

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

－ 総合研究報告書 －

分担研究報告書

研究テーマ： 1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討
2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

分担研究者

瀧 正志 聖マリアンナ医科大学小児科学教授
聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科部長

研究協力者

山下 敦己 聖マリアンナ医科大学小児科
足利 朋子 聖マリアンナ医科大学小児科
長江 千愛 聖マリアンナ医科大学小児科

研究要旨：

1) 本邦の血栓症患者における先天性血栓性素因の遺伝子異常の発現頻度、各遺伝子異常の血栓症発症リスクについて検討するため、血栓症を発症した患者を対象として先天性血栓性素因の3大疾患であるアンチトロンビン異常症、プロテインC異常症、プロテインS異常症の遺伝子解析を行った。解析した6家系の内4家系において先天性血栓性素因の遺伝子異常を認めた。凝固制御因子の活性値測定のみによる診断は正確性に欠け、先天性血栓性素因の診断に遺伝子解析は極めて有用であった。血栓症患者における遺伝子異常の発現頻度や各遺伝子異常の血栓症発症リスクについては今後症例を増やして検討したい。

2) 血栓症の治療および予防薬として抗 Xa 阻害薬を使用する際の有効な凝血学的モニタリングは未だ確立されていないが、Danaparoid においては凝固波形解析による凝血学的モニタリングが有用である可能性が示唆された。今後、モニタリングの精度を高めるため凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討を進める必要がある。

A. 研究目的

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

日本人における先天性血栓性素因は、アンチトロンビン(AT)異常症、プロテインC(PC)異常症、プロテインS(PS)異常症が多く、これまでに多くの原因遺伝子変異が同定されている。しかし本邦における先天性血栓性素因の遺伝子異常に関するデータは決して十分とは言えず、特に血栓症患者における各遺伝子異常の発現頻度、各遺伝子異常と血栓症発症リスクとの関連性については未だ不明な点が多い。

また先天性血栓性素因の診断は主として各凝固制御因子の活性値および抗原量の測定により行われている。しかし生理的要因や治療の影響からこれらの活性値測定のみによる診断は容易ではないこともあり、確定診断のためには遺伝子検査が有用であるが、その検査体制が整っていないのが現状である。

本研究は血栓症患者を対象とし、先天性血栓性素因の3大疾患であるAT異常症、PC異常症、PS異常症の遺伝子検査を行い、遺伝子異常と血栓症発症との関連性について解析することを目的としている。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

近年血栓症の治療および予防薬として抗 Xa 阻害薬が広く使用されるようになった。抗 Xa 阻害薬はトロンビンに対する直接的な阻害作用が少ないため出血の危険性が低いとされているが、出血性合併症は決して皆無とは言えない。しかしながら、従来の凝固時間法による薬効モニタリングは困難とされ、現時点で有効な凝血学的モニタリング法は確立されていない。そこで我々は、抗 Xa 阻害薬使用時の適切な凝血学的モニタリング法について検討するため、トロンビン生成能、凝固波形解析を用いて抗 Xa 阻害薬添加時の凝固能の変化について検討した。

B. 研究方法

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

対象は、血栓塞栓症を発症し先天性血栓性素因の存在が疑われ、遺伝子検査のための検体採取に対して同意が得られた患者である。患者の静脈血を採取し、九州大学病院臨床検査部で AT、PC、PS の遺伝子検査を行った。この遺伝子検査のために必要な採血量は 1 回 2ml であり、採血は 1 回のみである。

(倫理面への配慮)

聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会へ本研究の実施申請を行い、2013 年 3 月に「血栓症患者の遺伝子解析」の実施が承認された(承認番号 第 2365 号)。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

健常成人 5 名から得られた乏血小板血漿(2 回遠心、1800g、15 分間)に各濃度の Danaparoid、Fondaparinux を添加し、APTT、トロンビン生成能、凝固波形解析より得られる最大凝固加速度を測定した。トロンビン生成能は、トロンビンの総生成量を表す ETP(Endogenous thrombin potential)で評価した。各薬剤添加時の凝固時間および ETP の変化率(投与後/投与前)を求め、それぞ

れの変動係数(CV)を比較した。次に各薬剤添加による ETP の変化と最大凝固加速度との相関関係について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施に関しては、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会で承認された(承認番号 第 1210 号)。

C. 研究結果

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

6 家系 10 名の遺伝子解析を行い、その内 4 家系 7 名において先天性血栓性素因の遺伝子異常を認めた。その内訳は、AT 異常症が 3 家系、PC 異常症が 1 家系であった。一方、2 家系においては遺伝子異常を認めなかった。遺伝子異常を認めなかった 2 家系の内、1 家系は PS 欠損症を疑われた母子である。母親は他院で PS 活性値の低下から PS 欠損症と診断された。不育症のためアスピリン内服とヘパリン皮下注射を行い、妊娠が継続し分娩となった。児も PS 活性値 69%と軽度の低下を認めたが、母子とも PS 遺伝子解析で異常を認めず後天性の PS 低下症の可能性が高いと考えられた。もう 1 家系は脳梗塞を発症した乳児で、PC 活性値の低下を認めたが、遺伝子解析で異常を認めず、今後 PC 活性の経時的な追跡を行う予定である。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血学的モニタリングの検討

Danaparoid 添加により、APTT は濃度依存性に延長し、ETP は濃度依存性に低下した。両者の CV 値を比較すると、ETP の CV 値は APTT の CV 値に比べ大きい傾向が認められた。

Fondaparinux 添加による APTT の延長効果は極めて僅かであったが、ETP は濃度依存性に低下した。両者の CV 値を比較すると、ETP の CV 値は APTT の CV 値に比べ大きい傾向が認められた。

各薬剤添加時の ETP の変化率と最大凝固加速度の変化率の相関関係について検

討したところ、Danaparoid 添加時においては両者の間に有意な正の相関関係が認められた($r=0.86$, $p<0.01$)。Fondaparinux においては、両者の間に有意な相関関係は認められなかった($r=0.50$, $p=0.06$)。

D. 考察

1) 血栓症患者の遺伝子異常についての検討

遺伝子解析を行った6家系の内4家系に先天性血栓性素因の遺伝子異常が認められた。これらの家族に対して、正確な先天性血栓性素因の診断、正しい情報提供を行うことができた。一方、2家系においては凝固制御因子の低下を認めたものの、ダイレクトシーケンス法による遺伝子解析においてはその凝固制御因子の塩基配列に異常を認めなかった。凝固制御因子の活性値を経時的に測定し、凝固制御因子の一過性の活性値低下か否かを追跡する予定である。

凝固制御因子の活性値測定のみによる診断は正確性に欠け、先天性血栓性素因の診断に遺伝子解析は極めて有用であることが示唆された。

2) 抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血的モニタリングの検討

ETP 変化率の CV 値はいずれの薬剤においても大きく、これは各薬剤のトロンビン生成能抑制効果には個人差が存在することを示唆する成績と考えられ、この個人差は出血性合併症の一因である可能性が考えられた。

Danaparoid 添加による最大凝固加速度の変化率は ETP 変化率と正の相関関係にあり、最大凝固加速度は Danaparoid 添加時の個々に異なるトロンビン生成能抑制効果を鋭敏に捉えうる検査法である可能性が示唆された。しかし、Fondaparinux においては同様の結果は得られず、今後凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討を進めたいと考えている。

F. 結論

先天性血栓性素因の正確な診断に遺伝子解析は非常に有用であった。血栓症患者における遺伝子異常の頻度や各遺伝子異常の血栓症発症リスクについては今後症例を増やして検討したい。

抗 Xa 阻害薬使用時の有効な凝血的モニタリングの検討に関して、Danaparoid においては凝固波形解析による凝血的モニタリングが有用である可能性が示唆された。今後、モニタリングの精度を高めるため凝固波形解析に用いる最適な試薬について検討したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山下敦己、瀧 正志：日常生活における管理・指導 凝固異常症（血友病、先天性血栓性疾患）小児科臨床、65:808-812, 2012
- 2) 長江千愛、瀧 正志：播種性血管内凝固症候群（DIC）の治療、小児内科、53:1067-1075, 2012
- 3) 足利朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、秋田美恵子、鈴木典子、山崎哲、高山成伸、立浪忍、瀧 正志：ステロイドパルス治療家兎モデル実験における顕著なトロンビン生成能の上昇、血栓止血誌、23:571-579, 2012
- 4) 長江千愛、瀧 正志：小児科領域の DIC、臨床に直結する血栓止血学、朝倉英策（編著）p227-234、中外医学社（発行）2013
- 5) Hideaki Imamura, Yuko Akioka, Masashi Taki, Fumiko Terasawa, Nobuo Okumura, Motoshi Hattori: Successful living-related kidney transplantation in a boy with inherited dysfibrinogenemia. Pediatric Nephrology, 17: E161-E164, 2013
- 6) Ohga S, Ishiguro A, Takahashi Y, Shima M, Taki M, Kaneko M, Fukushima K, Kang D, Hara T, Japan Childhood Thrombophilia Study Group: Protein C deficiency as the major cause of thrombophilias in childhood. Pediatr Int. 55:267-71, 2013

- 7) 瀧 正志：出血性疾患に対する臨床的ならびに検査からのアプローチ、日本小児血液・がん学会雑誌、50(3)：450-456、2013
2. 学会発表
- 1) 瀧 正志：小児 DIC の新たな治療戦略、第 115 回日本小児科学会、2012.4
- 2) 足利朋子、山下敦己、武藤真二、長江千愛、瀧 正志：ステロイドパルス療法はトロンビン生成能を増加させる、第 115 回日本小児科学会、2012.4
- 3) Shinji Muto, Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Masashi Taki: Clinical experience with the medication of recombinant thrombomodulin to children with DIC in Japan. 25th Annual ASPHO (American Society of Pediatric Hematology Oncology) Meeting, 2012.5
- 4) Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Masashi Taki: Analysis of anticoagulant effect of factor Xa inhibitors using thrombin generation assay in vitro. The 74th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, 2012.10
- 5) 山下敦己、長江千愛、足利朋子、武藤真二、秋田美恵子、山崎哲、高山成伸、瀧正志：L-asparaginase による凝固障害の発症機序、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 6) 武藤真二、長江千愛、足利朋子、山下敦己、瀧正志：小児 DIC に対する遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤の有用性、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 7) 足利朋子、長江千愛、山下敦己、秋田美恵子、武藤真二、瀧 正志：小児の各種疾患に対するステロイドパルス療法のトロンビン生成能に及ぼす影響、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 8) 富田 知世子、山下 敦己、足利 朋子、武藤 真二、長江 千愛、瀧 正志：急性壊死性脳症に合併した DIC に対し遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤が著効した幼児例、第 54 回日本小児血液・がん学会、2012.11
- 9) Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Noriko Suzuki, Noriko Yamazaki, Masashi Taki, Masahiro Ieko, Yoko Kawai, Standardization Subcommittee of Laboratory test for Thrombosis and Hemostasis: Reevaluation of activated partial thromboplastin time (APTT) reagents in Japan, XXVth International Symposium on Technological Innovations in Laboratory Hematology, 2013.5
- 10) Atsuki Yamashita, Chiai Nagae, Tomoko Ashikaga, Shinji Muto, Mieko Akita, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Shinobu Tatsunami, Masashi Taki: Pathogenesis of hemostatic abnormalities by L-asparaginase in children with acute leukemia. XXIVth ISTH, 2013.6
- 11) Tomoko Ashikaga, Atsuki Yamashita, Shinji Muto, Chiai Nagae, Mieko Akita, Noriko Suzuki, Satoshi Yamazaki, Shigenobu Takayama, Shinobu Tatsunami, Masashi Taki: Pulsed methylprednisolone therapy markedly increases thrombin generation potential in a rabbit experiment. XXIVth ISTH, 2013.6

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし