

血小板減少性紫斑病 (TTP) や骨髄移植後 (BMT) 後の TMA では、血漿中の ADAMTS13 低下や破碎赤血球(FRC)の増加が有用とされている。

このため、肝移植 81 症例における FRC、von Willebrand factor(VWF) ならびに ADAMTS13 値の変動を調べ、肝移植における TMA の発症ならびに ADAMTS-13 の役割を検討した。

2. 研究方法

対象は、健常人 50 名ならびに 81 例の肝移植例 (女 : 男 = 35 : 46) で、その基礎疾患は肝癌 24 例、ウイルス性肝炎・肝硬変 20 例、原発性胆汁性肝硬変 11 例、その他の原因による肝硬変・重症肝炎 10 例、先天性胆道閉鎖症 7 例、胆汁うっ滞 6 例、その他 3 例であった。肝移植前、1 日後、1 週間後、2 週間後、4 週間後の各パラメーターの変動を調べた。

(倫理面への配慮)

三重大大学の倫理委員会の指針に従い、個人情報保護に留意して患者名は匿名化しておこなった。

FRC の測定は図 1 に示すように、全血の血球分画を XE-2100 にて測定

赤血球系パラメータ (XE-2100/RETch)

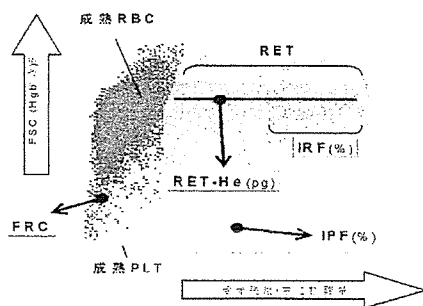


図 1 FRC の測定 (XE-2100 による) 後、ソフトウェア (XE RET master)

により FRC として換算された。

血漿中の ADAMTS13 活性は、FRET-VWF73 をもちいて測定された。VWF 値はバイダスアッセイキット vWF により測定された。

3. 研究結果

81 例の肝移植症例中、TMA の合併は 17 例 (21%) であり、基礎疾患、年齢、性別に差は認められなかった (表 1)。

表 1 TMA 例の内訳

| 基礎疾患 | N | 発症率 | 平均年齢 |
|-----------|----|-----|------|
| 肝癌 | 5 | 21% | 51 歳 |
| ウイルス性肝硬変 | 6 | | |
| 原発性胆汁性肝硬変 | 3 | | |
| その他の肝炎 | 2 | | |
| 胆汁うっ滞 | 1 | | |
| 合計 | 17 | | |

TMA 合併例では、FRC が増加するとともにヘモグロブリン (Hb) や血小板数が減少し、総ビリルビン (T-Bil) は増加し、ADAMTS13 値は著しく低下した (図 2)。一方、TMA 非合併例では

症例 1: TMA(+), B 型肝硬変

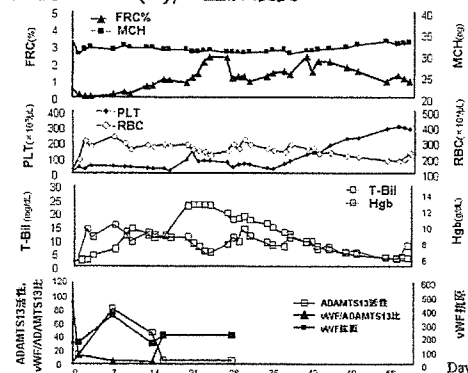


図 2 TMA 合併症例 FRC 値、ADAMTS13 値とも変動を示

さなかった(図 3)。

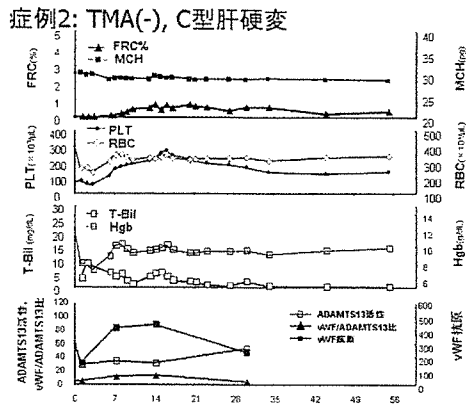


図 3 TMA 非合併症例

以上の成績により、FRC ならびに ADAMTS13 値は、TMA の診断に有用な可能性が示唆された。特に、FRC について ROC 解析を行うと、FRC 1.0 における感度は 0.724、特異度は 0.935 であった。

肝移植後の各パラメーターの変動においては、ADAMTS13 値は移植直後に両群とも急激に低下し、TMA 群では 14 日後さらに有意に低下した(図 4)。血中ヘモグロビン(Hb)値は、移

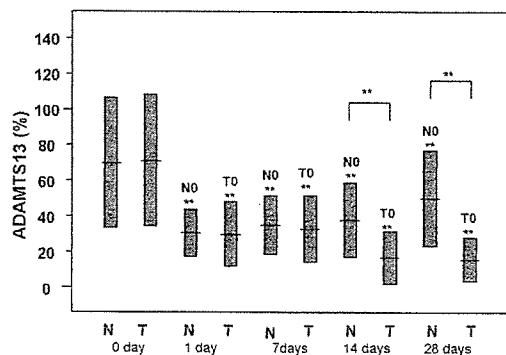


図 4 肝移植後の ADAMTS13 値
N; 非 TMA 例、 T; TMA 例
移植後増加増加傾向を示すが、14 日目

に TMA 群で有意な低下傾向を示した(図 5)。生体肝移植後の血小板数の変

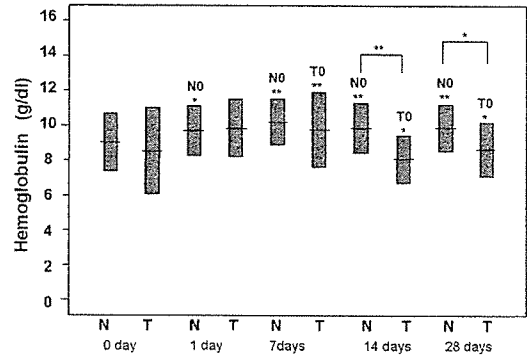


図 5 肝移植後の Hb 値
N; 非 TMA 例、 T; TMA 例

動については、移植前から TMA 群が非 TMA 群に比べて低下傾向にあった。移植 7 日後から血小板は非 TMA 群で増加を示すが、TMA 群では逆に低下傾向を示した。移植全経過を通じて、血小板数は非 TMA 群に比べて TMA 群で有意に低値を示した(図 6)。移植

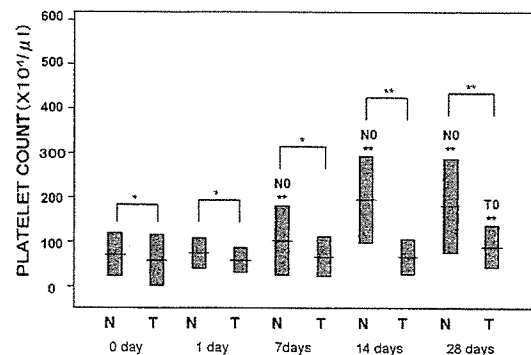


図 6 肝移植後の血小板数
N; 非 TMA 例、 T; TMA 例

後の総ビリルビン値(T-Bil)値は、移植後 7、14、28 日後に、非 TMA 群に比べて TMA 群で有意に高値を示した

(図7)。VWF 抗原は移植後低下し、そ

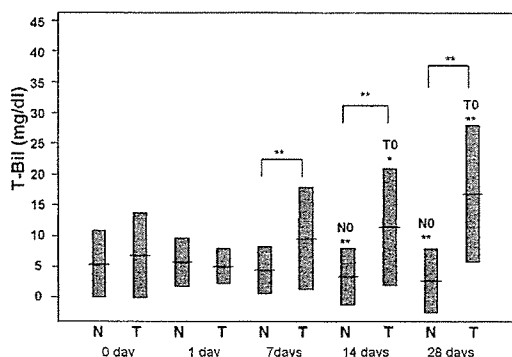


図7 肝移植後の T-Bil 値

N; 非 TMA 例、 T; TMA 例

の後増加した。VWF/ADAMTS13 比は、ほぼ ADAMTS13 値と反対の挙動を示した。血中 LDH 値は、移植後 14 日、28 日に TMA 群で有意に増加した。血中クレアチニン値は、著明な変動を示さなかった。

4. 考察

近年、生体部分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。その診断には破碎赤血球が有用であるが、充分標準化されていなかった。XE-2100 による FRC の測定は、破碎赤血球の定量化ならびに標準化に有用と考えられた。現時点の解析では、カットオフ値は FRC 1.0 が適当と示唆された。

肝移植前後の経過を追った解析では、TMA の診断には FRC、LDH、T-Bil の増加や、ADAMTS13、血小板数、Hb の低下が有用であった。最も特異度の高いマーカーは、FRC の増加ならびに ADAMTS13 の低下であった。一方、今回の検討では VWF 値は有意

な変動を示さず、以前の報告と一致しなかったが、測定キットのモノクローナル抗体などの特性を再度検討する必要がある。

また、TMA の早期診断には血小板数の低下ならびに網状血小板数の増加が有用であり、ADAMTS13、LDH、T-Bil、Hb 値などは、現時点で有用であることが示されなかった。

5. 結論

生体部分肝移植の致命的合併症である TMA の診断には、従来のマーカーに加え、FRC や ADAMTS-13 が有用であると考えられた。

6. 健康危険情報

特になし

7. 研究発表

1) 論文発表

1) 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) Kamikura Y, Wada H, Sase T, Yamaguchi M, Kaneko T, Sakaguchi A, Abe Y, Nishioka J, Nobori T, Shiku H: Hemostatic abnormalities and leukocyte activation caused by infection in patients with malignant lymphoma during chemotherapy. *Thromb Res*. 2006;117: 671-679

3) Matsumoto T, Wada H, Nishioka Y, Nishio M, Abe Y, Nishioka J, Kamikura Y, Sase T, Kaneko T, Houdijk WP, Nobori T,

- Shiku H: Frequency of Abnormal Biphasic aPTT Clot Waveforms in Patients with Underlying Disorders Associated with Disseminated Intravascular Coagulation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006; 12: 185-92
- 4) Wada H, Kobayashi T, Abe Y, Hatada T, Yamada N, Sudo A, Uchida A, Nobori T: Elevated levels of soluble fibrin or D-dimer indicate high risk of thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1253-8.
- 5) Matsumoto T, Kaneko T, Wada H, Kobayashi T, Abe Y, Nobori T, Shiku H, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S: Proteinase 3 expression on neutrophil membranes from patients with infectious disease. *Shock.* 2006; 26: 128-133.
- 6) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, Fujisawa K, Wada H, Nagasawa T, Nomura S, Kojima T, Yagi H, Ikeda Y: Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1936-43
- 7) Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T: A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 2006; 118: 463-9
- 8) Kobayashi T, Wada H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2007; 119: 447-52
- 9) Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, Shiku H: Reduced CD4⁺CD25⁺ T Cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* (in press)
- 2) 学会発表
- 1) Wada H: Pathophysiology and hemostatic molecular markers in septic DIC. Symposium 7; DIC in Asian countries. (chairperson; Zhaoyue Wang and Hideo Wada), The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis and Hemostasis, Suzhou, China, September 21-23, 2006
- 2) .卒後研修プログラム; 和田英夫: 凝固亢進状態と術後血栓予防に関して、第58回日本産科婦人科学会学術講演会、2006年
- 3) 和田英夫: 臨床検査のEBMに基づくDIC診断、シンポジウム治療戦略に直結する臨床検査、第45回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会、2006年
- 4) 和田英夫: DICの診断基準と検査ガイドライン、血栓症・DICの臨床と検査のガイドライン、日本臨床検査自動化学会第20回春季セミナー、2006年
- 5) 和田英夫: Guidelines for the diagnosis and treatment of DIC. 合同シンポジウム3. 血液専門医が遭遇する血栓止血関連疾患、第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会、2006年
- 6) 和田英夫: 赤血球関連パラメーター、シンポジウムI. 血液学的検査機器の自動化と新たな付加機能、日本臨床検査自動化学会第38回大会、2006、
- 7) 小林稔彦、和田英夫、登勉、森美貴、

臼井正信、伊佐地秀司、上本伸二：肝移植症例における ADAMTS13、フォン・ウィルブラント因子、破碎赤血球の変動についての検討、学術推進 SPC シンポジウム 3 「ADAMTS13 の臨床応用—測定とその解釈」、第 29 回日本血栓止血学会学術集会、2006 年

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>

- 1) Kamikura Y, Wada H, Sase T, Yamaguchi M, Kaneko T, Sakaguchi A, Abe Y, Nishioka J, Nobori T, Shiku H: Hemostatic abnormalities and leukocyte activation caused by infection in patients with malignant lymphoma during chemotherapy. *Thromb Res.* 2006;117: 671-679
- 2) Wada H, Kobayashi T, Abe Y, Hatada T, Yamada N, Sudo A, Uchida A, Nobori T: Elevated levels of soluble fibrin or D-dimer indicate high risk of thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1253-8.
- 3) Matsumoto T, Kaneko T, Wada H, Kobayashi T, Abe Y, Nobori T, Shiku H, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S : Proteinase 3 expression on neutrophil membranes from patients with infectious disease. *Shock.* 2006; 26: 128-133.
- 4) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, Fujisawa K, Wada H, Nagasawa T, Nomura S, Kojima T, Yagi H, Ikeda Y: Preliminary

laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost.* 2006; 4: 1936-43

5) Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T: A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res.* 2006; 118: 463-9

6) Kobayashi T, Wada H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2007; 119: 447-52

日本人の静脈血栓症患者の遺伝的背景：プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの遺伝子変異は約 31%に見られ、プロテイン S 遺伝子欠損は少ない

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）

研究要旨

「厚生労働省科学研究費難治性疾患克服研究事業、血液凝固異常症に関する調査研究班」で収集した 168 名の日本人静脈血栓症患者を対象とし、プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの各遺伝子の全エクソンの塩基配列を決定した。その結果、静脈血栓症患者の 19 名（11%）、28 名（17%）、12 名（7%）にそれぞれの遺伝子にアミノ酸配列レベルで変化を伴う変異が見られた。このうち、2つの遺伝子に変異を持つ患者は 7 名いたので、52 名の静脈血栓症患者に、アミノ酸配列レベルで変化を伴う変異を保有することが判明した。これは、今回対象とした静脈血栓症患者の 31%に相当した。また、変異保有者は非保有者に比べ、若年で静脈血栓症を発症していた ($p=0.028$)。静脈血栓症患者の全員を対象に、これらの遺伝子シーケンスを行った研究はこれまでなく、今回の徹底的なシーケンス解析の結果、3つの遺伝子変異の静脈血栓症への寄与が明確になった。また、これらの患者がプロテイン S 遺伝子の欠損を持つかどうかを MLPA 法で調べたところ、1名の患者にプロテイン S 遺伝子全長にわたっての欠損を認めた。

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（オッズ比 5.58、95%信頼区間 2.9-9.5）。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。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。ヘテロ接合体 34 名のうち、16 名は 70%以上の活性を示し、

7名は活性 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ことが明らかとなった。静脈血栓症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。本研究では、当研究班で収集した日本人静脈血栓症 168名の DNA を用いて、プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの各遺伝子をシーケンスし、アミノ酸配列レベルで変化を伴う変異を有する遺伝子変異を収集し、静脈血栓症との関連に検討を加えた。また、プロテイン S 遺伝子の欠損を調べた。

B. 研究方法

当調査研究班特発性血栓症サブグループで収集した 168名の日本人静脈血栓症患者を対象とする。プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの各遺伝子の全エクソンを PCR で増幅し塩基配列を決定した。MLPA 法を用いて、プロテイン S 遺伝子の欠損を調べた。

(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

プロテイン C 遺伝子のシーケンスにより 9 個の機能に影響を与えると考えられる変異を同定した。これらの変異は、静脈血栓症患者の 11%に相当する 19名に見られた。なかでも、Lys193 欠失と V339M は 4 名、R348Q は 3 名に同定された。プロテイン S 遺伝子のシーケンスにより 15 個の機能に影響を与えると考えられる変異を同定した。このうち、K196E 変異は 15 名、V87L は 2 名に見られた。アンチトロンビン遺伝子のシーケンスにより 11 個の機能に影響を与えると考えられる変異を同定した。なかでもミスセンス変異は 10 種あり、これらはいずれも 1 人だけに同定された。したがって、ミスセンス変異の保有者は、静脈血栓症の 7%に相当する 12 名であった。以上、168 名の静脈血栓症患者のプロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの遺伝子のシーケンスにより、患者の 19 名(11%)、28 名(17%)、12 名(7%)にそれぞれの遺伝子にアミノ酸配列レベルで変化を伴う変異を保有することが判明した。このうち、2 つの遺伝子に変異を持つ患者は 7 名いたので、52 名の静脈血栓症患者が、アミノ酸配列レベルで変化を伴う変異を保有することが判明した。これは、今回対象とした静脈血栓症患者の 31%に相当した。また、変異保有者は非保有者に比べ、若年で静脈血栓症を発症していた($p=0.028$)。また、これらの患者がプロテイン S 遺伝子の欠損を持つかどうかを MLPA 法で調べたところ、1 名の患者にプロテイン S 遺伝子全長にわたっての欠損を認めた。

D. 考察

静脈血栓症患者の全員を対象に、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子の全てのエクソンをシークエンスした研究はこれまでなく、今回の研究が始めての試みである。この徹底的なシークエンス解析の結果、3つの遺伝子のアミノ酸変異を伴う遺伝子異常は、52名の患者（約31%相当）に見られ、これら遺伝子の静脈血栓症への寄与が明確になった。このうち、プロテインSとプロテインCの両遺伝子に変異を持つ患者が6名、プロテインSとアンチトロンビン遺伝子の両遺伝子に変異を持つ患者は1名いた。この7名のうち、6名がプロテインS K196E変異を保有していた。これから考えると、日本人の55人に一人が保有するプロテインS K196E変異は、他の静脈血栓症遺伝子の変異と重なり、静脈血栓症の発症に寄与する可能性が示唆された。

今回同定された変異の内訳は、プロテインCに9変異、プロテインSに15変異、アンチトロンビンに11変異である。なかでも複数の患者に見られた変異は、プロテインS K196E（15名、2名のホモ体を含む）、プロテインC Lys193欠失とV339M（各4名）、R34Q（3名）、H149P（2名）、R211W（2名）、プロテインS V87L（2名）、アンチトロンビン L256フレームシフト（2名）であった。これらの変異は日本人に高頻度に見られると考えられるが、一般住民での頻度はPS K196E以外は不明なので、これらの変異の静脈血栓症発症に対する寄与は明確ではない。しかし、プロテインCやアンチトロンビンの

欠損症の頻度は、0.2%ともいわれているので、今回同定した変異が静脈血栓症発症に寄与していると考えられよう。

静脈血栓症患者を変異保有者（52名）と非保有者（116名）に分類し、血栓症発症の初発症年齢を比較したところ、変異保有者は有意に若年で発症していた。このことから、アミノ酸変異を伴う遺伝子変異は静脈血栓症の遺伝的要因となることが明らかとなった。ヒト遺伝子の変異を収集したHapMapが完了し、アレル頻度が5%以上の遺伝子多型を対象とした疾患遺伝子研究がCommon Diseasesを対象に進められ、成果が挙げられている。しかし、本研究のように比較的稀な変異の集積による疾患発症の研究の重要性も増している。今後、疾患の候補遺伝子を詳細に検討することにより、静脈血栓症の遺伝的背景が更に明らかになると考えられる。

本研究の成果の一部は、第29回日本血栓止血学会で発表した。その一部の成績はMedical Tribune誌（平成19年1月18日号）に紹介された。

E. 結論

当調査研究班で収集した静脈血栓症患者168名の約31%が、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子のアミノ酸配列レベルで変化を伴う変異を保有することが判明した。また、変異保有者は非保有者に比べ、若年で静脈血栓症を発症していた（ $p=0.028$ ）。日本人の静脈血栓症患者には、プロテインS遺伝子欠損は存在するものの、その頻度は余り高くないと推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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*, 119:35-43, 2007.
- (2) Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, Otsubo R, Nagatsuka K, Otsuki T, Sakata T, Nagura J, Okayama A, Minematsu K, Naritomi H, Honda S, Sato K, Tomoike H, Miyata T: Polymorphisms in vitamin K-dependent γ -carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in general population *Int J Hematol* 2006;84:387-397.
- (3) 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* 2006; 107:1737-1738.
- (4) Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, Okamoto A, Okayama A, Tomoike H, Miyata T: Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost* 2006;

4:2010-2013.

- (5) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T: Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol* 2006; 83:217-223.

2. 学会発表

宮田敏行、血栓症の遺伝子素因、ビタミン K サイクル遺伝子多型とワルファリン療法の今後の動向、第9回ビタミン K フォーラム、第16回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会、平成18年6月9日、甲府市

佐藤有希子、小亀浩市、木村利奈、竹下 聡、末久悦次、川崎富夫、巽純子、宮田敏行、「深部静脈血栓症患者におけるプロテイン S 遺伝子の解析」、第51回日本人類遺伝学会、平成18年10月17日-20日、米子市

宮田敏行、日本血管生物医学会とのジョイントシンポジウム、ワルファリン感受性の個人差を規定する遺伝子、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月18日、宇都宮市

阪田敏幸、岡本 章、小久保喜弘、佐藤 清、岡山 明、森田隆司、宮田敏行、血漿中プロトロンビン活性の加齢による変動とその性差、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市

石川淳子、木村利奈、本田繁則、川

崎富夫、末久悦次、辻 肇、窓岩清治、坂田洋一、小嶋哲人、村田 満、竹下 聡、池田康夫、宮田敏行、「日本人静脈血栓症における関連遺伝子の変異解析」、第29回日本血栓止血学会学術集会、平成18年11月16日-18日、宇都宮市

Toshiyuki Miyata, ADAMTS13: Deficiency, assay method, and mouse model, Lecture at University of Michigan, July 7, 2006, Ann Arbor, USA.

Toshiyuki Miyata, ADAMTS13 and its related issues, Invited lecture, Gordon Research Conference Hemostasis, July 11, 2006, Colby College, Waterville, ME, USA.

Toshiyuki Miyata, Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese, Symposium 2: Thrombophilia and some related factors. Invited lecture. The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.

Shoko Sugiyama, Hisao Hirota, Rina Kimura, Yoshihiro Kokubo, Tomio Kawasaki, Etsuji Suehisa, Akira Okayama, Hitonobu Tomoike, Tokio Hayashi, Kazuhiro Nishigami, Ichiro Kawase, Toshiyuki Miyata. Haplotype of thrombomodulin gene associated with plasma thrombomodulin level and deep vein thrombosis in the Japanese population. (Poster presentation) The 4th Asian-Pacific Congress on Thrombosis Hemostasis, September 21 - 23, 2006, Suzhou, China.

Toshiyuki Miyata, Genetic risk factors for thrombosis in Japanese, The Second Sweden-NCVC Symposium on Cardiovascular Disease and Metabolic Syndrome, September 26, 2006, Stockholm, Sweden.

- 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

ヘパリン在宅自己注射療法のガイドライン設定へ向けて
—「ヘパリンの在宅自己注射に関するアンケート調査」のまとめ—

分担研究者 辻 肇 京都府立医科大学 輸血・細胞医療部・病院教授

研究要旨

在宅医療の普及を踏まえ、特発性血栓症の予防法の確立を目的として、「ヘパリンの在宅自己注射に関するアンケート調査」を実施した。調査対象者の51%においてヘパリンの在宅自己注射の必要性が認められ、8%において行われていた。必要であったが、行われなかった理由として、保険適応がないため、投与方法に関するエビデンス、指針がないためなどが挙げられた。対象疾患では、下肢深部静脈血栓症、習慣性流産、肺塞栓症が多かった。未分画ヘパリン(皮下注用)が最も用いられ、1日2回の投与がなされていた。投与量は、52%は固定用量、44%は凝固能を指標に決定された。未分画ヘパリンの皮下投与量は10,000単位/日が最も多く、ついで5,000単位/日であった。凝固能を指標とする場合、APTTを用いて、皮下注後1～4時間において、測定値が1.5倍に延長するように投与量が決定されていた。投与期間が1カ月以上に及ぶものがあり、とりわけ産婦人科領域で顕著であった。投与中のモニタリングは90%で実施され、APTTを用いて、投与後2～3時間に実施され、1.5～2倍の延長が目標値とされた。出血性副作用は、皮下出血が28%に認められたが、重篤な出血はなかった。他にHIT、骨粗鬆症、アレルギー反応、肝機能障害、脱毛が認められた。経費は、患者あるいは病院により負担されていた。今後の課題として、治療指針の策定、保険適応、簡便なモニタリング法の開発が望まれた。

1. 研究目的

在宅医療の普及を踏まえ、特発性血栓症の予防法の確立を目的として、郵送法による「ヘパリンの在宅自己注射に関するアンケート調査」を実施した。

1,265名)を調査対象とした(回答数606名、回収率48%)。

2. 研究方法

大学附属病院(78)およびベッド数500床以上の一般病院(238)の専門医(計

3. 研究結果

(1) 回答者のプロフィール(表1、表2、表3、表4)

表1: 年 令 (回答数=601)

| | |
|-------------|-----|
| 30才未満 | 1 |
| 30才以上～40才未満 | 42 |
| 40才以上～50才未満 | 264 |
| 50才以上 | 294 |

表2: 勤務先 (回答数=600)

| | |
|--------|-----|
| 大学附属病院 | 196 |
| 病 院 | 398 |
| 医院・診療所 | 4 |
| その他 | 2 |

表3: ベッド数 (回答数=559)

| | |
|-----------------|-----|
| 100床未満 | 3 |
| 100床以上～500床未満 | 29 |
| 500床以上～1,000床未満 | 458 |
| 1,000床以上 | 69 |

表4: 専門領域 (回答数=600)

| | | |
|-----|--------|-----|
| 内 科 | 血液内科 | 138 |
| | 循環器内科 | 147 |
| | その他 | 10 |
| 外 科 | 一般外科 | 8 |
| | 心臓血管外科 | 136 |
| | 産婦人科 | 156 |
| | その他 | 5 |

(2) ヘパリンの在宅自己注射の実施状況

回答者全体の51%(309/412)においてヘパリン在宅自己注射の必要性が認められたが(表5)、実際に行っているものは8%(51/595)であった(表6)。必要であったが他剤で代替したものが29%(172/595)あり、その理由として保険

適応がない、投与方法に関するエビデンス、指針がないなどが挙げられた。

表5: ヘパリンの在宅自己注射は必要と考えられますか? (回答数=412)

| | |
|-------|-----|
| 必要である | 309 |
| 必要ない | 103 |

表6: ヘパリン自己注射を行ったことがありますか? (回答数=595)

| | | | |
|----|-----|----------------|-----|
| ある | 51 | | |
| ない | 544 | 必要な症例はなかった | 372 |
| | | 必要だったが、他剤で代替した | 172 |

(3) 対象疾患

下肢深部静脈血栓症、習慣性流産、肺塞栓症が最も多かった(表7)。その他の対象疾患としては、血栓性素因のある妊娠(抗リン脂質抗体症候群、川崎病、AT、PC欠損症)、巨大血管腫などが挙げられた。

表7: 対象疾患 (回答数=84)

| | |
|------------|----|
| 下肢深部静脈血栓症 | 31 |
| 肺塞栓症 | 11 |
| 大動脈瘤 | 2 |
| 心臓弁、血管置換術後 | 10 |
| 習慣性流産 | 19 |
| その他 | 11 |

(4) ヘパリンの在宅自己注射法

70%(42/60)において未分画ヘパリン

ン（皮下注用）が用いられ（表8）、75%（43/57）で1日2回の皮下投与がなされていた（表9）。投与量は、52%（34/66）が固定用量、44%（29/66）では凝固能を指標に投与量が決定された（表10）。

固定用量（皮下投与、回答数=32）では、未分画ヘパリンが4,000～25,000（単位/日）用いられ、10,000単位/日が最も多く（48%；11/23）、ついで5,000単位/日が（22%；5/23）であった。一方、低分子ヘパリン5,000～10,000単位/日あるいは低分子ヘパリン硫酸1,250～10,000（単位/日）も用いられていた。

凝固能を指標とする場合、APTTをもちいて79%（23/29）、皮下注後1～4時間において（75%；9/12）、測定値が1.5倍に延長するように投与量が決定されていた（71%；10/14）。投与期間が1カ月以上に及ぶものが92%（45/49）あり（表11）、とりわけ産婦人科領域で顕著であった。投与中のモニタリングは56/62（90%）で実施され、APTTを用いるものが71%（40/56）で（表12）、投与後2～3時間に実施された（50%；6/12）、1.5～2倍の延長が目標値とされた（94%；16/17）。

表8： 使用したヘパリンの種類（回答数=60）

| | |
|---------------|----|
| 未分画ヘパリン（静注用） | 5 |
| 未分画ヘパリン（皮下注用） | 42 |
| 低分子ヘパリン | 7 |
| 低分子ヘパリン硫酸 | 6 |

表9： 投与方法（回答数=57）

| | | |
|----|------|----|
| 皮下 | 1回/日 | 10 |
| | 2回/日 | 43 |
| | その他 | 2 |

| | | |
|----|------|---|
| 静注 | 持続 | 1 |
| | 1回/日 | 1 |
| | 2回/日 | 0 |

表10： 投与量（回答数=66）

| | | |
|---------|--------|----|
| 固定用量 | | 34 |
| 凝固能にて設定 | 全血凝固時間 | 6 |
| | APTT | 23 |
| | その他 | 0 |

表11： 投与期間（回答数=49）

| | |
|-------------|----|
| 1週間未満 | 2 |
| 1週間以上～1ヶ月未満 | 2 |
| 1ヶ月以上 | 45 |

表12： 投与期間中のモニタリング（回答数=62）

| | | |
|-----|--------|----|
| しない | | 6 |
| する | 全血凝固時間 | 7 |
| | APTT | 40 |
| | その他 | 9 |

(5) 副作用

出血性副作用は（表13）、皮下出血が28%（14/50）に認められたが、重篤な出血はなかった。他の非出血性副作用では、HIT（ヘパリン惹起血小板減少症）、骨粗鬆症、アレルギー反応、肝機能障害、脱毛が認められた。

表13： 出血性副作用（回答数=50）

| | | |
|----|-------|----|
| なし | | 35 |
| あり | 皮下出血 | 14 |
| | 血尿 | 0 |
| | 重篤な出血 | 0 |
| | その他 | 1 |

(6) その他

経費は、患者あるいは病院により負担されていた 90% (44/49)。今後の課題として、治療指針の策定、保険適応、簡便なモニタリング法の開発が望まれた。ヘパリンの在宅自己注射を行う上での問題点として、治療指針がないこと、保険適応がないこと、簡便なモニタリング方法の開発などが挙げられた。施設当たりの対象患者数として

表13のような結果が回答された。

表13： 貴施設で恩恵を受ける患者数
(回答数=40)

| | |
|--------|----|
| 5人未満 | 19 |
| 5～10人 | 6 |
| 10～20人 | 11 |
| 100人以上 | 4 |

4. 考察および結論

アンケート調査の結果、ヘパリンの在宅自己注射の必要性が認められるが、その実施においては、治療指針の策定、保険適応、簡便なモニタリング法の開発など解決されるべき課題が残されていると考えられる。今回の調査結果を踏まえて、「ヘパリン在宅自己注射療法のガイドライン(案)」(資料1)を提案するが、治療ガイドラインとして適切かつ有用なものとなるように、さらに検討を加える必要があると考えられた。

健康危険情報

特になし

研究発表

特になし

知的財産権の出願・登録

特になし

(資料1) ヘパリン在宅自己注射療法のガイドライン(案)

厚労省難治性疾患克服研究事業

血液凝固異常症調査研究班(班長、池田康夫)

特発性血栓症グループ(辻 肇、宮田敏行、小嶋哲人、坂田洋一、村田満、川崎富夫、小林隆夫)

はじめに

ヘパリンは、血栓症の治療や予防に有用な、最も広く用いられている抗凝固薬である。継続的なヘパリン注射を必要とする在宅患者においては、自らヘパリンを注射すること(ヘパリン在宅自己注射)で、通院の身体的、時間的、経済的負担が軽減され、より質の高い社会生活を送ることが可能になる。本ガイドラインは、ヘパリン在宅自己注射の基本事項を示し、有用で効率的な治療に資することを目的としている。

I. 目的および意義

ヘパリン在宅自己注射の目的は、通院の際に生じる身体的、時間的、経済的負担を軽減させ、患者により質の高い社会生活を送らせることである。

II. 適応基準

- (1)他の治療法で代替することができないヘパリン治療の適応患者であること。
- (2)在宅自己注射により通院の身体的、時間的、経済的負担、さらに精神的苦痛が軽減され、生活の質が高められること。
- (3)血栓性素因(先天性アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 欠損症、抗リン脂質抗体症候群など)を有する患者、習慣性流産、巨大血管腫、川崎病や心臓人工弁置換術後の患者などで、妊娠時の抗凝固療法を受ける場合。
- (4)患者ならびに家族が、目的、意義、遵守事項を十分に理解し、希望していること。
- (5)医師、医療スタッフとの間に安定した信頼関係が築かれている必要がある。

III. 患者教育

教育プログラムを作成し、それに従った患者教育が行われるべきである。短期間の入院による教育指導も効率的であり、必要に応じて考慮する。

〈教育プログラムの内容〉

- (1)血液凝固、血栓症に関する基礎知識
- (2)ヘパリンの薬理作用
- (3)副作用と発現時の対応
- (4)ヘパリンの管理と記録
- (5)注射の方法と実技
- (6)注射針などの医療廃棄物の処理
- (7)緊急時の連絡など

IV. 患者の遵守事項

- (1) ヘパリンを規定の方法で管理する。
- (2) 決められた方法で注射する。
- (3) 定期的に受診する。
- (4) 治療経過などの記録を提出し、評価と指導を受ける。
- (5) 判断に迷う場合、担当医に連絡し指示を仰ぐ。
- (6) 注射針や注射器などの在宅医療廃棄物を、担当医等の指示に基づき、適切に処理する。

V. 方法

(1) 皮下注射用ヘパリン^{注1)}を1回につき 5,000 単位、12 時間ごと(1万単位/日)^{注2)}にインスリン自己注射用注射器(29あるいは30G)を用い、皮下に自己注射する^{注3)}。

(2) 注射部位は、腹部、大腿、上腕とする。

(3) 凝固能をモニタリングする場合は、注射1~4時間後にAPTTを測定し、基準値の1.5~2.0 倍の延長を目標に投与量を調節する。

^{注1)} 現在、わが国で用いられる皮下注射用のヘパリンは、カプロシン(2万単/バイアル、0.8ml)のみである。欧米では、皮下注射用低分子ヘパリンも使用され、その有用性が報告されるが、わが国では市販されておらず使用できない。

^{注2)} カプロシンを5,000 単位、12 時間ごとに皮下注射するのが一般的であるが(低用量ヘパリン投与法)、8時間ごとに注射も可能である。

3,500 単位のヘパリンを皮下注射し、注射4時間後の APTT が正常上限となのように、8時間ごとに前回ヘパリン投与量±500 単位で皮下投与する方法もられる(用量調節ヘパリン投与法)。

^{注3)} 携帯用ポンプを用い24 時間持続的に静脈内に投与することも可能であるが、管理上の点を考慮すれば、皮下注射に優る方法として推奨できるものではない。

VI. 認可

- (1) 適応基準を満たしている。
- (2) 規定の教育プログラムに従った教育目標を達成していること。
- (3) 遵守事項を守ることに同意していること。

VII. 管理と記録

- (1) ヘパリンは規定の方法で管理する。
- (2) 処方された薬剤の名称、処方量、注射日時、注射量(単位数)、回数、注射部位、副作用の有無、疑問点などを記録する。
- (3) 担当医師は、定期的に確認してカルテに記載し、必要な指導を行う。

おわりに

- (1) 現在、ヘパリン在宅自己注射は保険適応されていない。
- (2) 目的、意義を十分に理解した上で、医療機関の取り決めに従い経費面での負担

や対応などをあらかじめ協議し、円滑に実施されることが望まれる。

(3) 今後の課題

ヘパリン在宅自己注射療法の保険適応

より簡便な凝固検査法の開発

低分子ヘパリンを始めとする新たな抗凝固薬の有用性に関する臨床試験成績の集積

(4) わが国における血栓症の治療法の選択肢のひとつとして認知され、普及することが望まれる。

妊娠時に深部静脈血栓症を発症した先天性 AT 欠損症の分子病態解析

分担研究者 小嶋哲人 名古屋大学 医学部 保健学科・教授

研究協力者

奥村薫 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

研究要旨 妊娠中に深部静脈血栓症を発症しアンチトロンビン (AT) 欠損症と診断された 4 症例において、その分子病態解明を目的に AT 遺伝子解析および同定変異 AT 分子の *in vitro* 発現解析を行った。それぞれ、症例 1 では一塩基置換 (T346C: Ser116Pro/AT Nagasaki)、症例 2 では一塩基置換 (T2C: Met-32Thr)、症例 3 では一塩基欠失 (47Tdel: FS-3Stop)、症例 4 では一塩基置換 (C2640T: Ala59Val) を認めた。各変異 AT の発現実験解析の結果、Met-32Thr 変異 AT ならび FS-3Stop 変異 AT は変異蛋白をほとんど検出できずタイプ 1 欠損症の原因と思われ、Ser116Pro 変異 AT および Ala59Val 変異 AT は培養上清中に分泌されたが、前者はヘパリン親和性の低下、後者はヘパリン親和性およびプロテアーゼ阻害活性はほぼ正常であるもののヘパリン結合後の立体構造変化異常によるヘパリンコファクター活性が低下するタイプ 2 欠損症の原因と思われた。

A. 研究目的

アンチトロンビン (AT) は、血液凝固反応に関わるトロンビンや活性型第 X 因子などのセリンプロテアーゼと 1 対 1 の複合体を形成して不活化し、凝固反応を制御する主要な血漿セリンプロテアーゼインヒビターである。AT の欠損ないし分子異常は、静脈血栓症の発症要因となる。AT は N 末端領域にヘパリン結合ドメインを、C 末端領域にトロンビンとの反応部位をもち、ヘパリンと結合することによってその抗トロンビン反応速度を約 1000 倍にも増強することが知られている。

先天性血栓性素因として最も古くから知られている AT 欠損症は、AT 抗原量が正常の 40~50%に減少して活性も低下するタイプ 1 AT 欠損症と、AT 抗原量は正常で活性が低下するタイプ 2 AT 欠損症の 2 つのタ

イプに分類される。今回、妊娠を契機に AT 欠損症と診断された 4 症例において AT 遺伝子解析を行いそれぞれ原因と思われる遺伝子異常を同定したので報告する。また同定した変異が AT 欠損症の原因となるかどうかを検討するため、それぞれ変異導入 AT 分子の発現実験を行ったので併せて報告する。

B. 研究方法

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血白血球より DNA を抽出し、各 AT 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ス法にて塩基配列を解析した。各同定遺伝子変異を AT cDNA に導入し発現ベクターを作製した後、HEK293 培養細胞での安定発現実験を行い、

ウェスタン解析あるいはヘパリン親和性解析、さらには培養上清中の変異型 AT 分子のヘパリン存在下、非存在下での抗トロンビン活性を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守するとともに、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た後に施行した。

C. 研究結果

表 1. 先天性AT欠損症の遺伝子変異

| Case | Age (years) | Sex | Mutation | Predicted AA change | Location |
|------|-------------|-----|-----------------|---------------------|----------|
| 1 | 33 | F | T5342C* | Ser116Pro* | Exon 3a |
| 2 | 28 | F | T72C | Met-32Thr | Exon 1 |
| 3 | 24 | F | <u>2417delT</u> | FS-3Stop | Exon 2 |
| 4 | 40 | F | <u>C2640T</u> | Ala59Val | Exon 2 |

*: cDNA and amino acid numbers are according to Old et al.

M: male, F: female, underline: novel mutation

遺伝子解析の結果、それぞれ原因と思われる遺伝子変異を認めた（表1）。

症例1では一塩基置換（T346C）を認め、これはヘパリン結合ドメインに位置する既報のミスセンス変異（Ser116Pro/AT Nagasaki）であった。症例2ではやはり既報のミスセンス変異（Met-32 Thr）の一塩基置換（T2C）を認めた。症例3では一塩基欠失（47Tdel）を認め、この変異はフレームシフトを起こして-16Tyr以降が13個の異常アミノ酸配列に置換する新規変異（FS-3Stop）であった。症例4では新規のミスセンス変異（Ala59Val）の一塩基置換（C2640T）を認めた。それぞれの変異AT発現実験の結果、Ser116Pro変異およびAla59Val変異ATは野生型ATと同様培養上清中に分泌されたが、Met-32Thr変異ならびFS-3Stop変異ATは変異蛋白をほとんど検出できなかった。分泌されたSer116Pro変異およびAla59Val変異ATの機能解析の

結果、前者はヘパリン親和性の低下、後者はヘパリン親和性およびプロテアーゼ阻害活性はほぼ正常であるが、ヘパリンコファクター活性は著しく低下し、ヘパリン結合後の立体構造変化異常による活性低下が推測された。

D. 考察

症例1において検出された遺伝子変異は、ヘパリン結合領域・ヘリックスDのミスセンス変異Ser116Proで、ヘパリン結合能が低下し、ヘパリンコファクター活性が低下してAT活性が低下するAT Nagasakiとして既にOkajimaらが報告しい変異と同一であり、我々のSer116Pro変異AT発現実験の結果でもこれを支持する結果で、タイプ2AT欠損症の原因と思われた。症例2、3での変異はともにシグナルペプチド内で未熟終末変異症であり、それぞれの変異AT発現実験の結果でも培養上清中に成熟ATタンパクは分泌されず、タイプ1AT欠損症の原因とお思われた。症例4では、ヘリックスAの中央部におけるミスセンス変異Ala59Valが認められたが、変異AT発現実験解析においては培養上清中に正常ATと同様に分泌されたが、ヘパリン親和性およびプロテアーゼ阻害活性はほぼ正常であるが、ヘパリンコファクター活性は著しく低下し、ヘパリン結合後の立体構造変化異常による活性低下が推測され、タイプ2AT欠損症の原因と思われた。

E. 結論

妊娠中に深部静脈血栓症を発症したAT欠損症の4症例の遺伝子解析によりそれぞれ4種類のAT遺伝子変異を同定した。HEK293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AT遺伝子の変異は、タイプ1AT欠損症（合成異常）あるいはタイプ2AT欠損症（活性低下）の原因と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- T. Adachi, T. Matsushita, Z. Dong, A. Katsumi, T. Nakayama, T. Kojima, H. Saito, E.J. Sadler, T. Naoe: Identification of amino acid residues essential for heparin binding by the A1 domain of human von Willebrand factor. **Biochem Biophys Res Commun.** 339(4): 1178-83, 2006.
- 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.
- 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):469-70, 2006.
- S. Kunishima, M. Motoyama, A. Takagi, M. Hamaguchi, T. Kojima, H. Saito: Further characterization of anti-platelet monoclonal antibody HPL5 as anti-glycoprotein V antibody. **Acta Haematol** 115(1-2):128-30, 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** 107(4):1737-1738, 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(2): 172-178, 2006.
- T. Matsushita, H. Adachi, H. Watanabe, Y. Shimoyama, T. Adachi, G. Sobue, M. Ito, T. Kojima, H. Saito, T. Naoe: Classic Polyarteritis Nodosa Presenting Rare Clinical Manifestations in a Patient with Hemophilia A. **Int J Hematol** 83(5): 420-425, 2006.
- K. Okumura, M. Kyotani, R. Kawai, A. Takagi, T. Murate, K. Yamamoto, T. Matsushita, J. Takamatsu, H. Saito and T. Kojima: Recurrent mutations of factor XI gene in Japanese. **Int J Hematol** 83(5): 462-463, 2006.
- A. Katsumi, T. Matsushita, K. Hirashima, T. Iwasaki, T. Adachi, K. Yamamoto, T. Kojima, J. Takamatsu, H. Saito, T. Naoe: Recurrent intramural hematoma of small intestine in a severe hemophilia A patient with high titer of factor VIII inhibitor. A case report and a review of the literatures. **Int J Hematol**, 84(2): 166-169, 2006.
- M. Kuwana, Y. Kurata, K. Fujimura, K. Fujisawa, H. Wada, T. Nagasawa, S.