

ITP（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	准教授
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	准教授
	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	千里金蘭大学	
	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
特別協力者（疫学班）：	島田直樹	国際医療福祉大学	教授

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。平成 17 年度から 26 年度（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。

A. 研究目的

ITP は平成 26 年度までは特定疾患治療研究事業の対象疾患であり、平成 27 年 1 月よりは指定難病医療費助成制度の対象疾患として、難病に位置づけられる疾患である。本研究班では本疾患を克服すべくその疫学を初めとして、治療ならびに診断を向上させることを課題として継続して検討を重ねている。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) 治療の標準化とその啓発（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（特に病態に則した新たな診断基準の作成）を大きな柱として検討してきた。

平成 30 年度においては、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した。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、「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」の改訂を行うため、メール審議およびガイドライン作成委員会を開催し、2019 年版の草案を作成した。ITP に関する新たな診断法として、ELISPOT 法の改良、血中 TPO 測定キット開発に向けての検討を行った。

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。

2. 治療の標準化に関しては、「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」、の公開と啓発に努めたが、今年度は 2012 年版の改訂作業を行った。方法としては、班員間でのメール審議を通して、参照ガイド改訂に向けて各項目の執筆担当者を決定し、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、改訂の最終作業を行った。

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抗血小板抗体検出法である ELISPOT 法のキット化の推進、血中トロンボポエチン (TPO) 濃度測定キットの開発を行った。

(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、倉田、島田)

1. 解析対象患者

臨床調査個人票の新規登録患者は出血症状の発現と血小板数の測定がほぼ同時期 (登録時) に記録されているので、両者の関連をみるのに適していると考え、新規登録患者を対象とした。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。

2. 紫斑

紫斑は、12,581 人 (64.5%) にみられた。男性より女性に出現しやすく、血小板数と紫斑出現頻度には直線的な負の相関があり、紫斑が出現しやすくなる血小板数閾値は存在しなかった。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 5.07 (95%CI: 4.691-5.480) であった。また、紫斑は年齢の増加につれて多くなったが、60 歳以上のオッズ比は 1.272 (95%CI: 1.187-1.362) であり、血小板数よりも弱い相関をもつリスク因子であった。

3. 歯肉出血

歯肉出血は、3,936 人 (20.2%) にみられた。男性にやや出現しやすく、歯肉出血の頻度は血小板数 1.5 万以上ではあまり変わらないが、1.5 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 4.169 (95%CI: 3.807-4.565) であった。また、歯肉出血は年齢の増加につれて多くなったが、60 歳以上のオッズ比は 0.982 (95%CI: 0.902-1.070, P=0.685) であり、独立リスク因子ではなかった。

4. 鼻出血

鼻出血は、2,424 人 (12.4%) にみられた。

男性に出現しやすく、鼻出血の頻度は血小板数 1.5 万以上ではあまり変わらないが、1.5 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 2.285(95%CI: 2.052-2.546)であった。また、鼻出血は 39 歳以下の若年層に多く、60 歳以上のオッズ比は 0.814(95%CI: 0.739-0.896)であり、他の出血症状と異なって、高齢者のほうが有意に少なかった。

5. 血尿

血尿は、1,240 人 (6.2%)にみられた。男性に出現しやすく、血尿の頻度は血小板数 2 万以上ではあまり変わらないが、2 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 2.933(95%CI: 2.488-3.457)であった。また、血尿は年齢の増加につれて多くなったが、60 歳以上のオッズ比は 1.098(95%CI: 0.958-1.260, P=0.179)であり、独立リスク因子ではなかった。

6. 下血

下血は、1,206 人 (6.1%)にみられた。男性に出現しやすく、下血の頻度は血小板数 1.5 万以上ではあまり変わらなかったが、1.5 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 4.153(95%CI: 3.3513-4.910)であった。また、下血は年齢の増加につれて多くなり、60 歳以上のオッズ比は 2.629(95%CI: 2.246-3.078)であり、血小

板数よりも弱い、独立したリスク因子であった。

7. 脳出血

脳出血は、222 人 (1.1%)にみられた。男性にやや出現しやすく、脳出血の頻度は血小板数 1 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 2.962(95%CI: 2.112-4.154)であった。また、下血は年齢の増加につれて多くなり、60 歳以上のオッズ比は 3.086(95%CI: 2.131-4.468)であり、血小板数とともに独立したリスク因子であった。さらに、血尿の存在が独立リスク因子として同定され、オッズ比は 1.562(95%CI: 1.037-2.351)であった。

2. ITP 治療の参照ガイドの改訂 (柏木、高蓋、羽藤、桑名、村田、藤村、倉田)

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。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/

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。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。さらに昨年度では、新たに市民公開講座を開催し、ITPを初めとして当班会議が担当する血液難病についての教育と啓発に努め、参加者から高評価を得た。

改訂版である2019年版においては、ステロイド不応例に対して、脾摘、TP0受容体作動薬およびリツキシマブを2nd Lineとして推奨し、それぞれの治療法の選択は、患者の状態やライフスタイルを考慮して個々に判断する、とした。

ただし、それぞれの治療の長所・短所について、表を用いて明確に提示することとした。

全体としてはITPに関する総論部分と治療各論のパートに分けられた。治療の各論においては、前回の参照ガイドをベースに、最初に各治療について概論(有効性、安全性)を記載し、一般的な投与法を具体的に記載する、最後に個別のQuestionに関して、Answerを記載し、解説を加えることを確認し、Questionの内容について班員間でのメール審議お

よび改訂委員会を開催し意見交換を行い、最終案を作成した。

3. 病態解析に基づいたITP診断法の標準化

1) 抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞測定法 (桑名、富山、柏木)

本年度は、プロトタイプではあるが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精度を高めることを目的とした。まずキット化したITP-ELISPOT法を用いて、大阪大学にてIRB審査後に、ITP患者検体を用いたパイロットスタディを施行したが、残念ながら良好な結果が得られなかった。その原因は検出感度の低下であった。そのため、検出感度の改善を目的に以下の改良を加えた。キメラ型抗GPIIb/IIIa抗体産生株OPG2を用いてキットとin-house法を比較したところ、キットに比べて従来のin-house法が検出感度が優れていることが確認された。そこで、プレート、基質液、標識二次抗体、Tween 20洗浄の有無の条件を組み合わせて、最適な測定条件を検討した。その検討結果を踏まえ、キット仕様を変更し、感度を高める改良を行った。

キット改良版を用いてITP患者10例、健常人ボランティア30例の末梢血を用いた解析では、陽性、陰性ビーズを用いたウェルのスポット数に明確に差がみられ、キットおよび手技に問題ないことが確認できた。また、抗ヒトIgG抗体を固相化した陽性コントロールウェルでは多数のスポットが検出され、一方でウシ

血清アルブミンを固相化した陰性コントロールウェルではスポットが全くみられなかったことから、末梢血検体の状態も良好で、結果の評価は可能と判断した。ITP患者10例中4例で1.3~10.3/ウェルのスポットが観察された(平均±標準偏差 5.8 ± 4.0)。一方、6例でスポットは <1.0 /ウェルであった。健常人では $0 \sim 1.3$ /ウェル(平均±標準偏差 0.2 ± 0.4)で、30例中21例でスポットは全く検出されなかった。健常人の平均値+2x標準偏差(1.0)をカットオフとすると、本キットのITPにおける感度は40%、特異度は97%であった。

2) TPO 測定キットの開発(桑名、富山、柏木)

ITPの診断の基本は除外診断であるが、本研究班では、ITPの診断における網状血小板比率(RP%あるいはIPF%)と血中血小板トロンボポエチン(TPO)濃度の有用性を明らかにしてきた。本年度は、その実用化に向けて血中TPO測定キットの開発に着手した。

サンドイッチELISAの構成内容として、すでに固相抗体(マウス抗ヒトTPOモノクローナル抗体)、rTPOの作成、精製は完了しており、本年度はおもに二次抗体の作成を進めた。昨年度までにrTPOを免疫したウサギ脾臓から構築した抗体ファージライブラリを用いたパンニングにより結合親和性の高いクローンを複数取得している。そのうち4クローン(a003、a004、a015、a020)の塩基配列をウサギIgG発現ベクターに組み換え、IgG組換え抗体を作成した。さらに、half-IgGとした上でHRP

を標識し、すでに作成済みの固相抗体、rTPO(1 ng/mL、100 pg/mL)と組み合わせ、ELISA系を仮組みした。4つすべてのクローンでTPO測定は可能であったが、rTPO添加の有無で吸光度(OD_{450})の差が最も大きかったa020をキットで使用する二次抗体として選択した。

全ての構成原料が準備できたため、既知のTPO高値検体2例と健常人ボランティア3例の血漿を用いて、仮組したELISA測定系でTPOを測定した。固相抗体は $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、二次抗体は 50 ng/mL 、検体は4倍希釈し、標準化のためrTPOを1500、750、375、187.5、93.8、46.9、23.4、11.7、0 pg/mLの濃度希釈で用いた。標準曲線はほぼ直線で、TPO高値検体では946.7、2271.2 pg/mLで、健常人全例で11.7 pg/mL以下結果が得られた。

D. 考案

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。

ステロイド不応性のITP患者における2nd Line治療としてのTPO受容体作動薬の安全性に関しては、メタアナリシスの結果から(Wang, et al. Sci Rep. 2016 Dec 19;6:39003)、その有効性と安全性が確立されてきている。またリツキシマブに関しては、欧米の報告では短期的には

60%程度、長期的には20-30%程度の有効率であり、本邦における臨床治験においても30%程度の有効率が報告されている(Miyakawa Y, et al. Int J Hematol 2015, 102: 654-661)。脾摘に関しては、現時点においても最も有効率が高い治療法ではあるが、敗血症や血栓症の頻度の増加が報告されてきている(Boyle S et al. Blood 2013;121:4782-4790)。以上のような点から、2nd Line治療として、TPO受容体作動薬、リツキシマブ、脾摘の選択は個々の症例毎に考慮することが望ましいということで合意を得た。今後、それぞれの治療の有効性、安全性を含めた特徴を文献的に考察し提示していく予定である。また、1st Line治療および3rd Line治療に関しても、最新の情報を整理して提示し、臨床家が使用しやすい参照ガイドの改訂を目指した。

さらにITPの診断はいまだ除外診断である現状を打開し、より良い診療を確立するために、本研究班では、ITP診断基準案を2004年に提唱しているが、その検査法の保険収載にむけて、一步一步前進しているところである。今後、これらの検査法に関して他施設共同で評価していく予定である。

以上のように今後も、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の病態およびその治療に関し、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「ITP治療の参照ガイド」を改訂、公開し、継続して情報

発信に努めていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kono M, Matsuhiroya S, Nakazawa F, Kaido M, Wada A, Tomiyama Y. Morphological and optical properties of human immature platelet-enriched population produced in immunodeficient mice. Platelets. 30:1-6, 2018.
- 2) Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, Tomiyama Y. Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method). Transfusion. 58:3003-3013, 2018.
- 3) Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. A unique phenotype of acquired Glanzmann thrombasthenia due to non-function-blocking anti- α IIb β 3 autoantibodies. J Thromb Haemost. 17:206-219, 2019

- 4) Ikeda Y, Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K: Safe childbirth for a type 1 antithrombin-deficient woman with novel mutation in the SERPINC1 gene undergoing antithrombin concentrate therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis* 30:47-51, 2019
- 5) Yamanouchi J, Tokumoto D, Ikeda Y, Maruta M, Kaneko M, Hato T, Yasukawa M. Development of an FVIII Inhibitor in a Mild Hemophilia Patient with a Phe595Cys Mutation *Internal Med* 57:3179-3182, 2018
- 6) Casey N, Fujiwara H, Azuma T, Murakami Y, Yoshimitsu M, Masamoto I, Nawa Y, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: An unusual, CD4 and CD8 dual-positive, CD25 negative, tumor cell phenotype in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma* 59:2740-2742, 2018
- 7) Ikeda Y, Yamanouchi J, Kumon Y, Yasukawa M, Hato T: Association of platelet response to cilostazol with clinical outcome and CYP genotype in patients with cerebral infarction. *Thromb Res* 172:14-20, 2018
- 8) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 日常診療に活かす診療ガイドライン UP-TO-DATE 2018-2019 (門脇孝, 小室一成, 宮地良樹 監修), メディカルレビュー社, 大阪, 2018, pp465-469
- 9) 富山佳昭. 難治性特発性血小板減少性紫斑病症例における治療選択. *血液学 NAVI*, 4:11-13, 2018
- 10) 富山佳昭. ITP に対する治療の進展-TPO 受容体作動薬、リツキシマブの臨床効果. *血液内科*, 77:54-60, 2018
- 11) 富山佳昭. 血小板数異常. *Medicina*, 55:1234-1236, 2018
- 12) 富山佳昭. 免疫性血小板減少症 (ITP) の病態. *Thrombosis Medicine*, 8:165-173, 2018
- 13) 富山佳昭. 血小板数, MPV, PDW. 臨床に直結する血栓止血学 (朝倉英策編), 中外医学社, 東京, 2018, pp119-121
- 14) 富山佳昭. 妊娠時の ITP 管理. 臨床に直結する血栓止血学 (朝倉英策編), 中外医学社, 東京, 2018, pp163-167
- 15) 富山佳昭. アテローム血栓症発症の分子機構の解明: Patient-Oriented Research からの解析. *日本血栓止血学会誌*, 29:765-774, 2018
- 16) 富山佳昭. 抗血小板抗体の検出とその臨床的意義. *日本輸血細胞治療学会誌*, 64:681-687, 2018
- 17) 清川知子, 高陽淑, 桑鶴知一郎, 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, 石井博之, 木瀬知一郎, 永峰啓丞, 木村正, 富山佳昭. 3種類の HPA 抗体, HPA4b, HPA5a, HPA15b 抗体を有した NAIT 症例. *日本輸血細胞治療学会誌*, 64:597-601, 2018
- 18) 羽藤高明 血液製剤の適正使用 血

- 小板 輸血学(改訂第4版) PP857-865, 2018 中外医学社 東京
- 19) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2019-2020 pp110-117, 2019 南江堂 東京
- 20) 羽藤高明 ヒト白血球抗原(HLA)検査 今日の臨床検査 2019-2020 pp118-123, 2019 南江堂 東京
2. 学会発表
- 1) **The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (2018. 6. 28-30, Royton Sapporo, Hokkaido, Japan)** Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y (発表日 6. 30) (Poster) Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface α IIb β 3 expression with non function-blocking anti- α IIb β 3 antibodies.
- 2) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA)** Kato H, Nishiura N, Akura K, Kashiwagi H, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y (発表日 12. 1) (Poster) Platelet integrin α IIb β 3 activation kinetics in inherited platelet functional disorders - the role of ADP receptor P2Y12, CalDAG-GEFI and kindlin-3 in α IIb β 3 activation by inside-out signaling.
- 3) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA)** Ueda T, Maeda T, Kusakabe S, Fujita J, Fukushima K, Yokota T, Shibayama H, Tomiyama Y, Kanakura Y (発表日 12. 1) (Poster) Addition of melphalan to fludarabine / busulfan (FLU/BU4/MEL) provides survival benefit for patients with myeloid malignancy following allogeneic bone marrow transplantation/peripheral blood stem cell transplantation.
- 4) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA)** Kruse C, Krusel A, Watson S, Morgan M, Cooper N, Ghanima W, Provan A, Arnold DM, Santoro C, Hou M, , Tomiyama Y, Laborde S, Lovrencic B, Waller J, Taylor-Stokesl G, Bailey T, Stankovic M, Bussel JB (発表日 12. 1) (Poster) Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP) Frequently Experience Severe Fatigue but Is It Under-Recognized By Physicians: Results from the ITP World Impact Survey (I-WISH).
- 5) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA)** Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H,

- Kunishima S, Banno F, Kokame K, Nishiura N, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y (発表日 12.3) (Poster) α IIb (R990W), a Gain-of Function Mutation of α IIb β 3, Knock-in Mice Show Moderately Impaired Thrombopoiesis.
- 6) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018.12.1-4, San Diego Convention Center, CA, USA)** Cooper N, Krusel A, Kruse C, Watson S, Morgan M, Bussel JB, Ghanima W, Arnold DM, Santoro C, Hou M, Tomiyama Y, Laborde S, Lovrencic B, Waller J, Bailey T, Taylor-Stokes1 G, Stankovic M, Provan A (発表日 12.3) (Poster) Results from the ITP World IMPACT Survey (I-WISh): Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP) Experience Impaired Quality of Life (QoL) Regarding Daily Activities, Social Interactions, Emotional Well-Being and Working Lives.
- 7) **第66回日本輸血・細胞治療学会総会 (2018.5.24-26, 栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ, 栃木, 室井一男)** 細川美香, 柏木浩和, 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, 柴山浩彦, 富山佳昭 (発表日 5.25) (口演) Daratumumab による不規則抗体検査偽陽性への改良対処法-0.01M DTTを用いた検討-
- 8) **第66回日本輸血・細胞治療学会総会 (2018.5.24-26, 栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ, 栃木, 室井一男)** 富山佳昭 (発表日 5.26) (教育講演) 血小板抗体の検出とその臨床的意義
- 9) **第40回日本血栓止血学会学術集会 (2018.6.28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也)** 富山佳昭 (発表日 6.28) (岡本賞受賞講演) 「Shosuke Award」 Molecular mechanism of atherothrombosis: lessons from patient-oriented research
- 10) **第40回日本血栓止血学会学術集会 (2018.6.28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也)** 西浦伸子, 柏木浩和, 芥田敬吾, 森川陽一郎, 加藤恒, 本田繁則, 金倉譲, 富山佳昭 (発表日 6.29) (口演) FCMを用いた血小板減少患者における血小板機能～凝集能を含めた検討～
- 11) **第40回日本血栓止血学会学術集会 (2018.6.28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也)** 加藤恒, 柏木浩和, 森川陽一郎, 芥田敬吾, 西浦伸子, 本田繁則, 小亀浩市, 宮田敏行, 金倉譲, 富山佳昭 (発表日 6.30) (口演) 血小板機能異常症におけるフィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3 活性化キネティクスの評価
- 12) **第40回日本血栓止血学会学術集会 (2018.6.28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也)** 芥田敬吾, 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 小亀浩市, 西浦伸子, 森川陽一郎,

- 加藤 恒, 本田繁則, 金倉 讓, 宮田敏行, 富山佳昭 (発表日 6. 30) (口頭) インテグリン α IIb β 3活性化変異 α IIb (R990W)ノックインマウスにおける血小板産生障害
- 13) 第80回日本血液学会学術集会 (2018. 10. 12-14, 大阪国際会議場, 大阪, 松村到) 芥田敬吾, 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 小亀浩市, 西浦伸子, 森川陽一郎, 加藤恒, 本田繁則, 金倉讓, 宮田敏行, 富山佳昭 (発表日 10. 13) (一般口演) インテグリン α IIb β 3 活性化変異 α IIb (R990W)ノックインマウスにおける血小板産生障害
- 14) 第80回日本血液学会学術集会 (2018. 10. 12-14, 大阪国際会議場, 大阪, 松村到) 西浦伸子, 芥田敬吾, 森川陽一郎, 加藤恒, 柏木浩和, 金倉讓, 富山佳昭 (発表日 10. 13) (口演) フローサイトメトリーを使ったITP患者の血小板機能解析
- 15) 第80回日本血液学会学術集会 (2018. 10. 12-14, 大阪国際会議場, 大阪, 松村到) 中澤英之, 酒井 均, 仁科さやか, 川上徹, 柏木浩和, 富山佳昭, 石川真澄, 山口智美, 古庄知己, 石田文宏 (発表日 10. 12) (口演) 家族歴を有する血小板減少症の女性に認めたインテグリン β 3L744P変異の一例
- 16) 第62回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (2018. 11. 24 BBプラザ, 兵庫, 藤盛好啓) 細川美香, 柏木浩和, 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, 柴山浩彦, 富山佳昭 (発表日 11. 24) (招待講演・追加発言) ダラツムマブによる輸血検査異常への対応 -0.01MDTTを用いた新規簡便法 (大阪法) の開発-
- 17) 第62回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (2018. 11. 24 BBプラザ, 兵庫, 藤盛好啓) 櫻木美基子, 味村和哉, 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, 遠藤誠之, 木村 正, 富山佳昭 (発表日 11. 24) (口演) 胎児輸血と交換輸血によって出生に成功した, 高力価抗Rh17(抗Hro)による新生児溶血性疾患(HDFN)の一例
- 18) 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム 2019.2.16 東京 羽藤高明, 島田直樹, 富山佳昭, 村田満 全国ITP患者統計からみた出血症状と血小板数の関連性
- 19) 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム 2019. 2. 16 東京 羽藤高明 今後の血友病診療を考える 地域中核病院としての取り組み
- 20) The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA) Yamanouchi J, Ikeda Y, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K: A heterozygous mutation of G-protein-coupled-receptor 25 in a family with thrombocytopenia and thrombosis.

- 21) 第80回日本血液学会学術集会
(2018.10.12-14, 大阪国際会議場,
大阪, 松村到) Yamanouchi J, Hato
T, Ikeda Y, Asai H, Ochi T,
Tanimoto T, Takeuchi K, Azuma T,
Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa
M: Characterization of bleeding
symptoms in patients with
essential thrombocythemia
- 22) 第40回日本血栓止血学会学術集会
(2018.6.28-30, ロイトン札幌, 北
海道, 渥美達也) 池田祐一、山之内
純、羽藤高明 脳梗塞患者におけるシ
ロスタゾールに対する血小板反応性
と臨床転帰およびCYP遺伝子多型との
関連
- 23) 第66回日本輸血・細胞治療学会総会
(2018.5.24-26, 栃木県総合文化セ
ンター/宇都宮東武ホテルグランデ,
栃木, 室井一男) 山之内純、池田祐
一、秋田誠、越智千晶、岡本康二、谷
口裕美、土居靖和、羽藤高明 たこつ
ぼ型心筋症による心不全を呈した
TACO症例
- 24) 第66回日本輸血・細胞治療学会総会
(2018.5.24-26, 栃木県総合文化セ
ンター/宇都宮東武ホテルグランデ,
栃木, 室井一男) 秋田誠、土居靖和、
越智千晶、岡本康二、小笠原健一、宮
崎孔、鈴木由美、伊佐和美、常山初江、
内川誠、米元めぐみ、猿渡晃、熊本誠、
山之内純、谷口裕美、西宮達也、宮本
仁志、羽藤高明 抗CROZと考えられる
抗体が検出された一例
- 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

成人 ITP 治療ガイド改訂に向けての検討

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

当研究班から2012年に発表された「成人ITP治療の参照ガイド2012年版」は、実臨床において広く利用されている。しかし、参照ガイド作成後、既に7年が経過し、当時保険収載された直後であったトロンボポエチン受容体作動薬の長期的な有効性や安全性に関するデータが蓄積されてきた。また2017年には新たにリツキシマブが保険適用となったこともあり、参照ガイドの改訂が必要な時期となっている。本年度は、参照ガイド改訂に向けて、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、改訂の最終作業を行った。

A. 研究目的

当研究班から「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」が発表されてから、既に 7 年が経過した。成人 ITP 治療の治療適応、治療目標、治療の流れにおいて大きな変化はなく、大筋において本参照ガイドは現時点でも有用なものであると考える。ただ、2012 年時点では承認発売された直後であったトロンボポエチン(TPO)受容体作動薬も、その長期的な有効性と安全性が明らかにされ、使用例が増えてきている。また、欧米のガイドラインではステロイド不応例に対する 2nd Line に位置づけられていたリツキシマブが、2017 年、本邦において保険適用となった。一方で、従来、2nd Line 治療に位置付けられていた脾臓摘出術(脾摘)は、TPO 受容体作動薬の普及および感染症や血栓症の増加などの問題点が指摘されてきたこともあり、実施例が減少してきており、参照ガイドと実臨床との乖離が大きくなってきている。以上のような状況

から、本研究班において参照ガイドの改訂に取り組んできた。

本改訂の第 1 の目的は、ステロイド不応例の 2nd Line 治療として脾摘、TPO 受容体作動薬およびリツキシマブをどのように位置づけるか、各々の治療の有効性と安全性に関し、文献的検索を行い、その指針を提示することにある。また、新規発症 ITP におけるステロイド療法においても、主に海外からデキサメタゾン大量療法の有効性が報告されてきている。また 3rd Line 治療に関しても新たな知見が蓄積されつつある。これらの情報を整理し、参照ガイドを実臨床に生かしやすいかたちに改訂することを目的としている。

B. 研究方法

昨年度に決定した各班員の分担領域に関する文献検討および原稿作成を行った。作成された原稿を基にメール審議および改訂委員会を開催し、意見交換を行い、

最終案の作成を行った。

C. 研究結果

ステロイド不応例に対して、脾摘、TPO受容体作動薬およびリツキシマブを2nd Lineとして推奨し、それぞれの治療法の選択は、患者の状態やライフスタイルを考慮して個々に判断する、とした。ただし、それぞれの治療の長所・短所について、表を用いて明確に提示することとした。

全体としてはITPに関する総論部分と治療各論のパートに分けられた。治療の各論においては、前回の参照ガイドをベースに、最初に各治療について概論(有効性、安全性)を記載し、一般的な投与法を具体的に記載する、最後に個別のQuestionに関して、Answerを記載し、解説を加えることを確認し、Questionの内容について班員間での合意を得た。

D. 考察

ステロイド不応性のITP患者における2nd Line治療としてのTPO受容体作動薬の長期にわたる有効性と安全性に関して明らかにされてきている(Wang, et al. Sci Rep. 2016 Dec 19;6:39003, Wong, et al. Blood 2017;130:2527-36, など)。しかし寛解にいたる例は少なく、継続的な治療が必要である。また保険適用となったリツキシマブに関しては、欧米の報告では短期的には60%程度、長期的には20-30%程度の有効率であり(Marangon, et al. Eur J Haematol 2017;98:371-7)、本邦における臨床治験においても30%程度の有効率が報告されている(Miyakawa

Y, et al. Int J Hematol 2015;102:654-61)。必ずしも十分な有効率ではないが、4週間の治療で終了し継続的な治療が不要となる可能性がある。脾摘に関しては、現時点においても最も寛解が期待できる治療法ではあるが(Chaturvedi, et al. Blood 2018;131:1172-82)、手術に伴う合併症の可能性を完全には否定できないこと、また敗血症や血栓症頻度が生涯にわたり僅かではあるが増加する可能性がある(Boyle S et al. Blood 2013;121:4782-90)。以上のようにそれぞれの治療には特有の長所および短所があることから、TPO受容体作動薬、リツキシマブ、脾摘の優劣を決定することは困難であり、個々の症例毎にその選択を考慮することが望ましいと考える。また、1st Line治療および3rd Line治療に関しても、最新の情報を整理して提示し、臨床家が使用しやすい参照ガイドの改訂を目指した。

E. 結論

ITP治療参照ガイド改訂の草案の作成を行い、班員間での意見交換を行い最終案の作成がほぼ終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Kono M, Matsuihiroya S, Nakazawa F, Kaido M, Wada A, Tomiyama Y. Morphological and optical properties of human immature platelet-enriched population produced in immunodeficient mice. Platelets. 30:1-6, 2008

- 2) Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, Sakuragi M, Nakao M, Morikawa T, Kiyokawa T, Aochi H, Nagamine K, Shibayama H, Tomiya Y. Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (Osaka method). *Transfusion*. 58:3003-3013, 2018.
- 3) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 日常診療に活かす診療ガイドライン UP-TO-DATE 2018-2019 (門脇孝, 小室一成, 宮地良樹 監修), メディカルレビュー社, 大阪, 2018, pp465-469
- 4) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 今日の治療指針 2018年版 (福井次矢, 高木 誠, 小室一成編), 医学書院, 東京, 2018, pp678-680
- 5) 富山佳昭. 難治性特発性血小板減少性紫斑病症例における治療選択. *血液学 NAVI*, 4:11-13, 2018
- 6) 富山佳昭. ITP に対する治療の進展-TPO 受容体作動薬、リツキシマブの臨床効果. *血液内科*, 77:54-60, 2018
- 7) 富山佳昭. 血小板数異常. *Medicina*, 55:1234-1236, 2018
- 8) 富山佳昭. 免疫性血小板減少症 (ITP) の病態. *Thrombosis Medicine*, 8:165-173, 2018
- 9) 富山佳昭. 血小板数, MPV, PDW. 臨床に直結する血栓止血学 (朝倉英策編), 中外医学社, 東京, 2018, pp119-121
- 10) 富山佳昭. 妊娠時の ITP 管理. 臨床に直結する血栓止血学 (朝倉英策編), 中外医学社, 東京, 2018, pp163-167
- 11) 富山佳昭. アテローム血栓症発症の分子機構の解明: Patient-Oriented Research からの解析. *日本血栓止血学会誌*, 29:765-774, 2018
- 12) 富山佳昭. 抗血小板抗体の検出とその臨床的意義. *日本輸血細胞治療学会誌*, 64:681-687, 2018
2. 学会発表
- 1) **The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis** (2018.6.28-30, Royton Sapporo, Hokkaido, Japan) Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiya Y. (発表日 6.30) (Poster) Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface α IIb β 3 expression with nonfunction-blocking anti- α IIb β 3 antibodies.
- 2) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018.12.1-4, San Diego Convention Center, CA, USA)**. Kato H, Nishiura N, Akura K, Kashiwagi H, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiya Y. (発表日 12.1) (Poster) Platelet integrin α IIb β 3 activation kinetics in inherited platelet functional disorders - the role of ADP receptor P2Y12, CalDAG-GEFI and kindlin-3 in α IIb β 3 activation

- by inside-out signaling
- 3) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA).** Ueda T, Maeda T, Kusakabe S, Fujita J, Fukushima K, Yokota T, Shibayama H, Tomiyama Y, Kanakura Y. (発表日 12.1) (Poster) Addition of melphalan to fludarabine / busulfan (FLU/BU4/ MEL) provides survival benefit for patients with myeloid malignancy following allogeneic bone marrow transplantation/peripheral blood stem cell transplantation.
 - 4) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA).** Kruse C, Krusel A, Watson S, Morgan M, Cooper N, Ghanima W, Provan A, Arnold DM, Santoro C, Hou M, Tomiyama Y, Laborde S, Lovrencic B, Waller J, Taylor-Stokes1 G, Bailey T, Stankovic M, Bussel JB. (発表日 12.1) (Poster) Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP) Frequently Experience Severe Fatigue but Is It Under-Recognized By Physicians: Results from the ITP World Impact Survey (I-WISH) .
 - 5) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA).** Akuta K, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kokame K, Nishiura N, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Miyata T, Tomiyama Y. (発表日 12.3) (Poster) α IIb(R990W), a Gain-of Function Mutation of α IIb β 3 Knock-in Mice Show Moderately Impaired Thrombopoiesis.
 - 6) **The American Society of Hematology 60th Annual Meeting (2018. 12. 1-4, San Diego Convention Center, CA, USA).** Cooper N, Krusel A, Kruse C, Watson S, Morgan M, Bussel JB, Ghanima W, Arnold DM, Santoro C, Hou M, Tomiyama Y, Laborde S, Lovrencic B, Waller J, Bailey T, Taylor-Stokes1 G, Stankovic M, Provan A. (発表日 12.3) (Poster) Results from the ITP World IMPACT Survey (I-WISH): Patients with Immune Thrombocytopenia (ITP) Experience Impaired Quality of Life (QoL) Regarding Daily Activities, Social Interactions, Emotional Well-Being and Working Lives.
 - 7) **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2018. 5. 24-26, 栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ, 栃木, 室井一男)** 細川美香, 柏木浩和, 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, 柴山浩彦, 富山佳昭 (発表日 5.25) (口演) Daratumumab による不規則抗体検査偽陽性への改良対処法-0.01M DTT を用いた検討-
 - 8) **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会**

- (2018. 5. 24-26, 栃木県総合文化センター/宇都宮東武ホテルグランデ, 栃木, 室井一男). 富山佳昭 (発表日 5. 26) (教育講演) 血小板抗体の検出とその臨床的意義
- 9) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 (2018. 6. 28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也). 富山佳昭 (発表日 6. 28) (岡本賞受賞講演) 「Shosuke Award」Molecular mechanism of atherothrombosis: lessons from patient-oriented research
- 10) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 (2018. 6. 28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也). 西浦伸子, 柏木浩和, 芥田敬吾, 森川陽一郎, 加藤恒, 本田繁則, 金倉讓, 富山佳昭 (発表日 6. 29) (口演) FCM を用いた血小板減少患者における血小板機能～凝集能を含めた検討～
- 11) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 (2018. 6. 28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也). 加藤 恒, 柏木浩和, 森川陽一郎, 芥田敬吾, 西浦伸子, 本田繁則, 小亀浩市, 宮田敏行, 金倉 讓, 富山佳昭 (発表日 6. 30) (口頭) 血小板機能異常症におけるフィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3 活性化キネティクスの評価
- 12) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 (2018. 6. 28-30, ロイトン札幌, 北海道, 渥美達也). 芥田敬吾, 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 小亀浩市, 西浦伸子, 森川陽一郎, 加藤 恒, 本田繁則, 金倉 讓, 宮田敏行, 富山佳昭 (発表日 6. 30) (口頭) インテグリン α IIb β 3 活性化変異 α IIb (R990W) ノックインマウスにおける血小板産生障害
- 13) 第 80 回日本血液学会学術集会 (2018. 10. 12-14, 大阪国際会議場, 大阪, 松村到). 芥田敬吾, 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 小亀浩市, 西浦伸子, 森川陽一郎, 加藤恒, 本田繁則, 金倉讓, 宮田敏行, 富山佳昭 (発表日 10. 13) (一般口演) インテグリン α IIb β 3 活性化変異 α IIb (R990W) ノックインマウスにおける血小板産生障害
- 14) 第 80 回日本血液学会学術集会 (2018. 10. 12-14, 大阪国際会議場, 大阪, 松村到). 西浦伸子, 芥田敬吾, 森川陽一郎, 加藤恒, 柏木浩和, 金倉讓, 富山佳昭 (発表日 10. 13) (口演) フローサイトメトリーを使った ITP 患者の血小板機能解析
- 15) 第 80 回日本血液学会学術集会 (2018. 10. 12-14, 大阪国際会議場, 大阪, 松村到). 中澤英之, 酒井 均, 仁科さやか, 川上徹, 柏木浩和, 富山佳昭, 石川真澄, 山口智美, 古庄知己, 石田文宏 (発表日 10. 12) (口演) 家族歴を有する血小板減少症の女性に認めたインテグリン β 3L744P 変異の一例
- 16) 第 62 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (2018. 11. 24 BB プラザ, 兵庫, 藤盛好啓). 細川美香, 柏木浩和, 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, 柴山浩彦, 富山佳昭 (発表日 11. 24) (招待講演・追加発言)

ダラツムマブによる輸血検査異常への対応 -0.01MDTTを用いた新規簡便法(大阪法)の開発-

- 17) 第 62 回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会 (2018.11.24 BB プラザ, 兵庫, 藤盛好啓). 櫻木美基子, 味村和哉, 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, 遠藤誠之, 木村 正,

富山佳昭 (発表日 11.24) (口演) 胎児輸血と交換輸血によって出生に成功した, 高力価抗 Rh17(抗 Hro)による新生児溶血性疾患(HDFN)の一例

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ITP診断に有用な臨床検査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

研究分担者 富山佳昭 大阪大学医学部附属病院輸血部 部長

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断には、いまだ血小板減少をきたす他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、含まれる項目の多くが保険診療上測定できない。そこで、すでにキット化に成功している抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞およびトロンボポエチン（TPO）測定法の体外診断薬として製造承認を得ることを目指した検討を進めている。本年度は、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。特異度は 97%と優れていたが、感度は 40%にとどまった。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。

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髓検査で巨核球の減少や他系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他疾患の除外が診断根拠となる。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て積極的に 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（TPO）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 TPO 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、すでにキット化されている抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出試薬（ITP-ELISPOT；MBL 社）、TPO 測定試薬（エスアールエル社）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たし、体外診断用医薬品として申請することを目的とした検討を行ってきた。ELISPOT (enzyme-linked immune-SPOT) の原理を用いた GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出キットは、昨年度までに陽性コントロールや標準化のために必須な校正用基準物質としてヒト GPIIb/IIIa に対するキメラ抗体

産生細胞および陽性・陰性コントロールビーズの作成に成功し、キット構成仕様を確立したことから、少数例での臨床検体を用いたパイロット評価を実施した。また、TPO 測定は2種類の抗 TPO 抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) として測定系が構築されているが、現状でまだキット化されていない。そこで、今回新たに TPO 測定系を体外診断用医薬品として申請するために必要なキット仕様の構築を同時に行う。

B. 研究方法

1) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの性能評価

昨年度までの検討で構築した最終形の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットを用いて ITP 患者および健常人の末梢血を用いた性能評価を実施した。ITP 患者は大阪大学病院に通院中で臨床的に ITP と診断された10例を対象とした。また、健常人ボランティア30例をコントロールとして用いた。採血より24時間以内に濃度勾配遠心法を用いて全血より末梢血単核球を分離し、速やかにキットでの測定に用いた。測定はキット構成の通り3ウェルで行い、その平均スポット数を求めた。抗ヒト IgG 抗体を固相化した陽性コントロールウェル、ウシ血清アルブミンを固相化した陰性コントロールウェルでも同時に測定した。また、キット、手技の評価のため末梢血単核球の代わりに陽性および陰性コントロールビーズを用いた。

2) TPO 測定キットの開発

TPO 測定系はサンドイッチ ELISA であることから、その構成内容として固相抗体 (マウス抗ヒト TPO モノクローナル抗体)、二次抗体 (horshradish peroxidase [HRP] 標識抗ヒ

ト TPO 抗体)、校正用基準物質としてリコンビナントヒト TPO (rTPO) が必要である。固相抗体はマウス抗ヒト TPO モノクローナル抗体クローン TN1 の配列を入手し、それを基に発現ベクターを構築して CHO 細胞に遺伝子導入して安定細胞株を樹立した。さらに、ヒト TPO をコードする遺伝子の C 末端に His タグを付加したベクターを作成し、CHO 細胞に遺伝子導入して rTPO を安定的に産生する細胞株を樹立した。また、得られた rTPO をウサギに免疫して、抗体ファージライブラリを構築し、パンニングにより rTPO に結合親和性の高いクローンを得た。得られたクローンの塩基配列を決定し、ウサギ IgG 発現ベクターに遺伝子を組み換えた。CHO 細胞に遺伝子導入後に薬剤を用いたセレクションと限界希釈法により高発現クローンを樹立し、プロテイン A カラムを用いて IgG を精製した。さらに、一本鎖 IgG (half-IgG) に切断した上で HRP を標識した。

(倫理面に対する配慮)

本研究ではヒト検体を使用することから学内倫理委員会で承認済みである (大阪大学)。患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

1) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの性能評価

ITP 患者10例、健常人ボランティア30例の末梢血を用いた解析では、陽性、陰性ビーズを用いたウェルのスポット数に明確に差がみられ、キットおよび手技に問題ないことが確認できた。また、抗ヒト IgG 抗体を固相化した陽性コントロールウェルでは多数のスポットが検出され、一方でウシ血清アルブミンを固相化した陰性コントロールウェル

ではスポットが全くみられなかったことから、末梢血検体の状態も良好で、結果の評価は可能と判断した。ITP 患者 10 例中 4 例で 1.3~10.3/ウェルのスポットが観察された(平均±標準偏差 5.8±4.0)。一方、6 例でスポットは<1.0/ウェルであった。健常人では 0~1.3/ウェル(平均±標準偏差 0.2±0.4)で、30 例中 21 例でスポットは全く検出されなかった。健常人の平均値+2x 標準偏差(1.0)をカットオフとすると、本キットの ITP における感度は 40%、特異度は 97%であった。

2) TPO 測定法

サンドイッチ ELISA の構成内容として、すでに固相抗体(マウス抗ヒト TPO モノクローナル抗体)、rTPO の作成、精製は完了しており、本年度はおもに二次抗体の作成を進めた。昨年度までに rTPO を免疫したウサギ脾臓から構築した抗体ファージライブラリを用いたパンニングにより結合親和性の高いクローンを複数取得している。そのうち 4 クローン(a003、a004、a015、a020)の塩基配列をウサギ IgG 発現ベクターに組み換え、IgG 組換え抗体を作成した。さらに、half-IgG とした上で HRP を標識し、すでに作成済みの固相抗体、rTPO (1 ng/mL、100 pg/mL) と組み合わせて ELISA 系を仮組みした。4 つすべてのクローンで TPO 測定は可能であったが、rTPO 添加の有無で吸光度 (OD₄₅₀) の差が最も大きかった a020 をキットで使用する二次抗体として選択した。

全ての構成原料が準備できたため、既知の TPO 高値検体 2 例と健常人ボランディア 3 例の血漿を用いて、仮組みした ELISA 測定系で TPO を測定した。固相抗体は 2.5 μg/mL、二次抗体は 50 ng/mL、検体は 4 倍希釈し、標準化のため rTPO を 1500、750、375、187.5、93.8、46.9、23.4、11.7、0 pg/mL の濃度希

釈で用いた。標準曲線はほぼ直線で、TPO 高値検体では 946.7、2271.2 pg/mL で、健常人全例で 11.7 pg/mL 以下結果が得られた。

D. 考察

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの開発段階では健常人でも少数のスポットが検出され、また ITP 症例での陽性スポット数との差も顕著でなかったため、特異度、感度を高める改良を重ねてきた。結果的に特異度の高いキット構成が確立できたが、感度は 40%にとどまった。今回対象とした ITP 患者は罹病期間が長く治療下の例が大半であった点も原因のひとつと考えられる。ただし、本キットで測定した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞でのみ ITP と診断できる例は 40%に過ぎないことから、単独での診断薬化は困難が予想される。そのため、とりあえず現状で研究目的での測定に用いている測定系を本キットに置き換え、今後開発される他の検査薬と組み合わせて保険収載が可能か今後検討することとした。

TPO 測定系を構成する固相抗体、二次抗体、校正用基準物質 rTPO の作成は終了し、仮組みしたキットを用いた少数例での検討で良好な結果を示した。今後は本キット最終仕様のカットオフ値の設定、保存性や安定性など詳細な条件設定を行うとともに、臨床試験の実施に向けた準備を進める予定である。

E. 結論

完成した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの特異度はきわめて高かったが感度が診断薬として十分でなかった。TPO 測定キットのキット構成仕様が完了した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

該当なし

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

平成 17 年度から 26 年度（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。紫斑の出現は血小板減少に比例して直線的に増加した。歯肉出血、鼻出血、血尿、下血、脳出血は血小板数 1-2 万以下で急激に増加した。血尿、下血、脳出血は年齢増加とともに多くなった。脳出血のリスク因子として、血小板数 1 万以下、60 歳以上、血尿が同定された。

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。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 ITP 患者の出血症状を解析した。

B. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 17 年度から 26 年度の間提出された 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。

（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. 解析対象患者

臨床調査個人票には新規登録患者データベースと更新登録患者データベースがある。新規登録患者は出血症状の発現と血小板数の測定がほぼ同時期（登録時）に記録されているので、両者の関連をみるのに適していると考え、新規登録患者を対象とした。また、小児患者の登録は限定的なので、成人（18 歳以上）の患者を対象とした。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。

2. 紫斑

紫斑は、19,415 人中 12,581 人（64.5%）にみられた。男性より女性に出現しやすく、平均年齢は 61.0 歳であった。血小板数と紫斑出現頻度には直線的な負の相関があり、紫斑が出現しやすくなる血小板数閾値は存

在しなかった。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 5.07 (95%CI: 4.691-5.480)であった。また、紫斑は年齢の増加につれて多くなったが、60 歳以上のオッズ比は 1.272 (95%CI: 1.187-1.362)であり、血小板数よりも弱い相関をもつリスク因子であった。

3. 歯肉出血

歯肉出血は、19,415 人中 3,936 人 (20.2%)にみられた。男性にやや出現しやすく、平均年齢は 61.3 歳であった。歯肉出血の頻度は血小板数 1.5 万以上ではあまり変わらないが、1.5 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 4.169 (95%CI: 3.807-4.565)であった。また、歯肉出血は年齢の増加につれて多くなったが、60 歳以上のオッズ比は 0.982 (95%CI: 0.902-1.070, P=0.685)であり、独立リスク因子ではなかった。

4. 鼻出血

鼻出血は、19,415 人中 2,424 人 (12.4%)にみられた。男性に出現しやすく、平均年齢は 61.3 歳であった。鼻出血の頻度は血小板数 1.5 万以上ではあまり変わらないが、1.5 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 2.285 (95%CI: 2.052-2.546)であった。また、鼻出血は 39 歳以下の若年層に多く、60 歳以上のオッズ比は 0.814 (95%CI: 0.739-0.896)であり、他の出血症状と異なって、高齢者のほうが有意に少なかった。

5. 血尿

血尿は、19,415 人中 1,240 人 (6.2%)に

みられた。男性に出現しやすく、平均年齢は 64.0 歳であった。血尿の頻度は血小板数 2 万以上ではあまり変わらないが、2 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 2.933 (95%CI: 2.488-3.457)であった。また、血尿は年齢の増加につれて多くなったが、60 歳以上のオッズ比は 1.098 (95%CI: 0.958-1.260, P=0.179)であり、独立リスク因子ではなかった。

6. 下血

下血は、19,415 人中 1,206 人 (6.1%)にみられた。男性に出現しやすく、平均年齢は 70.5 歳であった。下血の頻度は血小板数 1.5 万以上ではあまり変わらなかったが、1.5 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 4.153 (95%CI: 3.3513-4.910)であった。また、下血は年齢の増加につれて多くなり、60 歳以上のオッズ比は 2.629 (95%CI: 2.246-3.078)であり、血小板数よりも弱いですが、独立したリスク因子であった。

7. 脳出血

脳出血は、19,415 人中 222 人 (1.1%)にみられた。男性にやや出現しやすく、平均年齢は 71.5 歳であった。脳出血の頻度は血小板数 1 万未満になると急激に増加した。多変量解析では、血小板数 1 万未満は独立したリスク因子として同定され、オッズ比は 2.962 (95%CI: 2.112-4.154)であった。また、下血は年齢の増加につれて多くなり、60 歳以上のオッズ比は 3.086 (95%CI: 2.131-4.468)であり、血小板数とともに独立したリスク因子であった。さらに、血尿

の存在が独立リスク因子として同定され、オッズ比は 1.562 (95%CI: 1.037-2.351) であった。

D. 結語

1. ITP 患者が紫斑を呈する頻度と血小板数には直線的な負の相関があった。紫斑が出現しやすくなる血小板数閾値は存在しなかった。
2. 粘膜出血（歯肉出血・鼻出血）は血小板数 1.5 万未満で急激に増加した。
3. 内臓出血（血尿、下血、脳出血）は血小板数 2 万以下で多くなり、1 万未満では急激に増加した。
4. 皮膚・粘膜出血と年齢の相関は弱かった。
5. 内臓出血は年齢の増加とともに直線的に増加した。
6. 脳出血のリスクは血小板数 1 万未満、60 歳以上、血尿の 3 つが存在する時、最大となる。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda Y, Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K: Safe childbirth for a type 1 antithrombin-deficient woman with novel mutation in the SERPINC1 gene undergoing antithrombin concentrate therapy. Blood Coagul Fibrinolysis 30:47-51, 2019
- 2) Yamanouchi J, Tokumoto D, Ikeda Y,

Maruta M, Kaneko M, Hato T, Yasukawa M. Development of an FVIII Inhibitor in a Mild Hemophilia Patient with a Phe595Cys Mutation Internal Med 57:3179-3182, 2018

- 3) Casey N, Fujiwara H, Azuma T, Murakami Y, Yoshimitsu M, Masamoto I, Nawa Y, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: An unusual, CD4 and CD8 dual-positive, CD25 negative, tumor cell phenotype in a patient with adult T-cell leukemia/ lymphoma. Leuk Lymphoma 59:2740-2742, 2018
- 4) Ikeda Y, Yamanouchi J, Kumon Y, Yasukawa M, Hato T: Association of platelet response to cilostazol with clinical outcome and CYP genotype in patients with cerebral infarction. Thromb Res 172:14-20, 2018

2. 著書

- 1) 羽藤高明 血液製剤の適正使用 血小板 輸血学(改訂第4版) PP857-865, 2018 中外医学社 東京
- 2) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2019-2020 pp110-117, 2019 南江堂 東京
- 3) 羽藤高明 ヒト白血球抗原 (HLA) 検査 今日の臨床検査 2019-2020 pp118-123, 2019 南江堂 東京

2. 学会発表

- 1) 羽藤高明、島田直樹、富山佳昭、村田満 全国 ITP 患者統計からみた出血症状と

- 血小板数の関連性 第 13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム 2019. 2. 16 東京
- 2) 羽藤高明 今後の血友病診療を考える 地域中核病院としての取り組み 第 13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム 2019. 2. 16 東京
 - 3) Yamanouchi J, Ikeda Y, Hato T, Yasukawa M, Takenaka K: A heterozygous mutation of G-protein-coupled-receptor 25 in a family with thrombocytopenia and thrombosis. The 60th American Society of Hematology annual meeting and exposition, San Diego, USA, Dec 1, 2018
 - 4) Yamanouchi J, Hato T, Ikeda Y, Asai H, Ochi T, Tanimoto T, Takeuchi K, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Characterization of bleeding symptoms in patients with essential thrombocythemia 第 80 回日本血液学会学術集会 2018. 10. 12 大阪
 - 5) 池田祐一、山之内純、羽藤高明 脳梗塞患者におけるシロスタゾールに対する血小板反応性と臨床転帰および CYP 遺伝子多型との関連 第 40 回日本血栓止血学会学術集会 2018. 6. 30 札幌
 - 6) 山之内純、池田祐一、秋田誠、越智千晶、岡本康二、谷口裕美、土居靖和、羽藤高明 たこつぼ型心筋症による心不全を呈した TACO 症例 第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会 2018. 5. 26 宇都宮
 - 7) 秋田誠、土居靖和、越智千晶、岡本康二、小笠原健一、宮崎孔、鈴木由美、伊佐和美、常山初江、内川誠、米元めぐみ、猿渡晃、熊本誠、山之内純、谷口裕美、西宮達也、宮本仁志、羽藤高明 抗 CROZ と考えられる抗体が検出された一例 第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会 2018. 5. 26 宇都宮

G. 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

TTP（血栓性血小板減少性紫斑病）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・血栓止血センター	教授
	小亀浩市	国立循環器病研究センター研究所 分子病態部	部長
研究協力者：	八木秀男	奈良県総合医療センター 血液・腫瘍内科	部長
	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
	和田英夫	三重大学医学部 臨床検査医学	准教授
	宮田敏行	国立循環器病研究センター	前部長
	藤村吉博	日本赤十字社近畿ブロック血液センター	所長

グループ総括

分担研究者：松本雅則

研究要旨

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。

本年度は、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。

1) 2) に関しては、ADAMTS13 保険収載による症例数の減少はあったものの、継続できている。3) リツキサンの保険適用は、2019 年度早々に TTP に拡大される見込みである。4) 後天性 TTP に関する疾患感受性 HLA を 2 つ同定した。5) TTP 診療ガイドは Minds 形式のものも含めた形式で 2020 年に改定予定である。6) 今年度から造血幹細胞移植後 TMA の病態解析を予定であったが、TRUMP データの利用が困難であったので、保存検体を用いた病態解析を行う予定である。

A. 研究の目的

目的

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。

(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と倫理委員会、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。

B. 研究方法

平成 30 年度の計画

- 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

C. 研究成果

- 1) TMA レジストリーの継続

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。その基礎疾患別の内訳を表 1 に示す。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。TTP 全体の 663 症例のまとめを表 2 と 3 に示す。TTP で最

も症例数が多いのは、基礎疾患の明らかでない原発性で、TTP 全体の 60.2%であった。先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群:USS) は日本国内で 65 例同定しているが、我々が ADAMTS13 活性を確認しているのが 64 例 (9.7%)であった。それ以外の後天性二次性 TTP の中で、最も症例数が多いのが全身性エリテマトーデス(SLE)などの膠原病 108 例であり、TTP の中で 16.3% を占めた。それに続いて、チクロピジンなどの薬剤 27 例 (4.1%) であった。

2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続

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。そのうち ADAMTS13 遺伝子解析を本年度も 1 例で実施し、複合ヘテロ接合体異常であった。この遺伝子変異はこれまでに我々が報告したものであった。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。

上記の 58 例の遺伝子変異同定例は、ダイレクト・シーケンシング法で解析し、同定できないものはゲノム定量 PCR 法で補完している。この方法でも責任遺伝子変異が発見できないものが、4 症例存在する。この検討をさらに進めるため、未同定 4 例においてロング・リード・シーケンシング (PacBio) 法による解析を行った。最終的な結果はまだ得られていないが、興味深い結果が得られている。

3) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大

後天性 TTP に対するリツキシマブの保険適用は、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。

4) 後天性 TTP における HLA 解析

後天性 TTP は、ADAMTS13 に対する自己抗体が産生される自己免疫疾患である。そのため、HLA との関連が予想されるが、実際欧米からは HLA-DRB1*11 などが後天性 TTP の疾患感受性 HLA として報告されている。今回我々は、奈良医大の registry の中から 18 施設から登録された後天性 TTP 50 症例の HLA を解析した。その結果、DRB1*08:03(オッズ比 2.43)、DPB1*19:01(オッズ比 5.57)が疾患感受性 HLA として検出された。なお、欧米で認められた HLA-DRB1*11 は、本邦では有意ではなかった。

5) TTP 診療ガイド改定に向けた準備

我々はすでに TTP 診療ガイド 2017 を 2017 年 4 月に公表した。これは診断や治療に関するガイドラインで、日本語に加えて英文でも発表したことから、海外でも評価されている。その後、2018 年 4 月には ADAMTS13 検査の保険収載、後天性 TTP における血漿交換の回数制限の撤廃が実施され、臨床的に大きな変化がすでに認められることから診療ガイドの改定が必要となっている。

6) 造血幹細胞移植後 TMA の病態解析

2018 年度から TTP に加えて、TMA の中で血液内科領域として問題となっている移植後 TMA (TA-TMA) の病態解析を開始した。表 1 に示すように 1516 例の TMA の中で TA-TMA は 100 例あり、二次性 TMA の中では膠原病に続いて 2 番目に症例数が多く、予後不良な疾患である。まず、日本国内での TA-TMA の疫学を調査するため、日本造血幹細胞移植データセンターの登録一元管理プログラム (TRUMP) を利用することを計画した。我々のメンバーを中心にワーキンググループを立ち上げ、一次調査を行い症例をピックアップして、その症例の施設に二次調査を行う計画であった。二次調査には比較的高額の調査費用が発生し、また二次調査を行ってもそれほど精度の高いデータが得られるとは思えないので、TRUMP データの利用は断念した。今後は倉敷中央病院で保存されている移植後症例の血漿を検査することで病態解析を行う予定である。

D. 考察

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ため、次年度以降は症例の集積は困難となる可能性が高い。それに伴って先天性 TTP の遺伝子解析も本年度 1 例にとどまった。ただし、解析した症例では責任遺伝子変異を確実に同定している。現在までに 62 例で遺伝子解析を実施して 58 例 (93.5%) と高率で責任遺伝子異常を発見した。残りの 4 例は両アレル、もしくは片方のアレルに異常が発見できてい

ない。本年度この 4 例について Long read の遺伝子解析を実施し、興味深い結果を得ている。

リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大は、TTP 急性期治療に不応の場合や再発例に有効であることから、長く期待されてきた。ただし、日本でも 2014 年に医師主導治験を実施したが目標とした有効性が示せなかったため、日本血液学会から要望書を提出し、ようやく適用拡大となる予定である。

TMA registry の登録数が減少することが予想されるため、HLA の解析を症例が集まりやすい期間内に開始した。50 例症例が集積し、解析したところ TTP に対する 2 つの疾患感受性アレルが同定された。これらは欧米からの報告と異なっており、今後臨床症状との関連について解析する予定である。

今後の我々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。そのため次回の改定では、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。ただし、TTP は希少疾患であることから CQ に対する文献検索を実施しても、質の高い科学的根拠を得られる可能性は低いことが予想される。そのため、従来の方式に加えて Minds 方式によるガイドラインも作成する 2 本立てを考えている。

TTP の病態解析はほぼ終了したことから、その他の TMA の病態解析を計画した。その中で症例数も多く、予後不良で有効な治療法がないため、血液内科領域で最も問題と

なっている TA-TMA について解析することになった。まず TRUMP データの利用を考えたが、経済的な理由で断念した。倉敷中央病院血液内科で 2006 年 9 月以降に同種移植を受けた全症例の血漿が保存されていることから、これを解析することを計画している。VWF/ADAMTS13 と補体因子を中心に解析を行う予定である。

E. 結論

TTP registry や遺伝子解析は、症例数が減少しているが継続できている。新たに開始した先天性 TTP における PacBio と後天性 TTP に対する HLA 解析は興味深い結果が得られている。次年度は TTP 診療ガイドを Minds 形式を追加して改定したいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

欧文

1. Kawano N, Yokota-Ikeda N, Kawano S, Kuriyama T, Yamashita K, Ono N, Ueda N, Ochiai H, Ishikawa F, Kikuchi I, Shimoda K, Matsumoto M. Clinical effect of rituximab as early administration for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with connective tissue diseases. *Modern Rheumatology Case Reports*, 2:59-67, 2018
2. Takaya H, Kawaratani H, Kubo T, Seki K, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Takeda K, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. Platelet hyperaggregability is associated with decreased ADAMTS13 activity and enhanced endotoxemia in patients with acute cholangitis. *Hepatology Res*, 48:E52-E60, 2018
3. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients with age-related macular degeneration. *Sci Rep* 24:1491, 2018
4. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol*. 59(6) 595-599, 2018
5. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 22(5) 1088-1099, 2018
6. Matsumoto T, Toyoda H, Amano K, Hirayama M, Ishikawa E, Fujimoto M,

- Ito M, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Kawamura N, Ikejiri M, Kawakami K, Miyata T, Wada H. Clinical Manifestation of Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the C3 p.I1157T Variation in the Kinki Region of Japan. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018 1:1076029618771750. doi: 10.1177/1076029618771750.
7. Itami H, Hara S, Matsumoto M, Imamura S, Kanai R, Nishiyama K, Ishimura M, Ohga S, Yoshida M, Tanaka R, Ogawa Y, Asada Y, Sekita-Hatakeyama Y, Hatakeyama K, Ohbayashi C. Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency may contribute to the characteristic glomerular manifestations in Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res.* 1,170:148-155, 2018
 8. Shigekiyo T, Udaka K, Sekimoto E, Shibata H, Ozaki S, Higuchi Y, Matsumoto M. Identification of a homozygous missense mutation (p.Cys379Gly) in the D1 domain of von Willebrand factor propeptide in a family with type 2A (IIC) von Willebrand disease. *Haemophilia* ;24(6):e422-e425, 2018
 9. Tsuda M, Shiratsuchi M, Nakashima Y, Ikeda M, Muta H, Narazaki T, Masuda T, Kimura D, Takamatsu A, Matsumoto M, Fujimura Y, Kokame K, Matsushima T, Ogawa Y. Upshaw-Schulman syndrome diagnosed during pregnancy complicated by reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Transfus Apher Sci.* 57(6):790-792, 2018
 10. Takaya H, Kawaratani H, Tsuji Y, Nakanishi K, Saikawa S, Sato S, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Shimozato N, Kitade M, Akahane T, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. von Willebrand factor is a useful biomarker for liver fibrosis and prediction of hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B and C. *United European Gastroenterol J.* ;6(9):1401-1409, 2018
 11. Wada H, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Iba T, Matsumoto M. Differences and similarities between disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy. *Thromb J.* 16;14, 2018
 12. Kato H, Miyakawa Y, Hidaka Y, Inoue N, Ito S, Kagami S, Kaname S, Matsumoto M, Mizuno M, Matsuda T, Shimono A, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Okada H. Safety and effectiveness of eculizumab for adult patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clinical*

- and Experimental Nephrology 23(1) 65-75, 2019
13. Ito S, Hidaka Y, Inoue N, Kaname S, Kato H, Matsumoto M, Miyakawa Y, Mizuno M, Okada H, Shimono A, Matsuda T, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Kagami S. Safety and effectiveness of eculizumab for pediatric patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clinical and Experimental Nephrology* 23(1)112-121, 2019
 14. van Dorland HA, Mansouri Taleghani M, Sakai K, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, Knöbl PN, von Krogh AS, Schneppenheim R, Aebi-Huber I, Bütikofer L, Largiadèr CR, Cermakova Z, Kokame K, Miyata T, Yagi H, Terrell DR, Vesely SK, Matsumoto M, Lämmle B, Fujimura Y, Kremer Hovinga JA; Hereditary TTP Registry. The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrolment until 2017. *Haematologica* 2019 pii:haematol.2019.216796. doi:10.3324/haematol.2019.216796.
 15. Hayakawa M, Kato S, Matsui T, Sakai K, Fujimura Y, Matsumoto M. Blood group antigen A on von Willebrand factor is more protective against ADAMTS13 cleavage than antigens B and H. *J Thromb Haemost In press*.
 16. Horiuchi H, Doman T, Kokame K, Saiki Y, Matsumoto M. Acquired von Willebrand Syndrome Associated with Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb* 26(4)303-314, 2019 doi:10.5551/jat.RV17031.
 17. Maruyama K, Akiyama M, Miyata T, and Kokame K: Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI. *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, 2 (4), 751-756 (2018)
 18. Miyoshi T, Oku H, Asahara S, Okamoto A, Kokame K, Nakai M, Nishimura K, Otsuka F, Higashiyama A, Yoshimatsu J, and Miyata T: Effects of low-dose combined oral contraceptives and protein S K196E mutation on anticoagulation factors: a prospective observational study. *Int. J. Hematol.*, In press.
- 和文
1. 松本雅則. 血栓性微小血管障害症 (TMA). *Coagulation & Inflammation* 4 巻 1 号 3-10, 2018.
 2. 酒井和哉, 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病の病態と治療. *日本臨床* 76 巻 9 号 1687-1693, 2018.
 3. 久保政之, 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 診療ガイド 2017. *Medical Practice* 35 巻 7 号 1067-1072, 2018.
 4. 松本雅則. 造血幹細胞移植後合併症に対するアフェレシス. *血液フロンティ*

- ア 28 卷 10 号 1479-1485, 2018.
5. 久保政之, 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の病態. *Thrombosis Medicine* 8 卷 3 号 174-180, 2018.
 6. 酒井和哉, 松本雅則. 造血管細胞移植後 TMA の診断と治療. *血液内科* 77 卷 5 号 613-620, 2018.
 7. 松本雅則. TMA (血栓性微小血管症) と HELLP 症候群. *産科と婦人科* 89 卷 2 号 231-236, 2019.
 8. 丸山慶子, 小亀浩市: PS Tokushima (K196E)変異の検査. 臨床に直結する血栓止血学 改訂 2 版, 85-87, 2018.
 9. 小亀浩市: ADAMTS13. *日本血栓止血学会誌*, 29 卷 6 号, 586-588, 2018.
- 学会発表
1. 早川正樹, 加藤誠司, 松井太衛, 酒井和哉, 藤村吉博, 松本雅則. ABO 血液型 A 型抗原を持つ Von Willebrand 因子は ADAMTS13 による切断を受けにくい. 宇都宮, 日本輸血細胞治療学会, 2018 年 5 月 25 日
 2. 早川正樹, 井上雄介, 山田昭博, 白石泰之, 堀内久徳, 山家智之, 松本雅則. 経皮的心肺補助循環装置使用時における合併する後天性 von Willebrand 症候群の基礎解析. 第 40 回日本血栓止血学会, 札幌, 2018 年 6 月 30 日
 3. 中塚優希, 酒井和哉, 吉井由美, 早川正樹, 和田英夫, 松本雅則. 後天性 TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) における凝固マーカーの後方視的解析. 第 40 回日本血栓止血学会, 札幌, 2018 年 6 月 30 日
 4. 酒井和哉, 松本雅則. 「DIC 診断 UP TO DATE」 TTP における凝固検査の検討: DIC との鑑別が可能か? 第 40 回日本血栓止血学会, 札幌, 2018 年 6 月 30 日
 5. Matsumoto M. New treatment modalities of thrombotic thrombocytopenic purpura. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH). Sapporo, 2018 年 6 月 30 日
 6. Baker R I, Ruan C, Yu Z, Oh D, Angchaisuksiri P, Sathar J, Matsumoto M, Tien S L, Shen M, Wong R. Successful International Standardised Study of ADAMTS13 Assays-Results from the Asia-Pacific Microangiopathic Thrombocytopenia (APMAT) Network, The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Sapporo, 2018 年 6 月 29 日
 7. Sugawara S, Doman T, Kokame K, Matsumoto M, Fujiwara S, Horiuchi H. on behalf of the AVEc study group. Correlation of the ratios of von Willebrand factor (VWF) ristocetin cofactor activity to VWF antigen amount (VWF Rco/VWF Ag) with the large multimer levels evaluated with its multimer analysis. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on

- Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Sapporo, 2018年6月29日
8. Doman T, Matsumoto M, Kokame K, Horiuchi H. on behalf of the AVeC study group. Quantitative analysis of VWF large multimers may predict bleeding risk in patients with aortic stenosis. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Sapporo, 2018年6月29日
 9. Sakai K, Yagi H, Hayakawa M, Harada K, Someya T, Fujimura Y, Matsumoto M. Inhibitory effect of novel DNA aptamer for von Willebrand factor on platelet thrombosis formation. 第80回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018年10月12日
 10. 松本雅則. TMAの診断と治療の進歩— aHUSを中心に—. 第39回日本アフェレシス学会学術大会, 倉敷, 2018年10月27日
 11. 松本雅則. 科学的根拠に基づいた血液製剤の適正使用. 日本臨床麻酔学会第38回大会, 北九州, 2018年11月1日
 12. 松本雅則. ADAMTS13活性の測定とその臨床応用. 第54回千葉県輸血研究会, 千葉, 2018年11月10日
 13. 松本雅則. 血小板減少症の鑑別に重要なADAMTS13検査. 第65回日本臨床検査医学会学術集会, 東京, 2018年11月17日
 14. Sakai K, Yagi H, Hayakawa M, Someya T, Harada K, Matsumoto M. Inhibitory Effect on Platelet Thrombosis Formation of a Novel DNA Aptamer with Artificial Nucleic Acid Bases that binds to the von Willebrand Factor A1 Domain. 60th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2018年12月1日
 15. Dorland A V, Mansouri Taleghani M, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, Knöbl PN, Lammle B, Matsumoto M, von Krogh AS, Schneppenheim R, Aebi-Huber I, Lukas B, Cermakova Z, Quist-Paulsen P, Terrell D, Vesely S K, Fujimura Y, Kremer Hovinga JA. Genotype-Phenotype Correlation in Congenital TTP: New Insights from a Multicentre Study with 121 Patients. 60th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2018年12月1日
 16. 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の診断と治療に関する最近の進歩. 第13回日本血栓止血学会 標準化委員会シンポジウム, 東京, 2019年2月16日
 17. 松本雅則. 造血幹細胞移植後に発症するTMA(血栓性微小血管障害症)への挑戦. 第41回日本造血細胞移植学会総会, 大阪, 2019年3月8日
 18. 山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: von Willebrand因子の分泌におけるエンドソームの関与. 第40回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018年6月28日.
 19. 根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 柳生剛, 小亀浩市, 宮田敏行: 濃厚な家族歴を有する静脈血栓症症例に

- における先天性プロテイン S 欠乏症の遺伝子解析の検討. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018 年 6 月 28 日.
20. 芥田敬吾, 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 小亀浩市, 西浦伸子, 森川陽一郎, 加藤恒, 本田繁則, 金倉讓, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン α IIb β 3 活性化変異 α IIb (R990W) ノックインマウスにおける血小板産生障害. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018 年 6 月 28 日.
21. 加藤恒, 柏木浩和, 森川陽一郎, 芥田敬吾, 西浦伸子, 本田繁則, 小亀浩市, 宮田敏行, 金倉讓, 富山佳昭: 血小板機能異常症におけるフィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3 活性化キネティックスの評価. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018 年 6 月 28 日.
22. 根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 丸山慶子, 小亀浩市, 宮田敏行: 妊娠を契機に深部静脈血栓症を発症した先天性アンチトロンビン欠乏症症例の遺伝学的検査の検討. 日本人類遺伝学会第 63 回大会, 横浜, 2018 年 10 月 10 日.
23. 根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 小亀浩市, 宮田敏行: 閉経後に深部静脈血栓症を発症した先天性プロテイン S 欠乏症の検討. 第 33 回日本女性医学学会学術集会, 岐阜, 2018 年 11 月 3 日.
24. Doman T, Sugawara S, Kokame K, Matsumoto M, Fujimaki S, Saiki Y, and Horiuchi H on behalf of the AVeC study group. Is the ratios of VWF:RCo to VWF:Ag useful for the diagnosis of AVWS associated with LVAD? The International Society for Mechanical Circulatory Support (ISMCS) 2018, Tokyo, October 31, 2018.
25. 吉田亜佑美, 樋口 (江浦) 由佳, 小亀浩市: Derlin-3 は造血・免疫系組織で発現し、マウスでは Derlin-3 欠損により血清 IgG 濃度が減少する. 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018 年 11 月 28 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 TMAのADAMTS13活性 (n=1516)
(奈良医大輸血部1998. 7-2018. 12)

	Congenital TMAs (n=161)		Acquired TMAs (n=1355)											Total (n=1516)
	USS (n=65)	aHUS (n=96)	Primary (n=597)		Secondary (n=734)									
			TTP (n=472)	HUS (n=125)	Drug-induced (n=45)			CTD/AD (n=345)	Malignancies (n=89)	HSCT (n=100)	Pregnancy (n=31)	STEC-HUS (n=50)	Others (LC, etc) (n=98)	
					TC(n=25)/CL(n=4)	MMC (n=12)	Others (n=4)							
ADAMTS13:AC (%)	(n=64)	(n=94)	(n=472)	(n=125)	(n=25/n=3)	(n=12)	(n=4)	(n=324)	(n=86)	(n=91)	(n=27)	(n=47)	(n=87)	(n=1516)
<10	64	0	399	0	24	0	3	108	12	5	8	2	38	663
1年間の増加数	1	0	15	0	0	0	0	5	1	0	0	0	4	26
10~<25	0	6	35	15	3	2	0	70	24	31	3	8	16	213
25 ~<50	0	21	29	62	1	6	0	113	33	47	13	23	25	373
≥50	0	65	9	48	1	4	1	54	20	17	7	17	19	262
全体の年間増加数	1	2	15	0	0	0	0	11	3	3	0	2	5	42

TC: テクロピジン、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*
 LC: liver cirrhosis

表 2 TTP (<ADAMTS13活性10%) 症例のまとめ (n=663)
(奈良医大輸血部1998. 7-2018. 12)

	Congenital TMAs (n=65)	Acquired TMAs (n=599)									Total (n=664)
	USS (n=65)	Primary (n=399)	Secondary (n=200)								
		TTP (n=399)	Drug-induced (n=27)	CTD/AD (n=108)	Malignancies (n=12)	HSCT (n=5)	Pregnancy (n=8)	STEC-HUS (n=2)	Others (LC, etc) (n=38)		
ADAMTS13:AC (%)	(n=64)	(n=399)	(n=27)	(n=108)	(n=12)	(n=5)	(n=8)	(n=2)	(n=38)	(n=663)	
< 0.5	36	337	22	82	6	0	7	0	27	517	
0.5~< 5	26	27	5	15	4	1	1	0	6	85	
5~< 10	2	22	0	11	0	4	0	2	5	46	
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=64)	(n=398)	(n=27)	(n=106)	(n=11)	(n=2)	(n=8)	(n=2)	(n=35)	(n=653)	
> 5	0	84	6	16	4	0	1	0	6	117	
2~< 5	0	143	13	33	2	0	3	1	11	206	
0.5 ~< 2	7	158	7	46	4	0	4	1	13	240	
< 0.5	57	13	1	11	1	2	0	0	5	90	

TC: テクロピジン、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*
 LC: Liver cirrhosis

表3 TTP (ADAMTS13 <10%) の基礎疾患の割合

	分類	症例数		割合(%)	
先天性	USS (Upshaw-Schulman症候群)	64		9.7	
後天性	原発性	399		60.2	
	二次性	200		30.2	
	膠原病	108		16.3	
	薬剤	27		4.1	
	悪性腫瘍	12		1.8	
	妊娠	8		1.2	
	その他	45		6.8	
	肝硬変・肝炎	8		1.2	
	計	663		100	

日本人の後天性 TTP における HLA 解析

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 酒井和哉 奈良県立医科大学 輸血部 診療助教

研究要旨

後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (aTTP) は、ADAMTS13 に対する自己抗体に起因する致死的な自己免疫性疾患である。多くの自己免疫性疾患の患者において疾患特有の感受性 HLA が同定されており、target molecule と抗原提示細胞とのペプチド配列の相同性などが検討されている。aTTP においても、欧州を中心に複数の研究から HLA-DRB1*11 などが aTTP の発症に寄与することが報告されている。我々は日本人における aTTP において疾患感受性 HLA を検討するため、奈良県立医科大学で集積した症例を中心に解析した。

血小板減少と溶血性貧血を認め、ADAMTS13 活性 10%未満で、ADAMTS13 に対するインヒビターを持つ TTP 患者を対象とした。HLA 解析は 8 遺伝子座について第 3 区域まで HLA 研究所で解析した。対照として健常人の HLA アリル頻度を HLA 研究所より公開されているものを使用した。

2018 年末までに全国 18 施設より紹介された 50 例の症例について HLA 解析が終了した。連鎖不均衡を加味し解析した結果、HLA-DRB1*08:03 (補正 $p=0.014$ 、オッズ比: 2.43 (95%CI: 1.369-4.088))、HLA-DPB1*19:01 (補正 $p=0.027$ 、オッズ比: 5.57 (95%CI: 1.368-16.843)) が疾患感受性 HLA として同定された。欧州において疾患感受性 HLA として報告されている HLA-DRB1*11 は、患者および健常人で統計学的有意差はなく、本邦においては疾患感受性 HLA としては同定されなかった。

本邦における aTTP の疾患感受性 HLA は欧州から報告されているものとは異なり、欧州と本邦の HLA アリル頻度の違いが影響していると推測される。現在、同定された HLA と臨床データとの関連性の詳細を検討中である。

A. 研究の目的

後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (aTTP) は、VWF 切断酵素である ADAMTS13 に対する自己抗体が産生されることで発症する致死的な自己免疫性疾患である。他の多くの自己免疫性疾患の患者において疾患特有の感受性 HLA が同定されており、target molecule と抗原提示細胞とのペプチド配列の相同性などが検討されて

いる。aTTP においても、欧州を中心に疾患感受性 HLA の研究報告があり、複数の研究から HLA-DRB1*11 などが aTTP の発症に寄与すると報告されている。我々は、欧米とは遺伝的背景が全く異なる本邦の aTTP において疾患感受性 HLA を検討するため、2017 年 8 月より奈良県立医科大学で aTTP と診断された症例において HLA 解析を行う多施設共同研究を開始した。

2018 年未までの解析症例数が 50 症例を超えたので、その解析結果を報告する。

B. 研究方法

血小板減少と溶血性貧血を認め、ADAMTS13活性10%未満で、ADAMTS13に対するインヒビターを持つaTTP患者を対象とした。患者からの同意取得後にEDTA採血2mlを公益財団法人HLA研究所に送付し解析を依頼した。HLA解析はイルミナ社製の次世代シーケンサーを用いて8遺伝子座 (A, B, C, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1 and DPB1) について第3区域まで解析した。対照として健常人のHLAアレル頻度をHLA研究所より公開されているものを使用した、 χ 二乗検定を用いて統計解析を行い、Bonferroni法による補正p値を算出した。文書による同意が取得後に通常採血の際にEDTA末梢血2mlを採取し奈良県立医科大学輸血部に診療情報とともに検体を送付した。奈良県立医科大学では速やかに情報管理者による患者データおよび検体の匿名化を行った。匿名化された検体はHLA研究所に個人情報保護された状態で送付され、HLA解析結果は奈良県立医科大学にて検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、奈良県立医科大学および検体採取施設のヒトゲノム倫理審査委員会の許可を受けて実施した。また、検体採取に際しては、主治医より被験者に対して十分な説明を行い、文書による同意を得た。

C. 研究成果

日本国内の 18 施設から 50 名の後天性

TTP 患者が登録された。男性 20 名、女性 30 名であり、年齢中央値は 59 歳 (1-81 歳) であった。後天性 TTP の内訳は 36 例が原発性、12 例が膠原病 (全身性エリテマトーデス 6 例、Sjogren 症候群 2 例、混合性結合組織病 3 例、原発性胆汁性肝硬変 1 例)、1 例が悪性腫瘍、1 例が重症急性膵炎であった。以下のアレルは健常人よりも TTP 患者において有意に頻度が高く、疾患感受性アレルと判断した。図 1、2 にその結果を示す。DRB1*08:03 [18.0 % vs 8.3 %, 補正 p=0.014, オッズ比 : 2.43 (95%CI : 1.369-4.088)] および DPB1*19:01 (4 % vs 0.7 %, 補正 p=0.027, オッズ比 : 5.57 (95%CI : 1.368-16.843)) であった。なお、ヨーロッパから疾患感受性アレルと報告されている DRB1*11 は TTP 患者及び健常人間でアレル頻度に有意な差はみられなかった。

引き続き DRB1*08:03 の有無と TTP 発症時の採血データとの関連を解析した。DRB1*08:03 陽性例は 16 例あり、うち 2 例がホモ接合体、14 例がヘテロ接合体であった。残りの 34 例では DRB1*08:03 は陰性であった。陽性群では陰性群と比して、有意に FDP・LDH・総ビリルビン値が低かった。なお、発症時の年齢、性別、白血球数、ヘモグロビン値、血小板数、ADAMTS13 インヒビター力価、PT-INR、APTT、Fibrinogen、Anti-thrombin、D-dimer、血清クレアチニンは 2 群間で有意差がみられなかった。

D. 考察

本研究は比較的多数例の日本人後天性 TTP 患者における疾患感受性 HLA アレル

の解析を行った最初の報告である。この解析より2つの新たな知見が得られた。

まず1つは、日本人独自の疾患感受性アリルが2つ同定されたことである。DRB1*08:03, DPB1*19:01ともに他の膠原病などでは感受性アリルとしては報告されていない。2つ目として、ヨーロッパで報告された疾患感受性アリルは日本国内では疾患感受性アリルとして同定されなかったことである。DRB1*08:03はヨーロッパではまれなアリルであり、人種によるHLA多様性の差異が関与していると推測された。

疾患感受性アリルと同定されたDRB1*08:03の有無と発症時の臨床データとの関連を解析したところ、血小板数、ADAMTS13インヒビター力価などでは有意差がみられなかった。しかし、陽性群ではLDHや総ビリルビンが低値であることから溶血の程度が軽度である可能性が示された。今後治療反応性や臨床経過との相関を解析する方針である。

E. 結論

日本人においてaTTPに対する疾患感受性アレルとして、DRB1*08:03およびDPB1*19:01が同定された。しかし、欧米から疾患感受性アレルと報告されているDRB*11は、日本人においてはTTP患者及び健常人間でアリル頻度に有意な差はみられなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

欧文

1. Kawano N, Yokota-Ikeda N, Kawano S, Kuriyama T, Yamashita K, Ono N, Ueda N, Ochiai H, Ishikawa F, Kikuchi I, Shimoda K, Matsumoto M. Clinical effect of rituximab as early administration for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with connective tissue diseases. *Modern Rheumatology Case Reports*, 2:59-67, 2018
2. Takaya H, Kawaratani H, Kubo T, Seki K, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Takeda K, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. Platelet hyper-aggregability is associated with decreased ADAMTS13 activity and enhanced endotoxemia in patients with acute cholangitis. *Hepatology Res*, 48:E52-E60, 2018
3. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients with age-related macular degeneration. *Sci Rep* 24:1491, 2018
4. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M,

- Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol.* 59(6) 595-599, 2018
5. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Nephrol.* 22(5) 1088-1099, 2018
 6. Matsumoto T, Toyoda H, Amano K, Hirayama M, Ishikawa E, Fujimoto M, Ito M, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Kawamura N, Ikejiri M, Kawakami K, Miyata T, Wada H. Clinical Manifestation of Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the C3 p.I1157T Variation in the Kinki Region of Japan. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2018 1:1076029618771750. doi: 10.1177/1076029618771750.
 7. Itami H, Hara S, Matsumoto M, Imamura S, Kanai R, Nishiyama K, Ishimura M, Ohga S, Yoshida M, Tanaka R, Ogawa Y, Asada Y, Sekita-Hatakeyama Y, Hatakeyama K, Ohbayashi C. Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency may contribute to the characteristic glomerular manifestations in Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res.* 1,170:148-155, 2018
 8. Shigekiyo T, Udaka K, Sekimoto E, Shibata H, Ozaki S, Higuchi Y, Matsumoto M. Identification of a homozygous missense mutation (p.Cys379Gly) in the D1 domain of von Willebrand factor propeptide in a family with type 2A (IIC) von Willebrand disease. *Haemophilia*;24(6):e422-e425, 2018
 9. Tsuda M, Shiratsuchi M, Nakashima Y, Ikeda M, Muta H, Narazaki T, Masuda T, Kimura D, Takamatsu A, Matsumoto M, Fujimura Y, Kokame K, Matsushima T, Ogawa Y. Upshaw-Schulman syndrome diagnosed during pregnancy complicated by reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Transfus Apher Sci.* 57(6):790-792, 2018
 10. Takaya H, Kawaratani H, Tsuji Y, Nakanishi K, Saikawa S, Sato S, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Shimozato N, Kitade M, Akahane T, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. von Willebrand factor is a useful biomarker for liver fibrosis and prediction of hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B and C. *United*

- European Gastroenterol J. ;6(9):1401-1409, 2018
11. Wada H, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Iba T, Matsumoto M. Differences and similarities between disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy. *Thromb J*. 16;14, 2018
 12. Kato H, Miyakawa Y, Hidaka Y, Inoue N, Ito S, Kagami S, Kaname S, Matsumoto M, Mizuno M, Matsuda T, Shimono A, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Okada H. Safety and effectiveness of eculizumab for adult patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clinical and Experimental Nephrology* 23(1) 65-75, 2019
 13. Ito S, Hidaka Y, Inoue N, Kaname S, Kato H, Matsumoto M, Miyakawa Y, Mizuno M, Okada H, Shimono A, Matsuda T, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Kagami S. Safety and effectiveness of eculizumab for pediatric patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clinical and Experimental Nephrology* 23(1) 112-121, 2019
 14. van Dorland HA, Mansouri Taleghani M, Sakai K, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, Knöbl PN, von Krogh AS, Schneppenheim R, Aebi-Huber I, Bütikofer L, Largiadèr CR, Cermakova Z, Kokame K, Miyata T, Yagi H, Terrell DR, Vesely SK, Matsumoto M, Lämmle B, Fujimura Y, Kremer Hovinga JA; Hereditary TTP Registry. The International Hereditary Thrombotic Thrombocytopenic Purpura Registry: Key findings at enrolment until 2017. *Haematologica* 2019 pii:haematol.2019.216796. doi:10.3324/haematol.2019.216796.
 15. Hayakawa M, Kato S, Matsui T, Sakai K, Fujimura Y, Matsumoto M. Blood group antigen A on von Willebrand factor is more protective against ADAMTS13 cleavage than antigens B and H. *J Thromb Haemost* In press.
 16. Horiuchi H, Doman T, Kokame K, Saiki Y, Matsumoto M. Acquired von Willebrand Syndrome Associated with Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb* 26(4) 303-314, 2019 doi:10.5551/jat.RV17031.
- 和文
1. 松本雅則. 血栓性微小血管障害症 (TMA). *Coagulation & Inflammation* 4 卷 1 号 3-10, 2018.
 2. 酒井和哉, 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病の病態と治療. *日本臨床* 76 卷 9 号 1687-1693, 2018.
 3. 久保政之, 松本雅則. 血栓性血小板

- 減少性紫斑病(TTP)診療ガイド 2017. Medical Practice 35 巻 7 号 1067-1072, 2018.
4. 松本雅則. 造血幹細胞移植後合併症に対するアフェレシス. 血液フロンティア 28 巻 10 号 1479-1485, 2018.
 5. 久保政之, 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の病態. Thrombosis Medicine 8 巻 3 号 174-180, 2018.
 6. 酒井和哉, 松本雅則. 造血幹細胞移植後 TMA の診断と治療. 血液内科 77 巻 5 号 613-620, 2018.
 7. 松本雅則. TMA (血栓性微小血管症) と HELLP 症候群. 産科と婦人科 89 巻 2 号 231-236, 2019.
 4. 酒井和哉, 松本雅則. 「DIC 診断 UP TO DATE」 TTP における凝固検査の検討: DIC との鑑別が可能か? 第 40 回日本血栓止血学会, 札幌, 2018 年 6 月 30 日
 5. Matsumoto M. New treatment modalities of thrombotic thrombocytopenic purpura. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH). Sapporo, 2018 年 6 月 30 日
 6. Baker R I, Ruan C, Yu Z, Oh D, Angchaisuksiri P, Sathar J, Matsumoto M, Tien S L, Shen M, Wong R. Successful International Standardised Study of ADAMTS13 Assays-Results from the Asia-Pacific Microangiopathic Thrombocytopenia (APMAT) Network, The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Sapporo, 2018 年 6 月 29 日
 7. Sugawara S, Doman T, Kokame K, Matsumoto M, Fujiwara S, Horiuchi H. on behalf of the AVeC study group. Correlation of the ratios of von Willebrand factor (VWF) ristocetin cofactor activity to VWF antigen amount (VWF Rco/VWF Ag) with the large multimer levels evaluated with its multimer analysis. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on

学会発表

1. 早川正樹, 加藤誠司, 松井太衛, 酒井和哉, 藤村吉博, 松本雅則. ABO 血液型 A 型抗原を持つ Von Willebrand 因子は ADAMTS13 による切断を受けにくい. 日本輸血細胞治療学会, 宇都宮, 2018 年 5 月 25 日
2. 早川正樹, 井上雄介, 山田昭博, 白石泰之, 堀内久徳, 山家智之, 松本雅則. 経皮的心肺補助循環装置使用時における合併する後天性 von Willebrand 症候群の基礎解析. 第 40 回日本血栓止血学会, 札幌, 2018 年 6 月 30 日
3. 中塚優希, 酒井和哉, 吉井由美, 早川正樹, 和田英夫, 松本雅則. 後天性 TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) における凝固マーカーの後方視的解析. 第 40 回日本血栓止血学会, 札幌, 2018 年 6 月 30 日

- Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Sapporo, 2018年6月29日
8. Doman T, Matsumoto M, Kokame K, Horiuchi H. on behalf of the AVeC study group. Quantitative analysis of VWF large multimers may predict bleeding risk in patients with aortic stenosis. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH), Sapporo, 2018年6月29日
 9. Sakai K, Yagi H, Hayakawa M, Harada K, Someya T, Fujimura Y, Matsumoto M. Inhibitory effect of novel DNA aptamer for von Willebrand factor on platelet thrombosis formation. 第80回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018年10月12日
 10. 松本雅則. TMA の診断と治療の進歩—aHUS を中心に—. 第39回日本アフレスス学会学術大会, 倉敷, 2018年10月27日
 11. 松本雅則. 科学的根拠に基づいた血液製剤の適正使用. 日本臨床麻酔学会第38回大会, 北九州, 2018年11月1日
 12. 松本雅則. ADAMTS13 活性の測定とその臨床応用. 第54回千葉県輸血研究会, 2018年11月10日
 13. 松本雅則. 血小板減少症の鑑別に重要な ADAMTS13 検査. 第65回日本臨床検査医学会学術集会, 東京, 2018年11月17日
 14. Sakai K, Yagi H, Hayakawa M, Someya T, Harada K, Matsumoto M. Inhibitory Effect on Platelet Thrombosis Formation of a Novel DNA Aptamer with Artificial Nucleic Acid Bases that binds to the von Willebrand Factor A1 Domain. 60th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2018年12月1日
 15. Dorland A V, Mansouri Taleghani M, Friedman KD, George JN, Hrachovinova I, Knöbl PN, Lammle B, Matsumoto M, von Krogh AS, Schneppenheim R, Aebi-Huber I, Lukas B, Cermakova Z, Quist-Paulsen P, Terrell D, Vesely S K, Fujimura Y, Kremer Hovinga JA. Genotype-Phenotype Correlation in Congenital TTP: New Insights from a Multicentre Study with 121 Patients. 60th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, 2018年12月1日
 16. 松本雅則. 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の診断と治療に関する最近の進歩. 第13回日本血栓止血学会標準化委員会シンポジウム, 東京, 2019年2月16日
 17. 松本雅則. 造血幹細胞移植後に発症する TMA (血栓性微小血管障害症) への挑戦. 第41回日本造血細胞移植学会総会, 大阪, 2019年3月8日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

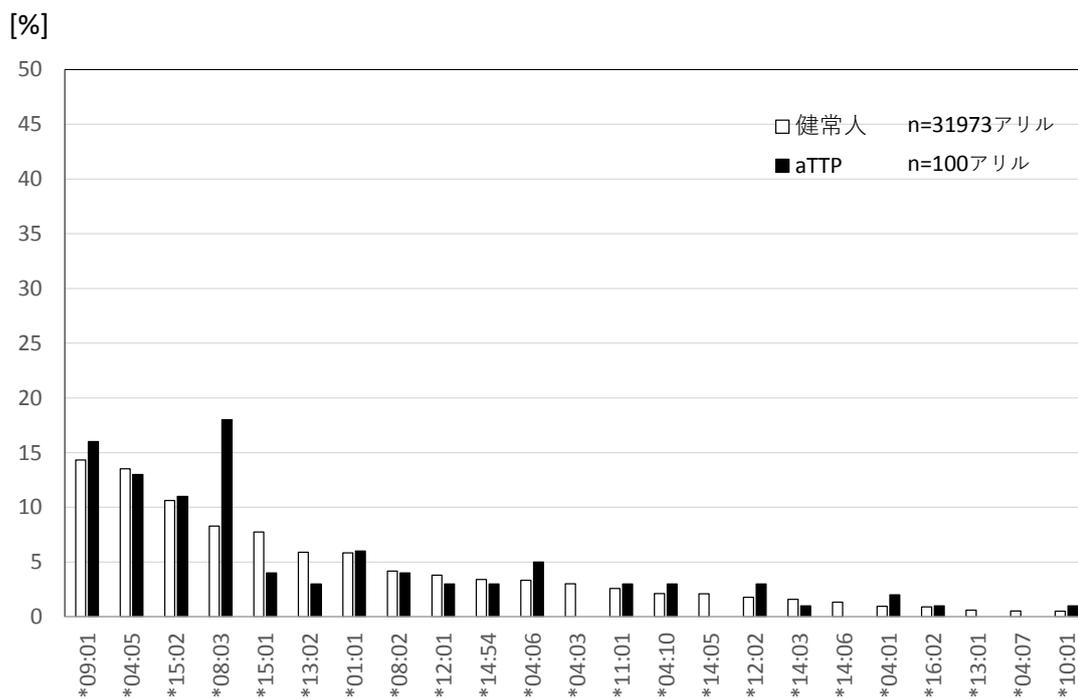


図1 HLA-DRB1のアリル頻度比較

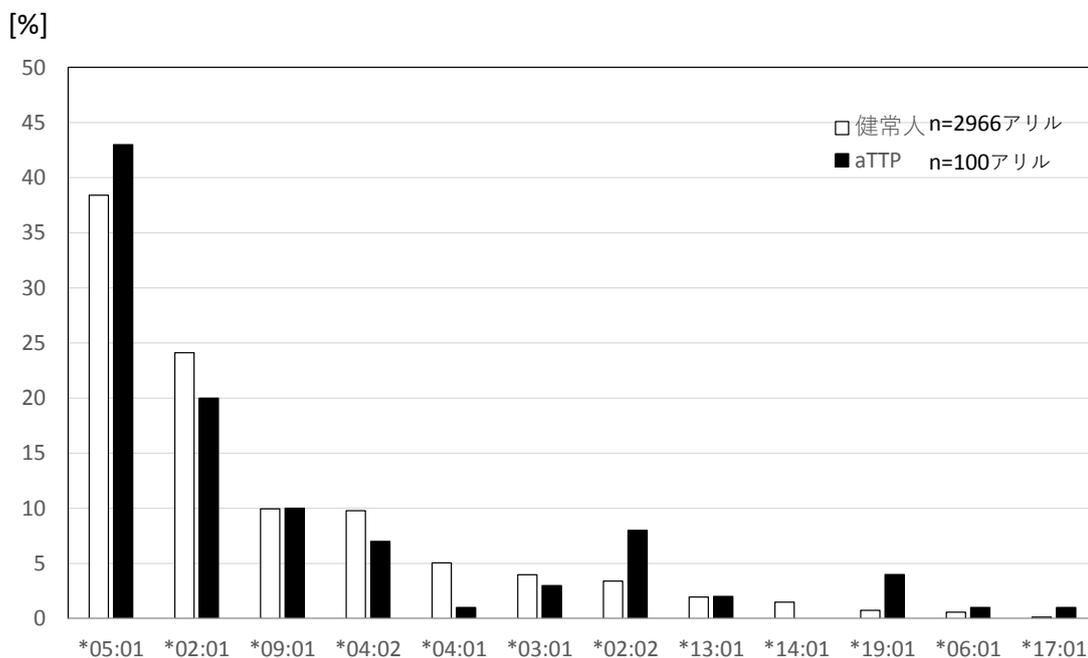


図2 HLA-DPB1のアリル頻度比較

TTP に対するリツキシマブの適応拡大と TTP ガイドライン改訂

研究分担者 宮川 義隆 埼玉医科大学・教授

研究要旨

慢性 ITP に対する抗体医薬リツキシマブの適応拡大は、医師主導治験の研究成果をもとに、医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議を経て成功した。TTP ガイドラインの改訂作業を Minds 形式を進めることを決定した。

A. 研究目的

血液難病である ITP に対する抗体医薬リツキシマブは、国内のガイドラインで推奨されているが、永らく保険適応外である。欧米と同様、我が国でも保険診療でできるよう適応拡大を目標に薬事対応を行う。別途、TTP のガイドライン改訂作業を進める。

B. 研究方法

医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に、慢性 ITP に対する抗体医薬リツキシマブの公知性、医学上の必要性を審議依頼した。別途、TTP のガイドライン改訂に必要な国内外の情報収集を行った。

(倫理面への配慮)

非該当

C. 研究結果

2018 年 3 月、慢性 ITP に対する抗体医薬リツキシマブが保険償還、同年 6 月に適応拡大された。TTP ガイドラインを Minds 準拠で改訂することを決定した。

D. 考察

医師主導治験の研究成果をもとに、当研究班が関連学会、行政に働きかけたことが、適応拡大に繋がった。今後、成人 ITP ガイドライン改訂に繋がる研究成果となる。

E. 結論

慢性 ITP に対するリツキシマブの適応拡大に成功した。TTP ガイドラインは Minds 形式で改訂作業を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙
2. 学会発表
別紙

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

先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析

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 を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改訂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 1 名 (1 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、p. G909R 変異と p. Y1074Afs*46 変異の複合ヘテロ接合体であった。いずれもこれまでに日本の先天性 TTP 患者に同定されたことのある原因変異であった。

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 (インヒビター) 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ともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改訂に寄与することをめざしている。

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た。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 1 名（1 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試薬キットなので、凍結血球 (約 200 μ L) を解凍しながら約 100 μ L の生理食塩水で懸濁して約 300 μ 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 (TGTAACGACGCGCCAGT) を、アンチセンス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACGCTATGACC) 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 μ 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 μ 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 μ L を加え、37°C/30 分間、80°C/15 分間反応させた。このうち 1 μ 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 μ 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

患者は生後すぐに発症した女児で、交換輸血後の当日の血漿 ADAMTS13 活性は 3.1%、18 日後の血漿 ADAMTS13 活性は 2.1%であった。いずれの血漿もインヒビターは陰性 (<0.5 BU/mL) であった。両親の血漿 ADAMTS13 活性は、父 25.6%、母 16.1%で、いずれもインヒビターは陰性であった。先天性 TTP の可能性が強く推定されたため、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、患者に c. 2725G>A (p. G909R) ミスセンス変異と c. 3220_3223delTACC (p. Y1074Afs*46) フレームシフト変異がそれぞれヘテロ接合で同定された。父に c. 2725G>A がヘテロ接合で、母に c. 3220_3223delTACC がヘテロ接合で同定されたため、患者は両変異による複合ヘテロ接合体であると確認された。c. 2725G>A 変異は日本の先天性 TTP 患者

1 家系に、c. 3220_3223delTACC は 2 家系に同定されていた原因変異である。

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 1 名 (1 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、1 種のミスセンス変異と 1 種のフレームシフト変異であった。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。

これまでに解析した結果をまとめると、先天性 TTP 疑い患者 61 名 (55 家系) のうち 57 名 (51 家系) に、複合ヘテロ接合性 (40 家系) あるいはホモ接合性 (11 家系) の原因変異を同定したことになる。変異は 62 種類で、その内訳は、ミスセンス 37 種類 (59.7%)、フレームシフト 11 種類 (17.7%)、ナンセンス 8 種類 (12.9%)、スプライシング異常 4 種類 (6.5%)、構造異常 2 種類 (3.2%) であった。論文発表されている海外の原因変異を含めると全部で 162 種類になり、

その内訳は、ミスセンス 98 種類 (60.5%)、フレームシフト 29 種類 (17.9%)、ナンセンス 17 種類 (10.5%)、スプライシング異常 13 種類 (8.0%)、挿入・欠失 3 種類 (1.9%)、構造異常 2 種類 (1.2%) となった。

解析した 55 家系のうち 4 家系には、未発見の遺伝子異常が存在する可能性があり、解決すべき課題として残っている。ロング・リード・シーケンシングによる解析が役立つかもしれない。

E. 結論

先天性 TTP 疑い患者 1 名 (1 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、両アレル性の異常が同定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Madoka Fujisawa, Hideki Kato, Yoko Yoshida, Tomoko Usui, Munenori Takata, Mika Fujimoto, Hideo Wada, Yumiko Uchida, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata, and Masaomi Nangaku: Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. *Clin. Exp. Nephrol.*, 22 (5), 1088-1099 (2018).

Keiko Maruyama, Masashi Akiyama,

Toshiyuki Miyata, and Koichi Kokame: Protein S K196E mutation reduces its cofactor activity for APC but not for TFPI. *Res. Pract. Thromb. Haemost.*, 2 (4), 751-756 (2018)

Mariko Tsuda, Motoaki Shiratsuchi, Motohiko Ikeda, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Koichi Kokame, Takamitsu Matsushima, Yasuhiro Nakashima, and Yoshihiro Ogawa: Upshaw-Schulman syndrome diagnosed during pregnancy complicated by reversible cerebral vasoconstriction syndrome. *Transfus. Apher. Sci.*, 57 (6), 790-792 (2018)

H. Anette van Dorland, Magnus Mansouri Taleghani, Kazuya Sakai, Kenneth D. Friedman, James N. George, Ingrid Hrachovinova, Paul N. Knöbl, Anne Sophie von Krogh, Reinhard Schneppenheim, Isabella Aebi-Huber, Lukas Bütikofer, Carlo R. Largiadèr, Zuzana Cermakova, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Hideo Yagi, Deirdra R. Terrell, Sara K. Veseley, Masanori Matsumoto, Bernhard Lämmle, Yoshihiro Fujimura, Johanna A. Kremer Hovinga: Hereditary TTP Registry: The international hereditary thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) registry: Key findings at enrolment until 2017. *Haematologica*, In press.

Takekazu Miyoshi, Hisato Oku, Saiko

Asahara, Akira Okamoto, Koichi Kokame, Michikazu Nakai, Kunihiro Nishimura, Fumiya Otsuka, Aya Higashiyama, Jun Yoshimatsu, and Toshiyuki Miyata: Effects of low-dose combined oral contraceptives and protein S K196E mutation on anticoagulation factors: a prospective observational study. *Int. J. Hematol.*, In press.

Hisanori Horiuchi, Tsuyoshi Doman, Koichi Kokame, Yoshikatsu Saiki, and Masanori Matsumoto: Acquired von Willebrand Syndrome Associated with Cardiovascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.*, 26 (4), 303-314 (2019)

丸山慶子, 小亀浩市: PS Tokushima (K196E)変異の検査. 臨床に直結する血栓止血学 改訂2版, 85-87 (2018)

小亀浩市: ADAMTS13. 日本血栓止血学会誌, 29 (6), 586-588 (2018)

2. 学会発表

山崎泰男, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市: von Willebrand 因子の分泌におけるエンドソームの関与. 第40回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018年6月28-30日.

根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 柳生剛, 小亀浩市, 宮田敏行: 濃厚な家族歴を有する静脈血栓症症例における先天性プロテイン S 欠乏症の遺伝子解析の検討. 第40回日本血栓止血学会学術集会,

札幌, 2018年6月28-30日.

芥田敬吾, 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 小亀浩市, 西浦伸子, 森川陽一郎, 加藤恒, 本田繁則, 金倉讓, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン α IIb β 3活性化変異 α IIb (R990W)ノックインマウスにおける血小板産生障害. 第40回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018年6月28-30日.

加藤恒, 柏木浩和, 森川陽一郎, 芥田敬吾, 西浦伸子, 本田繁則, 小亀浩市, 宮田敏行, 金倉讓, 富山佳昭: 血小板機能異常症におけるフィブリノゲン受容体インテグリン α IIb β 3活性化キネティックスの評価. 第40回日本血栓止血学会学術集会, 札幌, 2018年6月28-30日.

Tsuyoshi Doman, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame, and Hisanori Horiuchi on behalf of the AVeC study group: Quantitative analysis of VWF large multimer may predict bleeding risk in patients with aortic stenosis. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, June 28-30, 2018.

Shingo Sugawara, Tsuyoshi Doman, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Shin-ichi Fujimaki, and Hisanori Horiuchi on behalf of the AVeC study group: Correlation of the ratios of von Willebrand factor (VWF) ristocetin cofactor activity to VWF

antigen amount with the VWF large multimer levels evaluated with its multimer analysis. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, June 28-30, 2018.

根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 丸山慶子, 小亀浩市, 宮田敏行: 妊娠を契機に深部静脈血栓症を発症した先天性アンチトロンビン欠乏症症例の遺伝学的検査の検討. 日本人類遺伝学会第63回大会, 横浜, 2018年10月10-13日.

根木玲子, 伊田和史, 光黒真菜, 岡本章, 小亀浩市, 宮田敏行: 閉経後に深部静脈血栓症を発症した先天性プロテイン S 欠乏症の検討. 第33回日本女性医学学会学術集会, 岐阜, 2018年11月3-4日.

Tsuyoshi Doman, Shingo Sugawara, Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Shin-ichi Fujimaki, Yoshikatsu Saiki, and Hisanori Horiuchi on behalf of the

AVeC study group. Is the ratios of VWF:RCo to VWF:Ag useful for the diagnosis of AVWS associated with LVAD? The International Society for Mechanical Circulatory Support (ISMCS) 2018, Tokyo, October 31-November 2, 2018.

吉田亜佑美, 樋口(江浦)由佳, 小亀浩市 Derlin-3は造血・免疫系組織で発現し、マウスではDerlin-3欠損により血清IgG濃度が減少する. 第41回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018年11月28-30日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

aHUS（非典型溶血性尿毒症症候群）サブグループ研究報告

グループリーダー：南学正臣 東京大学 教授
研究分担者：香美祥二 徳島大学 教授
研究協力者：丸山彰一 名古屋大学 腎臓内科 教授
伊藤秀一 横浜市立大学 教授
芦田 明 大阪医科大学 講師

グループ統括

分担研究者 南学正臣

研究要旨

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。

東京大学医学部附属病院は平成 26 年 9 月に奈良県立医科大学輸血部から aHUS 患者コホートならびに診断システムを引き継ぎ、aHUS 事務局を設立して全国から aHUS の診療におけるコンサルテーション、溶血試験、抗 CFH 抗体検査、遺伝子検査を行ってきた。

1998 年から 2018 年 12 月末までに集積した臨床的 aHUS 患者 264 例の中から 184 例の遺伝子解析を実施した (うち 77 例は奈良県立医大の症例)。昨年までの報告同様に、本邦の遺伝的背景は C3 I1157T 変異が多いという特徴は一貫していたが、それ以外に CFI の変異は 4 例のみと少ないながらも全例で R201S という同一の変異であることがわかった。CFH の変異は多彩であり新規変異も複数検出された。また妊娠関連の aHUS/HELLP 症候群の症例は 6 例集積し、そのうち 5 例は分娩直後の発症であった。6 例全例で補体関連因子の遺伝子異常が認められた。同定された遺伝子異常が aHUS の発症にどの程度影響を及ぼすか今後検討課題である。

溶血試験において CFH の C 末領域の変異、抗 CFH 抗体陽性例、CFH/CFHR の遺伝子融合および C3 の変異の一部において高度の溶血が認められることがわかった。

Sanger 法あるいは WES 法にて補体関連因子に変異が見つからなかった aHUS 症例において MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) を実施したところ、一部に CFH-CFHR の融合遺伝子が検出された。これらは病的変異と考えられ、今後の aHUS の診断における MLPA の重要性を示した。

2013 年より治療薬として承認された Eculizumab の長期治療の有効性と安全性を確認するために小児と成人、それぞれにわけて市販後調査を行った。

今後も引き続き病態解明・疫学調査に努め、本邦の疾患背景を考慮した独自のガイドライン策定に向け研究を継続する。

A. 研究目的

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 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。ただしそれらの遺伝子に変異が通常の

遺伝子検査で検出されない症例も約 40% は存在しており、これらの症例が aHUS なのかどうか鑑別することが大きな問題となっていた。また aHUS は臨床的には二次性 TMA と鑑別が時として困難であり、これらを容易に鑑別する方法が必要とされていた。

当研究班は aHUS 診断のための体系的な検査体制を構築しており、本邦最大の aHUS 患者コホートを有する唯一の組織である。集積患者数は日本国内における推定 aHUS 患者の約 8 割を占めることから、当研究班の解析データは、本邦における aHUS の疾患背景を反映すると言っても過言ではない。これまでのコホート情報に新規の aHUS 症例を累積していき、より質の高いデータを構築する必要があった。

aHUS の治療に関して Eculizumab は 2013 年に本邦にて保険適応で臨床使用できることとなってから本邦における長期治療による有効性と安全性が明確に示されていなかったため、検討する必要があった。

最終的には得られた知見をもとに本邦独自の aHUS 診療ガイドラインを作成することが目標である。

B. 研究方法

疫学調査

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科において臨床所見、検査所見、薬剤使用状況などを記載する質問票と家系図を作成、これらの書式を各解析依頼施設の主治医に送付し、データの集積を行った。凝固系プロフィールについては急性期の症例でデータが収集できた症例のみの解析とした。

Eculizumab の有効性と安全性の調査においては 2013 年 9 月から 2017 年 3 月 15

日までの間に、aHUS 診療ガイドに基づき臨床的に aHUS または二次性 TMA と診断され、エクリズマブを投与された 18 歳未満の小児および 18 歳以上の成人の登録患者を対象とした。TMA イベント・フリー、TMA の完全寛解、血小板数の正常化、eGFR 改善を有効性の評価項目とした。全登録症例に関し、エクリズマブ投与期間中の副作用を集計した。

蛋白質学的解析

1. 羊赤血球溶血試験

奈良県立医科大学輸血部で樹立した手法を用い (Yoshida Y, et al. *PLoS One* 10, e0124655, 2015)、羊赤血球と患者の血漿を混合、37°C で 30 分間反応させた後に羊赤血球の溶血度を算出した。なお、本試験では H 因子に対する機能阻害モノクローナル抗体 (clone: 072) を陽性コントロールとして用い、この 072 抗体を正常人血漿に添加した際に見られる羊赤血球の溶血度を 100% と定義し、患者の溶血度を定量的に算出した。

2. 抗 H 因子抗体解析

Abnova 社の CFH Ab ELISA kit (cat no. KA1477) を用いて測定した。抗体陽性の判定は kit のプロトコルを参考に、正常人検体における平均値 + 3SD より高い値を陽性と判断とした。

遺伝子解析

共同研究先である国立循環器病研究センター研究所 (研究責任者: 宮田敏行) において、aHUS 発症に関連する 6 因子 (CFH, CFI, MCP, C3, CFB, THBD, DGKE) のエクソ

ン領域を Sanger 法で解析するか、東京大学ゲノム医学センターあるいは Gene Nex にて Whole Exome Sequencing (WES) 法にて全エクソンを解析した。

MLPA は MRC-Holland 社製造の Salsa MLPA® kit を用いて PCR をかけた後にフラグメント解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学における臨床研究、疫学研究倫理委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の承認を得ており、大学病院医療情報ネットワーク研究センターにおける UMIN-CTR にも登録済みである。

全国の各医療機関で aHUS 疑い患者が発生した場合は、同院での倫理委員会にて溶血試験・抗体検査・遺伝子検査の審査を行うか、東大病院にて他施設のものも一括審査を行うかのどちらかで審査を通過したのちに、患者より同意書などを取得する手続きをとった。患者の同意を得たうえで採血検体を送付してもらい、解析を実施した。

C. 研究結果

aHUS コホート患者背景

2018 年 12 月末までに集積した臨床的に aHUS と診断された 264 例の中から 184 例の遺伝子解析を実施した(うち、77 例は 1998 年から 2014 年 8 月末の間に奈良県立医科大学輸血部で診断された症例)。成人発症(18 歳以上)が 55%であった。コホート全体における男性の割合は 56%であった。

妊娠は aHUS 発症の 1 つのトリガーであることが報告されているが、当研究班のコホートで妊娠を契機に TMA を発症した症例は 6 例存在していた。その全例で aHUS の

原因と考えられる遺伝子変異が同定された。

蛋白質学的解析結果

当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%)、n=20) や 2 次性 TMA 症例(11.9% (1.6-19.2%)、n=19) に比べ、有意に高い値を示した。

異常因子別に見ると、CFH : 7 例、抗 CFH 抗体陽性:7 例、CFH/CFHR 融合遺伝子:2 例、C3 : 14 例、MCP : 3 例、DGKE : 1 例、変異なし : 15 例であった。

CFH の変異においてホットスポットである C 末領域の変異では全例高度の溶血を示したのに対し、N 末領域の変異 (n=1) では溶血を示さなかった。(図 1) CFH/CFHR 融合遺伝子および抗 CFH 抗体陽性例でも高度の溶血を示した。(図 1) この結果は CFH の融合により CFH の C 末領域に変異が起こること、また抗 CFH 抗体の出現により CFH の C 末領域の機能が阻害されることで矛盾なく説明される。また、C3 変異の多くは溶血試験で高度の溶血を認めなかったが、p. K1105Q という変異のみ CFH 関連異常と同等の溶血亢進を示した。(図 1) 本邦で最多の変異である C3 I1157T 変異は弱陽性になる傾向があったが、今後、検証が必要である。

(図 1)

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 (正常人 : 約 8~15 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。

遺伝学的解析結果

184 例の患者について解析を実施した結果、遺伝子異常の内訳は次に示す通りであった：C3 42 例 (23%)、CFH 16 例 (8.7%)、MCP 12 例 (6.5%)、CFI 4 例 (2.2%)、CFB 2 例 (1.1%)、DGKE 2 例 (1.1%)、THBD 9 例 (4.9%)、抗 CFH 抗体陽性 21 例 (11%) であり異常因子特定率は 61% であった。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 (諸外国における CFH 変異の割合：20-30%、C3 変異の割合：~10%) ことが報告されていたが (Fan X, et al. *Mol Immunol* 54, 238-246, 2013, Yoshida Y, et al. *PLoS One* 10, e0124655, 2015)、いずれも少数例での報告であった。我々の報告 (Fujisawa M, et al. *Clin Exp Nephrol*. 2018 Oct;22(5):1088-1099) 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と言えるが、それをさらにアップデートしてこれまで検出されなかった変異などが検出されたことなどより精度の高いコホートデータになったと考えられる。

本邦好発変異として知られる C3 p. I1157T は遺伝子検査を行った症例のなかで 42 例と最も多い変異であり、三重・奈良を中心とする関西地域に集簇するが、それ以外の地域の症例においてもこの変異が認められた。また C3 I1157T 以外には CFI の変異が 4 例認められ、その変異はすべて R201S の変異であった。そのうち 1 例は CFI の変異に加え、CFH の変異と抗 CFH 抗体が

検出されている複合変異症例であるが、残りの 3 例は CFI 単独変異であった。現時点ではこの変異が病的かどうかの判断はできていないが、R201S は日本特有の変異であることが示唆されており、近傍のアミノ酸変異 R202I、T203I が aHUS の病的変異であることが報告されていることから病的である可能性は十分にあると考えられる。

CFH の変異は多彩でありこれまでに F176L, R232Q, H651Y, L697F, D798N, V837I, W1058H, V1060L, I1115M, S1191L, E1198D, E1198V, R1215G, R1215Q が変異として同定されたが、既報にないあるいは病的変異かはっきりしない変異も多く認められ、病的変異かどうかの判断をどのように行っていくかが今後の課題である。

妊娠関連の aHUS/HELLP 症候群の症例は 6 例が集積しており、そのうち 5 例は分娩直後の発症であり、残りの 1 例は妊娠 9 週での発症であった。6 例全例で補体関連因子の遺伝子異常が認められた。その変異に同一のものはなく (CFH R1215G, CFB K533R, C3 V555I, C3 S562L, CFI R201S, MCP S13F)、またこれらの変異は妊娠関連 aHUS に特異的な変異ではなかった。この 6 例はフォローアップの結果、妊娠・分娩時以外では aHUS を再発しておらず、1 例のみその後の妊娠・分娩が確認されたがその時の再燃は認められなかった。また非分娩関連 aHUS (通常の aHUS) 症例では周産期に aHUS を再発していない可能性も示唆されており、妊娠関連あるいは分娩直後に発症する aHUS (pregnancy associated / postpartum aHUS) の発症機序や臨床経過の特徴を同定された遺伝子変異および WES の補体関連因子以外の遺伝子異常の情報を組み合わせることで解明する

ことが今後の課題となった。

補体関連因子に一塩基遺伝子変異あるいは短い変異を認めなかった症例のうち①抗 CFH 抗体陽性例、②溶血試験陽性例、③WES にてリード数に不自然な偏りがある症例に対して multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) によって CFH および CFHR 領域の copy number variant を調査すると 12 例中 3 例で copy number の異常が認められた。当該領域に対して long PCR および direct Sanger sequencing を施行することで break point を含めた遺伝子の構造変化を明確にした。3 例のうち 2 例は CFH/CFHR1 の融合遺伝子であり、CFH の C 末部分に CFHR1 の C 末の遺伝子が融合することで CFH の機能の異常（低下）が想定され、これが aHUS の発症につながるものと考えられた。もうひとつの構造異常は CFH の広範な欠失および CFHR4-2-5 の広範な欠損であり、これは新規の構造多型異常であった。これについては今後、詳細な解析を行う予定である。

aHUS の凝固プロファイルの検討

我々のコホートの症例（aHUS 15 例、二次性 TMA 20 例、正常コントロール 15 例）で凝固系プロファイルについて解析した結果、aHUS 群では有意に凝固系亢進マーカー（PT ratio, APTT, FDP, FMC, PIC）は上昇していた。しかし二次性 TMA 群でも同様に上昇しており、両群での比較では有意差を認めなかった。また DIC 基準を満たす症例は aHUS 群では 20% に留まり、aHUS において DIC 基準を満たす症例は少ないことが示された。二次性 TMA 群でも 25% であり、DIC 基準を満たす症例数にほぼ差は認めら

れなかった。本研究から DIC は aHUS の除外診断にはならないことも示された。

Eculizumab の小児における有効性と安全性

有効性解析対象の aHUS 患者 27 名のエクリズマブ投与開始時の年齢（中央値）は 4 歳、診断から投与開始までの期間（中央値）は 2 日間であった。TMA イベント・フリー、TMA の完全寛解、血小板数の正常化、eGFR の改善はそれぞれ、85.2% (23/27), 36.4% (8/22), 78.3% (18/23), 75.0% (9/12) の患者で達成された。

血小板数、LDH 値、eGFR の改善は、投与開始 1 か月以内に観察された。報告された副作用は、24 件/aHUS 患者 31 名、10 件/二次性 TMA 患者 17 名であった。

本中間解析によって、実臨床において小児 aHUS 患者に対するエクリズマブの安全性と有効性が確認された。

Eculizumab の成人における有効性と安全性

有効性解析対象の aHUS 患者 29 名のエクリズマブ投与開始時の年齢（中央値）は 58 歳、診断から投与開始までの期間（中央値）は 22.5 日間であった。TMA イベント・フリー、TMA の完全寛解、血小板数の正常化、eGFR の改善はそれぞれ、68% (19/28), 28% (5/18), 57% (13/23), 15% (4/26) (Cre 25%以上では 16/28 (57%)) 低下の患者で達成された。

血小板数、LDH 値の改善は投与 1 週間で観察されたが、腎機能の改善は投与開始 1 ヶ月後程度で観察された。

報告された副作用は、aHUS 患者で 33 件

/33例、高度な副作用は10件/33例であった。

本中間解析によって、実臨床において成人 aHUS 患者に対するエクリズマブの安全性と有効性が確認された。

解析期間中に髄膜炎菌感染症が無かったが、引き続き注意が必要である。

D. 考察

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。検査の面に関しては、溶血試験の有用性が明らかになりつつあることから、より正確な診断につながる事が期待される。

Eculizumab の有効性と安全性に関する検討では今回の本邦における臨床実績調査から小児・成人とも血液データの改善は比較的速やかにもたらされ、また有効性は大きいと考えられたが、その半面で特に成人において腎機能改善効果は海外の先行するデータには及ばないと考えられた。診断されてから Eculizumab 投与までの時間に大きな差があるが、これが腎機能改善効果が減弱する要因になりうると思われる。また Eculizumab 不応性の C5 変異がどのくらい認められたか明確にされていないが、この変異による影響も考えられる。

安全性については本調査内では小児・成人ともに髄膜炎菌感染を含む大きな副作用は認められなかった。しかし世界的に髄

膜炎菌感染による死亡事例が相次いで報告されており、今後も安全性における調査を継続していく必要があると考えられた。

E. 結論

本研究班での aHUS 解析活動を通して、本邦における aHUS 患者の独自の疾患背景が明らかにされつつある。今後も引き続き、各々の原因因子ごとの解析を推し進め、どういった症例にどのような治療が必要か、という点を明らかにしていく必要がある。本邦において Eculizumab は安全に臨床使用でき、また aHUS 発症後に一定の治療効果があることが示された。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. Clin Exp Nephrol. 22:1088-1099, 2018
2. Yoshida Y, Kato H, Ikeda Y, Nangaku M. Pathogenesis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. J Atheroscler Thromb. 26: 99-110,

- 2019
3. Ikeda Y, Yoshida Y, Sugawara Y, Nangaku M. Geographic Diversity in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS): The Genetic Background of aHUS Cohort in Japan. *Rare Dis Res Treat.* (2018) 3(3): 1-3
 4. Yamamura T, Nozu K, Ueda H, Fujimaru R, Hisatomi R, Yoshida Y, Kato H, Nangaku M, Miyata T, Sawai T, Minamikawa S, Kaito H, Matsuo M, Iijima K. Functional splicing analysis in an infantile case of atypical hemolytic uremic syndrome caused by digenic mutations in C3 and MCP genes. *J Hum Genet.* 63: 755-759, 2018
 5. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. *Clin Exp Nephrol.* 22:979-980, 2018
 6. Matsumoto T, Toyoda H, Amano K, Hirayama M, Ishikawa E, Fujimoto M, Ito M, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Kawamura N, Ikejiri M, Kawakami K, Miyata T, Wada H. Clinical Manifestation of Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the C3 p.I1157T Variation in the Kinki Region of Japan. *Clin Appl Thromb Hemost.* 24: 1301-1307, 2018
 7. Ito S, Hidaka Y, Inoue N, Kaname S, Kato H, Matsumoto M, Miyakawa Y, Mizuno M, Okada H, Shimono A, Matsuda T, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Kagami S. Safety and effectiveness of eculizumab for pediatric patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clin Exp Nephrol*, 23: 112-121, 2019
 8. Kato H, Miyakawa Y, Hidaka Y, Inoue N, Ito S, Kagami S, Kaname S, Matsumoto M, Mizuno M, Matsuda T, Shimono A, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Okada H. Safety and effectiveness of eculizumab for adult patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clin Exp Nephrol.* 23:65-75, 2019
 9. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. *Clin Exp Nephrol.* 22:979-980, 2018
- (和文)
1. 川端千晶, 池田洋一郎. 非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断. *血液内科* 78 (2) : 234-238, 2019
 2. 池田洋一郎. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) . *日本血栓止血学会誌* 30 (1) : 164-167, 2019
 3. 吉田瑤子, 南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態と臨床検査. *炎症と免疫* 27, 41-17, 2019
 4. 吉田瑤子, 加藤秀樹, 菅原有佳, 南学

- 正臣. フォンヴィレブランド因子. 腎と透析ベッドサイド検査辞典 84 増刊号, 226-228, 2018
5. 吉田瑤子, 加藤秀樹, 菅原有佳, 南学正臣. 補体関連非典型溶血性尿毒症症候群. 腎と透析 84, 603-608, 2018
3. 香美祥二. ランチョンセミナー: aHUSの診断と治療、第53回小児腎臓病学会、2018年6月、福島市
4. 香美祥二. 教育講演: Atypical HUSの診断と治療、第35回中国四国小児腎臓病学会、2018年11月、高知市

2. 学会発表

1. 芦田 明. 血栓性微血管症. 第39回日本アフェレシス学会シンポジウム9「小児重症疾患治療におけるアフェレシス治療の位置づけ」、2018年10月、倉敷
2. 加藤秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群. 第55回日本補体学会学術集会 シンポジウム「補体を標的とする治療の現状

3. その他

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特になし。

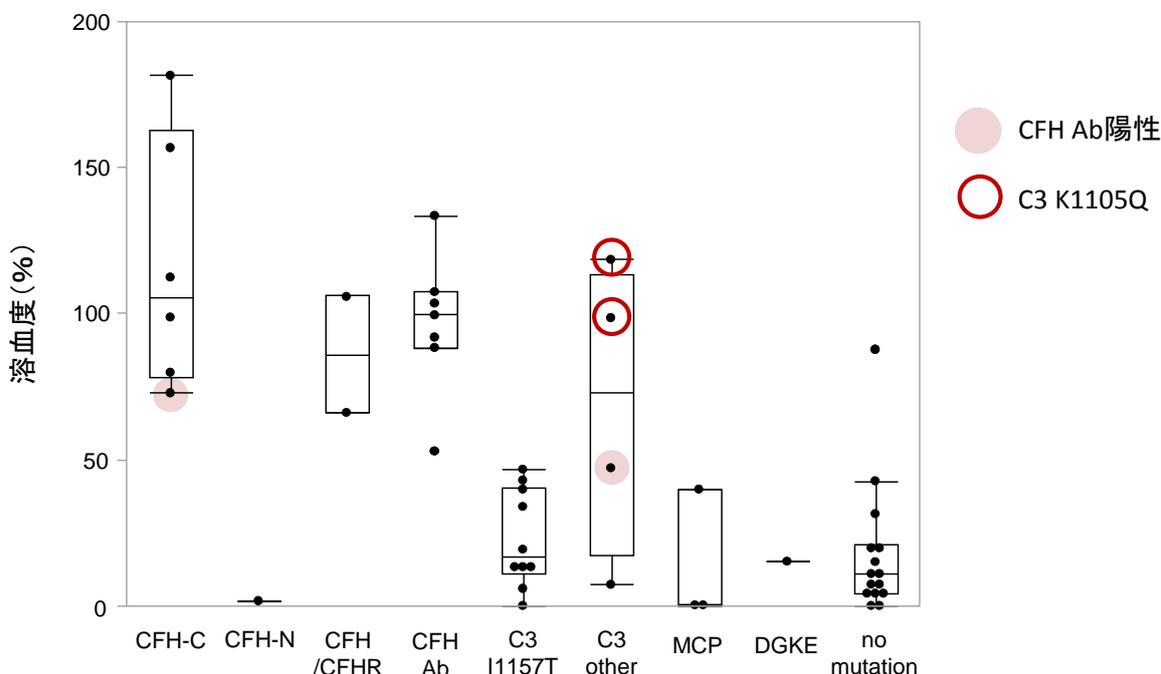


図1 変異別に見たaHUS患者の溶血試験における溶血度

CFH-C: CFHのC末領域における遺伝子変異、CFH-N: CFHのN末領域における遺伝子変異
CFH/CFHR: CFHとCFHRの融合遺伝子異常、C3 other: C3 I1157T以外の遺伝子変異

本邦における非典型溶血性尿毒症症候群患者の疫学的・遺伝的背景の解析

研究分担者	南学正臣	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	教授
研究協力者	藤村吉博	日本赤十字社近畿ブロック血液センター		所長
研究協力者	宮田敏行	国立循環器病研究センター	脳血管外科	シニア研究員
	丸山彰一	名古屋大学	腎臓内科	教授
	池田洋一郎	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	助教

研究要旨

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。2017年（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。

1998年から2018年12月末までに集積した臨床的aHUS患者264例の中から184例の遺伝子解析を実施した（うち77例は奈良県立医大の症例）。昨年までの報告同様に、本邦の遺伝的背景はC3 I1157T変異が多いという特徴は一貫していたが、それ以外にCFIの変異は4例のみと少ないながらも全例でR201Sという同一の変異であることがわかった。CFHの変異は多彩であり新規変異も複数検出された。また妊娠関連のaHUS/HELLP症候群の症例は6例集積し、そのうち5例は分娩直後の発症であった。6例全例で補体関連因子の遺伝子異常が認められた。同定された遺伝子異常がaHUSの発症にどの程度影響を及ぼすか今後検討課題である。

溶血試験においてCFHのC末領域の変異、抗CFH抗体陽性例、CFH/CFHRの遺伝子融合およびC3の変異の一部において高度の溶血が認められることがわかった。

Sanger法あるいはWES法にて補体関連因子に変異が見つからなかったaHUS症例においてMLPA（Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification）を実施したところ、一部にCFH-CFHRの融合遺伝子が検出された。これらは病的変異と考えられ、今後のaHUSの診断におけるMLPAの重要性を示した。

aHUS患者の凝固系プロファイルの検討したところ、健常コントロールに比べてPT ratio, APTT, FDP, FMC, PICは有意に上昇していたが、これらは二次性TMA群でも上昇しており両者を鑑別することはできないと結論づけられた。またaHUSではDIC基準を満たすものは20%程度に留まり、高度なDIC所見を伴うことは稀であることがわかった。今後も引き続き病態解明・疫学調査に努め、本邦の疾患背景を考慮した独自のガイドライン策定に向け研究を継続する。

A. 研究目的

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) は血栓性微小血管症 (TMA) を惹起する疾患であり、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ことが分かってきた。ただしそれらの遺伝子に変異が通常の遺伝子検査で検出されない症例も約 40% は存在しており、これらの症例が aHUS なのかどうか鑑別することが大きな問題となっていた。また aHUS は臨床的には二次性 TMA と鑑別が時として困難であり、これらを容易に鑑別する方法が必要とされていた。

当研究班は aHUS 診断のための体系的な検査体制を構築しており、本邦最大の aHUS 患者コホートを有する唯一の組織である。集積患者数は日本国内における推定 aHUS 患者の約 8 割を占めることから、当研究班の解析データは、本邦における aHUS の疾患背景を反映すると言っても過言ではない。これまでのコホート情報に新規の aHUS 症例を累積していき、より質の高いデータを構築する必要があった。

B. 研究方法

疫学調査

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科において臨床所見、検査所見、薬剤使用状況などを記載する質問票と家系図を作成、これらの書式を各解析依頼施設の主治医に送付し、データの集積を行った。凝固系プロフィールについては急性期の症例でデータが収集できた症例のみの解析とした。

蛋白質学的解析

1. 羊赤血球溶血試験

奈良県立医科大学輸血部で樹立した手法を用い (Yoshida Y, et al. *PLoS One* 10, e0124655, 2015)、羊赤血球と患者の血漿を混合、37°C で 30 分間反応させた後に羊赤血球の溶血度を算出した。なお、本試験では H 因子に対する機能阻害モノクローナル抗体 (clone: 072) を陽性コントロールとして用い、この 072 抗体を正常人血漿に添加した際に見られる羊赤血球の溶血度を 100% と定義し、患者の溶血度を定量的に算出した。

2. 抗 H 因子抗体解析

Abnova 社の CFH Ab ELISA kit (cat no. KA1477) を用いて測定した。抗体陽性の判定は kit のプロトコルを参考に、正常人検体における平均値 + 3SD より高い値を陽性と判断とした。

遺伝子解析

共同研究先である国立循環器病研究センター研究所 (研究責任者: 宮田敏行) において、aHUS 発症に関連する 6 因子 (*CFH*, *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFB*, *THBD*, *DGKE*) のエクソン領域を Sanger 法で解析するか、東京大学ゲノム医学センターあるいは Gene Nex にて Whole Exome Sequencing (WES) 法にて全エクソンを解析した。

MLPA は MRC-Holland 社製造の Salsa MLPA® kit を用いて PCR をかけた後にフラグメント解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京大学における臨床研究、

疫学研究倫理委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の承認を得ており、大学病院医療情報ネットワーク研究センターにおける UMIN-CTR にも登録済みである。

全国の各医療機関で aHUS 疑い患者が発生した場合は、同院での倫理委員会にて溶血試験・抗体検査・遺伝子検査の審査を行うか、東大病院にて他施設のものも一括審査を行うかのどちらかで審査を通過したのちに、患者より同意書などを取得する手続きをとった。患者の同意を得たうえで採血検体を送付してもらい、解析を実施した。

C. 研究結果

aHUS コホート患者背景

2018 年 12 月末までに集積した臨床的に aHUS と診断された 264 例の中から 184 例の遺伝子解析を実施した（うち、77 例は 1998 年から 2014 年 8 月末の間に奈良県立医科大学輸血部で診断された症例）。成人発症（18 歳以上）が 55%であった。コホート全体における男性の割合は 56%であった。

妊娠は aHUS 発症の 1 つのトリガーであることが報告されているが、当研究班のコホートで妊娠を契機に TMA を発症した症例は 6 例存在していた。その全例で aHUS の原因と考えられる遺伝子変異が同定された。

蛋白質学的解析結果

当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%），n=20）や 2 次性 TMA 症例（11.9%（1.6-19.2%），n=19）に比べ、

有意に高い値を示した。

異常因子別に見ると、CFH : 7 例、抗 CFH 抗体陽性 : 7 例、CFH/CFHR 融合遺伝子 : 2 例、C3 : 14 例、MCP : 3 例、DGKE : 1 例、変異なし : 15 例であった。

CFH の変異においてホットスポットである C 末領域の変異では全例高度の溶血を示したのに対し、N 末領域の変異（n=1）では溶血を示さなかった。CFH/CFHR 融合遺伝子および抗 CFH 抗体陽性例でも高度の溶血を示した。この結果は CFH の融合により CFH の C 末領域に変異が起ること、また抗 CFH 抗体の出現により CFH の C 末領域の機能が阻害されることで矛盾なく説明される。また、C3 変異の多くは溶血試験で高度の溶血を認めなかったが、p. K1105Q という変異のみ CFH 関連異常と同等の溶血亢進を示した。本邦で最多の変異である C3 I1157T 変異は弱陽性になる傾向があったが、今後、検証が必要である。

遺伝学的解析結果

184 例の患者について解析を実施した結果、遺伝子異常の内訳は次に示す通りであった：C3 42 例（23%）、CFH 16 例（8.7%）、MCP 12 例（6.5%）、CFI 4 例（2.2%）、CFB 2 例（1.1%）、DGKE 2 例（1.1%）THBD 9 例（4.9%）、抗 CFH 抗体陽性 21 例（14%）であり異常因子特定率は 61%であった。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（諸外国における CFH 変異の割合：20-30%、C3 変異の割合：~10%）ことが報告されていたが（Fan X, et al. *Mol Immunol* 54, 238-246, 2013, Yoshida Y, et al. *PLoS One* 10, e0124655, 2015）、いずれも

少数例での報告であった。我々の報告 (Fujisawa M, et al. *Clin Exp Nephrol.* 2018 Oct;22(5):1088-1099) 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と言えるが、それをさらにアップデートしてこれまで検出されなかった変異などが検出されたことなどより精度の高いコホートデータになったと考えられる。

本邦好発変異として知られる C3 p. I1157T は遺伝子検査を行った症例のなかで42例と最も多い変異であり、三重・奈良を中心とする関西地域に集簇するが、それ以外の地域の症例においてもこの変異が認められた。また C3 I1157T 以外には CFI の変異が4例認められ、その変異はすべて R201S の変異であった。そのうち1例は CFI の変異に加え、CFH の変異と抗 CFH 抗体が検出されている複合変異症例であるが、残りの3例は CFI 単独変異であった。現時点ではこの変異が病的かどうかの判断はできていないが、R201S は日本特有の変異であることが示唆されており、近傍のアミノ酸変異 R202I、T203I が aHUS の病的変異であることが報告されていることから病的である可能性は十分にあると考えられる。

CFH の変異は多彩でありこれまでに F176L, R232Q, H651Y, L697F, D798N, V837I, W1058H, V1060L, I1115M, S1191L, E1198D, E1198V, R1215G, R1215Q が変異として同定されたが、既報にないあるいは病的変異かはっきりしない変異も多く認められ、病的変異かどうかの判断をどのように行っていくかが今後の課題である。

妊娠関連の aHUS/HELLP 症候群の症例は6例が集積しており、そのうち5例は分娩

直後の発症であり、残りの1例は妊娠9週での発症であった。6例全例で補体関連因子の遺伝子異常が認められた。その変異に同一のものではなく (CFH R1215G, CFB K533R, C3 V555I, C3 S562L, CFI R201S, MCP S13F)、またこれらの変異は妊娠関連 aHUS に特異的な変異ではなかった。この6例はフォローアップの結果、妊娠・分娩時以外では aHUS を再発しておらず、1例のみその後の妊娠・分娩が確認されたがその時の再燃は認められなかった。また非分娩関連 aHUS (通常の aHUS) 症例では周産期に aHUS を再発していない可能性も示唆されており、妊娠関連あるいは分娩直後に発症する aHUS (pregnancy associated / postpartum aHUS) の発症機序や臨床経過の特徴を同定された遺伝子変異および WES の補体関連因子以外の遺伝子異常の情報を組み合わせることで解明することが今後の課題となった。

補体関連因子に一塩基遺伝子変異あるいは短い変異を認めなかった症例のうち①抗 CFH 抗体陽性例、②溶血試験陽性例、③WES にてリード数に不自然な偏りがある症例に対して multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) によって CFH および CFHR 領域の copy number variant を調査すると12例中3例で copy number の異常が認められた。当該領域に対して long PCR および direct Sanger sequencing を施行することで break point を含めた遺伝子の構造変化を明確にした。3例のうち2例は CFH/CFHR1 の融合遺伝子であり、CFH の C 末部分に CFHR1 の C 末の遺伝子が融合することで CFH の機能の異常 (低下) が想定され、これが aHUS の発症につながるものと考えられた。もうひとつの構造異常は

CFH の広範な欠失および CFHR4-2-5 の広範な欠損であり、これは新規の構造多型異常であった。これについては今後、詳細な解析を行う予定である。

aHUS の凝固プロファイルの検討

我々のコホートの症例 (aHUS 15 例、二次性 TMA 20 例、正常コントロール 15 例) で凝固系プロファイルについて解析した結果、aHUS 群では有意に凝固系亢進マーカー (PT ratio, APTT, FDP, FMC, PIC) は上昇していた。しかし二次性 TMA 群でも同様に上昇しており、両群での比較では有意差を認めなかった。また DIC 基準を満たす症例は aHUS 群では 20% に留まり、aHUS において DIC 基準を満たす症例は少ないことが示された。二次性 TMA 群でも 25% であり、DIC 基準を満たす症例数にはほぼ差は認められなかった。本研究から DIC は aHUS の除外診断にはならないことも示された。

D. 考察

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。検査の面に関しては、溶血試験の有用性が明らかになりつつあることから、より正確な診断につながることを期待される。

E. 結論

本研究班での aHUS 解析活動を通して、本

邦における aHUS 患者の独自の疾患背景が明らかにされつつある。今後も引き続き、各々の原因因子ごとの解析を推し進め、どういった症例にどのような治療が必要か、という点を明らかにしていく必要がある。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. Clin Exp Nephrol. 22:1088-1099, 2018
2. Yoshida Y, Kato H, Ikeda Y, Nangaku M. Pathogenesis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. J Atheroscler Thromb. 26: 99-110, 2019
3. Ikeda Y, Yoshida Y, Sugawara Y, Nangaku M. Geographic Diversity in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome (aHUS): The Genetic Background of aHUS Cohort in Japan. Rare Dis Res Treat. (2018) 3(3): 1-3
4. Yamamura T, Nozu K, Ueda H, Fujimaru R, Hisatomi R, Yoshida Y, Kato H,

- Nangaku M, Miyata T, Sawai T, Minamikawa S, Kaito H, Matsuo M, Iijima K. Functional splicing analysis in an infantile case of atypical hemolytic uremic syndrome caused by digenic mutations in C3 and MCP genes. J Hum Genet. 63: 755-759, 2018
5. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. Clin Exp Nephrol. 22:979-980, 2018
 6. Matsumoto T, Toyoda H, Amano K, Hirayama M, Ishikawa E, Fujimoto M, Ito M, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Kawamura N, Ikejiri M, Kawakami K, Miyata T, Wada H. Clinical Manifestation of Patients With Atypical Hemolytic Uremic Syndrome With the C3 p.I1157T Variation in the Kinki Region of Japan. Clin Appl Thromb Hemost. 24: 1301-1307, 2018
2. 池田洋一郎. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS). 日本血栓止血学会誌 30 (1) : 164-167, 2019
 3. 吉田瑤子, 南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の病態と臨床検査. 炎症と免疫 27, 17-41, 2019
 4. 吉田瑤子, 加藤秀樹, 菅原有佳, 南学正臣. フォンヴィレブランド因子. 腎と透析ベッドサイド検査辞典 84 増刊号, 226-228, 2018
 5. 吉田瑤子, 加藤秀樹, 菅原有佳, 南学正臣. 補体関連非典型溶血性尿毒症症候群. 腎と透析 84, 603-608, 2018
2. **学会発表**
特になし
 3. **その他**
特になし
- H. **知的財産権の出願・登録状況**
(予定を含む)
特になし。

(和文)

1. 川端千晶, 池田洋一郎. 非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断. 血液内科 78 (2) : 234-238, 2019

本邦における小児および成人の非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)に対する Eculizumab の有効性と安全性の検証

研究分担者	香美祥二	徳島大学	小児科	教授
研究協力者	伊藤秀一	横浜市立大学	小児科	教授
	芦田 明	大阪医科大学	小児科	講師
	加藤秀樹	東京大学医学部	社会連携講座 糖尿病・生活習慣病予防講座	講師

研究要旨

aHUS は 100 万人に 2-3 人発症する予後不良の希少疾病である。近年、aHUS が補体第二経路に関わる補体関連因子の異常により発症する TMA であることが判明し、抗 C5 抗体療法が保健収載され優れた治療成果も報告されている。2016 年、本邦における aHUS 診療の向上のために、aHUS 診療ガイド 2015 (日本腎臓学会/日本小児科学会合同委員会編) を発表した。

本研究では 2013 年より治療薬として承認された Eculizumab の長期治療の有効性と安全性を確認するために小児と成人、それぞれにわけて市販後調査を行った。

A. 研究目的

現在、aHUS の治療法としては血漿療法(血漿交換あるいは血漿輸注)と Eculizumab の選択肢があるが、Eculizumab は 2013 年に本邦にて保険適応で臨床使用できることとなってから本邦における長期治療による有効性と安全性が明確に示されていなかった。今回、Eculizumab 市販後調査の臨床使用実績を小児と成人に分けて検討した。

B. 研究方法

2013 年 9 月から 2017 年 3 月 15 日までの間に、aHUS 診療ガイドに基づき臨床的に aHUS または二次性 TMA と診断され、エクリズマブを投与された 18 歳未満の小児および 18 歳以上の成人の登録患者を対象とした。TMA イベント・フリー、TMA の完全寛解、血小板数の正常化、eGFR 改善を有効性の評

価項目とした。全登録症例に関し、エクリズマブ投与期間中の副作用を集計した。

C. 研究結果

Eculizumab の小児における有効性と安全性

有効性解析対象の aHUS 患者 27 名のエクリズマブ投与開始時の年齢(中央値)は 4 歳、診断から投与開始までの期間(中央値)は 2 日間であった。TMA イベント・フリー、TMA の完全寛解、血小板数の正常化、eGFR の改善はそれぞれ、85.2% (23/27)、36.4% (8/22)、78.3% (18/23)、75.0% (9/12) の患者で達成された。

血小板数、LDH 値、eGFR の改善は、投与開始 1 か月以内に観察された。報告された副作用は、24 件/aHUS 患者 31 名、10 件/二次性 TMA 患者 17 名であった。

本中間解析によって、実臨床において小

児 aHUS 患者に対するエクリズマブの安全性と有効性が確認された。

Eculizumab の成人における有効性と安全性

有効性解析対象の aHUS 患者 29 名のエクリズマブ投与開始時の年齢（中央値）は 58 歳、診断から投与開始までの期間（中央値）は 22.5 日間であった。TMA イベント・フリー、TMA の完全寛解、血小板数の正常化、eGFR の改善はそれぞれ、68%(19/28)、28%(5/18)、57%(13/23)、15%(4/26) (Cre 25% 以上では 16/28 (57%)) 低下の患者で達成された。

血小板数、LDH 値の改善は投与 1 週間で観察されたが、腎機能の改善は投与開始 1 ヶ月後程度で観察された。

報告された副作用は、aHUS 患者で 33 件/33 例、高度な副作用は 10 件/33 例であった。

本中間解析によって、実臨床において成人 aHUS 患者に対するエクリズマブの安全性と有効性が確認された。

解析期間中に髄膜炎菌感染症が無かったが、引き続き注意が必要である。

D. 考察

今回の本邦における臨床実績調査からは小児・成人とも血液データの改善は比較的速やかにもたらされ、また有効性は大きいと考えられたが、その半面で特に成人において腎機能改善効果は海外の先行するデータには及ばないと考えられた。本邦における海外との遺伝的背景の相違はあるものの、本邦の変異は予後が良好の変異が多いため Eculizumab の反応が悪化する理由に

はならないと考えられる。診断されてから Eculizumab 投与までの時間に大きな差があるが、これが腎機能改善効果が減弱する要因になりうると思われる。また Eculizumab 不応性の C5 変異がどのくらい認められたか明確にされていないが、この変異による影響も考えられる。

安全性については本調査内では小児・成人ともに髄膜炎菌感染を含む大きな副作用は認められなかった。しかし世界的に髄膜炎菌感染による死亡事例が相次いで報告されており、今後も安全性における調査を継続していく必要があると考えられた。

E. 結論

本邦において Eculizumab は安全に臨床使用でき、また aHUS 発症後に一定の治療効果があることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(英文)

1. Ito S, Hidaka Y, Inoue N, Kaname S, Kato H, Matsumoto M, Miyakawa Y, Mizuno M, Okada H, Shimono A, Matsuda T, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Kagami S. Safety and effectiveness of eculizumab for pediatric patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. Clin Exp Nephrol, 23: 112-121, 2019

2. Kato H, Miyakawa Y, Hidaka Y, Inoue N, Ito S, Kagami S, Kaname S, Matsumoto M, Mizuno M, Matsuda T, Shimono A, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Okada H. Safety and effectiveness of eculizumab for adult patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. Clin Exp Nephrol. 23:65-75, 2019
3. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. Clin Exp Nephrol. 22:979-980, 2018

2. 学会発表

1. 芦田 明. 血栓性微小血管症. 第39回日本アフェレシス学会シンポジウム9「小児重症疾患治療におけるアフェレシス治療の位置づけ」、2018年10月、倉敷

2. 加藤 秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群. 第55回日本補体学会学術集会 シンポジウム「補体を標的とする治療の現状と展望」、2018年8月、北九州
3. 香美 祥二. ランチョンセミナー：aHUSの診断と治療、第53回小児腎臓病学会、2018年6月、福島市
4. 香美 祥二. 教育講演：Atypical HUSの診断と治療、第35回中国四国小児腎臓病学会、2018年11月、高知市

3. その他

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特になし。

特発性血栓症 サブグループ研究報告

グループリーダー：森下英理子 金沢大学 教授

研究分担者：小嶋哲人 名古屋大学 教授

小林隆夫 浜松医療センター 名誉院長

津田博子 中村学園大学 教授

大賀正一 九州大学 教授

研究協力者：坂田洋一 自治医科大学 名誉教授

宮田敏行 国立循環器病研究センター シニア研究員

根木玲子 国立循環器病研究センター 室長

辻 明宏 国立循環器病研究センター 医員

横山健次 東海大学 教授 / 和田英夫 三重大学 准教授

尾島俊之 浜松医科大学 教授 / 杉浦和子 名古屋市立大学 講師

榛沢和彦 新潟大学 特任教授 / 中村真潮 なかむら内科 院長

グループ総括

研究分担者：森下英理子

研究要旨

特発性血栓症サブグループは、静脈血栓塞栓症を対象とし、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ラインの作成を通して、特発性血栓症の予知・予防の対策確立を目的としている。平成29年4月から指定難病「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因による）」として医療助成が開始されたが、以後診療ガイドライン策定に向けて、個別研究として、Arg596以外のトロンビンNa⁺結合領域ミスセンス変異のAT抵抗性（ATR）解析（小嶋ら）、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（小林ら）、遺伝性血栓性素因の人種差および血中PS活性測定のpreanalytical variablesに関する研究（津田ら）、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（大賀ら）、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（森下ら）、を行った。

今年度の研究成果を元に、今後は成人血栓症例の全国実態調査の計画や、蓄積された症例のデータや欧米の論文報告や指針などを参考にして、ガイドライン策定に向けての準備を開始したい。また、新生児・小児血栓症を早期に診断し、適切な急性期治療と長期治療管理の方針を確立するために、全国の解析ネットワークを拡充、血栓傾向を正確に評価するための凝固機能測定法の確立、また有効な抗凝固療法、補充療法の検討、更には肝細胞移植療法などを含めた新規根治療法の開発に向けた取り組みを行いたい。

A. 研究目的

特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症（VTE）のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診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。

特発性血栓症は、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。平成29年4月より、厚労省の指定難病に「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）」として認定されたばかりである。したがって、全国の症例数や実態は十分に把握しきれていない。

本研究班の最終的な研究課題として、(a) 「う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。

B. 研究方法

個別研究として、以下の研究を行った。

1. Arg596 以外のトロンビン Na⁺結合領域ミスマッチ変異の AT 抵抗性 (ATR) 解析 (小嶋ら)

ATR 症例では、変異プロトロンビンから生じた異常トロンビンが AT による不活化に抵抗性をもつため静脈血栓リスクとなり、これまで Yukuhashi 変異 (Arg596Leu)、Belgrade 変異 (Arg596Gln)、および Padua 2 変異 (Arg596Trp) が血栓症リスクとして報告されている。今回、Arg596 以外での ATR 変異候補探索のため Na⁺結合領域 (Thr540、Arg541、Glu592、および Lys599) での単一ヌクレオチド置換変異体の凝固活性特性を調べた。

2. 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 (小林ら)

3. 遺伝性血栓性素因の人種差および血中 PS 活性測定の preanalytical variables に関する研究 (津田ら)

ブラジルの University Federal de Minas Gerais の Prof. Luci Dusse、Prof. Maria Carvalho との国際共同研究を実施し、VTE 患者 154 名、健常人 301 名の gDNA 検体を用いて、PS Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del の遺伝子多型について解析した。

また、クエン酸加血漿などの Ca²⁺非存在下では、PS はトロンビンによって切断されて失活する可能性が高い。そこで、ウサギ抗ヒト PS ポリクローナル抗体を用いた Western blotting 法にて、クエン酸加血漿を保存中の PS 分子の切断について検討した。さらに、total PS 活性と total PS 抗原量を測定し

た。

4. 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 (大賀ら)

公益財団法人かずさ DNA 研究所の協力で、PC と PS 遺伝子 (*PROC*、*PROSI*) を含む遺伝子解析パネルを作成した。また、全国の周産期母子医療センターと新生児・小児診療施設に一次調査票を送付し、新生児血栓症の診療実績について調査した。

5. 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 (森下ら)

先天性 AT、PC、PS 欠乏症が疑われ遺伝子解析を施行した発端者およびその家系員、228 家系 327 症例 (AT : 52 家系 85 症例、PC : 76 家系 118 症例、PS : 100 家系 124 症例) を対象として、phenotype と genotype について検討した。また、昨年度新規として同定された I 型欠乏症 5 症例の AT 遺伝子変異部位を有する遺伝子組換え蛋白を作成し、その変異が AT 欠乏症をもたらす機序について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「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

1. Arg596 以外のトロンビン Na⁺結合領域ミ

スセンス変異の ATR 解析 (小嶋ら)

野生型の AT による 30 分不活性化後の相対残存トロンビン活性 (RRTA) (30' RRTA) は 5.1% で、Yukhashi および Belgrade 変異体の 30' RRTA は、それぞれ 90.9% および 88.7% であった。Lys599 および Thr540 での全変異体、Glu592 のほとんどの変異体も高度の ATR を示し、Glu592Val は全て中程度の ATR を示した。また、Arg541 の変異体は全て軽度の ATR を示した。各変異体の残存凝固活性 (RCA) を評価したところ、AT 不活性化後 30 分の RCA (30' RCA) $[30' RCA = (\text{凝固一段法活性}) \times (30' RRTA)]$ を野生型の 30' RCA で補正した「RCA スコア」は、変異体 Lys599Arg (5.35) および Glu592Gln (4.71) では Yukhashi 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を示す可能性のあることが判明した。

2. 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 (小林ら)

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ため調査結果はまだ得られていないが、アンケート調査項目を下記のように作成した。

<一次調査票 (別紙回答用紙 No. 1、別紙回答用紙 No. 2) >

問 1. 調査対象施設の過去 5 年間 (2014 年～2018 年) の分娩件数

問 2. 2014 年 1 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日までの 5 年間における妊娠・分娩のうち、遺伝性血栓性素因の合併症例の有無

問 3. 年度別の血栓性素因別症例数

問 4. 各施設における診断方法

問 5. 各施設における基本的な管理方法

なお、遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩を経験した施設においては、同時に二次調査も行う。

<二次調査票 (別紙回答用紙 No. 3) >

No. 1: 先天性血栓性素因の種類、診断方法、血栓症家族歴、既往妊娠分娩歴

No. 2: 今回の妊娠分娩歴、妊娠中の管理方法、分娩時の管理方法

No. 3: 分娩後の管理方法、母体転帰、新生児転帰

この調査結果は次年度に報告する予定である。

3. 遺伝性血栓性素因の人種差および血中 PS 活性測定の preanalytical variables に関する研究 (津田ら)

ブラジル人 VTE 患者ならびに健常人を対象とした遺伝子多型解析の結果、PS Tokushima、PC p. Arg189Trp、PC p. Lys193del のいずれも同定しなかった。

また、クエン酸加血漿を 4°C 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。

4. 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 (大賀ら)

新生児血栓症の未診断例で、PC と PS 遺伝子 (PROC、PROSI) を含む遺伝子解析パネルの検定を行った。また、全国の周産期母子医療センターと新生児・小児診療施設を対象に一

次調査を行い、血栓症の疫学を調査した。

5. 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 (森下ら)

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等が明らかとなった。遺伝子変異同定率は AT 欠乏症が約 9 割と高く、遺伝子解析は確定診断の手法として有用である。新規の変異として、AT 欠乏症では 3 変異： c. 546delA (p. Lys182Asn fsX102)、c. 657-660delCAAA、c. 409G>T (p. Val105Leu)、PC 欠乏症では 2 変異： c. 518T>C (p. Leu173Pro)、エクソン 7, 8 欠失、PS 欠乏症では 1 変異：イントロン G c. 728-2A>C が同定された。

I 型 AT 欠乏症 5 症例において同定された変異 [1: c. 112delG (p. Asp38Tyrfs*12)、2: c. 155_161 dupTGTCAT (p. Tyr55Valfs*12)、3: c. 613delC (p. Leu205Trpfs*56)、4: c. 1069delA (p. Ile357 Leufs*7)、5: c. 1331_1337delTAAGAGA (p. Ile444 Lysfs*4)] について、遺伝子組換え蛋白を作成し病態解析を行なった。変異 2 の mutant AT は細胞内で急速に分解される、または mRNA の段階で分解されると考えられた。一方、それ以外の mutant AT は細胞内で変異蛋白が合成されても分泌されない、または分泌されても速やかに分解されると予測された。

D. 考察

小嶋らの Arg596 以外のトロンビン Na⁺結合領域ミスセンス変異の ATR 解析の検討によると、トロンビン Na⁺ 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。また、RCA スコアによる血栓リスク推定の結果、Lys599Arg 変異と Glu592Gln 変異は Yukuhashi 変異や Belgrade 変異と同等の血栓リスクを呈するプロトロンビン異常症となることが示唆された。

小林らは、「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」のためのアンケートを作成し、次年度に実施する予定である。

津田らの PS Tokushima、PC p. Arg189Trp、PC p. Lys193del の遺伝子多型の人種差の検討では、ブラジル人ではいずれの多型も同定できず、これらの遺伝子多型は東アジア人特有である可能性が高いことが示唆された。また、クエン酸加血漿を 4°C 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。

大賀らの新生児～小児期の血栓症例の集積により、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。

森下らの遺伝性血栓性素因患者の phenotype と genotype の検討によると、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のが、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。

E. 結論

「特発性血栓性素因」は厚労省の指定難病に平成 29 年度に認定されたばかりである。今年度の研究成果を元に、今後は全国実態調査の計画や、蓄積された症例のデータや欧米の論文報告や指針などを参考にして、ガイドライン策定に向けての準備を開始したい。また、新生児・小児血栓症を早期に診断し、適切な急性期治療と長期治療管理の方針を確立するために、全国の解析ネットワークを拡充、血栓傾向を正確に評価するための凝固機能測定法の確立、また有効な抗凝固療法、補充療法の検討、更には肝細胞移植療法などを含めた新規根治療法の開発に向けた取り組みを行いたい。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida R, Seki S, Hasegawa J, Koyama T, Yamazaki K, Takagi A, Kojima T, Yoshimura M: Familial pulmonary thromboembolism with a prothrombin mutation and antithrombin resistance. J Cardiol Cases. 17(6): 197-199, 2018.
- 2) Sanda N, Suzuki N, Suzuki A, Kanematsu T, Kishimoto M, Hasuwa H, Takagi A, Kojima T, Matsushita T, Nakamura S: Vwf K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice. Int J Hematol. 107(4): 428-35, 2018
- 3) Tamura S, Suga Y, Tanamura M, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Hattori Y, Kakihara M, Suzuki S, Takagi A, Kojima T: Optimisation of antithrombin resistance assay as a practical clinical laboratory test: development of prothrombin activator using factors Xa/Va and automation of assay. Int J Lab Hematol. 40(3): 312-319, 2018
- 4) 小嶋哲人: プロテインC、プロテインS。ベッドサイド検査事典『腎と透析』編集委員会: 編 腎と透析 Vol 84 2018増刊号 231-2333, 2018
- 5) 小嶋哲人: IX 治療薬へパリン類似物質徹底ガイドDICのすべて 丸藤哲編 救急・集中治療臨時増刊号 総合医学社 東京pp354-359, 2018.
- 6) Morikawa M, Umazume T, Hosokawa-Miyanishi A, Watari H, Kobayashi T, Seki H, Saito S: Relationship between antithrombin activity and interval from diagnosis to delivery among pregnant women with early-onset pre-eclampsia. Int J Gynaecol Obstet. 2019 Feb 3. doi: 10.1002/ijgo.12780. [Epub ahead of print]
- 7) Koizumi J, Hara T, Sekiguchi T, Ichikawa T, Tajima H, Takenoshita N, Tanikake M, Suyama Y, Kaji T, Kato K, Sone M, Arai Y, Anai H, Kichikawa K, Fujieda H, Nishibe T, Yamada N, Nakamura M, Nakano T, Kunieda T, Kuriyama T, Sugimoto T, Takayama M, Kobayashi T, Goto S, Kanazawa M, Itou

- M, Shirato K: Multicenter investigation of the incidence of inferior vena cava filter fracture. *Jpn J Radiol.* 2018 Nov;36(11):661-668. doi: 10.1007/s11604-018-0764-x. Epub 2018
- 8) Sugiura K, Ojima T, Urano T, Kobayashi T. The incidence and prognosis of thromboembolism associated with oral contraceptives: age-dependent difference in Japanese population. *J Obstet Gynaecol Res* 2018 Sep;44(9):1766-1772. doi: 10.1111/jog.13706. Epub 2018
- 9) 杉浦和子, 尾島俊之, 浦野哲盟, 小林隆夫: わが国における経口避妊薬に関連した血栓塞栓症の年齢別発症数とその予後. *日産婦誌* 71(3):546, 2019
- 10) 小林隆夫: エビデンスからみる OC・EP 配合剤の血栓症リスクとマネジメント. *Female Hormone Digest* 第2回: 1-5, 2018
- 11) 小林隆夫, 杉浦和子: 連載「周術期に留意すべき凝固異常」第4回 後天性血栓性素因～女性ホルモン剤～. *Thromb Med* Vol. 8, No. 3: 206-210, 2018
- 12) 小林隆夫: 月経困難症治療におけるルナベル配合錠ULDの適正使用－血栓症リスクを考える－. *京* no.194, i-vii, 2018
- 13) Kuma H, Matsuda R, Nakashima A, Motoyama K, Takazaki S, Hatae H, Jin X, Tsuda T, Tsuda H, and Hamasaki N: Protein S-specific activity assay system is not affected by direct oral anticoagulants. *Thromb Res.* 168:60-62, 2018
- 14) 梶山倫未、安武健一郎、森口里利子、宮崎瞳、阿部志磨子、増田隆、今井克己、岩本昌子、津田博子、大部正代、河手久弥、上野宏美、小野美咲、川崎遥香、能口健太、市川彩絵、鬼木愛子、前田翔子、中野修治:食物摂取頻度調査報告(FFQ 中村)で推定された女子大学生のナトリウム、カリウム摂取量の妥当性:24時間尿中排泄量との比較. *中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要.* 51:105-111, 2019
- 15) Fujiyoshi J, Yamaza H, Sonoda S, Yuniartha R, Ihara K, Nonaka K, Taguchi T, Ohga S, Yamaza T: Therapeutic potential of hepatocyte-like-cells converted from stem cells from human exfoliated deciduous teeth in fulminant Wilson's disease. *Sci Rep.* Feb 7;9(1):1535, 2019
- 16) Ichiyama M, Inoue H, Ochiai M, Ishimura M, Shiraishi A, Fujiyoshi J, Yamashita H, Sato K, Matsumoto S, Hotta T, Uchiumi T, Kang D, Ohga S: Diagnostic challenge of the newborn patients with heritable protein C deficiency. *J Perinatol.* Feb;39(2):212-219, 2019
- 17) Nagata H, Terashi E, Muraoka M, Uike K, Hirata Y, Tatewaki H, Fujita Y, Yamamura K, Ohga S: High incidence of ductal closure or narrowing at birth in patients with right ventricular outflow tract obstruction with normal orientation of the ductus arteriosus. *Cardiol*

- Young. Jan;29(1):54-58, 20, 2019
- 18) Kinjo T, Inoue H, Kusuda T, Fujiyoshi J, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Koga Y, Hara T, Ohga S: Chemokine levels predict progressive liver disease in Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis. *Pediatr Neonatol.* Sep 24. pii: S1875-9572(18)30128-1, 2018
- 19) Itami H, Hara S, Matsumoto M, Imamura S, Kanai R, Nishiyama K, Ishimura M, Ohga S, Yoshida M, Tanaka R, Ogawa Y, Asada Y, Sekita-Hatakeyama Y, Hatakeyama K, Ohbayashi C: Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency may contribute to the characteristic glomerular manifestations in Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res.* Oct;170:148-155, 2018
- 20) Okuzono S, Ishimura M, Kanno S, Sonoda M, Kaku N, Motomura Y, Nishio H, Oba U, Hanada M, Fukushi JI, Urata M, Kang D, Takada H, Ohga S: *Streptococcus pyogenes*-purpura fulminans as an invasive form of group A streptococcal infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* Jul 9;17(1):31, 2018
- 21) Uehara E, Nakao H, Tsumura Y, Nakadate H, Amari S, Fujinaga H, Tsutsumi Y, Kang D, Ohga S, Ishiguro A: Slow Elevation in Protein C Activity without a PROC Mutation in a Neonate with Intracranial Hemorrhage. *AJP Rep.* 2018 Apr;8(2):e68-e70, 2018
- 22) Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S: Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol.* Dec;59(6):595-599, 2018
- 23) Kadohira Y, Yamada S, Hayashi T, Morishita E, Asakura H, Ichinose A: A discrepancy between prothrombin time and Normotest (Hepaplastintest) results is useful for diagnosis of acquired factor V inhibitors. *Int J Hematol*, 108(2):145-150, 2018
- 24) Kamijima S, Sekiya A, Takata M, Nakano H, Murakami M, Nakazato T, Asakura H, Morishita E: Gene analysis of inherited antithrombin deficiency and functional analysis of abnormal antithrombin protein (N87D). *Int J Hematol*, 107(4):490-494, 2018
- 25) Nagaya S, Akiyama M, Murakami M, Sekiya A, Asakura H, Morishita E: Congenital coagulation factor X deficiency: Genetic analysis of five patients and functional characterization of mutant factor X proteins. *Haemophilia*, 24(5):774-785, 2018
- 26) Abe N, Oku K, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Bohgaki T, Yasuda S, Mori R, Morishita E, Suzuki-Inoue K, Atsumi T: Potential therapeutics for

- antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Mod Rheumatol.* 2018 Dec 17:1-21.
- 27) Nomoto H, Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, Kashiwase K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Doki N, Miyamura K, Mori T, Nakao S, Morishita E: Recipient ADAMTS13 single-nucleotide polymorphism predicts relapse after unrelated bone marrow transplantation for hematologic malignancy. *Int J Mol Sci.* 2019, Jan 8;20(1)
- 28) Setaka T, Hirano K, Moriya K, Kaneko T, Morita S, Shinkai T, Morishita E, Ichida T. Portal Vein Thrombosis in a Patient with Hereditary Antithrombin Deficiency. *Intern Med.* 2019 Feb 25. doi: 10.2169/internalmedicine.2295-18.
- 29) 菅原夢穂, 小野 南月, 森下英理子, 高島 洋: プロテインC遺伝子変異が同定された再発性脳静脈血栓症の1例. *臨床神経学*, Nov 29, cn-001221, 2018
- 30) 榎佑介, 石東光司, 上床武史, 森下英理子, 杉森宏: 一過性脳虚血性発作を契機に診断し得た先天性プロテインC欠損症の1例. *脳卒中*, 40(5):377-381, 2018
- 31) 森下英理子: 抗凝固療法. *臨床血液*, 59(6): 774-783, 2018
- 32) 長屋聡美, 森下英理子: ホモシステイン. 『腎と透析 ベッドサイド検査事典』(編集:「腎と透析」編集委員会), 東京医学社, 東京, 2018年5月, pp108-110.
- 33) 森下英理子: 血栓性素因の検査の進め方. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp30-35.
- 34) 森下英理子: 出血性素因の検査の進め方. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp36-41.
- 35) 森下英理子: アンチトロンビン, プロテインS, プロテインC. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp71-76.
- 36) 森下英理子, 寺上貴子: DOACのAT・PC・PS測定への影響. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp77-81.
- 37) 關谷暁子, 森下英理子: 先天性AT・PC・PS欠乏症の遺伝子検査. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp82-84.
- 38) 森下英理子: Lp(a), ホモシステイン. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp151-153.
- 39) 森下英理子: 稀な先天性凝固因子欠乏/異常症. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp185-192.
- 40) 長屋聡美, 森下英理子: 先天性第X因子欠乏症の臨床と遺伝子検査. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp193-195.
- 41) 森下英理子: アミロイドーシス. 『臨床に

- 直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp272-276.
- 42) 森下英理子: 先天性アンチトロンビン(AT)・プロテイン C(PC)・プロテイン S(PS) 欠乏症. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp424-431.
- 43) 森下英理子: 多発性骨髄腫の凝固異常. 日本臨床 76(7):1262-1270, 2018.
- 44) 森下英理子: 特発性血栓症の診断と治療. Medical Practice 35(7):1123-1128, 2018.
- 45) 森下英理子: 抗凝固薬の最近の話題. 臨床血液 59(6):774-783, 2018.
- 46) 森下英理子: DIC 診断に関連するその他の検査と意義. 臨床検査 62(9):1032-1042, 2018.
- 47) 森下英理子: 動脈硬化性疾患における血栓形成機序とスタチンの抗血栓作用. 冠疾患誌 24:137-142, 2018.
- 48) 森下英理子: 遺伝性血栓性素因. 医学のあゆみ 268(9):809-814, 2019.
2. 学会発表
- 1) Kojima T: Antithrombin resistance: a unique inherited thrombophilia. Symposium 2: Enlarging horizon of thrombosis and hemostasis: emerging new therapeutic targets The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 2) Hattori Y, Takagi Y, Kakihara M, Suzuki S, Odaira K, Tokoro M, Tamura S, Suzuki N, Matsushita T, Kojima T: Functional analysis of a variant fibrinogen from dysfibrinogenemia patient with cerebral (P1-26) The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 3) Kakihara M, Tamura S, Hattori Y, Suzuki S, Odaira K, Tokoro M, Kanematsu T, Suzuki N, Matsushita T, Kojima T: Haploid origin of unusual Inv22 X-chromosome carrying wild-type telomere region in severe hemophilia A patients (P1-38) The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 4) 大平晃也, 田村彰吾, 坂根寛人, 所真昼, 垣原美紗樹, 服部有那, 橋本恵梨華, 鈴木幸子, 高木夕希, 高木明, 兼松毅, 岸本麻由子, 鈴木伸明, 松下正, 小嶋哲人: スプライシング異常を引き起こす血液凝固第 IX 遺伝子サイレント変異・血友病 B 分子病態 (O-001, P-002) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 平成 30 年 6 月 28-30 日
- 5) 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 高橋伸典, 田村彰吾, 兼松毅, 高木明, 小嶋俊久, 清井仁, 小嶋哲人, 石黒直樹, 松下正: 血友病 A において関節症の進行抑制には出血抑制よりも高い FVIII 活性が必要である (O-070) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 平成 30 年 6 月 28-30 日
- 6) 鈴木幸子, 高木夕希, 坂根寛人, 橋本恵梨華, 垣原美紗樹, 服部有那, 大平晃也, 所真昼, 田村彰吾, 高木明, 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 松下正, 山崎鶴夫, 小嶋哲人: 血液

- 凝固第V因子欠乏症を合併する血友病 A 症例:第2報・凝血学的評価 (P-005) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 7) 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 兼松毅, 岸本磨由子, 田村彰吾, 高木明, 川上萌, 梶浦容子, 小嶋哲人, 松下正: 凝固一段法と合成基質法による第VIII因子活性測定において乖離を示した血友病 A 症例 (P-008) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 8) 兼松毅, 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 高木明, 岸本磨由子, 川上(村田)萌, 田村彰吾, 三田直美, 小山大輔, 小嶋哲人, 清井仁, 松下正: ループスアンチコアグラント低プロトロンビン血症症候群(LAHPS)の2例 (P-041) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 9) 勝見章, 渡辺浩, 松下正, 小嶋哲人: 臨床研究DB システムD☆Dを用いた静脈血栓塞栓症の発症率推計 (P-046) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 10) 三田直美, 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 兼松毅, 岸本磨由子, 高木明, 小嶋哲人, 松下正, 中村 栄男: VWF K1362A ノックインマウスの解析 (P-054) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 11) 高木明, 田村彰吾, 小嶋哲人: アンチトロンビン抵抗性の診断—凝検査法を中心に— (SY1-3) 第19回日本検査血液学会学術集会、大宮、平成30年7月21~22日
- 12) 田村彰吾, 高木明, 藤岡亮也, 服部有那, 垣原美紗樹, 高木夕希, 鈴木幸子, 高木夕希, 小嶋哲人: 血漿検体測定を目指したアンチトロンビン抵抗性凝固第X因子検出法の構築 (023-2) 第19回日本検査血液学会学術集会、大宮、平成30年7月21~22日
- 13) Tamura S, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y, Kojima T: Peri-arteriolar megakaryopoietic microenvironment via reciprocal CLEC-2/PDPN axis mouse bone marrow (SY-7-6) 第80回日本血液学会学術集会、大阪、平成30年10月12~14日
- 14) Hattori Y, Tamura S, Kakihara M, Suzuki S, Odaira K, Tokoro M, Hayakawa H, Kanemetsu T, Suzuki N, Matsushita T, Kojima T: Molecular genetic analysis of dysfibrinogenemia including novel mutations with thrombosis (PS2-29-1) 第80回日本血液学会学術集会、大阪、平成30年10月12~14日
- 15) Katsumi A, Ikeno S, Watanabe H, Matsushita T, Kojima T: Relevance of venous thromboembolism in a single institute (PS2-31-6) 第80回日本血液学会学術集会、大阪、平成30年10月12~14日
- 16) 津田博子: 血中プロテインS濃度とアポリポタンパク質C-IIの関連、第7回プロテインS研究会シンポジウム「血液凝固制御因子プロテインS~最新の話題」、第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、2018年6月29日
- 17) Noguchi K, Nakazono E, Miya M, Sata S, Tsuda H: Genetic and functional analyses of two protein C gene mutations on healthy Japanese young women. 10th Congress of Asian-Pacific

- Soc. Thromb. Haemost, Sapporo, Japan, Jun 30, 2018
- 18) Tsuda H: Investigation into racial differences in genetic risk factor for venous thromboembolism. “Plasma coagulation inhibitors”, 64th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Dublin, Ireland, July 19, 2018
- 19) Tsuda H: Total protein S assay system: Clinical significance and pre-analytical quality control. 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2018, Fukuoka, Japan, Oct 16, 2018
- 20) Otsuka Y, Ueda M, Nakazono E, Tsuda T, Jin X, Noguchi K, Sata S, Miyazaki H, Abe S, Imai, K, Iwamoto M, Masuda T, Moriguchi R, Nakano S, and Tsuda H: Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women. 第20回日本血液学会学術集会、大阪、2018年10月12日
- 21) 津田博子: 血中プロテイン S 濃度はアポリポタンパク質 C- II と正に相関する。第65回日本臨床検査医学会総会、東京(京王プラザホテル)、2018年11月16日
- 22) 市山正子、井上普介、白石暁、石村匡崇、藤吉順子、山下博徳、佐藤和夫、落合正行、大賀正一: 遺伝性プロテインC欠乏症新生児を予測するための血漿プロテインC/S活性比:第121回日本小児科学会学術集会、福岡、2018年4月20~22日
- 23) 金城唯宗、井上普介、藤吉順子、市山正子、落合正行、高畑靖、原寿郎、大賀正一: 一過性異常骨髄増殖症を合併したDown症候群における肝障害の進行と血清ケモカイン値の関連:第28回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会、宮崎、2018年6月15日
- 24) 安岡和昭、田中幸一、井上普介、藤吉順子、松下悠紀、落合正行、古賀友紀、松浦俊治、田口智章、大賀正一: 生体肝移植を施行した一過性骨髄異常増殖症の1例:第28回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会、宮崎、2018年6月15日
- 25) 園田素史、石村匡崇、市山正子、藤吉順子、井上普介、落合正行、大賀正一: 新生児HSV関連血球貪食性リンパ組織球症(HSV-HLH) ~病態と予後因子の検討~:第28回日本産婦人科・新生児血液学会、宮崎、2018年6月16日
- 26) 大賀正一、市山正子、落合正行、石村匡崇、石黒精、末延聡一、西久保敏也、高橋幸博、嶋緑倫、瀧正志、堀田多恵子、内海健、康東天: シンポジウム「小児の遺伝性血栓性素因の特徴とその治療」:第19回日本検査血液学会学術集会、さいたま、2018年7月22日
- 27) 井上普介、江上直樹、安岡和昭、澤野徹、市山正子、藤吉順子、金城唯宗、落合正行、大賀正一: 一過性異常骨髄増殖症における肝障害と血清ケモカイン値の推移との関連:第63回日本新生児成育医学会学術集会、東京、2018年11月22~24日
- 28) 市山正子、江上直樹、安岡和昭、澤野徹、井上普介、藤吉順子、落合正行、大賀正一: 新生児発症遺伝性プロテ

- ンC 欠乏症の効率的診断法に関する検討：第 63 回日本新生児成育医学会学術集会、東京、2018 年 11 月 22～24 日
- 29) Abe N, Oku K, Amengual O, Yasuda D, Mori R, Morishita E, Suzuki-Inoue K, Atsumi T: Efficacy of treatments for antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia: A systematic review and meta-analysis. APSTH, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 30) Nishioka K, Morishita E, Furukawa N, Imanaka S, Noguchi T, Kajihara H, Horie K: A case of congenital coagulant factor V deficiency that has been disclosed after the incidence of repeated postpartum hemorrhage. APSTH, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 31) Morishita E: Molecular basis and thrombotic manifestations of antithrombin deficiency in Japanese patients, 64th Annual SSC meeting of ISTH, Dublin, 2018. 7. 18-21.
- 32) 木村浩, 大辻道雄, 大槻希美, 森下英理子: 難治性下腿潰瘍を伴った 48XXY/47XXY モザイク型 Klinefelter 症候群の 1 例. 第 117 回日本皮膚科学会総会、広島、2018 年 5 月 31 日～6 月 3 日
- 33) 長屋聡美, 秋山正志, 關谷暁子, 朝倉英策, 森下英理子: 先天性第 X 因子欠乏症 5 症例から検出された遺伝子変異を有する変異型第 X 因子蛋白の機能解析. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌、2018 年 6 月 28 日～6 月 30 日
- 34) 山田真也, 門平靖子, 荒幡昌久, 林 朋恵, 森下英理子, 菅 幸生, 朝倉英策, 中尾眞二: ヘパリン類・トラネキサム酸併用療法の週末期固形癌 DIC への効果, 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌、2018 年 6 月 28 日～6 月 30 日
- 35) 阿部靖矢, 奥健志, Olga Amengual, 藤枝雄一郎, 加藤将, 坊垣暁之, 保田晋助, 森臨太郎, 森下英理子, 井上克枝, 渥美達也: 抗リン脂質抗体関連血小板減少症に対する治療法: システムティックレビューとメタ解析. 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌、2018 年 6 月 28 日～6 月 30 日
- 36) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療～悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に～, Cancer-VTE セミナー～造血器腫瘍, 長崎, 2018 年 7 月 11 日.
- 37) 森下英理子: 遺伝性・後天性血栓性素因が関与する血栓症 (シンポジウム), 第 50 回日本動脈硬化学会, 大阪, 2018 年 7 月 13 日.
- 38) 村上森花, 丸山慶子, 脇坂真穂, 森広太郎, 上島沙耶香, 關谷暁子, 小亀浩一, 朝倉英策, 森下英理子: 当研究室で解析した先天性アンチトロンビン (AT)・プロテイン C (PC)・プロテイン S (PS) 欠損症の遺伝子解析ならびに所見, 第 19 回日本検査血液学会学術集会, 大宮, 2018 年 7 月 21 日～7 月 22 日
- 39) 長屋聡美, 森下英理子: 遺伝性血栓性素因の診断 (シンポジスト), 第 19 回日本検査血液学会学術集会, 大宮, 2018 年 7 月 21 日～22 日
- 40) 森下英理子: 悪性腫瘍に合併する DIC, エキスパートから学ぶ DIC パート 5, 仙台, 2018 年 7 月 28 日.

- 41) 森下英理子:がんと血栓—血液内科医の立場から, INNOVATE プログラム 2018 群馬, 高崎, 2018 年 9 月 15 日.
- 42) 森下英理子:先天性アンチトロンビン欠乏症～総論～, 先天性アンチトロンビン欠乏症セミナー, 東京, 2018 年 9 月 22 日.
- 43) 森下英理子:DIC の基礎から臨床まで, 第 10 回 DIC 治療フォーラム, 浦安, 2018 年 10 月 5 日.
- 44) 森下英理子:静脈血栓塞栓症の臨床～血栓止血学の立場から～, 婦人科腫瘍と静脈血栓塞栓症を考える会, 金沢, 2018 年 10 月 11 日.
- 45) 長屋聡美, 脇坂真穂, 森広太郎, 村上森花, 門平靖子, 朝倉英策, 森下英理子: 当研究室における先天性アンチトロンビン欠乏症の遺伝子解析および臨床背景, 第 80 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018 年 10 月 12 日～14 日.
- 46) 森下英理子:がん患者における血栓形成のメカニズム(第 10 回 JCAC Symposium) 第 59 回脈管学会, 広島, 2018 年 10 月 25 日.
- 47) 森下英理子:血液内科領域での静脈血栓塞栓症の管理について, Hematology Expert Meeting, 千葉, 2018 年 11 月 22 日.
- 48) 森下英理子:産婦人科で遭遇する血栓症, 婦人科疾患を考える, 弘前, 2018 年 11 月 30 日.
- 49) 本木由香里, 吉田美香, 關谷暁子, 新井次郎, 小川正昌起, 阪田敏幸, 金重里沙, 家子正裕, 森下英理子, 野島順三: 自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体測定の有用性. 第 6 回日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ, 東京, 2018 年 12 月 1 日.
- 50) 吉田美香, 本木由香里, 關谷暁子, 金重里沙, 野島順三, 森下英理子, 家子正裕: 日本における抗リン脂質抗体 ELISA の標準化に向けて—EliA による抗リン脂質抗体測定の有用性—. 第 6 回日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ, 東京, 2018 年 12 月 1 日.
- 51) 森下英理子:造血器悪性腫瘍関連血栓症—多発性骨髄腫と血栓症—, 多発性骨髄腫診療を考える会, 金沢, 2019 年 1 月 18 日.
- 52) 森下英理子:多発性骨髄腫と血栓症, Multiple Myeloma のトータルマネジメント～Bone & Thrombosis～, 京都, 2019 年 2 月 7 日.
- 53) 森下英理子:未発症の先天性アンチトロンビン欠乏症ヘテロ接合体保持者が血栓症を発症するまで, 第 13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム, 東京, 2019 年 2 月 16 日.
- 54) 關谷暁子, 吉田美香, 本木由香里, 金重里沙, 家子正裕, 森下英理子, 野島順三: 抗リン脂質抗体値測定の標準化に向けた自動分析装置による測定法の有用性, 第 13 回日本血栓止血学会学術標準化委員会 (SSC) シンポジウム, 東京, 2019 年 2 月 16 日.
- 55) 森下英理子:がん患者における血栓症, 泌尿器腫瘍と血栓症を考える会, 金沢, 2019 年 3 月 1 日.
- 56) 山田真也, 奥村廣和, 森下英理子, 朝倉英策: 第 XIII 因子製剤投与により完全止血を得た再生不良性貧血、慢性 DIC 合併抜歯後出血例, 第 19 回 TTMフォー

- ラム, 東京, 2019年3月2日.
- 57) 森下英理子: 血友病診療ガイドラインの
実践, 出血性疾患と抗体治療セミナー,
金沢, 2019年3月22日.
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。

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、 ならびに変異アンチトロンビン蛋白の分子病態解析

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

研究要旨

先天性アンチトロンビン (AT) は、プロテイン C (PC)、プロテイン S (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等が明らかとなった。遺伝子変異同定率は AT 欠乏症が約 9 割と高く、遺伝子解析は確定診断の手法として有用である。一方、PC および PS 欠乏症の変異同定率は 4~5 割前後ときわめて低く、その原因としてワルファリン内服、妊娠、急性期の採血による二次的な活性低下の症例が混入してしまっている可能性が考えられた。今後、診断の精度を高めるためには、二次性活性低下症例を適切に除外する方法を検討する必要がある。また、AT 欠乏症 I 型では妊娠が主要な血栓リスクとなるため、妊娠・分娩・産褥期の管理に関する診療ガイドラインの作成が早急に必要であろう。

先天性 AT 欠乏症は血栓症リスクも高く、その病態解析は診断基準を作成するうえでも重要である。今回、I 型 AT 欠乏症 5 症例において同定された変異 [1: c.112delG (p. Asp38Tyrfs*12)、2: c.155_161dupTGTGCAT (p. Tyr55Valfs*12)、3: c.613delC (p. Leu205Trpfs*56)、4: c.1069delA (p. Ile357Leuufs*7)、5: c.1331_1337delTAAGAGA (p. Ile444Lysfs*4)] について、遺伝子組換え蛋白を作成し、欠乏症をきたす機序について検討した。変異 1、3、4、5 は細胞内で変異蛋白が合成されても分泌されない、または分泌されても速やかに分解され、変異 2 は細胞内で急速に分解される、または mRNA の段階で分解されると示唆された。このような機序が発端者の AT 欠乏症の原因であると考えられた。

A. 研究目的

1. 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

指定難病「特発性血栓性素因(遺伝性血栓性素因に限る。)」の診断基準を申請時に作成したが、その有用性を検証し、より適切な基準へ改善していく必要がある。そのためには、遺伝子異常が明らかとなり確定診断がついた症例の臨床症状、検査所見などを詳細に検討したり、活性測定法に影響する要因について検討することは意義がある。今年度は、先

天性血栓性素因が疑われ当研究室に遺伝子解析を依頼されたアンチトロンビン (AT)・プロテイン C (PC) およびプロテイン S (PS) 欠乏症患者について、血栓症状、発症年齢、活性値、血栓症誘発因子、遺伝子変異同定率、家族内血栓発症率、などについて検討した。

2. 変異 AT 蛋白の分子病態解析

先天性 AT 欠乏症には、抗原量・活性値ともに低下する I 型(量的欠乏)と抗原量は正常で活性値のみが低下する II 型(質的異常)が

存在する。今回、本研究室で昨年度新規に同定された I 型欠乏症5症例のAT遺伝子変異部位を有する遺伝子組換え蛋白を作成し、その変異がAT欠乏症にもたらす機序を検討した。

B. 研究方法

1. 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

先天性 AT、PC、PS 欠乏症が疑われ遺伝子解析を施行した発端者およびその家系員、228 家系 327 症例 (AT : 52 家系 85 症例、PC : 76 家系 118 症例、PS : 100 家系 124 症例) を対象とした。

遺伝子解析は、発端者ならびに家系員よりインフォームドコンセントを得た後、目的とする遺伝子のエクソン全域ならびにエクソン/イントロン境界領域を、ダイレクトシーケンス法にて解析した。ダイレクトシーケンスで変異が同定できなかった場合は、MLPA 法にて遺伝子の欠失、重複などについて検策した。家系員が発端者と同変異を有するかどうかを調べる場合は、PCR-RFLP 法を用いた。

2. 変異 AT 蛋白の分子病態解析

対象遺伝子は、I 型 AT 欠乏症 5 症例において同定された変異

[1:c.112delG (p. Asp38Tyrfs*12)、
2:c.155_161dupTGTGCAT (p. Tyr55Valfs*12)、
3:c.613delC (p. Leu205Trpfs*56)、
4:c.1069delA (p. Ile357Leufs*7)、
5:c.1331_1337delTAAGAGA
(p. Ile444Lysfs*4)]とした。5種類すべて塩基の欠失や挿入によるフレームシフト変異が生じ、早期に終始コドンが出現する変異である。

完全長の野生型AT cDNAを使用し、site-directed mutagenesisにより、変異型AT発現ベクターを作製した。作製したベクターをヒト胎児腎由来のHEK293細胞にリポフェクト法を用いて導入し、48時間培養後、ELISA法により細胞溶解液と培養上清を回収し、細胞内の蛋白量と細胞外への分泌を調べた。また、免疫染色により細胞内の蛋白の局在を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、金沢大学大学院医薬保健総合研究科で倫理面の審査を受け承認されている。研究参加者からは書面での同意を取得し研究を行った。

C. 研究結果

1. 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

AT52 家系中 44 家系 (変異同定率 84.6%、うち II 型ヘパリン結合部位異常 8 家系)、PC76 家系中 46 家系 (変異同定率 60.5%)、PS100 家系中 43 家系 (変異同定率 43.0%、うち K196E 変異 13 家系) について変異が同定された。今年度新規の変異として、AT 欠乏症では 3 変異: c.546delA (p. Lys182Asn fsX102)、c.657-660delCAAA、c.409G>T (p. Val105Leu)、PC 欠乏症では 2 変異: c.518T>C (p. Leu173Pro)、エクソン7,8 欠失、PS 欠乏症では 1 変異: イントロンG c.728-2A>C が同定された。血栓症初発年齢の中央値は AT 欠乏症 29 歳 (14-73 歳)、PC 欠乏症 47 歳 (0-90 歳)、PS 欠乏症 40 歳 (0-82 歳) であった。

臨床症状は主に静脈血栓塞栓症であり、全ての欠乏症において深部静脈血栓症 (DVT)・肺塞栓 (PE) が約 50-60% を占め、次いで脳

静脈洞血栓症が10-20%を占めた。PC欠乏症では、脳梗塞などの動脈血栓症が約20%認められ、ATおよびPS欠乏症と比較して明らかに多かった。

また、AT欠乏症は妊娠を契機に血栓症を起こした症例が半数を占め最も多かった。

2. 変異AT蛋白の分子病態解析

1) 蛍光免疫染色法

変異1、3、4、5においては、細胞質内の核周辺に野生型(wild type)と同様の蛍光分布が観察され、AT蛋白がwild typeと同程度に合成・分泌されていることが示された。一方、変異2においては、蛍光が確認できなかった。

2) 培養上清及び細胞溶解液中 AT 蛋白量の測定

AT蛋白量をELISA法にて測定したが、野生型の抗原量を100%とすると、変異1から5の順にそれぞれ0、0、2、1、7%であった。細胞溶解液中において、変異1、3、4、5では、6、5、11、98%程度AT蛋白が合成されていた。一方、変異2では、AT蛋白の合成がほとんど確認できなかった。

3) mRNA 定量

野生型のmRNA量を100%とした場合、変異1から5の順にそれぞれ68、4、58、123、1197%であり、変異2ではmRNAがほとんど確認できなかった。

D. 考察

1. 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

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

ることが多いこと等が明らかとなった。遺伝子変異同定率はAT欠乏症が約9割と高く、遺伝子解析は確定診断の手法として有用である。一方、PCおよびPS欠乏症の変異同定率は4~5割前後ときわめて低く、その原因としてワルファリン内服、妊娠、急性期の採血による二次的な活性低下の症例が混入してしまっている可能性が考えられた。今後、診断の精度を高めるためには、二次性活性低下症例を適切に除外する方法を検討する必要がある。

2. 変異AT蛋白の分子病態解析

変異1、3、4、5は細胞内で変異蛋白が合成されても分泌されない、または分泌されても速やかに分解され、変異2は細胞内で急速に分解される、またはmRNAの段階で分解されると示唆された。このような機序が発端者のAT欠乏症の原因であると考えられた。

E. 結論

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が、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。また、特に、先天性AT欠乏症においては、妊娠を契機に発症する症例が多く、診療ガイドラインの作成が急務であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kadohira Y, Yamada S, Hayashi T, Morishita E, Asakura H, Ichinose A: A discrepancy between prothrombin time and Normotest (Hepaplastintest) results is useful for diagnosis of acquired factor V inhibitors. *Int J Hematol*, 108(2):145-150, 2018
- 2) Kamijima S, Sekiya A, Takata M, Nakano H, Murakami M, Nakazato T, Asakura H, Morishita E: Gene analysis of inherited antithrombin deficiency and functional analysis of abnormal antithrombin protein (N87D). *Int J Hematol*, 107(4):490-494, 2018
- 3) Nagaya S, Akiyama M, Murakami M, Sekiya A, Asakura H, Morishita E: Congenital coagulation factor X deficiency: Genetic analysis of five patients and functional characterization of mutant factor X proteins. *Haemophilia*, 24(5):774-785, 2018
- 4) Abe N, Oku K, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Bohgaki T, Yasuda S, Mori R, Morishita E, Suzuki-Inoue K, Atsumi T: Potential therapeutics for antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2018 Dec 17:1-21.
- 5) Nomoto H, Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, Kashiwase K, Morishima Y, Fukuda T, Kodera Y, Doki N, Miyamura K, Mori T, Nakao S, Morishita E: Recipient *ADAMTS13* single-nucleotide polymorphism predicts relapse after unrelated bone marrow transplantation for hematologic malignancy. *Int J Mol Sci*. 2019, Jan 8;20(1)
- 6) Setaka T, Hirano K, Moriya K, Kaneko T, Morita S, Shinkai T, Morishita E, Ichida T. Portal Vein Thrombosis in a Patient with Hereditary Antithrombin Deficiency. *Intern Med*. 2019 Feb 25. doi: 10.2169/internalmedicine.2295-18.
- 7) 菅原夢穂, 小野 南月, 森下英理子, 高島 洋: プロテインC遺伝子変異が同定された再発性脳静脈血栓症の1例. 臨床神経学, Nov 29, cn-001221, 2018
- 8) 榎佑介, 石束光司, 上床武史, 森下英理子, 杉森宏: 一過性脳虚血性発作を契機に診断し得た先天性プロテインC欠損症の1例. 脳卒中, 40(5):377-381, 2018
- 9) 森下英理子: 抗凝固療法. 臨床血液, 59(6): 774-783, 2018
- 10) 長屋聡美, 森下英理子: ホモシステイン. 『腎と透析 ベッドサイド検査事典』(編集:「腎と透析」編集委員会), 東京医学社, 東京, 2018年5月, pp108-110.
- 11) 森下英理子: 血栓性素因の検査の進め方. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp30-35.
- 12) 森下英理子: 出血性素因の検査の進め方. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集:朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp36-41.

- 13) 森下英理子 : アンチトロンビン, プロテインS, プロテインC. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp71-76.
- 14) 森下英理子, 寺上貴子 : DOACのAT・PC・PS測定への影響. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp77-81.
- 15) 關谷暁子, 森下英理子 : 先天性AT・PC・PS欠乏症の遺伝子検査. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp82-84.
- 16) 森下英理子 : Lp(a), ホモシステイン. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp151-153.
- 17) 森下英理子 : 稀な先天性凝固因子欠乏/異常症. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp185-192.
- 18) 長屋聡美, 森下英理子 : 先天性第X因子欠乏症の臨床と遺伝子検査. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp193-195.
- 19) 森下英理子 : アミロイドーシス. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp272-276.
- 20) 森下英理子 : 先天性アンチトロンビン(AT)・プロテインC(PC)・プロテインS(PS)欠乏症. 『臨床に直結する血栓止血学 改訂2版』(編集: 朝倉英策), 中外医学社, 東京, 2018年10月, pp424-431.
- 21) 森下英理子 : 多発性骨髄腫の凝固異常. 日本臨床 76(7) : 1262-1270, 2018.
- 22) 森下英理子 : 特発性血栓症の診断と治療. Medical Practice 35 (7) : 1123-1128, 2018.
- 23) 森下英理子 : 抗凝固薬の最近の話題. 臨床血液 59 (6) : 774-783, 2018.
- 24) 森下英理子 : DIC診断に関連するその他の検査と意義. 臨床検査 62(9) : 1032-1042, 2018.
- 25) 森下英理子 : 動脈硬化性疾患における血栓形成機序とスタチンの抗血栓作用. 冠疾患誌 24:137-142, 2018.
- 26) 森下英理子 : 遺伝性血栓性素因. 医学のあゆみ 268(9) : 809-814, 2019.
2. 学会発表
- 1) Abe N, Oku K, Amengual O, Yasuda D, Mori R, Morishita E, Suzuki-Inoue K, Atsumi T: Efficacy of treatments for antiphospholipid antibody associated thrombocytopenia: A systematic review and meta-analysis. APSTH, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 2) Nishioka K, Morishita E, Furukawa N, Imanaka S, Noguchi T, Kajihara H, Horie K: A case of congenital coagulant factor V deficiency that has been disclosed after the incidence of repeated postpartum hemorrhage. APSTH, Sapporo, 2018. 6. 28-30.
- 3) Morishita E: Molecular basis and thrombotic manifestations of antithrombin deficiency in Japanese

- patients, ISTH SSC Dublin 2018, Dublin, 2018. 7. 18-21.
- 4) 木村浩, 大辻道雄, 大槻希美, 森下英理子: 難治性下腿潰瘍を伴った48XXXY/47XXY モザイク型 Klinefelter 症候群の1例. 第117回日本皮膚科学会総会、広島, 2018年5月31日~6月3日
 - 5) 長屋聡美, 秋山正志, 關谷暁子, 朝倉英策, 森下英理子: 先天性第X因子欠乏症5症例から検出された遺伝子変異を有する変異型第X因子蛋白の機能解析. 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 2018年6月28日~6月30日
 - 6) 山田真也, 門平靖子, 荒幡昌久, 林 朋恵, 森下英理子, 菅 幸生, 朝倉英策, 中尾眞二: ヘパリン類・トラネキサム酸併用療法の週末期固形癌 DIC への効果, 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 2018年6月28日~6月30日
 - 7) 阿部靖矢, 奥健志, Olga Amengual, 藤枝雄一郎, 加藤将, 坊垣暁之, 保田晋助, 森臨太郎, 森下英理子, 井上克枝, 渥美達也: 抗リン脂質抗体関連血小板減少症に対する治療法: システムティックレビューとメタ解析. 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 2018年6月28日~6月30日
 - 8) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療~悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に~, Cancer-VTE セミナー~造血器腫瘍, 長崎, 2018年7月11日.
 - 9) 森下英理子: 遺伝性・後天性血栓性素因が関与する血栓症(シンポジウム), 第50回日本動脈硬化学会, 大阪, 2018年7月13日.
 - 10) 村上森花, 丸山慶子, 脇坂真穂, 森広太郎, 上島沙耶香, 關谷暁子, 小亀浩一, 朝倉英策, 森下英理子: 当研究室で解析した先天性アンチトロンビン(AT)・プロテインC(PC)・プロテインS(PS)欠損症の遺伝子解析ならびに所見, 第19回日本検査血液学会学術集会, 大宮, 2018年7月21日~7月22日
 - 11) 長屋聡美, 森下英理子: 遺伝性血栓性素因の診断(シンポジスト), 第19回日本検査血液学会学術集会, 大宮, 2018年7月21日~22日
 - 12) 森下英理子: 悪性腫瘍に合併するDIC, エキスパートから学ぶDIC パート5, 仙台, 2018年7月28日.
 - 13) 森下英理子: がんと血栓—血液内科医の立場から, INNOVATE プログラム2018 群馬, 高崎, 2018年9月15日.
 - 14) 森下英理子: 先天性アンチトロンビン欠乏症~総論~, 先天性アンチトロンビン欠乏症セミナー, 東京, 2018年9月22日.
 - 15) 森下英理子: DICの基礎から臨床まで, 第10回DIC治療フォーラム, 浦安, 2018年10月5日.
 - 16) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の臨床~血栓止血学の立場から~, 婦人科腫瘍と静脈血栓塞栓症を考える会, 金沢, 2018年10月11日.
 - 17) 長屋聡美, 脇坂真穂, 森広太郎, 村上森花, 門平靖子, 朝倉英策, 森下英理子: 当研究室における先天性アンチトロンビン欠乏症の遺伝子解析および臨床背景, 第80回日本血液学会学術集会, 大阪, 2018年10月12日~14日.
 - 18) 森下英理子: がん患者における血栓形成

- のメカニズム(第10回JCAC Symposium)
第59回脈管学会, 広島, 2018年10月25日.
- 19) 森下英理子: 血液内科領域での静脈血栓塞栓症の管理について, Hematology Expert Meeting, 千葉, 2018年11月22日.
- 20) 森下英理子: 産婦人科で遭遇する血栓症, 婦人科疾患を考える, 弘前, 2018年11月30日.
- 21) 本木由香里, 吉田美香, 關谷暁子, 新井次郎, 小川正昌起, 阪田敏幸, 金重里沙, 家子正裕, 森下英理子, 野島順三: 自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体測定の有用性. 第6回日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ, 東京, 2018年12月1日
- 22) 吉田美香, 本木由香里, 關谷暁子, 金重里沙, 野島順三, 森下英理子, 家子正裕: 日本における抗リン脂質抗体ELISAの標準化に向けて—ELiAによる抗リン脂質抗体測定の有用性—. 第6回日本抗リン脂質抗体標準化ワークショップ, 東京, 2018年12月1日
- 23) 森下英理子: 造血器悪性腫瘍関連血栓症—多発性骨髄腫と血栓症—, 多発性骨髄腫診療を考える会, 金沢, 2019年1月18日.
- 24) 森下英理子: 多発性骨髄腫と血栓症, Multiple Myelomaのトータルマネジメント〜Bone & Thrombosis〜, 京都, 2019年2月7日
- 25) 森下英理子: 未発症の先天性アンチトロンビン欠乏症ヘテロ接合体保持者が血栓症を発症するまで, 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム, 東京, 2019年2月16日.
- 26) 關谷暁子, 吉田美香, 本木由香里, 金重里沙, 家子正裕, 森下英理子, 野島順三: 抗リン脂質抗体値測定の標準化に向けた自動分析装置による測定法の有用性, 第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム, 東京, 2019年2月16日.
- 27) 森下英理子: がん患者における血栓症, 泌尿器腫瘍と血栓症を考える会, 金沢, 2019年3月1日.
- 28) 山田真也, 奥村廣和, 森下英理子, 朝倉英策: 第XIII因子製剤投与により完全止血を得た再生不良性貧血、慢性DIC合併抜歯後出血例, 第19回T TMフォーラム, 東京, 2019年3月2日
- 29) 森下英理子: 血友病診療ガイドラインの実践, 出血性疾患と抗体治療セミナー, 金沢, 2019年3月22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。

遺伝性血栓性素因の人種差および 血中プロテイン S 活性測定の preanalytical variables に関する研究

研究分担者 津田博子 中村学園大学大学院栄養科学研究科 教授

研究要旨

静脈血栓塞栓症 (VTE) は、遺伝性血栓性素因と環境要因の相互作用により発症する。遺伝子多型としての遺伝性血栓性素因としては、白人では FV Leiden、FII G20210A があるが、日本人ではプロテイン S (PS) 遺伝子多型 (PS Tokushima)、中国人ではプロテイン C (PC) 遺伝子多型 (PC p. Arg189Trp および PC p. Lys193del) が報告されている。そこで、遺伝学的に白人とアフリカ黒人の混血が最も多くの割合を占めるブラジルの VTE 患者 154 名、健常人 301 名について検討したところ、PS Tokushima、PC p. Arg189Trp、PC p. Lys193del のいずれも同定しなかった。したがって、これらの遺伝子多型は東アジア人特有である可能性が高いことが示唆された。

次に、指定難病「特発性血栓症 (遺伝性血栓性素因によるものに限る。)」の診断では、検査所見として血液凝固制御因子の活性低下が必須であることから、特に pre-analytical variables が問題となる PS 活性測定について検討した。PS 分子は、Ca²⁺非存在下ではトロンビン感受性部位が容易に切断されて 2 本鎖となり、APC cofactor 活性を失う。そこで、クエン酸加血漿を 4℃ ないし室温で保存したところ、2 本鎖 PS の割合が増加するとともに、total PS 活性が低下するが total PS 抗原量は変化せず、PS 比活性が低値となることが分かった。したがって、PS Tokushima などの II 型 PS 欠乏症の判定が困難となる可能性が示唆された。特発性血栓症の診断には、正確で標準化された測定方法の確立が必須であることが示された。

A. 研究目的

静脈血栓塞栓症 (Venous thromboembolism :VTE) は、遺伝性血栓性素因と環境要因の相互作用により発症する。主な遺伝性血栓性素因としては、アンチトロンビン(AT)、プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) などの血液凝固制御因子の稀な遺伝子変異があり、若年期より VTE のリスクが著しく増大する。一方、遺伝子多型としての遺伝性血栓性素因としては、血液凝固第 V 因子遺伝子多型 (FV Leiden:rs6025) と第 II 因子遺伝子多型 (FII

G20210A:rs1799963) が白人に存在するが、日本人などの東アジア人やアフリカ黒人には同定されない。東アジア人では、PS 遺伝子多型 (PS Tokushima, PS p. Lys196Glu:rs121918474) が日本人一般集団の約 2% に存在し、2 種の PC 遺伝子多型 (PC p. Arg189Trp:rs146922325, PC p. Lys193del:rs199469469) が中国人一般集団にそれぞれ 0.9%、2.4% 存在するが、白人などの他の民族については十分に検討されていない。また、これらの PS、PC 遺伝子多型は II 型欠乏症であり、血中の PS、PC 活性は低下するが抗原量が正常である。

遺伝性血栓性素因による若年性、再発性で重篤な血栓症が、指定難病「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る。)」(告示番号 327)に認定され、平成 29(2017)年 4 月 1 日から医療費助成が開始している。「特発性血栓症」の診断基準は、A. 症状、B. 検査所見、C. 鑑別診断、D. 遺伝学的検査、E. 遺伝性を示唆する所見からなり、診断のカテゴリーで Definite、Probable に該当する場合に認定される。検査所見では、血漿中の AT、PC、PS 活性のいずれかが、成人の基準値の下限値未満であること(18 歳未満の場合は年齢別下限値)となっている。症状とともに検査所見は診断の必須項目であり、正確で標準化された測定方法の確立が求められる。しかし、AT、PC 活性測定に比べて、PS 活性測定は、検体採取から測定までの過程で結果に影響を及ぼす要因(pre-analytical variables)が多く、十分に配慮しなければ測定結果の解釈を誤る可能性がある。

そこで、昨年度に引き続いて 1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明、および 2) 血中プロテイン S 活性測定の preanalytical variables の 2 つの課題について研究した。

B. 研究方法

1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明

ブラジル南東部のミナス・ジェライス州に位置する連邦大学 University Federal de Minas Gerais の Prof. Luci Dusse、Prof. Maria Carvalho との国際共同研究を実施した。ブラジルより送付された VTE 患者 154 名(2-80 歳:男性 49 名、女性 105 名)、健常人 301 名(8-90 歳:男性 14 名、女性 287 名)の gDNA 検体を用いて、real

time PCR 法にて遺伝子型を検討した。PS Tokushima と PC p.Arg189Trp は Cycling probe 法、PC p.Lys193del は TaqMan 法を用いた。

2) 血中プロテイン S 活性測定の preanalytical variables

PS の分子量は 77 kDa で、アミノ末端から Gla ドメイン、トロンビン感受性部位、EGF ドメイン、SHBG 様ドメインからなる。

トロンビン感受性部位はトロンビン、FXa などで切断されやすく、生成した 2 本鎖 PS は activated PC (APC) cofactor 活性を失う。トロンビンによる切断は Ca^{2+} 存在下では阻害されるが、FXa による切断は Ca^{2+} 依存性である。したがって、クエン酸加血漿などの Ca^{2+} 非存在下では、PS はトロンビンによって切断されて失活する可能性が高い。そこで、我々が作成したウサギ抗ヒト PS ポリクローナル抗体を用いた Western blotting 法にて、クエン酸加血漿を保存中の PS 分子の切断について検討した。さらに、我々が開発した total PS assay 系(Tsuda, T. et al. Blood Coagul Fibrinolysis, 23:56-63, 2012)を用いて、total PS 活性と total PS 抗原量を測定した。

(倫理面への配慮)

University Federal de Minas Geras 倫理審査委員会および中村学園大学倫理審査委員会で承認を受け、両大学間で Materials Transfer Agreement (MTA) および Memorandum of Understanding (MOU) を締結後、研究を開始した。すべての対象者に紙面にて説明し同意を得た。

C. 研究結果

1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明

人種構成としては、VTE 患者 154 名ではブラジル人 138 名 (89.6%)、白人 10 名 (6.5%)、黒人 6 名 (3.9%) であり、健常人 301 名ではブラジル人 299 名 (99.3%)、日本人 2 名 (0.7%) で白人、黒人は含まれていなかった。VTE 患者の病態は、DVT 134 名 (87.0%)、PE 6 名 (3.8%)、その他 14 名 (9.1%) であった。その他としては、Budd-Chiari syndrome 8 名、retinal vein thrombosis 4 名、mesenteric vein thrombosis 1 名、inferior vena cava syndrome 1 名が含まれていた。遺伝子解析の結果、VTE 患者、健常人ともに、PS Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del のいずれも同定しなかった。

2) 血中プロテイン S 活性測定の preanalytical variables

クエン酸加血漿を還元状態で電気泳動し、抗 PS 抗体を用いて Western blotting 法で解析したところ、分子量が 77 kDa のバンドの他に 70 kDa の弱いバンドが観察され、一部がすでに 2 本鎖 PS になっていることが分かった。血漿を 4°C で 24 時間保存すると、77 kDa のバンドが減少して 70 kDa のバンドが増加し、4°C で 7 日間保存後には 77 kDa が消失して全て 70 kDa のバンドとなったことから、保存中に血漿中の PS が切断されることが分かった。そこで、室温で保存したクエン酸加血漿について、70 kDa のバンドの割合と total PS 活性、total PS 抗原量を検討したところ、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いことから PS 比活性が低下

することが分かった。

D. 考察

1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明

ブラジルの VTE 患者および健常人の遺伝子解析では、PS Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del のいずれの遺伝子多型も同定しなかった。ブラジルの人種構成で最も多くの割合を占めるブラジル人は、遺伝学的には白人とアフリカ黒人の混血と考えられている (Parra, F.C. et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 100:177-82, 2003)。我々がこれまでに検討したハンガリーの VTE 患者 294 名、健常人 243 名の遺伝子解析でも、PS Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del のいずれも同定しなかった。したがって、これらの PS、PC 遺伝子多型は東アジア人特有である可能性が高いことが示唆された。

2) 血中プロテイン S 活性測定の preanalytical variables

クエン酸加血漿を室温で保存すると、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を確認した。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。

その他の preanalytical variables としては、血中での PS-C4BP 複合体形成が Ca^{2+} 依存性であることから、クエン酸加血漿中の PS-C4BP 複合体解離が PS 活性測定に影響を与える可能性がある。また、抗凝固薬の影響としては、warfarin による PS、PC 活性の偽低値だけでなく、直接経口抗凝固薬 DOACs が凝固時間法による PC、PS 活性を偽高値を示すことが報告されている。しかし、

我々は合成基質法による total PS 活性測定が DOACs の影響を受けないことを確認している。

今回の検討でも明らかになったように、特発性血栓症の診断では、pre-analytical variables を認識して測定を実施し、測定結果を解釈することが重要である。

E. 結論

遺伝学的に白人とアフリカ黒人の混血が最も多くの割合を占めるブラジルの VTE 患者、健常人には、PS Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del のいずれも同定しなかった。したがって、FV Leiden、FII G20210A と同様に、PS、PC 遺伝子多型にも人種差が存在することが示唆された。指定難病「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）」の診断では、血漿中の AT、PC、PS 活性低下が必須要件であるが、PS 活性測定では特に pre-analytical variables が問題であり、正確で標準化された測定方法の確立が不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuma, H., Matsuda, R., Nakashima A., Motoyama K., Takazaki S., Hatae, H., Jin, X., Tsuda T., Tsuda, H., and Hamasaki, N. Protein S-specific activity assay system is not affected by direct oral anticoagulants. *Thromb Res.* 168:60-62, 2018.
- 2) 梶山倫未、安武健一郎、森口里利子、宮崎瞳、阿部志磨子、増田隆、今井克己、岩本昌子、津田博子、大部正代、河手久

弥、上野宏美、小野美咲、川崎遥香、能口健太、市川彩絵、鬼木愛子、前田翔子、中野修治:食物摂取頻度調査報告 (FFQ中村) で推定された女子大学生のナトリウム、カリウム摂取量の妥当性:24時間尿中排泄量との比較. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要. 51:105-111, 2019.

2. 学会発表

- 1) 津田博子: 血中プロテインS濃度とアポリポタンパク質C-IIの関連、第7回プロテインS研究会シンポジウム「血液凝固制御因子プロテインS～最新の話題」、第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌 (ロイトン札幌)、6月29日2018年
- 2) Noguchi K., Nakazono E., Miya M., Sata S., Tsuda H.: Genetic and functional analyses of two protein C gene mutations on healthy Japanese young women. 10th Congress of Asian-Pacific Soc. Thromb. Haemost., Sapporo (Royton Sapporo), Japan, Jun 30, 2018.
- 3) Tsuda H.: Investigation into racial differences in genetic risk factor for venous thromboembolism. “Plasma coagulation inhibitors”, 64th Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Dublin (Convention Centre Dublin), Ireland, July 19, 2018
- 4) Tsuda H.: Total Protein S Assay System: Clinical Significance and Pre-analytical Quality Control. 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology-2018, Fukuoka (Hilton

- Fukuoka Sea Hawk), Japan, Oct 16, 2018.
- 5) Otsuka, Y., Ueda, M., Nakazono, E., Tsuda, T., Jin, X., Noguchi, K., Sata, S., Miyazaki, H., Abe, S., Imai, K., Iwamoto, M., Masuda, T., Moriguchi, R., Nakano, S., and Tsuda, H. Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women. 第20回日本血液学会学術集会、大阪（大阪国際会議場）、10月12日2018年
- 6) 津田博子. 血中プロテイン S 濃度はアポリポタンパク質 C- II と正に相関する. 第65回日本臨床検査医学会総会、東京（京王プラザホテル）、11月16日2018年
- G. 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

先天性血栓性素因の分子病態解析：

Arg596 以外のトロンビン Na⁺結合領域ミスセンス変異のアンチトロンビン抵抗性解析

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

アンチトロンビン (AT) 抵抗性 (ATR) 症例では、変異プロトロンビンから生じた異常トロンビンが AT による不活化に抵抗性をもつため静脈血栓リスクとなり、これまで Yukuhashi 変異 (Arg596Leu)、Belgrade 変異 (Arg596Gln)、および Padua 2 変異 (Arg596Trp) が血栓症リスクとして報告されている。今回、Arg596 以外での ATR 変異候補探索のため Na⁺結合領域 (Thr540、Arg541、Glu592、および Lys599) での単一ヌクレオチド置換変異体の凝固活性特性を調べた。野生型の AT による 30 分不活性化後の相対残存トロンビン活性 (RRTA) (30' RRTA) は 5.1% で、Yukuhashi および Belgrade 変異体の 30' RRTA は、それぞれ 90.9% および 88.7% であった。Lys599 および Thr540 での全変異体、Glu592 のほとんどの変異体も高度の ATR を示し、Glu592Val は全て中程度の ATR を示した。また、Arg541 の変異体は全て軽度の ATR を示した。各変異体の残存凝固活性 (RCA) を評価したところ、AT 不活性化後 30 分の RCA (30' RCA) [30' RCA=(凝固一段法活性) x (30' RRTA)] を野生型の 30' RCA で補正した「RCA スコア」は、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。

A. 研究目的

静脈血栓塞栓症は様々な先天的／後天的リスクにより発症する多因性疾患で、従来欧米人に多く日本人には少ないとされてきた。しかし、診断技術の向上や食生活の欧米化などにより日本人にも決して少なくないことが明らかにされている。遺伝性血栓症の原因として様々な凝固関連因子の遺伝子異常が同定されているが、いまだに原因不明な遺伝性血栓症もある。

我々は長らく原因不明であった遺伝性静脈血栓症家系において、通常は出血症状を示すプロトロンビン異常症で逆に血栓症の原因となる遺伝子変異を発見した。これはプロトロンビン遺伝子・F2 のミスセンス変異 (c.1787G>T, p.Arg596Leu: Yukuhashi 変異)

で、変異型トロンビンがアンチトロンビン (AT) 抵抗性 (ATR) を示し、トロンビン活性が長時間持続するために血栓症の原因となる。また、トロンビンと結合してその凝固活性を阻害する生理的凝固制御因子・トロンボモジュリン (TM) による凝固抑制作用に対しても、変異型トロンビンは抵抗性 (TMR) を示すことも明らかになっている。

本研究班で昨年我々は、F2 の Arg596 コドン (CGG) の一塩基置換により生ずる 596Leu (CTG) 以外のミスセンス変異体 (596Gln (CAG)、596Trp (TGG)、596Gly (GGG)、596Pro (CCG)) の AT ならびに TM による抗凝固作用に及ぼす影響を評価し、すべての Arg596 ミスセンス変異型プロトロンビン (596Gln、596Trp、596Gly) が ATR ならびに TMR を示し、

生体内では各変異型プロトロンビンの凝固能に依存して血栓症の引き起こしやすさにつながることが報告された。

今年度は、Arg596 以外での ATR 変異候補探索のため Na⁺結合領域(Thr540、Arg541、Glu592、およびLys599)での単一ヌクレオチド置換変異体の凝固活性特性を調査検討した。

B. 研究方法

野生型および変異型プロトロンビン発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に遺伝子導入後、各プロトロンビン安定発現細胞株を取得した。変異型プロトロンビンの凝固活性と ATR は、HEK293 細胞を用いて作製した各リコンビナント・プロトロンビンをプロトロンビン欠乏血漿に添加し再構成血漿を作製しそれぞれ検討に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、名古屋大学大学院医学系研究科倫理審査委員会の承認のもと、被験者から書面によるインフォームドコンセントを得て行った。

C. 研究結果

各変異プロトロンビンの凝固一段法によるプロトロンビン活性は 1.7~79.5%であった(表1)。一方、ATR を評価する AT による不活化 30 分後の残存トロンビン活性(30' RRTA)は、野生型プロトロンビンでは 5.1%であるのに対し、Lys599 と Thr540 の各変異体では >84%、Glu592 では Glu592Val(30' RRTA: 40.9%)を除いて 30' RRTA は 83.6~87.0%と高度な ATR を示し、Arg541 の変異体では 30' RRTA が 16.3~38.7%と中等度の ATR を示した(表1)。これら変異体の血栓性

リスクを推定するため、我々はプロトロンビン活性と 30' RRTA から残存凝固活性(residual clotting activity: RCA)を算出し、さらに野生型プロトロンビンに対する相対値(RCA スコア)を算出した(図1)。今回検討した変異プロトロンビンでは、Lys599Arg 変異(5.35)と Glu592Gln 変異(4.71)がプロトロンビン Yukuhashi 変異(4.36)および Belgrade 変異(5.19)に匹敵する高い RCA スコアとなった。

D. 考察

プロトロンビン異常症は、通常ではその凝固活性低下のため出血症状を示す。しかし、トロンビン Na⁺ 結合領域のミスセンス変異では、その一部は凝固活性が比較的保たれ、かつ変異型トロンビンが ATR を示すことにより凝固活性が長時間持続するため、血栓傾向となる。今回、検討したミスセンス変異体の多くが ATR を示したが、同時に凝固活性も低値を示した。出血傾向も血栓傾向もないと報告されている既報の Scranton 変異(Lys599Thr)もその一つであり、凝固能と抗凝固能のバランスが取れて無症候となっていることが考えられた。一方、Lys599Arg 変異と Glu592Gln 変異は、比較的凝固能は保たれ、しかも高度な ATR を示すことから、この変異が生じた場合には Yukuhashi 変異や Belgrade 変異と同様に血栓リスクとなることが推測された。

E. 結論

トロンビン Na⁺ 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。また、RCA スコアによる血栓リスク推定の結果、Lys599Arg 変

異と Glu592Gln 変異は Yukuhashi 変異や Belgrade 変異と同等の血栓リスクを呈するプロトロンビン異常症となることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida R, Seki S, Hasegawa J, Koyama T, Yamazaki K, Takagi A, Kojima T, Yoshimura M: Familial pulmonary thromboembolism with a prothrombin mutation and antithrombin resistance. *J Cardiol Cases*. 17(6): 197-199, 2018.
- 2) Sanda N, Suzuki N, Suzuki A, Kanematsu T, Kishimoto M, Hasuwa H, Takagi A, Kojima T, Matsushita T, Nakamura S.: Vwf K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice. *Int J Hematol*. 107(4): 428-35, 2018.
- 3) Tamura S, Suga Y, Tanamura M, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Hattori Y, Kakihara M, Suzuki S, Takagi A, Kojima T: Optimisation of antithrombin resistance assay as a practical clinical laboratory test: development of prothrombin activator using factors Xa/Va and automation of assay. *Int J Lab Hematol*. 40(3): 312-319, 2018.
- 4) 小嶋哲人: プロテインC、プロテインS ベッドサイド検査事典 『腎と透析』編集委員会: 編 腎と透析 Vol 84 2018 増刊号 231-2333, 2018.

- 5) 小嶋哲人: IX 治療薬へ パリン類似物質 徹底ガイドDICのすべて 丸藤哲編 救急・集中治療臨時増刊号 総合医学社 東京pp354-359, 2018.

2. 学会発表

- 1) 大平晃也, 田村彰吾, 坂根寛人, 所真昼, 垣原美紗樹, 服部有那, 橋本恵梨華, 鈴木幸子, 高木夕希, 高木明, 兼松毅, 岸本磨由子, 鈴木伸明, 松下正, 小嶋哲人: スプライシング異常を引き起こす血液凝固第 IX 遺伝子サイレント変異・血友病 B 分子病態 (O-001, P-002) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 平成 30 年 6 月 28-30 日
- 2) 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 高橋伸典, 田村彰吾, 兼松毅, 高木明, 小嶋俊久, 清井仁, 小嶋哲人, 石黒直樹, 松下正: 血友病 A において関節症の進行抑制には出血抑制よりも高い FVIII 活性が必要である (O-070) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 平成 30 年 6 月 28-30 日
- 3) 鈴木幸子, 高木夕希, 坂根寛人, 橋本恵梨華, 垣原美紗樹, 服部有那, 大平晃也, 所真昼, 田村彰吾, 高木明, 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 松下正, 山崎鶴夫, 小嶋哲人: 血液凝固第 V 因子欠乏症を合併する血友病 A 症例: 第 2 報・凝血学的評価 (P-005) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌, 平成 30 年 6 月 28-30 日
- 4) 鈴木敦夫, 鈴木伸明, 兼松毅, 岸本磨由子, 田村彰吾, 高木明, 川上萌, 梶浦容子, 小嶋哲人, 松下正: 凝固一段法と合成基質法による第 VIII 因子活性測定において乖離を示した血友病 A 症例 (P-008) 第 40 回日本血栓止血学会学術集会、札幌,

平成 30 年 6 月 28-30 日

- 5) 兼松毅, 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 高木明, 岸本磨由子, 川上(村田)萌, 田村彰吾, 三田直美, 小山大輔, 小嶋哲人, 清井仁, 松下正: ルーフプスアンチコアグラント低プロトロンビン血症症候群(LAHPs)の2例 (P-041) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 6) 勝見章, 渡辺浩, 松下正, 小嶋哲人: 臨床研究DB システムD☆Dを用いた静脈血栓塞栓症の発症率推計 (P-046) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 7) 三田直美, 鈴木伸明, 鈴木敦夫, 兼松毅, 岸本磨由子, 高木明, 小嶋哲人, 松下正, 中村 栄男: VWF K1362A ノックインマウスの解析 (P-054) 第40回日本血栓止血学会学術集会、札幌、平成30年6月28-30日
- 8) Tetsuhito Kojima: Antithrombin resistance: a unique inherited thrombophilia. Symposium 2: Enlarging horizon of thrombosis and hemostasis: emerging new therapeutic targets The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo 平成30年6月28-30日
- 9) Hattori Y, Takagi Y, Kakihara M, Suzuki S, Odaira K, Tokoro M, Tamura S, Suzuki N, Matsushita T, Kojima T: Functional analysis of a variant fibrinogen from dysfibrinogenemia patient with cerebral (P1-26) The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis,

Sapporo 平成 30 年 6 月 28-30 日

- 10) Misaki Kakihara, Shogo Tamura, Yuna Hattori, Sachiko Suzuki, Koya Odaira, Mahiru Tokoro, Takeshi Kanematsu, Nobuaki Suzuki, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima: Haploid origin of unusual Inv22 X-chromosome carrying wild-type telomere region in severe hemophilia A patients (P1-38) The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis, Sapporo 平成30年6月28-30日
- 11) 高木明, 田村彰吾, 小嶋哲人: アンチトロンビン抵抗性の診断—凝検査法を中心に— (SY1-3) 第19回日本検査血液学会学術集会、大宮、平成30年7月21-22日
- 12) 田村彰吾, 高木明, 藤岡亮也, 服部有那, 垣原美紗樹, 高木夕希, 鈴木幸子, 高木夕希, 小嶋哲人: 血漿検体測定を目指したアンチトロンビン抵抗性凝固第X因子検出法の構築 (023-2) 第19回日本検査血液学会学術集会、大宮、平成30年7月21-22日
- 13) Shogo Tamura, Katsue Suzuki-Inoue, Yukio Ozaki, Tetsuhito Kojima: Peri-arteriolar megakaryopoietic microenvironment via reciprocal CLEC-2/PDPN axis mouse bone marrow (SY-7-6) 第80回日本血液学会学術集会、大阪、平成30年10月12-14日
- 14) Yuna Hattori, Shogo Tamura, Misaki Kakihara, Sachiko Suzuki, Koya Odaira, Mahiru Tokoro, Humihiko Hayakawa, Tsuyoshi Kanematsu, Nobuaki Suzuki, Tadashi Matsushita,

- Tetsuhito Kojima: Molecular genetic analysis of dysfibrinogenemia including novel mutations with thrombosis (PS2-29-1) 第80回日本血液学会学術集会、大阪、平成30年10月12-14日
- 15) Akira Katsumi, Seara Ikeno, Hiroshi Watanabe, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima: Revalence of venous thromboembolism in a single institute (PS2-31-6) 第80回日本血液学会学術集会、大阪、平成30年10月12-14日
- (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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

表 1

Na⁺結合領域での
ミスセンス変異体
の凝固活性特性

	Clot Ac*	30' RRTA	ATR-phenotype	
K599T	8.46	101.40	Severe	Scranton
K599R	32.74	85.60	Severe	
K599E	13.43	84.20	Severe	
K599I	3.44	92.70	Severe	
K599N	8.43	94.80	Severe	
K599Q	8.37	88.80	Severe	
E592K	4.15	83.60	Severe	
E592Q	28.89	85.50	Severe	
E592A	3.66	85.80	Severe	
E592V	30.58	40.90	Moderate	
E592D	14.49	87.00	Severe	
T540A	9.35	94.60	Severe	
T540I	13.48	92.40	Severe	
T540N	4.17	89.00	Severe	
T540P	1.67	95.00	Severe	
T540S	12.67	90.30	Severe	rs752961431
R541G	38.72	33.20	Moderate	
R541W	45.54	28.60	Moderate	
R541Q	79.49	16.30	Mild	rs552953108
R541P	43.25	38.70	Moderate	
R541L	24.59	18.70	Mild	
WT	102.74	5.10	-	
R596L	25.13	90.90	Severe	Yukuhashi
R596Q	30.64	88.70	Severe	Belgrade

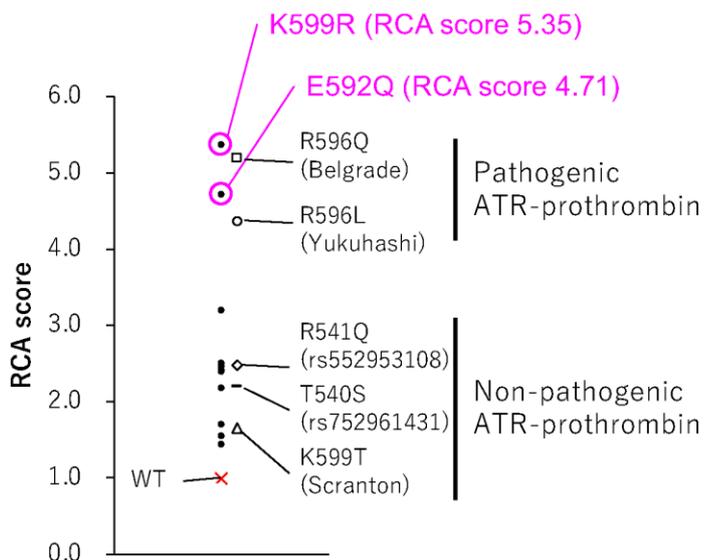
図 1

残存凝固活性スコア
[RCA score]

$$30' \text{ RCA} = (\text{Clot Ac}) \times (30' \text{ RRTA})$$

$$\text{RCA score} = \frac{30' \text{ RCA in mutant}}{30' \text{ RCA in wild type}}$$

	Clot Ac*	30' RRTA	30' RCA	RCA score	
WT	102.74	5.10	523.97	1.00	
R596L	25.13	90.90	2284.32	4.36	Yukuhashi
R596Q	30.64	88.70	2717.77	5.19	Belgrade



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

研究分担者 小林隆夫 浜松医療センター 名誉院長
森下英理子 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授
研究協力者 尾島俊之 浜松医科大学健康社会医学講座 教授
杉浦和子 名古屋市立大学大学院看護学研究科 講師

研究要旨

【目的】本研究では、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を目的とする。

【方法】研究方法としては、まずは昨年までと同様、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などから血栓性素因保有者を抽出しその背景を探るとともに、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を行い、その結果に加え、欧米の論文報告や指針などを参考に診療ガイドラインを策定する。

【結果】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を企画した。一次調査は、1) 調査対象施設の過去5年間（2014年～2018年）の分娩件数、2) 2014年1月1日から2018年12月31日までの5年間における妊娠・分娩のうち、遺伝性血栓性素因の合併症例の有無、3) 年度別の血栓性素因別症例数、4) 各施設における診断方法、5) 各施設における基本的な管理方法とし、遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩を経験した施設においては、二次調査として、1) 先天性血栓性素因の種類、診断方法、血栓症家族歴、既往妊娠分娩歴、2) 今回の妊娠分娩歴、妊娠中の管理方法、分娩時の管理方法、3) 分娩後の管理方法、母体転帰、新生児転帰を調査する。

【考察及び結論】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結果を踏まえ、欧米の論文報告や指針などを参考に診療ガイドラインを策定する予定であるが、現時点でのQ & A方式の診療ガイドラインの項目としては、下記の通りである。1) 遺伝性血栓性素因保有者とは？2) AT 欠乏症とは？3) PS 欠乏症とは？4) PC 欠乏症とは？5) 妊娠前もしくは経口避妊薬（以下OC）使用前の血栓性素因スクリーニングの必要性は？6) 妊娠中もしくはOC使用中に静脈血栓塞栓症が発症したら？7) 血栓性素因保有妊婦の妊娠中の管理は？8) 血栓性素因保有妊婦の分娩時の管理は？9) 血栓性素因保有妊婦の分娩後の管理は？10) 血栓性素因保有妊婦から出生した新生児の管理は？11) 血栓性素因保有女性に対するOC使用の可否は？12) 血栓性素因保有女性に対する不妊治療の注意点は？などの予定である。

A. 研究目的

平成 29 年に「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）」が指定難病 327 として認定された。「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）」とは、血液凝固制御因子であるプロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) およびアンチトロンビン (AT) が生まれつき欠乏することにより、血栓ができやすい体質になり、若年性（40 歳以下）に重篤な血栓症を発症する症候群である。したがって、遺伝性血栓性素因保有者が妊娠すると妊娠中や分娩後に血栓症を発症することがあり、その診断・治療に苦慮する。

なかでも先天性 AT 欠乏症は、頻度は少ないものの血栓症リスクが高く、どのように妊娠・分娩を管理すべきか一定の見解は定まっていない。しかし、現時点で遺伝性血栓性素因保有者の妊娠分娩に関する診療ガイドラインは作成されていない。また、日本人には血栓性素因としての PS 欠乏症（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を目的とする。

B. 研究方法

研究方法としては、まずは昨年までと同様、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などから血栓性素因保有者を抽出しその背景を探ると

ともに、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を行い、その結果に加え、欧米の論文報告や指針などを参考に診療ガイドラインを策定する。

全国調査研究は、郵送法により、問 1～問 5 の調査（別紙回答用紙 No. 1、回答用紙 No. 2）を行う。具体的には、日本産科婦人科学会の周産期登録施設へ調査票（415 施設）を郵送し、遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩症例数・診断法・管理法などを把握する。調査対象期間は、2014 年 1 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日までの 5 年間で、二次調査における 5 年間の遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩数は、約 100 例を見込んでいる。

遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩を経験した施設においては、各症例毎に二次調査（個票調査：別紙回答用紙 No. 3）も行う。症例毎の基本属性・発症日、実際に行われている診断法・管理法・転帰などの情報を把握し、解析する。

（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（金沢大学倫理委員会承認番号：890-1、浜松医療センター倫理委員会承認番号：平成 30 年度迅速第 78 号）を得た後に実施するため、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考える。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する。

C. 研究結果

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」の準備を行い、実際の調査は次年度早々に行う予定であるため調査結果はまだ得られていないが、調査項目は下記の通りである。

＜一次調査票（別紙回答用紙 No. 1、別紙回答用紙 No. 2）＞

・問 1. 調査対象施設の過去 5 年間（2014 年～2018 年）の分娩件数

・問 2. 2014 年 1 月 1 日から 2018 年 12 月 31 日までの 5 年間における妊娠・分娩のうち、遺伝性血栓性素因の合併症例の有無

・問 3. 年度別の血栓性素因別症例数

・問 4. 各施設における診断方法

・問 5. 各施設における基本的な管理方法

なお、遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩を経験した施設においては、同時に二次調査も行う。

＜二次調査票（別紙回答用紙 No. 3）＞

・No. 1：先天性血栓性素因の種類、診断方法、血栓症家族歴、既往妊娠分娩歴

・No. 2：今回の妊娠分娩歴、妊娠中の管理方法、分娩時の管理方法

・No. 3：分娩後の管理方法、母体転帰、新生児転帰

この調査結果は次年度に報告する予定である。

D. 考察

昨年までと同様、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などから血栓性素因保有者を抽出しそ

の背景を探るとともに、次年度早々に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を行い、その結果に加え、欧米の論文報告や指針などを参考に診療ガイドラインを策定する予定であるが、現時点での Q & A 方式の診療ガイドラインの項目としては、下記の通りである。

1) 遺伝性血栓性素因保有者とは？

2) アンチトロンビン (AT) 欠乏症とは？

3) プロテイン S (PS) 欠乏症とは？

4) プロテイン C (PC) 欠乏症とは？

5) 妊娠前もしくは経口避妊薬（以下 OC）使用前の血栓性素因スクリーニングの必要性は？

6) 妊娠中もしくは OC 使用中に静脈血栓塞栓症が発症したら？

7) 血栓性素因保有妊婦（AT・PS・PC 欠乏症）の妊娠中の管理は？

8) 血栓性素因保有妊婦（AT・PS・PC 欠乏症）の分娩時の管理は？

9) 血栓性素因保有妊婦（AT・PS・PC 欠乏症）の分娩後の管理は？

10) 血栓性素因保有妊婦（AT・PS・PC 欠乏症）から出生した新生児の管理は？

11) 血栓性素因保有女性に対する OC 使用の可否は？

12) 血栓性素因保有女性に対する不妊治療の注意点は？

E. 結論

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に関しては、「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」を行った上で引き続き十分に検討を重ねなければならないが、蓄積され

たデータの解析や文献を参考にしながら、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Morikawa M, Umazume T, Hosokawa-Miyanishi A, Watari H, Kobayashi T, Seki H, Saito S. Relationship between antithrombin activity and interval from diagnosis to delivery among pregnant women with early-onset pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2019 Feb 3. doi: 10.1002/ijgo.12780. [Epub ahead of print]
- Koizumi J, Hara T, Sekiguchi T, Ichikawa T, Tajima H, Takenoshita N, Tanikake M, Suyama Y, Kaji T, Kato K, Sone M, Arai Y, Anai H, Kichikawa K, Fujieda H, Nishibe T, Yamada N, Nakamura M, Nakano T, Kunieda T, Kuriyama T, Sugimoto T, Takayama M, Kobayashi T, Goto S, Kanazawa M, Itou M, Shirato K. Multicenter investigation of the incidence of inferior vena cava filter fracture. *Jpn J Radiol.* 2018 Nov;36(11):661-668. doi: 10.1007/s11604-018-0764-x. Epub 2018 Aug 14.
- Sugiura K, Ojima T, Urano T, Kobayashi T. The incidence and prognosis of thromboembolism

associated with oral contraceptives: age-dependent difference in Japanese population. *J Obstet Gynaecol Res* 2018 Sep;44(9):1766-1772. doi: 10.1111/jog.13706. Epub 2018 Jul 12.

- 杉浦和子, 尾島俊之, 浦野哲盟, 小林隆夫: わが国における経口避妊薬に関連した血栓塞栓症の年齢別発症数とその予後. *日産婦誌* 71(3):546, 2019
- 小林隆夫: エビデンスからみる OC・EP 配合剤の血栓症リスクとマネジメント. *Female Hormone Digest* 第2回: 1-5, 2018.6
- 小林隆夫, 杉浦和子: 連載「周術期に留意すべき凝固異常」第4回 後天性血栓性素因～女性ホルモン剤～. *Thromb Med* Vol.8, No.3: 206-210, 2018
- 小林隆夫: 月経困難症治療におけるルナベル配合錠 ULD の適正使用－血栓症リスクを考える－. *京* no.194, i-vii, 2018.1

2. 学会発表

- Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T. Thromboembolism as the adverse event of combined oral contraceptives in Japan. 63rd Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research. Berlin, 2019.2.28
- Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T. National survey of thromboembolism patients among Japanese users of female hormones. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis (APSTH),

- Sapporo, 2018. 6. 29
- Hirayama AT, Fukuda I, Kawasugi K, Kobayashi T, Nakanishi N, Nakamura M, Maeda H, Yamada N, Takeichi M, Okayama Y, Sunaya T, Ohashi Y, Sakaguchi T, Yamamoto N, Yamanaka S. The Interim Analysis of the Xarelto Post-marketing Surveillance in Japanese Patients with Venous Thromboembolism. 第 82 回日本循環器学会学術集会, 大阪, 2018. 3. 23
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 湘南藤沢徳洲会病院 VTE 医療安全セミナー. 藤沢, 2018. 3. 13
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 社会保険田川病院 VTE セミナー. 田川, 2019. 3. 22
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 広島. 広島, 2019. 3. 9
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 多摩. 立川, 2019. 2. 23
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 福岡. 福岡, 2019. 2. 10
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 埼玉. 大宮, 2019. 1. 26
 - 小林隆夫: OC/LEP に関連する静脈血栓症-SHBG と APC-sr の意義. 第 40 回日本エンドメトリオーシス学会ランチョンセミナー. 東京, 2019. 1. 20
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 釧路. 釧路, 2018. 12. 15
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 神戸. 神戸, 2018. 12. 8
 - 小林隆夫: リスク評価と予防こそが最高の武器～VTE 予防システムの確立と内科入院患者の取り組み～. 第 13 回医療の質・安全学会学術集会教育セミナー. 名古屋, 2018. 11. 24
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 函館. 函館, 2018. 11. 10
 - 小林隆夫: わが国における OC/LEP 使用時の血栓塞栓症の現状と課題. 千葉産婦人科研究会特別講演. 千葉, 2018. 11. 1
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 熊本赤十字病院医療安全研修会. 熊本, 2018. 10. 26
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 千葉. 柏, 2018. 10. 20
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 小倉医療センター平成 30 年度第 1 回医療安全管理研修. 北九州, 2018. 9. 28
 - 小林隆夫: 先天性 AT 欠乏症の周産期管理. 先天性 AT 欠乏症セミナー. 東京, 2018. 9. 22
 - 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 宮崎大学医学部附属病院医療安全講演会. 宮崎, 2018. 9. 14
 - 小林隆夫: 院内における静脈血栓塞栓症のリスク評価と予防対策. 徳島大学病院平成 30 年度安全管理研修会. 徳島,

2018. 9. 7

- 小林隆夫 : OC・LEP 配合剤の血栓症リスクと管理. 沼津産婦人科医会講演会. 沼津, 2018. 8. 31
- 小林隆夫 : 院内における肺血栓塞栓症の予防対策. 住友病院平成 30 年度第 1 回リスクマネジメント大会. 大阪, 2018. 6. 5
- 小林隆夫 : 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 下関市立病院医療安全講演会. 下関, 2018. 5. 25

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
なし
3. その他
なし

ご回答年月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

ご回答先生氏名 _____

メールアドレス _____

問 1. 貴施設の過去5年間(2014年～2018年)の分娩件数をご回答下さい。

(多胎も1分娩としてください)

5年間の分娩数:(_____)件

問 2. 2014年1月1日から2018年12月31日までの5年間における妊娠・分娩のうち、貴施設で妊娠・分娩管理した先天性血栓性素因の合併症例の有無について、該当する□に☑してください。なお、妊娠管理中に他院へ紹介した場合は、「症例なし」としてください。

1. 症例あり
 2. 症例なし
 3. 不明

- ◆ 「症例あり」の場合、問3・問4・問5・別紙のご記入をお願い致します
 - ・ 問3. 年度別の血栓性素因別症例数
 - ・ 問4. 貴施設における診断方法 (回答用紙 No. 2)
 - ・ 問5. 貴施設における基本的な管理方法 (回答用紙 No. 2)
 - ・ 別紙. 二次調査票 (個票調査)
- ◆ 「症例なし」および「不明」の場合、次の問4・問5のご記入をお願い致します
 - ・ 問4. 貴施設における診断方法 (回答用紙 No. 2)
 - ・ 問5. 貴施設における基本的な管理方法 (回答用紙 No. 2)

問 3. 問 2 の「症例あり」の症例について、年度別血栓性素因別症例数をご記入下さい。

	2014	2015	2016	2017	2018	合計
アンチトロンビン欠乏症						
プロテインS欠乏症						
プロテインC欠乏症						
その他						
合計						

貴施設における診断、妊娠中・分娩時・分娩後の管理方法についてお尋ねいたします。

* 調査期間中に症例がなくても過去に症例を経験している場合、妊娠管理中に他院へ紹介した場合、もしくは今後症例に遭遇した場合の対応も含めて記載してください。

問 4. 血栓性素因の診断について、次の 1. および 2. に該当する□に☑してください。

1. 活性値測定

- 1) 抗原量と活性値ともに測定
- 2) 抗原量のみ測定
- 3) 活性値のみ測定

2. 遺伝子診断の有無

- 1) 必ず行う (自施設 ・ 他施設に依頼)
- 2) 可能なら行う (自施設 ・ 他施設に依頼)
- 3) 行わない

問 5. 血栓性素因別の妊娠中・分娩時・分娩後の管理方法の該当する□に☑してください。

1. アンチトロンビン欠乏症 (抗凝固療法に関する質問)

妊娠中	分娩時	分娩後
<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 2) 症例ごとに決める <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 3) 行わない (慎重な観察のみ)	<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 2) 症例ごとに決める <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 3) 行わない (止血を確認するまで)	<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 2) 症例ごとに決める <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 3) 行わない (慎重な観察のみ)

2. プロテイン S およびプロテイン C 欠乏症 (抗凝固療法に関する質問)

妊娠中	分娩時	分娩後
<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 2) 症例ごとに決める <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 3) 行わない (慎重な観察のみ)	<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 2) 症例ごとに決める <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 3) 行わない (止血を確認するまで)	<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 2) 症例ごとに決める <input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン(IU/日) <input type="checkbox"/> ②他の薬剤() <input type="checkbox"/> 3) 行わない (慎重な観察のみ)

* プロテイン S 欠乏症とプロテイン C 欠乏症で管理方法が上記と異なる場合は下記に記載して下さい

3. 補充療法施行の有無 (アンチトロンビン欠乏症の場合)

妊娠中	分娩時	分娩後
<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> 2) 活性低下の場合は行う (%) 以下の場合(IU/日) <input type="checkbox"/> 3) 行わない	<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> 2) 活性低下の場合は行う (%) 以下の場合(IU/日) <input type="checkbox"/> 3) 行わない	<input type="checkbox"/> 1) 必ず行う <input type="checkbox"/> 2) 活性低下の場合は行う (%) 以下の場合(IU/日) <input type="checkbox"/> 3) 行わない

* 活性化プロテイン C 製剤を使用する場合は、使用時期と用量を下記に記載して下さい。

4. その他自由記載

* 2例以上の症例がある場合は、お手数ですが
本用紙(No.1~No.3)をコピーしてご回答下さい。

以下、1~11の項目についてご回答ください。

1. 先天性血栓性素因の種類

<input type="checkbox"/> アンチトロンビン
<input type="checkbox"/> プロテイン S
<input type="checkbox"/> プロテイン C
<input type="checkbox"/> その他()

2. 診断方法

1) 活性値測定

<input type="checkbox"/> 抗原量 ()
<input type="checkbox"/> 活性値 ()

2) 遺伝子診断の有無

<input type="checkbox"/> 有 (変異のタイプ:)
<input type="checkbox"/> 無

3) 診断時期

<input type="checkbox"/> 今回の妊娠以前 (その時期:)
<input type="checkbox"/> 今回の妊娠中 () 週

3. 血栓症家族歴

<input type="checkbox"/> 有 (保因者ありの場合、保因者の血縁関係親族をすべてご記載下さい) ()
<input type="checkbox"/> 無

4. 血栓症既往歴

<input type="checkbox"/> 有 (血栓症の種類と部位:)
<input type="checkbox"/> 無

5. 既往妊娠分娩歴

① 妊娠回数: _____ 回
② 分娩回数: _____ 回
③ 妊娠合併症の有無
<input type="checkbox"/> 有
<input type="checkbox"/> 習慣流産・不育症
<input type="checkbox"/> 常位胎盤早期剥離
<input type="checkbox"/> 妊娠高血圧症候群
<input type="checkbox"/> その他()
<input type="checkbox"/> 無

6. 今回の妊娠分娩歴

① 年齢: _____ 歳
② 身長・体重: _____ cm _____ kg(妊娠初期) _____ kg(分娩時)
③ 妊娠・分娩帰結
(1) 分娩年月日 (_____ 年 _____ 月 _____ 日)
(2) <input type="checkbox"/> 経膈分娩 <input type="checkbox"/> 予定帝王切開 <input type="checkbox"/> 緊急帝王切開 (_____)週
(3) <input type="checkbox"/> 単胎 <input type="checkbox"/> 多胎
(4) <input type="checkbox"/> 早産(_____)週
(5) <input type="checkbox"/> 流産(_____)週
<input type="checkbox"/> 人工流産 <input type="checkbox"/> 自然流産
④ 妊娠合併症の有無
<input type="checkbox"/> 常位胎盤早期剥離
<input type="checkbox"/> 妊娠高血圧症候群
<input type="checkbox"/> その他(_____)

7. 妊娠中の管理方法

① 妊娠中の抗凝固療法施行の有無
<input type="checkbox"/> 有
<input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン (_____)IU/日を妊娠(_____)週より開始
* 妊娠中に用量の増減があれば記載してください
(_____)
<input type="checkbox"/> ②他の薬剤 (_____)
<input type="checkbox"/> 無
② 妊娠中の補充療法施行の有無
<input type="checkbox"/> 有
<input type="checkbox"/> ①アンチトロンビン製剤 (_____)IU/日を妊娠(_____)週より開始
* 妊娠中に用量の増減があれば記載してください
(_____)
<input type="checkbox"/> ②他の薬剤 (_____)
<input type="checkbox"/> 無

8. 分娩時の管理方法

① 分娩時の抗凝固療法施行の有無
<input type="checkbox"/> 有
<input type="checkbox"/> ①未分画ヘパリン (_____)IU/日を投与
<input type="checkbox"/> ②他の薬剤 (_____)
<input type="checkbox"/> 無
② 分娩時の補充療法施行の有無
<input type="checkbox"/> 有
<input type="checkbox"/> ①アンチトロンビン製剤 (_____)IU/日を(_____)に投与
<input type="checkbox"/> ②他の薬剤 (_____)
<input type="checkbox"/> 無

9. 分娩後の管理方法

① 分娩後の抗凝固療法施行の有無

有

①未分画ヘパリン ()IU/日を、分娩後()日まで投与

②ワルファリン ()mg/日を、分娩後()日まで投与

③他の薬剤 ()

無

② 分娩後の補充療法施行の有無

有

①アンチトロンビン製剤 ()IU/日を、分娩後()日まで投与

②他の薬剤 ()

無

10. 母体転帰

異常なし

血栓症発症(部位と発症時期:)

出血合併症(部位と重症度:)

その他の異常()

11. 新生児転帰

出生時体重()g

Apgar スコア(/1分, /5分)

男児 女児

異常なし

異常あり(異常の詳細を下記に記載して下さい)

()

母親の血栓性素因と同様の欠乏因子を測定してあれば記載してください

臍帯血 血漿

抗原量() 活性値()

遺伝子診断を行ってあれば記載してください

()

以上、ご協力ありがとうございました。

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

研究分担者	大賀正一	九州大学・大学院医学研究院・成長発達医学・教授
研究協力者	落合正行	九州大学・大学院医学研究院・周産期小児医療学・准教授
	石村匡崇	九州大学病院・総合周産期母子医療センター・助教
	市山正子	九州大学病院・総合周産期母子医療センター・助教
	井上普介	九州大学病院・総合周産期母子医療センター・助教
	永田 弾	九州大学病院・小児科・助教
	堀田多恵子	九州大学病院・検査部・部門長
	内海 健	九州大学・大学院医学研究院・臨床検査医学・准教授
	康東 天	九州大学・大学院医学研究院・臨床検査医学・教授
	小原 收	公益財団法人かずさ DNA 研究所
	石黒 精	国立成育医療研究センター

研究要旨

本研究事業において研究分担者らは、新生児・小児血栓症の包括的な診療アルゴリズムの確立を目指して、「特発性血栓症（小児領域）診療ガイドの策定」を分担した。分担者らの研究施設では、血栓性素因の症例を前向きに集積し、遺伝子検査と診療を行っている。これまでの症例登録から得られた血栓症例より、臨床像の多様性と後天性因子が明らかになった。新生児は抗凝固因子の活性値から遺伝性血栓症の診断が困難であり、効率的な遺伝子診断を求めて遺伝子解析パネル作成した。全国の周産期母子医療センターと新生児・小児診療施設を対象に一次調査を行い、血栓症の疫学を調査した。今後二次調査では、個別の症例調査と高次医療の診療実績を問い、遺伝子パネル検査の提案と診療支援を行う予定である。今後新規治療法の保険適応に向けた診療アルゴリズムの確立を目指す。

A. 研究目的

新生児期および小児期発症の特発性血栓症は稀少であるが、集中治療や周術期医療の進歩、および疾患認知の普及に伴い増加傾向にある。新生児期はとりわけ血栓症の危険が高く、本邦の新生児集中治療施設における発症頻度は、この10年で約2倍に増加した。私たちはこれまで、このような血栓症は新生児期と Adolescents and Young Adults (AYA) 世代の発症が多いこと、新生児から乳児期にかけて発症した症例はプロテインC (PC) 欠乏症が多く、AYA

世代発症例にはプロテイン S (PS) とアンチトロンビン (AT) 欠乏症が多いこと、さらに胎児水頭症、頭蓋内出血、電撃性紫斑病など成人とは異なる発症様式を呈することを報告してきた。さらに新生児期はPCとPS活性値の基準範囲が定められず、遺伝子解析のコンセンサスも確立されていなかった。そこで新生児期発症のPC欠乏症を集積し、PC活性値に加えてPC/PS活性比が遺伝子変異の診断に有用であることを示した (Ichiyama M et al. J Perinatol 2018)。本研究班で私たちは、新生児・小児血栓症

の包括的な診療アルゴリズムの確立を目指して、「特発性血栓症（小児領域）診療ガイドの策定」を分担する。

B. 研究方法

九州大学病院小児科及び検査部では、血栓性素因の症例を前向きに集積し、遺伝子検査と診療を行っている。本研究計画は九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会（448-02）の承認を受けている。

C. 研究結果

1) 後天性血栓症の小児例の経験

症例1：正期産男児。家族歴に血栓性素因なし。日齢13に発作性上室性頻拍で入院、日齢77で脳静脈洞血栓症をおこし未分画へパリンで軽快した。新生児の脳静脈洞血栓症は症状に乏しく、画像評価が困難である（Matsuoka W et al. *Pediatr Neonatol* 2014）。症例2：先天性心疾患の正期産児。重度の僧房弁逆流のため日齢34に僧房弁形成術、術後4日目にTMA様の激しい消費性凝固障害をきたした。僧房弁閉鎖術により軽快した（Matsunaga Y et al. *Pediatr Neonatol* 2018）。症例3：出生直後に左下肢の虚血をきたした早産児。D-dimerの上昇なく、画像検査にて血管奇形の遺残座骨動脈と診断した。新生児血栓症診断では画像検査の適応が難しいため、症候からの整理が必要である（Kirino M, et al. *Am J Perinatol* 2017）。

2) 新生児血栓症遺伝子解析パネル検査

新生児ではプロテインC（PC）、プロテインS（PS）およびアンチトロンビンの活性値か

ら各因子欠乏による遺伝性血栓症を診断することが困難なため、効率的な遺伝子診断が必要となる。公益財団法人かずさDNA研究所の協力で、PCとPS遺伝子（*PROC*、*PROS1*）を含む遺伝子解析パネル作成した。当院で集積された新生児血栓症の未診断例でパネル検査の検定を行っている。

3) 全国調査のアウトライン

全国の周産期母子医療センターと新生児・小児診療施設に一次調査票を送付した。新生児血栓症の診療実績を問うものであり、症例提示の同意を得た施設を対象に二次調査票を送付する予定である。二次調査では、個別の症例調査と高次医療（移植医療、特異的因子補充療法、新規抗凝固療法等）の診療実績を問い、未診断例には下記遺伝子パネル検査を提案する。パネル検査施行例に対しては、追跡調査と高次医療を含めた診療支援を行う。

D. 考察

症例の集積により、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が提案できる。

E. 結論

遺伝性PC欠乏症において、保因者である親族からの生体肝移植は適切ではない。そこで小児間でのドミノ生体肝移植が試みられ、その有益性が報告された（Matsunami M et al. *Pediatr Transplant* 2015）。また

特異的因子補充療法や新規凝固療法の有効性も報告されつつある。今後患者会と連携して、新規治療法の保険適応に向けた診療アルゴリズムの確立を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiyoshi J, Yamaza H, Sonoda S, Yuniartha R, Ihara K, Nonaka K, Taguchi T, Ohga S, Yamaza T. Therapeutic potential of hepatocyte-like-cells converted from stem cells from human exfoliated deciduous teeth in fulminant Wilson's disease. *Sci Rep*. 2019 Feb 7;9(1):1535.
- 2) Ichiyama M, Inoue H, Ochiai M, Ishimura M, Shiraishi A, Fujiyoshi J, Yamashita H, Sato K, Matsumoto S, Hotta T, Uchiumi T, Kang D, Ohga S. Diagnostic challenge of the newborn patients with heritable protein C deficiency. *J Perinatol*. 2019 Feb;39(2):212-219.
- 3) Nagata H, Terashi E, Muraoka M, Uike K, Hirata Y, Tatewaki H, Fujita Y, Yamamura K, Ohga S. High incidence of ductal closure or narrowing at birth in patients with right ventricular outflow tract obstruction with normal orientation of the ductus arteriosus. *Cardiol Young*. 2019 Jan;29(1):54-58.
- 4) Kinjo T, Inoue H, Kusuda T, Fujiyoshi J, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Koga Y, Hara T, Ohga S. Chemokine levels predict progressive liver disease in Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis. *Pediatr Neonatol*. 2018 Sep 24. pii: S1875-9572(18)30128-1.
- 5) Itami H, Hara S, Matsumoto M, Imamura S, Kanai R, Nishiyama K, Ishimura M, Ohga S, Yoshida M, Tanaka R, Ogawa Y, Asada Y, Sekita-Hatakeyama Y, Hatakeyama K, Ohbayashi C. Complement activation associated with ADAMTS13 deficiency may contribute to the characteristic glomerular manifestations in Upshaw-Schulman syndrome. *Thromb Res*. 2018 Oct;170:148-155.
- 6) Okuzono S, Ishimura M, Kanno S, Sonoda M, Kaku N, Motomura Y, Nishio H, Oba U, Hanada M, Fukushi JJ, Urata M, Kang D, Takada H, Ohga S. *Streptococcus pyogenes*-purpura fulminans as an invasive form of group A streptococcal infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018 Jul 9;17(1):31.
- 7) Uehara E, Nakao H, Tsumura Y, Nakadate H, Amari S, Fujinaga H, Tsutsumi Y, Kang D, Ohga S, Ishiguro A. Slow Elevation in Protein C Activity without a PROC Mutation in a Neonate with Intracranial Hemorrhage. *AJP Rep*. 2018 Apr;8(2):e68-e70.
- 8) Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H,

Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol*. 2018 Dec;59(6):595-599.

2. 学会発表

- 1) 市山正子、井上普介、白石暁、石村匡崇、藤吉順子、山下博徳、佐藤和夫、落合正行、大賀正一：遺伝性プロテインC欠乏症新生児を予測するための血漿プロテインC/S活性比：第121回日本小児科学会学術集会 2018年4月20-22日 福岡市
- 2) 金城唯宗、井上普介、藤吉順子、市山正子、落合正行、高畑靖、原寿郎、大賀正一：一過性異常骨髄増殖症を合併したDown症候群における肝障害の進行と血清ケモカイン値の関連：第28回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 2018年6月15日 宮崎市
- 3) 安岡和昭、田中幸一、井上普介、藤吉順子、松下悠紀、落合正行、古賀友紀、松浦俊治、田口智章、大賀正一：生体肝移植を施行した一過性骨髄異常増殖症の1例：第28回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 2018年6月15日 宮崎市
- 4) 園田素史、石村匡崇、市山正子、藤吉順子、井上普介、落合正行、大賀正一：新生児HSV関連血球貪食性リンパ組織球

症 (HSV-HLH) ～病態と予後因子の検討～：第28回日本産婦人科・新生児血液学会 2018年6月16日 宮崎市

- 5) 大賀正一、市山正子、落合正行、石村匡崇、石黒精、末延聡一、西久保敏也、高橋幸博、嶋緑倫、瀧正志、堀田多恵子、内海健、康東天：シンポジウム「小児の遺伝性血栓性素因の特徴とその治療」：第19回日本検査血液学会学術集会 2018年7月22日 さいたま市
- 6) 井上普介、江上直樹、安岡和昭、澤野徹、市山正子、藤吉順子、金城唯宗、落合正行、大賀正一：一過性異常骨髄増殖症における肝障害と血清ケモカイン値の推移との関連：第63回日本新生児成育医学会学術集会 2018年11月22-24日 東京都
- 7) 市山正子、江上直樹、安岡和昭、澤野徹、井上普介、藤吉順子、落合正行：新生児発症遺伝性プロテインC欠乏症の効率的診断法に関する検討：第63回日本新生児成育医学会学術集会 2018年11月22-24日 東京都

G. 知的財産権の出現・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