

- ・ 三室 淳:VI.凝固・線溶系 血液病の遺伝子治療 Annual Review 血液 2002.207-214.2002. 1月
- ・ 諏合輝子:最近明らかにされたフィブリノゲンの立体構造 日本血栓止血学会誌 第 13 卷 第 3 号 2002.6月

2)学会発表

- ・ 窓岩清治、山内忠彦、新井盛夫、小林英司、三室 淳、諏合輝子、坂田洋一:第 VIII 因子欠損マウスを用いた新生児免疫寛容誘導の試み 第 25 回日本血栓止血学会学術集会 2002.11
- ・ 内藤雅夫、三室 淳、遠藤仁司、窓岩清治、尾形享一、菊池次郎、諏合輝子、坂田洋一:先天性プロテインCの欠乏症の分子機構:ゴルジネットワークから分泌顆粒への輸送障害 (Defect of sorting to secretory vesicles in the Golgi is responsible for type I protein C deficiency)第 64 回日本血液学会総会 2002.9
- ・ 菊池次郎、三室 淳、尾形享一、上田泰治、久米晃啓、窓岩清治、諏合輝子、内藤雅夫、長谷川 護、水上浩明、花園 豊、小澤敬也、坂田洋一:SIV ベクターを用いた CD34 陽性細胞への凝固第 VIII 因子遺伝子導入による血友病 A の遺伝子治療法の検討 (Transplantation of Human Factor VIII producing Cord Blood derived CD34+cells into NOD/SCIDmice)第 64 回日本血液学会総

会 2002.9

- ・ 尾形享一、三室 淳、菊池次郎、上田泰治、水上浩明、内藤雅夫、窓岩清治、諏合輝子、長谷川 護、花園豊、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一:血友病 A 遺伝子治療の基礎検討 (Haemophilia A Gene Therapy: Expression of Factor VIII Transgene in Adipocytes)第 64 回日本血液学会総会 2002.9
- ・ 窓岩清治、坂田洋一:「癌の凝固線溶系への挑戦」第 3 回日本検査血液学会学術集会シンポジウム 2002.7
- ・ Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Kume A, Hanazono Y, Mizukami H, Ogata K, Madoiwa S, Sugo T, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y:Sustained Production of Human Factor VIII from Human Cord Blood-Derived CD34⁺ Cells Transduced by Simian Immunodeficiency Virus agmTYO1-Based Vectors Carrying the Human Factor VIII Transgene in NOD/SCID Mice. American Society of Hematology 44th Annual Meeting and Exposition 2002.12.(p-200)

H.知的財産権の出願・登録:特になし。

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

拘束ストレス負荷マウスにおける PAI-1 の組織特異的発現 —加齢の影響—

分担研究者名 小嶋 哲人(名古屋大学医学部教授)

研究要旨

近年我が国では、ストレスにより誘発される血栓性疾患が増加の一途をたどっており、そのメカニズムの解明は急務である。我々は拘束ストレス負荷後のマウス組織における微小血栓形成と線溶阻害因子 PAI-1 の発現との関連について検討した。拘束ストレス負荷2時間後に血中の PAI-1 抗原値は有意に上昇し、組織における PAI-1 mRNA 発現も増加した。この変化はストレス負荷20時間後にはさらに著明となり、特に脂肪組織での PAI-1 mRNA 増加が顕著であった。ストレスにより誘導される PAI-1 発現は老齢マウスでより顕著であり、組織での微小血栓形成に反映されていた。

A. 研究目的

近年、種々の肉体的・精神的ストレスが誘因となって起こる血栓性疾患(脳梗塞、心筋梗塞など)は増加の一途をたどっており、特に高齢者における罹患率の上昇は大きな問題である。そのメカニズムを追究することは重要な課題であるが、その病態には、血管弾性や血圧の変動、ホルモンバランスの変化、自律神経系のレスポンスなど様々な要素がからんでおり、いまだ明解な結論は得られていない。我々はストレスによる血液凝固線溶能の変化と血栓傾向との関連という点に着目し、ストレス負荷個体における血栓形成のメカニズムを明らかにすることを目的として、拘束ストレス負荷後のマウス組織における微小血栓形成と線溶阻害因子である PAI-1 の発現変化について解析した。また、若年マウスと老齢マウスを用いて同様の解析を行い、ストレス誘発性の血栓傾向に及

ぼす加齢の影響についても検討した。

B. 研究方法

8週齢および12ヶ月齢、24ヶ月齢のオスの C57BL/6J マウスを50 ml 用チューブ内に一定時間閉じ込めて拘束ストレスを負荷した後、血漿と主要臓器を採取した。肝臓、腎臓、副腎、心臓、肺、脳、大動脈、脂肪組織の各臓器より組織 RNA を抽出して competitive RT-PCR 法により PAI-1 mRNA を定量するとともに、血漿中の活性型 PAI-1 抗原量を t-PA binding assay 法にて測定した。また in situ hybridization 法を用いて、組織における PAI-1 mRNA 発現の局在についても検討した。最後に HE および PAS 染色による組織学的な検討により、20時間の拘束ストレス負荷後の腎臓および脂肪組織における微小血栓沈着の有無について、若年・老齢マウス間で半定量的な比較検討を行った。

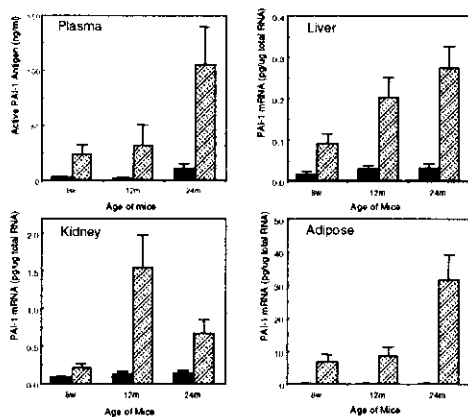
(倫理面への配慮)

なお、動物実験に際しては名古屋大学医学部動物実験指針に基づき、動物愛護の精神のもとに動物に与える苦痛が最小限となるよう留意した。

C. 研究結果

まず8週齢の若年マウスでは、拘束ストレス負荷2時間後に早くも血中 PAI-1 抗原量(3倍)および腎臓での PAI-1 mRNA 量(10倍)の顕著な増加を認めた。ストレス負荷20時間後には、血中 PAI-1 抗原量は負荷前の約7倍と著明に上昇し、組織での PAI-1 mRNA 発現量も肝臓(4倍)、腎(2.5倍)、副腎(12倍)、脂肪組織(20倍)において増加した。ストレス負荷後のこのような PAI-1 発現の増加は、12ヶ月齢および24ヶ月齢の老齢マウスではより顕著であった(図1)。

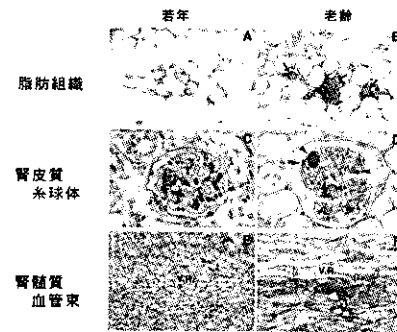
拘束ストレスによる PAI-1 の発現増加 (若年および老齢マウスでの比較)



in situ hybridization 法による局在解析では、腎尿細管上皮細胞、肝実質細胞、副腎髄質内のクロム親和性細胞、血管平滑筋細胞、脂肪細胞、傍大動脈交感神経節細胞などにおいて PAI-1 mRNA 発現の著しい増強を認めたが、いずれの臓

器においても血管内皮細胞においては PAI-1 mRNA の明らかな発現増強を認めなかった。また組織学的な検討により、20時間の拘束ストレスを負荷した老齢マウスでは、腎系球体内や脂肪組織における微小血管内に血栓の沈着を認めたが、若年マウスではいずれの組織においても微小血栓沈着は認められなかった(図2)。

20 時間拘束ストレス負荷後の組織内微小血栓形成



D. 考察

拘束ストレス負荷によって in vivo での PAI-1 発現は組織特異的、加齢依存的に著明に増大したが、特に脂肪組織における発現増加が顕著であり、この変化が全身的な血栓傾向に寄与していると推測された。老齢個体においては、血中・組織における PAI-1 発現増加が組織微小血管における血栓形成のひとつの原因となっていると考えられた。今後、その分子生物学的メカニズムについての詳細な検討や、ストレス誘発性血栓症の予防・治療への応用が期待される。

E. 結論

マウスに拘束ストレス負荷を与えることによって、血中および主要臓器における PAI-1 の発現は有意に増加し、この変化は老齢個体でより顕著であった。ストレス誘発性の血栓傾向の背景には組織特異

的な PAI-1 の発現増加があると考えられ、この発現制御が血栓症予防のカギとなるであろうと思われた。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等も記載）

1. 論文発表

- 1) T. Murate, M. Suzuki, M. Hattori, A. Takagi, T. Kojima, T. Tanizawa, H. Asano, T. Hotta, H. Saito, S. Yoshida, and K. Tamiya-Koizumi: Up-regulation of acid sphingomyelinase during retinoic acid-induced myeloid differentiation of NB4, a human acute promyelocytic leukemia cell line. **J. Biol. Chem.** 277 (12): 9936-9943, 2002.
- 2) M. Yanada, T. Kojima, K. Ishiguro, Y. Nakayama, K. Yamamoto, T. Matsushita, K. Kadomatsu, M. Nishimura, T. Muramatsu, and H. Saito: The impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: LPS and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin deficient mice. **Blood** 99 (7): 2455-2458, 2002.
- 3) T. Nakayama, T. Matsushita, Z. Dong, J. E. Sadler, S. Jorieux, C. Mazurier, D. Meyer, T. Kojima, and H. Saito: Identification of the regulatory elements of human von Willebrand factor for binding to platelet GPIb. Importance of structural integrity of the regions flanked by Cys509-Cys695 disulfide bond. **J. Biol. Chem.** 277 (24): 22063-22072, 2002.
- 4) K. Ishiguro, T. Muramatsu, and T. Kojima: Syndecan-4 (Ryudocan) as a Defense Molecule in Endotoxin Shock. **Connective Tissue** 34: 277-281, 2002.
- 5) T. Kojima: Targeted gene disruption of natural anticoagulant proteins in mice. **Int. J. Hematol.** 76 Suppl 2:36-39, 2002.
- 6) K. Yamamoto, T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskutoff, and H. Saito: Aging and obesity augment the stress-induced expression of tissue factor gene in the mouse. **Blood** 100 (12): 4011-4018, 2002.
- 7) K. Yamamoto, T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskutoff, and H. Saito: Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis: increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and LPS signaling with aging. **Am.J. Pathol.** 161 (5): 1805-1814, 2002.
- 8) S. Kunishima, T. Matsushita, T. Kojima, M. Sako, F. Kimura, E.-K. Jo, C. Inoue, T. Kamiya and H. Saito: Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A (NMMHCA) in *MYH9* disorders: association of subcellular localization with *MYH9* mutations.

Lab. Invest. 83 (1): 115-122, 2003

2. 学会発表

- 1) T. Kojima: Antithrombin Deficient Mice. 3rd International Symposium on Serpin Biology, Structure and Function, Chicago, U.S.A. 平成14年 6月
 - 2) T. Kojima: Education Program 3: Update on Hypercoagulability. Targeted gene disruption of natural anticoagulant proteins in mice. The 29th World Congress of the International Society of Hematology, Seoul, Korea 平成14年8月
 - 3) T. Kojima, M. Yanada, K. Ishiguro, A. Takagi, T. Murate, K. Yamamoto, T. Matsushita, H. Saito: Free Paper (Oral): Antithrombin Deficient in Mice. The 29th World Congress of the International Society of Hematology, Seoul, Korea 平成14年8月
 - 4) 国島伸治、井上知加子、神谷 忠、小澤和郎、小嶋哲人、松下 正、迫正廣、木村文彦、齋藤英彦 白血球封入体を伴う巨大血小板減少症好中球におけるA型細胞性ミオシン重鎖の免疫蛍光染色解析第63回日本血液学会、横浜、平成14年 9月
 - 5) 山本晃士、下川高賢、竹下享典、柳田正光、松下正、小嶋哲人、齋藤英彦 拘束ストレス負荷におけるTissue factorの組織特異的発現 —加齢の影響— 第63回日本血液学会、横浜、平成14年 9月
 - 6) 足立達哉、松下 正、足立弘明、渡邊英孝、祖父江 元、下山芳江、山本晃士、小嶋哲人、齋藤英彦 血友病A患者に発症した多彩な症状を呈する結節性動脈周囲炎 第44回日本臨床血液学会、横浜、平成14年 9月
 - 7) 岡田浩美、中出祐介、高木 明、村手 隆、松下 正、田中美保子、中宏之、杉本充彦、吉岡 章、齋藤英彦、小嶋哲人 プロテインS欠損症一家系の遺伝子解析 第25回日本血栓止血学会学術集会、神戸、平成14年11月
 - 8) 塚原明子、山田貴之、中出祐介、高木 明、村手 隆、足立達哉、柳田正光、山本晃士、松下 正、齋藤英彦、小嶋哲人 複合ヘテロ遺伝子異常による血液凝固第FXI因子欠損症の一例 第25回日本血栓止血学会学術集会、神戸、平成14年11月
- H. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)
1. 特許取得 なし
 2. 実案新案登録 なし
 3. その他 なし
- I. 研究協力者
- 高木明、村手隆
:名古屋大学医学部保健学科
柳田正光、山本晃士、松下 正
:名古屋大学大学院分子細胞内科学
齋藤英彦
:国立名古屋病院

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

TTP の病態解明

分担研究者 藤村吉博

A. 研究目的

von Willebrand 因子特異的切断酵素 (VWF-CP)/ADAMTS13は、メタロプロテアーゼドメインをはじめとしたマルチドメイン構造をとっていることが明らかにされたが、それぞれのドメインの機能は全く判明していない。また、後天性 TTP患者の多くではVWF-CPに対する IgG型インヒビターが出現し、同酵素活性が著減することが知られている。このインヒビター活性の測定法として、従来はBethesda法に準拠した酵素活性阻害法が用いられてきた。今回、Hela細胞にて遺伝子発現したVWF-CPを用いて、western blot(WB)法にて、このインヒビターの検出を試みた。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

VWF-CP の wild type(WT)とC末端から順にドメインを欠損した変異体を 13 種類作成し、Hela 細胞にて発現させた。この変異体には、すべて FLAG tag を付加し、マーカーとした。この発現蛋白を用いて、後天性 TTP 患者のインヒビターとの反応性を WB にて確認した。この患者は 15 才男性で血漿交換やステロイド治療で再発を繰り返し、シクロスポリン(CsA)投与で寛解となった。発症当初 VWF-CP 活性が 3%未満で、CsA 投与で寛解に至った約 1年後まで 3%未満であったが、その後上

昇し、76%と正常値まで回復した。しかし、最近 CsA の減量とともに低下傾向である。また、インヒビター活性は当初 64 Bethesda 単位/ml 認められたが、治療により徐々に低下し、酵素活性の上昇が認められるところには1BU/ml 未満となり、持続している。

倫理面の配慮としては、患者およびその家族からこれらの検査について、主治医から同意を得ているので、問題ないと考えている。

C. 研究結果

WT を含め 13 種類の遺伝子発現体において、Cystein richドメインと Spacerドメインとの境界付近の 3 種類を除く 10 種類が上清中に分泌された。この上清中の VWF-CP 活性を測定すると、SpacerドメインよりC末端が欠損してもWTと同様の活性は認めるが、SpacerおよびCys-richドメインを欠損すると酵素活性を認めなくなった。次に、後天性 TTP 患者のインヒビターとの反応性を上記の発現蛋白で調べると、SpacerドメインよりC末端が欠損しても期待されるバンドは認めるが、Spacer および Cys-rich ドメインを欠損するとバンドは認めなくなった。よって、このインヒビターの認識部位は Spacer および Cys-richドメインに存在することが確認できた。また、経

時的に WT と患者インヒビターとの反応性を WB で調べてみると、当初強い反応性が認められたが、徐々に低下した。しかし、インヒビター力価が 1BU/ml 以下となってもはっきりとしたバンドが認められた。

D. 考察

Spacer および Cys-rich ドメインを欠損すると VWF-CP 活性が消失すること、後天性 TTP 患者に存在するインヒビターの認識部位が Spacer および Cys-rich ドメインであることより、この部位が酵素活性の発現に重要であることが確認できた。しかし、この酵素の活性中心としてメタロプロテアーゼドメインが存在する。よって、これらのドメインの働きの役割分担について今後検討を行いたい。

また、VWF-CP のインヒビター活性の測定法として、従来は Bethesda 法に準拠した酵素活性阻害法が用いられてきたが、発現した VWF-CP を使った WB では、従来法では検出ができない低力価のインヒビターも検出可能であることが示された。また、この症例に関しては臨床症状はサイクロスポリンでうまくコントロールできているようであるが、クローン化したインヒビター産生機能は依然として持続しており、環境条件を整えば、いつでも症状が再燃する状態にあると推定される。かかる TTP が従来 of 難治性あるいは慢性再発性 TTP の概念にあてはまるものと考えられる。

E. 結論

Hela 細胞で発現した VWF-CP/ADAMTS13

を用い、WB 法で TTP 患者の IgG 型インヒビターを検出できる事を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugimoto M, Matsui H, Mizuno T, Tsuji S, Miyata S, Matsumoto M, Matsuda M, Fujimura Y, Yoshioka A. Mural thrombus generation in type 2A and 2B von Willebrand disease under high shear conditions. *Blood* 101, 915-920, 2003.
2. Ashida A, Nakamura H, Yoden A, Tamai H, Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y. A successful treatment of a young infant who developed high-titer inhibitors against VWF-cleaving protease (ADAMTS13); an important discrimination from Upshaw-Schulman syndrome. *American Journal of Hematology* 71: 318-322, 2002.
3. Yasuzawa S, Inoue M, Yoshida Y, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Yoshioka A. Intensive plasma IgG removal therapy for severe thrombotic thrombocytopenic purpura. *International Journal of Hematology* 76, 474-476, 2002.
4. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M,

- Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y, Miyata T, Fujimura Y. Mutations and common polymorphisms in *ADAMTS13* gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proceedings of National Academy Sciences USA* 99: 11902-11907, 2002.
5. Matsuda J, Sanaka T, Gohchi K, Matsui K, Uchida S, Matsumoto M, Fujimura Y. Occurrence of thrombotic thrombocytopenic purpura in a systemic lupus erythematosus patient with antiphospholipid antibodies in association with a decreased activity of von Willebrand factor-cleaving protease. *Lupus* 11: 463-464, 2002.
 6. Matsui T, Hamako J, Matsushita T, Nakayama T, Fujimura Y, Titani K. Binding site on human von Willebrand factor of bitiscetin, a snake venom-derived platelet aggregation inducer. *Biochemistry USA* 41: 7939-7946, 2002.
 7. Park Y-D, Yoshioka A, Kawa K, Ishizashi H, Yagi H, Yamamoto Y, Matsumoto M, Fujimura Y. Impaired activity of plasma von Willebrand factor-cleaving protease may predict the occurrence of hepatic veno-occlusive disease after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 29: 789-794, 2002.
 8. Mori Y, Wada H, Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. *Transfusion* 42: 572-580, 2002.
 9. Hayashi T, Yagi H, Suzuki H, Nonaka Y, Nomura T, Sakurai Y, Shibata M, Matsumoto M, Yamamoto Y, Fujimura Y. Low-dosage intravenous immunoglobulin in the management of a patient with acquired von Willebrand syndrome associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 32: 33-39, 2002.
 10. Orimo S, Ozawa E, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Simple plasma exchange reduced autoantibody to von Willebrand factor-cleaving protease in a Japanese man with ticlopidine-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Journal of Internal Medicine* 251: 280-281, 2002.
 11. Fujimura Y, Matsumoto M, Yoshioka A, Matsui T, Titani K. von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome. *International Journal of Hematology* 75: 25-34, 2002.
 12. 山崎哲、瀧正志、安室洋子、高

山成伸、三宅良彦、藤村吉博、鈴木康夫. 膠原病における von Willebrand 因子特異的切断酵素と抗リン脂質との関連. 臨床病理 50 : 301-307, 2002.

2. 学会発表

1. Yagi H, Matsumoto M, Ishizashi H, Soejima K, Nakagaki T, Kokame K, Kimura H, and Fujimura Y. Recombinant ADAMTS13 rapidly and preferentially cleaves unusually-large von Willebrand factor multimers in the plasmas with Upshaw-Schulman syndrome under high shear stress. 44th Annual Meeting of the American Society of Hematology (於 Philadelphia, 平成 14 年 12 月 9 日)
2. 萱島道徳、野口幸、松本雅則、八木秀男、石指宏通、藤村吉博、池田直也、小山文一、吉田淳、森下亨. 血小板減少と著しい全身症状の悪化を呈した2症例に対して実施した血漿交換療法の劇的効果. 第 46 回 日本輸血学会近畿支部総会 (於 郡山、平成 14 年 11 月 30 日)
3. 藤村吉博. SCT 合併症としての TMA と VOD:ADAMTS13 との関係. 第 25 回 日本造血細胞移植学会総会 ランチョンセミナー (於 大阪、平成 14 年 10 月 25 日)
4. 小亀浩市、松本雅則、副島見事、八木秀男、石指宏通、船戸正久、玉井晋、今野武津子、神出計、河野雄平、藤村吉博、宮田敏行. von Willebrand 因子切断酵素をコードするヒト ADAMTS13 遺伝子の変異と多型. 第 75 回 日本生化学会大会 (於 京都、平成 14 年 10 月 15 日)
5. 高橋幸博、川口千晴、塙坂八重、松本雅則、藤村吉博、吉岡章. 著明な vWF-CPase 活性の低下が見られ、生後早期に急死した左心低形成症候群の 1 例. 第 64 回 日本血液学会総会、第 44 回 日本臨床血液学会総会 (合同) (於 横浜、平成 14 年 9 月 14 日)
6. 長谷川大一郎、松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博. Upshaw-Schulman 症候群の同胞例の解析. 第 64 回 日本血液学会総会、第 44 回 日本臨床血液学会総会 (合同) (於 横浜、平成 14 年 9 月 14 日)
7. 石丸裕康、中村陽子、東光久、八田和夫、郡義明、林孝昌、松本雅則、八木秀男、石指宏通、藤村吉博. バイアグラ服用後 VWF-cleaving protease に対するインヒビターが出現し、TTP 様の症状が見られた 1 例. 第 64 回 日本血液学会総会、第 44 回 日本臨床血液学会総会 (合同) (於 横浜、平成 14 年 9 月 14 日)
8. 湊上健吾、田口潤、陣内逸郎、朝長万左男、早田央、松本雅則、石指宏通、八木秀男、藤村吉博. 定型的精神神経症状を欠いた血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の 3 例. 第 64 回 日本血液学会総会、第 44 回 日本臨床血液学会総会 (合同) (於 横浜、平成 14 年 9 月 14 日)
9. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、森美

貴、和田英夫、松井太衛、千谷晃一、木村弘、藤村吉博。日本人における後天性 TTP117 例の解析。第 64 回日本血液学会総会、第 44 回日本臨床血液学会総会(合同)(於横浜、平成 14 年 9 月 13 日)

10. 小亀浩市、松本雅則、副島見事、八木秀男、石指宏通、船戸正久、玉井晋、今野武津子、神出計、河野雄平、宮田敏行、藤村吉博。先天性 TTP 患者家系に見出された VWF 切断酵素遺伝子の変異と日本人における多型。第 64 回日本血液学会総会、第 44 回日本臨床血液学会総会(合同)(於横浜、平成 14 年 9 月 12 日)

11. 石井禎暢、植村正人、藤本正男、小嶋秀之、吉川正英、安辰一、櫻井伸也、松村吉庸、奥田浩史、高谷章、福井博、田中一郎、嶋緑倫、吉岡章、藤村吉博。血友病に合併した C 型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の効果とその長期予後。第 3 回日本肝臓病学会(於 大阪、平成 14 年 6 月 14 日)

12. 高橋幸博、川口千晴、塙坂八重、濱田匡章、藤村吉博、吉岡章。Neonatal thrombotic diathesis from VWF-CPase and unusually large VWF multimers。第 105 回日本小児科学会学術集会(於名古屋、平成 14 年 4 月 19 日)

H. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

救急領域の DIC 診断基準の作成について

分担研究者名 和田英夫

研究要旨

日本救急委員会と日本血栓止血学会の DIC 合同委員会により、救急領域の DIC 診断基準案が作成された。救急領域 DIC 診断基準案は SIRS3 項目、血小板数、FDP、PT 比、フィブリノゲン値を用いて診断する、厚生省診断基準を修正したものである。両基準を用いて多施設におけるレトロスペクティブスタディを行った。この結果、救急領域 DIC 診断基準案は感度が良く、特異性の検証が今後の課題であることが示された。また、厚生省基準では診断し得ないか診断が遅れる救急領域の DIC が存在することが示唆された。

A. 研究目的

造血器腫瘍性疾患を基礎疾患とする DIC の発症率並びに死亡率は、最近著しい減少を見ている。この原因としては ATRA に代表される治療法の進歩とともに、厚生省 DIC 診断基準改訂版の普及により、DIC の早期診断・治療が進んだことが大きいと考えられる。一方、救急領域においては現在においても DIC の発症頻度および死亡率のいずれも高い。この原因として救急領域で DIC を発症する基礎疾患が造血器腫瘍性疾患と異なることに加えて、厚生省基準では救急領域の DIC 診断に際して感度が低い可能性が示唆される。また、救急領域においては SIRS/敗血症等の新しい疾患概念が提唱され、この病態が DIC と密接に関連していることが知られるようになった。重症敗血症を対象とした活性化プロテイン C のランダム化比較試験において、同薬剤の使

用が対象疾患の転帰を改善することが証明され、subgroup 解析において対象症例の 94% が DIC 様病態を合併している事実が明らかになった。これらの結果は、救急領域の DIC においても早期発見により適切な薬剤を使用すると、その転帰の改善が得られる可能性を示唆している。このような背景を考慮し、新しく救急領域の DIC 診断基準案を作成して、予後ならびに厚生省診断基準との比較からその有用性を検討した。

B. 研究方法

救急領域の DIC 診断基準案は、日本救急委員会(射場敏明; 順天堂大学医学部附属浦安病院外科、江口 豊; 滋賀医科大学医学部附属病院集中治療部、大友康裕; 国立病院災害医療センター救命救急センター、岡本好司; 産業医科大学医学部附属病院第一外科、丸藤 哲;

北海道大学医学部附属病院救急部、小関一英；川口医療センター救命救急センター、真弓俊彦；名古屋大学医学部附属病院救急部・集中治療部、村田厚夫；杏林大学医学部附属病院救命救急センター)と日本血栓止血学会(朝倉英策；金沢大学医学部附属病院高密度無菌治療部、川杉和夫；帝京大学医学部附属病院内科、古賀 震；天草中央病院血液免疫内科、和田英夫；三重大学医学部臨床検査医学)のDIC 専門家12人が集まったDIC 合同委員会(研究協力者)により、以下のように作成された。

i)救急領域のDIC 診断基準案の作成

過去のDIC 関連論文約10,000編を読破し、論文ならびに委員施設のデータを参考にして、後ろ向きに選択項目、項目の区切り値、項目の重み付けを行った。なお、1点はDIC 発症を予測することが可能な数値、3点はその値により臓器不全の発症あるいは死亡率に有意差の見られる数値とした。何点以上をDIC にするかでは、厚生省基準7点あるいは6点+補助診断項目の2項目以上陽性をDIC 確診として、一施設データで使用可能な378症例1050検体を用いて判別特性を検討し、委員の経験を加味して検討した。

ii)合同委員会施設において多施設後ろ向き調査検討を行った。

対象：合同委員会委員施設に入院した症例で、2002年6月1日から9月30日までの間に血小板が15万未満になった症例を対象とし、化学療法施行中および肝硬変症例は除外した。

収集項目：年齢、性別、基礎疾患、転帰、

厚生省 DIC スコアおよびスコア算定に必要な凝固線溶系指標(D-ダイマー含む)、SIRS 診断項目、SOFA 診断項目、出血症状の有無。

項目収集日：血小板が15万未満となった日およびその前日のデータ。厚生省基準7点を満たした症例は、15万未満となった日から厚生省基準で7点となった日あるいは病態が改善した日までの連日。

(倫理面への配慮)

レトロスペクティブスタディでは、患者の名前はID 表示して匿名化した。また、検討項目は日常臨床検査項目であることから、匿名化することにより特に同意は必要ないと考えた。

C. 研究結果

i)救急領域の診断基準案(以下、新基準案と略す)

検討項目として出血症状、臓器症状は削除され、SIRS3項目、血小板数、PT、フィブリノゲン値、FDP(D-dimer で代用可)が採用され、カットオフ値に対しそれぞれ1点あるいは3点が与えられた(表1)。

表1 救急領域のDIC 診断基準：スコア表(日本救急委員会と日本血栓止血学会のDIC 合同委員会による)

スコア	SIRS	血小板数 or 血小板減少率	FDP or D-dimer	PT比	fibrinogen
1	3項目以上陽性	12万/mm ³ 未満 あるいは 15万/mm ³ 未満で24時間以内に30%以上減少	10 µg/ml 以上 (D-dimerは換算表参照)	PT比 1.2以上	350mg/dl 未満
2					
3		8万/mm ³ 未満 あるいは15万/mm ³ 未満で24時間以内に50%以上減少	25 µg/ml 以上 (D-dimerは換算表参照)		

4項目以上満たすか5点以上をDICとする。

一施設の判別特性成績から、DIC スコア 5 点あるいは 4 項目が 1 点以上(陽性)を DIC とした。

ii)多施設におけるレトロスペクティブスタ

ディ
収集された 682 検体中、参入症例は 156 症例 610 検体で、施設ごとの基礎疾患を表 2 に示す。

表 2 合同委員会によるレトロスペクティブスタディの内訳

	合計	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
年齢	57	51	57	71	58	50	46	62	67	69	52	72
例数	156	20	25	20	8	28	10	7	8	6	15	9
男性	105	13	13	16	6	20	8	7	6	2	7	5
女性	53	7	12	4	2	8	2	0	2	4	8	4
感染症	62	6	4	17	2	5	4	7	3	4	2	8
外傷	30	4	1		4	17			1		3	
術後	10	1	6				1				2	
動脈瘤	9	3	2				1		1		2	
心疾患	6		4						1		1	
CPA	5	2				1					2	
その他	34	4	8	3	2	5	4	0	2	2	3	1

DIC 診断率は、新基準案 (101/156, 64.7%) が厚生省基準 (66/156, 42.3%) に比べて有意に高値であった ($p < 0.01$) (図 1)。

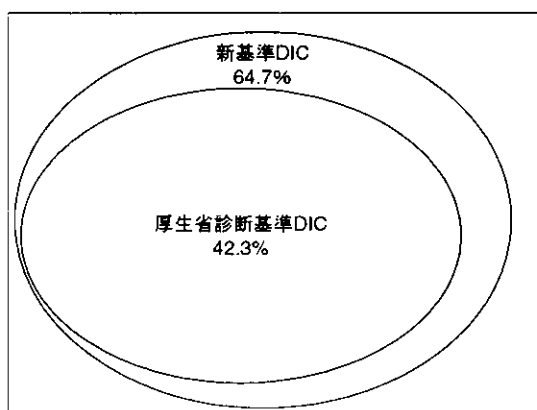


図 1 両基準の DIC 診断率

厚生省基準を満たした 66 例中 19 例 (28.8%) は新基準案による診断が先行し DIC の早期診断が可能であった。この 19 例中 14 例 (73.7%) は感染を合併していた。46 例 (69.7%) は両基準同日診断であっ

たが、その内 27 例は初回参入データで両基準を満たして DIC と診断された症例であった。厚生省基準を満たした 66 例中 28 例 (42.4%) が死亡し、新基準案を満たした 101 例中 36 例 (35.6%) が死亡した。また、前者で DIC と診断されなかった 90 例中 14 例 (15.5%) が死亡し、後者で DIC と診断されなかった 55 例中 6 例 (10.9%) が死亡した。なお、新基準案で DIC と診断されたが厚生省基準では DIC と診断されなかった 35 例中 8 例 (22.9%) が死亡した。新 DIC スコアと SOFA の相関を検討すると有意 ($r = 0.525$, $p < 0.0001$) の相関を見た。フィブリノゲンおよび PT を除いた新基準案を使用しても上記の結果と大きくは乖離しなかった。

D. 考察

救急領域の DIC 診断基準案作成のため約 1 万篇の論文を読破したが、目的とする論文は少なかった。出血症状や臓器症状の臨床症状に関しては、客観的な点数化が困難なことや止血系検査に反映されることから、十分な議論の上本診断基準案からは省略された。血小板数は小関ならびに丸藤の成績から、12 万/ μ l 以下が 1 点、8 万/ μ l 以下を 3 点とした。PT 比は和田の成績から 1.2 以上を 1 点とした。フィブリノゲンは激論となったが、大友らの成績から 350mg/dl を 1 点に採用したが、炎症反応がない症例では全て 1 点になってしまうため、プロスペクティブスタディ後削除される可能性がある。FDP の 1 点は厚生省基準と同様に 10 μ g/ml とされたが、3 点は FDP25 μ g/ml とした。この理由とし

ては、救急領域の DIC では炎症反応が強く PAI-I が高値であることから、FDP の増加が抑制されることによる。これらが何点以上で DIC とするかでは、川口医療センター救命救急センターの成績を用いた判別解析から、DIC スコア 5 点以上ならびに 4 項目以上陽性が最も感度・特異度とも良好であった。

多施設レトロスペクティブスタディの検討では、欠損値が多いことから採用症例は 156 例となった。基礎疾患では感染症が最も多かったが、外傷、大動脈瘤など雑多な疾患がみられた。新基準案は厚生省診断基準に比べて有意に DIC 診断率は高く、感度が良いことは証明されたが、DIC に対する特異性が高いかが問題になる。救急領域の DIC の Gold Standard が無いことから、早期診断率や予後との関係を参考に検討した。新基準案の早期診断率は 28.8%とそれ程高くなく、69.7%は両基準同日診断であった。その内 27 例は初回参入データで両基準を満たして DIC と診断され、新基準案が早期診断していた可能性は否定できない。死亡率の検討では、厚生省 DIC 診断基準で診断された症例の予後は非常に悪く、より早期で救急領域 DIC を診断する必要が示唆された。また、新基準案で診断されたが厚生省基準では DIC と診断されなかった 35 例中、22.9%が死亡した。これらのことから、救急領域 DIC には厚生省基準では診断し得ないか診断が遅すぎる病態が存在することが示された。今後、プロスペクティブスタディにより上記病態をも診断する救急領域の DIC 診断基準を作成する予定

である。

E. 結論

日本血栓止血学会ならびに日本救急医学会との合同で、救急領域の DIC 診断基準案を作成した。多施設レトロスペクティブスタディの検討で、救急領域の DIC 診断基準案は厚生省診断基準に比べ感度が良く、救急領域 DIC には厚生省基準では診断し得ないか診断が遅すぎる病態が存在することが示された。

F. 健康危険情報

救急領域の DIC は感染症を主体にした DIC であり、予後が極めて悪く、早期診断・治療を行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Shiku T, Nakamura S: Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol*, 69(2): 247-254, 2002
- 2) Mori Y, Wada H, Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y: Defective von Willebrand factor-cleaving activity on admission is a marker of excellent clinical response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*, 42(5): 572-580, 2002

- 3) Tamaki S, Wada H, Ohfuzi K, Shibata T, Masuya M, Kageyama S, Gabazza EC, Kawakami K, Tsuji K, Miyanishi E, Minami N, Nobori T, Shiku H: Hemostatic abnormalities following bone marrow transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost*, 8(1): 125-132, 2002
- 4) Wada H, Nobori T, Watanabe R, T, Shiku H, Sakuragawa N: Plasma levels of plasminogen activator inhibitor -I (PAI-I) and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) in patients with disseminated intravascular coagulation. *Turkey J Hematol*, 19(2): 235-237, 2002
- 5) Noda A, Wada H, Kusiya F, Sakakura M, Onishi K, Nakatani K, Gabazza EC, Asahara N, Tsukada M, Nobori T, Shiku H: Plasma levels of heparin cofactor II (HCII) and thrombin-HCII complex in patients with disseminated intravascular coagulation. *Clin Appl Thromb Hemostasis* 8(2): 265-271, 2002

2. 学会発表

- 1) 和田英夫: DIC の診断基準—厚生省 1988 と ISTH2001、第 30 回日本救急医学会総会、2002 年 10 月 10 日、ロイトン札幌
- 2) 丸藤 哲、和田英夫; コンセンサスシンポジウム: 日本救急医学会 DIC 特別委員会および日本血栓止血学会学術専門委員会 DIC 検討部会合同「救急領域の DIC 診断・管理・治療指針」の作成について、第 25 回日本血栓止血学会学術集会、2002 年 11 月 15 日、神戸国際会議場
- 3) 丸藤 哲、和田英夫; パネルディスカッション: 日本救急医学会 DIC 特別委員会および日本血栓止血学会学術専門委員会 DIC 検討部会合同「救急領域の DIC 診断・管理・治療指針」の作成について、第 30 回日本救急医学会総会、2002 年 10 月 10 日、ロイトン札幌

H. 知的財産権の出願・登録

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
桑名正隆 池田康夫	ITP: 診断の進歩	高久史麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉謙監修	Annual Review 血液 2003	中外医学社	東京	2003.	183-189
石黒和博 小嶋哲人	凝固制御因子のノックアウトマウス	高久史麿ほか編	Annual Review 血液 2002	中外医学社	東京	2002	203-206

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
藤村欣吾	特発性血小板減少性紫斑病	SELECTED ARTICLES 2003		1141-1152	平成 14
Nomura S, Dan K, Hotta T, Fujimura K, Ikeda Y	Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura	Blood	100 (2)	728-230	July 15, 2002
Fujimura K, Harada Y, Ikeda Y, Omine M, Mizoguchi H. et al	Nationwide study of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnant women and the clinical influence on neonates	Int'l J of Hematology	75	426-433	2002
Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, and Ikeda Y.	Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura	J. Immunol.	168 (7)	3675-3682	2002
Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, and Ikeda Y	Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia	Arthritis Rheum	46 (8)	2148-2159	2002
Kuwana M, Kimura K, and Kawakami Y	Identification of an immunodominant epitope on RNA polymerase III recognized by systemic sclerosis sera: application to enzyme-linked immunosorbent assay.	Arthritis Rheum	63 (12)	1156-1163	2002

Kuwana M, Kawakami Y, and Ikeda Y	Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura	Blood.	101 (2)	621-623	2003
N. Ogasawara, Y. Kijima, S. Ike, Y. Nakagawa, T. Takagi, T. Hata, E. Suehisa, T. Kawasaki, and T. Miyata	Hereditary protein S deficiency with recurrent history of myocardial infarction: A case report.	Jpn. Circulation J.	67	166-168	2003
阪田敏幸、 宮田敏行	血栓症を理解するための基礎知識 6.先天性血栓性素因	臨床医	28	2253- 2255	2002
K. Kokame, M. Matsumoto, K. Soejima, H. Yagi, H. Ishizashi, M. Funato, H. Tamai, M. Konno, K. Kamide, Y. Kawano, T. Miyata, Y. Fujimura	Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	99	11902- 11907	2002
Ashida A, Nakamura H, Yoden A, Tamai H, Ishizashi H, Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y.	A successful treatment of a young infant who developed high-titer inhibitors against VWF-cleaving protease (ADAMTS13); an important discrimination from Upshaw-Schulman syndrome.,.	American Journal of Hematology	71:	318-322	2002
Mori Y, Wada H. Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y.	Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity.	Transfusion	42	572-580	2002
Fujimura Y, Matsumoto M, Yoshioka A, Matsui T, Titani K.	von Willebrand factor-cleaving protease and Upshaw-Schulman syndrome.	International Journal of Hamatology	75	25-34	2002

Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, Zivelin A, Geffen E, Seligsohn U.	The Frequent 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism Is Associated with a Common Haplotype in Whites, Japanese, and Africans	Am J Hum Genet.	70 (3)	758-62	2002
Matsubara Y, Murata M, Moriki T, Yokoyama K, Watanabe N, Nakajima H, Handa M, Kawano K, Aoki N, Yoshino H, and Ikeda Y.	A novel polymorphism, 70Leu/Phe, disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein Ib α .	Thrombosis and Haemostasis	87	867-872	2002
Watanabe T, Ohkuchi A, Sakata Y, Sato I et al	Perioperative changes in plasma antithrombin activity and platelet counts in patients undergoing gynecologic surgery.	Seminars in Thrombosis and Hemostasis	28 (6)	519- 524	2002
Sugo T, Sakata Y and Matsuda M	Structural alterations in hereditary dysfibrinogens	Current Protein and Peptide Sci.	3	239-247	2002
Hamano A, Tanaka S, Takeda Y, meda M and Sakata Y	A novel monoclonal antibody to fibrin monomer and soluble fibrin for the detection of soluble fibrin in plasma.	Clinica Chimica Acta	318	25-32	2002
M. Yanada, T. Kojima, K. Ishiguro, Y. Nakayama, K. Yamamoto, T. Matsushita, K. Kadomatsu, M. Nishimura, T. Muramatsu, and H. Saito	The impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: LPS and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin deficient mice.	Blood	99 (7)	2455-2458	2002
T. Kojima	Targeted gene disruption of natural anticoagulant proteins in mice.	Int. J Hematol	76 Suppl 2	36-39	2002
K. Yamamoto, T. Shimokawa, H. Yi, K. Isobe, T. Kojima, D. J. Loskut off, and H. Saito	Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis: increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and LPS signaling with aging.	Am.J. Pathol	161: (5)	1805-1814	2002

Noda A, Wada H, Kusiya F, Sakakura M, Onishi K, Nakatani K, Gabazza EC, Asahara N, Tsukada M, Nobori T, Shiku H	Plasma levels of heparin cofactor II (HCII) and thrombin-HCII complex in patients with disseminated intravascular coagulation.	Clin Appl Thromb Hemost	8(2)	265-271	2002
Wada H, Mori Y, Sakakura M, Gabazza EC, Kushiya F, Watanabe M, Nishikawa M, Shiku H, Nobori T	High plasma levels of fibrinogen are associated with poor outcome.	Am J Hematol	72: (1)	1-7	2003
和田英夫、阿部泰典、西岡淳二、戸松宏明、登勉	DIC の診断基準と血液凝固検査の標準化	臨床病理	50 (3)	273-276	2002