

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

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

研究協力者 吉田 瑤子 奈良県立医科大学 輸血部 研究助手
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）の約90%は病原性大腸菌感染を契機に発症する下痢関連であるが、約10%は下痢を伴わない非定型HUS（a）HUSである。近年、欧米では先天性aHUSの原因としてH因子（FH）に代表される補体調節因子の遺伝子異常が多く報告されているが、本邦におけるaHUSの系統的病態解析はほとんど行われていなかった。そこで我々はFHを中心とした補体調節因子の解析をタンパク質レベルで行った。

奈良医大輸血部で2011年12月末までに集積した1085例のTMA（血栓性微小血管障害症）患者のうち、家族性や症状反復性等から先天性aHUSと診断した31家系48例の患者、およびその後解析依頼のあった新規患者7例を対象とした。これら55例の患者を対象に、ヒツジ赤血球を用いた溶血試験、抗FH抗体検査、FH抗原量測定を行った。補体調節因子の遺伝子解析は国立循環器病研究センターに解析を依頼した。その結果、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遺伝子異常を同定した。また、溶血の亢進が見られなかった患者のうち2家系5症例でC3遺伝子異常を同定した。

以上のごとく、遺伝子解析で補体調節因子を検査する前に、タンパク質レベルで異常分子を推定できる検査法を確立した。今後、様々な補体調節因子の異常を解析することで、タンパク質レベルの検査の特徴を明らかにして行く予定である。

A. 研究目的

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を契機に発症する。これに対し、約10%の割合で発症する下痢を伴わない

HUSは非定型（atypical, a）HUSと呼ばれている。aHUSは死亡率が約25%、約半数が高度の腎不全に至るといわれている予後不良の疾患である。近年、欧米ではaHUSの病態解析が急速に発展し、先天性aHUS患者において補体活性化の第2経路の調節因子であるFHや、I因子（FI）、B

因子 (FB), MCP (膜補因子蛋白質), C3(補体第3成分)などの遺伝子異常が次々と報告された。中でもFH遺伝子異常の頻度が最も高く、補体調節因子異常の約30%を占めると言われている。補体調節因子は通常、補体成分の活性化を調節し、さらには補体による攻撃から自己細胞を保護する役割を果たしている。これら補体調節因子に遺伝子異常が生じて活性が低下すると、自己細胞は補体の攻撃から十分に保護されず、過剰な補体の活性化により傷害を受け、その結果HUSが発症すると考えられている。また最近ではCFHR(H因子様蛋白質) 1, 3, 4 遺伝子のホモ欠損例では抗FH抗体を生じることやトロンボモジュリンの遺伝子異常によってもaHUSを生じることが報告されている。

しかし、本邦におけるaHUSの系統的病態解析はほとんど行われておらず、遺伝子解析はおろかその臨床的特徴さえ明らかとなっていない。そこで我々はFHを中心とした補体調節因子の解析をタンパク質レベルで行った。

B. 研究方法

i) 対象症例

TMA (血栓性微小血管障害症) 解析センターとして奈良医大輸血部で日本全国の医療機関から2011年12月末までに集積した1085例のTMA患者のうち、

ADAMTS13活性が著減しておらず、家族性や症状反復性等から先天性aHUSと診断した31家系48例の患者、およびその後解析依頼のあった新規患者7例、計55例を対象とした。

ii) 解析方法

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、以下の実験と解析を行った。

a) 血漿からのFHの精製

FHの精製のために、福島県立医科大学免疫学講座教授の藤田禎三先生より、FHをウサギに免疫し採取した抗血清の供与を受けた。この血清からProtein Aカラムで抗FHポリクローナル抗体(pAb) IgGを精製した。本抗体20mgをCNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) 2gにカップリングし、約7mLの抗FH pAbカップリングカラムを作成した。

このカラムに期限切れの新鮮凍結血漿(FFP) (奈良県赤十字血液センターより供与) 10mLを平衡化バッファー(20mM EACA, 2mM PMSF, 2mM BZ, 5mM EDTA, 0.02% NaN3

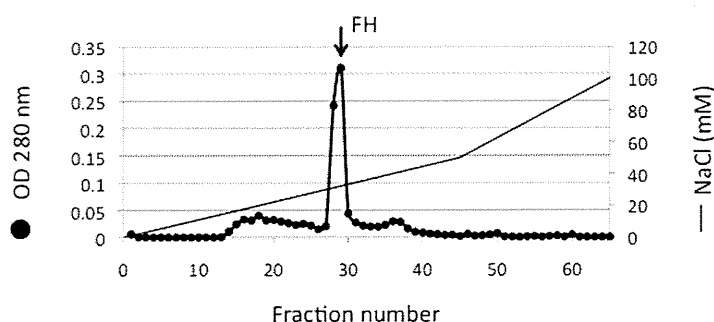


図1 Mono QカラムによるFHの精製
FH pAbカップリングカラムで粗精製したFHをMono Qカラムに添加しNaCl濃度を0Mから45分で0.5M、65分で1Mになるよう変化させ、溶出を行った。Fraction number 28, 29にFHの溶出を確認した。

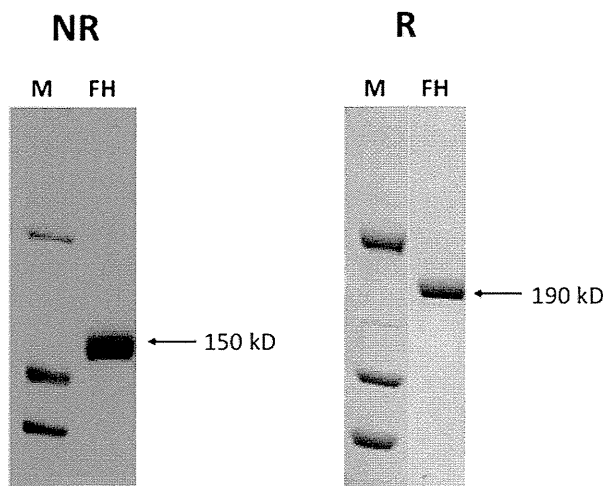


図2 血漿より精製したFHのSDS-5% PAGE
精製したFHの非還元条件(NR)、還元条件(R)での電気泳動

in TBS, pH 7.4) で3倍希釈し、添加した。添加後、カラムを一晩かけて洗浄し、溶出バッファー(0.1M Glycine-HCl, 0.02% NaN₃, pH 2.7)にて溶出した。得られた粗精製FHは濃縮後、20mM-Tris, 2mM BZ, 0.05% NaN₃, pH 8にて透析し、同緩衝液で平衡化したMono Qカラムに添加した。その後、図1に示すように0→1MになるようNaCl濃度勾配をかけ、溶出を行った。280 nmでの吸光度を測定し、蛋白の溶出が見られた画分についてSDS-5%PAGE電気泳動により精製FHの純度確認を行った(図2)。

b) 精製FHを用いた抗FHモノクローナル抗体(mAb)の作成とサブクラスの決定

上記方法より精製したFHをウサギとマウスに免疫し、FHに対するpAbと6種類のmAbを作成した。得られた6種類のmAb(O37-1, O52-16, O72-16, Q34-11, R27-11, R35-8)のサブクラスはMouse Monoclonal Antibody Isotype Test Kit (AbD Serotec)を用いて決定した(表1)。

c) ヒツジ赤血球を用いた溶血試験

c-i) 6種類の抗FH mAbのスクリーニング

患者解析にさきがけ、6種類のmAbの溶血試験によるスクリーニングを行った。正常人血漿20 μLに6種類の抗体をそれぞれ終濃度が50~400 μg/mLになるよう添加し、室温で30 min反応させた。その後、100万/μLに調整したヒツジ赤血球と混合させ37°Cで30min反応を行い、溶血の強さを414 nm

の吸光度で測定した(図3)。その結果、O52-16, O72-16抗体に血漿中のFH活性を阻害し、溶血を亢進させる作用があることを確認した。さらにO72-16抗体(200 μg/mL)を添加した血漿を用いてヒツジ赤血球を10万~500万/μLの間で変化させ、溶血の強度を比較したところ、赤血球濃度が500万/μLの際に最も溶血の亢進が見られることが判明した(図4)。

mAb	サブクラス
O37-1	IgG1-κ
O52-16	IgG2a-κ
O72-16	IgG1-κ
Q34-11	IgG1-κ
R27-11	IgG1-κ
R35-8	IgG1-κ

表1 精製FHより作成した6種類の抗FH mAbのIgGサブクラス

c-ii) 患者解析

上記実験結果を踏まえ、患者解析ではヒツジ赤血球を500万/μLに固定した。

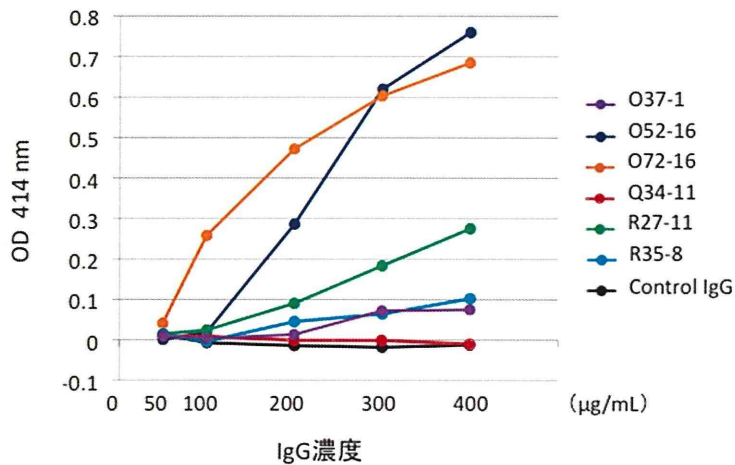


図3 6種類の抗FH mAbを使用した溶血試験によるスクリーニング
IgG濃度を50-400 μg/mLになるよう正常人血漿に添加し、100万/μLに調整したヒツジ赤血球と混ぜ、30分インキュベートした後、反応を停止し、414nmの吸光度を測定した。
O52-16, O72-16抗体を添加した血漿では、抗体濃度依存的に明らかな溶血の亢進が確認された。

500 万/μL のヒツジ赤血球に患者血漿を 5 ~80μL 添加し、37°Cで 30 min 反応させたのち、溶血の強さを吸光度で測定した。この際、O72-16 抗体 200 μg/mL を正常人血漿に添加したものの吸光度を 100%として患者の溶血度を算出した。血漿中の補体調節因子活性が正常であれば溶血の亢進は見られないが、活性が低下している場合には、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 等の補体制御因子の活性低下を疑い、溶血の亢進が見られない場合には MCP やトロンボモジュリンなどの膜結合型制御因子の異常を疑った。

d) FH 添加による溶血補正試験

c) 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、補正されない場合は FH 以外の FI や FB, C3 などの活性低下を疑った。

e) 抗 FH 抗体スクリーニング

以下の2種類の解析方法を用いて行った。

e-i) ELISA 法

血漿より精製した FH 10 μg/mL を 1 ウェルあたり 100uL 加え、プレート上に固相化し、Protein-Free T20 (PBS) Blocking Buffer (Pierce) にて 4°Cで一晩、ブロッキングを行った。その後、患者血漿を希釈バッファー (Protein-Free T20 (PBS) Blocking Buffer+0.5 M NaCl) にて 50 倍

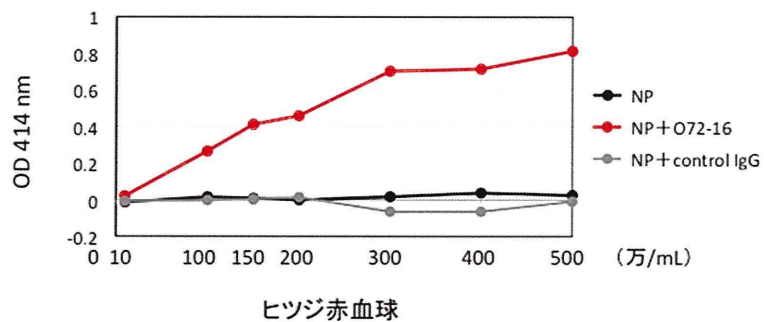


図4 O72-16抗体添加血漿の溶血に対するヒツジ赤血球濃度の検討
O72-16抗体200 μg/mLを添加した血漿20μLを用いて、ヒツジ赤血球を100万~500万/μLまで変化させ、溶血度を比較したところ、ヒツジ赤血球が500万/μLで最も溶血の亢進が見られた。

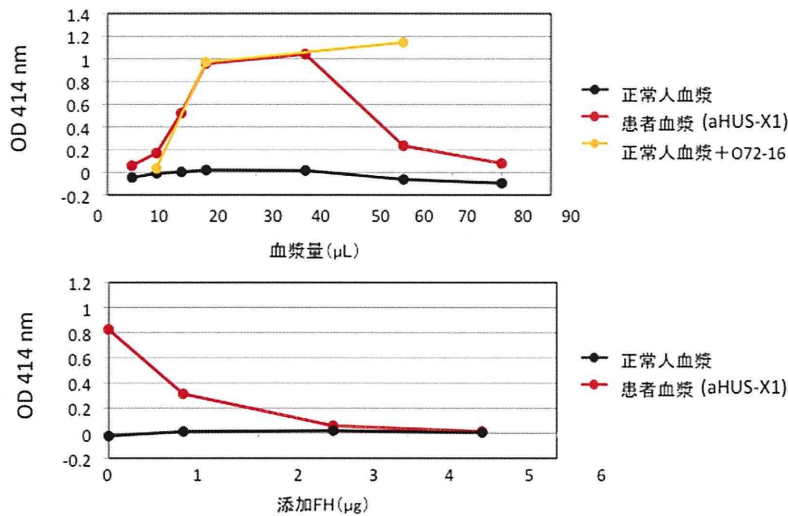


図5 患者の血漿を用いた溶血試験と溶血補正試験
 上段にヒツジ赤血球溶血試験の結果を示す。ヒツジ赤血球と正常人血漿、患者血漿5-80 μLを反応させ、吸光度を測定した。O72-16による溶血を100%とした時、患者血漿が20, 40μLでほぼ100%の溶血を認めた。下段に示すように、この溶血亢進は精製FHの添加により補正された。

希釈したものを1 ウエルあたり 100 μL 添加し、RT で3時間反応させた。抗体の検出は、30000 倍希釈した HRP-conjugated goat anti-human IgG (DS ファーマバイオメディカル)を室温で2h反応させたのち、TMB Substrate kit (Thermo) を添加し、450nm の吸光度を測定した。

e-ii) Western blot 法

血漿より精製した FH の SDS-5%PAGE を行い (1 ウエルあたり 0.5 μg)、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℃ で一晩反応させた。その後、1000 倍希釈した HRP-conjugated goat anti-human IgG を室温で2時間反応させ、

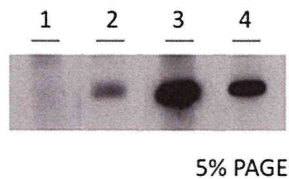


図6 Western blot法を用いた抗FH抗体のスクリーニング
 血漿より精製したFHをSDS-5%PAGE展開し、PVDF膜に転写した。抗FH抗体ELISA陽性患者の血漿(レーン4)では、抗FH抗体陽性と他施設で診断された患者血漿(レーン3)と同様に、精製FHと反応するIgG抗体を確認した。

Western lighting™-ECL (Perkin Elmer) を用いて検出を行った。

以上の結果より、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った。

(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

溶血試験における患者解析の結果、保存血漿では補体活性の低下により、正確に陽性反応を捉えることができないと判断したため、本年度新たに採血できた 21 例の患者で溶血試験を行った。このうち 5 例で明らかな溶血の亢進 (溶血度 50%以上)、5 例に軽度の溶血亢進 (溶血度 10%

1. 正常人血漿(コントロール)
2. 抗FH mAb (O72-16, 5μg/mL)
3. 抗FH抗体陽性患者
4. 抗FH抗体ELISAによって陽性と判定した患者

以上 50%未満) を認めた。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確認された 5 症例について精製 FH 添加による溶血補正試験を行ったところ、5 例全例において溶血の亢進が補正された。うち、1 症例の結果を図 5 に示す。また、ELISA 法を用いた抗 FH 抗体スクリーニングでは 5 例中 1 例は陽性であり、4 例は陰性であった。抗体陽性であった 1 例の患者では Western blot 法による解析においても、抗体の存在を確認することができた (図 6)。

1) 明らかな溶血の亢進が見られ、抗 FH 抗体陰性であった症例・・・4 例

遺伝子解析の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 に責任遺伝子変異 (R1215Q) が同定された。本遺伝子変異は 2003 年に Caprioli らによって既に aHUS 患者に見られる遺伝子変異の 1 つとして報告されているものと同一であった。

また他の 1 例の患者については既に他施設にて FH に遺伝子異常 (R1215Q) が報告されている症例であったことから、溶血試験の結果は遺伝子解析の結果と矛盾しないことが確認できた。

2) 明らかな溶血の亢進が見られ、抗 FH 抗体陽性であった症例・・・1 例

抗 FH 抗体陽性であったことから、CFHR1, 3, 4 遺伝子の異常が疑われた。CFHR 領域のホモ接合体の遺伝子欠損症例では、血漿中に CFHR1 や 3 のタンパク質が発現していない可能性が考えられるため、今後

抗 CFHR 抗体による Western blot の実験を行い、さらなる解析を行う予定である。

3) 溶血の亢進が見られなかった症例・・・11 症例

同一家系内の 2 症例 (患者、患者父親) で C3 遺伝子に原因変異と考えられる I1157T を同定した。さらに他の同一家系内の 3 症例 (患者本人、患者母親、患者弟) で C3 の S562L 変異を同定したが、本変異が責任変異であるのかについては、今後検討が必要であると考えている。

これら 55 例のタンパク質レベルでの解析結果と遺伝子解析の結果についてまとめたものを表 2 に示す。さらに添付資料として、解析を行った 55 症例のうち、同一家計内に 2 人以上患者が存在する家系、遺伝子解析により変異が同定された家系について、その家系図と簡単な患者情報について示す。

D. 考察

本研究では、aHUS 疑診患者 55 例を対象に FH を中心としたタンパク質レベルで補体調節因子の解析を行った。我々の行った検査の結果より、補体調節因子の異常分子として以下のように推定された。

- 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 により、抗体の有無を調べた。抗体検査が陰性であれば FH の遺伝子異常を疑った。抗体検査が陽性であれば、CFHR1, 3, 4 領域の遺伝子異常を疑った。

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 等の遺伝子異常を疑った。

③ 溶血の亢進が見られない場合：トロポモジュリンや MCP の分子異常を疑った。

今回行った溶血検査の結果、5 例で明らかな溶血亢進を、5 例に軽度の亢進を認めた。明らかな溶血亢進を認めた 5 例で溶血補正試験を行ったところ、5 例全例で溶血亢進が補正された。また、抗 FH 抗体陽性患者は 4 例中 1 例であった。その後の遺伝子解析で溶血亢進が認め、抗 FH 抗体陰性の 2 例で FH 遺伝子異常が確認されたことより、我々の溶血試験がスクリーニングとして有用であることが確認された。

また、溶血検査で溶血が亢進していない 5 例に C3 の遺伝子異常が疑われる結果が得られ、これは当初の予想と違う結果であった。今後、解析症例数を増やすことで様々な補体調節因子異常でのタンパク質レベルでの検査異常を集積し、簡便なタンパク質レベルでのスクリーニング検査法の確立を目指す予定である。

E. 結論

我々の確立したタンパク質レベルでの補体調節因子の解析方法によって、FH の遺伝子異常を推定することができるようになった。今後他の補体調節因子に関しても症例数を増やすことで、簡便にスクリーニングが可能となることを目指している。

謝辞：本研究を行うにあたって、抗 FH mAb の作成にご協力いただいた奈良県立医科大学のラジオアイソトープ実験施設森俊雄教授、岩本顕聰博士に深謝致します。

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* (in press)

和文

1. 八木秀男、藤村吉博、血栓症に関するQ&A: 動脈血栓症の病態診断におけるADAMTS13測定の意義はなんでしょうか、*血栓と循環*19, 73-75, 2011
2. 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
3. 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
4. 八木秀男、藤村吉博、血栓の増大・成長とADAMTS13-VWFシステム、*血管医学*、12, 21-29, 2011
5. 松本雅則、藤村吉博、ADAMTS13、分子脳血管病、10, 74-77, 2011
6. 藤村吉博、血栓性血小板減少性紫斑病、脾臓 - 基礎と臨床 - (沖永功太 編)、151-158, 2011
7. 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. 藤村吉博. (シンポジウム) VWF 研究深化で示された TTP 診断と血漿交換療法のエビデンス. 第 59 回日本輸血・細胞治療学会 (2011 年 4 月 14 日、東京)
2. Seiji Kato, Masanori Matsumoto, Yoshihiro 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
3. Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Hideo Yagi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, Toshiyuki 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
 4. Hiroaki Takaya, Masahito Uemura, Masao Fujimoto, Tomomi Matsuyama, Chie Morioka, Masatoshi Ishikawa, Tatsuhiro Tsujimoto, Hideto Kawaratani, Shinya Takeyama, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Hiroshi 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
 5. Hideo Yagi, Naoko Yamaguchi, Yasuaki Shida, Masanori Matsumoto, Mitsuhiko Sugimoto, Kazuo Tsubaki, Yoshihiro 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
 6. Yuji Hori, Ayami Isonishi, Kenji Soejima, Masanori Matsumoto, Midori Shima, Yoshihiro 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
 7. Chie Morioka, Masahito Uemura, Hiroaki Takaya, Masayoshi Sawai, Motoyuki Yoshida, Akira Mitoto, Jyunichi Yamao, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Hiroshi Fukui, Potential role of ADAMTS13 associated with post ERCP pancreatitis, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 25, 2011
 8. Masahito Uemura, Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Hiromichi Ishibashi, Tomomi Matsuyama, Seiji Kato, Yuji Hori, Chie Morioka, Hiroaki Takaya, Masao Fujimoto, Tatsuhiro Tsujimoto, Hideo Kawaratani, Hiroshi 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
 9. Tsunenari Soeda, Hiroyuki Kawata, Ji-Hee Sung, Satoshi Somekawa, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Shiro Uemura, Yoshihiko 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
 10. Hidetada Fukushima, Kenji Nishio, Kazuo Okuchi, Ayami Isonishi, Masanori Matsumoto, Yoshihiro

- Fujimura, Keisuke Takano, Hideki Asai, Tomoo Watanabe, Shingo Ito, Tadehiko Seki, Yasuyuki Urizono, Michiaki Hata, Masaaki Doi, Yasuaki Shida, Hideto Matsui, Mitsuhiro 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
11. Noriko Koyama, Masanori Matsumoto, Shinji Tamaki, Masanori Yoshikawa, Yoshihiro Fujimura, Hiroshi 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
 12. Ayami Isonishi, Barbara Plaimauer, Friedrich Scheifflinger, Kenji Nishio, Mitsuhiro Uchiba, Yuji Yonemura, Masanori Matsumoto, Yoshihiro 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
 13. Masaki Hayakawa, Masanori Matsumoto, Yoko Yoshida, Ayami Isonishi, Seiji Kato, Yoshihiro 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
 14. Masanori Matsumoto, Kayo Yamada, Keiko Nakayama, Ayami Isonishi, Masaki Hayakawa, Masami Inoue, Keisei Kawa, Yoshihiro 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
 15. Taei Matsui, Yukio Suzuki, Fumio Matsushita, Jiharu Hamako, Izumi Furuta, Youhei Nashimoto, Masanori Matsumoto, Yoshihiko Sakurai, Yoshihiro Fujimura, cDNA cloning and expression of botrocetin-like protein, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 27, 2011
 16. Hiroyuki Kawata, Yasuhiro Takemoto, Soeda Tsunenari, Ji-Hee Sung, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Yasuhiko Tabata, Yoshihiko 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
 17. Yoshihiro Fujimura, Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Hideo Yagi, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Mitsuru Murata, Toshiyuki 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
 18. Masanori Matsumoto, Charles Bennett, Ayami Isonishi, Zaina

- Qureshi, Yuji Hori, Masaki Hayakawa, Yoko Yoshida, Hideo Yagi, Yoshihiro 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
19. Ayami Isonishi, Barbara Plaimauer, Friedrich Scheiflinger, Kenji Nishio, Mitsuhiro Uchiba, Yuji Yonemura, Masanori Matsumoto, Yoshihiro 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
 20. Yukako Kawasaki, Hidemi Toyoda, Shouichiro Ootuki, Shoutaro Iwamoto, Tadashi Iwasa, Hiroki Hori, Eiichi Azuma, Yoshihiro Komada, Naomi Habe, Hideo Wada, Yoshihiro Fujimura, Tomohiro Morio, Kousuke Imai, Shigeaki Nonoyama, A novel Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein complex mutation in an infant with TTP, The 73rd Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology, Nagoya, October 15, 2011
 21. Tomohiro Kajiguchi, Yutaka Kamiura, Toshihiro Sakakibara, Ryuichi Hasegawa, Ayami Isonishi, Masaki Hayakawa, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshihito 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
 22. Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Yuji Hori, Masaki Hayakawa, Kenji Soejima, Yoshihiro 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
 23. Atsuko Igari, Takanori Moriki, Yusuke Ymaguchi, Terumichi Nakagawa, Hideo Wada, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Kenji Soejima, Mituru 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
 24. Kenji Nishio, Hidetada Fukushima, Tomoro Watanabe, Tadahiko Seki, Hideto Matsui, Mitsuhiro Sugimoto, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Kazuo 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

表2-1 奈良医大で集積した55例のaHUSの解析結果

No	Pt	Year of Birth	Gender	Date		ADAMTS13 :AC (%)	FH:AG (%) Laurell	Hemolytic assay		Anti-FH antibody		Diagnosis	Remarks
				Sample collection	Hemolytic Assay			Hemolysis (%)	Correction with FH	ELISA	WB		
Normal plasma						50-150	50-150	<5		<0.3			
1	A1	1976	M	2003.5.18	*	56.4	92	*		0.25	*		
2	A2	1979	F	2003.5.18	2011.8.9	78.6	58	-4.3		0.24	*		
3	A3	2001	M	2003.5.18	*	70.6	30	*		0.37	*		
4	B1	1964	M	2003.2.21	2011.8.9	71.9	117	1.2		*	*		
5	B2	1991	F	2009.1.27	2011.8.9	70.0	114	-7.1		*	*		
6	C1	2001	F	2003.4	2011.8.5	49.1	160	0		0.58	—		
7	C2	1968	M	2003.4	2011.8.5	50.6	86	2.6		0.33	*		
8	D1	1988	M	2000.10.3	*	63.4	64	*		*	*		
9	D2	1947	M	2002.2.20	2011.8.9	101.0	100	2.9		0.39	*		
10	E1	1999	F	2003.1.15	2011.8.8	56.8	150	-0.4		0.36	—		
11	E2	1962	M	2003.2.2	2011.8.8	61.4	100	-0.1		0.29	—		
12	F1	1997	M	2005.1.27	2011.8.9	27.8	72	-4.6		0.42	—		
13	F2	1962	M	2002.12	2011.8.5	48.3	90	-8.4		0.34	—		
14	F3	1971	M	2003.7.26	2011.9.30	47.4	68	-0.9		*	—		
15	F4	2010	M	2010.9.22	2011.8.9	112.0	85	-4.9		*	±		
16	F5	2005	M	2010.10.4	2011.8.9	87.0	68	-0.3		0.22	—		
17	F6	—	M	2011.8.18	2011.8.18	43.7	87	4.3		0.18	—		
18	G1	1974	M	1999.9.17	2011.8.8	66.5	125	-0.4		0.4	*		
19	G2	1996	M	2011.3.30	2011.8.9	69.0	97	17.9	±	0.18	*		

* Not determined

表2-2

No	Pt	Year of Birth	Gender	Date		ADAMTS13 :AC (%)	FH:AG (%) Laurell	Hemolytic assay		Anti-FH antibody		Diagnosis	Remarks
				Sample collection	Hemolytic assay			Hemolysis (%)	Correction with FH	ELISA	WB		
Normal plasma						50-150	50-150	<5		<0.3			
20	H1	1973	F	2003.12.4	2011.8.8	118.0	97	-2.4		0.64	±		
21	H2	1948	F	2004.1.14	2011.8.8	104.0	134	-0.2		0.35	±		
22	I1	-	M	2005.7.16	2011.8.9	69.2	100	-0.8		0.21	*		
23	I2	-	F	2005.7.16	2011.8.9	64.8	125	2.1		0.29	*		
	J3	1937	M	2006.4.11	2011.8.8	45.0	143	0		0.25	*	以後の経過より特発性TTPと診断	
24	K1	1991	M	2006.3.8	2011.8.8	23.0	52	0.2		0.21	*		
25	L1	2005	M	2006.6.5	2011.8.5	120.0	100	3.3		0.29	*		
26	L2	-	F	2006.6.7	2011.8.5	118.0	65	-1.9		0.29	*		
27	L3	-	M	2006.6.7	2011.8.5	104.0	194	-3.4		0.29	*		
28	M1	1990	M	2006.4.28	2011.8.8	40.0	83	1.1		0.23	*		
29	N1	-	M	2010.4.17	2011.8.5	87.0	95	-2.1		0.38	*		
30	O1	2009	M	2009.1.23	2011.8.5	42.0	97	0.5		0.2	*		
31	P1	2000	M	2009.3.16	2011.8.8	67.0	114	-4.2		0.4	*		
32	Q1	2009	M	2010.5.1	2011.8.9	44.0	119	-0.9		0.21	*	FB mutation	
33	R1	1980	M	2010.8.16	2011.8.9	43.0	107	-0.6		0.22	*	Wiskott-Aldrich Syndrome (WAS)	
34	S1	1970	M	2010.8.30	2011.8.9	55.0	107	2.6		0.23	*		
35	T1	2010	F	2010.11.5	2011.8.8	70.0	80	-1.1		0.34	*		
36	U1	2001	M	2005.2.23	2011.8.5	118.0	80	-2.1		0.99	+	Anti-FH antibody (※1)	
37	V1	-	M	2011.3.15	2011.8.9	81.0	85	-3.4		0.30	*	MCP mutation (France)	

※1 フランスにて解析 (Duragon-Durey MA, et al. : J Am Soc Nephrol 12: 2180-2187, 2010.)

* Not determined

表2-3

No	Pt	Year of Birth	Gender	Date		ADAMTS13 :AC (%)	FH:AG (%) Laurell	Hemolytic assay		Anti-FH antibody		Diagnosis	Remarks
				Sample collection	Hemolytic assay			Hemolysis (%)	Correction with FH	ELISA	WB		
Normal plasma						50-150	50-150	<5		<0.3			
38	W1	2003	F	2011.7.15	2011.8.5	105.0	76	99.5	+	0.28	*	※2	
39	W2	-	M	2011.3.8	2012.3.13	101.5	*	40.9	+	0.31	*		
40	W3	-	F	2011.3.8	2012.3.13	88.3	*	31.8	+	0.25	*		
41	X1	1980	M	2003.2.13	2011.8.11	34.0	*	0.9		*	*	CFH mutation (R1215Q)	
				2011.8.10	2011.8.11	35.5	97	98.7	+	0.22	*		
42	X2	1948	M	2011.8.30	2011.9.30	87.2	114	56.6	+	0.24	*	CFH mutation (R1215Q)	
43	Y1	2007	M	2011.8.10	2011.8.10	42.6	97	10.3	±	0.16	*		
44	Z1	1967	F	2011.8.25	2011.8.29	10.6	87	22.3	±	0.23	*		
45	2-A1	1967	M	2011.9.15	2011.9.16	58.3	118	4.7		0.46	*	C3 mutation (I1157T)	
46	2-A2	1958	M	2011.10.5	*	94.1	131	*		0.31	*	C3 mutation (I1157T)	
47	2-B1	2005	F	2011.10.24	2011.11.22	74.2	64	-5.8		0.28	*	CFH mutation (R1215Q ※3)	
48	2-B2	-	M	2011.11.2	2011.11.22	90.7	81	53.4	+	0.26	*	CFH mutation (R1215Q ※3)	
49	2-C1	2007	M	2011.11.22	2011.11.22	>100	98	5.9		0.29	*		
50	2-D1	2005	M	2011.12.5	2011.12.17	63.7	75	-3.5		0.43	*		
51	2-E1	1983	M	2011.12.6	2011.12.7	82.9	75	8.3		0.34	*		
52	2-F1	2008	F	2011.12.6	2011.12.6	107.7	98	-4.3		0.32	*	C3 mutation (S562L)	
53	2-F2	2010	M	2011.12.6	2011.12.6	102.0	92	4.1		*	*	C3 mutation (S562L)	
54	2-F3	-	F	2011.12.6	2011.12.6	98.3	75	2.3		*	*	C3 mutation (S562L)	
55	2-G1	2006	F	2012.1.5	2012.1.7	43.1	66	90.7	+	1.1	+		

* Not determined

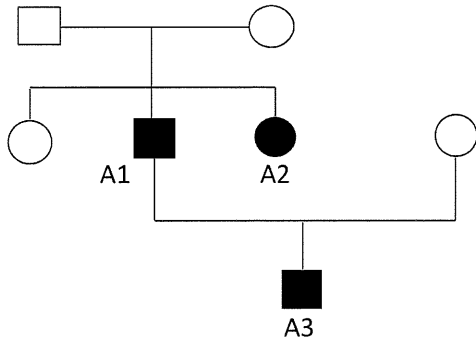
※2 現在、米国にて解析中

※3 天野芳郎, 他: 日本小児科学会雑誌115(1): 107-112, 2011

添付資料

以下、解析を行った 55 症例のうち、同一家計内に 2 人以上患者が存在する家系、遺伝子解析により変異が同定された家系について、その家系図と簡単な患者情報について示す。

aHUS-A



Brief Summary

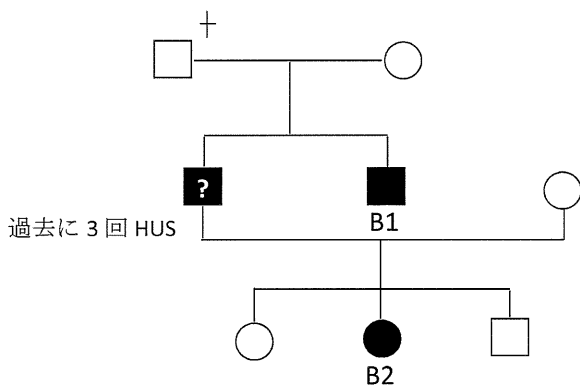
A1: 過去に 4 回の HUS 発作を起こしている (詳細不明)。26 歳時に 5 回目の発作。

A2: 過去に 5 回の HUS 発作を起こしている (詳細不明)。24 歳時に 6 回目の発作。

A3: 6 か月、1 歳 1 か月、1 歳 6 か月の 3 回 HUS 発作を起こしている。

A1, 2, 3 ともに発作時の詳細は不明。

aHUS-B

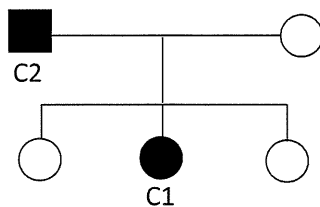


Brief Summary

B1: 9, 10, 16, 26, 27 歳の計 4 回 HUS 発症。

B2: 4 歳時に HUS 発症。その後、17 歳時にインフルエンザ A 感染を契機に HUS を再発。血漿交換、新鮮凍結血漿の輸注により症状改善。B2 の父も過去に 3 回 HUS を発症している。

aHUS-C

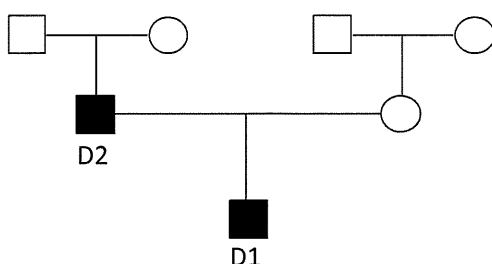


Brief Summary

C1: 1 歳、1 歳 7 ヶ月、1 歳 11 ヶ月の 3 回に渡って原因不詳の血小板減少を起こしている。

C2: 詳細不明。

aHUS-D

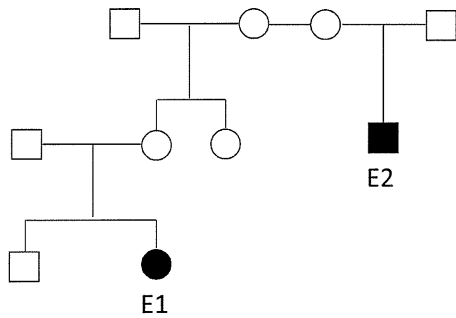


Brief Summary

D1: 4 歳時に HUS 発症。入院治療により改善するも、その後 9 回に渡り感冒様症状をきっかけに HUS を再発。16 歳以降、発作は見られていない。

D2: TMA の既往はあるものの詳細不明。

aHUS-E

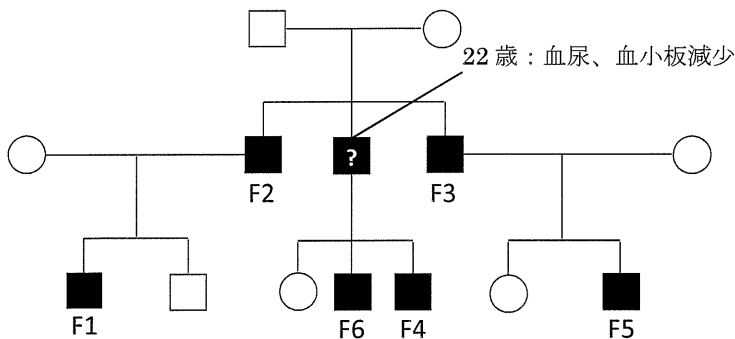


Brief Summary

E1：3 歳時にインフルエンザ感染を契機に HUS 発症。免疫グロブリンの投与により症状改善。

E2：3 歳時に HUS を発症、その後、小学生、中学生の時に HUS を再発。

aHUS-F



Brief Summary

F1：3 歳時に 1 回、5 歳時に 2 回、計 3 回 HUS 発症。いずれも腎症状は軽度であった。

F2：5, 14 歳時に TTP を発症。いずれも輸液、輸血のみで症状は改善している。

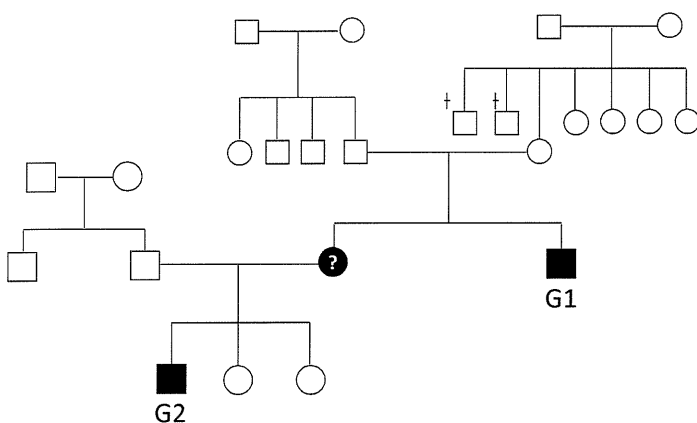
F3：32 歳時にウイルス感染を機に HUS 発症。血漿交換、ステロイドパルスによる治療を受け、症状改善。その後 2 回 TMA 発作を起こしている。

F4：生後 8 か月時に HUS 発症。血漿交換（1 回）により症状改善。

F5：5 歳時に HUS 発症。血漿交換（5 回）により症状改善。

F6：4 歳時に HUS 発症。血漿交換（5 回）により症状改善。

aHUS-G

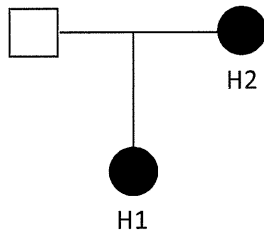


Brief Summary

G1：25 歳時に上気道炎症状を契機に HUS 発症。自然経過にて症状改善するも、28 歳時にインフルエンザ感染を契機に再発。3 回の PE 施工後、症状改善。

G2：14 歳時に HUS 発症。自然経過にて症状の改善が見られた。G1, G2 ともに腎障害は軽度であり、透析等の治療は要していない。G2 の母親も 7 歳、20 歳、25 歳、35 歳の計 4 回 HUS を発症している。

aHUS-H

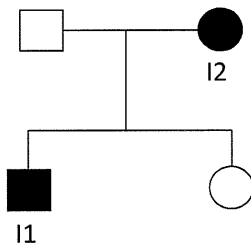


Brief Summary

H1: 小児期より HUS を 5 回ほど発症 (詳細不明)。その後、30 歳時に 2 回、38 歳時に 1 回発作をおこし、計 8 回発症している。

H2: 過去に HUS の既往あり (詳細不明)。

aHUS-I

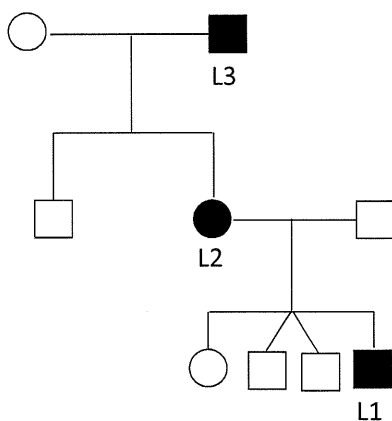


Brief Summary

I1: 3 歳時に HUS 初発、2 週間の加療にて退院となるも 4 歳、5 歳と 1 年おきに再発。いずれも上気道炎症状を契機に発症しており、血漿療法等による治療は受けず、症状改善。5 歳時に行った腎生検では TMA の所見が見られた。

I2: 10 歳時に HUS を発症し、急性腎不全にて腹膜透析による治療を受けた。

aHUS-L



Brief Summary

L1: 生後 3 ヶ月時に血小板減少、その後、血小板は 3 万から 10 万を推移。3 回の熱性けいれんの既往があり、いずれも発熱を伴う短期間の全身痙攣であった。歩き始めるようになってからは、内出血が絶えず、血小板数は 2 万-5 万/ μ L を推移している状態であった。その後は、インフルエンザ感染を契機に血小板減少が見られるといったエピソードがある。

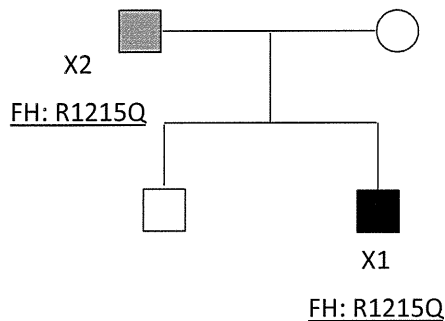
L2: 多発性硬化症の診断で加療中。L1 の兄を出産時に血小板減少を認めるも、その後異常なし。

L3: 幼少時から出血傾向あり。高校生のとき、血小板減少を指摘される。40 歳台で出血がとまらず、1-2 ヶ月入院歴あり。

遺伝子解析により変異が同定された家系

(本研究班による解析例：aHUS-X, 2-A, 2-F、他施設解析例：aHUS-2-B)

aHUS-X

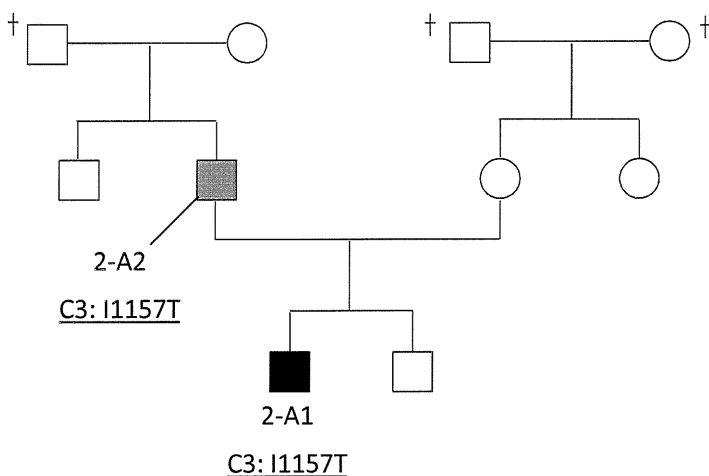


Brief Summary

X1：22歳時に嘔吐、血便、下痢、肉眼的血尿が出現し、血液検査にて腎機能低下を認めた。ペロ毒素陰性であり、腎生検よりTMA所見が見られたことからHUSと診断される。その後2か月ほどで腎不全に至り、血液透析導入となる。30歳時に母をドナーとし、生体腎移植を施工するも腎障害の再燃を認め、腎生検ではTMAの所見が見られた。

患者、患者の父親（X2）の血漿を用いた溶血試験では明らかな溶血の亢進、FH添加による溶血の補正が確認され、遺伝子解析でFHにR1215Q変異が同定された。現在はエクリズマブ投与による治療を受けている、父親は現在のところ無症状。

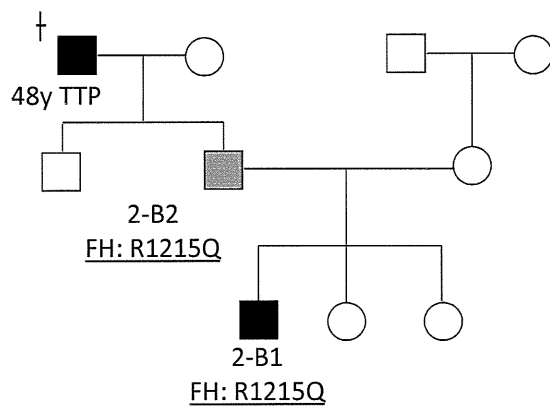
aHUS-2-A



Brief Summary

2-A1：9, 15, 18, 22歳時にHUSと診断され、血漿交換による治療を受けている。いずれも上気道炎症状のあとに血尿が出現して病院を受診。29歳時には2回HUSを発症し、2回目の発作時は入院後、連日血漿交換による治療を受け、1週間ほど経過してから血小板数の上昇が見られた。経過中、Cr 8.0mg/mLと腎機能障害の進行が見られたため血液透析を施行。その後、徐々に腎機能の改善を認め、退院前の腎生検ではTMA等の所見は見られなかった。患者と患者の父親（2-A2）の血漿を用いた溶血試験では溶血の亢進は見られなかったものの、遺伝子解析によりC3にI1157T変異が同定された。父親は43歳時に脳梗塞をおこし、現在は構語障害が見られる。

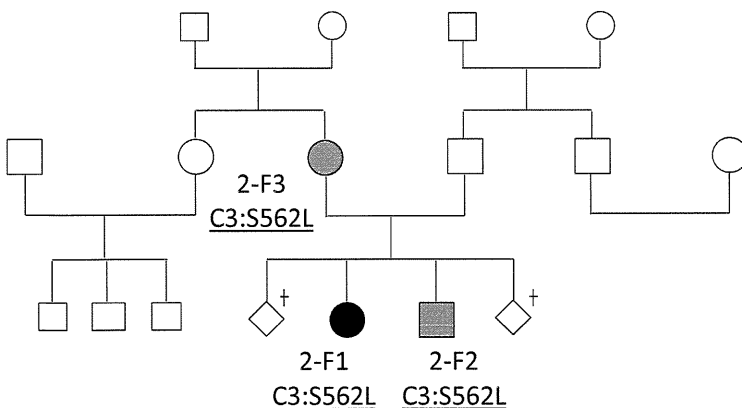
aHUS-2-B



Brief Summary

2-B1：1歳4か月時にインフルエンザワクチン接種後、血液検査にて溶血性貧血と腎機能障害を認めた。血小板数は正常範囲内であったが、臨床経過と腎組織所見より、aHUSと診断。患者紹介施設にて補体調節因子の遺伝子解析を行ったところ、患者と患者の父親（2-B2）でFHにR1215Q遺伝子変異が同定された。父親は現在のところ無症状であるが、父方の祖父が48歳時にTTPと診断され、死亡している。遺伝子変異同定後、定期的なFFP輸注による治療を行うも、腎機能症状の悪化が見られたためエクリズマブ投与を開始。現在は、透析とエクリズマブによる治療を並行して行っており、症状は安定している。

aHUS-2-F



Brief Summary

2-F1：2歳時、両下肢、左前頭部に出血斑を認め、近医受診。血液検査にて、血小板の低下、溶血性貧血、腎機能障害を認めたためHUSと診断された。血液透析、血小板輸血、赤血球輸血により血小板の増加、貧血の改善は認められたものの、腎機能の改善が乏しく、透析からの離脱は困難と判断された。退院後も、腹膜透析による治療の継続を余儀なくされている。本患者と患者家族の血漿では溶血試験において溶血の亢進は見られなかったものの、遺伝子解析では患者、患者の母親、弟にC3のS562L変異が同定された。本変異が責任変異であるのかについては、今後検討が必要である。

患者母親（2-F3）、弟（2-F2）は現在のところ無症状である。

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

非定型 HUS を発症した患者の遺伝子変異に関する研究

研究分担者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター研究所分子病態部 部長
研究協力者 Xinping FAN 国立循環器病研究センター研究所分子病態部 研究員
研究協力者 本田 繁則 国立循環器病研究センター研究所分子病態部 室長

研究要旨：奈良県立医科大学輸血部で非定型溶血性尿毒症症候群(atypical HUS, aHUS)と診断された5家系の5名患者の末梢血から染色体 DNA を調製し補体調節因子・補体因子 (CFH, MCP, CFI, C3, CFB, THBD) のタンパク質をコードする領域の遺伝子の塩基配列解析を行った。その結果、家系 X の CFH に R1215Q 変異、家系 2-A の C3 に I1157T 変異、家系 2-F の C3 に S562L 変異をいずれもヘテロ接合体として同定した。このうち、家系 X の患者は羊溶血活性が亢進しており、CFH 遺伝子の変異でうまく説明された。本研究により、非定型 HUS と診断した5家系のうち、3家系にミスセンス変異を同定した。これらの変異が非定型 HUS を起こす責任変異であるとする、6 遺伝子の解析により多くの責任変異が同定できることが判明した。

A. 研究目的

溶血性尿毒症症候群(HUS)は、腎臓小動脈ならびに糸球体毛細血管の微小血管障害、微小血管性溶血性貧血、血小板減少を示す疾患である。HUSは、大腸菌 O-157 などの感染によるシガ毒素もしくはシガ様毒素での下痢を伴う定型例と、補体制御因子の遺伝子変異により補体系が内皮細胞を攻撃した結果生じる下痢を伴わない非定型例に分類される。定型 HUS では、大腸菌が産生するシガ毒素の A サブユニットが B サブユニットを介して細胞内に侵入し、60S リボソームサブユニットを不活化しタンパク質合成を阻害し細胞死をもたらす。一方、非定型 HUS(atypical HUS, aHUS)は、H 因子などの補体制御因子によ

り補体の攻撃から守られている内皮細胞が、補体制御因子の遺伝子変異により保護機能が低下することによって、補体の攻撃を受けることとなり内皮細胞障害が生じる。

非定型 HUS の発症メカニズムは次のように考えられる。補体 C3 因子(C3)は僅かながら生体内で C3b に変換されている。この C3b のほとんどは水と反応して安定化するが、一部は細胞膜の水酸基やアミノ基などとエステル結合を形成し膜上に固定化される。この細胞上の C3b に補体因子 Bb が結合すると C3 convertase となり、更にもう 1 分子の Bb が結合すると C5 convertase となつて、C3b が固定化された細胞を攻撃し膜侵襲複合体 (membrane