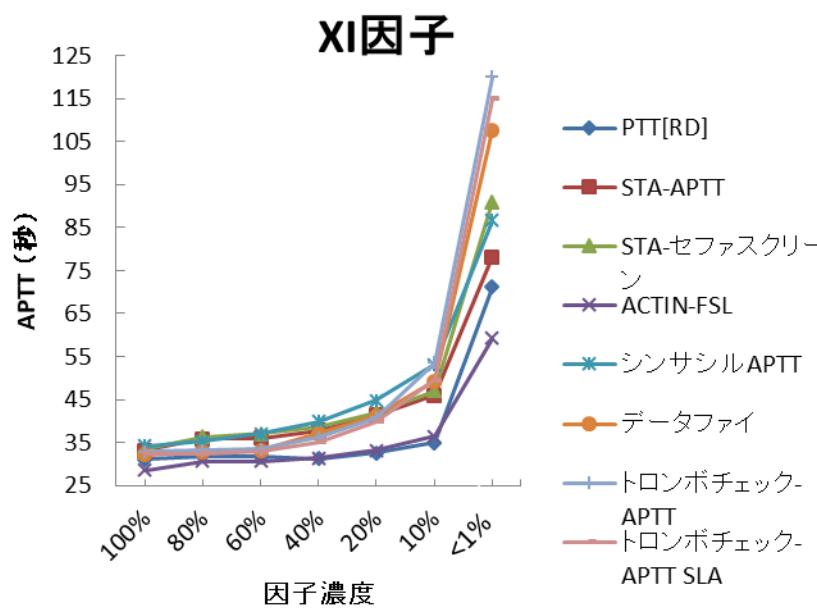
APTT試験

[F.VIII]

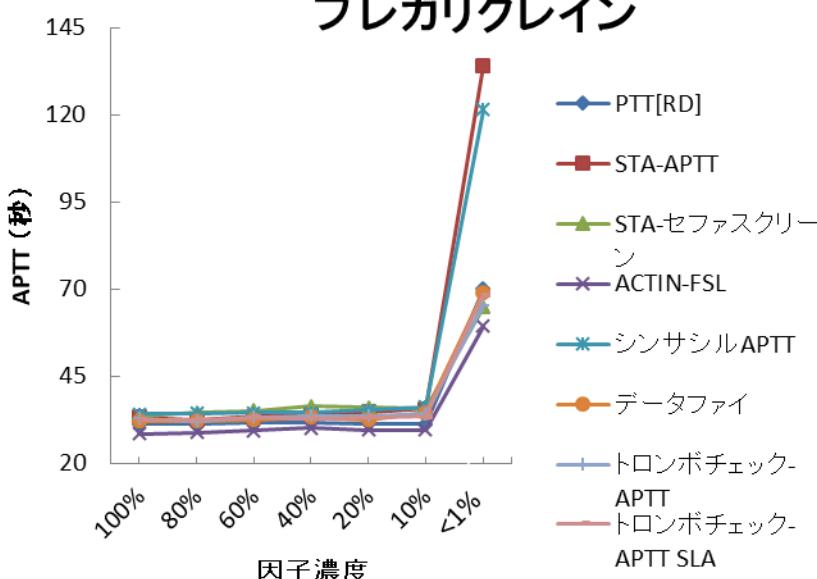
試薬用

[F.XII]

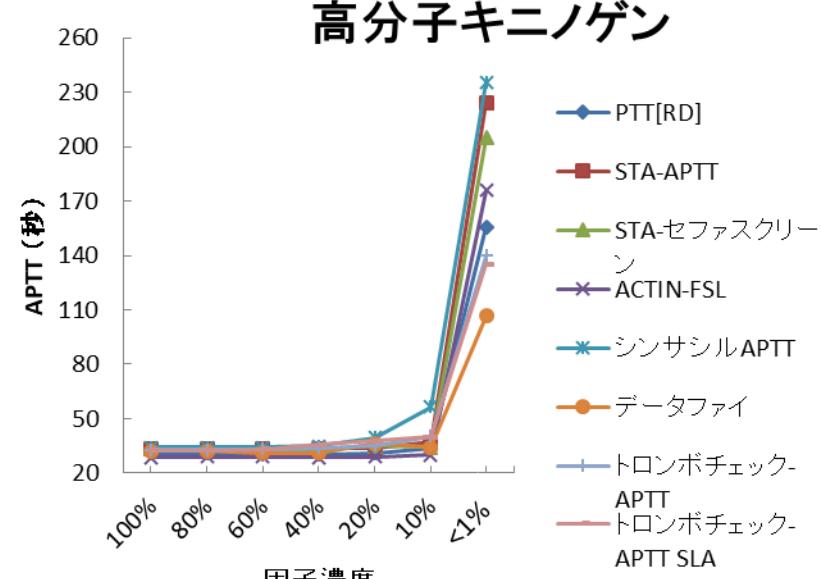
試薬用



プレカリクレイン



高分子キニノゲン



影響しない

APTT試薬のLA感受性



【LA】

® (ロシュ・ダイアグノスティックス)

APTT試薬	メーカー	感度(%)	特異度(%)
トロンボチェックAPTT	シスマックス	57.1	100.0
トロンボチェックAPTT-SLA	シスマックス	90.5	98.0
ヒモスアイエルAPTT SP	アイ・エル・ジャパン	100	100.0
ヒモスアイエルシンサシルAPTT	アイ・エル・ジャパン	85.7	98.0
APTT-EA	Trinity Biotech	28.6	96.0
APTT-P	Trinity Biotech	42.9	100.0

内藤澄悦.ループスアンチコアグラント検査におけるクロスミキシング試験の標準化に関する研究. 北海道医誌95(1),21-28. 2020 表2 引用・改変



CMT実施にあたり押さえておくべきポイント



- ① 検体と正常血漿の混合比率
- ② 2時間インキュベーションの方法
- ③ CMTにおける試薬の選択
- ④ CMTにおける正常血漿の選択

Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI)

ガイドラインでは**自家製プール血漿**が推奨されている。

- ・ 健常人20名以上から調整（男女比同等）
- ・ すべての凝固因子が80%以上
- ・ 血小板数が $10 \times 10^9 / L$ 未満
- ・ LA陰性

残余検体を用いる場合は倫理審査が不可欠



臨床検査を終了した既存試料（残余検体）の研究、業務、教育のための使用について
—日本臨床検査医学会の見解— 2021年改訂

2021年10月16日

一般社団法人日本臨床検査医学会

(2) 臨床検査を終了した既存試料（残余検体）の研究利用の際の手続き、とくにインフォームド・コンセント（IC）手続きが困難な場合について

自らの施設/機関において保有している臨床検査を終了した既存試料（残余検体）を研究目的に使
用する場合は、生命・医学系指針を遵守し、当該施設の倫理審査委員会の承認と施設/機関の許
可を得て使用する。即ち、文書による IC を受けることは必ずしも求められてはいないが、文書に
より IC を受けない場合には、口頭による説明とその記録を残すことが原則であり、それが困難で
ある場合には生命・医学系指針に基づく適切な手続に従うことによって、臨床検査を終了した既存
試料（残余検体）を利用ることができる。生命・医学系指針に基づく適切な手續とは、第4章第
8の1によれば、要点は以下の通りである（詳細は注釈24を参照）。

正常血漿には何を用いるべきか

Clinical and Laboratory Standards Institute's (CLSI)

ガイドラインでは**自家製プール血漿**が推奨されている。

- ・健常人20名以上から調整（男女比同等）
- ・すべての凝固因子が80%以上
- ・血小板数が $10 \times 10^9 / L$ 未満
- ・LA陰性

倫理面・操作面で
自施設による
調整は困難？

国際血栓止血学会学術標準化委員会（SSC）ガイドラインでは自家製プール血漿に加え、市販の凍結正常血漿および凍結乾燥正常血漿も使用可能であると記載されている。

- ・自施設で調整したプール血漿
- ・市販の凍結正常血漿
- ・市販の凍結乾燥正常血漿

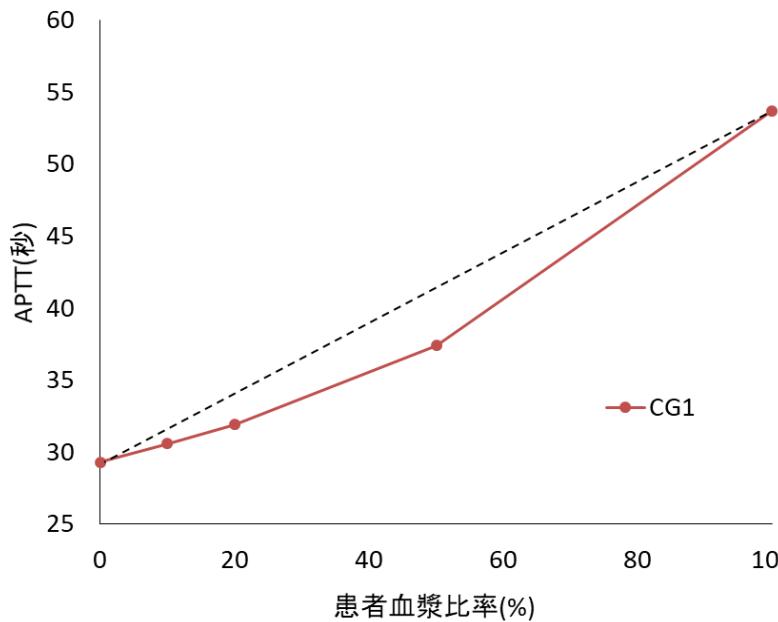
クロスミキシング試験の結果判定において、正常血漿の選択が最も影響するのは**低力価のLA陽性検体**を評価する場合であり、用いる正常血漿によって結果が乖離することも報告されている。



一部の市販の凍結（乾燥）正常血漿も使用可能

各正常血漿によるCMT結果（波形パターン）の比較

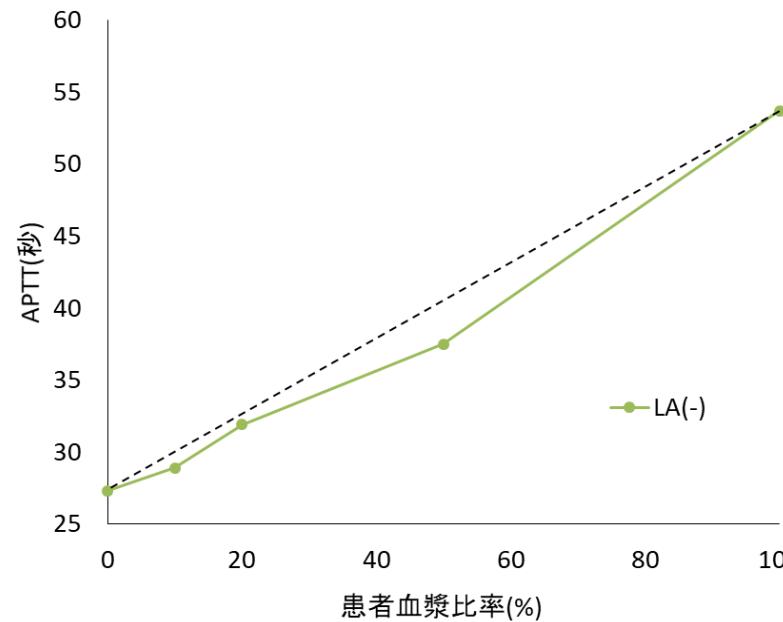
CG1



ICA : 15.08

ALD50 : 90.12

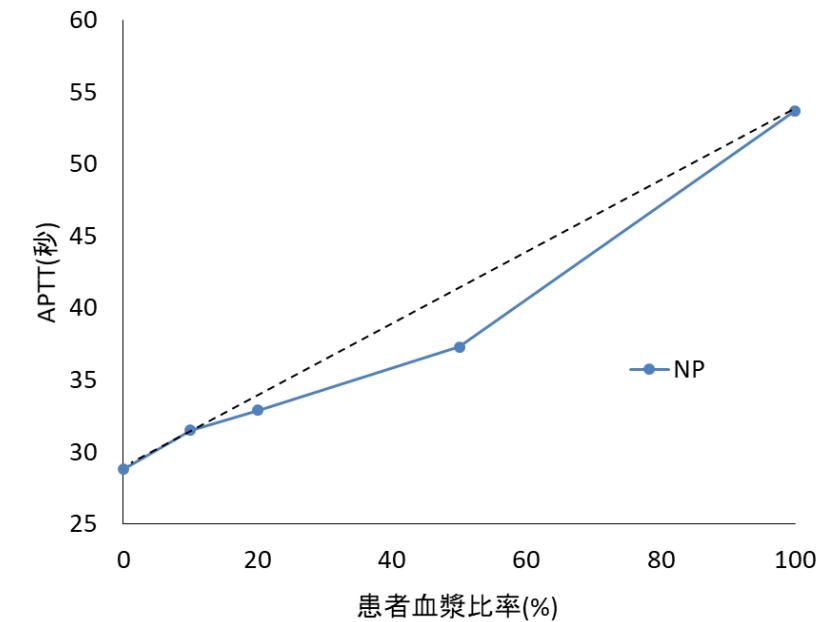
LA(-)



ICA : 18.99

ALD50 : 92.59

NP



ICA : 15.83

ALD50 : 90.42

CMT実施にあたり押さえておくべきポイント



① 検体と正常血漿の混合比率

即時反応：0, 10, 20, 50, 80, 100% 遅延反応：0, 50, 100%

② 2時間インキュベーションの方法

密閉容器にパラフィルムなどで空気を遮断する

③ APTT試薬の感受性

LA感受性の差によって反応パターンや結果判定に影響がでる

④ 正常血漿に何を用いるか

評価された一部の市販凍結（乾燥）正常血漿も使用可能

ご清聴ありがとうございました

