

シンポジウム 1 肺塞栓—その予防と治療—

新規血液凝固マーカー(ETP-based APC-sr)を用いた 深部静脈血栓・肺塞栓症の管理

浜松医科大学周産母子センター

大 橋 涼 太

Management for Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Thromboembolism Using a New Blood Coagulation Marker (ETP-based APC-sr)

Ryota OHASHI

Department of Maternal and Perinatal Center, Hamamatu Medical University Hospital, Shizuoka

Key words : Thrombosis · Pregnancy · Activated protein C · Endogenous thrombin potential

緒 言

日本産婦人科新生児学会血栓症調査委員会実施の多施設アンケート調査¹⁾では、わが国における産科領域の肺塞栓症(PTE)は1991年から2000年までの10年間に於いて76例確認されている。その内訳は産褥期早期(3日以内)が71%であり産褥期症例における

分娩様式別の検討では帝王切開分娩が84.7%であった。

つまりわが国における産科領域のPTEは帝王切開分娩の産褥早期に疫学的リスクが高いといえる。産科領域におけるPTEの対策としては帝王切開分娩・産褥期早期の静脈血栓症(VTE)の予知・予防が重要で

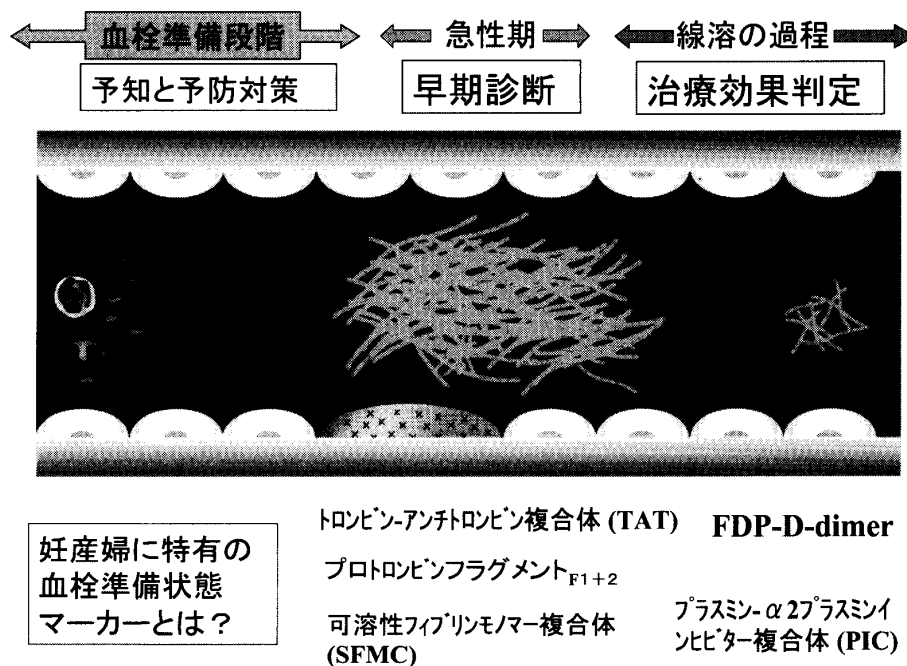


図1 静脈血栓症の血液凝固学的マーカーとして考えられる項目

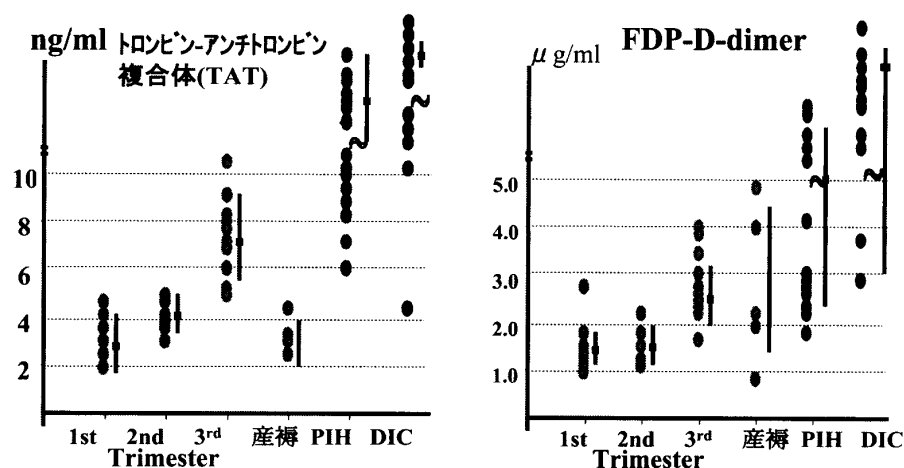


図2 従来の血液凝固・線溶マーカー

トロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT)および FDP-D-dimer は妊娠期間を通じて上昇し妊娠高血圧症, DIC 症例ではさらに高値となる。

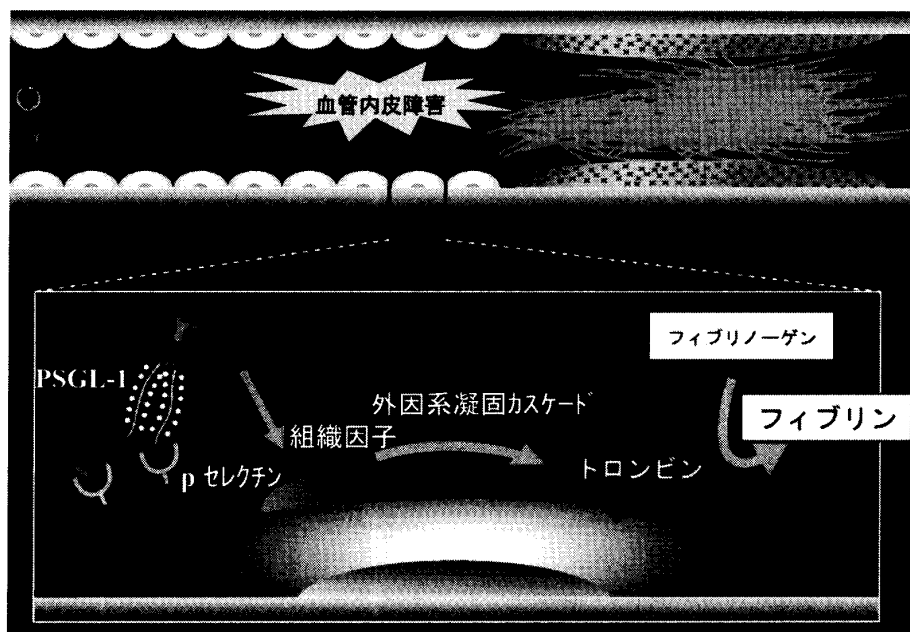


図3 血管内皮障害による cell based coagulation pathway

あり, わが国における母体死亡の減少に寄与すると考えられる。本研究では患者血液サンプルを用いてどこまで帝王切開分娩・産褥早期の VTE の病態に迫りその予知が可能となるのか? という戦略で研究をすすめた。

VTE の血液マーカーとしては図1のような項目が考えられる。急性期におけるプロトロンビンフラグメント F_{1+2} ・可溶性フィブリンモノマー複合体(SFMC)や線溶の過程におけるプラスミン- $\alpha 2$ プラスミンインヒビター複合体(PIC)・FDP-D-dimer などは血栓症の

病態把握のために臨床応用されている。産婦人科における血液凝固学の礎は産科出血・DIC・妊娠高血圧症にあるといえる。従来の血液凝固マーカーとしてのトロンビン-アンチトロンビン複合体(TAT), 線溶のマーカーとしての FDP-D-dimer については当教室においても多くのデータが蓄積されている(図2)。TAT・FDP-D-dimer とともに妊娠週数の経過とともに上昇し妊娠高血圧症, DIC の症例ではさらに高値となっている。FDP-D-dimer については臨床現場で血栓症の除外診断に汎用されている。しかし妊娠²⁾・産褥

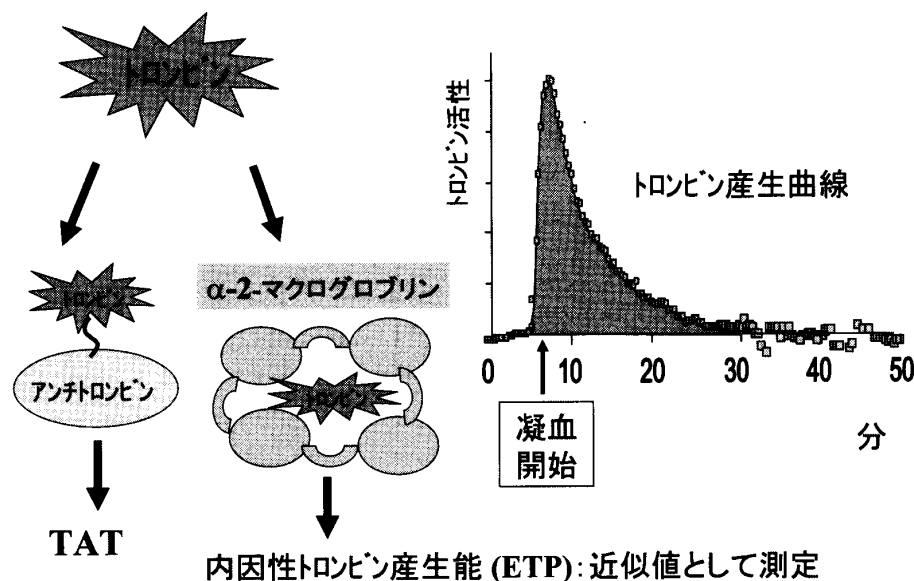


図4 トロンビン産生のモニター

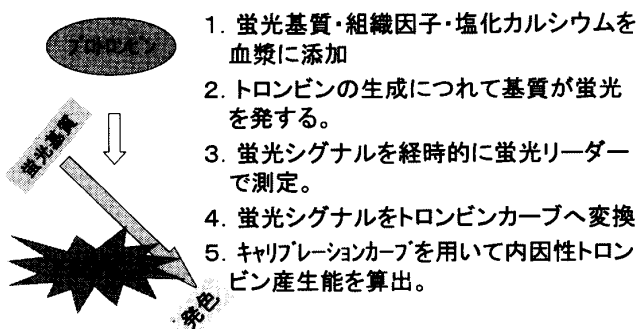


図5 Thrombogram System によるトロンビン測定の原理

期³⁾の FDP-D-dimer はダイナミックに変動し個人差も大きいと考えられるため産褥期早期の VTE の診断には不適であるとされている³⁾。

近年血管内皮障害と血栓症の発症についての相互作用が注目されている⁴⁾。リン脂質上の血液凝固反応に対してこの内皮細胞上での反応は cell based coagulation pathway と提唱されている(図3)。本シンポジウムにおいて妊産婦に特有の血栓準備状態を検出するための新規血液凝固マーカーの確立を目的として研究をすすめた。

方 法

1. トロンビン産生のモニター

患者血漿サンプルにおける過凝固状態を検出するためにはトロンビンの産生量を測定することが重要である。しかしトロンビン産生が開始して数分で凝血

が開始するため PT 法や APTT 法はトロンビン産生の一部しか反映されない。また血液中のトロンビンはさまざまなインヒビターにより不活化され消失する(図4)。これらの要因によりトロンビンの測定は困難であるとされていた。アンチトロンビンにより不活化されたトロンビンは TAT としてエライザ法で測定される。TAT の上昇は不活化されたトロンビンを反映するもので血栓準備段階の抽出には適さないと考えられる。α2 マクログロブリンと結合したトロンビンは全トロンビン産生の近似値として内因性トロンビン産生能 ETP として活性系のアッセイで測定される⁵⁾。この ETP をトロンビン産生の指標として測定してきたがこの活性系のアッセイは測定手法がいくつかのステップに分かれ手間と時間のかかるものであった⁶⁾。

近年蛍光マイクロプレートリーダーとソフトウェアを組み合わせることで簡単にトロンビンの産生をリアルタイムでモニターできる Thrombogram System が開発された⁷⁾。Thrombogram System を用いたトロンビン産生の原理を図5に示す。

2. 活性化プロテイン C (APC) 抵抗性について

活性化プロテイン C による凝固制御系は生体内の最も重要な生理的抗凝固機構といえる(図6)。第 V 因子の Leiden 変異 (Arg⁵⁰⁶-CGA→Gln-CAA) による APC レジスタンス (APC 抵抗性) は APC による凝固制御機能の異常であり欧米人における先天性血栓性素因と

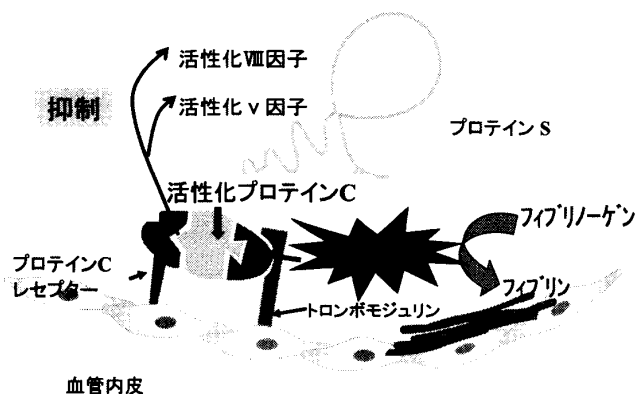
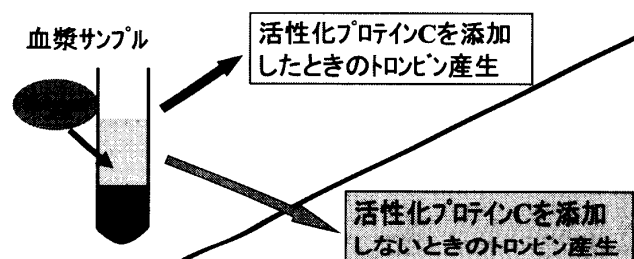


図6 活性化プロテインC凝固制御系



この比の上昇は活性化プロテインCに対する抵抗性、すなわち凝固抑制機能の低下をあらわしている。

図7 ETP-based APC-sr とはトロンビン産生を指標とした活性化プロテインCに対する感受性比である。

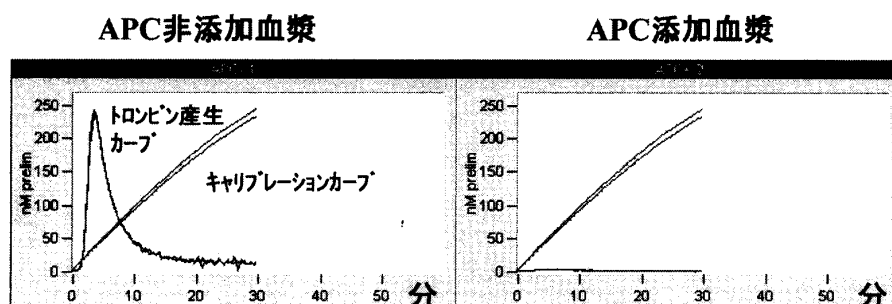


図8 Thrombogram System による活性化プロテイン添加血漿でのトロンビン産生の抑制

して知られていて欧米人の血栓症患者の20%以上を占めるとされている⁸⁾。日本人にはこの遺伝子変異の報告はないが妊娠・産褥期および経口避妊薬内服時に後天性の(acquired)APC抵抗性が生じることが判明した⁹⁾¹⁰⁾。当教室においては後天性APC抵抗性の検出をVTEの予測マーカーとして検討してきた¹¹⁾。

3. ETP-based APC-sr の測定方法

Thrombogram System と当教室考案の活性化プロテインCを測定ウエルにコーティングした特殊EIAプレートを用いることにより測定手順の簡略化に成功し臨床現場での実用に近づくことに成功した。

1. 3.8% クエン酸入りのスピッツ(最終濃度10:1)にて採血。遠心分離は4℃にて1,500G・15分間に行い血漿を採取。

2. 血漿を37℃にincubateしてからAPC-sr測定用のウエルに添加。

3. 試薬を添加しThrombogram Systemをスタートさせる。

測定手順は以上のように簡略化された。

ETP-based APC-sr とはトロンビン産生を指標とし

た活性化プロテインCに対する感受性比である(図7)。Thrombogram SystemにてAPCによるトロンビン産生の抑制を測定した図を示す(図8)。

結 果

APC-sr の臨床データ

a. 非妊婦の月経周期における変動(図9)

基礎体温上の排卵期にわずかな上昇を認めるが有意差はみられなかった。

b. 妊娠産褥期における変動(図10)

妊娠後半期から産褥早期にかけてAPC-srは有意に上昇して産褥4週後には正常の値に復していた。

c. 静脈血栓症例におけるAPC-sr(図11)

当科にて経験した産褥期の静脈血栓症例における発症24時間以内のAPC-srは正常経過の対照群に比較して有意に上昇していた¹²⁾。

d. 帝王切開手術後の不顕性下肢深部静脈血栓症(DVT)症例におけるAPC-srの検討(図12)

VTEの予防ガイドラインが制定された2004年4月以降におけるAPC-srの有用性を検討するために帝王切開症例において術後下肢静脈エコーによる不顕性

非妊婦の月経周期におけるAPC感受性比の変動

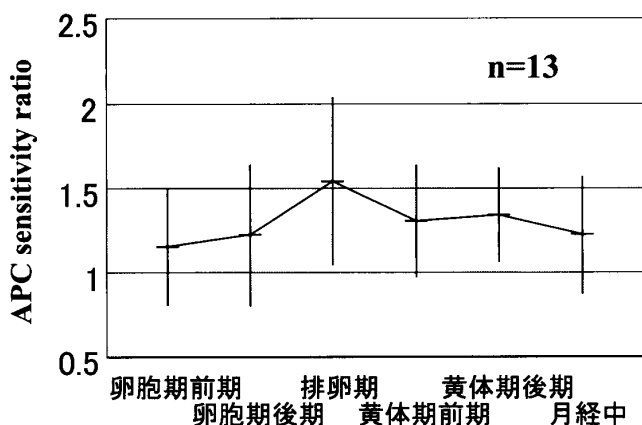


図9 非妊婦における月経周期とAPC-srの変動に関する検討：対象は基礎体温にて月経周期を確認した非妊婦(n=13：平均年齢 21.2 ± 1.7)、血栓症の既往・家族歴・喫煙なし。

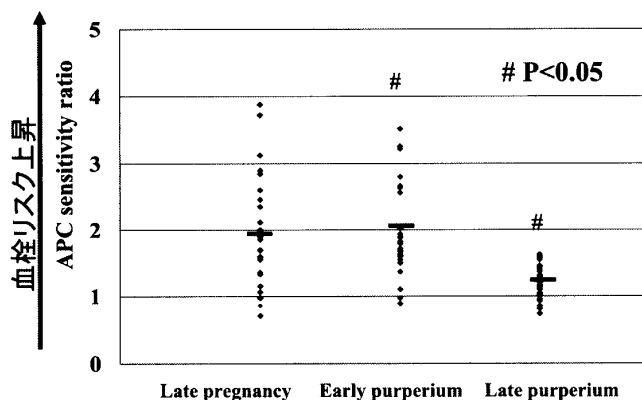


図10 妊娠・産褥期におけるAPC-srの変動
対象は産科的合併症、血栓症の既往・家族歴のない妊産婦30例。妊娠後期(妊娠36～41週)、分娩後早期(1～6日)、分娩後4週間において経時的に採血しAPC-srを測定した。

	Patients group (n=6)	Control group (n=30)	p value
Age	28.9 ± 5.3	28.8 ± 4.2	N.S.
BMI	33.5 ± 2.3	24.0 ± 3.0	$P < 0.05$
Ht (%)	33.5 ± 2.3	34.2 ± 4.5	N.S.
PLT ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	32.9 ± 4.7	29.9 ± 6.8	N.S.
TAT (ng/ml)	8.4 ± 3.5	8.4 ± 6.6 (n=25)	N.S.
APC-sr	3.3 ± 1.0	2.0 ± 0.3	$P < 0.05$

図11 産褥期発症の静脈血栓症例におけるAPC-sr値
産褥期発症の静脈血栓症例(n=6)と正常産褥経過症例(n=30)との比較

血栓症群においてはBMIとAPC-srが有意に高値であった。

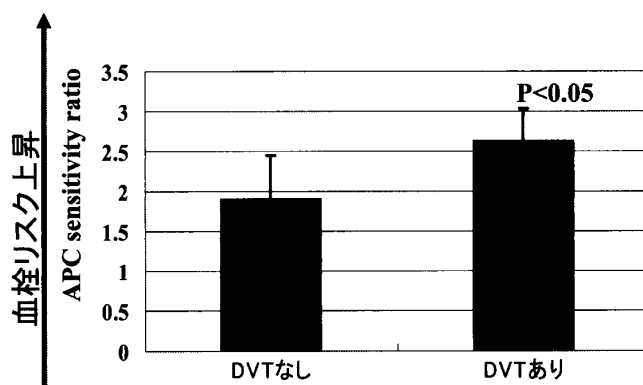


図12 帝王切開術後の下肢静脈エコースクリーニングによる不顕性DVT検出症例におけるAPC-sr
選択帝王切開(n=50)において不顕性の下肢静脈血栓は3例発見された。血栓が同定されなかった群(n=47)と手術前日のAPC-srを比較すると血栓ありの群が有意に上昇していた。

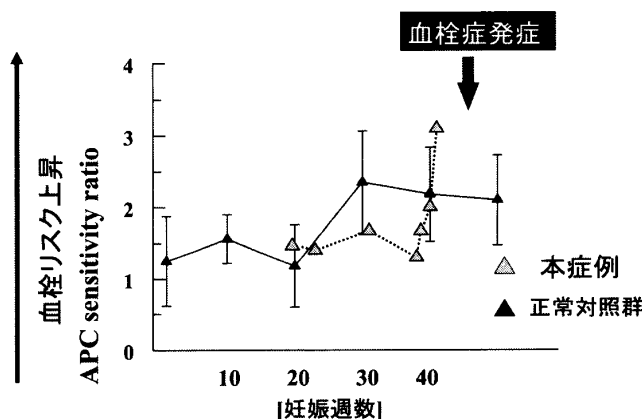


図13 急激なAPC-srの上昇に引き続いて上矢状洞静脈血栓症を発症した症例

DVT症例を検出しAPC-sr値を検討したところ術前のAPC-srがDVT検出群において有意に上昇していた。

妊娠・産褥期にAPC-srが高値を示した症例

a. 急激なAPC-srの上昇に引き続いて上矢状洞静脈血栓症を発症した症例(図13)。

症例は正常経産分娩後に上矢状洞静脈血栓症を発症した。本症例におけるAPC-srは分娩直前に1.6であったが分娩後1日目には3.1に急上昇し、その後血栓症を発症した¹³⁾。

b. APC-srが高値であったDVTの既往妊婦症例(図14)。

前回妊娠時に左下肢から骨盤内における静脈血栓症の既往のある妊婦において今回妊娠時(妊娠7週)

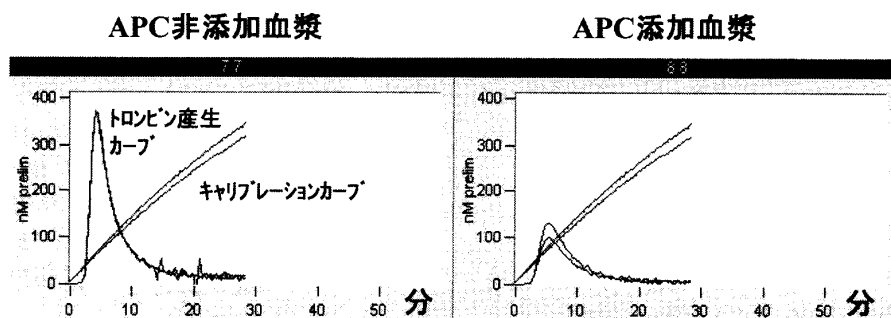


図 14 APC-sr が高値であった静脈血栓症の既往妊婦症例の Thrombogram System による APC-sr 測定結果

における Thrombogram System による APC-sr 測定を行った。APC によるトロンビン産生は抑制が弱く APC-sr: 3.9 と高値であった。ヘパリンによる抗凝固療法の適応となった。

考 察

産科領域における血液凝固・線溶については産科 DIC・妊娠高血圧症などで多くの研究がなされてきた。そして今出血の時代から血栓の時代へと大きな転換期を迎えたとの認識が必要であると考えられる。Virchow の 3 徴のなかでも血栓形成のキーワードは血管内皮障害であるといえる。帝王切開手術の手術時間はおおむね短いが生理的炎症反応の場である妊娠子宮に対する手術であり、炎症反応と血管内皮障害がおきやすい手術であるとの認識が必要であろう。また妊娠・産褥期の血栓準備段階の検出には従来の TAT・FDP-D-dimer などの凝固・線溶マーカーではなく凝固抑制系の指標を用いるべきであると考えられる。

当教室における Thrombogram System を用いた ETP-based APC-sr の測定は、従来困難とされてきたトロンビンの産生を簡便にリアルタイムでモニターできる点で有用であり、また当教室における APC をコーティングした特殊 EIA プレートの考案により臨床現場での使用により近づくことに成功した点で新規血液凝固マーカーとして妊娠・産褥期における DVT・PTE の予防・予知のために今後臨床応用されることが期待される。

共同研究者(敬称略)

浜松医科大学産婦人科学教室(主任教授: 金山尚裕):
田村直顕 尾松公平 福田有佳
浜松医科大学周産母子センター: 杉村 基 河村隆一
小林友季子

袋井市民病院産婦人科: 井嶋真理

清水厚生病院産婦人科: 鈴木康之

富士宮市立病院産婦人科: 徳永直樹 土井貴之 原
信 小菅陽子

伊東市民病院産婦人科: 北村公也 内田季之 大久保大
考

(財)化学および血清療法研究所

Thrombinoscope BV; Maastricht Netherlands

(株)サーモエレクトロン バイオサイエンステクノロ
ジー事業部: 米田武史

謝 辞

本シンポジウムにおいて発表の機会を与えていただきました第 57 回日本産科婦人科学会学術講演会会長 京都大学教授 藤井信吾先生、座長の労をお取りくださった金山尚裕 浜松医科大学教授、左近賢人 西宮市立病院副院長に深謝申し上げます。

共同研究者の皆様に深謝申し上げます。

文 献

1. Kobayashi T, Nakabayashi M, Ishikawa M, Ikenoue T, Adachi T, Kobashi G, Maeda M. Final reports of deep vein thrombosis/pulmonary thromboembolism between 1991 and 2000 in Obstetrics and Gynecology. Jpn J Obstet Gynecol Neonatal Hematol 2005; 14: 1—24
2. Chabloz P, Reber G, Reber G, Boehlen F, Hohlfeld, Moerloose P. TAFI antigen and D-dimer levels during normal pregnancy and at delivery. British J of Haematology 2001; 115: 150—152
3. Epiney M, Boehlen F, Reber E, Antonelli E, Morales M, Irion O, Moerloose P. D-dimer levels during delivery and the postpartum. J of Thromb Haemost 2004; 3: 268—271
4. Levi M, Keller T, Gorp E, Cate HT. Infection and inflammation and the coagulation system. Thromb

- Res 2003 ; 60 : 26—39
5. Hemker HC, Bèguin S. Thrombin generation in plasma : its assessment via endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* 1995 ; 74 : 134—138
 6. Ohashi R, Sugimura M, Kanayama N. Estrogen administration enhances thrombin generation in rats. *Thromb Res* 2003 ; 112 : 325—328
 7. Hemker HC, Giesen P, Bèguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003 ; 33 : 25—31
 8. Dahlbäck B. Inherited resistance to activated protein C, a major cause of venous thrombosis, is due to a mutation in the factor V gene. *Haemostasis* 1994 ; 24 : 139—151
 9. Tans G, Vlieg A, Thomassen M, Curvers J, Bertina R, Rosendaal R. Activated protein C resistance determined with a thrombin generation-based test predicts for venous thrombosis in men and women. *Brit J Haematol* 2003 ; 122 : 465—470
 10. Curvers J, Thomassen M, Nicolaes G, Oerle R, Tans G, Rosing J. *Brit J Haematol* 1999 ; 105 : 88—94
 11. Sugimura M, Kobayashi T, Kanayama N, Toshiko Terao. Detection of marked reduction of sensitivity to activated protein C prior to the onset of thrombosis during puerperium by the endogenous thrombin potential assay. *Thromb Haemost* 1999 ; 82 : 1364—1365
 12. Ohashi R, Sugimura M, Kawamura T, Tamura N, Kanayama N. Sensitivity to activated protein C in patients with deep vein thrombosis (DVT) during early puerperium period. *Acta Obstet Gyn Scan* (in press).
 13. Sugimura M, Kobayashi T, Kanayama N. Detection of decreased response to activated Protein C during pregnancy by an endogenous thrombin potential-based assay. *Semin in Thromb Hemost* 1999 ; 25 : 497—40

Abstract

Pregnancy is known to be a major risk factor for deep vein thrombosis (DVT) and pulmonary thromboembolism (PE). The latter is a major cause of maternal death in the United States, Europe and Japan. Caesarian delivery increases the risk of venous thromboembolism (VTE). Little is known, though, about the mechanisms underlying thrombotic disorders during pregnancy and puerperium, and there is no specific coagulation marker that would allow early detection of DVT and PE.

Thrombin-antithrombin-complex (TAT) and fibrin/fibrinogen-degradation product (FDP) -D-dimer are used as markers of DVT and PTE. However, mean levels of FDP-D-dimer and TAT change dramatically during puerperium, making them unsuitable as blood markers for making predictions of DVT and PTE risk during puerperium. Thrombin plays a central role in the entire clotting process. The Thrombogram System can enable the analysis of appearance of thrombin generation over time. On the other hand, protein C is a principal component in the anticoagulant pathway, and the elevated risk of DVT and PTE in patients with congenital activated protein C (APC) resistance suggests that APC plays a major role in the onset of thrombotic disorders. APC-sr is defined as the ratio of endogenous thrombin potential (ETP) in the presence and absence of APC (final concentration, 5.9 nM). An elevated APC-sr thus indicates reduced sensitivity to APC. We have designed special ELISA plates coated with activated protein C reagent to simplify the APC-sr assay procedure.

We examined the changes in APC-sr values during pregnancy and puerperium. APC-sr levels in late pregnancy and early puerperium revealed lower sensitivity to APC than 4 weeks after delivery ($p < 0.01$). We also examined APC-sr levels during early puerperium in 6 Japanese DVT and PE patients. Mean APC-sr in the patient group was significantly higher than in the control group ($p < 0.05$).

We detected markedly elevated APC-sr in a case that developed superior sagittal sinus thrombosis during puerperium. APC-sr levels were significantly higher in patients who had asymptomatic DVT of the lower leg detected by ultrasonography after caesarian section.

We believe APC-sr to be a potentially useful blood marker for identifying elevated risk of DVT and PTE during puerperium.
