

【設問】
 過去1年間(2007年1月~2007年12月)に輸血後感染症検査でHBV-DNAまたはHBs抗原が陽性であった症例はありますか

【回答】

- なし: 215施設
- 把握していない: 103施設
- 無回答: 20施設
- あり: 37施設(70例)
 - HBV既感染例: 55例
 - 輸血による感染例: 4例
 - 再活性化: 15例
 - 上記の鑑別不能: 6例

施設別症例数

- 1例: 26施設
- 2例: 3施設
- 5例: 1施設
- 33例: 1施設
- 回答なし: 6施設

図1 HBVマーカー陽性症例に対する個別調査対象症例の内訳

表2 輸血後HBVマーカー陽性原因の鑑別

	輸血後検査	輸血前検査 or 輸血前保管検体	供血者保管検体
HBVキャリア	HBVDNA(+) and/or HBsAg(+)	HBsAg(+) and/or HBVDNA(+)	
HBV既感染者	HBVDNA(+) and/or HBsAg(+)	HBsAg(-) and [HBsAb(+) and/or HBcAb(+)]	
輸血感染	HBVDNA(+) and/or HBsAg(+)	HBsAg(-) and/or HBVDNA(-) and [HBsAb(-) and HBcAb(-)]	個別NAT(+)
その他 (院内感染, STDなど)	HBVDNA(+) and/or HBsAg(+)	HBsAg(-) and/or HBVDNA(-) and [HBsAb(-) and HBcAb(-)]	個別NAT(-)

別NATが実施されたものと仮定した。

上記基準で判定した37症例中、HBVキャリアは19例、輸血による感染は4例、HBV既感染からの再活性化は6例、鑑別不能は8例であった(表3)。HBVキャリア19例の内訳は、血液疾患が2例、非血液疾患が17例であった。HBV既感染者からの再活性化6例の内訳は、血液疾患が4例、非血液疾患が2例であった。院内感染、性感染が原因と特定できた症例は一例もなく、原因を特定できなかった症例が5例であった。1例は輸血前のHBs抗体、HBc抗体が未検のため、原因を鑑別できなかった。残り4例は、輸血後HBVDNA陽性、輸血前検査・保管検体検査でHBsAb/HBcAbが陰性であったため輸血による可能性が疑われ、血液センターに報告していたが、輸血による感染と診断されていなかった。院内

感染や性交渉による感染なども考えられるが、原因は特定できていない。これらの症例に関しては正しく検査が行われているにもかかわらず、輸血による感染が否定できなかったことになる。その理由として、ウインドウ期供血者からの血液が感染原因であるが、供血者がそれ以降献血に来ていないため供血者がウインドウ期であったことを証明できていないことがあげられる。また、本研究では献血者保管検体の個別NATの結果まで調べていないので、院内感染など輸血以外による感染が推定されるが、輸血による感染が完全に否定しきれていないこともあげられる。判定不能は、データが不足し判定できなかったものである。

輸血後HBVマーカー陽性症例の治療内容を「血液疾患」、「非血液疾患」に分けてまとめた(表4)。

表3 個別調査における輸血後HBVマーカー陽性の原因

－HBVキャリア	: 19例(血: 2例, 非血: 17例)
－HBV既感染から再活性化	: 6例(血: 4例, 非血: 2例)
－輸血による感染例 (4例とも血液センターに報告済)	: 4例(血: 0例, 非血: 4例)
－院内感染	: 0例
－性交渉による感染	: 0例
－原因の特定不能	: 5例(血: 1例, 非血: 4例)
－HBsAb, HBcAb未検	: 1例(輸血前検査, 保管検体の検査)
－輸血による感染の可能性あり*	: 4例(4例とも血液センターに報告済)
－判定不能	: 3例(血: 2例, 非血: 1例)

HBVマーカー陽性例とは、HBsAg陽性 and/or HBVDNA陽性と定義。*輸血後検査陽性で、輸血前検査・保管検体検査で陰性。血液センターには報告しているが、輸血による感染と診断されていないもの。院内感染や性交渉による感染などが考えられるが、原因は特定できない。

表4 輸血後HBVマーカー陽性例の治療内容

	抗腫瘍薬			免疫抑制薬			分子標的薬			大量輸血		
	あり	なし	空白	あり	なし	空白	あり	なし	空白	あり	なし	空白
血液疾患n=9 (再活性化n=4)	5 (3)	0 (0)	4 (1)	2 (1)	3 (2)	4 (1)	1 (1)	4 (2)	4 (1)	0 (0)	9 (4)	0 (0)
非血液疾患n=28 (再活性化n=2)	2 (1)	13 (0)	13 (1)	2 (1)	13 (0)	13 (1)	0 (0)	14 (1)	14 (1)	10 (0)	18 (2)	0 (0)
全症例n=37 (再活性化n=6)	7 (4)	13 (0)	17 (2)	4 (2)	16 (2)	17 (2)	1 (1)	18 (3)	18 (2)	10 (0)	27 (6)	0 (0)

大量輸血は1日に20単位以上の赤血球輸血と定義。

個別調査は、輸血部門に依頼して行ったので、治療の詳細は十分に把握されておらず、回答には不明や空白が多かった。HBV再活性化例のうち4例は血液疾患で、2例が非血液疾患であった。再活性化例に限って治療内容をまとめると、血液疾患では4例中3例で抗腫瘍薬を使用、また、免疫抑制薬(ステロイド)を3例中1例、分子標的薬(リツキサソ)を3例中1例で使用しており、大量輸血例はなかった。非血液疾患では、2例中1例で抗腫瘍薬を使用、また2例中1例で免疫抑制薬(ステロイド)を使用しており、血液疾患群と同様に大量輸血例はなかった。HBV再活性化例で輸血後肝炎を発症したという回答はなかったが、AST・ALTの上昇が血液疾患3例中2例に認められた(表5)。HBV再活性化を認めた全例で輸血前検体が保管され、輸血後HBVマーカー陽性の原因を鑑別するのに有用であった。

HBV再活性化症例

当院で経験したHBV再活性化症例のHBV関連マーカーの推移を呈示する(図2)¹⁾。多発性骨髄腫に対し化学療法と自家末梢血幹細胞移植を行った。この間、19名の供血者からの血小板濃厚液と15名の供血者からの赤血球濃厚液を輸血した。輸血後感染症検査を行ったところ、HBVDNAが陽性であり、入院時検査のHBsAgは陰性であった。輸血による感染の可能性を考え、血液センターに報告した。供血者の保管検体はすべてHBVDNA陰性で輸血による感染は否定された。凍結保存してあった患者検体のHBsAb, HBcAbを調べたところ、輸血前の検体ですでに陽性であったため、HBV再活性化と診断できた。HBVDNA陽性を確認した数か月後に一過性のALT上昇を認めたが、無治療で肝機能は正常化し、HBVDNAも陰性化した。化学療法の開始直後からHBsAb抗体価は急激に低下し、検出感度近くまで低下した際に、HBsAgとHBVDNAが陽性と

表 5 輸血後HBVマーカー陽性例の輸血後肝炎発症，肝機能異常

	輸血後肝炎				AST・ALT上昇			輸血前検体保管	
	ありなし	不明	空白		ありなし	不明		あり	なし
血液疾患n=9 (再活性化n=4)	2 (0)	2 (2)	3 (1)	2 (1)	3 (2)	4 (1)	2 (1)	7 (4)	2 (0)
非血液疾患n=28 (再活性化n=2)	5 (0)	10 (1)	12 (0)	1 (1)	7 (0)	18 (1)	3 (1)	18 (2)	10 (0)
全症例n=37 (再活性化n=6)	7 (0)	13 (3)	17 (1)	4 (2)	16 (2)	17 (2)	1 (2)	18 (6)	18 (0)

大量輸血は，1日に20単位以上の赤血球輸血と定義。

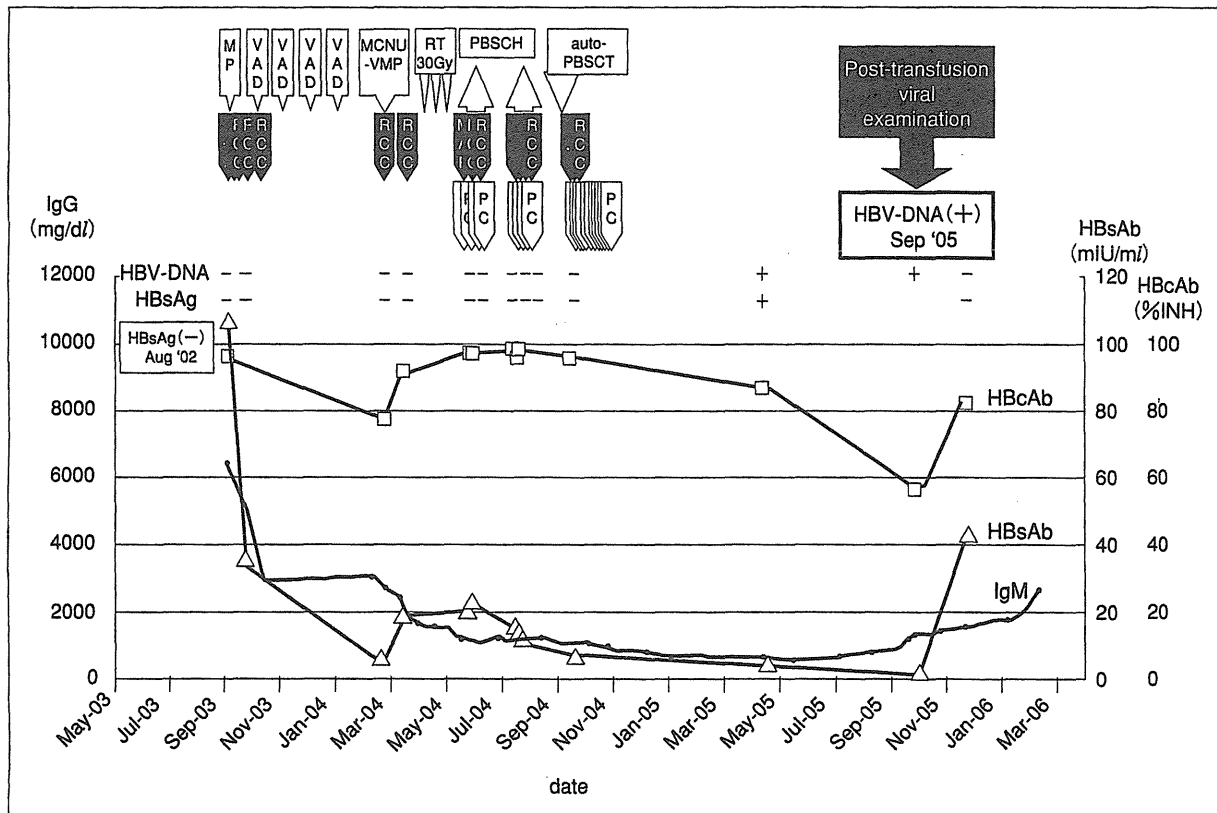


図 2 HBV再活性化症例

RCC；赤血球濃厚液，PC；濃厚血小板，MP；melphalan and prednisolone, VAD；vincristine-adriamycin-dexamethasone, MCNU-VMP；ranimustine, vindesine, melphalan, prednisolone, PBSCH；末梢血幹細胞採取，PBSCT；末梢血幹細胞移植，RT；放射線治療，(-)；HBVDNA or HBsAg陰性，(+); HBVDNA or HBsAg陽性 (文献¹⁾より引用)

なった。HBsAb抗体価の上昇とともに、HBsAgとHBVDNAは再び陰性化した。

まとめ

「輸血業務に関する総合的アンケート調査」の結果をもとに、輸血後HBVマーカー陽性例の個別調査を実施した。今まで輸血後にHBVマーカー(HBV-DNA/HBsAg)が陽性となったり、輸血後に肝炎を発症した場合、その原因は、詳細な調査が行われることなく輸血に帰することが多かつ

た。今回の検討で、その原因として既感染者のHBV再活性化が少なからず存在することが明らかになった。輸血を行った患者において、輸血によるHBV感染とHBV再活性化を鑑別するためには、「輸血療法の実施に関する指針」⁶⁾に従って、輸血前にHBs抗体・Hbc抗体検査を行うか、輸血前の患者検体を凍結保存することが必須である。

本稿の内容は、厚生労働科学研究費補助金ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究(H19-肝炎-一般-003)の援助を受けた。

文 献

- 1) 紀野修一, 友田 豊, 伊藤玲美, ほか. 輸血前血清を凍結保管していたことでB型肝炎ウイルス再活性化の経過を調査しえた1例. 日本輸血細胞治療学会誌 2007 ; 53 : 553.
- 2) 田守昭博, 藤野恵三, 尾嶋成子, ほか. 遡及調査にて判明した輸血後B型肝炎ウイルス感染の1例. 日本輸血細胞治療学会誌 2008 ; 54 : 393.
- 3) 日本赤十字社血液事業本部医薬情報課. 医療機関での輸血後感染症全数調査について. 輸血情報0804-112. 2008.
- 4) 輸血業務に関する総合的アンケート調査(平成16～19年度)輸血前後の感染症検査関係の結果集計. Available from : URL : <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Document/MedicalInfo/Result1-4.pdf>
- 5) 厚生省健康政策局長通知. 輸血に関し医師又は歯科医師の準拠すべき基準の廃止及び輸血療法の適正化に関するガイドラインの制定について(健政発第502号). 平成元年9月19日.
- 6) 厚生省医薬安全局長通知. 血液製剤の使用指針及び輸血療法の実施に関する指針について(医薬発第715号). 平成11年6月10日.
- 7) 厚生労働省医薬食品安全対策課長・監視指導・麻薬対策課長・血液対策課長通知. 血液製剤の遡及調査について(薬食安発第0730007号, 薬食監麻発第0730002号, 薬食血発第0730002号). 平成16年7月30日.
- 8) 厚生労働省・編. 血液製剤の使用にあたって(第4版). 東京:じほう;2009.

* * *

術中大量出血に対して臨床検査部門ができること

紀野 修一*1 竹中 進*2 新関 紀康*3 花田 大輔*4
友田 豊*5 赤坂 和美*6 伊藤 喜久*7

Role of the Clinical Laboratory for Patients with Massive Transfusion Undergoing Elective Surgery

*Shuichi KINO, MD*1, Susumu TAKENAKA*2, Noriyasu NIIZEKI*3, Daisuke HANADA*4,
Yutaka TOMODA*5, Kazumi AKASAKA, MD*6 and Yoshihisa ITO, MD*7*

The microvascular bleeding resulting from the dilutional coagulopathy can occur when patients with massive blood loss are treated by infusing a lot of crystalloids, colloids, and red blood cell concentrates. For the management of dilutional coagulopathy and the appropriate replacement therapy of with coagulation factors and platelets, we usually monitor the patient's course of with platelet count, conventional coagulation tests such as the prothrombin time, the activated partial prothrombin time, and the fibrinogen concentration. The central clinical laboratory has a responsibility for an accurate and quick report of these test results of patients with massive transfusion. Furthermore, use of point care testing is of clinical value to fulfill a clinical demand in case with dilutional coagulopathy.

[Rinsho Byori 59 : 670~675, 2011]

Corresponding author: *Shuichi KINO*, MD, Department of Medical Laboratory and Blood Center, Asahikawa Medical University Hospital, Asahikawa 078-8510, Japan. E-mail: skino@asahikawa-med.ac.jp

【Key Words】 massive bleeding(大量出血), dilutional coagulopathy(希釈性凝固障害), critical bleeding(危機的出血), perioperative coagulation management(周術期凝固機能管理)

日本麻酔科学会の調査によると、手術室で発生している心停止の最大の原因は出血である¹⁾。術前から大量の出血が予測されている手術もあるが、術中に突然発生する大量出血もある。出血した血液により赤くなった術野では、出血点を見出し結紮や縫合による止血操作が難しくなる。出血が続くと凝固因子は消費される。そして、循環を維持するために大量の輸液と輸血が行われると希釈性凝固障害を生じる。このような状況になると結紮や熱凝固などの通

常の外科的止血は困難になり、ありとあらゆる創面からしみ出すような出血が見られ(microvascular bleeding)、出血量はどんどん増加し悪循環に陥る。

心停止など患者生命の危機を覚悟するような大量出血を危機的出血と呼び、2007年4月に日本麻酔科学会と日本輸血・細胞治療学会が共同で作成した「危機的出血への対応ガイドライン」が公表された²⁾。このガイドラインでは、危機的出血への確かつ迅速に対応するために、院内の輸血体制整備と指揮命令

*1~*6 旭川医科大学病院臨床検査・輸血部, *7 同 大学臨床検査医学講座(〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目)

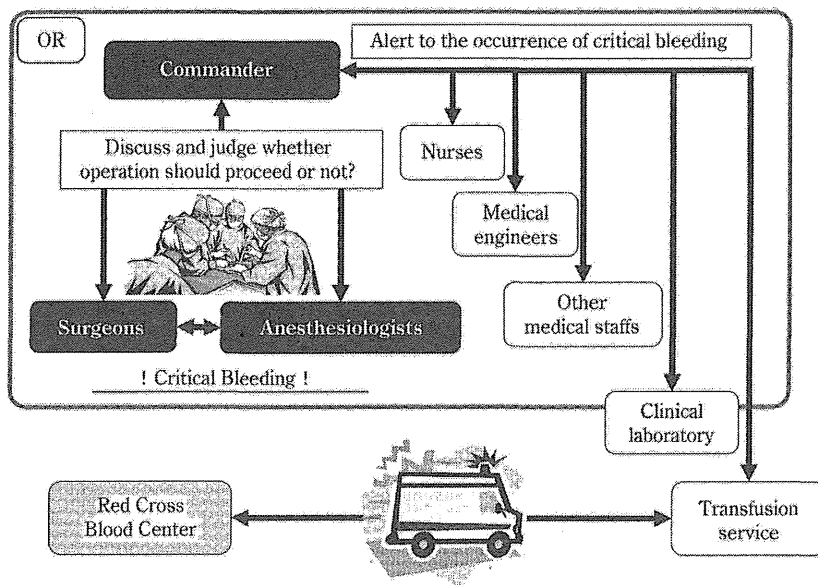


Figure 1 Management of critical bleeding.

系統確立の2項目を最重要課題としてとりあげている。危機的出血発生時には、術者と麻酔科医の連携はもとより、看護師や臨床工学技士などのコメディカルを含めたマンパワー投入と、血液センターも巻き込んだ血液供給体制を迅速に確立することが必要である (Fig. 1)。これらを統括する役目を果たす統括指揮者(コマンダー)は、非常事態の発生を宣言し、止血状況、循環動態、検査データ、血液の供給体制などを総合的に評価し、危機的出血の状況を速やかに離脱できるように努めることとされている。また本ガイドラインには、適合血の選択順位、大量輸血に伴う副作用・合併症、急速輸血装置の取り扱いについても記載されている。本稿では危機的出血に直結する術中大量出血に対して、臨床検査部門はいかに対応すべきかについて述べる。

I. 術中大量出血と大量輸血

「輸血療法の実施に関する指針」³⁾では、24時間以内に患者の循環血液量と等量またはそれ以上の輸血が行われることを大量輸血と定義している。世界的に様々な定義がなされており⁴⁾、総輸血量に関しては、24時間以内に10単位以上、または20単位以上の赤血球輸血とする定義もある⁵⁾。また、輸血速度を加味して、1時間に4単位以上、3時間に循環血液量の50%以上の赤血球輸血を大量輸血と定義

することもある⁵⁾。

大量出血・大量輸血を来たしやすい定期手術として、1)癒着が強い再手術など複雑な手術、2)組織因子放出が多い脳神経外科手術、3)DIC予備状態にある癌の手術、4)人工心肺を使う手術、5)肝移植、6)大動脈瘤手術、7)敗血症を伴う患者の手術、などが上げられる⁵⁾。このような種類の定期手術では大量出血を予測できるが、想定外の手術における術中大量出血も稀ではない。

2009年1年間に当院で行われた手術のうち、赤血球輸血を要した手術は765例であった。そのうち輸血量が10単位未満であったのは586例(77%)、10単位以上20単位未満は110例(14%)、20単位以上30単位未満は41例(5%)、30単位以上は28例(4%)であった。体重60Kgの人の循環血液量4,200mlの赤血球量にほぼ相当する20単位以上の大量の赤血球輸血を要した手術は輸血を必要とした手術の9%に相当し、日常臨床ではしばしば経験されている。

大量出血時の出血凝固能の変動について Krevansらは1954年7月から1955年1月までに Johns Hopkins 病院で全血輸血を受けた32例を対象に検討した⁶⁾。48時間以内に5,000ml以上の輸血を受けた14例の術中大量出血患者すべてに血小板減少を認めたこと、11例で異常な出血症状(皮下点状出血、斑状出血、術創からの出血、粘膜出血、消化管出血、血

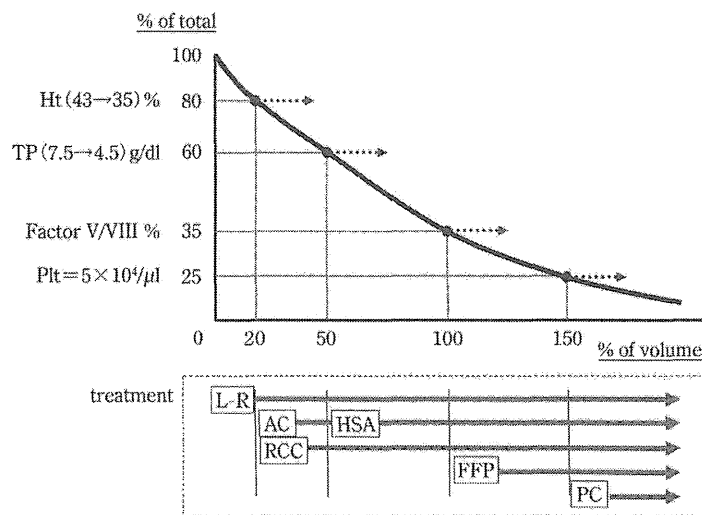


Figure 2 Basic diagram of blood component therapy.

Cited from “Criteria for Indication of Blood Products for Transfusion”, issued in 2005 by the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

L-R: lactate Ringer solution (crystalloid), RCC: red cell concentrate, AC: artificial colloid solution, HSA: human serum albumin, FFP: fresh frozen plasma, PC: platelet concentrate

尿)を呈したこと、生存例は2例のみで、全例ショック状態に陥ったこと、輸血量が45,00ml以下の13例中4例では10万/μl以下の血小板減少を来したが、出血傾向を呈した症例はなかったことを報告し、大量輸血による異常な出血傾向と血小板数の関係について初めて言及した。

1988年、Murrayらは大量出血を来した定期手術患者12名を対象に、赤血球濃厚液と晶質液を投与した際の凝固系の変化を調べた⁷⁾。凝固障害と血小板減少(8.3万/μl以下)を4例に認め、血小板輸血を行ったところ、フィブリノゲンが100mg/dl以上あった2例は改善したが、フィブリノゲン濃度が低かった2例(73mg/dl, 40mg/dl)では効果がなく、それぞれ2単位、4単位の新鮮凍結血漿(FFP)を投与したところ、止血機能は正常化したと報告し、成分輸血時のFFPと血小板補充の必要性について言及した。

大量出血時に止血困難となる理由として、出血の持続、凝固因子と血小板補充の遅れ、血液希釈が継続することによる凝固因子減少や血小板減少症、凝固因子と血小板の消費、肝臓での凝固因子産生の減少、骨髄での血小板産生減少、薬剤の影響(抗血小板薬、抗凝固薬)、ショック、体温管理障害、加温されていない輸液による低体温の持続、併存疾患

(腎機能低下、肝機能低下)などが上げられる⁴⁾。

II. 術中の輸血管理に必要な止血・凝固機能検査

Lundsgaard-Hansenは出血している患者の血管内の状況をコンピュータシミュレーションし、出血量と輸液・成分輸血療法の適応をまとめた⁹⁾。血液製剤の使用指針では、それに基づいた術中出血患者における輸液・成分輸血療法の実施法が記載されている(Fig. 2)⁹⁾。Lundsgaard-Hansenの報告では、術中出血患者における成分輸血の優先順位は、第一に循環血液量の維持であり、続いて酸素供給能の維持、さらに膠質浸透圧の維持、凝固因子活性の維持、血小板数の維持とされている。術中の出血を細胞外液(原著ではゼラチン膠質液)で補充して行く場合、出血量が循環血液量の20%になるとヘマトクリット値は正常の43%から35%まで低下し、赤血球輸血が必要になる。また、膠質浸透圧維持のため膠質液の補充も必要になる。出血量が循環血液量の50%になると、血清膠質浸透圧は正常の28mmHgから臨界値の20mmHgまで低下する。この値は血清総蛋白量5.0g/dlに相当し、蛋白質が組織間隙に逃げることを考慮し、血清総蛋白量が4.5g/dlになったら膠質浸透圧維持のためにアルブミン製剤を用いる。出血量

Table 1 Coagulation tests in perioperative period

<ul style="list-style-type: none"> • In the central laboratory <ul style="list-style-type: none"> • Complete blood count <ul style="list-style-type: none"> • Red cell count, Hemoglobin concentration, platelet count • Coagulation test <ul style="list-style-type: none"> • PT, APTT, Fibrinogen • In the operation room <ul style="list-style-type: none"> • Clinical judgment (bleeding of operative field) • Hemoglobin concentration (blood gas analyzer) • POCT <ul style="list-style-type: none"> • PT, APTT (CoaguCheck) • Thromboelastography (TEG) • Thromboelastometry (ROTEM) • Platelet function test (Hemostatus, PFE-100)
--

が循環血液量と同量になると、第 V, VIII 因子活性は 35%まで低下するため、凝固因子活性を維持するために新鮮凍結血漿を投与する。出血量が循環血液量の 1.5 倍になると、血小板数は 5 万/ μ l となり止血が困難になり始めるので血小板輸血が必要になる。

検査成績を指標とすると、出血が持続している場面では、PT, APTT が対照の 1.5 倍以下、血小板数 8 万/ μ l 以上を維持するように成分輸血を行うことが必要とされている⁴⁾。また、microvascular bleeding の状況に陥らないようにするため、凝固カスケードの最終基質であるフィブリノゲン濃度を常に 100mg/dl 以上に維持することが重要である⁹⁾。

以上のような成分輸血を合目的に行うためには、術中止血凝固機能の変動を知るための検査が必要になる。止血異常診断のための検査項目としては、赤血球数、ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、血小板数などの血算、PT, APTT、フィブリノゲン濃度などの凝固機能検査があげられる (Table 1)¹⁰⁾。これらの検査は中央検査室で行う必要があるが、近年止血凝固能の把握に POCT 機器の活用が報告されている¹¹⁾。これらの検査成績を参考に、手術野の出血状況を合わせて判断し、最終的に各種血液製剤の使用適応を決定する。

III. 術中大量出血時に

臨床検査部門で対応できること

正しい検査結果を迅速に報告することが検査部門の重要な役割であることは論を待たない。特に大量出血が発生した際には、検査結果を参考に血液製剤が選択されることもあるため、一層迅速な対応が求

められる。大量出血はいつ何時発生するかわからないため、検査依頼がルーチン業務の真っ最中に飛び込んで来ることや、人手が足りない時間外に来ることもしばしばである。また、提出された検体に大量出血で生命の危機に瀕している患者のものであるというコメントがないことがあり、ただちに測定をしなければいけない検体であるという認識を持ってないこともある。

凝固検査の中でも大量出血時に早急に結果を知りたい 3 項目 (PT, APTT, フィブリノゲン濃度) の測定時間は、当院で稼働しているコアプレスタ 2000 (積水メディカル) では、サンプル投入から PT が 75 秒、APTT が 266 秒、フィブリノゲンが 75 秒であり、3 項目合わせて 7 分以内で測定は終了する。乏血小板血漿が必要なため、前処理として約 13 分のプレーキなしの遠心が必要なので、検体到着から測定終了までの所用時間は最低で約 20 分となる。当院外来ルーチン業務における凝固 3 項目の検体到着から結果送信までの所用時間は約 30 分で最小値に比べ 10 分以上長くなっており、大量出血患者の検体では、検体到着から結果報告までの所用時間をさらに短縮する努力が必要である。

手術室での採血から検査室搬送までの所用時間を 3 分、測定終了から検査結果を病院情報システムに送信するまでの時間を 1 分と仮定すると、検体採取から結果報告までの最短所用時間は理論的には約 24 分となる。大量出血時の凝固検査は 15~20 分毎に行う必要があるため、最短所用時間に近い時間で結果を報告することが必要になる。そのためには、大量出血時に凝固検査結果が必要な場合には躊躇なく

検査を提出するように臨床側に働きかけること、大量出血が発生していることを検査部門が知りうる体制を構築すること、検査部門では緊急事態が発生しているという認識をもつこと、サンプルエラーによる誤った結果報告を防ぐため凝固用採血管に規定量採血をするように教育すること、採血後速やかに検査部門へ検体搬送できるシステムを作ること、前処理時間を短縮できるような方法を考えること、緊急時には遠心機を専用化または優先化できる体制を作ること、止血完了まで繰り返し提出される検体の到着にあわせてすぐに検査できるようにルーチン検査の流れに余裕を持たせること、検査結果の解釈についてアドバイスできるスタッフを配置することなどを考慮することが必要である。

IV. 大量出血と POCT 機器

術中出血管理におけるルーチン凝固検査の限界として、結果報告までに時間がかかること、検体が全血でないので術中の複雑な凝固障害を鑑別するのに不十分であること、フィブリノゲン、線溶亢進、血小板機能を鋭敏に把握できないこと、検査結果からは出血の有無や予後予測ができないこと、エビデンスがなく慣習的に使われていること、大きな機器を要し検査にコストがかかることなどがあげられている¹²⁾。このような背景から出血凝固検査を行える POCT 機器が開発され実用化されている。なかでも、viscoelastic point-of-care coagulation assay (thromboelastometry: ROTEM, thromboelastography: TEG) は机上に載るコンパクトな機器で、簡便な操作で全血による内因系、外因系凝固機能やヘパリンの効果、フィブリノゲン量、線溶系を検査することができる。肝臓移植の周術期管理や二次性急性止血障害の判別などに有用とされている。その他にも、全血凝固時間や PT, APTT を測定する専用機や血小板機能を検査する機器が発売されている (Table 1)。

本来の目的からすると POCT 機器は手術室に設置されるべきだが、管理上の問題点がいくつか存在する。すなわち、手術室への設置により手術を行っている間近で迅速な検査を遂行することが可能であるが、誰が機器を操作するのか、誰が機器を管理するのか、どの様に操作者を教育するのか、誰が結果を解釈するのかなどの問題が生じる。逆に、POCT 機器を輸血部門や中央検査部門に設置すると、検体搬送に要する時間が余計にかかるが、臨床検査技師が

機器を管理し、統一した操作で測定することが可能になり、検査専門医・輸血専門医・血液専門医などが結果を解釈でき、質が保証された検査が可能になる。また、POCT 機器を導入するとルーチン検査に干渉しない利点がある。

大量出血に対する凝固能検査を目的とした POCT 機器使用の有用性は既に報告されていることから、今後我が国でも機器の導入が進んでいくことと思われる^{5)10)~12)}。“POCT 機器”イコール“手術室に設置”ではなく、輸血部門や中央検査部門を含めて施設の実情にあった稼働体制を構築することが必要であろう。

V. ま と め

大量出血・大量輸血時には、止血機構が破綻し microvascular bleeding が生じることがある。適切な補充療法のためには、術中の凝固検査が必要である。術中大量出血に対して臨床検査部門がすべきことは、正しい検査結果を迅速に報告することである。そのためには、現場から検査部門への情報提供が必須で、検査部門ではそれに応じて最短時間で検査結果を報告できる体制を整備しておく必要がある。大量出血に対する凝固機能検査には、POCT 機器の導入を考慮する必要がある。

文 献

- 1) 川島康男, 入田和男, 森田潔, 他. 本邦手術死の二大主原因としての出血性ショックの術前状態及び術中大量出血についての統計的研究, 日本輸血学会雑誌 2005; 51: 23-31.
- 2) 社団法人日本麻酔科学会, 有限責任中間法人日本輸血・細胞治療学会: 危機的出血への対応ガイドライン(改訂版).
<http://www.jstmct.or.jp/jstmct/Document/Guideline/Ref4-1.pdf> (2010年11月現在),
http://www.anesth.or.jp/dbps_data/_material/_localhos/t/kikitekiGL2.pdf (2010年11月現在)
- 3) 厚生労働省医薬食品局血液対策課長, 「輸血療法の実施に関する指針」及び「血液製剤の使用指針」の一部改正について, 薬食血発第 0220001 号, 平成 21 年 2 月 20 日
- 4) Erber WN. Massive blood transfusion in the elective surgical setting. Transfus Apher Sci 2002; 27: 83-92.
- 5) Sihler KC, Napolitano. Massive transfusion. Chest

- 2009; 136: 1654-67.
- 6) Krevans JR, Jackson DP. Hemorrhagic disorder following massive whole blood transfusion. *JAMA* 1955; 159: 171-7.
 - 7) Murray DJ, Olson J, Strauss R, et al. Coagulation changes during packed red cell replacement of major blood loss. *Anesthesiology* 1988; 69: 839-45.
 - 8) Lundsgaard-Hansen P. Component therapy of surgical hemorrhage: Red cell concentrates, colloids and crystalloids. *Bibliotheca Haemal* 1980; 46: 147-69.
 - 9) 山本晃士. 大量出血(希釈性凝固障害)時における止血のための輸血療法. *医学のあゆみ* 2008; 224: 205-9.
 - 10) Schols SEM, Heemskerk JWM, van Pampus ECM. Correction of coagulation in dilutional coagulopathy: Use of kinetic and capacitive coagulation assays to improve hemostasis. *Transfusion Med Rev* 2010; 24: 44-52.
 - 11) Sie P, Steib A. Central laboratory and point of care assessment of perioperative hemostasis. *Can J Anesth* 2006; 53: S12-20.
 - 12) Kozek-Langenecker SA. Perioperative coagulation monitoring. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 2010; 24: 27-40.

Patient Blood Management(PBM)とは

What is Patient Blood Management(PBM)?



紀野修一

Shuichi KINO

旭川医科大学病院臨床検査・輸血部

◎輸血は日本中どこでも行えるもっとも簡単な移植医療であるが、それに伴う副作用が存在する。同種血(血液センターから供給される血液)の安全性は、ウイルス感染症に関しては飛躍的に高まったが、免疫学的副作用に関してはいまだ解決されていないことが多い。最近、同種血輸血そのものが、術後合併症を増加させたり患者予後を悪化させたりすることが報告され、患者の幸福(余命延長や予後向上)を考えると同種血輸血を極力避ける工夫が必要となる。そのためには輸血が必要になることが予想される患者には術前からのアプローチが重要である。すなわち、患者のヘモグロビン値、抗血小板薬などの服薬状況、併存疾患の状況などを術前の早い時期から把握し、それぞれの患者に適した輸血回避プログラムを作成し、術前から術後にわたってそのプログラムを実行する必要がある。プログラムの作成・実行には、医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師、診療工学技士など多職種の医療従事者がチームとして関与することが必須条件である。このような取組みは Patient Blood Management(PBM)とよばれている。PBMの正式な日本語訳は存在しないが、あえて訳せば“患者中心の輸血医療”という言葉がその概念から考えて適切と思われる。その柱は、①術前のヘモグロビン量を増やし、止血凝固能を最適化すること、②手術手技や手術機器の改善、麻酔管理の工夫などにより術中・術後の出血量を減少させること、③エビデンスに基づいた限定的・制限的な血液製剤の使用を実践することである。



チーム医療、術前貧血の治療、テーラーメイド輸血医療

近代輸血医療の歴史は輸血感染症との闘いであった。第二次世界大戦が終わってほどない1948年、職業的供血者が供血した生血の輸血(枕元輸血)が原因で、子宮筋腫の手術を受けた患者が梅毒に感染した。いわゆる東大分院輸血梅毒事件である。梅毒スピロヘータは冷蔵保存で不活化されるため、この件を知ったGHQ(連合国総司令部)は血液銀行の設置と保存血輸血の導入を指示した。1951年、大阪では初の民間血液銀行である株式会社日本ブラッドバンク・血液銀行が営業を開始し、その後各地に血液銀行が設立された。民間血液銀行の多くは供血の対価として金銭を支払う売血制を採用しており、生活に困窮している供

者はしだいに常習化していった。常習供血者のなかでの肝炎ウイルスの浸透率は高かった。流通している血液のほとんどが売血由来のもので、1960年ごろの輸血後肝炎患者発生率は約50%であった(図1)¹⁾。1964年3月24日、ライシャワー駐日米国大使が暴漢に刺され、手術を受けた。民間血液銀行から調達された売血が輸血され、大使は後に肝炎を発症した。この事件を受けて同年8月21日、ときの内閣は献血推進についての閣議決定を行い、1969年には売血の完全廃止に至っている。完全献血制度になり輸血後肝炎発生率は約1/3に低下した。一部では輸血後肝炎は輸血につきもの副作用として容認されていたが、1980年代には

血液製剤によるヒト免疫不全ウイルス(HIV)伝播が社会問題となり、安全な血液供給に対する国民の要求が高まっていった。また、同種血輸血による感染リスクを避けるために自己血輸血への関心

も高まっていった。病原体ウイルスの発見により、それらに対する血清学的検査や核酸増幅検査(NAT)が輸血用血液のスクリーニングに用いられるようになり、輸血後肝炎の発生率は激減し

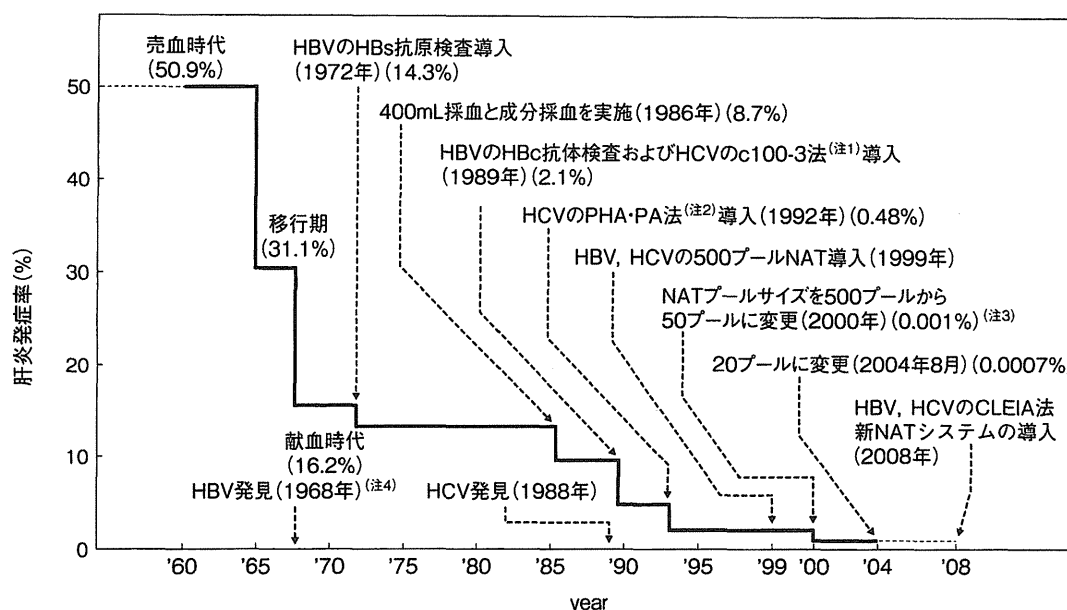


図1 日本における輸血後肝炎発症率の推移¹⁾

注1: C型肝炎ウイルス発見後早期に開発されたC型肝炎ウイルス抗体検査(第1世代検査法)。

注2: 特異性・感度が改善されたC型肝炎ウイルス抗体検査(第2世代検査法)。

注3: 全国の推定輸血患者数のうち、保管検体による個別NATなど、詳細な検査で感染の可能性が高いと判断された件数で試算。

注4: 1963年にBlumbergは、オーストラリア原住民の一人の血清が、たびたび輸血を受けている患者の血清と寒天ゲル内で沈降反応を起こすことを見出し、オーストラリア抗原と名付けた。1968年には、Prince, 大河内がそれぞれ独立して血清肝炎と密接な関係のある抗原を発見し、それがオーストラリア抗原と同じであることが確認されたため、HBs抗原として統一された。

サイトメモ1

PBMに類似する言葉

PBMに似た同種血輸血の回避を表す言葉を解説する。

① Transfusion-free medicine and surgery(無輸血治療・無輸血手術): エホバの証人の治療とともに発展してきた概念で、同種血輸血をまったく用いずに行う治療・手術を意味し、多くの専門分野の知識や工夫を用いた集学的取組みを指す。Bloodless medicine(無血治療)、bloodless surgery(無血手術)ともいう。

② Blood conservation(輸血の節約・節減): 輸血用血液の安定供給と輸血のリスク回避のため、同種血輸血の使用を少なくする手段・方法を取り入れた輸血療法の概念で、同種血輸血を完全に排除するものではない点

で無輸血治療とは異なる。

③ Blood management: 患者転帰の改善を最終目標とし、多くの学問領域で明らかにされた科学的根拠に支えられた手技・手段を、適時用いることで実践される輸血回避戦略を表す。2000年前後に登場した概念。Blood managementには2つの意味があり、ひとつは血液を供給する血液センター内での製剤管理を指す。もうひとつは医療機関内において輸血を必要とする患者の同種血輸血回避に対する管理を指す。Patient blood managementは後者に相当し、2010年ごろから登場した概念。

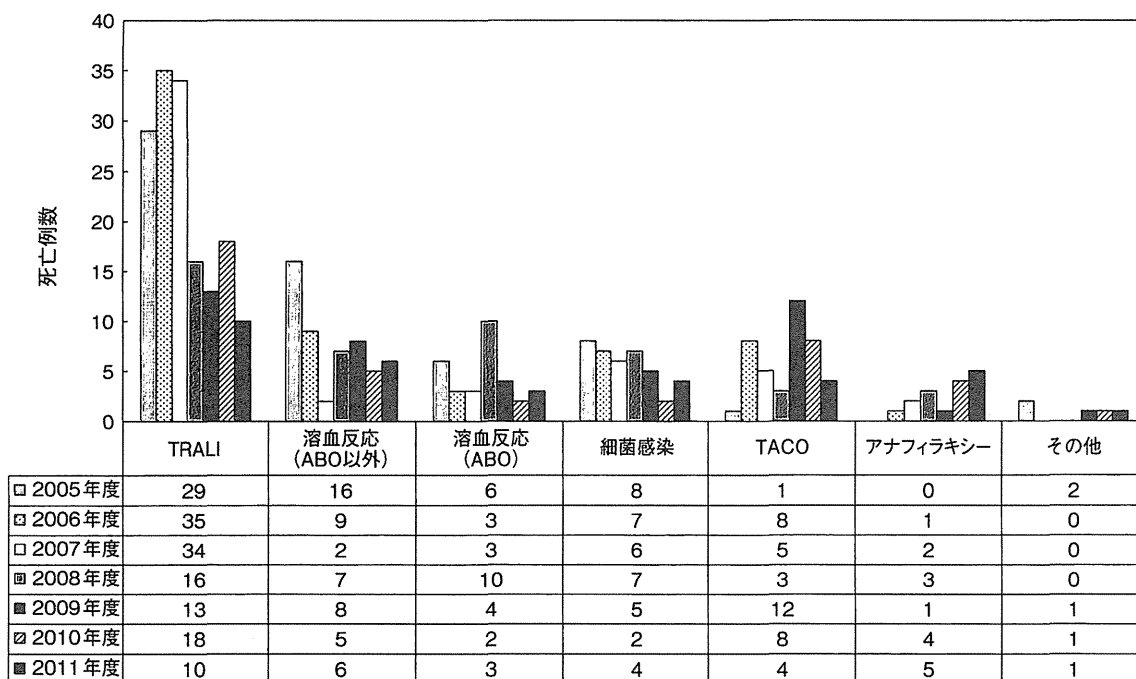


図 2 アメリカにおける輸血に関連した死亡²⁾

た。2004年、20プールNATが導入されたが、いまでも年間10件程度の輸血後肝炎が報告されている。年間の輸血患者を100万人とするとその頻度は0.001%となる。HIVに関しては20プールNAT導入後、輸血による感染例は報告されていない。

このように同種血輸血による特定のウイルス感

染のリスクは激減したが、スクリーニングされていない病原体や未確認の病原体の伝播や、免疫学的リスクなどいまだに同種血輸血にはさまざまなリスクが存在する。軽症から中等症の輸血副作用の発生頻度は2%程度とされるが、アメリカFDAがまとめた輸血に関連する死亡症例の年次推移統計によると、ABO血液型不適合輸血以外に、TRALI(transfusion related acute lung injury；輸血関連急性肺障害)、ABO血液型以外の抗体による溶血性副作用、TACO(transfusion associated circulatory overload；輸血関連循環過負荷)などによる輸血に関連した死亡例が存在する(図2)²⁾。輸血はあくまでも疾病を治療するための補助療法なので、輸血を原因として不幸の転帰をとる症例はゼロにならなければならない。もっとも簡単な解決策は輸血しないことであるが、現実的にはそう単純にはいかない。

サイド
メモ
2

適正使用とPBMの関係

適正使用(appropriate use of blood component)の最終目的は、血液製剤の安定供給を維持することにある。そのためには保健衛生当局が中心になって科学的証拠に基づいたガイドラインを策定し、それに準拠する輸血療法を実践するように各方面に働きかける必要がある。

PBM(patient blood management)の最終目的は、同種血輸血を受ける患者の予後を改善することにある。そのためには輸血にかかわる医療従事者がチームを組んで、多くの学問領域にわたる科学的証拠に基づく輸血回避策を患者ごとに提示し、実践していくことが必要である。

「Patient Blood Management(PBM)とは

さきに述べたように、同種血の安全性はウイルス感染症に関しては飛躍的に高まったが、TRALIや同種免疫による抗体産生など免疫学的副作用はいまだ解決されてはいない。最近、同種

血輸血そのものが術後合併症を増加させたり患者予後を悪化させたりすることが報告され³⁻⁵⁾、患者の幸福(余命延長や予後向上)を考えると、輸血リスクを下げる工夫、すなわち同種血輸血を極力避ける工夫が必要となる。そのため輸血が必要になることが予想される患者には術前からのアプローチが重要となる。すなわち、患者のヘモグロビン値、抗血小板薬などの服薬状況、併存疾患の状況などを、術前の早い時期から把握し、それぞれの患者に適した輸血回避プログラムを作成し、術前から術後にわたってそのプログラムを実行する必要がある。このような取組みは Patient Blood Management(PBM)とよばれている(図3)^{6,7)}。PBMの正式な日本語訳は存在しないが、あえて訳せば“患者中心の輸血医療”という言葉がその概念から考えて適切と思われる。その柱は、①術前のヘモグロビン量を増やし、止血凝固能を最適化すること、②手術手技や手術機器の改善、麻酔管理の工夫などにより術中・術後の出血量を減少させること、③エビデンスに基づいた限定的・制限的な血液製剤の使用を実践することである。

PBMはエホバの証人に対する無輸血治療で培われた工夫と血液が不足する戦場での有効な血液利用法を背景として発展してきた。エホバの証人は同種血輸血を拒否するが、自身の疾病に対する治療は放棄していない。1964年、アメリカテキサスの外科医、Denton Cooleyは、エホバの証人の無輸血開心術に成功したことを報告し⁸⁾、大手術や込み入った複雑な手術も無輸血で行うことが可能であることが示された。その後、エホバの証人の手術を積極的に行う施設が現れ、同種血輸血を用いない手術法の工夫や術中管理などの周辺知識が蓄積していった。これらの工夫や知識は1990年代に入り同種血輸血のリスク回避のため、エホバの証人以外にも応用されるようになっていった。第一次世界大戦当時の戦場では輸血用血液は不足しており、外科医は傷病兵の治療に難渋していた。第二次世界大戦になると、アメリカでは国内の血液銀行で確保した保存血を大量に前線へ輸送し、負傷兵の治療に使用した。凍結乾燥血漿や血漿分画製剤も使用されるようになり、朝鮮戦争の終わりころには血漿製剤による血清肝炎発症を防

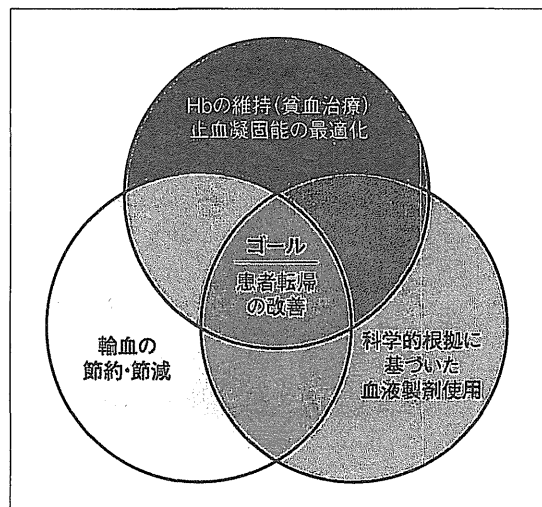


図3 患者中心の輸血医療(Patient Blood Management; PBM)

患者中心の輸血医療の最終目的は患者転帰の改善であり、周術期全体を通じた同種血輸血回避策を一人ひとりの患者に適用していく。そのためには、①術前のヘモグロビン量を増やし、止血凝固能を最適化すること、②手術手技や手術機器の改善、麻酔管理の工夫などにより術中出血量を減少させ、輸血使用を減らすこと、③エビデンスに基づいた限定的・制限的な血液製剤の使用を実践することである。

止するために、代用血漿としてデキストラン製剤が用いられはじめた。ベトナム戦争では回収式自己血輸血装置を戦地に持ち込み、負傷兵の治療にあたった。戦場における血液不足は血液代替物や血液の再利用などの方法を生み出した。

PBMの実際

PBMは周術期全体をカバーする概念である。図4に周術期における同種血輸血の回避策を示す⁹⁾。術前の最重要点は貧血のスクリーニングとその精査・治療である。また、術中出血量を減少させるため、抗血小板薬や抗凝固薬の服用歴を把握し休薬が可能であれば一定期間休薬する。貯血式自己血が適応となる場合には貯血を行う。術中には術野の止血を丹念に行い、必要があれば回収式自己血輸血や希釈式自己血輸血を用いる。線溶系の亢進による出血を予防するため抗線溶薬を使用する。手術部位によっては低血圧麻酔を選択し、患者の保温には注意する。術後は後出血の有無を評価し、可能であればドレーン血の回収を行う。また、検査用採血量を減らすように心がける。

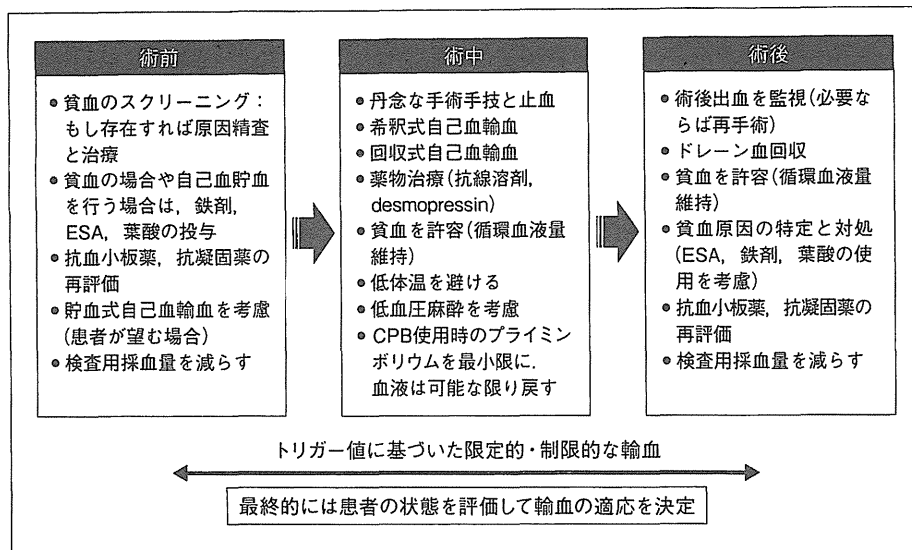


図 4 周術期における同種血輸血回避の方法

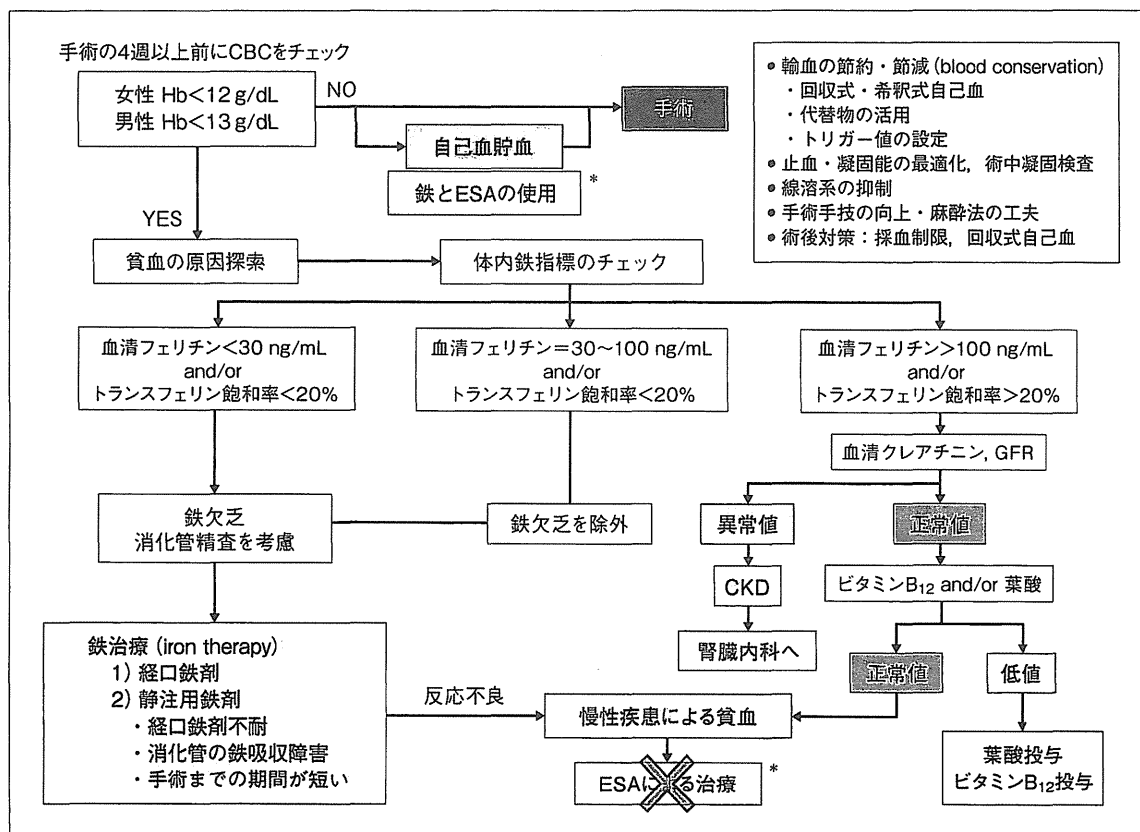


図 5 Patient Blood Managementの実際¹³⁾

* : わが国においては術前貧血を改善するために ESA を使用することはできない。術前貧血のある患者に対しては鉄剤を単独で用いて貧血を改善するか、鉄剤と ESA を組み合わせて自己血貯血を行うことになる。

もし貧血があれば鉄剤治療を考慮する。

術前に貧血がある患者は少なくなく、それら患者の予後は不良である¹⁰⁻¹²⁾。そのほとんどは鉄欠乏性貧血であり、術前に貧血を改善することができれば、患者の予後改善とともに、同種血輸血のリスクを回避できる確率は高まる。Goodnoughらは術前患者の貧血スクリーニングを手術予定日の4週間前に行い、貧血を認めた場合にはその原因精査と治療の必要性を唱えている(図5)¹³⁾。このアルゴリズムの目的は、術前に貧血のある患者の拾い上げと治療、赤血球造血刺激剤(erythrocyte stimulating agent: ESA)適応患者の選択にある。鉄欠乏性貧血の患者に対しては鉄剤を用いて治療を開始し、体内の赤血球量を増加させる。欧米では術前貧血に対するESAの使用が認可されているため、鉄剤に反応しない場合などにはESAを用いて体内の赤血球量を増加させることが可能である。しかし、術前貧血の改善を目的にESAを用いることができないわが国にあっては、鉄剤やESAを用いた自己血貯血で体外に赤血球を蓄える方法が選択される。

今後の展望——PBMの効果とその普及

PBMは同種血輸血が必要と考えられる患者の予後改善をめざした輸血医療のあらたな概念である。PBMの実践により、①同種血輸血のリスクが回避されることによる患者の安全確保、②少子高齢化による血液需給のアンバランスを解消し、安定供給に貢献、③同種血の使用量削減による医療費の低減、などの効果が期待できる。

PBMを導入するためには、術前・術中・術後、すべてのステージを見通した同種血輸血回避計画を立て実践することが必要になる。そのためには患者一人ひとりの状況を的確に把握することが必要となり、外科医、麻酔科医、輸血医、血液内科医など多くの専門分野の医師、臨床検査技師、学会認定自己血輸血看護師、臨床輸血看護師、臨床工学技士、薬剤師、事務職など、輸血に関連する多分野・多職種の医療従事者がチームをつくって対応することが求められる。

今後は、日本輸血・細胞治療学会、日本自己血

輸血学会などの輸血関連団体や行政組織などが中心となって、PBMの概念を啓発・普及するとともに、一人ひとりの患者に最適化された良質の輸血医療、すなわちテーラーメイド輸血医療を提供するために、わが国の医療制度にあった仕組みをつくるのが課題である。

文献/URL

- 1) 厚生労働省医薬食品局血液対策課。平成23年版血液事業報告。http://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/2r/index.html(2012年7月31日現在)。
- 2) US Food and Drug Administration. Fatalities Reported to FDA Following Blood Collection and Transfusion Annual Summary for Fiscal Year 2011. http://www.fda.gov/downloads/Biologics-BloodVaccines/SafetyAvailability/ReportaProblem/TransfusionDonationFatalities/UCM300764.pdf(2012年7月31日現在)。
- 3) Surgenor, S. D. et al.: The association of perioperative red blood cell transfusions and decreased long-term survival after cardiac surgery. *Anesth. Analg.*, **108**: 1741-1746, 2009.
- 4) Andrew, C. et al.: Intraoperative Transfusion of 1 U to 2 U Packed Red Blood Cells Is Associated with Increased 30-Day Mortality, Surgical-Site Infection, Pneumonia, and Sepsis in General Surgery Patients. *J. Am. Coll. Surg.*, **208**: 931-937, 2009.
- 5) Ferraris, V. A. et al.: Surgical outcomes and transfusion of minimal amounts of blood in the operating room. *Arch. Surg.*, **147**: 49-55, 2012.
- 6) Goodnough, L. T. and Shander, A.: Blood management. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **131**: 695-701, 2007.
- 7) Spahn, D. R. et al.: Patient blood management. The pragmatic solution for the problems with blood transfusions. *Anesthesiology*, **109**: 951-953, 2008.
- 8) Cooley, D. A. et al.: Open heart surgery in Jehovah's witness. *Am. J. Cardiol.*, **13**: 779-781, 1964.
- 9) Shander, A. and Goodnough, L. T.: Objectives and limitations of bloodless medical care. *Curr. Opin. Haematol.*, **13**: 462-470, 2006.
- 10) Carson, J. L. et al.: Effect of anaemia and cardiovascular disease on surgical mortality and morbidity. *Lancet*, **348**: 1055-1160, 1996.
- 11) Shander, A. et al.: Prevalence and outcome of anaemia in surgery: A systematic review of the literature. *Am. J. Med.*, **116**: 58S-69S, 2004.
- 12) Kulier, A. et al.: Impact of preoperative anemia on outcome in patient undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*, **116**: 471-479, 2007.
- 13) Goodnough, L. T. et al.: Detection, evaluation, and management of preoperative anaemia in the elective orthopaedic surgical patient: NATA guidelines. *Br. J. Anaesth.*, **106**: 13-22, 2011.

INVITED REVIEW

Natural history of Upshaw–Schulman syndrome based on *ADAMTS13* gene analysis in Japan

Y. FUJIMURA,* M. MATSUMOTO,* A. ISONISHI,* H. YAGI,* K. KOKAME,† K. SOEJIMA,‡
M. MURATA§ and T. MIYATA†

*Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, Nara; †Department of Molecular Pathogenesis, National Cerebral and Cardiovascular Center, Suita, Osaka; ‡The First Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kumamoto; and §Department of Laboratory Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

To cite this article: 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 (Suppl. 1): 283–301.

Summary. Upshaw–Schulman syndrome (USS) is an extremely rare hereditary deficiency of *ADAMTS13* activity, termed congenital TTP. The clinical signs are usually mild during childhood, often with isolated thrombocytopenia. But their symptoms become more evident when patients have infections or get pregnant. We identified 43 USS-patients in Japan, who ranged in age from early childhood to 79 years of age. Analysing the natural history of these USS patients based on *ADAMTS13* gene mutations may help characterise their clinical phenotypes. Severe neonatal jaundice that requires exchange blood transfusion, a hallmark of USS, was found in 18 of 43 patients (42%). During childhood, 25 of 43 patients were correctly diagnosed with USS without gender disparity. These 25 patients were categorised as having ‘the early-onset phenotype’. Between 15 and 45 years of age, 15 were correctly diagnosed, and, interestingly, they were all female. The remaining three patients were male and were diagnosed when they were older than 45 years of age, suggesting that they were ‘the late-onset phenotype’. Two of these three males developed sudden overt TTP when they were 55 and 63 years old, respectively. These two men had two different homozygous *ADAMTS13* gene mutations, p.R193W/p.R193W and p.C1024R/p.C1024R, respectively. Both of which were not discovered in the US or Western countries. *In vitro* expression studies showed that these two proteins were consistently secreted into the culture medium but to a lesser extent and with reduced activity compared to the wild-type protein. Our results indicate that ‘the late-onset phenotype’ of USS is formed with ethnic specificity.

Keywords: *ADAMTS13* gene mutation, clinical phenotype, natural history, Upshaw–Schulman syndrome.

Introduction

Upshaw–Schulman syndrome (USS) is an hereditary deficiency in the activity of von Willebrand factor-cleaving protease (VWF-CP) [1], termed *ADAMTS13* (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motifs 13) [2–4]. In the absence of *ADAMTS13*, unusually large VWF multimers (UL-VWFMs) released from vascular endothelial cells are not cleaved appropriately, which induces platelet hyperagglutination under high shear stress [5]. Thus, USS is alternatively called congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). On the other hand, approximately half of congenital atypical haemolytic uremic syndrome (aHUS) cases are caused by genetic mutations in complement regulatory factors, such as factor H, I, and B, and membrane cofactor protein, or thrombomodulin [6]. However, the majority of both TTP and HUS occur in the acquired form, and it has been said that TTP and HUS patients predominantly exhibit neurotropic and nephrotropic signs, respectively. Further, it is often difficult to discriminate between these two diseases in clinical practice [7–9] because both diseases are identified based on common pathological features termed thrombotic microangiopathies (TMAs), which are characterised by organ dysfunction due to platelet thrombi in the microvasculature, consumptive thrombocytopenia, and microangiopathic haemolytic anaemia (MAHA) [10].

The classic hallmarks of USS are severe neonatal jaundice with a negative Coombs test that requires an exchange blood transfusion and repeated childhood episodes of thrombocytopenia and MAHA that are reversed by infusions of fresh frozen plasma (FFP) [11]. However, recent studies indicated that the clinical signs of USS during childhood may be much milder than expected, and often only an isolated thrombocytopenia occurs, causing physicians to sometimes overlook this important disease [12].

Correspondence: Yoshihiro Fujimura, Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara City, 634-8522 Nara, Japan.

Tel.: +81 744 22 3051 ext 3289; fax: +81 744 29 0771.

E-mail: malon@naramed-u.ac.jp

Despite a lengthy history of clinical diagnoses of USS, only 10 years have passed since the disease-related enzyme, ADAMTS13, was discovered [3,4,13,14]. Furthermore, USS is an extremely rare disease, and to date, it is estimated that there have been approximately 100 patients worldwide [15]. In this regard, Nara Medical University has functioned as a TMA referral centre in Japan since 1998 and collected a large dataset of 919 patients with TMA between 1998 and 2008 [16]. In this registry, we identified 41 USS patients in 36 different families who ranged in age from early childhood to 79 years old. Subsequently, until the end of March 2011, we have identified two new USS-patients belonged to different families in Japan. Analysing the natural history of these 43 USS-patients will further our understanding of the clinical significance of ADAMTS13, which functions to regulate the size of platelet-thrombi that form in the microvasculature under high shear stress.

Historical backgrounds

In 1953, Dacie *et al.* [17] reviewed 12 patients with atypical congenital haemolytic anaemia and identified a 6-year-old girl who had experienced repeated episodes of severe jaundice, thrombocytopenia, haemolytic anaemia, and schistocytes since she was a newborn. Before first visiting Dacie, this patient had received a splenectomy but did not improve. She died of renal failure at 7 years of age. This patient was the third of four children, and both the first and second children were jaundiced at birth and died of haemorrhage at 2 years and 4 days old, respectively. The fourth child and the parents were asymptomatic. Thus, the authors concluded that these three patients must have a hitherto unrecognised hereditary blood disease.

In the absence of any known concept of TTP, in 1960, Schulman *et al.* [18] reported an 8-year-old girl who had no coagulation abnormalities but repeated bleeding episodes due to chronic thrombocytopenia and MAHA. These symptoms dramatically improved with fresh plasma infusions, suggested that the patient had a congenital deficiency in a 'platelet-stimulating factor' in her plasma. In 1978, Upshaw [19] reported the case of a 29-year-old female who had repeated episodes of thrombocytopenia and MAHA starting in childhood and was successfully treated with plasma infusions. Of note, both Schulman and Upshaw determined that plasma infusions successfully treated their patients. Rennard and Abe [20] reported a case that was originally identified by Upshaw with 'a slightly decreased level of plasma cold-insoluble globulin (fibronectin) during the acute phase', and proposed a nomenclature of USS for these types of patients. However, no correlation between the fibronectin levels and disease activity in USS patients was reported by Koizumi *et al.* [21] and Goodnough *et al.* [22], including Schulman's original case. Furthermore, after the thrombopoietin assay was established, Miura *et al.* [23] reported five Japanese USS patients with a normal plasma level of thrombopoietin. Thus, all the pathogenic features that were initially postulated for USS have been entirely excluded by subsequent investigations.

For this reason, the term USS was almost forgotten in 1997, when the assay for VWF-CP (now ADAMTS13) activity was established. Instead, the practical diagnostic term of 'chronic relapsing TTP (CR-TTP)' has been historically used. This term was coined by Moake *et al.* [24], who found that UL-VWFMs were present in the plasma of four CR-TTP patients including the Upshaw's case during the remission phase, but disappeared during the acute phase. In 1997, Furlan *et al.* [25] showed that four CR-TTP patients, who were distinct from the cases of Moake *et al.* [24], lacked VWF-CP activity, but did not examine the presence of ADAMTS13 inhibitors. However, it was retrospectively determined that two CR-TTP patients in both the case reports by Moake *et al.* [24] and Furlan *et al.* [25] had congenital TTP, while the remaining two cases in each report had acquired TTP. Under these circumstances, we revisited the term USS [11], which included analysing three Japanese patients with USS, and found that they uniformly had a severe deficiency in VWF-CP activity (determined based on the VWFm assay in the presence of 1.5 mol L⁻¹ urea) and no evidence of inhibitors. The parents of these patients were asymptomatic and had moderately decreased VWF-CP activity (17–60% of normal), except for one carrier who had very low VWF-CP activity (5.6% of normal). Later, this carrier was shown to have a unique single nucleotide polymorphism (SNP), a p.P475S mutation in the *ADAMTS13* gene in one allele, which is very common among Japanese people (9.6% of normal individuals are heterozygous for the p.P475S mutation) [26].

In 2001, Levy *et al.* [3] provided solid evidence that linked congenital TTP or USS and *ADAMTS13* gene mutations, and simultaneously other research groups successfully purified this enzyme and/or cloned the encoding cDNA [2,4,13,14].

Patients, materials and methods

USS patients

Forty-three USS patients (28 females and 15 males) belonging to 38 different families and their family members were enrolled in this study.

Assays for plasma ADAMTS13 activity and ADAMTS13 inhibitors

Between 1998 and 2004, our laboratory examined ADAMTS13 activity using a classic VWFm assay in the presence of 1.5 mol L⁻¹ urea following the method of Furlan *et al.* [27]. The detection limit of this assay was 3% of the normal control [11]. In 2005, Kato *et al.* [28] developed a novel chromogenic ADAMTS13-act-ELISA using a recombinant VWF substrate (termed GST-VWF73-His). The detection limit of this assay was 0.5% of the normal control [28]. Both assays had a high correlation, and since then, the VWFm assay was completely replaced with the act-ELISA. In our patients with USS, the ADAMTS13 activity was determined at least two different occasions, using their plasmas obtained at more than 2 weeks

after the last plasma infusion therapy. Further, in some experiments with normal individuals as described below, FRETTS-VWF73 assays [29] were used.

The ADAMTS13 inhibitor titers were evaluated using the Bethesda method, and the values < 0.5 Bethesda U (BU) mL^{-1} were negative, but those between 0.5 and 1.0 BU mL^{-1} were assumed to be marginal.

Assay for IgG-type plasma ADAMTS13 binding antibody titers

Measurement of plasma anti-ADAMTS13 IgG antibody titers in USS-patients was performed as described by Ferrari *et al.* [30] with a slight modification. Briefly, the recombinant (r) ADAMTS13 was directly coated to micro-titer plates, and after blocking with Protein-Free Blocking Buffers (Pierce, Rockford, IL, USA), the coated plates were incubated with normal and patient plasma dilutions. The IgG-type antibody bound to rADAMTS13 was detected by using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (AbD Serotec, Kidlington, UK) with a TMB substrate kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) at absorbance 450 nm at room temperature for 15 min. The results were calculated as a ratio of sample OD at each dilution divided by normal plasma OD at each dilution. The IgG antibody titer of a sample corresponds to the last dilution at which the ratio is above the cut-off level. This assay kit was kindly provided from Drs Barbara Plaimauer and Friedrich Scheiflinger of Baxter BioScience. In our laboratory, 25 normal plasmas (15 males and 10 females, aged between 20 and 40 years) consistently showed the titer of IgG-type binding antibody with a < 25 -fold dilution (shown as $< 25 \times$ in Table 1).

ADAMTS13 gene analysis

All DNA analyses of the *ADAMTS13* gene were performed as previously described [26], with permission from the Ethics Committees of both the sample-collecting hospitals and the institute that performed the gene analysis. Hereafter, the disease-causing mutations (DCMs) of *ADAMTS13* are highlighted in bold.

Results

ADAMTS13 SNPs among Japanese individuals

The human *ADAMTS13* gene is located on chromosome 9q34. The gene consists of 29 exons, and the translated enzyme contains 1427 amino acid residues with a multi-domain structure [2,4]. To date, more than 10 SNPs in *ADAMTS13* have been identified worldwide [3,26]. Among these, Japanese people ($n = 3616$) had six SNPs with the following allele frequencies, respectively: p.T339R (exon 9) (2.7%), p.Q448E (exon 12) (19.2%), p.P475S (exon 12) (5.0%), p.P618A (exon 16) (2.7%), p.S903L (exon 21) (4.8%), and p.G1181R (exon 25) (2.2%) [31]. Both p.T339R and p.P618A are almost completely linked in the

general Japanese population, but this linkage may not exist in the Caucasian population as some reports have described individuals carrying p.P618A but not p.T339R [32,33]. Plasma and rADAMTS13 with the Asian-specific SNP, p.P475S [26,34,35], has markedly reduced activity compared to the wild-type protein in both the VWFm assay in the presence of urea (1.5 mol L^{-1}) [26] and the FRETTS-VWF73 assay in the absence of urea [36], although the contribution of this polymorphism to thrombotic diseases has not been determined.

Recently, we have analysed the nucleotide sequences of *ADAMTS13* in 128 individuals without a history of TTP and identified 14 rare nonsynonymous mutations. Interestingly, among these 14 mutations, three mutations of **p.I673F** (exon 17), **p.Q723K** (exon 18), and **c.3220del TACC**, were also found as DCMs for USS in this study (below). Thus, the remaining 11 mutations may or may not be associated with a reduced activity of plasma ADAMTS13 [31].

Natural history of 43 USS-patients in Japan

Until the end of March 2011, we identified 43 USS patients in 38 different families (Family USS-A~LL) who ranged in age from early childhood to 79 years old. Hence, we present an up-dated natural history of these 43 USS patients together with their family members (Tables 1 and 2).

Family USS-A

Patient

One male (USS-A4) born in 1999.

Brief clinical data

The history of USS-A4 (*ADAMTS13* genotype: **p.R268P/p.Q448E-p.C508Y**) before he reached 5 years of age was previously described [11,26,37]. He currently receives biweekly FFP infusions (10 mL kg BW^{-1}) that are prepared from several fixed donors to prevent allergic reactions. He contracted the seasonal influenza A virus in 2010 and became severely ill with a reduced platelet count but did not develop overt TTP. He is currently in good clinical condition and has not had signs of renal or hepatic dysfunction. Both of his parents are asymptomatic carriers, but his father, aged 45 years old, has a **p.R268P/p.P475S** genotype and very low plasma ADAMTS13 activity at 5.6% of normal by the VWFm assay in the presence of 1.5 mol L^{-1} urea [26] and 3.6% by the chromogenic ADAMTS13-act-ELISA in the absence of urea (unpublished data).

Family USS-B

Patient

One female (USS-B3) born in 1986.

Table 1 Forty-three Japanese patients with USS registered in Nara Medical University and their ADAMTS13 gene mutations

No.	Patient	Year of birth	Gender	ADAMTS13			ADAMTS13 gene mutations				Reference numbers and remarks
				Activity (%)	Inhibitor (BU mL ⁻¹)	Titer of IgG-type binding antibody (Year of examination)	Father's origin		Mother's origin		
							DCM	Missence SNP	DCM	Missence SNP	
1	A4	1999	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2001), < 25 × (2011)	p.R268P		p.C508Y	p.Q448E	11,26,37
2	B3	1986	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2005), < 25 × (2008)	p.Q449X		p.Q449X		11,26,38
3	C3	1972	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (1999)	c.414 + 1G > A		c.414 + 1G > A		39,40
4	D4	1978	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2001), < 25 × (2009)	p.I673F		c.414 + 1G > A		40,41
5	E4	1985	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2001), < 25 × (2011)	p.I673F		p.C908Y		40
6	F3	1993	M	0.6	< 0.5	< 25 × (2002), < 25 × (2009)	p.R193W		c.1244 + 2T > G		40
7	G3	1987	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	p.R1123C		c.686 + 1G > A		40
8	H3	1951	M	0.6	< 0.5	*	p.A250V		c.330 + 1G > A		42
9	I4	1972	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003), < 25 × (2009)	p.H234Q		p.R1206X		43
10	J3	1977	F	< 0.5–0.8	< 0.5	< 25 × (2000)	p.R312C		c.3198delCT		†
11	J4	1979	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2000)	p.R312C		c.3198delCT		†
12	K3	1976	F	< 0.5–0.7	< 0.5	200 × (2003), 400 × (2011)	p.Y304C		p.G525D	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	12
13	K4	1978	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2003), 100 × (2011)	p.Y304C		p.G525D	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	12
14	L2	1967	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003)	p.Q1302X	p.P618A	p.R125VfsX6	p.T339R, p.Q448E	12
15	L3	1972	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003)	p.Q1302X	p.P618A	p.R125VfsX6	p.T339R, p.Q448E	12
16	M3	1969	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2002)	p.R193W		p.R349C		12
17	M4	1971	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2002)	p.R193W		p.R349C		12
18	N6	1986	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (1999), < 25 × (2005)	p.H234R	p.P475S	c.3220delTACC		11,37
19	O4	1958	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	p.I178T		p.Q929X		12
20	P3	1971	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2003), < 25 × (2005)	p.C908Y				45 <i>de novo</i> mutation (p.C322G, p.T323R, p.F324L)
21	Q1	1983	M	< 0.5–0.7	< 0.5	25 × (2004), 25 × (2009)	p.G227R	p.G1181R	p.C908Y		46
22	Q2	1988	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2007), < 25 × (2009)	p.G227R	p.G1181R	p.C908Y		46
23	R5	1982	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2005)	p.R193W		p.A606P	p.T339R, p.Q448E, p.P618A	12
24	S3	1982	M	0.9	< 0.5	< 25 × (1998)	*		*		†
25	T4	1981	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	c.3220delTACC		c.3220delTACC		47
26	U3	1990	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	c.2259delA		c.2259delA		†
27	V3	1983	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2009)	p.W1081X		p.R193W		†
28	W4	1990	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2005), < 25 × (2009)	p.G550R	p.Q448E	*	p.P475S	†
29	X5	1963	F	< 0.5	< 0.5	200 × (2004)	*	p.G1181R	*	p.P475S	†
30	Y3	1960	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2005)	p.G385E		p.R1206X		†
31	Z3	1971	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2006), < 25 × (2009)	p.R193W		p.R193W		12
32	AA3	1987	F	< 0.5	< 0.5	200 × (2006)	*		*		†
33	BB3	1947	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2006)	p.R193W		p.R193W		†
34	CC5	2004	M	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2007)	p.Q723K		p.R398C		†
35	DD5	2007	F	< 0.5	< 0.5	25 × (2007), < 25 × (2009)	p.R268P		p.Y304C		†
36	EE4	2003	M	< 0.5	< 0.5	200 × (2008), 200 × (2011)	c.2259delA		c.2259delA		†
37	FF3	1991	F	< 0.5	< 0.5	< 25 × (2008)	p.Q449X		p.Q449X		48