

直接経口抗凝固薬が血中プロテインS, プロテインC, アンチトロンビン活性測定値に与える影響

著者	寺上 貴子
著者別表示	TERAKAMI Takako
雑誌名	博士論文本文Full
学位授与番号	13301甲第5396号
学位名	博士(保健学)
学位授与年月日	2021-09-27
URL	http://hdl.handle.net/2297/00064477



博士論文

直接経口抗凝固薬が血中プロテイン S、プロテイン C、アンチトロンビン活性
測定値に与える影響

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
保健学専攻 医療科学領域 腫瘍検査学分野

学籍番号	1829022035		
氏名	寺上 貴子		
主任指導教員	森下 英理子	副指導教員	稲津 明広
提出年月日	2021年7月21日		

目 次

要旨	1 頁
緒言	2 頁
方法	6 頁
結果	8 頁
考察	11 頁
結語	15 頁
謝辞	15 頁
参考文献	16 頁
図表説明	21 頁
図表	別紙参照

要旨

【背景】抗凝固療法、特に直接経口抗凝固薬（DOACs）がプロテイン S（PS）、プロテイン C（PC）、アンチトロンビン（AT）活性測定値にどのような影響を与えるかを把握することは重要である。これまでの研究で、DOACs 内服下において凝固時間法を原理とする試薬を使用した PS および PC 活性は血中薬剤濃度に依存して偽高値を示し、また AT 活性は合成基質法を原理とする 2 種類の測定法を使用した場合、DOACs の種類によって偽高値を示すことが報告されている。したがって、PC 活性測定に際しては、凝固時間法ではなく合成基質法に基づく活性測定試薬を用いることが世界的に推奨されているが、PS 活性測定に際しては合成基質法の試薬がなかったため遊離型 PS 抗原量を測定することが推奨されてきた。近年、日本において世界初の合成基質法に基づいた PS 活性測定試薬が開発された。

【目的】3 種類の活性化第 X 因子（Xa）阻害薬（リバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバン）が PS 活性値に及ぼす影響について、合成基質法を原理とする新規試薬を使用し、従来の凝固時間法の試薬と比較検討した。さらに、3 種類の Xa 阻害薬が PC および AT 活性値に及ぼす影響について、それぞれ測定原理の異なる複数の試薬を用いて検討した。

【対象と方法】対象は、1) 3 種類の Xa 阻害薬による抗凝固療法を受けている非弁膜症性心房細動または静脈血栓塞栓症の患者 152 名（男性 82 名、女性 70 名、平均年齢 68.5 ± 14.0 歳）、2) 新規にリバーロキサバンを導入した患者 7 名とした。PS 活性は、凝固時間法の 4 試薬および合成基質法の 1 試薬を使用して測定した。PC 活性は、凝固時間法の 3 試薬および合成基質法の 3 試薬を使用して測定した。AT 活性は、合成基質法を原理とする 2 種類の試薬（トロンビン阻害に基づく測定法：トロンビン法、第 Xa 因子阻害に基づく測定法：Xa 法）を使用して測定した。

【結果】リバーロキサバンまたはエドキサバン内服患者では、プロトロンビン時間（PT）と活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）が血中薬剤濃度依存的に延長した。この結果に対応するように、凝固時間法で測定した PS 活性値は、リバーロキサバンまたはエドキサバンを服用している患者において血中薬剤濃度に依存して偽高値を示した。一方、合成基質法で測定した PS 活性値は、3 種類の Xa 阻害薬のいずれにも影響を受けなかった。

3 種類の凝固時間法の試薬で測定した PC 活性値は、全てリバーロキサバンのみ影響を受け、血中薬剤濃度依存的に偽高値を示した。エドキサバンでは、凝固時間法で測定した PC 活性値が 1 試薬のみ血中薬剤濃度と正相関を示す傾向がみられたが、有意ではなかった。アピキサバンは、凝固時間法で測定した場

合、いずれの試薬も PC 活性値に影響を与えなかった。一方、合成基質法による 3 種類の試薬で測定した PC 活性値は、3 種類の Xa 阻害薬のいずれにも影響を受けなかった。

Xa 法で測定した AT 活性値は、3 種類の Xa 阻害薬すべての血中薬剤濃度に依存して偽高値を示したが、トロンビン法で測定した AT 活性値は 3 種類の Xa 阻害薬のいずれの影響も受けなかった。

新規にリバーロキサバンを導入した患者における導入前後の比較では、導入後血中薬剤濃度依存的に PT および APTT の延長を認め、その結果、3 種類の凝固時間法の試薬で測定した PS 活性値がすべて偽高値を示した。一方、合成基質法で測定した PS 活性値は、リバーロキサバン導入による変動を認めなかった。また PC 活性値は、凝固時間法に基づく 3 種類の試薬で測定した場合、すべての試薬においてリバーロキサバン導入後に偽高値を示した。一方、合成基質法に基づく 3 種類の試薬で測定した PC 活性値は、すべてにおいてリバーロキサバン導入による変動を認めなかった。各因子の活性測定試薬および Xa 阻害薬の組み合わせによって反応性が異なり、活性値に差異を生じたものと考えられた。

【結論】 DOACs の凝固活性に対する抑制効果は、DOAC 療法を受けている患者の一般的な凝固検査測定に影響を及ぼす。リバーロキサバンまたはエドキサバンを服用している場合、凝固時間法に基づく試薬で測定した PS 活性値は偽高値となり、遺伝性 PS 欠乏症を見落とす可能性がある。しかし、合成基質法に基づく PS 活性測定ではいずれの Xa 阻害薬においても影響を受けないことを本研究で明らかにした。また、リバーロキサバンまたはエドキサバン服用時に PC 活性を測定する場合は偽高値を避けるために合成基質法を使用し、Xa 阻害薬服用時の AT 活性測定はトロンビン法を使用する必要がある。DOACs 内服下に検査を行う場合は、各凝固制御因子検査試薬の測定原理に加え、阻害活性や試薬との反応性などの薬剤固有のパラメーターを十分に把握し、DOACs 血中濃度が低下したタイミングでの検体採取や DOAC-stop を使用するなどの対応が重要である。

緒 言

直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants:DOACs) は、本邦では 2011 年に導入され、2014 年から非弁膜症性心房細動 (non-valvular atrial fibrillation:NVAF) による脳卒中、全身性塞栓症の発症予防および静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism:VTE) の治療などに使用が可能となった。図 1 に生体内の凝固反応と DOACs の作用部位を示す。DOACs は、トロンビンや活性化第 X 因子 (Xa) を選択的に阻害することで抗凝固作用を示す。これまで 50

年近くにわたり唯一の経口抗凝固薬として使用されてきたワルファリンなどのビタミン K 拮抗薬に比べ、DOACs は予測可能な薬物動態および薬力学プロファイルを示すため、定期的な凝固モニタリングは不要とされている¹⁾。また、ワルファリンに比べて食事による影響がない、服用後速やかに抗凝固効果が発現する、頭蓋内出血が少ないなどの利点を有し、その使用頻度は年々増加している²⁻⁶⁾。DOACs は、その薬剤の阻害部位によって、トロンビン阻害薬（ダビガトラン）と Xa 阻害薬（リバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバン）に分類される。

健常者においては、凝固を促進する凝固作用と、凝固を阻止する抗凝固作用のバランスが保たれているため、血管内において血栓が形成されることはない。しかし、一度このバランスが崩れると、出血傾向や血栓傾向を呈する。生体内において過剰に血栓が形成されてしまう血栓症は、様々な環境因子と遺伝的要因の組み合わせにより発症する。血栓性素因とは、動脈硬化性病変がなくても血栓症を繰り返し発症する病態であり、遺伝性と後天性に分類される⁷⁾。遺伝性血栓性素因は遺伝的要因による血栓性素因のことであり、VTE の発症リスクが高く、凝固制御因子であるプロテイン S (protein S:PS)、プロテイン C (protein C:PC)、アンチトロンビン (antithrombin:AT) の欠乏症が挙げられる^{8,9)}。これら 3 つの遺伝性血栓性素因は、2019 年 4 月 1 日に特発性血栓症として指定難病に認定され、その認定には正確な活性測定が要求されることとなった。

PS は、肝臓だけでなく、血管内皮細胞、単球、骨髄巨核球などでも産生される分子量約 80kDa のビタミン K 依存性糖タンパク質である。活性化 PC (APC) の補酵素として活性化第 V 因子 (FVa) と活性化第 VIII 因子 (FVIIIa) を不活化することで、凝固阻止作用を発揮する。PS は、血中では約 60%が補体制御蛋白の一種である C4b 結合蛋白 (C4BP) の複合体として、残りの約 40%が遊離型として存在している。APC 補酵素活性を有するのは遊離型 PS のみで、この遊離型 PS の低下が血中 PS 活性の低下につながると考えられている。また、炎症などにより血中 C4BP が増加すると、遊離型 PS と C4BP とが結合して遊離型 PS が減少し、血中 PS 活性が低下するとされている。さらに、PS は組織因子経路インヒビター (tissue factor pathway inhibitor:TFPI) の補因子でもあり、FXa や活性化第 VII 因子 (FVIIa) -TF 複合体を阻害する作用も有している。PS の血中半減期は健常人で約 40 時間である。PC は、肝臓で合成される分子量約 62kDa のビタミン K 依存性のセリンプロテアーゼ前駆体である。PC は、血液内皮細胞上のトロンボモジュリンに結合したトロンビンによって急速に活性化され、APC に変換される。PS の補酵素作用によって、APC はホスファチジルセリンと Ca²⁺ の存在下で FVa および FVIIIa を不活化し、凝固活性化を阻止する。PC の血中半減期は 6~8 時間と、FVII (半減期は 3~5 時間) 以外のビタミン K 依存

性凝固因子よりも短い。AT は、肝臓で合成される分子量約 58kDa のセリンプロテアーゼインヒビターである。トロンビン、FXa、活性化第 IX 因子 (FIXa)、カリクレインなどの凝固系因子ならびに線溶系のプラスミンと 1 対 1 に結合し、その作用を阻害する。凝固系の活性化により生成されたトロンビンは、直ちに AT と複合体を形成し不活化される。また、AT は単独ではその阻害反応はゆっくりであるが、ヘパリンの存在下では約 1,000 倍に加速する。ヘパリンが結合することにより抗トロンビン活性が促進するため、ヘパリンの抗凝固効果は血漿 AT 活性に依存する。AT の半減期は約 65 時間である。

遺伝性血栓性素因を含む血栓性素因のスクリーニング検査を実施する場合、PS、PC および AT 活性値の測定は必須である。特に、遺伝性 PS 欠乏症は日本人の遺伝性血栓性素因の中で最も頻度が高い。日本人における発症頻度は 1-2% であり、欧州や米国の 0.16-0.21% と比べて約 5-10 倍高い¹⁰⁻¹³⁾。この発症頻度が高い要因として、PS Tokushima 変異 (PS p.Lys196Glu:PS K196E) の存在が挙げられる。日本人における PS K196E アレル保有頻度は 0.9%¹⁰⁻¹²⁾ と言われており、PS K196E は pathogenic variant (病原性変異) と考えられている^{14, 15)}。

遺伝性 PS 欠乏症は、常染色体顕性遺伝形式をとり、PS 抗原量 (複合型・遊離型) と PS 活性値がともに低下する産生異常 (I 型)、PS 抗原量 (複合型・遊離型) は正常であるが PS 活性値が低下を認める II 型分子異常、抗原量の中でも遊離型 PS 抗原量と PS 活性値が低下する III 型分子異常に分類される。本症は主に PS 活性と抗原量の測定によって診断される。PS K196E は II 型 PS 欠乏症に分類され、PS K196E ヘテロ接合体の PS 活性値の平均は PS K196E 非保有者集団よりも約 16% 低いが、PS 抗原量の低下は認めない。また、PS K196E の PS 活性の低下は軽度 (16% 低下) であるため、たとえ PS 活性を正確に測定しても、PS K196E 保因者を見落とす可能性がある¹⁶⁾。遺伝性 PC 欠乏症は、常染色体顕性遺伝形式をとり、ほとんどの場合ヘテロ接合体として認められる。日本人における発症頻度は 0.13% と推定され、欧米人における 0.2-0.4% とほぼ同程度である。PC 遺伝子 (*PROC*) の変異によって引き起こされ、血中 PC 活性値は多くの場合、正常の 30-60% 程度である。PC 抗原量と活性値の両方が低下する産生異常 (I 型) と、抗原量は正常であるが活性値のみ低下する分子異常 (II 型) の 2 種類に分類される^{17, 18)}。PC 欠乏症の診断は、主に PC 活性値と抗原量の測定によって行われ、PC 活性と PC 抗原量の比 (比活性) を比較することで I 型と II 型を区別できる。したがって、II 型 PC 欠乏症は、抗原量の測定のみでは見逃される可能性がある。遺伝性 AT 欠乏症も同じく常染色体顕性遺伝形式をとり、通常ヘテロ接合体として報告される。AT 遺伝子 (*SERPINC1*) の変異によって引き起こされ、AT の量的および質的異常が含まれる。日本人における

発症頻度は 0.15%と考えられ、欧米人の発症頻度 (0.02-0.2%) と同程度である。ヘテロ接合体の血中 AT 活性値は正常の 40-70%程度を示す。遺伝性 AT 欠乏症は、抗原量と活性値の両方が低下する産生異常 (I 型) と、抗原量は正常であるが活性値のみ低下する分子異常 (II 型) に分類される。II 型はさらに、活性部位に異常を有するタイプ、ヘパリン結合部位に異常を有するタイプ、反応部位近接領域に異常を有し多方面の機能に影響を及ぼすタイプの 3 つのサブタイプに分類され、II 型が多いとされている (約 80%)¹⁹⁾。AT 欠乏症の診断は、主に AT 活性値と抗原量の測定によって行われる。

これまでの研究では、DOACs を服用している患者において、凝固時間法に基づく試薬で測定した PS および PC 活性は、DOACs の効果として現れる凝固時間の延長に伴い血中薬剤濃度に依存して偽高値を示すとされ、また、同じ合成基質法であっても測定方法の違いによって AT 活性が偽高値となることがあると報告されている²⁰⁻²⁴⁾。しかし、PS 活性については、これまで凝固時間法に基づく方法以外の測定試薬がなかったため、世界的なガイドラインでは、PS 活性値ではなく遊離型 PS 抗原量を測定することが推奨されている²⁵⁾。以前の報告においても、総 PS 抗原量の測定による検討結果が示されている^{20,23)}。近年、本邦において、総 PS 活性を測定するための合成基質法を用いた試薬が世界で初めて開発された^{26,27)}。図 2 に合成基質法に基づく総 PS 活性測定試薬の測定原理を示す。第一反応では、Ca²⁺およびリン脂質存在下にて血漿中 PS と試薬中の APC および FVa とを一定時間反応させ、APC は PS を補因子として FVa を不活性化化する。試薬には一定過剰量の FVa が含まれているため、第一反応で FVa が不活性化された後も FVa は残存する (残存 FVa)。第二反応では、Ca²⁺およびリン脂質存在下で、残存 FVa が FXa とともにプロトロンビンをトロンビンに活性化する。生成されたトロンビンはトロンビン特異的合成基質を分解して発色する。この呈色を比色定量することによって、PS 活性を間接的に測定する。この測定方法は合成基質の分解とそれによる発色を利用するため、凝固時間の影響を受けないとされている。

本研究では、Xa 阻害薬内服患者において、新規に開発された合成基質法を原理とする試薬を使用して、Xa 阻害薬が PS 活性に及ぼす影響について検討した。同時に、試薬の測定原理の違いによる影響を確認するため、従来から使用されている凝固時間法を原理とする複数の PS 活性測定試薬を用いて、合成基質法との比較を行った。さらに、凝固時間法および合成基質法を原理とする複数の試薬を使用した PC 活性測定、合成基質法を原理とする 2 種類の試薬を用いた AT 活性測定を行い、Xa 阻害薬が PC 活性、AT 活性それぞれに及ぼす影響について検討したので報告する。

対象と方法

1. 研究対象

対象とした DOACs は、Xa 阻害薬であるリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンである。金沢大学附属病院循環器内科または血液内科の外来に通院中であり、NVAf または VTE と診断されている患者のうち、(i) すでに Xa 阻害薬による抗凝固療法を受けている患者、(ii) 新しく Xa 阻害薬の導入を開始する患者を対象とした。この研究は、金沢大学倫理審査委員会によって承認を受けて実施され（承認番号 530-2）、登録前にすべての患者から書面によるインフォームドコンセントが得られている。クレアチニン濃度が 2.0mg/dL を超え、糸球体濾過量が 30mL/min/1.73m²未満（Cockcroft-Gault の式による）の患者は除外した。遺伝性 PS、PC、AT 欠乏症または抗リン脂質抗体症候群、血栓症の急性期、重度の肝機能障害、またはネフローゼ症候群と診断された患者も除外した。

2. 方法および検討項目

1) Xa 阻害薬内服患者の検体採取および検討項目

Xa 阻害薬による抗凝固療法を受けている患者は、Xa 阻害薬内服後 2 時間以内に 3.2%クエン酸ナトリウム加採血管にて採血を行った。採血後直ちに遠心分離し、乏血小板血漿を作製してチューブに分注し、測定までは-80℃で保存した。採取した患者血漿においては、血中 Xa 阻害薬濃度、プロトロンビン時間（prothrombin time:PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time:APTT）、PS 活性（凝固時間法、合成基質法）、総 PS 抗原量、PC 活性（凝固時間法、合成基質法）、PC 抗原量、AT 活性（トロンビン阻害に基づく測定法：トロンビン法、Xa 因子阻害に基づく測定法：Xa 法）を検討した。

2) 新規にリバーロキサバンを導入する患者の検体採取および検討項目

新規に Xa 阻害薬であるリバーロキサバンによる抗凝固療法を開始する 7 名の患者を対象として、導入前と導入後 2 回（2 週間後、4-8 週間後）の合計 3 回にわたり採血を実施した。採血は 3.2%クエン酸ナトリウム加採血管を用い、リバーロキサバン内服後 2 時間以内に採血を行った。採血後直ちに遠心分離して乏血小板血漿を分注し、測定まで-80℃で保存した。採取した患者血漿を使用して、リバーロキサバン投与前後における血中リバーロキサバン濃度、PT、APTT、PS 活性（凝固時間法、合成基質法）、PC 活性（凝固時間法、合成基質法）の変動を検討した。

3) 凝血学的検査方法

①血中 Xa 阻害薬濃度 (リバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバン)

3 種類の Xa 阻害薬による抗凝固療法中のそれぞれの患者から採取した血漿について、各薬剤に適切な Xa 阻害薬キャリブレーターを用い、Biophen DiXaI (Hyphen BioMed) を使用して血中 Xa 阻害薬濃度を測定した。測定は、全自動血液凝固測定装置 CS-5100 (シスメックス) にて実施した。

②PT および APTT

PT 測定試薬はトロンボレル S (Siemens)、APTT 測定試薬はアクチン FSL (Siemens) を使用し、測定には CS-5100 を用いた。基準範囲は、PT が 10.6-13.0 秒、APTT が 27.3-40.3 秒である。

③PS 活性 (凝固時間法)

Xa 阻害薬内服患者における PS 活性値に対する Xa 阻害薬の影響の評価は、ヒモスアイエル PS-クロット (アイ・エル・ジャパン株式会社) を使用した。新規にリバーロキサバンを導入した患者における導入前後の PS 活性値に対する Xa 阻害薬の影響の評価は、STA-スタクロットプロテイン S (富士レビオ)、Protein S Ac (Siemens)、Hemoclot™ Protein S (Hyphen BioMed) の 3 種類の試薬を使用して検討した。測定は CS-5100 で実施した。

④総 PS 活性 (合成基質法)

総 PS 活性は、総プロテイン S 活性 “シノテスト” (シノテスト) を使用して測定した。本試薬においては、血漿中に存在する複合型 PS から C4BP を遊離させ、全ての PS を遊離型 PS として総 PS 活性値を測定する。

⑤総 PS 抗原量

総 PS 抗原量は、ラテックス凝集法を原理とするシグナスオート総プロテイン S 蛋白量 (シノテスト) を使用した。本試薬においては、試薬中に過剰量の C4BP が存在しているため、血漿中の遊離型 PS は C4BP と結合し、全ての PS を C4BP との複合型 PS とした後に、抗 PS-C4BP 抗体を使用して総 PS 抗原量を測定する。

⑥PC 活性 (凝固時間法)

凝固時間法を原理とする試薬は、STA-スタクロットプロテイン C (富士レビオ)、Protein C Reagent (Siemens)、Hemoclot™ Protein C (Hyphen BioMed) の 3 種類を使用した。測定は CS-5100 で実施した。

⑦PC 活性 (合成基質法)

合成基質法を原理とする試薬は、テストチーム S PC (積水メディカル)、Biophen Protein C (LRT) (Hyphen BioMed)、Berichrom Protein C (Siemens) の 3 種類を使用した。測定は、全自動血液凝固分析装置コアプレ

スタ 2000 (積水メディカル) を使用して実施した。図 3 に合成基質法の測定原理を示す。

⑧PC 抗原量

PC 抗原量は、ラテックス凝集法を原理とするエルピアエース PC II (LSI メディエンス) を使用した。

⑨AT 活性

合成基質法を原理とする AT 活性測定試薬には 2 種類存在する。トロンビン阻害活性測定試薬 (トロンビン法) として Berichrom AT III (Siemens) を、FXa 阻害活性測定試薬 (Xa 法) としてテストチーム S AT III (積水メディカル) を使用した。

3. 統計学的解析

統計学的解析には、STAT VIEW プログラム (Abacus Concepts) を使用した。ピアソンの積率相関係数を使用して、各種の試薬で評価された凝固制御因子活性と抗原量の分布の相関を評価した。 $P < 0.05$ は統計学的有意差ありとした。

結 果

1. Xa 阻害薬内服中の対象患者

NVAF または VTE の合計 152 名 (男性 82 名、女性 70 名) の患者が Xa 阻害薬による抗凝固療法を受けていた。患者の年齢は 68.5 ± 14.0 歳 (平均 \pm SD) であった。表 1 に対象患者における疾患および合併症の内訳を示す。NVAF 患者 123 名のうち、69 名は NVAF のみで、38 名は慢性心不全 (chronic heart failure: CHF) を合併していた。CHF 合併例 38 名の患者のうち、22 名は他疾患の合併も認めた (14 名の患者は洞不全症候群、8 名の患者はアテローム血栓性脳梗塞)。16 名の患者は肥大型心筋症を合併し、5 名は深部静脈血栓症を合併した。表 1 では 3 名未満の合併疾患を省略している。

2. PT および APTT に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響 (図 4)

血中に存在する 3 種類の Xa 阻害薬が PT および APTT に及ぼす影響を評価した。リバーロキサバンまたはエドキサバンを服用している患者では、PT および APTT が血中薬剤濃度依存的に有意に延長した (図 4A、4B、4D、4E)。PT の延長が最も顕著であったのはエドキサバンであり、APTT よりも PT においてさらに顕著に延長した (図 4B; $r = 0.838$, $P < 0.001$)。同様に、APTT の延長が最も顕著であったのはリバーロキサバンであり、PT よりも APTT においてさらに

顕著に延長した (図 4D; $r = 0.851$, $P < 0.001$)。一方で、アピキサバンは PT (図 4C; $r = 0.158$, $P = 0.396$) または APTT (図 4F; $r = 0.404$, $P = 0.062$) のいずれも凝固時間が延長せず、影響を与えなかった。PT、APTT はともに Xa 阻害薬の種類によって、凝固時間の延長に差異を認めた。

3. PS 活性値に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響 (図 5、表 2)

1) 凝固時間法 (図 5A-C : 白丸)

凝固時間法を原理とする試薬を使用して PS 活性値を測定した。リバーロキサバンおよびエドキサバンが PS 活性値に影響を与え、血中薬剤濃度依存的に高値となった (リバーロキサバン: $r = 0.792$, $P = 0.0001$ 、エドキサバン: $r = 0.616$, $P = 0.002$) (図 5A、5B)。一方、アピキサバンは PS 活性値への影響を認めなかった (アピキサバン: $r = 0.037$, $P = 0.909$) (図 5C)。凝固時間法による PS 活性値は、Xa 阻害薬の種類によって測定値に差異を認めた。

2) 合成基質法 (図 5A-C : 黒丸)

合成基質法を原理とする試薬を使用して総 PS 活性値を測定した。3 種類の Xa 阻害薬は、いずれの血中薬剤濃度においても総 PS 活性値と有意な相関を認めず、影響を与えなかった (図 5A-C)。

4. 総 PS 抗原量に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響 (図 5D-F、表 2)

ラテックス凝集法を原理とする試薬を使用して総 PS 抗原量を測定した。3 種類の Xa 阻害薬は、いずれの血中薬剤濃度においても総 PS 抗原量と有意な相関を認めず、影響を与えなかった (図 5D-F)。

5. PC 活性値に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響 (図 6、7、表 2)

1) 凝固時間法 (図 6)

凝固時間法を原理とする 3 種類の試薬を使用して PC 活性値を測定した。リバーロキサバンは、STA-スタクロットプロテイン C 試薬、Protein C Reagent 試薬、Hemoclot™ Protein C 試薬の 3 種類の試薬すべてにおいて PC 活性値に影響を与え、血中薬剤濃度依存的に PC 活性が高値を示した (図 6A)。特に、STA-スタクロットプロテイン C 試薬を使用して測定した PC 活性値は 3 種類の試薬の中で最もリバーロキサバンの影響を受け ($r = 0.695$, $P < 0.001$)、Hemoclot™ Protein C 試薬を使用して測定した PC 活性はリバーロキサバンの影響が最も小さかった ($r = 0.378$, $P = 0.039$)。エドキサバンは、Protein C

Reagent 試薬を使用して測定した PC 活性値への影響がわずかに認められたが、有意ではなかった ($r = 0.341$ 、 $P = 0.076$) (図 6B)。一方、アピキサバンは、Hemoclot™ Protein C および Protein C Reagent 試薬を使用して測定した PC 活性値に影響を与えなかった (図 6C)。凝固時間法による PC 活性値は、測定試薬および Xa 阻害薬の種類によって測定値に差異を認めた。

2) 合成基質法 (図 7)

合成基質法を原理とする 3 種類の試薬を使用して PC 活性値を測定した。リバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンは、3 種類すべての試薬においていずれの血中薬剤濃度においても PC 活性値と有意な相関を認めず、影響を与えなかった (図 7A-C)。

6. PC 抗原量に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響 (図 8、表 2)

ラテックス凝集法を原理とする試薬を使用して PC 抗原量を測定した結果、3 種類の Xa 阻害薬は、いずれの血中薬剤濃度においても PC 抗原量と有意な相関を認めず、影響を与えなかった。

7. リバーロキサバンの導入前後における血中薬剤濃度と PT、APTT、PS 活性値、PC 活性値の変動 (図 9、10)

対象患者の血漿検体は、7 名の新規リバーロキサバン導入患者において、リバーロキサバン導入前、投与 2 週間後、投与後 4-8 週間後の 3 回採取した。図 9 に示すように、各採血ポイントにおけるリバーロキサバンの血中濃度は、薬剤投与の 2 時間後に約 50-450 ng/mL であった (図 9A)。PT および APTT は、リバーロキサバン導入前のベースラインと比較して、リバーロキサバン導入後に明らかに凝固時間が延長した (図 9B、9C)。

また、凝固時間法を原理とする 3 種類の試薬を使用して測定した PS 活性値は、リバーロキサバン導入前のベースラインと比較して有意に高値を示した (図 9D)。特に、Siemens 社の Protein S Ac および Hyphen BioMed 社の Hemoclot™ Protein S が顕著に高値となった。凝固時間法による PS 活性値は、測定試薬によって測定値に差異を認めた。一方で、合成基質法を原理とする試薬を使用して測定した PS 活性値は、リバーロキサバン導入前後において変動を認めず、リバーロキサバンの影響を受けなかった (図 9D)。

さらに、凝固時間法を原理とする 3 種類の試薬を使用して測定した PC 活性値は、すべての試薬においてリバーロキサバン導入前のベースラインと比較して有意に高値を示した (図 10A)。特に、富士レビオ社の STA スタクロットプロテイン C および Hyphen BioMed 社の Hemoclot™ Protein C が顕著に高値となっ

た。凝固時間法による PC 活性値は、測定試薬によって測定値に差異を認めた。一方で、合成基質法を原理とする 3 種類の試薬を使用して測定した PC 活性値は、すべての試薬においてリバーロキサバン導入による変動をほとんど認めなかった (図 10B)。

8. AT 活性値に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響 (図 11、表 2)

1) トロンビン法 (図 11 : 黒四角)

合成基質法を原理とするトロンビン法にて AT 活性値を測定した。3 種類の Xa 阻害薬はいずれも AT 活性値に影響を与えなかった。

2) Xa 法 (図 11 : 白四角)

合成基質法を原理とする Xa 法にて AT 活性値を測定した。3 種類の Xa 阻害薬はすべて AT 活性値に影響を与え、血中薬剤濃度依存的に高値を示した (リバーロキサバン: $r = 0.844$ 、 $P < 0.0001$ 、エドキサバン: $r = 0.581$ 、 $P = 0.002$ 、アピキサバン: $r = 0.596$ 、 $P = 0.0003$)。特にリバーロキサバンは、AT 活性値に最も顕著な影響を与えた。Xa 法による AT 活性値は、Xa 阻害薬の種類によって測定値に差異を認めた。

考 察

近年、NVAf および VTE の患者数の増加に伴い、DOACs の使用頻度も増加の一途を辿っている。しかし、DOACs の内服により DOACs の凝固阻害活性が血中に残存していると、凝固制御因子の活性の測定や一般的な凝固検査である PT および APTT の測定に影響を与えることが報告されており、遺伝性血栓性素因 (遺伝性 PS、PC、AT 欠乏症) の見逃しをもたらす可能性がある。

1. PS 活性への影響

本研究ではまず、凝固時間法と合成基質法という 2 つの異なる測定原理を使用して、Xa 阻害薬内服が PS 活性値に及ぼす影響を検討した。凝固時間法による PS 活性値は、血漿中の PS が補酵素となり、試薬に存在する APC による FVa の不活化を PT の延長として検出する。したがって、Xa 阻害薬の影響による PT 延長は血漿中の PS 活性値を過大評価し、偽高値となる^{22, 23, 28)}。一方、合成基質法では最終的に生成するトロンビン量に応じて合成基質が分解され発色し、それを比色定量して PS 活性を算出するため、凝固時間の影響は受けないとされている^{26, 27)} (図 2)。今回、Xa 阻害薬内服中の患者検体における凝固時間を評価した結果、PT および APTT はリバーロキサバンとエドキサバン血中濃度の

上昇に伴い、有意に延長を認めた。一方、アピキサバンは PT および APTT の延長を認めなかった (図 4)。我々の研究に先立ち、限らは *in vitro* 実験において、リバーロキサバンとエドキサバンは薬剤濃度依存的に PT および APTT を延長したが、アピキサバンはそのような影響がなかったと報告している²⁹⁾。これらの結果は、我々の研究結果と同様であった。しかし、限らによる検討は Xa 阻害薬内服中の患者血漿を使用していないという点で、我々の研究とは本質的に大きく異なる。

凝固時間法を原理とする試薬で測定した PS 活性値は、リバーロキサバンとエドキサバンの血中薬剤濃度に依存し、有意に正の相関を示した (図 5A、5B)。一方、アピキサバンは、PS 活性に影響を与えなかった (図 5C)。この結果は、アピキサバンは PT の延長を認めなかったため (図 4C)、凝固時間法による PS 活性値にほとんど影響を及ぼさないという推察結果と一致していた。このように、各種 Xa 阻害薬の PT 延長の程度が、PS 活性値に大きく影響したと考えられる。以前の研究では、Xa 阻害薬内服時に凝固時間法を使用して測定した PS 活性値は、いずれの薬剤においても偽高値を示すと報告された²⁰⁻²⁴⁾。しかし、本検討においてはリバーロキサバンとエドキサバンの 2 薬剤のみが血中薬剤濃度依存的に高値を示した。本研究で観察された凝固時間の延長は、個々の Xa 阻害薬と、試薬中に存在するホスファチジルセリンとの間の物理的または化学的相互作用が原因である可能性がある。さらに、血漿中濃度がピークのタイミングでのアピキサバンの抗 FXa 活性は、リバーロキサバンのその約 60% にすぎないことが報告されている^{30,31)}。したがって、採血時の抗 FXa 活性の違いが、PT 延長効果の違いとして現れた可能性がある。このように、DOACs の分類上は同じ Xa 阻害薬であっても、3 種類の薬剤それぞれによって PS 活性値への影響は異なる。一方、合成基質法を原理とする試薬で測定した PS 活性値に対しては、3 種類の Xa 阻害薬はすべて影響を与えなかった (図 5A-C)。この方法は生成したトロンビンによる合成基質の分解および発色を利用するため凝固時間の影響を受けないとされているが、一致した結果となった。また、ラテックス凝集法を使用して測定した総 PS 抗原量に対しては、3 種類の Xa 阻害薬はいずれも影響を与えなかった (図 5D-F)。

2. PC 活性への影響

Xa 阻害薬内服が PC 活性値に及ぼす影響を検討するために、凝固時間法と合成基質法の 2 種類の測定原理を用いて検討した。凝固時間法を原理とする 3 種類の試薬を使用した PC 活性値に対しては、リバーロキサバンが 3 種類の試薬すべてにおいて血中薬剤濃度依存的に高値を示した (図 6)。一方、合成基質法を原理とする 3 種類の試薬を使用して測定した PC 活性値に対しては、3 種類の

Xa 阻害薬はすべて影響を与えなかった(図 7)。PC 活性の測定は、凝固時間法・合成基質法ともに、蛇毒由来 PC アクチベーターを使用して血漿中の PC を十分に活性化し、APC に変換する。凝固時間法は主に APTT を利用し、PC 活性値は APC による FVa および FVIIIa の不活化に起因する凝固時間の延長を使用して検出される(APTT 延長効果)。したがって、血中に残存する Xa 阻害薬による APTT 延長は、血漿中の PC 活性値を過大評価することが報告されている^{20, 22, 23)}。本研究においては、Xa 阻害薬の中でリバーロキサバンのみが血中薬剤濃度依存的に有意に高値を示し、エドキサバンは 1 種類の試薬のみ高値傾向を認めたが有意ではなかった。また、アピキサバンは PC 活性値に影響を与えなかった。各種 Xa 阻害薬の APTT 延長の程度が、PC 活性値に大きく影響したと考えられる。これは、使用する試薬のホスファチジルセリンとの反応性や、採血時点での血中抗 FXa 活性の違いなどが原因となっている可能性がある。このように、同じ Xa 阻害薬でも薬剤によって PC 活性値への影響は異なる。

一方、合成基質法による PC 活性値測定は、血漿検体において生成された APC の発色基質分解による呈色を比色定量しているため(図 3)、凝固時間の延長による影響を受けないとされており、本研究でも一致した結果が得られた。また、ラテックス凝集法を使用して測定した PC 抗原量に対しては、3 種類の Xa 阻害薬はいずれも影響を与えなかった(図 8)。

3. Xa 阻害薬治療前後の PS、PC 活性の変動

Xa 阻害薬の導入による凝固時間や PS、PC 活性値の変動を確認するため、新規にリバーロキサバンを導入した患者の薬剤導入前後における PT、APTT、PS、PC 活性値の変動を評価した。その結果、凝固時間の延長と PS および PC 活性値の上昇がリバーロキサバンの導入に関連していることを確認した。リバーロキサバン導入後は有意に PT および APTT の延長を認め(図 9B、C)、凝固時間法を原理とした PS および PC 活性値はこの凝固時間の延長と相関して偽高値を示した(図 9D、10A)。同じ Xa 阻害薬でも PS 活性、PC 活性はともに、測定試薬によって活性値への影響は異なる。Xa 阻害薬における各種測定試薬に対する反応性の違いが原因のひとつと考えられる。一方で、合成基質法を原理とする試薬で測定した PS および PC 活性値はいずれも、リバーロキサバン導入前後における変動が認められず、リバーロキサバンの影響を受けなかった(図 9D、10B)。

以上より、Xa 阻害薬内服患者において、本邦で新たに開発された合成基質法を原理とする試薬で測定する PS 活性値は、Xa 阻害薬の影響を受けないことが明らかとなった。したがって、Xa 阻害薬内服中の患者において PS K196E 保因者を見逃さないための正確な PS 活性値測定には、合成基質法を使用して測定する必要がある。ただし、たとえ正確に PS 活性を測定できたとしても、PS

K196E 患者の PS 活性はわずかしき低下しない（約 16%の低下）ため、必ずしも PS K196E の保因者を検出できるわけではないことに注意が必要である。また、合成基質法を使用した PC 活性測定は、PS 活性と同様に、3 種類の Xa 阻害薬のいずれにおいても影響を受けなかった。

4. AT 活性への影響

AT 活性値は、合成基質法を原理とする試薬を使用して測定され、測定法は、トロンビン法と Xa 法の 2 種類がある。トロンビン法を使用して測定した AT 活性値は、3 種類の Xa 阻害薬すべてにおいて血中薬剤濃度と有意な相関を認めず、影響を受けなかった。一方、Xa 法を使用して測定した AT 活性値は、3 種類すべての Xa 阻害薬において血中薬剤濃度と正の相関を認め、AT 活性が偽高値となった。Xa 阻害薬の中でも、リバーロキサバンが AT 活性値に最も影響を与えた（図 11）。Xa 法は、血漿中に存在する Xa 阻害薬が試薬に含まれる FXa を阻害するため、FXa の残存活性が低下し AT 活性が偽高値となると考えられている^{22, 23, 32, 33}。AT 活性値に対する Xa 阻害薬の影響が異なる理由としては、各 Xa 阻害薬の FXa 阻害機序に関する反応性の違いに関連している可能性がある。本研究では、以前の報告と同様に^{20, 22, 23, 32-34}、Xa 阻害薬内服患者の AT 活性値は、トロンビン法を用いて測定することで影響を受けないことが示された。

5. まとめ

以上のことから DOACs 内服下では、各種 DOACs の凝固活性阻害作用が凝血学的検査の測定系に干渉する。したがって、DOAC 療法を受けている患者における遺伝性血栓性素因のスクリーニング検査に必要な凝固制御因子（PS、PC、AT）活性を測定する際、本来低値を示すはずの結果が正常値を示してしまい、診断を見逃してしまう可能性がある。凝固検査の前に DOAC 療法を中止することが望ましいが、実際には凝固系の検査のためだけに、一旦開始された DOACs 投与を中止することは困難である。可能な限り、DOACs の血漿濃度が低下したトラフ期のタイミングで検体採取を行うことが、DOACs による干渉を最小限に抑える方法の 1 つである^{23, 35}。現在、凝血学的検査は、検体中の DOACs の抗凝固作用を中和する「DOAC Stop」という試薬を使用して、DOAC の干渉を除外しながら行うことが可能となったが^{36, 37}、試薬が非常に高価であるため浸透していないのが現状である。

本研究の検討結果を表 2 にまとめた。本邦で新たに開発された合成基質法を原理とする PS 活性測定試薬は、Xa 阻害薬内服患者の PS 活性値の測定に適していることが示され、遺伝性 PS 欠乏症、特に日本人で多いとされる PS K196E 保因者の診断精度向上に繋がること明らかとなった。本研究では、トロンビン

阻害薬の影響については検討していないが、ダビガトランの抗凝固効果は APTT に反映されるため、凝固時間法を使用して測定した PS および PC 活性は偽高値となると考えられる^{20, 22, 23, 35, 39, 40)}。一方、合成基質法を原理とする試薬を用いた PS および PC 活性値は、Xa 阻害薬同様、トロンビン阻害薬の影響を受けないと推測される^{20, 22, 23)}。凝固制御因子 (PS、PC、AT) 活性測定試薬における DOAC 特異的反応性の違いは、各種 DOACs の特性に起因する可能性がある。DOACs の薬理活性、FXa またはトロンビン阻害機序、測定試薬に対する反応性など固有のパラメーターによるものと考えられるが明確ではなく、今後更なる研究に期待したい^{1, 24, 35, 41, 42)}

結 語

Xa 阻害薬内服患者における凝固制御因子 (PS、PC、AT) の活性測定は、DOACs の種類と測定試薬の原理により様々な影響を受ける。また、同じ測定原理の試薬を使用しても、試薬ごとに測定値への影響の程度が異なる。PS 活性値は、本邦で新たに開発された合成基質法を原理とする試薬を使用した測定では、Xa 阻害薬の影響を受けないことが本研究で明らかとなった。今後、この合成基質法を使用した PS 活性測定により、PS K196E などの遺伝性 PS 欠乏症の迅速かつ正確な診断に繋がることが期待される。DOAC 療法を受けている患者の遺伝性血栓性素因のスクリーニングを行う場合には、測定試薬の原理と特性、および DOACs に固有のパラメーターを熟知する必要がある。さらに、DOAC 血漿濃度が低下したトラフ期における適切なタイミングでの検体採取、検体中の抗凝固作用を中和する「DOAC Stop」の使用などの工夫も必要であろう。

謝 辞

我々の研究に参加していただいた患者様に心より感謝申し上げます。また、検体収集にご協力頂きました林研至先生、古荘浩司先生、藤野陽先生、加藤武史先生、中西千明先生、朝倉英策先生に心より感謝申し上げます。さらに、各種活性測定等にご協力頂きました長屋聡美先生、末武司様 (シスメックス)、鈴木健史様 (シスメックス)、小濱聖佳様 (シスメックス)、津田友秀様 (シノテスト) に心より感謝申し上げます。なお、本研究は、日本厚生労働省科学研究費補助金 (E. M) (助成金番号 6046619-01、20FC1024)、日本文部科学省科学研究費 (E. M) (助成金番号 18K07442) および日本医療研究開発機構研究費 (E. M) (助成金番号 19ek0109210h0003) の助成金により実施された。

利益相反

すべての著者は、開示すべき利益相反はありません。

参考文献

- 1) Eikelboom JW, Quinlan DJ, Hirsh J, Connolly SJ, Weitz JI: Laboratory monitoring of non-vitamin K antagonist oral anticoagulant use in patients with atrial fibrillation: a review. *JAMA Cardiol*, 2017; 2: 566-574
- 2) Castellucci LA, Cameron C, Le Gal G, Rodger MA., Coyle D, Wells PS, Clifford T, Gandara E, Wells G, Carrier M: Clinical and safety outcomes associated with treatment of acute venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 2014; 312: 1122-1135
- 3) Verhamme P, Wells PS, Segers A, Ageno W, Brekelmans MP, Cohen AT, Meyer G, Grosso MA, Raskob G, Weitz JI, Zhang G, Buller H: Dose reduction of edoxaban preserves efficacy and safety for the treatment of venous thromboembolism. An analysis of the randomised, double-blind HOKUSAI VTE trial. *Thromb Haemost*, 2016; 116: 747-753
- 4) Almutairi AR, Zhou L, Gellad WF, Lee JK, Slack MK, Martin JR, Lo-Ciganic W-H: Effectiveness and Safety of Non-vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants for Atrial Fibrillation and Venous Thromboembolism: A Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Ther*, 2017; 39: 1456-1478
- 5) Nick van Es, Coppens M, Schulman S, Middeldorp S, Büller HR: Direct oral anticoagulants compared with vitamin K antagonists for acute venous thromboembolism: evidence from phase 3 trials. *Blood*, 2014; 124: 1968-1975
- 6) Forster R, Stewart M: Anticoagulants (extended duration) for prevention of venous thromboembolism following total hip or knee replacement or hip fracture repair. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016; Mar 30; 3: CD004179
- 7) Christiansen SC, Cannegieter SC, Koster T, Vandenbroucke JP, Rosendaal FR: Thrombophilia, clinical factors, and recurrent venous thrombotic events. *JAMA*, 2005; 293: 2352-2361
- 8) Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, Okada H, Takeshita S, Sakata T,

- Kokame K, Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Suehisa E, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Ikeda Y: Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*, 2009; 124: 14-18
- 9) Patracchini P, Aiello V, Palazzi P, Calzolari E, Bernardi F: Sublocalization of the human protein C gene on chromosome 2q13-q14. *Hum Genet*, 1989; 81: 191-192
 - 10) Kinoshita S, Iida H, Inoue S, Watanabe K, Kurihara M, Wada Y, Tsuda H, Kang D, Hamasaki N: Protein S and protein C gene mutation in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem*, 2005; 38: 908-915
 - 11) Tsuda H, Noguchi K, Oh D, Berezky Z, Lee LH, Kang D, Dusse LMS, Carvalho MG, Morishita E: SSC Subcommittee on Plasma Coagulation Inhibitors of the ISTH. Racial differences in protein S Tokushima and two protein C variants as genetic risk factors for venous thromboembolism. *Res Pract Thromb Haemost*, 2020; 4: 1295-1300
 - 12) Hamasaki N, Kuma H, Tsuda H: Activated protein C anticoagulant system dysfunction and thrombophilia in Asia. *Ann Lab Med*, 2013; 33: 8-13
 - 13) Sakata T, Okamoto A, Mannami T, Tomoike H, Miyata T: Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita Study. *J Thromb Haemost*, 2004; 2: 1012-1013
 - 14) Pecheniuk NM, Elias DJ, Xu X, Griffin JH: Failure to validate association of gene polymorphisms in EPCR, PAR-1, FSAP and protein S Tokushima with venous thromboembolism among Californians of European ancestry. *Thromb Haemost*, 2008; 99: 453-455
 - 15) Liu W, Yin T, Okuda H, Harada KH, Li Y, Xu B, Yang J, Wang H, Fan X, Koizumi A, Miyata T: Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism, is limited to Japanese. *Thromb Res*, 2013; 132: 314-315
 - 16) Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, Okamoto A, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost*, 2006; 4: 2010-2013
 - 17) Ogiwara K, Nogami K, Mizumachi K, Nakagawa T, Noda N, Ohga S,

- Shima M: Hemostatic assessment of combined anticoagulant therapy using warfarin and prothrombin complex concentrates in a case of severe protein C deficiency. *Int J Hematol*, 2019; 109: 650-656
- 18) Human Gene Mutation Database (HGMD), 2019.3. Available at <https://portal.biobase-international.com>, access day, August 8, 2019
- 19) Patnaik MM, Moll S: Inherited antithrombin deficiency: a review. *Hemophilia*, 2008; 14: 1229-1239
- 20) Favaloro EJ, Lippi G: Laboratory testing in the era of direct or non-vitamin K antagonist oral anticoagulants: a practical guide to measuring their activity and avoiding diagnostic errors. *Semin Thromb Hemost*, 2015; 41: 208-227
- 21) Douxfils J, Chatelain B, Chatelain C, Dogné JM, Mullier F: Edoxaban: Impact on routine and specific coagulation assays. A practical laboratory guide. *Thromb Haemost*, 2016; 115: 368-381
- 22) Gosselin RC, Adcock DM: The laboratory's 2015 perspective on direct oral anticoagulant testing. *J Thromb Haemost*, 2016; 14: 886-893
- 23) Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, Dogné JM, Mullier F: Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: A practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost*, 2018; 16: 209-219
- 24) Harenberg J, Du S, Weiss C, Krämer R, Hoppensteadt D, Walenga J: Report of the Subcommittee on Control of Anticoagulation on the determination of the anticoagulant effects of apixaban: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 2014; 12: 801-804
- 25) Brinkman HJM, Ahnström J, Castoldi E, Dahlbäck B, Marlar RA: Pleiotropic anticoagulant functions of protein S, consequences for the clinical laboratory. Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost*, 2021; 19: 281-286
- 26) Tsuda T, Jin X, Tsuda H, Ieko M, Morishita E, Adachi T, Hamasaki N: New quantitative total protein S-assay system for diagnosing protein S type II deficiency: clinical application of the screening system for protein S type II deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2012; 23: 56-63

- 27) Tsuda T, Jin X, Yoshimura H: Development of novel methods and reagents for measuring protein S -Assay systems for total protein S activity, total protein S mass and protein S specific activity. *Jpn J Clin Chem*, 2019; 48: 245-251
- 28) Bonar R, Favalaro EJ, Mohammed S, Ahuja M, Pasalic L, Sioufi J, Marsden K: The effect of the direct factor Xa inhibitors apixaban and rivaroxaban on haemostasis tests: a comprehensive assessment using in vitro and ex vivo samples. *Pathology*, 2016; 48: 60-71
- 29) Kuma H, Matsuda R, Nakashima A, Motoyama K, Takazaki S, Hatae H, Jin X, Tsuda T, Tsuda H, Hamasaki N: Protein S-specific activity assay system is not affected by direct oral anticoagulants. *Thromb Res*, 2018; 168: 60-62
- 30) Ieko M: Characteristics of various anticoagulants and evaluation methods for risk of bleeding and thrombosis. *Jpn J Electrocardiology*, 2014; 34: 149-156 (in Japanese)
- 31) Frost C, Song Y, Barrett YC, Wang J, Pursley J, Boyd RA, LaCreta F: A randomized direct comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of apixaban and rivaroxaban. *Clin Pharmacol*, 2014; 6: 179-187
- 32) Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg B, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, Strandberg K, Lindahl TL: Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. *J Thromb Haemost*, 2011; 9: 133-139
- 33) Van Blerk M, Bailleul E, Chatelain B, Demulder A, Devreese K, Douxfils J, Jochmans K, Mullier F, Wijns W, Soumali MR, Coucke W, Vernelen K, Van de Walle P: Influence of dabigatran and rivaroxaban on routine coagulation assays. A nationwide Belgian survey. *Thromb Haemost*, 2015; 113: 154-164
- 34) Mani H, Hesse C, Stratmann G, Lindhoff-Last E: Rivaroxaban differentially influences ex vivo global coagulation assays based on the administration time. *Thromb Haemost*, 2011; 106: 156-164
- 35) Samuelson BT, Cuker A, Siegal DM, Crowther M, Garcia DA: Laboratory assessment of the anticoagulant activity of direct oral anticoagulants: A systematic review. *Chest*, 2017; 151: 127-138
- 36) Platton S, Hunt C: Influence of DOAC Stop on coagulation assays in

- samples from patients on rivaroxaban or apixaban. *Int J Lab Hematol*, 2019; 41: 227–233
- 37) Favresse J, Lardinois B, Sabor L, Devalet B, Vandepapeliere J, Braibant M, Lessire S, Chatelain B, Jacqmin H, Douxfils J, Mullier F: Evaluation of the DOAC-Stop® procedure to overcome the effect of DOACs on several thrombophilia screening tests. *TH Open*, 2018; 2: e202–e209
- 38) Lindahl TL, Banghaei F, Blixter IF, Gustafsson KM: Expert Group on Coagulation of the External Quality Assurance in Laboratory Medicine in Sweden: Effect of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb Haemost*, 2011; 105: 371–378
- 39) Halbmayr WM, Weigel G, Quehenberger P, Tomasits J, Haushofer AC, Aspöck G, Loacker L, Schnapka-Koepf M, Goebel G, Griesmacher A: Interference of the new oral anticoagulant dabigatran with frequently used coagulation tests. *Clin Chem Lab Med*, 2012; 50: 1601–1605
- 40) Douxfils J, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM: Impact of dabigatran on a large panel of dabigatran etexilate. *Thromb Haemost*, 2012; 107: 985–997
- 41) Lippi G, Favaloro EJ: Recent guidelines and recommendations for laboratory assessment of the direct oral anticoagulants (DOACs) : is there consensus? *Clin Chem Lab Med*, 2015; 53: 185–197
- 42) Tripodi A: The laboratory and the new oral anticoagulants. *Clin Chem* 59:353–362, 2013

図表説明

表 1 対象患者の疾患および合併症の内訳

NVAF 患者 123 名のうち、他の合併疾患を有する患者数が 3 名未満の場合、省略した。

表 2 遺伝性血栓性素因の凝固制御因子測定に対する DOACs の影響

トロンビン阻害薬については検討を行っていない。トロンビン阻害薬の影響は既に報告されており^{20, 22, 23, 33, 38)}、トロンビン阻害薬のパラメーターは、それらが文献から引用されていることを示すためにアスタリスクでマークした。

図 1 生体内の凝固反応と DOACs の作用部位

図 2 合成基質法を使用した PS 活性測定の原理

血漿中の PS は APC および FVa と一定時間反応し、FVa は PS によって不活化される（反応 1）。残存した FVa は、FXa およびリン脂質とプロトロンビナーゼ複合体を形成し、次にプロトロンビンをトロンビンに活性化する。生成されたトロンビンは発色基質を分解するため、PS 活性はその呈色の比色定量によって間接的に検出される（反応 2）。

図 3 合成基質法を使用した PC 活性測定の原理

血漿中の PC は蛇毒アクチベーターを使用して APC に変換される。生成された APC は発色基質を分解するため、PC 活性は呈色を比色定量し、検出される。

図 4 PT および APTT に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響

A、D：リバーロキサバン、B、E：エドキサバン、C、F：アピキサバン

図 5 PS 活性値および総 PS 抗原量に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響

●：合成基質法、○：凝固時間法、▲：総 PS 抗原量、A、D：リバーロキサバン、B、E：エドキサバン、C、F：アピキサバン

図 6 PC 活性値に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響（凝固時間法）

A：リバーロキサバン、B：エドキサバン、C：アピキサバン

図7 PC 活性値に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響（合成基質法）

A：リバーロキサバン、B：エドキサバン、C：アピキサバン

図8 PC 抗原量に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響

A：リバーロキサバン、B：エドキサバン、C：アピキサバン

図9 リバーロキサバンの導入前後における血中リバーロキサバン濃度と PT、APTT、PS 活性値の変動

図は、血中リバーロキサバン濃度（A）、リバーロキサバン導入前後における PT（B）と APTT（C）、凝固時間法と合成基質法による PS 活性値（D）の変動を示す。STA-スタクロットプロテイン S、Protein S Ac、Hemoclot™ Protein S は凝固時間法を原理とする試薬、総プロテイン S 活性“シノテスト”は合成基質法を原理とする試薬である。

図10 リバーロキサバンの導入前後における血中リバーロキサバン濃度と PC 活性値の変動

図は、血中リバーロキサバン濃度とリバーロキサバン導入前後における凝固時間法による PC 活性値（A）、合成基質法による PC 活性値（B）の変動を示す。STA-スタクロットプロテイン C、Protein C Reagent、Hemoclot™ Protein C は凝固時間法を原理とする試薬、テストチーム S PC、Berichrom Protein C、Biophen Protein C（LRT）は合成基質法を原理とする試薬である。

図11 AT 活性値に対するリバーロキサバン、エドキサバン、アピキサバンの影響

A：リバーロキサバン、B：エドキサバン、C：アピキサバン、□：Xa 法、
■：トロンビン法

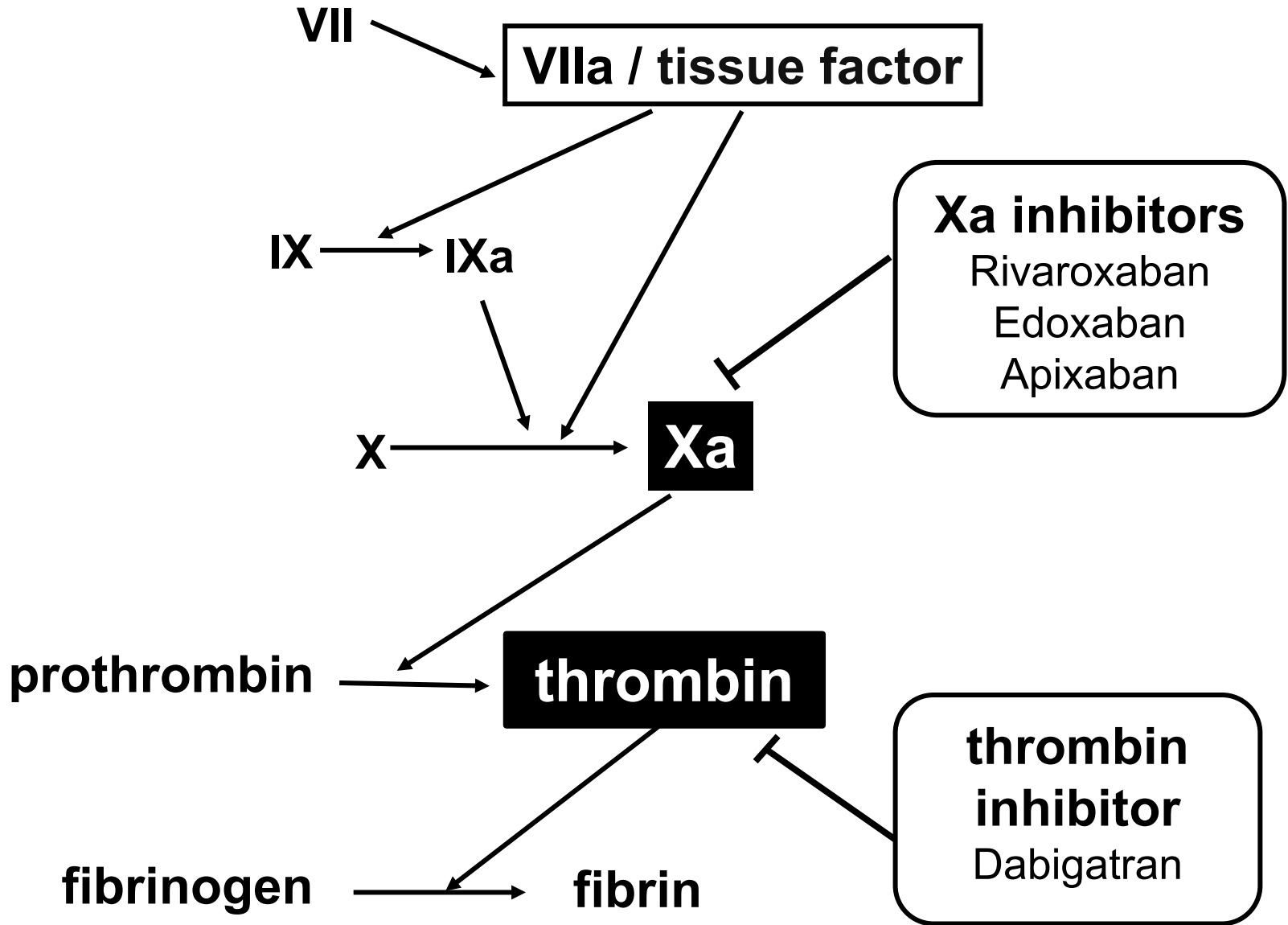
研究業績

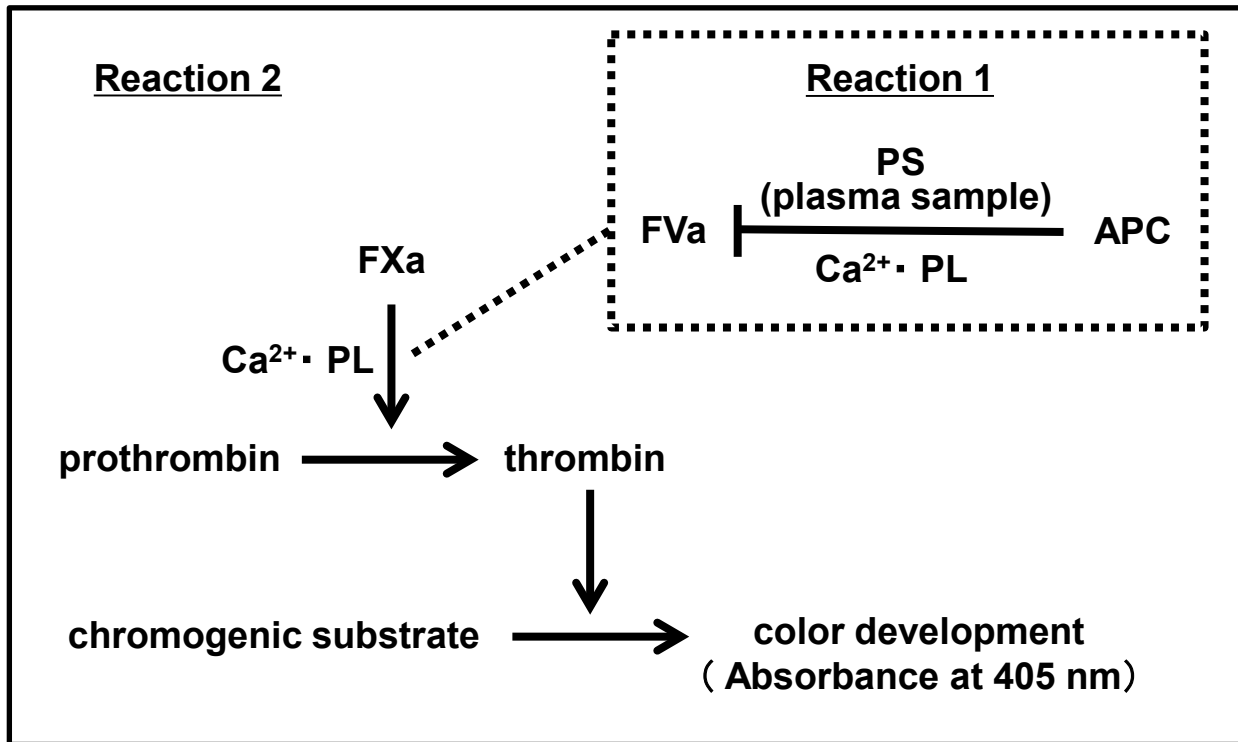
原著論文

1. Takako Terakami, Satomi Nagaya, Kenshi Hayashi, Hiroshi Furusho, Noboru Fujino, Takeshi Kato, Hidesaku Asakura, Eriko Morishita: Effect on plasma protein S activity in patients receiving the factor Xa inhibitors. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2021 年; 掲載予定 査読あり
2. Takako Terakami, Akiko Sekiya, Kenshi Hayashi, Takeshi Suzuki, Hiroshi Furusho, Hidesaku Asakura, Eriko Morishita, Takashi Wada: The effect of direct oral anticoagulants on blood protein C activity. Journal of Wellness and Health Care, 2020 ; 44 : 33-41. 査読あり

学会発表

1. 寺上貴子, 森下英理子, 宮嶋良康, 中田晶子, 中出祐介, 大江宏康, 森三佳, 朝倉英策, 酒井佳夫, 和田隆志: 当院における下肢静脈エコー図検査の現状. 第20回日本検査血液学会, 奈良, 2019年7月7日.
2. 寺上貴子, 森下英理子, 關谷暁子, 森三佳, 林研至, 末武司, 鈴木健史, 小濱聖佳, 古荘浩司, 朝倉英策, 和田隆志: 直接経口抗凝固薬が血中アンチトロンビン, プロテインC, プロテインS活性測定値に与える影響. 第79回日本血液学会学術集会, 東京, 2017年10月22日.





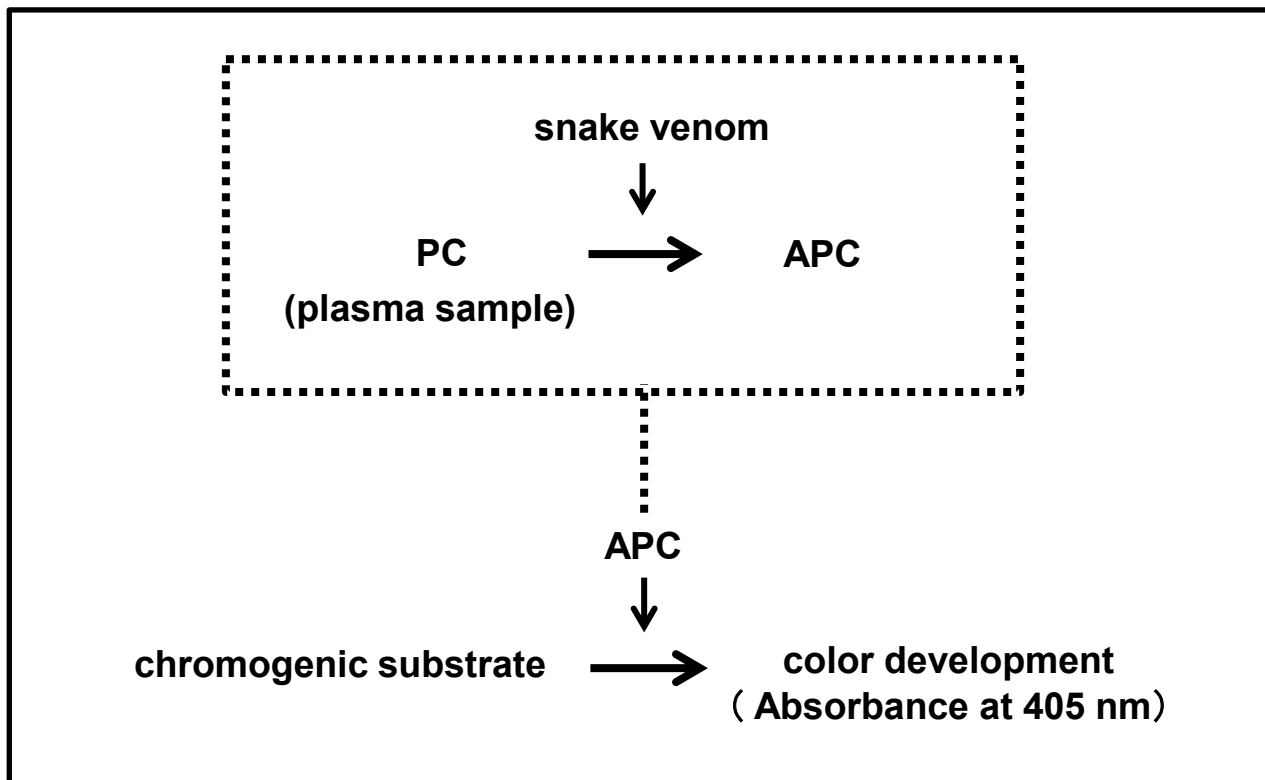
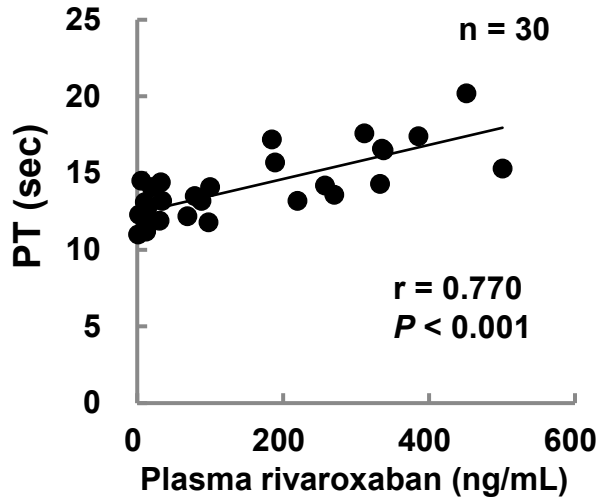


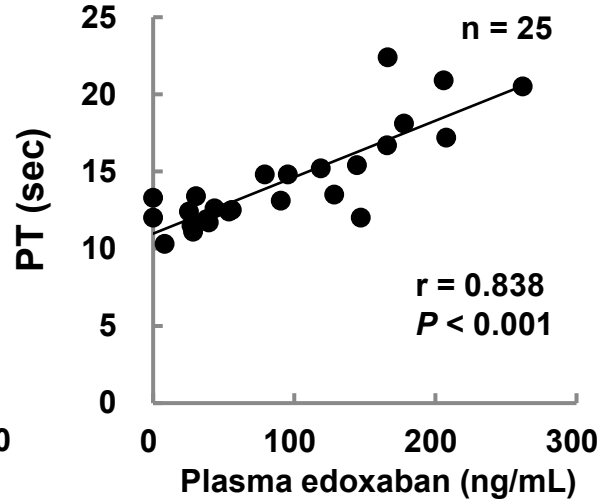
表 1

Disease	Cases
Non-valvular atrial fibrillation (NVAF)	Total 123
NVAF	69
NVAF & CHF	16
NVAF & Hypertrophic cardiomyopathy	16
NVAF, CHF & Sick sinus syndrome	14
NVAF, CHF & Atherothrombotic cerebral infarction	8
VTE	Total 34
DVT	28
DVT & NVAF	5
Retinal vein thrombosis	1

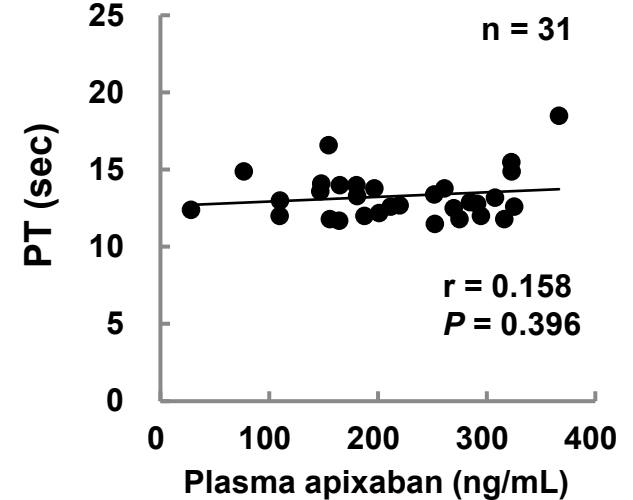
A. Rivaroxaban



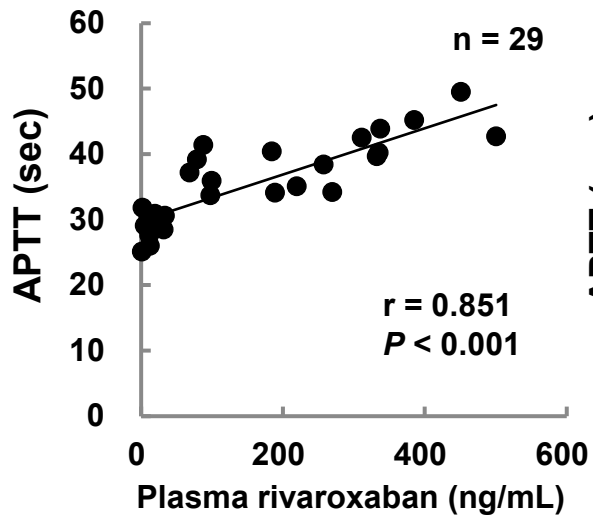
B. Edoxaban



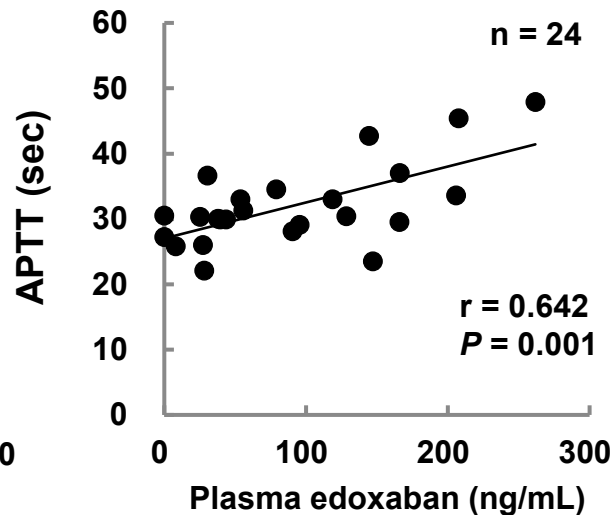
C. Apixaban



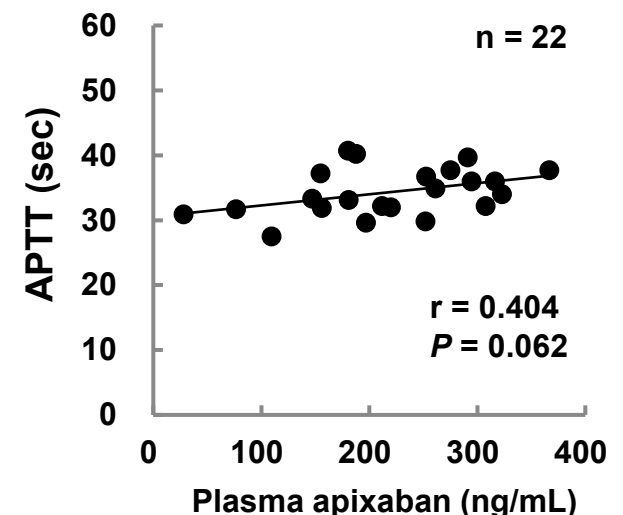
D. Rivaroxaban



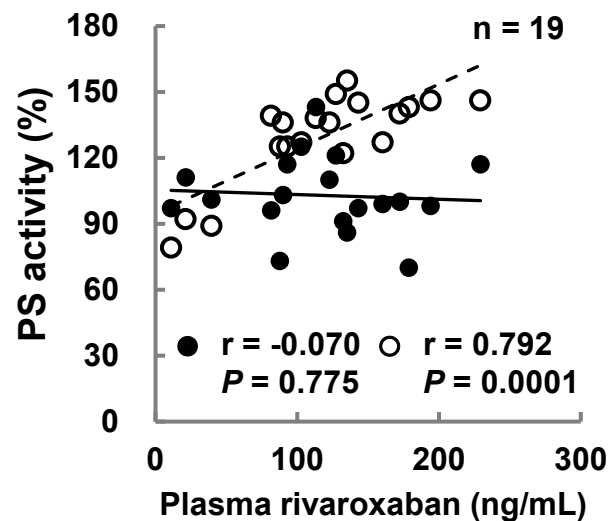
E. Edoxaban



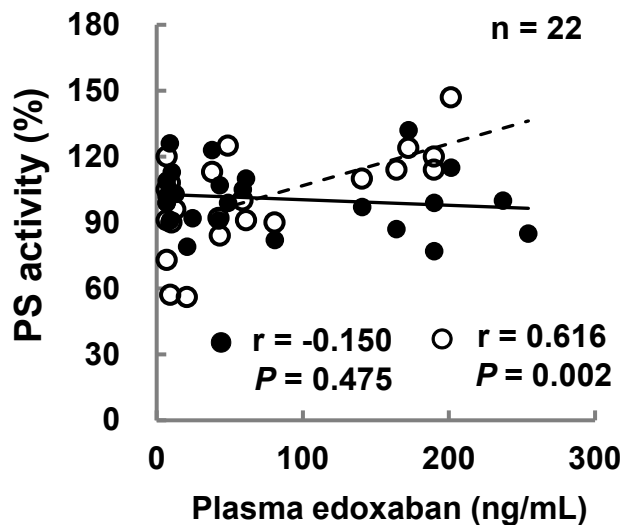
F. Apixaban



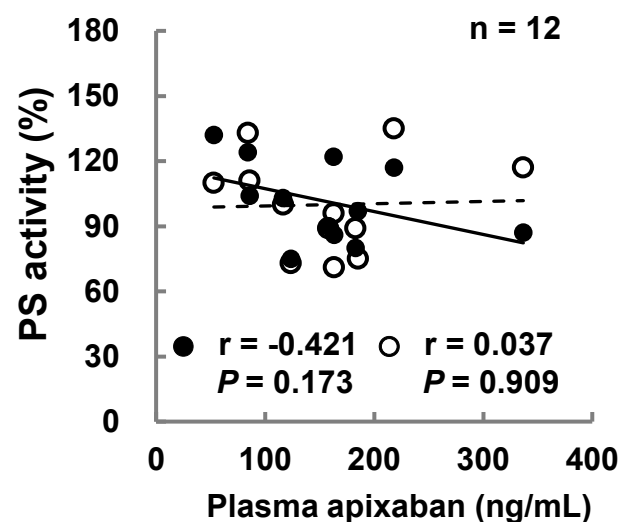
A. Rivaroxaban



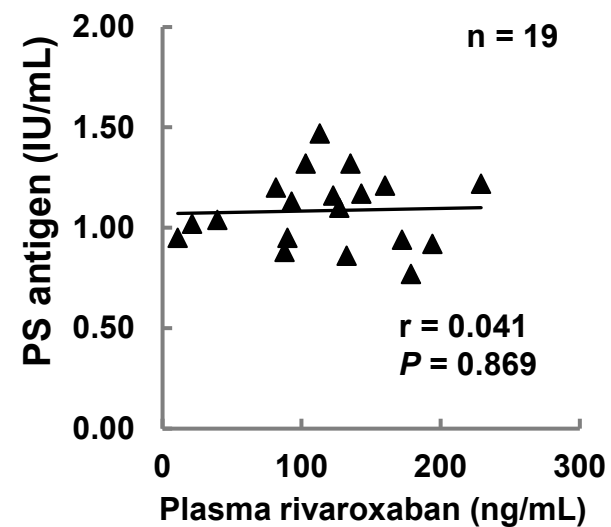
B. Edoxaban



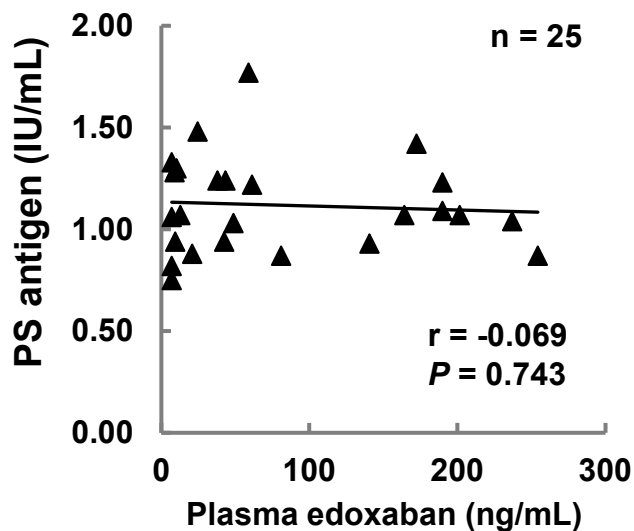
C. Apixaban



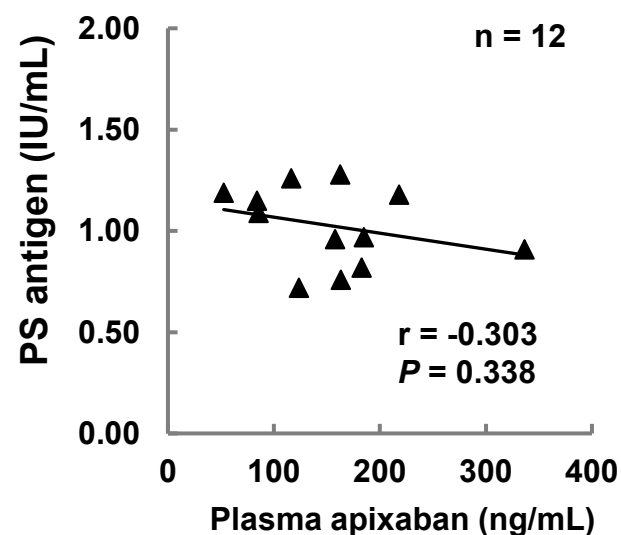
D. Rivaroxaban



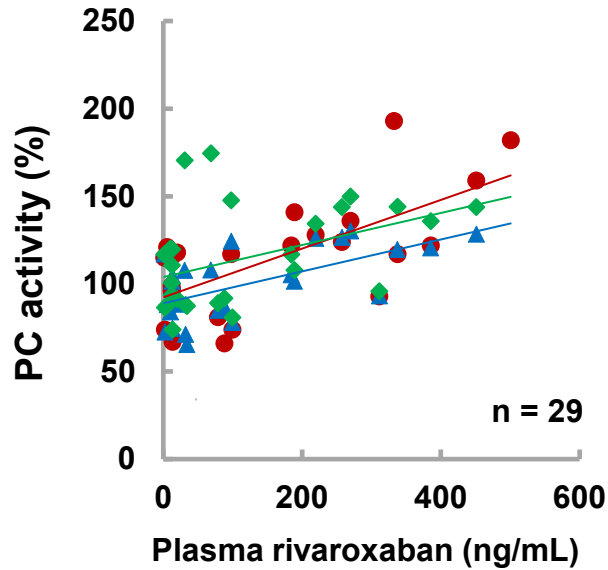
E. Edoxaban



F. Apixaban



A. Rivaroxaban



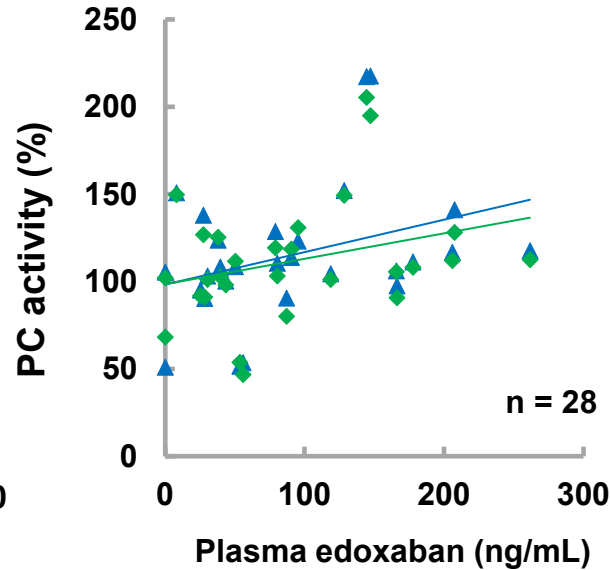
- STA-Staclot Protein C
- ▲ Protein C Reagent
- ◆ Hemoclot Protein C

● $r = 0.695$
 $P < 0.001$

▲ $r = 0.551$
 $P = 0.002$

◆ $r = 0.378$
 $P = 0.039$

B. Edoxaban

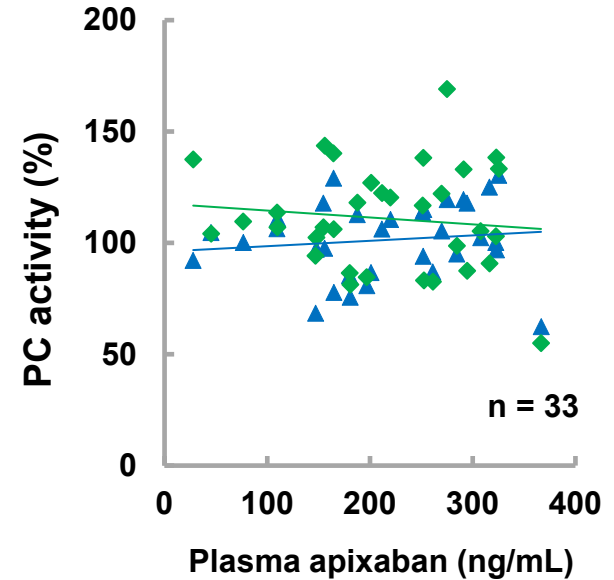


- ▲ Protein C Reagent
- ◆ Hemoclot Protein C

▲ $r = 0.341$
 $P = 0.076$

◆ $r = 0.297$
 $P = 0.125$

C. Apixaban

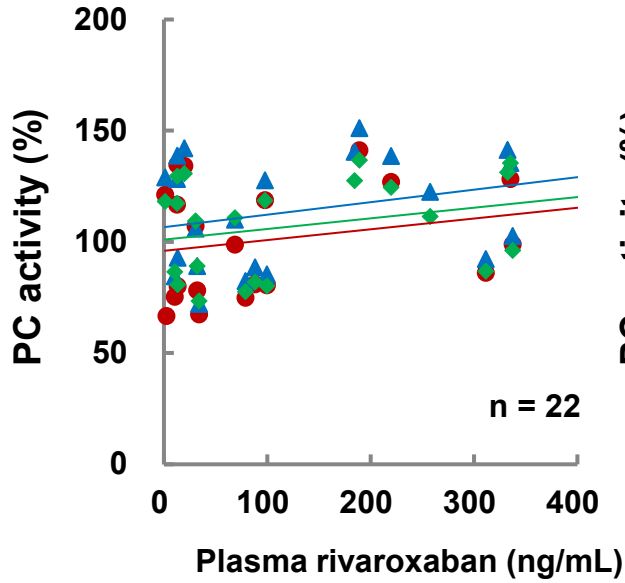


- ▲ Protein C Reagent
- ◆ Hemoclot Protein C

▲ $r = 0.124$
 $P = 0.493$

◆ $r = -0.113$
 $P = 0.529$

A. Rivaroxaban



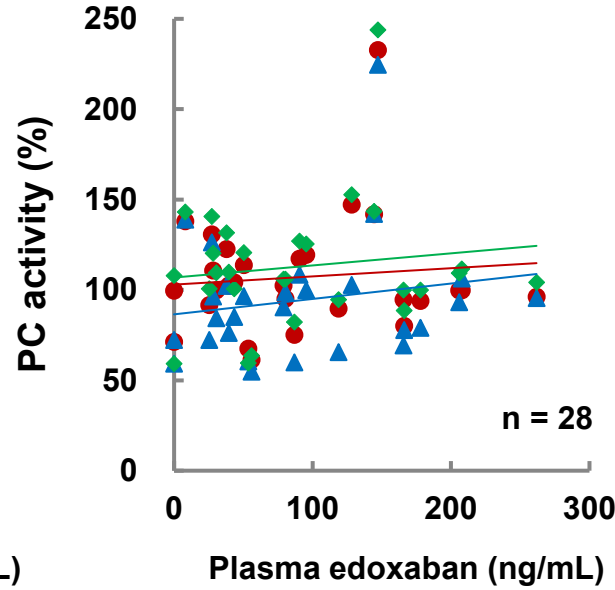
- Testzym S PC
- ◆ Biophen Protein C
- ▲ Berichrom Protein C

● $r = 0.163$
 $P = 0.388$

◆ $r = 0.212$
 $P = 0.260$

▲ $r = 0.218$
 $P = 0.246$

B. Edoxaban



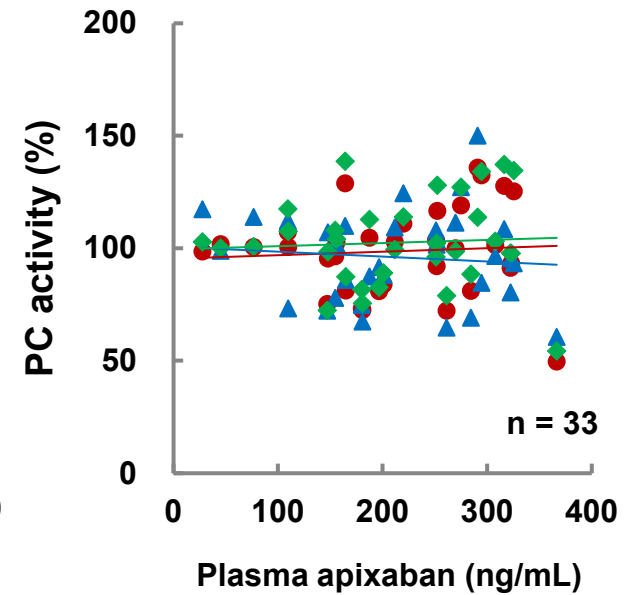
- Testzym S PC
- ◆ Biophen Protein C
- ▲ Berichrom Protein C

● $r = 0.098$
 $P = 0.619$

◆ $r = 0.137$
 $P = 0.489$

▲ $r = 0.177$
 $P = 0.368$

C. Apixaban



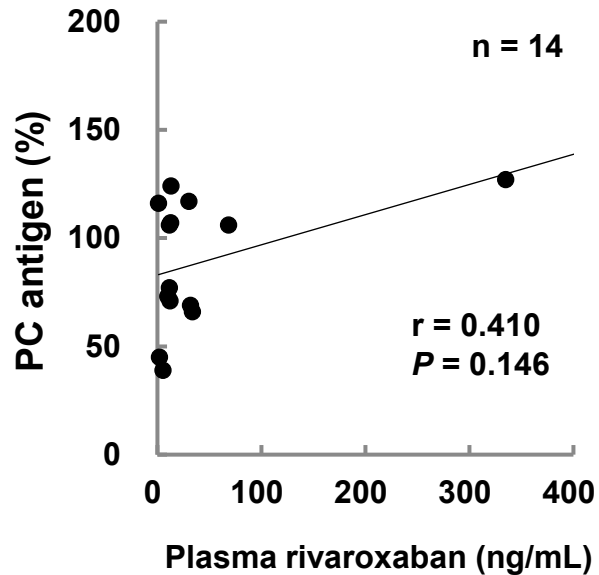
- Testzym S PC
- ◆ Biophen Protein C
- ▲ Berichrom Protein C

● $r = 0.068$
 $P = 0.708$

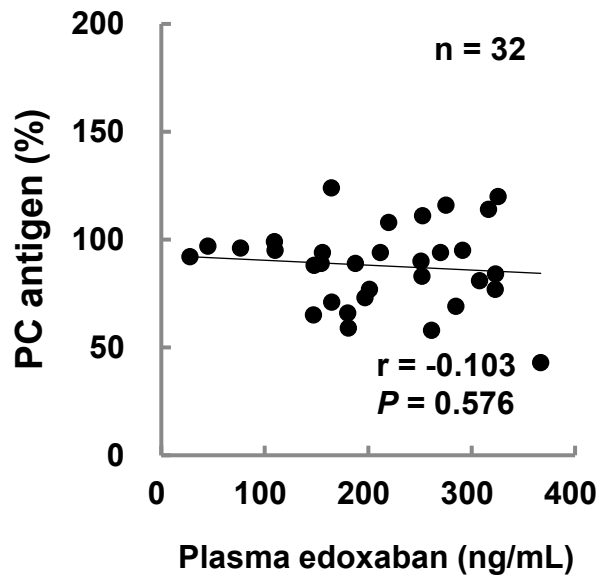
◆ $r = 0.062$
 $P = 0.731$

▲ $r = -0.093$
 $P = 0.608$

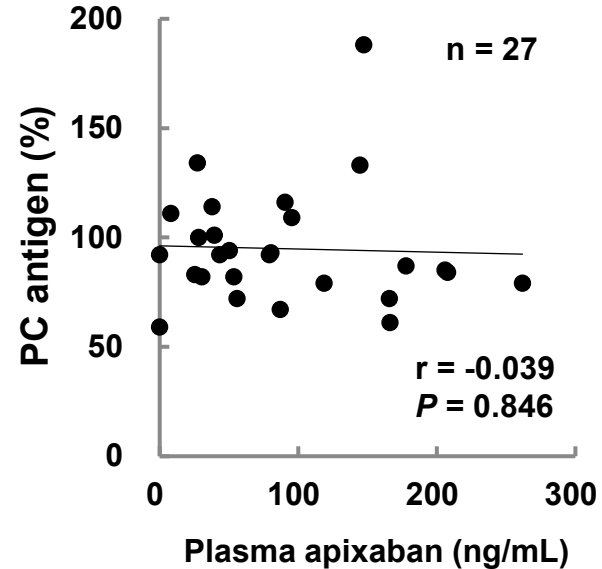
A. Rivaroxaban

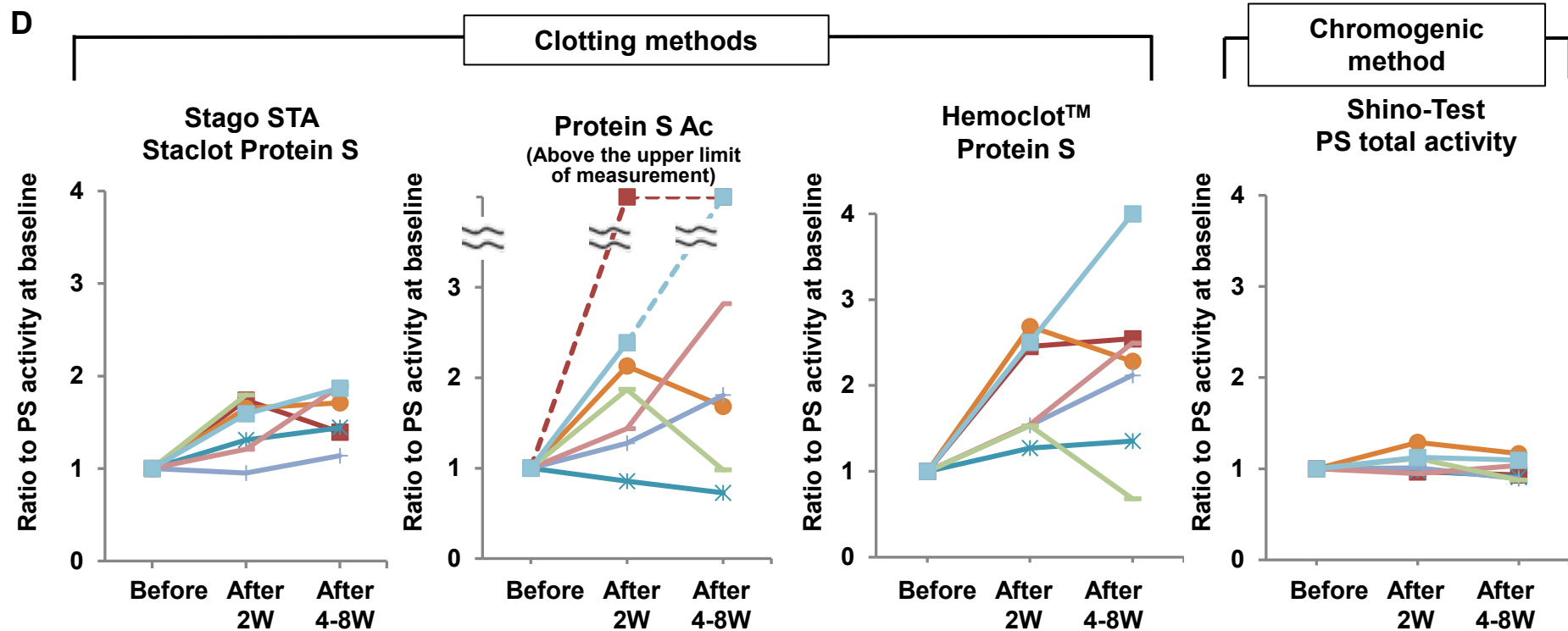
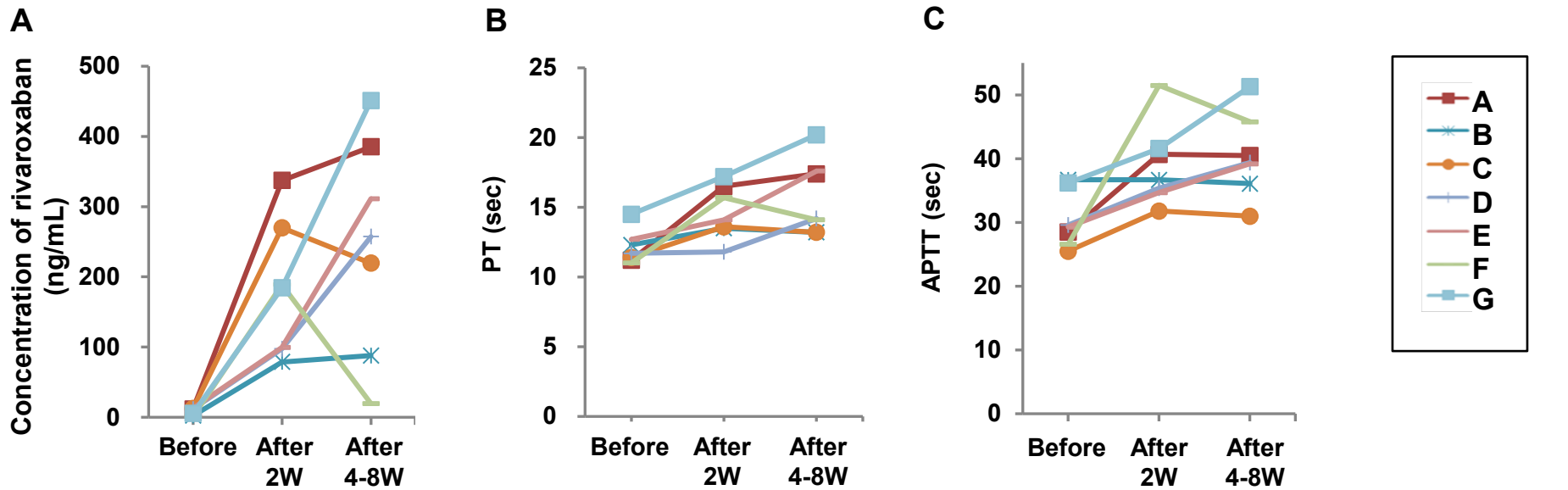


B. Edoxaban



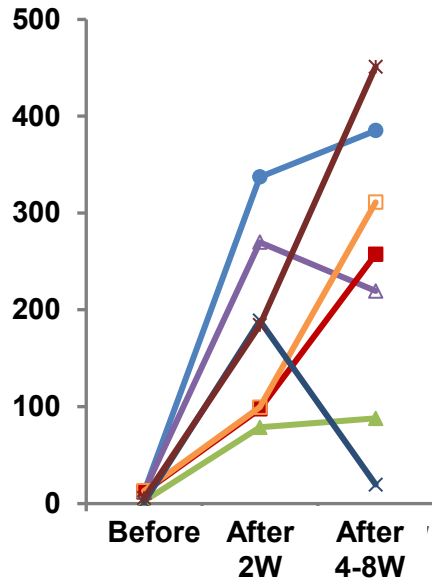
C. Apixaban



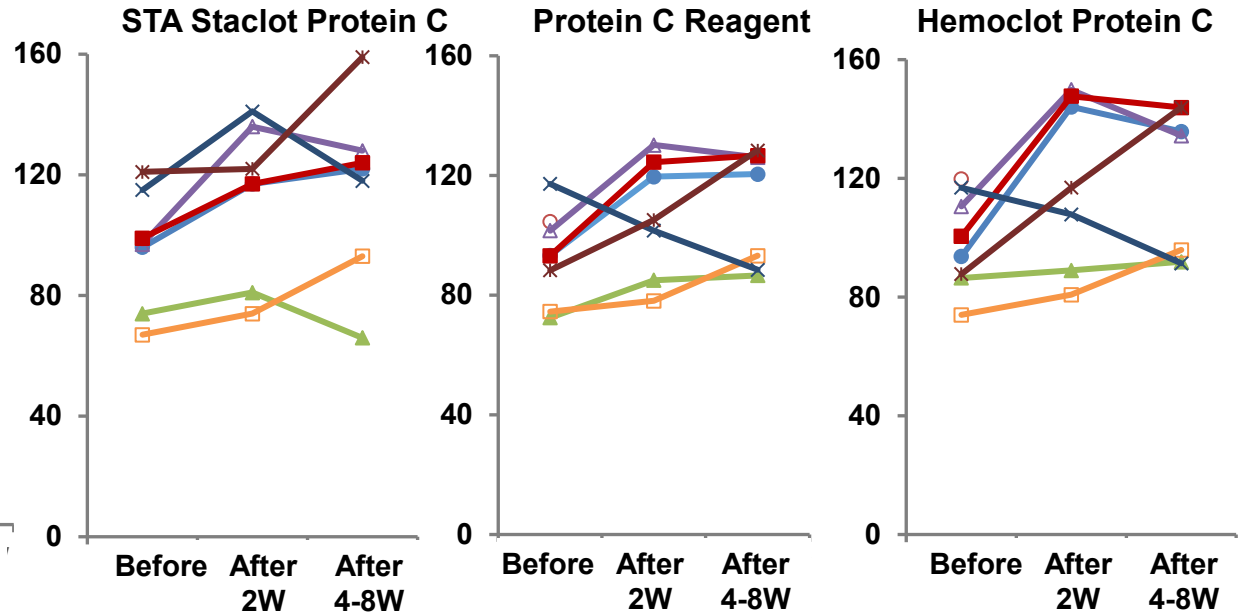


A

Concentration of rivaroxaban (ng/mL)

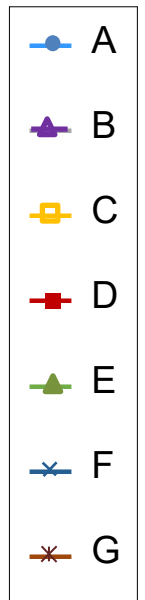
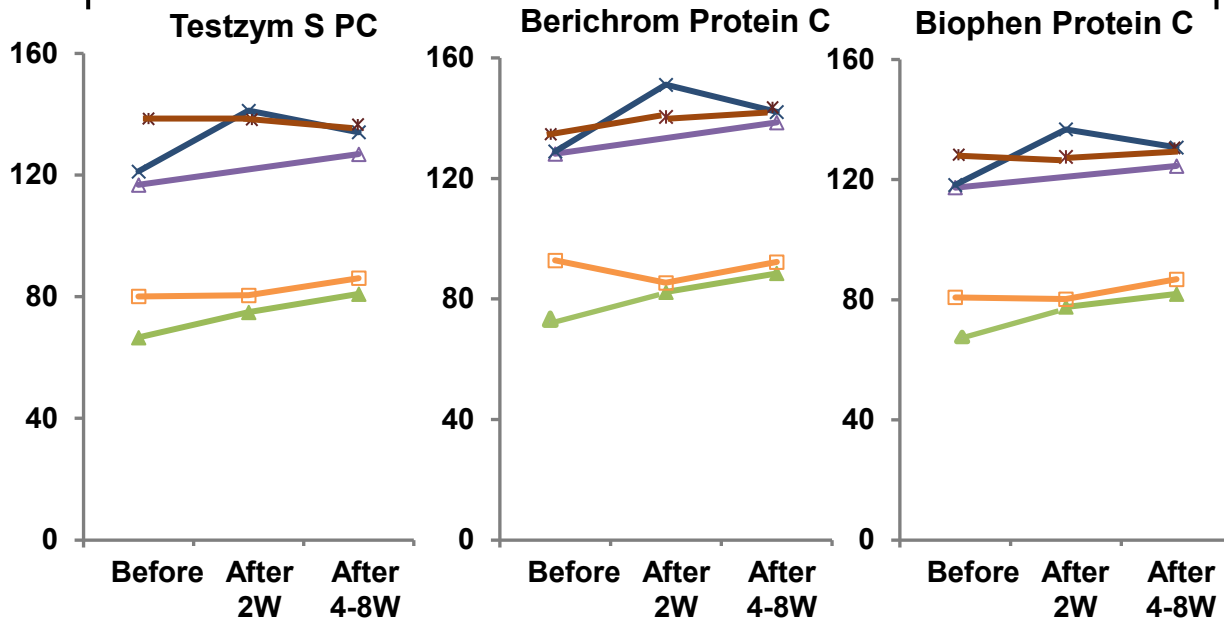


PC activity (%) : Clotting methods

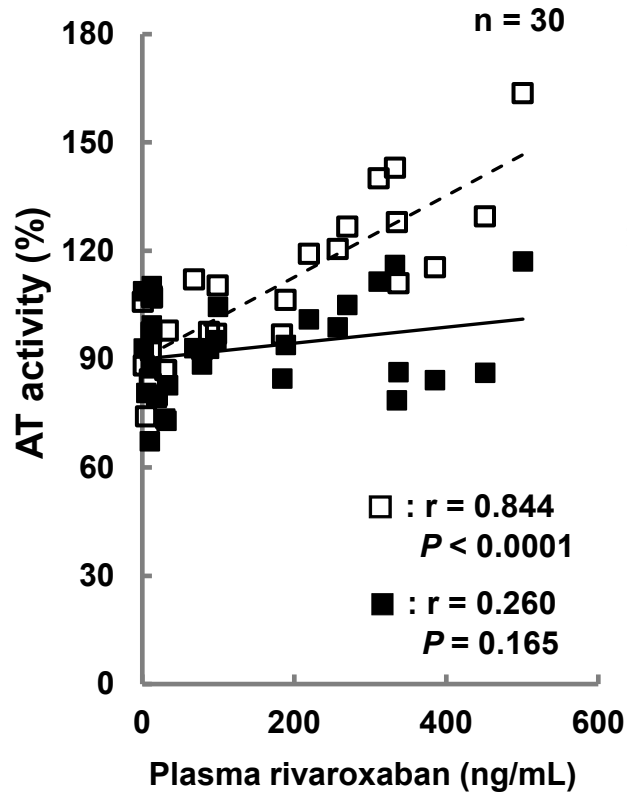


B

PC activity (%) : Chromogenic methods

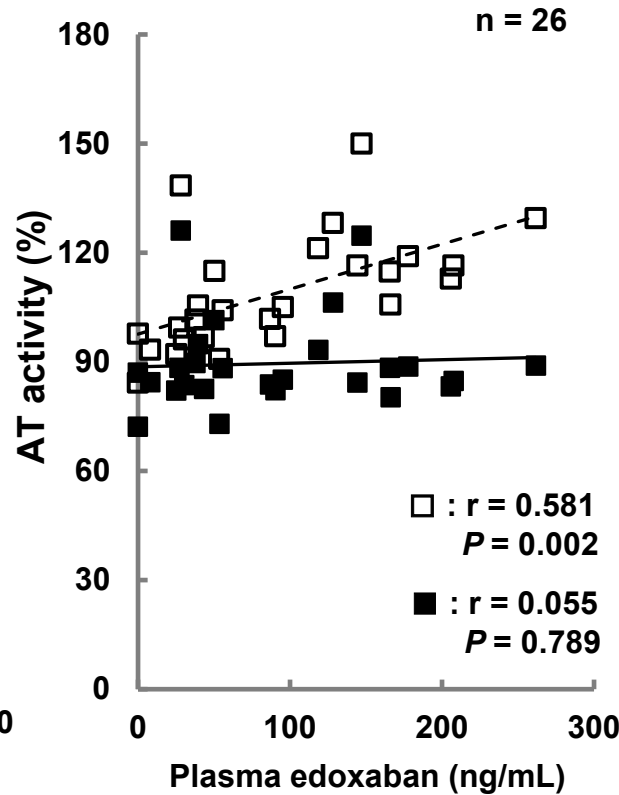


A. Rivaroxaban



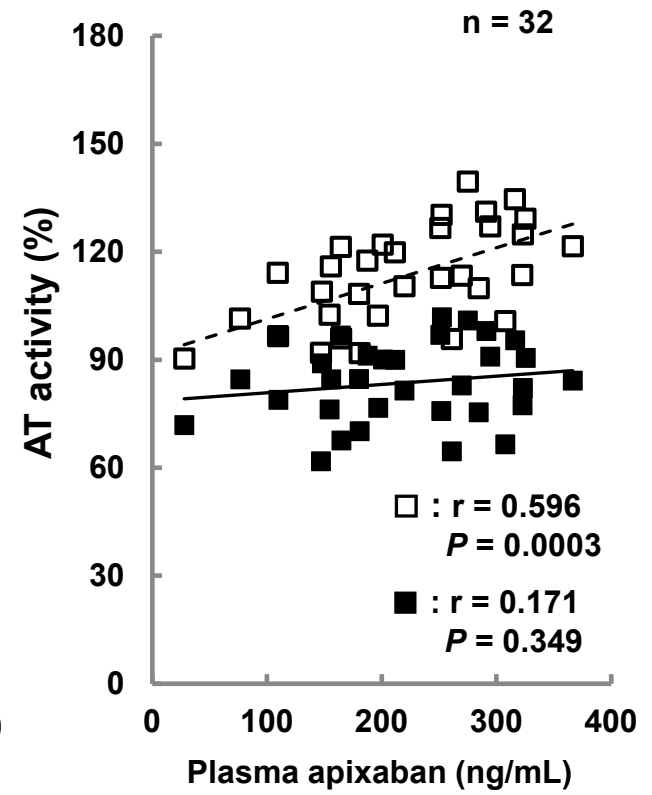
□ Testzym S AT III
■ Berichrom AT III

B. Edoxaban



□ Testzym S AT III
■ Berichrom AT III

C. Apixaban



□ Testzym S AT III
■ Berichrom AT III

表 2

Methods		Thrombin inhibitor	Factor Xa inhibitors		
		Dabigatran	Rivaroxaban	Edoxaban	Apixaban
PS activity	Chromogenic assay	no effect*	no effect	no effect	no effect
	Clotting assay	false high*	false high	false high	no effect
PS antigen	Latex photometric immunoassay	no effect*	no effect	no effect	no effect
PC activity	Chromogenic assay	no effect*	no effect	no effect	no effect
	Clotting assay	false high*	false high	no effect	no effect
PC antigen	Latex photometric immunoassay	no effect*	no effect	no effect	no effect
AT activity	Thrombin assay	false high*	no effect	no effect	no effect
	Chromogenic assay Xa assay	no effect*	false high	false high	false high