

**先天性アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS欠乏症の
遺伝子変異同定率・臨床症状・
検査所見、ならびに直接型経口抗凝固薬が活性測定値におよぼす影響に関する研究**

研究分担者 森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 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 助教

研究要旨

本研究により、先天性 AT、PC、PS 欠乏症は、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ことが明らかとなった。遺伝子変異同定率は AT 欠乏症が約 9 割と高く、遺伝子解析は確定診断の手法として有用である。一方、PC および PS 欠乏症の変異同定率は 4~5 割前後ときわめて低く、その原因としてワルファリン内服、妊娠、急性期の採血による二次的な活性低下の症例が混入してしまっている可能性が考えられた。今後、診断の精度を高めるためには、二次性活性低下症例を適切に除外する方法を検討する必要がある。

また、AT 欠乏症 型と 型 HBS では血栓リスクが異なるため、診断時にサブタイプまで分類する必要がある。 型 HBS は若年性血栓症のリスクにはなりにくい、60 才以上では血栓症発症に注意が必要と思われる。 型では妊娠が主要な血栓リスクとなるため、妊娠・分娩・産褥期の管理に関する診療ガイドラインの作成が早急に必要であろう。

近年、静脈血栓塞栓症の治療に直接型経口抗凝固薬(DOAC)を使用する症例が増加している。先天性血栓性素因のスクリーニングにおいて、患者がすでに DOAC を服用している場合、AT、PC、PS 活性値が偽高値になり先天性欠乏症を見逃す可能性があるため、なるべく血中濃度の低いタイミングで採血する、などの対処が必要である。

A . 研究目的

昨年度は先天性血栓性素因の診断基準を作成し、「指定難病」の申請を行った。今後はこの作成した診断基準の有用性を検証し、より適切な基準へ改善していく必要がある。そのためには、遺伝子異常が明らかとなり確定診断がついた症例の臨床症状、検査所見などを詳細に検討したり、活性測定法に影響する要因について検討することは意義がある。今年度は、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)欠乏症患者について、血栓症状、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、直接型経口抗凝固薬(DOAC)内服患者では、PC・PS・AT活性値が偽高値になることを以前報告している。これは、血栓性素因の原因検索の際に診断を見落とす可能性があり、きわめて重要な問題である。そこで、今年度はさらに検査試薬の違いにより偽高値の程度は異なるのか、AT、PC、PS低値血漿がリバーロキサバンの共存により活性値が正常範囲には

いってしまうのか、リバーロキサバン高値血漿を希釈すると真値が得られるのか、の3点について検討した。

B. 研究方法

(1) 先天性凝固阻止因子欠乏症患者の総括

先天性 AT、PC、PS 欠乏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、158 家系 229 症例 (AT : 28 家系 51 症例、PC : 54 家系 79 症例、PS : 76 家系 99 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策した。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) リバーロキサバンが AT・PC・PS 活性に及ぼす影響

a) リバーロキサバン内服心房細動 (af) 患者 7 例 (男性 4 例、女性 3 例、年齢中央値 72 歳 (年齢幅 : 53 ~ 83 歳) を対象とし、内服開始前、内服開始から 2 週間後、3 ~ 8 週間後の 3 ポイントで採血した検体合計 21 検体を測定に用いた。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 AT3 (Xa 法) (積水メディカル)、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)、Hemoclot Protein C (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)、合成基質法 1 試薬 ; 総プロテイン S 活性 “シノテスト” (シノテスト) を用いた。また、リバーロキサバンの血中濃度測定試薬は、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。

b) 次に、市販の正常血漿、および正常血漿を生理食塩水で 3 倍に希釈し模擬的に AT、PC、PS 活性値が 30% 程度に低下した血漿を作成し、そこにリバーロキサバンを終濃度 0 ~ 1000 ng/ml になるよう添加して、AT、PC、PS 活性値を測定した。

c) さらに、リバーロキサバンの影響で偽高値となった検体を、希釈することにより真値に近い値が得られるかどうかについて検討した。対象は、リバーロキサバン内服患者 6 名で、内服開始前、内服開始後、内服開始後の検体を生理食塩水で 2、4、8 倍に希釈したものの AT 活性および PS 活性を測定した。

(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乏症患者の総括

88 家系 129 症例に遺伝子変異を認め、変異同定率は AT 89%、PC 56%、PS 43% であった。血栓症初発年齢の中央値は、AT 欠乏症では 20 歳代と若年であるのに対し、PC・PS 欠乏症は 40 歳代前後と中年

であった。臨床症状は主に静脈血栓症であり、全ての欠乏症において深部静脈血栓症(DVT)・肺塞栓(PE)が約50-60%を占め、次いで脳静脈洞血栓症が10-20%を占めた。PC欠乏症では、脳梗塞などの動脈血栓症が約20%認められ、ATおよびPS欠乏症と比較して明らかに多かった。

また、AT欠乏症はⅠ型の約9割がDVT/PE、あるいは脳静脈洞血栓症を発症しているのに対して、Ⅱ型ヘパリン結合部位異常(HBS)のタイプでは5例中3例が無症状であった。また、AT欠乏症は妊娠を契機に血栓症を起こした症例が半数を占め、最も多かった。

(2) リバーロキサバンがAT・PC・PS活性に及ぼす影響

a) リバーロキサバン内服下では、トロンビン阻害活性によるAT活性値は全く影響を受けなかったが、FXa阻害活性によるAT活性値は濃度依存的に偽高値となった。PS活性は凝固時間法による試薬では1~2.5倍程度偽高値となったが、合成基質法は影響を受けなかった。PC活性は、凝固時間法の2試薬とも1.4倍程度偽高値となった。以上、リバーロキサバンによる偽高値の程度は、項目および試薬により異なった。

b) 正常血漿、および3倍希釈血漿の両方において、AT、PC、PSのすべてが添加したリバーロキサバン濃度と一致して偽高値になった。AT活性値は、リバーロキサバン600 ng/mlの存在下で、本来30%であるはずのAT活性値が正常範囲となった。また、PS活性値はリバーロキサバン200 ng/mlで正常範囲となった。PC活性値は、リバーロキサバン1000 ng/mlまで正常範囲に入ることはなかった。

c) 内服開始後の検体を2倍、4倍、8

倍に希釈しても、AT活性およびPS活性は偽高値のままであり、補正されなかった。

D. 考察

本研究により、先天性AT、PC、PS欠乏症は、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ことが明らかとなった。遺伝子変異同定率はAT欠乏症が約9割と高く、遺伝子解析は確定診断の手法として有用である。一方、PCおよびPS欠乏症の変異同定率は4~5割前後ときわめて低く、その原因としてワルファリン内服、妊娠、急性期の採血による二次的な活性低下の症例が混入してしまっている可能性が考えられた。今後、診断の精度を高めるためには、二次性活性低下症例を適切に除外する方法を検討する必要がある。

また、AT欠乏症Ⅰ型とⅡ型HBSでは血栓リスクが異なるため、診断時にサブタイプまで分類する必要がある。Ⅱ型HBSは若年性血栓症のリスクにはなりにくいが、60才以上では血栓症発症に注意が必要である。Ⅰ型では妊娠が主要な血栓リスクとなるため、妊娠・分娩・産褥期の管理に関する診療ガイドラインの作成が今後必要である。

先天性血栓性素因のスクリーニングにおいて、患者がすでにリバーロキサバンを服用している場合は、AT、PC、PS活性値が偽高値になり、欠乏症を見逃す可能性があるため、なるべく血中濃度の低いタイミングで採血する、などの対処が必要である。

E. 結論

先天性AT・PC・PS欠乏症は、遺伝子変

異同定率、血栓症初発年齢、症状、家族歴、などがそれぞれ異なっており、個々の疾患の特徴をよく理解し診療にあたるのが、再発予防あるいは家系内保因者の血栓予防において重要である。

また、AT、PC、PS 活性値は DOAC の内服により偽高値になり、欠乏症の存在を見逃す可能性があることを周知させ、対応としては血中濃度が低くなる時間帯に採血をすることを推奨する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniguchi F, Morishita E, Sekiya A, Nomoto H, Katsu S, Kaneko S, Asakura H, Ohtake S. Gene analysis of six cases of congenital protein S deficiency and functional analysis of protein S mutations (A139V, C449F, R451Q, C475F, A525V and D599TfsTer13. *Thromb Res.* 151: 8-16, 2016
- 2) Sekiya A, Taniguchi F, Yamaguchi D, Kamijima S, Kaneko S, Katsu S, Hanamura M, Takata M, Nakano H, Asakura H, Ohtake S, Morishita E. Causative genetic mutations for antithrombin deficiency and their clinical background among Japanese patients. *Int J Hematol.* Nov: 17, 2016
- 3) Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, Shibayama M, Tsuda T, Jin X, Nomoto H, Asakura H, Wada T, Ohtake S, Morishita E. Thrombosis prediction

based on reference ranges of coagulation-related markers in different stages of pregnancy. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis.* 10: DOI 1177, 2016

- 4) Kagami K, Yamazaki R, Minami T, Okumura N, Morishita E, Fujiwara H: Familial discrepancy of clinical outcomes associated with fibrinogen Dofen: A case of huge genital hematoma after episiotomy. *J Obstet Gynaecol Res.* 42(6):722-725, 2016
- 5) Kadohira Y, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Nakao S, Asakura H: A case of aortic aneurysm-associated DIC that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban. *Int Med.* In press, 2016
- 6) 本木 由香里, 野島 順三, 吉田 美香, 關谷 暁子, 原 和冴, 森下 英理子, 家子 正裕. ELISAによる抗リン脂質抗体価測定の標準化に向けて. *日本血栓止血学会誌*, 27(6):644-652, 2016
- 7) 森下英理子, 林朋恵: 血栓性血小板減少性紫斑病, *検査と技術*, 44(11): 1080-1087, 2016.
- 8) 森下英理子: フォンウィルブランド因子の臨床検査, *BIO Clinica*, 31(6):39-43, 2016
- 9) 森下英理子: 「質疑応答 プロからプロへ」不育症例に対する抗凝固療法と対応, *日本医事新報*, 8月12日号, 4816, 2016
- 10) 森下英理子: 最新情報と今後の展望 2016 (血小板・凝固・線溶系疾患)

オーバービュー，臨床血液 57(3):
307, 2016

- 11) 森下英理子：その他の先天性凝固異常症・線溶異常症，『血液疾患最新の治療2017-2019』（編集：小澤敬也，中尾眞二，松村到），南江堂，東京，242-247，2017
- 12) 森下英理子：深部静脈血栓症・肺塞栓症の発症機序と危険因子．日本医師会雑誌 平成29年4月号特集（印刷中）
- 13) 森下英理子：繰り返す静脈血栓症，『むかしの頭で診ていませんか？血液診療をスッキリまとめました』，南江堂，東京，2017（印刷中）
- 14) 森下英理子：静脈疾患の検査，『動脈・静脈の疾患（上）- 最近の診断・治療動向 - 』，日本臨床 2017年5月増刊（印刷中）

2. 学会発表

- 1) Morishita E, Takata M, Akiyama M, Miyata T, Takagi A, Kojima T, Sekiya A, Taniguchi F: Asymptomatic dysprothrombinemia (Prothrombin Himi) with p.M380T and p.R431H shows severely reduced clotting activity, moderate antithrombin resistance and severe thrombomodulin binding defect. 58th American Society of Hematology Annual Meeting. 2016.12.3-6, San Diego
- 2) 森下英理子：先天性血栓性素因．第38回日本血栓止血学会学術集会（教育講演），奈良春日野国際フォーラム 薨，2016年6月16～18日，奈良．
- 3) 森下英理子：静脈血栓症の成因と治療 悪性腫瘍から先天性血栓性素因 - ，印旛沼エリア循環器セミナー，ウィシュトンホテル・ユーカーリ，2016年6月23日，佐倉．
- 4) 勝詩織，關谷暁子，金子将ノ助，朝倉英策，大竹茂樹，森下英理子：先天性AT欠乏症24家系の臨床所見ならびに遺伝子変異部位の検討，第38回日本血栓止血学会学術集会，奈良春日野国際フォーラム 薨，2016年6月16～18日，奈良
- 5) 森下英理子：静脈血栓症の成因と治療，第17回日本検査血液学会学術集会ランチョンセミナー，福岡国際会議場，2016年8月7日，福岡．
- 6) 關谷暁子，鈴木健史，三澤絵梨，末武 司，古莊浩司，林研至，朝倉英策，大竹茂樹，森下英理子：直接経口抗凝固薬が血中アンチトロンビン，プロテインC，プロテインS活性値に与える影響，第17回日本検査血液学会学術集会，福岡国際会議場，2016年8月6日～7日，福岡．
- 7) 本木由香里，吉田美香，關谷暁子，原 和牙，家子正裕，森下英理子，野島順三：抗リン脂質抗体価測定ELISAの標準化に向けた取組み，第17回日本検査血液学会学術集会，福岡国際会議場，2016年8月6日～7日，福岡．
- 8) 沼波仁，飯嶋真秀，鈴木基弘，金澤俊郎，田中宏明，横田隆徳，森下英理子：右内頸動脈閉塞による脳梗塞と多発性深部静脈血栓症をきたしたプロテインS異常症の41歳女性例．第218回日本神経学会関東・甲信越地方会，2016年9月3日，東京
- 9) 上島沙耶香，關谷暁子，仲里朝周，

- 金子将ノ助，勝詩織，花村美帆，高田麻央，中野明華，大竹茂樹，森下英理子：先天性アンチトロンビン欠乏症の遺伝子解析および異常アンチトロンビン蛋白(N87D)の機能解析，第41回北陸臨床病理集談会，福井赤十字病院，2016年9月10日，福井
- 10) 金子将ノ助，關谷暁子，勝詩織，上島沙耶香，花村美帆，中野明華，大竹茂樹，森下英理子：先天性アンチトロンビン欠乏症 25 家系の臨床所見ならびに遺伝子変異部位の検討，第41回北陸臨床病理集談会，福井赤十字病院，2016年9月10日，福井
- 11) 花村美帆，關谷暁子，上島沙耶香，勝詩織，金子将ノ助，中野明華，大竹茂樹，森下英理子：当研究室で実施したプロテイン C およびプロテイン S 遺伝子解析の総括，第41回北陸臨床病理集談会，福井赤十字病院，2016年9月10日，福井
- 12) 金秀日，津田友秀，森下英理子，關谷暁子，康東天，濱崎直孝：プロテイン S 比活性によるプロテイン S 異常症のスクリーニング．第48回日本臨床検査自動化学会，パシフィコ横浜，2016年9月21日～23日，横浜
- 13) 金森尚美，古莊浩司，關谷暁子，高島伸一郎，加藤武史，村井久純，薄井莊一郎，林研至，森下英理子，高村雅之：抗凝固療法が先天性凝固異常のスクリーニング検査に与える影響．第64回日本心臓病学会学術集会，東京国際フォーラム，2016年9月23日～25日，東京
- 14) 森下英理子：血栓止血領域の診療ガイド．先天性血栓性素因，第78回日本血液学会学術集会(シンポジウム)，横浜パシフィコ 2016年10月14日，横浜．
- 15) 本木由香里，吉田美香，關谷暁子，原 和冴，家子正裕，森下英理子，野島順三：日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて-第3報-，第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム，野村コンファレンスプラザ日本橋，2017年1月21日，東京
- 16) 森下英理子：基礎から学ぶ血液凝固異常症，血液・凝固セミナー，日本医科大学附属病院セミナー室，2017年2月20日，東京．

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし