

8. Ikegami, K, Kaida, K, Fujioka, T, Kawakami, M, Hasei, H, Inoue, T, Taniguchi, Y, Yoshihara, S, Hayashi, S, Kurata, Y, Ogawa, H: Idiopathic thrombocytopenic purpura after influenza vaccination in a bone marrow transplantation recipient. *Bone Marrow Transpl*, 38: 323-325. 2006
9. 西山美保、林 悟、二日市良彰、末久悦次、倉田義之：  
血小板減少症患者における多項目自動血球分析装置 XE-2100 を用いた未熟血小板分画の測定－基礎的検討および血小板減少症鑑別診断における有用性の検討－  
日本検査血液学会雑誌、7: 313-318. 2006
10. 倉田義之、林 悟、城崎 潔、小西一郎、柏木浩和、富山佳昭：  
血小板寒冷凝集素により偽性血小板減少症を呈した4例。  
臨床血液、47: 781-786. 2006
11. Kuwana, M., Kaburaki, J., Okazaki, Y., Yasuoka, H., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. Increase in circulating endothelial precursors by atorvastatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 54 1946-1951 2006
12. Kuwana, M., Kurata, Y., Fujimura, K., Fujisawa, K., Wada, H., Nagasawa, T., Nomura, S., Kojima, T., Yagi, H., and Ikeda, Y. Preliminary laboratory-based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: Evaluation by multi-center prospective study. *Thromb. Haemost.* 4 1936-1943 2006
13. Yamazaki, R., Kuwana, M., Mori, T., Okazaki, Y., Kawakami, Y., Ikeda, Y., and Okamoto, S. Prolonged thrombocytopenia after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: Associations with impaired platelet production and increased platelet turnover. *Bone. Marrow. Transplant.* 38 377-384 2006
14. Kuwana, M. Potential benefit of statins for vascular disease in systemic sclerosis. *Curr. Opinion. Rheumatol.* 18 594-600 2006
15. Asahi, A., Kuwana, M., Suzuki, H., Hibi, T., Kawakami, Y., and Ikeda, Y. Effects of *Helicobacter pylori*

- eradication regimen on anti-platelet autoantibody response in infected and uninfected patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.  
Haematologica  
91 594-600 2006
16. Kuwana, M., Ikeda, Y.  
*Helicobacter pylori* and immune thrombocytopenic purpura: unsolved questions and controversies.  
Int. J. Hematol.  
84 309-315 2006
17. Kuwana, M., Okazaki, Y., Kodama, H., Satoh, T., Kawakami, Y., and Ikeda, Y.  
Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells.  
Stem Cells 24 2733-2743 2006
18. 藤村 欣吾  
ITPにおける *Helicobacter pylori* 除菌療法について  
臨床血液 47 : 724-733 2006
19. 藤村 欣吾  
医学と医療の最前線  
ITP (特発性血小板減少性紫斑病) と *Helicobacter pylori* 除菌療法について  
日本内科学会雑誌  
95 : 2310-2320, 2006
20. Kajihara, M., Okazaki, Y., Kato, S., Ishii, H., Kawakami, Y., Ikeda, Y., and Kuwana, M.  
Evaluation of platelet kinetics in patients with liver cirrhosis: Similarity to idiopathic thrombocytopenic purpura.  
J. Gastroenterol. Hepatol.  
22 112-118 2007
21. Takahashi, H., Amagai, M., Tanikawa, A., Suzuki, S., Ikeda, Y., Nishikawa, T., Kawakami, Y., and Kuwana, M.  
T helper 2-biased natural killer cell phenotype in patients with pemphigus vulgaris.  
J. Invest. Dermatol.  
127 324-330 2007
22. Kuwana M, Iki S, Urabe A  
The role of autoantibody-producing plasma cells in immune thrombocytopenic purpura refractory to rituximab  
Am J Hematol  
82(9) 846-848 2007
23. Yamaguchi Y, Seta N, Kaburaki J, Kobayashi K, Matsuura E, Kuwana M  
Excessive exposure to anionic surfaces maintains autoantibody response to  $\beta_2$ -glycoprotein I in

patients with antiphospholipid syndrome  
Blood 110(13) 4312-4318 2007

24. Yasuoka H, Yamaguchi Y, Mizuki N, Nishida T, Kawakami Y, Kuwana M  
Preferential activation of circulating CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T cells in patients with active Behçet's disease and HLA-B51  
Clin Exp Rheumatol In press

25. 倉田義之  
特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) : 最新の治療  
臨床血液、48; 355-362 2007

26. 藤村 欣吾  
消化器外疾患に対する *Helicobacter pylori* 除菌療法の適応  
*Helicobacter Research* 11: 237-246, 2007

27. Yamaguchi M., Fujimura K., Toga H., Khwaja A., Okamura N., Chopra R.  
Shwachman-Diamond syndrome is not necessary for the terminal maturation of neutrophils but is important for maintaining viability of granulocyte precursors.  
Experimental Hematology 35: 579-586, 2007

28. Kodama M., Kitadai Y., Ito M.,

Kai H., Masuda H., Tanaka S., Yosihara M., Fujimura K., Chayama K.

Immune response to CagA protein is associated with improved platelet count after *Helicobacter pylori* eradication in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.  
*Helicobacter* 12: 36-42, 2007

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. 実案新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

病院 血液内科 御中

先生

拝啓

秋晴れの候、ますますご健勝のことと拝察申し上げます。

さて難治性 ITP 症例の治療に関しては従来種々の治療研究がなされましたが有用な治療成績は世界的にも得られていないと考えます。

このような状況下で、この度厚生労働省 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」班では“難治性 ITP” 症例に対する実態調査を行うと共に新たな治療研究を行い ITP の治療成績を向上させることを計画致しました。

つきましては大変ご多忙中と存じますが下記の点について貴診療科にご協力をお願いしたいと存じます。

- ・ 別紙の定義に基づく難治性 ITP 症例数について
- ・ 現在貴病院に通院中の I T P 症例数について
- ・ 1年間（平成 16 年 9 月～17 年 8 月）に受診された新規 ITP 症例数について

上記 3 点について別紙調査表にご記入後、返送頂きます様お願いいたします。

以上ご迷惑とは存じますが今回の主旨にご賛同頂き是非ご協力賜りますようお願い申し上げます。

敬具

平成 17 年 10 月 28 日

血液凝固異常症研究班 班長

慶應大学医学部 内科

池田 康夫

血液凝固異常症研究班 班員

広島国際大学 病態薬物治療学講座

藤村 欣吾

血液凝固異常症研究班 班員

慶應大学医学部先端医科学研究所

桑名 正隆

血液凝固異常症研究班 班員

大阪大学医学部付属病院 輸血部

倉田 義之

**難治性 ITP の基準：以下の 3 項目を満足する症例**

1. 少なくとも発症から 1 年以上経過している症例。
2. 次の治療法に反応しない症例。
  - (1) ビロリ菌陰性或いは不明の I T P 例： 副腎皮質ステロイド療法、  
或いは、これに加え摘脾療法にも反応せず、
  - (2) ビロリ陽性 I T P 例： 除菌療法さらに副腎皮質ステロイド療法  
或いは、これらに加え摘脾療法にも反応せず、これらの症例に対し  
さらには 1 つ以上の難治性薬物療法（ダナゾール、他の免疫抑制剤など）に  
反応しない症例
3. 治療に対する反応性について。  
上記治療中にもかかわらず血小板数 2 万以下の回数が観察回数  
（少なくとも 6 ヶ月以上の期間で）の半分以上を数える症例。

**新規 ITP 症例と通院中の I T P 症例調査：**

- ・新規 I T P 症例：平成 16 年 9 月から平成 17 年 8 月の 1 年間に貴施設を受診した新規 ITP 症例数
- ・現在通院中の総 I T P 症例数

以上ご不明な点、調査表の返送先は下記へお願い致します。

〒737—0112

広島県呉市広古新開 5-1-1

広島国際大学 薬学部 病態薬物治療学講座

藤村 欣吾

電話 0823 - 73 - 8296

FAX 0823 - 73 - 8981

E-mail [k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp](mailto:k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp)

## ★調査表（１）：難治性 I T P 調査

（資料 3）

難治性 ITP の基準： 以下の 3 項目を満たす症例

1. 少なくとも発症から 1 年以上経過している症例。
2. 次の治療法に反応しない症例。

（１）ピロリ菌陰性或いは不明の I T P 例： 副腎皮質ステロイド療法、  
或いは、これに加え摘脾療法にも反応せず、

（２）ピロリ陽性 I T P 例： 除菌療法さらに副腎皮質ステロイド療法  
或いは、これらに加え摘脾療法にも反応せず、

これらの症例に対し

さらに 1 つ以上の難治性薬物療法（ダナゾール、他の免疫抑制剤など）に  
反応しない症例

3. 治療に対する反応性について。

上記治療中にもかかわらず血小板数 2 万以下の回数が観察回数  
（少なくとも 6 ヶ月以上の期間で）の半分以上を数える。

◎ 現在通院中の上記難治性 I T P 症例数

\_\_\_\_\_ 例

◎ すでに死亡した上記難治性 I T P 症例数

\_\_\_\_\_ 例

◎ 現在通院中の総 I T P 症例数

\_\_\_\_\_ 例

★調査表（２）：新規ITP症例数調査

（資料４）

（平成16年9月～平成17年8月

の1年間に受診した新規症例）

◎ 急性ITP \_\_\_\_\_ 例

◎ 慢性ITP \_\_\_\_\_ 例

平成17年 月 日

施設名 \_\_\_\_\_

住所 \_\_\_\_\_

報告者 \_\_\_\_\_

連絡先：

電話：

ファックス：

E-mail：

病院  
科  
先生

拝啓

余寒なお厳しき折、先生におかれましてはますます御健勝のこととお慶び申し上げます。

昨年秋にはお忙しい中を難治性 ITP 症例の一次調査にご協力いただき誠にありがとうございました。

お陰様で無事滞りなく終了させていただきました。

まとめた結果は簡単ですが別紙同封の如くです。

全国43都道府県からご返事を頂き、多くの症例を診ていただいていることが判明すると共に、日本の主要な施設からの専門家の回答として信頼性の高い調査結果として意義深いものと認識しております。

但し難治症例の解釈に戸惑われたかもしれませんが摘脾は必須ではありませんので、非脾摘例でもお示しした3つの条件に合えば難治例として、さらに症例がございますようでしたら何なりとメールで藤村までご連絡ください。(難治性 ITP 案を同封します) 今後難治症例の治療ガイドラインを作成するために今回の実態調査に加え、さらに掘り下げた研究班として簡単な2次調査を設定したいと考えておりますのでその節には再びご面倒をおかけいたしますがご協力いただきたくお願い申し上げます。

今回のご協力に対して改めて御礼申し上げますと共に今後ともご指導、ご鞭撻を賜りますよう、よろしくお願い申し上げます。

敬具

平成18年3月8日

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」ITP グループ

班長 慶応義塾大学医学部 内科 池田 康夫

班員 広島国際大学薬学部 病態薬物治療学 藤村 欣吾

慶応義塾大学医学部 内科 桑名 正隆

大阪大学医学部附属病院 輸血部 倉田 義之

藤村欣吾メールアドレス： [k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp](mailto:k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp)



病院  
科  
先生

拝啓

若葉の鮮やかな季節、ますます御健勝のこととお慶び申し上げます。

日頃は大変お世話になっております。

また前回の難治性 ITP の実態調査（1次調査）では多大な御協力を頂きましてありがとうございました。

先般お知らせいたしましたように今回難治 ITP 症例及び死亡例につきましてもう少し掘り下げた調査を行い今後の治療計画に役立てたいと考えました。

そこで大変申し訳ございませんが 2 次調査の依頼をさせていただいた次第でございます。

色々ご多用とは存じますが作成いたしました難治症例、死亡症例の調査表に御回答をお願い申し上げます。

前回ご回答いただきました症例分の調査用紙を同封させて頂いておりますがその後症例が増えた場合には恐れ入りますがコピーをして頂き御回答いただければ幸いです。

なるべく多くの症例の情報をご提供いただきますようお願いいたします。

なお個人情報の問題上、症例番号は貴施設でご自由にお決めください。また管理については充分配慮して行うことをお約束すると共に、個人、施設が特定できない形でまとめさせていただきますのでご協力のほど重ねてよろしくお願い申し上げます。

回答は同封の返信用封筒にて 平成18年6月下旬までに 藤村までご返送ください。なおご不明な点は藤村までご連絡頂ければ幸いです。(藤村メールアドレス k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp)

敬具

平成18年5月22日

厚生労働省難治性疾患克服事業

「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 内科

班員 藤村 欣吾 広島国際大学薬学部 病態薬物治療学講座

桑名 正隆 慶応義塾大学医学部 リュウマチ内科

倉田 義之 大阪大学医学部附属病院 輸血部

(資料7)

前回の1次調査(平成17年10~12月)で貴施設から

ご報告頂いた症例数。

現在通院中の難治性ITP症例数

\_\_\_\_\_ 例

最近数年間(年限を問いません)死亡したITP症例数

\_\_\_\_\_ 例

現在通院中のITP症例数

\_\_\_\_\_ 例

以上でした。

厚生労働省難治性疾患克服事業

「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 内科

班員 藤村 欣吾 広島国際大学薬学部 病態薬物治療学講座

桑名 正隆 慶応義塾大学医学部 リュウマチ内科

倉田 義之 大阪大学医学部附属病院 輸血部

通院中の難治性 ITP 症例調査表 (2 次調査) (資料 8)

施設名 :

症例番号 : \_\_\_\_\_

性別 : 男 女

生年月日 : 19 年 月 (年齢 才)

ITP 診断時期 : 年 月 (年齢 才)

ITP 初回療法 : 副腎皮質ステロイド (プレドニン換算) mg/day

その他の初回治療 \_\_\_\_\_

摘脾 (該当に○印) : あり ( 年 月 ) なし

ITP による脳出血の既往 (該当に○印) : あり ( 年 月 ) なし

その他の臓器出血の既往 (該当に○印) : あり (場所 ) なし

上記以外で現在までに行った ITP に対する治療のうち下記の中で該当するものに○印をつけてください (複数可)

ダナゾール、ビンカアルカロイド、ビタミンC大量、ダプソン、エンドキサン、イムラン、デカドロン大量、ステロイドパルス、IFN- $\alpha$ 、リツキサン、IVI gG、サイクロスポリン、ピロリ除菌、その他 \_\_\_\_\_

現在の ITP の状態

直近の血小板数 : 万 ( 年 月 )

最近 6 ヶ月の 最低血小板数 万、 最高血小板数 万

出血傾向 : 最近 6 ヶ月間の皮下出血 (該当に○印) あり なし

最近 6 ヶ月間の粘膜出血 (該当に○印) あり なし

現在の ITP に対する治療 : 副腎皮質ステロイド (プレドニン換算) mg/day

その他の治療 1. \_\_\_\_\_ 2. \_\_\_\_\_ 3. \_\_\_\_\_

合併症 1. \_\_\_\_\_ 2. \_\_\_\_\_ 3. \_\_\_\_\_

I TP 死亡症例調査表 (2 次調査) (資料 9)

施設名 :

症例番号 : \_\_\_\_\_

性別 :        男                    女

生年月日 :    1 9        年    月    (年齢    才)

I TP 発症時期 :            年    月    (年齢    才)

死亡年月日 :            年    月    (年齢    才)

死亡時の I TP の臨床状態 (該当するものに○印) :

寛解中、        薬物でコントロール良好、        不良

この間行った治療に○印をつけてください (複数可)

副腎皮質ステロイド、摘脾、ダナゾール、ビンカアルカロイド、

ビタミン C、ダプソン、エンドキサン、イムラン、IFN- $\alpha$ 、

デカドロン大量、ステロイドパルス、リツキサン、IVI g G、

サイクロスポリン、ピロリ除菌、血小板輸血、

その他 \_\_\_\_\_

死因 : \_\_\_\_\_

I TP 関連死:        Yes            No

合併症 : \_\_\_\_\_

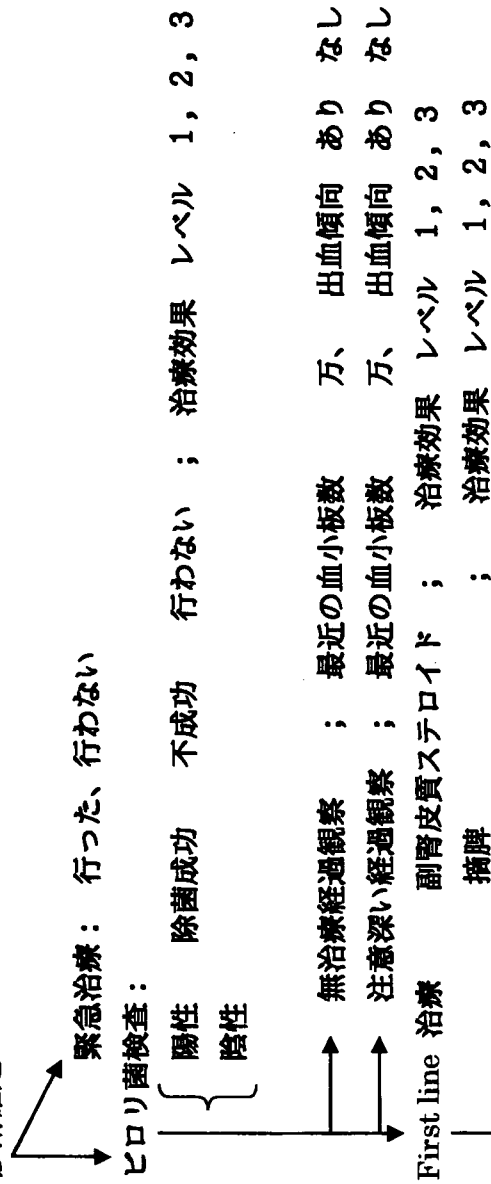
施設名：

症例番号

ITP診断時：西暦	年月	西暦	年月	性別	男	女	出血症状：皮下出血	なし、	粘膜出血	あり	なし
ITP治療開始時期	西暦	年月	西暦	年月	男	女	出血症状：皮下出血	なし、	粘膜出血	あり	なし

治療経過：初診時から行ってきた治療およびその効果について、該当する項目に○印を付け、現在進行中の治療には◎印をつける。

ITPの診断確定



Second line 治療 行っている（治療薬を記載）、行っていない

- 1) 治療効果 レベル 1, 2, 3
- 2) 治療効果 レベル 1, 2, 3
- 3) 治療効果 レベル 1, 2, 3

最終観察時点（ 年 月 日）での 血小板数 万、

出血傾向：皮下出血 あり なし・粘膜出血 あり なし・臓器出血 あり なし

合併症：なし あり（ ）（ ）

状況：血小板数>15万：無治療、何らかの治療中  
 血小板数3~15万：無治療、何らかの治療中  
 血小板数<3万：無治療、何らかの治療中

## 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	宮田 敏行
自治医科大学	坂田 洋一
名古屋大学医学部	小嶋 哲人
慶應義塾大学医学部	村田 満
大阪大学医学部	川崎 富夫
京都府立医科大学	辻 肇

### 研究要旨

本研究は、静脈血栓症の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、血栓症発症の予知、及び、予防のための方策を検討することを目的とする。この目的のため、静脈血栓症の治療と予防に関するアンケート調査を行うとともに、多施設共同で静脈血栓症患者を大規模に収集し遺伝子解析を行い、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓症の予防対策のエビデンスを提供する。日本人を対象に静脈血栓症発症の予知・予防のためのエビデンスを収集し、これを用いて安全・安心な医療実現を目指す。日本人の静脈血栓症の発症には、プロテインS K196E 変異に加えて、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子の稀な変異が大きく寄与している事が明らかとなった。これまでに日本人に同定されたプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子の変異を文献調査し、その成果を名古屋大学のホームページで公開した。ヘパリンの在宅注射に関するアンケート調査をまとめた結果をもとに、「ヘパリンの在宅自己注射に関する」治療指針案の設定を試みた。静脈血栓症に対する日本人に適したワルファリン療法を確立するため、ワルファリン使用の現状を把握するアンケート調査を行った。

特発性血栓症サブグループは、下記の二つの調査研究を行った。

日本人の血栓症の遺伝的背景に関する調査研究

日本人の静脈血栓症の治療に関する調査研究

日本人静脈血栓症患者の遺伝的背景に関する調査研究-1

分担研究者	宮田敏行	国立循環器病センター研究所
分担研究者	坂田洋一	自治医科大学
分担研究者	小嶋哲人	名古屋大学医学部
分担研究者	村田 満	慶應義塾大学医学部
分担研究者	川崎富夫	大阪大学医学部
分担研究者	辻 肇	京都府立医科大学

## 研究要旨

「厚生労働省科学研究費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」特発性血栓症サブグループで収集した約 170 名の日本人静脈血栓症患者を対象とし、地域一般住民群をコントロールとして、症例対照研究を行い、日本人の静脈血栓症の遺伝的背景に検討を加え、次の結果を得た。1) プロテイン S K196E 変異は日本人の静脈血栓症のリスク因子である (オッズ比 4.7、95%信頼区域 2.4-9.3)。2) プロテイン S K196E 変異ヘテロ接合体は地域一般住民の 55 人に 1 人見られた。3) 地域一般住民群のプロテイン S K196E 変異ヘテロ接合体は、血中プロテイン S 活性が約 16%低い。4) 静脈血栓症患者群に一名のプロテイン S 遺伝子の完全欠損患者を同定した。5) 収集した静脈血栓症患者の約 30%にアンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S のいずれかの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を同定した。6) トロンボモジュリン遺伝子 A455V 変異を含むハプロタイプが血中濃度に影響を与え、男性で静脈血栓症に関連を示した。7) 凝固第 V 因子 R 2 多型は静脈血栓症に関連しなかった。8) Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)  $\beta$  の Asn221Ser 変異は血中の total TFPI 抗原量を増加させたが、静脈血栓症には関連を示さなかった。以上の結果から、日本人の静脈血栓症の遺伝的要因は、プロテイン S K196E 変異のように白人種と異なる遺伝背景を示すものもあるが、アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S の稀な変異のように、白人種に見られる遺伝的要因と同じものも見られた。本研究に用いた静脈血栓症患者群は、先天性欠損症症例が集積している可能性があるため、本研究の結果は慎重に検討する必要がある。

### A. 研究目的

日本人の静脈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。静脈血栓症は、凝固制御因子系の機能低下と凝固因子系の機能亢進がある。凝固因子系の機能亢進は、白人種に広く見られる凝固第 V 因子 Leiden 変異とプロトロンビン G20210A 変異が有名である。これらの変異は日本人には同定されないため、明らかに人種差が見られる。近年の遺伝子多型の研究から、遺伝子多型の頻度には人種差が見られるものが少なからず存在し、それぞれの人種の DNA を用いて疾患との関連を詳しく調べる必要があるとされている。そこで、「厚生労働省科学研究費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」特発性血栓症サブグループでは、本サブグループに参加する国内 6 施設で静脈血栓症患者を登録し、臨床情報を収集するとともに、静脈血栓症の原因となる候補遺伝子の解析を行った。

### B. 研究方法

日本人静脈血栓症患者約 170 名は、「厚生労働省科学研究費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」特発性血栓症サブグループ (6 施設：大阪大学、京都府立医科大学、名古屋大学、自治医科大学、慶応大学、国立循環器病センター) で収集した。一般住民群は、国立循環器病センター予防検診部が進めている都市部のコホート研究である「吹田研究」を用いた。遺伝型は、多型を識別するために蛍光標識されたプローブを用いる TaqMan 法で決

定した。プロテインC、プロテインS、アンチトロンビン、トロンボモジュリン、TFPI の各遺伝子の全エクソンはPCR で増幅し塩基配列を決定し、変異を同定した。プロテイン S 遺伝子の欠損は、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法 (MRC-Holland, the Netherlands) でスクリーニング後、定量 PCR 法で確認した。一般住民 (1,866 名) の血漿プロテインS活性は Staclot Protein S (Diagnostica Stago, Asnieres, France) を用い、活性化部分トロンボプラスチン時間で活性化プロテイン C のコファクター活性として測定した。可溶性トロンボモジュリン量は enzyme-linked immunosorbent assay (三菱ガス、東京) を用いて測定した。Total および free TFPI 抗原量は、特異抗体を用いた ELISA 法で行った。統計計算には、JMP v5.1 ソフトウェア (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いた。

(倫理面への配慮)

全ての被験者は、研究の内容についての説明を受けた後、研究に協力する旨の同意書を書面で残している。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。

### C. 研究結果

1) プロテイン S K196E 変異は日本人の静脈血栓症のリスク因子であった。

161 名の静脈血栓症患者と 3,651 名の一般住民を対象に、プラスミノゲン A620T 変異 (プラスミノゲン Tochigi 変異)、プロテイン S K196E 変異 (プロテイン S Tokushima 変異)、ADAMTS13 P475S 変異、凝固 XII 因子 -4C>T (FXII 46C>T)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 4G/5G 多型、をタイピングした。その結果、プロテイン S K196E 変異は日本人の静脈血栓症のリスクであることが判明した (オッズ比 5.6、95%信頼区域 3.1-10.0、調整後、オッズ比 4.7、95%信頼区域 2.4-9.3)。他の 4 変異は関連を示さなかった。

2) プロテイン S K196E 変異ヘテロ接合体は地域一般住民の 55 人に 1 人見られた。

一般住民 (3,651 名) のプロテイン S K196E 変異をタイピングしたところ、KK 型が 3,585 名、KE 型が 66 名、EE 型が 0 名であった。この結果から、変異 E 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ることが判明した。このことから、約 12,000 人に 1 人がホモ接合体であり、日本人の総人口を 1 億 2000 万人とすると約 1 万人がホモ接合体であると推定された。

3) 一般住民群のプロテイン S K196E 変異ヘテロ接合体は、血中プロテイン S 活性が約 16%低い。

プロテイン S K196E 変異の遺伝型を決定した 3,651 名の中から、1,866 名のプロテイン S 活性を測定した。その結果、野生型 (1,828 名) のプロテイン S 活性の平均値は  $87.9 \pm 19.8\%$  (平均値  $\pm$  標準偏差, SD) であり、ヘテロ接合体 (34 名) のプロテイン S 活性の平均値は  $71.9 \pm 17.6\%$  であった。両群は有意な差

( $p < 0.0001$ ) を示した。ヘテロ接合体 34 名のうち、16 名はプロテイン S 活性 70%以上を示し、7 名はプロテイン S 活性 90%以上を示した。ヘテロ接合体は活性 100%前後にも散在していた。こういったことから、活性低値を示す個体と K196E 変異ヘテロ接合体は一致せず、プロテイン S 活性測定法では変異個体を同



定できないと考えられた。

一般住民 1,866 名を対象としたプロテイン S 活性値から  $-2SD$  および  $-3SD$  を計算すると、47.8% および 27.9% であった。一般住民では、 $-2SD$  より低値を示す人は 26 名であり、そのうちヘテロ接合体は 2 名であった。また、 $-3SD$  より低値を示す人は一般住民には存在しなかった。

同じ対象者を含む集団 (3,295 名) を対象に、プラスミノーゲン活性を測定しプラスミノーゲン A620T 変異をタイピングした。プラスミノーゲン A620T 変異のヘテロ接合体は、プラスミノーゲン活性低値域に高度に集積されていた。このことより、プラスミノーゲン活性低値を示す個体と A620T 変異を持つ個体は高率で一致することが明らかとなった。

4) 静脈血栓症患者群に 1 名のプロテイン S 遺伝子の完全欠損患者を同定した。

静脈血栓症患者 163 名を対象に、MLPA 法を用いてプロテイン S 遺伝子欠損患者をスクリーニングし、定量 PCR 法で欠損を確認した。その結果、1 名の患者にプロテイン S 遺伝子の欠損を認めた。マイクロサテライトマーカーと SNP のタイピングの結果から、この欠損は少なくともプロテイン S 遺伝子の全域 (107 kb) から最大ではセントロメアから D3S3619 までの領域が欠損していると考えられた。本患者の free プロテイン S 抗原量は 2.1 ug/ml (正常域: 6.5-9.8 ug/ml)、total プロテイン S 抗原量は 16% (正常域: 65-105%) であるため、複合ヘテロ体を疑い、プロテイン S 遺伝子の全領域の DNA シークエンスを行ったが、変異を見いだせなかった。

5) 静脈血栓症患者の約 30% にアンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S のいずれかの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を同定した。

静脈血栓症患者 173 名を対象に、プロテイン S、プロテイン C、アンチトロンビン、の 3 つの遺伝子のタンパク質の全コード領域の DNA シークエンスを行った。その結果、プロテイン S 遺伝子では 10 個のミスセンス変異 (延べ 23 名)、2 個のフレームシフト変異 (延べ 2 名)、3 個のスプライス部位変異 (延べ 3 名)、プロテイン C 遺伝子では 8 個のミスセンス変異 (延べ 15 名)、1 個のインフレーム変異 (延べ 5 名)、アンチトロンビン遺伝子では 9 個のミスセンス変異 (延べ 9 名)、1 個のフレームシフト変異 (延べ 2 名)、1 個のナンセンス変異 (延べ 1 名) が同定された。7 名の患者は異なった遺伝子に 2 つの変異を保有していた。このなかの 6 名は、プロテイン S K196E 変異を保有していた。このことから、プロテイン S K196E 変異は、他の変異と重複することにより、静脈血栓症を発症させる modifier mutation で有る可能性が考えられた。

6) トロンボモジュリン遺伝子 A455V 変異を含むハプロタイプが血中濃度に影響を与え、男性で静脈血栓症に関連を示した。

静脈血栓症患者 118 名を対象に、トロンボモジュリン遺伝子のシークエンス解析を行い 17 個の変異を同定した。このうち 5 多型を静脈血栓症患者と一般住民 (2,247 名) を対象にタイピングした。また、一般住民の可溶性トロンボモジュリン量を測定した。その結果、A455V 変異と連鎖不平衡 ( $r\text{-square} > 0.9$ ) にある 2729A>C の C アレル保有者の可溶性トロンボモジュリン量は、非保有者に

比べ男女ともに有意に6%程度低かった。CC型を持つ男性の頻度は、一般住民群より静脈血栓症群に高く見られ(オッズ比=2.76、95%信頼区域=1.14-6.67、 $p=0.02$ )、静脈血栓症の危険因子と考えられた。しかし、この関連は女性には見られなかった。2729A>C多型とA155V変異を含むハプロタイプが静脈血栓症に関連する可能性を指摘した。

7) 凝固第V因子R2多型は静脈血栓症に関連しなかった。

静脈血栓症患者174名および一般住民1,499名を対象に、FV H1299R変異をTaqMan法およびPCR-RFLP法によりタイピングを行った。静脈血栓症患者群では、HH型140名(80.5%)、HR型32名(18.4%)、RR型2名(1.1%)であり、一般住民群では、HH型1,284名(85.7%)、HR型207名(13.8%)、RR型8名(0.5%)であった。これらの遺伝型では両者の頻度に有意差は認められなかった

( $P=0.152$ )。アレル頻度では、静脈血栓症患者群のAアレル(His)頻度は0.897、Gアレル頻度(Arg)は0.103、一般住民群のAアレル頻度は0.926、Gアレル頻度は0.074であり、両群間の頻度に差を認める傾向を示したものの、有意差は認めなかった( $P=0.055$ )。

8) TFPI $\beta$ のAsn221Ser変異は血中のtotal TFPI抗原量を増加させるが静脈血栓症には関連しなかった。

静脈血栓症患者175名を対象に、TFPIのタンパク質コード領域のDNAシーケンスを行ない12変異を同定した。このうちミスセンス変異はN221S変異だけであった。本変異は、TFPI $\beta$ に特異的なエクソン7 $\beta$ 内に位置し、N221残基はglycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカーが結合する残基であることから、本変異を保有するTFPI $\beta$ は細胞膜上にGPIアンカーされないと予想され、静脈血栓症発症との関連に興味を持たれた。そこで、1,684名の一般住民を対象に本変異のタイピングを行い、静脈血栓症との関連を検討した。また、一般住民のtotalおよびfree TFPI抗原量を測定し、遺伝型の影響を検討した。その結果、N221S変異のNN型は静脈血栓症患者149名(85.1%)、NS型25名(14.3%)、SS型1名(0.6%)あった。一般住民1,684名では、NN型は1,425名(84.6%)、NS型は251名(14.9%)、SS型は8名(0.5%)であった。両群間に遺伝子型の頻度に差は見られなかった( $P=0.86$ )。また、アレル頻度にも差は見られなかった( $P=0.89$ )。一般住民124名のtotalおよびfree TFPI抗原量を調べたところ、NN型のtotal TFPI量は $56.6 \pm 0.9$  ng/ml(平均値 $\pm$ SD、108名)、NS+SS型のtotal TFPI量は $63.4 \pm 2.3$  ng/ml(平均値 $\pm$ SD、16名)であり、Sアレル保持者のtotal TFPI量は有意に増加していた( $P=0.006$ )。free TFPI抗原量に差は見られなかった。

#### D. 考察

日本人静脈血栓症を対象にその遺伝的背景を検討した。幾つかの遺伝子の血栓症への寄与が明らかになったが、対象とした静脈血栓症患者の登録にバイアスが入っている可能性があることをまず指摘したい。全国の6施設で約3年間をかけて170症例程度を収集した。この症例数から理解されるように、各施設の静脈血栓症の症例を全て登録・収集したものではない。また、診療科は血管外科、血液内科、循環器内科などからの症例を登録した。対象患者にがん患者も入っている。こういった患者収集の背景因子を考慮した上で、研究の成果の

臨床上の意義を考える必要があるだろう。こういった研究の限界があるものの、プロテイン S K196E 変異の重要性や、3つの遺伝子 (*PROC*, *PROS1*, *SERPINC1*) の稀な変異の重要性が明らかとなった。これらの成果は日本人の静脈血栓症の発症を予防する上で、重要な成果であると考えられ、今後静脈血栓症の発症予防に役立つことを期待したい。

次に、各項目に関して議論したい。

1) プロテイン S K196E 変異は日本人の静脈血栓症のリスク因子であった。

プラスミノゲン A620T 変異 (プラスミノゲン Tochigi 変異)、プロテイン S K196E 変異 (プロテイン S Tokushima 変異)、ADAMTS13 P475S 変異、凝固 XII 因子 -4C>T (FXII 46C>T)、PAI-1 4G/5G 多型、をタイピングしプロテイン S K196E 変異が日本人の静脈血栓症の遺伝的要因であることを明らかにした。プロテイン S K196E 変異が日本人の静脈血栓症の危険因子になることは、九州大学濱崎教授のグループからも報告された。プロテイン S K196E 変異はこれまで日本人にしか同定されていないので、白人種には見られない人種特異的な変異であると考えられる。したがって、日本人、広くは東アジア人の静脈血栓症の発症を考える上で重要であり、今後本変異に関して、集中した研究がなされるべきであると考えられる。アジア太平洋血栓止血学会が組織されており、2年に一度学会が開催されている。こういった組織と協調し、日本が主導的に研究を進めることが内外から期待されている。また、プラスミノゲン A610T 変異は東アジア人に広く見られる機能消失変異として知られている。本変異は今回の研究でも取り上げたが、静脈血栓症との関連は見いだせなかった。しかし、何らかの血栓症との関連も考えられるため、変異保有者の長期に渡る詳細な臨床上の観察が重要と考えられよう。

2) プロテイン S K196E 変異ヘテロ接合体は地域一般住民の 55 人に 1 人見られた。

プロテイン S K196E 変異の変異 E アレル頻度は 0.009 であり、約 55 人に 1 人がヘテロ接合体と考えられた。このことから、約 12,000 人に 1 人がホモ接合体であり、日本人の総人口を 1 億 2000 万人とすると約 1 万人がホモ接合体であると推定された。このように多くの日本人が変異アレルを有し静脈血栓症のリスクに晒されていると考えられる。しかし、変異 E アレルを持っていても必ずしも静脈血栓症を発症するものではない。イベントの発症は何らかの要因、例えば外傷、手術、妊娠、長期臥床などが重なって起こると考えられる。したがって、静脈血栓症の発症を未然に防ぐため、変異保有者を同定し、血栓症を誘発する環境を避けることが肝要である。このように、日本人における静脈血栓症のリスクである K196E 変異の有無を診断することは、静脈血栓症の予防に役立つと考えられる。

3) 一般住民群のプロテイン S K196E 変異ヘテロ接合体は、血中プロテイン S 活性が約 16% 低い。

プロテイン S K196E 変異は、1993 年に山崎らにより報告された。それによると、ヘテロ接合体のプロテイン S 抗原量は 122%、活性は 83% (ともに 3 名の平均値) であった。一方、同年の重清らの報告によると、ヘテロ接合体のプロ

テイン S 抗原量は 103%、活性は 43% (ともに 7 名の平均値) であった。すなわち、2 つの報告はともに抗原量は正常値を示すものの、活性に違いが見られた。このように家系が異なる 2 つのヘテロ接合体の集合では、ヘテロ接合体の血漿プロテイン S 活性は正常域にあるのか 50% 近くまで低下するのかについては明確な結論が得られていなかった。日本人の一般住民を対象に、プロテイン S K196E 変異の遺伝型と血漿プロテイン S 活性の関連を検討した。その結果、KE ヘテロ接合体群は野生型 KK 群に比べ平均値で 16% プロテイン S 活性が低下していた。しかし、ヘテロ接合体は 100% 程度の活性を示す個体も散見され、プロテイン S 活性低値域に集積していなかった。このことは、プロテイン S 活性が低い個体と、K196E 変異を持つ個体は必ずしも一致しないことを示すものであった。したがって、プロテイン S 活性の測定では、K196E 変異ヘテロ接合体を同定できないと考えられた。プロテイン S K196E 変異を持つ個体を正確に同定するためには、変異 E アレルを直接検出できる遺伝子検査を用いることが、最も簡便な方法であると考えられた。

4) 静脈血栓症患者群に 1 名のプロテイン S 遺伝子の完全欠損患者を同定した。

これまで、プロテイン S の活性や抗原量の低値を示す患者の遺伝子解析が数多く行われ、200 を超す各種の変異が同定されているが、活性や抗原量の低値を示す患者の約半数に責任と考えられる変異を同定できないことが広く知られている。その原因として、1) PCR で増幅した DNA をシークエンスするという戦略では同定できない変異の存在 (大きな欠損・逆位もしくはエクソン領域以外の変異)、2) 遺伝子以外の理由による活性・抗原量の低下、が考えられる。本研究では、プロテイン S 遺伝子の欠損を想定して、静脈血栓症患者 163 名を対象に遺伝子欠損の同定を試みたところ、1 例に欠損を認めた。このことから、プロテイン S 遺伝子欠損は静脈欠損症患者では稀であると考えられた。しかし、プロテイン S 活性の低値例、即ちプロテイン S 活性が 50% 以下で、かつプロテイン C 活性が 90% 以上の 11 例に限ってみると、一人がプロテイン S 遺伝子欠損となる。11 例のうち、5 例はミスセンス変異保有者なので、変異を同定できない活性低値例は 6 例となり、このうち一例が遺伝子欠損を持っていたことになる。このように、プロテイン S 活性が低値で先天性欠損症を疑った症例で、PCR を使った方法では変異を同定できない患者には、遺伝子欠損が見られることを考え、こういった患者を対象にプロテイン S 遺伝子欠損をスクリーニングすることは重要であろう。

5) 静脈血栓症患者の約 30% にアンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S のいずれかの遺伝子にアミノ酸変化を伴う変異を同定した。

静脈血栓症患者の全員 (173 名) を対象に、アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S の遺伝子シークエンスを行った研究はこれまでなく、今回の徹底的なシークエンス解析の結果、3 つの遺伝子変異の静脈血栓症への寄与が明確になった。173 名の静脈血栓症患者群に、アミノ酸配列レベルで変化を伴う変異保有者 54 名、およびプロテイン S 遺伝子の全域にわたる欠損 1 名を同定した。これは、静脈血栓症患者の 32% に相当した。今回の結果は、患者の登録にバイアスが入っている可能性があるため、慎重に議論する必要があるが、日本人静