

表 4. 算出された補正係数値

No.	N 法	B 法	S 法	M 法
1	1.00	0.44	0.35	0.62
2	1.00	0.48	0.27	0.62
3	1.00	0.46	0.38	0.51
4	1.00	0.44	0.48	0.59
5	1.00	0.43	0.34	0.45
6	1.00	0.31	0.29	0.34
7	1.00	0.52	0.43	0.46
8	1.00	0.64	0.67	0.57
9	1.00	0.63	0.55	0.56
10	1.00	0.54	0.62	0.58
Mean (f)	1.00	0.49	0.44	0.53

(N 法測定値/各法測定値)

から同一の測定法による結果と誤解されることも少なくない。また、インヒビター測定には様々な変動要因が指摘されており⁹⁾、中でも FVIII:C の測定に使用する APTT 試薬の組成(リン脂質、活性化剤)とインヒビター間で認められる反応性の違いは著しく⁹⁾、異なるインヒビター測定法の混在に加え、さらなる問題点も抱えている。われわれは、これまでに FVIII インヒビター陰性の血友病 A 患者検体を対象としてインヒビター測定法 4 法について検討し、その特性に差異があることを報告した⁹⁾。今回さらに、インヒビター陽性の血友病 A 患者検体を対象として、同様にインヒビター測定法 4 法について比較検討した。

はじめに 4 法の検体希釈法について、FVIII 欠乏血漿を被検材料に用い pH と FVIII:C の変化を比較検討した。N 法では検体希釈に伴う差異は観察されなかったが、被検血漿と希釈液の両者がともに FVIII 欠乏血漿で、同じ反応液条件となるためと思われた。これに対し、緩衝液で希釈する B 法、M 法では検体希釈に伴った中性域への pH 変化が観察され、反応液中の緩衝液比率の漸増によってもたらされる変化と考えられた。また、このとき FVIII:C は 1 倍で B 法; 29.1%, M 法; 18.8% であったが、希釈液のみの反応液ではそれぞれ 46.5%, 39.6% と両測定法内で大きな差を認め、このことは、既にわれわれが報告したインヒビター測定時における反応液 pH と FVIII:C 測

表 5. 補正後の 4 法のインヒビター結果

No.	N 法	B 法	S 法	M 法	CV%
1	1.47	1.62	1.82	1.27	15.3
2	1.85	1.90	2.99	1.57	30.0
3	2.07	2.18	2.36	2.16	5.6
4	3.32	3.70	3.07	2.96	10.0
5	3.38	3.86	4.38	4.02	10.6
6	3.54	5.53	5.41	5.54	19.6
7	5.61	5.23	5.68	6.40	8.5
8	6.02	4.62	3.92	5.61	18.9
9	6.50	5.06	5.20	6.15	12.3
10	113.58	103.38	80.05	103.95	14.2

各法の結果は BU/ml

定値の負の関係⁹⁾と同様の結果(すなわち、反応液の pH が中性域へと低下するにつれて、FVIII:C 測定値は上昇する)と考えられた。実際のインヒビター測定時において、B 法では緩衝液のみの反応液が対照反応液であるため、今回検討した 1 倍反応液がそのまま FVIII 残存活性 62.6% となり、ゆえにインヒビター値は 0.68BU/ml と求められて「陽性」と判定される値となってしまう。一方、M 法では、同じ血漿成分比率に保持された条件下の測定反応液と対照反応液から残存活性を求めるため、希釈に伴う pH 等の液性差は小さく、偽陽性を示すことは少ないと考えられる。また、生理食塩水で希釈する S 法は、pH 8.3 前後と高いものの変動は小さく FVIII:C 変化も軽度であったが、pH 緩衝作用の無い生理食塩水がもたらす結果と考えられた。

インヒビター陽性血友病 A 患者血漿 10 検体を対象とした 4 法の各インヒビター値の比較成績(表 3)をみると、方法の違いによるインヒビター値のバラつき程度は著しく、低い検体希釈倍率でより大きい CV 値が観察された。また、平均値に対する比で各法を比較した結果では、ISTH/SSC の推奨法である N 法と比較して他の 3 法のインヒビター値は有意に高く ($p < 0.001$)、とりわけ S 法が高値を示すことが明らかとなった。この成績は、N 法で 5BU/ml 未満であった 6

例のうち、S法で5例、B法およびM法で3例が5BU/ml以上を示したことも符合することから、これら4法間の較差を明確に反映した成績と解釈された。

N法を基準として方法ごとに算出した補正係数を適用した補正後の比較成績では、著明な高値例のNo.10を含め前述した方法間のバラつきが補正後にCV値5.6%~30.0%と顕著に改善し、各法間の有意差も認めず、さらに、5BU/mlを基準とした4法間の判定も、補正前の一致率5/10(50%)に比べて補正後は8/10(80%)と向上した。この成績は、補正係数の適用によって各法の測定較差が適切に是正され、さらに、N法以外の方法で得たインヒビター値であってもよりN法に準じた値として評価し得ることを示唆している。これまでにも、new Oxford法とB法間では平均1.21倍の較差があることが示されており⁷⁾、今回の補正係数もこれと同様に各方法間の較差を表していると思われる。

これまで、各種インヒビター測定法についてその測定特性や差違を詳細にした報告は少なく、また、検査企業に委託される場合が多い今日においては、報告された値から測定方法の違いを察知し比較することは困難であると考えられる。今回示された各インヒビター測定法間の差違を理解し把握することは血友病A患者の止血管理において重要と思われ、加えて、ISTHが推奨するN法がその煩雑さ故に日常検査法として普及しにくい点を考慮すると、補正係数を用いた結果値の評価は、現時点において日常検査法として簡便に利用できる方法であり、従来の測定値をより有用な治療選択の指標として活用し得る方法であると思われた。しかしながら、使用するAPTT試薬の特性も較差の要因となり得ることから、使用する測定法とN法との較差を確認した上で結果の解釈を行う事が望ましいと考えられた。

結 論

FVIIIインヒビター陽性検体を対象として、4つのインヒビター測定法を比較検討した。

1)各法より得られるインヒビター値には明らかな差異を認め、反応液の違いや希釈操作の違いが要因となることが示唆された。とくに、Bethesda法の希釈操作は大きな変動要因となると考えられた。

2)Nijmegen法に比較して、Bethesda法、Bethesda変法(S法、M法)は有意に高いインヒビター値を示した($p < 0.001$)。

3)Nijmegen法を基準とした補正法の適用により、従来の各法のインヒビター値を容易に比較し得る可能性が示唆され、日常の血友病Aの止血管理において有用と考えられた。

文 献

- 1) 瀧 正志：血友病患者のインヒビター。血栓・止血・血管学—血栓症制圧のために— 一瀬白帝編，p402—409，中外医学社，東京，2005。
- 2) Verbruggen B, et al: The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb and Haemost* 73: 247—251, 1995.
- 3) Kasper CK, et al: A more uniform measurement of factor VIII inhibitor. *Thromb Diathes Haemorrh* 34: 869—972, 1975.
- 4) 山崎 哲，他：第VIII因子インヒビター測定の特性および不活化処理の有用性。日本血栓止血学会誌 19(2)：235—243，2008。
- 5) 2006 Minutes and Annual Reports; ISTH/SSC, Factor VIII inhibitor assays, (<http://www.med.inc.edu/isth/ssc/06sscminutes/06factorviiiinhibitorix.html>)
- 6) 山崎 哲，他：循環抗凝血素を有する症例における凝固因子活性測定。日本検査血液学会雑誌 7(2)：270—277，2006。
- 7) Austen DEG, et al: A comparison of the Bethesda and new Oxford methods of factor VIII antibody assay. *Thromb Haemost* 47: 72—75, 1982.

Abstract**Methodological characteristics of Factor VIII: C inhibitor assays, and an evaluation by the application of correction factor**

Satoshi Yamazaki¹⁾, Noriko Yamazaki¹⁾, Noriko Suzuki¹⁾, Hiromi Goto¹⁾,
Shigenobu Takayama²⁾, Masashi Taki³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Hospital,
2-16-1, Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa, 216-8511 Japan

²⁾Faculty of Health Science, Daito Bunka University

³⁾Department of Pediatrics, St. Marianna University Yokohama City Seibu Hospital

In recent years, for the FVIII inhibitor assay, the Nijmegen method has been recommended by the ISTH. However, it has not yet become common in Japan, and the Bethesda method is still widely used, and modified Bethesda methods also exist.

To clarify the differences between these methods, we compared four FVIII inhibitor assays: the Nijmegen (N), Bethesda (B), and two (S and M) modified Bethesda methods. The two modified methods use pre-treated plasma with an inactivation treatment of coagulation factors at 56°C, method S uses FVIII deficient plasma, and method M uses normal plasma as a control.

In a comparison of sample dilution procedures using FVIII deficient plasma, the N and S methods, with nearly the same pH values in all of the tested samples, showed a constant FVIII: C. However, methods B and M, with a decrease in pH due to sample dilution, showed an elevated FVIII: C of 12%~16%, according to their pH changes.

The results for 10 samples with FVIII: C inhibitor varied remarkably (CV: 22%~55%; mean, 34.6%) among the four methods. The inhibitor values from B, S, and M were significantly higher than the values from method N ($p < 0.001$). Especially, the six cases of $< 5\text{BU/ml}$ validated by method N were indicated as $> 5\text{BU/ml}$ in five cases by method S, and in three cases by methods B and M.

By application of the correction factors obtained based on method N, the CV variations were improved markedly to 5.7%~30.0% (mean, 14.5%). Furthermore, the discrepant six cases were corrected, decreasing to two cases in S and B, and to one case in method M.

These results have clearly shown that the inhibitor values obtained via the four methods differ, which may be due to differences in the dilution procedures. An application of the correction factor based on method N may be useful for comparing the inhibitor values.

Key words: Factor VIII, Inhibitor, Haemophilia A, Bethesda method, Nijmegen method

