

治療がされていた。一方、全経過ではプレドニゾン治療が77%、次いでピロリ除菌療法、大量IgG療法、摘脾などであった。

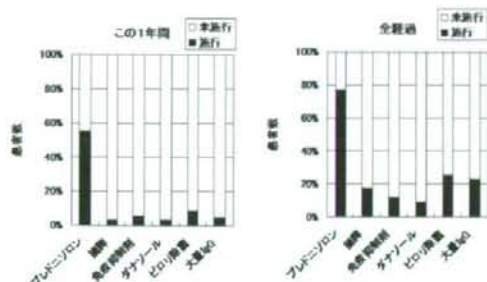


図9. 選択された治療法(更新・慢性型症例)

ピロリ除菌療法は徐々に増加している。図10に平成15年からの推移を示す。新規症例では急性型、慢性型ともに増加傾向を示している。早期に保険適応となることが望まれる。

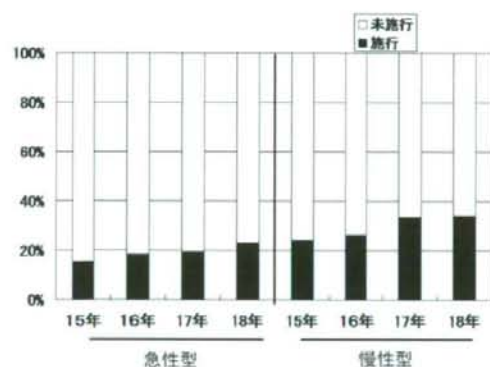


図10. ピロリ除菌療法(新規症例) 平成15~18年度の比較

更新症例におけるこの1年間の病気の経過を図11に示す。この1年間で治癒した症例が1%、軽快した症例が21%であった。多くの症例(68%)で病状は不変であった。ITPは良性疾患ではあるが治癒、軽快する疾患でもないことがうかがわれた。

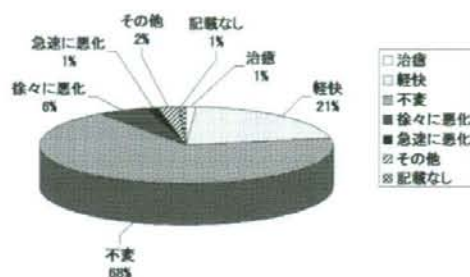


図11. この1年間の病気の経過(更新症例)

10) 生活状況、受診状況

ITP患者の生活状況を図12に示す。新規・急性型患者では46%の患者が就労、就学、家事労働など日常生活が行なっていた。新規・慢性型の患者においても67%の患者が日常生活を行っていた。

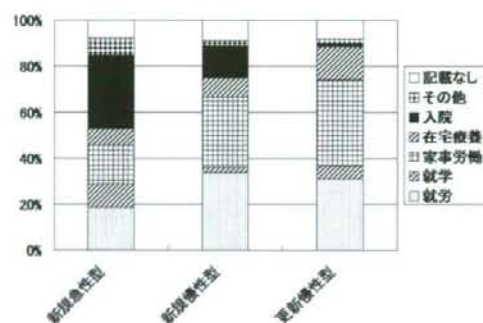


図12. 生活状況(平成18年度)

図13に患者の介助度のデータを示す。新規症例、更新症例を含めて介助を必要としないとの回答が大半であった。

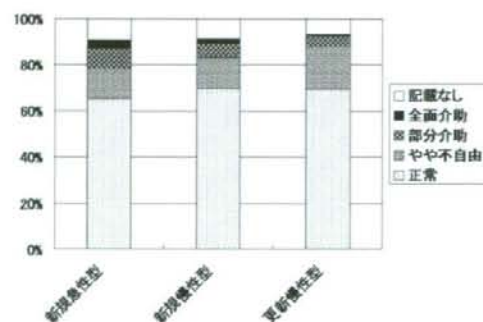


図13. 日常生活

受診状況のデータを図 14 に示す。新規・急性型症例では 49% の症例が入院していた。新規・慢性型患者においても 21% の症例が入院していた。一方、更新・慢性型患者では入院中の症例はごく一部で大半の症例が主に通院であり、日常生活を維持していた。

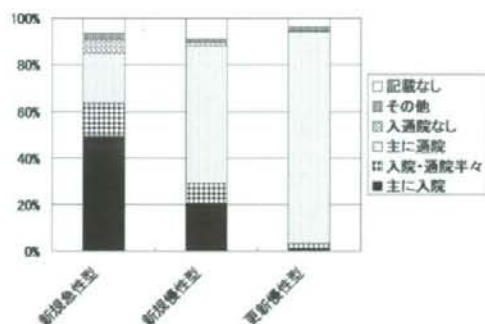


図 14. 受診状況

1) 合併症

ITP は罹病期間が長期にわたることが多い。その間には多くの合併症を併発することが予想される。特にプレドニゾン治療が長期にわたって行われるのでプレドニゾンによる副作用が懸念される。調査表に記載されている合併症を表 6 に列記する。

表 6. 合併症

	この1年間	全経過
脳出血	37	149
重症感染症	124	320
糖尿病	1,101	1,162
脊椎圧迫骨折	194	313
悪性腫瘍	185	292

慢性型更新症例 8,548 例中の合併症

血小板減少による合併症としての脳出血が一部の症例で認められている。脳出血のすべての症例が血小板減少によるものかは不明であるが大多数の症例で血小板数が 1 万以下であったこと、半数の症例は 50 歳以下であることから血

小板減少が主な因子であったのではないかと考えられる。そのほかプレドニゾンや免疫抑制剤の長期投与が原因ではないかと考えられる感染症、プレドニゾンの影響と考えられる糖尿病、脊椎圧迫骨折などが報告されている。また免疫抑制剤の副作用と考えられる悪性腫瘍の合併も報告されている。

結論

今回の調査では ITP の発症頻度は 10 万人あたり 1.88 人、更新患者は 10 万人あたり 13.21 人であった。発症頻度は平成 17 年度の調査結果よりも少し減少していた。年齢分布は平成 17 年度と同じで高齢者での発症増加が確認できた。更新患者の年齢分布においても高齢者に大きくシフトしていた。今回の成績は平成 17 年度の調査結果とほぼ同じで、ITP 患者の高齢化が確認された。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

1) 論文発表

- (1) 倉田義之：特発性血小板減少性紫斑病診断の進歩日本検査血液学会雑誌、9；388-393
- (2) 倉田義之：変異型クロイツフェルト・ヤコブ病と輸血による感染のリスク ウイルス感染症セミナー、10；27-32
- (3) 倉田義之：特発性血小板減少性紫斑病 内科、102；1418-1423
- (4) 倉田義之：臨床個人調査票集計による特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査（3年間のまとめ）厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克

服研究事業、平成 19 年度総括・分担
研究報告書、血液凝固異常症に関する
調査研究、p95-98

- (5) 倉田義之：臨床個人調査票（平成 17
年度）集計による特発性血小板減少
性紫斑病の全国疫学調査 厚生労働
科学研究費補助金、難治性疾患克服
研究事業、平成 19 年度総括・分担研
究報告書、血液凝固異常症に関する
調査研究、p90-94
- (6) 倉田義之：非溶血性輸血副作用実態
調査報告（平成 17～19 年度総合研究
報告） 厚生労働省研究費補助金、医
薬品・医療機器等レギュラとリー
サイエンス総合研究事業、免疫学的輸
血副作用の把握とその対応に関する
研究、平成 17～19 年度報告書、p38
～40
- (7) 倉田義之：免疫学的輸血副作用実態
調査報告 厚生労働省研究費補助金、
医薬品・医療機器等レギュラとリー
サイエンス総合研究事業、免疫学的
輸血副作用の把握とその対応に関する
研究、平成 19 年度報告書、p32～
37
- (8) 倉田義之：血液型不適合輸血 今日の
治療指針、p61～62

2) 学会発表

- (1) 押田眞知子、永峰啓介、清川知子、
青地 寛、林 悟、池田珠世、矢尾

真希子、中原千尋、富山佳昭、倉田
義之：輸血管理料取得を目指したア
ルブミン製剤の適正使用と臨床的影
響について 第 52 回日本輸血・細胞
治療学会近畿支部総会、シンポジウ
ム「血漿分画製剤の輸血部での管理」、
平成 20 年 11 月 29 日 奈良

- (2) 倉田義之：特発性血小板減少性紫斑
病診断の進歩 第 9 回日本検査血液学
会シンポジウム「血小板関連疾患の
病態と診断の進歩」、平成 20 年 7 月
26-27 日、三重
- (3) 清川知子、押田眞知子、中原千尋、
池田珠世、矢尾真希子、青地 寛、
永峰啓丞、林 悟、富山佳昭、倉田
義之：輸血後感染症検査実施率向上
にむけての取り組みと効果について
第 56 回日本輸血細胞治療学会総会、
平成 20 年 4 月 25 日～4 月 27 日、福
岡国際会議場
- (4) 押田眞知子、永峰啓丞、清川知子、
青地 寛、林 悟、池田珠世、矢尾
真希子、中原千尋、富山佳昭、倉田
義之：アルブミン製剤の適正使用と
臨床的影響について。第 56 回日本輸
血細胞治療学会総会、平成 20 年 4
月 25 日～4 月 27 日、福岡国際会議
場

特発性血小板減少性紫斑病の補助診断としての 網状血小板測定法に関する基礎的研究 —FCM法とIPF法の比較検討—

研究分担者 富山佳昭 大阪大学医学部 講師

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の新たな診断基準案に網状血小板比率の増加が挙げられている。網状血小板の測定にはフローサイトメーターを用いた方法 (FCM法) が知られているが、最近では多項目自動血球分析装置を用いる簡便な自動定量法が汎用されるようになってきた (IPF法)。本研究では、網状血小板測定 of 標準化のための検討として、同じ臨床検体を上記2方法にて測定しその検査値を比較検討した。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) は血小板に対する自己抗体に感作された血小板が早期に網内系により破壊され減少する難治性の自己免疫疾患である。本疾患の診断はいまだ除外診断が基盤となっているが、平成16年の血液凝固異常症に関する調査研究班の案では、診断基準として新たに以下の4項目が取り入れられている。1) 末梢血中の抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞の増加、2) 血小板関連抗GPIIb-IIIa抗体の増加、3) 網状血小板比率の増加、4) 血漿TPOは軽度上昇にとどまる。

しかしながら網状血小板比率の測定法の標準化は未だなされておらず、全国どこでも施行しえるに至っていない。網状血小板の測定にはフローサイトメーターを用いた方法 (FCM法) が知られているが、手技が煩雑である、機器として高価なフローサイトメーターが必要であるなどの欠点があり、研究室レベルで

の測定に留まっており、汎用されるに至っていない。一方、より簡便な方法として最近では多項目自動血球分析装置を用いる簡便な自動定量法が汎用されるようになってきた (IPF法)。本研究では、網状血小板測定 of 標準化のための検討として、同じ臨床検体を上記2方法にて測定しその検査値を比較検討し、それぞれの利点、欠点につき解析した。

B. 研究方法

1. 対象

血小板数が $10 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 以下の、ITP 61例 (mean \pm SD; 血小板数: $4.7 \pm 2.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$)、再生不良性貧血 (AA) 27例 (血小板数: $4.6 \pm 2.9 \times 10^4 / \mu\text{l}$)、および正常対照として健康人 58例 (血小板数: $24.3 \pm 5.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$) を対象とした。なお、ITP と AA の診断は厚生省特発性造血器障害調査研究班の診断基準によった。

(倫理面への配慮)

検体使用にあたり対象者からは書面

にてインフォームド・コンセントを得た。また検体は中央臨床検査に提出された検体の残りを用いた。

2. FCM 法

方法の概略は、全血 $15 \mu\text{l}$ 、血小板モニター用モノクローナル抗体として PE 標識 CD42b 抗体 (BD Pharmingen 社) $5 \mu\text{l}$ と 2%PFA・PBS $20 \mu\text{l}$ 加えて 30 分間反応する。チアゾールオレンジ (TO:Retic-COUNT 試薬、日本ベクトン・デイッキンソン (株)) を 1ml 加えて、 350G で 30 秒間遠心して赤血球を除き、上清を室温 90 分反応させる。検体対照には TO の代わりに PBS を入れ 90 分反応させた。反応後、FACSCalibur (日本ベクトン・デイッキンソン (株)) を用いて、それぞれの血小板数を 1 万個測定し、RP% の解析には CellQuest Pro を使用した。

3. IPF 法

概略は、EDTA-2K 加末梢血を用い、IPF 解析用ソフトウェア XE-Pro シリーズを搭載した多項目自動血球分析装置 XE-2100 (シスメックス (株)) にて血小板数、IPF% を求めた。IPF は本装置の網状赤血球測定チャンネルにて測定・解析した。

4. 統計処理の方法

平均値の差の検定は Student の対応のない T 検定を、また相関検定はスピアマンの順位相関係数検定を用いた。

C. 研究結果

1. 基準値

FCM 法を用いて健常人 ($n=58$) の網状血小板値 (%) を検討すると、その RP% 値は

$4.6 \pm 1.4\%$ (mean \pm 1SD) であり mean + 3SD 以下つまり 8.7% 以下を基準値とした。

一方、多項目自動血球分析装置 XE-2100 において同一検体を検討すると IPF% 値は、 $2.7 \pm 1.4\%$ (mean \pm 1SD) であり、mean + 3SD 以下つまり 7.0% 以下を基準値とした。

2. ITP 症例における FCM 法と IPF 法の相関関係

次に ITP61 例の検体に関して FCM 法 (RP%) および IPF 法 (IPF%) の両者を用いて測定し、RP% と IPF% を比較検討した。両者には $Y=0.806X-0.050$ ($r=0.634$, $p<0.001$) と比較的良好的な相関を認めた。しかしながら、その式から大きくずれる検体も若干存在した。

3. ITP および AA 症例における RP% と IPF% の比較検討

上記 ITP 症例と AA 症例の RP% と IPF% の陽性率を比較検討した。

FCM 法による RP% は ITP 症例では $15.5 \pm 19.1\%$ (mean \pm 1SD) であり、健常人 ($4.6 \pm 1.4\%$) に比して有意 ($p<0.001$) に増加していた。AA 症例では $4.0 \pm 1.6\%$ であり健常人と較べると統計上有意に ($p<0.05$) 低下していた。ITP で 82% (50/61)、AA で 7% (2/27) と ITP で高値であった。

一方、IPF 法における IPF% は ITP では $12.7 \pm 11.6\%$ と健常人 ($2.7 \pm 1.4\%$) に比して有意 ($p<0.001$) に高値であった。それに対して AA では FCM 法とは異なり $6.2 \pm 3.7\%$ と健常人に比較し軽度上昇 ($p<0.001$) していた。また基準値以上であった症例数、即ち陽性率は健常人で 2%

(1/58)、ITP で67% (41/61)、AA で37% (10/27) と ITP で高値であった。

4. ITP の鑑別診断における FCM 法と IPF 法の比較

血小板の破壊亢進状態である ITP 症例と血小板産生低下である AA 症例に対して、FCM 法と IPF 法の ITP 診断法としての感受性、特異性および予測値を比較検討した。その結果、FCM 法の ITP 診断の感受性 82%、特異性 93%であり、一方 IPF 法は感受性 67%、特異性 63%であった。このように、その感受性、特異性において FCM 法が IPF 法に比較し優れていることが明らかになった。

以上の成績より、IPF 法は簡便であり汎用検査として普及する可能性はあるも、その精度は FCM 法に較べ若干劣っていることが明らかになった。今回の検討では、ITP 群と AA 群の鑑別診断における、ITP 群の感受性は 67%であり、FCM 法では 82%であることを考えあわせると、さらに精度を改善させる必要があることが明らかとなった。また、IPF 法では検体の保存が困難であるため、中央検査機関での測定に関してはこの点の改良が課題であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomiyama Y, Shiraga M, Kashiwagi H. Positive and negative regulation of integrin function. Recent advance in thrombosis and hemostasis (Eds. Tanaka K and Davie EW), Springer Japan KK, Tokyo, Japan, 2008, pp243-252
 - 2) 富山佳昭. 抗血小板薬の種類とその作用機序. Clinician 567:18-22, 2008
 - 3) 富山佳昭. 造血障害に対する免疫抑制療法 特発性血小板減少性紫斑病. 血液フロンティア 18:87-93, 2008
 - 4) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 臨床血液 49:14-21, 2002
- #### 2. 学会発表
- 1) Tomiyama Y: Positive or Negative regulatory system for platelet function (Plenary session). 5th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis (2008.9.18, Singapore, Republic of Singapore, Tien SL)
 - 2) Tomiyama Y: Positive or Negative regulatory system for platelet function (Education Session). 49th Korean Society of Hematology Meeting (2008.11.1, Jeju, Korea, Cho HC)
 - 3) Tadokoro S, Shiraga M, Kashiwagi H, Kamae T, Akiyama M, Nakazawa T, Kanakura Y, Tomiyama Y: (Poster) A role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. The American Society of Hematology 50th Annual meeting (2008.12.6-9, San Francisco, USA, Kaushansky K)
 - 4) 富山佳昭: (ランチョンセミナー) 血栓形成の分子機構: ADP 受容体 P2Y₁₂ の役割. 第72回日本循環器学会総会 (2008.3.28-30, 福岡, 松崎益徳)
 - 5) 秋山正夫, 柏木浩和, 東道公人, 田所誠司, 金倉 譲, 富山佳昭: (一

- 般口演) 抗 GPVI 抗体に起因すると
思われる GPVI 欠損症の一例. 第 56
回日本輸血・細胞治療学会総会
(2008. 4. 25-27, 福岡, 佐川公嬌)
- 6) 富山佳昭: (教育講演) 特発性血小
板減少性紫斑病. 第 70 回日本血液
学会総会 (2008. 10. 10-12, 京都,
須田年生)
- 7) 白鹿正通, 釜江 剛, 中澤剛士, 秋
山正夫, 田所誠司, 柏木浩和, 本田
繁則, 富山佳昭, 金倉 譲: (口演)
インテグリン α IIb β ₃ 機能における
P2Y₁₂ の役割- α IIb β ₃ と rap1 活性化
の同期性-. 第 70 回日本血液学会総
会 (2008. 10. 10-12, 京都, 須田年
生)
- 8) 本田繁則, 田所誠司, 前田裕輔, 富
山佳昭, 木下タロウ, 宮田敏行:
(優秀ポスター) 変異導入法を用い
たインテグリン機能発現分子の同定.
第 70 回日本血液学会総会
(2008. 10. 10-12, 京都, 須田年生)
- 9) 富山佳昭: (教育講演) 血栓形成の
分子機構: 促進機構と抑制機構. 第
31 回日本血栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)
- 10) 白鹿正通, 釜江 剛, 中澤剛士, 秋
山正夫, 田所誠司, 柏木浩和, 本田
繁則, 富山佳昭, 金倉 譲: (口演)
血小板インテグリンと Rap1 の機能
における P2Y₁₂ の役割. 第 31 回日本
血栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)
- 10) 秋山正夫, 柏木浩和, 東道公人, 諸
井将明, 小島 寛, 中澤剛士, 田所
誠司, 白鹿正通, 金倉 譲, 富山佳
昭: (ポスター) ITP 合併 GPVI 欠損
例の解析~GPVI 欠損発症メカニズ
ムに関する検討. 第 31 回日本血栓
止血学会学術集会 (2008. 11. 20-22,
大阪, 松尾 理)
- 11) 本田繁則, 池島裕子, 田所誠司, 前
田祐輔, 木下タロウ, 富山佳昭, 宮
田敏行: (学術推進 SPC シンポジウ
ム) 発現クローニングによるインテ
グリン機能発現分子の同定. 第 31
回日本血栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

平成 20 年度 TMA サブグループ研究報告

分担研究者

藤村吉博	奈良県立医科大学輸血部	教授
宮田敏行	国立循環器病センター研究所	部長
和田英夫	三重大学医学部臨床検査医学	准教授

研究協力者：

森木隆典	慶應義塾大学保健管理センター
日笠 聡	兵庫医科大学血液内科
小亀浩市	国立循環器病センター研究所
松本雅則	奈良県立医科大学輸血部

グループ総括

分担研究者：藤村吉博

研究要旨

TMA サブグループでは、本邦 TMA 解析センターとして全国の医療機関から ADAMTS13 解析依頼を受け付け、TMA 症例の集積を行い、データベース化することを行ってきた。1998 年 7 月から 2008 年 12 月の期間に我々が集積した TMA は 922 例と世界に類を見ない症例数となった。この中から先天性 TTP である Upshaw-Schulman 症候群 (USS) を 41 例発見し、36 例で ADAMTS13 遺伝子解析を行った。臨床的特徴の観察の結果、新生児重症黄疸は 19 例 (46%) に認め、FFP の定期輸注は 26 例 (63%) で行われていること、USS 患者は妊娠すると 100% 血小板減少が認められ、その多くは TMA 発作を伴うことを確認した。また、遺伝子解析の結果では、責任遺伝子変異を同定した 34 例中ホモ変異 9 例、複合ヘテロ変異 25 例であること、日本人に多い ADAMTS13 遺伝子異常は R193W や Q449X であり、発見した 34 個の ADAMTS13 遺伝子異常のほとんどが日本人に特有の変異であることが確認した。

A. 研究目的

血栓性微小血管障害症 (TMA) とは、細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、そして血小板血栓による臓器機能障害を特徴とする疾患で、この代表疾患に神経症状優位の血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) と腎臓症状優位の溶血性尿毒症症候群 (HUS) が含まれる。近年、TTP では IgG 型の自己抗体によって von Willebrand 因子 (VWF) 切断酵素 (学術名 ADAMTS13) の活性が著減することが明らかになり、TMA 患者において、ADAMTS13 が注目されている。

このような背景の中でこの TMA サブグループは、1) TMA の多数例解析による病型分類、2) ADAMTS13 抗原・遺伝子解析、3) 確立された ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の評価と普及、4)

ADAMTS13 インヒビターのエピトープ解析、5) TMA (または TTP) の診断・治療ガイドラインの確立、の 5 項目を初期からの一貫した研究目的として掲げている。

奈良医大輸血部は本邦 TMA 解析センターとして日本全国の医療機関から ADAMTS13 などの解析依頼を受け付けてきた。本年度も TMA の患者集積を続行し、平成 20 年 12 月末までに 922 例の TMA の解析を終了した。この中から先天性 TTP である Upshaw-Schulman 症候群 (USS) を 41 例発見した。USS は遺伝的に ADAMTS13 活性が低下している常染色体劣性遺伝の疾患である。USS は先天性疾患であるにもかかわらず、成人になって初めて診断される症例が存在する。その代表が、妊娠によるものであるが、妊娠時に初めて USS と診断した 6 家系 9 症例について

解析した。また、USS 41 例のうち 36 症例で ADAMTS13 遺伝子解析を施行したので報告する。

B. 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: 2007 年 3 月までは、VWF マルチマー法にて主として測定していたが、2007 年 4 月以降は、より簡便で高感度な chromogenic ADAMTS13-act-ELISA 法 (Kato et al, Transfusion 2006 年) を用いて測定している

2. TMA 患者登録: 奈良医大輸血部 HP (<http://www.naramed-u.ac.jp/~trans/>) を介して 1998 年 7 月から 2008 年 12 月末までに全国の 426 医療機関から 1564 名の TMA 疑い症例の解析依頼を受け、ADAMTS13 活性測定を測定した。このうち臨床症状とラボ検査成績から TMA と診断されたのは 922 例であった。

3. ADAMTS13 遺伝子解析: 登録 TMA 患者 922 例中、ADAMTS13 活性著減例 (正常の <3%) は 325 例であったが、この中で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施設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 (主に宮田班員が担当、一部は委託検査にて実施)。

倫理面への配慮

ADAMTS13 遺伝子解析は、奈良県立医大、国立循環器病センター、慶応義塾大学および依頼病院の倫理委員会の承認を得た後、対象者に書面での同意を得た。

C. 研究結果と考察

本邦 TMA 症例の集積状況

奈良医大輸血部は、1998 年に本邦で初めて VWF マルチマー法を利用した ADAMTS13 活性測定法を確立した。その結果、全国の医療機関から ADAMTS13 活性依頼を引き受ける形で、本邦 TMA 解析センターとして活動してきた。1998 年 7 月から 2008 年 12 月までに全国の 426 カ所の医療機関から 1564 名の TMA 疑い症例の解析依頼があり、添付された臨床所見より 922 例を TMA と診断した。これによって世界に類を見ないデータベースが構築された。その症例数の増加の推移を図 1 に示す。ADAMTS13 が同定された 2001 年以降症例数が急激に上昇した。2006 年 10 月より ADAMTS13 活性測定が外注検査で測定可能となり、症例数の増加はやや鈍化した。現在も症例数は増加している。USS は非常に稀な疾患であると報告されているが、我々の最終的な症例数は 41 例で、922 例中の 4.4% を占めている。この比率はこの数年は変化していないことより、USS の TMA 全体に占める割合は 4-5% と比較的高頻度ではないかと予想している。

2008 年 12 月における 922 例の内訳は、先天性 65 例、後天性 857 例であった。後天性の中で基礎疾患を認めない特発性が 392 例で、臨床所見より TTP と診断されたものが 288 例、HUS が 104 例であった。2 番目に症例数の多い膠原病合併 TMA が 223 例あり、その解析の詳細はグループリーダーの藤村の分担研究報告に記載した。

ADAMTS13 活性著減症例は、TMA 全体 922 例中 325 例 (35%) と低率であるが、後天性特発性 TTP 288 例に限ると 198 例 (69%) と高率であった。これは、海外からの後天性 TTP における ADAMTS13 著

減症例の比率が平均 75%であるとする報告と一致する結果であり、基礎疾患の存在しない TTP 症例は、多くの症例で ADAMTS13 活性が著減していると考えられる。一方、後天性特発性 HUS では ADAMTS13 活性著減例は 1 例も認めなかった。基礎疾患に伴う 2 次性 TMA で ADAMTS13 活性が著減する症例が多いのは、抗血小板薬チクロピジン内服に伴う TMA のみである。膠原病に合併した TMA でも ADAMTS13 活性が著減する症例は存在するが、21%に留まった。

以上のごとく多数例の解析によって、基礎疾患による ADAMTS13 活性の特徴が明らかになったが、全体の約 2/3 を占める ADAMTS13 活性が著減しない症例の病因の解明が今後の課題である。

本邦 USS の解析状況

USS の臨床的特徴

まず、本邦 USS の臨床的な特徴を解析した。USS に特徴的とされる交換輸血を必要とするような新生児期の重症黄疸が認められた症例は 41 例中 19 例 (46%) に過ぎず、半数以上の症例で新生児期重症黄疸は認めなかった。小児期に繰り返し血小板減少を認めた症例は 32 例 (78%) であったが、残りの 9 例は血小板減少を認めなかったということではなく、検査すらされていなかった可能性が残った。

また、妊娠時に初めて USS と診断された症例を 6 家系 9 症例認めた。9 症例で 16 回の妊娠を確認したが、すべての妊娠で血小板減少を認めた。これは、妊娠 20 週以降に発生し、しばしば TMA 発作を伴うことから、胎児側の流産のみでなく、母体側にも危険が高く、妊娠する前に

USS と診断しておくことが重要であることが認識された (Br J Haematol 144:742, 2009)。

USS は常染色体劣勢遺伝であることより男女比は 1 体 1 であると考えられるが、我々の症例では 16 対 25 で女性が優位であった。これは、妊娠時に発症する症例が多いことが関係していると予想され、男性では高齢になるまでも USS が見逃されている可能性がある。実際、50 才を過ぎて USS と診断された男性 USS を 3 例経験しており、これらは手術後などに TMA を発症していることから臨床的に重要な問題であると思われ、今後検討が必要であると考えている。

現在、USS の唯一の治療法である新鮮凍結血漿 (FFP) を定期的に輸注している症例は 41 例中 26 例 (63%) に過ぎず、約 1/3 の症例は通常は無治療で、血小板減少などを認めた場合にのみ FFP を投与されている。

USS の ADAMTS13 遺伝子解析

USS の地理的分布を図 2 に示す。41 例の USS のうち、36 例で ADAMTS13 遺伝子解析を実施し、34 例で責任遺伝子変異を同定した。9 例がホモ接合体異常、34 例が複合ヘテロ接合体異常であった。未発表の変異を含め、34 種類の遺伝子異常を確認したが、3 種類の異常を除く 31 種類は本邦に特有な変異であった。R268P はフランスからの報告中のハイチ人、R349C は中国人、330+1 g>a は韓国人に認められた。このうち 2 アレル以上で確認された変異は 11 種類で、R193W が 7 アレル、Q449X は 5 アレルで発見された。これらの ADAMTS13 遺伝子異常の地理的分布を検討すると、R193W は本州と四国

に広く分布するのに対し、Q449Xは東北地方に収束して発見されていた。Q449X変異は3症例で確認されているが、このうち1例は札幌で発見されたホモ接合体異常症例である。この症例の家系調査を行ったところ両親とも先祖が東北地方の出身であることが判明した

以上のようにUSS解析においては、既往歴や家族歴などの徹底した病歴の解析が重要である。今後も日本全国に散在しているTMA患者の主治医との連携を大切にし、臨床所見に基づいたTMAの解析を行う予定である。

D. 結論

本邦TMA解析センターとしての活動を通じて、922例のTMA患者を集積した。その中から、USS患者41例を発見し、36例のADAMTS13遺伝子解析を行った。genotype-phenotype両面からUSSを解析することで、妊娠発症USSや日本人特有のADAMTS13遺伝子異常の発見など新たな知見を得ることができた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表

英文原著

Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, Ishizashi H, Kato S, Matsuyama T, Isonishi A, Ishikawa M, Yagita M, Morioka C, Yoshiji H, Tsujimoto T, Kurumatani N, Fukui H. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost* 99:1019-1029, 2008

Furukoji E, Tanaka N, Yamashita A, Matsumoto M, Fujimura Y, Yamamoto R, Tamura S, Asada Y. Ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase inhibits ATP- and ADP-induced vasoconstriction. *Thromb Res* 121:583-585, 2008

Kokame K, Aoyama Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Inherited and *de novo* mutations of ADAMTS13 in a patient with Upshaw-Schulman syndrome. *J Thromb Haemost* 6:213-215, 2008 (letter)

Shida S, Nishio K, Sugimoto M, Mizuno T, Hamada M, Kato S, Matsumoto M, Okuchi K, Fujimura Y, Yoshioka A. Functional imaging of shear-dependent activity of ADAMTS13 in regulating mural thrombus growth under whole blood flow conditions. *Blood* 111:1295-1298, 2008

Horii M, Uemura S, Uemura M, Matsumoto M, Ishizashi H, Imagawa K, Iwama H, Takeda Y, Kawata H, Nakajima T, Fujimura Y, Saito Y. Acute Myocardial Infarction as a Systemic Prothrombotic Condition Evidenced by Increased von Willebrand Factor Protein Over ADAMTS13 Activity in Coronary and Systemic Circulation. *Heart and Vessels* 23:301-307, 2008

Morioka C, Uemura M, Matsuyama T, Matsumoto M, Kato S, Ishikawa M, Ishizashi H, Fujimoto M, Sawai M,

Yoshida M, Mitoro A, Yamao J, Tsujimoto T, Yoshiji H, Urizono Y, Hata M, Nishio K, Okuchi K, Fujimura Y, Fukui H. Plasma ADAMTS13 activity parallels the APACHE II score, reflecting an early prognostic indicator for patients with severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 43:1387-1396, 2008

Kanno M, Nakamura S, Kawahara M, Ueno S, Nakamine H, Matsumoto M, Fujimura Y. Chemotherapy-resistant intra-vascular lymphoma accompanied by ADAMTS13 inhibitor successfully treated with rituximab. *Int J Hematol* 88:345-347, 2008. (letter)

Kato K, Kobayashi C, Katayama Y, Moriyama N, Shiono J, Kudo K, Koide K, Aoki K, Fujisawa K, Okada M, Matsumoto M, Fujimura Y, Tsuchida M. A one-month-old boy with acute idiopathic thrombocytopenic purpura complicated with intracranial hemorrhage in association with minor head trauma. *J Ped Hematol Onc* 2008 (in press).

Zakarija A, Kwaan HC, Moake JL, Bandarenko N, Pandey DK, Mckoy JM, Yarnold PR, Raisch DW, Winters JL, Raife TJ, Cursio JF, Luu TH, Richey EA, Fisher MJ, Ortel TL, Tallman MS, Zheng XL, Matsumoto M, Fujimura Y, Bennett C. Ticlopidine- and clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): review of clinical, laboratory,

epidemiological, and pharmacovigilance findings (1989-2008). *Kidney Int* 75:S20-S24, 2009

Fujimura Y, Matsumoto M, Kokame K, Isonishi A, Soejima K, Akiyama N, Tomiyama J, Kazuhiko Natori K, Kuranishi Y, Imamura Y, Inoue N, Higasa S, Seike M, Kozuka T, Hara M, Wada H, Murata M, Ikeda Y, Miyata T, George JN. Pregnancy-induced thrombocytopenia and thrombotic microangiopathy in Upshaw-Schulman syndrome: Clinical observations and *ADAMTS13* gene analysis in nine patients representing six families. *Br J Haematol* 144:742-754, 2009

英文総説

Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H. Thrombotic microangiopathy. Recent Advances of Thrombosis and Hemaostasis. Springer Verlag, pp625-639, 2008.

Uemura M, Fujimura Y, Matsuyama T, Matsumoto M, Ishikawa M, Ishizashi H, Tsujimoto T, Yoshiji H, Fukui H. Potential roles of ADAMTS13 in the development of alcoholic hepatitis. *Current Drug Abuse Reviews* 1:188-196, 2008

日本語総説

加藤誠司、藤村吉博. 凝固因子活性測定 VWF 切断酵素 [VWF-CP] «ADAMTS13» von Willebrand factor-cleaving protease. 臨床検査データブック

2009-2010. pp371、2009

藤村吉博、石西綾美、松本雅則. ADAMTS13の最近の話題. Coagulation & Inflammation 3:1-9, 2009

松本雅則、藤村吉博. ADAMTS13とTTP—最近の進歩—. Annual Review 血液 2009. pp209-216、2009

松本雅則、藤村吉博. von Willebrand病—最近の進歩. Annual Review 血液 2008. pp211-220、2008

植村正人、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病. 血栓と循環 16:15-21, 2008

藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病. 講義録 血液・造血器疾患学. pp250-252, 2008

藤村吉博. 溶血性尿毒症症候群. 講義録 血液・造血器疾患学. pp253-255, 2008

藤村吉博. TTP/TMAの診断と治療. CLINICIAN 55:110-114, 2008

藤村吉博. TTP/の診断と治療. 日本血栓止血学会誌 19:358-362, 2008

藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病の診断と治療. 日本内科学会雑誌 97:295-302, 2008

藤村吉博、植村正人. 肝産生酵素 ADAMTS13と血栓症. 臨床血液 49:1420-1433, 2008

植村正人、藤村吉博. TTP. 腎と透析. 65:421-427, 2008

学会発表

西口貴司、西尾健治、田淵由希子、浅井英樹、北岡寛教、石西綾美、松本雅則、藤村吉博、渡邊知朗、奥地一夫. 血漿交換・ステロイドパルス療法に抵抗するもリツキマシブが奏効したTTPの一例. 第70回日本血液学会総会(於:国立京都国際会館、平成20年10月11日)

東浦壮志、岡田恵子、朴永東、大杉夕子、松尾崇史、大塚康義、宇城敦司、徳平夏子、嶋岡英輝、松本雅則、石西綾美、藤村吉博、原純一. 早期のRituximab投与が奏効した血栓性血小板減少性紫斑病の小児例. 第70回日本血液学会総会(於:国立京都国際会館、平成20年10月12日)

植村正人、福井博、藤村吉博. 重症肝臓疾患とADAMTS13. 第29回日本アフェレーシス学会学術大会(於:広島国際会議場、平成20年11月23日)

小西康司、森田友規、切畑屋智史、岩下裕一、横田基次、萱島道徳、米田龍生、吉田克法、石西綾美、松本雅則、藤村吉博. 第29回日本アフェレーシス学会学術大会(於:広島国際会議場、平成20年11月22日)

藤田百合、武山雅博、内田賀子、柴田真理、釜本智之、新居育世、井崎和史、西久保敏也、高橋幸博、佐道俊幸、赤坂珠理晃、西岡和弘、小林浩、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、結石杏奈、

松本雅則、藤村吉博、胎児期治療で管理した重症 Rh 不適合妊娠の 2 例. 第 52 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会学術講演会 (於: 奈良県立医科大学、平成 20 年 11 月 29 日)

松本雅則、石西綾美、藤村吉博、造血幹細胞移植後 TMA に対する FFP 定期輸注による治療効果. 第 52 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会学術講演会 (於: 奈良県立医科大学、平成 20 年 11 月 29 日)

西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、結石杏奈、松本雅則、藤村吉博、奈良医大輸血部における血漿分画製剤管理体制の確立をめざして. 第 52 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会学術講演会 (於: 奈良県立医科大学、平成 20 年 11 月 29 日)

松本雅則、植村正人、加藤誠司、石指宏通、松山友美、石川昌利、森岡千恵、辻本達寛、藤本正男、福井博、藤村吉博、新鮮凍結血漿 (FFP) の予防的投与は造血幹細胞移植後の肝 VOD 発症を予防する. 第 44 回日本肝臓学会総会 (於: 愛媛県県民文化会館、平成 20 年 6 月 6 日)

石西綾美、藤村吉博、松本雅則、加藤誠司、小亀浩市、宮田敏行、本邦 Upshaw-Schulman 症候群 37 例の phenotype-genotype 解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 (於: 大阪国際交流センター、平成 20 年 11 月 21 日)

竹田知広、松本雅則、櫻井嘉彦、嶋緑倫、藤村吉博、ADAMTS13 活性の低下がみられ

た悪性高血圧の 1 例. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 (於: 大阪国際交流センター、平成 20 年 11 月 21 日)

松本雅則、石西綾美、藤村吉博、中山京子、井上雅美、河敬世. 造血幹細胞移植後 TMA に対する FFP 定期輸注による治療効果. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 (於: 大阪国際交流センター、平成 20 年 11 月 21 日)

山口雄亮、森木隆典、和田英夫、松本雅則、藤村吉博、池田康夫、村田満. 血栓性血小板減少性紫斑病にみられる自己抗体 IgG が結合する ADAMTS13 エピトープ配列. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 (於: 大阪国際交流センター、平成 20 年 11 月 22 日)

岩田宏紀、鈴木崇、松本雅則、藤村吉博、一瀬白帝. 重度 Plasminogen 欠損症における代替的線溶機構の解析. 第 31 回日本血栓止血学会学術集会 (於: 大阪国際交流センター、平成 20 年 11 月 22 日)

Yusuke Yamaguchi, Takanori Moriki, Hideo Wada, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Terumichi Nakagawa, Atsuko Igari, Yasuo Ikeda, Mitsuru Murata. Identification of ADAMTS13 peptide sequences recognized by autoantibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. 50th ASH annual meeting. San Francisco (USA), 2008

Masatoshi Ishikawa, Masahito Uemura, Tomomi Matsuyama, Masanori Matsumoto, Masao Fujimoto, Hiromichi Ishizashi,

Seiji Kato, Chie Morioka, Tatsuhiro
Tsujimoto, Toshiyuki Kitazawa,
Hidehito Kawaratani, Yoshihiro
Fujimura, Hiroshi Fukui. Potential
role of enhanced cytokinemia and
endotoxemia on the decreased activity
of plasma ADAMTS13 in patients with
alcoholic hepatitis. 50th ASH annual
meeting. San Francisco (USA), 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 本邦TMA患者922例のADAMTS13とそのインヒビター活性
(奈良医大輸血部1998.7-2008.12)

	先天性TMA (n=65)		後天性TMA (n=857)										合計	
	Upshaw-Schulman 症候群 (n=41)	原因不明 (n=24)	特異性* (n=392)		寛物** (n=35)			膠原病 (n=223)	悪性腫瘍 (n=61)	造血幹細胞 移植 (n=54)	妊娠 (n=15)	E. coli O157:H7 (n=31)		その他 (n=46)
			TTP (n=286)	HUS (n=104)	TC/CL (n=23)	MMC (n=10)	他の寛物 (n=2)							
ADAMTS13 活性 (%)														
□	40	0	198	0	19	0	2	46	5	0	4	0	11	325
31~25 (1)	4	4	73	20	2	2	0	67	23	16	4	4	16	234
25~10	0	9	14	47	1	5	0	67	22	24	4	17	7	217
≥50	0	11	3	37	1	3	0	43	11	12	3	10	12	148
インヒビター (Bethesda U/ml)	(n=41)	(n=23)	(n=286)	(n=104)	(n=23)	(n=7)	(n=2)	(n=187)	(n=26)	(n=15)	(n=6)	(n=16)	(n=21)	(n=696)
<0.5	41	23	33	41	2	7	0	79	13	11	3	14	6	275
0.5~2	0	0	131	2	6	0	2	60	8	4	2	0	7	242
≥2	0	0	122	0	15	0	0	28	5	0	3	0	8	181

* TTPとHUSの鑑別は臨床データによる。

** TC (テクロロピリン)、CL (クロロドグレム)、MMC (マイトマイシンC)、他の寛物: PEG-IFN、ハイアグラ

(1) TTP発症下でのADAMTS13活性(□ %)

図1. 奈良医大で輸血部で集積したTMA症例数の推移

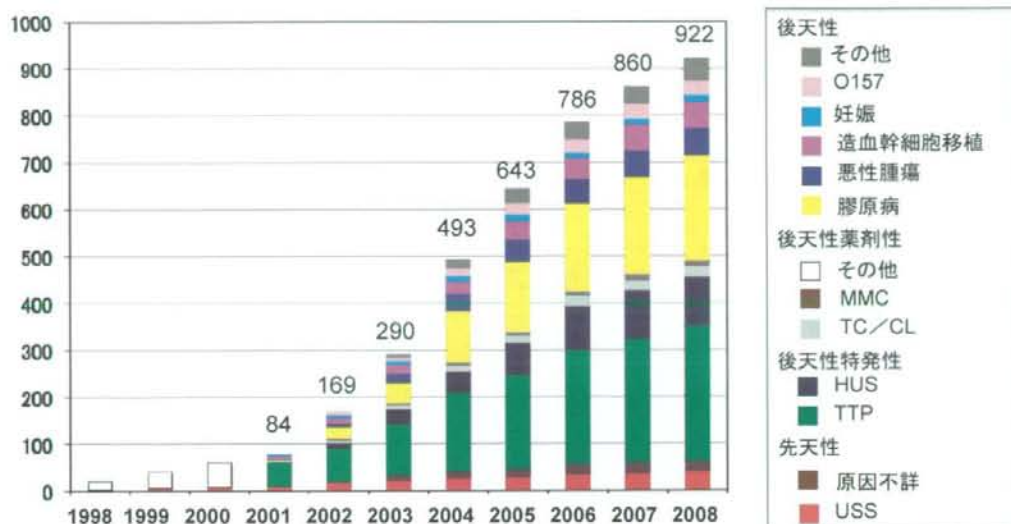
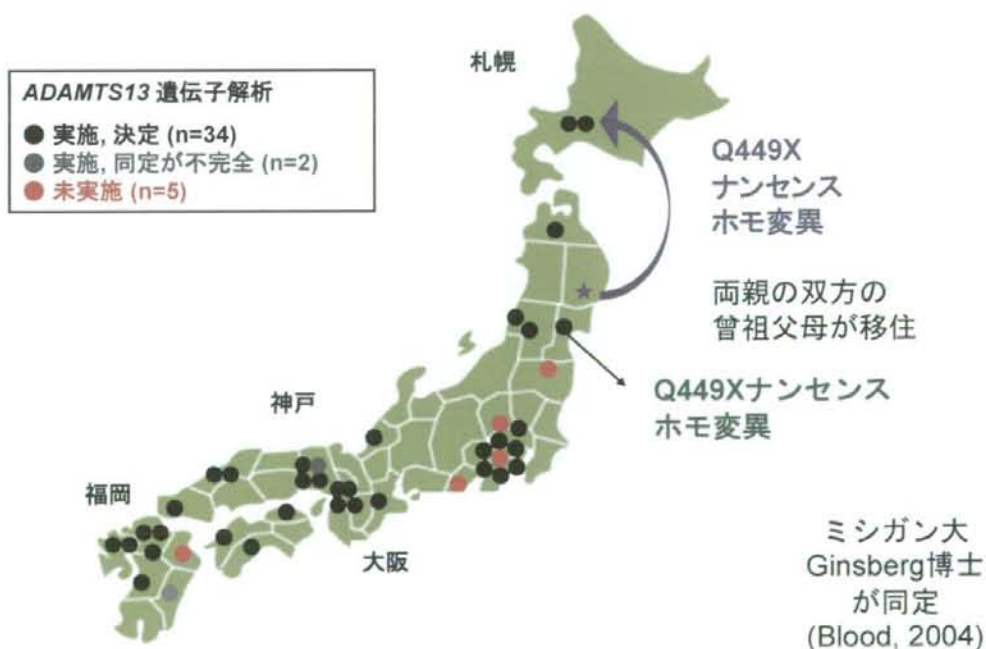


図2. 本邦USS 41例の地理的分布



膠原病 TMA における ADAMTS13 と臨床所見の解析

分担研究者 藤村 吉博 奈良県立医科大学 輸血部 教授
研究協力者 松本 雅則 奈良県立医科大学 輸血部
松山 友美 奈良県立医科大学 輸血部
桑名 正隆 慶應義塾大学 内科

研究要旨

後天性特発性 TTP では、IgG 型の自己抗体によって ADAMTS13 活性が著減することが明らかとなった。SLE などの膠原病に TMA が合併することは知られているが、多数例での解析は無く、病態も明らかになっていない。今回我々は、本邦 TMA 解析センターとして活動している奈良医大輸血部で集積した多数の TMA の中から、膠原病 (SLE, SSc, PM/DM, RA) について解析した。その結果、膠原病合併 TMA の中で ADAMTS13 活性が著減するタイプの比率は 17%であったが、この頻度は基礎疾患によって大きく異なることが判明した。また、ADAMTS13 活性が著減するタイプは、著減しないタイプに比べて、血小板減少が高度で、腎障害が軽度である傾向が認められた。

A. 研究の目的

膠原病の代表疾患である SLE に血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) が合併することは古くから報告されているが、症例報告程度で大規模な検討は報告されていない。近年、後天性特発性 TTP (ai-TTP) では、IgG 型の自己抗体 (インヒビター) によって ADAMTS13 活性が低下することが明らかとなった。

今回我々は、全国の医療機関から ADAMTS13 解析依頼を受けた血栓性微小血管障害症 (TMA) の中の膠原病合併 TMA (CTD-TMA) から、SLE、強皮症、多発性筋炎・皮膚筋炎、慢性関節リウマチの 4 疾患 127 例について ADAMTS13 を解析し、併せて臨床所見と治療予後について検討した。

B. 研究方法

対象: 1998 年 7 月から 2006 年 12 月までに奈良医大輸血部で集積した 783 例の TMA で膠原病 (自己免疫疾患) に合併した 187 例のうち、下記の 4 疾患 127 例を解析した: 全身性エリトマトーデス (SLE) 64 例、強皮症 (SSc) 42 例、多発性筋炎・皮膚筋炎 (PM/DM) 11 例、慢性関節リウマチ (RA) 10 例。対照として 2006 年 3 月から 2008 年 4 月に経験した ai-TTP 64 例と健常人 (20-40 歳) 20 例を同様に検討した。

方法: ADAMTS13 活性は、我々の開発した ELISA (Kato et al. Transfusion 46:1444-1452, 2006) で、ADAMTS13 抗原は我々の作成したモノクローナル抗体 2 種類を使ったサンドイッチ ELISA (Yagi

H, et al. *Int Hematol* 85:403-407, 2007) で測定した。ADAMTS13 活性阻害抗体 (インヒビター) は、正常血漿中の ADAMTS13 活性を 50% 阻害する抗体価を 1 Bethesda 単位とした。IgG 型自己抗体の検出は、血漿から精製した ADAMTS13 を SDS-5% PAGE で電気泳動後、PVDF 膜に転写し、被検血漿と反応させ、抗 IgG ポリクローナル抗体で検出するウエスタンブロットにて行った (Uemura M, et al. *Thromb Haemost* 99:1019-1029, 2008)。von Willebrand 因子 (VWF) 抗原量はポリクローナル抗体 2 種類のサンドイッチ ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

検体採取に際しては、主治医より十分な説明を行い、同意を得た。

C. 研究成果

表 1 に示すように CTD-TMA 4 疾患に分類し、ai-TTP を加えた 5 疾患について臨床的特徴と予後を比較した。TMA 発症年齢について、SLE は他の疾患に比べて有意に低かった。男女比は、CTD-TMA 群では、ai-TTP に比べて有意に女性が多かった。血小板数は、ai-TTP では CTD-TMA に比べて有意に低く、CTD-TMA の中では SSc が有意に高かった。興味深いことに、CTD-TMA では ai-TTP に比べて有意に VWF 抗原量は高かった。死亡率は、SLE と ai-TTP で有意に低かった。

次に図 1 に示すように ADAMTS13 活性と抗原について解析した。活性、抗原とも CTD-TMA すべての疾患で健常人に比べて有意に低かったが、ai-TTP に比べて有意に高かった。活性と抗原を比較すると、CTD-TMA および ai-TTP 両者とも、活性が 0.5% 未満に低下している症例での抗

原については、ばらつきが大きかった (図 1b)。それに対して、活性著減例以外の症例では正の相関が認められた。図 2 に示すように、ADAMTS13 活性が 0.5% 未満に著減する症例の比率は疾患によって大きく異なり、ai-TTP では 70% と大半を占めるが、CTD-TMA で最も比率の高い RA で 30%、SLE 23%、PM/DM 9%、SSc 5% であった。

ADAMTS13 に対するインヒビターの陽性率は、ai-TTP では 80% であるのに対して、SLE 32/64 (50%)、SSc 21/42 (50%)、PM/DM 6/11 (55%)、RA 6/10 (60%) であった。CTD-TMA の活性著減症例以外に認められるインヒビターは、多くは 1 BU/ml 未満の低値であった。さらにこのインヒビターの性状について解析した。ADAMTS13 活性著減 CTD-TMA 症例 21 例中 18 例で IgG 型の自己抗体が検出された。活性 0.5-20% では 40 例中 2 例、25% 以上 66 例中では 1 例も IgG 型の自己抗体は認めなかった。

ADAMTS13 活性別に CTD-TMA の臨床的特徴を解析した (表 2)。ADAMTS13 活性著減例では、TMA の発症年齢が低く、血小板数も低かった。また、活性著減例は、血清クレアチニン値が低く、腎障害の出現頻度も有意に低かった。予後に関しては、活性著減例で死亡率が低い傾向が認められた。CTD-TMA で認められた以上の結果は、ai-TTP でも同様の傾向が認められた。

D. 考察

今回の我々の検討より CTD-TMA は少なくとも 2 つの病因に分類できることが確認された。1 つは ai-TTP と同様の IgG 型自己抗体によって ADAMTS13 活性が著