

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09263

研究課題名（和文）誘電率測定を用いた直接経口抗凝固薬の薬効評価システムの確立

研究課題名（英文）Establishment of a system for evaluating the anticoagulation potential of direct oral anticoagulants using a dielectric coagulometer

研究代表者

内田 篤治郎（Uchida, Tokujiro）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：40262183

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、健康人ボランティアより採血した検体に、アピキサバン、リバーロキサバン、エドキサバンといった凝固第Xa因子阻害薬、およびダビガトラン、アルガトロバンといった直接トロンビン阻害薬を添加した全血人為検体に対して、誘電コアグロメーターによる凝固時間（DBCM CT）測定を行った。結果として、凝固第X因子活性化試薬を作用させた系において、DBCM CTが濃度依存性に延長することが明らかとなった。凝固第Xa因子阻害薬および直接トロンビン阻害薬を含めた直接経口抗凝固薬の薬効評価のためのPoint of Care検査として、誘電コアグロメータを用いた本システムが有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Point of Care 型の検査機器で直接経口抗凝固薬（DOAC）の薬効が評価できるようになれば、DOACが目標に適合した薬効を発揮しているかどうか簡便かつ迅速に評価でき、患者への適切な介入が可能となる。特に緊急的に観血的な介入をしなければならない症例において、中和の適応の判断基準として役立つことができるようになり、臨床的な意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we measured the clotting time using a dielectric blood coagulometer (DBCM CT) on whole blood samples from healthy volunteers, spiked with coagulation factor Xa inhibitors such as apixaban, rivaroxaban, and edoxaban, as well as direct thrombin inhibitors such as dabigatran and argatroban. The results indicated that in the system where a coagulation factor X activator reagent was applied, the DBCM CT was prolonged by direct oral anticoagulants in a concentration-dependent manner. This suggests that the dielectric blood coagulometer system used in this study is useful as a point-of-care test for evaluating the anticoagulation potential of direct oral anticoagulants, including factor Xa inhibitors and direct thrombin inhibitors.

研究分野：麻酔科学

キーワード：直接経口抗凝固薬 ポイントオブケア検査

## **1. 研究開始当初の背景**

直接経口抗凝固薬(Direct oral anticoagulants: DOAC)はワルファリンと比べ、作用発現が早い、頭蓋内出血が少ない、食事の制限がない、等の点から近年、使用が増えている。一方、高齢者や腎障害患者に対しては投与量の減量が必要であり、血中 DOAC 濃度の治療域を超えた上昇に注意が必要である。また、手術などの観血的な処置を行う際に、休薬が必要となるが、緊急手術などで薬効が残存すると、出血の危険性が増大する。全血凝固能の過不足を分析することができれば、中和薬などによる介入の適応の判断などを含めて、治療の過程での出血や血栓塞栓症といった重大な合併症のいずれに対しても適切な介入が可能となるが、今のところ、そのようなニーズにこたえる検査法が十分にあるとはいえない。

ソニー株式会社は、包括的血液凝固検査を高感度な電気測定によって実現する新たな手法を開発し、自動化された誘電コアグロメーター実験機として開発し、2019年3月には臨床検査機としてアークレイ株式会社から SPOTCHEM HS HS-7710 として上市されるに至っている。これまでに、我々の教室で心臓手術における包括的凝固機能検査法としての臨床的な評価を行ったが、この過程において誘電コアグロメーターで計測される凝固反応時間(DBCM-CT)はトロンピン生成能に対する相関性が高いことが示された。そこで、DOACの薬効評価に対するこの方法の有用性を検討し、同機を当該領域における臨床的なニーズにこたえる装置へと発展させ、DOAC 処方患者における薬効評価や中和処置を適切に行うことができるようになることを目指して、本研究を計画した。

## **2. 研究の目的**

本研究は、健康人ボランティアより採血した検体に、アピキサバン、リバーロキサバン、エドキサバンを濃度を変えて添加した人為検体に対して、誘電コアグロメーターによる測定を行い、凝固第 X 因子活性化試薬を作用させた系において、誘電コアグロメーターで測定される凝固開始時間が上記 DOAC 混合時に濃度依存性に延長することを明らかにし、DBCM-CT が DOAC の薬効評価に役立つ検査指標であることを確立すること目的として実施した。さらに、この系が第 X 因子阻害薬に加えて直接トロンピン阻害薬に対しても一定のパフォーマンスを示すかどうかを検討した。

## **3. 研究の方法**

本研究では、健康人ボランティアより採血した検体に、凝固第 X 因子阻害薬であるアピキサバン、リバーロキサバン、エドキサバンの濃度を変えて添加した人為検体に対して、DBCM、CAT による測定を行い、凝固第 X 因子活性化試薬を作用させた系での DBCM CT が上記 DOAC 混合時の薬物濃度と相関するか評価した。さらに、個人間での薬力学的なばらつきを考慮し、凝固第 X 因子活性化試薬を作用させた系で測定した DBCM CT が、CAT により測定されたトロンピン生成の指標と相関するかどうかについても評価した。直接トロンピン阻害薬であるダビガトラン、アルガトロバンについても人為検体を作成し、薬物濃度と DBCM CT の相関性について検討した。本研究は東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を受けている(承認番号:M2019-120, M2022-078)。

### **血液サンプル**

インフォームドコンセントを取得した健康人ボランティア 28 名より採血を行った。参加者は 2 週間以上、抗血小板薬、抗凝固薬の内服歴がない、20 歳以上の健康成人とした。採血は静脈穿刺により行い、3.2%クエン酸採血管(ベノジェクト ;テルモ、東京、日本)に採取した。DBCM で用いる血液サンプルは室温で保存され、即座に測定を行った。CAT で用いる血液サンプルは各 DOAC を添加し転倒混和したのち、遠心分離(2000G、10 分、18 )を行い、血漿を分注し、さらに超遠心(20000G、10 分、18 )を行った。血漿を分注し、乏血小板血漿として-80 で凍結保存した。

#### ・DOAC の調整

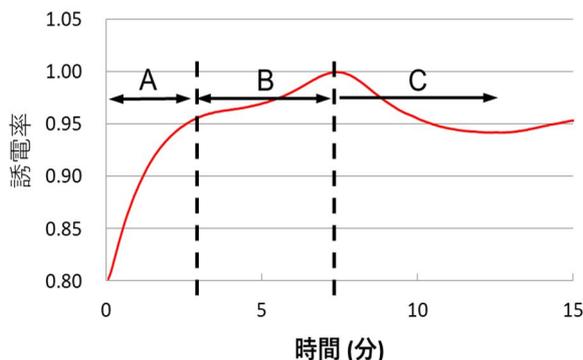
リバーロキサバンを DMSO に溶解させ希釈し 800 $\mu$ l/ml とした。それを PBS で希釈し 32 $\mu$ l/ml とし (800ng/ml)、全血 1ml に対して終濃度 25、50、100、200、400ng/ml となるよう希釈溶液で希釈した。エドキサバン、アピキサバン、ダビガトランについて、それぞれ同様に希釈した。アルガトロバンについては 0-4  $\mu$ g/ml で 5 段階の濃度設定とした。

#### ・第 X 因子活性化試薬の調整

第 X 因子活性化試薬については、液体試薬として調整し、分注したのち -80 で凍結保存したものを用いた。

#### ・DBCM による測定

DBCM は DBCM 実験機 (ソニー株式会社、東京、日本) を用いて行った。Ca が含まれる CA カートリッジに第 X 因子活性化試薬を 20 $\mu$ L、各 DOAC を 5 $\mu$ L 添加し、1 条件あたり 200 $\mu$ L の血液サンプルを機械にセットし、測定した。血液サンプルは 37 で 5 分間加温されたのち、自動的にポリプロピレンのディスポーザブル分析カートリッジに分注され、攪拌された。1MHz の交流電流が流され、37 で 5 秒ごとに 60 分間誘電率の変化の測定が行われた。誘電率のピークまでの時間を DBCM CT と定義し、評価に用いた。この時間はフィブリン重合により凝血塊が成熟するフェーズから血餅の退縮に転ずるまでに要する時間を反映している。



**図 1 : Ca 添加によって起こる血液凝固に伴う誘電率の変化 (1MHz 下)**

**A** : 赤血球の連鎖形成状態、**B** : 血液凝固に伴う赤血球凝集 (フィブリン網の形成) 状態、**C** : 凝集塊での赤血球の変形状態を示す。誘電率のピークまでの時間を **DBCM CT** 定義した。

#### ・CAT による測定

トロンビンの最大濃度である Peak Thrombin との関係性を評価しトロンビン生成を定量化した。5pM の組織因子と 4  $\mu$ M のリン脂質が含まれた PPP 試薬 (Thrombinoscope BV、Maastricht、オランダ) と Thrombin Calibrator 試薬 (Thrombinoscope BV、Maastricht、オランダ) に脱イオン水 1ml ずつを加え、室温静置 (10 分間) し、その後穏やかに転倒混和し攪拌した。Fluo-Buffer (Thrombinoscope BV、Maastricht、オランダ) を 37 の恒温槽で加温したのち、Fluo Substrate (Thrombinoscope BV、Maastricht、オランダ) を添加した状態で攪拌し、完全に溶解したことを確認し、再び恒温槽で加温した。Thrombin generation well へ PPP 試薬 20 $\mu$ l ずつ添加し、Thrombin Calibrator well へ Thrombin Calibrator 試薬を 20 $\mu$ l ずつ添加する。1well あたり 80 $\mu$ l の血漿を攪拌後添加した。気泡を除き、プレートを設定し 37 で 60 分間測定が行われた。Thrombinoscope™ソフトウェア (バージョン 3.0.029; Thrombinoscope BV、マーストリヒト、オランダ) によって Peak のデータが分析された。

#### ・統計

多重比較のためにボンフェローニの方法を用いて事後比較を行ったスピアマンの相関係数は薬物 DBCM CT と トロンピン生成 Peak の関係の評価に用いた。P<0.05 は相関係数と統計的有意性を表すとみなした。すべての統計分析は SPSS Statistics ver.26 (IBM Japan、東京、日本)を使用した。

#### 4. 研究成果

##### A. アピキサバン、エドキサバン、リバーロキサバンに関する検討

本研究では、10 名のボランティアから採血された検体により、「方法」で述べた人為検体を作成し、以下の結果を得た。

##### 第 X 因子活性化試薬を作用させた系での凝固時間 DBCM CT が DOAC 添加血で濃度依存性に延長する

各 DOAC の濃度と DBCM CT の関係を以下に示す (x 軸:DOAC 濃度、y 軸:DBCM CT) (図2)。中央線は中央値、箱は四分位範囲を示している。いずれの DOAC においても、第 X 因子活性化試薬を作用させた系での凝固開始時間が DOAC の濃度依存性に延長した。各濃度の DOAC を添加した検体とコントロールの間で DBCM CT に有意に差がみられた(P<0.01)。これより薬効の有無や休薬の評価に DBCM が有用である可能性が示された。エドキサバン (60mg/日)のトラフ濃度とピーク濃度はそれぞれ 10-40ng/mL および 120-250ng/mL、リバーロキサバン (20mg/日)はそれぞれ 6-87ng/mL および 189-419ng/mL、アピキサバン (5mg 錠)はそれぞれ 41-230ng/mL、91-321ng/mL とされており、DBCM は DOAC が治療域にあるかを判断するための有用な手段となりうる事が示唆された。

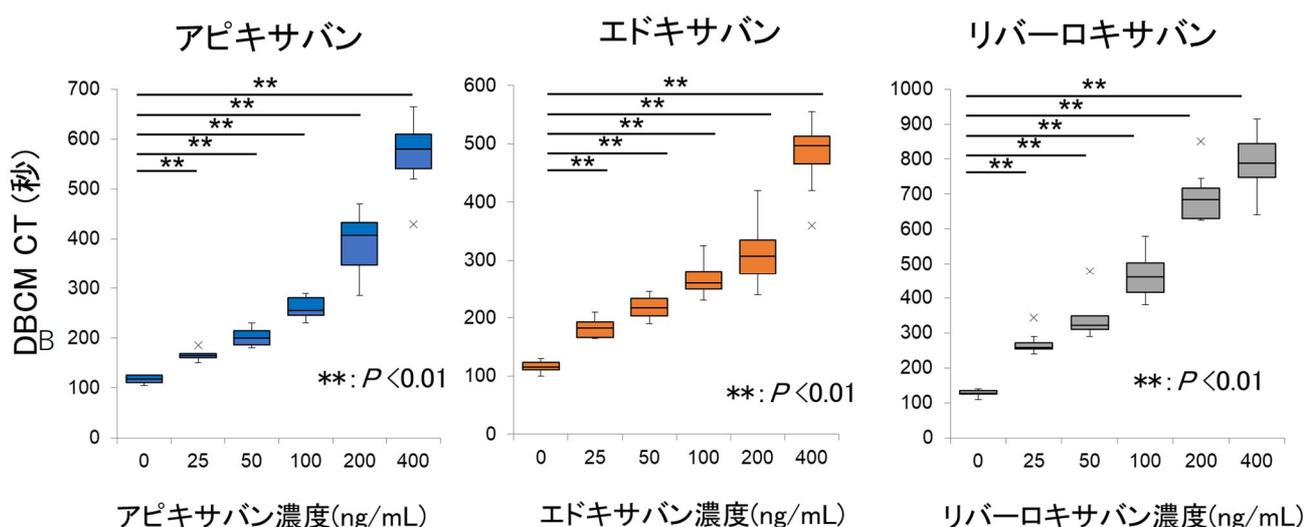


図 2: 各 DOAC 濃度と DBCM CT A: アピキサバン B: エドキサバン C: リバーロキサバン

##### DBCM から得られる凝固時間 DBCM CT はトロンピン生成量の指標に相関する

DOAC によるトロンピン生成の薬力的変動の影響を考慮し、DBCM CT とトロンピン生成を反映するパラメータ Peak との関係の評価した。DBCM CT と CAT における Peak との関係を図5に示す。DOAC を添加していない(エドキサバン、リバーロキサバン、アピキサバンにおけるコントロール 30 検体)値は Peak 231 ± 96nM であった。DBCM CT と Peak との関係は、アピリバーロキサバン (-0.91、P<0.001)、エドキサバン( = -0.86、P<0.001)、リバーロキサバン( = -0.86、P<0.001)を添加したサンプルにおいて有意な負の相関を示した。

DBCM CT は抗第 a 因子効果によるトロンビン生成の減少を反映するパラメータであると考えられた。

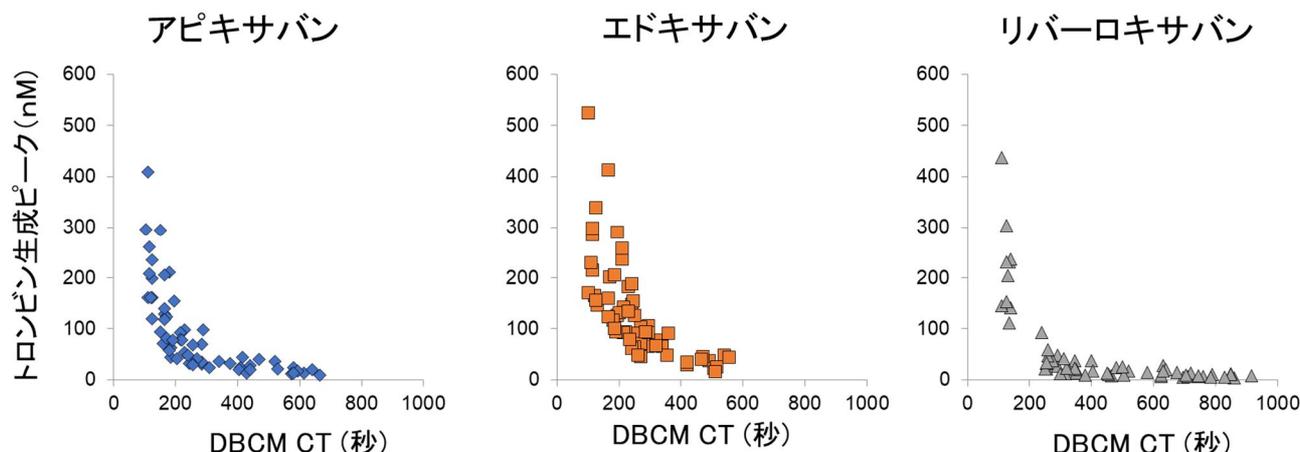


図 3: 各 DOAC におけるトロンビン生成ピークと DBCM CT の関係  
A: アピキサバン B: エドキサバン C: リバーロキサバン

### B. ダビガトラン、アルガトロバンに関する検討

作成した 6 段階濃度のダビガトラン添加人為検体のダビガトラン濃度を DTI 法で測定すると、0, 43 ± 9, 85 ± 16, 180 ± 29, 372 ± 35, 650 ± 57 (平均値 ± 標準偏差) ng/mL であった。ダビガトランは DBCM CT, ECT を濃度依存性に延長し、DBCM CT および ECT は DTI テストによる血漿中濃度と相関した ([DBCM CT] = 0.95, P < 0.001; [ECT] = 0.98, P < 0.001)。

5 段階の人為検体のアルガトロバン血漿濃度は、0.06 ± 0.02, 0.46 ± 0.02, 0.94 ± 0.04, 2.11 ± 0.31, 4.34 ± 0.38 (平均値 ± 標準偏差) µg/mL であった。DBCM CT は濃度依存性に延長し、血漿濃度と相関した (r = 0.93, P < 0.001)。

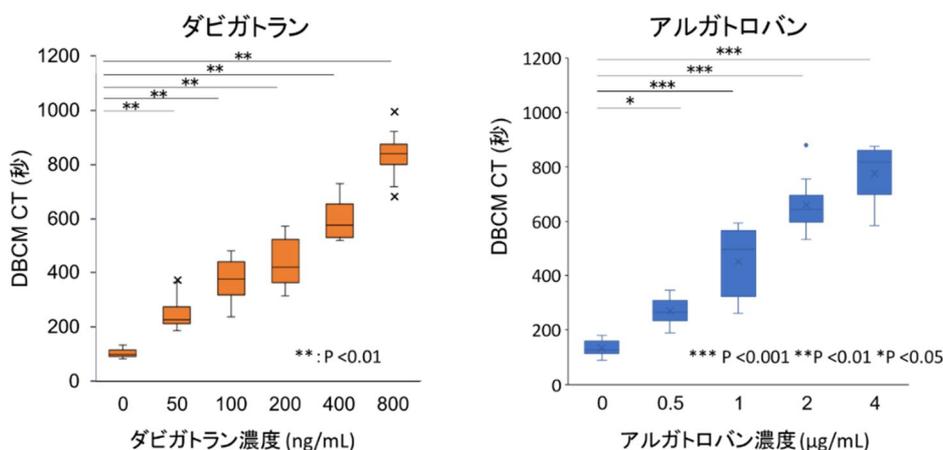


図 4: 各 DOAC 濃度と DBCM CT の関係 A: ダビガトラン B: アルガトロバン

以上の結果により、アピキサバン、エドキサバン、リバーロキサバンといった抗 **Xa** 阻害薬およびダビガトラン・アルガトロバンといった直接トロンビン阻害薬を含めた **DOAC** による抗凝固作用を評価する **Point of Care** 検査として、**DBCM** が有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Yamamoto Yudai, Sato Yunosuke, Takahashi Miri, Yamamoto Hiroto, Echizen Mayumi, Uchida Tokujiro	4. 巻 36
2. 論文標題 TEG6s Platelet Mapping assay for the estimation of plasma fibrinogen concentration during cardiovascular surgery: a single-center prospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 79 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-021-03009-4	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 -

1. 著者名 内田篤治郎	4. 巻 12
2. 論文標題 【トロンボエラストグラム (ROTEMも含めて) の原理と応用】 SPOTCHEM HS HS-7710の原理と応用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thrombosis Medicine	6. 最初と最後の頁 24 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Yudai, Uchida Tokujiro	4. 巻 197
2. 論文標題 Dielectric blood coagulometry as a means of evaluating the change in thrombin generation induced by direct oral anticoagulants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 141 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2020.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 北條 亜樹子, 内田 篤治郎, 近藤 伸世, 山本 寛人, 山本 雄大, 竹本 彩
2. 発表標題 誘電コアグロメーターによるダビガトランの薬効評価に関する人為検体を用いた検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kitajo A, Kondo N, Takemoto A, Yamamoto Y, Yamamoto H, Uchida T
2. 発表標題 Dielectric blood coagulometry for analyses of anticoagulation in samples spiked by dabigatran and idarucizmab
3. 学会等名 Anesthesiology 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北條 亜樹子, 近藤 伸世, 山本 雄大, , 山本 寛人, 竹本 彩, 内田 篤治郎治郎
2. 発表標題 誘電コアグロメーターによるアルガトロパンの薬効評価に関する人為検体を用いた検討: 50段階の濃度設定によるROC解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第71回学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 北條亜樹子、内田篤治郎、近藤伸世、山本寛人、山本雄大、竹本彩
2. 発表標題 誘電コアグロメーターによるダビガトランの薬効評価に関する人為検体を用いた検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田 篤治郎
2. 発表標題 血液凝固モニタリングにおける新しい方法論: 誘電コアグロメーター (DBCM) の可能性をさぐる
3. 学会等名 第31回日本臨床モニター学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田 篤治郎
2. 発表標題 麻酔科医が知っておくべき止血の基礎
3. 学会等名 日本臨床麻酔学会 第41回大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tokujiro Uchida, Yudai Yamamoto, Yunosuke Sato, Miri Takahashi
2. 発表標題 Evaluation of dielectric blood coagulometer as a point of care test for measurement of anticoagulation potential caused by direct oral anticoagulants
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔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

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