

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861241

研究課題名(和文)流動力学環境下に観察する新規抗凝固薬の抗血栓性と、急性拮抗薬の決定

研究課題名(英文)The Evaluation of Novel Anti-Coagulants and Antagonists Under Flow Condition

研究代表者

小川 覚 (OGAWA, SATORU)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50636131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：直接作用型抗凝固薬(DOAC)の急性拮抗方法は確立されていない。本研究では、血流環境下でDOACと血栓形成制御の相互関係を解明し、拮抗薬剤の効果を評価した。ダビガトラン、リバロキサバン、アピキサバンに対して、各種拮抗薬は静的検査項目を改善したが、フローチャンバー装置による動的評価では新鮮凍結血漿による血栓形成能の改善がプロトロンビン複合体製剤に比較して低かった。原因に、新鮮凍結血漿による血液希釈効果が考えられた。プロトロンビン複合体製剤はDOACに対する急性拮抗薬剤として有効であること、フローチャンバー装置による動的血栓形成能評価は急性拮抗の有用なモニタリングになり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are no specific antidotes available for Direct Oral Anticoagulants (DOACs). In this study, we evaluated the effect of DOACs on clot formations and reversal agents under flow conditions.

All antidotes such as fresh-frozen plasma (FFP), recombinant factor VIIa, prothrombin complex concentrates (PCCs) showed reversal effect of static coagulation parameters in dabigatran-, rivaroxaban, or apixaban- treated plasma. Under flow condition using flow condition, PCCs improved clot formation, but FFP did not. Thrombin generation assay showed the insufficient effect of FFP, which is one of the reason caused discrepancy between static and dynamic conditions. PCCs are useful antidotes for DOACs, and Flow chamber assays are possible monitoring devices for evaluating the effect of DOACs and its reversal.

研究分野：血液凝固

キーワード：直接作用型抗凝固薬 血栓 フローチャンバー プロトロンビン複合体製剤 新鮮凍結血漿

1. 研究開始当初の背景

高齢化、生活様式の変化とともに、本邦でも、心血管疾患、脳血管塞栓症、肺塞栓症といった種々の血栓症が死因の上位を占めている。近年、薬剤の作用部位(活性化第 X 因子; fXa、トロンビン)を選択的にすることで、安全域が高く、定期的なモニタリングを必要としない直接作用型抗凝固薬(Direct Oral Anticoagulant: DOAC)が幅広く使用されており(抗 Xa 薬: フォンダパリヌクス、リバロキサバン、エドキサバン、アピキサバン、抗トロンビン薬: ダビガトラン)、その有効性を示すデータも蓄積つつある。しかし、抗凝固薬投薬中の患者においては、脳内出血や消化管出血などの重篤な出血性合併症が臨床的に問題となることが少なくない。ワルファリンにおいては、ビタミン K や、プロトロンビン複合体製剤(PCC)が拮抗薬として有効である。その一方で、DOAC に対しては、特異的拮抗方法は現在確立していない。さらには、急性拮抗時には、その効果判定(モニタリング)が重要となるが、その開発も望まれている。プロトロンビン時間(PT)や活性化部分トロンボプラスチン時間(aPTT)などの従来の凝血的検査でもある程度の抗凝固効果を判定することは可能であるが、これらのテストを、抗凝固作用部位の異なる各種抗凝固薬に一律に適応するには限界がある。これには、従来の凝固検査に用いられてきた検査法は、血流により生じるズリ応力が反映できない非生理的環境下で測定されることなどがその要因の一つに挙げられる。

我々は、止血障害患者を対象として、ズリ応力が凝固経路の障害と血栓強度に密接に影響することを過去に報告した。¹⁻³ 従って、より生体に近いと考えられる流体力学的環境を取り入れる事が、DOAC の抗血栓性評価、および、その拮抗薬決定に望ましいと考えた。

2. 研究の目的

血流環境下で形成された血栓を多面的に観察することで、と血栓形成制御の相互関係を解明し、そのモデルを応用して、各種 DOAC に対する最適な拮抗薬剤とモニタリング手法を探索することを目的に本研究はおこなわれた。

3. 研究の方法

健康人から採取したクエン酸加全血を、Corn tripsin inhibitor により抗凝固処理を行なう。対象とする抗凝固薬を添加した後、Recalcification を行なった全血検体を、フローチャンバー装置を用いて任意のズリ速度下でマイクロチップ内(キャピラリーを型コラーゲンと Tissue factor でコーティング)に灌流させる。血栓形成に伴うキャピラリー内部の圧力変化を計測することで血流に対する血栓の強度を評価した。また、形成された血栓を video-microscope (×10) にて経時的に観察することにより血栓の凝集と飛散を視覚的に評価した。添加薬剤は、リバロキサバン (70 µg/mL) アピキサバン (100ng/mL) ダビガトラン (100 µg/mL) とした。

マイクロチップを用いたフローチャンバー実験系を使用して、各種抗凝固薬の急性拮抗試験をおこなった。拮抗薬剤に、新鮮凍結血漿(FFP; 20%置換)、4factor-PCC; 0.3 or 0.6U/mL)、FEIBA (aPCC; 0.3 or 0.6U/mL)、遺伝子組み換え活性型第 7 因子製剤 (rFVIIa; 60nM) を添加し、その拮抗効果を判定した。

乏血小板血漿を用い、凝固時間検査 [トロンボテスト、PT、aPTT、エカリン凝固時間]、凝固因子測定 (第 II 因子、第 VII 因子、第 X 因子)、トロンビン生成試験] を測定した。

4. 研究成果

ダビガトラン、アピキサバン、リバロキサバンは、フローチャンバー装置をもちいた動

的血栓形成能および静的血栓形成能を濃度依存性に低下させた。また、ダビガトランでは aPTT、エカリン凝固時間、アピキサバンおよびリバロキサバンでは PT の延長効果が高かった。組織因子惹起のトロンビン生成試験では、Thrombin Peak および Lag time が各抗凝固剤により濃度依存性に抑制された。

急性拮抗試験では、いずれの静的凝固パラメーターも各種拮抗薬の拮抗効果が確認できたが、FFP と rFVIIa による第 II 因子および第 X 因子の上昇は、PCC および aPCC に比較して有意に低かった。組織因子惹起によるトロンビン生成試験では、FFP、PCC、aPCC の添加により、Thrombin Peak が有意に改善した。一方で、rFVIIa は Lag time が有意に短縮したが、Thrombin Peak の増加効果は他薬剤に比較して低値にとどまった。FFP による動的血栓形成の改善効果は、PCC および aPCC に比較して有意に低く、これは血液希釈に伴う血小板数とヘマトクリット値の低下が主因と考えられた。ずり応力による血栓形成能を評価していない従来の静的検査法では、FFP による拮抗効果を過剰評価している可能性がある。これらの結果から、新鮮凍結血漿に比較して、PCC や aPCC などの血漿分画製剤は DOAC の急性拮抗薬として有効であること、フローチャンバー装置は治療効果判定のモニタリング装置として有用である可能性が示唆された。

<引用文献>

Satoru Ogawa, Tomoko Ohnishi, Kazuya Hosokawa, Fania Szlam, Edward P. Chen, Kenichi A. Tanaka. Haemodilution-induced Changes in Coagulation and Effects of Haemostatic Components under Flow Conditions. *British Journal of Anaesthesia*. 2013;111:1013-23.

Satoru Ogawa, Michael A. Mazzeffi, Fania Szlam, Jerrold H. Levy, Kazuya

Hosokawa, Kenichi A. Tanaka. Influences of hemodilution and anticoagulation on anti-platelet P₂Y₁₂ therapy - *In vitro* whole blood perfusion model. *J Cardiothorac Vas Anesth*. 2013;27: e69-71.

Satoru Ogawa, Fania Szlam, Daniel Bolliger, Tomoko Ohnishi, Kazuya Hosokawa, Kenichi A. Tanaka. Evaluation of a Novel Flow Chamber System to Assess Clot Formation in Factor VIII-deficient Mice and Anti-factor IX Treated Human Blood. *Haemophilia*. 2012; 18, 926-932.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Satoru Ogawa, Kenichi Tanaka, Yasufumi Nakajima, Yoshinobu Nakayama, Jun Takeshita, Masatoshi Arai, Toshiki Mizobe. Fibrinogen measurements in plasma and whole blood: A performance evaluation study of the Dry-Hematology system. *Anesthesia & Analgesia*. 査読あり. 2015; 120: 18-25. doi: 10.1213/ANE.

Yoshinobu Nakayama, Yasufumi Nakajima, K Tanaka, D I Sessler, Sachiko Maeda, Jun Iida, Satoru Ogawa, Toshiki Mizobe : Thromboelastometry-guided intraoperative haemostatic management reduces bleeding and red cell transfusion after paediatric cardiac surgery. *British Journal of Anaesthesia*. 査読あり. 2015; 114. 91-102. doi: 10.1093/bja/aeu339

小川覚, 中山力恒, 岡林志帆子. 心臓外科手術における凝固因子補充療法. *臨床麻酔*. 査読あり. 2016; 40: 609-619.

小川覚, 中山力恒. 100歳のヘパリン. *心臓外科手術の抗凝固管理*. *臨床麻酔*. 査読あり. 2016; 40 (増): 2816-94.

小川覚, 岡林志帆子. 大量出血における止血機能モニタリング. *Thrombosis Medicine*.

査読なし. 2016; 17. 17-25.

小川覚. 心臓外科手術における凝固テストの活用法. 日本臨床麻酔学会誌. 査読あり. 2016; 36: 204-211.

田中健一、小川覚. Viscoelastic Device 原理と使い方・注意点. Thrombosis Medicine. 査読なし. 2015; 2. 158-164.

小川覚. 周術期凝固線溶系活性化とその制御 -周術期血栓症と抗凝固療法-. Thrombosis Medicine . 査読なし. 2014; 4. 43-51.

[学会発表](計14件)

小川覚. 京滋クリティカルヤングアカデミー2015 セミナー advanced編、2015年12月5日、ホテル京阪京都 (京都、京都市). 抗凝固薬の拮抗治療・出血性合併症時の管理バンドル2015.

小川覚. 第35回日本臨床麻酔学会学術大会、横浜コンベンションセンター (神奈川県、横浜市)、2015年11月23日、麻酔科医が知っておきたい血液凝固検査の基本

小川覚. 第20回日本心臓血管麻酔学会学術総会、メルパルク福岡 (福岡、福岡市)、2015年10月10日、ACC/AHA心疾患患者における非開心術管理のガイドライン. ガイドラインから読み解く、抗血小板薬、抗凝固薬投薬患者の取り扱い

小川覚. 第61回日本輸血細胞治療学会総会、新高輪プリンスホテル (東京都、東京)、2015年5月30日、東京、周術期における輸液輸血療法の現状 -膠質輸液と血漿分画製剤の位置づけを考える-

小川覚. 抗凝固薬適正使用セミナー、リッツ・カールトン京都 (京都府、京都市)、2015年2月16日、抗凝固薬の急性拮抗-出血性合併症へのアプローチ-

小川覚. 第34回日本臨床麻酔学会学術大会、新高輪プリンスホテル (東京都、東京)、2014年11月1日、周術期血液凝固能の評価

と管理、心臓手術における、血液凝固能の評価と管理

小川覚. 港島循環器懇話会、神戸医療センター中央市民病院 (兵庫県、神戸市)、2014年11月28日、循環器内科医が知っておきたい、止血・凝固の基本

小川覚. 第4回心臓・血管疾患を考える会、宝塚ホテル (兵庫県、宝塚市)、2014年11月17日、臨床に活かす、止血凝固のメカニズム ~循環器領域での話題~

小川覚. 第19回日本心臓血管麻酔学会学術総会、ホテル阪急エキスポパーク (大阪府大阪市)、2014年9月20日、大量出血のフィブリノゲン製剤について考える、心臓外科領域における止血輸血量法: フィブリノゲン製剤をどのようにもちいるか

小川覚. 第36回日本血栓止血学会総会、大阪国際会議場 (大阪府、大阪市)、2014年5月29日、危機的出血への対応シンポジウム: 抗血栓療法を受ける患者の緊急手術における止血管理-本邦での対応-

小川覚. 第62回日本輸血細胞治療学会総会、奈良会館 (奈良県、奈良市)、2014年5月15日、大量出血症例における急性凝固障害に対する最適輸血量法を考える: 心臓血管外科領域での大量出血への対応

小川覚. 第61回日本麻酔科学会総会、横浜コンベンションセンター (神奈川県、横浜市)、2014年5月15日、周術期の出血と、フィブリノゲン-もう迷わない、止血へのアプローチ-

小川覚. 第61回日本麻酔科学会総会、横浜コンベンションセンター (神奈川県、横浜市)、2014年5月16日、手術室内での危機管理-突然の危機

に際しても麻酔科医がコマンダーとな
って冷静に対応する：術中の突然の大量
出血

小川覚. 第61回日本麻酔科学
会総会、横浜コンベンションセンター
(神奈川県、横浜市)、2014年5月16
日、麻酔科に必要な技術、技能と臨床診
療における諸問題：最後の砦

〔図書〕(計1件)

小川覚. 症例で学ぶ周術期の凝固・線溶
の管理. 「人工心肺離脱後の止血困難」.
P93-102. メディカルサイエンスインターナ
ショナル 2015.

〔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

(1)研究代表者

小川 覚(Ogawa, Satoru)

京都府立医科大学大学院医学研究科 麻酔科
学教室・助教

研究者番号：50636131