

## 新規静脈血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビンを検出する スクリーニング検査法の開発

研究分担者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部 教授  
研究協力者 高木 明 名古屋大学医学部 助教

**研究要旨** これまで血栓性素因・先天性アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS欠損症の原因遺伝子変異を同定し、変異分子の発現実験などを通して分子病態解析を行ってきた。本年度は、今までの解析で未だ原因の同定に至っていなかった遺伝性血栓症症例において、プロトロンビン遺伝子にミスセンス変異を同定し、静脈血栓症の原因となるトロンビン不活化不良の検査法を検討考案した。遺伝子工学的に作成した変異型プロトロンビン由来トロンビンはヘパリン存在下において明らかなアンチトロンビン抵抗性を示した。さらに、ワルファリン服用中患者血漿を用いた測定においても同様にアンチトロンビン抵抗性の結果を得た。開発したアンチトロンビン抵抗性プロトロンビンを検出するスクリーニング検査法は静脈血栓症発症メカニズムの解明にも有効なツールとなることが期待できる。

### A. 研究目的

血栓症の発症リスクファクターとしてアンチトロンビン(AT)、プロテインC(PC)、プロテインS(PS)などの生理的凝固制御因子の欠乏が知られている。我々は、これまでにこれら凝固制御因子の先天性欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因となる遺伝子変異を解析し、さらに同定した変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。一方、静脈血栓塞栓症 173 名を対象とした全国的共同研究の解析結果では、約 32% (55 名) に原因と思われる AT, PC, PS 遺伝子変異を同定したが、残り 2/3 以上の症例では原因同定に至っていない。

最近我々は、未だ原因同定に至っていなかった遺伝性血栓症家系のプロトロンビン遺伝子に変異を発見し昨年度に報告した。今年度は、このアンチトロンビン抵抗性を示す異常を血漿検体で検出する検査法を開発したので報告する。

### B. 研究方法

変異部はトロンビンの AT 結合部にあた

ることから静脈血栓症の原因を変異トロンビンの不活化不良と想定し、被検血漿中プロトロンビンの活性化(トロンビン生成相)、生成トロンビンのアンチトロンビン・ヘパリン複合体による不活化(トロンビン不活化相)、発色性合成基質を用いた残存トロンビン活性測定(残存トロンビン測定相)の3相からなるトロンビン不活化動態解析法を開発を行った。

健常人肝由来 cDNA ライブラリーより野生型プロトロンビン cDNA クローニングし、野生型プロトロンビンおよび同定変異を導入した変異型プロトロンビン発現ベクターを作成し、それぞれ安定発現細胞株を樹立した。それぞれ細胞株の培養上清よりリコンビナントプロトロンビンを精製して性状比較をするとともに、プロトロンビン欠乏血漿にそれぞれ添加再構成したホモ接合型変異プロトロンビン血漿、ヘテロ接合型変異プロトロンビン血漿、野生型プロトロンビン血漿を検討に用いた。

希釈検体 500  $\mu$ l にプロトロンビンアクチベータ混液 200  $\mu$ l を加えてトロンビン

を生成後、アンチトロンビン+ヘパリン液 100  $\mu$  l を加えて不活化反応後に残存トロンビンを測定するため発色性合成基質 200  $\mu$  l を加えて直ちに、吸光度変化率を測定した。

### C. 研究結果

トロンビン不活化動態解析法の測定条件を検討した結果、検体血漿希釈液は 50mmol/l Tris、200mmol/l NaCl、pH8.1 が至適で、検体血漿希釈倍率は 100 倍が適当であった。プロトロンビンアクチベータ混液 (*Oxyuranus scutellatus* 蛇毒、リン脂質、CaCl<sub>2</sub>) の至適濃度は、0.05~0.08mg/ml、25% PTT 試薬「RD」、5~10mmol/l であった。至適プロトロンビン活性化時間は 2 分、アンチトロンビンは検体血漿 (5  $\mu$  l) の 5 倍相当を添加することで検体中のアンチトロンビン濃度の影響を排除できた。アンチトロンビン液中のヘパリンは 5U/ml に添加すれば充分であった。

本測定法を用いて、リコンビナントプロトロンビンのアンチトロンビン・ヘパリンによる不活化動態を観察し、経時的トロンビン残存率を求めると図 1 のようになった。

トロンビン残存率は、それぞれ野生型プロトロンビン (rWT) は 1 分の不活化で約 2%、2 分以上の不活化で 1% 以下になったのに対し、変異型プロトロンビン (rMut) では 1 分で 68%、3 分で 50%、5 分で 40% であった。

一方、血漿検体を用いると図 2 示すように、健常人血漿では図 1 の野生型リコンビナントプロトロンビンを用いた場合とほぼ同様の結果となり、患者血漿を用いた場合は血栓再発予防を目的に処方さ

れているワルファリンのためトロンビン生成量は少なかったがトロンビン残存率を求めるとトロンビン不活化不良を検出可能であった。

### D. 考察

プロトロンビン分子異常のため生じたトロンビンがアンチトロンビンの不活化を受けにくくなることが原因と考えられる深部静脈血栓症家系を経験し、新規静脈血栓症発症リスク・アンチトロンビン抵抗性を検出する臨床検査室で実施可能なスクリーニング検査法を考案した。

ワルファリン服用中の患者血漿検体において、従来の臨床検査法ではワルファリンの影響と考えられる低凝固状態のため異常の検出ができなかったが、今回開発した検査法を用いると明らかなトロンビン不活化不良が検出可能であった。すなわち、ワルファリン治療中の静脈血栓症患者検体においても測定でき、今まで原因が特定できていない遺伝性の静脈血栓症症例における血栓発症メカニズムの解明に本検査法は有用と思われる。

### E. 結論

新規静脈血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビンのスクリーニング検査法を開発した。本法はワルファリン服用患者においてもワルファリンの服用を中止することなく検査でき、アンチトロンビンによる不活化反応を受けにくい異常トロンビンを検出できた。

### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 51) Miyata T, Hamasaki N, Wada H, Kojima T: Venous thromboembolism and a race-specific genetic variation, protein S K196E, in Japanese. *J Thromb Haemost.* 2011 Dec 5. [Epub ahead of print].
- 52) 鈴木敦夫、小嶋哲人：エストロゲンによるProtein S産生抑制 日本血栓止血学会誌 22(5), 285-288, 2011.
- 53) 小嶋哲人：血栓性素因の病因と病態 臨床血液 52(10), 1454-60, 2011.
- 54) 鈴木伸明、小嶋哲人：先天性血栓性素因 III. 血小板・凝固線溶系疾患「専門医のための薬物療法Q&A：血液」小松則夫/片山直之/富山佳昭：編 中外医学社 東京pp 379-387, 2011.
- 55) 中山享之、小嶋哲人：ワルファリンの薬効評価 V抗血栓療法の薬効評価は？ -そこが知りたい 抗血栓療法- 後藤信哉編 メジカルビュー社 東京 122-128, 2011.
- 56) 小嶋哲人：基礎の立場からみた新規抗凝固薬 日本血栓止血学会誌 22(4), 151-155, 2011.
- 57) 小嶋哲人：新規抗凝固薬 脈管学 51(3), 315-320, 2011.
- 58) 小嶋哲人：経口ロロンビン阻害薬では、なぜ頭蓋内出血の頻度が少ないのか -基礎の立場から- 日本心電学会誌 31(3), 287-291, 2011.
- 59) 菅原宏丈、鈴木宗三、惣宇利正善、小嶋哲人、一瀬白帝：東北地方に置ける血友病インヒビター調査のまとめ 山形医学 29(2), 37-44, 2011.
- 60) Saito H, Matsushita T, Kojima T: Historical perspective and future direction of coagulation research. *J Thromb Haemost. Suppl 1*: 352-63, 2011.
- 61) Iwaki T, Tanaka A, Miyawaki Y, Suzuki A, Kobayashi T, Takamatsu J, Matsushita T, Umemura K, Urano T, Kojima T, Terao T, Kanayama N: Life-threatening hemorrhage and prolonged wound healing are remarkable phenotypes manifested by complete plasminogen activator inhibitor-1 deficiency in humans. *J Thromb Haemost.* 9(6): 1200-6, 2011.
- 62) 小嶋哲人：抗Xa薬 カレントセラピー 29(6), 512-516, 2011.
- 63) 小嶋哲人：先天性凝固阻止因子欠乏症 (antithrombin, protein C, protein S欠損症) わかりやすい血栓と止血の臨床 日本血栓止血学会編集 南江堂 東京pp107-9, 2011.
- 64) Ikesue M, Matsui Y, Ohta D, Danzaki K, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 deficiency limits neointimal formation after vascular injury by regulating vascular smooth muscle cell proliferation and vascular progenitor cell mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5): 1066-74, 2011.
- 65) Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Morimoto J, Sato M, Tanaka S, Kojima T, Tsutsui H, Uede T: Syndecan-4 prevents cardiac rupture and dysfunction after

- myocardial infarction. *Circ Res.* 108(11): 1328-39, 2011.
- 66) Katsumi A, Nishida T, Murata M, Terakura S, Shimada K, Saito S, Kobayashi M, Kodaira A, Shibata S, Oda I, Yagi T, Kiyoi H, Matsushita T, Kojima T, Naoe T: Virus-associated hemophagocytic syndrome caused by pandemic swine-origin influenza A (H1N1) in a patient after unrelated bone marrow transplantation. *J Clin Exp Hematop.* 51(1): 63-5, 2011.
- 67) 鈴木敦夫、小嶋哲人：プロテインS異常症・欠損症の遺伝子解析 臨床検査 55(4), 347-55, 2011.
- 68) 宮田敏行、川崎富夫、坂田洋一、村田満、小嶋哲人：日本人の血栓性素因 特にプロテインS欠損症を中心に 日本産婦人科・新生児血液学会誌 20(2), 75-82, 2011.
2. 学会発表
- 57) 小嶋哲人：新規抗凝固薬の特徴について 抗凝固薬セミナー、東京
- 58) 藤田絢子、牧明日加、奥山恵理子、村田 萌、宮脇由理、鈴木敦夫、松下 正、國島伸治、高木 明、小嶋哲人：GPIIb 遺伝子において複合ヘテロ変異を認めた血小板無力症の一症例解析 第12回日本検査血液学会学術集会、倉敷
- 59) 高木 明、宮脇由理、鈴木敦夫、藤田絢子、牧明日加、奥山恵理子、村田萌、村手 隆、松下 正、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性を検出するトロンビン不活化動態解析法の開発 第12回日本検査血液学会学術集会、倉敷
- 60) Iwaki T, Kobayashi T, Umemura K, Urano T, Kojima T, Kanayama N: PAI-1 DEFICIENCY IN HUMANS AND MICE XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 61) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujimori Y, Fujita J, Maki A, Takagi A, Murate T, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Kojima T: A NOVEL PROTHROMBIN GENE MUTATION LEADS TO AN AT-RESISTANT THROMBIN IN A FAMILY WITH INHERITED THROMBOPHILIA. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 62) Fujita J, Suzuki A, Miyawaki Y, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Suzuki N, Saito H, Kojima T: DISTINCT X-CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS WITH *F8*-INTRON22 INVERSION IN THREE UNRELATED JAPANESE SEVERE HEMOPHILIA A PATIENTS WITH HIGH TITER INHIBITOR. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 63) Suzuki A, Miyawaki Y, Fujita J, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Teranishi M, Matsushita T, Saito H, Kojima T: NOVEL L13Q MUTATION OF ENDOGLIN GENE IN HEREDITARY HEMORRHAGIC TELANGIECTASIA CAUSED IMPAIRED COTRANSLATIONAL PROCESSING AND

- CELL-SURFACE EXPRESSION. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 64) Uchida Y, Takeshita K, Yamamoto K, Kikuchi R, Nakayama T, Matsushita T, Nakamura H, Kojima T, Murohara T: STRESS-INDUCED ADIPOSE INFLAMMATION PROMOTES A PROCOAGULANT STATE AND IMPAIRS INSULIN SENSITIVITY BY ADIPOCYTE-DERIVED MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN-1. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 65) Saito H, Matsushita T, Kojima T: Historical perspective and future direction of coagulation research. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 66) Katsumi A, Takasu T, Kobayashi M, Kaneda N, Matsushita T, Kojima T, Naoe T, Kaibuchi K: PROTEOME ANALYSIS AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NOVEL RHOH EFFECTORS. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 67) Suzuki N, Sanda N, Matsushita T, Kojima T, Yamamoto K, Katsumi A, Hirashima K, Kajiura Y, Takatsu M, Naoe T: USE OF RECOMBINANT FACTOR VIIA PLUS CONTINUOUS INFUSION OF RECOMBINANT FACTOR VIII IN THE HEMOSTASIS OF TYPE 3 VON WILLEBRAND DISEASE WITH ANAPHYLACTIC ANTI-VWF INHIBITOR. XXIIIrd Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, Japan
- 68) Suzuki A, Miyawaki Y, Okuyama E, Murata M, Fujita J, Maki A, Fujimori Y, Takagi A, Murate T, Teranishi M, Matsushita T, Saito H, Kojima T: Novel L13Q mutation identified in endoglin gene caused impaired cell-surface expression in hereditary hemorrhagic telangiectasia. 第9回血液オルピス、東京
- 69) 小嶋哲人: 教育講演: 基本シリーズ: 血栓・止血 血栓性素因の病因と病態 第73回日本血液学会学術集会、名古屋
- 70) Suzuki N, Kunishima S, Takeshita K, Ikejiri M, Maruyama M, Sone S, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T: PL-3: R702C Mutation of the MYH9 Gene causes great changes in blood cell and other organs in mice model. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋
- 71) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Kojima T: OS-3-120: Molecular basis of an AT-resistant variant thrombin found in a Japanese family with thrombophilia. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋

- 72) Maki A, Fujita J, Okuyama E, Murata M, Miyawaki Y, Suzuki A, Takagi A, Murate T, Kojima T: PS-1-63: Thrombophilia and *JAK2* V617F mutations in Japanese patients with Budd-Chiari syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋
- 73) Fujita J, Miyawaki Y, Suzuki A, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Suzuki N, Saito H, Kojima T: PS-1-72: Unusual X-chromosomal rearrangements with *F8-int22* inversion in three severe hemophilia A patients. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋
- 74) Kobayashi M, Ito H, Hagiwara K, Murakami M, Hoshikawa A, Mizutani N, Sobue S, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Naoe T, Ohnishi O, Murate T: PS-2-197: Overexpression of DNA dependent protein kinase (DNA-PK) in multidrug resistant leukemia cells. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋
- 75) Mizutani N, Ito H, Hagiwara K, Murakami M, Kobayashi M, Hoshikawa A, Sobue S, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Naoe T, Daibata M, Murate T: PS-1-72: The role of K-rasG12A mutation in IL-2 independent growth of a LGL leukemia cell line, PLT-2. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

図1

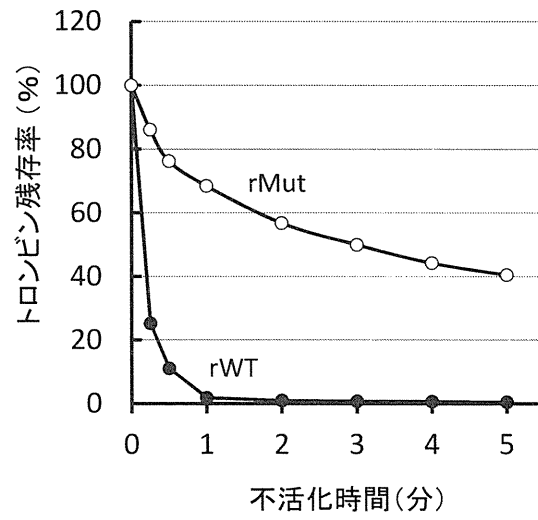
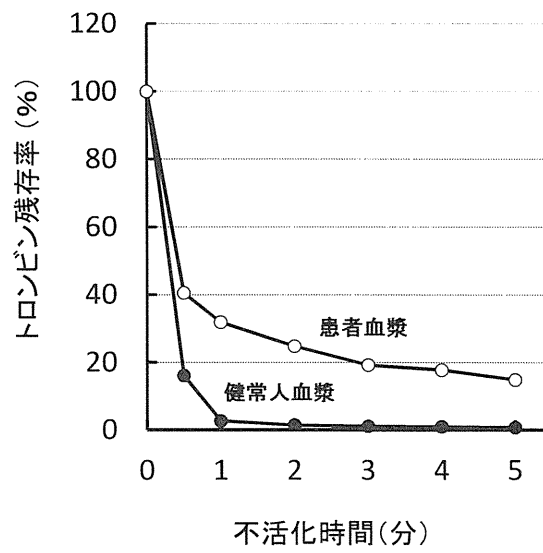


図2



## 特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法施行患者におけるプロトロンビン時間 (PT-INR) 自己測定の有効性と安全性に関する臨床研究

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)

研究要旨:本研究(自治医科大学臨床研究倫理審査委員会承認 第臨 A10-47 号)では、特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対する日本人に適したワルファリン療法を確立するために、自治医科大学病院血液内科外来における特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対してワルファリン療法を施行している患者を対象に、1) PT-INR 自己測定の実施が可能か否か、2) および自己測定された PT-INR 値と医療機関での PT-INR 値との差異がどの程度であるか、3) PT-INR 値の自己測定が医師の指導下において出血、塞栓のイベントが軽減ないしは抑制することが可能か否か検討する。PT-INR 自己測定群は週に1度の自己測定による確認を登録開始日から6ヶ月間実施し、対照群は外来受診(1回/1-2月)のみに本学附属病院中央検査部において PT-INR 値の測定を実施する。平成24年1月27日の時点で15例が登録され、臨床研究を継続中である。これらのエビデンスの蓄積により、ワルファリン療法の最も重要な副作用である出血予防案の作成へと研究を展開する。

### A. 研究目的

本邦における静脈血栓塞栓症に対する抗凝固療法の現状と問題点を把握するために、これまでに本研究班において全国の臨床研修医療機関を対象とした「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する全国実態個別調査」を実施した。その結果、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ものの、PT-INR 値が治療域内と思われる症例において出血イベントや血栓症再発がみられた。これらのことは、医療機関受診時と実際のイベント時で PT-INR 値が乖離していたためか、もしくは血栓症再発予防に対するワルファリンの用量設定が適切でない可能性を示唆するものである。

本研究(自治医科大学臨床研究倫理審査委員会承認 第臨 A10-47 号)では、特発

性血栓症/静脈血栓塞栓症に対する日本人に適したワルファリン療法を確立するために、自治医科大学病院血液内科外来における特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対してワルファリン療法を施行している患者を対象に、1) PT-INR 自己測定の実施が可能か否か、2) および自己測定された PT-INR 値と医療機関での PT-INR 値との差異がどの程度であるか、3) PT-INR 値の自己測定が医師の指導下において出血、塞栓のイベントが軽減ないしは抑制することが可能か否か検討することとした。

### B. 研究方法

a. 対象患者:特発性血栓症/静脈血栓塞栓症(深部静脈血栓症、肺動脈血栓塞栓症)で血栓塞栓症の予防目的でワルファリン療法を行っている自治医科大学附属病院血液



内科外来通院患者で、20歳から80歳未満までのもので性別は問わない。患者は、静脈血栓塞栓症（深部静脈血栓症、肺動脈血栓塞栓症）、抗リン脂質抗体症候群、およびアンチトロンビン III 欠乏症、プロテイン C 欠乏症、プロテイン S 欠乏症などの先天性血栓性素因のいずれかを有するものとする。

#### b. PT-INR の測定と管理域：

PT-INR 自己測定群：1週間に1度の自己測定による確認を、登録開始日から6ヶ月間実施する。自己測定は、異常値を確認した場合に連絡がとれるように、平日8時から16時までの時間帯に行なう。

また、外来受診（1回/月（適宜増減））時に、本学附属病院内科外来において PT-INR 値の測定を実施する。患者によるコアグチェック自己測定に際しては、担当医師等から十分な説明および教育を行い、担当医により安全に実施できることが確認された後に開始する。

対照群（中央検査部のみでの PT-INR 測定群）：自治医科大学附属病院血液内科外来受診時（1回/1-2ヶ月に、本学附属病院内科外来において PT-INR 値の測定を実施する。

#### c. ワルファリン療法の PT-INR 目標治療域の設定

特発性血栓症/静脈血栓塞栓症（深部静脈血栓症、肺動脈血栓塞栓症）では PT-INR 1.5-2.5 とする。さらに血栓性素因を有する患者のうち、抗リン脂質抗体症候群患者では PT-INR 2.0-3.5 とする。

### C. 研究結果

平成24年1月末の時点で15例（男性5例/女性10例、平均年齢43±11歳）が登録されている。基礎疾患は、肺血栓塞栓症＋下肢深部静脈血栓症3例、下肢深部静脈血栓症3例、上腸間膜静脈および門脈血栓

症4例、その他5例であり、プロテイン S 欠乏症、プロテイン C 欠乏症およびアンチトロンビン III 欠乏症などの先天性血栓性素因を有する症例が3例、抗リン脂質抗体症候群が4例などである。抗血小板薬としてアスピリン併用患者が3例でいずれも抗リン脂質抗体症候群を血栓性素因に有する症例であった。

ワルファリン療法の PT-INR 目標治療域は13例が1.5-2.5であり、抗リン脂質抗体症候群の2例で目標治療域が2.0-2.5に設定されていた。自己測定の導入に際してのトレーニング時において、2名の患者が自己穿刺に対する恐怖感等の理由により臨床研究から離脱した。

PT-INR 自己測定開始前6ヶ月間における中央検査部での PT-INR 値は、15例中6例で複数回以上目標治療域を下回っており、2例において1回以上目標値領域を超えていた。

PT-INR 自己測定開始後3ヶ月間の時点で中間解析を行った4例において、いずれも血栓再発や出血性イベントを生じていない。個々の症例解析において、PT-INR 値が目標値領域内にあるものの、自己測定ごとに PT-INR 値が0.5-1.0の範囲内で変動することが明らかとなった。

外来受診時当日の自己測定 PT-INR 値と中央検査部測定値とは極めて高い相関関係（ $r=0.984$ ）がみられた（図1）。

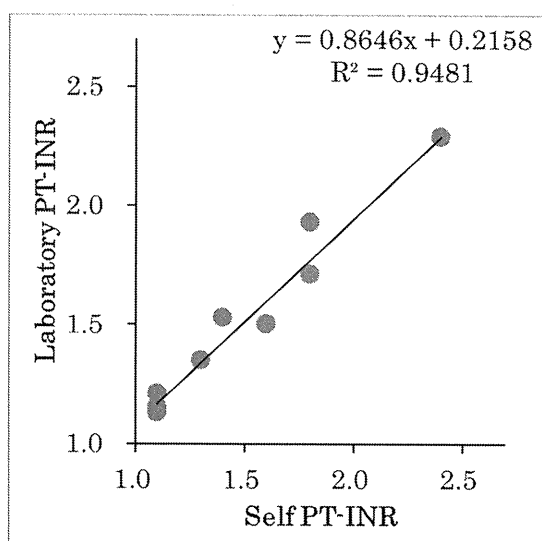


図1. 外来受診当日の自己測定 PT-INR 値 (Self PT-INR) と外来受診時の中央検査部測定 PT-INR 値 (Laboratory PT-INR) との関係 (n=10)

#### D. 考察

自治医科大学病院血液内科外来における特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対してワルファリンによる抗凝固療法を施行している患者を対象に、その有効性と安全性を確立するための臨床研究を開始した。自己測定の導入に際してのトレーニング時において針穿刺手技の恐怖感に基づく離脱症例 (2 例) がみられたことは重要な課題であり、今後一般臨床に広く普及させる際には、その必要性を十分に説明し患者の理解度や受け入れ状態に応じたきめ細かいプログラムを確立する必要がある。なお自己測定を実施している患者においては、これまでの観察期間中に自己穿刺に関連する出血や感染症はみられていない。

個々の症例解析において、PT-INR 値が目標値領域内にあり、患者記録を確認しながら主治医による薬剤調節がなされており自己測定の有用性みいだされたと考えられる。一方自己測定ごとに PT-INR 値が

0.5-1.0 の範囲内で変動することが明らかとなったが、いずれの症例も薬剤コンプライアンスは高く、今後その要因を解析する必要がある。

外来受診時当日の自己測定 PT-INR 値と中央検査部測定値とは高い相関関係がみられたことから、患者による自己測定のデータの正確性を証明するデータが得られ、日常臨床への応用が期待できる。

これらのエビデンスをさらに蓄積することにより、ワルファリン療法の最も重要な副作用である出血予防案の作成へと研究を進展させる予定である。

#### E. 結論

特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対する日本人に適したワルファリン療法を確立するために、自治医科大学病院血液内科外来における特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対してワルファリン療法の施行患者を対象とした PT-INR 自己測定を実施し、安全性と有効性に関する臨床研究を展開した。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 原著論文

Madoiwa S, Kobayashi E, Kashiwakura Y, et al. Immune response against serial infusion of factor VIII antigen through an implantable venous-access device system in haemophilia A mice. *Haemophilia : the official journal of the World Federation of Hemophilia* 2011.

Ohmori T, Yano Y, Sakata A, et al. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thrombosis research*

2011.

Madoiwa S, Tanaka H, Nagahama Y, et al. Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis research* 2011;127:349-55.

Watanabe H, Madoiwa S, Sekiya H, et al. Predictive blood coagulation markers for early diagnosis of venous thromboembolism after total knee joint replacement. *Thrombosis research* 2011;128:e137-43.

Dokai M, Madoiwa S, Yasumoto A, et al. Local regulation of neutrophil elastase activity by endogenous alpha1-antitrypsin in lipopolysaccharide-primed hematological cells. *Thrombosis research* 2011;128:283-92.

Kurosaki H, Hiratsuka M, Imaoka N, et al. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome. *Journal of human genetics* 2011;56:727-33.

## 2. 学会発表

Yoichi, Sakata., Hoyu, Takahashi., Hajime, Tsuji., Jun, Mimuro., Yutaka, Eguchi., Isao, Kitajima., Tadashi, Matsusita., Tatsuhiko, Kuroda.: Post marketing surveillance of the safety and effectiveness of thrombomodulin alfa in Japanese patients with DIC. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28. 京都.

Seiji, Madoiwa., Hideyuki, Tanaka., Yutaka, Nagahama., Atsushi, Yasumoto., Asuka, Sakata., Yuji, Kashiwakura., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Yoichi, Sakata.: Leukocyte elastase as an alternative pathway for fibrinolysis. 57th

Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28. 京都.

Seiji, Madoiwa., Hideyuki, Tanaka., Yutaka, Nagahama., Yuji, Kashiwakura., Asuka, Sakata., Atsushi, Yasumoto., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Yoichi, Sakata.: Degradation of cross-linked fibrin by leukocyte elastase as alternative pathway for plasmin-mediated fibrinolysis in sepsis-induced disseminated intravascular coagulation. ISTH2011. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28. 京都.

Yuji, Kashiwakura., Tsukasa, Ohmori., Jun, Mimuro., Atsushi, Yasumoto., Akira, Ishiwata., Asuka, Sakata., Seiji, Madoiwa., Makoto, Inoue., Mamoru, Hasegawa., Natsumi, Watanabe., Kohei, Tatsumi., Kazuo, Ohashi., Teruo, Okano., Yoichi, Sakata.: Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells ameliorates hemophilic arthropathy in factor VIII-deficient mice. ISTH2011.XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28. 京都.

Seiji Madoiwa Alternative pathway for fibrinolysis: Clinical significance and therapeutic opportunities, leukocyte elastase. ISTH2011. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 57th Annual SSC Meeting. 2011.7/23-28. 京都.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特記事項なし。

## プロテイン S K196E 変異の血栓症における重要性に関する研究

研究分担者 宮田敏行 国立循環器病研究センター研究所分子病態部 部長

### 研究要旨

日本人は静脈血栓塞栓症の遺伝因子として、プロテイン S K196E 変異を持つ。本変異の変異 E アレルの静脈血栓塞栓症に対するオッズ比は 3.7-8.6 である。日本人 4,319 人中に 77 人のヘテロ接合体が同定されているので、変異アレル頻度は 0.89%、すなわち日本人約 56 人に 1 人がヘテロ接合体と推定される。日本人総人口を 1.27 億人とすると、ホモ接合体は約 1 万人と計算される。変異ホモ接合体は、これまでわずか 3 名しか報告されていない。即ち、静脈血栓塞栓症患者約 85 人に 1 人の割合で変異ホモ接合体が見いだされている。ヘテロ接合体のプロテイン S 抗凝固活性は約 16%低下している。これまで東アジア人は、欧米人に比し血栓塞栓症が少ないと考えられてきたが、プロテイン S K196E 変異の存在は日本人にも血栓性素因保有者が少なからず存在することを示している。

### A. 研究目的

血栓性素因の研究として、プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの欠損症の遺伝子解析研究から、静脈血栓塞栓症の遺伝的背景には人種差があることがわかってきた。すなわち、白人種では第 V 因子 Leiden 変異 (Arg506Gln 変異) とプロトロンビン G20210A 変異 (3' 非翻訳領域中の変異) が一般住民中にも数%の頻度で見られ、これらが静脈血栓塞栓症のリスクとして確立している。一方、日本人は両変異を持たないものの、静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクとして、プロテイン S K196E 変異を保有することを、本研究のこれまでの活動を通して明らかにしてきた。そこで、プロテイン S K196E 変異に関して、これまでに成された幾つかの報告をまとめ、情報の整理を行った。

### B. 研究方法

プロテイン S K196E 変異に関する報告を文献的に調査した。

(倫理面への配慮)

本研究は文献調査研究であり、倫理的配慮を必要とする研究ではない。

### C. 研究結果

プロテイン S K196E は、第 2EGF 様ドメイン内にあるミスセンス変異で、活性化プロテイン C 抗凝固能が低下すると報告されている。プロテイン S K196E 変異は成熟プロテイン S のアミノ末端を 1 と数える番号では K155E 変異となる。またプロテイン S 徳島ともよばれる。本変異は 1993 年に名古屋大学山崎らによりプロテイン S 異常症患者にエクソン 6 の 586A>G

変異として報告されたものである。プロテイン S K196E 変異が静脈血栓塞栓症のリスク変異であるとの報告はこれまでに 3 報あり、それぞれオッズ比 (95%信頼区間) を 4.72 (2.39-9.31)、3.74 (1.06-13.23)、8.56 (2.07-35.3) と報告している。すなわち、複数の独立した研究が本変異と静脈血栓塞栓症の関連を報告した。

本変異は今のところ日本人にしか見つかっておらず、プロテイン S K196E 変異は白人には同定されていない。日本人での本変異の頻度に関して 4 つの報告がある。そのなかでも国立循環器病研究センターが行った一般住民を対象にした研究が最も大きな研究であり、3,651 人中 66 人がヘテロ接合体であり、ホモ接合体はいなかった。この研究を含めて 4 つの研究の成果をまとめると、日本人 4,319 人中に 77 人のヘテロ接合体が同定されている。このことから変異アレル頻度は 0.89%、すなわち日本人 56 人に 1 人の割合でヘテロ接合体がいることになる。日本人総人口を 1.27 億人とするとホモ接合体は約 1 万人と計算され、多くの日本人が静脈血栓塞栓症のリスクに晒されていると考えられる。しかし、プロテイン S K196E 変異ホモ接合体は、これまでわずか 3 名しか報告されていない。即ち、静脈血栓塞栓症患者約 85 人に 1 人の割合で見いだされている。

ヘテロ接合体のプロテイン S 抗凝固活性は約 16%低下している。一般住民を対象

にプロテイン S 抗凝固活性と遺伝型を調べた研究では、1,862 中 34 名がヘテロ接合体で、その抗凝固活性は 40%から 110%の広い範囲に分布していた。正常型プロテイン S 保有者の活性は 40%から 170%までを示し、ヘテロ接合体の活性と大きくオーバーラップしていた。これより、プロテイン S 抗凝固活性の測定ではヘテロ接合体は確定できないと考えられた。しかし、平均値をみると、ヘテロ接合体は約 16%活性が低い。

2011 年の *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 誌に Zakai and McClure は *Racial difference in venous thromboembolism* と題した総説を発表した。この総説には、白人種に見られる第 V 因子 Leiden 変異とプロトロンビン G20210A 変異は紹介したが、日本人に見られるプロテイン S K196E 変異は記載されていない。そこで、本邦の研究成果の情報発信として、同誌に *Venous thromboembolism and a race-specific genetic variation, protein S K196E, in Japanese* を投稿し受理された。

#### D. 考察

日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝因子としてプロテイン S K196E 変異に関する研究を整理した。プロテイン S 抗凝固活性は妊娠、経口避妊薬、腎障害などで低下することが知られているので、本変異保有者がそういった環境要因に暴露されると更に抗凝固活性が低下し、血栓リスク

が上昇するのではないかと考えられた。プロテイン S K196E 変異の血栓症との関連を調べるには、ホモ接合体の血栓症の解析が重要であると考えられるが、ホモ接合体は稀であるため研究が進んでいないのが現状である。本変異と静脈血栓塞栓症に関するより詳しい研究が必要である。

#### E. 結論

プロテイン S K196E 変異は遺伝因子として日本人の静脈血栓塞栓症発症に関わっている。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) R. Neki, T. Fujita, K. Kokame, I. Nakanishi, M. Waguri, Y. Imayoshi, N. Suehara, T. Ikeda, T. Miyata: Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*, 94(2), 150-155, 2011.
- 2) S. Kameda, T. Sakata, Y. Kokubo, M. Mitsuguro, A. Okamoto, M. Sano, T. Miyata: Association of platelet aggregation with lipid levels in the Japanese population: the Suita study. *J Atheroscler Thromb*, 18(7), 560-567, 2011.

3) T. Miyata, N. Hamasaki, H. Wada, T. Kojima: Venous thromboembolism and a race-specific genetic variation, protein S K196E, in Japanese. *J Thromb Haemost*, 2012, in press.

4) 宮田敏行、岡本 章、小久保喜弘「加齢とプロテインS」臨床検査、第 55 巻、第 4 号、407-409 頁、2011 年

5) 宮田敏行「二次止血：凝固のメカニズム」カレントセラピー、第 29 巻、第 6 号、12-15 頁、2011 年

6) 宮田敏行、喜多俊行「DIC と外因系凝固反応、マイクロパーティクル」医学のあゆみ、第 238 巻、第 1 号、5-9 頁、2011 年

7) 宮田敏行、喜多俊行「内因系凝固反応と血栓症」Annual Review血液2012、高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 譲・小島勢二 編集、中外医学社、236-244頁、2012年

##### 2. 学会発表

- 1) Sachika Kameda, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, Mana Mitsuguro, Akira Okamoto, Michitaka Sano, Toshiyuki Miyata. Association of platelet reactivity with lipid and PAI-1 levels in a Japanese general population, the Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011

2) Akira Okamoto, Toshiyuki Sakata, Yoshihiro Kokubo, Michitaka Sano, Toshiyuki Miyata, Age- and gender-related differences in PAI-1 antigen levels in a Japanese general population, the Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011

3) Yoshihiro Kokubo, Toshiyuki Miyata, Toshiyuki Sakata, Akira Okamoto, Makoto Watanabe, Yuu Ono, Mariko Banno, Yoshihiro Miyamoto, The Association between Plasma Fibrinogen and Coronary Heart Disease in a Japanese Urban Cohort: The Suita Study, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28 · 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし

## 日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略

研究分担者：川崎 富夫 大阪大学医学部 助教

### 研究要旨

難治性血栓症、とりわけ肺血栓塞栓症の予防を完成させるためには、医学的先端的分野での進歩と同時に、社会的分野での説明責任を果たすことが重要である。前者において、止血検査法の進歩は分析方法自体の正確さを増したが、それに保存検体の安定性がまだ追いついていない。今回血漿の緩衝化により検体保存の安定性の問題を解決した（Ⅰ）。また後者は医療訴訟の原因の一つとして解決が必要な喫緊の課題である。司法は、医学側が次々に作成するガイドラインを勝手に拡大解釈して、医療が守るべき医療水準と看做すようになった。そのため、研究班での提言やガイドラインの位置づけを、司法側が理解しやすい形で説明する必要が生じている。現段階での一応の検討結果を司法側に示して、司法側の次の対応を導き出したい（Ⅱ）。

### A. 研究目的

（Ⅰ）我々は以前に FVIII インヒビター測定の際の 37℃、2 時間加温における血漿 pH の上昇は、測定に使用する試験管に左右されることを報告した。この pH 上昇は、FVIII のみならず他の凝固因子インヒビター測定の際にも問題になると考えられる。今回、F-II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII について検討した。

（Ⅱ）静脈血栓塞栓症の早期診断や予防はいまだに困難を伴う。現在様々なガイドラインが存在し、そのガイドラインに沿わなかったために肺塞栓症が生じた、とする判決が増加している。大阪地判平 21・9・29 判決は、肺塞栓症研究会のガイドライン通りの予防を行わなかったために患者が死亡し有責となった。しかし、ガイドラインに示されている弾カストッキングの効果には誤訳があるにもかかわらず、その問題が見逃されて司法判断がなされた。ここには、ガイドラインの実質的な信頼

性・正確性をその作成者がどのように検証したのかという問題と、ガイドライン使用者に対してガイドラインの位置づけを作成者がどのように具体的に周知したのか、すなわちコンセンサスをどのように得たのか、という問題が存在する。前者については既に報告したので（年報医事法学 26, 2011）、今回は後者の検討を行う。

ガイドラインの位置付けは、これまで医学的立場から真剣に検討されることが無かった。医療と司法の共同研究では、認識の相違が存在することは明らかになったが、説明の主体は医療側にある。そのため、研究班との関わりにおいて、ガイドラインの位置づけを如何に表現すれば司法側が理解しやすいのかを検討する必要が生じた。

### B. 研究方法

（Ⅰ）1. Bethesda 法における反応溶液中の pH 上昇の軽減法



緩衝化血漿は、血漿 9.5 容に対し 1M HEPES 緩衝液 pH7.35 を 0.5 容添加し作成した。

種々の試験管を使用し、緩衝化血漿を使用した時の 37℃、2時間加温後の pH の変動について検討した。

2. Bethesda 法における検体血漿添加量による因子の安定性

試験管容積 6.5ml、内径 11mm の試験管を使用し、非緩衝化血漿と緩衝化血漿および対照血漿（非緩衝化血漿と 30mM HEPES 緩衝液 pH7.35 の等量混合）のそれぞれを 1.0ml と 0.5ml を添加し、37℃、2時間加温後の各凝固因子の安定性を検討した。

(II) guideline の翻訳がガイドライン（指針）であることに注目して、英語と日本語のそれぞれの意味について辞書等を用いて確認する。その上で、研究班に関連するガイドラインならびに指針について検討する。なお、広辞苑と診療ガイドライン作成・活用ガイド（金原出版）を参照した。

### C. 研究結果

(I) 1. Bethesda 法における反応溶液中の pH 上昇の軽減法

pH と使用試験管との間には、 $pH = 2.2766 \left\{ \left( \frac{\text{試験管容積 ml}}{\text{添加血漿容量 ml}} \right) / \text{空気と血漿との接触面積 mm}^2 \right\} + 7.448$  の関係があることを見出した。

2. 緩衝化血漿 1.0ml、0.5ml 添加における 37℃、2時間加温後の pH はそれぞれ 7.60 および 7.76 であった。

非緩衝化血漿では、FII, FVII, および FX を除く凝固因子活性は 1.0ml 添加血漿に比較し 0.5ml 添加血漿で有意な低下が認められた。緩衝化血漿を使用した場合には、F-VIII 以外の因子に有意な変動を示さなかったが、F-VIII については、0.5ml

と 1.0ml との間に有意な低下（1.0ml 添加に比較し約 5% の低下）を認めたが、各添加量と対照血漿との間には有意差はなかった。

(II) 学会のマニュアル、あるいは信頼性の高いガイドラインとは、会員全員のコンセンサスが得られているものを指す。具体的には少なくとも、個々の内容に対する反論とその反論に対する作成者の説明、そして最終決定者の判断とその理由ならびに利害相反（COI）が、ホームページ上に明記され、定期的に見直しがなされることが前提となる。ガイドラインについてのコンセンサスが得られた範囲を明確にすることは、学会の姿勢や信頼性そのものを示す。

医療ガイドラインが、manual に相当するものから、個別的な policy に相当するまでの分布があることは、医療界では周知の事実である。ガイドラインの問題は Guideline を指針（ガイドラインとも言い換えられる）と翻訳した時に始まる。Guideline は 60～95% の患者に当てはまるとされており、日本でもガイドラインの作成者はそのように解釈していると思われる。しかし一方、指針＝ガイドラインという社会的認識があり、国語辞書でも「物事をそれによって進めるべき方針」とされていることから、この意味では 95% 以上の患者に適応するものである、と社会的には認識されることになる。ここに[英語]guideline と[日本語]ガイドライン(指針)に対する認識の相違が生じており、それぞれの解釈を通じて訴訟問題に影響する。班研究の関連では現在、「ITP 治療の参照ガイド」と「(ヘパリン在宅自己注射療法の適応と)指針」とが関係する。前者は現時点の段階では reference (参照)に

相当し、後者は概ね 95%の患者に当てはめようとする意図があることから ガイドライン(指針)に相当することが確認できる。そして両者を含めて総称するときには、guideline と呼ぶことは適切であるが、ガイドライン(指針)とよぶことは不適切ということになる。

#### D. 考察

(I) 検体血漿を緩衝化してもなお 37°C, 2時間の加温の pH 上昇は使用容器によって残存因子活性に差を有することを意味している。しかしながら、Bethesda 法(Nijmegen 法)における測定法に関して、血漿の緩衝化について記述があるものの測定時に使用する容器についての記述はこれまでなかった。

Bethesda 法によるインヒビターの測定において、検体の緩衝化と測定に使用する試験管を考慮し、pHを7.6以下に設定できる測定試験管と血漿容積を算出することで凝固因子活性の自然失活を抑制することが可能である。そして凝固因子活性自体の正確な測定においても、この方法は有用である。

(II) guideline とガイドライン(指針)を区別することが重要である。Guideline の概念が幅広いため、作成当初で一部の専門家のコンセンサスしか得られていない場合、あるいは信頼度について作成者が(医学的だけでなく)社会的説明責任を負えない場合には、あえて参照(reference)という表現を用いるのが適切であろう。ガイドライン(指針)という表現を、信頼性とコンセンサスの面から完成度の高いものに限ることにより、医療と司法の間に認識の相違が生じるのを回避することができる。なぜなら、司法のいう医療水準としてのガイドライン(指針)は、完

成度の高いものをさすからである。

#### E. 結論

(I) 血漿の緩衝化と試験管の選択により、凝固因子活性の失活を防ぐことが可能となった。Bethesda 法における問題である擬陽性や施設間格差を防ぐことができる。

(II) (英語) guideline と(日本語)ガイドライン(指針)とは、区別して理解し使用する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 業績リスト

##### G 1. 論文発表

1. Torita S, Suehisa E, Kawasaki T, Toku M, Takeo E, Tomiyama Y, Nishida S, Hidaka Y.

Development of a new modified Bethesda method for coagulation inhibitors: the Osaka modified Bethesda method.

Blood Coagul Fibrinolysis. 22(3): 185-189, 2011.

##### 2. 川崎富夫

法律用語としての意思の成立と社会への影響

法律時報 9・10号 101-107, 2011

##### G 2. 学会発表

##### 1. 川崎富夫

判例データベースから見た静脈血栓塞栓症診療上の有責リスク

第52回日本脈管学会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## bortezomib が血小板機能に与える影響の解析

研究分担者 横山 健次 慶應義塾大学医学部内科

多発性骨髄腫 (MM) の治療に使用される薬剤の一つに、プロテアゾーム阻害薬である bortezomib (BOR) がある。MM 治療に thalidomide (Thal) を使用した患者では高率に静脈血栓塞栓症 (VTE) を発症することが知られているが、アスピリンの併用、BOR の併用により VTE 発症率が低下する可能性が報告されている。現時点では予備的検討な段階であるが、BOR は *in vitro* で血小板機能を抑制すること、抑制には何らかの形で P2Y<sub>12</sub> が関与している可能性があること、が示唆された。

### A. 研究目的

悪性腫瘍患者では静脈血栓塞栓症 (VTE) 発症率が高く、VTE は腫瘍の進行に次いで悪性腫瘍患者の主要な死因の一つとなっている。固形がん患者での VTE 発症率、発症の危険因子に関してはおもに欧米から多くの報告があり、予防的抗凝固薬投与の有効性を検証する臨床試験も施行されている。一方で造血器腫瘍患者では、原病あるいは治療に伴い血小板減少、凝固異常を呈することも稀ではなく、従来出血症状に注意を払われることが多かった。しかし近年いくつかの報告により、造血器腫瘍患者でも固形がん患者と同様に VTE 発症率が高いことが明らかにされ、我々がびまん性大細胞性リンパ腫患者を対象として後ろ向きに解析した研究結果でも 11% と高率であった (論文 1)。また造血器悪性腫瘍の一つである多発性骨髄腫 (MM) 患者では 5% 前後の VTE 発症率とされているが、新規薬剤である

thalidomide (Thal)、lenalidomide (LEN) を投与された患者では VTE 発症率が高くなり、ステロイドと併用した場合には 50% を越える、との報告もある。一方で作用機序の異なる新規薬剤である bortezomib (BOR) 投与患者では VTE 発症率が高まることはなく、さらに Thal に BOR を併用した場合には、Thal 単独投与と比較して VTE 発症率が低下することが報告されている。BOR 投与患者では *ex vivo* で血小板凝集能が低下していること、健常人血小板に *in vitro* で添加した場合に血小板凝集能が低下することが報告されているが、BOR が血小板凝集に与える影響の作用機序は解明されていない。BOR の血小板への作用機序を解明することにより実際に VTE 発症を抑制している可能性があるのか、さらに MM における VTE 発症機序を解明することを目的として今回の研究を計画した。

## B. 研究方法

健常人血液を採取、in vitro で BOR を添加して 2 時間放置した後に、各種検査法で血小板機能を測定した。

(倫理面への配慮)

血液を提供する健常人には口頭で同意を得た。なお現時点では本研究で遺伝子解析を行う予定はない。

## C. 研究結果

現在は予備的検討を行っている段階であり、今後実験条件の見直す予定である。従って現時点の結果は参考値である。

### 1) アゴニスト惹起血小板凝集

血小板数 30 万/ $\mu$ l に調整して測定した。

BOR により ADP 凝集 (5  $\mu$ M、10  $\mu$ M) は濃度依存性に抑制された (図 1)。なお shape change の変化はみられなかった。また複数回の実験を繰り返した結果、BOR 400  $\mu$ M により 5  $\mu$ M ADP 凝集は有意に抑制された (5  $\mu$ M ADP 凝集 BOR(-) 81.9  $\pm$  7.6%、BOR 400  $\mu$ M 32.5  $\pm$  3.0% p = 0.0007)。一方でコラーゲン凝集、エピネフリン凝集の抑制はみられなかった (表 1)。

### 2) verifyNow

BOR 40  $\mu$ M、BOR 400  $\mu$ M で、軽度の抑制がみられた (表 2)。

### 3) VASP リン酸化

BOR 400  $\mu$ M まででは VASP リン酸化の有意な低下はみられなかった (表 3)。

### 4) PFA-100

コラーゲン/エピネフリン、コラーゲン

/ADP とともに BOR 40  $\mu$ M では閉塞時間の明らかな変化はみられなかった (表 4)。

## D. 考察

一般に VTE 発症には血小板よりも凝固線溶系の関与の方が大きいと考えられている。臨床的にも術後の VTE 発症予防目的での抗凝固薬投与の有用性は証明されているものの、抗血小板薬投与の有効性は証明されていない。一方で MM 患者における VTE 発症機序は不明であるが、臨床試験の結果では、アスピリン投与により Thal あるいは LEN 投与 MM 患者における VTE 発症率が低下することが報告されている。さらに BOR を Thal と併用した場合にも VTE 発症率が低下する可能性が報告されている。従って MM 患者、特に Thal、LEN 投与患者における VTE 発症予防の観点からは、BOR が血小板機能に与える影響を解析することは有用であると考えられる。

現時点では予備的検討の段階であり、十分な考察を行うには更なる研究継続が必要であるが、現在までの結果から BOR は in vitro で血小板機能に一定の影響を与えられた。Avcu らは健常人血小板に in vitro で bortezomib を加え多結果 ADP 凝集が抑制されたこと、ortezomib の凝集能抑制効果は NO 産生増加に由来すると考えられること、を報告している (Avcu F, et al Thromb Res 121 2008)。ADP 凝集の抑制がみられることは今回の研究結果でも同様であった。また