

to support this notion has been provided by a study that revealed a significantly reduced risk of intrapartum bleeding complications in women carrying FVL in comparison with noncarriers [49].

Prothrombin Gene Variant (G20210A)

Prothrombin, a vitamin K-dependent zymogen, plays a key role in its activated form (thrombin) in the conversion of fibrinogen to fibrin. In 1996, a novel genetic factor involved in the etiology of VTE was described: a G→A transition at nucleotide position 20210 (G20210A) in the 3'-untranslated region of the coagulation prothrombin gene [50]. This mutation, found in 1%–3% of subjects in the general Caucasian population and in 6%–18% of patients with VTE, is associated with a two- to fivefold increased risk of VTE [8]. The prothrombin G20210A mutation results in elevated concentrations of plasma prothrombin and a tendency to hypercoagulability due to the greater availability of prothrombin for conversion to thrombin.

Patients with G20210A mutation have been demonstrated to have an increased risk of both coronary and cerebral arterial thromboses. It has been shown that in the presence of traditional risk factors for coronary disease the prothrombin mutation acts synergistically to increase the risk of myocardial infarction [51]. Prothrombin G20210A mutation can be diagnosed only by gene analysis. Prothrombin G20210 A is considered the second most prevalent genetic abnormality linked to thrombophilia in Caucasians.

Hyperhomocysteinemia

The pathogenesis of thrombosis in hyperhomocysteinemia is unclear. Proposed mechanisms include direct endothelial injury, increased TF activity, inhibition of PC activation, increased platelet activation and aggregation, suppression of thrombomodulin expression, and impaired fibrinolysis by inhibition of tissue plasminogen activator (t-PA) binding to its endothelial cell receptor [52, 53].

Inherited severe hyperhomocysteinemia, as seen in classic homocystinuria, may result from homozygous methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) or cystathionine β-synthase (CBS) deficiency and, more rarely, from inherited errors of cobalamin (vitamin B₁₂) metabolism [54]. Inherited mild to moderate hyperhomocysteinemia may result from heterozygous MTHFR and CBS deficiencies but most commonly results from the C677T gene polymorphism, which is the most common mutation in the gene that codes for the MTHFR enzyme [53, 54]. This single-point mutation (C677T) in the coding region for the MTHFR-binding site (exon 4) is autosomal recessive, leads to substitution of a valine for an alanine, and results in a thermolabile variant of MTHFR deficiency [53]. Recent studies showed, however, that *MTHFR*C667T homozygosity with hyperhomocysteinemia is not associated with VTE [55, 56].

Acquired Hypercoagulable States

The acquired or secondary hypercoagulable states include a variety of clinical conditions that are known to have an increased risk for developing thrombotic complications [4, 5]. Transient or reversible conditions include pregnancy, use of oral contraceptives, hormone replacement therapy, immobilization, trauma or major

surgery, and prolonged travel (economy class syndrome). Conditions that are generally irreversible include malignancy, myeloproliferative disorders, nephrotic syndrome, antiphospholipid syndrome, and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Certain acquired conditions (e.g., elevated factor VIII, IX, and XI levels [57-59], lupus anticoagulant, pregnancy, oral contraceptive use) could result in the laboratory phenotype of APC resistance. This type of APC resistance is not associated with FVL. The origin and molecular basis of APCR in the absence of FVL is not well known and is likely to be of mixed genetic and acquired origin. It should be also noted that AT, PC, and PS deficiencies may occur in acquired hypercoagulable states, such as nephrotic syndrome, pregnancy, or disseminated intravascular coagulation [60].

Pregnancy and Puerperium

Pregnancy and puerperium are well-recognized hypercoagulable states. About 70% of DVTs in pregnancy are iliofemoral, with 80% of these persisting on the left side [61]. The risk of thromboembolism associated with pregnancy increases with age, the presence of hypertension, and the mode of delivery. It is particularly high in women who are confined to bed because of preeclampsia or eclampsia and who undergo a cesarean section [4].

Various anatomical, physiological, and biochemical changes during pregnancy and the postpartum period may predispose a patient to thromboembolism [4]. Pregnancy is associated with a hypercoagulable state due to increased concentrations of coagulation factors I, VII, VIII, IX, X, XI, and XII. There is also an elevated platelet count, and concentrations of PS [62] and AT decrease. Hypercoagulability is further enhanced by a marked depression of fibrinolytic activity during pregnancy, which is promptly restored within an hour of delivering the placenta [63]. These changes in the coagulation system are compounded by stasis generated by the gravid uterus compressing venous return from the lower extremities.

The risk of thrombosis during pregnancy is further increased if a woman has a concomitant genetic risk for thrombosis. Most notably is the FVL mutation that confers a threefold higher risk of thrombosis in pregnant women than in pregnant women without the mutation. The prothrombin gene variant (G20210A) is associated with a twofold increase in pregnancy-related thrombosis [64].

Warfarin crosses the placenta, is possibly teratogenic, and presents a hazard of hemorrhage to the fetus. Thus, heparin, which does not traverse the placenta, is the anticoagulant of choice during the first trimester and during late pregnancy. The hypercoagulable state persists up to 2 months following delivery of the fetus, and consideration should be given to continuing therapy after delivery [5].

Oral Contraceptives and Hormone Replacement Therapy

Venous thromboembolic events are serious complications of oral contraceptives and hormone replacement therapy (HRT). The administration of estrogen has been associated with a two- to sixfold increased relative risk of VTEs with either therapy [65]. Use of oral contraceptives is associated with increased levels of activated factor VII and decreased activities of PS and circulating thrombomodulin [66]. Oral contraceptives and HRT are associated with exponentially higher VTE relative risks when used by women with an inherited hypercoagulable state [8].

It remains impractical to screen for hypercoagulable disorders in every woman currently taking HRT or women who wish to begin therapy with oral contraceptives. If there is a family history of thrombosis or recurrent venous thrombosis, screening for a congenital hypercoagulable state is reasonable. Women who develop thrombosis while taking oral contraceptives should be treated like any patient with an acute thrombotic event and counseled regarding alternate methods of contraception. In addition, they should be tested for other causes of the hypercoagulable state [5].

Polycythemia Vera

Polycythemia vera (PV), a myeloproliferative disorder, carries with it an increased risk of thrombotic events. In a large series of 1213 patients with PV followed for 20 years, 634 fatal and nonfatal arterial and venous thromboses were recorded in 485 patients (41%) [67]. In PV, the prothrombotic effect of an elevated hematocrit is well established. The high hematocrit causes blood hyperviscosity, which plays a major role in the pathogenesis of both microcirculatory disturbances and arterial and venous thromboses. The multivariable, time-dependent analysis suggested that a high white blood cell count was also an independent predictor of vascular risk [68]. The predisposition for arterial thrombosis is reduced by cytoreductive therapy. However, aggressive treatment with cytoreductive agents carries an increased risk of malignancy [67].

Recently, a somatic mutation of the Janus kinase 2 (*JAK2*) gene resulting in constitutive activation of tyrosine kinase was identified with high frequency in patients with PV [69–71]. It is worth noting that the *JAK2* V617F mutation has been reported in a large proportion of patients with Budd-Chiari syndrome [72], in those with portal and mesenteric venous thrombosis [73, 74], and in a small but significant number of patients with cerebral vein thrombosis [75].

Laboratory Diagnosis

Table 3 shows the primary and secondary methods employed in the investigation of inherited thrombophilias [8, 76]. Diagnosis of AT, PC, and PS deficiency is established by plasma measurements of each protein using functional and immunological methods. APCR may be diagnosed by the aPTT modified assay or by identification of the FVL mutation with gene analysis techniques. Prothrombin G20210A is detected by gene analysis only. The usefulness of measuring plasma levels of coagulation factors in patients with VTE remains to be demonstrated [8].

Laboratory testing for hypercoagulable states is costly; and it rarely influences acute VTE management. It should be performed in selected patients with an objectively diagnosed venous thrombotic event under the following circumstances: relatively young patients (<50 years), recurrence of VTE, thrombosis at unusual sites, a positive family history of venous thrombotic disease [6, 7]. It may also be considered in selected asymptomatic individuals, particularly women who are relatives of patients with known inherited hypercoagulability, if the results may affect their decision to begin oral contraceptives use or HRT.

One should keep in mind the following points during the workup of patients with hypercoagulable states. Assays performed during acute illness or while a patient is

TABLE 3. Laboratory diagnosis of inherited hypercoagulable states

Risk factor	Primary method	Secondary method
AT deficiency	Plasma measurement ^a	DNA analysis
PC deficiency	Plasma measurement ^a	DNA analysis
PS deficiency	Plasma measurement ^a	DNA analysis
APCR	aPTT-based test	—
FVL	DNA analysis	—
Factor II G20210A	DNA analysis	—
Hyperhomocysteinemia	Plasma measurement	DNA analysis ^b

Modified from Franco and Reitsma [8]

APCR, activated protein C resistance; FVL, factor V Leiden; aPTT, activated partial thromboplastin time

^aFunctional method for AT and PC measurements and immunological method for (free and total) PS measurement. Immunological methods are useful for further characterization of cases of AT and PC deficiency

^bNo mutation was unequivocally associated with risk for VTE

anticoagulated may be unreliable, leading to misdiagnosis. For example, anticoagulant therapy with warfarin may influence the PC and PS levels; and in some tests for APC resistance, heparin treatment may influence the measurement of AT. Recent thrombosis, inflammatory disease, and pregnancy may also affect some of these tests [77]. Abnormal results for inherited hypercoagulable states should, in general, be confirmed by a second measurement obtained under ideal circumstances.

Management

Anticoagulant therapy is a mainstay of management. The timing, type, duration, and intensity of anticoagulation depend on the clinical situation. The decision to extend therapy beyond 6–12 months after an incident thrombotic event must be made on an individual basis [61]. Patients with acquired hypercoagulable states who develop VTE during transient high-risk clinical settings—such as oral contraceptive use, in a post-surgical state, or with limb immobilization—has a low risk of developing recurrent thrombosis after 3 months of treatment. They should, however, have appropriate thromboprophylaxis for future high-risk situations; and if they fall into a category where a prothrombotic disorder is likely, they may warrant further investigation. Patients who develop VTE with ongoing malignancy, lupus anticoagulant paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) or other continued risk factors are at high risk of having a recurrent thrombosis. For most of these patients, long-term anticoagulation should be considered, and expert advice is recommended.

Patients with inherited hypercoagulable states require appropriate counseling, including the advisability of testing first-degree relatives [61]. They should be considered for prolonged anticoagulation after a first episode of spontaneous VTE. However, long-term management should be individualized and depends on such factors as the precise nature of the disorder or disorders, circumstances of thrombosis, anticoagulant risk, and patient preference. Expert advice is recommended for all patients.

Recommendations may change as new knowledge related to natural history and results of clinical trials become available. Patients with congenital and some acquired thrombophilias are at increased, but variable, risk of VTE with pregnancy or use of oral contraceptives or HRT. Management in these patients should be guided by expert advice and an informed patient's preferences.

References

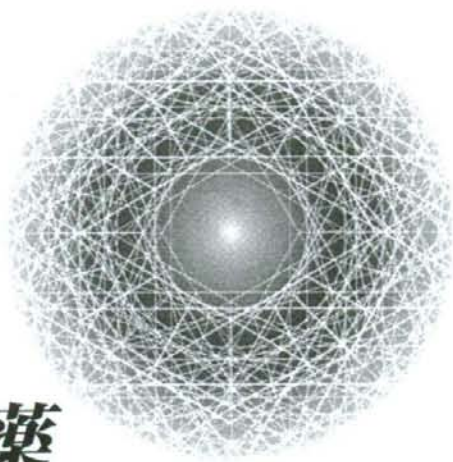
1. Rosendaal FR (2005) Venous thrombosis: the role of genes, environment, and behavior. *Hematology [Am Soc Hematol Educ Program]* 1-12
2. Kitchens C (1985) Concept of hypercoagulability: a review of its development, clinical application, and recent progress. *Semin Thromb Hemost* 11:293-315
3. Tripodi A, Mannucci PM (2007) Abnormalities of hemostasis in chronic liver disease: reappraisal of their clinical significance and need for clinical and laboratory research. *J Hepatol* 46:727-733
4. Schafer AI (1985) The hypercoagulable states. *Ann Intern Med* 102:814
5. Johnson CM, Mureebe L, Silver D (2005) Hypercoagulable states: a review. *Vasc Endovasc Surg* 39:123-133
6. Bauer KA (2001) The thrombophilias: well-defined risk factors with uncertain therapeutic implications. *Ann Intern Med* 135:367-373
7. Cushman M (2005) Inherited risk factors for venous thrombosis. *Hematology* 2005:452-457
8. Franco R, Reitsma P (2001) Genetic risk factors of venous thrombosis. *Hum Genet* 109:369-384
9. Van Boven HH, Lane DA (1997) Antithrombin and its inherited deficiency states. *Semin Hematol* 34:118-204
10. Egeberg O (1965) Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 13:516-530
11. Chowdhury V, Lane D, Mille B, et al (1994) Homozygous antithrombin deficiency: report of two new cases (99 Leu to Phe) associated with arterial and venous thrombosis. *Thromb Haemost* 72:198-202
12. Okajima K, Ueyama H, Hashimoto Y, et al (1989) Homozygous variant of antithrombin III that lacks affinity for heparin, AT III Kumamoto. *Thromb Haemost* 61:20-24
13. Boyer C, Wolf M, Vedrenne J, et al (1986) Homozygous variant of antithrombin III: AT III Fontainebleau. *Thromb Haemost* 56:250-255
14. Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, et al (2000) Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest* 106:873-878
15. Lane D, Bayston T, Olds R, et al (1997) Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update: For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 77:197-211
16. Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, et al (1993) Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* 32:4216-4224
17. Bayston T, Lane D (1997) Antithrombin: molecular basis of deficiency. *Thromb Haemost* 78:339-343
18. Van Boven HH, Olds RJ, Thein SL, et al (1994) Hereditary antithrombin deficiency: heterogeneity of the molecular basis and mortality in Dutch families. *Blood* 84:4209-4213
19. Sagar S, Stamatakis JD, Higgins AF, et al (1976) Efficacy of low-dose heparin in prevention of extensive deep-vein thrombosis in patients undergoing total-hip replacement. *Lancet* 307:1151-1154

20. Bucciarelli P, Rosendaal FR, Tripodi A, et al (1999) Risk of venous thromboembolism and clinical manifestations in carriers of antithrombin, protein C, protein S deficiency, or activated protein C resistance: a multicenter collaborative family study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1026-1033
21. Pabinger I, Schneider B (1996) Thrombotic risk in hereditary antithrombin III, protein C, or protein S deficiency: a cooperative, retrospective study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:742-748
22. Griffin J, Evatt, B, Zimmerman, TS, et al (1981) Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest* 68:1370-1373
23. Broekmans A, Veltkamp, JJ, Bertina, RM (1983) Congenital protein C deficiency and venous thromboembolism: a study of three Dutch families. *N Engl J Med* 309:340-344
24. Comp P, Nixon RR, Cooper DW, et al (1984) Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest* 74:2082-2088
25. Schwarz HP, Fischer M, Hopmeier P, et al (1984) Plasma protein S deficiency in familial thrombotic disease. *Blood* 64:1297-1300
26. Kamiya T, Sugihara T, Ogata K, et al (1986) Inherited deficiency of protein S in a Japanese family with recurrent venous thrombosis: a study of three generations. *Blood* 67:406-410
27. Miletich J, Sherman L, Broze G (1987) Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 317:991-996
28. Reitsma PH, Poort SR, Allaart CF, et al (1991) The spectrum of genetic defects in a panel of 40 Dutch families with symptomatic protein C deficiency type I: heterogeneity and founder effects. *Blood* 78:890-894
29. Aiach M, Gandrille S, Emmerich J (1995) A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. *Thromb Haemost* 74:81-89
30. Reitsma P (1997) Protein C deficiency: from gene defects to disease. *Thromb Haemost* 78:344-350
31. Millar D, Johansen B, Berntorp E, et al (2000) Molecular genetic analysis of severe protein C deficiency. *Hum Genet* 106:646-653
32. Van Wijnen M, Stam J, van't Veer C, et al (1996) The interaction of protein S with the phospholipid surface is essential for the activated protein C-independent activity of protein S. *Thromb Haemost* 76:397-403
33. Koppelman SJ, Hackeng TM, Sixma JJ, et al (1995) Inhibition of the intrinsic factor X activating complex by protein S: evidence for a specific binding of protein S to factor VIII. *Blood* 86:1062-1071
34. Zoller B, Garcia de Frutos P, Dahlback B (1995) Evaluation of the relationship between protein S and C4b-binding protein isoforms in hereditary protein S deficiency demonstrating type I and type III deficiencies to be phenotypic variants of the same genetic disease. *Blood* 85:3524-3531
35. Gandrille S, Borgel D, Sala N, et al (2000) Protein S deficiency: a database of mutations—summary of the first update; for the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 84:918
36. Makris M, Leach M, Beauchamp NJ, et al (2000) Genetic analysis, phenotypic diagnosis, and risk of venous thrombosis in families with inherited deficiencies of protein S. *Blood* 95:1935-1941
37. Kimura R, Honda S, Kawasaki T, et al (2006) Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* 107:1737-1738
38. Bertina RM, Koeleman BPC, Koster T, et al (1994) Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 369:64-67
39. Seligsohn U, Lubetsky A (2001) Genetic susceptibility to venous thrombosis. *N Engl J Med* 344:1222-1231

40. Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al (1998) Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. *Blood* 92:2353-2358
41. Koster T, Rosendaal FR (1993) Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet* 342:1503-1506
42. Svensson PJ, Dahlback B (1994) Resistance to activated protein C as a basis for venous thrombosis. *N Engl J Med* 330:517-522
43. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K, et al (1995) Mutation in the gene coding for coagulation factor V and the risk of myocardial infarction, stroke, and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 332:912-917
44. Salomon O, Steinberg DM, Zivelin A, et al (1999) Single and combined prothrombotic factors in patients with idiopathic venous thromboembolism: prevalence and risk assessment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:511-518
45. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, et al (1995) High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 85:1504-1508
46. Rees DC, Cox M (1995) World distribution of factor V Leiden. *Lancet* 346:1133-1134
47. Ridker P, Miletich JP, Hennekens CH, et al (1997) Ethnic distribution of factor V Leiden in 4047 men and women: implications for venous thromboembolism screening. *JAMA* 277:1305-1307
48. Zivelin A, Griffin JH, Xu X, et al (1997) A single genetic origin for a common caucasian risk factor for venous thrombosis. *Blood* 89:397-402
49. Lindqvist P, Svensson PJ, Dahlback B, et al (1998) Factor V Q506 mutation (activated protein C resistance) associated with reduced intrapartum blood loss: a possible evolutionary selection mechanism. *Thromb Haemost* 79:69-73
50. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al (1996) A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698-3703
51. Doggen CJM, Cats VM, Bertina RM, et al (1998) Interaction of coagulation defects and cardiovascular risk factors: increased risk of myocardial infarction associated with factor V Leiden or prothrombin 20210A. *Circulation* 97:1037-1041
52. Welch GN, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 338:1042-1050
53. Guba S, Fonseca V, Fink L (1999) Hyperhomocysteinemia and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 25:291-309
54. De Stefano V, Casorelli I, Rossi E, et al (2000) Interaction between hyperhomocysteinemia and inherited thrombophilic factors in venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 26:305-311
55. Frederiksen J, Juul K, Grande P, et al (2004) Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (C677T), hyperhomocysteinemia, and risk of ischemic cardiovascular disease and venous thromboembolism: prospective and case-control studies from the Copenhagen City Heart Study. *Blood* 104:3046-3051
56. Mansilha A, Araujo F, Severo M, et al (2005) Genetic polymorphisms and risk of recurrent deep venous thrombosis in young people: prospective cohort study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 30:545-549
57. Rosendaal FR (1999) Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 353:1167-1173
58. Vlieg AvH, van der Linden IK, Bertina RM, et al (2000) High levels of factor IX increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 95:3678-3682
59. Meijers JCM, Tekelenburg WLH, Bouma BN, et al (2000) High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med* 342:696-701
60. Joist J (1990) Hypercoagulability: introduction and perspective. *Semin Thromb Hemost* 16:151-157

61. Bockenstedt PL (2006) Management of hereditary hypercoagulable disorders. *Hematology* 2006:444-449
62. Horinaga H, Otsuka H, Ishizuka B (2005) Changes in protein S activities and its significance in the coagulating and fibrinolytic system during normal pregnancy. *J Obstet Gynecol Neonatal Hematol* 14:36-42
63. Bonnar J, McNicol GP, Douglas AS (1969) Fibrinolytic enzyme system and pregnancy. *BMJ* 3:387-389
64. Dilley A, Austin H, El-Jamil M, et al (2000) Genetic factors associated with thrombosis in pregnancy in a United States population. *Am J Obstet Gynecol* 183:1271-1277
65. Gomes MPV, Deitcher SR (2004) Risk of venous thromboembolic disease associated with hormonal contraceptives and hormone replacement therapy: a clinical review. *Arch Intern Med* 164:1965-1976
66. Quehenberger P, Loner U KS, Handler S, et al (1996.) Increased levels of activated factor VII and decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thromb Haemost* 76:729-734
67. Gruppo Italiano Studio P (1995) Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. *Ann Intern Med* 123:656-664
68. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, et al (2007) Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood* 109:2446-2452
69. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352:1779-1790
70. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al (2005) Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365:1054-1061
71. James C, Ugo V, Le Couedic J-P, et al (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434:1144-1148
72. Patel RK, Lea NC, Heneghan MA, et al (2006) Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 130:2031-2038
73. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, et al (2006) Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 44:1528-1534
74. Colaizzo D, Amitrano L, Tiscia G, et al (2007) The JAK2 V617F mutation frequently occurs in patients with portal and mesenteric venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 5:55-61
75. De Stefano V, Fiorini A, Rossi E, et al (2007) Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. *J Thromb Haemost* 5:708-714
76. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM (1996) Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* 87:3531-3544
77. Tripodi A, Mannucci PM (2001) Laboratory investigation of thrombophilia. *Clin Chem* 47:1597-1606

Chapter 2



その他の抗凝固薬

Paragraph

1 ヘパリン, 低分子量ヘパリン

1.

ヘパリンカルシウム, ヘパリンナトリウム

小嶋哲人



はじめに

ヘパリンは、古くから強力な抗血栓製剤として汎用され、現在でも最も安価な抗凝固薬の一つとして使用されている。その発見は1916年にJ. McLeanが偶然に犬の肝臓からの抗凝固成分を単離して始まり、肝細胞(Hepatocyte)から抽出されたためヘパリン(heparin)と名付けられた¹⁾。臨床的に使われるヘパリンは、ブタの腸粘膜から抽出される種々の異なる分子量の酸性ムコ多糖類の不均一な混成物である。

商品名(販売企業)

現在、日常臨床において一般的に用いられているヘパリン製剤を表1にまとめた。

一般名	商品名
ヘパリンカルシウム	ヘパリンカルシウム注射液 (味の素ファルマ)
	カプロシン注 (沢井)
ヘパリンナトリウム	ヘパリンナトリウム注N「味の素」
	ヘパリンナトリウム注射液 (扶桑)
	ヘパリンモチダ (持田)
	ノボ・ヘパリン注 (持田)

薬物概説・薬理学

ヘパリンは、グルクロン酸 (GluA) / イズロン酸 (IdA) とグルコサミンとの2糖体の繰り返し構造を基本骨格にもつグリコサミノグリカンで、種々の程度にO-硫酸基、またグルコサミンのN-硫酸基あるいはアセチル基をもっている²⁾。ヘパリンの分子量は3,000 ~ 100,000と幅広く、哺乳動物の肝臓、心臓、肺、腎臓、小腸など種々の臓器に存在している。現在抗凝固薬として使用されているヘパリンは通常ブタ小腸粘膜から精製されている。

ヘパリンの抗凝固能は、ヘパリン依存性の血液凝固阻止因子である血漿プロテアーゼインヒビターの作用促進能であり、ヘパリンそのものには抗凝固活性はない。ヒト血漿中のヘパリン依存性トロンビンインヒビターとしては、アンチトロンビン、ヘパリンコファクターIIおよびプロテインCインヒビターが主なものである。これらは、セルピン (Serpins : serine protease inhibitors) と総称されるインヒビター群に属し、互いに分子構造やアミノ酸配列の相同性が認められている³⁾。

アンチトロンビン (AT) は、その欠乏症や異常症家系に重篤な血栓症が多発することから、極めて重要な抗血栓性インヒビターであることは臨床的にも裏付けられ、ヘパリン存在下での血中トロンビン阻害活性の約8割を占める最も重要なトロンビンインヒビターである。トロンビン以外に第IXa因子や第Xa因子の生理的インヒビターとしても機能している。ヒトATは58kDaの分子量と5.11の等電点をもち、その平均血漿中濃度は約30mg/dLである。ATは1:1のモル比でそのアルギニン残基とトロンビンのセリン活

263-00925

性基とで結合しその活性を中和するが、ヘパリン存在下においてその反応速度が劇的に促進される。これは、ヘパリンがATに結合することによりその立体構造を変化させ、ATのアルギニン残基をトロンビンと反応させやすくさせている機序が想定されている(図1)⁴⁾。

適応(症)

血液凝固の亢進状態が関与する病態はヘパリン療法の適応となり、以下にあげるような血栓塞栓症の治療や予防、血液凝固防止に用いられる(表2)⁵⁾。

禁忌

ヘパリン療法の副作用に出血症状があり、重篤な場合は生命も危険となることがあるため出血傾向のある場合には原則禁忌(投与しないことを原則と

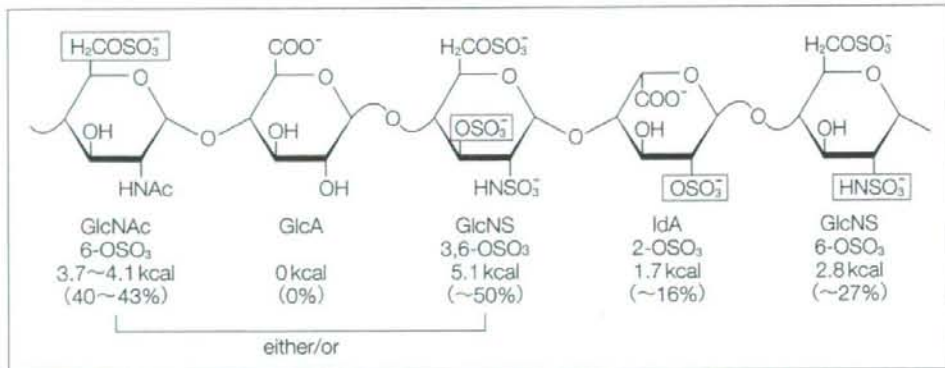


図1 ヘパリンのアンチトロンビン結合ドメイン構造 各残基の相対的結合

(Rosenberg, RD: Molecular Basis of Blood Diseases. pp530-550, 1987. より改変引用)

寄与度は、それぞれアンチトロンビンとの結合力で示した。

□で囲ったO-硫酸基はアンチトロンビン結合に特に重要とされる。

表2 ヘパリンの適応(症)

1. 血液体外循環時における灌流血液の凝固防止(人工腎臓および人工心肺など)
2. 汎発性血管内血液凝固症候群の治療
3. 輸血及び血液検査の際の血液凝固の防止
4. 血管カテーテル挿入時の血液凝固の防止
5. 血栓塞栓症(静脈血栓症, 心筋梗塞症, 肺塞栓症, 脳塞栓症, 四肢動脈血栓塞栓症, 手術中・手術後の血栓塞栓症など)の治療および予防

するが、特に必要とする場合には慎重に投与)となる。

例えば、頭蓋内出血またはその恐れ・疑い、血小板減少性紫斑病、血管障害による出血傾向、血友病、その他の汎発性血管内凝固症候群(DIC)を除く血液凝固障害、月経期間中、手術時、消化管潰瘍、尿路出血、咯血、流早産・分娩直後など性器出血を伴う妊産褥婦、血管や内臓の障害箇所に出血が起こる恐れがある内臓腫瘍、消化管の憩室炎、大腸炎、亜急性細菌性心内膜炎、重症高血圧症、重症糖尿病、重篤な肝障害、重篤な腎障害、中枢神経系の手術または外傷直後、過敏症の既往、ヘパリン起因性血小板減少症(heparin-induced thrombocytopenia: HIT)の既往のある患者では、ヘパリンの使用は原則禁忌である。

また、脊髄・硬膜外麻酔、腰椎穿刺などでは、穿刺部位に血腫が生じ、神経の圧迫による麻痺が現れる恐れがあるので、併用する場合には神経障害の徴候及び症状について十分注意し、異常が認められた場合には直ちに適切な処置を行う必要がある。

治療の特異点

ヘパリンの抗凝固作用はATを介して発揮されることはすでに述べたとおりで、ヘパリン自身には抗凝固作用がない。したがって、ATレベルの低下した病態、例えば先天性AT欠損症やDICなどでの消耗性AT低下状況においてはヘパリンの効果は十分に発揮されず、AT濃縮製剤による補充が必要となる。DICでは、ATレベルを70%以上に保つべくAT濃縮製剤による補充が適応とされ、ヘパリンとの併用が有効と報告されている。

必要な検査

ヘパリン投与量調節のためのモニタリングには、通常、血液凝固能としてAPTTが測定される⁶⁾。APTTの測定は、経済的に比較的安価で多くの施設で容易に施行可能であること、検査結果が速やかに得られることなどの利点から実施されることが多く、通常、対照凝固時間の1.5～2.5倍に延長するように投与量が調節される。また、副作用の早期発見のため血小板数、便中ヘモグロビンの定期的検査が推奨される。

投与方法と投与量

ヘパリン投与は、通常、静脈内もしくは皮下投与され、血腫をつくる可能性があるため筋肉内投与は避けられている。静脈内に投与されたヘパリンの血中半減期は約40分と短く、十分な血中濃度を保ち安定して抗凝固作用を発揮するためには、持続的あるいは間欠的に投与する必要がある。静脈内に投与されたヘパリンは、急速な第1相に続き、比較的緩徐な第2相の減衰を示すことから、初期に比較的用量を単回投与し、その後少量の維持量を持続投与することも提唱される。一方、皮下投与時には、最大効果は約3時間後に現れ、約12時間持続する。

血栓性疾患治療のヘパリンの適切な使用法の根拠となる大規模臨床試験の大部分は欧米人を対象として実施されたもので、直ちに日本人に適応できないが、わが国における報告は非常に乏しいのが現状で、ここでは欧米において報告されている知見からヘパリンの使用法を概説する⁶⁾。下肢深部静脈血栓症(DVT)の治療において、通常5~15単位/kg/時間または10,000~30,000単位/日のヘパリンが、持続的あるいは間欠的(4~6時間ごと)に静脈内に投与され、APTTが治療域(1.5~2.5倍の延長)になるようにヘパリン投与量を調整することが勧められる。ヘパリン投与期間は7~10日とし、その投与期間の後半における4~5日間に経口抗凝固薬を併用し、以降は経口抗凝固薬単独に移行することが提唱されている。一方、DVTの予防には、いわゆるミニドーズ・ヘパリン療法(5,000単位/12時間ごと)が効果的とされる。心筋梗塞発症時における壁在血栓の予防には12,500単位のヘパリンが1日2回皮下投与され、再梗塞の発症予防には12,500単位/日の持続的静脈内投与が有効とされる。また、DIC治療におけるヘパリンの投与量は、一般に5~15単位/kg/時間または10,000~20,000単位/日程度の比較的少量のヘパリンが持続的あるいは間欠的に静脈内に投与される。

併用されることの多い薬物と問題点

ヘパリンは、しばしばワルファリンなどの経口抗凝固薬、アスピリンなどの抗血小板剤、組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)やウロキナー

ゼなどの血栓溶解剤と併用され、ヘパリンの出血作用が増強されることがあり注意を要する。また、テトラサイクリン系抗生物質、抗ヒスタミン薬、ジギタリス製剤、ニコチン酸などの薬剤はヘパリンの作用を中和すると報告され、ニトログリセリンの併用時にはヘパリン投与量を増量する必要があることが指摘されているが、これらの作用機序の詳細は不明である⁵⁾。

副作用・合併症対策

ヘパリン使用時での最も注意すべき副作用は、出血とHITである。

出血性副作用への対応策としては、ヘパリンが速やかに代謝されることから、多くの場合ヘパリンの投与を中断することで止血能は回復するものと考えられる。しかし、緊急時には、プロタミンの静脈内投与によりヘパリンの作用を中和することが必要である。プロタミンは、ATと拮抗してヘパリンと複合体を形成することでヘパリンの抗凝固作用（アンチトロンビン・コファクター活性）を中和する。100単位のヘパリンを中和するためには、1mgのプロタミンが必要とされ、50mgを投与総量の上限として、APTTなどを繰り返し測定して血液凝固能の改善程度を評価しながら、血圧降下やショックなどのプロタミン自体の副作用を避けつつ緩徐に投与する。

抗凝固薬としてヘパリンを投与したにもかかわらず、重篤な血栓症（脳梗塞、肺塞栓症、DVTなど）を伴う血小板減少（HIT）をきたすことがある。HITは、ヘパリン-血小板第4因子複合体に対する自己抗体（HIT抗体）の出現による免疫学的病態であり、ヘパリン投与時は血小板数を適宜測定し、血小板数の著明な減少や血栓症を疑わせる異常が認められた場合には速やかにヘパリン投与を中止してHITを起こさない他の抗凝固療法に切り替えるなど、適切な処置を行う必要がある。

その他、長期間のヘパリン投与において、まれに骨粗鬆症の合併や、アルドステロン低下症の報告がある。また、蕁麻疹、結膜炎、絞扼感などのヘパリン過敏症と考えられる症状の報告もあるが、まれである。



おわりに

ヘパリンは、古くから使用され現在も広く臨床の場で汎用される抗凝固薬

であるが、血中濃度の至適治療域が狭いため出血症状をきたす恐れや、近年その病態が解明されつつあるHITなどの重篤な副作用が問題となる。このような、切れ味鋭く、効き過ぎると副作用となる恐れのある薬効をもつ薬剤は、その特性を十分に把握して使用する必要がある。

◆ 文献

- 1) 小嶋哲人：Xa 阻害薬の薬理学的特徴を見る。抗凝固薬の歴史と Xa 阻害薬の開発目的を探る。「Xa 阻害役のすべて」(池田康夫ほか編)。先端医学社、東京、pp68-75, 2007.
- 2) 小嶋哲人：ヘパリンの作用機序。日常診療と血液 3：41-46, 1993.
- 3) 小出武比古：ヘパリン依存性トロンビンインヒビター。医学のあゆみ 160：599-600, 1992.
- 4) Rosenberg, RD：Regulation of the hemostatic mechanisms, in Molecular Basis of Blood Diseases (Dyson, J. ed). W.B.Saunders, Philadelphia, pp530-550, 1987.
- 5) カプロシン注添付文書情報。医薬品検索イーファーマ(閲覧日 2007 年 12 月 28 日)。 <http://www.e-pharma.jp/allHtml/3334/3334400A1020.htm>
- 6) 辻 肇, 中川雅夫：ヘパリン, 低分子量ヘパリン。抗凝固薬の適正な使い方 第 1 版(櫻川信男, ほか編)。医歯薬出版, 東京, pp221-232, 2002.

2. 血栓性素因としてのATとPC異常

小嶋 哲人

名古屋大学医学部保健学科

要 旨

本シンポジウムでは、血栓性素因としてのAT、PC異常について、我々の経験した先天性AT欠損症、PC欠損症症例での分子病態解析について紹介する。名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとにインフォームドコンセントを得たのち、それぞれ末梢血白血球ゲノムDNAを抽出した。AT遺伝子、PC遺伝子は、各エクソンのPCR産物の塩基配列をDirect Sequence法にて解析し、同定した変異について発現実験解析を行った。AT遺伝子解析では、それぞれミスセンス変異ならびに一塩基欠失変異を同定し、それぞれ変異AT分子の発現解析からAT欠損症の原因と思われる。また、PC遺伝子解析ではそれぞれPC欠損症の原因と思われる変異を同定した。これらの家系には同じ変異をもちながら血栓症未発症例もあり、血栓症発症には他のリスクの重複が重要と考えられた。

はじめに

外傷などにより血管が破綻した場合、血液が血管外に漏れ出ないように血管損傷部ですみやかに血栓形成を起こす止血機構が働く。一方、生理的状況下では血管内で血栓を生じることのないように、また、血栓形成部位でも無制限に血液凝固反応が進行しないように凝固阻止機構が働いている。このような止血という生態防御機構の一環である血栓形成は、血管、血小板、凝固線溶因子およびその阻止因子などの巧妙な連携により営まれており、その制御機構に異常が起こるとや血栓症が発生することになる。遺伝的に血栓傾向を示す

病態は血栓性素因と呼ばれ、生理的血液凝固抑制因子であるアンチトロンビン(AT)、プロテインC(PC)あるいはプロテインS(PS)の先天性欠損症などにより引き起こされることが知られている。血栓症は日本人に比べ欧米白人に多い疾患とされてきたが、食生活の欧米化や高齢化社会を迎えて日本でも年々増加傾向にあり、血栓症発症のリスクファクターとして日本人にもAT欠損症、PC欠損症が存在することが報告されてきた。

本稿では、日本検査血液学会第9回学術集会・シンポジウム2-2「血栓性素因としてのATとPC異常」と題して講演した我々の施設での解析結果を紹介する。

1. AT欠損症

アンチトロンビン(AT)は従来アンチトロンビンIII(ATIII)と呼ばれていたもので、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

Kojima Tetsuhito

(〒461-8673 名古屋市東区大幸南1-1-20)

アドレス: kojima@met.nagoya-u.ac.jp

キーワード: 血栓性素因, アンチトロンビン(AT), プロテインC(PC), 欠損症

表 1. 先天性アンチトロンビン欠損症の分類

		抗原量	アンチトロンビン活性	
			プロテアーゼ 阻害活性	ヘパリン・ コファクター活性
Type I		低下	低下	低下
Type II	RS	正常	低下	正常
	HBS	正常	正常	低下
	PE	正常	低下	低下

表 2. 先天性アンチトロンビン欠損症の遺伝子変異報告数

Mutation type	Number of mutations	
	Japan	World
Missense/nonsense	23	113
Splicing	0	12
Regulatory	1	0
Small deletions	6	41
Small insertions	2	18
Small indels	0	2
Gross deletions	0	9
Gross insertions	0	1
Complex rearrangements	0	2
total	32	198

(2006 年末現在：著者作)

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 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 1,000 倍にも増強することが知られている¹⁾。

先天性 AT 欠損症は、1965 年に Egeberg により血栓塞栓症多発家系の病因の検索においての記載において初めて報告され、その概念が明らかにされた。先天性血栓性素因の一つとして知られる AT 欠損症は、AT 抗原量および活性値が共に 50% 程度まで低下するタイプ 1 欠損症と、AT 抗原量は正常だが阻害活性に異常を認めるタイプ

2 欠損症に分けられる。タイプ 2 欠損症には、プロテアーゼ阻害活性が低下するタイプ (reactive site: RS)、ヘパリン結合能が低下するタイプ (heparin binding site: HBS)、またその双方が低下するタイプ (pleiotropic effect: PE) に分類される (表 1)²⁾。

先天性 AT 欠損症の原因となる AT 遺伝子異常は多種多様で、いくつかのホットスポットはあるものの基本的にそれぞれの家系ごとで異なっている。2006 年末現在、世界的にみて約 200 種類のアンチトロンビン遺伝子異常が文献報告されており、これらのうち日本においても最近の我々の報告³⁾も含め 32 種類の遺伝子異常が同定され報告さ

表3. 先天性AT欠損症のSERPNC1遺伝子変異 (文献3より引用改変)

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

*: genomic DNA and amino acid numbers are according to Old et al. (7).
M: male, F: female, ND: not done, underline: novel mutation



図1. 変異AT分子のウェスタンブロット解析(文献3より引用改変)

A: 培養上清, B: 細胞溶解液

1: Mock, 2: wild type-AT, 3: 116Pro-AT, 4: 32Thr-AT, 5: FS-3Stop-AT, 6: 59Val-AT

れている(表2).

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、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとにインフォームドコンセントを得たのち末梢白血球より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結果、それぞれ原因と思われる遺伝子変異を同定した(表3)。また、同定した変異のAT欠損症発症分子病態を解析する目的に、それぞれ変異導入AT分子の発現実験を行った(図1)。

症例1では一塩基置換(T5342C)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)⁴であった。

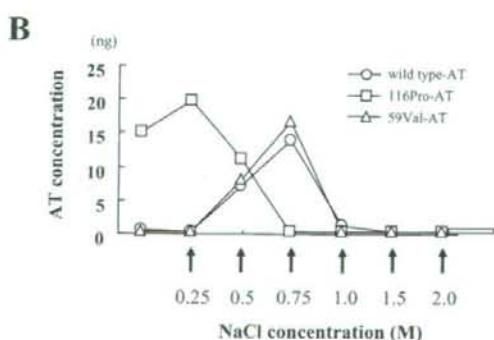
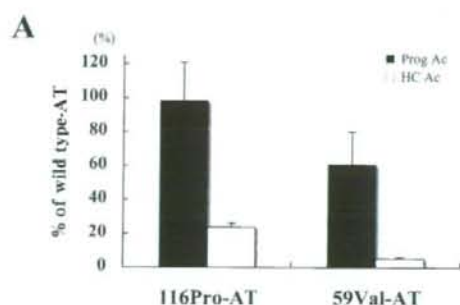


図2. 変異アンチトロンビン分子のヘパリン親和性解析(文献3より引用)

A: ヘパリン非存在下(Prog Ac)、存在下(HC Ac)でのアンチトロンビン活性

B: ヘパリンセファロースカラムからの段階的NaCl濃度のバッファーによる各アンチトロンビン分子の溶出

症例2ではやはり既報のミスセンス変異(Met-32Thr)の一塩基置換(T72C)を認めた。症例3では一塩基欠失(2417delT)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

表 4. 先天性プロテイン C 欠損症の遺伝子変異報告数

Mutation type	Number of mutations	
	Japan	World
Missense/nonsense	20	170
Splicing	3	22
Regulatory	2	11
Small deletions	7	20
Small insertions	1	10
Small indels	0	1
Gross deletions	1	2
Gross insertions	0	0
Complex rearrangements	0	0
total	35	236

(2006 年末現在：著者作)

異常アミノ酸配列に置換する新規変異 (FS-3 Stop) 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。

また、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、HEK293 培養細胞での発現実験を行い、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 (図 1)。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。

一方、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 (図 2)。

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⁹⁾が報告した変異と同一であり、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、type I AT 欠損症の原因と思われた。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、type II AT 欠損症の原因と思われた。

2. PC 欠損症

プロテイン C (PC) は生理的に重要な血液凝固制御因子の一つで、血管内皮細胞上のトロンボモジュリン (TM) に結合したトロンビンによって活性化される。活性化 PC はプロテイン S (PS) 存在下に、活性化第 V 因子および活性化第 VIII 因子を限定分解、失活させ、その結果、血液凝固反応

におけるプロトロンビンの活性化を著しく抑制し、凝固反応の促進に重要なトロンビンの生成を阻害することで抗凝固作用を示す。

PC 遺伝子変異に伴う先天性 PC 欠損症の出現頻度は、およそ 500 人に 1 人といわれる。先天性 PC の質的・量的欠損症では過凝固状態を呈することになり、四肢の深部静脈血栓症、肺梗塞、脳梗塞、あるいは腸間膜静脈血栓症など、主として静脈系の血栓症を起こすことが知られている⁵⁾。

先天性 PC 欠損症の原因となる PC 欠損症遺伝子異常は、先天性 AT 欠損症の原因の AT 遺伝子異常と同様に多種多様で、いくつかのホットスポットはあるもののやはり基本的にそれぞれの家系ごとで異なっている。2006 年末現在、世界的にみて約 200 種類のアンチトロンビン遺伝子異常が文献報告されており、日本においても 35 種類の遺伝子異常が同定され報告されている (表 4)。

我々は、7 家系の PC 欠損症が疑われ遺伝子解析を希望された家系において、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとにそれぞれインフォームドコンセントを得た後、PC 遺伝子解析を行った。患者あるいはその家族の末梢血を採取しゲノム DNA を抽出し、PC 遺伝子のデータベース塩基配列情報をもとに、全エクソンをイントロンの境界領域を含めて PCR にて増幅後、Direct Sequence 法を用いて塩基配列を解析した。今回、7 家系それぞれにその原因と思われるプロテイン C 遺伝子変異を同定しこれを紹介したが、これらは他誌に

投稿準備中なので詳細については割愛する。

文 献

- 1) Rosenberg RD: Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. *Am J Med* 87: S2—S9, 1989.
- 2) Lane DA, Olds RJ, Conard J, et al: Pleiotropic effects of antithrombin strand IC substitution mutations. *J Clin Invest* 90: 2422—2433, 1992.
- 3) Kyotani M, Okumura K, Takagi A, et al: Molecular basis of antithrombin deficiency in four Japanese patients with antithrombin gene abnormalities including two novel mutations. *Am J Hematol* 82: 702—705, 2007.
- 4) Okajima K, Abe H, Maeda S, et al: Antithrombin III Nagasaki (Ser116-Pro): a heterozygous variant with defective heparin binding associated with thrombosis. *Blood* 81: 1300—1305, 1993.
- 5) Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ: Deficiency of Protein C in Congenital Thrombotic Disease. *J Clin Invest* 68: 1370—1373, 1981.
- 6) Miyata T, Zheng YZ, Sakata T, Kato H: Protein C Osaka 10 with Aberrant Propeptide Processing: Loss of Anticoagulant Activity Due to an Amino Acid Substitution in the Protein C Precursor. *Thromb Haemost* 74: 1003—1008, 1995.
- 7) Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, et al: Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* 32: 4216—4224, 1993.