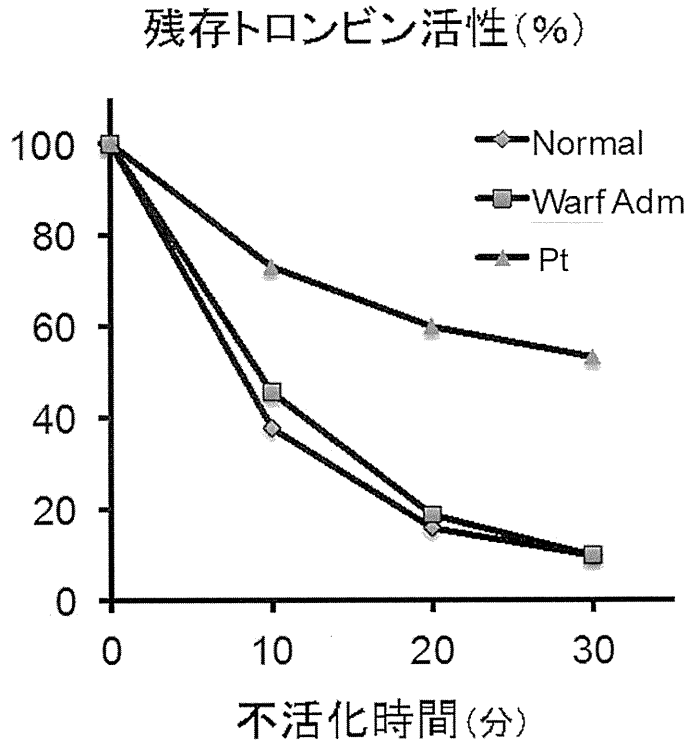
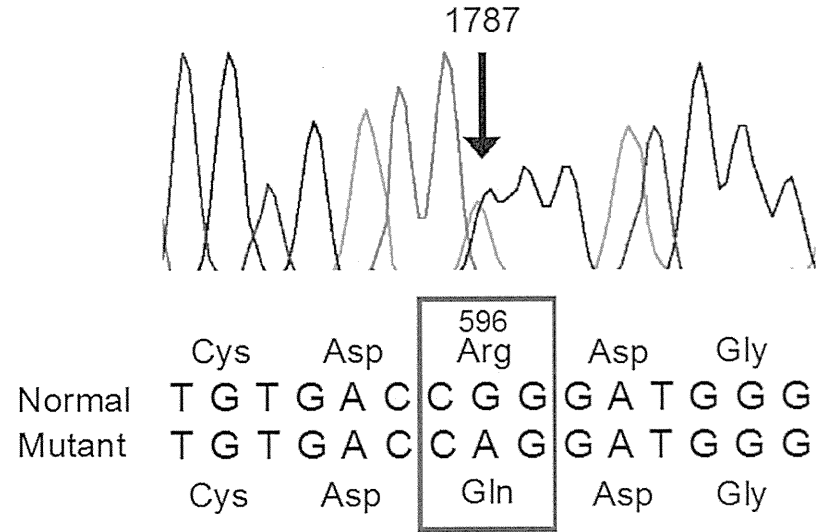


図2. 症例2のATR解析, F2 遺伝子解析



F2 c.1787G>A (p.Arg596Gln)
 (prothrombin Belgrade)
 (Djordjevic: JTH, 2013)



日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテインS K196E 変異の
ELISA法を用いた検出法の確立に関する研究

研究分担者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター 分子病態部 部長
研究協力者 丸山 慶子 国立循環器病研究センター 分子病態部 研究員
研究協力者 秋山 正志 国立循環器病研究センター 分子病態部 室長
研究協力者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター 分子病態部 室長
研究協力者 關谷 暁子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査学 助教
研究協力者 森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査学 教授

研究要旨

プロテインS (PS) の機能低下を伴う K196E 変異は、日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクである。PS K196E 変異は日本人の約 55 人に 1 人の頻度で存在する。本変異保有者の PS 活性値は、平均で約 16%低下しているが、非保有者の値と大きくオーバーラップするため、活性測定では変異の有無を識別できない。本研究では、PS K196E 変異特異的モノクローナル抗体を用いて、血中に存在する異常 PS K196E 分子を検出することにより、変異保有者を同定する系を確立した。本測定法は、遺伝子解析を行わずに変異の同定ができるため、本邦における血栓症診療に有用であると考えられる。

A. 研究目的

静脈血栓塞栓症は加齢で発症が増加し、欧米では80歳を超えると約100人に1人が起こすといわれている。超高齢化を迎えた本邦でも、静脈血栓塞栓症の予防と治療は重要な研究課題である。静脈血栓塞栓症は環境因子と遺伝因子が絡み合って発症する多因子疾患であり、生活習慣の欧米化などにより、近年本邦で急速に増加している。静脈血栓塞栓症の環境因子として、加齢、がん、長期臥床、妊娠、経口避妊薬、ホルモン補充療法、などがあげられており、遺伝因子として血液凝固、線溶やその制御に関わる因子

の先天的異常があげられる。

私達は、難治性疾患研究事業の成果として、これまでに日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的背景としてPS K196E 変異を同定し（オッズ比：3.74-8.56）、本変異は日本人約55人に1人の頻度で認められ（アレル頻度：0.0089）、約1万人がホモ接合体であると報告してきた。本変異は白人種には見られず、加えて中国人と韓国人にも見られないことから、日本人に特有の血栓性変異であることも明らかにした。本変異保有者のPS活性値は、平均で約16%低下しているが、非保有者の値と大

大きくオーバーラップするため、
活生測定では変異の有無を識別できない。

本研究では、PS K196E 変異の保有者を
同定するため、PS K196E 変異特異的モノ
クローナル抗体を用いて、血中の異常
PS-K196E 分子を検出する簡便な系を確
立する。PS K196E 変異の有無を識別する
ことで、血栓症の高リスク群の抽出が可
能となり、血栓症の発症を予防すること
が期待できるため、本研究の臨床的意義
は大きいと考える。

B. 研究方法

血中 PS K196E 変異体を ELISA 系で同定
するため、PS K196E 変異特異的モノク
ローナル抗体を作製した。抗体可変領域
に高頻度で突然変異が誘発される GANP マ
ウスは、通常のマウスに比べて多様な抗
体産生細胞が出現する。そこで GANP マウ
スを抗原ペプチド C¹⁸⁶KNGFVMLSNE¹⁹⁶（下
線で示す Glu 残基が変異部位）を共有結
合したヘモシアニンで免疫し、B 細胞より
抗体産生ハイブリドーマを作製した。組
み換えヒト PS 変異 EGF 様ドメイン 1-4
を HEK293S 細胞で発現精製し、これを用
いて作製した 1,672 クローンをスクリー
ニングし変異 EGF 様ドメイン 1-4 に反応
する 3 クローンを樹立した。次いで、組
み換えヒト野生型 PS および変異型 PS を
HEK293S 細胞で発現精製し、これを抗原と
して用いて 3 種のモノクローナル抗体の
特異性を検討した。このうち、変異型 PS
に最も反応性が高いモノクローナル抗体
を用いて血中 PS K196E 変異体の ELISA 系
を確立した。すなわち、PS ポリクローナ
ル抗体を固相化し、モノクローナル抗体

15C8 を用いてサンドウィッチ ELISA を確
立した。モノクローナル抗体の作製はト
ランスジェニック社に委託した。

（倫理面への配慮）

本研究は国立循環器病研究センターおよ
び金沢大学大学院医薬保健学総合研究科
で倫理面の審査を受け承認されている。
研究参加者から書面での同意を取得し研
究を行った。

C. 研究結果

組み換えヒト野生型 PS および変異型 PS
を HEK293S 細胞で発現させ精製し、これ
を抗原に 3 種のモノクローナル抗体の特異
性を検討した。3 種のモノクローナル抗
体はいずれも野生型 PS には反応しなかつ
たが、変異型 PS には良く反応した。なか
でも、モノクローナル抗体 15C8 は変異型
PS に最も高い反応性を示した。この 15C8
を用いて、血中 PS K196E 変異体検出のた
めのサンドウィッチ ELISA 法を確立した。
本法を用いて遺伝型を同定済みの 33 検体
（野生型 25 名、変異ヘテロ接合体 8 名）の
変異の有無を調べたところ、野生型であ
る正常者は ELISA での吸光度はすべて 0.1
未満であり、変異保有者の吸光度は
0.3-1.0 と明らかに高い値を示し、全ての
検体で変異を同定できた。ワルファリン
加療中の変異保有者や妊娠中の変異保有
者（各 1 人）も 0.3-0.4 の吸光度を示し、
野生型保有者と明確に識別が可能であつ
た。

D. 考察

本研究により、血漿中の PS K196E 変異
体を検出する簡便な ELISA 法を確立した。

入院患者の院内での静脈血栓塞栓症発症の予防や、最近大きな社会問題になっている低用量ピルによる血栓症発症の予防などに対して、本法を用いると血栓症の高リスク群を抽出できることとなり、多方面で血栓症の発症予防が期待できるため、臨床的意義は大きいと考えられる。

E. 結論

日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるPS K196E 変異の有無を、血漿を用いて簡便に検出する系を確立した。今後、血栓症の予防のため、広く使用されることを期待している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K, Fujita D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res*, 133(5), 914-918, 2014
- 2) Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol Genet Genomic Med*,

2(3), 240-244, 2014

- 3) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol*, 100(5), 437-442, 2014
 - 4) Mitsuguro M, Okamoto A, Shironouchi Y, Sano M, Miyata S, Neki R, Araki T, Hamamoto T, Yoshimatsu J, Miyata T: Effects of factor VIII levels on the APTT and anti-Xa activity under a therapeutic dose of heparin. *Int J Hematol*, 2014 Nov 23. [Epub ahead of print]
 - 5) 宮田敏行、丸山慶子「日本人における先天性血栓性素因 -欧米との比較-」臨床血液、第55巻、第8号、908-916頁(2014)
- ### 2. 学会発表
- 1) Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Symposium 2, Thrombosis, leukocytes and vascular cells, Registry of hereditary thrombotic microangiopathies in Japan, The 18th *International Vascular Biology Meeting*, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan.
 - 2) 宮田敏行、シンポジウム「TTPとHUS

- (総会長シンポジウム)」、「TTP/HUSの遺伝子解析」、第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014年5月16日、奈良市
- 3) 宮田敏行、プロテインS研究会シンポジウム、APC凝固制御異常と血栓性素因、「プロテインS徳島は日本人に特有の変異なのか?」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月30日、大阪市
- 4) 宮田敏行、Wanyang Liu、Tong Yin、奥田裕子、原田浩二、Xinping Fan、小泉昭夫、「静脈血栓症のリスクとなるプロテインS K196E 変異の地理的分布」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29日-31日、大阪市
- 5) 宮田敏行、内田裕美子、吉田瑤子、池島裕子、Fan Xinping、芦田明、和田英夫、大塚泰史、中村健治、石川智朗、八田和大、服部元史、久野正貴、才田謙、西尾健治、瀧本智仁、幡谷浩史、大原敦子、川村尚久、波多江健、松本雅則、加藤秀樹、南学正臣、藤村吉博、「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者41人の遺伝子解析」、第51回補体シンポジウム、2014年8月22-23日、神戸市
- 6) Toshiyuki Miyata, “Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13 ” , 2014 Suzhou International Symposium on Basic and Translational Vascular Research, October 11-13, 2014, Suzhou, China
- 7) 宮田敏行、2014年度千里ライフサイエンスセミナー「血栓症形成の分子メカニズムとその制御」基礎：凝固系、「静脈血栓症」、2014年11月6日、吹田市
- 8) 宮田敏行、「血栓症はどうして起こるのか」、奈良女子大学 共生自然科学専攻 ライフサイエンスセミナー、2014年11月28日、奈良市
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
プロテインS K196E 変異検出法、2014年9月24日国内出願、特許出願2014-194080
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

先天性プロテイン S 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する
診療ガイドラインの策定

研究分担者 小林 隆夫 浜松医療センター 院長
研究協力者 尾島 俊之 浜松医科大学健康社会医学講座教授
杉浦 和子 浜松医科大学健康社会医学講座

研究要旨

【目的】日本人には血栓性素因としてのプロテイン S (PS) 欠損症が多く、妊娠中や女性ホルモン剤使用中に血栓症を発症することがある。しかし、妊娠前や女性ホルモン剤使用前に本症と診断されていることは殆どなく、対応に苦慮することが多い。本研究では、先天性 PS 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定を目的とする。【方法】研究方法としては、まずは下記の厚生労働科学研究費補助金難治疾患克服研究事業のデータベースから血栓性素因患者を抽出し、その背景を探り、診療ガイドラインの策定の一助とする。1. 産婦人科領域の静脈血栓塞栓症 (VTE) の調査、2. 肺塞栓症 (PE) と深部静脈血栓症 (DVT) の頻度、臨床的特徴に関する研究、3. 入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究、4. 院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子、5. 肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究、6. 不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究、7. 女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究。【結果】1. の調査結果から産科症例の解析によれば、妊産褥婦に発症する VTE では、血栓性素因を有する患者は、妊娠中発症が 15.4%、産褥期発症が 6.9%であり、妊娠中発症が多い。とくに PS 欠損症や AT 欠損症を有する妊婦は妊娠中発症が多い。また、VTE 症例で血栓症の家族歴・既往歴を有する患者のオッズ比は 209.7 (95%CI:130.5-337.0) と極めて高く、とくに妊娠中発症の方が産褥期発症よりも高い。5. のデータでは、血栓性素因を有する患者の発症時の平均年齢は 46.9 歳と若年者に多かったが、血栓性素因を有する患者は、PE で 2.1%、DVT で 1.8%であり、妊産褥婦に比し低い傾向にあった。3. と 7. の研究から、女性ホルモン剤使用中に発症した PE の 1 例では、活性化プロテイン C 感受性比 (APC-sr) 3.15 (高値)、PS 比活性 0.87 (正常)、もう 1 例では、APC-sr 4.48 (極めて高値)、PS 比活性 0.14 (極めて低値) であり、後者では PS 欠損症が疑われた。これらは非常に有用な予知マーカーになり得ると考えられる。【考察及び結論】血栓性素因を有する妊婦は妊娠中に VTE を発症することが多いため、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要である。また、APC-sr および PS 比活性 の測定が、妊婦や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に有用の可能性がある。

A. 研究目的

日本人には血栓性素因としてのプロテイン S (PS) 欠損症 (PS 徳島変異は日本人 55 人に 1 人と推定) が多く、妊娠中や女性ホルモン剤使用中に血栓症を発症することがある。しかし、妊娠前や女性ホルモン剤使用前に本症と診断されていることはほとんどなく、対応に苦慮することが多い。本研究では、先天性 PS 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定を目的とする。

B. 研究方法

研究方法としては、まずは下記の厚生労働科学研究費補助金難治疾患克服研究事業のデータベースから血栓性素因患者を抽出し、その背景を探り、診療ガイドラインの策定の一助とする。

1. 産婦人科領域の静脈血栓塞栓症 (VTE) の調査 (平成 17-19 年度同事業)
2. 肺塞栓症 (PE) と深部静脈血栓症 (DVT) の頻度、臨床的特徴に関する研究 (同上)
3. 入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究 (平成 20-24 年度同事業)
4. 院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子 (平成 20-22 年度同事業)
5. 肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究 (平成 23-25 年度同事業)
6. 不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究 (平成 23-25 年度同事業)
7. 女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究 (平成 25 年度同事業)

上記研究事業のデータベース以外の

文献やデータベース等も利用し、総合的に考察して診療ガイドラインを策定する。とくに、妊娠管理に関しては、血栓症の発症時期や発症リスクを明らかにし、妊娠中の PS 測定において血栓性素因を有しているのか、単に妊娠中に PS 活性が低下しただけなのかの判別可能なシステムを確立したい。また、女性ホルモン剤使用に関しては、日本人の血栓症 (静脈血栓症および動脈血栓症) の発症実態を明らかにし、使用される女性ホルモン剤の処方実績から発症頻度を割出し、日本初のエビデンスを確立するとともに、PS 欠損症等の血栓性素因保有者における安全な処方方法を提言し、服用前および服用中の最適な検査法として活性化プロテイン C 感受性比 (APC-sr) や PS 比活性 (PS 活性/PS 抗原量) 等を盛り込んだ診療ガイドラインを策定したい。

(倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則り、研究実施施設の倫理委員会の承認を得た後にすでに実施しているため、有害事象が起こる可能性はない。また、既存資料等のみを用いるため、個々の患者からインフォームドコンセントを得ることはしない。さらに患者情報については、連結不可能匿名化された情報のみを収集し、個人情報収集しないため倫理的に問題ないと考える。なお、上記の研究の実施については、研究実施時にホームページで公開している。

C. 研究結果

すべての解析は終了していないが、まず、「産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査（2001年から2005年）」から産科症例のみでみると、静脈血栓塞栓症（VTE）は187例が登録され、妊娠中発症が130例、産褥期発症が58例であった（1例は妊娠中にDVT発症し、産褥期にPEを発症したので、重複）。この中で血栓性素因を有する患者は、妊娠中発症が20例（15.4%）、産褥期発症が4例（6.9%）であった。妊娠中発症は、PS欠損症が7例、アンチトロンビン（AT）欠損症が6例、プロテインC（PC）欠損症が3例、抗リン脂質抗体症候群が4例で、産褥期発症はPC欠損症が2例、抗リン脂質抗体症候群が2例であった。また、上記すべてのVTEにおいて、日本産科婦人科学会の周産期委員会が行った2005年の周産期統計からVTE未発症者110,092件の分娩症例をコントロールとして血栓症の家族歴・既往歴のオッズ比を計算すると、VTE全体では209.7（95%信頼区間：130.5-337.0）、妊娠中発症では247.1（同：146.3-417.3）、産褥期発症では111.0（同：39.1-314.6）であった。

次に、「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究」のデータでは、血栓性素因を有する患者は24例（男性10例、女性14例）で、PEは16例（うち13例はDVT合併）、DVT21例であった。発症時の平均年齢は46.9歳（21歳-85歳）であった。この調査では全体でPEが778例、DVTが1186例登録されたので、血栓性素因を有する患者は、PEで2.1%、DVTで1.8%であった。なお、PE

とDVT合併の1例は経口避妊薬と関連性があった。

また、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」では、結果の解析は終了していないので詳細は今後の解析を待たなければならないが、月経困難症の治療薬であるLEP（low-dose estrogen progestin）製剤服用中に発症したPE症例に関して興味深い2症例を紹介する。APC-srとPS比活性に関しては、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」で得られた結果から、血栓症の予知マーカーとして有用との結論を得ている。

【症例1】：20歳代後半、産婦人科医師、BMI=21.8、リスク因子なし
発症（診断）日：平成××年12月26日
診断名：PE（観戦初日から歩くと息切れがした）＋総腸骨静脈血栓症
LEP服用歴：平成××年8月8日～同年12月26日（約5か月）
誘因：スポーツ観戦3日間（5時間以上水分控え、トイレに行かず座って観戦）
診断に至る経緯：定期検査で、Dダイマーが12 μ g/mLと上昇していたため、CT検査を行い診断
治療：ヘパリン、ワルファリンにて治癒
血栓症予知検査：APC-sr 3.15、PS活性80%、PS比活性0.87

【症例2】：10歳代後半、高校生、BMI=19.6、リスク因子なし
発症（診断）日：平成××年2月21日
診断名：PE（急性、右心負荷、呼吸困難。ただし、DVT症状はなし）
LEP服用歴：平成××年11月15日～平成××年2月21日（約3か月）

誘因：受験勉強（1日10時間、水分摂取は食事の際のみ、トイレに行くとき以外は座位）

診断に至る経緯：駅のエレベーター内で呼吸困難と胸痛を来し、救急搬送

治療：ヘパリン、ワルファリンにて治癒

血栓症予知検査：APC-sr 4.48、PS 活性 13%、PS 比活性 0.14

D. 考察

平成 26 年度は今回の研究の初年度であり、十分な結果が得られていない。しかし、「産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査（2001 年から 2005 年）」から産科症例の解析によれば、妊産褥婦に発症する VTE では、血栓性素因を有する患者は、妊娠中発症が 15.4%、産褥期発症が 6.9%であり、妊娠中発症が多い傾向にある。とくに PS 欠乏症や AT 欠乏症を有する妊婦は妊娠中発症が多いものと思われる。また、VTE 症例で血栓症の家族歴・既往歴を有する患者のオッズ比は 209.7（95%信頼区間：130.5-337.0）と極めて高く、とくに妊娠中発症の方が産褥期発症よりも高かった。すなわち、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要である。

「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究」のデータでは、血栓性素因を有する患者の発症時の平均年齢は 46.9 歳と若年者に多かったが、血栓性素因を有する患者は、PE で 2.1%、DVT で 1.8%であり、妊産褥婦に比し低い傾向にあった。このデータをみても、血栓性素因を有する患者が妊娠すると初

期からの注意が必要と思われる。

上記調査では、PE と DVT 合併の 1 例は経口避妊薬使用が認められたが、現時点では「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」からの詳細なデータは得られていない。しかし、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」で得られた血栓症の有用な予知マーカーである APC-sr、PS 活性および PS 比活性 の測定が、女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に資する可能性があり、さらには PS 欠乏症等の血栓性素因を有する場合は、極めて有用である可能性を秘めている。今後は蓄積されたデータの解析をはじめ適切な予知方法を盛り込んだ診療ガイドラインの策定を行いたい。

E. 結論

血栓性素因を有する妊婦は妊娠中に VTE を発症することが多いため、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要である。また、APC-sr および PS 比活性 の測定が、妊婦や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に有用の可能性はある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 鈴木重統, 後藤信哉編集, 止血・血栓ハンドブック. 西村

- 書店, 東京 (in press)
- 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と VTE. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第 1 章 静脈血栓塞栓症の病理と病態. 医薬ジャーナル社, 大阪 (in press)
 - 小林隆夫: 妊娠中および産褥期の VTE. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第 6 章 特殊な病態下の静脈血栓塞栓症 (VTE) の診断と治療. 医薬ジャーナル社, 大阪 (in press)
 - 小林隆夫, 杉浦和子: 日本人に多い先天性凝固阻止因子欠乏症について教えてください. 特集/OC・LEP の静脈血栓塞栓症リスク Q&A. 産科と婦人科 (in press)
 - 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と活性化プロテイン C 凝固制御系. Thrombosis Medicine (in press)
 - 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症の歴史. Thrombosis Medicine 4(4): 69-73, 2014
 - 小林隆夫: 妊娠中の血栓塞栓症. 産婦人科分野監修: 小西郁生. 今日の臨床サポート (改訂第 2 版). 永井良三, 木村健二郎, 上村直実, 桑島巖, 今井靖, 名郷直樹, 編. エルゼビア・ジャパン, 2014
(<http://clinicalsup.jp/jpoc/>)
 - 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の治療と予防指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療最新ガイドライン 2014-'15, 総合医学社, 東京, pp303-307, 2014
 - 小林隆夫: 検査値のみかた D ダイマ
- 一. 最新女性医療 1(1): 52-53, 2014
 - 小林隆夫: わが国における静脈血栓塞栓症の最近の動向. 産科と婦人科 81(8): 933-938, 2014
 - 小林隆夫: 癌関連血栓症患者の血栓予防に関するガイドランス (再発血栓症と出血を含む). ISTH (国際血栓止血学会の SSC 版). International Review of Thrombosis 9(2): 48-51, 2014
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防対策. 日本臨牀 72(7): 1303-1308, 2014
 - 小林隆夫: 特集 管理法はどう変わったか?: 温故知新 産科編. 妊婦血栓塞栓症. 周産期医学 44(3): 391-395, 2014
 - 小林隆夫: 低用量ピルによる血栓症リスク. 日本医事新報 No4690: 60-61, 2014
- ## 2. 学会発表
- 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症に関する最近の話題. 第 6 回関西凝固線溶研究会学術講演会特別講演. 大阪, 2015. 1. 31
 - 小林隆夫: OC・LEP 製剤と血栓症—安全処方のために—. 第 36 回日本エンドメトリーオーシス学会学術講演会ランチョンセミナー. 東京, 2015. 1. 25
 - Kazuko Sugiura, Toshiyuki Ojima, Takao Kobayashi. Risk of thromboembolism and other adverse events by body mass index in Japanese oral contraceptive users. The 25th

- Annual Scientific Meeting of the Japan Epidemiological Association, Nagoya, 2015.1.23
- 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症－安全処方に向けて－. 平成26年度岩手産科婦人科学会集談会. 盛岡, 2015.1.17
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症－安全処方に向けて－. 第224回大分市医師会産婦人科臨床検討会. 大分, 2015.1.16
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第2回薬の安全処方を考える会. 大阪, 2014.12.5
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第1回薬の安全処方を考える会. 大阪, 2014.11.21
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第29回日本女性医学会学術集会教育講演. 東京, 2014.11.1
 - 小林隆夫：知られていない？日常生活とエコノミークラス症候群－女性ホルモン剤と静脈血栓塞栓症－. 世界血栓症デー. 東京, 2014.10.13
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話題. 新潟県産婦人科医会研修会. 新潟, 2014.10.4
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第2回薬の安全処方を考える会. 福岡, 2014.10.3
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話題. 第3回女性内分泌診療研究会. 大阪, 2014.9.27
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第2回薬の安全処方を考える会. 横浜, 2014.9.26
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症－その安全処方に向けて－. 尼崎産婦人科医会. 尼崎, 2014.9.20
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話題. 札幌市産婦人科医会学術講演会. 札幌, 2014.8.23
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第2回薬の安全処方を考える会. 東京 B, 2014.8.22
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第1回薬の安全処方を考える会. 東京 B, 2014.7.19
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症に関する最新の話題. 第302回奇松会学術講演会. 浜松, 2014.7.18
 - 小林隆夫：静脈血栓症予防の現状～院内での取り組みと安全対策の重要性について～. COVIDEIN 第10回VTE医療安全セミナー in 栃木, 下野, 2014.7.5
 - 小林隆夫：LEP製剤の血栓症リスクに関する話題. 柏市地区産婦人科医会学術講演会. 柏, 2014.7.1
 - 杉浦和子、尾島俊之、小林隆夫：日本における過去10年間の血栓塞栓症患者数の推移. 第60回東海公衆衛生学会学術大会, 名古屋, 2014.7.19
 - 杉浦和子、尾島俊之：日本における血栓塞栓症患者死亡数の推移. 第73回日本公衆衛生学会総会, 宇都宮, 2014.11.5
 - 小林隆夫：わが国における肺塞栓症予防の変遷. 第36回日本血栓止血学会学術集会教育講演 2. 大阪, 2014.5.30

- ・ 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症の最近の話題. 第41回品川地区産婦人科臨床研究会. 東京, 2014. 5. 22
- ・ 小林隆夫：血栓症と検査. 第2回薬の安全処方を考える会. 仙台, 2014. 5. 10
- ・ 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症～その安全処方のためにも～. 弘前市医師会産婦人科部会講演会. 弘前, 2014. 5. 2
- ・ 小林隆夫：血栓症と検査. 第2回薬の安全処方を考える会. 広島, 2014. 4. 26
- ・ 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第1回薬の安全処方を考える会. 福岡, 2014. 4. 4

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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
臨床症状・検査所見、ならびに新規経口抗凝固薬が活性測定におよぼす影響

分担研究者 森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査 教授
研究協力者 關谷 暁子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査 助教
研究協力者 三澤 絵梨 シスメックス株式会社 商品開発グループ
研究協力者 鈴木 健史 シスメックス株式会社 データ保証グループ
研究協力者 新井 信夫 シスメックス株式会社 データ保証グループ 課長

研究要旨

110 家系 170 症例中、59 家系 93 症例に遺伝子変異を同定した。静脈血栓症が中心であったが、PC 欠損症では動脈血栓症が 20%みられた。AT 欠損症は PC・PS 欠損症と比較してより若年性の血栓症を引き起こした。また PC 欠損症は青壮年期に血栓症を発症するという従来の認識とは異なり、10 代での発症例も数例みられた。血栓症のリスクファクターとしては、妊娠および長距離移動が重要であると考えられた。AT は血栓症発症に遺伝的要因が大きく寄与しているのに対し、PS は遺伝的要因よりも環境要因の影響が大きいことが示唆された。先天性 AT・PC・PS 欠損症は発症年齢、血栓症の起こしやすさ、血栓症の種類などが異なっており、その病態を各々正確に把握することが重要と考えられた。また、Xa 阻害剤の内服にて AT・PC・PS 活性は 1.2~1.5 倍偽高値となった。このように、活性値は、測定法・抗凝固薬内服などにより大きく値が変わることを十分認識して、検査結果を解釈する必要があると考えられた。

A. 研究目的

先天性血栓性素因の診断基準を作成するに際して、その臨床症状、検査所見などを詳細に検討することは意義がある。今回、先天性血栓性素因が疑われ当研究室に遺伝子解析を依頼されたアンチトロンビン (AT)・プロテインC (PC) およびプロテインS (PS) 欠損症患者について、血栓症症状、発症年齢、活性値、血栓症誘発因子、遺伝子変異同定率、家族内血栓発症率、などについて総括した。また、今後血栓症の治療薬としてワルファリンの代わりに新規経口抗凝固薬

(NOAC) を内服する症例が増加する可能性があるため、NOAC が PC・PS・AT 活性値におよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

(1) 先天性凝固阻止因子欠損症患者の総括：

先天性 AT, PC, PS 欠損症が疑われ遺伝子解析を施行した発端者およびその家系員、110 家系 170 症例 (AT : 17 家系 34 症例、PC : 41 家系 63 症例、PS : 52 家系 73 症例) を対象とした。

遺伝子解析は、発端者ならびに家系員

よりインフォームドコンセントを得た後、目的とする遺伝子のエクソン全域ならびにエクソン/イントロン境界領域を、ダイレクトシーケンス法にて解析した。ダイレクトシーケンスで変異が同定できなかった場合は、MLPA 法にて遺伝子の欠失、重複などについて検索した。家系員が発端者と同変異を有するかどうかを調べる場合は、PCR-RFLP 法を用いた。

(2) NOAC が AT・PC・PS 活性に及ぼす影響

NOAC 内服者としては、リバーロキサバン内服心房細動 (af) 患者 8 例 (男女各 4 例ずつ、平均年齢 69 歳 (年齢幅: 53 ~ 76 歳) を対象とした。前投与薬として、ワルファリン内服者は除外した。活性測定試薬は、①AT 活性: 合成基質法 2 試薬; Berichrom ATIII (トロンビン法) (シーメンス)、テストチーム S ATIII (Xa 法) (セキスイ)、②PC 活性: 凝固時間法 3 試薬; STA Protein C clot II (ロシュ)、Protein C Reagent (シーメンス)、Protein C Reagent (ハイフェン)、合成基質法 2 試薬; Berichrom Protein C (シーメンス)、Biophen Protein C LRT (ハイフェン)、③PS 活性: 凝固時間法 3 試薬; STA Protein S clot (ロシュ)、Protein S Ac (シーメンス)、Hemoclot Protein S (ハイフェン)、遊離型 PS 抗原量: ラテックス法 2 試薬; LIATEST Free PS II (ロシュ)、Innovance Free PS Ag (シーメンス) を用いた。また、NOAC の血中濃度測定試薬はダビガトランは

Hemoclot Thrombin Inhibitor (ハイフェン)、リバーロキサバンは、Biophen DiXaI (ハイフェン) を用いた。測定機器は全自動血液凝固測定装置 CS-5100 (シスメックス) を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢大学大学院医薬保健総合研究科で倫理面の審査を受け承認されている。研究参加者からは書面での同意を取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) 先天性凝固阻止因子欠損症患者の総括:

59 家系 93 症例に遺伝子変異を認め、変異同定率は AT 88%、PC 49%、PS 46% であった。臨床症状は全ての因子で静脈血栓症が多数を占めたが、PC 欠損症では動脈血栓症が全体の約 20%と、AT および PS 欠損症と比較して多かった。発端者の血栓症初発年齢は AT では 20 代、PS では 40 代に発症のピークがみられたのに対し、PC では 10 代と 40 代に二峰性のピークが認められた。血栓症を発症した患者には様々な背景因子が認められたが、特に妊娠、長距離移動が主要なリスクファクターであった。また変異が同定された発端者の家系内血栓症の有無を検索したところ、AT 欠損症では 7 割で家族歴が認められた。また、AT 欠損症では spontaneous mutation を 1 例認めた。

(2) NOAC が AT・PC・PS 活性に及ぼす影響

服用後の検体において、PS 活性は 3 種類の試薬のうち 2 試薬で 1~2.5 倍程度偽高値となり、PC 活性は 2 試薬とも 1.4 倍程度偽高値となった。AT 活性はトロンビン法ではリバーロキサバン服用前後で変化をみとめなかったが、Xa 法では服用後に 1.3 倍程度高値を示した。リバーロキサバン服用後に高値を示した項目の測定値は、いずれも検体中のリバーロキサバン濃度と正の相関を示し、リバーロキサバンによる抗 Xa 活性とそれに伴う APTT 延長が、PC、PS 活性の偽高値をもたらしたと考えられた。

D. 考察

本研究により、先天性 AT、PC、PS 欠損症は、発症年齢、血栓症の起こしやすさ、症状、などがそれぞれ異なっていた。今回、PS 活性 40%以上の症例では変異を同定することができなかった (PS K196E を除く) が、40%未満の活性を示しかつ血栓症の家族歴があるにも関わらず変異が同定されない症例もあり、PS の現行の遺伝子解析方法には限界があることが示された。血栓症発症には AT 欠損症では遺伝的要因が大きく寄与しており、血栓症発症を未然に防ぐためには、家系調査を行い保因者に予防的指導を行うことが有用であると考えられた。

血栓症の原因検索を、ワルファリンなどの抗凝固剤投与後に行わざる負えないことは多々あり、PC・PS 欠損症の診断をより困難にしてきた。今後、ワルファリンの代わりに NOAC などが使用される場合もあり、活性が偽高値となり診

断を見落とす可能性があることに留意すべきであろう。

E. 結論

先天性 AT・PC・PS 欠損症は発症年齢、血栓症の起こしやすさ、血栓症の種類などが異なっており、その病態を各々正確に把握することが重要と考えられた。

また、Xa 阻害剤の内服にて AT・PC・PS 活性は 1.2~1.5 倍偽高値となった。このように、活性値は、測定法・抗凝固薬内服などにより大きく値が変わることを十分認識して、検査結果を解釈する必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi T, Nakagawa N, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H: Rivaroxaban in a patient with disseminated intravascular coagulation associated with an aortic aneurysm: a case report, *Ann Intern Med* 161(2):158-159, 2014.
- 2) Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S: Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* [Advance Publication] Released: January 16, 2015.
- 3) Yoshikawa Y, Kitayama J, Ishikawa H, Nakamura A, Taniguchi F, Morishita E, Ago T, Nakane H, Kitazono T: Fulminant bilateral

- cerebral infarction caused by paradoxical embolism in a patient with protein S Ala525Val substitution. **Neurology and Clinical Neuroscience**. (in press).
- 4) 森下英理子：「まれな凝固因子異常症」。「プリンシプル血液疾患の臨床：よくわかる血栓・止血異常の臨床」 金倉譲, 富山佳有昭 編集, p. 67-80, 中山書店. 2014. 11. 20.
- 5) 森下英理子：徹底ガイド DIC のすべて 2014-15, VIII. 基礎病態と治療－血管性病変. 救急・集中治療 26(5-6): 851-855, 2014.
- 6) 森下英理子：徹底ガイド DIC のすべて 2014-15, IX. 治療薬－抗線溶薬(内科系). 救急・集中治療 26(5-6):929-934, 2014.
- 7) 森下英理子：新しい経口抗凝固薬のモニタリング検査. 臨床検査 58(8): 979-986, 2014.
- 8) 森下英理子：遺伝子検査. 日本臨床 72(7):1237-1242, 2014.
- 9) 林朋恵、森下英理子：造血幹細胞移植後関連 TMA. 日本血栓止血学会誌 25(6):725-731, 2014.
2. 学会発表
- 1) Kosugi I, Matano A, Morishita E, Taniguchi F. An uncommon case of deep venous thrombosis and pulmonary thromboembolism in a juvenile with compound heterozygous congenital protein S deficiency. XXVI World Congress of the International Union of Angiology, August 10-14, 2014, Sydney, Australia.
- 2) Nomoto H, Morishita E, Takami A, Katsu S, Yamaguchi D, Yasuo Morishima M, Onizuka M, Kashiwase K, Fukuda T, Kodera Y, Suzuki Y, Nitta N, Nakao S, Ohtake S. Thrombomodulin has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-9, 2014, San Francisco, USA.
- 3) 森下英理子：抗凝固薬と血液凝固線溶系検査. B I・生活習慣病セミナー, 2014. 4. 15, 金沢.
- 4) 森下英理子, 林朋恵：大動脈瘤・大動脈解離に伴う止血・凝固異常(慢性 DIC). (シンポジウム). 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014. 7. 10, 東京.
- 5) 森下英理子：血液凝固異常症に遭遇した場合の臨床診断の進め方. 第 9 回四国ナノピア凝固・線溶研究会, 2014. 9. 27, 松山.
- 6) 森下英理子：活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 測定値の解釈－臨床の現場から－. 平成 26 年度日臨技中部圏支部 医学検査学 ランチョンセミナー, 2014. 9. 28, 富山.
- 7) 森下英理子：ヘムオキシゲナーゼー 1 (HO-1) /一酸化炭素(CO)による抗

- 血栓作用の調節. 第 19 回近畿血栓症研究会 北浜フォーラム, 2014. 10. 11, 大阪.
- 8) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の危険因子. 第 2 回日本肺高血圧学会・第 3 回日本肺循環学会合同学術集会教育セミナー, 2014. 10. 4, 東京.
- 9) 森下英理子: なぜ血は固まるの?—血が固まらないはずの血管の中で血が固まる話—. 世界血栓症デー日本市民公開講座 2014, 2014. 10. 13, 東京.
- 10) 林朋恵, 門平靖子, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二: 抗リン脂質抗体症候群における抗リン脂質抗体のプロファイル. 第 111 回日本内科学会学術集会, 2014. 4. 11-13, 東京.
- 11) 關谷暁子, 林朋恵, 川野充弘, 津田友秀, 金秀日, 野本明華, 谷口文苗, 山口大介, 朝倉英策, 大竹茂樹, 森下英理子: 血中可溶性 Mer チロシンキナーゼは妊娠中に増加する, 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 2013. 5. 29- 31, 大阪.
- 12) 谷口文苗, 山口大介, 關谷暁子, 野本明華, 小杉郁子, 朝倉英策, 大竹茂樹, 森下英理子: 広範な下肢深部静脈血栓症を呈した, 複合ヘテロ接合体先天性プロテイン S 欠損症の一例, 第 15 回日本検査血液学会学術集会, 2014. 7. 20-21, 仙台.
- 13) 山口大介, 谷口文苗, 關谷暁子, 野本明華, 佐藤那美, 森永浩次, 岩澤仁, 大竹茂樹, 森下英理子: 当研究室におけるアンチトロンビン遺伝子解析の総括, 第 15 回日本検査血液学会学術集会, 2014. 7. 20-21, 仙台.
- 14) 谷口文苗, 山口大介, 野本明華, 高田麻央, 小林英里奈, 關谷暁子, 門平靖子, 林朋恵, 朝倉英策, 中尾眞二, 大竹茂樹, 森下英理子: 当研究室における先天性プロテイン S, プロテイン C, アンチトロンビン欠損症の遺伝子解析の総括, 第 76 回日本血液学会学術集会, 2014. 10. 31-11. 2, 大阪.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
プロテイン S K196E 変異検出法、
2014 年 9 月 24 日国内出願、特許出願 2014-194080
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

<書籍>

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小野-宇留賀 友佳子, 村田満	MicroRNA と血小板	高久史麿, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉讓, 小島勢二	Annual Review 血液 2015	中外医学社	東京	2015	206-210
富山佳昭	免疫性血小板減少性紫斑病	直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二編	血液疾患 最新の治療- 2014-2016	南江堂	東京	2014	221-224
富山佳昭	特発性血小板減少性紫斑病	門脇孝, 小室一成, 宮地良樹 監修	診療ガイドライン UP-TO-DATE 2014-2015	メディカルレビュー社	大阪	2014	429-434
富山佳昭	ITP の治療指針	金倉讓, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸 編	EBM 血液疾患 の治療 2015-2016	中外医学社	東京	2014	408-412
富山佳昭	特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)	金倉讓, 富山佳昭 編	よくわかる 血栓・止血異常の診療	中山書店	東京	2014	80-91
桑名正隆	免疫性血小板減少症		血栓止血血管学(分冊1)	金芳堂	京都	2015	印刷中
羽藤高明	血栓性血小板減少性紫斑病	福井次矢, 高木誠, 小室一成	今日の治療 指針 2014	医学書院	東京	2014	654-655
羽藤高明	先天性および後天性血管障害による出血	直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二	血液疾患最新の治療 2014-2016	南江堂	東京	2014	217-220
羽藤高明	血小板輸血の適応とそのピットフォール	矢富裕, 大森司	出血性疾患の 実践診療 マニュアル	南江堂	東京	2014	59-64
羽藤高明	新鮮凍結血漿の適応とそのピットフォール	矢富裕, 大森司	出血性疾患の 実践診療 マニュアル	南江堂	東京	2014	65-70
羽藤高明	凝固因子製剤の分類とその適応	矢富裕, 大森司	出血性疾患の 実践診療 マニュアル	南江堂	東京	2014	71-77

村田萌, 小嶋哲人	深部静脈血栓症 に対する対策と 治療	編: 金倉讓, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸	EBM 血液疾患 の治療 2015-2016	中外医学 社	東京	2014	439-442
小林隆夫, 杉浦和子	女性ホルモン剤 と血栓症	鈴木重統, 後藤信哉	止血・血栓ハ ンドブック	西村書店	東京	2015	印刷中
小林隆夫, 杉浦和子	経口避妊薬と VTE	福田幾夫	臨床医のため の静脈血 栓塞栓症診 断・治療マニ ュアル	医薬ジャ ーナル社	大阪	2015	印刷中
小林隆夫	妊娠中および産 褥期の VTE	福田幾夫	臨床医のため の静脈血 栓塞栓症診 断・治療マニ ュアル	医薬ジャ ーナル社	大阪	2015	印刷中
小林隆夫	妊娠中の血栓塞 栓症	永井良三, 木村健二 郎, 上村直実, 桑島巖, 今井靖, 名郷直樹	今日の臨床 サポート (改訂第2版)	エルゼビ ア・ジャ パン	東京	2014	http:// clinical sup.jp /jpoc/
小林隆夫	肺血栓塞栓症の 治療と予防指針	岡元和文	救急・集中治 療最新ガイ ドライン 2014-' 15	総合医学 社	東京	2014	303-307
森下英理子	まれな凝固因子 異常症	金倉讓, 富山佳昭 編集	プリンシ プル血液疾患 の臨床: よくわかる 血栓・止血異 常の臨床	中山書店		2014	67-80