

全自動血液凝固測定装置に搭載した血小板凝集能検査を用いた研究用新規指標の抗血小板療法における薬物効果判定としての有用性の検討

坂寄 輔^{*1}, 渡邊 ゆり^{*1}, 北野 圭介^{*1}, 松井 陽平^{*2},
狩野 大樹^{*2}, 新井 信夫^{*1}, 小宮山 豊^{*3}

*1 シスメックス株式会社 第一エンジニアリング本部：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒651-2271)

*2 シスメックス株式会社 第二エンジニアリング本部

*3 シスメックス株式会社 ICH 事業推進本部 (現 北陸大学 医療保健学部)

要 旨

抗血小板療法は、血栓性疾患の治療法として現在広く用いられているが、出血性合併症の制御は治療の成功にとって重要な問題のひとつである。そのため、現在の血小板凝集能の測定目的の半数以上は抗血小板薬の効果確認である。全自動血液凝固測定装置 CS-5100, CS-2500, CS-2400, CS-2100i, CS-2000i で血小板凝集能の測定ができるようになったが、現在本邦で汎用されている半自動の装置に備わっているような抗血小板薬の効果確認指標は搭載されていなかった。今回我々は、抗血小板薬の効果確認に応用を目指した研究用のスコアリングシステムである Platelet Aggregation Level (以下, PAL) を開発した。PAL は ADP 試薬を使用した場合は ADP induced PAL (以下, APAL), コラーゲン試薬を使用した場合は Collagen induced PAL (以下, CPAL) として指標を算出する仕様である。

APAL は P2Y₁₂ 阻害薬であるカングレロールの添加試料に対して、CPAL はアスピリンの添加試料に対して、それぞれ濃度依存的に値が低下し、また、添加前後で有意に値が低下していた。既存のシステムである既存指標 (2 濃度法) に対しては APAL, CPAL ともに相関係数が 0.90 以上の高い関係性を示した。

これまで専用の半自動装置が必要であった抗血小板薬の効果確認の検査が全自動血液凝固測定装置で可能となることが示唆されたことより、これまで新規導入に伴うコストの観点で使用できなかった施設でも使用が容易になることに伴う医療貢献を期待する。

キーワード 血小板凝集, 透過光血小板凝集検査法, 抗血小板薬, PAL (Platelet Aggregation Level)

はじめに

透過光の血小板凝集能検査法 (Light Transmission Aggregometry: 以下, LTA) は *in vitro* で血小板機能を検査する方法として 1962 年に考案され¹⁾, 血小板無力症やフォン・ヴィレブランド病などの血小板機能異常症の診断に広く使用されている方法であり、2013 年発行の国際血栓止血学会の学術標準化委員会による提言ではゴールドスタンダード法として解説されている²⁾。2015 年に全自動血液凝固測定装置

CS-5100, CS-2500, CS-2400, CS-2100i, CS-2000i で血小板凝集能測定機能が追加され、これまで専用機が必要であった本検査が PT, APTT, AT, D ダイマーなどの凝固検査と同じ全自動血液凝固測定装置で測定可能となった³⁾。

本検査は血小板機能異常症の診断貢献目的としての使用以外にも、現在は特に抗血小板薬の薬理学的作用の個人差 (代謝酵素などの要因による不応症や投薬時の投与量不足あるいは過量投与) の確認に使

用される頻度が高く、検査目的の半数以上を占めている⁴⁾。また実臨床の間では抗血小板薬の投与方法としてはクロピドグレル・プラスグレル・カングレロールに代表される P2Y12 受容体拮抗薬と COX-1 阻害薬のアセチルサリチル酸（以下、アスピリン）の 2 剤併用療法（Dual Antiplatelet Therapy：DAPT）の場合が多い⁵⁾。クロピドグレルについては、CYP2C19 の遺伝子変異によって酵素代謝のない抵抗性の存在が報告されており、日本人の約 20% が該当し、白人の 3% に比べて高頻度であることから⁶⁾、これらの抵抗性を確認することは抗血栓療法のマネジメント、特に最近研究が進んでいる脳血管領域では非常に重要である可能性がある。

LTA の結果報告には従来、最大凝集率や凝集波形が使用されてきたが、結果の解釈に一定の経験や技量を要する。これらの課題を解決するために抗血小板薬の効果確認方法として複数の濃度（2 濃度または 4 濃度）の試薬を用いて結果をスコア化する方法が発案され^{7,8)}、その方法は本邦で多く利用されている半自動の専用機に搭載されている。これは本邦の現状を調査した日本血栓止血学会標準化委員会血小板部会のアンケート結果から確認でき、既存指標（2 濃度法）および 4 濃度法の使用頻度は最大凝集率・凝集波形の次に高い⁴⁾（表 1）。しかし、血液凝固検

査の汎用機でありながら血小板凝集能が測定できる CS においてはこれらのスコア化する方法が搭載されていないかった。

そこで、今回筆者らは CS シリーズ（本稿の機能が搭載される CS-5100, CS-2500, CS-2400 の 3 機種を本稿では CS シリーズと表現する）に搭載できる抗血小板薬の効果判定指標確立を目指し、Platelet Aggregation Level（以下、PAL）を新規に開発した。なお、PAL では抗血小板薬の 2 剤併用療法に対応できるよう P2Y12 受容体拮抗薬（クロピドグレルやプラスグレル等）を測定ターゲットとしているアデノシン二リン酸（以下、ADP）と COX-1 阻害薬（アスピリン）を測定ターゲットとしているコラーゲンの 2 試薬が対象で、それぞれ 2 濃度に試薬調製して使用する。2 濃度の ADP 測定結果から算出される値を ADP induced PAL（以下、APAL）、2 濃度のコラーゲン測定結果から算出される値を Collagen induced PAL（以下、CPAL）と命名した。スコア化は 0.0 から 10.0 の 100 段階とし、抗血小板薬の効果で血小板凝集能活性が抑制されるに従い数字が小さくなる仕様である（図 1）。本報告では、健康人検体を用いた *in vitro* の実験系で PAL の評価結果を報告する。なお、PAL は研究用項目であり診断には使用できない。

表 1. 血小板凝集能検査 検査部から臨床への報告方法 (210 施設のアンケート結果)

日本血栓止血学会 血小板部会, 血小板凝集能検査実施状況のアンケート調査結果⁴⁾より執筆者が作成

報告方法 (複数回答可)	施設数
最大凝集率 (%)	138
凝集波形 (チャート)	101
既存指標 (2濃度法) (class1 ~class9)	49
4濃度法 (グレーディングカーブ: PATI, G-type)	37
最終凝集率 (%)	30

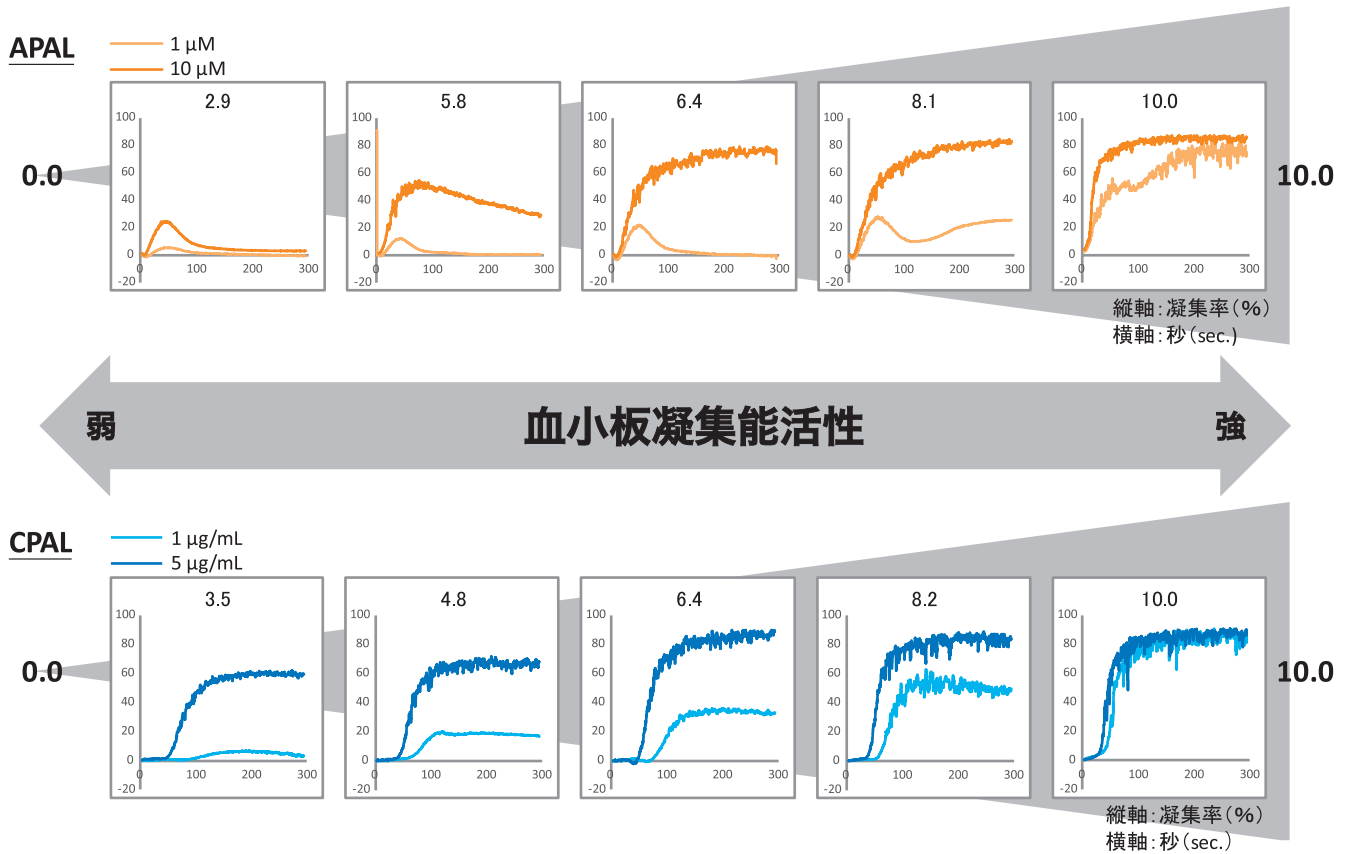


図1. PAL のスコアリングと凝集波形の例

APAL, CPAL はそれぞれ ADP, コラーゲン 2 濃度による凝集波形結果から算出され, 血小板凝集能活性に従い数字が小さくなる。

ボランティア健常人検体を用いた PAL 機能の評価

1. 対象

シスメックス株式会社の倫理委員会にて承認された社内ボランティアの健常人 79 名から 3.2% クエン酸ナトリウム加採血管を用いて採血し, 200 × g で 10 分間遠心した後の上清の一部を回収して多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; 以下, PRP) とした。残りの血液を 1,500 × g で 15 分間遠心した後に上清を回収したものを乏血小板血漿 (Platelet Poor Plasma; 以下, PPP) とした。

回収後に何も添加していない状態の PRP を正常試料とした。P2Y₁₂ 受容体拮抗薬の場合はその活性代謝産物と同様の効果があるカングレロール (Adooq Bioscience) を正常試料に添加したものをカングレロール添加試料, COX-1 阻害薬 (アスピリン) の場合はアセチルサリチル酸 (和光純薬工業株式会社)

を添加したものをアスピリン添加試料, カングレロールとアスピリンを両方添加したものをカングレロール・アスピリン添加試料とした。抗血小板薬は正常試料に対し 1 / 50 量となるように添加した。抗血小板薬の終濃度は方法および図表中に記載した。

2. 測定装置

評価装置として, 全自動血液凝固測定装置 CS-5100 (シスメックス; 以下, CS-5100) を用いた。2 濃度の ADP およびコラーゲンの結果より算出される, APAL および CPAL は血小板凝集能結果表示の画面で確認できる (図 2)。

対照装置として, 既存の血小板凝集能測定装置 (A 社) を用いた。既存指標 (2 濃度法) の結果として算出される指標 (以下, 既存指標 (2 濃度法)) を PAL の対照として用いた。既存指標 (2 濃度法) は 1 から 9 の 9 段階の結果表示であるが, CSV データから下 1 桁までの結果を抽出した。



図2. PALの結果表示の例

表2. 試薬調製濃度と終濃度

アッセイ名称	使用試薬	試薬調製濃度	終濃度
APAL	レボヘムADP	8μM	1μM
		80μM	10μM
CPAL	レボヘム コラーゲン	8μg/mL	1μg/mL
		40μg/mL	5μg/mL

3. 測定試薬

評価試薬として、レボヘム ADP、レボヘム コラーゲン（ともにシスメックス）を用い、それぞれ終濃度がADPは1μMと10μM、コラーゲンは1μg/mLと5μg/mLになるよう調製した（表2）。

対照試薬として、A社の装置で使用するADPおよびコラーゲンを、それぞれ終濃度がADPは1μM

と10μM、コラーゲンは2μg/mLと5μg/mLになるよう調製した。

4. 方法

1) 抗血小板薬の添加による反応性の確認

(1) 1剤に対する濃度依存的なPALの変化

正常試料および2種のカングレロール添加試料

(0.05 および 0.5 μM) を調製し、測定結果から凝集波形と APAL を求めた。正常試料および 2 種のアスピリン添加試料 (1.0 および 1.5mM) を調製し、測定結果から凝集波形と CPAL を求めた。

(2) 1 剤・2 剤に対する PAL の変化

正常試料, 0.05 μM カングレロール添加試料および 0.05 μM カングレロール・1.0mM アスピリン添加試料を調製し、凝集波形と APAL を求めた。正常試料, 1.0mM アスピリン添加試料, および 0.05 μM カングレロール・1.0mM アスピリン添加試料を調製し、凝集波形と CPAL を求めた。

2) 正常試料への抗血小板薬添加前後での PAL の比較

51 検体の正常試料および同一の試料から 0.05 μM カングレロール添加試料を調製し、APAL を求めた。51 検体の正常試料および同一の試料から 1.0 mM アスピリン添加試料を調製し、CPAL を求めた。統計学的手法には Student t-test を用いた。

3) 既存指標 (2 濃度法) との相関性

正常試料および複数濃度のカングレロール添加試料, アスピリン添加試料およびカングレロール・アスピリン添加試料を調製し, CS-5100 および A 社血小板凝集能測定装置を用いて測定した。ADP の APAL および既存指標 (2 濃度法), コラーゲンの CPAL および既存指標 (2 濃度法) から, それぞれの関係性を求めた。

5. 結果

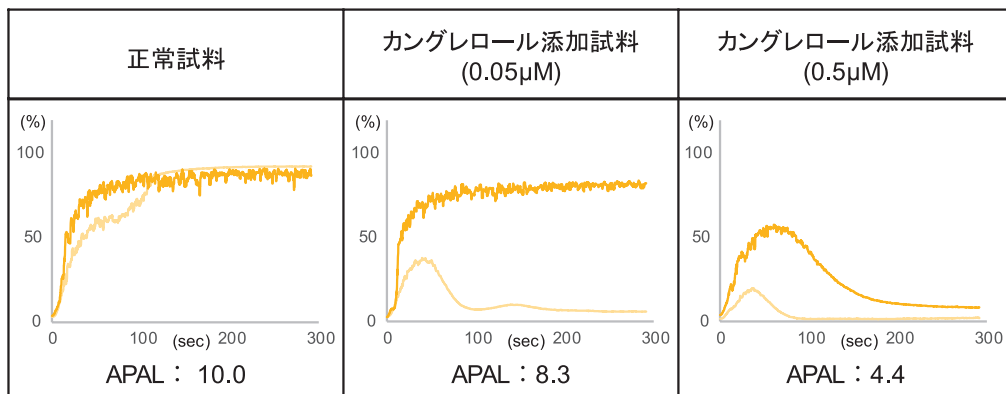
1) 抗血小板薬の添加による反応性

(1) 1 剤に対する濃度依存的な PAL の変化

P2Y12 受容体拮抗薬の場合, カングレロール濃度依存的に, APAL は 10.0 (0.0 μM), 8.3 (0.05 μM), 4.4 (0.5 μM) と小さくなった (図 3 A)。COX-1 阻害薬の場合, アスピリン濃度依存的に, CPAL は 10.0 (0.0mM), 7.4 (1.0mM), 6.6 (1.5mM)

A. APAL

— 1 μM
— 10 μM



B. CPAL

— 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
— 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

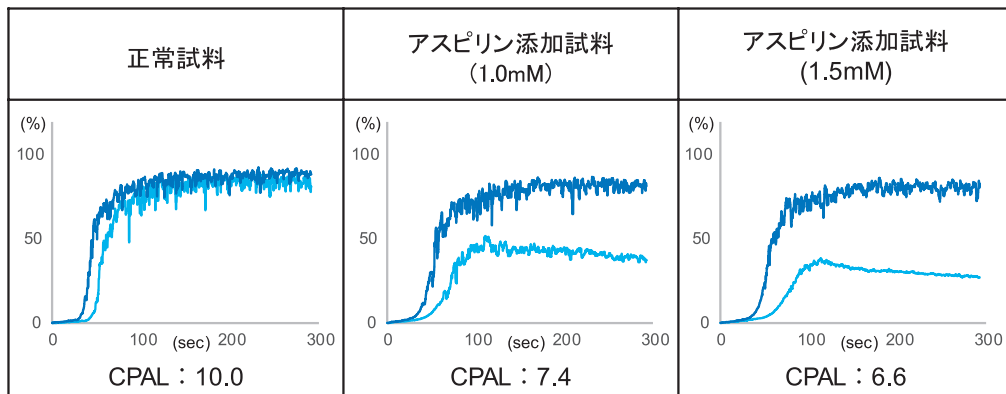


図 3. 1 剤に対する濃度依存的な PAL の変化例

(A) 正常試料および 2 種のカングレロール添加試料 (0.05 および 0.5 μM) の APAL 算出結果と凝集波形の一例。
(B) 正常試料および 2 種のアスピリン添加試料 (1.0 および 1.5mM) の CPAL 算出結果と凝集波形の一例。

と小さくなった(図3B)。

(2) 1剤・2剤に対するPALの変化

APALは正常試料で10.0, 0.05 μ Mカングレロール添加試料で8.3, 0.05 μ Mカングレロール・1.0mMアスピリン添加試料で5.6となり1剤添加に比べて2剤添加で2.7低下した(図4A)。

CPALは正常試料で10.0, 1.0mMアスピリン添加試料で7.4, 0.05 μ Mカングレロール・1.0mMアスピリン添加試料で4.2となり単剤添加に比べて2剤添加で3.2低下した(図4B)。

2) 正常試料への抗血小板薬添加前後でのPALの比較

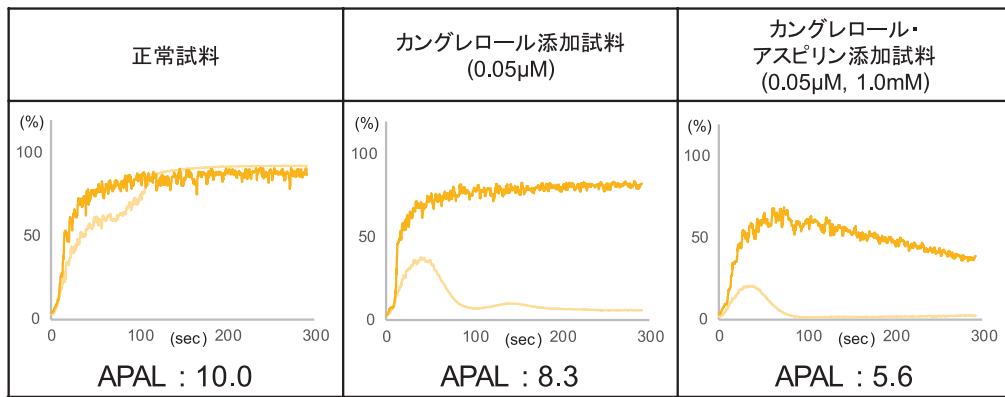
APALのMean \pm SDは添加前の正常試料で9.4 \pm 0.9, 0.05 μ Mカングレロール添加試料で6.7 \pm 1.4であり, 有意な差を認めた($p < 0.001$). CPALのMean \pm SDは添加前の正常試料で9.8 \pm 0.9, 1.0mMアスピリン添加試料6.0 \pm 1.3であり, 有意な差を認めた($p < 0.001$)(図5)。

3) 既存指標(2濃度法)との相関性

APALおよび既存指標(2濃度法)で $y=0.79x+1.60$, $r=0.94$, CPALおよび既存指標(2濃度法)で $y=0.83x+0.95$, $r=0.90$ (図6)であった。

A. APAL

— 1 μ M
— 10 μ M



B. CPAL

— 1 μ g/mL
— 5 μ g/mL

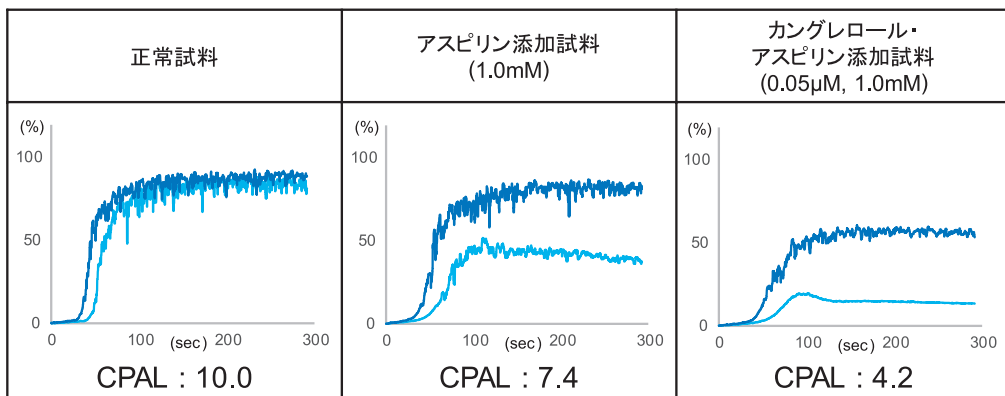


図4. 1剤・2剤に対するPALの変化例

- (A) 正常試料およびカングレロール添加試料 (0.05 μ M), カングレロール・アスピリン添加試料 (0.05 μ M・1.0mM) のAPAL算出結果と凝集波形の一例。
 (B) 正常試料およびアスピリン添加試料 (1.0mM), カングレロール・アスピリン添加試料 (0.05 μ M・1.0mM) のCPAL算出結果と凝集波形の一例。

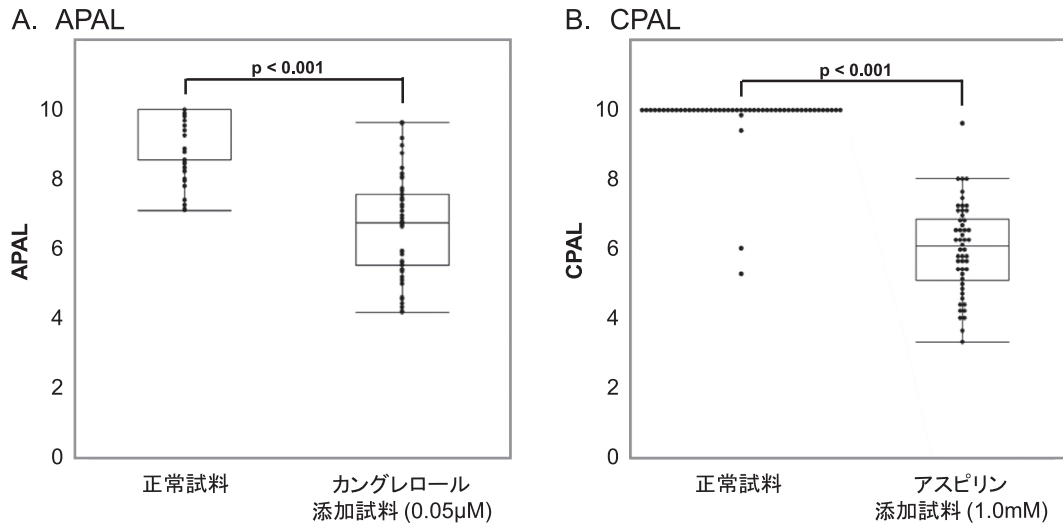


図5. 正常試料への抗血小板薬添加前後での PAL の比較

51 検体の正常試料および同一の試料から薬剤添加試料を調製し、薬剤添加前後の APAL, CPAL の算出値を箱ひげ図により比較した。

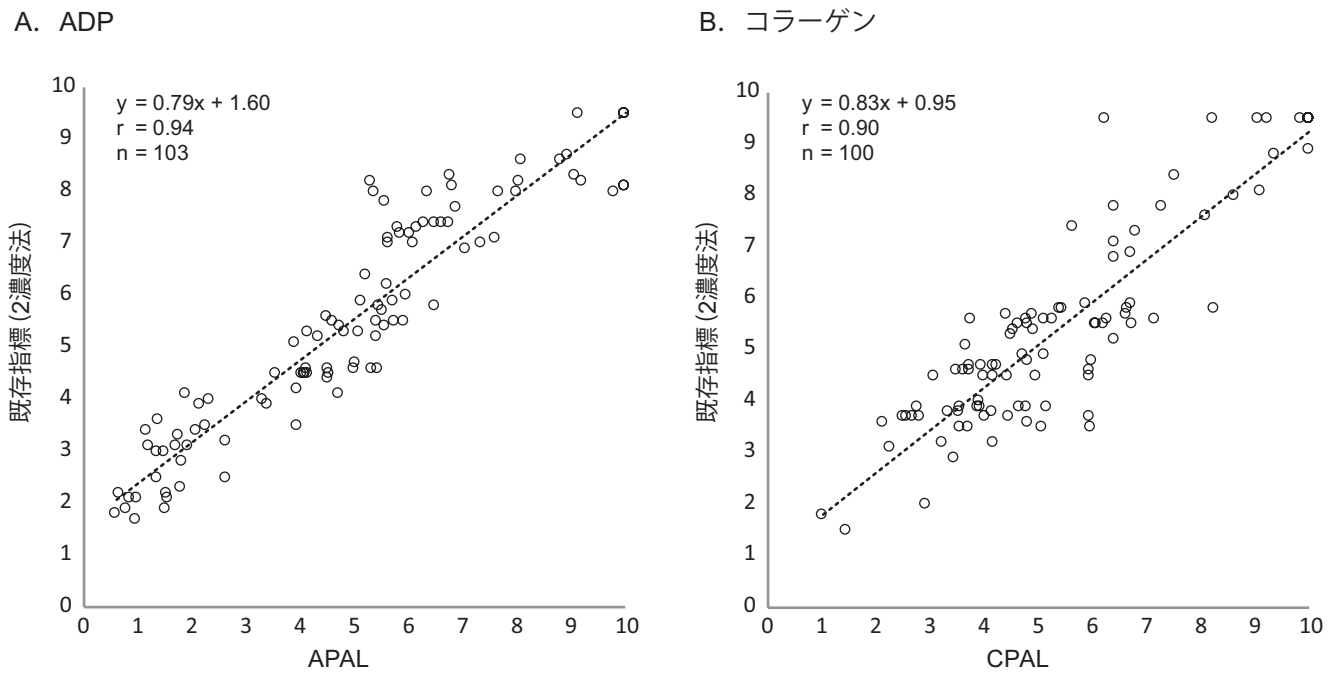


図6. 既存指標 (2濃度法) との相関性

考 察

抗血小板薬の効果確認への応用を目指して新たに開発した解析項目の PAL について、現在臨床的に汎用されている抗血小板薬 2 剤併用療法 (アスピリン

+クロピドグレル) での効果判定を目的にクロピドグレルには判定指標 APAL, アスピリンには判定指標 CPAL を考案し、今回、*in vitro* の系で抗血小板薬への反応性を確認し、既存指標との相関性を評価した。

まず抗血小板薬1剤を模した系として実験した添加実験で、本指標は各薬剤の効果を反映して用量(濃度)依存的に変化し(図4 A, B), さらに2剤併用療法を模した系では1剤よりもさらに強い血小板凝集能を反映した(図5 A, B)。これらの結果から、*in vitro*の系であるが抗血小板薬の効果に応じてAPALおよびCPALが小さくなることが確認できた。今後実施される抗血小板薬投与患者の実検体を用いた系で反応性を確認し、本指標の有用性、実用性が確認できるものと考ええる。

次に本指標と既存指標(2濃度法)との比較検討を行ったが、ADP惹起のAPALと既存指標(2濃度法)、コラーゲン惹起のCPALと既存指標(2濃度法)で非常に良い相関が確認でき、本指標の信頼性が高いことが考えられた(図6 A, B)。なお、少数例の報告ではあるが、臨床検体を用いた評価においてもPALと既存指標(2濃度法)で良好な相関が報告されており、PALおよび既存指標(2濃度法)の結果を3分類した際の一致率もすべての条件で70%以上の結果が得られている^{9, 10)}。

本邦で既存指標(2濃度法)と同じように使用されている4濃度法をベースにしたグレーディングカーブ(表1)との関係性についても既に臨床検体を用いて評価がされており、良好な評価結果が得られている¹¹⁾。

抗血小板薬の効果確認については臨床医の関心を寄せており、推奨レベルは高くないものの、複数の診療領域での診療ガイドラインにも記載がある¹²⁻¹⁵⁾。最近出版されている書籍の中では脳血管内治療の分

野における抗血小板療法プロトコルの例が挙げられて、抗血小板薬の不应症評価・術直前の最終確認・抗血小板薬の早期の中止判断または継続する指標として血小板凝集能検査の使用が紹介されていることから¹⁶⁾(図7)、今後、これまで以上に使用する施設・テストの増加が予想される。

血小板凝集能の測定は全血を試料とした複数の装置が販売されていて、操作は簡便であるがテストあたりのコストが高く、保険診療との兼ね合いで継続して多数例の凝集能検査実施には不向きである。また、メーカーによって原理・結果報告形式が異なり、抗血小板薬モニタリングは研究の域を超えていないのが実情であり、今後、臨床応用を目指すためには、カットオフ値の設定や日常診療で使用できる検査プロトコルが必要であると提言されて数年経過したが、いまだ未解決の状態が続いている¹⁷⁾。

以上まとめると、今回我々はCSシリーズで新たな研究用の解析指標を開発し、*in vitro*での抗血小板薬に対する反応性の確認および既に使用されている既存指標(2濃度法)との相関性を評価した。CSシリーズは一般的な全自動血液凝固測定装置であることから、装置の追加購入なしで血小板凝集能の測定が可能となり、これまで測定ができなかった施設においても血小板凝集能の測定が安価に可能となっている。また、CSシリーズは世界各地で販売されていることから、今後、PALの臨床有用性や臨床実用のエビデンスが集積されることを通じて、抗血小板薬の効果確認の標準化に寄与することが期待される。

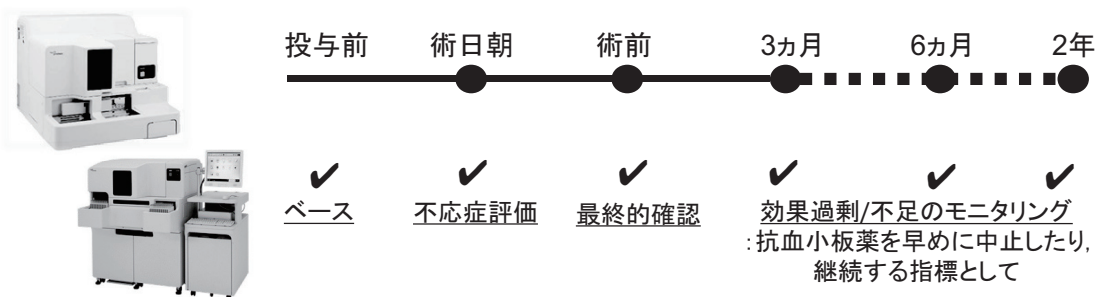


図7. 血小板凝集能測定を用いたモニタリング例

参考文献

- 1) Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962 ; 194 : 927-929
- 2) 富山佳昭 他. 「透過光血小板凝集検査法の標準化：国際血栓止血学会血小板機能標準化部会からの提言」の紹介と解説. *日本血栓止血学会誌*. 2016 ; 27 (3) : 365-369
- 3) 坂寄 輔 他. 全自動血液凝固測定装置 CS シリーズを用いた血小板凝集能測定の紹介. *Sysmex Journal Web*. 2016 ; 17 (1) : 1-12
- 4) 一般社団法人 日本血栓止血学会 血小板部会, 血小板凝集能検査実施状況のアンケート調査結果, <http://www.jsth.org/com/c1/c1-4/> (参照 2018-1-15)
- 5) 中川義久. 冠疾患患者における抗血小板療法と抗凝固療法. *冠疾患誌*. 2017 ; 23 : 117-119
- 6) Desta Z et al: Clinical significance of the cytochrome P 450 2 C 19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet*. 2002 ; 41 : 913-958
- 7) 目黒 嵩 他. Aggregation size (凝集面積) 解析法を取り入れた新しい血小板凝集能検査の有用性. *機器・試薬*. 1993 ; 16 (6) : 1307-1312
- 8) 井宮雅宏, 松尾武文. 新しい血小板凝集能パラメータによる慢性期脳梗塞患者の検討. *臨床病理*. 1993 ; 41 (8) : 923-929
- 9) 定方智美 他. CS シリーズに搭載された抗血小板薬の効果確認の研究用指標 PAL の基礎評価と既存装置に搭載されている指標との比較検討. *Sysmex Journal Web*. 2018 ; 19 (2) : 1-10
- 10) 大森由佳里 他. 全自動血液凝固測定装置 (CS シリーズ) の新規解析法を用いた抗血小板薬の効果確認指標に対する有用性検討. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会. 2017 ; 64 (suppl) : 143-143
- 11) 樋口正一 他. 全自動血液凝固測定装置 CS-5100 に搭載された新規解析法のグレーディングカーブに対する有用性検討と検査ワークフローへの効果検証. *Sysmex Journal Web*. 2018 ; 19 (2) : 1-10
- 12) Wright RS et al. 2011 ACCF/AHA focused update of the Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2007 guideline) : a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines Developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*. 2011 ; 57 (19) : 1920-1959
- 13) Ferraris VA et al. 2012 Update to the Society of Thoracic Surgeons Guideline on Use of Antiplatelet Drugs in Patients Having Cardiac and Noncardiac Operations. *Ann Thorac Surg*. 2012 ; 94 (5) : 1761-1781
- 14) Hamm CW et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011 ; 32 (23) : 2999-3054
- 15) 日本脳神経外科学会, 日本脳卒中学会, 日本脳神経血管内治療学会. 頭蓋内動脈ステント (脳動脈瘤治療用 Flow Diverter) 実施基準 第 2 版, 2015-4
- 16) 坂井信幸 編. 頭蓋内動脈ステントのすべて コイル併用から Flow Diverter ・ ICAD まで, 大阪 : MC メディカ出版, 2017 ; 12-9. 165p
- 17) 松原由美子. 抗血小板薬モニタリングの現状と問題点. *Angiology Frontier*. 2013 ; 12 (3) : 43-48

Evaluation of a Novel Research Use Index for Dose Determination in Antiplatelet Therapy Using a Platelet Aggregation Test Installed in a Fully Automated Blood Coagulation Analyzer

Tasuku SAKAYORI^{*1}, Yuri WATANABE^{*1}, Keisuke KITANO^{*1}, Yohei MATSUI^{*2},
Daiki KARINO^{*2}, Nobuo ARAI^{*1} and Yutaka KOMIYAMA^{*3}

*1 Engineering 1, Sysmex corporation, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, 651-2271

*2 Engineering 2, Sysmex Corporation

*3 ICH Business Development, Sysmex Corporation (Current affiliation: Faculty of Health and Medical Sciences, Hokuriku University)

SUMMARY

Antiplatelet therapy is currently widely used as a treatment for thrombotic diseases, and the control of bleeding complications is one of the important steps in successful treatment. Therefore, more than fifty percent of the objectives of platelet aggregation testing is to confirm the effect of antiplatelet drugs. Although the fully automated blood coagulation CS-5100, CS-2500, CS-2400, CS-2100i and CS-2000i have equipped function about the measurement of platelet aggregation, an index to confirm the effect of antiplatelet drugs was not installed, unlike semi-automated analyzers currently commonly used in Japan. We have developed Platelet Aggregation Level: PAL, a new scoring system, aimed at confirming the effect of antiplatelet drugs. PAL calculates ADP induced PAL: APAL for ADP agonist, and collagen induced PAL: CPAL for collagen agonist.

The values of concentration-dependent APAL and CPAL decreased in cangrelor (P2Y12 inhibitor) -added samples and aspirin-added samples. Also, the values significantly decreased before and after addition. APAL and CPAL showed a strong relationship to the index obtained by the existing analyzer with a correlation coefficient of ≥ 0.90 .

It is expected that a fully automated blood coagulation analyzer is able to perform the test to suggest the effect of antiplatelet drugs that had so far required a dedicated semi-automated analyzer. Taken together, our novel research use index for platelet aggregation is expected to contribute to institutions that could not introduce a special device to measure platelet aggregation due to cost and space, since they may perform the test easily with a fully automated blood coagulation analyzer with platelet aggregation.

Key Words Platelet Aggregation, Light Transmission Aggregometry, Antiplatelet Drug, PAL (Platelet Aggregation Level)
