

# グループ研究報告書

## IITP（特発性血小板減少性紫斑病）サブグループ研究報告

グループリーダー：富山佳昭 大阪大学医学部附属病院 病院教授  
班員：桑名正隆 日本医科大学 教授  
羽藤高明 愛媛大学医学部附属病院 病院教授  
村田 満 慶應義塾大学医学部 教授

研究協力者：藤村欣吾 安田女子大学 教授  
倉田義之 千里金襴大学  
高蓋寿朗 国立病院機構呉医療センター 科長  
柏木浩和 大阪大学大学院医学系研究科 講師  
宮川義隆 埼玉医科大学 教授

特別協力者（疫学班）：杉田 稔 東邦大学医学部衛生学  
島田直樹 国際医療福祉大学

## グループ総括

分担研究者：富山 佳昭

### 研究要旨

ITP に関して、1) 疫学調査、2) 治療の標準化（特に ITP 治療の参照ガイドの作成および改訂）、3) ITP 診断法の標準化と病態解析を基盤とした新規診断法の検討、を中核としてグループ研究および個別研究を行った。疫学研究は臨床個人調査表を基に平成 25 年度の本邦における ITP の実態を調査把握した。平成 25 年度においても発症年齢、更新年齢とも中高年の男女に最も多い事が確認された。本研究班にて作成した「妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド」は、血液内科医以外の診療科の医師も参照できるようにフリーアクセスとした。さらに執筆活動や講演により、その啓蒙に努めた。医師主導型治験として行った ITP に対するリツキシマブ療法に関して、論文発表を行った。また、平成 27 年 1 月より新たに施行された指定難病医療費助成制度における、ITP の臨床個人調査表の改訂、重症度分類の設定を行った。個人研究では、診断に関して、引き続き検査の標準化を検討し、IPF%の測定法に関してその保険収載に向けての基礎的検討、血小板抗体測定法である ELISPOT 法の検討、血小板減少時の機能検査法の検討を行った。

#### A . 研究目的

ITP は特定疾患治療研究事業の対象疾患であり、本研究班では本疾患の疫学を初めとして、その診断ならびに治療法を向上させることは急務の課題であることを常に念頭おいている。この目的のために、本研究班では ITP に関して、1) 疫学調査、2) 治療の標準化（特に ITP 治療の参照ガイドの作成および改訂）、3) ITP 診断法の標準化と病態解析を基盤とした新規診断法の検討、などを目的として検討してきた。

まず特定疾患治療研究事業の対象疾患であることから、ITP の臨床疫学的研究を経年的に行い最近の ITP の臨床実態を明らかにする。治療に関しては治療プロトコルを履行するに当たり保険医療上の制約を克服すると共に、本疾患の治療の

標準化をめざし「成人 ITP 治療の参照ガイド」、「妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド」の作成および公開を行ってきた。本年度は、これらの参照ガイドのさらなる啓発および ITP に対するリツキシマブ療法の論文発表、ITP に関する新たな診断法としての IPF%の測定、ELISPOT 法の検討を行った。

#### B . 研究方法

1 . 疫学研究に関しては特定疾患治療研究事業の対象疾患にともなって毎年行われる ITP 臨床個人調査表を基に、新規発症症例数、更新症例数、発症年齢、性、分布、さらには罹病期間、治療内容、合併症、現在の QOL,等を解析した。さらに ITP 臨床個人調査表の改訂作業を計画した。

2. 治療の標準化に関しては、「成人 ITP 治療の参照ガイド」、「妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド」の公開と啓発に努めた

3. ITP 診断法の標準化と病態解析を基盤とした新規診断法の検討、(個別研究)

ITP の補助診断法として、網状血小板比率(RP%)を提唱しているが、日常診療にて利用できる幼若血小板比率(IPF%)の感度、特異度を検証した。血小板減少状態での血小板機能解析法の検討、抗血小板抗体検出法である ELISPOT 法のさらなる標準化の検討を行った。

#### (倫理面への配慮)

臨床研究に関しては、当該施設の臨床研究倫理審査委員会での承認を得たのち、インフォームドコンセントを得て施行した。また、一部研究では、残余検体を用いた。

## C. 研究結果

### 1. ITP の疫学研究 (羽藤班員、倉田研究協力者、島田研究協力者)

#### 1) 登録症例数

平成 15 年から開始し本年は平成 25 年度をまとめることが出来た。平成 25 年度の ITP 医療受給者証所持患者は 24,956 人であり、過去 5 年間ほぼ同数であった。今年度解析可能であった臨床調査個人票は 13,126 人分 (53%) であり、新規患者数は 2,071 人、更新患者数は 11,055 人であった。

#### 2) 年齢分布

発症年齢分布についてはここ 5 年間変化なく、ITP は中高年齢者に多い疾患であることが定着している。新規急性型・新規慢性型では男女とも 65-80 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 61-80 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 2.29 倍であった。

#### 3) 出血症状

新規急性型では紫斑を 79.3%、下血を 8.1%、脳出血を 1.4%の症例において認められた。下血と脳出血は 60 歳以上で血小板数 1 万未満の患者に多かった。

#### 4) 血小板数

新規急性型は血小板数 5 万未満の患者が 98.6%と大多数を占めていたが、治療が行われた慢性更新症例では 45%であり、19.2%が血小板数 2 万未満にとどまっていた。

#### 5) 特殊検査

骨髄穿刺は 90%と高い実施率であった。網状血小板は近年増加傾向にあり、20%に実施されていた。網状血小板数の中央値は 13.4%であり、増加していた。

#### 6) 治療

新規急性型ではプレドニゾン治療が 83%の症例において選択されていた。次いで大量 IgG 療法 30%、ピロリ除菌 29%の順であった。また新規慢性型においてはプレドニゾン治療が 58%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、急激に使用例が増加していたが、今回は慢性更新型の 12%と前年度とほぼ同じ程度であった。脾摘は慢性更新型の 14%で行われていた。

## 7) 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148例(1.5%)が発症しており、脳出血を発症した51例(0.5%)よりも多かった。

臨床調査表に基づく疫学研究の問題点はすべての都道府県からのデータが含まれていないことである。実際、今年度の回収率は53%と低かった。これらの欠損データを補うために、人口統計から補正を行い本邦の推定データとしている。従って発症例数が年によって変動するのは欠損データの数に関係している可能性もある。いずれにしてもより多くの都道府県に協力していただきより正確な傾向を把握したい。さらに、この調査表は基本的には治療が必要となるITP患者の実数の把握という理解である。

## 8) 個人調査表の改訂作業

国際的見地からすると、最近ITP国際作業部会において本疾患の呼称や、急性および慢性ITPの定義の見直しが提唱された。ITPは、血小板減少が6ヵ月以内に寛解する急性ITPと6ヵ月以上持続する慢性ITPに分類されている。しかしながら急性との表現は、その曖昧さと6ヵ月経過後にレトロスペクティブに診断されるという理由により、その使用は好ましくないと判断された。ITPがどのぐらいの期間持続するかを予測するマーカーが無いため、新規のITPはすべてnewly diagnosed ITPと表記する。また新たなカテゴリーとして血小板減少が3ヵ月~12ヵ月持続する場合は、persistent ITPと表記する。この範疇には自然寛解しなかった

症例や治療を止めた後に血小板が減少した症例も含む。Persistent ITPでは自然寛解する可能性がまだ残っていると考えられる。そのため摘脾などのより強力な治療法はpersistent ITPに関しては延期しても良いとの意見である。また、この期間設定によりchronic ITPは12ヶ月以上持続する場合、としている。研究班として、これらの国際的な動向を考慮し、さらに臨床医に対して調査票記入の労力を軽減すべくより簡便に記載できるように配慮し、個人調査表の改訂案を作成した。

さらに今年度は、臨床調査個人表に関して、今までは新規例と更新例の様式が別様式であったが、それを一つ様式に統一する作業を行った。

## 2. ITP治療の参照ガイドと妊娠合併ITP管理の参照ガイド(富山班員、桑名班員、村田班長、藤村研究協力者、倉田研究協力者、宮川研究協力者、高蓋研究協力者、柏木研究協力者)

研究班では、司法においても用いられる可能性のある拘束性の強いメッセージではなく、拘束性を若干弱めた形での治療の参照ガイドを作成し「臨床血液」誌(53巻4号:433-442, 2012; 2012年4月)に掲載し公開した。妊娠合併ITPに関しても、班会議の枠を超え、産科、小児科、麻酔科の専門家も参画し専門家のコンセンサスの形で診療の参照ガイドを作成し、「臨床血液」誌に掲載した(妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド. 臨床血液 55:934-947, 2014)。これらの成果はすべてオープンアクセス化している。

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/53/4/53\\_433/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/53/4/53_433/_article/-char/ja/)

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/58/55\\_934/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/58/55_934/_article/-char/ja/)

本研究班では、「参照ガイド」との名称を意識して使用しているが、その理由としては、エビデンスレベルが高くなく専門家のコンセンサスにて作成していること、ITP に用いられている薬剤に関して保険適用が無い薬剤が多いこと、があげられ、あくまで標準的な目安を提示している。個別の症例に対しては、個々に存在する状況を鑑み、総合的に診療を行うべきである。

#### 4. 個人研究

##### 1) ITP 診断における IPF% 測定の有用性 (富山班員、柏木研究協力者)

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。本研究班では 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。そのため、ITP の診断法としての保険収載は困難である。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、XN-1000 を用いた %IPF の有用性に関する検討を行った。その結果、ITP 診断における感度、特異度は XE-2100 ではそれぞれ 83.0% および 75.0% であったが、XN-1000 では 85.1% と 89.3%、RP% (FCM 法) では 93.6% と 89.3% であり、XN-1000 において良好な結果が得られた。さらに夜間発作性血色素尿症患者 16 名の検体を用いて、溶血による影響を検討したが、XE-2100 では赤血球フラグメントの影響を受け 16 例中 6 例で IPF% が高値を示したが、XN-1000 では高値を示した例は 0 例、RP% では 2 例であった。このように XE-2100 にくらべ XN-1000 では赤血球フラグメントによる影響はほとんど見られなかった。

##### 2) 血小板減少状態での血小板機能解析法の検討 (富山班員、柏木研究協力者)

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)は抗血小板自己抗体による血小板破壊および産生障害に基づく血小板減少がその主たる病態であるが、自己抗体の結合部位によっては血小板機能が障害され、出血症状を増悪させる可能性がある。しかしながら血小板減少患者の血小板機能を把握することは従来の血小板機能検査では困難であった。本研究ではフローサイトメト

リーを用いた血小板機能の多角的な評価方法を確立し、ITP 患者における血小板機能の評価を行った。

FCA 法を用いることにより、血小板数 2-3 万程度の血小板減少患者においても、経時的に PMA, ADP, PAR1p およびコラーゲン刺激後の血小板凝集能を検討することが可能となった。ITP の一例においては FCA 法および PAC1, CD62P 発現を検討し、血小板機能が軽度に障害されていることが示唆された。

### 3) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出法の実用化に向けた試み (桑名班員)

本年度は、昨年引き続きキット化に成功している抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT、MBL 社) を体外診断薬としての質を高めることを目的とした。具体的には、体外診断用医薬品として申請するためのロードマップを医薬品医療機器総合機構による体外診断用医薬品の承認申請に係わる関連通知 (<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/taigai.html>) に照らし合わせて立案した。その中で必要な改善点を検討し、キット仕様の確定、較正用基準物質の設定、品質管理の確立、測定範囲の決定の 4 項目に絞り込んだ。さらに、主にキットに添付する陽性・陰性コントロールを設定することでキット仕様を確定した。そこで、本年度は次のステップとして較正用基準物質の設定を目指した検討を行った。

具体的には、較正用基準物質としてヒト型抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する細胞が必要である。そのため、ヒト GPIIb/IIIa

と反応するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (#33 株) から IgG 遺伝子を分離し、Fc 領域をコードする部分をヒト IgG-Fc に置換したキメラ型抗体をコードする遺伝子を作成して CHO 細胞に導入した。遺伝子導入した CHO 細胞 (#33 キメラ株) は上清中にキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体を持続的に産生することを確認した。CHO 細胞は付着細胞であったため、無血清培地での継代培養を繰り返すことで、B 細胞と同様の浮遊細胞への変換に成功した。そこで、#33 キメラ株が ELISPOT における較正用基準物質として使用できるかを ITP-ELISPOT キットを用いて検証した。#33 キメラ株および #33 株 (12.5、25、50 個/ウェル) を GPIIb/IIIa 抗原が固相化された膜上で 4 時間培養し、細胞成分を除去後に 2 次抗体 (酵素標識抗ヒト IgG または抗マウス IgG) を添加し、さらに基質を加えることで発色した。#33 キメラ株、#33 株両者でスポットが観察され、スポット数は培養に加えた細胞数が増えるに従って増加した ( $R^2 = 0.99, 0.98$ )。#33 キメラ株では #33 株に比べてスポットが大きく判別が容易で、培養に添加した細胞数とほぼ同数のスポットが得られた。したがって、#33 キメラ株は較正用基準物質として使用可能であった。また、対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するキメラ型抗体を産生する CHO 細胞も作成した。

今後は昨年度立案した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として承認申請するためのロードマップに従って、ITP 患者や健常人末梢血などヒト検体を用いて至適な測定条件 (検

体量、保存安定性、抗凝固薬の影響など) やカットオフを設定する必要がある。また、平成 28 年度末までにカットオフの設定と同時に試薬の最終仕様を確定する。さらに、キットの構成が確定した平成 29 年度以降に多施設での臨床性能試験を施設する予定である。

## D . 考案

ITP の診療は、近年大きく変化している。妊娠合併 ITP の診療の標準化では、班会議の枠を超え、小児科、産科、麻酔科のエキスパートと妊娠合併 ITP 治療の参照ガイドを作成した。さらに新たに ITP に対するリツキシマブの医師主導型治験の成績も発表した。リツキシマブの保険収載はいまだ未定であるが、保険収載にむけて努力するとともに、保険収載になれば ITP 診療の参照ガイド改訂も計画している。

今後も、研究班として確実に成果をあげ正しい情報を発信していく予定である。

## E . 結論

ITP の現状把握し、問題点を早期把握すると共に、新たな薬剤に関してその適正使用を含めた情報発信が急務であり、今後の課題として継続して取り組む予定である。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

1) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M,

Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 101(4): 369-375, 2015.

2) Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T, Nomura S, Nishiwaki K, Tomiyama Y, Higashihara M, Shirasugi Y, Nishikawa M, Ozaki K, Abe T, Kikuchi K, Kanakura Y, Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S. Efficacy and safety of rituximab in Japanese patients with relapsed chronic immune thrombocytopenia refractory to conventional therapy. *Int J Hematol* 102:654-661, 2015

3) Kato H, Nakayama T, Uruma M, Okuyama Y, Handa M, Tomiyama Y, Shimodaira S, Takamoto S. A retrospective observational study to assess adverse transfusion reactions of patients with and without prior transfusion history. *Vox Sang*. 108:243-50, 2015.

4) Kato H, Nakayama T, Uruma M, Okuyama Y, Handa M, Tomiyama Y, Shimodaira S, Takamoto S. Repeated exposure rather than the total volume of transfused components may influence the incidence of allergic transfusion reactions. *Transfusion* 55(11):2578-2581, 2015.

5) Kuwana M. What do we learn from

- immunomodulation in patients with immune thrombocytopenia? **Semin Hematol**. In press.
- 6) Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, Niiya T, Nakamura H, Yasukawa M: A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia. **Ann Hematol** 94:1599-1600, 2015
- 7) Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. **Blood Coagul Fibrin** (in press)
- 8) Nishime C, Kawai K, Yamamoto T, Katano I, Monnai M, Goda N, Mizushima T, Suemizu H, Nakamura M, Murata M, Suematsu M and Wakui M: Innate Response to Human Cancer Cells with or without IL-2 Receptor Common  $\gamma$ -Chain Function in NOD Background Mice Lacking Adaptive Immunity. **J Immunol** 195(4):1883-1890, 2015
- 9) Noguchi K, Morishima Y, Takahashi S, Ishihara H, Shibano T, Murata M: Impact of nonsynonymous mutations of factor X on the functions of factor X and anticoagulant activity of edoxaban. **Blood Coagul Fibrinolysis** 26(2): 117-122, 2015
- 10) 柏木浩和、富山佳昭. ITP の病態と治療の進歩. **臨床血液** 56:177-184, 2015
- 11) 富山佳昭. 成人の紫斑・出血傾向. **今日の診断指針(第7版)** 金沢一郎、永井良三総編集, 医学書院, 東京, 2015, pp54-57
- 12) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **止血・血栓ハンドブック**(鈴木重統、後藤信哉、松野一彦編), 西村書店, 東京, 2015, pp168-175
- 13) 富山佳昭. 脾摘. **血液専門医テキスト**(改訂第2版)(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp108-110
- 14) 富山佳昭. 血管障害による出血性疾患:血管性紫斑病. **血液専門医テキスト**(改訂第2版)(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp371-373
- 15) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **血液専門医テキスト**(改訂第2版)(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp374-377
- 16) 富山佳昭. 血小板減少の分子機構. **Thrombosis Medicine** 5:34-40, 2015
- 17) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **最新ガイドライン準拠 血液疾患 診断・治療指針**(金倉 謙編), 中山書店, 東京, 2015, pp498-504
- 18) 富山佳昭. 妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド. **血液内科** 71:529-534, 2015
- 19) 富山佳昭. IgA 血管炎(旧名称:アレルギー性紫斑病). **診療の手引きと臨床データ集 血液疾患診療ハンドブック 改訂3版**(吉田彌太郎編), 医薬ジャーナル社, 大阪, 2015, pp558-564
- 20) 羽藤高明. 最新の静脈血栓形成機序から治療を考える **静脈学** 26:1-8, 2015

- 21) 羽藤高明. 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2015-2016 PP127-133, 2015 南江堂 東京
- 22) 羽藤高明. H L A 検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp134-139, 2015 南江堂 東京
- 23) 岡田陽子、加藤丈陽、山下泰治、越智雅之、永井勅久、越智博文、伊賀瀬道也、羽藤高明、小原克彦. Crescendo TIA を呈した JAK2 陽性本態性血小板血症の1例 脳卒中 37:36-40, 2015
- 24) 羽藤高明. 第9回日本血栓止血学会標準化委員会シンポジウム血小板部会報告 日本血栓止血学会誌 26:470-471, 2015
- 25) 藤森祐多、片桐尚子、涌井昌俊、清水長子、阪田敏幸、三ツ橋雄之、村田満. トロンピン力価の異なるフィブリノゲン測定試薬を用いた直接トロンピン阻害薬モニタリングの基礎的検討. 日本検査血液学会雑誌 16(3): 247-252, 2015
- 26) 谷田部陽子、村田満. 血小板数と血小板形態. 臨床検査. 59(2): 173-179, 2015
- 27) 村田満. 日本人の一次予防におけるアスピリンの位置づけ: JPPP の経験から. Pharma Medica 33(5): 17-20, 2015
- 28) 村田満. 血栓症研究のブレイクスルー. International Review of Thrombosis. 10(2): 24, 2015
- 29) 村田満. 臨床検査の進むべき道. 臨床検査. 60(1): 6-11, 2016

## 2. 学会発表

- 1) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (Oral) Tomiya Y. Immature platelet fraction (IPF) measurement for the diagnosis of ITP
- 2) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (ポスター) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiya Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders.
- 3) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (Oral) Kato H, Nakazawa Y, Kashiwagi H, Tadokoro S, Morikawa Y, Daisuke M, Yumi K, Kanakura Y, Tomiya Y. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CaIDAG-GEFI deficiency

- 4) **5<sup>th</sup> ICIS Expert Meeting. (2015.9. Flueli-Ranft, Switzerland).** Kuwana M: What do we learn from Immunomodulation?.
- 5) **25<sup>th</sup> International Society of Thrombosis and Haemostasis Congress, 2015.6.22 Toronto, Canada** Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M: Association of platelet response to cilostazol with clinical outcome and cyp genotypes in patients with cerebral infarction.
- 6) **The 57<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology 2015.12.7 Orlando, USA:** Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Function of integrin IIb 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation
- 7) **The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada, Schulman S)** Tozawa K, Ono-Uruga Y, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y: Identification of Megakaryocytic Progenitor Cells among Subcutaneous Pre-adipocytes Thrombopoietin.
- 8) **The 57<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology 2015.12.7 Orlando, USA.** Tozawa K, Ono-Uruga Y, Takizawa N, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, and Matsubara Y: Establishment of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cell Lines: A Culture System to Manufacture Megakaryocytes Releasing Functional Platelets
- 9) **第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム(2015.2.28 野村コンファレンスプラザ日本橋, 東京, 羽藤高明)** (口演) 富山佳昭. 「抗血小板薬の分子標的とそのリスクベネフィット」 GPIIb-IIIa 阻害薬
- 10) **第 40 回日本脳卒中学会総会 (2015.3.26-29 リーガロイヤルホテル広島, 広島, 松本昌泰)** (口演) 富山佳昭. 「抗血栓療法 Update」 GPIIb-IIIa 阻害薬の現状と展望
- 11) **第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015.5.28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治)** (口演) 富山佳昭, 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村正, 高 陽淑, 石井博之. 抗 HPA4 b と抗 HPA5 b 抗体を有する NAIT(第一子): 第二子の経過からの考察
- 12) **第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015.5.28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治)** (口演) 櫻木美基子, 林 悟, 丸山美保, 兜森 修, 中山小太郎純友, 細川美香, 中尾まゆみ, 森川珠世, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 加藤 恒, 柏木浩和, 金倉 譲, 富山佳昭. ITP 診断における網状血小板比率測定 of 臨床的意義: FCM 法、自

- 動血球分析装置 XE-2100, および XN-1000 の比較検討
- 13) **第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2015.5.28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治)(口演) 細川美香、中山小太郎純友、櫻木美基子、中尾まゆみ、森川珠世、清川知子、青地 寛、永峰啓丞、和田浩志、丸橋 繁、江口英利、永野浩昭、富山佳昭. ABO 血液型メジャー不適合成人生体肝移植におけるリツキシマブ投与例, 非投与例の抗 A, 抗 B 抗体価の推移と FFP の使用状況
  - 14) **37 回日本血栓止血学会** (2015.05.21-23, 甲府市総合市民会館, 山梨, 尾崎由基男)(口演) 柏木浩和、清水一亘、國島伸司、坂野史明、加藤 恒、森川陽一郎、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉 讓、富山佳昭. IIb 3 活性化変異、IIb(R990W)KI マウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす
  - 15) **第 77 回日本血液学会学術集会** (2015.10.16-28、ホテル金沢、石川、中尾真二)(口演) 加藤 恒、中沢洋三、盛田大介、黒川由美、柏木浩和、森川陽一郎、金倉 讓、富山佳昭. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CaIDAG-GEFI deficiency
  - 16) **第 59 回日本リウマチ学会総会 (名古屋)**. 2015. 4. (**シンポジウム S8-6: SLE の難治性病態**) 桑名正隆: 難治性血液障害-免疫性血小板減少症と血球貧食症候群-
  - 17) **第 37 回日本血栓止血学会学術集会 (山梨)**. 2015. 5. 21. (**学術推進委員会(SPC)シンポジウム 3: 炎症・免疫と血栓を繋ぐ動物モデル**) 桑名正隆: A regulatory T cells-deficient mouse model as a useful tool for evaluating the pathophysiology of human immune thrombocytopenia.
  - 18) **第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015.5.23 甲府** 山之内純、羽藤高明 VASP リン酸化測定によるシロスタゾール薬効判定と脳梗塞再発および CYP 遺伝子多型との関連
  - 19) **平成 27 年第 1 回日本手術医学会教育セミナー 2015.4.11 松山** 羽藤高明 術中大量出血への輸血対応
  - 20) **第 77 回日本血液学会学術集会 2015.10.16 金沢** 山之内純、羽藤高明、中西英元、朝井洋晶、松原悦子、谷本一史、竹内一人、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Effect of calreticulin mutation on the integrin IIb 3 function.
  - 21) **第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015.5.23 甲府** 戸澤圭一、小野-宇留賀友佳子、堀内正、村田満、岡本真一郎、池田康夫、須田年生、松原由美子: ヒト脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導: トランスフェリン/CD71/TP0 分泌機序を介した高効率産生.
  - 22) **第 77 回日本血液学会学術集会 2015.10.16-18 金沢** Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto,

Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara:  
Characterization of MPL in human  
pre-adipocytes and its role in  
megakaryocyte differentiation.

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

### **1 . 特許取得**

該当なし

### **2 . 実用新案登録**

該当なし

### **3 . その他**

該当なし

## 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

研究分担者：富山 佳昭 大阪大学医学部附属病院 輸血部

研究協力者：柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

### 研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病(ITP) 診断において幼若な血小板である網状血小板の測定は有用である。今回、シスメックス社製多項目自動血球分析装置新機種 XN-1000 における幼若血小板分画 (IPF%) 測定の ITP 診断における有用性を、旧機種である XE-2100 および Flow cytometry (FCM)法と比較検討を行ったところ、XN-1000 では FCM 法に匹敵する感度、特異性を得られ、XE-2100 に比べ改善されていることが明らかとなった。また血小板減少患者における血小板機能は通常血小板凝集能検査では評価が困難であったが、FCM を用いることにより血小板機能を検討することが可能となり、ITP 患者では血小板機能が低下している例が多く、またトロンボポエチン受容体作動薬が血小板機能に与える影響は少ないと思われた。

### A . 研究目的

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や骨髓異形性症候群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 (Kurata et al. *Am J Clin Pathol* 2001)。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状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(林ら、*臨床病理* 2009)、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 ITP 症例と、再生不良性貧血あるいは化学療法後の血小板減少患者の IPF%を XE-2100 および XN-1000 を用いて測定し、FCM 法と比較することにより、XN1000 を用いた IPF%の ITP 診断における有用性を検討した。

また 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

することを目標になされるが、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 ( $\alpha$ I**IIb**83) や GPIb-IX 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 ( Kiyomizu et al. *Blood*2012 )。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トロンボポエチン(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った。

## B . 研究方法

1 ) IPF%測定に関する検討 : ITP症例47例 (血小板数 $5.68 \pm 3.38$ 万/ $\mu$ l)、再生不良性貧血 (AA) または化学療法による血小板減少例(CIT)(血小板数 $4.25 \pm 2.75$ 万/ $\mu$ l)、正常コントロール80例において、FCMを用いたRP%測定、XE-2100およびXN-1000を用いたIPF%測定を同一検体を用いて行い、各検査のITP診断における感度および特異度を検討した。また破碎赤血球の影響をみる

ため、発作性夜間血色素尿症(PNH)患者16例においても検討した。

2 ) 血小板機能測定に関する検討 : ITP患者11例、血小板無力症患者2例およびP2Y<sub>12</sub>欠損症患者1例において、FCMを用いて $\alpha$ I**IIb**83の活性化を、PAC1結合、顆粒放出能をCD62P発現、およびFCMを用いた血小板凝集能検査(FCA法)にて、血小板機能測定を行った。

尚、本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を得ており、患者からは研究協力に関し、十分な説明の上で書面による同意書を得ている。

## C . 研究結果

1 ) IPF%測定に関する検討 : FCM法、XE-2100あるいはXN-1000を用いたIPF%測定のいずれにおいてもITP症例では、正常コントロールに比べ有意に増加していた。一方、AAあるいはCIT症例においては、XE-2100では7例が基準値を上回っていたのに対し、XN-1000とFCM法では3例のみであった。この結果、XN-1000では感度・特異度ともにXE-2100よりも良好であり (感度 : XE-2100 83.0%, XN-1000 85.1%, 特異度 : XE-2100 75.0%, XN-1000 89.3%)、XN-1000の特異度はFCM法と同等であった (FCM法 : 感度 93.6%, 特異度 89.3%)。ROC解析においても、XN-1000の精度はFCMと同等であり、XN-1000

はXE-2100よりも測定精度が改善されていると考えられた(AUC: RP%; 0.959, XN-1000; 0.956, XE-2100; 0.863)。

またXE-2100では破碎赤血球などの赤血球粒子の影響を受けやすいことが予想される。PNH症例16例を検討した結果、XE-2100ではIPF%の基準範囲を大きく上回る症例が6例認められたのに対し、XN-1000およびFCM法ではすべての症例は正常範囲内にあり、XN-1000の有用性が認められた。

#### 2) 血小板機能測定に関する検討：

Flow cytometryを用いて、ITP症例における血小板機能の検討を行った。FCA法においては多くのITP患者で、PMA、ADPおよびPAR1刺激に対する凝集反応の低下が認められた。ADPおよびPAR1刺激後のPAC1結合およびCD62P発現も同様に低下傾向を示す症例が多かった。これら血小板機能の低下と抗GPIIb-IIIa抗体の有無あるいはそのエピトープと明らかな相関は認めなかったが、抗GPIIb-IIIa抗体を有する1例においてはアゴニスト刺激後のPAC1結合が著明に障害されており、抗体による直接的なリガンド結合の阻害が関与していると考えられた。またITP症例における血小板機能とTPO受容体作動薬の有無との間に明らかな関連は認めなかった。

## D. 考察

我々はITP診断においてFCMを用いた網状血小板測定が有用であることを示してきたが、その測定方法の煩雑性から標準化することが困難であった。今回の検討により、新機種であるXN-1000を用いたIPF%測定はFCM法に匹敵する感度と特異度を得られることが明らかとなった。更にXN-1000においては赤血球分画との分離が向上したことから破碎赤血球今後、複数の施設における前向き試験によりそのITP診断への有用性が証明されることが期待される。

ITP症例における血小板機能に関しては、多くの症例において正常例より低下しているという結果であった。この結果がITPに特異的なことであるかどうかは、他の原因による血小板減少例と比較検討する必要がある。また症例によっては抗GPIIb-IIIa抗体により直接的にリガンド結合が影響されている可能性があることが示された。また、今回、TPO受容体作動薬使用により血小板機能に大きな差が見られなかったが、更なる解析が必要である。

## E. 結論

ITP診断においてXN-1000を用いたIPF%測定が有用である可能性が示された。今後は、骨髓異形成症候群との鑑別における有用性の検討も加える予定で

ある。またFCMを用いた血小板機能測定により、ITP患者では血小板機能が低下している可能性が示唆された。今後は臨床症状との相関を含めた検討を加えていくことを予定している。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 101(4): 369-375, 2015.
- 2) Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T, Nomura S, Nishiwaki K, Tomiyama Y, Higashihara M, Shirasugi Y, Nishikawa M, Ozaki K, Abe T, Kikuchi K, Kanakura Y, Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S. Efficacy and safety of rituximab in Japanese patients with relapsed chronic immune thrombocytopenia refractory to conventional therapy. *Int J Hematol* 102:654-661, 2015
- 3) 柏木浩和、富山佳昭. ITP の病態と治療の進歩. **臨床血液** 56:177-184, 2015
- 4) 富山佳昭. 成人の紫斑・出血傾向. **今日の診断指針(第7版)** 金沢一郎、永井良三総編集, 医学書院, 東京, 2015, pp54-57

- 5) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **止血・血栓ハンドブック**(鈴木重統、後藤信哉、松野一彦編), 西村書店, 東京, 2015, pp168-175
- 6) 富山佳昭. 脾摘. **血液専門医テキスト**(改訂第2版)(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp108-110
- 7) 富山佳昭. 血管障害による出血性疾患: 血管性紫斑病. **血液専門医テキスト**(改訂第2版)(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp371-373
- 8) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **血液専門医テキスト**(改訂第2版)(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp374-377
- 9) 富山佳昭. 血小板減少の分子機構. *Thrombosis Medicine* 5:34-40, 2015
- 10) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **最新ガイドライン準拠 血液疾患 診断・治療指針**(金倉 譲編), 中山書店, 東京, 2015, pp498-504
- 11) 富山佳昭. 妊娠合併ITP診療の参照ガイド. **血液内科** 71:529-534, 2015
- 12) 富山佳昭. IgA 血管炎(旧名称: アレルギー性紫斑病). **診療の手引きと臨床データ集 血液疾患診療ハンドブック 改訂3版**(吉田彌太郎編), 医薬ジャーナル社, 大阪, 2015, pp558-564

### 2 . 学会発表

- 1) The 25th Congress of the

- International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada, Schulman S) (Oral) Tomiyama Y. Immature platelet fraction (IPF) measurement for the diagnosis of ITP
- 2) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada, Schulman S) (ポスター) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders.
- 3) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015.6.20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Canada, Schulman S) (Oral) Kato H, Nakazawa Y, Kashiwagi H, Tadokoro S, Morikawa Y, Daisuke M, Yumi K, Kanakura Y, Tomiyama Y. Severe bleeding tendency and impaired platelet function in a patient with CalDAG-GEFI deficiency
- 4) **第9回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム**(2015.2.28 **野村** **コンファレンスプラザ日本橋, 東京, 羽藤高明**) (口演) 富山佳昭. 「抗血小板薬の分子標的とそのリスクベネフィット」 GPIIb-IIIa 阻害薬
- 5) **第40回日本脳卒中学会総会** (2015.3.26-29 **リーガロイヤルホテル広島, 広島, 松本昌泰**) (口演) 富山佳昭. 「抗血栓療法 Update」 GPIIb-IIIa 阻害薬の現状と展望
- 6) **第63回日本輸血・細胞治療学会総会** (2015.5.28-30 **京王プラザホテル, 東京, 田所憲治**) (口演) 富山佳昭, 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村正, 高 陽淑, 石井博之. 抗 HPA4 b と抗 HPA5 b 抗体を有する NAIT(第一子): 第二子の経過からの考察
- 7) **第63回日本輸血・細胞治療学会総会** (2015.5.28-30 **京王プラザホテル, 東京, 田所憲治**) (口演) 櫻木美基子, 林 悟, 丸山美保, 兜森 修, 中山小太郎純友, 細川美香, 中尾まゆみ, 森川珠世, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 加藤 恒, 柏木浩和, 金倉 譲, 富山佳昭. ITP 診断における網状血小板比率測定 of 臨床的意義: FCM 法, 自動血球分析装置 XE-2100, および XN-1000 の比較検討
- 8) **第63回日本輸血・細胞治療学会総会** (2015.5.28-30 **京王プラザホテル, 東京, 田所憲治**) (口演) 細川美香, 中山小太郎純友, 櫻木美基子, 中尾まゆみ, 森川珠世, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 和田浩志, 丸橋 繁, 江口英利, 永野浩昭, 富山佳昭. ABO 血液

型メジャー不適合成人生体肝移植におけるリツキシマブ投与例，非投与例の抗 A, 抗 B 抗体価の推移と FFP の使用状況

9) **第 37 回日本血栓止血学会**  
(2015.05.21-23, 甲府市総合市民会館, 山梨, 尾崎由基男) (口演) 柏木

浩和、清水一亘、國島伸司、坂野史明、加藤 恒、森川陽一郎、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉 讓、富山佳昭. IIb 3 活性化変異、IIb(R990W)KI マウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす

10) **第 77 回日本血液学会学術集会**  
(2015.10.16-28, ホテル金沢、石川、**中尾真二**) (口演) 加藤 恒、中沢

洋三、盛田大介、黒川由美、柏木浩和、森川陽一郎、金倉 讓、富山佳昭. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CaIDAG-GEFI deficiency

## H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞検出法の実用化に向けた試み

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 教授

### 研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断にはいまだに血小板減少をきたす多数の疾患の除外に主眼を置いた基準が用いられている。平成16年度に本研究班がITPに感度または特異度の高い臨床検査を組み合わせた診断基準案を提唱したが、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは保険診療上測定できない。そこで、キット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT）を体外診断薬として承認申請することを目指した検討を進めてきた。昨年度は承認までに必要なロードマップを立案し、その上でキットに含めるコントロールを設定した。そこで、今年度は較正用基準物質としてGPIIb/IIIaに対するヒト型モノクローナル抗体産生細胞を作成することを目的とした。ヒトGPIIb/IIIaと反応するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからキメラ型抗体をコードする遺伝子を作成し、CHO細胞に導入することでキメラ型抗GPIIb/IIIa抗体を産生する浮遊細胞株の作成に成功した。今後、臨床検体を用いて至適な測定条件やカットオフを設定した上で多施設臨床試験の実施を目指している。

### A. 研究目的

我が国では1990年に厚生省研究班により作成された特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断基準が現状も用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり骨髄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。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不可能で、そのために数多くの検査を行うことは医療経済上好ましくない。そこで、平成16年度に本研究班で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を組み合わせ積極的に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。しかしながら、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗

体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは現状では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キットの作成およびその体外診断用医薬品としての承認が不可欠である。そこで、昨年度からキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たすレベルまで質を高めることを目的として検討を進めてきた。昨年度は、すでにキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の測定系（ITP-ELISPOT；MBL社）を体外診断用医

薬品として申請するためのロードマップを医薬品医療機器総合機構による体外診断用医薬品の承認申請に係わる関連通知 (<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/taigai.html>) に照らし合わせて立案した。その中で必要な改善点を検討し、キット仕様の確定、校正用基準物質の設定、品質管理の確立、測定範囲の決定の 4 項目に絞り込んだ。さらに、主にキットに添付する陽性・陰性コントロールを設定することでキット仕様を確定した。そこで、次のステップとして本年度は校正用基準物質の設定を目指した検討を行った。

## B . 研究方法

校正用基準物質として陽性および管理検体が必要であるため、ヒト GPIIb/IIIa に対するヒト型 IgG 抗体産生細胞および対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するヒト型 IgG 抗体産生細胞を作成した。マウスのヒト GPIIb/IIIa を免疫することで作成したマウス抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体のハイブリドーマ (#33 株) を用いて、遺伝子改変後に CHO 細胞に導入することで Fc 領域をヒト IgG に置換したキメラ型抗体産生細胞 (#33 キメラ株) を作成した。さらに、CHO 細胞を無血清培地で培養することで浮遊細胞化した。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞を検出する測定キット (ITP-ELISPOT) において、被検末梢血単核球の代わりにキメラ型抗体産生 CHO 細胞 #33 キメラ株、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #33 株を用いた。

## (倫理面に対する配慮)

本研究ではヒト検体を使用しないことから、倫理審査を必要とするいかなる指針にも合致しない。

## C . 研究結果

キットの品質管理には校正用基準物質としてヒト型抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する細胞が必要である。そのため、ヒト GPIIb/IIIa と反応するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (#33 株) から IgG 遺伝子を分離し、Fc 領域をコードする部分をヒト IgG-Fc に置換したキメラ型抗体をコードする遺伝子を作成して CHO 細胞に導入した。遺伝子導入した CHO 細胞 (#33 キメラ株) は上清中にキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体を持続的に産生することを確認した。CHO 細胞は付着細胞であったため、無血清培地での継代培養を繰り返すことで、B 細胞と同様の浮遊細胞への変換に成功した。そこで、#33 キメラ株が ELISPOT における校正用基準物質として使用できるかを ITP-ELISPOT キットを用いて検証した。#33 キメラ株および #33 株 (12.5、25、50 個/ウェル) を GPIIb/IIIa 抗原が固相化された膜上で 4 時間培養し、細胞成分を除去後に 2 次抗体 (酵素標識抗ヒト IgG または抗マウス IgG) を添加し、さらに基質を加えることで発色した。#33 キメラ株、#33 株両者でスポットが観察され、スポット数は培養に加えた細胞数が増えるに従って増加した ( $R^2 = 0.99, 0.98$ )。#33 キメラ株では #33 株に比べてスポットが大きく判別が容易で、培養に添加した細胞数とほぼ同数のスポットが得られた。したがって、

#33 キメラ株は校正用基準物質として使用可能であった。また、対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するキメラ型抗体を産生する CHO 細胞も作成した。

## D . 考察

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キット (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として構成する際の品質管理に用いる校正用基準物質としてキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞株の作成に成功した。本細胞株を用いることで、製造したキットの感度、正確性、同時再現性が確認でき、またキットの検出感度や測定範囲を設定するためにも応用することができる。キット毎に必要な B 細胞の生存性確認方法、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞の陽性、陰性コントロールの設定を昨年度に終えていることから、キット構成に必要な材料を揃えることができた。

今後は昨年度立案した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として承認申請するためのロードマップに従って、ITP 患者や健常人末梢血などヒト検体を用いて至適な測定条件 (検体量、保存安定性、抗凝固薬の影響など) やカットオフを設定する必要がある。また、平成 28 年度末までにカットオフの設定と同時に試薬の最終仕様を確定する。さらに、キットの構成が確定した平成 29 年度以降に多施設での臨床性能試験を施設する予定である。

## E . 結論

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットを診断用医薬品として承認を受けるために

必要な校正用基準物質の作成に成功した。

## F . 健康危険情報

該当なし

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

Kuwana M. What do we learn from immunomodulation in patients with immune thrombocytopenia? Semin Hematol. In press.

### 2 . 学会発表

Kuwana M.: What do we learn from Immunomodulation?. 5<sup>th</sup> ICIS Expert Meeting. (Flueli-Ranft, Switzerland). 2015.9.

桑名正隆: 難治性血液障害-免疫性血小板減少症と血球貧食症候群-. 第 59 回日本リウマチ学会総会 (名古屋). 2015. 4. (シンポジウム S8-6: SLE の難治性病態)

桑名正隆: A regulatory T cells-deficient mouse model as a useful tool for evaluating the pathophysiology of human immune thrombocytopenia. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 (山梨). 2015. 5. 21. (学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 3: 炎症・免疫と血栓を繋ぐ動物モデル)

## H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 臨床調査個人票（平成 25 年度）集計による特発性血小板減少性紫斑病の 全国疫学調査

研究分担者 羽藤高明 愛媛大学医学部附属病院輸血・細胞治療部准教授  
研究協力者 島田直樹 国際医療福祉大学基礎医学研究センター教授  
研究協力者 倉田義之 千里金蘭大学看護学部内科学客員教授

### 研究要旨

我が国における特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症頻度、年齢分布、患者の病状や治療、生活状況を平成 25 年度の臨床調査個人票をもとに解析した。年間新規患者数は 3,908 人と推計された。高齢者に多い疾患であり、女性では 35 歳前後にも小ピークがあった。新規患者の約 9 割が血小板数 5 万以下であった。治療ではトロンボポエチン受容体作動薬の投与例が増加していた。

### A . 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病（以下 ITP）は、しばしば治療に難渋し、長期間にわたって治療を必要とする難治性疾患である。厚生労働省は ITP を特定疾患に指定し、患者への支援を実施してきている。今後の ITP 患者への治療計画、支援計画をたてるにあたりわが国における ITP 患者の実態を把握することは非常に重要であると考えられる。本研究では ITP 患者より厚生労働省へ提出された臨床調査個人票をもとに平成 25 年度における ITP 患者の実態を解析したので報告する。

### B . 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 25 年度の ITP 症例の臨床調査個人票をもとに入力されたデータの提供を受けた。このデータを用いて入力項目別に診療状況の詳細を解析した。

### （倫理面への配慮）

本疫学研究の施行に当たっては愛媛大学

医学部附属病院倫理委員会の承認を得た。

### C . 研究結果および考察

#### 1 . 臨床調査個人票登録率

都道府県から厚労省に提出された臨床調査個人票は 13,126 人分であった。難病医学研究財団 難病情報センターの資料では平成 25 年度 ITP 医療受給者証交付数は 24,956 人であるので全国 ITP 患者の 52.6% において臨床個人調査票を解析できた。同様な方法で算出した平成 19 年度～25 年度の 7 年間の個人票登録率（解析症例率）を表 1 に示す。登録率は 43-85% の幅があり、平成 25 年度はこれまでと比べると低かった。

#### 2 . ITP 患者発生数

平成 25 年度に新規発症した患者数を表 2、3 に示す。新規患者登録数は男女合わせて 2,071 名であった。回収率 52.6% の数値であることを考慮すると本邦における平成 25 年度新規患者数は 3,908 名であると推計された。

表 4 に平成 19 年度～25 年度の 7 年間の新規患者発生数の推移を示す。年度別登録率(表 1)を考慮した推定新規患者数は約 4,000 人前後で推移していた。

### 3. 新規患者年齢分布

急性型の年齢分布を図 1 に示す。男女とも 66～85 歳に幅広いピーク(最大ピークは男 76～80 歳、女 71～75 歳)があり、加えて女子では 26～30 歳に小さなピークがあった。男女とも 5 歳以下にも小さなピークがあった。

慢性型の年齢分布を図 2 に示す。男女とも 61～80 歳に大きなピーク(男では 76～80 歳、女では 61～65 歳に最大ピーク)を認めた。女では更に 21～40 歳に幅広いピーク(31～35 歳に最大ピーク)を認めた。16～60 歳で女は男の約 1.7～9.5 倍多かった。一方、61 歳以上では男女差は 1.5 倍以下にとどまった。

従来認められた小児 ITP のピークは平成 25 年度も殆ど認められなかった。小児 ITP においては、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業が行われている。これらの制度や研究事業に申請すると特定疾患に申請するよりも一部負担金の免除など有利との考えで、小児 ITP 症例は特定疾患に申請せず、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業のほうへ申請が行われていると推測された。そのため小児における発症のピークが消失していると考えられた。

### 4. ITP 更新患者数

平成 25 年度に更新申請があった患者数を表 5、表 6 に示す。更新患者数は男女合わせて 11,055 名であった。登録率

52.6%の数値であることを考慮すると本邦における平成 25 年度更新患者数は 20,858 名であると推計された。

表 7 に更新申請症例の平成 19 年度～25 年度の症例数の推移を示す。年度別回収率(表 1)を考慮した推定患者数はこの 7 年間、20,000 人前後で推移しているものと思われた。

### 5. 更新・慢性型患者の年齢分布

慢性型の更新患者の年齢分布を図 3 に示す。女では 56～80 歳に大きなピーク(61～65 歳に最大ピーク)があり、21～50 歳にもなだらかなピークがあった。男では 56 歳より増加傾向を示し、71～75 歳にピークを認めた。女が男の 2.1 倍多かった。

### 6. 身体障害者手帳、介護認定、日常生活の不自由度

身体障害者認定の有無を表 8 に示す。身体障害者手帳を交付されている症例は 7.7%で、大多数の症例は身体障害者の認定を受けていなかった。身体障害者の認定が ITP によるものか、他の身体的要因によるものかは不明であった。

介護認定の有無を表 9 に示す。要介護、要支援認定者もごく一部の症例のみであった。

日常生活不自由度を表 10 に示す。約 30%の症例がやや不自由あるいは介護を要するとの回答であったが ITP 症例が非常に高齢化しているため高齢による身体の不自由さを反映しているのではないかと推測された。

### 7. 生活状況

生活状況を表 11 に示す。新規・急性型症例では 61%の症例が就労、就学、家事など社会生活を保っていた。一方、新規・

慢性型や更新・慢性型では 67～78%の症例が社会生活を保っていた。

#### 8 . 受診状況

受診状況を表 12 に示す。新規・急性型症例では 49%の症例が入院していた。新規・慢性型症例においても 22%の症例が入院していた。一方、更新・慢性型症例では入院中の症例は 1.3%とごく一部で大半の症例は主に通院であった。

#### 9 . 出血症状

出血症状を図 4 に示す。新規・急性型では出血症状を呈する症例が多く、紫斑を 79%の症例において認めた。その他、歯肉出血 (29%)、鼻出血 (16%) など、粘膜出血の頻度も高かった。新規・慢性型では紫斑を 58%に認めたが、急性型に比べ粘膜出血の頻度は 14%、10%と低かった。更新・慢性型では紫斑を 35%に認めたが粘膜出血はいずれも 5-6%と新規申請症例に比べると頻度は低かった。治療の結果、出血症状が軽減しているためと思われた。

#### 10 . 血小板数

血小板数を図 5 に示す。新規・急性型症例においては血小板数 1 万以下の症例が 68%と多かった。新規・慢性型においても血小板数 1 万以下の症例を 33%に認め、5 万以下の症例が 93%であった。一方、更新・慢性型症例においては血小板数が 5 万以下の症例は少なく、55%の症例で 5 万以上であり、治療の結果を反映しているものと思われた。

#### 11 . 特殊検査

新規症例における骨髓検査、PAIgG、抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率を表 13 に示す。骨髓検査は急性型

で 90%、慢性型で 88%とほぼすべての症例で実施されていた。ITP に特異的な検査である抗血小板自己抗体検査は 3～6%、網状血小板検査は 18～22%と実施率は低かった。

表 14 に最近 7 年間における特殊検査の実施率の推移を示す。骨髓検査は 90%前後、PAIgG は約 70%の症例で実施されていた。一方、自己抗体検査は 6%前後と低いままであったが、網状血小板検査は増加の傾向を示しており、5 年前の 2.7 倍に増加していた。この増加は網状血小板数を計測する自動機器の普及と思われた。

#### 12 . 治療

新規症例において選択された治療法を図 6、7 に示す。新規・急性型ではプレドニゾン治療が 83%の症例において選択されていた。次いで大量 IgG 療法が 30%、ピロリ除菌が 29%の症例で施行されていた。また新規・慢性型においてもプレドニゾン治療が 58%の症例で選択されていた。次いでピロリ除菌、大量 IgG 療法が実施されていた。

新規症例におけるピロリ除菌療法の年度別の推移を図 8 に示す。この数年間は 30-35%で推移していたが、減少傾向にあった。

図 9 に更新症例でこの 1 年間に試みられた治療法、図 10 に全経過で実施された治療法を示す。更新症例においてもこの 1 年間ではプレドニゾン治療が最多で 56%の症例に実施されていた。これは各種治療に抵抗性でプレドニゾンによる維持療法が行われていた症例を含むためと推察された。一方、全経過でみるとプレドニゾン治療が 76%、次いでピロリ

除菌療法、大量 IgG 療法、摘脾など各種の治療が行われていた。平成 22 年 12 月～平成 23 年 4 月に発売された新規薬剤（レボレード、ロミプレート）であるトロンボポエチン受容体アゴニスト (TRA) はこの 1 年で 11% の症例で使われていた。

TRA を含むその他の薬剤の使用状況を表 15、表 16 に示す。セファランチン、ビタミン C、加味帰脾湯などに変化はなかった。TRA は平成 23 年度以降、急激な増加を示していたが、25 年度は増加が緩やかになった。

### 13 . この 1 年間の経過

この 1 年間の経過を表 17 に示す。更新・慢性型症例では、不変 69%、軽快 23%、徐々に悪化 4% であった。ITP は良性疾患ではあるが難治性の疾患であることがうかがわれた。

### 14 . 罹病期間

更新症例（慢性型）における罹病期間を図 11 に示す。罹病期間は 1 年未満の症例から 50 年以上に及ぶ症例まで幅広く分布していた。ITP が慢性疾患であることを示しているとともに基本的には予後良好な疾患であることを現しているものと思われた。

### 15 . 合併症

ITP は罹病期間が長期にわたることが多い。その間には多くの合併症を併発することが懸念される。特にプレドニゾン治療が長期にわたって行われるためプレドニゾンによる副作用が懸念される。調査表に記載されていた合併症を図 12 に示す。

プレドニゾンの影響と考えられる糖尿病の頻度が高い。またプレドニゾン

や免疫抑制剤の長期投与が原因ではないかと考えられる脊椎骨折や重症感染症も報告されていた。脳出血は原疾患に基づく重篤な合併症であるが、プレドニン等の治療に基づく重篤な合併症である重症感染症は脳出血よりも多く発生していた。その他の合併症として高血圧症、脂質異常症（高脂血症）、大腿骨頭壊死などが報告されていた（図 13 参照）。

### 16 . 難治症例の頻度

難治症例の定義は明確ではないが、摘脾を含む各種治療を行っても血小板数が低く（血小板数 2 万以下）出血傾向を示している症例と考え、臨床調査個人票から上記条件にて絞り込み、難治症例数を推計した。

更新申請症例で慢性型 9,761 例を対象とした（表 18）。まず血小板数 2 万以下の症例に絞り込むと 1,787 例（18.3%）の症例が対象となった。血小板数 2 万以下の症例を、さらに出血傾向を示していた症例に絞り込むと 1,382 例（14.2%）が対象となった。出血傾向を示している症例のうちプレドニゾン治療をされていた症例は 988 例（10.1%）であった。各種治療に抵抗性であるとの考えに従い、摘脾済み症例に絞り込むと大幅に減少し、203 例（2.1%）が難治例に相当すると考えられた。

表 19 に難治症例頻度の年度別推移を示す。難治症例頻度は 2.1～2.8% で推移しており、一定の頻度で存在していた。

## E . 結論

- 1 . 新規症例数は 3,908 人と推計された。年間発症者数は最近 7 年間、4,000 人

- 前後で推移しており、発症率に変化はなかった。
2. 更新症例数は 20,858 人と推計された。本邦の患者数は最近 7 年間、20,000 人前後で推移していた。
  3. 特殊検査では、骨髄検査実施率 90% 前後、PAIgG 70% 前後、自己抗体検査 5% 前後、網状血小板 20% 前後であった。最近、網状血小板検査が増加傾向を示していた。
  4. 治療ではトロンボポエチン受容体作動薬 (TRA) の投与例が増加していた。
  5. 難治症例頻度は 2.1% であった。
- 4) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2015-2016 PP127-133, 2015 南江堂 東京
  - 5) 羽藤高明 H L A 検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp134-139, 2015 南江堂 東京
  - 6) 岡田陽子、加藤丈陽、山下泰治、越智雅之、永井勅久、越智博文、伊賀瀬道也、羽藤高明、小原克彦 Crescendo TIA を呈した JAK2 陽性本態性血小板血症の 1 例 脳卒中 37:36-40, 2015
  - 7) 羽藤高明 第 9 回日本血栓止血学会標準化委員会シンポジウム血小板部会報告 日本血栓止血学会誌 26:470-471, 2015

## F . 健康危険情報

特になし。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, Niiya T, Nakamura H, Yasukawa M: A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia. Ann Hematol 94:1599-1600, 2015
- 2) Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. Blood Coagul Fibrin (in press)
- 3) 羽藤高明 最新の静脈血栓形成機序から治療を考える 静脈学 26:1-8, 2015
- 4) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2015-2016 PP127-133, 2015 南江堂 東京
- 5) 羽藤高明 H L A 検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp134-139, 2015 南江堂 東京
- 6) 岡田陽子、加藤丈陽、山下泰治、越智雅之、永井勅久、越智博文、伊賀瀬道也、羽藤高明、小原克彦 Crescendo TIA を呈した JAK2 陽性本態性血小板血症の 1 例 脳卒中 37:36-40, 2015
- 7) 羽藤高明 第 9 回日本血栓止血学会標準化委員会シンポジウム血小板部会報告 日本血栓止血学会誌 26:470-471, 2015

### 2 . 学会発表

- 1) 山之内純、羽藤高明 VASP リン酸化測定によるシロスタゾール薬効判定と脳梗塞再発および CYP 遺伝子多型との関連 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015.5.23 甲府
- 2) 羽藤高明 成人血友病患者の止血管理とターゲットジョイントからの脱却 ~ 定期補充療法と滑膜切除術 ~ 第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム ランチョンセミナー 2015.2.28 東京
- 3) 羽藤高明 術中大量出血への輸血対応 平成 27 年第 1 回日本手術医学会教育セミナー 2015.4.11 松山
- 4) 羽藤高明 インヒビター保有血友病患者における滑膜切除術の効果と術後止血コントロール 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 共催セミナー 2015.5.30 東京

- 5) 山之内純、羽藤高明、中西英元、朝井洋晶、松原悦子、谷本一史、竹内一人、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Effect of calreticulin mutation on the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 function 第77回日本血液学会学術集会 2015.10.16 金沢
- 6) 羽藤高明 今日における血小板凝集能検査の臨床的意義 平成27年度日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会ランチョンセミナー 2015.11.7 米子
- 7) Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M: ASSOCIATION OF PLATELET RESPONSE TO CILOSTAZOL WITH CLINICAL OUTCOME AND CYP GENOTYPES IN PATIENTS WITH CEREBRAL INFARCTION. 25<sup>th</sup> International Society of Thrombosis and Haemostasis Congress, 2015.6.22 Toronto, Canada
- 8) Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Function of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation The 57<sup>th</sup> annual meeting of American Society of Hematology 2015.12.7 Orlando, USA

## 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

表 1 . ITP 患者数

年度(平成)	19	20	21	22	23	24	25
医療受給者証交付人数	23157	22,945	22,853	22,200	23,791	24,100	24,956
臨床個人調査票登録数	10,000	12,034	19,047	15,977	20,129	18,115	13,126
登録率(解析症例率)	43%	52%	83%	72%	85%	75%	53%

表 2 . 新規患者数

	全症例	男	女
登録患者数	2,071	853	1,218
推定患者数	3,908	1,609	2,298

表 3 . 病型別の患者数(新規患者)

	急性型	男	女	慢性型	男	女	型不明
登録患者数	806	369	437	1,206	461	745	59
推定患者数	1,520	696	825	2,275	870	1,406	111

表 4 . 新規患者数の推移

年度(平成)	19	20	21	22	23	24	25
登録患者数	1,955	2,025	2,631	2,695	3,235	3,192	2,071
推定患者数	4,547	3,894	3,170	3,743	3,806	4,256	3908

表 5 . 更新患者数

	全症例	男	女
登録患者数	11,055	3,364	7,691
推定患者数	20,858	6,347	14,511

表 6 . 病型別の患者数(更新患者)

	急性型	男	女	慢性型	男	女	型不明
登録患者数	1,075	411	664	9,761	2,871	6,884	219
推定患者数	2,028	775	1,253	18,417	5,417	12,989	413

表 7 . 更新患者数の推移

年度(平成)	19	20	21	22	23	24	25
登録患者数	8,045	10,009	16,416	13,282	16,894	14,923	11,055
推定患者数	18,709	19,248	19,778	18,447	19,875	19,897	20,858

表 8 . 身体障害者手帳の有無

	あり	なし	記載なし
新規・急性型	32	715	59
新規・慢性型	56	1,079	71
更新・急性型	95	938	42
更新・慢性型	720	8,621	420

表 9 . 介護認定の有無

	要介護	要支援	なし	記載なし
新規・急性型	43	27	671	65
新規・慢性型	70	20	1,031	85
更新・急性型	120	35	868	52
更新・慢性型	571	267	8,457	466

表 10 . 日常生活不自由度

	正常	やや不自由	部分介助	全面介助	記載なし
新規・急性型	503	162	65	27	49
新規・慢性型	814	219	94	24	55
更新・急性型	669	253	94	24	35
更新・慢性型	6,691	2,123	563	127	257

表 11 . 生活状況

	就労	就学	家事労働	在宅療養	入院	入所	その他
新規・急性型	202	30	210	110	188	17	24
新規・慢性型	343	35	398	190	161	16	13
更新・急性型	271	37	359	287	30	26	24
更新・慢性型	3,022	282	4,086	1,690	188	132	108

表 12 . 受診状況

	入院	入院・通院	通院	往診あり	入通院なし	その他
新規・急性型	382	116	240	1	33	8
新規・慢性型	254	103	790	1	14	13
更新・急性型	26	80	930	12	1	13
更新・慢性型	123	275	9,034	52	31	173

表 13 . 特殊検査の実施率

	骨髄検査	PAIgG	抗血小板自己抗体検査	網状血小板検査
新規・急性型	90.2	59.6	6.0	22.2
新規・慢性型	88.2	68.2	3.1	18.2

表 14 . 特殊検査実施率の年度別推移

年度 (平成)	新規・急性型				新規・慢性型			
	骨髄検査	PAIgG	自己抗体	網状血小板	骨髄検査	PAIgG	自己抗体	網状血小板
19	96.7	56.3	3.1	4.1	95.8	68.6	4.9	4.4
20	88.7	57.4	3.1	7.1	87.7	69.4	3.8	5.8
21	89.3	62.7	6.6	7.6	86.3	66.5	6.1	6.7
22	90.0	63.8	5.0	14.5	86.7	67.4	6.7	10.7
23	90.0	56.4	6.1	14.3	87.0	64.6	5.4	11.1
24	90.5	60.8	5.4	18.9	87.6	70.8	6.1	14.4
25	90.2	59.6	6.0	22.2	88.2	68.2	3.1	18.2

表 15 . その他の薬剤の使用状況

	レボレード	ロミプレート	リツキサン	セファランチン	V C	加味帰脾湯
新規・急性型	34	17	2	2	1	3
新規・慢性型	95	18	1	14	7	8
更新・急性型	76	28	2	9	2	5
更新・慢性型	956	252	11	243	179	85

表 16 . その他の薬剤の年度別推移

年度 (平成)	レボレード	ロミプレート	リツキサン	セファランチン	V C	加味帰脾湯
21	0	11	22	492	442	152
22	11	30	28	376	321	135
23	665	117	29	437	343	144
24	1157	296	10	345	296	121
25	1161	315	16	268	189	101

表 17 . この 1 年間の臨床経過（更新症例）

	治癒	軽快	不変	徐々に悪化	急速に悪化	その他	記載なし
更新・急性型	33	539	421	23	18	20	21
更新・慢性型	60	2,200	6,727	423	133	162	56

表 18 . 難治症例の頻度

	症例数	%
更新・慢性型症例	9,761	100.0
血小板数 2 万未満	1,787	18.3
+ 出血症状あり	1,382	14.2
+ プレドニゾン治療あり	988	10.1
+ 摘脾済み症例	203	2.1

表 19 . 難治症例頻度（%）の年度別推移

年度（平成）	21	22	23	24	25
更新慢性型症例	100	100	100	100	100
うち血小板 2 万未満	19.2	21.2	18.6	19.0	18.3
うち出血症状あり	15.4	16.8	14.7	14.5	14.2
うちプレドニゾンあり	11.4	12.3	10.9	10.5	10.1
うち摘脾済み症例 （難治症例）	2.5	2.6	2.8	2.3	2.1

图 1 . 年龄分布 (新规・急性型)

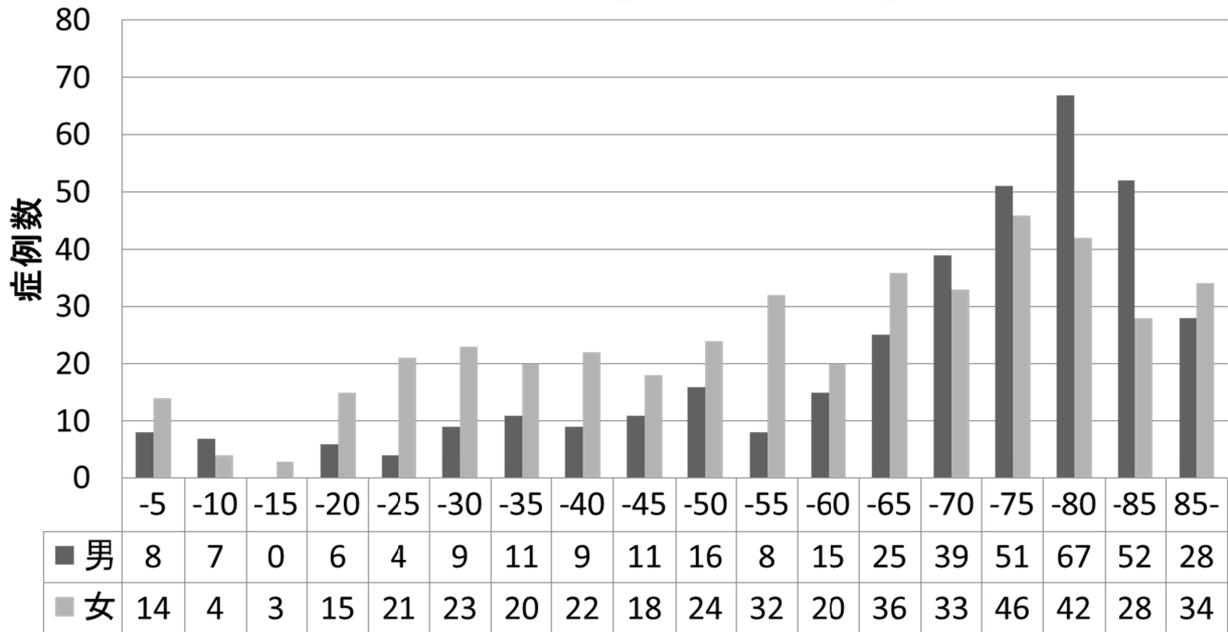


图 2 . 年龄分布 (新规・慢性型)

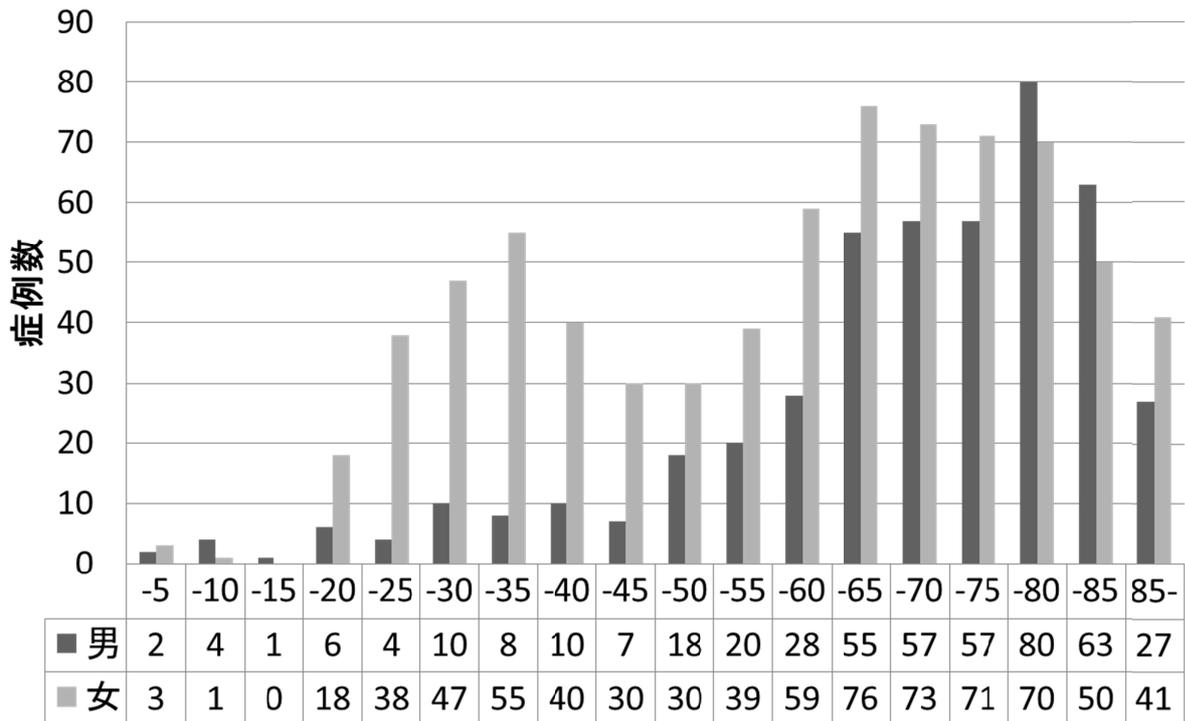


图3. 年齢分布（更新・慢性型）

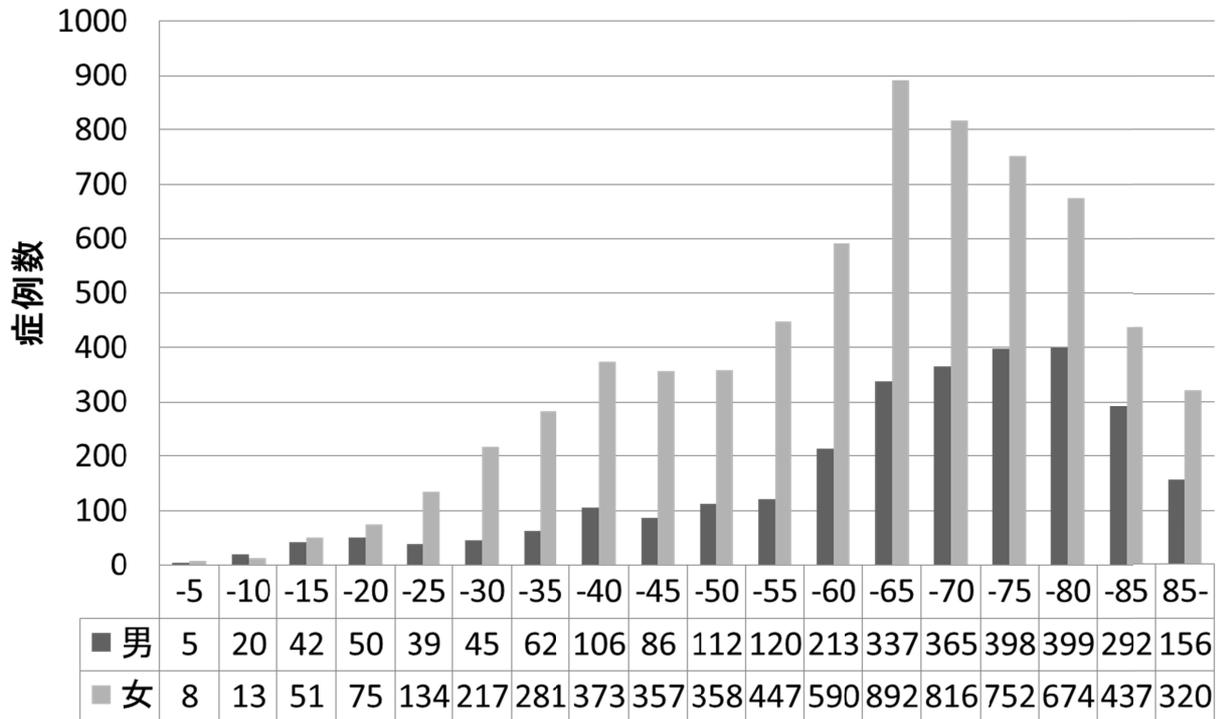


图4. 出血症状

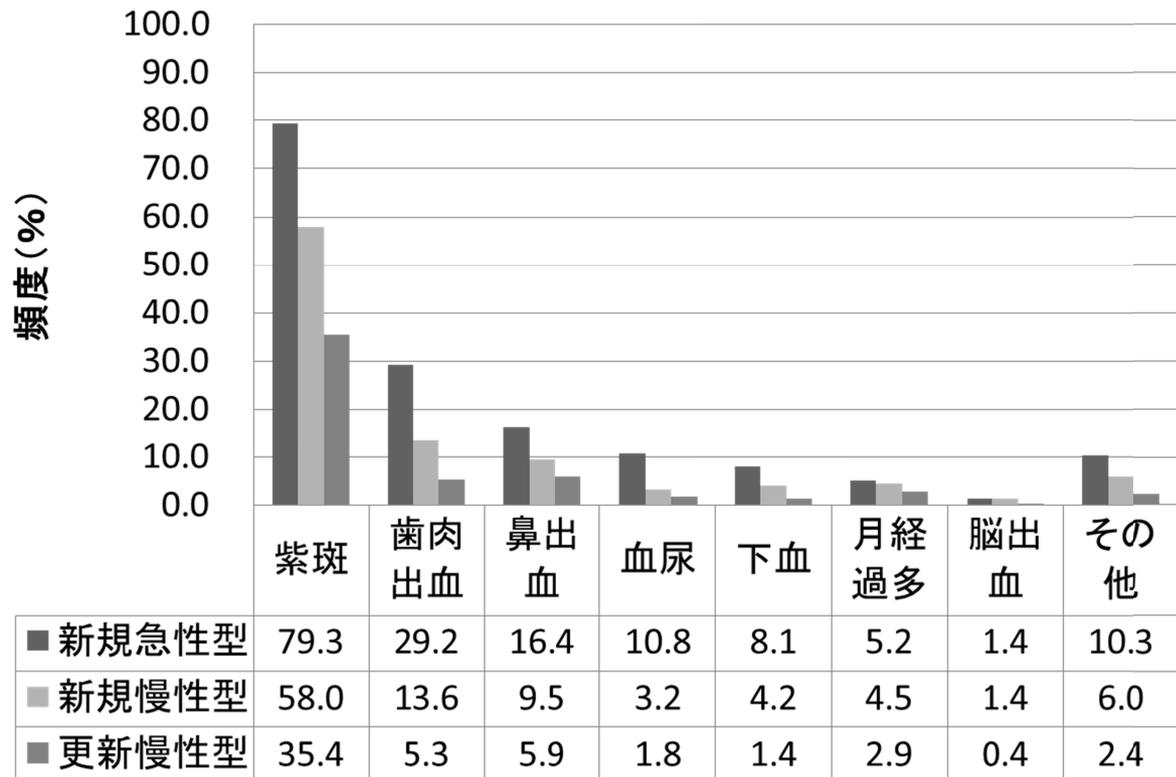


図5 . 血小板数

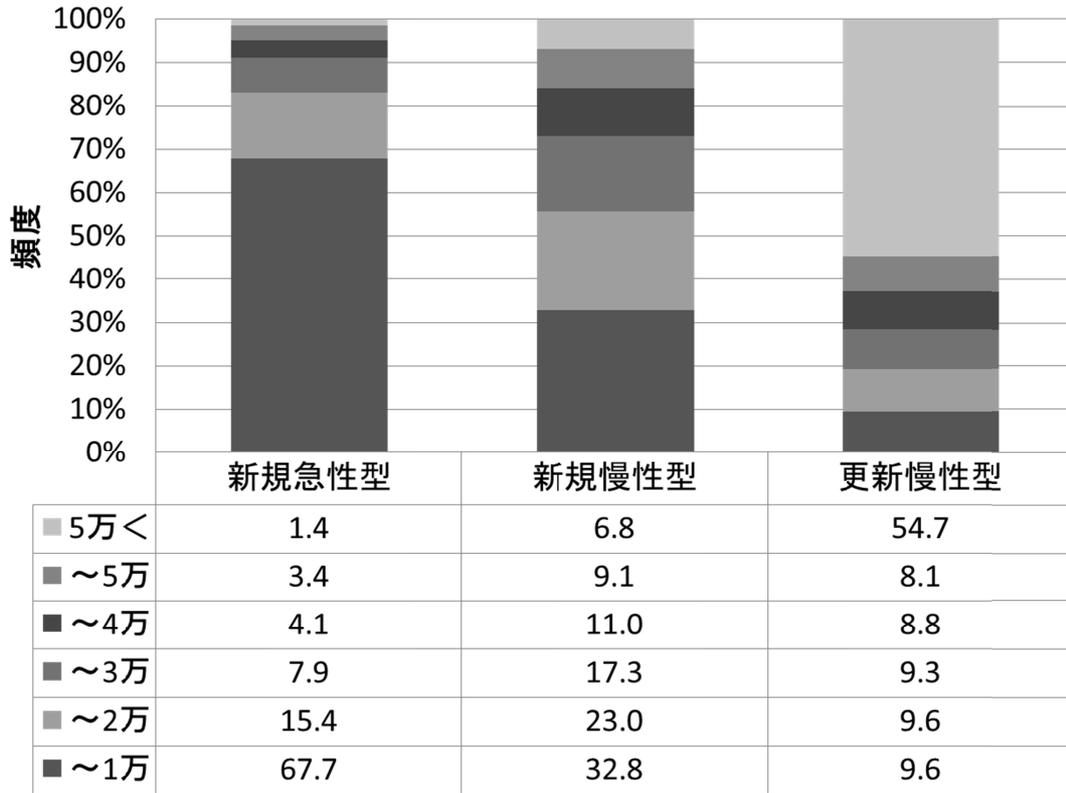


図6 . 治療（新規・急性型）

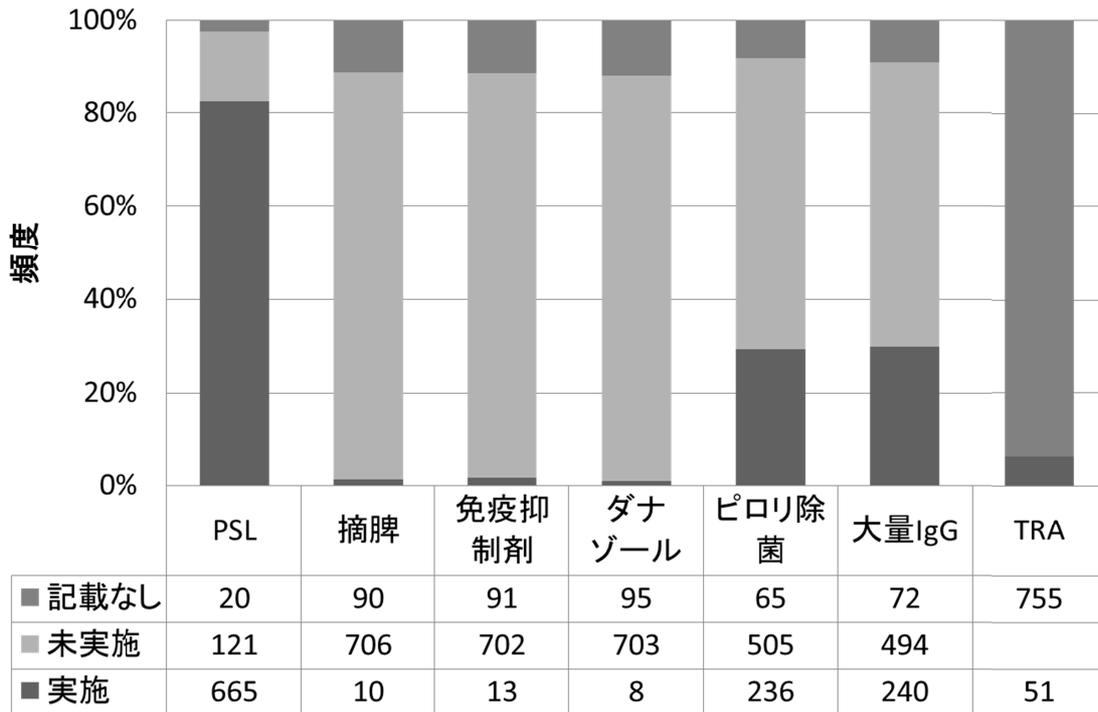


図7. 治療（新規・慢性型）

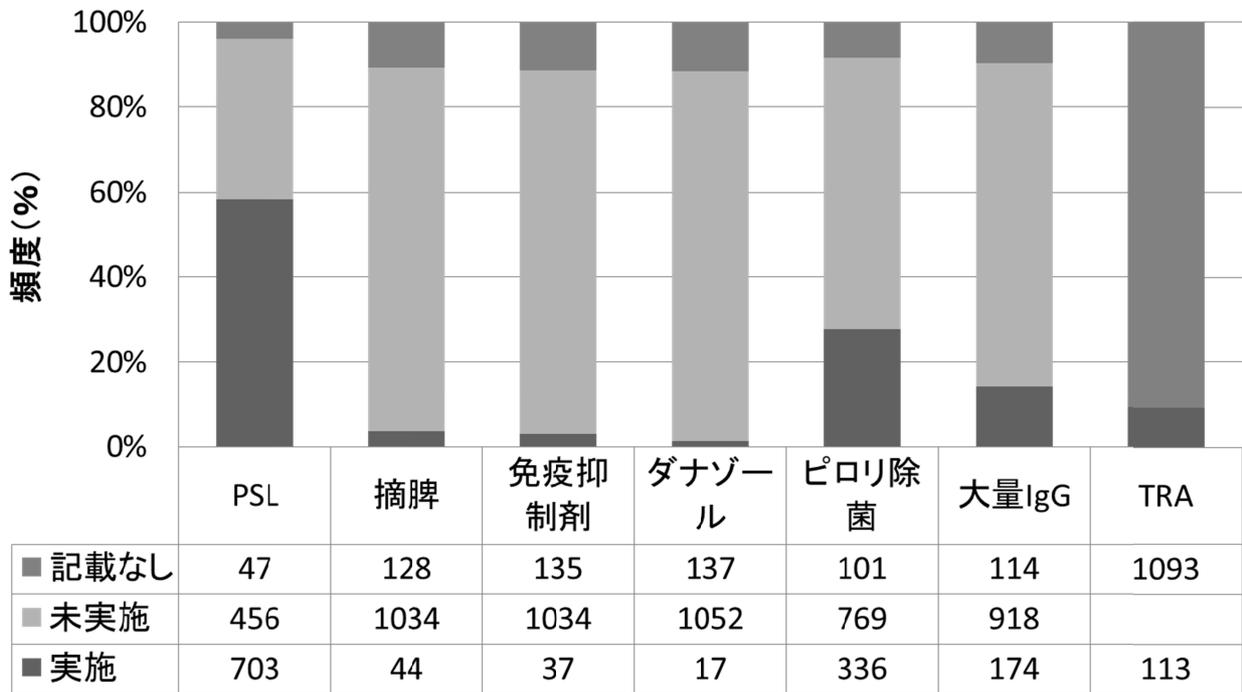
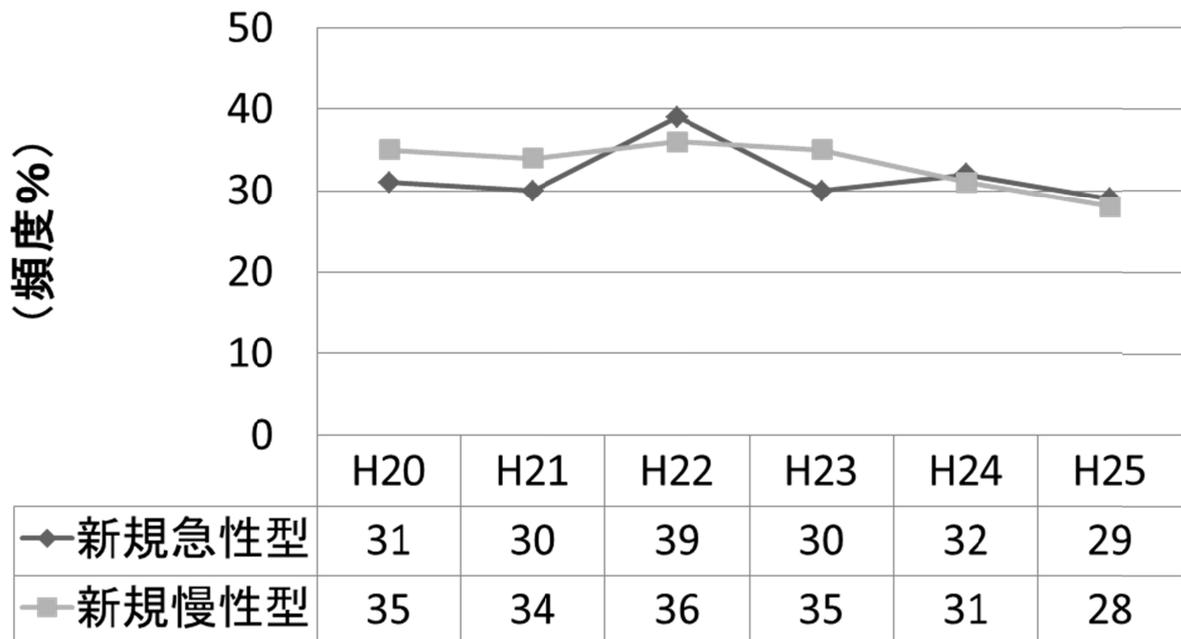
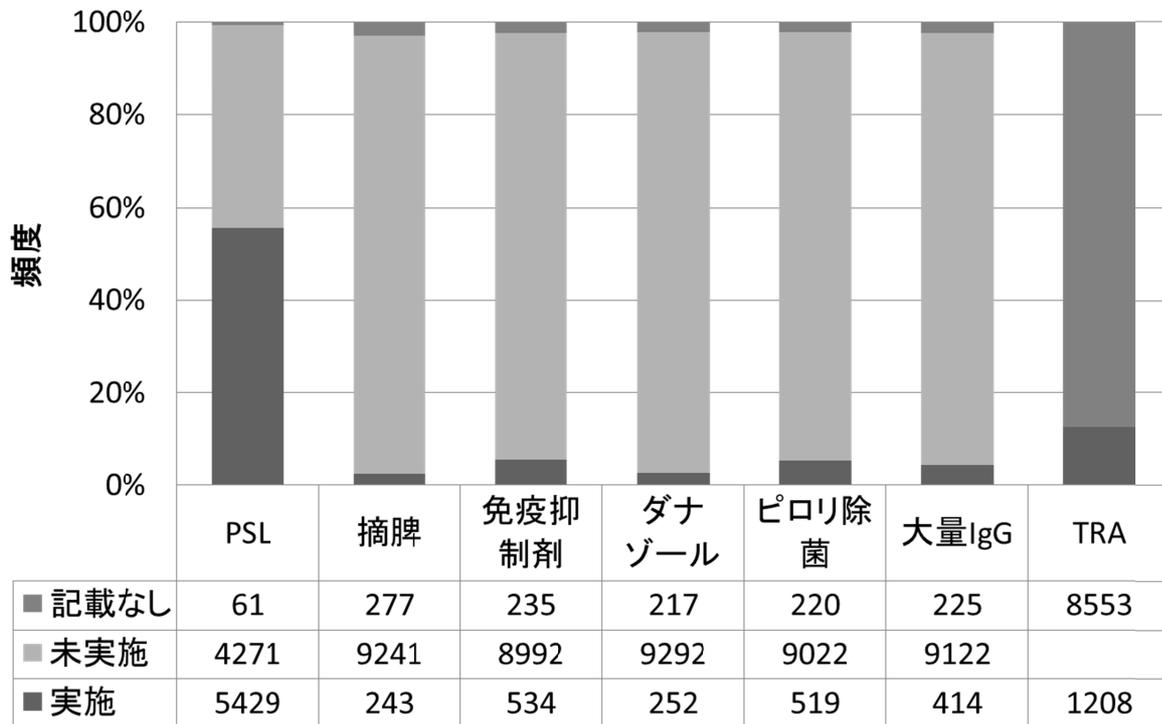


図8. ピロリ除菌率の年度別推移



**図9. この1年間の治療（更新・慢性型）**



**図10. 全経過での治療（更新・慢性型）**

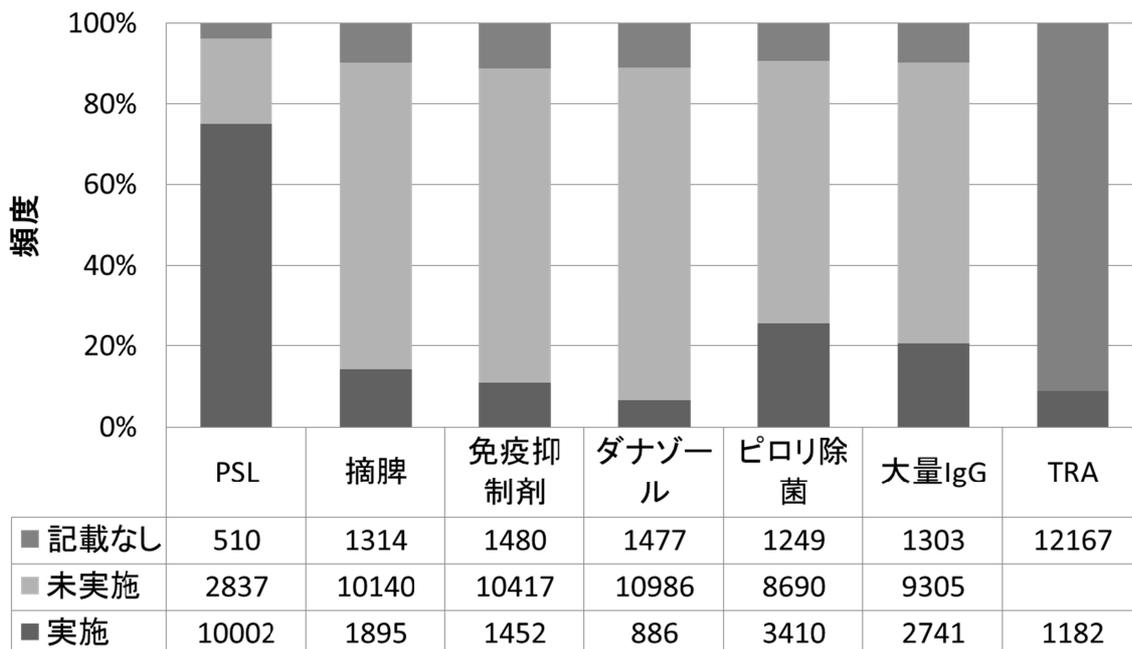


図 11 . 罹患期間

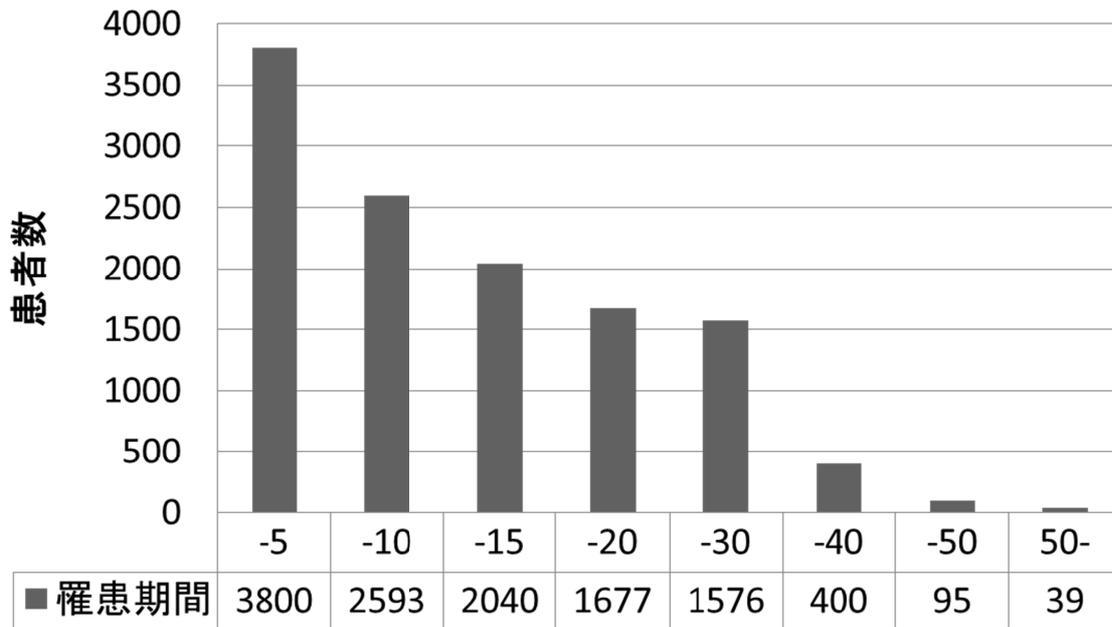


図 12 . 合併症（更新・慢性型）

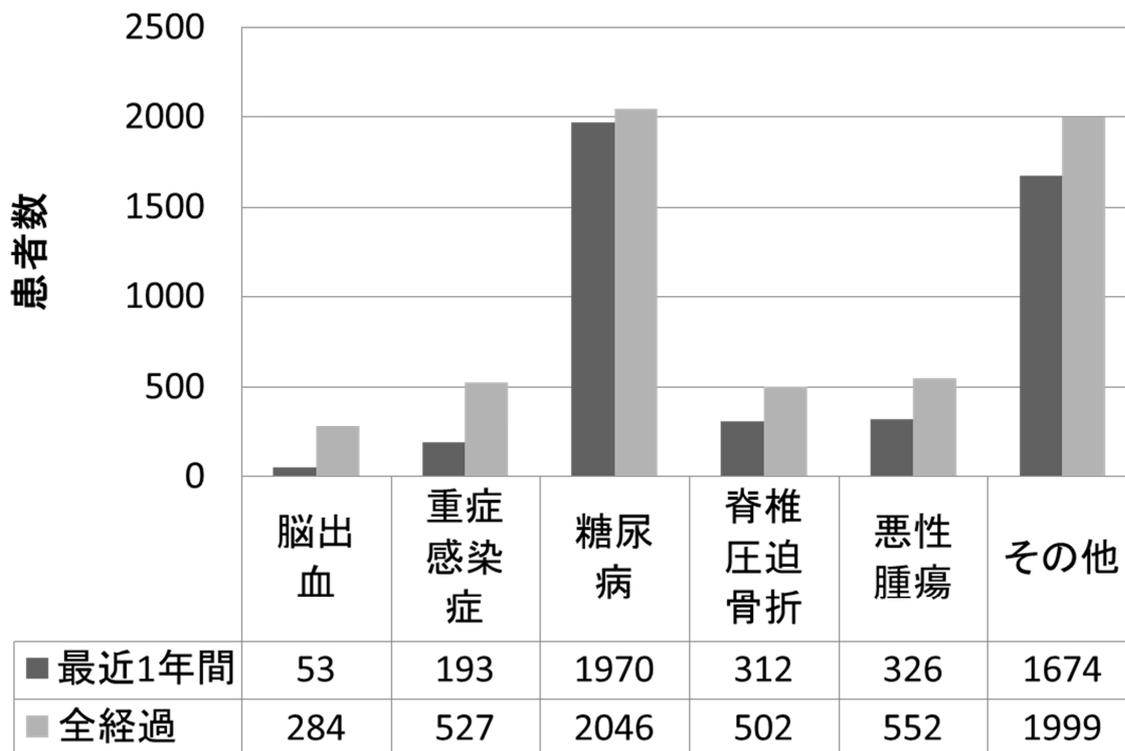
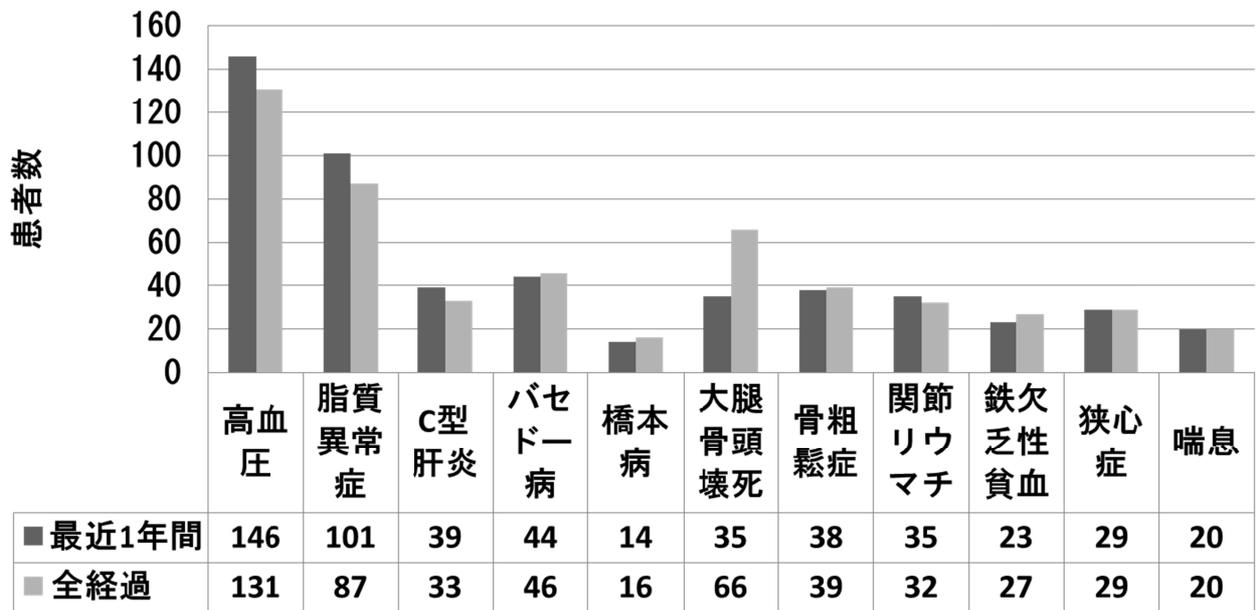


図 13 . その他の合併症（更新・慢性型）



## TTP サブグループ報告書

グループリーダー :	松本雅則	奈良県立医科大学輸血部	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	部長
研究協力者 :	森木隆典	慶応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	前部長
	八木秀男	近畿大学奈良病院 血液内科	准教授
	藤村吉博	奈良県立医科大学輸血部	名誉教授

## グループ総括

分担研究者：松本 雅則

### 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。本年度の活動目標は1）本邦の血栓性微小血管症（TMA）の症例集積の継続し、症例の特徴の解析、2）Upshaw-Schulman 症候群(USS)における ADAMTS13 遺伝子解析の継続、3）TTP 治療ガイドラインの作成、4）難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの保険適応の拡大、5）ADAMTS13 検査の保険収載と測定キットの体外診断薬承認であり、目標に向けて活動した。

1）本年度は TMA の中で ADAMTS13 活性著減 TTP を中心に集積した。2）先天性 TTP である USS 患者 3 例において ADAMTS13 遺伝子解析を実施し、すべての症例で遺伝的な背景を明らかにし、新規遺伝子異常を 3 種類同定した。3）昨年度の TTP 治療ガイドラインに続き、TTP 治療ガイドを作成した。4）医師主導治験の結果をもとに保険適用拡大を目指した活動を行った。5）ADAMTS13 検査が保険収載となっていないため、まず ADAMTS13 検査キットの臨床性能試験を現在実施している。

これらの成果をもとに、次年度は診断、治療ガイドを含んだ診療ガイドラインを論文としてまとめ、それを実際の臨床で生かせるように ADAMTS13 検査の保険収載とリツキシマブの TTP に対する保険適用拡大を目指して活動を継続する

### 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）本邦の血栓性微小血管症（TMA）の症例集積の継続し、症例の特徴を解析する
- 2）Upshaw-Schulman 症候群(USS)における ADAMTS13 遺伝子解析を継続する
- 3）TTP 治療ガイドラインを作成する
- 4）難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの保険適応の拡大を目指す

シマブの保険適応の拡大を目指す

- 5）ADAMTS13 検査の保険収載と測定キットの体外診断薬承認を目指す

### （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）本邦 TMA の症例集積の継続し、症例の特徴の解析  
奈良医大輸血部では TMA 症例におい

ADAMTS13 解析を全国の医療機関から受け付けている。1998 年から開始し、2015 年 12 月末で総数が、1369 例となった。詳細を図 1 に示すが、2015 年 1 年間で新規登録患者数は 46 例であり、後天性 TTP で 23 例、膠原病合併 TMA で 14 例が新規登録された。この 1369 例のうち、TTP の診断基準に合致する ADAMTS13 活性 10%未満の症例が 582 例あり、その詳細を表 2 に示す。このうち、ADAMTS13 活性が我々の検査の検出限界である 0.5%未満が 452 例 (77.8%) であり、大部分が著減していた。また、ADAMTS13 に対する自己抗体 (インヒビター) が 5 Bethesda 単位 (BU)/mL 以上の症例が 100 例 (17.5%)、2 BU/mL 以上が 278 例 (48.7%) であった。

#### 2) USS における ADAMTS13 遺伝子解析の継続

先天性 TTP である USS の新規登録は 2 例であったが、前年に未実施であった 1 例を加え、ADAMTS13 遺伝子解析を 3 例で行った。この 3 例で p.C908Y のホモ接合体、p.R973Nfs\*14/p.G1031D の複合ヘテロ接合体、p.C400R/p.C908Y 複合ヘテロ接合体の異常を発見した。このうち p.C908Y は日本で 2 番目に多く発見されている異常であるが、それ以外の 3 つは今までに報告が無い新規の変異である。

#### 3) TTP 治療ガイドラインの作成

添付のような TTP 治療ガイドを作成した。後天性 TTP の急性期では血漿交換とステロイド治療の併用療法を強く推奨したが、ステロイド治療は保険適用が無い。難治例や再発例では、リツキシマブを強く推奨したが、これも保険適用になっていない。難治例で経験的に使用されてき

たシクロフォスファミド、ビンクリスチン、シクロスポリンなどは、科学的根拠が明らかではないので弱い推奨とした。先天性 TTP では、ADAMTS13 を補充する意味で新鮮凍結血漿 (FFP) 輸注しか治療法が無いのが現状のため、強い推奨とした。

#### 4) 難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの保険適応の拡大

2014 年に医師主導治験を実施し、13 名が仮登録、6 名が効果判定の対象となった。全例で血漿交換が中止可能となり、血小板数の増加を認めた。重篤な有害事象は認めなかった。これらの治験結果をもとに次年度中の適用拡大を目指している。

#### 5) ADAMTS13 検査の保険収載と測定キットの体外診断薬承認

ADAMTS13 検査の保険収載に向けて、現在 ADAMTS13 検査で対外診断薬として承認されているキットがないため、まず対外診断薬承認を目指して、臨床性能試験を開始した。臨床性能試験とは、新しい対外診断用医薬品についての臨床的意義を明らかにするために、行われる試験である。今回、奈良医大、倉敷中央病院、埼玉医科大学の 3 施設を中心に実施する。ADAMTS13 活性著減例で確認する必要があるが、前向きに集めることは困難であることが予想されるので、奈良医大で保存している検体を、患者の同意を得た後に検査を実施する。

## D. 考察

TTP の診断と治療ガイドライン作成を本サブグループとして目標としているが、昨年度の診断ガイドラインに続いて、本

年度は治療ガイドを作成した。次年度は、本研究班の3年計画の最終年であり、この2つをまとめた形にして論文化したいと考えている。

1)のTMAデータベースに関しては、2015年は登録症例数の増加が減少傾向となった。この原因として、ADAMTS13活性測定が外注検査として増加していること、非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の患者登録は東京大学腎臓内科に移管したことなどによると思われる。そのため、ADAMTS13が著減したTTPと確定できた症例が多く集まり、TTPデータベースとしては効率が良くなった。しかし、TMAデータベースとしては症例の偏りが大きくなった可能性がある。次年度は、aHUSが我々の研究班に加わり、TMAサブグループとして共同で活動する予定であるので再度広い範囲のデータベースが構築できると予想される。

2)のUSS遺伝子解析は、USS新規発見症例数に依存している。上記のように外注検査としてADAMTS13検査が広く浸透すると、日本全体のUSS症例の把握が難しくなる可能性があり、広く登録を呼びかける必要がある。

3)の治療ガイドでは、急性期の治療法として、一般的に行われている血漿交換とステロイド治療を強く推奨した。ただし、ステロイド治療はTTPでは保険適用になっておらず、問題が残っている。また、CD20に対するモノクローナル抗体リツキシマブは悪性リンパ腫などで使用されている。TTPに対しては今のところ保険適用外であるが、難治例で強く推奨した。4)での取り組みが現在行われてお

り、次年度中にTTPに対しても適用拡大になることを期待している。

5)ADAMTS13検査の保険収載は、測定キットの臨床性能試験を経て、次年度中には実現したいと考えている。ADAMTS13検査は、TTPの診断のみならず、aHUSの除外診断にも必須の検査である。現状では、外注検査として結果を受け取るまでに約1週間程度の期間が必要であり、実臨床では治療方針の決定には間に合わない。この検査が保険適用となり、多数の検体が提出されることで、頻回に検査され、検査結果が迅速に判明することを期待したい。

## E. 結論

TTPの診断、治療ガイドラインを策定する目標はほぼ達成した。次年度は、このガイドラインを実臨床において保険適用下で行えるようにするために、ADAMTS13検査の保険収載とリツキシマブのTTPに対する保険適用拡大を成し遂げたいと考えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kamimoto Y, Wada H, Ikejiri M, Nakatani K, Sugiyama T, Osato K, Murabayashi N, Yamada N, Matsumoto T, Ohishi K, Ishikawa H, Tomimoto H, Ito M, Ikeda T: High frequency of decreased antithrombin level in pregnant women with thrombosis. *Int J Hematol.* 2015; 102: 253-8

- 2) Kamimoto Y, Wada H, Ikejiri M, Nakatani K, Sugiyama T, Osato K, Murabayashi N, Habe K, Mizutani H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikeda T.: Hypofibrinogenemia and the -Fibrinogen Thr312Ala Polymorphism may be Risk Factors for Early Pregnancy Loss. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015; [Epub ahead of print]
- 3) Takahashi N, Usui M, Naitoh K, Wada H, Mastsui T, Kobayashi T, Matsumoto T, Uemoto S, Isaji S: Elevated Soluble Platelet Glycoprotein VI Levels in Patients After Living Donor Liver Transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015[Epub ahead of print]
- 4) Squizzato A, Hunt BJ, Gary T. Kinasevit GT, Wada H, ten Cate H, Thachil J, Levi M, Vicente V, Angelo AD, Di Nisio M: Supportive management strategies for disseminated intravascular coagulation-An international consensus, *Thromb Haemost.* 2015 [Epub ahead of print]
- 5) Aota T, Wada H, Yamashita Y, Matsumoto T, Ohishi K, Suzuki K, Imai H, Usui M, Isaji S, Katayama N.: The efficacy of the administration of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with DIC. *Int J Hematol.* 2016; 103: 173-179
- 6) Habe K, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikejiri M, Tsuda K, Kondo M, Kamimoto Y, Ikeda T, Katayama N, Mizutani H: Plasma ADAMTS13, von Willebrand Factor (VWF), and VWF Propeptide Profiles in Patients With Connective Tissue Diseases and Antiphospholipid Syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2016 [Epub ahead of print]
- 7) 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; 442: 22-23
- 8) 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; 13: 684-5
- 9) Wada H, Aota T, Yamashita Y, Matsumoto T, Katayama N: New Insights of the Tissue Factor Pathway Inhibitor in Patients with Hypercholesterolemia Treated with Statins. *J Atheroscler Thromb.* 2015; 22: 654-5
- 10) Habe K, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikejiri M, Matsubara K, Morioka T, Kamimoto Y, Ikeda T, Katayama N, Mizutani H: Presence of antiphospholipid antibodies is a risk factor for thrombotic events

- in patients with connective tissue diseases and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Internal Med*, (in press)
- 11) Yamaguchi T, Wada H, Miyazaki S, Hasegawa M, Wakabayashi H, Asanuma K, Fujimoto N, Matsumoto T, Ohishi K, Sakaguchi A, Yamada N, Ito M, Katayama N, Sudo A: Fibrin related markers for diagnosing acute or chronic venous thromboembolism in patients with major orthopedic surgery. *Int J Hematol* 2016 (in press)
  - 12) Ikejiri M, Wada H, Yamaguchi T, Miyazaki S, Hasegawa M, Wakabayashi H, Asanuma K, Sakaguchi A, Matsumoto T, Ohishi K, Fujimoto N, Yamada N, Ito M, Katayama N, Sudo A: Comparison of three different anti-Xa assays in major orthopedic surgery patients treated with fondaparinux. *Int J Hematol* 2016 (in press)
  - 13) Toyoda H, Wada H, Miyata T, Amano K, Kihira K, Iwamoto S, Hirayama M, Komada Y: Disease recurrence after early discontinuation of eculizumab in a patient with atypical hemolytic uremic syndrome with complement C3 I1157T mutation" *J Pediatr Hematol Oncol*. 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]
  - 14) Keiko Maruyama, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Akiko Sekiya, Eriko Morishita, Toshiyuki Miyata: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. *PLoS One* 10 (7), e0133196 (2015)
  - 15) Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, José A. Fernández, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, John H. Griffin, Toshiyuki Miyata: Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying protein S K196E mutation. *Blood* 126 (19), 2247-2253 (2015)
  - 16) Yu Mi Oh, Hyung Bae Park, Jae Hun Shin, Ji Eun Lee, Ha Young Park, Dhong Hyo Kho, Jun Sung Lee, Heonsik Choi, Tomohiko Okuda, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, In-Hoo Kim, Seung Hoon Lee, Ronald Schwartz, Kyungho Choi: Ndr1 is a T cell clonal anergy factor negatively regulated by CD28-costimulation and interleukin-2. *Nat. Commun.* 6, 8698 (2015)
  - 17) Noritsugu Naito, Toshihide Mizuno, Takashi Nishimura, Satoru Kishimoto, Yoshiaki Takewa, Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kazuma Date, Akihide Umeki, Masahiko Ando, Minoru Ono, Eisuke Tatsumi: Influence of a rotational speed modulation system used with an implantable continuous-flow left ventricular assist device (EVAHEART) on von Willebrand factor dynamics. *Artif. Organs*, in press.

- 18) Xiping Fan, Johanna A. Kremer Hovinga, Hiroko Shirovani-Ikejima, Yuka Eura, Hidenori Hirai, Shigenori Honda, Koichi Kokame, Magnus Mansouri Taleghani, Anne-Sophie von Krogh, Yoko Yoshida, Yoshihiro Fujimura, Bernhard Lämmle, Toshiyuki Miyata: Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. *Int. J. Hematol.*, in press.
- 19) Thuong Manh Le, Koji Hashida, Hieu Minh Ta, Mika Takarada-Iemata, Koichi Kokame, Yasuko Kitao, Osamu Hori: Deletion of Herpud1 enhances heme oxygenase-1 expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Parkinsons. Dis.*, in press.
- 20) 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. *Transfus Med and Hemotherapy* 42;59-63, 2015
- 21) 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* 3: 208-212, 2015.
- 22) 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*, ped.12469, 2015
- 23) Kato S, Tanaka M, Isonishi A, Matsumoto M, Samori T, Fujimura Y.: A rapid, fully automated and highly sensitive ADAMTS13 gold particle immunoassay using a routine biochemistry analyser. *Br J Haematol* 171:655-658, 2015
- 24) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirovani-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y: A Novel Quantitative Hemolytic Assay Coupled with Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis Enabled Early Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Identified Unique Predisposing Mutations in Japan. *PLoS ONE*, journal.pone.0124655, 2015
- 25) Isonishi A, Bennett CL, Plaimauer B, Scheiflinger F, Matsumoto M, Fujimura Y. Poor-responder to plasma exchange therapy in acquired TTP is associated with ADAMTS13 inhibitor boosting: Visualization

- of an ADAMTS13-inhibitor complex, and its proteolytic clearance from plasma. *Transfusion* ;55: 2321-2330, 2015
- 26) Nishigori N, Matsumoto M, Koyama F, Hayakawa M, Hatakeyayama K, Ko S, Fujimura Y, Nakajima Y: von Willebrand Factor-Rich Platelet Thrombi in the Liver Cause Sinusoidal Obstruction Syndrome following Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *PLoS One*;10:e0143136. doi: 10.1371/journal.pone.0143136. 2015.
- 27) 小亀浩市: ADAMTS13. 新・血栓止血血管学「血管と血小板」,197-203 (2015)
- 28) 樋口(江浦)由佳、小亀浩市: フィブリン線維を架橋することで強固なフィブリン塊を形成して止血を誘導する合成ポリマー. *日本血栓止血学会誌* 26 (4) , 483 (2015)
- 29) 丸山慶子、小亀浩市: ヘモグロビンは GP1b を介して血小板の活性化とアポトーシスを誘導する. *日本血栓止血学会誌* 26 (2) , 692 (2015)
- 30) 樋口(江浦)由佳、小亀浩市: 先天性 TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) の遺伝子解析. *血栓と循環* , 印刷中 .
- 31) 八木秀男、松本雅則. TTP(血栓性血小板減少性紫斑病)の病態と治療. *日本内科学会雑誌* ; 104 : 607-614、2015
- 32) 吉田瑤子、松本雅則 . 補体関連因子の異常による aHUS . *臨床血液* ; 56 : 185-193、2015
- 33) 松本雅則 . 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態、診断と治療 . *日本検査血液学会雑誌* ; 16 : 223-231、2015
- 34) 松本雅則 . TMA の診断と治療 . *臨床血液* ; 56 : 232-239、2015

## 2. 学会発表

- 1) Miyakawa Y, Imada K, Ichinohe T, Yamane Y, Nishio K, Abe T, Fujimura Y, Matsumoto M, Okamoto S. Investigator-initiated clinical trial of rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura. 第 77 回日本血液学会学術集会(2015 年 10 月、石川県)
- 2) Matsumoto T, Takahashi T, Usui M, Naitoh K, Wada H, Ohishi K, Katayama N, Isaji I: Elevated soluble platelet glycoprotein VI levels in patients after living donor liver transplantation. XXVth ISTH Congress, Tronto, June 20-25, 2015
- 3) 池尻誠、和田英夫: 三重大学における先天性血栓性素因の遺伝子診断、静脈血栓塞栓症の危険因子 先天性血栓性素因と後天性要因、第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、野村コンファレンスプラザ日本橋、2015 年 2 月 28 日
- 4) 青田卓実、和田英夫、松本剛史、山下芳樹、片山直之: 日本血栓止血学会 DIC 診断基準案の検討、新 DIC 診断基準案と実際の臨床、野村コンファレンスプラザ日本橋、2015 年 2 月 28 日
- 5) 和田英夫: 日本血栓止血学会 DIC 診断基準暫定案検討、日本血栓止血学会・

- 日本救急医学会ジョイントシンポジウム「重症敗血症とDIC - 新しいDIC診断基準とアンチトロンビンの役割 -」, 第37回日本血栓止血学会学術集会、甲府市総合市民会館（甲府市）、2015年5月21日～23日
- 6) 樋口（江浦）由佳、小亀浩市、水野敏秀、巽英介、宮田敏行：補助人工心臓装着による高分子量VWFマルチマーの減少は循環開始直後に始まる。第37回日本血栓止血学会学術集会、甲府、2015年5月21日-23日
- 7) Keiko Maruyama, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Akiko Sekiya, Eriko Morishita, Toshiyuki Miyata: Development of ELISA system for detection of protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.
- 8) Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Masaki Hayakawa, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: Characteristics and outcomes of patients with Upshaw-Schulman syndrome receiving maintenance hemodialysis due to chronic renal failure. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.
- 9) Magnus Mansouri, Masanori Matsumoto, Zuzana Cermakova, Kenneth D. Friedman, James N. George, Ingrid Hrachovinova, Paul N. Knöbl, Koichi Kokame, Anne Sophie von Krogh, Reinhard Schneppenheim, Sara K. Vesley, Yoshihiro Fujimura, Bernhard Lämmle, Johanna A. Kremer Hovinga: Hereditary TTP - a young patient population with high prevalence of arterial thromboembolic events: first results from the hereditary TTP registry. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.
- 10) 宮田敏行、加藤秀樹、内田裕美子、吉田瑤子、小亀浩市、福岡利仁、要伸也、大田敏之、浦山耕太郎、藤永周一郎、櫻谷浩志、喜瀬智郎、渡邊栄三、織田成人、永田裕子、玉井宏史、小松真太郎、前沢浩司、川村尚久、永野幸治、河野智康、松本雅則、藤村吉博、南学正臣：日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者の遺伝子解析 補体系因子とDGKEの遺伝子変異。第52回日本補体系学会学術集会、名古屋、2015年8月21日-22日
- 11) 丸山慶子、小亀浩市、秋山正志、宮田敏行：野生型プロテインSおよびK196E変異体の発現精製と機能解析。第77回日本血液学会学術集会、金沢、2015年10月16日-18日
- 12) 水野敏秀、内藤敬嗣、樋口（江浦）由佳、小亀浩市、宮田敏行、築谷朋典、武輪能明、巽英介：植え込み型補助人

- 工心臓が血中 von Willebrand factor に与える影響に関する研究. 第 53 回人工臓器学会大会, 東京, 2015 年 11 月 19 日-21 日
- 13) 内藤敬嗣、西村隆、岸本諭、水野敏秀、武輪能明、樋口 (江浦) 由佳、小亀浩市、宮田敏行、小野稔、巽英介: 定常流型左室補助人工心臓に用いる自己心拍同期回転数制御システムが von Willebrand factor に及ぼす影響. 第 53 回人工臓器学会大会, 東京, 2015 年 11 月 19 日-21 日
- 14) Noritsugu Naito, Toshihide Mizuno, Takashi Nishimura, Satoru Kishimoto, Yoshiaki Takewa, Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Minoru Ono, Eisuke Tatsumi: Influence of a Rotational Speed Modulation of an Implantable Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device (EVAHEART) on von Willebrand Factor Dynamics. 23rd Annual Meeting of the International Society for Rotary Blood Pumps (ISRBP), Dubrovnik, Croatia, September 27-29, 2015.
- 15) 松本雅則、藤村吉博「TTP の診断基準について」第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2015 年 2 月 28 日、東京都
- 16) 早川正樹、藤村吉博、松本雅則「von Willebrand 因子による造血幹細胞移植後 TMA/VOD の病態解析」第 37 回日本造血細胞移植学会総会、2015 年 3 月 6 日、神戸市
- 17) Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. シンポジウム “ Japanese experience of congenital thrombotic microangiopathies ” The 11th Asian Society for Pediatric Research (ASPR 2015)、2015 年 4 月 17 日、大阪市
- 18) 森山雅人、玉木悦子、松本雅則、石西綾美、松本吉史、富永麻理恵、工藤理沙、安達聡介、生野寿史、高桑好一、宮腰淑子、小堺貴司、小林弘典、牛木隆志、柴崎康彦、増子正義、瀧澤淳、成田美和子、曾根博仁、西條康夫「妊娠を契機に診断された Upshaw-Schulman 症候群症例における第二子妊娠の周産期管理」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市、山梨県
- 19) 金谷秀平、小川孔幸、平形絢子、柳澤邦雄、石崎卓馬、三原正大、内藤千晶、半田寛、早川正樹、石西綾美、松本雅則、野島美久「若年性脳梗塞を契機に診断された高ホモシスチン血症合併 Upshaw-Schulman 症候群の 1 例」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市、山梨県
- 20) 内藤千晶、小川孔幸、柳澤邦雄、石崎卓馬、三原正大、半田寛、石西綾美、早川正樹、松本雅則、野島美久「腹部大動脈瘤切迫破裂術後に重症意識障害で発症した血栓性血小板減少性紫斑病の 1 例」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市、山梨県
- 21) 吉井由美、藤村吉博、石西綾美、堀勇二、早川正樹、車谷典男、Charles L Bennett、松本雅則「血小板輸血は後

- 天性 TTP の予後を悪化させるか？」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市、山梨県
- 22) 狩野泰輝、松下文雄、浜子二治、松本雅則、藤村吉博、近藤一直、松井太衛「ヒト VWF に存在する ABO(H)血液型抗原の付加経路の解析」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市、山梨県
- 23) 山下真理子、松本雅則、石西綾美、早川正樹、吉田瑤子、藤村吉博、緒方奈保子「滲出性加齢黄斑変性患者における Factor H と von Willebrand 因子による病態解析」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 22 日、甲府市、山梨県
- 24) 高岸波穂、堀有沙、浜子二治、松下文雄、松本雅則、早川正樹、藤村吉博、狩野泰輝、近藤一直、松井太衛「変異導入組換えポトロセチン-2 を用いた血小板凝集の制御」第 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 23 日、甲府市、山梨県
- 25) 隅志穂里、長谷川真弓、辻内智美、門池真弓、下村志帆、前田美和、早川正樹、松本雅則「血漿分画製剤による副作用の検討」第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、2015 年 5 月 29 日、東京都
- 26) Mansouri M, Matsumoto M, Cermakova Z, Friedman K, George J, Hrachovinova I, Knöbl P, Kokame K, von Krogh AS, Schneppenheim R, Vesley S, Fujimura Y, Lämmle B, Johanna A, Hovinga K. “ Hereditary TTP-a young patient population with high prevalence of arterial thromboembolic events. First results from the hereditary TTP registry ” XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015 年 6 月 23 日、Toronto/Canada
- 27) Matsui T, Hori A, Hamako J, Matsushita F, Takagishi N, Kondo K, Kano T, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. “ Regulation of VWF-GPIB interaction with modified recombinant botrocetin. ” XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015 年 6 月 23 日、Toronto/Canada
- 28) Yamashita M, Matsumoto M, Isonishi A, Yoshida Y, Hayakawa M, Fujimura Y, Ogata N. “ Analysis of plasma von willebrand factor and complement factor H polymorphisms in patients with age-related macular degeneration. ” XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015 年 6 月 23 日、Toronto/Canada
- 29) Nishigori N, Matsumoto M, Koyama F, Hayakawa M, Hatakeyama K, Fujimura Y, Nakajima Y. “ Analysis of oxaliplatin-based chemotherapy induced liver injury in patients with advanced colorectal cancer

with special references to von willbrand factor. ” XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015 年 6 月 23 日、Toronto/Canada

- 30) Matsumoto M, Isonishi A, Kokame K, Hayakawa M, Yagi H, Miyata T, Fujimura Y. “ Characteristics and outcomes of patients with Up-Shaw-Schulman syndrome receiving maintenance hemodialysis due to chronic renal failure. ” XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015 年 6 月 24 日、Toronto/Canada
- 31) Yoshii Y, Yagi H, Hayakawa M, Isonishi A, Yoshida N, Fujimura Y, Matsumoto M. “ Characteristics and outcomes in 247 patients with ADAMTS13 activity-deficient primary acquired TTP ” 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日、金沢市、石川県
- 32) Miyakawa Y, Imada K, Ichinohe T, Yamane Y, Nishio K, Abe T, Fujimura Y, Matsumoto M, Okamoto S. “ Investigator-initiated clinical trial of rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura ” 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日、金沢市、石川県
- 33) 松本雅則 教育講演 「TMA の診断と治療」第 77 回日本血液学会学術集会、

2015 年 10 月 16 日、金沢市、石川県  
34) 松本雅則 シンポジウム「血栓性微小血管症 (TMA) ～診断と輸血療法を含めた治療～」第 22 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、2015 年 10 月 23 日、長野県

## H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

**表1 TMA全体のADAMTS13活性分布(n=1369)**  
(奈良医大輸血部1998.7-2015.12)

	Congenital TMAs (n=149)		Acquired TMAs (n=1220)											Total (n=1369)
	USS (n=59)	aHUS (n=90)	Primary (n=545)				Secondary (n=675)							
			TTP (n=420)	HUS (n=125)	Drug-induced (n=42)			Malignancies (n=84)	HSCT (n=89)	Pregnancy (n=24)	STEC-HUS (n=45)	Others (Liver cirrhosis, etc) (n=82)		
					TC(n=25)/CL(n=2)	MMC (n=12)	Others (n=3)						CTD/AD (n=309)	
ADAMTS13:AC (%)	(n=58)	(n=90)	(n=420)	(n=125)	(n=25/n=2)	(n=12)	(n=3)	(n=309)	(n=84)	(n=89)	(n=24)	(n=45)	(n=82)	(n=1368)
<10	58	0	347	1	23	0	3	96	11	4	7	1	31	582
10~<25	0	5	35	14	2	2	0	62	22	27	1	7	13	190
25~<50	0	24	29	62	1	6	0	100	33	42	9	23	23	352
50	0	61	9	48	1	4	0	51	18	16	7	14	15	244
1年間の増加症例	2	0	23	0	0	0	0	14	0	1	2	0	4	46

TC: チクロピジン、CL: クロピドグレル  
 CTD/AD: Connective tissue diseases and Autoimmune diseases  
 HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation  
 STEC: shiga toxin producing *E.coli*

**表2 ADAMTS13活性10%未満症例のまとめ(n=582)**  
(奈良医大輸血部1998.7-2015.12)

	Congenital TMAs (n=59)	Acquired TMAs (n=524)									Total (n=582)
	USS (n=59)	Primary (n=347)	Secondary (n=176)								
		TTP (n=347)	Drug-induced (n=26)	CTDs/ADs (n=96)	Malignancies (n=11)	HSCT (n=4)	Pregnancy (n=7)	STEC-HUS (n=1)	Others (Liver cirrhosis, etc) (n=31)		
			TC (n=25)/CL (n=1)								
ADAMTS13:AC (%)	(n=58)	(n=347)	(n=26)	(n=96)	(n=11)	(n=4)	(n=7)	(n=1)	(n=31)	(n=581)	
<0.5	35	291	21	71	5	0	6	0	23	452	
0.5~<5	21	22	5	14	4	1	1	0	5	73	
5~<10	2	21	0	11	0	3	0	1	3	41	
マルチマーのみ <3(3~10)	0	12(1)	0	0	1(1)	0	0	0	0	15	
ADAMTS13:INH (BU/ml)	(n=58)	(n=346)	(n=26)	(n=94)	(n=10)	(n=1)	(n=7)	(n=1)	(n=28)	(n=571)	
>5	0	71	6	13	4	0	0	0	6	100	
2~<5	0	119	13	31	2	0	3	0	10	178	
0.5~<2	7	145	7	39	3	0	4	1	11	217	
<0.5	51	11	0	11	1	1	0	0	1	76	

TC: チクロピジン、CL: クロピドグレル  
 CTD/AD: Connective tissue diseases and Autoimmune diseases  
 HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation  
 STEC: shiga toxin-producing *E.coli*

## TTP 治療ガイド

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura : TTP)は、緊急に治療を必要とする致死的疾患である。原因不明の血小板減少と溶血性貧血を認めた場合に本疾患を疑うことが重要である。指定難病の診断基準では、ADAMTS13 活性が10%未満の症例のみを TTP としているが、10%以上の症例でも同様の治療方法が有効な症例も存在する。また、ADAMTS13 活性の結果が判明するまでに現状では数日を要するため、病状によってはその結果を待たずに治療を開始する必要がある。

TTP には先天性 (Upshaw-Schulman 症候群 : USS) と、後天性が存在する。先天性は ADAMTS13 遺伝子異常により、後天性は ADAMTS13 に対する自己抗体 (インヒビター) が産生されることにより発症する。ADAMTS13 活性が10%未満に低下している症例でインヒビターが存在すれば後天性である。それ以外の症例は USS が疑われるが、経時的な同活性の確認や両親の検査で後天性との鑑別が可能な場合があるが、最終的な診断は ADAMTS13 遺伝子解析が必要である。

本ガイドラインでは後天性を中心に記載し、最後に先天性を別項目として記載する。後天性は成人について記載しており、小児に対する薬剤の用法・用量は経験が少ないため注意を要する。ADAMTS13 活性非著減例 (10%以上) の治療については、本ガイドでは扱わない。

### 1. 後天性 TTP

#### 1) 急性期

原因不明の血小板減少と溶血性貧血を認めた場合、後天性 TTP を疑うことが重要である。できるだけ、早期に治療を開始することが必要である。他疾患との鑑別のため直接クームス試験陰性を確認し、破碎赤血球の存在が参考になる。また、急性期には心血管イベントによる死亡が問題となるため、トロポニンを確認する。

#### A. 初期治療

##### a) 血漿交換 (1A)

新鮮凍結血漿 (fresh frozen plasma: FFP) を置換液とした血漿交換を1日1回連日施行する。FFP の量は、患者循環血漿量の1~1.5倍 (一般に循環血漿量は40~50mL/kg とされる) を用いて交換する。血漿交換が有効である理由として、1) ADAMTS13 の補充、2) ADAMTS13 インヒビターの除去、3) ADAMTS13 で切断できない超高分子量 von Willebrand 因子重合体の除去、などが予想される。1) の効果が期待できないため、アルブミンを置換液として使用してはいけない。なお、緊急避難的に FFP 輸注が行われることがあるが、FFP を置換液とした血漿交換と比べると明らかに効果が悪いことが報告されている。

#### 血漿交換

FFP 50-75mL/kg を置換液として、1日1回連日施行する。

理想としては、英国ガイドラインに記載されているように、血小板が正常化 (15万/uL 以上) して、2日後まで連日施行することであるが、日本国内では保険適

用（1週間に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（1B）

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（保険適用外）

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（保険適用外）

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（2B）

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（保険適用外）

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（1A）。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（1B）。

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(1B)。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、その間も血漿交換が必要な場合がある。

**a) リツキシマブ(1B)(保険適用外)**

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 375mg/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(2B)(保険適用外)**

生理食塩水 500mL

シクロfosファミド 500mg/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) ピンクリスチン(2B)(保険適用外)**

生理食塩水 20ml

ピンクリスチン 1mg/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(2B)(保険適用外)**

シクロスポリン 4mg/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(保険適用外)**

以前は脾臓摘出(2C)、免疫グロブリン大量療法(2C)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場合がある。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存在する。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 輸注 (1B)

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。この際ドナーの人数が最小となるように考慮する。

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。

表 1 GRADE system による推奨度

---

推奨度の強さ
1: 強い推奨 殆どの患者において、良好な結果が不良な結果より明らかに勝っており、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
推奨の基になったエビデンスの質
A: 複数の RCTs 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: RCTs 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 RCTs 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

---

註: RCT; ランダム化比較試験

## ADAMTS13 活性著減後天性原発性 TTP の予後に関与する臨床的特徴

研究分担者 松本雅則 奈良県立医科大学 輸血部 教授

研究協力者 吉井由美 奈良県立医科大学 輸血部

### 研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、血小板減少、溶血性貧血などの臨床所見で診断されてきたが、最近では ADAMTS13 活性著減で診断されるようになった。日本国内でも TTP の診断基準として 10%未満となったが、現在まで奈良医大輸血部で集積した同活性 5%未満の後天性・原発性 TTP(aTTP)247 例の予後に関与する臨床的特徴を解析した。

今回解析した aTTP 症例は、60 歳以上が 41%、女性が 55%と海外の報告と比べると高齢で男性が多い傾向が認められた。その他、2 万/uI 未満の著明の血小板減少と高度の精神神経症状を伴う症例が多いが、腎機能障害は軽度である症例が多いことが明らかになった。多変量解析で、60 歳以上、高度精神神経症状が予後不良因子であり、血漿交換とステロイド治療によって予後が改善することが示された。

ADAMTS13インヒビター高値も予後不良因子と報告されているが、今回の検討では有意ではなかった。今回検討した症例ではリツキシマブなど免疫抑制剤が44%の症例で追加されており、それによって予後が改善された可能性が予想された。現状ではリツキシマブは保険適用ではないにもかかわらず、21%の症例で高頻度に使用されていることより、今後早期に保険適用となることを期待したい。

### 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、古くは血小板減少、溶血性貧血、腎機能障害、発熱、精神神経症の古典的 5 徴候が用いられてきた。その後、他に原因が明らかでない場合、血小板減少と溶血性貧血の 2 徴候で診断されてきた。最近では、TTP の病因として ADAMTS13 活性著減が報告され、同活性著減で診断されるようになった。ただ、活性著減レベルが 5%未満とされてきたが、10%未満が国際的に用いられるようになった。日本国内でも、昨年度に本研究班

から ADAMTS13 活性 10%未満を TTP の診断基準として提唱した。

今後は ADAMTS13 活性 10%で診断されることになるため、現在まで我々が同活性 5%未満で診断し集積した後天性原発性 TTP(aTTP)247 例の臨床的特徴および予後についてまとめた。

### B . 研究方法

奈良医大輸血部では日本全国の医療機関から ADAMTS13 検査を通じて血栓性微小血管症(TMA)症例の集積を行い、データベースを構築している。1998 年から 2013

年末の期間に 1211 例を集積した。このうち、ADAMTS13 活性が 5%未満に著減した aTTP 247 例について解析した。

ADAMTS13 活性およびインヒビターは chromogenic ADAMTS13-act-ELISA(カイノス)で測定した。TTP の重症度分類は、神経学的症状、腎機能障害、血小板数、ヘモグロビン値の 4 項目をもとに算定される Rose&Eldor(Blood Reviews 7. 94-103, 1993)のスコアを用いた。統計解析は EZR を用いて、Logrank 検定、Cox 比例ハザード回帰を施行した。

### **(倫理面への配慮)**

検体採取に際しては、主治医より十分な説明を行い、同意を得た。また、TMA コホート研究は奈良医大の倫理委員会の承認を得ている。

## **C . 研究結果**

患者背景を表 1 に示す。60 歳以上が 41%、女性が 55%であり、海外の報告に比べて年齢が高く、男性が多かった。5 徴候に関して、Rose&Eldor のスコアに従えば、精神神経症状が 2 点以上の重症が 49%とほぼ半数であった。腎機能障害はなしが 53%で、血小板減少も 2 万/uI 未満が 89%であった。ヘモグロビンは 9 g/dI 未満が 78%ともっとも多く、発熱は 68%に認められた。重症度スコアは 6 点以上が 53%とかなり重症と考えられた。インヒビターは 2 Bethesda 単位 (BU) /ml 以上が 61%と、比較的高いものが多かった。治療に関して、血漿交換が 94%、ステロイド治療が 82%と非常に多くの症例で実施されていた。さらに、リツキシマブは保険適用になっていないにもかかわらず

らず、21%の症例で実施されていた。

上記の項目について生存率に関する単変量解析では、図 1 に示すように、60 歳以上であること(A)、高度の精神神経症状を有する症例で予後不良であった(B)。また、治療に関しては血漿交換の実施(C)、ステロイドの治療(D)が生存率を上昇させた。

次に多変量解析では、表 2 に示すように血漿交換の実施、ステロイド治療、精神神経症状の重症度、高齢(60 歳以上)が生存率に関与していることが明らかになった。

## **D . 考察**

今回、ADAMTS13 活性が 5%未満である aTTP 症例について予後を中心に解析した。日本国内の症例は、既報(Matsumoto M, et al. PLOS ONE, 2012)のごとく、海外の報告と比べ比較的高齢で男性が多いことが判明しており、同様の結果であった。予後に関しては多変量解析で、60 歳以上であること、精神神経障害が重症であることが予後不良の因子であった。高齢者はそれだけで予後不良と考えられ、精神神経症症状は予後不良因子と既に報告されている。

Rose & Eldor 重症度スコアは、血小板減少、貧血、腎機能障害、中枢神経症状の 4 項目について 0 点、1 点、2 点と点数化し、8 点が最も重症である。4 点以上が重症とされているが、その中でも 6 点以上は 4 点、5 点と比べて 30 日後の死亡率が 3.8 倍になると報告されている。今回の解析では、中枢神経症状が高度である症例は約半数あり、多変量解析で有意な

予後不良因子として抽出された。しかし単に、重症度スコアが6点以上というのみでは統計学的には有意とはいえず、TTPの5徴の中でも高度の中枢神経症状を有するものは特に注意が必要であることが示された。

治療に関しては、新鮮凍結血漿(FFP)を置換液とした血漿交換とステロイド治療が急性期のaTTPに対して推奨される治療である。血漿交換は、前向き研究で有効性が示されているが、ステロイド治療に関して現在までエビデンスは明らかではなかった。今回我々の検討では、ステロイドの治療の実施は多変量解析でも予後良好因子であることが示された。

既報(Hovinga K, et al. Blood, 2010)ではインヒビター $\geq 2$ BU/ml以上は予後不良因子とされている。我々の解析ではインヒビター高値は予後不良因子として検出されなかった。その原因として、ステロイド以外の免疫抑制剤の使用が影響している可能性がある。単変量解析では、免疫抑制剤の使用が予後を改善することが認められたが、多変量解析では予後因子としては有意でなかった。また、ステロイド以外の免疫抑制剤の追加症例を除いて生存率を検討すると、インヒビター $\geq 2$ BU/ml以上で有意に生存率が低かった( $p < 0.05$ )。免疫抑制剤の一つがリツキシマブであり、保険適用になっていないにもかかわらず21%の症例で使用されていた。海外でもリツキシマブはTTPに対する標準治療として使用されていることから、日本国内においても早期にTTPに対して適用拡大となることが期待される。

## E . 結論

本邦のADAMTS13活性著減aTTPの特徴として、2万/uI未満の著明の血小板減少と高度の精神神経症状を伴うが、腎機能障害は認めないか軽度であることが明らかになった。予後に関しては、60歳以上、高度精神神経症状が予後不良因子であり、血漿交換、ステロイド治療によって予後が改善することが示された。ADAMTS13インヒビター高値も予後不良因子とされているが、今回の検討では予後悪化因子ではなかった。その理由として、今回の症例ではリツキシマブなど免疫抑制剤が44%で追加されており、それによって予後が改善された可能性が予想された。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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. **Transfus Med and Hemotherapy** 42;59-63, 2015
- 2) 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** 3: 208-212, 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, ped.**12469, 2015
  - 4) Kato S, Tanaka M, Isonishi A, Matsumoto M, Samori T, Fujimura Y.: A rapid, fully automated and highly sensitive ADAMTS13 gold particle immunoassay using a routine biochemistry analyser. **Br J Haematol** 171:655-658, 2015
  - 5) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirotani-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y: A Novel Quantitative Hemolytic Assay Coupled with Restriction Fragment Length Polymorphisms Analysis Enabled Early Diagnosis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and Identified Unique Predisposing Mutations in Japan. **PLoS ONE**, journal.pone.0124655, 2015
  - 6) Isonishi A, Bennett CL, Plaimauer B, Scheiflinger F, Matsumoto M, Fujimura Y. Poor-responder to plasma exchange therapy in acquired TTP is associated with ADAMTS13 inhibitor boosting: Visualization of an ADAMTS13-inhibitor complex, and its proteolytic clearance from plasma. **Transfusion** ;55: 2321-2330, 2015
  - 7) Nishigori N, Matsumoto M, Koyama F, Hayakawa M, Hatakeyayama K, Ko S, Fujimura Y, Nakajima Y: von Willebrand Factor-Rich Platelet Thrombi in the Liver Cause Sinusoidal Obstruction Syndrome following Oxaliplatin-Based Chemotherapy. **PLoS One**;10:e0143136. doi: 10.1371/journal.pone.0143136. 2015.
  - 8) 八木秀男、松本雅則. TTP(血栓性血小板減少性紫斑病)の病態と治療. **日本内科学会雑誌** ;104 : 607-614、2015
  - 9) 吉田瑤子、松本雅則 . 補体関連因子の異常によるaHUS . **臨床血液** ; 56 : 185-193、2015
  - 10) 松本雅則 . 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態、診断と治療 . **日本検査血液学会雑誌** ; 16 : 223-231、2015
  - 11) 松本雅則 . TMAの診断と治療 . **臨床血液** ; 56 : 232-239、2015
- ## 2. 学会発表
- 1) 松本雅則、藤村吉博「TTPの診断基準について」第9回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2015年2月28日、東京都
  - 2) 早川正樹、藤村吉博、松本雅則「von Willebrand 因子による造血幹細胞移植後 TMA/VOD の病態解析」第37回日本造血細胞移植学会総会、2015年3

- 月6日、神戸市
- 3) Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. シンポジウム “ Japanese experience of congenital thrombotic microangiopathies ” The 11th Asian Society for Pediatric Research (ASPR 2015)、2015年4月17日、大阪市
  - 4) 森山雅人、玉木悦子、松本雅則、石西綾美、松本吉史、富永麻理恵、工藤理沙、安達聡介、生野寿史、高桑好一、宮腰淑子、小堺貴司、小林弘典、牛木隆志、柴崎康彦、増子正義、瀧澤 淳、成田美和子、曾根博仁、西條康夫「妊娠を契機に診断された Upshaw-Schulman 症候群症例における第二子妊娠の周産期管理」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月22日、甲府市、山梨県
  - 5) 金谷秀平、小川孔幸、平形絢子、柳澤邦雄、石崎卓馬、三原正大、内藤千晶、半田 寛、早川正樹、石西綾美、松本雅則、野島美久「若年性脳梗塞を契機に診断された高ホモシスチン血症合併 Upshaw-Schulman 症候群の1例」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月22日、甲府市、山梨県
  - 6) 内藤千晶、小川孔幸、柳澤邦雄、石崎卓馬、三原正大、半田 寛、石西綾美、早川正樹、松本雅則、野島美久「腹部大動脈瘤切迫破裂術後に重症意識障害で発症した血栓性血小板減少性紫斑病の1例」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月22日、甲府市、山梨県
  - 7) 吉井由美、藤村吉博、石西綾美、堀勇二、早川正樹、車谷典男、Charles L Bennett、松本雅則「血小板輸血は後天性 TTP の予後を悪化させるか？」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月22日、甲府市、山梨県
  - 8) 狩野泰輝、松下文雄、浜子二治、松本雅則、藤村吉博、近藤一直、松井太衛「ヒト VWF に存在する ABO(H)血液型抗原の付加経路の解析」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月22日、甲府市、山梨県
  - 9) 山下真理子、松本雅則、石西綾美、早川正樹、吉田瑤子、藤村吉博、緒方奈保子「滲出性加齢黄斑変性患者における Factor H と von Willebrand 因子による病態解析」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月22日、甲府市、山梨県
  - 10) 高岸波穂、堀 有沙、浜子二治、松下文雄、松本雅則、早川正樹、藤村吉博、狩野泰輝、近藤一直、松井太衛「変異導入組換えボトロセチン-2 を用いた血小板凝集の制御」第37回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月23日、甲府市、山梨県
  - 11) 隅 志穂里、長谷川真弓、辻内智美、門池真弓、下村志帆、前田美和、早川正樹、松本雅則「血漿分画製剤による副作用の検討」第63回日本輸血・細胞治療学会総会、2015年5月29日、東京都
  - 12) Mansouri M, Matsumoto M, Cermakova Z, Friedman K, George J, Hrachovinova I, Knöbl P, Kokame K, von Krogh AS, Schneppenheim R, Vesley S, Fujimura Y, Lämmle

- B, Johanna A, Hovinga K. "Hereditary TTP-a young patient population with high prevalence of arterial thromboembolic events. First results from the hereditary TTP registry" XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015年6月23日、Toronto/Canada
- 13) Matsui T, Hori A, Hamako J, Matsushita F, Takagishi N, Kondo K, Kano T, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. "Regulation of VWF-GPIB interaction with modified recombinant botrocetin." XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015年6月23日、Toronto/Canada
- 14) Yamashita M, Matsumoto M, Isonishi A, Yoshida Y, Hayakawa M, Fujimura Y, Ogata N. "Analysis of plasma von willebrand factor and complement factor H polymorphisms in patients with age-related macular degeneration." XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015年6月23日、Toronto/Canada
- 15) Nishigori N, Matsumoto M, Koyama F, Hayakawa M, Hatakeyama K, Fujimura Y, Nakajima Y. "Analysis of oxaliplatin-based chemotherapy induced liver injury in patients with advanced colorectal cancer with special references to von willbrand factor." XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015年6月23日、Toronto/Canada
- 16) Matsumoto M, Isonishi A, Kokame K, Hayakawa M, Yagi H, Miyata T, Fujimura Y. "Characteristics and outcomes of patients with Up-Shaw-Schulman syndrome receiving maintenance hemodialysis due to chronic renal failure." XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis and 61st Annual SSC Meeting、2015年6月24日、Toronto/Canada
- 17) Yoshii Y, Yagi H, Hayakawa M, Isonishi A, Yoshida N, Fujimura Y, Matsumoto M. "Characteristics and outcomes in 247 patients with ADAMTS13 activity-deficient primary acquired TTP" 第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16日、金沢市、石川県
- 18) Miyakawa Y, Imada K, Ichinohe T, Yamane Y, Nishio K, Abe T, Fujimura Y, Matsumoto M, Okamoto S. "Investigator-initiated clinical trial of rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura" 第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16日、金沢市、石川県

- 19) 松本 雅則 教育講演 「TMA の診断と治療」第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日、金沢市、石川県
- 20) 松本 雅則 シンポジウム「血栓性微小血管症 (TMA ) ~ 診断と輸血療法を含めた治療法 ~ 」第 22 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、2015 年 10 月 23 日、長野県

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表 1 患者背景

因子		症例数	割合
年齢	60歳未満	146	59.1%
	60歳以上	101	40.9%
性別	女性	136	55.1%
	男性	111	44.9%
精神神経症状	なし	59	23.9%
	軽度	67	27.1%
	高度	121	49.0%
腎機能異常	なし	131	53.0%
	軽度	101	40.9%
	高度	15	6.1%
血小板数	2万/ $\mu$ l	28	11.3%
	<2万/ $\mu$ l	219	88.7%
ヘモグロビン (Hb)	>12g/dl	10	4.0%
	9-12g/dl	45	18.2%
	<9g/dl	192	77.7%
発熱	あり	169	68.4%
	なし	78	31.6%
重症度スコア	<6	116	47.0%
	6	131	53.0%
ADAMTS13インヒビター力価	<2BU/ml	96	38.9%
	2BU/ml	151	61.1%
血漿交換	あり	231	93.5%
	なし	16	6.5%
ステロイド	あり	202	81.8%
	なし	45	18.2%
ステロイド以外の免疫抑制剤	あり	90	36.4%
	なし	157	63.6%
リツキシマブ	あり	52	21.1%
	なし	195	78.9%
血小板輸血	あり	50	20.2%
	なし	197	79.8%

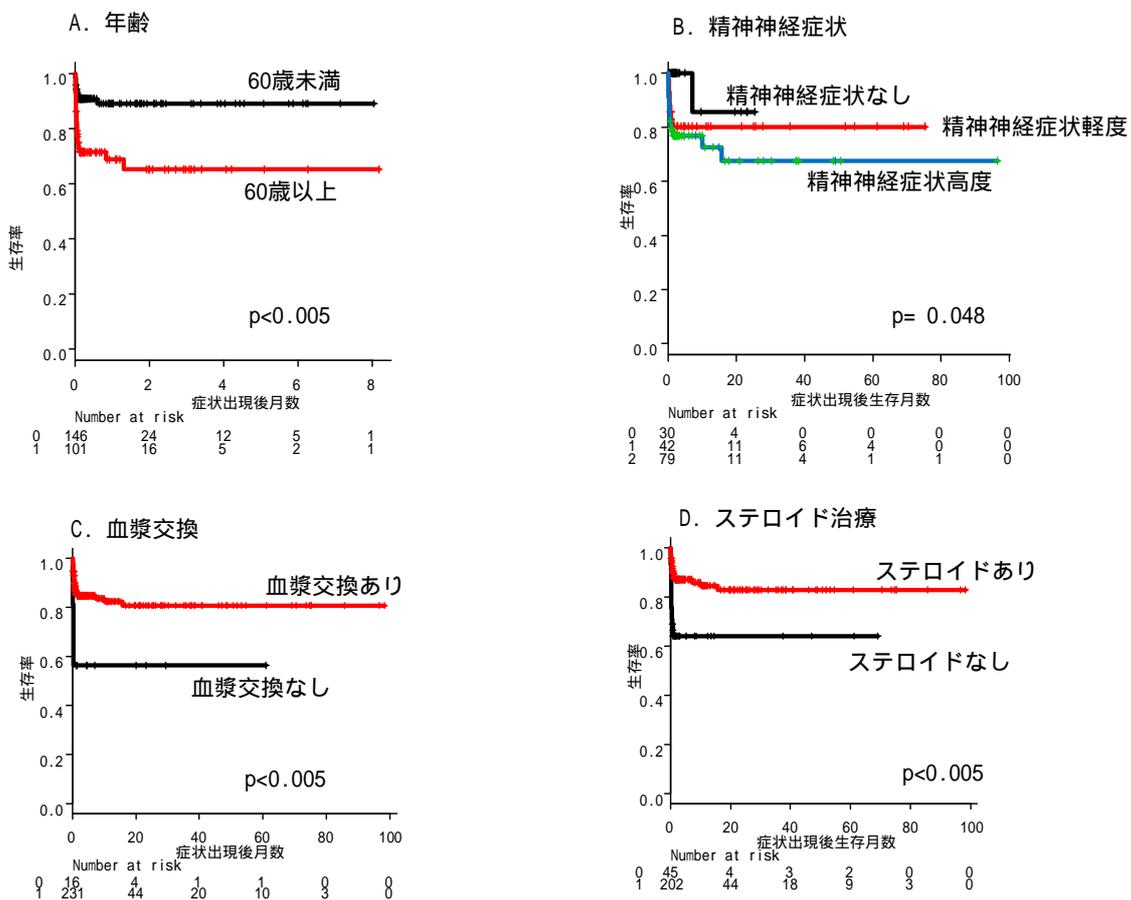


図1 様々な因子による生存率の相違

表2 .生存率に対する多変量解析の結果

Factor	Hazard ratio	p.value
血漿交換あり	0.21 (0.09-0.50)	<0.0005
ステロイド療法あり	0.40 (0.20-0.80)	<0.01
ステロイド以外の免疫抑制剤あり	0.63 (0.27-1.47)	0.28
精神神経症状あり	1.89 (1.18-3.02)	<0.01
年齢 60歳以上	2.73 (1.43-5.21)	<0.005

## 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

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）について、治療ガイド（案）の作成を分担し、TTP の診断に必要な ADAMTS13 体外診断薬の治験体制構築を行い、TTP に対するリツキシマブの適応拡大に関する支援を行った。

### A . 研究目的

平成 27 年 1 月に TTP は指定難病となったが、国内には診療ガイドラインが整備されていない。また、難病の指定要件に含まれる ADAMTS13 酵素活性の測定は、研究機関または民間の検査会社に委託可能であるが、保険収載されていない。今年度は、治療ガイド（案）の作成、ADAMTS13 体外診断薬の開発支援、リツキシマブの適応拡大に関する支援を行った。

### B . 研究方法

TTP 治療ガイド（案）（別紙）を作成し、研究班構成員による査読を受けた。今後、関連学会の診療委員会などで査読を受ける予定である。ADAMTS13 体外診断薬は、PMDA の対面助言を受け、臨床性能試験を行うことにした。なお、リツキシマブの医師主導治験は平成 26 年 12 月に終了しており、適応拡大に向けた PMDA との協議について支援を行う。アメリカ血液学会総会に参加して、TTP ガイドライン作成と開発に必要な情報を収集する。

### C . 研究成果

TTP 治療ガイド（案）が完成した。今後

は日本血液学会、または日本血栓止血学会の専門委員会に審査を依頼予定。学会を通じたパブリックコメントの収集も検討する。ADAMTS13 体外診断薬の開発権をもつカイノス（株）が臨床性能試験を行うにあたり、試験のデザイン、試験施設の選定、PMDA への回答などについて支援した。リツキシマブの適応拡大に関しても PMDA への対応を支援した。なお、アメリカ血液学会参加により、欧米における TTP 診療ガイドラインの整備状況、新薬と診断法の開発に関する最新情報を入手できた。

### D . 考察

今年度の研究により、TTP 治療ガイド（案）が完成した。また、ADAMTS13 体外診断薬の臨床性能試験が平成 28 年 1 月から開始、リツキシマブの適応拡大に向けた申請準備が進められている。新しい診断薬と新規治療法の承認を見越して、診断と治療を含む包括的な診療ガイドライン（案）を作成することにした。

### E . 結論

本研究により国内で初めて治療ガイド（案）が完成した。希少疾病に関する標

準的治療を提示できるようになったことは、意義深い。なお、ADAMTS13 診断薬と抗体医薬リツキシマブが承認されれば、国内の TTP 診療も欧米に追いつくことができると期待される。

## **F . 健康危険情報**

該当なし

## **G . 研究発表**

### **1 . 論文発表**

なし

### **2 . 学会発表**

第 77 回 日本血液学会学術集会（2015 年 10 月、石川県）

Investigator-initiated clinical trial of rituximab for thrombotic thrombocytopenic purpura. Miyakawa Y, Imada K, Ichinohe T, Yamane Y, Nishio K, Abe T, Fujimura Y, Matsumoto M, Okamoto S.

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

## 厚生労働科学研究費補助金

(難治性疾患克服研究事業「血液凝固異常症に関する調査研究」(分担)研究報告書

研究分担者 和田英夫 三重大学 医学部臨床検査医学 准教授

### 研究要旨

血栓性微小血管障害(TMA)と播種性血管内凝固(DIC)の、一般的検査の比較検討を行った。赤血球数ならびに血小板数は、TMA群でより著しく低下した。アルブミン値はDIC群でより低下し、クレアチニン値、LDH値ならびに総ビリルビン値は、TMA群でより有意に増加した。PT比やFDP値はDIC群で有意に高値であり、fibrinogen値はDIC群で有意に低値であった。診断精度を上げるため、さらに詳細な検討が必要と考えられた。

### A. 目的

救急領域などでは、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)や非定型性溶血性尿毒症症候群(HUS)を含む血栓性微小血管障害(TMA)と播種性血管内凝固(DIC)との鑑別が必要といわれている。TTPではADAMTS13値が著減し、aHUSでは補体制御系因子の異常が診断根拠になる。しかし、上記の検査値が出るまでに時間を要し、一般的な検査である程度の鑑別診断をする必要がある。ここでは、一般的検査について、TMA患者とDICの比較検討を行った。

### B. 研究方法

対象症例は、9例のaHUS患者を含むTMA患者は43例(中央値, 44歳; 25-75%tile, 21-59歳; 男女比, 23:20)、DIC患者は56症例(57歳, 38.5-67.5歳; 31:26)であった。DICの基礎疾患は、白血病30例、固型癌12例、感染症12例、その他3例であった。DICの診断は厚生労働省の

DIC診断基準によった。TMAの診断は、微小血管障害性の溶血性貧血(MHA)、血小板減少、臓器障害の有無によった。本研究では、両群の一般的検査の統計学的検討を行った。数値は中央値ならびに25-75%tileで現し、有意差検定はMann-whitney U検定を行った。

### C. 研究結果

赤血球数ならびに血小板数は両群とも著しく低下したが、TMA群の方がより低値を示した(表1)。白血球数は両群間に有意な差を認めなかった。

生化学所見では、アルブミン値はDIC群でより低下し、クレアチニン値、LDH値ならびに総ビリルビン値は、TMA群でより有意に増加した(表2)。

止血検査では、プロトロンビン時間(PT)比はDIC群で有意に高値であり、フィブリノゲン値はDIC群で有意に低値であった(表3)。フィブリノゲンならびにフィブリン分解産物(FDP)値はDIC群で有意

に高値であったが、TMA例でも高値の症例が見られた。

#### **D . 考察**

TMA と DIC における一般的検査の比較検討では、赤血球数ならびに血小板数は TMA 群でより著しく低下し、LDH 値ならびに総ビリルビン値は、TMA 群でより有意に増加することから、TMA 群では MHA による影響がより強く出ていることが示唆された。しかし、DIC 群でも TMA を合併するものがあり、より緻密な鑑別が必要と考えられた。アルブミン値は DIC 群でより低下し、サードスペースへの漏出が DIC で著明であり、クレアチニン値は逆に TMA 群で高いことから、腎障害は TMA 群でより高度であることが示唆された。DIC 群では、PT 比や FDP 値は有意に高値で、フィブリノゲン値は有意に低値であることから、DIC 群の方が凝固系異常は著明であるが、TMA 例でも FDP 値が高知例が認められた。また、今回の検討では感染症 DIC が少ないことが、止血検査で著しい有意差が出た原因と考えられる。

#### **E . 結論**

TMA 群では貧血がより著明で、溶血関連検査の異常がより強く、腎障害も著しかった。DIC 群ではアルブミン値が低く、止血異常が著明であった。

#### **F . 健康危険情報**

なし

#### **G . 研究発表**

##### **1 . 論文発表**

- 1) Kamimoto Y, Wada H, Ikejiri M, Nakatani K, Sugiyama T, Osato K, Murabayashi N, Yamada N, Matsumoto T, Ohishi K, Ishikawa H, Tomimoto H, Ito M, Ikeda T: High frequency of decreased antithrombin level in pregnant women with thrombosis. *Int J Hematol.* 2015; 102: 253-8
- 2) Kamimoto Y, Wada H, Ikejiri M, Nakatani K, Sugiyama T, Osato K, Murabayashi N, Habe K, Mizutani H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikeda T.: Hypofibrinogenemia and the -Fibrinogen Thr312Ala Polymorphism may be Risk Factors for Early Pregnancy Loss. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015; [Epub ahead of print]
- 3) Takahashi N, Usui M, Naitoh K, Wada H, Mastsui T, Kobayashi T, Matsumoto T, Uemoto S, Isaji S: Elevated Soluble Platelet Glycoprotein VI Levels in Patients After Living Donor Liver Transplantation. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015[Epub ahead of print]
- 4) Squizzato A, Hunt BJ, Gary T. Kinasevitz GT, Wada H, ten Cate H, Thachil J, Levi M, Vicente V, Angelo AD, Di Nisio M: Supportive management strategies for disseminated intravascular coagulation-An international consensus, *Thromb Haemost,* 2015 [Epub ahead of print]

- 5) Aota T, Wada H, Yamashita Y, Matsumoto T, Ohishi K, Suzuki K, Imai H, Usui M, Isaji S, Katayama N.: The efficacy of the administration of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with DIC. *Int J Hematol.* 2016; 103: 173-179
- 6) Habe K, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikejiri M, Tsuda K, Kondo M, Kamimoto Y, Ikeda T, Katayama N, Mizutani H: Plasma ADAMTS13, von Willebrand Factor (VWF), and VWF Propeptide Profiles in Patients With Connective Tissue Diseases and Antiphospholipid Syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2016 [Epub ahead of print]
- 7) 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; 442: 22-23
- 8) 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; 13: 684-5
- 9) Wada H, Aota T, Yamashita Y, Matsumoto T, Katayama N: New Insights of the Tissue Factor Pathway Inhibitor in Patients with Hypercholesterolemia Treated with Statins. *J Atheroscler Thromb.* 2015; 22: 654-5
- 10) Habe K, Wada H, Matsumoto T, Ohishi K, Ikejiri M, Matsubara K, Morioka T, Kamimoto Y, Ikeda T, Katayama N, Mizutani H: Presence of antiphospholipid antibodies is a risk factor for thrombotic events in patients with connective tissue diseases and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Internal Med,* (in press)
- 11) Yamaguchi T, Wada H, Miyazaki S, Hasegawa M, Wakabayashi H, Asanuma K, Fujimoto N, Matsumoto T, Ohishi K, Sakaguchi A, Yamada N, Ito M, Katayama N, Sudo A: Fibrin related markers for diagnosing acute or chronic venous thromboembolism in patients with major orthopedic surgery. *Int J Hematol* 2016 (in press)
- 12) Ikejiri M, Wada H, Yamaguchi T, Miyazaki S, Hasegawa M, Wakabayashi H, Asanuma K, Sakaguchi A, Matsumoto T, Ohishi K, Fujimoto N, Yamada N, Ito M, Katayama N, Sudo A: Comparison of three different anti-Xa assays in major orthopedic surgery patients treated with fondaparinux. *Int J Hematol* 2016 (in press)
- 13) Toyoda H, Wada H, Miyata T, Amano K, Kihira K, Iwamoto S, Hirayama M, Komada Y: Disease recurrence after early discontinuation of

eculizumab in a patient with atypical hemolytic uremic syndrome with complement C3 I1157T mutation" J Pediatr Hematol Oncol. 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]

## 2. 学会発表

- 1) Matsumoto T, Takahashi T, Usui M, Naitoh K, Wada H, Ohishi K, Katayama N, Isaji I: Elevated soluble platelet glycoprotein VI levels in patients after living donor liver transplantation. XXVth ISTH Congress, Toronto, June 20-25, 2015
- 2) 池尻誠、和田英夫：三重大学における先天性血栓性素因の遺伝子診断、静脈血栓塞栓症の危険因子 先天性血栓性素因と後天性要因、第9回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、野村コンファレンスプラザ日本橋、2015年2月28日
- 3) 青田卓実、和田英夫、松本剛史、山下芳樹、片山直之：日本血栓止血学会DIC診断基準案の検討、新DIC診断基準案と実際の臨床、野村コンファレンスプラザ日本橋、2015年2月28日
- 4) 和田英夫：日本血栓止血学会DIC診断基準暫定案検討、日本血栓止血学会・日本救急医学会ジョイントシンポジウム「重症敗血症とDIC - 新しいDIC診断基準とアンチトロンビンの役割 -」、第37回日本血栓止血学会学術集会、甲府市総合市民会館（甲府市）、2015年5月21日～23日

## 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

**表1** 血液検査所見の違い

	DIC	TMA
RBC ** ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	303 (243-381)	225 (200-330)
WBC ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	8240 (2100-20300)	7880 (4900-12800)
PLT*** ( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	3.8 (1.8-7.0)	1.9 (1.3-3.0)

DIC, 播種性血管内凝固; TMA, 血栓性微小血管障害; RBC, red blood cell;  
WBC, white blood cell; PLT, platelet; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

**表2** 生化学所見の違い

	DIC	TMA
Albumin** (g/dl)	3.2 (2.7-3.5)	3.6 (3.3-3.8)
Creatinine*** (mg/dl)	1.0 (0.8-1.7)	1.7 (1.2-4.3)
LDH*** (IU/L)	512 (313-1036)	2112 (1308-3477)
T-Bil*** (mg/dl)	0.8 (0.5-1.3)	3.8 (2.4-5.5)

DIC, 播種性血管内凝固; TMA, 血栓性微小血管障害; T-Bil, total bilirubin;  
\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

**表3** 止血系検査の違い

	DIC	TMA
PT 比***	1.39 (1.23-1.63)	1.10 (1.00-1.17)
Fibrinogen*** (mg/dl)	134 (77.5-226)	266 (214-345)
FDP** ( $\mu\text{g/ml}$ )	40.0 (19.8-48.0)	18.2 (7.4-36.9)
AT (%)	77.0 (57.5-93.0)	79.0 (66.0-102)

DIC, 播種性血管内凝固; TMA, 血栓性微小血管障害; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ;  
PT, prothrombin time; FDP, fibrinogen and fibrin degradation products;  
AT; アンチトロンビン

## 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 部長

研究協力者 宮田敏行 国立循環器病研究センター脳血管内科 シニア研究員

### 研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) は、von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減で発症する指定難病である。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 疑い患者 3 名 (3 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子解析を行った。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.C908Y のホモ接合体、p.R973Nfs\*14 と p.G1031D の複合ヘテロ接合体、p.C400R と p.C908Y の複合ヘテロ接合体であった。p.R973Nfs\*14、p.G1031D、p.C400R は海外も含めて未報告の変異であった。これらの結果を臨床データと合わせて考えることで、TTP 関連疾患の診療ガイドライン作成に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 の酵素活性が 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-XX 家系の患者は、c.2723G>A (p.C908Y) のホモ接合体であり、両親とも同変異のヘテロ接合体であった。c.2723G>A (p.C908Y) 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。この変異のホモ接合体が見つかったのは本症例が初めてである。

USS-YY 家系の患者は、c.2918\_2919del (p.R973Nfs\*14) と c.3092G>A (p.G1031D) のヘテロ接合体であった。母は c.3092G>A (p.G1031D) のヘテロ接合体であったため、患者の同変異は母由来と考えられた。しかし、父に変異が見出されなかったため、c.2918\_2919del (p.R973Nfs\*14) の由来アレルは明らかにならなかった。しかし、臨床症状や検査結果等を考慮すれ

ば、患者は c.2918\_2919del (p.R973Nfs\*14) と c.3092G>A (p.G1031D) の複合ヘテロ接合体であると考えてよいと判断した。

USS-ZZ 家系の患者は、c.1198T>C (p.C400R) と c.2723G>A (p.C908Y) のヘテロ接合体であった。母は c.2723G>A (p.C908Y) のヘテロ接合体であったため、患者の同変異は母由来と考えられた。父はすでに亡くなっており解析できなかったが、患者の兄は c.1198T>C (p.C400R) のヘテロ接合体であったため、患者の同変異は父のアレル由来と推定された。つまり、患者は c.1198T>C (p.C400R) と c.2723G>A (p.C908Y) の複合ヘテロ接合体であると考えられた。

## 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。今回同定されたのは、ミスセンス変異およびフレームシフトを伴う欠失異常であった。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、いずれの患者も両アレル性の ADAMTS13 遺伝子異常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**

Keiko Maruyama, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Akiko Sekiya, Eriko Morishita, Toshiyuki Miyata: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. PLoS One 10 (7), e0133196 (2015)

Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, José A. Fernández, Hiroji Yanamoto, Yuko Tashima, Koichi Kokame, John H. Griffin, Toshiyuki Miyata: Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying protein S K196E mutation. Blood 126 (19), 2247-2253 (2015)

Yu Mi Oh, Hyung Bae Park, Jae Hun Shin, Ji Eun Lee, Ha Young Park, Dhong Hyo Kho, Jun Sung Lee, Heonsik Choi, Tomohiko Okuda, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, In-Hoo Kim, Seung Hoon Lee, Ronald

Schwartz, Kyungho Choi: NdrG1 is a T cell clonal anergy factor negatively regulated by CD28-costimulation and interleukin-2. Nat. Commun. 6, 8698 (2015)

Noritsugu Naito, Toshihide Mizuno, Takashi Nishimura, Satoru Kishimoto, Yoshiaki Takewa, Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Kazuma Date, Akihide Umeki, Masahiko Ando, Minoru Ono, Eisuke Tatsumi: Influence of a rotational speed modulation system used with an implantable continuous-flow left ventricular assist device (EVAHEART) on von Willebrand factor dynamics. Artif. Organs, in press.

Xinping Fan, Johanna A. Kremer Hovinga, Hiroko Shirotani-Ikejima, Yuka Eura, Hidenori Hirai, Shigenori Honda, Koichi Kokame, Magnus Mansouri Taleghani, Anne-Sophie von Krogh, Yoko Yoshida, Yoshihiro Fujimura, Bernhard Lämmle, Toshiyuki Miyata: Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. Int. J. Hematol., in press.

Thuong Manh Le, Koji Hashida, Hieu Minh Ta, Mika Takarada-Iemata, Koichi Kokame, Yasuko Kitao, Osamu Hori: Deletion of Herpud1 enhances heme

oxygenase-1 expression in a mouse model of Parkinson's disease. Parkinsons. Dis., in press.

小亀浩市: ADAMTS13. 新・血栓止血血管学「血管と血小板」, 197-203 (2015)

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: フィブリン線維を架橋することで強固なフィブリン塊を形成して止血を誘導する合成ポリマー. 日本血栓止血学会誌 26 (4), 483 (2015)

丸山慶子, 小亀浩市: ヘモグロピンは GP1b を介して血小板の活性化とアポトーシスを誘導する. 日本血栓止血学会誌 26 (2), 692 (2015)

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: 先天性 TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) の遺伝子解析. 血栓と循環, 印刷中.

## 2. 学会発表

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 水野敏秀, 巽英介, 宮田敏行: 補助人工心臓装着による高分子量 VWF マルチマーの減少は循環開始直後に始まる. 第37回日本血栓止血学会学術集会, 甲府, 2015年5月21日-23日

Keiko Maruyama, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Akiko Sekiya, Eriko Morishita, Toshiyuki Miyata: Development of ELISA system for detection of protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous

thromboembolism. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.

Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Masaki Hayakawa, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: Characteristics and outcomes of patients with Upshaw-Schulman syndrome receiving maintenance hemodialysis due to chronic renal failure. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.

Magnus Mansouri, Masanori Matsumoto, Zuzana Cermakova, Kenneth D. Friedman, James N. George, Ingrid Hrachovinova, Paul N. Knöbl, Koichi Kokame, Anne Sophie von Krogh, Reinhard Schneppenheim, Sara K. Vesley, Yoshihiro Fujimura, Bernhard Lämmle, Johanna A. Kremer Hovinga: Hereditary TTP - a young patient population with high prevalence of arterial thromboembolic events: first results from the hereditary TTP registry. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada, June 20-25, 2015.

宮田敏行, 加藤秀樹, 内田裕美子, 吉田瑤子, 小亀浩市, 福岡利仁, 要伸也, 大田敏之, 浦山耕太郎, 藤永周一郎, 櫻谷

浩志, 喜瀬智郎, 渡邊栄三, 織田成人, 永田裕子, 玉井宏史, 小松真太郎, 前沢浩司, 川村尚久, 永野幸治, 河野智康, 松本雅則, 藤村吉博, 南学正臣: 日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者の遺伝子解析 補体系因子と DGKE の遺伝子変異. 第 52 回日本補体学会学術集会, 名古屋, 2015 年 8 月 21 日-22 日

丸山慶子, 小亀浩市, 秋山正志, 宮田敏行: 野生型プロテイン S および K196E 変異体の発現精製と機能解析. 第 77 回日本血液学会学術集会, 金沢, 2015 年 10 月 16 日-18 日

水野敏秀, 内藤敬嗣, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行, 築谷朋典, 武輪能明, 巽英介: 植え込み型補助人工心臓が血中 von Willebrand factor に与える影響に関する研究. 第 53 回人工臓器学会大会, 東京, 2015 年 11 月 19 日-21 日

内藤敬嗣, 西村隆, 岸本諭, 水野敏秀, 武輪能明, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行, 小野稔, 巽英介: 定常流型左室補助人工心臓に用いる自己心拍同期回転数制御システムが von Willebrand factor に及ぼす影響. 第 53 回人工臓器学会大会, 東京, 2015 年 11 月 19 日-21 日

Noritsugu Naito, Toshihide Mizuno, Takashi Nishimura, Satoru Kishimoto, Yoshiaki Takewa, Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Minoru Ono, Eisuke Tatsumi: Influence of a

Rotational Speed Modulation of an Implantable Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device (EVAHEART) on von Willebrand Factor Dynamics. 23rd Annual Meeting of the International Society for Rotary Blood Pumps (ISRBP), Dubrovnik, Croatia, September 27-29, 2015.

## 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

## 特発性血栓症 / 先天性血栓性素因サブグループ研究

グループリーダー：森下英理子 金沢大学

研究分担者：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 慶應義塾大学 / 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 / 關谷暁子 金沢大学

根木玲子 国立循環器病研究センター

## グループ総括

分担研究者：森下 英理子

### 研究要旨

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、静脈血栓塞栓症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、重症度分類、ならびに診療ガイドの作成を通して、静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策確立を目的とする。今年度は、特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の先天的要因である「先天性血栓性素因」の診断基準ならびに重症度分類を作成した。次年度以降に「先天性血栓性素因患者の診療ガイド」や「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイド」の作成に向けて、先天性血栓性素因についての実態調査やアンケートを計画している。また、個別研究として「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）の機能解析に関する研究」、「血栓性素因の調査研究：先天性 AT 欠損症の遺伝子解析」、「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に関する研究」、「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 - 女性ホルモン剤の副作用としての血栓塞栓症の調査結果を中心に」の各個研究が行われた。

### A . 研究目的

我が国では静脈血栓塞栓症（VTE）の発症頻度は欧米に比べて低いと言われてきたが、食生活の欧米化および高齢化に伴い、日本人における VTE の頻度は増加してきている。一方、VTE 発症リスクは人種差があることもわかっており、日本人における VTE の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、その予知・予防対策を確立することは急務である。本研究班では、日本人のための特発性血栓症の予知・予防のための対策確立を目的とする。

特発性血栓症（先天性血栓性素因による）は、血液凝固制御因子のプロテイン C（PC）、プロテイン S（PS）およびアンチ

トロンビン（AT）の先天的な欠乏などにより、若年性に重篤な血栓症を発症する疾患群である。新生児・乳児期には脳出血・梗塞や電撃性紫斑病などを引き起こすが、小児期・思春期・成人では時に致死性となる VTE の若年発症や繰り返す再発の原因となる。本研究班では、先天性血栓性素因について、その診断基準、重症度分類ならびに診療ガイドの作成を目指す。なかでも、日本人に多い「先天性プロテイン S 欠乏症」における妊娠合併症例の診療ガイドや周術期治療ガイドの作成は重要な課題である。

## B . 研究方法

特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の誘因となる先天性血栓性素因についての政策研究を行う。具体的には、先天性血栓性素因の診断基準ならびに重症度分類の作成とともに、診療ガイドの策定の策定に向けての調査研究を行った。さらに各個研究については、それぞれ特発性血栓症の発症実態の把握、発症予防のための適切な診療に向けての診断法の開発やその有効性についての調査研究を行った。

### （倫理面への配慮）

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則り、また、遺伝子解析研究においても「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、各施設の倫理委員会の承認を得た後に実施した。研究対象者には人権を配慮し、研究への参加は自由意思で書面にてインフォームドコンセントを得て施行した。

## C . 研究結果

「特発性血栓症（先天性血栓性素因による）」の「診断基準」ならびに「重症度分類」を作成した。作成に当たり、「新生児・小児における特発性血栓症の診断、予防および治療法の確立に関する研究班」の研究代表である山口大学の賀正一先生の協力を得て、小児期の年齢別活性値の下限値など貴重なデータを頂戴し、新生児から成人まで用いることができる診断基準を作成した。作成した診断基準および重症度分類は、日本血栓止血学会 SSC 血栓性素因部会、静脈血栓症/肺塞栓症部会にて検討いただいたのち、理事会の承

認を得た。また、作成した診断基準ならびに重症度分類を用いて、「指定難病」の申請を行った。

「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 (PT) 異常症 (Prothrombin Himi) の機能解析に関する研究」では、無症候性 PT 異常症患者から同定した 2 種類の変異に対するリコンビナント PT を作成し、活性低下にも関わらず無症候である原因を検索した。その結果、M380T 変異 PT は高度な AT 抵抗性と、TM との結合不全があるため、正常よりも凝固活性を持ったトロンビンが多く存在すると考えられる。しかし、M380T 変異トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに変換することが出来ないため、生体内での凝固能はほとんど存在しない。よって、生体内での止血は発端者の PT 蛋白の内約半数を占める R431H 変異 PT が担っていると推測される。R431H 変異 PT は、凝固活性が低下し、さらに TM との結合不全と軽度の AT 抵抗性を示す。よって、R431H 変異 PT は活性が低下しているものの AT による不活化に抵抗するため、通常の PT よりも長く活性が保たれ、その結果止血に必要な凝固能が保たれているのではないかと推測された。

「血栓性素因の調査研究：先天性 AT 欠損症の遺伝子解析」の調査研究では、本研究の 2 年間に AT 欠損症疑い 10 症例の *SERPINC1* 遺伝子解析を行った結果、2 症例に AT 欠損症の原因と思われるミスセンス変異、1 症例に一塩基挿入変異を同定し、1 症例にエクソン 3-5 の欠失と 2 症例にエクソン 7 の欠失とそれぞれの break

point を同定した。また、*SERPINC1* 遺伝子異常を 4 症例で同定できず、AT 活性低下の原因として他の原因の存在が示唆された。

「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に関する研究」では、組換えヒト PS K196E 変異体の酵素学的解析を行い、変異による血栓症発症の分子メカニズムを検討した。K196E 変異体の APC 依存性抗凝固能は低下していたが、TFPI 依存性抗凝固能は正常であった。また、PS の抗凝固能発揮に必要なリン脂質との結合や PS の抗凝固能を阻害する C4BP との結合、トロンビンによる切断はいずれも正常であった。以上の結果より、K196E 変異が静脈血栓塞栓症のリスクになるのは、APC 依存性抗凝固能の低下によると考えた。

「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 - 女性ホルモン剤の副作用としての血栓塞栓症の調査結果を中心に」の調査研究では、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」に関して、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）のデータベースを用いて日本における女性ホルモン剤の副作用としての血栓塞栓症の発症について調査した。2004 年から 2013 年までの 10 年間に 581 件（VTE394 件、動脈血栓塞栓症 154 件、部位不明の血栓症 33 件）が報告され、発症頻度は欧米人よりわずかに低い程度であった。服用期間別の発症数では、服用開始 90 日までが最も発症頻度が高かった。40 歳代以降が急激に増加する傾向がみられ、肥満群（BMI $\geq$ 25）リスクは 2 倍

以上であった。死亡率は極めて低かったが、日本人でも欧米人と同様な傾向であることが判明した。また、全 VTE 患者に占める血栓性素因保有者の割合は 4%前後で、周術期 PE では 2%弱であった。

## D. 考察

特発性血栓症（先天性血栓性素因による）は、若年性に重篤な血栓症を発症するが、客観的な診断基準がなかったために、指定難病に認定されていない。今回、新生児・小児における先天性血栓性素因を調査・研究している班と合同で、新生児から成人まで通して用いることができる診断基準を作成したことは、意義深い。今回指定難病申請を行ったので、近い将来医療行政上の補助を患者が受けられるようになることを期待する。また、今後は本診断基準の精度を高めるための調査研究をさらに進めていく必要がある。そして、次年度以降に「先天性血栓性素因患者の診療ガイド」や「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイド」の作成に向けて、先天性血栓性素因についての実態調査研究を継続して行っていく。

新しい血栓性素因である AT 抵抗性は今まで 2 種類の変異が同定され、いずれも VTE を発症した。今回、新たに 2 種類の AT 抵抗性を示す変異トロンビンを同定し、かつ AT 抵抗性に加えてフィブリノゲン活性化能が低下している場合は無症候となる可能性を明らかにした。

VTE を発症し特発性血栓症の原因となる AT 欠乏症の疑われた 10 症例の遺伝子解析の結果、6 症例に原因と思われる遺伝子変異（ミスセンス変異 2 例、一塩基挿入

変異 1 例、欠失変異 3 例)を同定したが、残り 4 症例では遺伝子変異の同定に至らず、それらの AT 活性低下は、妊娠合併 DVT や原因不明 DVT による消耗性、あるいは新生児期の産生低下によるものと考えられた。エクソン 3-5 欠失例では、break point 解析結果から *SERPINC1* 領域内 (イントロン 2 とイントロン 5) に存在する Alu 配列間の相同組み換えの結果生じたエクソン 3-5 の欠失症例と判明したが、イントロン領域に Alu 配列の多い *SERPINC1* 遺伝子では、これら Alu 配列間での相同組換えによる欠失変異は比較的多く報告されている。また、エクソン 7 欠失の 2 症例は親子例で、break point 部に 7 塩基挿入が同定されたが、欠失部に挿入 7 塩基を含む 9 塩基の相同配列が存在することから、相同組み換えを繰り返す FoSTeS (Fork Stalling and Template Switching) モデルによる *SERPINC1* のイントロン 6 から下流 35kb に及ぶ大規模欠失例であることが強く示唆された。

また、日本人の血栓性素因である PS K196E 変異体の性状を正確に理解することは、血栓症の予防や治療に重要である。PS K196E 変異体の酵素学的解析の研究により、APC 依存性抗凝固能は野生型に比べて低下しているが、TFPI 依存性抗凝固能は正常であることが明らかになった。PS K196E 変異が VTE のリスクになるのは、APC 依存性抗凝固能の低下によるものであり、TFPI 依存性抗凝固能は関与しないことが考えられた。K196E 変異は APC との結合部位である EGF2 ドメインに位置することから、変異により APC との結合が低下し、APC 依存性抗凝固能が低下した可能

性が考えられた。

産科の解析では PMDA に報告された症例に限られるものの、日本の OC 服用者の血栓塞栓症の発症率がはじめて明らかになり、その発症頻度は欧米人よりわずかに低い程度であった。また、プロゲスチン世代別にかかわらず服用開始 90 日までが最も発症頻度が高く、以後低下し、1 年半を過ぎるころからほぼプラトーになることが明らかになった。日本人でも欧米人同様、肥満および加齢と関係していることがはじめて明らかになった。また、全 VTE 患者に占める血栓性素因保有者の割合は 4%前後で、周術期 PE では 2%弱であった。今回の検討では血栓性素因のうち PS 欠乏症に特化した結果は得られていないものの、昨年報告したように、「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」で得られた血栓症の有用な予知マーカーである APC-sr、PS 活性および PS 比活性 の測定が、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。

## E・結論

今回、先天性血栓性素因の診断基準を作成した。今後は、その実態調査を踏まえ日本人の特発性血栓症 (静脈血栓塞栓症) の予知・予防対策を確立するための診療ガイドの作成は、超高齢化社会を迎えた我が国において重要な課題である。

## F . 健康危険情報

特になし。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Yoshikawa Y, Kitayama J, Ishikawa H, Nakamura A, Taniguchi F, Morishita E, Ago T, Nakane H, Kitazono: Fulminant bilateral cerebral infarction caused by paradoxical embolism in a patient with protein S Ala525Val substitution. *Neurology and Clinical Neuroscience*. 3(3): 105-107, 2015
- 2) Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S: Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 22(7): 660-668, 2015
- 3) Taniguchi F, Morishita E, Sekiya A, Yamaguchi D, Nomoto H, Kobayashi E, Takata M, Kosugi I, Takeuchi N, Asakura H, Ohtake S: Late onset thrombosis in two Japanese patients with compound heterozygote protein S deficiency. *Thromb Res*. 135(6): 1221-1223, 2015
- 4) Nomoto H, Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, Mizuno S, Onizuka M, Kashiwase K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Doki N, Miyamura K, Mori T, Nakao S, Ohtake S, Morishita E: A donor thrombomodulin gene variation predicts graft-versus-host disease development and mortality after bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 102(4): 460-70, 2015
- 5) Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. *PLoS One*. 10(7): e0133196, 2015
- 6) Miyasaka N, Miura O, Kawaguchi T, Arima N, Morishita E, Usuki K, Morita Y, Nishiwaki K, Ninomiya H, Gotoh A, Imashuku S, Urabe A, Shichishima T, Nishimura JI, Kanakura Y: Pregnancy outcomes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab: a Japanese experience and updated review. *Int J Hematol*. 2016 Feb 8. [Epub ahead of print]
- 7) 森下英理子: 第X因子とプロトロンビン、新・血栓止血血管学 凝固と炎症、一瀬白帝、丸山征郎、家子正裕 編著、金芳堂、pp20-27、2015
- 8) 森下英理子: PNHの血栓症、発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)、金倉譲、西村純一編、医薬ジャーナル社、pp100-111、2015
- 9) 大谷綾子、福田英ツグ、新山史朗、中橋澄江、長島義宣、青山幸生、森下英理子、向井秀樹. プロテインS欠乏症による難治性下腿潰瘍の1例 . 西

- 日本皮膚科、77(5):461-164、2015
- 10) 森下英理子：細血管障害性溶血性貧血の診断と治療。臨床血液、56(7):795-806、2015
  - 11) 森下英理子：血栓止血性疾患の遺伝子診断 - 血栓性疾患。日本血栓止血学会誌。26(5):518-523、2015
  - 12) 森下英理子：先天性血栓性素因の診断。日本検査血液学会雑誌16(1):1-10、2015
  - 13) 森下英理子：凝固・線溶系のメカニズムと血栓形成。Medicina 52(13):2300-2304、2015
  - 14) 森下英理子：先天性素因の検査 アンチトロンピン、プロテインC、プロテインS。臨床検査 60(2):158-165、2015
  - 15) 森下英理子、永井信夫、家子正裕：2015 Hot Topics 線溶分野、日本血栓止血学会誌 27(1)、2016(印刷中)
  - 16) 森下英理子：フォンウィルブランド因子の臨床検査。BIO Clinica、2016(印刷中)
  - 17) 森下英理子：「質疑応答 プロからプロへ」不育症例に対する抗凝固療法と対応、日本医事新報(印刷中)
  - 18) 森下英理子：最新情報と今後の展望 2016(血小板・凝固・線溶系疾患) オーバービュー、臨床血液 57(3):2016(印刷中)
  - 19) Nakamura Y, Murata M, Takagi Y, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Kitazawa JI, Shima M, Kojima T: SVA retrotransposition in exon 6 of the coagulation factor IX gene causing severe hemophilia B. Int J Hematol. 102(1): 134-139, 2015
  - 20) Mizutani N, Omori Y, Tanaka K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Nakatochi M, Ogiso H, Kawamoto Y, Nakamura M, Suzuki M, Kyogashima M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T: Increased SPHK2 transcription of human colon cancer cells in serum-depleted culture: the involvement of CREB transcription factor. J Cell Biochem. 116(10):2227-38, 2015
  - 21) Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Ito H, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Iwaki S, Nakatochi M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T: Increased Acid Ceramidase Expression depends on Upregulation of Androgen-dependent Deubiquitinases, USP2, in a Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP. J Biochem. 158(4):309-19, 2015
  - 22) Nikaido T, Tanino Y, Wang X, Sato S, Misa K, Fukuhara N, Sato Y, Fukuhara A, Uematsu M, Suzuki Y, Kojima T, Tanino M, Endo Y, Tsuchiya K, Kawamura I, Frevert C, Munakata M: Serum syndecan-4 as a possible biomarker in patients with acute pneumonia. J Infect Dis. 212(9):1500-1508, 2015
  - 23) Santoso A, Kikuchi T, Tode N, Hirano T, Komatsu R, Damayanti T,

- Motohashi H, Yamamoto M, Kojima T, Uede T, Nukiwa T, Ichinose M: Syndecan 4 mediates Nrf2-dependent expansion of bronchiolar progenitors that protect against lung inflammation. *Mol Ther*. 2015 Aug 26. in press
- 24) Kishimoto M, Suzuki N, Murata M, Ogawa M, Kanematsu T, Takagi A, Kiyoi H, Kojima T, Matsushita T.: The first case of antithrombin-resistant prothrombin Belgrade mutation in Japanese *Ann Hematol*. 2015 Oct 19. in press
- 25) Nakamura Y, Ando Y, Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Matsushita T, Shima M, Kojima T: Distinct X chromosomal rearrangements in four haemophilia B patients with entire F9 deletion. *Haemophilia*. 2015 Dec 21. in press
- 26) 高木夕希、小嶋哲人：アンチトロンビン これだけは知っておきたい検査のポイント 矢富裕：編 *Meditina* 52(4) 増刊号 100-101, 2015
- 27) 村田萌、小嶋哲人：プロテインC、プロテインS これだけは知っておきたい検査のポイント 矢富裕：編 *Meditina* 52(4): 108-109, 2015
- 28) 高木夕希、小嶋哲人：Xa阻害薬の薬理作用 ファーマナビゲーター抗凝固療法編 山下武志/是常之宏/矢坂正弘：編 株式会社メディカルレビュー社：pp 72-80, 2015
- 29) 小嶋哲人、高木明、村田萌、高木夕希：アンチトロンビンレジスタンス 新しい遺伝性血栓性素因、臨床血液 56(6): 632-637, 2015
- 30) 小嶋哲人、高木明：III.血液凝固系の検査 (pp387-425) IV.線溶系の検査 (pp425-428) V.血栓・止血の分子マーカー (pp429-441) VI.血栓性素因の検査 (pp441-445) 臨床検査法提要 (改訂第34版) 金原出版株式会社 金井正光監修、奥村伸生ほか編：2015
- 31) 中村友紀、小嶋哲人：血友病Bの分子遺伝 *Frontiers in Haemophilia* 2(2): 15-18, 2015
- 32) 小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性新・血栓止血血管学 凝固と炎症、金芳堂、一瀬白帝、丸山征郎、家子正裕：編 pp29-33, 2015
- 33) 小嶋哲人：アンチトロンビンの基礎と臨床：ヘパリンファクターを含む新・血栓止血血管学 抗凝固と線溶 金芳堂 一瀬白帝、丸山征郎、和田英夫：編 pp441-445, 2015
- 34) 鈴木伸明、小嶋哲人：391. 血友病 血液疾患診療ハンドブック 吉田彌太郎編 医歯ジャーナル社 東京：pp515-530, 2015
- 35) 小嶋哲人：抗凝固薬・ヘパリン類、フォンダパリヌクス、*Medicina* 52(13): 2318-2321, 2015
- 36) 小嶋哲人：NOACの作用メカニズムと抗凝固としての特性、*Life Style Medicine* 9(3): 88-92, 2015
- 37) 高木夕希、小嶋哲人：凝固第XI因子

- のアンチセンス療法 循環器内科  
79(1):60-64, 2016
- 38) 高木夕希、小嶋哲人 : 2. 血液凝固接触相 -最近の進歩 - VI. 凝固線溶系 Annual Review 2016血液 高久史磨ほか編 東京: pp212-217, 2016
- 39) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirotani-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y: A novel quantitative hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan. PLoS ONE, 10(5), e0124655, 2015
- 40) Tashima Y, Banno F, Akiyama M, Miyata T: Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. Thromb Haemost, 114(1), 206-207, 2015
- 41) Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. PLoS ONE, 10(7): e0133196, 2015
- 42) Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y: Atypical haemolytic uremic syndrome in a Japanese patient with DGKE genetic mutations. Thromb Haemost, 114(4): 862-863, 2015
- 43) Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, Griffin JH, Miyata T: Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying protein S K196E mutation. Blood. 126(19): 2247-2253, 2015
- 44) Fan X, Kremer Hovinga JA, Shirotani-Ikejima H, Eura Y, Hirai H, Honda S, Kokame K, Taleghani MM, von Krogh A-S, Yoshida Y, Fujimura Y, Lämmle B, Miyata T: Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. Int J Hematol, 2016, in press.
- 45) Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T: Risks of thromboembolism associated with hormonal contraceptives related to body mass index and aging in Japanese women. Thromb Res 137: 11-16, 2016
- 46) Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T: Thromboembolism as the adverse event of combined oral contraceptives in Japan. Thromb Res 136: 1110-1115, 2015
- 47) Murakami M, Kobayashi T, Kubo T, Hata T, Takeda S, Masuzaki H: Experience with recombinant activated factor VII for severe post-partum hemorrhage in Japan, investigated by Perinatology Committee, Japan Society of Obstetrics and Gynecology. J Obstet Gynaecol Res 41(8): 1161-1168, 2015

- 48) Makino S, Takeda S, Kobayashi T, Murakami M, Kubo T, Hata T, Masuzaki H: National survey of fibrinogen concentrate usage for post-partum hemorrhage in Japan: Investigated by the Perinatology Committee, Japan Society of Obstetrics and Gynecology. J Obstet Gynaecol Res 41(8): 1155-1160, 2015
- 49) Sakon M, Maehara Y, Kobayashi T, Kobayashi H, Shimazui T, Seo N, Crawford B, Miyoshi I: Economic burden of venous thromboembolism in patients undergoing major abdominal surgery. Value in Health Regional Issues 6C: 73-79, 2015
- 50) 杉浦和子, 小林隆夫: 日本における女性ホルモン剤使用に起因する血栓塞栓症と肥満および加齢との関係. Thrombosis Medicine 6(1): 2016 (in press)
- 51) 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 日本産婦人科・新生児血液学会誌 25(2): 43-58, 2016
- 52) 小林隆夫, 杉浦和子: 低用量経口避妊薬(OC)と血栓症. 吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司編集, 産科婦人科疾患最新の治療2016-2018, 南江堂, 東京, pp47-49, 2016
- 53) 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の予防と治療指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療最新ガイドライン2016-'17, 総合医学社, 東京: pp311-315, 2015
- 54) 杉浦和子, 小林隆夫: わが国における女性ホルモン剤使用に起因する血栓塞栓症の実態. Thrombosis Medicine 5(4): 342-347, 2015
- 55) 小林隆夫: 周産期の電話相談~テレフオントリアージ. 産科編 妊婦12週から36週まで. 静脈瘤ができたのですが. 周産期医学 45(11): 1551-1552, 2015
- 56) 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤の安全な処方と血栓症への対策. 産婦人科の実際臨時増刊号 64(11): 1402-1410, 2015
- 57) 小林隆夫: 妊娠中および産褥期の静脈血栓塞栓症. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第6章 特殊な病態下の静脈血栓塞栓症の診断と治療. 医薬ジャーナル社, 大阪: pp373-382, 2015
- 58) 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と静脈血栓塞栓症(VTE). 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第1章 静脈血栓塞栓症の病理と病態. トピックス4. 医薬ジャーナル社, 大阪, pp84-85, 2015
- 59) 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と血栓症 - 海外における報告を中心に -. Thrombosis Medicine 5(3): 255-260, 2015
- 60) 小林隆夫, 杉浦和子: OC・LEP製剤と血栓症 - 安全処方のために -. 日本エンドメトリオージス学会会誌36: 90-97, 2015
- 61) 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 日本女性医学学会雑誌 22(2): 153-158, 2015

- 62) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防と治療．一瀬白帝，丸山征郎，内山真一郎編著，新・血栓止血血管学 血管と血小板．金芳堂，京都，pp102-110，2015
- 63) 小林隆夫，杉浦和子：経口避妊薬と活性化プロテインC抵抗性．Thrombosis Medicine 5(2)：171-175，2015
- 64) 小林隆夫：肺血栓塞栓症．日本の妊産婦を救うために2015．日本産婦人科医会医療安全委員会監修，関沢明彦，長谷川潤一編集，東京医学社，東京，pp165-173，2015
- 65) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症．特集 高齢妊娠を知る．産婦人科の実際 64(4)：527-534，2015
- 66) 小林隆夫，杉浦和子：日本人に多い先天性凝固阻止因子欠乏症について教えてください．特集/OC・LEPの静脈血栓塞栓症リスクQ&A．産科と婦人科 82(4)：361-370，2015
- 67) 小林隆夫：産婦人科医のための血栓症大全．小林隆夫監修．ノーベルファーマ株式会社，富士製薬工業株式会社，日本新薬株式会社発行，カンナル印刷，東京，pp1-72，2015
- 68) 小林隆夫，杉浦和子：女性ホルモン剤と血栓症．鈴木重統，後藤信哉編集，止血・血栓ハンドブック．西村書店，東京，pp215-229，2015
- congenital dysprothrombinemia with both decreased prothrombin activity and antithrombin resistance．第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
- 2) Matsuura E, Nakahashi T, Iwaki N, Kadohira Y, Hayashi T, Morishita E, Asakura H, Yamagishi M, Nakao S: Acute coronary syndrome due to a paradoxical embolus during elthombopag treatment for ITP. 第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
- 3) Sekiya A, Misawa E, Suzuki T, Arai N, Furusho H, Hayashi K, Asakura H, Ohtake S, Morishita E: Influences of rivaroxaban on laboratory data of antithrombin, protein C and protein S activities. 第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
- 4) Kobayashi E, Taniguchi F, Maruyama K, Takata M, Katsu S, Kaneko S, Sekiya A, Ohtake S, Miyata T, Morishita E: 第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
- 5) Kadohira Y, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Asakura H, Nakao S: Multiple coagulation factor inhibitors detected in patients with lupus anticoagulant. 第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
- 6) Maruyama K, Akiyama M, Kokame K,

## 2. 学会発表

- 1) Takata M, Morishita E, Taniguchi F, Sekiya A, Kobayashi E, Asakura H, Takage A, Kojima T, Otake S : A

- Sekiya A, Morishita E, Miyata T:  
Development of ELISA system for detection of Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 20-25, 2015, Toronto, Canada
- 7) 小林英里奈、關谷暁子、三澤絵梨、鈴木健史、新井信夫、高田麻央、野本明華、朝倉英策、大竹茂樹、森下英理子：ワルファリンのプロテインS、プロテインC測定値への影響。日本検査血液学会、2015年7月11日、名古屋
- 8) 高田麻央、關谷暁子、小林英里奈、野本明華、朝倉英策、大竹茂樹、森下英理子：プロテインCK193del 変異検出のためのPC 活性測定法の検討。日本検査血液学会、2015年7月11日、名古屋
- 9) 松浦絵里香、門平靖子、林朋恵、森下英理子、奥村伸生、小林隆夫、朝倉英策：フィブリノゲン補充療法にて安全に出産できた hypodysfibrinogenemia 妊婦の一例。37 回日本血栓止血学会学術集会、2015年5月21～23日、山梨
- 10) 森下英理子：先天性プロテインS・プロテインC 欠損症の遺伝子診断ならびに臨床所見，プロテインS 研究会シンポジウム。第37回日本血栓止血学会学術セミナー、2015年5月21～23日、甲府
- 11) 森下英理子：なぜできる！？静脈血栓症。世界血栓症デー日本 市民公開講座、2015年10月10日、大阪
- 12) 森下英理子：トロンボモジュリンと血管内皮傷害。2015.10.17. 第77回日本血液学会学術集会コーポレートセミナー、金沢
- 13) 森下英理子：静脈血栓症の成因と治療，あきた凝固線溶系セミナー，2015年11月27日、秋田
- 14) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療 悪性腫瘍ならびに先天性血栓性素因を中心に，第14回千葉循環器クリニカルフロンティア、2015年12月4日、千葉
- 15) 森下英理子：血液凝固異常の検査の進め方。第3回北陸血栓止血検査研究会、2015年12月12日、金沢
- 16) 森下英理子：血栓症の基礎と治療 先天性血栓性素因と悪性腫瘍に伴う血栓症 血栓症Total Management、2016年2月5日、札幌
- 17) 森下英理子：APTT 延長を認めたらどんな病態を考えますか，第36回有明セミナー、2016年2月13日、東京
- 18) 森下英理子：「特発性血栓症（先天性血栓性素因による）」の「指定難病」認定に向けての取り組み、第10回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2016年2月20日、東京
- 19) 關谷暁子、三澤絵梨、鈴木健史、末武司、津田友秀、金秀日、古莊浩司、林研至、朝倉英策、大竹茂樹、森下英理子：リバーロキサバンが血中アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS 活性値に与える影響および試薬間

- 比較、第 10 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2016 年 2 月 20 日、東京
- 20) 小嶋哲人 : Cell-based coagulation の立場からの抗凝固療法 (SPC シンポ) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会、山梨、平成 27 年 5 月
- 21) 村田萌、水谷直貴、高木夕希、長谷部瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、榎山愛弓、河村奈美、橋本恵梨華、高木明、松下正、小嶋哲人 : プロトロンビン変異による新たなアンチトロンビン抵抗性変異の候補解析 (O-069、P-001 : 優秀ポスター賞) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会、平成 27 年 5 月、山梨
- 22) 岸本磨由子、鈴木伸明、村田萌、小川実加、兼松毅、高木明、小嶋哲人、松下正 : 深部静脈血栓症で発症しアンチトロンビン抵抗性を示した本邦初 Prothrombin Belgrade 変異の一家系 (P-002) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会、平成 27 年 5 月、山梨
- 23) 高木夕希、村田萌、中村友紀、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、橋本恵梨華、高木明、小嶋哲人 : プロトロンビン Arg596 における一塩基置換ミスセンス変異体のトロンボモジュリン抵抗性評価 (P-003 : 優秀ポスター賞) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会、平成 27 年 5 月、山梨
- 24) 橋本恵梨華、村田萌、榎山愛弓、河村奈美、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、高木夕希、水谷直貴、高木明、國島伸治、松下正、小嶋哲人 : 血小板無力症に同定された GPIIb 遺伝子のミスセンス変異とスプライス変異の複合ヘテロ変異解析 (P-0072 : 優秀ポスター賞) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会、平成 27 年 5 月、山梨
- 25) 小嶋哲人 : 新たな血栓性素因 : アンチトロンビン・レジスタンス 新生児ワークショップ 第 25 回日本産婦人科新生児血液学会、平成 27 年 6 月、東京
- 26) Naoki Mizutani, Yuki Nakamura, Moe Murata, Yuki Takagi, Ryo Hasebe, Toshihiro Kozuka, Yukiko Nakata, Akira Takagi, Jun-ichi Kitazawa, Midori Shima, Tetsuhito Kojima : A case of severe hemophilia B associated with a large insertion of SVA RETROTRANSPOSON in the coagulation factor IX gene (P0151-MON) XXV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada 平成 27 年 6 月
- 27) Moe Murata, Naoki Mizutani, Yuki Takagi, Ryo Hasebe, Toshihiro Kozuka, Yukiko Nakata, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima : Analysis of prothrombin mutants in NA+ binding domain as a potential candidate conveying antithrombin resistance (P0486-TUE: Receptient of Young Invesigator Award) XXV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada 平成 27 年 6 月
- 28) Yuki Takagi, Moe Murata, Yuki Nakamura, Toshihiro Kozuka, Yukiko

- Nakata, Ryo Hasebe, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima: Analysis of prothrombin missense mutants at 596ARG by single nucleotide substitution for anticoagulant system (P0560-WED) XXV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada 平成 27 年 6 月
- 29) 岸本磨由子、鈴木伸明、村田萌、小川実加、兼松毅、高木明、小嶋哲人、松下正: 深部静脈血栓症で発症したアンチトロンビンレジスタンス症例の抗凝固療法 第 16 回日本検査血液検査血液学会学術集会、平成 27 年 7 月、名古屋
- 30) 中田悠紀子、小塚敏弘、長谷部瞭、高木夕希、村田萌、上牧務、松尾真稔、高木明、松下正、小嶋哲人: 先天性アンチトロンビン欠乏症 8 症例 *SERPINC1* 遺伝子解析 第 16 回日本検査血液検査血液学会学術集会、平成 27 年 7 月、名古屋
- 31) 村田萌、水谷直貴、高木夕希、長谷部瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、高木明、松下正、小嶋哲人: アンチトロンビン抵抗性検出検査法の自動凝固検査機器への最適化 Part 2 第 16 回日本検査血液検査血液学会学術集会、平成 27 年 7 月、名古屋
- 32) 高田麻央、森下英里子、谷口文苗、關谷暁子、小林英里奈、朝倉英策、高木明、小嶋哲人、大竹茂樹: A congenital dysprothrombinemia with both decreased prothrombin activity and antithrombin resistance [OS-1-77] 第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16~18 日、金沢
- 33) 高木夕希、水谷直貴、村田萌、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、高木明、小嶋哲人: Practical laboratory assay to detect abnormal prothrombin conveying thrombomodulin resistance [OS-2-79]\_\_第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16~18 日、金沢
- 34) 小塚敏弘、長谷部瞭、中田悠紀子、榎山愛弓、河村奈美、中村友紀、高木夕希、村田萌、水谷直貴、高木明、小嶋哲人: Investigation of molecular mechanisms of PS mRNA up-regulation by progesterin isoforms in HepG2 cells [PS-2-78] 第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16~18 日、金沢
- 35) 宮田敏行、会長特別企画: 日本人の血栓性素因「Congenital Deficiency of Protein C/S, Especially Protein S K196E Mutation」第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年 4 月 24-26 日、大阪市
- 36) 宮田敏行、内田裕美子、大田敏之、浦山耕太郎、吉田瑤子、藤村吉博: 「非典型溶血性尿毒症症候群患者に見られた diacylglycerol kinase e の遺伝子変異」第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015 年 5 月 21-23 日、山梨県
- 37) 樋口(江浦)由佳、小亀浩市、水野敏秀、巽英介、宮田敏行: 「補助人工心臓装着による高分子量 VWF マル

- チマーの減少は循環開始直後に起こる」第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015 年 5 月 21-23 日、山梨県
- 38) Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Masaki Hayakawa, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: Characteristics and outcomes of patients with Upshaw-Schulman syndrome receiving maintenance hemodialysis due to chronic renal failure. XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 20-25, 2015, Toronto, Canada
- 39) 宮田敏行、加藤秀樹、内田裕美子、吉田瑤子、小亀浩市、福岡利仁、要伸也、大田敏之、浦山耕太郎、藤永周一郎、櫻谷浩志、喜瀬智郎、渡邊栄三、織田成人、永田裕子、玉井宏史、小松真太郎、前沢浩司、川村尚久、永野幸治、河野智康、松本雅則、藤村吉博、南学正臣：日本人の非典型型溶血性尿毒症候群患者の遺伝子解析補体系因子と DGKE の遺伝子変異。第 52 回補体シンポジウム、2015 年 8 月 21-22 日、名古屋市
- 40) Erina Kobayashi, Fumina Taniguchi, Keiko Maruyama, Mao Takata, Shiori Katsu, Shonosuke Kaneko, Akiko Sekiya, Shigeki Ohtake, Toshiyuki Miyata, Eriko Morishita: Detection of protein S K196E mutation by a newly developed ELISA-based system. 口頭発表、第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16-18 日、金沢
- 41) Toshiyuki Miyata, X. P. Fan, H. Shirotani-Ikejima, Y. Eura, H. Hirai, S. Honda, J. A. Kremer Hovinga, M. Mansouri Taleghani, A.S. von Krogh, Y. Yoshida, B. Lämmle, Y. Fujimura: Mutations in complement factors in patients with Upshaw-Schulman syndrome with renal insufficiency. 優秀ポスター発表、第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16~18 日、金沢
- 42) Keiko Maruyama, Koichi Kokame, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata: Expression, purification, and functional characterization of wild-type and K196E-mutant protein S. 口頭発表、第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16~18 日、金沢
- 43) 小林隆夫：周術期の VTE 予防。第 77 回日本臨床外科学会総会教育セミナー-18, 福岡, 2015
- 44) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓塞栓症 - 安全処方に向けて - . 平成 27 年度岐阜産科婦人科研究会 ~ 生殖医学 ~ , 岐阜, 2015
- 45) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓塞栓症 - 安全な処方のために. 第 22 回肺塞栓症研究会シンポジウム. 東京, 2015
- 46) 杉浦和子, 小林隆夫, 尾島俊之：わが国の女性ホルモン剤使用に起因する血栓塞栓症の実態。第 22 回肺塞栓症研究会シンポジウム。東京, 2015
- 47) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の現状と課題。抗凝固療法フォーラム, 浜松,

2015.11.4

- 48) 小林隆夫：子宮内膜症治療におけるホルモン製剤と血栓症 - 安全に治療を行うためのポイント - . 神奈川子宮内膜症研究会, 横浜, 2015
- 49) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓をめぐる諸問題～症例解説も含めて～. 周産期医学特別講演会. 札幌, 2015
- 50) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. Covidien 第12回VTE医療安全セミナー. 新潟, 2015
- 51) 小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンファレンス in 大阪, 2015
- 52) 小林隆夫, 杉浦和子, 尾島俊之：女性ホルモン剤と血栓症. 第57回日本婦人科腫瘍学会シンポジウム 5 がん治療～女性のQOL維持には. 盛岡, 2015
- 53) 小林隆夫：子宮内膜症治療におけるホルモン製剤と血栓症～安全に治療を行うためのポイント～. 子宮内膜症ネットフォーラム, 東京, 2015
- 54) 小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンファレンス in 新宿, 東京, 2015
- 55) 小林隆夫：最近の肺塞栓症の現況と院内における予防対策. 藤枝地区学術講演会. 藤枝, 2015
- 56) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 大阪府大阪市内南部エリア 医療安全講演会. 大阪, 2015
- 57) 小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンファレンス in 日本橋, 東京, 2015
- 58) 小林隆夫：本邦におけるOC・LEP配合剤による血栓塞栓症の実態について. 全国子宮内膜症フォーラム. 東京, 2015
- 59) 小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンファレンス in 渋谷, 東京, 2015
- 60) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第25回日本産婦人科・新生児血液学会特別講演. 東京, 2015
- 61) Kobayashi T, Sugiura K, Ojima T: Venous thromboembolism as the adverse event of combined oral contraceptives or hormone replacement therapy. SPC symposium of the 37th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Kofu, 2015
- 62) 小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンファレンス in 名古屋, 名古屋, 2015
- 63) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. Covidien 第11回VTE医療安全セミナー. 広島, 2015

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許出願人：【識別番号】504139662【氏名又は名称】国立大学法人名古屋大学。

特許番号：特許第5818299号（NY15010:旧  
PY10147(H10126)）登録年月日：

2015.10.9

発明の名称：凝固因子として作用する異常トロンビンのためのトロンビン不活性化動態測定方法。

発明者：高木 明、小嶋 哲人、松下 正。

## **2. 実用新案登録**

なし。

## **3. その他**

なし。

## 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) の機能解析に関する研究

研究分担者 森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 教授  
研究協力者 關谷暁子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 助教  
小嶋哲人 名古屋大学大学院医学系研究科 教授  
高木 明 名古屋大学大学院医学系研究科 講師

### 研究要旨

我々は以前、無症候性の先天性プロトロンビン(PT)異常症 (Prothrombin Himi) 患者の遺伝子解析を行い、2種類の遺伝子変異 g.8751T>C, p.Met380Thr および g.8904G>A, p.Arg431His を同定した。今回、この2種類の変異プロトロンビンを作製し、アンチトロンビン(AT)抵抗性ならびにフィブリノゲン活性化能を検討したので報告する。野生型、M380T 変異型、R431H 変異型の3種類のリコンビナント PT を、CHO 細胞を用いて発現させ、機能解析を行った。凝固一段法を用いた活性測定の結果、M380T 変異型の凝固活性は検出感度以下であり、R431H 変異型は野生型の20%に低下していた。一方、合成基質法を用いて測定した活性は、野生型を100%とするとM380T 変異型は61%、R431H 変異型は67%とやや低下していた。変異型トロンビンのATによる不活化動態を解析するために、トロンビン・アンチトロンビン複合体(TAT)量を測定した結果、R431H 変異型では、TATの形成が野生型と比較して40%に低下していた。一方、M380T 変異型は120分間の不活化反応でTATの形成がほとんど認められなかった。以上の結果から、M380T 変異型は凝固能がほとんど存在せず、生体内での止血はR431H 変異型が担っていると推測された。発端者がまったく出血傾向を示さなかった理由として、R431H 変異型は凝固活性が低下しているが、ATとの結合不全によりATの不活化に抵抗するため、通常のプロトロンビンよりも長く活性が保たれ、その結果止血に必要な凝固能が維持されていると推測された。

### A. 研究目的

先天性プロトロンビン (PT)異常症は通常出血傾向を呈するが、無症候の症例も報告されている。近年、アンチトロンビン(AT)に抵抗性を示し血栓傾向となる異常トロンビンが報告され、新しい血栓性素因として「AT 抵抗性」が提唱された。我々は以前、無症候性の先天性PT 異常症 (Prothrombin Himi) 患者の

遺伝子解析を行い、2種類の遺伝子変異 g.8751T>C, p.Met380Thr および g.8904G>A, p.Arg431His を同定した。今回、この2種類の変異プロトロンビンを作製し、AT 抵抗性ならびにフィブリノゲン活性化能を検討したので報告する。

## B . 研究方法

完全長の野生型 PT cDNA に Site-directed mutagenesis を用いて一塩基置換を導入し、変異型 PT cDNA を作製した。野生型、M380T 変異型、R431H 変異型の 3 種類のリコンビナント PT を CHO 細胞に導入し、培養上清を回収・濃縮して機能解析に用いた。野生型および変異型 PT の活性を、凝固一段法および合成基質法 (S-2238) の 2 種類の方法で測定した。次に、リコンビナント PT の AT による不活化を、AT 抵抗性解析および TAT を測定することで、検討した。

最後に、リコンビナントトロンビンとトロンボモジュリン (TM) の結合能を ELISA 法にて測定した。

### (倫理面の配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守するとともに、金沢大学ヒトゲノム遺伝子解析研究倫理審査委員会、および金沢大学組み換え DNA 実験計画の承認を得て解析した。

## C . 研究結果

凝固一段法を用いた活性測定の結果、M380T 変異型の凝固活性は検出感度以下であり、R431H 変異型は野生型の 20% に低下していた。一方、合成基質法を用いて測定した活性は、野生型を 100% とすると M380T 変異型は 61%、R431H 変異型は 67% であり、合成基質分解活性は比較的保たれていた。よって、変異型トロンビンはフィブリノゲンとの親和性低下により、フィブリン生成能が低下してい

ることが明らかとなった。

次に、AT 抵抗性解析では、野生型 PT は不活化 30 分で不活化前の約 10% にまでトロンビン活性が低下した。一方、M380T 変異型は 30 分後の残存トロンビン活性が 74% と、高度な AT 抵抗性を示した。R431H 変異型は、30 分後の残存トロンビン活性が 21% と野生型と比べると高く、軽度の AT 抵抗性を示した。TAT 測定の結果、R431H 変異型では TAT の形成が野生型と比較して 40% に低下していた。一方、M380T 変異型は 120 分間の不活化反応で TAT の形成がほとんど見られなかった。

TM 結合量は、野生型の結合量を 100% としたとき、M380T 変異型が 3.4%、R431H 変異型が 6.1% と、どちらの変異型においても著明な低下がみられた。

## D . 考察

以上の結果から、M380T 変異 PT は高度な AT 抵抗性と、TM との結合不全があるため、正常よりも凝固活性を持ったトロンビンが多く存在すると考えられる。しかし、M380T 変異トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに変換することが出来ないため、生体内での凝固能はほとんど存在しない。よって、生体内での止血は発端者の PT 蛋白の内約半数を占める R431H 変異型が担っていると推測される。R431H 変異型は、凝固活性が野生型と比較して低下し、さらに TM との結合不全と軽度の AT 抵抗性を示す。R431H 変異 PT は凝固活性が低下しているものの AT による不活化に抵抗するため、通常の PT よりも長く活性が保たれ、

その結果止血に必要な凝固能が保たれているのではないかと推測された。

## E . 結論

本症例で発端者が出血傾向を呈さなかった理由として、AT 抵抗性が寄与していることを明らかにした。また、M380T、R431H の二つの変異が AT 抵抗性をきたすことを明らかにした。これは世界で 3 種類目および 4 種類目の変異の報告となる。さらに、近年、血栓傾向をもたらす機序として新しく TM 抵抗性が提唱されており、本症例もそれに該当する可能性がある。

## F . 健康危険情報

特になし。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

- 1) Yoshikawa Y, Kitayama J, Ishikawa H, Nakamura A, Taniguchi F, Morishita E, Ago T, Nakane H, Kitazono: Fulminant bilateral cerebral infarction caused by paradoxical embolism in a patient with protein S Ala525Val substitution. *Neurology and Clinical Neuroscience*. 3(3): 105-107, 2015
- 2) Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S: Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 22(7): 660-668, 2015
- 3) Taniguchi F, Morishita E, Sekiya A, Yamaguchi D, Nomoto H, Kobayashi E, Takata M, Kosugi I, Takeuchi N, Asakura H, Ohtake S: Late onset thrombosis in two Japanese patients with compound heterozygote protein S deficiency. *Thromb Res*. 135(6) : 1221-1223, 2015
- 4) Nomoto H, Takami A, Espinoza JL, Matsuo K, Mizuno S, Onizuka M, Kashiwase K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Doki N, Miyamura K, Mori T, Nakao S, Ohtake S, Morishita E: A donor thrombomodulin gene variation predicts graft-versus-host disease development and mortality after bone marrow transplantation. *Int J Hematol*. 102(4) : 460-70, 2015
- 5) Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. *PLoS One*. 10(7): e0133196, 2015
- 6) Miyasaka N, Miura O, Kawaguchi T, Arima N, Morishita E, Usuki K, Morita Y, Nishiwaki K, Ninomiya H, Gotoh A, Imashuku S, Urabe A, Shichishima T, Nishimura JI, Kanakura Y: Pregnancy outcomes of

- patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab: a Japanese experience and updated review. *Int J Hematol*. 2016 Feb 8. [Epub ahead of print]
- 7) 森下英理子：第X因子とプロトロンビン、新・血栓止血血管学 凝固と炎症（一瀬白帝、丸山征郎、家子正裕編著）金芳堂、pp20-27、2015
  - 8) 森下英理子：PNHの血栓症．発作性夜間ヘモグロビン尿症(PNH)、金倉讓、西村純一編、医薬ジャーナル社、pp100-111、2015
  - 9) 大谷綾子，福田英ツグ，新山史朗，中橋澄江，長島義宣，青山幸生，森下英理子，向井秀樹．プロテインS欠乏症による難治性下腿潰瘍の1例．*西日本皮膚科*77(5):461-164,2015
  - 10) 森下英理子：細血管障害性溶血性貧血の診断と治療．*臨床血液* 56(7):795-806、2015
  - 11) 森下英理子：血栓止血性疾患の遺伝子診断 - 血栓性疾患．*日本血栓止血学会誌* 26(5):518-523, 2015
  - 12) 森下英理子：先天性血栓性素因の診断．*日本検査血液学会雑誌* 16(1):1-10, 2015.
  - 13) 森下英理子：凝固・線溶系のメカニズムと血栓形成．*Medicina* 52(13):2300-2304, 2015
  - 14) 森下英理子：先天性素因の検査 アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS．*臨床検査* 60(2)：158-165，2015
  - 15) 森下英理子、永井信夫、家子正裕：2015 Hot Topics 線溶分野．*日本血栓止血学会誌* 27(1), 2016(印刷中)
  - 16) 森下英理子：フォンウィルブランド因子の臨床検査．*BIO Clinica*, 2016.(印刷中)
  - 17) 森下英理子：「質疑応答 プロからプロへ」不育症例に対する抗凝固療法と対応．*日本医事新報* (印刷中)
  - 18) 森下英理子：最新情報と今後の展望 2016(血小板・凝固・線溶系疾患) オーバービュー．*臨床血液* 57(3), 2016 (印刷中)
- ## 2. 学会発表
- 1) Takata M, Morishita E, Taniguchi F, Sekiya A, Kobayashi E, Asakura H, Takage A, Kojima T, Otake S: A congenital dysprothrombinemia with both decreased prothrombin activity and antithrombin resistance. 第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
  - 2) Matsuura E, Nakahashi T, Iwaki N, Kadohira Y, Hayashi T, Morishita E, Asakura H, Yamagishi M, Nakao S: Acute coronary syndrome due to a paradoxical embolus during elthombopag treatment for ITP. 第77回日本血液学会学術集会、平成27年10月16日～18日、金沢
  - 3) Sekiya A, Misawa E, Suzuki T, Arai N, Furusho H, Hayashi K, Asakura H, Ohtake S, Morishita E: Influences of rivaroxaban on

- laboratory data of antithrombin, protein C and protein S activities. 第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16 日～18 日、金沢
- 4) Kobayashi E, Taniguchi F, Maruyama K, Takata M, Katsu S, Kaneko S, Sekiya A, Ohtake S, Miyata T, Morishita E : 第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16 日～18 日、金沢
  - 5) Kadohira Y, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Asakura H, Nakao S : Multiple coagulation factor inhibitors detected in patients with lupus anticoagulant. 第 77 回日本血液学会学術集会、平成 27 年 10 月 16 日～18 日、金沢
  - 6) Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T. Development of ELISA system for detection of Protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. ISTH, Toronto, 2015.6.20-24
  - 7) 小林英里奈、關谷暁子、三澤絵梨、鈴木健史、新井信夫、高田麻央、野本明華、朝倉英策、大竹茂樹、森下英理子 : ワルファリンのプロテイン S、プロテイン C 測定値への影響. 日本検査血液学会、2015 年 7 月 11 日、名古屋
  - 8) 高田麻央、關谷暁子、小林英里奈、野本明華、朝倉英策、大竹茂樹、森下英理子 : プロテイン CK193del 変異検出のための PC 活性測定法の検討. 日本検査血液学会、2015 年 7 月 11 日、名古屋
  - 9) 松浦絵里香、門平靖子、林朋恵、森下英理子、奥村伸生、小林隆夫、朝倉英策 : フィブリノゲン補充療法にて安全に出産できた hypodysfibrinogenemia 妊婦の一例. 37 回日本血栓止血学会学術集会、2015 年 5 月 21～23 日、山梨
  - 10) 森下英理子 : 先天性プロテイン S・プロテイン C 欠損症の遺伝子診断ならびに臨床所見, プロテイン S 研究会シンポジウム. 第 37 回日本血栓止血学会学術セミナー、2015 年 5 月 21 日～23 日、甲府
  - 11) 森下英理子 : なぜできる!? 静脈血栓症. 世界血栓症デー日本 市民公開講座、2015 年 10 月 10 日、大阪
  - 12) 森下英理子 : トロンボモジュリンと血管内皮傷害. 2015.10.17. 第 77 回日本血液学会学術集会コーポレートセミナー、金沢
  - 13) 森下英理子 : 静脈血栓症の成因と治療, あきた凝固線溶系セミナー、2015 年 11 月 27 日、秋田
  - 14) 森下英理子 : 静脈血栓塞栓症の成因と治療 悪性腫瘍ならびに先天性血栓性素因を中心に, 第 14 回千葉循環器クリニックフロンティア、2015 年 12 月 4 日、千葉
  - 15) 森下英理子 : 血液凝固異常の検査の進め方, 第 3 回北陸血栓止血検査研究会、2015 年 12 月 12 日、金沢
  - 16) 森下英理子 : 血栓症の基礎と治療 先天性血栓性素因と悪性腫瘍に伴う血栓症, 血栓症 Total

Management、2016年2月5日、札幌

- 17) 森下英理子: APTT 延長を認めたらどんな病態を考えますか、第 36 回有明セミナー、2016 年 2 月 13 日、東京
- 18) 森下英理子: 「特発性血栓症 (先天性血栓性素因による)」の「指定難病」認定に向けての取り組み、第 10 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2016 年 2 月 20 日、東京
- 19) 關谷暁子、三澤絵梨、鈴木健史、末武司、津田友秀、金秀日、古莊浩司、林研至、朝倉英策、大竹茂樹、森下英理子: リバーロキサバンが血中アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 活性値に与える影響および試薬間比較、第 10 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム、2016 年 2 月 20 日、東京

## **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

## 血栓性素因の調査研究：先天性 AT 欠損症の遺伝子解析

研究分担者 小嶋 哲人 名古屋大学大学院医学系研究科 教授

### 研究要旨

我々はこれまで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)欠損症の遺伝子異常解析、さらには新たな先天性血栓性素因のアンチトロンビンレジスタンスの原因遺伝子異常としてプロトロンビン異常症を報告してきた。今回、本研究班の2年間にAT欠損症疑い10症例の遺伝子解析を行ったので報告する。特発性血栓症を発症しAT欠損症を疑われた症例において、*SERPINC1* 遺伝子解析を行った結果、2症例にAT欠損症の原因と思われるミスセンス変異、1症例に一塩基挿入変異を同定し、1症例にエクソン3-5の欠失と2症例にエクソン7の欠失とそれぞれの break point を同定した。また、*SERPINC1* 遺伝子異常を同定できなかった4症例のAT活性低下には、他の原因の存在が示唆された。

### A. 研究目的

日本人にも決して少なくなく、加齢とともに増加する静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策は、高齢化社会を迎えた日本において大きな課題である。特発性血栓症の要因となる日本人での先天性血栓性素因にアンチトロンビン(AT)、プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS)などの生理的凝固制御因子の欠乏が知られているが、AT欠損症、PC欠損症は欧米人とほぼ同頻度に、PS欠損症は欧米人に比べ高頻度に見られる。我々は、これまでに本研究班においてこれら凝固制御因子の先天性欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因となる遺伝子変異を同定し、さらに同定した変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。

今回我々は、本研究班の2年間に特発性血栓症を発症し、AT欠損症を疑われた症例家系において、それぞれ *SERPINC1* 遺

伝子変異解析を行ったので報告する。

### B. 研究方法

名古屋大学医学部生命倫理審査委員会の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、患者の白血球よりゲノムDNAを抽出し、*SERPINC1* 遺伝子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解析を行った。また、塩基配列解析にて原因遺伝子変異を認めなかった症例については、MLPA ( Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification )法を用いて遺伝子欠失の有無を解析し、遺伝子欠失の認められた症例についてはその break point 同定解析を行った。

### (倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第

1号)を遵守するとともに、名古屋大学医学部生命倫理審査委員会の承認を得て解析した。

### C . 研究結果

AT欠損症の疑われた10症例(表)において *SERPINC1* 遺伝子の各エクソン PCR産物ダイレクトシーケンス法では、3症例に原因と思われる遺伝子変異(ミスセンス変異2例、一塩基挿入変異1例)を同定した。また、残り7症例についてMLPA法にて遺伝子欠失解析を行った結果、1症例にエクソン3-5の欠失と2症例にエクソン7欠失を同定した。それぞれ欠失症例のbreak point解析により、前者は *SERPINC1* 領域内(イントロン2とイントロン5)に存在するAlu配列間の相同組み換えの結果生じたエクソン3-5の欠失症例と判明した。また、後者2症例は親子例で、7塩基挿入を伴う *SERPINC1* のイントロン6から下流35kbに及ぶ大規模欠失例と判明した。残り4症例では、AT欠損症の原因となる遺伝子変異は認められなかった。

### D . 考察

静脈血栓塞栓症を発症し特発性血栓症の原因となるAT欠損症の疑われた10症例において遺伝子解析の結果、6症例に原因と思われる遺伝子変異(ミスセンス変異2例、一塩基挿入変異1例、欠失変異3例)を同定したが、残り4症例では遺伝子変異の同定に至らず、それらのAT活性低下は、妊娠合併DVTや原因不明DVTによる消耗性、あるいは新生児期の産生低下によるものと考えられた。

エクソン3-5欠失例では、break point解析結果から *SERPINC1* 領域内(イントロン2とイントロン5)に存在するAlu配列間の相同組み換えの結果生じたエクソン3-5の欠失症例と判明したが、イントロン領域にAlu配列の多い *SERPINC1* 遺伝子では、これらAlu配列間での相同組換えによる欠失変異は比較的多く報告されている。また、エクソン7欠失の2症例は親子例で、break point部に7塩基挿入が同定されたが、欠失部に挿入7塩基を含む9塩基の相同配列が存在することから、相同組み換えを繰り返すFoSTeS(Fork Stalling and Template Switching)モデルによる *SERPINC1* のイントロン6から下流35kbに及ぶ大規模欠失例であることが強く示唆された。

### E . 結論

平成26年度以降の本研究班にて、特発性血栓症の原因としてAT欠損症の疑われた症例家系において、*SERPINC1* 遺伝子解析を行った結果、6症例に種々の遺伝子変異・異常を同定した。また、*SERPINC1* 遺伝子異常を同定できなかった症例のAT活性低下には、他の原因の存在が示唆された。

### F . 健康危険情報

特になし。

### G . 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Nakamura Y, Murata M, Takagi Y, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Kitazawa JI, Shima M, Kojima T:

- SVA retrotransposition in exon 6 of the coagulation factor IX gene causing severe hemophilia B. *Int J Hematol.* 2015 Jul;102(1):134-139.
- 2) Mizutani N, Omori Y, Tanaka K, Ito H, Takagi A, Kojima T, Nakatochi M, Ogiso H, Kawamoto Y, Nakamura M, Suzuki M, Kyogashima M, Tamiya-Koizumi K, Nozawa Y, Murate T: Increased SPHK2 transcription of human colon cancer cells in serum-depleted culture: the involvement of CREB transcription factor. *J Cell Biochem.* 2015 Oct;116(10):2227-38.
  - 3) Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Ito H, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Nakamura M, Iwaki S, Nakatochi M, Suzuki M, Nozawa Y, Murate T: Increased Acid Ceramidase Expression depends on Upregulation of Androgen-dependent Deubiquitinases, USP2, in a Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP. *J Biochem.* 2015 Oct;158(4):309-19.
  - 4) Nikaido T, Tanino Y, Wang X, Sato S, Misa K, Fukuhara N, Sato Y, Fukuhara A, Uematsu M, Suzuki Y, Kojima T, Tanino M, Endo Y, Tsuchiya K, Kawamura I, Frevert C, Munakata M: Serum syndecan-4 as a possible biomarker in patients with acute pneumonia. *J Infect Dis.* 2015 Nov 1; 212(9):1500-8.
  - 5) Santoso A, Kikuchi T, Tode N, Hirano T, Komatsu R, Damayanti T, Motohashi H, Yamamoto M, Kojima T, Uede T, Nukiwa T, Ichinose M.: Syndecan 4 mediates Nrf2-dependent expansion of bronchiolar progenitors that protect against lung inflammation. *Mol Ther.* 2015 Aug 26. in press
  - 6) Kishimoto M, Suzuki N, Murata M, Ogawa M, Kanematsu T, Takagi A, Kiyoi H, Kojima T, Matsushita T.: The first case of antithrombin-resistant prothrombin Belgrade mutation in Japanese. *Ann Hematol.* 2015 Oct 19. in press
  - 7) Nakamura Y, Ando Y, Takagi Y, Murata M, Kozuka T, Nakata Y, Hasebe R, Takagi A, Matsushita T, Shima M, Kojima T.: Distinct X chromosomal rearrangements in four haemophilia B patients with entire F9 deletion. *Haemophilia.* 2015 Dec 21. in press
  - 8) 高木夕希、小嶋哲人: アンチトロンビン これだけは知っておきたい検査のポイント 矢富裕: 編 *meditina* 52(4) 2015 増刊号 100-101, 2015.4.1
  - 9) 村田萌、小嶋哲人: プロテインC、プロテインS これだけは知っておきたい検査のポイント 矢富裕: 編 *meditina* 52(4) 2015 増刊号 108-109, 2015.4.1
  - 10) 高木夕希、小嶋哲人: Xa阻害薬の薬理作用 ファーマナビゲーター抗凝固療法編 山下武志/是常之宏/矢坂正弘: 編 株式会社メディカルレビュー社 pp 72-80, 2015.4.25.

- 11) 小嶋哲人、高木明、村田萌、高木夕希：  
アンチトロンビンレジスタンス 新  
しい遺伝性血栓性素因 臨床血液  
56(6), 632-637, 2015. June. 30.
  - 12) 小嶋哲人、高木明：III. 血液凝固系の  
検査 (pp387-425)、IV. 線溶系の検査  
(pp425-428)、V. 血栓・止血の分子マ  
ーカー (pp429-441)、VI. 血栓性素因  
の検査 (pp441-445) 臨床検査法提  
要(改訂第34版) 金原出版株式会社  
金井正光監修、奥村伸生ほか編  
2015.6.30.
  - 13) 中村友紀、小嶋哲人：血友病Bの分子  
遺伝 Frontiers in Haemophilia 2(2),  
15-18, 2015. Aug.
  - 14) 小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性  
新・血栓止血血管学 凝固と炎症 金  
芳堂 一瀬白帝、丸山征郎、家子正  
裕：編 pp29-33, 2015.9.20
  - 15) 小嶋哲人：アンチトロンビンの基礎と  
臨床：ヘパリンファクターを含む  
新・血栓止血血管学 抗凝固と線溶  
金芳堂 一瀬白帝、丸山征郎、和田英  
夫：編 pp441-445, 2015.10.20
  - 16) 鈴木伸明、小嶋哲人：391. 血友病  
血液疾患診療ハンドブック 吉田彌  
太郎編 医歯ジャーナル社 東京  
pp515-530, 215. 12.10.
  - 17) 小嶋哲人：抗凝固薬・ヘパリン類、フ  
ォンダパリヌクス medicina 52(13),  
2318-2321, 2015. 12.10.
  - 18) 小嶋哲人：NOACの作用メカニズムと抗  
凝固としての特性 Life Style  
Medicine 9(3), 88-92, 2015. 12.25.
  - 19) 高木夕希、小嶋哲人：凝固第XI因子の  
アンチセンス療法 循環器内科  
79(1), 60-64, 2016. 1.28.
  - 20) 高木夕希、小嶋哲人：2. 血液凝固接  
触相 -最近の進歩- VI. 凝固線溶  
系 Annual Review 2016血液 高久史  
磨ほか編 2016.1.30 東京pp212-217,  
2016.1.30.
- ## 2. 学会発表
- 1) 小嶋哲人：Cell-based coagulation  
の立場からの抗凝固療法 (SPC シンポ)  
第37回日本血栓止血学会学術集会、  
山梨，平成27年5月
  - 2) 村田萌、水谷直貴、高木夕希、長谷部  
瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、榎山愛弓、  
河村奈美、橋本恵梨華、高木明、松下  
正、小嶋哲人：プロトロンビン変異に  
よる新たなアンチトロンビン抵抗性  
変異の候補解析 (0-069, P-001：優  
秀ポスター賞) 第37回日本血栓止血  
学会学術集会、山梨，平成27年5月
  - 3) 岸本磨由子、鈴木伸明、村田萌、小川  
実加、兼松毅、高木明、小嶋哲人、松  
下正：深部静脈血栓症で発症しアンチ  
トロンビン抵抗性を示した本邦初  
Prothrombin Belgrade 変異の一家系  
(P-002) 第37回日本血栓止血学会  
学術集会、山梨，平成27年5月
  - 4) 高木夕希、村田萌、中村友紀、小塚敏  
弘、中田悠紀子、長谷部瞭、橋本恵梨  
華、高木明、小嶋哲人：プロトロンビ  
ン Arg596 における一塩基置換ミス  
センス変異体のトロンボモジュリン  
抵抗性評価 (P-003:優秀ポスター賞)  
第37回日本血栓止血学会学術集会、  
山梨，平成27年5月
  - 5) 橋本恵梨華、村田萌、榎山愛弓、河村

- 奈美、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部 瞭、高木夕希、水谷直貴、高木明、國 島 伸治、松下正、小嶋哲人：血小板 無力症に同定された GPIIb 遺伝子の ミスセンス変異とスプライス変異の 複合へ テロ変異解析 (P-0072：優秀 ポスター賞) 第 37 回日本血栓止血 学会学術集会、山梨，平成 27 年 5 月
- 6) 小嶋哲人：新たな血栓性素因：アンチ トロンビン・レジスタンス 新生児ワ ークショップ 第 25 回日本産婦人科 新生児血液学会、東京、平成 27 年 6 月
- 7) Naoki Mizutani, Yuki Nakamura, Moe Murata, Yuki Takagi, Ryo Hasebe, Toshihiro Kozuka, Yukiko Nakata, Akira Takagi, Jun-ichi Kitazawa, Midori Shima, Tetsuhito Kojima: A case of severe hemophilia B associated with a large insertion of SVA RETROTRANSPOSON in the coagulation factor IX gene (P0151-MON) XXV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada 平成 27 年 6 月
- 8) Moe Murata, Naoki Mizutani, Yuki Takagi, Ryo Hasebe, Toshihiro Kozuka, Yukiko Nakata, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima: Analysis of prothrombin mutants in NA+ binding domain as a potential candidate conveying antithrombin resistance (P0486-TUE: Receipt of Young Investigator Award) XXV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada 平成 27 年 6 月
- 9) Yuki Takagi, Moe Murata, Yuki Nakamura, Toshihiro Kozuka, Yukiko Nakata, Ryo Hasebe, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima: Analysis of prothrombin missense mutants at 596ARG by single nucleotide substitution for anticoagulant system (P0560-WED) XXV Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Toronto, Canada 平成 27 年 6 月
- 10) 岸本磨由子、鈴木伸明、村田萌、小川 実加、兼松毅、高木明、小嶋哲人、松 下正：深部静脈血栓症で発症したアン チトロンビンレジスタンス症例の抗 凝固療法 第 16 回日本検査血液検査 血液学会学術集会、名古屋、平成 27 年 7 月
- 11) 中田悠紀子、小塚敏弘、長谷部 瞭、高 木夕希、村田萌、上牧務、松尾真稔、 高木明、松下正、小嶋哲人：先天性ア ンチトロンビン欠乏症 8 症例 *SERPINC1* 遺伝子解析 第 16 回日本検 査血液検査血液学会学術集会、名古屋、 平成 27 年 7 月
- 12) 村田萌、水谷直貴、高木夕希、長谷部 瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、高木明、 松下正、小嶋哲人：アンチトロンビン 抵抗性検出検査法の自動凝固検査機 器への最適化 Part 2 第 16 回日本検 査血液検査血液学会学術集会、名古屋、 平成 27 年 7 月
- 13) 高田麻央、森下英里子、谷口文苗、關 口暁子、小林英里奈、朝倉英策、高木

明、小嶋哲人、大竹茂樹：A congenital dysprothrombinemia with both decreased prothrombin activity and antithrombin resistance [OS-1-77] 第77回日本血液学会学術集会、金沢、平成27年10月16-18日

- 14) 高木夕希、水谷直貴、村田萌、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、高木明、小嶋哲人：Practical laboratory assay to detect abnormal prothrombin conveying thrombomodulin resistance [OS-2-79] 第77回日本血液学会学術集会、金沢、平成27年10月
- 15) 小塚敏弘、長谷部瞭、中田悠紀子、榎山愛弓、河村奈美、中村友紀、高木夕希、村田萌、水谷直貴、高木明、小嶋哲人：Investigation of molecular mechanisms of PS mRNA up-regulation by progestin isoforms in HepG2 cells [PS-2-78] 第77回日本血液学会学術集会、金沢、平成27年10月16-18日

不活化動態測定方法

発明者：高木 明、小嶋 哲人、松下 正

## 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

( 予定を含む。)

### 1. 特許取得

特許出願人：【識別番号】504139662

【氏名又は名称】国立大学法人名古屋大学

特許番号：特許第5818299号( NY15010: 旧 PY10147(H10126) ) ) 登録年月日：2015.10.9

発明の名称：凝固因子として作用する異常トロンビンのためのトロンビン

症例表：平成26年度以降、名古屋大学にて解析したSERPINC1遺伝子解析の結果

No.	Age	Sex	AT:Ag mg/dl	AT:Ac %	Mutation			memo
					Location	Description DNA	Description Protein	
AT-12	55	M	11.4	50	Exon 3-5	c.408+5(23_534)_1153+(437_448)del		再発性VTE
AT-13	24	M	-	48	Exon 7	c.1315C>A	p.Pro439Thr	下肢動脈閉塞+VTE、
AT-14	17	F	-	56	-	-	-	妊娠合併DVT、PSも低下
AT-15	30	F	-	68	-	-	-	妊娠合併DVT、PSも低下
AT-16	41	F	-	49	Intron 3	c.624+1dupG	p.Glu209glyfs17*	AT-9の姉
AT-17	40	F	-	51	Exon 4	c.652A>T	p.Ile217Phe	ビル服用時血栓症
AT-18	0	M	-	48	-	-	-	AT-11の子
AT-19	64	F	-	50	-	-	-	多発性リンパ腫大+肺高血圧症
AT-20	16	F	-	75	Exon 7	NT_004487.20:g30685920_30721022 delinTGGAGTA		左下肢DVT, ATIII製剤補充
AT-21	45	F		60	Exon 7	NT_004487.20:g30685920_30721022 delinTGGAGTA		AT-20の母

## 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 酵素学的解析に関する研究

研究分担者	宮田敏行	国立循環器病研究センター	脳血管内科	シニア研究員
研究協力者	丸山慶子	国立循環器病研究センター	分子病態部	研究員
研究協力者	秋山正志	国立循環器病研究センター	分子病態部	室長
研究協力者	小亀浩市	国立循環器病研究センター	分子病態部	部長

### 研究要旨

プロテイン S (PS) の機能低下を伴う K196E 変異は、日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクである。PS K196E 変異は日本人の約 55 人に 1 人の頻度で存在する。本研究では、組換えヒト PS K196E 変異体の酵素学的解析を行い、変異による血栓症発症の分子メカニズムを検討した。K196E 変異体の APC 依存性抗凝固能は低下していたが、TFPI 依存性抗凝固能は正常であった。また、PS の抗凝固能発揮に必要なリン脂質との結合や PS の抗凝固能を阻害する C4BP との結合、トロンビンによる切断はいずれも正常であった。以上の結果より、K196E 変異が静脈血栓塞栓症のリスクになるのは、APC 依存性抗凝固能の低下によると考えた。

### A . 研究目的

静脈血栓塞栓症は加齢で発症が増加し、80 歳を超えると約 100 人に 1 人が起こすと欧米ではいわれている。超高齢化を迎えた本邦においても、静脈血栓塞栓症の予防と治療は重要な研究課題である。静脈血栓塞栓症は環境因子と遺伝因子が絡み合って発症する多因子疾患であり、生活習慣の欧米化などにより、近年本邦で急速に増加している。

プロテイン S (PS) は、活性化プロテイン C (APC) や組織因子経路インヒビター (TFPI) の補酵素として働き、生体内での血管内凝固を阻止する重要な抗凝固因子である。したがって、PS の欠損あるいは異常は血栓症のリスクを増大させる。私達は、難治性疾患研究事業の成果として、これまでに日本人の静脈血栓塞栓症の遺

伝的背景として PS K196E 変異を同定し (オッズ比 : 3.74-8.56) 本変異は日本人の約 55 人に 1 人の頻度で認められ (アレル頻度 : 0.0089) 約 1 万人がホモ接合体であると報告してきた。本変異は白人種には見られず、加えて中国人と韓国人にも見られないことから、日本人に特有の血栓性変異であることも明らかにした。本変異は日本人の約 55 人に 1 人が保有していることより、多くの日本人が本変異による静脈血栓塞栓症のリスクに晒されていると考えられる。さらに、PS 抗原量は加齢や妊娠などで低下する。PS K196E 変異保有者がそういった環境要因に暴露されると、さらに PS 活性が低下し血栓症のリスクが上昇すると考えられる。

本研究では、組換えヒト PS K196E 変異体の酵素学的解析を行い、変異による血

栓症発症の分子メカニズムを解明する。PS K196E変異体の性状を正確に理解することは、血栓症の予防や治療に重要であると考えられるため、本変異による血栓症発症のメカニズムを解明することの意義は大きいと考える。

## B . 研究方法

CHO Lec 3.2.8.1 細胞に His タグ付きヒト野生型 PS および変異型 PS 発現ベクターをリポフェクション法にて導入し、G418 を用いてセレクションをかけ、安定発現細胞株を樹立した。野生型 PS および変異型 PS 発現細胞をローラーボトルにて大量に培養し、上清から Ni-NTA アフィニティーカラムで His タグ付き PS タンパク質を精製した。His タグを除去するために、TEV プロテアーゼで処理した後、陰イオン交換 (Mono Q) カラムで翻訳後修飾 (Glu Gla 残基) された PS タンパク質を精製した。精製した野生型および変異型 PS タンパク質を用いて、APC 依存性抗凝固能および TFPI 依存性抗凝固能を合成基質を用いて測定した。さらに、PS の抗凝固能発揮に必要なリン脂質との結合能、および PS の抗凝固能を阻害する C4BPbeta 鎖(大腸菌で発現させリフォールディングした C4BPbeta 鎖の CCP1-2 領域)との結合能を測定した。また、PS はトロンピンや FXa により分解され、抗凝固作用を失う。そこで、PS をトロンピンと反応させた後 SDS-PAGE 電気泳動を行い、トロンピンによる切断への抵抗性を確認した。

### (倫理面への配慮)

本研究はヒト試料などを用いないので、倫理面を考慮すべき内容を含んでいない。

## C . 研究結果

組換えヒト野生型 PS および変異型 PS を CHO Lec 細胞で発現させ、解析に十分な量の翻訳後修飾された PS タンパク質を精製した。精製した PS タンパク質を用いて、APC 依存性抗凝固能および TFPI 依存性抗凝固能を測定した結果、変異型 PS の APC 依存性抗凝固能は野生型 PS に比べ約 46% と低下していたが、TFPI 依存性抗凝固能は正常であった。また、リン脂質との結合 ( $K_d$ : 野生型  $77.09 \pm 6.45$  nM、変異型  $78.25 \pm 7.61$  nM) や、C4BP beta 鎖 CCP1-2 領域との結合 ( $K_d$ : 野生型  $8.15 \pm 1.10$  nM、変異型  $8.22 \pm 0.78$  nM)、トロンピンによる切断は、いずれも正常であった。

## D . 考察

日本人の血栓性素因である PS K196E 変異体の性状を正確に理解することは、血栓症の予防や治療に重要である。本研究により、PS K196E 変異体の APC 依存性抗凝固能は野生型に比べて低下しているが、TFPI 依存性抗凝固能は正常であることが明らかになった。PS K196E 変異が静脈血栓塞栓症のリスクになるのは、APC 依存性抗凝固能の低下によるものであり、TFPI 依存性抗凝固能は関与しないことが考えられた。K196E 変異は APC との結合部位である EGF2 ドメインに位置することから、変異により APC との結合が低下し、APC 依存性抗凝固能が低下した可能性が考えられた。

## E . 結論

PS K196E 変異が静脈血栓塞栓症のリスクになるのは、APC 依存性抗凝固能の低下

によるものであり、TFPI依存性抗凝固能は関与しない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

- 1) Yoshida Y, Miyata T, Matsumoto M, Shirotani-Ikejima H, Uchida Y, Ohyama Y, Kokubo T, Fujimura Y: A novel quantitative hemolytic assay coupled with restriction fragment length polymorphisms analysis enabled early diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome and identified unique predisposing mutations in Japan. PLoS ONE, 10(5), e0124655, 2015.
- 2) Tashima Y, Banno F, Akiyama M, Miyata T: Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. Thromb Haemost, 114(1), 206-207, 2015.
- 3) Maruyama K, Akiyama M, Kokame K, Sekiya A, Morishita E, Miyata T: ELISA-based detection system for protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism. PLoS ONE, 10(7), e0133196, 2015.
- 4) Miyata T, Uchida Y, Ohta T, Urayama K, Yoshida Y, Fujimura Y: Atypical haemolytic uremic syndrome in a Japanese patient with DGKE genetic mutations. Thromb Haemost,

114(4):862-863, 2015.

- 5) Banno F, Kita T, Fernández JA, Yanamoto H, Tashima Y, Kokame K, Griffin JH, Miyata T: Exacerbated venous thromboembolism in mice carrying protein S K196E mutation. Blood. 126(19):2247-2253, 2015.
- 6) Fan X, Kremer Hovinga JA, Shirotani-Ikejima H, Eura Y, Hirai H, Honda S, Kokame K, Taleghani MM, von Krogh A-S, Yoshida Y, Fujimura Y, Lämmle B, Miyata T: Genetic variations in complement factors in patients with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with renal insufficiency. Int J Hematol, 2016, in press.

### 2. 学会発表

- 1) 宮田敏行、会長特別企画：日本人の血栓性素因「Congenital Deficiency of Protein C/S, Especially Protein S K196E Mutation」第79回日本循環器学会学術集会、2015年4月24-26日、大阪市
- 2) 宮田敏行、内田裕美子、大田敏之、浦山耕太郎、吉田瑤子、藤村吉博「非典型溶血性尿毒症症候群患者に見られたdiacylglycerol kinase eの遺伝子変異」第37回日本血栓止血学会学術集会 2015年5月21-23日、甲府市、山梨県
- 3) 樋口（江浦）由佳、小亀浩市、水野敏秀、巽英介、宮田敏行「補助人工心臓装着による高分子量VWFマルチマーの減少は循環開始直後に起こる」

- 第37回日本血栓止血学会学術集会  
2015年5月21-23日、甲府市、山梨県
- 4) Masanori Matsumoto, Ayami Isonishi, Koichi Kokame, Masaki Hayakawa, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, “Characteristics and outcomes of patients with Upshaw-Schulman syndrome receiving maintenance hemodialysis due to chronic renal failure”, XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 20-25, 2015, Toronto, **Canada**.
- 5) Keiko Maruyama, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Akiko Sekiya, Eriko Morishita, Toshiyuki Miyata, “Development of ELISA system for detection of protein S K196E mutation, a genetic risk factor for venous thromboembolism”, XXV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, June 20-25, 2015, Toronto, **Canada**.
- 6) 宮田敏行、加藤秀樹、内田裕美子、吉田瑤子、小亀浩市、福岡利仁、要伸也、大田敏之、浦山耕太郎、藤永周一郎、櫻谷浩志、喜瀬智郎、渡邊栄三、織田成人、永田裕子、玉井宏史、小松真太郎、前沢浩司、川村尚久、永野幸治、河野智康、松本雅則、藤村吉博、南学正臣、「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者の遺伝子解析補体系因子とDGKEの遺伝子変異」第52回補体シンポジウム、2015年8月21-22日、名古屋市、愛知県
- 7) Erina Kobayashi, Fumina Taniguchi, Keiko Maruyama, Mao Takata, Shiori Katsu, Shonosuke Kaneko, Akiko Sekiya, Shigeki Ohtake, Toshiyuki Miyata, Eriko Morishita “Detection of protein S K196E mutation by a newly developed ELISA-based system” 口頭発表、第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16-18日、金沢市
- 8) T. Miyata, X. P. Fan, H. Shirota-Ikejima, Y. Eura, H. Hirai, S. Honda, J. A. Kremer Hovinga, M. Mansouri Taleghani, A.S. von Krogh, Y. Yoshida, B. Lämmle, Y. Fujimura, “Mutations in complement factors in patients with Upshaw-Schulman syndrome with renal insufficiency” 優秀ポスター発表、第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16-18日、金沢市、石川県
- 9) Keiko Maruyama, Koichi Kokame, Masashi Akiyama, Toshiyuki Miyata, “Expression, purification, and functional characterization of wild-type and K196E-mutant protein S”、口頭発表、第77回日本血液学会学術集会、2015年10月16-18日、金沢市、石川県

## 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

## 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 - 女性ホルモン剤の副作用としての血栓塞栓症の調査結果を中心に

研究分担者：浜松医療センター 小林 隆夫 院長

研究協力者：浜松医科大学健康社会医学講座 尾島俊之 教授

名古屋市立大学大学院看護学研究科 杉浦和子 講師

### 研究要旨

【目的】本研究では、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を目的とする。【方法】研究方法としては、まずは下記の厚生労働科学研究費補助金難治疾患克服研究事業のデータベースから血栓性素因患者を抽出し、その背景を探り、診療ガイドラインの策定の一助とする。1. 産婦人科領域の静脈血栓塞栓症 (VTE) の調査、2. 肺塞栓症 (PE) と深部静脈血栓症 (DVT) の頻度、臨床的特徴に関する研究、3. 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、4. 院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子、5. 肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究、6. 不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究、7. 女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究。さらに、8. The Japan VTE Treatment Registry Study (急性 VTE の他施設共同観察研究 2009-2010)、9. 日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査 (2002 年-2013 年) 結果も参考にした。【結果】今年度は「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」に関して、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のデータベースを用いた日本における女性ホルモン剤の副作用としての血栓塞栓症の調査結果を中心に報告する。2004 年から 2013 年までの 10 年間に 581 件 (VTE394 件、動脈血栓塞栓症 154 件、部位不明の血栓症 33 件) が報告され、発症頻度は欧米人よりわずかに低い程度であった。服用期間別の発症数では、服用開始 90 日までが最も発症頻度が高かった。月経困難症治療薬 3 剤の使用者における年齢階層別の発症頻度においては、40 歳代以降が急激に増加する傾向がみられた。BMI 別 VTE リスクでは、BMI 標準体重群を基準とした肥満群 (BMI $\geq$ 25) リスクは 2 倍以上であった。死亡率は極めて低かったが、日本人でも欧米人と同様な傾向であることが判明した。また、全 VTE 患者に占める血栓性素因保有者の割合は 4%前後で、周術期 PE では 2%弱であった。【考察及び結論】今回の検討で日本人の女性ホルモン剤使用者における血栓症の実態が初めて明らかになった。血栓性素因のうち PS 欠乏症に特化した結果は得られていないものの、昨年報告したように活性化プロテイン C 感受性比および 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の可能性はある。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。

## A . 研究目的

日本人には血栓性素因としてのプロテイン S (PS) 欠損症 (PS 徳島変異は日本人 55 人に 1 人と推定) が多く、妊娠中や女性ホルモン剤使用中に血栓症を発症することがある。しかし、妊娠前や女性ホルモン剤使用前に本症と診断されていることはほとんどなく、対応に苦慮することが多い。本研究では、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を目的とする。

## B . 研究方法

研究方法としては、まずは下記の厚生労働科学研究費補助金難治疾患克服研究事業のデータベースから血栓性素因患者を抽出し、その背景を探り、診療ガイドラインの策定の一助とする。

- 1 . 産婦人科領域の静脈血栓塞栓症 (VTE) の調査 (平成 17-19 年度同事業)
- 2 . 肺塞栓症 (PE) と深部静脈血栓症 (DVT) の頻度、臨床的特徴に関する研究 (同上)
- 3 . 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 (平成 20-24 年度同事業)
- 4 . 院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子 (平成 20-22 年度同事業)
- 5 . 肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究 (平成 23-25 年度同事業)
- 6 . 不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究 (平成 23-25 年度同事業)
- 7 . 女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究 (平成 25 年度同事業)

さらに、下記 2 つの調査研究結果も参考とし、総合的に考察して診療ガイドラ

インを策定する。

8 . The Japan VTE Treatment Registry Study (急性 VTE の他施設共同観察研究 2009-2010)

9 . 日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査 (2002 年-2013 年)

とくに、妊娠管理に関しては、血栓症の発症時期や発症リスクを明らかにし、妊娠中の PS 測定において血栓性素因を有しているのか、単に妊娠中に PS 活性が低下しただけなのかの判別可能なシステムを確立したい。また、女性ホルモン剤使用に関しては、日本人の血栓症 (静脈血栓症および動脈血栓症) の発症実態を明らかにし、使用される女性ホルモン剤の処方実績から発症頻度を割出し、日本初のエビデンスを確立するとともに、PS 欠損症等の血栓性素因保有者における安全な処方方法を提言し、服用前および服用中の最適な検査法として活性化プロテイン C 感受性比 (APC-sr) や PS 比活性 (PS 活性/PS 抗原量) 等を盛り込んだ診療ガイドラインを策定したい。

### (倫理面への配慮)

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則り、研究実施施設の倫理委員会の承認を得た後にすでに実施しているため、有害事象が起こる可能性はない。また、既存資料等のみを用いるため、個々の患者からインフォームドコンセントを得ることはしない。さらに患者情報については、連結不可能匿名化された情報のみを収集し、個人情報収集しないため倫理的に問題ないとする。なお、上記の研究の実施については、研究実施時にホームページ

で公開している。

## C. 研究結果

今年度は「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」に関して、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)のデータベースを用いた日本における女性ホルモン剤の副作用としての血栓塞栓症の調査結果を中心に報告する。

### 1) 2004年から2013年までの血栓塞栓症発症報告数

10年間に581件の報告を抽出した。その内訳は、VTE394件、動脈血栓塞栓症(ATE)154件、部位不明の血栓症33件であった(このうち3件はVTEとATEの合併例、1件はATEと他の部位のATEの合併例のため血栓症症例としては577例)。VTEでは、DVTとPEがもっとも多く78.4%(DVTのみが153件、PEのみが66件、PEとDVTの合併が90件)を占めており、脳静脈血栓症は11.4%(45件)、その他の静脈血栓症が40件であった。ATEでは、脳梗塞が最も多く76.0%(117件)で、冠動脈疾患は17件、その他の動脈血栓症が20件であった。なお、血栓塞栓症の報告数は年々増加しているが、とくに2011年以降の増加が著しく、2004年の21件に対し2013年は184件であった。

### 2) 血栓塞栓症の服用期間別発症数

血栓塞栓症例のうち服用期間が判明している415件(VTE299件、ATE97件、部位不明19件、2例はVTEとATE、1例はATEと他の部位のATEとの合併例)における服用期間別の発症数に関しては、OCを服用開始90日以内に発症したすべ

ての血栓塞栓症の頻度は45.5%(189件)であり、服用開始180日以内の発症が62.9%(261件)、360日以内の発症が81.2%(337件)で、服用開始から540日を超えると発症はほぼプラトーに達した。そのうち特に30日以内の発症は115件(27.7%)、7日以内の発症は15件(3.6%)であった。なお、服用開始90日以内に発症したVTEはVTE全体の43.8%(131件)、ATEはATE全体の43.3%(42件)であった。

### 3) 血栓塞栓症の推定発症頻度

2009年から2013年まで5年間の血栓塞栓症は439件(VTE313件、ATE103件、部位不明の血栓症23件)で、1万人年あたりの発症頻度(発症報告数/年間推定処方患者数)を算出した。すべてのOCおよびプロゲスチン単剤を合算した発症頻度は、VTEが1.11、ATEが0.37、すべての血栓塞栓症が1.56であった。しかし、プロゲスチン世代別にみると第4世代OCがVTE、ATE、すべての血栓塞栓症でそれぞれ、7.85、1.39、9.45と欧米同様に高く、次いで1相性の第1世代OCが、それぞれ1.75、0.86、2.91であり、さらに第3世代OC、第2世代OCと続き、プロゲスチン単剤のリスクは欧米同様に低かった。なお、プロゲスチン世代別では、VTEに発症頻度の差が見られたもののATEではほとんど差が見られなかった。

### 4) 月経困難症治療薬3剤の使用者における年齢階層別の推定発症頻度

VTE、ATE、およびすべての血栓塞栓症において、月経困難症治療薬3剤(low-dose estrogen progestin (LEP)2剤：第1

世代 OC と第 4 世代 OC、およびプロゲスチン単剤のジエノゲスト) 使用者の 2009 年から 2013 年までの 1 万人年あたりの年齢階層別血栓塞栓症推定発症頻度は、10 歳代から 50 歳代すべての年代では、月経困難症治療薬 3 剤でそれぞれ 2.38、0.63、3.17 であったが、LEP 2 剤ではそれぞれ 3.26、0.81、4.28 と高く、ジエノゲストではそれぞれ 0.13、0.17、0.30 と低かった。また、すべての血栓塞栓症での発症リスクは加齢とともに増加した。すなわち、40 歳代では月経困難症治療薬 3 剤で 4.61、LEP2 剤で 7.31 となり、50 歳代ではそれぞれ 6.49、13.16 と増加した。なお、50 歳代では、LEP2 剤で VTE が 8.46、ATE が 3.76 と高く、50 歳以降では VTE のみならず ATE も高くなることになった。一方、この傾向はジエノゲストではみられず、すべての血栓塞栓症で発症頻度は低かった。プロゲスチン単剤であるジエノゲストに関しては、欧米人と同様、加齢にも拘わらず発症頻度は低いものと推定された。

#### 5) 肥満指数 (BMI) 分類別の年齢調整オッズ比

581 件の血栓塞栓症のうち年齢と BMI が明確であった 306 件 (VTE226 件、ATE72 件、部位不明の血栓症 8 件) を解析対象とした。年齢調整オッズ比は標準体重群 (BMI:18.5-24.9) を 1 として算出し、やせ群 (BMI<18.5) では VTE が 0.46、ATE が 0.76、すべての血栓塞栓症が 0.51 で、肥満群 (BMI≥25) では VTE が 2.32、ATE が 1.16、すべての血栓塞栓症が 1.83 であった。

#### 6) 死亡例の推定発症頻度

死亡例のうち 16 例は血栓塞栓症に関連していると考えられ、2009 年から 2013 年における 10 万人年あたりの死亡率 (死亡は 14 例) は 0.50 であった。これは年間ほぼ 20 万人に 1 人の確率と考えられる。

次に、The Japan VTE Treatment Registry Study の結果から VTE のリスク因子としての血栓性素因の頻度を見ると、VTE1,076 例中で 44 例 (4.1%)、症候性 PE338 例中で 12 例 (3.6%)、DVT738 例中で 32 例 (4.3%) であった。VTE の既往例では、同様に 66 例 (6.1%)、21 例 (6.2%)、45 例 (6.1%)、OC またはホルモン補充療法では、同様に 28 例 (2.6%)、8 例 (2.4%)、20 例 (2.7%)、妊娠中および産褥期症例では、同様に 19 例 (1.8%)、4 例 (1.2%)、15 例 (2.0%) であった。

さらに、日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査では、2002 年-2013 年までの 12 年間の全危険因子に占める平均は、血栓性素因が 1.68%、妊娠が 2.67%、OC 内服が 0.38% であった。

## D. 考察

今回の解析は PMDA に報告された症例に限られるものの、日本の OC 服用者の血栓塞栓症の発症率がはじめて明らかになり、その発症頻度は欧米人よりわずかに低い程度であった。また、プロゲスチン世代別にかかわらず服用開始 90 日までが最も発症頻度が高く、以後低下し、1 年半を過ぎるころからほぼプラトーになることが明らかになった。日本人でも欧米人同様、肥満および加齢と関係していることがはじめて明らかになった。すべての血栓塞栓症リスクは、40 歳以上は 20

歳代と比較して3倍以上に増加していた。今回のデータでは、10歳代の発症頻度が20歳代や30歳代と比較してやや高いように見えるが、この理由は明らかではない。10歳代での処方量が少ないにも拘わらず、たまたまVTE症例が報告された可能性があるが、若年者発症の場合、血栓性素因が関与している可能性を否定できない。月経困難症に対する女性ホルモン療法は、日本において2008年以降に保険適用されたが、この治療を受ける患者の増加とともにそれに関連する血栓塞栓症も増加している。死亡率は極めて低いが、月経困難症患者にLEPを処方する際には、そのリスクとベネフィットを十分に説明し、リスクである血栓塞栓症も常に念頭に置いて、安全な処方と血栓塞栓症の早期発見・早期診断を心がけることが肝要である。

また、全VTE患者に占める血栓性素因保有者の割合は4%前後で、周術期PEでは2%弱であった。今回の検討では血栓性素因のうちPS欠乏症に特化した結果は得られていないものの、昨年報告したように、「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」で得られた血栓症の有用な予知マーカーであるAPC-sr、PS活性およびPS比活性の測定が、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。

## E．結論

今回の検討で日本人の女性ホルモン剤使用者における血栓塞栓症の実態が初めて明らかになった。血栓性素因のうちPS欠乏症に特化した結果は得られていないものの、昨年報告したように血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要であり、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者の血栓症予知に有用である可能性がある。

## F．健康危険情報

なし

## G．研究発表

### 1. 論文発表

- ・ [Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T](#). Risks of thromboembolism associated with hormonal contraceptives related to body mass index and aging in Japanese women. *Thromb Res* 137: 11-16, 2016
- ・ [Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T](#). Thromboembolism as the adverse event of combined oral contraceptives in Japan. *Thromb Res* 136: 1110-1115, 2015
- ・ [Murakami M, Kobayashi T, Kubo T, Hata T, Takeda S, Masuzaki H](#). Experience with recombinant activated factor VII for severe post-partum hemorrhage in Japan, investigated by Perinatology Committee, Japan Society of Obstetrics and Gynecology. *J Obstet Gynaecol Res* 41(8): 1161-1168, 2015
- ・ [Makino S, Takeda S, Kobayashi T, Murakami M, Kubo T, Hata T, Masuzaki H](#).

National survey of fibrinogen concentrate usage for post-partum hemorrhage in Japan: Investigated by the Perinatology Committee, Japan Society of Obstetrics and Gynecology. J Obstet Gynaecol Res 41(8): 1155-1160, 2015

・ Sakon M, Maehara Y, Kobayashi T, Kobayashi H, Shimazui T, Seo N, Crawford B, Miyoshi I. Economic burden of venous thromboembolism in patients undergoing major abdominal surgery. Value in Health Regional Issues 6C: 73-79, 2015

・ 杉浦和子, 小林隆夫: 日本における女性ホルモン剤使用に起因する血栓塞栓症と肥満および加齢との関係. Thrombosis Medicine 6(1): 2016 (in press)

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 日本産婦人科・新生児血液学会誌 25(2): 43-58, 2016

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 低用量経口避妊薬(OC)と血栓症. 吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司編集, 産科婦人科疾患最新の治療 2016-2018, 南江堂, 東京, pp47-49, 2016

・ 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の予防と治療指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療最新ガイドライン 2016- '17, 総合医学社, 東京, pp311-315, 2015

・ 杉浦和子, 小林隆夫: わが国における女性ホルモン剤使用に起因する血栓塞栓症の実態. Thrombosis Medicine 5(4): 342-347, 2015

・ 小林隆夫: 周産期の電話相談~テレフォントリアージ. 産科編 妊婦 12 週から 36

週まで. 静脈瘤ができたのですが. 周産期医学 45(11): 1551-1552, 2015

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤の安全な処方と血栓症への対策. 産婦人科の実際臨時増刊号 64(11): 1402-1410, 2015

・ 小林隆夫: 妊娠中および産褥期の静脈血栓塞栓症. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第 6 章 特殊な病態下の静脈血栓塞栓症の診断と治療. 医薬ジャーナル社, 大阪, pp373-382, 2015

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と静脈血栓塞栓症(VTE). 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第 1 章 静脈血栓塞栓症の病理と病態. トピックス 4. 医薬ジャーナル社, 大阪, pp84-85, 2015

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と血栓症 - 海外における報告を中心に -. Thrombosis Medicine 5(3): 255-260, 2015

・ 小林隆夫, 杉浦和子: OC・LEP 製剤と血栓症 - 安全処方のために -. 日本エンドメトリオージス学会会誌 36: 90-97, 2015

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 日本女性医学学会雑誌 22(2): 153-158, 2015

・ 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防と治療. 一瀬白帝, 丸山征郎, 内山真一郎編著, 新・血栓止血血管学 血管と血小板. 金芳堂, 京都, pp102-110, 2015

・ 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と活性化プロテイン C 抵抗性. Thrombosis Medicine 5(2): 171-175, 2015

・ 小林隆夫: 肺血栓塞栓症. 日本の妊産

婦を救うために 2015. 日本産婦人科医会  
医療安全委員会監修, 関沢明彦, 長谷川  
潤一編集, 東京医学社, 東京, pp165-173,  
2015

・小林隆夫: 静脈血栓塞栓症. 特集 高齢  
妊娠を知る. 産婦人科の実際 64(4):  
527-534, 2015

・小林隆夫, 杉浦和子: 日本人に多い先  
天性凝固阻止因子欠乏症について教えて  
ください. 特集/OC・LEP の静脈血栓塞栓  
症リスク Q&A. 産科と婦人科 82(4):  
361-370, 2015

・小林隆夫: 産婦人科医のための血栓症  
大全. 小林隆夫監修. ノーベルファーマ  
株式会社, 富士製薬工業株式会社, 日本  
新薬株式会社発行, カンナル印刷, 東京,  
pp1-72, 2015

・小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と活  
性化プロテイン C 凝固制御系.  
Thrombosis Medicine 5(1): 73-77, 2015

・小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤  
と血栓症. 鈴木重統, 後藤信哉編集, 止  
血・血栓ハンドブック. 西村書店, 東京,  
pp215-229, 2015.

## 2. 学会発表

・小林隆夫: 周術期の VTE 予防. 第 77 回  
日本臨床外科学会総会教育セミナー18,  
福岡, 2015.11.27

・小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓塞栓  
症 - 安全処方に向けて -. 平成 27 年度岐  
阜産科婦人科研究会 ~ 生殖医学 ~, 岐阜,  
2015.11.26

・小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓塞栓  
症 - 安全な処方のために. 第 22 回肺塞栓  
症研究会シンポジウム. 東京,

2015.11.21

・杉浦和子, 小林隆夫, 尾島俊之: わが  
国の女性ホルモン剤使用に起因する血栓  
塞栓症の実態. 第 22 回肺塞栓症研究会シ  
ンポジウム. 東京, 2015.11.21

・小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の現状と課  
題. 抗凝固療法フォーラム, 浜松,  
2015.11.4

・小林隆夫: 子宮内膜症治療におけるホル  
モン製剤と血栓症 - 安全に治療を行う  
ためのポイント -. 神奈川子宮内膜症研  
究会, 横浜, 2015.10.28

・小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓をめ  
ぐる諸問題 ~ 症例解説も含めて ~. 周産  
期医学特別講演会. 札幌, 2015.9.12

・小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防 ~ リ  
スク評価と予防対策 ~. Covidien 第 12  
回 VTE 医療安全セミナー. 新潟,  
2015.8.29

・小林隆夫: 血栓症発症を初期症状から  
見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンフ  
ァレンス in 大阪, 2015.8.22

・小林隆夫, 杉浦和子, 尾島俊之: 女性  
ホルモン剤と血栓症. 第 57 回日本婦人科  
腫瘍学会シンポジウム 5 がん治療 ~ 女  
性の QOL 維持には. 盛岡, 2015.8.8

・小林隆夫: 子宮内膜症治療におけるホル  
モン製剤と血栓症 ~ 安全に治療を行う  
ためのポイント ~. 子宮内膜症ネットフ  
ォーラム, 東京, 2015.8.5

・小林隆夫: 血栓症発症を初期症状から  
見抜くコツ. 女性ホルモン剤症例カンフ  
ァレンス in 新宿, 東京, 2015.8.1

・小林隆夫: 最近の肺塞栓症の現況と院  
内における予防対策. 藤枝地区学術講演  
会. 藤枝, 2015.7.31

・小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～．大阪府 大阪市内南部エリア 医療安全講演会．大阪，2015.7.24

なし

### 3. その他

・小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ．女性ホルモン剤症例カンファレンス in 日本橋，東京，2015.7.4

なし

・小林隆夫：本邦における OC・LEP 配合剤による血栓塞栓症の実態について．全国子宮内膜症フォーラム．東京，2015.7.18

・小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ．女性ホルモン剤症例カンファレンス in 渋谷，東京，2015.7.11

・小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症．第25回日本産婦人科・新生児血液学会特別講演．東京，2015.6.5

・Kobayashi T, Sugiura K, Ojima T. Venous thromboembolism as the adverse event of combined oral contraceptives or hormone replacement therapy. SPC symposium of the 37th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Kofu, 2015.5.21

・小林隆夫：血栓症発症を初期症状から見抜くコツ．女性ホルモン剤症例カンファレンス in 名古屋，名古屋，2015.5.16

・小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～．Covidien 第11回 VTE 医療安全セミナー．広島，2015.3.15

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録