

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590692

研究課題名(和文) 抗凝固療法のモニターと新しい抗血栓機序の解明

研究課題名(英文) Monitoring for anticoagulant therapy and mechanism for anticoagulant

研究代表者

和田 英夫 (Wada, Hideo)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40158704

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)：抗Xa活性は体重や体表面積に逆比例し、抗凝固療法時には血栓症の有無で有意差はなく、大出血群で高値を示した。可溶性フィブリン(SF)とD-dimerは血栓症群で高値であり、抗凝固療法時では大出血群で高値であった。血小板活性化マーカーである可溶性血小板糖膜蛋白(sGPVI)は、血栓群で有意に高値であった。播種性血管内凝固(DIC)ではDICスコアが有用であり、妊婦の抗凝固療法のモニターには、アンチトロンビン、SFやD-dimerが有用であった。

研究成果の概要(英文)：Anti-Xa activity was negatively correlated with weight or surface area of a body. There was no significant difference in Xa activity between with and without thrombosis, but that was markedly high in the patients with major bleeding. Plasma levels of soluble fibrin (SF) and D-dimer were significantly high in the patients with thrombosis, but that was markedly high in those with major bleeding. Soluble platelet membrane glycoprotein VI (sGPVI) as a marker for platelet activation was markedly high in those with thrombosis. Disseminated intravascular coagulation (DIC) score was useful in the monitoring for DIC, and antithrombin, SF and D-dimer were useful in the monitoring for pregnant women.

研究分野：検査医学

キーワード：抗Xa活性 NOAC 抗凝固療法

1. 研究開始当初の背景

我が国でも肺塞栓症(PE)による突然死が注目され、術後の静脈血栓塞栓症(VTE)予防が徹底に行われるようになり、VTEの発症頻度が欧米並みに高いことがわかった。我々は、経日的な可溶性フィブリン(SF)やD-dimerの測定により、術後のVTE発症リスクを評価できることを報告した。最近我が国でも、術後のVTEの発症予防にフォンダパリヌクス{アンチトロンピン(AT)を介する抗活性化凝固第X因子(Xa薬)}やエノキサパリン(低分子ヘパリン)が承認され、その後フォンダパリヌクスはVTE治療にも承認された。フォンダパリヌクスは選択的にXaを阻害し、エノキサパリンも抗トロンピン(IIa)作用に比べ抗Xa作用が強いため、出血の副作用は少ないとされている。近年では、心房細動の脳血栓症発症予防にダビガトラン(抗IIa薬)が、整形外科術後のVTEの発症予防にエドキサバン(直接的抗Xa薬)が承認され、リバロキサバン(直接的抗Xa薬)も心房細動の脳血栓症発症予防に承認される予定である。これらの薬剤は第3相臨床試験で、既存の薬剤と比べて出血の副作用が少なく、抗血栓作用が強いと報告された。これらの薬剤の血中の半減期が短く、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)やプロトロンピン時間(PT)ではモニターができないこともあり、モニターの必要がない安全な薬剤とされてきた。しかし、フォンダパリヌクスやダビガトランにおいては、市販後に重篤な出血の副作用が報告されている。このため、抗Xa活性測定法の開発が始められており、我々もフォンダパリヌクスの抗Xa活性測定法を確立した。

播種性血管内凝固(DIC)の治療においても、活性化プロテインC(APC)やリコンビナントトロンボモジュリン(rTM)が開発され、DICの生存率が著しく改善してきている。しかし、rTMは高価なため、rTMが有効なDIC症例の選択が必要と考えられている。我々は血栓症

におけるAPC-プロテインCインヒビター(PCI)複合体測定の有用性を報告している。また、rTM投与翌日にはAPC-PCI複合体値が著しく低下することを確認している。血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)を代表とする血栓性微小血管障害(TMA)においても、ADAMTS13測定法が開発されてから、診断技術の向上に伴い生命予後も改善してきた。しかし、ADAMTS13低下を伴わないTMAに対する診断法ならびに治療法は確立されておらず、血管内皮細胞障害を的確に診断する検査法が必要である。また我々は、TMA症例においてADAMTS13活性ならびにvon Willebrand factor(VWF)の有用性を報告してきた。不育症に対しても、ヘパリンの自己注射やアスピリンの投与が注目され、ヘパリンの自己注射が承認される可能性が強い。

2. 研究の目的

Xa活性や止血系分子マーカーなど抗凝固療法中のモニター法を確立し、抗凝固療法中の多数例でモニターを行う。すなわち、抗凝固療法中のモニターを行うことが出血の副作用を減らし、効果的な抗凝固療法を行うのに有用か否かを検証する。また、モニター時期、トラフ値やピーク時の抗Xa活性のカットオフ値を決定する。治療効果や出血の副作用と血中抗Xa活性の関係を調べることにより、抗凝固薬の新しい抗血栓作用機序の可能性が示唆される。抗凝固療法中に生じる線溶系の活性化が抗血栓作用として有効であることを示す。また、DICやTMAなどの疾患においても、抗凝固療法モニターの有用性について検証する。

3. 研究の方法

(1) 抗凝固療法中のモニター法の確立、抗Xa活性：発色基質S-2222、Xa、アンチトロンピン(AT)等を用いて、ATを介する系での抗Xa活性測定法を確立する。同様にS-2222ならびにXa等を用いて、ATを介さない抗Xa活性測定

法を確立する。抗IIa活性：IIaならびにIIaに特異性の高い発色基質を用いて、抗IIa活性の測定系を確立する。トロンピン生成試験。

フィブリン関連マーカー(FRM)：血栓症診断のためのカットオフ値を確立する。止血系分子マーカー：TATならびにプロトロンビン複合体F1+2 (F1+2) あるいはプラスミン-プラスミンインヒビター複合体 (PPIC)、APC-PCI複合体などを測定する。血小板活性化ならびに血管内皮細胞障害マーカー：

ADAMTS13、VWFppならびに可溶性血小板膜糖蛋白VI (sGPVI) 値などを測定する。

(2) 対象患者の抽出ならびに検体の採取、整形外科手術後に、抗Xa製剤の投与を受けている患者100例について、抗凝固薬濃度がピークになる時間に採血して、(1)のモニター項目を測定する。VTE発症し、抗Xa製剤などの抗凝固療法がなされている患者20例について、抗凝固薬濃度がピークになる時間に採血し、Iのモニター項目を測定する。rTMを投与されているDIC患者20例について、rTM投与後経時的にAPC-PCI複合体などのモニターを行う。

TTPならびに移植に伴うTMA患者20例について、ADAMTS13活性やVWFppなどのモニターを行う。不育症患者でヘパリンの自己注射やアスピリン投与等を行っている妊婦20例についても、経時的にモニターを行う。

(3) イベントの評価、エンドポイント、臨床症状ならびに画像診断にて、VTEの診断を行うとともに、臨床症状ならびにヘモグロビンの減少により、出血の副作用を診断する。

診断後28日の死亡の有無、1週間後のDICからの離脱。寛解や生存期間を。生児を得ることならびにVTEの有無。

4. 研究成果

抗 Xa 活性の測定系を低分子ヘパリンならびにフォンダパリヌクスについて、AT を含む系と含まない系で、発色基質を用いて確立した。抗 Xa 活性は、体重や体表面積に逆相

関した。抗 Xa 活性と血栓症の発症との間に有意な関係は見られなかった。一方、人工関節置換術後第一日目の抗 Xa 活性が高い群では、出血量が多かった。また、非術後の肺塞栓症例での抗 Xa 活性は、術後の血栓予防時の3倍以上でも、出血の副作用はみられなかった。

フィブリン関連マーカーでは、抗凝固療法をしていない時は、DVT 群で有意に SF や D-dimer が高値であった。一方、抗凝固療法時には、D-dimer や SF は血栓症の診断に有用でなかった。また、D-dimer は大量出血群で有意に高値であり、D-dimer 高値群では PPIC の増加がみられた。血小板活性化のマーカーとしては、TMA 例では ADAMTS13 や vWFpp が有用であった。また、sGPVI の測定が、DIC や TMA の診断に有効であった。抗凝固療法中の患者においても、VTE の診断に sGPVI の測定は有用であった。

DIC のモニターには、単項目でなくスコアリングシステムによるモニターが有効であった。また、止血系分子マーカーでは、TAT よりは SF の方が有用であった。不育症患者の妊娠期間においては、未分画ヘパリンの皮下注射が有効であり、モニターには D-dimer と SF の組み合わせが有用であった。また、血栓症の予防には AT 値のモニターも有用であった。

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 40 件)

- 1) Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Wada H.: Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an observational nationwide study: comment. J Thromb Haemost 2015; 13: 679680 (査読有)
- 2) Wada H., Aota T, Yamashita Y, Matsumoto T, Katayama N: New Insights of the Tissue Factor Pathway Inhibitor in Patients with

- Hypercholesterolemia Treated with Statins. *J Atheroscler Thromb* 2015 (in press) (査読有)
- 3) Ota S, Wada H, Mastuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux. *Clin Chim Acta* 2015; 442: 22-23 (査読有)
 - 4) Wada H, Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N: Antithrombin or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers. *J Thromb Haemost.* 2015; 13:684-5 (査読有)
 - 5) Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic micro angiopathy. *Thromb Res* 2014; 133: 440-444 (査読有)
 - 6) Yamashita Y, Wada H, Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y, Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N: Elevated fibrin-related markers in patients with malignant diseases frequently associated with disseminated intravascular coagulation and venous thromboembolism. *Intern Med* 2014; 53: 413-419 (査読有)
 - 7) Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H: Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. *Int J Hematol.* 2014; 99:437-440 (査読有)
 - 8) Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S: Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. *Int J Hematol.* 2014; 99: 418-428 (査読有)
 - 9) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol.* 2014; 100: 437-442 (査読有)
 - 10) Iba T, Saitoh D, Wada H, Asakura H: Efficacy and bleeding risk of antithrombin supplementation in septic disseminated intravascular coagulation: a secondary survey. *Crit Care.* 2014; 18: 497 (査読有)
 - 11) Aota T, Naitoh K, Wada H, Yamashita Y, Miyamoto N, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Asanuma K, Matsumoto T, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Nishikawa M, Katayama N, Uchida A, Sudo A: Elevated soluble platelet glycoprotein VI is a useful marker for DVT in postoperative patients treated with edoxaban. *Int J Hematol.* 2014; 100: 450-456 (査読有)
 - 12) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *Journal of Intensive Care* 2014; 2: 15 (査読有)
 - 13) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2014; 436C:130-134 (査読有)
 - 14) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?, *Crit Care*, 2014 18:447 (査読有)
 - 15) Wada H, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the “Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan”. *Thromb Res*, 2014; 134: 924-925 (査読有)
 - 16) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40: 866-873 (査読有)
 - 17) Takahashi N, Wada H, Usui M, Kobayashi T, Habe-Ito N, Matsumoto T, Uemoto S, Nobori T, Isaji S: Behavior of ADAMTS13 and Von Willebrand factor levels in patients after living donor liver transplantation. *Thromb Res.* 2013; 131: 225-229 (査読有)
 - 18) Fan X, Yoshida Y, Honda S, Matsumoto M, Sawada Y, Hattori M, Hisanaga S, Hiwa R, Nakamura F, Tomomori M, Miyagawa S, Fujimaru R, Yamada H, Sawai T, Ikeda Y, Iwata N, Uemura O, Matsukuma E, Aizawa Y, Harada H, Wada H, Ishikawa E, Ashida A,

- Nangaku M, Miyata T, Fujimura Y: Analysis of genetic and predisposing factors in Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol.* 2013; 54: 238-246 (査読有)
- 19) Habe K, Wada H, Ito-Habe N, Suzuki H, Nobori T, Mizutani H : Two patients with antiphospholipid antibody developed disseminated intravascular coagulation. *Intern Med.* 2013; 52: 269-272 (査読有)
- 20) Habe K, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikejiri M, Matsubara K, Morioka T, Kamimoto Y, Ikeda T, Katayama N, Nobori T, Mizutani H: Presence of antiphospholipid antibody is a risk factor in thrombotic events in patients with antiphospholipid syndrome or relevant diseases. *Int J Hematol.* 2013; 97: 345-350 (査読有)
- 21) Toyoda H, Azuma E, Kawasaki Y, Iwasa T, Ohashi H, Otsuki S, Iwamoto S, Hirayama M, Itoh-Habe N, Wada H, Kondo M, Keida Y, Ito T, Komada Y: Cord blood transplantation combined with rituximab for Wiskott-Aldrich syndrome with autoimmune thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:226-227 (査読有)
- 22) Hasegawa M, Wada H, Wakabayashi H, Yoshida K, Miyamoto N, Asanuma K, Matsumoto T, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Uchida A, Sudo A: The relationships among hemostatic markers, the withdrawal of fondaparinux due to a reduction in hemoglobin and deep vein thrombosis in Japanese patients undergoing major orthopedic surgery. *Clin Chim Acta.* 2013; 425: 109-113 (査読有)
- 23) Seki Y, Wada H, Kawasaki K, Okamoto K, Uchiyama T, Kushimoto S, Hatada T, Matsumoto T, Imai H; Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC Subcommittee A prospective analysis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections. *Intern Med* 2013;52: 1893-1898 (査読有)
- 24) Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Mathew P, Kurosawa S, Gando S, Kim HK, Nielsen JD, Dempfle CE, Levi M, Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis: Guidance for diagnosis and treatment of DIC from harmonization of the recommendations from three guidelines. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 761-767(査読有)
- 25) Wada H, Thachil J, Di Nisio M, Kurosawa S, Gando S, Toh CH; The Scientific Standardization Committee on DIC of the International Society on Thrombosis Haemostasis: Harmonized guidance for DIC from the ISTH and the current status of anticoagulant therapy in Japan: a rebuttal. *J Thromb Haemost* 2013; 11: 2078-2079 (査読有)
- 26) Shindo A, Ikejiri M, Ii Y, Nakatani K, Wada H, Nobori T, Tomimoto H:A novel protein S gene mutation combined with protein S Tokushima mutation in a patient with superior sagittal sinus thrombosis. *J Neurol.* 2012; 259: 178-179 (査読有)
- 27) Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A.: Increased fibrinolysis increases bleeding in orthopedic patients receiving prophylactic fondaparinux. *Int J Hematol.* 2012; 95: 160-166 (査読有)
- 28) Ikejiri M, Shindo A, Ii Y, Tomimoto H, Yamada N, Matsumoto T, Abe Y, Nakatani K, Nobori T, Wada H.: Frequent association of thrombophilia in cerebral venous sinus thrombosis. *Int J Hematol* 2012; 95: 257-262 (査読有)
- 29) Tanemura A, Mizuno S, Wada H, Yamada T, Nobori T, Isaji S: Donor Age Affects Liver Regeneration during Early Period in the Graft Liver and Late Period in the Remnant Liver after Living Donor Liver Transplantation, *World Journal of Surgery* 2012; 36: 1102-1111 (査読有)
- 30) Habe K, Wada H, Ito-Habe N, Hatada T, Matsumoto T, Ohishi K, Maruyama K, Imai H, Mizutani H, Nobori T : Plasma ADAMTS13, von Willebrand Factor (VWF) and VWF Propeptide Profiles in Patients with DIC and Related Diseases. *Thromb Res.* 2012; 129: 598-602 (査読有)
- 31) Hatada T, Wada H, Kawasaki K, Okamoto K, Uchiyama T, Kushimoto S, Seki Y, Okamura T, Imai H, Kaneko T, Nobori T: Analysis of the Cutoff Values in Fibrin-Related Markers for the Diagnosis of Overt DIC. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012; 18: 495-500. (査読有)
- 32) Kushimoto S, Wada H, Kawasaki K, Okamoto K, Uchiyama T, Seki Y, Hatada T, Imai H, Nobori T: Increased Ratio of Soluble Fibrin Formation/Thrombin Generation in Patients With DIC. *Clin Appl Thromb*

Hemost. 2012; 18: 627-631 (査読有)

〔学会発表〕(計 22 件)

- 1) 和田英夫: 播種性血管内凝固と輸血療法、シンポジウム2「止血検査からみた最適な輸血療法」、第21回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、H26年10月18日(土)ひめぎんホール(愛媛)
- 2) Wada H: Diagnosis and therapy of DIC, Educational Lecture, The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi (Vietnam), 9th-11th October (Vietnam), 2014
- 3) Wada H: New guideline for DIC management The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi (Vietnam), 9th-11th October, 2014
- 4) 和田英夫: 臨床検査を活用した血栓・止血異常症の診療、教育講演、第54回日本臨床化学会年次学術集会、2014年9月5-7日、東京大学(東京)
- 5) 和田英夫: aHUS/TTP患者の検査値異常、共催シンポジウム「補体制御因子と腎疾患」、第49回日本小児腎臓学会シンポジウム、2014年6月5日~7日、秋田ビューホテル(秋田)
- 6) 和田英夫: DIC、医師シンポジウム「救急から集中治療へ・臓器不全対策」、第21回日本集中治療医学会東海北陸地方会、2013年6月15日、じゅうろくぷらざ(岐阜)
- 7) Wada H: Guidance for diagnosis and treatment of DIC, Educational Lecture, 59th SSC meeting, Amsterdam (Holland), June 29-30, 2013
- 8) Wada H: Chairman's report, 59th SSC meeting, Amsterdam (Holland), June 29-30, 2013
- 9) Matsumoto T, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Miyamoto N, Asanuma K, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Uchida A, Sudo A: The relationships among hemostatic markers, the withdrawal of fondaparinux due to a reduction in hemoglobin and deep vein thrombosis in Japanese patients undergoing major orthopedic surgery. XXIVth ISTH Congress, Amsterdam (Holland), June 29-July 4, 2013
- 10) 和田英夫: 整形外科術後の血栓予防療法に対する抗Xa活性のモニター、シンポジウムIV 血栓・塞栓症の予防診断/治療の最前線と臨床検査の役割、日本臨床検査自動化学会第44回大会、2012年10月11-13日、パシフィコ横浜(横浜)

- 11) 池尻誠、和田英夫、登 勉: 血栓症・止血異常症の診断に必要な遺伝子解析と結果の読み方、血液疾患遺伝子解析の読み方のポイント、第13回日本検査血液学会学術集会、2012年7月28日~29日、高槻現代劇場(大阪)
 - 12) Wada H: Elevated fibrin related markers in patients with malignant diseases associated with DIC or DVT. 58th SSC meeting, Liverpool (UK), June 27-30, 2012
 - 13) Wada H: Chairman's report, 58th SSC meeting, Liverpool (UK), June 27-30, 2012
 - 14) 和田英夫: 播種性血管内凝固(DIC)の病態と治療、教育講演、第34回日本血栓止血学会学術集会、2012年6月7日 9日、ハイアットリージェンシー(東京)
 - 15) 和田英夫: 播種性血管内凝固(DIC)の病態と輸血療法、教育講演、第60回日本輸血・細胞治療学会、2012年5月25日-27日、ホテルハマツ(福島)
- 〔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:
出願年月日:
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

和田英夫(Wada, Hideo)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40158704

(2) 研究分担者 なし

()
研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

()
研究者番号: