

に3回、3ヶ月まで)の問題から実際には困難である。そのため、当初5日程度連日施行後に隔日に施行し、血小板数とADAMTS13等の推移を見ながら、血漿交換の実施を判断する。

#### b) ステロイド療法 (1 B)

ステロイドパルス療法、ステロイド大量内服のいずれも使用されているが、どちらが有用かは明らかになっていない。重症例にステロイドパルスが選択される傾向にある。ステロイド投与によって、自己抗体の産生抑制が期待できる。なお、高齢者や糖尿病、重症感染症患者などでは減量を考慮する。

ステロイドパルス療法

5%ブドウ糖 または生理食塩水 500mL

メチルプレドニゾン 1000mg

1日1回 約2時間かけて点滴静注 当初3日間継続  
その後ステロイド量を漸減する

ステロイド大量内服

プレドニゾン 1mg/kg/日 朝を中心に内服

例 患者体重60kgの場合 プレドニゾン60mg、12錠内服  
朝6錠、昼4錠、夕2錠

#### c) 抗血小板薬 (2 B)

血小板数が5万/uL以上に回復した場合にアスピリン投与が行われる場合があるが、TTPの再発に対する効果は明らかではない。

抗血小板薬療法

アスピリン 81-100mg 1日1回、朝内服 ステロイド中止まで

#### d) その他の治療

赤血球輸血は心疾患のない患者ではヘモグロビン値7.0g/dL未満を目安に行うが、心疾患が存在すれば8.0g/dL未満を目安とする(1 A)。なお、血小板輸血は明らかな出血がある場合には適応となるが、それ以外の予防的使用は血栓症を増悪させる危険性があるため禁忌と考えられる(1 B)。

また、膠原病、悪性腫瘍やチクロピジンなどの薬剤使用などによりADAMTS13活性が著減する二次性TTPが存在する。薬剤性の場合は薬剤を中止し、基礎疾患がある場合は、基礎疾患の治療を継続する。

### B 難治例、早期再発例

上記の急性期の治療を5回以上行っても血小板数が5万/uL以上とならない場合、も

しくは 15 万/uL 以上に回復しても再度血小板数が 5 万/uL 未満に低下した場合には、血漿交換に加えてリツキシマブ投与を考慮する。この場合に、血漿交換による ADAMTS13 の投与によって、ADAMTS13 インヒビターが上昇している場合 (ADAMTS13 inhibitor boosting) が予想されるので、ADAMTS13 検査が必要である。ADAMTS13 inhibitor boosting の場合は、リツキサン治療が強く推奨される。なお、TTP に対するリツキシマブの効果が明らかになるまでの期間は 10 日～14 日間であるので、その間も血漿交換を継続する必要がある。

**a) リツキシマブ (1 B)**

リツキシマブは、CD20 に対するモノクローナル抗体で、B リンパ球に作用することで ADAMTS13 インヒビターの産生を抑制する。

リツキシマブ療法

1 回投与量リツキシマブ 375 mg/m<sup>2</sup> 輸液ポンプにて徐々に投与速度を上げる。

1 週間に 1 回投与、合計 4 回

リツキシマブ以外に下記の治療が難治性、再発性症例に有効な場合があるが、全例に効果が期待できるわけではない。様々な投与方法があるが代表的なものを記載する。

**b) シクロfosファミド (2 B)**

生理食塩水 500mL

シクロfosファミド 500m g/body or m<sup>2</sup>

1 日 1 回、2 時間で投与、通常は 1 回のみ投与

**c) ビンクリスチン (2 B)**

生理食塩水 20m l

ビンクリスチン 1 m g/body、1 日 1 回ゆっくり静脈投与、通常は 1 回のみ投与

**d) シクロスポリン (2 B)**

シクロスポリン 4 mg/kg 1 日 2 回に分けて連日内服投与。

シクロスポリンの血中濃度を確認し、トラフ 100-200ng/mL 程度を維持する。

**e) その他の治療**

以前は脾臓摘出 (2 B)、免疫グロブリン大量療法 (2 B) が難治例、再発例の TTP に対して実施されていたが、リツキシマブが使用できるようになったことより、現状では選択される機会が少なくなっている。

**C. 寛解期**

寛解期となった場合、ステロイド治療は、ADAMTS13 活性およびインヒビターの経過

を見ながらできるだけ早期に中止する。寛解期に特別な治療は存在しないが、最低 1 年間は定期的に通院し、血小板数と ADAMTS13 検査などを行うことが望ましい。

## 2. 先天性 TTP (USS)

USS の特徴として、新生児期の重症黄疸にて交換輸血を受けていることがある。その後、血小板減少が再発するため FFP の定期輸注が行われている早期発症例がある。また、妊娠、感染などを契機に初めて TTP 発作が出現し、成人以降に診断される症例もある。USS の中には、FFP の定期輸注が継続的に必要な症例から、増悪時のみ FFP の輸注が必要で、定期輸注は必要がない症例まであり、FFP の定期輸注の必要性は症例によって異なる。

### FFP の定期輸注 (1 A)

FFP 5~10 mL/kg を 2~3 週ごとに輸注する。症状出現時には、まず 10mL/kg を輸注して効果を確認する。

現在までに日本国内で経験はないが、USS で ADAMTS13 同種抗体が産生された場合には FFP の効果が悪くなると思われるので、USS においても ADAMT13 インヒビターの定期的な検査が必要である。

補足

2015 年 6 月の保険適用に関する状況

ADAMTS13 活性およびインヒビターの測定：保険適用外

血漿交換：保険適用

それ以外の治療はすべて保険適用外

表 1 GRADE システムによる推奨度

<b>推奨度の強さ</b>
1: 強い推奨 ほとんどの患者において良好な結果が不良な結果よりあきらかに勝っており、その信頼度が高い
2: 弱い推奨 良好な結果が不良な結果より勝っているが、その信頼度は低い
<b>推奨のもとになったエビデンスの質</b>
A: 複数の無作為化比較試験において確立したエビデンス、あるいは観察研究による極めて強いエビデンス
B: 無作為化比較試験による限定的なエビデンス、あるいは観察研究による強いエビデンス
C: 重大な弱点のある無作為化比較試験によるエビデンス、観察研究による弱いエビデンス、あるいは間接的エビデンス

## 特発性血栓症／先天性血栓性素因サブグループ研究報告

### 研究分担者：

森下英理子 金沢大学  
小嶋哲人 名古屋大学  
宮田敏行 国立循環器病研究センター  
小林隆夫 浜松医療センター

### 研究協力者：

坂田洋一 自治医科大学  
津田博子 中村学園大学  
横山健次 東海大学  
中村真潮 村瀬病院  
榛沢和彦 新潟大学  
尾島俊之 浜松医科大学  
杉浦和子 浜松医科大学  
根木玲子 国立循環器病研究センター  
関谷暁子 金沢大学

特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症(VTE)のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診断基準ならびに診療ガイドの作成を通して、エコノミークラス症候群として国民から注目されるVTEの予知・予防の対策確立を目的としている。

また、「先天性血栓性素因」は難治性疾患であるにもかかわらず厚労省の指定難病に認定されていないため、まずは検討対象の疾患に選定されるべく活動を開始し、指定難病認定の取得を目指す。

具体的には、以下の4項目を研究課題としている。

- (a) 「先天性血栓性素因の診断基準」の策定
- (b) 「先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定
- (c) 「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイドライン」の策定
- (d) 「妊娠合併先天性プロテインS欠損症患者の診療ガイドライン」の策定

#### 1. 「先天性血栓性素因の診断基準」の策定

平成26年度は、静脈血栓塞栓症(VTE)の先天的要因である「先天性血栓性素因」の診断基準の素案を作成した。また、個別研究として「特発性血栓症リスク・アンチトロンビン(AT) resistance (ATR)検出検査」や「日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテインS(PS) K196E 変異のELISA法を用いた検出法の確立に関する研究」により、先天性血栓性素因の診断のための有効な検査法を作成・確立した。また、単一施設の研究ではあるが、血栓症を発症した先天性血栓性素因104家系160症例を対象とした病態解析を行った。一方「広島豪雨土砂災害の深部静脈血栓症」の発生状況についても調査を行った。

平成27年度は、作成した診断基準の確立ならびに公開を目指す。そのために、日本血栓止血学会に「先天性血栓性素因の診断基準検討委員会」を設立していただき、当委員会と本研究班が協力して今回作成した診断基準の素案を協議し、日本血栓止血学会あるいは日本血液学会の機関誌への掲載を目指す。また、同時に指定難病の認定に向けて「重症度分類」を作成する。

## 2. 「先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定

平成26年度は、個別研究にて「先天性PS欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定」が行われ、APC-srおよびPS比活性の測定が、妊婦や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に有用である可能性が判明した。

平成27年度は、「先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」や「妊娠合併先天性PS欠損症患者の診療ガイドライン」「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイドライン」の策定を予定している。平成28年度には、ガイドラインの確立ならびに普及を目指す。

# 個別研究

## ITP の全国疫学調査

研究分担者 羽藤高明 (愛媛大学)  
研究協力者 島田直樹 (国際医療福祉大学)  
倉田義之 (四天王寺大学)

### 1. 方法

厚生労働省に提出された平成 24 年度臨床調査個人票をもとに解析した。

### 2. 結果および考察

#### 1) 患者数

平成 24 年度の ITP 医療受給者証所持患者は 24,100 人であり、このうち解析可能であった臨床調査個人票は 18,115 人分 (75%) であった。これら解析症例のうち新規患者数は 3,192 人、更新患者数は 14,923 人であり、平成 23 年度とほぼ同数であった。

#### 2) 年齢分布

新規急性型・新規慢性型では男女とも 56-85 歳に幅広いピークがあり、加えて女性では 31-35 歳にもピークを持つ 2 峰性を示した。更新慢性型では男女とも 56-85 歳に幅広いピークがあり、最大ピークは 61-65 歳であった。女性は男性の 2.36 倍であった。

#### 3) 血小板数

急性型は血小板数 5 万未満の患者が 95% と大多数を占めていた。慢性型では新規症例の 80% が血小板数 5 万未満であったが、更新症例では 47% に減少していることから慢性型では治療により血小板数が増加している症例が増加していると思われた。

#### 4) 特殊検査

骨髓穿刺と PAIgG は 70-90% と高い実施率であったが、抗血小板膜蛋白自己抗体は 6% と低く、網状血小板は近年増加傾向にあるが 14% にとどまっていた。

#### 5) 治療

新規急性型ではプレドニゾロン治療が 82% の症例において選択されていた。次いで大量 IgG 療法 31%、ピロリ除菌 28% の順であった。また新規慢性型においてはプレドニゾロン治療が 57% の症例で選択され、次いでピロリ除菌、大量 IgG 療法の順であった。慢性更新型ではこの 1 年間にプレドニトロン治療が 56% の症例で選択されていて最も多かった。トロンボポエチン受容体作動薬は近年、急激に使用症例が増加しており、慢性更新型の 9% で使われていた。脾摘は慢性更新型の 14% で行われていた。

#### 6) 合併症

副腎皮質ステロイドによる副作用と考えられる重症感染症は慢性更新型でこの 1 年間に 193 例 (1.5%) が発症しており、脳出血を発症した 53 例 (0.4%) よりも多かった。

### 3. 臨床調査個人票の変更

平成 27 年より臨床個人票の記入項目が変更となった。これにより、より詳細な疫学調査が可能になる一方、軽症例が調査から除外される面があると思われた。

## 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出法の実用化に向けた試み

桑名正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科

ITP の診断には 1990 年に厚生省研究班により作成された診断基準が用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり骨髓検査で巨核球の減少や他系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他疾患の除外が診断根拠となる。しかし、血小板減少をきたす全ての疾患を診療で除外することは現実的に困難で、そのために多岐に渡る血液、画像検査を実施することは医療経済的にも好ましくない。本研究班では平成 16 年度に多施設前向き研究を実施し、ITP に感度、特異度の高い臨床検査に組み合わせて ITP を診断する基準案を作成した。本基準は侵襲性の低い血液検査のみで迅速に結果が得られ、感度 93%、特異度 75%と良好な結果を示したが、項目に含まれる検査を保険診療で測定できない。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは研究目的での受託測定が可能になったが、検査費用が発生することから一般診療で普及していない。これら問題点を解決するためには、再現性・汎用性の高い臨床検査薬の開発が不可欠である。そこで、昨年度から抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を体外診断薬として認証を受けることを目的とした基礎検討を行ってきた。本年度は測定系における陽性コントロールや標準化のため抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体産生細胞の作成し、さらに引き続き固相化 GPIIb/IIIa 抗原の長期安定性を検討する。さらに、改良版 ITP-ELISPOT の性能評価のために、血小板減少症患者を対象とした多施設臨床試験に実施に向けた準備を進める予定である。

## ITP 診断における新機種を用いた IPF%の有用性および ITP 治療における血小板機能測定の意味に関する検討

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科 柏木 浩和

大阪大学医学部附属病院 輸血部 富山 佳昭

1) ITP の診断の基本は除外診断であるが、特に再生不良性貧血との鑑別が問題になることが多い。網状血小板(RP)は細胞内に RNA を豊富に含む幼若な血小板であり、網状血小板比率(RP%)は血小板寿命を反映していると考えられている。我々は Flow cytometry を用いた RP%測定(FCM 法)が ITP と再生不良性貧血の鑑別に有用であることを報告してきた。しかし、FCM 法は精度は高いものの高価な機器と煩雑な操作のため本法による網血小板測定が実施可能な施設は限られている。近年、RP の自動測定が試みられ、シスメックス社製多項目自動血球分析装置を用いて、RNA が含まれる血小板分画を幼若血小板分画 (immature platelet fraction, IPF) として簡便かつ迅速に測定する方法が開発されている。従来の XE-2100 を用いた IPF%測定は ITP 診断の感度と特異性に難点があったが、最新機器である XN シリーズにおいては IPF 専用チャンネルを設けたことによりその精度の改善が期待されていた。我々は ITP47 例、再生不良性貧血あるいは化学療法後の血小板減少患者 28 例の IPF%を XE-2100 および XN-1000 を用いて測定し、XN1000 を用いた IPF の有用性に関する検討を行い、RP%に匹敵する有用性を示すことが明らかとなった。

2) ITP の治療は、重篤な出血を回避するため安全と思われる血小板数を維持することを目指されるが、出血リスクには血小板数だけでなく血小板機能も関与する。ITP 患者において検出される抗血小板抗体の多くは血小板機能に必須の分子である GPIIb-IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) や GPIb-IX-V 複合体を標的していることから、ITP 患者の血小板機能は正常者と異なる可能性がある。一方、ITP 患者では血栓症の合併が意外に多いこと、また最近、難治性 ITP で広く使用されてきている TPO 受容体作動薬は血小板機能を亢進する可能性があることから、ITP 患者の血小板機能を把握することは重要である。しかし血小板機能検査のゴールドスタンダードとされる比濁法を用いた血小板凝集能検査は血小板減少患者においては信頼できるデータが得られない。我々は FCM を用いることにより血小板減少患者における血小板機能測定法を確立し、ITP 患者における血小板機能の評価を行い、TPO 受容体作動薬による血小板機能への直接的な影響は認められなかった。

## Upshaw-Schulman 症候群における維持透析患者の臨床的特徴と予後

奈良県立医科大学輸血部 松本雅則、藤村吉博

国立循環器病センター研究所 小亀浩市、宮田敏行

近大奈良病院 血液内科 八木秀男

後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) において認められる腎機能障害は比較的軽く、多くの症例では寛解後に回復する。しかし、先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群 : USS) では、慢性腎不全となり維持透析が導入されている症例が散見される。今回、USS で維持透析患者を受けている症例の臨床的特徴と予後について解析した。

2014 年 12 月までに奈良医大で集積した TMA (血栓性微小血管症) 1323 例の中に USS を 57 例同定した。15 歳未満に診断された小児発症が 30 例 (男性 15 例、女性 15 例)、15 歳以上で診断された成人発症が 27 例 (男性 8 例、女性 19 例) であった。遺伝子解析が 55 例で実施され、ホモ接合体性異常 10 例、ヘテロ接合体性異常 43 例で、2 例では 2 つの遺伝子異常が同定できなかった。ADAMTS13 遺伝子異常で、最も頻度が高いのが p. C908Y で、10 例に発見された (1 例はホモ接合体)。57 例中 8 例で死亡を確認したが、そのうち 5 例が維持透析患者であった。

USS 57 例中 6 例が維持透析を受けていた。急性腎不全による短期の透析は除外した。6 例は全例男性で、新生児期に重症黄疸で交換輸血を受けている症例は 1 例も存在しなかった。ADAMTS13 遺伝子解析の結果、3 例で p. C908Y がヘテロで同定され、最も頻度が高かった。6 例中 4 例で血清補体値が測定されていたが、3 例で C3 低値、C4 正常と補体第二経路の活性化が予想された。6 例のうち、5 例が 38 才から 67 才で死亡していた。死亡した 3 例は透析歴 15, 16, 19 年と長期であったが、2 例は 6 ヶ月、4 年と比較的短期の透析歴で死亡していた。

USS の維持透析患者は、全例男性であり、新生児期の重症黄疸を認めないという特徴があった。また、ADAMTS13 の遺伝子異常として p. C908Y が多い傾向が認められた。USS 患者 57 例で死亡した 8 例のうち、5 例が維持透析患者であり、慢性腎不全への進展を予防することが USS の予後改善に重要であることが示唆された。

## PRESS が疑われた血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の一例

三重大学検査医学 和田英夫

TTP の精神神経症状は微小血栓によるものと考えられてきたが、可逆性脳血管攣縮症候群 (Reversible Cerebral Vasoconstriction Syndrome: RCVS ) や可逆性白質脳症 (posterior reversible encephalopathy syndrome; PRES) など、血管攣縮によって起こっている可能性も示唆されている。今回、MRI にて経過観察できた TTP 症例を紹介して、TTP の臨床症状と血管攣縮の関係を考察する。

67 歳 男性で、主訴は四肢脱力である。200X 年 2 月 1 日の朝から主訴あり、近医受診し TIA の診断で経過観察入院となる。2 月 3 日となり麻痺の進行が認められたため当院脳神経外科紹介となるも、来院時の血液検査で高度な血小板減少認められたため、当科紹介となる。

Hb 7.2g/dl、PLT 5.000/ $\mu$ l、LDH 1033 IU/L、T-Bil 1.4g/dl、クレアチニン 2.0 mg/dl、ハプトグロブリン 測定感度以下、ADAMTS13 測定感度以下により、TTP と診断され、血漿交換ならびにステロイドの投与により、神経症状は徐々に改善した。発表において、MRI 所見を供覧する。

ADAMTS13 遺伝子解析によって確定診断された  
ADAMTS13 インヒビター陰性の後天性 TTP

国立循環器病研究センター分子病態部 小亀浩市・宮田敏行  
奈良県立医科大学輸血部 石西綾美・松本雅則  
京都大学附属病院神経内科 三橋賢大

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は ADAMTS13 活性著減によって診断されるが、ADAMTS13 に対するインヒビターが陽性の場合に後天性、陰性の場合に先天性（Upshaw-Schulman 症候群：USS）に分類される。しかし、ADAMTS13 自己抗体がインヒビター活性を持たない場合（binding 抗体）があり、先天性と後天性の鑑別が困難な場合がある。今回、複数回の検査で ADAMTS13 活性陰性、インヒビター陰性であったが、血漿中の ADAMTS13 抗原が陽性であり、最終的に ADAMTS13 遺伝子解析で後天性と診断した症例を報告する。

症例は 65 才の男性で、2～3 年前から歩行障害があり Parkinsonism が疑われていた。今回、意識障害、左眼瞼下垂などが出現し脳梗塞を疑われ、神経内科へ入院となった。入院時検査所見 Hb 12.2 g/dL、Plt 8,000/uL、LDH 1,216 IU/L などから TTP を疑い、FFP 8 単位を 3 日間輸注され、血小板は速やかに回復した。入院時の ADAMTS13 活性 <0.5%、同インヒビター <0.5 BU/mL の結果と合わせ USS が強く疑われた。入院 2 週間後の検査で ADAMTS13 活性著減のままであったが、インヒビター 1.3 BU/mL のため、ウエスタンブロットにて血漿 ADAMTS13 抗原を確認したところ、健常人以上の抗原量を認めた。しかし、その後 2 回の検査では活性著減、インヒビター陰性であったため、binding 抗体陽性の後天性 TTP、もしくは ADAMTS13 抗原としては存在するが活性を持たない USS という二つの可能性を考え、ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。ダイレクト PCR 法で ADAMTS13 遺伝子の全エクソン領域をシーケンシングした結果、5ヶ所のヘテロ接合性 1 塩基置換が見つかった。うち 1ヶ所は高頻度に見られる p. Q448E 多型であり、残り 4ヶ所はサイレント置換であった。したがって、この患者の ADAMTS13 遺伝子には ADAMTS13 活性に影響を及ぼす変異はないと考えられた。

現在のところ、この症例は binding 抗体陽性の後天性 TTP と考えているが、一般的にその発症メカニズムは binding 抗体によって血漿中の ADAMTS13 のクリアランスが増大すると考えられており、他の病因が予想される。

先天性プロテイン S 欠損症 6 症例の遺伝子解析および  
変異型プロテイン S 蛋白の機能解析

金沢大学大学院医薬保健学総合研究科病態検査学 森下 英理子・關谷 暁子

血液凝固阻止因子であるプロテイン S (PS) の先天性欠損症は青壮年期より高頻度に主として静脈系の血栓症を発症する。今回、先天性 PS 欠損症と診断された 6 家系の遺伝子解析を施行し、*PROS1* 遺伝子内に 5 つのミスセンス変異 c.757C>T (Ala139Val; A139V)、c.1346 G>T (Cys449Phe; C449F)、c.1352G>A (Arg451Gln; R451Q)、c.1424G>T (Cys475Phe; C475F)、c.1574C>T (Ala525Val; A525V) と 1 つのフレームシフト変異 c.2135delA (Asp599ThrfsX12; D599TfsX12) を同定した。なお、C449F、R451Q、A525V、D599TfsX12 は新規の変異であった。

各変異が PS 欠損症をもたらす機序を解明するため、変異型蛋白を作製し機能解析を行った。ELISA 法による培養上清中の PS 抗原量測定の結果、A139V 変異型は野生型と同等であったが、その他の変異型は野性型と比較して減少していた。パルスチェイス解析の結果、A139V 変異型では野生型と同程度の分泌がみられたのに対し、他の変異型は細胞外へ分泌されず 6 時間後までにほとんどが細胞内で分解されていることが確認された。さらにプロテアソーム阻害剤 (ラクタシスチンおよび MG-132) を用いたパルスチェイス解析の結果、変異型蛋白の細胞内分解は抑制されていた。A139V 変異型の活性は野生型の 71% に低下しており、リン脂質結合能は 45% まで低下していた。以上の結果より、A139V 変異型は分泌は正常であるが、リン脂質結合能に異常があるため PS 活性が低下する II 型 PS 欠損症を引き起こす可能性が示唆された。また他の変異型はアミノ酸変異に起因するミスフォールディングにより、ほとんどの PS が細胞内で分解されるため I 型 PS 欠損症を引き起こすと考えられた。

## 血栓性素因の調査研究：先天性アンチトロンビン欠損症の遺伝子異常解析

名古屋大学大学院医学系研究科 小嶋哲人

【はじめに】これまで、我々は本研究班にて先天性血栓性素因の原因となるアンチトロンビン (AT) プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) 欠損症の遺伝子解析、さらに新たな先天性血栓性素因・アンチトロンビンレジスタンス (ATR) の遺伝子解析・検出検査法開発を報告してきた。今回、先天性 AT 欠損症を疑われた血栓症家系において AT 遺伝子 (*SERPINC1*) 変異解析を実施し、通常のダイレクトシーケンス法で異常を同定できない遺伝子大欠失でその breakpoint を同定したので報告する。

【方法】症例のゲノム遺伝子を用い、*SERPINC1* の全エクソンをそのイントロンとの境界領域を含めて PCR 増幅後、直接シーケンス法により塩基配列を解析、さらに MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法にて解析した。MLPA 法にて遺伝子欠失が示唆された *SERPINC1* 周辺領域において、ダイレクトシーケンスによる SNP 解析ならびに real-time PCR による遺伝子コピー数測定により欠失範囲を推定し、その後 Long-PCR にて変異増幅産物のシーケンスにて大規模欠失の breakpoint を同定した。なお、本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとに行った。

【結果および考察】各エクソン PCR 産物のダイレクトシーケンス法では AT 欠損症を発症し得る変異を認めず、MLPA 法にて *SERPINC1* エクソン 7 欠失が示唆され、最終的に *SERPINC1* イントロン 6 からその下流 35kb におよぶ大規模欠失の breakpoint を同定した。breakpoint には 7-bp の挿入が存在し、これを含む 9-bp と同一の配列を、breakpoint から約 1 kb 下流の位置に認めた。この遺伝子再構成異常は、DNA 複製過程の異常・FoSTeS モデルによって説明が可能であった。

【結論】先天性 AT 欠損症が疑われた症例において、*SERPINC1* の PCR ダイレクトシーケンス解析で検出不能な比較的大きな欠失変異解析には MLPA 法が有効であった。最終的に *SERPINC1* エクソン 7 を含む大規模欠失を認め、さらに 7-bp の挿入をもつ複雑な遺伝子再構成異常を同定した。

日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテイン S K196E 変異の  
ELISA 法の測定精度評価

国立循環器病センター 分子病態部 宮田敏行、丸山慶子、秋山正志、小亀浩市  
金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査学 關谷暁子、森下英理子

プロテイン S (PS) K196E 変異 (PS Tokushima) は日本人の血栓性素因のひとつである。PS K196E 変異は、日本人の約 55 人に 1 人の頻度で存在する。現在用いられている PS 活性測定法では、健常者の PS 活性値と変異保有者の PS 活性値の分布が大きくオーバーラップするため、PS K196E 変異をスクリーニングすることは難しい。そこで昨年、血漿検体を用いて PS K196E 変異を同定する ELISA 法を開発した。本研究では、本測定法の測定精度評価 (同時再現性試験、日差再現性試験、添加回収試験および希釈直線性試験) および血漿 100 検体 (変異保有者 3 名、野生型 97 名) を追加し、合計 133 検体 (変異保有者 11 名、野生型 121 名) の測定を行った。

3 名の変異保有者血漿を用いて行った同時再現性および日差再現性試験の変動係数は、それぞれ 1.4~3.1% および 8.1~14.7% であった。リコンビナント PS-K196E 変異体を用いた添加回収試験での回収率は 95~106% と良好な結果であった。リコンビナント PS-K196E 変異体の倍々希釈 (0-2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) により良好な直線性を示した ( $R^2=0.99-1.00$ )。また、血漿 133 検体を測定した結果、野生型の吸光度はすべて 0.1 未満であったが、変異保有者の吸光度は 0.3~1.0 と明らかに高い値を示し、全ての検体で変異を同定できた。以上の結果より、本測定法の測定精度は良好であり、本邦における血栓症診療に有用であると考えられる。

先天性プロテイン S 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する  
診療ガイドラインの策定

研究分担者：浜松医療センター 院長 小林 隆夫  
研究協力者：浜松医科大学健康社会医学講座教授 尾島 俊之  
浜松医科大学健康社会医学講座 杉浦 和子

経口避妊薬（エストロゲンとプロゲステンの合剤：combined oral contraceptives；COCs）に関連した静脈血栓塞栓症（venous thromboembolism：VTE）の報告は海外では多いものの日本人における VTE の実態は不明である。この実態調査としてわれわれは 2 つの研究を行っている。一つは「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」、もう一つは「PMDA のデータベースを用いた日本における経口避妊薬の副作用としての血栓塞栓症」である。結果の解析は終了していないので詳細は今後の解析を待たなければならないが、班会議では現時点での解析結果を報告する。

なお、月経困難症の治療薬である LEP（low-dose estrogen progestin）製剤服用中に発症した肺塞栓症（PE）症例に関して興味深い 2 例を紹介する。活性化プロテイン C 感受性比（APC-sr）とプロテイン S（PS）比活性に関しては、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」で得られた結果から、血栓症の予知マーカーとして有用との結論を得ている。

【症例 1】：20 歳代後半、医師、BMI=21.8、リスク因子なし

発症（診断）日：平成××年 12 月 26 日、診断名：PE（観戦初日から歩くと息切れがした）＋総腸骨静脈血栓症、LEP 服用歴：平成××年 8 月 8 日～同年 12 月 26 日（約 5 か月）、誘因：スポーツ観戦 3 日間（5 時間以上水分控え、トイレに行かず座って観戦）、診断に至る経緯：定期検査で、D ダイマーが  $12\mu\text{g/mL}$  と上昇していたため、CT 検査を行い診断、治療：ヘパリン、ワルファリンにて治癒、血栓症予知検査：APC-sr 3.15（高値）、PS 活性 80%（正常）、PS 比活性 0.87（正常）

【症例 2】：10 歳代後半、高校生、BMI=19.6、リスク因子なし

発症（診断）日：平成××年 2 月 21 日、診断名：PE（急性、右心負荷、呼吸困難。ただし、DVT 症状はなし）、LEP 服用歴：平成××年 11 月 15 日～平成××年 2 月 21 日（約 3 か月）、誘因：受験勉強（1 日 10 時間、水分摂取は食事の際のみ、トイレに行くとき以外は座位）、診断に至る経緯：駅のエレベーター内で呼吸困難と胸痛を来し、救急搬送。治療：ヘパリン、ワルファリンにて治癒

血栓症予知検査：APC-sr 4.48（高値）、PS 活性 13%（極低値）、PS 比活性 0.14（極低値）

平成 26 年度は今回の研究の初年度であり、十分な結果が得られていない。しかし、血栓症の有用な予知マーカーである APC-sr および PS 比活性 の測定が、妊娠中や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に資する可能性があり、さらには PS 欠乏症等の血栓性素因を有する場合は、極めて有用である可能性を秘めている。今後は蓄積されたデータの解析をはじめ適切な予知方法を盛り込んだ診療ガイドラインの策定を行いたい。

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業

血液凝固異常症等に関する研究班

第 2 回班会議

日時：平成 28 年 1 月 22 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 2 号館 11 階中会議室

プログラム・抄録集

研究代表者 村田 満

## 血液凝固異常症等に関する研究班 第2回班会議プログラム

日時：平成28年1月22日（金）午前10時～午後5時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 2号館11階中会議室

10：00～ 研究代表者 挨拶 村田 満

10：10～ 国立保健医療科学院 武村 真治 様

10：20～ **I T P研究班** 研究計画 富山 佳昭

サブグループリーダー：富山 佳昭 大阪大学医学部

研究分担者：桑名 正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科

羽藤 高明 愛媛大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

研究協力者：

藤村 欣吾 安田女子大学／倉田 義之 千里金蘭大学

柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科／高蓋 寿朗 呉医療センター

宮川 義隆 埼玉医科大学医学部

10：40～ **T T P研究班** 研究計画 松本 雅則

サブグループリーダー：松本 雅則 奈良県立医科大学

研究分担者：和田 英夫 三重大学医学部

宮川 義隆 埼玉医科大学医学部

小亀 浩市 国立循環器病研究センター

研究協力者：

藤村 吉博 奈良県立医科大学／森木 隆典 慶應義塾大学医学部

日笠 聡 兵庫医科大学血液内科／上田 恭典 倉敷中央病院

八木 秀男 近畿大学奈良病院血液内科

11：00～ **特発性血栓症研究班** 研究計画 森下 英理子

サブグループリーダー：森下 英理子 金沢大学大学院医学系研究科病態検査学

研究分担者：小嶋 哲人 名古屋大学医学部

宮田 敏行 国立循環器病研究センター

小林 隆夫 浜松医療センター

研究協力者：

坂田 洋一 自治医科大学／津田 博子 中村学園大学大学院栄養科学研究科

横山 健次 東海大学医学部附属八王子病院／中村 真潮 村瀬病院

榛沢 和彦 新潟大学教育研究院／尾島 俊之 浜松医科大学

杉浦 和子 浜松医科大学／根木 玲子 国立循環器病研究センター

關谷 暁子 金沢大学大学院医学系研究科病態検査学

11:20～12:20 各グループミーティング

12:20～13:00 昼食

13:00～14:00

**特発性血栓症班研究報告：司会 森下 英理子**

森下英理子 「アンチトロンビン抵抗性およびフィブリノゲン活性化低下により

無症状を示した先天性プロトロンビン異常症 (Prothrombin Himi) の機能解析」

小嶋哲人 「血栓性素因の調査研究:先天性 AT 欠損症の遺伝子解析」

宮田敏行 「日本人の静脈血栓塞栓症のリスクであるプロテイン S-K196E 変異の酵素学的解析」

小林隆夫 「先天性プロテイン S 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する

診療ガイドラインの策定」

14:00～15:15

**TTP 班研究報告：司会 松本 雅則**

松本雅則 「血小板輸血は後天性 TTP の予後を悪化させるか？」

和田英夫 「TMA と DIC の鑑別ならびに aHUS の鑑別」

小亀浩市 「先天性 TTP 疑い患者 3 家系の ADAMTS13 遺伝子解析」

宮川義隆 「後天性 TTP に対するリツキシマブの第 II 相医師主導治験」

15:15～15:30 休憩

15:30～16:15

**ITP 班研究報告：司会 富山 佳昭**

羽藤高明 「臨床調査個人票集計による ITP の全国疫学調査」

桑名正隆 「抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出法の実用化に向けた試み」

柏木浩和 「ITP 診断における網状血小板比率 (RP%) および幼若血小板比率 (IPF%) の有用性  
および ITP 治療における血小板機能測定の意義に関する検討」

**終了**

---

平成 27 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業

血液凝固異常症等に関する研究班 研究代表者：村田 満

事務局：慶應義塾大学医学部臨床検査医学 富田ゆかり・佐野有果

村田教授室 Tel: 03-5363-3838

# サブグループ研究