

表 題 クロピドグレル, プラスグレル投与下における血小板反応性の比較

論文の区分 博士課程

著 者 名 新島 聡

担当指導教員氏名 苅尾 七臣 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系
循環器・呼吸器疾患学
心血管病学

2018 年 1 月 10 日申請の学位論文

目次

1. はじめに	2
2. 背景	4
3. 本研究の目的	12
4. 対象と方法	12
5. 結果	18
6. 考察	35
7. 研究の限界と今後の課題	40
8. 結論	41
9. 謝辞	41
10. 参考文献	42

1. はじめに

我が国における死亡原因として、心疾患は悪性新生物に次いで2番目に多く、高齢化社会や食事の欧米化に伴いその数は増加傾向である。心疾患の内訳は、心筋梗塞などの虚血性心疾患が多くを占める。虚血性心疾患は冠動脈の狭窄や血栓性の閉塞に伴う疾患であり、脳梗塞と同様、動脈血栓症の抑制によって、疾患の予防・治療を行う。動脈血栓症の発症には一次止血に関与する血小板の関与が重要であり、虚血性心疾患の予防・治療には抗血小板薬の投与が重要である。抗血小板薬は、動脈血栓形成部位における血小板凝集を抑制し、心筋梗塞の再発やカテーテル治療後のステント血栓症の頻度を低下させることが、多くの臨床試験で示されている。日常診療において、抗血小板薬は、どの患者においても一定量を処方することが一般的であり、抗凝固療法であるワルファリンのように薬理効果をモニタリングすることはない。どんな薬剤もその薬効には個人差があるため、実臨床では、個々の患者において、どの程度の抗血小板作用を発揮しているかは分からず投与をおこなっているのが現状である。事実、抗血小板薬の効果が減弱するアスピリン抵抗性やクロピドグレル抵抗性と臨床予後との関連が報告されており、抗血小板薬の効果が不十分な症例を抽出し、適切な介入をおこなうことも必要と思われる。近年、抗血小板薬の

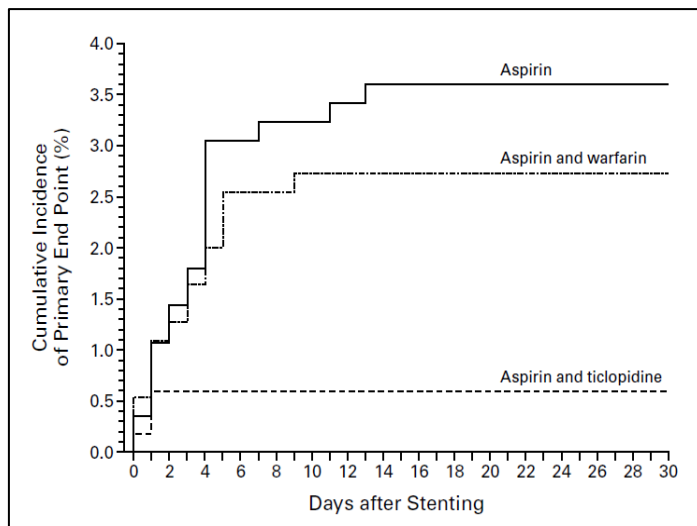
薬効の個人差を解決するために新たな抗血小板薬としてプラスグレルが開発された。プラスグレルの抗血小板作用はクロピドグレルよりも速く強力に効果を示し、より臨床予後を改善することが示されている。一方、強力な抗血小板薬の投与は出血合併症の増加とも密接に関連している。出血合併症の増加は、特に脳出血の頻度が高い、日本人を含む東アジア人種においては深刻な問題である。事実、国内においては、出血合併症を危惧し、欧米の3分の1量のプラスグレルが保険適応となっている。以上より、プラスグレルの薬効に影響を及ぼす因子を同定することは、最適な薬剤の投与量や投与方法の選択の一助になるのではないかと考え、本研究を行った。

2. 背景

1) 経皮的冠動脈形成術と抗血小板療法

狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患に対して、薬物療法に加え経皮的冠動脈形成術（percutaneous coronary intervention: PCI）を行うことが確立している。PCI とは狭窄または閉塞した冠動脈にカテーテルを挿入し、血管の内側から風船で拡張しステントを留置する低侵襲的な治療法である。カテーテル治療が始まった当初はバルーン拡張しか行われていなかったが、再狭窄が多く、バルーン拡張に伴う内膜解離による急性冠動脈閉塞が問題であった。それらを克服するために冠動脈ステントが広く使用されるようになったが、術後のステント血栓症の発生が問題として残った。それは重篤な心筋梗塞を引き起こし、PCI 前よりも病態が不安定化することも稀ではなかった。ステント血栓症に、アスピリンやワルファリンなどの抗血栓療法を行っても、その頻度は 4~10% と高かった。その後、ステント血栓に対する ADP 受容体シグナルを介した血小板活性化の重要性がクローズアップされ、アスピリン単剤やワルファリン併用よりもアスピリンにチエノピリジン系抗血小板薬を併用した 2 剤抗血小板薬療法（dual antiplatelet therapy: DAPT）が一般的となった [1-3] (図 1)。一方でステントの種類も金属だけでできたベアメタルステントから免疫抑制剤がコ

ーティングされた薬剤溶出性ステント（Drug Eluting Stent：DES）へと変化し、慢性期の再狭窄率は 20-30%から 3-6%まで低下した。しかし、DES はステント留置後の局所の細胞増殖を抑制するため、数ヶ月たってもステント表面が内皮細胞に被覆されずに晩期ステント血栓症を引き起こすことがある。そのため、長期に DAPT を継続する必要がある、その間に出血合併症が増加することが問題とされている。ストラット厚と薬剤搭載量の調整による DES の改良が進むにつれてこの問題も解決に向かっているが、依然としてステント血栓症を完全に予防するまでには至っていない。



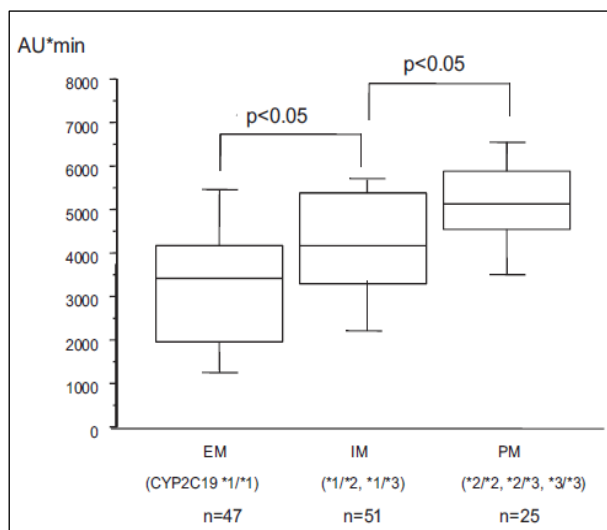
Leon MB et al. , N Engl J Med 1998

図 1 PCI 後の抗血栓療法とイベント発生率の比較

狭心症患者を対象にステント留置を行い、アスピリン単剤群（557 名）、ワルファリン併用群（550 名）、チクロピジン併用群（546 名）でのステント血栓発生率をカプランマイヤーの生存曲線により解析を行った。

2) チェノピリジン系抗血小板薬の作用と問題点

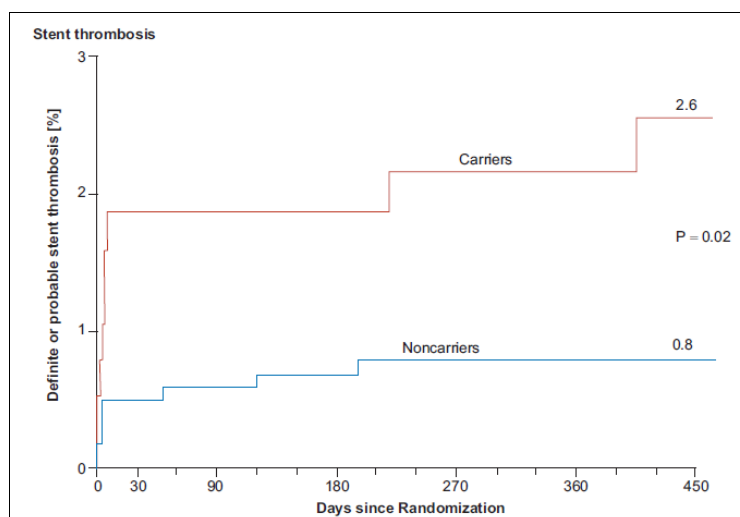
チェノピリジン系抗血小板薬は血小板膜上のアデノシン二リン酸 (Adenosine diphosphate: ADP) 受容体 $P2Y_{12}$ を選択的かつ非可逆的に阻害することで、血小板凝集を抑制する。チェノピリジン系抗血小板薬自身に抗血小板作用はなく、その肝臓での活性化代謝物が $P2Y_{12}$ 受容体に不可逆的に結合する。日常診療で最も用いられているクロピドグレルは、吸収された 15% のみが、肝臓で 2 回のチトクローム P450 (CYP) による代謝を受けて活性化するため [4]、その作用発現までに時間を要する。日本人においてはクロピドグレル抵抗性をしめす CYP 遺伝子多型 (CYP2C19 多型) の頻度が 19% と高く [5]、クロピドグレルの抗血小板作用が弱い患者が多いこと [5, 6] (図 2) が知られている。プロトンポンプインヒビターなどの CYP2C19 で代謝される薬剤との同時投与もクロピドグレルの効果を減弱する一因であることが報告されている。このような CYP2C19 の遺伝子多型や薬物相互作用によるクロピドグレルの薬効の個人差が PCI 後の心血管イベントに関連する [7, 8] (図 3)。



Yamamoto et al., J Cardiol 2011

図2 CYP2C19 遺伝子多型別の血小板凝集能の比較

安定狭心症患者を対象にクロピドグレルを投与して、透過度法で血小板機能を評価した。CYP2C19 遺伝子多型を、EM: Extensive Metabolizer (高代謝群)、IM: Intermediate Metabolizer (中程度代謝群)、PM: Poor Metabolizer (低代謝群)に分け、血小板機能を比較した。統計は Mann-Whitney の U 検定。



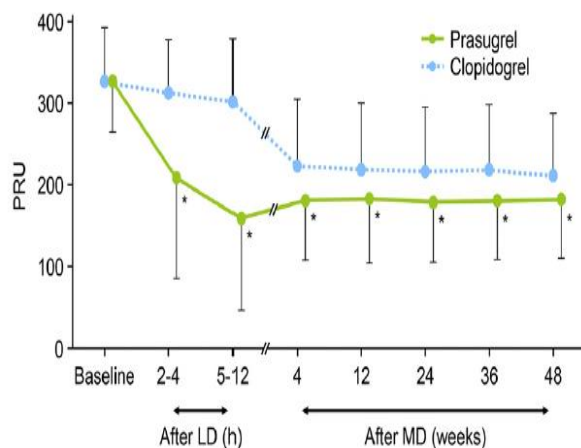
Mega JL et al., N Engl J Med 2009

図3 CYP2C19 遺伝子多型とステント血栓症の発生率の関係

急性冠症候群患者を対象にステント留置を行い、クロピドグレルとアスピリンを投与した。CYP2C19 の遺伝子多型により、Carrier 群(低代謝群と中程度代謝群) (n =375)と非 Carrier 群 (高代謝群) (n =1014)に分け、それぞれのステント血栓発生率を Kaplan-Meier の生存曲線により解析を行った。

3)新規 P2Y₁₂ 受容体拮抗薬プラスグレル

以上より、クロピドグレルは、抗血小板作用の発現が遅いことや CYP 遺伝子多型に強く影響されることが問題である。このクロピドグレルの欠点を補うために、新規チエノピリジンであるプラスグレルが開発された。クロピドグレルとは異なり腸管エステラーゼの作用により、ほとんどが吸収され中間活性体となり、肝臓での CYP 代謝は 1 回だけで活性体となるために CYP2C19 遺伝子多型の影響を受けない[9]。クロピドグレルとの比較対照試験において、速やかな強力な抗血小板作用が証明され、有意に血栓イベントを抑制したが[10]、出血イベントは増加した[11]。前述の通り、日本人は脳出血を始めとした出血合併症の頻度が欧米より高く[12]、抗血小板療法を強力に行うことがためられたため、欧米よりも少量の投与量で臨床研究が行われ、その結果を元に国内で保険収載された[13]。低用量にも関わらず、クロピドグレルよりもローディング量投与後早期（2-4hr 後）に強い抗血小板作用を示し[14]、主要な心血管イベントの発症を抑制した [15] (図 4，図 5)。

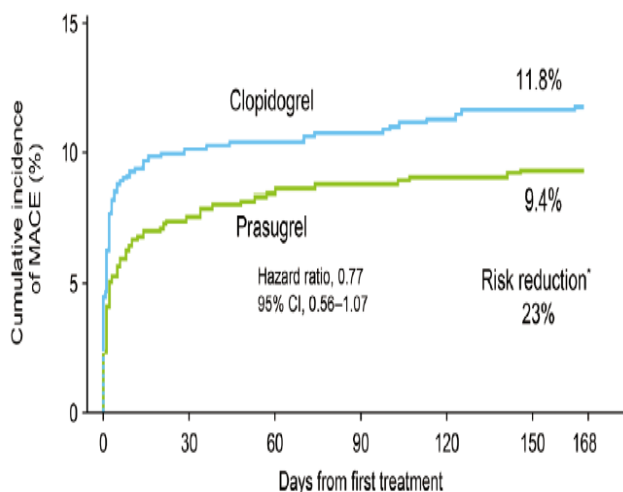


Nakamura et al., Int J Cardiol 2015

図4 クロピドグレルとプラスグレルの抗血小板機能の比較

日本人の急性冠症候群患者を対象にステント留置を行い、アスピリンに加え、クロピドグレル 300 mg (維持量 75mg、n =409) または、プラスグレル 20 mg (維持量 3.75mg、n =411) を投与した。経時的に血小板機能を VerifyNowP2Y₁₂ により測定した。データは平均と標準偏差。統計は Student の t 検定により行った。* $P < 0.05$ 。

PRU : P2Y₁₂ reaction units LD : loading dose MD : maintenance dose



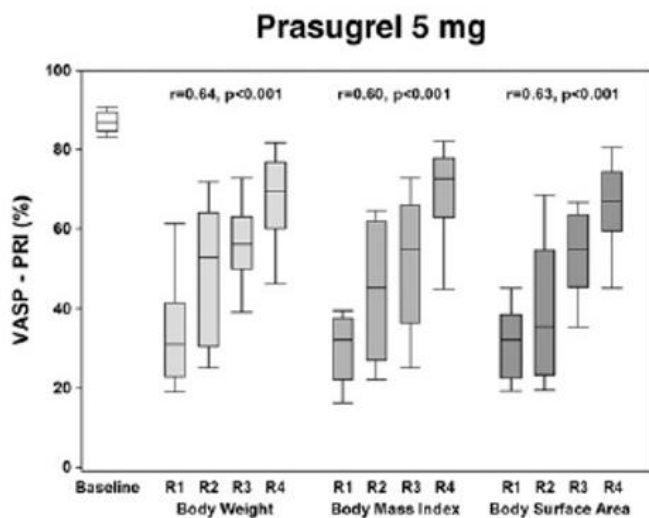
Saito et al., Circ J 2014

図5 クロピドグレルとプラスグレル投与後の主要心血管イベントの比較

日本人の急性冠症候群患者を対象にステント留置を行い、アスピリンに加え、クロピドグレル 300 mg (n =678) または、プラスグレル 20 mg (n =685) を投与した。主要心血管イベント (MACE) の発症を Kaplan-Meier 曲線により評価した。ハザード比 0.77、95%信頼区間 0.56-1.07

プラスグレルはその薬理作用に個人差が少ないとされている一方、効果不十分な症例の存在も報告されている。このプラスグレルの薬効に影響を及ぼす因子として、唯一、その体格（体重、BMI、体表面積）が影響するという報告がある[16]（図 6）。体格の小さい患者では大きい患者よりもプラスグレルの効果が強かった。事実、体重 50 kg 未満への通常量(3.75 mg)は出血リスクが増大する恐れがあり、本邦で減量(2.5 mg)が考慮された 1 つの理由である。しかし、体格の小さい患者でも薬剤効果が不十分な場合があり、体格以外の因子がプラスグレルの薬理作用に関与している可能性もある。

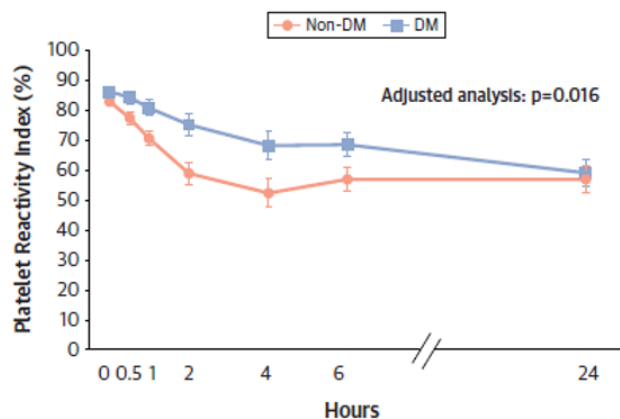
クロピドグレルでは CYP2C19 の遺伝子多型に加えて、糖尿病の存在が抗血小板作用発現までの時間を遅延させたという報告がある（図 7）が[17]、プラスグレルでは糖尿病の有無が抗血小板作用へ影響したとの報告はない。糖尿病以外にも、高血圧や脂質異常症、睡眠時無呼吸などは血小板凝集を促進させるが[18-20]、これらの患者因子が、日本人における低用量プラスグレル投与時の抗血小板作用に、どのような影響を及ぼしているかは知られていない。



Jakubowski A et al., Thrombosis Res 2014

図6 体格(体重、体表面積、BMI)とプラスグレルの抗血小板作用の関係

安定狭心症患者を対象にアスピリンに加えて、プラスグレル 5mg を 12 ± 2 日間投与した ($n = 72$)。経時的に血小板機能を VerifyNowP2Y12 により測定した。血小板機能の抑制を Platelet Reactivity Index (VASP-PRI) で示した。体重、BMI、体表面積でそれぞれ 4 群に分けて解析を行った。データは平均と標準偏差。* $P < 0.05$ 。



Angiolillo J et al., JACC 2014

図7 クロピドグレルの抗血小板作用に対する糖尿病の影響

糖尿病患者 (DM) ($n = 30$)、非糖尿病患者 (Non-DM) ($n = 30$) を対象にローディング量として 600mg のクロピドグレルを投与した。経時的に血小板機能をフローサイトメトリーで測定し、血小板機能の抑制を Platelet Reactivity Index で示した。データは平均と標準偏差。統計は反復測定による 1 元配置の分散分析により行った。

3. 本研究の目的

本研究の目的は、プラスグレルとクロピドグレル投与後の血小板機能を詳細に比較し、それぞれの抗血小板作用に影響を及ぼす患者背景因子や各薬剤の新たな薬理学的な特徴を見出すことである。

プラスグレルはクロピドグレルよりも安定した抗血小板作用を発揮するが、日本人における低用量投与によって、全ての患者でプラスグレルが効果的に投与できているかは不明である。効果不十分な症例だけでなく、逆に過剰な効果のため出血の危険性が高まる症例も存在する可能性もある。日本人に保険適用となっている低用量プラスグレルの薬効に関与する因子が同定できれば、さらにプラスグレルを安全、かつ効果的に使用できる可能性があり、最適な薬剤選択の一助になるのではないかと考え本研究を施行した。

4. 対象と方法

研究対象と研究デザイン

2014年11月～2016年4月の期間に本学附属病院循環器内科に入院した、PCIを予定している安定狭心症患者40名を対象として、無作為群間比較前向きオー

ブンラベル試験を行った(UMIN000017624)。下記の選択基準を全て満たす者を研究の対象とした。①冠危険因子を有し典型的な狭心症の症状がある者、または、冠動脈3DCT・心筋シンチグラフィ・トレッドミル負荷試験のいずれかが陽性の者、②アスピリン100 mg/日を入院時に1週間以上内服している者、③年齢20歳以上。除外基準は下記の通りである。①硫酸クロピドグレル、プラスグレル、塩酸チクロピジン、シロスタゾール、エイコサペンタエン酸、ベラプロストナトリウム、塩酸サルボグレラートなどの抗血小板薬、ワルファリンや直接経口抗凝固薬などの抗凝固薬を入院時に併用している者、②体重50 kg以下の者、③同意取得から抗血小板薬開始までの間に、活動性出血など早期の中止が必要と考えられる症状または異常が発現した者、④悪性腫瘍・膠原病など重篤な基礎疾患を持つ者、⑤血小板数が $10 \times 10^4/\text{mm}^3$ 以下、 $40 \times 10^4/\text{mm}^3$ 以上の者、⑥他の臨床試験に参加している者、⑦creatinine $>2.5 \text{ mg/dl}$ の者、⑧肝疾患 (bilirubin levels $>2 \text{ mg/dl}$)を合併している者、⑨その他、研究責任者又は研究者が対象として不適当と判断した者。本研究は当院臨床研究倫理審査委員会で承認され、全ての患者から書面でのインフォームドコンセントを得た。

無作為化は事前に統括臨床コーディネーターがコンピューターの乱数表を用いて行い、カテーテル検査前日にプラスグレル 20 mg またはクロピドグレル 300 mg のローディング量投与を行った (図 9)。カテーテル検査当日からそれぞれの

維持量（プラスゲレル 3.75 mg、クロピドグレル 75 mg）を継続し、退院後の初回外来で抗血小板薬をスイッチした。ローディング量投与前と投与後（投与後 30 分、3 時間、6 時間、20 時間）の合計 5 ポイント、各外来 1 ポイントずつで血液サンプルを採取し抗血小板作用を評価した。血中クロピドグレル・プラスゲレル代謝産物濃度の測定はローディング量投与後 30 分と 3 時間の 2 ポイントで行った（図 9）。

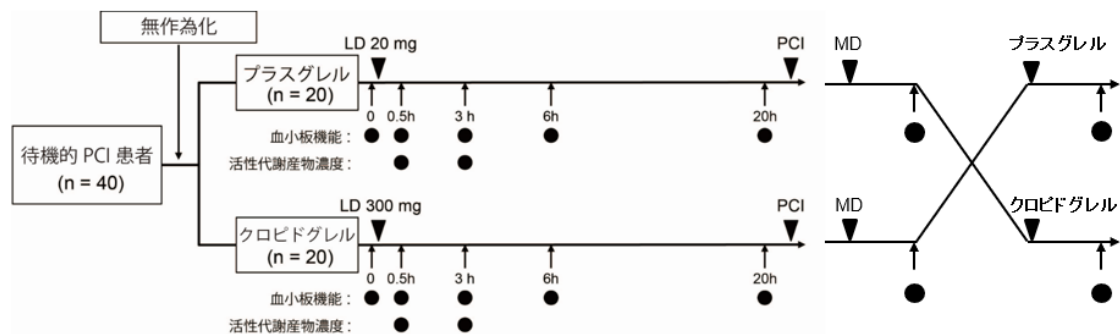


図 9 研究デザイン

PCI を予定されていた患者 40 名を、プラスゲレル群とクロピドグレル群に割り付けしローディング量の投与を行った。血小板機能は投与前、投与後 30 分、3 時間、6 時間、20 時間で測定した。活性代謝産物濃度は 30 分と 3 時間の 2 ポイントで測定した。PCI 翌日から維持量を継続し、初回外来で血小板機能を測定し薬剤をスイッチした。2 回目の外来で、スイッチした薬剤投与下での血小板機能を測定した。PCI: percutaneous coronary intervention LD: loading dose MD: maintenance dose

疾患の定義と主要評価項目

高血圧は収縮期血圧 140 mmHg 以上もしくは降圧薬の内服と定義した。脂質異常症は血清 LDL コレステロール 140 mg/dl 以上もしくはスタチンの内服、糖尿病は HbA1c 6.5%(NGSP)以上もしくは経口血糖降下薬やインスリンの使用と定義した。研究の主要評価項目はプラスグレルとクロピドグレルの血小板反応性を比較し、血小板反応性に影響を及ぼす因子や各薬剤の新たな違いを見出すことである。

抗血小板作用と薬剤活性代謝産物の評価

測定する血液サンプルは、クエン酸ナトリウム0.5 ml入りの5 mlシリンジで前肘静脈から21G針を用いて採血し、血小板凝集能とVASPリン酸化、薬剤活性代謝産物の評価を行った。

血小板凝集能は全血を1時間室温放置後に遠心操作（220g 12分；室温）で血小板多血漿を得て、PA-200C (Kowa Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用して透過度法ならびに粒子計測法により測定した。PA200Cはフローサイトメトリーの原理を用いて血小板凝集塊の大きさを定量化する事が可能であり、100個程度の血小板からなる小凝集塊の検出に優れており、血小板を小凝集塊、中凝集塊、大凝集塊に分類することが可能である[21]。アゴニストはADP 5 μ M、 20

μMとし、血小板凝集を7分間観察した。透過度法では最大凝集率を、粒子計測法ではサイズ別凝集塊の曲線下面積（AUC）をそれぞれ測定した。データは、其々の測定値を抗血小板薬投与前の値からの変化率（%）として求めた。

VASPリン酸化は、収集した全血の一部（20 μL）を室温で保存し、24時間以内に血小板 VASP/P2Y₁₂アンタゴニスト活性測定キット（Biocytex Inc., Marseille, France）を用いてプロトコール通りに測定検体を作成した。その検体からフローサイトメトリー（FACS Aria II; BD Biosciences, San Jose, CA）で VASPリン酸化を測定し血小板反応性指標（PRI；platelet reactivity index）を算出した[22]。VASP-PRI>50%では血栓イベントが多く、VASP-PRI<16%では出血イベントが有意に多かったと報告されており[23]、本研究でもそれに準じて抗血小板薬の効果が不良か過剰かを判断した。

チエノピリジンの活性代謝産物濃度は抗血小板薬内服後30分と3時間の2ポイントで測定した。血液を採取後、活性代謝産物を安定化させるために速やかにMPBr（0.5 mol/L 3'-methoxyphenacyl bromide）溶液25 μLを加え、可能な限り早く遠心分離し（10分、4°C、3000rpm）血漿を-80°Cで保存した。活性代謝産物（プラスグレルR-138727、クロピドグレルR-130964）は株式会社LSIメディアエンスでLC-MS/MS（液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計）を用いて測定した。

統計解析

薬効に影響を及ぼす因子を同定するために、過去の報告よりVASP-PRIの標準偏差を20、検出したい群間の差を30、検出力を0.8と仮定した場合、パワー解析を行うとサンプルサイズは各群16症例ずつ必要と計算された。そのため、プラスグレル20症例、クロピドグレル20症例の合計40症例とした。連続変数の正規性の検定は、Kolmogorov-Smirnov検定を行った。患者背景の統計的な差は、頻度に関してはカイ2乗検定によって確認した。連続変数は正規分布の場合はStudent の t 検定を、正規分布でない場合はMann-WhitneyのU検定を行った。 $P < 0.05$ を統計的に有意であると判断した。2群間の経時的な連続変数（凝集率の変化（%）、VASP-PRI、血小板凝集塊数）の比較は、母集団が正規分布を示したため、反復測定による1元配置の分散分析を行った。抗血小板作用と様々な因子の相関係数を求め、重回帰分析を行い薬効に影響を及ぼす因子の解析を行った。全ての統計解析はSPSS version 23.0 software (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) を用いて行った。

5. 結果

合計 40 名を登録し研究への同意を得た。ローディング量投与後のデータは全例で収集できたが、維持量を継続できたのは 30 症例であった。そのうちの 1 症例は内服コンプライアンス不良が疑われたため除外し、解析対象となったのは 29 症例であった（図 10）。

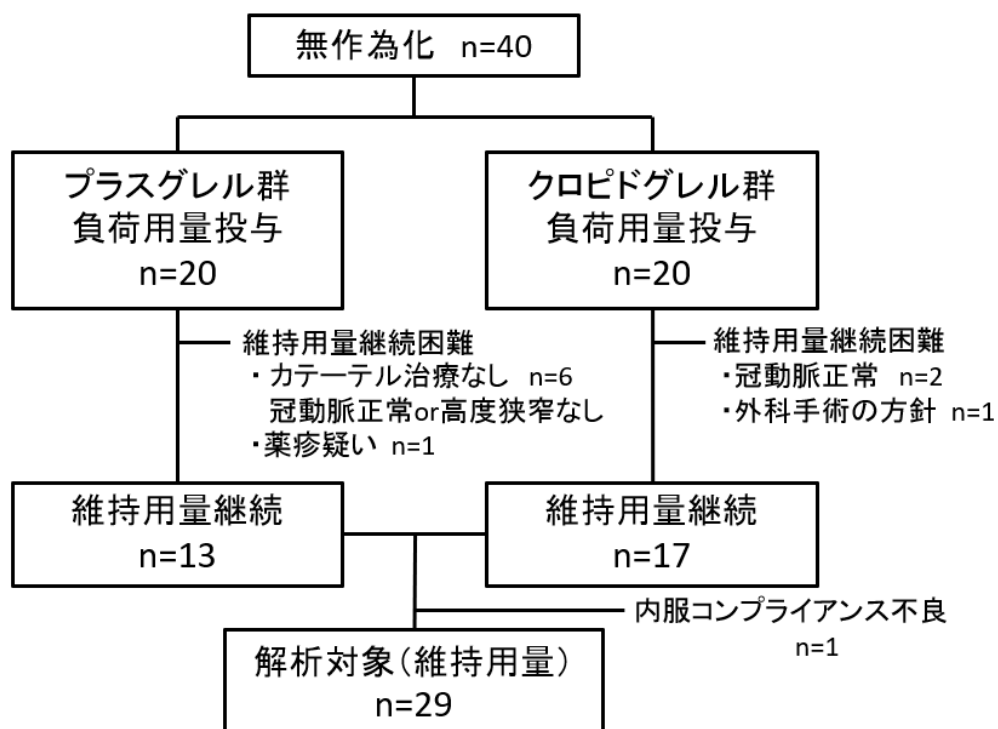


図 10 患者フロー図

1)患者背景

両群で患者背景に有意な差はなかった（表 1）。年齢は両群とも 60 代で男性が多く、BMI は 26 以上と高値であった。ほとんどの患者で高血圧または脂質異常症を合併しており、糖尿病はプラスグレル群で 8 名（40%）、クロピドグレル群で 7 名（35%）に認めた。インスリン投与中の患者は 1 名のみであった。狭心症に対して PCI 歴のある患者はプラスグレル群で 2 人（10%）、クロピドグレル群で 1 人（5%）であった。心筋梗塞の既往のあるものはいなかった。

表 1 患者背景

	プラスグレル群 (n=20)	クロピドグレル群 (n=20)	P 値
年齢, yrs	61.1 ± 11.0	66.1 ± 11.2	0.16
男性, n (%)	17 (85)	13 (65)	0.14
Body mass index, kg/m ²	27.4 ± 3.6	26.3 ± 4.3	0.37
喫煙, n (%)	7 (35)	4 (20)	0.24
高血圧, n (%)	13 (65)	17 (85)	0.14
脂質異常症, n (%)	15 (75)	11 (55)	0.19
糖尿病, n (%)	8 (40)	7 (35)	0.74
睡眠呼吸障害(ODI 3%), n (%)	6 (30)	6 (30)	1.00
心筋梗塞の既往, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0
狭心症の既往, n (%)	2 (10)	1 (5)	0.55
PCI 施行歴, n (%)	2 (10)	1 (5)	0.55
CABG 施行歴, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0
脳梗塞の既往, n (%)	1 (5)	1 (5)	1.0
末梢動脈疾患, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0
冠動脈疾患の家族歴, n (%)	8 (40)	6 (30)	0.51
左室収縮能, %	69.9 ± 6.3	69.4 ± 6.2	0.74
eGFR, ml/min/1.73m ²	65.8 ± 18.5	68.2 ± 17.2	0.68
血小板数, ×10 ³ /μL	21.0 ± 5.9	20.0 ± 4.2	0.54
内服薬			
アスピリン, n (%)	20 (100)	20 (100)	1.00
プロトンポンプ阻害薬, n (%)	15 (75)	11 (55)	0.19
経口血糖降下薬, n (%)	8 (40)	4 (20)	0.17
インスリン治療, n (%)	0 (0)	1 (5)	0.31
スタチン, n (%)	15 (75)	11 (55)	0.19
硝酸薬, n (%)	6 (30)	3 (15)	0.26
カルシウム拮抗薬, n (%)	9 (45)	10 (50)	0.75
ACE 阻害薬/ARB, n (%)	11 (55)	11 (55)	1.00
β 遮断薬, n (%)	15 (75)	12 (60)	0.31

患者背景因子の数字は平均値±標準偏差もしくは症例数 n (%)。

睡眠呼吸障害：ODI3%15 回以上。ODI = oxygen desaturation index,

PCI：percutaneous coronary intervention, CABG：coronary artery bypass grafting,

eGFR：estimate glomerular filtration rate, ACE: angiotensin converting enzyme,

ARB: angiotensin II receptor blocker

2) ローディング量投与後の抗血小板効果

VASP-PRI と血小板凝集（最大透過度）で $P2Y_{12}$ 阻害を評価した結果、先行研究と同様、プラスグレルは低用量にも関わらず、クロピドグレルよりも早期、かつ強力な抗血小板作用を認めた（図 11）。3 時間値は VASP-PRI、最大透過度ともにプラスグレル群で有意に低下していた（図 11）。

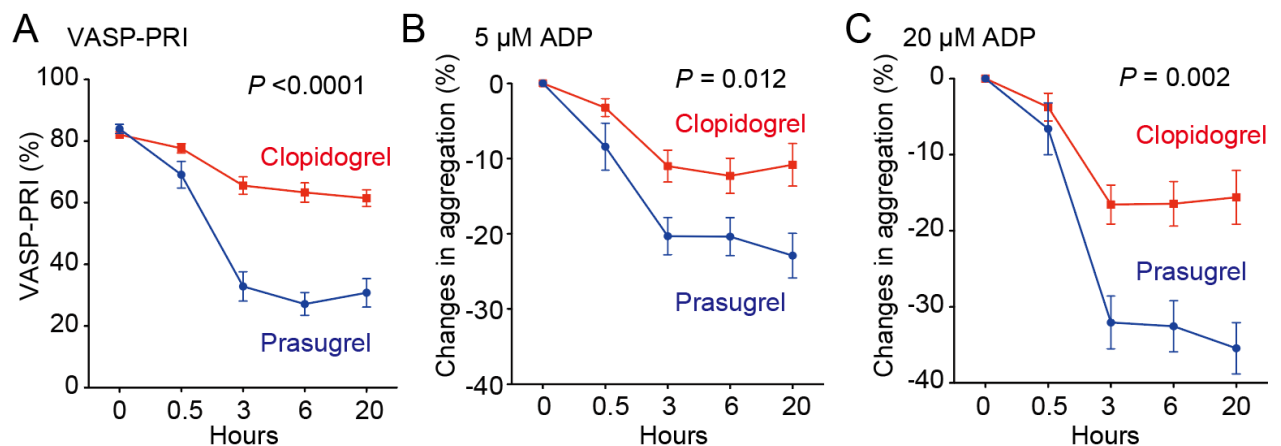


図 11 抗血小板薬ローディング量投与後の経時的な血小板反応性の比較
プラスグレル、またはクロピドグレル投与後の経時的な VASP-PRI (A) と最大凝集の変化率 (5 μ M ADP: B, 20 μ M ADP: C)。値は平均値 \pm 標準誤差。経時的な変化の比較は反復測定による 1 元配置の分散分析を行った。

代謝産物濃度と血小板の $P2Y_{12}$ 阻害との関連を調べるために、プラスグレルとクロピドグレルの代謝産物濃度 (30 分値) と VASP-PRI との相関を比較した。その結果、プラスグレル群では投与 30 分後から、薬剤血中濃度との相関を認めた（図 12A）。また、プラスグレル群では、VASP-PRI と凝集能も早期か

ら強く相関していた (図 12B)。一方でクロピドグレルはプラスグレルよりもその相関は弱かった。3 時間の代謝産物濃度と両薬剤投与後の VASP-PRI に相関は認められなかった(図 12C)。

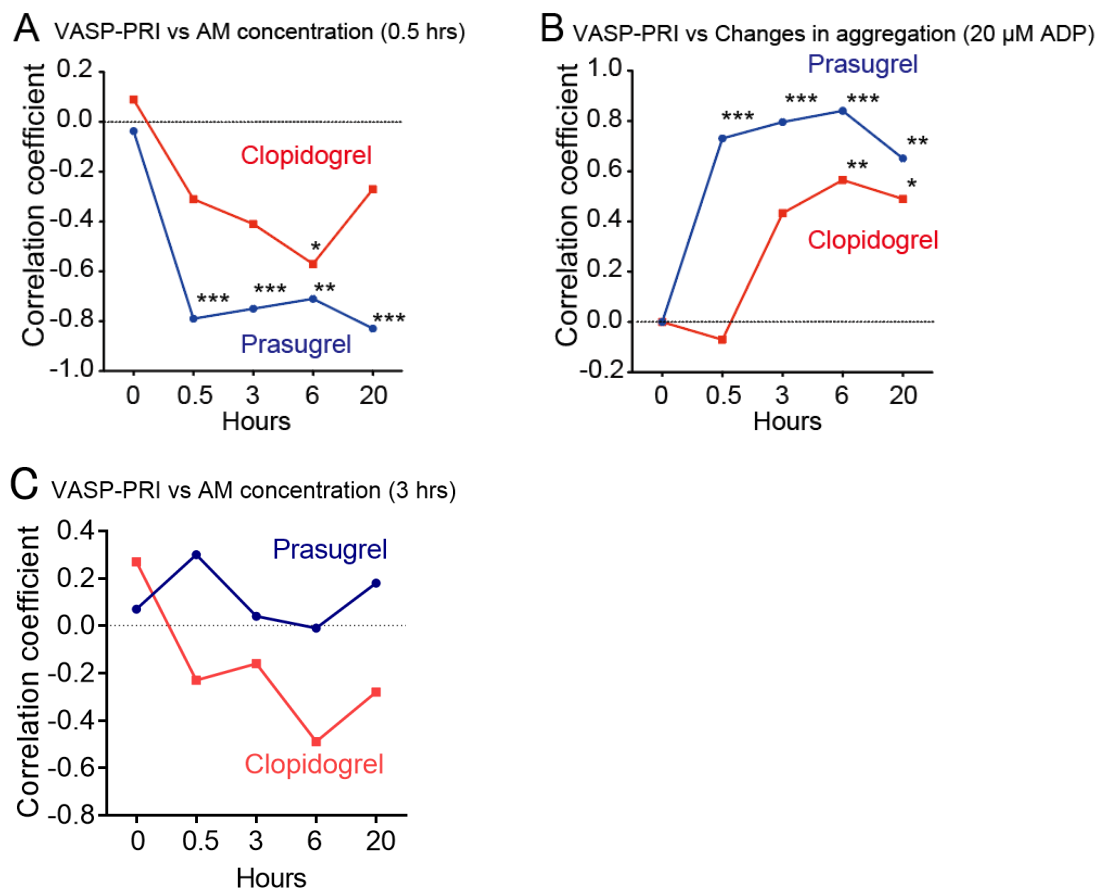


図 12 相関係数の経時的変化 (VASP-PRI vs 代謝産物濃度, VASP-PRI vs 凝集能)
 プラスグレル、またはクロピドグレル投与後に経時的に薬剤の活性代謝産物の測定、VASP-PRI、20 μM ADP 刺激による透過度法による凝集能を評価した。(A) 血中代謝産物濃度 (0.5 時間値) と VASP-PRI (各ポイント) の相関。(B) 各ポイントでの VASP-PRI と血小板凝集の変化率 (20 μM ADP) の相関。(C) 血中代謝産物濃度 (3 時間値) と VASP-PRI (各ポイント) の相関。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

次に、血小板凝集塊の大きさを粒子計測によって定量比較した。ADP 低濃度 (5 μ M) 刺激では、大凝集塊形成の抑制はプラスグレルとクロピドグレルでは同程度であった (図 13C) が、小凝集塊形成はプラスグレルでのみ著明に抑制された (図 13A)。ADP 高濃度 (20 μ M) 刺激で誘発された血小板凝集塊の形成は、クロピドグレルでは中凝集塊と小凝集塊がむしろ薬剤投与前よりも増加し (図 13D, E)、クロピドグレルの P2Y₁₂ 阻害が不完全であることが示唆された。

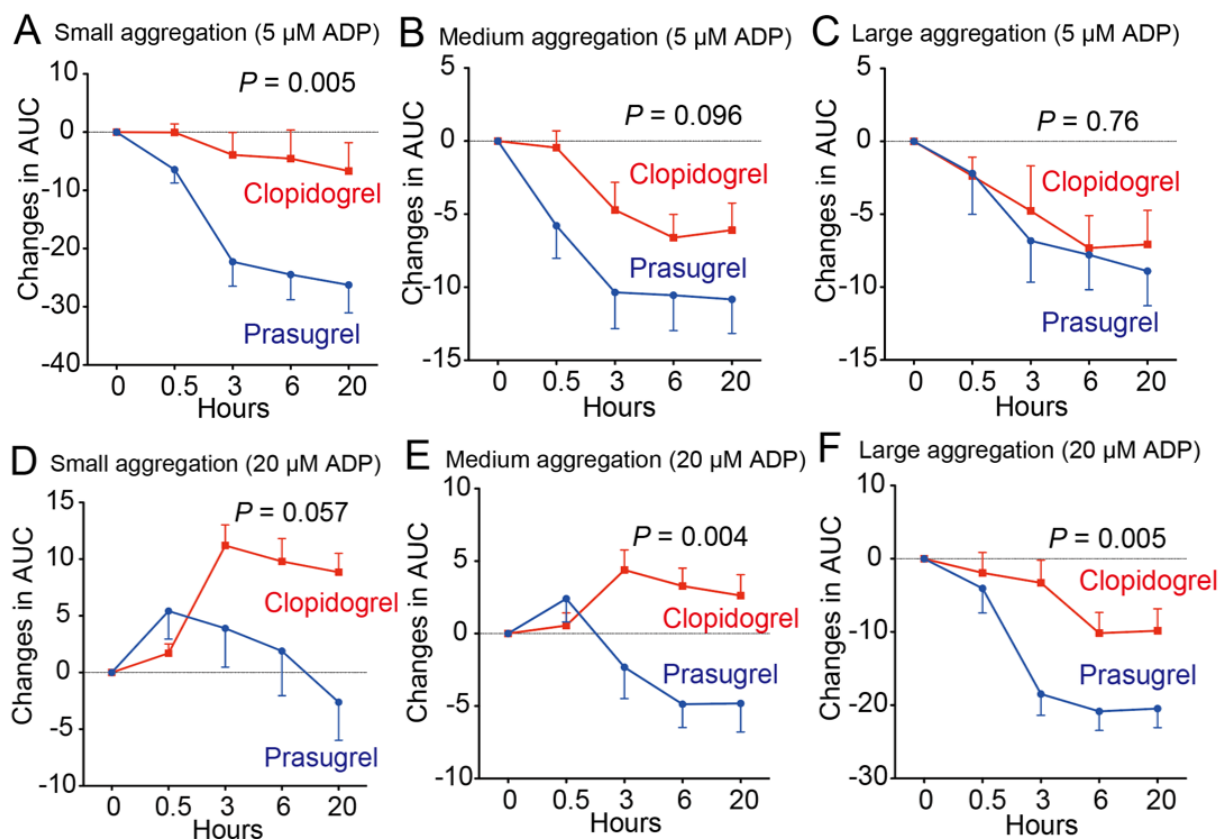


図 13 粒子計測法で評価した薬剤ローディング量投与後の血小板凝集塊の推移
 プラスグレル、またはクロピドグレル投与後の血小板凝集能 (5 μ M ADP: A, B, C; 20 μ M ADP: D, E, F) を粒子計測法で測定し、大凝集、中凝集、小凝集に分け、サイズ別凝集塊の曲線下面積 (AUC) をそれぞれ測定した。小凝集塊: A, D 中凝集塊: B, E 大凝集塊: C, F。値は平均値 \pm 標準誤差。経時的な変化の比較は反復測定による 1 元配置の分散分析を行った。

3) ローディング投与時の薬理効果を規定する因子

プラスグレルとクロピドグレル投与後の血小板反応性に影響を及ぼす因子を同定するために、患者背景や血液データなどの様々な因子と VASP-PRI の相関を分析した。その結果、プラスグレルでは糖尿病と代謝産物濃度が各ポイントでの VASP-PRI と有意な相関を認めた (表 2)。年齢、性別、BMI、脂質異常症、高血圧、睡眠呼吸障害、血小板数、プロトンポンプ阻害薬で補正して重回帰分析を行ったところ、糖尿病は VASP-PRI に影響を及ぼす独立した因子であった (VASP-PRI 3 hr; $R^2=0.93$, $P<0.001$, 6 hr; $R^2=0.92$, $P=0.001$, 20 hr; $R^2=0.86$, $P=0.006$)。一方、クロピドグレルでは糖尿病の影響は乏しく、睡眠呼吸障害のみが抗血小板作用と有意な関連を認めた (表 3)。

表 2 臨床指標と VASP-PRI(各ポイント)との相関関係：プラスグレル

臨床指標	相関係数				
	投与前	0.5 hr	3 hr	6 hr	20 hr
年齢, yrs	-0.28	-0.16	-0.33	-0.31	-0.27
男性	-0.29	-0.24	-0.13	-0.04	0.03
体重, kg	0.01	0.22	0.23	0.29	0.41
Body mass index, kg/m ²	-0.02	0.23	0.25	0.27	0.38
体表面積, m ²	-0.06	0.16	0.21	0.28	0.39
現在の喫煙	-0.02	0.32	0.14	0.26	0.20
飲酒	0.06	-0.06	-0.14	0.10	0.0
高血圧	0.38	0.20	0.28	0.38	0.30
脂質異常症	0.02	0.44	0.22	0.50*	0.37
糖尿病	0.14	0.62**	0.70***	0.64**	0.68***
eGFR, ml/min/1.73m ²	0.14	0.30	0.39	0.57*	0.44
血小板数, ×10 ³ /μL	0.43	0.24	0.52*	0.53*	0.39
プロトンポンプ阻害薬	-0.17	0.14	0.07	0.21	0.35
薬剤代謝産物濃度	-0.04	-0.79***	-0.75***	-0.71**	-0.83***
睡眠呼吸障害	0.15	-0.16	0.18	0.05	0.03

睡眠呼吸障害：ODI3%15 回以上. ODI = oxygen desaturation index

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

表 3 臨床指標と VASP-PRI(各ポイント)との相関関係：クロピドグレル

臨床指標	相関係数				
	投与前	0.5 hr	3 hr	6 hr	20 hr
年齢, yrs	0.14	-0.32	-0.18	-0.30	-0.13
男性	0.12	0.28	0.16	0.40	0.28
体重, kg	0.13	0.27	0.22	0.32	0.16
Body mass index, kg/m ²	0.26	0.19	0.13	0.26	0.08
体表面積, m ²	0.14	0.40	0.21	0.37	0.17
現在の喫煙	0.13	0.31	0.33	0.41	0.41
飲酒	0.02	0.36	0.22	0.38	0.1
高血圧	0.46*	0.30	0.16	0.01	0.09
脂質異常症	-0.17	-0.23	-0.12	-0.05	-0.11
糖尿病	-0.20	-0.17	-0.08	-0.12	-0.23
eGFR, ml/min/1.73m ²	-0.02	0.19	0.34	0.32	0.37
血小板数, ×10 ³ /μL	-0.08	-0.16	-0.10	-0.20	-0.29
プロトンポンプ阻害薬	0.06	0.25	0.17	0.27	0.24
薬剤代謝産物濃度	0.09	-0.31	-0.41	-0.57*	-0.27
睡眠呼吸障害	0.12	0.50*	0.48*	0.49*	0.44*

睡眠呼吸障害：ODI3%15 回以上。 ODI = oxygen desaturation index

* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

4)糖尿病、睡眠呼吸障害と抗血小板効果の関連

薬剤代謝と血小板凝集抑制への糖尿病の影響を調べるために、糖尿病患者と非糖尿病患者に分けて代謝産物、VASP-PRI、血小板凝集抑制（ADP 20 μM 刺激下）を比較した。糖尿病患者はプラスグレル群 8 名、クロピドグレル群 7 名であった。プラスグレルでは糖尿病患者で代謝産物の濃度が低下し（図 14A）、抗血小板作用の発現が遅く効果も減弱していた（図 14B,C）。一方でクロピドグ

レルではそのような傾向は認められなかった (図 14D,E,F)。次に、クロピドグレル群を睡眠呼吸障害の有無で分けて代謝産物、VASP-PRI、血小板凝集抑制 (ADP20 μ M 刺激下) を比較した。代謝産物濃度は有意な差はなかったが、睡眠呼吸障害を有する患者では抗血小板作用が減弱していた (図 15)。

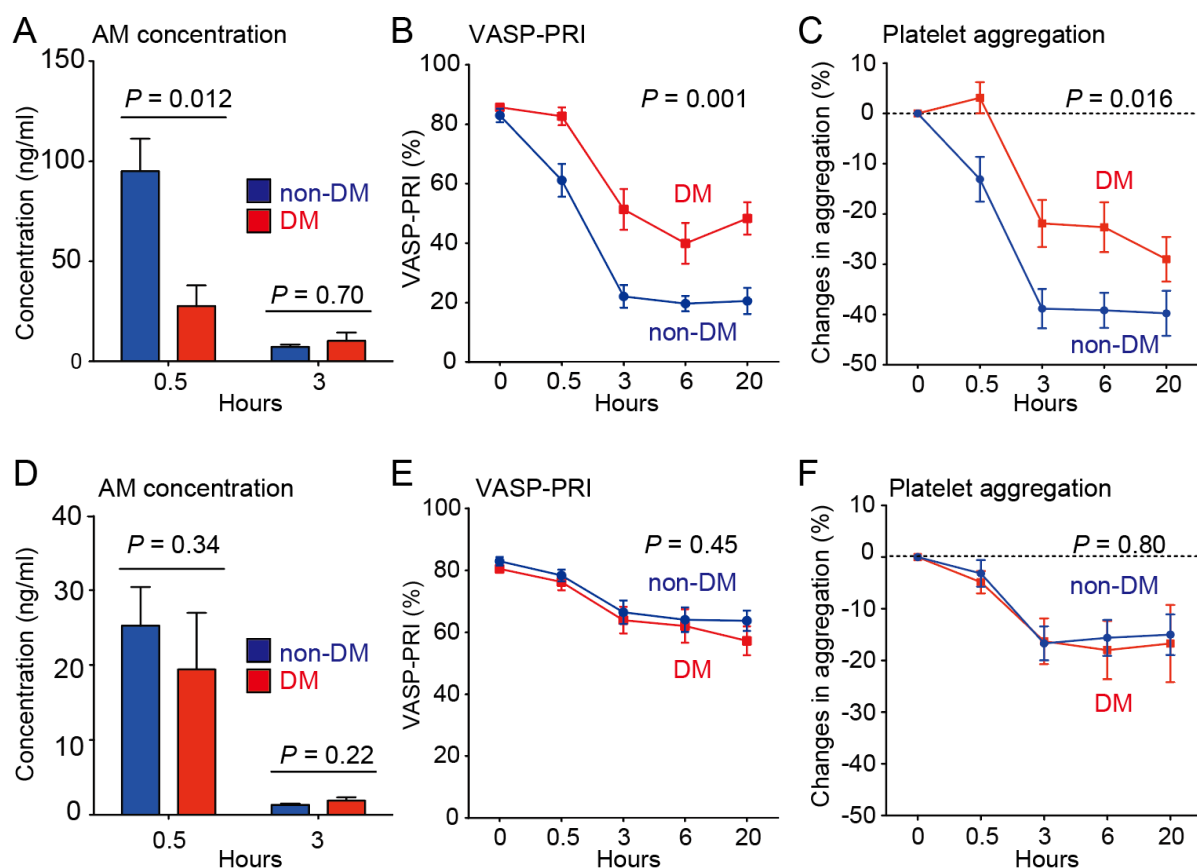


図 14 糖尿病の抗血小板作用への影響

プラスグレル (A, B, C)、またはクロピドグレル (D, E, F) 投与後に経時的に薬剤の活性代謝産物の測定 (A, D)、VASP-PRI (B, E)、20 μ M ADP 刺激による透過度法による凝集能 (C, F) を糖尿病 (DM)、非糖尿病 (non-DM) に分けて評価した。値は平均値 \pm 標準誤差。代謝産物濃度の有意差は Mann-Whitney の U 検定を、経時的な変化の比較は反復測定による 1 元配置の分散分析を行った。

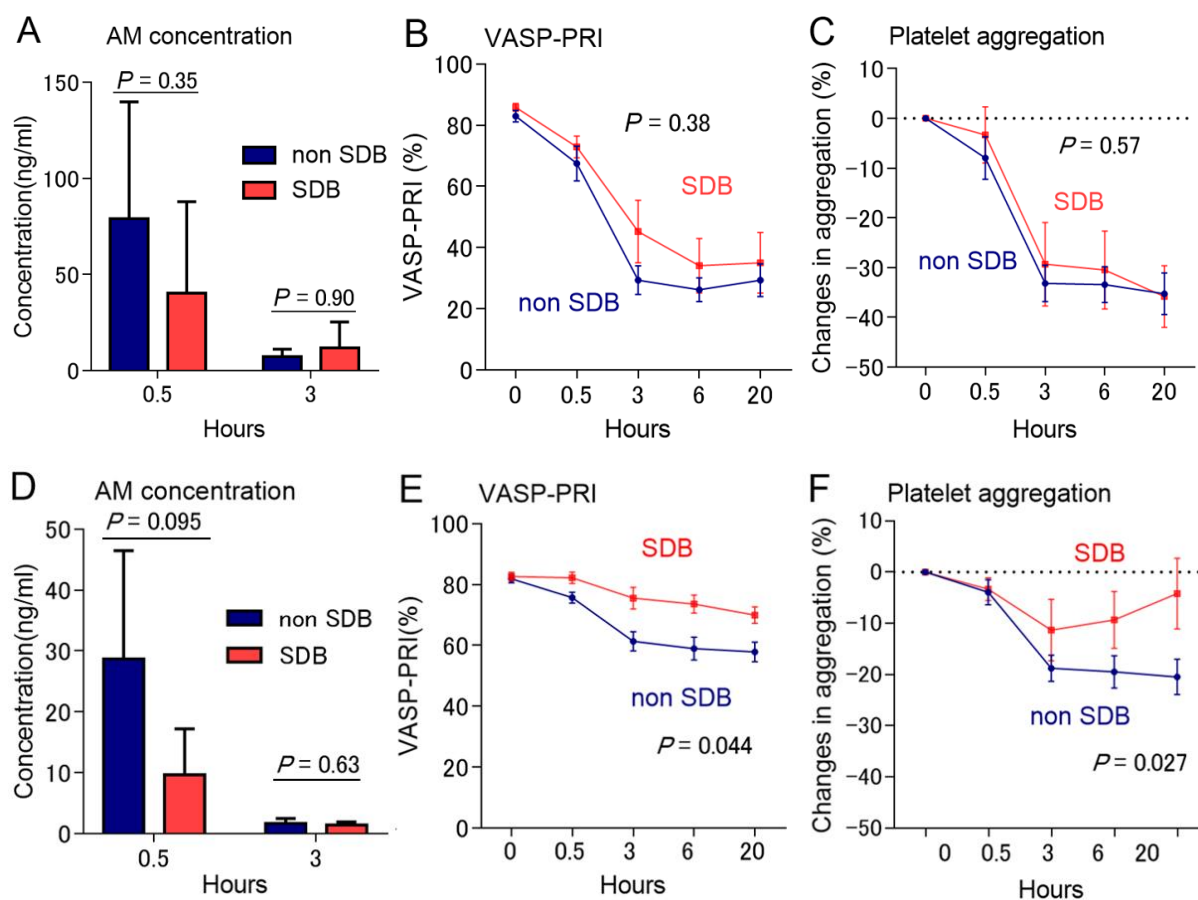


図 15 睡眠呼吸障害の抗血小板作用への影響

プラスグレル (A, B, C)、またはクロピドグレル (D, E, F) 投与後に経時的に薬剤の活性代謝産物の測定 (A, D)、VASP-PRI (B, E)、20 μ M ADP 刺激による透過度法による凝集能 (C, F) を睡眠呼吸障害 (SDB)、非睡眠呼吸障害 (non-SDB) に分けて評価した。値は平均値 \pm 標準誤差。代謝産物濃度の有意差は Mann-Whitney の U 検定を、経時的な変化の比較は反復測定による 1 元配置の分散分析を行った。

5) 維持量継続時の血小板反応性

退院後は初回外来で薬剤をスイッチし、同一患者において、プラスグレルとクロピドグレル両薬剤の効果と比較した。図 16 に個々の患者における両薬剤の VASP-PRI の結果を示す。6 症例（図 16 赤線）を除く 23 症例（図 16 黒線）でクロピドグレルよりもプラスグレルで VASP-PRI は低値であった（図 16）。

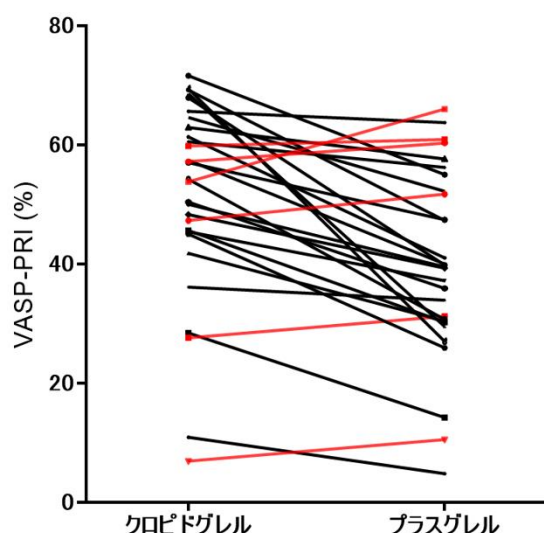


図 16 抗血小板薬維持量継続時の VASP-PRI の比較

維持量のプラスグレル（3.75 mg/日）、またはクロピドグレル（75 mg/日）を投与後 20-30 日後に採血し VASP-PRI を測定した。その後、他方の薬剤に変更し、投与後 20-30 日後に再度 VASP-PRI を測定した。同一患者におけるクロピドグレルとプラスグレル内服時の VASP-PRI 値の変化を直線で示した（n = 29）。

維持量の薬効に影響している因子を明らかにするために、ローディング投与時と同様に、VASP-PRI と各種臨床背景の関連を調査した。その結果、プラスグ

レル継続時の VASP-PRI は体表面積と高血圧で有意な相関を認めた (表 4)。クロピドグレル継続時の VASP-PRI はどの因子とも関連しなかった。単相関で有意差のあった体表面積と高血圧に加え、血小板凝集を亢進させると報告されている、糖尿病、脂質異常症、睡眠呼吸障害の 5 つを独立因子として重回帰分析を行った。先行研究と同様に、体表面積だけがプラスグレル維持量継続時の VASP-PRI と有意な関連を認めた (表 5)。高血圧と脂質異常症は有意な独立因子ではなかったものの薬効に影響する傾向を認めた。

VASP-PRI と体表面積の散布図を図 17 に示す。体表面積が増加するに従って VASP-PRI も上昇する傾向だが、体表面積が小さい ($<1.7 \text{ m}^2$) にも関わらず VASP-PRI が高値である症例も存在した (図 17A ▲)。それらは全例で高血圧と脂質異常症の両方を合併していた。また、VASP-PRI が 50% 以上である症例では 1 例を除いて高血圧と脂質異常症の両方を合併していた (合併率 88.9%)。一方で、VASP-PRI 50% 未満では両方の合併率は 25% と低く、体表面積 $<2.0 \text{ m}^2$ で高血圧と脂質異常症の合併が 1 つ以下の症例では、プラスグレルの効果不良例は 1 例も認めなかった。

次に、体表面積 $\geq 2.0 \text{ m}^2$ に高血圧と脂質異常症を加えた 3 つをリスク因子とし、リスク数別の VASP-PRI を比較した。プラスグレル群では、リスク数が

増えるに従って VASP-PRI は有意に高値であった（図 18）。クロピドグレルではこの関係は認められなかった。

表 4 維持量継続時の VASP-PRI と臨床指標との相関関係

臨床指標	プラスグレル	クロピドグレル
	相関係数	
体表面積, m ²	0.44*	0.07
現在の喫煙	0.28	-0.01
飲酒	0.09	0.22
高血圧	0.38*	0.23
脂質異常症	0.26	0.12
糖尿病	0.27	-0.15
血小板数, ×10 ³ /μL	0.16	0.24
プロトンポンプ阻害薬	0.21	0.08
睡眠呼吸障害	0.34	0.31
睡眠呼吸障害：ODI3%15 回以上. ODI = oxygen desaturation index *P<0.05		

表 5 プラスグレル維持量継続時の VASP-PRI と臨床指標との関係（重回帰分析）

臨床指標	B	P 値
体表面積, m ²	25.1	0.038
高血圧	14.0	0.053
脂質異常症	10.6	0.051
糖尿病	5.9	0.27
睡眠呼吸障害	2.6	0.66
睡眠呼吸障害：ODI3%15 回以上. ODI = oxygen desaturation index		
R ² = 0.46 F = 3.95 P = 0.01		

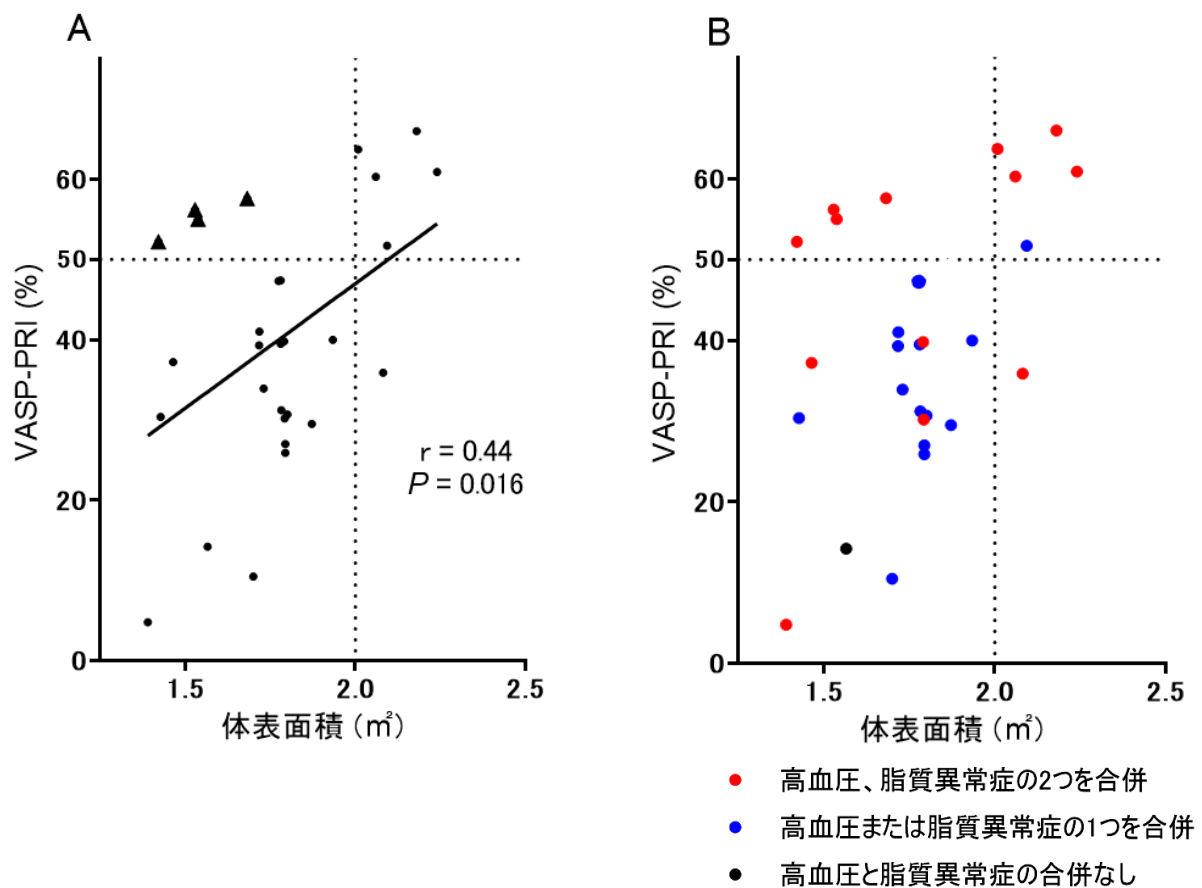


図 17 プラスグレル継続投与時の体表面積と VASP-PRI との関連

維持量のプラスグレル (3.75 mg/日)、またはクロピドグレル (75 mg/日) を投与後 20-30 日後に採血し VASP-PRI を測定した。その後、他方の薬剤に変更し、投与後 20-30 日後に再度 VASP-PRI を測定した。プラスグレル内服時の VASP-PRI 値と体表面積の相関を示した ($n = 29$)。(A) 相関図、(B) 同様の相関図を高血圧、高脂血症との合併の有無に分けて示した (赤、両者を合併 ; 青、1 つを合併 ; 黒、合併なし)。

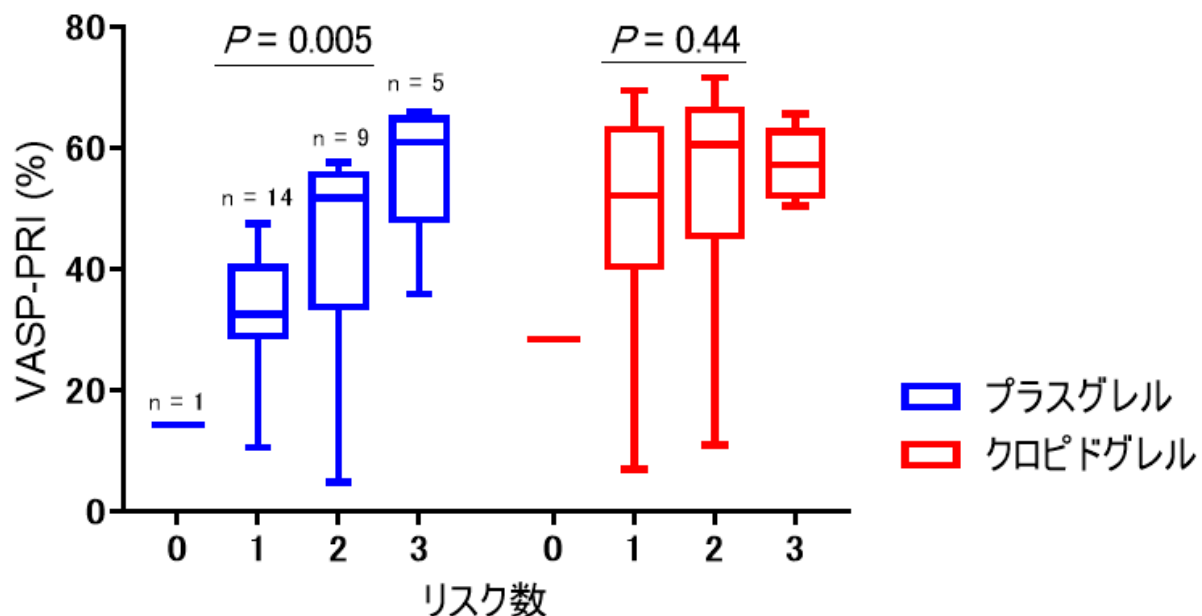


図 18 プラスゲレル、クロピドゲレル継続投与時の体表面積、高血圧、脂質異常症と VASP-PRI との関連

維持量のプラスゲレル (3.75 mg/日)、またはクロピドゲレル (75 mg/日) を投与後 20-30 日後に採血し VASP-PRI を測定した。その後、他方の薬剤に変更し、投与後 20-30 日後に再度 VASP-PRI を測定した。其々の薬剤内服時の VASP-PRI 値を、体表面積 ≥ 2.0 m²、高血圧、脂質異常症のリスク数に分けて解析を行った。値は平均値 \pm 標準偏差。群間の比較は 1 元配置の分散分析を行った。

6. 考察

多くのランダム化比較試験で、新規の P2Y₁₂ 阻害薬は PCI 後のイベント発症率を低下させた[11, 15, 24]。しかし、チエノピリジン系抗血小板薬は血栓イベントに影響すると同時に出血合併症にも影響する。したがって、チエノピリジンへ影響を及ぼす因子を同定し、抗血小板作用を予測できれば、より効果を高め、かつ副作用を軽減できる可能性がある。本研究では、糖尿病の存在がローディング量投与後のプラスグレル活性代謝産物の濃度を規定し、その薬効を遅延させることを見出した。さらに、クロピドグレルでは不完全な P2Y₁₂ 阻害により血小板大凝集塊抑制に伴う中凝集塊・小凝集塊の増加が認められたが、プラスグレルは全ての凝集塊形成を効果的に抑制した。プラスグレルを維持量で継続時には、体表面積が大きく高血圧と脂質異常症を合併しているとその抗血小板作用が不良となる可能性が示唆された。

本研究で見出した最も重要な点はプラスグレルとクロピドグレルでローディング投与時の糖尿病の影響が異なることである。この現象は、恐らく薬剤の代謝過程の差によるものと思われる。クロピドグレルは腸管で吸収されたのち、そのほとんどがエステラーゼにより不活性体に代謝される（図 19）。残りのわずか 15%のみが肝臓で 2 回の CYP による代謝を受けて活性化する。そのため、

CYP2C19 の機能喪失が代謝産物濃度へ強く影響する。一方で、プラスグレルは小腸のエステラーゼにより速やかに中間代謝物に代謝され、その後 1 回の CYP 代謝で活性体となる。以上より、糖尿病は CYP 代謝よりも腸管吸収に関与し、薬剤の効果を遅らせる可能性が考えられる。実際、多くの糖尿病患者では自律神経障害により胃排泄能が低下していると言われている[25]。最近、プラスグレルの粉碎投与が薬剤の吸収を速め、抗血小板作用も強くなると報告された[26]。糖尿病患者でかつ血栓リスクが非常に高い場合、そのような戦略がプラスグレル吸収遅延を克服し血栓性イベントを抑制する可能性がある。

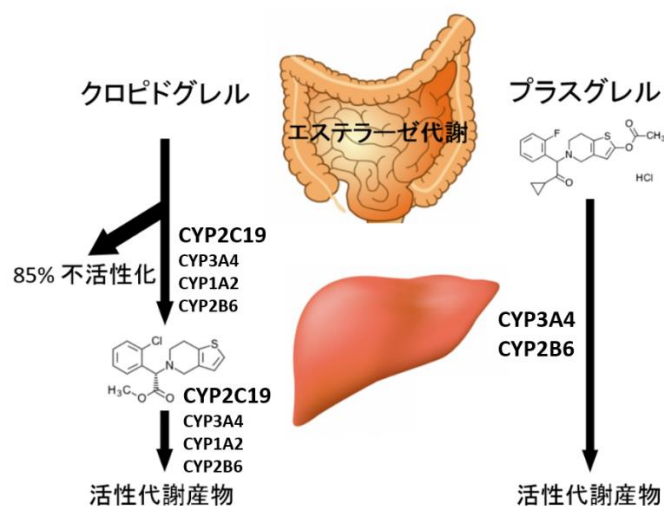


図 19 プラスグレルとクロピドグレルの代謝過程

次に、本研究では、チエノピリジン系抗血小板薬の P2Y₁₂ 阻害の程度により、凝集塊の形成過程に影響が生じることが明らかとなった。高濃度 ADP 刺

激下ではクロピドグレルの効果は不十分で、大凝集塊形成が抑制されると同時に中凝集塊と小凝集塊の形成は亢進した。血小板凝集には段階があり、小凝集塊の形成から中凝集、大凝集へと凝集塊の大きさの移行が認められるが、大凝集塊が形成されるとともに小凝集塊は減少していく[27]。チエノピリジン系抗血小板薬の標的である $P2Y_{12}$ は、フィブリノーゲンとの結合を介して血小板凝集を誘導する GP IIb/IIIa 活性化の維持に重要である[28]。不完全な $P2Y_{12}$ 阻害は大凝集塊の形成は抑制するものの、中凝集塊と小凝集塊は増加してしまうと予測される。クロピドグレルよりもプラスグレルがステント血栓症などの冠動脈イベントを減らしたひとつの理由として、この小凝集塊形成をも効果的に抑制することも関係するかもしれない。しかし、強力な $P2Y_{12}$ 阻害には出血合併症の危険があることを常に念頭に置かなければならない。遺伝的に $P2Y_{12}$ 変異のある患者では重篤な出血症状を引き起こすことが報告されており[29, 30]、完全な $P2Y_{12}$ 阻害は重篤な出血合併症を引き起こす危険性がある。このように、本機器を用いて ADP 刺激下での小・中・大凝集塊形成の割合を定量的に評価することは、チエノピリジン投与中の $P2Y_{12}$ 阻害の至適範囲を決める指標となる可能性がある。

既報では、プラスグレルは糖尿病の影響を受けないとされているが[31, 32]、本研究では、全く異なる結果となった。この理由として、本邦におけるプラスグ

レルの用量が少ないことが挙げられる。日本人で保険適応となる低用量で投与されたことにより、糖尿病患者での吸収障害を助長している可能性がある。本邦でプラスグレルの用量が少ないのにはいくつかの理由がある。上述の通り、日本人では頭蓋内出血を含む出血合併症が欧米人よりも多いこと[12]、血小板凝集抑制効果が強いこと[33]、低用量でも日本人を対象として、効果的な血小板凝集抑制が証明されたことなどである[13]。一方、クロピドグレルの薬効は糖尿病の影響を強く受けるという数多くの報告がある[17, 34]。しかし、本研究ではその関連は認められなかった。これは、CYP2C19 遺伝子多型の影響で日本人におけるクロピドグレル不応性の割合が多いため、糖尿病の影響がマスクされたためと考えられる。糖尿病との関連はなかったが、クロピドグレルのローディング投与後には、VASP-PRI と睡眠呼吸障害の存在が有意に関連していた。クロピドグレル代謝産物濃度と血小板反応性の関連が低かったことから、睡眠呼吸障害はP2Y₁₂を介さず、cAMP 代謝に影響を及ぼす別の経路により血小板凝集を亢進させている可能性がある。

ローディング投与とは異なり、維持量継続時には、プラスグレルでは体表面積と高血圧、脂質異常症が薬理作用に関与していることが示唆された。体表面積 $\geq 2.0 \text{ m}^2$ に高血圧、脂質異常症を含めた3つをリスク因子として解析した結果、リスク数が多いほど VASP-PRI は有意に高値であった。生活習慣病コントロール

不良群で、ステント血栓症を引き起こす割合が高いことを裏付ける結果とも考えられる。維持量投与時の VASP-PRI への糖尿病の影響は小さかったが、維持量はより少量の薬剤が持続的に使用されるため、糖尿病の薬剤吸収過程よりも、体重あたりの薬剤投与量がより重要になると思われる。

本研究では日本人用量の抗血小板薬の薬理作用に影響を及ぼす因子を解析した。プラスグレルは出血のリスクを除けばクロピドグレルよりも優れた抗血小板作用を有している。プラスグレルの効果については、他の薬剤と同様に一定の個人差が生じており、ローディング投与時には糖尿病の影響、維持量投与時には体表面積、高血圧、高脂血症の存在が、その効果減弱に関連した。これらの症例について、現行の少量投与でよいかどうか、今後の解析が必要である。また、今回は、薬剤の著効例に対しての解析は行わなかったが、プラスグレルが著効する症例に対しては、逆にクロピドグレルローディング投与やプラスグレル維持量の減量(2.5 mg)を検討する必要があるのかもしれない。

7. 研究の限界と今後の課題

本研究では、CYP2C19 遺伝子多型の解析は行っていない。そのため、クロピドグレルの薬効に糖尿病の影響がなかった理由として CYP2C19 遺伝子多型の関与を挙げたが、あくまで推測であり本研究結果からは明らかではない。同様に、睡眠呼吸障害がクロピドグレル投与後の血小板反応性に影響していたが、CYP2C19 遺伝子多型が不明である以上はそれが本当に睡眠呼吸障害だけによるものなのかは断言できない。

本研究は症例数が少ないうえに追跡期間が短く、主要な心血管イベントを発症した患者はいなかった。今後は今回の結果をもとに、本学附属病院循環器内科に入院した患者の抗血小板薬・影響因子と出血・血栓イベントの関連について後ろ向きに調査を行い、どのような場合にイベント(ステント血栓症、出血合併症)が多いのかを明らかにしたい。

8. 結論

プラスグレルはクロピドグレルよりも、ローディング量投与後は効率的に小凝集塊の形成をも抑制した。糖尿病がローディング量投与後のプラスグレル代謝産物濃度と血小板反応性を規定したが、クロピドグレルでは糖尿病の影響は認められなかった。一方で、睡眠呼吸障害がクロピドグレルローディング量投与後の血小板反応性に影響していた。維持量継続時は体表面積がプラスグレルに影響を及ぼす独立因子であった。体表面積の他に、高血圧と脂質異常症を合併していれば、プラスグレル維持量継続時の効果を減弱させることが示唆された。

8. 謝辞

本研究を施行するにあたり、学術論文指導教員の大森司教授および荏尾七臣教授より丁寧かつ熱心な御指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究に御協力頂いた医局の諸先生方・研究補助員の皆様および心臓カテテル検査室・病棟スタッフ・外来スタッフの皆様に心より御礼申し上げます。なお、本研究の一部は第一三共株式会社からの資金援助を受けて施行しました。

9. 参考文献

1. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO: **A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators.** *N Engl J Med.* **339**:1665-1671, 1998.
2. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK: **Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation.** *N Engl J Med.* **345**:494-502, 2001.
3. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ: **Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial.** *Jama.* **288**:2411-2420, 2002.
4. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A: **Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite.** *Drug Metab Dispos.* **38**:92-99, 2010.
5. Yamamoto K, Hokimoto S, Chitose T, Morita K, Ono T, Kaikita K, Tsujita K, Abe T, Deguchi M, Miyagawa H: **Impact of CYP2C19 polymorphism on residual platelet reactivity in patients with coronary heart disease during antiplatelet therapy.** *J Cardiol.* **57**:194-201, 2011.
6. Holmes MV, Perel P, Shah T, Hingorani AD, Casas JP: **CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis.** *JAMA.* **306**:2704-2714, 2011.
7. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS: **Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel.** *N Engl J Med.* **360**:354-362, 2009.
8. Stone GW, Witzenbichler B, Weisz G, Rinaldi MJ, Neumann FJ, Metzger DC, Henry TD, Cox DA, Duffy PL, Mazzaferri E: **Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study.** *Lancet.* **382**:614-623, 2013.
9. Rehmel JL, Eckstein JA, Farid NA, Heim JB, Kasper SC, Kurihara A, Wrighton SA, Ring BJ: **Interactions of two major metabolites of prasugrel, a thienopyridine antiplatelet agent, with the cytochromes P450.** *Drug Metab Dispos.* **34**:600-607, 2006.
10. Wallentin L, Varenhorst C, James S, Erlinge D, Braun OO, Jakubowski JA, Sugidachi A,

- Winters KJ, Siegbahn A: **Prasugrel achieves greater and faster P2Y₁₂receptor-mediated platelet inhibition than clopidogrel due to more efficient generation of its active metabolite in aspirin-treated patients with coronary artery disease.** *Eur Heart J.* **29**:21-30, 2008.
11. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, Neumann FJ, Ardissino D, De Servi S, Murphy SA: **Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes.** *N Engl J Med.* **357**:2001-2015, 2007.
 12. Mak KH, Bhatt DL, Shao M, Hankey GJ, Easton JD, Fox KA, Topol EJ: **Ethnic variation in adverse cardiovascular outcomes and bleeding complications in the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance (CHARISMA) study.** *Am Heart J.* **157**:658-665, 2009.
 13. Yokoi H, Kimura T, Isshiki T, Ogawa H, Ikeda Y: **Pharmacodynamic assessment of a novel P2Y₁₂ receptor antagonist in Japanese patients with coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention.** *Thromb Res.* **129**:623-628, 2012.
 14. Nakamura M, Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Ikeda Y, Saito S: **Optimal cutoff value of P2Y₁₂ reaction units to prevent major adverse cardiovascular events in the acute periprocedural period: post-hoc analysis of the randomized PRASFIT-ACS study.** *Int J Cardiol.* **182**:541-548, 2015.
 15. Saito S, Isshiki T, Kimura T, Ogawa H, Yokoi H, Nanto S, Takayama M, Kitagawa K, Nishikawa M, Miyazaki S, Nakamura M: **Efficacy and Safety of Adjusted-Dose Prasugrel Compared With Clopidogrel in Japanese Patients With Acute Coronary Syndrome.** *Circulation Journal.* **78**:1684-1692, 2014.
 16. Jakubowski JA, Angiolillo DJ, Zhou C, Small DS, Moser BA, Ten Berg JM, Brown PB, James S, Winters KJ, Erlinge D: **The influence of body size on the pharmacodynamic and pharmacokinetic response to clopidogrel and prasugrel: a retrospective analysis of the FEATHER study.** *Thromb Res.* **134**:552-557, 2014.
 17. Angiolillo DJ, Jakubowski JA, Ferreiro JL, Tello-Montoliu A, Rollini F, Franchi F, Ueno M, Darlington A, Desai B, Moser BA: **Impaired responsiveness to the platelet P2Y₁₂ receptor antagonist clopidogrel in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease.** *J Am Coll Cardiol.* **64**:1005-1014, 2014.
 18. Lip GY, Beevers DG: **Abnormalities of rheology and coagulation in hypertension.** *J Hum Hypertens.* **8**:693-702, 1994.
 19. van Willigen G, Gorter G, Akkerman JW: **LDLs increase the exposure of fibrinogen binding sites on platelets and secretion of dense granules.** *Arterioscler Thromb.* **14**:41-46, 1994.

20. Terada S, Koyama T, Watanabe H, Makabe S, Igarashi G, Seki K, Ito H: **Abnormal coagulation and platelet profile in patients with obstructive sleep apnea syndrome.** *Int J Cardiol.* **146**:423-425, 2011.
21. 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.* **218**:284-294, 1994.
22. Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M: **Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects.** *Thromb Haemost.* **82**:1145-1152, 1999.
23. Bonello L, Mancini J, Pansieri M, Maillard L, Rossi P, Collet F, Jouve B, Wittenberg O, Laine M, Michelet P: **Relationship between post-treatment platelet reactivity and ischemic and bleeding events at 1-year follow-up in patients receiving prasugrel.** *J Thromb Haemost.* **10**:1999-2005, 2012.
24. James S, Angiolillo DJ, Cornel JH, Erlinge D, Husted S, Kontny F, Maya J, Nicolau JC, Spinar J, Storey RF: **Ticagrelor vs. clopidogrel in patients with acute coronary syndromes and diabetes: a substudy from the PLATelet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial.** *Eur Heart J.* **31**:3006-3016, 2010.
25. Ordog T, Hayashi Y, Gibbons SJ: **Cellular pathogenesis of diabetic gastroenteropathy.** *Minerva Gastroenterol Dietol.* **55**:315-343, 2009.
26. Rollini F, Franchi F, Hu J, Kureti M, Aggarwal N, Durairaj A, Park Y, Seawell M, Cox-Alomar P, Zenni MM: **Crushed Prasugrel Tablets in Patients With STEMI Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention: The CRUSH Study.** *J Am Coll Cardiol.* **67**:1994-2004, 2016.
27. 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 upon light scattering.** *Thromb Res.* **81**:515-523, 1996.
28. Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: **Critical role of ADP interaction with P2Y₁₂ receptor in the maintenance of alpha(IIb)beta₃ activation: association with Rap1B activation.** *J Thromb Haemost.* **4**:1379-1387, 2006.
29. Lecchi A, Razzari C, Paoletta S, Dupuis A, Nakamura L, Ohlmann P, Gachet C, Jacobson KA, Zieger B, Cattaneo M: **Identification of a new dysfunctional platelet P2Y₁₂ receptor variant associated with bleeding diathesis.** *Blood.* **125**:1006-1013, 2015.
30. Lecchi A, Femia EA, Paoletta S, Dupuis A, Ohlmann P, Gachet C, Jacobson KA, Machura K, Podda GM, Zieger B, Cattaneo M: **Inherited dysfunctional platelet P2Y₁₂**

- receptor mutations associated with bleeding disorders. *Hamostaseologie*. **36**:279-283, 2016.
31. Wrishko RE, Ernest CS, 2nd, Small DS, Li YG, Weerakkody GJ, Riesmeyer JR, Macias WL, Rohatagi S, Salazar DE, Antman EM: **Population pharmacokinetic analyses to evaluate the influence of intrinsic and extrinsic factors on exposure of prasugrel active metabolite in TRITON-TIMI 38.** *J Clin Pharmacol*. **49**:984-998, 2009.
 32. Erlinge D, Varenhorst C, Braun OO, James S, Winters KJ, Jakubowski JA, Brandt JT, Sugidachi A, Siegbahn A, Wallentin L: **Patients with poor responsiveness to thienopyridine treatment or with diabetes have lower levels of circulating active metabolite, but their platelets respond normally to active metabolite added ex vivo.** *J Am Coll Cardiol*. **52**:1968-1977, 2008.
 33. Small DS, Kothare P, Yuen E, Lachno DR, Li YG, Winters KJ, Farid NA, Ni L, Jakubowski JA, Salazar DE: **The pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel in healthy Chinese, Japanese, and Korean subjects compared with healthy Caucasian subjects.** *Eur J Clin Pharmacol*. **66**:127-135, 2010.
 34. Sweeny JM, Angiolillo DJ, Franchi F, Rollini F, Waksman R, Raveendran G, Dangas G, Khan ND, Carlson GF, Zhao Y: **Impact of Diabetes Mellitus on the Pharmacodynamic Effects of Ticagrelor Versus Clopidogrel in Troponin-Negative Acute Coronary Syndrome Patients Undergoing Ad Hoc Percutaneous Coronary Intervention.** *J Am Heart Assoc*. **6**, 2017.