◆特集：血栓・止血検査の最前線 総説◆

血小板機能で血栓を切る：血栓症の診断, 抗血小板療法のモニタリングに血小板機能測定は有用か？

尾崎 由基男*

尾崎由基男

Are platelet function tests useful for the diagnosis of thrombosis and monitoring of anti-platelet agents?

Yukio OZAKI*

1977年3月 東京大学医学部医学科卒業
1998年4月 山梨大学大学院医学工学総合研究部 臨床検査医学教授
現在に至る

Key words: platelet function tests, activated platelet, anti-platelet agents, monitoring, thrombosis

はじめに

血小板は心筋梗塞、脳梗塞などの動脈血栓症の病態と深く関与することが示唆されている。そのみでなく、これらの血栓症の発生の基盤となるアテローム性動脈硬化症の進展に血小板が大きな役割を果たすことが、多くの研究により明らかになってきた^{1)~4)}。血栓形成性疾患においては、生体内において血小板が活性化されやすい状態になっていると考えられており、実際に血小板機能が亢進している症例では血管イベントの発症が多いとの報告が増えている^{5)~7)}。血栓症の発症における血小板機能の関与を裏付けるように、これまでに多くの大規模臨床試験により抗血小板剤の有効性が示されている。例えば Antithrombotic Trialists' Collaboration において約 20 万例のメタアナリシスが行われ、アスピリン、チクロピジン、ジピリダモールなどの抗血小板薬が脳梗塞、TIA に有意な治療効果をもつことが認められた。これまでに蓄積された多くの evidence から得られる結論としては、脳梗塞や血管死などの発症は抗血小板療法で約

25%減少することである⁸⁾。

このように血栓症発症における血小板機能の役割が明らかであるなら、血栓症を発症しやすい個人の特定、また抗血小板療法のモニタリングに血小板機能測定が行われてよい。しかし、日本のみでなく世界各国でも血栓症発症傾向の診断、抗血小板療法の評価に広く血小板機能検査が行われているとは言いがたい。血小板機能測定に熱心な一部の施設では行われているが、ほとんどの施設では抗血小板剤の投与は血小板機能測定なしに決定されていると思われる。血小板機能測定があまり行われない原因として、いくつかの原因が挙げられるが、本稿ではこれらの問題点について検討を加える。

問題点として、次のような項目が考えられる。

1. 血栓症において血小板機能亢進、血小板活性化状態が存在するのか、また存在するとしたら、それは現時点までに開発されている方法で評価可能なのか？
2. 血栓症、血栓形成傾向は血小板機能で評価可能なのか？

*山梨大学大学院医学工学総合研究部医学学域 臨床検査医学講座 [〒 409-3898 山梨県中央市下河東 1110]
Department of Clinical and Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi [1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409-3898, Japan]
Tel: 055-273-6770 Fax: 055-273-6924 e-mail: yozaki@yamanashi.ac.jp

表1 血小板機能亢進状態の評価法

評価法	検体	利点と欠点
光透過法 血小板凝集能	多血小板血漿 (PRP)	多くの施設に整備 検体作成に時間がかかる
インピーダンス法 血小板凝集能	全血	簡便だが、サンプル量が多い 感度がやや悪い
散乱光法 血小板凝集能	PRP	感度がよい 機器がやや高価
Cone-plate 法 血小板凝集能	PRP	高シアによる血小板活性を評価 操作に熟練を要する
PFA-100 血小板凝集計	全血	簡便、シアと刺激剤の相加効果を評価 一検体毎に使用するカセットがやや高価

図1 血小板活性化状態の評価

3. 抗血小板療法にモニタリングは必要か？
以上の点について順次検討したい。

1. 血栓症において血小板機能亢進，血小板活性化状態が存在するのか，また存在するとしたら，それは現時点までに開発されている方法で評価可能なのか？

まず本稿における血小板機能亢進状態，血小板活性化状態の定義をしたい。この二つの状態は同時に存在することが多く，同義に使われることがあるが，実際には異なる場合もある。血小板機能亢進状態は患者より採取した血小板に対して血小板活性化物質を加えると，より低濃

度で血小板の活性化状態が惹起される，または血小板活性化の程度が正常より増強している場合である。通常，血小板凝集能を *ex vivo* で測定することにより判定する（表1）。血小板活性化状態とは患者の体内で血小板がすでに活性化を受けている状態であり，血小板膜抗原の変化，血小板顆粒からの放出物，血小板代謝産物等で評価する。血小板機能亢進状態の評価のように体外に取り出した血小板を血小板活性化物質で刺激することはしない（図1に血小板活性化状態の評価法を示す）。血小板機能亢進状態と血小板活性化状態は必ずしも同じではなく，体内で活性化された血小板は疲弊して，体

外に取り出して血小板活性化物質を加えても反応が低下している場合もある．ectoADPase 欠損マウスの血小板は体内でADP刺激を受けているため，体外に取り出して血小板凝集能を測定すると，ADP凝集が欠如，または低下しているのが良い例と言える⁹⁾．

血小板機能亢進状態は種々の血栓性疾患で評価されてきたが，その存在を肯定する報告^{5)-7) 10)-16)}，また反対に個人差，日間変動が大きすぎるなどの要因で評価するのは困難であるとの報告があった^{17) 18)}．また測定法に問題があるのであり，感度やシアの条件を変えると血小板機能亢進状態の評価が出来るとの提案もある．例えば，これまでに広範に使われていた吸光度法による血小板凝集能測定計は小さい血小板凝集塊を検出する感度が悪く，患者における軽度の血小板機能亢進状態を検出できないが^{19) 20)}，より感度の良い散乱光を用いた血小板凝集能測定計では血小板機能亢進状態を的確に評価できるとの報告されている²¹⁾⁻²³⁾．また従来法の凝集計のように低シアストレス状態での測定では血小板機能亢進を判定し難いが，高シアストレス下の血小板凝集能を測定すると血栓症患者で血小板機能亢進状態が検出できるなどの報告もある²⁴⁾⁻²⁶⁾．一方，最近多数の症例に対して，複数の血小板機能測定を用い解析したところ（吸光度法血小板凝集能，cone-plateによるシア凝集，PFA-100等）確かに血小板機能亢進状態が存在する患者がおり，それはどの血小板機能測定法を用いても評価可能であるとの報告がなされた^{27) 28)}．また欧米で広く使われ，国際血栓止血学会においても測定法のワーキンググループができているPFA-100（ずり応力による血小板活性化とアゴニスト刺激の両者による凝集能を評価する測定計）は全血を用いる操作は簡便な血小板機能測定法であり，血小板機能低下検出には適当であるが，感度の点から血小板機能亢進には不適とされていた²⁹⁾⁻³¹⁾．しかし，最近多数の症例の解析により，この装置で血栓形成性疾患における血小板機能亢進を評

価できるとの報告がなされた^{32) 33)}．PFA-100を用いた血小板機能亢進検出はまだ限られた施設に限られており，やや疑問も残る．私見であるが，どの血小板機能測定法を用いても，一定の手順にそって測定を行えば，少なくとも一部の血栓性疾患症例において有意に血小板機能亢進の存在を示すことが出来ると思われる．ただ，当然ながら，感度の良い方法を使えば，より多くの症例で血小板機能亢進状態を検出できる可能性が高まるであろう．PFA-100は現在広く欧米で使用されており，当然この装置を用いた報告が多いが，血小板機能亢進状態を評価するために適当な装置かどうかの結論はまだ得られていない．血小板機能亢進状態の評価がより広く臨床で使われるためには，恐らくこれまでに開発された装置のみでは十分でなく，より簡便な，感度良く血小板機能亢進状態を検出できる測定方法の開発が必要であろう．

体内での血小板活性化状態を評価する方法として，以前よく測定されていたの項目は，血小板第4因子（platelet factor 4; PF4）及び β トロンボグロブリン（ β thromboglobulin; β TG）であった．両者とも血小板 α 顆粒中にあるサイトカインであり，血小板活性化に伴い血小板外に放出される．血中のPF4や β TGはELISA法によって鋭敏に測定できるが，採血時の血小板の活性化を防ぐことが大きな問題点として存在する．駆血帯の使用，注射針の太さなどの採血法，採血管の種類等でも測定値がかなり変化するため，標準化が困難であり，現在はあまり測定されないようになった．血小板放出反応に伴う血小板活性化を評価するより良い方法として，最近ではflow cytometer（FACS）を用いたp-selectin（CD62P）やCD63の測定が用いられている．CD62Pは α 顆粒膜，CD63はライソゾーム膜に存在しており，静止時には外表の血小板膜には存在しない．血小板放出反応に伴い，血小板膜と顆粒の膜が融合し，CD62PやCD63が外側に表出する．これをそれぞれの抗体を用いてFACSで測定する³⁴⁾．この方法は

血小板活性化を鋭敏に検出でき、また前述の PF4, β TG 測定よりデータのばらつきが少ない。特に CD62P については基礎的検討、臨床症例の検討が数多くなされており、動脈硬化病変を基盤とする血栓性疾患等で有意に血小板活性化状態が存在することが報告されている³⁵⁾⁻³⁸⁾。ただ、測定法の統一化、標準化が進んでおらず、まだ基準値の設定が行われていないのが残念である。FACS を用いた血小板活性化のもう一つの示標として、フィブリノーゲン受容体である $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) の活性化状態をその特異抗体である PAC-1、またはフィブリノーゲン結合を用いて検出する方法がある。これらの方法も CD62P と同様鋭敏に体内での血小板活性化状態を検出できるが、標準化はされていない。

血小板が活性化されると血小板膜の一部がちぎれ、microparticle (platelet-derived microparticle, PDMP) が産生される。PDMP には procoagulant 活性を示す蛋白が多く、PDMP の産生に伴う総表面積の増大により血小板による凝固促進作用が増強されると考えられている³⁹⁾。PDMP は FACS を用いて測定されることが普通だが、日本では ELISA 測定キットも開発されている^{4) 40)}。PDMP 数は多くの血栓形成性疾患で増加することが明らかになっており^{42) 43)}、現在標準的な測定のプロトコールに従い検体作成をする多施設研究が行われている。

以上述べたように血栓性疾患において、血小板機能亢進状態または血小板活性化状態はこれまでに開発された方法を用いて検出可能と考えられる。すなわち血小板活性化状態の評価は FACS による CD62P 等の測定、PDMP 等の測定で感度は十分であろう。これらの方法による血小板活性化状態の評価は標準化されれば臨床上の有用性は高く、国際的な機関による早期の標準化が望まれる。血小板機能亢進状態の評価にはより鋭敏な装置の開発が望ましいが、現在広く用いられている吸光度法血小板凝集能でも少なくとも一部の症例は検出可能である。

2. 血栓症、血栓形成傾向は血小板機能で評価可能なのか？

前述のように血栓形成性疾患において、有意に血小板機能亢進状態や血小板活性化状態が認められるとの報告が多い^{5)-7) 10)-16) 19)-26) 32) 33)}。それでは、血栓症や血栓形成傾向が血小板機能測定で評価可能であろうか？これまでに多くの報告が種々の血小板機能評価法を使いながら、賛否両論あるものの、肯定する論文のほうが多いようである。血小板機能亢進状態の面からは、従来から使用されている吸光度法血小板凝集能、また最近欧米で広く使われるようになった PFA-100 でも、血栓症、血栓形成傾向が予期出来るとの報告がある³²⁾。また体内における血小板活性化状態を評価できる CD62P や PDMP も血栓症、血栓形成傾向の存在判定に有用との報告が多い^{35)-38) 42) 43)}。しかしながら、これらの報告は統計学的な有意差をもって血小板機能が異なることを示しているものであり、血小板機能測定値が overlap している症例が多い。(複数の評価法を比較した報告はまだないが、血小板活性化状態の評価のほうで、overlap が少ない傾向と思われる) よってグループとしての予知はある程度できても、ある特定の症例において血小板機能を測定し、血栓が存在する、または将来的に血栓が形成されることを判定することは実際には困難なことが多い。しかし、このことは血小板機能測定の意義を否定するものではない。残念ながら、まだ prospective study の evidence に欠けるが、明らかに血小板機能亢進状態または血小板活性化状態を示す場合は、血栓症、血栓形成傾向の存在が十分疑われる。これらの片方でも異常であれば、抗血小板剤の投与を考慮するのが良いと思われる。

それではこれまでに解説した血小板機能亢進や血小板活性化状態が認められない場合、抗血小板療法は不要なのであろうか？血栓形成は血小板機能のみでなく、血管内皮細胞機能、凝固

因子，線溶系，またこれらに影響を与える糖尿病や高脂血症等に存在する代謝因子が複合的に関連して起きるものである。血小板機能自身に問題がなくとも，他の何れかの因子に異常があれば，結果として血栓形成傾向が認められることが起きうる。しかし，血小板は血栓形成過程における重要なプレーヤーであり，いずれにしても血小板機能を抑制すれば，最終的に血栓形成傾向が弱まると推測できる。すなわち，血栓形成傾向が認められる，またはいくつかのリスクファクターの存在により血栓形成傾向が予測される場合，抗血小板療法により血栓形成抑制効果が十分に期待できる。よって血小板機能検査で異常がなくとも，抗血小板剤の投与が臨床的に有用であり，正当化される場合は多いと思われる。

3. 抗血小板療法のモニタリング

前述したように血小板機能亢進状態，生体における血小板活性化状態が存在する場合はこれらを示標にして，抗血小板療法のモニタリングが可能であろう。しかし，血小板機能亢進状態，血小板活性化状態が確認できる場合のみならず，血小板機能が正常な場合でも血栓形成傾向をもたらすリスクファクターがある場合，抗血小板療法は有用である可能性が大きい。それではこのような場合でもモニタリングは必要なのであろうか？血小板機能に異常があってもなくても抗血小板剤を投与するなら，血小板機能を用いたモニタリングは必要ないとの議論も成り立つ。実際，現在ほとんどの施設において抗血小板剤は血小板機能測定なしに投与されている。しかし筆者は抗血小板剤投与時には血小板機能測定を使ったモニタリングが望ましいとの立場を取るものである。

近年抗血小板剤として最も頻用されているアスピリンに対する不応性が注目を浴びている⁴⁴⁾。また thienopyridine 耐性の報告も相次いでなされている⁴⁵⁾。アスピリン耐性のメカニズ

ムはまだ不明であるが，COX-Iがアスピリンにより阻害されない状態というわけではなく，COX-I非依存性血小板機能亢進状態やアスピリンの吸収等にも原因があるらしい⁴⁶⁾⁴⁷⁾。アスピリン耐性の患者はアスピリン感受性の患者と比較して，血栓症の発症率が高いことが報告されている。アスピリン抵抗性の評価法がまだ定まっていない問題点はあるが⁴⁸⁾，いずれにせよアスピリン抵抗性が疑われる患者に対しては他の薬剤を付け加えるか，他の薬剤に切り替えるべきであろう。アスピリンに限らず，ほとんどすべての薬剤に対して反応性の個人差が存在することが知られており，抗血小板剤を漫然と投与するのではなく，血小板機能を測定し，その薬剤により血小板機能抑制が認められない患者には他の機序の抗血小板剤を投与することが必要であろう。

またモニタリングのもう一つの利点としてはコンプライアンスが評価できることである。特に長期投与が必要な抗血小板薬はコンプライアンスを確かめることが薬効の正確な評価に繋がると思われ，そのためには血小板機能検査が必要である。消化器症状と関連するかどうかは不明であるが，実際アスピリンのコンプライアンス不良は頻度が高いことが知られている⁴⁹⁾。

抗血小板剤投与時のモニタリングとして血小板機能測定があまり行われない原因として，いくつかの問題点が存在すると思われるが，最も大きな要因の一つは，これまでに行われてきた血小板機能測定の臨床上的評価が低いことではないであろうか？血小板機能測定の再現性，バラツキの大きさ，また抗血小板剤投与と血小板機能抑制との相関が小さいなどの批判がこれまでにあった。

血小板機能は確かに個人差が大きく，健常人における基準値，病的な範囲を設定することは困難である。しかし，血小板凝集能測定をルーチンとして行っている施設では周知のことであるが，血小板凝集能測定は，一定の手技を用いて，採血時間，測定までの時間などを守ること

により一個人についてはよい再現性を持つデータを得ることができる検査である。血小板凝集能測定を統一されたマニュアル通り（採血法、遠心条件、採血後より測定時までの経過時間、保存状態、刺激剤等の統一化など）に従うなど標準化に努めれば、従来の吸光度法血小板凝集能測定法でも十分に基準値が設定できうる臨床検査として、採用可能と考える。現時点で最も普及している血小板機能評価法は吸光度法を用いた血小板凝集能測定計であり、日本に多施設における標準化を行うとすれば、この方法を使用するのがベストであろう。臨床化学でも標準化を推進するためには標準物質、測定法の共有化などが必要とされている。血小板凝集能測定においても、測定法のプロトコルを定め、血小板活性化物質も同じもの（物質が同じという意味でなく、同じところで作成されたロットが同じもの）を用いることが肝要と思われる。国際血栓止血学会学術標準化委員会も最近この問題に対応すべくワークショップの開始を決定した。

基準値の設定範囲がかなり広いことは血小板凝集能等の血小板機能測定を臨床検査に用いるに於ける欠点と思われるが、プロラクチン等内分泌の検査などもかなり基準値は広いが十分に臨床検査項目として使用されている。特に血小板凝集能を抗血小板剤のモニタリングに使用する場合は使用前後の比較が出来ればよいのであり、基準値の範囲は問題にならない。血小板機能測定の再現性さえ担保されれば、十分に臨床の有用性が期待できる。

また、一つの方法ですべての薬剤のモニタリングが可能かどうかの検証も必要である。体内での血小板活性化のメカニズムが多様であると同様、種々の血小板機能検査においてその評価できる血小板活性化メカニズムが異なる。よって一つの血小板機能測定法で、複数の抗血小板剤の薬効を適切に評価するのは困難であると思われる。それぞれの抗血小板剤において、血小板凝集能測定法のどれが最もモニタリングに

適しているか、血小板活性化物質はなにが適当であるのか等を見いだす必要がある。また薬剤によっては新しい系の開発も必要となる。例えばアスピリンの薬効評価には低濃度コラーゲン惹起血小板凝集、PFA-100のcollagen-epinephrineカセットを用いた測定が適している^{50) 51)}。クロピドグレル等のthienopyridine系薬剤はADP惹起血小板凝集が適しているが、PFA-100のcollagen-ADPカセットは不適であるとされている^{52) 53)}。我々はセロトニン受容体阻害剤であるサルボグレラートの評価系を考案し、臨床試験でこの薬剤の薬効を確認できた⁵⁴⁾。このように薬剤に合わせた評価法等の試みにより、抗血小板剤投与と血小板機能抑制との相関、すなわち抗血小板剤の薬効をより適切に評価できると思われる。

文 献

- 1) Ruggeri ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* **8** : 1227-34, 2002.
- 2) Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* **115** : 3378-3384, 2005.
- 3) Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K: Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* **9** : 61-67, 2003.
- 4) Burger PC, Wagner DD: Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* **101** : 2661-2666, 2003.
- 5) Michelson AD: Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation* **110** : e489-e493, 2004.
- 6) Trip MD, Cats VM, van Capelle FJ, Vreken J: Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med* **322** : 1549-1554, 1990.
- 7) Tschöepe D, Schultheiss HP, Kolarov P, Schwippert B, Dannehl K, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, Strauer B, Gries FA: Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation* **88** : 37-42, 1993.
- 8) Antithrombotic Trialists' collaboration: Collaborative meta-analysis of randomized trials of anti-platelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* **324** : 71-96, 2002.
- 9) Enjyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS Jr, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD: Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nature Med* **5** : 1010-1017, 1999.
- 10) Dougherty JH Jr, Levy DE, Wesler BB: Platelet activation in acute cerebral ischemia. Serial measurements of platelet function in cerebrovascular disease. *The Lancet* April **16** : 821-824, 1977.

- 11) Uchiyama S, Takeuchi M, Osawa M, Kobayashi I, Maruyama S, Aosaki M, Hirosawa K: Platelet function tests in thrombotic cerebrovascular disorders. *Stroke* **14** : 511-517, 1983.
- 12) 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* **84** : 613-617, 1991.
- 13) Breddin HK, Lippold R, Mittner M, Kirchmaier CM, Krzywanek HJ, Michaelis J: Spontaneous platelet aggregation as a predictive risk factor for vascular occlusions in healthy volunteers? Results of the HAPARG Study. *Atherosclerosis* **144** : 211-219, 1999.
- 14) Kabbani SS, Watkins MW, Ashikaga T, Terrien EF, Holoch PA, Sobel BE, Schneider DJ: Platelet reactivity characterized prospectively: a determinant of outcome 90days after percutaneous coronary intervention. *Circulation* **104** : 181-186, 2001.
- 15) Kabbani SS, Watkins MW, Ashikaga T, Terrien EF, Sobel BE, Schneider DJ: Usefulness of platelet reactivity before percutaneous coronary intervention in determining cardiac risk one year later. *Am J Cardiol* **91** : 876-878, 2003.
- 16) Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, Domanovits H, Schreiber W, Laggner AN, Jilma B: Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **110** : 1392-1397, 2004.
- 17) Elwood PC, Beswick A, Pickering J, McCarron P, O'Brien JR, Renaud SR, Flower RJ: Platelet tests in the prediction of myocardial infarction and ischaemic stroke: evidence from the Caerphilly Prospective Study. *Br J Haematol* **113** : 514-520, 2001.
- 18) Lowe GDO: Can haematological tests predict cardiovascular risk? The 2005 Kettle Lecture. *Br J Haematol* **133** : 232-250, 2006.
- 19) Harrison P: Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol* **111** : 733-744, 2000.
- 20) Harrison P: Platelet function analysis. *Blood Rev* **19** : 111-123, 2005.
- 21) Iwase E, Tawata M, Aida K, Ozaki Y, Kume S, Satoh K, Ruomei Q, Onaya T: A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in patients with type 2 diabetes mellitus in relation to microangiopathies. *Metabolism* **47** : 699-705, 1998.
- 22) Eto K, Takeshita S, Ochiai M, Ozaki Y, Sato T, Isshiki T: Platelet aggregation in acute coronary syndrome: use of a new aggregometer with laser light scattering to assess platelet aggregability. *Cardiovasc Res* **40** : 223-229, 1998.
- 23) Miyamoto S, Kawano H, Sakamoto T, Soejima H, Kajiura I, Shimomura H, Kojima S, Hokamaki J, Sugiyama S, Hirai N, Yoshimura M, Ozaki Y, Ogawa H: Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis* **89** : 681-686, 2003.
- 24) Uchiyama S, Yamazaki M, Maruyama S, Handa M, Ikeda Y, Fukuyama M, Itagaki I: Shear-induced platelet aggregation in cerebral ischemia. *Stroke* **25** : 1547-51, 1994.
- 25) Eto K, Ochiai M, Isshiki T, Takeshita S, Terakura N, Sato T, Ikeda Y, Handa S, Goto S: Japanese Circulation Journal **65** : 279-282, 2001.
- 26) Kitai T, Nishikawa M, Tanigawa T, Okinaka T, Wada H, Shiku H, Ikeda Y, Ito M, Isaka N, Nakano T: Inhibition by combined therapy with ticlopidine and aspirin of enhanced platelet aggregation during physical exercise in patients with coronary artery disease. *American Heart Journal* **142** : e1, 2001.
- 27) Yee DL, Sun CW, Bergeron AL, Dong JF, Bray PF: Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals. *Blood* **106** : 2723-2729, 2005.
- 28) Yee DL, Bergeron AL, Sun CW, Dong JF, Bray PF: Platelet hyperreactivity generalizes to multiple forms of stimulation: *J Thromb Haemost* **4** : 2043-2050, 2006.
- 29) Jilma B: Platelet function analyzer (PFA-100) : a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* **138** : 152-163, 2001.
- 30) Harrison P: The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol* **130** : 3-10, 2005.
- 31) Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK: Platelet function analyzer (PFA) -100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost* **4** : 312-319, 2006.
- 32) Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, Domanovits H, Schreiber W, Laggner AN, Jilma B: Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **110** : 1392-1397, 2004.
- 33) Fuchs I, Frossard M, Spiel A, Riedmuller E, Laggner AN, Jilma B: Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *J Thromb Haemost* **4** : 2547-2552, 2006.
- 34) Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA: Flow cytometry. In: Michelson AD, ed. *Platelets*. San Diego, Calif, Academic Press, 2002, 297-315.
- 35) Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* **101** : 880-886, 1985.
- 36) Minamino T, Kitakaze M, Sanada S, Asanuma H, Kurotobi T, Koretsune Y, Fukunami M, Kuzuya T, Hoki N, Hori M: Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide. *Circulation* **98** : 1721-1727, 1998.
- 37) Yamazaki M, Uchiyama S, Iwata M: Measurement of platelet fibrinogen binding and p-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thrombosis Research* **104** : 197-205, 2001.
- 38) Hirabayashi H, Shimizu M, Kohara S, Shinohara Y: Activated platelets in transient global amnesia and TIA. *Neurology* **64** : 736-738, 2004.
- 39) Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-Geroge F, Freyssinet JM: Procoagulant microparticles. Disrupting the vascular homeostasis equations? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** : 2594-2604, 2006.
- 40) Osumi K, Ozeki Y, Saito S, Nagamura Y, Ito H, Kimura Y, Ogura H, Nomura S: Development and assessment of enzyme immunoassay for platelet-derived microparticles. *Thrombosis and Haemostasis* **85** : 326-330, 2001.
- 41) 小関靖, 野村昌作: 血小板由来マイクロパーティクルの測定法ー利点と問題点ー. *血栓止血誌* **15** : 286-292, 2004.
- 42) Van Wijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **59** : 277-287, 2003.
- 43) Nomura S, Inami N, Iwasaka T, Liu Y: Platelet activation markers, microparticles and soluble adhesion molecules

- are elevated in patients with arteriosclerosis obliterans: therapeutic effects by cilostazol and potentiation by dipyridamole. *Platelets* **15** : 167-172, 2004.
- 44) Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ: A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* **41** : 961-965, 2003.
- 45) Matetzky S, Shenkman B, Guetta V: Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **109** : 3171-3175, 2004.
- 46) Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y: Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway (s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* **4** : 1271-1278, 2006.
- 47) Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne ME, Fitzgerald DJ: Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke* **37** : 2153-2158, 2006.
- 48) Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao AK: Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; Working Group on Aspirin Resistance. Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost* **3** : 1309-1311, 2005.
- 49) De Schryver EL, van Gijn J, Kappelle LJ, Koudstaal PJ, Algra A: Non-adherence to aspirin or oral anti-coagulants in secondary prevention after ischaemic stroke. *J Neurology* **252** : 1316-1321, 2005.
- 50) Jilma B, Fuchs I: Detecting aspirin resistance with the platelet function analyzer (PFA-100). *Am J Cardiol* **88** : 1348-1349, 2001.
- 51) Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I: Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* **108** : 37-42, 2002.
- 52) Van der Planken MG, Claeys MJ, Vertessen FJ, Dilling D, Bosmans JM, Berneman ZN, Michiels JJ, Vrints C: Comparison of turbidimetric aggregation and in vitro bleeding time (PFA-100) for monitoring the platelet inhibitory profile of antiplatelet agents in patients undergoing stent implantation. *Thromb Res* **111** : 159-164, 2003.
- 53) Agarwal S, Coakley M, Reddy K, Riddell A, Mallett S: Quantifying the effect of anti-platelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry. *Anesthesiology* **105** : 676-683, 2006.
- 54) Satoh, K., Yatomi, Y., Ozaki, Y: A new method for assessment of an anti-5-HT agent, sarpogrelate hydrochloride, on platelet aggregation. *J Thromb Haemost* **4** : 479-481, 2005.