

深部静脈血栓症に対する対策と治療

A 序論

深部静脈血栓症 (deep vein thrombosis: DVT) は、本邦においても食生活の欧米化や高齢化に伴って近年増加傾向にある疾患である。発症危険因子としては、アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S など生理的抑制因子の欠乏症による血栓性素因、妊娠や加齢、さらには術後の長期臥床やロングフライト、災害時の車中泊などがあげられる (表 1)。特に DVT に起因する肺血栓塞栓症 (pulmonary embolism: PE) は重篤な症状を呈し、ときには致命的となるため迅速な対応が求められる。PE は DVT に合併することも多く、同じ病態で発症することが知られており、合わせて静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism: VTE) と称する。

2004 年に肺血栓塞栓症/深部静脈血栓症 (静脈血栓塞栓症) 予防ガイドラインが策定された¹⁾。また、低分子量ヘパリンや Xa 阻害薬などの新規抗凝固薬の保険適用が開始されたことなどから、肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断、治療、予防に関するガイドライン (2009 年改訂版) が発表された²⁾。

B 指針

肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断、治療、予防に関するガイドライン (2009 年改訂版) では検査法および治療法の適応に関する推奨基準を 4 段階に設定している (表 2)。また、

表 1 DVT の付加的な危険因子の強度

危険因子の強度	危険因子
弱い	肥満 エストロゲン治療 下肢静脈瘤
中等度	高齢 長期臥床 うっ血性心不全 呼吸不全 悪性疾患 中心静脈カテーテル がん化学療法 重症感染症
強い	DVT の既往 血栓性素因 下肢麻痺 ギプスによる下肢固定

表 2 検査法および治療法の適応に関する推奨基準のクラス分類

Class I	検査・治療が有効、有用であることについて証明されているか、あるいは見解が広く一致している。
Class II	検査・治療の有効性、有用性に関するデータまたは見解が一致していない場合がある。
Class IIa	データ・見解から有用・有効である可能性が高い。
Class IIb	データ・見解から有用性・有効性がそれほど確立されていない。
Class III	検査・治療が有用でなく、ときに有害であるという可能性が証明されている。あるいは有害との見解が広く一致している。

表3 リスクの階層化とDVTの発生率、および推奨される予防法

リスクレベル	下腿DVT (%)	中枢型DVT (%)	症候性PE (%)	致死性PE (%)	推奨される予防法
低リスク	2	0.4	0.2	0.002	早期離床および積極的な運動
中リスク	10~20	2~4	1~2	0.1~0.4	弾性ストッキングあるいは間歇的空気圧迫法
高リスク	20~40	4~8	2~4	0.4~1.0	間歇的空気圧迫法あるいは抗凝固療法
最高リスク	40~80	10~20	4~10	0.2~5	抗凝固療法と間歇的空気圧迫法の併用あるいは抗凝固療法と弾性ストッキングの併用

入院患者を対象としたDVTの一時予防を目的として、第6回ACCP Consensus Conference on Antithrombotic Therapyの予防ガイドライン（ACCPガイドライン）に準拠し、リスクレベルを4段階に分類している（表3）。血栓症の効果的な治療を目指す上で考慮すべき危険因子として、妊娠・分娩、外科手術などの静脈の機械的圧迫、がんなどの組織因子による凝固系機構のみでなく、プロテインC/S、アンチトロンビンなどの制御系タンパク質の異常や欠乏状態を把握することが重要である（Class I）。予防法としては、理学的予防法と薬物的予防法がある。DVT予防の基本である下肢の運動は、血流うっ滞を減少させる。できる限りの早期離床（低リスク群でClass I）を目指し、自力での運動が困難な場合は、弾性ストッキングの着用（中リスク群でClass II a）、間歇的空気圧迫法（IPC：高リスク群でClass II a）などを行う。IPCは2004年に弾性ストッキングとともに診療報酬として認可された。スリーブの形状や圧力、圧迫回数などは装置により様々で、最近では日本人の体型に合ったものも出てきている。その効果は低分子量ヘパリンに匹敵するという報告もある³⁾。薬物的予防法は、従来一般的に抗凝固療法（高リスク群でClass II a）に用いられてきたワルファリンの内服、未分画ヘパリンの投与に加えて、最近では低分子量ヘパリン（LMWH）やXa阻害薬の使用が認可された。DVT治療においては、PEの合併発症を防ぎ、速やかに血栓を除去もしくは溶解し、再発を防ぐ必要がある。血栓溶解療法においてプラスミノゲンアクチベータのウロキナーゼを用いる場合、初回6万~24万単位/日を点滴静注、7日目まで漸減し投与する（Class II a）。

エビデンス

1) Wells PS, et al (JAMA. 2014; 311: 717-28)⁴⁾

目的 VTEの病因、ならびに3つのVTE治療期間：急性（5~10日）、長期（急性期治療の終了から3~6カ月）、長期以降の延長（3~6カ月以上）、について検索。

方法 ヒトでのVTE治療に関する文献検索（コクランレビュー、メタアナリシス、ランダム化比較試験、その他の臨床試験など）。

結果 LMWHと引き続きビタミンK拮抗薬（VKA）を用いることで、ほとんどの急性期DVT

患者の外来診療を可能にした。新規経口抗凝固薬の開発はさらに急性期治療を簡素化し、2つの経口薬はLMWHの必要性を回避する、単剤療法として使用することができる。PE患者であってもまた、予後およびPEの重症度に応じた判断のもと、外来患者として急性期治療をすることもできる血栓溶解療法は重症VTE患者に確保される最高のもので、下大静脈フィルター（理想的には回収可能なもの）は抗凝固療法が禁忌である場合に使用されるべきである。一般にVTE患者は、LMWHとVKA、あるいは直接Xa因子阻害薬や直接IIa因子阻害薬などによる薬物的抗凝固療法を3カ月必要とする。その後、VTEの病因（一過性リスク要因、孤発性、悪性腫瘍随伴）、再発リスク、大出血リスクのバランスを取った治療法を選択する。大出血に対してより良い予測ツールが必要とされている。急性期、長期、および長期以降の延長された治療での選択肢として、新しい経口抗凝固薬の使用経験はまだ限定されているが、これらすべての時期での治療において、安全かつ有効であることが示されつつある。

結論▶ VTE治療の主力は抗凝固療法であるが、血栓溶解療法や下大静脈フィルターなどの介入は特殊状況下の選択肢として確保されている。抗凝固薬は出血リスクを増大させる可能性があり、病因、リスク、利益、コスト、および患者の好みを組み込んだ個人に合わせた治療戦略を必要とする。

2) Nakamura M, et al (Circ J. 2014; 78: 708-17)⁵⁾

目的▶ 急性期VTEの疫学と臨床管理は日本での十分な情報がないため、これらを明らかにする。

方法▶ 日本VTE治療全国疫学調査（JAVA）は、症候性急性PE、症候性急性DVT、または無症候性急性近位DVT患者の多施設コホート研究である。

結果▶ 急性VTEで登録1,076人の患者のうち、68.7%が孤発性DVT、17.0%はPEのみを発症しており、14.4%は両者を合併していた。VTE管理では、高頻度の下大静脈フィルター挿入（40.6%）、頻回の血栓溶解（21.1%）、ワルファリン（INR=1.5~2.5）に引き継がれる低用量の未分画ヘパリンによる抗凝固療法を特徴とした。平均252.5日間の観察期間中、VTEの再発は29例（発生率：3.9/100患者・年）であった。試験期間中での死亡は123例（16.6/100患者・年）であった。大出血の発生率は2例の致命的な出血と7例の頭蓋内出血を含み、3.2%/患者・年であった。

結論▶ 日本のVTE管理は、低用量の抗凝固療法を使用するプロトコルとは対照的に、急性期での積極的な治療を特徴とする。日本や欧米でのVTE再発率は同様であるが、死亡率は日本で高く、患者とその管理法の特性に応じてかなりのばらつきがある。

D 根拠となった臨床研究の問題点と限界

DVTの予防や治療に関するデータの多くは欧米人を対象としたものであり、その結果をそのまま日本人に適用することには問題がある。その点、後者の日本人でのデータは貴重なものといえる。

E (本邦の) 患者に適応する際の注意点

ワルファリンのコントロールには一般にPT-INRを用いるが、欧米人は2.0~3.0でコントロールするのに対し、出血の副作用を起こしやすい日本人では2.0 (1.5~2.5: Class II b) が推奨されている。

F コメント

本邦におけるDVTの予防と治療に関するエビデンスは欧米に比較して乏しい。そのためガイドラインでは、出血合併症の頻度が明らかでない抗凝固療法による薬物的予防法より理学的予防法に比重を高めた推奨がなされている。今後、わが国でも新規抗凝固薬のVTE予防・治療への適応拡大が進むことが期待されるが、日本人に関するデータの蓄積と十分なエビデンスに基づく治療方針の決定が望まれる。

文献

- 1) 肺血栓塞栓症/深部静脈血栓症 (静脈血栓塞栓症) 予防ガイドライン作成委員会. 肺血栓塞栓症/深部静脈血栓症 (静脈血栓塞栓症) 予防ガイドライン. 東京: Medical Front International Limited; 2004.
- 2) 安藤太三, 伊藤正明, 應儀成二. 肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断, 治療, 予防に関するガイドライン (2009年改訂版). 2009: http://www.j-circ.or.jp/guideline/pdf/JCS2009_andoh_h.pdf.
- 3) Ginzburg E, Cohn SM, Lopez J, et al. Randomized clinical trial of intermittent pneumatic compression and low molecular weight heparin in trauma. *Br J Surg*. 2003; 90: 1338-44.
- 4) Wells PS, Forgie MA, Rodger MA. Treatment of venous thromboembolism. *JAMA*. 2014; 311: 717-28.
- 5) Nakamura M, Miyata T, Ozeki Y, et al. Current venous thromboembolism management and outcomes in Japan. *Circ J*. 2014; 78: 708-17.

〈村田 萌 小嶋哲人〉

A complex genomic abnormality found in a patient with antithrombin deficiency and autoimmune disease-like symptoms

Io Kato · Yuki Takagi · Yumi Ando · Yuki Nakamura ·
Moe Murata · Akira Takagi · Takashi Murate · Tadashi Matsushita ·
Tadaaki Nakashima · Tetsuhito Kojima

Received: 24 March 2014/Revised: 28 April 2014/Accepted: 30 April 2014/Published online: 3 June 2014
© The Japanese Society of Hematology 2014

Abstract Hereditary antithrombin (AT) deficiency is an autosomal dominant thrombophilic disorder caused by *SERPINC1* abnormality. In the present study, we analyzed *SERPINC1* in a Japanese patient with AT deficiency and autoimmune disease-like symptoms. Direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification revealed that the patient was hemizygous for the entire *SERPINC1* deletion. Single nucleotide polymorphism genotyping, gene dose measurement, and long-range polymerase chain reaction (PCR) followed by mapping PCR and direct sequencing of the long-range PCR products revealed that the patient had an approximately 111-kb gene deletion from exon 2 of *ZBTB37* to intron 5 of *RC3H1*, including the entire *SERPINC1* in chromosome 1. We also found a 7-bp insertion of an unknown origin in the breakpoint, which may be a combination of three parts with a few base-pair microhomologies, resulting from a replication-based process known as ‘fork stalling and template switching’. Because *RC3H1*, which encodes the protein roquin is

involved in the repression of self-immune responses, the autoimmune disease-like symptoms of the patient may have resulted from this gene defect. In conclusion, we identified an entire *SERPINC1* deletion together with a large deletion of *RC3H1* in an AT-deficient patient with autoimmune disease-like symptoms.

Keywords Genome rearrangement · Antithrombin deficiency · *SERPINC1* · *RC3H1*

Introduction

Antithrombin (AT), a member of the serine protease inhibitor superfamily, functions as a major physiological anticoagulant molecule [1, 2]. AT forms a complex with serine protease type coagulation factors such as thrombin and factor Xa and, inactivates them. When heparin binds to AT, AT undergoes conformational changes and accelerates the anticoagulant efficacy by more than a 1000-fold.

Congenital AT deficiency caused by abnormality in the AT gene (*SERPINC1*) is inherited as an autosomal dominant disorder associated with predisposition to recurrent venous thromboembolism. In 1965, Egeberg described the first case of inherited AT deficiency, the incidence of which is estimated to be 1 in 500 to 1 in 5000 with no racial or sexual differences worldwide [3, 4]. It has been reported that homozygous AT-null mice result in embryonic lethality [5] and assumed that complete AT deficiency in humans could be fatal. Indeed, causative mutations in inherited AT deficiencies have usually been determined to be heterozygous [6]. Till date, extensive gene analyses in patients with AT deficiency have revealed many distinct *SERPINC1* defects such as missense, nonsense, deletion and insertion mutations. It is rare to find a large deletion

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12185-014-1596-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Kato · Y. Takagi · Y. Ando · Y. Nakamura · M. Murata ·
A. Takagi · T. Murate · T. Kojima (✉)
Department of Pathophysiological Laboratory Sciences, Nagoya
University Graduate School of Medicine, 1-1-20 Daiko-Minami,
Higashi-ku, Nagoya 461-8673, Japan
e-mail: kojima@met.nagoya-u.ac.jp

T. Matsushita
Department of Transfusion Medicine, Nagoya University
Hospital, Nagoya, Japan

T. Nakashima
Department of Cardiology, Tokuyama Central Hospital, Shunan,
Japan

(>20 bp) in *SERPINC1*, and very few cases have been analyzed with regard to the deletion region in detail [7–10]. One of the reasons is that a large heterozygous gene deletion on an autosomal chromosome may result in normal findings by polymerase chain reaction (PCR)-mediated direct sequencing analysis.

Here, we report a large deletion of more than 100 kb in chromosome 1 involving *SERPINC1* in a Japanese patient who suffered from autoimmune disease-like symptoms associated with venous thromboembolism and was diagnosed with AT deficiency.

Materials and methods

Patient and DNA sample

The patient was a Japanese female who had a first episode of deep vein thrombosis (DVT) with pulmonary embolism (PE) at the age of 41 years. Since then, she had been treated with warfarin in another hospital. One year later, she was admitted to Yamaguchi University Hospital to be surveyed for autoimmune disease because she had autoimmune-like symptoms such as joint pain and mild fever with a positive rheumatoid arthritis (RA) test. However, she was not diagnosed with a definitive autoimmune disease. Two years later, she was readmitted to Yamaguchi University Hospital for further examination because of recurrent DVT despite warfarin treatment. Finally, she was diagnosed with AT deficiency and treated with plasma-derived AT concentrate. She was also referred to Nagoya University for examination of DNA abnormalities. She had no family history of thrombosis at that time. The study was approved by the ethics committee of each university. A genomic DNA sample was isolated from peripheral blood leukocytes of the patient after a written informed consent was obtained.

Direct sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis of *SERPINC1*

All exons and intron–exon junctions were amplified by PCR and sequenced as described previously [11]. MLPA analysis of *SERPINC1* was performed using the SALSA MLPA P227 SerpinC1 kit (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions to search for intragenic deletions or duplications [12].

Identification of deletion region and breakpoint

To assess the extent of the deletion, PCR-mediated single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping, real-time PCR, and long-range PCR were performed with primer pairs

designed on the basis of the NCBI Reference Sequence (NT_004487.19) containing *SERPINC1* at chromosome 1 (Supplemental Table 1). PCRs for SNP genotyping were performed under the same conditions as *SERPINC1* sequencing, except for the annealing temperature of 55 to 68 °C. In a range covering 21–27.7 Mb of NT_004487.19, SNP genotyping and real-time PCR were performed to assess the ploidy in a certain part of the genome.

Real-time PCR was performed using SYBR Premix Ex Taq and the Thermal Cycler Dice Real Time System II (Takara Bio Inc., Otsu, Japan). Relative values of the interested gene dosages were calculated using the delta–delta C_t method, in which the C_t was defined by each second derivative maximum (SDM) point of the amplification curves. All relative gene dosages were revised using that of *F11* exon 15 as a reference.

Long-range PCR was performed with KOD FX Neo DNA polymerase (Toyobo Co. Ltd.) in a touch-down PCR, which involved 25 cycles of a temperature profile similar to that of *SERPINC1* sequencing, with the exception that the annealing temperature was 74 °C in the first cycle and decreased by 2 °C every 5 cycles to reach 68 °C and that the extension time was 10 min. Nested PCR following long-range PCR was performed for 25 cycles with KOD FX Neo DNA polymerase. The products were analyzed by mapping PCR and by digested patterns with some restriction enzymes, such as *Sma*I, *Eco*RI, *Sca*I, and *Sac*I (New England Biolab Japan).

Results

PCR-mediated sequencing revealed no causative mutation in *SERPINC1* in the patient (data not shown). However, MLPA analysis for *SERPINC1* revealed that the relative gene dosage values in all exons were ~50 % of normal values, suggesting that the patient had a complete *SERPINC1* deletion (Fig. 1).

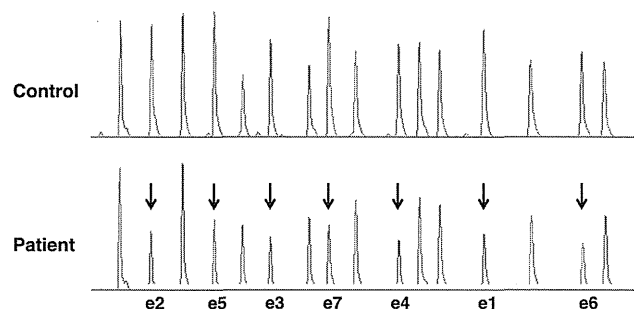


Fig. 1 Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis for *SERPINC1*. MLPA analysis revealed that the relative gene dosage values in all *SERPINC1* exons of the patient were ~50 % of normal values, suggesting a complete *SERPINC1* deletion

Table 1 Locations and results of SNP genotyping and real-time PCR

Gene	Reference SNP, real-time PCR	Genotype of patient	Location (bp) (NT_004487.19)	Distance from <i>SERPINC1</i> (kb)
<i>F5</i>	rs6022	T/G	21,018,468	-4,357
<i>F5</i>	rs6029	G/A	21,018,615	-4,356
<i>FASLG</i>	rs10458360	G/C	24,122,617	-1,252
<i>SLC9A11</i>	rs7516544	G/A	24,980,073	-395
<i>SLC9A11</i>	rs12565753	G/A	24,980,247	-395
<i>KLHL20</i>	rs2273366	A/G	25,213,584	-161
<i>DARS2</i>	rs2295366	T/G	25,314,334	-61
<i>DARS2</i>	Real-time PCR (A1)	2 n	25,315,440	-60
5'-breakpoint			25,326,758	-48
<i>ZBTB37</i>	rs1322774	C	25,327,882	-47
<i>ZBTB37</i>	rs9286895	A	25,331,109	-44
<i>ZBTB37</i>	Real-time PCR (A2)	1 n	25,344,011	-31
<i>SERPINC1</i>	Real-time PCR	1 n	25,367,296	-8
<i>SERPINC1</i> c.1			25,375,039	0
<i>RC3H1</i>	rs9425780	G	25,391,942	17
<i>RC3H1</i>	rs12566651	A	25,393,879	19
<i>RC3H1</i>	Real-time PCR (A3)	1 n	25,396,451	21
<i>RC3H1</i>	rs12066153	T	25,426,057	51
3'-breakpoint			25,437,835	63
<i>RC3H1</i>	rs1884994 (A4)	T/C	25,438,924	64
<i>RC3H1</i>	rs6686083	T/A	25,441,181	66
<i>RABGAP1L</i>	rs727279	G/A	25,953,806	579
<i>CACYBP</i>	rs1046439	T/C	26,457,913	1,083
<i>RFWD2</i>	rs10913112	G/A	27,402,470	2,027
<i>RFWD2</i>	rs670143	C/T	27,665,137	2,290

A1, A2, A3, and A4 are PCRs shown in Fig. 2A

We evaluated whether certain parts of the genome were lost on 1 allele by SNP genotyping or real-time PCR in 21–27.7 Mb of NT_004487.19. Locations and results of SNP genotyping and real-time PCR are shown in Tables 1, 2. In Fig. 2A, *DARS2* (A1) was diploid and *ZBTB37* (A2) was monoploid, suggesting that the breakpoint might locate between them on the centromere side. On the telomere side, the breakpoint may be located on *RC3H1* (A3–A4), next to *SERPINC1*.

We then performed nested PCR for long-range amplification over the deleted portion (Fig. 2B). We obtained an approximately 13-kb PCR product from the patient's genome; however, we did not obtain any product from the normal control (B-1). The 13-kb amplicons were purified and used as templates for mapping PCRs targeting parts of uncertain deletion regions (B-2). On the centromere side of the 13-kb mutant PCR product, mapping PCR at B1 revealed a positive signal; however, a positive signal was not revealed at B2 located on *ZBTB37* intron 3. On the telomere side, mapping PCR at A4 located on intron 4 of *RC3H1* revealed a positive signal; however, a positive signal was not revealed at B3 on intron 5.

We performed another PCR targeted from F3 to R3 (115 kb in size from the normal control), and obtained an aberrant 4-kb product from the patient; however, no product was obtained from the normal control (Fig. 2C). To assess an unknown region of the deletion, PCR products from the patient were digested with several restriction enzymes that recognize a single site in the PCR product from the normal control (C-1). The PCR products digested with either *SmaI* or *EcoRI* changed to the expected sizes, indicating that these positions were not deleted. On the other hand, those digested with either *ScaI* or *SacI* did not change, thereby indicating that these positions were deleted (C-2).

Finally, we performed gene walking analysis for amplicons from mutant allele and found a breakpoint at both sides of the deletion (Fig. 3). The mutant allele of the patient lost an 111-kb region from *ZBTB37* exon 2 to *RC3H1* intron 5, and had a small inserted sequence of 7 bp inside the breakpoint. We searched for the origin of the 7-bp insertion on the GenBank database and found that the same sequence existed in more than 900 positions on chromosome 1. However, the same alignment as a 15-bp

Table 2 Location and name of primers in Fig. 2

Gene	Name of primer (set)	Location (bp) ^a (NT_004487.19)	Distance from <i>SERPINC1</i> (kb)	cf.	Short PCR result
<i>DARS2</i> int 16	F1	25,314,224	-60.8	Fig. 2B	
<i>DARS2</i> ex 18	F2	25,315,428	-59.6	Fig. 2B	
<i>DARS2</i> ex 18	A1	25,315,440	-59.6	Fig. 2A	
<i>GAS5</i> int 5	F3	25,323,895	-51.1	Fig. 2C	
<i>GAS5</i> int 1	B1	25,324,990	-50.0	Fig. 2B	+
<i>ZBTB37</i> int 1	seq	25,326,325	-48.7	Fig. 2C	
<i>ZBTB37</i> ex 4	B2	25,327,667	-47.4	Fig. 2B	-
<i>ZBTB37</i> ex 6	A2	25,344,011	-31.0	Fig. 2A	
<i>SERPINC1</i> c.1		25,375,039	0.0		
<i>RC3H1</i> ex 19	A3	25,396,451	21.4	Fig. 2A	
<i>RC3H1</i> int 5	B3	25,437,502	62.5	Fig. 2B	-
<i>RC3H1</i> int 4	A4	25,438,717	63.7	Fig. 2A, B	+
<i>RC3H1</i> int 4	R3	25,439,134	64.1	Fig. 2C	
<i>RC3H1</i> int 4	R2	25,439,413	64.4	Fig. 2B	
<i>RC3H1</i> int 4	R1	25,439,479	64.4	Fig. 2B	

A1–A4 and B1–B3 are PCR primer sets

^a Position of the centromere side

sequence, corresponding to the breakpoint and including a 7-bp insertion, was only found 1.2-kb downstream of the breakpoint on the centromere side in the reverse direction.

Discussion

Here, we reported a case with a large deletion of more than 100 kb on chromosome 1 involving the entire *SERPINC1* and most part of *RC3H1* in a Japanese patient with AT deficiency who also suffered from autoimmune disease-like symptoms. The breakpoint of the deletion would be caused by a complicated rearrangement with a 7-bp insertion, which could be explained by the Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) model [13, 14]. Lee et al. [15] proposed a model based on a DNA replication stage to explain the microhomology of the junctions, the putative mechanism of which is the switching of a nascent strand during DNA replication. According to this model, during DNA replication, the replication fork stalls at one position, following which the nascent lagging strand disengages from the original template, transfers, and anneals to another replication fork in physical proximity. It then “primes” and restarts the DNA synthesis. These steps could occur multiple times in series; therefore, the eventual replicated DNA sequence results in the complicated alignment. The generated alignments are characterized by the sequences at the junction juxtaposed to some sequences derived from different origins with microhomologies. These features could account for the complicated gene rearrangement that was simply and successfully determined in this case.

The observed gene rearrangement also resulted in losses of the entire coding sequence of *ZBTB37* and two-thirds

sequence of *RC3H1*. *ZBTB37* encodes a protein known as “Zinc finger and BTB domain-containing protein 37”, but its function remains unknown. Meanwhile, *RC3H1* encodes a protein termed “RING finger and CCCH-type zinc finger domain-containing protein 1 (Roquin-1)”. Roquin-1 is an intracellular protein that is highly conserved across its full length from mammals to invertebrates, and it limits inducible T cell co-stimulator (ICOS) expression by promoting the degradation of ICOS mRNA.

Vinuesa et al. [16] identified that a methionine residue at position 199 is substituted by arginine (M199R) in Roquin-1 of mice, termed “the *sanroque* strain”. In *sanroque*-female mice, homozygous M199R mutation of Roquin-1 increased ICOS expression on T cells, causing the accumulation of lymphocytes typically associated with lupus-like autoimmune symptoms [17]. On the other hand, a recent study reported that tissue-specific knockout of Roquin-1 in the hematopoietic system did not cause autoimmunity but caused defined changes in immune homeostasis, dominated by the expansion of eosinophilic granulocytes, macrophages, and CD8 effector-like T cells [18]. Leppek et al. [19] demonstrated that Roquin-1 recognizes the constitutive decay elements (CDEs) folded into an RNA stem-loop motif and that Roquin-1 proteins promote mRNA degradation. Through genome-wide investigation, it was revealed that Roquin-1 targets several immunity- and inflammation-related mRNAs. These data suggest that Roquin-1 plays an important role in the immune system.

Meanwhile, no human *RC3H1* mutation has been reported till date, and the influence of *RC3H1* mutation in humans is not clear. We do not have any evidence to explain autoimmune disease-like symptoms of this patient

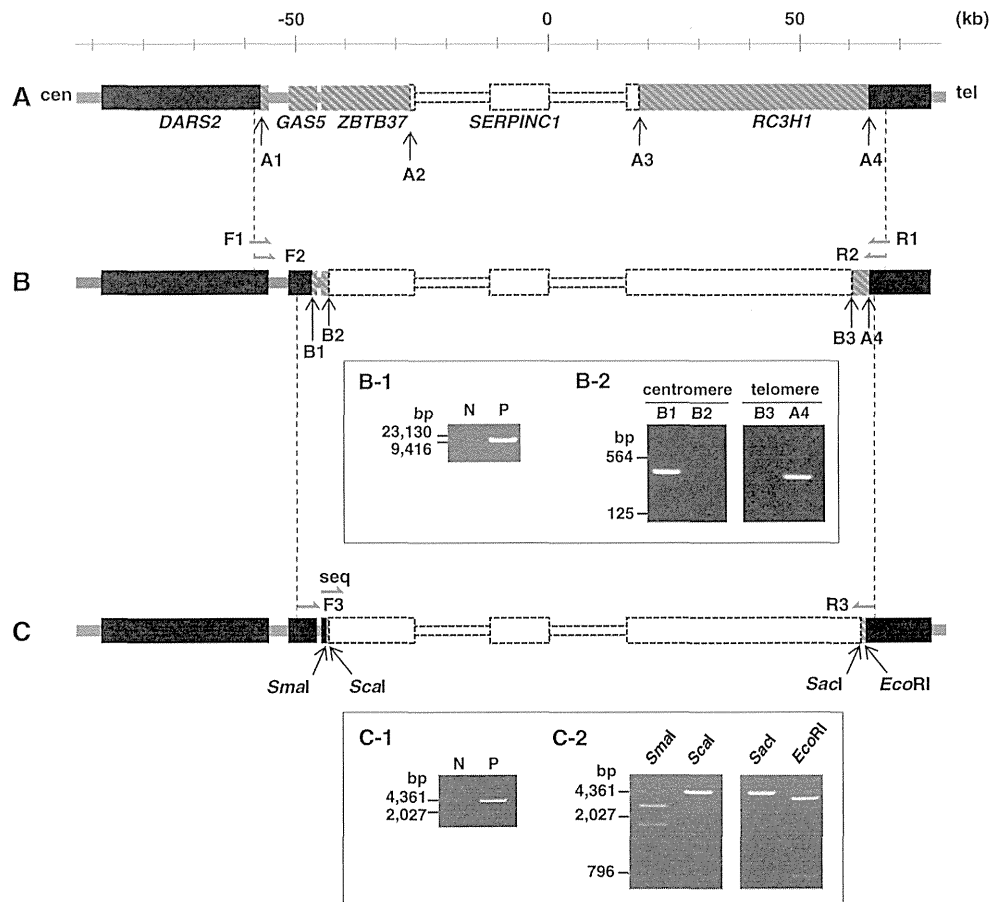
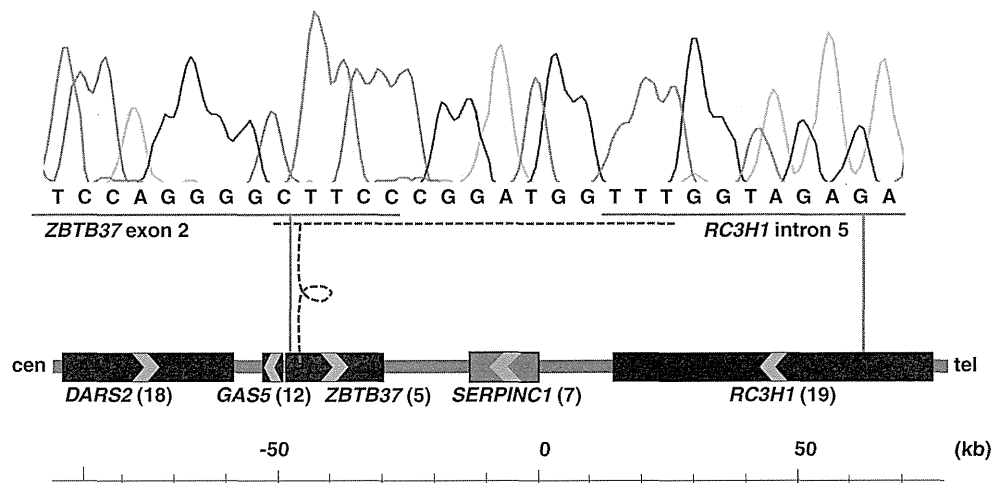


Fig. 2 Strategy to assess deletion region. Strategy schemes to assess the extent of deletion region are shown. *Closed bars* indicate no deletion regions, whereas *dashed white bars* indicate obvious 1-allele deleted regions. *Striped bars* indicate uncertain regions. *Up-pointing arrows* indicate tested regions of deletion assessment. *Horizontal arrows* (F1-3, R1-3) indicate primer sites for respective polymerase chain reactions (PCRs) and sequencing (cf. Table 2). **A** Summarized results of single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping and real-

time PCR. **B** Ranges of nested long-range PCR from *DARS2* to *RC3H1* (F1-R1 and F2-R2). Inserted B-1 and B-2 are results of nested long-range PCR (N, normal; P, patient) and mapping PCR (B1, B2, B3, and A4) for nested PCR products, respectively. **C** Another long-range PCR targeting *GAS5* to *RC3H1* (F3-R3). Inserted C-1 and C-2 are results of second long-range PCR (N, normal; P, patient) and digestion patterns by restriction enzymes, respectively

Fig. 3 DNA sequence of breakpoint junction. The sequence was connected *ZBTB37* exon 2 to *RC3H1* intron 5 with an insert of 7 bp. The *bottom column* indicates a schema of genome around *SERPINC1*. The numbers in *parentheses* indicate total exon numbers of each gene



with AT deficiency; however, we identified a large deletion including the entire *SERPINC1* together with most part of *RC3H1*. These data suggest that the *RC3H1* defect may have some effect on the immune responses of the patient.

In summary, we identified a complex genome rearrangement on chromosome 1 involving deletion of the entire *SERPINC1* and most part of *RC3H1*, which may be associated with the autoimmune disease-like symptoms together with AT deficiency in this patient.

Acknowledgments We would like to thank C. Wakamatsu for her expert technical assistance. This study was supported in part by grants-in-aid from the Baxter Coagulation Research Foundation (I.K.); the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (25293129: T.K. and 25460683: A.T.); and the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (Research on Measures for Intractable Diseases: TK). The authors would like to thank Enago for the English language review.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Rosenberg RD. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. *Am J Med.* 1989;87:2S–9S.
- Cooper PC, Coath F, Daly ME, Makris M. The phenotypic and genetic assessment of antithrombin deficiency. *Int J Lab Hematol.* 2011;33:227–37.
- Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:516–30.
- Patnaik MM, Moll S. Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia.* 2008;14:1229–39.
- Ishiguro K, Kojima T, Kadomatsu K, Nakayama Y, Takagi A, Suzuki M, et al. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. *J Clin Invest.* 2000;106:873–8.
- Caspers M, Pavlova A, Driesen J, Harbrecht U, Klamroth R, Kadar J, et al. Deficiencies of antithrombin, protein C and protein S—practical experience in genetic analysis of a large patient cohort. *Thromb Haemost.* 2012;108:247–57.
- Olds RJ, Lane DA, Chowdhury V, De Stefano V, Leone G, Thein SL. Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry.* 1993;32:4216–24.
- Fernandez-Rachubinski F, Rachubinski RA, Blajchman MA. Partial deletion of an antithrombin III allele in a kindred with a type I deficiency. *Blood.* 1992;80:1476–85.
- Picard V, Chen JM, Tardy B, Aillaud MF, Boiteux-Vergnes C, Dreyfus M, et al. Detection and characterisation of large *SERPINC1* deletions in type I inherited antithrombin deficiency. *Hum Genet.* 2010;127:45–53.
- Sekiya A, Morishita E, Karato M, Maruyama K, Shimogawara I, Omote M, et al. Two case reports of inherited antithrombin deficiency: a novel frameshift mutation and a large deletion including all seven exons detected using two methods. *Int J Hematol.* 2011;93:216–9.
- Kyotani M, Okumura K, Takagi A, Murate T, Yamamoto K, Matsushita T, et al. Molecular basis of antithrombin deficiency in four Japanese patients with antithrombin gene abnormalities including two novel mutations. *Am J Hematol.* 2007;82:702–5.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e57.
- Zhang F, Khajavi M, Connolly AM, Towne CF, Batish SD, Lupski JR. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat Genet.* 2009;41:849–53.
- Gu W, Zhang F, Lupski JR. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics.* 2008;1:4.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell.* 2007;131:1235–47.
- Vinuesa CG, Cook MC, Angelucci C, Athanasopoulos V, Rui L, Hill KM, et al. A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature.* 2005;435:452–8.
- Yu D, Tan AH, Hu X, Athanasopoulos V, Simpson N, Silva DG, et al. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature.* 2007;450:299–303.
- Bertossi A, Aichinger M, Sansonetti P, Lech M, Neff F, Pal M, et al. Loss of Roquin induces early death and immune deregulation but not autoimmunity. *J Exp Med.* 2011;208:1749–56.
- Leppek K, Schott J, Reitter S, Poetz F, Hammond MC, Stoecklin G. Roquin promotes constitutive mRNA decay via a conserved class of stem-loop recognition motifs. *Cell.* 2013;153:869–81.

VI. 特 論

新規血栓性素因アンチトロンビン抵抗性の
発見と今後の展望

高木 夕希 小嶋 哲人

Discovery and prospects of a novel thrombophilia: antithrombin resistance

Yuki Takagi, Tetsuhito Kojima

Department of Pathophysiological Laboratory Sciences,

Nagoya University Graduate School of Medicine

Abstract

Pathogenesis of venous thromboembolism (VTE) known to be complex and multifactorial process involves the interaction of acquired factors and genetic predisposing conditions. Deficiency of natural anticoagulant factors such as antithrombin (AT), protein C and protein S increases the risk of a VTE. Recently, we have reported novel mechanism of hereditary thrombosis in a Japanese family, in which AT resistance was associated with a missense mutation (p.Arg596Leu) in the prothrombin gene named prothrombin Yukuhashi. The mutant thrombin showed a low clotting activity, but a severely impaired inactivation by AT, resulting in a susceptibility to thrombosis. We have developed a new laboratory test to evaluate AT resistance in plasma. Prothrombin mutation causing AT resistance has found in Caucasian, not only in Japanese.

Key words: VTE, DVT, PE, AT resistance, thrombophilia

はじめに

静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism: VTE) は、遺伝的リスクと環境的リスクが重なることによって発症する多因子疾患である。静脈血栓症は、欧米人に多くみられ、日本人には少ないとされてきたが、食生活の欧米化や診断技術の向上により、日本人における患者数も少なくなることが明らかになってきた。静脈血栓症を招く原因となる環境的リスクとしては、加齢、妊娠、長期臥床、ロングフライト (エコノミークラス症候群) などが挙げられる。遺伝的リスクとしては、生理的血液凝固阻止因子であるアン

チトロンビン (antithrombin: AT)、プロテイン C (protein C: PC)、プロテイン S (protein S: PS) 欠損症/異常症が広く知られている。

本稿では、新たな先天性血栓性素因として報告されたアンチトロンビン抵抗性とそのスクリーニング検査法について概説する。

1. 先天性血栓性素因

遺伝的リスクである先天性血栓性素因をもつ患者は、50歳以下の比較的若年で深部静脈血栓症 (deep venous thrombosis: DVT) や肺塞栓症 (pulmonary embolism: PE) などを発症し、繰り返すことも多い。血栓発生部位に関しても腸

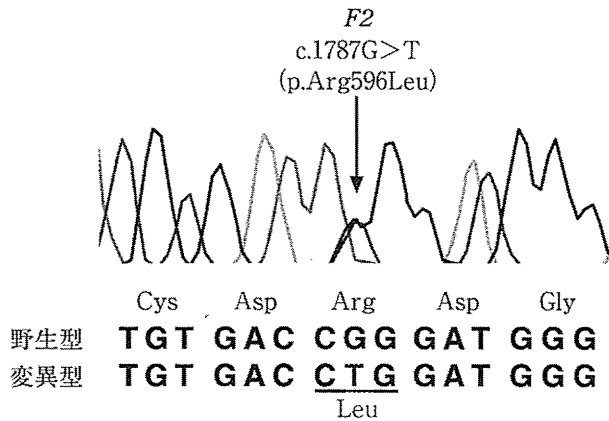


図1 AT抵抗性を呈するプロトロンビン遺伝子変異

発端者のプロトロンビン遺伝子(F2)において一塩基置換が同定された。アンチトロンビンとの結合部に位置するアルギニンがロイシンに置換するミスセンス変異(c.1787G>A, p.Arg596Leu: Prothrombin Yukuhashi). (文献¹⁾より改変)

間膜静脈や上矢状静脈などの非定型部位での発症が多いことも特徴である。また、家族歴がみられることが多く、その原因として先に挙げた生理的血液凝固阻止因子の遺伝子異常が同定されている。しかし、いまだ原因不明な遺伝性血栓症も数多く、発症要因が不明な血栓症は特発性血栓症として難病疾患の一つに指定されている。こうしたなか、著者らのグループは長らく原因不明であった静脈血栓症家系において血栓症発症原因となる遺伝子変異を凝固因子であるプロトロンビン遺伝子に同定し、新たな血栓性素因として報告した^{1,2)}。

2. アンチトロンビン抵抗性(antithrombin resistance: ATR)

1) プロトロンビン遺伝子変異

発端者は日本人女性であり、11歳のときにDVTを発症した。女性の家系では3世代にわたって8人の静脈血栓症患者がおり、うち3人は既に亡くなっていた。本家系においては、若年性の静脈血栓症がみられ、特に代を経るにつれてその発症率が高くなる傾向があった。以上から遺伝性血栓症が強く疑われたため、2001年当時、本家系での既知の先天性血栓性素因について検査がされたが、すべてが否定された³⁾。こ

うしたなか、2009年ISTH Bostonにおいて、ある遺伝性血栓症家系のゲノムワイド連鎖解析からプロトロンビン遺伝子異常の存在が報告された⁴⁾。それを受け発端者のプロトロンビン遺伝子を解析したところ、プロトロンビンの活性体トロンビンに対する生理的凝固阻止因子ATとの結合部に位置する596番アルギニンがロイシンに置換するミスセンス変異(c.1787G>A, p.Arg596Leu)が⁵⁾、ヘテロ接合体で同定された(図1)。また、このミスセンス変異は本家系内の他の血栓症患者でも検出されたことから、遺伝性血栓症の原因であることが強く疑われた。

2) 血栓症発症機序

2009年ISTH Bostonではプロトロンビン遺伝子異常の存在が報告されたが血栓症に至る機序は解析されておらず、著者らのグループは日本人患者での血栓症発症機序について詳細に解析した。

異常プロトロンビンで変異がみられたアルギニン(Arg596)はトロンビンへの活性化後に、AT分子のアスパラギン(Asn265)との結合に重要な水素結合を形成していることから⁶⁾、Arg596Leu置換はATによるトロンビン不活化不全を起こす可能性が示唆された。しかし、血栓症患者は治療のためにワルファリンを服用しており患者血漿検体でのプロトロンビン機能解析は困難であったため、遺伝子工学技法を用いてリコンビナント野生型/変異型プロトロンビンを作製してトロンビンへの活性化動態、活性化後の不活化動態を比較検討した。

a. 変異型プロトロンビンの活性化動態

プロトロンビン欠乏血漿にリコンビナントプロトロンビンを添加して疑似血漿とし、プロトロンビンからトロンビンへの活性化とフィブリノゲン凝固活性を反映する凝固一段法、十分に活性化したトロンビンのフィブリノゲンに対する凝固活性のみを反映する凝固二段法、トロンビンに特異的な発色性合成基質S-2238に対する活性を反映する合成基質法の3種を用いて野生型/変異型プロトロンビンの活性化動態を測定した。その結果、野生型疑似血漿はいずれの測定でも正常血漿と同様な活性を示したが、変

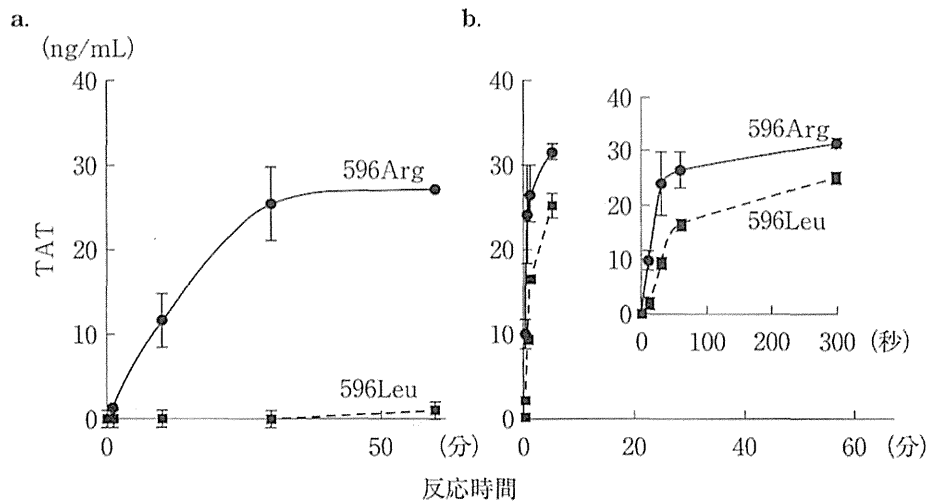


図2 変異型トロンビンのTAT複合体形成能

リコンビナントプロトロンビン由来トロンビンとATとの結合能(TAT複合体形成能)をELISA法にて測定した結果, (a)ヘパリン非存在下で, 変異型(596Leu)は野生型(596Arg)に対してTAT複合体形成がほとんどみられず, (b)ヘパリン存在下でも低値を示した。

(文献¹⁾より改変)

異型では3つのすべての測定法で野生型を下回り, 凝固一段法で最も低く(野生型の15%), ついで凝固二段法(同32%), 合成基質法(同66%)の順で活性が大きくなった。これらの結果より, 変異型プロトロンビンはトロンビンへの転換が遅延し, フィブリノゲンを基質とした凝固活性も低下することが示唆された。また, S-2238はフィブリノゲンと比較して分子量が小さいために合成基質法では変異型トロンビンの活性があまり低下しないと推察された。

一方, ウシ由来のFXa・FVaとリン脂質, カルシウムイオンからなるプロトロンビナーゼを用い, プロトロンビンからトロンビンへの活性化の様子を経時的にウェスタンブロット解析したところ, 野生型と変異型でほとんど差がみられなかった。ウェスタンブロット解析で, トロンビンへの転換に要した最短時間は20秒と長く数秒単位の差を反映する凝固法による検出限界には及ばなかったことが, 先述した凝固一段法, 二段法での比較と一見矛盾するようにみえる要因と考えられた。

b. 変異型トロンビンの不活化動態

プロトロンビンを十分に活性化した後に生理的阻止因子ATと反応させ, TAT複合体形成能

(トロンビンとATとの結合能)を比較したところ, ヘパリン非存在下で, 野生型では経時的にTAT複合体の増加がみられたが, 変異型では形成時間30分まで検出感度未満であり, 60分後にわずかに検出されただけであった(図2-a)。ヘパリン存在下では変異型でも野生型に似た経時的なTAT複合体上昇を示したが, 1分以内に形成されたTAT複合体は野生型の約半分程度にとどまった(図2-b)。これらの結果から, 変異型トロンビンではATによるトロンビン不活化反応が強く障害されていることが予想された。

更に, プロトロンビン欠乏血漿にリコンビナント変異型プロトロンビンを添加した疑似患者血漿におけるトロンビン生成試験(thrombin generation assay: TGA)では, 野生型プロトロンビンを加えた疑似正常血漿や正常プール血漿と比較して最高トロンビン活性がやや低いものの, 不活化の著しい遅延がみられ, 結果的に測定時間内での総トロンビン活性量(活性値の持続時間の積分値)が著しく増大していた(図3)。すなわち, 患者血漿中の変異型プロトロンビンは, 凝固活性は低いものの, いったん活性化されるとATによる不活化をほとんど受けず(AT

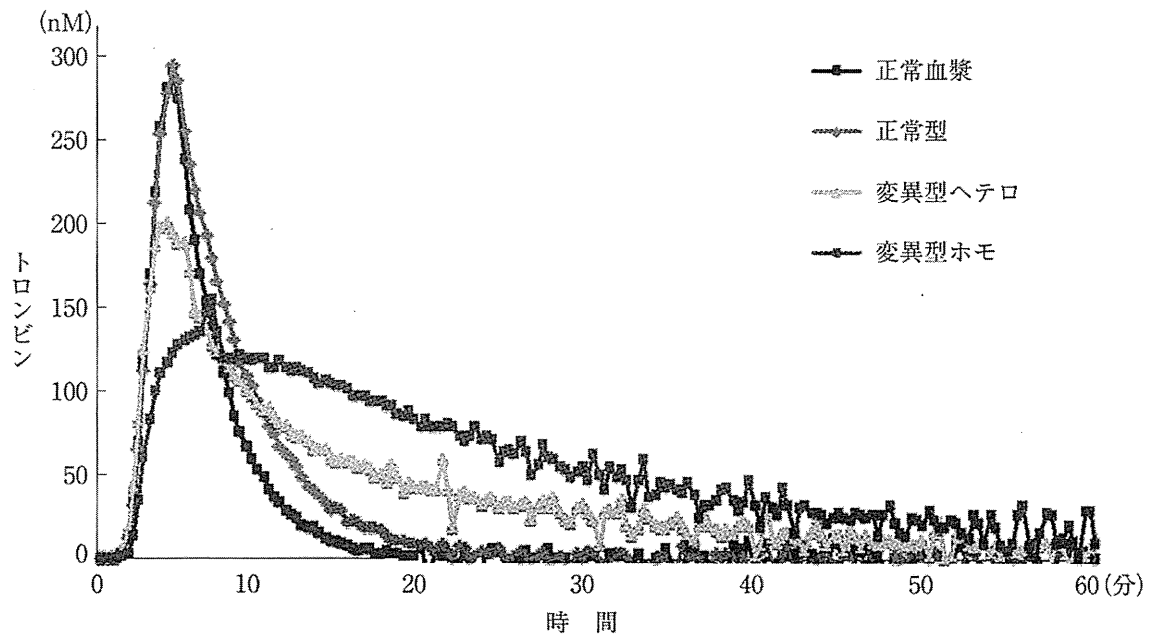


図3 プロトロンビン異常疑似血漿でのトロンビン生成試験(TGA)

プロトロンビン欠乏血漿にリコンビナントプロトロンビンを加えた疑似患者血漿(変異型ヘテロ)では、疑似正常血漿(正常型)に比べ最高トロンビン活性がやや低いものの不活化が著しく遅く、結果として総トロンビン活性量(活性値と持続時間の積分値)の著しい増大を認めた。(文献⁷⁾より改変)

抵抗性)、凝固活性を保ち続けることが示唆され、これが遺伝性血栓症の原因であると判明した。

3) スクリーニング検査法の開発

著者らは、ヘパリン存在下・非存在下でのATによるトロンビンの不活化動態を観察することでAT抵抗性を検出する臨床検査法を考案し、報告した⁶⁾。この臨床検査法はプロトロンビン活性化相、トロンビン不活化相、残存トロンビン活性測定相からなる。本検査法において、正常検体ではヘパリン非存在下で血中濃度5倍量のAT添加から30分で、トロンビン活性が約10%にまで阻害されるのに対し、変異型トロンビンでは30分後に90%以上残存していた(図4-a)。ヘパリン存在下でも正常検体は30秒程度で10%以下まで阻害されるのに対し、変異型は30秒後に約50%のトロンビン活性が残存していることから、AT抵抗性を判別できる。また、臨床検体解析を想定し、ワルファリンが本検査法に及ぼす影響を評価した結果、考案した検査法はワルファリン服用中の静脈血栓症患者の検体でもAT抵抗性が検出可能であった

(図4-b)。本検査法を用いて、原因不明であった静脈血栓塞栓症症例を解析することにより、静脈血栓塞栓症における新規血栓性素因としてのAT抵抗性の関与の実態が明らかとなることが期待される。

4) AT抵抗性 報告例

現在、日本国内においては上述家系以外の報告はないが、2013年に遺伝性血栓症をもつセルビア人2家系でAT抵抗性を示すプロトロンビン遺伝子変異(c.1787G>A, p.Arg596Gln)が報告された⁷⁾。また、この変異は同年にインド人患者で同定され報告されたものと同じ変異と思われる⁸⁾。これらの報告から、この新規血栓性素因の発見は、日本人だけでなく欧米人をはじめ、他の人種での遺伝性血栓症においても新たな病態解明につながる事が予想される。

おわりに

遺伝性血栓症の原因として、現在までに様々な凝固阻止因子の遺伝子異常が同定されているが、いまだ原因不明な家族性血栓症も数多い。著者らは、通常多くの報告では出血傾向を示す

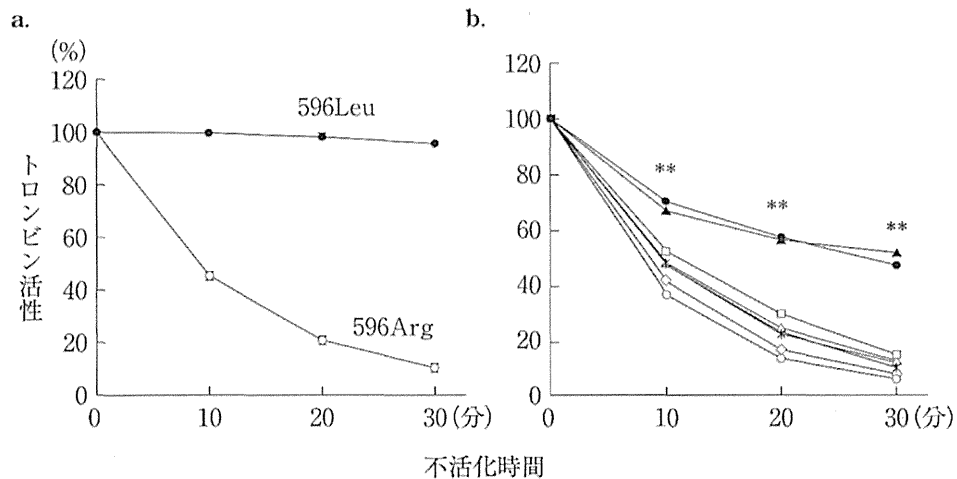


図4 スクリーニング検査法でのAT抵抗性評価

a. ヘパリン非存在下で、野生型(596Arg)は血中濃度5倍量ATとの混和30分でトロンビン活性が10%程度にまで阻害されるのに対して、変異型(596Leu)は90%以上残存がみられた。

b. ヘパリン非存在下で、プロトロンビンに異常のないワルファリン服用患者血漿(□, △, ◇, ※)は健常人血漿(○)と同様の不活化を示し、プロトロンビンYukuhashi患者のワルファリン服用時の血漿(●, ▲)ではATの阻害を受けにくい結果を示した(**p<0.001)。

(文献⁶⁾より改変)

凝固因子・プロトロンビンの遺伝子変異が、正反対の静脈血栓症の原因となる詳細な分子病態を解明し、新規血栓性素因AT抵抗性を世界で初めて報告した。この血栓性素因の発見は、日

本人のみでなく世界中での原因不明な家族性血栓症の発症要因の究明につながることも期待され、今後、AT抵抗性病態について更なる研究成果の蓄積が望まれる。

■ 文 献

- 1) Miyawaki Y, et al: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin resistance. *N Engl J Med* **366**: 2390-2396, 2012.
- 2) Matsushita T, et al: The authors reply. *N Engl J Med* **367**: 1069-1070, 2012.
- 3) 酒井道生ほか: 乳児発症例を含む血栓症多発の1家系. *産業医科大学雑誌* **23**: 297-305, 2001.
- 4) ten Kate M, et al: A genome wide linkage scan for thrombosis susceptibility genes identifies a novel prothrombin mutation. XXII Congress of ISTH, Boston, July 11-16, 2009(Abstract).
- 5) Li W, et al: Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 857-862, 2004.
- 6) Murata M, et al: Development of a new laboratory test to evaluate antithrombin resistance in plasma. *Thromb Res* **133**: 293-298, 2014.
- 7) Djordjevic V, et al: A novel prothrombin mutation in two families with prominent thrombophilia—the first cases of antithrombin resistance in a Caucasian population. *J Thromb Haemost* **11**: 1936-1939, 2013.
- 8) Sivasundar S, et al: Molecular defect of 'Prothrombin Amrita': substitution of arginine by glutamine (Arg553 to Gln) near the Na(+) binding loop of prothrombin. *Blood Cells Mol Dis* **50**: 182-183, 2013.

ヘパリン類似物質

名古屋大学大学院医学系研究科 病態解析学講座 小嶋哲人 こじまてつひと

point

- ◆ ヘパリン類似物質（ヘパリノイド）とは、ヘパリンと類似した糖鎖構造をもつが全く異なる分子のヘパラン硫酸のことである。
- ◆ ヘパリン類似物質（ヘパラン硫酸）を主成分とする抗凝固薬・ダナパロイドナトリウム（オルガラン[®]）が、日本ではDICを適応症に使用されている。
- ◆ ダナパロイドの抗Xa/抗トロンビン活性比は、未分画ヘパリンや低分子量ヘパリンに比べ大きく、出血性副作用の少ないことが期待されている。
- ◆ ダナパロイドは、日本では適応症となっていないが、II型HITでの抗凝固薬として8th ACCPガイドラインではGrade 1Bと推奨されている。
- ◆ やはり日本では適応症となっていないが、欧米ではHIT合併妊娠時での血栓症に対してもダナパロイドは有効な薬剤として評価されている。

Q ヘパリンとは、どう違うのですか？

ヘパリン類似物質（ヘパリノイド）とは、ヘパラン硫酸（heparan sulfate：HS）のことで、ヘパリンと同様に、種々の分子との相互作用を介して、細胞接着、細胞増殖、血液凝固などに関わる生物学的多機能分子です¹⁾。ヘパラン硫酸は、ヘパリンと類似した糖鎖構造をしていますが、ヘパリンとは生合成されるコア蛋白が異なる、全くの別分子です。ヘパラン硫酸は、ヘパリンと同様にウロン酸（グルクロン酸/イズロン酸）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ち、種々の程度にO-硫酸化、グルコサミンのN-硫酸化、あるいはアセチル化を受けますが（図1）²⁾、ヘパリンとは異なり、2糖体の繰り返し構造のうち、ウロン酸としてグルクロン酸を多く含み、O-硫酸化やグルコサミンのN-硫酸化頻度が低い特徴があります。

しかし、ヘパラン硫酸にもイズロン酸や硫酸基のクラスター（高硫酸化領域）がみられ、これらの部位はヘパリンに酷似した構造をもっています。このようなヘパラン硫酸の高硫酸化領域には、アンチトロンビン

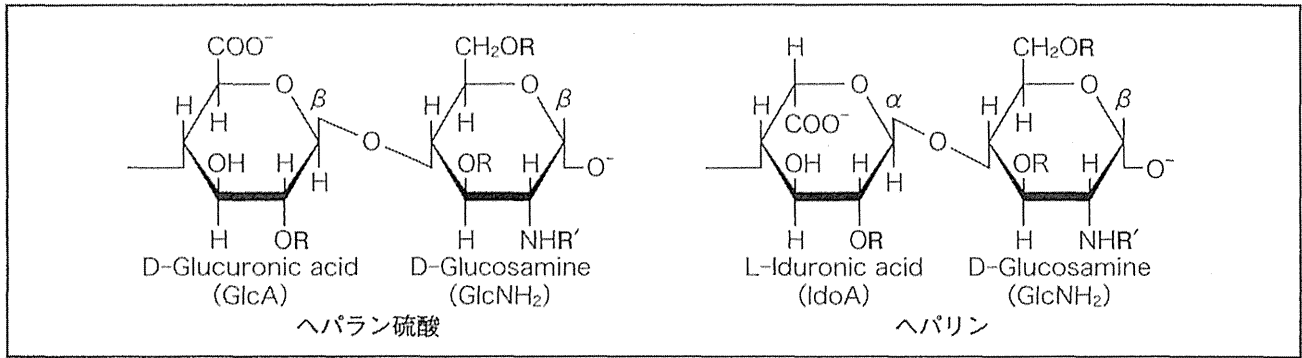


図1 ヘパラン硫酸、ヘパリンの繰り返し2糖単位

ウロン酸 (D-GlcA または L-IdoA) とアミノ糖 (D-GlcNH₂) からなる。
 R と R' の部分は、硫酸化されうる部位で、R は H または SO₃⁻、R' は H、COCH₃ または SO₃⁻。
 ヘパリン中にも GlcA がわずかに存在し、逆に、ヘパラン硫酸中にも IdoA が存在する。
 ヘパリンの硫酸化はヘパラン硫酸に比べ高頻度。

(文献2より引用)

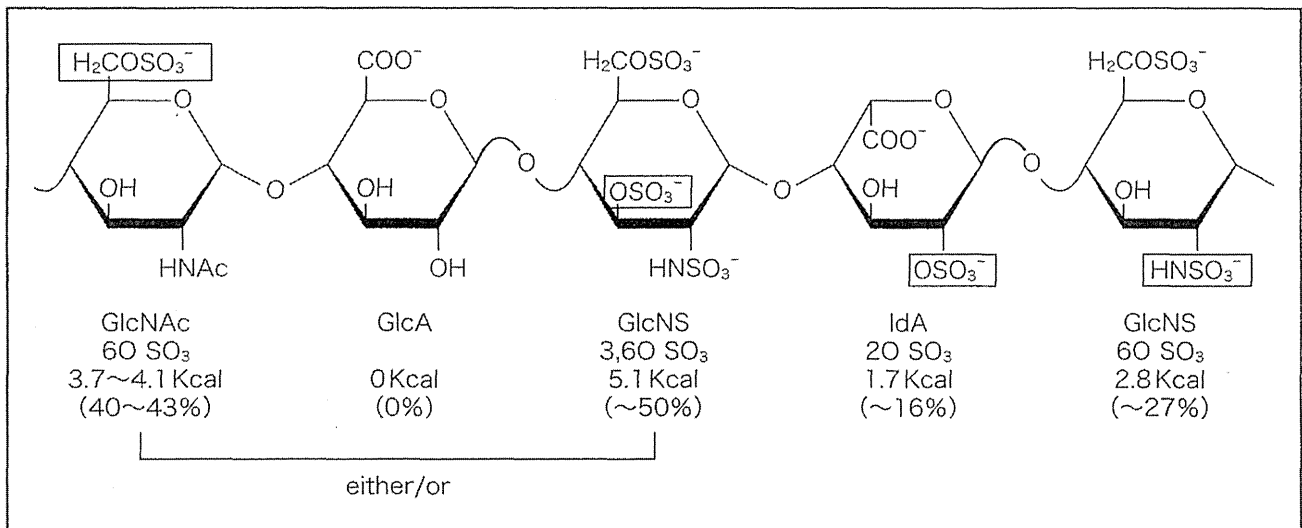


図2 ヘパリンのアンチトロンビン結合ドメイン構造

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。

(文献3を参照して作成)

(antithrombin : AT) と結合して AT の抗凝固活性を増強する、ヘパリンに特異な 5 糖 (pentasaccharide) 構造 (図2)³⁾ を含む、AT 結合ドメインを形成しています。

また、ヘパリンは通常血液中には存在しませんが、ヘパラン硫酸は生体内の血管内皮細胞でヘパラン硫酸プロテオグリカンとして産生され、血管内皮上での血液凝固反応制御、すなわち血液流動性維持に働いていると考えられています。

日本では、このヘパラン硫酸を主成分とするヘパリノイド製剤・ダナパロイドナトリウム (オルガン注®:ヘパラン硫酸 84%, デルマタン硫酸 12%, コンドロイチン硫酸 4%) が [disseminated intravascular coagu-

lation (DIC)：播種性血管内凝固症候群] の治療に用いられています。

一方、欧米ではこのダナパロイドが出血性副作用の少ない抗血栓症治療薬として「深部静脈血栓症の予防」あるいは「ヘパリン起因性血小板減少症 (heparin induced thrombocytopenia：HIT) での血栓症の予防・治療」に用いられています。



抗凝固作用のヘパリンとの違いは何ですか？



ヘパラン硫酸 (ヘパリノイド/ヘパリン類似物質) は、前に述べたように、アンチトロンビンを介して抗凝固活性を示す点ではヘパリンと同じですが、ヘパリンに比べて抗トロンビン活性に必要な高度硫酸化領域が少ないため、抗Xa/抗トロンビン活性比が大きいことが知られています。

ダナパロイドの抗Xa 活性と抗トロンビン活性の比は 22/1 以上で、未分画ヘパリンの 1/1、低分子量ヘパリンの 2~4/1 に比べ格段に高く、より選択的にXa 活性を抑制することが認められています(表 1)⁴⁾。したがって、理論的には、ダナパロイドでは未分画ヘパリンや低分子量ヘパリンより出血の副作用が少なくなることが期待できます。実際にラットの出血モデルにおいて、同程度の出血症状を示す投与量の抗Xa 活性値を比較すると、ダナパロイドは未分画ヘパリンの 5~10 倍ほど高く、すなわち、同じ抗Xa 活性用量では、ダナパロイドでの出血性副作用が格段に少ないことが確認されています。また、静注単回投与時での血中抗Xa 活性半減期は約 21 時間と、未分画ヘパリンの 0.7 時間や低分子量ヘパリンの 1.7 時間と比較して長く、連続投与においては投与 5 日目ではほぼ定常状態に達し、蓄積性も認められていません。

表 1 ヘパリン類製剤の比較の性質

ヘパリン類	未分画ヘパリン	低分子量ヘパリン	ヘパラン硫酸
成分	ヘパリン	ヘパリンを分解・精製	主にヘパラン硫酸
分子量	5,000~20,000	約 5,000	約 5,500
抗Xa/IIa 活性比	1	2~4	22
血中半減期	約 0.5~1 時間	約 2 時間	約 20 時間
血小板への影響	強い	弱い	極めて弱い
適応症	DIC 血液凝固の防止 血栓塞栓症の治療・予防 体外循環装置使用時の 血液凝固予防	DIC 体外循環装置使用時の 血液凝固予防	DIC
DIC 治療：用法・用量	5,000~10,000 単位/day	75 単位/kg/day	1,250 単位×2 回/day

(文献 4 を参照して作成)



HIT 抗体との交差反応性は？



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、深部静脈血栓症など）を伴う血小板減少（Ⅱ型 HIT）をきたすことがあります。

これはヘパリンの重篤な副作用として知られており、活性化血小板から放出される血小板第 4 因子（platelet factor 4 : PF4）と、ヘパリンとの複合体を抗原とした抗体（HIT 抗体）の出現による免疫学的病態です。HIT 抗体は、さらに血小板を活性化して、血小板凝集・血小板減少を起こし、加えて血管内皮上のヘパラン硫酸と PF4 との複合体にも反応して内皮細胞を傷害（組織因子発現）し、動静脈に血栓症を生ずる重篤な病態です。

ヘパリノイド製剤であるダナパロイドは、英国、ドイツ、フランスなどの欧州ではⅡ型 HIT や深部静脈血栓症（DVT）に対して適応が認められ、その有用性も高く評価（8th ACCP ガイドラインでは Grade 1B と推奨）⁵⁾されています。しかし、一部に、HIT 治療に用いられたダナパロイド療法においても血小板の増加がみられず、HIT 抗体がダナパロイドと交差反応を示したとの報告もあります⁶⁾。このため、日本においては、使用上の注意として「ヘパリン起因性血小板減少症の既往歴があり、ヘパリン抗体と本剤との交差反応性（HIT の既往歴があり、ヘパリン抗体と本剤との交差反応性）のある患者」では原則禁忌とされています。



モニタリングは？



ヘパリン類似物質・ヘパラン硫酸を主成分とする抗凝固薬・ダナパロイドの抗Xa/抗トロンビン活性比は、22/1 とヘパリンの 1/1 に比べ極めて大きく、低分子量ヘパリンと同様に、APTT の延長もほとんどみられないことより、通常、そのモニタリング検査は行われません。しかし、時に HIT の既往のある患者などでの血小板減少の恐れや、過量投与により出血症状が現れる恐れがあるので、血小板数、凝血学的検査（APTT を含む）、便中ヘモグロビンなどの定期的検査が推奨されています。



中和薬としてプロタミンは有効ですか？



ヘパリンには中和薬としてプロタミンがあり、出血性副作用への緊急時対応策としてプロタミン静脈内投与により、ヘパリンの作用を中和することができます。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（AT コファクター活性）を中和します。ダナパロイドもヘパリンと同じく、AT コファクター活性による抗凝固作用を示します。しかしプロタミンによる中和効果はヘパリンに比べて弱く、プロタミン 100mg 投与によるダナパロイド常用量の抗

Xa 活性は約 17%，抗トロンビン活性は約 60%阻害されたとのデータがありますが、通常量のプロタミンでは十分には中和できません。

Q 妊娠時の使用は？

□ ダナパロイドの妊娠時における使用は、日本においてはまだ適応となっておりません。しかし、ヨーロッパでは数多くの妊娠時使用経験が報告されており、オランダのグループから、HIT やヘパリンが無効な血栓症や流産経験 83 症例・91 妊娠での、ダナパロイドの使用経験が報告されています⁷⁾。

この報告によると、生存出産成功率は 90.4%と高率で、副作用も許容範囲であり、HIT や低分子量ヘパリンでも無効な妊娠症例での代替抗凝固薬に、ダナパロイドは有効で安全であると報告されています。この中でダナパロイドは抗Xa 活性として、1,000~7,500 U/day を皮下注、もしくは静脈内投与され、母体の血漿中抗Xa 活性は 0.1~1.2 U/mL、母乳にも 0~0.07 U/mL と検出されましたが、胎児・臍帯血には全く検出されていません。これは、動物実験のデータとも一致するもので、ダナパロイドの胎盤通過性は、非常に少ないものと考えられます。こうしたデータから、日本では使用上の注意として「授乳中の婦人への投与は、避けることが望ましいが、やむを得ず投与する場合には、授乳を避けさせること」と記載されています。

日本においても、臨床試験が行われたうえで、抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome : APS) 患者における習慣性流産やヘパリンが使用できない妊娠時血栓症に対しても、ダナパロイドが適応となることが望まれています。

Q 腎機能障害時の使用は？

□ ダナパロイドは、重篤な腎障害のある患者では慎重投与が必要で、血清クレアチニン値が 2 mg/dL 以上の場合には、投与量を減らすか投与間隔を延ばす、あるいは投与の中止を考慮することが推奨され、透析患者では原則禁忌となっています。

しかし、欧州などで、ダナパロイドがヘパリンの代わりに、HIT 患者の週 2~3 回の透析に使われ、長期の投与が安全に実施できることが多くの文献で示されており、透析患者への投与は 48 時間の投与間隔をあければ可能であると思われ⁸⁾。

また、ダナパロイドの血中濃度が上昇し、APTT が 50 秒以上に延長するときは、出血リスクが増大するので、ダナパロイドによる APTT の延長が疑われる場合には、投与を中止する必要があります。なお、ダナパロイドの血中濃度モニターについては、血中抗Xa 活性を測定する必要があります。