

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590623

研究課題名（和文）血栓症における過凝固症の早期診断ならびに発症機構の解明

研究課題名（英文）Study on early diagnosis of hypercoagulable state and mechanism for the onset in thrombosis

研究代表者

和田 英夫（WADA HIDEO）

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40158704

研究成果の概要（和文）：

血栓症発症時には止血系分子マーカーの著しい変動とともに凝固阻害因子の低下が認められ、これらのマーカーは血栓症診断以外にも予後や治療効果の予測にも有用と考えられた。Protein S徳島などの遺伝性血栓性素因ならびに遺伝子異常のない二次性凝固阻害因子低下が、血栓症患者で高頻度に認められた。術後の抗凝固療法時の止血系マーカーのモニターから、抗Xa活性というよりは線溶能の亢進が大量出血の原因として重要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Elevated hemostatic molecular markers and decreased anticoagulant factors are observed in the onset of thrombosis, thus suggesting that these markers are useful for both making diagnosis of thrombosis and predicting the outcome or efficacy of treatment. Not only hereditary deficiencies of anticoagulant factor such as protein S Tokushima but also secondary deficiencies of anticoagulant factor are frequently observed in the patients with thrombosis. Data from the monitoring of anticoagulant therapy suggest that elevated fibrinolysis may be more important than the anti-Xa activity for assessing major bleeding.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：血栓症、過凝固症、播種性血管内凝固、深部静脈血栓症、肺塞栓症、可溶性フィブリン、D-dimer

1. 研究開始当初の背景

現在においても、我が国の死亡原因の第2位と第3位には心筋梗塞と脳梗塞が入っており、血栓症が死亡原因に大きな比重を占めている。このため、早期に無駄のない抗凝固・抗血栓療法が必要と考えられている。抗凝固ならびに抗血栓療法を早期に開始する病態の概念として、過凝固状態、血栓性素因、前血栓症状態などがあるが、血液検査による厳密な定義や診断基準は存在しない。唯一、一般的な血栓症診断マーカーとして認められているD-dimerも、深部静脈血栓症(DVT)/肺塞栓症(PE)のnegative predictive value(NPV)としてエビデンスがあるのみである。また、播種性血管内凝固(DIC)の国際的診断基準にfibrin関連マーカーとして、soluble fibrin(SF)、D-dimer、fibrinogen and fibrin degradation products(FDP)が利用されているが、カットオフ値の設定はされていない。我々の予備的検討では、fibrin関連マーカーの増加は、血栓症の重要なリスクファクターと考えられた。過凝固状態の発症機序としては、先天性の凝固阻害因子の異常と後天性の凝固系の活性化が考えられている。

2. 研究の目的

大規模スタディにより、fibrin関連マーカーや組織因子(TF)などの止血系分子マーカーの増加による血栓症発症に対するリスクを検討し、早期に抗凝固ならびに抗血栓療法を開始するために、過凝固状態の診断基準ならびに早期の抗凝固療法のガイドライン作成を目的とする。すなわち、血栓症ならびに血栓症のハイリスク患者において、fibrin関連マーカーなどや凝固阻害因子の動態を検討する。後天性の凝固系の活性化の原因としては、白血球の活性化ならびにそれに伴う白血球のTF産生の増加も一要因と考えられ、白血球の活性化とともに白血球のTF産生亢

進を検討する。また、血小板活性化ならびに血管内皮細胞障害を呈する血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)についても検討し、血小板活性化ならびに臓器障害に関連するマーカーを測定する。

3. 研究の方法

対象とする血栓性疾患は、脳梗塞、急性心筋梗塞(AMI)、DVT/PE、DIC、習慣流産、TTPなどであった。また、整形外科術後におけるDVT発症予防のための抗凝固療法時のモニターを、fibrin関連マーカーや抗Xa活性などで行った。Fibrin関連マーカーはラテックス免疫凝集法で、von Willebrand factor(VWF)やVWF propeptide(VWFpp)などは酵素抗体法で、抗Xa活性やATは発色基質法で、ADAMTS13活性はFRETS法などにて測定した。

血栓症群と非血栓症群との比較検討を行うとともに、感度、特異度、オッズ比などを算定する。以上のデータを基に、血栓症診断のための止血系分子マーカーの選定やそのカットオフ値を決定する。また、血栓症発症リスクを診断するマーカーを見つける。

なお、若年発症例や頻回の静脈血栓症例などでは、antithrombin(AT)、protein C(PC)ならびにprotein S(PS)の遺伝子診断とともに抗リン脂質抗体の測定を行い、血栓性素因の有無を調べた。

4. 研究成果

DIC、DVT/PE、脳静脈洞血栓症(CST)、TTPなどの血栓症発症時では、SF、D-dimer、FDP、thrombin-AT complex(TAT)、plasmin plasmin inhibitor complex(PPIC)などの止血系分子マーカーが著しい高値であった。しかし、血栓症の病態や基礎疾患によりこれらのマーカーの変動は異なり、基礎疾患ならびに病態別のカットオフ値の設定が必要と考えられた。特に担癌患者では、非血栓症でもD-dimerは高値であり、止血系マーカーのみによる血

栓症診断は困難であった。一般に、血栓症に対して最も鋭敏なマーカーはSFであり、最も安定なマーカーはD-dimerであった。

整形外科術後における血栓症予防のため、低分子ヘパリンやフォンダパリヌクスなどが投与された症例に対して、抗Xa活性の測定に成功した。経日的な止血系マーカーや抗Xa活性のモニターが、血栓症や大量出血の診断ならびに予防に有用であることが示唆された。また、大量出血例では、FDP、D-dimer、PPICが著しく高値であり、術後の出血には抗Xa活性のみでなく、線溶能の亢進が重要であると考えられた。

DIC、DVT、PE、CSTなどの発症時には、AT、PC、PSなどの低下が高頻度に認められた。DVT、PE、CSTでのAT、PC、PS低下例のうち、約50%が遺伝子解析により遺伝子異常が同定され、残りの50%は遺伝子異常が見つからず、二次性の低下が考えられた。また、特にCSTでは遺伝性の血栓性素因の頻度が高かった。さらに、PS徳島は日本人に特有な変異で、血栓性素因の一つと考えられた。

血漿中のTF抗原量ならびに白血球中のmessenger RNA量は、DICならびにDVT/PE例で著しく高値であり、白血球TFのモニターが血栓症の診断ならびにモニターに有用と考えられた。TFの増加は炎症反応など白血球の活性化に関連していた。

DIC患者の検討では、血小板数、プロトロンビン時間、FDP、fibrinogenなどの一般的止血系検査がovert-DIC診断に有用であった。また、SFやTATなどの止血系分子マーカーは病態の解析にも有用である可能性が示唆された。ただし、一般的止血系検査のみのスコアリングで行うDIC診断基準では、DICの早期診断は困難であった。一方、一般的止血系検査の経日変化や止血系分子マーカーを加えた修正版non-overt DIC診断基準では、早期

DICの診断能が著しく向上した。また、感染症DIC死亡群ではAT活性の低下や可溶性thrombomodulin (TM)の増加が有意であり、TM製剤やAT製剤の適応を決めるのに有用である可能性が示唆された。また、活性化PC(APC)とPC inhibitor (PCI)複合体の測定も、DICの診断・治療に有用であると考えられた。

約50%のTTP症例で、ADAMTS13の著明な低下が認められたが、残りの50%では認められず、これらの症例ではADAMTS13以外の原因でTTPが発症すると考えられた。ADAMTS13が著減しないTTPの診断には、VWF、VWFppならびにTMの測定が有用であった。特にVWFppは予後を反映し、血管内皮細胞障害のマーカーとして有用と考えられた。また、活性化血小板のマーカーとして、血小板膜糖蛋白GPVIの測定も有用と考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Ikejiri M, Shindo A, Ii Y, Tomimoto H, Yamada N, Matsumoto T, Abe Y, Nakatani K, Nobori T, Wada H: Frequent association of thrombophilia in cerebral venous sinus thrombosis. *Int J Hematol.* 2012; 95: 257-262 査読有
- ② Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A.: Increased fibrinolysis increases bleeding in orthopedic patients receiving prophylactic fondaparinux. *Int J Hematol.* 2012; 95: 160-166 査読有
- ③ Shindo A, Ikejiri M, Ii Y, Nakatani K, Wada H, Nobori T, Tomimoto H.: A novel protein S gene mutation combined with protein S Tokushima mutation in a patient with superior sagittal sinus thrombosis. *J Neurol.* 2012; 259: 178-9 査読有
- ④ Habe K, Wada H, Ito-Habe N, Hatada T, Matsumoto T, Ohishi K, Maruyama K, Imai H, Mizutani H, Nobori T: Plasma ADAMTS13, von Willebrand Factor (VWF) and VWF Propeptide Profiles in Patients with DIC and

- Related Diseases. *Thromb Res.* 2011 Nov 7. Epub ahead of print 査読有
- ⑤ Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Ando H, Oshima S, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A: Monitoring for anti-Xa activity for prophylactic administration of fondaparinux in patients with artificial joint replacement. *Int J Hematol.* 2011; 94: 355-360 査読有
- ⑥ Ota S, Yamada N, Ogihara Y, Tsuji A, Ishikura K, Nakamura M, Wada H, Ito M: High Plasma Level of Factor VIII. *Circ J.* 2011; 75: 1472-1475 査読有
- ⑦ Kawasugi K, Wada H, Hatada T, Okamoto K, Uchiyama T, Kushimoto S, Seki Y, Okamura T, Nobori T; Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee. Prospective evaluation of hemostatic abnormalities in overt DIC due to various underlying diseases. *Thromb Res.* 2011; 128:186-90 査読有
- ⑧ Ito-Habe N, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Toyoda H, Ishikawa E, Nomura S, Komada Y, Ito M, Nobori T, Katayama N Elevated Von Willebrand factor propeptide for the diagnosis of thrombotic microangiopathy and for predicting a poor outcome. *Int J Hematol.* 2011; 93: 47-52 査読有
- ⑨ Takemitsu T, Wada H, Hatada T, Ohmori Y, Ishikura K, Takeda T, Sugiyama T, Yamada N, Maruyama K, Katayama N, Isaji S, Shimpo H, Kusunoki M, Nobori T: Prospective evaluation of three different diagnostic criteria for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost.* 2011; 105: 40-44 査読有
- ⑩ Wada H, Hatada T, Okamoto K, Uchiyama T, Kawasugi K, Mayumi T, Gando S, Kushimoto S, Seki Y, Madoiwa S, Okamura T, Toh CH; Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee.: Modified non-overt DIC diagnostic criteria predict the early phase of overt-DIC: *Am J Hematol.* 2010; 85: 691-694 査読有
- ⑪ Ikejiri M, Wada H, Sakamoto Y, Ito N, Nishioka J, Nakatani K, Tsuji A, Yamada N, Nakamura M, Ito M, Nobori T: The association of protein S Tokushima-K196E with a risk of deep vein thrombosis. *Int J Hematol.* 2010; 92: 302-305 査読有
- ⑫ Ito-Habe N, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M, Izuno T, Sugita M, Ikeda Y: A second national questionnaire survey of TMA. *Int J Hematol.* 2010. 92: 68-75 査読有
- ⑬ Kaneko T, Wada H, Nobori T, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Prevention of venous thromboembolism according to the guidelines of a domestic manual. *Int J Hematol.* 2010; 91: 909-911 査読有
- ⑭ Nomura H, Wada H, Mizuno T, Yamashita Y, Saito K, Kitano S, Katayama N, Yamada N, Sugiyama T, Sudo A, Usui M, Isaji S, Nobori T: Elevated Fibrin-Related Markers in Patients with Malignant Diseases Suspected of Having Thrombotic Disorders. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010; 16: 266-272 査読有
- ⑮ Oh D, Jang MJ, Lee SJ, Chong SY, Kang MS, Wada H: Evaluation of modified non-overt DIC criteria on the prediction of poor outcome in patients with sepsis. *Thromb Res.* 2010; 126: 18-23 査読有
- ⑯ Okamoto K, Wada H, Hatada T, Uchiyama T, Kawasugi K, Mayumi T, Gando S, Kushimoto S, Seki Y, Madoiwa S, Asakura H, Koga S, Iba T, Maruyama I; Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Frequency and hemostatic abnormalities in pre-DIC patients. *Thromb Res.* 2010; 126: 74-78 査読有
- ⑰ Ikejiri M, Tsuji A, Wada H, Sakamoto Y, Nishioka J, Ota S, Yamada N, Matsumoto T, Nakatani K, Nobori T, Itoh M: Analysis three abnormal Protein S genes in a patient with pulmonary embolism. *Thromb Res.* 2010; 125: 529-532 査読有
- ⑱ Ito N, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M, Izuno T, Sugita M, Ikeda Y: National questionnaire survey of TMA. *Int J Hematol.* 2009; 90: 328-335 査読有
- ⑲ Kobayashi T, Wada H, Usui M, Sakurai H, Matsumoto T, Nobori T, Katayama N, Uemoto S, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Isaji S: Decreased ADAMTS13 Levels in Patients after Living Donor Liver Transplantation. *Thromb Res.* 2009; 124: 541-5 査読有
- ⑳ Sudo A, Wada H, Nobori T, Yamada N, Ito M, Niimi R, Hasegawa M, Suzuki K, Uchida A: Cut-off values of D-dimer and soluble fibrin for prediction of deep vein thrombosis after orthopaedic surgery. *Int J Hematol.*

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① Igari A, Moriki T, Yamaguchi Y, Nakagawa T, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Soejima K, Murata M: Quantitative analysis of the domain-specific autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura, The 53th Annual Meeting of The American Society of Hematology, San Diego, December 10-13, 2011
- ② Ikejiri M, Nishioka J, Sakamoto Y, Shimokariya Y, Noma K, Abe Y, Nakatani K, Wada H, Hayashi T, Suzuki K, Nobori T: Change of behavior in C4B binding protein and protein S in the patient with inflammatory disease, XXIIIth ISTH Congress, July 25, Kyoto, 2011
- ③ 和田英夫: 血栓・止血異常症診療センターの役割について、第 21 回日本臨床検査専門医会春季大会、2011 年 6 月 10-11 日、岩手アイーナ
- ④ 和田英夫: 静脈血栓塞栓症におけるフィブリン関連マーカーの有用性の検討、第 5 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム (DIC 部会)、東医会館、2010、10 月 30 日
- ⑤ 和田英夫: プロスペクティブスタディの解析結果からの DIC 診断における止血系マーカーの評価、第 5 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム (DIC 部会)、東医会館、2010、10 月 30 日
- ⑥ 和田英夫: 血栓症の臨床 up-to-date、シンポジウム III 「血栓症高まる検査の役割」、第 42 回日本臨床検査自動化学会、2010 年 10 月 7 日-9 日、神戸国際会議場
- ⑦ 和田英夫: DIC の新しい概念と治療への展望～臨床検査部の立場から～、シンポジウム「DIC 治療の新しい展開～リコモジュリン製剤の登場～」、第 11 回日本検査血液学会学術集会、2010 年 7 月 24-25 日、東京ビッグサイト
- ⑧ Wada H: Chairperson's report. 57th SSC meeting subcommittee for DIC. July 24, Kyoto, 2010
- ⑨ Wada H: Chairman's report. 56th SSC meeting

subcommittee for DIC. May 24, Cairo, 2010

- ⑩ Wada H: the Japanese guideline on DIC treatment. 56th SSC meeting subcommittee for DIC. May 24, Cairo, 2010
- ⑪ 畑田剛、和田英夫: 日本血栓止血学会プロスペクティブスタディの解析報告、日本救急医学会ジョイントシンポジウム「DIC-診断と治療の最前線」、第 33 回日本血栓止血学会学術集会、2010 年 4 月 22-24 日、鹿児島

〔図書〕(計 1 件)

- ① 尾崎由基男、和田英夫 監修: 臨床病理レビュー 特集第 147 号 DIC～とびらを拓く第三世代へ～臨床病理刊行会、東京都、2011、pp 1-221

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.medic.mie-u.ac.jp/th-center/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 英夫 (WADA HIDEO)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40158704

(2) 研究分担者 特になし

(3) 連携研究者 特になし