

201128276A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

非定型溶血性尿毒症症候群の診断法と治療法の確立

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 藤村 吉博
奈良県立医科大学

平成 24 年 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

非定型溶血性尿毒症症候群の診断法と治療法の確立
(H23-難治-一般-121)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

平成 24 年 (2012) 年 3 月

研究組織

研究代表者	藤村	吉博	奈良県立医科大学	輸血部
研究分担者	宮田	敏行	国立循環器病研究センター	研究所
	松本	雅則	奈良県立医科大学	輸血部
研究協力者	八木	秀男	近畿大学医学部	奈良病院
	芦田	明	大阪医科大学	
	日笠	聡	兵庫医科大学	
	上田	恭典	倉敷中央病院	
	和田	英夫	三重大学医学部	
	吉田	瑤子	奈良県立医科大学	

目 次

I. 総括報告書

非定型溶血性尿毒症症候群の診断法と治療法の確立-----	1
	藤村吉博

II. 分担報告書

1. 奈良医大 TMA 解析センター登録症例からの非定型溶血性尿毒症症候群患者の同定-----	7
	松本雅則
2. 非定型溶血性尿毒症症候群における補体調節因子のタンパク質レベルでの診断法の確立-----	17
	藤村吉博
3. 非定型 HUS を発症した患者の遺伝子変異に関する研究-----	39
	宮田敏行

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	45
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	47
----------------------	----

V. その他

I. 総括研究報告書

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 23 年度総括研究報告書

非定型溶血性尿毒症症候群の診断法と治療法の確立

研究代表者 藤村 吉博 奈良県立医科大学輸血部 教授

研究要旨

溶血性尿毒症症候群 (HUS) は、細血管障害性溶血性貧血、血小板減少、腎不全を 3 主徴とする全身性重篤疾患である。HUS の約 90%は O157:H7 等の病原性大腸菌感染による下痢に伴って発症するが、約 10%は下痢を伴わず、非定型 (atypical, a) HUS と呼ばれている。近年 aHUS の原因の多くは H 因子 (FH) に代表される補体活性化の調節因子の遺伝子異常によることが欧米で数多く報告され、特異的治療法も開発されつつある。しかし、本邦における aHUS 病態解析はほとんど行われていない。そこで我々は、FH を中心とした補体調節因子の解析を行い、本邦 aHUS の病態解析を行った。

奈良医大輸血部は、1998 年以降本邦 TMA (血栓性微小血管障害症) 解析センターとして機能してきた。この結果 2011 年 12 月末までに 1085 例の TMA 患者の登録を行い、その中で家族性や症状反復性等から先天性 aHUS と考えられる症例を 31 家系 48 例同定した。これら aHUS 疑診患者と新規 aHUS 疑診 7 例について、患者及び家族の同意が得られた症例を対象として解析を行った。まず、タンパク質レベルの解析として、奈良医大輸血部でヒツジ赤血球を使った溶血試験、抗 FH 抗体検査、FH 抗原量測定などを行った。その結果をもとに国立循環器病研究センターで補体調節因子の遺伝子レベルでの解析を行った。本年度、新たに検体が採取できた 21 例中 5 例で明らかな溶血亢進が確認され、このうち 2 例の患者で FH 遺伝子変異を同定した。また、溶血亢進が見られなかった患者のうち 2 家系 5 症例で C3 遺伝子の異常を同定した。次いで、これらの変異を簡便に同定できる遺伝子解析法を確立した。

本研究の結果、55 例の aHUS 症例を同定し、3 家系 7 症例において責任遺伝子変異を同定することができたことより、今後本研究を継続することによって、本邦 aHUS 患者の病態解析と治療法の確立に大きく寄与すると考えられる。

研究分担者氏名

松本雅則

宮田敏行

奈良県立医科大学輸血部、准教授

国立循環器病研究センター研究所、部長

研究協力者

八木秀男
近畿大学医学部奈良病院 講師
芦田明
大阪医科大学 講師
日笠 聡
兵庫医科大学 講師
上田恭典
倉敷中央病院 部長
和田英夫
三重大学医学部 准教授
吉田瑤子
奈良県立医科大学 研究助手

A. 研究目的

aHUS（非定型溶血性尿毒症症候群）は死亡率が約 25%、約半数が高度の腎不全に至るといわれる予後不良の疾患である。近年、欧米では先天性 aHUS の病態解析が急速に進み、補体活性化の第 2 経路の調節因子である FH, I 因子 (FI), B 因子 (FB), MCP (膜補因子蛋白質) や、C3 (補体第 3 成分) の遺伝子異常が続々と報告された。最近では *CFHR (H 因子様蛋白質) 1, 3, 4* 遺伝子のホモ欠損例では抗 FH 抗体を産生することやトロンボモジュリンの遺伝子異常によって aHUS が生じることも報告された。この中で *FH* 遺伝子異常が全体の 30% を占め、最も頻度が高い。

それに対して、本邦における aHUS 病態解析は大きく立ち遅れており、平成 22 年までに aHUS 症例として遺伝子変異が同定されたのはわずか 2 例に留まっている (1 例はフランスで実施)。その原因として aHUS の病態が複雑であることや診断基準が欠如していることなどが考えられる。

奈良医大輸血部で登録している TMA (血栓性微小血管障害症) 症例のうち、先天性 aHUS が疑われる患者の多くは、診断未確定のまま血漿輸注、血漿交換などの治療が行われているが、多くの症例が小児期に発症しており、中には末期腎不全となり、血液透析で治療されている症例も存在する。

したがって、本邦における aHUS 症例の病態解析および治療法の確立は急務であると考えられる。本研究では、我々が既に集積している aHUS 疑診例および全国の医療機関から解析依頼を受けた症例において、まず奈良医大にて補体調節因子のタンパク質レベルでの aHUS 診断スクリーニングを行い、その結果で異常を認めた補体調節因子を中心に遺伝子解析を国立循環器病研究センターで行う 2 段階での病態解析を行った。患者情報を集積することで本邦 aHUS 患者の病態を明らかにし、症例に応じた適切な治療法の選択が可能となることを目的とする。

B. 研究方法

i) 研究対象となる aHUS の抽出

奈良医大輸血部で集積した TMA データベースの中から、2010 年までは TMA 発作の反復、もしくは家族内に TMA 症例が存在することで先天性が疑われるも ADAMTS13 活性が著減しない症例を原因不詳と分類していた。2011 年からは、前記に加え、他院で aHUS と診断された症例、ヒツジ赤血球を用いた溶血試験で陽性の症例、臨床症状に関わらず遺伝子解析の結果で異常を発見した症例を含め、aHUS と分類した。その結果、2011 年末では 31

家系 48 症例を先天性 aHUS 疑診例として登録した。これらの症例と 2012 年に新規に依頼を受けた 7 例を先天性 aHUS 症例として登録した（奈良医大 松本が分担し、患者の集積には近大奈良病院 八木、大阪医大 芦田、兵庫医大 日笠、倉敷中央病院 上田、三重大学 和田が協力した）。これらより、遺伝子解析の同意が得られた症例から順次解析を行った。

ii) aHUS 患者であることの診断方法

aHUS 病態解析の第一段階として、補体調節因子異常の中でも最も頻度が高いとされている FH に焦点を当てた解析をタンパク質レベル（後述 藤村分担）、そして遺伝子レベル（後述 宮田分担）の 2 段階で解析を行った。

1) 補体調節因子のタンパク質レベルでの解析（奈良医大輸血部 吉田、藤村）

本研究のために、まず、FH に対するモノクローナル抗体（mAb）6 種類とポリクローナル抗体（pAb）を作成した。さらに、mAb の 1 つである 072-16 に FH 活性阻害作用があることを確認し、また抗 FH pAb カップリングカラムを用いて血漿から FH を精製する手法を確立した。

a) ヒツジ赤血球を用いた溶血試験

Sanchez-Corral ら（Molecular Immunology 41:81-84, 2004）の方法を用いてヒツジ赤血球（500 万/ μ L）に患者血漿を添加し反応させたのち、溶血の強さを吸光度で測定した。本試験では正常血漿に mAb である 072-16 を添加したものを、陽性コントロールとして用いた。血漿中の補体

調節因子の機能異常の場合には、補体活性が亢進し溶血が強くなる。よって、本試験において溶血の亢進が見られた場合には FH, FI, FB, C3 等の補体調節因子の機能異常を疑い、溶血の亢進が見られない場合は MCP やトロンボモジュリン（TM）などの膜結合型の因子の異常を疑った。

b) FH による溶血補正試験

a) の溶血反応において溶血の亢進が見られた場合、血漿より精製した FH を添加し溶血が補正されるか否かを調べた。本試験において溶血が補正された場合は FH 活性の低下を疑い、補正されない場合では FH 以外の FI や FB, C3 などの活性低下を疑った。

c) 抗 FH 抗体スクリーニング

FH に対する抗体（抗 FH 抗体）は ELISA 法、Western blot 法にてスクリーニングを行った。ELISA 法では精製 FH をプレート上に固相化し、そこに患者血漿を加え、抗ヒト IgG 抗体で検出を行った。Western blot 法では、血漿より精製した FH の SDS-5%PAGE を行い、PVDF 膜に転写した。スキムミルクでブロッキング後、100 倍希釈した患者血漿を添加し、4°C で一晩反応させた。その後、抗ヒト IgG 抗体を用いて検出を行った。抗 FH 抗体が陽性である場合は *CFHR1*, 3, 4 領域遺伝子の異常を疑い、解析した。

2) 補体調節因子の遺伝子レベルでの解析（国立循環器病研究センター 宮田）

FH, MCP, FI, TM, C3, FB の計 6 種類の遺伝子解析を行った。タンパク質レベ

ルでの解析結果より、以下のようにターゲットとなる分子を絞り込み、遺伝子解析を進めた。

- ① 溶血亢進を認め、精製 FH の添加により溶血の亢進の補正を確認した場合：抗 FH 抗体 ELISA, Western blot 法により、抗体の有無を調べた。抗体検査が陰性であれば FH の機能異常を疑い、FH 遺伝子解析を行った。抗体検査が陽性であれば、CFHR1, 3, 4 領域の遺伝子解析を行った。
- ② 溶血亢進を認めるも、精製 FH の添加による溶血の補正が見られない場合：FI や FB, C3 等の分子異常を疑い、遺伝子解析を行った。
- ③ 溶血の亢進が見られない場合：トロンボモジュリンや MCP の分子異常を疑い、これら分子に焦点を当て遺伝子解析を行った。

なお、タンパク質レベルでの異常部位のスクリーニングの後に、海外から報告されている 6 種類の補体調節因子の遺伝子解析を網羅的に施行した。

3) FH 遺伝子変異と C3 遺伝子変異の RFLP 解析 (国立循環器病研究センター 宮田)

今回同定された FH 遺伝子変異の確認のため RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を確立した。また、同様に同定された C3 遺伝子変異には mutagenic primer を用いた。RFLP 解析では、患者より抽出した DNA を PCR 反応により増幅させたのち、制限酵素処理を行うことで変異の有無を同定した。

(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、書面での同意を得た。また、遺伝子解析に関しては、奈良医大および国立循環器病研究センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

予備実験の結果、長期保存した血漿ではヒツジ溶血反応検査ができないことが明らかとなったため、本年度新たに採血できた 21 例の患者でタンパク質レベルの解析を行った。このうち 5 例で明らかな溶血の亢進を認め、5 例に軽度の溶血亢進、残り 11 例については溶血の亢進を認めなかった。明らかな溶血の亢進が見られた 5 例の患者について精製 FH 添加による溶血補正試験を行ったところ、全例で溶血の亢進が補正された。抗 FH 抗体スクリーニングは 1 例で陽性であった。

溶血反応亢進を認めた症例のうち、同意が得られた症例について遺伝子解析を行ったところ、同一家系内の 2 症例 (患者本人、患者父親) で FH 遺伝子に変異 (R1215Q) が同定された。本遺伝子変異は、2003 年に Caprioli らによって aHUS の責任遺伝子変異の 1 つとして報告されていた。この遺伝子変異の存在を確認するために RFLP を行ったところ、患者、父親ともに変異の存在を確認した。

さらに、溶血亢進が認められなかった症例について遺伝子解析を行ったところ、5 例で C3 に遺伝子変異 (I1157T と S562L) を同定した。また、これらの変異を簡便に同定するため、PCR-RFLP 法を確立し、変異の存在を確認した。本遺伝子変異は海外から報告されているものではあった

が、本邦において aHUS 患者で C3 の遺伝子変異が同定された最初の症例となった。

今回 FH や C3 の遺伝子変異の存在を確認するため開発した RFLP 法は、簡便であるので、これらの変異の同定に広く使用が可能である。

D. 考察

我が国では先天性の aHUS はその存在が疑われるほど症例数が少ないとされてきた。そのため、本邦ではまとまった検討がされずに放置され、その結果、臨床医の認識が低く積極的に診断できない悪循環が続いていた。一方で、欧米では 2000 年以降先天性 aHUS 症例で補体調節因子の遺伝子異常が発見され、病態解析が急速に進められてきた。その結果、補体 C5 に対するモノクローナル抗体 Eculizumab が aHUS の治療薬として有効であることが確認され、2011 年に欧米で aHUS の治療薬として承認された。

奈良医大輸血部では、1998 年以降 ADAMTS13 の解析を通じて本邦 TMA 解析センターとして、日本全国の医療機関から依頼された TMA 症例のデータベース化を行って来た。2011 年 12 月末現在で 1085 例の TMA を集積したが、昨年までは ADAMTS13 活性が著減する TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) に焦点を当てて解析してきた。TTP の中にも遺伝的に ADAMTS13 が欠損する先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群: USS) が存在し、ADAMTS13 遺伝子を解析した。今回の研究班の対象として、我々のデータベースの中から小児期から TMA 発作を繰り返す、もしくは家族内に TMA 症例が存在することなどから先天性

aHUS を疑う症例を 55 例同定した。これらの症例の中には、小児期に末期腎不全となり、血液透析が導入され、腎移植が考慮されている症例が存在した。

本研究では奈良医大でのヒツジ赤血球を用いた溶血検査などのタンパク質レベルでの検討に加えて、国立循環器病研究センターでの補体調節因子の遺伝子レベルでの解析を行った。遺伝子解析は、タンパク質レベルで異常部位のスクリーニングの後に実施した。海外から aHUS の遺伝子異常と報告されている 6 種類の遺伝子解析を網羅的に行った。

その結果、溶血反応が陽性であった患者に FH 遺伝子異常を同定した。このように溶血反応の結果から遺伝子異常部位を推測し、遺伝子解析を行うという一連の解析方法は有用であることが確認できた。また、最も頻度が高いとされている FH 遺伝子異常だけでなく C3 遺伝子異常も発見した。これらの遺伝子変異は、海外から報告されているものと同じのものであり、本邦の先天性 aHUS においても海外と同様の遺伝子異常が認められることが明らかとなった。USS 患者における ADAMTS13 遺伝子異常は、欧米からの報告と全く異なっていることと対照的である。また、FH、C3 遺伝子異常とも発端者とともに、同じ遺伝子異常が父や母にも同定されたが、両親には症状は認めず penetrance (浸透率) が低いことが確認された。

今回、C3 遺伝子異常患者では溶血反応の亢進を認めなかった。FH は補体活性化を制御する因子であるが、C3 異常は補体それ自身の異常であり、Gain-of-function (機能獲得型) の異常である。そ

のため、C3 遺伝子異常の患者の血漿では、補体が過度に活性化して、消耗性に補体が減少した可能性が考えられる。その結果、ヒツジ赤血球を破壊できる程度の補体が、患者血漿中に残存していなかった可能性も考えられるが、今後多数例で解析する必要がある。

本研究により 32 家系 55 症例の aHUS を同定し、7 例の患者で責任遺伝子変異を確認するに至ったことは大きな進歩であり、今後引き続き解析を行うことで症例の集積を行い、本邦 aHUS の病態が明らかになることが期待される。

E. 結論

本研究を継続することで、多数の本邦

aHUS 症例において、臨床所見と遺伝子異常の関連が明らかとなり、現在まで不明であった病態が明らかとなる可能性が高い。その結果をもとに多くの臨床医が簡便に診断できる aHUS の診断基準を作成することが最終的な目標である。本研究が平成 24 年度も継続された場合、日本腎臓学会と日本小児科学会が共同で設立予定の aHUS 診断基準作成ワーキンググループと協議しながら、本邦における aHUS 診断基準の作成を行う計画である。

謝辞：本研究を始めるにあたり福島県立医科大学の藤田禎三名誉教授から抗 FH pAb を御供与いただきました。ここに改めて感謝の意を表します。

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

奈良医大 TMA 解析センター登録症例からの
非定型溶血性尿毒症症候群患者の同定

研究分担者 松本雅則 奈良県立医科大学 輸血部 准教授

研究協力者 八木秀男 近畿大学医学部奈良病院 血液内科 講師
芦田明 大阪医科大学 小児科 講師
日笠聡 兵庫医科大学 血液内科 講師
上田恭典 倉敷中央病院 血液内科 部長
和田英夫 三重大学医学部 臨床検査医学 准教授
吉田瑤子 奈良県立医科大学 輸血部 研究助手

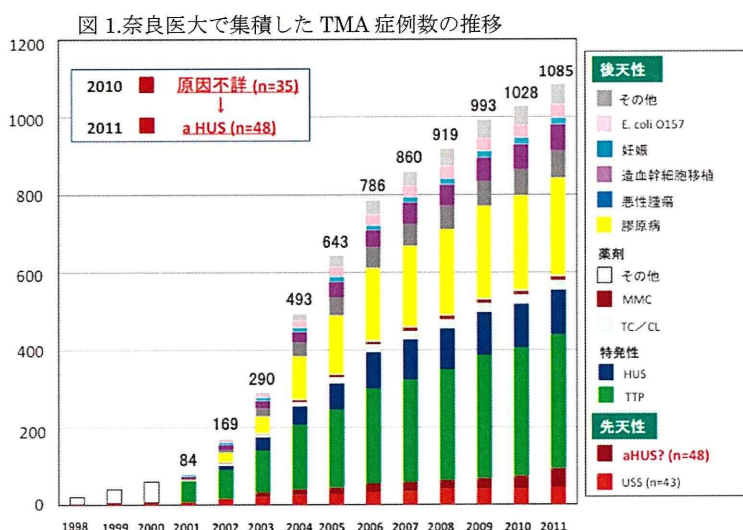
研究要旨：溶血性尿毒症症候群（HUS）は細血管障害性溶血性貧血、血小板減少、腎不全を3主徴とする全身性重篤疾患である。本研究ではHUSの中で、補体調節因子の異常などにより発症する atypical (a) HUS 患者の発掘を目的とした。奈良医大輸血部で集積した1085例のTMA（血栓性微小血管障害症）患者の中で、ADAMTS13活性が著減しておらず、家族性や症状反復性などの特徴から先天性 aHUS と考えられる患者について検討した。その結果、2011年12月末までに31家系48例の aHUS 疑診患者を同定し、2012年に新規 aHUS 疑い患者7例を同定し、計55例で検討した。これら aHUS 疑診患者の年齢分布は、1ヶ月～43歳と幅広く、男性39人、女性16人と男性優位であった。発症年齢は15才未満の小児期に発症する症例が86%と大多数をしめた。55例中、血漿療法による治療を受けた患者は23例(42%)であり、うち血漿交換が20例、新鮮凍結血漿 (FFP) 輸注が9例であった。透析を受けている患者は14例(25%)で、このうち血液透析が8例(15%)、腹膜透析が7例(13%)、両者ともが1例であった。本邦における aHUS 患者の多数例での解析は現在までほとんど行われておらず、今回同定した aHUS 患者から Factor H などの遺伝子異常患者が発見されており、今後このデータベースを解析することで、本邦 aHUS 症例の病態解明を進める予定である。

- A. 研究目的 管性溶血性貧血、血小板減少、腎不全の3
溶血性尿毒症症候群（HUS）は、細小血 徴候で診断されるが、臨床的に鑑別が困

難な類縁疾患として血栓性微小血管障害症（TTP）がある。最近 TTP は、ADAMTS13 活性著減で診断されることがあり、HUS では著減しないことから、両疾患は ADAMTS13 によって鑑別可能と報告された。しかし、TTP 症例の中でも膠原病や造血幹細胞移植例などの二次性を中心に ADAMTS13 が著減しない症例もあることから、依然として TTP と HUS の鑑別診断は困難な場合がある。そのような場合に両者を包含するような疾患概念である血栓性微小血管障害症（TMA）という病理学的な病名が用いられる場合がある。

HUS の 90%以上の症例は、腸管出血性大腸菌感染を契機に発症し、血便や下痢を伴う。これに対し、約 10%の症例で下痢を伴わない HUS があり、非定型(atypical) HUS (aHUS) と呼ばれている。aHUS は下痢関連の HUS に比べ予後が悪く、死亡率は約 25%で、約半数が高度の腎不全に至ると報告されている。最近、欧米では先天性 aHUS の研究が急速に発展し、その病因として H 因子 (FH) に代表される補体調節因子の遺伝子異常によるものであることが報告されている。しかし、本邦における aHUS 研究は欧米に比べ大きく立ち遅れている状態である。

奈良医大輸血部では ADAMTS13 解析を通じて、本邦 TMA 解析センターとして活動してきた。全国の医療機関から解析依頼を受けた症例のうち TMA と診断したも



のは 2011 年 12 月末で 1085 例であった。本研究では奈良医大に病態解析を依頼された TMA 患者の中から aHUS 患者の発掘を行い、本邦における aHUS 患者の現状を検討した。

B. 研究方法

奈良医大輸血部で 1998 年から 2011 年に集積した 1085 例の TMA 症例について対象とした。我々の集積した症例数の年次推移を図 1 に示す。2010 年 12 月の段階で TMA の全症例数は 1028 例であり、家族性や症状反復性等から先天性が疑われるが、ADAMTS13 活性が著減しておらず Upshaw-Shulman 症候群 (USS) が否定される症例が 35 例存在した。この当時は、先天性が疑われるが原因不詳と分類していた。2011 年からは、前記の 1) 先天性で原因不詳、に加え、2) 他院で aHUS と診断され、改めて当院へ紹介された患者、3) ヒツジ赤血球を用いた溶血試験で陽性の症例、4) 遺伝子解析の結果で異常を発見した症例を含め、aHUS と分類した。なお、3) と 4) は患者両親などで HUS の症状がない場合も無症候性潜在患者疑いとして

登録した。その結果、2011 年末では先天性が疑われる症例が 93 例存在した。このうち ADAMTS13 活性が著減しインヒビターを認めない 45 症例は、USS と診断した。残りの 48 例は、ADAMTS13 活性が著減しておらず、先天性 aHUS に分類した。今回この 48 例に、本年に入って同定した 7 例を加え、計 55 例の本邦 aHUS 症例の臨床所見について解析した。

(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、書面での同意を得た。

C. 研究結果

我々の集積した TMA のうち先天性 aHUS が疑われた症例が 32 家系、55 例存在した。これら患者の年齢分布は 1 ヶ月～43 歳と幅広く分布しており、うち男性が 39 人、女性が 16 人と男性が多かった。aHUS 患者の初発年齢は、発症時期が明らかな 36 例中、15 歳未満の小児期発症が 32 例 (89%) と大部分で、15 才以上は 4 例 (11%) であった。小児期の中でも 2-6 歳で発症している症例が 15 例と最も多かった。55 例の

うち、家族内に HUS 患者が存在する家族性症例が 40 例 (73%) であった (表 1)。

ADAMTS13 活性が著減していない (3% 以上) 症例を aHUS と診断したが、同活性の最低値は 11% であった。発作時の ADAMTS13 活性は、25% 未満 2 例、25-50% 12 例、50-100% 28 例、100% 以上が 13 例であった。aHUS 症例では、ADAMTS13 活性が 50% 以上である症例が 75% と、大部分の症例がほぼ正常の ADAMTS13 活性を示した (表 1)。

表 2 に aHUS に対する治療法を記載した。血漿療法 (23 人) やステロイド療法 (7 人)、免疫グロブリン療法 (5 人) が施行されていた。血漿療法を受けている患者のうち、血漿交換が 20 例、FFP 輸注が 9 例、両者ともが 6 例であった。しかし、このような特異的な治療を必要とせず、対症療法のみで寛解となっている症例も 9 例存在した。腎障害に関して、透析治療を受けた症例は 14 例 (25%) であった。このうち血液透析が 8 例、腹膜透析が 7 例、両者とも 1 例であった。また、生体腎移植が施行された症例が 2 例存在したが、両症例とも腎移植後にも HUS の再発

表1 aHUS 55例の患者背景

	aHUS患者 (n=55)
年齢分布	1 ヶ月 ~ 43歳
男女比 男性/女性	39 / 16
初発年齢	(n=36)
- 15 才未満	32 (89%)
- 15 才以上	4 (11%)
発症時期不明	(n=13)
症状なし	(n= 6)
家族性/ 散発例	40/15
ADAMTS13活性	
<3	0
3-<25	2 (4%)
25-<50	12 (22%)
50-<100	28 (51%)
100-	13 (24%)

表2 aHUS患者55例の治療法の選択

治療	n=55
血漿療法	n=23 (43%)
- 血漿交換	20
- FFP輸注	25 9
両者とも	6
透析	n=14 (25%)
- 血液透析	8
- 腹膜透析	7
両者とも	1
移植	
- 腎臓	2
- 腎臓・肝臓同時	0
ステロイド療法	7
免疫グロブリン療法	5
エクリズマブ	3

が認められた。なお、補体 C5 に対するモノクローナル抗体エクリズマブの投与を受けている患者は 3 例であった。この新薬は、昨年欧米で aHUS の適応拡大が認められたが、本邦では未だに保険適応になっていない。

D. 考察

先天性TMAの中で病因が明らかになっているものとして、遺伝的にADAMTS13が欠損するUSSがある。今回用いたTMAデータベースの中から、我々は既に45例のUSSを同定している。このUSS45例と、今回同定した先天性aHUSと考えられる55症例の臨床的特徴を比較した(表3)。USSは常染色体劣性遺伝であるが、先天性aHUSは常染色体優性と劣性遺伝どちらも存在することが欧米から報告されている。今回のaHUS症例で親子ともに発症しているのは17例(30%)で、家族内発症は40例(73%)であった。ちなみにUSSの家族内発症は5例(12%)であったが、全例同胞での発症である。男女比は、USSでは女性優位であったが、aHUSでは男性が39例で圧倒的に男性に多い傾向が認められた。しかし、欧米からの報告では、aHUSでは男女差はないと言われており我々の結果と大きく異なっている。この原因として、aHUS発症のトリガーは上気道炎や妊娠などが報告されているが、今回検討した55症例で妊娠に関連した症例は1人も存在しなかった(表3)。これは、我々の集計では妊娠関連TMAは、二次性TMAとして

別のカテゴリーに分類されている可能性がある。また、本邦では妊娠中に発症しているHUS症例は、HELLP (Hemolysis, Elevated Liver Enzyme, and Low Platelet)症候群などとの鑑別が困難であることから、適切に診断されていない可能性がある。今後、妊娠関連TMAに分類した症例を再度見直すとともに、産婦人科医へのaHUSへの啓蒙が重要であると思われる。

今回検討した 55 症例中、多くの症例が 15 才未満の小児期に発症しており、中には幼少期から末期腎不全となり、透析導入となっている例も存在する。このことから、本邦においても aHUS の実態を調査し、病態解析をさらに進める重要性が明らかになった。そのためには、まず aHUS を簡便な検査で診断できる診断基準の作成が必要であると思われる。その診断基準を用いて、本邦における aHUS 症例を集積し、Factor H などの補体調節因子のタンパク質レベルの解析と遺伝子レベルの解析を進めることが重要である。本研究における症例解析をもとに、今後本邦 aHUS の病態解析を進める予定である。

表3 本邦の先天性TMAとしてUSSとaHUSとの比較

	USS (n=45)	aHUS (n=55)
家族性	5 (12%)	40 (73%)
男性/女性	17/28	39/16
新生児期重症黄疸	18 (40%)	0 (0%)
初発年齢		
15才未満	26	32
15才以上	19	4
不明	0	13
症状無し	0	6
TMAの増悪要因 インフルエンザ感染 妊娠	有り 有り	有り 無し?

E. 結果

奈良医大輸血部で集積した 1085 例の TMA 患者について検討した結果、ADAMTS13 活性が著減していない症例の中で、家族性や反復性などの特徴から先天性 aHUS と考えられる症例を 31 家系 48 症例同定し、さらに 2012 年に新規 aHUS 疑い患者 7 例を同定した。これらの患者をさらに解析することで、FH などの遺伝子異常を発見しており、貴重なデータベースと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

英文

1. Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, Murata M, Miyata T. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost.* 2011; 9:283-301.
2. Akiyama R, Komori I, Hiramoto R, Isonishi A, Matsumoto M, Fujimura Y. H1N1 influenza (swine flu)-associated thrombotic microangiopathy with a markedly high plasma ratio of von Willebrand factor to ADAMTS13. *Intern Med* 2011;50 : 643-647.
3. Yamaguchi Y, Moriki T, Igari A, Nakagawa T, Wada H, Matsumoto M, Fujimura Y, Murata M. Epitope analysis of autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res* 2011;128 : 169-173.

4. Takaya H, Uemura M, Fujimura Y, Matsumoto M, Matsuyama T, Kato S, Morioka C, Ishizashi H, Hori Y, Fujimoto M, Tsujimoto T, Kawaratani H, Kurumatani N, Fukui H. The ADAMTS13 activity may predict the cumulative survival of patients with liver cirrhosis - in comparison with the Child-Turcotte-Pugh score and the MELD score. *Hepatol Res* (in press).
5. Matsuyama T, Uemura M, Takaya H, Matsumoto M, Kato S, Ishizashi H, Morioka C, Fujimoto M, Tsujimoto T, Kawaratani H, Hori Y, Koyama N, Hatake K, Fujimura Y, Fukui H. Decreased plasma ADAMTS13 activity during moderate to much consumption of ethanol in healthy volunteers: Differences between normal and heterozygous mutant aldehyde dehydrogenase-2 Alleles. *Hepatol Res* (in press).
6. Uemura M, Fujimura Y, Ko S, Matsumoto M, Nakajima Y, Fukui H. Determination of ADAMTS13 and Its Clinical Significance for ADAMTS13 supplementation therapy to improve the survival of patients with decompensated liver cirrhosis. *Int J Hepatol* (Review) (in press).
7. Yagi H, Matsumoto M, Fujimura Y. Paradigm shift of childhood TTP with severe ADAMTS13 deficiency. *Le Presse Médicale* (Review) (in press).
8. Koyama N, Matsumoto M, Tamaki S, Yoshikawa M, Fujimura Y, Kimura H. Reduced larger VWF multimers at dawn in OSA plasmas reflect severity of apneic episodes *Eur Respir J* (in press)
9. Taguchi F, Yagi H, Matsumoto M, Sadamura S, Isonishi A, Soejima K,

- Fujimura Y, The homozygous p.C1024R- ADAMTS13 gene mutation links to a late-onset phenotype of Upshaw - Schulman syndrome in Japan. *Thromb Haemost* (in press)
10. Matsumoto M, Bennett C. L., Isonishi A, Qureshi Z, Hori Y, Hayakawa M, Yoshida Y, Yagi H, Fujimura Y. Acquired idiopathic ADAMTS13 activity deficient thrombotic thrombocytopenic purpura in a population from Japan. *PLoS ONE* 7:e33029. doi:10.1371/journal.pone.0033029)

和文

1. 松本雅則. 非定型溶血性尿毒症症候群. *Annual Review 血液* 2011 174-181, 2011.
2. 松本雅則. TMAとHUSの違いは何か. *血栓と循環* 19. 24-26, 2001.
3. 森岡千恵, 植村正人, 高谷正章, 松本雅則, 藤村吉博, 福井博. 重症急性性膵炎におけるADAMTS13活性の動態とその臨床的意義. *消化器内科* 52:200-208, 2011.
4. 松本雅則. TTPの検査と治療-ADAMTS13検査の意義-. *機器と試薬* 34:251-256, 2011
5. 藤村吉博, 松本雅則, 八木秀男, 溶血性尿毒症症候群、血栓性血小板減少性紫斑病、*日本内科学会雑誌* 5: 1296-1307, 2011
6. 藤村吉博, 八木秀男, 石西綾美, 山口直子, 早川正樹, 松本雅則, 佐道俊幸, 血栓性微小血管障害症 (TMA) と妊娠 -その診断と治療-, *日本産婦人科・新生児血液学雑誌* 20, 83-92, 2011
7. 松本雅則, 藤村吉博, ADAMTS13、分子脳血管病 10, 74-77, 2011
8. 藤村吉博, 吉田瑤子, 石西綾美, 堀勇二, 早川正樹, 八木秀男, 松本雅則. 血栓性微小血管障害性 (TMA)

の診断と治療戦略、*血液フロンティア* 21: 43-59, 2011

2. 学会発表

1. S.Kato, M. Matsumoto, Y. Fujimura. A 10 min-assay for ADAMTS13 activity with an automated biochemistry analyzer. 57th Annual meeting of the Scientific and Standardization Committee. Kyoto, July 23, 2011
2. Y. Fujimura, M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, M. Murata, T. Miyata, (Sate-of-the-Art Lecture) Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 28, 2011
3. H. Takaya, M. Uemura, M. Fujimoto, T. Matsuyama, C. Morioka, M. Ishikawa, T. Tsujimoto, H. Kawaratani, S. Takeyama, M. Matsumoto, Y. Fujimura, H. Fukui, Determination of ADAMTS13 and its clinical significance related to endotoxemia in patients with hepatic failure, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
4. H. Yagi, N. Yamaguchi, Y. Shida, M. Matsumoto, M. Sugimoto, K. Tsubaki, Y. Fujimura, Cilostazol down-regulates the height of mural platelet thrombi formed under a high shear rate flow in the absence of ADAMTS13 activity, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
5. Y. Hori, A. Isonishi, K. Soejima, M. Matsumoto, M. Shima, Y. Fujimura,

- Isoelectric focusing analysis with a large-pore agarose-acrylamide composite gel identified two forms of ADAMTS13, unbound and bound to von willebrand factor, in plasma milieu, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
6. C. Morioka, M. Uemura, H. Takaya, M. Sawai, M. Yoshida, A. Mitoto, J. Yamao, M. Matsumoto, Y. Fujimura, H. Fukui, Potential role of ADAMTS13 associated with post ERCP pancreatitis, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
 7. M. Uemura, Y. Fujimura, M. Matsumoto, H. Ishibashi, T. Matsuyama, S. Kato, Y. Hori, C. Morioka, H. Takaya, M. Fujimoto, T. Tsujimoto, H. Kawaratani, H. Fukui, The ADAMTS13 activity reflects the cumulative survival of patients with liver cirrhosis, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
 8. T. Soeda, H. Kawata, Ji-Hee Sung, S. Somekawa, M. Matsumoto, Y. Fujimura, S. Uemura, Y. Saito, CD39 in atherosclerotic lesion contributes to the vascular pleiotropic effects of stain, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
 9. H. Fukushima, K. Nishio, K. Okuchi, A. Isonishi, M. Matsumoto, Y. Fujimura, K. Takano, H. Asai, T. Watanabe, S. Ito, T. Seki, Y. Urizono, M. Hata, M. Doi, Y. Shida, H. Matsui, M. Sugimoto, Transitions of plasma vWF propeptide, vWF and ADAMTS13 in patients with septic DIC, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
 10. N. Koyama, M. Matsumoto, S. Tamaki, M. Yoshikawa, Y. Fujimura, H. Kimura, Dynamic changes in von Willebrand factor multimers reflect the severity of obstructive sleep apnea, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
 11. A. Isonishi, B. Plaimauer, F. Scheiflinger, K. Nishio, M. Uchiba, Y. Yonemura, M. Matsumoto, Y. Fujimura. Anti-ADAMTS13 inhibitor boosting with plasma exchange in acquired TTP: characterization of inhibitors and efficient treatment with Rituximab, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
 12. M. Hayakawa, M. Matsumoto, Y. Yoshida, A. Isonishi, S. Kato, Y. Fujimura. Estimated patient number of congenital atypical HUS within a TMA patient registry across Japan: A registry of Nara Medical University, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
 13. M. Matsumoto, K. Yamada, K. Nakayama, A. Isonishi, M. Hayakawa, M. Inoue, K. Kawa, Y. Fujimura, Size of vWF multimers, modulated by therapeutic regimens in hematopoietic stem cell transplantation, determine an adverse reaction to bleeding or thrombotic microangiopathy, XXIII Congress of the International

- Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
14. T. Matsui, Y. Suzuki, F. Matsushita, J. Hamako, I. Furuta, Y. Nashimoto, M. Matsumoto, Y. Sakurai, Y. Fujimura. cDNA cloning and expression of botrocetin-like protein, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
 15. H. Kawata, Y. Takemoto, S. Tsunenari, J. Sung, M. Matsumoto, Y. Fujimura, Y. Tabata, Y. Saito, CD39 gene-eluting stent prevents subacute in-stent thrombosis in injured artery, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
 16. Y. Fujimura, M. Matsumoto, A. Isonishi, H. Yagi, K. Kokame, K. Soejima, M. Murata, T. Miyata, Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, October 16, 2011
 17. M. Matsumoto, C. Bennett, A. Isonishi, Z. Qureshi, Y. Hori, M. Hayakawa, Y. Yoshida, H. Yagi, Y. Fujimura, Acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura in a population from Japan, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, October 16, 2011
 18. A. Isonishi, B. Plaimauer, F. Scheiflinger, K. Nishio, M. Uchiba, Y. Yonemura, M. Matsumoto, Y. Fujimura. Anti-ADAMTS13 inhibitor boosting with plasma exchange in acquired TTP, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, October 16, 2011
 19. T. Kajiguchi, Y. Kamiura, T. Sakakibara, R. Hasegawa, A. Isonishi, M. Hayakawa, M. Matsumoto, Y. Fujimura, T. Ohno, Rituximab in a patient with daily plasma exchange-refractory thrombotic thrombocytopenic purpura, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, October 15, 2011
 20. 松本雅則、藤村吉博、造血幹細胞移植後致命的合併症に対する新鮮凍結血漿の新たな適応、第 55 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (2011 年 11 月 26 日、兵庫)
 21. M. Matsumoto, A. Isonishi, Y. Hori, M. Hayakawa, K. Soejima, Y. Fujimura. A large-pore gel electrophoresis separates the complex in both of ADAMTS13 bound to VWF and to the IgG autoantibodies from the unbound in plasma milieu, The 54th American Society of Hematology annual meeting and exposition, San Diego, December 8, 2011
 22. A. Igari, T. Moriki, Y. Yamaguchi, T. Nakagawa, H. Wada, M. Matsumoto, Y. Fujimura, K. Soejima, M. Murata, Quantitative analysis of the domain-specific autoantibodies to ADAMTS13 in patients with acquired thrombotic thrombocytopenia purpura, The 54th American Society of Hematology annual meeting and exposition, San Diego, December 8, 2011
 23. K. Nishio, H. Fukushima, T. Watanabe, T. Seki, H. Matsui, M. Sugimoto, M. Matsumoto, Y. Fujimura, K. Okuchi, The ratio of ADAMTS13 to VWF-Propeptide can reflect the disease severity and the extent of inflammation of the patients with severe sepsis or

septic shock, The 54th American Society of Hematology annual meeting and exposition, San Diego, December 10, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし