

新しいPAL法を用いた血小板凝集能測定法の臨床経験

和田 始 櫻井 寿郎 栗原 聖治 進藤 崇史
 大仲 佳祐 岩間 淳哉 小林 理奈 小林 徹
 竹林 誠治 瀧澤 克己 牧野 憲一

Key Word: PAL: Platelet aggregation Level, dual antiplatelet therapy, cerebral vascular disease

要 約

脳梗塞、脳血管内治療に抗血小板剤は欠かせない。一方で代表的な薬剤であるチアノピリジン系抗血小板剤の反応性は個人差が大きく、しばしば問題となる。そのため全血を用いた血小板凝集能検査であるVerifyNow®の有用性が報告され冠動脈治療やFlow-Diverter留置術に推奨されてはいるものの、高価で保険適応がなく普及しているとは言いがたい。普及している血液凝固検査機にソフトウェアを追加し測定できる透過法測定:LTA (Light Transmission Aggregometry)によるPAL (Platelet aggregation Level)が考案され使用可能となった。当施設で導入されたため、臨床症例で使用し検討した。

【対象と方法】

旭川赤十字病院脳神経外科にて2021年4月以降の患者74人に対し約149回測定した。脳血管内治療前にDAPT (dual antiplatelet therapy, アスピリン100mg、クロピドグレル75mg)を導入した群間でAPAL, CPAL, エピネフリン値を測定した。その他脳卒中例でも抗血小板剤内服中であるのに繰り返す脳梗塞例、もしくは冠動脈疾患後のプラスグレル内服中で当科において加療した患者群でもその結果をPAL臨床例とし検討した。

【結果】

治療前にDAPTが投与された群と抗血小板剤を投与されていない群とを比較した。APALは抗血栓薬ない群で平均 8.0 ± 2.2 , DAPT群で 5.2 ± 2.1 , $P < 0.1$ と、DAPTの有無で有意差をもって反応し、高い再現性を示した。カットオフ値を求め、VerifyNow®との比較した従来の報告と併せAPALの目標値を5-8, CPAL5以下, エピネフリン値(抑制率)20-50%, 抗血小板剤量変更のcut-off値をAPAL:28とした。また、クロピドグレルとアスピリンのDAPT群と、アスピリン、プラスグレルによるDAPT群の平均値を比較したが、有意差を認めなかった。

【考察】

複数の血小板刺激物質を用いて血小板凝集能を評価するLTA法は正確でstandardではあるが評価が難しい。そのLTA方で求めた結果をPAL値として0～10.0の値とする方法が提唱され導入された。エビデンスは乏しいものの、再現性をもった結果を得ることが確認され、APALのカットオフ値28とした運用での妥当性が確認された。

【結語】

安全に抗血小板剤を使用するために、保険適応のあるPAL法は血小板剤使用において血小板凝集能変化を再現性をもって値を示す事が示され、DAPT中のカットオフ値をAPAL28として運用することにより大きな合併症を来すことがなかった。

Abstract

The effects of cyanopyridine antiplatelet agents vary widely from person to person, and although the VerifyNow® monitor has been reported to be useful and recommended for Flow-Diverter implantation, it is not widely used because it is not covered by public insurance. Sysmex has developed PAL (Platelet Aggregation Level) using LTA (Light Transmission Aggregometry), which can be measured by adding software to conventional blood coagulation testers. Since it was introduced at our institution, we used it in a clinical case and examined it.

[Subjects and Methods]

A total of 149 measurements were performed on 74 patients at the Department of Neurosurgery, Asahikawa Red Cross Hospital since April 2021. APAL, CPAL, and epinephrine levels were measured between groups in which aspirin 100 mg and clopidogrel 75 mg

旭川赤十字病院 脳神経外科

Clinical experience with new Light Transmission Aggregometry method; PAL(Platelet Aggregation Level) for evaluation platelet aggregation

Hajime WADA, Juro SAKURAI, Seiji KURIBARA, Takafumi SHINDO, Keisuke OHNAKA, Junya IWAMA, Rina KOBAYASHI, Tohru KOBAYASHI, Seiji TAKEBAYASHI, Katsumi TAKIZAWA, Kenichi MAKINO
 Asahikawa Red Cross Hospital, Department of Neurosurgery

were introduced before endovascular treatment. The results of PAL clinical cases were also examined in other stroke cases with repeated cerebral infarction while taking antiplatelet agents, or in patients treated in our department while taking prasugrel after coronary artery disease.

[Results]

The group that received DAPT before treatment was compared to the group that did not receive antiplatelet agents. Each group responded significantly differently after the introduction of DAPT from the non-administered group. The cut-off values were determined and compared with those of VerifyNow®. The target values of APAL were 5-8, CPAL less than 5, and epinephrine (inhibition rate) 20-50%, in accordance with previous reports. The mean values of the clopidogrel and aspirin DAPT group were compared with those of the aspirin and prasugrel DAPT group, and no significant differences were found.

[Discussion]

The LTA method, which uses a platelet-stimulating substance to evaluate platelet aggregation capacity, is standard but difficult to evaluate. The LTA method was proposed and introduced to evaluate APAL and CPAL values from 0 to 10.0. Although the evidence is still lacking, it was confirmed that reproducible results were obtained, and the validity of the APAL cut-off value of 2-8 was confirmed.

[Conclusion]

For the safe use of antiplatelet agents, the PAL method, which is covered by insurance, was proven to reproducibly show changes in platelet aggregation during platelet administration. The use of APAL2-8 as a cutoff value during DAPT in endovascular therapy did not result in major complications.

はじめに

高齢化社会となり脳梗塞や心筋梗塞など動脈硬化性血管障害が増加し、その再発予防に抗血小板剤は重要な役割を担っている。一方で、現在最も普及しているチアノピリジン系抗血小板剤の反応性は特に個人差が大きく、臨床的に問題となる。

令和3年4月に当院にLTA法で血小板凝集能が測定できるこの機器の一つであるSysmex製測定装置CN3000 (Kobe, Hyogo)が導入された。この機器は試薬としてコラーゲン、エピネフリン、リストセチンも使用し測定できる。これは血小板凝集が起こる経路は複数存在し、各種抗血小板剤によって誘発物質の阻害経路が異なることに対応する。例えば、ADPレセプターであるP2Y12阻害薬であるチアノピリジン系薬剤であるクロピドグレルやプラスグレルはADP誘発の経路を選択的に阻害し、アスピリン

はコラーゲンにて誘発される経路を主に阻害する。エピネフリンはこれらの複数経路の影響を受けることが分かっている。すなわち、いくつかの試薬を用いて比較する事で実際の生体内の血小板凝集能を正確に把握することができる。なぜなら、体内でクロピドグレルはCYP2C19によって活性代謝物となり作用を発現するが人種差も確認されており、遺伝子活性が欠損し代謝機能が低下している割合が欧米では約3%であるのに対し、日本人では約20%と報告されている¹⁴⁾。逆に原因ははっきりしないが15-40%は過剰活性を来すことも知られている⁵⁾。PAL法は数値として算出されるものの、まだその指し示す正常値や目標値のエビデンスは乏しいのが現状である。

今回当院でDAPT(dual antiplatelet therapy)時の血小板凝集能値PALの臨床的な意義をVerifyNow®法の文献的報告と比較し検討する。さらに、繰り返す脳梗塞を呈する症例や、抗血小板剤内服時の脳出血症例などにおけるPAL値、また新しく臨床使用できるようになったチアノピリジン系抗血小板剤プラスグレル塩酸塩の投与時データも収集し検討した

対象と方法

[対象者]

2021年4月当院に血小板凝集能測定器が導入されて以降2023年1月までの脳血管内治療症例に対し、血栓性合併症予防にクロピドグレルとアスピリンを抗血小板剤として2剤を導入する患者。脳動脈瘤治療において、neck bridge stentを用いるもの、頸部内頸動脈狭窄病変に対しstentを用いる治療は3か月以上のDAPTが必要のため、治療2週間前からDAPTを開始し、治療前と治療が終わった退院時に血小板凝集能を測定している。ステントを用いないシンプルテクニックで完結する脳動脈治療はDAPT開始し治療前に血小板凝集能を測定し、治療時の効果を確認し、治療が終わるとおよそ1か月以内に抗血小板内服を終了するプロトコルとしている。更に、抗血小板剤内服中に脳卒中を再発した患者に対しては新しいチアノピリジン系抗血小板剤プラスグレル内服患者の入院時点で測定を行った。

DAPT導入群と非導入群でそれぞれの値の平均値を比較し、反応性、再現性を確認する。また、先行するVerifyNow®とPALの比較研究から、DAPT時の目標値をAPAL:5~8, CPAL:5未満, エピネフリン抑制値:20-50%とし臨床使用するが、この期間の合併症からその妥当性を検討する。

[測定項目]

赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン値、白血球数、血小板数、血糖値、ヘモグロビンA1C値、PAL法にて算出されたAPAL、CPAL、エピネフリン、リセストチン凝集能。入院時の治療前、退院時、治療後2週間後をめぐりに測定する。

[調査項目]

脳血管内治療を要した原疾患、合併症の有無、血小板凝集能の結果で抗血小板剤の投与量の変更の有無および、臨床経過。脳卒中症例では既往歴、脳卒中中の病型、内服薬。

[解析、統計方法]

脳血管内治療患者における抗血小板剤投与前後2群の血小板凝集能値を測定、さらに同一の患者においても内服からの日数を加え、経時的な変化も検討した。まず、抗血小板剤を内服していない群と、2週間後のクロピドグレル75mgとアスピリン100mg内服時(DAPT)時の値をROC曲線を用いてカットオフ値を求めた。脳血管内治療例群では、合併症の有無による2群に分けて、解析ソフトEZRを用い分散をF検定で検定後、スチューデントT検定もしくはウェルチのt検定する。また、プラスグレル(エフィエント)の脳卒中疾患に対する使用時クロピドグレル投与の2群間の値も検討した。また、抗血小板剤使用中の脳梗塞再発例および脳出血合併症例群間での血小板凝集能値をスチューデントT検定で検定した。

結果

2021年4月より脳血管内治療患者74例と脳卒中後患者12例で合計149回測定を行った。APALはDAPTの有無で平均 5.2 ± 2.0 、CPALは平均 3.6 ± 1.6 であった。エピネフリン抑制値ではDAPTの投与時で平均 $35.1 \pm 15.7\%$ であった(図1)。

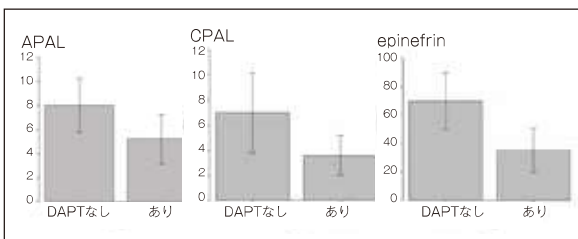


図1. DAPTの有無によるPAL、エピネフリン値の検討

DAPT使用時のPAL、エピネフリン値のcut-off値を検討した(図2)。APALのROC曲線によるcut-off値は6.7(Specificity:1, Sensitivity:0.79)、曲線下面積 0.80 95%信頼区間 0.61-0.98であった。CPALのROC曲線によるcut off値は5.2(Specificity:1, Sensitivity:0.67)で曲線下面積 0.82 95%信頼区間 0.55-1であった。エピネフリン値のcut-off値は55.4%(Specificity:0.929, Sensitivity:0.833)曲線下面積 0.905 95%信頼区間 0.751-1であった(図2)。

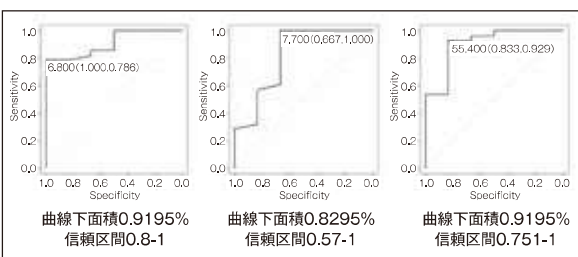


図2. DAPTの有無によるPAL、エピネフリン値のcut-off値

頸部内頸動脈狭窄症の診断で頸動脈ステント留置術の際28例中3例(10.1%)でクロピドグレルを減量した。動脈

瘤治療33例では2例(6.1%)でクロピドグレルを減量、2例(6.1%)でクロピドグレルの増量を要した。

次にDAPTを開始してからの経時的なAPAL, CPAL, エピネフリン値の変化を検討した(図3)。今回検討した患者群で6名が以前からアスピリン100mgのみを内服していたので、これらを加えた。それぞれ経時的に値が低下し、抗血小板作用発現に時間が掛かることを示している。また、アスピリンのみ内服群でCPALは低下しているもののAPAL、エピネフリン値の低下は軽度であった。

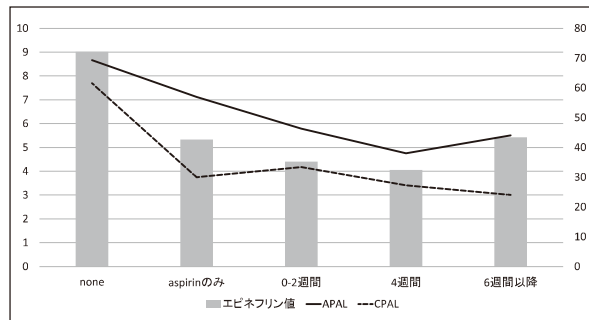


図3. 血小板凝集能経時変化

6週間以上経過した長期服用群においてはそれ以前の変化と比べると、APAL、エピネフリン値ともその前の期間より高値となった。母集団が前者と異なり、効き過ぎて減量もしくは増量が必要であった症例を省き、DAPTを飲んでいて脳梗塞を発症した群が加わってくるので、その点を考慮する必要がある。

APALとCPAL、APALとエピネフリン値の相関を検討した(図4)。APALとCPAL、APALとエピネフリン値の相関を検討した。APALとCPALのSpearmanの順位相関係数は0.622 P<0.01, エピネフリン値はピアソンの相関係数0.64, 95%信頼区間 0.503-0.745, P<0.01であり、ともに良く相関した。

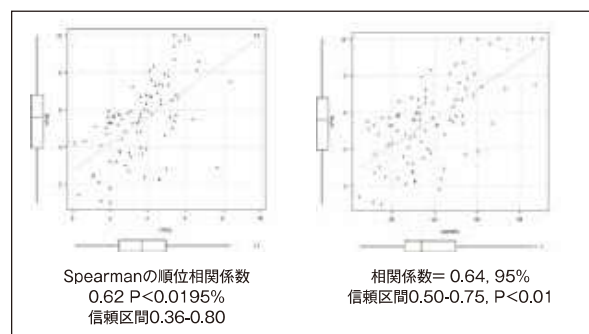


図4. APALとCPAL、エピネフリン値の相関係数

アスピリン100mgクロピドグレル75mgのDAPT群75例と、アスピリン100mgとプラスグレル3.75mgのDAPT群5例で検討した(図5)。2群間には有意差を認めなかった。

今回検討した期間での脳動脈瘤の脳血管内治療は33例で術後一過性高次機能障害を呈した脳梗塞1例(図6)、術中の母血管損傷が1例、脳出血症例は認めなかった。頸部内頸動脈狭窄症に対し、ステント治療(CAS: Carotid Artery Stenting)

28例では、臨床症状を伴った脳梗塞、脳出血を認めず1例で穿刺部の仮性瘤を来し血管形成術を要した。この期間での死亡例は認めなかった。術後脳梗塞症例ではAPAL: 6.6, CPAL:5.6, エピネフリン値:23.5%であった。合併症例が少なく統計学的有意差の判定はできなかった。

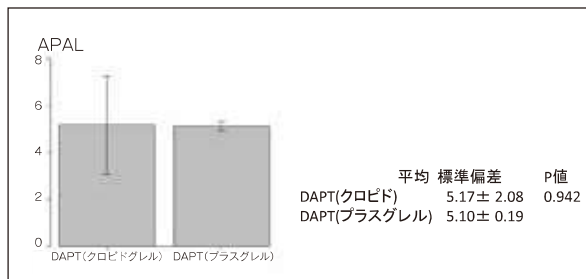


図5. DAPT群とエフィエント群のAPALの比較

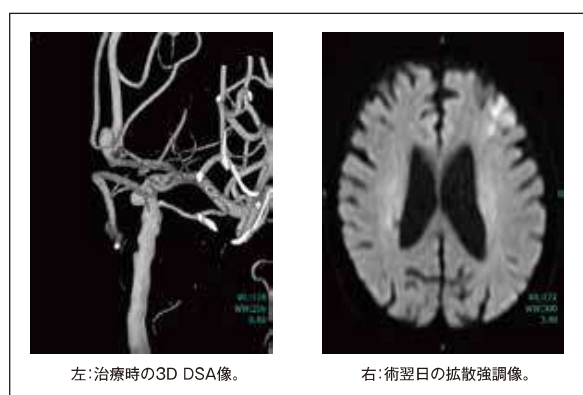


図6. 血栓性合併症例

考 察

ADP阻害による抗血小板作用を示すチエノピリジン系であるクロピドグレルはスタンダードな抗血栓薬であるが、遺伝子多型のある肝cytochrome P450 2C19 (CYP2C19)を介し作用発現がされるためその作用にばらつきがある。そのため、抗血小板剤使用時の血小板凝集の有用性に関し、全血解析によるVerifyNow[®]など全自動血液凝固測定装置point-of-care testing (POCT)が開発され、その有用性が報告されている^{6,7)}。また、頭蓋内に金属被覆率の多いFlow-Diverter留置術において、ステント内血栓症や脳還流の正常化に伴う相対的過還流による脳出血の危険があり、血小板凝集能測定は非常に重要とされる。28施設1556症例システムティックレビューではASA81mgもしくは300mg、クロピドグレル75mgの使用が推奨されるが、海外でもほぼすべての施設で血小板凝集能検査(VerifyNow[®]が最も一般的)が行われていた⁸⁾。その結果Flow-Diverter使用した34例の検討では、血小板凝集能検査を行った結果35%で量の変更を要したと報告されている。脳卒中の抗血小板剤は血小板凝集能検査を行わず使用する事が多いが、血小板凝集能検査が普及すれば、脳卒中診療の有効性安全性がより高いレベルで担保される可能性がある。

当院で施行している血小板凝集能検査であるLTA法

は従来からある遠沈した光透過方で、10分間遠心分離し得られた多血小板血漿(PRP)に血小板凝集を惹起する物質アデノシン二リン酸(ADP)試薬を複数濃度作成し測定、それらの測定パターンから0から10.0までの数値で算出⁹⁾し、Collagen induced PAL (CPAL)も合わせて算出している¹⁰⁾。更に、従来からあるエピネフリン:5.0 μ M, リストセチン:1.2 mg/mLを用いた抑制率も合わせて測定することができる。現在の保険診療でこの検査法は50点、月に一度判断料として125点の算出が可能である。

これまでのLTA法では解釈も一定せずその結果の判断に困難を伴った¹¹⁾。そこで数値化を試み今回のPALが導入された¹²⁾。PALでの課題として、新しい検査法であるためエビデンスが乏しい。エビデンスの十分なPOCTと比較すると遠沈する濃厚血小板液を用いる違いから、原理的にはより正確な値が期待できるものの、検体採取から測定までの移送方法、移送時間、検査環境が影響する。

PALの値の解釈に関し、DAPT使用時の基準値が提唱されているVerifyNow[®]との相関を検査し、APAL: 5-8がDAPTの効果判定閾値と報告された¹³⁾。今回の研究より、厳密な意味でのDAPTの有無の統計的検討ではないが、DAPTの導入時の平均値と標準偏差から再現性が高く、ほぼ同じ分布を示した。DAPT有無によるcut-off値もAPAL:6.8, CPAL:7.7, エピネフリン値55%であった。以上から、当施設のDAPT投与時の目標値として、APLA:5-8, CPAL:5以下, エピネフリン値20-50%で、更にカットオフ値をAPAL:2以下を不応, 8以上を過反応とし抗血小板剤を調節する運用の妥当性も確認できた。

PALを用いた血小板凝集能検査では、4つの値が示される。そのうちのリストセチン値(抑制率)は血小板型von Willebrand病など特別な疾患のみで異常値を示し、通常血小板凝集能は反映しない。APAL, CPAL, エピネフリン値は良好な相関関係を認めた。アスピリンの有効性に個人間に差はないとされる事と、VerifyNow[®]でもチエノピリジン系の作用を示すPRU値のみで判断する最近の傾向を合わせ、APAL値のみを参考にクロピドグレルの効果判定するのが妥当と思われる。一方で、CPALはやはりアスピリンの有無を反映し、総合的な血小板凝集能をエピネフリン値が反映すると考え、現在のところはAPALを主にCPALとエピネフリン値を参考にすべきと考える。

脳動脈瘤の脳血管内治療の合併症率は6.1%, CASが7.1%で死亡例はなかった。一般的な脳動脈瘤の合併症はmoribidity4.96%, mortality0.3%¹⁴⁾及びCASによる脳血管内治療の合併症率が12.2%¹⁵⁾であるとすると、標準的なVerifyNow[®]を用いていない短期間1施設の結果ではあるがPALを用いた抗血小板剤調整使用も遜色ないと言える。

同じP2Y12を介するチエノピリジン系である新しいプラスグレールは、体内の代謝がシンプルで有るためより強力で安定した抗血小板作用が期待される。血小板凝集能においても、酵素誘導の個人差に少なく安定した強い効果が示唆される¹⁶⁾。そのためプラスグレールは冠動脈疾患に対しクロピドグレルに取って代わる抗血小板剤となった。その一方、脳出血の合併症が4倍多いと報告される¹⁷⁾。

脳卒中に関する報告はまだ数少ない¹⁸⁾が、今回の日本でのエフィエント3.75mgの使用下DAPTの結果からはクロピドグレルとアスピリンのDAPTと有意差のないPALの結果となり、特に過抑制となる結果を認めなかった。

limitation

PAL値をもって、安全性のcut-off値を検討する研究であれば、検査のみを行い、その値から合併症の出現をみて統計的検討をすべきである。今回の検討では検査値から61例中7例で抗血小板剤の量の調整を行った。また、繰り返す脳梗塞例、抗血小板剤内服中に脳出血をおこした例は少なく統計学的検討は行えなかった。

結 語

光透過法を用いた新しい血小板凝集能検査PAL法による、DAPT時の効果を検討した。保険適応のあるPAL法は血小板剤使用において凝集能変化を再現性をもって値を示し、VerifyNow[®]検査法との検討報告と合わせ、DAPT中のカットオフ値をAPAL:2以下、8以上とし運用する事により大きな合併症を来すことがなかった。今後も血小板凝集能検査の知見を重ね、より安全に抗血小板剤を使用する事が重要と思われた。

この論文に関し、筆者が開示すべきCOIはありません。論文の内容は、2022年3月17-19日STROKE2022で発表しました。

文 献

- 1) Takahiro KUBOTA, Kan CHIBA* and Tatsuji IGA, CYP2C19, CYP2D6, およびCYP2C9の遺伝子多型と人種差 Frequency Distribution of CYP2C19, CYP2D6, and CYP2C9 Mutant-alleles in Several Different Populations 薬物動態 Xenobio. Metaol. And Dispos. 16(2):69-74(2001)
- 2) Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA: Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquin and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. Clin Pharmacol Ther, 38: 402-408(1985).
- 3) Jurima M, Inaba T, Kadar D, Kalow W.: Genetic polymorphism of mephenytoin p(4')-hydroxylation: Difference between Orientals and Caucasians. Br J Clin Pharmacol, 19: 483-487(1985).
- 4) Horai Y, Nakano M, Ishizaki T, Ishikawa K, Zhou H-H, Zhou B-J, Liao C-L, Zhang L-M. Metoprolol and mephenytoin oxidation polymorphisms in Far Eastern Oriental subjects: Japanese versus mainland Chinese. Clin Pharmacol Ther, 46: 198-207(1989).
- 5) 脳動脈瘤コイル塞栓術における Active Target P2Y12 Reaction Unit Management の試み
中川 一郎*, 横山 昇平等, 脳循環代謝 28:241 ~ 247, 2017
- 6) Yusuke Yamaguchi, Takayuki Abe, Yuji Sato, et al.: Effects of VerifyNow P2Y12 test and CYP2C19*2 testing on clinical outcomes of patients with cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis Platelets. 2013;24(5):352-61.
- 7) Yu Luo 1, Jimin Li 1, Xu Liu 2, et al.: Combination of P2Y12 reaction unit and percentage of platelet inhibition assessed by VerifyNow P2Y12 assay is a useful predictor of long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention. Thromb Res. 2016 Mar;139:114-20.
- 8) Pavlos Texakalidis, Kimon Bekelis, Elias Atallah, et. Al.: Flow diversion with the pipeline embolization device for patients with intracranial aneurysms and antiplatelet therapy: A systematic literature review. Clin Neurol Neurosurg 2017 Oct;161:78-87.
- 9) 大森 由佳里, 石田 秀和, 坂寄 輔, 他: 新たな解析法を搭載した全自動血液凝固測定装置の評価 - 抗血小板薬の効果確認指標 -. 臨床病理 (0047-1860) 67巻3号 Page205-211 (2019.03)
- 10) 清水 美千絵, 坂寄 輔, 北野 圭介, 他: CS-5100に搭載された血小板凝集能解析パラメータであるPlatelet Aggregation LevelとPRP313MのGrade Typeの比較検討. 医学検査 Vol.68 No. 3(2019) pp. 501-506
- 11) Rita Paniccia, Raffaella Priora, Agatina Alessandrello Liotta, et al., Platelet function tests: a comparative review: Vasc Health Risk Manag. 2015 Feb 18;11:133-48.
- 12) 富山 佳昭, 佐藤 金夫, 尾崎 由基男, 他: 「透過光血小板凝集検査法の標準化: 国際血栓止血学会血小板機能標準化部会からの提言」の紹介と解説. 血栓止血誌2016; 27(3): 365-369.
- 13) Kodai Uematsu, Tasuku Sakayori, Hidekazu Ishida, et al.: Correlation Between the VerifyNow P2Y12 Assay and the Newly Developed APAL System in Neuroendovascular Patients. Annals of Clinical & Laboratory Science 2020 Jul;50(4):490-496.
- 14) Algra AM, Lindgren A, Vergouwen MDI, et al. Procedural Clinical Complications, Case-Fatality Risks, and Risk Factors in Endovascular and Neurosurgical Treatment of Unruptured Intracranial Aneurysms: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Neurol 2019; 76: 282-293.
- 15) Jay S. Yadav, M.D., Mark H., et al., Protected Carotid-Artery Stenting versus Endarterectomy in High-Risk Patients N Engl J Med 2004; 351:1493-1501
- 16) Stephen D Wiviott 1, Eugene Braunwald, Carolyn H McCabe, et al.: Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med. 2007 Nov 15;357(20):2001-15.
- 17) JiaXin Li, Moo Hyun Kim, LongZhe Guo, et al.: Impact of CYP2C19 Polymorphism on Antiplatelet Potency of Prasugrel 5 and 10 mg Daily Maintenance. Cardiology. 2018;140(3):155-162.
- 18) Takanari Kitazono, Kazunori Toyoda, Kazuo Kitagawa, et al.: Efficacy and Safety of Prasugrel by Stroke Subtype: A Sub-Analysis of the PRASTRO-I Randomized Controlled Trial. J Atheroscler Thromb. 2021 Feb 1;28(2):169-180.