

macrophages basically play a role in the defense against tumors in the absence of IL-2R γ_c , whereas the antitumor effect can be likely affected by modulation of M1/M2 macrophage polarization by tumor cells.

In conclusion, to our knowledge the present study is the first to assess qualitative and quantitative differences in innate elimination of human cancer cells between the presence and absence of IL-2R γ_c function in NOD background mice lacking adaptive immunity. The results provide insights into the nature of innate response in the absence of adaptive immunity, aiding in developing tumor xenograft models in experimental oncology.

Acknowledgments

We thank Dr. Atsushi Miyawaki (Brain Science Institute, RIKEN, Saitama, Japan) for providing the original vector containing the Venus gene sequence. We also thank Miyuki Kuronuma (Central Institute for Experimental Animals) for expert technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Kelland, L. R. 2004. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur. J. Cancer* 40: 827–836.
- Zhou, Q., J. Facciponte, M. Jin, Q. Shen, and Q. Lin. 2014. Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies. *Cancer Lett.* 344: 13–19.
- Ito, M., H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, et al. 2002. NOD/SCID/ γ_c ^{null} mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175–3182.
- Ito, R., I. Katano, M. Ida-Tanaka, T. Kamisako, K. Kawai, H. Suemizu, S. Aiso, and M. Ito. 2012. Efficient xenografting in severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2r γ ^{null} mice is attributed to a lack of CD11c⁺B220⁺CD122⁺ cells. *J. Immunol.* 189: 4313–4320.
- Takenaka, K., T. K. Prasolava, J. C. Wang, S. M. Mortin-Toth, S. Khalouei, O. I. Gan, J. E. Dick, and J. S. Danska. 2007. Polymorphism in *Sirpa* modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* 8: 1313–1323.
- Yamauchi, T., K. Takenaka, S. Urata, T. Shima, Y. Kikushige, T. Tokuyama, C. Iwamoto, M. Nishihara, H. Iwasaki, T. Miyamoto, et al. 2013. Polymorphic *Sirpa* is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. *Blood* 121: 1316–1325.
- Nagai, T., K. Ibata, E. S. Park, M. Kubota, K. Mikoshiba, and A. Miyawaki. 2002. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20: 87–90.
- Khatib, A. M., L. Fallavollita, E. V. Wancewicz, B. P. Monia, and P. Brodt. 2002. Inhibition of hepatic endothelial E-selectin expression by C-raf antisense oligonucleotides blocks colorectal carcinoma liver metastasis. *Cancer Res.* 62: 5393–5398.
- Morris, V. L., E. E. Schmidt, I. C. MacDonald, A. C. Groom, and A. F. Chambers. 1997. Sequential steps in hematogenous metastasis of cancer cells studied by in vivo videomicroscopy. *Invasion Metastasis* 17: 281–296.
- Kudo, A., S. Kashiwagi, M. Kajimura, Y. Yoshimura, K. Uchida, S. Arai, and M. Suematsu. 2004. Kupffer cells alter organic anion transport through multi-drug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* 39: 1099–1109.
- Fraser, C. C., B. P. Chen, S. Webb, N. van Rooijen, and G. Kraal. 1995. Circulation of human hematopoietic cells in severe combined immunodeficient mice after CI2MDP-liposome-mediated macrophage depletion. *Blood* 86: 183–192.
- Morikawa, K., D. Fan, Y. M. Denkins, B. Levin, J. U. Gutterman, S. M. Walker, and I. J. Fidler. 1989. Mechanisms of combined effects of gamma-interferon and 5-fluorouracil on human colon cancers implanted into nude mice. *Cancer Res.* 49: 799–805.
- Lewis, C. E., and J. W. Pollard. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 66: 605–612.
- O'Sullivan, T., R. Saddawi-Konefka, W. Vermi, C. M. Koebel, C. Arthur, J. M. White, R. Uppaluri, D. M. Andrews, S. F. Ngiew, M. W. Teng, et al. 2012. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 209: 1869–1882.
- Holden, J. A., T. J. Attard, K. M. Laughton, A. Mansell, N. M. O'Brien-Simpson, and E. C. Reynolds. 2014. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 82: 4190–4203.
- Ma, X. L., Y. H. Li, J. X. Gao, J. Li, L. Guo, and C. Z. Wu. 2008. Expression of inducible nitric oxide synthase in the liver is under the control of nuclear factor κ B in concanavalin A-induced hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23: e231–e235.
- Kimura, K., M. Nagaki, S. Takai, S. Satake, and H. Moriwaki. 2004. Pivotal role of nuclear factor κ B signaling in anti-CD40-induced liver injury in mice. *Hepatology* 40: 1180–1189.
- Katz, S. C., V. G. Pillarisetty, J. I. Bleier, A. B. Shah, and R. P. DeMatteo. 2004. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J. Immunol.* 173: 230–235.
- Herkel, J., B. Jagemann, C. Wiegand, J. F. Lazaro, S. Lueth, S. Kanzler, M. Blessing, E. Schmitt, and A. W. Lohse. 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology* 37: 1079–1085.
- Hu, Z., and Y. G. Yang. 2012. Full reconstitution of human platelets in humanized mice after macrophage depletion. *Blood* 120: 1713–1716.
- Hu, Z., N. Van Rooijen, and Y. G. Yang. 2011. Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. *Blood* 118: 5938–5946.
- Ogasawara, K., S. Hida, N. Azimi, Y. Tagaya, T. Sato, T. Yokochi-Fukuda, T. A. Waldmann, T. Taniguchi, and S. Taki. 1998. Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* 391: 700–703.
- Ohteki, T., K. Suzue, C. Maki, T. Ota, and S. Koyasu. 2001. Critical role of IL-15-IL-15R for antigen-presenting cell functions in the innate immune response. *Nat. Immunol.* 2: 1138–1143.
- Di Carlo, E., G. Forni, P. Lollini, M. P. Colombo, A. Modesti, and P. Musiani. 2001. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 97: 339–345.
- He, H., J. R. Stone, and D. L. Perkins. 2002. Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity. *Transplantation* 73: 853–861.
- Hung, S. I., A. C. Chang, I. Kato, and N. C. Chang. 2002. Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 72: 72–82.
- Harbord, M., M. Novelli, B. Canas, D. Power, C. Davis, J. Godovac-Zimmermann, J. Roes, and A. W. Segal. 2002. Ym1 is a neutrophil granule protein that crystallizes in p47^{phox}-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 277: 5468–5475.
- Nio, J., W. Fujimoto, A. Konno, Y. Kon, M. Ohashi, and T. Iwanaga. 2004. Cellular expression of murine Ym1 and Ym2, chitinase family proteins, as revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem. Cell Biol.* 121: 473–482.
- Zheng, D., H. Chen, M. Y. Barte, J. Williams, J. A. Davids, D. A. Lomas, G. McFadden, and A. R. Lucas. 2013. Myxomaviral anti-inflammatory serpin reduces myeloid-derived suppressor cells and human pancreatic cancer cell growth in mice. *J. Cancer Sci Ther* 5: 291–299.

Impact of nonsynonymous mutations of factor X on the functions of factor X and anticoagulant activity of edoxaban

Kengo Noguchi^{a,b}, Yoshiyuki Morishima^{a,b}, Shinichi Takahashi^{a,b}, Hiroaki Ishihara^{a,c}, Toshiro Shibano^{a,d} and Mitsuru Murata^{a,e}

Edoxaban is an oral direct factor Xa (FXa) inhibitor and its efficacy as an oral anticoagulant is less subject to drug–food and drug–drug interaction than existing vitamin K antagonists. Although this profile of edoxaban suggests it is well suited for clinical use, it is not clear whether genetic variations of factor X influence the activity of edoxaban. Our aim was to investigate a possible impact of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the factor X gene on the functions of factor X and the activity of edoxaban. Two nonsynonymous SNPs within mature factor X, Ala152Thr and Gly192Arg, were selected as possible candidates that might affect the functions of FXa and the activity of edoxaban. We measured catalytic activities of wild type and mutant FXas in a chromogenic assay using S-2222 and coagulation times including prothrombin time (PT) and activated partial thrombin time (aPTT) of plasma-containing recombinant FXs in the presence and absence of edoxaban. Michaelis–Menten kinetic parameters of FXas, K_m and V_{max} values, PT and aPTT were not influenced by either mutation indicating these mutations do not affect the FXa catalytic and coagulation activities. The K_i values of edoxaban for the FXas and the concentrations of edoxaban required to

double PT and aPTT were not different between wild type and mutated FXas indicating that both mutations have little impact on the activity of edoxaban. In conclusion, these data suggest that edoxaban has little interpatient variability stemming from SNPs in the factor X gene. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 26:117–122 Copyright © 2015 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2015, 26:117–122

Keywords: anticoagulant, edoxaban, factor Xa, factor Xa inhibitor, interpatient variability, single-nucleotide polymorphisms

^aThe Keio-Daiichi Project on Genetics of Thrombosis, Keio University, ^bBiological Research Laboratories, ^cNew Drug Regulatory Affairs Department, ^dResearch Oversight Function, R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd and ^eLaboratory Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Correspondence to Kengo Noguchi, Biological Research Laboratories, R&D Division, Daiichi Sankyo Co., Ltd., 1–2–58, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo 140–8710, Japan

Tel: +81 3 3492 3131; fax: +81 3 5436 8587; e-mail: noguchi.kengo.gn@daiichisankyo.co.jp

Received 10 April 2013 Revised 17 April 2014
Accepted 26 April 2014

Introduction

The interpatient variability of a drug response is a major problem in clinical development and practice. It can lead to therapeutic failure or adverse drug reactions in individuals or subpopulations of patients [1]. The interpatient variability may be partially explained by genetic variations, mainly single-nucleotide polymorphisms (SNPs). Such polymorphisms are located in gene coding for proteins, which influence drug pharmacokinetics as well as pharmacodynamics by modulating their expressions and functions. Owing to accumulating evidence that genetic variations can influence drug reactions, pharmacogenomics progressively informs drug regulatory agencies decisions, including pharmacogenomic information onto labels regarding drug product characteristics [2].

Warfarin is the most commonly prescribed outpatient oral anticoagulant in the world [3,4]; however, it is well known that warfarin has a large interpatient variability not only in pharmacokinetics by SNPs of cytochrome P450 (CYP) 2C9, but also in pharmacodynamics by SNPs of vitamin K epoxide reductase complex-1 (VKORC1), the target protein of warfarin [2,5–7]. Hence, the US Food and Drug Administration has updated the labeling for

warfarin several times to deal with pharmacogenomical issues. Furthermore, clinical efficacy of an antiplatelet drug clopidogrel is affected by SNPs in CYP2C19 [8], paraoxonase-1 [9] and the PI^A polymorphism (Leu33Pro) of the platelet glycoprotein IIIa gene [10]. As variable response in antithrombotic effects can lead to increased thrombotic or bleeding risks, more consistent antithrombotic effects with novel agents in all patients regardless of genetic variations are highly desirable.

Activated factor X (FXa) plays a pivotal role in the coagulation cascade being the first enzyme in the common pathway of thrombin formation and is a promising target for antithrombotic drugs. Edoxaban is a new once-daily, oral, direct FXa inhibitor and its efficacy is less subject to drug–food and drug–drug interaction than existing vitamin K antagonists [11–15].

Factor X, a zymogen of FXa, is synthesized and cleaved signal and propeptide in the liver followed by secretion into circulation as mature factor X. The factor X gene, located on chromosome 13q34, spans 27 kb and contains eight exons [16,17]. Amounts of variants including deletions, missense, frame shift and splice site mutations have been reported in factor X gene [18]. Congenital

deficiency of factor X is thought to be rare because factor X has critical roles in hemostasis. In knockout mice, approximately one-third of the factor X-deficient embryos died around embryonic day 11.5–12.5 and the majority of neonates died within 5 days, most frequently from hemorrhagic complications [19], implying that variants in the factor X gene likely influence clinical cardiovascular events. Therefore, impacts of genetic variants in the factor X gene on functions of factor X should be assessed carefully. However, little has been elucidated about influences of genetic variants on the catalytic activity of FXa as well as the pharmacodynamic profile of direct FXa inhibitors. As direct FXa inhibitors like edoxaban exert its effects by direct binding to FXa, SNPs accompanying an amino acid substitution within mature factor X could modulate the effects of direct FXa inhibitors via, for example, change in the affinity for FXa.

Among known SNPs of factor X gene, two nonsynonymous SNPs, Ala152Thr (A152T) and Gly192Arg (G192R), which are positioned within the light chain and activation peptide region, respectively, were selected as possible influential mutations. Although the A152T mutation is structurally apart from the active site of FXa and interacting sites with factor Va (FVa, Fig. 1) [20–22] and the G192R mutation is located inside the activation

peptide, they can affect the function of factor X and FXa by several aspects, for example, modulating posttranslational modifications, secretion from hepatocytes, factor X activation and interaction with cofactors.

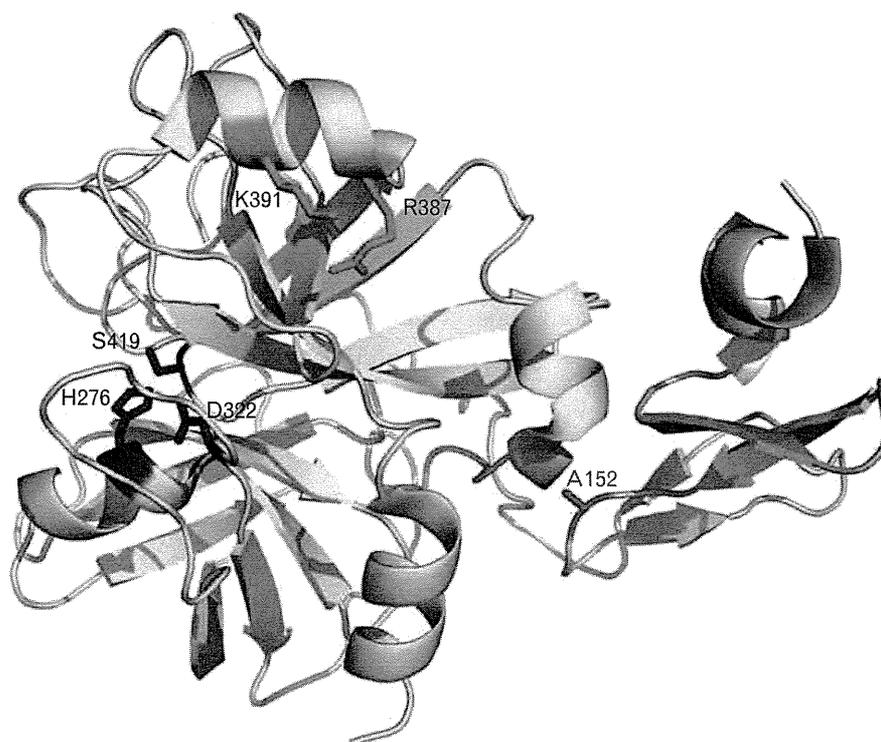
In this study, we assessed the influence of two mutations, A152T and G192R, on the function of FXa, and anti-FXa and anticoagulation activities of edoxaban.

Materials and methods

Reagents and drugs

Edoxaban tosylate, (DU-176b) was synthesized at Daiichi Sankyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan). All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, Massachusetts, USA). S1 nuclease and DNA Ligation Kit Ver.2.1 were obtained from TAKARA BIO Inc. (Tokyo, Japan). LB-Agar Medium tablet, LB-Medium tablet, vitamin K1, dimethyl sulfoxide (DMSO), phosphate-buffered saline (PBS), albumin from bovine serum (BSA) and PEG8000 were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, Missouri, USA). Ampicillin and kanamycin sulfate were supplied from Funakoshi Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Isopropyl alcohol, ethyl alcohol, distilled water (dH₂O), NaCl, CaCl₂ and HCl were purchased from WAKO Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan). Human embryonic kidney (HEK) 293

Fig. 1



Schematic representation of crystal structure of FXa and locations of A152T mutation. The A152 is colored red and the active site residues, H276, D322 and S419, are colored blue; interacting site residues with FVa, R387 and K391, are colored green. Both active sites of FXa and interacting sites with FVa are structurally apart from A152. This model was generated using PyMOL (<http://pymol.sourceforge.net>).

cells were purchased from Dainippon Pharmaceutical (Kyoto, Japan). Trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin and Opti-MEM I Reduced-Serum medium (Opti-MEM I) were obtained from Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA). Tris was purchased from MP Biomedicals (Solon, Ohio, USA). Taq PCR Master Kit was from Qiagen K.K. (Tokyo, Japan). QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit and pCMV-Script vector were obtained from Stratagene Cloning Systems (La Jolla, California, USA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from JRH Biosciences (Lenexa, Kansas, USA). FuGENE 6 Transfection Reagent was purchased from Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, Indiana, USA). Factor X extracted from human plasma was obtained from Calbiochem (San Diego, California, USA). RVV-X factor X activator was purchased from Pentapharm (Basel, Switzerland). S-2222 was purchased from Chromogenix (Milan, Italy). Factor X-deficient plasma, Owren's veronal buffer, Thromborel S, actin-activated cephaloplastin reagent and CaCl₂ solution were all obtained from Sysmex Corporation (Hyogo, Japan).

Construction of expression vectors

The pCMV4-ss-pro-II-hFX plasmid, which contains a chimeric cDNA consisting of a human prothrombin signal and propeptide sequence (position: +1 to 129 in Genbank accession number NM_000506) followed by mature human factor X (position: 121 to 1467 in NM_000504) [23], was provided by Dr Rodney M. Camire (The Children's Hospital of Philadelphia, Pennsylvania, USA). This chimeric factor X cDNA increases the ratio of fully γ -carboxylated recombinant factor X (rFX) compared with the carboxylation of the native factor X cDNA [24]. In this study, the oligonucleotide numbers are defined as follows: the A in ATG initiation codon of a chimeric cDNA of prothrombin and factor X is denoted nucleotide +1. The first amino acid of mature factor X, Ala, is denoted amino acid +1. Two mutations, G463A and G583A, which correspond to G454A (rs3211772) and G574A (rs3211783) in NM_000504, respectively, were introduced using a QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. Modification of G463A and G583A result in amino acid substitutions of A152T and G192R, respectively. The following primers were constructed for mutagenesis, in which the underlined parts show where the nucleotide was modified. Primer A: 5',-GTGTGCTCC TGCACCCGCGGGTACACC-3' and primer B: 5',-GGT GTACCCGCGGGTGCAGGAGCACAC-3', introduced A152T. Primer C: 5'-CAGCAGCAGCAGGGAGGCCCC TGAC-3' and primer D: 5'-GTCAGGGGCCTCCCT GCTGCTGCTG-3', introduced G192R. Each chimeric prothrombin/factor X insert (wild type, A152T and G192R) was digested with *Bgl*II followed by S1 nuclease and digested by *Hind*III, gel-purified and subcloned into pCMV-Script vector generating pCMV-Script-ss-pro-II-

hFX, pCMV-Script-ss-pro-II-hFX-A152T and pCMV-Script-ss-pro-II-hFX-G192R, respectively.

Expression of recombinant factor X

HEK 293 cells were dispersed to flasks in DMEM supplemented with 10% FBS and grown to subconfluence at 37°C in 5% CO₂ followed by changing the medium to Opti-Mem I containing 6 μ g/ml of vitamin K1. Cells were transiently transfected with pCMV-Script-ss-pro-II-hFX, pCMV-Script-ss-pro-II-hFX-A152T, or pCMV-Script-ss-pro-II-hFX-G192R using FuGENE 6 Transfection Reagent to generate wild-type rFX, rFX-A152T, or rFX-G192R, respectively. The culture media containing rFXs were harvested every 48 h and concentrated with Amicon Ultra-15. The concentrations of rFXs were determined by diagnostic assay (ASSERACHROM X:Ag/Diagnostica Stago, Paris, France). The concentrations of rFXs referring to the standard curve of factor X extracted from human plasma were calculated.

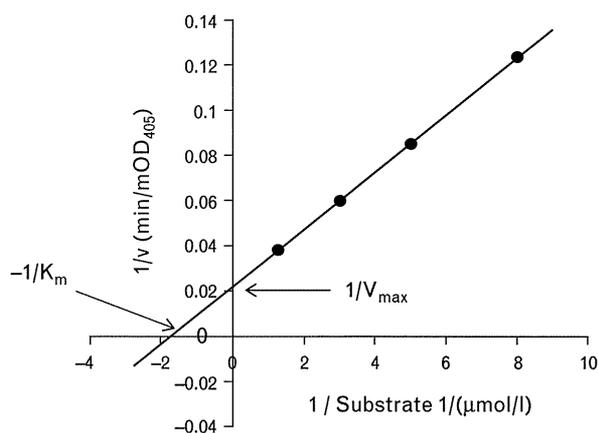
Measurement of enzyme activities of rFXAs and anti-FXa activity of edoxaban

Catalytic activities of rFXAs were measured based on the methods described in the previous report with some modifications [11]. Activation of rFX to rFXa was driven as follows using 96-well microplates: 25 μ l of rFX (0.2 μ g/ml: adjusted with Opti-MEM I) was mixed with 25 μ l of activation buffer containing RVV-X FX activator (0.1 U/ml), NaCl (0.1 mol/l), Tris-HCl (0.02 mol/l), BSA (0.1 mg/ml), PEG8000 (0.1%) and CaCl₂ (5 mmol/l). The reactions were incubated at 37°C for 1.5 h. The enzymatic reactions of FXa were triggered by the addition of the chromogenic substrate S-2222. To measure amidolysis of S-2222 (125 to 800 μ mol/l) by FXa, the absorbance at 405 nm was monitored with a Wallac ARVO 1420 (Perkin-Elmer, Inc, Waltham, Massachusetts, USA) for 10 min and the reaction velocity (mOD/min) was obtained. The anti-FXa activity of edoxaban was measured in the presence of 1 to 4 nmol/l of edoxaban. Michaelis-Menten parameters, reaction velocity maxima (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) of rFXAs were calculated by the Lineweaver-Burk plots as indicated in Fig. 2, and the inhibition constant (K_i) values and their 95% confidence intervals (95% CIs) of edoxaban were calculated by the Lineweaver-Burk plots followed by subsequent secondary plots.

Measurement of clotting time and anticoagulant activity of edoxaban

To investigate an influence of factor X mutations on the coagulation and anticoagulant activity of edoxaban, we used reconstituted plasma consisting of rFXs and factor X-deficient plasma. Clotting parameters including prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT) were measured with a coagulometer CA-50 (Sysmex Corporation, Hyogo, Japan).

Fig. 2



Representative Lineweaver–Burk plot of catalytic activity of recombinant FXa. Catalytic activities of recombinant FX as were measured in a chromogenic assay using S-2222.

PT was measured as follows: 25 μ l of 5 μ g/ml rFXs, 25 μ l of edoxaban (0.01 to 1.0 μ mol/l) in 4% DMSO/Owren's Veronal Buffer (v/v) and 50 μ l of FX-deficient plasma were mixed at 37°C. Three minutes later, the clotting reactions were started by the addition of 200 μ l of Thromborel S and the clotting assays were measured.

aPTT was measured as follows: 25 μ l of 5 μ g/ml factor X, 25 μ l of edoxaban (0.01 to 1.0 μ mol/l) in 4% DMSO/Owren's Veronal Buffer (v/v) and 50 μ l of factor X-deficient plasma were mixed at 37°C. One minute later, 100 μ l of actin-activated cephaloplastin reagent was added to the reagent mixture and incubated at 37°C for 2 min. The reactions were started with the addition of 100 μ l of 25 mmol/l CaCl₂ solution to the mixture and the clotting times were measured.

Statistical analysis

Analyses were performed using EXSAS ver. 6.10 and 7.10 (ARM SYTEX, Osaka, Japan) based on SAS System release 8.2 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan). Data are expressed as mean (standard deviation of mean, SD) unless otherwise noted.

Results

Impacts of F mutations, A152T and G192R, on functions of factor X

As with wild-type rFX, both rFX-A152T and rFX-G192R can be obtained from transfected cells, suggesting these mutations did not influence secretory pathway of factor X. A representative Lineweaver–Burk plot of catalytic activity of rFXa is shown in Fig. 2. All of rFXas activated from wild-type rFX, rFX-A152T and rFX-192R cleaved S-2222 with K_m values (SD) of 0.58 (0.06), 0.56 (0.05) and 0.60 (0.09) nmol/l and V_{max} values (SD) of 50.4(7.3), 46.4(3.3) and 53.3(8.6) mOD/min, respectively (Table 1).

Table 1 Impacts of Factor X mutations, A152T and G192R, on functions of Factor X

	Catalytic activity		Coagulation time	
	K_m (mmol/l)	V_{max} (mOD/min)	PT (s)	aPTT (s)
Wild-type	0.58 (0.06)	50.4 (7.3)	23.6 (1.8)	75.1 (3.6)
A152T	0.56 (0.05)	46.4 (3.3)	23.8 (0.6)	72.5 (5.6)
G192R	0.60 (0.09)	53.3 (8.6)	24.3 (0.4)	71.8 (3.1)

Factor X mutations, A152T and G192R, did not affect the catalytic activity and coagulation activity of FX. Data represent mean (standard deviation) of six independent experiments. aPTT, activated partial thrombin time; PT, prothrombin time.

These data indicate that these mutations do not influence FXa catalytic activity.

Clotting time was measured using reconstituted plasma consisting of factor X-deficient plasma and recombinant factor X. All rFXs were functional in both extrinsic (PT) and intrinsic (aPTT) coagulation pathway measurements in the reconstituted plasma. PTs of plasma containing wild-type rFX, rFX-A152T and rFX-192R were 23.6 (1.8), 23.8 (0.6) and 24.3 (0.4) seconds, respectively. APTTs of plasma containing wild-type rFX, rFX-A152T and rFX-192R were 75.1 (3.6), 72.5 (5.6) and 71.8 (3.1) seconds, respectively (Table 1). There are no changes in clotting times by these mutations.

Influence of A152T and G192R on anti-FXa activity of edoxaban

All of FXas activated from wild-type rFX, rFX-A152T and rFX-192R were inhibited by edoxaban with the coequal K_i values (95% CI) of 0.89 (–0.020 to 2.8), 0.85 (0.30–1.6) and 1.1 (0.40–2.4) nmol/l, respectively (Table 2), implying that anti-FXa activity of edoxaban was not influenced by the mutations.

Impact of A152T and G192R on anticoagulant activity of edoxaban

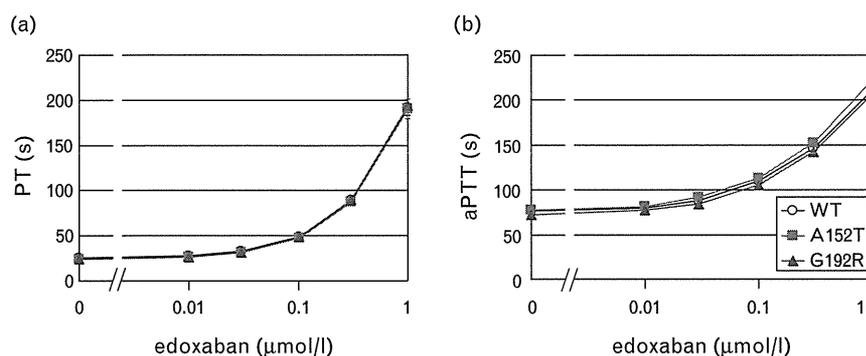
The coagulation times of reconstituted plasma consisted with rFXs and factor X-deficient plasma were prolonged by edoxaban (Fig. 3). The concentrations of edoxaban required to double the PT (95% CI) of wild-type rFX, rFX-A152T and rFX-192R were 0.12 (0.09–0.14), 0.12 (0.09–0.14) and 0.11 (0.09–0.14) μ mol/l, respectively. The concentrations of edoxaban required to double

Table 2 Impacts of Factor X mutations, A152T and G192R, on anti-FXa and anti coagulant activity of edoxaban

rFX	K_i value (nmol/l) Mean (95% CI)	Concentration to double coagulation times (μ mol/l)	
		PT (95% CI)	aPTT (95% CI)
Wild-type	0.89 (–0.020–2.8)	0.12 (0.09–0.14)	0.50 (0.44–0.56)
A152T	0.85 (0.30–1.6)	0.12 (0.09–0.14)	0.45 (0.40–0.51)
G192R	1.1 (0.40–2.4)	0.11 (0.09–0.14)	0.46 (0.41–0.52)

Data indicate there was no significant difference among wild-type and mutant rFXas. K_i values of edoxaban are expressed as the means and 95% confidence intervals (95% CI) of three independent experiments. aPTT, activated partial thrombin time; PT, prothrombin time.

Fig. 3



Anticoagulant effects of edoxaban in reconstituted plasma with Factor X-deficient plasma and wild-type rFXa, rFXa-A152T or rFXa-G192R. There was no significant difference in the anticoagulant effects to extend (a) prothrombin time (PT) and (b) activated partial thrombin time (aPTT) of edoxaban between wild-type and mutant Factor X. Data represent the means \pm standard deviation ($N=3$).

the aPTT (95% CI) of wild-type rFX, rFX-A152T and rFX-192R were 0.50 (0.44–0.56), 0.45 (0.40–0.51) and 0.46 (0.41–0.52) $\mu\text{mol/l}$, respectively.

Discussion

Pharmacogenomics has recently been used to uncover a number of genetic variants that affect drug safety and efficacy. The identification of such genetic variations can improve drug-prescribing decisions by identifying which patients should avoid specific drugs and which patients should take a modified dosage of drugs. In fact, the labels of several drugs have been updated based on pharmacogenomic evidence. The variability of a drug response caused by genetic mutations often results from changes in the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. Pharmacokinetic alternations can be attributed to variations of drug-metabolizing enzymes and transporters. Alternations in pharmacodynamics often result from variations of genes of the drug target or target-related proteins such as VKORC1 for warfarin [2,5–7], platelet glycoprotein IIIa for clopidogrel [8,9] and KRAS (V-KI-RAS2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) for panitumumab [25,26]. The interpatient variability of a drug response is a serious issue especially for antithrombotic drugs. Warfarin has a large interpatient variability not only in pharmacokinetics by SNPs of CYP2C9, but also in pharmacodynamics by SNPs of VKORC1. Hence, the patients receiving warfarin have to be carefully and repeatedly monitored to maintain the appropriate dosage [27]. Anticoagulant drugs, which can exert a consistent antithrombotic effect regardless of genetic variations, therefore provide a clinically important advantage over vitamin-K antagonists.

In this study, we focused on the possibility of impact of genetic SNPs on factor X. Among known factor X SNPs in the NCBI dbSNP database, we selected two nonsynonymous SNPs inside mature factor X, A152T and G192R, as possible candidates, which might affect the

function of factor X and the activity of edoxaban. Although allelic frequencies of A152T and G192R are around 5% or less, if these mutants would have an excess procoagulant tendency or an abnormal reactivity to anticoagulants, these mutants may lead to severe thrombotic or hemorrhagic events. At present, limited data are available regarding the impact of these two mutations on the function of factor X as a coagulation factor and the activities of anticoagulants. Therefore, we investigated the impact of A152T and G192R mutations on the functions of factor X and the activities of edoxaban by measuring FXa activity and clotting times, PT and aPTT. Although we cannot exclude the possibility that PT and aPTT are insensitive to detect the impact of factor X mutations, we think the coagulation times reflect some important process related to factor X function such as factor X activation, prothrombinase formation and thrombin formation.

First, both mutations showed no statistically significant differences in K_m and V_{max} values of FXa, or PT and aPTT. These results indicate that the mutations have little impact on the functions of factor X and FXa and suggest that the two mutations do not influence the activation process from zymogen to active form and interaction between cofactors including FVa and Ca^{2+} , or enzyme activity. Secondly, no statistically significant difference was found between wild-type and the two mutations in activities of edoxaban, suggesting that these mutations do not influence the affinity of edoxaban for FXa.

In our previous report, the K_i value of edoxaban was 0.561 nmol/l, and the concentrations to double PT and a PTT of human plasma were 0.256 and 0.508 $\mu\text{mol/l}$, respectively [11]. The K_i values and the concentrations to double aPTT of edoxaban in the present study were consistent with those in the previous report. In contrast, the mean concentrations to double PT of reconstituted plasma containing rFX and factor X-deficient plasma

were 0.12, 0.12 and 0.11 $\mu\text{mol/l}$, respectively, indicating the concentrations were approximately half of that in the previous report. This difference may depend on the different PT reagents used, as PT response by edoxaban differs by PT reagent [28].

In previous reports, edoxaban was noted to have a predictable and consistent pharmacokinetic and pharmacodynamic profile across subjects with low intersubject variability [14,15]. Taken together, these data suggest edoxaban might have less interpatient variability than warfarin in terms of both pharmacokinetics and pharmacodynamics. To prove the above hypothesis, the impact of the mutations of factor X should be investigated in clinical pharmacogenomic studies.

In conclusion, two mutations of factor X, A152T and G192R, did not affect the FXa catalytic and coagulation activities and, furthermore, had little impact on the anti-Xa and anticoagulant activities of a direct FXa inhibitor, edoxaban. This study suggests that edoxaban is less likely to have interpatient variability stemming from SNPs in the factor X gene.

Acknowledgements

Conflicts of interest

This study presented here is sponsored by Daiichi Sankyo Co., Ltd., K.N., Y.M., S.T., H.I. and T.S. are employees of Daiichi Sankyo Co., Ltd. M.M. is funded by Daiichi Sankyo Co., Ltd.

References

- Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; **356**:1667–1671.
- Becquemont L. Pharmacogenomics of adverse drug reactions: practical applications and perspectives. *Pharmacogenomics* 2009; **10**:961–969.
- Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. American Heart Association/ American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation* 2003; **107**:1692–1711.
- Baglin TP, Keeling DM, Watson HG. Guidelines on oral anticoagulation (warfarin): third edition-2005 update. *Br J Haematol* 2006; **132**:277–285.
- Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; **358**:999–1008.
- Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, et al. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet* 1996; **348**:423–428.
- Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, O Kane DJ, Xia F, Verbrugge RR, et al. Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**:2804–2812.
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009; **360**:354–362.
- Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 2011; **17**:110–116.
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Sabate M, Fernandez C, et al. PIA polymorphism and platelet reactivity following clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stent implantation. *Blood Coagul Fibrinol* 2004; **15**:89–93.
- Furugohri T, Isobe K, Honda Y, Kamisato-Matsumoto C, Sugiyama N, Nagahara T, et al. DU-176b, a potent and orally active factor Xa inhibitor: in vitro and in vivo pharmacological profiles. *J Thromb Haemost* 2008; **6**:1542–1549.
- Weitz JI, Connolly SJ, Patel I, Salazar D, Rohatagi S, Mendell J, et al. Randomised, parallel-group, multicentre, multinational phase 2 study comparing edoxaban, an oral factor Xa inhibitor, with warfarin for stroke prevention in patients with atrial fibrillation. *Thromb Haemost* 2010; **104**:633–641.
- Raskob G, Cohen AT, Eriksson BI, Puskas D, Shi M, Bocanegra T, et al. Oral direct factor Xa inhibition with edoxaban for thromboprophylaxis after elective total hip replacement: a randomised double-blind dose-response study. *Thromb Haemost* 2010; **104**:642–649.
- Ogata K, Mendell-Harary J, Tachibana M, Masumoto H, Oguma T, Kojima M, et al. Clinical safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the novel factor Xa inhibitor edoxaban in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2010; **50**:743–753.
- Mendell J, Tachibana M, Shi M, Kunitada S. Effects of Food on the Pharmacokinetics of Edoxaban, an Oral Direct Factor Xa Inhibitor, in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol* 2011; **51**:687–694.
- Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; **53**:505–518.
- Leytus SP, Chung DW, Kisiel W, Kurachi K, Davie EW. Characterization of a cDNA coding for human factor X. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**:3699–3702.
- Herrmann FH, Auerswald G, Ruiz-Saez A, Navarrete M, Pollmann H, Lopaciuk S, et al. Greifswald Factor X Deficiency Study Group. Factor X deficiency: clinical manifestation of 102 subjects from Europe and Latin America with mutations in the factor 10 gene. *Haemophilia* 2006; **12**:479–489.
- Dewerchin M, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D, et al. Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice. *Thromb Haemost* 2000; **83**:185–190.
- Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; **76**:1–16.
- Levigne S, Thiec F, Cheral G, Irving JA, Fribourg C, Christophe OD. Role of the alpha-helix 163-170 in factor Xa catalytic activity. *J Biol Chem* 2007; **282**:31569–31579.
- Steen M, Villoutreix BO, Norström EA, Yamazaki T, Dahlbäck B. Defining the factor Xa-binding site on factor Va by site-directed glycosylation. *J Biol Chem* 2002; **277**:50022–50029.
- Camire RM, Larson PJ, Stafford DW, High KA. Enhanced gamma-carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide. *Biochemistry* 2000; **39**:14322–14329.
- Fung MR, Hay CW, Mc Gillivray RT. Characterization of an almost full-length cDNA coding for human blood coagulation factor X. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**:3591–3595.
- Sheffield LJ, Phillimore HE. Clinical use of pharmacogenomic tests in 2009. *Clin Biochem Rev* 2009; **30**:55–65.
- Soulières D, Greer W, Magliocco AM, Huntsman D, Young S, Tsao MS, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol* 2010; **17**:S31–40.
- Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, et al. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009; **360**:753–764.
- Samama MM, Mendell J, Guinet C, Le Flem L, Kunitada S. In vitro study of the anticoagulant effects of edoxaban and its effect on thrombin generation in comparison to fondaparinux. *Thromb Res* 2012; **129**:e77–e82.

トロンビン力価の異なるフィブリノゲン測定試薬を用いた直接トロンビン阻害薬モニタリングの基礎的検討

藤森 祐多¹⁾ 片桐 尚子¹⁾ 涌井 昌俊²⁾ 清水 長子¹⁾
阪田 敏幸³⁾ 三ツ橋雄之²⁾ 村田 満²⁾

¹⁾慶應義塾大学病院中央臨床検査部

²⁾慶應義塾大学医学部臨床検査医学

³⁾アイ・エル・ジャパン株式会社血液凝固学術部

要 旨

経口直接トロンビン阻害薬は経口直接 Xa 阻害薬とともにワルファリンと比べて出血リスクが小さく有効性がありモニタリングは不要と考えられ、抗凝固療法の主流に位置づけられつつある。しかし、死亡例を含む重篤な出血例が数多く報告されてモニタリングの有用性に関する議論が活発化し、APTT を利用したモニタリングも一部で試みられている。我々は、トロンビン力価の異なる2種類の試薬間における Clauss 法でのフィブリノゲン測定値の乖離に着目し、モニタリングへの応用の可能性について基礎検討を行った。直接トロンビン阻害薬であるアルガトロバンを添加した3段階のフィブリノゲン濃度の血漿を調製し、トロンビン力価の異なる2つの市販試薬キットを用いてフィブリノゲンを測定した。トロンビン高濃度の系ではアルガトロバン濃度 1.9 $\mu\text{mol/L}$ の添加まで測定値は一定であり、トロンビン低濃度の系ではアルガトロバン添加濃度依存性に測定値の低下が見られた。トロンビン高濃度での測定値をトロンビン低濃度での測定値で除して求めた FIB 比は、アルガトロバン添加濃度の増加に対して、高濃度域で APTT よりも、低濃度域と高濃度域の両方で PT よりも鋭敏に上昇した。FIB 比は直接トロンビン阻害薬のモニタリング、特に出血の危険域の察知に有用である可能性が示唆された。

はじめに

特定の活性化凝固因子を直接的かつ選択的に阻害する新規経口抗凝固剤は、出血リスクが小さく

有効性があることが期待されて、ワルファリンに代わる抗凝固療法の旗手として注目されている。直接的トロンビン阻害剤 (direct thrombin inhibitor: DTI) であるダビガトランおよび活性化第 X 因子 (Xa) 阻害剤であるリバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバンが既に実用化されている。

最近これらの服用に関連した重篤な出血例が報告され、モニタリングの有用性についての議論が活発化している。新規経口抗凝固薬ガイドンス¹⁾では、ダビガトラン服用中に出血が認められるような病態は、希釈トロンビン時間やエカリン凝固時

Fujimori Yuta

(〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35)

アドレス: yuta.fujimori@adst.keio.ac.jp

キーワード: 直接トロンビン阻害薬, アルガトロバン, FIB 比, モニタリング

受付日: 2015年2月9日

受理日: 2015年5月19日

間法をベースとした検査法で血中濃度を測定することが推奨されている。しかし、本邦では保険適応となっていないのが現状である。代わりにAPTTによるDTIsのモニタリングが報告されているものの²⁾、有用性はまだ十分に確立されていない。

DTIがフィブリノゲン濃度測定値に影響を及ぼすことが指摘されており、その変化は用いる市販キットによって異なる³⁾。血中フィブリノゲン(Fbg)濃度は、トロンビン時間法(Clauss法)に基づいて定量する方法で測定されているため、測定値への影響の違いは、使用する試薬中のトロンビン活性濃度に依存すると考えられる。すなわち、低力価のトロンビン試薬では濃度依存性にDTIによって阻害されることでFbg濃度は偽陰的に低値を示し、高力価のトロンビン試薬では有意なトロンビン阻害作用はなく、Fbg濃度に変化は認められない。このようなトロンビン力価の異なる2つの測定試薬間におけるFbg測定値の乖離の程度はDTI濃度の把握に応用できると期待される。我々は、アンチトロンビン非依存性の合成抗トロンビン薬であるアルガトロバンとプール血漿を用いた添加実験系による基礎的検討を行い、本邦でも利用可能なモニタリングへの応用の可能性について検討した。

対象および方法

1. プール血漿の作製

学内倫理委員会の承認(倫理委員会承認番号: 20100224)のもとで、残余検体の提供に関する包括的協力が同意が得られた当院における入院患者および外来患者の3.2%クエン酸Na加血漿検体の残余を用いた。PTおよびAPTTが基準範囲内かつ抗凝固薬未使用の患者血漿を同じFbg濃度域ごとにプールし、3段階(低濃度140mg/dL、基準域濃度240mg/dL、高濃度440mg/dL)のプール血漿を作製した。

2. 使用したDTIおよびDTIの添加方法

DTIとして、アルガトロバン(スロンノンHI注10mg/2mL: 田辺三菱製薬)を使用し、Factor Diluent(アイ・エル・ジャパン)を用いて、19.0 μmol/Lのアルガトロバン溶液を作製した。この

アルガトロバン溶液をプール血漿に10%の割合で添加して1.90 μmol/Lのアルガトロバンプール血漿およびFactor Diluentを10%の割合で添加してアルガトロバン無添加プール血漿を作製した。両者を用いて0 μmol/Lから1.9 μmol/Lのアルガトロバン濃度系列のプール血漿を作製した。

3. 測定機器および測定項目

全自動血液凝固測定装置CA-7000(Sysmex)を用いて、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定し、全自動臨床検査システムSTACIA(LSIメディエンズ)を用いて、Fbg濃度を測定した。

4. 測定試薬および評価方法

PT測定にはヒーモスアイエルリコンビプラスチン2G(アイ・エル・ジャパン、ローカルSI: 0.90)を用い、PT-INRで評価した。APTT測定にはデータファイ・APTT(シスメックス)、アクチンFSL(シスメックス)、ヒーモスアイエル シンサシルAPTT(アイ・エル・ジャパン)、コアグピアAPTT-N(積水メディカル)の4種の試薬を用い、アルガトロバン無添加プール血漿での測定値を投与前値とし、各アルガトロバン濃度における測定値を無添加プール血漿での測定値で除したAPTT比で評価した。Fbg測定にはトロンビン100NIH units/mLのデータファイ・フィブリノゲン(シスメックス): 測定値A、および35NIH units/mLのヒーモスアイエル フィブ・C XL(アイ・エル・ジャパン): 測定値Bの2種の試薬を用い、FIB比=A/Bで評価した。

結 果

1. アルガトロバン添加によるFbg測定値の変化

アルガトロバンを添加した3段階のFbg濃度のプール血漿についてFbg濃度を測定した(図1)。トロンビン100NIH units/mLを含むデータファイ・フィブリノゲン試薬を用いて測定した時、アルガトロバン添加によるFbg測定値への影響は認められなかった。トロンビン35NIH units/mLを含むヒーモスアイエル フィブ・C XL試薬で測定した時、アルガトロバン添加濃度に依存したFbg測定値の低下が認められた。これ

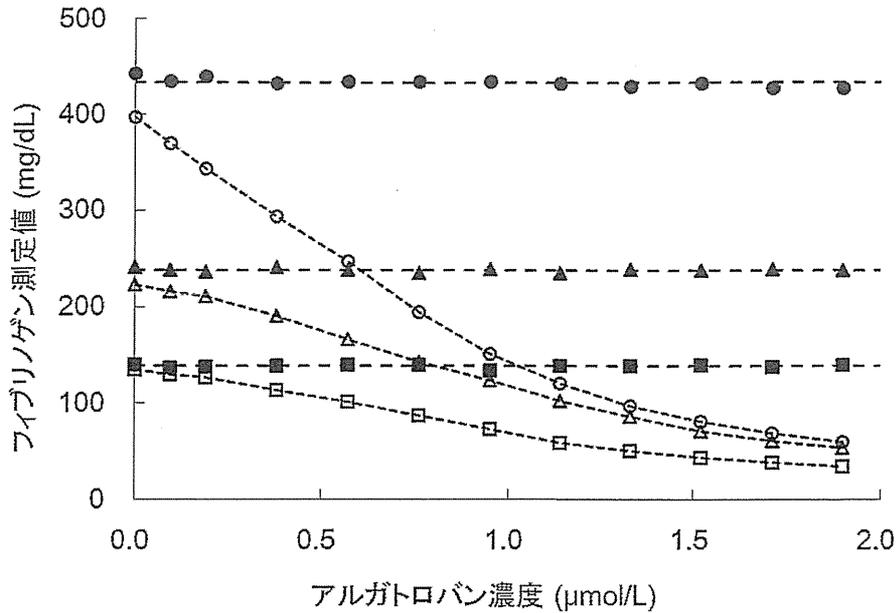


図1. 異なるフィブリノゲン濃度のプール血漿におけるアルガトロバン添加によるフィブリノゲン測定値の変化
 プール血漿中のフィブリノゲン濃度；○, ●：440mg/dL, △, ▲：240mg/dL, □, ■：140mg/dL
 データファイ・フィブリノゲン試薬での測定値；●, ▲, ■
 ヒーモスアイエル フィブ・C XL 試薬での測定値；○, △, □

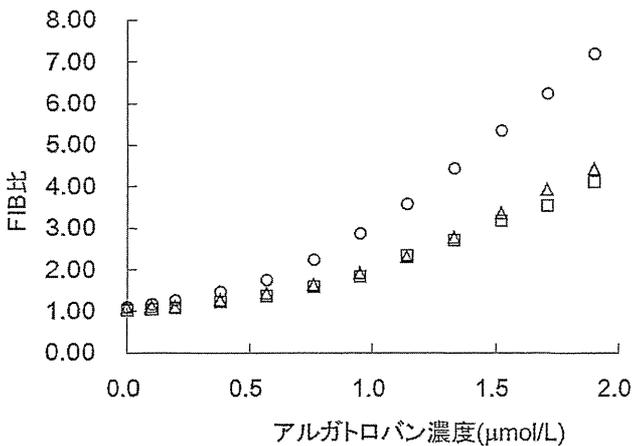


図2. 異なるフィブリノゲン濃度のプール血漿におけるアルガトロバン添加によるFIB比（データファイ・フィブリノゲン試薬/ヒーモスアイエル フィブ・C XL 試薬比）の変化
 プール血漿のフィブリノゲン濃度；○：440mg/dL, △：240mg/dL, □：140mg/dL

らのFbg測定値からFIB比を算出したところ、全てのFbg濃度のプール血漿において、アルガトロバン添加濃度に依存してFIB比が上昇した（図2）。

2. 4種類のAPTT測定試薬を用いたAPTT比の測定結果

3つのFbg濃度のアルガトロバン添加プール血漿で、4種類のAPTT測定試薬を用いて測定したAPTT比を示す（図3A～C）。どのプール血漿においても、全ての試薬でアルガトロバン添加濃度に依存してAPTT比が上昇したが、試薬間で差が見られた。

3. アルガトロバン添加によるPT-INRの変化

3つのFbg濃度のプール血漿でのアルガトロバン添加によるPT-INRの変化を図4に示す。

全てのプール血漿で、アルガトロバンによってPT-INRの上昇がみられた。

考 察

アルガトロバンは、本邦で開発された先駆的なDTIであり、非心原性脳血栓症急性期、慢性動脈閉塞症、アンチトロンビン欠損・欠乏症例の血液体外循環時、ヘパリン起因性血小板減少症における血栓症の発症抑制に用いられる注射薬である⁴⁾。それ自体が薬理活性体であり、DTIsのモニタリ

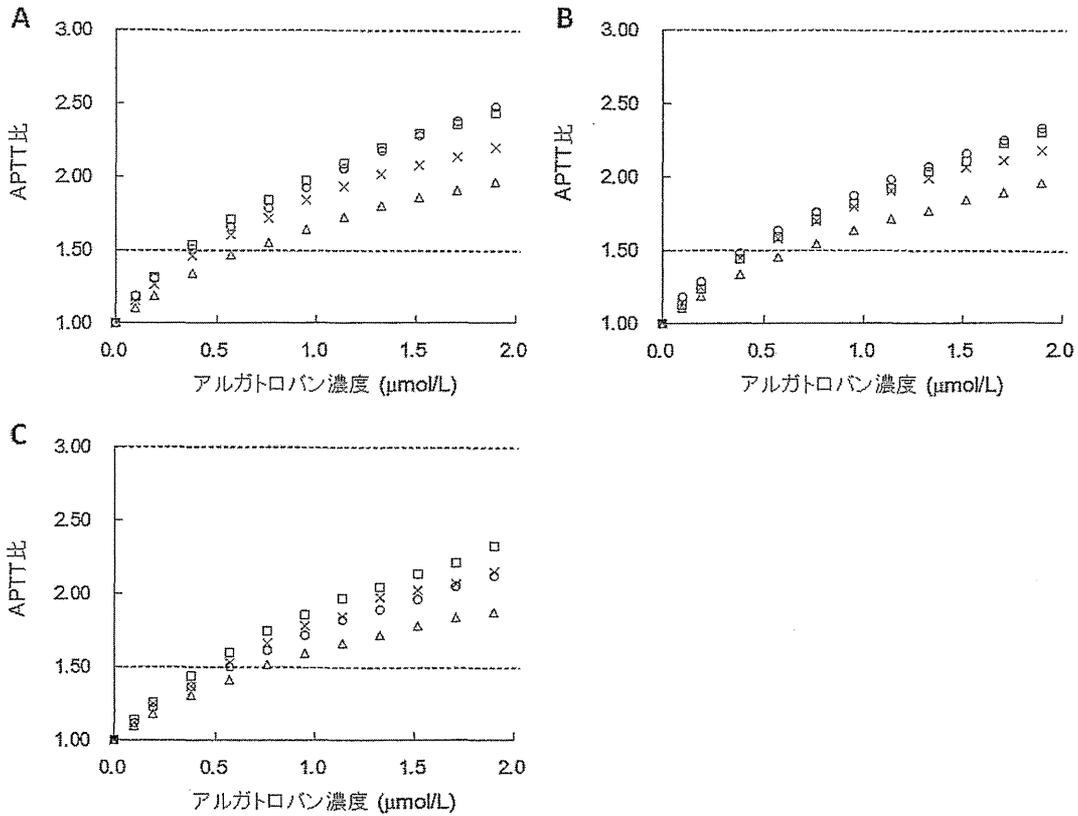


図 3. APTT 試薬のアルガトロバン感受性比較

A. 140mg/dL, B. 240mg/dL, C. 440mg/dL のフィブリノゲン濃度のプール血漿を使用。点線はアルガトロバンの治療域を示す。各試薬でのアルガトロバン添加前後の APTT (秒数) の比を APTT 比とする。

- × : コアグピア APTT-N □ : データファイ・APTT
- : シンサシル APTT △ : アクチン FSL

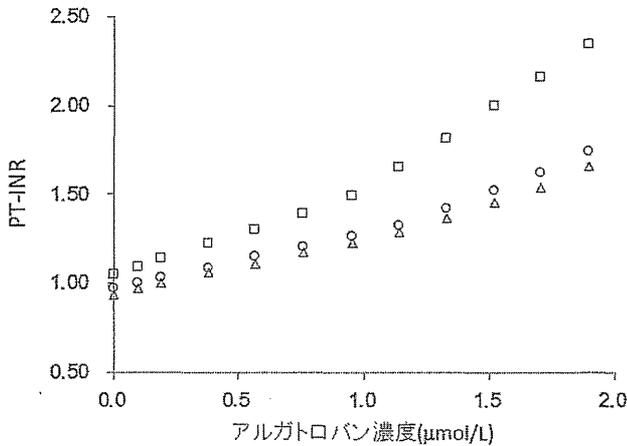


図 4. アルガトロバン添加による PT-INR の変化
 プール血漿のフィブリノゲン濃度 (□ : 140mg/dL
 ○ : 240mg/dL △ : 440mg/dL)

ングの基礎検討としての添加実験のモデル薬物として適しており、本研究を実施した。

アルガトロバン投与例において、トロンビンの酵素活性を利用する原理に基づく凝固系検査、具体的には Fbg などの凝固因子の測定ではアルガトロバン用量に依存的に偽低値を示し、プロテイン C などの凝固抑制因子の測定では偽高値を示すことが指摘されている⁵⁾。これはトロンビン阻害に由来する事象であり、本来得べき測定値との乖離の大きさは、共存するアルガトロバンの濃度に依存すると考えられる。DTI に影響されない高濃度のトロンビンによる Fbg 測定値と影響される低濃度のトロンビンによる測定値により算出される FIB 比は、その発想に基づいて DTI 濃度を反映させる指標である。今回の検討で実際にそれぞれの Fbg 濃度のプール血漿について、アルガト

ロバン濃度依存性にFIB比の上昇が認められたことから有用性が示唆された。PT-INR, APTT比およびFIB比の3つのアッセイを比較した結果、アルガトロバンの添加濃度に対して、PT-INRの上昇は最も鈍くモニタリングには不適切と考えられた。APTT比は低濃度のアルガトロバン添加で上昇変化が鋭敏で治療域のモニタリングには有利であるが、高濃度のアルガトロバン添加では変化が鈍くなり、出血の危険域のモニタリングには適さない。これに対し、FIB比は低濃度のアルガトロバンではAPTT比に比べて変動が小さいものの、高濃度のアルガトロバン添加で大きく上昇するため、危険域を評価するにはAPTTよりも有利であることが示唆された。

アルガトロバンによるAPTTの延長は、試薬により異なることが報告されており⁶⁾、本研究でも同様であった。APTTは標準化されていない検査であり、組成物質である活性化剤とリン脂質の組合せや濃度が試薬間で異なり、試薬間差が存在する⁷⁾。凝固第VIII因子や第XI因子は基質としてトロンビンの作用を受け、APTTに反映される凝固因子である。これらの凝固因子のトロンビンによる活性化において、リン脂質と活性化剤の違いによりアルガトロバンの阻害効果の程度が左右される可能性が考えられる。このことからアルガトロバン添加によるAPTT比の増大に試薬間差が生じると考えられたが、さらなる検討が必要である。

FIB比は検体中のFbgについてのトロンビン時間に対する延長効果を反映し、DTIに影響されない高濃度のトロンビンによるトロンビン時間がDTI無添加と同様の測定値をもたらすことを利用している。このため、APTTのようなDTI投与前の被験者からのサンプリングを必要とせず、観察したい時点のサンプリングのみでアッセイできる。また、フィブリノゲン測定は検体由来のフィブリノゲンと試薬中のトロンビンの両者だけで成立する単純な試験管内凝固反応であり、内因系凝固因子の連鎖的活性化の最終的な結果であるAPTTとは異なり、干渉要因が極めて少ない。したがって、FIB比は変動幅が小さいものの、有効性を評価する低濃度域においても一定の有用性があると考えられた。

しかし、同じDTI濃度であっても、検体中のFbg濃度が高値であるとFIB比が大きくなるため、個々のFbg濃度を考慮してFIB比からDTI濃度を求める必要がある。本研究で実施したように複数のFbg濃度血漿でDTI濃度とFIB比の検量線を予め作成し、高濃度トロンビンによって得られる測定値の近傍のFbg濃度の場合の検量線を利用して概算し、網羅されていないFbg濃度の検体については、同じFbg濃度の血漿または溶液を調製して検量線を作成することで測定するというアプローチはDTIsのモニタリングへの実用化を可能にすると期待される。

今後さらなる検討を重ねてアッセイの実用性を高めるとともに、ダビガラン等のアルガトロバン以外のDTIsについても同様の検討を行い、FIB比の普遍的な有用性について確認する必要がある。

結 語

アルガトロバン添加血漿を用いた検討により、トロンビン力価の異なる2つの測定試薬間におけるFbg測定検査値の乖離に由来するFIB比は、直接型トロンビン阻害薬のモニタリング、特に出血の危険域の察知に有用である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kitchen S, et al: Measurement of non-coumarin anticoagulants and their effects on tests of Haemostasis: Guidance from the British Committee for Standards in Haematology, *Br J Haematol* 166(6): 830—841, 2014.
- 2) Douxfils J, et al: Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring of dabigatran etexilate. *Thromb Haemost* 107(5): 985—997, 2012.
- 3) Dager WE, et al: Dabigatran effects on the international normalized ratio, activated partial thromboplastin time, thrombin time, and fibrinogen: a multicenter, in vitro study. *Ann Pharmacother* 46(12): 1627—1636, 2012.
- 4) Okamoto S, et al: Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereo-structure of its hydrophobic car-

- boxamide portion. *Biochem Biophys Res Commun* 101 (2): 440—446, 1981.
- 5) Walenga JM: Coagulation laboratory testing in patients treated with argatroban. *Semin Thromb Hemost* 25(Suppl 1): 61—66, 1999.
- 6) Francis JL, Hursting MJ: Effect of argatroban on the activated partial thromboplastin time: a comparison of 21 commercial reagents. *Blood Coagul Fibrinolysis* 16 (4): 251—257, 2005.
- 7) 山崎 哲, 他: APTT の現状と標準化に向けた課題. *生物試料分析* 32 (5): 365—370, 2009.

Abstract

Basic examination of direct thrombin inhibitor monitoring using two fibrinogen reagents containing different thrombin units

Yuta Fujimori¹⁾, Hisako Katagiri¹⁾, Masatoshi Wakui²⁾, Nobuko Shimizu¹⁾, Toshiyuki Sakata³⁾,
Takayuki Mitsuhashi²⁾, Mitsuru Murata²⁾

¹⁾Department of Central Clinical Laboratory, Keio University Hospital,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

²⁾Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University,
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

³⁾IL Japan, 1-3-30 Mita, Minato-ku, Tokyo 108-0073, Japan

It has been expected that oral direct thrombin inhibitors (DTIs) would not require routine monitoring, in contrast to warfarin. However, some cases of severe bleeding with or without a fatal outcome have been reported among patients on medication with a DTI. Therefore, the clinical significance of monitoring DTIs is of considerable interest. We focused on the discrepancy between the measurement of fibrinogen in the presence of DTIs due to the use of different thrombin concentrations in the Clauss fibrinogen assay to basically examine the potential for laboratory tests to monitor anticoagulant activity of DTIs. Human plasma was spiked with various concentrations of the DTI, argatroban, and was then subjected to the measurement of fibrinogen at two different thrombin concentrations. The measured values of fibrinogen in the presence of argatroban were similar to those in the absence of argatroban at all concentrations up to 1.9 $\mu\text{mol/L}$ when assayed with a high thrombin concentration (high-thrombin). On the other hand, the measured values of fibrinogen decreased in parallel with an increase in the concentration of argatroban when assayed with a low thrombin concentration (low-thrombin). The fibrinogen ratio, which is calculated by dividing the fibrinogen value measured with high thrombin by that measured with low thrombin, increased more sensitively than the activated partial thromboplastin time at a high concentration range of argatroban, and the prothrombin time at both low and high concentration ranges. These results suggest that the fibrinogen ratio is useful for DTI monitoring, especially for the detection of the levels of DTI activities potentially leading to bleeding.

Key words: Direct thrombin inhibitor, Argatroban, Fibrinogen ratio, Monitoring

血小板数と血小板形態

Blood platelet count and platelet morphology

や た べ よう こ¹⁾ むら た みつる²⁾
谷田部 陽子¹⁾ 村田 満²⁾

〔臨床検査 59 : 173-179, 2015〕

Point

- 自動血球分析装置の血小板数測定にはさまざまな原理が用いられており、自施設で使用している機器の特徴を把握したうえで評価することが必要である。
- 血小板数測定にはピットフォールが存在し、電気抵抗法で表されるヒストグラムや塗抹標本上の血小板形態の観察は重要である。
- 血小板関連のパラメータには血小板数以外にも平均血小板容積(MPV)、血小板容積分布幅(PDW)などがあり、血小板に関する情報を得ることができる。
- 血小板減少症、増加症には多くの疾患があるが、MPVに表される血小板サイズにも特徴的な疾患が存在する。

Keywords

血小板数, 平均血小板容積(MPV), 血小板容積分布幅(PDW), 偽性血小板減少, 血小板形態異常

はじめに

現在、血小板数の測定は、自動血球計数装置による報告が主流となっている。しかし、自動血球計数装置の結果で報告できない場合があり、Brecher-Cronkite法やFonio法などを用いて報告している。

血小板数の基準範囲は15万~35万/ μL で、5万/ μL 以下に減少すると出血症状が出現し始め、2万/ μL 以下で血小板輸血の対象となることがある。血小板は骨髄中の巨核球が分化、成熟し、その細胞質の辺縁を切断して多数の血小板を放出する。放出された血小板は末梢血液中を7~10日間

循環して脾臓で寿命を終える。この産生機序に異常が生じると、血小板数の減少や増加、および大きさの大小に変化がみられる。

血小板減少症で出血がみられた場合、脳出血などの重篤な症状を引き起こすこともあり、治療として血小板輸血が行われる。2万/ μL 以下の血小板数では特に精度の高い報告値が求められる。一方、血小板増加症では血栓合併症のリスクも考慮しなければならない。血小板数の正確な測定を行うことは診断や治療経過において重要である。また、自動血球計数装置からは血小板に関するパラ

1) 慶應義塾大学病院 中央臨床検査部 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 2) 慶應義塾大学 医学部臨床検査医学

メータが測定されているが、検査指標のなかであり活用されていない。これらのパラメータには平均血小板容積(mean platelet volume: MPV)や血小板容積分布幅(platelet distribution width: PDW)などがあり、さまざまな情報を得ることが

できる。

本稿では血小板に関する計数値の意義や注意点、さらに血小板に関連する疾患や血小板形態について述べる。

自動血球分析装置の血小板数測定原理

自動血球計数装置に搭載されている血小板数計測の原理は、電気抵抗法や光学的測定法が主流である。電気抵抗法はオームの法則を応用した方法で、電流を通した小孔(アパーチャー)に血球を通過させると血球の容積に比例して電気抵抗の増加がみられ、これを用いて血球を鑑別して血小板を算定する¹⁾。カウントする細胞数が多いため、再現性に優れている。光学的測定法は、レーザー光を当てて通過する血球により反射した前方散乱光と側方散乱光から細胞の大きさや密度を計測し分類を行う方法で、レーザーの反射情報から血球の

内部構造を識別できるため、破碎赤血球や大血小板などの影響を受けにくい。

近年、蛍光標識抗 CD61 抗体を用いた免疫学的測定法を採用したセルダイン サファイア[®](アボットジャパン)²⁾や、蛍光色素を用いたフローサイトメトリー法(flow cytometry: FCM)による PLT-F チャンネル³⁾を搭載した XN シリーズ(シスメックス)も発売され、特に血小板低値域における精度の向上が図られている。自動血球分析装置の血小板数計測には多種の原理があり、特性を正しく理解して使い分けることが大切である。

血小板数の評価におけるピットフォール

自動血球計数装置において、電気抵抗法で測定された血小板の大きさはヒストグラムにて表示される。小赤血球や破碎赤血球が存在すると赤血球の大きさが血小板の大きさに近くなるため、血小板の測定範囲内に入り込み偽高値となる(図 1)¹⁾。一方、大血小板さらには巨大血小板が存在すると大きさが赤血球と近くなるために赤血球との区別が難しく、血小板測定範囲内から逸脱して偽低値となる。このような場合のヒストグラムは、正規分布である健常人と異なり、歪な山型や右肩上がりのような形状を示すので注意を要する。また、電気抵抗法と光学的測定法が両方搭載されている装置では、両データに解離がみられることが多く、推測が可能である。

偽性血小板減少が起こる機序には2つあり、1つは抗凝固剤のエチレンジアミン四酢酸(ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA)により血小板凝集を起こす EDTA 依存性偽性血小板減少症

(図 2)や白血球の周囲に血小板が付着する血小板衛星現象である⁴⁾。EDTA 依存性偽性血小板減少症が疑われた患者の血小板数計測には、クエン酸 Na やヘパリンなど EDTA とは異なる抗凝固剤を使用して測定を行う方法が一般的であるが、ほかにも EDTA 加採血管にカナマイシンなどの抗菌薬を添加して測定する方法や抗凝固剤の入っていない採血管で採血後、直ちに測定する方法などがある。

2つ目の原因は、採血手技や激しい攪拌による血小板凝集である。当検査室では、初回値が血小板数 15 万/ μ L 以下、または、前回値からの減少幅/前回値と今回値の平均 $>40\%$ である場合、血小板凝集やフィブリンの有無を末梢血塗抹標本で確認している。自動血球計数装置によっては、これらに関して警告メッセージ(PLT Clumps? など)を表示し注意を促すこともあり、その場合には血小板粒度分布と標本の確認が必要である。

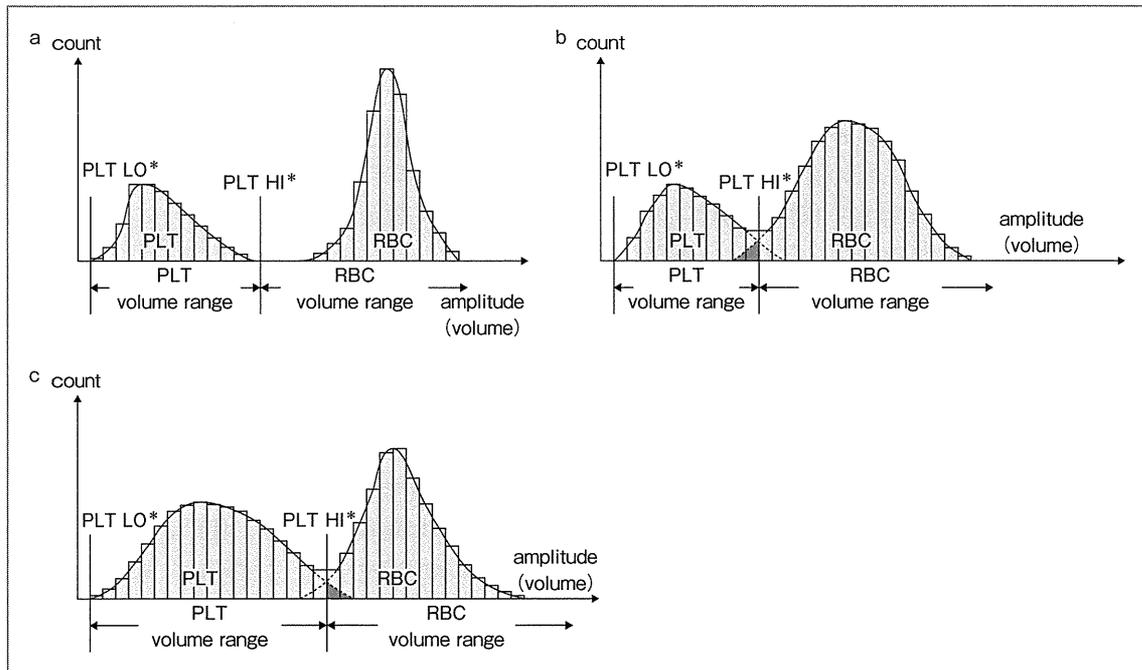


図1 電気抵抗法による血小板数のヒストグラム

a : normal blood. 血小板(直径 $2\mu\text{m}$)と赤血球(直径 $8\mu\text{m}$)が明確に分類されている。

b : microcytic blood(microcythemia). 血小板領域に小赤血球, 破碎赤血球が入り込んでいる(青色)。

c : macro platlet. 大血小板, 巨大血小板が血小板領域から逸脱している(青色)。

PLT LO* : lower threshold, PLT HI* : upper threshold.

[杉山昌晃, 巽典之: 自動血球分析の歴史. 英文対訳 計測技術ティーチング-自動血球分析装置の基本原理解(巽典之, 血液検査学研究会編), 宇宙堂八木書店, pp32-38, 2006 より一部改変して転載]

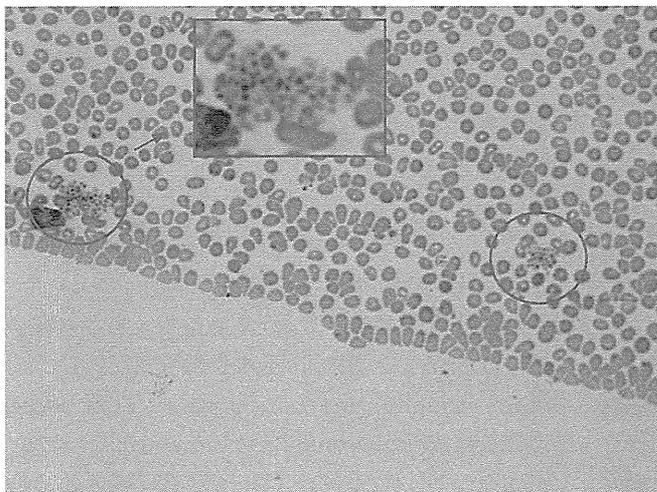


図2 偽性血小板減少

血小板の凝集が2カ所認められる(青丸印)。自動血球計数装置では、これらの血小板がカウントされないために、見掛け上血小板は減少する。偽性血小板減少症と考えられる。

血小板関連のパラメータ

自動血球計数装置における測定で表示される血小板関連パラメータは、血小板数のほか、MPV, PDW, 血小板クリット(plateletcrit : PCT)が挙げられる。

MPVは赤血球での平均赤血球容積(mean corpuscular volume : MCV)に相当し、血小板産生の程度などを推定することができる。血小板減少症においてMPVが利用されており、再生不良性

貧血などの血小板産生低下では小さくなり、特発性血小板減少性紫斑病(idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP)のように破壊消費亢進では大きくなる。血小板の産生が亢進している状態では、骨髄での産生後間もない血小板の容積は大きくなるため、健常人では血小板数とMPVの間には逆比例の関係がある⁵⁾。しかし、MPVはEDTA添加により時間とともに血小板が膨張傾向を示すため、採取後なるべく早く測定することが望ましい。松野⁶⁾は、MPVはEDTA添加30分間で増加し、その後2時間までは比較的安定した値をとるが、その後はさらに増大するとしている。厳密にMPVの解析を行うには、採血後30分から2時間に測定した結果を用いるのが望ましい。また、基準範囲は測定機種により測定値が異なるため、施設ごとに設定する必要がある。

PDWは、赤血球での赤血球粒度分布幅(red cell distribution width : RDW)に相当し、ヒストグラムで表した血小板容積分布の程度を数値化したものである。MPVに比べ臨床的意義は低い。また、電気抵抗法にて算出されるため、破碎赤血球が多数出現している試料では偽高値となる場合がある。

PCTは赤血球のヘマトクリットに相当し、全血に対する血小板容積の体積比を示している。個々の血小板容積が小さいため、臨床的有用性は低い。

その他に、シスメックスの分析装置のパラメー

タには大血小板比率(platelet-large cell ratio : P-LCR)、幼若血小板比率(immature platelet fraction : IPF)がある。P-LCRは12fLディスクリ以上の大型血小板比率を表しており、血小板凝集や破碎赤血球出現などで起こるオーバーラップの検知、血小板造血機能のモニターに有用とされている。

IPFは、骨髄から産出されたばかりの幼若な血小板を比率で表した数値で、参考基準値は1.1~6.1%である。IPFは骨髄の血小板産生能を反映し骨髄巨核球数と相関する。骨髄機能が正常であれば血小板が増えると巨核球が減り、逆に血小板が減ると巨核球が増えるため、健常人では、IPFと血小板数は逆相関を示す。IPFは血小板回復に先行して増加するため、化学療法や造血細胞移植などの血小板回復予測や血小板輸血適応の判断、血小板減少性疾患での造血不良(再生不良性貧血など)と血小板消費亢進(ITPなど)の鑑別に有用である⁷⁾。ほかにも骨髄検査などの侵襲的検査が困難な新生児における血小板減少症の鑑別や経過観察にも用いられ、活用の幅が広がっている。しかし、骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome : MDS)には血小板数がそれほど減少していないにもかかわらずIPFが高い“IPF高比率MDS”が存在する。このMDSの特徴には、7番染色体を中心とした予後不良の染色体異常、血小板や骨髄巨核球の形態異常の存在⁸⁾が挙げられている。

血小板に関する疾患や病態

■ 血小板減少症(表1)^{9,10)}

血小板数が10万/ μ L以下に減少した場合を血小板減少症という。重大な疾患が隠れている可能性があり、臨床状態と合わせて詳細に検査を行う必要がある。その要因は産生不良、破壊・消費亢進、血管内分布異常の3つに分けられる。

産生不良の疾患は機序によりさらに分類され、そのなかの1つである巨核球の減少は再生不良性貧血などの骨髄不全症や腫瘍細胞の骨髄浸潤、遺伝性血小板形態異常を伴う先天性疾患などで認められる。ほかに、MDSで主に認められる無効造血や血小板産生調節機構の異常がある。

破壊や消費亢進による血小板減少を起こす疾患は、ITPや血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)、播種性血管内凝固(disseminated intravascular coagulation : DIC)である。ITPは自己抗体による血小板減少、TTPや溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome : HUS)を含む血栓性微小血管障害(thrombotic microangiopathy : TMA)、DICは微細血管における血栓形成が原因となる。このような無効造血や破壊、消費亢進の病態では巨核球数が増加して血小板の産生サイクルが早くなるため、末梢血塗抹標本上で大血小板が認

表 1 血小板に関する病態や疾患

1. 血小板数の増減
(1) 血小板数減少
a) 産生の低下
再生不良性貧血, 骨髄浸潤(癌, 白血病など), 放射線・抗癌剤などによる骨髄抑制
先天性疾患 (Fanconi 症候群, May-Hegglin 異常, Bernard-Soulier 症候群など)
骨髄異形成症候群 (MDS), ビタミン B ₁₂ または葉酸欠乏症
b) 破壊・消費の亢進
特発性血小板減少性紫斑病 (ITP), 膠原病, 周期性血小板減少症, ヘパリン惹起血小板減少症 (HIT),
血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP), 溶血性尿毒症症候群 (HUS),
播種性血管内凝固 (DIC), 新生児血小板減少症, 妊娠, 感染症
c) 血管内分布異常
Banti 症候群, 脾機能亢進症
(2) 血小板数増加
a) 腫瘍性による増加
本態性血小板血症 (ET)
b) 反応性による増加 (2 次性血小板増加)
慢性感染症, 炎症性疾患, 溶血性貧血, 鉄欠乏性貧血, 悪性腫瘍(癌, 悪性リンパ腫),
真性多血症 (PV), 慢性骨髄性白血病 (CML), 骨髄線維症 (MF)
2. 血小板サイズ異常
(1) 小型血小板 (MPV の減少)
再生不良性貧血, 脾機能亢進症, ビタミン B ₁₂ または葉酸欠乏症, 抗癌剤などによる影響,
Wiskott-Aldrich 症候群
(2) 大血小板・巨大血小板 (MPV の増加)
特発性血小板減少性紫斑病 (ITP), 慢性骨髄性白血病 (CML), 脾摘,
May-Hegglin 異常 (MHA), Bernard-Soulier 症候群 (BSS)

MDS : myelodysplastic syndrome, ITP : idiopathic thrombocytopenic purpura, HIT : heparin-induced thrombocytopenia, TTP : thrombotic thrombocytopenic purpura, HUS : hemolytic uremic syndrome, DIC : disseminated intravascular coagulation, ET : essential thrombocythemia, PV : polycythemia vera, CML : chronic myelogenous leukemia, MF : myelofibrosis, MPV : mean platelet volume, MHA : May-Hegglin anomaly, BSS : Bernard-Soulier syndrome.

[文献 9, 10)より作成]

められ MPV や PDW は高値となるが, 血小板数は増加しない。ただし, TMA, DIC では破碎赤血球の出現がみられ, 前述した血小板数偽高値の可能性があり注意が必要である。ほかに薬剤により血小板減少や血栓が起こる疾患も存在し, 抗生物質や鎮痛剤などは薬物投与 6~10 日後に現れる場合が多い。特にヘパリンによって引き起こされる疾患はヘパリン起因性血小板減少症 (heparin-induced thrombocytopenia : HIT) と呼ばれる。

体内分布異常は, 通常 1/3 プールしている脾臓にて血小板が増大し, 血中の血小板が減少する状態である。主な原因は脾腫で, 悪性腫瘍やうっ血が多い。

正常血小板サイズは約 2 μm に対し, 大血小板は 4~8 μm , 巨大血小板は赤血球 (約 8 μm) を超える大きさである¹¹⁾。血小板の形態異常は, 大血小板や巨大血小板がほとんどを占め, MPV は高値となる。このような血小板は ITP や MDS だけでなく先天性血小板減少症にも認められ, 代表疾患には May-Hegglin 異常 (May-Hegglin anomaly : MHA) をはじめとする MYH9 異常症,

Bernard-Soulier 症候群 (Bernard-Soulier syndrome : BSS) が挙げられる (図 3 a)。MHA は巨大血小板, 血小板減少に加え白血球封入体の特徴とする。白血球封入体はデーレ様小体とも呼ばれ, デーレ小体とは好中球以外にもみられる点で異なる。染色性が弱いまたは小型デーレ様小体の場合は見過ごされやすいため, 血小板数低値であり, さらに巨大血小板が認められる症例では, 顕微鏡の倍率を上げて詳細に観察をするべきである¹²⁾。

血小板の顆粒に異常がみられる疾患としては, α 顆粒が著減する Gray platelet 症候群 (図 3 b), 巨大 α 顆粒を有する Paris-Trousseau 症候群などがあり, まれではあるが念頭に置いて標本観察を行うことも必要である。

一方, 血小板の産生能が低下すると血小板は長期にわたり血管内の循環を繰り返す, 小型化する。再生不良性貧血だけでなく先天性疾患の Wiskott-Aldrich 症候群 (図 3 c) にもみられる。このような血小板は MPV が低値または測定不可となる場合もある。

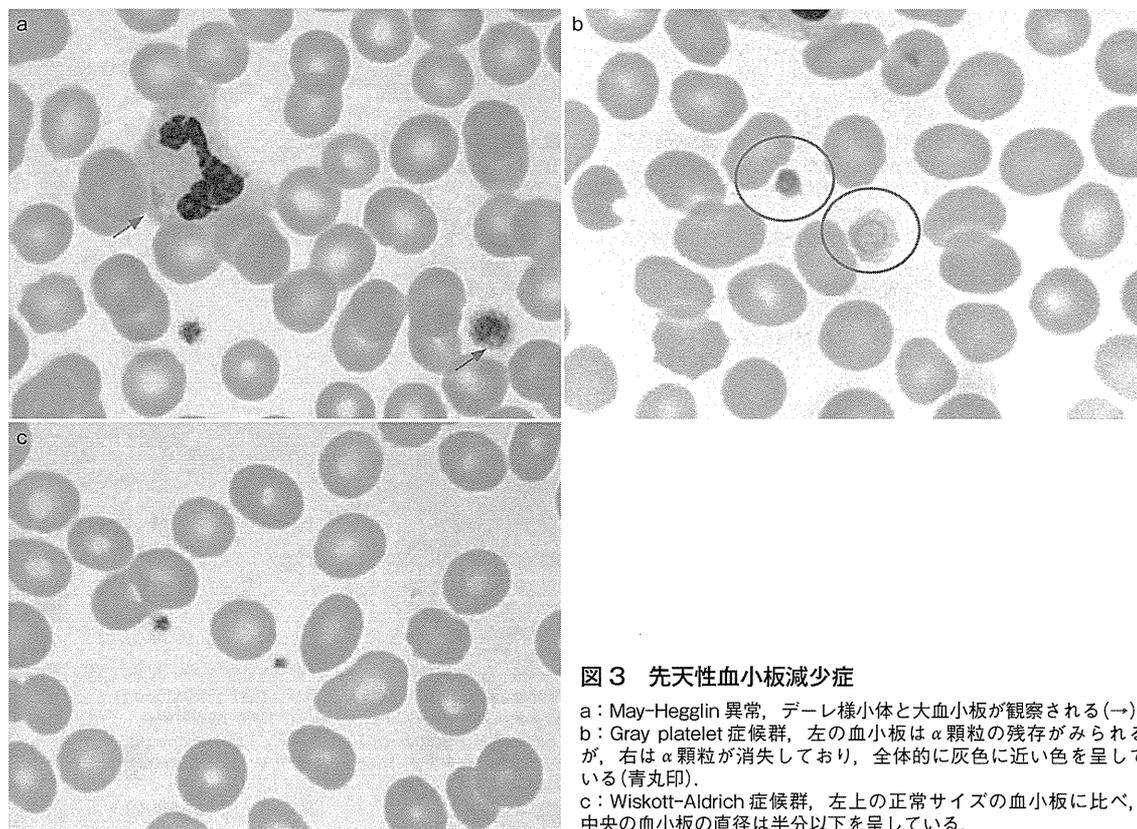


図3 先天性血小板減少症

a : May-Hegglin 異常，デーレ様小体と大血小板が観察される(→)。
 b : Gray platelet 症候群，左の血小板は α 顆粒の残存がみられるが，右は α 顆粒が消失しており，全体的に灰色に近い色を呈している(青丸印)。
 c : Wiskott-Aldrich 症候群，左上の正常サイズの血小板に比べ，中央の血小板の直径は半分以下を呈している。

■ 血小板増加症

一般に血小板数が 40 万/ μL 以上の場合を指す。血小板増加は骨髓巨核球の増殖により起こり，代表的な腫瘍性疾患は本態性血小板血症 (essential thrombocythemia : ET) である。ET は 100 万/ μL 以上であることがほとんどであり，血小板機能異常が出現することがある¹⁰⁾。ほかに血小板増多を起こす疾患には，鉄欠乏性貧血，感染症を含む炎症性疾患，骨髓増殖性疾患，悪性腫瘍などがあり，慢性骨髓性白血病 (chronic my-

elogenous leukemia : CML) では MPV 高値を伴うこともある。これらは一過性であることが多い。

血小板数が高値である血液では，他の測定項目への影響を考慮する必要がある。血液が凝固する過程で血小板は大量のカリウムを放出し，その結果，血清中のカリウムのデータが異常高値となる。この影響を受けずに真のカリウム値を測定するには，測定試料としてヘパリン採血した血漿を用いる方法がある。

おわりに

日常的に行われている自動血球計数装置の血小板測定値からわかる情報を中心に述べた。血小板数だけでなく，同時に測定されたパラメータから得られる情報は多く，さまざまな病態との関係が示唆されていくと思われる。異常値または粒度分

布異常のパラメータを活用することで，大血小板や破砕赤血球など干渉の有無の判定，血小板産生回復や予後の予測ができる可能性がある。また，顕微鏡にて血小板形態を観察することも重要であり，それらは臨床的有用性の高い情報となる。

文献

- 1) 杉山昌晃, 巽典之: 自動血球分析の歴史. 英文対訳 計測技術ティーチング—自動血球分析装置の基本原理解(巽典之, 血液検査学研究会編), 宇宙堂八木書店, pp32-38, 2006
- 2) 室佳孝, 木下雅夫, 星野勝信: 全自動総合血液学分析装置を用いた免疫学的血小板(Immunoplatelet CD61)の測定法. 生物試料分析 30: 213-218, 2007
- 3) 越智康浩, 丸木佳子: 多項目自動血球分析装置 XN-Seriesの概要. Sysmex J 34(suppl.2): 31-46, 2011
- 4) 矢作かおり, 村田満: 偽性血小板減少症. 血小板減少症・増加症, 最新医学社, pp215-221, 2009
- 5) Bessman JD: 血液学分析の最新技術—Dr. Bessman 学術講演より. From Coulter 1: 10-12, 1985
- 6) 松野一彦: 血小板数の算定. 血小板検査ハンドブック, ベックマンコールター, pp12-13, 2004
- 7) 高見昭良: 幼若血小板比率(IPF). 臨床に直結する血栓止血学(朝倉英策編), 中外医学社, pp77-79, 2013
- 8) Sugimori N, Kondo Y, Shibayama M, et al: Aberrant increase in the immature platelet fraction in patients with myelodysplastic syndrome: a marker of karyotypic abnormalities associated with poor prognosis. Eur J Haematol 82: 54-60, 2009
- 9) 清水長子, 川合陽子: 血小板数. medicina 42: 82-85, 2005
- 10) 村田満: 血小板の異常. スタンダード検査血液学 第2版, 医歯薬出版, pp263-266, 2008
- 11) 三ツ橋雄之: 血液像コメントに“大型血小板を認めます”とありましたが, これは異常ですか?. 臨検 57: 1246-1247, 2013
- 12) Kunishima S, Hamaguchi M, Saito H: Differential expression of wild-type and mutant NMMHC-IIA polypeptides in blood cells suggests cell-specific regulation mechanisms in MYH9 disorders. Blood 111: 3015-3023, 2008