

学位論文

Doctor's Thesis

冠動脈疾患患者における血小板小凝集塊の生成が将来の心血管事故発生と関連する

(Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease)

宮本 信三

Shinzo Miyamoto

指導教官

熊本大学大学院医学研究科循環器内科学

小川久雄教授

2003 年度

# 学位論文

Doctor's Thesis

論文題名:冠動脈疾患患者における血小板小凝集塊の生成が将来の心  
管事故発生と関連する

(Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical  
outcome in patients with coronary artery disease)

著者名: 宮本 信三  
Shinzo Miyamoto

指導教官: 熊本大学大学院医学研究科循環器内科学  
小川 久雄 教授

審査委員名: 臨床検査医学講座担当教授: 岡部 紘明 教授  
外科学第一講座担当教授: 川筋 道雄 教授  
代謝内科学講座担当教授: 荒木 栄一 教授  
病理学第二講座担当教授: 竹屋 元裕 教授

2003 年度

## 目次

1. 要旨	3-4
2. 発表論文リスト	5-10
3. 謝辞	11
4. 略語一覧	12
5. 研究の目的と背景	13-21
6. 研究方法	22-24
7. 研究結果	25
8. 考察	26-27
9. 結論	27
10. 表およびその説明	28-29
11. 図およびその説明	30-35
12. 文献	36-43

## 1. 要旨

(背景) 血小板の活性化は不安定狭心症や急性心筋梗塞、さらには虚血性心臓突然死を含む急性冠症候群の病態に重要な役割を果たしている。血小板凝集能に関しては従来の方法では感度が不十分で臨床応用に限界があったが、レーザー散乱光を用いた血小板凝集計は凝集塊の大きさや数を定量的に測定することを可能とした。以前の研究で血小板凝集塊の生成については小凝集塊から中、大凝集塊が生成されることが確認されている。このように小凝集塊を測定することは血栓形成の評価において重要であると考えられている。

(方法) 冠動脈疾患患者 204 名(男 149 名、女 55 名、平均年齢  $68 \pm 9$  歳)においてレーザー散乱光を用いた血小板凝集計を用いて血小板小凝集塊を測定し、将来の心血管事故発生との関係について最大 48 ヶ月間フォローアップした。血小板凝集能測定のための採血は退院日に施行した。

(結果) 冠危険因子数が増加すると血小板小凝集塊の程度が亢進することが明らかになった。多変量 Cox 比例ハザードモデル解析において血小板小凝集塊 [相対危険度 4.34, 95%信頼区間(1.62-11.7,  $p=0.004$ )]と低左室駆出率 [相対危険度 2.88, 95%信頼区間(1.23-6.73),  $p=0.015$ ]が将来の心血管事故発生を予測する因子であることが判明した。また Kaplan-Meier 解析において血小板小凝集塊の程度と将来の心血管事故発症の関連があることが判明した。

(考察) 虚血性心疾患に対する冠危険因子数が増加するにつれて血小板小凝集塊生成の程度が亢進することが明らかになった。冠動脈疾患患者において、将来の心血管事故発生のリスクに関して予測因子を検討するために従来から言われている冠危険因子を含めて多変量 Cox 比例ハザードモデル解析を施行すると、血小板小凝集塊高値と低左室駆出率が将来の心血管事故発生を予測する因子であることが判明した。さらに低左室駆出率に比し血小板小凝集塊高値の方がより相対危険度が高いことにより、血小板小凝集塊高値がより優れた予測因子となりうる可能性が示唆された。

(結論) 冠動脈疾患患者において血小板小凝集塊の亢進は将来の心血管事故発症と関連がある可能性が示唆された。

## Summary

**Background**– Platelet activation plays a pivotal role in the pathogenesis of acute coronary syndromes. Laser–light scattering in a platelet aggregometer was used to evaluate aggregate size and number quantitatively. Small platelet aggregates ultimately develop into medium and then large platelet aggregates. Thus the measurement of small platelet aggregates is important in the evaluation of thrombus formation.

**Objective**– We examined the relationship between small platelet aggregates and the occurrence of subsequent cardiovascular events.

**Methods**– We followed up 204 patients (149 men 55 women, mean age  $68 \pm 9$  years) with coronary artery disease (CAD) for 48 months. Blood sampling to determine platelet aggregation was performed on the day of hospital discharge.

**Results**– The degree of small platelet aggregates (relative risk 4.34, 95% confidence interval [1.62–11.7],  $p= 0.004$ ) and low left–ventricular ejection fraction (relative risk 2.88, 95% confidence interval [1.23–6.73],  $p= 0.015$ ) were independent predictors of the occurrence of cardiovascular events in multivariate Cox hazard analysis. In Kaplan–Meier analysis, the degree of small platelet aggregates correlated with the probability of cardiovascular event occurrence.

**Conclusions**– In patients with CAD, an increase in small platelet aggregates is closely correlated with the future occurrence of cardiovascular events.

## 2. 発表論文リスト

Shinzo Miyamoto, Hiroaki Kawano, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Ichiro Kajiwara, Hideki Shimomura, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Seigo Sugiyama, Nobutaka Hirai, Michihiro Yoshimura, Yukio Ozaki, Hisao Ogawa.

Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2003;89:681-6.

### その他の論文

1. Shinzo Miyamoto, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Hideki Shimomura, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Yukio Ozaki, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa. Plasma thioredoxin levels and platelet aggregability in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2003;146:465-71.
2. Shinzo Miyamoto, Hiroaki Kawano, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Ichiro Kajiwara, Jun Hokamaki, Nobutaka Hirai, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Hirofumi Yasue, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa. Increased Plasma Levels of thioredoxin in patients with coronary spastic angina. *Antioxidants Redox Signaling* 2003 (in press)
3. Hiroaki Kawano, Hirofumi Yasue, Akira Kitagawa, Nobutaka Hirai, Toshiaki Yoshida, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Masahiro Nakano, Hisao Ogawa. Dehydroepiandrosterone supplementation improves endothelial function and insulin sensitivity in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3190-5.
4. Hiroaki Kawano, Hirofumi Yasue, Nobutaka Hirai, Toshiaki Yoshida, Hironubu Fukushima, Shinzo Miyamoto, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Hajime Nakamura, Junji

Yodoi, Hisao Ogawa. Effects of transdermal and oral estrogen supplementation on endothelial function, inflammation and cellular redox state. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003;41:346–53.

5. Hirofumi Soejima, Atsushi Irie, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Tomohiro Sakamoto, Tomoko Tanaka, Michihiro Yoshimura, Nishimura Yasuharu, Hisao Ogawa. Preference toward a T-helper type 1 response in patients With coronary spastic angina. *Circulation* 2003;107:2196–200.
6. Hirofumi Soejima, Hisao Ogawa, Tomohiro Sakamoto, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Sunao Kojima, Jun Hokamaki, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Hisakazu Suefuji, Yuji Miyao, Kazuteru Fujimoto, Hiroo Miyagi, Hideki Kishikawa. Increased serum matrix metalloproteinase–1 concentration predicts advanced left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2003;67:301–4.
7. Nobutaka Hirai, Hiroaki Kawano, Hirofumi Yasue, Hideki Shimomura, Shinzo Miyamoto, Hirofumi Soejima, Ichiro Kajiwara, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Hajime Nakamura, Junji Yodoi, Hisao Ogawa. Attenuation of nitrate tolerance and oxidative stress by an angiotensin II receptor blocker in patients with coronary spastic angina. *Circulation* 2003;108:1446–50.
8. Sunao Kojima, Tohru Funahashi, Tomohiro Sakamoto, Shinzo Miyamoto, Hirofumi Soejima, Jun Hokamaki, Ichiro Kajiwara, Seigo Sugiyama, Michihiro Yoshimura, Kazuteru Fujimoto, Yuji Miyao, Hisakazu Suefuji, Akira Kitagawa, Noriyuki Ouchi, Shinji Kihara, Yuji Matsuzawa, Hisao Ogawa. The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. *Heart* 2003;89:667–8.

9. Hideki Shimomura, Hisao Ogawa, Keiji Takazoe, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Tomohiro Sakamoto, Hiroaki Kawano, Hisakazu Suefuji, Hioaki Nishikawa, Hidekazu Arai, Jun Hokamaki, Ichiro Kajiwara, Kiyotaka Kugiyama, Michihiro Yoshimura. Comparison of urinary biopyrrin levels in acute myocardial infarction (after reperfusion therapy) versus stable angina pectoris and their usefulness in predicting subsequent cardiac events. *Am J Cardiol* 2002;90:108–11.
10. Shinzo Miyamoto, Hisao Ogawa, Tomohiro Sakamoto, Hirofumi Soejima, Keiji Takazoe, Hideki Shimomura, Ichiro Kajiwara, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Shin Nakamura, Yukio Ozaki. Platelet hyperaggregability persists even after the improvement of increased blood coagulation and impaired fibrinolysis with the stabilization of symptoms in patients with unstable angina. *Int J Cardiol* 2001;80:235–42.
11. Shinzo Miyamoto, Hisao Ogawa, Hirofumi Soejima, Keiji Takazoe, Ichiro Kajiwara, Hideki Shimomura, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Hirofumi Yasue, Yukio Ozaki. Enhanced platelet aggregation in the coronary circulation after coronary spasm. *Thromb Res* 2001;103:377–86.
12. Hirofumi Soejima, Hisao Ogawa, Hisakazu Suefuji, Koichi Kaikita, Keiji Takazoe, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Hideki Shimomura, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Shin Nakamura. Comparison of effects of losartan versus enalapril on fibrinolysis and coagulation in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2001;87:1408–11.
13. Hironobu Fukushima, Kiyota Kugiyama, Seigo Sugiyama, Osamu Honda, Shun-ichi Koide, Shin-ichi Nakamura, Hiroaki Kawano, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Michihiro Yoshimura, Tomohiro Sakamoto, Hisao Ogawa. Comparison of remnant-like

lipoprotein particles in postmenopausal women with and without coronary artery disease and in men with coronary artery disease.

Am J Cardiol 2001;88:1370–3.

14. Hisao Ogawa, Hirofumi Soejima, Keiji Takazoe, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Hideki Shimomura, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Kimura M, Hirofumi Yasue. Increased autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein in coronary circulation in patients with coronary spastic angina. *Angiology* 2001;52:167–74.
15. Ichiro Kajiwara, Hisao Ogawa, Hirofumi Soejima, Keiji Takazoe, Shinzo Miyamoto, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Hirofumi Yasue. The prognostic value of small-sized platelet aggregates in unstable angina: detection by a novel laser-light scattering method. *Thromb Res* 2001;101:109–18.
16. Kiyotaka Kugiyama, Yuji Miyao, Tomohiro Sakamoto, Hiroaki Kawano, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Michihiro Yoshimura, Hisao Ogawa, Seigo Sugiyama, Hirofumi Yasue. Glutathione attenuates coronary constriction to acetylcholine in patients with coronary spastic angina. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H264–71.
17. Hisao Ogawa, Hisakazu Suefuji, Keiji Takazoe, Hirofumi Soejima, Tomohiro Sakamoto, Shinzo Miyamoto, Koichi Kaikita, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Hirofumi Yasue. Difference in fibrinolytic activity between multivessel coronary spasm and one-vessel coronary spasm. *Am J Cardiol* 2000;85:98–101.
18. Shinzo Miyamoto, Hisao Ogawa, Hisao Soejima, Keiji Takazoe, Ichiro Kajiwara, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Hirofumi Yasue.

Increased rate of formation of small-sized platelet aggregates in patients with acute coronary syndromes. Jpn Circ J 2000;64:647-52.

19. Tomohiro Sakamoto, Hisao Ogawa, Hiroaki Kawano, Nobutaka Hirai, Shinzo Miyamoto, Keiji Takazoe, Hirofumi Soejima, Kiyotaka Kugiyama, Michihiro Yoshimura, Hirofumi Yasue. Rapid change of platelet aggregability in acute hyperglycemia. Detection by a novel laser-light scattering method. Thromb Haemost 2000;83:475-9.
  
20. Shinzo Miyamoto, Hisao Ogawa, Hirofumi Soejima, Keiji Takazoe, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Hirofumi Yasue. Formation of platelet aggregates after attacks of coronary spastic angina pectoris. Am J Cardiol 2000;85:494-7.
  
21. Kiyotaka Kugiyama, Yasutaka Ota, Seigo Sugiyama, Hiroaki Kawano, Hideki Doi, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Hisao Ogawa, Keiji Takazoe, Hirofumi Yasue. Prognostic value of plasma levels of secretory type II phospholipase A<sub>2</sub> in patients with unstable angina pectoris. Am J Cardiol 2000;86:718-22.
  
22. Hisakazu Suefuji, Hisao Ogawa, Hirofumi Yasue, Tomohiro Sakamoto, Yuji Miyao, Koichi Kaikita, Hirofumi Soejima, Kenji Misumi, Shinzo Miyamoto, Keiichiro Kataoka. Increased plasma level of soluble E-selectin in acute myocardial infarction. Am Heart J 2000;140:243-8.
  
23. Hisao Ogawa, Tomohiro Sakamoto, Koichi Nishiyama, Hirofumi Soejima, Koichi Kaikita, Keiji Takazoe, Shinzo Miyamoto, Kiyotaka Kugiyama, Michihiro Yoshimura, Hirofumi Yasue. Elevated levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 in the coronary circulation of patients with coronary organic stenosis and spasm. Jpn Circ J 2000;64:170-6.

24. Hisao Ogawa, Hisakazu Suefuji, Hirofumi Soejima, Koichi Nishiyama, Kenji Misumi, Keiji Takazoe, Shinzo Miyamoto, Ichiro Kajiwara, Hitoshi Sumida, Tomohiro Sakamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Hirofumi Yasue, Katsuhiko Matsuo. Increased blood vascular endothelial growth factor levels in patients with acute myocardial infarction. *Cardiology* 2000;93:93–9.
25. Michihiro Yoshimura, Yuji Mizuno, Eisaku Harada, Masafumi Nakayama, Yukio Shimasaki, Teruhiko Ito, Shota Nakamura, Hirofumi Soejima, Shinzo Miyamoto, Keiji Takazoe, Hisao Ogawa, Kiyotaka Kugiyama, Yoshihiko Saito, Kazuwa Nakao, Hirofumi Yasue. Interaction on metabolic clearance between A-type and B-type natriuretic peptides in patients with heart failure. *Metabolism* 2000;49:1228–33.
26. Hirofumi Soejima, Hisao Ogawa, Hirofumi Yasue, Koichi Kaikita, Keiji Takazoe, Koichi Nishiyama, Kenji Misumi, Shinzo Miyamoto, Michihiro Yoshimura, Kiyotaka Kugiyama, Shin Nakamura, Ichiro Tsuji. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:983–8.

### 3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御支援下さいました熊本大学大学院医学研究科循環器内科学講座 小川久雄教授、山梨大学医学部臨床検査医学講座 尾崎由基男教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究において直接御指導をいただきました熊本大学大学院医学研究科集中治療部講座 河野宏明講師、熊本大学大学院医学研究科循環器内科学講座 吉村道博助教授、熊本大学大学院医学研究科循環器内科学講座 坂本知浩講師をはじめ多くの先生方に深く感謝いたします。

#### 4. 略語一覽

ACh: acetylcholine

ADP: adenosine diphosphate

CABG: coronary artery bypass graft

CAD: coronary artery disease

GP: glycoprotein

HDL: high-density lipoprotein

LDL: low-density lipoprotein

PAI: plasminogen activator inhibitor

PCI: percutaneous coronary intervention

TFPI: tissue factor pathway inhibitor

t-PA: tissue-type plasminogen activator

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1. 血小板の構造

血小板は直径2～4  $\mu\text{m}$  で、円盤状の細胞である。透過型顕微鏡で血小板の内部を観察すると、他の細胞で見られるような細胞核は存在せず、 $\alpha$  顆粒、濃染顆粒、開放小管系、ミトコンドリア、ゴルジ装置、リソソームなどの小器官が見られる。 $\alpha$  顆粒は血小板の中で最も数が多い顆粒で50個前後存在している。この直径は、0.3～0.5  $\mu\text{m}$  の球状体でこの顆粒の中にはトロンボグロビン、血小板第4因子、血小板由来成長因子などの血小板固有の蛋白質が存在している。さらに、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、トロンボスポンジン、von Willebrand 因子などの粘着性蛋白質も存在する。濃染顆粒は直径0.2～0.3  $\mu\text{m}$  の球状体で数は少なく、血小板当たり数個しか存在しない。濃染顆粒の中には、セロトニン、ADP、ATP、カルシウムなどが存在している。また血小板は細胞の骨組みとなる細胞骨格が豊富に存在する。これらの細胞骨格は、血小板の基石状の形態を維持するために重要な役割を果たしている。

### 5-2. 血小板活性化の病態生理

通常正常の血管すなわち正常の血管内皮に覆われている血管内では血栓の形成は起こらない。血小板は血管内を円盤状の形を維持したまま流れていると考えられており、血流の存在下では、常に血管内皮細胞と相対し、血管壁の統合性を保持することに関与している。ある部位で血管に損傷が起こると血管内皮細胞の脱落あるいは剥離を引き起こし、これに伴い血管内皮の抗血栓性は失われ、血管内皮下組織が露出する(1)。この局所にはコラーゲン、フィブリノネクチン、ラミニン、von Willebrand 因子などの血管内皮下に存在する接着蛋白質が露出し、組織因子が放出される。血小板膜糖蛋白 glycoprotein (GP) Ia/IIa や GP Ib/IX などの血小板インテグリンは、それぞれコラーゲン、von Willebrand 因子と結合し、血管壁に血小板を粘着させる(2,3)。冠動脈硬化を基礎にして起こる冠動脈血栓においては、プラークの破裂により血栓形成過程が始まる。正常な生理学的状況の下では血小板の膜表面に通常存在する GP IIb/IIIa 受容体は不活性構造を示し、血小板と血小板、あるいは血小板と血管壁の相互作用は見られない。この GP IIb/IIIa 受容体は血小板に最も豊富に存在する膜糖蛋白で、総血小板蛋白の約

1-3%を占め、血小板あたり約 40,000-80,000 分子存在することが知られている。GP IIb/IIIa 受容体は、血小板に活性化のシグナルが入ることによりその構造を変化させ、活性化したフィブリノーゲン、von Willebrand 因子、ビトロネクチンと結合しやすくなる (4)。フィブリノーゲンは重要なリガンドのひとつで、2つの隣接する血小板と結合して血小板同士を架橋し血小板凝集をもたらす (5)、血小板血栓(一次血栓、白色血栓)を形成する。血小板活性化の持続は、血小板から放出される血小板活性化物質である ADP、セロトニン、トロンボキサンなどによってもたらされる。活性化した血小板には通常は細胞膜内側に存在する陰性荷電を有するリン脂質、特にホスファチジルセリンが血小板膜表面に表出し、活性化凝固第 V 因子、X 因子に結合表面を提供することで凝固カスケードが作動、促進される。血小板  $\alpha$  顆粒に含まれる von Willebrand 因子、フィブリノーゲンなどの局所放出、白血球と結合する P-selectin の血小板表面への発現 (6)、も凝固活性の亢進に参与する。損傷した血管壁に強固に固着した血小板血栓は、下流に血液のうっ滞を惹起することによって、間接的に凝固カスケードによるフィブリン形成を促進させる作用もある。血小板が凝固活性を亢進させるのみでなく、凝固系の活性化もまた血小板の活性化をもたらしている。動脈硬化巣の破綻とともにプラーク内部の組織、特にマクロファージが血流に曝されるとその中に発現している組織因子が第 VII 因子と複合体を形成し外因系凝固カスケードが活性化されてトロンビンが生成される。トロンビンは血小板凝集を促進し、さらにフィブリノーゲンからフィブリンが生じる。そして生成されたトロンビンにより強力なフィブリン血栓(二次血栓、赤色血栓)が形成され血栓の安定化がもたらされる。つまり凝固系と血小板は、相互に相手を活性化させつつ強固な閉塞血栓を形成させている。すでに多くの研究により、これらの凝固因子の活性化は液相に比べ数千倍以上のスピードで進行することが知られている。

### 5-3. 血小板凝集能の測定

現在までに血小板凝集能の測定として広く用いられている方法としては 1962 年に Born が発表した吸光度(透過光)法である (7)。血小板は 2~4  $\mu\text{m}$  位の非常に小さい細胞であるので、それを含む液は濁っている。しかしそれが互いに大きな凝集塊を形成

してくると、濁度が次第に低下し光の透過性が増してくる。吸光度法はこのような現象を用いて判定する方法であり、この方法で色々な研究がなされてきた。

しかしながら、色々な研究がなされるにつれてこの方法における欠点が見つかってきた。一番大きな欠点は、凝集塊の形成と光透過性の程度の相関があまり良くないという点である。つまり数十個、数百個の血小板が凝集しても光透過性にはほとんど変化が見られず、血小板の弱い活性化の状態は判定が出来ないということであった。この欠点を克服するために新しい方法が開発された(8)。その方法は散乱光を用いる方法で、散乱光を血小板にあてると血小板の凝集塊程度であれば直径の自乗に比例した散乱光を出すことがわかっているため、散乱光が減弱する前に特殊な光学顕微鏡を用いて測定するというものである。このレーザー散乱光を用いた方法で低濃度アゴニスト刺激による血小板凝集を凝集塊の大きさ(小、中、大凝集塊)別に定量化することが可能となった(8)。これにより従来の吸光度法では評価が困難と考えられていたわずかな血小板の活性化を評価することが臨床例において検討されるようになった。血小板凝集に関しては、小凝集塊(粒径 25 $\mu$ m 以下)から中凝集塊(粒径 25-50 $\mu$ m)、大凝集塊(粒径 50 $\mu$ m 以上)が形成されていくことがわかっているため(8,9)、特にわずかな血小板の活性化をみるためには小凝集塊の生成が重要と考えられる(図 11-1)。

#### 5-4. 冠動脈血栓と急性冠症候群

急性冠症候群(Acute Coronary Syndrome)とは、不安定狭心症、心筋梗塞、虚血性の心臓性突然死を意味する。その大部分は冠動脈のプラーク(粥腫)の薄くなった線維性被膜に破裂や亀裂が生じ、それに続いて冠動脈内腔に血栓が形成されて内腔が閉塞ないしは亜閉塞されるために発生することが明らかにされた(10,11)。急性冠症候群における冠動脈血栓の重要性は、病理学的のみならず(12,13)、臨床的にも冠動脈造影法さらには血管内視鏡所見からも証明されている(14,15)。冠動脈血栓は動脈硬化の最も急激な合併症であり、大部分は動脈硬化巣の線維性被膜の破裂によるが、一部はびらんによっても生じる(16)。破裂やびらんから血栓が生じる機序として炎症が関与することが指摘されている(17)。さらに、動脈硬化の発症から進行にも炎症が関与していることも明らかになりつつある(18)。冠動脈造影法で心筋梗塞発症前後の経過を追っ

た症例の検討では、心筋梗塞は必ずしも動脈硬化の最も強かった部位に生じるとは限らない(19,20)。また 冠動脈病変の急激な進行(jump-up phenomenon)には冠攣縮(spasm)が関与することも指摘されており(21)、さらには心筋梗塞急性期の冠動脈造影像上ニトログリセリンの冠動脈内注入により閉塞が解除される症例もかなりあることから、冠攣縮も心筋梗塞の発症要因となりうると考えられる(22)。さらに、プラーク損傷部位には血小板が凝集しやすく、その結果血小板由来のトロンボキサン $A_2$ 、ヒスタミン、セロトニンなどが放出される。これらの血管収縮物質は冠攣縮を誘発し、その部位での血栓形成へと進展していく(18)。すなわち、冠攣縮、血小板凝集、血栓形成と悪循環を生じ、ついには急性心筋梗塞へと導かれていくと考えられる。また、不安定狭心症の発症にも冠動脈血栓のみならず冠攣縮が関与している症例があることも明らかとなっている(23)。

#### 5-5. 急性冠症候群と血液凝固系

血液凝固系よりの検討では、トロンビンによるフィブリノーゲンの分解産物である fibrinopeptide A (24)やその他の凝固系の分子マーカーである thrombin-antithrombin III 複合体、prothrombin fragment 1+2 を用いて研究が行われてきた。Fibrinopeptide A は生体内トロンビン生成のもっとも鋭敏な指標であり、既に急性心筋梗塞でその上昇が確認され(25)、続いて不安定狭心症についても上昇していることが証明されてきた(26)。つまり、fibrinopeptide A の上昇は冠動脈血栓の発生と関連を有していると考えられる。われわれは、冠攣縮の自然発作並びに過呼吸負荷試験で誘発される発作の前後で、血漿 fibrinopeptide A 値が有意に上昇すること(27, 28)、また、その値は発作頻度と同様深夜から早朝にかけてピークを有する日内変動があること(28)、さらに冠静脈洞より採血を行うことにより冠攣縮時の血漿 fibrinopeptide A 値の上昇は主に冠循環内で生じることから(29)、冠攣縮により冠循環内で凝固カスケードの亢進が引き起こされ、冠攣縮から冠動脈血栓の形成ひいては急性心筋梗塞発症へと進展する可能性が示唆された。

近年、組織、細胞由来の凝固因子である組織因子(tissue factor)が注目されている。Tissue factor は凝固第 VII 因子と複合体を形成して、第 VII 因子を活性化し、その後の凝固カスケードを活性化していく、血液凝固系の initiator であり(30)、動脈硬化巣で

の血栓形成に重要な役割を果たしていることが知られている(31)。また、tissue factor pathway inhibitor (TFPI)は、tissue factor による凝固経路を最初の段階で調節する。さらに prothrombin fragment 1+2 は、prothrombin の分解産物で、生体内 thrombin 生成の指標となる。生体の血漿中では、tissue factor は強力な procoagulant activity を持った membrane-bound form と弱い procoagulant activity しか持たない soluble form がある。我々はこの両者を合わせた total tissue factor 抗原レベルを測定している(32-36)。この tissue factor 抗原レベルは、membrane-bound tissue factor レベルと強い相関があり、また、membrane-bound tissue factor レベルは procoagulant activity と強い相関があることが証明されている。したがって、tissue factor 抗原レベルの上昇は、tissue factor activity の上昇、すなわち procoagulant activity の上昇、さらには動脈硬化病変からの membrane-bound tissue factor の上昇を意味する。一方、TFPI には、free TFPI、lipoprotein-associated TFPI、endothelial cell-associated TFPI がある。Total TFPI レベルは、free TFPI と lipoprotein-associated TFPI を合わせたものであるが、free TFPI 抗原レベルが free TFPI activity とよく相関し、endothelial cell-associated TFPI の変化をよく反映する(37)。それに対し、lipoprotein-associated TFPI は free TFPI に比較して anticoagulant activity は極めて低い。我々は free TFPI レベルを測定することにより検討した。虚血性心疾患患者において血中の tissue factor 抗原レベルを測定すると、急性冠症候群である不安定狭心症や急性心筋梗塞においては、安定労作狭心症や対照患者に比し、血中の tissue factor 抗原レベルが高く、凝固活性が亢進していることが示唆される。また、安定労作狭心症においては、冠動脈に 90%以上の器質的狭窄を有していても、対照患者に比し、凝固活性の亢進は認められない。これは安定労作狭心症では冠動脈の器質的狭窄が強くても急性心筋梗塞にはなりにくいという臨床的な経験ともよく一致する。また、治療により症状を安定化させると、tissue factor 抗原レベルは低下していった(32-36)。同時に不安定狭心症では、free TFPI 抗原も上昇しており、さらに生体内 thrombin 生成の指標となる prothrombin fragment 1+2 も上昇していること、およびこれらの値は治療により安定化すると低下してくることも証明した。tissue factor、TFPI、prothrombin fragment 1+2 レベルは、それぞれ強い相関が認められた(36)。血漿 tissue factor、TFPI、prothrombin fragment 1+2 レベルと患者の予後との関連についても検討し

た。この中で、tissue factor の高値のみが不安定狭心症の予後悪化と関連していた。即ち、不安定狭心症患者において tissue factor 抗原高値は、その後の心事故発症のマーカにもなることが明らかとなった。(36)

Tissue factor について、さらに詳細に検討するために、急性冠症候群の症例について、directional coronary atherectomy 切除組織を用いて組織学的検討を行った。急性冠症候群においては安定労作狭心症に比し炎症細胞であるマクロファージの浸潤が高度であることが指摘されていたが(38)、実際、著者らが免疫染色にて検討したところ急性冠症候群である不安定狭心症においては安定労作狭心症に比し、マクロファージの陽性率、組織全体に占める infiltration rate とも高率であった。さらに、血液凝固系の initiator である tissue factor は、不安定狭心症例においては安定狭心症例に比して発現が亢進しており、前者においては後者に比し tissue factor が高率に発現していること、しかもマクロファージの部位に一致して tissue factor、さらにフィブリンも発現していることを明らかにした(39)。以上より、急性冠症候群におけるプラーク破裂やその後の血栓形成過程にマクロファージおよびマクロファージ膜表面上の tissue factor が関与していることが示唆された。さらに我々は冠動脈硬化病変においては、マクロファージに tissue factor のみならず、TFPI も発現していることも証明した(40)。

## 5-6. 急性冠症候群と線溶系

冠動脈血栓の存在を検討するためには、生体内の血栓形成に対する防御機転である線溶系の面からの検討も必要である。線溶系の重要な要素はプラスミンであり、フィブリンを分解する。プラスミンは t-PA (tissue-type plasminogen activator) によってプラスミノゲンから生成される。しかし、t-PA はその阻害物質である PAI (plasminogen activator inhibitor) により速やかに不活化される。このため、線溶能の発現は t-PA と PAI のバランスによって決まるが、PAI が事実上プラスミノゲンの活性化や線溶に関わる free の t-PA の量を規定しており、PAI が全体の線溶活性を決定するより重要な要素であることが知られている(41)。すなわち、PAI 活性の上昇は線溶能の低下を、PAI 活性の低下は線溶能の亢進を意味する。PAI は少なくとも4つの免疫学的に異なったサブタイプに分けられるが、血中の PAI 活性の 80-95% は endothelial cell-type の PAI、すなわ

ち PAI-1 に由来している。このため、我々が通常血中の PAI 活性として認識しているものは、実際はこの PAI-1 の活性である。PAI の高値は心筋梗塞の再発の risk factor であることが報告され(42)、虚血性心疾患における PAI の重要性が注目されている。急性心筋梗塞の急性期において血漿 PAI 活性は上昇しており、急性心筋梗塞の急性期では線溶能が低下していることを意味する。この PAI 活性の上昇は、約1ヶ月後の退院の時点においても、急性期より低下はするものの、対照群に比較しなお上昇している(43)。したがって、急性心筋梗塞においては、tissue factor、fibrinopeptide A の上昇でみられるように、冠動脈血栓が生じやすく、また PAI 活性の上昇でみられるように、生じた冠動脈血栓は溶解されにくい状態にあることが証明される。ただし、急性心筋梗塞急性期においても血漿 PAI 活性が対照群のそれと変らぬ症例がある。急性心筋梗塞の 20 - 30% において認められる冠動脈血栓溶解療法施行前に既に梗塞責任冠動脈が開存している自然再開通群、血栓溶解療法によって再開通が得られる治療再開通群、および再開通が得られない閉塞群に分けて検討を行ったところ、自然再開通群では全例で血漿 PAI 活性は対照群の範囲内にあり、血漿 PAI 活性の平均値は対照群に比して有意に低下している。また、血栓溶解療法に対する反応性の面から、再開通に成功する群では閉塞したままの症例よりも血漿 PAI 活性の平均値が高い(43)。このことから、血漿 PAI 活性が低く線溶能が亢進していると思われる症例では、冠動脈血栓が形成され一旦急性心筋梗塞を発症しても、線溶系により冠動脈血栓が溶解され、自然再開通が起こるものと考えられる。また、血漿 PAI 活性がより高く、線溶能の低下が著明な急性心筋梗塞症例では、その発症に冠動脈血栓の関与がより強いと考えられ、血栓溶解剤によってもたらされた線溶能の増強により、冠動脈閉塞血栓が溶解したと考えられる。一方、血栓溶解療法に反応しなかった閉塞群では、血漿 PAI 活性は半分以上の症例で対照群の範囲内にある。すなわち、これらの症例では線溶能は低下していなかったと思われ、また血栓溶解療法にも反応がみられなかったということから、これらの症例の中には冠動脈閉塞血栓が、急性心筋梗塞の発症に直接関与していない症例が含まれている可能性がある。不安定狭心症は安定労作狭心症と対照的に、心筋梗塞、突然死に移行しやすい危険な病態である。近年、血管内視鏡が開発され臨床に用いられるようになり、不安定狭心症や急性心筋梗塞はいずれもその発症機序として冠動脈粥腫の損傷と血栓形成が重要

であり、共通していることが明らかとなってきた。不安定狭心症患者においては、安定労作狭心症患者や対照患者に比し、血漿 PAI 活性は有意に上昇しており、不安定狭心症患者をカルシウム拮抗剤や亜硝酸剤により治療を行い症状を安定化させると、血漿 PAI 活性は低下し安定労作狭心症や対照患者のレベルになる(44)。このように不安定狭心症においても線溶能の低下が認められ、また、治療により血漿 PAI 活性は正常レベルにまで低下することから、血漿 PAI 活性は不安定狭心症の病態とも密接に関係していることが示唆される。このように不安定狭心症では、tissue factor、fibrinopeptide A の上昇にみられるような、血液凝固系の亢進が起こり血栓形成の傾向が増加し、さらに PAI 活性の上昇から線溶能も低下している。このため形成された血栓は、溶解されにくい状態にあると思われ、これらの患者の一部は急性心筋梗塞発症へと導かれる可能性がある。

#### 5-7. 急性冠症候群における血小板凝集能

現在標準的な血小板凝集能を評価する方法である吸光度法は臨床応用されてからすでに 30 年余経過している。この方法は高濃度のアゴニスト刺激による最大凝集率を測定するという方法論的な限界があり、また測定感度が低いことから臨床応用や抗血小板薬の治療効果などを詳細に評価することは困難であった。このような現状を踏まえて最近、血小板凝集能はレーザー散乱光を用いた方法で低濃度アゴニスト刺激による血小板凝集を凝集塊の大きさ(小、中、大凝集塊)別に定量化することが可能となった(8)。これにより従来の吸光度法では評価が困難と考えられていたわずかな血小板の活性化を評価することが臨床例において検討されるようになった。この方法により急性心筋梗塞や不安定狭心症を含む急性冠症候群の患者において血小板小凝集塊の生成が亢進していることが明らかとなった(45,46)。また不安定狭心症患者で、入院時には安定労作狭心症患者および胸痛症候群患者に比較し血小板小凝集塊の生成が著明に亢進しているが、治療 2 週間後には入院時に比較し著明に改善するものの、tissue factor や PAI 活性といった凝固線溶マーカーが正常化したにもかかわらず、安定労作狭心症患者および胸痛症候群に比較して依然として亢進していることが認められた(図 11-2)(46)。このような事実は、不安定狭心症患者の治療にあたり、臨床症状が軽快しても長期に持続的に抗血小板療法が必要であることを示唆していると考えられる。さらに、不安定狭

心症患者の入院中の心事故を検討すると、入院中に急性心筋梗塞に移行したり緊急に冠動脈血行再建術を要する群では、他の群に比較して血小板小凝集塊の生成が著明に亢進していた(47)。このような症例においては、より強力な抗血小板療法が必要であると考えられた。

急性心筋梗塞の緊急冠動脈造影時にニトログリセリンを冠動脈内注入により内腔の閉塞が解除されること(22)から急性冠症候群の原因のひとつに冠攣縮の関与が考えられるようになった。冠攣縮は内皮に障害をもたらし、これがプラークの破裂、亀裂、あるいは糜爛を引き起こし、これが血栓形成の引き金となると思われる。内皮の傷害は血小板を活性化してトロンボキサン A<sub>2</sub> やセロトニンを放出し、これらの物質は血管を強力に収縮させる。われわれは冠攣縮性狭心症と血栓形成について検討し、冠攣縮性狭心症においては、自然発作後に血小板小凝集塊の生成の有意な亢進を明らかにした(図 11-3)(48)。このことにより冠攣縮により血小板凝集能が亢進することが明らかとなった。また冠静脈洞と大動脈基部での血小板小凝集塊生成の比較では、前者でより大きな変動を認めていることから、冠攣縮においては冠循環内での血小板凝集能の亢進が示唆された(図 11-4)(49)。

#### 5-8. 冠動脈疾患と血小板凝集能

血小板凝集能の亢進は冠動脈疾患に対する危険因子と考えられている(50-52)。冠動脈疾患患者の予後については比較的良いということが知られているが(53,54)、しかしながら時として急激に病状が進行し、生命にかかわる状況に陥る場面に遭遇する時がある。このように冠動脈疾患患者の外来診療においてリスクの層別化を行うことは日常診療において非常に重要であると考えられる。

#### 5-9. 本研究の目的

本研究では高感度のレーザー散乱光を用いた血小板凝集計により冠動脈疾患患者における血小板凝集能と将来の心血管事故発症との関係について検討することを目的とする。

## 6. 研究方法

### 6-1. 対象

当院に入院した冠動脈疾患患者連続 275 名をこの研究に登録した。冠動脈疾患患者は主要冠動脈に 70%以上の器質的狭窄を有するものと定義した。71 名について過去 3 カ月以内の冠動脈バイパス術の既往、過去 6 カ月以内の経皮的冠動脈形成術の既往、過去 6 週間以内の急性心筋梗塞の既往、不安定狭心症、薬物コントロールが困難な狭心症あるいは非心臓疾患ではあるが主要な疾患(悪性新生物、慢性炎症性疾患、腎不全)を有するために本研究から除外した。最終的には 204 名(74%)を本研究の対象とした。

本研究の観察期間においてすべての患者には標準的な治療であるアスピリンとカルシウム拮抗剤、ベータ遮断剤、亜硝酸剤、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、抗高脂血症剤の中から各患者に適した薬剤の組み合わせによる併用による薬物治療を行った。本研究の観察期間においてアスピリン以外の抗血小板剤の併用は行わなかった。本研究の登録においてはすべての患者からインフォームド・コンセントを得て、熊本大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得た。

### 6-2. 観察期間

すべての患者において冠動脈造影所見と採血により検体を採取した後、心血管事故を発症するまで最大 48 ヶ月前向きに検討した。心血管事故としては血行再建の必要な再発性あるいは薬物抵抗性狭心症、急性心筋梗塞、心臓死とした。急性心筋梗塞の定義は典型的な胸痛、心電図上の新規 Q 波の出現、クレアチンキナーゼの正常上限の 2 倍以上の上昇とした。死亡原因については診療録を基に調査した。本研究には末梢病変の冠動脈疾患、冠動脈バイパス術の既往や繰り返す経皮的冠動脈形成術のため施行にはハイリスクを伴うもの、また冠血行再建術の手技に適さない重症冠動脈疾患も含めて検討した。

### 6-3. 検体の採取

採血は至適量の内服薬によって症状軽快し、症状の安定した退院日に前腕静脈より行った。臥位にて21ゲージの注射器で血小板、ヘマトクリットと脂質を測定するために採血を行い、その後4.5mlのクエン酸入り採血管に血小板凝集能測定用として採血を行った。血小板凝集能測定用の検体は室温にて15分間静置して、多血小板血漿を採取するために室温で150Gにて10分間遠心分離を行った。その後乏血小板血漿を採取するために室温で300Gにて10分間遠心分離を行った。乏血小板血漿をコントロールとして多血小板血漿を測定した。

### 6-4. 血小板凝集能の測定

血小板凝集の測定はレーザー散乱光を用いた方法で凝集塊別の凝集の程度を測定できるPA-200(興和株式会社)を用いた。この方法の有効性は他のいくつかのスタディで確立されており(48,55-57)、我々は自然凝集と惹起物質としてADP(0.5、1.0、3.0 $\mu$ M)を用いて測定を行った。我々は予備テストとしてADP 1.0 $\mu$ Mによる惹起が血小板凝集塊を最も感度良く検知できる濃度であると判断し、ADP 1.0 $\mu$ Mによる惹起した血小板凝集塊のデータを解析に使用した。ADPは測定開始から60秒で注入し、血小板凝集の解析には最大散乱光強度を用いた。

### 6-5. 統計学的解析

血小板小、中、大凝集塊は正規分布していなかったため、ノンパラメトリック解析を使用した。 Kaplan-Meier法には血小板凝集塊の4分位に対する生存解析を使用した。観察期間中の心血管事故に対する予測因子にはステップワイズ法を用いてCox比例ハザード解析を行った。解析には以下の項目を含めた。小、中、大凝集塊、吸光度による血小板凝集能、冠動脈罹患枝数、血小板数、ヘマトクリット、年齢(>70歳)、性、喫煙歴(10本以上、10年以上)、高血圧(血圧>140/90mmHgあるいは降圧剤内服中)、糖尿病(WHO基準)(58)、肥満(body mass index  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>)、高コレステロール血症(>220 mg/dlあるいは抗コレステロール血症剤の使用)、低高比重リポ蛋白(HDL)(<35mg/dl)、高中性脂肪血症(>150mg/dl)と左室造影による低左室駆出率(<40%)を

含めた。解析においては小、中、大凝集塊、吸光度による血小板凝集能、血小板数とヘマトクリットについては4分位に分けて解析を行った。正規分布している連続変数の比較には一元配置分散分析法に引き続く多重比較検定(Fisher's PLSD)を統計解析に用いた。p値 0.05 未満を有意と判定した。結果は平均値±標準偏差(Mean±SD)にて表記した。

## 7. 研究結果

### 7-1. 観察結果

平均観察期間は  $23.8 \pm 13.4$  カ月でフォローアップ期間に脱落した症例はなかった。フォローアップ期間にはすべての患者には、カルシウム拮抗剤、亜硝酸剤、ベータ遮断剤、アンギテンシン変換酵素阻害剤、アスピリンおよび抗脂質低下剤の組み合わせによる標準的な治療を行った。フォローアップ期間中に心血管事故を生じた患者群と起こさなかった患者群の間に内服治療による相違は認めなかった。表 10-1 に血小板小凝集塊の 4 分位で分けた患者背景と心血管事故発生数を示す。血小板小凝集塊の中央値は  $4.1 \times 10^3$  V であった(25th/75th percentile  $1.2 \times 10^3$  V/ $1.4 \times 10^4$  V)。Quartile 4 の患者のうち 20 名(39%)に心血管事故(3 名が心臓死、6 名が非致死性心筋梗塞、11 名が薬剤抵抗性狭心症)が生じた。Quartile 3 の患者のうち 5 名(10%)に心血管事故(3 名が心臓死、1 名が非致死性心筋梗塞、1 名が薬剤抵抗性狭心症)が生じた。一方、Quartile 2 の患者のうち 2 名(4%)に心血管事故(1 名が心臓死、1 名が薬剤抵抗性狭心症)が生じた。Quartile 1 の患者のうち 5 名(10%)に心血管事故(1 名が心臓死、2 名が非致死性心筋梗塞、2 名が薬剤抵抗性狭心症)が生じた。

### 7-2. 冠危険因子と血小板凝集能

図 11-5 に冠動脈疾患に対する冠危険因子数と血小板小凝集塊の関係を示す。その結果、冠危険因子数が増加するに従って血小板凝集能亢進の程度が増加することが明らかになった。

### 7-3. 将来の心血管イベント発生と血小板凝集能

Cox 比例ハザード解析により将来の心血管事故発生に対する独立した因子を検討した。その結果、血小板小凝集塊高値と低左室駆出率が将来の心血管事故発症を予測する独立した因子であることが判明した(表 10-2)。また血小板小凝集塊の 4 分位に分けて Kaplan-Meier 解析の結果、血小板小凝集塊高値群は血小板小凝集塊低値群に比較して有意に累積心血管イベント発生率が高値を示すことが明らかとなった(図 11-6)。

## 8. 考察

### 8-1. 血小板凝集能と冠危険因子について

以前の報告では血小板凝集能と糖尿病、高脂血症、喫煙などの冠危険因子との関連が報告されている(59-61)。今回の検討では冠危険因子数が累積するに従って血小板凝集能の亢進が認められた。このような結果からも冠危険因子を減らすことが将来の心血管事故の発症を未然に防ぐ対策であり治療法のひとつであることが改めて認識される。またその機序のひとつとして冠危険因子を減らすことが血小板凝集能を低下させ、将来の心血管事故の発症を減らしている可能性も示唆された。

### 8-2. 冠動脈疾患と血小板凝集能について

臨床研究では血小板凝集能の亢進と経皮的冠動脈形成術(PCI)の再狭窄との関係が報告されている(62)。つまり再狭窄を認めた症例では慢性期に血小板凝集能の亢進が明らかになっている。以前我々は、不安定狭心症患者において入院中に心事故を認めた症例では入院時の血小板凝集能が亢進していることを報告している(47)。今回の検討では冠動脈疾患患者の退院時に血小板凝集能が亢進している患者で将来心血管事故を発症する可能性が高いことが明らかになった。以前より冠動脈疾患患者において左室駆出率の低下は予後不良であることが報告されている(63,64)。今回の検討で、血小板凝集能の亢進と低左室駆出率が将来の心血管事故発症と関係があることが明らかとなった。しかも血小板凝集能の相対危険度は低左室駆出率に比較して高く、冠動脈疾患患者においては血小板凝集能の亢進が低左室駆出率よりも将来の心血管事故をより強く予測する因子である可能性がある。

### 8-3. 抗血小板剤と血小板凝集能について

アスピリンは心筋梗塞後の長期の心臓死を減少させることが明らかになっている(65-67)。今回の検討では全患者がアスピリンを内服していた。以前の検討でアスピリン内服は血小板凝集能および血小板中凝集能の生成を阻害しないことが明らかになっている(56,57)。Rothらはアスピリンが血小板のシクロオキシゲナーゼを阻害し、 тромбоキサン A<sub>2</sub> の産生を減少させるというということを報告している(68)。しかしADPによ

る血小板凝集において、トロンボキサン A<sub>2</sub> は血小板小凝集塊の生成に影響を与えないことがわかっている。このように、アスピリンは ADP 依存性の血小板小凝集塊の生成に影響を与えないと考えられる (56,57)。つまりアスピリンは血小板大凝集塊の生成を減少させることにより(57)、将来の心血管事故の発症を減じていると考えられる。

#### 8-4. 臨床的意義

今回の検討で冠動脈疾患患者において血小板小凝集塊の生成は将来の心血管事故発症を予測する独立した因子であることが明らかとなった。冠動脈疾患患者において血小板凝集の最初の過程である血小板小凝集塊の生成を減じることは将来の心血管事故を減少させることに繋がる可能性がある。すなわちアスピリンに追加してチクロピジンや血小板糖蛋白 GP IIb/IIIa 阻害剤のような血小板小凝集塊の生成を減じる抗血小板剤を投与することは、将来の心血管事故発症率を減少させる可能性がある。このように血小板小凝集塊を測定することは、冠動脈疾患患者の将来の心血管リスクを層別化し、治療方針を決定するのに有用な方法であるのかも知れない。

### 9. 結論

累積した冠危険因子が血小板凝集能の亢進と関係があることが明らかとなった。血小板凝集能の亢進は冠動脈疾患患者において将来の心血管事故発症と強く関係が認められた。冠危険因子の評価に加えて血小板小凝集塊を測定することはこのような患者の治療方針を決定するのに有用であるのかも知れない。特に血小板小凝集塊の亢進を認める冠動脈疾患患者には、治療戦略としてより強力な抗血小板療法による利益がある可能性がある。

## 10. 表およびその説明

### 10-1. 血小板小凝集塊で比較した患者背景

	4 分位 (血小板小凝集塊, V)			
	1 ( $< 1.2 \times 10^3$ ) (n=51)	2 ( $1.2-4.1 \times 10^3$ ) (n=51)	3 ( $> 4.1 \times 10^3-1.4 \times 10^4$ ) (n=51)	4 ( $> 1.4 \times 10^4$ ) (n=51)
年齢 (歳)	68±9	66±10	70±10	67±8
性別 (男性/ 女性) (n, 男性%)	31 / 20 (61)	44 / 7 (86)	38 / 13 (75)	36 / 15 (71)
ヘマトクリット (%)	37.0±4.9	37.0±4.1	37.3±3.9	36.1±5.1
血小板数 ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	19.2±5.5	21.0±6.2	20.1±5.2	22.4±6.7
高血圧 (n, %)	25 (49)	26 (51)	31 (61)	32 (63)
糖尿病 (n, %)	27 (53)	20 (39)	26 (51)	31 (61)
肥満 (n, %)	9 (18)	11 (22)	15 (29)	12 (24)
喫煙 (n, %)	21(41)	30 (59)	26 (51)	25 (49)
総コレステロール (mg/dl)	192±33	177±33	191±37	195±38
LDL- コレステロール(mg/dl)	119±30	111±30	123±30	123±30
HDL-コレステロール (mg/dl)	49±14	42±11	47±14	47±18
中性脂肪 (mg/dl)	117±44	133±62	120±52	133±74
血小板中凝集塊 (V)	$1.1 \pm 0.6 \times 10^3$	$1.4 \pm 1.3 \times 10^3$	$1.6 \pm 1.6 \times 10^3$	$3.2 \pm 11.3 \times 10^3$
血小板大凝集塊 (V)	$2.2 \pm 1.7 \times 10^3$	$2.8 \pm 2.4 \times 10^3$	$2.8 \pm 1.6 \times 10^3$	$3.6 \pm 6.5 \times 10^3$
吸光度法 (%)	8.2±5.7	7.9±6.7	9.1±3.7	16.8±7.5
冠動脈造影データ				
1 枝病変 (n, %)	26 (51)	21 (41)	24 (47)	18 (35)
2 枝病変 (n, %)	11( 22)	14 (27)	15 (29)	13 (25)
3 枝病変 (n, %)	14 (27)	16 (31)	12 (24)	20 (39)
左室駆出率 (%)	66.5±16.4	67.0±13.9	63.6±15.4	63.5±16.3
心血管イベント(n, %)	5 (10)	2 (4)	5 (10)	20 (39)
心臓死	1	1	3	3
非致死性心筋梗塞	2	0	1	6
薬剤抵抗性狭心症	2	1	1	11

Values are mean±SD. HDL = high-density lipoprotein, LDL = low-density lipoprotein.

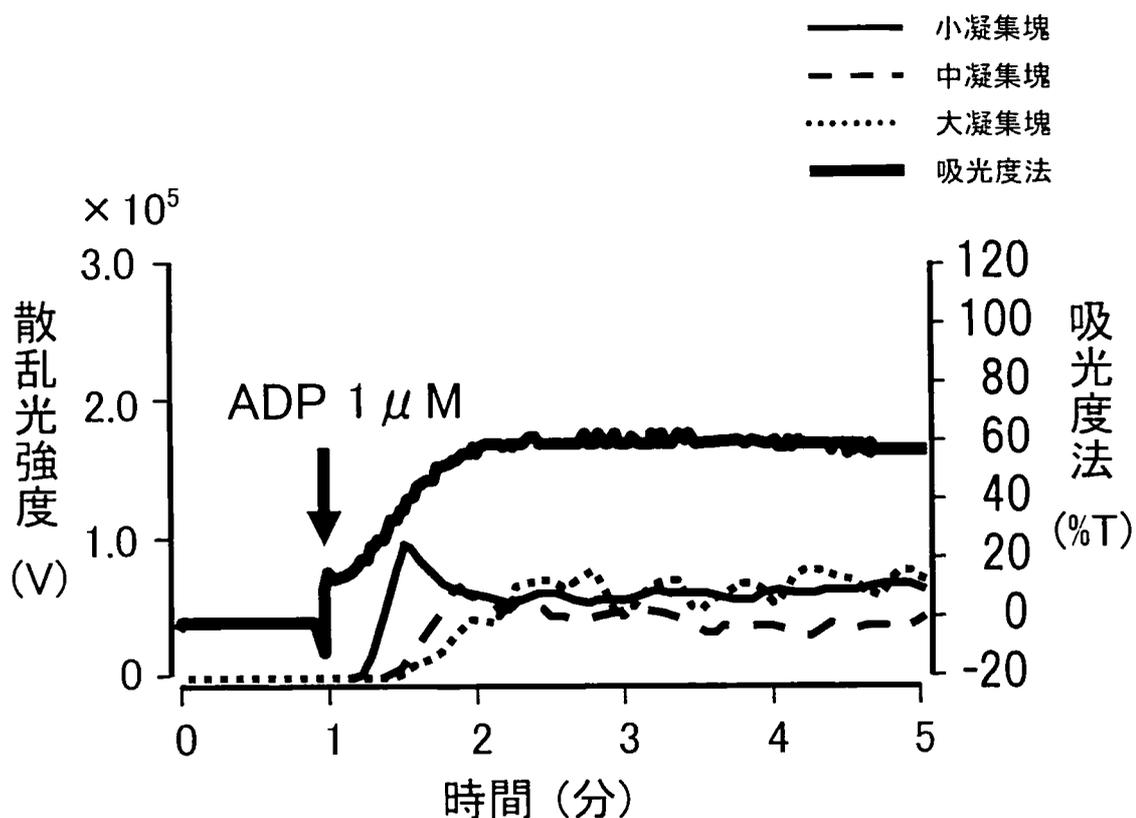
## 10-2. 冠動脈疾患患者の心血管事故発症リスクに対する多変量 Cox 比例ハザードモデル解析

	相対危険度 (95%信頼区間)	p 値
<b>血小板小凝集塊</b>		
Quartile 1 ( $<1.2 \times 10^3$ V)	1	-
Quartile 2 ( $1.2-4.1 \times 10^3$ V)	0.42 (0.08-2.20)	0.31
Quartile 3 ( $>4.1 \times 10^3 - 1.4 \times 10^4$ V)	1.27 (0.37-4.38)	0.71
Quartile 4 ( $>1.4 \times 10^4$ V)	4.34 (1.62-11.7)	0.004
<b>低左室駆出率</b>		
-	1	-
+	2.88 (1.23-6.73)	0.015

ある一定の血小板凝集能を越えると将来の心血管事故を発症する危険性が急に増加している。また低左室駆出率も将来の心血管事故発症の予測因子となっている。

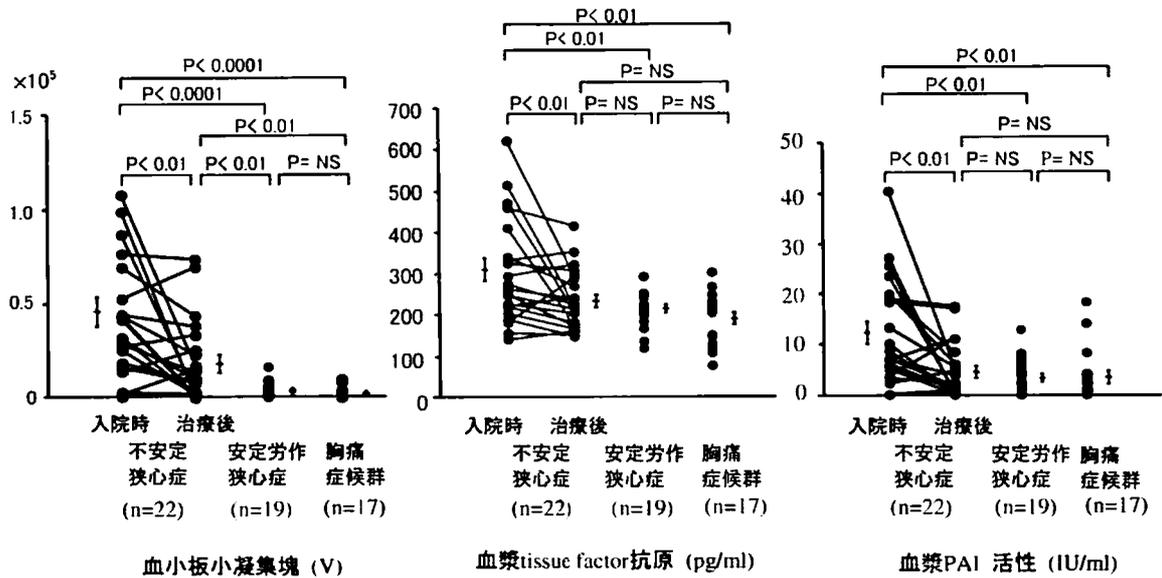
## 11. 図およびその説明

### 11-1. レーザー散乱光と吸光度法との比較



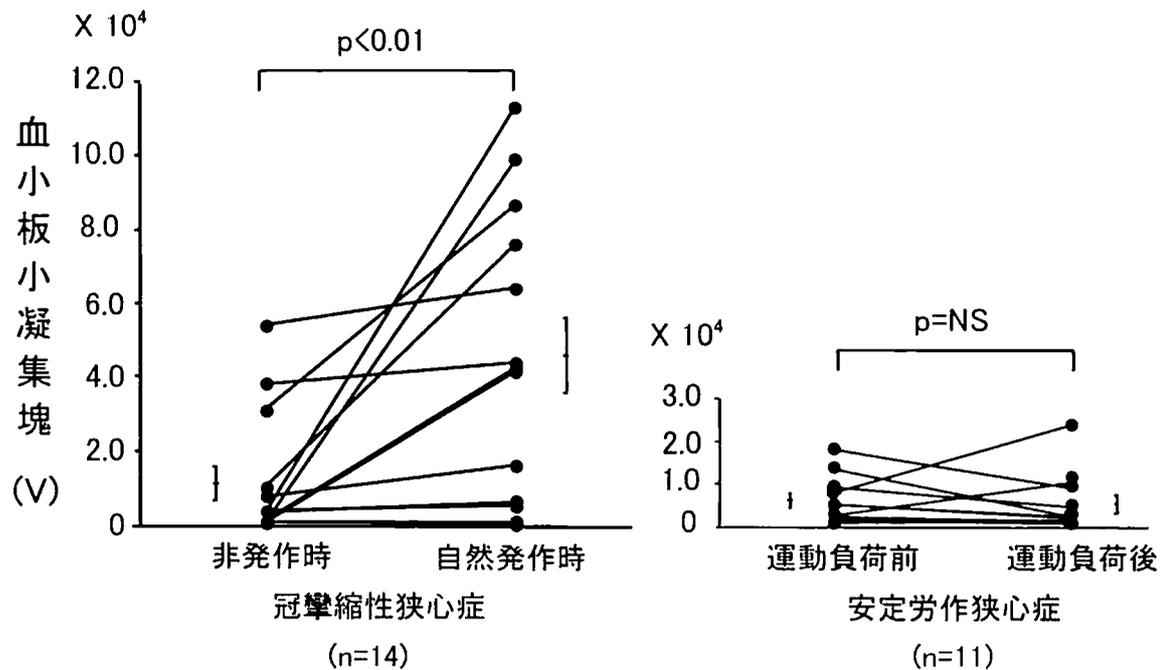
レーザー散乱光を用いた血小板凝集は血小板小凝集塊から中凝集塊そして大凝集塊の順番で凝集が起こっている。これを吸光度法での血小板凝集と比較すると、血小板小凝集塊の生成の亢進が見られているにもかかわらず吸光度法での血小板凝集能はまだほとんど亢進していないのがわかる。

11-2. 不安定狭心症患者における血小板凝集と凝固線溶系の動態



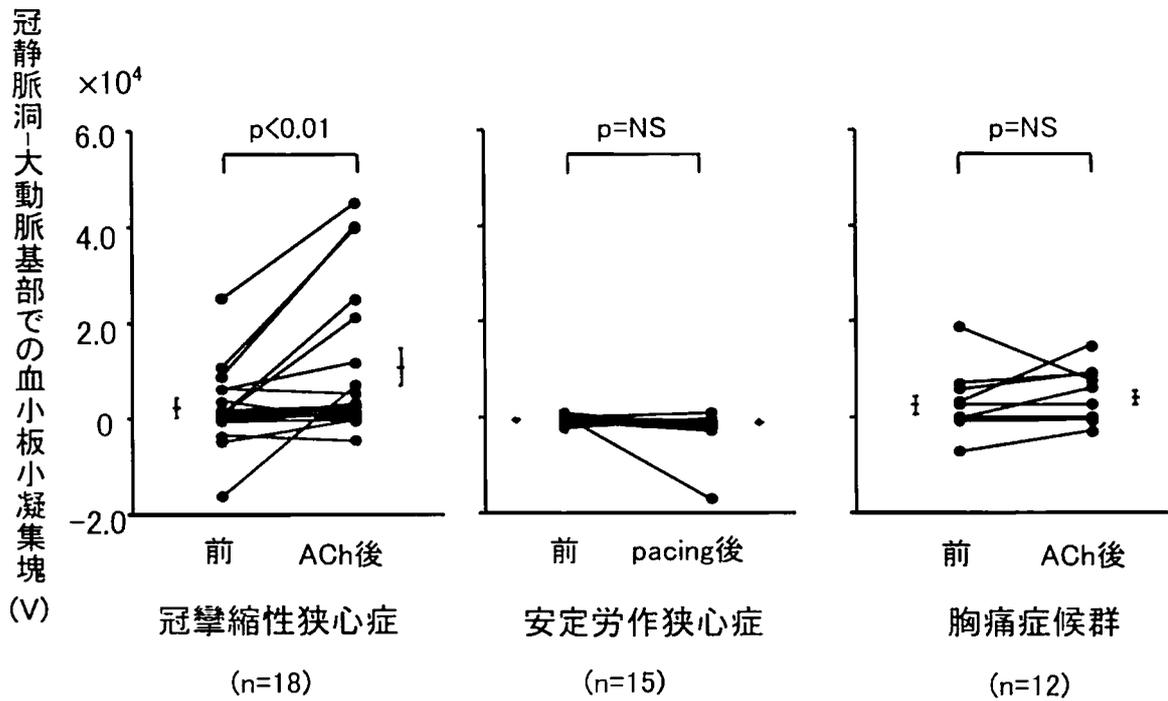
不安定狭心症患者において、入院時には安定労作狭心症患者および胸痛症候群患者に比較し血小板小凝集塊の生成が著明に亢進している。血小板小凝集塊の生成が治療2週間後には入院時に比較し著明に改善するものの、tissue factor やPAI 活性といった凝固線溶系のマーカーが正常化するにもかかわらず、安定労作狭心症患者および胸痛症候群に比較して依然として亢進していることがわかる。結果は平均値±標準誤差 (Mean±SEM) で表した。

11-3. 冠攣縮性狭心症における発作時の血小板凝集能の変動



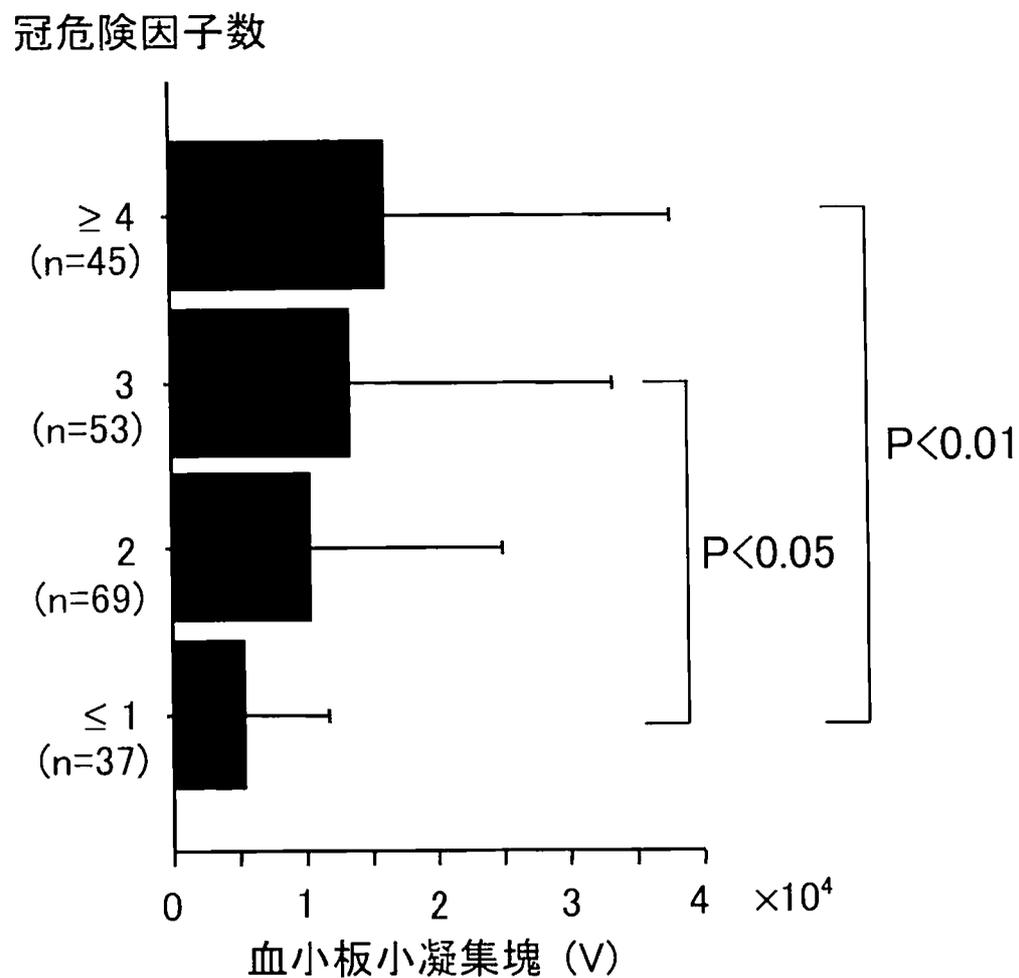
冠攣縮性狭心症患者において発作時には血小板凝集能の亢進を認めるが、安定労作狭心症患者の運動負荷による症状出現時には血小板凝集能が亢進していないことがわかる。結果は平均値±標準誤差(Mean±SEM)で表した。

11-4. 冠循環における冠攣縮性狭心症患者の発作時の血小板凝集能の変動



冠攣縮性狭心症患者においてアセチルコリン(ACh)負荷にて発作を誘発すると血小板凝集能の冠静脈洞-大動脈基部較差が亢進している。このことより血小板凝集能の亢進は主に冠循環内で生じていることがわかる。これに対して安定労作狭心症患者においてはペーシング負荷を行い虚血を誘発しても冠循環内では血小板凝集能の亢進は生じない。さらに胸痛症候群患者に ACh 負荷を行っても冠循環内での血小板凝集能の亢進は生じない。結果は平均値±標準誤差(Mean±SEM)で表した。

### 11-5. 冠危険因子数と血小板凝集能との関係

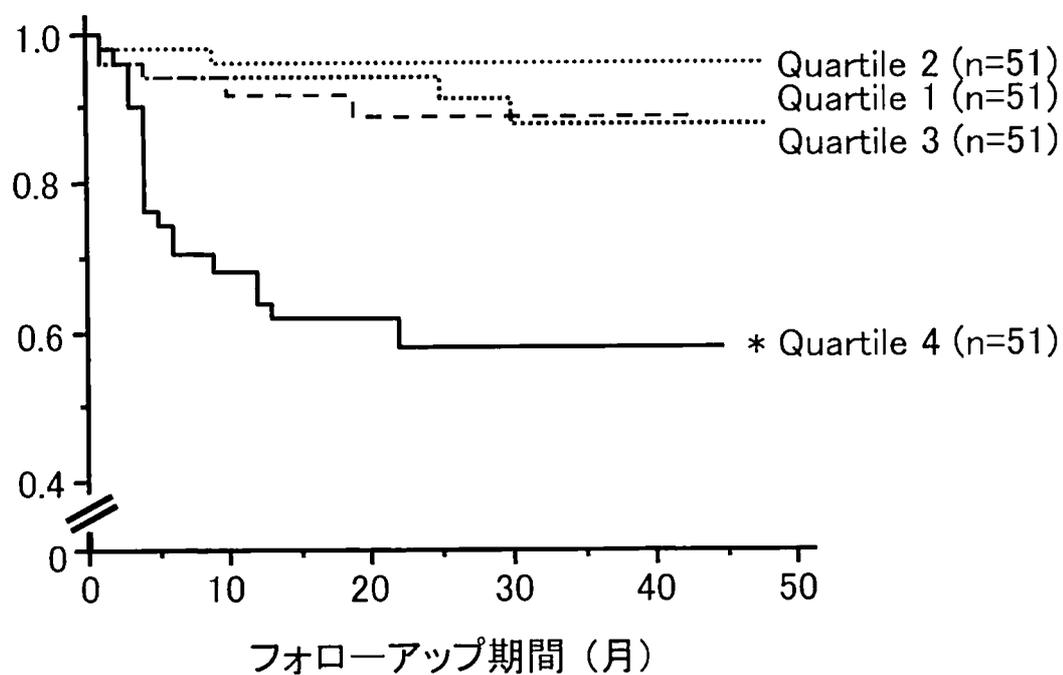


冠危険因子数が増加するに従って血小板小凝集塊の生成が増加している。

結果は平均値±標準偏差(Mean±SD)で表した。

## 11-6. 血小板小凝集塊の4分位で比較した将来の心血管イベント回避率

### 累積心事故回避率



\* $p < 0.001$  vs. quartile 1

結果は log-rank test で表した。ある一定の血小板凝集能を越えると将来の心血管事故を発症する危険性が急に増加している。

## 12. 文献

1. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985;53:363–73.
2. Ginsberg MH, Ruggeri ZM, Varki AP. Cell adhesion in vascular biology: series introduction (editorial). *J Clin Invest* 1996;98:1505.
3. Hantgan RR, Hindriks G, Taylor RG, Sixma JJ, de Groot PG. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb/IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood* 1990;76:345–53.
4. Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL Jr, Marguerie GA, Ginsberg MH. Related binding mechanism for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood* 1985;66:724–7.
5. Plow EF, Marguerie G, Ginsberg M. Fibrinogen. Fibrinogen receptors, and the peptides that inhibit these interactions. *Biochem Pharmacol* 1987;36:4035–40.
6. Theroux P, Ouimet H, McCans J, Latour JG, Joly P, Levy G, Pelletier E, Juneau M, Stasiak J, deGuise P, et al. Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 1988;319:1105–11.
7. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962;194:927–9.
8. Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Yamamoto T, Shirasawa Y, Kume S. Detection of platelet aggregates with a particle counting method using light scattering. *Anal Biochem* 1994;218:284–94.
9. Satoh K, Ozaki Y, Qi R, Yang L, Asazuma N, Yatomi Y, Kume S. Factors that affect the size of platelet aggregates in epinephrine-induced activation. A study using the particle counting method based on light scattering. *Thromb Res* 1996;81:515–23.
10. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326:242–50, 310–8.

11. Libby P. The molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844–50.
12. Horie T, Sekiguchi M, Hirose K. Coronary thrombosis in pathogenesis of acute myocardial infarction. Histopathological study of coronary arteries in 108 necropsied cases using serial section. *Br Heart J* 1978;40:153–61.
13. Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 1985;71:699–708.
14. Gotoh K, Minamino T, Katoh O, Hamano Y, Fukui S, Hori M, Kusuoka H, Mishima M, Inoue M, Kamada T. The role of intracoronary thrombus in unstable angina: angiographic assessment and thrombolytic therapy during ongoing anginal attacks. *Circulation* 1988;77:526–34.
15. Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T, Kurita A, Nakamura H, Ambrose JA. Angioscopic evaluation of coronary-artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992;326:287–91.
16. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaque is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994;89:36–44.
17. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365–72.
18. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135–43.
19. Giroud D, Li JM, Urban P, Meier B, Rutishauer W. Relation of the site of acute myocardial infarction to the most severe coronary arterial stenosis at prior angiography. *Am J Cardiol* 1992;69:729–32.
20. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657–71.

21. Nobuyoshi M, Tanaka M, Nosaka H, Kimura T, Yokoi H, Hamasaki N, Kim K, Shindo T, Kimura K. Progression of coronary atherosclerosis: Is coronary spasm related to progression ? J Am Coll Cardiol 1991;18:904-10.
22. Oliva PB, Breckinridge JC. Arteriographic evidence of coronary arterial spasm in acute myocardial infarction. Circulation 1977;56:366-74.
23. Epstein SE, Palmeri ST. Mechanisms contributing to precipitation of unstable angina and acute myocardial infarction: Implications regarding therapy. Am J Cardiol 1984;54:1245-52.
24. Nossel HL, Yudelman I, Canfield RE, Butler VP Jr, Spanondis K, Wilner GD, Qureshi GD. Measurement of fibrinopeptide A in human blood. J Clin Invest 1974;54:43-53.
25. Eisenberg PR, Sherman LA, Schectman K, Perez J, Sobel BE, Jaffe AS. Fibrinopeptide A: a marker of acute coronary thrombosis. Circulation 1985;71:912-8.
26. Theroux P, Latour JG, Leger-Gauthier C, De Lara J. Fibrinopeptide A and platelet factor levels in unstable angina pectoris. Circulation 1987;75:156-62.
27. Oshima S, Ogawa H, Yasue H, Okumura K, Matsuyama K, Miyagi H. Increased Plasma Fibrinopeptide A levels during attacks induced by hyperventilation in patients with coronary vasospastic angina. J Am Coll Cardiol 1989;14:150-4.
28. Ogawa H, Yasue H, Oshima S, Okumura K, Matsuyama K, Obata K. Circadian Variation of plasma fibrinopeptide A level in patients with variant angina. Circulation 1989;80:1617-26.
29. Oshima S, Yasue H, Ogawa H, Okumura K, Matsuyama K. Fibrinopeptide A is released into the coronary circulation after coronary spasm. Circulation 1990;82:2222-5.
30. Nemerson Y. Tissue factor and haemostasis. Blood 1998;71:1-8.
31. Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH Jr, Stack RS, Morrissey JH, Peters KG. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. Circulation 1995;91:619-22.

32. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, Mizuno Y, Oshima S, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Kamikubo Y, Nakamura S. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997;134:253-9.
33. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998;81:22-6.
34. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Suefuji H, Kaikita K, Tsuji I, Kumeda K, Aoyama N. Effects of enalapril on tissue factor in patients with uncomplicated acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1996;78:336-40.
35. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Takazoe K, Nishiyama K, Misumi K, Miyamoto S, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:983-8.
36. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K. Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;99:2908-13.
37. Kokawa T, Enjyoji K, Kumeda K, Kamikubo Y, Harada-Shiba M, Koh H, Tsushima M, Yamamoto A, Kato H. Measurement of the free form of TFPI antigen in hyperlipidemia: Relationship between free and endothelial cell-associated forms of TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:802-8.
38. Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-8.
39. Kaikita K, Ogawa H, Yasue H, Takeya M, Takahashi K, Saito T, Hayasaki K, Horiuchi K, Takizawa A, Kamikubo Y, Nakamura S. Tissue factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2232-7.

40. Kaikita K, Takeya M, Ogawa H, Suefuji H, Yasue H, Takahashi K.. Co-localization of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in coronary atherosclerosis. *J Pathol* 1999;188:180-8.
41. Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. Type 1 plasminogen activator inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 1989;9:87-115.
42. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, Blomback M, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9.
43. Sakamoto T, Yasue H, Ogawa H, Misumi I, Masuda T. Association of patency of the infarct-related coronary artery with plasma levels of plasminogen activator inhibitor activity in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1992;70:271-6.
44. Masuda T, Yasue H, Ogawa H, Misumi I, Sakamoto T, Okubo H, Miyao Y, Kato H. Plasma plasminogen activator inhibitor activity and tissue plasminogen activator levels in patients with unstable angina and those with coronary spastic angina. *Am Heart J* 1992;124:314-9.
45. Eto K, Takeshita S, Ochiai M, Ozaki Y, Sato T, Isshiki T. Platelet aggregation in acute coronary syndromes: use of a new aggregometer with laser scattering to assess platelet aggregability. *Cardiovasc Res* 1998;40:223-9.
46. Miyamoto S, Ogawa H, Sakamoto T, Soejima H, Takazoe K, Shimomura H, Kajiwara I, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Ozaki Y. Platelet hyperaggregability persists even after the improvement of increased blood coagulation and impaired fibrinolysis with the stabilization of symptoms in patients with unstable angina. *Int J Cardiol* 2001;80:235-42.
47. Kajiwara I, Ogawa H, Soejima H, Takazoe K, Miyamoto S, Sakamoto T, Yoshimura M, Kugiyama K, Yasue H. The prognostic value of small-sized platelet aggregates in unstable angina: detection by a novel laser-light scattering method. *Thromb Res* 2001;101:109-18.

48. Miyamoto S, Ogawa H, Soejima H, Takazoe K, Sakamoto T, Yoshimura M, Kugiyama K, Yasue H. Formation of platelet aggregates after attacks with coronary spastic angina pectoris. *Am J Cardiol* 2000;85:494-7.
49. Miyamoto S, Ogawa H, Soejima H, Takazoe K, Kajiwara I, Shimomura H, Sakamoto T, Yoshimura M, Kugiyama K, Yasue H, Ozaki Y. Enhanced platelet aggregation in the coronary circulation after coronary spasm. *Thromb Res* 2001;103:377-86.
50. Trip DM, Cats MV, van Capelle LJJ, Vreken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1990;322:1549-54.
51. Thaulow E, Erikssen J, Sandvik L, Stormorken H, Cohn PF. Blood platelet count and function are related to total and cardiovascular death in apparently healthy men. *Circulation* 1991;84:613-7.
52. Breddin HK, Lippold R, Bittner M, Kirchmaier CM, Krzywanek HJ, Michaelis J. Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusion in healthy volunteers? Results of the HAPARG study. *Atherosclerosis* 1999;144:211-9.
53. Mock MB, Ringqvist I, Fisher LD, Davis KB, Chaitman BR, Kouchoukos NT, Kaiser GC, Alderman E, Ryan TJ, Russell RO Jr, Mullin S, Fray D, Killip T 3rd. Survival of medically treated patients in the coronary artery surgery study (CASS) registry. *Circulation* 1982;66:562-8.
54. Califf RM, Mark DB, Harrell FE Jr, Hlatky MA, Lee KL, Rosati RA, Pryor DB. Importance of clinical measures of ischemia in the prognosis of patients with documented coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1988;11:20-6.
55. Sakamoto T, Ogawa H, Kawano H, Hirai N, Miyamoto S, Takazoe K, Soejima H, Kugiyama K, Yoshimura M, Yasue H. Rapid change of platelet aggregability in acute hyperglycemia detection by a novel laser-light scattering method. *Thromb Haemost* 2000;83:475-9.

56. Miyamoto S, Ogawa H, Soejima H, Takazoe K, Kajiwara I, Sakamoto T, Yoshimura M, Kugiyama K, Yasue H. Increased rate of formation of small-sized platelet aggregates in patients with acute coronary syndromes. *Jpn Circ J* 2000;64:647-52.
57. Tohgi H, Takahashi H, Watanabe K, Kuki H, Shirasawa Y. Development of large platelet aggregates from small aggregates as determined by laser-light scattering: Effect of aggregant concentration and antiplatelet medication. *Thromb Haemost* 1996;75:838-43.
58. The expert committee. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-97.
59. Shukla SD, Paul A, Klachko DM. Hypersensitivity of diabetic human platelets to platelet activating factor. *Thromb Res* 1992;66:239-46.
60. Davi G, Gresele P, Violi F, Basili S, Catalano M, Giammarresi C, Volpato R, Nenci GG, Ciabattini G, Patrono C. Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. Evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation* 1997;96:69-75.
61. Hawkins R. Smoking, platelets and thrombosis. *Nature* 1972;236:450-2.
62. Kabbani SS, Watkins MW, Ashikaga T, Terrien EF, Holoch PA, Sobel BE, Schneider DJ. Platelet reactivity characterized prospectively. A determinant of outcome 90 days after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2001;104:181-6.
63. Holmes DR Jr, Detre KM, Williams DO, Kent KM, King SB 3rd, Yeh W, Steenkiste A. Long-term outcome of patients with depressed left ventricular function undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. The NHLBI PTCA Registry. *Circulation* 1993;87:21-9.
64. Yusuf S, Zucker D, Peduzzi P, Fisher LD, Takaro T, Kennedy JW, Davis K, Killip T, Passamani E, Norris R, et al. Effect of coronary artery bypass graft surgery on survival: overview of 10-year results from randomised trials by the Coronary Artery Bypass Graft Surgery Trialists Collaboration. *Lancet* 1994;344:563-70.

65. Fuster V, Dyken ML, Vokonas PS, Hennekens C. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. *Circulation* 1993;87:659–75.
66. Antiplatelet trialists' collaboration Secondary prevention of vascular disease by prolonged antiplatelet treatment. *BMJ* 1988;296:320–31.
67. Yasue H, Ogawa H, Tanaka H, Miyazaki S, Hattori R, Saito M, Ishikawa K, Masuda Y, Yamaguchi T, Motomiya T, Tamura Y. Effects of aspirin and trapidil on cardiovascular events after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1999;83:1308–13.
68. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets: I: acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975;56:624–9.