

# 総括研究報告書

## 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

### 平成 30 年度総括研究報告書

#### 「血液凝固異常症等に関する研究」

研究代表者 村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授

#### 研究要旨

本研究班は指定難病の中でも血液疾患と腎疾患を対象に、政策研究事業としてエビデンスに基づいた全国共通の診断基準・重症度分類の作成や改正、診療ガイドライン等の確立や改正及び普及などを目的に活動している。具体的には特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）、特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）、を対象としている。4疾患について、それぞれのサブグループに分かれて課題に取り組むとともに、グループ間の相互議論を活発に行うことによって、(1)分子病態に基づいた診断基準、治療指針の確立/普及およびその効果の検証、改正、(2)大規模な疫学的解析による我が国での発症頻度、予後の把握と治療の標準化、などを目標とした。小児と成人を対象とし、さらに小児から成人への移行期医療も含めて検討している。平成30年度は3年計画の2年目として、前年度に引き続き診療ガイドの改訂、指定難病検討資料の作成、臨床情報やゲノム情報に基づく病態解明に注力した。また臨床的有用性の高いデータベース化システムの構築、そして新しい体外診断薬の開発や検証、新規治療の検証と保険適応へ向けての検討を班全員の参加のもとに行った。疫学研究も継続した。特発性血小板減少性紫斑病については、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、平成17年度から26年度の10年間におけるデータをもとに解析を実施した。また「成人ITP治療の参照ガイド2019年版」の最終原案を作成した。血栓性血小板減少性紫斑病については、レジストリーの継続、ADAMTS13遺伝子解析の継続、リツキシマブの後天性TTPへの保険適用拡大、後天性TTPにおけるHLA解析、TTP診療ガイド改定に向けた準備、造血幹細胞移植後TMAの病態解析を行った。aHUSについては蛋白質学的解析（羊赤血球溶血試験）、抗H因子抗体解析、遺伝子解析のほか、aHUSの凝固プロファイルの検討、Eculizumabの小児における有効性と安全性、Eculizumabの成人における有効性と安全性、が検討された。特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）では「遺伝性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、「遺伝性血栓性素因患者の周術期診療ガイドライン」の策定、「妊娠合併遺伝性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定を目標に、これらの達成に必要なアンチトロンビン抵抗性の分子病態解明、遺伝性血栓性素因の人種差、新生児・小児期における遺伝性血栓症の診断と治療法の確立に向けた研究、先天性凝固阻止因子欠乏症患者のphenotypeとgenotypeについての検討を行った。

当研究班の活動はホームページに公開されている。

<http://ketsuekigyoko.org/index.html>

## ITP（特発性血小板減少性紫斑病） 研究グループ

ITP に関しては、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継続的に行っている。

平成 30 年度においては、疫学調査では 10 年間の ITP 臨床調査個人票のデータを用いて出血症状出現のリスク因子を調査した。治療の標準化に関しては、本研究班にて作成した「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」の改訂に向けて、各班員による草案の作成を行い改訂委員会にて討議し、その後もメール審議などを通して、「成人 ITP 治療の参照ガイド 2019 年版」の最終原案を作成した。個別研究では、診断に関して構成仕様を確立した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの性能評価を実施した。また、TPO を測定するサンドイッチ ELISA 系を構成する固相抗体、スタンダード原料、標識二次抗体の作成を終えてキットを構築した。

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もなっており毎年行われる ITP 臨床個人調査票（平成 17 年度から 26 年度）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皮膚・粘膜・臓器の出血症状と血小板数・年齢との関連やその他のリスク因子について調査した。成人（18 歳以上）の患者を対象とし、平成 17 年度から 26 年度の 10 年間における新規登録患者数は 21,811 人であり、このうち、血小板数値を含む報告データに欠

損のない新規登録成人患者 19,415 人を調査対象とした。

ITP の診療は、近年大きく変化している。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本班員が中心となり遂行しその成果を発表している。リツキシマブは 2017 年 3 月に ITP に対して保険収載されたこと、さらに 2012 年に参照ガイドを公開してから 6 年が経過していることより、改訂の至適時期であると考えられる。ITP 治療の参照ガイドの改訂に関して、本年度においても研究班が作成した上記参照ガイドの普及、啓発に学会シンポジウムや総説原稿にて活発に行った。実際「臨床血液」誌のダウンロード数において、一位が成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012 年版であり、二位は妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイドであり、この 2 編が圧倒的なダウンロード数（約 1,500/月）であり、その使命を果たしていることが裏付けられた。

個別研究に関しては、1) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定法、2) TPO 測定キットの開発、などが実施された。

## TTP（血栓性血小板減少性紫斑病） 研究グループ

TTP グループは、日本国内の TMA（血栓性微小血管症）症例の集積と病態解析を行い、TTP（血栓性血小板減少性紫斑病）の実態を明らかにし、予後の改善を図ることを目的としている。我々は既に TTP 診療ガイド 2017 を作成し和文と英文で発表した。

平成 30 年度は、1) TMA レジストリーの継続、2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続、

3) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大、4) 後天性 TTP における HLA 解析、5) TTP 診療ガイド改定に向けた準備、6) 造血幹細胞移植後 TMA の病態解析を行った。

本年度の主要な目標は、日本国内の TMA 症例の集積と病態解析を行い、独自の TTP と aHUS の診療ガイドラインを作成することであった。TTP 症例の集積は順調に継続しており、現在までの解析症例数は 607 例となった。

奈良県立医科大学輸血部では、1998 年以降 ADAMTS13 の検査を通じて、日本全国の医療機関から TMA 症例の集積を行ってきた。その症例数は 2018 年 12 月末で 1516 例となった。この 1 年間の症例数の増加は 42 例で、そのうち ADAMTS13 活性が 10%未満の TTP 症例の増加は 26 例であった。ADAMTS13 遺伝子解析については、先天性 TTP は本年度 1 例新たに同定し、全部で 65 例となった。これまでに日本人で 62 例について ADAMTS13 遺伝子解析を行い、58 例 (93.5%) で責任遺伝子変異を同定した。11 例がホモ接合体異常、47 例が複合ヘテロ接合体異常であった。後天性 TTP に対するリツキサンの保険適用は、2014 年に医師主導治験を実施したが、2017 年 8 月に日本血液学会を通じて、医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に、保険適用の拡大を要望した。2018 年 7 月に開かれた医療上の必要性に係る基準への専門作業班において必要性が認められているので、2019 年度早々に適用拡大となる見込みである。

そのほか、後天性 TTP における HLA 解

析、TTP 診療ガイド改定に向けた準備、造血幹細胞移植後 TMA の病態解析を行った。

2018 年 4 月から ADAMTS13 検査が保険収載された事より、TMA registry の症例集積が減少することが予想された。本年度はそれほどの減少は認めなかったが、年度後半にはかなり減少しているので、次年度以降は症例の集積は困難となる可能性が高いと予想している。

今後の大きな目標として、TTP 診療ガイドラインの改定がある。前回のガイドライン作成は Minds の方針に従っていなかったが、近年では Minds に従うことが求められている。そのため今回の改定では、clinical question (CQ) を 2、3 個設定して文献検索を行うことを考えている。

### **aHUS (非典型溶血性尿毒症症候群) 研究グループ**

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) は補体関連因子の遺伝的・後天的異常により発症する疾患である。平成 29 年度より aHUS は本研究班のサブグループに加わり、日本国内の aHUS 症例の疫学的・蛋白質学的・遺伝学的解析を通して、本研究班独自の aHUS 診療ガイドラインを作成することを目的として研究活動を開始した。本疾患は血栓性微小血管症 (TMA) に含まれる疾患であり、補体関連因子の遺伝的・後天的異常により発症する。約 60% の症例で補体や補体制御因子 (H 因子、I 因子、C3、MCP) の遺伝子異常、H 因子に対する自己抗体の存在が報告されているが、近年では凝固系因子の異常も原因となりうるようになってきた。

平成 30 年度は、蛋白質学的解析（羊赤血球溶血試験）、抗 H 因子抗体解析、遺伝子解析、等が行われた。

蛋白質学的解析では、事務局に問い合わせ・コンサルテーションのあった 264 例のうち、aHUS 発症急性期の採血検体が得られた症例は 49 例であった。49 例の溶血試験の結果を解析すると、溶血度の中央値は 33.9% であり、正常人 (5.2% (3.8-5.9%)) や 2 次性 TMA 症例 (11.9% (1.6-19.2%)) に比べ、有意に高い値を示した。

抗 H 因子抗体は 21 例に同定され、急性期に検体が得られた症例における抗体価の中央値は 2882 AU/mL であった。抗体陽性例の 20% は成人期に aHUS を発症していたが、小児例に比べ溶血や血小板減少の程度が軽度であるという特徴を示した。

遺伝学的解析では 184 例の患者について解析を実施した結果、遺伝子異常が一定の割合で検出された。以前より、本邦では欧米諸国や米国に比べ CFH 変異の割合が低く、C3 変異の割合が高いことが報告されていたが、今回の我々の報告では 100 例を上回る症例の遺伝的背景を明らかにしたことで、信憑性が高いデータを得ることができた。

このほか、aHUS の凝固プロファイルの検討、Eculizumab の小児における有効性と安全性、Eculizumab の成人における有効性と安全性、が検討された。

昨年度に引き続き 250 例を超える aHUS 症例のコホートを樹立し、200 例近くの症例に溶血試験・抗体検査・遺伝子解析を実施してきたことにより、本邦における aHUS 患者の実情をより正確に把握できるよう

になった。これらのデータは、新たな診療ガイド作成に向けて非常に重要な知見となると考えられる。これらの成果を通して、本邦独自の診療ガイドライン策定を目指す。

### 特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）グループ

特発性血栓症は、先天性プロテイン C(PC)、プロテイン S(PS)、アンチトロンビン(AT)欠乏症により新生児・乳児期から成人期に亘って重篤な血栓症を発症する疾病である。若年性発症で、再発を繰り返し、重篤な機能障害を合併する。ここでは近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症(VTE)のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診療ガイドの作成を通して、VTEの予知・予防の対策確立を目的としている。具体的な研究課題として、(a)「遺伝性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、(b)「遺伝性血栓性素因患者の周術期診療ガイドライン」の策定、(c)「妊娠合併遺伝性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、を目指している。

平成 30 年度は個別研究として、以下の研究を行った。

Arg596 以外のトロンビン Na<sup>+</sup>結合領域ミスセンス変異の AT 抵抗性 (ATR) 解析：変異体 Lys599Arg (5.35) および Glu592Gln (4.71) では Yukuhashi 変異 (4.36) および Belgrade 変異 (5.19) と同等に高値で、同様の血栓症リスク示す可能性のあることが判明した。トロンビン Na<sup>+</sup> 結合領域を構成するアミノ酸のミスセンス変異体は、

多くが ATR を示すことが明らかになった。

遺伝性血栓性素因保有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：今年度は「遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩管理に関する全国調査研究」の準備を行った。実際の調査は次年度早々に行う予定である。

遺伝性血栓性素因の人種差および血中 PS 活性測定の前analytical variables に関する研究：クエン酸加血漿を 4℃ないし室温で保存すると分子量が 77 kDa のバンドと 70 kDa の弱いバンドが観察され、PS 分子が切断されていた。さらに、70 kDa のバンドの割合が多い保存血漿では total PS 活性が低下しているが、total PS 抗原量は低下していなかった。クエン酸加血漿を 4℃ないし室温で保存すると PS 分子が切断されて APC cofactor 活性が低下するが、PS 抗原量は変化しないことが示された。その結果、PS 比活性が低値となり、PS Tokushima などの II 型 PS 欠乏症の判定が困難となることが明らかとなった。

新生児・小児期における遺伝性血栓症の診断と治療法の確立に向けた研究：新生児

血栓症の未診断例で、PC と PS 遺伝子 (*PROC*, *PROS1*) を含む遺伝子解析パネルの検定を行った。新生児期と小児期で異なる後天性因子が明らかになった。血縁者の既往症、後天性因子の除外に加えて、年齢別の抗凝固因子の活性化下限値と活性予測式による症例の絞り込みを行い、遺伝子解析パネル検査へとつなげるアウトラインを提案した。

先天性凝固阻止因子欠乏症患者の phenotype と genotype についての検討、ならびに変異 AT 蛋白の分子病態解析：先天性 AT 欠乏症は、PC、PS 欠乏症より発症年齢が若いこと、血栓症のリスクが高く家系内発症率が高いこと、妊娠を契機に発症することが多いことなどが明らかとなった。先天性 AT・PC・PS 欠乏症は、遺伝子変異同定率、血栓症初発年齢、症状、家族歴、などがそれぞれ異なっており、個々の疾患の特徴をよく理解し診療にあたることで、再発予防あるいは家系内保因者の血栓予防において重要であることが示された。