

5に示す。術前のADAMTS13値は5-140%であり、移植直後は15-40%に著しく低下した。多くの症例は術後7日目よりADAMTS13の増加を見るが、数例では著しい低下が認められた。

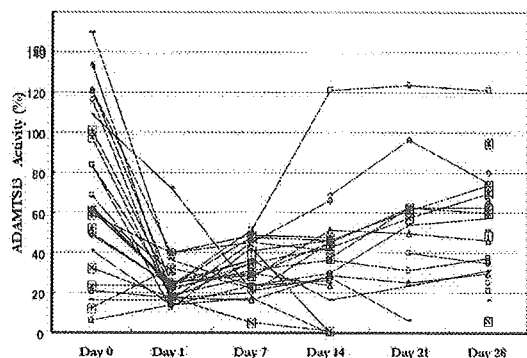


図 5 肝移植の経過中のADAMTS13

4. 考察

近年、肝移植手術の普及により、その合併症であるTMAが注目されている。その診断にはFRCの測定が重要であるが、充分標準化されていなかった。今回我々が検討したXE-2100によるFRCの測定は、定量化ならびに標準化が可能と考えられた。健常人女性1例でFRCが高値であったため、正常範囲が高値となってしまったが、正常範囲はもう少し低値かもしれない。また、再生不良性貧血でFRCは高値であったが、小球性のRBCがFRCとしてカウントされた可能性が推測される。また、再生不良性貧血の1例は無効造血が著明であり、TMAとの鑑別が困難であった。また、肝移植例ではFRCが著しく増加し、その他の肝疾患では有意な増加を認めないことか

らも、肝移植がTMAの原因と考えられた。FRCの増加は、主に術後14日から28日後に見られ、この時期がTMAの好発時期と推測された。

ADAMTS13はTTPの発症原因として同定されたが、肝移植や骨髄移植におけるTMAの原因としても注目されている。今回の我々の検討では、ADAMTS13は肝移植直後に著減し、TMA発症例では術後14日から28日後にさらに低下した。これらの成績から、ADAMTS13は肝移植におけるTMAの発症に重要な働きをしていると考えられる。

今後さらに、肝移植例におけるFRCとADAMTS-13値とTMA発症の関係を検討する必要がある。

5. 結論

XE-2100によるFRCの測定は、定量化ならびに標準化が可能であり、TMAの診断などへの臨床応用が期待される。肝移植症例ではFRCが有意に高値であり、TMA発症リスクが高いと考えられる。また、ADAMTS-13は肝移植直後著しく減少し、TMA発症例ではさらに減少することから、肝移植に合併するTMAの原因の一因と考えられた。

6. 健康危険情報

特になし

7. 研究発表

1) 論文発表

・ Kushiya F, Wada H, Ooi K, Sakurai Y, Sakaguchi A, Noda M, Abe Y, Nakasaki T, Tsukada T, Shiku H, Nobori T: Effects of atorvastatin on serum lipids, lipoproteins, and

- hemostasis. *Am J Hematol*, 2005; 78:1-6
- Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Matsumoto T, Shiku H, Ishikura K, Yamada N, Nakano T, Kazahaya Y, Sawai T, Matsuda M: Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*, 2005; 115: 53-57
 - Yazaki A, Tamaru S, Sasaki Y, Komatsu N, Wada H, Shiku H, Nishikawa M: Inhibition by Rho-kinase and protein kinase C of myosin phosphatase is involved in thrombin-induced shape change of megakaryocytic leukemia cell line UT-7/TPO. *Cell Signal*. 2005; 17: 321-30.
 - Sase T, Wada H, Yamaguchi M, Ogawa S, Kamikura Y, Nishikawa M, Kaneko T, Abe Y, Nishioka J, Nobori T, Shiku H: Haemostatic abnormalities and thrombotic disorders in malignant lymphoma. *Thromb Haemost*. 2005; 93: 153-9
 - Wada H, Sakakura M, Kushiya F, Nishikawa M, Onishi K, Nakatani K, Shiku H, Nobori T: Thrombomodulin accelerates activated protein C production and inhibits thrombin generation in the plasma of disseminated intravascular coagulation patients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16:17-24.
 - Gando S, Wada H, Asakura H, Iba T, Eguchi Y, Okamoto K, Ohtomo Y, Kawasugi K, Koga S, Koseki K, Tsuji H, Mayumi T, Murata A, Nakagawa M, Endo S: Evaluation of new Japanese diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation in critically ill patients. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005;11: 71-6.
 - Kushiya F, Wada H, Sakakura M, Mori Y, Gabazza EC, Nishikawa M, Nobori T, Noguchi M, Izumi K, Nakasaki T, Takagi M, Shiku H: Prognostic Impact of Aortic Calcification Index and Ankle-Arm Blood Pressure Index in Patients under Hemodialysis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005; 11: 161-9.
 - Sakakura M, Wada H, Abe Y, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, Oguni S, Shiku H, Nobori T: Usefulness of measurement of reticulated platelets for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005;11: 253-61
 - Abe Y, Wada H, Sakakura M, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, Oguni S, Shiku H, Nobori T: Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2005; 11: 263-70
 - Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Kobayashi T, Sase T, Nishikawa M, Ishikura K, Yamada N, Abe A, Nishioka J, Nakano T, Shiku H: Elevated levels of leukocyte tissue factor mRNA in patients with venous thromboembolism. *Thromb Res*, 2005; 116: 307-12
 - Ota S, Wada H, Nobori T, Kobayashi T, Nishio M, Nishioka Y, Noda M, Sakaguchi A, Abe Y, Nishioka J, Ishikura K, Yamada N, Nakano T: Diagnosis of deep vein thrombosis by plasma-soluble fibrin or D-dimer. *Am J Hematol*. 2005; 79: 274-80
 - Matsumoto T, Wada H, Nobori T, Nakatani K, Onishi K, Nishikawa M, Shiku H, Kazahaya Y, Sawai T, Koike K, Matsuda M: Elevated

plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with disseminated intravascular coagulation. Clin Appl Thromb Hemost. 2005; 11: 391-400

・ Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, Uemoto S, Yamada S, Maruyama I: Plasma concentrations and importance of high mobility group box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. Thromb Haemost, 2005; 94: 975-979

・ Asakura H, Wada H, Okamoto K, Iba T, Uchiyama T, Eguchi Y, Kawasugi K, Koga S, Mayumi T, Koike K, Gando S: Evaluation of hemostatic molecular markers for diagnosis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections. Thromb Haemost, 2006; 95: 282-7

2) 学会発表

・ (Grand Round) ; Wada H: The Experience from Japan; DIC and Cancer, (Robert Hickey Auditorium) The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center 12:00-13:00, April 29, 2005

・ Wada H: Disseminated Intravascular Coagulation (DIC); Results of Pilot Studies of Overt DIC Using the Sub-Committee Algorithm. 51st SSC Scientific Subcommittees, Sydney, Australia, August 6 and 7, 2005

・ Wada H, Yamada S, Nobori T, Maruyama I: High mobility group box protein is increased in the plasma and may have a role in development of organ failure in DIC. XXth ISTH Congress, Sydney, Australia, August 6-12, 2005

・ Kobayashi T, Wada H, Nobori T, Abe Y, Nishioka J, Ota S, Ishikura K, Yamada N,

Nakano T, Shiku H: Diagnosis of deep vein thrombosis by soluble fibrin or D-dimer. XXth ISTH Congress, Sydney, Australia, August 6-12, 2005

・ Wada H, Nobori T, Yamada S, Maruyama I: Plasma levels of high mobility group box protein in patients with organ failure, disseminated intravascular coagulation or poor outcome. 47th American Society of Hematology annual meeting and Exposition (Atlanta), December 10-13, 2005

・(徹底討論)和田英夫、登 勉、太田覚史、山田典一、石倉 健、中野 昶：血中でのフィブリン形成が増加すると血栓症発症のリスクが増加する、第46回日本脈管学会総会、大阪、2005年12月1-3日

8. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実案新案登録 なし
3. その他 なし

<研究成果の刊行に関する一覧>

・ Sakakura M, Wada H, Abe Y, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, Oguni S, Shiku H, Nobori T: Usefulness of measurement of reticulated platelets for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. Clin Appl Thromb Hemost. 2005;11: 253-61

・ Abe Y, Wada H, Sakakura M, Nishioka J, Tomatsu H, Hamaguchi Y, Oguni S, Shiku H, Nobori T: Usefulness of fully automated measurement of reticulated platelets using whole blood. Clin Appl Thromb Hemost. 2005; 11: 263-70

• Ota S, Wada H, Nobori T, Kobayashi T, Nishio M, Nishioka Y, Noda M, Sakaguchi A, Abe Y, Nishioka J, Ishikura K, Yamada N, Nakano T: Diagnosis of deep vein thrombosis by plasma-soluble fibrin or D-dimer. *Am J Hematol.* 2005; 79: 274-80

• Matsumoto T, Wada H, Nobori T, Nakatani K, Onishi K, Nishikawa M, Shiku H, Kazahaya Y, Sawai T, Koike K, Matsuda M: Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2005; 11: 391-400

• Hatada T, Wada H, Nobori T, Okabayashi K, Maruyama K, Abe Y, Uemoto S, Yamada S, Maruyama I: Plasma concentrations and importance of high mobility group box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost,* 2005; 94: 975-979

• Asakura H, Wada H, Okamoto K, Iba T, Uchiyama T, Eguchi Y, Kawasugi K, Koga S, Mayumi T, Koike K, Gando S: Evaluation of hemostatic molecular markers for diagnosis of disseminated intravascular coagulation in patients with infections. *Thromb Haemost,* 2006; 95: 282-7

血漿プロテイン S 活性と遺伝型との関連

分担研究者 宮田敏行（国立循環器病センター研究所・病因部・部長）

研究協力者 木村利奈（国立循環器病センター研究所・病因部・室員）

研究要旨

日本人の静脈血栓症の発症の遺伝的背景として、プロテイン S K196E 変異（成熟型での番号では K155E 変異、プロテイン S 徳島変異ともよばれる）を同定した。本年度は、本変異と血漿プロテイン S 活性低下との関連を検討した。地域一般住民（1,866 名）のプロテイン S 活性を測定し、ヘテロ接合体群（34 名）と野生型群（1,832 名）とのあいだで平均活性値の比較を行った。その結果、ヘテロ接合体群の平均値±標準偏差は $71.9 \pm 17.6\%$ 、野生型群のそれは $87.9 \pm 19.8\%$ であり、K196E 変異ヘテロ接合体群のプロテイン S 活性は野生型群に比べて有意に低かった ($p < 0.0001$)。1,866 人のプロテイン S 活性値をヒストグラムに表し、K196E 変異を持つ個体の分布をみると、必ずしも活性低値域にヘテロ接合体が集積しているわけではなかった。この結果は、プロテイン S 活性の測定により K196E 変異を持つか否かを予測することは困難であり、変異を直接検出することが重要であることを示唆している。

A. 研究目的

日本人の静脈血栓症の発症メカニズムを解明し、発症を予防する方策を検討する。前年度までの本研究から、プロテイン S K196E 変異（成熟型プロテイン S の番号では K155E 変異、プロテイン S 徳島ともよばれる）が、日本人の静脈血栓症の危険因子であることが判明した。地域一般住民（3,655 名）でのアレル頻度は 0.009 であり、約 55 人に 1 人がヘテロ接合体であ

った。したがって、約 12,000 人に 1 人がホモ接合体であり、日本人の総人口を 1 億 2000 万人とすると約 1 万人がホモ接合体であると推定された。このように多くの日本人が変異アレルを有し静脈血栓症のリスクに晒されている。しかし、本変異アレルを持って必ずしも静脈血栓症を発症するものではない。イベントの発症は何らかの要因、例えば外傷、手術、妊娠、長期臥床、急性内科疾患などが重な

って起こると考えられる。したがって、発症を未然に防ぐため、変異の保有者を同定し、血栓症を誘発する環境を避けることが肝要である。

プロテイン S K196E 変異は、1993 年に山崎らにより報告された。それによると、ヘテロ接合体の抗原量は 122%、活性は 83% (ともに 3 名の平均値) であった。一方、同年の重清らの報告によると、抗原量は 103%、活性は 43% (ともに 7 名の平均値) であった。すなわち、2 つの報告はともに抗原量は正常値を示すものの、活性に違いが見られた。このように家系が異なる 2 つのヘテロ接合体の集合では、ヘテロ接合体の血漿プロテイン S 活性は正常域にあるのか 50% 近くまで低下するのかについては明確な結論が得られていない。もし、ヘテロ接合体が明らかにプロテイン S 活性の低下を示すのであれば、静脈血栓症を起こしやすい環境にある人は、活性を測定することで変異の保有者であるかどうかを明らかにすべきであろう。もし、活性と遺伝型が強い関連を示さないのであれば、活性を測定する意義は高くないと考えられる。

本研究では、地域一般住民 1,866 名を対象にプロテイン S 活性の測定と K196E 変異のタイピングを試行し、両者の関連に検討を加えた。

B. 研究方法

地域一般住民 (1,866 名) を対象とした。血漿プロテイン S 活性は Staclot protein S (Diagnostica Stago, Asnieres, France) を用いて、活性化部分トロンボプラスチン時間で活性化プロテイン C のコファクター活性として測定したものを使用した。遺伝型は、多型を識別するために蛍光標識されたプローブを用いる TaqMan 法で求めたものを使用した。統計計算には、JMP v5.1 ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。

(倫理面への配慮)

全ての被験者は、研究の内容についての説明を受けた後、研究に協力する旨の同意書を書面で残している。遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日)」を遵守して行う。

C. 研究結果

一般住民 1,866 名には、34 名の K196E 変異ヘテロ接合体が同定された。ホモ接合体は存在しなかった。E アレル頻度は 0.009 であった。ヘテロ接合体 34 名のプロテイン S 活性の平均値は $71.9 \pm 17.6\%$ (平均値 \pm 標準偏差) であり、野生型のプロテイン S 活性の平均値は $87.9 \pm 19.8\%$ であった。両群の平均値は、 $p < 0.0001$ で有意な差を示した。

1,866 名のプロテイン S 活性を、

5%毎の間隔でのヒストグラムに表して検討を行った。全体の平均±標準偏差は $87.6 \pm 19.9\%$ であった。このうち、16名のヘテロ接合体は70%以上の活性を示し、7名のヘテロ接合体は、活性90%以上を示した。ヘテロ接合体は活性100%前後にも散在していた。したがって、活性低値を示す個体とK196E変異ヘテロ接合体は、必ずしも一致しないといえる。

同様に、プラスミノゲン活性値を示したヒストグラムにおける、プラスミノゲンA620T変異（プラスミノゲンTochigi変異とも呼ばれる）のヘテロ接合体の分布を検討した。プロテインSにおける結果とは異なり、A620T変異ヘテロ接合体は、プラスミノゲン活性低値域に高度に集積されていた。このことより、プラスミノゲン活性低値を示す個体とA620T変異を持つ個体は高率で一致するといえる。

図1に、一般住民において測定したプロテインS活性の性差と加齢依存性を示す。30歳代・40歳代では女性のプロテインS活性は男性に比べて20%程度低い。男性のプロテインS活性は、40歳代をピークに加齢による低下を示す。一方、女性では加齢による低下は見られない。このように、プロテインS活性は、一般住民において年齢および性により変動しうる。

一般住民1,866名で測定したプ

ロテインS活性値の $-2SD$ および $-3SD$ を計算すると、47.8%および27.9%であった。 $-2SD$ より低値を示す人は28名おり、ヘテロ接合体は2名であった。また、 $-3SD$ より低値を示す人は一般住民には存在しなかった。

D. 考察

日本人の一般住民を対象に、プロテインSK196E変異の遺伝型と血漿プロテインS活性の関連を検討した。その結果、野生型群とK196E変異ヘテロ接合体群は平均値で有意差を示したものの、ヘテロ接合体には100%程度の活性を示す個体も散見され、プロテインS活性低値域に集積していなかった。このことは、プロテインS活性測定値が低い個体と、K196E変異を持つ個体は必ずしも一致しないことを示すものであった。つまり、今回用いた血漿プロテインS活性の測定法では、K196E変異ヘテロ接合体を同定できないことを示している。プロテインSK196E変異を持つ個体を正確に同定するためには、変異プロテインSを直接検出できる検査法を用いることが必要である。倫理的問題を解決できるならば、遺伝検査によりK196E変異を検出することが、最も簡便な方法であると考えられる。日本人における静脈血栓症のリスクであるK196E変異の有無を診断することは、静脈血栓症の予防に

役立つと予想される。外科的手術・出産前のスクリーニングとして用いることが有効であると考えられる。

E. 結論

日本人の静脈血栓症のリスクであるプロテイン S K196E 変異を持つかどうかは、今回用いた血漿プロテイン S 活性測定系では予測できなかった。K196E 変異を正確に検出できる検査法の確立が望まれる。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*, 107, 1737-1738, 2006.
2. Sugiyama S, Hirota H, Kimura R, Kokubo Y, Kawasaki T, Suehisa E, Okayama A, Tomoike H, Hayashi T, Nishigami K, Kawase I, Miyata T: Haplotype of

Thrombomodulin Gene Associated with Plasma Thrombomodulin Level and Deep Vein Thrombosis in the Japanese Population. *Thromb Res.*, in press.

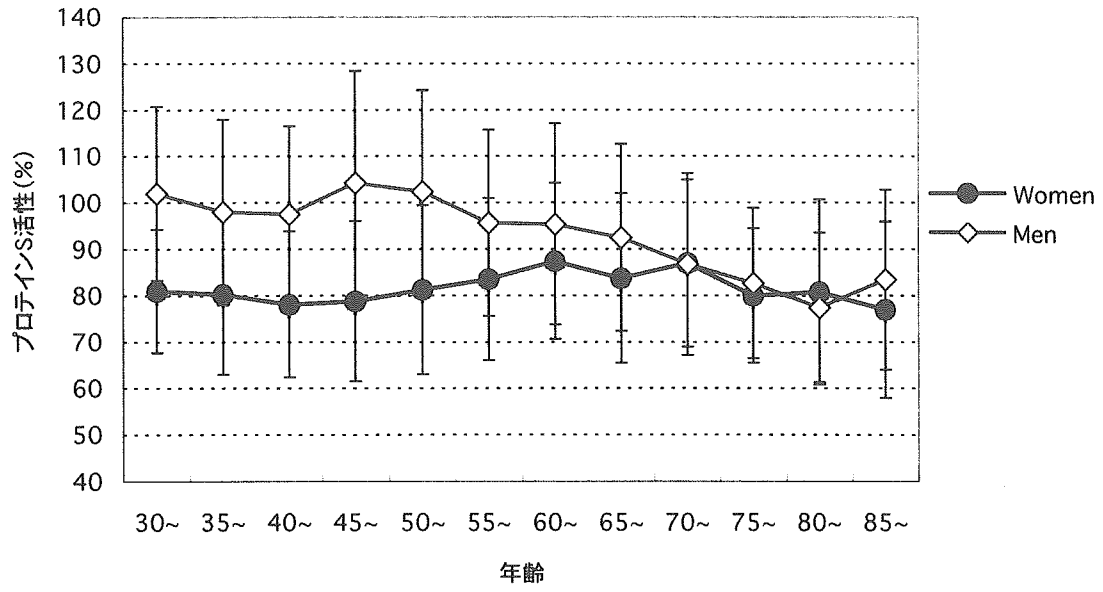
3. Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T: Genetic Risk Factors for Deep Vein Thrombosis in Japanese, Importance of Protein S K196E Mutation. *Int J Hematol.*, in press.

2. 学会発表

1. 宮田敏行、シンポジウム 2、脳卒中と血液凝固異常、「血栓性素因の遺伝的背景」、第 30 回日本脳卒中学会総会、平成 17 年 4 月 21 日、盛岡市
2. 小亀浩市、宮田敏行、「血栓性血小板減少性紫斑病」シンポジウム：凝固異常を引き起こす疾患の病態と検査、日本臨床検査医学会・近畿支部例会、平成 17 年 6 月 11 日、神戸市
3. 宮田敏行、「凝固異常症研究の進展」第 28 回シスメックス血液学セミナー、血液疾患の分子生物学的基礎、平成 17 年 6 月 18 日、神戸市

4. 宮田敏行、「病的血栓の遺伝的背景」第3回血液血管オルビス、指名講演、平成17年8月20-21日、東京都
 5. 木村利奈、宮田敏行、本田繁則、川崎富夫、辻肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田満、池田康夫「日本人の静脈血栓症の危険因子、プロテイン S K196E：血液凝固異常症に関する調査研究班の成績」第67回日本血液学会総会、平成17年9月17-19日、横浜市
 6. 宮田敏行、「血栓症の遺伝的背景」、第42回近畿MMC研究会、平成17年9月17日、大阪市
 7. 宮田敏行、「病的血栓の遺伝的背景」第28回日本血栓止血学会学術集会、モーニングレクチャー、平成17年11月25日、福岡市
 8. 木村利奈、阪田敏幸、岡本章、小久保喜弘、岡山明、友池仁暢、本田繁則、宮田敏行「一般人口におけるプロテイン S K196E 変異とプロテイン S 活性値との相関」第28回日本血栓止血学会学術集会、平成17年11月23-25日、福岡市
 9. 岡本章、阪田敏幸、小久保喜弘、岡山明、宮田敏行、「凝固・線溶系活性化マーカーの加齢による変動とその性差」第28回日本血栓止血学会学術集会、平成17年11月23-25日、福岡市
 10. 木村利奈、阪田敏幸、岡本章、小久保喜弘、岡山明、友池仁暢、本田繁則、川崎富夫、辻肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田満、池田康夫、宮田敏行「日本人の静脈血栓症の危険因子プロテイン S K196E 変異」第12回関西血栓フォーラム、平成18年1月21日、大阪市
- H. 知的財産権の出願・登録
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

図 1



変異型プロテイン S 分子の発現解析

小嶋哲人 名古屋大学 医学部 保健学科・教授

研究協力者

岡田浩美、高木 明、村手 隆 名古屋大学 医学部 保健学科

岩崎年宏、勝見 章、松下 正 名古屋大学 大学院 医学系研究科

山本晃士、高松純樹 名古屋大学 医学部 附属病院 輸血部

国島伸治、山崎鶴夫、濱口元洋、齋藤英彦 独立行政法人 国立病院機構 名古屋医療センター

研究要旨 我々は血栓性素因・先天性プロテイン S 欠損症 2 症例について遺伝子解析を行い、新規ミスセンス変異を 3 種類 R275C、P375Q、D455Y（後 2 者は同一患者の同一アレル上に存在）を同定した。また、昨年報告した C80Y、R314H を含めた計 5 種類のミスセンス変異について、COS-1 細胞を用いた発現実験を行い、変異型 PS 分子の活性化プロテイン C に対する補酵素活性を解析した。その結果、いずれの変異型 PS は野生型 PS に比べ、発現量は低下しており、パルスチェイス解析においても分泌が障害されていることが明らかとなった。一方で、変異型 PS 分子の補酵素活性については、R314H、P375Q+D455Y 変異型 PS においては野生型 PS と同程度であったのに対し、C80Y 変異型 PS では著しく低下し、R275C 変異型 PS では野生型 PS の 62%と活性の低下を認めた。各症例において同定された PS 遺伝子の変異にともなう分泌異常ならびに活性低下が PS 欠損症の原因であることが示唆された。

A. 研究目的

プロテイン S (PS) はビタミン K 依存性凝固制御因子の一つで活性化プロテイン C が活性化第 V 因子および第 VIII 因子を不活化する際に補酵素として機能しており、PS 欠損症は血栓症を起こすことが知られている。我々は、先天性 PS 欠損症 4 症例について遺伝子解析を行い、計 5 種類のミスセンス変異を同定した。また、同定したミスセンス変異について、欠損症となる原因を明らかにするために COS-1 細胞を用いた発現実験を行い、変異型プロテイン S 分子動態について検討するとともに、変異型 PS 分子の補酵素活性を測定し機能解析を行った。

B. 研究方法

症例はいずれも深部静脈血栓症または脳幹梗塞を発症、精査の結果 PS 欠損症と診断された。インフォームドコンセントを得た後、患者あるいはその家族から末梢白血球より DNA を抽出し、各 PS α 遺伝子の全エクソンをイントロンとの境界領域を含め PCR 増幅、ダイレクトシーケンシング法にて塩基配列を解析した。各同定遺伝子変異を PS cDNA に導入し発現ベクターを作製した後、COS-1 培養細胞での一過性発現実験および ^{35}S -Met/Cys によるパルスチェイス解析を行った。さらに、培養上清中の変異型 PS 分子の補酵素活性はスタクロット

PS 測定キットを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て施行した。

C. 研究結果

塩基配列解析の結果、C80Y、R314H、R275C を各 1 例に、P375Q と D455Y を同一患者から同定した。また、P375Q と D455Y は同アレル上に存在していた。これらの変異型 PS を一過性に発現させた培養上清中の抗原量を ELISA によって測定した結果、分泌量は野生型 PS に比べて、R314H 変異型 PS がもっとも低く (33%)、つづいて C80Y 変異型 (44%)、P375Q+D455Y 変異型 PS (50%) であり、R275C 変異型 PS は軽度 (72%) に低下していた。またパルスチェイス解析においても 8 時間後の培養上清中では R314H 変異型 PS の分泌量が最も低く、他の変異型 PS 分子も野生型 PS と比べ、その分泌が障害されていることが確認された。変異型 PS 分子の補酵素活性については、R314H、P375Q+D455Y 変異型 PS においては野生型と同程度であったのに対し、C80Y 変異型 PS では著しく低下し、R275C 変異型 PS では野生型の 62% と活性の低下を認めた。

D. 考察

先天性 PS 欠損症解析の結果、計 5 種の PS α 遺伝子変異を同定した。発現実験および機能解析の結果より、症例 1 での C80Y 変異は発現量が低下し、かつ培養上清中の C80Y 変異型 PS の補酵素活性が著しく低下していることからこの変異が欠損症の原因であると考えられる。症例 2 での R314H 変異は発現量が野生型の約 33% に低下していたが、この変異による補酵素活性への影響は認められず、変異による発現量の低下が欠損症の原因として考えられる。症例 3 の R275C 変異は発現量が軽度に低下し、かつ、この変異型 PS の補酵素活性も低下

していることから、この変異が欠損症を引き起こす原因であると推察される。症例 4 では P375Q と D455Y の 2 種類の変異が同定されたが、両変異ともに補酵素活性への影響は認められず、この症例での欠損症の原因変異としては発現量の低下を引き起こす D455Y 変異であると示唆された。

E. 結論

深部静脈血栓症または脳幹梗塞を発症した PS 欠損症の遺伝子解析によりの計 5 種の PS α 遺伝子変異を同定した。COS-1 細胞を用いた発現実験結果により、各症例において同定された PS 遺伝子の変異にともなう分泌異常ならびに活性低下が、PS 欠損症の病因と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
- K. Yamamoto, K. Takeshita, T. Kojima, J. Takamatsu, H. Saito: Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. **Cardiovas. Res.** 66:276-285, 2005.
- K. Yamamoto, T. Kojima, T. Adachi, M. Hayashi, T. Matsushita, J. Takamatsu, D. J. Loskutoff, and H. Saito: Obesity enhances the induction of plasminogen activator inhibitor-1 by restraint stress: a possible mechanism of stress-induced renal fibrin deposition in obese mice. **J. Thromb. Haemost.** 3(4):1495-1502, 2005.
- H. Saito, T. Matsushita, K. Yamamoto, T. Kojima, S. Kunishima: Giant platelet syndrome. **Hematology.** 10

- Suppl 1:41-46, 2005.
- S. Sobue, K. Hogiwara, K. Tamiya-Koizumi, M. Suzuki, A. Takagi, T. Kojima, H. Asano, Y. Nozawa, and T. Murate.: Transcription factor specificity protein 1 (Sp1) is the main regulator of nerve growth factor-induced sphingosine kinase 1 gene expression of the rat pheochromocytoma cell line, PC12. **J Neurochem.** 95(4):940-949, 2005.
- M. Hayashi, T. Matsushita, N. Mackman, M. Ito, T. Adachi, A. Katsumi, K. Yamamoto, K. Takeshita, T. Kojima, H. Saito, T. Murohara and T. Naoe: Fatal thrombosis of antithrombin deficient mice is rescued differently in the heart and liver by intercrossing with low tissue factor mice. **J. Thromb. Haemost.** 4(1):177-85, 2006.
- R. Kimura, S. Honda, T. Kawasaki, H. Tsuji, S. Madoiwa, Y. Sakata, T. Kojima, M. Murata, K. Nishigami, M. Chiku, F. Hayashi, Y. Kokubo, A. Okayama, H. Tomoike, Y. Ikeda and T. Miyata: Protein S K196E mutation as a genetic risk for deep vein thrombosis in Japanese patients. **Blood** 15;107(4):1737-1738, 2006.
- K. Yamamoto, T. Honda, T. Matsushita, T. Kojima, and J. Takamatsu: Anti-HCV agent, ribavirin, elevates the activity of clotting factor VII in hemophilia patients: a possible mechanism of decreased events of bleeding in hemophiliacs by ribavirin. **J. Thromb. Haemost.** 4(2):469-470, 2006.
- N. Yamakage, M. Ikejiri, K. Okumura, A. Takagi, T. Murate, T. Matsushita, T. Naoe, K. Yamamoto, J. Takamatsu, T. Yamazakki, M. Hamaguchi, and T. Kojima: A case of coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutations in the factor V gene. **Haemophilia** 12:172-178, 2006.
2. 学会発表
- T. Matsushita, H. Hayashi, S. Kunishima, M. Hayashi, M. Ikejiri, Y. Yuzawa, T. Adachi, K. Hirashima, M. Sone, K. Yamamoto, A. Takagi, A. Katsumi, T. Nezu, T. Nakashima, T. Kojima, Hirano, H. Saito, T. Naoe.: Targeted Disruption of Mouse Ortholog of the Human MYH9 Responsible for the Macrothrombocytopenia with Different Organ Involvement: Hematological, Nephrological, and Otological Studies of Heterozygous KO Mice. XXth Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Sydney, Australia (2005)
- H. Okada, T. Yamazaki, S. Kunishima, M. Hamaguchii, T. Adachi, K. Yamamoto, T. Matsushita, A. Takagi, T. Kojima, Hirano, H. Saito: In vitro Characterization Of Two Missence Mutations Associated With Quantitative Protein S Deficiency. XXth Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Sydney, Australia (2005)
- K. Yamamoto, T. Honda, S. Suzuki, H. Toyoda, T. Matsushita, T. Kojima, H. Goto, J. Takamatsu: Anti-HCV Agent, Ribavirin, Decreases Events of Bleeding in Hemophilia Patients, Possibly by Elevating the Clotting. American Society of Hematology Forty-Seventh Annual Meeting, Atlanta, U.S.A. (2005)

小嶋哲人：シンポジウム3 「血液凝固亢進状態の臨床化学」4. 血液凝固亢進状態の抗凝固療法 第24回日本臨床化学会夏期セミナー 抄録集 山形 (2005)

高木 明、山下真代、池尻 誠、山影 望、山田貴之、奥村 薫、京谷麻由、岡田浩美、村手 隆、小嶋哲人、元山正子、国島伸治：遊離型血小板膜糖蛋白V測定法に関する基礎的検討 第6回日本検査血液学会学術集会、

木村利奈、宮田敏行、本田繁則、川崎富夫、辻 肇、小嶋哲人、窓岩清治、坂田洋一、村田 満、池田康夫：日本人の静脈血栓症の危険因子、プロテインSK196E：血液凝固異常症に関する調査研究班の成績 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会 合同総会、東京 (2005)

山本晃士、小嶋哲人、足立達哉、林 睦晴、松下 正、齋藤英彦、高松純樹：肥満・ストレスによるPAI-1発現亢進と血栓傾向 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会 合同総会、東京 (2005)

高木 明、山本紗和子、山下真代、山影 望、池尻 誠、山田貴之、奥村 薫、京谷麻由、岡田浩美、村手 隆、佐野雅之、小嶋哲人：第V・VIII因子合併欠乏症のLMAN-1遺伝子解析 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会 合同総会、東京 (2005)

岩崎年宏、足立達哉、平島寛司、林 睦晴、勝見 章、山本晃士、松下 正、小嶋哲人、高松純樹、齋藤英彦：Systemic amyloidosis with Factor X deficiency. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会 合同総会、東京 (2005)

山影 望、池尻 誠、山下真代、山田貴之、奥村 薫、京谷麻由、岡田浩美、高木 明、村手 隆、岩崎年宏、足立達哉、勝見 章、松下 正、山本晃士、高松純樹、国島伸治、山崎鶴夫、濱口元洋、齋藤英彦、小嶋哲人：複合ヘテロ接合型凝固第V因子

欠損症の分子病態解析 第28回日本血栓止血学会学術集会、福岡 (2005)

山本晃士、松下 正、小嶋哲人、高松純樹：血友病患者におけるC型肝炎治療薬リバビリンの出血予防効果とそのメカニズム 第28回日本血栓止血学会学術集会、福岡 (2005)

岡田浩美、山崎鶴夫、国島伸治、濱口元洋、高木 明、小嶋哲人、足立達哉、勝見 章、松下 正、山本晃士、高松純樹、齋藤英彦：変異型プロテインS分子の分泌障害解析 第28回日本血栓止血学会学術集会、福岡 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略
—診療と訴訟とガイドライン—

分担研究者：川崎 富夫 大阪大学医学部

研究要旨

社会には血栓症に関する様々なガイドラインが存在する。ガイドラインが守られていない場合には、訴訟では注意義務違反ないし過失と判断されかねない。そのため、現在様々な混乱が生じている。本研究は、阪大ガイドラインの運用結果に基づいて、従来のガイドラインの抱える問題点とその解決法を明らかにすることが目的である。

訴訟では院内発症例に対する予防対策が十分であったかが争点となる。阪大ガイドラインの運用結果から、院内発症の中に持ち込み症例が多く含まれている可能性が高いことが明らかになった。

持ち込み症例における再発ないし増悪に対しては従来の予防法は無効である上、一旦発症すると持ち込み症例であることの証明が困難となる。阪大ガイドラインは、入院時と第一歩行開始時において持ち込み症例のスクリーニングが、ガイドラインの有効性を高める上で必須であることを示している。スクリーニングには、詳細な問診、触診、周囲径測定、理学的所見が重要である。そして何よりも、当たり前のことがその通りに理解出来ていない現状こそが問題であり、臨床血栓止血学を含めた実地臨床教育の充実（歴史的再考と基本への復帰）が急務であると考えられる。

A. はじめに

最近肺塞栓症に関する訴訟が増加している。情報化社会において様々なガイドラインが社会に氾濫しており、その情報を誰もが容易に手に入れることができる。ガイドラインは医療をより良くしたいという動機から医師が作成したと考えられ

るが、現実には医師が守るべきルールとみなされている。このルールが守られていない場合には注意義務違反ないし過失と判断されかねない状況にある。

日本のガイドラインを注意深く検証すると、日本のデータに基づいていないだけでなく、必ずしも専門家のコンセンサ

スを得られているとは言えないことも明らかである。そのために各種の問題が発生している。例えば、弾力ストッキングの適応が無い患者に多用されている現状は問題である。また、日本において既に有用性が明らかで安価な低用量未分画ヘパリンの予防的な投与量(2500単位)での出血の危険性が低分子量ヘパリンより明らかに高いかどうかの検討が不十分なまま、非常に高価な低分子量ヘパリンの承認申請が進んでいることも大きな問題である。

2003年12月から大阪大学医学部附属病院は独自の「深部静脈血栓症と肺塞栓症の予防・診断・治療ガイドライン」を運用している。この院内ガイドラインの運用を通して、これらの問題解決に一つ一つ取り組んでいる。

B. 方法

2003年12月から大阪大学医学部附属病院において本ガイドラインを運用し、2004年6月までのデータを検討した

患者入院時に血栓症のリスク評価を行い、リスクが中または高の患者には、下肢周囲径を測定し、左右差があれば超音波診断による血栓症の精査を行った。また、長期臥床あるいはベッド上安静後にもう一度下肢周囲径を測定して左右差あるいは術前後での周囲径の異常があった場合も血栓症の精査を行った。

C. 結果

この期間の深部静脈血栓症/肺塞栓症の有病者は36名で、このうち、入院中

に症状が出現し血栓症の診断がついた患者は25例であった。入院時点(入院直後で手術前または長期臥床前におけるスクリーニング時)で血栓症が発見された患者数は11例であった。このうち6例は既往歴が明らかであったが、他の5例は既往歴が明らかで無かった。この5例について、改めて深部静脈血栓症および肺塞栓症の具体的症状を問診した結果、過去に静脈血栓症を強く疑う症状を確認できた。

D. 考察

大阪大学病院の血栓症ガイドラインの運用結果では、入院時の問診にて血栓症の既往を確認できた患者数と、問診では既往歴を確認できなかったが阪大ガイドラインのスクリーニングにて入院時に既に深部静脈血栓症が存在した患者数は大凡1:1(6:5)であった。

この5例は、もしスクリーニングが行われていなければ深部静脈血栓症に気づかれないまま手術あるいは治療を開始して血栓症が再発ないし増悪していた可能性が高い症例(持ち込み症例)と考えられた。これら持ち込み症例が院内発症につながると考えられる理由は、第一に持ち込み症例では血栓症の既往歴が認識されないため危険度(高)として認識されない可能性が高いこと。第二に、持ち込み症例5例は既に血栓症を発症しているので本来治療用量のヘパリンの投与が必要であるにも関わらず、極く少量の予防用量のヘパリンしか使用されないため血栓症の再発ないし増悪を阻止しえないか

らである。一旦深部静脈血栓症を発症した際には院内発症として扱われるうえに、後から持ち込み症例であることを証明することは困難である。そして、これまで院内発症とされてきた症例の中にも持ち込み症例多数含まれていると推測できる。従来のガイドラインでは、これらの点の検討が不十分であった。阪大ガイドラインの運用結果から、具体的で詳細な問診と入院時スクリーニングによる持ち込み症例の診断が大変重要である。

日本では、やっと深部静脈血栓症の正確な診断が可能となりつつある段階であり、いまだ深部静脈血栓症の診断がっていない症例が多い。そのため、今後しばらくの間このような持ち込み症例が存在すると考えられるものの、将来的には静脈血栓症の診断済みの患者の割合が増えることにより持ち込み症例は減少すると予想される。

肺塞栓症における様々な訴訟は、従来のガイドラインの限界が明確でないために、あたかも従来のガイドラインを守らなかったことが明らかな注意義務違反ないし過失に当たるかのように誤解されている面が大きい。我々は社会に対して、より正確なメッセージを発信する義務がある。そして、血栓症の既往歴の聴取や触診視診など基本的な診察法を徹底するための臨床教育の重要性を改めて再評価することが重要である。

E. 参考文献

1.Kimura R., Honda S., Kawasaki T., Tsuji H.,

Madoiwa S., Sakata Y., Kojima T., Murata M., Nishigami K., Chiku M., Hayashi T., Kokubo Y., Okayama A., Tomoike H., Ikeda Y., Miyata T. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 15 107(4),1737-8,2006

2.Miwa K, Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Oishi M, Kataoka K, Ohgi S, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R.

Inhibition of ets, an essential transcription factor for angiogenesis, to prevent the development of abdominal aortic aneurysm in a rat model.

Gene Ther. 12(14), 1109-18, 2005

3.Nakashima H., Aoki M, Miyake T., Kawasaki T., Iwai M., Jo N., Oishi M., Kataoka K., Ohgi S., Ogihara T., Kaneda Y., Morishita R.

Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors.

Circulation. 109(1), 132-138, 2004

4.川崎富夫

日本の現状に即した新しい発想の肺塞栓症予防戦略

日本産婦人科学会雑誌 57(9),1530-1537, 2005

新潟県中越地震後の肺塞栓症発症症例の検討

分担研究者

三重大学大学院医学系研究科循環器内科学 中野 赴

研究協力者

東北大学大学院医学系研究科循環器病態学 佐久間 聖仁

研究要旨

新潟中越地震が肺塞栓症発生に影響を与えたか否かを検討する目的で、新潟中越地震後1ヶ月間に院外発症した肺塞栓症を調査した。避難所生活高頻度地区、女性が新潟中越地震後の院外発症肺塞栓症の危険因子であった。また、車中泊が非常に大きなリスクであることが示唆された。

1. 研究目的

地震が発症の契機となる疾患として心筋梗塞、たこつぼ心筋症が知られている。これらの疾患は地震によるストレスによって引き起こされると考えられている。一方、新潟中越地震後の肺塞栓症や深部静脈血栓症患者が新聞報道されているが、地震後に肺塞栓症が増加したか否かについては科学的に検討されてはいない。新潟中越地震が肺塞栓症発生に影響を与えたか否かを検討する。

2. 研究方法

病院便覧に掲載された精神科専門以外の全病院と、大学病院のナンバー内科、外科にアンケートを送付し(122通)、新潟中越地震(2004年10月23日発生)後1ヶ月間に院外発症した肺塞栓症を調査した。117通(回答率95.9%)の回答が得られた。相対リスクの計算にはポアソン回帰分析を用いた。

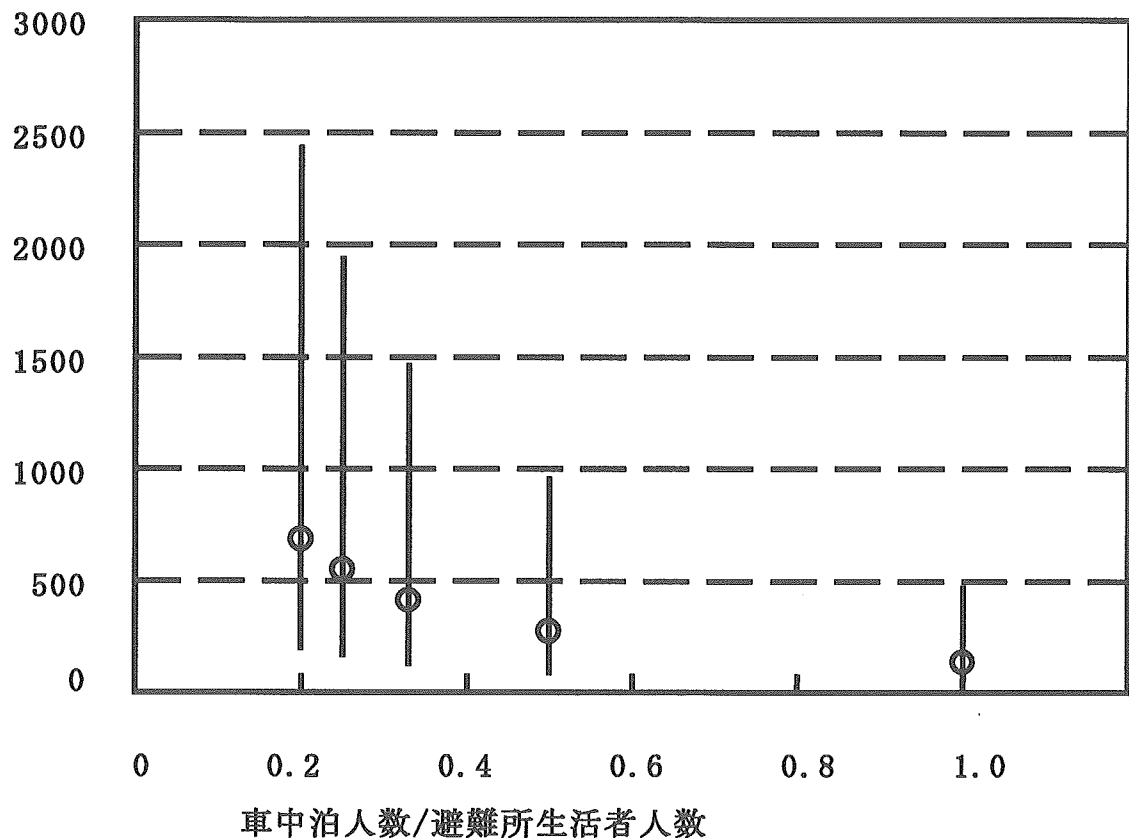
3. 研究結果

地震発生後1ヶ月間に院外発症した肺塞栓症は10例で、このうち初期の1週間以内に5%以上の住民が避難所生活を送った地区(避難所生活高頻度地区:高頻度地区)での発症は7例であった。5%未満の住民が避難所生活を送った地区(避難所生活低頻度地区:低頻度地区)での発症は全国平均の1ヶ月あたりの院外発症頻度と同等であった。性別の年齢分布は、高頻度地区では全例女性で40才代3人、60才代1人、70才代3人であった。低頻度地区では70才代に男女とも各1人、80才代に女性1人であった。高頻度地区と女性が院外肺塞栓症発症の独立した危険因子であった。高頻度地区の症例では全員が車中泊(1泊1人、2泊2人、3泊1人、4泊1人、5泊2人)をしていたが低頻度地区では皆無であった($p=0.008$)。一方、肺塞栓症の一般的な危険因子(長期臥床

など)は高頻度地区では1人、低頻度地区では全員に認めた (p=0.03)。新潟県での地震発生後1週間の車中泊延べ人数と避難所生活者の延べ人

数の比を1, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5としシミュレーションすると車中泊の相対リスクは図のようになる。

相対リスク



4. 考察

新潟中越地震後の院外発症肺塞栓症には車中泊が関与していることが示唆された。今後、災害に関連して類似した状況が発生した際には、車中泊を避けること、やむを得ず車中泊を繰り返す場合には積極的な予防法を取り入れるべきと考えられる。

避難所生活高頻度地区、女性が新潟中越地震後の院外発症肺塞栓症の危険因子であった。車中泊が非常に大きなリスクと考えられる。しかし、車中泊については現時点では実態が把握されていない。

6. 健康危険情報：なし

5. 結論

7. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saji K, Sakuma M, Suzuki J, Takahashi T, Demachi J, Nawata J, Kitamukai O, Onoue N, Sugimura K, Tada T, Fukui S, Kagaya Y, Watanabe J, Shirato K: Efficacy of acute inhalation of nitric oxide in patients with primary pulmonary hypertension using chronic use of continuous epoprostenol infusion. *Circ J* 69: 335-338, 2005
- 2) Nakamura M, Nakanishi N, Yamada N, Sakuma M, Miyahara Y, Okada O, Tanabe N, Kuriyama T, Kunieda T, Shirato K, Sugimoto T, Nakano T: Effectiveness and safety of thrombolytic therapy for acute pulmonary thromboembolism: results of a multicenter registry of the Japanese Society of Pulmonary Embolism Research. *Int J Circ* 99: 83-89, 2005
- 3) Oikawa M, Kagaya Y, Otani H, Sakuma M, Demachi J, Suzuki J, Takahashi T, Nawata J, Ido T, Watanabe J, Shirato K: Increased [18F] fluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of epoprostenol. *J Am Coll Cardiol* 45: 1849-1855, 2005
- 4) Sakuma M, Nakamura M, Nakanishi N, Miyahara Y, Tanabe N, Yamada N, Fujioka H, Kuriyama T, Kunieda T, Sugimoto T, Nakano T, Shirato K: Clinical characteristics, diagnosis and management of patients with pulmonary thromboembolism who are not diagnosed in the acute phase and not classified as chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J* 69: 1009-1015, 2005
- 5) Sakuma M, Souma S, Kitamukai O, Demachi J, Takahashi T, Suzuki J, Nawata J, Sugimura K, Oikawa M, Saji K, Tada T, Fukui S, Kagaya Y, Watanabe J, Shirato K: Portopulmonary hypertension: hemodynamics, pulmonary angiography, and configuration of the heart. *Circ J* 69: 1386-1393, 2005

2. 学会発表

- 1) Sakuma M, Nakamura M, Nakanishi N, Miyahara Y, Tanabe N, Yamada N, Kuriyama T, Kunieda T, Sugimoto T, Nakano T, Shirato K: Diagnostic strategy for acute pulmonary embolism. 第69回日本循環器学会総会, Tokyo,