

## 日本人特有の血栓性素因：九州大学病院検査部の成果

濱崎，直孝  
九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野九州大学病院検査部

<https://doi.org/10.15017/19315>

---

出版情報：福岡醫學雜誌. 97 (1), pp.1-7, 2006-01-25. 福岡医学会  
バージョン：  
権利関係：



---

---

## 総 説

---

---

### 日本人特有の血栓性素因 —九州大学病院検査部の成果—

九州大学大学院医学研究院臨床検査医学分野

九州大学病院検査部

濱 崎 直 孝

#### はじめに

単一の遺伝子異常が疾病発症と直接的に結びつく疾患（単因子疾患：monogenic disease）、例えば、ヘモグロビン異常症や血友病など、については疾病と遺伝子異常については詳細に検討されてきた。しかしながら、1983年にポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction；PCR）がK.B.Mullisによって考案されて以来、遺伝子の研究は飛躍的に発展し、今日ではヒトの全遺伝子が明らかにされた<sup>1)</sup>。このような状況になり遺伝情報が蓄積してくると、ある特定の遺伝子異常が疾病発症に直接的には結びつかなくても、ある種の体質的要因（遺伝的要因）があると生活習慣や環境要因で疾病発症が誘発される事例などが徐々に明らかにされつつある。最近、盛んに行われている一塩基変異多型（single nucleotide polymorphism, SNP）の検索と疾病との関係を明らかにしようとする研究は、このような背景のもとで行われている。このような種類の疾病は、問題となる遺伝子に変異がみられても、必ずしも発症するとは限らず、発症頻度が変異を持っていない人に比べて発症の危険性が高くなるものである。このような疾病を多因子疾患（polygenic disease）とよんでいる。血栓症は多因子疾患である。九州大学病院検査部では、血栓症あるいは血栓症疑い患者の病因解析を目的として、遺伝子診断検査について凝固系あるいは凝固制御系の機能異常に関わる因子の遺伝子検査を過去10年余りに亘って行って来ている。その10年余りの解析成果で、我々が明らかにすることが出来たことは「日本人血栓症の病因は白人血栓症の病因とは明らかに異なる」ということである。ここでは、九州大学病院検査部で行われたこれまでの成果の概略をする。

#### 1. 血栓症の分類

血栓症とは血栓止血機序亢進による病気である。血管閉塞と言えば心筋梗塞や脳梗塞がすぐに頭に浮かんでくるが、このような疾患だけでなく様々な病気の主要な原因が血管の閉塞であることが明らかにされつつある。現在は、血栓が形成された部位によって区別し、その部位が静脈か動脈か微小血管なのかで大別され、それぞれ、静脈性血栓症、動脈性血栓症、微小循環血栓症に分類されている。

#### 2. 解析の方法

血栓症の病因を解析するには、本来、血漿因子だけではなく血管内皮、血小板機能などもっと幅広く総合的な解析が必要であるが、取りあえず、血漿成分についてのみ解析を行ってきた。詳細は別途文献<sup>2)</sup>を参照頂きたい。血栓形成機序亢進の原因として考えられるのは、(i)凝固因子の亢進、(ii)凝固制御因子の低下、(iii)線溶因子の低下、(iv)線溶制御因子の亢進、であり、これらに注目して検査を系統的に行い、異常が示唆された因子に対しては、患者の同意が得られた場合は遺伝子検査を行っている。

---

Naotaka HAMASAKI

Department of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Graduate School of Medical Sciences Kyushu University  
Japanese Thrombophilia —A Fruit from Clinical Chemistry and Laboratory Medicine in Kyushu University—

### 3. 遺伝子検査の概要

臨床検査としての遺伝子検査はほぼ例外なく PCR で増幅したサンプルを用いる。用いた遺伝子検査は遺伝子の塩基配列検査が主な目的で、その手段として PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP (PCR-single-strand conformation polymorphism), RT-PCR (reverse transcription PCR) や直接塩基配列決定法 (PCR-direct sequencing) などがある。

血栓症発症要因は様々なものが考えられるが、前述のごとく、我々は血漿中の凝固関連因子に限って検索を行った。まず、関連因子の血漿中の活性を測定し、活性低下を呈する因子が見つかったら、それをコードする遺伝子の全エクソンとエクソン/イントロン境界領域の全ての塩基配列を PCR 法で直接的に決定することで検索した。特定部位の異常を解析する時には、PCR-RFLP や PCR-SSCP は短時間に大量の検体を処理できるので有力な解析手法になるが、部位が特定できない場合は PCR 産物から直接塩基配列を決定するのが結果的には早道である。

### 4. 凝固制御因子活性低下と血栓症

解析を開始して約 10 年余で 1280 名の患者を検査した。この中で、明らかに血栓症である患者は 686 名 (平成 16 年 7 月現在) であった。この時点での患者の内訳は、静脈性血栓症 217 症例、動脈性血栓症 252 症例、その他の血栓症 217 症例である<sup>3)</sup>。静脈性血栓症は血栓の形成を何らかの形で証明できたものを、動脈性血栓症は臨床診断にしたがい、その他の血栓症は微小循環血栓症など血栓形成機能亢進が病因と推測される症例で静脈性でも動脈性でもないものを分類した。血漿成分のみの分析でも予想外に多くの症例について、病因と思われる因子異常を同定できた。主要な凝固制御系因子 Protein S, Protein C, Antithrombin の基準範囲と活性低下の定義を表 1 に示す。検索した全症例 (686 症例) の約 20% (121 症例) について Protein S 活性の低下が見出された。健常人では 126 名調べて 1 名のみが Protein S 活性低下を示しているため、凝固制御系因子の活性低下、特に、Protein S 活性低下が血栓症発症の危険因子になっていることが推測される。

### 5. 深部静脈血栓症についての解析<sup>3)</sup>

病因解析を行う場合、病名の診断が明確でないと解析が正しく行われなくなる。そこで、我々は確定診断を画像診断で確認できる深部静脈血栓症に限って、さらに詳細な解析を行った。我々のところで検索できた深部静脈血栓症は 85 症例である。その男女比並びに初発年齢の分布を表 2 に示す。併せて、表 2 には基準範囲などを決定するのに協力頂いた健常人の男女比、年齢分布も示す。深部表脈血栓症の初発年齢は予想外に若く、男女ともに 20-30 歳代にピークがあり、30 歳代以下の患者が 60% を占めるのは驚き

表 1 Criteria for Reduced Activity

Items	Reference intervals (mean±2SD)	Criteria for the reduced activity (low mean-3SD)	Number of healthy individuals examined	Healthy individuals having reduced activity
Protein S (PS)	M: 73-121% F: 59-128%	M: below 61% F: below 50%	126 (M: 73) (F: 53)	1 (M: 0) (F: 1)
Protein C (PC)	75-131%	below 61%	95	1
Antithrombin (AT)	80-120%	below 70%	95	0

M: male; F: female

- two-standard deviations (2SD) and three-standard deviations (3SD) from the mean were determined using data from healthy subjects transformed by the parametric minimal skewness method.
- A level within 2SD was regarded as the reference interval, and a level below -3SD was defined as reduced activity in this study.

表 2 深部静脈血栓症 (DVT) 患者発症時年齢分布

Table 1. Age distribution

	Age	<10	10-	20-	30-	40-	50-	60-	70-	80-	M	F
			19	29	39	49	59	69	79	89	All	All
Healthy individuals	M	0	0	30	28	6	8	1	0	0	73	
	F	0	0	18	8	11	14	2	0	0		53
Deep vein thrombosis (age of the first thrombosis)	M	1	9	9	11	6	5	7	1	0	45	
	F	0	2	9	10	7	3	5	2	0		40

M: male; F: female

初発年齢：20-30 歳代にピーク

文献：Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

であった。このことは、深部静脈血栓症発症には体質的要因（遺伝的要因）が強く関与していることを示唆している。

### 6. 深部静脈血栓症患者と Protein C/Protein S 凝固制御系活性低下

深部静脈血栓症患者における凝固制御系活性低下を示している実数を表 3 に示す。ここに示している他に Heparin Cofactor なども測定しているが活性低下を示した症例はなかった。この表で判るようにプロテイン S, プロテイン C 活性低下がある患者が非常に多いのが特徴的である。特に、プロテイン S 活性低下の頻度が高い。

### 7. 深部静脈血栓症患者と遺伝子異常

凝固制御系活性低下をきたしている症例に関して、遺伝子検査の同意を得られた場合はその因子の全遺伝子配列を検索した。その結果を表 4 に示す。プロテイン S では 19 症例に、プロテイン C では 8 症例に、アンティトロンビンでは 2 症例について遺伝子異常が見い出された。日本人の深部静脈血栓症患者 (85 名) の中でプロテイン S 遺伝子異常を呈する症例は 19 症例, 22% の高頻度であることが判明した。この頻度は欧米の報告の 5-10 倍の高頻度である。プロテイン C 分子異常も 8 症例, 9% と欧米の報告よりも 2 倍ほど高い。アンティトロンビン分子異常は 2 症例, 2.3% でこの頻度は欧米の頻度と同等である (文献 11 参照)。

我々はこれら異常分子を HEK 293 細胞に発現して、それぞれの異常因子と患者の活性低下の因果関係を調べている<sup>4)~10)</sup>。その結果は分子異常が活性低下を説明でき、血栓症発症の一つの要因と考えて良いと考えられる症例がほとんどである。

表 3 深部静脈血栓症患者と PS, PC, AT 活性低下

Type of thrombosis	Examined patients	Number of patients having reduced activities of PS and/or PC	Number of patients having reduced activities of		
			PS	PC	AT
Number of DVT patients	85	49*	40	27	6
		(18 patients having reduced activities of PS and PC)			
DVT alone	55	30	23	16	2
DVT with PE	23	14	13	8	2
DVT with mesenteric venous thr.	1	1	1	0	0
DVT with portal vein thr.	6	4	3	3	2

thr: thrombosis, AT: antithrombin, PC: protein C, PS: protein S

DVT: deep vein thrombosis, PE: pulmonary embolism.

Protein C / Protein S 凝固制御系の活性低下, 特に, Protein S の活性低下があると考えられる症例が多いのが目立つ  
文献：Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

## 8. Protein C/Protein S 凝固制御系異常と Factor V Leiden (R506Q)

白人血栓症患者の主要な病因は Protein C/Protein S 凝固制御系に抵抗性の第 V 因子異常分子 (Factor V Leiden, R506Q) である<sup>11)</sup>。この変異, Factor V Leiden, は遺伝子多型の一様で, この分子の凝固活性には全く異常がない。正常の第 V 因子は 506 番目のアルギニン (R) のカルボキシ側が Protein C/Protein S 凝固制御系で切断されることで凝固活性が失われ, 過剰な凝固が起らないように調節されている。Factor V Leiden 分子では 506 番目のアルギニン (R) がグルタミン (Q) に変異することで, Protein C/

表 4 a 深部静脈血栓症患者と PS 遺伝子異常

	Patient No.	Age at first thrombosis	Sex	Kinds of DVT	Activity (%)	Antigen Total (%)	C4bBP (%)	Previous publication	Nucleotide Changes*	Amino Acid Mutated*
Protein S patients examined probands: n=39	PS 1	9	F	DVT	<10	7	50	148 New	IVS 1-1 G>C	-
	PS 2	37	M	DVT, Mesenteric v.	10	24	58	100 New	IVS 13-2 A>G	-
	PS 3	35	M	DVT, PE	33	25	90	142	Exon 4 276 C>T	G 54 R
	PS 4	40	F	DVT, PE	34	38	63	105 New	Exon 14 122 C>T	R 520 W
	PS 5	19	M	DVT	28	34	50	130 New	Exon 15 183 A>G	Y 595 C
	PS 6	26	F	DVT, pregnancy	49	56	98	120 New	Exon 7 288 G>C	E 201 Q
	PS 7	23	M	DVT	60	73	88	141 New	Exon 15 165 C>T	T 589 I
	PS 8	16	M	DVT	33	22	46	91 New	Exon 12 244 C>A	A 450 D
	PS 9	32	F	DVT	3	36	103	111 New	Exon 6 340 G>T Exon 6 448 A>G	E 119 X K 155 E
	(compound heterozygotes)									
	PS 10	39	F	DVT	19	22	84	161 New	Exon 8 156 G>T	C 206 F
	PS 11	42	M	DVT, PE	35	78	94	127	Exon 6 448 A>G	K 155 E/K 155 E
	PS 12	23	M	DVT	58	84	84	108	Exon 6 448 A>G	K 155 E
	PS 13	63	F	DVT, Portal v.	38	49	78	80	Exon 6 448 A>G	K 155 E
	PS 14	34	F	DVT, pregnancy	50	75	88	96	Exon 6 448 A>G	K 155 E
	PS 15	22	M	DVT	6	17	42	103 New	Exon 8 262 T>G	C 241 W
	PS 16/PC 4	13	M	DVT	21	14	31	43 New	Exon 10 227 G>T	E 301 X
	PS 17	66	F	DVT	48	53	79	103	Exon 15 276 C>T	P 626 L
	PS 18	16	M	DVT, PE	11	10	35	106	Exon 12 123 C>T	R 410 X
PS 19	18	M	DVT	32	35	60	84	Exon 13 218 C>T	R 474 C	

Healthy individuals examined: n=47/0

日本人の DVT 患者は Protein S 分子異常頻度 (19/85; 22%) が欧米人の頻度の 5-10 倍高い。

文献: Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

表 4 b 深部静脈血栓症患者と PC 遺伝子異常

	Patient No.	Age	Sex	Kinds of DVT	Activity (%)	Antigen (%)	Nucleotide Changes		
Protein C patients examined n=23	PC 1	25	F	DVT, portal v.	62	73	6218	C>T	R 169 W
	PC 2	24	M	DVT	50	81	8886	G>A	G 391 S
	PC 3	63	M	DVT	34	31	New	8577 C>A	L 288 I
	PC 4/PS 16	13	M	DVT	18	31	New	1330 C>T (IVS 2-4 C>T)	-
	PC 5	30	F	DVT	60	90		6152 C>T	R 147 W
	PC 6	65	M	DVT	42	68	New	6164-6166 del AAG	K 151 del
	PC 7	55	F	DVT	59	85	New	6164-6166 del AAG	K 151 del
	PC 8	30	M	DVT	39	97		1387 C>T	R-1 C
Healthy individuals examined: n=30									
	PC N 1	30			63	88	New	6164-6166 del AAG	K 151 del

Protein C 分子異常頻度も高いが (8/85.9%) その程度は欧米人の 2 倍程度である。

文献: Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

表 4c 深部静脈血栓症患者と AT 遺伝子異常

Antithrombin patients examined : n=6	AT1	41	F	DVT, PE	52	46	New	2495 A>T	K 11 X
	AT2	64	F	DVT	51	52	New	2511 C>A	P 16 H
Healthy individuals examined : n=24/0									2

\*Expression of nucleotide changes is according to the method described in Human Mutation 11, 1-3 (1998). X: stop codon.

DVT: deep vein thrombosis, PE: pulmonary embolism, Mesenteric v.: mesenteric venous thrombosis,

Antithrombin 分子異常の頻度 (2/85; 2.3%) は欧米人と同程度である。

文献: Kinoshita, S. et al. Clin. Biochem. 38, 908-915 (2005)

Protein S 凝固制御系で切断され難くなり、過剰な凝固が起こることになる。白人集団での、この多型 (R506Q) の頻度は 3%-7% であるが、白人血栓症患者集団では Factor V Leiden を持っている患者の頻度は 20%-60% までにも上昇している<sup>11)</sup>。このように血栓症患者に Factor V Leiden が蓄積していることと、Factor V Leiden 分子が Protein C/Protein S 凝固制御系で切断され難くなることを、考えあわせて、Factor V Leiden は血栓症の非常に強い危険因子であると考えられるようになっていく<sup>11)</sup>。

しかしながら、第 V 因子異常分子 Factor V Leiden は日本人には一名も発見されておらず、現時点では、白人に特異的な現象であると考えられている。我々の検索では興味深いことに、日本人の血栓症患者では Factor V Leiden を持っていない代わりに、Protein S の分子異常を持っている患者が多い結果が得られている (表 4)。この事実は Protein C/Protein S 凝固制御系の凝固制御に果たす生理的・病理的役割の重要性を示していると我々は考えている。すなわち、Protein C/Protein S 凝固制御系の活性は低下していないが Protein C/Protein S 凝固制御系に抵抗性の Factor V Leiden を持っていることは (白人血栓症患者に多く見られる)、凝固制御の観点からは、Factor V Leiden は持っていないが Protein C/Protein S 凝固制御活性が低下している (日本人血栓症患者に多く見られる) ことと結果的に同じ現象になる。すなわち、日本人血栓症において、Protein S の分子異常で Protein C/Protein S 凝固制御活性低下が多いということと、白人血栓症患者で Factor V Leiden 遺伝子保有者が多いのとは、病態発症原因的には同じ意味合いがあると思える。このような状況では、凝固制御機構が正しく機能せず異常な血栓形成ができると推測される (図 1)。

## 9. 遺伝子多型と血栓症

これまでは、血栓形成に直接関係する因子の異常について述べてきたが、血栓症のような多因子疾患では、発症には遺伝的要因、年齢、食餌、環境因子を含めて様々な要因が複雑に関係していると考えられる。我々の経験でも家系検索ができた何例かの家系で、全く同一の Protein S 遺伝子異常があり、その異常が原因で血中の Protein S 活性が低下している親、兄弟でも血栓症を発症していない例は多い。このような場合は、複合的な要因が絡んでいるのだが、体質的な血栓症の発症要因として、幾つかの遺伝子多型が関係していると言われている。このような多型のなかで、我々の検索結果、何らかの関係があると考えられ

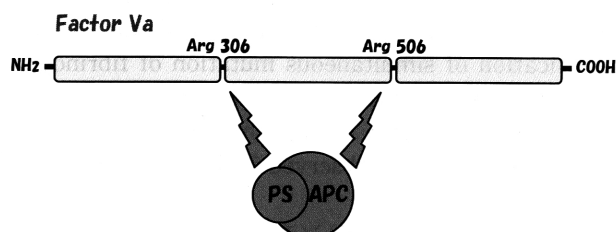
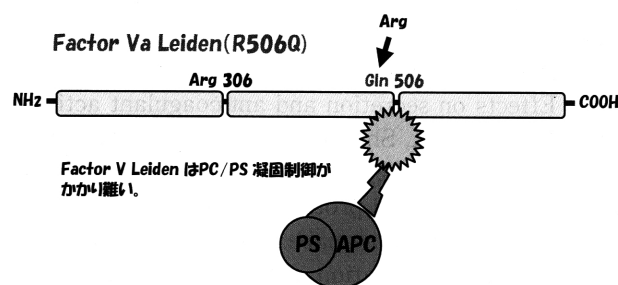


図 1a Protein C/Protein S 凝固制御系による Factor Va の制御



Factor V Leiden を有する人は凝固制御がかかりにくく、この多型は DVT の危険因子である。欧米人 DVT における Factor V Leiden 頻度は 20-50% である。

図 1b Factor Va と Protein C/Protein S 凝固制御 (欧米人の血栓性素因)

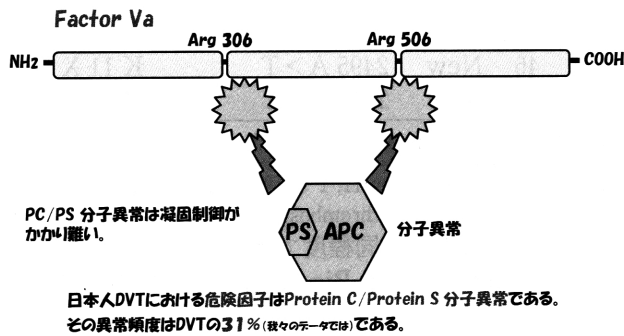


図1c PC/PS凝固制御活性低下時のFactor Vaの制御（日本人の血栓性素因）

たものは、凝固第XII因子の46 C/T多型とProtein S徳島 (K155E) がある<sup>3)12)</sup>。もう少し症例を集め血栓症の危険因子としての遺伝子多型を明確にする事ができれば、そのような人々の血栓症の予防に繋がる効果を挙げる事ができるのかもしれない。因に、Protein S徳島 (K155E) は日本人では深部静脈血栓症発症の明らかな危険因子になる(オッズ比: 3.74)<sup>3)</sup>。

## おわりに

我々の経験を簡便にまとめてみた。血栓症発症の遺伝的要因では明らかな人種差が存在していた。疾病の種類によってこのような人種差は存在するものと、そうでないものがある筈である。疾病の病因解析を行う時は、ある特定の因子だけを調べ、その因子異常とその疾病との関連を調査するだけでは、なかなか本質が見えてこない。その疾病に関連すると思われる因子群の系統的な臨床検査を行うことが重要なポイントになる。これらの事実から、病因解析には組織化された系統的な臨床検査が有力な検索方法になりうる事が判る。

## 文 献

- 1) International Human Genome Sequencing consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921, 2001.
- 2) 濱崎直孝: 血栓症患者における凝固関連因子の異常: 予防および治療への探索. *血栓止血* 11, 347-357, 2000.
- 3) Kinoshita S, Iida H, Inoue S, Watanabe K, Kurihara M, Wada Y, Tsuda H, Kang D and Hamasaki N: Protein S and protein C gene mutations in Japanese deep vein thrombosis patients. *Clin Biochem.* 38, 908-915, 2005.
- 4) Iida H, Nakahara M, Komori K, Fujise M, Wakiyama M, Urata M, Kinoshita S, Tsuda H, Sugimachi K and Hamasaki N: Failure in the detection of aberrant mRNA from the heterozygotic splice site mutant allele for protein S in a patient with protein S deficiency. *Thromb. Res.* 102, 1-10, 2001.
- 5) Tatewaki H, Iida H, Nakahara M, Tsuda H, Kinoshita S, Kanaji T, Yoshida N, Miyazaki S and Hamasaki N: A Novel Splice Acceptor Site Mutation Which Produces Multiple Splicing Abnormalities Resulting in Protein S Deficiency Type I. *Thromb. Haemost.* 82, 65-71, 1999.
- 6) Nakahara M, Iida H, Urata M, Fujise M, Wakiyama M, Kinoshita S, Tsuda H, Okamura T, Yao K, Yao T and Hamasaki N: A novel splice acceptor site mutation of protein S gene in affected individuals with type I protein S deficiency: Allelic exclusion of the mutant gene. *Thromb. Res.* 101, 1-7, 2001.
- 7) Tsuda H, Urata M, Tsuda T, Wakiyama M, Iida H, Nakahara M, Kinoshita S and Hamasaki N: Four missense mutations identified in the protein S gene of thrombosis patients with protein S deficiency: Effects on secretion and anticoagulant activity of protein S. *Thromb Res.* 105, 233-239, 2002.
- 8) Watanabe K, Shibuya A, Ishii E, Kurihara M, Inoue S, Ono M, Wada Y, Wakiyama M, Zaitzu M, Iida H, Muraoka K, Kinoshita S and Hamasaki N: Identification of simultaneous mutation of fibrinogen alpha chain and protein C genes in a Japanese kindred. *Br J Haematol.* 120, 101-108, 2003.
- 9) Kurihara M, Watanabe K, Inoue S, Wada Y, Ono M, Wakiyama M, Iida H, Kinoshita S and Hamasaki N: Characterization of two novel mutations of the antithrombin gene observed in Japanese thrombophilic patients. *Thromb Res.* 115, 351-358, 2005.
- 10) 井上須美子, 藤井智美, 浦田美秩代, 和田結, 小野美由紀, 栗原正子, ウォラワンチュンピア, 飯田広子, 木下幸子, 津田博子, 康 東天, 濱崎直孝: プロテインS活性低下を示した血栓症患者に見出された変異型プ

ロテインS分子の機能解析. 日本血栓止血学会誌 16, 641-649, 2005.

- 11] Rosendaal FR: Risk Factors for Venous Thrombosis: Prevalence, Risk, and Interaction. Semi. Hematol. 34, 171-187, 1997.
- 12] 木下幸子, 濱崎直孝: 凝固関連諸因子の異常ならびに遺伝子多型. 臨床病理 49, 165-171, 2001.

(参考文献のうち, 数字がゴシック体で表示されているものについては, 著者により重要なものと指定された分です.)

#### プロフィール

濱崎 直孝 (はまさき なおたか)

九州大学教授 (大学院医学研究院臨床検査医学専攻) 医学博士

◆**略歴** 1942年長崎県佐世保市に生る。昭和43年3月九州大学医学部医学科卒業, 昭和47年3月九州大学大学院医学研究科修了, 昭和47年4月15日国立療養所中野病院 (厚生技官医療職) に採用, 昭和50年4月1日九州大学医学部講師 (文部教官教育職) に転任, 昭和53年10月31日辞職, 昭和53年11月1日福岡大学医学部助教授に採用 (生化学), 昭和63年10月1日福岡大学医学部教授 (臨床検査医学), 平成4年12月31日福岡大学医学部を退職, 平成5年1月1日九州大学医学部教授 (臨床検査医学)

◆**研究テーマと抱負** 「赤血球の生化学」, 「血栓症の病因解析と治療」, 「臨床検査の標準化」を主たるテーマとして仕事をいたしております。特別な抱負はありませんが, それぞれについて, 独自の視点で仕事をするをモットーにしております。

◆**趣味** テニス, 水泳