

報告番号	※乙	第	号
------	----	---	---

主論文の要旨

論文題目

Evaluation of anticoagulant effects of direct thrombin inhibitors, dabigatran and argatroban, based on the Lineweaver–Burk plot applied to the Clauss assay
(クラウス法に適用したラインウェーバー＝バークプロットに基づく直接トロンビン阻害薬、ダビガトランとアルガトロバンの抗凝固効果の評価)

氏名

藤森 祐多

論文内容の要旨

【緒言】

ダビガトランに代表される直接抗トロンビン薬 (direct thrombin inhibitors; DTIs) はワルファリンとは異なり、定期的なモニタリングを必要とせずに臨床的に利用が可能であると期待されていた。しかし、ダビガトラン服薬患者での重篤な出血性副作用が複数報告されたことから、血中のダビガトラン濃度と出血性リスクについて強い関心が集められている。DTIsであるダビガトランおよびアルガトロバンは合成基質であるS-2238を用いた酵素学的研究から、可逆的かつ競合的にトロンビン反応を阻害することが知られている。しかし、この阻害様式がそのまま抗凝固効果を反映しているかは定かではない。

クラウス法は古典的であるが、現在においても最も一般的な血中のフィブリノゲン濃度の定量方法である。この方法は、トロンビンによってフィブリン塊が形成されるまでの時間とフィブリノゲン濃度との間の定量性に基づいている。高濃度のトロンビンを希釈した血漿に加えるため、凝固時間はフィブリノゲン濃度にも依存し、他の凝固因子の影響を受けない。

酵素反応速度論のためのミカエリスメンテン式の古典的線形変換の一つであるラインウィーバー＝バークプロットは、基質濃度の逆数と反応速度の逆数の間の直線性を示す。酵素阻害の種類を決定するために用いると、ラインウィーバー＝バークプロットは競合、反競合、非競合、混合型阻害剤を区別することができる。

本研究では、ダビガトランまたはアルガトロバンを添加した血漿におけるクラウス法による測定結果に基づき、ラインウィーバー＝バークプロットを作成し、酵素学的な視点からDTIsが試験管内凝固反応に与える影響を評価した。

【方法】

3つのフィブリノゲン濃度のプール血漿を作製し、様々な濃度でダビガトランまたはアルガトロバンを添加した。DTIsに対して感受性を示す濃度である40.25IU/mLのトロンビン試薬を用いて、各添加血漿のクラウス法による凝固時間を測定した。その後、検体のフィブリノゲン濃度の逆数を横軸に、凝固時間を反応速度の逆数とみなして縦軸にとり、ラインウィーバー＝バークプロットを作成した。各添加濃度におけるプロットについて一次近似式と相関係数を得た。また、無添加の凝固時間に対する各濃度の添加時の凝固時間の比、すなわち延長比とDTIsの濃度の関係性を検討した。

【結果】

ダビガトランのラインウィーバー＝バークプロットの結果、250 ng/mL (0.53 μ M)まで良好な直線性を示し、一次近似式の傾きがほぼ一定で、切片のみが変化したことから、反競合阻害様式を呈した。これに一致して、血漿検体のフィブリノゲン濃度、すなわち基質濃度が高いほど、ダビガトランによる凝固時間の延長が大きく認められた。一方、250 ng/mL以上の濃度では抗凝固効果は混合型阻害様の阻害様式を示し、凝固時間の延長は曲線的に急峻化した。興味深いことに、今回阻害様式や凝固時間の延長に重大な影響が観察された250 ng/mLは、臨床試験（RE-LY試験）の解析にて出血リスクを2倍にするダビガトラン血中濃度（210ng/mL）に近いものであった。

アルガトロバンを用いた検討でも、おおよそダビガトランと同様の結果だったことから、観察された特徴はダビガトランのみに限らないことが示唆された。

【考察】

DTIsの抗凝固効果は、フィブリノゲンの分子構造とトロンビン分子の動態のために複雑に発現すると考えられる。S-2238はトロンビンによる触媒作用のために1箇所だけ結合部位を持つ小さなペプチド分子である。これに対して、フィブリノゲン1分子は2つの同一モノマーからなる巨大分子である。フィブリンモノマーはトロンビンによって、フィブリノペプチドA (FPA) とフィブリノペプチドB (FPB) がそれぞれ放出される2箇所の切断部位を持つ。FPA切断部位のトロンビンとの結合反応性は、FPB切断部位のそれよりも極めて大きい。トロンビンはまずフィブリノゲンからのFPA切断を触媒し、その直後にフィブリン生成中間体であるdes-A フィブリノゲンから解離することなく次にFPB切断を触媒する。今回の結果から、フィブリノゲンのFPA切断部位とトロンビンとの結合に競合できない低濃度のDTIsは、des-A フィブリノゲンと結合したままのトロンビンと結合して見かけ上、反競合的にFPBの切断を阻害するかもしれない。また、FPA切断だけでも観察可能な凝固を起こすことができることは、250 ng/mL以下のダビガトラン添加血漿における凝固時間が無添加血漿のそれと非常に近いことを説明できるように思われる。対照的に、高濃度のDTIsではトロンビンとdes-A フィブリノゲンの複合体に加えて、遊離型のトロンビンとも結合してFPA切断とFPB切断の両者を阻害することで、混合型のような阻害形式を示したと考えられる。

トロンビンによって生成されたフィブリンはトロンビン分子の一部を吸着する。その結果起こるトロンビンの固相化は、遊離トロンビンだけの場合と比べて酵素の活性動態に複雑な影響を及ぼし得る。このように、フィブリノゲンの分子構造やトロンビン分子の動態は、S-2238を用いたトロンビン反応に基づくDTIsの知見からの乖離に関係すると推察される。

【結語】

クラウス法に適用したラインウィーバー＝バークプロットに基づき DTIs の抗凝固効果を評価した結果、S-2238を基質とするトロンビン反応を利用して得られた過去の知見との乖離が明らかとなった。試験管内あるいは生体内での凝固反応に対してDTIsがどのように影響を与えるのかについて理解を深めることが、より安全で有効なDTIsの投薬方法を研究する一助になることが期待される。