

凝固波形解析

涌井昌俊*

Clot waveform analysis

Masatoshi WAKUI

Key words: clot waveform analysis, clotting reaction curve, global coagulation assays, coagulation abnormality, anticoagulants

1. はじめに

最初の報告から20年以上経つ凝固波形解析 (clot waveform analysis: CWA) は、実用化に向けてまだ研究途上にある。本稿ではその概要、利点と課題、実際の研究例について概説する。

2. CWA とは

CWA は、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) やプロトロンビン時間 (PT) などの測定において、フィブリン生成に伴う検体の濁度の時間的変化の光学的検出に基づき作成される凝固反応曲線を、時間で逐次微分して得られる凝固波形とそれ由来するパラメータを利用する包括的凝固関連情報解析である (図1)¹⁾。トロンボエストグラフィ (TEG)、ローテーションアルトロンボエストメトリー (ROTEM)、トロンビン形成試験 (TGT) と比べると非生理的な凝固ではあるが、それらと違って専用の機器試薬を必要とせず、APTTやPTの自動分析の際に同時にデータが取得されるという利便性ゆえ、検査現場への導入には極めて有利である。横軸は時間、縦軸は濁度を表す吸光度または透過光量であるため、凝固反応曲線はフィブリン生成量を反映し、1次微分はフィブリン生成速度 (凝固速度) を、2次微分はフィブリン生成加速度 (凝固加速度) または生成

減速度 (凝固減速度) を反映することになる。透過光量を利用する機器によるCWAでは透過光量の減少が、吸光度を利用する機器によるCWAでは吸光度の増加がそれぞれフィブリン生成に相当する。どちらにせよ、フィブリン生成の方向を陽性とすれば混乱を回避できる。

得られた波形ピークの形状、ピークまでの時間 (ピーク時間)、ピークの高さ (ピーク値) に着目して解析を行う。これらのパラメータは検査試薬間差があり、異なる試薬を用いて得られた結果と単純には比較できない。ピーク値については、1次微分における最大値 (Max₁) は最大凝固速度に、2次微分における最大陽性値 (Max_{p2}) は最大凝固加速度に、最大陰性値 (Max_{n2}) は最大凝固減速度に相当する。

凝固抑制ならばピーク時間は延長、ピーク値は減少を呈するが、実際には前者の延長を伴わない後者の減少、または後者の減少を伴わない前者の延長というパターンがしばしば存在する。凝固反応曲線の高さは、基本的にフィブリノゲン濃度に比例する。このためフィブリノゲン濃度が異なる検体間では、凝固反応曲線の高さが違うゆえ当然逐次微分で得られるピーク値も異なる。そのような検体間差の影響を排除するべく、凝固反応曲線の高さを標準化してピーク値補正を行うことがある。しかし、フィブリノゲン濃度自体も凝固関連情報であると踏まえると、そのような補正が一律に最善とは言い難い。フィブリノゲン濃度の高濃度域や低濃度域では凝固反応曲線の高さが比例相関から逸脱することが知られている。さらに、抗凝固薬の使用、フィブリノゲン以外の凝固因子の異常でも凝固反応曲線の高さが変化する。このように、凝固反応曲線の高さの標準化の

*責任者連絡先:

慶應義塾大学医学部臨床検査医学

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

Tel: 03-3533-1211 (内線62558), Fax: 03-3359-6963

E-mail: wakuism@a6.keio.jp

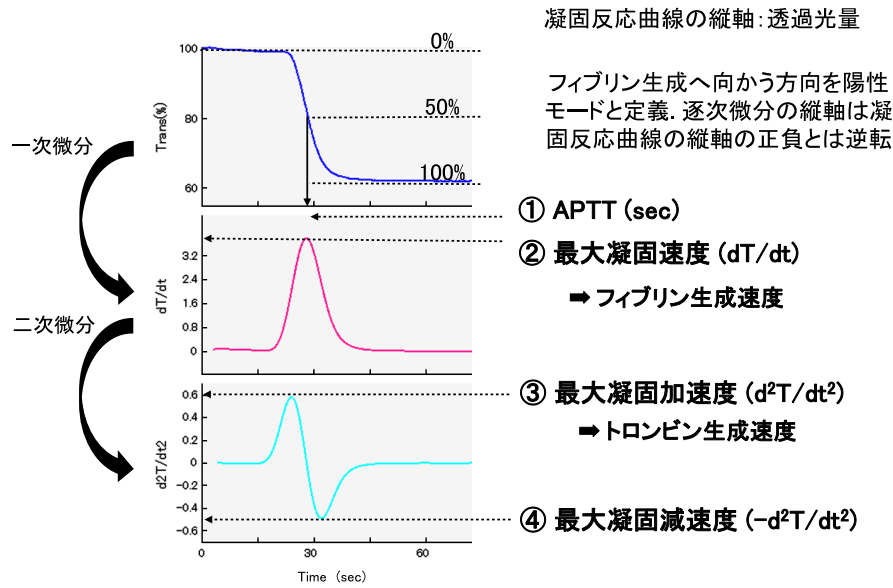


図1 APTT-CWAの概略

是非については引き続き検討すべき課題の1つである。

3. CWAの数理的解釈

フィブリン生成までの一連の凝固活性化経路はセリンプロテアーゼ反応の連鎖である。1つの反応の生成物（活性化凝固因子）は次の反応の酵素または補酵素となる。個々の反応の基質は恒常的に存在する凝固因子である。フィブリン生成速度（凝固速度）は当該酵素であるトロンビン生成量に比例する。さらに時間で微分して得られるフィブリン生成加速度（凝固加速度）はトロンビン生成速度に比例し、トロンビン生成を触媒するプロトロンビナーゼ（IIase）の生成量に比例する。IIaseは活性化凝固第V因子（FVa）との複合体として存在するFXaである。フィブリン生成加速度を時間で微分すれば（3次微分）、トロンビン生成加速度に比例し、トロンビン生成加速度はIIaseの生成速度に比例する（図2）²⁾。内因系におけるFXa生成速度は、それを触媒するXase（FVIIIaとの複合体として存在するFIXa）の生成量に比例する。このように酵素反応速度論的な考え方に則って、凝固反応曲線を時間で逐次微分することで下流から上流へ順次遡って、個々の凝固因子活性

化反応に数理的に解体することができる。

しかし、ここで若干の注意が必要である。Michaelis-Menten式に基づく教科書的な酵素反応速度論は、初濃度の酵素が与えられた単一の反応を前提としている。一方、APTTやPTの測定系に用いられる凝固活性化経路では、酵素、すなわち活性化凝固因子は最初には存在せず、時間経過とともに生成されるので、酵素濃度は定数ではなく時間に伴う変数である。したがって、CWAで得られるパラメータの値をそのままMichaelis-Menten式、Lineweaver-Burkプロット、Dixonプロットに代入するのは不適切である。凝固因子の活性化カスケードは、含まれる酵素反応の数だけ存在する連立微分方程式の解を体現しているのが凝固波形であり、最終的に凝固反応曲線となる³⁾。そのような考え方に則って、CWAは凝固活性化経路全体の結果から個々の凝固因子活性化反応へ数理的に解体する情報解析法であると見なすことができる。

4. CWAを用いた研究例

1) 凝固異常の病態解明

(1) DIC

初期の研究では微分をせずに凝固反応曲線を観察して、正常血漿では単純な逆シグモイド波形となるの

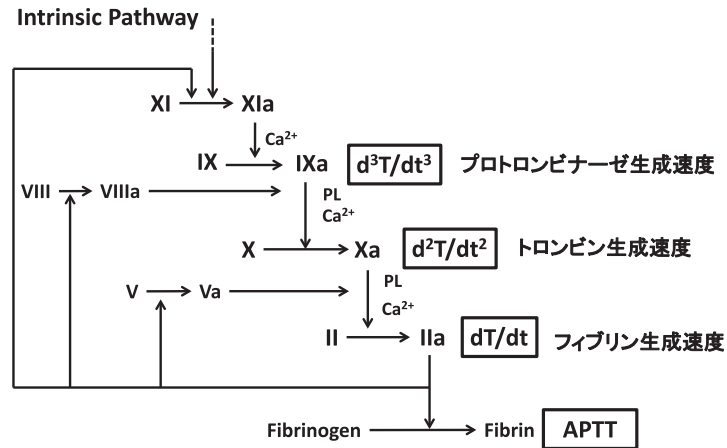


図2 凝固活性化経路を踏まえたCWAパラメータの意味付け
PL: Phospholipid.

に対し、播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation: DIC) では特徴的な二相性の波形が出現することが報告された⁴⁾。Downey らの検討では、DIC 症例における二相性波形の感度と特異度はともに約 98%であった⁵⁾。APTT が正常である敗血症患者の一部でも観察されることから、DIC の早期診断マーカーとしての有用性が注目された。その後、逐次微分で得られるパラメータも駆使した DIC の早期診断、重症度分類、転帰予測への CWA の応用が検討されている⁶⁾。

(2) 凝固因子異常

先天性および後天性の凝固因子異常について、CWA を利用した種々の研究が報告されている⁷⁻⁹⁾。FVIII 活性および FIX 活性の測定限界は概ね 1 IU/dL であるが、CWA を利用することで 1 IU/dL 未満の微量 FVIII 活性を評価できる^{7,8)}。FVIII 活性が 1 IU/dL 未満のため重症血友病 A と診断されている症例の中には、臨床症状に乏しく、CWA のパラメータでは 10 IU/dL 相当であるものが含まれることが報告されており、FVIII 活性測定値よりも CWA パラメータの方が臨床的重症度を反映することが示唆された⁹⁾。

FVIII 製剤に代わり、FIXa と FX にバイスペシフィックに結合し FX 活性化をもたらす抗体医薬エミシズマブが血友病 A の新たな治療薬として登場した。Nogami らは CWA を利用したエミシズマブ治療のモニタリング法を開発した¹⁰⁾。

(3) 異常フィブリノゲン血症

Clauss 法の凝固反応曲線について CWA を行い、得られるパラメータの所見と Clauss 法によるフィブリノゲン測定値を組み合わせることで異常フィブリノゲン血症のスクリーニングを可能にするアプローチが最近報告された^{11,12)}。このように、APTT や PT だけではなく Clauss 法の凝固反応曲線における CWA も有用である。

(4) その他の病態・疾患

蛇毒、肝硬変、川崎病等における凝固異常についても CWA による検討が報告されている¹³⁻¹⁵⁾。最近では COVID-19 症例を対象に検討が行われ、CWA におけるピーク値の増加により過凝固が示唆される結果が複数のグループから報告されている^{16,17)}。Tan らは Dengue 熱についても検討し、対照的に凝固低下と出血性を示唆する結果を得ている¹⁸⁾。Fan らは、軽症の COVID-19 では CWA をはじめ凝固関連検査のいずれについても過凝固所見が観察されなかったことを報告した¹⁹⁾。

2) 抗凝固薬の特性解明

(1) 直接トロンビン阻害薬および直接 FXa 阻害薬の *in vitro* 抗凝固効果の評価

筆者らは直接トロンビン阻害薬 2 剤 (ダビガトランとアルガトロバン)、ならびに直接 FXa 阻害薬 3 剤 (いずれも DOAC であるリバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン) を対象に、添加血漿を用

いてAPTT測定におけるCWA (APTT-CWA)を実施した(図3)²⁰⁾。いずれの薬剤についても、各ピーク最大値の濃度依存性減少とともに、トロンビンポジティブフィードバックの阻止が観察された。また、用量反応曲線として注目すると、各薬剤ともHillプロットで直線となる曲線性が認められた。直線の傾きの絶対値はHill係数、直線のX切片は、50%阻害濃度(IC₅₀)の対数にそれぞれ相当する。Hill係数は用量反応曲線の急峻度を定量的に表現しており、IC₅₀前後の濃度の変動に伴う阻害率の変化の大小を反映する(図4)。CWAの各ピーク最大値の濃度依存性減少に関するHill係数は、直接トロンビン阻害薬2剤ではともに1より大きく、直接FXa阻害薬3剤ではいずれも1またはそれより小さかった。CWAではなくTGTを用いて抗凝固薬の*in vitro*薬理特性をHill係数で評価した報告もあるが、トロンビンによる蛍光生成を阻害して検出自体に干渉してしまう可能性がある直接トロンビン阻害薬については、CWA

を利用するのが妥当である²¹⁾。

(2) 間接抗凝固薬の*in vitro*効果の評価

アンチトロンビンに依存して効果を発揮する間接抗凝固薬の3剤、未分画ヘパリン、低分子ヘパリン、フォンダパリヌクスについてもAPTT-CWAを用いて検討した²²⁾。これらはアンチトロンビンと複合体を形成し、標的の活性化凝固因子との間の共有結合を介して不可逆的の阻害をもたらす。それを反映するように、或る濃度に達するとCWAの各ピーク値は漸近ではなくゼロに達する様相を呈した。また、波形そのものに注目すると、1次微分のピークの山は左右対称であり、非対称を呈するアンチトロンビン非依存性抗凝固薬である直接トロンビン阻害薬や直接FXa阻害薬とは対照的であった。2次微分の陽性ピーク値と陰性ピーク値の関係性がその対称性を規定することに注目し、抗凝固物質がアンチトロンビン依存性か非依存性かを推測できる定量的指標を提案した。

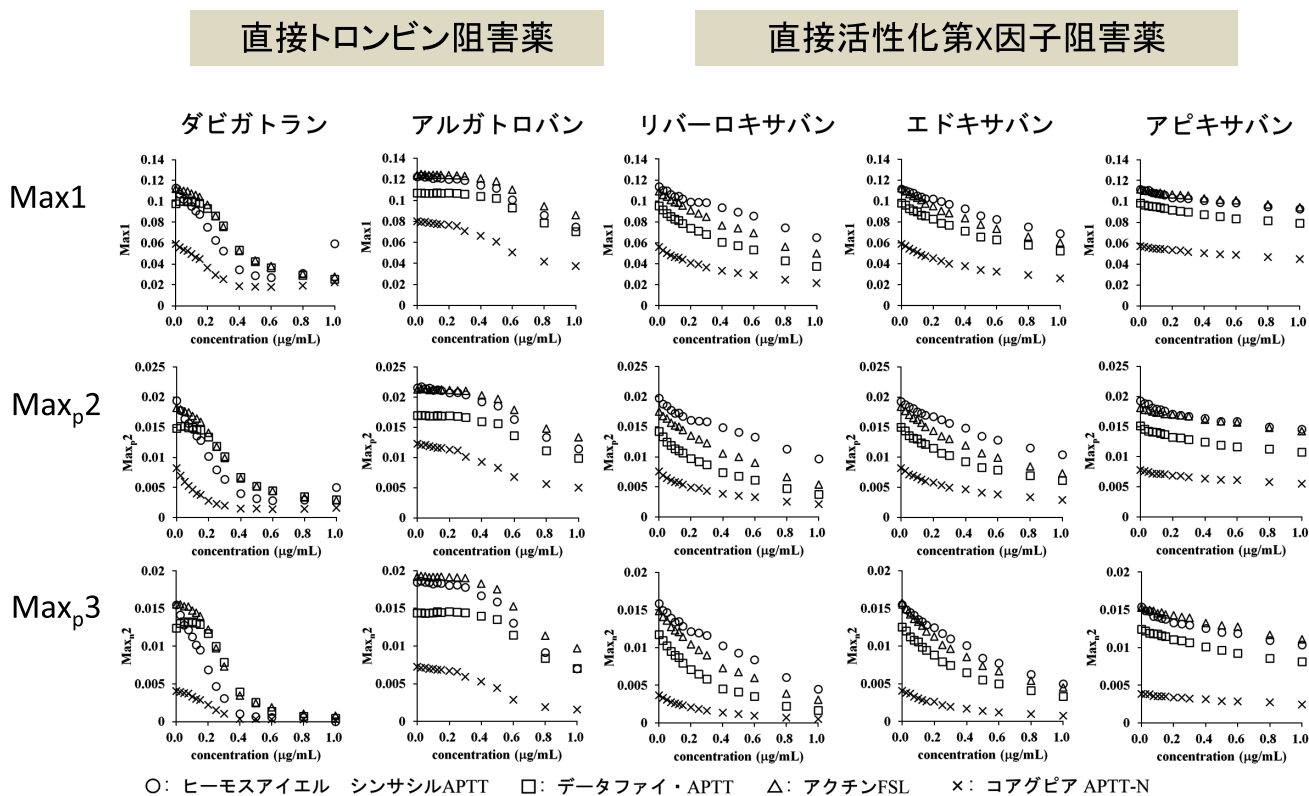


図3 直接トロンビン阻害薬およびFXa阻害薬における最大1次微分陽性値(Max₁), 最大2次微分陽性値(Max_{p2}), 最大3次微分陽性値(Max_{p3})の薬剤濃度依存的減少
Wakui M *et al.* 2019²⁰⁾ より改変引用

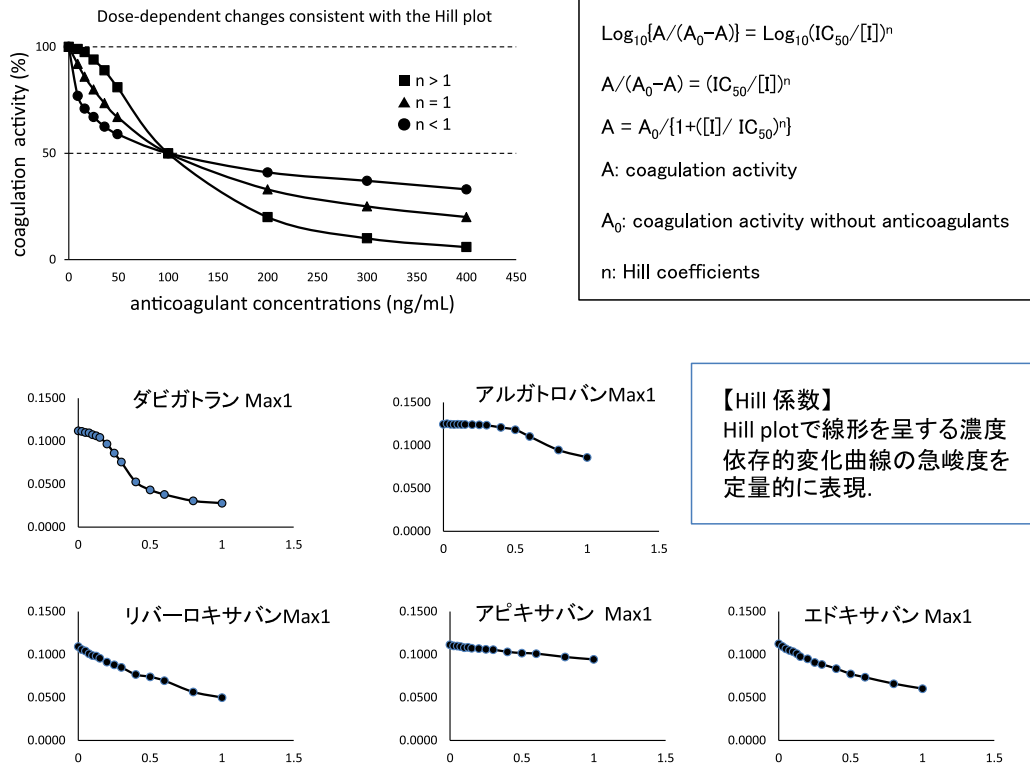


図4 Hill plot 解析が適用される様相を呈する CWA パラメータの薬剤濃度依存的変化

5. CWA の応用形としての凝固線溶波形解析 (clot-fibrinolysis waveform analysis: CFWA)

CWA の系に組織プラスミノゲン活性化因子 (t-PA) の添加を導入することで凝固に続く線溶を惹起し、濁度変化として光学的に検出される凝固線溶反応曲線を微分して得られる凝固線溶波形を利用すれば、APTT や PT の系を流用して簡便に線溶を評価でき、出血異常の病態解明の応用が期待できることが最近報告された²³⁾。凝固線溶反応曲線の 1 次微分でフィブリン生成方向に対する陽性のピークの出現の後に陰性のピークが出現し、それぞれ最大凝固速度、最大線溶速度を表す。プラスミン阻害薬であるトラネキサム酸は凝固時間や最大凝固速度には影響せず、線溶時間を延長し、最大線溶速度を低下させた。一方、トロンビン阻害薬であるアルガトロバンは凝固時間を延長し最大線溶速度を低下させただけでなく、最大線溶速度を上昇させ、線溶促進が示唆された。

筆者らは、DOAC の線溶への影響に関する検討へ

の CFWA を利用して DOAC の線溶への影響について検討し、ダビガトランとリバーロキサバンについては低濃度域では最大線溶速度が低下し線溶抑制が観察されたが、高濃度域では逆に最大線溶速度が上昇し線溶促進が観察された。このように、薬剤濃度によって異なる影響が CFWA によって示唆された²⁴⁾。

6. 微量組織因子による CWA

微量の組織因子の存在下では FVIIa は FX ではなく FIX の活性化を惹起し、いわゆる細胞基盤凝固経路の活性化をもたらすので、APTT に反映される内因系や PT に反映される外因系よりも生理的状況に近い凝固反応による CWA が可能となる²⁵⁾。

7. おわりに

CWA は APTT や PT などの測定における凝固反応曲線の逐次微分による包括的凝固情報解析手法であり、様々な凝固異常や抗凝固薬の研究に応用されて

いる。専用の機器試薬が必要な TEG, ROTEM, TGT と異なり, CWA は凝固時間ベースのルーチン検査の際に自動的にデータを取得できるという利便性がある。凝固異常や抗凝固効果のスクリーニングへの実用化に向けて, 今後の発展が大いに期待される。

著者の利益相反 (COI) の開示 :

研究費 (受託研究, 共同研究, 寄付金等) (ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社)

文献

- Shima M, Thachi J, Nair SC, et al.: Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost* **11**: 1417–1420, 2013.
- Siegemund T, Scholz U, Schobess R, et al.: Clot waveform analysis in patients with haemophilia A. *Hamostaseologie* **34** (Suppl 1): S48–S52, 2014.
- Kogan AE, Kardakov DV, Khanin MA: Analysis of the activated partial thromboplastin time test using mathematical modeling. *Thromb Res* **101**: 299–310, 2001.
- Downey C, Kazmi R, Toh CH: Novel and diagnostically applicable information from optical waveform analysis of blood coagulation in disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol* **98**: 68–73, 1997.
- Downey C, Kazmi R, Toh CH: Early identification and prognostic implications in disseminated intravascular coagulation through transmittance waveform analysis. *Thromb Haemost* **80**: 65–69, 1998.
- Suzuki K, Wada H, Matsumoto T, et al.: Usefulness of the APTT waveform for the diagnosis of DIC and prediction of the outcome or bleeding risk. *Thromb J* **17**: 12, 2019.
- Matsumoto T, Shima M, Takeyama M, et al.: The measurement of low levels of factor VIII or factor IX in hemophilia A and hemophilia B plasma by clot waveform analysis and thrombin generation assay. *J Thromb Haemost* **4**: 377–384, 2006.
- Shima M, Matsumoto T, Ogiwara K: New assays for monitoring haemophilia treatment. *Haemophilia* **14** (Suppl 3): 83–92, 2008.
- Yada K, Nogami K, Wakabayashi H, et al.: The mild phenotype in severe hemophilia A with Arg1781His mutation is associated with enhanced binding affinity of factor VIII for factor X. *Thromb Haemost* **109**: 1007–1015, 2013.
- Nogami K, Matsumoto T, Tabuchi Y, et al.: Modified clot waveform analysis to measure plasma coagulation potential in the presence of the anti-factor IXa/factor X bispecific antibody emicizumab. *J Thromb Haemost* **16**: 1078–1088, 2018.
- Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, et al.: Clot waveform analysis in Clauss fibrinogen assay contributes to classification of fibrinogen disorders. *Thromb Res* **174**: 98–103, 2019.
- Arai S, Kamiyo T, Kaido T, et al.: Automated screening procedure for the phenotypes of congenital fibrinogen disorders using novel parameters, |min1|c and Ac/|min1|c, obtained from clot waveform analysis using the Clauss method. *Clin Chim Acta* **521**: 170–176, 2021.
- Abraham SV, Rafi AM, Krishnan SV, et al.: Utility of clot waveform analysis in Russell's viper bite victims with hematotoxicity. *J Emerg Trauma Shock* **11**: 211–216, 2018.
- Ruberto MF, Sorbello O, Civolani A, et al.: Clot wave analysis and thromboembolic score in liver cirrhosis: Two opposing phenomena. *Int J Lab Hematol* **39**: 369–374, 2017.
- Yoshizawa H, Noogami K, Matsumoto T, et al.: Dynamic evaluation of hemostasis in the acute phase of Kawasaki disease using comprehensive coagulation functional assays. *Thromb Res* **174**: 76–83, 2019.
- Tan CW, Tan JY, Wong WH, et al.: Clinical and laboratory features of hypercoagulability in COVID-19 and other respiratory viral infections amongst predominantly younger adults with few comorbidities. *Sci Rep* **11**: 1793, 2021.
- Shimura T, Kurano M, Kanno Y, et al.: Clot waveform of APTT has abnormal patterns in subjects with COVID-19. *Sci Rep* **11**: 5190, 2021.
- Tan CW, Wong WH, Cheen MHH, et al.: Assessment of aPTT-based clot waveform analysis for the detection of haemostatic changes in different types of infections. *Sci Rep* **10**: 14186, 2020.
- Fan BE, Ramanathan K, Sum CLL, et al.: Global haemostatic tests demonstrate the absence of parameters of hypercoagulability in non-hypoxic mild COVID-19 patients: A prospective matched study. *J Thromb Thrombolysis* (Online ahead of print) 2020. doi: 10.1007/s11239-021-02575-4.
- Wakui M, Fujimori Y, Katagiri H, et al.: Assessment of in vitro effects of direct thrombin inhibitors and activated factor X inhibitors through clot waveform analysis. *J Clin Pathol* **72**: 244–250, 2019.
- Chang JB, Quinnes KM, Realubit R, et al.: A novel, rapid method to compare the therapeutic windows of oral anticoagulants using the Hill coefficient. *Sci Rep* **6**: 29387, 2016.
- Wakui M, Fujimori Y, Nakamura S, et al.: Characterisation of antithrombin-dependent anticoagulants through clot waveform analysis to potentially distinguish them from antithrombin-independent inhibitors targeting activated coagulation factors. *J Clin Pathol* **74**: 251–256, 2021.
- Nogami K, Matsumoto T, Sasai K, et al.: A novel simultaneous clot-fibrinolysis waveform analysis for assessing fibrin formation and clot lysis in haemorrhagic disorders. *Br J Haematol* **187**: 518–529, 2019.
- Oka S, Wakui M, Fujimori Y, et al.: Application of clot-fibrinolysis waveform analysis to assessment of in vitro effects of direct oral anticoagulants on fibrinolysis. *Int J Lab Hematol* **42**: 292–298, 2020.
- Wada H, Shiraki K, Matsumoto T, et al.: Effects of platelet and phospholipids on clot formation activated by a small amount of tissue factor. *Thromb Res* **193**: 146–153, 2020.