

I TP の新しい診断基の作成

分担研究者 桑名正隆（慶應義塾大学医学部先端医科学研究所）

研究要旨

本研究班では特発性血小板減少性紫斑病（ITP）に特異的な臨床検査項目を導入することで、積極的に ITP を診断する基準の作成を目指している。そのために、ITP 患者に特異的な検査法として報告されている抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体、網状血小板比率、血漿トロンボポエチン（TPO）濃度の ITP 診断における有用性を調べた。まず、慶應義塾大学病院に血小板減少のため受診した 69 例を対象として、初診時の各種検査結果と将来の ITP の診断との関連を前向きに検討した。さらに、その結果を確認するため、8 つの研究分担者施設での 113 例を対象として同様の試験を行った。その結果、貧血なし、白血球数正常、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体増加、網状血小板比率増加、血漿 TPO 濃度正常または軽度増加の 6 項目が ITP の診断と関連する臨床所見として抽出された。これら 6 項目のうち 3 項目以上を満たした場合を ITP とする診断基準案を作成すると、単施設での検討では感度 96%、特異度 94%、多施設での検討では感度 96%、特異度 79%と良好な結果が得られた。基準案に含まれる臨床検査を行える体制の確立や専門医によるコンセンサスを得る必要があるが、本基準案を基本とすることで新しい ITP の診断基準の作成が可能と考えられた。

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、骨髓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、血小板減少をきたしうる他の疾患が除外されれば ITP と診断してよい。しかし、血小板減少をきたす全ての疾患を除外することは現実的に困難で、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。そこで、ITP に特異性の高い臨床検査項目を含めた、積極的に ITP を診断する基準の作成が望まれている。そのため、ITP の診断に有用な検査法として報告されている GPIIb-IIIa に対する血小板特異抗体、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、網状血小板比率、血漿中のトロンボポエチン（TPO）濃度の 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単施設、次いで多施

設で行い、その結果をもとに ITP の診断基準の作成を試みた。

B. 研究方法

1. 単施設での前向き試験

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 14 年 10 月の間に慶應義塾大学病院内科を受診した患者のうち、(a) 血小板数 <10 万/ μl 、(b) 末梢血塗抹標本で異型性がない、(c) 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、(d) 副腎皮質ステロイドや免疫抑制薬による薬物療法や摘脾を受けていない、(e) 経過観察期間が 6 ヶ月以上、のすべてを満たす 69 例を対象とした。エントリー時に年齢、性別、出血症状の有無、塗抹も含めた末梢血検査の結果を登録し、さらに末梢血検体を用いた以下の 4 つの検査を施行した。

- (1) ELISPOT 法による 10^5 個の末梢血単核球あたりの IgG 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度
- (2) P-GP-ELISA による IgG 抗 GPIIb-IIIa 抗体
- (3) フローサイトメトリーによる網状血小板比率
- (4) ELISA キット (Quantikine; R&D systems) による血漿 TPO 濃度

最終診断は、6 ヶ月以上経過した時点で担当医により臨床経過および骨髄検査を含めた各種検査所見により行われた。合計 10 の臨床項目について 2 群間の平均値および頻度の差は Mann-Whitney U-test, Fisher's 2-tailed exact test を用いて解析した。

2. 多施設での前向き試験

本研究班を分担する 8 施設 (大阪大学、広島大学、慈恵医科大学、三重大学、慶應義塾大学、筑波大学、関西医科大学、名古屋大学、奈良県立医科大学) の協力のもと、113 例を対象とした単施設と同様の前向き試験を行った。研究期間は平成 14 年 11 月から平成 15 年 10 月の 1 年間とした。末梢血検体はブラインドで慶應義塾大学と大阪大学へと送付し、(1) (2) (4) は慶應義塾大学、(3) は大阪大学 (倉田義之先生) で測定した。2 群間における単変量解析に加えて、各因子の独立性を検討するための多変量解析も行った。

(倫理面への配慮)

末梢血検体の取り扱いに際しては個人情報保護のため、すべて匿名化して検査および集計に用いた。

C. 研究結果

まず慶應義塾大学単施設での調査では、エントリーした 62 例の最終診断は 46 例が ITP、2 例が再生不良性貧血、8 例が骨髄異形成症候群 (MDS)、1 例が無巨核球性血小板減少症、5 例が診断未確定 (巨核球低形成であるが再生不良性貧血、MDS と診断できない) であった。診断が ITP 以外の 16 例を非 ITP とし、エントリー時の各種臨床項目を ITP と非 ITP 群で比較した。両群間で性、年齢、出血症状の頻度に差はなかったが、貧血と白血球減少の頻度は ITP で非 ITP に比べて有意に低かった (いずれも $P < 0.001$)。抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体価、網状血小

血小板比率は非 ITP 群に比べて ITP 群で有意に高く ($P < 0.001$, $= 0.01$, $= 0.001$), 血漿 TPO は有意に低かった ($P < 0.001$)。これら臨床項目単独では ITP 診断における感度, 特異度が 59-94%, 陽性的中度は 90%以上と比較的良好であったが, 陰性的中度は 44-81%と低かった。そのため, ITP 診断に有用な検査所見の組合せを検討したところ, 感度, 特異度, 陽性的中度, 陰性的中度がすべて 90%以上となる組合せはなかった。その中でも, 6 項目全てのうち 3 項目以上を陽性とする場合が最もよい結果が得られ, 感度 96%, 特異度 94%, 陽性的中度 98%, 陰性的中度 88%であった。

多施設での検討でエントリーされた 113 例の最終診断は 89 例が ITP, 11 例が再生不良性貧血, 10 例が骨髄異形成症候群(MDS), Fanconi 貧血, May-Hegglin 異常, 骨髄線維症がそれぞれ 1 例ずつであった。診断が ITP 以外の 24 例を非 ITP とし, エントリー時の各種臨床項目を ITP と非 ITP 群で比較すると, 有意な差のある臨床所見として貧血なし ($P < 0.0001$), 白血球減少なし ($P = 0.0006$), 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度増加 ($P < 0.0001$), 血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体価上昇 ($P = 0.006$), 網状血小板比率増加 ($P = 0.001$), 血漿 TPO 正常又は軽度増加 ($P < 0.0001$) の 6 項目が抽出され, 単施設での検討結果が再現された。さらに, 多変量解析を行ったところ, 貧血の有無, 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度, 網状血小板比率, 血漿 TPO 濃度の 4 項目が ITP の診断と関連する独立した因子として抽出された。ITP の診断と関連する 6

項目のうち 3 項目以上を満たす場合を陽性とする, 感度 96%, 特異度 79%, 陽性的中度 94%, 陰性的中度 83%であった。

D. 考察

単施設, 多施設いずれの前向き試験でも貧血なし, 白血球数正常, 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度増加, 血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体価増加, 網状血小板比率増加, 血漿 TPO 正常または軽度増加 (300 pg/mL 未満) が将来の ITP の診断を予測する因子として抽出された。これら 6 項目中 3 項目以上を陽性とする, いずれの対象でも感度は 96%と高かった。多施設試験で特異性は 79%とやや低かったが, この結果を踏まえて表 1 に示す診断基準案を提案した。今後も継続して多彩な臨床背景を持った多数例のデータを集積し, 必要に応じて現在の基準案を見直していく必要があり, 専門医のコンセンサスを得ていかなければならない。さらに, 診断基準に用いるアッセイは臨床の現場で必要に応じて正確に行える必要があり, そのための検査システムの確立と保険収載も重要な課題である。

E. 結論

ITP の診断と関連する臨床検査を組み合わせることで, 積極的に ITP を診断する診断基準の作成が可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

<論文発表>

- 1) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol* 168:3675-3682, 2002
- 2) Kuwana M, Okazaki Y, Kajihara M, Kaburaki J, Miyazaki H, Kawakami Y, Ikeda Y. Autoantibody to c-Mpl (thrombopoietin receptor) in systemic lupus erythematosus: relationship to thrombocytopenia with megakaryocytic hypoplasia. *Arthritis Rheum* 46:2148-2159, 2002
- 3) Kuwana M, Kawakami Y, 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* 101:621-623, 2003
- 4) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y. Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is a sensitive and specific test for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* 114:322-325, 2003
- 5) Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ishii M, Ikeda Y, Kuwana M. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. *Hepatology* 37:1267-1276, 2003
- 6) Nomura S, Kuwana M, Ikeda Y. Induction of T-cell tolerance in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura by single injection of humanized monoclonal antibody to CD40 ligand. *Autoimmunity* 36:317-319, 2003
- 7) Kuwana M, Nomura S, Fujimura K, Nagasawa T, Muto Y, Kurata Y, Tanaka S, Ikeda Y. The effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 103:1229-1236, 2004
- 8) Satoh T, Pandey JP, Okazaki Y, Yasuoka H, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. Single nucleotide polymorphisms of the inflammatory cytokine genes in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 124:796-801, 2004
- 9) Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of ITP. *Int J Hematol* 81:106-112, 2005
- 10) Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study. *Am J Med*, 印刷中

- 11) 桑名正隆: 血小板減少症と抗リン脂質抗体、抗血小板抗体. リウマチ科 28: 340-347, 2002
 - 12) 桑名正隆, 池田康夫: ステロイド/摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガンドを標的とした治療法. 臨床血液 44:82-89, 2003
 - 13) 桑名正隆: ITP に関する免疫学的研究の進歩. 日本臨床 61:670-675, 2003
 - 14) 桑名正隆: CD40/CD154 相互作用遮断による Tr 細胞の誘導. 臨床免疫 39:228-231, 2003
 - 15) 桑名正隆: 自己免疫疾患における CD40/CD154 シグナル阻害療法. 日本臨床免疫学会会誌 26:259-266, 2003
 - 16) 桑名正隆, 池田康夫: 自己免疫疾患に対する抗 CD154 抗体療法. 最新医学 58:81-87, 2003
 - 17) 桑名正隆: ITP の発症機序と新たな治療戦略. 医学のあゆみ 209:93-97, 2004
 - 18) 桑名正隆: 特発性血小板減少性紫斑病の分子病態. 炎症と免疫 12:16-23, 2004
 - 19) 桑名正隆: 自己免疫疾患の遺伝子学. 最新医学 59:78-92, 2004
 - 20) 桑名正隆, 池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病. Molecular Medicine 41:1535-1541, 2004
 - 21) 棚井千春, 壹岐聖子, 中原史雄, 飯島喜美子, 臼杵憲祐, 桑名正隆, 浦部晶夫: Rituximab が有効であった難治性特発性血小板減少性紫斑病. 臨床血液 45:1181-1186, 2004
 - 22) 桑名正隆: 特発性血小板減少性紫斑病における自己抗体産生の分子機構とその制御. 分子細胞治療 3:27-31, 2004
 - 23) 桑名正隆, 池田康夫: ITP の免疫学的発症機序とそれに基づいた診断基準作成の試み. 血液フロンティア 14:25-33, 2004
 - 24) 桑名正隆: *Helicobacter pylori* 感染と特発性血小板減少性紫斑病 (ITP). 感染・炎症・免疫 34:51-53, 2004
 - 25) 桑名正隆: CD40 および CD40 リガンド. 臨床免疫 43:39-46, 2005
- <学会発表>
- 1) 桑名正隆, 池田康夫: ステロイド/摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガンドを標的とした治療. 第 44 回日本臨床血液学会総会 (横浜). 2002. 9.
 - 2) 桑名正隆, 朝日厚子, 鈴木秀和, 正岡建弘, 岡崎有佳, 池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) と *H. pylori* 感染 -*H. pylori* 陰性例での除菌療法の結果から-. 第 10 回日本ヘリコバクター学会 (東京). 2004. 7.
 - 3) 桑名正隆, 池田康夫: ITP の免疫動態と新たな治療標的. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 (京都). 2004. 9.
 - 4) 朝日厚子, 桑名正隆, 岡崎有佳, 鈴木秀和, 正岡建弘, 河上裕, 池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) と *H. pylori* 感染 -*H. pylori* 陰性例での除菌療法の結果から-. 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 (京都). 2004. 9.
 - 5) 岡崎有佳, 桑名正隆, 村田満, 池田康夫: 各種血小板減少症における抗 GPIb 抗体産生 B 細胞の検出. 第 66 回日本血液学会総

- 会・第46回日本臨床血液学会総会（京都）.
2004. 9.
- 6) Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ikeda Y, Ishii H, Kuwana M: Accelerated platelet turnover in patients with liver cirrhosis. The 54rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (Boston). 2003. 10.
- 7) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, Fujisawa K, Wada H, Nagasawa T, Nomura S, Kojima T, Yagi H, Ikeda Y: Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of chronic ITP: results of a multicenter prospective study. The 46th American Society of Hematology Annual Scientific Meeting (San Diego). 2004. 12.
- 8) Asahi A, Kuwana M, Suzuki H, Okazaki Y, Masaoka T, Ikeda Y: Therapeutic action of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) eradication in patients with chronic ITP—lessons from eradication therapy on *H. pylori*-negative patients. The 46th American Society of Hematology Annual Scientific Meeting (San Diego). 2004. 12.
- 9) Yamazaki R, Kuwana M, Okazaki Y, Kawakami Y, Ikeda Y, Okamoto S: Impaired platelet production and autoantibody-mediated platelet destruction are two major causes for prolonged thrombocytopenia after allogeneic HSCT. The 46th American Society of Hematology Annual Scientific Meeting (San Diego). 2004. 12.
- 10) Kuwana M: Extra-digestive in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) infection. The 4th Annual Conference of Korea-Japan Joint Meeting on *Helicobacter* Infection (Beppu). 2005. 2.
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
なし。

表 1. ITP の診断基準案

-
1. 血小板減少 (10万/ μ L以下)。
 2. 末梢血塗沫標本で3系統すべてに明らかな形態異常を認めない。
 3. 以下の検査所見のうち3), 4), 5)のいずれかを含む3つ以上を満たす。
 - 1) 貧血がない。
 - 2) 白血球数が正常。
 - 3) 末梢血中の抗GPIIb-IIIa抗体産生 B 細胞の増加。
 - 4) 血小板関連抗GPIIb-IIIa 抗体の増加。
 - 5) 網状血小板比率の増加。
 - 6) 血漿トロンボポエチンは軽度上昇にとどまる (<300 pg/mL)。
 4. 他の免疫性血小板減少性紫斑病 (SLE, リンパ増殖性疾患, HIV感染症, 肝硬変, 薬剤性など) を除外できる。
-

慢性 ITP の診断には上記の 4 項目全てを満たすこと。

ただし, 4 項目を満たしても ITP として非典型的な所見を認める場合は骨髄検査を行うことが望ましい。

蛍光ペプチド基質を用いた ADAMTS13 活性測定法の開発

分担研究者 宮田敏行(国立循環器病センター研究所・病因部・部長)
研究協力者 小亀浩市(国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室長)
研究協力者 坂野史明(国立循環器病センター研究所・脈管生理部・室員)

研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、異常高分子量フォンビルブランド因子(VWF)マルチマーによる血小板凝集の亢進が原因であり、細小血管に生じた血小板血栓が種々の臨床症状をもたらす。異常高分子量 VWF マルチマーは、血漿 VWF 切断酵素 ADAMTS13 の活性が著減することで増加する。TTP の発症予知や溶血性尿毒症症候群との鑑別診断には、ADAMTS13 活性の測定が有用とされるが、従来法は煩雑な操作と時間を必要とする。最近我々は、VWF の部分配列 73 残基が ADAMTS13 の特異的基質となることを見出し、従来法より簡便な活性測定法を開発した。本年度は、化学修飾された VWF73 を合成することにより、さらに簡便で定量的な測定法を確立した。臨床検査レベルでの普及が期待される。

1. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、フォンビルブランド因子(VWF)切断酵素 ADAMTS13 の先天的および後天的欠乏によって惹起される。ADAMTS13 は、2価金属イオン要求性のメタロプロテアーゼであり、VWF の A2 ドメイン内に位置する Y1605-M1606 間を特異的に切断する。通常、ADAMTS13 の活性によって VWF マルチマーのサイズは最適化されているが、ADAMTS13 活性が著減すると、異常高分子量 VWF マルチマーが増加し、病的血栓が生じる。ADAMTS13 活性の測定は、TTP 診断にとってきわめて重要な判断基準になり、また発症の予知にも役立つことが期待されている。これまで、ADAMTS13 活性の測定法がいくつも報告されているが、いずれも時間がかかる

方法であった。我々は、従来法の問題を克服するため、新しい活性測定法の確立をめざした。

2. 研究方法

ADAMTS13 の特異的基質となる 73 残基領域(VWF の D1596-R1668)の P7 位(Q1599)を 2-(N-methylamino)benzoyl(Nma)で修飾した 2,3-diaminopropionic residue(A2pr)に、P5'位(N1610)を 2,4-dinitrophenyl(Dnp)で修飾した A2pr にそれぞれ置換したペプチド FRETs-VWF73 を化学合成した。これを緩衝液に溶解し、96 ウェルプレート上で血漿と混合した。各ウェルの蛍光を 340nm 励起/450nm 測定用フィルターを備えたプレートリーダーで経時

的に測定することにより、切断活性を測定した。

3. 研究結果

FRETS-VWF73 を正常血漿と反応させたところ、反応時間依存的かつ血漿用量依存的な蛍光値の上昇が見られた。種々のプロテアーゼ阻害剤の影響を受けないこと、2価金属イオンキレート剤で完全に阻害されること、TTP 患者由来の血漿で蛍光値が変化しないことなどから、FRETS-VWF73 は血漿中の ADAMTS13 特異的に切断されることが示唆された。緩衝液の組成を最適化した結果、1時間の反応で定量的に測定できるようになった。本方法で種々の患者血漿の ADAMTS13 活性を測定したところ、先天性および後天性 TTP 患者では活性が著減しており、溶血性尿毒症症候群や播種性血液凝固症候群患者では活性が観察された。

4. 考察

ADAMTS13 に特異的な最小基質 VWF73 に蛍光基 Nma と消光基 Dnp を導入することにより、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 現象を利用した測定系を構築することに成功した。基質溶液と血漿を混合し、蛍光プレートリーダーで測定するのみという、ごく簡単な操作で完了する。反応時間は1時間で済むため、解析時間を含めても全行程は1時間半～2時間で終了する。したがって、本法は従来法より格段に簡便化されているということができ、臨床検査レベルでの普及が期待される。実際、平成17年4月開始を目標に、国内の臨床検査会社が本法の受託検査を実施する体制を整えており、また、海外からも多くの問い合わせが来ている。米国血液学会の教育講演会で本法を紹介し、その普及に務めた。今後、多施設で有用性が評価検討され、

TTP 診断のための強力な指標となることが期待される。

5. 結論

ADAMTS13 に特異的な消光性蛍光基質 FRETS-VWF73 を開発し、血中 ADAMTS13 活性の簡便かつ定量的な測定法を確立した。

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表

7-1. 論文発表

Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T : Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem* 279 : 30896-30903, 2004.

Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN : Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* : 407-423, 2004.

Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T : FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*, In press.

7-2. 学会発表

Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T : Development of ADAMTS13 enzymatic assay. *Gordon Research Conferences 'Hemostasis'*, Waterville, USA, July, 2004.

Banno F, Kokame K, Okuda T, Kaminaka K, Soejima K, Miyata T : Genetic and functional characterization of mouse ADAMTS13. Gordon Research Conferences 'Hemostasis', Waterville, USA, July, 2004.

宮田敏行・小亀浩市 : ADAMTS13 酵素活性と血栓性血小板減少性紫斑病. 第 23 回日本臨床化学会夏期セミナー, 鹿児島, 2004 年 7 月.

Soejima K, Matsumoto M, Banno F, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y, Nozaki C, Nakagaki T : Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) -structure and function relationship. Xth Congress of the International Society of Hematology, Asian-Pacific Division, Nagoya, September, 2004.

小亀浩市 : 先天性および後天性の血栓性血小板減少性紫斑病. 第 66 回日本血液学会総会, 京都, 2004 年 9 月.

坂野史明・小亀浩市・奥田智彦・宮田敏行 : マウス ADAMTS13 の完全欠損は TTP 発症の十分条件にならない. 第 77 回日本生化学会大会, 横浜, 2004 年 10 月

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行 : 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, 京都, 2004 年 11 月.

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集会, 奈良, 2004 年 11 月.

坂野史明・小亀浩市・奥田智彦・宮田敏行 : ADAMTS13 の欠損だけではマウスは血栓性血小板減少性紫斑病を発症しない. 第 27 回日本血栓止血学会学術集会, 奈良, 2004 年

11 月.

Miyata T: New ADAMTS13 assays and applications. American Society of Hematology, 46th ASH Annual Meeting and Exposition, Education program, Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. San Diego, USA, December 2004.

8. 知的財産権の出願・登録

8-1. 特許取得

なし

8-2. 実用新案登録

なし

8-3. その他

なし

先天性アンチトロンビン欠損症 —血栓症の遺伝的背景—

分担研究者 京都府立医科大学 輸血・細胞医療部 辻 肇

研究要旨

先天性AT欠損症と診断された56家系の欠損患者において遺伝的解析を行った。Sasの分類によるタイプI欠損症（古典的欠乏症）は14家系、タイプII欠損症（分子異常症）は11家系、抗原量が不明のためタイプを確定できないものが31家系あった。さらに、タイプI欠損症において遺伝子異常が不明のものが6家系（43%）に認められ、タイプII欠損症においては1家系（9%）であった。また、エクソン6のAla384(GCA)のPro(CCA)への1塩基置換によるアミノ酸置換例が見い出され、AT-Charleville、Cambridge、Vicenza、Sudburyと同様の変異でプロテアーゼ阻害活性に異常を認める極めて稀な症例であった。

1. 研究目的

昨年度の本調査研究において、先天性アンチトロンビン（AT）欠損症患者を対象にして、血栓症発症の臨床的背景の検討を行った。一方、先天性AT欠損症患者の遺伝子解析が国内外において行われており、明らかにされた遺伝子異常は、欠損症における血栓症の発症機序を解明するうえで、また診断を確定するうえで重要と考えられる。しかし、欧米人において同定された遺伝的背景が、直ちに日本人集団に適用できるものではなく、血栓症発症に関与する血栓性素因としての遺伝的背景を日本人集団において明らかにすることが重要である。また、ヒト肝細胞（HuH-7）を用いた基礎的検討において、RNA/DNAオリゴヌクレオチド(RDO)法により細胞核内への遺伝子導入が可能であり、本欠損症おける

能であり、本欠損症における変異遺伝子の修正が将来可能となることも予測される。現在まで進められている遺伝子解析結果は、今後の治療にも結びつくものでもあり、その成績をまとめて報告する。

2. 研究方法

先天性AT欠損症と診断された56家系の欠損患者において遺伝的解析を行った。遺伝子解析は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理方針（平成13年3月29日）」を遵守し、倫理委員会での承認を受けた。

3. 研究結果

1) AT欠損症のタイプ（表1）

AT欠損症の分類として、SasおよびLaneの分類が広く用いられている。Sasの分類は、免疫学的に測定される抗原量と活性によるものであり、タイプI欠損症（古典的欠乏

Sas		Lane		
Type I	14	I	8	43%
		ND	6	
Type II	11	II-HBS	2	9%
		II-RS	6	
		II-PE	2	
		ND	1	
ND	31	I	8	65%
		II-HBS	3	
		ND	20	
		56		

表1 AT欠損症のタイプ

Type I : タイプI 欠損症 (古典的欠乏症)、Type II : タイプII 欠損症 (分子異常症)、HBS : ヘパリン結合部位に異常を認めるもの、RS : 反応部位に異常を認めるもの、PE : 多面的影響を認めるもの、ND は確定できなかったものを示す。

症) は 14 家系、タイプ II 欠損症 (分子異常症) は 11 家系、抗原量が不明のためタイプを確定できないものが 31 家系あった。さらに、タイプ I 欠損症において、遺伝子異常が同定されたものは 8 家系あったが、不明のものが 6 家系 (43%) 認められた。一方、タイプ II 欠損症の 11 家系においては、ヘパリン結合部位に異常を認めるもの (HBS) が 2 家系、反応部位に異常を認めるもの (RS) が 6 家系、多面的影響を認めるもの (PE) が 2 家系認められた。遺伝子異常が同定されないものは 1 家系 (9%) に過ぎなかった。抗原量が不明のため

タイプを確定できないもの (31 家系) のうち、8 家系はタイプ I、3 家系はタイプ II と確定された。

2) 症 例

患者は、19才の男性。既往歴に特記すべきものは認められない。家族歴として、祖父が血栓性静脈炎のため治療中である (図 1)。発端者を含めて、3 世代 4 名に AT 欠損を認める。現病歴では、平成 15 年 4 月頃より、右下腿部疼痛を自覚し、5 月 6 日に呼吸困難と意識消失を認めた。臨床検査成績 (表 2) から AT 分子異常症が疑われ、血栓マーカーの上昇、胸部 CT 所見等より肺血栓

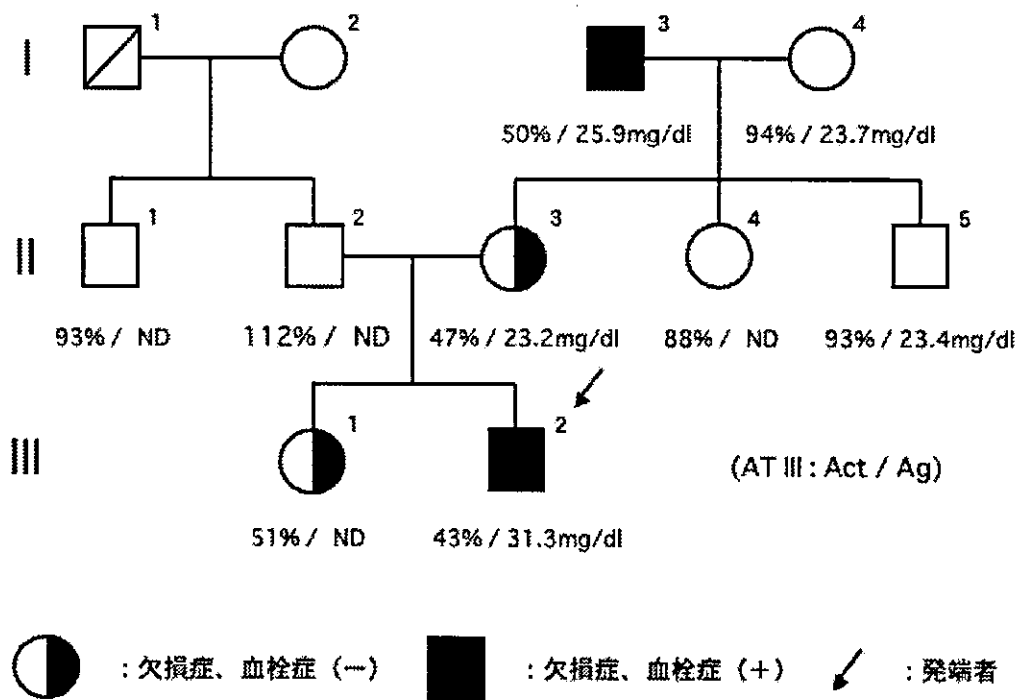


図1 先天性 AT 欠損症の家系図

WBC	13,820	/ μ L	PT	16.9	sec
RBC	485	$\times 10^4$ / μ L	PT-INR	1.96	
Hb	14.9	g/dl	APTT	39.5	sec
Ht	41.4	%	Fbg	171	mg/dl
Plts	13.2	$\times 10^4$ / μ L	D-D	30<	μ g/dl
			TAT	60<	ng/ml
			AT : Ag	31.3	mg/dl
ANF	(-)		AT : Act	43	%
LA	1.38		PC;Act	48	%
Anti-CL · β GP	1.2	U/ml	PS;Act	116	%

表2 臨床検査成績

塞栓症と診断された。血栓溶解療法、両肺動脈経カテーテル的血栓除去術、抗凝固療法を施行し、6月5日退院した。

遺伝子解析においては、エクソン6において Ala 384 (GCA) のPro (CCA) への、1塩基置換によるアミノ酸置換を認めた (図2)

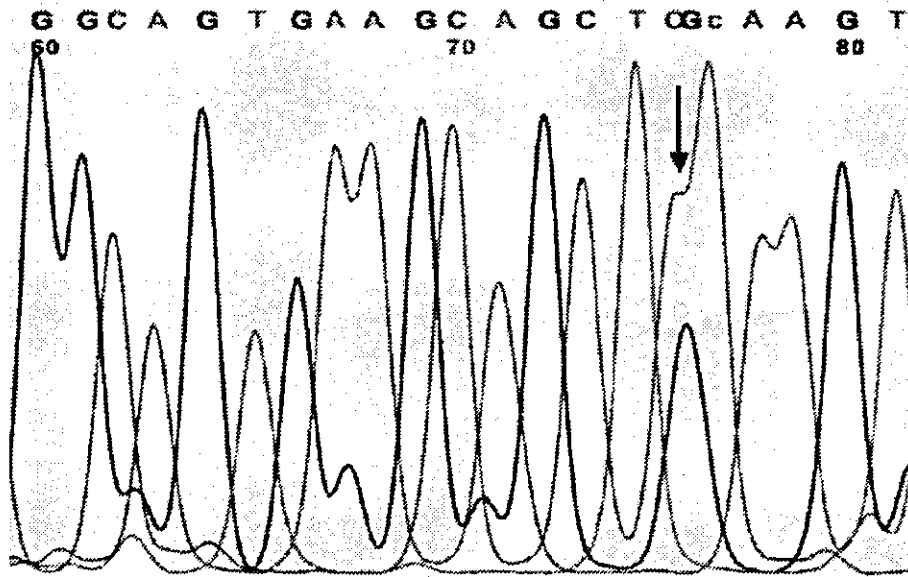


図2 エクソン6の遺伝子解析結果
Ala384(GCA) とともにPro(CCA)への変異を認める。

4 / 5. 考察および結論

先天性AT欠損症と診断された56家系の欠損患者において遺伝的解析を行った。AT欠損症の分類としては、Sas および Lane の分類が広く用いられている。Sas の分類は、免疫学的に測定される抗原量と活性によるものである。一方、Lane による分類

は、遺伝子異常部位から分類したものである。今回の検討において、タイプI欠損症(古典的欠乏症)は14家系、タイプII欠損症(分子異常症)は11家系、抗原量が不明のためタイプを確定できないものが31家系あった。さらに、タイプI欠損症において遺伝子異常が不明のものが6家系

(43%) に認められ、タイプ II 欠損症においては、遺伝子異常が同定されないものは 1 家系 (9%) に過ぎなかった。タイプ I 欠損症においては、今回の主としてエクソンの塩基配列を主体とする解析では見出せない異常により欠損が起る可能性がタイプ II 欠損症に比べて高いことが示唆された。また、提示した症例は、エクソン 6 の Ala384(GCA) の Pro(CCA) への 1 塩基置換によるアミノ酸置換例であり、AT - Charleville、Cambridge、Vicenza、Sudbury と同様のアミノ酸変異でプロテアーゼ阻害活性に異常を認める極めて稀な症例である。

- 6. 健康危険情報
なし
- 7. 研究発表
 - 1) 論文発表
なし
 - 2) 学会発表
なし
- 8. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
 - 1) 特許取得
なし
 - 2) 実用新案登録
なし
 - 3) その他
なし

平成16年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業
「血液凝固異常症に関する調査研究班」
班長：池田康夫 慶応義塾大学医学部
分担研究報告書

敗血症 DIC の病態と線溶系因子

分担研究者 坂田洋一（自治医科大学医学部分子病態研究部教授）
研究協力者 窓岩清治（自治医科大学医学部分子病態研究部講師）

研究要旨

重症感染症に伴う DIC は、微小血栓に起因する虚血障害により多臓器不全を合併しやすく、致命的な病態へと進展することが多い。感染症症例で SIRS 基準を満たした病態、いわゆる敗血症を基礎疾患とする敗血症 DIC 症例 117 例と非敗血症 DIC 症例 1,627 例を対象として、重症感染症に伴う DIC の早期診断、病態および予後を把握する上で有用な新規線溶系分子マーカーを検討した。その結果、（1）敗血症 DIC では、血漿フィブリノゲン値が高く、血清 FDP の増加が抑制されている状態にある。（2）線溶系分子マーカーである PIC、D-ダイマーの変動が少ない。（3）敗血症 DIC における線溶反応の抑制は、血漿 PAI-1 の増加に起因する。（4）血漿 PAI-1 は、臓器障害の程度および診断 28 日後の予後と良く相関することが明らかとなった。これらのことから、敗血症 DIC を早期診断するためには、血漿 PAI-1 等の新規線溶系分子マーカーを加えた診断が有用である可能性が示された。

1. 研究目的

成人以降に出現する原因不明の血栓症の一因として、例えば悪性腫瘍を基礎疾患とする“慢性”播種性血管内凝固 (DIC) は、鑑別すべき重要な病態である。本研究において、DIC の血栓形成に関与する線溶系因子の役割を検討した。特に、重症感染症に伴う DIC は、微小血栓に起因する虚血障害により多臓器不全を合併することが多い。感染症の治療が肝要であるものの、そのコントロールは必ずしも容易ではない。このような場合、併発する DIC に対して可及的に抗凝固療法を施

されなければ、致命的な病態へと進展することが多い。旧厚生省 DIC 診断で用いられているグローバルマーカー（血小板数、プロトロンビン時間比、血漿フィブリノゲン値および血清 FDP) のみを用いた診断基準は、感染症に併発する DIC を至適な時期に診断し抗凝固療法を開始するための十分な基準とは必ずしもいえない。本研究では、感染症症例で Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) 基準を満たした病態を敗血症と定義し、敗血症を基礎疾患とした DIC (敗血症 DIC) に対して、その早期診断、病態お

よび予後を把握する上で有用な新規線溶系分子マーカーを検討することを目的とする。

2. 研究方法

1984年から2004年までの当研究施設の疾患データベースに登録されている症例の中で、旧厚生省の診断基準でDICないしはDIC疑いと診断される1,744症例を対象とした。全対象症例において、DICをきたす基礎疾患の検索とともに、凝固線溶系検査項目、補助的検査項目（トロンビン-アンチトロンビン III 複合体：TAT、プラスミン- α 2プラスミンインヒビター複合体：PIC、D-ダイマー）、およびPAI-1について非敗血症DICと敗血症DICとの2群間での比較解析を行った。さらに敗血症DIC症例では、DIC診断時の臓器障害の指標であるSOFAスコアと、診断後28日目の予後についても評価項目とした。

統計解析は、Mann-Whitney's U-test およびone-way ANOVAによる検定を用いた。

(倫理面への配慮)

臨床検体の取り扱いに際して、個人情報保護には充分留意し、各検体を匿名化した上で、諸検査を施行した。

3. 研究結果

血液培養の陽性症例は、全敗血症症例の37.8%で、グラム陽性菌の単独感染症は28.5%、グラム陰性菌の単独感染は36.5%であった。グラム陽性菌を起炎菌とする敗血症DIC症例のSOFAスコアは、グラム陽性菌による敗血症DIC症例に比較して有意であった。

敗血症DIC症例の血漿フィブリノゲン

濃度は、非敗血症DICと比較して有意に高値を示す一方で、血清FDP値は、敗血症DIC症例で有意に低値であった。線溶系分子マーカーのうちプラスミン- α 2プラスミンインヒビター複合体とD-ダイマーとは、いずれも敗血症DIC群で有意に低下していた。一方、敗血症DIC症例におけるPAI-1値は、非敗血症DIC症例と比して、有意に高値であった。

敗血症DIC症例において血漿PAI-1値とSOFAスコアの関係を見ると、血漿PAI-1値が90 ng/mL以上の群ではSOFAスコアが9点であるのに対して、血漿PAI-1値が30 ng/mL未満の群の4.6点と比較して、SOFAスコアが有意に高値を示していました。さらにDIC診断後28日目の死亡率の比較では、血漿PAI-1値が30 ng/mL未満の敗血症DIC例では死亡例がみられないのに対して、90 ng/mL以上の群での死亡率が約65%と、他の群に比較して有意に高値を示した。

4. 考察

グラム陰性菌による敗血症DIC症例ではグラム陽性菌によるDIC症例に比較してSOFAスコアが有意に高値を示していた。このことは、グラム陰性菌による敗血症DICでは多臓器不全を伴いやすいことを示しており、起炎菌の検索が、敗血症の重症度を知る上でいかに重要であるかを示唆するものである。

敗血症DICでは、非敗血症DICに比較してフィブリノゲン値が高く、FDPの増加が抑制されていることから、敗血症DICの病態が診断基準上の加点に結びつきにくいことを示している。さらにPIC、D-ダイマーなどの線溶系分子マーカーも、敗血症DICでの変動が少なくために、

DIC の診断に寄与する可能性が少ないものと考えられる。

PAI-1 は、プラスミノゲンアクチベータの特異的阻害因子であり、線溶反応の開始段階を制御する重要な生理的調節因子です。敗血症などの重症感染症において、PAI-1 は重要なキーファクターである。これらの病態では PAI-1 の病的な増加を伴うため、生理的な線溶反応が抑制され、止血栓の除去障害をきたすことが示唆されている。本研究では、敗血症 DIC 症例では非敗血症 DIC 症例と比較して、血漿 PAI-1 値が有意に増加していることが明らかにされただけでなく、DIC 診断時における血漿 PAI-1 値の多寡が、臓器障害と予後判定の重要な指標となる可能性が示された。

5. 結論

血漿 PAI-1 値は、敗血症 DIC 症例における臓器障害の程度および予後と良く相関していることが明らかとなった。敗血症 DIC を早期診断し、病態を把握し予後を判定するためには、血漿 PAI-1 値等の新規線溶系分子マーカーを加えた診断が有用である可能性が示唆された。

6. 健康危険情報

特記事項なし。

7. 研究発表

A. 論文発表

Hamano A, Ueda M, Ueno Y, Tanaka S, Mimuro J, Sakata Y.: Latex Immunoturbidimetric Assay for Soluble Fibrin Complex. *Clinical Chemistry*. 51(1) 183-188,2005.

Satoh Y, Kita H, Kihira K, Mutoh H, Osawa H, Satoh K, Ido K, Sakata Y, Sugano K.: Gastrointestinal Angiodysplasia in a Patient with Type2 von Willebrand's Disease and Analysis of Exon 28 of the von Willebrand Factor Gene. *Am J Gastroenterology*. 99:2495-2498,2004.

Iimura O, Takahashi H, Yashiro T, Madoiwa S, Sakata Y, Asano Y, Kusano E.:Effect of ureteral obstruction on matrix metalloproteinase-2 in rat renal cortex. *Clin Exp Nephrol*. 8(3)223-9,2004.

Sejima T, Madoiwa S, Mimuro J, Sugo T, Ishida T, Ichimura K, Sakata Y.: Expression profiles of fibrinolytic components in nasal mucosa. *Histochem Cell Biol*. 122 (1)61-73, 2004.

Kikuchi J, Mimuro J, Ogata K, Tabata T, Ueda Y, Ishiwata A, Kimura K, Takano K, Madoiwa S, Mizukami H, Hanazono Y, Kume A, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y.: Sustained transgene expression by human cord blood derived CD34⁺ cells transduced with simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vectors carrying the human coagulation factor VIII gene in NOD/SCID mice. *J Gene Med*. 6(10):1049-1060,2004.

Madoiwa S, Yamauchi T, Hakamata Y, Kobayashi E, Arai M, Sugo T, Mimuro J, Sakata Y.:Induction of immune tolerance by neonatal intravenous injection of human factor VIII in murine hemophilia A.

J.Thromb.Haemost. 2(5)754-762, 2004.

Hamano A, Mimuro J, Aoshima M, Itoh T, Kitamura N, Nishinarita S, Takano K, Ishiwata A, Kashiwakura Y, Niwa K, Ono T, Madoiwa S, Sugo T, Matsuda M, Sakata Y: Thrombophilic dysfibrinogen Tokyo V with the amino acid substitution of γ Ala327 Thr: formation of fragile but fibrinolysis-resistant fibrin clots and its relevance to arterial thromboembolism. Blood 103(8)3045-3050, 2004.

Mimuro J, Mizukami H, Ono F, Madoiwa S, Terao K, Yoshioka A, Ozawa K, Sakata Y. : Specific detection of human coagulation factor IX in cynomolgus macaques. J.Thromb.Haemost. 2:275-280, 2004.

Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, Tabata T, Ueda Y, Naito M, Madoiwa S, Takano K, Hasegawa M, Ozawa K, Sakata Y. : Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agmTYO1-based vector for hemophilia A gene therapy. Gene Ther. 11:253-259, 2004.

Watanabe T, Minakami H, Sakata Y, Matsubara S, Sato I, Suzuki M.: Changes in Activity of Plasma Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Pregnancy. Gynecol Obstet Invest. 58(1):19-21, 2004.

B. 学会発表

松下卓、三室 淳、石渡 彰、窓岩清

治、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也 : Hemophilia A Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Dual Vector System: Improved FVIII activity by balanced expression of heavy and light chains of FVIII. 第 10 回日本遺伝子治療学会年次集会 2004.8/5-6 東京一橋会館

Mizukami, H, Mimuro, J, Ogura, T, Okada, T, Kume, A., Sakata, Y., Ozawa, K.: A novel method for in vivo gene transfer to adipose tissue using adeno-associated virus(AAV)vectors. The 10th Annual Meeting The Japan Society of Gene Therapy. 2004.8/5-6 東京一橋会館

窓岩清治、山内忠彦、袴田陽二、小林英司、新井盛夫、諏合輝子、三室 淳、坂田洋一 新生児血友病 A マウスに対するヒト第 VIII 因子の投与は T 細胞性アレルギーを誘導する 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9/17-19 国立京都国際会館

高野勝弘、三室 淳、水上浩明、石渡彰、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田洋一 PAI-1 promoter を用いた血管内皮細胞特異的ヒト第 IX 因子遺伝子導入と発現 第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 2004.9/17-19 国立京都国際会館

石渡 彰、三室 淳、水上浩明、高野

勝弘、柏倉裕志、大森 司、窓岩清治、
諏合輝子、久米晃啓、小澤敬也、坂田
洋一 第 VIII 因子欠乏マウスへのシ
ングル AAV1 ベクターをもちいた第
VIII 因子遺伝子導入と発現 第 66 回
日本血液学会総会・第 46 回日本臨床
血液学会総会 2004.9/17~19 国立
京都国際会館

水上浩明、三室 淳、小倉 剛、岡田
尚巳、久米晃啓、坂田洋一、小澤敬也：
AAV ベクターをもちいた脂肪組織へ
の in vivo 遺伝子導入法の開発 第
66 回日本血液学会総会・第 46 回日本
臨床血液学会総会 2004.9/17~19
国立京都国際会館

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 2004.11/18~20
奈良県新公会堂

小野智子、副島見事、窓岩清治、三室
淳、坂田洋一：フォンビルブランド切
断酵素抗原量測定 ELISA の開発およ
び各種疾患群における抗原量検討。
第 27 回日本血栓止血学会学術集会
2004.11/18~20 奈良県新公会堂

瀬嶋尊之、窓岩清治、三室 淳、諏合
輝子、大森 司、高野勝弘、石渡 彰、
柏倉裕志、石田 孝、市村恵一、坂田
洋一：鼻粘膜における線溶系因子の局
在とその役割 -特にアレルギー性炎
症の有無による差異-。 第 27 回日本
血栓止血学会学術集会

2004.11/18~20 奈良県新公会堂

大森 司、西井清行、萩原 淳、関戸
清貴、窓岩清治、諏合輝子、三室 淳、
坂田洋一：市販漢方薬“寿位”による
血小板減少. 第 27 回日本血栓止血学
会学術集会 2004.11/18~20 奈良県
新公会堂

諏合輝子、大森 司、窓岩清治、三室
淳、坂田洋一：損傷血管内皮細胞の修
復におけるフィブリンの役割. 第
27 回日本血栓止血学会学術集会
2004.11/18~20 奈良県新公会堂

Mimuro J, Ishiwata A, Kashiwakura Y,
Takano K, Ohmori T, Madoiwa S,
Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y.
Phenotype Correction of Hemophilia A
Mice with Adeno-Associated Virus
(AAV) Vectors Carrying the B Domain
Deleted Canine Factor VIII Gene. 46th
Annual Meeting of the American Society
of Hematology. Dec 6, 2004 San Diego,
USA

8. 知的財産権の出願・登録
特記事項なし。