

ヘパリン投与例における APTT 試薬の反応性に関する検討

多根総合病院 医療技術部 中央検査部門

柏井伸幸 森下律子 杉山昌晃 川住 勇
竹浦久司

要 旨

活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) は、内因系凝固検査の1つであり、凝固因子欠損症のスクリーニング、ループスアンチコアグラントや凝固因子に対する抗体などのインヒビターの検出などに使用されている。また、ヘパリン投与時のモニタリングとして使用され、ヘパリンを使用した抗凝固療法では重要な検査である。APTTの測定法は未だ標準化に至っていないのが現状であり、ヘパリン感受性に関しては試薬間で特性の違いがあることが知られている。従って、APTT検査に使用する試薬の特性を理解し結果の解釈を行う必要がある。試薬評価法として、ヘパリン投与検体における APTT (秒数) の相関、ヘパリン添加試験、またヘパリン濃度と APTT (秒数・比) の比較を実施した結果、当院で採用したレボヘム APTT-SLA は、従来使用していたトロンボチェック APTT-SLA に比してヘパリン感受性が高くモニタリングに有用であった。しかし、結果の乖離例については、ヘパリン投与量だけでなく、血中ヘパリン濃度およびアンチトロンビン (antithrombin : AT) 活性、その他ヘパリン中和活性を持つ物質などについても考慮する必要がある。

Key words : APTT (活性化部分トロンボプラスチン時間) ; 未分画ヘパリン ; ヘパリン感受性

はじめに

抗凝固薬のヘパリンは生理的凝固調節因子のアンチトロンビンによるトロンビン、活性化第X因子 (Xa) およびその他のセリンプロテアーゼ阻害作用を増強する。ヘパリンは過剰投与になると出血性の副作用が、投与量が少ない場合は抗凝固作用が期待できない。このためヘパリン投与のモニタリングとして、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、活性化凝固時間 (activated clotting time : ACT) が用いられている。

モニタリングする場合、APTT比 (ヘパリン投与後 APTT 値 / 正常コントロール血漿 APTT 値) は 1.5 ~ 2.5 倍に維持することが知られ、血中ヘパリン濃度は、抗 Xa 活性では 0.35 ~ 0.70 IU/mL に相当するとされている^{1,2)}。

APTTは測定法が標準化されていないため、試薬

間差、ヘパリン感受性が異なるのが現状である。そのため結果の解釈は使用する試薬の特性を理解する必要がある。

今回、当院で使用しているレボヘム APTT-SLA と、従来使用していたトロンボチェック APTT-SLA (いずれもシスメックス株式会社) の2種の試薬の相関およびヘパリン投与検体の反応性について検討した。

対象および方法

1. 対象

ヘパリン投与の入院患者 13 例 (年齢 67 ~ 99 歳, 平均年齢 80.1 歳, 男性 6 例, 女性 7 例), 34 検体 (脳梗塞 20 検体, 新型コロナウイルス感染症 8 検体, および心内腔血栓を伴った PCPS 使用のたこつぼ型心筋症 1 例の 6 検体) の 3.2% クエン酸 Na 加血漿 (残余検体) を用いた。検体は、-80℃ の冷凍庫で保管し、



37℃で5分間の加温融解後、室温に15分静置後に測定した。正常コントロール血漿はコアグトロール I X (シスメックス株式会社) を使用した。

2. 試薬および測定機器

APTT 測定は、トロンボチェック APTT-SLA, レボヘム APTT-SLA (いずれもシスメックス株式会社) を使用した。AT 活性測定は、レボヘム AT (シスメックス株式会社), 血中ヘパリン濃度測定は、BIOPHEN™ Heparin LRT (HYPHEN BioMed) を使用し、全自動血液凝固測定装置 CN-3000 (シスメックス株式会社) で測定を行った。

3. 方法

①ヘパリン添加試験

未分画ヘパリン (ヘパリン Na 注5千単位 /5mL 「モチダ」(持田製薬株式会社)) を生理食塩水で溶解後、正常コントロール血漿に添加しヘパリン終濃度 0.0, 0.2, 0.4, 0.8 IU/mL に調整した。各試薬で測定し APTT 比を算出した。

②相関

日常検査として APTT の検査依頼があったヘパリン投与 34 検体を各試薬で測定した。

③血中ヘパリン濃度との比較

ヘパリン投与 34 検体の血中ヘパリン濃度を測定 (抗Xa 合成基質法) し、APTT の秒数および APTT 比と比較した。また AT 活性の測定も行い、AT 活性の影響の有無も確認した。

④PCPS 使用のたこつぼ型心筋症例の血中ヘパリン濃度と APTT 比の比較

心内腔血栓を伴った PCPS 使用のたこつぼ型心筋症 1 例の 6 検体について血中ヘパリン濃度と APTT 比を比較した。(PCPS 症例では他の症例に比べ高用量のヘパリンが用いられていることが多いため別途抽出し、比較を行った)。相関係数の算出、回帰分析等は EZR (version 1.55), Microsoft Excel 2016 を使用した。

結 果

①ヘパリン添加試験

ヘパリン濃度 0.4 IU/mL の APTT 比はトロンボチェック APTT-SLA が 1.78, レボヘム APTT-SLA は 2.26 であった。ヘパリン濃度 0.8 IU/mL の APTT 比はトロンボチェック APTT-SLA が 3.76, レボヘム APTT-SLA は 6.31 となり、*in vitro* におけるヘパリンの感受性はレボヘム APTT-SLA が高かった (表 1, 図 1)。

表 1 トロンボチェック APTT-SLA とレボヘム APTT-SLA における各ヘパリン濃度に対する APTT 秒数と APTT 比

トロンボチェック APTT-SLA		ヘパリン濃度 (IU/mL)				
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	
① APTT (秒)	27.4	35.0	48.3	70.1	102.1	
② APTT (秒)	27.2	35.2	48.7	70.6	103.2	
③ APTT (秒)	27.3	35.1	48.7	70.1	102.7	
mean	27.3	35.1	48.6	70.3	102.7	

レボヘム APTT-SLA		ヘパリン濃度 (IU/mL)				
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	
① APTT (秒)	26.7	36.9	60.4	106.1	170.4	
② APTT (秒)	26.5	37.3	59.9	103.8	166.6	
③ APTT (秒)	26.6	37.1	60.2	104.9	166.8	
mean	26.6	37.1	60.2	104.9	167.9	

APTT 比		ヘパリン濃度 (IU/mL)				
	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	
トロンボチェック APTT-SLA	1.00	1.29	1.78	2.58	3.76	
レボヘム APTT-SLA	1.00	1.39	2.26	3.94	6.31	

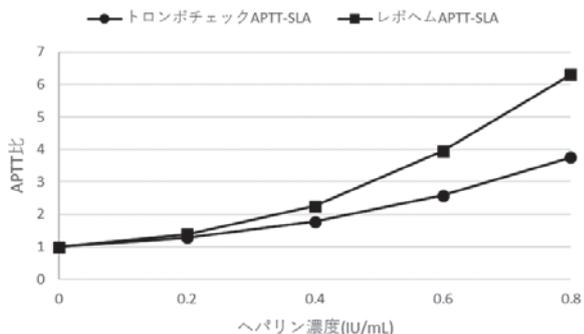


図1 ヘパリン感受度試験

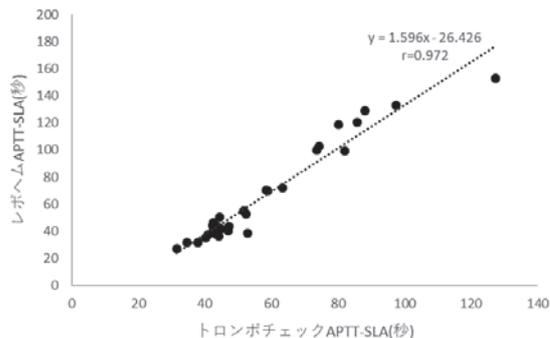


図2 トロンボチェック APTT-SLA・レボヘム APTT-SLA の相関

表2 ヘパリン投与検体の各試薬における APTT 秒数・APTT 比・ヘパリン濃度・AT 活性値

No.	トロンボチェック		レボヘム		ヘパリン濃度 (IU/mL)	AT 活性 (%)
	APTT-SLA 秒	APTT 比	APTT-SLA 秒	APTT 比		
1	31.6	1.2	27.3	1.1	<0.10	81.0
2	42.5	1.7	44.0	1.7	<0.10	96.7
3	47.0	1.9	40.4	1.6	<0.10	62.8
4	44.2	1.7	36.2	1.4	<0.10	66.1
5	37.9	1.5	31.4	1.2	<0.10	103.0
6	34.6	1.4	31.9	1.3	0.10	107.0
7	52.9	2.1	38.8	1.5	0.13	57.1
8	42.7	1.7	41.4	1.6	0.16	75.8
9	43.4	1.7	37.8	1.5	0.17	77.6
10	40.3	1.6	35.0	1.4	0.19	75.0
11	51.7	2.0	54.8	2.2	0.23	80.8
12	41.0	1.6	37.6	1.5	0.24	85.0
13	42.6	1.7	46.5	1.8	0.25	71.6
14	43.4	1.7	42.6	1.7	0.27	82.4
15	43.4	1.7	43.2	1.7	0.27	75.7
16	42.8	1.7	40.9	1.6	0.27	83.7
17	59.0	2.3	69.5	2.7	0.30	82.1
18	43.4	1.7	42.7	1.7	0.30	83.2
19	44.5	1.8	50.7	2.0	0.30	60.9
20	45.0	1.7	42.2	1.6	0.31	70.3
21	47.2	1.9	43.4	1.7	0.31	76.6
22	43.8	1.8	43.8	1.7	0.33	78.2
23	42.7	1.7	45.4	1.8	0.36	79.5
24	52.4	2.1	52.8	2.1	0.41	88.6
25	82.1	3.2	99.3	3.9	0.41	79.9
26	73.6	2.9	99.9	3.9	0.41	60.5
27	74.4	2.9	102.7	4.0	0.51	71.5
28	58.5	2.3	70.5	2.8	0.52	75.4
29	80.1	3.2	118.9	4.7	0.52	70.9
30	63.5	2.5	72.2	2.8	0.52	83.4
31	97.5	3.8	132.8	5.2	0.59	74.8
32	88.2	3.5	129.2	5.1	0.74	92.1
33	85.7	3.4	120.7	4.8	0.76	76.7
34	127.3	5.0	152.7	6.0	1.13	92.1

②相関

レボヘム APTT-SLA とトロンボチェック APTT-SLA の相関は回帰式 $y=1.60x-26.43$, 相関係数 $r=0.972$ と良好であった。ヘパリン濃度が 0.4 IU/mL より高

濃度では、レボヘム APTT-SLA の APTT 秒数はトロンボチェック APTT-SLA より延長する傾向がみられた (表2, 図2)。

③血中ヘパリン濃度との比較

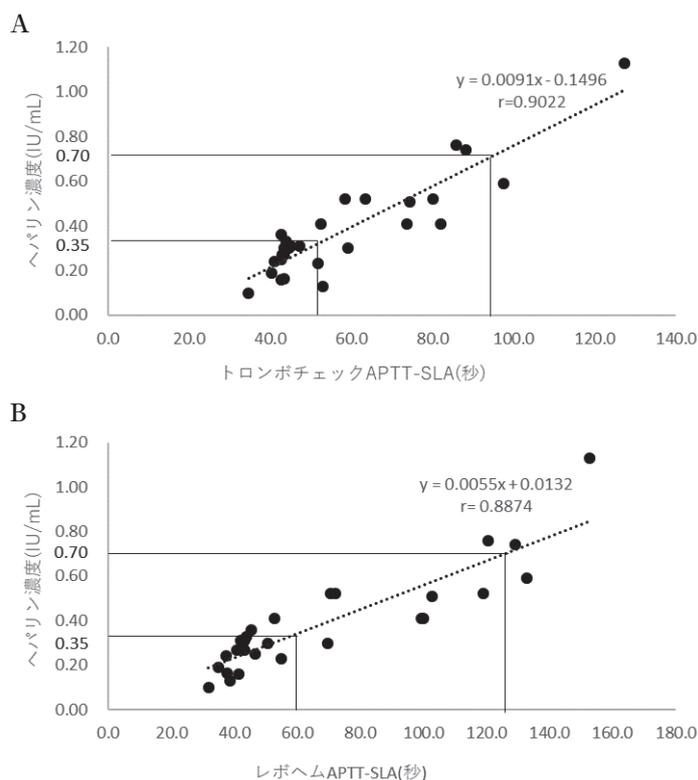


図3 各 APTT 試薬の APTT 秒数とヘパリン濃度の相関
 A：トロンボチェック APTT-SLA の APTT 秒数とヘパリン濃度の相関
 B：レボヘム APTT-SLA の APTT 秒数とヘパリン濃度の相関

表3 PCPS 使用のたこつぼ型心筋症例の血中ヘパリン濃度と APTT 比の比較

No.	トロンボチェック APTT-SLA		レボヘム APTT-SLA		ヘパリン濃度 (IU/mL)
	秒	APTT 比	秒	APTT 比	
1	44.5	1.8	50.7	2.0	0.30
2	82.1	3.2	99.3	3.9	0.41
3	73.6	2.9	99.9	3.9	0.41
4	74.4	2.9	102.7	4.0	0.51
5	80.1	3.2	118.9	4.7	0.52
6	97.5	3.8	132.8	5.2	0.59

トロンボチェック APTT-SLA の APTT 秒数とヘパリン濃度の相関係数は $r=0.902$ 、APTT 比とヘパリン濃度との相関係数は $r=0.906$ であった。また、レボヘム APTT-SLA の APTT 秒数とヘパリン濃度の相関係数は $r=0.887$ 、APTT 比とヘパリン濃度との相関係数は $r=0.888$ であった。APTT 秒数と APTT 比は各試薬ともに高い相関が示された(表2, 図3A, B)。

④ PCPS 使用のたこつぼ型心筋症例の血中ヘパリン濃度と APTT 比の比較

ヘパリン濃度 0.30～0.59 IU/mL の APTT 比は、レボヘム APTT-SLA が 2.0～5.2、トロンボチェック APTT-SLA は 1.8～3.8 であった。APTT 比の差は各々の試薬で 3.2、2.0 となった。また、ヘパリン濃

度が 0.4 IU/mL 以上では濃度依存性に APTT 比の差が増大した(表3)。

考 察

APTT の測定方法は標準化されておらず、活性化剤とリン脂質の組成の違いによる試薬間差が生じることが知られ、凝固因子やヘパリンなどに対する感受性について試薬の特性をよく理解し使用することが必要とされる³⁾。通常、ヘパリン療法時の血中ヘパリン濃度は、抗 Xa 合成基質法(活性)で 0.35～0.70 IU/mL とされており⁴⁾、今回の検討から、未分画ヘパリン血中濃度と APTT の相関性の回帰式から求めた 0.35～0.70 IU/mL に相当する APTT 凝固時間はレボ

ヘム APTT-SLA が 61.2～124.9 秒に対し、トロンボチェック APTT-SLA は 54.9～93.4 秒と差異を認めた。レボヘム APTT-SLA はヘパリン濃度が 0.4～0.8 IU/mL では、トロンボチェック APTT-SLA と比べ、ヘパリン濃度に依存して APTT 秒数の延長、APTT 比が増大し、APTT 比は最大 1.7 倍の差を認めた。PCPS の 1 例では血中ヘパリン濃度 (0.30～0.59 IU/mL) とレボヘム APTT-SLA での APTT 比 (2.9～5.2) はヘパリン濃度に依存した APTT 比の変動を認めた。今回検討したレボヘム APTT-SLA はヘパリン濃度に依存した APTT 比の変動を示すことからトロンボチェック APTT-SLA よりもヘパリン療法でのモニタリングに適した試薬であることが確認できた。

ヘパリン感度は、ヘパリン感度試験 (*in vitro*) と患者検体 (*in vivo*) での反応性の違いが報告されている。ヘパリンは陰性荷電の性質上、血管内皮細胞、単球などの細胞、およびアルブミン、血小板第 4 因子などのタンパク質と結合する。ヘパリンは生体内では豊富にあるこれらの細胞やタンパク質と十分に結合して抗凝固の機能を示すが、*in vitro* では試験管内の限られたタンパク質のみと結合して抗凝固能を発揮すると考えられ、この反応系の違いが両者の場におけるヘパリンの挙動の違いとして現れる 1 つの要因と想定され考慮しなければならない⁵⁾。

また、血中ヘパリン濃度と APTT 比の乖離を認める場合は、ヘパリン抵抗性を考慮する必要がある。ヘパリン抵抗性とは、APTT 比を 1.5 倍に延長するために 35,000 単位 / 日以上以上のヘパリンを要する病態として知られる⁶⁾。この原因として、血漿 AT 活性の低下、急性相反応蛋白質 (CRP) やヒスチジンリッチグリコプロテイン、血小板第 4 因子などの血漿蛋白、テトラサイクリン、抗ヒスタミン剤、ジギタリス、ニコチン酸などの薬剤によるヘパリン作用の中和、HIT (ヘパリン起因性血小板減少症) の存在が考えられる⁶⁾。従って、未分画ヘパリン療法の治療域に関しては、ヘパリン投与中の患者血漿を使用して検討することが望ましいと CLSI のガイドラインに記載されている⁷⁾。

今回の 34 検体の検討において、レボヘム APTT-SLA は良好なヘパリン感受性を示し、ヘパリン療法のモニタリングに適した試薬であると考えられた。

おわりに

レボヘム APTT-SLA は従来使用していたトロンボチェック APTT-SLA に比べ、ヘパリン治療のモニタリングに適した試薬である。しかし、未分画ヘパリンの反応性が異なる点に注意を要し、ヘパリン濃度が 0.4 IU/mL 以上では APTT 比はトロンボチェック APTT-SLA よりも高値となることに留意してモニタリングを行う必要がある。

文 献

- 1) 田中紀子, 眞部正弘, 山下昭一郎, 他: APTT 検査における検査試薬による実測値の違い. 臨病理, 61 (7): 576-582, 2013
- 2) 内藤澄悦, 家子正裕, 吉田美香, 他: ヘパリン治療のモニタリングにおける種々の APTT 試薬およびヘパリン投与量の相関性に関する検討. 日検血会誌, 13 (2): 160-166, 2012
- 3) 山崎あずさ, 糸井彩子, 甲田祐樹, 他: 全自動血液凝固測定装置 CS-5100 を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 測定試薬「レボヘム APTT SLA」の基礎的性能評価およびブループスアンチコアグラント感受性に着目した相関乖離検体の解析. 医療検査と自動化, 46 (3): 208-214, 2021
- 4) Hirsh J, Raschke R: Heparin and low-molecular weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest, 126 (3 Suppl): 188S-203S, 2004
- 5) 下村大樹, 河野 紋, 高田旬生, 他: 全自動血液凝固測定装置 CN-6000 における活性化部分トロンボプラスチン時間キット レボヘムTM APTT SLA の基礎的検討. Sysmex Journal Web, 22 (2): 31-49, 2021
- 6) 辻 肇: ヘパリン類の適正使用. 日血栓止血会誌, 19 (2): 187-190, 2008
- 7) 山崎 哲, 鈴木典子, 後藤宏実, 他: APTT の現状と標準化に向けた課題. 生物試料分析, 32 (5): 365-370, 2009

Editorial Comment

ヘパリンは、脳梗塞や急性心筋梗塞などの塞栓症の治療を行う上では欠かせない注射薬であり、血液の凝固作用を抑制して血栓形成を防ぐことで塞栓症の進行や新規発症を予防する。一方で、裏を返せば、その作用は出血しやすくすることでもあり、重篤な副作用として脳出血や肺出血などがある。そのため投与量は厳密に管理する必要がある。この研究はその指標であるAPTTを測定する試薬の精度について検討している。その結果、新規に採用した試薬は、従前のものと比較

して、ヘパリンの高濃度領域では投与量のわずかな変化でAPTTも大きく変動することが明らかになった。これは、特に高いAPTT比を目標とすることの多い循環器疾患を扱う場合に有用であり、臨床的にも重要な知見と思われる。

脳神経内科
白石翔一

脳血管領域・心血管領域でヘパリンは、従来幅広く汎用されている注射薬であり、特に本邦においては抗血栓薬の注射薬として最も多く使用されている。現在、経口の新規抗凝固薬（DOAC）の出現によりその使用頻度は減少しつつあるが、全てが置き換わるわけではなく未だその役割は大きい。

その作用効果の指標として血液検査でAPTT（活性化部分トロンボプラスチン時間）を測定することで、有効かつ安全な範囲でヘパリンの投与量を調整してきた。故に、その精度が重要となるがAPTTの測定法は未だ標準化されていないのが現状である。本研究は、そのAPTT測定に使用するレボヘムAPTT-SLA（当院で新規採用）とトロンボチェックAPTT-

SLA（従来使用）の2種類の試薬間でヘパリン感受性の違いを検討している。結果、レボヘムAPTT-SLAの方がトロンボチェックAPTT-SLAに比してヘパリン感受性が高く、濃度依存性にAPTT比の変動が大きくなる傾向を認めた。特にヘパリン濃度が0.4 IU/ml以上でその差は大きくなり、ヘパリン高濃度においてより正確なモニタリングが可能であることが示唆された。このことは、臨床的にはAPTT比をおおよそ2.0以上で調整する場合に、より安全にヘパリンを使用できるという点で重要である。

循環器内科
福田圭祐