

血友病臨床における凝固波形解析の応用

萩原建一*, 野上恵嗣

Clinical application of clot waveform analysis in hemophilia practice

Kenichi OGIWARA, Keiji NOGAMI

要約：血友病の凝固検査の特徴はAPTT延長にある。APTT測定時に得られる経時的な光強度情報（透過率、吸光度、散乱光量など）に基づく凝固波形解析から、血友病診療に有用なさまざまな情報が得られる。光強度変化を相対化することにより、凝固第VIII因子、第IX因子（FVIII, FIX）機能に焦点を当て、形成されるフィブリンの質的あるいは量的な影響を補正することが可能であり、実際に活用され始めている。血友病の診断においては、FVIII活性やFIX活性の1%未満の微量測定、genotypeとphenotypeを反映した包括的凝固機能“coagulotype”の判定、APTT延長要因についての効率的な識別、などに凝固波形解析が有用である。血友病の治療においては、半減期延長型凝固因子製剤、バイパス止血製剤、非凝固因子製剤のモニタリングへの応用が研究されている。凝固波形解析は臨床検査室レベルの全自動凝固検査装置に実装可能であることから、汎用性が最も期待される包括的凝固機能検査法であると言える。

Key words: hemophilia, clot waveform analysis, activated partial thromboplastin time, factor VIII, factor IX

はじめに

出血傾向患者の診療において、最初に行う一般的なスクリーニング検査を問われたら、ほとんどの臨床医が、血小板数、プロトロンビン時間（prothrombin time: PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time: APTT）を挙げるであろう¹⁾。この常識はおよそ半世紀の間、変わっていない。PubMed検索でprothrombin, partial thromboplastin timeを検索すると前者は1916年以降、後者は1958年以降からの履歴が表示される。PTとAPTTは今でも日常診療に欠くことのできない重要な検査であるが、その測定方法は時代とともに進化を遂げ、初期の職人的な目視技術（検査技師がストップウォッチを手に、試験管内血漿にフィブリン塊が生じるまでの時間を測定）の時代から、物理的測定

（金属球の振り子運動が静止するまでの時間を自動測定）、光強度計を用いた全自動測定へと変化してきた²⁾。試薬間差や施設間差といった課題について、PTはINR（international normalized ratio）表示による標準化がなされているが、APTTの標準化は未解決の課題である³⁾。時代と技法は変わっても、APTTの結果は時間（秒数）で表示される。凝固第VIII因子（FVIII）あるいは凝固第IX因子（FIX）が欠乏する血友病の一般止血検査の特徴は、今も昔も「血小板数正常、PT正常、APTT延長」である¹⁾。

1. 凝固波形解析と血友病

1) 凝固波形解析のパラメータ

凝固関連検査の自動化が進むに連れて、APTT測定時に記録される経時的な光強度データ（透過率、吸光度、散乱光量など）が得られるようになった。このデータから臨床的に有益な追補の情報を得られる可能性が初めて報告されたのは約25年前である⁴⁾。血友病への応用についても同時期にBraunらが初めて報告した⁵⁾。本邦ではShimaらがAPTT凝

*責任者連絡先：

奈良県立医科大学

〒634-8502 奈良県橿原市四条町840

Tel: 0744-29-8881, Fax: 0744-24-9222

E-mail: ogiwarak@naramed-u.ac.jp

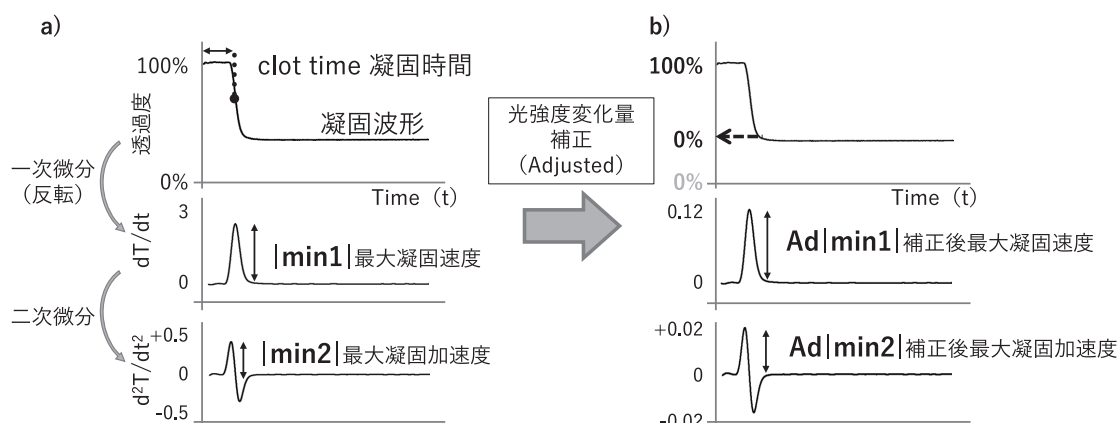


図1 APTT凝固波形の例と代表的な解析パラメータ。CaCl₂添加からの時間を横軸に、縦軸に透過度などの光強度をプロットする。a) 下向きS字波形の透過度変化量の50%に達した時間を凝固時間とし（凝固時間の定義は機種により異なる）、縦軸を反転し一次微分した波形から最大凝固速度が得られ、さらに二次微分した波形から最大凝固加速度が得られる。b) 透過度の開始値を100%、後凝固相で透過度が最下点でプラトーに達した値を0%と定義し、光強度変化量を相対化した波形から補正後最大凝固速度、補正後最大凝固加速度が得られる。（西山敦子と著者にて作成）

凝固波形解析が血友病診療へ応用できることをいち早く報告した⁶⁾。すなわち、APTT測定の際に記録される透過率の波形（横軸は時間、縦軸は透過率）において、反応曲線はフィブリン形成量を反映する。APTTではCaCl₂添加から凝固開始までの凝固前相のみ（凝固開始時間）が評価されるが、反応曲線は凝固開始後に一定速度でフィブリン形成を生じる凝固相、凝固反応が終了後に生じる凝固後相に至る全過程から構成される。この全波形データをコンピュータ処理し、一次微分波形と二次微分波形を得ることができた。前者はフィブリン生成速度（凝固速度）を、後者はフィブリン生成加速度（凝固加速度）と減速度（凝固減速度）を反映する。フィブリン形成によって透過光量は低下し、反応曲線は下向きのシグモイド曲線を描くため、一次（二次）微分波形における最小値をmin1（min2）と表示し、その絶対値である|min1|（|min2|）を最大凝固速度（最大凝固加速度）と定義した⁶⁾。APTT凝固波形解析における基本的なパラメータは、この凝固開始時間、最大凝固速度、最大凝固加速度である（図1a）。近年、凝固波形解析が可能な機器が複数登場しているが、光学的情報として透過率ではなく吸光度や散乱光量を用いる場合、反応曲線は上向きの曲線となるため留意が必要である。いずれにおいてもフィブリン形成

の方向を陽性とするれば混乱を回避できる⁷⁾。

2) 包括的凝固機能検査における凝固波形解析の位置付け

血友病診療において、APTTや凝固因子活性測定は必須であるが、それだけでは臨床ニーズに十分に応えることができない。例えば、「APTT延長があっても必ずしも出血傾向を呈するわけではない（第XII因子欠乏や抗リン脂質抗体症候群）」「凝固因子活性が同程度の低値でも臨床的な出血症状の重症度に個人差がある」「インヒビター患者におけるバイパス止血治療の適切なモニタリング法がない」などである。このようなニーズから包括的凝固機能検査が開発されてきた⁸⁾。キーワードは、「生理的な凝固反応（凝固惹起物質、血液成分、血流など）への近似」と「経時的多角的なパラメータを用いた評価」であると筆者は考える⁹⁾。これらの条件を理想的に追求すれば複雑な装置や高額な試薬が必要である。凝固波形解析の利点は、一般的な臨床検査室が購入する全自動凝固検査装置に実装可能なレベルで、試薬やプログラムが提供できる点にある。凝固波形解析は、最も汎用性が高い包括的凝固機能検査と言える。

3) 光強度変化量補正の意義

凝固波形解析の凝固相における光強度の変化は、フィブリン形成量を反映する。凝固後相で光強度が

プラトーに達した状態では、ほぼ全てのフィブリノゲンがフィブリンに変換されたと解釈できる。したがって、凝固前相と凝固後相の間の光強度変化量は被検血漿中のフィブリノゲン濃度に依存する。血友病における APTT 延長要因は FVIII あるいは FIX の欠乏であるため、およそ正常範囲にあるフィブリノゲン濃度の影響は除外する必要がある。凝固波形パラメータのうち、縦軸の光強度変化量に関連する最大凝固速度や最大凝固加速度は、たとえ FVIII (FIX) 活性が同じであってもフィブリノゲン濃度が異なれば数値が異なる。この問題を解決するには、光強度変化量を相対値に変換することが有用である。Nogami らは、凝固前相と凝固後相の光強度をそれぞれ 0% と 100% に変換し変化量を補正 (adjusted) することで、 $|min1|$ 、 $|min2|$ よりも FVIII 活性に対して鋭敏となるパラメータ ($Ad|min1|$ 、 $Ad|min2|$) を報告した (図 1b)¹⁰⁾。

しかし、フィブリノゲン濃度が同一であっても他の凝固因子の欠乏状態によって光強度変化量に違いがあることがわかっている。Wolberg らは血友病 B 血漿に遺伝子組換え活性化型第 VII 因子製剤 (rFVIIa) を添加した際の希釈 PT 試験における血漿の濁度変化 (大雑把な凝固波形と言える) と電子顕微鏡画像の解析から、形成されるフィブリンの質はトロンビン生成量に依存し、トロンビン生成量が不十分な場合は疎で太いフィブリン線維となり、トロンビン生成量が十分な場合は密で細いフィブリン線維となることを確認し、濁度変化量はフィブリノゲン濃度が同一であっても、前者で大きく、後者で小さくなることを報告した¹¹⁾。Shimonishi らは、FVIII 欠乏血漿に rFVIII やエミシズマブを添加した際の APTT 試験においても同様にフィブリンの質的变化が生じることを報告した¹²⁾。

市販 FVIII 欠乏血漿 (FVIII 活性 0.3% 未満) を用いた実例を示す (図 2a)。フィブリノゲン濃度を含む他の凝固因子活性が一定の条件で、種々の濃度の FVIII を添加して APTT 凝固波形解析を実施した。凝固開始時間は FVIII 濃度に比例して短縮すると同時に、光強度 (透過率) 変化量は FVIII 濃度に比例して減少した。このことはフィブリン線維が疎で太い物性から密で細い物性に質的に変化したことを示

す^{11,12)}。この波形解析から $|min1|$ と $Ad|min1|$ 、あるいは $|min2|$ と $Ad|min2|$ といったパラメータを比較すると、この補正により FVIII 濃度変化に対して、より鋭敏なパラメータが得られることがわかる (図 2b)。

以上から、血友病患者血漿の凝固波形解析における光強度変化量補正の意義は、第 1 にフィブリノゲン濃度の影響を除くこと、第 2 に形成されるフィブリン線維の質的变化の影響を除くことにあり、総じて内因性 tenase 活性 (リン脂質膜上で FIXa/FVIIIa による凝固第 X 因子 (FX) 活性化反応) に鋭敏なパラメータを供する点にある。しかし、フィブリノゲン濃度も重要な凝固関連情報であることを考慮すると、このような補正が一律に最善とは言い難く、検討すべき課題である⁷⁾。例えば COVID-19 患者血漿ではフィブリノゲンが著増するため、最大凝固速度 (加速度) も基準値を超過するが、フィブリノゲン濃度を補正した値は正常域に近づくであろう。高フィブリノゲン血漿も血栓リスク因子とされており、Onishi らの検討では、フィブリノゲン濃度を加味したパラメータ (補正なし) が主要な解析指標とされた¹³⁾。このように光強度補正の利点と欠点をふまえて目的に応じた使い分けが必要である。血友病においては、FVIII (FIX) に特化した凝固機能を評価するうえで補正する意義が高いと考えるが、フィブリノゲンの量と質も含めた総合的な (補正なしの) 評価も同時に重要であろう。

凝固波形解析の理論的解釈については他稿を参照されたい⁷⁾。本稿では、血友病における凝固波形解析の特徴について、診断と治療にわけて述べたい。

2. 血友病の診断における凝固波形解析

1) 微量活性測定

血友病の診断に必須の検査は血漿 FVIII (FIX) 活性測定であり、活性 1% (IU/dL) 未満が重症、1~5% が中等症、5~30% が軽症とされる。重症が 1% 未満という定義は臨床的にもおよそ正しいが、凝固 1 段法にせよ 2 段法 (合成基質法) にせよ、従来の測定限界が 1% 程度であったから 1% 未満と定義されたのであろう。測定下限が 5% であれば重症の定義は 5% 未満であったかもしれない。血友病の最重症

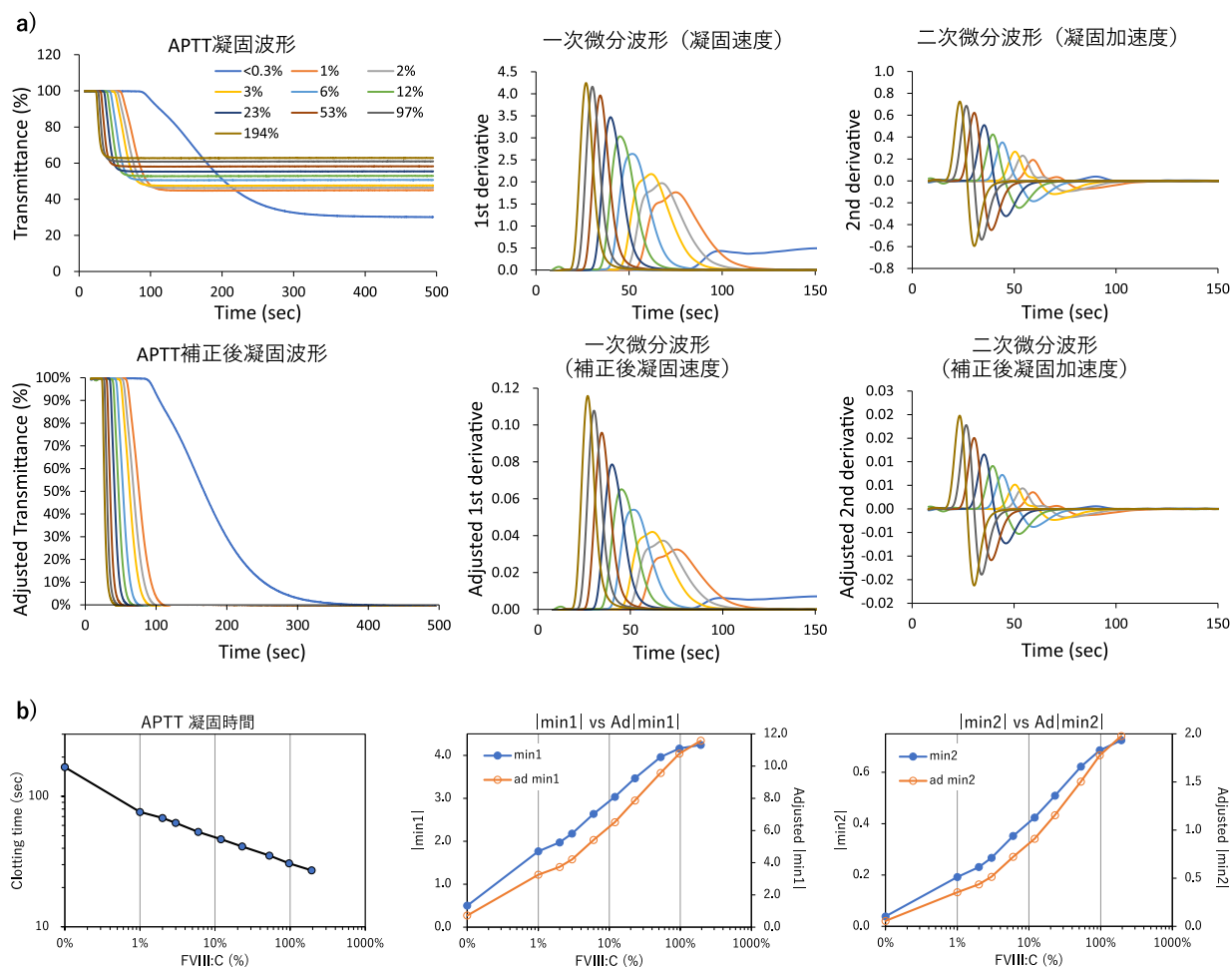


図2 FVIII活性が光強度変化量に及ぼす影響と変化量補正の意義. a) 市販FVIII欠乏血漿 (FVIII活性<math><0.3\%</math>)にrFVIIIを1%~194% (IU/dL)添加した際のAPTT凝固波形, 一次微分波形, 二次微分波形を示す. 上段は補正なし, 下段は光強度変化量を相対値 (百分率)に補正した波形を示す. b) APTT凝固波形の各パラメータを縦軸に, FVIII活性を横軸に示す. 凝固時間は光強度変化量の補正に影響は受けない, 最大凝固速度 ($|min1|$)と補正後最大凝固速度 ($Ad|min1|$), 最大凝固加速度 ($|min2|$)と補正後最大凝固加速度 ($Ad|min2|$)を同じグラフで示す. (笹井香那と著者にて作成)

型はFVIII (FIX)活性の完全欠損例およびインヒビター例であることは自明であるが, では完全欠損でない場合, どの程度の微量活性を有する症例があり得るのか? その解答にAPTT凝固波形解析が有用であった. Shimaらは, 重症血友病AのAPTT凝固波形が均一ではなく, 凝固前相の長さや凝固相の傾きが様々であることを見出した. そして全自動凝固測定装置を用いた凝固一段法によるFVIII活性測定において, 検量線希釈列を従来の1%からさらに微量の0.2%まで希釈して同定することに成功した. そ

の結果, APTT凝固波形パラメータである $|min1|$, $|min2|$ は微量FVIII活性と良好に相関し, FVIII完全欠損例のFVIII活性は0.2%未満であるとした⁶⁾. さらに松本らは, genotypeがnull変異であるイントロン22逆位では, 全例がFVIII活性0.2%未満であり, non-null変異の重症例の中にはFVIII活性が0.2~0.9%の微量活性を認める例があることを報告した¹⁴⁾.

一方, 血友病Bにおいて, FIX活性1%未満の重症例のAPTT凝固波形も, 血友病Aと同様に均一で

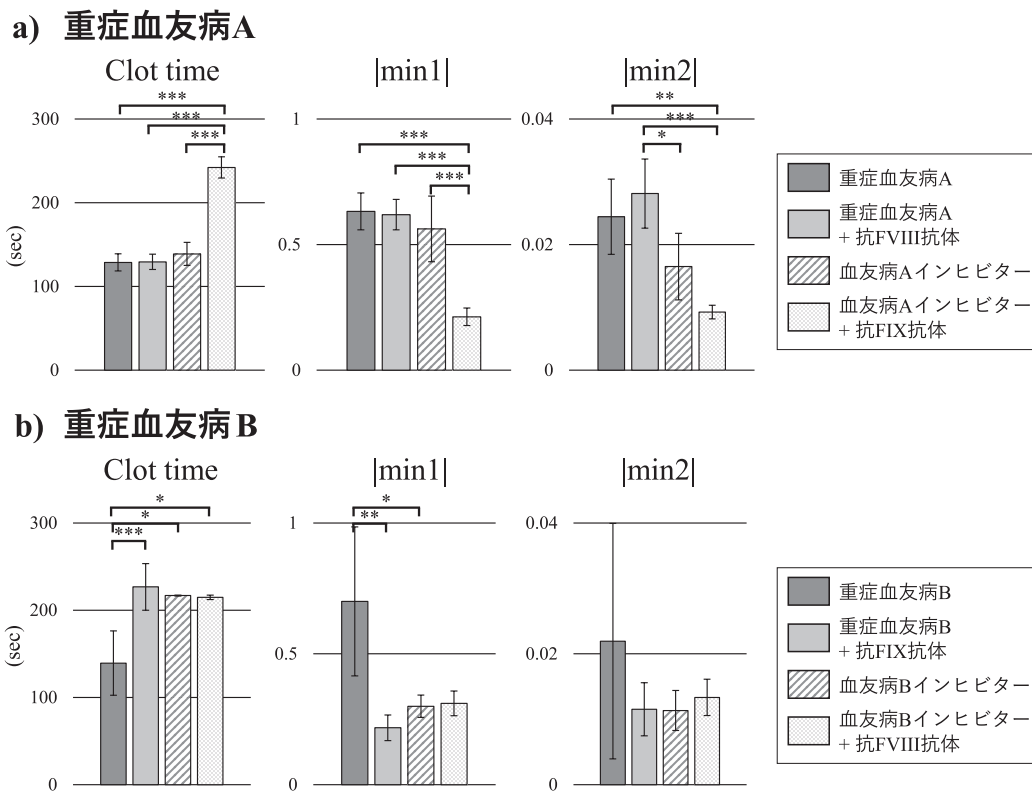


図3 重症血友病Aと重症血友病BにおけるAPTT凝固波形パラメータの比較. a) 市販の重症血友病A患者血漿 (n = 6) に抗FVIII抗体添加の有無, 抗FVIIIインヒビター保有先天性血友病A患者血漿 (n = 4) に抗FIX抗体添加の有無の4群. b) 市販の重症血友病B患者血漿 (n = 6) に抗FIX抗体添加の有無, 抗FIXインヒビター保有先天性血友病B患者血漿 (n = 3) に抗FVIII抗体添加の有無の4群. 各4群間で, 凝固時間 (clot time), 最大凝固速度 (|min1|), 最大凝固加速度 (|min2|) の統計学的有意差を解析した. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (文献15より一部改変)

はなかった. しかし, 全自動凝固測定装置を用いたFIX活性の微量測定のためには, 一工夫が必要であった. Nishiyamaらは活性1%未満の市販FVIIIあるいはFIX欠乏血漿を用いAPTT凝固波形解析を実施したところ(図3), FVIII欠乏血漿, FIX欠乏血漿の凝固能パラメータ (clot time, |min1|, |min2|) は, およそ同等であった. これらの血漿中FVIII (FIX) 活性を完全消失させるため, FVIII欠乏血漿に抗FVIII中和抗体を, FIX欠乏血漿に抗FIX中和抗体を添加したところ, FIX欠乏血漿のみ凝固能が有意に低下した. この時のパラメータ値は, 血友病AおよびBそれぞれのインヒビター患者血漿と同等であった¹⁵⁾. よって, この検討に用いたFVIII欠乏血漿には残存活性がほとんどなく, FIX欠乏血漿には1%未満ながら微量残存活性を有することが示唆された. さらに,

血友病Aインヒビター患者血漿に抗FIX抗体を添加すると凝固能はさらに低下したが, 血友病Bインヒビター患者血漿に抗FVIII抗体を添加しても凝固能はそれ以上には低下しなかった(図3). つまり, APTT凝固反応において, セリンプロテアーゼ活性を有するFIXが原理的に不可欠であることが確認された. この知見をもとに, 凝固一段法によるFIX活性微量測定法を検討したところ, 測定に用いる市販FIX吸着除去血漿には, 実は1%未満の微量FIX活性が種々の程度に残存していることが判明し, 微量活性測定を困難にしている要因と考えられた. 残存活性のより少ない吸着除去血漿を選択することで0.01%~1.0% (IU/dL) の範囲で良好な検量線を作成することに成功し, 0.01% (IU/dL) を最下限としてFIX微量活性を測定することができた¹⁵⁾.

最近、本邦の血友病患者におけるレジストリ研究 (J-HIS1/2) の成果が報告されたが、海外の既報告と同様、重症血友病 A では F8 遺伝子の null 変異が多い一方、重症血友病 B では F9 遺伝子の non-null 変異が多いことが分かり¹⁶⁾、null 変異はインヒビター発現リスクであった¹⁷⁾。凝固波形解析とその原理を応用した FVIII (FIX) の微量活性測定は、臨床的な出血症状の重篤度の予測に加えて、遺伝子型やインヒビターリスクの予測にも貢献できる可能性を秘めている。

2) “Coagulotype” の評価

FVIII (FIX) 活性が同程度であっても臨床病型 (phenotype) は患者によって異なることがある。この差は遺伝子型 (genotype) に規定されるが、凝固波形解析などの包括的凝固機能でも差を認めることがあり、我々は“coagulotype”と呼んでいる¹⁸⁾。中等症・軽症血友病は F8 (F9) 遺伝子の点変異により生じることが多く、因子活性による重症型分類と phenotype に乖離が生じ、包括的凝固機能検査で評価した“coagulotype”と phenotype が合致することをしばしば経験する。

Yada らは、凝固一段法で FVIII 活性が 0.9 IU/dL と重症型でありながら臨床的な出血症状が軽微な血友病 A 患者において、凝固波形解析パラメータからは通常の FVIII 活性 5~10 IU/dL の軽症型に相当する“coagulotype”であることを示し、この患者の genotype (p.R1800H の点変異) との関連 (変異 FVIII が FX との強い親和性を有する) を報告した¹⁹⁾。Miyashita らも、FVIII 活性が 1 IU/dL 未満と重症型でありながら関節・筋肉出血の既往がない若年成人血友病 A 患者において、凝固波形解析では通常の重症型よりも高い凝固能 (最大凝固速度と最大凝固加速度) を示すことを報告した。さらにこの患者の genotype (p.H118R) を発現させた変異 FVIII 蛋白は、野生型に比べて α トロンピンによる活性化が持続し、活性化プロテイン C による不活化が遅延することを明らかにした²⁰⁾。このように、凝固波形解析による“coagulotype”判定は、genotype、phenotype と共に FVIII (FIX) 分子異常症を評価する際に有用なツールとなり得る。

3) APTT 延長要因の識別

～新規パラメータ応用の試み～

凝固波形解析のパラメータは、波形を一次・二次微分することで得られ、時には三次微分を用いた報告もなされてきた²¹⁾。このような波形処理によって安定的なパラメータを得るためには、波形の微細な乱れ (ノイズ) を除去する必要がある、詳細は非公開ながら何らかの (移動平均など) 手法で波形の平滑化処理がなされていると推測される。しかし、この平滑化処理によって重要な情報が見逃されていた可能性がある。Shimonishi らは、種々の凝固因子欠乏血漿の凝固波形において、平滑化処理の有無による波形を比較し、平滑化処理前の波形では左右非対称で 2 峰性を示す欠乏血漿があり、この特徴は平滑化処理で失われることを見出した (図 4a)²²⁾。特に FVIII 欠乏血漿では 2 峰性が顕著で、かつピークが低く横に長い波形となり、FVIII 濃度が増すにつれて 2 峰目が大きくなり、やがて 1 峰目と区別のつかない 1 峰性となった (図 4b)。この 2 峰性波形の特徴を数値として表現するため、加重平均に関連した合計 50 に及ぶパラメータ群を算出した。そして、凝固因子活性などの情報が既知であるテンプレート血漿を 158 検体準備し、被検血漿のパラメータ群と各テンプレート血漿のパラメータ群とで相関係数を評価した。そして最も高い相関係数を示すテンプレート血漿を被検血漿の「診断名」として結果を検証したところ、78 例の被検血漿において、感度 97.2%、特異度 83.3% で FVIII 活性 40 IU/dL 未満の検体を識別できた²²⁾。

APTT 延長時に見落としてはならない疾患には、ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant: LA) やインヒビター保有血友病、後天性血友病があり、これらの鑑別に交差混合試験が有用であるが、通常は 2 時間の加温時間が必要である²³⁾。Shimonishi らは、凝固波形解析パラメータを用いた短時間 (加温時間 0 分と 12 分) の交差混合試験 (正常血漿: 被検血漿 = 1:9, 1:1, 9:1) を実施することで、先天性血友病 A、インヒビター保有血友病 A、LA 陽性を効率的に識別できる方法を開発した²⁴⁾。

包括的凝固機能検査を用いて APTT 延長要因を識別する試みは過去にもあった²⁵⁾。このような方法を

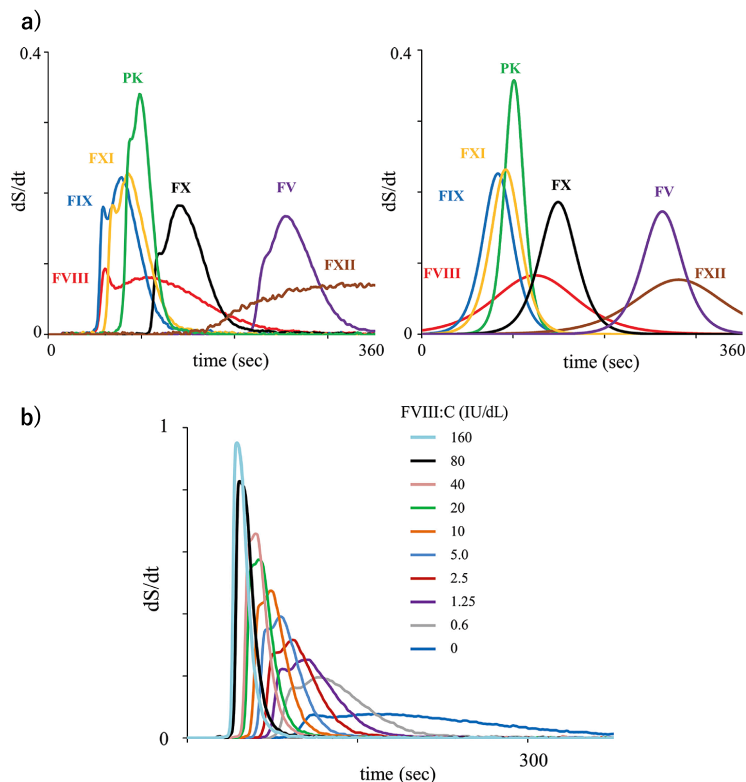


図 4 種々の凝固因子欠乏血漿における APTT 凝固波形の特徴. a) FV, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, プレカリクレイン (PK) の各欠乏血漿の APTT 凝固波形の一次微分波形. 平滑化処理なし (左), 平滑化処理あり (右). b) 市販 FVIII 欠乏血漿に種々の濃度の rFVIII (0~160 IU/dL) を添加した際の APTT 凝固波形の一次微分波形. (文献 22 より一部改変)

全自動装置に実装できれば, APTT 延長検体が発生した際に, 装置が自動的に疾患判定まで行うといった応用が期待される.

3. 血友病の治療における凝固波形解析

1) 遺伝子組換え凝固因子製剤・半減期延長型製剤のモニタリング

血友病治療の基本は, 不足する FVIII (FIX) の補充である. 現在, 血漿由来製剤 (pdFVIII/pdFIX), 遺伝子組換え標準型製剤 (SHL-rFVIII/rFIX), 遺伝子組換え半減期延長型製剤 (EHL-rFVIII/rFIX) が種々に存在し, 患者の活動度, 年齢, 出血頻度, 標的関節の有無などに応じた製剤選択が可能である. しかし, 凝固因子活性測定に関しては, APTT 標準化問題に起因する試薬間差, 施設間差が従来から課

題であったところに, 新たに製剤間差の課題が加わった. すなわち, rFVIII における B ドメインの有無や EHL-rFVIII (rFIX) における修飾物質 (ポリエチレングリコール, Fc フラグメント, アルブミンなど) の影響により, 適切な凝固因子活性測定方法が異なるといった問題が生じている^{26, 27)}.

Wada らは, 市販標準血漿, SHL-rFVIII のオクトコグベータ, EHL-rFVIII のダモクトコグアルファペゴルの 3 検体について, 12 種の APTT 試薬による凝固波形解析を比較検討したところ, 凝固波形パラメータごとの試薬間差が大きかったものの, 最大凝固速度をパラメータに測定した FVIII 比活性はダモクトコグアルファペゴルで高い傾向がほとんどの APTT 試薬 (10/12) に共通して認められた. 希釈 PT 試薬と rFIX からなる混合試薬 (sTF/FIX) を用いて凝固波形解析を実施した場合も同様の傾向があり, 時間

軸パラメータよりも速度軸パラメータ（最大凝固速度）の有用性が示唆された²⁸⁾。このように、凝固波形解析は各種凝固因子製剤の特性を反映した解析に活用できる可能性がある。

2) バイパス止血製剤のモニタリング

インヒビターの発生した血友病患者において、バイパス止血製剤は出血時治療における重要な選択肢であり、遺伝子組換え活性型第 VII 因子製剤 (rFVIIa)、血漿由来の活性化プロトロンビン複合体製剤 (activated prothrombin complex concentrate: aPCC)、血漿由来の FVIIa/FX 製剤 (FVIIa/FX) が本邦では使用可能であり、aPCC と FVIIa/FX は出血予防目的の定期補充療法の適応がある。しかし、これらの薬剤の臨床検査による評価方法は確立しておらず、多くの施設では PT や APTT を間接的な指標に臨床症状を慎重に観察しながら投与せざるを得ないのが現状である²⁹⁾。Haku らは、遺伝子組換え組織因子とエラグ酸の混合試薬を用いた凝固波形解析による rFVIIa と aPCC のモニタリング法を考案し、本法が実際のインヒビター保有血友病患者の周術期止血管理に有用であったと報告した³⁰⁾。

3) 非凝固因子製剤のモニタリング

2018 年に FVIII 機能を代替する二重特異性抗体製剤 エミシズマブが保険収載され、インヒビター保有患者を含む重症～中等症血友病 A 患者の出血予防に優れた効果を発揮している。エミシズマブは正確には活性型 FVIII (FVIIIa) 機能を代替し、FVIII が活性化される時間が短縮されるため、投与患者の APTT は過剰に短縮するため、モニタリング法が課題である³¹⁾。Nogami らは、前述のバイパス止血製剤モニタリング法をふまえ、市販 PT 試薬と APTT 試薬を最適な濃度で希釈混合した希釈 PT/APTT 試薬を用いた凝固波形解析法を考案し、エミシズマブのモニタリングへの応用を試みた。本法では、前項で述べた光強度変化量補正処理を導入し、フィブリノゲン濃度や形成フィブリンの質の差を補正することが可能であり、補正最大凝固速度 (Ad|min1) が有用なパラメータであると報告した¹⁰⁾。本法は前述のバイパス止血製剤モニタリング法の応用であり、Furukawa らは、エミシズマブとバイパス止血製剤の併用時のモニタリングに有用であったと報告した³²⁾。エミシ

ズマブと FVIII 併用時のモニタリングについても、Yamada らが治療中の Ad|min1|の経過を報告している³³⁾。

また、Nakajima らは、エミシズマブ投与中の患者群と軽症血友病 A 患者群について、希釈 PT/APTT 混合試薬による凝固波形解析等の包括的凝固機能検査を用いて比較検討し、両群の出血パターンや凝固機能が同等であったことから、エミシズマブの臨床的止血効果は、軽症血友病 A 患者レベルに相当すると結論した³⁴⁾。こうしたエミシズマブ単独の包括的凝固機能と、バイパス止血製剤や FVIII 製剤と併用した際の総合的止血機能について、現在、UNEBI 研究 (jRCTs051190119)、Caguyama 研究 (jRCTs051210137) という 2 つの特定臨床研究法に基づく多施設前向き介入研究が行われており、凝固波形解析パラメータが主要評価項目となっている。

生理的抗凝固因子製剤を阻害することで血友病患者の出血傾向を改善 (rebalancing) する非凝固因子製剤の開発も進んでいるが、これらのモニタリング法も解決すべき課題であり、凝固波形解析の応用が期待される³⁵⁾。

おわりに

血友病診療に関連する凝固波形解析の最近の知見を紹介した。これらの知見が今後の血友病の診断と治療に臨床応用されることを期待したい。凝固波形解析が普及した近未来に、例えば「APTT 延長アラームです。凝固波形解析が重症血友病 A 疑いと表示しています。」「凝固波形解析からは FVIII 活性 50% 相当の凝固能が得られています。エミシズマブとバイパス止血製剤の併用効果としては良好ですね。」といった会話が医師や臨床検査技師の間で交わされるような時代が来ることを願ってやまない。

謝辞

図の作成に協力頂いた笹井香那氏、西山敦子氏に深謝いたします。

著者全員の利益相反 (COI) の開示 :

萩原建一 : 企業などが提供する寄附講座 (CSL)

野上恵嗣 : 講演料・原稿料など (中外製薬, Sanofi, NovoNordisk, CSL), 臨床研究 (治験) (中外製薬, NovoNordisk, Sanofi, Takeda, KM-Bio, Pfizer), 研究費 (受託研究, 共同研究, 寄付金等) (中外製薬, NovoNordisk, KM-Bio, Sanofi, Bayer, CSL, Fujimoto, Sysmex, SEKISUI Medical, Takeda), 企業などが提供する寄附講座 (Takeda, CSL)

文献

- 1) 備後真登: 出血傾向の鑑別. 血栓止血誌 **29**: 659–664, 2018.
- 2) 福士顕: 自動分析装置による血液凝固時間測定—ACL TOP シリーズ, STACIA—. 生物試料分析 **32**: 408–416, 2009.
- 3) 山崎哲, 内藤澄悦, 静怜子, 他: APTT 検査およびルーブスアンチコアグラント検査の標準化. 血栓止血誌 **27**: 636–643, 2016.
- 4) 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.
- 5) Braun PJ, Givens TB, Stead AG, et al.: Properties of optical data from activated partial thromboplastin time and prothrombin time assays. *Thromb Haemost* **78**: 1079–1087, 1997.
- 6) 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.
- 7) 涌井昌俊: 凝固波形解析. 血栓止血誌 **33**: 69–74, 2022.
- 8) 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.
- 9) 萩原建一: 包括的血液凝固検査. 血栓止血誌 **29**: 595–599, 2018.
- 10) 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.
- 11) Wolberg AS, Allen GA, Monroe DM, et al.: High dose factor VIIa improves clot structure and stability in a model of hemophilia B. *Br J Haematol* **131**: 645–655, 2005.
- 12) Shimonishi N, Nogami K, Ogiwara K, et al.: Emicizumab improves the stability and structure of fibrin clot derived from factor VIII-deficient plasma, similar to the addition of factor VIII. *Haemophilia* **26**: e97–e105, 2020.
- 13) Onishi T, Shimonishi N, Takeyama M, et al.: The balance of comprehensive coagulation and fibrinolytic potential is disrupted in patients with moderate to severe COVID-19. *Int J Hematol* **115**: 826–837, 2022.
- 14) 松本智子, 嶋緑倫: 凝固波形解析と第 VIII 因子微量測定への応用. 血栓止血誌 **14**: 122–127, 2003.
- 15) Nishiyama A, Ogiwara K, Mizumachi K, et al.: Activated partial thromboplastin time-based clot waveform analysis enables measurement of very low levels of factor IX activity in patients with severe hemophilia B. *Int J Hematol* **116**: 778–786, 2022.
- 16) Shinozawa K, Yada K, Kojima T, et al.: Spectrum of F8 genotype and genetic impact on inhibitor development in patients with hemophilia A from multicenter cohort studies (J-HIS) in Japan. *Thromb Haemost* **121**: 603–615, 2021.
- 17) Nogami K, Taki M, Matsushita T, et al.: Clinical conditions and risk factors for inhibitor-development in patients with haemophilia: A decade-long prospective cohort study in Japan, J-HIS2 (Japan Hemophilia Inhibitor Study 2). *Haemophilia* **28**: 745–759, 2022.
- 18) 野上恵嗣: 包括的凝固検査を用いた血友病診療の発展. 血栓止血誌 **28**: 451–459, 2017.
- 19) 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.
- 20) Miyashita R, Shinozawa K, Inaba H, et al.: Prolonged α -thrombin-related activation and delayed active protein C-associated degradation confer mild phenotype in a patient with severe hemophilia A with F8 p.H118R. *Int J Hematol* **116**: 489–499, 2022.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) 山崎哲: 交差混合試験. 血栓止血誌 **29**: 582–585, 2018.
- 24) 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.
- 25) Matsumoto T, Nogami K, Shima M: 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.
- 26) Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD: A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* **14**: 248–261, 2016.
- 27) Nagao A, Kaneko M, Kazama F, et al.: Discrepancies between the one-stage clotting assay and chromogenic assay in patients with hemophilia A receiving standard or extended half-life factor VIII products in clinical settings. *Thromb Res* **185**: 150–152, 2020.
- 28) 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.
- 29) 田中一郎, 天野景裕, 瀧正志, 他: インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン. 血栓止血誌 **19**: 520–539, 2008.
- 30) Haku J, Nogami K, Matsumoto T, et al.: Optimal monitoring

-
- of bypass therapy in hemophilia A patients with inhibitors by the use of clot waveform analysis. *J Thromb Haemost* **12**: 355–362, 2014.
- 31) 徳川多津子, 石黒精, 大平勝美, 他: 血友病患者に対する止血治療ガイドライン: 2019年補遺版 ヘムライブラ® (エミシズマブ) 使用について. *血栓止血誌* **31**: 93–104, 2020.
- 32) Furukawa S, Nogami K, Shimonishi N, et al.: Prediction of the haemostatic effects of bypassing therapy using comprehensive coagulation assays in emicizumab prophylaxis-treated haemophilia A patients with inhibitors. *Br J Haematol* **190**: 727–735, 2020.
- 33) Yamada Y, Nakajima Y, Ohara A, et al.: Two pediatric cases of severe hemophilia A in which emicizumab prophylaxis failed to prevent traumatic extra-articular hemorrhage. *Int J Hematol* **12**: 1–6, 2022.
- 34) Nakajima Y, Mizumachi K, Shimonishi N, et al.: Comparisons of global coagulation potential and bleeding episodes in emicizumab-treated hemophilia A patients and mild hemophilia A patients. *Int J Hematol* **115**: 489–498, 2022.
- 35) Nogami K, Shima M: Current and future therapies for haemophilia—Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol*, 2022. doi: 10.1111/bjh.18379.