

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08621

研究課題名(和文)新規経口抗凝固薬における残存凝固能モニタリング検査の開発に関する研究

研究課題名(英文)Development of monitoring tests for residual coagulation activity in novel oral anticoagulants

研究代表者

家子 正裕 (Ieko, Masahiro)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：50250436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規経口抗凝固薬(NOAC)はモニタリング検査が不要とされているが、有効な抗凝固療法を行うためには、NOACの過不足を判断できる検査が必要である。そこで、我々はトロンビン阻害薬では、エカリン凝固時間(ECT)を利用したTIRを開発した。また、Xa阻害薬では、希釈PTを利用したRITGを開発した。TIRおよびRITGが基準値以下のサンプルでは血栓マーカーが検出されるものが多く、これらの指標はNOACの過不足を反映する検査であった。特にRITGは3種類のXa阻害薬を横並びに検討できる指標と思われた。今後、この指標を用いて、より有効なNOAC療法の検討ができるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Novel oral anticoagulants (NOAC) are considered unnecessary for monitoring tests, however the test that can indicate the excess and under-dosage of NOAC is necessary for effective anticoagulant therapy. We developed Thrombin Inhibition Ratio (TIR) using Ecarin Clotting Time for dabigatran therapy. TIR correlated well with the blood dabigatran concentration ($r_2 = 0.66$). Then, for direct oral factor Xa inhibitors (Xa-INH) therapy, we developed Ratio of inhibited thrombin generation (RITG) using dilute PT. RITG correlated with the blood concentration of each Xa-INH (Rivaroxaban: $r_2 = 0.51$, Apixaban: 0.45, Edoxaban: 0.75). In samples with low value of TIR or RITG, there were many samples with increased thrombus markers such as FMC. TIR and RITG can reflect the excess and under-dosage of NOAC. Also, RITG is a unique test that can simultaneously evaluate the effects of three kinds of Xa-INH. We are planning to consider more effective NOAC therapy using these indexes in the future.

研究分野：血液内科

キーワード：抗凝固療法 新規経口抗凝固薬 血栓症

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国においても心原性脳塞栓症などの血栓症は増加傾向であり、様々な経口抗凝固薬が予防・治療として投与されている。近年、ワルファリンに変わる経口抗凝固薬が開発され、その抗凝固機序の違いより直接経口抗凝固薬(DOAC)と呼ばれている。現在、トロンビン阻害薬1剤、Xa阻害薬4剤が使用されている。DOAC服用者は多いが、DOACはwarfarinのようにモニタリング検査による投与量の調節は不要である。しかし、現在服用しているDOACが効果的であるのか否かを知る指標がなく、過剰効果による出血症状や不足による血栓症再発などをきたすことも少なくない。効果を知る指標がないことは、患者にとっても主治医にとっても不安で悩ましい事である。何らかの指標があれば、より良い抗凝固療法が可能となり、出血性副作用や効果不十分による血栓症再発の予防できると考えられる。このような理由から現在DOAC療法の効果を確認する確認試験(Measuring)方法が検討されている。

2. 研究の目的

DOAC療法における抗凝固効果を反映できる凝固時間法検査を確立し、DOAC療法における有用性を検討する。また、本法を利用し、各DOACの有効域および過剰域を反映する指標を作成することを目的とした。

3. 研究の方法

1) トロンビン阻害薬における検討

(1) Ecarin clotting time (ECT)

Ecarinは、凝固第Xa因子(FXa)と同様の機序でprothrombinを活性化することが知られている。被検血漿に当量のEcarin(Sigma)を終濃度0.42, 0.83, 1.65 EU/mLで加えて凝固するまでの時間を凝固検査汎用機CP2000(積水メディカル)を測定した。Dabigatran(Dab; ベーリンガー社より提供)をコントロール血漿(Sysmex)に混和(終濃度: 0~800 ng/mL)し、Ecarin凝固時間(ECT)を測定し、最もDab濃度を反映するEcarin濃度を決定した。また、ECTの希釈直線性なども検討した。

(2) Thrombin inhibition ratio (TIR)

Dabによるトロンビンの阻害率TIRをETCを用いて検討した。TIRは下記の計算式より求めた。

$$TIR = (ECTp - ECTc) / ECTc \times 100$$

(ECTp: 被検血漿のECT、ECTc: コントロール血漿のECT)

Dabを終濃度0~800 ng/mLに混和したコントロール血漿よりTIRを求めて、希釈直線性、測定限界などを検討した。その結果を検量線として、患者血漿を測定した。同血漿サンプルを活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)、トロンビン時間(TT)による血中Dab濃度も測定し、TIRと比較検討した。

2) Xa阻害薬における検討

(1) 希釈プロトロンビン時間(dPT)

種々のPT試薬をオーレンバッファードで25~500倍に希釈し、被検血漿と同量に混和し、凝固時間を測定した。Rivaroxaban標準血漿(Riv: Hyphen)で終濃度0~800 ng/mLになるように調整したコントロール血漿を用いてdPTを測定し、最もRiv濃度の変化を良好に反映するPT試薬およびその濃度を決定した。凝固時間は凝固検査汎用機CP2000で測定した。また、Rev混入血漿を用いたdPT測定の希釈直線性なども検討した。

同様の検討をApixaban標準化血漿(Api: Hyphen)およびEdoxaban(Edo: 第一三共より提供)を用いて検討し、全てのXa阻害薬で良好に濃度を反映するdPT試薬およびその希釈濃度を確認した。

(2) Ratio of Inhibited Thrombin Generation (RITG)

Xa阻害薬による凝固反応(トロンビン産生)の阻害率RITGをdPTを用いて検討した。

RITGは下記の計算式より求めた。

$$RITG = (dPTp - dPTc) / dPTc \times 100$$

(dPTp: 被検血漿のdPT、dPTc: コントロール血漿のdPT)

まず、Rivを終濃度0~800 ng/mLに混和したコントロール血漿よりRITGを求めて、その希釈直線性、測定限界などを検討した。その結果を検量線として、Riv服用患者血漿を測定した。

同様にApiおよびEdo混合コントロール血漿を用いて、それぞれの検量線を作成し、それぞれを服用している患者血漿を測定した。Apiは通常PTへの感受性が低いが、dPTおよびRITGには反映された。同血漿サンプルをAPTT、PTおよびXa阻害薬血中濃度(テストチームヘパリン[積水メディカル])を応用して測定)と比較検討した。

3) 患者血漿の採取

本研究は、本学倫理委員会で承認のもとで行われた(承認番号107号、117号、136号、137号)。

本学関連施設で診療および検査依頼のあったDOAC服用患者より、インフォームドコンセントを行い、了承の得られた患者より、通常の診療検査時に本研究用サンプルを同時に採取した。サンプルは匿名化し、個人が特定できないように情報管理者(研究代表者)が管理した。

患者情報としては、性別、年齢、体重、DOACの種類、DOAC服用から採血までの時間、腎機能(eGFRおよびCCr)および基礎疾患、併用薬を使用した。

4. 研究成果

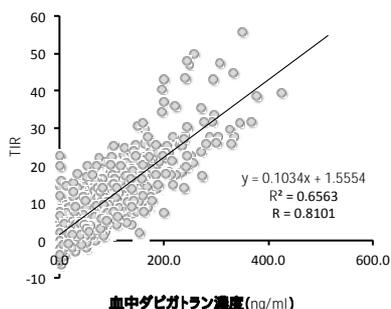
1) トロンビン阻害薬療法

(1) ECTおよびTIR ECTはDab血中濃

度と良好に相関し、500～31.3 ng/mL の範囲で希釈直線性も得られた。測定限界は Dab 12.5 ng/mL で ECT は Dab の効果を反映する臨床検査として十分であることが分かった。

次に Dab 服用者からの 364 サンプルを用いて ECT を測定し、TIR に換算した。TIR は Dab 血中濃度に相関した ($r^2=0.9593$)、APTT との相関 ($r^2=0.4180$) と比べても良好であった (図 1)。正確な治療域は現在明確では無いため、仮に 50~250 mg/mL とした場合、治療域となる TIR は 7~27 と推定された。

(図 1)



(2) Dab 抗凝固療法と TIR

Dab 療法患者より得た 452 サンプルより TIR を測定した。常用量 (300mg/日) 服用者 (144 サンプル) と低用量 (220mg/日) 服用者 (308 サンプル) に分けて検討した。低用量のピーク期 (服用から 0.5~6 時間) の TIR において、上記で求めた有効域 (TIR=7~27) にあるものは 67.2% であり、常用量のピーク期サンプルでの 68.1% とほぼ同様の結果であった。

TIR は Dab 療法における有効性を確認できる方法であることが示された。

2) Xa 阻害薬療法

(1) dPT と RITG

dPT は Riv、Api、および Edo 血中濃度に良好に相関した。Riv および Edo は 80~800 ng/mL で、Api は 60~580 ng/mL で希釈直線性が得られた。また、測定限界は Riv、Api、Edo それぞれで 20, 42, 20 ng/mL であり、dPT は Xa 阻害薬の効果을反映する臨床検査として十分であることが確認された。

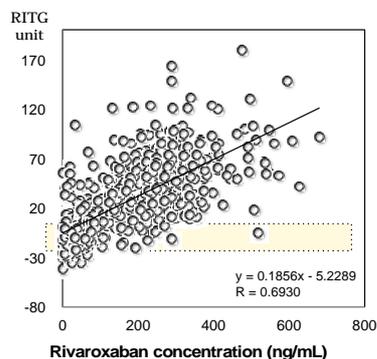
Riv 療法における RITG

Riv 療法中の患者血漿 593 サンプルを用いて RITG を測定した。RITG-Riv は Riv の血中濃度に良好に相関した ($r=0.6930$)。相関式は $Y=0.1856X-5.2289$ であった (図 2)。

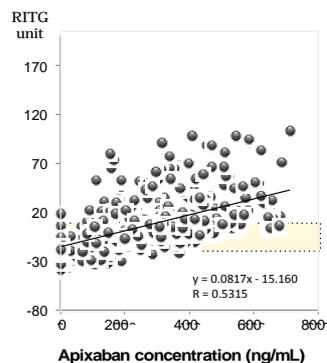
Api 療法における RITG

Api 療法中の患者血漿 471 サンプルを用いて RITG を測定した。RITG-Api は Api の血中濃度に良好に相関した ($r=0.5315$)。相関式は $Y=0.0817X-15.160$ であった (図 3)。

(図 2)



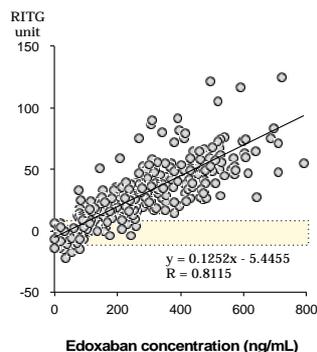
(図 3)



Edo 療法における RITG

Edo 療法中の患者血漿 310 サンプルを用いて RITG を測定した。RITG-Edo は Edo 血中濃度に良好に相関した ($r=0.8115$)。相関式は $Y=0.1252X-5.4455$ であった (図 4)。

(図 4)



(2) Xa 阻害薬療法と RITG

Riv 服用者のトラフ期 (服用後 18~28 時間) はほぼ健常人の RITG と同様であるが、Api 服用者ではトラフ期 (服用後 8~14 時間) では比較的 RITG が高めのサンプルが多く、Api は血中濃度の増減が小さな抗凝固療法であることが確認された。

RITG が健常人の範囲より低い場合には、血栓マーカーであるフィブリンモノマー複合体 (FMC) が高いサンプルが多く、RITG は抗凝固不足のみならず、過凝固も反映する検査である可能性が示唆された。

各 Xa 阻害薬服用者での血栓症や出血性の

副作用などのイベント数が少ないため、至適 RITG 領域や危険域 RITG 値が検討できなかった。今後の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Kato M, Uedo N, Hokimoto S, Ieko M, Higuchi K, Murakami K, Fujimoto K. Guidelines for Gastroenterological Endoscopy in Patients Undergoing Antithrombotic Treatment: 2017 Appendix on Anticoagulants Including Direct Oral Anticoagulants (DOACs). Dig Endosc. 2018 May 7. [Epub ahead of print] (査読あり)
2. Yamaguchi Y, Nakazato S, Izumi K, Ieko M, Nomura T, Shimizu H. Rapid remission of severe pain from livedoid vasculopathy by apixaban. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017; 31: e45-e46. (査読あり)
3. Ieko M, Naitoh S, Yoshida M, Takahashi N. Profiles of direct oral anticoagulants and clinical usage-dosage and dose regimen differences. J Intensive Care. 2016; 4: 19. (査読あり)
4. 家子正裕. 新規経口抗凝固薬 (NOAC). 臨床血液 2015; 56: 2123-33. (査読あり)

[学会発表](計11件)

1. T Suzuki, M Ieko, S Naito, et al: Fibrin monomer complex and diluted prothrombin time as a marker for thrombotic tendency in anti-Xa DOAC therapy. 26th Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis. 2017年7月10日 (Berlin).
2. S Naito, M Ieko, T Suzuki, et al: New evaluation test for direct oral factor Xa inhibitors using diluted prothrombin time. 第64回日本臨床検査医学会 2017年11月16日 (京都).
3. 鈴木健史、家子正裕、高橋信彦、他: 経口直接 Xa 阻害薬療法における抗凝固効果の確認に関する検討 第18回日本検査血液学会. 2017年7月23日 (札幌).
4. 家子正裕. 直接経口抗凝固薬 (DOAC)

のモニタリング検査と拮抗薬。(教育講演)第44回に本集中治療医学会 2017年3月9日 (札幌市)

5. 山崎昌子, 志賀剛, 長尾毅彦, 遠井素乃, 水野聡子, 家子正裕, 北川一夫. 直接経口抗凝固薬服用患者のプロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間の日差変動. 第38回日本血栓止血学会学会学術集会 2016年6月16日 (奈良市).
6. 鈴木健史, 家子正裕, 佐久間一郎, 他. Edoxaban 服用検体における血栓マーカーを用いた Ratio of Inhibited Thrombin Generation の評価. 第38回日本血栓止血学会学術集会 2016年6月17日 (奈良市).
7. 内藤澄悦, 家子正裕, 佐久間一郎, 他. エドキサバン療法における希釈プロトロンビン時間を用いた残存凝固能 (RITG) の測定. 第38回日本血栓止血学会学術集会 2016年6月17日 (奈良市).
8. T Suzuki, M Ieko, I Sakuma, et al: Evaluation of anticoagulant therapy with Dabigatran based on ecarin clotting time. 25th Congress of International Society of Thrombosis and Haemostasis. 2015年6月20日 (Tront)
9. 内藤澄悦, 家子正裕, 佐久間一郎, 他: 新規経口抗凝固薬 (NOAC) の服用が日常凝固検査に及ぼす影響. 第16回日本検査血液学会 2015年7月11日 (名古屋).
10. 鈴木健史, 家子正裕, 佐久間一郎, 他: 各種 NOAC 服用者における血栓マーカーの比較. 第37回日本血栓止血学会学術集会. 2015年5月21日 (甲府).
11. 鈴木健史, 家子正裕, 佐久間一郎, 他: 各種 Direct Oral anticoagulat 服用中の血中濃度の比較. 第62回日本臨床検査医学会学術集会 2015年11月20日 (岐阜).

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

家子 正裕 (Ieko Masahiro)
北海道医療大学・歯学部・教授
研究者番号：50250436

(2)研究分担者

高橋 伸彦 (Takahashi Nobuhiko)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号：20372279

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()