

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590687

研究課題名(和文) 抗血小板薬シロスタゾールの薬効モニタリング法の開発ならびに有用性の検討

研究課題名(英文) Development of cilostazol monitoring method based on platelet aggregometry

研究代表者

佐藤 金夫 (SATO, Kaneo)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20242662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：これまで抗血小板薬シロスタゾールの薬効モニタリング法は実用的な方法が構築されていなかった。その理由として、半減期の短いcAMPが多血小板血漿(PRP)作成中に消失してしまうことが考えられた。そこで本研究では、PGE1でPRPを前処理して血小板内cAMPを増加させる薬効モニタリングの測定系の構築を目指した。アラキドン酸、ADP、トロンビン受容体活性化ペプチドといった血小板活性化物質を使って至適PGE1濃度を設定し、PGE1で血小板を前処理することでシロスタゾールの薬効をモニタリングする方法を構築し、脳梗塞患者を対象としてシロスタゾール服薬前後で血小板凝集能の抑制が確認された。

研究成果の概要(英文)：Cilostazol has been shown to be effective for prevention and treatment of cerebral infarction. However, there appears to be no widely accepted method appropriate for monitoring cilostazol. We attempted to establish an assay system for cilostazol monitoring, using platelet aggregation induced by arachidonic acid (AA), ADP or thrombin receptor agonist peptide (TRAP) in the presence of PGE1 which upregulates intracellular cyclic AMP.

AA-, ADP- or TRAP-induced platelet aggregation in the presence of PGE1 could give good estimate after ingestion of cilostazol. It is suggested that this system is a good tool for monitoring cilostazol. We believe this system for monitoring cilostazol can be useful for estimating the actual efficacy of cilostazol on platelet aggregation, bioavailability, and compliance for cilostazol in actual clinical settings, and hope that this method can serve as a tailor-made therapy for cilostazol.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：抗血小板薬 血小板 シロスタゾール PGE1 cAMP

1. 研究開始当初の背景

シロスタゾールは cyclic AMP (cAMP) 分解酵素である cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3) を抑制することで血小板内 cAMP の持続的な増加をもたらし、血小板活性化を抑制することで抗血小板作用を発揮する。国内で実施された大規模臨床研究 CSPS2 (Lancet Neurol 2010;9:959) で、アスピリンと同等の再発予防効果を有し、しかもアスピリンよりも出血性合併症が少ないことが報告された。動脈血栓症の第一選択薬であるアスピリンよりも優れた抗血小板薬であることが明らかとなり、今後、さらに使用頻度が高まると予想される抗血小板薬である。しかし、シロスタゾールの薬効をモニタリングする評価系はいまだ構築されていない。

現在、薬効モニタリングが可能な抗血小板薬はアスピリン、クロピドグレルに代表される ADP 受容体阻害薬、サルポグレラートの 3 剤があり、サルポグレラートの評価系は我々が世界に先駆けて開発した (J Thromb Haemost 2006;4:479, Cerebrovasc Dis 2007;24:264)。これらの薬効モニタリングは薬剤の作用機序に基づき、異なる血小板活性化物質が使われている。すなわち、アスピリンはアラキドン酸代謝に関わる cyclooxygenase1 の阻害、クロピドグレルは P2Y12ADP 受容体の阻害、サルポグレラートは 5HT2A 受容体の阻害を介して血小板機能を抑制することから、それぞれアラキドン酸ナトリウム (以下、AA)、ADP、セロトニン (5-hydroxy-tryptamine, 5HT) を血小板活性化物質として用いて、血小板凝集能検査により薬効モニタリングがおこなわれている。

シロスタゾールは常用量 (100mg) の服薬で到達する血中濃度は約 3 μM であり、これまでに実施した *in vitro* での予備実験では、3 μM 以下のシロスタゾールで血小板凝集能が抑制されたのは AA 惹起血小板凝集のみであり、その他の活性化物質による血小板凝集は 6 ~ 20 μM のシロスタゾールでなければ抑制されなかった (山梨医科学誌 2008;23:43)。この結果より AA による血小板活性化はシロスタゾールに対して最も感受性が高いことが明らかとなった。そこで、シロスタゾールを服用後に AA 惹起凝集による薬効モニタリングを試みたが、シロスタゾール服用者の 40% しか血小板凝集の抑制が見られなかった。その原因として、採血により血小板が体外に取り出されると血管内皮細胞の関与は失われて、血管内皮細胞が産生する PGI₂ の供給が絶たれ、血小板内 cAMP 濃度は低下し、そこにシロスタゾールが作用しても、もともとの cAMP レベルが低いために cAMP の増加はわずかにとどまる事が挙げられる。このことから、PGE₁ を作用させることで細胞内 cAMP 濃度を生体内濃度まで増加させれば、シロスタゾール本来の抑制

作用が評価できると予想される。

シロスタゾールは PGE₁ の添加や血管内皮細胞の共存下で、その作用が増強されることは過去の報告からよく知られた事実であったが、PGE₁ は単独で血小板機能を抑制する作用を有することから、PGE₁ 併用下でのシロスタゾール薬効モニタリング法はタブー視されてきた。しかし、クロピドグレルの薬効モニタリングに低濃度の PGE₁ が用いられた検査法が開発され、クロピドグレルの薬効モニタリングで世界標準となりつつある (Eur Heart J 2008;29:2877)。そのため、シロスタゾールの薬効モニタリングに PGE₁ を利用しても、薬効モニタリング法としての有用性を実証すれば、臨床の現場で受け入れられると確信するに至った。

2. 研究の目的

近年、抗血小板療法中の患者を対象とした研究で、血小板機能抑制が不十分な患者群では血栓性イベントの再発が有意に増加することが示され、抗血小板療法を受けている患者に対して予後の改善を目的として薬効モニタリングをするべきである、といった流れが世界的に形成されつつある。シロスタゾールは脳梗塞の治療に使われ、血小板機能を抑制するにも関わらず出血性合併症の少ない優れた抗血小板薬である。しかし、実用的な薬効モニタリング法は皆無で、血小板機能抑制と予後との関連についての研究はおこなわれていない。そこで、シロスタゾール薬効モニタリング法の開発、ならびにその有用性について検討することを目的として本研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究は山梨大学医学部倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言にのっとりおこなった。すべての健常人ボランティアならびに患者から同意を得た上で採血をおこない、研究を実施した。

(1) 採血

2 週間以内に薬剤を服用していない健康成人 (*in vitro*, *ex vivo* 実験) ならびに 2 週間以内に抗血小板薬を服用していない脳梗塞発症時の患者 (*ex vivo* 実験) から、クエン酸ナトリウム入り真空採血管およびヒルジン入り真空採血管に肘静脈から採血した。その後、100mg シロスタゾールを服用してもらい、2 時間後に再度採血をおこない、服薬前後の血小板機能を測定し比較した。採血直後は血小板反応性が大きく変化するので、測定時の安定性を確保するため、採血後 0.5 ~ 1 時間は室温に放置してから測定をおこなった。

また、一部の脳梗塞患者では 50 ~ 150mg/日 (1 回の服薬量はすべて 50mg) でシロスタゾールを連続服用し、最後の服薬 2 時間後に採

血をおこない、服薬前後の血小板機能を測定し比較した。

(2) 血小板凝集能の測定 (PRP)

クエン酸ナトリウム加血液を遠心して PRP を作成した。0.5 時間程度室温に放置してから測定を行った。PRP に種々の濃度の PGE1 を添加した後、血小板活性化物質 (AA、ADP) で血小板を活性化して血小板凝集能を測定した。

(3) 全血血小板凝集能の測定 (VerifyNow)

測定は取扱説明書に従って測定した。はじめに VerifyNow に上記の専用カセットをセットした。血液の入ったクエン酸ナトリウム入り採血管に 3nM シロスタゾールを加えて室温で 2 分静置し、PGE1 を加えてさらに 2 分間静置した。採血管を専用カセットに挿入すると自動的に血液が吸引されて測定が開始され、規定の時間が経過後に結果が出力される。

4. 研究成果

健常成人を対象にシロスタゾール服薬前後に採血して、0~30nM の PGE1 存在下にアラキドン酸 (AA) を活性化物質として血小板凝集能を測定した (AA 凝集能)。シロスタゾール服用前の AA 凝集能は 30nM PGE1 存在下でも抑制されなかったが、服用後では 10 および 30nM PGE1 の存在により AA 凝集能が有意に抑制された。以上の結果よりシロスタゾールの薬効モニタリングには PGE1 の前処理が有用であることが示された。

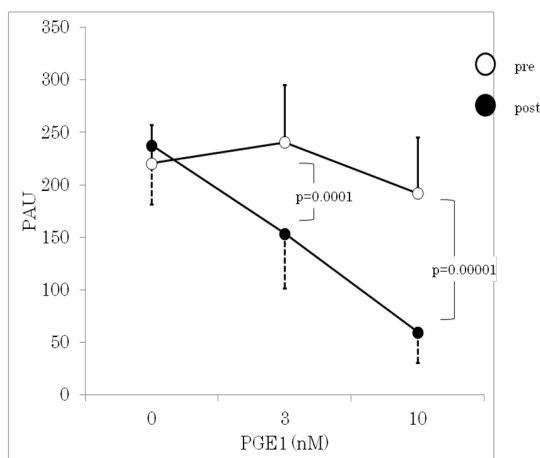
そこで、同意の得られたシロスタゾール服用患者を対象に同様の測定系で薬効モニタリングを実施したところ、3、10、30nM PGE1 のいずれの存在下でも有意に抑制された。ROC 解析では、30nM PGE1 存在下での測定が最も大きい AUC (0.927) を示し、また、感度 (90.5%)・特異度 (88.4%) とともに良好であった。以上のように、in vitro、in vivo の実験を通じて AA を用いたシロスタゾールの薬効モニタリング法を構築できた。

予備実験から見出したシロスタゾールに最も感受性の高い AA を PGE1 と組み合わせることで、シロスタゾールの薬効モニタリングできることが確認でき、シロスタゾールの薬効モニタリングには細胞内 cAMP を増加させることが有効であることが証明できた。しかし、AA による血小板凝集反応はアスピリンをはじめとする NSAID の影響を受けるため、アスピリンとの併用療法や解熱・鎮痛薬の服用している患者ではシロスタゾールの薬効モニタリングを実施できない。そこで、アスピリンの影響を受けにくい薬効モニタリング系の構築について、細胞内 cAMP 増加の原理を用いて更に取り組んだ。ADP 凝集に対する PGE1 の 50%抑制濃度 (IC50) は 114 ± 98 nM であり、シロスタゾールの存在下では 53 ± 89 nM と有意に抑制された。そこで、30~300nM PGE1 存在下に ADP 凝集の変化を評価したところ、30nM、100nM、300nM PGE1 存在下でシロスタゾール服用後にそれぞれで

10%、37%、72%抑制され、アスピリン併用時においては 12%、34%、47%抑制され、アスピリンの有無に関わらず、同定道に抑制されていることが確認できた。以上の結果より、ADP を用いたシロスタゾールの薬効モニタリングには 100 ないしは 300nM PGE1 で前処理した ADP 凝集が有用であると結論できた。

ここまで、PRP によるシロスタゾールの薬効モニタリング法の構築を進めてきた。PRP による血小板凝集能測定法は多くの検査室で血小板機能測定法として採用され、出血性疾患の診断や抗血小板薬の薬効モニタリングに用いられている。一方で、PRP の作成は遠心分離を必要とし、手間の掛かる検査法であることがデメリットである。そこで、国際的に普及しつつある全血測定法 (VerifyNow, Accumetrics) に微量の PGE1 添加によるシロスタゾールの薬効モニタリング法の構築を試みた。VerifyNow にはアスピリン評価用の Aspirin Assay (AA を含む)、P2Y12 受容体阻害薬の評価用に P2Y12 Assay (ADP を含む)、GPIIb/IIIa 阻害薬の評価用に GPIIb/IIIa assay (トロンピン受容体活性化ペプチド [TRAP] を含む) の 3 種類がある。そこで、それぞれに対してシロスタゾールを in vitro で添加し、さらに 3 または 10nM PGE1 で前処理した血液と、シロスタゾールや PGE1 を添加しない血液とを検体として測定したところ、予想に反して GPIIb/IIIa assay に於いて最も抑制が顕著であった。

そこで、GPIIb/IIIa assay を用いて脳梗塞患者の測定を行った。シロスタゾールを服用する前の全血血小板凝集能は PGE1 非存在下 (221 ± 37 PAU) と比較して、PGE1 存在下で 192 ± 55 PAU となり抑制は見られなかった。ところが、シロスタゾール服薬後の PGE1 非存在下 (238 ± 56 PAU) の血小板凝集能と比較して、PGE1 存在下では 60 ± 29 PAU となり有意に抑制されていた (図)。以上の実験よ



り、GPIIb/IIIa assay を用いた VerifyNow による全血測定法において、3 あるいは 10nM PGE1 を添加することでシロスタゾールの薬効モニタリングを全血で簡便に測定できる方法を構築できた。この測定系を使ってシロスタゾール服薬後の血小板凝集能の目標値の設定や長期的な患者予後と血小板凝集能

との関連を調べるため、シロスタゾール服用患者の血小板凝集能測定を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Satoh K, Fukasawa I, Kanemaru K, Yoda S, Kimura Y, Inoue O, Ohta M, Kinouchi H, Ozaki Y. Platelet aggregometry in the presence of PGE1 provides a reliable method for cilostazol monitoring. *Thrombosis Research*. 2012;130:616-621, 査読有.
doi:10.1016/j.thromres.2012.05.030

〔学会発表〕(計 3件)

佐藤金夫・凝固・線溶・血小板マーカーの最前線：新規血小板機能評価法・日本臨床検査自動化学会・2014年10月10日・神戸コンベンションセンター(兵庫県、神戸市)。

佐藤金夫・深澤功・尾崎由基男・プロスタグランジン E1 存在下での血小板凝集能検査による抗血小板薬シロスタゾールの薬効評価法・日本検査血液学会・2012年7月28日~7月29日・高槻現代劇場(大阪府、高槻市)。

佐藤金夫・深澤功・多田正人・尾崎由基男・プロスタグランジン E1 を利用した抗血小板薬シロスタゾールの薬効評価法・日本血栓止血学会・2012年6月7日~6月9日・ハイアットリージェンシー東京(東京都、新宿区)。

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：シロスタゾールの薬効評価方法
発明者：佐藤金夫・尾崎由基男・中込純子・多田正人
権利者：国立大学法人山梨大学
種類：特許
番号：特願 2015-013661
出願年月日：2015年1月27日
国内外の別：国内

〔その他〕

山梨大学・臨床検査医学講座のページ
<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin0lab/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 金夫 (SATOH, Kaneo)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：20242662

(2)研究分担者

尾崎 由基男 (OZAKI, Yukio)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号：30134539

高野 勝弘 (TAKANO, Katsuhiko)

山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：60382925

(3)連携研究者

金丸 和也 (KANEMARU, Kazuya)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：80402080