

凝固波形解析を応用した フィブリノゲンの“質”を評価する新しい臨床検査法を開発 ～日常検査で利用可能かつ追加コスト不要の 新規スクリーニング検査～

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学医学部附属病院 医療技術部 臨床検査部門の鈴木敦夫(すずきあつお)主任臨床検査技師、輸血部の鈴木伸明(すずきのぶあき)講師、松下正(まつしたただし)教授らの研究グループは、血中フィブリノゲンの“質”を評価することが可能な新しい臨床検査法を開発し、シスメックス株式会社との共同研究で自動分析装置による解析を可能とすることに成功しました。

フィブリノゲンは、止血に働く極めて重要なタンパク質の一つであり、フィブリンとよばれる止血に必要な「糊」となる素です。先天的あるいは後天的な要因により、フィブリノゲンの質(機能)に異常をきたすことがあり、多くは無症候ですが稀に出血症状や血栓症を引き起こします。現在、術前検査等のスクリーニング検査として広く使用されているフィブリノゲンの測定法(トロンビン時間法)は、血液中のフィブリノゲンの量を捉えることができますが、フィブリノゲン自体の“質”を評価することはできません。したがって、正確な診断がなされない潜在的な患者さんが一定数存在するということが考えられています。

今回開発した検査法は、「凝固波形解析」と呼ばれる新たなデータ解析手法による分析法を、日常検査として使用しているトロンビン時間法に応用し、解析ソフトウェアとして新しく設計したものです。この方法は、既存の測定に基づいて実施可能であり、したがって新たな測定コストを要さず、かつ速やかにフィブリノゲンの“質”を示す指標を算出することができます。日常検査で生じた患者さんの残検体を使用し、この検査法の性能を評価したところ、感度(疾患をもつ人が検査で陽性[=疾患あり]と判断される割合)が96.6%以上、特異度(疾患を持たない人が陰性[=疾患なし]と判断される割合)が100%となり、極めて高い精度をもつことが分かりました。

この新しい臨床検査法は、検査に使用する自動分析装置に搭載可能な機能として、すでに日常検査への利用が計画されています。今後、さまざまな施設での検査が可能となり、潜在的な患者さんの発見につながることで大いに期待されます。

本研究成果は、学術雑誌「Scientific Reports」の電子版(2022年1月21日版)に掲載されました。

ポイント

- フィブリノゲンは、止血に働く極めて重要なタンパク質の一つであり、フィブリンとよばれる止血に必要な「糊」となる素ですが、先天的あるいは後天的な要因により、その質に異常をきたすことがあり、多くは無症候ですが稀に出血症状や血栓症を引き起こします。
- 現在、術前検査等のスクリーニング検査として広く使用されているフィブリノゲンの測定法（トロンビン時間法）は、血液中のフィブリノゲンの量を捉えることができますが、フィブリノゲン自体の“質”を評価することはできないことが大きな課題となっています。
- 本研究により、トロンビン時間法による測定データを元に解析を行うことで、追加の検査コストを要さず、かつ高い精度をもってフィブリノゲンの機能異常症を検出することが可能となりました。
- この新しい検査法（解析ソフトウェア）は、今後、日常検査での利用が計画されており、さまざまな施設での検査が可能となることで潜在的な患者さんの発見につながるが大いに期待されます。

1. 背景

フィブリノゲンは血液凝固反応における最終段階を担うタンパク質の一つであり、止血に必要な不可欠な極めて重要な凝固因子です。フィブリノゲンは、トロンビンと呼ばれる血液凝固因子の働きにより、止血のための「糊」であるフィブリンへと転化し、血液を凝固させることで出血を止める役割を果たします。フィブリノゲンの検査は、多くの医療機関でスクリーニング検査として採用されており、その98%以上は「トロンビン時間法（Clauss法）」と呼ばれる検査法により測定が行われています（図1上）。

トロンビン時間法は測定時間が短く、かつ単純な原理に基づくため自動分析装置での測定が可能であり、世界的に見ても広く普及しています。しかし、トロンビン時間法は、フィブリノゲンがフィブリンへと転化することを利用した測定法であり、一定量のトロンビンを加えた際のフィブリン析出時間をもとにフィブリノゲン濃度を算出していることから、フィブリノゲン自体の“質”を無視した機能的な量のみを捉えるものです。すなわち、通常フィブリノゲンの機能には異常がないことを前提とした検査法であり、絶対量（＝抗原量）や、絶対量に対する機能量（＝比活性）を評価することができません。

一方で、フィブリノゲンは先天的あるいは後天的にその量や質に異常をきたすことが知られており、特に質の異常（＝機能異常症）の代表である先天性フィブリノゲン異常症と呼ばれる疾患は、多くが無症候であるものの、稀に出血症状や血栓症を発症する患者さんがいることから、その診断を正確に行うことは極めて重要です。先天性フィブリノゲン異常症を含めたフィブリノゲンの機能異常症を診断するためには、トロンビン時間法による機能的フィブリノゲンの測定に加え、免疫学的測定法等によるフィブリノゲン抗原量（機能の良し悪しを無視したフィブリノゲンの絶対的な量）を測定し、機能的な量と抗原量に乖離があるかどうか（比活性の低下があるかどうか）を調べる必要があります（図1下）。しかし、フィブリノゲン抗原量の測定は、特別な検査試薬が必要であり、追加のコストを要する点や、そもそもフィブリノゲン異常症が稀な疾患である点などから、ごく一部の専門施設でのみ可能な限られた検査となっています。しかし言い換えれば、正確な診断のため

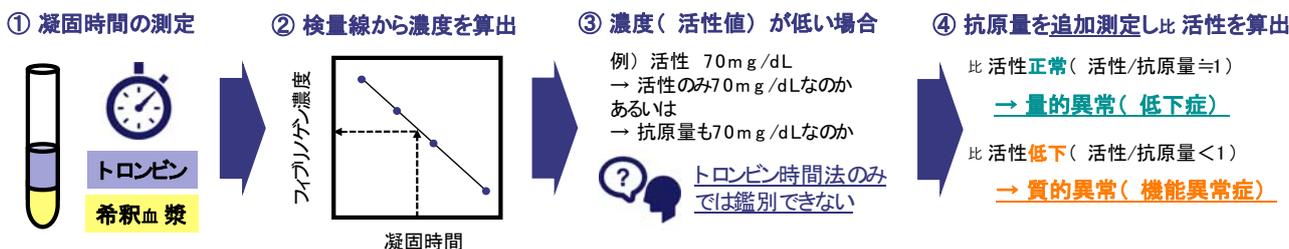
の検査が広く提供されていないことから、フィブリノゲン異常症の正確な頻度を求めることは困難であると考えられており、実際に見逃されているケースがあるとされています。これらのことから、より簡便にフィブリノゲンの質を評価することができる検査法が求められていました。

図1. フィブリノゲン測定法の種類・特徴(上)とトロンビン時間法によるスクリーニング検査の流れ



測定法	利点	欠点
Clauss法 (トロンビン時間法)	迅速 スクリーニング検査として推奨 ¹⁾	トロンビン阻害物質の影響を受ける ²⁾ 質的異常と量的異常を区別できない ³⁾
PT同時測定法 (PT-derived法)	測定コストの削減	高濃度・低濃度域の直線性が悪い ⁴⁾ 一部の症例で活性を反映しない ⁵⁾
免疫学的測定法	唯一抗原としての絶対量を測定可能	コストが高い・スループットが悪い 非特異反応の可能性

1) Roberts HR, Br J Hematol, 2001; 2) 青木 延雄, medicina, 1975; 3) Casini A, J Thromb Haemost, 2018; 4) Chitolie et al, 1998; 5) Miesbach et al, Thromb Res, 2010



2. 研究成果

我々は、最近開発された新たな解析技術である「凝固波形解析」に着目しました。凝固波形解析は、測定反応の動態を数学的に解析し、凝固反応におけるパラメータを数値として算出する手法(図2)です。我々は、トロンビン時間法による測定において、この解析パラメータのうちの一つである「Min1」と称される値がフィブリノゲンの抗原量に強く相関することを見出しました。Min1値を利用してフィブリノゲン抗原量に相当する値(推定抗原量 estimated fibrinogen antigen: eAg)を算出し、トロンビン時間法本来の測定から得られる機能的な量(活性値 fibrinogen activity: Ac)との比(Ac/eAg比)が、フィブリノゲンの“質”を反映する指標となることを見出しました。このeAg値の取得とAc/eAg比の計算をより迅速かつ簡便に行うため、検査を行うための自動分析装置を改良し、測定と同時に解析を実施可能な自動解析ソフトウェア開発しました。

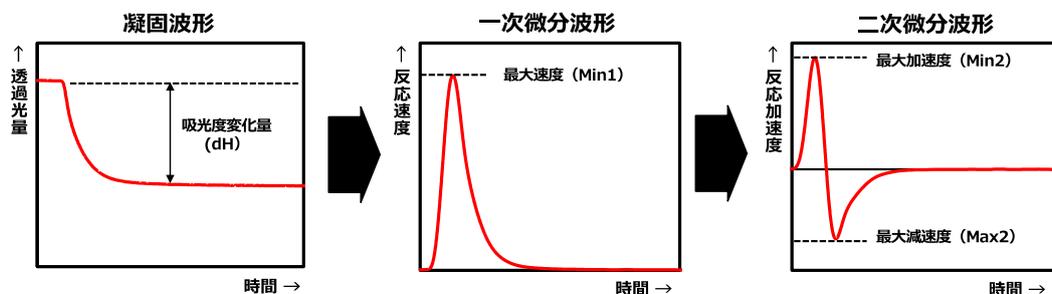


図2. 凝固波形解析の概要

左) フィブリノゲン測定における凝固波形の一例

中) 凝固波形を一次微分した波形で反応速度を示す: 最大速度をMin1と称する

右) 一次微分波形をさらに微分した二次微分波形で反応加速度を示す: 最大加速度をMin2、最大減速度をMax2と称する

名古屋大学医学部附属病院にてフィブリノゲン検査を受けた患者さんの残検体を使用し、新しく開発した自動解析ソフトウェアの検証を実施しました。まず、519名の患者さんの検体（うち先天性異常フィブリノゲン血症と診断された患者さんの検体15名分を含む）を用いてAc/eAg比を求め、ROC解析*により疾患の有無を区別するためのカットオフ値を算出しました。その結果、最適なカットオフ値は0.65であることが分かりました。

次に、別の523名の患者さんの検体（うち上記とは別の先天性異常フィブリノゲン血症と診断された患者さんの検体14名分を含む）を用いてAc/eAg比を求め、設定した0.65というカットオフ値がどの程度正しく疾患の有無を判別できるのか検証を行いました。その比較対照として、これまでに用いられていた手法、すなわち実際にフィブリノゲン抗原量を測定し求めた比活性（Ac/Ag比）による疾患有無の判定も合わせて併せて用いました。その結果、新しく開発した解析ソフトウェアによる異常フィブリノゲン血症の検出能力は、既存の手法に対して同等以上であり、機能異常症の代表的疾患である異常フィブリノゲン血症を明確に鑑別できることが明らかとなりました（図3）。また、検証した2種類の試薬キットでは、その性能にほとんど差がなく、使用するキット間での検出性能は同等であることが明らかとなりました。

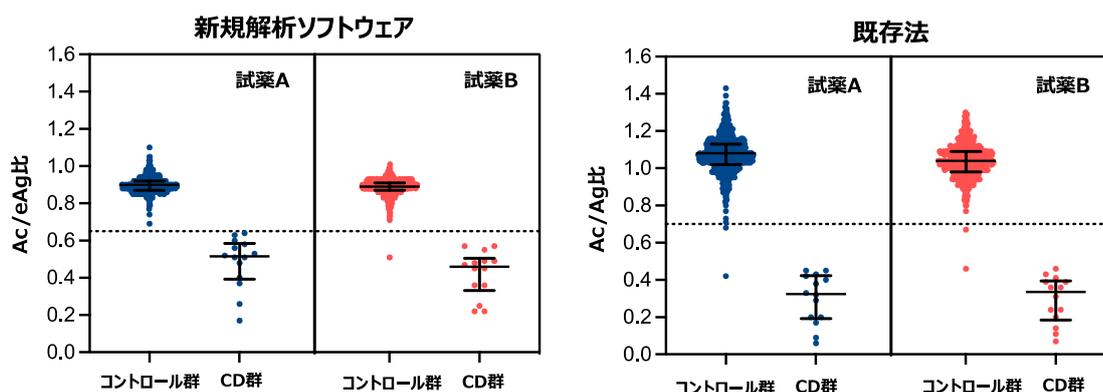


図3. 新規開発ソフトウェアと既存法による異常フィブリノゲン血症（CD）の検出性能比較

左) 新規解析ソフトウェアによる測定結果

右) 既存法による測定結果

どちらもフィブリノゲンの質的異常症である異常フィブリノゲン血症（CD群）とそうでない集団（コントロール群）を明確に区別可能である。

新規解析ソフトウェアでは、コントロール群のAc/eAg比は中央値で0.90（95%信頼区間で0.78-0.99）であるのに対し、CD群では0.65未満の値を示した。

3. 今後の展開

新しく開発した解析ソフトウェアを搭載した自動分析装置を用いて、実際に日常検査での利用を始めていきます。これにより、これまで発見されていなかった潜在的な患者さんを見つけることができる可能性があります。また、今後さまざまな疾患を対象にして、この解析ソフトウェアにより得られるデータを検討し、その有用性について評価を進めていく予定です。

4. 用語説明

*ROC解析：検査や診断法の性能を評価するための手法で、例えば正常と異常を区別する能力や区別に使用する最適な値（カットオフ値）を算出することに用いられる。

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Scientific Reports

論文タイトル : Development and validation of a novel qualitative test for plasma fibrinogen utilizing clot waveform analysis

著者 : Atsuo Suzuki¹, Nobuaki Suzuki², Takeshi Kanematsu³, Sho Shinohara⁴, Hiroshi Kurono⁴, Nobuo Arai⁴, Shuichi Okamoto³, Naruko Suzuki⁵, Shogo Tamura⁶, Ryosuke Kikuchi¹, Akira Katsumi⁷, Tetsuhito Kojima⁸, and Tadashi Matsushita^{2,3}

所属 : ¹ Department of Medical Technique, Nagoya University Hospital

² Department of Transfusion Medicine, Nagoya University Hospital

³ Department of Clinical Laboratory, Nagoya University Hospital

⁴ Sysmex Corporation

⁵ Department of Hematology-Oncology, Nagoya University Graduate School of Medicine

⁶ Division of Cellular and Genetic Sciences, Department of Integrated Health Sciences, Nagoya University Graduate School of Medicine

⁷ Department of Hematology, National Centre for Geriatrics and Gerontology

⁸ Aichi Health Promotion Foundation

DOI : 10.1038/s41598-021-04464-5

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Sci_Rep_220121en.pdf