

特発性血栓症 / 先天性血栓性素因サブグループ研究報告

グループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学

研究分担者：宮田 敏行 国立循環器病研究センター

小林 隆夫 浜松医療センター

森下英理子 金沢大学

研究協力者：坂田 洋一 自治医科大学 / 横山 健次 東海大学

榛沢 和彦 新潟大学 / 尾島 俊之 浜松医科大学

杉浦 和子 浜松医科大学 / 根木 玲子 国立循環器病研究センター

中村 真潮 村瀬病院

グループ総括

分担研究者：小嶋 哲人

研究要旨

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診断基準ならびに診療ガイドの作成を通して、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策確立を目的とする。今年度は、特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の先天的要因である「先天性血栓性素因」の診断基準作成を行い、次年度以降に「先天性血栓性素因患者の診療ガイド」や「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイド」の作成に向けて、先天性血栓性素因についての実態調査アンケートを計画している。また、個別研究として「特発性血栓症リスク・AT resistance 検出検査法による新たな症例」、「広島豪雨土砂災害の深部静脈血栓症」、「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」、「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」、「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値におよぼす影響」の各個研究が行われた。

A．研究目的

高齢化社会を迎えた我が国において、加齢とともに増加する静脈血栓塞栓症（VTE）の日本人での発症原因と発症メカニズムを明らかにし、その予知・予防対策を確立することは急務である。本研究班では、エコノミークラス症候群としても国民から注目される特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の予知・予防のための対策確立を目的とする。人種差を認めるものの日本人にも決して少なくない特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の先天的要因となる「先天性血栓性素因」について、その診断基準ならびに診療ガイドの作成を目指す。なかでも、日本人に多い「先天性プロテイン S 欠損症」にお

ける妊娠合併症例診療ガイドや周術期治療ガイドの作成は重要な課題である。

B．研究方法

特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の誘因となる先天性血栓性素因についての政策研究を行う。具体的には、先天性血栓性素因の診断基準作成とともに、診療ガイドの策定の策定に向けての調査研究を行った。さらに各個研究については、それぞれ特発性血栓症の発症実態の把握、発症予防のための適切な診療に向けての診断法の開発やその有効性についての調査研究を行った。

（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、また、遺伝子解析研究においても「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、各施設の倫理委員会の承認を得た後に実施した。研究対象者には人権を配慮し、研究への参加は自由意思で書面にてインフォームドコンセントを得て施行した。

C . 研究結果

先天性血栓性素因の診断基準を作成した。

「特発性血栓症リスク・AT resistance (ATR)検出検査」の調査研究では、今まで原因不明とされていた 2 家系の日本人静脈血栓塞栓症患者において、血漿検体検査にて ATR と診断でき、患者 F2 遺伝子解析においていずれもプロトロンビン Belgrade 変異(c.1787G>A, p.R596Q)を検出した。

「広島豪雨土砂災害の深部静脈血栓症」の発生状況の調査では、災害の種類によらず DVT 陽性率が一般住民に比べて増加し、かつ避難所環境と関連することが示唆された。

「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」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。本法を用いて遺伝型を同定済みの検体での変異の有無を調べたところ、野生型である正常者と変異保有者と明らかに区別でき、全ての検体で変異を同定でき

た。また、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でも、野生型保有者と明確に識別が可能であった。

「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」のための調査研究では、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り、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判明した。

「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」の研究では、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。

D . 考察

数年来の本研究班活動を通した「日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせないプロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」の医療行政上の成果は、日本人での特発性血栓症での診

療・予後改善に寄与することが期待される。今年度より政策研究班となった当特発性血栓症サブグループでは、先天性血栓性素因の診断基準を作成し、その血栓症発症予防を含めた診療ガイドの作成を目指す。

今まで原因不明とされた血栓性素因の中には新しい血栓性素因である ATR が潜在するものと考えられ、開発された ATR 検出法が血漿検体を用いて解析するもので、遺伝子変異が異なる ATR も検出可能であることから、日常診療での静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用と思われる。

日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクである PS K196E 変異の有無について、血漿中の PS K196E 変異体を検出する簡便な ELISA 法の確立は、遺伝子解析を行わずに変異の同定ができる臨床的意義も大きく、本邦における血栓症の予防診療にきわめて有用と考えられる。

産科症例の解析によれば、妊娠産婦に発症する VTE では、血栓性素因を有する患者は妊娠中発症が多い傾向にあり、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 症例のうち血栓症の家族歴・既往歴は妊娠中発症例で高く、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と思われる。一方、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、さらには PS 欠乏症等の血栓性素因を有する場

合にもきわめて有用である可能性がある。

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る。また、PS の現行の遺伝子解析方法には限界があると思われる。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る。さらに、ワルファリンと同様 NOAC などが使用される場合も、PC・PS 欠損症の診断を困難にする可能性があることに留意すべきだと思われる。

E . 結論

先天性血栓性素因の診断基準を作成し、その実態調査を踏まえた日本人の特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の予知・予防対策を確立するための診療ガイドの作成は、超高齢化社会を迎えた我が国において重要な課題である。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Nishida Y, Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Minami Y, Ohnishi K, Naoe T, Murate T: Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia

- cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1839(4): 265-274, 2014.
- 2) Kato I, Takagi Y, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Nakashima T, Kojima T: A complex genomic abnormality found in a patient with antithrombin deficiency and autoimmune disease-like symptoms. *Int J Hematol*. 100: 200-205. 2014
 - 3) 高木夕希、小嶋哲人：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 *日本臨牀* 72(7), 1320-1324, 2014.
 - 4) 小嶋哲人：徹底ガイド DICのすべて2014-15 (丸藤哲編) ヘパリン類似物質 救急・集中治療 26(5-6), 887-892, 2014.
 - 5) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Sezuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, and Maruyama M: RhoF Promotes Murine Marginal Zone B Cell Development. *Nagoya J Med Sci*. 2014 Aug; 76(3-4): 293-305.
 - 6) Takagi Y, Kato I, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Kojima T: Antithrombin-resistant prothrombin Yukuhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation. *Thromb Res*. 134(4): 914-917, 2014.
 - 7) 村田萌、小嶋哲人：深部静脈血栓症に対する対策と治療 V. 出血・血栓性疾患「EBM血液疾患の治療2015-2016」金倉譲/木崎昌弘/鈴木律朗/神田善伸：編 中外医学社 東京pp 439-442, 2014.
 - 8) 小嶋哲人：新たな血栓性素因：アンチトロンビンレジスタンス *日本検査血液学会雑誌* 15(3), 289-296, 2014.
 - 9) Kovac M, Elezovic I, Mikovic Z, Mandic V, Djordjevic V, Radojkovic D, Lalic-Cosic S, Murata M, Takagi A, Kojima T: High prophylactic LMWH dose successfully suppressed hemostatic activation in pregnant woman with a new prothrombin c.1787G>A mutation. *Thromb Res*. in press.
 - 10) 榛沢和彦：深部静脈血栓症・糖尿病医療者のための災害時糖尿病診療マニュアル p68-71 日本糖尿病学会編・著 文光堂 2014
 - 11) 榛沢和彦：災害時の循環器疾患対応：災害と肺塞栓症(静脈血栓症)。*心臓* 2014, vol.46, No5, 569-573
 - 12) 榛沢和彦：災害と静脈血栓塞栓症。石丸 新 編集、新しい診断と治療のABC 86, 循環器14, 静脈血栓塞栓症、下肢静脈；p102-111 最新医学社 2014
 - 13) 榛沢和彦：震災(災害)と静脈血栓塞栓症。International Review of Thrombosis, 2014, vol. 9 No.4, 26-31
 - 14) 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
 - 15) 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
- 16) 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
- 17) 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]
- 18) 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)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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
- 25) 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/>)
- 26) 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
- 27) 小林隆夫: 検査値のみかた Dダイマ- . 最新女性医療 1(1): 52-53, 2014
- 28) 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
- 29) 小林隆夫: 癌関連血栓症患者の血栓

- 予防に関するガイドンス(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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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.
- 34) 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 (in press).
- 35) 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).
- 36) 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.
- 37) 森下英理子: 徹底ガイド DICのすべて2014-15, . 基礎病態と治療 - 血管性病変. 救急・集中治療 26(5-6): 851-855, 2014.
- 38) 森下英理子: 徹底ガイド DICのすべて2014-15, . 治療薬 - 抗線溶薬(内科系). 救急・集中治療 26(5-6):929-934, 2014.
- 39) 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.
- 40) 森下英理子: 遺伝子検査. 日本臨牀 72(7):1237-1242, 2014.
- 41) 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, 2014.

2. 学会発表

- 1) 中村友紀、村田萌、安藤裕実、加藤衣央、高木夕希、高木明、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、齋藤英彦、小嶋哲人: 血友病 B・40 家系における血液凝固第 IX 因子遺伝子解析 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大阪、平成 26 年 5 月 29-31 日 (ポスター優秀賞: P-058)
- 2) 村田萌、高木夕希、中村友紀、長谷部瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、高木明、村手隆、松下正、小嶋哲人: アンチトロンビン抵抗性検出検査法の自動凝固検査機器への最適化 第 15 回日本検査血液検査血液学会学術集会、仙台、平成 26 年 7 月 20-21 日
- 3) 村田萌、高木明、岸本磨由子、清井

- 仁、松下正、小嶋哲人：原因不明であった静脈血栓塞栓症にみられたアンチトロンビン抵抗性を示す本邦2家系目のプロトロンビン異常症 第33回日本臨床検査医学会東海・北陸支部例会、名古屋、平成26年8月2日
- 4) M Murata, Y Takagi, Y Nakamura, R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, A Takagi, T Kojima: Optimization of the antithrombin resistance assay for the automated analyzer. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 5) Y Nakamura, M Murata, Y Takagi, T Kozuka, Y Nakata, R Hasebe, A Takagi, T Matsushita, T Kojima: Precise genetic abnormalities in four hemophilia B patients with large deletions of X-chromosome including entire F9. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 6) R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: A wide variety of F8 gene abnormality of hemophilia A in Nagoya. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 7) T Kozuka, R Hasebe, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: Skewed X chromosome inactivation caused moderately severe hemophilia B in a Japanese female. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 8) T Kojima : Symposium 9 / The front line of thrombosis and hemostasis research: Antithrombin resistance. 第76回日本血液学会学術集会、大阪、平成26年10月30-11月1日
- 9) 中村友紀、村田萌、高木夕希、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、高木明、村手隆、山崎鶴夫、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人: Gene analysis in an unprecedented rare case of mild hemophilia A combined with factor V deficiency. [PS-2-264: 優秀ポスター賞] 第76回日本血液学会学術集会、大阪、平成26年10月30-11月1日
- 10) 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.
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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

- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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
- 24) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話。新潟県産婦人科医会研修会。新潟，2014.10.4
- 25) 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
- 26) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話。第 3 回女性内分泌診療研究会。大阪，2014.9.27
- 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
- 28) 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
- 29) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話。札幌市産婦人科医会学術講演会。札幌，2014.8.23
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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
- 43) 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.
- 44) 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. American Society of Hematology, December 6-9, 2014, San Francisco, USA. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-9, 2014, San Francisco, USA.

- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 森下英理子: 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)測定値の解釈ー臨床の現場からー. 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.
- 49) 森下英理子: ヘムオキシゲナーゼ-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.
- 50) 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.
- 51) 森下英理子: なぜ血は固まるの?ー血が固まらないはずの血管の中で血が固まる話ー. 世界血栓症デー日本 市民公開講座2014, 2014. 10. 13, 東京.
- 52) 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(東京), 2014. 4. 11-13.
- 53) 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, 大阪国際交流センター, 2013年5月29日~31日
- 54) 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, 仙台国際センター, 2014年7月20日~21日
- 55) 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, 仙台国際センター, 2014年7月20日~21日
- 56) 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, 大阪国際会議場, 2014年10月31日~11月2日

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（家族性 / 遺伝性）血栓性素因

< 疾患概念 >

先天性（家族性 / 遺伝性）血栓性素因は、血液凝固とその制御に関わる因子の遺伝的障害により血栓傾向を示す病態で、時に致死性となる静脈血栓塞栓症の若年発症や繰り返す再発の原因となる。静脈血栓（塞栓）症の発症原因は多因性で、発症リスクとなる先天性血栓性素因をもつ場合は、発症前でも身体的な予防的対処が望まれる。また、先天性血栓性素因の保因者では、静脈血栓（塞栓）症を一度発症すると再発リスクが高いため、身体的な予防的対処に加えて抗凝固薬投与などによる積極的な長期予防が必要な場合がある。

1. 主要項目

(1) 臨床所見

静脈血栓（塞栓）症の家系内多発、若年性（40歳以下）発症、繰り返す再発、まれな部位発症（上矢状洞静脈洞、上腸間膜静脈など）などの特徴や、まれに動脈血栓症もみられる。

(2) 血液・生化学的検査所見

生理的血液凝固阻止因子（アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S など）の活性が健常人の 50%程度 of 家族性 / 遺伝性低下を示し、診断の参考となる。この場合、ビタミン K 拮抗薬服用、肝機能障害、妊娠、女性ホルモン剤使用、ネフローゼ症候群、静脈血栓症の発症急性期、感染症などによる二次的活性低下の除外診断が必要となる。また、参考事項にあげる血液凝固とその制御に関わる因子の遺伝子解析により、確定診断を下すことができる。

(3) 除外事項

血小板障害、血管障害、血流障害、抗リン脂質抗体症候群、および悪性腫瘍に伴う血栓傾向を除く。

2. 参考事項

静脈血栓（塞栓）症の発症リスクとなる遺伝子異常が同定されている血液凝固とその制御に関わる因子の主なものを以下にあげる。

- a. 凝固阻止因子（アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 欠乏症など）
- b. 血液凝固第 V 因子（活性化プロテイン C 抵抗性）
- c. プロトロンビン（アンチトロンビン抵抗性）
- d. その他（F2 G20210A、FIX Padua など）

3. 診断基準

確実例：

血液凝固とその制御に関わる因子の遺伝子解析もしくは活性測定（複数回測定で二次的異常を除外）により、先天性（家族性 / 遺伝性）に静脈血栓（塞栓）症の発症リスクをもつと診断されるもの。

ほぼ確実例：

静脈血栓（塞栓）症を発症*、かつ以下項目の2つ以上を示すもの。

（*CT、MRI、超音波等の画像検査にて確認された無症候性のものも含む）

1. 家系内多発
2. 若年性（40歳以下）発症
3. 繰り返す再発
4. まれな静脈（上矢状洞静脈洞、上腸間膜静脈など）での発症

発性血栓症リスク・AT resistance 検出検査

研究分担者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部 教授

研究要旨

本研究班で我々は、プロトロンビン・Yukuhashi 変異 (c.1787G>T, p.R596L) による新しい静脈血栓素因・アンチトロンビン抵抗性 (AT resistance : ATR) を報告した。今回、我々は ATR 検出検査法を開発し、原因不明であった日本人 VTE 2 家系に新たな ATR 症例を同定した。症例 1 は 22 歳女性、13 歳時に VTE 発症。症例 2 は 45 歳男性、発症後内服していたワルファリンを自己中断して VTE 再発。いずれも VTE の家族歴があったが、原因は不明であった。今回の ATR 検出検査では、ともに患者由来トロンビン活性は明らかな AT による不活化不良を示し、ATR と診断された。また、F2 遺伝子解析では、ともにプロトロンビン Belgrade 変異 (c.1787G>A, p.R596Q) を検出した。これまで原因不明とされた血栓性素因の中には ATR が潜在するものと考えられ、血漿検体を用いて解析する我々の開発した ATR 検出法は簡便かつ遺伝子変異が異なる ATR も検出可能であることから、日常診療での静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用である。

A . 研究目的

我々は、長らく原因が不明であった静脈血栓塞栓症 (VTE) 家系において、発端者のプロトロンビン遺伝子に血栓症の原因となるミスセンス変異 (c.1787G>T, p.R596L : プロトロンビン Yukuhashi) を同定し、本研究班でも報告してきた。変異由来の異常トロンビンは、重要な生理的凝固抑制因子であるアンチトロンビン (AT) による不活化に抵抗性 (AT resistance : ATR) を示し凝固活性が持続するため、血栓性素因となることも判明している。また、我々は、この ATR が既存の臨床検査では検出が困難であったため、ATR 異常を血漿検体で簡便に検出する検査法を開発し、やはり本研究班で報告して来た。

今回は、我々が開発したこの ATR 検出検査法により、原因不明であった日本人

VTE 症例に新たな ATR 症例を同定したので報告する。

B . 研究方法

従来の臨床検査法では原因の特定に至らなかった VTE 発症患者血漿を用い、我々の開発した ATR 検出検査法にて ATR 異常の有無を検討した。また、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、患者の白血球よりゲノム DNA を抽出した。さらに、他施設からの検査依頼については、依頼施設での倫理審査の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、患者から採血した匿名化検体から、同じく白血球よりゲノム DNA を抽出した。各解析検体のプロトロンビン遺伝子 (F2) の全エクソンをそのイントロンとの境界領域を含めて PCR 増幅後、直接シーケ

ンス法により塩基配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守するとともに、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て解析した。

C . 研究結果

症例1 : 患者は22歳女性、13歳時に原因不明のVTEを発症した。患者家系の母方に深部静脈血栓症(DVT)の家族歴があり先天性血栓性素因が疑われたが、血栓症初発当時の各種凝血学的検査には異常がなく原因が不明であった。今回、ATR 検出検査の結果、患者血漿由来のトロンビン活性は明らかにATによる不活化不良を示しATRと診断された。患者F2遺伝子の解析では、2013年にセルビアから報告されたプロトロンビンBelgrade変異(c.1787G>A, p.R596Q)をヘテロ接合体として日本で初めて検出した(図1)。

症例2 : 45歳男性、2年前にVTEを発症してワルファリンを内服していたが、自己中断してVTEが再度した。母、兄、甥にDVT、VTEの既往があり、先天性血栓性素因が疑われたが、各種凝血学的検査に異常を認めず原因不明であった。今回、ATR 検出検査の結果、患者血漿由来のトロンビン活性は明らかにATによる不活化不良を示しATRと診断された(図2)。また、患者F2遺伝子解析では、日本で2例目のプロトロンビンBelgrade変異を検出した。

D . 考察

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

今回、従来の凝血学的検査では異常を検出できなかったVTE患者において、我々の開発した検査法にてAT-Rを検出し、F2遺伝子解析にて日本人で初めてR596Q変異、プロトロンビンBelgrade変異を2家系に同定した。この変異は現在までにセルビア人のほかインド人にも報告されており、国内外を問わず、AT-Rは原因不明のVTE患者の中に潜在しているものと考えられる。

このAT-R検出検査法は、患者由来トロンビン活性のアンチトロンビンによる不活化動態を評価する方法であり、ワルファリン服用中での検体においても解析が可能であることよりその利便性が高く、実臨床においても有用な検査法であると考えられる。

E . 結論

今まで原因不明とされた血栓性素因

の中には ATR が潜在するものと考えられる。我々の開発した ATR 検出法は血漿検体を用いて解析するもので、遺伝子変異が異なる ATR でも検出可能であることから、日常診療での静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用である。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Nishida Y, Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Minami Y, Ohnishi K, Naoe T, Murate T: Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1839(4): 265-274, 2014.
- 2) Kato I, Takagi Y, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Nakashima T, Kojima T: A complex genomic abnormality found in a patient with antithrombin deficiency and autoimmune disease-like symptoms. *Int J Hematol*. 100: 200-205. 2014
- 3) 高木夕希、小嶋哲人: 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 *日本臨牀* 72(7), 1320-1324, 2014.
- 4) 小嶋哲人: 徹底ガイド DICのすべて2014-15 (丸藤哲編) ヘパリン類似物質 救急・集中治療 26(5-6), 887-892, 2014.
- 5) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Sezuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, and Maruyama M: RhoF Promotes Murine Marginal Zone B Cell Development. *Nagoya J Med Sci*. 2014 Aug; 76(3-4): 293-305.
- 6) Takagi Y, Kato I, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Kojima T: Antithrombin-resistant prothrombin Yukuhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation. *Thromb Res*. 134(4): 914-917, 2014.
- 7) 村田萌、小嶋哲人: 深部静脈血栓症に対する対策と治療 V. 出血・血栓性疾患「EBM血液疾患の治療2015-2016」金倉譲/木崎昌弘/鈴木律朗/神田善伸: 編 中外医学社 東京pp 439-442, 2014.
- 8) 小嶋哲人: 新たな血栓性素因: アンチトロンビンレジスタンス *日本検査血液学会雑誌* 15(3), 289-296, 2014.
- 9) Kovac M, Elezovic I, Mikovic Z, Mandic V, Djordjevic V, Radojkovic D, Lalic-Cosic S, Murata M, Takagi A, Kojima T: High prophylactic LMWH dose successfully suppressed hemostatic activation in pregnant

woman with a new prothrombin c.1787G>A mutation. Thromb Res. in press.

2. 学会発表

- 1) 中村友紀、村田萌、安藤裕実、加藤衣央、高木夕希、高木明、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、齋藤英彦、小嶋哲人：血友病 B・40 家系における血液凝固第 IX 因子遺伝子解析 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大阪、平成 26 年 5 月 29-31 日 (ポスター優秀賞：P-058)
- 2) 村田萌、高木夕希、中村友紀、長谷部瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、高木明、村手隆、松下正、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性検出検査法の自動凝固検査機器への最適化 第 15 回日本検査血液検査血液学会学術集会、仙台、平成 26 年 7 月 20-21 日
- 3) 村田萌、高木明、岸本磨由子、清井仁、松下正、小嶋哲人：原因不明であった静脈血栓塞栓症にみられたアンチトロンビン抵抗性を示す本邦 2 家系目のプロトロンビン異常症 第 33 回日本臨床検査医学会東海・北陸支部例会、名古屋、平成 26 年 8 月 2 日
- 4) M Murata, Y Takagi, Y Nakamura, R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, A Takagi, T Kojima: Optimization of the antithrombin resistance assay for the automated analyzer. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 5) Y Nakamura, M Murata, Y Takagi, T Kozuka, Y Nakata, R Hasebe, A Takagi, T Matsushita, T Kojima: Precise genetic abnormalities in four hemophilia B patients with large deletions of X-chromosome including entire F9. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 6) R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: A wide variety of F8 gene abnormality of hemophilia A in Nagoya. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 7) T Kozuka, R Hasebe, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: Skewed X chromosome inactivation caused moderately severe hemophilia B in a Japanese female. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 8) T Kojima : Symposium 9 / The front line of thrombosis and hemostasis research: Antithrombin resistance. 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪、平成 26 年 10 月 30-11 月 1 日
- 9) 中村友紀、村田萌、高木夕希、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、高木明、村手隆、山崎鶴夫、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人：Gene analysis in an unprecedented rare case of mild hemophilia A combined with factor

V deficiency. [PS-2-264 : 優秀ポ
スター賞] 第 76 回日本血液学会学
術集会、大阪、平成 26 年 10 月 30-11
月 1 日

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし。

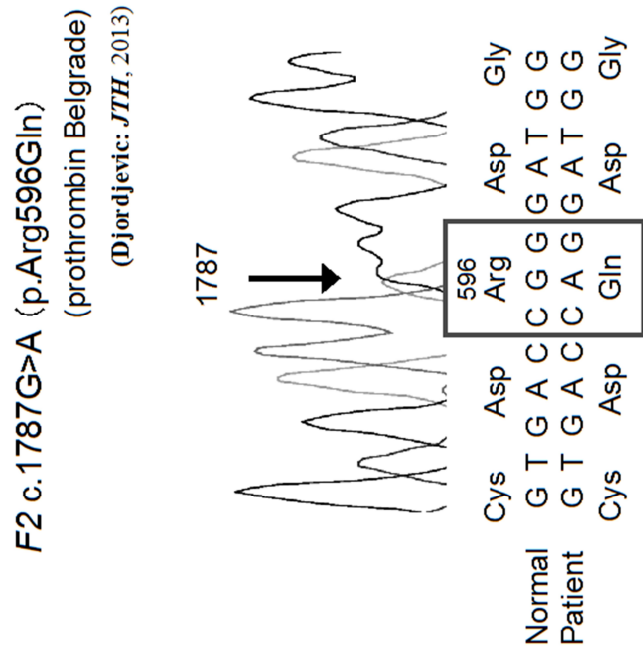
2 . 実用新案登録

なし。

3 . その他

なし。

図1. 症例1のATR解析, F2 遺伝子解析



残存トロンビン活性 (%)

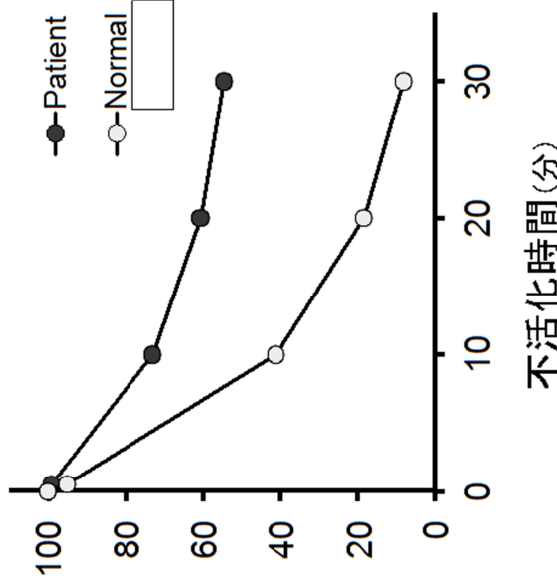
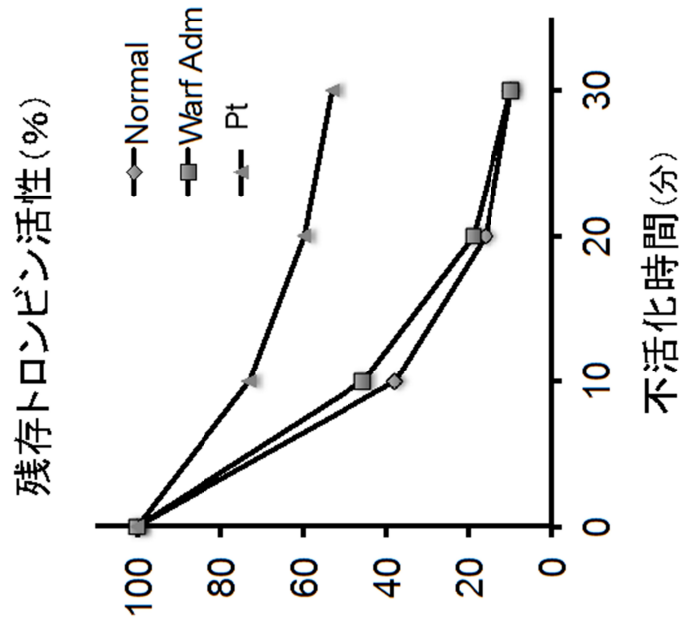
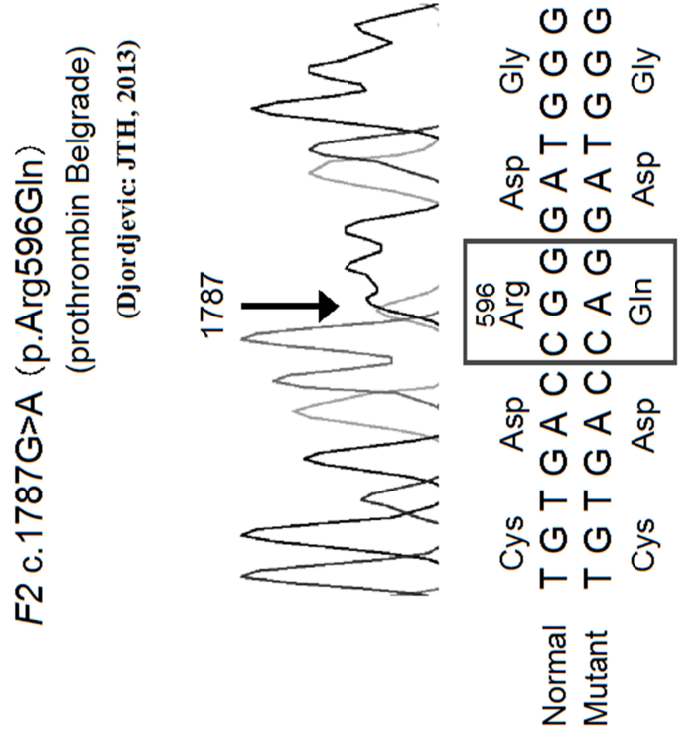


図2. 症例2のATR解析. F2 遺伝子解析



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

の先天性異常があげられる。

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
かったが、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った。

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見ると、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12μg/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療
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
- ー. 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. 日本臨床 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オーシス学会学術講演会ランチオンセミナー. 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～. COVIDIEN 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、AT 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)、PC 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) PS 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 DiXal (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， 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， 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 - 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

