

図1 凝固の開始反応と増幅反応を介したトロンビン生成

凝固は、血管壁やマイクロパーティクル上の組織因子と血液中のVIIa因子が複合体を形成することにより開始される。詳しくは本文を参照のこと。トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンへと変換するだけでなく、血小板膜上のトロンビン受容体(protease activated receptor: PAR)を介して血小板を活性化させ、血小板血栓形成を惹起する。PL:リン脂質。

分に制御される必要がある。血管損傷の局所にトロンビンの形成を限定するため、血管の内側を覆う血管内皮細胞は、VIIと組織因子の結合を遮断するバリアとして働き、損傷部位以外での凝固の開始を阻止している。

組織因子活性の制御機構

組織因子は凝固を作動させる重要な因子であるため、その活性は巧妙に制御されており、組織因子の発現が確認されてもかならずしも凝固活性がみられるというものではない。組織因子活性の制御として、膜リン脂質の構成成分の重要性があげられる。通常、生体膜のリン脂質二重層は外と内で構成成分が異なる(非対称性とよぶ)。二重層の外側はホスファチジルコリンとスフィンゴミエリンに富み、一方、内側はホスファチジルセリンとホスファチジルエタノールアミンに富む。凝固反応は酸性リン脂質であるホスファチジルセリンを要求するので、内側にあるホスファチジルセリンが何らかの作用で外側に露出する必要がある(「サイドメモ」参照)。ホスファチジルセリンを露出したリン脂質膜にはプロトロンビン、X、IX、VIIと

いった凝固因子がGlaドメインを介して結合し、トロンビン形成反応が効率よく進行する。また、凝固制御因子であるプロテインCとプロテインSもホスファチジルセリンを露出したリン脂質膜に結合し、凝固を抑制する。

組織因子の細胞外領域には2つのジスルフィド結合がある。このうちCys186-Cys209結合はアロステリックなジスルフィド結合といわれ、チオール基をもつ還元型の組織因子は凝固能を示さず、酸化型の組織因子のみがVIIa-組織因子複合体を形成し凝固能を示すといわれている。この酸化還元反応を行うprotein disulfide isomeraseは組織因子活性の発現とフィブリン形成に重要であることが、マウスモデルを用いて示されている²⁾。

病態時での組織因子の発現誘導

敗血症などの感染症に合併したDICの発症にはサイトカインが大きな役割を果たす。単球はエンドトキシン(リポ多糖, LPS)、炎症性サイトカイン(tumor necrosis factor, インターロイキン-1など)、免疫複合体、Pセレクトリン、血小板で活性化され、組織因子を発現する。血管内皮細胞はエ

ンドトキシンやある種の炎症性サイトカインにより組織因子を発現する。このように、敗血症ではエンドトキシンや炎症性サイトカインにより単球や血管内皮細胞に組織因子発現が誘導され、これらの細胞上に発現した組織因子が凝固反応を作動させる。組織因子遺伝子のプロモーター領域には転写因子である AP-1 や NF- κ B が結合する塩基配列があり、これらの配列が組織因子 mRNA の転写誘導に重要な役割を果たしている。また、アテローム性動脈硬化病変の細胞の多くに組織因子が検出されており、これらの組織因子により動脈閉塞性血栓が起こり、虚血性疾患が発症すると考え

られている。

● 組織因子含有マイクロパーティクル

マイクロパーティクルは 0.1~1 μ m の膜断片で、活性化やアポトーシスを起こした血管内皮細胞、単球、血小板の細胞膜から生じる³⁾。マイクロパーティクルの特徴は元の細胞がもつ膜蛋白質を保有している点である。たとえば、血小板由来のマイクロパーティクルは glycoprotein I b を膜上に提示しているし、エンドトキシンなどで刺激を受けた単球から生成するマイクロパーティクルは膜上に組織因子を有する。

マイクロパーティクルのもうひとつの特徴は、凝固促進能をもつホスファチジルセリンがリン脂質二重層の外側に露出している点である。これはマイクロパーティクルが細胞の活性化やアポトーシスにより生じることからも支持される。こういったマイクロパーティクル、とくに組織因子含有マイクロパーティクルの潜在的な凝固能の特性から、血栓性疾患の病態の発症においてマイクロパーティクルが果たす役割がたいへん注目されている。

組織因子含有マイクロパーティクルが関与する血栓形成のメカニズムを図 2 に示した¹⁾。止血に働くマイクロパーティクルは恒常的に低濃度で血中に存在する。この組織因子含有マイクロパーティクルは、自身ももつ P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) を介して、活性化血小板上に発現する接着分子 P セレクチンに結合し、成長している血栓に集積される。この際、血小板上に集積したマイクロパーティクルは自身ももつ組織因子を介して凝固を作動させ、フィブリン塊の形成を促進する。一方、病態下でのマイクロパーティクルも、P セレクチンを発現する活性化血小板に結合し血栓部位に集積し、フィブリン塊の形成を促進する。

図 2 に示した血栓形成のメカニズムはつぎの動物モデルを使った研究から導きだされた。Giesenらはブタ大動脈中膜にヒト血液を灌流し、血栓が組織因子陽性になることを観察した。また彼らは、血小板表面への組織因子陽性の膜ベジクルのクラスタの存在を示し、血中の組織因子が血栓に取

サイド メモ

TMEM16Fはリン脂質スクランブラーゼである

動物細胞の細胞膜二重層は、外側と内側でリン脂質が非対称に分布している。血小板の活性化ではこのリン脂質膜の非対称性が損なわれ、内側にある酸性リン脂質ホスファチジルセリンが外側に露出し、これが凝固を促進する。ホスファチジルセリンの外側への移動は、リン脂質を双方向移動させるリン脂質スクランブラーゼが行うと考えられていたが、その実態は明らかでなかった。ごく最近、リン脂質スクランブラーゼとして TMEM16F がクローニングされた¹¹⁾。本蛋白質は 911 アミノ酸からなる 8 回膜貫通領域をもつ蛋白質であった。本酵素は細胞膜に存在し、細胞内の Ca²⁺イオン依存性に内側にあるホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミンを外側に、また外側のホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンを内側に移動させるリン脂質スクランブラーゼ活性を示した。まれな出血性疾患として Scott 症候群が知られている。Scott 症候群では凝固に必要とされるホスファチジルセリンの露出が起こらず(リン脂質の移動が起こらず)、その結果、出血症を呈すると考えられている。ホスファチジルセリンの露出が起こらない Scott 症候群の患者 1 名の TMEM16F 遺伝子に、スプライス部位の変異が同定された。これにより Scott 症候群はスクランブラーゼである TMEM16F 遺伝子に変異をもち、それが原因でホスファチジルセリンをリン脂質二重層の外側に露出できないことが明らかとなった。リン脂質スクランブラーゼの変異と出血症の関連が明らかとなり、今後凝固反応におけるリン脂質成分の重要性が分子レベルでより詳しく解析されると考えられる。

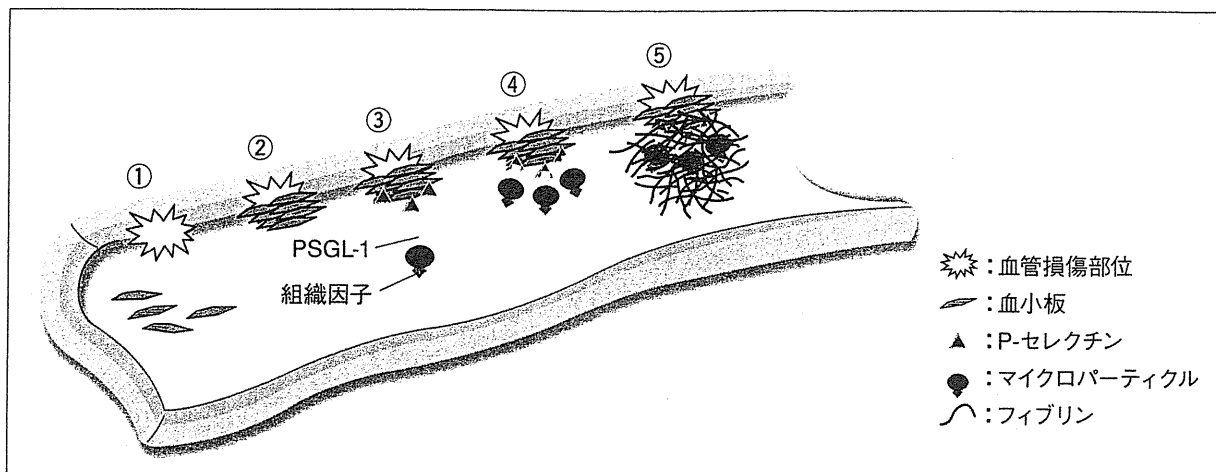


図 2 血管損傷部位での血栓形成とマイクロパーティクルの関与

血管損傷部位では血管内皮下層に存在するコラーゲンが血液に露出する(①)。血小板はコラーゲン受容体である glycoprotein VI とインテグリン $\alpha_2\beta_1$ を発現しており、とくに glycoprotein VI を介して血小板はコラーゲン上に集積し活性化される(②)。活性化血小板は表面に接着分子 P セレクチンを発現し(③)、この P セレクチンを介して、P セレクチンの受容体である sialyl Lewis^x 糖鎖抗原をもつ P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) を発現する組織因子含有マイクロパーティクルが集積する^{5,6)}(④)。マイクロパーティクル上の組織因子は凝固系を作動し、その結果としてフィブリンが形成される¹⁾。病的血栓形成過程では必ず応力下で von Willebrand 因子依存性に、血小板は血管壁に集積し活性化され P セレクチンを発現する。P セレクチンは、PSGL-1 をもつマイクロパーティクルを捕集することにより組織因子を保有するマイクロパーティクルをとらえ、組織因子を血小板血栓局所に集積させることができる⁶⁾。

り込まれることを示した⁴⁾。この観察により組織因子含有マイクロパーティクルが血管損傷部位での血栓の増大にかかわることが明らかとなり、循環する組織因子が凝固の活性化にある種の役割を果たしていると考えられはじめた。In vitro の研究では単球由来の組織因子含有マイクロパーティクルの血小板へ結合は CD15(3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine) と組織因子に依存性であった。すなわち、組織因子含有マイクロパーティクル上の CD15(sialyl Lewis^x として知られる白血球膜抗原で P セレクチンのリガンド)が血小板上の P セレクチンと結合し、血小板血栓に取り込まれ、組織因子が血栓に蓄積した⁵⁾。また、蛍光標識した単球由来マイクロパーティクルをマウスに注入し、レーザーで血管傷害を与えたモデルでは組織因子と PSGL-1(糖鎖に CD15 抗原をもつ)を含むマイクロパーティクルが P セレクチンを発現する血小板血栓に取り込まれ、PSGL-1 欠損マウスと P セレクチン欠損マウスでは組織因子の血栓への取込みが抑制された⁶⁾。

凝固のセオリーでは血中に組織因子は存在しないはずであるが、組織因子抗原はヒト血中に検出される。ヒト血漿の組織因子抗原量は約 150 pg/

ml と報告された⁷⁾。その後、ヒト血中の組織因子量に関していくつかの報告がなされた。もっとも高い濃度はリウマチ患者で 37 pM と報告されている⁸⁾。Butenas らは、健常人の活性型の血中組織因子量はきわめて低い濃度(20 fM 以下)であるため、生理的には血栓形成に関与しないと報告している⁹⁾。またこの報告では、血小板は活性化を受けても組織因子が検出されなかった⁹⁾。研究者間で血中組織因子量に大きな違いがみられる原因として、測定に用いられる抗体の違いがあげられている。

これらの報告から組織因子は、①血管壁の外膜と中膜での構成的発現、②単球・顆粒球・内皮細胞への刺激依存性の誘導、③マイクロパーティクル、の3つの様態で存在すると考えられる。これらの組織因子は、異なった止血血栓のイベントでそれぞれの役割を果たしているものと考えられる。

おわりに

組織因子で開始される凝固反応と、最近注目されている組織因子含有マイクロパーティクルの血栓形成における意義を解説した。現在、マイクロパーティクルはその定義や測定法の標準化、生成

メカニズム, 臨床的意義など多彩な研究が行われている。2011年1月号の『*Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*』誌はマイクロパーティクルに関して5つの総説を特集した¹⁰⁾。マイクロパーティクルに興味をおもちの方はこれらの総説を参照されたい。

文献

- 1) Furie, B. and Furie, B. C. : *N. Engl. J. Med.*, **359** : 938-949, 2008.
- 2) Reinhardt, C. et al. : *J. Clin. Invest.*, **118** : 1110-1122, 2008.

- 3) George, F.D. : *Thromb. Res.*, **22**(Suppl. 1) : S55-S59, 2008.
- 4) Giesen, P.L. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96** : 2311-2315, 1999.
- 5) Rauch, U. et al. : *Blood*, **96** : 170-175, 2000.
- 6) Falati, S. et al. : *J. Exp. Med.*, **197** : 1585-1598, 2003.
- 7) Koyama, T. et al. : *Br. J. Haematol.*, **87** : 343-347, 1994.
- 8) So, A.K. et al. : *J. Thromb. Haemost.*, **1** : 2510-2515, 2003.
- 9) Butenas, S. et al. : *Blood*, **105** : 2764-2770, 2005.
- 10) Boulanger, C.M. and Dignat-George, F. : *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*, **31** : 2-3, 2011.
- 11) Suzuki, J. et al. : *Nature*, **468** : 834-838, 2010.

* * *

アスピリンレジスタンス

宮田敏行^{*}, 宮田茂樹^{*2}, 嘉田晃子^{*3}, 長束一行^{*4}

はじめに

血小板凝集は心筋梗塞や脳梗塞などの心血管イベントの一因であり、その抑制は心血管イベント発症抑制に有効である¹⁾。低用量のアスピリン療法は、心筋梗塞、虚血性脳梗塞、致死性血管傷害に対する二次予防に有効性を示すことが確立している²⁾。最近のメタ解析では、アスピリンは重篤な血管イベントの再

発を年8.2%から年6.7%へ低下させると報告された³⁾。しかし、アスピリンの服薬にもかかわらず、イベントを再発する症例が年6.7%と未だに高いことも事実である。アスピリン投与にもかかわらず血小板機能が効果的に抑制されない患者群が見られ、これらの患者群はアスピリンにより血小板機能が抑制される患者群と比較して、血栓塞栓症を発症するリスクが高いと報告された。アスピリン投与にもかかわらず血小板機能が効果的に抑制されない例を、検査学的アスピリン抵抗性と呼ぶ。一方、アスピリン投与にもかかわらず血栓イベントを発症する例を、臨床的アスピリン抵抗性という。アスピリン抵抗性の問題として、標準化された血小板機能測定法がないことと、抵抗性と反応性を区別する検査測定法のカットオフ値が明確でないことが指摘されている⁴⁾。

私達は、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、アスピリン抵抗性の頻度、心血管イベントとの関係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、ProGEAR研究を進めている。ProGEAR研究の最大の特徴は、アスピリン単独症例のみを登録し、クロピドグレルやシロスタゾールなどの他の抗血小板薬の併用例は除外している点である。

本稿では、アスピリンの効果的な使用の観点から、アスピリン抵抗性に関して概説し、アスピリン抵抗性に関する多施設共同前向き観察研究であるProGEAR研究を紹介する。

Key word

Aspirin
thromboxane
secondary prevention
myocardial infarction
stroke

Aspirin resistance

^{*}Toshiyuki Miyata :

Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病研究センター 研究所 分子病態部

^{*2}Shigeki Miyata :

Department of Transfusion Medicine,
National Cerebral and Cardiovascular Center
国立循環器病研究センター 輸血管理室

^{*3}Akiko Kada :

Department of Advanced Medical Technology Development, Research and Development Initiative Center, National Cerebral and Cardiovascular Center
国立循環器病研究センター 研究開発基盤センター 先進医療・治験推進部

^{*4}Kazuyuki Nagatsuka :

Department of Neurology,
National Cerebral and Cardiovascular Center
国立循環器病研究センター 脳神経内科

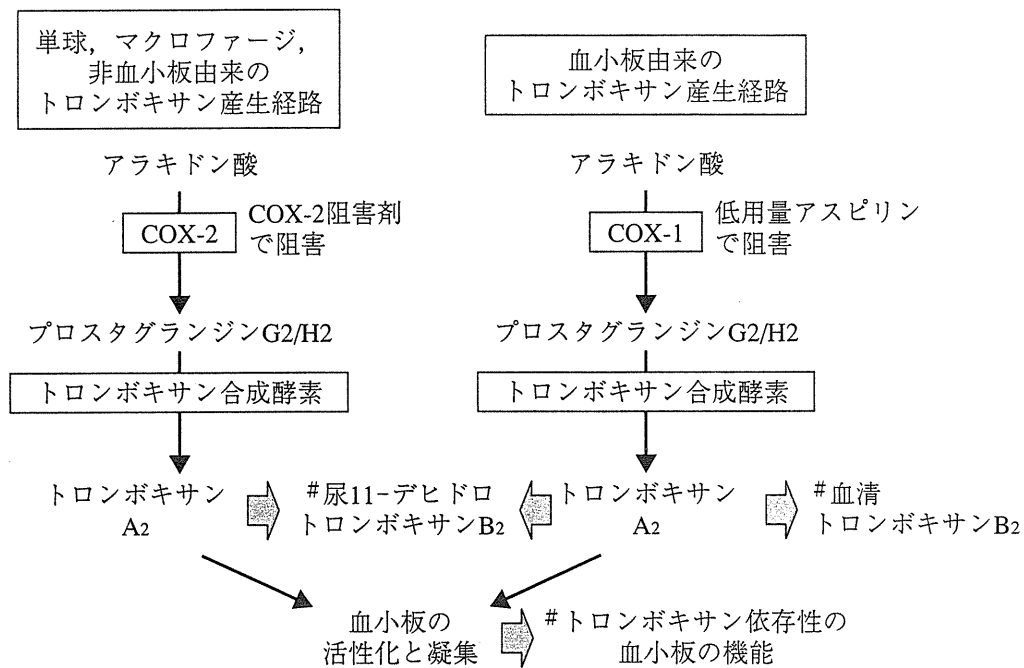


図1. トロンボキサン産生経路とアスピリンの抗血小板効果
 *ProGEAR研究では、尿11-デヒドロトロンボキサンB₂、血清トロンボキサンB₂、血小板の機能をそれぞれ測定した。(文献5より改変)

I. アスピリンによる血小板凝集抑制機構

アスピリンは、トロンボキサン A₂ (TxA₂) 合成を阻害することにより薬理学的作用を発揮する(図1)^{2,5-8)}。TxA₂の生合成は、ホスホリパーゼAによる膜リン脂質からのアラキドン酸の生成で始まる。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PGH₂合成酵素はシクロオキシゲナーゼ(COX)とも呼ばれ、COX-1とCOX-2という2種の酵素が知られる。COXにより生成されたPGH₂は、作用が正反対の2つの物質であるPGI₂(プロスタサイクリン)とTxA₂へ、それぞれの合成酵素により変換される。TxA₂は血小板活性化作用/血管平滑筋収縮作用を示し、PGI₂は血小板凝集阻

止活性/血管平滑筋拡張作用を示す。

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を阻害し、PGH₂産生を抑制することによりTxA₂産生を不可逆的に抑制する。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。血小板はCOX-1によりTxA₂を産生するので、アスピリンはトロンボキサン依存性の血小板活性化だけを阻害する。このように、アスピリンは単にトロンボキサンの産生を抑制し、それ以外の血小板活性化経路を抑制しないので、これが、アスピリン抵抗性の一つの要因と考えられる。すなわち、アスピリンにより血小板が十分に抑制されない理由として、アスピリンは必ず応力、カテコールアミン、トロンビン、ADPといった他の血小板活性化刺激による血小板活性化を

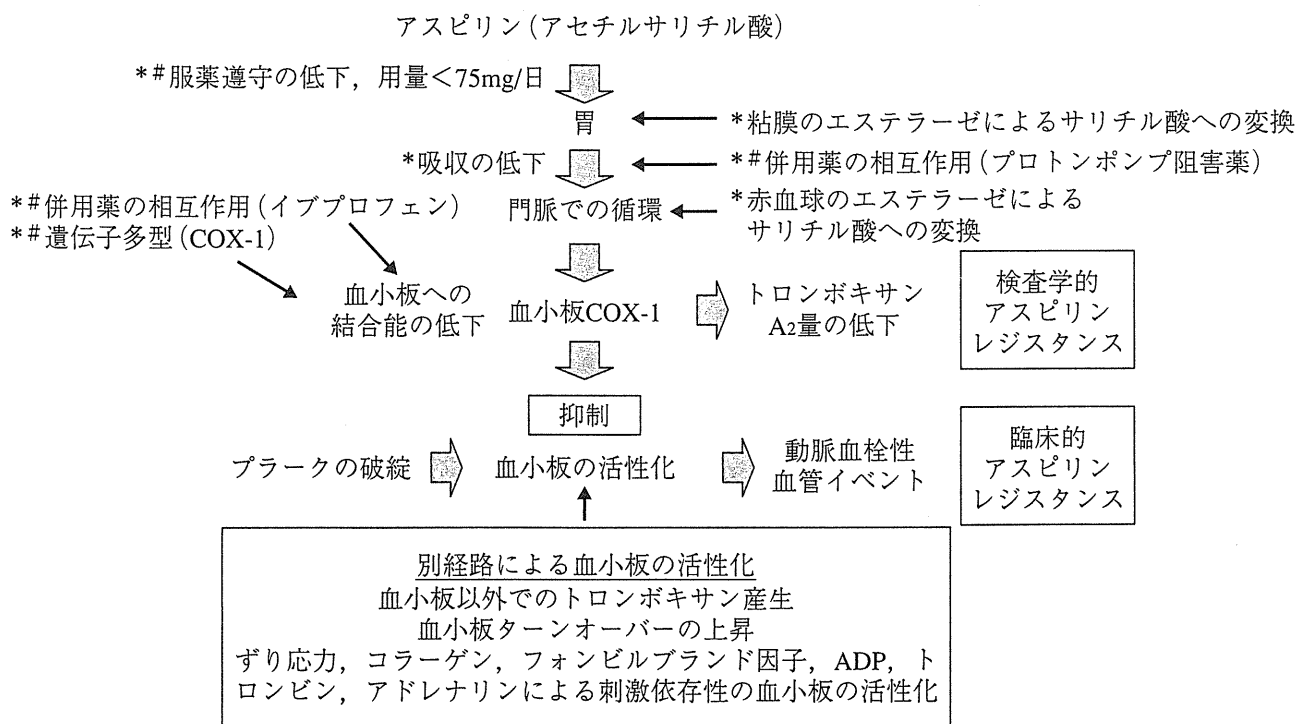


図2. アスピリンレジスタンスのメカニズム
 想定されるアスピリンレジスタンスの原因を*にて示す。*ProGEAR研究で測定した項目を示す。(文献5より改変)

抑制できないことがあげられる。COX-1の阻害はプロスタノイド類の恒常的な生成を抑制するので、腎障害や胃粘膜潰瘍といった副作用を起こすことがある。

経口投与されたアスピリンは、胃と小腸の粘膜から素早く吸収される(図2)。アスピリンは投与後20分以内に血漿に検出され、30~40分以内に血漿中でピークとなり、1時間以内に血小板機能の阻害が観察される。アスピリンは弱酸性の薬剤で、脂溶性のため、胃粘膜を速く通過できる。また、胃のpHは酸性なのでアスピリンの加水分解が最小限に抑えられる。一方、腸溶剤は小腸の上部で溶け出すのでpHが高くてアスピリンはプロトン化されにくく膜を通りにくい状態となり吸収されにくい。したがって、腸溶剤はアスピリンの吸収が遅い。腸溶剤とアスピリン抵抗性との関連も指摘されている。

アスピリンの血中の半減期は約20分であるが、効果を示す半減期はより長い。血小板は核を持たないので新しい酵素を生成できない。アスピリン単回投与によるCOXの不可逆的な阻害効果は、血小板の寿命が尽きる約10日間継続する。アスピリンの単回投与の後、血小板のターンオーバーを反映して、COX活性は1日につき約10%ずつ回復する。しかし、止血能は通常の機能を持つ血小板が約20%程度あれば正常に保たれるので、アスピリンの単回投与後3~4日以内に正常の出血時間に戻る。

II. 検査学的アスピリン抵抗性

アスピリンは抗血小板効果がモニターされずに投薬されることから、アスピリンの抗血小板効果を検査することにより再発予防効果の改善が見込まれる。そこで、血小板凝集能

表1. 検査学的アスピリン抵抗性の頻度 (42の研究のメタ解析) (文献12より引用)

	頻 度	
	Not adjusted % (95 % CI)	Adjusted* % (95 % CI)
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 (21.6 ~ 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		
≤ 100mg	27.1 (18.7 ~ 35.6)	35.6 (28.1 ~ 43.2)
101~299mg	29.6 (21.8 ~ 37.5)	28.2 (20.9 ~ 35.6)
≥ 300mg	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.

やトロンボキサン代謝産物量などの検査学的手法を用いて, アスピリンの抗血小板薬としての効果を評価することが試みられている(図2)。その結果, アスピリンの抗血小板作用抑制が十分でない検査学的アスピリン抵抗性を示す患者群で, イベント発症が高率に観察されるとい報告が2002年頃から相次いでなされた^{10,11)}。

検査学的アスピリン抵抗性の頻度に関して, 42の試験のメタ解析が報告されている¹²⁾。表1に, その結果を示した。メタ解析に使われた研究で用いられた血小板活性化の測定法は, 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ビーズを用い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などである。メタ解析の結果では, これらの測定法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 %)であった。測定方法, 対象疾患, アスピリンの用量で補正した頻度は27.1 % (95 %信頼区間=22~33 %)であった。また, 補正後では, 100mg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 %, 300mg以上の投与では19 %であった。測定方法でもアスピリン抵抗性の頻度に大きな違いが見られた。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RPFAを用いた場合は, それぞれ28.1 %および18.9 %であった。

このメタ解析の後もアスピリン抵抗性に関する検査方法についての研究が発表されたが, どの検査法が臨床イベントと関連を示すかについては, 諸家の一致を見ないのが現状である。4種の血小板凝集能測定法(アラキドン酸惹起血小板凝集能, PFA-100, RPFA, 全血 multiple electrode aggregometry) および血清および尿中トロンボキサン代謝産物, 計6種の手法で試料検体を測定したところ, 測定法間の関連性は弱く, 尿中トロンボキサン代謝産物量はいずれの測定法とも関連を示さなかった¹³⁾。血清TxB₂量で定義するアスピリン抵抗性は他の5つの測定法(尿中11-デヒドロTxB₂, アラキドン酸惹起血小板凝集能, ADP惹起血小板凝集能, RPFA, トロンボエラストグラム PlateletMapping System)で定義するアスピリン抵抗性と一致しなかった⁴⁾。冠動脈バイパス術を受けたアスピリン投与患者を対象にした研究でも, 検査法(コラーゲン惹起血小板凝集能, ADP惹起血小板凝集能, PFA-100, 血清TxB₂, 尿中11-デヒドロTxB₂)間の関連が認められなかった¹⁴⁾。

健康人48人にアスピリン100mgを1~8週間服薬させ, 各種の測定を行った研究による

表2. 16試験のメタ解析によるアスピリンの二次イベント予防効果

	イベント数(年当たりの%)		年当たりのイベント発症率の比 アスピリン群：非アスピリン群 (信頼区間)
	アスピリン群	非アスピリン群	
心イベント	995 (4.30)	1,214 (5.30)	0.80 (0.73 ~ 0.88) p < 0.00001
脳卒中	480 (2.08)	580 (2.54)	0.81 (0.71 ~ 0.92) p = 0.002
重篤な血管イベント	1,505 (6.69)	1,801 (8.19)	0.81 (0.75 ~ 0.87) p < 0.00001

ハイリスク患者17,000名, 43,000人年, 重篤な血管イベント数3,306例での解析(文献3より引用)

と, 血清TxB₂は完全(99%)に抑制されていた。尿11-デヒドロTxB₂, アラキドン酸惹起血小板凝集能, RPF_Aはそれぞれ65%, 80%, 35%阻害で部分的な阻害であった。ADP惹起血小板凝集能, コラーゲン惹起血小板凝集能は阻害が大きくばらついていていた。これらの血小板の機能は, 休薬3日後に戻っていた。どの測定においても, 大きく阻害を示すresponderが阻害を示さないresistantになることがたまに見られた。この結果から, 血清TxB₂が反映している血小板のCOX活性は低用量アスピリンの服薬で均一に永続的に抑制されることが示された。しかし, 測定法の再現性が乏しいため, アスピリンのresponderをresistantと誤認する可能性があることが指摘されている¹⁵⁾。

健常人165人にアスピリン81mgを1週間服薬させ, 各種の測定を行った研究によると, 文献的にアスピリンの効果を最も反映するといわれている血清TxB₂で定義するアスピリン抵抗性患者は, 他の測定法(尿11-デヒドロTxB₂, アラキドン酸惹起血小板凝集能, ADP惹起血小板凝集能, VerifyNow Aspirin, TEG PlateletMapping)では抵抗性と思えない場合が多く, 測定法間での一致が乏しいと報告された。本研究では, アスピリン服薬前に検査を行っており, 検査学的アスピリン抵抗性は, アスピリン治療を始める前の血小板反応性で部分的に説明できるという¹⁶⁾。

Ⅲ. 心血管性疾患発症のリスク因子としてのアスピリン抵抗性

アスピリン抵抗性は臨床的には, アスピリンの服薬にもかかわらず心血管イベントを発症することを指す。どの薬剤でも疾患の発症を完全に抑制することは難しいので, アスピリン抵抗性という考えに異を唱える意見も多い。そもそも「抵抗性」というのは, 細菌が何らかの抵抗性を獲得するという現象から生まれたものなので, アスピリン抵抗性はそういった意味では, アスピリン不応症およびアスピリンの治療失敗にすべきであるとの意見も強い。

17,000名を対象とし43,000人年を追跡したアスピリン二次予防のメタ解析では3,306イベントが観察され, アスピリン服薬患者の重大な血管イベントは年8.2%, プラセボでは年6.7%, absolute risk reductionはその差の1.5%であった。これ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(表2)³⁾。脳卒中はアスピリン服薬により2.54%から2.08%へと0.46%減少し, 心臓での重大な血管イベントは5.3%から4.3%へと1.0%減少した。また, 性別と年齢別に分けて5年間の重大な血管イベント発症を予想すると, 65歳以上の患者では, アスピリンはプラセボ群に比べて明らかなイベント抑制(男性: 10.6%, 女性: 9%の減少)効果が期待され

表3. 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，メタ解析

研究 (対象者数)	検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数 (%)	心血管疾患イベントを発症した人数			
		検査学的アスピリン抵抗性を示した患者数* (%)	検査学的アスピリン抵抗性を示さなかった患者数* (%)	オッズ比 (95% CI)	P値
Grotemeyer, et al, 1993 (180)	60 (33)	24/60 (40)	5/114 (4)	14.5 (5.2 ~ 40.9)	< 0.001
Buchanan, et al, 2000 (289)	158 (55)	15/158 (10)	9/131 (7)	1.4 (0.6 ~ 3.4)	0.42
Andersen, et al, 2002 (71)	25 (35)	9/25 (36)	11/46 (24)	1.8 (0.6 ~ 5.2)	0.28
Eikelboom, et al, 2002 (448 cases, 488 controls)	NR	NR	NR	1.8 (1.2 ~ 2.9)	0.01
Grundmann, et al, 2003 (35 cases, 18 controls)	12 (23)	12/35 (34)	0/18 (0)	6.8 (1.8 ~ 26.2)	0.004
Gum, et al, 2003 (326)	17 (5)	4/17 (24)	30/309 (10)	2.9 (0.9 ~ 9.3)	0.09
Cotter, et al, 2004 (73)	21 (29)	6/21 (29)	3/52 (6)	6.5 (1.5 ~ 29.3)	0.01
Cheng, et al, 2005 (422)	113 (27)	NR	NR	2.9 (1.5 ~ 5.7)	0.002
Pamukcu, et al, 2006 (105)	20 (19)	9/20 (45)	10/85 (12)	6.1 (2.0 ~ 18.5)	< 0.001
Stejskal, et al, 2006 (103)	57 (55)	50/57 (88)	21/46 (46)	8.5 (3.2 ~ 22.7)	< 0.001
Mueller, et al, 1997 (100)	65 (65)	8/65 (12)	0/35 (0)	10.5 (0.6 ~ 187.5)	0.048
Ziegler, et al, 2002 (52)	5 (10)	0/5 (0)	13/47 (28)	0.2 (0.0 ~ 4.5)	0.31
Yilmaz, et al, 2005 (14 cases, 14 controls)	8 (29)	7/14 (50)	1/14 (7)	13.0 (1.3 ~ 128.1)	0.03
Poston, et al, 2006 (225)	22 (10)	4/22 (18)	12/203 (6)	3.5 (1.0 ~ 12.1)	0.06
Chen, et al, 2004 (151)	29 (19)	15/29 (52)	30/122 (25)	3.3 (1.4 ~ 7.6)	0.004
Lev, et al, 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(文献17より引用)

た。しかし，アスピリンを服薬しても50歳以上の患者では，5年間に男性45%，女性39%の再発が予想された³⁾。

次に，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）との関連を検討した16の試験のメタ解析の結果を示す(表3)¹⁷⁾。この結果では，オッズ比は3.8(95%信頼区間=2.3~6.1)であり，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比べ，心血管系疾患の再発率が高いことを示唆していた。いくつかある検査法のなかでも，尿11-デヒドロTxB₂で四分位に分けると，最も高い値を示す群に虚血性疾患の再発が高いとの報告がある¹⁸⁾。また，経皮的冠動脈形成術

患者700名にアスピリンを投与した2年間の追跡研究では，血清TxB₂とPFA-100によるcollagen-ADP閉塞時間が心臓有害事象と関連を示した¹⁹⁾。ここに示されるように，どの検査法が臨床上のイベントと関連を示すのかについて，意見の一致した測定法はないのが現状である。

最近のメタ解析では，抗血小板薬クロピドグレルに対する抵抗性と虚血性イベントの関連に関して，論文が発表された年代と，報告されたリスクの強さの間に有意な関連があると指摘されている²⁰⁾。すなわち，2003~2006年に発表された6つの研究では，クロピドグレル抵抗性の心血管系疾患に対するglobal relative riskは6.62であったが，2007年以降に

発表された8つの研究では2.93であった。遅れて発表される研究が低いリスクを示すことは既に知られていることであり、発表時期にまつわる諸々の事象を検討することも、抗血小板薬抵抗性の正しい理解に重要である。

血小板機能検査に基づいて抗血小板薬の投与量を個別化することによる、イベント抑制を目的とした、初めての大規模ランダム化前向き試験が発表された²¹⁾。本研究は、アスピリンではなく、クロピドグレルの投与量を個別化により、ステント留置患者の6カ月後の臨床アウトカムを改善できるかを調べた研究である。VerifyNowで血小板の機能検査を行い、血小板機能が高い患者に高用量と通常量のクロピドグレルを割り付け、心血管イベントの発症を調べた。その結果は、高用量のクロピドグレル投与でも、通常量に比べて虚血性イベントの発症は減少しなかった²¹⁾。

アスピリン服薬患者の血小板凝集能やトロンボキサン代謝産物量を測定し、その値をもとにアスピリンの増量や他の抗血小板薬への変更は勧められていない^{2, 5, 22)}。高用量のアスピリンにより検査学的アスピリン抵抗性は減るものの(表1)¹²⁾、文献調査研究では1日75~81mgより多いアスピリンを服薬してもイベントがより抑制されることは見出されず、胃腸で出血が増えるという結果が報告されている²³⁾。しかしながら、低用量のアスピリンの推奨は初期のアスピリンの研究のメタ解析から得られたものなので、個人のわずかな違いを見逃している可能性も指摘されている。

Ⅳ. アスピリン抵抗性を生じさせる要因

検査学的アスピリン抵抗性を示す要因を下記に考察する^{5, 6, 7, 24)}。

1. アスピリンの生体有用性の低下

アスピリンを正しく服薬しないことが、ア

スピリン抵抗性の原因としてあげられる。アスピリンの長期服薬患者190名を対象とした研究では、17名(9%)のアラキドン酸惹起血小板凝集が抑制されなかったが、観察下での服薬では1名の凝集が抑制されなかっただけであった²⁵⁾。このことは、検査学的アスピリン抵抗性の多くは、服薬が守られていないことを示唆している。

健常者に腸溶剤を服薬させた研究では、体重の増加によりTxB₂産生抑制が障害を受けていた⁹⁾。また、腸溶剤を処方された安定な心血管疾患患者131名を対象にした研究では、44%の患者は血清TxB₂産生が十分に抑制しておらず、こうした患者の多くはアラキドン酸惹起血小板凝集が阻害されないと報告されている²⁶⁾。すなわち、肥満者はアスピリンが効きにくく、腸溶剤も効き目が悪いことを示唆している。

糖尿病患者は非糖尿病患者より、血清および血小板中のTxB₂量が高く、血清TxB₂量は絶食時の血漿グルコース量とヘモグロビンA1c量と関連を示した¹³⁾。糖尿病患者から単離した血小板のCOX-1はアスピリンで阻害されるので、糖尿病患者では何らかの理由で、高血糖がアスピリンのCOX-1の阻害を妨害している。

2. 非ステロイド系抗炎症薬併用による血小板COX-1の抑制障害

COX-1の可逆的阻害剤である非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)の併用は、アスピリンのCOX-1基質結合部位への接近を妨げるので、アスピリンのCOX-1活性阻害を妨害する²⁷⁾。健常人男性を対象にした研究では、NSAIDsを年に60日以上服薬すると、アスピリンのイベント予防効果が観察されなかった²⁸⁾。

3. COX-2を介したトロンボキサンの産生 (アスピリンバイパス)

尿中トロンボキサン代謝産物である11-デヒドロTxB₂量と心血管疾患リスクとの関連が示された¹⁸⁾。尿のトロンボキサン代謝産物量の上昇は、COX-2活性が単球やマクロファージ、血管内皮細胞に誘導されトロンボキサンが産生されたことを示唆する。COX-2によりトロンボキサン産生が産生され、血小板凝集能が保持された状態になると考えられる。

4. 血小板活性化の別の経路

血小板はトロンボキサン以外の多くのアゴニストでも活性化するので、こうしたアゴニストによる血小板凝集の亢進が考えられる。

5. 遺伝子多型

アスピリン抵抗性に関連する遺伝子多型の解明は、抗血小板療法の個別化医療に繋がるので、精力的に研究が進められた。アスピリンの薬理遺伝学の研究から、COX-1遺伝子-842A>G, 50C>T多型、血小板糖タンパク質II b/III a遺伝子1565T>C多型などとアスピリン抵抗性の関連が報告されたが、その後の研究でいずれも関連が見出されていない^{29, 30)}。血小板糖タンパク質I a遺伝子80C>T多型、P2Y₁₂遺伝子H1/H2ハプロタイプ、P2Y₁遺伝子A1622G多型も関連を示さない。

V. ProGEAR研究

私達は、脳梗塞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、アスピリン抵抗性の発症頻度、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: Pro

GEAR study)を計画した。本研究の登録は平成20年3月末で終了し、その後2年間、臨床イベントを追跡した。ProGEAR研究の最大の特徴は、アスピリン単独症例のみを登録し、クロピドグレル、パナルジンやシロスタゾールなどの他の抗血小板薬の併用例は除外している点である。

症例の選択は、以下の基準のすべてを満たす症例とした。すなわち、①脳梗塞(心原性脳塞栓症をのぞく)/TIAおよび急性冠症候群の二次予防としてアスピリンの投与を受けている長期服薬患者で、最終イベント後28日以上・最終イベントから2年以内(可能な限り最終イベントから6カ月以内にエントリーする)。②登録時年齢20歳以上。ただし、3カ月以内の血小板数が10万/ μ L以下、もしくは45万/ μ L以上の患者や心房細動のある患者、他の抗血小板薬やワルファリン服用者は除外する。

検査学的アスピリン抵抗性の評価項目として、アラキドン酸(2濃度)とコラーゲン(2濃度)による血小板凝集能、ずり応力下血栓形成能、血清TxB₂、尿中11-デヒドロTxB₂を測定する。アスピリンの服薬を客観的に確かめるため、アスピリンの代謝産物であるサリチル酸を測定する(図3)。エンドポイントは、脳梗塞、TIA、心筋梗塞、不安定狭心症、血行再建術、その他血栓塞栓症の発症、心血管疾患による死亡とした。症例登録目標は600例とした。

ProGEAR研究は、592名を登録し2年間イベントを追跡した。エンドポイントとなる心血管イベントは69名(11.8%)に観察した。このイベント発症率は、私達が参考にしたメタ解析の値によく一致した。現在、イベントと血小板機能の各種パラメータとの関連、イベントと遺伝子多型の関連を解析している。ProGEAR研究により、アスピリン服薬にもかかわらずイベントを再発する症例のリスク

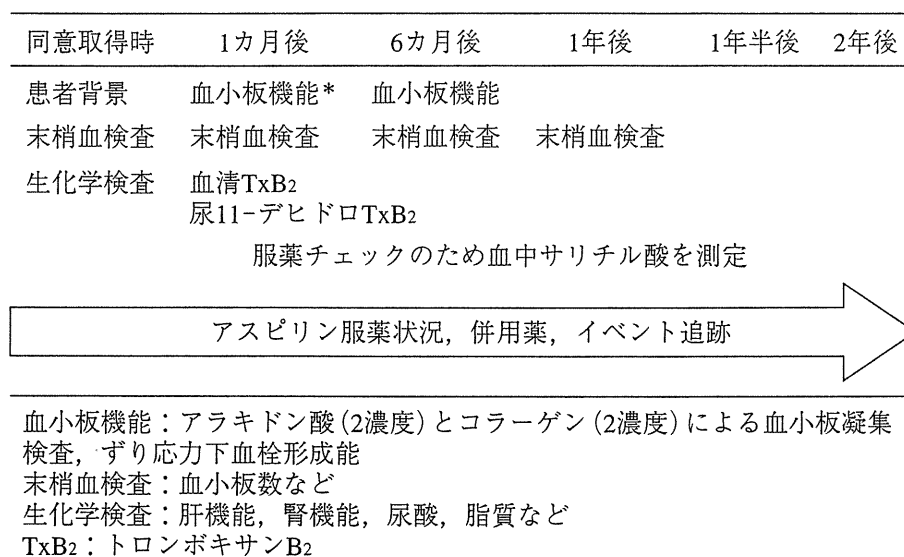


図3. ProGEAR研究：観察スケジュール

因子が明確になることを期待している。

おわりに

2002年当時、アスピリン抵抗性はアスピリンを服薬しても虚血性イベントを十分に予防できない可能性を示唆する概念として、センセーショナルにBBCなどの海外メディアに取り上げられた。それは、当時の新規抗血小板薬クロピドグレルの売り上げ販売に大きく寄与した面があると考えられる。その後、このクロピドグレルにも、活性化体へ変換する酵素の遺伝子多型により抵抗性があるとされた。そういった多型を持たない酵素で活性化体へ変換される抗血小板薬プラスグレルが市販された。2011年の報告では、しかし、プラスグレルにおいても、血小板の反応性が十分に抑制できない患者に虚血性イベントが多いという報告が見られる³¹⁾。このように、抗血小板薬の使用の研究は、製薬企業の思惑に踊らされる危険性がある。安価なアスピリンを安心・安全に使用するため、私達は公的な資金だけを使って、ProGEAR研究を進め

ているところである。ProGEAR研究は、厚生労働科学研究費補助金(循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業)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の支援を受けて行ったものである。

§ 文 献

- 1) Davi G, Patrono C : Platelet activation and atherothrombosis. N Engl J Med 2007;357:2482-94.
- 2) Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, et al : Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. N Engl J Med 2005;353:2373-83.
- 3) Baigent C, Blackwell L, Collins R, et al : Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease : collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. Lancet 2009;373:1849-60.
- 4) Kuliczkowski W, Witkowski A, Polonski L, et al : Interindividual variability in the response to oral antiplatelet drugs : a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 2009;30:426-35.

- 5) Hankey GJ, Eikelboom JW : Aspirin resistance. *Lancet* 2006;367:606-17.
- 6) Gasparyan AY, Watson T, Lip GY : The role of aspirin in cardiovascular prevention : implications of aspirin resistance. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1829-43.
- 7) Sweeny JM, Gorog DA, Fuster V : Antiplatelet drug 'resistance'. Part 1 : mechanisms and clinical measurements. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:273-82.
- 8) Fuster V, Sweeny JM : Aspirin : a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation* 2011;123:768-78.
- 9) Cox D, Maree AO, Dooley M, et al : Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke* 2006;37:2153-8.
- 10) Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, 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* 2002;105:1650-5.
- 11) Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, et al : A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:961-5.
- 12) Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, et al : Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin : a systematic review. *Am Heart J* 2007;153:175-81.
- 13) Pulcinelli FM, Biasucci LM, Riondino S, et al : COX-1 sensitivity and thromboxane A2 production in type 1 and type 2 diabetic patients under chronic aspirin treatment. *Eur Heart J* 2009;30:1279-86.
- 14) Ferreiro JL, Angiolillo DJ : Clopidogrel response variability : current status and future directions. *Thromb Haemost* 2009;102:7-14.
- 15) Santilli F, Rocca B, De Cristofaro R, et al : Platelet cyclooxygenase inhibition by low-dose aspirin is not reflected consistently by platelet function assays : implications for aspirin "resistance". *J Am Coll Cardiol* 2009;53:667-77.
- 16) Frelinger AL, Li Y, Linden MD, et al : Aspirin 'resistance' : role of pre-existent platelet reactivity and correlation between tests. *J Thromb Haemost* 2008;6:2035-44.
- 17) 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;167:1593-9.
- 18) Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, et al : Incomplete inhibition of thromboxane biosynthesis by acetylsalicylic acid : determinants and effect on cardiovascular risk. *Circulation* 2008;118:1705-12.
- 19) Frelinger AL 3rd, Li Y, Linden MD, et al : Association of cyclooxygenase-1-dependent and -independent platelet function assays with adverse clinical outcomes in aspirin-treated patients presenting for cardiac catheterization. *Circulation* 2009;120:2586-96.
- 20) Combescure C, Fontana P, Mallouk N, et al : Clinical implications of clopidogrel non-response in cardiovascular patients : a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2010;8:923-33.
- 21) Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al : Standard vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* 2011;305:1097-105.
- 22) Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al : ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-Elevation myocardial infarction : a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *J Am Coll Cardiol* 2007;50: e1-e157.
- 23) Campbell CL, Smyth S, Montalescot G, et al : Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease : a systematic review. *Jama* 2007;297:2018-24.
- 24) Angiolillo DJ : Variability in responsiveness to oral antiplatelet therapy. *Am J Cardiol* 2009;103:27A-34A.
- 25) Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, et al : Compliance as a critical consideration in patients

- who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2005;95:973-5.
- 26) Maree AO, Curtin RJ, Dooley M, et al : Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1258-63.
- 27) Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, et al : Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001;345:1809-17.
- 28) Hennekens CH, Schneider WR, Hebert PR, et al : Hypothesis formulation from subgroup analyses : nonadherence or nonsteroidal anti-inflammatory drug use explains the lack of clinical benefit of aspirin on first myocardial infarction attributed to “aspirin resistance”. *Am Heart J* 2010;159:744-8.
- 29) Verschuren JJ, Trompet S, Wessels JA, et al : A systematic review on pharmacogenetics in cardiovascular disease : is it ready for clinical application?. *Eur Heart J* 2011 Jul 30.
- 30) Verschuren JJ, Jukema JW : Pharmacogenetics of antiplatelet therapy : ready for clinical application?. *Heart* 2011;97:1268-76.
- 31) Bonello L, Pansieri M, Mancini J, et al : High on-treatment platelet reactivity after prasugrel loading dose and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:467-73.

