

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 乙 第	号
------	-------	---

氏 名 藤 森 祐 多

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)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学教授 涌 澤 伸 哉

名古屋大学准教授 高 木 明

名古屋大学教授 小 嶋 哲 人

フィブリノゲン測定法である Clauss 法は、血漿に一定量のトロンビン溶液（試薬）を加えて凝固時間を測定しフィブリノゲン量に換算する方法で、アルガトロバンやダビガトランエテキシラートなどの直接トロンビン阻害薬（Direct Thrombin Inhibitor: DTI）の影響が懸念されている。高力価トロンビンが含まれるフィブリノゲン測定試薬では、これら DTI の影響はほぼ無視できると考えられるが、低力価トロンビン試薬ではその影響は比較的大きいと考えられ、実際、低力価トロンビン試薬ではダビガトラン濃度に依存してフィブリノゲン測定値が偽低値になることが、すでに報告されている。本研究では、フィブリノゲンの測定法である Clauss 法に Lineweaver-Burk plot を適用し、DTI の抗凝固効果を検証した。

本研究の新知見と意義は要約すると以下の通りである。

1. ダビガトラン濃度が 0~200ng/mL では反競合阻害様式、250ng/mL 以上では混合型阻害様式を示した。添加濃度が高濃度になるにつれて直線性が低下し、低濃度域では凝固時間の比に大きな変化はないが、添加濃度が大きくなるにつれて大きく変化することが観察された。
2. アルガトロバン添加血漿を用いた Lineweaver-Burk plot 解析の結果はダビガトランと同様で、アルガトロバンが~100ng/mL の低濃度域では反競合阻害様式、それ以上の濃度では混合型阻害様式を示した。アルガトロバンが高濃度になると直線性が低下し、近似直線間の間隔が大きくなる点、凝固時間比の変化についてもダビガトラン同様であった。
3. 合成基質を用いた従来の研究では競合阻害を示すが、今回の Clauss 法では反競合阻害および混合型阻害の 2 相性阻害様式を示した原因は、フィブリノゲンからフィブリンへの生成過程により説明ができる可能性が考えられた。
4. トロンビンは、フィブリノゲンからまずフィブリノペプチド A を放出して des-AA フィブリノゲンを、続いてフィブリノペプチド B を放出し des-AABB フィブリン（フィブリンモノマー）を生成するが、des-AA フィブリノゲンに結合したトロンビンは解離することなく結合した状態でフィブリノペプチド B の放出にも作用すると考えられた。
5. 直接トロンビン阻害薬が低濃度では、desAA-フィブリノゲンからのフィブリノペプチド B の放出のみを阻害する反競合阻害を示し、高濃度ではフィブリノペプチド B の放出に加えフィブリノペプチド A の放出も阻害する混合型阻害様式を示したと考えられた。
6. 高濃度の阻害薬で直線性が低下する原因については、フィブリンへのトロンビンの吸着・固相化が考えられ、フィブリンに固定されることでトロンビンの酵素活性やその動態に影響を及ぼし、液相反応理論である酵素反応速度論では説明ができないことが考えられた。

本研究では、

直接トロンビン阻害薬の抗凝固効果について、初めて生理的基質であるフィブリノゲンを用いる Clauss 法で Lineweaver-Burk plot を適用することにより評価した結果、合成基質を用いた過去の研究で得られたトロンビンの阻害様式とは乖離する結果が得られた。直接トロンビン阻害薬の抗凝固効果について、より生理的条件下での洞察を与える結果が得られ、より臨床に近い出血リスクの管理への示唆につながると考えられる。なお、本研究は国際英文臨床病理学雑誌・Journal of Clinical Pathology (5 year impact factor: 2.623) に掲載された (J Clin Pathol. 2016 Apr;69(4):370-2.)。