

MEMO

研究分担者 大阪大学心臓血管外科 川崎富夫

1. 大阪大学病院ガイドラインの運用結果

【目的】大阪大学病院では入院患者に対して独自の静脈血栓塞栓症ガイドラインの運用している。その調査結果を報告する。【対象と方法】DVT診断には超音波検査を使用。対象期間は①群：2006年4月から1年間、②群：2010年4月から1年間。それぞれ心臓血管外科に紹介となった患者を対象とした。対象検査総数は①群141例、②群138例である。【結果】過去4年間肺塞栓症による死亡患者ゼロ。①群：急性中枢型12例(8.5%)、急性末梢型17例(12%)、慢性型33例(23%)。②群：急性中枢型9例(6.5%)、急性末梢型13例(9.4%)、慢性型19例(14%)。男女比はいずれも1:1.5~2。【結語】最近4年間において、検査対象患者数は変化ないものの、急性型と慢性型および中枢型と末梢型が見つかる頻度は、それぞれ減少傾向にある。特に肺血栓塞栓症に結びつく急性中枢型の減少は、院内ガイドラインの目的を達成したものと考えられる。また慢性型の著しい減少は、DVT持ち込み症例の減少を意味しており、大阪大学病院の診療圏におけるDVT発生の減少、つまり診療圏内においてDVTの予防が効果を現わしていることを示唆するものと思われる。

今年には阪大ガイドラインの大幅な見直し予定となっている。新ガイドラインの策定を通じて、病院における予防と治療の簡素化を目指す予定である。

2. 血漿の凍結融解における凝固因子の安定性の検討

血液凝固検査または研究に於いて凍結した血漿を用いることが少なくない。Bethesda法では、37℃2時間加温後にpH上昇し、それによる凝固因子活性の自然失活を認める。基礎検討として、血漿の凍結・融解における凝固因子の安定性について、凍結する容器容量を一定にし、凍結血漿量における37℃での融解時間による因子変動を観察した。第V因子と第VIII因子のみが溶解時間に伴いその活性値は低下した。緩衝化血漿による凝固因子安定化の有効性を検討したところ、予め血漿を緩衝化することによって活性低下を抑制できた。因子量を測定する場合は、凍結前に血漿の緩衝化が有用である。血漿緩衝化は、Bethesda法によるインヒビター低力価領域での偽陽性を軽減するのに有用である。

3. 司法医療水準と医療ガイドラインの乖離

肺塞栓症ガイドライン中の弾カストッキング効果の誤訳が原因で有責となった一例(大阪地判平21・9・29、年報医事法学26)を検討した結果、ガイドラインの意図が司法に正確に伝わっていないことが明らかになった。本研究会との関係において、これまで「ガイドライン」と称せられてきたものを、さらに具体的に司法側に示すことが必要である。

Guidelineとは「岩場の案内綱、白地図のなぞり線、活字などを並び線にそろえるために軽く印した線」のことであり、これを訳した指針とは「時計、磁石

盤、計器類に付けられた、目盛りを指示する針」転じて「物事をそれによって進めるべき方針、手引き」とされる。例えば胃癌ガイドラインはこれに相当する。しかし多くの「ガイドライン」と呼ばれるものは該当しない。この研究班は「参照ガイド」という立場をとるので、その位置づけを検討する。

「参照ガイド」を使用する主体が研究会に限られる場合は問題が生じない。しかし、研究会の会員以外の医師も使用することを前提とするならば、以下の使い分けが必要となる。以下“guideline”に関連するものを自由度が低いものから順に並べた。

“guideline 指針”、“help 助け 援助 手伝い 力添え 重宝なもの 手助けになるもの 逃げ道”、“assistance 補助 手伝い”、“reference 参考 参照”、“policy 方針 やりかた 手段 方法”。研究班においてコンセンサスが得られるならば、司法側に「参照ガイド」の定義として示して、司法の意見をこの研究班にフィードバックしたい。

プロテイン S K196E 変異の血栓症における重要性

国立循環器病研究センター分子病態部 宮田 敏行

血栓性素因の研究として、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの欠損症の遺伝子解析研究から、静脈血栓症の遺伝的背景には人種差があることがわかってきた。すなわち、白人種では第V因子Leiden変異(Arg506Gln変異)とプロトロンビンG20210A変異(3'非翻訳領域中の変異)が一般住民中にも数%の頻度で見られ、これらが静脈血栓塞栓症のリスクである。一方、両変異は日本人には見られないものの、日本人は静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクとしてプロテインS K196E変異を保有していることが明らかとなってきた。2011年のJournal of Thrombosis and Haemostasis誌にZakai and McClureはRacial difference in venous thromboembolismと題した総説を発表した。この総説には、第V因子Leiden変異とプロトロンビンG20210A変異は紹介されていたが、日本人に見られるプロテインS K196E変異に関して、記載されていなかった。そこで、本邦の研究成果の情報発信として、同誌にVenous thromboembolism and a race-specific genetic variation, protein S K196E, in Japaneseを投稿し受理された。

プロテインS K196Eは、第2EGF様ドメイン内にあり、プロテインC抗凝固能が低下すると報告されている。その頻度は、本邦の4つの研究をまとめると、健常人4,319人中77名がヘテロ接合体であったので、ヘテロ接合体は1.78%に見られ、変異アレル頻度は0.89%と計算された。したがって、日本人の55名~60名に1名は本変異のヘテロ接合体である。静脈血栓塞栓症患者に3名のホモ接合体が同定されている。その頻度は静脈血栓塞栓症患者約5名に1名である。ホモ接合体のプロテインS抗原量は正常域に入っているものの、活性は35%および39%と低下していた。

ヘテロ接合体のプロテインS抗凝固活性は低下している。一般住民1,862名中34名がヘテロ接合体で、そのプロテインS抗凝固活性は40%から110%の広い範囲に分布していた。正常型プロテインS保有者の活性は40%から170%までを示し、ヘテロ接合体の活性と大きくオーバーラップしていた。これより、プロテインS抗凝固活性の測定ではヘテロ接合体は確定できないと考えられた。しかし、平均値をみると、ヘテロ接合体は約16%活性が低い。プロテインS抗凝固活性は妊娠、経口避妊薬、腎障害などで低下することが知られているので、本変異保有者がそういった環境要因に暴露されると更に抗凝固活性が低下し、血栓リスクが上昇するのではないかと考えられる。現在、本変異マウスを作製しprotein S K196E変異の影響を生体内で調べている。

MEMO

Bortezomib が血小板機能に与える影響の解析

特発性血栓症サブグループ 慶應義塾大学医学部内科 横山 健次

[背景]多発性骨髄腫 (MM) 治療に使用される薬剤の中で、thalidomide (Thal) は静脈血栓症 (VTE) 発症率を高くすることが知られている。一方で Thal に bortezomib (BOR) を併用した患者では Thal 単独投与の患者と比較して、VTE 発症率が低くなることが知られている。BOR 投与により MM 患者血小板 ADP 凝集が抑制されたこと、in vitro で BOR が健常人血小板 ADP 凝集を抑制したこと、などが報告されているが、作用機序は解明されていない。in vitro で BOR が健常人血小板機能に与える影響を解析して、BOR の血小板への作用機序を明らかにすることを目的として今回研究を行った。

[方法]血小板数 30 万/ μ l に調整した PRP に in vitro で BOR を添加、2 時間 incubate した後にアゴニスト惹起血小板凝集、VerifyNow、VASP により BOR が血小板機能に与える影響を解析した。

[結果]

	BOR 0 μ M	BOR 40 μ M	BOR 0 μ M	BOR 400 μ M
ADP 凝集 (5 μ M)	92.6 \pm 16.2	80.3 \pm 11.0	81.9 \pm 7.6	32.5 \pm 3.0
ADP 凝集 (20 μ M)	93.2 \pm 6.1	91.1 \pm 9.9	90.0 \pm 4.1	86.3 \pm 7.0

BOR はコラーゲン、エピネフリン、アラキドン酸凝集には影響を与えなかった。VerifyNow は BOR 40 μ M で 14.7 \pm 13.3% の inhibition がみられた。VASP では明らかな変化はみられなかった。

[考案]BOR を in vitro で添加することにより血小板凝集 (5 μ M) の抑制がみられたが、既報 (Avcu F, et al Thromb Res 121 2008) の BOR 40 μ M で ADP 凝集 (5 μ M) が 65.7 \pm 7.2 \rightarrow 38.0 \pm 17.3 と抑制された結果と比較して、BOR の抑制は弱かった。また VerifyNow の結果からは ADP 凝集抑制に P2Y12 関与の可能性も考えられるが、BOR の作用機序を明らかにするためにはさらに検討が必要である。本研究は慶應義塾大学医学部臨床検査医学、山口 雄亮、大竹 真貴子とともにに行った。

MEMO

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

浜松医療センター 小林 隆夫、平井 久也

【研究目的】浜松医療センターでは入院患者、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静脈血栓塞栓症 (VTE) 予知スクリーニング法を確立する研究を行っている。この研究の中でプロテイン S (PS) も測定しているので、APC-sr と PS との関連性、および PS 抗原と PS 活性の比活性から VTE の予知が可能かどうか検討する。【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。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ため、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。浜松医療センター入院患者において、倫理委員会で承認された本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、PS 抗原 (total と free) および PS 活性 (シノテスト法) も測定して個々の相関を検討した。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 (DVT) の有無を検索し、臨床経過の参考にする。さらに研究に同意が得られた VTE 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】現在解析が終了している帝王切開 (6 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 (13 例) の計 41 例、および VTE 12 例 (肺塞栓症 8 例、DVT 単独 4 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 VTE 予知に関して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) 妊産婦では帝王切開術前術後とも ETP と APC-sr は高い。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。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。2) PS 抗原 (total と free) および PS 活性は、悪性腫瘍患者と整形外科患者では術後 1 日目に減少するものの術前および術後 4 日目以降は正常であった。妊産婦では帝王切開術前はいずれも 50%前後と低値を示し、術後 4 日目にかけて回復する傾向にあった。3) PS 抗原と PS 活性の比活性はほぼ相関しているが、比活性が 70% (-3SD) 未満を呈した症例のうち 5 例が肺塞栓症例であり、そのうち 4 例の PS 活性は 60%未満であった。PS の II 型欠乏症が疑われた。4) APC-sr と PS 抗原 (活性) の間には負の相関がみられ ($P < 0.01$)、APC-sr の増加と 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が、抗凝固療法施行前に採血できた VTE 患者 5 例の APC-sr は 2.27 ± 1.12 で、悪性腫瘍と整形外科患者術前 (29 例) の 1.20 ± 0.46 より有意に高かった ($P < 0.01$)。すなわち、VTE 高リスク患者の APC-sr および PS 抗原と PS 活性の比活性測定が VTE 予知に寄与する可能性が判明した。

MEMO

新潟県中越地震7年後のDVT検診結果

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

2011年10月15日、16日に小千谷市で、11月12日、13日に十日町で新潟県中越地震7年目のDVT検診を行った。小千谷市では838人(平均年齢67才、24-90才、男女比1:3)に検診を行い、東日本大震災による南相馬市からの被災者検診受診総数は7人であった。このうち中越地震被災者では54人(6.4%)に血栓を認め、南相馬市からの被災者では1人に血栓認めた。中越地震後に初めてDVT検診を受けた方は276人で、このうち11人(4.1%)に血栓を認め、小千谷市地域のDVT頻度は4.1%と推定された。また血栓があった54人中43人は過去に血栓があった方で、震災直後に血栓を認め治療で消失し治療中止後に再び出現した被災者が7人いた。またDVT有り被災者で震災後に脳梗塞・TIAを発症したのは5人(9.3%)、DVT無し被災者では12人(1.5%)であり、DVT有り被災者で3.9倍有意に脳梗塞が多かった($p<0.005$)。またDVT有り被災者で震災後に症候性肺塞栓を5人(9.3%)に認め、DVT無し被災者では0人であり、肺塞栓症はDVT有り群で有意に15.6倍多かった($p<0.0001$)。十日町市では403人に検査を行い、南相馬から1人、長野北部地震関連2人をのぞいた中越地震被災者では399人(平均年齢68.0才、22-88才、男女比1:3)で、そのうち40人(10%)に血栓を認めた。また中越地震後初めてDVT検診を受けたのは144人で、このうち9人(6.2%)に血栓を認めた。したがって十日町市地域の現在の血栓頻度は6.2%であった。また、十日町市のDVT有り40人のうち脳梗塞を地震後に起こした方は3人(7.5%)、DVT無しでは359人中8人(2.2%)であり、DVT有り被災者で2.7倍有意に脳梗塞が多かった($p<0.01$)。また狭心症・心筋梗塞・狭心症はDVT有り被災者で3人(7.5%)、DVT無し5人(1.4%)で有意に3.8倍多かった($p<0.01$)。以上のことから新潟県中越地震被災地では東日本大震災と同じように地域でDVT頻度に差が認められた。また震災後のDVT保有者で有意に脳虚血性疾患や虚血性心疾患を慢性期に発症していた。また治療中止後の再発が少なくないことから震災後に一旦できた血栓では薬の中止が難しいことが示唆され予防が重要であることが再認識された。東日本大震災でも津波被災地域に多くのDVTが認められていることから、被災者の二次的健康被害を防ぐために今後のDVT検診継続が重要である。

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	三重大学大学院循環器・腎臓内科学	助教	太田覚史
共同研究者	三重大学臨床心血管病解析学	教授	中村真潮
	三重大学大学院循環器・腎臓内科学	講師	山田典一
	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収集する。2011 年 11 月に三重大学倫理委員会にて本研究の承認を得、2012 年 1 月大学病院の約 2000 講座、および一般病院の約 6800 施設にアンケート調査書を送付済である。

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

小児期発症の ADAMTS13 活性著減後天性 TTP の解析

奈良県立医科大学 輸血部 八木秀男、○松本雅則、藤村吉博

TTP は、ADAMTS13 活性著減により診断されることが多くなったが、同活性著減症例として、先天性 TTP である Upshaw-Schulman 症候群(USS)と、IgG 型の自己抗体（インヒビター）による後天性 TTP がある。小児期発症 ADAMTS13 活性著減後天性 TTP は、USS との鑑別が困難な場合があり、また TTP は主として成人に発症するものと考えられていることから、小児期発症 TTP は的確に診断されていない可能性がある。

奈良医大輸血部は本邦 TMA 解析センターとして活動し、1998 年から 2008 年までに 919 例の TMA のデータベースを構築した(Inter Med 2010)。このうち、ADAMTS13 活性著減例 (<3%) が 324 例存在し、41 例が USS で、残り 283 例が後天性 TTP であった。今回、同活性著減後天性 TTP で 15 才以下の 17 例についてその臨床的特徴について解析した (Presse Med 2012)。

17 例のうち、14 例は基礎疾患のない後天性特発性(ai-)TTP で、3 例は膠原病合併(CTD-)TTP であった。小児期発症例は、ADAMTS13 活性著減 ai-TTP195 例中 14 例 (7.2%)、CTD-TTP は 46 例中 3 例 (6.5%) であった。ai-TTP の最年少は 8 ヶ月で中央値 11 才であった。ai-TTP で 16 才以上の成人例と比較すると、男性の比率が高く、血小板数、ヘモグロビン値が高く、血清クレアチニンが低く、発熱の割合が高く、致死率が低かった。14 例中で、7 例に血小板輸血が行われており、特に 2 才未満の 5 例全例で血小板輸血が行われていることから、的確に診断されていない現状が示された。

CTD-TMA 221 例中 ADAMTS13 活性著減例は 46 例 (20.8%) で、そのうち SLE-TMA は 92 例と最も多く、同活性著減例は 24 例 (26.1%) であった。同活性著減 CTD-TTP のうち、小児期発症は 3 例 (SLE 2 例、MCTD1 例) であった。3 例とも 2 BU/ml 未満の低いインヒビターで、血漿交換とステロイドパルス療法で寛解となった。

ADAMTS13 活性著減後天性 TTP は自己免疫疾患であり、CTD との関連が注目されている。CTD が先に発症する場合と、ai-TTP が先に発症し、後に SLE を発症した症例もあり、厳重な経過観察が必要である。小児期に発症する後天性 TTP は決して稀ではなく、注意すべき疾患と考えられた。

MEMO

<研究計画>

1) 診断法の検討

・ ADAMTS13 活性

Kobayashi T, Wada H, Kamikura Y, Matsumoto T, Mori Y, Kaneko T, Nobori T, Matsumoto M, Fujimura Y, Shiku H: Decreased ADAMTS13 activity in plasma from patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2007; 119: 447-452

・ ADAMTS13 関連マーカー

Kobayashi T, Wada H, Nishioka J, Yamamoto M, Matsumoto T, Tamaru T, Nomura S, Masuya M, Mori Y, Nakatani K, Nishikawa M, Katayama N, Nobori T: ADAMTS13 Related Markers and Von Willebrand Factor in Plasma from Patients with Thrombotic Microangiopathy (TMA), *Thromb Res.* 2008;121: 849-854

・ VWF、VWFpp

Ito-Habe N, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Toyoda H, Ishikawa E, Nomura S, Komada Y, Ito M, Nobori T, Katayama N Elevated Von Willebrand factor propeptide for the diagnosis of thrombotic microangiopathy and for predicting a poor outcome. *Int J Hematol.* 2011; 93: 47-52

新たに

・ 血小板活性化あるいは破壊のマーカーの可能性として、可溶性 GPVI をサンドイッチ ELISA で測定する。

2) 対象疾患

・ アンケート調査

Mori Y, Wada H, Tamaki S, Minami N, Shiku H, Ihara T, Omine M, Kakisita E: Outcome of thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome in Japan. *Clin Appl Thromb Hemostas*, 5: 110-112, 1999

Ito N, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M, Izuno T, Sugita M, Ikeda Y: National questionnaire survey of TMA. *Int J Hematol.* 2009; 90: 328-335

Ito-Habe N, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M, Izuno T, Sugita M, Ikeda Y: A second national questionnaire survey of TMA. *Int J Hematol.* 2010. 92: 68-75

・ 家族性

Uchida T, Wada H, Mizutani M, Iwashita M, Ishihara H, Shibano T, Suzuki M, Matsubara Y, Soejima K, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikeda Y, Murata M: Identification of novel mutations in ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 104: 2081-2083, 2004

・ TTP ADAMTS13 著明低下する type とあまり低下しない type

Mori Y, Wada H, Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Matsumoto M, Yagi H, Ishizashi H, Fujimura Y: Defective von Willebrand factor-cleaving

activity on admission is a marker of excellent clinical response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*, 42: 572-580, 2002

- ・肝移植

Kobayashi T, Wada H, Usui M, Sakurai H, Matsumoto T, Nobori T, Katayama N, Uemoto S, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y, Isaji S: Decreased ADAMTS13 Levels in Patients after Living Donor Liver Transplantation. *Thromb Res.* 2009; 124: 541-5

Mizuno S, Wada H, Hamada T, Nobuoka Y, Tabata M, Nobori T, Isaji S.: Lethal hepatic infarction following plasma exchange in living donor liver transplant patients. *Transpl Int.* 2011

Tanemura A, Mizuno S, Wada H, Yamada T, Nobori T, Isaji S: Donor Age Affects Liver Regeneration during Early Period in the Graft Liver and Late Period in the Remnant Liver after Living Donor Liver Transplantation, *World Journal of Surgery* (in press)

- ・DIC

Habe K, Wada H, Ito-Habe N, Hatada T, Matsumoto T, Ohishi K, Maruyama K, Imai H, Mizutani H, Nobori T: Plasma ADAMTS13, von Willebrand Factor (VWF) and VWF Propeptide Profiles in Patients with DIC and Related Diseases. *Thromb Res.* 2011

新たに

- ・膠原病
- ・開心術

3) 薬剤性 TMA の検討

ADAMTS13-P475S 変異体の立体構造解析

国立循環器病研究センター・分子病態部 小亀浩市

ADAMTS13 は、血小板の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、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。近年、我々は、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 (非触媒領域) の立体構造の解析などに重点を置き、研究を進めてきた。

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している。(1) Upshaw-Schulman 症候群患者の遺伝子解析、(2) ADAMTS13 の立体構造未決定部分および変異体の構造決定、(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、(4) ADAMTS13 活性修飾物質の探索。

今回、ADAMTS13-P475S 変異体の立体構造解析に関して報告する。我々はこれまでに、ADAMTS13 遺伝子多型 P475S (c. 1423C>T) に関して、日本人にアレル頻度 0.05 で存在すること、欧米人には見られないこと、P475S 変異体は正常型と比べて酵素活性が低く、変性剤に対する感受性が高いこと、DTCS ドメインの結晶の Pro475 (C ドメインに含まれる) はシス体であることを明らかにした。そこで、ADAMTS13 の構造安定性に対する P475S 変異の影響と、P475S 変異が酵素活性の低下をもたらす分子機構を明らかにするため、P475S 変異を導入した DTCS ドメイン (399 残基) の結晶化を試み、2.8 Å 分解能で立体構造を決定することに成功した。正常型 DTCS ドメインの立体構造と比較解析した結果、全体的な構造は P475S 変異の影響を大きく受けないが、Ser475 近傍では周辺残基や近接ループの原子間距離が増大していることが分かった。したがって、シス型 Pro475 の Ser への置換は、周辺残基間の相互作用を減弱させることで構造安定性や活性に影響を与えることが示唆された。

MEMO

RIPA を用いた ADAMTS13 機能ドメイン特異的自己抗体定量法の検討

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

後天性 TTP 患者に見られる抗 ADAMTS13 自己抗体のエピトープは cys-rich/spacer 領域を中心に、各ドメインに存在することが報告されている。現在、抗 ADAMTS13 自己抗体の検出方法は ELISA 法、western blot 法が一般的である。

本研究では ADAMTS13 全長のみならず、各機能ドメインを特異的に認識する自己抗体を高感度に定量できる測定系を確立することを目的とする。本測定系により、後天性 TTP 患者における自己抗体エピトープと病態の関連性が明らかになることを期待している。

方法としては無細胞発現系により ³⁵S メチオニンで標識した各機能ドメインを抗原として作成し、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) 法を用いた抗体価測定系を検討した。まずは、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 RI 標識 MDTCS 抗原と RI 標識 T2-8/CUB 抗原を免疫沈降させたところ、両抗原ともに抗体濃度依存的に免疫複合体が回収されたことより、本測定系の信頼性が示唆された。次に後天性 TTP 患者由来精製 IgG (n=12) を用いて上記 2 種類の RI 標識抗原を免疫沈降し、抗体価を定量測定したところ、全ての TTP 患者は健常人 IgG (n=5) よりも有意に高い抗体価を示した。

さらに詳細な自己抗体エピトープの情報を得るため、上記と同様に RI 標識 MDT、CS、T2-8、CUB 抗原をそれぞれ作製中である。今後は、これらの抗原を使用した自己抗体価測定を試みるとともに、本測定系の感度を上げるため、抗原作成や RIPA の条件検討を詳細に行う予定である。