

ADAMTS13 機能と関連する重要なアミノ酸配列の探索

慶應義塾大学 保健管理センター 森木 隆典

平成 20 年度より、ADAMTS13 機能解析を目標として、以下に示すテーマを設定して研究を行ってきた。

1. モノクローナル抗体エピトープマッピングによる ADAMTS13 機能ドメインの解析
2. TTP 患者 IgG が結合する ADAMTS13 アミノ酸配列の解析
3. TTP 患者における新規自己抗体探索の試み
4. VWF における ADAMTS13 結合アミノ酸配列の探索

以下、現時点での進行過程と今後の予定を各テーマ別にまとめる。

モノクローナル抗体エピトープマッピングによる ADAMTS13 機能ドメインの解析
抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体 14 種類（化血研副島先生、奈良県立医大藤村先生より供与）につき、ADAMTS13 フェージライブラリーを用いて抗体エピトープマッピングを行ったところ、11 種類の抗体についてエピトープが判明した（2009 年アメリカ血液学会発表）。現在は、ディスインテグリン領域に注目し、VWF との結合に重要と考えられるアミノ酸配列を解析中である（2010 年日本血栓止血学会発表）。

TTP 患者 IgG が結合する ADAMTS13 アミノ酸配列の解析

TTP 患者 IgG（三重大学和田先生、奈良県立医大藤村先生より供与）につき、ADAMTS13 フェージライブラリーを用いてエピトープマッピングを行ったところ、スパーサー領域に重要と考えられるアミノ酸配列を見出した（2008 年アメリカ血液学会発表）。現在、このアミノ酸配列に結合する自己抗体を定量的に検出する系を作成中である。

TTP 患者における新規自己抗体探索の試み

肝細胞や骨髄細胞由来の cDNA フェージライブラリーを作成し、TTP 患者 IgG によるスクリーニングを試みたが、有意と考えられる新規自己抗原は得られなかった。ひとえにライブラリーの性能によるところが大きいと思われるため、高性能ライブラリー作成のための条件検討が必要と考えられる。

VWF における ADAMTS13 結合アミノ酸配列の探索

VWF 側の ADAMTS13 結合アミノ酸配列探索を目的とし、VWF 由来のペプチド配列を発現するフェージライブラリーを作成した。ADAMTS13 全長やドメインごとのリコンビナント蛋白などを用いてスクリーニングを予定している。

以上。

インテグリン α IIb (R995W) 変異をもつ血小板減少症例の解析

大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科、大阪大学医学部附属病院輸血部
柏木 浩和、富山 佳昭

先天性の血小板減少症をきたす疾患として、May-Hegglin 異常や BSS などが知られており、時に ITP と誤診されることもある。最近、integrin α IIb β 3 の β 3 細胞膜直下の β 3 (D723H) 変異による家族性血小板減少例が報告された。 β 3 (D723) は α IIb (R995) と水素結合を形成し、 α IIb β 3 を非活性化状態に保つために重要であることが明らかにされているが、我々は、その α IIb (R995) において、Arginine が Tryptophan に変異した α IIb (R995W) 変異を有する家族性血小板減少例を見いだした。【症例】24 歳女性。15 歳時に近医を受診した際に、鉄欠乏性貧血および軽度血小板減少を指摘。その後も血小板数は常に $6-10$ 万/ μ l 程度であった。高校生頃まではやや生理出血が多く、また紫斑を認めることが多かった。骨髓検査等施行され ITP と診断、無治療にて経過をみられていたが、母親および母方祖父において、発端者と同様の軽度血小板減少 ($6-10$ 万) が指摘されたことから、先天性血小板減少症が疑われ当院に紹介された。【結果】一般検査では、軽度の血小板減少およびやや大型の血小板を認める以外に異常認めず。網状血小板、TPO は正常範囲内。コラーゲンおよび ADP による血小板凝集は軽度の障害が疑われた。血小板表面の α IIb β 3 発現は正常例の $60-70\%$ 程度であった。患者遺伝子を検討した結果、患者は α IIb (R995W) 変異のヘテロ接合体であり、母親において同じ変異の存在が確認された。患者血小板は未刺激状態において PAC-1 の軽度の結合を認めた。 α IIb (R995W) を β 3 とともに 293T 細胞に発現させて検討を行った結果、PAC-1 およびフィブリノゲン結合の増加および未刺激状態における FAK のリン酸化が認められた。【考察】 α IIb (R995W) 変異は、國島らにより本例を含めて本邦において既に 4 家系において認められている。すべて本例と同様の軽度血小板減少およびやや大型の血小板を認めており、本邦における先天性血小板減少の主要な原因のひとつである可能性がある。我々は α IIb (R995W) 変異において α IIb β 3 の細胞表面での発現低下、 α IIb β 3 および FAK の恒常的な活性化を認めたが、 α IIb (R995W) 変異が血小板数低下、血小板サイズ増大をきたすメカニズムの解明、さらにこの変異が生理的病的血栓形成に影響を与えるかどうかは今後の検討課題である。

妊娠合併 I T P の治療ガイドライン作成に関するコンセンサス

藤村欣吾 広島国際大学

I T P の治療の今年度の目標は 1) 妊娠合併 I T P の治療ガイドラインの作成、
2) I T P 治療ガイドラインの作成を掲げた。この内妊娠合併 I T P の治療ガイドライン作成の手順として今回本研究班員に主要項目に関する意見聴取を行ったのでその結果を報告する。

8 名の班員の意見のまとめは以下の如くである。

1. 妊娠可否の基準： 治療中で出血なし、かつ血小板数 > 5 万 或いは
無治療で血小板数 > 3 万 のいずれか
2. 治療対象となる場合：何らかの出血傾向がある
3. 妊娠中の治療開始時期：妊娠初期（15 週以内）を避ける
4. 治療法：緊急時 I V I g G, 通常は副腎皮質ステロイド
5. 初回副腎皮質ステロイド使用量：プレドニン換算 20~30 mg/day
6. 治療目標：出血傾向消失 或いは 血小板数 > 3 万
7. 分娩時出血管理の対象：血小板数 < 5 万
8. 分娩時の治療法：I V I g G, 血小板輸血、副腎皮質ステロイド
9. 腰椎麻酔、帝王切開時の必要血小板数：血小板数 > 5 万
10. 経膈分娩時の必要血小板数：血小板数 > 5 万
11. 妊娠中の児の血小板数の測定：必要なし
12. 血小板減少児に対する治療適応：出血傾向がある
13. 血小板減少児に対する治療：I V I g G
14. 児に対する副腎皮質ステロイド使用量：プレドニン換算 < 10 mg/day

今後の予定として以上の結果をもとに妊娠合併 I T P の治療ガイドライン原案を作成し、班としての意見統一を計り、班員以外の専門家へ意見聴取を行う方向を考えている。

ご意見を頂いた班員、研究協力者（敬称略）：富山佳昭（大阪大学）、桑名正隆（慶應大学）、宮川義隆（慶應大学）、倉田義之（四天王寺大学）、小島哲人（名古屋大学）、小林隆夫（県西部浜松医療センター）、高蓋寿朗（西神戸医療センター）

制御性 T 細胞が特発性血小板減少性紫斑病の発症を抑制する

○桑名正隆 西本哲也 慶應義塾大学内科

近年、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者において CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) の減少や機能異常が報告され、病態との関連が考えられている。これまでに、BALB/c ノードマウスに同系マウス由来 CD4⁺CD25⁻細胞を移入することで作製した Treg 欠損マウスの約 35% は慢性的な血小板減少を自然発症することを示してきた。血小板減少マウスでは、網状血小板比率と PAIgG の増加を伴い、血小板溶出液もしくは脾細胞の培養上清中から正常マウス血小板に結合する抗血小板抗体が検出され、自己抗体産生による血小板減少病態であることを確認した。また、Treg 欠損マウスでみられる血小板減少は移植細胞数に依存すること、他の自己免疫症状とは独立して起きていることがわかった。Treg 欠損マウスの作製時に Treg を同時移植すると、血小板減少の発症が完全に抑制されることから、Treg が ITP の発症抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

今年度は以下の課題について検討する。

① Treg 欠損マウスで産生される抗血小板抗体の対応抗原の同定

ITP 患者でみられる抗血小板抗体は血小板膜糖蛋白である GPIIb/IIIa を高頻度に認識する。そこで、GPIIb/IIIa の発現を欠く GPIIIa 欠損マウス由来の血小板表面を用いて、Treg 欠損マウスで産生される抗血小板抗体の対応抗原が GPIIb/IIIa であるか調べる。

② Treg 移植による血小板減少の治療効果の検討

Treg 欠損マウスにおける血小板減少は Treg の移入により発症を抑制することができた。そこで、血小板減少した Treg 欠損マウスに対して Treg を移植することで治療効果の検討をおこなう。

③ Treg が自己血小板反応性 T 細胞の活性化を抑制する分子メカニズムの追究

Treg の細胞表面に発現している CTLA-4 の関与について検討する。ブロッキング作用を有する抗 CTLA-4 抗体を用いて、Treg 移植による血小板減少の発症抑制効果が失われることを確認する。

臨床調査個人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

研究分担者：倉田義之 四天王寺大学人文社会学部人間福祉学科 教授

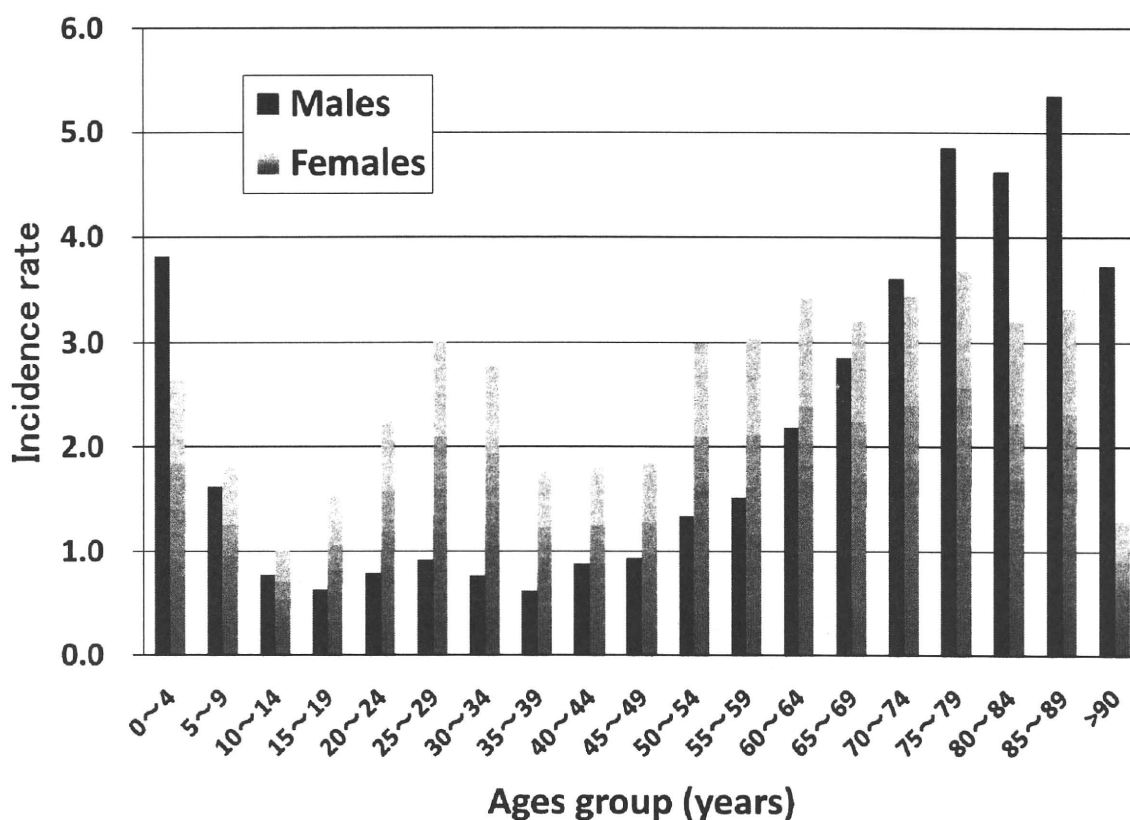
1. 特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症率（2004年～2007年）

Table 1. Overall and sex-specific incidence rates of childhood and adult ITP

	Overall		Childhood		Adult	
	Number of patients	Incidence rate	Number of patients	Incidence rate	Number of patients	Incidence rate
Overall ITP	7,774	2.16	929	1.91	6,845	2.20
Male	3,043	1.72	505	2.01	2,538	1.68
Female	4,731	2.58	424	1.79	4,307	2.69

発症率：10万人当たりの発症者数/年

2. 年齢別・性別発症率（2004年～2007年）



3. 臨床個人調査票の改訂作業を開始

血小板減少症の病態解明と新しい治療戦略開発を目指した基礎的研究

研究協力者：松原 由美子

血小板減少の原因として、血小板破壊・消費および血小板産生低下のいずれか、あるいは両方が関与している。本研究においては血小板の産生低下に注目し、巨核球分化・血小板産生の分子機序を詳細に解明することを目的とする。

これまでの班会議において、(1) 造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導にて巨核球・血小板産生を得るシステムを確立した事、(2) この血小板産生システムを応用した *in vitro* 分化誘導法により、ヒト正常皮下脂肪組織から巨核球・血小板を得た事、(3) 脂肪前駆細胞株 3T3-L1 から *in vitro* にて巨核球・血小板を得た事、を報告した。現在、3T3-L1 から巨核球への分子機序を解明するための検討を重ねており、今回はその進行状況について報告したい。

3T3-L1 細胞を巨核球への分化誘導培地で約 12 日間培養し、培養中の細胞の細胞表面マーカー（フローサイトメトリー法）や発現遺伝子（リアルタイム定量 PCR）の候補因子解析を経時的に行った。分化誘導前細胞は CD45(-)、c-Kit(-)、CD41(-)、CD42b(-)、CD11b、CD44、CD73 は僅かに発現細胞あり、CD105(+)、CD106(+)、CD90(+)、CD29(+)、Sca-1(+)を示した。誘導 12 日の細胞は CD45(+)、CD41(+)、CD42b(+)、CD90 は僅かに発現細胞あり、CD105(-)、CD106(-)、CD29(-)、Sca-1(-)を示した。c-Kit は分化誘導 4 日目細胞で(-)であった。発現遺伝子解析において、分化誘導前に比し、分化誘導 4~5 日、11 日で発現増加が認められたのは NFE2-p45、発現に変化の認められないのは PPARgamma、FOG1、c-mpl、発現低下が認められたのは Fli1、GATA2、いずれの細胞においても発現を認めない因子は GATA1、Oct3/4、Sox2 であり、これら発現を認めない因子はコントロールとして用いた ES 細胞や造血幹細胞では発現を認めた。

今回の検討により認められた、脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞の *in vitro* 分化誘導による巨核球分化の pathway は、3T3-L1 細胞→造血幹細胞や多能性幹細胞→巨核球ではなく、3T3-L1 細胞→巨核球の機構が関与している可能性を示唆している。また、今回認めた transdifferentiation の効率は、これまで報告されたいくつかの study による transdifferentiation 効率に比し高い。現在、この分子機序を解明するための検討を重ねている。

血栓傾向の分子病態解析

名古屋大学医学部 小嶋哲人

生理的凝固制御因子であるアンチトロンビン (AT)、プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) の欠乏は血栓症の発症リスクファクターとなることが知られている。我々は、これまでにこれら凝固制御因子欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因遺伝子変異を同定し、さらに変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。これらの結果は、他者からの報告も合わせて現在までの日本人における変異としてまとめ、我々のホームページ (http://hes.met.nagoya-u.ac.jp/KENSAWEB/labo/blood/bunshi_hp/mutation.html) に掲載している。

今年度はさらに遺伝子解析を進め、AT 欠損症と PC 欠損症の各 2 例に原因と予想される変異を認めた。AT 欠損症 1 例目はイントロン 5 に一塩基置換 (c. 1154-14G>A) を認め、新たなアクセプターサイト (AG) を生ずる既報 (日本人では初) のスプライシング異常 (p. Pro384_Gly385insValPheLeuPro) が同定された。AT 欠損症 2 例目はエクソン 2 に一塩基置換 (c. 269T>G) をヘテロに認め、これは新規のミスセンス変異 (p. Phe90Cys) で健常人の RFLP 解析にてポリモルフィズムでないことを確認した。一方、PC 欠損症 1 例目はエクソン 9 に一塩基置換 (c. 1000G>A) をヘテロに認め、これは既報のミスセンス変異 (p. Gly334Ser) であった。PC 欠損症 2 例目はエクソン 9 に 2 つの一塩基置換 (c. 1075G>A, c. 1218G>A) を認め、サブクローニング解析の結果これらは別々のアレルに存在することは明らかとなった。前者は既報のミスセンス変異 (p. Met406Ile: Osaka 2) で、後者は新規のミスセンス変異 (p. Val359Ile) で健常人の RFLP 解析にてポリモルフィズムでないことを確認した。

しかし、PCR をもとにしたこれらの直接塩基配列解析法では遺伝子変異を同定できていない症例もあり、今後、MLPA 法など他の手法や他の候補遺伝子解析の必要性があると思われた。

「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の簡易モニタリングに関する臨床研究」の展開

窓岩清治*、坂田洋一 (*発表者)

自治医科大学分子病態研究部

我々はこれまでに、全国の臨床研修医療機関を対象とした「ワルファリン使用に関するアンケート調査」や、二次調査として実施した「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する全国実態個別調査」から、静脈血栓塞栓症予防ガイドラインに準じた用量調節ワルファリン療法が行われているものの、血栓症再発例や出血合併症が大きな問題となっていることを明らかにしてきた。本年度はこれらの調査結果を踏まえて、ワルファリン療法中の合併症の軽減を目的とした「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の簡易モニタリングに関する臨床研究」へと展開することにより、個々の症例に応じたより安全なワルファリン療法確立するためのエビデンスを蓄積していく予定である。

静脈血栓症の基礎研究と医療訴訟問題解決

「深部静脈血栓症のリスクとしての凝固第V因子量」

分担研究者 川崎 富夫 大阪大学心臓血管外科

発表 末久 悦次 大阪大学附属病院医療技術部

血液凝固第V因子 (F-V) は分子量の違いによる F-V1 と F-V2 の二つのフォームで循環しているとされており、低濃度のリン脂質の存在下において、F-Va1 のリン脂質に対する結合は F-Va2 に比べて低く、F-Va1 の活性化プロテインCによる不活化は F-Va2 に比較して約 1.5 倍低いことが報告されている。このことは、F-V のリン脂質に対する結合能の低下は血栓形成を導く可能性を示唆している。

我々は F-V のリン脂質結合能 (F-V:PL-bound) 測定法を構築し、123 名の深部静脈血栓症 (DVT) および 100 名の健常人について血漿中 F-V 抗原量 (F-V:Ag) と F-V:PL-bound の比較を実施した。F-V:Ag と F-V:PL-bound の両者ともに DVT 症例群で健常人群に比較し、有意に低値を示した ($p < 0.05$, $p < 0.005$)。F-V:Ag レベルでは 123 名の DVT 症例の内 30 例 (24.4%) が、また F-V:PL-bound レベルでは 32 例 (26%) がそれぞれの測定のカットオフ値 (健常人の 5th percentile) 以下であり、Odd 比はそれぞれ 6.1 (95%CI: 2.3-16.5) および 6.7 (95%CI: 2.5-17.9) であった。また、DVT 症例群から PS, PC, AT-III 欠乏症を除いた場合、その Odd 比は F-V:Ag で 6.6 (95%CI: 2.4-18.3) および F-V:PL-bound で 7.4 (95%CI: 2.7-20.3) と増加した。さらに、DVT 症例群の 21 例 (17%)、健常人群の 1 例 (1%) は両測定のカットオフ値以下であり、その Odd 比は 21.6 (95%ci: 2.85-163.1) であった。DVT 症例群で 3 例 (F-V:PL-bound/ F-V:Ag 値, 22.6/117.6, 35.9/196, 48/222.2) が F-V:PL-bound 低値, F-V:Ag 高値の乖離を示した。

この結果は、血漿中の低レベルの F-V 量 (特に F-V のリン脂質結合能) が深部静脈血栓症と関係する可能性を示唆する。

アンチトロンビン欠損症 I 型は静脈血栓症リスクが極めて高い

宮田敏行¹、阪田敏幸²、岡本 章²、小久保喜弘³、塘 義明⁴、佐野道孝²

1) 国立循環器病研究センター研究所 , 2) 同センター 臨床検査部, 3) 同センター 予防健診部, 4) 同センター 心臓内科

アンチトロンビン(AT) 欠損症は、静脈血栓塞栓症 (VTE) の血栓性素因である。AT 欠損症は、活性と抗原量がともに低下する I 型欠損症と、活性のみが低下する II 型分子異常症に分類される。II 型は、さらにヘパリン結合障害型 (HBS 型)、反応部位障害型 (RS 型)、多面的障害型 (PL 型) に分類される。404 例の AT 欠損症を文献的に調査した研究では、I 型欠損症と II 型 RS 型・PL 型患者の半数以上は VTE を発症するが、II 型 HBS 型患者はわずか 6 % しか VTE を発症せず、HBS 型の VTE リスクは低いと報告されていた (TH, 1987)。この報告は、文献調査なので、測定法などは施設により異なり標準化されていない。今回、私たちは国立循環器病研究センターの単施設で、AT 活性を測定することにより欠損症を同定し、さらに AT 抗原量を測定することにより、I 型 21 名と II 型 10 名を同定した。次いで、これら患者の VTE 発症を後ろ向きに調べた。その結果、I 型患者の VTE 発症頻度は II 型患者より有意に高く見られ、また VTE は明らかに若年で発症していた。後ろ向きに収集した VTE 発症年齢を用いて、VTE 累積発症率を Kaplan-Meier 法を用いて比較したところ、I 型の VTE 発症リスクは II 型の約 7 倍高いことが判明した (ハザード比: 7.2, 95%CI: 1.9-12.2)。以前、私たちは VTE 患者 (108 例) と地域一般住民群 (4,517 名) に見られる AT 欠損症の頻度を比較し、AT 欠損症はオッズ比 37.9 で VTE のリスクになることを報告した (JTH, 2004)。今回、この集団の AT 欠損症を I 型と II 型に分類したところ、VTE 群の I 型および II 型は 6 例 (5.56%) および 0 例 (0.00%) であり、一般住民群では 2 例 (0.04%) および 5 例 (0.11%) であった。この頻度を比較したところ、I 型は VTE リスクを示したものの (オッズ比: 133, 95%CI: 26.5-666.1)、II 型はリスクではなかった (オッズ比: 3.8, 95%CI: 0.2-68.9)。以上の結果から、AT 欠損症 I 型は II 型分子異常症に比べ VTE に対するリスクが極めて高いことが確認された。VTE の発症管理において、I 型と II 型を鑑別診断することは極めて重要と考えられた。日本人の AT 欠損症 II 型には、AT 富山 (R47C 変異) に代表される II 型 HBS 型が多いと考えられ、VTE リスク評価は I 型と II 型の分類で可能であり、II 型の再分類は必要とされなかったのではないかと考えた。

先天性血栓傾向（アンチトロンビン[AT]、プロテインC[PC]、プロテインS[PS]欠損症）日本人患者の実態調査-最終報告-

慶應義塾大学医学部内科 横山 健次

日本血栓止血学会、日本静脈学会、日本血管外科学会の各学会の評議員の諸先生の中で、現在病院に勤務して診療を行っていると思われる321人を対象にアンケート用紙を送付した。前回の班会議で中間報告を行ったが、最終的に103人の先生から回答を頂き解析を行った（回収率 32%）。詳細な情報を得られた症例は183例、内訳はAT欠損症 50例（男17例、女33例）、PC欠損症 62例（男29例、女33例）、PS欠損症 59例（男24例、女35例）、複数の因子欠損症が12例（男8例、女4例）であった。1回以上静脈血栓塞栓症（VTE）を発症していた症例は142例（78%）であり、VTE発症例の内訳はAT欠損症38例（男12例、女26例）、PC欠損症46例（男21例、女25例）、PS欠損症47例（男22例、女25例）、40歳未満の若年者でのVTE発症はAT欠損症男12例中8例、女26例中15例（うち8例は妊娠・出産に関連）、PC欠損症男21例中9例、女25例中11例（うち3例は妊娠・出産に関連）、PS欠損症男22例中10例、女25例中11例（うち6例は妊娠・出産に関連）、であり、PC、PS欠損症と比較してAT欠損症では男女ともに40歳未満の若年で初回のVTEを発症した症例が多い傾向がみられた。また2回以上VTEを発症した症例はAT欠損症15例、PC欠損症8例、PS欠損症8例と、AT欠損症に多くみられた。VTEの既往のある患者の中で現在も抗凝固薬内服中の症例はAT欠損症38例中34例、PC欠損症46例中29例、PS欠損症は47例中35例であった。以上の結果からAT欠損症患者は、PC欠損症、PS欠損症患者と比較して若年でVTEを発症する例が多く、また再発の危険性も高いことが示唆された。また我が国の先天性血栓傾向を有する患者の多くではVTE発症後長期間抗凝固薬を継続している傾向がみられた。

入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究

—内因性トロンビン産生能 (ETP)を用いた活性化プロテインC感受性比 (APC-sr) —

県西部浜松医療センター 小林 隆夫
浜松医科大学産婦人科 平井 久也

【研究目的】入院患者、とくに術前患者において内因性トロンビン産生能 (Endogenous Thrombin Potential : ETP) に基づく、活性化プロテインC感受性比 (Activated Protein C sensitivity ratio : APC-sr) を測定し、後天性APC抵抗性の状態を把握することによってVTEリスクを評価し、本測定法による静脈血栓塞栓症予知スクリーニング法を確立する。

【方法】ETPとは、合成基質 (S-2238) を用いて血漿中のトロンビン産生を経時的に測定する方法としてHemkerらが報告した手法で (Thromb Haemost .56(1): 9-17, 1986)、現在では合成基質に変わり蛍光基質 (ZGGR-AMC) を用いた測定法となっている。すなわち、クエン酸加血漿にリン脂質、ヒトリコンビナント組織因子を添加し 37°C加温の後、蛍光基質及び CaCl₂を添加し外因系凝固反応を惹起する。生成されたトロンビンは蛍光基質の発色基を切断し、その後アンチトロンビンにより中和され、反応が終結する。一部トロンビンは α_2 マクログロブリンとも結合し、蛍光基質との反応を続けるため、コンピュータ解析によりその影響を除外する。このような蛍光基質の水解反応を一次微分した曲線がトロンビン産生曲線であり、その Area under the curve : AUC をETPとして算出する。本測定系にAPCを添加・反応させることでETPを抑制することができる。患者血漿と正常男性コントロール血漿に 8.7nM のAPCを添加した際のETPの抑制率を比で表したものをAPC-srとして算出する。

リスク評価されたそれぞれの県西部浜松医療センター入院患者 (産婦人科、整形外科、外科等) で、研究に同意が得られた患者血漿のETPおよびAPC-srを測定するが、同時にまた、従来の静脈血栓塞栓症のマーカーであるDダイマー、フィブリンモノマー複合体、プロテインS活性および抗原も測定して個々の相関を検討し、リスク評価に反映する。入院患者や手術予定患者は、術前 (入院時)、術後1日、(術後4日)、術後7日、術後14日もしくは退院前の4~5回の採血となる。なお、研究対象患者は、入院時 (手術前) および退院前に超音波検査で深部静脈血栓症の有無を検索し、臨床経過の参考にする。

【結果】現在までに測定結果が得られたデータを示す。

院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子：検診症例との比較

佐久間聖仁¹⁾、中村真潮²⁾、中西宣文¹⁾、山田典一²⁾、白土邦男³⁾、伊藤正明²⁾、小林隆夫⁴⁾

1) 国立循環器病研究センター心臓血管内科、2) 三重大学循環器内科、3) 齋藤病院、4) 県西部浜松医療センター

【背景と目的】

外来新患患者を対照とした場合、静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism; VTE) の危険因子として長期臥床、活動性癌が有意な危険因子であり、外傷・骨折は統計学的有意とまではいえない事、更に生活習慣病との関連では糖尿病、高血圧、高脂血症は有意な危険因子ではなく、血液型との関連も認めない事を報告した。しかし、外来新患患者を対照とすれば、本症例登録での回答が多かった診療科の疾患を引き起こす危険因子が VTE の危険因子であるか否かについては正確な判断が困難である。

そこで、検診症例 (学校検診、健康診断、住民検診) との比較から院外発症 VTE の危険因子を検討した。

【方法】

全国医療機関へのアンケート調査により、2009年2月と3月の二ヶ月間での新規発症例を前向きに登録した。それぞれの症例に対応した同性、年齢差が5才以内という条件を満たす最初の検診症例も同時に登録し、コントロール症例とする matched case-control study の研究デザインとした。

【結果】

登録総数 561 例、この内訳は院外発症が明らかなのは 230 例であり、住民検診症例とのペアが作れたのは 161 (70%) であった。

住民検診症例との matched case-control study の解析結果は単変量解析では長期臥床、活動性癌、最近の大手術、骨折・外傷が有意な危険因子であった (全て $P < 0.0001$)。肥満 (body mass index > 25) は VTE で少なかった ($P = 0.01$)。生活習慣病との関連では糖尿病、高脂血症は有意な危険因子ではなく、高血圧は VTE で少ない傾向にあった ($P = 0.09$)。血液型では A 型が多く ($P = 0.02$)、O 型で少なかった ($P = 0.02$)。

【まとめ】

住民検診症例との比較では、長期臥床、活動性癌、最近の大手術、骨折・外傷が有意な危険因子であり、血液型との関連も示唆された。

ネフローゼ症候群患者における深部静脈血栓症の発生頻度調査

山田典一、中村真潮 (三重大学大学院医学系研究科循環器内科学)

【目的】 欧米では周術期や周産期だけでなく、内科領域の入院患者に対する静脈血栓塞栓症予防の必要性が認識され、普及しつつあるが、本邦における内科領域入院患者における疫学的調査はほとんど行なわれていない。我々は、これまでに日本人においてもうっ血性心不全による入院患者に高頻度に深部静脈血栓(DVT)が発生していることを示してきた。欧米にて内科領域の入院患者における危険因子とされているネフローゼ症候群患者で、日本人におけるDVTの発生頻度ならびにネフローゼ症候群の中でのDVT発生のリスクを明らかにする。

【方法】 三重大学にネフローゼ症候群で入院した連続42例(男性25例、平均年齢 61.2 ± 18.0 歳)に対して、下肢静脈超音波検査(圧迫法)にて鼠径部より下腿まで血栓の有無を検索した。但し、静脈血栓塞栓症の既往、悪性疾患、下肢の麻痺、術後3ヶ月以内の症例は除外した。

【結果】 全体では28.6%(12/42)、検査時ワルファリン服用例8例を除くとDVT発生率は35.3%(12/34)と高率であった。血栓は両側7例、左側4例、右側1例で、存在部位(重複あり)はヒラメ静脈が最も多く11例、腓骨静脈4例、後脛骨静脈3例、膝窩静脈1例、小伏在静脈1例であった。DVT陽性例と陰性例の間には、ネフローゼ症候群をきたした基礎疾患やステロイド薬服用の有無に明らかな差はなく、Dダイマー値(\cdot g/ml)(10.8 ± 3.5 vs 6.6 ± 7.6 , p:n.s.)、血中アルブミン値(g/dl)(2.5 ± 0.7 vs 2.5 ± 0.5 , p:n.s.)、尿たんぱく量(g/gCrea)(9.3 ± 0.5 vs 8.1 ± 12.0 , p:n.s.)にも有意差はみられなかった。

【結論】 日本人においても、ネフローゼ症候群患者では欧米と同程度の高頻度に深部静脈血栓症が発生しており、内科領域における危険因子として捉え、一次予防の徹底が必要と考えられた。

1. 新潟県中越地震震災被災者のDVTと脳梗塞発症との関連

新潟県中越地震では被災者に多数のDVTが発生した。DVTは脳心血管イベントのリスク因子となる可能性が報告されている。そこで震災被災者のDVTと震災後に発生した脳梗塞との関連について検討した。

対象と方法：市の広報、新聞・ラジオ、テレビで検診参加を呼びかけ集まった新潟県小千谷市、十日町及び周辺市町村の新潟県中越地震被災者756人（男202人、女554人、平均年齢 65.9 ± 11.1 才）を対象とした。検査は平成21年11月22日、23日、12月6日に行い、膝窩静脈より末梢の下腿深部静脈のエコー検査と血液検査を行い、震災後5年以内の脳梗塞発症の有無について聞き取り調査を行った。

結果：下肢静脈エコーにより75人（男15人、女60人、平均年齢 67.9 ± 8.7 才）に血栓（浮遊血栓26人、器質化血栓 49人）を認め、このうち28人（37.5%）で下肢腫脹・疼痛などを訴えていた。また女性では男性よりも1.5倍血栓頻度が大であったが有意差は認めなかった（ $p=0.06$ ）。左右ヒラメ静脈最大径はDVT(-)群 7.5 ± 1.9 mm($n=677$)、DVT(+)群 8.3 ± 2.1 mm($n=75$)、DVT(+)群で有意に大であった（ $p=0.00003$ ）。検査受診者のうち脳梗塞を震災後に発症したのは11人で全員後遺症は無く、DVT(+)群5人（6.6%）、DVT(-)群6人（0.88%）で、有意にDVT(+)群で7.5倍脳梗塞発症率が高かった（ $p=0.00003$ ）。また血栓(+)群の脳梗塞は男1人、女4人（平均年齢 69.0 ± 10.1 才）であり、DVT(+)群の危険因子は高血圧30人、高脂血症20人、糖尿病5人（重複あり）、DVT(+)群で脳梗塞を発症した方の危険因子は高血圧2人、不整脈1人（重複なし）であった。

考察：震災後のDVTは遷延しやすいことをこれまでに報告しており、今回見つかったDVTも震災後早期に発生していた可能性も否定できない。したがって震災後のDVTは震災後早期の肺塞栓症や慢性期の血栓後症候群だけでなく脳梗塞とも関連がある可能性が示唆され、無症状でも注意して観察し場合によっては治療が必要であると考えられた。DVTは予防が最も効果的な疾患であることから、震災後の避難生活におけるDVT予防が重要であることが再確認された。

2. 震災被災者のDVTと血栓性素因について検討した。

対象と方法：対象は平成18年11月19日に行った新潟県中越地震2年後のDVT検診受診者のうち検討できた350人(男105人、女245人、平均年齢 61.7 ± 11.8 才)と平成21年7月19日に行った新潟県中越沖地震2年後のDVT検診受診者のうち検討できた298人(男82人、女215人、平均年齢 63.4 ± 11.8 才)。血液は採血後速やかに遠心し凍結血漿として -70 度で保存し、中越地震被災者の検体は自治医科大学検査部で、中越沖地震被災者の検体は国立循環器病センター検査部でプロテインC(PS)、プロテインS(PC)、アンチトロビン(AT)等を測定して頂いた。結果：平成18年に採血した中越地震被災者350人中43人に下腿静脈の血栓を認めていた。このうちPS欠乏症疑いは15人(4.2%)、PC欠乏症疑いは9人(2.6%)、PS+PC欠乏症疑い8人(2.3%)、AT欠乏症疑い3人(0.9%)に認めた。このうちDVTはPS欠乏症疑いの6人、PC欠乏症疑いの5人に認め、特にPS+PC両欠乏症疑い8人中5人に認めた。PS欠乏症単独では1人、PC欠乏症ではDVTを認めずAT欠乏症でもDVTを認めなかった。また無症候性肺塞栓症をPS+PC欠乏症疑いでDVTを認めた全員に認めた。平成21年に採血した中越沖地震被災者では298人中21人にエコー検査で下腿静脈の血栓を認めた。PS欠乏症疑い11人(3.7%)、PC欠乏症疑い2人(0.7%)を認め、AT欠乏症疑い及びPG欠乏症疑いは認めなかった。このうちDVTはPS欠乏症疑い11人中1人(9%)に認めた。考察：日本人でも血栓性素因は4-7%に認め少ないことが示唆された。またPS欠乏とPC欠乏が重複している場合に合併しやすい可能性が示唆された。一方、DVTを認めた大部分の被災者には今回検討した血栓性素因は見つからないことは注目に値し、未知の血栓性素因がある可能性と、震災後では環境要因がDVT発生に影響が強い可能性が示唆され今後検討が必要である。

平成 22 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

第 2 回班会議

日時：平成 23 年 1 月 28 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階中会議室

プログラム・抄録集

研究代表者 村田 満

平成 22 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
第 2 回班会議 プログラム

日時：平成 23 年 1 月 28 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階中会議室

（サブグループ研究計画：20 分 各個人研究計画：10 分 討論含む）

10：00～ 研究代表者 挨拶 村田 満
厚生労働省健康局疾病対策課 御挨拶

10：10～ TMA 研究班 研究計画 藤村 吉博
サブグループリーダー： 藤村 吉博 奈良県立医科大学
班員： 和田 英夫 三重大学医学部
小亀 浩市 国立循環器病研究センター
研究協力者：森木 隆典 慶應義塾大学医学部
日笠 聡 兵庫医科大学血液内科
松本 雅則 奈良県立医科大学
上田 恭典 倉敷中央病院

10：30～ I T P 研究班 研究計画 富山 佳昭
サブグループリーダー： 富山 佳昭 大阪大学医学部
班員： 藤村 欣吾 広島国際大学薬学部
桑名 正隆 慶應義塾大学医学部
倉田 義之 四天王寺国際仏教大学
研究協力者：降旗 謙一 株式会社エスアールエル
野村 昌作 関西医科大学 第一内科
宮川 義隆 慶應義塾大学医学部

10：50～ 特発性血栓症研究班 研究計画 小嶋 哲人
サブグループリーダー： 小嶋 哲人 名古屋大学医学部
班員： 坂田 洋一 自治医科大学
川崎 富夫 大阪大学医学部
宮田 敏行 国立循環器病研究センター
横山 健次 慶應義塾大学医学部

11：10～ 静脈血栓塞栓症研究班 研究計画 小林 隆夫
サブグループリーダー： 小林 隆夫 県西部浜松医療センター
班員： 榛沢 和彦 新潟大学教育研究院
研究協力者：佐久間聖仁 国立循環器病センター心臓血管内科
中村 真潮 三重大学大学院
山田 典一 三重大学大学院

11:30~12:30 昼休み

12:30~13:30

TMA班研究報告：司会 藤村 吉博

藤村吉博・松本雅則 「後天性・特発性TTPにおけるADAMTS13活性著減例と

古典的5徴候で診断された症例の比較」

和田英夫・波部尚美 「ADAMTS13が著減しないTMAと肝移植におけるVWFプロペプチド」

小亀浩市 「臨床医学への貢献を目指したADAMTS13に関する基礎研究」

13:30~14:30

ITP班研究報告：司会 富山 佳昭

柏木浩和・富山佳昭 「 α IIb β 3(GPIIb/IIIa)変異をもつ遺伝性血小板減少症例の解析」

藤村欣吾 「成人慢性ITPの治療ガイドラインについて」

高蓋寿朗 「ITPとして診断、治療を受けていた先天性血小板減少症の一例」

桑名正隆・西本哲也 「制御性T細胞が特発性血小板減少性紫斑病の発症を抑制する」

倉田義之 「臨床個人調査票(平成20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」

14:30~14:45 休憩

14:45~15:45

特発性血栓症班研究報告：司会 小嶋 哲人

小嶋哲人 「血栓傾向の分子病態解析」

窓岩清治・坂田洋一 「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の

簡易モニタリングに関する臨床研究」

川崎富夫 「H20年度～H22年度-最終報告-」

宮田敏行 「地域一般住民を対象とした血小板数および

血小板凝集能レベルと血中脂質量との関連」

横山健次 「H20年度～H22年度-最終報告-」

15:45~16:45

静脈血栓塞栓症班研究報告：司会 小林 隆夫

小林隆夫 「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究

—内因性トロンビン産生能(ETP)を用いた活性化プロテインC感受性比

(APC-sr)—」

佐久間聖仁 「院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子：検診症例との比較」

榛沢和彦 「震災後のDVTについての検討」

太田覚史・山田典一 「ネフローゼ症候群患者における深部静脈血栓症の発生頻度調査」

終了

平成22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 研究代表者：村田 満

事務局：慶應義塾大学医学部臨床検査医学 村田教授室 Tel: 03-5363-3838 内線 62553

サブグループ研究