

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09008

研究課題名（和文）抗血小板薬薬効モニタリング法の自動分析装置への応用とカットオフ値の設定

研究課題名（英文）Application of Antiplatelet Drug Monitoring to Automated Analyzers and Establishment of Cutoff Values

研究代表者

佐藤 金夫（Sato, Kaneo）

山梨大学・大学院総合研究部・特任准教授

研究者番号：20242662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：様々な条件を設定して自動分析装置（CS2000i）での至適条件を検討してきたが、用手法（ヘマトレーサー）による測定法と比較して安定的にモニタリングできる条件を見出すことができなかった。さらに、新型コロナウイルス感染症の拡大により症例の登録が困難となり、コロナ拡大以前より測定してきた症例を含めて解析をおこなった。

ROC解析により30nMPGE1存在下での30microMTRAPによる血小板凝集能がシロスタゾールの薬効評価に最適であることが示された。この条件下でのカットオフ値は最大凝集率で9%であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗血小板薬は脳梗塞や心筋梗塞といった血栓症の再発予防に使われているが、薬が効きにくい患者さんの存在が知られている。そのため、血小板機能検査を使って薬の効果を調べることが行われているが、シロスタゾールにおいては測定方法が煩雑なため日常検査では行われていない。そこで、自動で検査できる装置を使って簡単に測定する方法の構築を目的に本研究を実施した。

研究成果の概要（英文）： We have examined the optimum conditions for the automatic analyzer (CS2000i) by setting various conditions, but were unable to find good conditions for constant monitoring compared to the measurement method using the conventional method (hematracer). In addition, the expansion of COVID-19 infection made it difficult to register patients, so we conducted an analysis including cases that had been measured before the COVID-19 spread.

ROC analysis showed that platelet aggregation by 30 microMTRAP in the presence of 30nMPGE1 was optimal for assessing cilostazol efficacy. The cutoff value under these conditions was 9% for maximum platelet aggregation.

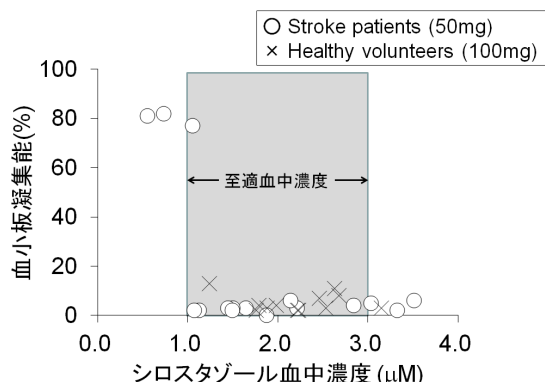
研究分野：血栓止血学

キーワード：薬効モニタリング 血小板凝集能 シロスタゾール 脳梗塞

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化を基盤とするアテローム血栓症の発症には血小板が中心的役割を演じており、抗血小板薬（アスピリン、ADP 受容体阻害薬、シロスタゾールなど）による抗血小板療法が脳梗塞や虚血性心疾患の二次予防に用いられている。急性冠症候群に対する PCI (percutaneous coronary intervention) 施行後の心血管イベント（ステント血栓症、心筋梗塞、死亡）の発症リスクは高く、血小板機能測定の意義は高いとされており、抗血小板療法の最適化を目的として薬効モニタリングが循環器学会のガイドラインに新しい推奨検査項目として記載された^{i,ii)}。胸部外科学会では手術前の血小板機能測定が出血リスクの評価につながることで、血小板機能が正常に保たれている場合には手術に伴う出血が少ない可能性があることが記載されたⁱⁱⁱ⁾。国内では、頭蓋内動脈ステントの適正使用指針において、血小板凝集能を確認して、十分な抗血栓効果を確保している事を確認すべきであると記載されている。このように血小板機能検査による抗血小板薬の薬効モニタリングは重要性が認識されつつある。

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、シロスタゾール、サルボグレラートの 4 剤があり、後二薬の評価系は我々が世界に先駆けて開発した^{iv-vi)}。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す、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。しかし、従来はシロスタゾールの薬効評価は困難とされ、シロスタゾールには抗血小板作用はないとの意見もあった。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、PGI₂ 安定アナログである 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ることで、シロスタゾール本来の抑制作用が評価できるようになった。この理論を元に、我々は平成 24～26 年度の基盤研究 C^{vii)}により、アラキドン酸ナトリウム^{iv)}あるいはトロンビン受容体活性化ペプチド (TRAP)^{viii)}と微量のプロスタグランジン E₁ (PGE₁) との組み合わせにより薬効評価できることを確認し、血中のシロスタゾール濃度と連関して血小板凝集能が抑制されることを明らかにした (下図)。



しかし、この方法は血小板浮遊液に対して、最初に PGE₁ を、続いて 2 分後にアゴニストをピペットで添加する二試薬の手法であり、自動化が主流となっている検査業務において非常に煩雑な方法であり、自動化することで普及に弾みがかかると期待される。

国際的には血小板機能の主要な検査法は全血測定法である VerifyNow®や多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) を用いた吸光度法があるが、前者は医療用測定機器として国内では認可されていないことや一測定あたり 5000 円のディスポーザブルカセットが必要であり、ランニングコストが保険点数の 50 点を遥かに超過している。そのため、国内では吸光度法による薬効モニタリングが主流であるが、本法は用手法で手間と時間のかかる検査であるため、限られた施設でしか実施されていないので^{vii)}、自動化法を構築することで多施設でのシロスタゾールの薬効モニタリングが実施可能となる。その際、海外と日本でカットオフ値が異なる可能性が報告されているので^{viii)}、日本人を対象とした解析が必要である。

2. 研究の目的

- 1) 自施設で使用している血小板凝集能検査装置ヘマトレーサーと、最近になって凝集能検査が測定可能になった自動分析装置 CS2000i (シスメックス株式会社) との間に機種間差が存在することが明らかとなっている (標準物質がないため、どちらの装置が正しい値なのか不明であり、機種間差を前提に研究を進める)。ヘマトレーサーで設定した PGE₁ およびアゴニストの濃度がそのまま CS2000i に適用できるかチェックし、変更の必要があれば、薬効評価に至適な PGE₁ 濃度を *in vitro* の実験によりパラメータを再決定する。
- 2) 同意の得られたシロスタゾール服用を服用している非心原性脳梗塞患者から採血した *ex vivo* の実験により、1. で (再) 決定したパラメータの妥当性を検証するため、シロスタゾールを服用している患者に対して、未服用者・他の抗血小板薬服用者を対照としてデータ収集を行い、測定系の特異度が 90% 以上となるような測定系の構築を目指す。妥当性は ROC 解析により評価する。

3. 研究の方法

1) 【CS2000i における PGE₁ 至適濃度の設定】

これまでの研究で、従来装置であるヘマトレーサーでの薬効モニタリングの測定条件は 30 nM PGE₁ 存在下で 50 μM TRAP を血小板活性化物質として測定することが至適と考えられる (血中濃度と最大凝集率の相関係数は $r=0.902$)。この条件をそのまま CS2000i に測定パラメータとして設定し、至適血中濃度である 1 ~ 3 μM のシロスタゾールにより *in vitro* で血小板凝集が抑制されることを確認する。健康人や患者を対象とした *ex vivo* での服用実験は繰り返しの実施が容易ではないため、*in vitro* での実験を重ねて行う。

2) 【服用患者による評価法の検証】

あらかじめ同意を得たシロスタゾールを服用している非心原性脳梗塞患者から採血し、薬効モニタリングを実施して、妥当性を検証する。対照は非服薬患者や他の抗血小板薬を服用している脳梗塞患者とする。検証は ROC 解析によっておこなう。

4. 研究成果

1) 【CS2000i における PGE₁ 至適濃度の設定】

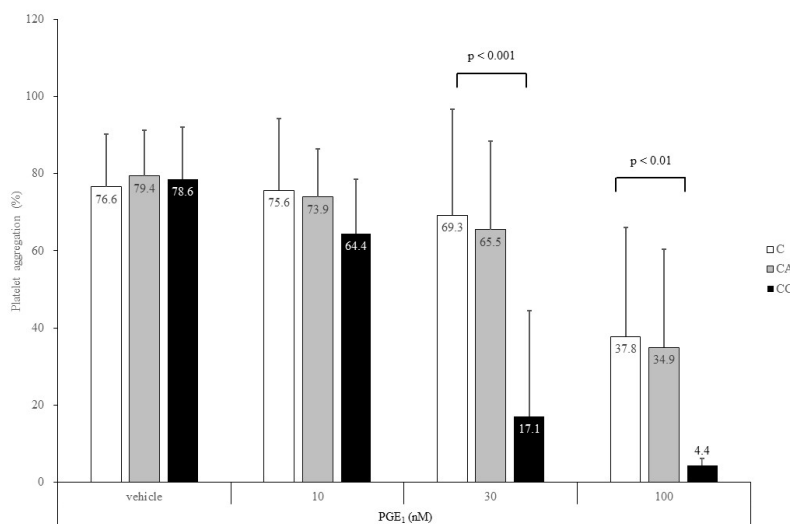
本研究開始前の予備調査において、用手法と自動分析装置との血小板反応性の違いが認められていたことから、最初にアラキドン酸ナトリウムならびに TRAP を血小板活性化物質とし、両測定法の反応性の差異について比較した。いずれの血小板活性化物質においても、用手法と比較して自動分析装置において血小板反応性が高かった。*in vitro* でのシロスタゾール存在下での PGE₁ による血小板凝集能の抑制は、用手法ではこれまでと同様に観察されたが、自動分析装置では PGE₁ による抑制が見られないことが多く、両測定法において、PGE₁ による抑制の乖離が見られた。

乖離の原因として、PGE₁ 非存在下でも自動分析装置で血小板反応性が高いことに注目し、血小板浮遊液(Platelet-rich plasma; PRP)の攪拌条件ならびに透過光の波長を複数の条件で測定して血小板反応性に対する影響を評価した。その結果、透過光の波長はいずれの条件でも類似の反応性を示した一方で、攪拌条件では、回転数に依存して反応性が低下した。これらの結果から、用手法と同程度の反応性を示す条件を設定し直すための実験を繰り返したが至適条件を見出すことができなかった。研究期間ならびに予算が限られていることから自動分析装置における至適条件の設定は保留し、血小板機能検査によるシロスタゾールの薬効モニタリングの有効性を証明することを優先することとし、既に測定系を確立している用手法を用いて研究を継続する方針に変更した。

2) 【服用患者による評価法の検証】

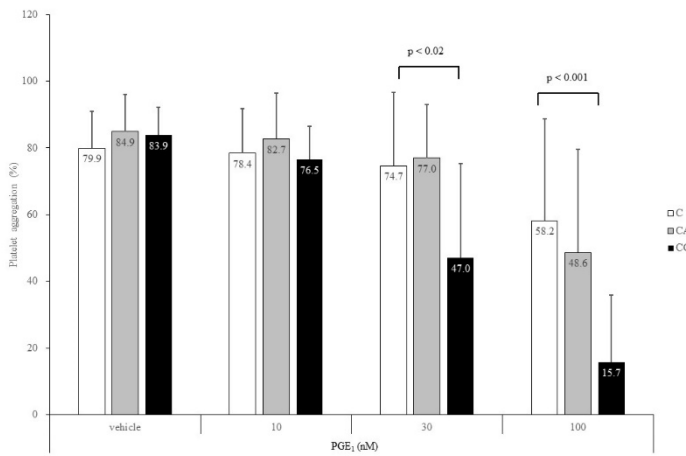
非心原性脳梗塞患者を対象として TRAP 惹起血小板凝集における PGE₁ の至適濃度設定をおこなった。シロスタゾールの単独療法を実施している患者は少ないため、クロピドグレル単独療法(C群)を対照として、クロピドグレルとシロスタゾールの併用療法(CC群)およびクロピドグレルとアスピリンの併用療法(CA群)とを比較してシロスタゾールの薬効評価法としての有用性を検証した。

30μM TRAP 惹起血小板凝集において、C群を対照としてCA群は vehicle、10nM PGE₁、30nM PGE₁、100nM PGE₁ の何れの条件下でも有意差は見られなかった。一方、30nM PGE₁ 及び 100nM PGE₁ 存在下では CC 群において有意な血小板凝集能抑制が見られた(図1)。



【図1】
30μM TRAP 惹起血小板凝集における PGE₁ の影響

50μM TRAP 惹起血小板凝集においても、C群を対照としてCA群は vehicle、10nM PGE₁、30nM PGE₁、100nM PGE₁ の何れの条件下でも有意差は見られなかった。一方、30nM PGE₁ 及び 100nM PGE₁ 存在下では CC 群において有意な血小板凝集能抑制が見られた(図2)。図1、図2の結果から、一定濃度の PGE₁ 存在下ではシロスタゾールの服用により TRAP 惹起血小板凝集が抑制されることが確認され、シロスタゾールの薬効評価に有用であると考えられた。

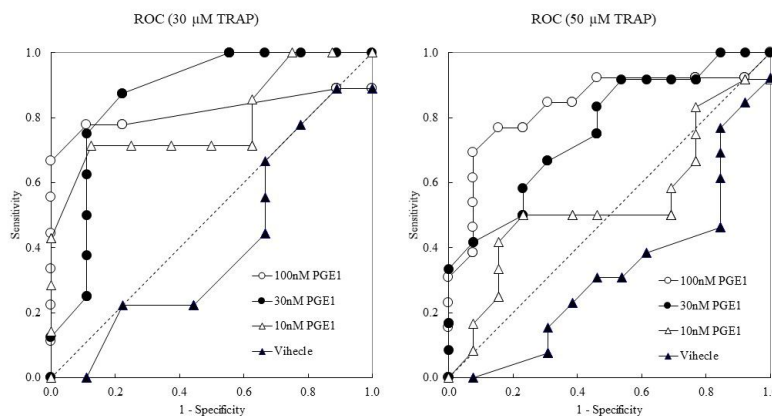


【図2】
50 μ M TRAP 惹起血小板凝集における PGE₁ の影響

続いて、シロスタゾール服用の有無の判別に何れの PGE₁ 濃度が最も適しているか、C 群と CC 群とを対象として Receiver operating characteristic (ROC) 解析により評価した。

30 μ M TRAP 惹起血小板凝集における area under the curve (AUC) は 0, 10, 30, 100nM PGE₁ においてそれぞれ 0.407, 0.795, 0.868, 0.821 であった (図3)。また、50 μ M TRAP 惹起血小板凝集における AUC は 0, 10, 30, 100nM PGE₁ においてそれぞれ 0.323, 0.539, 0.763, 0.837 であった (図3)。これらの解析から、AUC が最も大きくなった 30nM PGE₁ 存在下における 30 μ M TRAP 惹起血小板凝集が最も優れた判別性を有する結果となった。

これら一連の研究により、30nM PGE₁ 存在下での 30 μ M TRAP による血小板凝集能がシロスタゾールの薬効評価に最適であることが示された。



【図3】
ROC 解析による PGE₁ の影響の評価

【引用文献】

- i) Wright RS. et al. *J Am Coll* 2011;57:1920.
- ii) Hamm CW. et al. *Eur Heart J* 2011;32:2999.
- iii) Feraris VA. et al. *Ann Thorac Surg* 2012; 94: 1761.
- iv) Satoh K. et al. *Thromb Res* 2012; 130:612.
- v) Satoh K. et al. *J Thromb Haemost* 2006;4:479.
- vi) Uchiyama S. et al. *Cerebrovasc Dis* 2007;24:264.
- vii) 研究課題名：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 (課題番号 2 4 5 9 0 6 8 7)
- viii) 発明の名称：シロスタゾールの薬効評価方法 (国際公開番号：WO2016/121738)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 Kaneo Satoh
2 . 発表標題 Platelet Aggregation Induced by Thrombin Receptor Agonist Peptide (TRAP) in the Presence of PGE : a Reliable Method for Cilostazol Monitoring
3 . 学会等名 International Society for Laboratory Hematology (国際学会)
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Yugo Shimada, Kaneo Satoh, Fuminori Kazama, Takeshi Suzuki, Yutaka Komiyama, Tsukasa Suetake, Katsue Suzuki-Inoue
2 . 発表標題 Study On The Detection Of Remaining Platelets In Plasma Samples By Clot Waveform Analysis Of Prothrombin Time -The Evaluation Using Clinical Samples-
3 . 学会等名 XXXIst International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Takeshi Suzuki, Yutaka Komiyama, Tsukasa Suetake, Yugo Shimada, Kaneo Satoh, Fuminori Kazama, Sho Shinohara, Hiroshi Kurono, Katsue Suzuki-Inoue
2 . 発表標題 Study On The Detection Of Remaining Platelets In Plasma Samples By Clot Waveform Analysis Of Prothrombin Time -The Basic Analysis Using Artificial Samples-
3 . 学会等名 XXXIst International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology (国際学会)
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学大学院医学工学総合研究部・臨床検査医学講座
<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin01ab/>
 臨床検査医学講座 (山梨大学大学院医学工学総合研究部)
<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clin01ab/index.html>

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	金子 誠 (Kaneko Makoto) (00377491)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	高野 勝弘 (Takano Katsuhiro) (60382925)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	
研究分担者	井上 克枝 (Inoue Katsue) (10324211)	山梨大学・大学院総合研究部・教授 (13501)	

	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
研究協力者	深澤 功 (Fukasawa Isao)		
研究協力者	山本 正博 (Yamamoto Masahiro)		

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
研究協力者	青海 明実 (Aoumi Akemi)		
連携研究者	金丸 和也 (Kanemaru Kazuya) (80402080)	山梨大学・大学院総合研究部・非常勤講師 (13501)	
連携研究者	尾崎 由基男 (Ozaki Yukio) (30134539)	山梨大学・大学院総合研究部・名誉教授 (13501)	

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