

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07842

研究課題名（和文）直接経口抗凝固薬（DOAC）に対する血中モニタリング法の開発

研究課題名（英文）Development of blood monitoring method for direct oral anticoagulant (DOAC)

研究代表者

森山 雅人（MORIYAMA, MASATO）

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30598131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「ダイヤモンドセンサ」を用いてDOAC血中濃度を迅速かつ簡便に定量する方法を確立し、抗凝固活性と、効果や副作用など臨床症状との関連を検討することを目的とした。今回は「ダイヤモンドセンサ」によるエドキサバン濃度測定最適化を推進した。「ダイヤモンドセンサ」の測定感度と選択性の向上を目指し、最適な測定条件や前処理方法などを検討した。併せて、血漿蛋白質に結合したエドキサパンを分離する最適な方法の評価や、各種遠心式フィルタを用いて血漿中からエドキサパンのみを抽出する方法についても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ダイヤモンド電極法を用いて、DOAC血中濃度を迅速かつ簡便に測定する方法を確立する。併せて、抗凝固活性、臨床症状を評価し、包括的モニタリングとして実臨床へ応用する。最終的には、広く症例を集積して、薬物血中濃度と抗凝固活性、および臨床症状との関連性を評価し、DOACの有効かつ安全な個別化（テーラーメイド）治療の確立に寄与するものである。本研究は DOAC服用患者の薬物血中濃度と治療効果・有害事象の関連を評価できる、迅速・簡便・安価にDOAC濃度を測定し治療へ反映できる、合併症管理を含む不必要な薬剤を抑制できる、効果を最大現に発揮し、副作用を最小限に抑える投薬方法開発に寄与する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a rapid and simple method for quantifying DOAC blood concentration using the "Diamond Sensor" and to examine the relationship between anticoagulant activity and clinical symptoms such as efficacy and side effects. In this study, optimization of Edoxaban concentration measurement using the "Diamond Sensor" was promoted. We studied optimal measurement conditions and pretreatment methods to improve the measurement sensitivity and selectivity of the "Diamond Sensor. In addition, we evaluated the optimal method for separating Edoxaban bound to plasma proteins and examined methods for extracting only Edoxaban from plasma using various centrifugal filters.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：ダイヤモンド電極 直接経口抗凝固薬 DOAC 血栓塞栓症 抗凝固活性 薬物血中濃度 モニタリング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において、心原性脳塞栓症など血栓症は増加の一途をたどっている。また深部静脈血栓症 (DVT) や肺塞栓症 (PE) などの静脈血栓塞栓症 (VTE) は、震災に伴うエコノミークラス症候群などで広く一般にも認識され、がん領域においても血栓塞栓症が原病死に次ぐ死因第二位と報告されており、薬物療法による予防や治療が重要視されている。これまでの抗凝固療法は、注射のヘパリン類と内服のビタミンK拮抗薬 (ワルファリン) のみであった。しかし近年、新たな経口抗凝固薬として直接経口抗凝固薬 (DOAC) が開発され、日常臨床で使用されている。ワルファリンは有効域・安全域が狭く、併用薬や食品等の影響を受け、治療に際して難しい部分があった。これに対してDOACは、食物や薬物などの相互作用がほとんどなく、用量調節のためのモニタリングも不要とされ、簡便性が評価されている。

実際、ヘパリン類は活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、ワルファリンはプロトロンビン時間国際標準比 (PT-INR) というモニタリング検査に該当するものがあり、有効かつ安全な抗凝固効果を得るために必要とされる薬物投与量の調節をするテーラーメイド治療が実施されている。一方DOACは、常用量または低用量という選択で、それぞれに既定の減量基準があるものの、モニタリング検査は確立されておらず、細かな用量調整は行われていない。そのため、過剰作用による出血や、効果不足による血栓形成・再発を来すことも少なくない。やはりDOACにおいても、これらを迅速かつ簡便に予測できる何らかの指標は必要であるが、現状では体系化された血中濃度測定や抗凝固活性評価の検査は確立されていない。

有効かつ安全なDOAC治療を実施するためには、症状に応じて迅速かつ簡便な血中モニタリングが重要となる。現在、薬物血中濃度を定量するには、質量分析器などの特殊な装置が必要となるため、ほとんどの施設では実施困難である。その結果、DOACの効果や有害事象と、血中濃度の相関性はほとんど検討されておらず、至適な薬物投与方法の評価はできていない。

新潟大学・慶応大学・東京大学のグループは、先端径40 $\mu$ mの針状ダイヤモンドセンサを用いた薬物モニターシステムを開発した。このセンサは電気化学反応を利用し、水溶液中にある化合物が酸化還元される際の電流を濃度として測定するもので、実際に当グループはラットの薬物濃度をリアルタイムで測定することに成功した (Ogataら, Nature Biomed Eng 2017)。ダイヤモンドセンサは、従来品に比べ蛋白質などの体液中の内因性物質の影響を受けにくく、測定可能な化合物の種類も多い (Diam Elec 2005)。よってダイヤモンド電極法は、臨床の現場で求められる迅速かつ簡便な薬物測定システムとして理想的であり、既に殺細胞薬 (ドキシソルピシン) や分子標的治療薬の濃度測定にも成功している。

DOACの主流は活性化第X因子 (FXa) を阻害する抗Xa薬である。薬物血中濃度に加え、実際のFXa阻害活性を評価することは、有効性と安全性を検討する上で有意義である。Xa阻害薬服用患者の血液は抗Xa活性を有するため、患者血漿に検査試薬として過剰のXaを添加すると、血漿中のanti-Xaと試薬中のXaが結合するので、Xaに対する合成基質を添加すれば残存Xa活性が測定できる。当グループでは、この「抗凝固活性」を「薬物血中濃度」と同時に評価し、「臨床所見」と組み合わせることで、よりの確かな抗凝固療法の提供が可能

であると考える。

## 2. 研究の目的

本研究では、ダイヤモンドセンサを用いてDOAC血中濃度を迅速かつ簡便に定量する方法を確立し、抗凝固活性と、効果や副作用など臨床症状との関連を検討する。最初に定量方法の評価として、①動物を用いてDOAC 測定法を最適化し、検査技術の評価する。次に、②ヒト血液やDOAC を経口投与した動物を用いて測定法を検証し、迅速かつ簡便な測定法を確立する。最後に、③投薬患者の血漿中濃度を計測し、LC-MS/MS による計測値と比較することで定量性を検証する。さらに、④これらのデータと抗凝固活性、および臨床症状との関連性を評価する。そして将来、DOAC の有効かつ安全なテーラーメイド治療の発展に寄与するものである。

ダイヤモンド電極法は新潟大学・慶応大学・東京大学が開発した測定法である。本研究により、以下の点が期待できる。

- ・ DOAC服用患者の薬物血中濃度と、治療効果・有害事象の連関関係の深い理解に貢献する。
- ・ 迅速・簡便・安価に血漿中のDOAC濃度を測定し、リアルタイムに治療へ反映することができる。
- ・ 合併症管理を含め、無駄な薬剤の使用を抑制し、社会医療費の削減に貢献する。
- ・ 効果を最大限に発揮し、副作用を最小限に抑える投薬方法開発の発展に寄与する。

## 3. 研究の方法

### ① DOAC (エドキサバン) 測定の最適化

ダイヤモンドセンサによる測定感度と選択性の向上を目指し、エドキサバンの測定条件の最適化を検討する。続いて、サンプル前処理の方法を最適化する。標本として、ラットの血液に既知濃度のイマチニブを溶解したものを使用する。血漿サンプルにアセトニトリル添加の上、遠心分離し、除蛋白質処理をする。これにより血漿蛋白質に結合したエドキサバンを分離する最適なアセトニトリル量を見出す。さらに、各種遠心式フィルタを用いて、血漿中からエドキサバンのみを抽出する方法も試みる。

### ② ヒト血液および動物実験による測定方法の性能検証

#### (1) ヒト血液による性能検証

上記①で開発した測定法の性能を、市販の実験用ヒト血液（コスモバイオ）を用いて再評価する。必要があればアセトニトリル量など、測定方法を最適化する。

#### (2) 動物実験による性能検証

ラットにエドキサバンや各種併用薬を経口投与し、一定時間毎に採血する。血中濃度を計画①で開発した測定法と、質量分析器にて測定し、両者の結果を比較する。さらに、半減期などの薬物動態パラメータを算出し、抗凝固活性等と合わせて既存データと検討する。

## 4. 研究成果

#### ① DOAC 測定の最適化

エドキサバンの電気化学的特性と作用電極依存性を検証した。はじめに、PBS 溶液中に溶かしたエドキサバンと PBS 溶液を、ダイヤモンド電極で、CV (サイクリックボルタンメトリー) 測定をした。その結果、ダイヤモンド電極で酸化還元電流を観察可能であることを確認した。

さらなる測定感度の向上を目指して、CV 法より測定感度が良いことが知られている、OSWSV (オステルヤング矩形波ストリッピングボルタンメトリー) 法を用いて、PBS 溶液に溶かしたエドキサバンサンプルの測定を行った。現在、さらなる測定条件の最適化を検討中である (23K06906)

さらに、サンプル前処理方法の最適化も検討する。血漿サンプルにアセトニトリル添加の上、遠心分離し、除蛋白質処理をし、血漿蛋白質に結合したエドキサバンを分離する最適なアセトニトリル量を算出する。また、各種遠心式フィルタを用いたエドキサバンの抽出も検討する。

#### ② ヒト血液および動物実験による測定方法の性能検証

上記①検討後、実験用ヒト血液を用いた性能検証や、ラットにエドキサバンを経口投与し、血中濃度を測定、評価する。加えて、半減期などの薬物動態パラメータを算出し、抗凝固活性等と合わせて既存データと検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sawamura Seishiro, Ogata Genki, Asai Kai, Razvina Olga, Ota Takeru, Zhang Qi, Madhurantakam Sasya, Akiyama Koei, Ino Daisuke, Kanzaki Sho, Saiki Takuro, Matsumoto Yoshifumi, Moriyama Masato, Saijo Yasuo, Horii Arata, Einaga Yasuaki, Hibino Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Analysis of Pharmacokinetics in the Cochlea of the Inner Ear	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.633505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 将門  (MATSUDA MASATO)  (30838652)	福島県立医科大学・保健科学部・助教   (21601)	
研究分担者	齋木 琢郎  (SAIKI TAKURO)  (90865057)	新潟大学・歯学総合病院・医員   (13101)	
研究分担者	緒方 元気  (OGATA GENKI)  (80452829)	慶應義塾大学・理工学部（矢上）・特任准教授   (32612)	
研究分担者	日比野 浩  (HIBINO HIROSHI)  (70314317)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授   (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	西條 康夫  (SAIJO YASUO)  (10270828)	新潟大学・医歯学系・教授     (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関