

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) —

浜松医療センター 小林 隆夫、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、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 CaCl_2 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加水分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。さらに静脈血栓塞栓症患者も同様に測定し、陽性対象として解析した。【結果および考察】帝王切開 (5 例)、婦人科悪性腫瘍 (3 例)、外科悪性腫瘍 (19 例)、整形外科下肢手術 (14 例) の計 41 例で検討した。症例数がまだ少なく、また術前・術後の超音波検査にて DVT 症例なかったため現時点では明確な結論は出ていない。現在判明していることとして、1) 帝王切開妊産婦では術前術後とも ETP と APC-sr はともに高い。2) 悪性腫瘍患者では術前の ETP と APC-sr はやや高く、術後 3-4 日目にかけて増加した。3) 整形外科患者では術前の ETP と APC-sr はほぼ正常であるものの術後に増加し、4 日目に最大となった。4) APC-sr と PS 抗原 (活性) の間には負の相関がみられ、APC-sr の増加は PS の減少との関連性が示唆された。5) 予防的抗凝固薬投与中は ETP と APC-sr とともに抑制される。すなわち、血栓が形成されにくくなることなどが判明した。今後本測定法により前方視的に VTE リスク判定を行うことができれば、血液凝固学的指標に基づいた予防的抗凝固療法の実施が可能となることが示唆される。

MEMO

血液凝固異常症に関する調査研究班 H23-25 研究計画

新潟大学大学院呼吸循環外科、新潟大学災害・復興科学研究所 榛沢和彦

題名) 震災被災者の VTE についての調査・研究

目的) 新潟県中越地震、中越沖地震、岩手・宮城内陸地震、東日本大震災後の被災者における静脈血栓塞栓症(VTE)(深部静脈血栓症と肺塞栓症)の発生頻度推移を調査し、発生頻度とその背景因子について検討し、震災後の VTE についての危険因子ならびに予後を調査し、今後の震災発生時の予防方法についての指針作成を目的とする。さらに震災後の DVT による肺塞栓症、脳梗塞などの二次的健康被害について調査し分析する。

方法) ①新潟県中越地震被災地の小千谷市、十日町市の広報や新聞、ラジオ、テレビなどの広告で DVT 検診日を通知、2004 年、2005 年に検査を受けた方には葉書で通知する。DVT 検診ではアンケートによる新たな病気の発症、内服薬などについて調査する。採血を行って D ダイマーなどの検査、可能であれば血栓性素因を検査する。さらに下肢静脈エコーを行い DVT の有無を検査し、DVT がある場合・ヒラメ静脈拡張所見がある場合及び下肢腫脹などの症状がある場合には弾性ストッキング着用指導を行う。DVT 認め D ダイマー高値の場合は医療機関受診を勧める。

②新潟県中越沖地震被災地の柏崎市、刈羽村の広報、マスコミに広告を出すなどにより通知し、また 2007 年、2008 年に DVT 検診を受けた方には葉書で通知する。アンケート調査、エコー検査、採血は中越地震被災者と同様に行う。

③東日本大震災被災地の南三陸町、陸前高田市、大槌町、釜石市の被災者に広報、マスコミを通じて通知し、中越地震被災者と同様にアンケート調査、エコー検査、採血を行う。

MEMO

肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究

研究責任者 三重大学医学部附属病院
臨床研修・キャリア支援センター 助教 太田覚史

共同研究者 三重大学大学院病態制御医学講座 講師 中村真潮
三重大学大学院病態制御医学講座 講師 山田典一
県西部浜松医療センター 院長 小林隆夫

肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症（両者を合わせて VTE と呼ぶ）は日本人においても急増傾向にあり、その診断・治療・予防法の確立は喫急の課題である。しかし、欧米人と日本人では VTE の特徴が異なる可能性が高いため日本人の発生頻度などわが国独自の情報が必要となるが、日本人を対象とした臨床研究はきわめて少ない。

VTE の確定診断数の調査は、厚生労働省の科学研究などでこれまで数回行われ、日本人での確定診断数は米国の約 20 分の 1 と報告されている。今回の調査は、これまでの発生頻度調査を引き継いで行うアンケート調査であり、本年度 1 年間の全国での VTE の発生数を推定するものである。さらに、発症例に関する病型やリスクも調査し、これまで得られている結果との経年的変化を検討する。具体的には大学病院の約 2000 講座、および一般病院の約 4300 施設にアンケート調査書を送付し、平成 23 年 11 月 1 日から平成 23 年 12 月 31 日までに診断された肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の患者数、ならびにそのリスク因子などの基本情報を前向きに収集する。

本研究にて年間の VTE 患者数やそのリスク因子の経年的な変化が明らかとなり、わが国における本疾患群の実態や影響を与えている因子を推定でき、本疾患群に対する今後の対策の重要な足がかりとなり得る。

MEMO

汎用生化学自動分析装置で測定可能な ADAMTS13 活性測定法の開発

奈良県立医科大学 輸血部

藤村吉博, ○加藤誠司, 松本雅則

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断および治療方針の決定のために、ADAMTS13 活性測定は必須の検査となりつつある。我々は、これまでに ADAMTS13 活性を簡便に測定する方法として、ELISA を原理とする ADAMTS13 act-ELISA の開発をおこなった (Kato et al, Transfusion, 2006)。ADAMTS13 act-ELISA は、従来法に比べ簡便・高感度な測定法であり、検査センターや研究室レベルでの測定が普及し、TTP の診断と治療方針の決定に利用されてきた。しかし、ADAMTS13 の保険収載が遅れていることに加え、結果が得られるまでに 3 時間 30 分かかること、ELISA といえども作業が煩雑であることなどより、実際の臨床現場では十分普及している状態ではない。そこで、一般病院の検査室での普及を目指し、一般病院で広く使用されている「汎用生化学自動分析装置」を使用して測定可能な ADAMTS13 活性測定法の構築をおこなった。

今回開発した ADAMTS13 活性の測定法は、ADAMTS13 act-ELISA に使用されている VWF-A2 ドメイン中の切断端アミノ酸 Tyr 1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (N10) を使用し、金コロイド凝集法を原理として構築した。本法は、ADAMTS13 act-ELISA と良好な相関を示し、正常血漿の 0.4% まで測定可能で、さらに高感度な測定法となった。測定時間も 10 分と非常に迅速性を高めることができた。また自動分析装置の使用により、安全面・処理能力・再現性が向上し、他の検査と同様に処理可能となったことにより、電子媒体での報告も容易となることが期待される。

最近の ADAMTS13 および TTP の研究成果によって、一般臨床医にも ADAMTS13 活性測定の重要性が認識されてきている。しかしながら実際の ADAMTS13 活性測定の利用には、外部委託検査として検査結果報告までの時間差やキットの煩雑性などの課題があった。この新規の測定法の開発により一般病院の検査室での測定が可能となることが期待されるが、今後更なる普及のために、研究用試薬ではなく体外診断用医薬品として ADAMTS13 活性測定が保険収載されることが重要であると思われる。

MEMO

和田英夫、波部幸司 (三重大学血栓・止血異常症診療センター)

DIC 患者における 血漿中 ADAMTS13, Von Willebrand Factor (VWF) ならびに VWF Propeptide の動態

Plasma ADAMTS13, Von Willebrand Factor (VWF) and VWF Propeptide Profiles in Patients with DIC

ADAMTS13, endothelial VWF and related proteins are involved in the pathogenesis of some life threatening systemic thrombotic coagulopathies. Changes of plasma ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is well known but is also involved in septic disseminated intravascular coagulation (DIC). Here we investigated the ADAMTS13 activity, Von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide (VWFpp) antigens in 69 patients with DIC, 143 with non-DIC, 21 with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and 23 with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) for diagnosis of DIC.

The plasma ADAMTS13 activity was significantly decreased in patients with DIC as well as TTP and aHUS patients. In contrast to non-DIC, TTP and aHUS patients, elevation of VWF and VWFpp antigens were observed in DIC patients. The difference in the plasma ADAMTS13, VWF and VWFpp profiles are different between DIC and non-DIC cases, and between patients with infectious and malignant diseases. Thus, VWFpp/ VWF ratio were elevated DIC patients with infectious diseases but not with malignancy. Additionally the plasma levels of VWFpp were significantly higher in non-survivors than in survivors.

These findings suggest that ADAMTS/VWF profiles may have important roles in the onset of DIC, and that ADAMTS13 and VWFpp are useful indicators for the diagnosis and prognosis of DIC.

MEMO

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 ADAMTS13 に関する研究

国立循環器病研究センター・分子病態部
小亀浩市

ADAMTS13 は、血小板凝集過程で重要な役割を果たす von Willebrand 因子 (VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼである。遺伝子異常や自己抗体の出現などによる ADAMTS13 活性の損失は、血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の一形態である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。

我々はこれまで、基礎科学的見地から ADAMTS13 の作用機構などを解析し、臨床領域への貢献を目指した研究を進めてきた。特に最近の 3 年間では、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の関連分析、VWF 認識に関わる ADAMTS13-DTCS ドメインの立体構造決定などに重点を置き、成果をあげた。

今年度から始まる本研究事業の 3 年間では、以下の 4 項目を主な研究内容とする。(1) Upshaw-Schulman 症候群 (USS) 患者の遺伝子解析：新たに見出された USS 患者 (疑い患者を含む) の ADAMTS13 遺伝子を解析し、原因変異を同定する。場合によっては、ADAMTS13 以外の遺伝子を解析する可能性もある。(2) ADAMTS13 の立体構造未決定部分および変異体の構造決定：すでに結晶構造を決定した DTCS ドメイン以外の領域、すなわち、メタロプロテアーゼドメインや C 末端側ドメイン、P475S 変異型 DTCS ドメインなどの結晶構造を決定する。(3) ADAMTS13 遺伝子変異のタンパク質化学的・生物学的影響の解析：アジア人特有の P475S 多型や、疫学的研究と培養細胞発現実験の結果に不一致がある P618A 多型を中心に、ADAMTS13 分子に対する変異の影響を調べる。(4) ADAMTS13 活性修飾物質の探索：化合物ライブラリーを利用して、ADAMTS13 の活性に強く影響を与える物質を探索し、医学的に有用有益な化合物の開発基盤を作成する。

以上の研究計画を遂行することで、ADAMTS13 に関する知見をさらに集積し、TTP あるいは TMA の診断・治療・予防に役立つ情報を発信したい

MEMO

後天性 TTP 患者における ADAMTS13 機能ドメイン特異的自己抗体の定量的解析の試み

猪狩敦子¹、森木隆典²

¹ 慶應義塾大学医学部臨床検査医学, ² 慶應義塾大学保健管理センター

ADAMTS13 はマルチドメイン構造を呈するプロテアーゼであるが、後天性 TTP 患者にみられる自己抗体のエピトープはシステインリッチ・スパーサドメインを中心に、各ドメインに存在することが報告されている。近年では、市販の ELISA キットを用いて ADAMTS13 全長に結合する血中自己抗体量を測定することが可能である。

本研究では、後天性 TTP 患者において、ADAMTS13 の機能ドメイン単位に対して特異的に結合する自己抗体を、高感度に定量することができる測定系を開発することを目的とした。この測定により、TTP における自己抗体と病態との更なる詳細な関連が明らかになることを期待している。

方法としては RIA を用いた定量測定系の開発を試みた。無細胞発現系を用いて、ADAMTS13 の MDTCS 領域または T2-8/CUB 領域を ³⁵S メチオニンでラベルして発現し、2 種類の抗原を作製した。RI 標識抗原の確認のため SDS-PAGE を行ったところ、予想していた位置に単一バンドを確認することができた。RIA を用いた定量測定系の検証を行うために、エピトープが判明している抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を用いて 2 種類の抗原を免疫沈降させたところ、抗体濃度依存的に免疫複合体を回収することができた。次に、後天性 TTP 患者由来精製 IgG (n=12) を用いて RI 標識抗原 MDTCS または T2-8/CUB を免疫沈降し、抗原に結合した IgG を定量した。結果として、どちらの抗原に対しても、全ての TTP 患者 IgG は正常コントロール IgG と比較して、明らかに高い抗体価を示す結果が得られた。

今後は、正常人 IgG 等を用いて cut-off 値の検討を行うとともに、RI 標識抗原をさらに細かい機能ドメインごとに作製し、TTP 患者自己抗体を定量することを予定している。

MEMO

インテグリン α IIb β 3 変異による遺伝性血小板減少症の病態解析

大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 柏木 浩和

大阪大学医学部附属病院輸血部 富山 佳昭

インテグリン α IIb β 3 の発現低下あるいは機能異常により出血傾向をきたす血小板無力症患者や α IIb β 3 ノックアウトマウスの検討から、 α IIb β 3 変異は血小板数や血小板形態には影響を与えないと考えられていた。しかし國島および我々は、本邦における複数の家族性 macrothrombocytopenia 症例において、 α IIb 細胞膜直下の R995W 変異を有することを見いだした。 α IIb (R995W)変異を有する血小板における α IIb β 3 発現は正常の 70%程度に低下しており、また α IIb (R995W)変異を CHO 細胞などに発現させると恒常的な α IIb β 3 活性化が認められた。興味深いことに近年になり α IIb β 3 膜周辺領域において複数の α IIb β 3 活性化変異が見いだされており、いずれも macrothrombocytopenia を示すことが報告されている。今回、我々は macrothrombocytopenia を伴う血小板無力症患者において、新たに α IIb(G991C)変異を見いだした。患者は 9 歳女児。生後 4 ヶ月時に大腿、上肢に皮下出血を繰り返したため近医受診。10 万程度の軽度血小板数減少を認めるのみであったため、それ以上の精査はなされなかった。昨年 6 月に抜歯後の止血困難、頻回の鼻出血、皮下出血斑を主訴に近医受診。血小板数の低下と血小板凝集能の著明な低下を認めたため、病態解析の依頼が当院にあった。患児血小板表面の α IIb β 3 発現は正常の 5-10%程度に低下しており、血小板無力症タイプ II であると診断したが、血小板数は 3 万程度に低下しており、また血小板サイズの増大が認められた。興味深いことに、父親は 10 万程度の血小板減少と血小板サイズの増大を認め、母親においては血小板数、形態ともに正常であった。また両親の血小板の α IIb β 3 発現はともに正常の 70%程度に低下していた。遺伝子解析の結果、患児は父親由来の α IIb(G991C)変異と母親由来の α IIb(R422X)変異の複合ヘテロ接合体であった。 α IIb(G991C)変異を 293T 細胞に発現させたところ、強い α IIb β 3 の活性化が認められた。この結果と従来の報告から膜領域近傍の α IIb β 3 活性化変異を有するヘテロ患者においては、軽度～中等度の macrothrombocytopenia をきたすこと、ホモあるいは本例のように nonsense mutation との複合ヘテロ患者においては、macrothrombocytopenia に加え α IIb β 3 の発現低下が顕著となり血小板無力症様の病態を呈すると考えられる。

今後、そのメカニズムを明らかにすることを目標に、症例における検討を進めるとともに、R995W ノックインマウスを用いた検討を行う予定である。

MEMO

I T P 治療の参照ガイド作成について

広島国際大学薬学部	藤村 欣吾
慶應義塾大学医学部免疫内科	桑名 正隆
慶應義塾大学医学部血液内科	宮川 義隆
西神戸医療センター 血液免疫内科	高蓋 寿朗
四天王寺大学人文社会学部	倉田 義之
大阪大学医学部附属病院 輸血部	富山 佳昭

I T P 治療に対する治療ガイドラインは、1988年に特発性造血障害調査研究班によって「特発性血小板減少性紫斑病の治療の手引き」として発表されたのが最初である。以来副腎皮質ステロイドホルモン、摘脾が治療の主流として定着してきた。その後ヘリコバクター・ピロリ陽性 I T P 症例に対する除菌治療効果が明らかとなり、本研究班では 2004 年にピロリ除菌療法の位置づけを加えた I T P 治療ガイドライン（案）を作成した。

最近新たな作用機序を持った薬剤、トロンボポエチン受容体作動薬が治療抵抗性 I T P に対し有効性、有用性が明らかとなった。さらに昨年から今年にかけてこれら新薬や I T P の病名での除菌療法が健康保険適応となり、新たな診療ガイドが必要となってきた。

このような背景に基づき本研究班として昨年より治療ガイドライン作成に取り組み、I T P サブグループでは 3 回の会合を重ね「I T P 治療の参照ガイド(案)」として今回提案することにした。

- 特徴は
- 1) ピロリ陽性症例に対してはまずピロリ除菌を行うこと
 - 2) 以後の治療に関しては血小板数と出血症状によって開始する
 - 3) 治療目標を設定し漫然とした治療を避ける
 - 4) **First line 治療** は副腎皮質ステロイド
Second line 治療 は脾摘
Third line 治療 は今回保健適応となったトロンボポエチン受容体作動薬を始めとした各種薬剤を使用する
 - 5) これらの治療に対して推奨度(GRADE system による)を付記した
 - 6) 保健適応薬と未承認薬を明確にした

等が挙げられる。

MEMO

モデルマウスを用いた ITP の根治的治療法の開発
○桑名正隆 西本哲也 慶應義塾大学リウマチ内科

昨年度までに、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%が ITP 病態を自然発症することを報告した。そこで、今年度は ITP モデルマウスを用いて以下の課題を検討する。

1. ITP 免疫病態評価系の確立

- ① 血小板反応性 CD4⁺T 細胞の解析: 血小板破砕液もしくは GPIIb/IIIa リコンビナント蛋白を抗原とした T 細胞の増殖反応、サイトカイン産生により血小板反応性 CD4⁺T 細胞を検出する。
- ② 抗血小板抗体産生を誘導する T-B 細胞協調作用の解析: CD4⁺T 細胞、B 細胞を分離し、抗原存在下の共培養で上清中に産生された抗血小板抗体を測定する。さらに、T-B 細胞協調作用に関与するサイトカインや膜蛋白を阻害することで抗血小板抗体の産生を促進する分子メカニズムを解析する。
- ③ 網内系マクロファージの機能解析: 脾細胞からマクロファージを分離し、Fcγ受容体発現レベル、貪食能、T 細胞活性化能を解析する。
- ④ 血小板反応性 CD4⁺T 細胞の *in vivo* 動的解析: 血小板反応性 CD4⁺T 細胞株を樹立し、個々の血小板反応性 CD4⁺T 細胞株の抗原エピトープや T 細胞受容体を決定する。また、T 細胞株をノードマウスに移植し、抗血小板抗体産生、血小板減少を誘導する病的活性の有無を確認する。

2. 新規治療法の検討

ITP モデルマウスを用いて ITP 病態を是正する根治的治療法の開発を目指す。以下の 2 つの治療戦略を検証する予定である。

- ① TPO 受容体作動薬と抗 CD154 抗体の同時投与による血小板反応性 T 細胞の免疫寛容の誘導: 副刺激遮断による自己反応性 T 細胞の免疫寛容の誘導効果は T 細胞の抗原認識時に発揮される。そこで、TPO 受容体作動薬投与で血小板を増加させ、大量の抗原をマクロファージ、T 細胞に暴露させた状態で抗 CD154 抗体を投与する。
- ② Syk 阻害薬によるマクロファージ Fcγ受容体、B 細胞受容体シグナル同時阻害: Syk はマクロファージの Fcγ受容体と B 細胞受容体に会合して正のシグナルを伝達する。そこで、Syk 阻害により網内系マクロファージ、自己反応性 B 細胞両者の機能を同時に抑制する。

MEMO