

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業

血液凝固異常症等に関する研究班

第 2 回班会議

日時：平成 31 年 2 月 1 日（金）午前 10 時～午後 4 時 30 分

場所：慶應義塾大学病院 2 号館 11 階中会議室

プログラム・抄録集

研究代表者 村田 満

血液凝固異常症等に関する研究班 第2回班会議プログラム

日時：平成31年2月1日（金）午前10時～午後4時30分

場所：慶應義塾大学病院 2号館11階中会議室

10：00～ 研究代表者 挨拶 村田 満

10：10～ 厚生労働省難病対策課 林 瑞季 様

10：20～ **I T P研究班** 研究計画 富山 佳昭

サブグループリーダー：富山 佳昭 大阪大学医学部

研究分担者：桑名 正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科

羽藤 高明 愛媛大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

研究協力者：

藤村 欣吾 安田女子大学／倉田 義之 四天王寺悲田院

柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科／高蓋 寿朗 広島西医療センター

10：35～ **T T P研究班** 研究計画 松本 雅則

サブグループリーダー：松本 雅則 奈良県立医科大学

研究分担者：宮川 義隆 埼玉医科大学医学部

小亀 浩市 国立循環器病研究センター

研究協力者：

藤村 吉博 日本赤十字社近畿ブロック血液センター／和田 英夫 三重大学医学部

上田 恭典 倉敷中央病院／日笠 聡 兵庫医科大学

八木 秀男 奈良県総合医療センター

10：50～ **aHUS研究班** 研究計画 南学 正臣（代）池田 洋一郎

サブグループリーダー：南学 正臣 東京大学医学部

研究分担者：香美 祥二 徳島大学医学部

研究協力者：池田 洋一郎 東京大学医学部／伊藤 秀一 横浜市立大学医学部

丸山 彰一 名古屋大学医学部／芦田 明 大阪医科大学

11:05～ **特発性血栓症研究班** 研究計画 森下 英理子

サブグループリーダー：森下 英理子 金沢大学

研究分担者：小嶋 哲人 名古屋大学医学部

津田 博子 中村学園大学大学院栄養科学研究科

小林 隆夫 浜松医療センター

大賀 正一 九州大学医学部

研究協力者：

宮田 敏行 国立循環器病研究センター／坂田 洋一 自治医科大学

横山 健次 東海大学医学部附属八王子病院／中村 真潮 村瀬病院

榛沢 和彦 新潟大学教育研究院／尾島 俊之 浜松医科大学

杉浦 和子 名古屋市立大学／根木 玲子 国立循環器病研究センター

辻 明宏 国立循環器病研究センター／和田 英夫 三重大学医学部

落合 正行 九州大学

疫学協力 島田直樹 国際医療福祉大学

杉田 稔 東邦大学

11:20～12:20 **各グループミーティング**

12:20～13:00 **昼食**

13:00～13:40

I T P班研究報告：司会 富山 佳昭

桑名正隆 「ITP 診断に有用な臨床検査法の実用化に向けた試み」

羽藤高明 「臨床調査個人票集計による ITP の全国疫学調査」

柏木浩和・富山佳昭「成人 ITP 治療参照ガイドの改訂：進捗状況および今後の予定」

13:40～14:30

T T P班研究報告：司会 松本 雅則

松本雅則 「後天性血栓性血小板減少性紫斑病患者における疾患感受性 HLA の検討」

小亀浩市 「先天性 TTP 疑い患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析」

藤村吉博 「先天性 TTP の極印 - 交換輸血が必要な新生児期重症溶血性黄疸 - の機序判明？」

宮川義隆 「Minds 方式による TTP 診療ガイドライン改訂」

14 : 30～14 : 55

aHUS 班研究報告 : 司会 南学正臣 (代) 松本 雅則

南学正臣・香美祥二

池田洋一郎 「aHUS における凝固異常のコホート解析」

菅原有佳 「CFH/CFHR gene cluster 内の融合遺伝子により生じた aHUS 2 例」

14 : 55～15 : 10 休憩

15 : 10～16 : 10

特発性血栓症班研究報告 : 司会 森下 英理子

森下英理子 「欠乏症をきたす異常アンチトロンビン蛋白の機能解析」

津田博子 「血中プロテイン S 濃度の予測因子の検討」

小嶋哲人 「血栓性素因の調査研究 :

アンチトロンビン抵抗性を示すトロンビン Na+結合領域ミスセンス変異」

落合正行・大賀正一 「特発性血栓症・先天性血栓性素因領域

新生児・小児血栓症の包括的診断アルゴリズムに向けて」

小林隆夫 「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

および診療ガイドラインの策定」

終了

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業

血液凝固異常症等に関する研究班 研究代表者 : 村田 満

事務局 : 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 富田ゆかり 村田教授室TEL : 03-5363-3838

サブグループ研究

ITP サブグループ

グループリーダー：富山佳昭	大阪大学医学部附属病院 病院教授
班員：桑名正隆	日本医科大学 教授
羽藤高明	愛媛大学医学部附属病院 病院教授
村田 満	慶應義塾大学医学部 教授
研究協力者：藤村欣吾	安田女子大学 教授
倉田義之	千里金蘭大学
高蓋寿朗	国立病院機構 広島西医療センター 部長
柏木浩和	大阪大学大学院医学系研究科 講師
島田直樹	国際医療福祉大学 教授

ITP 診療に関して本研究班では、従来の成果を継続、発展すべく、H29-H31 において、以下の項目を 3 つの柱として ITP の解析を行う。

- 1) 疫学研究、
 - 2) 治療の標準化、特に ITP 治療の参照ガイドの作成、
 - 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
- 以下にその概要を記載

1) 疫学研究の継続、発展（羽藤、倉田、島田）

H27 年度より指定難病に変更され、臨床個人調査表の様式も改訂されている。ITP 班は厚労省研究班からの模擬申請対象疾患に選ばれ、その審査会を経て平成 31 年より情報提供が予定されている。

2) ITP 治療の参照ガイド 2019 年版の作成（2012 年版の改定）（柏木、全班員）

成人慢性 ITP の診療に関して海外のガイドを参照しつつ、*H. Pylori* 除菌療法など、わが国の特徴を加味し ITP 治療の参照ガイド

2012 年度を作成、公開した（現在オープンアクセス化）。2017 年 3 月にリツキシマブの ITP に対する保険償還が認められたことに対応し、2012 年版の改定作業を開始（柏木）。今回改定版として 2019 年版の草案を提示する。

3) 病態解析と ITP 診断検査の開発とその普及（桑名、富山、柏木）

ITP の診断は、いまだ除外診断が主体となっている。そのため、さらなる病態解析とそれに基づく診断法の開発が必要である。当 ITP サブグループが提唱した ITP 診断基準案に関して、その基盤となる検査法の一般化、標準化、保険収載にむけて検討する。

同時に ITP における抗血小板抗体の解析とその検出法の開発、ELISPOT assay の実用化、網状血小板比率測定その他施設共同研究の検討、血小板減少症の鑑別診断など、ITP 診断法の検討およびその病態の解析法の検討を行う。

TTP サブグループ

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
分担研究者：小亀 浩市	国立循環器病研究センター	部長
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
研究協力者：上田 恭典	倉敷中央病院 血液内科	部長
日笠 聡	兵庫医科大学 血液内科	講師
八木 秀男	奈良県総合医療センター血液・腫瘍内科	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

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。

本年度の計画

以下の項目を実施する。

- 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

本年度ADAMTS13活性とインヒビターが保険適用となり、TMAレジストリーへの登録は減少するかと思われたが全体で42例(総数1516例)、ADAMTS13活性が10%未満の著減例(総数663例)で新規26例の登録があった。ただし、先天性TTPの新規登録は1例のみであり、今後発見が困難になる可能性がある。TTP診療ガイドは、改定すべき項目が複数あるので次年度中には改定を行いたいと考えている。

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) サブグループ研究計画

サブグループリーダー：南学正臣 東京大学 腎臓・内分泌内科 教授

分担研究者： 南学正臣 東京大学 腎臓・内分泌内科 教授

香美祥二 徳島大学 小児科 教授

研究協力者： 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

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 小児科 教授

芦田 明 大阪医科大学 小児科 講師

池田洋一郎 東京大学 腎臓・内分泌内科 助教

目的

本サブグループは、本邦での aHUS 症例の遺伝学解析および生化学的手法による診断とコホート解析を実施している。今後も引き続き aHUS 疑診患者の診断を行うと共に、本邦の新たなガイドライン作成に向けた活動を実施する。

進捗状況

2014 年から継続している aHUS のコホート調査は今年で 5 年目を迎える。2013 年までの奈良県立医大の症例をあわせて現在、200 例以上の症例がコホートとして集まっている（奈良県立医大の症例は 77 例）。Sanger 法 and/or whole exome sequencing (WES) 法にて遺伝子解析した症例は aHUS 190 例、C3 腎症 5 例となった。

本邦の aHUS における遺伝子異常は欧米と異なり C3 の異常が多く（全体の 3 割程度）、その中でも約 8 割が I1157T 変異をもつことがこれまでにわかってきたが、CFH の遺伝子異常の頻度は欧米と比べては高くはないものの（全体の約 10%）、多彩な変異が認められ、新規の遺伝子異常部位も複数認められた。また本邦における CFI 変異は 4 例と少ないが、全例で R201S という共通の変異を有しており本邦特有の変異である可能性が示唆された。

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において multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) によって構造多型を調査すると 12 例中 2 例で構造多型異常が認められた。（CFH/CFHR1 の融合遺伝子と、CFH および CFHR 4-2-5 の欠損）

また、検査依頼のあった症例のほぼ全例で行っているヒツジ赤血球を用いた溶血試験よ抗 CFH 抗体検査もデータが蓄積してきている。

来年度の研究計画と変更点

1) aHUS 事務局機能の移転

現在、東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科にて aHUS 事務局を運営しているが、これを名古屋大学医学部附属病院 腎臓内科へ移転する。

2) サブグループリーダーを南学正臣 教授（東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科）から丸山彰一 教授（名古屋大学医学部附属病院 腎臓内科）に変更し、南学正臣 教

授を研究協力者とする。

- 3) 補体学会と提携して aHUS が疑われる症例に対して遺伝子検査を行う。(WES からパネル検査に変更)
- 4) 名古屋大学医学部附属病院 腎臓内科にて aHUS 疑いの症例に対してヒツジ赤血球溶血試験および抗 CFH 抗体の検査を行う。
- 5) aHUS レジストリーの継続。
- 6) aHUS 患者のコホート追跡の継続。
- 7) WES のデータを用いて既知の遺伝子異常の見つからなかった aHUS 症例における新規責任遺伝子あるいは疾患感受性のあるハプロタイプの同定を行う。
- 8) aHUS 診療ガイドラインの作成
治療においては十分なエビデンスが蓄積していないため CQ には含まれないと判断しているが、「遺伝子検査は aHUS の診断に必須か？」を CQ とし、2015 年の aHUS 診療ガイドを基にガイドラインを作成する方針である。

特発性血栓症／先天性血栓性素因サブグループ研究報告

研究分担者：

森下英理子 金沢大学
大賀正一 九州大学
小嶋哲人 名古屋大学
小林隆夫 浜松医療センター
津田博子 中村学園大学

研究協力者：

尾島俊之 浜松医科大学
坂田洋一 自治医大
杉浦和子 名古屋市立大学
辻 明宏 国立循環器病研究センター
中村真潮 村瀬病院
根木玲子 国立循環器病研究センター
宮田 敏行 国立循環器病研究センター
榛沢和彦 新潟大学
横山健次 東海大学
和田英夫 三重大学

特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症(VTE)のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診療ガイドの作成を通して、VTEの予知・予防の対策確立を目的としている。具体的には、最終的な研究課題として、「先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、ならびに「妊娠合併先天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。

本年度当研究班は、全国から相談された新生児・小児発症例ならびに、成人発症例の遺伝子解析を行った。また、個別研究としては、遺伝性血栓性素因の診療ガイドライン作成のため有用な病態解析ならびに診断のための検査法の改良並びに開発に向けて、それぞれ以下の検討が行われた。大賀らによる「新生児・小児血栓症の包括的診断アルゴリズムに向けて—新生児血栓症遺伝子パネル」、小嶋らによる「アンチトロンビン(AT)抵抗性を示すトロンビンNa+稀有合領域ミスセンス変異」、津田らによる「血中プロテインS濃度の予測因子の検討」、森下らによる「欠乏症をきたす異常AT蛋白の機能解析」「AT活性測定法の標準化への取り組み」を行った。また、妊婦管理の診療ガイドライン策定に向けて、小林らは「遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩管に関する全国調査研究」のアンケートを作成し、近々実施予定である。

平成31年度は、早々に「遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩管に関する全国調査研究」を実施し、アンケート結果の解析から「妊娠合併先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」策定をめざしたい。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。一方で、診断に用いる活性測定法の標準化を順次進めていき、ATに関しては基準値の設定を行う予定である。

個別研究

ITP 診断に有用な臨床検査法の実用化に向けた試み

桑名正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科
富山佳昭 大阪大学医学部附属病院輸血部

ITP の診断には今なお 1990 年に厚生省研究班により作成された診断基準が用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり骨髓検査で巨核球の減少や他系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他疾患の除外が診断根拠となる。しかし、血小板減少をきたす全ての疾患を診療で除外することは現実的に困難で、そのために多岐に渡る血液、画像検査を実施することは医療経済的にも好ましくない。本研究班では平成 16 年度に多施設前向き研究を実施し、ITP に感度、特異度の高い臨床検査に組み合わせて ITP を診断する診断基準案を作成した。本基準は侵襲性の低い血液検査のみで迅速に結果が得られ、感度 93%、特異度 75%と良好な結果を示したが、項目に含まれる検査を保険診療で測定できない点が課題となっていた。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、網血小板比率、トロンボポエチン (TPO) は研究目的での受託測定が可能になったが、標準化されてない上に検査費用が発生することから一般診療で普及してない。これら問題点を解決するためには、再現性・汎用性の高い臨床検査薬 (体外診断薬) の開発が不可欠である。

ITP サブグループでは、これまで抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、TPO の臨床検査キットの実用化を目的とした取り組みを行ってきた。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を体外診断薬として認証を受けることを目的とした基礎検討では、キットを構成する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し、すでに最終条件設定を完了した。また、TPO 測定キットは 2 種類の抗 TPO 抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA として測定系を構築した。性能評価のために血小板減少症患者を対象とした小規模での評価を実施中である。

臨床調査個人票集計による ITP の全国疫学調査

研究分担者 羽藤高明（愛媛大学）

研究協力者 島田直樹（国際医療福祉大学）

倉田義之（四天王寺悲田院）

1. 目的・方法

厚生労働省に提出された臨床調査個人票のデータを解析し、本邦における ITP 診療状況を明らかにする。

2. 臨床調査個人票のデータ集計状況

厚労省から平成 27 年度以降の臨床調査個人票集計データの提供が止まっているために年度毎の解析ができない状態が続いている。厚労省は指定難病に関するデータ提供に当たって申請様式や審査方法を策定中であり、厚労省研究班からの模擬申請とその審査会を経て平成 31 年には提供開始を予定している。

3. 平成 17-26 年度データ

我々は昨年度、厚労省から平成 17-26 年度までの 10 年間の臨床個人調査票データを入手し、脳出血および消化管出血のリスク因子等を解析した。今回は同じデータベースを用いて皮膚粘膜出血症状と血小板数やその他の因子との関連について検討した。対象患者は血小板数の測定時期と出血症状の発現時期が近いと考えられる新規発症登録患者とした。また、小児の登録患者数は極めて少ないため、18 歳以上を対象とし、成人 ITP 患者の解析に限定した。平成 17 年から 26 年度までの 10 年間に新規発症した 18 歳以上の ITP 患者は 20,022 人であった。紫斑の出現頻度は血小板数の低下に伴って直線的に増加していて、いわゆる紫斑発現の血小板数閾値は存在しなかった。一方、歯肉出血、鼻出血、血尿などの粘膜出血と消化管出血、脳出血などの内臓出血は血小板数 1 万/ \cdot 1 未満で急激に増加するパターンをとっていた。年齢との相関では、皮膚・粘膜出血は 60 歳以上に多く、年齢との弱い関連がみられたが、血小板数の方が関連は強いと思われた。しかし、内臓出血は年齢増加とともに直線的に増加し、明らかな相関が見られた。これらの結果から、出血症状の出現リスクは血小板数と年齢を基にある程度判断することができ、特に内臓出血の発現は血小板数と年齢がともに大きく関与するが、皮膚・粘膜出血症状の発現は年齢よりも血小板数が大きく関与していた。

成人ITP治療参照ガイドの改訂：進捗状況および今後の予定

大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学 柏木浩和
大阪大学医学部附属病院輸血部 富山佳昭

2012年に厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 血液凝固異常症に関する調査研究班から、「成人ITP治療の参照ガイド2012年版」を発表した。このガイドは当時のITP治療に関する世界の情勢や、研究班での研究成果と専門医の意見を踏まえ、本邦の実態に即して作成した。このガイドの特徴としては、まず本邦に特徴的といえるピロリ菌関連ITPの位置づけが明確化された。またITPの治療開始基準および治療目標が明示され、副腎皮質ホルモンを1st Line、脾臓摘出術（脾摘）を2nd Line、その他の治療を3rd Lineとする治療の流れがその推奨度とともに示された。ITP治療に対する基本的な理念はその後も大きな変わりはなく、2012年版ガイドは現在においても十分有用なものである。しかし、当時発売直後であったために3rd Lineに位置付けられていたトロンボポエチン受容体作動薬（TPO-RA）の使用経験が蓄積され、その長期的な有効性および安全性が明らかにされてきた。さらに欧米では2nd Lineに位置付けられていたリツキシマブが2017年に成人ITPにおいて保険収載された。一方で脾摘は実施症例が減少してきており、副腎皮質ステロイド抵抗例における2nd Line治療の選択において、臨床現場の判断と参照ガイドの乖離が大きくなってきている。また1st Lineとして用いられる副腎皮質ステロイドの投与方法に関しても、海外からデキサメサゾン大量療法の有効性が報告されるなど、ITP治療に関する新たなエビデンスが蓄積されてきている。このような状況を鑑み、成人ITP治療ガイドの改訂に関する検討を行ってきており、今回、その草案（第1稿）を提示したい。最大の改定点は、2nd Line治療として、TPO-RA、リツキシマブおよび脾摘を推奨し、それぞれの薬剤の選択は、患者の状態や好みに合わせて個々に判断する、とした点にある。班員の皆様の率直なご意見をお伺いしたい。

後天性血栓性血小板減少性紫斑病患者における疾患感受性 HLA の検討

奈良県立医科大学輸血部 松本雅則、○酒井和哉

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 に対する自己抗体の産生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。遺伝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 月より多施設共同研究を開始した。解析症例数が 50 例を超えたので、その解析結果を報告する。

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患者を対象とした。同意取得後に患者 EDTA 採血 2ml を 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 11 遺伝子座について第 3 区域まで解析した。健常人の HLA アリル頻度は HLA 研究所より公開されているものを使用し、 χ 二乗検定を用いて統計解析を行った。なお、当研究は奈良県立医科大学および紹介医療機関両方のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認のもと実施した。

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。連鎖不均衡などを加味し解析した結果、HLA-A*11:01 ($p=0.009$ 、オッズ比: 2.07 (95%CI: 1.149-3.521)) および HLA-DRB1*08:03 ($p=0.0008$ 、オッズ比: 2.43 (95%CI: 1.369-4.088))、HLA-DPB1*19:01 ($p=0.003$ 、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 a-TTP 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 (治療抵抗性、予後など) との関連性を検討中である。

先天性 TTP 疑い患者家系の ADAMTS13 遺伝子解析

国立循環器病研究センター分子病態部 小亀浩市

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は血漿中の von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減（正常血漿の 10%未満）によって起こる疾患であり、先天性と後天性に大別される。先天性 TTP は常染色体劣性遺伝形式を示し、患者は ADAMTS13 遺伝子異常の複合ヘテロ接合体あるいはホモ接合体、両親（保因者）はヘテロ接合体である。本研究では、日本における先天性 TTP 疑い患者家系を対象として ADAMTS13 遺伝子解析を行っている。今年度は、先天性 TTP 疑い患者の 1 家系を解析し、第 1 回班会議で報告した。

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、複合ヘテロ接合体性（40 家系）あるいはホモ接合体性（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。次年度には、1 家系でも異常を同定したいと考え、ロング・リード・シーケンシングを行う予定である。

先天性 TTP の極印 - 交換輸血が必要な新生児期重症溶血性黄疸 -

の機序判明？

日本赤十字社近畿ブロック血液センター 藤村吉博、高橋幸博
日本海総合病院小児科 田辺さおり
奈良医大輸血部 松本雅則、酒井和哉

先天性 TTP (別名 Upshaw-Schulman 症候群、USS) は稀疾患で、ADAMTS13 遺伝子異常に基づく先天性同酵素活性欠損症である。古典的には、「患者は新生児期に交換輸血が必要な Coombs 試験陰性の重症黄疸があり、小児期には慢性再発性の血小板減少症が見られる」と記載されており、本症状は USS 患者の極印 (hallmark) と考えられてきたが、発生機序は不明のままであった。今回、奈良医大で登録している USS 患者の自然史解析にて、生後 1 ヶ月以内に 3 回の溶血性発作を反復している一女兒例を発見した。本患者は動脈管開存症 (PDA, patent ductus arteriosus) の合併例で、この超稀症例の新生児期臨床経過から、動脈管の存在が hallmark 発症成因に重要との結論を得た。

【症例】患者は 2003 年生まれで、生直後に 1 回目の溶血発作 (①) があり、交換輸血で治療された。2 回目 (②) は生後 11 日目で、PDA による左心不全に伴って生じた。3 回目 (③) は 19-21 日目の 3 日間、インドメタシンの経静脈投与後、生後 26 日目に出現した。29 日目に PDA の外科的閉鎖術が施行され、以後、溶血発作は完全に停止し、改めて発作が生じたのは水痘に罹患した生後 14 ヶ月時であった。USS の確定診断は 3 歳時に ADAMTS13 解析にてなされた。

【結論・考察】健常児では、分娩後、肺呼吸が始まると、高酸素血が大動脈から肺動脈に流入し、この刺激によって動脈管は瞬時に痙攣収縮し、機能的閉鎖となる。その後 48 時間以内には器質化を伴って動脈管は完全閉鎖に至る。①について：本患児は PDA で、高酸素血流入だけでは完全閉塞には至らず、狭窄血管内で急激なずり応力上昇が起こり血小板凝集と溶血発作を生じた。②について：左心不全に基づく低酸素血症にて、血管内皮細胞からの VWF 放出が促され、溶血発作を生じさせた。③について：インドメタシンは COX 阻害剤で、血中のプロスタサイクリン (血管拡張剤) 濃度を低下させる。このため、投与後は速やかに動脈管収縮 (攣縮) による機能的閉鎖を誘発するが、本患児は内径 3.8 mm と比較的大きな PDA 合併のため、完全閉鎖に至らず、血管狭窄のみが助長され、動脈管内のずり応力がさらに上昇し、溶血発作が生じた。生後 29 日目に、外科的処置により PDA を完全閉鎖することにより、高ずり応力の発生は遮断され、以後はこの発作が消失したことは、以上の仮説を裏付ける。

Minds 方式による TTP 診療ガイドライン改訂

埼玉医科大学病院

宮川義隆

【背景】血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）が 2015 年に国の指定難病となり、本研究班は本邦初となる「血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）診療ガイド 2017」を作成して公開した。医学の進歩は早く、TTP に対する新薬の登場を控え、厚生労働省と国立保健医療科学院が推奨する Minds 方式によるガイドライン改訂の準備を進める。

【目的】Minds 方式による TTP 診療ガイドライン改訂

【方法】

1. 日本医療機能評価機構の医療情報サービス（Minds）による診療ガイドラインの作成支援（講習会）を受ける。
2. 同機構による「診療ガイドラインの作成の手引き 2014」を参考にする。
3. システマティックレビューを以下の手順で行う
 - (ア) クリニカルクエスチョン（CQ）設定
 - (イ) エビデンス収集
 - (ウ) エビデンス総体の評価と統合
 - (エ) 推奨度の決定
4. ガイドライン公開
5. 活用促進（ホームページ、学会誌、出版）
6. 「希少疾患などエビデンスが少ない領域での診療ガイドライン作成」に関する Minds からの提言（2016 年）を参考にする
 - (ア) CQ 設定では、当該希少疾病の全国調査の成績などを元に、疾病の自然史を把握し、重要臨床課題を抽出した上で CQ を設定する。
 - (イ) 文献検索では、海外の特定地域などに偏在する場合も考慮して、英文以外の研究論文の検索と入手も行う
 - (ウ) 症例報告、症例集積のような論文しか入手できない場合でもバイアスリスクを過剰に恐れず、定性的な評価も検討する
 - (エ) 推奨作成では、システマティックレビューの結果に加えて、益と害のバランス、患者の価値観・希望を考慮し、コスト・資源についても評価を行う
 - (オ) エビデンスが極めて乏しく、合意形成に達しない CQ では、推奨を作成せずに臨床研究推奨の提言に留めることも考慮する

aHUS における凝固異常のコホート解析

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

池田洋一郎，櫻井仁子，加藤秀樹，南学正臣

徳島大学医学部・小児科

香美祥二

これまで aHUS での凝固関連因子のプロファイルについては知られていなかった。我々のコホートを解析した結果 (aHUS 15 例，二次性 TMA 20 例，正常コントロール 15 例)，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。

CFH/CFHR gene cluster 内の融合遺伝子により生じた aHUS 2 例

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

菅原有佳, 池田洋一郎, 加藤秀樹, 南学正臣

徳島大学医学部・小児科

香美祥二

本邦の aHUS コホートにおいて CFH/CFHR gene cluster における融合遺伝子を有していた症例を 2 例認め、それらについて報告する。

症例 1 は 40 歳女性。32 歳時に胃腸炎罹患後に急性腎不全をきたし、透析導入された。36 歳時に母をドナーとする生体腎移植をうけるも術後 2 日目に血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy; TMA) をきたしたが、エクリズマブ投与により病勢の改善を得た。症例 2 は 55 歳男性。倦怠感・下痢・嘔吐を主訴に受診し、各種検査ののちに臨床的 aHUS と診断された。血漿交換により病勢の改善を認めた。

これらの 2 症例は、ヒツジ赤血球溶血試験が陽性であったことから H 因子関連の補体制御異常が示唆された。まずサンガー法や全エクソンシーケンスを用いた一般的な遺伝子解析を行ったが原因変異は認めず、また抗 H 因子抗体も検出されなかった。次に CFH に関連した融合遺伝子を有する可能性を考慮し、更なる精査として MLPA 法によるコピー数解析を施行した。症例 1、2 の両方で CFH/CFHR gene cluster 内に多型として報告のない稀なコピー数変化を認め、この結果をもとに融合遺伝子の存在を仮定し、long PCR 法により融合遺伝子が存在することを確認した。さらに、PCR 産物のダイレクトシーケンスにより融合点周辺の配列を明らかにした。

既知の原因遺伝子のエクソンに対するサンガー法や、WES による解析では原因遺伝子は不明であったが、ヒツジ赤血球溶血試験という機能解析と、MLPA というコピー数解析を併用したことで、融合遺伝子の検出につながった。aHUS の遺伝子解析においては MLPA などのコピー数解析を行うことが有用と考えられた。

欠乏症をきたす異常アンチトロンビン蛋白の機能解析

金沢大学医薬保健研究域病態検査学 森下英理子

先天性アンチトロンビン (AT) 欠乏症 I 型患者 5 症例の遺伝子解析を行い、5 種類の新規の遺伝子変異を同定した。これらの変異について遺伝子組換え変異蛋白を作製し、I 型欠乏症をきたす機序について解析した。5 種類の変異は、① c.112delG (p. Asp38Tyrfs*12)、②c.155_161dupTGTGCAT (p. Tyr55Valfs*12)、③c.613delC (p. Leu205Trpfs*56)、④c.1069delA (p. Ile357Leufs*7)、⑤ c.1331_1337delTAAGAGA (p. Ile444Lysfs*4) である。site-directed mutagenesis により変異型 AT 発現ベクターを作製し、HEK293 細胞にリポフェクト法を用いて導入、48 時間培養後細胞溶解液と培養上清を回収した。細胞内の抗原量と細胞外へ分泌された抗原量を ELISA で測定した結果、野生型の抗原量を 100%とした場合の 1~5 の変異型の抗原量は、細胞溶解液ではそれぞれ 2.7、0.2、4.9、7.4、111.1%、培養上清ではそれぞれ 0.8、1.0、3.6、1.7、11.0%であった。蛍光免疫染色により細胞内の AT 蛋白の局在を調べると、変異 1、3、4、5 では細胞質内に AT 蛋白の分布を示す蛍光が検出されたが、変異 2 では検出されず、さらに変異 2 は mRNA の定量を行ってもほとんど検出されなかった。以上の結果から、変異 1、3、4、5 は細胞内で変異蛋白が合成されるが分泌される前に分解されてしまうか、あるいは分泌されても速やかに分解されると考えられた。一方、変異 2 は mRNA が合成されないか、あるいは合成されても速やかに分解されてしまう可能性が示唆された。このような機序により、AT 欠乏症をきたすものと考えられた。

血中プロテイン S 濃度の予測因子の検討

中村学園大学大学院栄養科学研究科 津田博子

「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）」の診断基準では、プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS)、アンチトロンビン(AT)活性のいずれかが基準値の下限値未満であることが必須条件となっている。健康人の血中 PS 濃度は約 320 nM (25 μ g/mL) で、約 60%が補体制御因子 C4b-binding protein (C4BP) と 1:1 のモル比で複合体を形成し、残りの約 40%の遊離型 PS が活性化 PC (APC) の cofactor として機能する。前回、クエン酸加血漿中での PS-C4BP 複合体の解離、トロンビン感受性ドメインの切断について報告したが、今回は、PS-C4BP 複合体解離の影響を除いた測定系による血中 PS 濃度について、その予測因子について報告する。

血中 PS 濃度は閉経前女性で低く、妊娠・産褥期やエストロゲン製剤服用時には更に低下する。一方、主に欧米中高年成人を対象とした解析から、血中 PS 濃度が血中脂質、炎症マーカー、脂肪蓄積などの心血管病危険因子と正に相関することが報告されている。そこで、心血管病を発症しておらず非妊娠の日本人中年肥満女性 62 名 (48.5 \pm 7.8 歳) および若年非肥満女性 160 名 (20.0 \pm 0.3 歳) を対象として、血中総 PS 抗原量、遊離型 PS 抗原量、総 PS 活性と心血管病危険因子との関連を検討した。なお、エストロゲン製剤服用者、PS Tokushima 変異保有者は除外した。

中年肥満女性の約半数は閉経後で脂質異常症に罹患していた。血中総 PS 抗原量は estradiol と負に、triglycerides、total cholesterol、LDL cholesterol、ApoB、ApoC-II、ApoC-III、ApoA-II、Apo E、lipoprotein (a)、遊離脂肪酸、空腹時血糖、HbA1c、fibrinogen、PC と正に関連していたが、BMI、体脂肪率、内臓脂肪面積、血圧、HDL cholesterol、apoA-I、insulin、HOMA-IR、高感度 CRP、HMW adiponectin、total PAI-1、FVII活性とは関連しなかった。遊離型 PS 抗原量、総 PS 活性もほぼ同様の傾向を示した。重回帰分析の結果、総 PS 抗原量、総 PS 活性の正の予測因子として PC、ApoC-II、fibrinogen が選択され、遊離型 PS 抗原量では ApoC-II のみが選択された。次に、脂質異常症に罹患していない若年非肥満女性を対象に、同様の重回帰分析を実施したところ、総 PS 抗原量の正の予測因子として ApoC-II が選択されたが、総 PS 活性、遊離型 PS 抗原量では選択されなかった。

ApoC-II は triglycerides を多く含むリポタンパク質上に存在し、血管内皮細胞膜上の lipoprotein lipase の cofactor として triglycerides の加水分解を促進する。

PS は血液凝固制御だけでなく、補体制御、アポトーシス制御などに関与する多機能タンパク質であるが、今回の結果から脂質代謝制御との関連が示唆された。

血栓性素因の調査研究：

アンチトロンビン抵抗性を示すトロンビン Na⁺結合領域ミスセンス変異

名古屋大学大学院学系研究科 小嶋哲人

アンチトロンビン (AT) 抵抗性 (ATR) プロトロンビン血症は、プロトロンビンの Na⁺結合領域の Arg596 のミスセンス変異によって引き起こされる遺伝性の血栓性疾患である。これまでプロトロンビン Yukuhashi (Arg596Leu)、Belgrade (Arg596Gln)、および Padua 2 (Arg596Trp) 変異体が ATR-プロトロンビンとして報告され、家族性静脈血栓症リスクの原因とされている。ATR 表現型をもたらすその他のプロトロンビン変異候補を探索するため、Na⁺結合領域アミノ酸残基における単一ヌクレオチド置換により引き起こされるプロトロンビン変異体の凝固活性特性を調べた (Thr540、Arg541、Glu592、および Lys599)。全てのプロトロンビン変異体の分泌量は、野生型プロトロンビンのそれと同程度であった。各変異体の凝固活性は、凝固一段法では 1.7%~79.5%、発色合成基質二段法では 2.0%~104.5%であった。野生型プロトロンビンにおいて、30 分間 AT で不活性化した後の相対残存トロンビン活性 (RRTA) (30' RRTA) は 5.1%であった。対照的に、プロトロンビン Yukuhashi (Arg596Leu) および Belgrade (Arg596Gln) の 30' RRTA は、それぞれ 90.9%および 88.7%であった。Lys599 および Thr540 の変異プロトロンビンはすべて重度の ATR 表現型を示した (30' RRTA > 84%)。さらに、Glu592 のほとんどの変異体も ATR 表現型 (30' RRTA: 83.6~87.0%) で、Glu592Val は中程度の ATR 表現型 (30' RRTA: 40.9%) を示した。また、Arg541 の変異体は軽度の ATR 表現型を示した (30' RRTA: 16.3~38.7%)。これらの変異による血栓症リスクを推定するため、我々は各プロトロンビン変異体の残存凝固活性 (RCA) を評価した。AT による 30 分不活性化後の RCA (30' RCA) [30' RCA = (凝固一段法活性) x (30' RRTA)] を野生型の RCA で補正した「RCA スコア」は、プロトロンビン変異体 Lys599Arg (5.35) および Glu592Gln (4.71) ではプロトロンビン Yukuhashi (4.36) および Belgrade (5.19) と同等であった。トロンビンの Na⁺結合領域でのミスセンス変異トロンビンは AT による不活性化に対する抵抗性を引き起こし、そのうち Lys599Arg および Glu592Gln 変異は既知のプロトロンビン Yukuhashi および Belgrade と同様の血栓症リスクを有する可能性のあることが判明した。

[次年度分担研究計画： SEPINC1 遺伝子異常の分子病態解析]

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

および診療ガイドラインの策定

研究分担者：浜松医療センター名誉院長	小林隆夫
金沢大学医薬保健研究域保健学系病態検査学教授	森下英理子
研究協力者：浜松医科大学健康社会医学講座教授	尾島俊之
名古屋市立大学大学院看護学研究科講師	杉浦和子
浜松医療センター産婦人科医長	平井久也

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あたり、遺伝性血栓性素因患者の妊娠分娩管理に関するアンケート調査を、これらの患者の妊娠分娩管理を行う可能性が高い日本産科婦人科学会の周産期登録施設 415 施設に対して行う。今年度は金沢大学および浜松医療センター倫理委員会での承認をうける予定で現在申請中である。すべての準備が整い次第、アンケート調査は次年度に実施する。

具体的には、日本産科婦人科学会の周産期登録施設へアンケート調査票を郵送し、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。一次調査内容は下記の項目である。

- 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、各症例毎に二次調査（個票調査）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。

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終了後に日本の現状を把握したうえで、診療ガイドラインを策定する予定であるが、Q&A の骨子は下記の通りである。項目の追加や修正部分があればご意見をいただきたい。

- 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？

以上は、森下英理子先生、津田博子先生、小嶋哲人先生、宮田敏行先生が担当

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？

これは小林隆夫が担当

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？

以上は、安達知子先生、根木玲子先生、平井久也先生、小林隆夫が担当。今回のアンケート調査結果や文献および各種ガイドラインを参考にして作成

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？

これは大賀正一先生が担当

11) 血栓性素因保有女性に対する OC 使用の可否は？

これは小林隆夫が担当

12) 血栓性素因保有女性に対する不妊治療の注意点は？

これは安達知子先生が担当

など

特発性血栓症・先天性血栓性素因領域

新生児・小児血栓症の包括的診断アルゴリズムに向けて

市山正子¹⁾、落合正行²⁾、石村匡崇¹⁾、大賀正一¹⁾

九州大学大学院医学研究院 1)成長発達医学、2)周産期・小児医療学
研究協力者

堀田多恵子、内海 健、康 東天（九州大学臨床検査医学）

小原 収（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）

血栓症は多元病であり、遺伝的背景と環境要因、および発症年齢によってその病態は多彩となる。本研究班では、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」を分担してきた。今年度下半期の進捗と展望を報告する。

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する予定である。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。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。

新生児血栓症遺伝子パネル

遺伝性血栓症を、新生児期のプロテイン C (PC) とプロテイン S (PS) 活性値から診断することは困難である。効率的な遺伝子診断アルゴリズムが必要であり、PC 活性値と PC/PS 活性比を含む遺伝子変異の予測式を作成した (Ichiyama M. J Perinatol 2018)。さらに PC と PS 遺伝子 (*PROC*、*PROSI*) 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う予定である。

根治治療と予防法への展開

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. 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ガイドラインの確立を目指す。