

T-TAS[®]と凝固因子欠乏血漿から再構成した血液を用いた個々の凝固因子の止血への寄与の定量化

瀧崎 晶弘¹⁾ 保井 一太¹⁾ 林 智也¹⁾ 藤村 吉博¹⁾ 小山田千秋²⁾
大西 (和田) 朋子²⁾ 細川 和也²⁾ 下垣 一成¹⁾ 木村 貴文¹⁾ 平山 文也³⁾
瀧原 義宏¹⁾

【背景と目的】個々の凝固因子の止血への寄与を定量化することは稀な凝固因子欠乏症患者の止血機能の理解と適切な治療法の探索に役立つ可能性がある。

【材料と方法】特定の凝固因子欠乏血漿（第 II 因子：プロトロンビン、第 V 因子、第 VII 因子、第 VIII 因子、第 IX 因子、第 X 因子、第 XI 因子、または第 XII 因子）および赤血球/血小板製剤から調製した再構成血液を使用して稀な凝固因子欠乏症患者血液を模倣した。凝固因子製剤と新鮮凍結血漿を使用して、プロトロンビン欠乏症患者の *in vitro* 治療モデルを作成した。止血機能はマイクロチップフローチャンバーシステムを使用して 600s^{-1} で測定した。

【結果】止血機能はプロトロンビンおよび第 X 因子欠乏血漿による再構成血液で特に低値を示した。プロトロンビン欠乏症の血漿輸血モデルでは、正常血漿に 10% 置換後に止血機能が回復し、60% 以上の置換でプラトーに達した。プロトロンビン欠乏症のプロトロンビン複合体濃縮製剤治療モデルでは、0~50IU/kg の範囲で用量依存的な治療効果が示された。

【結論】再構成血液を使用したマイクロチップフローチャンバーシステムによる止血機能の定量化は、プロトロンビン欠乏症患者の止血機能と治療効果を予測できる可能性がある。

キーワード：凝固障害、止血、血漿、プロトロンビン、プロトロンビン複合体濃縮製剤

この論文記事は、John Wiley & Sons 社の許可のもと、Vox Sanguinis 誌 (2024; 119 (10): 1065–1071) に最初に報告された研究に基づくものである。(Akihiro Fuchizaki, Kazuta Yasui, Tomoya Hayashi, Yoshihiro Fujimura, Chiaki Oyamada, Tomoko Ohnishi-Wada, Kazuya Hosokawa, Kazushige Shimogaki, Takafumi Kimura, Fumiya Hirayama, and Yoshihiro Takihara: Quantification of the contribution of individual coagulation factors to haemostasis using a microchip flow chamber system and reconstituted blood from deficient plasma. Vox Sanguinis 2024; 119 (10): 1065–1071)

はじめに

凝固因子は不活性型で血液中に存在しており、凝固反応が開始されることで活性型となり、さらに次の不活性型凝固因子を活性化することで、最終的に不溶性フィブリンを生成して強固な止血血栓を形成する（凝固カスケード）¹⁾。凝固因子の欠損もしくは機能不全は凝固カスケードの遮断や止血不良となる（稀な凝固因子欠乏症）。この疾患では関節内出血や筋肉内出血のような深部出血のほか、鼻出血や皮膚出血など欠損している凝固因子の種類によってさまざまな症状を呈する。

第 VIII 因子と第 IX 因子の欠乏症はそれぞれ血友病 A および血友病 B として知られており、一般的な有病率は男性 10 万人あたり約 10 人と推定されている²⁾。その他の稀な凝固因子欠乏症の一般人口における有病率は、1 : 500,000 から 1 : 2,000,000 とされている³⁾。稀な凝固因子欠乏症は凝固スクリーニング検査として、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、それに続けて各凝固因子を測定することで診断され、その出血症状は欠損した凝固因子の種類と活性に依存する⁴⁾。しかしながら、これらの検査は乏血小板血漿を

1) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

2) 藤森工業株式会社

3) 日本赤十字社大阪府赤十字血液センター

連絡責任者：瀧崎 晶弘, E-mail : a-fuchizaki@kk.bbc.jrc.or.jp

〔受付日：2024 年 7 月 10 日, 受理日：2024 年 9 月 11 日〕

サンプルとして使用しているため、二次止血の指標として有用であるが、一次止血因子である血小板機能は反映されない。それゆえに最近では、単一の凝固因子の評価だけでなく、一次止血とそれに続く二次止血を包括的に評価する方法が注目されており、従来法と組み合わせることで、個々の患者の止血機能をより深く理解することができる。

PTA-100 (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, マールブルク, ドイツ) は、流動条件下における止血解析システムとして広く使用されている。本システムはコラーゲン/エピネフリンまたはコラーゲン/アデノシン二リン酸でコーティングされたキャピラリーを用いているため、血小板凝集形成に伴う閉塞時間を評価できるが、二次止血の評価はできない⁵⁾。最近、一次および二次止血を包括的に評価する装置として、血栓形成能解析システム (Total Thrombus-formation Analysis System: T-TAS[®], 藤森工業, 東京, 日本) が開発された⁶⁾。このシステムでは、クエン酸採取の血液サンプルに CaCl₂ とコーントリプシンインヒビター (corn trypsin inhibitor: CTI) を添加することで凝固システムを回復させる。これらをコラーゲンと組織トロンボプラスチンでコーティングされたマイクロチップに注入することで、血小板のコラーゲンへの接着と組織トロンボプラスチンによって開始される外因系経路を促進する。その結果、流動条件下 (600s⁻¹ または 1,500s⁻¹)、活性化血小板とフィブリンから構成される止血血栓を定量的に測定することが可能である。我々は最近、3つの血液成分である赤血球製剤、標準ヒト血漿 (standard human plasma: SHP, Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, マールブルク, ドイツ)、血小板製剤で再構成した血液を用いた T-TAS[®] ベースの新しい止血試験を確立した⁷⁾。我々のシステムは、3つの血液成分のうち赤血球と血小板の2つを同品質由来サンプルとすることで血漿成分に基づいた止血機能を定量的に評価することが可能である。

本研究では我々が開発した新しい T-TAS[®] 試験が、稀な凝固因子欠乏症患者やその治療薬投与中の患者血漿の止血機能を定量的に解析するのに有用であるかを評価することを目的とした。そこで我々は特定の凝固因子欠乏血漿によって再構成された血液の止血機能を解析し、最も止血機能の低下が認められたプロトロンビン欠乏症患者模倣検体を対象に血漿もしくはプロトロンビン複合体濃縮製剤を添加することによって、稀な凝固因子欠乏症患者の治療を模倣する試験を実施した。

材料と方法

倫理声明

日本赤十字社の血液事業本部倫理委員会にて本研究

が承認された (倫理審査番号: 2019-016)。

血栓形成能解析システム (Total Thrombus-formation Analysis System)

T-TAS[®] はキャピラリー内に I 型コラーゲンと組織トロンボプラスチンを塗布したマイクロチップ (AR-chip; 藤森工業) における流圧変化を数値化することによって、血栓形成を測定できる装置である (補足図 1A)。簡単に説明すると、クエン酸採取血液サンプル (480 μl) は凝固システムを回復させるために、分析直前に 1.25mg/ml CTI 含有の 0.3M CaCl₂ 20μl (藤森工業) と混合された。試験サンプルをマイクロチップに加えると、37°C、せん断応力条件下 (600s⁻¹)、血小板のコラーゲンへの接着と組織トロンボプラスチンを開始因子とする凝固カスケードが促進されて血小板とフィブリンからなる血栓が形成される。血栓は崩壊と再形成を繰り返しながら徐々に大きくなり、チップ内の流路を閉塞する。試験時間は 30 分以内である。典型的な解析例パターンと測定パラメータを補足図 1B に示す。

血漿、赤血球、血小板のサンプル供給源

Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH (マールブルク, ドイツ) から購入した単一ロットの SHP または凝固因子欠乏血漿 (第 II 因子; プロトロンビン, 第 V 因子, 第 VII 因子, 第 VIII 因子, 第 IX 因子, 第 X 因子, 第 XI 因子, または第 XII 因子) を血漿サンプルに使用した。SHP には 0.86~1.06IU/ml の凝固因子と 2.57g/l のフィブリノゲンが含まれている。凝固因子欠乏血漿は正常血漿から免疫吸着法により製造され、標的凝固因子を 1% 未満、その他の凝固因子を 40% 以上、フィブリノゲンを 1g/l 以上含有している。この組成には欠乏因子以外の止血に必要な凝固関連因子が十分に含まれている。SHP および凝固因子欠乏血漿は、クエン酸を抗凝固剤として製造された凍結乾燥ヒト血漿であり、使用時に 1ml の精製水で溶解した。

赤血球製剤はクエン酸-リン酸-デキストロース溶液を抗凝固剤として用いた 400ml 全血採取後に白血球除去し、テルモ血液自動遠心分離装置 (Terumo BCT, レイクウッド, 米国) により赤血球を分離し、95ml マンニトール-アデニン-リン酸溶液に懸濁し、4°C で 3 日間保存して調製した⁸⁾。この赤血球製剤に等容量のリン酸緩衝生理食塩水を加えて 500×g で 15 分間遠心後に上清除去した。得られた赤血球沈査を赤血球サンプルとして用いた。

血小板製剤は抗凝固剤としてクエン酸-デキストロース溶液を用いて、Trima Accel (Terumo BCT, レイクウッド, 米国) または CCS (Haemonetics, ポストン, 米国) により採取されたアフエレーシス由来の多血小板血漿であり、22°C で 2 日間振とう保存された。血小板製剤に PBS とクエン酸-デキストロース溶液を 1:2:

0.3の比率で混合し、 $800\times g$ で5分間遠心分離した。上清除去後、残存沈渣を評価対象である凝固因子欠乏血漿で浮遊させたものを血小板サンプルとした。同じ方法で調製した血小板サンプルの *in vitro* 特性を別途評価したところ、血小板は遠心分離によりわずかに活性化されていたが、凝集能は良好に保たれていた（補足表1）。

特定の凝固因子を欠損した再構成血液の T-TAS[®]解析

特定の凝固因子を欠損した再構成血液は血漿、赤血球、血小板サンプルを混和して調製した。血小板と赤血球サンプルは各凝固因子の影響を評価するために、一連の試験で同じ製品から調製された。試験サンプルは、3つの血液成分のうち他の2つの成分である血小板数とヘマトクリット値がそれぞれ $300\times 10^3/\mu l$ と40%で一定になるように再構成し、血漿成分に起因する止血機能を評価した。再構成血液サンプルは異なる血小板および赤血球サンプルから10本調製された(N=10)。止血機能は T-TAS[®]を用いて解析した。赤血球、血小板、プロトロンビン欠乏血漿から再構成された血液サンプルが本当にプロトロンビン活性を欠き、その他の凝固因子は活性を保持しているかを確認するために、プロトロンビン欠乏血漿そのものではなく、再構成サンプルの上清について各凝固因子濃度を測定した（補足表2）。

プロトロンビン欠乏症に対する血漿輸血モデルの T-TAS[®]解析

再構成血液は赤血球サンプルにプロトロンビン欠乏血漿と SHP の混合比を調整した血小板および血漿サンプルを加えて調製した。具体的にはプロトロンビン欠乏血漿と SHP 混合比率を0%~100%の7濃度系列(SHP比率:0%, 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%)に設定した。血小板数 $300\times 10^3/\mu l$ 、ヘマトクリット値40%の血漿輸血モデルを T-TAS[®]で解析した(N=10)。同じ方法で調製した試験サンプルのプロトロンビン活性を別途分析した（補足表3）。

プロトロンビン欠乏症に対するプロトロンビン複合体濃縮製剤投与モデルの T-TAS[®]解析

プロトロンビン欠乏症モデルとして、プロトロンビン欠乏血漿、血小板及び赤血球サンプルから調製した再構成血液を使用した。プロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子を500IU/バイアル含むプロトロンビン複合体濃縮製剤 (prothrombin complex concentrate: PCC, 静注, 500単位, CSL ベーリング株式会社, 東京, 日本)として、ケイセントラを使用した⁹⁾。本製剤は凍結乾燥法により製造され、使用時に20mlの精製水で溶解した。本品はプロトロンビン時間—国際標準化比が6を超える投与量である50IU/kgを基準として、0, 5, 25IU/kgで再構成血液に添加した。血

小板数 $300\times 10^3/\mu l$ 、ヘマトクリット値40%のPCC投与モデルを T-TAS[®]で解析した(N=10)。同じ方法で調製した試験サンプルのプロトロンビン活性を別途分析した（補足表4）。

統計解析

統計解析は GraphPad Prism 8(GraphPad Software, サンディエゴ, 米国)を用いて行った。データは正規分布と仮定し、一元配置分散分析を用いて群間の差を分析した。SHPと凝固因子欠乏血漿から再構成された血液の止血機能を比較するために、ポストホック分析として Tukey-Kramer 多重比較検定を実施した。プロトロンビン欠乏症患者モデルにおける治療効果を比較するために、50IU/kg用量のPCC投与と他の条件、および100% SHP 血漿輸血と他の条件について、ポストホック分析として Dunnett の多重比較検定を実施した。統計的な有意差は $p<0.05$ とした。サンプルが検出範囲を超えた場合、そのサンプル数を比較した。

結 果

T-TAS[®]は凝固因子欠乏血漿から再構成された血液において止血機能の低下を示した

特定の凝固因子が欠乏した再構成血液と止血機能の関係を図1に示す。加えて、閉塞時間と圧力曲線の関係を示す本研究の代表的な結果を図2に示す。SHPで再構成した試験サンプルは最も高い止血機能を示した。血小板、赤血球、その他の凝固因子が十分量存在していたにも関わらず、プロトロンビンを含有しないすべての試験サンプルでは、80kPaに到達するまでの時間 (T_{80}) が検出限界である30分を超えた。第X因子欠乏血漿で再構成した試験サンプルでは、10検体中3検体で T_{80} が検出限界である30分を超えた。第V因子を含有しない再構成試験サンプルは、第XI因子、第IX因子、第VIII因子、第X因子またはプロトロンビンを含有しない再構成試験サンプルよりも30分間曲線下面積 (area under the curve for 30 min: AUC_{30}) で有意に高値を示した。第XII因子、第XI因子、第IX因子、第VIII因子もしくは第VII因子を含有しない再構成試験サンプルでは、グループ間において AUC_{30} に有意な差を認めなかった。

T-TAS[®]はプロトロンビン欠乏症の治療モデルにおいて正常血漿への置換に敏感である

再構成血漿サンプルにおけるプロトロンビン欠乏血漿に対する SHP 比率と止血機能の関係を図3に示す。プロトロンビンを含有しないすべての試験サンプル(0% SHP)で T_{80} が検出限界である30分を超えたが、SHP 10%以上含有するすべてのサンプルでは止血機能が観察された。再構成血漿サンプルにおけるプロトロンビン欠乏血漿に対する SHP 比率を10%, 40%, 100%に増

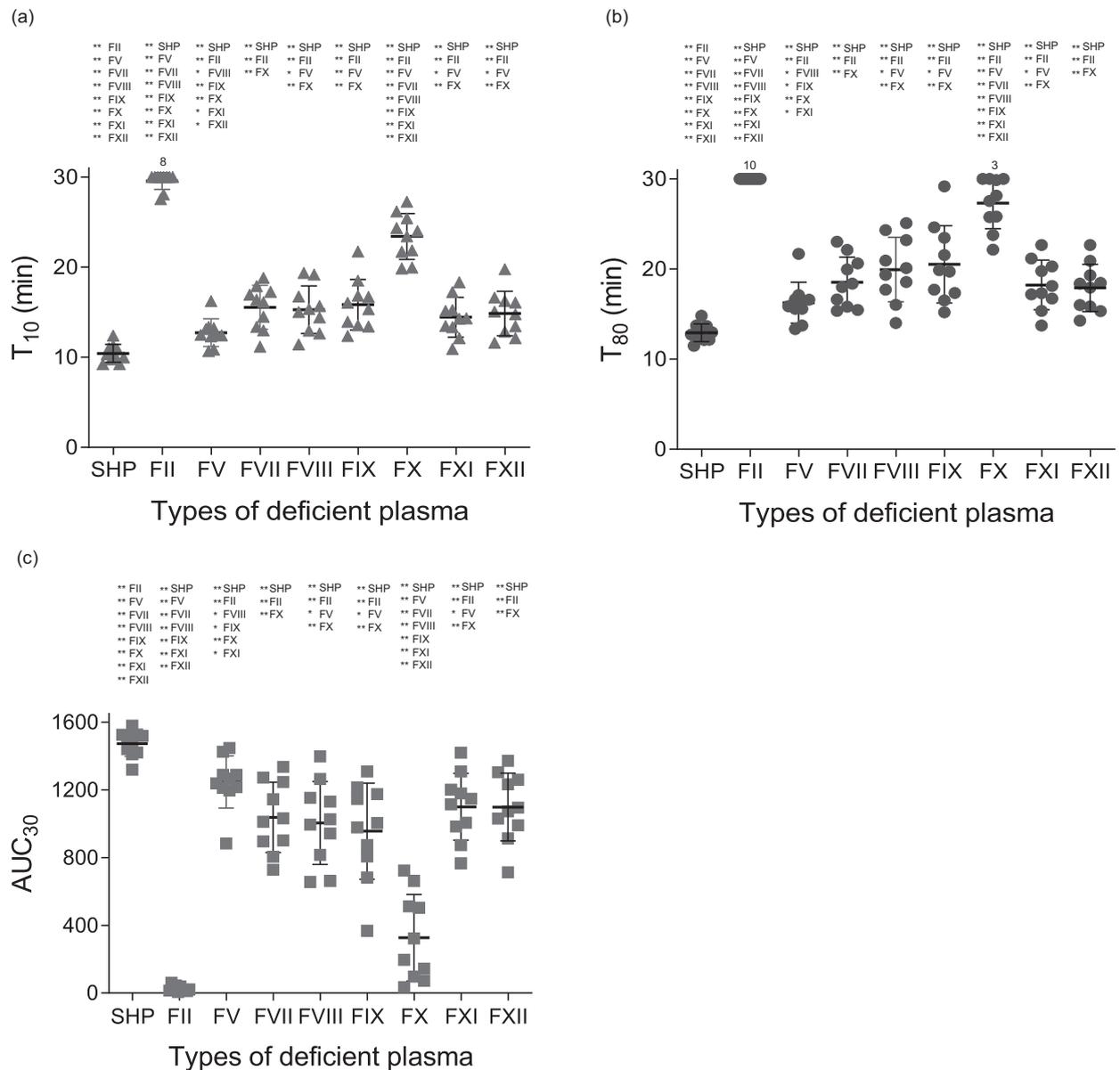


図1 特定の凝固因子が欠乏している再構成血液の止血機能

欠乏血漿から再構成された血液と各パラメータ、 T_{10} (10kPaまでの時間)、 T_{80} (80kPaまでの時間)、 AUC_{30} (30分間曲線下面積)との関係をそれぞれ (a), (b), (c) に示す (N=10)。ドットプロットの上の数字は30分間の測定範囲を超えたサンプル数を示す。統計的な有意差は、* $p < 0.05$ (一元配置分散分析, ポストホック分析としてTukey-Kramer検定) および ** $p < 0.01$ (一元配置分散分析, ポストホック分析としてTukey-Kramer検定) とした。サンプルが検出範囲を超えた場合、そのサンプル数を比較した (** $p < 0.01$)。

SHP, standard human plasma (標準ヒト血漿)

加させると、 T_{10} (流圧が10kPaに達するまでの時間(分)) (平均値 \pm 標準偏差) はそれぞれ 14.4 ± 2.6 , 13.3 ± 2.0 (0.92倍), 11.9 ± 1.5 分 (0.83倍) に短縮し、 T_{80} (流圧が80kPaに達するまでの時間(分)) はそれぞれ 17.7 ± 2.8 , 16.0 ± 2.5 (0.90倍), 14.2 ± 1.6 分 (0.80倍) に短縮した。その結果、 AUC_{30} はそれぞれ $1,107 \pm 225$, $1,235 \pm 185$ (1.12倍), $1,366 \pm 121$ (1.23倍) に増加した。再構成血漿サンプルにおけるプロトロンビン欠乏血漿に対するSHP比率が60%~100%の場合、 AUC_{30} に有意な

差はなかった。

プロトロンビン欠乏症のPCC投与モデルでは用量依存的に止血機能が回復した

プロトロンビン欠乏血漿から再構成した血液へのPCC投与量と止血機能の関係を図4に示す。プロトロンビンを含有しないすべての試験サンプル (PCC投与量0 IU/kg) で T_{80} が検出限界である30分を超えたが、PCC投与量が5IU/kg以上のすべてのサンプルでは止血機能が観察された。すなわち、正常血漿への置換に限らず、

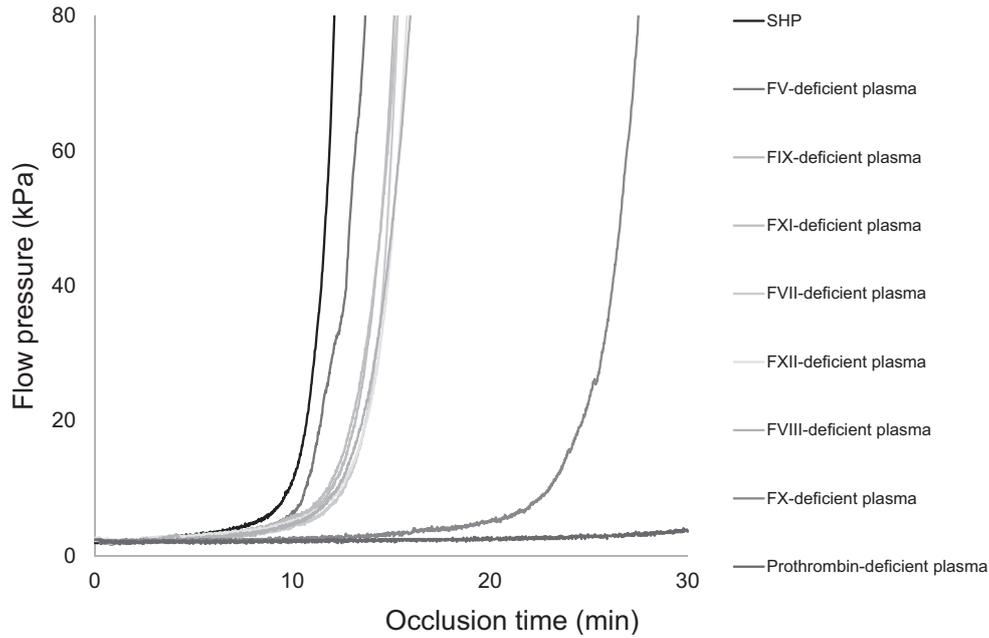


図2 代表的なデータ (サンプル No.8)

標準ヒト血漿 (standard human plasma : SHP), 第 V 因子欠乏血漿, 第 IX 因子欠乏血漿, 第 XI 因子欠乏血漿, 第 VII 因子欠乏血漿, 第 XII 因子欠乏血漿, 第 VIII 因子欠乏血漿, 第 X 因子欠乏血漿, プロトロンビン欠乏血漿を使用した再構成血液の時間に対する圧力上昇の代表的なデータ

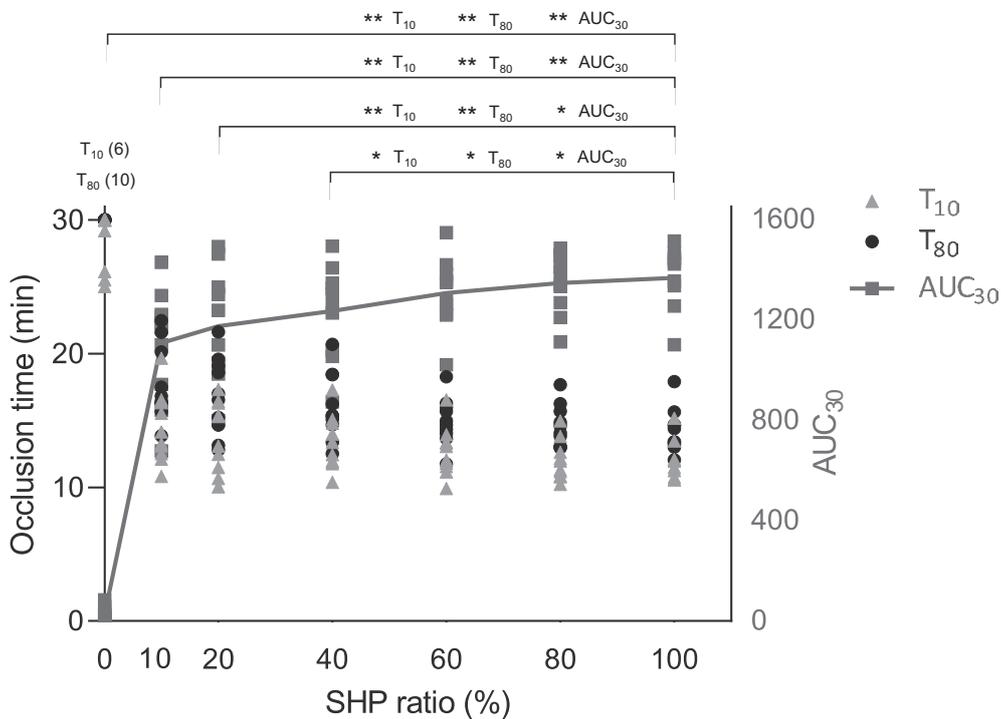


図3 プロトロンビン欠乏症モデルにおける血漿輸血と止血機能の関係

血漿輸血モデルは血栓形成能解析システムを用いて測定した (N=10)。ドットプロットの上の数字は30分間の測定範囲を超えたサンプル数を示す。統計的な有意差は, * $p < 0.05$ (対標準ヒト血漿 [standard human plasma : SHP] 100% 比) および ** $p < 0.01$ (対 SHP 100% 比) とした。サンプルが検出範囲を超えた場合, そのサンプル数を比較した (** $p < 0.01$)。

AUC₃₀, area under the curve for 30 min (30 分間曲線下面積)

T₁₀, time to 10kPa (10kPa までの時間)

T₈₀, time to 80kPa (80kPa までの時間)

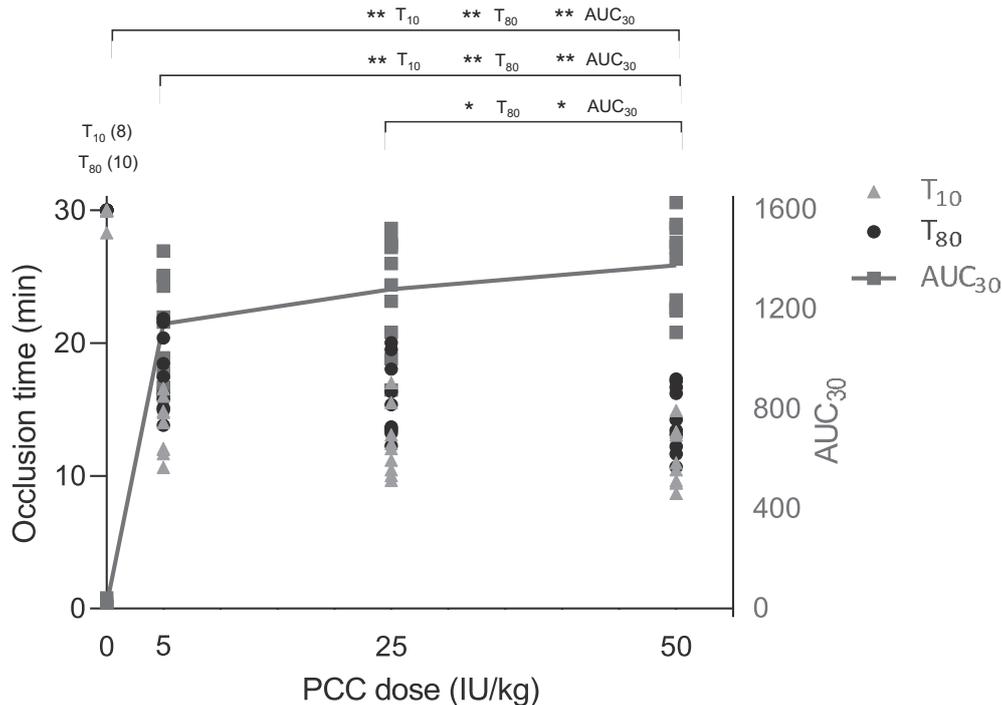


図4 プロトロンビン欠乏症モデルにおけるプロトロンビン複合体濃縮製剤の投与量と止血機能の関係
 プロトロンビン複合体濃縮製剤投与モデルは血栓形成能解析システムを用いて測定した(N=10)。ドットプロットの上の数字は30分間の測定範囲を超えたサンプル数を示す。統計的な有意差は、* $p < 0.05$ (対プロトロンビン複合体濃縮製剤 [prothrombin complex concentrate : PCC] 投与量 50IU/kg 比), ** $p < 0.01$ (対 PCC 投与量 50IU/kg 比) とした。サンプルが検出限界を超えた場合はその数を比較した (** $p < 0.01$)。

AUC₃₀, area under the curve for 30 min (30分間曲線下面積)

T₁₀, time to 10kPa (10kPa までの時間)

T₈₀, time to 80kPa (80kPa までの時間)

PCC 投与においても T-TAS[®]は鋭敏に止血能回復を検出することができた。プロトロンビン欠乏血漿から再構成された血液における PCC 投与量を 5, 25, 50IU/kg に増加させると, T₁₀ はそれぞれ 13.9 ± 2.2 , 12.2 ± 2.4 (0.88 倍), 11.4 ± 2.1 分 (0.82 倍) に短縮し, T₈₀ はそれぞれ 17.6 ± 2.9 , 15.5 ± 2.8 (0.88 倍), 14.3 ± 2.4 分 (0.81 倍) に短縮した。その結果, AUC₃₀ はそれぞれ $1,141 \pm 206$, $1,280 \pm 221$ (1.12 倍), $1,375 \pm 177$ (1.21 倍) に増加した。

考 察

本研究では T-TAS[®]ベースの *in vitro* 試験が凝固因子治療を受けた, または受けなかった稀な凝固因子欠乏症患者の *in vivo* 止血機能を模倣し, 結果として, 稀な凝固因子欠乏症の実際の治療を最適化するのに役立つと考えた。プロトロンビンから少量でもトロンピンが生成されれば, テンナーゼ生成にフィードバックされ, さらにプロトロンビナーゼ複合体生成が瞬時に繰り返されることにより, 大量のトロンピンが生成される(トロンピンバースト)^{10,11}。Peyvandi らは血漿中にプロト

ロンピンを検出できない患者が生存できないことを報告しており, これは遺伝子ノックアウトにより得られたプロトロンビン完全欠損マウスが生命維持できないことにより証明されている¹²。我々のシステムにおいてもプロトロンピンが *in vitro* 止血機能で最も重要な因子であることが示された(図 1c)。第 X 因子は内因系もしくは外因系のテンナーゼによって活性化されることで第 Xa 因子を生成し, これが共通系を開始する¹³。第 Xa 因子は補酵素である第 Va 因子とプロトロンビナーゼ複合体を形成し, 即時型トロンピン生成に主要な役割を果たす¹⁴。我々は第 X 因子の寄与がプロトロンピンに次いで大きいことを示した(図 1c)。他の凝固因子とは対照的に第 V 因子は酵素活性を持たず, 第 Xa 因子の補因子として機能する。第 V 因子欠乏症における最も一般的な出血症状は粘膜出血であり, 多くの場合は軽傷であり生命を脅かすことは稀である¹⁵。我々の研究において, 第 V 因子欠乏による止血機能への影響は他の凝固因子と比較して最も小さかった(図 1c)。これらに反して, 活性値 1% 未満の場合に重度出血に分類される第 VIII 因子および第 IX 因子欠乏症を模倣したサンプル

と、出血症状をほとんど示されない第 XI 因子および第 XII 因子欠乏症を模倣したサンプルに止血機能に差はなかった(図 1c)¹⁶⁾¹⁷⁾。小川らは、2つの異なるせん断応力で第 VIII 因子と第 IX 因子の止血機能への寄与を評価し、高せん断応力 ($1,100\text{s}^{-1}$) では相対的に血小板の寄与が高く、低せん断応力 (110s^{-1}) では第 VIII 因子と第 IX 因子の止血機能への寄与が増加することを報告している¹⁸⁾。T-TAS[®]は動脈血流条件 (600s^{-1}) であるため、第 VIII 因子および第 IX 因子欠乏による止血機能への寄与はせん断応力依存的に低下し、第 XII 因子および第 XI 因子欠乏による寄与と差が生じなかったと推測される。稀な凝固因子欠乏症患者は欠乏した凝固因子活性を補填するために、新鮮凍結血漿または凝固因子製剤による補充療法で治療される¹⁹⁾。血漿プロトロンビン活性は約 0.2IU/ml で臨床的な止血レベルに達するとされており、T-TAS[®]ベースの *in vitro* 試験評価においても同程度低値のプロトロンビン活性で医薬品剤形に関係なく止血機能が観察された ($10\% \text{SHP} : 0.09 \pm 0.00\text{IU/ml}$, $5\text{IU/kg PCC} : 0.09 \pm 0.01\text{IU/ml}$) (図 3, 図 4)³⁾。血漿プロトロンビン活性は約 0.5IU/ml で臨床的に出血症状がほとんどみられないレベルであり、本システムにおいて止血機能がプラトーに達するレベル ($\geq 60\% \text{SHP} : 0.47 \pm 0.02\text{IU/ml}$) と同程度である (図 3)。これらの結果は本システムが生理的な止血機能を模倣できる可能性を示唆している。

我々の研究には2つの制限事項がある。第一に、再構成血液には白血球がほとんど含まれておらず、好中球細胞外トラップのような凝固促進事象は反映されていない²⁰⁾。第二に、フィブリノゲンである第 I 因子とフィブリン安定化因子である第 XIII 因子は、本研究で評価した凝固因子とは別に凝固カスケードの下流で働く重要な因子である²¹⁾²²⁾。しかしながら、他の欠乏血漿と同じ調製法である乾燥血漿由来フィブリノゲン欠乏血漿と第 XIII 因子欠乏血漿を入手することができなかった。それゆえ、これらの止血機能に対する寄与を定量することはできなかった。このようにいくつかの欠点があり、我々の研究は現実世界におけるすべての稀な凝固因子欠乏症患者の止血機能と必ずしも一致しなかった。しかしながら、T-TAS[®]ベースの *in vitro* 試験は血小板や赤血球に依存せず、血漿因子のみに依存する再構成血液により稀な凝固因子欠乏症患者を模倣した止血機能を定量化するものであり、凝固因子治療を受けた患者と受けていない患者の *in vivo* 止血機能を模倣することができることから、従来の凝固試験と組み合わせることで個々の患者の止血機能をより深く理解することが可能である。将来的には稀な凝固因子欠乏症患者の止血機能や治療薬の効果を迅速に予測できる *in vitro* ベッドサイド試験として使用されることが期待される。

著者の COI 開示：瀧崎 晶弘, 保井 一太, 林 智也, 藤村 吉博, 下垣 一成, 木村 貴文, 平山 文也, 瀧原 義宏は血液製剤を製造している日本赤十字社の職員である。小山田 千秋, 大西-和田 朋子, 細川 和也は T-TAS[®]を製造している藤森工業株式会社の職員である。

謝辞：血液サンプルの調製にご協力いただいた近畿ブロック血液センターの皆様へ感謝いたします。研究の支援をいただいた永里 朋香先生、英文校正をサポートしていただいた Editage (www.editage.com) に感謝いたします。瀧崎 晶弘が研究を実施し、原稿の第一稿を執筆した。瀧崎 晶弘, 保井 一太, 林 智也, 下垣 一成が研究デザインを担当した。小山田 千秋, 大西-和田 朋子, 細川 和也が T-TAS[®]解析を行った。藤村 吉博, 木村 貴文, 平山 文也, 瀧原 義宏が研究を監督し、原稿を編集した。著者全員が結果について議論を行い、原稿について意見し原稿の公開を承認している。

文 献

- 1) Dahlbäck B: Blood coagulation. *Lancet*, 355: 1627—1632, 2000.
- 2) Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Soucie JM, et al: A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia*, 16: 20—32, 2010.
- 3) Peyvandi F, Duga S, Akhavan S, et al: Rare coagulation deficiencies. *Haemophilia*, 8: 308—321, 2002.
- 4) Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, et al: Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol*, 167: 304—326, 2014.
- 5) Kaikita K, Hosokawa K, Dahlen JR, et al: Total thrombusformation analysis system (T-TAS): clinical application of quantitative analysis of thrombus formation in cardiovascular disease. *Thromb Haemost*, 119: 1154—1162, 2019.
- 6) Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, et al: A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost*, 9: 2029—2037, 2011.
- 7) Fuchizaki A, Yasui K, Hayashi T, et al: A novel quantitative method to evaluate the contribution of platelet products to white thrombus formation in reconstituted blood under flow conditions. *Vox Sang*, 118: 367—375, 2023.

- 8) Cicha I, Suzuki Y, Tateishi N, et al: Gamma-ray-irradiated red blood cells stored in mannitoladeninephosphate medium: rheological evaluation and susceptibility to oxidative stress. *Vox Sang*, 79: 75–82, 2000.
- 9) Levy JH, Ghadimi K, Waldron , et al: Using plasma and prothrombin complex concentrates. *Semin Thromb Hemost*, 46: 32–37, 2020.
- 10) Furie B, Furie BC: Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*, 359: 938–949, 2008.
- 11) Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, et al: Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, 100: 148–152, 2002.
- 12) Sun WY, Witte DP, Degen JL, et al: Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 7597–7602, 1998.
- 13) Butenas S, Mann KG: Blood coagulation. *Biochemistry*, 67: 3–12, 2002.
- 14) Négrier C, Gomperts ED, Oldenburg J: The history of FEIBA: a lifetime of success in the treatment of haemophilia complicated by an inhibitor. *Haemophilia*, 12: 4–13, 2006.
- 15) Tabibian S, Shiravand Y, Shams M, et al: A comprehensive overview of coagulation factor V and congenital factor V deficiency. *Semin Thromb Hemost*, 45: 523–543, 2019.
- 16) Xu-Cai YO, Shen J, Chen S, et al: Factor XII gene mutation in the Hageman family. *J Thromb Haemost*, 9: 2329–2331, 2011.
- 17) Peyvandi F, Palla R, Menegatti M, et al: Introduction. Rare bleeding disorders: general aspects of clinical features, diagnosis, and management. *Semin Thromb Hemost*, 35: 349–355, 2009.
- 18) Ogawa S, Szlam F, Dunn AL, et al: Evaluation of a novel flow chamber system to assess clot formation in factor VIII-deficient mouse and anti-factor IXa-treated human blood. *Haemophilia*, 18: 926–932, 2012.
- 19) Peyvandi F, Mannucci PM: Rare coagulation disorders. *Thromb Haemost*, 82: 1207–1214, 1999.
- 20) Ghasemzadeh M, Hosseini E: Platelet-leukocyte crosstalk: linking proinflammatory responses to procoagulant state. *Thromb Res*, 131: 191–197, 2013.
- 21) Muszbek L, Yee VC, Hevessy Z: Blood coagulation factor XIII: structure and function. *Thromb Res*, 94: 271–305, 1999.
- 22) Levy JH, Welsby I, Goodnough LT: Fibrinogen as a therapeutic target for bleeding: a review of critical levels and replacement therapy. *Transfusion*, 54: 1389–1405, 2014.

QUANTIFICATION OF THE CONTRIBUTION OF INDIVIDUAL COAGULATION FACTORS TO HAEMOSTASIS USING A MICROCHIP FLOW CHAMBER SYSTEM AND RECONSTITUTED BLOOD FROM DEFICIENT PLASMA

*Akihiro Fuchizaki*¹⁾, *Kazuta Yasui*¹⁾, *Tomoya Hayashi*¹⁾, *Yoshihiro Fujimura*¹⁾, *Chiaki Oyamada*²⁾, *Tomoko Ohnishi-Wada*²⁾, *Kazuya Hosokawa*²⁾, *Kazushige Shimogaki*¹⁾, *Takafumi Kimura*¹⁾, *Fumiya Hirayama*³⁾ and *Yoshihiro Takihara*¹⁾

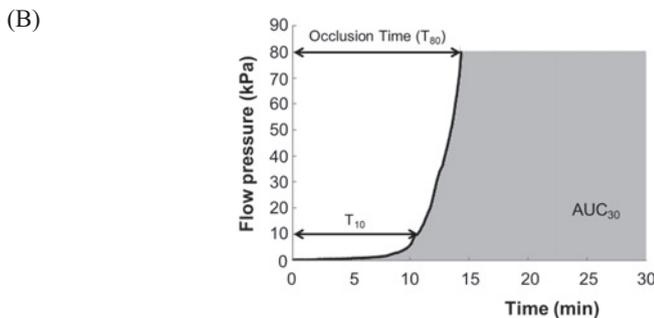
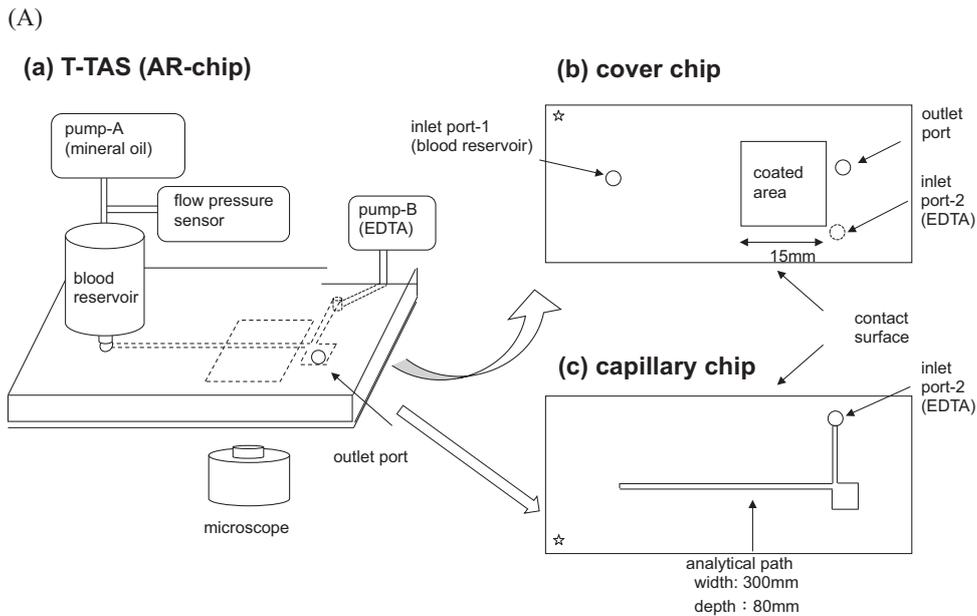
¹⁾Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

²⁾Fujimori Kogyo Co., Ltd.

³⁾Japanese Red Cross Osaka Blood Center

Keywords:

coagulation disorders, haemostasis, plasma, prothrombin, prothrombin complex concentrates



補足図1 アテロームチップ (Atheroma chip: AR chip) 搭載血栓形成能解析システム (Total Thrombus-formation Analysis System: T-TAS[®]) と解析結果

(A) T-TAS[®] (AR チップ) の概略図 (a) AR チップはカバーチップとキャピラリーチップで構成されている。(b) I型コラーゲンと組織トロンボプラスチンがカバーチップの一部にコーティングされている。(c) 流速は $10\mu\text{l}/\text{min}$ に設定され、これはチャンバー内の初期壁せん断速度約 600s^{-1} に相当する。血液サンプル ($480\mu\text{l}$) は、凝固系を回復させるため、分析前に $1.25\text{mg}/\text{ml}$ のコントリンインヒビターを含む 0.3M CaCl_2 $20\mu\text{l}$ と混和した。血液サンプルはキャピラリーチップの分析経路を通して灌流される。ポンプ A (ミネラルオイル) はリザーバー内の血液サンプルを分析経路に押し出す。血栓形成はコラーゲンと組織トロンボプラスチンでコーティングされた領域で起こる。血栓形成により背圧が発生し、流圧センサーでモニターされる。血栓形成は顕微鏡においてもモニターされる。ポンプ B (エチレンジアミン四酢酸; EDTA) は出口ポートでの凝固阻害に使用される。

(B) 流動条件下での T-TAS[®] の代表的な結果は流圧曲線として示される。解析パラメータである T_{10} (流圧が 10kPa に達するまでの時間 (分): 初期血栓形成), T_{80} (流圧が 80kPa に達するまでの時間 (分): キャピラリーをほぼ完全閉塞するほど十分に血栓形成されたことを示す閉塞時間), AUC_{30} (30 分間曲線下面積: 血栓形成定量化の指標) を図中に示す。

補足表1 血小板サンプルの *in vitro* 特性

<i>In vitro</i> properties		Platelet sample	Control
Aggregability	Collagen (%)	81 ± 7	82 ± 13
	Ristocetin (%)	85 ± 3	80 ± 12
	Collagen + ADP (%)	83 ± 6	84 ± 10
Platelet surface markers	CD62P positive platelet (%)	31 ± 4	15 ± 5
	PAC-1 positive platelet (%)	1.5 ± 0.5	1.2 ± 0.5

注：最大凝集率は凝集計（PRP313M, タイヨウ, 大阪, 日本）を使用して測定した。血小板製剤は成分採血由来で22℃で2日間振とう保存した。血小板製剤はPBSおよびクエン酸-デキストロース溶液で1:2:0.3の割合で混合し、800×gで5分間遠心した。上清を除去後、残った沈査を300×10³/μlのサンプル濃度となるよう自己血漿で懸濁したものを血小板サンプルとした。凝集惹起剤は、コラーゲン（モリヤ産業, 東京, 日本, 最終濃度5μg/ml）、リストセチン（ABP, ノーサンブトンシャー, 英国, 最終濃度1.5mg/ml）、またはコラーゲン（最終濃度2.5μg/ml）とアデノシン二リン酸（ADP；アーレイファクトリー, 滋賀, 日本, 最終濃度5μM）を同時に添加した。血小板活性化マーカーCD62Pの表面発現と血小板GPIIb/IIIa複合体上の立体構造エピトープの自発発現をフローサイトメトリー（FACS Cant II, BD Bioscience, サンノゼ, 米国）で測定した。端的に記載すると、血小板サンプルをPerCP標識抗ヒトCD61モノクローナル抗体（mAb）（BD Bioscience）、PE標識抗ヒトCD62P mAb（BD Bioscience）、およびFITC標識抗ヒトPAC-1 mAb（BD Bioscience）とインキュベートした。陰性コントロールとして、CD62PにはPE標識抗マウスIgG1抗体（BD Bioscience）を用い、PAC-1にはブロッキングペプチドであるフィブロネクチン活性フラグメント（RGDS；Sigma-Aldrich, セントルイス, 米国）を用いた。染色した血小板はパラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本, 最終濃度1%）で固定して測定した。データを平均値±標準偏差で示す（N=4）。Controlには成分採血由来の血小板製剤を22℃で2日間振とう保存後、検体を採取して*in vitro*特性を解析した（N=10）。

補足表2 プロトロンビン欠乏血漿を用いた再構成血液の凝固因子活性

Prothrombin (IU/ml)	FV (IU/ml)	FVII (IU/ml)	FVIII (IU/ml)	FIX (IU/ml)	FX (IU/ml)	FXI (IU/ml)	FXII (%)	Fibrinogen (g/l)
N.D. ^a	0.64 ± 0.01	0.63 ± 0.03	0.69 ± 0.02	0.75 ± 0.05	0.69 ± 0.01	0.71 ± 0.03	70 ± 2	1.66 ± 0.04

注：血漿サンプルとしてプロトロンビン欠乏血漿（Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, マールブルク, ドイツ）を用いた。採血後3日目の赤血球製剤に等量のリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline：PBS）を加え、500×gで15分間遠心分離後、上清を除去し、得られた赤血球沈査を赤血球サンプルとして用いた。採血後2日目の血小板製剤をPBSとクエン酸-デキストロース溶液を1:2:0.3の割合で混合し、800×gで5分間遠心分離後、上清を除去し、残った沈査をプロトロンビン欠乏血漿に懸濁して血小板サンプルとした。プロトロンビン欠乏血漿を用いた再構成血液は、血漿、赤血球および血小板サンプルを混和することで調製した。凝固試験サンプルはプロトロンビン欠乏血漿を用いた再構成血液を1,710×g、10分間、4℃で2回遠心分離し、得られた上清を用いた。凝固因子およびフィブリノゲンの測定は外注（エスアールエル, 東京, 日本）し、ACL TOP 750 CTS（Instrumentation Laboratory Company, マサチューセッツ, 米国）を用いて、メーカーの指示に従い凝固法で行った。データを平均値±標準偏差で示す（N=4）。

略号：F, factor（因子）；N.D., not detected（検出されず）

a すべての検体で凝固は観察されず、検出限界の0.03IU/mlを下回った。

補足表3 プロトロンビン欠乏症の血漿輸血モデルにおける再構成血液のプロトロンビン活性

SHP ratio (%)	0	10	20	40	60	80	100
Prothrombin (IU/ml)	N.D. ^a	0.09±0.00	0.18±0.01	0.34±0.01	0.47±0.02	0.58±0.01	0.71±0.01

注：血漿輸血モデルは赤血球サンプルにプロトロンビン欠乏血漿（Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, マールブルク, ドイツ）と標準ヒト血漿（standard human plasma : SHP ; Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH）の混合比を調整した血小板および血漿サンプルを添加して作成した。赤血球サンプルは採血後3日目の赤血球製剤に等量のリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline : PBS）を加え、500×gで15分間遠心分離後、上清を除去し、得られた赤血球沈査を用いた。血小板サンプルは採血後2日目の血小板製剤をPBSとクエン酸-デキストロース溶液を1:2:0.3の割合で混合し、800×gで5分間遠心分離後、上清を除去し、残った沈査にプロトロンビン欠乏血漿とSHPの混合比を調整して添加したものをを用いた。血漿サンプルはプロトロンビン欠乏血漿とSHPの混合比を0~100%の7つの濃度希釈系列（SHP比:0, 10, 20, 40, 60, 80, および100%）とした。プロトロンビン活性測定用サンプルは、血漿輸血モデルを1,710×gで10分間、4℃で2回遠心分離し、得られた上清を使用した。プロトロンビン活性測定は外注（エスアールエル, 東京, 日本）し、ACL TOP 750 CTS (Instrumentation Laboratory Company, マサチューセッツ, 米国) を用いて、メーカーの指示に従い凝固法で行った。

データを平均値±標準偏差で示す（N=4）。

略号：N.D., not detected（検出されず）

a すべての検体で凝固は観察されず、検出限界の0.03IU/mlを下回った。

補足表4 プロトロンビン欠乏症のプロトロンビン複合体濃縮製剤（prothrombin complex concentrate : PCC）投与モデルにおける再構成血液のプロトロンビン活性

PCC dose (IU/kg)	0	5	25	50
Prothrombin (IU/ml)	N.D. ^a	0.09±0.01	0.41±0.01	0.74±0.01

注：プロトロンビン欠乏血漿、赤血球サンプルおよび血小板サンプルから調製した再構成血液をプロトロンビン欠乏症モデルとして使用した。

赤血球サンプルは採血後3日目の赤血球製剤に等量のリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline : PBS）を加え、500×gで15分間遠心分離後、上清を除去し、得られた赤血球沈査を用いた。血小板サンプルは採血後2日目の血小板製剤をPBSとクエン酸-デキストロース溶液を1:2:0.3の割合で混合し、800×gで5分間遠心分離後に上清を除去し残った沈査をプロトロンビン欠乏血漿に懸濁し調製した。プロトロンビン、第VII因子、第IX因子、第X因子を500IU/バイアル含有するケイセントラ（静注用, 500単位, CSL Behring, 東京, 日本）をPCCとして使用した。この製剤は凍結乾燥により調製され、使用時に20mlの精製水で溶解した。PCCは再構成血液に0, 5, 25, 50IU/kg添加した。プロトロンビン活性測定用サンプルはPCCを添加した再構成血液を1,710×gで10分間、4℃で2回遠心分離し、得られた上清を使用した。プロトロンビン活性測定は外注（エスアールエル, 東京, 日本）し、ACL TOP 750 CTS (Instrumentation Laboratory Company, マサチューセッツ, 米国) を用いて、メーカーの指示に従い凝固法で行った。

データを平均値±標準偏差で示す（N=4）。

略号：N.D., not detected（検出されず）

a すべての検体で凝固は観察されず、検出限界の0.03IU/mlを下回った。