



【日本血栓止血学会サイト お役立ちリンク集】

日本血栓止血学会サイトに掲載しているおすすめコンテンツのリンクをご紹介します。

- ・ [診療ガイドライン](#)
- ・ [研修医のお役立ち論文コンテンツ](#)
- ・ [用語集](#)

本編は次ページより掲載しております。

その凝固因子インヒビター値は本当ですか？ ～偽陰性・偽陽性をきたす病態～

家子正裕*

Is the value of coagulation factor inhibitor reliable? ～ Cases of false negatives / false positives ～

Masahiro IEKO

要約：後天性血友病 A(AHA)に代表される凝固因子インヒビターは、突然の重篤な出血で生死に関わる可能性があり、その測定は正確に行われるべきである。凝固因子インヒビターの偽陰性・偽陽性の成因には、ループスアンチコアグラント(LA)や投与されている抗凝固薬の影響などがある。LAは最も注意すべき病態で、リン脂質を介してAPTTを抑制するので内因系凝固因子活性の測定に影響し、結果として内因系凝固因子インヒビター活性の偽陽性を生じる。とくにLAHPS症例では出血症状を認め、凝固因子活性の偽低値、凝固因子インヒビターの偽陽性の結果からAHAとの鑑別が難しい。両者の鑑別には交差混合試験が有用である。正確な凝固因子インヒビター測定は、抗凝固薬の混入を問診などで除外し、採血手技に注意しつつLAの存在を否定した上で、凝固因子インヒビター活性を測定する。将来的にはインヒビター量をELISAなどで確認することも必要である。

Key words: acquired hemophilia A, lupus anticoagulant, Bethesda method, LA-hypoprothrombinemia syndrome



家子正裕

1980年
北海道大学医学部卒業
1984年
北海道大学大学院医学研究科
博士課程修了(医学博士)
1993年
米国インディアナ州立ボール
大学凝固研究所 研究員
1997年
北海道医療大学歯学部内科学
助教授
1999年
同 教授
2009年
北海道大学病院 客員教授

1. はじめに

後天性血友病 A(AHA)は、凝固第VIII因子(FVIII)に対する自己抗体(第VIII因子インヒビター)により突然重篤な出血症状をきたす疾患である。わが国において社会的な問題となっている高齢者人口の増加は、凝固因子インヒビターの代表的病態であるAHAの発症にも影響している。もちろん主治医の認識の向上や関連する検査方法の充実もその要因ではあるが、「年齢」はAHA発症要因とも言われている¹⁾。また、高齢になるに従い凝固第VIII因子に増殖反応

を示すCD4⁺T細胞が増加するという報告もある²⁾。AHAは時に重篤な転帰をもたらす。わが国の統計によれば³⁾、死亡率は7.9～22.0%、再燃率は約20%と報告されている。AHAを含めた凝固因子インヒビター症例においては、より正確な診断を行い、適切な治療を適切な時期まで行うことが求められる。

近年、正確な凝固検査結果を求めて、凝固検査やそのサンプル作製の標準化が行われるようになった⁴⁾。当然ながら凝固因子インヒビターも正確に測定されるべきである。しかし、測定方法も判定基準もまだ十分な標準化が行われていない。本稿では、凝固因子インヒビターが偽陰性や偽陽性になる状態・病態をあげ、その成因を解説しつつ可能な対策についても言及したい。

*責任者連絡先：
北海道医療大学歯学部内科学分野
〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757
Tel: 0133-23-1211, Fax: 0133-23-1534
E-mail: iekom@hoku-iryu-u.ac.jp

2. 凝固因子活性および凝固因子インヒビター値の測定方法と問題点

凝固因子インヒビターの偽陰性・偽陽性を解説するには、その測定方法の理解が必要である。凝固因子インヒビターの検出に關与するのは、凝固因子活性測定法および凝固因子インヒビター検出法である。凝固因子インヒビターの検出法として、①ベセスタ法(Bethesda method)によるインヒビター活性の測定、②交差混合試験(cross mixing test)、③ELISA法によるインヒビター量の測定がある。

1) 凝固因子活性測定法

凝固因子インヒビター活性の測定にも必要となるテクニックで、わが国では通常1段法が普及している。被検血漿と目的凝固因子の欠乏血漿を混合し、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)またはプロトロンビン時間(PT)を測定する。その値を正常血漿の希釈列を用いて作製した検量線に当てはめて、当該凝固因子活性を算出する。凝固1段法は原理的には単純だが、様々な試薬と機器との併用により測定結果に多くのばらつきが認められることに加え、1段法では確認できない病態も生じてきている。より正確な測定方法と考えられている凝固2段法は自動化が難しく煩雑であるが、測定原理および結果が合成基質法に類似していることから、現在は合成基質法が注目されている。

2) 凝固因子インヒビター検出法

(1) 凝固因子インヒビター

凝固因子インヒビターとは、個々の凝固因子の作用を阻害する物質を言い、主に免疫グロブリンを意味する。凝固因子インヒビターが存在すると、血中の凝固因子活性が直接阻害され、または凝固反応に抑制的影響を与えることにより出血症状をきたす。時に致死的な出血傾向をきたす場合があり、より迅速で正確な検出が求められている。

(2) 凝固因子インヒビターの検出

①ベセスタ法：凝固因子インヒビターの活性検出にはベセスタ法が用いられる。ベセスタ法は、患者血漿または目的凝固因子欠乏血漿に健常人血漿を等量混和し、37℃で2時間加温後、それぞれの残存凝固因子活性を測定する。凝固因子欠乏血漿と混和したサンプルの凝固因子活性(B)に対する患者血漿と混

和したサンプルの凝固因子活性(A)の割合(A/B)を残存比率R(%)として検量線からインヒビター活性(BU)を読み取る。1BU以上の場合は必要に応じて患者血漿を倍数希釈し、Rが25~75%の範囲に2~3点入るようにして求めたBUを平均する。被検血漿を希釈した場合は、求めたBUに希釈倍数をかけた値が最終インヒビター力価となる。さらに正確な活性を求めて様々な変法が存在するが、その詳細は別稿に譲る。

②交差混合試験：スクリーニング検査であるPTやAPTTの延長を認めた場合、凝固因子インヒビター症例と凝固因子欠損症例を鑑別する目的で行われるのが交差混合試験である。たとえば、APTT延長例では、内因系凝固因子欠損症、AHAのような内因系凝固因子インヒビター症例およびループスアンチコアグラント(Lupus anticoagulant: LA)を鑑別診断しなければならない。本試験は、APTTを数回測定することにより鑑別のヒントを与えてくれる。交差混合試験には、患者血漿と健常人血漿を一定の割合で混合後に直ちにAPTTを測定する即時反応と、37℃2時間インキュベーション後に混合血漿のAPTTを測定する遅延反応がある。その結果を用いて、縦軸に凝固時間、横軸に患者血漿混合比のグラフを作成し、視覚的に判断する⁵⁾。一般的には、即時反応および遅延反応が同様に下に凸で健常人血漿の添加による補正効果が認められれば「凝固因子欠損」と判断し、ともに直線または上に凸の同様な反応曲線の場合は「LA」、さらに患者血漿50%の混合サンプルで即時・遅延の測定時間に乖離が認められた場合には「凝固因子インヒビター」と判断される(図1)⁶⁾。しかし、測定方法自体が標準化されておらず、判定も視覚的で経験に左右されることなどが問題となる。

③インヒビター-ELISA法：ベセスタ法で検出できるのは、凝固因子活性を直接抑制する「中和抗体」である。凝固因子活性に影響する凝固因子インヒビターには、中和抗体以外に「クリアランス抗体」がある⁷⁾。すなわち、凝固因子と複合体を形成することにより血中よりクリアランスされ、結果的には凝固因子量が減少し出血に至る(図2)⁸⁾。このクリアランス抗体の測定はベセスタ法では難しく、凝固因子インヒビターをELISA法などで検出する。ELISA法では中和抗体のみならず、目的凝固因子に結合する免疫グロ

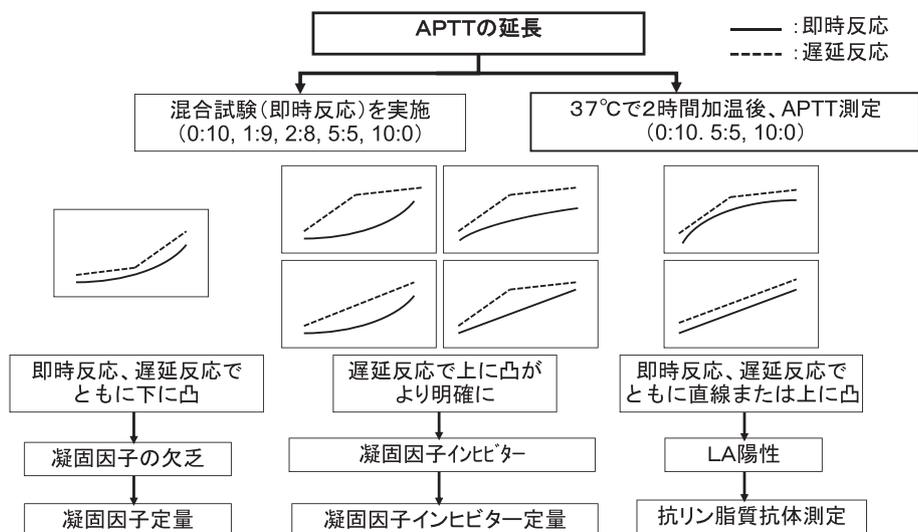


図1 APTT延長症例の鑑別診断へのアプローチ

凝固因子欠損パターン(左)：即時反応および遅延反応が同様に下に凸で健常人血漿の添加による補正効果が認められれば凝固因子欠損と判断する。凝固因子インヒターパターン(中央)：患者血漿50%で両反応に乖離が認められた場合には凝固因子インヒターと判断する。ループスアンチコアグラントパターン(右)：ともに直線または上に凸の同様な反応曲線の場合はLAと判断する。
(文献6より引用)

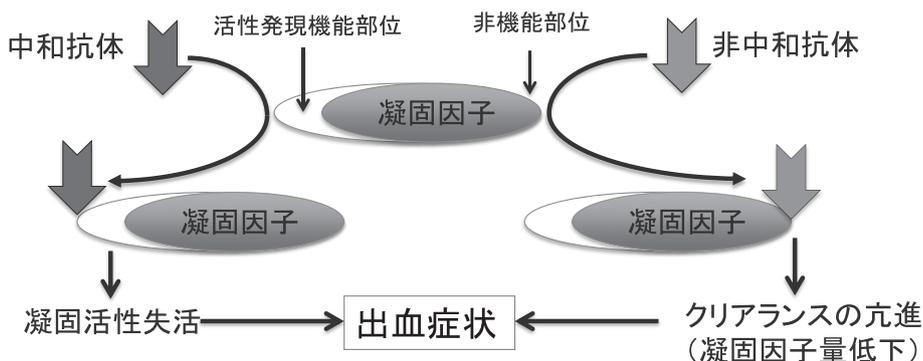


図2 凝固因子インヒター

凝固因子インヒターには、凝固因子の活性発現機能部位に結合し、その活性を阻害する「中和抗体」(左経路)と、凝固因子の非機能部位に結合し、複合体となって速やかに血中よりクリアランスされる「クリアランス抗体」(右経路)がある。中和抗体は凝固因子活性を阻害し、またクリアランス抗体は凝固因子量を低下させることにより出血傾向をもたらす。
(文献8より改変して引用)

ブリンのすべてを検出することになるが、わが国では本測定の保険収載がないことや測定試薬も簡単には手に入らないことにより測定は難しい。

3. 凝固因子インヒター偽陰性・偽陽性

実は凝固因子インヒターがあるのに測定では検出できないという「偽陰性」、また実際にはインヒターはないのに検査上はインヒター陽性として検

出される「偽陽性」、いずれの場合も患者に健康被害をもたらす結果である。その成因として様々な病態・状況が考えられる。代表的な凝固因子インヒビターとしてFVIIIインヒビターに焦点を絞り、幾つかの病態・状況をあげて解説する。

1) ループスアンチコアグラント (Lupus anticoagulant: LA)

(1) ループスアンチコアグラントと凝固因子インヒビター

ループスアンチコアグラント(LA)は、凝固反応に寄与するリン脂質に対する自己抗体(正確にはリン脂質とリン脂質結合蛋白複合体に対する自己抗体)と定義される。現在のところLAの責任抗体は特定されていないが、大部分が抗リン脂質抗体(aPL)のホスファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体(aPS/PT)や抗 β 2-Glycoprotein I(β 2GPI)抗体と推定されている⁹⁾。LAは、凝固反応に寄与するリン脂質を阻害することにより凝固反応を抑制する。その反応はリン脂質の種類や濃度依存性であり、サンプル中に混入血小板などのリン脂質供給源があれば正確なLA活性を検出できない。

LAはリン脂質を介してAPTTを抑制することにより、APTTをベースとする凝固因子活性の測定に影響する。すべての内因系凝固因子の活性は、LAによって見かけ上の低下を示す可能性がある。また、ベセスダ法で求める内因系凝固因子インヒビターの活性も、APTTベースの測定になるのでインヒビター活性が検出されることがある。LA活性により、すべての内因系凝固因子に対するインヒビターの活性が見かけ上の陽性(偽陽性)になる可能性がある。両者の鑑別には交差混合試験が有用である。AHAのインヒビターはFVIIIとの抗原-抗体反応にインキュベーション時間を必要とする遅延反応型であることに対し、LAはインキュベーション時間を必要としない即時反応型であることより、交差混合試験での即時・遅延反応曲線が異なる⁶⁾。

LA陽性例は比較的高齢者に多く、また基礎疾患として膠原病や悪性腫瘍が多い。時に出血傾向を示す場合もあり、内因系凝固因子活性の偽低値および内因系凝固因子インヒビターが偽陽性の場合にはAHAとの鑑別診断が難しくなる。その代表がLupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome (LAHPS)で

ある。

(2) LAHPS

LAHPSは当初、感染症後の小児や膠原病に罹患した若年女性に多いとされたが、高齢者での報告も増えてきている¹⁰⁾。LAHPSは、「prothrombin活性低値を伴うLA陽性者」と定義され、臨床症状は基本的にはLAに伴う血栓傾向だが、軽症から重症の出血傾向を示す。検査所見上prothrombinに対する(抗リン脂質抗体ではない)自己抗体が検出される。時に(複数の)凝固因子活性低下や(複数の)凝固因子インヒビター活性が検出される(表1)。Mazodierら¹¹⁾によれば、74例のLAHPSで89%に出血症状を認め、頭蓋内出血等の重篤な出血は51%だったと報告している。また、動静脈血栓症などの血栓症状は13%に認められている。検査所見では、全例でLA陽性でprothrombin活性が低下(中央値:11%)していた。88%にaPLではない抗プロトロンビン抗体が検出されている(表2)。また、Mulliezら¹²⁾は、LAHPS症例でprothrombin, FVIII, FIXおよびFXI因子活性の著しい低下を認めており、内因系凝固因子(FVIII, FIXおよびFXI)活性はサンプルを希釈処理して測定すると活性が正常域まで戻ったが、prothrombin活性は希釈処理でも低下していたことを報告している(表3)。

出血の原因は、プロトロンビンに対する非中和抗体(抗第II因子抗体)が存在し、プロトロンビン・抗体複合体が形成される。その複合体が体内からクリアランスされるためプロトロンビン量が低下し、出血傾向をきたすと説明されている¹³⁾(図2参考)。

われわれは検査依頼症例を含めて約3年間で20名のLAHPS症例を経験しており、年齢の中央値は41歳(2~85歳)であった。FVIII活性は18例で低下を認め、その15例でベセスダ法によるFVIIIインヒビター活性を検出した(表1)¹⁴⁾。Zymutest Anti-VIII IgG Mono Strip (Hyphen社, France)を用いたFVIIIインヒビター量の測定では、全例でインヒビターは検出できなかった(表1)。すなわち、LAHPSを含むLA陽性例におけるFVIIIインヒビター活性は偽陽性と思われた¹⁵⁾。

2) 偽陰性/偽陽性になるその他の場合

(1) 抗凝固薬のサンプル混入

まず、注意しなければならないのが被検血漿にヘパリンや直接経口抗凝固薬(direct oral anticoagulant:

表1 当科における LAHPS 20 症例の解析(自験例)

| 項目 | |
|---------------------------|-------------------------|
| 年齢 | 中央値：41 歳(2~85 歳) |
| 男女比 | 10：10 |
| 出血症状(軽~重症) | 7 例 |
| 凝固第 II 因子(prothrombin)活性 | 中央値：20.9% (3~59.7%) |
| ・抗第 II 因子インヒビター活性(B 法*) | 陽性例：0% |
| ・抗第 II 因子インヒビター量(E 法**) | 陽性例：55% |
| 凝固第 VIII 因子活性 | 中央値：12.5% (1.5~128%) |
| ・抗第 VIII 因子インヒビター活性(B 法*) | 陽性例：55% |
| | 中央値：5.7 BU(1.0~31.0 BU) |
| ・抗第 VIII 因子インヒビター量(E 法**) | 陽性例：0% |
| 凝固第 IX 因子活性 | 中央値：26.0% (0.1~153%) |
| ・抗第 IX 因子インヒビター活性(B 法*) | 陽性例：35% |
| | 中央値：2.0 BU(1.0~59.0 BU) |
| 凝固第 XI 因子活性 | 中央値：22.0% (1.0~137%) |
| 凝固第 XII 因子活性 | 中央値：16.5% (0.1~115%) |

*B 法：Bethesda 法, **E 法：ELISA 法(文献 14 より改変して引用)

表2 LAHPS 74 例の臨床症状および検査所見

| 臨床症状 | | 検査所見 (median, range) |
|-------|-----|----------------------|
| 出血症状 | 89% | PT および凝固第 II 因子活性 |
| ・小出血 | 62% | PT |
| 鼻出血 | 41% | 第 II 因子活性 |
| 皮下出血 | 35% | 抗プロトロンビン抗体陽性 |
| 歯肉出血 | 15% | 88% |
| 紫斑 | 7% | APTT および抗リン脂質抗体 |
| ・大出血 | 51% | APTT |
| 性器出血 | 15% | 2.0 倍(1.5~4 倍) |
| 肉眼的血尿 | 15% | LA 陽性 |
| 消化管出血 | 8% | 100% |
| 頭蓋内出血 | 5% | aCL 陽性 |
| 筋肉内血腫 | 4% | 70% |
| | | aβ2GPI-IgG |
| | | 73% |
| | | 血小板減少症 |
| | | 24% |
| 血栓症状 | 13% | (文献 11 より改変して引用) |
| 静脈血栓 | 4% | |
| 動脈血栓 | 5% | |
| 動静脈血栓 | 4% | |

DOAC)などの抗凝固薬が混入している場合である。とくにトロンビン阻害薬服用者のピーク期採血の血漿サンプルでは、第 VIII 因子インヒビター活性がベセスダ法で検出されたり、交差混合試験で凝固因子インヒビターパターンを示す場合がある。検査前に

抗凝固薬の使用を患者情報として得ておくことは重要である。

(2) 測定原理による影響

AHA ガイドライン¹⁶⁾では、ベセスダ法による凝固因子インヒビター活性が 1.0 BU 未満になった際に

表3 LAHPS 症例における凝固因子活性

| | 測定値(%) | (基準域)(%) |
|----------------------|--------|----------|
| 凝固第II因子(prothrombin) | 16 | (70~120) |
| 1:40 希釈 | 18 | |
| 1:100 希釈 | 26 | |
| 凝固第V因子 | 95 | (70~120) |
| 凝固第VIII因子 | 17.1 | (60~150) |
| 1:40 希釈 | 30.7 | |
| 1:100 希釈 | 86.5 | |
| 凝固第IX因子 | 6.3 | (60~150) |
| 1:40 希釈 | 10.4 | |
| 1:100 希釈 | 65.6 | |
| 凝固第X因子 | 88 | (70~120) |
| 凝固第XI因子 | 15 | (60~140) |
| 1:40 希釈 | 29 | |
| 1:100 希釈 | 50 | |

(文献 11 より改変して引用)

インヒビター消失と判断し、免疫抑制療法の減量・中止を考慮するとされている。FVIIIの半減期は8~12時間とされているので、抑制因子が消失すればFVIII活性はある程度は回復することが予想されるが、インヒビター活性が1.0 BU未滿となってもFVIII活性は数週にわたって回復しないことも多い。その一因にFVIIIクリアランス抗体が関与している可能性がある¹⁵⁾。また、AHAで再燃率が高いことにも関与しているかもしれない。ベセスダ法では中和抗体のみが検出され、クリアランス抗体は検出できない。この状態を偽陰性と言うかどうかは別として、凝固因子活性に関与するインヒビターをすべて検出しきれていない状況である。可能なら、ベセスダ法に加えてELISAでインヒビター量も測定し、治療効果を判断することができるなら最良の方法であろう。

4. より正確な凝固因子インヒビター測定のために

まず採血手技に、より注意が必要である。とくに内因系凝固因子に関連するインヒビター活性の測定の場合、被検血漿に混入血小板数が多くなることは避けなければならない。次いで、抗凝固薬の混入を問診などで除外し、LAの存在を正確に否定する。これには交差混合試験が極めて有用であろう。実際

に、AHAガイドライン¹⁶⁾の診断方法にも国際血栓止血学会(ISTH)で推奨するLAの診断方法¹⁷⁾にも、交差混合試験は必須項目としてあげられている。これらすべてが除外された上で凝固因子インヒビター測定になるが、ベセスダ法によるインヒビター活性測定に加え、将来的にはインヒビター量をELISA法などで確認することができれば理想的である。

5. おわりに

凝固因子インヒビターは、時に致命的な影響を与える病態である。AHAでは、インヒビターが検出された場合には副作用に気を使いながら即時に免疫抑制療法が行われ、出血傾向を認めた場合にはバイパス製剤による止血療法が考慮される。インヒビターが偽陽性であれば、対象者は免疫抑制剤の副作用や止血剤による血栓症の副作用の危険に曝されることになる。一方、インヒビターが偽陰性であれば、致死性の重篤な病態を見落とすことになる。

本稿が偽陰性・偽陽性の予防となり、より正確な凝固因子インヒビター測定がなされることを期待してやまない。

著者の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Tufano A, Coppola A, Guida A, Cimino E, De Gregorio AM, Cerbone AM, Di Minno G: Acquired haemophilia A in the elderly: case reports. *Curr Gerontol Geriatr Res* doi: 10.1155/2010/927503.
- 2) Hu GL, Okita DK, Diethelm-Okita BM, Conti-Fine BM: Recognition of coagulation factor VIII by CD4+ T cells of healthy humans. *J Thromb Haemost* **1**: 2159–2166, 2003.
- 3) 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 岡敏明, 酒井道生, 白幡聡, 高田昇, 高松純樹, 竹谷英之, 花房秀次, 日笠聡, 福武勝幸, 藤井輝久, 松下正, 三間屋純一, 吉岡章, 嶋緑倫: わが国における後天性凝固因子インヒビターの実態に関する3年間の継続調査—予後因子に関する検討—. *日血栓止血会誌* **19**: 140–153, 2008.
- 4) 日本検査血液学会標準化委員会 凝固検査標準化ワーキンググループ: 凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス. *日検血会誌* **17**: 149–168, 2016.
- 5) 家子正裕, 福武勝幸, 内藤澄悦, 吉田美香, 表美香, 静怜子, 安藤秀美, 下村大樹, 西脇圭子, 片岡美香, 山野智子, 中野かおり, 矢島智志, 矢後弘和: 交差混合試験における混合比率およびコントロール血漿に関する検討. —コアプレスタミキシングテスト研究会における結果報告(第1報)—. *日検血会誌* **12**: 312–322, 2011.
- 6) 家子正裕: クロスミキシング試験を臨床に活かすには. *医療と検機器・試薬* **35**: 867–872, 2012.
- 7) Rapaport SI, Ames SB, Duvall BJ: A plasma coagulation defect in systemic lupus erythematosus arising from hypoprothrombinemia combined with antiprothrombinase activity. *Blood* **15**: 212–227, 1960.
- 8) 家子正裕: その他の後天性インヒビター—後天性抗凝固因子抗体—. 一瀬白帝 編著, 図説 血栓・止血・血管学, 東京, 中外医学社, 2005, pp422–430.
- 9) 家子正裕: ループスアンチコアグラント: 測定方法から見える謎多き病態. *日検血会誌* **18**: 409–418, 2017.
- 10) Chung CH, Park CY: Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia in healthy adult. *Korean J Intern* **23**: 149–151, 2008.
- 11) Mazodier K, Arnaud L, Mathian A, Costedoat-Chalumeau N, Haroche J, Frances C, Harlé JR, Pernod G, Lespessailles E, Gaudin P, Charlanne H, Hachulla E, Niaudet P, Piette JC, Amoura Z: Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome: report of 8 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **91**: 251–260, 2012.
- 12) Mulliez SM, De Keyser F, Verbist C, Vantilborgh A, Wijns W, Beukinga I, Devreese KM: Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome: report of two cases and review of the literature. *Lupus* **24**: 736–745, 2015.
- 13) Male C, Lechner K, Eichinger S, Kyrle PA, Kapiotis S, Wank H, Kaider A, Pabinger I: Clinical significance of lupus anticoagulants in children. *J Pediatr* **134**: 199–205, 1999.
- 14) Yoshida M, Ieko M, Naito S, Takahashi N: Lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome and similar conditions in Japan. *臨床血液* **56**: 1505, 2014.
- 15) Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N, Ogawa Y, Ichinose A: Significance of quantity of factor VIII antibody in patients with acquired hemophilia A. Program book of the 9th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, p111, 2016.
- 16) 後天性血友病A診療ガイドライン作成委員会: 日本血栓止血学会 後天性血友病A診療ガイドライン. *日血栓止血会誌* **22**: 295–322, 2011.
- 17) Smock KJ, Rodgers GM: Laboratory identification of lupus anticoagulants. *Am J Hematol* **84**: 440–442, 2009.