

Laboratory assays

The APTT was measured using Dade[®] Actin[®] Activated Cephaloplastin Reagent (Siemens, Bayern, German) using ellagic acid as a surface activator and rabbit brain cephalin as a phospholipid. To evaluate the sensitivity to UFH of different APTT reagents, we used additional three APTT reagents, Coagpia[™] APTT-N (Sekisui Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan), STA[®]-PTT Automate 5 (Stago, Asnières, France), and STA Cephascreen (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The surface activators and the phospholipids of these reagents are the followings; Coagpia APTT-N: ellagic acid and rabbit brain-derived phospholipids, STA-PTT Automate 5: Celite and cephalin, STA Cephascreen: polyphenol compounds and cephalin prepared from rabbit cerebral tissues. APTT ratios were calculated by dividing the clotting time obtained for each sample by the clotting time of the normal plasma pool, and the slope for each APTT reagent was calculated by dividing log APTT ratio by UFH concentration (U/mL). The clotting time was measured up to 240 s. The chromogenic anti-Xa activity was measured using the STA-Liquid Anti-Xa assay (Roche Diagnostics). All assays were performed five times with the fully automated coagulation analyzer STA-R Evo (Roche Diagnostics). The FVIII activity and the fibrinogen activity were measured by the clotting time method using the STA Factor VIII kit and the STA Fibrinogen kit (Roche Diagnostics), respectively. The concentration of the VWF antigen was measured by the Latex aggregation method using the STA Liatest VWF kit (Roche Diagnostics).

Statistical analysis

We analyzed the effects of the increasing concentrations of FVIII on the APTT and anti-Xa activity in the plasma samples with or without UFH using the Tukey–Kramer test. We analyzed the effects of fibrinogen, FVII and FIX using the *t* test. *P* values <0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using JMP (ver. 10.0.0, SAS Institute, Cary, NC).

Results

Effects of the fibrinogen concentration on the APTT and anti-Xa activity in the plasma containing UFH

To examine the effects of increased fibrinogen concentration on the APTT and anti-Xa activity, we prepared plasma samples with a twofold increase in fibrinogen concentration (500 mg/dL of fibrinogen) and measured the APTT and anti-Xa activity in the presence of 0.0, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 U UFH/mL.

In the plasma samples containing 0.0, 0.3, and 0.5 U/mL of UFH, the differences in the APTTs between the normal plasma and the plasma samples with the twofold increase in fibrinogen concentration were very slight (Fig. 1a). In the plasma samples containing 0.7 U UFH/mL, the APTTs were slightly shortened in the plasma sample with the twofold fibrinogen concentration (Fig. 1a). In the plasma samples containing 1.0 U UFH/mL, all plasma samples showed prolonged APTTs over the detection limit, 240 s. Thus, Fig. 1a shows that the twofold increase in fibrinogen shortened the APTT in the UFH-containing plasma sample by 0.7 U UFH/mL. In contrast, the anti-Xa levels were relatively constant in all plasma samples and were not significantly influenced by the fibrinogen concentration or UFH concentration (Fig. 1b).

Effects of the FVII concentration on the APTT and anti-Xa activity in the plasma containing UFH

We measured the APTT and anti-Xa activity in normal plasma (0.5 µg FVII/mL) and plasma samples with a twofold increase in FVII concentration (1 µg FVII/mL) under the therapeutic concentrations of UFH. The APTTs were slightly shortened in the plasma samples with the twofold increase in FVII concentration compared to the normal plasma samples at 0.0, 0.3, 0.5, and 0.7 U UFH/mL (Fig. 1c). Plasma samples with 1.0 U UFH/mL showed prolonged APTTs over the measurable range. The anti-Xa levels were relatively constant in all plasma samples and were not significantly influenced by the FVII concentration or UFH concentration (Fig. 1d).

Effects of the FVIII concentration on the APTT and anti-Xa activity in the plasma containing UFH

We prepared normal plasma and plasma samples with 2, 4, and 6 U FVIII/mL and measured the APTT and anti-Xa activity in the presence of 0.0, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 U UFH/mL. In the plasma samples without UFH, the APTTs were slightly and progressively shortened depending on the FVIII concentration, and the same trend was observed in the plasma samples containing 0.3 U/mL of UFH (Fig. 1e). In the plasma samples containing 0.5 U/mL of UFH, the dependency of the APTT shortening on the plasma FVIII concentration was prominent. The APTTs were shortened by approximately one-half in the plasma samples with 6 U FVIII/mL (shown in the black column in Fig. 1e) compared to the normal plasma samples (shown in open column); the APTTs were 106.3 ± 2.6 s in the normal plasma samples and 49.5 ± 1.0 s in the plasma samples with 6 U/mL of FVIII. In the plasma samples containing 0.7 U UFH/mL, the shortening of the APTTs was more prominent, to approximately one-third (229.8 ± 4.1 s in the

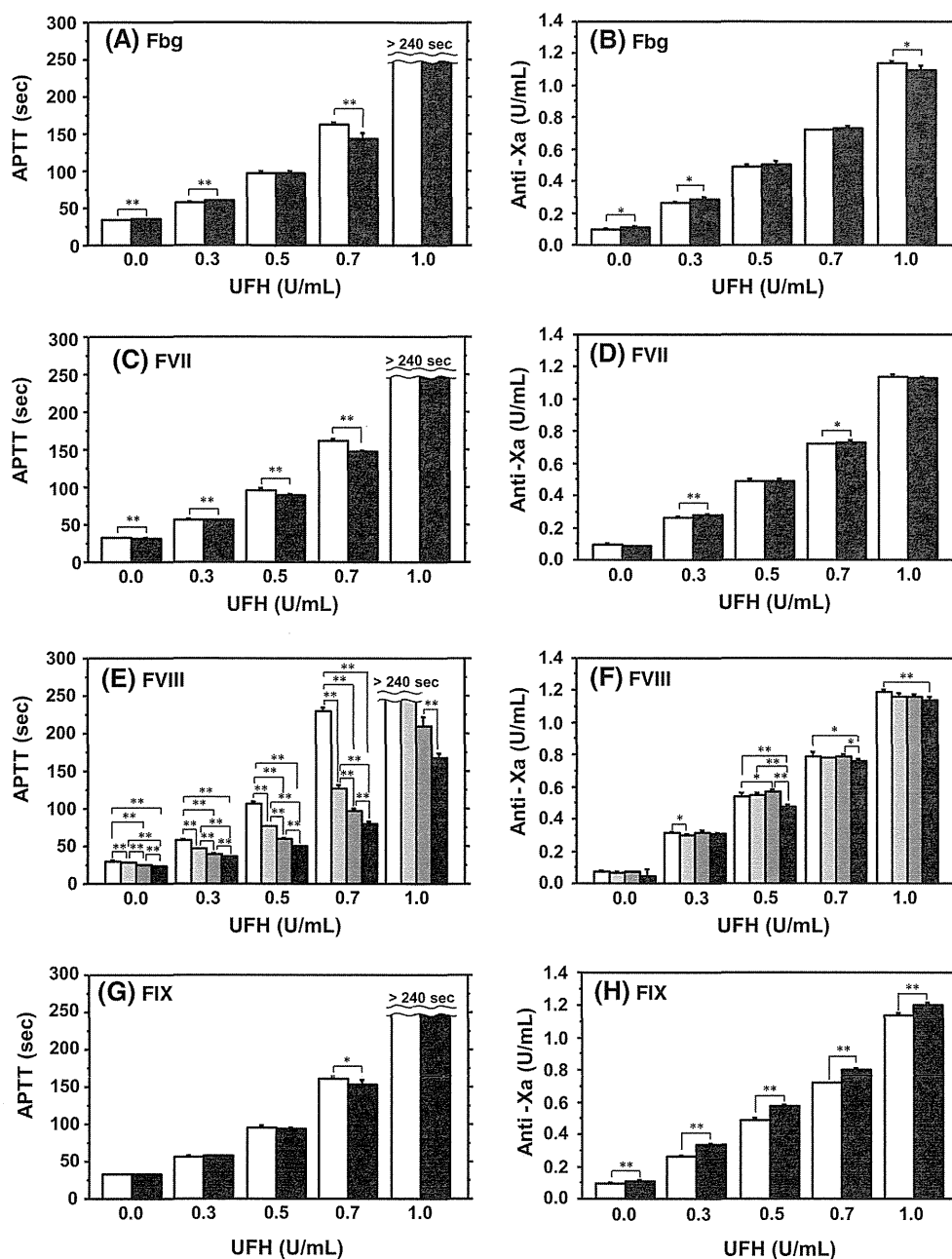


Fig. 1 Effects of increasing concentrations of fibrinogen, FVII, FVIII, and FIX on the APTT and anti-Xa activity in plasma samples with or without UFH. The UFH concentrations in the plasma samples were 0.0, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 U/mL. Both the APTT and anti-Xa activity were measured five times in the same samples and are expressed as mean \pm standard deviation (SD). * P < 0.05, ** P < 0.01. **a, b** Effects of fibrinogen on APTT and anti-Xa activity. Mean \pm SD of APTT (a) and anti-Xa activity (b) in plasma samples containing 250 and 500 mg fibrinogen/dL are shown in *open* and *filled columns*, respectively. **c, d** Effects of FVII on APTT and anti-Xa activity.

Mean \pm SD of APTT (c) and anti-Xa activity (d) in plasma samples containing 0.5 and 1.0 μ g FVII/mL are shown in *open* and *filled columns*, respectively. **e, f** Effects of FVIII on APTT and anti-Xa activity. Mean \pm SD of APTT (e) and anti-Xa activity (f) in plasma samples containing 1, 2, 4, and 6 U FVIII/mL are shown in *open*, *light gray*, *dark gray*, and *filled columns*, respectively. **g, h** Effects of FIX on APTT and anti-Xa activity. Mean \pm SD of APTT (g) and anti-Xa activity (h) in plasma samples containing 5 and 10 μ g FIX/mL are shown in *open* and *filled columns*, respectively

normal plasma samples, 80.3 ± 3.1 s in the plasma samples with 6 U FVIII/mL). In the plasma samples containing 1.0 U/mL of UFH, the APTTs in the normal plasma and

the plasma samples with 2 U/mL of FVIII were over the detection limit (240 s), and the APTTs in the plasma samples with 4 and 6 U/mL of FVIII were shortened to within

the detection limit (Fig. 1e). In contrast, the anti-Xa levels were relatively constant in all plasma samples and were not greatly influenced even with the high FVIII (6 U FVIII/mL) and high UFH (1.0 U UFH/mL) concentrations (Fig. 1f).

Figure 2 shows the mean regression lines for the plasma samples with increased concentrations of FVIII, where added UFH is plotted against the log APTT values. The increase in the concentrations of FVIII showed a reduction in the slope of the log APTT-added UFH response curve (0.94 s/U/mL in the twofold increase, 0.93 s/U/mL in the fourfold increase, and 0.85 s/U/mL in the sixfold increase) compared to the normal plasma (1.25 s/U/mL), indicating that increased FVIII concentrations shorten the APTT under the therapeutic dose range of UFH.

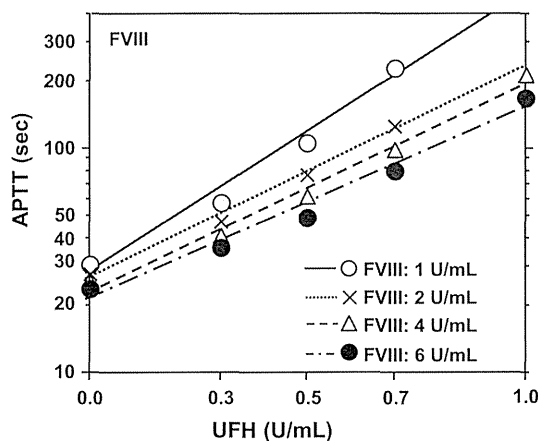


Fig. 2 Relationship between APTT (logarithmic scale) and the UFH concentration in plasma samples with increased FVIII concentrations. Slope: normal plasma, 1.25 s/U/mL; twofold FVIII increased plasma, 0.94 s/U/mL; fourfold FVIII increased plasma, 0.93 s/U/mL; sixfold FVIII increased plasma, 0.85 s/U/mL

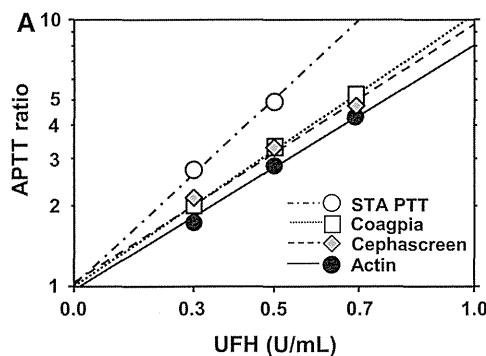


Fig. 3 Sensitivity to UFH of different APTT reagents. Four different APTT reagents were evaluated their sensitivities to UFH. **a** The mean regression lines for the APTT reagents, where added UFH is plotted against the log APTT ratio. The slope for each APTT reagent

Effects of the FIX concentration on the APTT and anti-Xa assay in the plasma containing UFH

We measured the APTT and anti-Xa activity in normal plasma (5 μg FIX/mL) and plasma samples with a twofold increase in FIX concentration (10 μg FIX/mL) with 0.0, 0.3, 0.5, 0.7 and 1.0 U UFH/mL. The APTTs were constant and not significantly affected by the twofold increase in FIX concentration, even under the high UFH concentration, 0.7 U UFH/mL (Fig. 1g). The anti-Xa levels were significantly higher in the plasma samples with the twofold increase in FIX concentration compared to the normal plasma samples at all UFH concentrations (Fig. 1h).

Sensitivity of different APTT reagents to UFH

Four different commercially available APTT reagents were evaluated their sensitivities to UFH. Figure 3a shows the mean regression lines for the APTT reagents, where added UFH is plotted against the log APTT ratio. The slope for each APTT reagent indicates the sensitivity to UFH and was highest in STA-PTT Automate 5 reagent (slope 7.74) and lowest in Actin reagent (slope 4.70) (Fig. 3b) and the difference was 1.65-fold. The slopes of Coagpia APTT-N and STA Cephascreen reagents were between STA-PTT Automate 5 and Actin reagents. APTT values of four APTT reagents were ranged from 30.2 to 33.1 s in the absence of UFH (Fig. 3b).

Discussion

We examined the effects of increased concentrations of fibrinogen, FVII, FVIII, and FIX on the APTT and the anti-Xa activity in plasma samples with therapeutic concentrations of UFH. We found that the APTT was shortened with

B

APTT reagent	slope	APTT value without UFH (sec)
Actin	4.70	30.2
Cephascreen	5.26	30.0
Coagpia	5.82	31.7
STA PTT Automate 5	7.74	33.1

indicates the sensitivity to UFH. **b** The slopes and APTT values in plasma samples without UFH for each APTT reagent. The slope was calculated by dividing log APTT ratio by UFH concentration (U/mL)

the increased concentrations of fibrinogen, FVII, and FVIII in the heparin-containing plasma samples. Among those factors, FVIII greatly shortened the APTT. Compared to the normal plasma samples, in the plasma samples containing 4 or 6 U/mL of FVIII, the APTT was shortened to 60 or 50 % in the presence of 0.5 U/mL of UFH and up to 40 or 33 % in the presence of 0.7 U/mL of UFH, respectively. In the pregnant women's third trimester, 4 U/mL or even 6 U/mL of FVIII can be observed [14, 15]. Our present *in vitro* findings are thus clinically relevant, and they suggest that an increased concentration of FVIII could be a culprit in the shortening of the APTT during pregnancy.

In addition to FVIII, the twofold increase in the fibrinogen concentration shortened the APTT in plasma samples with 0.7 U UFH/mL, but its effect was weaker compared to the effects of FVIII. In the plasma samples with <0.5 U/mL of UFH, the APTTs did not show a great difference between the normal plasma and the plasma samples with the twofold increase in fibrinogen concentration. A twofold increase in fibrinogen concentration is sometimes observed in pregnant women [14, 15], and thus these *in vitro* findings are clinically relevant. The therapeutic range of heparin is 0.3–0.7 U/mL [3, 4]. We suspect that patients rarely receive a very high dose of heparin (i.e., >0.7 U/mL). The effects of an increased fibrinogen concentration on the APTT would thus be observed in a very limited number of cases.

We measured the anti-Xa activity in the plasma samples with increased concentrations of fibrinogen, FVII, FVIII, and FIX under therapeutic UFH concentrations, i.e., from 0.3 to 0.7 U/mL of UFH. We found that the anti-Xa activity was fairly constant and was not significantly affected by the concentrations of coagulation factors or UFH. This outcome is reasonable because the anti-Xa assay specifically measures the heparin–antithrombin complex, and coagulation factors such as fibrinogen, FVII, FVIII, and FIX do not affect its activity. However, we must point out that the twofold increase in FIX slightly enhanced the anti-Xa activity in all UFH-containing plasma samples. Further studies are needed to clarify the mechanism of this finding.

We used “FVIII concentrate” for preparing the plasma samples with increased concentrations of FVIII. The FVIII concentrate we used contains a large amount of VWF to protect FVIII from its degradation. Therefore, the plasma samples with a twofold, fourfold, and sixfold increase in FVIII concentration had very high concentrations of VWF: 362, 1,026, and 1,786 % VWF, respectively. Pregnant women have an increased concentration of plasma VWF up to 10-fold [14]. FVIII affects the APTT but VWF does not. Therefore, the shortening of the APTT under the high concentrations of FVIII and VWF is attributable to the FVIII concentration.

Chunilal et al. [9] collected plasma samples from pregnant and non-pregnant women, mixed them with UFH, and measured the APTT and the anti-Xa activity. They found

that the APTT response to UFH was attenuated in the pregnant women's plasma and was correlated with the fibrinogen concentration, FVIII activity, and nonspecific plasma protein binding. Since pregnancy is associated with an increase in coagulation factors including fibrinogen, FVII, FVIII, and FIX [14, 15], Chunilal et al. did not identify a main influential factor on the APTT response. Our finding that the increased concentration of FVIII greatly affects the APTT response is compatible with their finding.

It is well known that the APTT value has a high degree of variability from one reagent to another [3, 11]. In the present study, we evaluated the sensitivities to UFH of four APTT reagents. We found that there is 1.65-fold difference of the sensitivity to UFH among reagents (Fig. 3b). In the present UFH study, we utilized a low sensitivity actin reagent for APTT measurement and discussed the FVIII effects of APTT values in UFH-containing plasma samples. As the sensitivity to UFH was different among APTT reagents, the degree of APTT shortening with FVIII in UFH-containing plasma sample would be dependent on the reagent.

The limitation of the present study is that we prepared plasma samples with increased concentrations of a single factor only. We did not prepare plasma samples mixed with multiple factors because of a technical limitation; we cannot prepare such plasma samples without extensive dilution at the mixing step. Once such samples are prepared, they must be diluted and are not appropriate for the assays.

The results of our study demonstrate that the APTT was greatly shortened mainly by the increased concentration of plasma FVIII under the therapeutic range of heparin. Therefore, in patients with increasing concentrations of coagulation factors—such as pregnant women—the APTT may underestimate the anticoagulant effect of UFH. Anti-Xa activity reflects the anticoagulant effect of UFH without the influence of these coagulation factors. The evaluation of anti-Xa activity is thus useful and ideal to adjust the therapeutic dose of UFH in pregnant women, and is favorable to avoid the unwanted bleeding. A dose-adjustment nomogram for a specific APTT reagent used in the laboratory may be an effective alternative method [3, 4].

Acknowledgments This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan, the Japan Society for the Promotion of Science, the Uehara Memorial Foundation, and the Takeda Science Foundation.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest associated with this manuscript.

References

1. Basu D, Cade J, Gallus A, Hirsh J. A prospective study of value of monitoring heparin treatment with activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med.* 1972;287:324–7.

2. Raschke R, Hirsh J, Guidry JR. Suboptimal monitoring and dosing of unfractionated heparin in comparative studies with low-molecular-weight heparin. *Ann Intern Med.* 2003;138:720–3.
3. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the seventh ACCP conference on antithrombotic and thrombolytic therapy. *Chest.* 2004;126:188S–203S.
4. Garcia DA, Baglin TP, Weitz JI, Samama MM. American College of Chest Physicians. Parenteral anticoagulants: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2012;141:e24S–43S.
5. Eikelboom JW, Hirsh J. Monitoring unfractionated heparin with the APTT: time for a fresh look. *Thromb Haemost.* 2006;96:547–52.
6. Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacother.* 2012;32:546–58.
7. Kitchens CS. To bleed or not to bleed? Is that the question for the PTT? *J Thromb Haemost.* 2005;3:2607–11.
8. Levine MN, Hirsh J, Gent M, Turpie AG, Cruickshank M, Weitz J, et al. A randomized trial comparing activated thromboplastin time with heparin assay in patients with acute venous thromboembolism requiring large daily doses of heparin. *Arch Intern Med.* 1994;154:49–56.
9. Chunilal SD, Young E, Johnston MA, Robertson C, Naguit I, Stevens P, et al. The APTT response of pregnant plasma to unfractionated heparin. *Thromb Haemost.* 2002;87:92–7.
10. Morabia A. Heparin doses and major bleedings. *Lancet.* 1986;1:1278–9.
11. Gouin-Thibaut I, Martin-Toutain I, Peynaud-Debayle E, Marion S, Napol P, Alhenc-Gelas M, et al. Monitoring unfractionated heparin with APTT: a French collaborative study comparing sensitivity to heparin of 15 APTT reagents. *Thromb Res.* 2012;129:666–7.
12. Teien AN, Lie M, Abildgaard U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor-X. *Thromb Res.* 1976;8:413–6.
13. Wool GD, Lu CM. Acad Clinical Lab Phys Scientists. Pathology consultation on anticoagulation monitoring factor X-related assays. *Am J Clin Pathol.* 2013;140:623–34.
14. Stirling Y, Woolf L, North WR, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost.* 1984;52:176–82.
15. Szecsi PB, Jorgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb Haemost.* 2010;103:718–27.
16. Brancazio LR, Roperti KA, Stierer R, Laifer SA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous heparin during the early third trimester of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1240–5.
17. Chiu HM, Hirsh J, Yung WL, Regoeczi E, Gent M. Relationship between anticoagulant and antithrombotic effects of heparin in experimental venous thrombosis. *Blood.* 1977;49:171–84.

日本人における先天性血栓性素因 —欧米との比較—

宮田 敏行, 丸山 慶子

Key words: Genetic mutation, Population genetics, Thrombophilia, Venous thromboembolism

1. はじめに

静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism, VTE) の頻度には人種差があるといわれ、東アジア人は VTE が少ないと報告されている¹⁾。アジア人一般住民を対象にした疫学研究は少ない。2006年のアンケート調査に基づき、佐久間らは日本人の肺塞栓症の発症率を報告している²⁾。これによると、年間の肺塞栓症の患者数は7,864人であり、10万人当たり6.19人であった。また、深部静脈血栓症の患者数は年間14,674人であり、10万人当たり11.55人であった²⁾。Leeらは2002年の台湾の国民健康保険のデータベースを基に、徴候性 VTE の発症率を分析した³⁾。台湾の成人の VTE の発症率は10万人当たり16.5人であり、これは白人や黒人より低く、他のアジア人の発症率に近かった。この報告では、40歳以下の患者は10万人当たり4人であったが、80歳以上の患者は10万人当たり108人であり、加齢により VTE の発症が欧米人同様に増加することを示した³⁾。

血栓性素因とは、先天性と後天性の要因により凝固亢進状態を基盤として VTE を生じやすい傾向とされる⁴⁾。VTE の発症に遺伝的要因が60%程度関与することは、白人の家系に基づく研究から明らかになっている。VTE の遺伝的要因として、凝固活性の増加と抗凝固活性の低下がよく知られている。臨床的に十分検討されている VTE 発症に関連する遺伝子変異は、V 因子 Leiden 変異 (V 因子 R506Q 変異) とプロトロンビン G20210A 変異である。これらは白人に見られる変異であり、白人との遺伝的混合を除いてアジア人には実質的に存在しない^{5,6)}。日本人には後述するプロテイン S K196E 変異がある⁷⁾。

本稿では、日本人の VTE の遺伝的背景を紹介し、白人との血栓性素因の相違点を述べてみたい。これまでに本誌では先天性血栓性素因に関して優れた総説が発表されてきた^{8,9)}。これらの総説との重複を避けつつ、中国人および韓国人での報告を含めて解説する。

2. 一般人口における抗凝固因子欠損症の頻度

抗凝固因子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) が知られている。これらの機能に関しては、本誌に優れた総説が掲載されているので、ここでは割愛する⁹⁾。アジア人を対象に抗凝固因子の欠損症の頻度を求めた研究は乏しい。地域一般住民もしくは健康人を対象に、大規模に AT, PC, PS の活性を測定した研究は、日本と中国から発表されている。私達の国立循環器病研究センターが行った研究では、一般住民4,517人での AT と PC の欠損症の頻度をそれぞれ0.15%および0.13%、一般住民2,690人での PS の欠損症の頻度を男性1.12%、女性1.60%と報告した^{10,11)} (Table 1)。

中国では、北京、上海、蘇州、天津の4都市の大学系列病院で3,493人の成人健康人 (平均年齢37歳) を対象に AT, PC, PS を測定した報告がある¹²⁾。活性測定の後、活性が1パーセント以下を示す試料の遺伝子解析を行ない、3人に AT 遺伝子変異、10人に PC 遺伝子変異、2人に PS 遺伝子変異、あわせて10人に遺伝子変異を同定した。この研究は抗凝固因子欠損症の頻度を求める研究ではないので、欠損症頻度は記載されていないが、遺伝子変異を有する AT, PC, PS の各欠損症の頻度は0.09%、0.29%、0.06%となる (Table 1)。活性値から欠損症の頻度を求めることは、閾値の設定により変動するので、大変難しい。したがって、活性値から求めた欠損症の頻度から人種の血栓性素因の違いを論じるのは無理があるように感じている。

Table 1 Prevalence of protein S, protein C, and antithrombin deficiency in Japanese and Chinese

Population	Protein S deficiency		Protein C deficiency		Antithrombin deficiency		Reference
	Number of deficiency/total (%)		Number of deficiency/total (%)		Number of deficiency/total (%)		
	VTE patients	general population	VTE patients	general population	VTE patients	general population	
Japanese	20/113 (17.70%)	8/392 (2.02%)	9/113 (7.96%)	2/392 (0.51%)	2/113 (1.77%)	0/392 (0%)	Suehisa et al, 2001 ⁴³⁾
Japanese	—	—	7/108 (6.48%)	6/4,517 (0.13%)	6/108 (5.56%)	7/4,517 (0.15%)	Sakata et al, 2004 ⁴⁰⁾
Japanese	—	Male: 14/1,252 (1.12%) Female: 23/1,438 (1.60%)	—	—	—	—	Sakata et al, 2004 ⁴¹⁾
Japanese	40/85 (47.06%)	1/126 (0.79%)	27/85 (31.76%)	1/95 (1.05%)	6/85 (7.06%)	0/95 (0%)	Kinoshita et al, 2005 ⁴³⁾
Chinese	10/52 (19.23%)	—	9/52 (17.31%)	—	5/52 (9.62%)	—	Liu et al, 1994 ⁴⁴⁾
Chinese	28/85 (32.94%)	—	16/85 (18.82%)	—	3/85 (3.53%)	—	Shen et al, 1997 ⁴⁵⁾
Chinese	39/116 (33.62%)	8/125 (6.40%)	20/116 (17.24%)	5/125 (40.00%)	6/116 (5.17%)	8/125 (6.40%)	Shen et al, 2000 ⁴⁶⁾
Chinese	4/50 (8.00%)	—	2/50 (4.00%)	—	2/50 (4.00%)	—	Ho et al, 2000 ⁴⁷⁾
Chinese	6/56 (10.71%)	—	6/56 (10.71%)	—	4/56 (7.14%)	—	Chen et al, 2003 ⁴⁸⁾
Chinese	—	2/3,493 (0.06%)	—	10/3,493 (0.29%)	—	3/3,493 (0.09%)	Zhu et al, 2011 ¹²⁾

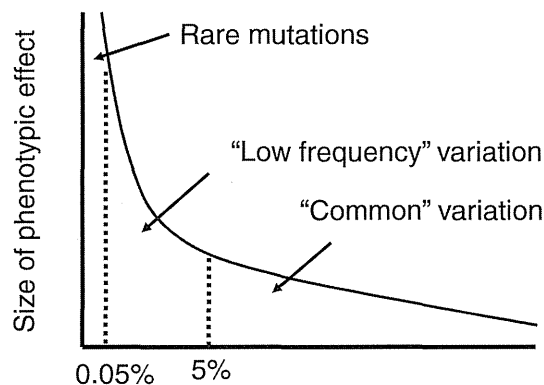
— : Data unavailable. ^aDeficiency was defined by low activity level and mutation.

3. 日本人・中国人に見られる低頻度血栓性変異

1) ヒトゲノムに存在する遺伝子変異

Fig. 1 にヒトゲノム上の遺伝子変異の一般人口における頻度と変異の疾患発症への影響を示す。Common variation (頻度の高い変異) はアレル頻度が 5% 以上 (ヘテロ接合体が 10 人に 1 人以上) の遺伝子変異を指す。ここに属する変異はゲノム網羅的関連解析法 (Genome-wide association study, GWAS) の対象になった変異であり、多くの疾患で関連研究が行われた。その結果、多くの遺伝子が疾患との関連を示したものの、オッズ比は低いものが極めて多く、頻度の高い変異の疾患発症への個々の影響は小さいと考えられるようになった。

一方、アレル頻度が 0.05% 以下の Rare mutation (ま



Minor allele frequency of single nucleotide polymorphisms in the general population

Fig. 1 Genetic mutation in humans

れな変異)は重度の機能障害を与える変異が含まれ、連鎖解析の対象となる遺伝子変異である。この両者のあいだにアレル頻度が0.05%~5%のLow-frequency variation(低頻度変異)がある。最近、この低頻度変異の中に機能に影響を与える変異があり、疾患発症の観点から注目されている。というのも、これまで疾患遺伝子の同定のためGWASと連鎖解析が用いられたが、低頻度変異はいずれの手法でもカバーできない領域であり、手つかずの領域と見なすことができる。血栓研究では、白人のVTEのリスク因子として確立しているV因子Leiden変異とプロトロンビンG20210A変異のアレル頻度は4%~5%および1.7%~4%であり、低頻度変異に属する。後述する日本人にのみ見られるPS K196E変異も低頻度変異である。低頻度変異は、進化上比較的最近生じた変異であるため、人種間に頻度の違いが見られる。

2) PS K196E変異(成熟PSの残基番号ではPS K155E変異)

日本人のVTEの遺伝素因を明らかにするため、国内6施設が参加した研究を含め、3つの症例対照研究が行われ、PS K196E変異が先天性血栓性素因として同定された^{13~15)}(Table 2)。本変異はPS分子の第2 EGF様ドメイン内にある。成熟PSのアミノ酸番号を用いるとPS K155E変異、また変異を同定した地名に因んでPS Tokushima変異ともよばれる^{16,17)}。VTEに対するオッズ比は3.74~8.56であった。本変異体は活性化PC(APC)のコファクター活性を示さないことが組み換えPSを用いた研究で明らかとなっている¹⁸⁾。本変異に関しては、以前にも本誌で紹介しているので、そちらも参考にしていただきたい⁸⁾。

日本、中国、韓国で多数のVTE患者を対象にPS遺伝子解析が報告されているが、PS K196E変異の他には変異の集積は見られない^{19~21)}。

i) PS K196E変異の頻度

これまでの4つの研究を合わせると、日本人4,319人に77人のヘテロ接合体が同定されている。ホモ接合体は一般住民には同定されていない。したがって、その頻度は0.018であり、Eアレル頻度は0.009である²²⁾。このようにヘテロ接合体は日本人約55人に1人認められ、ホモ接合体は約12,000人に1人と推定される。日本の総人口を1億2,700万人とすると、約1万人がホモ接合体であると推定された²³⁾。本変異は中国人や韓国人には見られず、日本人に特徴的である^{20,21,24)}。一方、ホモ接合体はVTE患者258人中3人に見られた^{13,19)}。ホモ接合体のPS抗原量は正常域を示すが、抗凝固活性は35%~39%と低値を示した。したがって、PS K196E変異は

血中に異常PS分子が循環する分子異常症である。

ii) PS K196E変異保有者の抗凝固活性

一般住民1,862人のPS抗凝固活性を測定しヘテロ接合体の活性を調べた報告によると、34人のヘテロ接合体のPS抗凝固活性は40%から110%の広い範囲に分布していた²⁵⁾。正常型PS保有者の抗凝固活性は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。この結果から、ヘテロ接合体はPS抗凝固活性で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%抗凝固活性が低い値を示した。PS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PS抗凝固活性が低下し、血栓リスクが上昇すると考えられる。2014年1月16日に、厚生労働省は経口避妊薬によって血栓症が誘導されるとして、「安全性速報」により注意喚起を行った。経口避妊薬による血栓症は、PSが関与する可能性がある。PS K196E変異などの血栓性素因を保有した女性の血栓症発症リスクに注意を払う必要があるかもしれない。

iii) 血栓症の修飾因子としてのPS K196E変異

日本人VTE患者173人を対象に、AT, PC, PSのタンパク質コード領域の全シーケンス解析を行った¹⁹⁾。それによると、173人の32%にあたる55人が、3つの遺伝子のいずれかにアミノ酸変異を伴う遺伝子異常を保有していた。3つの遺伝子のなかでもPS遺伝子変異保有者は29人で最も多かった。この中には、上述のPS K196E変異のヘテロ接合体13人およびホモ接合体2人が含まれていた。PS遺伝子変異保有者29人のうち、5人はPS遺伝子とPC遺伝子の両方に変異を保有していた。大変興味深いことに、この5人は全員、PS K196E変異保有者であった。このことから、PS K196E変異は他の遺伝子変異と重なってVTEの発症リスクをあげる修飾因子であると考えられる。

iv) PS K196E変異と妊娠・産褥期発症のVTE

妊娠もしくは産褥期にVTEを発症した患者18人を対象とし、PS, PC, ATのタンパク質コード領域の全シーケンス解析を行った結果、4人にPS遺伝子および1人にPC遺伝子の変異を認めた²⁶⁾。AT遺伝子には変異を認めなかった。PS K196E変異はVTE患者2人に認められた。変異を保有する5人のVTEは、妊娠の初期および中期に認め、後期ならびに産褥期での発症は認めなかった。この研究から、PS K196E変異を含むPS, PC, ATの変異は、妊産婦におけるVTEでもリスク因子になる可

Table 2 Influence of genetic variants in protein S and protein C genes on VTE in Japanese and Chinese

Gene	Nucleotide change	Amino acid change	rs number	Risk allele	No. of		Odds ratio (95% CI)	p value	Population	Reference
					Cases	Controls				
<i>PROS1</i>	c.586A>G	p.Lys196Glu	rs121918474	G	5/85 (5.88%)	5/304 (1.64%)	3.74 (1.06–13.2)	—	Japanese	Kinoshita et al, 2005 ¹³⁾
<i>PROS1</i>	c.586A>G	p.Lys196Glu	rs121918474	G	15/161 (9.32%)	66/3,651 (1.81%)	5.58 (3.11–10.01) adjusted: 4.72 (2.39–9.31)	<0.001	Japanese	Kimura et al, 2006 ¹⁴⁾
<i>PROS1</i>	c.586A>G	p.Lys196Glu	rs121918474	G	6/60 (10.00%)	3/234 (1.28%)	8.56 (2.07–35.30)	<0.05	Japanese	Ikejiri et al, 2010 ¹⁵⁾
<i>PROC</i>	c.565C>T	p.Arg189Trp	rs146922325	T	5/116 (4.31%)	11/1,292 (0.85%)	5.10 (1.7–14.8)	—	Chinese	Tsay et al, 2004 ²⁹⁾
<i>PROC</i>	c.565C>T	p.Arg189Trp	rs146922325	T	59/1,003 (5.88%)	9/1,031 (0.87%)	7.10 (3.50–14.39) adjusted: 7.34 (3.61–14.94) [#] or 7.13 (3.49–14.56) [§]	3.31 × 10 ⁻¹⁰ adjusted: 3.88 × 10 ^{-8#} or 6.88 × 10 ^{-8§}	Chinese	Tang et al, 2012 ^{30,34)}
<i>PROC</i>	c.565C>T	p.Arg189Trp	rs146922325	T	68/1,304 (5.21%)	12/1,334 (0.90%)	6.06 (3.26–11.25)	1.03 × 10 ⁻¹⁰	Chinese	Tang et al, 2013 ⁴⁹⁾
<i>PROC</i>	c.574_576del	p.Lys193del	rs199469469	Del	68/1,003 (6.78%)	25/1,031 (2.42%)	2.93 (1.84–4.67) adjusted: 2.71 (1.68–4.36)	2.59 × 10 ⁻⁶ adjusted: 4.59 × 10 ⁻⁵	Chinese	Tang et al, 2012 ³⁴⁾
<i>PROC</i>	c.574_576del	p.Lys193del	rs199469469	Del	85/1,304 (6.52%)	32/1,334 (2.40%)	2.84 (1.88–4.29)	2.77 × 10 ⁻⁷	Chinese	Tang et al, 2013 ⁴⁹⁾

*Data were analyzed by logistic regression adjusted for age, gender, smoking status, alcohol abuse, malignant tumor, type 2 diabetes, sedentariness/immobilization, and pregnancy/puerperium.

§Data were calculated by unconditional logistic regression adjusted for age, gender, smoking status, malignant tumor, sedentariness/immobilization, and pregnancy/puerperium.

能性が示唆された²⁶⁾。特に、妊娠中は PS 抗凝固活性が低下するので、先天性血栓性素因保有者では血栓症のリスクが高いと思われた。

v) PS K196E 変異と不育症

白人を対象にした不育症に関する研究では、低頻度の先天性血栓性素因である V 因子 Leiden 変異やプロトロンビン G20201A 変異と不育症との関連が報告されたが、研究が進むにつれその関連を支持する研究は多くない。また、機能への影響が大きいと考えられるまれな AT, PC, PS 変異が不育症の素因となるかどうかの研究報告はない。

最近、私達は PS K196E 変異と PS, PC, AT のまれな変異が不育症の素因となるかどうかの研究結果を発表した²⁷⁾。この研究では、330 人の不育症患者全員の PS, PC, AT 各遺伝子の塩基再配列解析を行った。その結果、PS K196E 変異は 6 人の不育症患者に見られその頻度は 0.018 であった。この頻度は一般住民に見られる頻度 77/4,319 人 (0.018) と比べ、有意差を認めなかった。また、まれな PS, PC, AT の変異は不育症の 3.3% (330 人中 11 人) に認めた。この結果から、PS K196E 変異は不育症の遺伝的リスクにはならないと考えられた。まれな変異は不育症の 3.3% の患者にしか認めないため、不育症の主な原因とはなりにくいと考えた²⁷⁾。

vi) PS K196E 変異保有者の検出法：比活性を用いる方法

PS K196E 変異保有者の血漿では、PS 抗凝固活性は低下するが抗原量は正常値を示す。これを PS 欠損症 II 型分子異常症とよぶ。活性と抗原量がともに低下する欠損症は I 型とよぶ。II 型分子異常症では、活性値を抗原量で割って得られる比活性値が低下する。そこで、血漿を用いて正常者と PS 分子異常症を判別するため、総 PS 活性と総 PS 抗原量を測定し、PS の比活性を求める新規測定法が開発された²⁸⁾。この方法を用いると、正常者の比活性は 1 に近い値になる。一方、PS K196E 変異ヘテロ接合体を含む II 型欠損症の血漿では 0.69 以下の値になり、正常者とヘテロ接合体の判定が可能になるという。前述のように、PS の血漿濃度は後天的な要因で影響を受けるので、比活性を求めると正確な診断に繋がる可能性があり、今後注目される。

3) PC R189W 変異 (成熟 PC の残基番号では PC R147W 変異)

本 PC 変異は 2004 年に台湾人 VTE 患者の 4.3%、健康人の 0.85% に同定され、VTE に対するオッズ比は 5.1 と報告された (Table 2)²⁹⁾。その後、中国本土での大規模な研究でもほぼ同様の頻度で観察され、VTE の遺伝

的リスクであると報告された (オッズ比, 7.34)³⁰⁾。上海から報告された研究では、23 人の PC 欠損症患者のうち 10 人が本変異保有者であった³¹⁾。本変異体の組み換え PC の発現実験によると、合成基質の分解活性は正常であるが、EPCR に対する親和性が 3 倍弱く、この低親和性が本変異の血栓性素因を説明すると思われる³²⁾。台湾と中国本土の一般人口では 0.9% 程度の頻度でヘテロ接合体が同定されるが (Table 2)、日本および韓国では、VTE 患者に 1 人ずつ同定されている^{13, 21)}。

4) PC K193del 変異 (成熟 PC の残基番号では PC K151del 変異)

本変異は PC の 192 位と 193 位の Lys が 2 残基連なったうちの 1 残基の欠失であり、PC 軽鎖の C 末端から 6 残基目に位置する。本変異はまず 3 人の日本人 VTE 患者に、抗原量と合成基質分解活性は正常だが、凝固時間で測定する抗凝固活性が低下する II 型欠損症として同定された³³⁾。その後、九州大学の報告では、健康人 (30 人中 1 人) にも同定された¹³⁾。しかし、白人には同定されていない。PC 合成基質分解活性法は、簡便性と優れた定量性から血栓性素因のスクリーニングとして広く使われるが、PC K193del 変異を持つ血漿は合成基質分解活性が低下しないので注意が必要である。

中国湖北省武漢市から報告された症例対照研究では、PC K193del 変異は VTE 患者の 6.8%、一般住民の 2.4% に見られ、VTE に対するオッズ比は 2.7 と報告された (Table 2)³⁴⁾。本変異体の組み換え体 PC を用いた実験によると、合成基質の分解活性は正常であるが、PS 存在下での抗凝固活性が 2~3 倍障害されており、これが本変異の血栓性素因を説明すると思われる³²⁾。本邦でも本変異は同定されているので、日本人の先天性血栓性素因の 1 つと考えられる。前述の韓国の研究では、本変異は VTE 患者 3 人に同定されている²¹⁾。

5) PC R211W 変異と PC M406I 変異 (成熟 PC の残基番号では PC R169W 変異および PC M364I 変異)

PC R211W 変異と PC M406I 変異は日本人 VTE 患者 7 人および 6 人に同定されており、日本人に広く見られる変異である³³⁾。韓国では、500 人の VTE 患者と 3,000 人以上の一般人を対象にした AT, PC, PS の研究がある²¹⁾。この研究では、VTE 集団では多くの遺伝子変異が同定されているが、中でも PC R211W 変異と PC M406I 変異が 18 人と 9 人に同定された。韓国一般人集団では 6 人に PC R211W 変異、8 人に AT R79C 変異および AT S148P 変異が同定された。PC M406I 変異は VTE 患者にのみ同定されているので、VTE に対するリスクは高いと考えられる。一方、PC R211W 変異は一般人にも多く

Table 3 Representative thrombotic genetic mutations

type of mutations	known thrombotic mutations	ethnicity
common mutations	ABO	worldwide
	fibrinogen γ' chain some others	
low frequency mutations	PS K196E	Japanese
	PC R189W	Chinese
	PC K193del	Japanese, Chinese, Korean
	PC R211W	Japanese, Korean
	PC V339M	Japanese
	PC M406I	Japanese, Korean
	factor V Leiden prothrombin G20210A	Caucasian Caucasian
rare mutations	mutations causing deficiency of AT, PC and PS	worldwide

見られるため、リスクは低いのではないかと考えられた²¹⁾。中国人では PC R211W 変異は同定されていないが、PC M406I 変異は 1 人に同定されている³¹⁾。

6) PC V339M 変異 (成熟 PC の残基番号では PC V297M 変異)

本変異は日本人 VTE 患者 9 人に同定されており、日本人に広く見られる変異である³³⁾。しかし、中国と韓国の大規模な研究では報告されていない^{21, 31)}。

4. 他の血栓性変異

VTE の遺伝要因として、凝固活性の増加および抗凝固活性の低下が知られているが、PS と PC の遺伝子変異は全て loss-of-function の変異で、抗凝固活性の低下に繋がる。凝固因子の血中量に影響する遺伝子多型、VTE 患者での GWAS 解析などの手法を用いて、血栓症に関連する遺伝子多型が探索され、ABO 血液型とフィブリノーゲン γ' 鎖が複数の研究で同定されている。

1) ABO

ABO 血液型は血漿 VWF と VIII 因子の量に影響を与えて VTE のリスクになる (Table 3)。ABO と VTE の関連は以前から示されていたが、GWAS 解析でも ABO は VTE に関連を示した (オッズ比, 約 1.8)^{35~37)}。VWF は ABO 型糖鎖を有し非 O 型糖鎖をもつ VWF は血中量が高い。VWF は VIII 因子の安定化に寄与するため、VWF 量が高いと血中 VIII 因子量も増加する。したがって、非 O 型では VIII 因子量が増えて VTE のリスクが高くなると説明されている。しかし、VWF と VIII 因子量で補

正しても、非 O 型は VTE のリスクとして残るので、これとは別の経路で心血管系疾患のリスクになることがあるかもしれない。

Population attributable risk (PAR) は一般人口からその危険因子が除去された場合、どれくらい病気が減少するかを示す指標として用いられる。PAR は危険因子の頻度とオッズ比から計算できる。イギリスで行われた VTE の危険因子の一般人口における研究では、V 因子 Leiden 変異 (頻度 3.4%, オッズ比 7) の PAR は 16.9%, プロトロンビン 20210A 変異 (頻度 2.0%, オッズ比 2~5) の PAR は 2.0%~7.4% であり、非 O 型 (頻度 55%, オッズ比 1.8) の PAR は 30% であった³⁸⁾。日本人に見られる PS K196E 変異 (頻度 1.8%, オッズ比 3.5 とする) の PAR は 4.3% であり、非 O 型 (頻度 70%, オッズ比 1.8) の PAR は 35.6% 見積もることができる。集団全体で見ると、低頻度変異よりも、集団での頻度が高い ABO 血液型は VTE のリスクであるといえよう。

2) FGG: フィブリノーゲン γ' 鎖

フィブリノーゲンはジスルフィド結合で繋がった A α B β γ' の 3 つのポリペプチド鎖の 2 量体として血中に存在する。 γ' 鎖は 411 アミノ酸残基のポリペプチドである。 γ' 鎖には γ' 鎖 C 末端 4 残基が生じる splicing が起こらず、4 残基が 20 アミノ酸に置換した 427 アミノ酸残基の γ' 鎖が 7%~15% 存在する。このため、血中には γ'/γ' 鎖に加えて γ'/γ' 鎖を持つフィブリノーゲンが存在する。血中の γ' 鎖を定量し VTE との関連解析を行った結果、 γ'/γ' フィブリノーゲンが血栓症と関連を示した³⁹⁾。FGG の遺伝子多型 rs2066865 は γ'/γ' フィブリノーゲン

量に関連を示し、本多型はVTEに関連を示した（オッズ比1.47）³⁹⁾。

おわりに

これまでに述べた血栓性遺伝子変異をTable 3にまとめた。先天性血栓性素因は頻度により、i) オッズ比がせいぜい1を超える程度の低いリスクを示す頻度の高い変異、ii) 機能障害を示す低頻度変異、iii) まれな頻度であるが機能を重度に障害する変異、に分類できる。これらと環境因子とが重なりVTEが発症すると考えられよう。遺伝要因を用いるとVTEの予測精度が増すと報告もある⁴⁰⁾。最後に今後の研究について述べてみたい。

i) PS K196E 変異について

本稿に述べたように、日本人には低頻度血栓性変異としてPS K196E 変異がある。関連解析により本変異が同定されてから今年で10年になるが、残念ながらいまだに海外の総説に血栓性素因として紹介されていない⁴⁾。PS K196E 変異はV因子Leiden 変異より頻度が低いので、臨床研究を進めにくいと思われるが、VTEの初発や再発に対する寄与度、VTE発症者とVTE未発症者で本変異保有者のVTE発症頻度の違いなどを調査する必要があると考える。特に、一般住民を対象にPS活性を測定しても、VTE発症と関連しないというオランダからの発表があり⁴¹⁾、本変異保有者のVTEに関して更に研究を進める必要があると考える。

ii) 1000ゲノムプロジェクトの遺伝情報の有用性

1000ゲノムプロジェクトの遺伝情報が公開されている (<http://www.1000genomes.org/about>)。この中には白人(758アレル)の遺伝情報に加えて、日本人(178アレル)と中国人(194アレル)の情報も保管されている。このデータベースを用いると、前述のFGGのrs2066865の多型は、リスクアレルであるGアレルの頻度は白人で77%、日本人で51%であり、日本人はリスクアレルの頻度が低いことが理解される。また、PS K196E 変異は日本人に1アレル(アレル頻度、0.0056)存在し、白人と中国人には見られないこと、PC R189W 変異は中国人に1アレル(アレル頻度、0.0052)存在し、1000ゲノムプロジェクトでは日本人と白人には見られないことが理解される。PS K196E 変異のアレル頻度は0.009なので、この程度の頻度の多型情報も含まれていることが分かる。今後、国内で行われている日本人ゲノムの遺伝情報にアクセスできるようになれば、これらを用いて日本人の低頻度変異の情報を収集でき、遺伝情報を血栓症の予防と予知に向けての応用が可能になるだろう。

う。

iii) まれな頻度であるが機能を重度に障害する変異の研究

GWAS解析およびそれに続く多人数でのヒト全ゲノム解析の結果から、ヒト疾患はこれまで考えられていた以上に著しい遺伝的不均一性を基盤として発症すると考えられるようになってきた。この不均一性は疾患発症の多段階で重要であるといわれている⁴²⁾。すなわち、i) 個々にはまれな変異でも、それらが集まるとありふれた疾患を起こさせるのに十分な役割を果たす。ii) ある疾患の患者には、同じ遺伝子に異なったまれな重度の機能障害を与える変異が多数見られる。iii) 患者によっては、同じ変異を保持しても異なった臨床症状を示すことがある。iv) 異なった遺伝子上の変異でも、同じパスウェイにある遺伝子であれば、同じ疾患を示すことがある。多因子疾患の多くは重度の機能障害を与えるまれな変異が起こすことも考えられ、こういったまれな遺伝子変異を同定するためエキソーム解析の重要性が指摘されている。

謝 辞

本研究は文部科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金、上原記念生命科学財団の支援を受けて行った。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Montagnana M, Favaloro EJ, Franchini M, Guidi GC, Lippi G. The role of ethnicity, age and gender in venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis*. 2010; **29**: 489-496.
- 2) Sakuma M, Nakamura M, Yamada N, et al. Venous thromboembolism: deep vein thrombosis with pulmonary embolism, deep vein thrombosis alone, and pulmonary embolism alone. *Circ J*. 2009; **73**: 305-309.
- 3) Lee CH, Cheng CL, Lin LJ, Tsai LM, Yang YH. Epidemiology and predictors of short-term mortality in symptomatic venous thromboembolism. *Circ J*. 2011; **75**: 1998-2004.
- 4) Martinelli I, De Stefano V, Mannucci PM. Inherited risk factors for venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol*. 2014; **11**: 140-156.
- 5) Margaglione M, Grandone E. Population genetics of venous thromboembolism. A narrative review. *Thromb Haemost*. 2011; **105**: 221-231.
- 6) Kujovich JL. Factor V Leiden thrombophilia. *Genet Med*. 2011; **13**: 1-16.
- 7) Yin T, Miyata T. Dysfunction of protein C anticoagulant system, main genetic risk factor for venous thromboembolism.

- lism in Northeast Asians. *J Thromb Thrombolysis*. 2014; **37**: 56-65.
- 8) 宮田敏行, 岡田浩美, 川崎富夫, ほか. Thrombosis & Hemostasis/Vascular Biology 日本人の血栓性素因. *臨血*. 2009; **50**: 381-388.
 - 9) 小嶋哲人. 血栓性素因の病因と病態. *臨血*. 2011; **52**: 1454-1460.
 - 10) Sakata T, Okamoto A, Mannami T, Matsuo H, Miyata T. Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J Thromb Haemost*. 2004; **2**: 528-530.
 - 11) Sakata T, Okamoto A, Mannami T, Tomoike H, Miyata T. Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita Study. *J Thromb Haemost*. 2004; **2**: 1012-1013.
 - 12) Zhu T, Ding Q, Bai X, et al. Normal ranges and genetic variants of antithrombin, protein C and protein S in the general Chinese population. Results of the Chinese Hemostasis Investigation on Natural Anticoagulants Study I Group. *Haematologica*. 2011; **96**: 1033-1040.
 - 13) Kinoshita S, Iida H, Inoue S, et al. Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem*. 2005; **38**: 908-915.
 - 14) Kimura R, Honda S, Kawasaki T, et al. Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood*. 2006; **107**: 1737-1738.
 - 15) Ikejiri M, Wada H, Sakamoto Y, et al. The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis. *Int J Hematol*. 2010; **92**: 302-305.
 - 16) Yamazaki T, Sugiura I, Matsushita T, et al. A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res*. 1993; **70**: 395-403.
 - 17) Hayashi T, Nishioka J, Shigekiyo T, Saito S, Suzuki K. Protein S Tokushima: abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor-like domain of protein S. *Blood*. 1994; **83**: 683-690.
 - 18) Hayashi T, Nishioka J, Suzuki K. Molecular mechanism of the dysfunction of protein S (Tokushima) (Lys155→Glu) for the regulation of the blood coagulation system. *Biochim Biophys Acta*. 1995; **1272**: 159-167.
 - 19) Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. *Thromb Res*. 2009; **124**: 14-18.
 - 20) Tang L, Jian XR, Hamasaki N, et al. Molecular basis of protein S deficiency in China. *Am J Hematol*. 2013; **88**: 899-905.
 - 21) Kim HJ, Seo JY, Lee KO, et al. Distinct frequencies and mutation spectrums of genetic thrombophilia in Korea in comparison with other Asian countries both in patients with thromboembolism and in the general population. *Haematologica*. 2014; **99**: 561-569.
 - 22) Miyata T, Hamasaki N, Wada H, Kojima T. More on: racial differences in venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2012; **10**: 319-320.
 - 23) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, Sakata T. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. *Int J Hematol*. 2006; **83**: 217-223.
 - 24) Liu W, Yin T, Okuda H, et al. Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism, is limited to Japanese. *Thromb Res*. 2013; **132**: 314-315.
 - 25) Kimura R, Sakata T, Kokubo Y, et al. Plasma protein S activity correlates with protein S genotype but is not sensitive to identify K196E mutant carriers. *J Thromb Haemost*. 2006; **4**: 2010-2013.
 - 26) Neki R, Fujita T, Kokame K, et al. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol*. 2011; **94**: 150-155.
 - 27) Neki R, Miyata T, Fujita T, et al. Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res*. 2014; **133**: 914-918.
 - 28) Tsuda T, Jin X, Tsuda H, et al. New quantitative total protein S-assay system for diagnosing protein S type II deficiency: clinical application of the screening system for protein S type II deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2012; **23**: 56-63.
 - 29) Tsay W, Shen MC. R147 W mutation of PROC gene is common in venous thrombotic patients in Taiwanese Chinese. *Am J Hematol*. 2004; **76**: 8-13.
 - 30) Tang L, Guo T, Yang R, et al. Genetic background analysis of protein C deficiency demonstrates a recurrent mutation associated with venous thrombosis in Chinese population. *PLoS One*. 2012; **7**: e35773.
 - 31) Ding Q, Shen W, Ye X, Wu Y, Wang X, Wang H. Clinical and genetic features of protein C deficiency in 23 unrelated Chinese patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2013; **50**: 53-58.
 - 32) Ding Q, Yang L, Hassanian SM, Rezaie AR. Expression and functional characterisation of natural R147 W and K150del variants of protein C in the Chinese population. *Thromb Haemost*. 2013; **109**: 614-624.
 - 33) Miyata T, Sakata T, Yasumuro Y, et al. Genetic analysis of protein C deficiency in nineteen Japanese families: five recurrent defects can explain half of the deficiencies. *Thromb Res*. 1998; **92**: 181-187.
 - 34) Tang L, Lu X, Yu JM, et al. PROC c.574_576del polymorphism: a common genetic risk factor for venous thrombosis in the Chinese population. *J Thromb Haemost*. 2012; **10**: 2019-2026.
 - 35) Heit JA, Cunningham JM, Petterson TM, Armasu SM, Rider DN, DE Andrade M. Genetic variation within the anticoagulant, procoagulant, fibrinolytic and innate immunity pathways as risk factors for venous thromboembolism. *J Thromb Haemost*. 2011; **9**: 1133-1142.
 - 36) Germain M, Saut N, Greliche N, et al. Genetics of venous

- thrombosis: insights from a new genome wide association study. *PLoS One*. 2011; **6**: e25581.
- 37) Morange PE, Trégouët DA. Current knowledge on the genetics of incident venous thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2013; **11** Suppl 1: 111-121.
- 38) Wu O, Bayoumi N, Vickers MA, Clark P. ABO (H) blood groups and vascular disease: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2008; **6**: 62-69.
- 39) Uitte de Willige S, de Visser MC, Houwing-Duistermaat JJ, Rosendaal FR, Vos HL, Bertina RM. Genetic variation in the fibrinogen γ gene increases the risk for deep venous thrombosis by reducing plasma fibrinogen γ' levels. *Blood*. 2005; **106**: 4176-4183.
- 40) de Haan HG, Bezemer ID, Doggen CJ, et al. Multiple SNP testing improves risk prediction of first venous thrombosis. *Blood*. 2012; **120**: 656-663.
- 41) Pintao MC, Ribeiro DD, Bezemer ID, et al. Protein S levels and the risk of venous thrombosis: results from the MEGA case-control study. *Blood*. 2013; **122**: 3210-3219.
- 42) McClellan J, King MC. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell*. 2010; **141**: 210-217.
- 43) Suehisa E, Nomura T, Kawasaki T, Kanakura Y. Frequency of natural coagulation inhibitor (antithrombin III, protein C and protein S) deficiencies in Japanese patients with spontaneous deep vein thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001; **12**: 95-99.
- 44) Liu HW, Kwong YL, Bourke C, et al. High incidence of thrombophilia detected in Chinese patients with venous thrombosis. *Thromb Haemost*. 1994; **71**: 416-419.
- 45) Shen MC, Lin JS, Tsay W. High prevalence of antithrombin III, protein C and protein S deficiency, but no factor V Leiden mutation in venous thrombophilic Chinese patients in Taiwan. *Thromb Res*. 1997; **87**: 377-385.
- 46) Shen MC, Lin JS, Tsay W. Protein C and protein S deficiencies are the most important risk factors associated with thrombosis in Chinese venous thrombophilic patients in Taiwan. *Thromb Res*. 2000; **99**: 447-452.
- 47) Ho CH, Chau WK, Hsu HC, Gau JP, Yu TJ. Causes of venous thrombosis in fifty Chinese patients. *Am J Hematol*. 2000; **63**: 74-78.
- 48) Chen TY, Su WC, Tsao CJ. Incidence of thrombophilia detected in southern Taiwanese patients with venous thrombosis. *Ann Hematol*. 2003; **82**: 114-117.
- 49) Tang L, Wang HF, Lu X, et al. Common genetic risk factors for venous thrombosis in the Chinese population. *Am J Hum Genet*. 2013; **92**: 177-187.

経口避妊薬と活性化プロテインC凝固制御系

小林隆夫¹⁾ 杉浦和子²⁾

Kobayashi Takao, Sugiura Kazuko

1) 浜松医療センター院長

2) 浜松医科大学健康社会医学講座

● ポイント ●

- ① 活性化プロテインC (APC) 凝固制御系と凝固系活性とのバランスが、生体内での血栓形成調節に重要な役割を果たしている。
- ② 経口避妊薬 (OC) 服用中はエストロゲンの影響により APC 凝固制御系の機能が低下する。
- ③ 先天性プロテインS (PS) 欠乏症、とくに徳島変異は日本人特有の先天性血栓性素因で、APC 凝固制御系の機能を低下させる。
- ④ OC 服用者や PS 欠乏症患者は APC 抵抗性となり、易血栓性となる。

● Key Words ●

経口避妊薬 (OC), エストロゲン, 活性化プロテインC (APC) 凝固制御系, 活性化プロテインC (APC) 抵抗性

はじめに

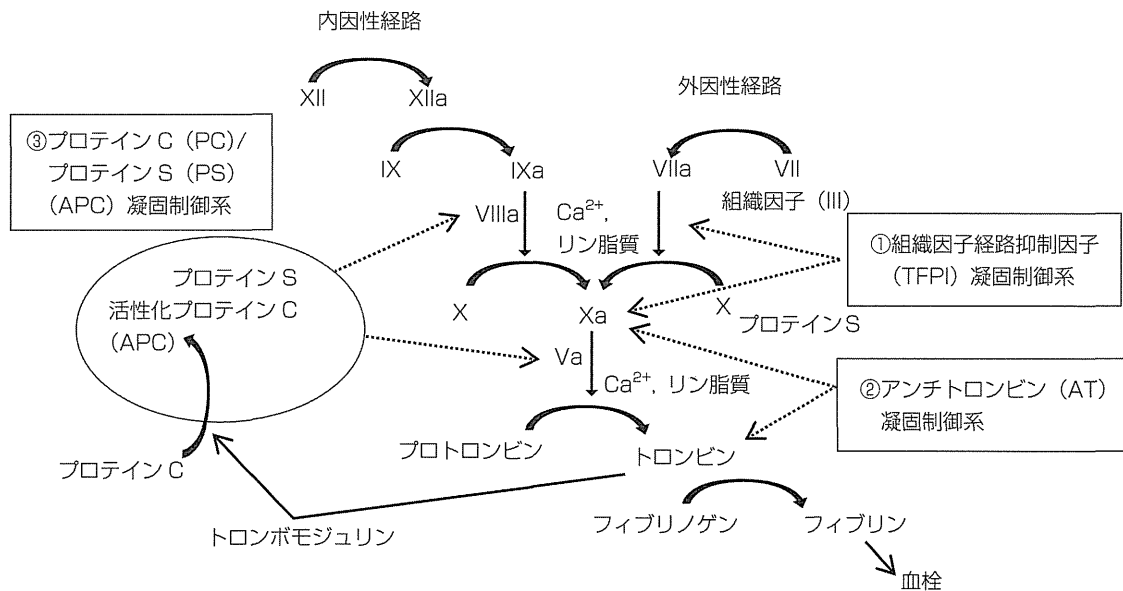
海外では経口避妊薬 (OC: oral contraceptives, 低用量ピル) として使用されている女性ホルモン剤が、2008年以降、わが国では月経困難症の治療薬 (low dose estrogen progestin: LEP) として保険適用され、その服用者は増加の一途を辿っている¹⁾。本連載「女性ホルモン剤と血栓症」シリーズ第1回目では、「女性ホルモン剤と血栓症の歴史」を紹介したが、第2回目ではOC/LEPの血栓症発症機序について最も関係があるとされる活性化プロテインC (activated protein C: APC) 凝固制御系について解説する。

生体内の血液凝固制御系

1) おもな血液凝固制御系

健康人の生体内での凝固制御系は、主として3制御系

がある。それは、① TFPI (tissue factor pathway inhibitor: 組織因子経路抑制因子) 凝固制御系、② AT (anti-thrombin: アンチトロンビン) 凝固制御系、③ APC 凝固制御系である (図1)²⁾。TFPI 凝固制御系と AT 凝固制御系は、それぞれに強力な凝固制御活性があり、TFPI 凝固制御系は“組織因子の阻害”で、AT 凝固制御系は“トロンビンおよび FXa (a は活性化血液凝固因子を意味する。以下同様) をはじめとする活性化凝固因子の阻害”を通して凝固を制御する。とくに AT はトロンビンに対するもっとも強い凝固制御系である。一方 APC 凝固制御系は、凝固系が活性化されトロンビンが形成されてはじめて動きはじめる凝固制御系で、その活性は凝固系の活性に比例して調節される。すなわち、トロンビンは凝固系の活性が亢進しすぎるとみずからネガティブフィードバックをかけて凝固系を制御し、凝固活性と凝固制御活性のバランスの調整をおこなっていると考えられる。したがって、凝固系と APC 凝固制御系



図① おもな血液凝固制御経路

TFPI : tissue factor pathway inhibitor (組織因子経路抑制因子), AT : antithrombin (アンチトロンビン), APC : activated protein C (活性化プロテイン C), PC : protein C (プロテイン C), PS : protein S (プロテイン S), Va, VIIIa などの a は、活性化血液凝固因子を意味する
(濱崎直孝, 2011²⁾ より引用して作成)

とのあいだで適切なバランスが崩れると異常な血栓形成が起こることが推測される。

2) APC 凝固制御系の機序^{3) 4)}

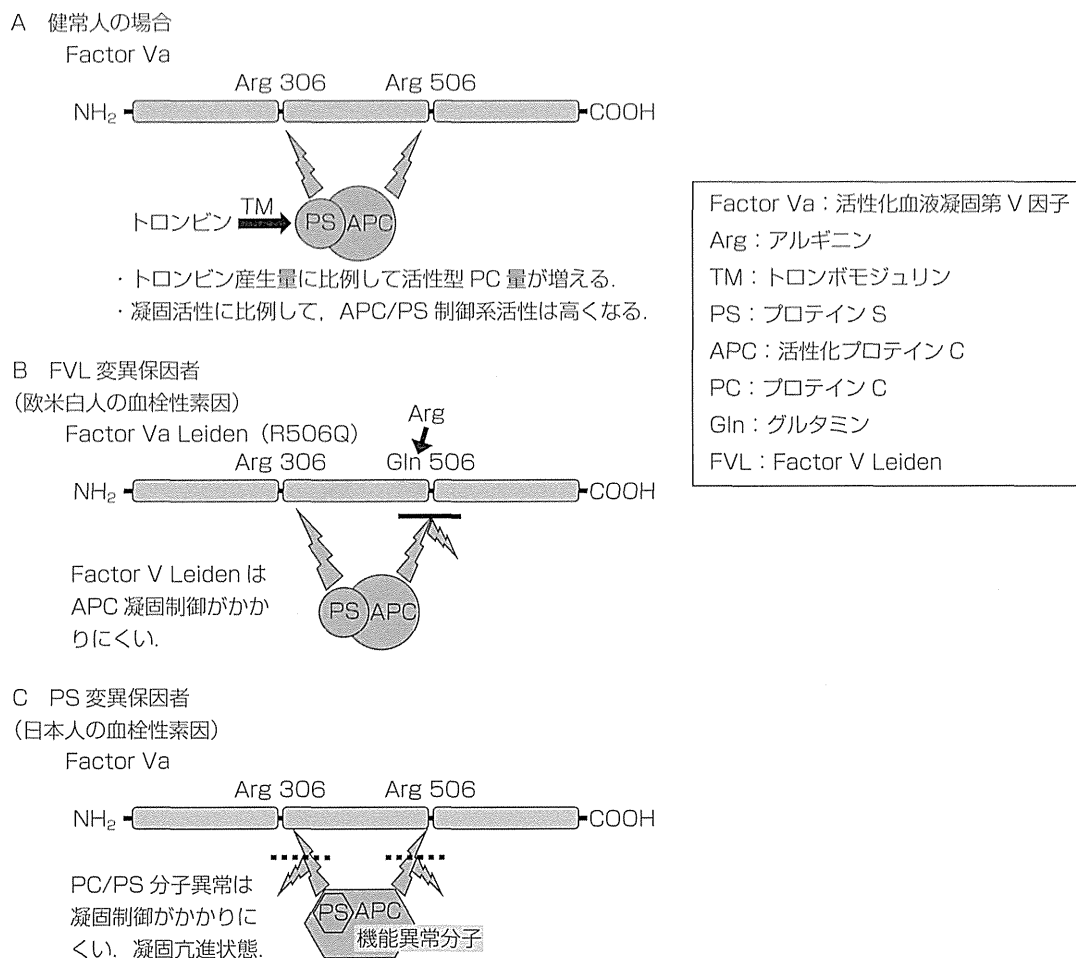
まず、健常人の場合の APC 凝固制御系の機序について説明する。プロテイン C (protein C : PC) はセリンプロテアーゼの前駆体であり、凝固系の最終産物であるトロンビン・トロンボモジュリン複合体で PC 分子の一部が切断され、その結果できた APC がセリンプロテアーゼ活性を發揮できるようになる (図② A)。しかし、APC 分子はそれだけでは十分なプロテアーゼ活性を示すことはできず、プロテイン S (protein S : PS) と結合した APC/PS 複合体を形成してはじめて十分なセリンプロテアーゼ活性 (= APC 凝固制御系) を發揮する。APC/PS 複合体は、FVa の 506 番目のアルギニンをまず切断、つぎに 306 番目のアルギニンを切断し、FVa を不活性化して凝固活性を抑制する。すなわち、PS は APC 凝固制御活性を左右する重要な因子である。

一方、欧米白人の血栓性素因である Factor V Leiden

(FVL) 変異では、第 V 因子の 506 番目のアルギニンがグルタミンに変異しているために、APC 凝固制御系では切断されなくなり、FVa の不活性化が健常人の場合よりも遅れることになる。APC 凝固制御系は、FVL 変異でも第 V 因子の 306 番目のアルギニン部分は切断可能であるので、FVa はそのうちに切断・不活性化されるが、健常人に比較して凝固制御が遅れる。その結果、FVL 変異保因者では、凝固活性が APC 凝固制御活性より相対的に強くなって過剰な血栓形成が起こり、血栓症が発症しやすくなると考えられる (図② B)。

そして PS 活性低下 (PS 変異) に代表されるアジア人、とくに日本人の血栓性素因では、図② C に示すように PS 活性が低下しているために APC 凝固制御系活性全体が低下し、凝固制御がかかりにくくなる。この場合も凝固活性が APC 凝固制御活性よりも相対的に強くなって血栓形成傾向が起こり、血栓症を発症しやすくなると考えられる。

以上のことより、欧米白人の FVL 変異保因者であっても、日本人の PS 変異保因者であっても、“凝固活性が



図② APC 凝固制御系の機序

(文献 2～4 より引用して作成)

APC 凝固制御活性よりも相対的に強くなった状態”になっていることが血栓症発症機序といえる。このような状態を APC 抵抗性という。すなわち、APC 凝固制御系と凝固系活性とのバランスが、生体内での血栓形成調節に重要な役割を果たしていることを示している。

3) プロテイン S 欠乏症

先天性 PS 欠乏症は、わが国での発症頻度は AT や PC とは異なり欧米人より高いため、アジア人、とくに日本人特有の先天性血栓性素因といえる。先天性 PS 欠乏症は、抗原量・活性値ともに減少するタイプ I、抗原量が正常で活性値のみ減少するタイプ II のほかに、遊離型 PS のみ低下するタイプ III に分けられる。通常は常染色

体優性遺伝である²⁾。なお、ホモ接合体では、新生児劇症紫斑病がみられ、予後不良である (PC も同様)。

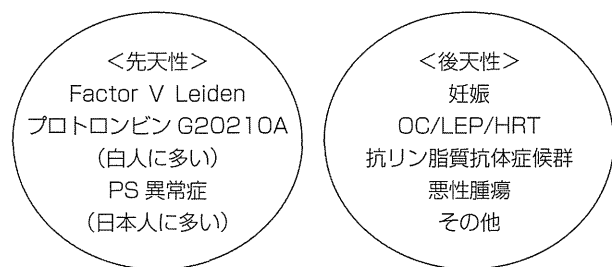
PS はビタミン K 依存性蛋白で、肝で合成される (PC も同様)。血漿中半減期は 42 時間で、遊離型が 40%、C4bBp (complement 4b-binding protein) との蛋白結合型が 60% で循環している⁵⁾。遊離型 PS のみが APC に対する co-factor としての生物作用を発揮するため、逆に C4bBp を増加させるような状況である妊娠、炎症、手術のストレスなどは PS 活性を減少させる。とくに妊娠経過とともに PS 活性は減少し、正常妊娠でも 30% 前後に低下することがある。この現象は OC/LEP 服用中も同様で、PS 活性は減少する。Suzuki らはこの機序として、エストロゲンそのものが PS の mRNA 発現を抑

制することを報告した⁶⁾。エストロゲン刺激は、ヒストンの脱アセチル化により PS 遺伝子のヒストン蛋白への結合を強固にし、その転写を抑制していること、すなわち、PS 遺伝子の down-regulation が示唆されたのである。その強さはエストロゲンの種類によって異なると思われるが、この現象によって C4bBp の増加に関係なく、妊娠初期もしくは OC/LEP 服用直後から PS 活性が低下することが説明できる。

前述したように PS は補酵素として APC がリン脂質と結合するのを強め、APC の FVa、FVIIIa に対する凝固阻害作用を促進する。また、PS は TFPI による FXa 阻害活性をも促進する。PS 遺伝子にはたくさんの遺伝子変異や多型がみられ、これらの PS 活性の多くは減少するが、血栓症をきたす可能性はおのおのでかなり異なる。

近年、日本人の PS 徳島変異 (K196E) は非常に多く、深部静脈血栓症 (deep vein thrombosis : DVT) 患者における発症頻度が欧米人の約 5~10 倍で、日本人 DVT 患者の 31% がこの変異をもっていたこと⁷⁾、および日本人における PS 徳島変異は欧米人の約 10 倍で、日本人 DVT 患者のオッズ比は 5.58 であり、日本人における血栓性素因として欧米人の FVL 変異に匹敵するものであることが明らかになった⁸⁾。PS 徳島変異は、1993 年に徳島大学と名古屋大学でほぼ同時に血栓症患者で見出された PS 分子異常である^{9) 10)}。血中に分泌された PS 分子の 196 番目のリジン (K) がグルタミン酸 (E) に変異しており、PS 活性が低下している。発見当初は K155E と呼ばれていたが、K196E と同じもので、アミノ酸番号の付け方で残基番号が違っているだけである。健常日本人の 55 名に 1 名の高頻度でヘテロ接合体として見出されている。PS 徳島変異分子をホモ接合体として保因している DVT 患者がみつまっているが、その患者の血中 PS 活性は 35% (蛋白量は 94%) であり、PS 徳島変異分子の分子活性 (= 比活性) は約 40% 弱に低下している。

今後更なる詳細な検討が必要ではあるが、PS 徳島変異と静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism : VTE) の因果関係に関しては、①日本人では、PS 徳島変異分子をヘテロ接合体で保因する健常人が 2% 弱の頻度で存在す



図④ 活性化プロテイン C (APC) 抵抗性 (activated protein C resistance)

PS : protein S (プロテイン S), OC : oral contraceptives, LEP : low dose estrogen progestin, HRT : hormone replacement therapy

(文献 11 ~ 13 より引用して作成)

ること、②その割合が DVT 患者で上昇し、オッズ比が 5.9-9.3 になることなどから、PS 徳島変異は日本人における有力な血栓性素因の一つであると考えてよい^{3) 7)~10)}。

4) APC 抵抗性と APC 感受性比

FVL 変異では第 V 因子に先天異常があるため APC による FVa の分解が遅れるが、一方の日本人でも PS の変異によりやはり第 V 因子 (FVa) の分解が遅れるので、どちらの場合にも APC 抵抗性が起こることになる。APC 抵抗性はこれら先天性血栓性素因以外に OC/LEP 服用や妊娠、抗リン脂質抗体症候群、悪性疾患などによっても後天的に起こることが報告されている (図④)^{11)~13)}。

APC 抵抗性は、内因性トロンビン産生能 (endogenous thrombin potential : ETP) にもとづく APC 感受性比 (APC sensitivity ratio : APC-sr) を測定することによって把握できる。OC/LEP 服用中や妊娠中は APC-sr が増加し APC 抵抗性となる結果、易血栓性になるものと考えられる。もちろん、APC 抵抗性のみではすぐ血栓症を発症するとはかぎらないが、いくつかの付加的リスク因子が加重することによって血栓症が発症しやすくなる。

おわりに

OC/LEP 服用中や妊娠中は PS 遺伝子の down-regu-

lation が起こるため、APC 凝固制御系の機能が低下し、易血栓性となる。今回の第3回目では、OC/LEP 服用と APC-sr の実際について紹介し、プロゲステリン世代別で VTE 発症頻度が異なる機序について考察する。

● 文 献 ●

- 1) 小林隆夫：低用量ピルによる血栓症リスク. 日本医事新報 **4690** : 60-61, 2014
- 2) 濱崎直孝：日本およびアジアにおける血栓性素因のスクリーニング. シスメックス学術, 神戸, pp.1-31, 2011
- 3) 濱崎直孝：日本人特有の血栓性素因-プロテイン S, プロテイン C 分子異常-. 日本血栓止血学会誌 **17** : 136-143, 2006
- 4) 濱崎直孝：アジア人特有な血栓性素因の研究. 長崎国際大学論叢 **8** : 275-281, 2008
- 5) Dahlbäck B *et al* : High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **78** : 2512-2516, 1981
- 6) Suzuki A *et al* : Down-regulation of *PROS1* gene expression by 17β -estradiol via estrogen receptor α (ER α)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and the corepressor-HDAC3 complex. *J Biol Chem* **285** : 13444-13453, 2010
- 7) Kinoshita S *et al* : Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem* **38** : 908-915, 2005
- 8) Kimura R *et al* : Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. *Blood* **107** : 1737-1738, 2006
- 9) Shigekiyo T *et al* : Protein S Tokushima : An abnormal protein S found in a Japanese family with thrombosis. *Thromb Haemost* **70** : 244-246, 1993
- 10) Yamazaki T *et al* : A phenotypically neutral dimorphism of protein S : the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res* **70** : 395-403, 1993
- 11) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症発症の予知と早期診断. 心臓 **45** : 924-927, 2013
- 12) Sugimura M *et al* : Detection of marked reduction of sensitivity to activated protein C prior to the onset of thrombosis during puerperium as detected by endogenous thrombin potential-based assay. *Thromb Haemost* **82** : 1364-1365, 1999
- 13) Rosing J *et al* : Oral contraceptives and venous thrombosis : different sensitivities to activated protein C in women using second- and third-generation oral contraceptives. *Br J Haematol* **97** : 233-238, 1997

女性ホルモン剤と血栓症の歴史

小林隆夫¹⁾ 杉浦和子²⁾

Kobayashi Takao, Sugiura Kazuko

1) 浜松医療センター院長

2) 浜松医科大学健康社会医学講座

● ポイント ●

- ①経口避妊薬（OC：エストロゲンとプロゲステンの合剤）と血栓症の発症数が、わが国でも近年増加傾向にある。
- ②OCが原因とされる世界初の肺塞栓症が1961年に報告され、以後エストロゲンの低用量化がはじまった。
- ③エストロゲンの低用量化にもかかわらず、プロゲステンの世代別で静脈血栓塞栓症（VTE）のリスクに差があると報告され、世界的な論争に発展した。
- ④現在では、プロゲステンの世代別でVTEリスクに差はあるもののわずかであり、リスクとベネフィットを十分に説明して処方すべきであるとされている。

● Key Words ●

経口避妊薬（OC）、エストロゲン、プロゲステン、肺塞栓症

はじめに

海外では経口避妊薬（oral contraceptives：OC、低用量ピル）として使用されている女性ホルモン剤が、2008年以降、わが国では月経困難症の治療薬（low dose estrogen progestin：LEP）として保険適用され、その服用者は増加の一途を辿っている。これらはOCとともに広く処方され、避妊のみならず月経調整、月経痛や月経過多の改善、月経前症候群の症状改善などの目的で、多数の女性に使用されている。こうしたなか、わが国ではあまり知られていなかった血栓症による死亡例が報告されたことから、厚生労働省は医療関係者などに注意喚起するよう製薬会社に指示し、現在はOC/LEPともに患者携帯カードが義務付けられるまでになった¹⁾。

本連載では、「女性ホルモン剤と血栓症」に焦点を絞って、シリーズで解説する。まず、第1回目は「女性ホルモン剤と血栓症の歴史」である。

1. OCに含まれる性ホルモン

現在OCには2種類ある。すなわち、混合型OCといわれる合成エストロゲンと合成プロゲステロン様物質（プロゲステン）が含まれているもの、もう一つはミニピルといわれるプロゲステンだけが含まれているものである。OCに含まれる合成エストロゲンとしてはエチニルエストラジオール（ethinylestradiol：EE）が最も一般的である。古くからの製剤のなかにはメストラノールという合成エストロゲンを含むものもあるが、体内でEEに変換されてから効果を発揮するので、本質的には同じものである。EEと天然型エストラジオール17β（E2）に関しては、子宮内膜に対する作用としてはE2のほうが強いが、肝臓における蛋白合成誘導に関してはEEのほうが強い。プロゲステロンに関しては、天然型はプロゲステロン、合成されたプロゲステロン様物質はプロゲステン、天然型と合成物をあわせた場合にはプロ