

200/0811

厚生科学研究費補助金

厚生科学特定疾患対策研究事業

血液凝固異常症に関する調査研究
平成13年度 総括・分担研究報告書

平成14年3月

主任研究者 中 川 雅 夫

目 次

I. 総括研究報告	
血液凝固異常症に関する調査研究	2
II. 分担研究報告	
1. 血管内皮細胞における血栓形成調節因子の発現に及ぼすトロンボキサン A ₂ の影響 中川 雅夫	5
2. DIC における臓器障害進展の機序について—組織因子誘発ラット DIC モデルによる検討より— 朝倉 英策	8
3. ITP 診断における各種検査法の有用性に関する前向き調査 池田 康夫	11
4. 活性化プロテイン C による血管新生 岡嶋 研二	16
5. 血液凝固第 XIII 因子欠損症 4 家系の遺伝子解析 岡村 孝	18
6. 糖尿病症例におけるメイラード反応後期生成物と血管内皮細胞障害との関連に関する研究 垣下 榮三	21
7. 下肢深部静脈血栓症の実践的診断法 川崎 富夫	24
8. アンチトロンビン・ノックアウトマウスの作製と表現型解析 小嶋 哲人	26
9. 癌細胞による止血機構への挑戦 坂田 洋一	30
10. 培養ラット大動脈血管内皮細胞における TPA 及び PAI-1 mRNA 発現に及ぼす ADP の影響 辻 肇	39
11. ヘリコバクターピロリ—感染症と免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) 藤村 欣吾	41
12. 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 藤村 吉博	44
13. 血液凝固異常症に関する研究 宮田 敏行	48
14. 国際血栓止血学会(ISTH)の overt-DIC 診断基準と厚生労働省 DIC 診断基準の有用性の比較 和田 英夫	50
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	54

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

血液凝固異常症に関する調査研究

主任研究者 中川 雅夫

京都府立医科大学第二内科

分担研究者

朝倉英策（金沢大学），池田康夫（慶應義塾大学），
岡嶋研二（熊本大学）岡村 孝（久留米大学），
垣下榮三（兵庫医科大学），川崎富夫（大阪大学）
小嶋哲人（名古屋大学），坂田洋一（自治医科大学），
辻 肇（京都府立医科大学），藤村欣吾（広島大学），
藤村吉博（奈良県立医科大学），丸山征郎（鹿児島大学），
宮田敏行（大阪循環器病センター），和田英夫（三重大学）

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)，血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) および特発性血栓症における病態解明，診断ならびに治療法の確立に寄与する基礎的ならびに臨床的研究を幅広く行うことを目的とする。

B. 研究方法 略

C. 研究結果・考察・結論

1) ITP, TTP 関連の研究

ITP の診断は，主に血小板減少をきたす他の疾患の除外により行われる。ITP 患者に特異的な検査法として抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度，血小板結合抗 GPIIb-IIIa 抗体，網状血小板，血漿 TPO などが報告されている。これら検査法の ITP 診断における有用性を調べるため，血小板減少症のために受診した 43 例を対象として初診時の各種検査結果と最終的な診断との関連を前向きに検討した。初診時における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加，血漿 TPO 正常または軽度上昇 (200 pg/ml)，貧血なしの 3 項目は ITP の診断と強く関連した。初診時に血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体陽性，網状血小板の増加，血小板数 $< 3 \text{ 万} / \mu\text{l}$ ，出血症状を有する症例は ITP と診断される頻度が高い傾向があった。ITP 群と非 ITP 群で差のあった臨床項目を用いたスコア制

診断指針を作成し，今回の症例をあてはめると，ITP と非 ITP 患者の層別化が可能であった。したがって，これら検査項目を組み合わせたスコア制診断指針は ITP の診断に有用と考えられた。また，ヘリコバクター感染 (HP) ITP 症例に対する除菌療法が血小板増加反応をもたらす報告が散見されている。完全寛解の得られていない症例に対し，ITP における HP 感染率，除菌療法の有効性，HP 菌体成分に対する末梢血リンパ球の反応性を検討した。感染率は 72%，そのうち治療抵抗性群における陽性率は 69% で非 ITP 症例における HP 菌陽性率と差は無かった。除菌療法の了解の得られた 5 例中 1 例は完全寛解に 2 例は部分寛解，2 例は血小板数の増加が 2 万以下であった。HP 菌体成分に対する反応性は HP 陽性例が陰性例に比し高い傾向は得られていない。TTP の成因に関連し，von Willebrand 因子 (VWF) 特異的プロテアーゼ (VWF-CPase) に関する検討を行った。VWF-CPase を精製し，本酵素の諸性質の検討を行った。さらに，後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 70 症例の VWF-CPase 活性およびそのインヒビターを検索したところ，急性期の 64 症例では，5% 未満 37 例 (57.8%)，5-25% 18 例 (28.1%)，26-50% 8 例 (12.5%)，50% 以上 1 例 (1.6%) であった。インヒビターは，急性期に血漿を用いて検索した 64 例中 52 例 (81.3%) に認めた。血漿から Protein G カラムを用いて IgG を精製し，検索すると 51 例中 48 例 (94.1%) にインヒビターを認めた。

2) 播種性血管内凝固 (DIC) の病態と診断

国際血栓止血学会 (ISTH) の overt-DIC 診断基準と厚生労働省 DIC 診断基準の比較検討を，レトロスペクティブに 1184 例の DIC 疑い症例で行った。厚生労働省診断基準による DIC と ISTH 診断基準による overt-DIC の一致は，全例中の 67.4%

に認められ、非造血管腫瘍群(69.2%)の方が造血管腫瘍群(64.8%)に比べて、若干一致率が高かった。一方、厚生労働省診断基準で Non-DIC であり、ISTH 診断基準で overt-DIC でない症例は 98.0%であった。両診断基準の一致率の高いものは敗血症や前骨髄球性白血病であり、低いものは膠原病、大動脈瘤、非ホジキン氏病性リンパ腫ならびに急性リンパ性白血病であった。DIC ならびに overt-DIC 例における異常値の出現頻度は、fibrinogen 値が極めて低く、血小板数ならびに FDP 値が高値であった。逆に、厚生労働省基準による Non-DIC ならびに ISTH 診断基準による非 overt-DIC 例における異常値の出現頻度は、fibrinogen 値と PT が極めて低く、血小板数と FDP 値が高値であった。一方、組織因子(TF)誘発 DIC モデルにおいて抗線溶薬であるトラネキサム酸(TA)の影響を検討すると、腎障害は高度となり腎糸球体フィブリン沈着も明らかになり、本モデルにおいて臓器症状がみられないのは、線溶活性化が主因であると考えられた。

3) 特発性血栓症の病態と診断

日本人においてプロテイン C(PC)、アンチトロンビン(AT)およびプラスミノゲン(PLG)の各欠乏症が静脈血栓症発症にどの程度関与するかは不明である。深部静脈血栓症(DVT)患者 108 名における PC, AT, PLG の各欠乏症の頻度を求め、前回までの研究で得られた日本人一般住民 4,505 人を対象にした結果と比較し、各欠乏症と DVT との関連を検討した。DVT 患者における各欠乏症の頻度は 6.48%, 5.56%, 2.78% であり、Odds 比は 34.6, 33.1 および 0.65 となった。以上、日本人において PC と AT の両欠乏症は DVT 発症の危険因子となることが結論された。しかし、PLG 欠乏症の DVT への関与は低かった。さらに日本人一般住民 2,690 人のプロテイン S(PS) 活性を測定し、PS 欠乏症の頻度を求めたところ、PS 欠乏症は AT, PC 欠乏症の 2~3 倍の頻度で存在する可能性が示唆された。DVT の早期診断と治療は、肺塞栓症予防による生命予後の改善のみでなく、医療経済上も合理的である。一般医療施設を対象とした、CT scan を使用した実践的な DVT 迅速診断法を新しく考案した。下腿部中枢側の CT 画像

1 枚において、患側と健側で筋束の断面積を比較してその違いを比較する方法である。筋束断面積比が 1.1 以上である場合に視覚にて認識可能となるが、この面積比を cut-off とすると、下腿部 DVT の約 90% をスクリーニング可能であり、リンパ浮腫などの非特異的な下肢腫脹を除外診断できることも明らかになった。AT の欠乏症は深部静脈血栓症の危険因子として知られているが、その完全欠損症例は胎児致死に至ると考えられている。AT 欠損型マウスの作製、解析を行った結果、完全欠損型は 14.5 日目まではほぼ正常に成長したが、その後心筋、肝臓類洞に広範な血栓形成を起し、消費性凝固障害ならびに肝障害に伴う広範な皮下出血や頭蓋内出血のため死亡することが示唆された。トロンボキサ A2 (TXA2) の血管内皮細胞における凝固・線溶調節因子の発現への影響を検討した。TXA2 は TF, PAI-1 の発現を亢進させ、TF, PAI-1 の発現亢進は thromboxane prostanoid (TP) receptor 拮抗薬である BAY u3405 で抑制された。TXA2 は TP receptor を介して血管内皮細胞を血栓形成方向に誘導していると考えられた。一方、adenosine 5'-diphosphate (ADP) の血管内皮細胞の凝固線溶調節への影響を検討したところ、ADP は TPA の発現を亢進し、Ang 11 による PAI-1 発現亢進を抑制すると考えられた。活性型プロテイン C は血管内皮を活性化して、血管内皮の増殖や管腔形成、血管新生を惹起し、血栓症の治療薬剤あるいは血管修復にも有効な薬剤と考えられた。腎盂移行上皮癌細胞株 SS-TCC を樹立し、止血栓形成抑制機構について解析したところ、SS-TCC は TFPI, u-PAR, MMP-2, MT1-MMP を発現し、SS-TCC は 3 次元コラーゲンゲル上で管腔様構造を形成した。糖尿病における血栓性合併症の発症に関連し、メイラード反応後期生成物(AGE)、血中セロトニン濃度、hepatocyte growth factor (HGF) について検討した。糖尿病症例において血中 AGE 濃度と血小板凝集の間に正相関関係が認められ、AGE は糖尿病症例における血栓形成傾向と関連することが示唆された。血中 HGF 濃度は高値を示し、年齢、頸動脈の内膜・中膜肥厚、プラークスコアと正相関し、頸動脈における血管内皮細胞障害に基づく変化であることが

考えられた。一方 HGF は HbA1c とは相関せず、AGE と相関が認められ、この変化は長期間の高血糖による血管内皮障害を背景としたものと考えられた。また HGF は血中 PAI-1 濃度と正相関を認め、血中 HGF 値は糖尿病症例において長期間の高血糖状態の結果生じた血栓形成傾向を基盤とした血管

合併症のマーカーになりうると考えられた。血液凝固 XIII 因子欠損症は、常染色体劣性遺伝形式をとる非常に稀な疾患であり、生下時の臍帯出血や脳出血が多いのが特徴である。4 家系の XIII 因子欠損症の遺伝子解析を行い、新たな変異を同定した。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

血管内皮細胞における血栓形成調節因子の発現に及ぼす

トロンボキサン A₂の影響に関する研究

分担研究者 中川 雅夫

京都府立医科大学第二内科

研究要旨

血小板凝集は、血栓症発症の重要な機序のひとつと考えられている。血小板凝集時に放出される血管作動性物質であるトロンボキサ A₂ (TXA₂) には血小板凝集や血管平滑筋収縮の作用以外にも凝固・線溶系調節因子に対する影響が推察される。そこで、血管内皮細胞において産生される凝固・線溶調節因子の発現に及ぼす TXA₂ の影響を検討した。TXA₂ は反応時間、添加濃度依存性に TF, PAI-1 mRNA ならびに蛋白レベルにおいて発現を亢進させた。また、TF, PAI-1 mRNA の発現亢進は thromboxane prostanoid (TP) receptor 拮抗薬である BAY u3405 で濃度依存性に抑制された。以上より、TXA₂ は TP receptor を介して血管内皮細胞を血栓形成方向に誘導していると考えられた。

A. 研究目的

TXA₂ は、主に血小板から放出され、血小板の凝集、血管平滑筋の収縮作用などを持つ重要な生理活性物質である。一方、血管内皮細胞に対しては、apoptosis の誘導、遊走抑制作用などが報告されている。さらに、不安定狭心症、心筋梗塞、血栓溶解療法後や閉塞性動脈硬化症では TXA₂ の代謝物質である TXB₂ の産生量が増加していることが報告されている。また、TP 受容体拮抗薬は、虚血モデルにおいて心筋梗塞のサイズ縮小や、虚血後の脳組織の保護作用などを示す。このように TXA₂ は動脈系血栓症の病態に関与しているが、内皮細胞における血栓形成調節因子産生に及ぼす影響は明らかでない。そこで、培養ラット大動脈血管内皮細胞(RAECs)を用い、これら諸因子産生に及ぼす TXA₂ の影響を検討した。

B. 研究方法

雄性 SD ラットを用い primary explant 法で胸部大動脈血管内皮細胞の培養を行い、継代 2 世代を実験に用いた。1% BSA を含んだ DMEM にて 24 時間 pre conditioning を行った後、培養上清中に TXA₂ analog (U-46619; 添加濃度:1nM-10 μM、反応時間:0-12h)を加え内皮細胞を刺激した。内皮細胞から RNeasy total RNA Kit (Qiagen

GmbH, Hiden, Germany)を用いて total RNA を抽出し、rat cDNA probe を用いて tissue factor (TF)、tissue factor pathway inhibitor (TFPI)、tissue plasminogen activator (tPA)及び plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の mRNA 発現量を northern blot 法で検討した。内皮細胞表面上に発現する TF 及び培養上清中の PAI-1 レベルについては、合成発色基質法及び ELISA 法で測定した。また、TP receptor antagonist (BAY-u3405:1nM-10 μM)で前処置を行い、その抑制効果も検討した。各々の実験は n=3 で行い、ANOVA 法で統計学的処理を行った。本実験は京都府立医科大学実験動物委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

TXA₂ により TF mRNA は 3 時間を peak として発現亢進し、TXA₂ の濃度が 100nM 以上では濃度依存性に TF mRNA は増加した。一方、TFPI mRNA 発現には変化は認められなかった。さらに、培養細胞表面上の TF 活性も TXA₂ の添加によって上昇した。次に TXA₂ の PAI-1 及び tPA mRNA 発現への影響は、PAI-1 mRNA は TXA₂ の添加後 3 時間を peak に発現亢進するとともに TXA₂ 100nM 以上では濃度依存性の増

加が認められた。また、tPA mRNA についても TXA₂ 添加後 6 時間を peak とする増加がみられ、100nM 以上で濃度依存性の発現亢進が認められた。また、培養上清中の PAI-1 蛋白レベルは、TXA₂ の添加濃度及び反応時間依存性に誘導された。TXA₂ 刺激による TF、PAI-1 及び tPAmRNA の発現亢進は BAY-u3405 での 30 分間の全処置により濃度依存性に抑制された。

D. 考 察

TXA₂ は主に血小板で産生され、その作用は局所的で、平滑筋収縮や血小板凝集などを引き起こし、速やかに加水分解され不活性な TXB₂ に変換される。このような TXA₂ の化学的性質から、アゴニストとしては化学的に安定な TXA₂ 類似作用物質が使用され、TXB₂ 及びその代謝物質 (1-dehydroTXB₂ や 2,3-dinor TXB₂) が TXA₂ の産生を見るのによく利用される。血管内皮細胞は TPA, PAI-1, TF, TFPI などの蛋白を産生しており、様々な物質が RAECs において TPA や PAI-1 mRNA 発現に影響を及ぼすことが報告されている。TXA₂ は RAECs において TF mRNA を発現亢進させ、蛋白レベルにおいてもその発現が確認された。一方、TFPI に関しては影響を及ぼさなかった。この結果から外因系凝固を促進することが考えられ、血栓形成方向へ作用する可能性が示唆される。Carroy Y et al は mononuclear cell において TXA₂ が TF 由来の凝固活性を上昇させていると述べている。また、TXA₂ は RAECs において TPA, PAI-1 mRNA をともに時間、濃度依存性に発現亢進させた。本実験で用いた PAI-1 測定 kit は tPA との結合能を有する active PAI-1 のみを検知するものであり、今回の蛋白レベルでの検討から実質的には PAI-1 が TPA より優位に産生していると考えられた。このことから内皮細胞において TXA₂ は線溶抑制方向に作用すると考えられた。これらの作用は、血小板凝集・血管平滑筋収縮作用とともに血栓形成作用を有する TXA₂ の働きに矛盾しないものと考えられた。

今回検討した TXA₂ の濃度は 1nM~10 μM であるが、1nM が SD rat の血清レベルに近い濃度

である。血小板凝集が引き起こされるような局所での TXA₂ 濃度については詳しい検討はなされていないが、虚血部位での血管内 TXB₂ 濃度の検討や、TXA₂ 同様に血小板凝集時に放出される serotonin の組織内濃度の研究からすると、mRNA や蛋白の検討で有意差が認められた濃度 (100nM) も in vivo とかけ離れたものではないと考えられる。

E. 結 論

TXA₂ は、血管内皮細胞上の TP receptor を介して TF 及び PAI-1 の mRNA 発現を著しく亢進させ、さらにこれらの発現亢進は蛋白レベルでも確認された。TXA₂ は血管内皮細胞を血栓形成方向に誘導する可能性が示唆された。

F. 参考論文

1. Tada M. Elevation of thromboxane B2 levels in patients with classic and variant angina pectoris. *Circulation* 64: 1107, 1981
2. Saldeen TG. Increased production of thromboxane A2 by coronary arteries after thrombolysis: *Am Heart J* 1993 Feb; 125(2 Pt1): 277-284
3. Schumacher WA The thromboxane receptor antagonist SQ 30,741 reduces myocardial infarct size in monkeys when given during reperfusion at a threshold dose for improving reflow during thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990 Mar 15;15(4):883-889
4. Matsuo Y Effect of a novel thromboxane A2 receptor antagonist, S-1452, on postischemic brain injury in rats. *Stroke* 1993 Dec;24(12): 2059-2064
5. Hamberg M. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 2994-2998, 1975
6. Hiromi Nishimura. Angiotensin II increases Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Tissue Factor mRNA Expression without Changing that of Tissue Type Plasminogen

- Activator or Tissue Factor Pathway Inhibitor in Cultured Rat Aortic Endothelial Cells. *Thromb Haemost* 1997; 77: 1189-1195
7. Hidehiko Kawano. Serotonin induces the expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. *Blood*, 15 Mar 2001 vol 97 number 6: 1697-1702
 8. Cadroy Y. Arachidonic acid enhances the tissue factor expression of mononuclear cells by the cyclooxygenase-1 pathway: beneficial effect of n-3 fatty acids. *J Immunol* 1998 Jun 15; 160(12): 6145-6150
 9. Laura Currolin. Effect of single and repeated doses of a new nitroderivative of acetylsalicylic acid on platelet TXA2 production in rats. *Life Sciences*, vol 58 No.11 pp. PL 207-210, 1996
 10. Chen HW. Effects of vitamin E deficiency and dietary linoleate on serum thromboxane synthesis in male Sprague-dawley rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995 Dec;53(6): 405-411
 11. Szekacs B. Prostacyclin and thromboxane production of rat and cat arterial tissue is altered independently by several vasoactive substances. *Prostaglandins* 1996 Sep;52(3): 221-235
 12. Rajbabu Pakala. Effect of serotonin and thromboxane A2 on endothelial cell proliferation: Effect of specific receptor antagonists. *J Lab Clin Med* 1998 June vol 131 number 6: 527-53

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

DIC における臓器障害進展の機序について
組織因子誘発ラット DIC モデルによる検討より
分担研究者 朝倉 英策
金沢大学医学部附属病院高密度無菌治療部

研究要旨

組織因子 (TF) 誘発 DIC モデルにおいては、LPS 誘発 DIC モデルと比較すると、臓器におけるフィブリン沈着は明らかに軽度で、臓器障害がみられにくいことを、昨年までの我々の検討より明らかにした。本年は、同モデルにおいて臓器障害がみられないのは、生体内における線溶活性化が主因であるかどうかを明確にするため、抗線溶薬であるトラネキサム酸 (TA) 投与による影響を検討した。TF 誘発 DIC モデルにおいては腎障害は軽度で腎糸球体フィブリン沈着はほとんどみられなかったが、TA を投与すると腎障害は高度となり腎糸球体フィブリン沈着も明らかになった。一方、低分子ヘパリンを投与すると、腎障害は完全に消失した。以上より、TF 誘発 DIC モデルにおいて臓器症状があまりみられないのは、線溶活性化が主因であると考えられた。LPS 誘発 DIC モデル (臨床の凝固優位型 DIC に類似) においては、線溶療法が臓器障害に対して部分的に有効ではないかと考察された。

A. 研究目的

播種性血管内凝固症候群 (DIC) における臓器症状の出現機序については、多発した微小血栓により臓器での微小循環障害をきたすためと考えられてきた。昨年までに、我々は lipopolysaccharide (LPS) および組織因子 (TF) 誘発 DIC モデルは特に線溶活性化の病態、臓器症状の出現においては、相当の差異があり、前者は臨床の凝固優位型 DIC に類似した病態を有し、後者は線溶優位型 DIC に類似した病態を有していることを明らかにした。すなわち、LPS 誘発 DIC モデルは線溶抑制状態、臓器における高度なフィブリン沈着、高度な臓器障害がみられるのに対し、TF 誘発 DIC モデルは、臓器におけるフィブリン沈着は軽度、臓器障害をきたしにくいという特徴がみられることを指摘した。本年は、TF 誘発 DIC モデルにおいて臓器症状がみられないのは、同モデルにおける有意な線溶活性化が主因であるかどうかを明確にするため、同モデルに対して抗線溶薬を投与し、臓器症状や腎糸球体フィブリン沈着に対する影響を検討した。

B. 研究方法

対象は体重 180~200 g、6~7 週齢の Wistar 系雄性ラットを一晩絶食して用いた。TF 誘発 DIC モデルの作成は、尾静脈より留置針を留置し、4 時間かけ TF 3.75 単位/kg/4 hr を持続点滴した。TF 投与開始時間を 0 時間 (n=8) とし、4、8 時間後にエーテル麻酔下、腹部大動脈より採血し、速やかに腎臓を摘出した (それぞれ n=9, 13)。薬物投与群については、トラネキサム酸 (TA) 50 mg/kg (それぞれ n=12, 13)、低分子ヘパリン (LMWH) 200 U/kg (それぞれ n=11, 11) を TF 投与開始 30 分前から投与し、TF 投与終了まで 4.5 時間持続点滴した。-0.5~0 時間までは、TA または LMWH を単独投与し、0~4 時間までは、TA または LMWH を TF と混合して持続点滴した。測定項目は、血小板数 (PLT)、血中フィブリンゲン濃度 (Fbg)、D-dimer (DD)、トロンビン-アンチトロンビン III 複合体 (TAT)、血中クレアチニン (Cr) である。腎糸球体フィブリン沈着の程度は、摘出した腎臓を 10%ホルマリン固定し、PTAH 染色を行い、100 個の糸球体中フィブリン沈着陽性の糸球体の個数を数え、percentage of glomerular fibrin deposition (%GFD) として

示した。

データは平均値±標準誤差 (mean±S. E.) で示し、分散分析 (ANOVA) を行った後、post hoc test (Scheffe 法) を行い、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

C. 研究結果

PLT の変動を、〈前値〉、〈TF 4 時間後、TF+TA 投与 4 時間後、TF+LMWH 投与 4 時間後〉、〈TF 8 時間後、TF+TA 投与 8 時間後、TF+LMWH 投与 8 時間後〉の順 (以下のマーカーも同様) で記載すると、〈 461 ± 23 〉、〈 191 ± 14 , 123 ± 5 , 300 ± 17 〉、〈 175 ± 24 , 164 ± 17 , 350 ± 16 〉 ($\times 10^3/\mu\text{L}$)、 $\text{Fbg}<220.7\pm 6.6$ 〉、〈 50.0 以下, 120.0 ± 22.1 , 178.0 ± 6.2 〉、〈 149.5 ± 16.1 , 163.5 ± 11.6 , 273.0 ± 6.6 〉 (mg/dL)、 $\text{D-dimer}<0.06$ 以下〉、〈 7.25 ± 1.77 , 0.47 ± 0.07 , 0.06 以下〉、〈 0.33 ± 0.11 , 0.17 ± 0.04 , 0.15 ± 0.03 〉 ($\mu\text{g/mL}$)、 $\text{TAT}<2.9\pm 1.1$ 〉、〈 50.2 ± 5.9 , 60.9 ± 4.4 , 16.7 ± 3.8 〉、〈 10.3 ± 1.7 , 14.0 ± 1.9 , 8.4 ± 2.4 〉 (ng/mL)、 $\text{Cr}<0.18\pm 0.01$ 〉、〈 0.48 ± 0.06 , 0.79 ± 0.03 , 0.16 ± 0.01 〉、〈 0.29 ± 0.07 , 0.65 ± 0.09 , 0.17 ± 0.01 〉 (mg/dL)、 $\%GFD<0.0\pm 0.0$ 〉、〈 3.2 ± 0.7 , 17.4 ± 4.4 , 1.4 ± 1.3 〉、〈 1.2 ± 0.8 , 38.9 ± 2.5 , 1.2 ± 0.8 〉 (%) であった。

TF 投与により、血小板数は低下したが、TA 投与により 4 時間後においてさらに低下し ($p<0.01$)、LMWH 投与により 4 時間および 8 時間後における低下傾向は抑制された ($p<0.01$, $p<0.01$)。TF 投与により血中 Fbg 濃度は低下したが、TA 投与では 4 時間後において低下が抑制され ($p<0.05$)、LMWH では 4 時間および 8 時間において低下が抑制された ($p<0.01$, $p<0.01$)。TF 投与により血中 TAT 値は 4 時間後をピークに上昇したが、TA 投与によりさらに上昇し (有意差はなし)、LMWH 投与により 4 時間後における上昇は抑制された ($p<0.01$)。TF 投与により血中 D-dimer 値は 4 時間後をピークに上昇したが、いずれの薬物投与によってもその上昇は著明に抑制された ($p<0.01$, $p<0.01$)。また、TF 投与により血中 Cr 値は軽度上昇したが、TA 投与により 4 時間後、8 時間後ともに有意に上昇し ($p<0.01$, $p<0.05$)、LMWH 投与により 4 時間後における上

昇は完全に抑制された ($p<0.01$)。TF 投与による腎糸球体フィブリン沈着はほとんどみられなかったが、TA 投与により 4 時間後、8 時間後ともに沈着が有意に高度となった ($p<0.01$, $p<0.01$)。

D. 考察

臨床でみられる DIC の病態は、基礎疾患によって相当異なることが明らかになりつつある。DIC の病型によって、より適切な治療が異なる可能性があり、今後検討されるべき課題ではないかと考えられる。

動物 DIC モデルにおいては、DIC 誘発物質として LPS または TF が使用されてきたが、両モデルは同じ DIC モデルということでありあまり区別されずに使用されてきたのが現状である。しかし、我々は、使用する DIC 誘発物質の違いにより DIC 病態が異なり、LPS 誘発 DIC モデルは臨床例の凝固優位型 DIC に、TF 誘発 DIC モデルは線溶優位型 DIC に類似した病態であることを指摘してきた。本年は、TF 誘発 DIC モデルに対して TA や LMWH を投与することによる影響を評価することにより、DIC モデルにおける臓器症状出現の機序を検討した。

今回我々が作成した TF 誘発 DIC モデルにおいては、血小板数、フィブリノゲンは著明に低下し、血中 TAT 値は著増していることから、消費性凝固障害を伴った DIC を発症していると考えられた。また、フィブリン形成後の線溶活性化を反映している血中 D-dimer の上昇が明らかであり、線溶活性化が強いモデルであると思われた。

まず、TF 誘発 DIC モデルに対して、TA を投与することにより、血小板数、血中 TAT 値に対する影響は比較的軽度であったが、血中 D-dimer 値の上昇はほとんど消失するまでに抑制されている点は際立った所見であり、TA は十分な抗線溶効果を発揮しているものと考えられた。その結果として、TF 誘発 DIC モデルにおいて本来は軽度である腎糸球体フィブリン沈着は明らかに高度となっている。腎障害のマーカーである血中 Cr 濃度も明らかに高値となっていることから、TF 誘発 DIC モデルにおいても線溶活性化を抑制することにより、微小血栓の多発、臓器障害の悪化が観

察されるようになるものと考えられた。このように、同モデルに対してTAを投与することにより、微小血栓の多発、臓器障害が高度になるという点からは、LPS誘発DICモデルに類似した病態になるものと考えられた。なお、TAの投与により、4時間後において血小板数は有意に低下したのに対してフィブリノゲンは有意に上昇と、対照的な変動となった。この理由については今後の検討課題であるが、このDICモデルにおけるフィブリノゲンの低下は、微小血栓形成に伴う消費のみではなく線溶活性化に伴うフィブリノゲンのプラスミンによる分解が加味されている可能性を考えている。同モデルにおける血中D-dimer値の上昇は、LMWHの投与によってもほぼ完全に消失するまでに抑制された。この場合は、血小板数の低下、フィブリノゲンの低下といった消費性凝固障害の所見の改善もみられ、血管内凝固活性化のマーカーである血中TAT値の抑制もみられた点は、TAを投与した際との大きな違いであった。これらの結果より、TF誘発DICモデルにおいて、臓器障害に乏しいのは、著しい線溶活性化が主因であると考えられた。

E. 結論

TF誘発DICモデルは臓器症状に乏しいモデル

であるが、線溶活性化を抑制することにより、LPS誘発DICモデルと同様に臓器症状をきたしやすくなるものと考えられた。換言すれば、TF誘発DICにおいて臓器症状に乏しいのは、線溶活性化が充分なためと考えられた。これらの結果は、線溶の抑制されたLPS誘発DICモデル（臨床の凝固優位型DICに類似したモデル）に対しては適度な線溶療法が臓器障害に対して部分的に有効である可能性を示しており、この点については今後の検討課題である。

F. 研究発表

1. Asakura H, Suga Y, Nakao S, et al.: Marked difference in pathophysiology between tissue factor- and lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation models in rats. Crit Care Med 30: 161-164, 2002.
2. Asakura H, Ontachi Y, Nakao S, et al.: An enhanced fibrinolysis prevents the development of multiple organ failure in disseminated intravascular coagulation in spite of much activation of blood coagulation. Crit Care Med 29: 1164-1168, 2001.

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

ITP 診断における各種検査法の有用性に関する前向き調査

分担研究者 池田 康夫

慶應義塾大学医学部内科

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断は、主に血小板減少をきたす他の疾患の除外により行われている。最近、ITP 患者に特異的な検査法として抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、血小板結合抗 GPIIb-IIIa 抗体、網状血小板、血漿 TPO などが報告されている。そこで、これら検査法の ITP 診断における有用性を調べるため、血小板減少症のために受診した 43 例を対象として初診時の各種検査結果と最終的な診断（ITP、骨髄異型性症候群などの非 ITP）との関連を前向きに検討した。初診時における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加、血漿 TPO 正常または軽度上昇（200 pg/ml）、貧血なしの 3 項目は ITP の診断と強く相関した。さらに、初診時に血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体陽性、網状血小板の増加、血小板数 < 3 万/ μ l、出血症状を有する症例は ITP と診断される頻度が高い傾向があった。ITP 群と非 ITP 群で差のあった臨床項目を用いたスコア制診断指針を作成し、今回の症例をあてはめると、ITP と非 ITP 患者の層別化が可能であった。したがって、これら検査項目を組み合わせたスコア制診断指針は ITP の診断に有用と考えられた。

A. 研究目的

我が国では、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断に 1990 年に厚生省（当時）研究班により提案された診断基準が広く用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり、骨髄検査で巨核球が正常または増加して他の系統に異型性がなく、血小板減少をきたす他の疾患が除外されれば ITP と診断してよい。しかし、一般診療の場では血小板減少をきたす全ての疾患を除外することは困難であり、他疾患の除外のために数多くの検査を行うことは医療経済上も好ましくない。そのため、専門医の経験に基づいて必要最小限の検査成績により ITP の診断を行っているのが現状である。ITP の診断における問題点のひとつは、血小板減少症をきたす他疾患の除外に主眼がおかれていることである。その理由として、ITP に特異性の高い臨床所見がなく、積極的に診断する根拠がないことが挙げられる。厚生省の診断基準の項目に含まれる骨髄所見や PAIgG は ITP に対する特異性が低く、それらの所見から ITP の積極的な診断はできない。そのため、アメリカ血液病学会（ASH）により最近提唱された

ITP の診断、治療のガイドラインでは、PAIgG は不必要で不適切とされており、高齢者や摘脾を考慮する患者以外では骨髄検査は必要ないと明記されている。ITP は比較的頻度の高い疾患で、専門医以外が遭遇する機会も多いことから、より実践的な基準の作成が必要である。ITP の診断に有用な検査法として以前から GPIIb-IIIa や GPIb-IX などに対する血小板特異抗体の検出が知られているが、操作の煩雑さから普及していない。最近、網状血小板の増加、血清または血漿中のトロンボポエチン（TPO）濃度の軽度の上昇が ITP の診断に有用であることが報告されている。さらに、我々は昨年度の本研究班で、enzyme-linked immunospot assay（ELISPOT 法）により検出される抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の増加が ITP にきわめて特異的な所見であることを報告した。そこで、本年度はこれら検査法の ITP の診断における有用性を検討するための前向き調査を行い、その結果をもとに ITP の診断指針の作成を試みた。

B. 研究方法

血小板減少または出血傾向を主訴に平成12年1月から平成13年10月の間に慶應義塾大学病院を受診した患者のうち、(1)血小板数 <10 万/ μ l、(2)末梢血スメアで異型性がない、(3)全身性エリテマトーデスなどの血小板減少をきたす全身性の基礎疾患がない、(4)経過観察期間が3ヶ月以上、のすべてを満たす43例を対象とした。ただし、初診時すでに血小板減少症に対して副腎皮質ステロイド療法が開始されていた例は除外した。エントリー症例は初診時に臨床的な出血症状の有無、末梢血スメア検査に加えて、末梢血サンプルを用いた以下の解析を行った。(1)ELISPOT法による 10^5 個の末梢血単核球あたりの抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞頻度、(2) 5×10^5 個の血小板から溶出した抗体を用いたELISA法による血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体、(3)チアゾールオレンジを用いたフローサイトメトリーによる網状血小板の割合、(4)ELISA法による血漿TPO濃度。2群間の平均値および頻度の差は、それぞれStudent's t-test、Fisher's 2-tailed exact testを用いて解析した。

(倫理面への配慮)本研究で用いた末梢血検体はすべて患者からの文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

初診時に血小板減少を有する43例を平均11.2ヶ月間(3~23ヶ月)経過観察した。23例はITPに矛盾しない骨髄所見と他疾患の除外によりITPと診断され(ITP群)、そのうち11例が副腎皮質ステロイドまたは免疫グロブリン静注療法の投与により血小板数の増加を認めた。11例は臨床経過からITPが強く疑われたが、骨髄検査を施行しなかったためITP疑い群とした。骨髄検査の結果から4例は骨髄異型性症候群(MDS)、1例が再生不良性貧血、1例は無巨核球性血小板減少症と診断され、これら6例をあわせて非ITP群とした。3例は臨床症状からITPが疑われたが、骨髄所見で巨核球が低形成であったため診断に至らなかった(未診断群)。

これら各群における初診時の抗GPIIbIIIa抗

体産生B細胞、血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体、網状血小板、血漿TPOを図1に示す。抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞はITP群、ITP疑い群で1例を除き全例で上昇していたが、非ITP群で高値を示したのはわずか1例であった。血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体はITP、ITP疑い群の約半数で高値を示したが、非ITP群に陽性例はなかった。したがって、いずれの検査法もITPに対する特異性が高かったが、ELISPOT法の方が感度が高かった。未診断群3例の全例で抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞が増加しており、そのうち2例では血小板結合GPIIb-IIIa抗体も上昇していた。網状血小板増加はITP、ITP疑い群で高頻度にみられたが、MDSの4例中2例でも増加していた。血漿TPOはITP、ITP疑い群のうち1例を除く全例で200pg/ml未満であったが、非ITP群では6例中5例で200pg/ml以上であった。したがって、ITPでは血漿TPOが上昇しないことが特徴的であった。未診断群3例中2例で血漿TPOが高値を示しており、これら症例では抗GPIIb-IIIa抗体とTPOがともに高値であり、ITPとは異なる病態を反映している可能性が考えられた。

初診時の上記検査所見に加えて、性、年齢、白血球減少、貧血、血小板数 <3 万/ μ l、出血傾向の有無をITP群23例と非ITP群6例で比較した(表1)。抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞の増加、血漿TPO <200 pg/mlはITP群で有意に高頻度で($P < 0.001$)、貧血ありは非ITP群で高頻度であった($P = 0.003$)。また、血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体の高値、網状血小板の増加、血小板数 <3 万/ μ l、出血傾向ありの頻度はITP群で非ITP群に比べて高い傾向があった。そこで、ITP群と非ITP群で差のあった臨床項目を用いたITPの診断指針の試案を作成した。そのためにスコア制を導入し、有意差のあった項目をスコア2、傾向はあったが有意差のなかった項目を1として、その合計を求めた(表2)。図2に示すように、ITP、ITP疑い群では1例を除きスコアの合計が5以上であったのに対し、非ITP群はすべて3以下であった。未診断群も1例を除き合計が3以下であった。スコア4をカットオフとする

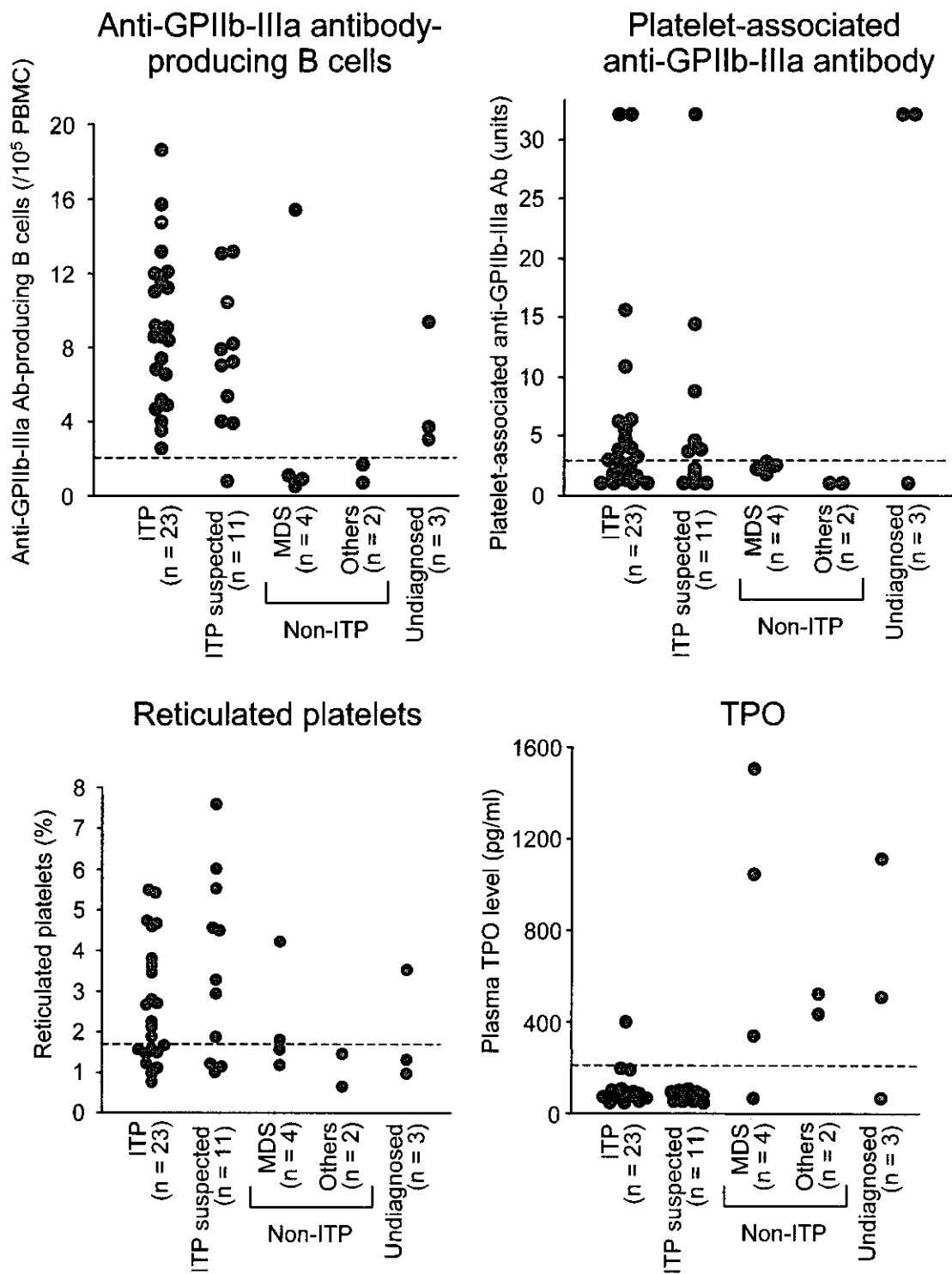


図1. 各疾患群における抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞頻度、血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体、網状血小板、血漿TPO濃度

表1. ITP群および非ITP群における初診時の臨床所見の比較

Clinical items	ITP (n = 23)	Non-ITP (n = 6)	P
Sex (male:female)	17:6	5:1	1.00
Age at visit (year)	46.0	44.8	0.88
Anti-GPIIb-IIIa Ab-producing B cells > 2/10 ⁵ PBMC	100%	17%	<0.001
Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa Ab > 3.3 units	48%	0%	0.058
Reticulated platelet > 1.7%	61%	33%	0.36
TPO < 200 pg/ml	96%	17%	<0.001
Leukocytopenia	4%	17%	0.88
Anemia	13%	83%	0.003
Platelet count < 30,000/ μ l	35%	0%	0.15
Bleeding tendency	52%	17%	0.18

表2. ITP診断のためのスコア制診断指針（試案）

Clinical items	Score
Anti-GPIIb-IIIa Ab-producing B cells > 2/10 ⁵ PBMC	2
Platelet-associated antiGPIIb-IIIa Ab > 3.3 units	1
Reticulated platelet > 1.7%	1
TPO < 200 pg/ml	2
Absence of anemia	2
Platelet count < 30,000/ μ l	1
Presence of bleeding tendency	1

Total	10

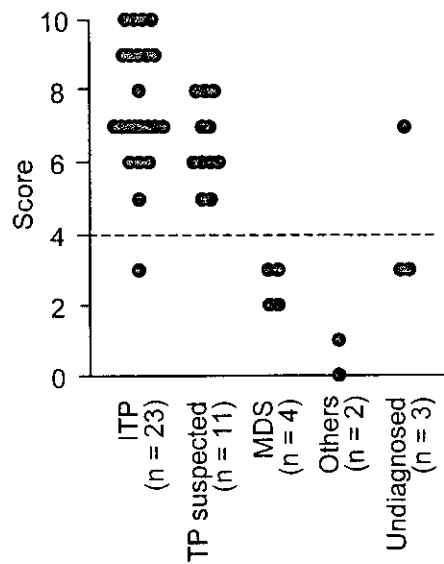


図2. 各疾患群における ITP診断のためのスコア制診断指針によるスコア

と、スコア4以上の割合はITP群96%。ITP疑い群100%、非ITP群0%、未診断群33%となり、今回のスコア制を導入した試案は感度、特異性ともに高いITPの診断指針と考えられた。

D. 考察

今回我々は血小板減少症のために来院した患者において、初診時のどの検査成績がITPの診断に有用かを調べる前向き調査を行った。その結果、初診時の抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞頻度の増加、血漿TPO正常または軽度上昇、貧血なしの3項目はITPの診断と強く相関することが示された。さらに、血小板関連抗GPIIb-IIIa抗体陽性、網状血小板の増加、血小板数 <3 万/ μ l、出血症状ありはITPの診断と関連する傾向があった。これら項目については今回有意な関連が見出されなかったが、その理由としてMDSなどITP以外の症例がわずか6例と少なかったことが考えられる。

今回ひとつの試みとしてITPと関連する臨床検査項目を組み合わせたスコア制診断指針を作成した。統計学的相関の強さからスコアに重み付けをし、個々のスコアの合計を求めた。その結果、ITPまたはITP疑い例をITP以外の疾患と層別化することが可能であった。どの項目を、どのように重み付けして用いるかなどのさらなる検討が必要であるが、このようなアプローチがITPの客観的な診断に有用である可能性が示された。

現時点では、抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞、血小板結合抗GPIIb-IIIa抗体、網状血小板、血漿TPOは臨床検査として一般診療でオーダーできない。網状血小板、血漿TPOに関しては市販のキットや標準化試薬があり、保健収載されれば一般臨床検査室での測定がすぐにも可能となる。しかし、ELISPOT法や血小板溶出抗体を用いたELISA法の確立には標準化された精製GPIIb-IIIa抗原が必要であり、大量生産が可能な

GPIIb-IIIaのリコンビナント蛋白の作成やそれを用いた測定キットの早急な開発が必要である。

E. 結論

抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb-IIIa抗体、網状血小板、血漿TPOを検出する検査法を組み合わせることで、感度、特異性の高いITPのスコア制診断指針の作成が可能であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1. 桑名正隆、池田康夫: 病因T細胞エピトープと疾患の発症機構: 特発性血小板減少性紫斑病. 臨床免疫 2001; 35: 420-426.
2. Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, Kato M, Kawai S, Kawakami Y, Ikeda Y. Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. Blood 2001; 98: 130-139.
3. 桑名正隆、河上裕、池田康夫: 免疫血液疾患研究の進歩と現状: 特発性血小板減少性紫斑病. 臨床病理 2001; 49: 992-995.

学会発表

1. Kajihara M, Kuwana M, Okazaki Y, Kato S, Kawakami Y, Ishii H, Ikeda Y: Detection of anti-platelet autoantibody producing B cells in liver cirrhosis: the role of autoimmunity in cirrhotic thrombocytopenia. 2001 Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (New Orleans). 2001. 11.

活性化プロテイン C による血管新生

分担研究者 岡 嶋 研 二

熊本大学医学部 臨床検査医学講座

研究要旨

活性化型プロテイン C (APC) の血管内皮細胞活性化に対する作用について解析した。APC はそのセリンプロテアーゼ活性に依存して、血管内皮を活性化した。この血管内皮細胞の活性化には MAPK の活性化が関与していた。In vitro において、APC は血管内皮細胞の増殖や管腔形成を促進した。また In vivo において APC は血管新生を惹起した。これらの結果から、APC は血栓症の治療薬剤として有効であるばかりでなく、血栓によって閉塞した血管の修復にも有効である可能性があると考えられた。

A. 研究目的

プロテイン C は生理的に重要な凝固制御物質であり、血管内皮上のトロンビン-トロンボモジュリン複合体によって活性化された活性化型プロテイン C (APC) が、活性化型凝固第 VIII 因子および活性化型凝固第 IX 因子を限定分解し不活化することで抗凝固作用を発揮し、APC 製剤は深部静脈血栓症の治療に用いられている。このような抗凝固作用に加えて、APC が敗血症などの病態を改善し、患者の予後を改善することが報告され、APC には、抗凝固作用に加え抗炎症作用が存在することが示唆されている。この APC の抗炎症作用発現起序として、我々はこれまでに、APC による単球の活性化抑制が重要な役割を果たしている事を報告してきた。炎症病態の形成には単球の活性化に加え、血管内皮細胞の活性化も重要な役割を果たしている。今回、我々は血管内皮細胞活性化に対する APC の効果について解析した。

B. 研究方法

実験にはヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVECs) を用いた。血管内皮細胞の活性化は血管内皮細胞上に発現する組織因子活性を指標とした。組織因子の活性は凝固時間法で測定した。NF-kappaB の核内移行は immunocytochemistry 法で評価した。JNK や p38、Mitogen activated protein kinase (MAPK) の活性化は phosphorylated-JNK、phosphorylated-p38、phosphorylated-

p42/44 および phosphorylated-MEK1/2 に対する特異抗体を用いた Western blot 法で解析した。血管内皮細胞の増殖は MTT 法で評価した。in vitro における血管内皮細胞の管腔形成促進作用の評価はマトリゲルを用いた解析をおこなった。in vivo における血管新生は mouse corneal assay で評価した。

C. 研究結果

単球ではエンドトキシン刺激による組織因子活性の上昇は、APC によって抑制されたが、血管内皮細胞ではエンドトキシン刺激による組織因子活性上昇は APC によって抑制せず、逆に APC 単独で、血管内皮細胞の組織因子活性は濃度依存的に上昇した。この組織因子活性の上昇のピークは APC の刺激後 12 時間後であった。これはエンドトキシン刺激による場合の 6 時間をピークとする上昇とは大きく異なった。APC による血管内皮細胞の活性化に、セリンプロテアーゼ活性が重要な役割を果たしているかを検討するために、活性中心を不活化した APC である不活化 APC の効果を検討したところ、不活化 APC では血管内皮細胞の組織因子活性の上昇は認められなかった。エンドトキシンなどの刺激による組織因子発現において重要な役割を果たしている NF-kappaB の核内移行や JNK や p38 の活性化は、APC 単独刺激によっては認められなかった。一方、APC 単独刺激によって MAPK の活性

化とそれに引き続く Egr-1 の発現が認められた。不活化 APC では MAPK の活性化は認められなかった。APC による組織因子活性上昇は MAPK pathway の阻害剤である PD98059 によって低下した。

MAPK の活性化は細胞の増殖に関与しているので APC によって血管内皮細胞の増殖が惹起されると考えられる。この可能性を検討するために、培養血管内皮細胞の増殖に対する APC の効果を解析した。その結果、in vitro において APC は血管内皮細胞の増殖を濃度依存的に促進した。この血管内皮細胞の増殖促進作用は不活化 APC では認められず、APC による血管内皮増殖にはプロテアーゼ活性が重要な役割を果たしていると考えられた。APC が血管内皮の増殖に加え in vitro において血管形成を惹起するかどうかを検討するために、matrigel を用いた解析をおこなった。その結果、APC によって matrigel 上に認められる血管内皮細胞の管腔形成は増強された。これら in vitro における血管内皮細胞増殖が in vivo において認められ、さらに血管新生を惹起するかどうかマウスの角膜内に APC を含むペレットを埋め込む cornea assay で解析した。その結果、APC によって角膜周囲からペレットに向かう新生血管が形成され、APC は in vivo においても、血管内皮細胞の増殖を促し、血管新生を惹起することが判明した。

D. 考 察

今回の研究で APC にはこれまで知られていなかった血管内皮細胞の活性化作用と血管内皮細胞の増殖促進作用、血管新生作用を持つことが判明した。

プロテイン C は、生理的凝固作用を有しており、その欠損症では血栓症が高頻度で発症する。現在 APC 製剤は PC 欠損症に合併する血栓症の治療に用いられているが、その抗凝固作用によって DIC の治療にも有効であると考えられる。DIC の中でも感染症に伴う DIC では、出血症状の発

現頻度は低い、臓器不全症状を発現する頻度が高く、これは、炎症性サイトカインがこの DIC の発症に関与するため、微小血栓形成に加えて、好中球の活性化や線溶活性の抑制が加わるためと考えられる。APC は単球の活性化を抑制し活性化単球からの TNF- α などの炎症性サイトカインの放出を抑制するので、感染症に伴う DIC や臓器障害の治療に有効であると考えられる。近年、リコンビナント APC 製剤が敗血症症例の予後改善に有効であるとの報告がある。

今回の解析で判明した APC の血管内皮細胞に対する効果は、単球に対する効果と大きく異なり、APC 単独で血管内皮細胞の活性化作用や血管新生作用を惹起するものであった。血管新生を惹起する物質としては VEGF などが知られているが、VEGF は血管新生を惹起すると共に血管内皮細胞の組織因子の発現も惹起する。組織因子は凝固系の活性化のみならず、細胞の発生分化にも関与している可能性が示唆されている。また、VEGF は血管内皮細胞の MAPK の活性化を惹起することも知られている。今回の解析で認められた APC の効果は、VEGF と多くの部分が共通していた。APC の血管内皮細胞活性化や血管内皮細胞増殖促進作用や血管新生作用の詳細なメカニズムは現在の所不明であるが、今後、その機構について解析を加えていく予定である。

APC は、現在、その抗凝固作用による血栓症の治療薬剤として使用されているが、血栓症の治療薬剤としてのみならず、血栓症などによって閉塞した血管の治療にも有効である可能性があり、今後この可能性についても検討を加えていく予定である。

E. 結 論

APC は血管内皮細胞を活性化し、血管内皮細胞の増殖を促進し血管新生を惹起する事が判明した。この作用は、その抗凝固作用による血栓症血用に有効であるばかりでなく、閉塞した血管の治療にも有効である可能性もある。

血液凝固第 XIII 因子欠損症 4 家系の遺伝子解析

分担研究者 岡村 孝

久留米大学 第二内科

研究要旨

血液凝固 XIII 因子欠損症は、常染色体劣性遺伝形式をとる非常に稀な疾患であり、生下時の臍帯出血や脳出血が多いのが特徴である。そのほとんどは A サブユニットの遺伝子異常であり約 40 種類の遺伝子変異が報告されている。われわれはこれまで 4 家系の XIII 因子欠損症の遺伝子解析を行い、新たな変異を同定したので報告する。

A. 研究目的

血液凝固第 XIII 因子 (XIII) は、血液凝固の最終段階でフィブリンをトランスグルタミナーゼ作用により架橋結合し、強固な血栓を形成するのに必要な酵素である。XIII は、肝臓で産生され、キャリアーとして働く B サブユニットと、単球や巨核球から産生され酵素活性を有する A サブユニットが 2 分子ずつ結合した 4 量体として血中に存在し、トロンビンにより A サブユニットから活性化ペプチドが切断され活性化 XIII となる。この欠損症は、世界で約 200 家系以上報告されている。そのほとんどは A サブユニットの欠損 (タイプ II) であり、B サブユニット欠損 (タイプ I) は 5 家系のみである。XIII 欠損に伴う症状は、生下時の臍帯出血や頭蓋内出血が比較的特異的である。われわれは、4 家系の XIII 欠損症を経験し、その臨床病態と遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

4 例の XIII 欠損患者は、すべて XIII 活性は感度以下であり、XIIIA 抗原量は検出感度以下で、XIIIB 抗原量は 30~70% 存在するタイプ II であった。そこで XIIIA 遺伝子の解析を施行した。XIIIA 遺伝子は、6p24.3-25.3 に局在し、約 142kb の長さであり、15 のエクソンからなっている。患者およびその家族の末梢血白血球から DNA を採取し、それぞれのエクソンを増幅するため両側のイントロンにプライマーを作成し、各エクソンのダイレクトシーケンスにより塩基配列決定を

した。

(倫理面への配慮)

患者およびその家族に説明を行い、本研究への同意を得た。

C. 研究結果

症例 1. 27 歳 男性 両親は、いとこ婚。エクソン 3 の 5' 末端における AG2 塩基欠失のホモ接合体であり、フレームシフトをきたしてすぐ下流に停止コドンが出現し、成熟した XIIIA の生成ができないことが判明した。

症例 2. 12 歳 男性 両親が血族結婚。260Arg->His のホモ接合体。三次構造の変化により成熟蛋白の安定性が低下し、分解されるものと考えられた。

症例 3. 0 歳 男児 両親の血族結婚なし。父親由来の遺伝子ではエクソン 5 の AAAGAAAG の繰り返し配列で AAAG の 4 塩基欠失がみられ、frameshift をきたし、stop codon がすぐ下流に出現した。母由来の遺伝子は、260Arg->His がみられ、ダブルヘテロであった。

症例 4. 18 歳 男性。血族結婚はないが、両親とも同じ離島出身である。167Tyr->Stop の nonsense mutation のホモ接合体であった。これは、制限酵素 AvrII による PCR RFLP でもホモ接合体を支持する結果が得られた。

4 家系のまとめを表 1 に示す。

表1 血液凝固 XIII 因子欠損症遺伝子解析のまとめ

症例	年齢	性	血族結婚	遺伝子変異		症 状
1	27	男	+	43Glu 2 base del	homo	臍帯出血・脳出血
2	12	男	+	260Arg->HIs	homo	臍帯出血・抜歯後出血
3	0	男	-	199Lys 4bases del + 260Arg->His	Double hetero	臍帯出血
4	18	男	-	167Tyr-> stop	homo	頭蓋内出血

D. 考 察

XIII 因子欠損症タイプ II の 4 家系の遺伝子解析を行った。症例 1 は、イントロン 2 とエクソン 3 の間の AGAG 配列の中の AG2 塩基の欠失により frameshift をきたしたもので、1992 年に世界ではじめて報告した XIII A 欠損症である (J Clin Invest 90: 315-319, 1992)。症例 2 で見出された 260Arg->His は、Kangsadalampai らが 1998 年 Br J Haemat に報告した変異と同じであるが、日本での報告ははじめてである。また、症例 3 の母由来のアリルにも同じ変異がみられたことから比較的多い変異の可能性が示唆された。この変異は、構造解析から三次構造変化により蛋白の安定性が低下し、細胞内で処理分解されることが予想された。症例 3 は、複合ヘテロの症例であり、父親由来の変異は、エクソン 4 における AAAGAAAG 繰り返し配列の中の AAAG4 塩基が欠失したため frameshift をきたしたものである。症例 1 も同じであるが、塩基の繰り返し配列部の欠失は DNA の修復時にきたしやすいものと推測される。この欠失は、初めての報告部位である。症例 4 は、167Tyr->Stop の nonsense 変異であった。この変異も今までに報告をみないものである。

以上 XIII A サブユニット欠損症の遺伝子変異部位はある一定の部位に集中することなく、他の遺伝子異常疾患と同じように症例ごとに異なり多岐にわたることが確認された。今回、新たに 2 箇所の変異部位を同定した。

XIII 欠損症は、臍帯出血をきたし分娩時に診断可能性である。XIII A 蛋白は造血系細胞で発現されていることから、自己臍帯血幹細胞への遺伝子導入 (遺伝子治療) が可能であり、将来の治療

開発が期待される。

E. 結 論

XIII 因子 A サブユニット欠損症 4 家系の遺伝子解析結果を報告した。Small deletion が 2 例、point mutation が 2 例であった。このうち、新たな遺伝子変異を 2 箇所同定した。遺伝子異常解析の積み重ねにより、XIII 因子の構造ならびに機能の解明が進み、先天性欠損症患者の治療に貢献できることが期待される。

F. 研究発表

G. 論文発表

1. Kunishima S, Kojima T, Matsushita T, Tanaka T, Tsurusawa M, Furukawa Y, Nakamura Y, Okamura T, Amemiya N, Nakayama T, Kamiya T, Saito H. Mutations in the *NMMHC-A* gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly/Sebastian syndrome). Blood 97: 1147-1149, 2001
2. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases *DNMT1, 3A, and 3B* in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. Blood 97: 1172-1179, 2001
3. Okamura T, Kinukawa N, Niho Y, Mizoguchi H. Primary chronic myelofibrosis: Clinical and prognostic evaluation