

抗血小板薬不応性

松原由美子

要 旨：抗血小板薬の有用性は多くの大規模臨床試験により示され，その需要は世界各国において高まっている。しかし，アスピリン，クロピドグレルの血小板機能抑制効果に大きな個体差が存在するという概念も定着してきている。抗血小板薬に対する低反応性群においては抗血小板療法時の心血管イベントの発症率が高いことから，抗血小板薬に対する血小板反応性の個体差に対するアプローチ研究が注目されている。それらの中でも抗血小板薬のモニタリング研究が重要視されている。
(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 309-314)

Key words: aspirin, clopidogrel, platelet function test, PFA-100, VerifyNow assay

はじめに

抗血小板薬は動脈血栓の主体となる血小板の機能抑制に働き，その有用性は多くの大規模臨床試験により示されている。血栓症の患者増加を背景に抗血小板薬の需要は世界各国において高まっている。しかし，アスピリン，クロピドグレルの血小板機能抑制効果に大きな個体差が存在するという概念も定着してきている。抗血小板薬に対する血小板機能抑制効果が低い，いわゆる *poor responders* においては抗血小板療法時の心血管イベントの発症率が高いことから，抗血小板薬に対する血小板反応性の個体差に対するアプローチ研究が注目されている。それらの中でも抗血小板薬のモニタリング研究が重要視されている。

動脈血栓の形成過程において，血管内皮が損傷を受けると内皮下組織に血小板が膜受容体を介して反応し，それらの刺激が主な引き金となり血小板活性化を招く。活性化血小板は凝集し，凝集塊となり血栓を形成する。このような血小板の機能発現に介在する経路や因子は数多く知られている。したがって抗血小板薬の作用機序も単一ではなく，抗血小板薬はその薬剤ごとに血小板の膜受容体をターゲットとするものや血小板活性化シグナルの関連因子をターゲットにするものなど，血小板機能を制御する種々の作用点で働き，それぞれ異なる作用機序

を有している。よって，抗血小板療法のモニタリングに用いる血小板機能の検査法を統一することは難しく，薬剤ごとに薬効を評価する検査法が必要であると考えられている。2010年現在，未だ研究の域を超えていないが，より簡便で再現性が高く，臨床成績と良好に関連するモニタリング法の確立を求め，血小板機能抑制効果に大きな個体差を有することが知られるアスピリンやクロピドグレルを対象に臨床的有用性が高いデータの集積が行われている¹⁻³⁾。

本稿では，アスピリンとクロピドグレルの血小板反応性の個体差，それらのモニタリング法と臨床成績との関連について最近のトピックスを交えて概説したい。

アスピリンの血小板反応性の個体差

アスピリンは抗血小板薬として歴史が古く(抗血小板薬としての承認はFDAで1985年，日本では2000年)，心血管イベントの一次予防，二次予防に用いられている。二次予防についてはATT(Antithrombotic Trialist's Collaboration)による報告をはじめとする数多くのエビデンスの集積により，現在では世界各国においてもガイドラインで第一選択薬となっている。アスピリンはアラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼ(COX)を阻害して血小板内でのトロンボキサン合成を阻害し，血小板の機能を抑制するとともにトロンボキサン A2 による血管

収縮作用も抑制する。

一般に細胞が刺激されるとホスホリパーゼ A2 が活性化されて膜リン脂質からアラキドン酸が遊離される。これが COX により PGG2, PGH2 となる。この後は組織により異なるが、血小板においては強い血小板活性化作用を有するトロンボキサン A2 が産生される。アスピリンは、血小板に一定の高いレベルで発現している COX-1 の 529 番の Ser をアセチル化することにより COX1 の酵素活性を阻害する(血小板での COX1 再合成はできないため、その作用持続性は高い)。その結果、血小板内でのトロンボキサン合成を阻害して血小板の機能を抑制するとともにトロンボキサン A2 による血管収縮作用も抑制する。しかし血管内皮細胞に対しては強力な血管拡張作用と抗血小板作用を有するプロスタグランジン I₂ の産生を阻害するという問題点を有している。アスピリンの血小板機能抑制の機序はよく解明されているが、アスピリンの血小板機能抑制効果の個体差の機序は不明点が多い。アスピリン低反応性群では心血管イベントのリスクが高いことがメタ解析により示されたため⁴⁾、その効果の個体差の機序解明の研究をはじめ、臨床予後と関連の深いモニタリング法の確立に関する研究(後述)は重要視されている。

クロピドグレルの血小板反応性の個体差

クロピドグレルは血小板 ADP 受容体のひとつである P2Y₁₂ の阻害薬である。

ADP は血小板の濃染顆粒に含まれ、血小板の活性化に伴い放出される。放出された ADP は ADP 受容体 (P2Y₁, P2Y₁₂) に作用して、さらに多くの血小板活性化に働きかける。ADP 受容体の役割は血小板に ADP を添加したときにおこる反応を指標にして検討されてきた。その受容体のひとつ P2Y₁ は Ca イオンの流入、血小板の形態反応などの活性化の初期反応(1 次凝集)に関与し、P2Y₁₂ は Gi を介するアデニル酸シクラーゼの機能調節、細胞内 cAMP 濃度の減少、そして Ca の上昇により血小板凝集の要である血小板膜受容体 glycoprotein (GP) IIb/IIIa の活性を誘導する 2 次凝集を主に司っている。P2Y₁₂ 阻害剤は他に保険適用の薬剤でチクロピジンがある。また、プラスグレルをはじめ現在いくつかの薬剤が臨床開発中である。

クロピドグレルはユニークな作用機序を有している。肝臓で代謝を受け、フリーの SH 基を持つ活性代謝産物

となり、この SH が P2Y₁₂ のシステイン残基と S-S 結合をして、ADP が受容体に結合するのを阻害する。薬剤が P2Y₁₂ に不可逆的に結合することにより、持続的に安定した血小板抑制作用を示す。ADP と P2Y₁₂ 反応により生じる AKT の経路やアデニレートシクラーゼを抑制して、cAMP 低下による血小板内のカルシウム濃度の増加を阻害して、GPIIb/IIIa の活性化を抑制する。

クロピドグレルの低反応性に関しては、その機序の多くが説明可能となってきた。クロピドグレルが肝臓で代謝を受ける際に関与する酵素(CYP)の活性が遺伝的な多型により影響を受け、クロピドグレルの作用発現の個体差が生じていることが多くの study により示されている。CYP の中でも CYP2C19 多型はクロピドグレル PK, PD ともに強い影響を与えている。多くの研究では、CYP2C19 多型の遺伝子型により extensive metabolizer 群, intermediate metabolizer 群, poor metabolizer 群に分けられ検討されている。この多型とクロピドグレル服用時の血小板機能、血漿クロピドグレル値、血漿中のクロピドグレル活性代謝物値の関連が報告されている。Poor metabolizer 群では他の群に比べ血小板機能抑制効果が低い⁵⁾。そして CYP2C19 の※2 多型(poor metabolizer として知られる)と心筋梗塞後クロピドグレル服用の若年患者(y < 45)におけるイベント発生の関係が報告されている⁶⁾。興味深いことに、この poor metabolizer 群はアジア人では約 20% 認められているが、白人では約 3% 存在するにすぎない。したがってクロピドグレル抵抗性は、アジア人で多く認められ、白人で少ない、といわれている。最近のトピックスとして、大規模な genome-wide association study により、クロピドグレルの抗血栓作用の個体差の約 70% は遺伝的要因の関与であることが示され、CYP2C19 多型の関与は約 10% であった。この報告により、クロピドグレルの抗血栓作用の個体差の研究において遺伝的要因の探索の重要性がクローズアップされた。したがって薬剤モニタリングの際には血小板機能検討に併せて遺伝子解析の必要性が周知されている。モニタリングに関しては後述したい。

アスピリンとクロピドグレルのモニタリング

抗血小板薬の有用性評価に用いる血小板機能検査法として報告されている方法を Table 1 に示す^{2,3)}。比濁法は最もスタンダードな方法であるが、本検査は検査手技が煩雑であることに加え、標準化が困難なことから現況

Table 1 Methods for measuring platelet functions in patients taking antiplatelet drugs

Methods	Basis	Advantages	Disadvantages
LTA	platelet aggregation	gold standard	high sample volume
Impedance	platelet aggregation	whole blood	sample preparation
VerifyNow	platelet aggregation	simple, rapid whole blood	limited platelet count
Plateletworks	platelet aggregation	simple, whole blood	not well studied
Impact-R	shear-induced platelet adhesion	simple, rapid whole blood, shear	requires pipetting
TEG Platelet Mapping System	clot	whole blood, clot	requires pipetting
PFA-100	shear-induced platelet aggregation	simple, rapid whole blood, shear	dependent on von Willebrand factor

ではモニタリングに適していないと考えられている。2010年現在、臨床的有用性が期待され、最も検討に用いられている検査法はアスピリンのモニタリングに対する Platelet Function Analyzer (PFA)-100 システム、クロピドグレルのモニタリングに対する VerifyNow-P2Y12 である。

PFA-100 システム(コラーゲン・エピネフリンカートリッジ) : アスピリンのレジスタンス検出が期待されている血小板機能検査法

PFA-100 システムは速い流動状態下で血小板機能が評価できる機器システムであり、出血性疾患のスクリーニング、抗血小板薬の簡易モニターを行うことを目的に開発された。2種類のカートリッジ[1つは惹起剤としてコラーゲンとエピネフリン(CEPI)が、もう1つはコラーゲンとADPが塗布されているもの(CADP)]を用いて血小板機能測定を行う。アスピリンの反応性の個体差を検討するためにはCEPIカートリッジを、クロピドグレルの場合はCADPカートリッジを用いる。全血サンプルをそれぞれのカートリッジに入れ、高いずれ応力と惹起剤の刺激によりもたらす血栓がカートリッジを閉塞する時間(CT)を測定する。測定時間は5分間で、その閉塞時間が短いほど血小板機能亢進と評価される。これら2種類のカートリッジを用いて、それぞれ異なる薬剤の薬効評価を行っているが、臨床的有用性が評価されているのはアスピリン反応性を検討するためのCEPI-CTである。CADP-CTはクロピドグレルの薬効評価に関する有用性に関しては否定的な論文報告が多い。

PFA-100 システム(コラーゲン・エピネフリンカートリッジ)による血小板機能評価と臨床予後の関連

2005年以降になるとアスピリン低反応性と臨床予後の関連を検討する study による報告が目立つようになってきた。2007年、2008年には meta-analysis の結果が示された。しかし meta-analysis が報告された当初は種々の方法で検討され定義されたアスピリン低反応性群をすべてまとめた解析であった。それら解析結果が発信され、考察を重ねた後に PFA-100 で評価した血小板機能と臨床予後の関連に焦点をあてた meta-analysis が施行されるに至った⁷⁾。

Snoep らは、meta-analysis に 12 の study の解析を行っているが、それら 12 の study において、PFA-100 を用いた血小板機能評価が行われていたのは 5 つの study であった⁸⁾。それら 5 つの中で non-prospective study は 2 つであった。それぞれ study のオッズ比(OR)は 9.0 と 19.7 を示すが、2 つの study をまとめた OR の記載はなかった。またそれら 5 つの中で prospective study は 3 つであった。3 つの study の OR は 0.3, 1.5, 3.8 を示すが、それら 3 つの study をまとめた OR の記載はなかった。Crescente らは、PFA-100 評価の個体差について 53 の study (n=6450) について review を発表した。その際に臨床予後が study されている 8 つ (non-prospective studies が 2 つ, prospective studies が 6 つ) について meta-analysis を行った。これら 8 つの study を対象に解析を行った結果、PFA-100 で評価されたアスピリン低反応性群の心血

管イベントに対するリスクの OR は 1.6(95% CI: 1.2-2.3) であった⁹⁾。Krasopoulos らは、20 の study を対象にした meta-analysis を行ったが、それら study の中で PFA-100 による評価のものは 7 つの study であった⁴⁾。それら 7 つの中で non-prospective study は 5 つであった。Study により OR は 1.8 から 19.7 を示すが、5 つの study をまとめた OR の記載はなかった。それら 7 つの中で prospective study は 2 つであった。2 つの study の OR は 1.4, 1.5 を示すが、それら 2 つの study をまとめた OR の記載はなかった。Reny らは、7 つの non-prospective studies と 8 つの prospective studies を対象に meta-analysis を行った。Prospective studies を対象に解析を行った結果 OR は 2.1 を示した¹⁰⁾。Crescente らでは、前述の Crescente ら、Snoep ら、Reny ら、Krasopoulos らの 4 つの meta-analysis の報告で PFA-100 を用いたものをまとめて再度、meta-analysis を行った。19 の study(cardiovascular patients n=3003)の meta-analysis の結果を報告している⁷⁾。報告によると、PFA-100 システム CEPI-CT で評価したアスピリンレジスタンス群はアスピリン反応群に比し心血管イベント率が有意に高かった。その OR(95% CI) は 2.35 (1.96-2.83) であった。サブ解析における、9 つの non prospective studies の meta-analysis での OR は 2.35(1.96-2.83)、10 の prospective studies の meta-analysis での OR は 2.35(1.96-2.83) であった。一方、解析対象集団が ischemic stroke patients の場合では CEPI-CT で評価したアスピリンレジスタンス群とアスピリン反応群における血栓性イベント率に有意差は認められなかった¹¹⁾。Stroke patients を対象とした study は未だ数少ないため今後のデータ蓄積が望まれている。

VerifyNow-P2Y12 システムによる 血小板機能評価と臨床予後の関連

クロピドグレルの血小板反応性の検討には惹起剤として ADP を用いる比濁法が用いられていた。しかし前述のように、比濁法は検査手技の煩雑さ、標準化の困難から、簡易モニターシステムである VerifyNow-P2Y12 を用いた検討が注目されている。VerifyNow システムはアスピリン、クロピドグレルの簡易モニターを目的に開発された。それぞれの薬剤専用のテストカートリッジを有しており、アスピリン、クロピドグレルの反応性検討のため、惹起剤としてアラキドン酸(VerifyNow-aspirin assay), ADP(VerifyNow-P2Y12 assay) がそれぞれ用いら

れている。テストカートリッジ内に採血された全血サンプルと惹起剤の反応がもたらすフィブリノゲン固相ビーズの凝集測定を行う。測定時間は 2~5 分である。

VerifyNow P2Y12 による血小板機能検査値と臨床予後の関連については、Breet らにより発表された¹²⁾。クロピドグレル服用 PCI 患者(n=1069)を対象に血小板機能を比濁法(惹起剤として ADP), VerifyNow-P2Y12, PFA100 CADP, platelet works, Impact-R で測定し、1 年後の心血管イベントと有意に関連する検査法の検出を行った。その結果、比濁法, VerifyNow, platelet works により評価されたクロピドグレルレジスタンス群ではその反応性群に比し、心血管イベントが有意に高頻度に認められた。VerifyNow P2Y12 による血小板機能評価とクロピドグレル服用 PCI 患者の臨床予後の関連を検討した prospective study はいくつか報告され、いずれも VerifyNow P2Y12 による血小板機能評価と臨床予後の関連が示されている。これら結果を基に GRAVITAS 治験が行われ¹³⁾、その内容が 2010 年の AHA(American Heart Association)において発表された。これは約 2800 人のクロピドグレル服用 PCI 患者を対象に VerifyNow P2Y12 による血小板機能評価に基づき行われた抗血小板療法が心血管イベントと関連するかどうかを検討した interventional, randomized, placebo-controlled clinical trial である。患者は血小板機能評価値に基づき、低反応性群と反応性群に分けられ、さらに低反応性群は 2 つに分けられ、クロピドグレル高用量服用群と通常量服用群に分けられた。半年の追跡結果では、VerifyNow P2Y12 による血小板機能評価は臨床予後と関連することが示された。しかし低反応性群におけるクロピドグレル高用量服用群の患者でも心血管イベントのリスクを減少しきれなかった。今後の追加情報の発信に注目したい。治験の詳細は、<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00645918> に記載されている。

VerifyNow P2Y12 による血小板機能検査値と臨床予後の関連の報告数は未だ少ないが、今後多くの研究グループからの報告が予測される。

おわりに

アスピリンやクロピドグレルの血小板機能抑制効果に個体差が存在し、その低反応性群は反応性群に比し心血管イベントのリスクが高いことは、現在広く知られている。抗血小板薬の血小板機能抑制の機序はよく解明さ

れているが、血小板機能抑制の個体差に関しては不明点が多いことや血小板の機能調節機構に關与する因子が多いことから、抗血小板薬の低反応性患者に対する有用性の高いマネージメント法の確立に至っていない。現在多くの専門家がデータ集積を行っている。本稿では、未だ研究の領域を超えていないが、アスピリンやクロピドグレルの低反応性患者の検出が期待できる血小板機能検査と臨床予後の関連に焦点をあて概説した。血小板機能検査は簡易モニタリング法が使用された論文報告が最近では数多く、アスピリンに対する PFA-100、クロピドグレルなど P2Y₁₂ 阻害剤に対する VriflyNowP2Y₁₂ という考えが広まっている。しかし日本において現在 PFA-100 の機器入手は難しいことや、前述のようにクロピドグレルの有用性に対しては民族差を有する遺伝的要因の關与が有名なことから、日本における抗血小板薬の血小板反応性の個体差研究のデザインが必要である。臨床的有用性の高い抗血小板療法のために、日常診療で用いることができる検査プロトコルの確立を目的とした study にできるだけ多くの施設が参加し、日本人を対象に行った study のデータ集積や成果発信が必要と考える。

文 献

- 1) Cattaneo M: Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost* 2007; **5** (Suppl 1): 230–237
- 2) Michelson AD: Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol* 2009; **103** (3 Suppl): 20A–26A
- 3) 松原由美子: 血小板機能検査で検出できる抗血小板薬レジスタンスと臨床的予後の関連性。血栓と循環 2010; **18**: 31–35
- 4) Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, et al: Aspirin “resistance” and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; **336**: 195–198
- 5) Kim KA, Park PW, Hong SJ, et al: The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **84**: 236–242
- 6) Collet JP, Hulot JS, Pena A, et al: Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 2009; **373**: 309–317
- 7) Crescente M, Castelnovo AD, Lacoviello L, et al: PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a meta-analysis of 19 studies comprising 3003 patients. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 1129–1131
- 8) Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, et al: Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; **167**: 1593–1599
- 9) Crescente M, Di Castelnovo A, Iacoviello L, et al: Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 14–26
- 10) Reny JL, De Moerloose P, Dauzat M, et al: Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008; **6**: 444–450
- 11) Boncoraglio GB, Bodini A, Brambilla C, et al: Aspirin resistance determined with PFA-100 does not predict new thrombotic events in patients with stable ischemic cerebrovascular disease. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; **111**: 270–273
- 12) Breet NJ, Bouman HJ, Werkum J, et al: Do platelet function assays predict clinical outcomes in clopidogrel pretreated patients undergoing elective PCI. 米国心臓協会学会, 2009
- 13) Price MJ: Bedside evaluation of thienopyridine antiplatelet therapy. *Circulation* 2009; **119**: 2625–2632

Low Responsiveness to Antiplatelet Drugs

Yumiko Matsubara

Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Key words: aspirin, clopidogrel, platelet function test, PFA-100, VerifyNow assay

Platelets have crucial roles in thrombus formation. Antiplatelet drugs have inhibitory effects on platelet functions, and antiplatelet drugs for the prevention and treatment of atherothrombosis have shown significant efficacy in clinical trials. However, there are inter-individual variations in platelet response to antiplatelet drugs, in particular, aspirin and clopidogrel. Data show that the poor responders, as assessed by platelet function tests, have higher risks of cardiovascular events. Therefore, a screening test is required to assess platelet function in patients taking antiplatelet drug(s), and research on the point-of-care platelet function test is recommended. The Platelet Function Analyzer (PFA)-100 system has been used to assess platelet reactivity to aspirin, and a meta-analysis demonstrated the value of PFA-100 to predict cardiovascular events in patients taking aspirin. On the other hand, the VerifyNow P2Y12 assay has been used to measure the platelet response to P2Y12 inhibitors, such as clopidogrel. To examine whether modifying antiplatelet therapy based on the VerifyNow P2Y12 assay improve assay, an intervention, randomized, placebo-controlled clinical trial was performed, and the results showed the predictive value of this assay for cardiovascular events in clopidogrel-treated patients undergoing percutaneous coronary interventions using drug-eluting stents.

(J Jpn Coll Angiol, 2011, **51**: 309–314)