

B 摘脾

対象：

- ・ ITP 診断後 6 ヶ月以上経過した症例であること
- ・ 副腎皮質ステロイド療法により治療目標レベル 3 の症例、
- ・ 或いはレベル 2 の中で無治療、維持量で血小板数 5 万以下の症例
- ・ 副腎皮質ステロイド療法の副作用が強い場合
- ・ 副腎皮質ステロイド不適応症例 など

方法：

腹腔鏡下内視鏡手術（副脾を残さない様に注意する）
（ただし術式は外科の判断にゆだね腹腔鏡下内視鏡手術にこだわらない）

目標：

- レベル 1：血小板数正常化
- レベル 2：薬物療法中止後も血小板数 3 万以上
- レベル 3：薬物療法中止後も血小板数は 3 万以下であるが出血傾向が認められなくなる

付記：

- 1) 摘脾後の感染症に注意し発熱など感染症が疑われる場合には早め
まずペニシリン系の抗生剤の使用を考慮する。
- 2) レベル 2、3 を保つために維持量の副腎皮質ステロイド
(5~10mg/day) を用いる場合もある。

Second line 治療

対象：

- ・副腎皮質ステロイド治療や摘脾効果が不十分の症例（無反応例、あるいはレベル3）
- ・摘脾の了解が得られない症例
- ・first line の薬物治療が選択されにくい症例

治療目標：

レベル1：血小板数正常化

レベル2：維持療法中止あるいは維持療法にて血小板数を3万以上に維持する。

レベル3：維持療法中止あるいは維持療法にて出血傾向軽減（血小板数は3万以下）

この場合の維持療法は副腎皮質ステロイド或いは当該薬物療法の維持量を示す。

Second line 治療に当たって以下の点に留意する

- ・*Second line* 治療法はいずれもエビデンスレベルIV,Vである事。
- ・これらの薬剤はすべてITPに対し保険適応となっていない。
- ・それぞれ特有の副作用が知られており注意を払う必要がある。
- ・これらの治療は1~2クール、或いは1.5~2ヶ月行い効果が無ければ中止し他の治療法を選択する。
- ・以下の*Second line* 治療を2~3試みた後、無効であればプレドニン維持量（5~10mg/day）のみで経過観察する選択肢もある。

*ダナゾール（ボンゾール）：100~400mg/day 経口

*デキサメサゾン大量療法（デカドロン）：40mg/day 4日間

経口或いは静注

*ステロイドパルス療法（ソルメドロール）：500~1000mg/day 3日間

点滴静注、以後漸減

*シクロスポリン（サンデュミン、ネオーラル）：4~6mg/kg/day 経口

血中濃度を200ng/ml前後にコントロールする量を用いる

- *サイクロフォスファミド (エンドキサン) : 50~100mg/day 経口
- *アザチオプリン(イムラン) : 50~100mg/day 経口
- *Rituximab(リツキサン) : 375mg/m² 点滴静注 週1回 4週間
等から適宜選択する。

緊急治療

対象：

- 1) 緊急時
- 2) First, Second line いずれの治療中であっても出血傾向の悪化や血小板数の急激な減少時、
- 3) 出産、外科的処置前

対応： 入院し以下の治療を一つないし複数選択する

- ・ IVIgG 療法 : 完全分子型ヒト免疫グロブリン
400mg/kg/day 5日間 点滴静注
或いは、急ぐときは
1000mg/kg/day 2日間 点滴静注
(本投与法は保健適応はない)

いずれも指定された静注速度を守りゆっくり時間をかけて行う。
(400mg/kg/day の場合、初日は4時間半以上かけ、2日目は3時間、
3日以降は2時間半以上を目安とする)

- ・ 血小板輸血 : 10~20 単位/day
- ・ ステロイドパルス療法 (既述)

特発性血栓症サブグループ研究報告

- 国立循環器病センター研究所、部長 宮田 敏行
京都府立医科大学、助教授 辻 肇
自治医科大学、教授 坂田 洋一
名古屋大学医学部、教授 小嶋 哲人
慶應義塾大学医学部、講師 村田 満
大阪大学医学部、助手 川崎 富夫
- 研究協力者
国立循環器病センター研究所、室員 木村 利奈

研究要旨

日本人の静脈血栓症の発症原因を明らかにし、血栓症の予防や予知に資するため、多施設共同研究として静脈血栓症患者試料 161 例を収集し、データベースを作成した。この試料を対象に血栓症にかかわると考えられる 5 つの候補遺伝子多型をタイピングし、地域一般住民約 3,650 名のタイピングで得られた遺伝子型頻度と比較した。その結果、プロテイン S 徳島変異（開始 Met からの番号では Lys196Glu 変異、成熟型での番号では Lys155Glu 変異）が静脈血栓症患者群で有意 ($P < 0.001$) に高いことが判明した。本変異の地域一般住民でのアレル頻度は 0.009 であり、約 55 人に 1 人がヘテロ接合体であった。

1. 研究目的

本研究は、特発性血栓症の発症メカニズムを解明し、発症を予防する方策を検討するため、多施設共同で静脈血栓症患者を大規模に収集する。収集した血栓症患者の臨床情報をデータベース化しパネルを作成する。この静脈血栓症患者群を対象に、血栓に関連する次の 5 つの遺伝子多型をタイピングし、一般住民を対象にして得られた遺伝子頻度と比較することにより、静脈血栓症の遺伝的背景を検討する。

血栓に関連する候補遺伝子多型は下記の 5 多型である。なお、多型番号は「ヒト遺伝子変異の命名法の勧告」(1)にしたがい、アミノ酸番号は、翻訳開始 Met を 1 とし、塩基番号はこの ATG の A を 1 とした。

1) ADAMTS13、Pro475Ser 変異。

国立循環器病センター研究所の研究から、日本人の約 10 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であり、変異体はフォンビルブランド因子切断活性が著減することが明らかになっている (2)。

2) プラスミノーゲン Ala620Thr 変異

(成熟型での番号は Ala601Thr 変異)。

自治医科大学の研究から、日本人の 30-40 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であり、変異体は酵素活性が著減することが明らかになっている (3)。

3) プロテイン S Lys196Glu 変異

(成熟型での番号は Lys155Glu 変異。

プロテイン S 徳島変異ともよばれる)。名古屋大学の研究から、日本人の約 80 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であることが明らかとなっている。その後、鈴木らの研究により、本変異体はプロテイン S 活性が著減することが明らかになっている (4, 5)。

4) XII 因子 C46T 変異。

九州大学の研究からアレル頻度は C/T = 0.27/0.73 であり、変異により新しくできた開始 Met からフレームがずれて転写され、その結果本来の XII 因子の転写が低下し、血中 XII 因子量が低下することが明らかとなっている (6)。

5) プラスミノゲン活性化因子インヒビター1 (PAI-1) 4G/5G。

スウェーデンの研究から、プロモーター領域にある 5G アレルは、転写抑制因子が結合することにより転写が抑制され、その結果血中 PAI-1 が低値を示すことが明らかとなっている (7)。

2. 研究方法

特発性血栓症サブグループを構成する 6 施設で静脈血栓症患者を対象に試料と臨床情報を収集した。遺伝子試料は試料採取施設にて匿名化後、国立循環器病センター-研究所に移送し、5 遺伝子多型のタイピングを行った。多型タイピングは TaqMan 法を用いた。即ち、6ngDNA を用いて、PCR 法にて多型部位を含む領域を増幅し、多型を識別できる蛍光標識されたプローブを用いてタイピングを行った。静脈血栓症群の遺伝子型頻度を、既に決定済みの一般住民 (約 3,650 名) を対象として得られた遺伝子頻度 χ^2 検定により比較することにより、静脈血栓症の遺伝的背景に検討を加えた。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日)」を遵守して行う。各施設は研究計画の倫理面を倫理委員会で承認を受けた。試料の外部機関への移送に先立ち、施設間で Material Transfer Agreement を交わし、試料管理の責任などを明確にした。

3. 研究結果

特発性血栓症サブグループとして静脈血栓症 161 例を収集した。患者群の特徴を表 1 に示した。この患者群を対象に 5 多型の遺伝子タイピングを施行した。その結果、ADAMTS13-Pro475Ser 変異、PP : 139 名、PS : 20 名、SS : 1 名、プラスミノゲン-Ala620Thr 変異、AA : 152 名、AT : 9 名、TT : 0 名、プロテイン S-Lys196Glu 変異、KK : 146 名、KE : 13 名、EE : 2 名、XII 因子 C46T、CC : 23 名、CT : 75 名、TT : 63 名、PAI-1-4G/5G、4G4G : 61 名、4G5G : 69

名、5G5G : 30 名、であった。この頻度を約 3,650 名の一般住民で求めた頻度と比較したところ、唯一プロテイン S Lys196Glu 変異が $P < 0.001$ で有意差を示した。すなわち、静脈血栓症患者群に Glu アレルが多いことが明らかとなった。

4. 考察

日本人の静脈血栓症患者 161 名を対象に 5 つの遺伝子多型のタイピングを行い、プロテイン S Lys196Glu 変異の遺伝子型の頻度が、静脈血栓症患者群と一般住民群の間で有意な差が観察された。静脈血栓症患者群で Glu アレルが多く、Glu アレルが静脈血栓症の遺伝的背景になることが明らかとなった。

Glu196 をもつプロテイン S 変異体は、プロテイン S 徳島として知られている。本変異は第 2EGF 様ドメイン内に位置し、異常プロテイン S として血中に存在する。日本人での本変異のアレル頻度は 0.82% と報告され、当初は機能に影響を与えない変異と考えられたが (4)、その後の発現実験により、本プロテイン S 変異体は活性化プロテイン C に対するコファクター活性を示さないことが明らかとなった (5)。

Glu アレル頻度は本研究のコントロールに用いた一般住民群でも 0.90% であり、名古屋大学の結果とよく一致した。このアレル頻度から計算すると、約 55 人に 1 人はプロテイン S Lys196Glu 変異のヘテロ接合体であると推察され、約 12,000 人に 1 人はホモ接合体であると推察される。日本人の人口を 1 億 2000 万人とすると、約 1 万人が、ホモ接合体と推定された。このように多くの日本人がプロテイン S Lys196Glu 変異により血栓症のリスクに晒されていると考えられた。日本人の血栓症患者にプロテイン S 活性の低下が多く見られるとのこれまでの報告とよく一致する (8)。

Glu196 をもつプロテイン S は異常分子として血中に存在するため、血中プロテイン S 抗原量は正常値を示す。本異常分子は活性化プロテイン C のコファクター活性に障

害を示すので、血中プロテイン S 活性は低値を示すと考えられる。現在、プロテイン S 抗原量の測定は保険収載されているものの、活性測定は保険外となっている。日本人の血栓症発症を未然に防ぐため、プロテイン S 活性の保険収載が必要と考える。

5. 結論

日本人の静脈血栓症発症には、プロテイン S Lys196Glu 変異が遺伝的背景になる可能性を明らかにした。

参考文献

- (1) Antonarakis SE: Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat*, 11:1-3, 1998.
- (2) Kokame K, et al.: 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.
- (3) Sakata Y, et al.: Molecular abnormality of plasminogen. *J Biol Chem*, 255:5442-5447, 1980.
- (4) Yamazaki T, et al.: A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res*, 70:395-403, 1993.
- (5) Hayashi T, et al.: Protein S Tokushima: abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor-like domain of protein S. *Blood*, 83:683-690, 1994.
- (6) Kanaji T, et al.: A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*, 91:2010-2014, 1998.
- (7) Eriksson P, et al.: Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is

associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:1851-1855, 1995.

- 8) Tsuda H, et al.: Screening for aetiology of thrombophilia: a high prevalence of protein S abnormality. *Ann Clin Biochem*, 36 (Pt 4):423-432, 1999.

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表

1. 論文発表

Sakata T, et al.: Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita Study. *J Thromb Haemost*, 2:1012-1013, 2004.

Okada H, et al.: Identification of protein Sa gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. *Br J Haematol*, 126: 219-225, 2004.

辻 肇. アンチトロンビン欠損症、平井久丸、押味和夫、坂田洋一編. 血液の事典. 東京:朝倉書店、340-342、2004.

辻 肇. Part 5 DIC 治療薬の将来展望を探る. DIC 治療薬の新しい動向から治療戦略を探る. 丸藤哲編. DIC 治療の新たなストラテジー. 東京:先端医学社、140-145、2004.

辻 肇. 特集・血液疾患と救急医療. 第1部一般的救急医療の代表的症候と救急医療. 3. 呼吸困難〜血栓症〜. 血液フロンティア. 14(4):29-35, 2004.

辻 肇. 血栓症を治療する-エビデンスを活かしたアプローチ [基本的な診療の進め方] 抗血栓薬の治療モニタリング. *Medicina* 41 (6): 958-960, 2004.

2. 学会発表

T. Miyata. Genetic studies on thrombotic diseases, Symposium 2: Genetic studies on thrombotic diseases. Third Asian Pacific Congress of Thrombosis and Hemostasis, Bangkok, October 14-16, 2004.

M. Murata. Genetic studies on thrombotic diseases, Symposium 2: Polymorphism in thrombotic diseases. Third Asian Pacific

Congress of Thrombosis and Hemostasis,
Bangkok, October 14-16, 2004.

H. Okada, et al.: Four novel mutations in
eight unrelated Japanese subjects with
protein S deficiency. The Xth Congress of
the International Society of Hematology,
Asian-Pacific Division Nagoya, September
1-4, 2004.

辻 肇：「血栓症に対する抗凝固療法の
新しい展開」第52回日本心臓病学会学
術集会。2004年9月15日；京都。

京谷麻由、池尻 誠、山影 望、奥村 薫、
堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、山田貴
之、高木 明、村手 隆、杉村 基、小
林隆夫、金山尚裕、足立達哉、山本晃士、
松下 正、高松純樹、齋藤英彦、小嶋哲
人：妊娠中に深部静脈血栓症を発症した
アンチトロンビン欠損症3例の遺伝子
解析 第27回日本血栓止血学会学術集
会2004年11月18-20日；奈良

窓岩清治、坂田洋一：「新しい分子マー
カーと新しいDIC診断基準の作成」線溶
系分子マーカー。 第27回日本血栓止血
学会学術集会 コンセンサス・シンポジ
ウム 2004年11月18-20日；

奈良

8. 知的財産権の出願・登録

なし

表 1

	静脈血栓症患者 (n=161)
採血時年齢(平均±SD)	56.4±15.3
性別 (男/女)	78 / 83
発症年齢(平均±SD)	49.5±16.8
50歳未満発症(%)	46.0
40歳未満発症(%)	29.2
家族歴 (有/無)	21 / 106

血栓性血小板減少性紫斑病サブグループ報告書

奈良県立医科大学輸血部 藤村吉博

国立循環器病センター研究所 宮田敏行
慶應大学医学部内科 村田 満
三重大学医学部臨床検査医学科 和田英夫

研究協力者：

東邦大学医学部衛生学 杉野 稔
伊津野 孝

要旨

TTP グループでは、全国から TTP/HUS 症例を集積して、ADAMTS13 活性および同インヒビターの測定を行い、平成 16 年末で 493 例となった。このうち、先天性および後天性 TTP の活性著減例において ADAMTS13 遺伝子の解析を行っている。一方で、全国の医療機関にアンケート調査を行い TTP/HUS の実態調査を行った。以上の結果から TTP/HUS の病型分類と診断基準の作成の作成を目指している。また、FRETs VWF73 および新規 ELISA 法を使った ADAMTS13 活性測定法の開発に成功し、ベットサイドでの TTP/HUS の診断が可能になることが期待される。また、上記の 493 例中 ADAMTS13 活性が著減しない症例が約 2/3 あり、factor H などの ADAMTS13 以外の原因も含めた TMA の系統的診断法の確立を目指している。

1. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は血小板減少、動揺性精神神経症状などの所謂 Moschowitz の 5 徴候からなる全身性重篤疾患で、血漿交換療法が導入される以前の死亡率は 90% を超える予後不良疾患であった。TTP は腎症状優位とされる溶血性尿毒症症

候群 (HUS) と臨床的にはしばしば鑑別が困難であるが、共に細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、血栓による臓器障害を 3 主徴とする血栓性微小血管障害症 (TMA) のカテゴリーに分類されている。近年、von Willebrand 因子切断酵素 (VWF-CP、別名 ADAMTS13) の発見とその活性測定

Willebrand 因子切断酵素 (VWF-CP、別名 ADAMTS13) の発見とその活性測定が可能となった事より、TTP では同活性が著減し HUS では略正常との報告がなされるようになった。しかし、このアッセイは技術的に大変困難であるという事情から、本邦では測定可能な施設が極めて制限されており、TTP 患者の頻度、診断、治療、予後等の実態は殆ど不明である。

奈良医大輸血部では 1998 年にこのアッセイを確立し、全国の医療機関から同活性測定の依頼を受け付け、まず臨床診断にて TMA と判定され、且つ ADAMTS13 活性が解析された数は平成 16 年末で 493 例になる。このような背景のもと、本研究サブグループは、1) 前記 493 例の解析による TMA の病型分類と TTP の診断基準の作成、2) ADAMTS13 抗原/遺伝子解析、3) アンケート調査による TTP の発症頻度と治療法の確立、4) 同酵素活性の簡便・迅速測定法の確立と評価、5) ADAMTS13 以外の原因も含めた TMA の系統的診断法の確立、の 5 項目を研究目的に掲げている。

2. 研究方法 (倫理面への配慮)

1. ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定: 精製 VWF を基質に用い、SDS アガロースゲル電気泳動で解析する VWF マルチマー法。

2. ADAMTS13 遺伝子解析: 奈良医大輸血部 HP

(<http://www.narmed-u.ac.jp/~trans/>) を介して全国の医療機関から同活性測定依頼を受け、臨床症状から TMA と診断された 493 例について、ADAMTS13 活性著減 (正常の <3%) と同インヒビター陰性 (<0.5 Bethesda U/ml) 所見から先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群: USS) が疑われた症例については各依頼と解析施設の双方で倫理委員会承認を得た後、ADAMTS13 遺伝子解析を行った (国立循環器病センター研究所の宮田班員が担当)。一方、ADAMTS13 活性著減で同インヒビター陽性の後天性 TTP で、患者の同意が得られたものについても前記と同じ手続きを経て遺伝子解析を行った (慶応大学の村田班員が担当)。(図 1 のフローチャート参照)

3. ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立: ADAMTS13 による VWF-A2 ドメインの切断部位 (サブユニットのアミノ酸残基 Tyr842-Met843) を含む人工基質を作成し、これを利用したアッセイ法について検討した。

4. ADAMTS13 抗原の解析: HeLa 細胞で発現した recombinant (r)ADAMTS13 を抗原とし、常法にてマウスモノクローナル抗体を作成し、これを用いた western blot 並びに酵素免疫測定法 (ELISA) による ADAMTS13 抗原の量的、

質的解析を行った。

5. アンケート調査:平成14年度に行ったTTP/HUS患者の一次調査によって報告された症例に対して二次調査を行った。(調査表は添付)

3. 研究結果

1. ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定:表1に結果を示す。先天性TMAと考えられる症例は計41例であった。うち26例(21家系)は同活性著減のUSSで、残り15例は原因不祥であった。USSの10家系についてはADAMTS13 遺伝子解析を終了し、その異常部位を同定した(後述)。後天性TMAは452例で、この診断並びにTTPとHUSのふり分けは紹介医からの臨床経過と基本検査所見をベースに行った。うちTTPは381例(特発性166例、膠原病111例、悪性腫瘍36例、造血幹細胞移植26例、妊娠12例、薬物12例、その他18例)、またHUSは71例(特発性48例、O157感染17例、マイトマイシン6例)であった。TTPの中で、特発性の93例(56%)ではADAMTS13 インヒビターが陽性で、同活性著減が確認された。膠原病では18例(16%)が同活性著減、また造血幹細胞移植では同活性著減例はなかった(0%)。一方、HUSではADAMTS13 活性著減例は認められなかった。

2. ADAMTS13 遺伝子解析:USS10家系(Family A~J)11症例についての家系図と遺伝子解析の結果を図2と3に示す。ADAMTS13 遺伝子は染色体9q34にあるが、両方のアレルに異なった変異部位を持つ「複合型ヘテロ接合体」は8家系9症例に見られ、患者の両親はいずれも非血縁結婚であった。一方、両方のアレルの変異が同一である「ホモ接合体」は2家系(Family BとC)2症例に見られ、Family Cの患者の両親は血縁結婚(いとこ)であった。Family B患者(札幌在住)もホモ接合体変異であったが、両親は非血縁結婚であった。しかし、その後の詳細な家系ルーツ調査によって、この御両親の各々の曾祖父母は19世紀末に東北地方のある同村から札幌に移住された方である事が判明し、元々は近縁であった事が考えられる症例である。更に、Family A家系の解析から日本人の9.6%にヘテロ接合体が存在する事が確認されたP475Sという潜在的な血栓症リスクファクターの多型が発見された。後天性TTPでの遺伝子解析は現在進行中であるが、先天性TTPに比べて遥かに少ない。

3. ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立:国立循環器病センター研究所の宮田班員とその共同研究者であ

る小亀らは ADAMTS13 による切断部位 Tyr842-Met843 を含む VWF-A2 ドメインの両端を各々 GST と His タグで挟み込んだ大腸菌発現蛋白を数種作成し、切断に必須である VWF サブユニットの最小アミノ酸残基数は 73 で、またその残基番号は 833-905 である事を示した。この基質 (GST-VWF73-His と命名) を用いた ELISA による活性測定系は米国の研究者が先行する形になったが、基質が両端標識されているため、検量線は切断されない残量を測定する逆勾配となり、その感度は必ずしも満足できるものではない。最近、小亀らは VWF73 に蛍光基と消光基を組み込んだ合成ペプチド (FRETS-VWF73 と命名) を作成し、同酵素切断にて発する蛍光を直接測定するという画期的な方法を構築した。このアッセイの有用性、特に従来法との精度比較は対価面も含めて現在世界的規模で検討が行われつつある。

一方、より最近藤村らの研究グループは Tyr842-Met843 結合が切断される事によって生ずる N 末端側の -Tyr842 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (N10 抗体と命名) を 24 種類作成する事に成功した (図 4)。この N10 抗体は正常 VWF とは ELISA や western blot では殆ど反応しないことから、マイクロプレート上に前記 GST-VWF73-His 基質を固相化し、正常

血漿 (希釈) 添加 によるペプチド切断反応を行い、生じた N 末端側の -Tyr842 ペプチドを N10 標識抗体で検出する測定系を構築した。本測定系の検出感度は 0.5% で、また inhibition assay でも TTP 患者の IgG で濃度依存性阻害が確認された事から、今後、迅速、高精度、安価な ADAMTS13 活性測定系のルーチン検査化が可能になるものと考えられる。

4. ADAMTS13 抗原の解析: rADAMTS13 にて作成したモノクローナル抗体は 2 種 (A10 と C7) で、それぞれのエピトープは、A10 が disintegrin-like ドメイン、C7 が thrombospondin-1 (T) ドメインの 7 と 8 番目 (T7/T8) であった。さらに A10 は正常血漿中の ADAMTS13 活性の完全中和抗体であり、C7 は非中和抗体であった。(WH2-11-1 は化学血清療法研究所で作成され、そのエピトープは T4 にある。) A10 は血漿中の ADAMTS13 抗原を western blot で直接検出する事ができ、USS や後天性 TTP 患者検体についての解析が現在進行中である。一方、A10 を用いた肝組織の免疫染色、mRNA の in situ hybridization、そして A10 (IgG) と α SMA モノクローナル抗体 (IgG) をそれぞれ蛍光標識した二重免疫染色にて、ADAMTS13 の肝臓での産生主細胞は類洞壁細胞で、しかも非実質細胞であ

る星状細胞（旧 伊東細胞）である事を同定した（論文投稿中）。星状細胞は肝繊維化の鉤をにぎる重要な細胞であり、古来、慢性肝疾患と TTP 様症状の関連については多くの議論がなされたが決定的な証拠は提示されていない。今回の発見は両病態の関連を直接結び付ける重要な発見と考えられる。

5. アンケート調査：一次調査では、USS 14 症例、後天性 TTP 167 例、先天性 HUS 17 例、後天性 HUS 223 例の回答があった。これをもとに本年度二次調査を実施し、各施設から回答を得られたものは先天性 TTP/HUS 18 例(58%)、後天性 TTP/HUS 177 例(51.5%)であった。

4. 考察

TTP 研究サブグループ代表である藤村は 1998 年に本邦で最初にこの酵素活性測定法を確立し (Int J Hematol 2001, Br J Hematol 2001)、以後今日迄全国の医療施設から依頼された TMA 患者について ADAMTS13 解析を行った。この結果、同活性著減例は TMA 全体の 1/3、中等度低下例が 1/3、そして軽度低下ないし正常例が残り 1/3 である事を示した (途中経過を Sem Hematol 2004 で報告)。著減例の中から先天性 TTP (別名 USS) を 21 家系 26 症例発

見し、うち 10 家系については宮田班員を中心に ADAMTS13 遺伝子解析を行い、また後天性 TTP についても村田班員を中心に同遺伝子解析を実施し、これらの結果は既報 (PNAS 2003, Blood 2004, Blood 2004) もしくは論文投稿中である。また後天性 TTP の中で原因不詳 (特発性) のものはその 56% に ADAMTS13 自己抗体が検出される事から自己免疫疾患のカテゴリーに入るが、基礎疾患に併発するものは極めて多彩であり、これらの中で初期、多発性硬化症が疑われた血管内リンパ腫に合併した TTP 症例と、C 型肝硬変経過中に定型的 TTP を発症した症例について、いずれも ADAMTS13 インヒビターの存在を証明し、これら患者に見られる血小板減少の原因を明らかにした (Neulology 2004, J Hepatology 2005)。また後天性 TTP の IgG 型インヒビターのエピトープは共通して ADAMTS13 の Cys-rich/Spacer ドメインにある事を同定 (Blood 2003) し、今後本所見の診断への利用が示された。

一方で、宮田班員らは ADAMTS13 で切断される VWF サブユニットの 73 アミノ酸残基 (VWF73) を同定し、これは現在 ADAMTS13 の最小 VWF 基質単位と考えられている (Blood 2004)。さらにこの VWF73 を蛍光標識した合成ペプチドを作成し、短時間で ADAMTS13 活

性を測定しうる FRETs-VWF73 アッセイを構築した (Br J Haematol 印刷中)。現在さらに藤村らにより大腸菌発現 VWF73 を基質に用いた、安価、迅速、正確なアッセイが構築されつつあり、ADAMTS13 活性測定が各医療施設で行われ、同所で定型的 TTP の迅速診断が行われる日も近いと考えている。また藤村らは ADAMTS13 に対するマウスモノクローナル抗体を作成し、その性状解析後、ELISA と western blot 法により TTP 患者の ADAMTS13 抗原解析を行っている。さらにこの特異抗体が作成された事により、肝臓での同酵素の産生細胞が星状細胞 (旧 伊東細胞) である事を同定した (論文投稿中)。和田班員は後天性 TTP の中で、ADAMTS13 活性著減、かつ同インヒビター陽性例では血漿交換療法が卓効する事を自験例で示し、その治療理論を構築した (Transfusion 2002)。この論文は臨床的にも高い評価を得ている。さらに和田は TMA の頻度や治療の標準化を目指して、全国の医療施設に対する大規模アンケート調査を行い、データを集積中である。

5. 結論

ADAMTS13 に対する IgG 型インヒビターが発生し、活性が著減する後天性・特発性 TTP に対して血漿交換療法が奏功する事の EBM (①インヒビター

除去、②UL-VWFM の除去、③ADAMTS13 の補充、④止血に必要な正常 VWF の補充) を確立した。

しかしながら、TMA 全体の 1 / 3 はこの酵素活性の著減で説明される定型的 TTP であるが、残り 2 / 3 の TMA の原因追求が今後の課題である事が示された。さらに、全国の血液疾患診療科を標榜する医療機関に TMA の診断、治療、予後についてアンケート調査を実施し、現在その結果を集計中であるが、本研究サブグループでは、今後、ADAMTS13 以外の TMA 病因として注目されつつある補体調節因子 (factor H、CD46) や血管内皮細胞膜結合糖蛋白質 (CD36, CD39) 等を含めた多角的な解析を行い TMA の系統的診断法の確立を目指す。

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表 (発表誌名、巻号、頁、発行年等)

論文発表

1. Uemura M, Tatsumi K, Matsumoto M, Fujimoto M, Matsuyama T, Ishikawa M, Iwamoto T, Mori T, Wanaka A, Fukui H, Fujimura Y. Localization of ADAMTS13 to the stellate cells of human liver. Submitted, 2005.

2. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FFRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. **Br J Haematol** (in press), 2005.
3. Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Fujimura Y, Kuyama J. Rituximab provided long-term remission in a case with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. **Int J Hematol** (in press), 2005.
4. Fujisaki K, Matsutani K, Yoshimitsu T, Nakanishi K, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y, Takeda K, Hirakata H, Iida M. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with polyarthritides nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. **Clinical Nephrology** (in press), 2005.
5. Fujimura Y. Down-regulation of ADAMTS13 activity by serine proteases. In: *Inside Blood*. **Blood** (Review) 105: 911-912, 2005.
6. Sugimoto T, Saigo K, Kanenda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murashima T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nishimura R, Koizumi T, Kumagai S. Von Willebrand factor-cleaving protease activity remains at the intermediate level in thrombotic thrombocytopenic purpura. A CML case treated with interferon- α . **Acta Haematologica** (in press), 2005.
7. Uemura M, Ishikawa M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Toyohara M, Yamazaki M, Yoshiji H, Yamao J, Matsumoto M, Ishizashi H, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. **Alcohol Clin Exp Res** (in press), 2005.
8. Hatakeyama K, Hao H, Imamura T, Ishikawa T, Shibata Y, Fujimura Y, Eto T, Ogawa H, Asada Y. Decreased CD39 expression in coronary atherosclerotic lesions is implicated in plaque instability and thrombus formation. **Am J Cardiol** 95: 632-635, 2005.
9. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K,

- Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus formation in vivo. **Circulation** 111: 808-815, 2005.
10. Yagita M, Uemura M, Yamahara H, Kitano T, Kunitomi A, Konaka Y, Nakamura T, Matsumoto M, Ishizashi H, Fukui H, Fujimura Y. Development of ADAMTS13 inhibitor in a patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis causes thrombotic thrombocytopenic purpura. **J Hepatology** 42: 420-421, 2005.
11. Kushiya F, Wada H, Ooi K, Sakurai Y, Sakaguchi A, Noda M, Abe Y, Nakasaki T, Tsukada T, Shiku H, Nobori T. Effects of atorvastatin on serum lipids, lipoproteins, and hemostasis. **Am J Hematol** 78: 1-6, 2005.
12. Kamikura Y, Wada H, Nobori T, Matsumoto T, Shiku H, Ishikura K, Yamada N, Nakano T, Kazahaya Y, Sawai T, Matsuda M. Elevated plasma levels of fibrin degradation products by granulocyte-derived elastase in patients with deep vein thrombosis. **Thromb Res** 115: 53-57, 2005.
13. Kawahara M, Kanno M, Matsumoto M, Nanno H, Danno D, Murata K, Nakamura S, Fujimura Y, Ueno S. Diffuse neurodeficits in intravascular lymphomatosis with ADAMTS13 inhibitor. **Neurology** 63: 1731-1733, 2004.
14. Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M. Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. **Blood** 104: 2081-2083, 2004.
15. Matsumoto M, Kokame K, Soejima K, Miura M, Hayashi S, Fujii Y, Iwai A, Ito E, Tsuji Y, Takada-Shitaka M, Iwadate M, Umeyama H, Yagi H, Ishizashi H, Banno F, Nakagaki T, Miyata T, Fujimura Y. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. **Blood** 103: 1305-1310, 2004.

16. Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Wada H, Fujimura Y. The Japanese experience with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. **Semin Hematol** 41: 68-74, 2004.
17. Kokame K, Miyata T: Genetic defects leading to hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura. **Semin Hematol** 41:34-40, 2004.
18. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. **Blood** 103: 607-612, 2004.
19. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y. Detection of von Willebrand factor -cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. **Biochem Biophys Res Commun** 313(1): 212-6, 2004.
20. Ishikura K, Wada H, Kamikura Y, Hattori K, Fukuzawa T, Yamada N, Nakamura M, Nobori T, Nakano T: High prevalence of anti-prothrombin antibody in patients with deep vein thrombosis. **Am J Hematol**, 76(4): 338-342, 2004

学会発表

1. Soejima K, Matsumoto M, Banno F, Kokame K, Miyata M, Wada H, Fujimura Y, Nozaki T, Nakagaki T. Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) -Structural and functional relationship-. Xth Congress pf International Society of Hematology (於 Nagoya, 2004年9月1日)
2. Hatakeyama K, Marutsuka K, Yamashita A, Moriguchi A, Imamura T, Shibata Y, Fujimura Y, Asada Y. CD39 expression in human coronary atherosclerotic lesions. Xth Congress pf International Society of Hematology (於 Nagoya, 2004年9月1日)
3. 藤村吉博. VWF 切断酵素 (ADAMTS13) による血小板血栓の病態解析 (特別講演). 第17回東京医科大学「脈管研究会」(於 東京医科大学講堂、2004年3月2日).
4. 植村正人、松本雅則、石指宏通、田村信宏、八木秀男、松山友美、藤本正男、今津博雄、小寫秀之、櫻井伸也、石井禎暢、石川昌利、浪崎正、豊原眞久、山崎正晴、吉治仁志、山尾純一、藤村吉博、福井博. アルコ

- ール肝炎における von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素 (ADAMTS13) の動態. 第 24 回アルコール医学生物学研究会. (於 奈良文化会館 2004 年 3 月 4 日)
5. 藤村吉博. TMA での VWF 切断酵素 (ADAMTS13) 解析 (特別講演). 第 2 回千葉造血器腫瘍研究会 (於 千葉京成ホテルミラマーレ、2004 年 5 月 28 日).
 6. 植村正人、松本雅則、石指宏通、田村信宏、八木秀男、松山友美、藤本正男、今津博雄、小島秀之、櫻井伸也、石井禎暢、石川昌利、藤村吉博、福井博. アルコール肝炎における von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素 (ADAMTS13) の動態. 第 12 回肝病態生理研究会. (於 浦安・ヒルトン東急ベイ 2004 年 6 月 5 日)
 7. 松本雅則、藤村吉博、石指宏通、秋山暢. 血小板減少と貧血を認めた妊婦の 1 例. 第 47 回日本臨床検査医学会近畿支部総会 (プレナリーセッション) (於 奈良県立医科大学大講堂 2004 年 6 月 12 日).
 8. 藤村吉博. ADAMTS13 から見た TTP/HUS (特別講演). 第 5 回腎とバイオロジー研究会 (於: 東京・東海大学校友会館 2004 年 7 月 17 日).
 9. 松本雅則、八木秀男、石指宏通、神野正敏、和田英夫、相原守夫、西浦哲雄、井原彰裕、中村忍、藤村吉博. Intravascular lymphoma 5 症例における ADAMTS13 活性とそのインヒビター. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (ワークショップ) (於 国立京都国際会館 2004 年 9 月 17 日)
 10. 奥田慎也、名取一彦、和泉春香、長瀬大輔、藤本吉紀、菅澤康幸、荒井ちあき、加藤元浩、梅田正法、石指宏通、松本雅則、藤村吉博、倉石安庸. 妊娠時の TTP 発症を契機に Upshaw-Schulman 症候群の診断に至った姉妹例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 京都・国立京都国際会館 2004 年 9 月 17 日)
 11. 長井一浩、大曲勝久、田口潤、宮崎泰司、河野茂、上平憲、藤村吉博、朝長万左男. 慢性に経過する血栓性血小板減少性紫斑病に原発性硬化性胆管炎を合併した 1 症例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学会総会 (於 国立京都国際会館 2004 年 9 月 17 日)
 12. 杉尾康浩、長岡克弥、牧野茂義、上田章、松本雅則、藤村吉博. 免疫抑制療法と長期の血漿交換療法にて救命しえた血栓性血小板減少性紫斑病の一例. 第 66 回日本血液学会総会/ 第 46 日本臨床血液学

- 会総会（於 国立京都国際会館 2004年9月17日）
13. 藤村吉博. TTP/HUS の病態と治療. 第34回日本腎臓学会西部学術大会（教育講演）（於 岡山コンベンションセンター 2004年10月2日）
 14. 藤村吉博. TTP と VWF（特別講演）. 第8回岡山血液セミナー（特別講演）（於 ホテルグランピア岡山 2004年10月9日）.
 15. 植村正人、松本雅則、石指宏通、松山友美、石川昌利、八木秀男、櫻井伸也、浪崎正、藤本正男、小寫秀之、石井禎暢、藤村吉博、福井博. 急性肝疾患における von Willebrand 因子特異的切断酵素の動態. 第46回日本消化器病学会大会.（於 福岡国際会議場 2004年10月21日）
 16. 小亀浩市、宮田敏行、松本雅則、藤村吉博. フォンビルブランド因子切断酵素 ADAMTS13 の活性測定. 第48回日本輸血学会近畿支部総会（シンポジウム）（於 京都大学医学部芝蘭会館, 2004年11月13日）
 17. 小亀浩市、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. 消光性蛍光基質を用いた血漿 ADAMTS13 活性の測定. 第27回日本血栓止血学会学術総会.（於 奈良県新公会堂, 2004年11月19日）
 18. 石西綾美、八木秀男、西村仁美、松本雅則、藤村吉博、石指宏通、岩本顕聰、森俊雄、副島見事、中垣智弘. I. 抗 ADAMTS13 マウスモノクローナル抗体の作成とその性状. 第27回日本血栓止血学会学術総会.（於 奈良県新公会堂, 2004年11月19日）
 19. 松本雅則、八木秀男、石西綾美、西村仁美、藤村吉博、石指宏通、岩本顕聰、森俊雄、副島見事、中垣智弘. II. TTP 患者における血漿 ADAMTS13 抗原解析. 第27回日本血栓止血学会学術総会.（於 奈良県新公会堂, 2004年11月19日）
 20. 古小路英二、松本雅則、山下篤、八木秀男、櫻井嘉彦、丸塚浩助、畠山金太、藤村吉博、浅田祐士郎. 胎盤由来 ecto-ATP Diphosphohydrolase I は傷害動脈壁における血栓形成を抑制する. 第27回日本血栓止血学会学術総会.（於 奈良県新公会堂, 2004年11月19日）
 21. 藤村吉博. 多彩な基礎疾患に合併する TMA の病態解析の進歩 第27回日本血栓止血学会学術総会（ランチョンセミナー）.（於：奈良・奈良県新公会堂、2004年11月19日）
 22. 藤村吉博. VWF 切断酵素（ADAMTS13）と血栓症 第12回東海

肝移植研究会(特別講演。(於 名古屋・栄ガスビル、2004年11月19日)

23. 藤村吉博、ADAMTS13を中心とした血栓性微小血管障害症(TMA)の病態解析 第6回北陸血管病変研究会(特別講演)。(於 ホテル日航金沢、2005年2月24日)

8. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)

1. 抗ADAMTS13モノクローナル抗体

出願人:株式会社日本臨床医学検査研究所、藤村吉博、松本雅則、森俊雄
発明人:藤村吉博、松本雅則、森俊雄
2004年10月19日国内出願

2. ADAMTS13 活性検定抗体及び活性検定方法

出願人:株式会社日本臨床医学検査研究所
発明人:加藤誠司、日裏久英、松本雅則、藤村吉博
2005年2月14日国内出願