

(3) 日本人の静脈血栓症におけるプロテイン S 徳島変異に関する調査研究

平成 14-16 年度の本研究班では、プロテイン S K196E 変異（成熟蛋白質番号では K155E 変異、プロテイン S 徳島変異）が、日本人の静脈血栓症の遺伝的背景（オッズ比=5.58、95%信頼区域=2.9-9.5, Blood, 2006）であることを明らかにした。時期を同じくして、九州大学の濱崎教授のグループも同様の結果を報告した（オッズ比=3.7、95%信頼区域=1.1-13.2, Clin.Biochem, 2005）。プロテイン S K196E 変異のヘテロ接合体の血中プロテイン S 活性を求めるため、地域一般住民 1,862 人のプロテイン S 活性を測定した。その結果、ヘテロ接合体のプロテイン S 活性（34 人、平均±SD=71.9±17.6%）は野生型アレル保有者の活性（1,828 人、87.9±19.8%）より低値を示した。ヘテロ接合体は先天的にプロテイン S 活性が低く、妊娠などのプロテイン S 活性の低下を招く後天性要因が加わると、静脈血栓症を発症しやすいと考えられた。

(4) 日本人でのプロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの欠乏症の遺伝子変異の調査研究

静脈血栓症患者や血栓症を発症していないもののプロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビン活性値が低い人の遺伝子解析が、本邦で行われている。これらの結果は、雑誌や学会で公表されているが、まとめた試みはなかった。これまでに本邦で行われたこれら 3 つの遺伝子解析の結果をまとめ、今後の資料とする。

(5) 第一期池田班の成果の英文誌への発表

プロテイン S K196E 変異が日本人の静脈血栓症のリスクであることを報告した。本変異は、日本人の 55 人に 1 人がヘテロ接合体と考えられた。

Kimura R, Honda S, Kawasaki T, Tsuji H, Madoiwa S, Sakata Y, Kojima T, Murata M, Nishigami K, Chiku M, Hayashi T, Kokubo Y, Okayama A, Tomoike H, Ikeda Y, Miyata T.

Protein S-K196E mutation as a genetic risk factor for deep vein thrombosis in Japanese patients. Blood. 2006;107(4):1737-1738.

2. 日本人の静脈血栓症の治療に関する調査研究

(1) ヘパリン自己注射の実態調査

表記のアンケート調査を下記の様に行った。

発送日 平成 17 年 12 月 16 日

発送施設 名古屋大学医学部保健学科 検査技術科学専攻 小嶋哲人 教授
〒461-8673 名古屋市東区大幸南 1-1-20

返信期限 平成 18 年 1 月 31 日

返信先 国立循環器病センター研究所 病因部 宮田敏行 部長
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

発送形態

厚生労働省難治性疾患克服研究班「血液凝固異常症」に関する調査研究班、主任研究者、池田康夫教授名の「ヘパリンの在宅自己注射に関するアンケート調査」のお願い（別紙）に、7名の分担研究者の名前を列記して、「ヘパリンの在宅自己注射の指導に関するアンケート調査（別紙）」を、返信用封筒とともに、下記の宛先に発送した。

発送先

1265 件

内訳

大学附属病院本院+500 床以上一般病院の血液内科・循環器内科・心臓血管外科・産婦人科 [316 x 4= 1264] および川崎先生より紹介のあった産婦人科医 1)

回収数

平成 18 年 2 月 24 日現在の回収数：602

回収率

47.6%

今後の予定：平成 18 年 5 月をめどにアンケート調査をまとめ、平成 18 年 7 月開催予定の本研究班の班会議にて結果を討議する。必要であれば、更に 2 次調査を行う。

（2）我が国における深部静脈血栓症後のワーファリン治療の実態調査

ワーファリンは、我が国においても血栓症予防、或いは血栓症再発予防に心・循環器系疾患、及び脳循環障害などに多用されているが、患者背景や予防目的などによりその使用量や使用期間は様々である。これらの点を踏まえ、実態調査を通して我が国におけるワーファリン使用の現状を把握し、次いでグループを選んでさらに詳細な解析を進め、有効なワーファリン療法について検討する。

（3）静脈血栓塞栓症の予防・診断・治療ガイドライン（阪大）の運用結果と考察

静脈血栓塞栓症の院内発症による訴訟問題の解決に向けて、大阪大学附属病院独自の「肺塞栓症と深部静脈血栓症に対する予防・診断・治療ガイドライン」の運用結果から、各学会および研究会のガイドラインの有する限界を明らかにした。そして、より正確な情報を社会に発信して誤解を解消し、医師と患者の相互理解を高めて医療の信頼性を高める方策を立てた。

倫理面への配慮

本研究の遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して行う。研究計画は当該施設の倫理委員会で審査を受け承認を受けた上で行う。研究対象者には人権擁護を配慮し、研究への参加は自由意思で書面にてインフォームドコンセントを得る。

(別紙)

厚生労働省難治性疾患克服研

「血液凝固異常症」に関する調査研

主任研究者 池田 康夫

「ヘパリンの在宅自己注射に関するアンケート調査」のお願い

本研究班におきましては、原因が明らかでない血栓症（特発性血栓症）の成因の解明、診断あるいは治療法の確立を研究目標のひとつとして、調査研究活動を行っております。

ヘパリンは、血栓症の治療ならびに予防において、もっとも広く用いられている有用な抗凝固薬であります。近年、在宅医療の普及に伴い、ヘパリンを在宅で患者自ら注射すること（ヘパリンの在宅自己注射）が不可欠な例も増加していると思われまます。

今般、ヘパリンの在宅自己注射に関するご意見を、貴診療科において血栓症治療に携わっておられます先生から賜り、安全で有用な治療法の確立に役立てたく存じます。ご多忙のところ、大変恐縮ではありますが、本アンケート調査にご協力賜りますようお願い申し上げます。

なお、勝手ではありますが調査結果の整理の都合上、同封の返送用封筒を用いて平成18年1月31日までにご回答いただければ幸いに存じます。

以上、よろしくようお願い申し上げます。

平成17年12月10日

慶応義塾大学医学部内科	池田康夫（主任研究者）
国立循環器病センター研究所病因部	宮田敏行
自治医科大学分子病態治療研究センター	坂田洋一
名古屋大学医学部保健学科	小嶋哲人
慶応義塾大学医学部中央臨床検査部	村田 満
大阪大学医学部心臓血管外科	川崎富夫
信州大学医学部保健学科	小林隆夫
京都府立医科大学輸血細胞医療部	辻 肇

ヘパリンの在宅自己注射の指導に関するアンケート調査（別紙）

血栓症の予防を目的としたヘパリンの在宅自己注射の指導について、お尋ねします。

（各 Q: いずれかの□にチェック、もしくは、空白部に自由記載をお願いします。）

まず、ご回答いただく先生のプロファイルをお教え下さい。（Q1-4）

Q1: 年 令

- 30 才未満、 30 才以上～40 才未満、 40 才以上～50 才未満、 50 才以上

Q2: 勤務先

- 大学附属病院、 病院、 医院・診療所、 その他（ ）

Q3: ベッド数

- 100 床未満、 100 床以上～500 床未満、 500 床以上～1,000 床未満、 1,000 床以上

Q4: 専門領域

- 内科系（ 血液内科、 循環器内科、 その他）
 外科系（ 一般外科、 心臓血管外科、 整形外科、 産婦人科、 その他）
 その他（ ）

Q5: ヘパリン自己注射を実施したことがありますか？

- ある （**Q6 以下にお進み下さい**）

- ない

「ない」とお答え頂いた先生にお尋ねします。

- ヘパリンの在宅自己注射が必要な症例はなかった。

- ヘパリンの在宅自己注射が必要だったが、経口抗凝固薬、抗血小板薬で代替した。

その理由をお教え下さい。

- 投与方法に関するエビデンス、指針がないため。

- 出血性副作用を危惧したため。

- 保険適用がないため。

- その他（ ）

ヘパリンの在宅自己注射は必要と考えられますか？

- 必要である 必要ない

ご協力、有難うございました。

ヘパリンの在宅自己注射を実施したことがあるとお答え頂いた先生にお尋ねします。

Q6: 対象疾患（複数回答可）

- 下肢深部静脈血栓症、 肺塞栓症、 大動脈瘤、 心臓弁、血管置換術後、
 習慣流産

- その他（ ）

Q7: 実施症例数（年間）

- 5 例未満、 5 例以上～10 例未満、 10 例以上～20 例未満、 20 例以上

Q8: 使用したヘパリンの種類

- 未分画ヘパリン（静注用）、 未分画ヘパリン（皮下注用）、 低分子量ヘパリン

- 低分子ヘパラン硫酸（ダナパロイドナトリウム）

Q9: 投与方法

- 皮下（ 1 回/日、 2 回/日、 その他）

- 静注（ 持続、 1 回/日、 2 回/日、 その他）

- その他

Q10: 投与量

- 固定用量（ ）単位/日

- 凝固能（ 全血凝固時間、 APTT、 その他）を測定して決定する

上記の検査結果が、投与後（ ）時間で、（ ）秒、あるいは（ ）倍に延長するのを目標にする。

- その他（ ）

・ 裏面に続く ・

Q11： 投与期間

- 1週間未満、 1週間以上～1ヶ月未満、 1ヶ月以上

Q12： 投与期間中のモニタリング

- しない

- する

- 全血凝固時間、 APTT、 その他 ()

上記の検査結果が、投与後 () 時間で、() 秒、あるいは () 倍

に延長するのを目標にする。

Q13： 副作用

出血性副作用

- なし

- あり (皮下出血、 血尿、 重篤な出血 (脳出血、消化管出血など) そ

の他)

その他副作用

- なし

- あり (HIT、 骨粗鬆症、 アレルギー、 その他)

Q14： 経費の負担

- 自費、 病院負担、 研究費、 その他 ()

Q15：ヘパリンの在宅自己注射を実施する上での問題点 (複数回答可)

- 治療指針がない

- 保険適用がない

- 簡便なモニタリング方法の開発

- その他 ()

Q : 16 ヘパリンの在宅自己注射で恩恵を受ける患者数をお聞かせ下さい (貴施設で)。

() 人

Q : 17 ヘパリンの在宅自己注射についてのご意見をお聞かせ下さい。

ご協力、有難うございました。

今後、さらに詳細な調査が必要な場合にご協力いただける方は、ご連絡先等のご記入をお願い致します。

ご氏名 : _____

ご所属施設名 : _____

同・住所 : _____

TEL : _____ FAX : _____

E-mail : _____

※ なお、ご不明な点など本調査に関してのお問い合わせは下記のいずれかまでお願い致します。

・京都府立医科大学 輸血細胞医療部 辻 肇 TEL 075-251-5891、FAX 075-251-5889

・名古屋大学 医学部 保健学科 小嶋 哲人 TEL 052-719-3153、FAX 052-719-3153

平成17年度 TMA研究班サブグループ報告書

藤村吉博* 奈良県立医科大学輸血部

*サブグループ長

宮田敏行 国立循環器病センター研究所

村田 満 慶應大学医学部血液内科

和田英夫 三重大学医学部臨床検査医学科

(研究協力者)

杉野 稔 東邦大学医学部衛生学

伊津野孝 東邦大学医学部衛生学

要旨

本研究班サブグループはTMA (thombotic microangiopathy、血栓性微小血管障害症) の中でも特に先天性の血栓性血小板減少性紫斑病 (congenital TTP or Upshaw-Schulman 症候群、USS) の患者発掘とその遺伝子解析に焦点を合わせてきた。この研究は今年度も継続して来たが、その中で妊娠を契機に血小板減少が生じ、その後TMAを発症し、精査にてUSSと診断された症例が5家系8症例あった。この結果は妊娠時の仮面血小板減少症の鑑別診断にADAMTS13活性の測定が必須である事を示している。またこれら研究の進展によって、ADAMTS13関連研究領域はより広範囲に、そしてより深くなった。この中には、迅速ADAMTS13活性測定法の開発、ADAMTS13の肝産生細胞の同定、慢性肝疾患におけるADAMTS13動態解析、生体肝移植に合併する血栓症の成因としてのADAMTS13の関与等が含まれ、近代医療で最も注目されている分野の問題点解決にADAMTS13が重要な位置を占めることになった。

研究目的

本研究サブグループは昨年度よりTMA (thombotic microangiopathy、血栓性微小血管障害症) 研究班と改称した。これは血液難病である血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)と溶血性尿毒症症候群(HUS)は臨床的には不可分な場合が多く、実際、共通の病態として、①細血管障害性溶血性貧血、②破壊性血小板減少、③血栓による臓器障害の3徴候を持ち、共にTMAのカテゴリーに

入るとされているからである。従来、本班は TMA の中でも特に先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群、USS) の患者発掘とその遺伝子解析に焦点を合わせていたが、この研究の進展に合わせて、その解析領域も広範囲となり、今年度の各班員と個々の研究目的は下記のごとくであった。

藤村吉博

- ・先天性及び後天性 TMA 患者の発掘 (継続)
- ・ADAMTS13 の肝臓での産生細胞の同定 (新規)
- ・慢性肝疾患での ADAMTS13 動態解析 (新規)
- ・迅速・汎用性 ADAMTS13 活性の ELISA 測定法の開発 (新規)

宮田敏行

- ・蛍光による ADAMTS13 活性測定法 FRETS-VWF73 の開発 (新規)
- ・USS の ADAMTS13 遺伝子解析 (継続)
- ・ADAMTS13 ノックアウトマウスの作成と解析 (新規)

村田満

- ・後天性 TMA の ADAMTS13 遺伝子解析 (継続)
- ・同定された ADAMTS13 遺伝子異常と血栓症の関係 (新規)

和田英夫

- ・全自動機器による TMA の破碎赤血球と網状血小板の測定 (新規)
- ・FRETS-VWF73 での TMA 検体の測定 (新規)
- ・TMA アンケートの全国調査 (継続)

研究方法 (倫理面への配慮)

① **TMA 患者の発掘・登録 (継続)** : 2001 年にグループリーダーの藤村班員の所属施設 (奈良医大輸血部) で TMA 解析についてのホームページ <<http://www.naramed-u.ac.jp/~trans/>> を開設した。この利用者は連日 10 - 15 名である事が記録されているが、その中で毎日 3 - 5 名の患者血液検体が全国の医療施設から患者情報と共に送られてきている。これらの検体について主に ADAMTS13 活性と同インヒビターを測定しているが、平成 17 年 11 月末で

の登録 TMA 患者数は 643 例であった (表 1)。

② **ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定**：1998 年 7 月—2005 年 3 月の間は、古典的な von Willebrand 因子マルチマー (VWFM) 解析法にて測定していたが、2005 年 4 月以降は VWFM 法に加えて後述の新規開発した ADAMTS13 活性測定 ELISA を導入し、迅速測定が可能となった。

③ **ADAMTS13 産生細胞の同定**：前年度に A10 と C7 と名付けた 2 種類の抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を作成した事を報告した。A10 は ADAMTS13 の disintegrin ドメインに、また C7 は thrombospondin-1(T)repeats ドメインの T7/8 に、各々エピトープがある。さらに A10 は IgG 終濃度 20 μ g/ml で ADAMTS13 活性を完全阻害したが、C7 は非阻害抗体であった。これらの抗体を用いた免疫染色と、cDNA プロローベを用いた in situ hybridization にて肝臓での産生細胞の同定を行った。

④ **ADAMTS13 遺伝子解析**：TMA 患者の ADAMTS13 遺伝子解析は患者の治療施設と、同遺伝子解析施設の双方の倫理委員会承認を経て実施している事は前年度に報告した。

研究結果と考察

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 46 例であった。うち 28 例 (23 家系) は同活性著減の USS で、残り 16 例は原因不祥であった。この内、妊娠の 2nd-3rd trimester に血小板減少が生じ、これをきっかけに、あるいはこの後 TTP を発症した例について相談があり、精査にて USS と診断した症例が 5 家系 8 症例あった。症例の中には発症後も TTP を正確に診断されていない例もあり、実際 ITP、Evans 症候群、妊娠中毒症、HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) 症候群、習慣性流産等と別途多彩な病名が付けられていた。多くの産婦人科医にこの現実を知らしめる事は重要かつ急務と考えられた。以下、その概略を紹介する。

【妊娠契機に発見された USS】 妊娠中の血小板数は大部分が正常域で推移するが、非妊婦に比べて僅かに低値を示す事が多い。このうち約 5~10% は妊娠月数の進行と共に血小板の減少傾向を認めるとされている。一方、妊娠月齢に応じて血中 VWF 量は増加し、妊娠末期一分娩直前には非妊娠時の 5~10 倍に著増する。さらに ADAMTS13 活性は非妊娠時の約 1/2 に低下する。この低下は恐

らく基質量の増加に伴う酵素量の消費と考えられるが、これにて酵素・基質均衡は基質超過多となり血栓側に傾く。しかし、通常この期間中に出血・血栓合併症を呈する事は殆ど無いため、正常妊婦においてはこの時期に血栓形成を防止する特異的な機構が働いているものと思われる。しかしながら、様々な先天性並びに後天性要因があると、血小板減少や血栓症が生じると考えられる。このうち、妊娠中毒症、ITP、DIC、HELLP 症候群等は後天性に生じる事は良く知られているが、先天性要因についてはこれ迄極めて限られたもの以外は知られていなかった。本研究サブグループは今回、前記のごとく、妊娠中〜末期の血小板減少等を契機に発見された USS 5 家系 8 症例を経験したが、その家系図を図 1 に、またその要旨を表 2 に記す。これらの特徴を短くまとめると、(1) 5 家系 8 症例は妊娠時に初めて USS と診断されているが、既往歴を詳細に検討してみると、幼小児期に血小板減少のエピソードがあったと思われる症例が殆どである。また、(2) 全例妊娠 20 週以降に血小板減少が顕著となり、それ以降の 20-30 週で早産や死産が引き起こされている。(3) TTP の 5 徴候が全部揃うのは、病状が進行してからである。また、発作時の血圧は全例正常であり、この点を留意すると、HELLP 症候群とは当初から鑑別可能との産科医の意見がある(信州大学医学部の小林隆夫先生との私信)。8 症例で 14 回の妊娠のうち、生児を得ているのは 4 症例 6 回のみある。このうち、USS 患者でありながら、双子を含む 4 人の生児を得ている家系 L の姉は、極めて稀な症例であり、特記すべきは全例アスピリンを内服し、早産ではあるが帝王切開にて生児を得ていた。しかし、かかる条件下でのアスピリンの効果についての EBM は確立されていない。家系 M 妹は予防的治療無く 2 人目の妊娠で生児を得ているが、詳細な情報は未だ得られていない。家系 K 妹、および家系 O 患者は FFP の定期輸注を行いながら生児を得ており、この酵素補充療法が現在のところ最も確実な出産法であると考えられる。ADAMTS13 遺伝子解析で、全例責任遺伝子の変異が確認されたが、これらの変異部位は各々家系毎に異なり、また全分子ドメインに見られて hot spot はなかった。また 3 姉妹を比較すると、各々が同じ遺伝子変異を持つ USS でありながら、臨床経過には発症時期を含めて差が見られた。これより、USS は疑い無く妊娠中に留意すべき「仮面血小板減少症(a masqueraded thrombocytopenia)」の代表の一つであり、血小板減少を示す妊婦では ADAMTS13 活性のスクリーニング測定は必須である事をここで改めて強調しておきたい。これら症例の ADAMTS13 遺伝子異常部位の同定は班員である国立循環器病センタ

一研究所の宮田敏行とその共同研究者である小亀浩市によってなされた。

② **ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立:** 前記の宮田班員と小亀らは2004年に ADAMTS13 にて切断される von Willebrand factor (VWF) の A2 ドメイン (VWF-A2) の最小基質であるアミノ酸 73 残基を同定し、これを大腸菌で発現した蛋白を GST-VWF73-His と命名した (図2)。この基質を用いた場合、酵素消化時に尿素やグアニジン塩酸などの蛋白変性剤は不要で、また短時間 (〜1 時間) で切断可能であることから、まず western blot で ADAMTS13 活性を定量する系が構築された。次に、彼らは VWF73 に蛍光基と消光基を導入した FRET-S-VWF73 測定法を開発した。測定限界は正常のほぼ 3% という値が得られており、その利便性より現在世界の研究所レベルのラボで使用されつつある。その他、この VWF73 のアミノ酸配列を利用した幾つかの測定法が報告されているが、当研究班の藤村とその共同研究者の加藤らは最近、GST-VWF73-His が ADAMTS13 にて切断を受けると GST-VWF10 と VWF63-His に分離し、その際 GST-VWF10 の C 末端アミノ酸残基 Tyr1605 が露出するので、この残基を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (N10-146) の作成に成功し、この抗体を用いて通常の ELISA 機器で定量できる簡便・迅速 ADAMTS13 活性測定系を完成した (図2と3)。この方法での検出限界は正常の 0.5% と超高感度で、また古典的 VWFM 法の測定値との相関も $r=0.85$ と良好であった (図4)。本法は輸血医療を行う病院レベルでの使用が有効であろう。

③ **ADAMTS13 産生細胞の同定:** ADAMTS13 の肝臓での産生細胞の同定については、最近、藤村らのグループの植村が星細胞 (旧 伊東細胞) である事を in situ hybridization による同 mRNA の局在と、抗 ADAMTS13 / 抗 α SMA モノクローナル抗体による二重蛍光免疫染色にて証明した。伊東細胞は肝臓の実質細胞と類洞内皮細胞の間に形成される Disse 腔内にあり、この内皮細胞に張り付いたような位置関係にあると云われている。また、伊東細胞の機能については古くからその細胞質に脂肪球を多く持つ事からビタミン A 貯蔵に関与する事、また肝臓の繊維化に重要との認識があったが、それらの相互関連性は未だ明瞭ではない。今回の発見は、肝繊維化が促進されるアルコール等の薬物や、ウイルス肝炎に続発する肝硬変等では患者血中の ADAMTS13 活性が著減するという最近

の植村らの報告とよく符合する。一方で、これら急性そして慢性肝疾患の患者血中のVWF量が500~1000%と著増している事はかなり前から良く知られているので、この酵素・基質均衡の破綻は、高ずり応力の発生する微小循環の環境下で、より血小板血栓側へと向かうものと推測している。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。

④ **ADAMTS13 遺伝子ノックアウトマウス**：宮田班員の個別研究にて紹介される予定なので、詳細は割愛し簡単な紹介にとどめる。即ち、人間のUSSとは異なり、マウスではADAMTS13遺伝子をノックアウトしてもこれだけではTMA症状は発来しない。しかし、マウス血中にはunusually large VWFM (UL-VWFM)が検出され、実際パラレルフロー実験にて高ずり応力を負荷すると血小板血栓が出来易く、prethromboticである事が確認されている。一方、ヒトUSSでは妊娠がTMA症状発来の引き金になるが、ノックアウトマウスでは妊娠してもTMA症状が出ず、ヒト-マウス間に「UL-VWFM依存性の血小板血栓形成調節機構」に何らかの根本的な機構相違がある事が想定される。

⑤ **生体肝臓移植とADAMTS13**：個別研究にて研究協力者の松本が報告するが、生体肝移植の前後、特に術後に破砕赤血球が出現し、血小板減少が見られる事は良く知られている。この機序が永く不明であったが、藤村班員—研究協力者の高は同移植例では直後にADAMTS13活性が低下しUL-VWFMが出現して、血小板減少が見られる事を報告した。この際、新鮮凍結血漿の輸注が奏功する事、一方で、他施設例ではあるが大量の「血小板輸血」を行った後、死亡例のある事が判明した。

結論

サブグループ代表の藤村班員のラボで集積しているTMA患者数は平成17年11月末で643例と膨大で、文献的にも一つのラボでのTMA集積数としては世界屈指である。この中から効率良く発見されたUSS患者とその家族(保因者)のADAMTS13遺伝子解析もグループ間の良好なコミュニケーションにて円滑に進んでいる。また、新たな展開として妊娠契機に発見されたUSSが5家系8症例いたのは大きな驚きであった。私共のラボに相談がある迄、妊婦側で正確な診断がなされていたのは皆無であったし、また胎児側も死産、早産のエピソードを反復し、「習慣性流産」等と全く異なった診断が産科医でなされている現実がある事を知り驚いた。即ち、本研究サブグループは当初、血液難病であるTTP

の病態解明から出発したが、その成果は先ず定型的 TTP (ADAMTS13 活性著減、同インヒビター陽性) に対する血漿交換療法の有効性について EBM を確立し、さらに現在はその根底にある「UL-VWFM 依存性の血小板血栓によって引き起こされる様々な病態」の解明へと、研究範囲が拡大しつつある。一方で、ADAMTS13 の産生細胞が肝星 (伊東) 細胞である事を同定した事は、肝硬変などでは同細胞が繊維化し、これより ADAMTS13 活性が著減し、末期には定型的 TTP と不可分な状態となる構図が見えて来た。これら病態解明の結果はその特異的治療法の選択に直接反映されるものと確信している。

健康危険情報

なし

研究発表 (発表誌名、巻号、頁、発行年等)

論文発表

1. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y. Novel monoclonal antibody-based immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. **Transfusion** (in press), 2006.
2. Ko S, Okano H, Matsumoto M, Ishizashi H, Uemura M, Tanaka K, Fujimura Y, Nakajima Y. Plasma ADAMTS13 activity may predict early adverse events in living donor liver transplantation: Observations in two cases. **Liver Transplantation** (in press), 2006.
3. Matsuyama T, Uemura M, Ishikawa M, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Morioka C, Fujimoto M, Kojima H, Yoshiji H, Fujimura Y, Fukui H. Increased von Willebrand factor over decreased ADAMTS13 activity may contribute to the development of liver disturbance and multiorgan failure in patients with alcoholic hepatitis. **Alcohol Clin Exp Res** (in press), 2006.
4. Shibagaki Y, Matsumoto M, Kokame K, Ohba S, Miyata T, Fujimura Y, Fujita T. Novel compound heterozygote mutations (H234Q/R1206X) of the ADAMTS13 gene in an adult patient with Upshaw-Schulman syndrome showing

- predominant episodes of repeated acute renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation** (in press), 2006.
5. Uemura M, Matsuyama T, Fujimoto M, Kojima H, Sakurai S, Ishii 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** 29: 264-71, 2005.
 6. Matsumoto M, Kawaguchi S, Ishizashi H, Yagi H, Iida J, Sakaki T, Fujimura Y. Platelets treated with ticlopidine are less reactive to unusually large VWF multimers than are those treated with aspirin under high shear stress. **Pathophys Haemost Thromb** 34: 35-40, 2005.
 7. 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. **Blood** 106: 922-924, 2005.
 8. Kosugi S, Matsumoto M, Ohtani Y, Take H, Ishizashi H, Fujimura Y, Kuyama J. Rituximab provided long-term remission in a patient with refractory relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. **Int J Hematol** 81: 433-436, 2005.
 9. 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 polyarthritidis nodosa: demonstration of the inhibitor against von Willebrand factor-cleaving protease. **Clinical Nephrology** 64: 305-310, 2005.
 10. Fujimura Y. Down-regulation of ADAMTS13 activity by serine proteases. In: Inside Blood. **Blood** (Review) 105: 911-912, 2005.
 11. Sugimoto T, Saigo K, Shin T, Kaneda Y, Manabe N, Narita H, Wakuya J, Imoto S, Murayama 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 chronic myelogenous case treated with interferon- α . **Acta Haematologica** 113:198-203, 2005.

12. 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.
13. 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.
14. Yagita M, Uemura M, Nakamura T, Kunitomi A, Matsumoto M, 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.

学会発表

1. The 47th Annual meeting of American Society of Hematology

於：Atlanta

日時：2005年12月10—12日

演題：Upshaw-Schulman syndrome: a masqueraded thrombocytopenia during pregnancy

演者：Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Akiyama N, Tomiyama J, Natori K, Kuraishi Y, Imamura Y, Inoue N, Kokame K, Miyata T, Fujimura Y

2. The 47th Annual meeting of American Society of Hematology

於：Atlanta

日時：2005年12月10—12日

演題：Monoclonal antibodies to a VWF-A2 decapeptide with the C-terminal residue Tyr1605, generated by ADAMTS13 cleavage, develop a highly sensitive ELISA for its activity and characterize Upshaw-Schulman syndrome.

演者：Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Hiura H, Fujimura Y

3. 第28回日本血栓止血学会学術総会教育講演

於：福岡国際会議場

日時：平成17年11月23－25日

演題：ADAMTS13

演者：藤村吉博

4. 第48回日本腎臓学会学術総会ワークショップ

於：横浜・パシフィコ横浜

日時：平成17年6月23－25日

演題：VWF切断酵素 (ADAMTS13)の動態解析と thrombotic microangiopathy の診断

演者：藤村吉博

5. 第15回日本産婦人科・新生児血液学会特別講演

於：奈良・奈良県新公会堂

日時：平成17年6月3－4日

演題：周産期の血小板減少症における ADAMTS13 活性測定的重要性

演者：藤村吉博

知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. ADAMTS13 の分離精製方法

出願人：高山正法

発明人：日裏久英、藤村吉博、松本雅則、加藤誠司

2005年12月28日国内出願

2. ADAMTS13 の安定化方法

出願人：高山正法

発明人：日裏久英、加藤誠司、藤村吉博、松本雅則

2005年12月28日国内出願

表1. 過去7年間に奈良医大輸血部で集積した本邦TTP/HUS患者 643例：
ADAMTS13とそのインヒビター活性（平成17年11月末）

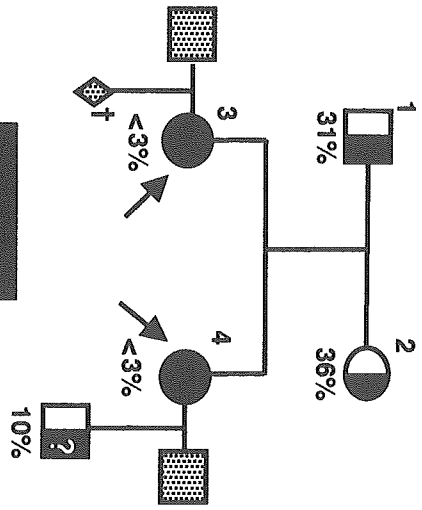
	先天性 TTP/HUS (n=46)	後天性 TTP (n=498)	後天性 HUS (n=99)
Upshaw - 原因不詳 Schulman (n=18) 症候群 (n=28)		特発性 (n=200) 膠原病 (n=151) 悪性腫瘍 (n=47) 造血幹細胞移植 (n=14) (n=17) (n=30) (n=39)	特発性 (n=68) 0157 Mitomycin (n=24) (n=7)
ADAMTS13 活性(%)			
< 3	28	121	0
3-<25	0	69	11
25-<50	0	9	32
≥50	0	1	25
	0	27	9
	0	53	3
	5	17	0
	7	17	12
	6	9	9
		33	12
		9	3
		9	0
		9	10
		4	3
		19	7
		11	10
		11	3
		5	0
		2	1
		3	0
		0	7
		16	0
		3	3
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0
		10	0
		3	0
		16	0
		3	0
		10	0
		7	0

表 2. 妊娠中～後期の血小板減少を契機に発見されたUSS 5 家系 8 症例の要旨

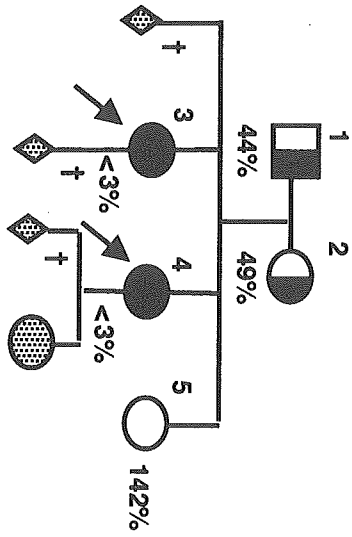
家系	K	L	M	O	X	
患者 出生 確定診断 (年・月)	婦 (K-3) 1976 2002.8	婦 (K-4) 1978 2002.8	婦 (L-2) 1967 2003.5	婦 (L-3) 1972 2003.5	婦 (M-3) 1969 2003.6	
主訴	妊娠時発症 TTP の疑念	妊娠時血小板減少	妊娠時血小板減少	妊娠時血小板減少	妊娠時発症 TTP の疑念	
検査 異常の血塗・出血症状 検査の血塗・出血症状 その他	(-) (+) (-) (+) (+)	(-) (+) (+) (+)	(-) (+) (+) (+)	(-) (+) (+) (+)	(-) (+) (+) (+)	
既往歴	新生児期重症貧血 交代出血 小児期の血小板減少 特記事項	(+) (+) (+) (+) (+)	(-) (+) (-) (+) (不明)	(-) (+) (-) (+) (不明)	(-) (+) (-) (+) (不明)	
要約	2002年6月に初産、当初血小板減少は18万/μlであった。上記TTPの診断のため、妊娠初期にアズロイドを服用していたが、妊娠5ヶ月で中止した。妊娠6ヶ月時に血小板減少(2.9万/μl)を認め、アズロイドを服用した。しかし血小板数がさらに低下(1.5万/μl)し、近産で入院後、胎動消失と診断された。胎動消失後、緊急帝王切開を行い、胎児死亡を認めた。母は健康であった。	2002年8月に初産、妊娠が明らかとなった。その時点での血小板数は20万/μlであったが、妊娠6ヶ月時に血小板数が5.9万/μlに低下し、Hb 9.1 g/dlと重症貧血が認められた。腎臓機能悪化、発熱、精神状態は認めなかった。	1994年：第1子を妊娠、当初正常であった血小板数が、妊娠27週に3.8万/μlに低下し、急性腎不全を伴い、妊娠28週で胎児死亡のため、帝王切開で死産期産を認めた。その後、自然に血小減少は回復し、HbLUP症候群もしくはHbLUP症候群(APS)が疑われ、以降アズロイド少量 (81mg) 内服を開始。 1995年：第2子妊娠、経過中、血小板数が1.7万/μlまで低下し、尿蛋白も高濃度性となったため、妊娠37週で帝王切開となり、無難に正常に産まれた。 1997年：アズロイド内服しながら第3子を妊娠した。経過の血小板減少を認めたため、妊娠37週に帝王切開にて産児を得た。	1995年：2.6才時に第1子を妊娠、2.4週から尿蛋白陽性、血小板減少(2.2万/μl)を認め、Evans症候群の診断名にてアズロイド治療を受けるも、2.5週にて胎児死亡、死産後、血小板数は自然に回復。 1998年：2.7才時に第2子を妊娠、2.4週で尿蛋白陽性、血小板減少(1.4万/μl)と腎不全にてTMAを疑われ、PEと血塗検査を行ったが、母体病態の改善はなかった。胎児の外容奇形は認められなかった。分娩後、母体の検査成績は急激に正常化した。それ以降、妊娠経過は良好であった。	2002年：3.3才時に初産、妊娠17週(同年10月)に胎児発症出血。次期に学習、芝居、運動、意識障害が出現、▲▲病態を疑われ、血小板減少、肝機能障害、尿蛋白陽性にて入院治療入院。翌日血液内科に転科、当初DIC疑いの診断の予じにFOYの他、PC、MAP、FPPの検査を受ける。この検査もなくTTPの5徴候(血小板減少、PE、出血傾向、HbLUP)は認められなかった。その後、母体の検査所見等は急速に回復した。1ヶ月後、血小板減少が再燃、FPPの発症と3日間で血小板数は上昇した。さらに	2005年：4月に初産、胎動消失の妊娠経過にて、妊娠23週に血小板減少(8.2万/μl)を指摘、同3週でさらに血小板数低下(4.7万/μl)のため骨髄穿刺を要しFPPと診断され経過観察していた。妊娠30週に胎動消失、骨髄穿刺後胎児死亡を認められ、帝王切開にて娩出。その後、母体は血小板減少(1.4万/μl)と重症貧血を認め、TTPs発症が出現し、PEとアズロイド下投薬を行い救命し得た。
確定診断に至る経過	第1産日にPEを一度行ったが、子宮内胎児死亡が確認されたため、帝王切開、子宮全摘術が施行された。手術後、切開血腫形成に血液を認め、第2産日の夜、意識レベルが回復し、その翌日はFPP 600の追加投与を行った。その夜、血小板数が10万/μl以上上昇したが、第19産日10.9万/μl、21産日2.7万/μlまで低下したため、FPP 4Uを投与した。この時点でアズロイドを投与し、ADAMTS 13活性検査の依頼があり、USSと診断された。同時期に母体の血小板が妊娠6ヶ月で頭頂骨の血小板	上記の時期に病がUSSであることが判明したため、急凍当り米に凍結があり、母のADAMTS 13活性を測定し、やはりUSSと確定診断された。そこでFPPを4U投与したところ、血小板数は30万/μlまで上昇し、以下に低下した。母体FPP4U投与し、血小板数は維持された。妊娠29週で突然胎児心音が弱くなったため、緊急帝王切開がなされ、無難に産まれた。児の血小板数は正常であった。	2000年：発熱を妊娠した。血小板数が5.3万/μlまで低下し、尿蛋白陽性も合併したため、Evans症候群を疑いアズロイド療法とigG大量療法を開始した。しかし、全身腫脹、尿赤も出現し、妊娠32週に帝王切開を行い、産児を得た。出生後、血小板数は20万/μlまで回復したが、2.4週前後に再度5万/μlまで低下した。しかし、自然経過で正常に回復した。さらに2ヶ月後に血小板減少を認め、アズロイドは増量のみで回復したが、その後、アズロイド、アズロイドとも中止したが、重症は認めなかった。TMAの診断を聞きUSSを	定期的なFPP輸注は実施していない。またアズロイドやアズロイド等の投与も中止している。	定期的なFPP輸注は実施していない。またアズロイドやアズロイド等の投与も中止している。	定期的なFPP輸注は実施せず。FPPの定期輸注は実施せず。
その他	診断確定後、3週間に1度の割合でFPP 4Uの定期輸注を開始し、現在も継続している。	分娩後、3週間に1度の割合でFPP 4Uの定期輸注を開始し、現在も継続している。				

(FPP: fresh frozen plasma, PE: plasma exchange)

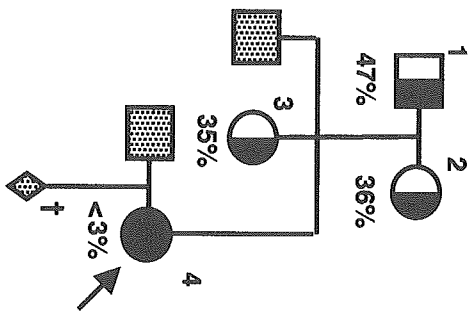
Family K



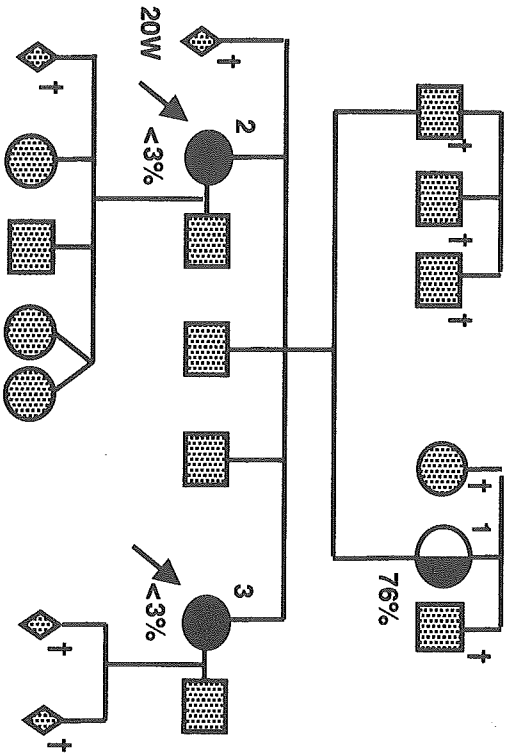
Family M



Family X



Family L



Family O

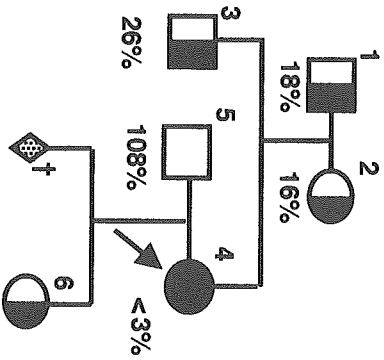
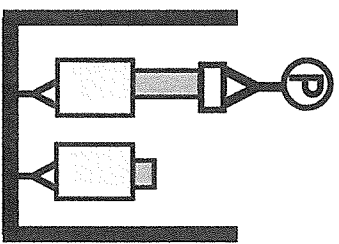
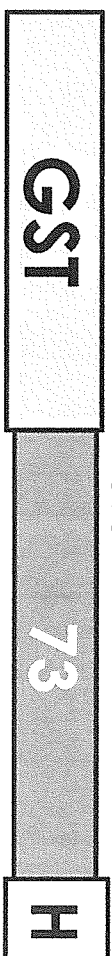


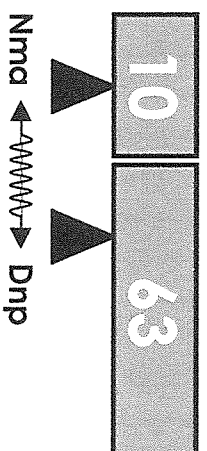
図 1. 妊娠発症USSの家系図

1605-1606
(842-843)

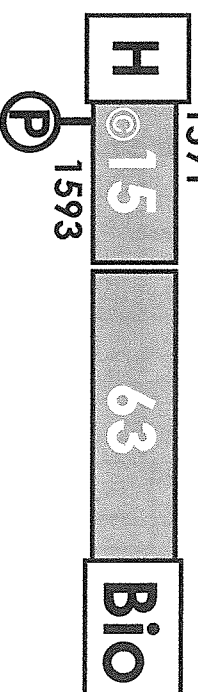
Kokame et al.
(Blood, 2004)



Zhou et al.
(Thromb Haemost, 2004)



Kokame et al.
(Br J Haematol, 2005)



Wu et al.
(J Thromb Haemost, 2005)

Kato et al.
(Transfusion, 2006)

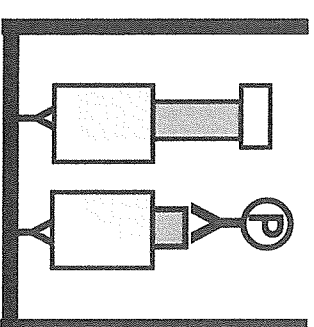


図 2. GST-VWF73-His と ADAMTS13 活性測定法