

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) における FcγR の 遺伝子多型と治療効果

(分担)研究者 藤村 欣吾

広島大学大学院医学系研究科 病態薬物治療学

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)における主要な血小板減少機序は網内系細胞によるFcRを介する血小板抗体結合血小板の貪食反応によると考えられ、摘脾が有効であることもこれを裏付けている。しかし摘脾の有効性は60%に留まり、その有効性を術前に予測する手段はない。今回FcγRの遺伝子多型の解析から、FcγRIIAの遺伝子多型は摘脾や薬物療法の有効性には関係性を認めなかった。一方FcγRIIIAの158番目がVal/Val(V/V)タイプはPhe/Val(F/V),Phe/Phe(F/F)タイプに比し摘脾奏効率が低く、むしろ薬物療法の有効例が多い傾向にあり、F/V,F/Fタイプは摘脾の奏効率が高い傾向にあった。このことより今後はプロスペクティブにFcγRIIIAの遺伝子多型を解析し治療法の選択に関する有用性を確認したい。

A.研究目的

ITPにおける血小板減少機序には種々の経路が想定されているが、中でも脾臓をはじめとする網内系の貪食細胞によって血小板抗体を結合した血小板が貪食破壊される機序が主要とされている。従来より臨床的には摘脾が有効であること、血小板寿命検査によってアイソトープ標識された血小板は短期間の内に脾臓や肝臓に集積されると共に血小板寿命が短くなる事などは、肝、脾の網内系細胞による貪食破壊が本症の血小板減少機序に大きく関わっていることを裏付けている。

一方摘脾の有効性は約60%に留まっております。再発も認められる点、本症の好発年齢が20才～40才の女性であること等から必ずしも本症例に容易に受け入れられる手術ではない。従って本症において、摘脾は現時点で最も信頼性の高い治療法であるにもかかわらず摘脾率は必ずしも高くなく、40%位に留まっているのが現状である。

摘脾率を向上させることは本症全体としての治療成績を上げることになり、血液学的緩解例が増加すると考えられる。

このような背景に基づいて今回摘脾の有効性をあらかじめ予測する方法が確立されれば摘脾率、摘脾成績の向上につながると考え、摘脾の有効性をあらかじめ予測する探索研究を行った。

具体的には貪食に関わる網内系細胞のFcRの遺伝子多型を解析すると共に、レトロスペクティブに治療成績との関係を検討した。さらに最近FcRは抗体の抗原認識と細胞性免疫の実行機能の橋渡しを主な機能とし、貪食能やADCCによる細胞障害を始めとして抗原提示、サイトカイン遊離、脱顆粒、抗体産生等の調節を行っていることが明らかとなっており、FcRの遺伝子多型と血小板抗体の出現、血小板抗体の種類等についても検討した。

B.研究方法

対象：

ITP 症例：104 例（男性 29 例、女性 75 例、平均年齢 54.2 才、血小板数 $0.2 \sim 36.9 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、平均 $8.7 \times 10^4 / \mu\text{l}$ ）で 1 年以上外来通院をを行っている症例（薬物療族群：47 例、摘脾群：40 例、無治療群：17 例）。正常人：59 例

方法：

1) 末梢血単核細胞からの DNA 抽出

クエン酸血から白血球層を採取し溶血バッファーにて赤血球を溶血後、単核細胞を得た。PBS にて 3 回洗浄後通常の如くフェノールクロロフォルム法にて DNA を抽出し、エタノール沈殿を行い精製 DNA を得、 4°C にて保存し用事使用した。

2) Fc γ IIA と Fc γ IIIA の遺伝子多型の解析

Fc γ IIA についてはエクソン 4 に、494 番目の塩基が G と A の遺伝子多型が存在することが示されており、何れもそれぞれ 131 番目のアミノ酸が Arg と His をコードしている。従ってこの部位を増幅するようにプライマーを作成した。この時 131 番目のアミノ酸 Arg をコードする DNA でのみ BstU I 認識配列を含んで増幅するプライマーを用いている。このプライマーを用いて PCR 法にて DNA を増幅し、得られた PCR 産物を BstU I 酵素を加えて消化後、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色を行った。191 bp のバンドが 1 本の場合 His/His (H タイプ)、168 bp と 23 bp の 2 本バンドの場合 Arg/Arg (A タイプ)、191 bp、168 bp、23 bp の 3 本のバンドが認められる場合は His/Arg (H/A タイプ、ヘテロ型) と判定した。

Fc γ IIIA に関してはエクソン 4 の 559 番目の塩基に T と G の遺伝子多型が存在し、

この結果 158 番目のアミノ酸が各々 Phe と Val にコードされる。まず 559 番目の塩基を含む約 1.2 kb のフラグメントを増幅するようにプライマーを設定し、PCR 法により増幅した (1st PCR)。1st PCR で増幅した cDNA から Fc γ III A 多型部分を含む 94 bp フラグメントを、559 番目の塩基が G、すなわち 158 番目のアミノ酸として Val をコードする DNA でのみ Nla III 認識配列を含んで増幅するプライマーを用い、PCR にて DNA を増幅した (2nd PCR)。2nd PCR 増幅産物を Nla III 酵素処理し 10%ポリアクリルアミド電気泳動、エチジウムブロマイド染色を行った。

94 bp の 1 本バンドの場合は Phe/Phe (Phe のホモ型、F タイプ)、61 bp と 33 bp の 2 本のバンドが認められる場合は Val/Val (Val のホモ型、V タイプ)、Phe/Val (Phe/Val のヘテロ型、F/V タイプ) と判定した。

H、A、及び V タイプのコントロール cDNA フラグメントの作成は、健常人の genomic DNA を PCR 法にて増幅し、Fc γ IIA の場合は 191 bp の、Fc γ III A の場合は 94 bp の cDNA フラグメントをそれぞれプラスミドに組み込みクローン化しコントロールのプラスミド DNA として用いた。

3) 血小板結合特異的 IgG の検出

洗浄血小板に抗ヒト GPIb、ないし GPIIb マウスモノクローナル抗体を加え反応後、TritonX-100 にて可溶化し、以後 MAIPA 法にてそれぞれ GPIb、GPIIb 抗体を検出した。

統計処理：

χ^2 -test 及び Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。

DNA 検体、及び血小板抗体検出のための

血液の採取に関して、患者症例については疾病の病態解析の必要性を説明し理解、賛同が得られた方々から採取させて頂いた。さらに健常人については検査目的を説明し、了解が得られたヒトから採取した。これらの個々の検査結果は他に使用しないことを申し添えた。

C. 研究結果

1. FcγRIIA 遺伝子多型解析

1) 各多型の出現頻度：本邦健常人 59 例、ITP 症例 104 例の解析では両群の間で各遺伝子型の発現頻度に統計学的に差は見られなかった（表 1）。いずれの群においてもヘテロ型、すなわち H/R タイプが最も多く、次に H/H タイプで R/R タイプは少ない。

表 1 FcγRIIA 遺伝子多型解析

	Control (n:59)	ITP (n:104)
Genotype Distribution		
131R/R	7(11.9%)	6(5.8%)
131H/R	30(50.8%)	58(55.8%)
131H/H	22(37.3%)	40(38.5%)
Allelic Frequency		
131R(Arg)	0.42	0.40
131H(His)	0.58	0.60

2) 遺伝子多型と血小板抗体の出現及び種類との関係（図 1）：遺伝子多型によって血小板抗体出現率、出現する抗体に差は認められなかった。

FcγRIIA 遺伝子多型(131 H/R) と血小板抗体の出現

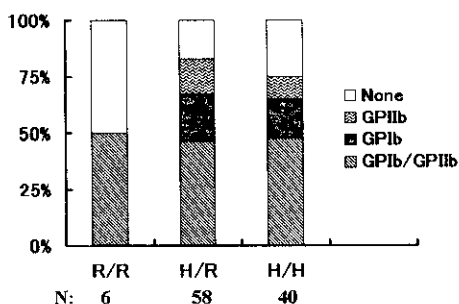


図 1

3) 遺伝子多型と治療効果との関係（図 2）：薬物療法の効果および摘脾療法の効果は FcγRIIA の遺伝子多型と関連を認めなかった。

FcγRIIA 遺伝子多型と ITP 治療効果

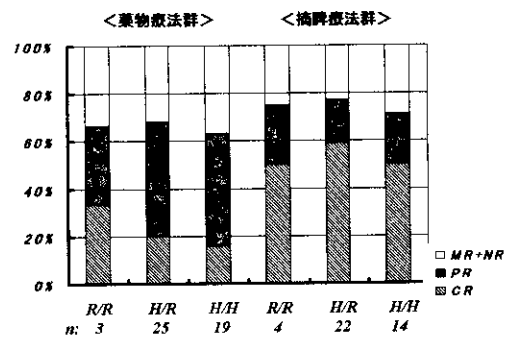


図 2

2. FcγRIIIA 遺伝子多型解析

FcγRIIA の多型解析を行った同一検体について FcγRIIIA 遺伝子多型解析を行った。

1) 各多型の出現頻度：健常人、ITP 症例群ともに V/F タイプが半数以上を占め、V/V タイプは非常に少ない事がわかった。ITP 群では健常人群に比し F/F タイプが有意に少ないが、各遺伝子型の発現頻度には両群に間に差は認められなかった（表 2）。

FcγRIIIA 遺伝子多型解析

	Control (n:59)	ITP (n:104)
Genotype Distribution		
158F/F	25(42.3%)	28(26.9%)
158V/F	30(50.9%)	65(62.5%)
158V/V	4(6.8%)	11(10.6%)
Allelic Frequency		
158F(Phe)	0.62	0.55
158V(Val)	0.38	0.45

表 2

2) 遺伝子多型と血小板抗体の出現及び種類との関係（図 3）：F/F, F/V, V/V いずれの多型群においても血小板抗体の出現

頻度、出現抗体の種類に有意差は認められなかった。

FcγRIIIA遺伝子多型(158 V/F)と血小板抗体の出現

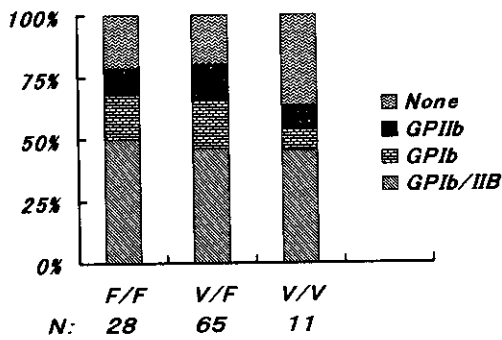


図 3

3) 遺伝子多型と治療効果との関係 (図 4) : V/V タイプが少なく各タイプ間での比較は充分ではないが以下のような結果が得られた。薬物療法に関しては V/V タイプで他のタイプに比し有意に完全緩解率が高い。一方摘脾の有効性に関しては逆に V/V タイプは F/F, V/F タイプに比し摘脾効果不良例の比率が高い傾向を認めた。

FcγRIIIAの遺伝子多型とITP治療効果

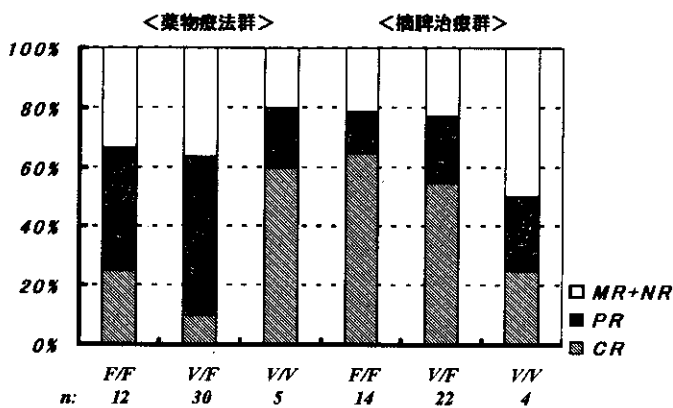


図 4

D. 考案

FcγRIIA 及び FcγRIIIA 遺伝子多型の人

種による発現頻度に関して、人種間で若干の差が認められている。例えば FcγRIIA に関してはコーカシアン、アフリカンアメリカンには R/R タイプが 20~30% を占めるのに対し、インドを除く東洋人においては 4~10% と少ない。しかし H/H タイプについては逆に東洋人に多い傾向がある。この傾向は今回の検索結果と一致している。一方 FcγRIIIA の遺伝子多型については人種間で解析された報告が限られ、特に本邦での報告は認められず比較は出来ないが今回の解析結果はコーカシアンの解析結果と類似していた。すなわち日本人、コーカシアンともに V/V タイプが 10%~13% で、FcγRIIIA の遺伝子多型については人種間であまり差がないようである。

健常人と ITP 症例間では FcγRIIA に関して難治性 ITP においては R/R タイプが健常人に比し有意に多く分布していたとの指摘がなされているが (1998 年 Williams)、両群間で差がないとする報告もあり (1998 年 Horsewood)、今回のデータは後者を支持するものである。FcγRIIIA の遺伝子多型についても健常人と ITP 症例間で各多型の出現頻度に差は認められず ITP の発症や疾患感受性が FcγR の遺伝子多型と連鎖していないと考えられる。

最近 FcγR によって引き金が引かれる機能の一つに抗体産生の調節がある。今回 FcγR の多型が血小板抗体の出現頻度や抗体の種類に関係するか否か検討したところ、FcγRIIA 及び FcγRIIIA のいずれにおいても、それぞれの多型は抗体の出現頻度や種類に関係が認められなかった。このことは ITP の発症や疾患感受性が FcγR の遺伝子多型と連鎖していない点とも関係し、FcγR の遺伝子多型は血小板特異抗体産生と遺伝子レ

ベルで関連していないことが示唆された。

FcγR の遺伝子多型と、薬物或いは摘脾療法との関連についての検討では FcγRIIA については各遺伝子型と治療効果の間に関連は認められなかった。しかし FcγRIIA に関しては、薬物療法群では V/V タイプに完全緩解例(CR)が、摘脾療法群においては F/F, F/V タイプに CR が多くなる傾向がみとめられた。逆に V/V タイプは摘脾有効例が少なく、F/F, F/V タイプには薬物療法が奏効しにくいといえる。しかし V/V タイプはいずれの人種間でも最も少なく、今回の対象群では約 1 割程度に過ぎず、今後プロスペクティブに症例を重ね確認が必要である。

以上の結果より ITP の治療効果には FcγRIIA ではなく、FcγRIIA の遺伝子多型が関係している可能性が示された。このことは ITP における血小板特異抗体の IgG サブクラスが主に IgG 1 と IgG 3 に属することが関係していると思われる。すなわち FcγRIIA の遺伝子多型では血小板特異抗体が属さない IgG 2 に対して結合親和性に差が生じるとされており、このことから FcγRIIA の遺伝子多型との関係が認められなかったことが説明可能であろう。

一方 FcγRIIA については、多型によって IgG 1 と IgG 3 に対して親和性に差が生じる。この結果免疫複合体との親和性が最も高い V/V タイプでは、摘脾によって血小板破壊部位の一部を除去しても、肝臓をはじめとするほかの残存網内系細胞によって血小板特異抗体結合血小板が貪食破壊され易いために摘脾の効果が十分に挙げられないと推測される。従って V/V タイプでは摘脾よりも血小板抗体産生を抑制する薬物療法が有効であろう。F/F, F/V タイプにおいては V/V タイプに比し免疫複合体に対

する親和性が低いために、主たる血小板破壊場所である摘脾が有効であると考えられた。このことはこのタイプ群では、通常の薬物療法で効果が挙げられない症例に対しては摘脾を積極的に勧める根拠になる可能性を考えている。

以上の FcγR の遺伝子多型解析、中でも FcγRIIA の遺伝子多型解析は、プロスペクティブに ITP における薬物、或いは摘脾療法の効果や予後の予測に応用できると共に、治療の選択に有用な情報を与える可能性が示唆された。このことは摘脾率や摘脾治療成績の向上に繋がると考えられ、今後症例を重ね検討して行く必要があると考えている。

E. 結論

ITP 症例において FcγR の遺伝子多型解析を行い以下の知見を得た。

1. FcγR の遺伝子多型と ITP の発症、血小板抗体産生、血小板抗体の種類の間には関連は認められなかった。
2. FcγRIIA 遺伝子多型と治療効果との関連は認められなかった。
3. FcγRIIA の遺伝子多型は治療効果や治療法との間に関連を認めた。すなわち V/V タイプは薬物療法の有効例が多く、F/F, F/V タイプは摘脾が有効例が多い傾向を認めた。
4. 以上より FcγRIIA の遺伝子多型解析は ITP における治療選択に有用な情報を提供する可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 臨床血液 40卷9号 918頁
1999年
2. 第39回日本血液学会中国四国地方
会 抄録集 10頁 2000年

フォンビルブランド因子特異的プロテアーゼの欠損による 血栓性疾患の病態解析

(分担) 研究者 藤村吉博

奈良県立医科大学 輸血部

研究要旨

フォンビルブランド因子 (vWF)の機能は主にそのマルチマー構造により規定され、より高分子量のものほど、より比活性が高い。vWF マルチマー構造を調節する物質は動脈血栓の形成を調節する重要な機能を有すると考えられるが、近年 vWF を特異的に切断する酵素(vWF プロテアーゼ) が血漿中に見いだされた。我々は、先天性の慢性反復性血栓性血小板減少症で少量の血漿輸注で血小板減少が改善することを特徴とする Upshaw-Shulman 症候群(USS)2 家系において vWF プロテアーゼ活性を検討した。vWF プロテアーゼ活性は患者においては3%以下と著明に低下しており、両親は20-50%と軽度の低下を認めた。これよりUSS患者はvWF プロテアーゼ遺伝子のホモ接合体欠損症、両親はヘテロ接合体欠損症と考えられた。また、vWF プロテアーゼ活性は160-240 mlの新鮮凍結血漿(FFP)輸注により12時間後まで最高8-9%未満のわずかな上昇を認めるのみであった。しかし、興味深いことに血小板はその後も増え続け、2万前後からFFP輸注10日後に最高20万以上となり約2週間で前値に復するという傾向が認められた。

A. 研究目的

フォンビルブランド因子 (von Willebrand 因子、vWF)は凝固第VIII因子と結合し、これを安定化させるキャリアー蛋白質としての作用と障害血管壁で血小板を血管内皮細胞下組織に粘着・凝集させ、血小板血栓を形成する作用という2つの止血作用をもつ。血中のvWFは酵素による分解を受け、分子量~20,000 kDa以上の超高分子量 vWF 重合体 (ultralarge VWF multimer, UL-vWFM)、~10,000 kDaの高分子量 vWF 重合体さらに分子量500 kDaに至る低分子量 vWF 重合体に至るまでの様々な分子形態を示す。

一般にvWFの機能は主にそのマルチマー構造により規定され、より高分子量のものほど、より比活性が高く、このvWFマル

チマー構造を調節する物質は動脈血栓の形成を調節する重要な機能を有する。近年、vWF を特異的に切断する酵素(vWF プロテアーゼ) が血漿中に見いだされた。本酵素はvWFサブユニットのA2ドメイン領域のTyr842-Me t843結合を特異的に切断する機能があり、分子量は約200~300kDaと巨大で、活性発現にBa²⁺などの二価陽イオンを必要とし、EDTAにて失活することからメタロプロテアーゼであることなどが判明しているが、その構造など詳細は一切不明で、その産生臓器すら同定されていない。本研究は従来、詳細な病態解明がなされないまま、治療法も確立されずに放置されてきた本邦の数種先天性並びに後天性の血栓症においてこの酵素活性を測定し、その病態解析を通じて、治療方法の確立を期

待するものである。

B. 研究方法

前記の原因・病態が不明である先天性血栓症として、本年度はまず congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia (New Engl J Med 15:1350-1352, 1978)を対象とした。本症は発見者の名を冠して本邦ではもっぱら Upshaw-Shulman 症候群 (USS) と呼称されている。我々は USS の独立した 2 家系 2 症例において、患者および両親において vWF プロテアーゼ活性を測定し、さらに新鮮凍結血漿 (FFP) 輸注による vWF プロテアーゼ活性の経時変化を観察した。vWF プロテアーゼの測定方法として Furlan ら (Blood 87:4223-4234, 1996) の方法を一部改変して行った。すなわち、1.5M 尿素と 10 mM Ba²⁺ 存在下に、精製 vWF と被検または希釈正常血漿を混じ、37℃、24 時間酵素反応後、SDS アガロースゲル電気泳動解析にて測定した。

(倫理面への配慮)

本検査は、主治医より十分な説明を行い、同意を得て施行した。

C. 研究結果

患者本人の vWF プロテアーゼ活性は、2 症例とも 3% 未満と著明に低下していた。両親は 2 症例とも 20-50% と中等度の低下を認めた。また、FFP 160-240ml 輸注後の vWF プロテアーゼ活性は、2 症例とも輸注後 3-4 時間後に最大 8-9% と上昇したが、12 時間後には 3% 未満に低下した。しかし、大変興味深いことに血小板数は、輸注前の約 2 万より vWF プロテアーゼ活性が

低下した後も上がり続け、輸注後約 10 日で最高 20 万以上となり、約 2 週間で前値に復することが判明した。

D. 考察

USS 患者の vWF プロテアーゼ活性が 3% 未満で、両親のそれは 20-40% であったことより、患者はこの酵素遺伝子のホモ接合体欠損症、両親はヘテロ接合体欠損症で無症候性キャリアーであると考えられた。また、FFP 輸注後のこの酵素活性と血小板数の増加との時期に解離が認められたのは、本酵素を FFP により補充しわずかに活性が上昇するだけで、蓄積した UL-vWFM を分解することが可能で、そして次回血小板減少を起こすほど UL-vWFM が蓄積するのに約 2 週間かかるのではないかと推測された。

E. 結論

USS は vWF プロテアーゼの遺伝子欠損が病因であり、治療法として本酵素が精製されていない現段階では少量の FFP の約 2 週間毎の定期輸注が最も有効であると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 木下清二, 藤村吉博, 他: Congenital chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Shulman 症候群): von Willebrand 特異的切断酵素の先天性欠損症. 血栓止血誌 10: 371, 1999.
2. 八木秀男, 藤村吉博, 他: 腸管出血性

大腸菌(E. coli O157)感染患者における von Willebrand 因子切断酵素の測定. 血栓止血誌 10 : 371, 1999.

3. 朴永東, 藤村吉博, 他 : 造血幹細胞移植後肝中心静脈閉塞症(VOD)における von Willebrand 特異的切断酵素活性. 血栓止血誌 10 : 401, 1999.
4. 今野武津子, 藤村吉博, 他 Upshaw-Shulman 症候群 2 例における病態と治療. Int. J. Hematology 71:49,2000
5. 朴永東, 藤村吉博, 他 : von Willebrand 因子切断酵素の VOD 発症への関与. Int. J. Hematology 71:50,2000

内因性カンナビノイドによる凝固の制御

(分担) 研究者 丸山 征郎

鹿児島大学医学部 臨床検査医学

研究要旨

エンドトキシン (LPS) はショックをひき起こす重要な原因分子である。これまで LPS がショック、特に低血圧性ショックを惹起する際の原因メディエーターとしては、炎症性サイトカインの TNF α や IL-1、脂質メディエーターの PAF, Prostaglandins などが候補としてあげられてきた。しかし今回我々は、1) 内因性カンナビノイド (内因性マリファナ様物質) のアナンダマイドと 2-AG が初期メディエーターとして重要であること 2) これらの内因性カンナビノイドはポリミキシン B (PMB) で中和されることを見出した。これは LPS ショックの発症機構と治療に大きなヒントを与えるものである。

A. 研究目的

LPS ショックは今なお、本邦で年間約 20 万人近くが罹患し、うち半数が死亡する重要な疾患である。今回は； 1) この LPS ショックのメディエーター、特に早期メディエーターを同定し、 2) その生理作用を明らかにし、 3) 治療方策を立案すること、等を目的とした。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

今回の研究は全て *in vitro* の研究であり、ヘルシンキ宣言など倫理面に抵触するような問題はなかった。また臨床検体は主治医がインフォームドコンセントを得て採取したものをを用いた。

C. 研究結果

1) ラットマクロファージ系の細胞株である RAW 細胞を LPS で刺激すると早期からアナンダマイドが産生/放出されることを HPLC で確認した。

2) ヒト血小板を LPS で刺激すると 2-AG が放出されるのを確認した。

3) カンナビノイドも 2-AG も PMB と結合して、その生理活性が中和された。そしてこれらは PMB 固相化ビーズや PMB

固相化カラムに可逆的に吸着され、エタノールで溶出された。

4) カンナビノイド、2-AG は培養神経細胞と内皮細胞にアポトーシスを誘導した。

D. 考察

これまで LPS ショックの原因として種々の分子があがられてきた。それらは炎症性サイトの TNF、IL-1、脂質メディエーターの PAF, prostaglandins 等である。しかしそれらのメディエーターや受容体のモノクロナル抗体が臨床的に効果を示さないことから、別のメディエーターの存在が推定されていた。今回 Varga, K らはアナンダマイドと 2-AG(2-arachydonilglycerol) がラットの LPS ショックのメディエーターである可能性を指摘した (FASEB J. 12:1035-44, 1998)。我々は LPS ショックの患者血中にアナンダマイド、2-AG が貯蔵していることを見出した。そしてこれらが PMB に吸着されること、PMB を固相化したカラムに吸着されることを見出した。またアナンダマイド、2-AG は神経細胞や血管壁細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。アナンダマイド、2-AG 等の内因性カンナビノイドは別名内因性マリファナ様物質ともよばれ、それぞれ中枢神経

系に発現している CB 1 受容体、免疫細胞、血管系に発現している CB 2 受容体を介して、一過性記憶障害、多幸感、低血圧、免疫抑制など多彩な生理作用を示すことが明らかにされているが、これらは LPS ショックの低血圧、免疫不全、意識障害などを説明するものである。PMB がカンナビノイド、2-AG を吸着、中和することが判明したことから、今後 LPS ショックの病態の解明と治療は大きく進むものと期待される。

E. 結論

LPS ショックの初期メディエーターはアナンダマイドと 2-AG である。前者は LPS で刺激されたマクロファージより、後者は血小板よりそれぞれ放出される。そしてこれらの内因性カンナビノイドは PMB で中和される。また PMB 固相化カラムに吸着される。従って PMB 固相化カラムは臨床的に効果がある。

F. 研究発表

論文発表

1. Wang, Y., Liu, Y., Sarker, KP., Nakashima, M., Serizawa, T., Kishida, A., Akashi, M., Kitajima, I., Maruyama, M. Polymyxin B binds to anandamide and inhibits its cytotoxic effect. FEBS Lett. 470:151-155, 2000
2. Sarker, KP., Obara, S., Nakata, M., Kitajima, I., Maruyama, I. Anandamide induces of apoptosis of neuronal cells: Involvement of superoxide and caspase-3. FEBS Lett. (in press)

先天性凝固制御因子欠乏症と血栓症

(分担) 研究者 宮田 敏行

国立循環器病センター研究所 脈管生理部

研究要旨

血栓症は遺伝子因子と環境因子から成る多因子病である。これまでの研究から凝固制御因子であるプロテインC (PC) およびアンチトロンビン (AT) の先天性欠乏症は静脈血栓症の素因であるが、動脈閉塞症への関与は明確ではない。本研究では、61家系 (118名) の先天性PC欠乏症と34家系 (51名) の先天性AT欠乏症のなかで、血栓症の種類と発症年齢を調べた。その結果、PC欠乏症患者はAT欠乏症患者より動脈閉塞症発症が高く、冠動脈疾患発症は若年化していた。PC欠乏症で動脈閉塞症を発症した群では、静脈血栓症発症群に比べ高血圧および高脂血症が高頻度にみられた。一方、AT欠乏症患者はPC欠乏症患者より静脈血栓症が高かった。また、静脈血栓症発症年齢は、両者に差を認めなかった。これらの結果から、PC欠乏症はAT欠乏症に比べ、動脈閉塞症への関与が大きいと考えられたが、動脈閉塞症発症には高血圧や高脂血症という要因も寄与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

PC や AT などの凝固制御因子の先天性欠乏症は静脈血栓症の素因である。PC や AT の先天性欠乏症のヘテロ接合体の頻度は約 500 人に 1 人であり、かなり高い。しかし、これらの先天性欠乏症と動脈閉塞症の関連は余り明確ではない。我々は先天性 PC 欠乏症患者の動脈閉塞発症年齢を正常 PC レベルの患者と比較し、心筋梗塞やアテローム性脳梗塞が若年化することを報告した。血管内皮細胞上の凝固制御系は、PC 系と AT 系の 2 つのシステムがある。本研究は、それぞれの先天性欠乏症患者の動脈閉塞症の発症年齢を調べることにより、動脈閉塞症の発症におけるそれぞれのシステムの寄与を検討した。

B. 研究方法

PC は検体血漿を蛇毒 PC 活性化酵素で

活性化後、生じた活性化 PC 活性を合成基質を用いて測定した。AT は、ヘパリン依存性のトロンビン中和活性を用いて測定した。PC および AT の欠乏症患者の血栓症の有無を調べ、初発の血栓発症年齢を比べた。(倫理面への配慮)

匿名化を行い、個人情報と遮断している。

C. 研究結果

国立循環器病センターでは、これまでに発端者 61 名、家系構成員 57 名、計 118 名の PC 欠乏症を同定した。このうち、42 名の発端者と 5 名の家系構成員に血栓症が認められた。血栓症の内訳は、静脈血栓 22 イベント、動脈閉塞 52 イベントであり、動脈閉塞症のイベントが多かった。これは心血管系疾患を扱う国立循環器病センターの特殊性を反映していると考えられた。一方、AT 欠乏症はこれまでに発端者 34 名、家系

構成員 17 名、計 51 名を同定した。このうち、28 名の発端者と 1 名の家系構成員に血栓症を認めた。血栓症の内訳は、静脈血栓 23 イベント、動脈閉塞 14 イベントであった。この集計から、PC 欠乏症は、AT 欠乏症に比し、動脈閉塞症が有意に多いことが明らかとなった。次に PC 欠乏症および AT 欠乏症患者の動静脈血栓症発症年齢を比較した。初発静脈血栓症の発症年齢に差はみられなかったが、初発冠動脈疾患の発症年齢は PC 欠乏症の方が早かった。(n=19, 48.6 ± 13.9 vs n=7, 63.7 ± 9.8, p=0.0071)

PC 欠乏症を動脈閉塞症発症群と静脈血栓症発症群に分けて危険因子を調べたところ、動脈閉塞発症群では高血圧および高脂血症が有意に高く、これらの寄与が考えられた。AT 欠乏症は PC 欠乏症に比べて、動脈閉塞症より静脈閉塞症の割合が高く、AT は動脈での血栓形成の制御にはあまり寄与していないと考えられた。一方、静脈血栓症発症年齢は、両欠乏症群間に有意差はなかった。

D. 考察

PC 抗凝固経路は、PC、プロテイン S、トロンボモジュリン、血管内皮 PC 受容体 (EPCR) から構成される。我々はこれまでに、PC 欠乏症患者の急性心筋梗塞とアテローム性脳梗塞の発症は PC が正常レベルある患者に比べ、有意に若年化することを報告した。また、EPCR は動脈の血管内皮細胞にも発現することや、活性化 PC の基質である第 Va 因子の先天性異常症(第 V 因子 Leiden)は、心筋梗塞の素因であることなどから、PC 抗凝固経路は動脈閉塞症に関与することが示唆されていた。今回、PC 欠乏

症と AT 欠乏症の血栓発症を比較することにより、PC 欠乏症は動脈閉塞症の発症に関与することを明らかにした。このことは、抗凝固機能としては同じように考えられる 2 つのシステムは、血管の場所で使い分けられていることを示唆している。

E. 結論

PC 欠乏症は AT 欠乏症に比し、動脈閉塞症の発症が多く、初発の冠動脈疾患の発症年齢も早かった。PC は AT よりも動脈内での血栓形成の制御に大きく寄与していると考えられた。

F. 研究発表

(1) 論文発表

1. T.Sakata, Y. Katayama, T. Matsuyama, H. Kato, and T. Miyata (1999): Prevalence of protein C deficiency in patients with cardiovascular problems in Japan. *Thrombosis and Haemostasis*, 81, 466-467.
2. T.Sakata, K. Kario, Y. Katayama, T. Matsuyama, H. Kato, and T. Miyata (1999): Analysis of 45 episodes of arterial occlusive disease in Japanese patients with congenital protein C deficiency. *Thrombosis Research*, 94, 69-78.
3. T.Sakata, T. Yamamura, K. Kario, Y. Katayama, T. Matsuyama, H. Kato, A. Yamamoto, and T. Miyata (1999): Age- and sex-related differences of plasma activated factor VII levels in children. *Thrombosis and Haemostasis*, 81, 910-912.

4. K.Kario, T. Matsuo, S. Hoshide, H. Kobayashi, T. Sakata, O. Mizuno, T. Mitsuhashi, U. Ikeda, T. Miyata, and K. Shimada (1999): Lipid-lowering therapy corrects endothelial cell dysfunction in a short time but does not affect hypercoagulable state even after long-term use in hyperlipidemic patients. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 10, 269-276.
 5. X.A. Li, K. Kokame, K. Okubo, K. Shimokado, Y. Tsukamoto, T. Miyata, H. Kato, C. Yutani (1999): Cloning and characterization of a novel human gene encoding a zinc finger protein with 25 fingers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1489, 405-412.
- (2) 学会発表
1. 宮田敏行、梅山秀明：プロテインCの分子モデリングと先天性欠乏症。第61回日本血液学会シンポジウム、血液凝固およびその制御因子の分子モデリング、東京都、1999年4月19-21日；*Int. J. Hematol.* 69, 43, 1999.
 2. 岡本章、阪田敏幸、林文子、片山善章、万波俊文、馬場俊六、武田裕、松尾汎、宮田敏行、加藤久雄：プラスミノゲン異常症の血栓症への関与について。第71回近畿血液学会地方会、大阪市、1999年6月5日
 3. Toshiyuki Sakata, Kazuomi Kario, Masa Higashikawa, Hiroshi Kikuchi, Toshiyuki Miyata, Kazuyuki Shimada: Silent cerebral infarction in hypertensive subjects with congenital protein C deficiency. XVIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Washington DC, August 14-21, 1999; *Thromb. Haemost.*, Supplement, p181, 1999.
 4. 宮田敏行、加藤久雄、阪田敏幸、片山善章、馬場俊六、万波俊文、緒方 絢：「シンポジウム 血液凝固の起こるメカニズム、先天性血栓性素因」第46回日本臨床病理学会総会、熊本市、1999年11月10-12日；*臨床病理* 47, 25, 1999.
 5. 岡本章、阪田敏幸、片山善章、万波俊文、馬場俊六、緒方 絢、武田 裕、松尾 汎、宮田敏行、加藤久雄：日本人におけるプラスミノゲン欠乏症の頻度ならびに血栓症への関与について (Suita Study)。日本動脈硬化学会冬季大会、大阪市、1999年11月25-26日
 6. 宮田敏行、小亀浩市、加藤久雄：シンポジウム ホモシステインフリーラジカルと臓器障害 ホモシステインによる血管内皮細胞の遺伝子発現の変化 第3回日本心血管内分泌代謝学会総会、東京都、1999年11月26-27日
 7. 阪田敏幸、岡本章、片山善章、加藤久雄、宮田敏行：先天性プロテインCおよびアンチトロンビンIII欠損症の動脈閉塞症への関与について。第22回日本血栓止血学会学術集会、宇都宮、1999年12月2-3日；*日本血栓止血学会誌*, 10, 353, 1999.
 8. 宮田敏行、小亀浩市、加藤久雄：シンポジウム *Frontiers in Atherosclerosis Research: The Molecular Mechanism of Coronary*

Atherosclerosis. Vascular
dysfunction caused by
homocysteine. 第16回国際心臓研
究学会日本部会、福岡市、1999年12
月1-3日 ; J. Mol. Cell. Cardiol., 31,
A164, 1999.

DIC 診断における Global Test の評価—多施設での検討—

(分担) 研究者 和田 英夫

三重大学 第二内科

研究要旨

近年、国内外で DIC 診断基準の見直しの機運が高まってきている。今回、多施設共同研究による Global Test の評価を行った。松田試案と厚生省の DIC 診断基準の一致率は、造血器腫瘍 79.3%、非造血器腫瘍 69.7%であったが、非 DIC 症例をそれぞれ 23.7%、27.1%を DIC と診断した。PT 比は Cut off 値を下げることにより、感度・特異度とも増加した。Fibrinogen は特異度は高いが、感度は低く、特に非造血器腫瘍では有用性が低かった。FDP は Cut off 値を下げることにより、感度ならびに特異度を改善させた。PT 比の Cut off 値を下げ、非造血器腫瘍の Fibrinogen を除いた修正案は、ほぼ厚生省の DIC 診断基準と一致し、非造血器腫瘍 Pre-DIC の 36.8%を DIC と早期診断し得た。

A. 研究目的

厚生省の播種性血管内凝固症候群(DIC)の診断基準¹⁾により DIC の概念・診断は広く普及した。しかし、10年以上経過した現在、新しい検査法の開発が進み、これらの導入が必要ととされている。また、敗血症・外傷などの基礎疾患の治療率が改善され、これらに合併する DIC の治療が必要となってきた。集中治療部や救急部においては、より簡易であるとともに、臓器障害を中心とする DIC に感度の良い診断基準の作成を求めている。数年前に厚生省の班会議でも、FDP と血小板数からなる松田の試案が提案された²⁾。このため、国際血栓止血学会は SSC ミーティングにおいて、日本の厚生省の診断基準を参考にして、global marker を中心とした DIC の診断基準を作成しようとしている³⁾。このような状況の下、我々は厚生省診断基準の global marker の有用性等について検討した。

B. 研究方法

対象症例は造血器腫瘍 296 例 (DIC;237 例、非 DIC;59 例)、非造血器腫瘍群 347 例 (277 例、70 例) で、その内訳は急性前骨髄球性白血病 (68 例、12 例)、急性骨髄芽球性白血病 (63 例、19 例) 急性リンパ球性白血病 (32 例、8 例)、慢性骨髄性白血病 (12 例、3 例)、悪性リンパ腫 (42 例、7 例)、固形癌 (109 例、27 例)、敗血症 (55 例、13 例)、その他 (133 例、80 例)、そのうち発症前 1 週間以内の止血系検査がしてある 167 症例 (造血器腫瘍;72 例、非造血器腫瘍;95 例) を Pre-DIC とした。

上記疾患において、APTT 比、PT 比、fibrinogen、FDP、血小板数の検討を行った。同時に、松田試案ならびに教室修正案の検討を行った。

C. 研究結果

Global Test の成績では、PT 比、Fibrinogen、FDP 値ともに、DIC 群が非 DIC 群に比して有意に高値であった。また、非造血器腫瘍群における血小板数は DIC 群で有意に低下

を示した（表1）。一方、DIC 群と非 DIC 群間に APTT 比の有意の差は認められなかった。松田の試案と厚生省 DIC 診断基準との一致率は、造血器腫瘍 79.3%、非造血器腫瘍 69.3%であった。しかし、厚生省の DIC 診断基準で DIC と診断し得ない症例において、造血器腫瘍 23.7%、非造血器腫瘍 27.1%を DIC と診断した。

PT 比 DIC スコアと DIC 診断との関係を見ると、造血器腫瘍における DIC では 0 点 44.7%、1 点 40.4%、2 点 14.9%で、非 DIC では 0 点 81.4%、1 点 18.6%、2 点 0%であった。非造血器腫瘍における DIC 例で 0 点 32.9%、1 点 38.3%、2 点 28.8%であり、非 DIC ではそれぞれ 72.9%、21.4%、5.7%

であった。Fibrinogen の DIC スコア値は、造血器腫瘍における DIC では 0 点 43.5%、1 点 26.2%、2 点 30.3%で、非 DIC では 0 点 83.1%、1 点 15.3%、2 点 1.6%であった。非造血器腫瘍における DIC 例で 0 点 54.5%、1 点 19.5%、2 点 26%であり、非 DIC ではそれぞれ 85.7%、12.9%、1.4%であった。FDP の DIC スコア値は、造血器腫瘍における DIC では 0 点 6.8%、1 点 9.7%、2 点 28.3%、3 点 55.2%で、非 DIC では 0 点 40.7%、1 点 33.9%、2 点 25.4%、3 点 0%であった。非造血器腫瘍における DIC 例で 0 点 0%、1 点 17.3%、2 点 23.1%、3 点 55.6%であり、非 DIC ではそれぞれ 17.2%、35.7%、25.7%、21.4%であった。

表1 DIC、非DIC症例におけるGlobal Test 値

	造血器腫瘍		非造血器腫瘍	
	DIC	非DIC	DIC	非DIC
APTT比	1.29±0.47	1.14±0.22	1.48±0.83	1.63±0.34
PT比	1.38±0.34**	1.13±0.92	1.93±0.63**	1.15±0.31
Fibrinogen	185±129**	288±153	231±189**	317±167
FDP	45.3±31.1**	13.9±9.6	49.6±48.3**	27.5±31.8
血小板数	5.7±5.6	5.5±4.7	6.7±5.2**	13.6±9.5

**はDICと非DIC群間で有意な変動を示す(p<0.01)

表2 ROC解析によるCut Off 値における感度と特異性

		Cut off 値	感度	特異度
PT比	造血器腫瘍	1.17	0.744	0.712
	非造血器腫瘍	1.21	0.722	0.700
Fibrinogen	造血器腫瘍	220 mg/dl	0.324	0.355
	非造血器腫瘍	240 mg/dl	0.382	0.400
FDP	造血器腫瘍	35 μ g/ml	0.586	0.661
	非造血器腫瘍	25 μ g/ml	0.671	0.671
血小板数	造血器腫瘍	4×10 ⁴ /μ l	0.472	0.525
	非造血器腫瘍	8×10 ⁴ /μ l	0.267	0.314

表3 厚生省 DIC 診断基準修正案

			造血器腫瘍	非造血器腫瘍
基礎疾患		+	1点	1点
臓器症状		+	1点	1点
出血症状		+	0点	1点
PT比		1.18 < < 1.67	1点	1点
		1.67 <	2点	2点
Fibrinogen	mg/dl	100 < < 150	1点	0点
	mg/dl	< 100	2点	0点
血小板数	$\times 10^4 / \mu l$	8 < < 12	0点	1点
	$\times 10^4 / \mu l$	5 < < 5	0点	2点
	$\times 10^4 / \mu l$	< 5	0点	3点
FDP	$\mu g/ml$	10 < < 20	1点	1点
	$\mu g/ml$	20 < < 40	2点	2点
	$\mu g/ml$	40 <	3点	3点
DIC			4点以上	6点以上

血小板数 DIC スコアは、非造血器腫瘍 DIC で0点9%、1点14.4%、2点25.3%、3点51.3%であり、非 DIC ではそれぞれ41.4%、27.1%、17.1%、14.4%であった。ROC 曲線での解析では、Cut off 値を下げると PT が感度、特異度とも最も良く、FDP も Cut off 値を上げると感度・特異度とも改善を示した。Fibrinogen と血小板数は感度・特異性とも低値を示した（表2）。

以上の成績から、PT 比の Cut off 値を下げ、非造血器腫瘍では Fibrinogen 値を削除した厚生省 DIC 診断基準の修正案（表3）を作成した。これは、DIC ならびに非 DIC ともほぼ 100%厚生省の DIC 診断基準と一致し、造血器腫瘍 Pre-DIC の 8.3%ならびに非造血器腫瘍 Pre-DIC の 36.8%を DIC と早期診断し得た。

D. 考察

ISTH における SSC ミーティングは今春にも Global test により、まず overt-DIC の診断基準を作成しようとしている。しかし、ISTH 自身は DIC 症例における Global test の成績を持っておらず、厚生省の診断基準を参考にして修正を加えようとしている。そこで、多施設での症例を集積して Global test の再評価を試みた。

Global test の成績では、PT 比、Fibrinogen、FDP 値、血小板数は DIC 群で有意な変動を示し、DIC の診断に有用な検査と考えられた。松田の試案は血小板数と FDP のみで DIC を診断する、非常に簡易な検査法であるが、松田の試案と厚生省 DIC 診断基準との一致率は、造血器腫瘍 79.3%、非造血器腫瘍 69.3%であった。また、厚生省 DIC 診断基準で DIC と診断し得ない症例のうち、造血器腫瘍 23.7%、非造血器腫瘍 27.1%を DIC と診断し、これらの解離の原因を検討

することが今後重要と考えられた。PT 比の DIC スコア 1 点以上の症例は 50% 以上存在し、かつ PT 比の特異度は高く、最初予想したより有用な検査と考えられた。Fibrinogen 値については特異度は高いが、感度は特に非造血管腫瘍では低く、DIC 診断には省略していい検査かもしれない。FDP や血小板数の解析では、感度は良いが特異度は低い傾向を示し、3 ポイントの段階的評価が優れている事が示唆された。ROC 曲線での解析によると、Cut off 値を下げることにより PT が感度、特異度とも最も良くなり、FDP も Cut off 値を上げると感度・特異度とも改善を示した。Fibrinogen と血小板数は感度・特異性とも低値を示した。以上の成績から、PT 比の Cut off 値を下げ、非造血管腫瘍では Fibrinogen 値を削除した厚生省 DIC 診断基準の修正案を作成すると、DIC ならびに非 DIC ともほぼ 100% 厚生省の DIC 診断基準と一致し、特に非造血管腫瘍では Pre-DIC の約 36% を DIC と早期診断し得た。本質的には、止血系分子マーカー⁴⁾を使用した診断基準を作成する必要があるが、現行の Global test も Cut off 値を変更したり、一部マーカーを削除することにより、少しは簡易で感度が良くなる可能性が示唆された。

〈謝辞〉

DIC 症例のデータをお送り頂いた丸藤哲先生（北海道大学）、朝倉栄策先生（金沢大学）、射場敏明先生（順天堂大学附属浦安病院）、内山俊正先生（国立高崎病院）、川杉和夫先生（帝京大学）、小池薫先生（日本医科大学）、岡本好司先生（産業医科大学）に深謝致します。

〈参考文献〉

1. 青木延雄、長谷川淳：DIC 診断基準の『診断のための補助的検査成績、所見』の

項の改訂について、厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班、昭和 62 年度研究報告書、1988、pp37-41

2. 和田英夫：国内外における播種性血管内凝固症候群(DIC)の診断基準作成の動きについて、血栓止血誌、11:3-15,2000
3. 松田保、朝倉英策、山崎雅英ほか：DIC 診断基準の問題点：フィブリノゲンとプロトロンビン時間の意義について、厚生省特定疾患血液凝固異常症調査研究班、平成 4 年度業績報告書、1993、pp24-30
4. Wada H, Wakita Y, Nakase T, et al: Increased plasma soluble fibrin monomer levels in patients with disseminated intravascular coagulation. Am J Hematol, 51: 255-260, 1996

IV. 発表文献