

## TTP サブグループ研究報告

グループリーダー：藤村 吉博 奈良県立医科大学輸血部 特任教授  
班員：宮川 義隆 埼玉医科大学総合診療内科 教授  
和田 英夫 三重大学医学部臨床検査医学 准教授  
小亀 浩市 国立循環器病研究センター研究所 室長

研究協力者：森木 隆典 慶應義塾大学保健管理センター 准教授  
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  
宮田 敏行 国立循環器病研究センター研究所 部長  
八木 秀男 近畿大学奈良病院 血液内科 准教授  
松本 雅則 奈良県立医科大学輸血部 教授

## グループ総括

分担研究者：藤村 吉博

### 研究要旨

日本国内の血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）症例の病態解析を行い、独自の TTP 診断と治療ガイドラインを作成することを目的としている。

1998 年から継続して実施している血栓性微小血管症（TMA）症例登録は、2014 年 12 月末までに 1323 例の TMA を日本国内で集積した。先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群: USS) 患者数は 57 例となったが、昨年新規に発見した症例は 5 例であった。このうち 54 例で ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。また、後天性 TMA 1176 例のうち、基礎疾患が無い原発性で ADAMTS13 活性著減例 303 例を後天性 TTP として同定した。

海外の TTP 診断基準に準拠して ADAMTS13 活性が 10% 未満の症例を TTP とする診断基準を作成した。また、TTP が指定難病となったため、その重症度も判定するための重症度分類も作成した。しかし、現状では ADAMTS13 検査が保険適用となっていないことより、本年度「早期導入を要望する医療機器に関する要望書」を作成し、日本血液学会を通じて厚生労働省に提出し、ヒアリングを受けた。今後、ADAMTS13 活性測定キットを製造・販売している会社と協力して体外診断薬承認のために治験を行う計画である。また、本年度は後天性 TTP で血漿交換に対して難治性、再発性の症例に対して、CD20 に対するモノクローナル抗体リツキシマブの保険適用拡大のための医師主導治験を別研究班と協力して実施した。平成 26 年末で治験は終了し、来年度に保険適用取得を目指している。今後、リツキシマブの使用を追加した TTP 治療ガイドラインを作成する予定である。

#### A . 研究の目的

日本国内の血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）症例の病態解析を行い、独自の診断と治療ガイドラインを作成することを目的としている。

#### B . 研究方法

平成 26 年度は以下の研究を行った。

- 1 ) TTP の診断基準と重症度分類の作成
- 2 ) 日本国内の血栓性微小血管症（TMA）症例の集積
- 3 ) ADAMTS13 検査の保険適用取得への取

#### り組み

- 4 ) 難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの医師主導治験
- 5 ) Upshaw-Schulman 症候群 (USS) の遺伝子解析と genotype-phenotype 解析

#### （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、同意を得た。また、コホート研究は奈良医大の倫理委員会、USS の遺伝子解析は奈良医大、国立循環器病研究センターのヒトゲノム倫理委員会の承認を得ている。

## C . 研究成果

### 1 ) TTP の診断基準と重症度分類の作成

平成 26 年 5 月 23 日に成立した「難病の患者に対する医療等に関する法律」により、指定難病 110 疾患が選定され、TTP が指定難病となり公費助成の対象となった。平成 27 年 1 月 1 日から新しい医療費助成制度が始まることより、疾患の診断基準（添付資料 1）および助成対処を決定する重症度分類（添付資料 2）を作成した。診断基準は、世界的なコンセンサスとされるようになった ADAMTS13 活性 10%未満のみを TTP とするに変更した。その上で、ADAMTS13 に対する自己抗体（インヒビター）が存在しない場合には Upshaw- Schulman 症候群（USS）を疑い、インヒビターが存在する場合は後天性 TTP と診断する。重症度分類として、後天性 TTP では 8 つの項目を持つかどうかで点数化し 1 点以上が中等症で、医療費助成対象となる。USS では定期的、不定期いずれでも新鮮凍結血漿（FFP）による治療を受けていれば中等症となり医療費助成の対象となる。

### 2 ) 日本国内の TMA 症例の集積

我々は 1998 年 7 月から日本国内の医療機関からの依頼によって ADAMTS13 活性測定を行うことで、TMA 症例の集積を行ってきた。その症例数は 2014 年 12 月末で 1323 例となり、この 1 年間で 72 例増加した（表 1）。先天性 TMA は、USS 57 例、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）90 例で計 147 例となった。後天性 TMA は 1176 例であったが、基礎疾患のない原発性は 522 例で、そのうち ADAMTS13 活性が著減している症

例は 303 例で、これらの症例が後天性原発性 TTP と診断される。

### 3 ) ADAMTS13 検査の保険適用取得への取り組み

TTP の診断基準に ADAMTS13 活性とインヒビターが含まれているが、日本国内では ADAMTS13 検査は保険適用となっていない。そのため、ADAMTS13 検査が保険収載されるように厚生労働省へ要望するとともに、ADAMTS13 活性測定キットの体外診断用医薬品承認を目指している。来年度は承認申請を行うため、医薬品医療機器総合機構（PMDA）と相談後に臨床性能試験を実施する予定である。（藤村個別報告参照）。

### 4 ) 難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの医師主導治験

後天性 TTP の急性期の治療として、血漿交換が有効であることが前向き比較研究で報告されており、第一選択で実施されている。しかし、血漿交換に不応である、もしくは難治である症例が報告されており、最近まではビンクリスチンやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤が経験的に使用されてきた。このような症例では、血漿交換施行中に ADAMTS13 インヒビターが急上昇していることを我々は明らかにしたが、CD20 に対するモノクローナル抗体リツキシマブが有効であることが国内外から報告されている。これは、リツキシマブ投与によって CD20 陽性細胞である B リンパ球を破壊し、インヒビターの産生を低下させる機序が予想される。現在、日本国内においてリツキシ

マブは TTP に対して保険適応を有していないことから、本サブグループが中心となって、医師主導治験を 2014 年に実施した。目標の症例数は 6 例で、7 例の登録があったが、評価対象は目標通り 6 例となった。その結果をもとに、リツキシマブの TTP への適応拡大を目指す予定である。(宮川個別報告参照)

5) Upshaw-Schulman 症候群(USS)の遺伝子解析と genotype-phenotype 解析  
現在までに発見した USS 57 例のうち、ADAMTS13 遺伝子解析を 54 例で実施し、52 例で責任遺伝子変異を同定した。その変異と臨床症状について解析を続けている。(小亀個別報告参照)

## D. 考察

本研究グループは、TMA の病態解析を中心に行っていた以前の厚労省研究班のグループをもとに形成されているが、今年度からの目的は、TTP の診断と治療ガイドラインを作成することである。診断や治療のガイドラインは、海外でも作成されており、それをそのまま導入することも可能であるが、我々の USS の遺伝子解析の結果では日本人と西洋人は全く異なった変異が見つかり、日本人独自の病態解析に基づいた診断基準、治療ガイドラインの作成が重要であると考えている。そのため、日本人におけるコホート研究を本年度も継続して独自のデータベースの作成を行い、臨床症状や治療効果などの解析を行っている。

2015 年 1 月から新たな難病制度が始まり、指定難病に対して公費補助が行われ

る。TTP は指定難病に選ばれたため、診断基準と公費補助の対象となる重症度分類を作成し、実際にそれをもとに運用されようとしている。診断基準として ADAMTS13 活性 10%未満の症例のみを TTP としたが、従来 TTP と診断されていた古典的 5 徴候を持つ症例については除外される症例もある。このような症例では未知の機序が予想されるが、現状では ADAMTS13 著減例のみを TTP とし、それ以外で TTP が疑われる症例は TTP 類縁疾患として今後病態解明が進むことが期待される。

本研究グループのメンバーを中心に、別組織の厚生労働科研を獲得し、難治性 TTP に対するリツキシマブの医師主導治験を実施した。TTP は希少疾患であり、また全国津々浦々の病院で治療されていることから、治験への参加症例数の不足が懸念された。しかし、目標症例数は辛うじて確保できたので、リツキシマブが TTP に対して適用拡大となることを期待している。

次年度以降の本グループの大きな目標は、TTP 治療ガイドラインの作成である。現状では、TTP に保険適用となっており、効果が明らかな治療法は血漿交換のみである。今後リツキシマブが保険適用になることで、治療選択が増えることによって、より具体的な TTP 治療ガイドラインが作成できるものと考えている。

## E. 結論

日本国内の多くの TMA 症例を集積し、コホート研究を続けて、TTP の臨床症状の解明を行った。また、TTP が指定難病とさ

れたことから、その認定に使用するため診断基準と重症度分類を作成した。今後、我々が行った医師主導治験の結果をもとにリツキシマブの TTP に対する適用拡大を目指し、それを含んだ形での TTP の治療ガイドラインを作成する予定である。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

### 論文発表

1. Yada N, Fujioka M, Bennett C, Hayakawa M, Matsumoto M, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Fujimura Y. The STEC-HUS followed by acute encephalopathy in a young girl was favorably treated on a basis of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. *Clinical Case Reports* (in press) 2015.
2. Ogawa Y, Matsumoto M, Sadakata H, Isonishi A, Kato S, Nojima Y, Fujimura Y. A unique case involving a female patient with Upshaw-Schulman syndrome: low titers of antibodies against ADAMTS13 prior to pregnancy disappeared after successful deliver. *Transfusion Med and Hematol* 42:59-63, 2015
3. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. A case of autoimmune-type HUS treated with eculizumab, as a first-line therapy. *Pediatrics Int.* in press, 2014.
4. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol.* 100 : 437-442, 2014.
5. Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, Fujimura Y, van der Zwaan C, Verbij FC, Pos W, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer AB. Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 12: 670-679, 2014.
6. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2: 240-244, 2014.
7. Takuma Y, Fujimura Y, Emoto Y, Kuriu Y, Iino M, Matoba R. Response to 'Death during pregnancy:

- Thrombotic thrombocytopenic purpura or septic shock?'. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 887, 2014.
8. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the joint committee of the Japanese society of nephrology and the Japan pediatric society. *Clin Exp Nephrol* 18: 4-9, 2014.
  9. Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, Fujimura Y, Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M. Effect of ADAMTS13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost* 12: 505-14, 2014.
  10. Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40 (1), 247-249 (2014)
  11. Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology* 155 (3), 1099-1106 (2014)
  12. Reiko Neki, Toshiyuki Miyata, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Daisuke Fujita, Shigeyuki Isaka, Tomoaki Ikeda, Jun Yoshimatsu: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb. Res.* 133 (5), 914-918 (2014)
  13. Fukushima N, Itamura H, Wada H, Ikejiri M, Igarashi Y, Masaki H, Sano M, Komiyama Y, Ichinohe T, Kimura S: A Novel Frameshift Mutation in Exon 4 Causing a Deficiency of High-molecular-weight Kininogen in a Patient with Splenic Infarction. *Intern Med.* 2014; 53: 253-257
  14. Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. *Thromb Res.* 2014: 133: 440-444
  15. Yamashita Y, Wada H, Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y, Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N:

- Elevated Fibrin-related Markers in Patients with Malignant Diseases Frequently Associated with Disseminated Intravascular Coagulation and Venous Thromboembolism. *Intern Med* 2014; 53: 413-419
16. Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H: Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. *Int J Hematol.* 2014; 99: 437-440
  17. Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S: Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. *Int J Hematol.* 2014; 99:418-28
  18. Sasaki T, Matsumoto T, Wada H, Ohishi K, Kanda H, Yamada Y, Arima K, Katayama N, Sugimura Y.: Successful treatment of non-invasive bladder tumour in a haemophilia A patient with high-responding inhibitors: a case report. *Haemophilia.* 2014; 20: 399-401
  19. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *Journal of Intensive Care* 2014; 2: 15
  20. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2014; 436C:130-134
  21. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?, *Crit Care*, 2014 18:447
  22. Wada H, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the "Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan". *Thromb Res*, 2014; 134: 924-925
  23. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40: 866-873
  24. Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Wada H.: Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an

observational nationwide study: comment. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

25. Ota S, Wada H, Mastuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux. Clin Chim Acta, 2015 (in press)
26. Wada H, Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N: Antithrombin or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

## 学会発表

1. 石西綾美、松本雅則、藤村吉博. 後天性 TTP の血漿交換療法の影響による ADAMTS13 自己抗体の動態解析. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
2. 長谷川真弓、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、馬場由美、下村志帆、内池敬男、早川正樹、松本雅則、藤村吉博. 奈良医大付属病院における輸血後感染症検査の実施状況. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
3. 八木秀男、早川正樹、山口尚子、山下慶悟、松本雅則、谷口繁樹、杉本充彦、椿和央、藤村吉博. 重症大動脈弁狭窄症患者の弁置換術前後における VWF 依存性血小板血栓形成の計時的変化の検討. 第 36 回日本血栓止

血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日

4. 樋口由佳、小亀浩市、高蓋寿朗、田中亮二郎、小林光、石田文宏、久永修一、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. ダイレクトシーケンシング、定量 PCR、次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
5. 吉田瑶子、範新萍、大山良文、古久保哲朗、岩本顕聰、森俊雄、松本雅則、池島裕子、宮田敏行、藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
6. 早川正樹、松本雅則、八木秀男、天野逸人、田中晴之、木村弘、藤村吉博. 造血幹細胞移植後患者における好中球生着と UL-VWF 出現との関連. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
7. 松本雅則、早川正樹、石西綾美、吉田瑶子、吉井由美、田中賢治、前田琢磨、宮田茂樹、藤村吉博. 維持血液透析患者の血小板減少に対する抗血小板第 4 因子/ヘパリン抗体の関与. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
8. 小亀浩市、樋口由佳、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血

- 学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
9. 池島裕子、Xinping Fan,平井秀憲、本田繁則、吉田瑶子、藤村吉博、Johanna A. Kremer Hovinga, Bernhard Lammle,宮田敏行. 腎障害を示した先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の補体制御因子の遺伝子解析. 第36回日本血栓止血学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
  10. 田井義彬、西尾健治、大野史郎、吉本清巳、赤井靖宏、池島裕子、宮田敏行、吉田瑶子、松本雅則、藤村吉博. インフルエンザ感染時の血小板減少を契機に診断された典型溶血性尿毒症症候群の1例. 第36回日本血栓止血学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
  11. 早川正樹、松本雅則、吉井由美、八木秀男、藤村吉博. 造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の発症と予防的輸血との関連性. 第36回日本血栓止血学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
  12. Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. Registry of congenital TMA s in Japan. The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis (APSTH). Hanoi / Vietnam. 2014年10月11日
  13. 宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村田満、阿部貴行、三宅真二、菊池佳代子、岡本真一郎、太田秀一、半田寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰夫、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第2相医師主導治験.第76回日本血液学会総会.大阪国際会議場. 2014年10月31日
  14. Hayakawa M, Yagi H, Yamaguchi N, Yamashita K, Hayata Y, Abe T, Taniguchi S, Fujimura Y, Matsumoto M. The changes of von Willebrand factor multimers in patients with aortic stenosis by valve replacement. 第76回日本血液学会総会.大阪国際会議場. 2014年11月1日
  15. 下村志帆、前田美和、長谷川真弓、辻内智美、門池真弓、馬場由美、上野華恵、隈志穂里、西田幸世、早川正樹、松本雅則. 奈良医大病院における緊急輸血の現状と問題点. 第58回日本輸血・細胞治療学会 近畿支部総会. 和歌山県立医科大学 講堂.2014年11月15日
  16. Yagi H, Hayakawa M, Yamaguchi N, Yamashita K, Taniguchi S, Matsumoto M, Tsubaki K, Fujimura Y. Decreased platelet thrombus size, due to a heightened proteolysis of VWF by ADAMTS13 is quickly restored after valve replacement in aortic stenosis patients. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco/USA. 2014年12月7日
  17. Yoshii Y, Matsumoto M, Kurumatani N, Isonishi A, Uemura M, Hori Y, Hayakawa M, Yagi H, Bennett CL,

- Fujimura Y. Introduction of a quick assay for ADAMTS13 activity improved a survival of acquired TTP patients who received platelet transfusions. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco/USA. 2014年12月8日
18. Fumiaki Banno, Yuko Tashima, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Kochi Kokame, Toshiyuki Miyata: Analysis of mice carrying northeast Asian-specific genetic mutations in thrombosis. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014.
  19. 小亀浩市: VWF 切断酵素 ADAMTS13 の基礎知識. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 15 日 -17 日
  20. 小亀浩市: TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
  21. 小亀浩市, 樋口 (江浦) 由佳, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
  22. 樋口 (江浦) 由佳, 小亀浩市, 高蓋寿朗, 田中亮二郎, 小林光, 石田文宏, 久永修一, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: ダイレクトシーケンシング, 定量 PCR, 次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
  23. 坂野史明, 田嶋優子, 小亀浩市, 宮田敏行: 深部静脈血栓症モデルを用いた日本人の血栓症モデルマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
  24. 清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉譲, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン IIb/3 活性化変異, IIb(R990W) ノックインマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
  25. 滝澤祥恵, 小菅由希子, 淡路比呂代, 田村恵美, 高井綾子, 矢内隆章, 山本玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 井上裕康: HUVEC におけるレスベラトロールによる eNOS, SIRT1, オートファジー関連遺伝子の発現誘導. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日
  26. 丸山慶子, 秋山正志, 小亀浩市, 森下英理子, 宮田敏行: プロテイン S K196E (PS 徳島) 変異検出 ELISA 法の開発. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月 31-11 月 2 日
  27. Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Fumiaki Banno, Hisashi Kato, Youichiro Morikawa, Seiji Tadokoro, Koichi Kokame, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama. IIb(R990W), a constitutive activating mutation

of integrin IIb 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function. The 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.

28. 小亀浩市: 先天性 TTP における遺伝子解析 . Ion Torrent/Applied Biosystems ユーザーグループミーティング 2014, 東京, 2014 年 12 月 16 日
29. 小亀浩市: 先天性 TTP (USS) の分子診断. 第 9 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム, 東京, 2015 年 2 月 28 日
30. Wada H: Diagnosis and therapy of DIC The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
31. Wada H: New guideline for DIC management The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
32. 和田英夫: aHUS/TTP 患者の検査値異常、共催シンポジウム「補体制御因子と腎疾患」、第 49 回日本小児腎臓学会シンポジウム、秋田、2014
33. 和田英夫: 播種性血管内凝固と輸血療法、シンポジウム 2「止血検査からみた最適な輸血療法」、第 21 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、愛媛、2014

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況**

なし

## 血栓性血小板減少性紫斑病（TTP） 診断基準

他に原因を認めない血小板減少を認めた場合、ADAMTS13 活性を測定し 10%未満に著減している症例を TTP と診断する。抗 ADAMTS13 自己抗体が陽性であれば後天性 TTP と診断する。陰性であれば USS と診断する。（補足）

なお、TTP を疑う 5 徴候を認めるが ADAMTS13 活性が著減していない症例も、従来 TTP と診断されてきたが、その病態が明らかでないため TTP 類縁疾患と考えられている。また、TTP 類縁疾患の場合でもただちに血漿交換などの治療が必要な症例が存在する。

### TTP を疑う徴候の目安

#### 血小板減少

血小板数が 10 万/uI 未満。1-3 万/uI の症例が多い。

#### 細血管障害性溶血性貧血(microangiopathic hemolytic anemia:MAHA)

MAHA は、赤血球の機械的破壊による貧血で、ヘモグロビンが 12g/dl 未満(8-10g/dl の症例が多い)で溶血所見が明らかなく、かつ直接クームス試験陰性で判断する。

溶血所見とは、破碎赤血球の出現、間接ビリルビン、LDH、網状赤血球の上昇、ハプトグロビンの著減などを伴う。

#### 腎機能障害

尿潜血や尿蛋白陽性のみの軽度のものから血清クレアチンが上昇する症例もあり。ただし、血液透析を必要とする程度の急性腎不全の場合は溶血性尿毒症症候群(HUS)が疑われる。

#### 発熱

37 以上の微熱から 39 台の高熱まで認める。

動揺性精神神経症状 頭痛など軽度のものから、せん妄、錯乱などの精神障害、人格の変化、意識レベルの低下、四肢麻痺や痙攣などの神経障害などを認める。

## 除外すべき疾患

播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation:DIC)  
TTP 症例では、PT,APTT は正常で、フィブリノゲン、アンチトロンビンは低下しないことが多く、FDP,D-dimer は軽度の上昇にとどまることが多い。DIC の血栓は、フィブリン/フィブリノゲン主体の凝固血栓であり、APTT と PT が延長し、フィブリノゲンが減少する。

溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome:HUS)  
腸管出血性大腸菌(O157 など)感染症による典型 HUS は、便培養検査・志賀毒素直接検出法(EIA)などの大腸菌の関与を確認する方法や抗 LPS(エンドトキシン)IgM 抗体などで診断する。

HELLP 症候群  
HELLP 症候群とは、妊娠高血圧腎症や子病で、溶血(hemolysis)、肝酵素の上昇(elevated liver - enzymes)、血小板減少(low platelets)を認める多臓器障害である。診断は、Shibai らの診断基準(Shibai BM,et al.Am J Obstet Gynecol 1993;169:1000)によって行われるが、この基準では TTP との鑑別が困難である。ADAMTS13 活性が著減していれば TTP と診断する。

Evans 症候群  
Evans 症候群では直接クームス陽性である。ただし、クームス陰性 Evans 症候群と診断されることがあるが、このような症例の中から ADAMTS13 活性著減 TTP が発見されている。

## 補足

抗 ADAMTS13 インヒビターをベセスダ法で測定し、1 単位/ml 以上は明らかな陽性と判断できる。しかし、陰性の判断は必ずしも容易ではなく、USS の診断は両親の ADAMTS13 活性測定などを参考に行うが、確定診断には ADAMTS13 遺伝子解析が必要である。USS 患者の両親は、ヘテロ接合体異常であることから ADAMTS13 活性は 30 から 50%を示す場合が多い。

なお、ADAMTS13 自己抗体は、中和抗体(インヒビター)を測定することが一般的であり、研究室レベルでのみ非中和抗体の検査が可能である。

## 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP) 重症度分類

### 後天性 TTP 重症度分類

1. ADAMTS13 インヒビター 2BU/ml 以上
2. 腎機能障害
3. 精神神経障害
4. 心臓障害（トロポニン上昇、ECG 異常等）
5. 腸管障害（腹痛等）
6. 深部出血または血栓
7. 治療不応例
8. 再発例

<判定> 有 1 点、無 0 点

重症 3 点以上

中等症 1 点～2 点

軽症 0 点

### 先天性 TTP（Upshaw-Schulman 症候群：USS）重症度分類

1) 重症

維持透析患者、脳梗塞などの後遺症残存患者

2) 中等症

定期的、または不定期に新鮮凍結血漿（FFP）輸注が必要な患者

3) 軽症

無治療で経過観察が可能な患者

## ADAMTS13 活性測定試薬の保険適用取得への活動状況

研究分担者 藤村 吉博 奈良県立医科大学輸血部 特任教授  
研究協力者 松本 雅則 奈良県立医科大学輸血部 教授

### 研究要旨

本年度我々は、ADAMTS13活性が10%未満への著減症例をTTPと診断するという診断基準を作成した。同活性を測定した後、著減の場合にはADAMTS13に対する自己抗体（インヒビター）を確認して、先天性(Upshaw-Schulman症候群)と後天性に区分することになっている。しかし、現状ではADAMTS13活性およびインヒビター測定とも保険適用となっていない上に、測定用キットで体外診断用医薬品として承認されているものが存在しない。ADAMTS13活性とインヒビターの測定は、TTPの診断ばかりではなく、リツキシマブのTTPに対する保険適用拡大治験やaHUSの診断基準にも関係しており、早期に保険適用となることが望まれる。

そこで本年度は、まずADAMTS13活性およびインヒビター測定の保険収載に向けて、「早期導入を要望する医療機器に関する要望書」を作成した。それを、平成26年6月に日本血液学会を通じて厚生労働省に提出し、7月にヒアリングを受けた。8月のworking groupの会議で検討され、本年度末を目処に結論が得られる予定とのことであった。上記と平行して、国内企業のカイノス社が研究用試薬として販売しているADAMTS13活性測定試薬を、体外診断用医薬品製造販売承認申請するための臨床性能試験を行う予定である。

このように本年度は、ADAMTS13活性とインヒビターの検査が保険で検査できるように2方向からのアプローチを行った。次年度は、測定用キットが体外診断用医薬品として承認されるように、TTPサブグループの施設を中心に臨床性能試験を行う予定である。

### A . 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の診断基準として、ADAMTS13活性が10%未満に著減する症例であると、国際的にも認められている。その上で、ADAMTS13に対する自己抗体（インヒビター）が陰性であれば、先天性TTPであるUpshaw-Schulman症候群が疑われ、インヒビターが陽性であれば後天性TTPと診断される。現在、日本国内においてはADAMTS13活性、

インヒビターともに外注検査として測定可能であるが、保険適用となっていない。本研究ではADAMTS13活性およびインヒビターを保険適応として測定可能にすることを目的とする。

### B . 研究方法

ADAMTS13活性、インヒビターを健康保険内で測定するためには、特定のADAMTS13を測定する検査試薬において体

外診断用医薬品としての承認を得る必要がある。しかし、現状ではADAMTS13検査試薬で体外診断用医薬品として承認されているものは無い。

今回、1)ADAMTS13活性とインヒビター力価の2項目で保険適用を取得する、2)カイノス社製ADAMTS13 activity ELISA kitを体外診断用医薬品として承認を得ることを計画した。ADAMTS13 activity ELISA kitを選んだ理由として、国内で開発製造されている、製造企業が体外診断用医薬品承認に積極的である、他に適当なキット化されている測定法が見つけれなかった、などの理由による。

#### **(倫理面への配慮)**

該当せず

### **C . 研究結果**

検体検査に使用される「診断薬」は、薬価や特定保険医療材料価格とは異なり、診療報酬本体の技術料として償還される「検体検査実施料」に包含されている。検体検査実施料は、個別の検査薬ではなく「検査項目」ごとに設定されるが、「測定方法」が指定されることになる。この方法としてADAMTS13 activity ELISA kitを考えている。新規項目の保険適用、新規測定方法の指定は、「診断薬」を有する企業からの希望により行われている。診断薬が存在しない検査の場合には、学会要望などにより行われることもある。検査の保険適用には、対象患者数や測定頻度、検査により削減できる医療費など医療経済上の有用性を示す必要があるとされている。

ADAMTS13検査については、2013年度よ

り日本血液学会から保険適用となるように要望書を提出していたが、2014年6月に本サブグループが中心となり「早期導入を要望する医療機器等に関する要望書」を作成し、日本血液学会を通じて厚生労働省に提出した。2014年7月に厚生労働省のヒアリングを受け、検査の目的、および体外診断用医薬品承認に向けた活動内容等について説明した。ADAMTS13検査がこの項目に該当すると判断された場合、承認申請が優先審査扱いとなり、早期に承認がおりる可能性がある。

ADAMTS13 activity ELISA kitは、2006年10月に研究用試薬として上市された。製造および国内での販売は(株)カイノスが、海外での販売はオーストリアのTechnoClone社が行っている。本製品の測定原理は、図に示すようにELISA法を用いており、血漿を検体として止血因子VWF (von Willebrand factor) の特異的切断酵素であるADAMTS13の活性を測定するものである。ADAMTS13によって切断されたVWFの切断断端を特異的に認識する抗体を使用することが特徴である。ADAMTS13活性測定に加え、血友病患者における第Ⅲ因子に対するインヒビター力価の定量法であるBethesda法に準じて操作することによりADAMTS13のインヒビター力価を測定することも可能である。活性を50%低下させる力価を1 Bethesda Unit (BU)と表記する。

今後の臨床性能試験実施について、まずカイノス社から医薬品医療機器総合機構(PMDA)に試験に関する相談を行う。その結果でTTPサブグループの参加施設を中心に症例を集めて、臨床性能試験を実

施する予定である。しかし、ADAMTS13活性著減TTP患者は非常に症例数が少ないため、臨床性能試験をどのように進めるのかPMDAとも相談し、検討する予定である。

#### D. 考察

ADAMTS13活性とインヒビター測定は、TTPの診断に必要であるのみでなく、難治性・再発性TTPに有効であるリツキシマブの使用に関して重要な指標となる。さらに、TTPとの鑑別が必要な非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の診断基準に採用されている。

後天性TTPの急性期の治療法は血漿交換であるが、それに不応例や早期に再発する症例が知られている。難治性・再発性の機序として、血漿交換の実施中にもかかわらず、血漿ADAMTS13インヒビターが急上昇する(ADAMTS13 inhibitor boosting)症例が予想以上に多いことを我々は明らかにした。これらの症例に対して、国内外からCD20に対するモノクローナル抗体リツキシマブが有効であることが報告されている。しかし、日本国内においてリツキシマブはTTPに対して保険適用となっていないため、TTPサブグループが中心となって2014年に医師主導治験を実施した。その際のエントリー基準としてADAMTS13活性著減とインヒビター2 BU/ml以上が使用されている。今後この医師主導治験の結果を用いて、リツキシマブのTTPに対する保険適用拡大が認められる可能性が高いが、その際にはADAMTS13検査が是非とも必要となる。

また、TTPと同様に指定難病110疾患に

選ばれたaHUSは、補体の第二経路の持続的な異常活性化によって発症することが明らかになった。その診断は、血小板減少、溶血性貧血、腎不全という3徴候に加えて、志賀毒素産生HUSとTTPを否定することである。TTPの否定にはADAMTS13活性が著減していないことと診断基準にも記載されており、ここでもADAMTS13検査は重要である。aHUSの治療は最近までは血漿交換などの血漿療法のみであったが、補体C5に対するモノクローナル抗体エクリズマブが日本国内でも使用可能となり、有効であることが示されている。しかし、エクリズマブは非常に高価な薬剤であり、その使用適応は厳しく判断する必要がある。また、補体活性化に関連したaHUSに対してはエクリズマブを早期に投与することで、腎機能の改善が良好になることが報告されている。このように、aHUSを正確に診断し、治療法を選択する上でもADAMTS13活性測定は非常に重要である。

TTPにおいては、ADAMTS13活性著減のみをTTPと診断することが国際的なコンセンサスになっている。さらに、ADAMTS13検査はTTPの予後を予測する重要な指標となることが報告されている。1)治療前にADAMTS13活性が著減している症例は再発が多いこと、2)治療前にインヒビターを検出した症例は再発率が高く、インヒビター力価が高いほど血漿交換への反応が悪く、早期死亡が多いこと、3)臨床的寛解期にADAMTS13活性著減が続く症例は再発が多く、同様にインヒビターが残存する症例も再発が多いことなどが報告されている。

これらの血液疾患以外にも、肝硬変に

においてADAMTS13活性は予後を予測する因子として報告されるなど、ADAMTS13検査は、肝臓疾患領域においても注目されている。これは、ADAMTS13は肝臓の星細胞で主として産生されていることが明らかになっており、肝臓の微小循環の調節に重要な役割を果たしていることが予想されているからである。今後、ADAMTS13検査は微小循環障害によることが予想される血液疾患以外においても重要な検査となることが予想される。

## E . 結論

ADAMTS13検査は、TTPの診断のみでなく治療法の選択や、aHUSの診断と治療にも必要な検査であり、早期に保険適用となることが期待されている。今後、ADAMTS13 activity ELISA kitの臨床性能試験を行うとともに、ADAMTS13検査が保険収載されるように活動を続けて行く予定である。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表 論文発表

1. Yada N, Fujioka M, Bennett C, Hayakawa M, Matsumoto M, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Fujimura Y. The STEC-HUS followed by acute encephalopathy in a young girl was favorably treated on a basis of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. *Clinical Case Reports* (in press) 2015.
2. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. A case of autoimmune-type HUS treated with eculizumab, as a first-line therapy. *Pediatrics Int.* in press, 2015.
3. Ogawa Y, Matsumoto M, Sadakata H, Isonishi A, Kato S, Nojima Y, Fujimura Y. A unique case involving a female patient with Upshaw-Schulman syndrome: low titers of antibodies against ADAMTS13 prior to pregnancy disappeared after successful deliver. *Transfusion Med and Hematol.* 42: 59-63, 2015.
4. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol.* 100 : 437-442, 2014.
5. Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, Fujimura Y, van der Zwaan C, Verbij FC, Pos W, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer AB. Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 12: 670-679, 2014.

6. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2: 240-244, 2014.
7. Takuma Y, Fujimura Y, Emoto Y, Kuriu Y, Iino M, Matoba R. Response to 'Death during pregnancy: Thrombotic thrombocytopenic purpura or septic shock?'. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 887, 2014.
8. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the joint committee of the Japanese society of nephrology and the Japan pediatric society. *Clin Exp Nephrol* 18: 4-9, 2014.
9. Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, Fujimura Y, Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M. Effect of ADAMTS13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost* 12: 505-14, 2014.
10. 藤村吉博、松本雅則、石西綾美、八木秀男、小亀浩市、宮田敏行. 血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 55: 93-104, 2014.

### 学会発表

1. 石西綾美、松本雅則、藤村吉博. 後天性 TTP の血漿交換療法の影響による ADAMTS13 自己抗体の動態解析. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
2. 長谷川真弓、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、馬場由美、下村志帆、内池敬男、早川正樹、松本雅則、藤村吉博. 奈良医大付属病院における輸血後感染症検査の実施状況. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
3. 八木秀男、早川正樹、山口尚子、山下慶悟、松本雅則、谷口繁樹、杉本充彦、椿和央、藤村吉博. 重症大動脈弁狭窄症患者の弁置換術前後における VWF 依存性血小板血栓形成の計時的変化の検討. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
4. 樋口由佳、小亀浩市、高蓋寿朗、田中亮二郎、小林光、石田文宏、久永修一、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. ダイレクトシーケンシング、定量 PCR、次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
5. 吉田瑶子、範新萍、大山良文、古久保哲朗、岩本顕聰、森俊雄、松本雅

- 則、池島裕子、宮田敏行、藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
6. 早川正樹、松本雅則、八木秀男、天野逸人、田中晴之、木村弘、藤村吉博. 造血幹細胞移植後患者における好中球生着と UL-VWFM 出現との関連. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
  7. 松本雅則、早川正樹、石西綾美、吉田瑶子、吉井由美、田中賢治、前田琢磨、宮田茂樹、藤村吉博. 維持血液透析患者の血小板減少に対する抗血小板第 4 因子/ヘパリン抗体の関与. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
  8. 小亀浩市、樋口由佳、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
  9. 池島裕子、Xinping Fan, 平井秀憲、本田繁則、吉田瑶子、藤村吉博、Johanna A. Kremer Hovinga, Bernhard Lammle, 宮田敏行. 腎障害を示した先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の補体制御因子の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
  10. 田井義彬、西尾健治、大野史郎、吉本清巳、赤井靖宏、池島裕子、宮田敏行、吉田瑶子、松本雅則、藤村吉博. インフルエンザ感染時の血小板減少を契機に診断された典型溶血性尿毒症症候群の 1 例. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
  11. 早川正樹、松本雅則、吉井由美、八木秀男、藤村吉博. 造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の発症と予防的輸血との関連性. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
  12. Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. Registry of congenital TMA s in Japan. The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis( APSTH ). Hanoi/Vietnam. 2014 年 10 月 11 日
  13. 宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村田満、阿部貴行、三宅真二、菊池佳代子、岡本真一郎、太田秀一、半田寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰夫、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第 2 相医師主導治験. 第 76 回日本血液学会総会. 大阪国際会議場. 2014 年 10 月 31 日
  14. Hayakawa M, Yagi H, Yamaguchi N, Yamashita K, Hayata Y, Abe T, Taniguchi S, Fujimura Y, Matsumoto M. The changes of von Willebrand factor multimers in patients with aortic stenosis by valve replacement. 第 76 回日本血液学会

総会.大阪国際会議場. 2014 年 11 月  
1 日

15. 下村志帆、前田美和、長谷川真弓、  
辻内智美、門池真弓、馬場由美、上  
野華恵、隈志穂里、西田幸世、早川  
正樹、松本雅則. 奈良医大病院にお  
ける緊急輸血の現状と問題点. 第 58  
回日本輸血・細胞治療学会 近畿支  
部総会. 和歌山県立医科大学 講堂.  
2014 年 11 月 15 日

16. Yagi H, Hayakawa M, Yamaguchi N,  
Yamashita K, Taniguchi S, Matsumoto  
M, Tsubaki K, Fujimura Y. Decreased  
platelet thrombus size, due to a  
heightened proteolysis of VWF by  
ADAMTS13 is quickly restored after  
valve replacement in aortic  
stenosis patients. The 56th Annual  
meeting of American Society of  
Hematology. San Francisco/USA.  
2014 年 12 月 7 日

17. Yoshii Y, Matsumoto M, Kurumatani  
N, Isonishi A, Uemura M, Hori Y,  
Hayakawa M, Yagi H, Bennett CL,  
Fujimura Y. Introduction of a quick  
assay for ADAMTS13 activity  
improved a survival of acquired TTP  
patients who received platelet  
transfusions. The 56th Annual  
meeting of American Society of  
Hematology. San Francisco/USA.  
2014 年 12 月 8 日

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

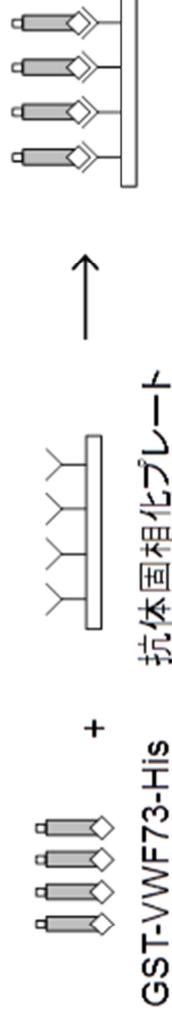
なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

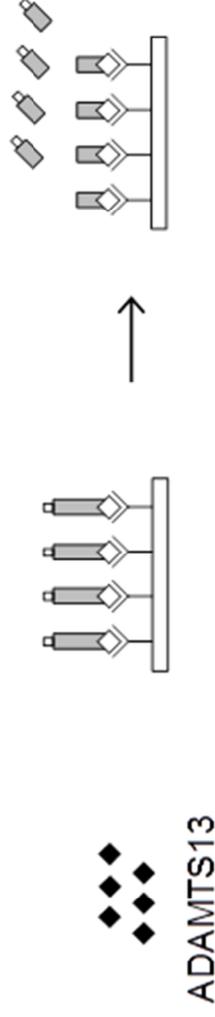
### 1. 特許取得

なし

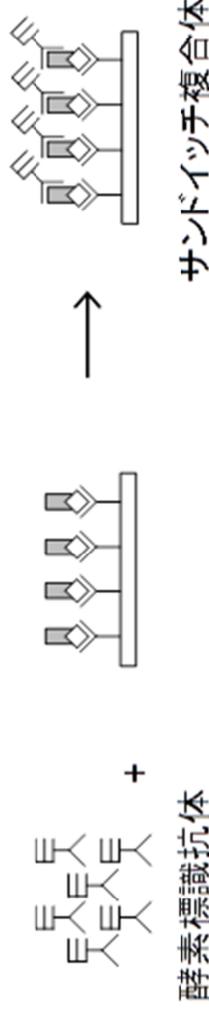
### 反応原理図①



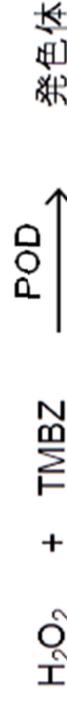
### 反応原理図②



### 反応原理図③



### 反応原理図④



## ADAMTS13 activity ELISA kit 測定原理

ADAMTS13 で切断される最小基質の 73 アミノ酸残基からなる VWF73 を GST を介してプレートに固相化する  
患者血漿を加えて VWF73 の切断反応を行う  
ADAMTS13 によって切断される断面を認識するモノクローナル抗体を切断部位に結合させる  
結合した抗体を発色させる

## 血液凝固異常症等に関する研究

研究分担者 宮川 義隆 埼玉医科大学教授

### 研究要旨

平成 26 年に国内で実施された血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第相医師主導治験の治験実施計画書の作成、研究体制の構築と被験者募集について支援を行った。治験実施期間中に目標の症例数に達し、計画通り無事に治験を終了した。今後、本治験で得られた成果をもとに、診療ガイドラインを作成予定である。

### A . 研究目的

平成 26 年 1 月～12 月にかけて、難治性疾患実用化研究事業として血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) に対するリツキシマブの第相医師主導治験が行われた。急性期疾患かつ国内の患者数が約 400 名と少ないことから、本研究班がこれまでの研究成果を生かして、治験実施計画書の作成、研究体制の構築、被験者募集について支援を行う。

### B . 研究方法

平成 25 年度に医薬品医療機器総合機構による薬事戦略相談を受けた。審議結果を反映させた治験実施計画書の作成支援、治験実施施設の選定、被験者候補者のリクルートについて支援をした。

### C . 研究成果

被験者募集の期間は約 12 ヶ月間と短期間であったが、TTP 疑いの被験者候補者を近くの治験実施施設へ紹介することにより、目標の 6 名に到達することができた。治験実施施設は、過去の疫学研究成果を元に TTP 患者数が多い施設を選び、このうち医師主導治験への参加を希望する医

療機関 11 ヶ所を選定した。最終的に 13 施設が本治験に参加した。

### D . 考察

これまでの TTP に関する一連の研究成果をもとに、医師主導治験の治験実施計画書の作成支援、治験実施施設の選定、被験者募集の支援を協力に行うことができた。

### E . 結論

本研究の支援により、TTP に対するリツキシマブの医師主導治験が予定期間内に無事に終了することができた。平成 27 年度中に適応拡大を承認申請する予定である。

### F . 健康危険情報

該当なし

### G . 研究発表

#### 1. 論文発表

宮川義隆

ITP と TTP に対するリツキシマブ  
日本内科学会雑誌 103, 1654-1659  
(2014)

宮川義隆  
新規診断 ITP に対するリツキシマブ  
とデキサメタゾン併用療法とデキサ  
メタゾン単剤療法の前向き比較試験、  
血液内科 68, 250-253 (2014)

宮川義隆  
特発性血小板減少性紫斑病  
内科 114, 209-213 (2014)

宮川義隆  
妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド  
Thrombosis Medicine 4, 388-394  
(2014)

## 2. 学会発表

第 76 回 日本血液学会学術集会  
2014 年 10 月、大阪)

妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病  
診療の参照ガイド

宮川義隆、柏木浩和、高蓋寿朗、藤  
村欣吾、倉田義之、小林隆夫、木村  
正、安達知子、渡辺尚、今泉益栄、  
高橋幸博、松原康策、照井克生、桑  
名正隆、金川武司、村田満、富山佳  
昭、妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド  
作成委員会

第 76 回 日本血液学会学術集会  
(2014 年 10 月、大阪)  
血栓性血小板減少性紫斑病に対する  
リツキシマブの第 2 相医師主導治験  
宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村  
田満、阿部貴行、三宅真二、菊地佳  
代子、岡本真一郎、太田秀一、半田  
寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、  
椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰  
夫、藤村吉博

第 76 回 日本血液学会学術集会  
(2014 年 10 月、大阪)

Investigato-inisiated clinical  
trial of rituximab for chronic  
primary immune thrombocytopenia  
Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T,  
Nomura S, Nishiwaki K, Tomiyama Y,  
Higashihara M, Shirasugi Y,  
Nishikawa M, Ozaki K, Abe T,  
Kikuchi K, Sato Y, Kanakura Y,  
Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S.

## 【メディア】

宮川義隆、TBS テレビ報道特集、「難  
病女性 決意の出産」、2014 年 12 月  
20 日

宮川義隆、産経新聞、「特発性血小板  
減少性紫斑病」、2014 年 4 月 22 日

宮川義隆、Medical Tribune、「ITP 患  
者の妊娠・出産に 20 年ぶり新指針」、  
2014 年 12 月 18 日

宮川義隆、読売新聞、医療ルネサ  
ス：シリーズ薬 妊娠と出産「持病  
ある女性支える指針」、2014 年 10 月  
30 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 肝移植におけるTMAの発症と血小板活性化との関係に関する研究

研究分担者 和田 英夫 三重大学医学系研究科検査医学 准教授

臼井 正信 三重大学医学系研究科肝胆膵・移植外科 准教授

### 研究要旨

血栓性微小血管障害（TMA）は種々の疾患で見られる予後不良な病態で、肝移植例での報告もある。今回、79例の肝移植例について検討したが、TMAはグラフトロス（死亡）例で認められた。ドナーに比べてレシピエントでは、血小板数と可溶性血小板膜糖蛋白（sGP）の変動は有意に著しかった。また、レシピエントを生存群（67例）と死亡群（12例）に分けると、死亡例は有意に多くの合併症を併発し、術後14、28日で有意に血小板数が低下した。また、死亡例のsGPVIは術後3日目に有意に高値であった。以上、肝移植後数日で血小板が活性化し、種々の合併症を併発してグラフトロスからTMA、死亡に至ることが推測された。

### A. 研究目的

血栓性微小血管障害（TMA）は、微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、臓器障害を主徴とし、肝移植後にも発症する後不良な病態である。経日的に可溶性血小板膜糖蛋白（sGP）を測定することにより、肝移植と血小板活性化の関係ならびに、血小板活性化とTMAの発症ならびに予後との関係について検討する。

### B. 研究方法

79例の肝移植例について、術後の血小板数、sGPVIの変動を調べ、合併症・生命予後との関係を調べた。sGPVIの測定は、2つのモノクローナルを用いたELISAで行った。術後90日以内に死亡した症例をnon-survivor、90日以上生存した症例をsurvivorとした。

### （倫理面への配慮）

本研究は三重大学の倫理審査委員会で研究計画の承認を受けており、研究参加者

からインフォームドコンセントを得た。

### C. 研究結果

血小板数の変動は、ドナーでは術後第三日目に有意に低下し、術後7日目には術前値に復した。一方レシピエントでは術後7日目までは低値が持続し、14日目に増加を示した。このため、術前から術後14日目まで、血小板値はドナーがレシピエントに比べて有意に高値であった（**図1**）。sGPVI値は、ドナーでは術後1日目で増加するのみであったが、レシピエントは術後持続して増加した。このため、術後3日目にドナーに比べてレシピエント群で有意にsGPVI値が高値であった（**図2**）。

90日後のnon-survivorは12例、survivorは67例であった。non-survivorは何らかの合併症を併発し、有意に合併症の併発が多かった。血小板数はsurvivor群で術後14日目から有意に増加したが、non-survivor群での増加は少なかった。このため、術後

14日目ならびに28日目において、血小板数はnon-survivor群に比べてsurvivor群で有意に高値であった(図3)。sGPVI値は、survivor群では術後3日目に有意に増加するのみであったが、non-survivor群では術後持続して増加した。このため、術後3日目におけるsGPVI値は、survivor群に比べてnon-survivor群で有意に高値であった(図4)。

#### D. 考察

以前より、sGPVI値は血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、播種性血管内凝固(DIC)や静脈血栓塞栓症(VTE)などで著しく増加し、血小板活性化マーカーとして注目されていた。今回の検討では、侵襲の少ないドナーでは血小板の減少ならびにsGPVIの増加は軽度であった。すなわち、血小板の活性化はドナーに比べてレシピエントの方が多いと推測される。肝移植のnon-survivorは、有意に合併症が多く、グラフトロスの患者はTMAを合併した。survivor群では血小板数は術後14日で増加するのに比し、non-survivor群では血小板数の増加は殆ど見られなかった。このため、術後14日と28日における血小板数の低下は、生命予後の悪化を示唆した。この生命予後の悪化は、合併症の併発によることを示唆される。合併症の併発を予測するのに、術後14日目の血小板では遅すぎると考えられる。survivor群は術後早期に血小板の活性化がなくなるのに比し、non-survivor群では術後持続してsGPVIが増加した。このため、術後3日目のsGPVIは有意にnon-survivor群で高値であり、肝移植の血小板活性化ならびに合併症併

発の指標として有用であることが示唆された。

#### E. 結論

sGPVIは血小板活性化マーカーとして有用であり、ドナーに比べて侵襲の強いレシピエントでより増加した。肝移植後数日で血小板が活性化し、種々の合併症を併発してグラフトロスからTMA、死亡に至ることが推測された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fukushima N, Itamura H, Wada H, Ikejiri M, Igarashi Y, Masaki H, Sano M, Komiyama Y, Ichinohe T, Kimura S: A Novel Frameshift Mutation in Exon 4 Causing a Deficiency of High-molecular-weight Kininogen in a Patient with Splenic Infarction. Intern Med. 2014; 53: 253-257
- 2) Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. Thromb Res. 2014; 133: 440-444
- 3) Yamashita Y, Wada H, Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y, Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N: Elevated Fibrin-related Markers in Patients with Malignant Diseases Frequently Associated with Disseminated

- Intravascular Coagulation and Venous Thromboembolism. Intern Med 2014; 53: 413-419
- 4) Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H: Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. Int J Hematol. 2014; 99: 437-440
  - 5) Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S: Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. Int J Hematol. 2014; 99:418-28
  - 6) Sasaki T, Matsumoto T, Wada H, Ohishi K, Kanda H, Yamada Y, Arima K, Katayama N, Sugimura Y.: Successful treatment of non-invasive bladder tumour in a haemophilia A patient with high-responding inhibitors: a case report. Haemophilia. 2014; 20: 399-401
  - 7) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. Int J Hematol. 2014; 100: 437-442
  - 8) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y:Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. Journal of Intensive Care 2014; 2: 15
  - 9) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis. Clin Chim Acta. 2014; 436C:130-134
  - 10) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?, Crit Care, 2014 **18**:447
  - 11) Wada H, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasaki K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the “Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan ”. Thromb Res, 2014; 134: 924-925
  - 12) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y:Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. Semin Thromb Hemost. 2014; 40: 866-873
  - 13) Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Wada H.: Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an observational nationwide study: comment. J Thromb Haemost. 2015 (in press)
  - 14) Ota S, Wada H, Mastuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux. Clin Chim Acta, 2015 (in press)
  - 15) Wada H, Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N: Antithrombin

or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Wada H: Diagnosis and therapy of DIC  
The 8<sup>th</sup> Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
- 2) Wada H: New guideline for DIC management  
The 8<sup>th</sup> Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
- 3) 和田英夫: aHUS/TTP 患者の検査値異常、共催シンポジウム「補体制御因子と腎疾患」第 49 回日本小児腎臓学会シンポジウム、秋田、2014
- 4) 和田英夫: 播種性血管内凝固と輸血療法、シンポジウム 2「止血検査からみた最適な輸血療法」第 21 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、愛媛、2014

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

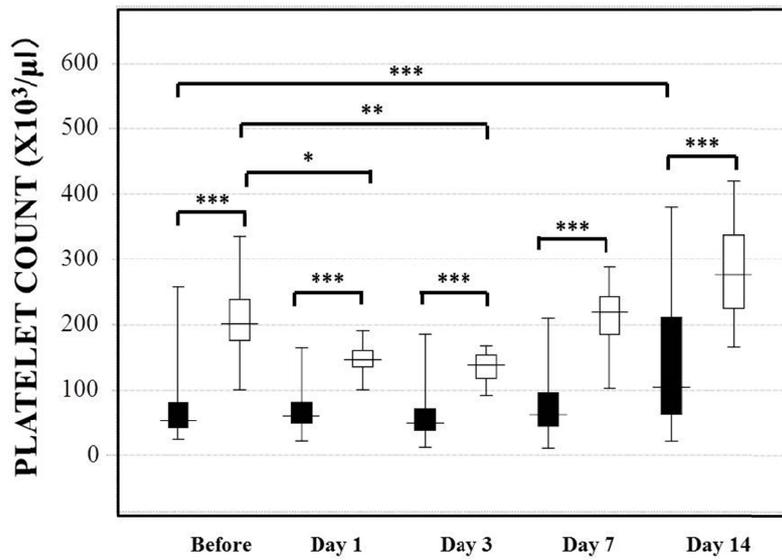
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

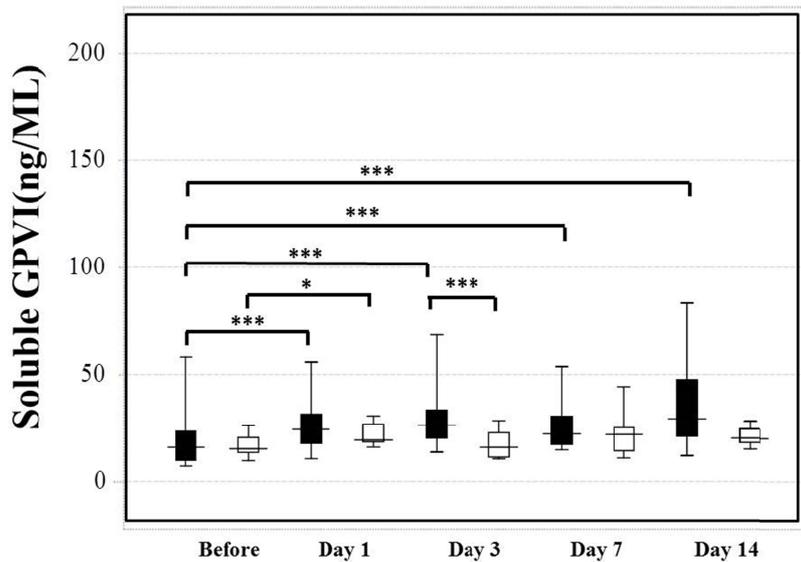
なし



■ 1 肝移植ドナーとレシピエントの血小板数

Closed bar: recipient, open bar: donor

\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.00



■ 2 肝移植ドナーとレシピエントの sGPVI 値

Closed bar: recipient, open bar: donor

\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001

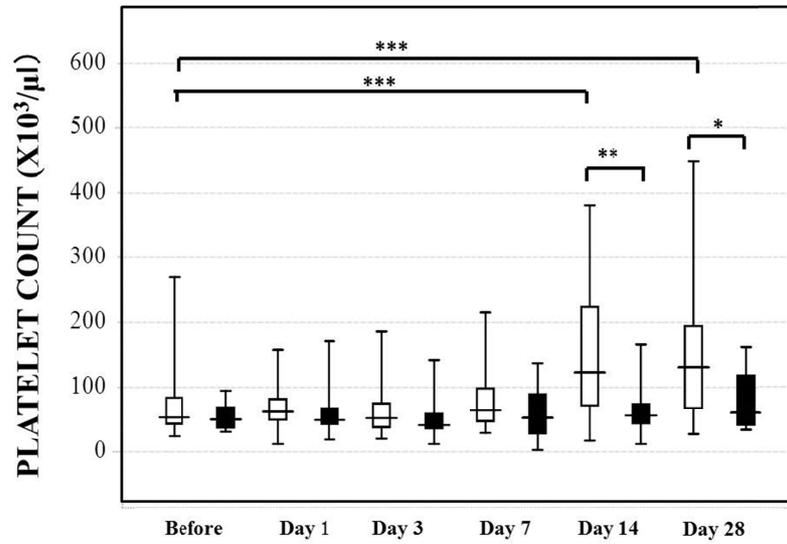


図 3 肝移植の生存群と非生存群における血小板数

Open bar: survivor, closed bar: non-survivor

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

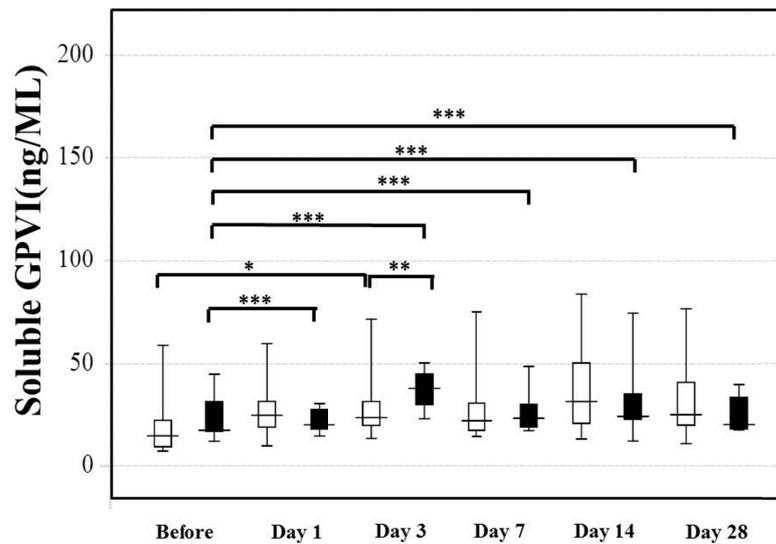


図 4 肝移植の生存群と非生存群における sGPVI 値

Open bar: survivor, closed bar: non-survivor

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$

## 先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析に関する研究

研究分担者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長  
研究協力者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

### 研究要旨

von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減は、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。ADAMTS13 活性を著減させる原因の一つとして ADAMTS13 遺伝子異常があり、これは先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) を引き起こす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、発症メカニズムの解明とともに、TTP 診断ガイドラインや治療ガイドラインの作成に寄与することをめざしている。今年度は、先天性 TTP 患者 3 名 (3 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子の解析を行った。ダイレクトシーケンシング法による塩基配列解析の結果、3 家系の患者はそれぞれ、p.G139Vfs\*17 と p.I673F、p.R193W と p.C908Y、p.G139Vfs\*17 と p.W686\* の複合ヘテロ接合体であった。p.G139Vfs\*17 と p.W686\* は海外も含めて未報告の変異であった。これらの結果は、臨床データと合わせて考えることで、TTP 関連疾患の診断および治療ガイドラインの作成において有効活用することができる。

### A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の発症は、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減で起こる。ADAMTS13 活性の損失は、先天的な ADAMTS13 遺伝子異常あるいは後天的に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体によって起こる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。我々は、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、

ADAMTS13 分子の立体構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。本研究事業では、先天性 TTP 患者の遺伝子解析を継続的に行い、遺伝子異常の特徴や発症メカニズムに関する知見を蓄積することを目的としている。

ADAMTS13 活性が 10% 未満でインヒビターが陰性であれば、先天性 TTP の可能性を考え、遺伝子解析を行う。我々はこれまで、先天性 TTP 疑い患者および家族を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、先天性 TTP 発症の原因となる遺伝子異常を特定してきた。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エクソンを PCR で増幅して塩基配列を解読する方法、すなわちダイレクト・シーケンシング法によって決定

される。我々もまず、ADAMTS13 遺伝子の各エクソンの外側に結合するよう設計した PCR プライマーを用いて、検体 DNA から各エクソンを選択的に増幅させ、その塩基配列を決定する。これまでに我々が行った先天性 TTP 患者解析の場合、約 9 割の症例はこの方法で複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の原因変異が同定される。ダイレクト・シーケンシング法では原因変異が一つしか、あるいは一つも見つからない場合、ダイレクト・シーケンシング法を効率よく補完する方法として開発したゲノム定量 PCR 法を行っている。この方法で、これまでに 3 患者の ADAMTS13 遺伝子にそれぞれ異なる欠失異常を見出した。

本研究では、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) の原因変異を明らかにするために、患者および家族の ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。

## B . 研究方法

患者および家族から得られた血球画分を凍結した状態で受け取り、解析を始めるまで冷凍保管した。DNA 調製には illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE ヘルスケア) を使用した。血液からの調製を前提としたキットなので、凍結血球 (約 200  $\mu$ L) を解凍しながら約 100  $\mu$ L の生理食塩水で懸濁して約 300  $\mu$ L の血液と見なし、マニュアルに従って調製した。

全 29 個のエクソンを PCR で増幅するために、24 ペアのプライマーを用いた。センス方向プライマーの 5' 側に M13F 配列 (TGTAACGACGGCCAGT) を、アンチセン

ス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を、それぞれ付加しておいた。これは、あとのシーケンシング反応を効率的に行うためである。エクソン 7 以外は一般的な PCR 条件で容易に増幅させることができた。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 1  $\mu$ L を添加した。エクソン 7 は GC 塩基の割合が非常に高いため、GC-RICH PCR System (ロッシュ) を使用した。PCR 終了後、1  $\mu$ L を用いてアガロース電気泳動でバンドを確認した。次に、PCR 反応液に残った過剰プライマーの除去と未反応 dNTP の不活化を目的として、ExoSAP-IT (アフィメトリクス) 1  $\mu$ L を加え、37 /30 分間、80 /15 分間反応させた。このうち 1  $\mu$ L を鋳型にして、M13F および M13R プライマーでシーケンス反応を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシステムズ) 試薬の 4 倍希釈液を用いて 5  $\mu$ L/反応で行った。反応終了後、CleanSEQ ダイターミネータ精製試薬キット (ベックマン・コールター) で精製し、Genetic Analyzer 3730xl (アプライド・バイオシステムズ) に供して波形データを得た。

解析ソフトウェア Sequencher (ジーンコード) を用いて波形データを観察し、対象領域 (各エクソンとその前後約 20 塩基) のレファレンス配列と比較した。エクソンに変異が見つかった場合、cDNA 配列 (GenBank: AB069698.2) と照合してアミノ酸配列への影響などを調べた。イントロンに変異が見つかった場合、スプライシングに対する影響等を検討した。なお、エクソンの異常でもスプライシング

に影響をおよぼす可能性もあるので、注意深く検討した。変異が先天性 TTP の原因として既知であれば、それを原因変異として確定した。未報告の変異であれば、アミノ酸レベルでの変異の特徴から機能への影響を類推した。日本人の ADAMTS13 遺伝子に存在する 6 個のミスセンス多型、p.T339R、p.Q448E、p.P475S、p.P618A、p.S903L、p.G1181R は原因変異から除外した。

#### **(倫理面への配慮)**

本研究は国立循環器病研究センターおよび奈良県立医科大学の倫理委員会で研究計画の承認を受けた上で実施した。研究参加者からは書面でのインフォームドコンセントを得た。

### **C . 研究結果**

USS-UU 家系の患者は、c.415-10G>A (p.G139Vfs\*17、母由来) と c.2017A>T (p.I673F、父由来) の複合ヘテロ接合体であった。c.2017A>T (p.I673F) は先天性 TTP の原因として過去に報告した変異と同一であった。一方、c.415-10G>A (p.G139Vfs\*17) は今回新たに同定された変異で、その配列の特徴からスプライシング異常が予想された。そこで、患者の末梢血球 RNA を解析したところ、予想通りのスプライシング異常により、エクソン 5 に 8 塩基のイントロン配列が含まれる異常 mRNA の存在が確認された。

USS-VV 家系の患者は、c.577C>T (p.R193W、母由来) と c.2723G>A (p.C908Y、父由来) の複合ヘテロ接合体であった。いずれも日本の先天性 TTP 患者に比較的によくみられるミスセンス変異であった。

USS-WW 家系の患者は、c.415-10G>A (p.G139Vfs\*17、父由来) と c.2057G>A (p.W686\*、母由来) の複合ヘテロ接合体であった。c.415-10G>A (p.G139Vfs\*17) は上記 USS-UU 家系に同定されたスプライシング異常と同一であった。c.2057G>A (p.W686\*) は国内外とも報告例のない部位のナンセンス変異であった。

### **D . 考察**

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因変異を特定することはきわめて重要である。次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、先天性 TTP のように責任遺伝子が限定されている場合、依然としてダイレクト・シーケンシング法がコスト面等で優れている。本研究では、種々の工夫により効率化したダイレクト・シーケンシング法を行い、先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) に発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。ミスセンス変異やナンセンス変異、フレームシフトを伴うスプライシング異常など、多様性に富む遺伝子異常が見られた。いずれも、ADAMTS13 の本来の機能、すなわち VWF 切断活性を発揮できなくなる変異であると考えられる。これまでの知見から考えると、いずれもタンパク質が細胞外に分泌されなくなる変異である可能性が高い。

### **E . 結論**

新たに見つかった先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) の ADAMTS13 遺伝子をダイレクト・シーケンシング法で解析した結

果、いずれの患者も ADAMTS13 遺伝子異常の複合ヘテロ接合体であることが明らかになった。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus.* 12 (S1), s153-s155 (2014)

Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40 (1), 247-249 (2014)

Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology* 155 (3), 1099-1106 (2014)

Reiko Neki, Toshiyuki Miyata, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Daisuke Fujita, Shigeyuki Isaka, Tomoaki Ikeda, Jun Yoshimatsu: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb. Res.* 133 (5), 914-918 (2014)

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2 (3), 240-244 (2014)

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行: ターゲット領域の異常を見逃さないゲノム定量 PCR 法の確立. *日本血栓止血学会誌* 25 (5), 615-618 (2014)

小亀浩市: TTP の分子診断. *日本血栓止血学会誌* 25 (6), 689-696 (2014)

小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病. *血液フロンティア* 25 (1), 51-57 (2015)

小亀浩市: ADAMTS13. 新・血栓止血血管学, 印刷中

## 2. 学会発表

Fumiaki Banno, Yuko Tashima, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Kochi Kokame, Toshiyuki Miyata: Analysis of mice carrying northeast Asian-specific genetic mutations in thrombosis. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014.

小亀浩市: VWF 切断酵素 ADAMTS13 の基礎知識. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 15 日-17 日

小亀浩市: TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

小亀浩市, 樋口(江浦)由佳, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: デジタルPCRを用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 高蓋寿朗, 田中亮二郎, 小林光, 石田文宏, 久永修一, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: ダイレクトシーケンシング, 定量 PCR, 次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

坂野史明, 田嶋優子, 小亀浩市, 宮田敏行: 深部静脈血栓症モデルを用いた

日本人の血栓症モデルマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉譲, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン IIb/3 活性化変異, IIb(R990W)ノックインマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

滝澤祥恵, 小菅由希子, 淡路比呂代, 田村恵美, 高井綾子, 矢内隆章, 山本玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 井上裕康: HUVEC におけるレスベラトロールによる eNOS、SIRT1、オートファジー関連遺伝子の発現誘導. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日

丸山慶子, 秋山正志, 小亀浩市, 森下英理子, 宮田敏行: プロテイン S K196E (PS 徳島)変異検出 ELISA 法の開発. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月 31-11 月 2 日

Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Fumiaki Banno, Hisashi Kato, Youichiro Morikawa, Seiji Tadokoro, Koichi Kokame, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama: IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin IIb/3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with

impairment of platelet function. The 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.

小亀浩市：先天性TTPにおける遺伝子解析． Ion Torrent/Applied Biosystems ユーザーグループミーティング 2014, 東京, 2014年12月16日

小亀浩市：先天性TTR(USS)の分子診断． 第9回日本血栓止血学会SSCシンポジウム, 東京, 2015年2月28日

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

### **1 . 特許取得**

なし

### **2 . 実用新案登録**

なし

### **3 . その他**

なし

