
研究助成業績報告集

第 22 回（2014 年度）バイエル循環器病研究助成
『深部静脈血栓症』

公益財団法人 循環器病研究振興財団

* 目 次 *

No	研 究 課 題	研 究 者	頁
1	静脈における凝固因子分泌と深部静脈血栓症	竹藤 幹人	1
2	遺伝子改変血栓症モデルマウスを用いた深部静脈血栓症の病態解析と新規治療法の開発	坂野 史明	8
3	低用量ピルとプロテインS抗原量・活性及び遺伝子変異に関する研究	三好 剛一	11
4	脊椎手術における静脈血栓塞栓症の実態と早期診断方法に関する研究	吉岡 克人	18

静脈における凝固因子分泌と深部静脈血栓症

名古屋大学医学部附属病院 循環器内科 病院助教
竹 藤 幹 人

I. 緒言

深部静脈血栓症はエコノミークラス症候群と呼ばれ、身近な問題として国民の関心も高く、厚生労働省のホームページにおいても注意を呼びかけられている。これまでの循環器分野の研究は、心臓と動脈に関する研究が多く、静脈をテーマにした研究は、ほとんどされていない。

これまでの静脈血栓症のマウス動物モデルの多くは、薬物・物理的刺激により静脈内皮に重篤な傷害を与え、血小板などの血球細胞の機能評価が行われてきた。薬物・物理学的刺激のいずれも、静脈内皮に大きな障害を与えていることから、静脈内皮を評価する実験による深部静脈血栓の研究はほとんどされていなく、深部静脈血栓症における静脈の機能評価は十分されていない。

申請者らはこれまで、G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) が制御する細胞シグナルと疾患の関わりについて研究を行ってきた^{1), 2), 3)}。G タンパク質は、心不全、高血圧、動脈硬化など、様々な循環器疾患との関連が示されてきた。アンギオテンシン II 受容体やアドレナリン受容体と G タンパク質は共役して作用することが知られており、疾患発症時の細胞内シグナル伝達において重要な働きをすることが報告されてきた。様々な循環器疾患と G タンパク質の研究は行われてきたが、深部静脈血栓症を G タンパク質の関連についての報告はない。本研究では、深部静脈血栓形成時における静脈内皮細胞の G タンパク質の役割について検討した。

細胞生物学的手法を用いて深部静脈血栓症の発症メカニズム・細胞シグナルを解明し、動物実験モデルを用いて、深部静脈血栓症の病態解明へ繋がる研究に発展させることを本研究の目的とする。

II. 対象・方法

(a) von Willebrand factor 測定

HUVEC 細胞 (PromoCell 社、ドイツ)を用いて、HUVEC 細胞から分泌される von Willebrand factor (vWF) を測定した。細胞を 96-well dish で培養させ、80-100%コンフルエントになったことを確認後、血清を除いた培養液で 24 時間培養した後、Thrombin もしくは Histamin を添加し、HUVEC 細胞を刺激し、培養液を回収した。回収した培養液中の vWF 濃度を EILSA 法によって解析した。96-well plate に抗 vWF 抗体 (Dako 社、A0082) を加え、24 時間、4 度で静置した。抗 vWF 抗体がコーティングされた 96-well plate に測定したい培養液 100 μ l を入れ、12 時間、4 度で静置した。12 時間後、PBS で 96-well plate を wash した後、抗 vWF /HRP 抗体 (Dako 社、P0026) を加え、1 時間、室温に静置した。1 時間後、PBS で plate を洗浄後、plate reader により vWF を測定した。

(b) siRNA 導入

標的遺伝子に対する siRNA (QIAGEN 社) を各遺伝子に対して 3 種ずつ用意し、実験を行った。各遺伝子に対するターゲット配列を表 1 に示す。

HUVEC 細胞を 96-well plate にて 24 時間培養後、siRNA 導入を行った。siRNA 導入は Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies 社) を用い、連続 2 日間、siRNA 導入を行い、2 回目の siRNA 導入 24 時間後より実験に使用した。siRNA のノックダウン効率については qPCR もしくはウエスタンブロット法により確認を行った。

また、siRNA 導入により viability への影響についても評価しており、siRNA 導入により cell viability に影響がないことを、いずれの siRNA でも確認している。

Gene_Symbol	siRNA Target Sequence	Gene_Symbol	siRNA Target Sequence
APBA1	CCGGGAAGACTGTGATCGTGA	SEC31B	CGCCTAGTCTTGATCAGTCAA
APBA1	CCGGGCGACTCGCTGGTCCAA	SEC31B	CGCAGCGTCTGGAGTATCTAT
APBA1	CAGAGTCCCATTTGCATATCA	SEC31B	TTGATGCAAGTGATGACTTAA
APBA2	TTGGCCATGATCAGTAAATAA	SNAP23	TACCCATGAATCGAGTTTA
APBA2	TAGGATGACTGTTATCGAGGA	SNAP23	CAGGCCTATTAAACATCAGCA
APBA2	CAGCCAGTAACTAAAGCTTTA	SNAP23	AAGAGGTTGTACCTCAGTAA
ATG10	CTGGATTACCTGTCCCTGAA	SNAP25	CAGAGCTCAAGTGGCATTTGAA
ATG10	AGGCTCCGAAGTGAATAA	SNAP25	AAGATTAAAGTATACAGCAA
ATG10	ATGGAAATTTTCACTCCACCA	SNAP25	AAGATTGGGAAAGTGGTTAA
ATG7	AAGCAGTATCGGCTGGATGAA	SNAP29	CAGAAGATCGAGCAGAAGCTA
ATG7	TCCCTGTCAGCTGGCATTGA	SNAP29	ATGGTGGACAAGATGGACCCA
ATG7	ATCAGTGGATCTAAATCTCAA	SNAP29	CCGGCTGACACAGCAAAAGTGA
BET1	CAGTGAATGCTGGGCGCTTTA	SNAPIN	CAGGAAGCAGTGGAGCGCTTA
BET1	CACACTGGATTTCTAGGTAA	SNAPIN	ACCGCTTCTCTTGGTTAACAA
BET1	ATGGCAGTATCGCTAGCTTA	SNAPIN	TTGCTTACCCTATTATGTGA
BET1L	CTGCTTCTCACTCTTTGATTA	SNCA	ATGGATGATTTCTATGAAGA
BET1L	CCCGGCGCTGTGGAAGAGAT	SNCA	CATGCTTATAGCAAGATGAA
BET1L	TGCAATGATAATTTGGGTCA	SNCA	CCCACTGATGACATTTCTCAA
BNIP1	ACGAACGATCTGGATGCCAA	SNCB	CCCGACTCCCATTAACCTGCA
BNIP1	TCCCGCGAGCTGGAGCCAAA	SNCB	ACCCGAGAAGGTGGTACAAA
BNIP1	CAGCTCCGATGTGAACCAA	SNCB	AGGGAGGAATCCCTACTGAT
C1orf142	CTCCAGCATAGTTGATGATA	SRA1	AGGGCGCTCGCTGCTTACCAA
C1orf142	CAGCGGTTTATGGAAAGCCA	SRA1	CAGGGCCCTGATGGTCTATTA
C1orf142	CAGCAAGCTGTACGCTTAA	SRA1	CAGGGAACGCAAGAGTGA
COPA	CACACGGGTGAAGGGCAACAA	STX10	CTCCCTGCTCTCATCTACTA
COPA	TCCGATCTCAGACGATCCGA	STX10	CTGGAAGAGACCTCGATATA
COPA	CTGGCCGATGAATGAATCAA	STX10	CAGCAGCTGATGATGGATGAA
COPB1	CAGCTTAATTAACGTGGCATA	STX11	CGCCAGGTTGAAGAAITGCAA
COPB1	AAGCTCCAGTGGAGACTTTT	STX11	CAGCATCAAGCCGACACCAA
COPB1	TTGGCTGGATCTTAAAGGTT	STX11	AGCACTCAAATGAAGTATCA
COPB2	AGGCGTGAATGCATGATTA	STX12	AAGAATTTGATGAGCCAGCTA
COPB2	CAGGTTTCAAGGGTATGAAA	STX12	AGCGAGCTGGTCTAGTACGA
COPB2	ACGATTTCTCAGAGTATGAAA	STX12	TCCCTAGCATGTACCGGAAA
QPLX1	CAGCGCGCTGTTCACTTTCAA	STX16	TCCAAGCTAAITGGTACAGTA
QPLX1	CCCGGCCACTACTGGGTGTA	STX16	CCGGTATAAGCAGAAGATGAA
QPLX1	AAGCTTAGACTGCATGATA	STX16	CAGCGGTTTAAACCAGCGCTTT
QPLX2	CAGCAGATCCGAGTAAAGTAA	STX17	TTGCAATTTGGTCCCACTATA
QPLX2	CAGATGAGTAGGAGAGCCAAA	STX17	ACCCCTGAATGGAGACCTTAA
QPLX2	CAGGCTGCTTCAAGTAGCATA	STX17	AAGCTAGTCTCAGAGTTTGA
QPLX3	CAGCTGAGAAATGCTGATGTA	STX18	CCGCGTGTGGATCTCTCTT
QPLX3	TAGCAGGATGATGAAGCAAAA	STX18	CAGAGAGCCATCCGAGTTAAA
QPLX3	TCCCGGAACACTAGCTGAAA	STX18	AAGCAATTCAAGCAACTGAAA
QPLX4	CAGCTTCGAGTAAATAGCTAA	STX19	CAGGCAGAAATACATCAACAGA
QPLX4	CATGAGCTTGGATCAATATA	STX19	AAGACCAGCTTCAAGAAGCTAA
QPLX4	AACCCAGATGATCGATTGACA	STX19	CAGAAATAGTCTGTGCCCTA
DOC2A	TCCGATGATGCCACGCCCTTA	STX1A	ACAAAAGTTCTGTTCAAGTTAA
DOC2A	CCGCTCAAGCTTCCGACGAAA	STX1A	GAGGGCCGCTGCTGACACCCAA
DOC2A	CAGCAGTGTGTTGAAGCTTTA	STX1A	AGAAGCTCATGTCGGAATGAA
DOC2B	ATGAGGAGTCTGTTACGAGAA	STX1B	AAGGTTCCGTCGAAATGAAA
DOC2B	CACAGTCTGACTCAATGATTA	STX1B	AACCAGATGAGAAGACCCAAA
DOC2B	CAGGAGTCCGATCTAGTCA	STX1B	CCGGAAGTTCCGTGGAGGATTA
GABARAPL1	TACAGTGAAGAGTGTCTACT	STX2	CAGTGGATCTCGGATACGAA
GABARAPL1	CAGCTGCAAGTCTTGTATATA	STX2	CACGGAAGAAGCAGCAACCCAA
GABARAPL1	CAGCTGCTAGTTTGAAGGTTT	STX2	CAGCTAGTTTGTGCTATGAAA
GABARAPL2	TTAGACTAGTAAATATGATA	STX3	CCCGGAAGAAATGATTAATA
GABARAPL2	AACACTTGTCTGACTAGATA	STX3	CAGCGCTAAATTAAGCTGTTA
GABARAPL2	CCGGAAAGTTCGAGCGAAATA	STX3	TCAGGGTGAAGTGTATAGATA
GOSR1	CATGAGTGTGTTGAAGCTAAA	STX4	CAGCTCCGAGCAAGAGGACAAA
GOSR1	GAGCGAGTAAACCAATCAA	STX4	TCCGGCAATTCGGCAGACTA
GOSR1	CAGCTGTGATTTATAGTATT	STX4	AGGAAGCTGATGAGAAGTATA
GOSR2	TAGCCTTAGGATTTCTAGATA	STX5	ATCAATAGCCTCAACAAACAA
GOSR2	CTGGTTGTTTGGAGTCAATGAT	STX5	CAACCGGTTGGCTCATGGTCAA
GOSR2	CAGCTGGAAGTGTGAGCTTTA	STX5	CAGTGGAAATGGAAGTAGATA
LLGL1	TGGAGATGTGCCACTAATA	STX6	CAGGCTGAAGTAAATAGAGA
LLGL1	CCCGGAGGCTTCCACATGAAA	STX6	AACCTAGTCAATTAAGTAGATA
LLGL1	CACCGTAGCCACACACCTTA	STX6	CACCACAGCTGAGAAATAA
LLGL2	CACCCAGATCTGTGGCGCTA	STX7	CAGCAGTATACTAACCCAGCT
LLGL2	CTGGTTGTCACTGGAGCCTTA	STX7	CAGCAGATTAACGCGCAAT
LLGL2	CTGCATCTCAGTGTACACGA	STX7	TTGCTGTAGATTGCCTAGTAA
NAPG	TGGAGCGAGTCCGAAAGCTTA	STX8	CACCAACGAAATCAATATGAA
NAPG	TCCGTACTTGTATACAGTCA	STX8	TTGGATGATCTGTAACCTCGA
NAPG	AAGGCTGTAGAGTTTATCAA	STX8	CAGGTTCCAGCCTGATGAGTGA
NRXN1	CTGGGACGAGATATATCTTAA	STXBP1	AAGGACCCGCGGAGCTGATAA
NRXN1	CCGGACGATTTAAAGCAA	STXBP1	CCGCTATGGGCACTGGCATA
NRXN1	CTGGCAGTGTGAGCGCTTA	STXBP1	ACGGTGAAGTCCGATATCAA
NRXN2	CGCCATAGTAGGCGAGCAA	STXBP2	CTGATCCAGATGCCAATGTA
NRXN2	GAGAGTTAATATGGCCATA	STXBP2	CCGGCCATCCGCTACCGCAA
NRXN2	ACGGAGTGGGCGCACCCAAA	STXBP2	CAGGCAACGGCGAAGCTGAAA
NRXN3	GAGAGGGAGTATACGCTGAA	STXBP3	CAGGTTGATCCAGAATGTAAA
NRXN3	CAGGATTAATAAGAGATATCA	STXBP3	TGGGTTAGAATTCGACATCGA
NRXN3	ACCAGTGTGGCTGTAACTTTA	STXBP3	CAGGTTATACTCTTGTATGTA
RPH3AL	CTGCTTATTGAAACCATCTA	STXBP4	AAGCGTGGCGCTTGAATCTAA
RPH3AL	AGGAGCCGGAAGGCGACAAA	STXBP4	CAGGCTTAGCAGAAGACTTAA
RPH3AL	GAGGTTTGGCTTGGCATGAAA	STXBP4	TAGCAATGGGTCATGACGCTTA
SOFD1	CTGACAACTCCGCTAAGCTAA	STXBP5	TTAGCCGATCAGCGAGCTCAA
SOFD1	CAGAGAACCTTACTATGATA	STXBP5	AAGTCAATTTATATGAGA
SOFD1	CAGGATGACTGATTTCCAT	STXBP5	CTGGTGGCATTGAAGCGTAAA
SEC22A	CTACAGTTTATAAAGTCAA	STXBP5L	CTGGAGAAGATGCTCATTGTA
SEC22A	CACCGCTGGCGGAATGCTAA	STXBP5L	TAGGAGACTCATGATAGATA
SEC22A	CAGGCGAAGCTCCGATTTA	STXBP5L	CAGCAGCAACTGTTATTCAA
SEC22B	ATCATGTGGCGCAATATGCAA	STXBP6	CAGTTAATGGTATCGATCT
SEC22B	CAGCCATATATATAGGAAA	STXBP6	AAGCCGAATATTAACTTATA
SEC22B	CCAGATGGGAAGTACTTCAA	STXBP6	CCGAGCAGTTTCCCTCGAGAA
SEC22C	CAGATGGAGTGCAGCTGGAAA	SYNPR	GAGCTCTGATGCTGATTTAA
SEC22C	CCAGATGGGAGTCTGCAGAA	SYNPR	TAGCCTTTGCTCCAGCTTGA
SEC22C	TCGGGAGCAGTGTGCTCAA	SYNPR	CAGCCTGTTATGCAAGCTT
SEC31A	CTGGTATGCTTGTGCTAAT	SNP	CAGCATCGAGTCCGATTCGA
SEC31A	GCCATGGACACTAGTACTGTA	SNP	CTCCTTAAACCACTAGTCAA
SEC31A	AAGCTAGATGATGCCAGCAA	SNP	AAGCCGCTTAGGAAATCCAA
SYPL1	AAGCAACCTAAGTGAGGATA	SYT1	TACTCGGAATGGGTGGCAA
SYPL1	CAGACCCTAGTCAAAGGTTA	SYT1	CACATCTGATCCTTACGTGAA
SYPL1	ATGATAGACTTTGTTGATCA	SYT1	TTCCGTAGTATGATTGTAAGA
SYPL2	CAGTGGCAATTGGCCACTAA	SYT10	AGCTATCATAGATCCTGTGA
SYPL2	CCCATGGTACTCAAGGACAA	SYT10	CTGCTATTGATAAAGTAGGA
SYPL2	TGCTGGACCCAGGATCTTA	SYT10	AACGATGAGTTTCCAGAAGGA

Gene_Symbol	siRNA Target Sequence	Gene_Symbol	siRNA Target Sequence
SYT11	CTGGATCTTGTATAGACCAAT	TRAPP06A	CTGTGTGTGGAAATCTGAAA
SYT11	CAGCATCGAGTCTCGCTTAT	TRAPP06A	GACCTAGCTCGTGAAGAGAAA
SYT11	CAGCTGCGTCTCCAACTGTA	TRAPP06A	CGGCGGCTCACTGGCCAGTAA
SYT12	AAGGGCTCTTTGACAAGTA	TRAPP06B	TAGGATTTACGTGTGGGTTAA
SYT12	CACGCTGAAGCTGGGCGTAT	TRAPP06B	ATGGATGACTGCATTCGTAA
SYT12	AACGTGGGCGATGTATCATT	TRAPP06B	CTACGGTATTCAGGAACAAA
SYT13	ACGAGCTAAGCAGAAGATCAA	TRAPP09	CACGTCACAACTGAACATGAA
SYT13	CAGGAGGAATTTAGTATTGA	TRAPP09	CCGCTGCTCAGGAGTGTGAAA
SYT13	CAGCAGATGATCTTTAAGTGA	TRAPP09	AACGATTACTGTGAACGGTTA
SYT14	CTGCATTGCTAACAAGCTTTA	TSNARE1	CGGCGGCTGTGGACCTGAA
SYT14	TATGGTACATCGGATGAAA	TSNARE1	CCGCTGAGCACCAGCAATAAA
SYT14	TACAGTAGTGAAGCATCAATA	TSNARE1	GAAGGTTGTTGATAGTTGAA
SYT14L	CACGGATCAAGAGATGTCCAA	UNC13A	TGGCAACAACTCAAAGAGAAA
SYT14L	TAGAGTCAAGATGAATACAA	UNC13A	ATGAAATACACTCAAGAGAAA
SYT14L	CGGGCCAAATCCAGTATACAA	UNC13A	CGGCCCTATTATACACTGCTA
SYT15	CGGGCGCTTCTGCCAACTCAA	UNC13B	AGGGTCAACTGATAAATTTA
SYT15	CAGGCTGAGTGTGGTGCAGAA	UNC13B	CAGGAGCTACCTCCAGAGGAAA
SYT15	CCCTTGAAGATGAGACCCTA	UNC13B	CTGCTCTGGTGGCGGCTTAAA
SYT16	CAGGTTGATGATTTCCGTTTA	UNC13C	CTAGGCTCAGCTATTGGTGAA
SYT16	TTGCTGGTTAACATAAGCAA	UNC13C	ATGATCTTATCAGGAGGATA
SYT16	CTGGGTTTCTCACAGTGATA	UNC13C	ATGATGATGTCTACAAGGATA
SYT17	TTGATCCTTGTCAACTGAAT	UNC13D	TTGGTGTACGCTCAGGCTTTATA
SYT17	TCCGCTGTTGGCGAGGCGAAA	UNC13D	TTGGGCGAGGCGCATGAAGATA
SYT17	CAGCCCTGGAGCAGTGGCATA	UNC13D	TGGCTTCCGAGGATCTTTAAA
SYT2	TACTCAAGTATGCCAAGCTTA	USE1	CGGCTCAGTGTGATCAAGAAA
SYT2	CAGCTTCAAGTGTCCATACCA	USE1	TGCAATCATGCCTAACTGAA
SYT2	CAGCAGCTTCAAGCAGCTGAA	USE1	GGCTCAGGCTGGAGCTGAAA
SYT3	ACCGTGAATCTATCTCGTTGA	USO1	TTGGGCTCAAGCTCAGAAA
SYT3	CACCAITGTAAGAGACTACGA	USO1	AAGGCTCAATTTGAAGTGA
SYT3	TCTCGAATCTCCATCCCTAA	USO1	ATCAGTCAATGATGGCTGTTA
SYT4	CTTGAAGATGATGCTCACTA	VAMP1	CCCTGGAGTCTGCAAGTCAA
SYT4	CAGAGCTGGCATGGCCACTA	VAMP1	ATGACCACTAACAGGAGCTA
SYT4	ATGGAATGAATAGTAGACCA	VAMP1	TGGCCTGATGCTGGTAGTTA
SYT5	CCGGCCCAAGCTGGAGCTTA	VAMP2	ACAAGCCGAGCCAGGCAAGTAA
SYT5	CCGGAGACCCGCGCAAAGCAA	VAMP2	TGGGAGCTCCAGCATGTTAA
SYT6	CAGAGTATTAAGTGTCCGAA	VAMP2	CCCATATGTTCTGTATCA
SYT6	TGGCTTTACCCGAGCAGTTAA	VAMP3	AACGAGGCGAGCCAAAGTAAA
SYT6	CTGGAACGAGATGCTGGCATA	VAMP3	TCCCTAGAAGAGACCCGCTTA
SYT7	CTGGCCAAACGCTACAAGAT	VAMP3	CAGCCGCTCTCAATTTGAAA
SYT7	CCGCAATGAGCTCATGGCCAA	VAMP4	TGGAACGTTGAGATGTCGAA
SYT7	CTCGCCCACTGATGAGACTA	VAMP4	TAGTATGGATGAATAGTGA
SYT8	CCAGCTGGCACCACAGCTATA	VAMP4	AAAGATTTGCTGCATATGAAA
SYT8	CCGCTCCGAAGCTGAGCCGTA	VAMP5	CTGCAGCAGTCAAGACCAA
SYT8	CTCCACCTGCATGGCTGGCAA	VAMP5	TTGGTGTTCGCTCCGCTGTA
SYT9	AAGATCCTTATACGTTCTCA	VAMP5	CAGGCTCAAGCAATTTGGCCTA
SYT9	AATCGTTATTCOAAGATAATA	VAMP7	TCCGACTACTACGCTGTTAA
SYT9	CAAGATCGGAGTATGAACAAA	VAMP7	TAGGCAATCGTGTCCGCTAAT
SYTL1	TCCCTGGACAGTACTGACAA	VAMP7	CGCCGCTAGTCTTATGAGTAA
SYTL1	CTGGCAAGGTGTCTCCCATTA	VAMP8	CTGGTCTGCTGCTTAAAGTAA
SYTL1	CCGAGCGTCTATGGCAGGAAA	VAMP8	CCGACTAGGCGAATTCACCTA
SYTL2	AAGTCCGAGAAAGATGACTAA	VAMP8	AAGCACTTTGATTAAGCTGTA
SYTL2	AAGAGTAGTCAACAACATGTT	VPS33A	ACGGCTTAGGACACATATGTA
SYTL2	CACAGTTAAGAGGGTCTGGTA	VPS33A	CAGCTTAGGATGATTCGCAAT
SYTL3	AAGCGCAAGACTGGAGTCAA	VPS33B	TAGCTAGGATGAATAGTAAA
SYTL3	CACGGAAGTTTAAATAGCAT	VPS33B	CAGGCTGGGCAAGGTTTAAA
SYTL3	CTGGCATAGTCAAGTATTGAA	VPS33B	CAGGCTGGATCAAGCAGTGA
SYTL4	AGGCGACTAAAGAAATGAGTTA	VPS33B	CAGGATCAAGAAATATGGGATA
SYTL4	CTCATAAGCGTTTCTACCCAA	VPS45	CAGGCGTGGTCCGAGCAAGTAA
SYTL4	CTGGGCGCTTTGAGTCCCAA	VPS45	GACAGCGGCGCTGGATGAAA
SYTL5	TGGCAAGTGGCTTACAATA	VPS45	TTGCTGAGATTTGATAGGATA
SYTL5	CTCGCGAGCTAAGGATTATA	VTH1A	CACCAACAAATGCTCAGGAGTA
SYTL5	TTGACTTAGACGCTCAAGAT	VTH1A	ATGCTCGCTTGGAAAGGCTAA
TC2N	AGGTTTCCGCTGATAGCTGA	VTH1A	GTCGTCGACTTCAAGGCTGAA
TC2N	TAGCTCGGAGAGTGTGATTA	VTH1B	AAGGACCTTCTCAAACTCAGT
TC2N	CTCATTAAAGCTTTAGAGTGA	VTH1B	TAGCTGAGTGAAGTAAATAA
TGOLN2	ACCAGTATTGAGAGAGCTCAA	VTH1B	CGGCGCTCCATGAAGACCTAA
TGOLN2	ACACAGTGAAGTCAACTGCTTA	YKT6	TGGCTTGAACATCAGGATGAA
TGOLN2	TAGGAGAAGGATGACCTTTA	YKT6	CCCATCCTAAGCAGGTTCCAA
TRAPP010	TCCGAAGATGATTCACCTAGA	YKT6	TTGGGAAATGAACCAATAAA
TRAPP010	CTGGTTAATAGTATGATTTGA		
TRAPP010	CCGCAACCTCTATTGGGACAA		
TRAPP04	ATGGAGGAGCTAGGTCGATA		
TRAPP04	CTCCGAAGATTTATGAGATT		
TRAPP04	CCGCTCAGTCTTAATGAGAA		
TRAPP05	CACCTACATCTCCGCTGCCAA		
TRAPP05	CAGGAGAAGCAGGACGCTCAA		
TRAPP05	CAGGCTCATGATCAAGTTCGA		

表1 : siRNA の標的配列

(c) 深部静脈血栓症マウスモデル

深部静脈血栓症モデルを用いて実験を行った⁴⁾。
 週齢8週のマウスをペントバルビタールを用いて
 麻酔し、開腹後、下大静脈を剥離した。右腎静脈
 直レベルで腹部下大静脈を27G注射針とともに
 結紮し、27G注射針を抜き取り、下静脈狭窄を作
 製した。
 狭窄作成48時間後に再開腹し、腹部静脈を取り
 出し、静脈内に形成された血栓を取り出した。静
 脈内で形成された血栓の性状、重さ、長さの評価
 した。

(d) 遺伝子欠損マウス

Tamoxifen 誘導性内皮特異的 G_{q11}^{-1} に連続 5 日間、Tamoxifen を腹腔内注射し、最終投与日から 1 週後に実験に使用した。

Tamoxifen 投与 (-) の状態では、コントロールマウスと同様に血管内皮に G_{q11} が発現し、tamoxifen 投与により血管内皮から G_{q11} が欠損することを確認している。

(e) データ解析

2 群の解析には t 検定を用い、3 群以上の解析には ANOVA を用いて、データ解析を行った (* <0.05, ** <0.01, *** <0.001)。

III. 結果

G_{q11} と vWF 分泌について

G タンパク質が静脈血管内皮からの凝固因子分泌に関与しているかを調べるため、HUVEC 細胞からの vWF 分泌量を測定した。G タンパク質には 4 つのサブファミリーが知られているが (G_s , G_i , G_{q11} , $G_{12/13}$) が知られている。本研究では、 G_{q11} , $G_{12/13}$ のサブファミリーを評価するため、siRNA 導入により HUVEC の G_{q11} , $G_{12/13}$ を欠損させ、vWF 分泌について検討を行った。

コントロール群では、Thrombin、Histamin、Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) 刺激により経時的に vWF の分泌が増加した (Figure 1)。

Thrombin 刺激下 vWF 分泌は G_{q11} 欠損により抑制されたが、 $G_{12/13}$ 欠損では、その分泌は抑制されなかった (Figure 1a)。 G_{q11} が Thrombin 刺激に伴う vWF 分泌に関与していることが示唆されたため、他の刺激によって誘発される vWF 分泌についても検討した。検討の結果、 G_{q11} 欠損により Histamin 誘発性の vWF 分泌は抑制されたが、PMA 刺激による vWF 分泌は抑制されなかった (Figure 1b, c)。

これらのデータは、 G_{q11} は静脈内皮細胞における vWF の分泌に関与していることが示唆された。 G_{q11} の siRNA 導入は、GPCR を介する Thrombin もしくは Histamin 刺激による vWF 分泌を抑制するが、GPCR を介さない PMA 刺激による vWF 分泌には影響していないことから、si G_{q11} による vWF 分泌抑制は siRNA の非特異的な作用でなく、GPCR・G タンパク質が制御する分泌機構が静脈

内皮に有することが示唆された。

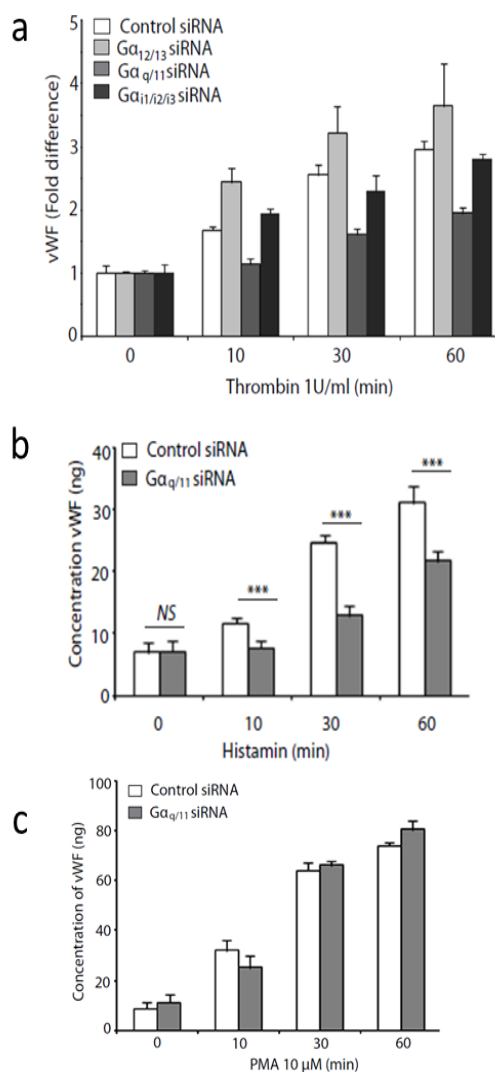


Figure 1. HUVEC 細胞からの vWF 分泌。

a) Thrombin 刺激、b) Histamin 刺激、c) PMA 刺激。

細胞内 vWF と細胞表面 vWF

G_{q11} siRNA による HUVEC 細胞からの vWF 分泌低下が (1) 分泌能低下もしくは (2) 産生低下による vWF 分泌低下を評価するため、細胞表面に局在する vWF と細胞内 vWF を評価した (Figure 2)。

HUVEC 細胞表面 vWF は、細胞をホルマリン固定後、抗 vWF 抗体を用いて免疫染色を行った。Thrombin 刺激により速やかに細胞表面へ vWF が分泌されることが確認された (Figure 2a)。siRNA による G_{q11} 欠損により、細胞表面への vWF の分泌が抑制された (Figure 2a, b)。

次に、細胞内 vWF を評価するため、細胞膜透過処理試薬により細胞膜に穴をあけ、細胞内 vWF を抗 vWF 抗体により免疫染色を行った (Figure 2c)。染色の結果、細胞内 vWF は control siRNA と $G_{q/11}$ siRNA の HUVEC 内の vWF 発現量には差はなく、 $G_{q/11}$ siRNA は vWF の細胞内産生には影響しないことを確認した。

Figure 2 の結果より、 $G_{q/11}$ は HUVEC 細胞の vWF 産生を制御しているのではなく、vWF 分泌を制御していると考えられた。Figure 1c に示した、 $G_{q/11}$ siRNA が PMA 刺激による vWF 分泌を抑制しないことも、 $G_{q/11}$ siRNA が細胞内 vWF 産生に影響を及ぼさないことを示唆していると考えられた。

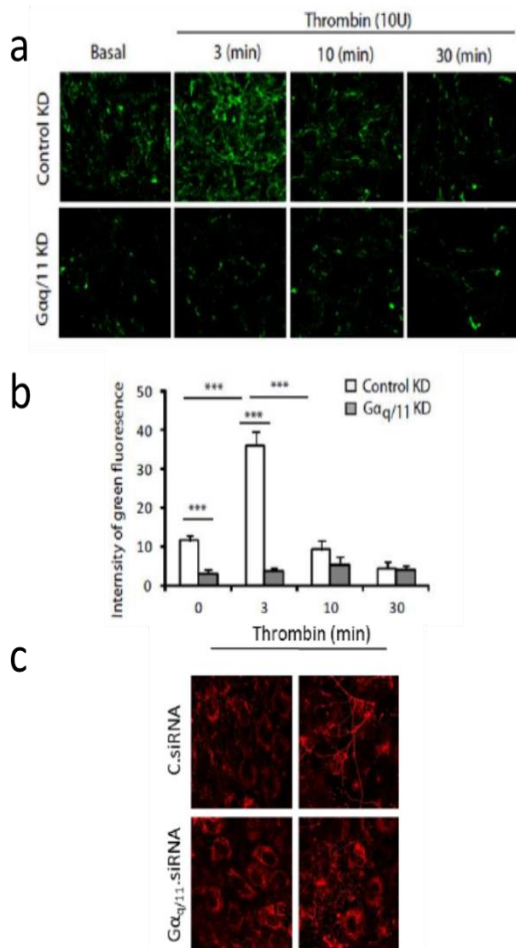


Figure 2. HUVEC 細胞表面 vWF と細胞内 vWF。

(a) Thrombin 刺激による細胞表面 vWF の経時的変化 (抗 vWF 抗体による免疫染色)。 (b) 同グラフ (c) 細胞内 vWF の免疫染色

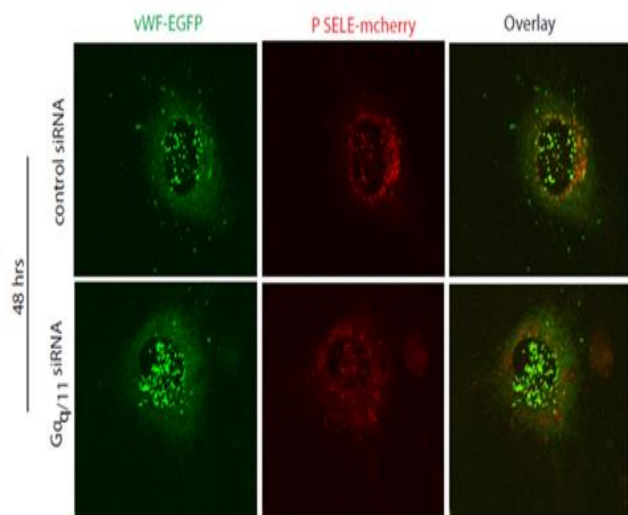
vWF と Weibel-Palade body

vWF は細胞内では P セレクチンなどのほかの分子とともに Weibel-Palade body と呼ばれる顆粒内に存在し、Weibel-Palade body が細胞膜と融合し、細胞外へと分泌されることが知られている^{5),6)}。

$G_{q/11}$ が Weibel-Palade body 形成に影響を及ぼしているかを検討した。siRNA により HUVEC 細胞内の $G_{q/11}$ 欠損させ、細胞内の Weibel-Palade body を GFP-vWF と抗 P セレクチン抗体で免疫染色した。免疫染色の結果、siRNA による $G_{q/11}$ 欠損により、Weibel-Palade body の減少は認められなかった。

Figure 2 と Figure 3 の結果より、 $G_{q/11}$ が vWF 産生や Weibel-Palade body 形成に影響を与えることなく、vWF 分泌に関与していると考えられた。

Figure 3. $G_{q/11}$ と Weibel-Palade body



深部静脈血栓形成と $G_{q/11}$

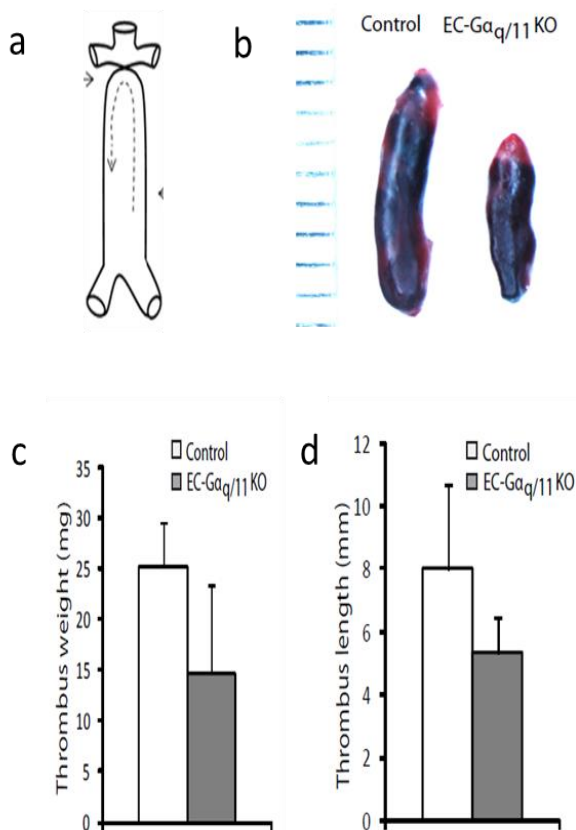
深部静脈血栓症について、マウスモデルを用いて、評価を行った。週齢 8 週のマウスにペントバルビタール麻酔した後、開腹し、腹部下大静脈に狭窄を作製した (Figure 4a)。48 時間後に再開腹し、腹部下大静脈を取り出した。静脈狭窄により、腹部下静脈内に血栓が形成されることを確認した。

(Figure 4b)。

細胞実験より、 $G_{q/11}$ が静脈内皮からの vWF 分泌に関与していることが示唆されたことから、tamoxifen 誘導性の内皮細胞特異的 $G_{q/11}$ 欠損マウスを作成し⁷⁾、コントロールマウスと同様、腹部下大静脈に狭窄を作製し、静脈内に形成される血

栓を評価した。内皮特異的 $G_{q/11}$ 欠損マウスでは、形成される血栓の長さ、重さともに、コントロールマウスと比較し、縮小していることが示された (Figure 4b, c, d)。これらの結果より、静脈内皮の $G_{q/11}$ が深部静脈血栓の形成に関与していると考えられた。

Figure 4. 深部静脈血栓症と $G_{q/11}$ (a) 術シエーマ、(b) 静脈内血栓像、(c, d) 血栓の重量・長さ



vWF 分泌と SNARE タンパク質

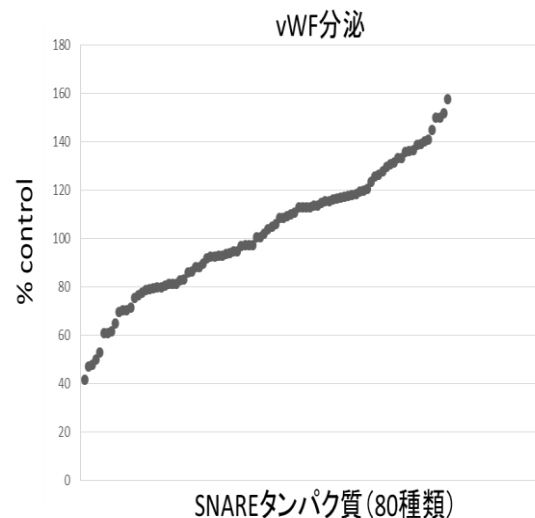
Figure 2 および Figure 3 の結果より、 $G_{q/11}$ が Weibel-Palade body と細胞膜と融合に関与し、vWF の細胞外分泌を制御しているという仮説をたてた。

細胞内顆粒と細胞膜の融合には SNARE タンパク質が関与していることが知られている^{8,9)}。顆粒と細胞膜の膜表面に SNARE タンパク質が局在している。顆粒の SNARE タンパク質と細胞膜の SNARE タンパク質が結合することにより、細胞質内の顆粒が細胞膜へ移動し、顆粒と細胞膜が結合・融合し、顆粒内の物質が細胞外へと分泌される。vWF 分泌に、いずれの SNARE タンパク質

が関与しているかについて siRNA を用いて、網羅的に解析した (表 1)。

SNARE タンパク質は哺乳類では約 80 種報告されており、全ての SNARE タンパク質に対して 3 種類ずつの siRNA を用意した。HUVEC 細胞に各 SNARE タンパク質の siRNA 導入し、SNARE タンパク質を欠損させた。各 SNARE タンパク質を欠損させた HUVEC 細胞に Thrombin を添加し、siControl の vWF 分泌量を 100% とし、検討した。解析の結果、SNARE タンパク質 (SNARE X) を欠損させることにより、vWF の分泌量が 60% 以上減少することを見出した (Figure 5)。また siSNARE X は基礎 vWF 分泌量に影響していないことを確認している (data not shown)。

Figure 5. siRNA を用いた網羅的スクリーニング



SNARE タンパク質と深部静脈血栓 (1)

SNARE X の遺伝子欠損マウスを用

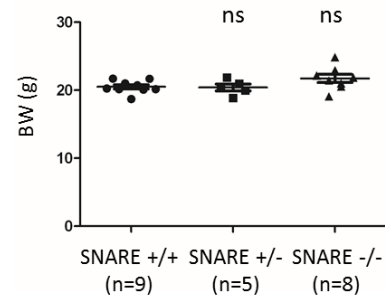


Figure 6. SNARE X 欠損マウス

を用意し、in vivo 実験を行った。SNARE X 欠損マウスでは、特に体重などの変化を認めなかつ

た (Figure 6)。

Figure 6. SNARE X 欠損マウス

次に、G タンパク質欠損マウスと同様、SNARE X 欠損マウスにも深部静脈形成モデルを用いて、血栓形成について評価を行った (Figure 7)。SNARE 欠損マウスでは深部静脈血栓の長さ、重さともに抑制されていた。

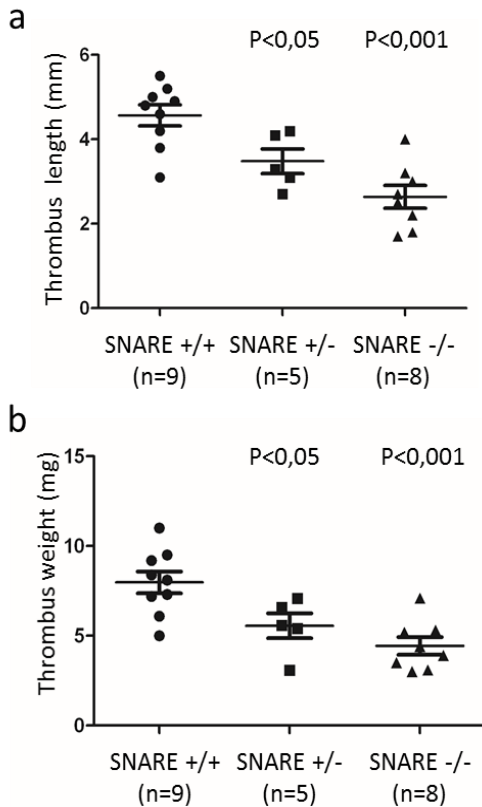


Figure 7. SNARE X と深部静脈血栓

(a) 血栓の長さ、(b) 血栓の重さ

SNARE タンパク質と深部静脈血栓 (2)

深部血栓の形成には静脈の他、血球細胞も働いている。SNARE X はユビキタスに発現しており、血球細胞の SNARE X が血栓形成により強く関与している可能性がある。血球細胞の影響の有無を検討するため、X 線照射後に、表 2 に示す骨髄移植を行った。

	ドナー		レシピエント
1	Wild Type マウス	→	Wild Type マウス
2	SNAREノックアウトマウス	→	Wild Type マウス
3	Wild Type マウス	→	SNAREノックアウトマウス
4	SNAREノックアウトマウス	→	SNAREノックアウトマウス

表 2. 骨髄移植

骨髄移植 5 週間後に体重を測定したが、4 群に特に有意な差は認めなかった (Figure 8a)。表 2 に示したマウス群に深部静脈血栓術を施行した (Figure 8b, c)。「Wild type から骨髄移植を受けた SNARE X ノックアウトマウス」と「ノックアウトから骨髄移植を受けた wild type マウス」は、ともに、コントロール群 (ドナー、レシ

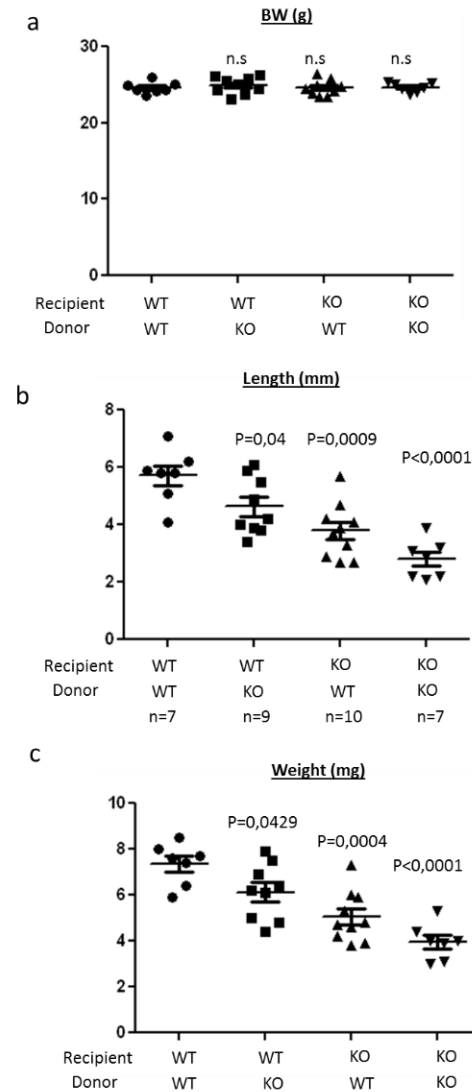


Figure 8. 骨髄移植 8 週後の深部静脈血栓

a) 体重、(b) 血栓長さ、(c) 血栓重量

ピエントともに wild type) よりも血栓の長さ、重さともに減少していた。しかし、「Wild type から骨髄移植を受けた SNARE X ノックアウトマウス群」が「ノックアウトから骨髄移植を受けた wild type マウス群」よりも血栓が縮小している傾向にあった。これらの結果は、血球成分に存在する SNARE X よりも、血球成分以外血球成分以外の組織の SNARE X が深部静脈血栓形成に関与していることが示唆しており、筆者らは血管内皮の SNARE X が深部静脈血栓に関与していると考えている。

IV. 考察

G タンパク質は、細胞遊走や細胞収縮などの現象を制御していることが知られ、外部からの刺激を 7 回膜貫通型受容体(GPCR)が受け、GPCR と共役して働いている。本研究で用いた Histamin などの細胞外刺激の受容体は GPCR であり、GPCR/G タンパク質のシグナルが静脈内皮細胞からの vWF 分泌を制御していることを明らかにした。

細胞内では vWF は Weibel-Palade body に含まれ、Weibel-Palade body が細胞膜と融合し、Weibel-Palade body 内の vWF が細胞外へ分泌される。小胞子と細胞膜の架橋には SNARE タンパク質が関与しており、本研究では、SNARE タンパク質が vWF の分泌に関与していることを in vitro、in vivo 実験で明らかにした。

助成期間内の研究結果は Figure1-8 に示した通りであるが、今後の研究について、筆者らの仮説、preliminary な実験結果も踏まえて、記載する。Figure1-8 のデータでは G_{q11} と SNARE のシグナル伝達について示していないが、SNARE を用いた生化学的な質量分析法では G_{q11} 下流で活性化される Rac/Cdc42 関連分子が SNARE と結合することを見出している。またメタボローム解析や質量分析法を用いた in vivo 解析を用いて、静脈内の凝固因子分泌の細胞シグナル経路を検討している。

V. 結論

本研究では、静脈内皮の凝固因子分泌機構が深部静脈血栓形成に関与していることが示唆され、G タンパク質 G_{q11} が凝固因子分泌を制御していると考えられた。

VII. 参考文献

- 1) Sivaraj KK, Takefuji M, Schmidt I, et al. G13 controls angiogenesis through regulation of VEGFR-2 expression. *Dev Cell*. 2013; 25(4):427-434.
- 2) Takefuji M, Krüger M, Sivaraj KK, et al. RhoGEF12 controls cardiac remodeling by integrating G protein- and integrin-dependent signaling cascades. *J Exp Med*. 2013; 210(4):665-673.
- 3) Takefuji M, Wirth A, Lukasova M, et al. G(13)-mediated signaling pathway is required for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure. *Circulation*. 2012; 126(16):1972-1982.
- 4) Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood*. 2011; 117(4):1400-1407
- 5) Weibel ER. Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells. *J Thromb Haemost*. 2012 Jun; 10(6):979-984.
- 6) Rondaij MG, Bierings R, Kragt A. et al. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 May; 26(5):1002-1007.
- 7) Herroeder S, Reichardt P, Sassmann A, et al. Anaphylactic shock depends on endothelial Gq/G11. *J Exp Med*. 2009 Feb 16; 206(2):411-420.
- 8) Wu LG, Hamid E, Shin W, et al. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2014; 76:301-331.
- 9) He B, Guo W. The exocyst complex in polarized exocytosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Aug; 21(4):537-542.

遺伝子改変血栓症モデルマウスを用いた 深部静脈血栓症の病態解析と新規治療法の開発

国立循環器病研究センター 分子病態部・上級研究員
坂野史明

I. 緒言

深部静脈血栓症 (DVT) や肺塞栓症などの静脈血栓塞栓症の発症機序については従来不明な点が多かったが、動物モデルを用いた解析から、近年その理解が進んだ¹⁾。マウス下大静脈の部分狭窄や、電気分解を利用した内皮活性化により DVT を引き起こすモデルが開発され²⁾、これらを用いた検討から、初期病変の形成に血小板が必須の役割を担うことが明らかにされている。血小板接着タンパク質であるフォンビルブランド因子 (VWF) の欠損マウスでは、DVT 発症が抑制される³⁾。また、血小板と VWF の結合を阻害する抗体を野生型マウスに投与することで DVT を予防できることから、VWF を介した血小板の活性化が DVT 発症のトリガーになると考えられている³⁾。活性化血小板は好中球から Neutrophil Extracellular Traps (NETs) と呼ばれる染色体 DNA を含む核内容物の放出を促し、これを足場として凝固反応が亢進する⁴⁾。また、活性化血小板自体もポリリン酸という凝固促進物質を放出することが明らかにされている⁵⁾。静脈血栓はフィブリン主体の凝固血栓であり、血小板凝集塊の取り込みは動脈血栓に比べて少ない。しかし、最近の知見から凝固カスケードの起動に、血小板-VWF 相互作用と白血球活性化が重要となることが明らかにされ、これらを標的とした新たな治療戦略が期待できる状況にある。

VWF はモノマーが多数連なったマルチマーとして血中に分泌され、その血小板接着活性はマルチマーが大きいほど強い。血中では ADAMTS13 という特異的プロテアーゼが VWF マルチマーを適度に断片化することで正常な止血機能が維持されている⁶⁾。ADAMTS13 活性が欠乏すると VWF 依存性の過剰血小板凝集により、血栓性血小板減少性紫斑病という微小血管障害症が引き起こる⁶⁾。ADAMTS13 は、高ずり応力環境下や VWF が血小板と結合した場合

に限って VWF を切断するため、出血副作用の少ない血小板凝集制御分子として注目されている。

申請者らは ADAMTS13 欠損マウスを樹立し、本欠損マウスでは血小板血栓形成が亢進すること^{7,8)}、脳梗塞モデルおよび心筋梗塞モデル実験にて梗塞巣が拡大すること^{9,10)}を報告してきた。本研究では ADAMTS13 欠損マウスを用いて、ADAMTS13 による VWF 活性制御と DVT 発症の関係性を明らかにし、組換え体 ADAMTS13 による DVT 治療効果を解析することで、DVT 予防、治療に ADAMTS13 を応用可能か検証することを目的とした。

II. 対象・方法

【実験動物】

野生型 129/Sv マウスおよび 129/Sv マウス系統の遺伝的背景を持つ ADAMTS13 欠損マウス (*Adamts13^{-/-}*)⁷⁾を解析対象とした。

動物実験は国立循環器病研究センター動物実験委員会の承認を得て実施した。

【組換え体 ADAMTS13 の精製】

ヒト ADAMTS13 発現プラスミドを CHO 細胞に導入し、培養上清中に分泌された組換え体ヒト ADAMTS13 を回収後、HiTrap SP カラムを用いて精製した¹¹⁾。得られた ADAMTS13 の活性は特異的蛍光基質 FRET-S-VWF73 を用いて測定した¹²⁾。

【電気分解による下大静脈障害深部静脈血栓症 (DVT) モデル^{2,13)}】

トリプロモエタノール麻酔下、マウス下大静脈にステンレス電極を挿入して 200 μ A または 100 μ A で 10 分間通電した。電極の電気分解の結果生じるフリーラジカルにより、血管内皮細胞が活性化し、血栓形成が誘発される。生じる血栓が最大となる処置 2 日後に採血して末梢血血小板数を測定後、実体顕微

鏡下に下大静脈内血栓を取り出し、その湿重量を測定した(図1)。また、ADAMTS13 投与による治療効果を検証するため、一部の処置マウスに組換え体ヒト ADAMTS13 (2,600 U/kg) を静注して同様に解析した。

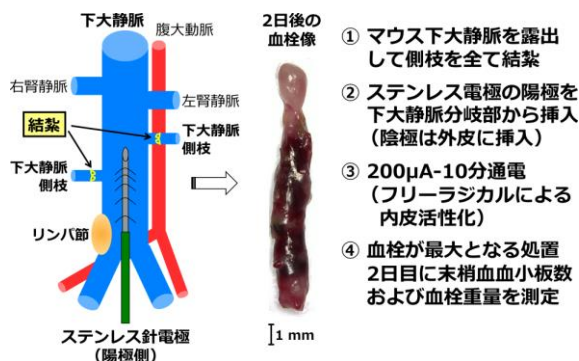


図1 電気分解による DVT モデル

III. 結果

まず、200 μ A \cdot 10 分間の通電条件により DVT を誘発した結果、*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて、消耗性と考えられる血小板減少が重症化した(野生型 = $41.1 \pm 19.4 \times 10^4/\mu\text{L}$, N = 9; *Adamts13*^{-/-} = $15.3 \pm 8.8 \times 10^4/\mu\text{L}$, N = 6; 平均値 \pm SD; $P < 0.01$)。この条件下では、*Adamts13*^{-/-}マウスで処置 2 日以前に死亡する個体が出現した(9 匹中 3 匹, 野生型マウスは 9 匹中死亡個体は 0 匹)。*Adamts13*^{-/-}マウスは静脈血栓誘発刺激に脆弱であり、致死性の塞栓が生じた可能性がある。

血管障害刺激をより穏やかな 100 μ A \cdot 10 分間の通電条件にすると、野生型、*Adamts13*^{-/-}マウス共に処置 2 日目までに死亡例は見られず、血小板減少も緩やかに留まった。しかし、下大静脈内に形成された血栓の重量は *Adamts13*^{-/-}マウスで野生型マウスに比べて大きく(野生型 = 5.6 ± 4.4 mg, *Adamts13*^{-/-} = 10.9 ± 8.4 mg)、ADAMTS13 欠損が DVT 悪化の原因となることが確認された(図 2)。そこで、通電処置後のマウスに組換え体ヒト ADAMTS13 を投与して治療効果を解析した結果、この投与により *Adamts13*^{-/-}マウスの血栓重量は野生型マウスと同レベルにまで改善することが明らかになった(野生型(投与なし) = 5.6 ± 4.4 mg, 野生型(投与あり) = 4.0 ± 3.2 mg, *Adamts13*^{-/-}(投与あり) = 4.8 ± 3.2 mg)(図 2)。

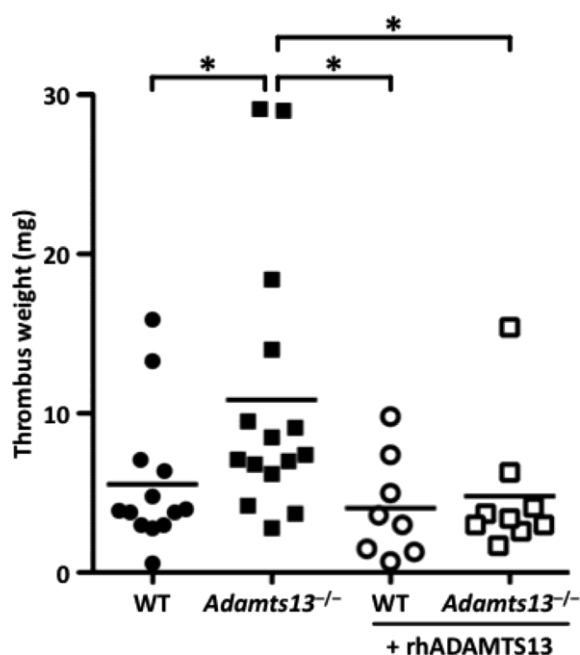


図2 DVT 誘発 2 日後の下大静脈内血栓重量

WT: 野生型マウス群 (N = 13), *Adamts13*^{-/-}: *Adamts13*^{-/-}マウス群 (N = 15), WT+rhADAMTS13: 野生型マウスに組換え体ヒト ADAMTS13 を投与した群 (N = 8), *Adamts13*^{-/-}+rhADAMTS13: *Adamts13*^{-/-}マウスに組換え体ヒト ADAMTS13 を投与した群 (N = 9), * $P < 0.05$ vs. ADAMTS13^{-/-}群。

IV. 考察

マウス下大静脈障害 DVT モデルを用いた検討の結果、*Adamts13*^{-/-}マウスでは野生型マウスに比べて静脈血栓形成亢進が認められた。この *Adamts13*^{-/-}マウスの症状は、組換え体ヒト ADAMTS13 の投与により、野生型マウスと同レベルにまで改善されたことから、少なくともマウスでは ADAMTS13 が DVT の抑制に寄与していることが明らかとなった。DVT 患者の次世代シーケンサーを用いた解析から、ADAMTS13 遺伝子変異が DVT 発症と有意な関連を示すことも報告されており¹⁴⁾、ADAMTS13 による VWF 依存性血小板接着・凝集の抑制は、DVT をはじめとする静脈血栓塞栓症発症においても重要な役割を担っていると考えられる。

V. 結論

本研究により、マウス DVT 発症における ADAMTS13 の病態生理学的重要性を解明することができた¹⁵⁾。現在、DVT の治療には主に抗凝固薬が用いられるが、長期投与では出血合併症が出現し、投与中止は再発を招くため、副作用の少ない新規治

療薬の開発が待たれている。ずり応力や血小板接着依存的に VWF を切断する ADAMTS13 は、病的血栓のみを溶解し、出血リスクの低い DVT 予防、治療薬として格好の候補分子になると考えられる。

VI. 研究協力者

田 畠 優 子

国立循環器病研究センター 分子病態部・流動研究員

秋 山 正 志

国立循環器病研究センター 分子病態部・室長

宮 田 敏 行

国立循環器病研究センター 分子病態部・部長

VII. 参考文献

- 1) Mackman N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 2331-2336.
- 2) Diaz JA, Obi AT, Myers DD Jr, et al. Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 ; 32 : 556-562.
- 3) Brill A, Fuchs TA, Chauhan AK, et al. von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* 2011 ; 117 : 1400-1407.
- 4) Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 ; 32 : 1777-1783.
- 5) Morrissey JH, Choi SH, Smith SA. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood* 2012 ; 119 : 5972-5979.
- 6) 宮田敏行, 小亀浩市, 秋山正志ほか. ADAMTS13 研究の最先端. *臨床血液* 2012 ; 53 : 672-679.
- 7) Banno F, Kokame K, Okuda T, et al. Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2006 ; 107 : 3161-3166.
- 8) Banno F, Chauhan AK, Kokame K, et al. The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood* 2009 ; 113 : 5323-5329.
- 9) Fujioka M, Hayakawa K, Mishima K, et al. ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage: a possible neuroprotective role of ADAMTS13 by ameliorating postischemic hypoperfusion. *Blood* 2010 ; 115 : 1650-1653.
- 10) Doi M, Matsui H, Takeda H, et al. ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2012 ; 108 : 1236-1238.
- 11) Akiyama M, Takeda S, Kokame K, et al. Crystal structures of the noncatalytic domains of ADAMTS13 reveal multiple discontinuous exosites for von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 19274-19279.
- 12) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al. FRETTS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005 ; 129 : 93-100.
- 13) Diaz JA, Hawley AE, Alvarado CM, et al. Thrombogenesis with continuous blood flow in the inferior vena cava. A novel mouse model. *Thromb Haemost* 2010 ; 104 : 366-375.
- 14) Lotta LA, Tuana G, Yu J, et al. Next-generation sequencing study finds an excess of rare, coding single-nucleotide variants of ADAMTS13 in patients with deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* 2013 ; 11 : 1228-1239.
- 15) Tashima Y, Banno F, Akiyama M, et al. Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. *Thromb Haemost* 2015 ; 114 : Epub ahead of print.

低用量ピルとプロテイン S 抗原量・活性及び 遺伝子変異に関する研究

国立循環器病研究センター
周産期・婦人科部 医師

三好 剛一

I. 緒言

近年、低用量ピル内服患者における血栓症が大きな社会問題となっている。ピル内服中の血栓症の発症頻度は 10 万人に 3-4 人と、一般的な発症頻度より数倍高くなることが報告されている。血栓症は脳梗塞や肺塞栓症に至った場合は神経学的予後のみでなく生命予後にも関わるため、発症を予防することが臨床で極めて重要である。血栓症のリスク因子として、年齢（40 歳以上）、喫煙、肥満、家族歴等が知られているが、それらのリスク因子の有無に関わらず血栓症は発症するため、現時点ではピル内服後の血栓症発症予測は困難と考えられる。

血栓症の発症機序に関してはまだ解明されていない点も多いが、近年、様々な医療分野において遺伝子検査が広く臨床応用されるのに伴って、先天性の血栓性素因が注目されてきている。欧米人では第 V 因子ライデン変異が多いが日本人では見られない。先天性血栓性素因として、アンチトロンビン、プロテイン S、プロテイン C の欠損症がよく知られている。このうちプロテイン S 欠損症が日本人

などアジア系人種では頻度が高く、プロテイン S 徳島変異（K196E 変異）は約 55 人に 1 人の頻度と報告されている¹⁾⁶⁾。プロテイン S 抗原量及び活性は年齢や性別により差があることは分かっているが、現時点では標準値は存在しない。プロテイン S 遺伝子変異を有すれば血栓症を発症する訳ではなく、またプロテイン S 遺伝子変異の有無とプロテイン S 抗原量及び活性が必ずしも相関していないことも指摘されており、血栓症の発症には幾つかの必要条件があると考えられる。

一方で、妊娠や低用量ピルの内服などのエストロゲン曝露によりプロテイン S 抗原量及び活性が低下することは分かっている^{7), 8)}。しかし、エストロゲン曝露によりどの程度低下するのか、どの程度まで低下すると血栓症を発症するのか、さらにそれらにプロテイン S 遺伝子変異の有無がどのように関与しているのかはまだ十分に検証されていない。そのため、ピル内服患者における血栓症の発症にプロテイン S がどの程度関与しているかは現時点では明らかでない。

本研究では、低用量ピルの内服前後におけ

るプロテイン S 抗原量・活性の変化及びプロテイン S 遺伝子変異を調べることにより、① 日本人女性 (20-50 歳) におけるプロテイン S 抗原量・活性の標準値 (プロテイン S 欠損症の診断基準) の作成、② 低用量ピルによるプロテイン S 抗原量・活性の低下率と遺伝子変異との関係を明らかにすることを目的としている。将来的には、ピル内服前のスクリーニング検査としてプロテイン S 検査 (抗原量・活性もしくは遺伝子検査) を導入することにより、血栓症の高リスク群を抽出できれば、血栓症の発症を予防することが期待されるため、臨床的意義は大きいと考えられる。

II. 対象・方法

<研究デザイン>

多施設共同・前方視的観察研究

<対象>

新規の低用量ピル内服予定者
(20~50 歳までの女性)

除外規定

- ① 3ヶ月以内にピルを内服している場合
- ② 出産後3ヶ月以内の場合
- ③ 抗凝固薬・抗血小板薬内服中の場合
- ④ ピルの内服予定期間が1ヶ月未満 (緊急避妊など) の場合
- ⑤ 18歳未満の場合
- ⑥ 遺伝性素因等の個別結果の開示を希望されない場合
- ⑦ その他、研究者が適切でないと判断した場合

<予定登録数及び症例登録期間>

- ・症例登録期間：2年間
- ・予定登録数：1350人

<評価項目及び観察期間>

観察期間：低用量ピル内服後6ヶ月間

・主要評価項目

- ① 内服前後のプロテイン S 抗原量・活性の変化
- ② プロテイン S 抗原量・活性と遺伝子変異の関連

・副次評価項目

- ① 血栓イベントの発症率
- ② 血栓イベント発症者と遺伝子変異の関連
- ③ ピル内服前後のアンチトロンビン抗原量・活性及びプロテイン C 抗原量・活性の変化

<検査プロトコール>

採血時期はピル内服前及び内服1ヶ月後

測定項目① プロテイン S 抗原量・活性、アンチトロンビン抗原量・活性、プロテイン C 抗原量・活性、PT、aPTT、D-dimer

測定項目② プロテイン S 徳島変異 (K196E 変異)

※血栓イベント発症者ではシーケンス解析を追加

<研究協力施設>

- ・国立循環器病研究センター
- ・茶屋町レディースクリニック

両施設の倫理委員会における承認の下、被験者より文書による説明同意 (国立循環器病研究センターバイオバンクの説明同意も含む) を得た上で実施した。

<採血場所、測定場所及び保管場所>

- ・採血場所
茶屋町レディースクリニック
- ・測定場所及び保管場所
国立循環器病研究センターバイオバンクで集積・保管、臨床検査室で測定
遺伝子検査は国立循環器病研究センター分子病態部で実施

Ⅲ. 結 果

平成 26 年 8 月～平成 27 年 3 月までの 8 ヶ月間に集積された 96 検体で解析を行なった。21～50 歳までの平均 30±8 歳の生来健康な女性で、平均 BMI は 20±2、血栓症の家族歴を 2 例で有していたが、観察期間中に血栓イベント発症者は認めなかった。処方された低用量ピルの内訳を表 1 に示す。

表 1 低用量ピルの内訳 (n=96) エストロゲンは全てエチニルエストラジオールで、代表的な含有量を記載

	症例数	エストロゲン含有量 (mg/錠)	プロゲステロンの種類
超低用量ピル	47	0.020	ノルエチステロン
第1世代ピル	36	0.040	ノルエチステロン
第2世代ピル	5	0.030 - 0.035	レボノルゲストレル
第3世代ピル	8	0.030	デソゲストレル

低用量ピル内服前及び内服 1 ヶ月後の測定値を以下に提示する (表 2、図 1～6)。プロテイン S 抗原量・活性及びアンチトロンビン抗原量・活性はいずれも低用量ピル内服後に有意に低下した ($p<0.05$)。プロテイン C に関して、抗原量は低用量ピル内服前後で変化を認めなかったが、活性は低用量ピル内服後に有意に上昇した ($p<0.05$)。低用量ピル内服後に、PT-INR および aPTT は有意に延長、一方で D-dimer は有意に上昇した ($p<0.05$)。

プロテイン S 徳島変異 (K196E 変異) のスクリーニングを全例で実施した結果、1 例でヘテロ接合体変異が検出された。陽性例において、プロテイン S 抗原量・活性は低用量ピル内服後でいずれも平均値より低値を呈し、とくに活性がより低値であった。一方、プロテイン C 抗原量・活性はいずれもピル内服後に上昇、アンチトロンビン抗原量・活性はいずれもピル内服前後で変化を認めず (低下せ

ず)、陰性例と異なる変化を呈していたが、陽性例は 1 例のみであり統計学的な検討は困難であった。

また、現時点で集積された症例数では、プロテイン S 抗原量・活性の正常値設定及び正常群とプロテイン S 徳島変異 (K196E 変異) 群との比較検討は困難であった。

表 2 低用量ピル内服前及び内服 1 ヶ月後の各種項目の測定値 (n=96)

	ピル内服前	ピル内服後	P 値
プロテイン S 抗原量 (%)	87±13	83±15	0.04
プロテイン S 活性 (%)	83±14	74±13	<0.01
プロテイン C 抗原量 (%)	101±13	104±14	0.91
プロテイン C 活性 (%)	106±12	112±15	<0.01
アンチトロンビン抗原量 (%)	99±7	90±7	<0.01
アンチトロンビン活性 (%)	103±7	93±7	<0.01
PT-INR	1.00±0.05	0.92±0.06	<0.01
aPTT (sec)	29±3	27±6	<0.01
D-dimer (ug/mL)	0.7±0.5	1.0±1.2	<0.01
D-dimer >1.0 ug/mL	8 (8%)	18 (19%)	<0.05

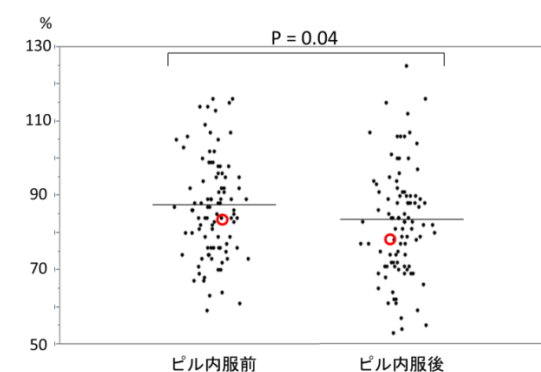


図 1 低用量ピル内服前後のプロテイン S 抗原量
○はプロテイン S 徳島変異陽性例

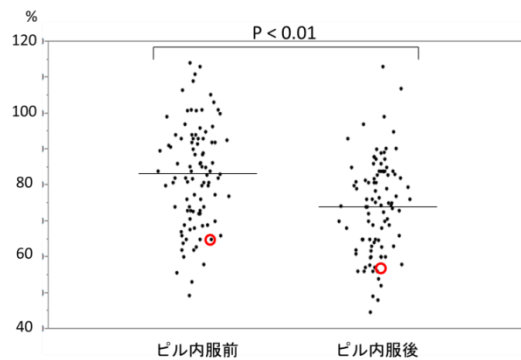


図2 低用量ピリン内服前後のプロテイン S 活性

○はプロテイン S 徳島変異陽性例

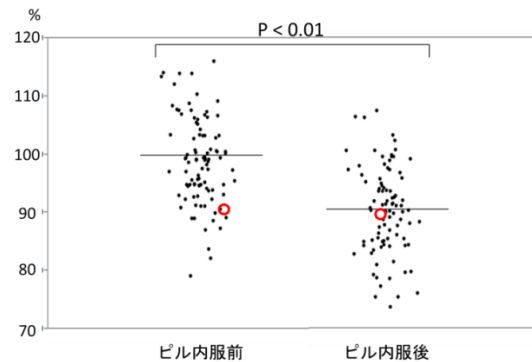


図5 低用量ピリン内服前後のアンチトロンビン抗原量

○はプロテイン S 徳島変異陽性例

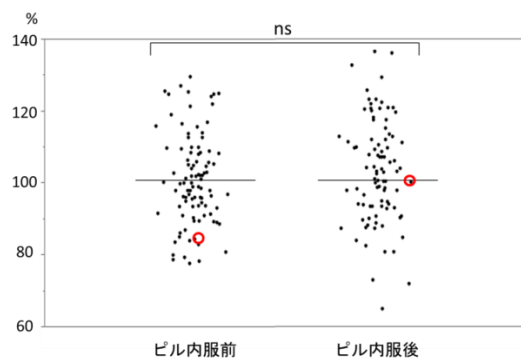


図3 低用量ピリン内服前後のプロテイン C 抗原量

○はプロテイン S 徳島変異陽性例

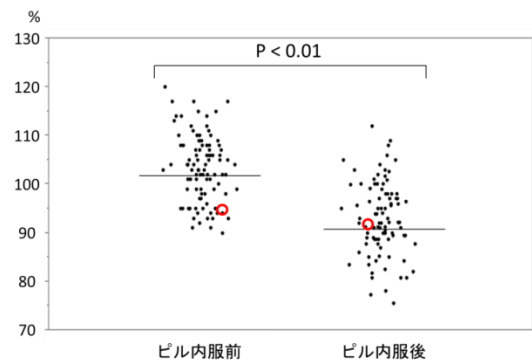


図6 低用量ピリン内服前後のアンチトロンビン活性

○はプロテイン S 徳島変異陽性例

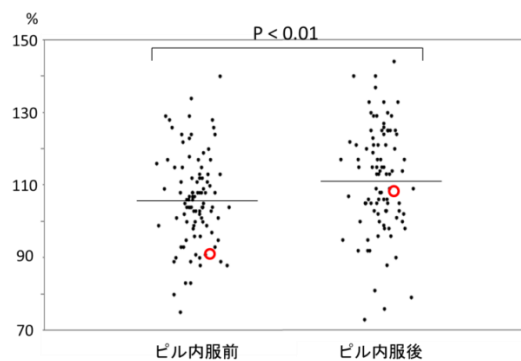


図4 低用量ピリン内服前後のプロテイン C 活性

○はプロテイン S 徳島変異陽性例

低用量ピリンの種類とプロテイン S 抗原量・活性に関して検討したところ、世代が上がるにつれて抗原量は高値を呈し（下がりにくくなり）、第三世代で活性が高い傾向が確認された。

表3 低用量ピリンの種類とプロテイン S 抗原量
年齢、BMI により補正

	β	95%信頼区間	P値
年齢	0.202	-0.244 - 0.647	0.370
BMI	-0.567	-2.077 - 0.943	0.456
低用量ピリンの世代	3.98	0.104 - 7.856	0.044

表4 低用量ピルの種類とプロテイン S 抗原量の変化
年齢、BMI により補正し、超低用量ピルと各世代のピル
を比較検討

	β	95%信頼区間	P値
年齢	0.264	-0.168 - 0.695	0.227
BMI	-0.519	-1.985 - 0.946	0.481
第1世代ピル	-2.566	-8.923 - 3.792	0.423
第2世代ピル	15.226	1.713 - 28.739	0.028
第3世代ピル	13.975	0.613 - 27.338	0.041

表5 低用量ピルの種類によるプロテイン S 活性の変化
年齢、BMI により補正し、超低用量ピルと各世代のピル
を比較検討

	β	95%信頼区間	P値
年齢	0.256	-0.225 - 0.738	0.291
BMI	-1.42	-3.052 - 0.217	0.088
第1世代ピル	-0.219	-7.311 - 6.874	0.951
第2世代ピル	7.135	-7.939 - 22.209	0.348
第3世代ピル	14.433	-0.473 - 29.339	0.057

IV. 考 察

経口避妊薬（ピル）はエストロゲンとプロゲステロンの合剤で、現在はエストロゲン含量を 50 μg 以下に減少させた低用量ピルが主流となっている^{8), 9)}。エストロゲンは肝における血液凝固因子産生を促進し、また血小板や血管内皮にも作用し血液凝固を促進させることにより、血栓症の危険因子と考えられている。エストロゲンの低用量化により、血栓症の危険性は減少したが、ピル非服用者に比べ依然として血栓症のリスクは高いことが社会的にも問題となっている。

凝固制御機序は複雑でまだ十分に解明されていない点も多いが、主に血管内皮細胞上で進

行し、その作用機序から、活性型凝固補助因子を蛋白分解して阻害するプロテアーゼ制御機序、および活性型プロテアーゼ凝固因子を直接阻害するプロテアーゼインヒビター制御機序に大別される⁸⁾⁻¹¹⁾。前者の中心的役割を担っているのがプロテイン C であり、プロテイン S はその補酵素として作用し、活性化プロテイン C の抗凝固作用を高める働きをしている。本研究結果より、低用量ピル内服後にプロテイン S 抗原量・活性が有意に低下し、逆にプロテイン C 活性は上昇していた。低用量ピル内服後や妊娠中のプロテイン C 抗原量・活性に関しては、変化がなかったもの、増加したもののいずれの報告も存在する^{9), 10)}。プロテイン S 抗原量・活性の低下に対して、急性期には代償性にプロテイン C 活性が上昇している可能性が考えられた。

一方、アンチトロンビンは、トロンビンや Xa 因子を分解する作用をもつ重要な凝固抑制因子であり、ヘパリン投与中に低下することが临床上よく知られている。本研究結果から、低用量ピル内服後にアンチトロンビンの抗原量・活性いずれも生理的な範囲内ではあるが低下を認めており、過凝固状態にあることが推察された。また、D-dimer の上昇から、線溶系の亢進も示唆された。

低用量ピルと凝固制御因子との関連を調査した従来の報告では⁸⁾⁻¹¹⁾、3~6 周期（ヶ月）内服後に測定しているのに対して、本研究では 1 周期（ヶ月）の時点で測定を行なっているが、1 周期（ヶ月）の時点で既に同様の変化が生じていることが確認された。これは、低用量ピル内服後の血栓症イベントの多くが 2~3 ヶ月以内に発生している臨床データと合致する。低用量ピル内服後は、血栓症の症状としては現れてなくとも、血液データ上の

変化は早期より生じており注意を要すると考えられた。

血栓症予防の観点からエストロゲンの低用量化が進んでいるが、本研究でのサブ解析結果から、プロゲステロンの種類によるプロテイン S 抗原量・活性への影響も無視できない可能性が示唆された。近年、プロゲステロンの種類によってプロテイン S や組織因子経路インヒビターへの影響が異なるとの報告もあり^{8)・11)}、今後、さらに症例を集積する中で、エストロゲンの含有量のみでなく、プロゲステロンの種類に関する検討も必要と考えられた。

現時点で集積された症例では、プロテイン S 徳島変異 (K196E 変異) 陽性例は 1 例のみであり、統計学的な検討は困難であった。約 55 人に 1 人と報告されており、検出頻度としては妥当であったが、今後、さらなる症例の集積が必要と考えられた。

V. 結 論

低用量ピル内服後 1 ヶ月の時点で既に凝固制御因子に変化が生じており、過凝固状態であることが確認された。特にプロテイン S 及びアンチトロンビン活性が有意に低下し、逆にプロテイン C 活性は上昇していた。今後、日本人特有の遺伝子変異であるプロテイン S 徳島変異 (K196E 変異) との関連性を明らかにするため、さらに症例の集積を進めていく予定である。

VI. 研究協力者

吉松 淳・国立循環器病研究センター・周産期・婦人科部 部長

出田和久・茶屋町レディースクリニック・院長

宮田敏行・国立循環器病研究センター・分子病態部 部長

鎌倉史郎・国立循環器病研究センター・臨床検査部 部長

宮本恵宏・国立循環器病研究センター・予防健診部 部長

西村邦宏・国立循環器病研究センター・予防医学・疫学情報部 室長

植田初江・国立循環器病研究センター・病理部 部長

松山高明・国立循環器病研究センター・臨床検査部 臨床病理科 医師

VII. 参考文献

- 1) 宮田敏行, 岡田浩美, 川崎富夫ほか. 日本人の血栓性素因. 臨床血液 2009; 50: 381-388.
- 2) 根木玲子, 宮田敏行. 遺伝性の凝固異常と静脈血栓塞栓症. 今月の臨床 2011; 65: 166-169.
- 3) Miyata T, Kimura R, Kokubo Y, et al. Genetic risk factors for deep vein thrombosis among Japanese: importance of protein S K196E mutation. Int J Hematol 2006; 83: 217-223.
- 4) Miyata T, Sato Y, Ishikawa J, et al. Prevalence of genetic mutations in protein S, protein C and antithrombin genes in Japanese patients with deep vein thrombosis. Thromb Res 2009; 124: 14-18.
- 5) Koenen RR, Tans G, van Oerle R, et al. The APC-independent anticoagulant activity of protein S in plasma is decreased by elevated prothrombin

- levels due to the prothrombin G20210A mutation. *Blood* 2003; 102: 1686-1692.
- 6) Neki R, Fujita T, Kokame K, et al. Genetic analysis of patients with deep vein thrombosis during pregnancy and postpartum. *Int J Hematol* 2011; 94: 150-155.
 - 7) Fought W, Garner P, Jones G, et al. Changes in protein C and protein S levels in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172: 147-150.
 - 8) van Vliet HA, Bertina RM, Dahm AE, et al. Different effects of oral contraceptives containing different progestogens on protein S and tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 346-351.
 - 9) Blanco-Molina Á. Oral contraception in women with mild thrombophilia: what have we learned recently? *Thromb Res* 2012; 130: S16-18.
 - 10) Tans G, Curvers J, Middeldorp S, et al. A randomized cross-over study on the effects of levonorgestrel- and desogestrel-containing oral contraceptives on the anticoagulant pathways. *Thromb Haemost* 2000; 84: 15-21.
 - 11) Raps M, Helmerhorst FM, Fleischer K, Dahm AE, et al. The effect of different hormonal contraceptives on plasma levels of free protein S and free TFPI. *Thromb Haemost* 2013; 109: 606-613.

脊椎手術における静脈血栓塞栓症の実態と早期診断方法に関する研究

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 先進運動器医療創成講座 特任助教
吉岡克人

I. 緒言

静脈血栓塞栓症 (Venous thromboembolism: VTE) に対する医学的・社会的認識の向上に伴い、整形外科領域では特に下肢の人工関節置換術後の合併症として注目され多くの研究がなされている。一方で、脊椎領域における VTE の研究は少なく、脊椎手術後の VTE に関してはいまだ十分に解明されていない。しかしながら、硬膜外血腫が危惧される脊椎手術においても、最近では国外を中心に抗凝固薬による予防法が行われつつある現状を考えると 1)、今後国内でも安易に予防的抗凝固薬が使用される危険性がある。リスクの高い症例には予防的抗凝固薬の導入も検討の余地があると考え、そのためにも脊椎周術期 VTE の実態解明が必要である。脊椎領域における最も大きな問題点は、単一疾患、単一術式による検討がほとんどないことである 2)。過去の報告では異なる疾患や部位、手術方法が含まれているため、それぞれの論文を比較することが不可能である。そのため、VTE ガイドラインでは脊椎手術を一括りで評価され、中リスク群と位置付けられている。また、VTE 研究の多くは、下肢深部静脈塞栓 (Deep vein thrombosis: DVT) のスクリーニング検査は行っているものの、肺血栓塞栓 (Pulmonary thromboembolism: PTE) のスクリーニングは併用していない。DVT が PTE の危険因子であることは言うまでもないが、無症候性の PTE が症候性 PTE の危険因子であることから 3)、VTE の実態を調査するには PTE のスクリーニングも重要と考える。

そこで本研究では、脊椎手術全例に DVT 及び PTE のスクリーニングを行い、疾患、術式別に VTE 発生頻度を調査し、その危険因子について検討した。さらに VTE の早期スクリーニングとして、可溶性フィブリン(SF)、D-dimer の有用性について評価した。

II. 対象・方法

対象は 2008 年 10 月から 2014 年 12 月までに行なった脊椎手術 1268 例のうち、下記に示すプロトコールに従い検査を行い、以下の 7 群に該当する 604 例とした。感染例や透析例、18 歳未満、術前に抗凝固薬を服薬中の症例は除外した。Group 1: 頸椎症性脊髄症に対して椎弓形成術を施行した 108 例、group 2: 頸椎変性疾患に対し頸椎固定術を施行した 59 例、group 3: 胸腰椎変性疾患に多椎間固定術を施行した 93 例、group 4: 腰部脊柱管狭窄症に対し腰椎後方除圧術を施行した 120 例、group 5: 腰椎変性すべり症に対し腰椎椎体間固定術 (1 椎間 PLIF: Posterior lumbar interbody fusion) を施行した 79 例、group 6: 脊椎腫瘍に対し後方除圧固定術を行った 55 例、group 7: 脊椎腫瘍に対し腫瘍脊椎骨全摘術を行った 92 例。変性疾患である Group 1 から 5 は手術部位、手術方法を統一し分類した。一方、Group 6、7 では脊椎腫瘍という特殊な病態を対象としており、手術部位は上位胸椎から腰椎まで含んだ。プロトコールは以下の如くである。VTE 予防として、全例に対し下肢弾性ストッキング、間欠的空気圧迫法を麻酔開始時から離床まで行った。硬膜外血腫の危惧から予防的抗凝固療法は使用していない。全症例術後 7~10 日に下肢静脈ドップラーエコー、肺血流シンチグラフィを施行し、血栓が疑われた場合は、症状の有無に関係なく静脈造影マルチスライス CT (64 列) を行い、血栓の有無を確認した。VTE 発生頻度を各群で比較し、さらに性別、年齢、手術部位、手術時間、BMI (Body mass index)、術後臥床期間、術前麻痺の有無、腫瘍の有無、について検討を行った。統計学的検討に χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定、Fisher's exact tests、二項ロジスティック回帰分析を用い、有意水準を 5% とした。また、術前、術後 1 日目に SF を、術前、術後 7 日目に D-dimer を測定し、VTE あり群、VTE なし群で比較検討した。

III. 結果

VTEの発生頻度は10.6%(64/604例)であり、DVTを9.3%(56/604例)、PTEを1.8%(11/604例)に認めた。DVTの内訳は遠位型DVTが48例、近位型DVTが8例であり、いずれも無症候性DVTであった。一方、呼吸苦など症状を有したPTE症例は0.59%(2/340例)であった。2症例とも、未分化ヘパリン、及びワーファリン治療で改善している。PTE11例のうちDVTを併発していないPTE単独発生が8例(72.7%)を占めた。遠位型DVT48例は全例経過観察のみであり、近位型DVT及びPTEの16例中治療に同意を得た15例に対して未分化ヘパリンもしくは低分子ヘパリン、ワーファリンで治療を行った。VTEの発生頻度はgroup 1からgroup 7それぞれ2.8%、3.4%、10.8%、12.5%、10.1%、15.1%、19.6%であった(図1)。危険因子の検討では、女性(P=0.036)、高齢(P=0.006)、頸椎以外(P=0.016)に有意差を認めた(表1)。また、SF、d-dimerを測定した結果、group 4に相当する腰椎除圧群においてのみ、術後1日目のSFが有意差をもってVTEあり群で高値であった(p=0.020)。一方で、他のgroupでは有意差は見られず、また、術後7日目のd-dimerではいずれの群においても有意差を認めなかった。

	No. of Patients	年齢	BMI	手術時間 (min.)	出血量 (ml)	VTE 陽性 (%)
Group 1	108	62.0	23.7	181.6	148.0	2.8
Group 2	59	53.0	21.8	204.2	175.0	3.4
Group 3	93	61.0	25.7	332.1	517.0	10.8
Group 4	120	63.0	23.8	151.3	91.7	12.5
Group 5	79	64.0	23.0	298.2	337.0	10.1
Group 6	53	53.9	22.2	337.4	737.5	15.1
Group 7	92	53.3	22.3	525.4	926.0	19.6
Total	604	61.0	23.7	227.9	246.9	10.6

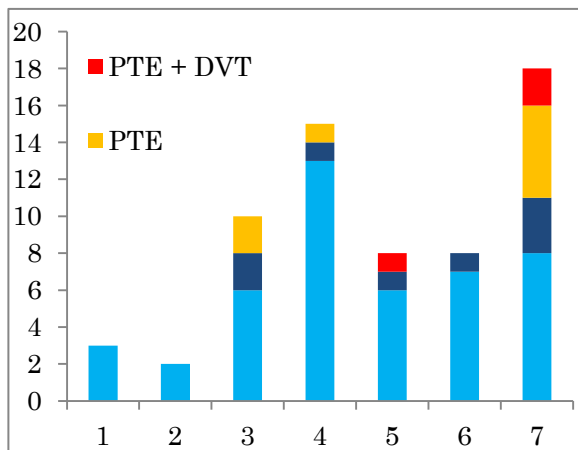


図1 VTEの内訳

表1 多変量解析

危険因子	Significance probability	Exp(B)	95.0% CI	
			under limit	upper limit
性別 (Female)	0.036	1.791	1.342	6.044
年齢	0.006	1.032	1.009	1.055
手術時間 (min)	0.785	1	0.998	1.002
術後臥床期間	0.575	1.217	0.415	1.63
麻痺	0.164	2.037	0.748	5.556
脊椎腫瘍	0.074	1.996	0.935	4.255
頸椎	0.016	0.319	0.115	0.883

IV. 考察

術後VTEの発生頻度は、手術部位や手術方法、体位などによって異なることが知られている。しかしながら、脊椎領域での研究の多くは脊椎全般を対象としているものが多く、データベースやメタアナリシスの検討も行われてはいるが、発生頻度は0.3%~15.5%と報告により大きく異なる(4-7)。さらにスクリーニングの有無や予防方法が施設によって異なるという大きな問題点も抱えている。従って、過去の脊椎手術後VTEの研究では危険因子に対する明確な記述は少ない(8)。

今回の検討では、頸椎手術(group 1, 2)のVTE発生頻度は3.0%(5/167例)であり、しかも全例遠位型のみであった。一方腰椎手術(group 4, 5)では11.6%(23/199例)と手術部位でかなりの差があることが判明した。両群において術中体位は同じであり、手術時間や手術侵襲にも差はない。従って、頸椎という手術部位自体が、VTE発生リスクを下げている要因と考える。また、頸椎での除圧術(group 1)と固定術(group 2)ではVTE発生頻度にほとんど差がなく、同様に腰椎での除圧術(group 4)と固定術(group 5)でもVTE発生頻度は同等であった。一般的に手術侵襲が高くなる固定術はVTEの危険因子となるが(9)、今回の結果からは同一部位であれば、少なくとも変性疾患に対する一般的な除圧術と固定術との間に、VTE発生頻度に大きな差がないといえる。しかしながら、group 3の多椎間固定ではVTEリスクが10%を超え、近位型DVT、PTEが40%を占めていた。Group 3はgroup 5とほぼ同様の手術方法であるが、固定範囲が広く、手術時間も大きく違いがあることから、やはり手術侵襲が非常に大きくなる場合は、VTE発生頻度に影響を与えている可能性があると考えられる。

また、脊椎腫瘍手術に対するVTEの詳細な検討は過去に報告がなく、本研究ではgroup 7が19.6%と高率にVTEを認めた。しかも、近位型DVT、

PTE が 55.6%を占めるなど、より重症度が高くなる傾向にあった。腫瘍脊椎骨全摘術では、腫瘍椎体を摘出するために椎体前方の動静脈（下大静脈など）を椎体から剥離することが必要であり、特殊な手術操作自体がVTEの原因となっている可能性がある。

一般的に危険因子と考えられる BMI や術後臥床期間は、今回の検討では有意差がでなかった。BMI 35 以上の症例は 8 例のみと、今回の症例群では肥満症例が少なかったことが影響した可能性がある。また、術後臥床による VTE 発生に関しては、下肢弾性ストッキングや間欠的空気圧迫法による予防を行ったため回避できたと考えた。

DVT が PTE の危険因子であるため、DVT 予防、DVT スクリーニングに関する注目度は高い。本研究でも潜在的な危険因子とされる遠位型 DVT が 35 例と最多であり、中でもヒラメ筋静脈での血栓を 88.6%に認めた。これは、スクリーニング検査なしでは見逃されやすい、無症候性の DVT が実際には多く存在していることを示している。しかしながら、PTE を認めた 11 例のうち 8 例は下肢静脈エコー、静脈造影マルチスライス CT のいずれにおいても DVT を認めなかった。おそらく、スクリーニング検査時には DVT が既に遊離していたと思われる。Dearborn らは、PTE 症例のいずれも臨床的に DVT の兆候はなかったと報告し 10)、Pateder らは PTE10 例中 DVT 陽性だったのは 2 例のみだったと報告している 11)。従って、DVT スクリーニングにおいては、スクリーニングの時期により血栓の有無や部位が異なることを認識する必要があると考える。以上より、高齢女性、脊椎腫瘍手術、麻痺といった複数の危険因子を併せ持つ症例では、DVT だけでなく PTE のスクリーニング検査を考慮すべきである。

また、VTE の早期スクリーニング検査として、d-dimer や SF が有用との報告が散見される。しかしながら本研究では、腰椎除圧群においてのみ術後 1 日目の SF で有意差を認めたものの、感度は決して高いものではなく、スクリーニングとして十分な結果とは言えなかった。

V. 結論

VTE の発生頻度は group 1 から group 7 それぞれ 2.8%、3.4%、10.8%、12.5%、10.1%、15.1%、19.6%と group 間で差を認めた。頸椎手術での VTE 発生は非常に少なく、しかも遠位型 DVT のみであった。除圧群における術後 1 日目の SF は VTE あ

り群で有意に高値を示したが、VTE に対する早期スクリーニングのマーカーとしては不十分な結果であった。一方、腫瘍例では高率に VTE が発生していた。また、DVT を併発しない PTE 単独発生が 72.7%を占めており、リスクの高い症例に対しては、PTE のスクリーニングも必要であると考えられる。

VI. 研究協力者

村上 英樹 金沢大学医薬保健学域機能再建学
(整形外科学) 准教授

出村 諭 金沢大学医薬保健学域機能再建学
(整形外科学) 講師

加藤 仁志 金沢大学医薬保健学域機能再建学
(整形外科学) 助教

米澤 則隆 金沢大学大学院医学系研究科がん医
科学専攻 大学院生

土屋 弘行 金沢大学医薬保健学域機能再建学
(整形外科学) 教授

VII. 文献

1. Strom RG, Frempong-Boadu AK : Low-molecular-weight heparin prophylaxis 24 to 36 hours after degenerative spine surgery: risk of hemorrhage and venous thromboembolism. Spine 2013; 38: E1498-1502.

2. Epstein NE : Intermittent pneumatic compression stocking prophylaxis against deep venous thrombosis in anterior cervical spinal surgery: a prospective efficacy study in 200 patients and literature review. Spine 2005; 30: 2538-2543.

3. Stein PD, Matta F, Musani MH, et al : Silent pulmonary embolism in patients with deep venous thrombosis: a systematic review. Am J Med. 2010; 123: 426-431

4. Smith JS, Fu KM, Polly DW Jr, et al : Complication rates of three common spine procedures and rates of thromboembolism following spine surgery based on 108,419 procedures: a report from the Scoliosis Research Society Morbidity and Mortality Committee. Spine 2010; 35: 2140-2149.

5. Gephart MG, Zygorakis CC, Arrigo RT, et al : Venous Thromboembolism After Thoracic/Thoracolumbar Spinal Fusion. World

Neurosurg 2012; 78: 545-552.

6. Sansone JM, del Rio AM, Anderson PA : The prevalence of and specific risk factors for venous thromboembolic disease following elective spine surgery. *J Bone Joint Surg Am* 2010; 92: 304-313.

7. Oda T, Fuji T, Kato Y, et al : Deep venous thrombosis after posterior spinal surgery. *Spine* 2000; 15: 2962-2967.

8. Brambilla S, Ruosi C, La Maida GA, et al : Prevention of venous thromboembolism in spinal surgery. *Eur Spine J* 2004; 13: 1-8.

9. Goldhaber SZ : Risk factors for venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 1-7.

10. Dearborn JT, Hu SS, Tribus CB, et al. Thromboembolic complications after major thoracolumbar spine surgery. *Spine* 1999; 24: 1471-1476.

11. Pateder DB, Gonzales RA, Kebaish KM, et al : Pulmonary embolism after adult spinal deformity surgery. *Spine* 2008; 33: 301-305.