

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

主論文の要旨

論文題目 Development of a new laboratory test to evaluate antithrombin resistance in plasma

(アンチトロンビン抵抗性評価のための新規臨床検査法開発)

氏名 村田 萌

論文内容の要旨

【緒言】

静脈血栓塞栓症は、遺伝的あるいは環境的要因が複数重なることで発症リスクが高まる多因子疾患である。遺伝性血栓症は、アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S などの抗凝固因子の低下によるものと、Factor V Leiden 変異や prothrombin G20210A 変異などの凝固因子の異常による凝固亢進によるものがある。後者の 2 つの変異は白人においては遺伝子多型として検出されるほど頻度が高いが、日本人を含むアジア人には検出されていない。

現在まで、遺伝性血栓症家系において非常に多くの遺伝子異常が同定されているが、未だ原因不明とされる症例も数多くある。私たちは、ある家族性血栓症症例において、凝固因子の一つであるプロトロンビンをコードする遺伝子に、新規の変異 (c.1787G>T, p.Arg596Leu: prothrombin Yukuhashi) を同定し、アンチトロンビン抵抗性という新たな機序による血栓性素因を報告した。しかしながら、現在行われている臨床検査では、このアンチトロンビン抵抗性を検出することはできない。本研究では、アンチトロンビン抵抗性を血漿検体で検出する、新たな臨床検査法を

開発した。

【方法】

測定系はトロンビン生成相、トロンビン不活化相、残存トロンビン活性測定相の3相で構成した。はじめに、健常人プール血漿を用いてプロトロンビン活性化すなわちトロンビン生成相における検体希釈液の至適 pH、塩化ナトリウム濃度を決定し、プロトロンビンアクチベータの各構成要素の濃度、活性化時間を順次決定した。次に、生成されたトロンビンをヘパリン存在下および非存在下で、アンチトロンビン液の添加により不活化した。トロンビン不活化相の至適条件の検討には、ヒト精製プロトロンビンを用いた。不活化時間は、ヘパリン存在下で5分まで1分毎、ヘパリン非存在下では30分まで10分毎とした。最終的な残存トロンビン活性測定相においては、トロンビンに特異的な発色性合成基質 S-2238 を添加し、吸光度変化率を測定した。トロンビン活性残存率は不活化0分の値との比として算出した。

測定法の評価のため、リコンビナントプロトロンビンを作製した。まず、野生型と変異型 (p.Arg596Leu: prothrombin Yukuhashi) プロトロンビン発現ベクターを作製し、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 に遺伝子導入後、安定過剰発現株を樹立した。ビタミン K 添加・無血清培養液に交換後 24 時間で培養上清を回収し、限外濾過にて濃縮した。プロトロンビン抗原量は ELISA にて測定した。

血漿検体におけるアンチトロンビン抵抗性検出のため、至適条件を用いて、健常人検体とアンチトロンビン抵抗性患者検体を解析した。また、抗凝固薬であるワルファリン服用の影響を検討するため、アンチトロンビン抵抗性以外の血栓性素因も含めて血栓症発症予防のためワルファリンを服用している患者血漿検体の解析を行い、prothrombin Yukuhashi 変異の有無による各時点でのトロンビン活性残存

率の有意差検定を行った。

【結果・考察】

変異型プロトロンビンはある程度の活性を保持しつつ、アンチトロンビンとの反応性が著しく損なわれていることが予想されたため、トロンビンへ活性化後のアンチトロンビンによる不活化動態を解析する検査法を構築した。トロンビン生成相では、FXa/FVa 様プロトロンビンアクチベータとして、カルシウムイオンと陰性荷電リン脂質を必要とする *Oxyuranus scutellatus* (Ox) 蛇毒を用いた。検体希釈液は 50 mmol/L トリス塩酸緩衝液 pH8.1、塩化ナトリウム 0.2 mol/L とし、プロトロンビンアクチベータの至適濃度（リン脂質 50%、塩化カルシウム 15 mmol/L、Ox 蛇毒 0.1 mg/mL）を決定し、活性化時間は 2 分、検体の希釈倍数は 100 倍希釈とした。トロンビン不活化相のアンチトロンビン液の濃度は 75 µg/mL とし、ヘパリンは 5 U/mL を添加した。添加アンチトロンビンの量は希釈血漿検体自体に含まれる量の約 5 倍に相当し、検体中のアンチトロンビン濃度のばらつきによる影響を最小限に抑えることができた。

リコンビナントプロトロンビンの解析では、ヘパリン存在下でのアンチトロンビンによる不活化 1 分後のトロンビン活性残存率は、野生型では $6.3 \pm 1.2\%$ であるのに対して、変異型では $34.3 \pm 2.2\%$ と有意に高値を示した。ヘパリン非存在下でのアンチトロンビンによる不活化 30 分後のトロンビン活性残存率は、野生型では $10.1 \pm 1.7\%$ であるのに対して、変異型では $95.8 \pm 0.4\%$ と有意に高値を示した。以上の結果より、本検査法はリコンビナントプロトロンビン解析において prothrombin Yukuhashi 変異によるアンチトロンビン抵抗性を検出可能であった。健常人血漿検体解析における本検査法の再現性は、ヘパリン存在下および非存在下

いずれの測定系においても良好であった。

prothrombin Yukuhashi 変異をヘテロで持つ 2 名のアンチトロンビン抵抗性患者の血漿検体解析では、ヘパリン添加系、非添加系のいずれにおいても健常人血漿検体と比べ明らかな不活化不良を示した。また、抗凝固薬であるワルファリン服用中でのプロトロンビンを含むビタミン K 依存性凝固因子低下の本検査法への影響を検討するため、アンチトロンビン抵抗性変異を持たないワルファリン服用血栓症患者 5 名の血漿検体を解析した結果、多少のばらつきはあるものの健常人とほぼ同様の不活化動態が観察された。prothrombin Yukuhashi 変異の有無により、ヘパリン添加系では不活化 1 分後から 3 分後のトロンビン活性残存率には有意差がみられたが、以降は有意差がみられなかった。一方、ヘパリン非添加系ではいずれの時点でもトロンビン活性残存率に有意差がみられた。すなわち、アンチトロンビン抵抗性の検出はヘパリンの有無に関わらず可能であったが、ヘパリン非添加系の方が時間を少し要するものの、より明確に検出できた。また、ワルファリン服用患者においては最大トロンビン活性が低値を示すために実測値の変化が小さいものの、トロンビン活性残存率に換算することで不活化動態の差異を明らかにすることができた。

【結語】

私たちは、prothrombin Yukuhashi 患者の血漿検体においてアンチトロンビン抵抗性を検出する新たな臨床検査法を開発した。本法は、原因不明の静脈血栓塞栓症症例においてアンチトロンビン抵抗性を検出するツールとして有用であり、患者がワルファリン服用中の血漿検体であっても解析が可能であった。