

Figure 4 Serial changes in the dose of argatroban, activated clotting time (ACT), and plasma argatroban concentration (A) before, (B) during, and (C) after cardiopulmonary bypass (CPB) for the implantation of a left ventricular assisted device in Patient 2 with acute heparin-induced thrombocytopenia (see details in Fig. 2). (A) The same strategy was used as described in Figure 3 with minor modifications: increased dose of bolus injections (0.2 to 0.3 mg/kg) and reduced continuous dose (5 to 15 µg/kg/minute) before the commencement of CPB attempting to avoid overshooting of ACT. (B) But the ACT reached > 999 at the end of surgery. (C) The ACT returned to the control level 7 hours after CPB.

Unfortunately, the patient died of myocardial dysfunction, sustained ventricular tachycardia/ventricular fibrillation, and bleeding including focal subarachnoid hemorrhage 1 day after the reoperation. In this case, the control of ACT was much more difficult as compared with the two cases described earlier because the patient required repeated CPB management and percutaneous cardiopulmonary support after CPB.

Through these events, we recognize that the use of argatroban during CPB is promising, but further modifications of technique, especially anticoagulation

monitoring, should evolve. Bivalirudin has shown promise as an anticoagulant for CPB in patients with acute HIT, and the strategy of bivalirudin anticoagulation for CPB has been reported.³⁷⁻⁴¹ However, bivalirudin is not available in Japan. We now recommend that cardiovascular surgery requiring systemic anticoagulation with or without CPB for acute HIT patients should be postponed as long as possible until the patient's anti-PF4/heparin antibody level becomes negative.^{10,42,43} In addition, a careful diagnostic workup for HIT, as described later, should be followed.

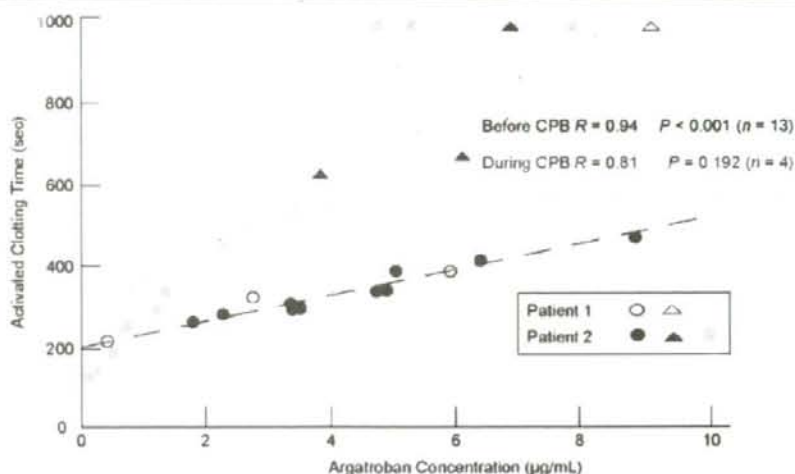


Figure 5 Relationship between activated clotting time (ACT) and plasma argatroban concentration. Plasma argatroban concentrations were assessed by a liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry periodically throughout the surgeries of Patient 1 (open marks) and Patient 2 (closed marks) (see details in Figs. 3 and 4). Good linear relationships between plasma argatroban concentrations and ACT were observed before ($r = 0.94$, $p < 0.001$; \circ and \bullet) and after ($r = 0.90$, $p < 0.001$; \square and \blacksquare) cardiopulmonary bypass (CPB). No relationship was found during CPB ($r = 0.81$, $p = 0.192$; Δ and \blacktriangle) due to ACT values exceeding the detection limit (999 seconds) at argatroban concentrations > 6.5 $\mu\text{g/mL}$ and few measurements ($n = 4$). Note that the slope of the regression line during and after CPB was steeper than that before CPB.

INCIDENCE OF HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA IN THE JAPANESE POPULATION

HIT is a clinicopathological syndrome. Thus the definitions of both clinical diagnosis and serological tests are very important and may profoundly influence the reported incidence of HIT.^{12,14,36,44} ELISA for detecting anti-PF4/heparin antibodies is now popular in Japan, but no functional assay using washed platelets has been established with high quality control. Thus we must diagnose HIT through a combination of clinical pretest probability (e.g., the 4 T's scoring system) and ELISA results. Overdiagnosis arising from the low specificity of this approach is a distinct possibility.^{14,44}

Previous reports in Western countries have indicated that the incidence of HIT is ~ 1 to 3% in cardiac surgery patients where UFH is used for routine postoperative prophylaxis.^{14,17,45,46} But routine heparin prophylaxis is not common in Japan in this patient population. However, acute ischemic stroke patients frequently receive UFH therapy, despite the lack of supporting evidence. We have conducted retrospective studies at our institute and a multicenter, prospective cohort study to determine the incidence of HIT in these clinical settings.

Among cardiovascular surgery or acute ischemic stroke patients who were treated with UFH, we have retrospectively investigated those who were clinically suspected of having HIT during the last several years.

A commercially available ELISA (Asserachrom HPIA; Diagnostica Stago; Asnières, France) assay was used to screen HIT patients. Clinically suspected HIT patients were evaluated by ¹⁴C-serotonin release assay (SRA), kindly performed by Prof. Walenga and her colleagues at Loyola University Medical Center (Maywood, IL), to confirm the HIT diagnosis.

We have also conducted a multicenter, prospective cohort study to determine the incidence and profile of HIT in patients undergoing cardiovascular surgery or PCI.²¹ Patients scheduled to undergo cardiovascular surgery ($n = 1,444$) or PCI ($n = 110$) were enrolled between November 2004 and December 2005 at 11 institutions. We followed the patients for 30 days after surgery or PCI and examined the patients' history, demographic data, changes in platelet count, and timing and period of heparin administration including heparin flush, complications, thromboembolism, and death. We took blood samples before, 7 days after, and 14 days after the surgery or PCI to test for HIT antibodies. The diagnosis of HIT was confirmed by SRA, kindly performed by Prof. Warkentin and his colleagues at the Coagulation Laboratory, McMaster University (Hamilton, ON, Canada).

Because the reports of these studies are not yet published, we cannot cite them in detail. However, our preliminary data suggest that the incidence of HIT in the Japanese population appears to be lower (e.g., by about one order of magnitude in patients undergoing

cardiovascular surgery) than those reported in Western countries. Ethnic factors and/or different clinical practices (e.g., routine heparin prophylaxis after the surgery is not common in Japan) may contribute to the low apparent incidence of HIT in the Japanese population.

CLINICAL TRIAL ON THE EFFICACY AND SAFETY OF ARGATROBAN IN JAPANESE PATIENTS WITH HEPARIN-INDUCED THROMBOCYTOPENIA

To overcome our problem that no drug for HIT treatment has been approved by Japanese regulators, we have

conducted a multicenter, nonrandomized, open-label trial at 20 institutions to evaluate the efficacy and safety of argatroban in patients with HIT.²² The same protocol as used in ARG-911¹⁷ with minor modifications was followed; in particular, a reduced initial dosage of argatroban was used.

In our institution, we had used the same initial dose (2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in patients with normal liver function and 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in those with hepatic impairment) as recommended in the United States by manufacturers' prescribing information. With this dosing regimen, we encountered serious bleeding with rapid increase of activated partial thromboplastin time (aPTT)

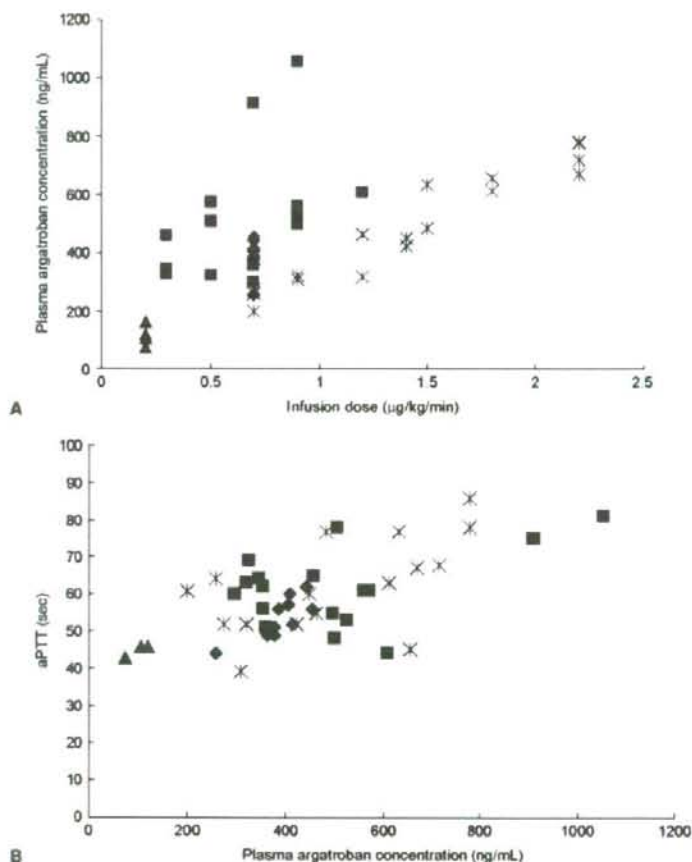


Figure 6 Relationships of argatroban dose or activated partial thromboplastin time (aPTT) versus plasma argatroban concentration. Plasma argatroban concentrations were examined in four patients as a substudy in the multicenter, nonrandomized, open-label trial to evaluate the efficacy and safety of argatroban in patients with heparin-induced thrombocytopenia. The initial dosages of argatroban were 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in three patients (\blacksquare , \blacklozenge , $*$) with normal liver function and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in one patient (\blacktriangle) with a risk factor for bleeding, respectively. These doses are about a third the initial dose recommended by the manufacturer in the United States and Europe. (A) However, almost all infusion doses (even < 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$) increased the plasma argatroban concentration to > 200 ng/mL, sufficient to keep the aPTT within the target range (B), except in one patient (\blacktriangle) whose argatroban therapy was terminated due to intracranial hemorrhage before his aPTT prolonged to the target range. (B) Plasma argatroban concentrations showed a good correlation with the values of aPTT ($r = 0.62$).

beyond the target range in several postcardiovascular surgery patients.²⁹ Moreover, several reports from the United States²⁸ and Germany^{38,49} have suggested that a lower starting dose of argatroban may be sufficient and safe for effective anticoagulation, especially in critically ill patients.

Thus, in our protocol, initial dosing of argatroban was reduced to 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in patients with normal liver function and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in those with hepatic impairment or a risk factor for bleeding. This was about a third the initial dose recommended by the manufacturer in the United States and Europe. However, the aPTT was targeted in the same range (1.5 to 3 times baseline aPTT). For patients with a risk factor for bleeding, 1.5 to 2 times baseline aPTT was recommended.

Thereafter, 8 patients were enrolled between July 2005 and September 2006. Among them, two patients who had a documented history of positive anti-PF4/heparin antibodies and required anticoagulation therapy were enrolled even in the absence of thrombocytopenia (defined as a platelet count $< 100,000/\mu\text{L}$ or $> 50\%$ reduction in count after heparin therapy with no explanation other than HIT) at enrollment.

The total number of enrolled patients was much smaller than expected, consistent with the results of other clinical research showing a low incidence of HIT in Japan as described earlier. Argatroban was initiated at a dose of 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in 5 patients and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$ in 3 patients. Even using these lower initial doses, the aPTT was prolonged to the target range (1.5 to 3 times baseline aPTT value) within ~ 2 hours of initiation of infusion in 6 patients (75%). The primary endpoint (composite of death, amputation of extremities, and new thrombosis) occurred in one patient (posterior tibial artery thrombosis). Thrombocytopenia was resolved in 33% of patients within 3 days after starting argatroban treatment and in 83% of patients during treatment. Two patients who had a documented history of positive HIT antibodies in the absence of thrombocytopenia at enrollment were excluded from the analysis of thrombocytopenia resolution.

One major hemorrhagic event (intracranial hemorrhage) with symptomatic epilepsy without neurological deficit occurred in the patient with a platelet count of $3,000/\mu\text{L}$ 2 days after starting therapy. The administration of argatroban was promptly terminated in this patient. Minor hemorrhagic events occurred in two patients.

Concomitant with this clinical trial, plasma argatroban concentrations were examined in four patients as a substudy. Almost all infusion doses (even $< 1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{minute}$) increased the plasma argatroban concentration properly (Fig. 6A), sufficient to maintain the aPTT within the target range (Fig. 6B). The exception was one patient who had an intracranial hemorrhage as

described earlier and whose argatroban therapy was terminated before his aPTT prolonged to the target range. Plasma argatroban concentrations showed a good correlation with the values of the aPTT ($r = 0.62$), as shown in Fig. 6B.

The results of our clinical trial appear to be compatible with those of the ARG-911 trial,⁴⁷ although the total number of enrolled patients in our trial is too small for statistical analysis. Argatroban seems to be effective and safe for the treatment of HIT but requires careful consideration of the initial dosage. Based on the results of our trial, two pharmaceutical companies are now submitting an application to the Japanese regulators for approval of argatroban to treat patients with HIT.

CONCLUSIONS

Immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia is a life-threatening side effect of heparin therapy. Although it appears that the incidence of HIT is lower in Japan than in Western countries, the serious morbidity and mortality profile of HIT warrants our continued attention. In acute HIT, cardiovascular surgery using CPB should be postponed as long as possible until the patient's anti-PF4/heparin antibody test becomes negative and UHF can be used as the CPB anticoagulant. For acute HIT patients who require immediate surgery with CPB, the risk/benefit profile of argatroban anticoagulation should be carefully considered. Argatroban appears to be effective and safe for treatment of Japanese HIT patients when properly dosed. Our dosing schedule is safe and effective at lower doses than those recommended elsewhere. These results should be considered in other demographic settings.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Jeanine M. Walenga and her colleagues at Loyola University Medical Center (Maywood, IL, USA) and Prof. Theodore E. Warkentin and his colleagues at the Coagulation Laboratory, McMaster University (Hamilton, ON, Canada) for their contributions to perform the ¹⁴C-serotonin release assay and other assays showing us the "real" patients with HIT. We also thank all of our Japanese investigators of the Argatroban Trial on HIT (especially Drs. Kazuhiro Myojin at National Hospital Organization Hokkaido Cancer Center, Tomoki Shimokawa at Sakakibara Heart Institute, Norikazu Yamada at Mie University Hospital, and Yutaka Ohkita at Kobe University Hospital for their efforts to enroll patients) and the investigators of the multicenter, prospective cohort study to clarify the incidence and profile of HIT. Finally, we thank Dr. Kenneth E. Noller (Fukushima Medical University) for his editorial assistance.

We received support from a Research Grant for Cardiovascular Diseases (15C-1) from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, a Health Labour Sciences Research Grant from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Center for Clinical Trial in Japan Medical Association, and a Grant-in-Aid from the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) of Japan.

DISCLOSURES

Shigeki Miyata and Haruko Yamamoto have research grants from Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation.

REFERENCES

1. Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia: recognition, treatment, and prevention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:311S-337S
2. Arepally GM, Ortel TL. Clinical practice. Heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2006;355:809-817
3. Warkentin TE. Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia—from purpura to thrombosis. *N Engl J Med* 2007; 356:891-893
4. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, et al. Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 1992; 68:95-96
5. Rauova L, Poncz M, McKenzie SE, et al. Ultralarge complexes of PF4 and heparin are central to the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2005;105:131-138
6. Rauova L, Zhai L, Kowalska MA, Arepally GM, Cines DB, Poncz M. Role of platelet surface PF4 antigenic complexes in heparin-induced thrombocytopenia pathogenesis: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2006;107:2346-2353
7. Suvarna S, Rauova L, McCracken EK, et al. PF4/heparin complexes are T cell-dependent antigens. *Blood* 2005;106: 929-931
8. Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost* 2005;94: 132-135
9. Warkentin TE, Heddle NM. Laboratory diagnosis of immune heparin-induced thrombocytopenia. *Curr Hematol Rep* 2003;2:148-157
10. Warkentin TE, Kelton JG. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2001;344:1286-1292
11. Warkentin TE, Kelton JG. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Ann Intern Med* 2001; 135:502-506
12. Warkentin TE, Roberts RS, Hirsh J, Kelton JG. An improved definition of immune heparin-induced thrombocytopenia in postoperative orthopedic patients. *Arch Intern Med* 2003;163:2518-2524
13. Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 Ts) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* 2006;4:759-765
14. Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96:1703-1708
15. Martel N, Lee J, Wells PS. Risk for heparin-induced thrombocytopenia with unfractionated and low-molecular-weight heparin thromb. prophylaxis: a meta-analysis. *Blood* 2005;106:2710-2715
16. Francis JL, Palmer GJ III, Moroosse R, Drexler A. Comparison of bovine and porcine heparin in heparin antibody formation after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;75:17-22
17. Pouplard C, May MA, Regina S, Marchand M, Fuscieri J, Gruel Y. Changes in platelet count after cardiac surgery can effectively predict the development of pathogenic heparin-dependent antibodies. *Br J Haematol* 2005;128:837-841
18. Warkentin TE, Elavathil LJ, Hayward CP, Johnston MA, Russett JI, Kelton JG. The pathogenesis of venous limb gangrene associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Intern Med* 1997;127:804-812
19. Magnani HN. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT): an overview of 230 patients treated with Orgaran (Org 10172). *Thromb Haemost* 1993;70:554-561
20. Warkentin TE, Kelton JG. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* 1996;101:502-507
21. Available at www.clinicaltrials.gov (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00198575)
22. Available at www.clinicaltrials.gov (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00198588)
23. Pouplard C, Gueret P, Fouassier M, et al. Prospective evaluation of the '4Ts' score and particle gel immunoassay specific to heparin/PF4 for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2007;5:1373-1379
24. Greinacher A, Eichler P, Lubenow N, Kwasy H, Luz M. Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aPTT range. *Blood* 2000;96:846-851
25. Chong BH, Berndt MC. Heparin-induced thrombocytopenia. *Blut* 1989;58:53-57
26. Greinacher A, Volpel H, Janssens U, et al. Recombinant hirudin (lepirudin) provides safe and effective anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study. *Circulation* 1999;99:73-80
27. Christiansen S, Jahn UR, Meyer J, et al. Anticoagulative management of patients requiring left ventricular assist device implantation and suffering from heparin-induced thrombocytopenia type II. *Ann Thorac Surg* 2000;69:774-777
28. Reichert MG, MacGregor DA, Kincaid EH, Dolinski SY. Excessive argatroban anticoagulation for heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Pharmacother* 2003;37:652-654
29. Ichikawa M, Oue M, Okamoto A, et al. A case of heparin-induced thrombocytopenia associated with unexpected excessive argatroban anticoagulation after abdominal aortic aneurysm resection. *Masui* 2006;55:188-192
30. Magnani HN, Gallus A. Heparin-induced thrombocytopenia (HIT). A report of 1,478 clinical outcomes of patients treated with danaparoid (Orgaran) from 1982 to mid-2004. *Thromb Haemost* 2006;95:967-981

31. Eichler P, Friesen HJ, Lubenow N, Jaeger B, Greinacher A. Antithirudin antibodies in patients with heparin-induced thrombocytopenia treated with lepirudin: incidence, effects on aPTT, and clinical relevance. *Blood* 2000;96:2373-2378
32. Kawada T, Kitagawa H, Hoson M, Okada Y, Shiomura J. Clinical application of argatroban as an alternative anticoagulant for extracorporeal circulation. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:445-457
33. Furukawa K, Ohteki H, Hirahara K, Narita Y, Koga S. The use of argatroban as an anticoagulant for cardiopulmonary bypass in cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:1255-1256
34. Edwards JT, Hamby JK, Worrall NK. Successful use of argatroban as a heparin substitute during cardiopulmonary bypass: heparin-induced thrombocytopenia in a high-risk cardiac surgical patient. *Ann Thorac Surg* 2003;75:1622-1624
35. Gasparovic H, Nathan NS, Fitzgerald D, Aranki SF. Severe argatroban-induced coagulopathy in a patient with a history of heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Thorac Surg* 2004;78:e89-e91
36. Zwicker JJ, Uhl L, Huang WY, Shaz BH, Bauer KA. Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 2004;2:2133-2137
37. Koster A, Spiess B, Chew DP, et al. Effectiveness of bivalirudin as a replacement for heparin during cardiopulmonary bypass in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 2004;93:356-359
38. Koster A, Dyke CM, Aldea G, et al. Bivalirudin during cardiopulmonary bypass in patients with previous or acute heparin-induced thrombocytopenia and heparin antibodies: results of the CHOOSE-ON trial. *Ann Thorac Surg* 2007;83:572-577
39. Koster A, Yeter R, Buz S, et al. Assessment of hemostatic activation during cardiopulmonary bypass for coronary artery bypass grafting with bivalirudin: results of a pilot study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:1391-1394
40. Veale JJ, McCarthy HM, Palmer G, Dyke CM. Use of bivalirudin as an anticoagulant during cardiopulmonary bypass. *J Extra Corpor Technol* 2005;37:296-302
41. Zucker ML, Koster A, Prats J, Laduca FM. Sensitivity of a modified ACT test to levels of bivalirudin used during cardiac surgery. *J Extra Corpor Technol* 2005;37:364-368
42. Potzsch B, Klovekorn WP, Madlener K. Use of heparin during cardiopulmonary bypass in patients with a history of heparin-induced thrombocytopenia. *N Engl J Med* 2000;343:515
43. Selleng S, Lubenow N, Wollert HG, Mullejans B, Greinacher A. Emergency cardiopulmonary bypass in a bilaterally nephrectomized patient with a history of heparin-induced thrombocytopenia: successful reexposure to heparin. *Ann Thorac Surg* 2001;71:1041-1042
44. Verma AK, Levine M, Shalansky SJ, Carter CJ, Kelton JG. Frequency of heparin-induced thrombocytopenia in critical care patients. *Pharmacotherapy* 2003;23:745-753
45. Warkentin TE, Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2003;76:2121-2131
46. Pouplard C, May MA, Iochmann S, et al. Antibodies to platelet factor 4-heparin after cardiopulmonary bypass in patients anticoagulated with unfractionated heparin or a low-molecular-weight heparin: clinical implications for heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 1999;99:2530-2536
47. Lewis BE, Wallis DE, Berkowitz SD, et al. Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Circulation* 2001;103:1838-1843
48. Koster A, Buz S, Hetzer R, Kuppe H, Breddin K, Harder S. Anticoagulation with argatroban in patients with heparin-induced thrombocytopenia antibodies after cardiovascular surgery with cardiopulmonary bypass: first results from the ARG-E03 trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:699-700
49. Beiderlinden M, Treschan TA, Gorlinger K, Peters J. Argatroban anticoagulation in critically ill patients. *Ann Pharmacother* 2007;41:749-754

抗血栓薬の抵抗性と遺伝子

宮田茂樹¹、宮田敏行²、嘉田晃子³、山本晴子⁴、長束一行⁵MIYATA Shigeki, MIYATA Toshiyuki, KADA Akiko, YAMAMOTO Haruko, NAGATSUKA Kazuyuki
国立循環器病センター ¹輸血管理室, ²研究所病因部, ³臨床研究センター, ⁴臨床研究開発部, ⁵内科脳血管部門

ワルファリンの必要投与量に、その標的酵素であるビタミン K エポキシド還元酵素や代謝酵素の遺伝子多型が関与していることが指摘されている。また、抗血小板薬が投与されているが、それらの血小板機能抑制効果が低い（抵抗性）患者群の存在が指摘され、抵抗性を示す患者群は、抗血小板薬感受性を示す患者群と比較して、心血管イベントの発生頻度が増加するとの報告が相ついでいる。一因として、標的蛋白や代謝酵素の遺伝子多型の関与も指摘されている。今後、患者個々に適した薬剤や、投与量を決定しようとする試み、すなわち個別化医療に結びつく可能性がある。

Key Words

抗血栓薬、ワルファリン投与量、アスピリン抵抗性、クロビドグレル抵抗性、遺伝子多型

はじめに

不安定粥腫の破綻を契機として形成される動脈血栓症を、アテローム血栓症としてとらえ、脳梗塞や心筋梗塞などを包括した概念として検討することが提唱されている。生活水準の向上による高齢化や生活習慣病の蔓延により、アテローム血栓症の克服が、ますます重要なテーマとなっている。実際、世界保健機構（WHO）の報告では、アテローム血栓症は世界の死因の約 3 割を占める人類最大の疾患となっている。アテローム血栓症に対する最も基本的な薬物療法が、抗血小板療法である。また、高齢化に伴う心房細動などにより血流が鬱滞し、それに内皮機能障害を伴うことによって発症する心原性脳梗塞の予防、また、弁置換術後患者、とくに機械弁を用い

た場合には、抗凝固療法は不可欠となる。しかしながらこれら薬物による抗血栓療法は、出血など重篤な副作用を引き起こす可能性があり、最大限に効果的かつ副作用を抑制できる治療方法の選択が、重要課題となっている。

そのために、これら抗血栓薬について、患者個々に適した薬剤や、その投与量を決定しようとする試み、逆に、患者に適さない薬剤や投与量の抽出（いわゆる抵抗性の定義）をおこなおうとする試みがなされており、今後、テーラーメイド（個別化）医療に結びつく可能性がある。

本稿では、現時点で最も代表的な抗凝固薬であるワルファリン、抗血小板薬であるアスピリンならびにクロビドグレルについて、遺伝子多型の情報も含めた個別化医療に向けた検討について、その概要を述べる。

表① 日本人のアレル頻度を用いた VKORC1/CYP2C9 遺伝型の推定 (国留でタイピングした頻度をもとに計算した)

		VKORC1		
		ワルファリン VKORC1	多い Non-A/ Non-A	少ない Non-A/A A/A
ワルファリン	CYP2C9	genotype frequency	0.008	0.164
多い	*1/*1	0.936	0.008	0.154
	*1/*3	0.063	0.001	0.010
少ない	*3/*3	0.001	0.000	0.000

日本人の 78% は VKORC1 A と CYP2C9 野生型をもつ
日本人の 5% は VKORC1 A と CYP2C9 *1/*3 をもつ
日本人の 15% は VKORC1 ヘテロと CYP2C9 野生型をもつ

1 ワルファリン投与量の個人差にかかわる遺伝子多型

近年、ファーマコゲノミクスが目ざされ、個別化医療という言葉も現実味を帯びてきている。個人に適した治療を目指した研究が進められ、とくに遺伝子型にもとづいた薬物療法の選択や投与量の調整がおこなわれようとしている。このファーマコゲノミクスの最先端をいくのがワルファリンと遺伝子型の研究である。

ワルファリン投与患者では、その効果を PT-INR (Prothrombin Time-International Normalized Ratio: プロトロンビン時間-国際標準化比) などでモニタリングしながら投与量を調節し、治療をおこなっている。しかしながら、その投与量は、各個人によってかなりのばらつきがある。ワルファリンの代謝酵素である CYP2C9 の遺伝子多型がワルファリン反応性の個人差を説明するものとして以前から報告されていた。しかし、白人より少量のワルファリンでコントロールできる傾向にある日本人は、CYP2C9 の活性を下げる多型の頻度が白人より少ないことから、CYP2C9 だけではワルファリンの反応性がうまく説明できなかった。

2004 年に、二つのグループがワルファリンの標的酵素であるビタミン K エポキシド還元酵素 (vitamin K epoxide reductase complex subunit 1: VKORC1) をクローニングした。多型解析から、本酵素の多型がきわめて強くワルファリン必要量と関連することが明らかとなった。多くの研究から、ワルファリンの個人差の約 30% が

VKORC1 多型、約 10% が CYP2C9 多型、約 15% が年齢、性別、併用薬などで説明される。しかし、なお残りの 45% 程度は、これらの因子では説明できていない¹⁾。

日本人における抗凝固作用は白人にくらべ少量のワルファリンで維持される傾向にある。この一因として、白人の VKORC1 遺伝子では、酵素活性の高いアレルの頻度が日本人にくらべて高いので、VKORC1 蛋白質が多く発現し、その活性を阻害するためには、多くのワルファリンが必要であると考えられる。表①に日本人の VKORC1 と CYP2C9 の遺伝子多型頻度を示した。ワルファリン量は両遺伝子の多型の組み合わせで影響を受けるが、日本人の約 78% は同一の遺伝子型 (VKORC1 A/A と CYP2C9 *1/*1) を保有している。このことより、日本人のワルファリン維持量の個人差は比較的少ないと推定される。しかし、頻度は低い (約 1%) ながらも、大量のワルファリンを必要とする日本人 (VKORC1 Non-A/Non-A と CYP2C9 *1/*1) もいる (表①)。反対に、きわめてまれであるが、VKORC1 A/A と CYP2C9 *3/*3 の保有者は、少ないワルファリン量で維持できると考えられる。こういった患者では、過剰投与により出血が起こらないように十分な注意が必要であると思われる²⁾。

206 名のワルファリン導入時において、ファーマコゲノミクス (PG) を用いて遺伝子情報により投与量を決定する方法と従来法を比較検討し、3 ヶ月間 PT-INR をフォローした報告がある³⁾。これによると、PG 法はワルファリン量の変更が少なく、その変更量も小幅だった。しかし、PT-INR が治療域をはずれるケースは PG 法

30.7%, 従来法 33.1% で二つの方法に差はみられなかった。ワルファリン導入時に遺伝型の情報を有効に用いることを目指した論文が発表された。297 名のワルファリン導入時の PT-INR を調べ、PT-INR がはじめて治療域に入るまでの日数を遺伝型に分けて調べたところ、VKORC1 多型がこの日数に大きく影響を与え、CYP2C9 多型は影響しなかった⁴⁾。治療域に入るまでの平均日数は、Non-A/Non-A 型 15 日、Non-A/A 型 11 日、A/A 型 7 日であり、A/A 型の患者は有意に治療域への移行が早かった。日本人には Non-A/Non-A 型は 1% しかみられず、日本人の 80% は A/A 型であるので、日本人は治療域への移行が容易である患者が多いことになる。ワルファリン初回導入時のワルファリン量を推定するアルゴリズムが公開されており (<http://www.warfarindosing.org>)、また投与 3 日後に投与量を補正するアルゴリズムも発表されている⁵⁾。

今後、ワルファリンの個人の反応性にかかわる遺伝子型を、臨床的に有効に応用する試みが増加してくるものと思われる。われわれも、「ワルファリン至適用量に対する遺伝子多型と食事の影響の検討: The Study on the Contribution of Genetic Factors or Dietary Vitamin K Intake to Individual Warfarin Dosage (Godward Study)」を開始し、わが国におけるワルファリンの個別化医療実施可能性について、検討をおこなっている。

2 アスピリン抵抗性 (aspirin-resistance)

アスピリンは、心筋梗塞や脳梗塞などのアテローム血栓症の予防薬として、最も多用されている抗血小板薬である。血栓症のハイリスク患者をランダムに割り付けた試験のメタアナリシスでは、アスピリン投与群 (29,652 名) の 2 年間の追跡期間中のイベント (心筋梗塞、脳梗塞、致死性血管傷害) 発生率は 12.9% であり、非投与群 (29,743 名) では 16.0% であったと報告されている⁶⁾。したがって、この差である 3.1% がアスピリンの二次イベントの発症抑制効果と考えられる。このように、大規模なメタアナリシスにより、その有効性が示されているものの、この結果から、アスピリンを服薬しても、ハイリスク患者の 8 人に 1 人 (12.9%) は 2 年間でイベントを再発していることとなる。発症の原因としていくつか

表② 検査学的アスピリン抵抗性の頻度 (42 の研究のメタ解析)
(Hovens MM *et al* 2007⁷⁾より引用)

測定法	全体	対象疾患	用量
全体	23.8 (19.5~28.0)	27.1 (21.5~32.6)	
測定法			
PFA-100	28.1 (22.2~33.9)	29.0 (23.1~34.8)	
RPFA	18.9 (12.1~25.8)	26.2 (18.6~33.9)	
LTA	15.4 (7.8~23.0)	21.3 (15.1~27.5)	
Rest	35.0 (6.0~64.0)	31.8 (21.8~42.0)	
対象疾患			
CAD	22.4 (17.5~27.4)	22.9 (17.0~28.7)	
Stroke	26.0 (16.3~35.7)	32.1 (22.4~41.8)	
Rest	27.3 (9.5~45.1)	26.3 (16.5~36.0)	
用量			
≤100 mg	27.1 (18.7~35.6)	35.6 (28.1~43.2)	
101~299 mg	29.6 (21.8~37.5)	28.2 (20.9~35.6)	
≥300 mg	21.7 (11.8~31.7)	18.6 (11.3~26.0)	
Unknown	19.8 (10.7~28.9)	25.8 (16.2~35.4)	

アスピリンレジスタンスの測定に使用された測定法、対象疾患、用量に分けてアスピリンレジスタンスの頻度を求めた。PFA-100 と RPFA は、測定に用いた機種 (本文参照)。LTA: 血小板凝集能の濁度法。95% CI: 95%信頼区間
*測定法、対象疾患、用量で補正した

の要因が考えられるが、その一因として、アスピリンに代表される抗血小板薬はワルファリンとは異なり、モニタリングをおこなわず、一定量で投与されることが多いため、アスピリンの効果に個人差が認められることが指摘されている。これらアスピリンの効果を生小板凝集能やトロンボキサン代謝産物量などを用いて評価し、アスピリンを服薬しているにもかかわらず、血小板機能抑制効果が弱い患者群をアスピリン抵抗性 (aspirin-resistance) と定義し、その頻度や意義について検討した報告が増加している。実際、さまざまな *in vitro* もしくは *ex vivo* 測定系を用いて評価しアスピリン抵抗性を定義した、いわゆる検査学的アスピリン抵抗性の頻度に関して、42 の試験を集めておこなわれたメタアナリシスの結果が報告されている⁷⁾。表②にその結果を示した。用いられた血小板機能評価法は、ざり応力下での血小板凝集能を測定する PFA-100、フィブリノーゲンが固相化された使い捨てタイプのカートリッジを用いる rapid platelet functional assay (RPFA)、古典的な血小板凝集法 (LTA) などである。メタアナリシスの結果では、これらの測定法

表⑨ 検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発（臨床学的アスピリン抵抗性）との関連、メタアナリシス (Snoep JD *et al* 2007¹⁰⁾より引用)

研究	検査学的アスピリン抵抗性 (%)	アスピリン投与 (%)	アスピリン投与なし (%)	オッズ比 (95% CI)	P値
Grotemeyer <i>et al</i> , 1993 (180)	60 (33)	24/60 (40)	5/114 (4)	14.5 (5.2~40.9)	<0.001
Buchanan <i>et al</i> , 2000 (289)	158 (55)	15/158 (10)	9/131 (7)	1.4 (0.6~3.4)	0.42
Andersen <i>et al</i> , 2002 (71)	25 (35)	9/25 (36)	11/46 (24)	1.8 (0.6~5.2)	0.28
Elkelboom <i>et al</i> , 2002 (448 cases, 488 controls)	NR	NR	NR	1.8 (1.2~2.9)	0.01
Grundmann <i>et al</i> , 2003 (35 cases, 18 controls)	12 (23)	12/35 (34)	0/18 (0)	6.8 (1.8~26.2)	0.004
Gum <i>et al</i> , 2003 (326)	17 (5)	4/17 (24)	30/309 (10)	2.9 (0.9~9.3)	0.09
Cotter <i>et al</i> , 2004 (73)	21 (29)	6/21 (29)	3/52 (6)	6.5 (1.5~29.3)	0.01
Cheng <i>et al</i> , 2005 (422)	113 (27)	NR	NR	2.9 (1.5~5.7)	0.002
Pamukcu <i>et al</i> , 2008 (105)	20 (19)	9/20 (45)	10/85 (12)	8.1 (2.0~18.5)	<0.001
Stejskal <i>et al</i> , 2006 (103)	57 (55)	50/57 (88)	21/46 (46)	8.5 (3.2~22.7)	<0.001
Mueller <i>et al</i> , 1997 (100)	65 (65)	8/65 (12)	0/35 (0)	10.5 (0.6~187.5)	0.048
Ziegler <i>et al</i> , 2002 (52)	5 (10)	0/5 (0)	13/47 (28)	0.2 (0.0~4.5)	0.31
Yilmaz <i>et al</i> , 2005 (14 cases, 14 controls)	8 (29)	7/14 (50)	1/14 (7)	13.0 (1.3~128.1)	0.03
Poston <i>et al</i> , 2006 (225)	22 (10)	4/22 (18)	12/203 (6)	3.5 (1.0~12.1)	0.06
Chen <i>et al</i> , 2004 (151)	29 (19)	15/29 (52)	30/122 (25)	3.3 (1.4~7.6)	0.004
Lav <i>et al</i> , 2006 (150)	19 (13)	7/18 (39)	23/126 (18)	2.9 (1.0~8.1)	0.045

*分子：心血管系疾患イベント発症者数。分母：対象患者数

で求めた検査学的アスピリン抵抗性の頻度は24% (95%信頼区間：20~28%)であり、測定方法、対象疾患、アスピリンの用量で補正した頻度は27% (95%信頼区間：22~33%)であった。また、補正後では、100 mg以下のアスピリン投与でのアスピリン抵抗性の頻度は36%、300 mg以上の投与では19%であった。測定法でもアスピリン抵抗性の頻度に大きな違いがみられており、アラキドン酸惹起血小板凝集能ではその頻度は6%であったものの、PFA-100やRPF Aを用いた場合は、それぞれ28%および19%であったと報告されている。

これらの検査学的アスピリン抵抗性が、実際どのような臨床的意義をもつかについても検討がなされている。アスピリンを服薬しているにもかかわらず血栓塞栓症を発症した患者群を臨床的アスピリン抵抗性と定義し、上述した検査学的アスピリン抵抗性が、臨床的アスピリン抵抗性のリスク因子であるとの報告⁹⁾がなされている。

表⑨に、2007年に発表された検査学的アスピリン抵抗性と心血管系疾患の再発（臨床的アスピリン抵抗性）との関連を検討したメタアナリシスの結果を示す¹⁰⁾。この解析では16の試験のデータを用いている。これらの結果をまとめると、そのオッズ比は3.8 (95%信頼区間：2.3~6.1)であり、アスピリン服薬患者において、血小板の機能が効果的に抑制されていない患者では、効果的に抑制されている患者にくらべ、心血管系疾患の再発率が高いことが示唆される。2008年にも同様のメタアナリシスの結果が報告¹¹⁾されている。心筋梗塞、急性冠症候群、脳梗塞、経皮的冠動脈形成術 (percutaneous coronary intervention: PCI)、冠動脈バイパス術、血管疾患に対して二次予防としてアスピリンを投与された患者に対するアスピリン抵抗性を検討した20試験に対するメタアナリシスであり、アスピリン投与量は75 mg/日から325 mg/日であった。用いられた血小板機能検査でアスピリ

表④ アスピリン抵抗性のメカニズム

(De Gaetano G *et al* : Aspirin resistance : a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost* 1 : 2048-2050, 2003より引用)

1. アスピリンのバイオアベイラビリティ
 - 服薬不全、
 - アスピリン投与量の不足、
 - salicylate の蓄積によるアスピリンの COX-1 結合部位への結合の妨害
 - 非ステロイド性抗炎症薬の同時服用によるアスピリンの効果の妨害
 - プロトンポンプ阻害薬によるアスピリンのバイオアベイラビリティの減少
2. 血小板機能
 - 血小板の代謝によるアスピリンにさらされていない新しい血小板の血中への出現
 - 新しく形成された血小板中の COX-2 の発現量の違い
 - ADP とコラーゲンへの血小板感受性の増強
3. 遺伝子多型
 - 血小板コラーゲン受容体の遺伝子多型
 - COX-1, COX-2, TXA₂合成酵素, アラキドン酸代謝酵素の遺伝子多型
 - 血小板フィブリノーゲン受容体 GP IIb/IIIa 遺伝子多型
 - 1. 低用量アスピリンによる FXIII 活性化の阻害の差異につながる FXIII Val34Leu 遺伝子多型
4. 他の血球細胞や細胞由来産物と血小板の相互作用
 - 赤血球による血小板活性化の不十分な阻害
 - アスピリン処理された血小板と血管細胞の間におこるアラキドン酸代謝の細胞間の移動
 - 単球-マクロファージ由来 TXA₂
 - 血小板 TXA₂の制御として COX-1/COX-2 で生成する PGI₂ もしくは血管の TPA の放出
5. 他の因子
 - 過度の運動や心理的ストレスによるノルエピネフリン量の増加
 - 喫煙
 - 酸化ストレスとアラキドン酸非酵素的な過酸化によって生成する活性をもつ 8-iso-PGF_{2α} の生成
 - アスピリンとアセチルコリンによって生じる一酸化窒素 (NO) の抗血小板作用と血管拡張作用の相互作用

ン抵抗性と分類された患者が全体の 28%で、そのなかの 39%で心血管イベントが発生した。一方、アスピリンに対して感受性を示した患者では、心血管イベントの発生率は 16%であったと報告され、アスピリン抵抗性群における心血管イベント発生のオッズ比は、3.85 (95%信頼区間：3.08~4.80) であった。

アスピリンは、プロスタグランジンの生合成を阻害することにより薬理学的作用を発揮する。プロスタグランジンの生合成は、ホスホリパーゼ A が膜リン脂質からアラキドン酸を生成することではじまる。このアラキドン酸はプロスタグランジン (PG) H 合成酵素により PGG₂ に変換され、さらに同酵素の過酸化酵素作用により PGH₂となる。この PGH 合成酵素はシクロオキシゲナーゼ (COX) ともよばれ、COX-1 と COX-2 が知られる。

アスピリンは、COX-1 の Ser529 をアセチル化し活性中心のコンホメーション変化を起こし、基質であるアラキドン酸への結合が阻害され、その結果 PGH₂産生を抑制する。アスピリンの COX-1 の阻害効果は COX-2 の阻害より約 170 倍強い。このように、アスピリンはトロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制する。

アスピリン抵抗性の原因として、血小板活性化経路は、トロンボキサン依存経路だけでなく、カテコールアミン、トロンビン、adenosine diphosphate (ADP) といった刺激による血小板活性化経路など、さまざまにその活性化が制御されているため、トロンボキサン依存性の血小板活性化を抑制しても、血小板活性化経路の一部を抑制しているに過ぎないことが考えられる。それ以外にも、現時点で、さまざまなアスピリン抵抗性のメカニズムが指

摘されている(表①)。

それらのなかで、健康人や心血管系疾患患者を対象にして、検査学的アスピリン抵抗性と遺伝子多型、とくに COX-1 遺伝子多型との関連についても報告されている^{12)~14)}。また、ADP 受容体である P2Y₁₂ の遺伝子多型とアスピリン服用後の残存アラキドン酸惹起血小板凝集能との関連について指摘されている¹⁵⁾。

わが国においても、アスピリン抵抗性に関する優れた研究が発表されている¹⁶⁾。これによると、アスピリン服薬患者のコラーゲン惹起血小板凝集能を四分位 (quartile) に分けると、凝集能が最も残存している群は、他の群より有意にイベント発症が高かった (ハザード比=8) と報告されている。われわれも、脳梗塞/一過性脳虚血発作ならびに急性冠症候群に対する二次予防としてアスピリン投与を受けている患者群を対象に、わが国におけるアスピリン抵抗性の頻度、その予後ならびに遺伝子背景を明らかにするために、多施設共同前向き観察研究「アスピリン抵抗性の実態ならびにその遺伝子背景に関する研究 (The Study on Profile and Genetic factors of Aspirin Resistance: ProGEAR study) を実施し、患者登録を完了している。今後、登録後 2 年間の臨床イベントを追跡し、わが国においてアスピリン抵抗性が臨床的意義をもつかどうか、もつとしたら、どのような測定系 (遺伝子背景を含めて) が臨床的アスピリン抵抗性を最適に反映できるのかどうか、検討をおこなう予定である。

アスピリン抵抗性に対する対応策として、検査学的アスピリン抵抗性を示した患者に対して、他の抗血小板薬に変更することにより予後が改善する可能性がある¹⁷⁾。実際このようなコンセプトにもとづいた介入試験¹⁸⁾が実施されており、検査学的アスピリン抵抗性を示す患者に対して、他の抗血小板薬に変更することで患者予後が改善することがこのような介入試験で証明されれば、抗血小板療法の個別化が現実味を帯びてくると思われる。

3 クロピドグレル抵抗性

チエノピリジン (Thienopyridine) 化合物であるクロピドグレルは、ADP 受容体 P2Y₁₂ を特異的に阻害することで、血小板凝集を抑制する。薬物そのものには抗血小板作用はなく、肝臓で代謝され活性化体となってはじめて抗血小板作用を発揮するプロドラッグである。

クロピドグレルについても、その血小板機能抑制効果にかなりの個人差があることが指摘されている¹⁹⁾²⁰⁾。その測定には、古典的な血小板凝集計を用いた ADP 惹起血小板凝集、ずり応力下での血小板凝集能を測定する PFA-100、フィブリノーゲンが固相化された使い捨てタイプのカートリッジを用いる RPEA、さらに特異的にクロピドグレルによる P2Y₁₂ 受容体抑制効果を測定可能な vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) のリン酸化を測定する方法などが用いられている。それら検討の結果が多数報告されており、測定方法によって異なるものの、検査学的クロピドグレル抵抗性、すなわちクロピドグレルを投与されているが、血小板機能が効果的に抑制されていない患者の頻度は 5% から 44% の幅であった¹⁹⁾²⁰⁾。

これら検査学的クロピドグレル抵抗性と心血管系疾患の再発 (臨床的クロピドグレル抵抗性) との関連を検討した研究についても近年、その報告が増加している¹⁹⁾²⁰⁾。待機的 PCI をおこなった 379 症例について、クロピドグレル導入後、70% を超える ADP 惹起血小板凝集が残存している患者群では、70% 以下に抑制されている患者群と比較して、PCI 実施 3 ヶ月後までの心血管イベントが有意 (オッズ比: 4.9, 95% 信頼区間: 1.66~14.96) に多く、心血管イベントに関係している因子に対して調整をおこなった後も、クロピドグレルに対する低反応性は、独立した危険因子であったと報告²¹⁾されている。急性 ST 上昇型心筋梗塞でプライマリ PCI を予定している連続 60 症例について検討 (全員アスピリン投与継続され、クロピドグレルは 3 ヶ月間服薬された) した報告²²⁾がなされている。ADP 凝集の結果で患者群を四分位 (quartile) に分けた (1 群: 103% ± 8%, 2 群: 69% ± 3%, 3 群: 58% ± 7%, 4 群: 33% ± 12%)。6 ヶ月のフォローアップ期間中に 7 名が心血管イベントを発症し、そのうち 6 名は 1 群 (クロピドグレル抵抗性群) に属し、残り 1 名は 2 群に属した。3 群ならびに 4 群には発症者はいなかった ($p=0.007$)。非 ST 上昇型急性冠症候群で PCI をおこなった 292 症例において、クロピドグレル導入後において 70% を超える ADP 惹起血小板凝集が残存していることが、1 ヶ月後までの心血管イベントに対し、唯一独立したリスク因子であったと報告²³⁾されている。さらに、クロピドグレル抵抗性に対し、治療介入することで患者予後に改善がみられるかどうかに関する多施設共

同ランダム化比較試験が報告²⁴⁾されている。PCIを実施する406症例のなかで、クロピドグレル600mgのloading doseで投与後、VASP指数を測定し、50%を超える(すなわちクロピドグレルによるP2Y₁₂受容体抑制効果が弱い)患者162症例を無作為に割り付け、VASP-guided群(78症例)は、VASP指数が50%以下に低下するまで、最大3回24時間ごとにクロピドグレル600mgが追加投与され、その後PCIが実施された。コントロール群(84症例)は、クロピドグレルの追加投与なしにPCIが実施された。その結果、PCI後1ヵ月までのフォローアップ期間に、心血管イベントは有意にVASP-guided群で、コントロール群と比較して少なかった(0% vs 10%, $p=0.007$)。これらの報告は、症例数が少ない検討であり、今後更なるデータの蓄積が望まれる。

現時点で指摘されているクロピドグレル抵抗性のメカニズムを表●に示す。これらの原因のなかで、クロピドグレル抵抗性に対する遺伝子多型の関与について検討した結果も報告されている。

健康人にクロピドグレルを服用させ、ADP惹起血小板凝集やVASPのリン酸化といった指標を用いてクロピドグレルの効果を評価し、これに関する個人差を説明する遺伝子多型が、候補遺伝子を対象に探索された。ADP凝集が十分に抑制されない遺伝的背景として、ADP受容体であるP2Y₁₂、P2Y₁、血小板膜受容体GP1a、プロドラッグであるクロピドグレルの活性化体への変換に関与するCytochrome P450であるCYP3A4、CYP3A5、CYP2C19の多型が報告された。これらはいずれも小規模な研究であったので、他の集団を用いて確認する必要がある。そこで、クロピドグレルとアスピリンを併用した1,419名の心筋梗塞患者を対象にADP凝集能とアラキドン酸凝集能を測定し、CYP3A4、CYP2C19、P2Y₁₂の多型を調べた研究がイタリアから報告された²⁵⁾。この三つの遺伝子のなかでCYP2C19の多型のみがADP凝集に強く関連を示した。この多型は、スプライス異常を生じる681G>Aであり、CYP2C19*2として知られている。本変異のAアレル保有者はADP凝集能が高く、その凝集能はアレル数に依存していた。また、この効果は弱いながらアラキドン酸凝集能にも関連を示した。以前の報告で関連がみられたCYP3A4とP2Y₁₂の多型は、本研究ではADP凝集能と関連を示さなかった。フランスの報告では、CYP3A4、CYP3A5、CYP2C19の多型を検討し、

表● クロピドグレル抵抗性のメカニズム
(De Miguel A et al 2008²⁶⁾より引用)

1. クロピドグレルのバイオアベイラビリティ
 - 服薬不全
 - クロピドグレル投与量の不足
 - 吸収不全
 - Cytochrome P450 3As に対する薬剤相互作用
2. 遺伝子多型
 - P2Y₁₂ 遺伝子多型
 - Cytochrome P450 3As の遺伝子多型
 - GP1a の遺伝子多型
 - 2. GP11b/IIIa の遺伝子多型
3. ADP 放出の増加
4. P2Y₁₂ 受容体の増加
5. 治療前の血小板活性化病態
 - 急性冠症候群
 - 糖尿病/インスリン抵抗性
 - 高い body mass index
6. P2Y₁₂ に依存しない血小板刺激伝達系の亢進
7. P2Y₁₂ に依存しない血小板刺激伝達系の亢進
 - トロンピン
 - トロンボキサン A₂
 - コラーゲン
 - エピネフリン
8. 血小板 turn-over の亢進

この研究でもCYP2C19の多型だけが関連を示す結果となった²⁵⁾。この研究では、クロピドグレルとアスピリンの併用療法をおこなっている急性冠症候群患者603名を対象にADP凝集、VASPのリン酸化、血小板表面へのPセレクトインの発現を調べた。CYP2C19*2はこれらいずれの測定値に対しても強い関連を示し、CYP2C19*2変異保有者ではADP惹起血小板凝集能が残存する結果となった。これらの報告を総合すると、クロピドグレル服用者の抗血小板作用のモニターとしてADP惹起血小板凝集を用いてクロピドグレル抵抗性を評価すると、CYP2C19多型がクロピドグレルの効果に関連を示す。クロピドグレルはプロドラッグであり、おもにCYP2C19を通して活性化体へ変換され、活性化体がP2Y₁₂のCys97を修飾し、P2Y₁₂が膜脂質ラフトから離れることによりADP凝集が抑制される²⁷⁾。このように、CYP2C19がクロピドグレルの活性化体への変換反応に大きく関わっている可能性が考えられた。

日本人を対象としたクロピドグレルの効果と遺伝子多型に関する研究はこれまでのところみつからない。CYP2C19の多型頻度に関しては、日本人を対象に詳しく

表⑥ 日本人の CYP2C19 遺伝型のアレル頻度 (国立食品薬品衛生研究所でタイピングした 253 人から得られた頻度)

クロピドグレルへの反応性		よい		悪い	
CYP2C19	CYP2C19	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
	*1*2				
クロピドグレルへの反応性	CYP2C19	genotype frequency	0.5378	0.3912	0.0712
	*1*3				
よい	*1/*1	0.7596	0.41	0.30	0.05
	*1/*3	0.2239	0.12	0.09	0.02
悪い	*3/*3	0.0165	0.01	0.01	0.00
CYP2C19*2, *3 は酵素ができない アレル	CYP2C19	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
	白人での頻度	0.71	0.27	0.03	

日本人はクロピドグレルを活性化体へ変換する CYP2C19 量が少ないヒトが多い。

調べられており、多くの論文が発表されている。なかでも、国立医薬品食品衛生研究所がミレニアムゲノムプロジェクトの一環としておこなった多型頻度に関する研究は、日本人 253 名を対象とし、ハプロタイプの構築までおこなっており、日本人の CYP2C19 の変異研究の集大成である²⁰⁾。これによると CYP2C19*2 のアレル頻度は 0.267、*3 のアレル頻度は 0.128 である。*2 は先ほども紹介したようにスプライス異常変異であり、*3 は停止コドンとなるナンセンス変異である。ともに、蛋白質に重大な影響を与える。両変異の頻度をもとに計算すると、日本人の約 40% しか CYP2C19 の野生型をもたないことが理解されよう(表⑥)。日本人の約 1 割は、CYP2C19 をまったく発現しない*2 のホモ体もしくは*3 のホモ体である。白人では CYP2C19*2 のアレル頻度は 0.16 であり*3 は存在しない。したがって、日本人は CYP2C19 を欠損する遺伝型を高頻度に保有すると理解されている。

おわりに

ここまで、抗血栓薬の抵抗性について、テーラーメイド(個別化)医療実施の可能性の観点から述べてきたが、これら薬剤抵抗性に関しては、いまだ臨床的に受け入れられているとはいえない²⁰⁾²⁹⁾。その大きな理由として、*in vivo* における血小板機能を鋭敏に反映する *in vitro* もしくは *ex vivo* 血小板機能測定系はいまだ確立されておらず、普遍的に認められた診断上のカットオフ値の設定

できないため、これら薬剤抵抗性の診断基準が確立できていないことが指摘されている。また、抗血栓薬に限らず、どんな薬剤でもすべての患者に有効であるわけではない。したがって、薬剤抵抗性と定義せずに "treatment failure" (治療不成功) とすべきで、特別な疾患として分類する必要はないとも指摘されている。さらに、薬剤服薬のコンプライアンスを確認する必要があること、また、血栓症は、血小板機能のみに依存するのではなく、さまざまな要因に依存すること、抗血小板薬は血小板凝集にかかわる刺激伝達系のたった一つの経路を抑えるに過ぎないことなどの理由で、抗血小板薬に過大な期待をもつこと自体が誤りであることも指摘されている。したがって、現時点では血小板機能を測定して、その結果をもって抗血小板療法に介入することを臨床現場でおこなうべきではないことを、強調しておきたい。今後、われわれが実施している研究も含めて、更なる検討が進められ、今後、個別化医療により、さらに有効で安全な抗血栓療法が確立されることを期待したい。

【謝辞】

この論文の成果の一部は、厚生労働科学研究費補助金および(独)医薬基盤研究所保健医療分野における基礎研究推進事業でおこなった。

●文 献●

- 1) Yin T et al: Warfarin dose and the pharmacogenomics of CYP2C9 and VKORC1—rationale and perspectives. *Thromb*

- Res 120 : 1-10, 2007
- 2) Fukuda T *et al* : Warfarin dose requirement for patients with both *VKORC1* 3673A/A and *CYP2C9* *3/*3 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 80 : 553-554, 2006
 - 3) Anderson JL *et al* : Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 116 : 2563-2570, 2007
 - 4) Schwarz UI *et al* : Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 358 : 999-1008, 2008
 - 5) Millican EA *et al* : Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 110 : 1511-1515, 2007
 - 6) Antithrombotic Trialists' Collaboration : Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324 : 71-86, 2002
 - 7) Hovens MM *et al* : Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin : a systematic review. *Am Heart J* 153 : 175-181, 2007
 - 8) Eikelboom JW *et al* : Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 105 : 1650-1655, 2002
 - 9) Gum PA *et al* : A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41 : 961-965, 2003
 - 10) Snoep JD *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* 167 : 1593-1599, 2007
 - 11) Krasopoulos G *et al* : Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity : systematic review and meta-analysis. *BMJ* 336 : 195-198, 2008
 - 12) Halushka MK *et al* : Genetic variation in cyclooxygenase 1 : effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 73 : 122-130, 2003
 - 13) Marea A *et al* : Glycoprotein IIb/IIIa antagonists in acute coronary syndromes : where are we now? *Semin Vasc Med* 3 : 385-390, 2003
 - 14) Lepantalo A *et al* : Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* 95 : 253-259, 2006
 - 15) Li Q *et al* : Frequency of genetic polymorphisms of *COX1*, *GP IIIa* and *P2Y1* in a Chinese population and association with attenuated response to aspirin. *Pharmacogenomics* 8 : 577-586, 2007
 - 16) Ohmori T *et al* : Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity : involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 4 : 1271-1278, 2006
 - 17) Cheng X *et al* : Aspirin resistance or variable response or both? *Am J Cardiol* 98 : 11N-17N, 2006
 - 18) Pettersen AA *et al* : Unstable angina, stroke, myocardial infarction and death in aspirin non-responders. A prospective, randomized trial. The ASCET (ASpirin non-responsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial) design. *Scand Cardiovasc J* 38 : 353-356, 2004
 - 19) Gurbel PA *et al* : Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 120 : 311-321, 2007
 - 20) De Miguel A *et al* : Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost* 100 : 196-203, 2008
 - 21) Geisler T *et al* : Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 27 : 2420-2425, 2006
 - 22) Matetzky S *et al* : Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 109 : 3171-3175, 2004
 - 23) Cuisset T *et al* : Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 48 : 1339-1345, 2006
 - 24) Bonello L *et al* : Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance : a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 51 : 1404-1411, 2008
 - 25) Giusti B *et al* : Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10+12 G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics* 17 : 1057-1064, 2007
 - 26) Frere C *et al* : Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 101 : 1088-1093, 2008
 - 27) Savi P *et al* : The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 : 11069-11074, 2006
 - 28) Fukushima-Uesaka H *et al* : Genetic variations and haplotypes of CYP2C19 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 20 : 300-307, 2005
 - 29) Cattaneo M : Aspirin and clopidogrel—efficacy, safety, and

the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
24: 1980-1987, 2004

みやた・しげき

宮田茂樹 国立循環器病センター輸血管理室医長

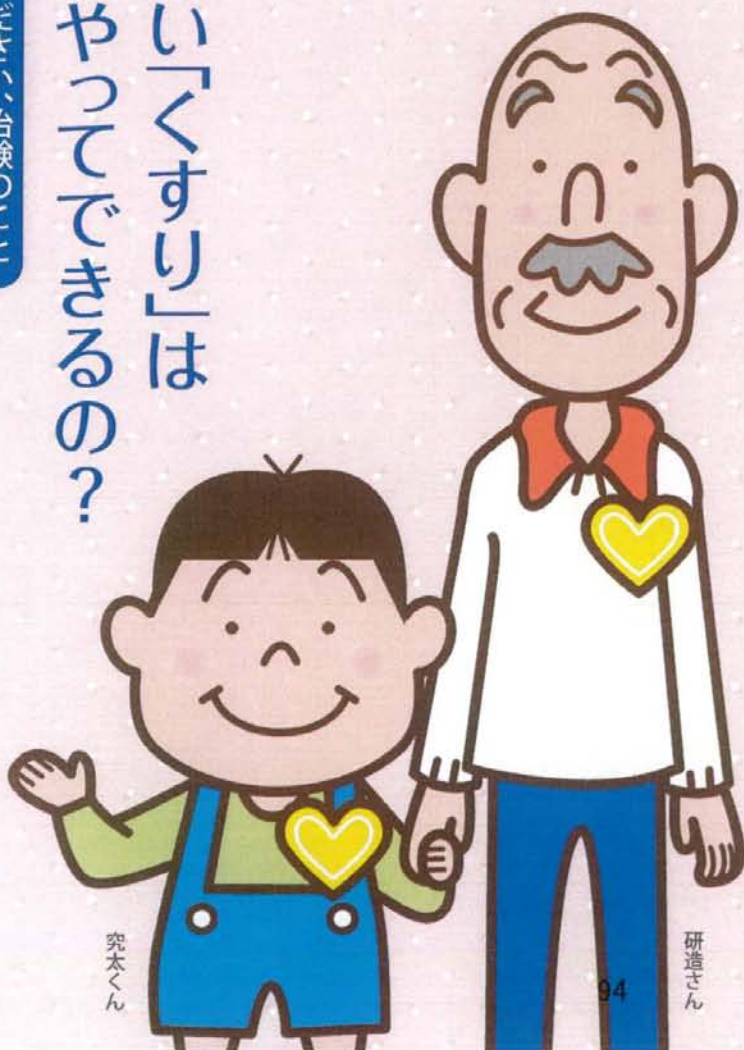
1961年、奈良県生まれ。

奈良県立医科大学小児科入局、同助手。1992年から4年間 The Scripps Research Institute (CA, USA) に留学。2000年から現職。研究テーマは、流動状況下（ずり応力下）血小板血栓形成メカニズム、アスピリンレジスタンス、人工心臓使用手術期間の血小板機能低下のメカニズム、ヘパリン起因性血小板減少症（HIT）など。



知ってください、治験のこと

新しい「くすり」は
どうやってできるの？



究太くん

94

研造さん

新しい「くすり」は どうやって生まれるの？

もくじ



- はじめに ②
- くすりが誕生するまで ③
- 治験とは ④
- 治験のながれ ⑤
- 治験のルール ⑦
- 治験のメリット・デメリット ⑨
- 治験の疑問Q&A ⑪

はじめに



「くすり」は、みなさんの 協力で生まれます。

みなさんも、病氣やケガの時、「くすり」を使いますよね。

「くすり」が進歩することで、これまで治らなかった病氣を治したり、
手術をしなくても治療できるようになってきました。

けれど、今も有効な「くすり」が見つかっていない

病氣がたくさんあり、それらに対する新しい「くすり」を

待ち望んでいる患者さんが数多くいるのです。

新しい「くすり」。

それは、研究者や医師だけでは

つくることができません。

実は、みなさんの協力が必要なのです。

みんなの力で、未来の「くすり」を。



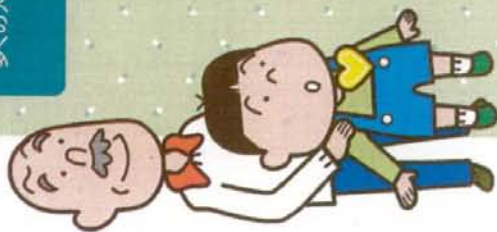
「くすり」は化学合成や植物、土壌中の菌、海洋生物などから発見された物質を「くすりの候補」として研究し、作られています。そして、みなさんが安心して使える「くすり」が誕生するまでには、10年を越える長い歳月と、多くの人たちの力が使われています。

「くすり」が誕生するまで



治療とは

「くすりの候補」を用いて、国の承認を得るための臨床試験のことを「治療（ちけん）」と呼びます。「治療」には3つの段階があり、安全性や有効性を確認しながら進みます。「治療」として実施した結果は、医薬品の承認申請の際、製薬会社が厚生労働省に提出する資料になります。この「治療」に、みなさんの協力が不可欠なのです。



くわしい説明としっかりしたサポートで、治験はすすみます。

治験のながれ

1 お声かけ



参加いただける治験があれば、医師が診察のタイミングにお知らせします。また治験に興味をお持ちの方は、主治医にお伝えください。

2 治験のご説明



治験担当医師やCRC（臨床研究コーディネーター）が、説明します。

参加をお考えの方に、くわしい説明をいたします。この時、治験の目的や検査内容、来院スケジュール、予測される効果や副作用などが書かれた説明書をお渡しします。

3 同意・署名



参加を決めるのは、医師ではなくあなた自身です。

治験の内容を十分に理解し、参加していただける場合は、同意書に署名をお願いします。

4 参加条件の確認



参加条件は、治験ごとに細かく決められています。このため、治験の条件にあうか確認するための診察や検査を行います。検査結果によっては、希望されていない場合もあります。

5 治験開始



期間中に、いくつが検査もおこないます。

治験担当医師の指示による用法・用量で一定期間、治験薬を使用します。治験期間中は、薬の飲み方、生活の仕方など、医師の指示に従っていただきます。

インフォームド・コンセントとは

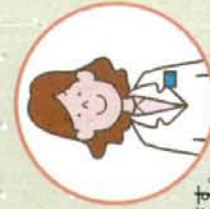
治療の前に、病気のことや治療法について十分な説明を受ける。そして、ご自身で理解・納得したうえで治療を受けることに同意する。この流れを「インフォームド・コンセント」と言います。治験の同意説明では、ふつうの治療の時以上に「インフォームド・コンセント」が重要になります。

こんなことを説明します

- 治験の目的
- 治験の実施方法
- 効果や副作用
- 他の治療方法
- フライバイシーの保護
- 参加を途中でやめられること
- その他

わからないこと、不安なことは、CRCにご相談を。

CRC（臨床研究コーディネーター）は、みなさんと医師の間で橋渡し役をつとめ、治験の中心となるスタッフです。みなさんにご参加いただく治験の内容をご説明（インフォームド・コンセント）したり、質問などにお答えし、医師にはみなさんからの不安や疑問を伝え、治験中のコミュニケーションがスムーズに取れるよう配慮します。CRCの多くは薬剤師や看護師、臨床検査技師などの資格を持った頼りになる専門家。わからないことは、何でもCRCにご相談ください。



CRC

※CRCとはClinical Research Coordinatorの略です。