

凝固波形解析(CWA)と凝固線溶波形解析(CFWA)の原理と応用

松本智子^{1*}, 下村大樹²

Description of the principles and applications of clot waveform analysis (CWA) and clot fibrinolysis waveform analysis (CFWA)

Tomoko MATSUMOTO, Daiki SHIMOMURA

要約：凝固波形解析 (clot waveform analysis: CWA) は自動凝固分析装置を用いた凝固機能評価法として発展している。CWA はプロトロンビン時間 (prothrombin time: PT) や活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT) の“凝固時間”のみならず、装置内で解析した結果を画面に表示することができ、汎用性が高いため、臨床検査室で凝固異常症の迅速な鑑別ができる。近年、CWA が出血性疾患だけでなく、血栓傾向を示す疾患に有用だと報告された。今後は、波形による鑑別の精度向上が課題である。一方、APTT による凝固反応の後、フィブリン溶解過程を評価できる凝固線溶波形解析 (clot fibrinolysis waveform analysis: CFWA) が登場した。CFWA は、間接的に凝固のみならず線溶能や線溶抑制効果を反映する画期的な方法で、血中の凝固・線溶バランスを評価することができる。CFWA は出血症状のみならず、血栓傾向や線溶亢進・抑制を半定量的に判断できる。臨床症状を反映する汎用性の高い検査法として今後、実用化に向けた努力が必要である。

Key words: automated coagulation analyzer, clot waveform analysis, activated partial thromboplastin time, clot fibrinolysis waveform analysis

1. はじめに

凝固機能は、全血を用いた ROTEM など POCT (point of care testing) が救急や手術室における出血予測の迅速診断法として活用される^{1,2)}。しかし、コストや再現性に課題がある。一方、血漿を用いた凝固機能評価法として、1990年代より国内外でトロンビン生成試験が広まった。トロンビン生成試験は、組織因子 (TF) / リン脂質 (PL) 存在下で Ca とトロンビン基質を用いることにより、フィブリン形成の1段階上流の反応過程を評価できる。その反面、一般的な検査室で測定するには、手技の煩雑さ、測定時

間ならびに専用装置の限定などの課題がある³⁾。その後、1990年代後半には自動凝固分析装置による凝固波形解析 (clot waveform analysis: CWA) が開発された⁴⁾。約10年前には国際血栓止血学会 (ISTH) の標準化委員会 (SSC) で、プロトロンビン時間 (prothrombin time: PT) や活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT) による CWA を用いた血友病の診断および治療のモニタリングを中心に凝固波形解析に関する標準化について提言された⁵⁾。それにより、汎用性の高い凝固機能評価法として注目されている。さらに、野上らは、凝固能のみならず線溶能を包括的に評価できる凝固線溶波形解析 (clot fibrinolysis waveform analysis: CFWA) を開発した⁶⁾。CFWA は CWA と同様に汎用性の高い新たな病態解析ツールである。今回、主に本邦における CWA ならびに CFWA の現状とその原理と応用について概説したい。

¹ 天理医療大学医療学部臨床検査学科

² 天理よろづ相談所病院臨床検査部

*責任者連絡先:

天理医療大学医療学部臨床検査学科
〒632-0018 奈良県天理市別所町 80-1
Tel: 0743-63-7811, Fax: 0743-63-6211
E-mail: t.matsumoto@tenriyoroze-u.ac.jp

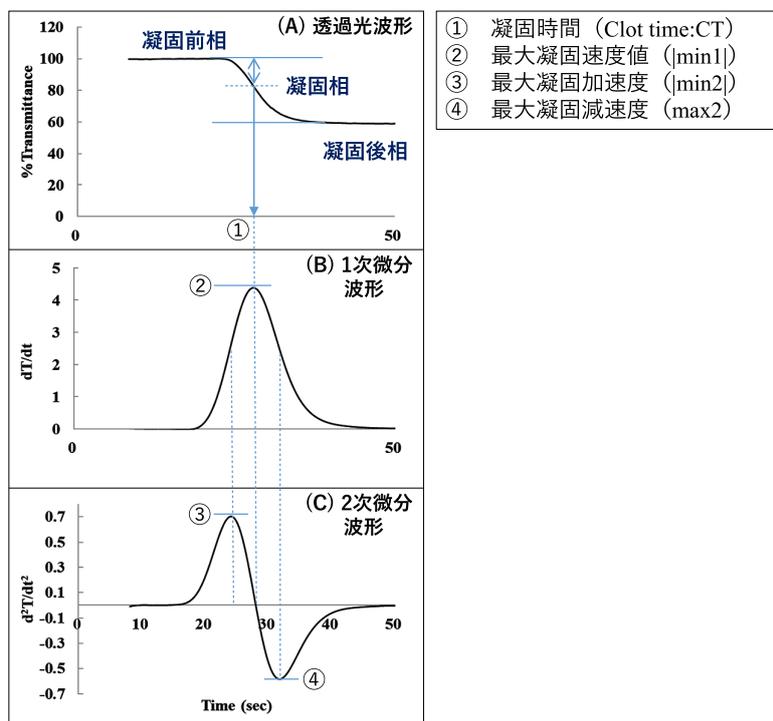


図1 凝固波形解析 (clot Waveform Analysis: CWA) と各パラメータ

自動凝固分析装置を用いた APTT-CWA の波形を示す。横軸は時間、縦軸は上段：透過光率 (%transmittance)、中段： dT/dt 、下段： d^2T/dt^2 を示す。APTT による $CaCl_2$ 添加後より、凝固の全過程をモニタリングでき、凝固開始までの凝固前相・凝固相・その後の凝固後相の 3 相を観察できる。図はシスメックス社の CWA で凝固時間は 50% 透過率が低下するポイントで算定される。1 次微分波形の最大値は最大凝固速度値 ($|min1|$)、2 次微分の最大値は最大凝固加速度 ($|min2|$)、逆向きのピークを最大凝固減速度 ($max2$) などのパラメータを算定する。

2. CWA と各パラメータ

臨床検査において、PT および APTT は凝固スクリーニング検査として最も汎用性が高い。これらは、フィブリン形成における可溶性フィブリンモノマー形成時点までの時間を測定する。自動凝固分析装置による CWA は、フィブリンが形成する変化を透過光あるいは散乱光で測定し、その変化量に 1 次微分あるいは 2 次微分波形の演算処理を加えることにより、凝固時間のみでは得られない情報を定量的にモニタリングすることが可能である⁷⁾。APTT による CWA (APTT-CWA) は血漿と APTT 試薬反応後の $CaCl_2$ 添加時より約 8 秒後を基準とし、フィブリン形成するまでの前凝固相 (図 1-A)、波形が最も急峻に変化するフィブリン形成過程 (凝固相) フィブリン形成後のプラトーな波形 (後凝固相) の各相を観察

できる (図 1-A)。いわゆる PT/APTT である“凝固時間”は、各社の自動凝固分析装置により捉える方法が異なる。CWA は凝固時間のみならず、1 次分波形の最大値が最大凝固速度値 (図 1-B)、さらに、2 次微分波形の最初のピーク値が最大凝固加速度値、2 つめの変化ピーク値が最大凝固減速度値 (図 1-C) などの各種パラメータが得られる⁸⁾。それらパラメータは各社のそれぞれの特徴を有し、さらに独自のパラメータを算定できる装置もある。

3. 国内各社における自動凝固分析装置の現状

Evrard J らは CWA における最適な波長は、内在性、外因性、共通の凝固経路のそれぞれをつかさどる PT, APTT, トロンビン時間, 希釈ラッセル毒蛇時間などの試薬を使用して評価され、その感度と特

異性が最も高い波長および装置間のベースラインの吸光度から設定された。凝固血漿は非凝固血漿に比し吸光度が有意に高値を示した結果などから、CWAを実施するには、650 nm以上の波長が推奨され、市販されている試薬のほとんどがCWAに使用可能であると報告された⁹⁾。今回、国内の検査室でCWAが可能な装置の一覧を表にまとめた(表1)。シスメックス社によるCWAは、透過光を使用し以前のMDAII装置を踏襲したCWA開発が行われた⁸⁾。その後、CSシリーズの装置でCWA実施可能となり、最近コンパクトで高性能なCNシリーズにもCWA機能が搭載されている。CNシリーズのAPTT-CWA結果画面を示す(図2-A)。CWA画面では、各波形とパラメータが表示され、数種類のサンプル結果の表示が可能である。また、血友病をはじめとするさまざまな凝固異常症の診断および治療モニタリングに活用されている⁷⁻¹²⁾。アイ・エル・ジャパン社のACL-TOPは検出部に透過光で測定し、アプリケーションには吸光度で表示され、シスメックス社の凝固波形とは逆向きを呈する(図2-B)。一つの画面に3種類の波形が同時に表示され、各種パラメータ解析が実施できる。凝固時間は2次微分波形のピーク値の時間を測定する。和田らの研究をはじめ凝固異常症の診断ならびに鑑別の利用など多数報告されている¹³⁻¹⁶⁾。LSIメディエンス社は新たにCWA解析が可能な全自動血液凝固検査システムSTACIA[®]CN10を上市した(図2-C)。CN10は、血友病とLA陽性検体が異なるパターンを示し、さらにCWAで新規APTT試薬の製造ロット間差が小さいことを証明した¹⁷⁾。なお、上記3社共通で各パラメータに至るまでの時間を測定できる。一方、積水メディカル社はCP3000を使用した新たなCWAのパラメータを開発した。660 nmの散乱光を使用したAPTTに基づく凝固波形の1次微分波形を用いて波形に囲まれた領域から加重平均パラメータを算定する。また、関連するパラメータから調整されたテンプレートマッチングにより血友病Aの第VIII因子活性値を反映し、APTT-CWAが迅速診断の一助になることを報告し、現在、研究室レベルの検討が実施されている^{18,19)}。ロシュ・ダイアグノスティックス社の自動凝固分析装置は、現在コバス i711が凝固波形を出力することは可能だが、解

析プログラムを搭載していない。国内でCWAが搭載される装置は着実に増えることが予測され、検査室での実用化が進み、今後さらに活用されることを期待する。

4. CWAの応用～明らかになったこと～

播種性血管内凝固 (disseminated intravascular coagulation: DIC) および血友病Aをはじめ、後天性凝固異常症²⁰⁾、出血性凝固異常症の診断にCWAが有用であることはすでに報告されている²¹⁻²³⁾。最近では、Coronavirus disease (COVID-19) 関連患者の凝固異常症の解析にCWAを用いた病態説明が国内外で進んでいる²⁴⁻²⁶⁾。また、深部静脈血栓症 (VTE) の診断ならびに解析にも活用された^{27,28)}。鈴木らはCWAの応用として、フィブリノゲン異常症の診断には、Clauss Fibrinogen法によるCWAのパラメータの組み合わせでFibrinogen異常症の鑑別が可能になることを報告した²⁹⁾。CWAによるフィブリノゲン抗原量 (eAg) を算定し、Ac/eAg比を指標として、多検体を用いてROC曲線と精度再現性を評価し、臨床検査室で応用できる優れた感度と特異性を明らかにした。これにより、CWAによるルーチン検査で実用性の高いFibrinogen異常症の評価が可能となった³⁰⁾。我々は、APTTが延長した約100検体のACL-TOPを用いたAPTT-CWAによる1次微分波形の数種類のパラメータを作成し、それらを用いたフローチャートを構築することにより凝固異常症の75%の検体を識別することができた。しかし、ループスアンチコアグラント陽性ならびに抗凝固薬服用下の検体などは鑑別が難しい症例も存在した³¹⁾。今後の課題として、CWAが人工知能 (AI) を用いられるなど、より詳細で精度の高い鑑別できれば、さらなる飛躍につながると期待される。

5. CWAの応用であるCFWAの原理

CWAの凝固反応過程は3相にわかれ、特に後凝固相はプラトーな時間が長く測定できる。この特徴を活かしたいとCWAを改良することを模索した。以前に、凝固第V因子と第VIII因子は線溶反応のプラ

表1 国内の検査室でCWAが可能な装置の一覧凝固波形解析が可能な装置と原理

会社名	検出法の原理	波長	最長測定時間	凝固波形の解析の有無	各パラメーター(種類)	データの抽出の有無	現在に至るまでの主な実績	その他(搭載装置)
シスミック株式会社	透過光	660 nm	1,800 秒	有	最大凝固速度 (min1) 最大凝固加速度 (min2) 最大凝固減速度 (max2) 各パラメーターの反応強度による補正值	可能	<ul style="list-style-type: none"> 血友病の重症度診断 後天性凝固異常症の鑑別 その他凝固異常症の診断法や薬効評価に活用 CFWAへ寄与 	CN-3000/6000/3500/6500 CS-5100/2400/2500 CS-2000i/2100i にて適用可能.
アイ・エル・ジャパン株式会社	透過光(検出部)アブリケーションで吸光度を表示	405 nm, 671 nm	1,800 秒	有	① Delta Absorbance ②-1 1st derivative peak height ②-2 Time to 1st derivative peak ③-1 2nd derivative positive peak height ③-2 Time to 2nd derivative positive peak ③-3 2nd derivative negative peak height ③-4 Time to 2nd derivative positive peak	可能	<ul style="list-style-type: none"> 血友病や凝固異常症の鑑別 和田先生をはじめCWAの改変 APTT延長による凝固異常症の鑑別 	ACL TOP ファミリー, ACL TOP ファミリー-50 シリーズ
株式会社 LSIメディアエンス	吸光度	405 nm, 660 nm	360 秒 (自動延長)	有	一次微分の最大値 (min1) 二次微分の最大値 (min2) 最小値 (max2) およびその時間	可能	<ul style="list-style-type: none"> APTT 試験の特性を評価 血友病と LA の鑑別 	STACIA CN10

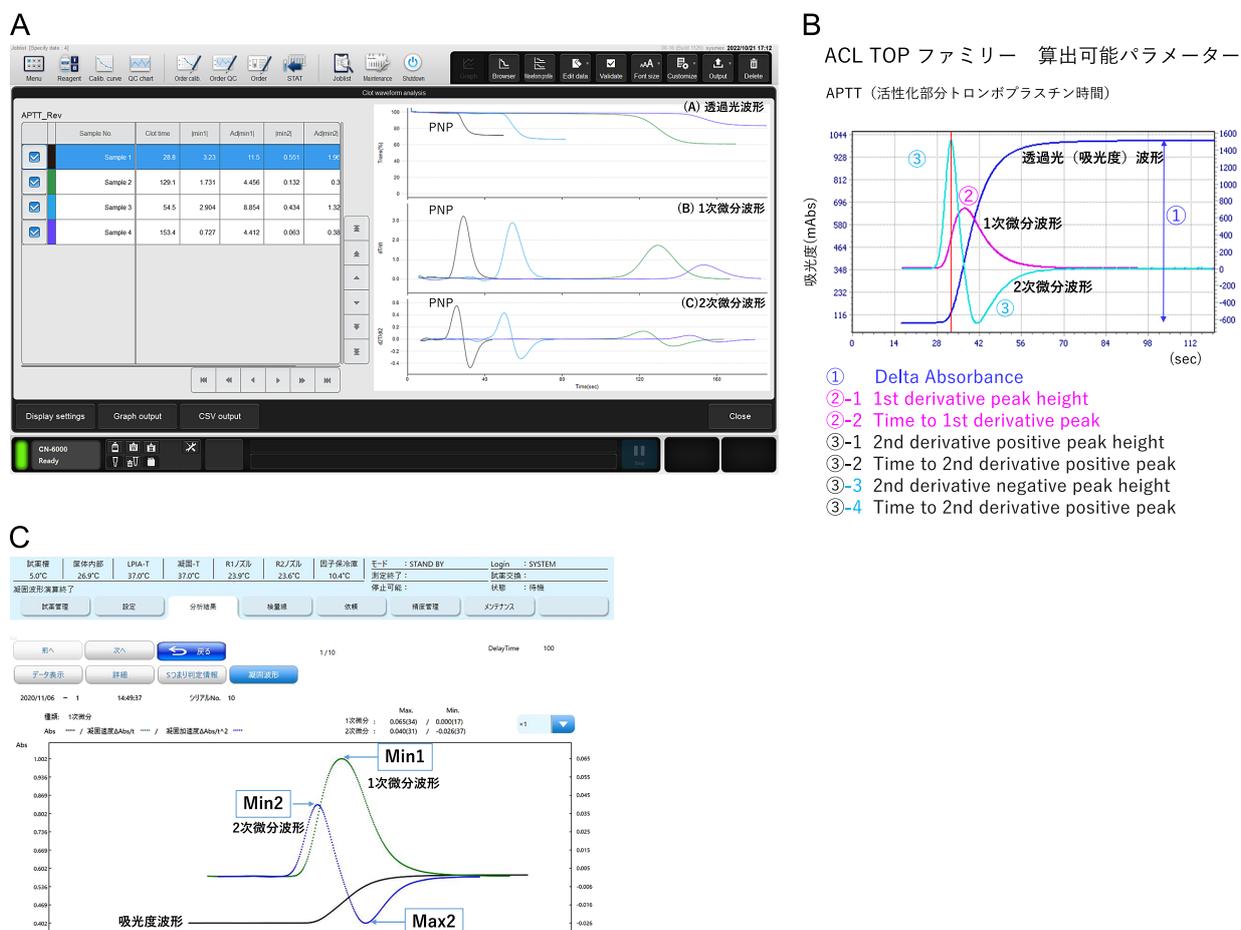


図2 各社のCWA表示画面

A: シスメックス社のCN-6000. 正常プール血漿 (PNP) と、ヘパリンを濃度依存性に添加した結果の表示画面を示す. 各パラメータとCWAを同時に数種類の検体結果を表示することができる.

B: アイ・エル・ジャパン社のACL-TOP. ACL-TOPは波形表示の縦軸が吸光度のため、凝固波形は他社と逆向きを示す. 1画面に凝固波形, 1次微分波形, 2次微分波形を同時に表示できる. 波形にポイントを置くと, 各パラメータと時間が同時に表示される.

C: LSIメディエンス社のCN10. CN10は, 縦軸が吸光度で, 吸光度凝固波形・1次微分波形・2次微分波形が1画面に同時に表示される. また, 1次微分・2次微分波形の最大値・最小値・時間を上部に表示することができる.

スミンと生化学反応的に相互関連性を示すことが明らかにされたこと^{32,33)}, トロンビン・プラスミン生成試験は凝固反応のみならず続いて起こる反応を捉えられることから, CWAにもフィブリン溶解反応を取り入れることができないかと考えた. 以前に確立したトロンビン生成試験を改変したトロンビン・プラスミン生成試験は, Ca添加時に組織プラスミノゲンアクチベータ (tissue plasminogen activator: tPA) を同時に添加し, トロンビンまたはプラスミンの各

蛍光基質を用いた方法で評価する³⁴⁾. この方法は凝固反応とフィブリン溶解反応を包括的に評価できるが, 手技の煩雑さや解析方法などが難しく, 一般的な検査室向きでない. それらの困難さを補完できる検査として, APTT-CWAを改変し, 凝固反応開始から続いて起こるフィブリン溶解反応を凝固後相で観察し, 間接的に線溶能を評価する方法を開発した⁶⁾ (図3-A). APTT測定のカCl₂添加時にtPAを終濃度約0.6 μg/mLを加えて測定すると, 自動凝固分析装

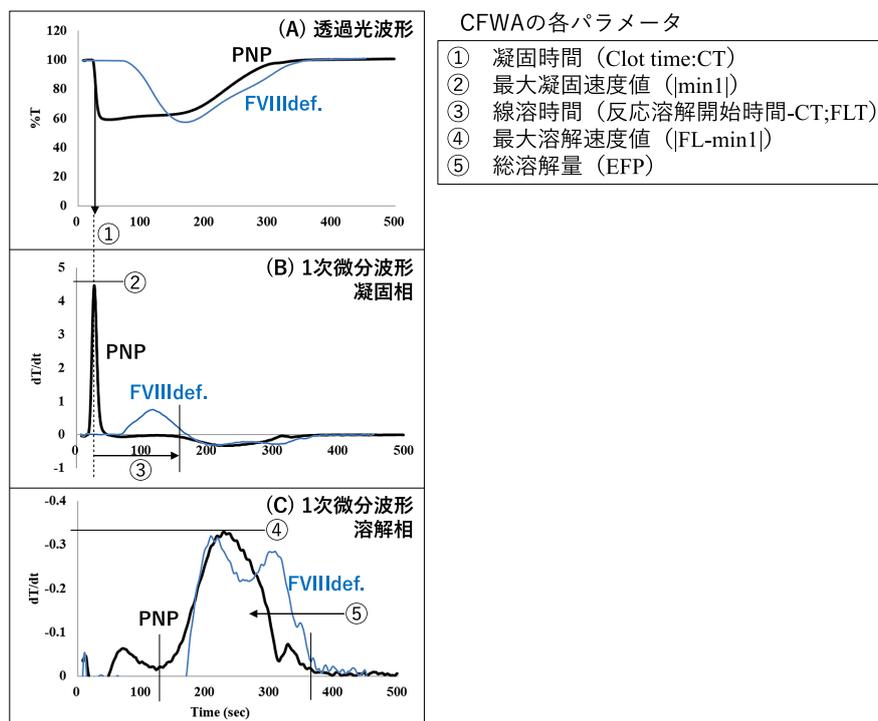


図3 凝固線溶波形解析 (clot fibrinolysis waveform analysis: CFWA) の波形

A: CFWA では上段: 透過光波形で一度凝固反応により低下した透過度がクロット溶解反応により上昇する. B: 1次微分波形で凝固パラメータの算定とフィブリン溶解開始時間から, 凝固時間を引いた線溶時間 (FLT) を算定できる. C: 縦軸を反転させることでフィブリン溶解相の各パラメータの算定が可能である. 波形のピーク値 (最大線溶速度値: $|\text{FL-min1}|$), その反応の面積より総溶解量など, 定量的に評価することができる. 黒線は正常プール血漿 (PNP), グレー線は第 VIII 因子欠乏血漿 (FVIIIdef.) の波形を示す. FVIIIdef. の凝固時間は延長し, 凝固終了直後にフィブリン溶解が開始する. 1次微分波形では, ピーク値までの延長と著明な低下, フィブリン溶解相が増大した.

置 (シスメックス社の CS シリーズなど) を用いて特徴的な波形を観察できる. 透過光波形は, 正常血漿において約 30 秒で凝固した約 100 秒後に装置中の反応キュベット内のフィブリン塊が溶解しゆっくりと波形が上昇する. これは, 凝固反応により低下した透過率が, 溶解反応により再上昇するためである. APTT-CWA と同様に 1次微分波形を用いた凝固パラメータの算定が可能で, 併せてフィブリン溶解相を評価できる. エクセルソフトを用いた解析で溶解開始時間, 最大溶解速度値および総溶解量など, 各パラメータを用いた定量的評価が可能である (図3). 正常プール血漿 (PNP) と比較して第 VIII 因子欠乏血漿 (FVIIIdef.) は透過光波形で凝固終了直後に溶解が起こり, パラメータ解析では PNP に比べ凝固時間 (clotting time: CT) の延長と最大凝固速度 ($|\text{min1}|$)

の低下ならびに FLT の短縮, フィブリン溶解反応 (EFP) の増大を認めた (図3-B, C).

6. CFWA の応用

図3で示した PNP に比し FVIIIdef. は CT の延長と $|\text{min1}|$ の低下と FLT の短縮/EFP の増大を認めるもこの波形変化が示す意味は十分に理解されていない. これらの波形が示す意義を明らかにするために, 各種凝固因子欠乏血漿 (def) における CFWA と各種凝固線溶マーカーによる解析を試みた. 装置外において, 凝固/線溶の各反応を再現し, サンプルに 11 mM EDTA と 1 M ベンズアミジン溶液の混液を添加して各反応を停止させ, それぞれのフィブリンモノマーコンプレックス (fibrin monomer complex: FMC) と

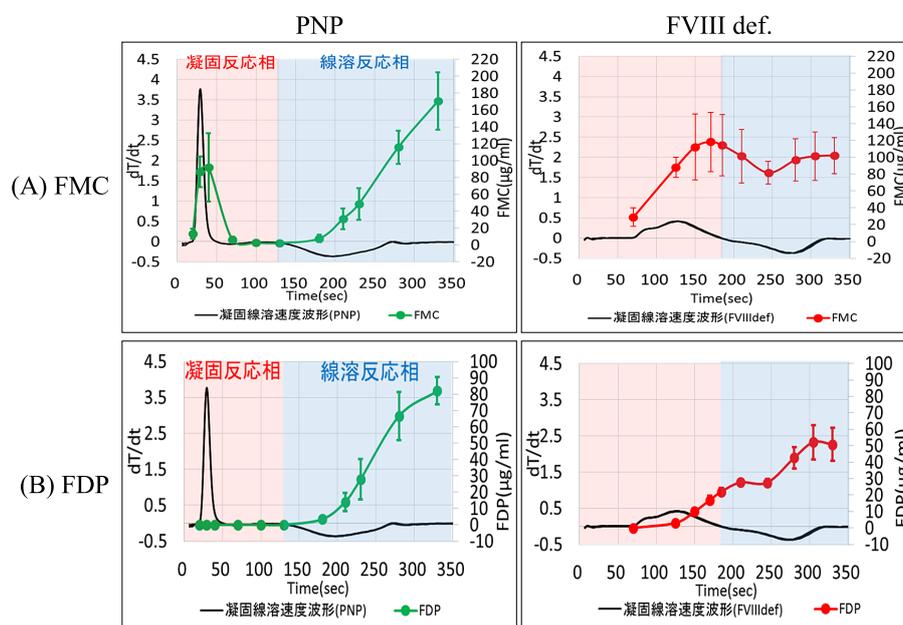


図4 CFWAと凝固 (FMC)・線溶 (FDP) マーカーの変動

黒線は1次微分波形の結果を示す。緑線は正常血漿、赤線はFVIIIdef.のFMCまたはFDPの推移を示す。A：FMCではPNPでは前半の凝固由来のピークの後0へ低下した後、フィブリン溶解反応における再上昇が明確だった。一方FVIIIdef.は凝固のピークの後、わずかに低下するもFMCは上昇したままでPNPのような2峰性のピークが不明瞭であった。B：FDPでは、PNPでは線溶反応相で上昇するが、FVIIIdef.は凝固反応相において早期にFDP上昇を認めた。

線溶マーカー (FDP) をCS-2400 (Sysmex社) にて測定し相対的に評価した³⁵⁾。なお、使用した市販血漿はFibrinogen量やFXIII量は健常人範囲内だった。FMCにおいて、PNPは凝固相で1次微分波形と同様に上昇し一旦0に戻り、フィブリン溶解相で再度上昇した。FVIIIdef.のFMCは約100秒から上昇し、わずかに低下するも途中で0には戻らず高値のままだった。(図4-A)この反応はFVIII IU/dL添加するとPNPのような2峰性ピークへ回復しFVIII濃度依存性に正常化を認めた。また、FDPにおいて、PNPは凝固完了後のフィブリン溶解開始より上昇したが、FVIIIdef.は、まだ凝固反応中のCTポイントでFDP：3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に上昇した。さらに、PICとDダイマーもFDPと同様に凝固反応中に上昇する結果を示した。血友病Aは凝固機能の低下のみならず線溶の早期開始によるフィブリン塊の脆弱性が重篤な出血症状を引き起こす原因の一つであると考えられた。また、CFWAのフィブリン溶解反応は、波形変化と同様に線溶マーカーが推移し、線溶能を反映することを証

明した。ただし、この線溶能は内因性の線溶能を反映する³⁶⁾のではなく、あくまでも本法は採血後の試験管内 (*in vitro*) における末梢血漿中の添加tPAによるフィブリン溶解能を反映すると考える。

7. CFWAのこれから

CFWAによる重症感染症由来のDICや、トランサミン投与下⁶⁾ではフィブリン溶解反応が抑制される³⁷⁾。また、急性前骨髄性白血病例ではフィブリン溶解が早期に起こる症例がある³⁸⁾ことが報告された。正常に比べて、凝固能のみならず、線溶亢進例ではフィブリン溶解相の早期にピークが出現すること、線溶抑制例では溶解相が500秒以内にピークを示さないことをリアルタイムに評価できる(図5)。出血あるいは血栓の予測に凝固と線溶のバランスの評価が重要であることを確認された。一方、岡らは、CFWAを用いて、抗凝固薬の効果を評価検討し、薬効評価モデル予測を報告された³⁹⁾。CFWAは波形解

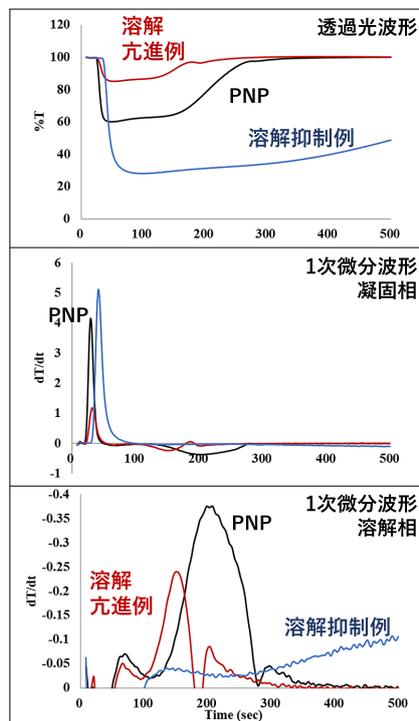


図5 CFWAのフィブリン溶解相の亢進・抑制パターン

横軸と縦軸は図3と同じである。PNPに比し、フィブリン溶解亢進例では、透過光波形で早く溶解し、1次微分波形の凝固相では、ピークの低下、溶解相では早期にピークが出現する。一方、フィブリン溶解抑制例では、透過光波形で溶解反応開始遅れを認め、1次微分波形の溶解相で波形の立ち上がりが遅くなりピークは無く、明らかに溶解反応抑制を認めた。

析を用いて、APTT-CWAよりも詳細な凝固・フィブリン溶解反応を評価することができることが明らかになった。問題点として、臨床で使用する検査には、試薬の安定性・再現性・感度などの課題がある。しかし本法は、凝固能のみならず、線溶能スクリーニングを判断できる半定量的な検査であり、線溶抑制状態を反映する画期的なアッセイである。今後は、出血症状のみならず、血栓症の診断、体外循環における抗凝固止血管理など、多目的な活用が期待できる⁴⁰⁾。現在はAPTTによるCFWAであるが、新たに組織因子を添加した測定系の開発^{41,42)}などの取り組みが喫緊の課題である。今後、CFWAが血栓・出血異常症の早期診断に資することを期待したい。

謝辞

この研究に関して、シスメックス株式会社、アイ・

エル・ジャパン株式会社、株式会社LSIメディエンス、積水メディカル株式会社、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社の皆様には、資料や現在のCWA解析の状況についてご助言やご協力を賜り、この場をお借りして深謝申し上げます。

著者全員の利益相反(COI)の開示:

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし

文献

- 1) 小川覚, 川崎潤, 田中建一: トロンボエラストメトリーを用いた周術期止血管理. 血栓止血誌 **21**: 553-561, 2010.
- 2) 小川覚, 小高光晴: 心臓血管外科手術における止血凝固モニタリング. *Caldiovascular Anesthesia* **23**: 5-10, 2019.
- 3) Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, et al.: Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Thromb Haemost* **33**: 4-15, 2003.
- 4) Braun PJ, Givens TB, Stead AG, et al.: Properties of optical data from activated partial thromboplastin time and pro-

- thrombin time assays. *Thromb Haemost* **78**: 1079–1087, 1997.
- 5) Shima M, Thachil J, Nair SC, et al.: Towards standardization of clot waveform analysis and recommendations for its clinical applications. *J Thromb Haemost* **11**: 1417–1420, 2013. doi: 10.1111/jth.12287.
 - 6) 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. doi: 10.1111/bjh.16111.
 - 7) Shima M, Matsumoto T, Fukuda K, et al.: The utility of activated partial thromboplastin time (aPTT) clot waveform analysis in the investigation of hemophilia A patients with very low levels of factor VIII activity (FVIII:C). *Thromb Haemost* **87**: 436–441, 2002.
 - 8) Matsumoto T, Nogami K, Tabuchi Y, et al.: Clot waveform analysis using CS-2000i™ distinguishes between very low and absent levels of factor VIII activity in patients with severe hemophilia A. *Haemophilia* **23**: e427–e435, 2017. doi: 10.1111/hae.13266.
 - 9) Evrard J, Siriez R, Morimont L et al.: Optimal wavelength for the clot waveform analysis: Determination of the best resolution with minimal interference of the reagents. *Int J Lab Hematol* **41**: 316–324, 2019. doi: 10.1111/ijlh.12975.
 - 10) Matsumoto T, Nogami K, Ogiwara K, et al.: A putative inhibitory mechanism in the tenase complex responsible for loss of coagulation function in acquired haemophilia A patients with anti-C2 autoantibodies. *Thromb Haemost* **107**: 288–301, 2012. doi: 10.1160/TH11-05-0331.
 - 11) Yoshizawa H, Nogami 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. doi: 10.1016/j.thromres.2018.12.016.
 - 12) 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. doi: 10.1111/jth.14022.
 - 13) Maeda K, Wada H, Shinkai T, et al.: Evaluation of hemostatic abnormalities in patients who underwent major hepatobiliary pancreatic surgery using activated partial thromboplastin time-clot waveform analysis. *Thromb Res* **201**: 154–160, 2021. doi: 10.1016/j.thromres.2021.03.030.
 - 14) Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, et al.: Update on the clot waveform analysis. *Clin Appl Thromb Hemost* **26**: 1076029620912027, 2020. doi: 10.1177/1076029620912027.
 - 15) Tokunaga N, Inoue C, Sakata T, et al.: Usefulness of the second-derivative curve of activated partial thromboplastin time on the ACL-TOP coagulation analyzer for detecting factor deficiencies. *Blood Coagul Fibrinolysis* **27**: 474–476, 2016. doi: 10.1097/MBC.0000000000000436.
 - 16) Wada H, Shiraki K, Matsumoto T, et al.: The evaluation of APTT reagents in reference plasma, recombinant FVIII products; Kovaltry® and Jivi® using CWA, including sTF/7FIX assay. *Clin Appl Thromb Hemost* **27**: 1076029620976913, 2021. doi: 10.1177/1076029620976913.
 - 17) 門脇淳, 楊宇航: コアグジュネシス®APTTの製造ロット間差と凝固波形に関する評価. *検査血液学会誌* **22**: 355–363, 2021.
 - 18) Shimonishi N, Ogiwara K, Oda Y, et al.: A novel assessment of factor VIII activity by template matching utilizing weighted average parameters from comprehensive clot waveform analysis. *Thromb Haemost* **121**: 164–173, 2021. doi: 10.1055/s-0040-1715838.
 - 19) Shimonishi N, Ogiwara K, Oda Y, et al.: Inhibitor index in the clot waveform analysis-based mixing test differentiates among hemophilia A without and with inhibitors, and lupus anticoagulant. *Thromb Haemost* **121**: 792–799, 2021. doi: 10.1055/s-0040-1721776.
 - 20) Takeyama M, Sasai K, Matsumoto T, et al.: Comprehensive blood coagulation potential in patients with acquired hemophilia A: Retrospective analyses of plasma samples obtained from nationwide centers across Japan. *Int J Hematol* **115**: 163–172, 2022. doi: 10.1007/s12185-021-03249-w.
 - 21) Toh CH, Samis J, Downey C, et al.: Biphasic transmittance waveform in the APTT coagulation assay is due to the formation of a Ca(++)-dependent complex of C-reactive protein with very-low-density lipoprotein and is a novel marker of impending disseminated intravascular coagulation. *Blood* **100**: 2522–2529, 2002. doi: 10.1182/blood.V100.7.2522.
 - 22) Matsumoto T, Nogami K, Shima M, et al.: A combined approach using global coagulation assays quickly differentiates coagulation disorders with prolonged aPTT and low levels of FVIII activity. *Int J Hematol* **105**: 174–183, 2017. doi: 10.1007/s12185-016-2108-x.
 - 23) Nogami K: Clot waveform analysis for monitoring hemostasis. *Semin Thromb Hemost* **29**: 2022. doi: 10.1055/s-0042-1756706.
 - 24) Fan BE, Ng J, Chan SSW, et al.: COVID-19 associated coagulopathy in critically ill patients: A hypercoagulable state demonstrated by parameters of haemostasis and clot waveform analysis. *J Thromb Thrombolysis* **51**: 663–674, 2021. doi: 10.1007/s11239-020-02318-x. Epub 2020 Oct 24.
 - 25) Shimura T, Kurano M, Kannno Y, et al.: Clot waveform of APTT has abnormal patterns in subjects with COVID-19. *Sci Rep* **11**: 5190, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-84776-8.
 - 26) Ichikawa J, Okazaki R, Fukuda T, et al.: Evaluation of coagulation status using clot waveform analysis in general ward patients with COVID-19. *J Thromb Thrombolysis* **53**: 118–122, 2022. doi: 10.1007/s11239-021-02499-z.
 - 27) Tan CW, Cheen MHH, Wong WH, et al.: Elevated activated partial thromboplastin time-based clot waveform analysis markers have strong positive association with acute venous thromboembolism. *Biochem Med (Zagreb)* **29**: 020710, 2019. doi: 10.11613/BM.2019.020710.
 - 28) Ruberto MF, Marongiu F, Mandas A, et al.: The venous thromboembolic risk and the clot wave analysis: A useful relationship? *Clin Chem Lab Med* **56**: 448–453, 2018. doi: 10.1515/ccim-2017-0678.
 - 29) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, et al.: Clot waveform analysis in Clauss fibrinogen assay. *Thromb Res* **174**: 98–103, 2019. doi: 10.1016/j.thromres.2018.12.018.
 - 30) Suzuki A, Suzuki N, Kanematsu T, et al.: Development and validation of a novel qualitative test for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis. *Sci Rep* **12**: 434, 2022. doi: 10.1038/s41598-021-04464-5.
 - 31) Shimomura D, Matsumoto T, Sugimoto K, et al.: The first-

- derivative curve of the coagulation waveform reveals the cause of aPTT prolongation. *Clin Appl Thromb Hemost* **26**: 1076029620978810, 2020. doi: 10.1177/1076029620978810.
- 32) Nogami K, Shima M, Matsumoto T, et al.: Mechanisms of plasmin-catalyzed inactivation of factor VIII: A crucial role for proteolytic cleavage at Arg336 responsible for plasmin-catalyzed factor VIII inactivation. *J Biol Chem* **282**: 5287–5295, 2007. doi: 10.1074/jbc.M607816200.
- 33) Kalafatis M, Mann KG: The role of the membrane in the inactivation of factor va by plasmin. Amino acid region 307–348 of factor V plays a critical role in factor Va cofactor function. *J Biol Chem* **276**: 18614–18623, 2001. doi: 10.1074/jbc.M007134200.
- 34) Matsumoto T, Nogami K, Shima M: Simultaneous measurement of thrombin and plasmin generation to assess the interplay between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* **110**: 761–768, 2013. doi: 10.1160/TH13-04-0345.
- 35) 松本 智子, 辻井 温, 下村 大樹, 他: 凝固・線溶波形を用いた病態解析—血友病 A における早期線溶—. 第 66 回日本臨床検査医学会学術集会 一般演題発表.
- 36) Mathews NS, Suzuki Y, Honkura N, et al.: Pre-administration of a carboxypeptidase inhibitor enhances tPA-induced thrombolysis in mouse microthrombi: Evidence from intravital imaging analysis. *Thromb Res* **210**: 78–86, 2022. doi: 10.1016/j.thromres.2021.12.031.
- 37) Onishi T, Nogami K, Ishihara T, et al.: A pathological clarification of sepsis-associated disseminated intravascular coagulation based on comprehensive coagulation and fibrinolysis function. *Thromb Haemost* **120**: 1257–1269, 2020. doi: 10.1055/s-0040-1713890.
- 38) Ishihara T, Nogami K, Onishi T, et al.: Hemostatic function in hyperfibrinolytic disseminated intravascular coagulation. *Pediatr Int* **61**: 872–881, 2019. doi: 10.1111/ped.13919.
- 39) 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. doi: 10.1111/ijlh.13168.
- 40) 清水 貞則, 松本 智子, 曾山 奉教, 他: 凝固線溶波形解析による体外循環中の新たな抗凝固線溶管理モニタリング法の開発—抗凝固剤が凝固・線溶機能に与える影響—. 第 60 回日本人工臓器学会大会 一般演題発表.
- 41) 矢部 睦実, 松本 智子, 下村 大樹, 他: 凝固線溶波形解析を用いた組織因子の凝固線溶機能の評価. 第 68 回日本臨床検査医学会学術集会 一般演題発表.
- 42) 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. doi: 10.1111/jth.14022.