◆原 著◆

日本人健常成人男子における Ivy 法と シンプレート法による出血時間の比較検討

池田 康彦^{*1}, 近藤 一直^{*1}, 梅村 和夫^{*2}

抗血小板薬の開発において出血時間は抗血小板作用や出血傾向の評価に用いられてきたが、従来のシンプレート法は皮膚に対する侵襲が問題となっており、より侵襲の少ない Ivy 法での評価系の確立が必要である。そこで日本人健常成人男子を対象としてアセチルサリチル酸、塩酸チクロピジンの出血時間におよぼす影響をシンプレート法と Ivy 法を用いて検討した。アセチルサリチル酸、塩酸チクロピジンそれぞれ単独投与ではシンプレート法においてのみ出血時間が延長したが、併用投与では Ivy 法においても出血時間が有意に延長した。さらに血小板数の減少した患者における Ivy 法での出血時間の検討でも、明らかな延長が認められた。今回検討した Ivy 法は、データが比較的安定していて、皮膚への侵襲が少ないという特徴があり、シンプレート法に代わりうる検査法である可能性が示された。

Key words: bleeding time, Ivy, Simplate, acetylsalicylic acid, ticlopidine

緒 言

抗血小板薬の開発において出血時間測定は、抗血小板作用の評価や出血傾向の評価に用いられてきた。本邦の抗血小板薬の開発における出血時間の測定法としては、機械的に深さ 1mm、長さ 5mm に調節したメス（シンプレート[®]）で前腕に切創をつくるシンプレート法が主に用いられてきたが、癒痕を形成するという問題があり、欧米ではより侵襲の少ない細い針を使用して出血させる Ivy 法での評価が行われている。さらにシンプレート[®]の製造が中止されたことより、本邦においても Ivy 法での評価系の確立が必要となった。しかし、Ivy 法による出血時間測定は日本では行われておらず、日本人におけるデータがほとんどないのが現状である。我々は日本人健常成人男子 120 名を対象とし

て Ivy 法の基準値を検討し、さらに本法がシンプレート法と比較して術者間、被験者間のデータの変動が少ないことを報告してきた¹⁾が、抗血小板薬投与による出血時間への影響をこの 2 法にて比較検討していない。そこで日本人健常成人男子を対象として、アセチルサリチル酸、塩酸チクロピジンをそれぞれ単独あるいは併用投与し、出血時間におよぼす影響を Ivy 法およびシンプレート法にて比較検討した。さらに Ivy 法にて血小板数の低下を有する患者における出血時間を検討し、両方法の特徴について考察した。

研究対象、材料および方法

本試験は、浜松医科大学・医の倫理委員会の承認を得て行われた。対象は 20-40 歳の成人

^{*1}浜松医科大学医学部薬理学講座〔〒 431-3192 静岡県浜松市半田山一丁目 20 番 1 号〕

Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine [1-20-1 Handayama, Hamamatsu 431-3192 Japan]

^{*2}連絡先

梅村和夫：浜松医科大学医学部薬理学講座〔〒 431-3192 静岡県浜松市半田山一丁目 20 番 1 号〕

Tel: 053(435)2269 Fax: 053(435)2269 e-mail: umemura@hama-med.ac.jp

受付：2005 年 3 月 11 日 受理：2005 年 3 月 28 日

男子で、肝機能障害、腎機能障害、血液疾患、心血管系疾患、内分泌系疾患、消化器系疾患（特に消化性潰瘍）などの基礎疾患を有する者、並びにこれらの疾患の既往歴を有する者また事前診察で異常が認められた者は対象外とした。さらに試験開始1週間以内に薬物を使用した者、試験開始2時間以内に喫煙をした者も対象外とした。出血時間測定は Ivy 法、シンプレート法ともに同一の1人の術者が行った。

Ivy 法: 出血は糖尿病患者が血糖測定用に用いるペン型の穿刺補助器具 auto-Lancet™ II (Palco Laboratories, USA) にウルトラファインランセット 28G (Becton, Dickinson and Company, Ireland) を装着し 2.3mm の深さで穿刺することにより出血を惹起した。被験者の上腕に血圧計のマンシェットを巻いて 40mmHg の圧を保ち、30 秒後に auto-Lancet™ II にて前腕内側部の血管のない任意の部位 3 カ所に出血をおこした。ろ紙にてそれぞれ 15 秒毎に血液を吸い取り、血液斑が付着しなくなるまでの時間を測定し、その平均値を出血時間とした。

シンプレート法: Ivy 法とは反対側の上腕に血圧計のマンシェットを巻いて 40mmHg の圧を保ち、30 秒後に Simplate® R (BIOMERIEUX, USA) にて前腕内側部の血管のない任意の部位 1 カ所に出血をおこした。ろ紙にて 30 秒毎に血液を吸い取り、血液斑が 1mm 以下になった時点を出血時間とした。50 分経過しても止血しなかった場合には、その時点で出血時間の測定を終了した。

血小板凝集能測定: 3.8% クエン酸ナトリウム入りチューブにて静脈より 5ml 採血し、150G、10 分間遠心して多血小板血漿 (PRP) を調製し、血小板数を $3 \times 10^5 \text{ cells}/\mu\text{l}$ に調整した。凝集はアラキドン酸 1mM もしくは ADP5 μM にて惹起し、アグリゴメーター (HemaTracer, MC medical, Japan) にて血小板凝集能を測定した。

抗血小板薬の出血時間におよぼす影響

日本人健常成人男子 55 名を対象とした。

Study 1: 日本人健常成人男子 19 名を対象として、アセチルサリチル酸 330mg (バファリン 330mg 錠) 1 錠を 1 日 1 回 5 日間経口投与し、その前後で出血時間およびアラキドン酸 1mM による血小板凝集能を測定した。

Study 2: 日本人健常成人男子 18 名を対象として、塩酸チクロピジン 100mg (パナルジン® 錠) 1 錠を 1 日 2 回 5 日間経口投与前後で出血時間およびアラキドン酸 1mM, ADP5 μM による血小板凝集能を測定した。

Study 3: 日本人健常成人男子 18 名を対象として、アセチルサリチル酸 330mg 1 錠 1 日 1 回と塩酸チクロピジン 100mg 1 錠 1 日 2 回を 5 日間併用で経口投与し、その前後で出血時間およびアラキドン酸 1mM, ADP5 μM による血小板凝集能を測定した。

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。

薬物投与前後での比較は、Paired t-test を用い、 $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと判定した。血小板凝集能は最大凝集率で比較した。

血小板数の減少している患者における Ivy 法での出血時間の検討

表 1 に示す血小板数減少患者において、Ivy 法での出血時間を検討した。尚、患者 #a, c は感染の危険性を考慮して、出血は 1 カ所のみとした。

成 績

Study 1: アセチルサリチル酸の出血時間におよぼす影響

アセチルサリチル酸投与によりアラキドン酸凝集は薬物投与前値と比較して 86% 抑制され (図 1), シンプレート法での出血時間は 8.47 ± 5.47 分から 13.08 ± 7.05 分へと有意に延長

表 1

Patients#	Age	Sex	Disease	Bleeding time (min)	Platelet count (/μl)
a	80	M	Myelodysplastic syndrome	6.5	29,000
b	74	F	Myelodysplastic syndrome	5.2	81,000
c	62	F	Myelodysplastic syndrome	4.5	49,000

図 1 アセチルサリチル酸 330mg 投与による血小板凝集におよぼす影響

図 2 アセチルサリチル酸 330mg 投与による出血時間におよぼす影響

図3 塩酸クロピジン 200mg 投与による血小板凝集におよぼす影響

図4 塩酸クロピジン 200mg 投与による出血時間におよぼす影響

したが, Ivy 法による出血時間は有意な変化を示さなかった (図 2).

Study 2: 塩酸クロピジンの出血時間におよぼす影響

塩酸クロピジン投与により ADP 凝集は 30%, アラキドン酸凝集は 7% とともに有意に抑制され (図 3), シンプレート法での出血時間は 7.92 ± 4.69 分から 12.61 ± 10.49 分へと有意に延長したが, Ivy 法による出血時間は有意な変化を示さなかった (図 4).

Study 3: アセチルサリチル酸, 塩酸クロ

ピジン併用の出血時間におよぼす影響

併用投与により ADP 凝集は 31%, アラキドン酸凝集は 84% と有意に抑制された (図 5). シンプレート法での出血時間は 8.22 ± 3.27 分から 26.97 ± 15.46 分であり, Ivy 法では 2.06 ± 0.58 分から 3.18 ± 0.91 分と有意に延長した (図 6).

血小板数の減少している患者における Ivy 法での出血時間は表 1 に示すとおりであり, 今回の健常成人男子の薬物投与前の平均値である 1.88 ± 0.49 分 ($n=55$) と比較して明らかに延長

図5 アセチルサリチル酸 330mg, 塩酸チクロピジン 200mg 併用投与による血小板凝集におよぼす影響

図6 アセチルサリチル酸 330mg, 塩酸チクロピジン 200mg 併用投与による出血時間におよぼす影響

図7 血小板数の減少している患者および健康成人男子の薬物投与前における Ivy 法による出血時間値

していた (図 7)。

考 案

今回の Ivy 法の平均値は前述のとおり 1.88 ± 0.49 分 ($n=55$) であり, 過去に本法の基準値を検討した我々の報告 (1.93 ± 0.43 分, $n=116$)¹⁾ とほぼ同様な値を示したことから, 本法の再現性が示された。

今回の研究において, アセチルサリチル酸, 塩酸チクロピジンはそれぞれ血小板凝集を有意

に抑制する用量でシンプレート法においてのみ出血時間を延長させたが, 併用投与では Ivy 法でも出血時間を有意に延長させた. 延長の程度はシンプレート法の方が大きかった. さらに血小板数の少ない患者において Ivy 法による出血時間の著明な延長が確認されたことより, 本法は軽度の血小板機能抑制では延長しないが, 強力な血小板機能抑制ならびに病的な血小板数減少において初めて延長することが示唆された.

今回の試験で抗血小板薬の併用投与によって 18 名中 2 名の被験者がシンプレート法で 50 分を超える出血時間を示した. アセチルサリチル酸と塩酸チクロピジンの併用投与は脳梗塞の再発予防のための抗血小板療法として行われており, これら 2 名の被験者が出血傾向を有する危険な状態に陥ったとは考えにくい. よってシンプレート法による出血時間がたとえ 50 分を超えても, それは危険な状態を意味するものではない. シンプレート法は軽度の血小板機能抑制を検出するという感度の点では優れているが, 健常者でも抗血小板薬によって極度に出血時間が延長してしまうという特徴があるのに対し, Ivy 法は強力な血小板機能抑制ならびに病的な血小板数減少において初めて有意に延長するという異なった特徴がある. それぞれの方法は一長一短があるが, 今回の検討によって Ivy 法がシンプレート法に代わりうる検査法である可能性が示された.

出血時間に影響をおよぼす因子として, 血小板数, 血小板機能, 毛細血管機能および凝固,

線溶系などが考えられるが, 一次止血に関与する血小板の数と機能が特に重要な因子と考えられている²⁾. 今回の研究では血小板数 $10^5/\mu\text{l}$ 以下の患者における Ivy 法での出血時間を検討し, 結果は 4.5 ~ 6.5 分であった. 患者はいずれも通常の生活を行っている外来患者であり, この程度の延長であれば出血のリスクは低いと思われる.

今回はそれぞれの出血器具による皮膚への侵襲に対する科学的な検討は行わなかったが, Ivy 法は 28G の細い針で 2.3mm の深さで穿刺しマッチ棒の頭程度の出血を惹起するのに対し, シンプレート法は深さ 1mm 長さ 5mm にわたって切開するため, Ivy 法の出血量の少なさや出血時間の短さ, ならびに皮膚への侵襲の少なさは一から明らかである.

今回検討した Ivy 法は, データが比較的安定していて, 皮膚への侵襲が少ないという特徴があり, シンプレート法に代わりうる検査法である可能性が示された.

謝辞: Ivy 法の技術導入にご協力していただきました Pharma Bio-Research 社 (オランダ王国) に感謝いたします.

文 献

- 1) 池田康彦, 近藤一直, 梅村和夫: 日本人健康成人男子における Ivy 法の基準値の検討. 臨床病理 **53**: 275-278, 2005
- 2) Deykin D: Emerging concepts of platelet function. N Eng J Med **290**: 144-151, 1974.

Comparative study of bleeding time evaluation: Ivy and Simplate method in Japanese healthy subjects

Yasuhiko IKEDA, Kazunao KONDO, Kazuo UMEMURA

Key words: bleeding time, Ivy, Simplate, acetylsalicylic acid, ticlopidine

The bleeding time method has been used to evaluate the antihemostatic effect and to predict bleeding complications, if any, in relation to the newly developing antiplatelet drugs. Although the Simplate bleeding time method has mostly been used for this purpose in our country, scar formation in the skin has caused a serious problem accompanying this method. As has widely been attempted in Europe and the United States, the Ivy method using a thin taper needle seems to be a less aggressive method and thus to be evaluated in our country as well. In this study, we examined the effects of antiplatelet drugs, i.e., acetylsalicylic acid, ticlopidine or a combination of both on the two bleeding time methods in 20 to 40-year-old 55 healthy males. Namely, 330 mg of acetylsalicylic acid, 200 mg of ticlopidine, or a combination of both was given daily over a period of 5 days to 19, 18 and 18 male subjects, respectively, and the bleeding time was measured by the two methods in each subject, and the results were compared. Although administration of acetylsalicylic acid alone or ticlopidine alone gave longer bleeding times only in the Simplate method, combined administration of the two drugs significantly prolonged the bleeding times measured by both methods. Furthermore, substantial prolongation of the bleeding time by the Ivy method was observed in thrombocytopenic patients. We thus propose that the Simplate method can be replaced by the Ivy method that is much less aggressive to the patients.