

脈血栓症患者にはこれら3つの遺伝子に頻度の低い稀な変異を保有する患者が多いと考えられた。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、成果が挙がっている。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。

6) トロンボモジュリン遺伝子A455V変異を含むハプロタイプが血中濃度に影響を与え、男性で静脈血栓症に関連を示した。

トロンボモジュリンA455V変異と連鎖不平衡($r\text{-square}>0.9$)にある2729A>CのCアレル保有者の血中可溶性トロンボモジュリン量は、非保有者に比べ有意に低かった。米国のLITE研究では、A455V変異と可溶性トロンボモジュリン量の関連を指摘しており、VV型保有者の可溶性トロンボモジュリン量はAA型保有者に比べて10%低い。これは私達の研究結果を支持するものである。本多型は男性の静脈血栓症に関連を示したが女性では関連が見られず、静脈血栓症の危険因子としては強いものではないと考えられた。

7) 凝固第V因子R2多型は静脈血栓症に関連しなかった。

ヨーロッパを中心に研究が進められているFV R2多型を調査した結果、日本人の静脈血栓症に関連を示す傾向にあるものの、有意差を示すには至らなかった。ヨーロッパの研究でも、本多型は静脈血栓症の遺伝的背景となることを支持する研究とそれを追試できない研究が報告されており、遺伝的背景としてさほど強いものではない。今回の日本人を対象にした研究でも、本多型は静脈血栓症と有意差を持った関連は示さなかったものの、その傾向は観察された($P=0.055$)。

8) TFPI β のAsn221Ser変異は血中のtotal TFPI抗原量を増加させるが静脈血栓症には関連しなかった。

TFPI β N221S変異は血中のtotal TFPI量の増加に関連を示し、変異型Sアレル保有者のtotal TFPI量は有意に増加していた。しかし、本遺伝子多型は静脈血栓症と関連を示さなかった。変異Serを持つTFPI β はGPIアンカーされないと考えられるので、細胞上に留まることができず、血中total TFPI量が増加することが説明されよう。このことは、変異Serを持つTFPI β は血管内皮細胞上のTFPI β 量が減ると考えられ、ある種の病態下では易血栓性を示すことが予想されよう。

E. 結論

日本人の静脈血栓症患者のDNAを用いて静脈血栓症の遺伝的背景を解析した。従来から言われていたプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子の稀な変異が、日本人の静脈血栓症の遺伝的要因になることを明らかにした。また、日本人に広く見られるプロテインS K196E変異が静脈血栓症の遺伝的要因になることを明らかにした。本研究で対象にした静脈血栓症患者の登録・収集は、先天性欠損症の症例が集積している可能性があるため、将来、静脈血栓症患者を連続で収集した試料を対象に、これらの遺伝的リスクの再評価を行う必要があると考える。

日本人静脈血栓症患者の遺伝的背景に関する調査研究-2

分担研究者	小嶋哲人	名古屋大学医学部	教授
研究協力者	奥村 薫	名古屋大学医学部	保健学科
	藤森祐多	名古屋大学医学部	保健学科
	高木 明	名古屋大学医学部	保健学科
	岩崎年宏	名古屋大学 大学院	医学系研究科
	勝見 章	名古屋大学 大学院	医学系研究科
	松下 正	名古屋大学 大学院	医学系研究科
	山本晃士	名古屋大学 医学部	附属病院 輸血部
	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た AT 欠損症の 4 症例に AT 遺伝子変異を同定し HEK293 細胞を用いた発現実験の結果、タイプ 1 AT 欠損症（合成異常）あるいはタイプ 2 AT 欠損症（活性低下）の原因と考えられた。また、深部静脈血栓症または脳幹梗塞を発症した PS 欠損症 4 症例に 5 種の PS α 遺伝子変異を同定し COS-1 細胞を用いた発現実験の結果、PS 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。さらに、PC 欠損症 7 症例に 6 つのミスセンス変異と一塩基 G 欠失のフレームシフト変異を同定し、これらはすべて先天性 PC 欠損症を引き起こす既報の変異であった。血栓性素因には種々の遺伝子変異が起因することが示された。

A. 研究目的

生理的凝固制御因子であるアンチトロンビン (AT)、プロテインC (PC)、プロテインS (PS) の欠乏は血栓症のリスクファクターとなることが知られている。本研究班において我々は、これら凝固制御因子の先天性欠損症が疑われた症例での各遺伝子解析を行い原因と思われる遺伝子変異を同定し、発現実験などを通して、各欠損症を発症する分子病態解析を行った。

B. 研究方法

名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを得た後に患者あるいはその家族から末梢血白血球ゲノムDNAを抽出した。

AT遺伝子、PC遺伝子あるいはPS α 遺伝子の各エクソンを特異的なプライマーを用いPCRを行い、そのPCR産物の塩基配列をDirect Sequence法にて解析した。同定したミスセンス変異については、発現ベクターを作製し、HEK293細胞もしくはCOS-1細胞を用いた発現実験を行い解析した。

(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て施行した。

C. 研究結果

PS α 遺伝子解析では、C80Y、R314H、R275Cを各1例に、P375QとD455Yを同一患者から同定した。ELISAではR314H変異型（33%）、C80Y変異型（44%）P375Q+D455Y変異型（50%）、R275C変異型（72%）に低下し、パルスチェイス解析においてもR314H変異の分泌量が最も低く、他の変異分子も分泌が障害されることが確認された。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。

AT 遺伝子解析では、既報のミスセンス変異S116P（AT Nagasaki）とM-32T、新規の一塩基欠失（47Tdel, FS-3Stop）とミスセンス変異（A59V）を認めた。変異AT発現実験の結果、S116P変異はヘパリン親和性の低下を示した。また、A59V変異AT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ていた。

PC遺伝子解析では既報のミスセンス変異 R220W、R42S [PC Osaka10]、M406I [PC Osaka2]、C147W、R211W [PC Tochigi]、V339Mならびに1268G一塩基欠失[PC Nagoya]を認めた。

日本人に同定されたAT、PC、PSの遺伝子変異の文献調査を行い、名古屋大学のホームページで公開した（資料）。

D. 考察

先天性PS欠損症解析の結果、PS α 遺伝子変異を同定し発現実験および機能解析の結果、C80Y変異は発現量の低下と補酵素活性の著しい低下、R314H変異は発現量の低下、R275C変異は発現量と補酵素活性の軽度低下、D455Y変異は発現量低下が、それぞれPS欠損症の原因と考えられた。なお、P375Q変異はポリモルフィズムと思われた。

先天性AT欠損症でのAT遺伝子解析の結果、既報ミスセンス変異S116P（AT Nagasaki）はヘパリン結合能低下によるヘパリンコファクター活性低下を示すタイプ2 AT欠損症、シグナルペプチド内で未熟停止変異（M-32T変異）はタイプ1 AT欠損症、新規ミスセンス変異A59Vは、分泌・ヘパリン親和性は正常であるがヘパリン結合後の立体構造変化異常による活性が低下するタイプ2 AT欠損症と思われた。

先天性PC欠損症ミスセンス変異R220Wのホモ接合体、2つのミスセンス変異R42S[PC Osaka10]とM406I [PC Osaka2]の複合ヘテロ接合体、G423VfsX82 [PC

Nagoya]とR211W [PC Tochigi]の複合ヘテロ接合体症例は、いずれもPC活性が著減し、出生時電撃性紫斑の原因となったと思われた。一方、ヘテロ接合体症例はいずれも30歳代で、PC活性は40-50%と中等度の低下を認めたものの、血栓症未発症の症例もあり、血栓症発症には他のリスクの重複が重要と考えられた。

E. 結論

先天性PS欠損症のPS α 遺伝子解析、先天性AT欠損症のAT遺伝子解析、先天性PC欠損症のPC遺伝子解析の結果、それぞれに原因と思われる多様な遺伝子変異を同定した。血栓性素因を示す静脈血栓症のリスクファクターには、種々血液凝固制御因子の先天性欠損症を引き起こす様々な遺伝子変異が存在することが示された。また、名古屋大学医学部のホームページに、文献調査により明らかとなった日本人に同定されたアンチトロンビン、プロテインC、プロテインSの遺伝子変異を公開した。

日本人に同定されたアンチトロンビンの変異

SERPINC1 (AT)

Type of Change	Number of mutations
Substitution	36
Deletion	8
Duplication	2
Insertion	0
Variability short sequence repeats	0
Inversion	0
Complex	0
Total	46

Deletions

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
Exon2	c.49delT	p.Tyr17IlefsX14	Kyotani (2007) Am J Hematol 82(2), 702
	c.280_283delTTCT	p.Phe94IlefsX19	Ozawa (1997) Thromb Res 85, 515
	c.403_405delATG	p.Met135del	Katayama (2005) Thromb Res 116, 215
Exon3a	c.454_462delCACTTCTTC	p.His152_Phe154del	Niiya (2001) Int J Hematol 74 469
	c.462_464delCTT	p.Phe154del	Ozawa (1998) Semin Thromb Hemost 24, 233
Exon4	c.1026delA	p.Glu342AspfsX5	Nakahara (1997) Thromb haemost 77, 616
Exon5	c.1184_1185delAT	p.Tyr395CysfsX7	Nakahara (1997) Thromb haemost 77, 616
Exon6	c.1237_1239delGAA	p.Glu413del	Tsuda (1999) Ann Clin Biochem 36, 423

- ・ Frame shifting mutations are designated by 'fs' after the amino acid (s) affected by the change.
- ・ 'X#' indicates at which codon position the new reading frame ends in a stop (X).

The position of the stop in the new reading frame is calculated

starting at the first changed aminoacid that is created by the frame shift, and ending at the first stop codon.

Duplications

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
----------	--------------------------	------------------------------	-----------

Exon2	c. 56_59dupCTTT	p. Leu19SerfsX47	Tsukahara (2002) Rinsho Shinkeigaku 42, 207
	c. 116dupA	p. Ile39AsnfsX26	Nakahara (1999) Blood Coagul Fibrinolysis 10, 229

- Frame shifting mutations are designated by 'fs' after the amino acid (s) affected by the change.
 - 'X#' indicates at which codon position the new reading frame ends in a stop (X).
- The position of the stop in the new reading frame is calculated starting at the first changed aminoacid that is created by the frame shift, and ending at the first stop codon.

Substitutions

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
promoter	c. -4G>A	-	Katayama (2005) Thromb Res 116, 215
Exon1	c. 2T>C	p. Met1Thr	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
Exon2	c. 127A>T	p. Lys43X	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
	c. 143C>A	p. Pro48His	Kurihara (2005) Thromb Res 115, 351
	c. 165C>G	p. Tyr55X	小出 (1999) 日本血栓止血学会誌 10(5), 23
	c. 235C>T	p. Arg79Cys	Koide (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81, 289
	c. 256G>A	p. Ala86Thr	中町 (2006) 臨床血液 47(9), PS-3-71
	c. 272C>T	p. Ala91Val	Kyotani (2007) Am J Hematol 82(2), 702
	c. 362T>A	p. Met121Lys	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
	c. 374G>A	p. Gly125Asp	奥村 (2006) 臨床血液 47(9), PS-3-70
	c. 377C>T	p. Ala126Val	Ozawa (1998) Semin Thromb Hemost 24, 233
	c. 379T>C	p. Cys127Arg	Ozawa (1997) Thromb Haemost 77, 403
c. 394C>T	p. Gln132X	Nakahara (1999) Blood Coagul Fibrinolysis 10, 229	
Exon3a	c. 433G>T	p. Glu145X	Yamada (2000) Am J Med Genet 91, 348
	c. 438A>T	p. Lys146Asn	Yamada (2000) Am J Med Genet 91, 348
	c. 442T>C	p. Ser148Pro	Okajima (1993) Blood 81, 1300
	c. 481C>T	p. Arg161X	Ozawa (1998) Semin Thromb Hemost 24, 233
	c. 490C>T	p. Arg164X	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
	c. 515T>A	p. Leu172X	Tomonari (1992) Thromb Haemost 68, 455
	c. 533T>A	p. Leu178His	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
	c. 571C>T	p. Gln191X	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
Exon3b	c. 677C>T	p. Thr226Ile	樋口 (2000) 臨床血液 41(10), 489
	c. 685C>T	p. Arg229X	Tomonari (1992) Thromb Haemost 68, 455
Exon4	c. 842C>A	p. Ala281Glu	中町 (2006) 臨床血液 47(9), PS-3-71
	c. 876T>A	p. Tyr292X	Nakahara (1997) Thromb Haemost 77, 616
	c. 1012G>T	p. Glu338X	Niiya (2001) Int J Hematol 74, 469
	c. 1055T>G	p. Met352Arg	Miura (2004) Pediatr Nephrol 19, 1294
Exon5	c. 1171C>T	p. Arg391X	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
	c. 1190C>G	p. Ser397X	Takenaga (2001) Thromb Haemost 85, 570
Exon6	c. 1240G>C	p. Ala416Pro	奥村 (2006) 臨床血液 47(9), PS-3-70
	c. 1273C>T	p. Arg425Cys	Okajima (1995) Am J Hematol 48, 12
	c. 1274G>A	p. Arg425His	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
	c. 1313G>T	p. Arg438Met	Tsuji (1991) Thromb Res 65, 913A
	c. 1315C>A	p. Pro439Thr	沖松 unpublished
	c. 1322T>C	p. Leu441Pro	Nagaizumi (2003) Int J Hematol 78, 79
	c. 1384T>C	p. Cys462Arg	浦田 (2001) 日本血栓止血学会誌 12(5), 86

*学会発表分は雑誌および演題番号を記載

- "c." for a coding DNA sequence
- "p." for a protein sequence
- nucleotide 1 is the A of the ATG-translation initiation codon
- the translation initiator Methionine is numbered as +1
- the nucleotide 5' of the ATG-translation initiation codon is -1, the previous -2, etc

日本人に同定されたプロテインCの変異

PROC

Type of Change	Number of mutations
Substitution	44
Deletion	6
Duplication	1
Insertion	0
Variability short sequence repeats	0
Inversion	0
Complex	0
Total	51

Deletions

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
Exon6	c. 458_460delAGG	p. Glu153del	Takahashi (1999) Am J Hematol 62, 260
	c. 529_533delCCCCGC	p. Pro177SerfsX36	Sugahara (1992) Blood 80, 126
Exon7	c. 577_579delAAG	p. Lys193del	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
Exon9	c. 889_891delGAC	p. Asp297del	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 1268delG	p. Gly423ValfsX82	Yamamoto (1991) Thromb Haemost 65 646A
entire gene	c. (?_73)_(*296_?)del	-	Matsuda (1988) N Engl J Med 319, 1265

- Frame shifting mutations are designated by 'fs' after the amino acid (s) affected by the change.
- 'X#' indicates at which codon position the new reading frame ends in a stop (X).
The position of the stop in the new reading frame is calculated starting at the first changed aminoacid that is created by the frame shift, and ending at the first stop codon.

Duplication

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
Exon8	c. 787dupG	p. Val263GlyfsX7	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181

- Frame shifting mutations are designated by 'fs' after the amino acid (s) affected by the change.
- 'X#' indicates at which codon position the new reading frame ends in a stop (X).
The position of the stop in the new reading frame is calculated starting at the first changed aminoacid that is created by the frame shift, and ending at the first stop codon.

Substitutions

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
Exon1	c. -43A>C	-	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. -32G>A	-	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
Exon2	c. 2T>C	p. Met1Thr	Zheng (1994) Blood Coagul Fibrinolysis 5, 687
Intron2	c. 71-4C>T	-	Hayashida (2003) Intern Med 42, 268
Exon3	c. 76G>A	p. Val26Met	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
	c. 102C>A	p. His34Glu	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181

	c. 124C>T	p. Arg42Cys	Kinoshita (2005) Clin Biochem 381, 908
	c. 124C>A	p. Arg42Ser	Miyata (1995) Thromb Haemost 74, 1003
	c. 169C>G	p. Arg57Gly	Mimuro (1993) Int J Hematol 57, 9
	c. 199G>A	p. Glu67Lys	水上 (2003) 日本血栓止血学会誌 14(5), 0-37
	c. 202G>A	p. Glu68Lys	Ido (1993) Thromb Haemost 70, 636
Intron4	c. 263-1G>A	-	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
Exon5	c. 373G>C	p. Gly125Arg	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 400G>T	p. Glu134X	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
Intron5	c. 400+1G>C	-	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
Exon6	c. 446A>C	p. His149Pro	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
Exon7	c. 541T>G	p. Phe181Val	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 555G>T	p. Arg185Ser	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
	c. 565C>T	p. Arg189Trp	Kinoshita (2005) Clin Biochem 381, 908
	c. 595C>T	p. Arg199X	Nakagawa (1994) Int J Hematol 60, 273
	c. 631C>T	p. Arg211Trp	Matsuda (1988) N Engl J Med 319, 1265
Exon8	c. 659G>A	p. Arg220Gln	Sugahara (1994) Thromb Haemost 72, 814
	c. 730C>T	p. His244Tyr	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
Exon9	c. 970G>A	p. Gly324Ser	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 983G>A	p. Arg328His	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 988C>A	p. Leu330Ile	山中 (2005) 日本血栓止血学会誌 16(5), P-01
	c. 1000G>A	p. Gly334Ser	Yamamoto (1992) J Lab Clin Med 119, 682
	c. 1015G>A	p. Val339Met	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 1019C>T	p. Thr340Met	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
	c. 1043G>A	p. Arg348Gln	石川 (2006) 日本血栓止血学会誌 17(5), P-17
	c. 1106C>T	p. Pro369Leu	Zheng (1994) Blood Coagul Fibrinolysis 5, 687
	c. 1117T>C	p. Cys373Arg	Sugahara (1994) Thromb Haemost 72, 814
	c. 1148A>G	p. Glu383Gly	Miyata (1998) Thromb Res 92, 181
	c. 1174G>A	p. Gly392Arg	Zheng (1994) Blood Coagul Fibrinolysis 5, 687
	c. 1180C>T	p. Arg394Trp	森下 (2002) 日本血栓止血学会誌 13(5), 117
	c. 1201G>A	p. Asp401Asn	Zheng (1994) Blood Coagul Fibrinolysis 5, 687
	c. 1218G>A	p. Met406Ile	Miyata (1994) Thromb Haemost 71, 32
	c. 1229T>C	p. Phe410Ser	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 1253G>A	p. Gly418Asp	Sugahara (1992) Blood 80, 126
	c. 1266G>C	p. Trp422Cys	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 1279G>C	p. Gly427Arg	Miyata (1994) Thromb Haemost 71, 32
	c. 1285C>T	p. Leu429Phe	Miyata (1996) Thromb Haemost 76, 302
	c. 1297G>A	p. Gly433Ser	Kinoshita (2005) Clin Biochem 381, 908
c. 1321T>C	p. Tyr441His	Zheng (1994) Blood Coagul Fibrinolysis 5, 687	

*学会発表分は雑誌および演題番号を記載

- "c." for a coding DNA sequence
- "p." for a protein sequence
- nucleotide 1 is the A of the ATG-translation initiation codon
- the translation initiator Methionine is numbered as +1
- the nucleotide 5' of the ATG-translation initiation codon is -1, the previous -2, etc
- beginning of the intron; the number of the last nucleotide of the preceding exon, a plus sign and the position in the intron
- end of the intron; the number of the first nucleotide of the following exon, a minus sign and the position upstream in the intron
- beginning of the intron; the number of the last nucleotide of the preceding exon, a plus sign and the position in the intron

日本人に同定されたプロテインSの変異

PROS1

Type of Change	Number of mutations
Substitution	42
Deletion	2
Duplication	1
Insertion	0
Variability short sequence repeats	0
Inversion	0
Complex	0
Total	45

Deletions

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
Exon2	c. 152_153delAG	p. Gln51ArgfsX2	三田 (2006) 日本血栓止血学会誌 17(5), 0-46
Exon8	c. 741_745delCTCTG	p. Cys247X	Okada (2004) Br J Haematol 126, 219

- Frame shifting mutations are designated by 'fs' after the amino acid (s) affected by the change.
- 'X#' indicates at which codon position the new reading frame ends in a stop (X).
The position of the stop in the new reading frame is calculated starting at the first changed aminoacid that is created by the frame shift, and ending at the first stop codon.

Duplication

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
Exon12	c. 1355dupG	p. Ser452ArgfsX22	三田 (2006) 日本血栓止血学会誌 17(5), 0-46

- Frame shifting mutations are designated by 'fs' after the amino acid (s) affected by the change.
- 'X#' indicates at which codon position the new reading frame ends in a stop (X).
The position of the stop in the new reading frame is calculated starting at the first changed aminoacid that is created by the frame shift, and ending at the first stop codon.

Substitutions

Location	Description at DNA level	Description at protein level	Reference
promoter	c. -168C>T	-	Sanda (2007) Br J Haematol [Epub ahead of print]
Intron1	c. 77-1G>C	-	Tatewaki (1999) Thromb Haemost 82, 65
Exon2	c. 148A>G	p. Lys50Glu	Fujimura (1998) Thromb Res 89, 151
	c. 200A>C	p. Glu67Ala	山中 (2004) 日本血栓止血学会誌 15(5), P-08
	c. 233C>T	p. Thr78Met	井上 (2002) 日本血栓止血学会誌 13(5), 91
Exon3	c. 259G>C	p. Val87Leu	Yamazaki(1997) Thromb Haemost 77, 14
Intron3	c. 259+1G>C	-	Yamazaki (1997) Thromb Haemost 77, 14

	c. 260-1G>A	-	岡田 (2006) 日本血栓止血学会誌 17(5), P-16
Exon4	c. 283G>A	p. Gly95Arg	Tsuda (2002) Thromb Res 105, 233
	c. 308C>G	p. Ser103X	Okamoto (1996) Thromb Haemost 75, 877
Exon5	c. 362G>A	p. Cys121Tyr	Okada(2004) Br J Haematol 126, 219
Exon6	c. 478G>T	p. Glu160X	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
	c. 586A>G	p. Lys196Glu	Yamazaki (1993) Thromb Res 70(5), 395
Exon7	c. 724G>C	p. Glu242Gln	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
	c. 727G>A	p. Asp243Asn	Iwaki (2001) Semin Thromb Hemost 27, 155
Intron7	c. 728-2A>T	-	Mizukami(2006) Am J Hematol 81, 787
Exon8	c. 740G>T	p. Cys247Phe	井上 (2002) 日本血栓止血学会誌 13(5), 91
	c. 745G>T	p. Glu249X	Okada(2004) Br J Haematol 126, 219
	c. 835C>T	p. Gln279X	Iwaki (2001) Semin Thromb Hemost 27, 155
	c. 846T>G	p. Cys282Trp	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
Exon9	c. 946C>T	p. Arg316Cys	Okada (2006) J Thromb Haemost 4, 2003
Exon10	c. 1006G>A	p. Gly336Ser	Fujimura (1998) Thromb Res 89, 151
	c. 1016T>C	p. Leu339Pro	Iwaki (2001) Semin Thromb Hemost 27, 155
	c. 1024G>T	p. Glu342X	Hayashida (2003) Intern Med 42, 268
	c. 1064G>A	p. Arg355His	Okada(2004) Br J Haematol 126, 219
	c. 1147T>C	p. Trp383Arg	Mizukami (2006) Am J Hematol 81, 787
Exon11	c. 1247C>A	p. Pro416Gln	Okada (2006) J Thromb Haemost 4, 2003
	c. 1297A>T	p. Lys433X	Iwaki (2001) Semin Thromb Hemost 27, 155
Exon12	c. 1351C>T	p. Arg451X	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
	c. 1472C>A	p. Ala491Asp	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
	c. 1486G>T	p. Asp496Tyr	Okada (2006) J Thromb Haemost 4, 2003
Intron12	c. 1492+2T>A	-	Iida (2001) Thromb Res 102, 187
Exon13	c. 1543C>T	p. Arg515Cys	Yamazaki (1996) Blood 87, 4643
Intron13	c. 1645-2A>G	-	Nakahara (2001) Thromb Res 101, 387
Exon14	c. 1680T>A	p. Tyr560X	Sanda (2007) ISTH
	c. 1681C>T	p. Arg561Trp	Kinoshita (2005) Clin Biochem 38, 908
	c. 1687C>T	p. Gln563X	Yamazaki (1995) Thromb Haemost 74, 590
	c. 1849A>G	p. Thr617Ala	田村 (2003) 臨床血液 44(8), OS-1-1
Intron14	c. 1871-1G>T	-	Yamazaki (1997) Thromb Haemost 77, 14
Exon15	c. 1889C>T	p. Thr630Ile	Tsuda (2002) Thromb Res 105, 233
	c. 1907A>G	p. Tyr636Cys	Tsuda (2002) Thromb Res 105, 233
	c. 2000C>T	p. Pro667Leu	和田 (2003) 日本血栓止血学会誌 14(5), P-35

*学会発表分は雑誌および演題番号を記載

- "c." for a coding DNA sequence
- "p." for a protein sequence
- nucleotide 1 is the A of the ATG-translation initiation codon
- the translation initiator Methionine is numbered as +1
- the nucleotide 5' of the ATG-translation initiation codon is -1, the previous -2, etc
- beginning of the intron; the number of the last nucleotide of the preceding exon, a plus sign and the position in the intron
- end of the intron; the number of the first nucleotide of the following exon, a minus sign and the position upstream in the intron

日本人の静脈血栓症の治療に関する調査研究

(1) ヘパリン在宅自己注射療法の指針 (案)

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、「ヘパリン在宅自己注射療法の指針」の設定を行った。指針設定に先立ち、ヘパリン在宅自己注射実施の現況を把握するため、アンケート調査を実施した。アンケート調査は、大学附属病院およびベッド数500床以上の一般病院(計316)の専門医(1265名)を対象に行った。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。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。このようなアンケート結果に基づき、ヘパリン在宅自己注射療法の指針(案)(資料1)の設定を行った。

今後、本指針が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広く認知され、普及することが望まれるが、そのためには現在は承認されていないヘパリン在宅自己注射療法が保険適応されるべきであることはいうまでもなく、また承認に至るまでは経費面での負担や実施に関する問題点について、目的、意義を十分に理解した上で、各医療機関における倫理委員会などの取り決めにしたがい、あらかじめ慎重に協議した上で、円滑に実施されることが望まれる。

A. 研究目的

「ヘパリン在宅自己注射療法の指針」設定のため、その実施状況に関するアンケート調査」を実施した。

B. 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1,265名)を調査対象とした(回答数606名、回収率48%)。

C. 研究結果

1. アンケート

調査結果

(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（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ラン硫酸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(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
低分子ヘパラン硫酸	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

2. ヘパリン在宅自己注射療法の指針(案)の設定

アンケート調査結果を踏まえ、特に実施上の安全性に十分配慮した上で、「ヘパリン在宅自己注射療法の指針(案)」(資料1)を設定した。

本治療法に使用するヘパリン製剤は、欧米では皮下注射用低分子ヘパリンも用いられ、その有用性が報告されているが、わが国では市販されておらず使用できないため、皮下注射用ヘパリンであるカプロシン(2万単位/バイアル、0.8ml)のみとした。

投与方法に関しては、アンケート調査において、ヘパリン注射1～4時間後にAPTTを測定し、基準値の1.5～2.0倍の延長を目標にヘパリン投与量を調節する方法も44%において行われていた。これに関連する投与方法として、3,500単位のヘパリンを皮下注射し、注射4時間後のAPTTが正常上限となるように、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(用量調節ヘパリン投与方法)も実際に行われている。これらの凝固能を投与量決定の指標とする方法は、一般的に必ずしも容易でないことより、投与方法は皮下注射用ヘパリン(カプロシン)を1回につき5,000単位、12時間ごと(1万単位/日)、インスリン自己注射用注射器(29あるいは30G)を用いて皮下に自己注射する方法(低用量ヘパリン投与方法)とした。また、より高単位のヘパリンが必要な症例においては、8時間ごとに注射可能とした。

副作用の回避においては、出血性副作用ならびにHIT(ヘパリン惹起血小板減少症)がとりわけ重視され、定期的にAPTTや血小板数などを測定し、ヘパリン投与量や投与継続の可否を決定することとした。

D. 考察および結論

本指針が、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広く認知され、普及することが望まれる。そのためには、現在は承認されていないヘパ

リン在宅自己注射療法が保険適応されるべきであることはいうまでもないが、承認に至るまでは、経費面での負担や実施に関する問題点について、目的、意義を十分に理解した上で、各医療機関における倫理委員会などの取り決めに従い、あらかじめ慎重に協議した上で、円滑に実施されることが望まれる。

(資料1) ヘパリン在宅自己注射療法の指針(案)
厚生労働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。本指針は、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欠損症、プロテインC欠損症、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、その治療のためあるいは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(29G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。

^{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。

^{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。

^{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。
- (4) 定期的にAPTT(活性化部分トロンボプラスチン時間)や血小板数などを測定し、ヘパリン投与量や投与継続の可否を決定する。

おわりに

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本指針が広く認知され、普及することが望まれるとともに、本指針の評価が継続して行われるべきと考えられた。そのためには、現在は承認されていないヘパリン在宅自己注射療法が保険適応されるべきであることはいうまでもないが、現時点においては経費面での負担や実施に関する問題点について、目的、意義を十分に理解した上で、医療機関における倫理委員会などの取り決めに従い、あらかじめ協議した上で、円滑に実施されることが望まれる。

(2) 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 大阪大学大学院医学系研究科外科学

大阪大学医学部附属病院では2003年12月から独自のコンセプトに基づいて深部静脈血栓症および肺塞栓症に関する予防ガイドラインを作成して運用している。この研究で、血栓症予防においては無侵襲スクリーニング法が有効であることを世界に先駆けて明らかにできた。最近3年間に2例の肺塞栓症死亡例(全入院患者の約0.01%)があった。いずれも低リスクと判断されていた化学療法中の進行癌患者であった。これらの患者群への積極的な予防対策が、患者余命を改善するのか、それとも患者QOLを低下させるのかについて今後慎重に検討する必要がある。また、阪大産婦人科手術における未分画ヘパリンであるカプロシン(2500単位、2回/日)の術前からの予防投与では、出血量増加はなく十分な予防効果が得られた。阪大整形外科股関節置換術における検討では、抗凝固薬による予防を行わなくても、深部静脈血栓症の発生は殆ど無いという結果が得られた。阪大産婦人科および整形外科での検討結果では、血栓症の予防目的での低分子量ヘパリンやXa阻害剤の必要性は非常に低いと考えられる。やはり従来の静脈血栓症ガイドライン作成手法には大きな問題点が存在したと言える。さらに現在の医療現場をみると、ガイドラインを根拠とする様々な医療訴訟が多発している。医療上のガイドライン作成者は、その問題点と利害相反について明確な説明責任から逃れられない。医療から司法に対して、裁判所からの公的鑑定や司法雑誌への投稿を通じて、ガイドラインを取り巻く問題解決を呼びかけたところ、「認識の相違」を如何に解決するかという具体的方法論について司法から反響があった。現在、民事訴訟のみでなく刑事訴訟を含めて「認識の統合」へのステップを策定している。

(3) 本邦における静脈血栓症に対するワルファリン使用の実態調査研究

分担研究者 坂田洋一 自治医科大学医学部分子病態研究部 教授
研究協力者 窓岩清治 自治医科大学医学部分子病態研究部 講師

ワルファリン使用に関する全国アンケート調査

本邦医療機関におけるワルファリン使用の現状を把握することを目的に、大学付属病院及び500床以上の一般病院と日本血栓止血学会評議員の1,470件を対象に、「ワルファリン使用に関するアンケート調査」を実施した(回収率33.4%)。ワルファリンの平均使用期間が6ヶ月以上のものは、先天性および後天性血栓性素因を有する症例ではそれぞれ91.9%、84.0%に対して、血栓性素因が明らかでない症例では56.7%であった。ワルファリンコントロールの指標は、PT-INR値を1.5-2.5に設定している施設が89.6%と大半を占めており、その多くは1ヶ月ごとにモニタリングされていた。コントロールにFDPあるいはD-ダイマーいずれかを指標としているものが41.6%であった。ワルファリン療法中に血栓症の再発がみられた施設は32.4%あり、その際のPT-INR値が1.0-1.5であるものが29.5%と、設定したPT-INRを下回ることにより血栓症を発症する傾向がみられ、感染症、脱水、悪性腫瘍および臥床が主な誘因となっていた。ワルファリン使

用中の出血例は 52.8%の施設で経験があり、その際の PT-INR 値が 2.5 以上と設定値を上回る症例が 43.5%にみられた。このうち重要臓器への出血ないし輸血を要する重篤な出血が 30.4%にみられた(3施設で死亡例の報告)。本調査結果は、日本人に適した静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法を確立するために、重要な臨床的資料となるものと考えられる。

ワルファリン使用に関する全国実態調査への展開

「ワルファリン使用に関するアンケート調査」から、ワルファリンコントロールの指標として PT-INR 値を 1.5-2.5 に設定している施設が 89.6%と、大部分の施設において静脈血栓塞栓症予防ガイドラインに準じた用量調節ワルファリン療法が行われていた。ところが、血栓症の再発は全施設の 32.4%で経験されており、このうち 63.3%の施設ではガイドラインに準拠したワルファリン療法中での再発例であった。一方でワルファリン使用中の出血例は 52.8%の施設で経験があり、PT-INR 値が 2.5 以上と推奨値を上回る症例での出血が 43.5%にみられたものの、PT-INR 値 1.5-2.5 での出血例が 51.7%を占めていた。これらの結果を踏まえ、アンケート調査協力施設を対象に、ワルファリン療法中の血栓症再発例および出血例において、症例ごとに基礎疾患、誘因、症状および治療等に関する前向き実態調査へ展開する。本実態調査により、日本人に適した静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法を確立するための重要なエビデンスが得られるものと考えられる。

厚生労働省難治性疾患克服研究班

「血液凝固異常症」に関する調査研究班

主任研究者 池田 康夫

「ワルファリンの使用に関するアンケート調査」のお願い

本研究班におきましては、原因が明らかでない血栓症（特発性血栓症）の成因の解明、診断あるいは治療法の確立を研究目標のひとつとして、調査研究活動を行っております。

ワルファリンは、血栓症の治療および予防において広く用いられている有用な抗凝固薬であります。静脈血栓塞栓症の診断・治療・予防に関するガイドライン（2004年）においても、静脈血栓塞栓症の薬物的予防法として用量調節ワルファリンが推奨されております。

今般、ワルファリンの使用に関するご意見を、貴診療科で血栓症の診療に携わっておられます先生から賜り、安全で有用な使用法の確立に役立てたく存じます。ご多忙のところ、大変恐縮ではありますが、本アンケート調査にご協力賜りますようお願い申し上げます。

なお、勝手ではありますが調査結果の整理の都合上、同封の返送用封筒を用いて平成 年 月 日までにご回答いただければ幸いに存じます。

以上、よろしくお願い申し上げます。

平成18年 月 日

慶応義塾大学医学部内科

池田康夫（主任研究者）

国立循環器病センター研究所病因部

宮田敏行

自治医科大学分子病態治療研究センター

坂田洋一

名古屋大学医学部保健学科

小嶋哲人

慶応義塾大学医学部中央臨床検査部

村田 満

大阪大学医学部心臓血管外科

川崎富夫

信州大学医学部保健学科

小林隆夫

京都府立医科大学輸血細胞医療部

辻 肇