

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

平成 26 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 村田 満

慶應義塾大学医学部

平成 27 年 3 月

目次

血液凝固異常症等に関する研究

・ 総括研究報告書	村田 満 慶應義塾大学 ----- 1
-----------	---------------------

・ 分担研究報告書

ITP (特発性血小板減少性紫斑病) 研究グループ

グループリーダー： 富山佳昭 大阪大学医学部附属病院

班員： 桑名正隆 日本医科大学

羽藤高明 愛媛大学医学部附属病院

研究協力者： 藤村欣吾 安田女子大学

倉田義之 四天王寺大学

高蓋寿朗 国立病院機構呉医療センター

柏木浩和 大阪大学大学院医学系研究科

宮川義隆 埼玉医科大学

特別協力者(疫学班)： 杉田 稔 東邦大学医学部衛生学

島田直樹 国際医療福祉大学

ITP グループ研究総括：富山佳昭 -----9

分担研究報告

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

桑名正隆：抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞検出法の実用化に向けた試み

羽藤高明：臨床調査個人票（平成24年度）集計による特発性血小板減少性紫斑病の
全国疫学調査

TTP（血栓性血小板減少性紫斑病）研究グループ

グループリーダー：藤村吉博	奈良県立医科大学
班員：宮川義隆	埼玉医科大学
和田英夫	三重大学
小亀浩市	国立循環器病研究センター
研究協力者：森木隆典	慶應義塾大学
日笠 聡	兵庫医科大学
上田恭典	倉敷中央病院
宮田敏行	国立循環器病研究センター
八木秀男	近畿大学奈良病院
松本雅則	奈良県立医科大学

TTP グループ研究総括：藤村吉博 -----62

分担研究報告

藤村吉博：ADAMTS13 活性測定試薬の保険適用取得への活動状況

宮川義隆：血液凝固異常症等に関する研究

和田英夫：肝移植におけるTMAの発症と血小板活性化との関係に関する研究

小亀浩市：先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析に関する研究

特発性血栓症 研究グループ

グループリーダー：	小嶋哲人	名古屋大学
班員：	宮田敏行	国立循環器病研究センター
	小林隆夫	浜松医療センター
	森下英理子	金沢大学
研究協力者：	坂田洋一	自治医科大学
	横山健次	東海大学
	榛沢和彦	新潟大学
	尾島俊之	浜松医科大学
	杉浦和子	浜松医科大学
	根木玲子	国立循環器病研究センター
	中村真潮	村瀬病院

特発性血栓症グループ研究総括：小嶋哲人 -----98

分担研究報告

小嶋哲人：特発性血栓症リスク・AT resistance検出検査

宮田敏行：日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテインS K196E
変異のELISA法を用いた検出法の確立に関する研究

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

森下英理子：先天性アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS欠損症の
臨床症状・検査所見、ならびに新規経口抗凝固薬が活性測定におよ
ぼす影響

. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----135
. 研究成果の刊行物・別冊	-----149
. その他	

總括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）

平成26年度総括研究報告書

「血液凝固異常症等に関する研究班」

研究代表者 村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授

研究要旨

本研究班は難治性疾患政策研究事業として、エビデンスに基づいた全国共通の診断基準・重症度分類の作成や改正、診療ガイドライン等の確立や改正及び普及などを目的としている。領域別基盤研究分野「血液系分野」の中で、特に止血・血栓領域を対象とし、平成26年度は特発性血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、特発性血栓症（先天性血栓性素因）を取り上げた。3疾患について、それぞれ3つのサブグループに分かれて課題に取り組むとともに、グループ間の相互議論を活発に行うことによって、(1)分子病態に基づいた診断基準、治療指針の確立/普及およびその効果の検証、(2)大規模な疫学的解析による我が国での発症頻度、予後の把握と治療の標準化などを図る。平成26年度は3年計画の1年目として、新たに治療参照ガイドを作成、また、平成27年1月より新たに施行された指定難病医療費助成制度にむけて臨床個人調査表の改訂、重症度分類の設定などを行った。また臨床的有用性の高いデータベース化システムの構築、そして新しい体外診断薬の開発や検証、新規治療の検証と保険適応へ向けての検討を班全員の参加のもとに行った。疫学研究は臨床個人調査表を基に平成24年度の本邦におけるITPの実態を調査把握した。またTMA患者の集積を続行した。特発性血栓症/静脈血栓症グループにおいては先天性血栓性素因の診断基準を作成した。研究班全体の活動を公開するためホームページを作成した。<http://ketsuekigyoko.org/index.html>

ITP（特発性血小板減少性紫斑病）研究グループ

ITPは特定疾患治療研究事業の対象で公費助成対象疾患である。その診断ならびに治療法の向上、標準化は急務である。このために本研究班ではITPに関して、1)疫学調査、2)診断および治療の参照ガイドの作成および改訂、3)病態解析およ

び新規治療法の評価を中核としてグループ研究および個別研究を行った。

疫学研究に関しては特定疾患治療研究事業の対象疾患にともなって毎年行われるITP臨床個人調査表を基に、新規発症症例数、更新症例数、発症年齢、性、分布、さらには罹病期間、治療内容、合併症、現在のQOL、等を解析した。平成15年から開始し本年は平成24年度をまとめ

ることが出来た。平成 24 年度の ITP 医療受給者証所持患者は 24,100 人であり、このうち解析可能であった臨床調査個人票は 18,115 人分 (75%) であった。これら解析症例のうち新規患者数は 3,192 人、更新患者数は 14,923 人であり、平成 23 年度とほぼ同数であった。また個人調査表の改訂作業については国際的な動向を考慮し、さらに臨床医に対して調査票記入の労力を軽減すべくより簡便に記載できるように配慮し、個人調査表の改訂案を作成した。平成 27 年 1 月より ITP の臨床調査個人表は、改訂版に変更されている。

妊娠合併 ITP 診療の参照ガイドの作成に関しては、参照ガイド作成委員会を組織した。約 15 年前にも特発性造血器障害調査研究班で提案されたが、医療環境、医療に対する意識、医療手段の変化により必ずしも適切なガイドラインとはいえない状況となってきた。一方では、妊娠合併 ITP に関しては、妊婦という特殊事情もあり治療のエビデンスは皆無であり、今後も臨床試験を行うことは不可能に近い。なぜなら、ほとんどの妊婦は臨床試験に消極的であるからである。そのため、産婦人科、小児科、麻酔科の ITP のエキスパートに参画頂き、専門家のコンセンサスの形で診療の参照ガイドを作成し、「臨床血液」誌に掲載した (妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド. 臨床血液 55:934-947, 2014)。本参照ガイドもオープンアクセス化している。

その他個別研究に関しては、1) ITP 診断における IPF%測定の有用性、2) 血小板減少状態での血小板機能解析法の検

討、3) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出法の実用化に向けた試みなどが実施された。

TTP(血栓性血小板減少性紫斑病)研究グループ

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) グループの目標は、本疾患の病態解析と治療法の開発を基礎と臨床の両面から行うことである。平成 26 年度は、グループ全体として、TTP 症例の集積、TTP の診断基準作成、重症度分類作成を行った。また血栓性血小板減少性紫斑病における ADAMTS13 測定の保険適用取得にむけ「早期導入を要望する医療機器に関する要望書」を作成し、日本血液学会を通じて厚生労働省に提出し、ヒアリングを受けた。また、本年度は後天性 TTP で血漿交換に対して難治性、再発性の症例に対して、CD20 に対するモノクローナル抗体リツキシマブの保険適用拡大のための医師主導治験を別研究班と協力して実施した。平成 26 年末で治験は終了し、来年度に保険適用取得を目指している。

1) TTP の診断基準と重症度分類の作成:平成 27 年 1 月 1 日から新しい医療費助成制度が始まることより、TTP が指定難病となり公費助成の対象となった。疾患の診断基準および助成対処を決定する重症度分類を作成した。

2) 日本国内の TMA 症例の集積:1998 年 7 月から日本国内の医療機関からの依頼によって ADAMTS13 活性測定を行うことで、TMA 症例の集積を行ってきた。その症例数は 2014 年 12 月末で 1323 例となり、

この1年間で72例増加した。

3) ADAMTS13検査の保険適用取得への取り組み：TTPの診断基準にADAMTS13活性とインヒビターが含まれているが、日本国内ではADAMTS13検査は保険適用となっていない。そのため、ADAMTS13検査が保険収載されるように厚生労働省へ要望するとともに、ADAMTS13活性測定キットの体外診断用医薬品承認を目指している。来年度は承認申請を行うため、医薬品医療機器総合機構(PMDA)と相談後に臨床性能試験を実施する予定である。

4) 難治性、再発性TTPに対するリツキシマブの医師主導治験：血漿交換に不応であるもしくは難治である症例が報告されており、最近まではビンクリスチンやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤が経験的に使用されてきた。このような症例では、CD20に対するモノクローナル抗体リツキシマブが有効であることが国内外から報告されている。日本国内においてリツキシマブはTTPに対して保険適応を有していないことから、本サブグループが中心となって、医師主導治験を2014年に実施した。目標の症例数は6例で、7例の登録があったが、評価対象は目標通り6例となった。

特発性血栓症研究グループ

本研究班における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のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診断基準ならびに診療ガイドの作成を通して、エコノミークラス症候群

として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策確立を目的としている。

今年度は、特発性血栓症(静脈血栓塞栓症)の誘因となる先天性血栓性素因についての政策研究として先天性血栓性素因の診断基準を作成するとともに、診療ガイドの策定の策定に向けての調査研究を行った。

さらに各個研究については、それぞれ特発性血栓症の発症実態の把握、発症予防のための適切な診療に向けての診断法の開発やその有効性についての調査研究を行った。特発性血栓症(静脈血栓塞栓症)の先天的要因である「先天性血栓性素因」の診断基準作成を行い、次年度以降に「先天性血栓性素因患者の診療ガイド」や「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイド」の作成に向けて、先天性血栓性素因についての実態調査アンケートを計画している。また、個別研究として「特発性血栓症リスク・AT resistance 検出検査法による新たな症例」、「広島豪雨土砂災害の深部静脈血栓症」、「日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテインS K196E変異のELISA法を用いた検出法の確立」、「先天性プロテインS欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定」、「先天性アンチトロンピン、プロテインC、プロテインS欠損症の臨床症状・検査所見、ならびに新規経口抗凝固薬が活性測定値におよぼす影響」の研究が行われた。

グループ研究報告書

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 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 四天王寺大学 教授
高蓋寿朗 国立病院機構呉医療センター 科長
柏木浩和 大阪大学大学院医学系研究科 講師
宮川義隆 埼玉医科大学 教授

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

グループ総括

分担研究者：富山 佳昭

研究要旨

ITP に関して、1) 疫学調査、2) 治療の標準化（特に ITP 治療の参照ガイドの作成および改訂）、3) ITP 診断法の標準化と病態解析を基盤とした新規診断法の検討、を中核としてグループ研究および個別研究を行った。疫学研究は臨床個人調査表を基に平成 24 年度の本邦における ITP の実態を調査把握した。平成 24 年度においても発症年齢、更新年齢とも中高年の男女に最も多い事が確認された。本研究班にて、産科、小児科、麻酔科の専門家も参加した作成委員会を組織し、横断的に作成した「妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド」を完成し、日本血液学会にて承認を受け、臨床血液誌に掲載した。論文は、血液内科医以外の診療科の医師も参照できるように、フリーアクセスとした。さらに本班会議から血液学会、産婦人科学会、小児科学会など関係する医師に別冊を配布した。また、平成 27 年 1 月より新たに施行される指定難病医療費助成制度にむけて、ITP の臨床個人調査表の改訂、重症度分類の設定を行った。個人研究では、診断に関して、引き続き検査の標準化を検討し、IPF%の測定法の保険収載に向けての基礎的検討、血小板抗体測定法である ELISPOT 法の検討、血小板減少時の機能検査法の検討を行った。

A . 研究目的

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

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

制約を克服すると共に、本疾患の治療の標準化をめざし「治療の参照ガイド」の作成および啓蒙を行ってきた。本年度は、さらに妊娠合併 ITP に対する妊娠、分娩管理の参照ガイドを完成し、その公開、啓蒙に努めた。

B . 研究方法

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

2 . 治療の標準化に関しては、妊娠合併 ITP の診療については従来のガイドライ

ンの改訂をめざし、産婦人科、小児科などの専門家も参画した作成委員会を組織し、治療の参照ガイドの完成およびその公開と啓蒙に努めた

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

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

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

1 . ITP の疫学研究(羽藤班員、倉田研究協力者、島田研究協力者)

1) 登録症例数と性差

平成 15 年から開始し本年は平成 24 年度をまとめることが出来た。平成 24 年度の ITP 医療受給者証所持患者は 24,100 人であり、このうち解析可能であった臨床調査個人票は 18,115 人分(75%)であった。これら解析症例のうち新規患者数は 3,192 人、更新患者数は 14,923 人であり、平成 23 年度とほぼ同数であった。

2) 年齢分布

発症年齢分布についてはここ 5 年間変化なく、ITP は中高年齢者に多い疾患であることが定着している。新規急性型・新

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

3) 出血症状

新規急性型では紫斑を 77%、下血を 9.1%、脳出血を 2.3%の症例において認め、慢性型よりも出血症状のある症例が多かった。

4) 血小板数

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

5) 特殊検査

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

6) 治療

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

の9%で使われていた。脾摘は慢性更新型の14%で行われていた。

7) 合併症

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

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

8) 個人調査表の改訂作業

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

表記する。この範疇には自然寛解しなかった症例や治療を止めた後に血小板が減少した症例も含む。Persistent ITPでは自然寛解する可能性がまだ残っていると考えられる。そのため摘脾などのより強力な治療法はpersistent ITPに関しては延期しても良いとの意見である。また、この期間設定によりchronic ITPは12ヵ月以上持続する場合、としている。研究班として、これらの国際的な動向を考慮し、さらに臨床医に対して調査票記入の労力を軽減すべくより簡便に記載できるように配慮し、個人調査表の改訂案を作成した。平成27年1月よりITPの臨床調査個人表は、改訂版に変更されている。

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

研究班では、司法においても用いられる可能性のある拘束性の強いメッセージではなく、拘束性を若干弱めた形での治療の参照ガイドを作成し「臨床血液」誌(53巻4号:433-442, 2012; 2012年4月)に掲載し公開した。その理由のひとつには、実際にITPに用いられている薬剤の保険適用が無いことがあげられる。本年度において日本血液学会と協議し、本参照ガイドを制限なく閲覧できるようにオープンアクセス化を行った。

https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/53/4/53_433/_article/-char/ja/

妊娠合併ITP診療の参照ガイドの作成

に関しては、表に示す参照ガイド作成委員会を組織した。若年 ITP は女性に多く出産適齢期であるためにこのような管理ガイドラインは必要である。約 15 年前にも特発性造血器障害調査研究班で提案されたが、医療環境、医療に対する意識、医療手段の変化により必ずしも適切なガイドラインとはいえない状況となってきた。一方では、妊娠合併 ITP に関しては、妊婦という特殊事情もあり治療のエビデンスは皆無であり、今後も臨床試験を行うことは不可能に近い。なぜなら、ほとんどの妊婦は臨床試験に消極的であるからである。そのため、産婦人科、小児科、麻酔科の ITP のエキスパートに参画頂き、専門家のコンセンサスの形で診療の参照ガイドを作成し、「臨床血液」誌に掲載した（妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド．臨床血液 55:934-947, 2014）。本参照ガイドもオープンアクセス化している。

https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/55/8/55_934/_article/-char/ja/

3 . 個人研究

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

ITP の診断の基本は除外診断であるが、特に再生不良性貧血との鑑別が問題になることが多い。網状血小板 (RP) は細胞内に RNA を豊富に含む幼若な血小板であり、網状血小板比率 (%RP) は血小板寿命を反映していると考えられている。本研究班では Flow cytometry を用いた RP % 測定 (FCM 法) が ITP と再生不良性貧血の鑑別

に有用であることを報告してきた。しかし、FCM 法は精度は高いものの高価な機器と煩雑な操作のため本法による網血小板測定が実施可能な施設は限られている。近年、RP の自動測定が試みられ、シスメックス社製多項目自動血球分析装置を用いて、RNA が含まれる血小板分画を幼若血小板分画 (immature platelet fraction, IPF) として簡便かつ迅速に測定する方法が開発されている。従来 XE-2100 を用いた IPF % 測定は ITP 診断の感度と特異性に難点があったが、最新機器である XN シリーズにおいては IPF 専用チャンネルを設けたことによりその精度の改善が期待されていた。我々は ITP 47 例、再生不良性貧血あるいは化学療法後の血小板減少患者 28 例の %IPF を XE-2100 および XN-1000 を用いて測定し、XN-1000 を用いた %IPF の有用性に関する検討を行った。その結果、ITP 診断における感度、特異度は XE-2100 ではそれぞれ 83.0% および 75.0% であったが、XN-1000 では 85.1% と 89.3%、RP % (FCM 法) では 93.6% と 89.3% であり、XN-1000 において良好な結果が得られた。さらに夜間発作性血色素尿症患者 16 名の検体を用いて、溶血による影響を検討したが、XE-2100 では赤血球フラグメントの影響を受け 16 例中 6 例で IPF % が高値を示したが、XN-1000 では高値を示した例は 0 例、RP % では 2 例であった。このように XE-2100 にくらべ XN-1000 では赤血球フラグメントによる影響はほとんど見られなかった。

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

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

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

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

本年度は、すでにキット化に成功している抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を体外診断薬としての質を高めることを目的とし、陽性コントロールの設定、保存安定性について基礎検討を行った。その結果、B 細胞の variability を評価する陽性コントロールとして抗ヒト IgG 抗体の固相化、GPIIb/IIIa に対する特異的反応の陽性コントロールとしてキメラ型抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体を固相化したビーズの使用により課題を解決できることが確認できた。また、固相化 GPIIb/IIIa 抗原

の安定性についても長期の安定性を検討中である。今後は改良版 ITP-ELISPOT の性能評価のために、血小板減少症患者を対象とした多施設臨床試験による検証が必要である。

D. 考案

ITP の診療は、近年大きく変化している。妊娠合併 ITP の診療の標準化をめざし、班会議の枠を超え、小児科、産科、麻酔科のエキスパートと妊娠合併 ITP 治療の参照ガイドを作成し、その無料公開もおこなった。今後もさらに ITP 研究班の果たす役割は大きくなると考えられる。今後も、研究班として確実に成果をあげ正しい情報を発信していく予定である。

E. 結論

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

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomiya Y. Eliminate dark side from antiplatelet therapy. *Blood* 123:2599-2601, 2014.
- 2) Kiyokawa T, Koh Y, Mimura K, Nakayama K, Hosokawa M, Sakuragi M, Morikawa T, Nakao M, Aochi H, Fukumori Y, Kanagawa T, Nagamine K,

- Kimura T, Tomiyama Y. A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy. *Int J Hematol* 100:398-401, 2014.
- 3) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 2015 Jan 25. [Epub ahead of print]
- 4) Kuwana M, Okazaki Y, and Ikeda Y. Detection of circulating B cells producing anti-GPIIb autoantibodies in patients with immune thrombocytopenia. *PLoS One*. 9(1): e86943, 2014
- 5) Kuwana M. Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia. *ISBT Sci. Ser.* 9:217-222, 2014.
- 6) Nishimoto T, Numajiri M, Nakazaki H, Okazaki Y, and Kuwana M. Induction of immune tolerance to platelet antigen by short-term thrombopoietin treatment in a mouse model of immune thrombocytopenia. *Int. J. Hematol.* 100: 341-344, 2014
- 7) Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Sato Y, Onishi S, Yasukawa M: Development of exogenous FVIII-specific inhibitor in a mild hemophilia patient with Glu272Lys mutation. *Haemophilia* 20:e179-182, 2014.
- 8) Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Azuma T, Yasukawa M: Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIIb/IX monoclonal IgM antibody. *Ann Hematol* 93:711-712, 2014.
- 9) Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: Dramatic and prompt efficacy of Helicobacter pylori eradication in the treatment of severe refractory iron deficiency anemia in adults. *Ann Hematol* 93:1779-1780, 2014
- 10) Kawaguchi K, Matsubara K, Takafuta T, Shinzato I, Tanaka Y, Iwata A, Nigami H, Takeuchi Y, Fukaya T: Factors predictive of neonatal thrombocytopenia in pregnant women with immune thrombocytopenia. *Int J Hematol.* 99:570-6, 2014
- 11) Asano J, Ueda R, Tanaka Y, Shinzato I, Takafuta T. Effects of immunosuppressive therapy in a patient with aplastic anemia-paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA-PNH) syndrome during ongoing eculizumab treatment. *Intern Med.* 53:125-8,

- 2014
- 12) 宮川義隆, 柏木浩和, 高蓋寿朗, 藤村欣吾, 倉田義之, 小林隆夫, 木村正, 安達知子, 渡辺 尚, 今泉益栄, 高橋幸博, 松原康策, 照井克生, 桑名正隆, 金川武司, 村田 満, 富山佳昭. 妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド. **臨床血液** 55:934-947, 2014
 - 13) 富山佳昭. 免疫性血小板減少性紫斑病. **血液疾患 最新の治療-2014-2016** - (直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二編), 南江堂, 東京, 2014, pp221-224
 - 14) 富山佳昭. 血小板減少. *medicina* 51:448-451, 2014
 - 15) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **診療ガイドライン UP-TO-DATE 2014-2015**(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, 2014, pp429-434
 - 16) 富山佳昭. 自己抗体の標的抗原 ITP を中心に. **日内会誌** 103:1570-1579, 2014
 - 17) 富山佳昭. 出血傾向の鑑別診断. **内科** 114:193-197, 2014
 - 18) 富山佳昭. ITP の治療指針. **EBM 血液疾患の治療 2015-2016**(金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編), 中外医学社, 東京, 2014, pp408-412
 - 19) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP). **よくわかる血栓・止血異常の診療**(金倉 譲, 富山佳昭編), 中山書店, 東京, 2014, pp80-91
 - 20) 柏木浩和, 富山佳昭. 血小板機能異常症. **よくわかる血栓・止血異常の診療**(金倉 譲, 富山佳昭編), 中山書店, 東京, 2014, pp92-104
 - 21) 柏木浩和, 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の治療. **臨床血液** 55:2087-2094, 2014
 - 22) 柏木浩和. 止血異常の診断のすすめかた - 病歴聴取、診察、止血スクリーニング検査とその読みかたの重要性 -. *Medical Practice* 31:14-22, 2014
 - 23) 柏木浩和. ITP の病態解析. *Annual Review 血液 2014*(高久史磨, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉 譲, 小島勢二編), 中外医学社, 東京, 2014, pp192-197
 - 24) 柏木浩和. 血小板機能異常症の診断と治療. **EBM 血液疾患の治療 2015-2016**(金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編), 中外医学社, 東京, 2014, pp434-438
 - 25) 加藤 恒, 富山佳昭. インテグリン IIb/3 の構造変化と活性化: talin による活性化機構. **日本血栓止血学会誌** 25:619-628, 2014
 - 26) 桑名正隆. 免疫性血小板減少症. 血栓止血血管学(分冊 1) 金芳堂, 京都, 2015 (印刷中)
 - 27) 羽藤高明. 止血異常に対する輸血療法の基本 - 適切な血小板製剤、新鮮凍結血漿の入手と適切な使い方 - *Medical Practice* 31:110-114, 2014.
 - 28) 羽藤高明. 血栓性血小板減少性紫斑病 **今日の治療指針 2014** PP654-655, 2014 医学書院 東京
 - 29) 羽藤高明. 先天性および後天性血管障害による出血 **血液疾患最新の治**

- 療 2014-2016** pp217-220, 2014 南江堂 東京
- 30) 羽藤高明 血小板輸血の適応とそのピットフォール **出血性疾患の実践診療マニュアル** pp59-64, 2014 南江堂 東京
- 31) 羽藤高明 新鮮凍結血漿の適応とそのピットフォール **出血性疾患の実践診療マニュアル** pp65-70, 2014 南江堂 東京
- 32) 羽藤高明 凝固因子製剤の分類とその適応 **出血性疾患の実践診療マニュアル** pp71-77, 2014 南江堂 東京
- 33) 宮川義隆 ITP と TTP に対するリツキシマブ. **日本内科学会雑誌** 103, 1654-1659 (2014)
- 34) 宮川義隆 新規診断 ITP に対するリツキシマブとデキサメタゾン併用療法とデキサメタゾン単剤療法の前向き比較試験、**血液内科** 68, 250-253 (2014)
- 35) 宮川義隆 特発性血小板減少性紫斑病 **内科** 114, 209-213 (2014)
- 36) 宮川義隆 妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド **Thrombosis Medicine** 4, 388-394 (2014)
- 2. 学会発表**
- 1) Tomiyama Y. (Oral) Proposal for a diagnostic test for ITP: Measurement of immature platelet fraction (IPF). **SSC 2014: 60th Annual Meeting** (2014.6.23-26, Milwaukee, R. Montgomery)
- 2) Tomiyama Y. (Oral) (Symposium) Pathophysiology and management of ITP in Asia **The 8th Congress of Asian Pacific Society on Thrombosis and Hemostasis** (2014.10.9-11, Convension Center, Hanoi, Vietnam, Nguyen AT)
- 3) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. (Poster) **IIb(R990W)**, a constitutive activating mutation of integrin **IIb 3**, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function. **The American Society of Hematology 56th Annual Meeting** (2014.12.6-9, Moscone Center, San Francisco, CA, USA, Burns LJ)
- 4) Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Nakanishi H, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Activation status of integrin **IIb 3** in essential thrombocythemia with calreticulin mutation. **The American Society of Hematology 56th Annual Meeting** (2014.12.6-9, Moscone Center, San Francisco, CA, USA, Burns LJ)
- 5) 富山佳昭 (教育講演) 血小板機能異常症の分子病態 **第 36 回日本血栓止血学会学術集会** (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 宮田敏行)
- 6) 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 森川陽一郎, 加藤 恒, 田所誠司, 小亀浩市, 本田繁則, 宮田

- 敏行, 金倉 讓, 富山佳昭 (口演) インテグリン IIb 3 活性化変異、IIb(R990W)ノックインマウスの解析 **第 36 回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 宮田敏行)**
- 7) 本田繁則, 池島裕子, 田所誠司, 富山佳昭, 宮田敏行 (ポスター) インテグリン IIb 3 機能発現における Integrin-linked kinase の役割 **第 36 回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 宮田敏行)**
- 8) 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村 正, 高 陽淑, 福森泰雄, 富山佳昭 (口演) HPA5b 抗体に起因する NAIT 症例: 第 1 子と第 2 子の HPA 抗体の解析 **第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014.5.15-17, 奈良県文化会館, 奈良, 藤村吉博)**
- 9) 柏木浩和, 富山佳昭 (教育講演) 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の治療. **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 讓)**
- 10) 柏木浩和, 清水一亘, 加藤 恒, 田所誠司, 森川陽一郎, 金倉 讓, 富山佳昭 (優秀ポスター) ITP 患者における血小板機能評価: フローサイトメトリーを用いた検討. **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 讓)**
- 11) 宮川義隆, 勝谷慎也, 矢野尊啓, 野村昌作, 西脇嘉一, 富山佳昭, 東原正明, 白杉由香理, 西川政勝, 尾崎勝俊, 阿部貴行, 菊地佳代子, 佐藤裕史, 金倉 讓, 藤村欣吾, 池田康夫, 岡本真一郎 (Oral) Investigator-initiated clinical trial of rituximab for chronic primary immune thrombocytopenia. **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 讓)**
- 12) 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 森川陽一郎, 加藤 恒, 田所誠司, 小亀浩市, 本田繁則, 宮田敏行, 金倉 讓, 富山佳昭 (一般口演) IIb 3 活性化変異、IIb(R990W)ノックインマウスは巨大血小板減少症を伴う血小板無力症様の表現型を示す. **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 讓)**
- 13) 櫻木美基子, 林 悟, 丸山美保, 兜森 修, 清川知子, 永峰啓丞, 加藤恒, 柏木浩和, 金倉 讓, 富山佳昭 (一般口演) Diagnostic value of IPF% measured by XN-1000 analyzer for primary ITP is comparable with FCM method. **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 讓)**
- 14) 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村 正, 高 陽淑, 福森泰雄, 富山佳昭 (ポスター) NAIT due to anti-HPA5b in the first sibling confirmed by the analysis of the

- subsequent pregnancy. **第76回日本血液学会学術集会(2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 譲)**
- 15) 富山佳昭 血小板血栓形成の分子機構: 血小板機能異常症からの解析. **千里ライフサイエンスセミナー(2014.11.6, 大阪)**
 - 16) 林 悟, 櫻木美基子, 丸山美保, 兜森 修, 加藤 恒, 柏木浩和, 金倉 譲, 富山佳昭(一般口演) ITP 診断における IPF%測定機器の比較検討 ~ 新機種 XN-1000 と XE-2100 による自動測定 ~. **第61回日本臨床検査医学会学術集会(2014.11.22-25, 福岡国際会議場, 福岡, 康 東天)**
 - 17) 桑名正隆: Cellular mechanisms for immune thrombocytopenic purpura - new insights and their relevance in treatment. **第36回日本血栓止血学会学術集会(大阪). 2014. 5. (学術推進委員会(SPC)シンポジウム3: 血小板減少の病態と分子メカニズム~最新の知見~)**
 - 18) 桑名正隆. Immune thrombocytopenia: roles of immune regulatory mechanisms in autoimmune pathogenesis. **第43回日本免疫学会学術集会(京都). 2014.12. (C8: Clinical Seminar 8)**
 - 19) 羽藤高明 輸血ガイドラインの見直し 「血小板濃厚液使用指針の見直し」 **第62回日本輸血細胞治療学会総会 2014.5.15 奈良**
 - 20) 羽藤高明 血栓症包囲網 - 多方面から血栓症を考える - 「最新の血栓形成機序から血栓症を考える」 **第47回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会 2014.9.14 松山**
 - 21) 羽藤高明 最新の血栓形成機序から治療を考える **第34回日本静脈学会総会 教育講演 2014.4.18 名護**
 - 22) 羽藤高明 輸血医療の最近の進歩 **第51回日本内科学会四国支部生涯教育講演会 2014.11.30 松山**
 - 23) 山之内純、羽藤高明 クロピドグレル服用脳梗塞患者での VASP assay に対する CYP 遺伝子多型とシロスタゾール併用の影響 **第36回日本血栓止血学会学術集会 2014.5.30 大阪**
 - 24) 山之内純、羽藤高明、中西英元、浅井洋晶、松原悦子、谷本一史、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation **第76回日本血液学会総会 2014.10.31 大阪**

【メディア】

- 1) 宮川義隆、TBS テレビ報道特集、「難病女性 決意の出産」、2014年12月20日
- 2) 宮川義隆、産経新聞、「特発性血小板減少性紫斑病」、2014年4月22日
- 3) 宮川義隆、Medical Tribune、「ITP患者の妊娠・出産に20年ぶり新指針」、2014年12月18日
- 4) 宮川義隆、読売新聞、医療ルネサンス: シリーズ薬 妊娠と出産「持病ある女性支える指針」、2014年10月30日

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1 . 特許取得

なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

表. 妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド作成委員会名簿

専門分野	委員名（所属）
血液内科	宮川義隆（埼玉医大）、柏木浩和（阪大）、高蓋寿朗（国立病院機構呉医療センター）、藤村欣吾（安田女子大）、桑名正隆（日本医大）、倉田義之（四天王寺大）、村田満（慶大）、富山佳昭（阪大）
小児科	今泉益栄（宮城県立こども病院）、高橋幸博（奈良医大）、松原康策（西神戸医療セ）
産科	小林隆夫（浜松医療センター）、木村正（阪大）、安達知子（愛育病院）、渡辺尚（自治医科大学）
産科麻酔科	照井克生（埼玉医大）

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

研究分担者：富山 佳昭 大阪大学医学部附属病院 輸血部

研究協力者：柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 診断において幼若な血小板である網状血小板の測定は有用である。しかし Flow cytometry を用いた網状血小板比率測定 (FCM 法) は手技が煩雑で標準化が困難であり、またシスメックス社製多項目自動血球分析装置 XE-2100 を用いた幼若血小板分画 (IPF%) 測定は簡便であるがその精度が不十分であった。今回、新機種である XN-1000 を用いた IPF% の ITP 診断における有用性について、XE-2100 および FCM 法と比較検討を行ったところ、XN-1000 では FCM 法にほぼ匹敵する感度、特異度を得られることが明らかとなった。また血小板減少患者における血小板機能は通常血小板凝集能検査では評価が困難であったが、FCM を用いることにより血小板機能を検討することが可能となった。ITP 患者においては血小板機能は正常よりも低下している例が多く、またトロンボポエチン受容体作動薬が血小板機能に与える影響は少ないと思われた。

A . 研究目的

ITP の診断の基本は除外診断であるが、特に再生不良性貧血との鑑別が問題になることが多い。網状血小板 (RP) は細胞内に RNA を豊富に含む幼若な血小板であり、網状血小板比率 (RP%) は血小板寿命を反映していると考えられている。我々は Flow cytometry を用いた RP% 測定 (FCM 法) が ITP と再生不良性貧血の鑑別に有用であることを報告してきた (Kurata et al. *Am J Clin Pathol* 2001)。しかし、FCM 法は精度は高いものの高価な機器と煩雑な操作のため本法による網状血小板測定が実施可

能な施設は限られている。近年、RP の自動測定が試みられ、シスメックス社製多項目自動血球分析装置を用いて、RNA が含まれる血小板分画を幼若血小板分画 (immature platelet fraction, IPF) として簡便かつ迅速に測定する方法が開発されている。従来の XE-2100 を用いた IPF% 測定は ITP 診断の感度と特異度に難点があったが (林ら、*臨床病理* 2009)、最新機器である XN シリーズにおいては IPF 専用チャネルを設けたことによりその精度の改善が期待されていた。我々は ITP47 例、再生不良性貧血あるいは化学療法後の血

血小板減少患者 28 例の IPF%を XE-2100 および XN-1000 を用いて測定し、FCM 法と比較することにより、XN1000 を用いた IPF%の ITP 診断における有用性を検討した。

また ITP の治療は、重篤な出血を回避するため安全と思われる血小板数を維持することを目標になされるが、出血リスクには血小板数だけでなく血小板機能も関与する。ITP 患者において検出される抗血小板抗体の多くは血小板機能に必須の分子である GPIIb-IIIa(α IIb β 3)や GPIb-IX 複合体を標的していることから、ITP 患者の血小板機能は正常者と異なる可能性がある(Kiyomizu et al. *Blood*2012)。一方、ITP 患者では血栓症の合併が意外に多いこと、また最近、難治性 ITP で広く使用されてきているトロンボポエチン(TPO)受容体作動薬は血小板機能を亢進する可能性があることから、ITP 患者の血小板機能を把握することは重要である。しかし血小板機能検査のゴールドスタンダードとされる比濁法を用いた血小板凝集能検査は血小板減少患者においては信頼できるデータが得られない。我々は FCM を用いることにより血小板減少患者における血小板機能測定法を確立し、ITP 患者における血小板機能の評価を行った。

B . 研究方法

1) IPF%測定に関する検討 : ITP症例47例(血小板数 5.68 ± 3.38 万/ μ l)、再生不良性貧血(AA)または化学療法による血小板減少例(CIT)(血小板数 4.25 ± 2.75 万/ μ l)、正常コントロール80例において、FCMを用いたRP%測定、XE-2100および

XN-1000を用いたIPF%測定を同一検体を用いて行い、各検査のITP診断における感度および特異度を検討した。また破碎赤血球の影響をみるため、発作性夜間血色素尿症(PNH)患者10例においても検討した。

2) 血小板機能測定に関する検討 : ITP患者11例、血小板無力症患者2例およびP2Y₁₂欠損症患者1例において、FCMを用いて α IIb β 3の活性化を、PAC1結合、顆粒放出能をCD62P発現、およびFCMを用いた血小板凝集能検査(FCA法)にて、血小板機能測定を行った。

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

C . 研究結果

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

法と同等であった（FCM法：感度 93.6%，特異度 89.3%）。ROC解析においても、XN-1000の精度はFCMと同等でありXN-1000はXE-2100よりも測定精度が改善されていると考えられた（AUC: RP% 0.959, XN-1000 0.956, XE-2100 0.863）。

またXE-2100では赤血球粒子の影響を受けやすいことが予想される。実際、溶血に伴う破砕赤血球が増加しているPNH症例を検討した結果、XE-2100ではIPF%の基準範囲を大きく上回る症例が多数認められたのに対し、XN-1000ではすべての症例は正常範囲内にあった。

2) 血小板機能測定に関する検討：最初にFCA法の妥当性の検討を行った。血小板数が14.0万/ μ lであるITP患者および正常コントロール例においてFCM法と通常の血小板凝集能検査（LTA法）の比較を行ったところ、ほぼ同等の結果が得られることを確認した。

次に、ITP症例における血小板機能の検討を行った。FCA法においては多くのITP患者で、PMA、ADPおよびPAR1刺激に対する凝集反応の低下が認められた。ADPおよびPAR1刺激後のPAC1結合およびCD62P発現も同様に低下傾向を示す症例が多かった。これら血小板機能の低下と抗GPIIb-IIIa抗体の有無あるいはそのエピトープと明らかな相関は認めなかったが、抗GPIIb-IIIa抗体を有する1例においては著明なアゴニスト刺激後の

PAC1結合が著明に障害されていた。またITP症例における血小板機能の低下とTP0受容体作動薬の有無との関連は認めなかった。

D. 考察

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

ITP症例における血小板機能に関しては、意外なことに多くの症例において正常例より低下しているという結果であった。この結果がITPに特異的なことであるかどうかは、他の原因による血小板減少例と比較検討する必要がある。また症例によっては抗GPIIb-IIIa抗体により血小板機能が大きく影響される可能性があることが示された。また、今回、TP0受容体作動薬使用により血小板機能に大きな差が見られなかったが、同一患

者においてTP0受容体作動薬使用前後の変化は検討できておらず、更なる解析が必要である。

E. 結論

ITP診断においてXN-1000を用いたIPF%測定が有用である可能性が示された。また血小板減少患者における血小板機能をFCMを用いることにより検討することが可能であり、ITP患者では血小板機能が低下している可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 2015 Jan 25. [Epub ahead of print]
- 2) Kiyokawa T, Koh Y, Mimura K, Nakayama K, Hosokawa M, Sakuragi M, Morikawa T, Nakao M, Aochi H, Fukumori Y, Kanagawa T, Nagamine K, Kimura T, Tomiyama Y. A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy. *Int J Hematol*. 2014 Oct;100(4):398-401.
- 3) 宮川義隆, 柏木浩和, 高蓋寿朗, 藤村欣吾, 倉田義之, 小林隆夫, 木村正, 安達知子, 渡辺 尚, 今泉益栄, 高橋幸博, 松原康策, 照井克生, 桑名正隆, 金川武司, 村田 満, 富山佳昭. 妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド. *臨床血液* 55:934-947, 2014
- 4) 柏木浩和, 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の治療. *臨床血液* 55:2087-2094, 2014
- 5) 柏木浩和, 富山佳昭. 血小板機能異常症. **よくわかる血栓・止血異常の診療 (金倉 譲, 富山佳昭編)**, 中山書店, 東京, 2014, pp92-104
- 6) 柏木浩和. 止血異常の診断のすすめかた-病歴聴取、診察、止血スクリーニング検査とその読みかたの重要性- *Medical Practice* 31:14-22, 2014
- 7) 柏木浩和. ITP の病態解析. *Annual Review 血液 2014 (高久史麿, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉 譲, 小島勢二編)*, 中外医学社, 東京, 2014, pp192-197
- 8) 柏木浩和. 血小板機能異常症の診断と治療. *EBM 血液疾患の治療 2015-2016 (金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編)*, 中外医学社, 東京, 2014, pp434-438
- 9) 富山佳昭. 免疫性血小板減少性紫斑病. *血液疾患 最新の治療 -2014-2016- (直江知樹, 小澤敬也, 中尾真二編)*, 南江堂, 東京, 2014, pp221-224
- 10) 富山佳昭. 血小板減少. *medicina*

51:448-451, 2014

- 11) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. **診療ガイドライン UP-TO-DATE 2014-2015 (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, 2014, pp429-434
- 12) 富山佳昭. 自己抗体の標的抗原 ITP を中心に **日内会誌** 103:1570-1579, 2014
- 13) 富山佳昭. 出血傾向の鑑別診断. **内科** 114:193-197, 2014
- 14) 富山佳昭. ITP の治療指針. **EBM 血液疾患の治療 2015-2016 (金倉 譲, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編)**, 中外医学社, 東京, 2014, pp408-412
- 15) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) **よくわかる血栓・止血異常の診療 (金倉 譲, 富山佳昭編)**, 中山書店, 東京, 2014, pp80-91

2. 学会発表

- 1) The American Society of Hematology 56th Annual Meeting (2014.12.6-9, Moscone Center, San Francisco, CA, USA, Burns LJ) (ポスター) Kiyomizu1 K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. Ilb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin Ilb 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function.
- 2) **第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014.5.15-17, 奈良県文化会館, 奈**

良, 藤村吉博)(一般口演) 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村 正, 高 陽淑, 福森泰雄, 富山佳昭. HPA5b 抗体に起因する NAIT 症例: 第 1 子と第 2 子の HPA 抗体の解析

- 3) **第 36 回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 宮田敏行)**(教育講演) 富山佳昭. 血小板機能異常症の分子病態
- 4) **第 36 回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 宮田敏行)**(一般口演) 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明, 森川陽一郎, 加藤 恒, 田所誠司, 小亀浩市, 本田繁則, 宮田敏行, 金倉譲, 富山佳昭. インテグリン Ilb 3 活性化変異、Ilb(R990W)ノックインマウスの解析
- 5) **第 36 回日本血栓止血学会学術集会 (2014.5.29-31, 大阪国際交流センター, 大阪, 宮田敏行)**(ポスター) 本田繁則, 池島裕子, 田所誠司, 富山佳昭, 宮田敏行. インテグリン Ilb 3 機能発現における Integrin-linked kinase の役割
- 6) **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 譲)**(教育講演) 柏木浩和, 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の治療
- 7) **第 76 回日本血液学会学術集会 (2014.10.31-11.2, 大阪国際会議場, 大阪, 金倉 譲)**(一般口演) 清水一亘, 柏木浩和, 國島伸治, 坂野史明,

森川陽一郎,加藤 恒,田所誠司,小
亀浩市,本田繁則,宮田敏行,金倉 讓,
富山佳昭. IIb 3 活性化変異、
IIb(R990W)ノックインマウスは巨大
血小板減少症を伴う血小板無力症様
の表現型を示す

- 8) **第 76 回日本血液学会学術集会**
(2014.10.31-11.2,大阪国際会議場,
大阪,金倉 讓)(一般口演) 櫻木美
基子,林 悟,丸山美保,兜森 修,
清川知子,永峰啓丞,加藤 恒,柏木
浩和,金倉 讓,富山佳昭. Diagnostic
value of IPF% measured by XN-1000
analyzer for primary ITP is
comparable with FCM method.
- 9) **第 76 回日本血液学会学術集会**
(2014.10.31-11.2,大阪国際会議場,
大阪,金倉 讓)(ポスター) 柏木
浩和,清水一亘,加藤 恒,田所誠司,
森川陽一郎,金倉 讓,富山佳昭. ITP
患者における血小板機能評価:フロー
サイトメトリーを用いた検討
- 10) **第 76 回日本血液学会学術集会**
(2014.10.31-11.2,大阪国際会議場,
大阪,金倉 讓)(一般口演) 宮川義
隆,勝谷慎也,矢野尊啓,野村昌作,
西脇嘉一,富山佳昭,東原正明,白杉
由香理,西川政勝,尾崎勝俊,阿部貴
行,菊地佳代子,佐藤裕史,金倉讓,
藤村欣吾,池田康夫,岡本真一郎.
Investigator-initiated clinical
trial of rituximab for chronic
primary immune thrombocytopenia
- 11) **第 61 回日本臨床検査医学会学術集会**
(2014.11.22-25,福岡国際会議場,福
岡,康 東天)(一般口演)林 悟,櫻

木美基子,丸山美保,兜森 修,加藤
恒,柏木浩和,金倉 讓,富山佳昭.
ITP診断におけるIPF%測定機器の比較
検討 ~新機種XN-1000とXE-2100に
よる自動測定~

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨

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）の診断基準では、血小板減少をきたしうる他疾患の除外に主眼がおかれている。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ることで積極的にITPを診断する基準案を作成した。しかし、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは保険診療上測定できない。そこで、本年度はすでにキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT）を体外診断薬として承認申請するための計画を立案した。較正用基準物質としてGPIIb/IIIaに対するヒト型モノクローナル抗体産生細胞を用い、B細胞のviabilityを評価する陽性コントロールとして抗ヒトIgG抗体の固相化、GPIIb/IIIaに対する特異的反応の陽性コントロールとしてキメラ型抗GPIIb/IIIaモノクローナル抗体を固相化したビーズの使用により課題の克服が可能なが判明した。キット構成の確定後には有用性を検証するための多施設臨床試験の実施が不可欠である。

A．研究目的

我が国では1990年に厚生省研究班により作成された特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断基準が現状でも広く用いられている。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的にも好ましくない。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ることで積極的にITPを診断する基準案を作成した。本基準は侵襲性の低い血液検査のみで迅速に結果が得られ、感度93%、特異度75%と良好な結果を示した。しかしながら、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗体産

生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは保険診療上測定できない。抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは研究目的での受託測定が可能になったが、検査費用が発生することから一般診療で普及していない。これら問題点を解決するためには、再現性・汎用性の高い臨床検査キットの作成およびその体外診断用医薬品としての承認が不可欠である。そこで、本年度は、すでにキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たすレベルまで質を高めるために必要な対策、計画を立案することを目的とした。

B．研究方法

医薬品医療機器総合機構（PMDA）による体

外診断用医薬品の承認申請に係わる関連通知（<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/taigai.html>）、および ITP-ELISPOT と同様の測定原理を用いてすでに体外診断用医薬品としての承認されている先行品の T-スポット TB の体外診断用医薬品製造販売承認申請書(84033000)を参考に、ITP-ELISPOT の承認申請までに必要な基本性能、手続きを検討した。

（倫理面に対する配慮）

本研究は倫理審査を必要とするいかなる指針にも合致しない。

C . 研究結果

1 . 品質管理および校正用基準物質

実際に流通している製品がその性能を保っていることを証明するためには品質管理に用いる校正用基準物質が必要である。校正用基準物質を用いることで、製造したキットの感度、正確性、同時再現性が確認でき、またキットの検出感度や測定範囲を設定するためにも応用することができる。一定の評価を常に行うためには抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する細胞が必要である。そのためには、ITP 患者末梢血または脾細胞由来の B 細胞からミエローム細胞株との融合によりハイブリドーマ株を作成することが望ましい。GPIIb/IIIa に対するヒト型モノクローナル抗体産生細胞を陽性管理検体、GPIIb/IIIa 以外のヒト型モノクローナル抗体産生細胞を陰性管理検体として使用することで常に正確な評価が可能となる。

2 . キット内のコントロール

ELISPOT 法では生細胞を 4 時間培養することから、検体として用いる B 細胞の生存性（viability）をキット毎に確認する必要がある。そこで、抗原として GPIIb/IIIa に加

えてウシ血清アルブミン（BSA）、ヒツジ抗ヒト IgG 抗体をセットで用いることで、B 細胞の生存性の評価が可能と考えた。生存 B 細胞が多数存在すれば抗ヒト IgG 抗体固相ウェルで多数のスポットが観察され、一方 BSA 固相ウェルではスポットが検出されない。この状態で GPIIb/IIIa 固相ウェルにおけるスポット数の評価が可能になる。

次に抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞の陽性、陰性コントロールの設定が必要である。校正用の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生ハイブリドーマは生細胞であるため各キットに加えることはできない。そこで、ヒト抗 GPIIb/IIIa 抗体を固相したビーズを陽性コントロール、ヒト IgG を固相したビーズを陰性コントロールとすると、保存性が高まりキットの構成目に加えることが可能になる。予備実験では 5.6 μm 径のビーズを用いることで患者検体を用いた際に観察されるスポットに類似したスポットの形成を確認している。

3 . カットオフや測定条件の設定

試薬のカットオフ設定には臨床検体を用いた検討が必要である。キットの仕様が決まった段階で健常人、ITP 患者、ITP 以外の血小板減少症患者を用いたプレ臨床試験を実施し、感度、特異度のバランスのとれたカットオフを設定する必要がある。同時に ITP 患者および健常人検体を用いて検体量、採血から測定までの時間（保存安定性）、抗凝固薬の影響などの最適化を図る。

4 . 臨床性能試験の実施

PMDA の資料によると診断用医薬品の臨床性能試験には多施設で 150 検体以上の解析が求められる。新しい ITP 診断基準案の項目に含まれる網血小板比率、血漿トロンボポエチンと同時に試験が組めれば効率よい進捗が可能である。

D. 考察

今回、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として承認申請するための開発計画を立案することができた。幸いにも、同様の測定原理を用いた T-スポット TB がすでに診断用医薬品として承認されていたため、その承認資料を参考に必要事項を明確にすることができた。今後のスケジュールとして、平成 27 年度中に較正用基準物質の作成を完了し、臨床検体を用いたプレ臨床評価を開始したい。平成 28 年度末までにカットオフの設定と同時に試薬の最終仕様を確定する。これら基礎的検討を 3 年間の研究期間で完了できれば、平成 29 年度に臨床性能評価試験を実施し、年度内に承認申請をしたい。来年度以降も本スケジュールの実現に向けて本テーマを推進したい。

E. 結論

ITP 診断基準案に含まれる抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として承認を受けるための計画を立案した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Detection of circulating B cells producing anti-GPIb autoantibodies in patients with immune thrombocytopenia. PLoS One. 2014; 9(1): e86943.
- 2) Kuwana M. Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia. ISBT Sci. Ser. 2014; 9: 217-222.

- 3) Nishimoto T, Numajiri M, Nakazaki H, Okazaki Y, Kuwana M. Induction of immune tolerance to platelet antigen by short-term thrombopoietin treatment in a mouse model of immune thrombocytopenia. Int. J. Hematol. 2014; 100(4): 341-344.

2. 学会発表

- 1) 桑名正隆: Cellular mechanisms for immune thrombocytopenic purpura - new insights and their relevance in treatment. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会 (大阪). 2014. 5.
- 2) 桑名正隆: ; Immune thrombocytopenia: roles of immune regulatory mechanisms in autoimmune pathogenesis. 第 43 回日本免疫学会学術集会 (京都). 2014.12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

臨床調査個人票（平成 24 年度）集計による特発性血小板減少性紫斑病の
全国疫学調査

研究分担者 羽藤 高明 愛媛大学医学部附属病院輸血・細胞治療部准教授
研究協力者 島田 直樹 国際医療福祉大学基礎医学研究センター教授
研究協力者 倉田 義之 四天王寺大学人文社会学部人間福祉学科教授

研究要旨

我が国における特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症頻度、年齢分布、患者の病状や治療、生活状況を平成 24 年度の臨床調査個人票をもとに解析した。年間新規患者数は 4,562 人と推計された。高齢者に多い疾患であり、女性では 35 歳前後にも小ピークがあった。新規患者の約 8 割が血小板数 5 万以下であった。治療ではトロンボポエチン受容体作動薬の投与例が急速に増加していた。

A．研究目的

特発性血小板減少性紫斑病（以下 ITP）は、しばしば治療に難渋し、長期間にわたって治療を必要とする難治性疾患である。厚生労働省は ITP を特定疾患に指定し、患者への支援を実施してきている。今後の ITP 患者への治療計画、支援計画をたてるにあたりわが国における ITP 患者の実態を把握することは非常に重要であると考え。本研究では ITP 患者より厚生労働省へ提出された臨床調査個人票をもとに平成 24 年度における ITP 患者の実態を解析したので報告する。

B．研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 24 年度の ITP 症例の臨床調査個人票をもとに入力されたデータの提供を受けた。このデータを用いて入力項目別に診療状況の詳細を解析した。

（倫理面への配慮）

本疫学研究の施行に当たっては愛媛大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得た。

C．研究結果および考察

1．臨床調査個人票登録率

都道府県から厚労省に提出された臨床調査個人票は 18,115 人分であった。難病医学研究財団 難病情報センターの資料では平成 24 年度 ITP 医療受給者証交付数は 24,100 人であるので全国 ITP 患者の 75%において臨床個人調査票を解析できた。同様な方法で算出した平成 18 年度～24 年度の 7 年間の個人票登録率（解析症例率）を表 1 に示す。登録率は 43-85%の幅があったが、平成 21 年度以降は 70-80%台で安定していた。

2．ITP 患者発生数

平成 24 年度に新規発症した患者数を表 2、3 に示す。新規患者登録数は男女合わせて 3,192 名であった。回収率 75%の数値であることを考慮すると本邦における平成 24 年度新規患者数は 4,256 名であると推計された。

表 4 に平成 18 年度～24 年度の 7 年間の新規患者発生数の推移を示す。年度別登録率（表 1）を考慮した推定新規患者数は約 4,000 人前後で推移していた。

3. 新規患者年齢分布

急性型の年齢分布を図1に示す。男女とも56～85歳に幅広いピーク（最大ピークは80歳台）があり、加えて女子では31～35歳に小さなピークがあった。男女とも5歳以下にも小さなピークがあった。

慢性型の年齢分布を図2に示す。男女とも51～85歳に大きなピーク（男では76～80歳、女では71～75歳に最大ピーク）を認めた。女では更に16～40歳に幅広いピーク（31～35歳に最大ピーク）を認めた。16～75歳で女は男の約1.4～6.4倍多かった。一方、76歳以上では男女差を認めなかった。

従来認められた小児ITPのピークは平成24年度も殆ど認められなかった。小児ITPにおいては、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業が行われている。これらの制度や研究事業に申請すると特定疾患に申請するよりも一部負担金の免除など有利との考えで、小児ITP症例は特定疾患に申請せず、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業のほうへ申請が行われていると推測された。そのため小児における発症のピークが消失していると考えられた。

4. ITP更新患者数

平成24年度に更新申請があった患者数を表5、表6に示す。更新患者数は男女合わせて14,923名であった。登録率75%の数値であることを考慮すると本邦における平成24年度更新患者数は19,897名であると推計された。

表7に更新申請症例の平成18年度～24年度の症例数の推移を示す。年度別回収率（表1）を考慮した推定患者数はこの7年間、20,000人前後で推移しているものと思われた。

5. 更新・慢性型患者の年齢分布

慢性型の更新患者の年齢分布を図3に示す。女では51～85歳に大きなピーク（61～65歳に最大ピーク）があり、21～50歳にもなだらかなピークがあった。男では56歳より増加傾向を示し、71～75歳にピークを認めた。女が男の2.36倍多かった。

6. 身体障害者手帳、介護認定、日常生活の不自由度

身体障害者認定の有無を表8に示す。身体障害者手帳を交付されている症例は7.5%前後で、大多数の症例は身体障害者の認定を受けていなかった。身体障害者の認定がITPによるものか、他の身体的要因によるものかは不明であった。

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

日常生活不自由度を表10に示す。28%前後の症例がやや不自由あるいは介護を要するとの回答であったがITP症例が非常に高齢化しているため高齢による身体の不自由さを反映しているのではないかと推測された。

7. 生活状況

生活状況を表11に示す。新規・急性型症例では56%の症例が就労、就学、家事など社会生活を保っていた。一方、新規・慢性型や更新・慢性型では72～80%の症例が社会生活を保っていた。

8. 受診状況

受診状況を表12に示す。新規・急性型症例では50%の症例が入院していた。新規・慢性型症例においても21%の症例が入院していた。一方、更新・慢性型症例では入院中の症例は1%とごく一部で大半の症例は主に通院であった。

9．出血症状

出血症状を図4に示す。新規・急性型では出血症状を呈する症例が多く、紫斑を77%の症例において認めた。その他、歯肉出血(31%)、鼻出血(19%)など、粘膜出血の頻度も高かった。新規・慢性型では紫斑を57%に認めたが、急性型に比べ粘膜出血の頻度は14%、9%と低かった。更新・慢性型では紫斑を39%に認めたが粘膜出血はいずれも6%と新規申請症例に比べると頻度は低かった。治療の結果、出血症状が軽減しているためと思われた。

10．血小板数

血小板数を図5に示す。新規・急性型症例においては血小板数1万以下の症例が66%と多かった。新規・慢性型においても血小板数1万以下の症例を29%に認め、5万以下の症例が80%であった。一方、更新・慢性型症例においては血小板数が5万以下の症例は少なく、53%の症例で5万以上であり、治療の結果を反映しているものと思われた。

11．特殊検査

新規症例における骨髓検査、PAIgG、抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率を表13に示す。骨髓検査は急性型で91%、慢性型で88%とほぼすべての症例で実施されていた。ITPに特異的な検査である抗血小板自己抗体検査は5~6%、網状血小板検査は11~14%と実施率は非常に低かった。

表14に最近7年間における特殊検査の実施率の推移を示す。骨髓検査は90%前後、PAIgGは約60%の症例で実施されていた。一方、自己抗体検査は6%前後、網状血小板検査はわずかに増加の傾向を示しているが14~19%の症例で実施されているのみであった。これらの特殊検査は一部の施設を除き施行できないためと思われた。早急に検査セン

ターなどで可能となることが必要と考えられた。

12．治療

新規症例において選択された治療法を図6、7に示す。新規・急性型ではプレドニゾン治療が82%の症例において選択されていた。次いで大量IgG療法が31%、ピロリ除菌が28%の症例で施行されていた。また新規・慢性型においてもプレドニゾン治療が57%の症例で選択されていた。次いでピロリ除菌、大量IgG療法が実施されていた。

新規症例におけるピロリ除菌療法の年度別の推移を図8に示す。この数年間は35%前後で推移していた。

図9に更新症例でこの1年間に試みられた治療法、図10に全経過で実施された治療法を示す。更新症例においてもこの1年間ではプレドニゾン治療が最多で57%の症例に実施されていた。これは各種治療に抵抗性でプレドニゾンによる維持療法が行われていた症例を含むためと推察された。一方、全経過でみるとプレドニゾン治療が78%、次いでピロリ除菌療法、大量IgG療法、摘脾など各種の治療が行われていた。平成22年12月~平成23年4月に発売された新規薬剤(レボレード、ロミプレート)であるトロンボポエチン受容体アゴニスト(TRA)は9%の症例で使われていた。

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

13．この1年間の経過

この1年間の経過を表17に示す。更新・慢性型症例では、不変69%、軽快22%、徐々に悪化5%であった。ITPは良性疾患

ではあるが難治性の疾患であることがうかがわれた。

14．罹病期間

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

15．合併症

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

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

16．難治症例の頻度

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

更新申請症例で慢性型13,349例を対象とした(表18)。まず血小板数2万以下の症例に絞り込むと2,534例(19.0%)の症例が対象となった。血小板数2万以下の症例を、さらに出血傾向を示していた症例に絞り込む

と1,931例(14.5%)が対象となった。出血傾向を示している症例のうちプレドニゾロン治療をされていた症例は1,404例(10.5%)であった。各種治療に抵抗性であるとの考えに従い、摘脾済み症例に絞り込むと大幅に減少し、303例(2.3%)が難治例に相当すると考えられた。

表19に難治症例頻度の年度別推移を示す。難治症例頻度は2.3~2.8%で推移しており、一定の頻度で存在していた。

E．結語

- 1．新規症例数は4,256人と推計された。年間発症者数は最近7年間、4,000人前後で推移しており、発症率に変化はなかった。
- 2．更新症例数は19,897人と推計された。本邦の患者数は最近7年間、20,000人前後で推移していた。
- 3．特殊検査では、骨髄検査実施率90%前後、PAIgG60%前後、自己抗体検査6%、網状血小板14%前後であった。最近、網状血小板検査が増加傾向を示していた。
- 4．治療ではトロンボポエチン受容体作動薬(TRA)の投与例が急速に増加していた。
- 5．難治症例頻度は2.3%であった。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

1．論文発表

- 1) Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Sato Y, Onishi S, Yasukawa M: Development of exogenous FVIII-specific inhibitor in a mild hemophilia patient with

- Glu272Lys mutation. Haemophilia
20:e179-182, 2014.
- 2) Yamanouchi J, Hato T, Niiya T, Azuma T, Yasukawa M: Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIb/IX monoclonal IgM antibody. Ann Hematol 93:711-712, 2014.
 - 3) Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: Dramatic and prompt efficacy of Helicobacter pylori eradication in the treatment of severe refractory iron deficiency anemia in adults. Ann Hematol 93:1779-1780, 2014
 - 4) 羽藤高明 止血異常に対する輸血療法の基本 - 適切な血小板製剤、新鮮凍結血漿の入手と適切な使い方 - Medical Practice 31:110-114, 2014.
 - 5) 羽藤高明 血栓性血小板減少性紫斑病 今日の治療指針 2014 PP654-655, 2014 医学書院 東京
 - 6) 羽藤高明 先天性および後天性血管障害による出血 血液疾患最新の治療 2014-2016 pp217-220, 2014 南江堂 東京
 - 7) 羽藤高明 血小板輸血の適応とそのピットフォール 出血性疾患の実践診療マニュアル pp59-64, 2014 南江堂 東京
 - 8) 羽藤高明 新鮮凍結血漿の適応とそのピットフォール 出血性疾患の実践診療マニュアル pp65-70, 2014 南江堂 東京
 - 9) 羽藤高明 凝固因子製剤の分類とその適応 出血性疾患の実践診療マニュアル pp71-77, 2014 南江堂 東京

2. 学会発表

- 1) 羽藤高明 輸血ガイドラインの見直し 「血小板濃厚液使用指針の見直し」 第62回日本輸血細胞治療学会総会 2014.5.15 奈良
- 2) 羽藤高明 血栓症包囲網 - 多方面から血栓症を考える - 「最新の血栓形成機序から血栓症を考える」 第47回日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会 2014.9.14 松山
- 3) 羽藤高明 最新の血栓形成機序から治療を考える 第34回日本静脈学会総会教育講演 2014.4.18 名護
- 4) 羽藤高明 輸血医療の最近の進歩 第51回日本内科学会四国支部生涯教育講演会 2014.11.30 松山
- 5) 山之内純、羽藤高明 クロピドグレル服用脳梗塞患者でのVASP assay に対するCYP 遺伝子多型とシロスタゾール併用の影響 第36回日本血栓止血学会学術集会 2014.5.30 大阪
- 6) 山之内純、羽藤高明、中西英元、浅井洋晶、松原悦子、谷本一史、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation 第76回日本血液学会総会 2014.10.31 大阪
- 7) Jun Yamanouchi, Takaaki Hato, Etsuko Matsubara, Taichi Azuma, Hideyuki Nakanishi, Hiroshi Fujiwara, Yoshihiro Yakushijin, Masaki Yasukawa: Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation. The 56th annual meeting of American Society of Hematology

2014.12.8 San Francisco, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 . ITP 患者数

年度(平成)	18	19	20	21	22	23	24
医療受給者証交付人数	23,196	23,157	22,945	22,853	22,200	23,791	24,100
臨床個人調査票登録数	11,629	10,000	12,034	19,047	15,977	20,129	18,115
登録率(解析症例率)	50%	43%	52%	83%	72%	85%	75%

表 2 . 新規患者数

	全症例	男	女
登録患者数	3,192	1,227	1,965
推定患者数	4,256	1,636	2,620

表 3 . 病型別の患者数(新規患者)

	急性型	男	女	慢性型	男	女	型不明
登録患者数	1,191	517	674	1,856	649	1,207	145
推定患者数	1,588	689	898	2,475	865	1,609	193

表 4 . 新規患者数の推移

年度(平成)	18	19	20	21	22	23	24
登録患者数	1,865	1,955	2,025	2,631	2,695	3,235	3,192
推定患者数	3,730	4,547	3,894	3,170	3,743	3,806	4,256

表 5 . 更新患者数

	全症例	男	女
登録患者数	14,923	4,435	10,488
推定患者数	19,897	5,913	13,984

表 6 . 病型別の患者数(更新患者)

	急性型	男	女	慢性型	男	女	型不明
登録患者数	1,170	429	741	13,349	3,876	9,473	404
推定患者数	1,560	572	988	17,799	5,168	12,631	539

表 7 . 更新患者数の推移

年度(平成)	18	19	20	21	22	23	24
登録患者数	9,764	8,045	10,009	16,416	13,282	16,894	14,923
推定患者数	19,528	18,709	19,248	19,778	18,447	19,875	19,897

表 8 . 身体障害者手帳の有無

	あり	なし	記載なし
新規・急性型	64	1021	106
新規・慢性型	77	1,615	164
更新・急性型	96	1,012	62
更新・慢性型	880	11,746	723

表 9 . 介護認定の有無

	要介護	要支援	なし	記載なし
新規・急性型	83	29	953	126
新規・慢性型	80	40	1,538	198
更新・急性型	106	42	945	77
更新・慢性型	691	341	11,513	804

表 10 . 日常生活不自由度

	正常	やや不自由	部分介助	全面介助	記載なし
新規・急性型	701	241	118	49	82
新規・慢性型	1,236	360	108	29	123
更新・急性型	727	273	94	29	47
更新・慢性型	9,228	2,715	686	147	573

表 11 . 生活状況

	就労	就学	家事労働	在宅療養	入院	入所	その他
新規・急性型	284	46	307	165	304	23	18
新規・慢性型	562	48	646	245	214	25	13
更新・急性型	302	44	415	261	40	20	31
更新・慢性型	4,223	416	5,499	2,089	181	162	172

表 12 . 受診状況

	入院	入院・通院	通院	往診あり	入通院なし	その他
新規・急性型	573	150	340	4	57	18
新規・慢性型	374	150	1,199	3	24	23
更新・急性型	48	72	1,000	10	2	23
更新・慢性型	143	346	12,138	71	36	263

表 13 . 特殊検査の実施率

	骨髄検査	PAIgG	抗血小板自己抗体検査	網状血小板検査
新規・急性型	90.5	60.8	5.4	18.9
新規・慢性型	87.6	70.8	6.1	14.4

表 14 . 特殊検査実施率の年度別推移

年度 (平成)	新規・急性型				新規・慢性型			
	骨髄 検査	PAIgG	自己 抗体	網状 血小板	骨髄 検査	PAIgG	自己 抗体	網状 血小板
18	87.3	43.1	2.2	2.6	90	62.4	2.0	3.8
19	96.7	56.3	3.1	4.1	95.8	68.6	4.9	4.4
20	88.7	57.4	3.1	7.1	87.7	69.4	3.8	5.8
21	89.3	62.7	6.6	7.6	86.3	66.5	6.1	6.7
22	90.0	63.8	5.0	14.5	86.7	67.4	6.7	10.7
23	90.0	56.4	6.1	14.3	87.0	64.6	5.4	11.1
24	90.5	60.8	5.4	18.9	87.6	70.8	6.1	14.4

表 15 . その他の薬剤の使用状況

	レボレード	ロミプレート	リツキサン	セファランチン	V C	加味帰脾湯
新規・急性型	48	14	0	1	0	4
新規・慢性型	122	19	0	10	3	4
更新・急性型	48	20	0	12	8	3
更新・慢性型	939	243	10	322	285	110

表 16 . その他の薬剤の年度別推移

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

表 17 . この 1 年間の臨床経過（更新症例）

	治癒	軽快	不変	徐々に悪化	急速に悪化	その他	記載なし
更新・急性型	40	600	446	22	19	19	2
更新・慢性型	82	2,893	9,222	655	155	250	92

表 18 . 難治症例の頻度

	症例数	%
更新・慢性型症例	13,349	100.0
血小板数 2 万未満	2,534	19.0
+ 出血症状あり	1,931	14.5
+ プレドニゾン治療あり	1,404	10.5
+ 摘脾済み症例	303	2.3

表 19 . 難治症例頻度（%）の年度別推移

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

图1. 年龄分布(新規・急性型)

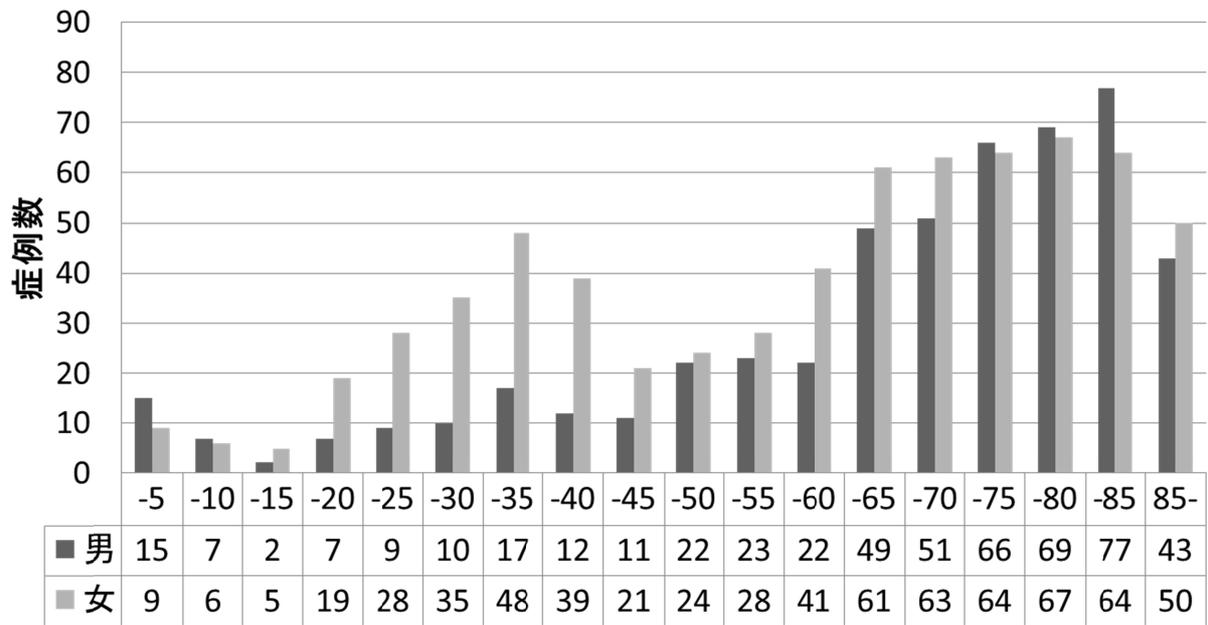


图2. 年龄分布(新規・慢性型)

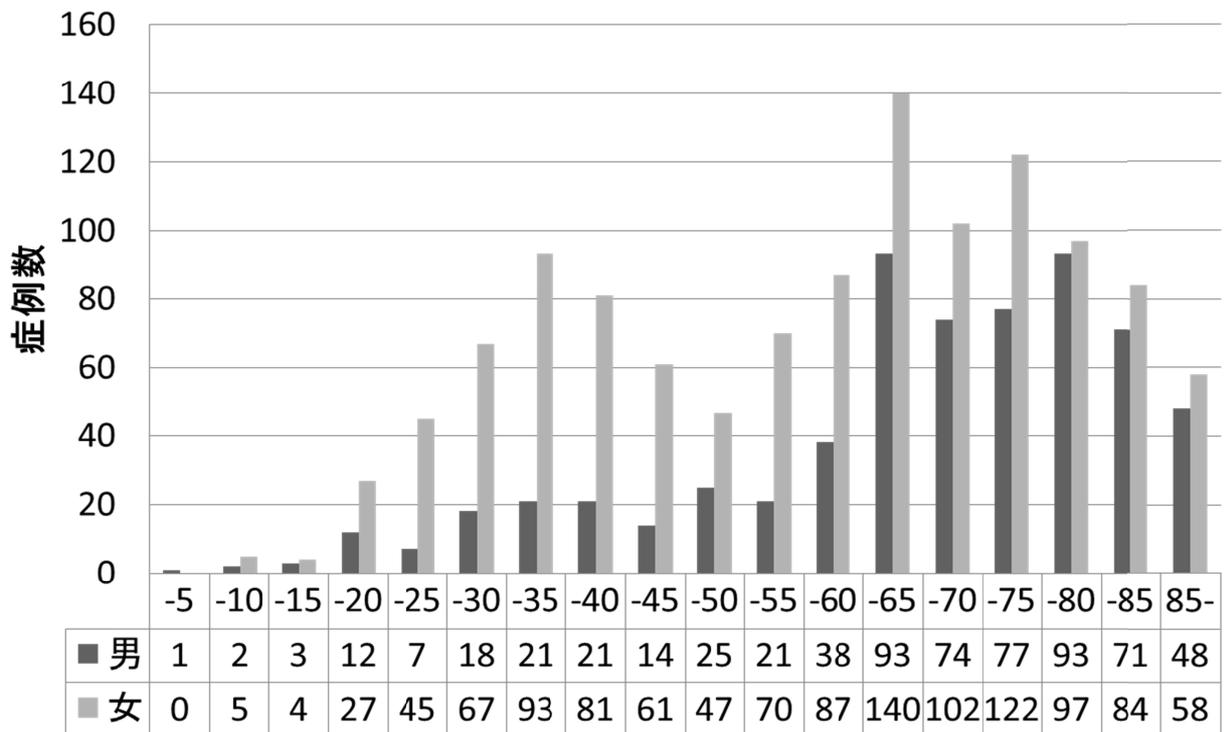


图3. 年齢分布(更新・慢性型)

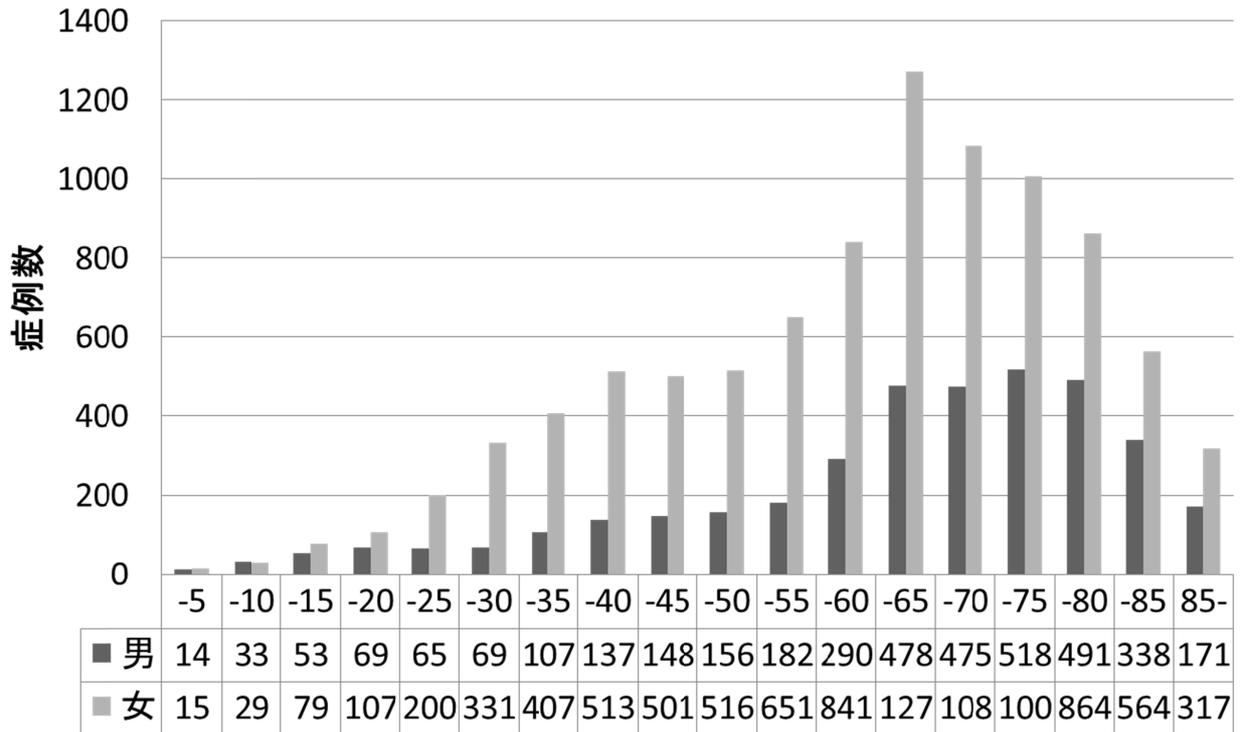


图4. 出血症状

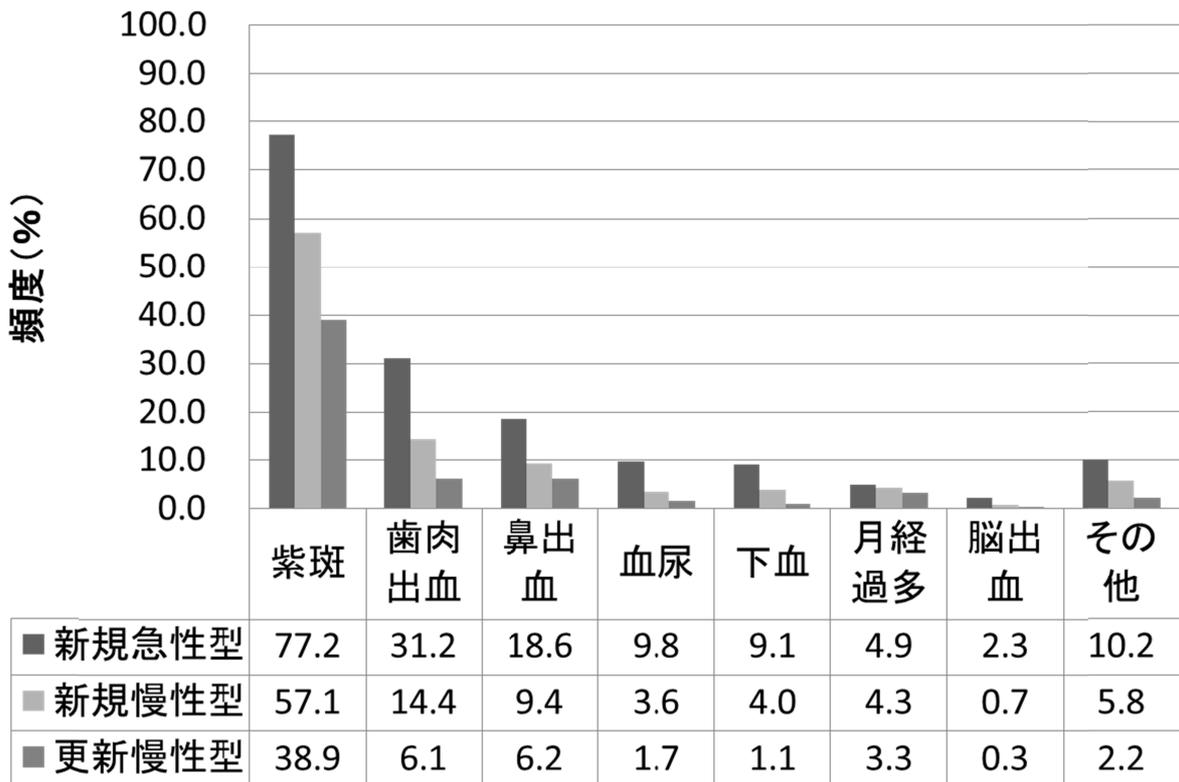


図5. 血小板数

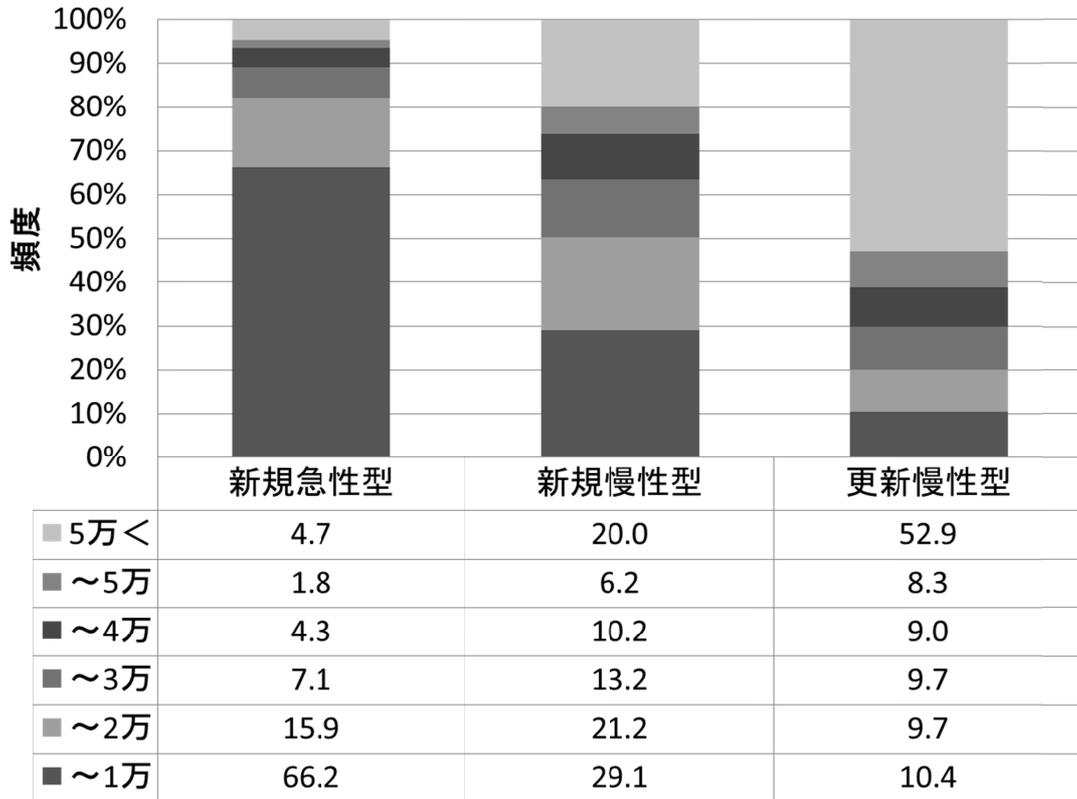


図6. 治療(新規・急性型)

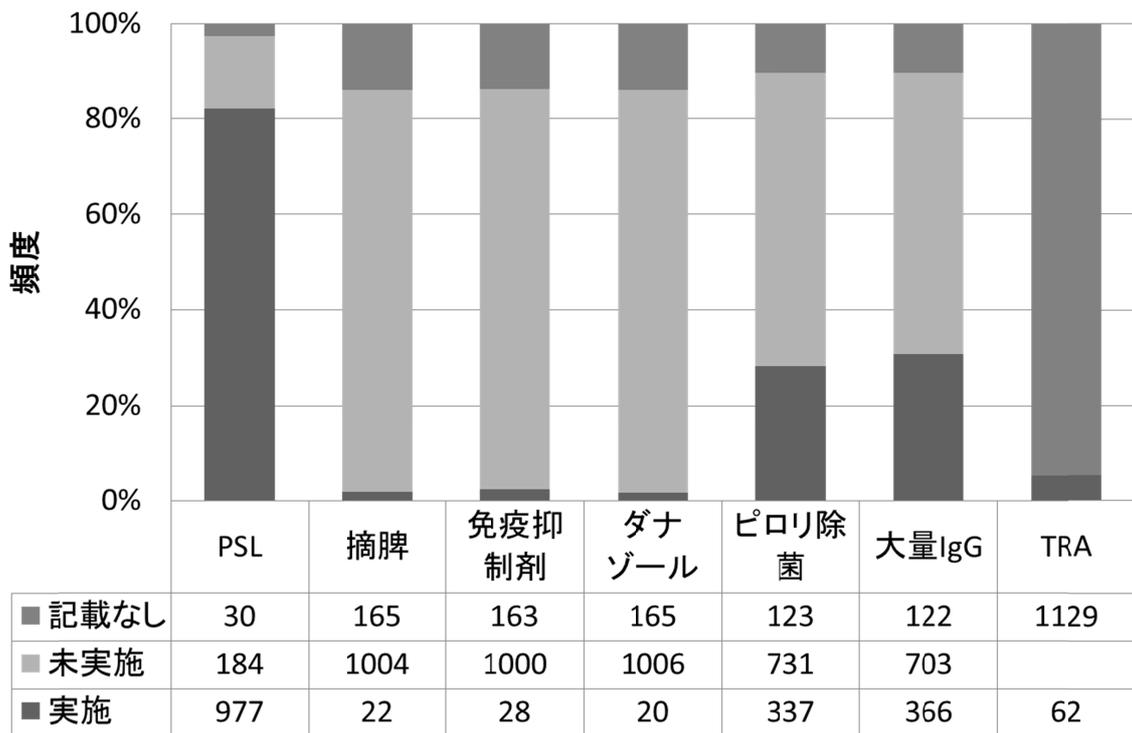


図7. 治療(新規・慢性型)

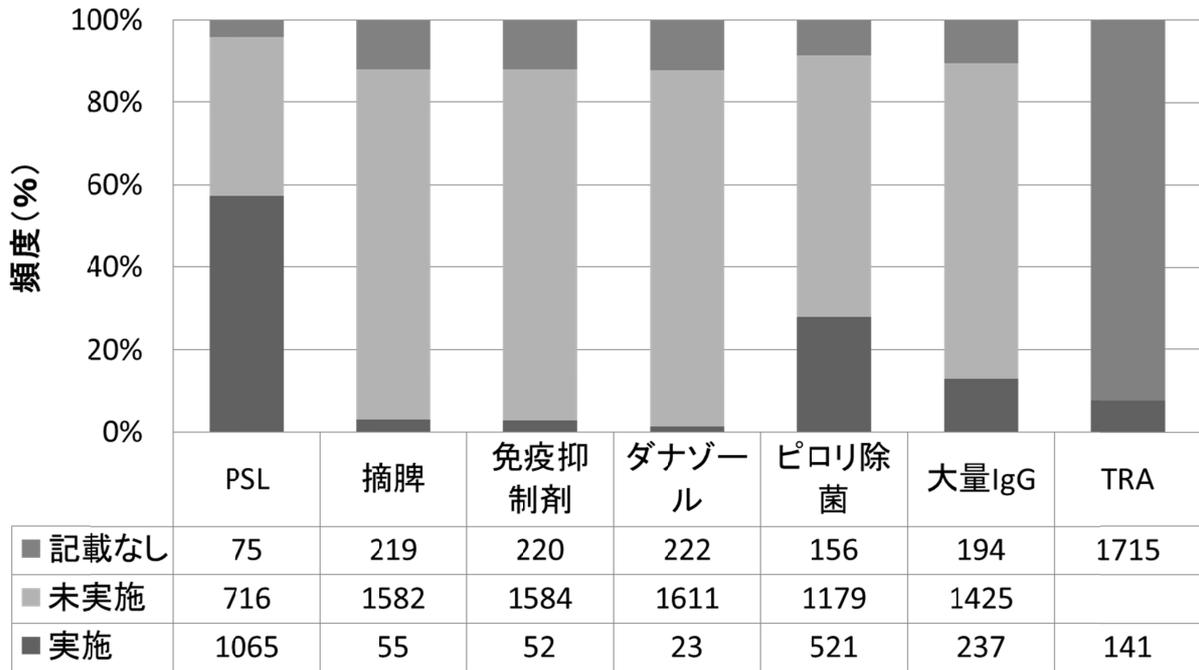


図8. ピロリ除菌率の年度別推移

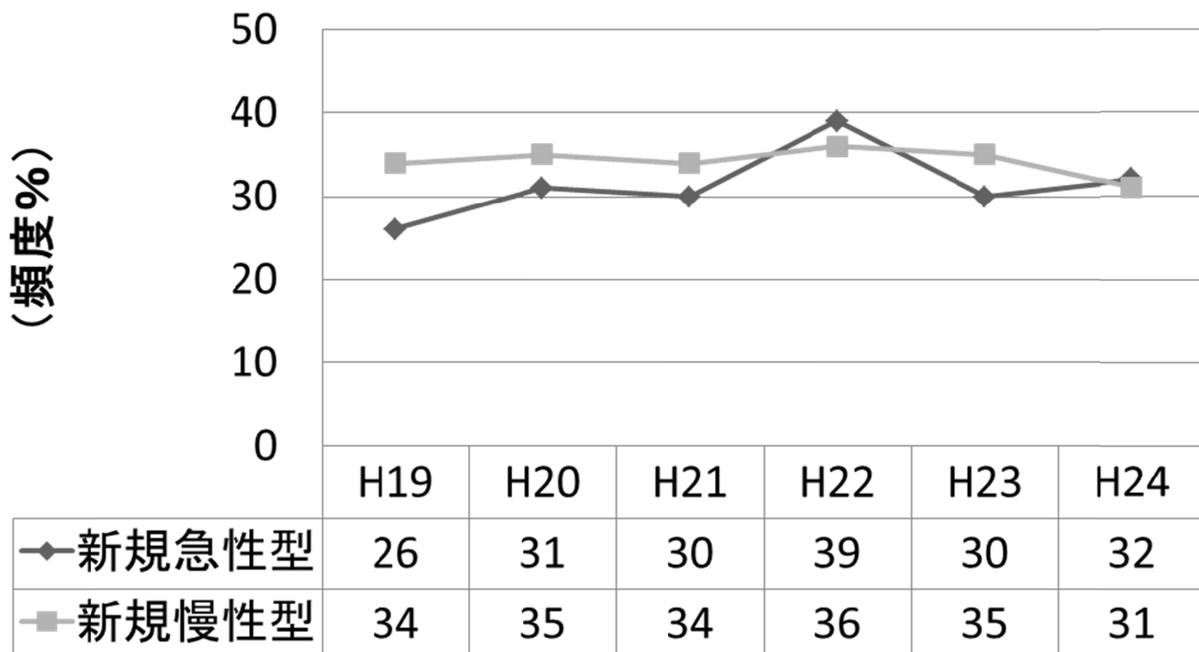


図9. この1年間の治療(更新・慢性型)

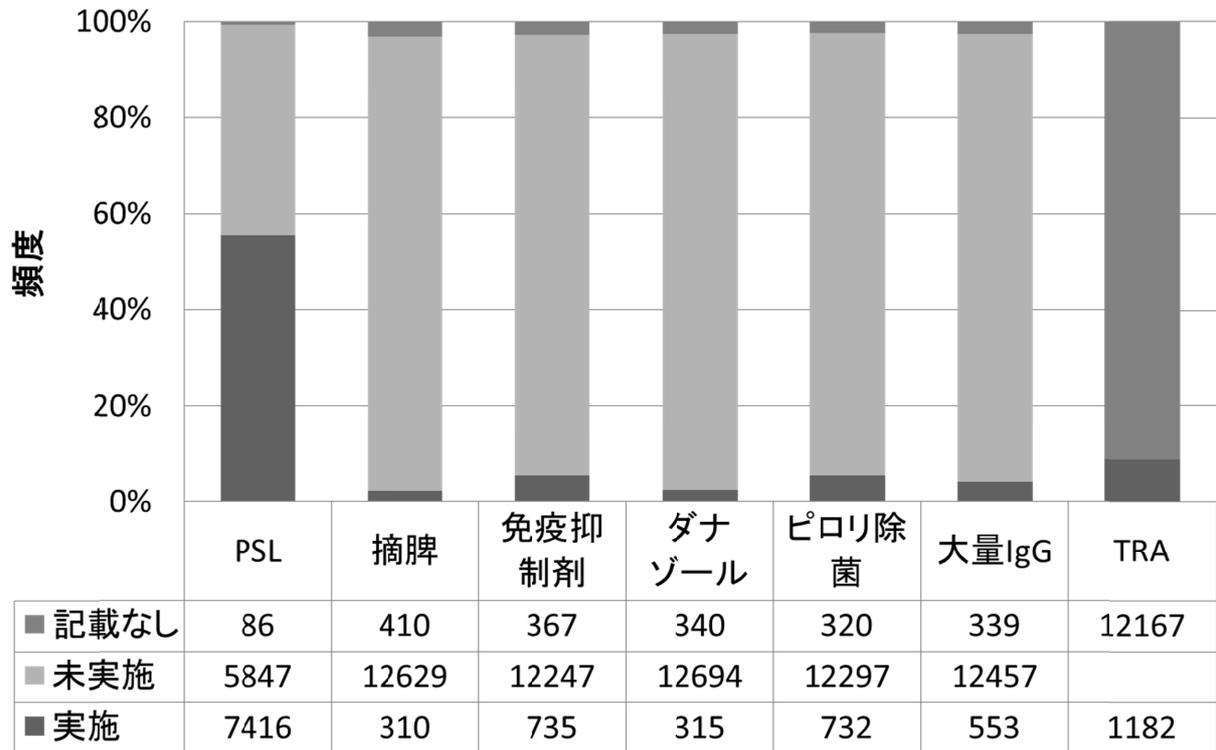


図10. 全経過での治療(更新・慢性型)

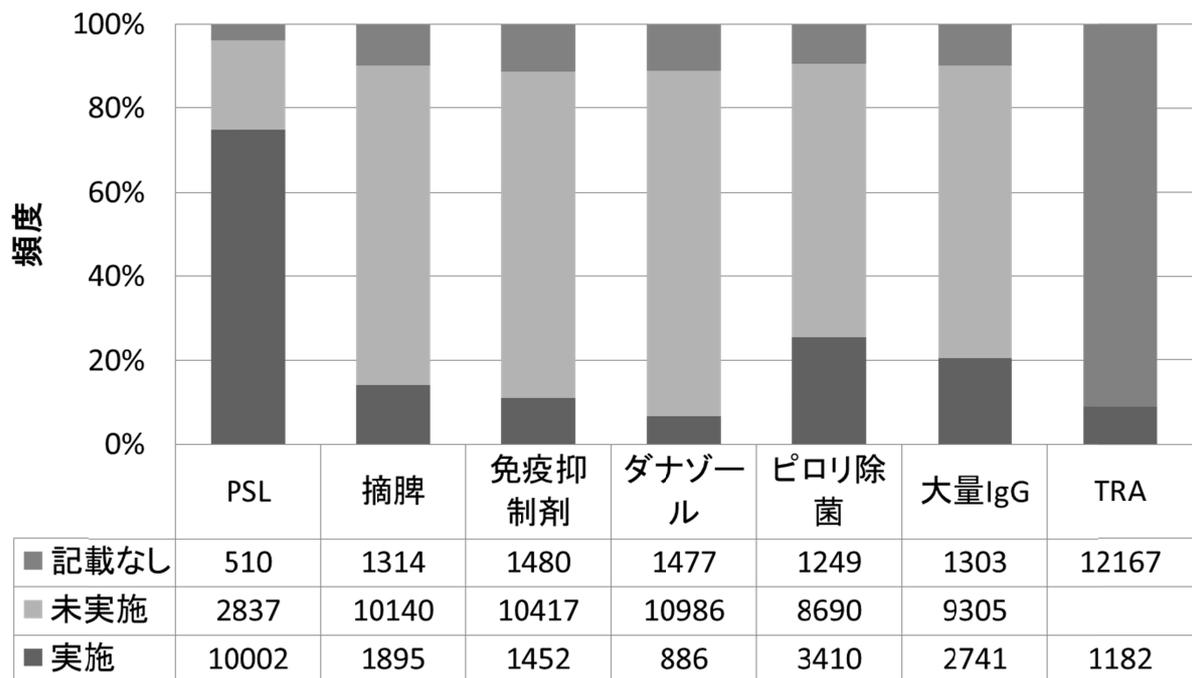


図11. 罹患期間

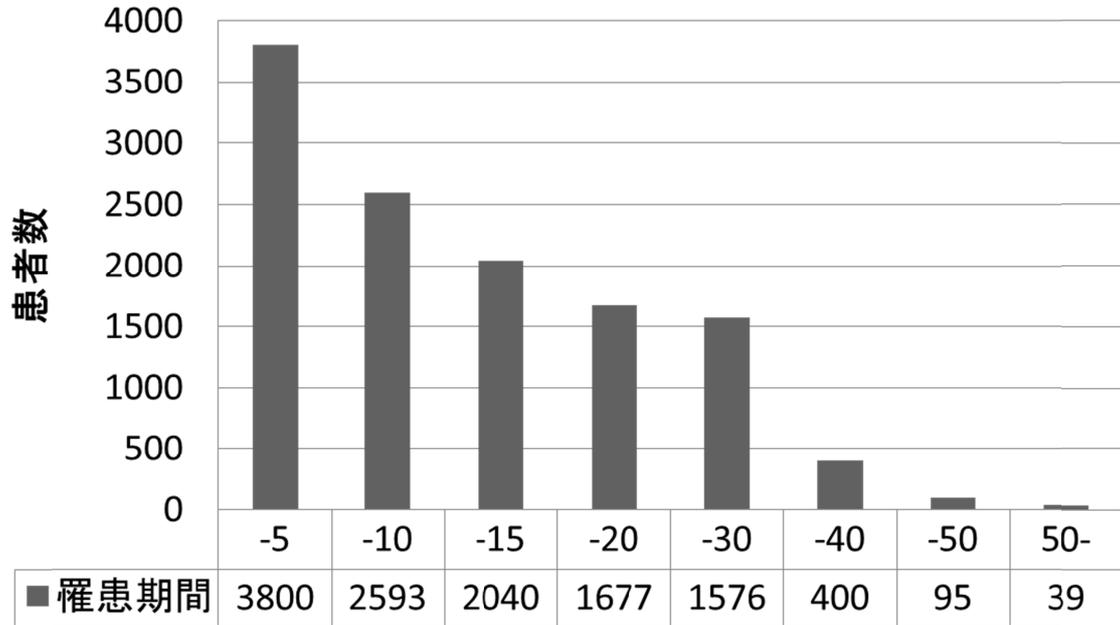


図12. 合併症(更新・慢性型)

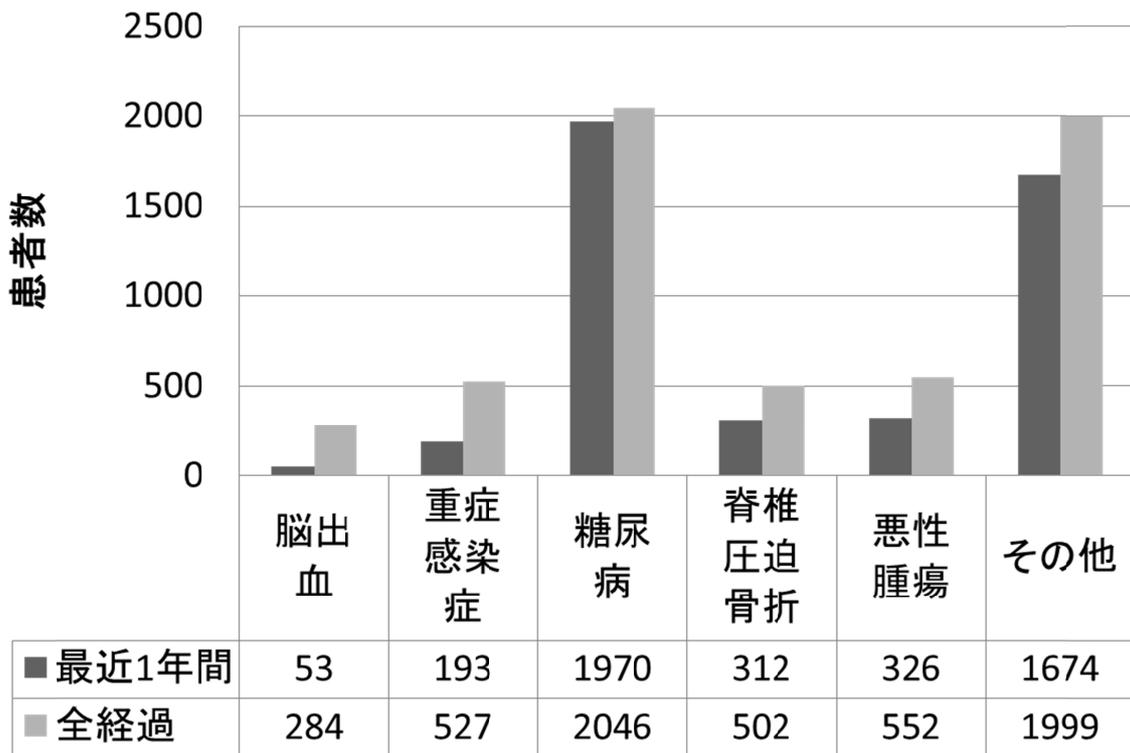
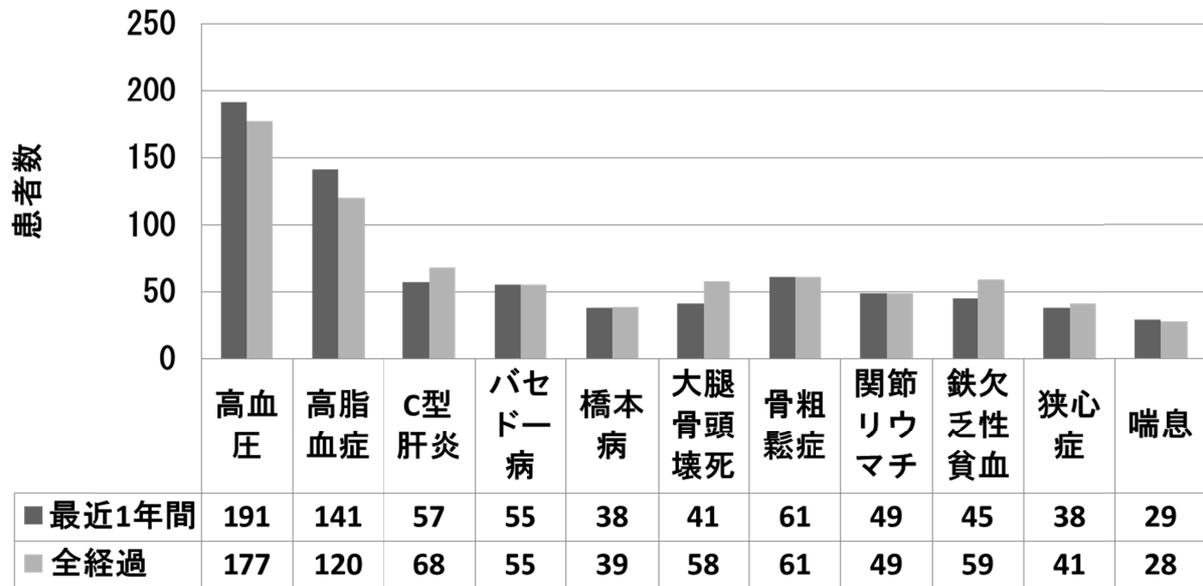


図13. その他の合併症(更新・慢性型)



TTP サブグループ研究報告

グループリーダー：藤村 吉博 奈良県立医科大学輸血部 特任教授
班員：宮川 義隆 埼玉医科大学総合診療内科 教授
和田 英夫 三重大学医学部臨床検査医学 准教授
小亀 浩市 国立循環器病研究センター研究所 室長

研究協力者：森木 隆典 慶應義塾大学保健管理センター 准教授
日笠 聡 兵庫医科大学血液内科 講師
上田 恭典 倉敷中央病院 血液内科 部長
宮田 敏行 国立循環器病研究センター研究所 部長
八木 秀男 近畿大学奈良病院 血液内科 准教授
松本 雅則 奈良県立医科大学輸血部 教授

グループ総括

分担研究者：藤村 吉博

研究要旨

日本国内の血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）症例の病態解析を行い、独自の TTP 診断と治療ガイドラインを作成することを目的としている。

1998 年から継続して実施している血栓性微小血管症（TMA）症例登録は、2014 年 12 月末までに 1323 例の TMA を日本国内で集積した。先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群: USS) 患者数は 57 例となったが、昨年新規に発見した症例は 5 例であった。このうち 54 例で ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。また、後天性 TMA 1176 例のうち、基礎疾患が無い原発性で ADAMTS13 活性著減例 303 例を後天性 TTP として同定した。

海外の TTP 診断基準に準拠して ADAMTS13 活性が 10% 未満の症例を TTP とする診断基準を作成した。また、TTP が指定難病となったため、その重症度も判定するための重症度分類も作成した。しかし、現状では ADAMTS13 検査が保険適用となっていないことより、本年度「早期導入を要望する医療機器に関する要望書」を作成し、日本血液学会を通じて厚生労働省に提出し、ヒアリングを受けた。今後、ADAMTS13 活性測定キットを製造・販売している会社と協力して体外診断薬承認のために治験を行う計画である。また、本年度は後天性 TTP で血漿交換に対して難治性、再発性の症例に対して、CD20 に対するモノクローナル抗体リツキシマブの保険適用拡大のための医師主導治験を別研究班と協力して実施した。平成 26 年末で治験は終了し、来年度に保険適用取得を目指している。今後、リツキシマブの使用を追加した TTP 治療ガイドラインを作成する予定である。

A . 研究の目的

日本国内の血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）症例の病態解析を行い、独自の診断と治療ガイドラインを作成することを目的としている。

B . 研究方法

平成 26 年度は以下の研究を行った。

- 1) TTP の診断基準と重症度分類の作成
- 2) 日本国内の血栓性微小血管症（TMA）症例の集積
- 3) ADAMTS13 検査の保険適用取得への取

り組み

- 4) 難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの医師主導治験
- 5) Upshaw-Schulman 症候群 (USS) の遺伝子解析と genotype-phenotype 解析

（倫理面への配慮）

検体採取に際しては、主治医より十分な説明を行い、同意を得た。また、コホート研究は奈良医大の倫理委員会、USS の遺伝子解析は奈良医大、国立循環器病研究センターのヒトゲノム倫理委員会の承認を得ている。

C . 研究成果

1) TTP の診断基準と重症度分類の作成

平成 26 年 5 月 23 日に成立した「難病の患者に対する医療等に関する法律」により、指定難病 110 疾患が選定され、TTP が指定難病となり公費助成の対象となった。平成 27 年 1 月 1 日から新しい医療費助成制度が始まることより、疾患の診断基準（添付資料 1）および助成対処を決定する重症度分類（添付資料 2）を作成した。診断基準は、世界的なコンセンサスとされるようになった ADAMTS13 活性 10%未満のみを TTP とするに変更した。その上で、ADAMTS13 に対する自己抗体（インヒビター）が存在しない場合には Upshaw- Schulman 症候群（USS）を疑い、インヒビターが存在する場合は後天性 TTP と診断する。重症度分類として、後天性 TTP では 8 つの項目を持つかどうかで点数化し 1 点以上が中等症で、医療費助成対象となる。USS では定期的、不定期いずれでも新鮮凍結血漿（FFP）による治療を受けていれば中等症となり医療費助成の対象となる。

2) 日本国内の TMA 症例の集積

我々は 1998 年 7 月から日本国内の医療機関からの依頼によって ADAMTS13 活性測定を行うことで、TMA 症例の集積を行ってきた。その症例数は 2014 年 12 月末で 1323 例となり、この 1 年間で 72 例増加した（表 1）。先天性 TMA は、USS 57 例、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）90 例で計 147 例となった。後天性 TMA は 1176 例であったが、基礎疾患のない原発性は 522 例で、そのうち ADAMTS13 活性が著減している症

例は 303 例で、これらの症例が後天性原発性 TTP と診断される。

3) ADAMTS13 検査の保険適用取得への取り組み

TTP の診断基準に ADAMTS13 活性とインヒビターが含まれているが、日本国内では ADAMTS13 検査は保険適用となっていない。そのため、ADAMTS13 検査が保険収載されるように厚生労働省へ要望するとともに、ADAMTS13 活性測定キットの体外診断用医薬品承認を目指している。来年度は承認申請を行うため、医薬品医療機器総合機構（PMDA）と相談後に臨床性能試験を実施する予定である。（藤村個別報告参照）。

4) 難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの医師主導治験

後天性 TTP の急性期の治療として、血漿交換が有効であることが前向き比較研究で報告されており、第一選択で実施されている。しかし、血漿交換に不応である、もしくは難治である症例が報告されており、最近まではピンクリスチンやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤が経験的に使用されてきた。このような症例では、血漿交換施行中に ADAMTS13 インヒビターが急上昇していることを我々は明らかにしたが、CD20 に対するモノクローナル抗体リツキシマブが有効であることが国内外から報告されている。これは、リツキシマブ投与によって CD20 陽性細胞である B リンパ球を破壊し、インヒビターの産生を低下させる機序が予想される。現在、日本国内においてリツキシ

マブは TTP に対して保険適応を有していないことから、本サブグループが中心となって、医師主導治験を 2014 年に実施した。目標の症例数は 6 例で、7 例の登録があったが、評価対象は目標通り 6 例となった。その結果をもとに、リツキシマブの TTP への適応拡大を目指す予定である。(宮川個別報告参照)

5) Upshaw-Schulman 症候群(USS)の遺伝子解析と genotype-phenotype 解析
現在までに発見した USS 57 例のうち、ADAMTS13 遺伝子解析を 54 例で実施し、52 例で責任遺伝子変異を同定した。その変異と臨床症状について解析を続けている。(小亀個別報告参照)

D. 考察

本研究グループは、TMA の病態解析を中心に行っていた以前の厚労省研究班のグループをもとに形成されているが、今年度からの目的は、TTP の診断と治療ガイドラインを作成することである。診断や治療のガイドラインは、海外でも作成されており、それをそのまま導入することも可能であるが、我々の USS の遺伝子解析の結果では日本人と西洋人は全く異なった変異が見つかり、日本人独自の病態解析に基づいた診断基準、治療ガイドラインの作成が重要であると考えている。そのため、日本人におけるコホート研究を本年度も継続して独自のデータベースの作成を行い、臨床症状や治療効果などの解析を行っている。

2015 年 1 月から新たな難病制度が始まり、指定難病に対して公費補助が行われ

る。TTP は指定難病に選ばれたため、診断基準と公費補助の対象となる重症度分類を作成し、実際にそれをもとに運用されようとしている。診断基準として ADAMTS13 活性 10%未満の症例のみを TTP としたが、従来 TTP と診断されていた古典的 5 徴候を持つ症例については除外される症例もある。このような症例では未知の機序が予想されるが、現状では ADAMTS13 著減例のみを TTP とし、それ以外で TTP が疑われる症例は TTP 類縁疾患として今後病態解明が進むことが期待される。

本研究グループのメンバーを中心に、別組織の厚生労働科研を獲得し、難治性 TTP に対するリツキシマブの医師主導治験を実施した。TTP は希少疾患であり、また全国津々浦々の病院で治療されていることから、治験への参加症例数の不足が懸念された。しかし、目標症例数は辛うじて確保できたので、リツキシマブが TTP に対して適用拡大となることを期待している。

次年度以降の本グループの大きな目標は、TTP 治療ガイドラインの作成である。現状では、TTP に保険適用となっており、効果が明らかな治療法は血漿交換のみである。今後リツキシマブが保険適用になることで、治療選択が増えることによって、より具体的な TTP 治療ガイドラインが作成できるものと考えている。

E. 結論

日本国内の多くの TMA 症例を集積し、コホート研究を続けて、TTP の臨床症状の解明を行った。また、TTP が指定難病とさ

れたことから、その認定に使用するため診断基準と重症度分類を作成した。今後、我々が行った医師主導治験の結果をもとにリツキシマブの TTP に対する適用拡大を目指し、それを含んだ形での TTP の治療ガイドラインを作成する予定である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

1. Yada N, Fujioka M, Bennett C, Hayakawa M, Matsumoto M, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Fujimura Y. The STEC-HUS followed by acute encephalopathy in a young girl was favorably treated on a basis of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. *Clinical Case Reports* (in press) 2015.
2. Ogawa Y, Matsumoto M, Sadakata H, Isonishi A, Kato S, Nojima Y, Fujimura Y. A unique case involving a female patient with Upshaw-Schulman syndrome: low titers of antibodies against ADAMTS13 prior to pregnancy disappeared after successful deliver. *Transfusion Med and Hematol* 42:59-63, 2015
3. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. A case of autoimmune-type HUS treated with eculizumab, as a first-line therapy. *Pediatrics Int.* in press, 2014.
4. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol.* 100 : 437-442, 2014.
5. Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, Fujimura Y, van der Zwaan C, Verbij FC, Pos W, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer AB. Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 12: 670-679, 2014.
6. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2: 240-244, 2014.
7. Takuma Y, Fujimura Y, Emoto Y, Kuriu Y, Iino M, Matoba R. Response to 'Death during pregnancy:

- Thrombotic thrombocytopenic purpura or septic shock?'. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 887, 2014.
8. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the joint committee of the Japanese society of nephrology and the Japan pediatric society. *Clin Exp Nephrol* 18: 4-9, 2014.
 9. Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, Fujimura Y, Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M. Effect of ADAMTS13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost* 12: 505-14, 2014.
 10. Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40 (1), 247-249 (2014)
 11. Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology* 155 (3), 1099-1106 (2014)
 12. Reiko Neki, Toshiyuki Miyata, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Daisuke Fujita, Shigeyuki Isaka, Tomoaki Ikeda, Jun Yoshimatsu: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb. Res.* 133 (5), 914-918 (2014)
 13. Fukushima N, Itamura H, Wada H, Ikejiri M, Igarashi Y, Masaki H, Sano M, Komiyama Y, Ichinohe T, Kimura S: A Novel Frameshift Mutation in Exon 4 Causing a Deficiency of High-molecular-weight Kininogen in a Patient with Splenic Infarction. *Intern Med.* 2014; 53: 253-257
 14. Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. *Thromb Res.* 2014: 133: 440-444
 15. Yamashita Y, Wada H, Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y, Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N:

- Elevated Fibrin-related Markers in Patients with Malignant Diseases Frequently Associated with Disseminated Intravascular Coagulation and Venous Thromboembolism. *Intern Med* 2014; 53: 413-419
16. Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H: Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. *Int J Hematol.* 2014; 99: 437-440
 17. Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S: Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. *Int J Hematol.* 2014; 99:418-28
 18. Sasaki T, Matsumoto T, Wada H, Ohishi K, Kanda H, Yamada Y, Arima K, Katayama N, Sugimura Y.: Successful treatment of non-invasive bladder tumour in a haemophilia A patient with high-responding inhibitors: a case report. *Haemophilia.* 2014; 20: 399-401
 19. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. *Journal of Intensive Care* 2014; 2: 15
 20. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis. *Clin Chim Acta.* 2014; 436C:130-134
 21. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?, *Crit Care*, 2014 18:447
 22. Wada H, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the "Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan". *Thromb Res*, 2014; 134: 924-925
 23. Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40: 866-873
 24. Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Wada H.: Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an

observational nationwide study: comment. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

25. Ota S, Wada H, Mastuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux. Clin Chim Acta, 2015 (in press)
26. Wada H, Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N: Antithrombin or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

学会発表

1. 石西綾美、松本雅則、藤村吉博. 後天性 TTP の血漿交換療法の影響による ADAMTS13 自己抗体の動態解析. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
2. 長谷川真弓、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、馬場由美、下村志帆、内池敬男、早川正樹、松本雅則、藤村吉博. 奈良医大付属病院における輸血後感染症検査の実施状況. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
3. 八木秀男、早川正樹、山口尚子、山下慶悟、松本雅則、谷口繁樹、杉本充彦、椿和央、藤村吉博. 重症大動脈弁狭窄症患者の弁置換術前後における VWF 依存性血小板血栓形成の計時的変化の検討. 第 36 回日本血栓止

血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日

4. 樋口由佳、小亀浩市、高蓋寿朗、田中亮二郎、小林光、石田文宏、久永修一、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. ダイレクトシーケンシング、定量 PCR、次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
5. 吉田瑶子、範新萍、大山良文、古久保哲朗、岩本顕聰、森俊雄、松本雅則、池島裕子、宮田敏行、藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
6. 早川正樹、松本雅則、八木秀男、天野逸人、田中晴之、木村弘、藤村吉博. 造血幹細胞移植後患者における好中球生着と UL-VWF 出現との関連. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
7. 松本雅則、早川正樹、石西綾美、吉田瑶子、吉井由美、田中賢治、前田琢磨、宮田茂樹、藤村吉博. 維持血液透析患者の血小板減少に対する抗血小板第 4 因子/ヘパリン抗体の関与. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
8. 小亀浩市、樋口由佳、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止

- 学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
9. 池島裕子、Xinping Fan,平井秀憲、本田繁則、吉田瑶子、藤村吉博、Johanna A. Kremer Hovinga, Bernhard Lammle,宮田敏行. 腎障害を示した先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の補体制御因子の遺伝子解析. 第36回日本血栓止血学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
 10. 田井義彬、西尾健治、大野史郎、吉本清巳、赤井靖宏、池島裕子、宮田敏行、吉田瑶子、松本雅則、藤村吉博. インフルエンザ感染時の血小板減少を契機に診断された典型溶血性尿毒症症候群の1例. 第36回日本血栓止血学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
 11. 早川正樹、松本雅則、吉井由美、八木秀男、藤村吉博. 造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の発症と予防的輸血との関連性. 第36回日本血栓止血学会学術集会.大阪国際交流センター. 2014年5月31日
 12. Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. Registry of congenital TMA s in Japan. The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis (APSTH). Hanoi / Vietnam. 2014年10月11日
 13. 宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村田満、阿部貴行、三宅真二、菊池佳代子、岡本真一郎、太田秀一、半田寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰夫、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第2相医師主導治験.第76回日本血液学会総会.大阪国際会議場. 2014年10月31日
 14. Hayakawa M, Yagi H, Yamaguchi N, Yamashita K, Hayata Y, Abe T, Taniguchi S, Fujimura Y, Matsumoto M. The changes of von Willebrand factor multimers in patients with aortic stenosis by valve replacement. 第76回日本血液学会総会.大阪国際会議場. 2014年11月1日
 15. 下村志帆、前田美和、長谷川真弓、辻内智美、門池真弓、馬場由美、上野華恵、隈志穂里、西田幸世、早川正樹、松本雅則. 奈良医大病院における緊急輸血の現状と問題点. 第58回日本輸血・細胞治療学会 近畿支部総会. 和歌山県立医科大学 講堂.2014年11月15日
 16. Yagi H, Hayakawa M, Yamaguchi N, Yamashita K, Taniguchi S, Matsumoto M, Tsubaki K, Fujimura Y. Decreased platelet thrombus size, due to a heightened proteolysis of VWF by ADAMTS13 is quickly restored after valve replacement in aortic stenosis patients. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco/USA. 2014年12月7日
 17. Yoshii Y, Matsumoto M, Kurumatani N, Isonishi A, Uemura M, Hori Y, Hayakawa M, Yagi H, Bennett CL,

- Fujimura Y. Introduction of a quick assay for ADAMTS13 activity improved a survival of acquired TTP patients who received platelet transfusions. The 56th Annual meeting of American Society of Hematology. San Francisco/USA. 2014年12月8日
18. Fumiaki Banno, Yuko Tashima, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Kochi Kokame, Toshiyuki Miyata: Analysis of mice carrying northeast Asian-specific genetic mutations in thrombosis. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014.
 19. 小亀浩市: VWF 切断酵素 ADAMTS13 の基礎知識. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 15 日 -17 日
 20. 小亀浩市: TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
 21. 小亀浩市, 樋口 (江浦) 由佳, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
 22. 樋口 (江浦) 由佳, 小亀浩市, 高蓋寿朗, 田中亮二郎, 小林光, 石田文宏, 久永修一, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: ダイレクトシーケンシング, 定量 PCR, 次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
 23. 坂野史明, 田嶋優子, 小亀浩市, 宮田敏行: 深部静脈血栓症モデルを用いた日本人の血栓症モデルマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
 24. 清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉譲, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン IIb/3 活性化変異, IIb(R990W) ノックインマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日
 25. 滝澤祥恵, 小菅由希子, 淡路比呂代, 田村恵美, 高井綾子, 矢内隆章, 山本玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 井上裕康: HUVEC におけるレスベラトロールによる eNOS, SIRT1, オートファジー関連遺伝子の発現誘導. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日
 26. 丸山慶子, 秋山正志, 小亀浩市, 森下英理子, 宮田敏行: プロテイン SK196E (PS 徳島) 変異検出 ELISA 法の開発. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月 31-11 月 2 日
 27. Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Fumiaki Banno, Hisashi Kato, Youichiro Morikawa, Seiji Tadokoro, Koichi Kokame, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama. IIb(R990W), a constitutive activating mutation

of integrin IIb 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function. The 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.

28. 小亀浩市: 先天性 TTP における遺伝子解析 . Ion Torrent/Applied Biosystems ユーザーグループミーティング 2014, 東京, 2014 年 12 月 16 日
29. 小亀浩市: 先天性 TTP (USS) の分子診断. 第 9 回日本血栓止血学会 SSC シンポジウム, 東京, 2015 年 2 月 28 日
30. Wada H: Diagnosis and therapy of DIC The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
31. Wada H: New guideline for DIC management The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
32. 和田英夫: aHUS/TTP 患者の検査値異常、共催シンポジウム「補体制御因子と腎疾患」、第 49 回日本小児腎臓学会シンポジウム、秋田、2014
33. 和田英夫: 播種性血管内凝固と輸血療法、シンポジウム 2「止血検査からみた最適な輸血療法」、第 21 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、愛媛、2014

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP） 診断基準

他に原因を認めない血小板減少を認めた場合、ADAMTS13 活性を測定し 10%未満に著減している症例を TTP と診断する。抗 ADAMTS13 自己抗体が陽性であれば後天性 TTP と診断する。陰性であれば USS と診断する。（補足）

なお、TTP を疑う 5 徴候を認めるが ADAMTS13 活性が著減していない症例も、従来 TTP と診断されてきたが、その病態が明らかでないため TTP 類縁疾患と考えられている。また、TTP 類縁疾患の場合でもただちに血漿交換などの治療が必要な症例が存在する。

TTP を疑う徴候の目安

血小板減少

血小板数が 10 万/uI 未満。1-3 万/uI の症例が多い。

細血管障害性溶血性貧血(microangiopathic hemolytic anemia:MAHA)

MAHA は、赤血球の機械的破壊による貧血で、ヘモグロビンが 12g/dl 未満(8-10g/dl の症例が多い)で溶血所見が明らかなこと、かつ直接クームス試験陰性で判断する。

溶血所見とは、破碎赤血球の出現、間接ビリルビン、LDH、網状赤血球の上昇、ハプトグロビンの著減などを伴う。

腎機能障害

尿潜血や尿蛋白陽性のみの軽度のものから血清クレアチニンが上昇する症例もあり。ただし、血液透析を必要とする程度の急性腎不全の場合は溶血性尿毒症症候群(HUS)が疑われる。

発熱

37 以上の微熱から 39 台の高熱まで認める。

動揺性精神神経症状 頭痛など軽度のものから、せん妄、錯乱などの精神障害、人格の変化、意識レベルの低下、四肢麻痺や痙攣などの神経障害などを認める。

除外すべき疾患

播種性血管内凝固症候群(disseminated intravascular coagulation:DIC)
TTP 症例では、PT,APTT は正常で、フィブリノゲン、アンチトロンビンは低下しないことが多く、FDP,D-dimer は軽度の上昇にとどまることが多い。DIC の血栓は、フィブリン/フィブリノゲン主体の凝固血栓であり、APTT と PT が延長し、フィブリノゲンが減少する。

溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome:HUS)
腸管出血性大腸菌(O157 など)感染症による典型 HUS は、便培養検査・志賀毒素直接検出法(EIA)などの大腸菌の関与を確認する方法や抗 LPS(エンドトキシン)IgM 抗体などで診断する。

HELLP 症候群
HELLP 症候群とは、妊娠高血圧腎症や子病で、溶血(hemolysis)、肝酵素の上昇(elevated liver - enzymes)、血小板減少(low platelets)を認める多臓器障害である。診断は、Shibai らの診断基準(Shibai BM,et al.Am J Obstet Gynecol 1993;169:1000)によって行われるが、この基準では TTP との鑑別が困難である。ADAMTS13 活性が著減していれば TTP と診断する。

Evans 症候群
Evans 症候群では直接クームス陽性である。ただし、クームス陰性 Evans 症候群と診断されることがあるが、このような症例の中から ADAMTS13 活性著減 TTP が発見されている。

補足

抗 ADAMTS13 インヒビターをベセスダ法で測定し、1 単位/ml 以上は明らかな陽性と判断できる。しかし、陰性の判断は必ずしも容易ではなく、USS の診断は両親の ADAMTS13 活性測定などを参考に行うが、確定診断には ADAMTS13 遺伝子解析が必要である。USS 患者の両親は、ヘテロ接合体異常であることから ADAMTS13 活性は 30 から 50%を示す場合が多い。

なお、ADAMTS13 自己抗体は、中和抗体(インヒビター)を測定することが一般的であり、研究室レベルでのみ非中和抗体の検査が可能である。

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP) 重症度分類

後天性 TTP 重症度分類

1. ADAMTS13 インヒビター 2BU/ml 以上
2. 腎機能障害
3. 精神神経障害
4. 心臓障害（トロポニン上昇、ECG 異常等）
5. 腸管障害（腹痛等）
6. 深部出血または血栓
7. 治療不応例
8. 再発例

<判定> 有 1 点、無 0 点

重症 3 点以上

中等症 1 点～2 点

軽症 0 点

先天性 TTP（Upshaw-Schulman 症候群：USS）重症度分類

1) 重症

維持透析患者、脳梗塞などの後遺症残存患者

2) 中等症

定期的、または不定期に新鮮凍結血漿（FFP）輸注が必要な患者

3) 軽症

無治療で経過観察が可能な患者

ADAMTS13 活性測定試薬の保険適用取得への活動状況

研究分担者 藤村 吉博 奈良県立医科大学輸血部 特任教授
研究協力者 松本 雅則 奈良県立医科大学輸血部 教授

研究要旨

本年度我々は、ADAMTS13活性が10%未満への著減症例をTTPと診断するという診断基準を作成した。同活性を測定した後、著減の場合にはADAMTS13に対する自己抗体（インヒビター）を確認して、先天性(Upshaw-Schulman症候群)と後天性に区分することになっている。しかし、現状ではADAMTS13活性およびインヒビター測定とも保険適用となっていない上に、測定用キットで体外診断用医薬品として承認されているものが存在しない。ADAMTS13活性とインヒビターの測定は、TTPの診断ばかりではなく、リツキシマブのTTPに対する保険適用拡大治験やaHUSの診断基準にも関係しており、早期に保険適用となることが望まれる。

そこで本年度は、まずADAMTS13活性およびインヒビター測定の保険収載に向けて、「早期導入を要望する医療機器に関する要望書」を作成した。それを、平成26年6月に日本血液学会を通じて厚生労働省に提出し、7月にヒアリングを受けた。8月のworking groupの会議で検討され、本年度末を目処に結論が得られる予定とのことであった。上記と平行して、国内企業のカイノス社が研究用試薬として販売しているADAMTS13活性測定試薬を、体外診断用医薬品製造販売承認申請するための臨床性能試験を行う予定である。

このように本年度は、ADAMTS13活性とインヒビターの検査が保険で検査できるように2方向からのアプローチを行った。次年度は、測定用キットが体外診断用医薬品として承認されるように、TTPサブグループの施設を中心に臨床性能試験を行う予定である。

A . 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の診断基準として、ADAMTS13活性が10%未満に著減する症例であると、国際的にも認められている。その上で、ADAMTS13に対する自己抗体（インヒビター）が陰性であれば、先天性TTPであるUpshaw-Schulman症候群が疑われ、インヒビターが陽性であれば後天性TTPと診断される。現在、日本国内においてはADAMTS13活性、

インヒビターともに外注検査として測定可能であるが、保険適用となっていない。本研究ではADAMTS13活性およびインヒビターを保険適応として測定可能にすることを目的とする。

B . 研究方法

ADAMTS13活性、インヒビターを健康保険内で測定するためには、特定のADAMTS13を測定する検査試薬において体

外診断用医薬品としての承認を得る必要がある。しかし、現状ではADAMTS13検査試薬で体外診断用医薬品として承認されているものは無い。

今回、1)ADAMTS13活性とインヒビター力価の2項目で保険適用を取得する、2)カイノス社製ADAMTS13 activity ELISA kitを体外診断用医薬品として承認を得ることを計画した。ADAMTS13 activity ELISA kitを選んだ理由として、国内で開発製造されている、製造企業が体外診断用医薬品承認に積極的である、他に適当なキット化されている測定法が見つけれなかった、などの理由による。

(倫理面への配慮)

該当せず

C . 研究結果

検体検査に使用される「診断薬」は、薬価や特定保険医療材料価格とは異なり、診療報酬本体の技術料として償還される「検体検査実施料」に包含されている。検体検査実施料は、個別の検査薬ではなく「検査項目」ごとに設定されるが、「測定方法」が指定されることになる。この方法としてADAMTS13 activity ELISA kitを考えている。新規項目の保険適用、新規測定方法の指定は、「診断薬」を有する企業からの希望により行われている。診断薬が存在しない検査の場合には、学会要望などにより行われることもある。検査の保険適用には、対象患者数や測定頻度、検査により削減できる医療費など医療経済上の有用性を示す必要があるとされている。

ADAMTS13検査については、2013年度よ

り日本血液学会から保険適用となるように要望書を提出していたが、2014年6月に本サブグループが中心となり「早期導入を要望する医療機器等に関する要望書」を作成し、日本血液学会を通じて厚生労働省に提出した。2014年7月に厚生労働省のヒアリングを受け、検査の目的、および体外診断用医薬品承認に向けた活動内容等について説明した。ADAMTS13検査がこの項目に該当すると判断された場合、承認申請が優先審査扱いとなり、早期に承認がおりる可能性がある。

ADAMTS13 activity ELISA kitは、2006年10月に研究用試薬として上市された。製造および国内での販売は(株)カイノスが、海外での販売はオーストリアのTechnoClone社が行っている。本製品の測定原理は、図に示すようにELISA法を用いており、血漿を検体として止血因子VWF (von Willebrand factor) の特異的切断酵素であるADAMTS13の活性を測定するものである。ADAMTS13によって切断されたVWFの切断断端を特異的に認識する抗体を使用することが特徴である。ADAMTS13活性測定に加え、血友病患者における第Ⅲ因子に対するインヒビター力価の定量法であるBethesda法に準じて操作することによりADAMTS13のインヒビター力価を測定することも可能である。活性を50%低下させる力価を1 Bethesda Unit (BU)と表記する。

今後の臨床性能試験実施について、まずカイノス社から医薬品医療機器総合機構(PMDA)に試験に関する相談を行う。その結果でTTPサブグループの参加施設を中心に症例を集めて、臨床性能試験を実

施する予定である。しかし、ADAMTS13活性著減TTP患者は非常に症例数が少ないため、臨床性能試験をどのように進めるのかPMDAとも相談し、検討する予定である。

D. 考察

ADAMTS13活性とインヒビター測定は、TTPの診断に必要であるのみでなく、難治性・再発性TTPに有効であるリツキシマブの使用に関して重要な指標となる。さらに、TTPとの鑑別が必要な非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)の診断基準に採用されている。

後天性TTPの急性期の治療法は血漿交換であるが、それに不応例や早期に再発する症例が知られている。難治性・再発性の機序として、血漿交換の実施中にもかかわらず、血漿ADAMTS13インヒビターが急上昇する(ADAMTS13 inhibitor boosting)症例が予想以上に多いことを我々は明らかにした。これらの症例に対して、国内外からCD20に対するモノクローナル抗体リツキシマブが有効であることが報告されている。しかし、日本国内においてリツキシマブはTTPに対して保険適用となっていないため、TTPサブグループが中心となって2014年に医師主導治験を実施した。その際のエントリー基準としてADAMTS13活性著減とインヒビター2 BU/ml以上が使用されている。今後この医師主導治験の結果を用いて、リツキシマブのTTPに対する保険適用拡大が認められる可能性が高いが、その際にはADAMTS13検査が是非とも必要となる。

また、TTPと同様に指定難病110疾患に

選ばれたaHUSは、補体の第二経路の持続的な異常活性化によって発症することが明らかになった。その診断は、血小板減少、溶血性貧血、腎不全という3徴候に加えて、志賀毒素産生HUSとTTPを否定することである。TTPの否定にはADAMTS13活性が著減していないことと診断基準にも記載されており、ここでもADAMTS13検査は重要である。aHUSの治療は最近までは血漿交換などの血漿療法のみであったが、補体C5に対するモノクローナル抗体エクリズマブが日本国内でも使用可能となり、有効であることが示されている。しかし、エクリズマブは非常に高価な薬剤であり、その使用適応は厳しく判断する必要がある。また、補体活性化に関連したaHUSに対してはエクリズマブを早期に投与することで、腎機能の改善が良好になることが報告されている。このように、aHUSを正確に診断し、治療法を選択する上でもADAMTS13活性測定は非常に重要である。

TTPにおいては、ADAMTS13活性著減のみをTTPと診断することが国際的なコンセンサスになっている。さらに、ADAMTS13検査はTTPの予後を予測する重要な指標となることが報告されている。1)治療前にADAMTS13活性が著減している症例は再発が多いこと、2)治療前にインヒビターを検出した症例は再発率が高く、インヒビター力価が高いほど血漿交換への反応が悪く、早期死亡が多いこと、3)臨床的寛解期にADAMTS13活性著減が続く症例は再発が多く、同様にインヒビターが残存する症例も再発が多いことなどが報告されている。

これらの血液疾患以外にも、肝硬変に

においてADAMTS13活性は予後を予測する因子として報告されるなど、ADAMTS13検査は、肝臓疾患領域においても注目されている。これは、ADAMTS13は肝臓の星細胞で主として産生されていることが明らかになっており、肝臓の微小循環の調節に重要な役割を果たしていることが予想されているからである。今後、ADAMTS13検査は微小循環障害によることが予想される血液疾患以外においても重要な検査となることが予想される。

E . 結論

ADAMTS13検査は、TTPの診断のみでなく治療法の選択や、aHUSの診断と治療にも必要な検査であり、早期に保険適用となることが期待されている。今後、ADAMTS13 activity ELISA kitの臨床性能試験を行うとともに、ADAMTS13検査が保険収載されるように活動を続けて行く予定である。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表 論文発表

1. Yada N, Fujioka M, Bennett C, Hayakawa M, Matsumoto M, Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, Fujimura Y. The STEC-HUS followed by acute encephalopathy in a young girl was favorably treated on a basis of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange. *Clinical Case Reports* (in press) 2015.
2. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, Hattori M. A case of autoimmune-type HUS treated with eculizumab, as a first-line therapy. *Pediatrics Int.* in press, 2015.
3. Ogawa Y, Matsumoto M, Sadakata H, Isonishi A, Kato S, Nojima Y, Fujimura Y. A unique case involving a female patient with Upshaw-Schulman syndrome: low titers of antibodies against ADAMTS13 prior to pregnancy disappeared after successful deliver. *Transfusion Med and Hematol.* 42: 59-63, 2015.
4. Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T. Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol.* 100 : 437-442, 2014.
5. Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, Fujimura Y, van der Zwaan C, Verbij FC, Pos W, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer AB. Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13. *J Thromb Haemost* 12: 670-679, 2014.

6. Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T. Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2: 240-244, 2014.
7. Takuma Y, Fujimura Y, Emoto Y, Kuriu Y, Iino M, Matoba R. Response to 'Death during pregnancy: Thrombotic thrombocytopenic purpura or septic shock?'. *J Obstet Gynaecol Res* 40: 887, 2014.
8. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, Hattori M, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the joint committee of the Japanese society of nephrology and the Japan pediatric society. *Clin Exp Nephrol* 18: 4-9, 2014.
9. Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, Fujimura Y, Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M. Effect of ADAMTS13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Thromb Haemost* 12: 505-14, 2014.
10. 藤村吉博、松本雅則、石西綾美、八木秀男、小亀浩市、宮田敏行. 血栓性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 55: 93-104, 2014.

学会発表

1. 石西綾美、松本雅則、藤村吉博. 後天性 TTP の血漿交換療法の影響による ADAMTS13 自己抗体の動態解析. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
2. 長谷川真弓、西田幸世、前田美和、辻内智美、門池真弓、馬場由美、下村志帆、内池敬男、早川正樹、松本雅則、藤村吉博. 奈良医大付属病院における輸血後感染症検査の実施状況. 第 62 回日本輸血細胞治療学会総会. 奈良県文化会館、2014 年 5 月 16 日
3. 八木秀男、早川正樹、山口尚子、山下慶悟、松本雅則、谷口繁樹、杉本充彦、椿和央、藤村吉博. 重症大動脈弁狭窄症患者の弁置換術前後における VWF 依存性血小板血栓形成の計時的変化の検討. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
4. 樋口由佳、小亀浩市、高蓋寿朗、田中亮二郎、小林光、石田文宏、久永修一、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. ダイレクトシーケンシング、定量 PCR、次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
5. 吉田瑶子、範新萍、大山良文、古久保哲朗、岩本顕聰、森俊雄、松本雅

- 則、池島裕子、宮田敏行、藤村吉博. 定量的溶血試験と遺伝子解析を用いた本邦 aHUS 患者の病態解析第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
6. 早川正樹、松本雅則、八木秀男、天野逸人、田中晴之、木村弘、藤村吉博. 造血幹細胞移植後患者における好中球生着と UL-VWFM 出現との関連. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 7. 松本雅則、早川正樹、石西綾美、吉田瑤子、吉井由美、田中賢治、前田琢磨、宮田茂樹、藤村吉博. 維持血液透析患者の血小板減少に対する抗血小板第 4 因子/ヘパリン抗体の関与. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 8. 小亀浩市、樋口由佳、松本雅則、藤村吉博、宮田敏行. デジタル PCR を用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 9. 池島裕子、Xinping Fan, 平井秀憲、本田繁則、吉田瑤子、藤村吉博、Johanna A. Kremer Hovinga, Bernhard Lammle, 宮田敏行. 腎障害を示した先天性血栓性血小板減少性紫斑病患者の補体制御因子の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 10. 田井義彬、西尾健治、大野史郎、吉本清巳、赤井靖宏、池島裕子、宮田敏行、吉田瑤子、松本雅則、藤村吉博. インフルエンザ感染時の血小板減少を契機に診断された典型溶血性尿毒症症候群の 1 例. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 11. 早川正樹、松本雅則、吉井由美、八木秀男、藤村吉博. 造血幹細胞移植後の肝中心静脈閉塞症の発症と予防的輸血との関連性. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会. 大阪国際交流センター. 2014 年 5 月 31 日
 12. Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y. Registry of congenital TMA s in Japan. The 8th Congress of Asia Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis(APSTH). Hanoi/Vietnam. 2014 年 10 月 11 日
 13. 宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村田満、阿部貴行、三宅真二、菊池佳代子、岡本真一郎、太田秀一、半田寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰夫、藤村吉博. 血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第 2 相医師主導治験. 第 76 回日本血液学会総会. 大阪国際会議場. 2014 年 10 月 31 日
 14. Hayakawa M, Yagi H, Yamaguchi N, Yamashita K, Hayata Y, Abe T, Taniguchi S, Fujimura Y, Matsumoto M. The changes of von Willebrand factor multimers in patients with aortic stenosis by valve replacement. 第 76 回日本血液学会

総会.大阪国際会議場. 2014 年 11 月
1 日

15. 下村志帆、前田美和、長谷川真弓、
辻内智美、門池真弓、馬場由美、上
野華恵、隈志穂里、西田幸世、早川
正樹、松本雅則. 奈良医大病院にお
ける緊急輸血の現状と問題点. 第 58
回日本輸血・細胞治療学会 近畿支
部総会. 和歌山県立医科大学 講堂.
2014 年 11 月 15 日

16. Yagi H, Hayakawa M, Yamaguchi N,
Yamashita K, Taniguchi S, Matsumoto
M, Tsubaki K, Fujimura Y. Decreased
platelet thrombus size, due to a
heightened proteolysis of VWF by
ADAMTS13 is quickly restored after
valve replacement in aortic
stenosis patients. The 56th Annual
meeting of American Society of
Hematology. San Francisco/USA.
2014 年 12 月 7 日

17. Yoshii Y, Matsumoto M, Kurumatani
N, Isonishi A, Uemura M, Hori Y,
Hayakawa M, Yagi H, Bennett CL,
Fujimura Y. Introduction of a quick
assay for ADAMTS13 activity
improved a survival of acquired TTP
patients who received platelet
transfusions. The 56th Annual
meeting of American Society of
Hematology. San Francisco/USA.
2014 年 12 月 8 日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

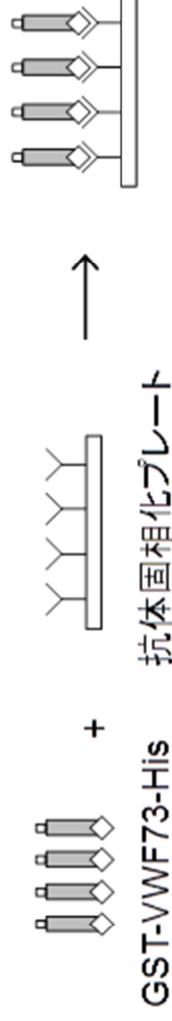
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

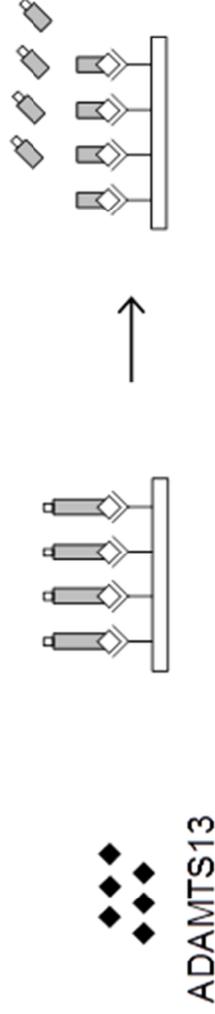
1. 特許取得

なし

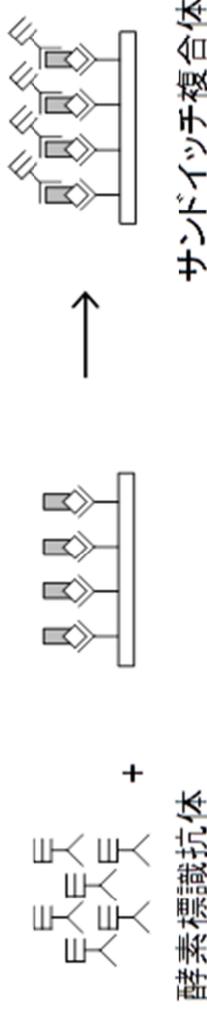
反応原理図①



反応原理図②



反応原理図③



反応原理図④

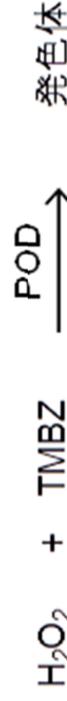


図 ADAMTS13 activity ELISA kit 測定原理

ADAMTS13 で切断される最小基質の 73 アミノ酸残基からなる VWF73 を GST を介してプレートに固相化する
患者血漿を加えて VWF73 の切断反応を行う
ADAMTS13 によって切断される断面を認識するモノクローナル抗体を切断部位に結合させる
結合した抗体を発色させる

血液凝固異常症等に関する研究

研究分担者 宮川 義隆 埼玉医科大学教授

研究要旨

平成 26 年に国内で実施された血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの第相医師主導治験の治験実施計画書の作成、研究体制の構築と被験者募集について支援を行った。治験実施期間中に目標の症例数に達し、計画通り無事に治験を終了した。今後、本治験で得られた成果をもとに、診療ガイドラインを作成予定である。

A . 研究目的

平成 26 年 1 月～12 月にかけて、難治性疾患実用化研究事業として血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) に対するリツキシマブの第相医師主導治験が行われた。急性期疾患かつ国内の患者数が約 400 名と少ないことから、本研究班がこれまでの研究成果を生かして、治験実施計画書の作成、研究体制の構築、被験者募集について支援を行う。

B . 研究方法

平成 25 年度に医薬品医療機器総合機構による薬事戦略相談を受けた。審議結果を反映させた治験実施計画書の作成支援、治験実施施設の選定、被験者候補者のリクルートについて支援をした。

C . 研究成果

被験者募集の期間は約 12 ヶ月間と短期間であったが、TTP 疑いの被験者候補者を近くの治験実施施設へ紹介することにより、目標の 6 名に到達することができた。治験実施施設は、過去の疫学研究成果を元に TTP 患者数が多い施設を選び、このうち医師主導治験への参加を希望する医

療機関 11 ヶ所を選定した。最終的に 13 施設が本治験に参加した。

D . 考察

これまでの TTP に関する一連の研究成果をもとに、医師主導治験の治験実施計画書の作成支援、治験実施施設の選定、被験者募集の支援を協力に行うことができた。

E . 結論

本研究の支援により、TTP に対するリツキシマブの医師主導治験が予定期間内に無事に終了することができた。平成 27 年度中に適応拡大を承認申請する予定である。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表

宮川義隆

ITP と TTP に対するリツキシマブ
日本内科学会雑誌 103, 1654-1659
(2014)

宮川義隆
新規診断 ITP に対するリツキシマブ
とデキサメタゾン併用療法とデキサ
メタゾン単剤療法の前向き比較試験、
血液内科 68, 250-253 (2014)

宮川義隆
特発性血小板減少性紫斑病
内科 114, 209-213 (2014)

宮川義隆
妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド
Thrombosis Medicine 4, 388-394
(2014)

2. 学会発表

第 76 回 日本血液学会学術集会
2014 年 10 月、大阪)

妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病
診療の参照ガイド

宮川義隆、柏木浩和、高蓋寿朗、藤
村欣吾、倉田義之、小林隆夫、木村
正、安達知子、渡辺尚、今泉益栄、
高橋幸博、松原康策、照井克生、桑
名正隆、金川武司、村田満、富山佳
昭、妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド
作成委員会

第 76 回 日本血液学会学術集会
(2014 年 10 月、大阪)
血栓性血小板減少性紫斑病に対する
リツキシマブの第 2 相医師主導治験
宮川義隆、松本雅則、上田恭典、村
田満、阿部貴行、三宅真二、菊地佳
代子、岡本真一郎、太田秀一、半田
寛、朝倉英策、和田英夫、西尾健治、
椿和央、日笠聡、野村昌作、一戸辰
夫、藤村吉博

第 76 回 日本血液学会学術集会
(2014 年 10 月、大阪)

Investigato-inisiated clinical
trial of rituximab for chronic
primary immune thrombocytopenia
Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T,
Nomura S, Nishiwaki K, Tomiyama Y,
Higashihara M, Shirasugi Y,
Nishikawa M, Ozaki K, Abe T,
Kikuchi K, Sato Y, Kanakura Y,
Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S.

【メディア】

宮川義隆、TBS テレビ報道特集、「難
病女性 決意の出産」、2014 年 12 月
20 日

宮川義隆、産経新聞、「特発性血小板
減少性紫斑病」、2014 年 4 月 22 日

宮川義隆、Medical Tribune、「ITP 患
者の妊娠・出産に 20 年ぶり新指針」、
2014 年 12 月 18 日

宮川義隆、読売新聞、医療ルネサ
ス：シリーズ薬 妊娠と出産「持病
ある女性支える指針」、2014 年 10 月
30 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

肝移植におけるTMAの発症と血小板活性化との関係に関する研究

研究分担者 和田 英夫 三重大学医学系研究科検査医学 准教授

臼井 正信 三重大学医学系研究科肝胆膵・移植外科 准教授

研究要旨

血栓性微小血管障害（TMA）は種々の疾患で見られる予後不良な病態で、肝移植例での報告もある。今回、79例の肝移植例について検討したが、TMAはグラフトロス（死亡）例で認められた。ドナーに比べてレシピエントでは、血小板数と可溶性血小板膜糖蛋白（sGP）の変動は有意に著しかった。また、レシピエントを生存群（67例）と死亡群（12例）に分けると、死亡例は有意に多くの合併症を併発し、術後14、28日で有意に血小板数が低下した。また、死亡例のsGPVIは術後3日目に有意に高値であった。以上、肝移植後数日で血小板が活性化し、種々の合併症を併発してグラフトロスからTMA、死亡に至ることが推測された。

A. 研究目的

血栓性微小血管障害（TMA）は、微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、臓器障害を主徴とし、肝移植後にも発症する後不良な病態である。経日的に可溶性血小板膜糖蛋白（sGP）を測定することにより、肝移植と血小板活性化の関係ならびに、血小板活性化とTMAの発症ならびに予後との関係について検討する。

B. 研究方法

79例の肝移植例について、術後の血小板数、sGPVIの変動を調べ、合併症・生命予後との関係を調べた。sGPVIの測定は、2つのモノクローナルを用いたELISAで行った。術後90日以内に死亡した症例をnon-survivor、90日以上生存した症例をsurvivorとした。

（倫理面への配慮）

本研究は三重大学の倫理審査委員会で研究計画の承認を受けており、研究参加者

からインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

血小板数の変動は、ドナーでは術後第三日目に有意に低下し、術後7日目には術前値に復した。一方レシピエントでは術後7日目までは低値が持続し、14日目に増加を示した。このため、術前から術後14日目まで、血小板値はドナーがレシピエントに比べて有意に高値であった（**図1**）。sGPVI値は、ドナーでは術後1日目で増加するのみであったが、レシピエントは術後持続して増加した。このため、術後3日目にドナーに比べてレシピエント群で有意にsGPVI値が高値であった（**図2**）。

90日後のnon-survivorは12例、survivorは67例であった。non-survivorは何らかの合併症を併発し、有意に合併症の併発が多かった。血小板数はsurvivor群で術後14日目から有意に増加したが、non-survivor群での増加は少なかった。このため、術後

14日目ならびに28日目において、血小板数はnon-survivor群に比べてsurvivor群で有意に高値であった(図3)。sGPVI値は、survivor群では術後3日目に有意に増加するのみであったが、non-survivor群では術後持続して増加した。このため、術後3日目におけるsGPVI値は、survivor群に比べてnon-survivor群で有意に高値であった(図4)。

D. 考察

以前より、sGPVI値は血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、播種性血管内凝固(DIC)や静脈血栓塞栓症(VTE)などで著しく増加し、血小板活性化マーカーとして注目されていた。今回の検討では、侵襲の少ないドナーでは血小板の減少ならびにsGPVIの増加は軽度であった。すなわち、血小板の活性化はドナーに比べてレシピエントの方が多くと推測される。肝移植のnon-survivorは、有意に合併症が多く、グラフトロスの患者はTMAを合併した。survivor群では血小板数は術後14日で増加するのに比し、non-survivor群では血小板数の増加は殆ど見られなかった。このため、術後14日と28日における血小板数の低下は、生命予後の悪化を示唆した。この生命予後の悪化は、合併症の併発によることを示唆される。合併症の併発を予測するのに、術後14日目の血小板では遅すぎると考えられる。survivor群は術後早期に血小板の活性化がなくなるのに比し、non-survivor群では術後持続してsGPVIが増加した。このため、術後3日目のsGPVIは有意にnon-survivor群で高値であり、肝移植の血小板活性化ならびに合併症併

発の指標として有用であることが示唆された。

E. 結論

sGPVIは血小板活性化マーカーとして有用であり、ドナーに比べて侵襲の強いレシピエントでより増加した。肝移植後数日で血小板が活性化し、種々の合併症を併発してグラフトロスからTMA、死亡に至ることが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukushima N, Itamura H, Wada H, Ikejiri M, Igarashi Y, Masaki H, Sano M, Komiyama Y, Ichinohe T, Kimura S: A Novel Frameshift Mutation in Exon 4 Causing a Deficiency of High-molecular-weight Kininogen in a Patient with Splenic Infarction. Intern Med. 2014; 53: 253-257
- 2) Yamashita Y, Naitoh K, Wada H, Ikejiri M, Mastumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N: Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy. Thromb Res. 2014; 133: 440-444
- 3) Yamashita Y, Wada H, Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y, Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N: Elevated Fibrin-related Markers in Patients with Malignant Diseases Frequently Associated with Disseminated

- Intravascular Coagulation and Venous Thromboembolism. Intern Med 2014; 53: 413-419
- 4) Shindo A, Wada H, Ishikawa H, Ito A, Asahi M, Ii Y, Ikejiri M, Tomimoto H: Clinical features and underlying causes of cerebral venous thrombosis in Japanese patients. Int J Hematol. 2014; 99: 437-440
 - 5) Nobuoka Y, Wada H, Mizuno S, Kishiwada M, Usui M, Sakurai H, Tabata M, Kobayashi T, Nobori T, Uemoto S, Isaji S: Prolonged thrombocytopenia after living donor liver transplantation is a strong prognostic predictor irrespective of splenectomy: the significance of ADAMTS13 and graft function. Int J Hematol. 2014; 99:418-28
 - 6) Sasaki T, Matsumoto T, Wada H, Ohishi K, Kanda H, Yamada Y, Arima K, Katayama N, Sugimura Y.: Successful treatment of non-invasive bladder tumour in a haemophilia A patient with high-responding inhibitors: a case report. Haemophilia. 2014; 20: 399-401
 - 7) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. Int J Hematol. 2014; 100: 437-442
 - 8) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines. Journal of Intensive Care 2014; 2: 15
 - 9) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis. Clin Chim Acta. 2014; 436C:130-134
 - 10) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T: Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?, Crit Care, 2014 **18**:447
 - 11) Wada H, Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasaki K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee: Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the “Expert consensus for the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan”. Thromb Res, 2014; 134: 924-925
 - 12) Wada H, Matsumoto T, Yamashita Y: Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome. Semin Thromb Hemost. 2014; 40: 866-873
 - 13) Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Wada H.: Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an observational nationwide study: comment. J Thromb Haemost. 2015 (in press)
 - 14) Ota S, Wada H, Mastuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M: Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux. Clin Chim Acta, 2015 (in press)
 - 15) Wada H, Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N: Antithrombin

or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers. J Thromb Haemost. 2015 (in press)

2. 学会発表

- 1) Wada H: Diagnosis and therapy of DIC
The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
- 2) Wada H: New guideline for DIC management
The 8th Congress of Asia Pacific Society on Thrombosis and haemostasis, Hanoi, 2014
- 3) 和田英夫: aHUS/TTP 患者の検査値異常、共催シンポジウム「補体制御因子と腎疾患」第 49 回日本小児腎臓学会シンポジウム、秋田、2014
- 4) 和田英夫: 播種性血管内凝固と輸血療法、シンポジウム 2 「止血検査からみた最適な輸血療法」第 21 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、愛媛、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

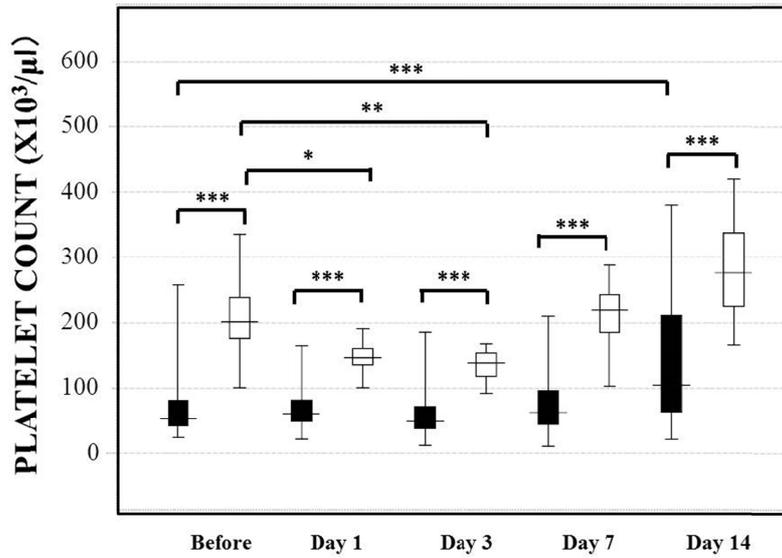
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

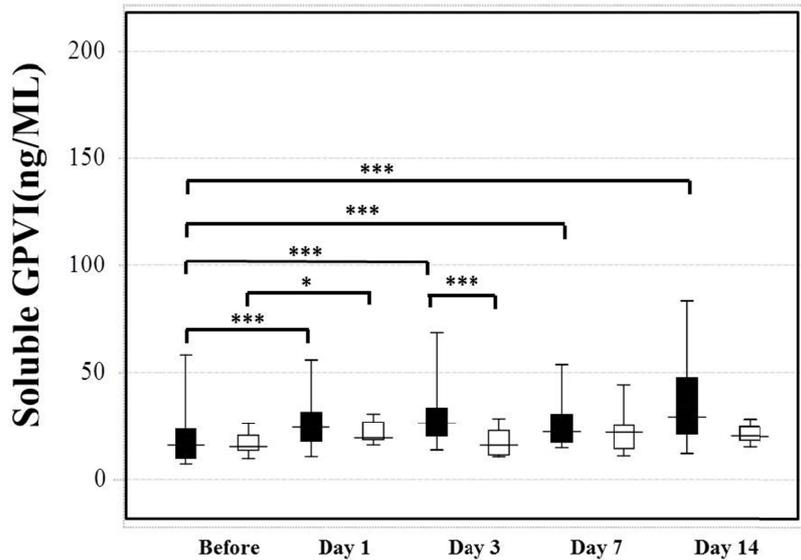
なし



■ 1 肝移植ドナーとレシピエントの血小板数

Closed bar: recipient, open bar: donor

*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001



■ 2 肝移植ドナーとレシピエントの sGPVI 値

Closed bar: recipient, open bar: donor

*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001

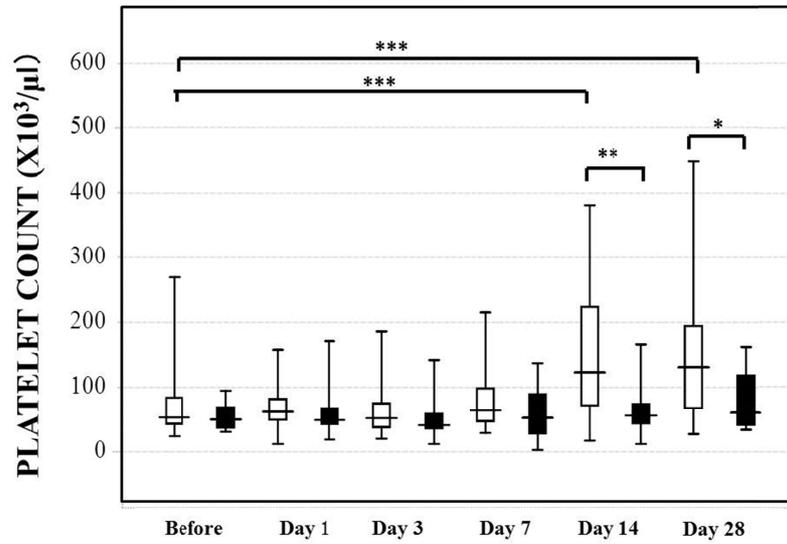


図 3 肝移植の生存群と非生存群における血小板数

Open bar: survivor, closed bar: non-survivor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

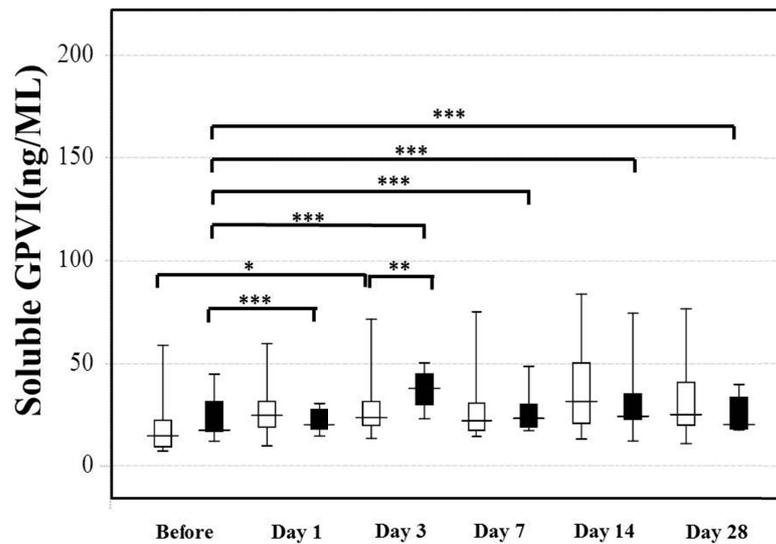


図 4 肝移植の生存群と非生存群における sGPVI 値

Open bar: survivor, closed bar: non-survivor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析に関する研究

研究分担者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 室長
研究協力者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

研究要旨

von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減は、血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。ADAMTS13 活性を著減させる原因の一つとして ADAMTS13 遺伝子異常があり、これは先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) を引き起こす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、発症メカニズムの解明とともに、TTP 診断ガイドラインや治療ガイドラインの作成に寄与することをめざしている。今年度は、先天性 TTP 患者 3 名 (3 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子の解析を行った。ダイレクトシーケンシング法による塩基配列解析の結果、3 家系の患者はそれぞれ、p.G139Vfs*17 と p.I673F、p.R193W と p.C908Y、p.G139Vfs*17 と p.W686* の複合ヘテロ接合体であった。p.G139Vfs*17 と p.W686* は海外も含めて未報告の変異であった。これらの結果は、臨床データと合わせて考えることで、TTP 関連疾患の診断および治療ガイドラインの作成において有効活用することができる。

A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の発症は、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減で起こる。ADAMTS13 活性の損失は、先天的な ADAMTS13 遺伝子異常あるいは後天的に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体によって起こる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。我々は、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、

ADAMTS13 分子の立体構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。本研究事業では、先天性 TTP 患者の遺伝子解析を継続的に行い、遺伝子異常の特徴や発症メカニズムに関する知見を蓄積することを目的としている。

ADAMTS13 活性が 10% 未満でインヒビターが陰性であれば、先天性 TTP の可能性を考え、遺伝子解析を行う。我々はこれまで、先天性 TTP 疑い患者および家族を対象に ADAMTS13 遺伝子の塩基配列を調べ、先天性 TTP 発症の原因となる遺伝子異常を特定してきた。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エクソンを PCR で増幅して塩基配列を解読する方法、すなわちダイレクト・シーケンシング法によって決定

される。我々もまず、ADAMTS13 遺伝子の各エクソンの外側に結合するよう設計した PCR プライマーを用いて、検体 DNA から各エクソンを選択的に増幅させ、その塩基配列を決定する。これまでに我々が行った先天性 TTP 患者解析の場合、約 9 割の症例はこの方法で複合ヘテロ接合性あるいはホモ接合性の原因変異が同定される。ダイレクト・シーケンシング法では原因変異が一つしか、あるいは一つも見つからない場合、ダイレクト・シーケンシング法を効率よく補完する方法として開発したゲノム定量 PCR 法を行っている。この方法で、これまでに 3 患者の ADAMTS13 遺伝子にそれぞれ異なる欠失異常を見出した。

本研究では、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) の原因変異を明らかにするために、患者および家族の ADAMTS13 遺伝子解析を実施した。

B . 研究方法

患者および家族から得られた血球画分を凍結した状態で受け取り、解析を始めるまで冷凍保管した。DNA 調製には illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE ヘルスケア) を使用した。血液からの調製を前提としたキットなので、凍結血球 (約 200 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 (TGTAACGACGGCCAGT) を、アンチセン

ス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を、それぞれ付加しておいた。これは、あとのシーケンシング反応を効率的に行うためである。エクソン 7 以外は一般的な PCR 条件で容易に増幅させることができた。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 1 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 /30 分間、80 /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

USS-UU 家系の患者は、c.415-10G>A (p.G139Vfs*17、母由来) と c.2017A>T (p.I673F、父由来) の複合ヘテロ接合体であった。c.2017A>T (p.I673F) は先天性 TTP の原因として過去に報告した変異と同一であった。一方、c.415-10G>A (p.G139Vfs*17) は今回新たに同定された変異で、その配列の特徴からスプライシング異常が予想された。そこで、患者の末梢血球 RNA を解析したところ、予想通りのスプライシング異常により、エクソン 5 に 8 塩基のイントロン配列が含まれる異常 mRNA の存在が確認された。

USS-VV 家系の患者は、c.577C>T (p.R193W、母由来) と c.2723G>A (p.C908Y、父由来) の複合ヘテロ接合体であった。いずれも日本の先天性 TTP 患者に比較的によくみられるミスセンス変異であった。

USS-WW 家系の患者は、c.415-10G>A (p.G139Vfs*17、父由来) と c.2057G>A (p.W686*、母由来) の複合ヘテロ接合体であった。c.415-10G>A (p.G139Vfs*17) は上記 USS-UU 家系に同定されたスプライシング異常と同一であった。c.2057G>A (p.W686*) は国内外とも報告例のない部位のナンセンス変異であった。

D . 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因変異を特定することはきわめて重要である。次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、先天性 TTP のように責任遺伝子が限定されている場合、依然としてダイレクト・シーケンシング法がコスト面等で優れている。本研究では、種々の工夫により効率化したダイレクト・シーケンシング法を行い、先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) に発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。ミスセンス変異やナンセンス変異、フレームシフトを伴うスプライシング異常など、多様性に富む遺伝子異常が見られた。いずれも、ADAMTS13 の本来の機能、すなわち VWF 切断活性を発揮できなくなる変異であると考えられる。これまでの知見から考えると、いずれもタンパク質が細胞外に分泌されなくなる変異である可能性が高い。

E . 結論

新たに見つかった先天性 TTP 疑い患者 3 名 (3 家系) の ADAMTS13 遺伝子をダイレクト・シーケンシング法で解析した結

果、いずれの患者も ADAMTS13 遺伝子異常の複合ヘテロ接合体であることが明らかになった。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

Masanobu Morioka, Masanori Matsumoto, Makoto Saito, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura: A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood Transfus.* 12 (S1), s153-s155 (2014)

Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, Koichi Kokame, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Hata: Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40 (1), 247-249 (2014)

Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, Koichi Kokame, Yaacov Barak, Yoel Sadovsky: NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury. *Endocrinology* 155 (3), 1099-1106 (2014)

Reiko Neki, Toshiyuki Miyata, Tomio Fujita, Koichi Kokame, Daisuke Fujita, Shigeyuki Isaka, Tomoaki Ikeda, Jun Yoshimatsu: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb. Res.* 133 (5), 914-918 (2014)

Yuka Eura, Koichi Kokame, Toshiro Takafuta, Ryojiro Tanaka, Hikaru Kobayashi, Fumihiro Ishida, Shuichi Hisanaga, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Toshiyuki Miyata: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: Identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* 2 (3), 240-244 (2014)

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行: ターゲット領域の異常を見逃さないゲノム定量 PCR 法の確立. *日本血栓止血学会誌* 25 (5), 615-618 (2014)

小亀浩市: TTP の分子診断. *日本血栓止血学会誌* 25 (6), 689-696 (2014)

小亀浩市: 血栓性血小板減少性紫斑病. *血液フロンティア* 25 (1), 51-57 (2015)

小亀浩市: ADAMTS13. 新・血栓止血血管学, 印刷中

2. 学会発表

Fumiaki Banno, Yuko Tashima, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Kochi Kokame, Toshiyuki Miyata: Analysis of mice carrying northeast Asian-specific genetic mutations in thrombosis. The 18th International Vascular Biology Meeting, Kyoto, Japan, April 14-17, 2014.

小亀浩市: VWF 切断酵素 ADAMTS13 の基礎知識. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会, 奈良, 2014 年 5 月 15 日-17 日

小亀浩市: TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

小亀浩市, 樋口(江浦)由佳, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: デジタルPCRを用いた ADAMTS13 遺伝子変異のヘテロ接合性の解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 高蓋寿朗, 田中亮二郎, 小林光, 石田文宏, 久永修一, 松本雅則, 藤村吉博, 宮田敏行: ダイレクトシーケンシング, 定量 PCR, 次世代シーケンシングを用いた TTP 患者の遺伝子解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

坂野史明, 田嶋優子, 小亀浩市, 宮田敏行: 深部静脈血栓症モデルを用いた

日本人の血栓症モデルマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

清水一亘, 柏木浩和, 森川陽一郎, 加藤恒, 田所誠司, 坂野史明, 小亀浩市, 本田繁則, 金倉譲, 宮田敏行, 富山佳昭: インテグリン IIb/3 活性化変異, IIb(R990W)ノックインマウスの解析. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会, 大阪, 2014 年 5 月 29 日-31 日

滝澤祥恵, 小菅由希子, 淡路比呂代, 田村恵美, 高井綾子, 矢内隆章, 山本玲子, 小亀浩市, 宮田敏行, 井上裕康: HUVEC におけるレスベラトロールによる eNOS、SIRT1、オートファジー関連遺伝子の発現誘導. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 15-18 日

丸山慶子, 秋山正志, 小亀浩市, 森下英理子, 宮田敏行: プロテイン S K196E (PS 徳島)変異検出 ELISA 法の開発. 第 76 回日本血液学会学術集会, 大阪, 2014 年 10 月 31-11 月 2 日

Kazunobu Kiyomizu, Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Fumiaki Banno, Hisashi Kato, Youichiro Morikawa, Seiji Tadokoro, Koichi Kokame, Shigenori Honda, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama: IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin IIb/3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with

impairment of platelet function. The 56th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, San Francisco, USA, December 6-9, 2014.

小亀浩市：先天性TTPにおける遺伝子解析． Ion Torrent/Applied Biosystems ユーザーグループミーティング 2014, 東京, 2014年12月16日

小亀浩市：先天性TTR(USS)の分子診断． 第9回日本血栓止血学会SSCシンポジウム, 東京, 2015年2月28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

特発性血栓症 / 先天性血栓性素因サブグループ研究報告

グループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学

研究分担者：宮田 敏行 国立循環器病研究センター

小林 隆夫 浜松医療センター

森下英理子 金沢大学

研究協力者：坂田 洋一 自治医科大学 / 横山 健次 東海大学

榛沢 和彦 新潟大学 / 尾島 俊之 浜松医科大学

杉浦 和子 浜松医科大学 / 根木 玲子 国立循環器病研究センター

中村 真潮 村瀬病院

グループ総括

分担研究者：小嶋 哲人

研究要旨

本研究班における特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診断基準ならびに診療ガイドの作成を通して、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防の対策確立を目的とする。今年度は、特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の先天的要因である「先天性血栓性素因」の診断基準作成を行い、次年度以降に「先天性血栓性素因患者の診療ガイド」や「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイド」の作成に向けて、先天性血栓性素因についての実態調査アンケートを計画している。また、個別研究として「特発性血栓症リスク・AT resistance 検出検査法による新たな症例」、「広島豪雨土砂災害の深部静脈血栓症」、「日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテイン S K196E 変異の ELISA 法を用いた検出法の確立」、「先天性プロテイン S 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定」、「先天性アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 欠損症の臨床症状・検査所見、ならびに新規経口抗凝固薬が活性測定値におよぼす影響」の各個研究が行われた。

A．研究目的

高齢化社会を迎えた我が国において、加齢とともに増加する静脈血栓塞栓症（VTE）の日本人での発症原因と発症メカニズムを明らかにし、その予知・予防対策を確立することは急務である。本研究班では、エコノミークラス症候群としても国民から注目される特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の予知・予防のための対策確立を目的とする。人種差を認めるものの日本人にも決して少なくない特発性血栓症（静脈血栓塞栓症）の先天的要因となる「先天性血栓性素因」について、その診断基準ならびに診療ガイドの作成を目指す。なかでも、日本人に多い「先天性プロテイン S 欠損症」にお

ける妊娠合併症例診療ガイドや周術期治療ガイドの作成は重要な課題である。

B．研究方法

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

（倫理面への配慮）

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫

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

C . 研究結果

先天性血栓性素因の診断基準を作成した。

「特発性血栓症リスク・AT resistance (ATR)検出検査」の調査研究では、今まで原因不明とされていた 2 家系の日本人静脈血栓塞栓症患者において、血漿検体検査にて ATR と診断でき、患者 F2 遺伝子解析においていずれもプロトロンビン Belgrade 変異(c.1787G>A, p.R596Q)を検出した。

「広島豪雨土砂災害の深部静脈血栓症」の発生状況の調査では、災害の種類によらず DVT 陽性率が一般住民に比べて増加し、かつ避難所環境と関連することが示唆された。

「日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテイン S K196E 変異の ELISA法を用いた検出法の確立に関する研究」では、PS K196E変異特異的モノクローナル抗体を用いて、血中に存在する異常PS K196E分子を検出することにより、変異保有者を同定する系を確立した。本法を用いて遺伝型を同定済みの検体での変異の有無を調べたところ、野生型である正常者と変異保有者と明らかに区別でき、全ての検体で変異を同定でき

た。また、ワルファリン加療中の変異保有者や妊娠中の変異保有者でも、野生型保有者と明確に識別が可能であった。

「先天性プロテイン S 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定」のための調査研究では、血栓性素因を有する妊婦は妊娠中に VTE を発症することが多いため、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要であり、また、APC-sr および PS 比活性の測定が、妊婦や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に有用の可能性が判明した。

「先天性アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 欠損症の臨床症状・検査所見、ならびに新規経口抗凝固薬が活性測定におよぼす影響」の研究では、先天性 AT・PC・PS 欠損症は発症年齢、血栓症の起こしやすさ、血栓症の種類などが異なっており、その病態を各々正確に把握することが重要と考えられた。また、Xa 阻害剤の内服にて AT・PC・PS 活性は 1.2~1.5 倍偽高値となった。このように、活性値は、測定法・抗凝固薬内服などにより大きく値が変わることを十分認識して、検査結果を解釈する必要があると考えられた。

D . 考察

数年来の本研究班活動を通じた「日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせないプロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに「ヘパリン在宅自己注射の保険適用」の医療行政上の成果は、日本人での特発性血栓症での診

療・予後改善に寄与することが期待される。今年度より政策研究班となった当特発性血栓症サブグループでは、先天性血栓性素因の診断基準を作成し、その血栓症発症予防を含めた診療ガイドの作成を目指す。

今まで原因不明とされた血栓性素因の中には新しい血栓性素因である ATR が潜在するものと考えられ、開発された ATR 検出法が血漿検体を用いて解析するもので、遺伝子変異が異なる ATR も検出可能であることから、日常診療での静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用と思われる。

日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクである PS K196E 変異の有無について、血漿中の PS K196E 変異体を検出する簡便な ELISA 法の確立は、遺伝子解析を行わずに変異の同定ができる臨床的意義も大きく、本邦における血栓症の予防診療にきわめて有用と考えられる。

産科症例の解析によれば、妊娠産婦に発症する VTE では、血栓性素因を有する患者は妊娠中発症が多い傾向にあり、とくに PS 欠乏症や AT 欠乏症を有する妊婦は妊娠中発症が多いものと思われる。また、VTE 症例のうち血栓症の家族歴・既往歴は妊娠中発症例で高く、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要と思われる。一方、血栓症の有用な予知マーカーである APC-sr、PS 活性および PS 比活性 の測定が、女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知、さらには PS 欠乏症等の血栓性素因を有する場

合にもきわめて有用である可能性がある。

先天性 AT、PC、PS 欠損症は、発症年齢、血栓症の起こしやすさ、症状、などがそれぞれ異なっている。また、PS の現行の遺伝子解析方法には限界があると思われる。血栓症発症には AT 欠損症では遺伝的要因が大きく寄与しており、血栓症発症を未然に防ぐためには、家系調査を行い保因者に予防的指導を行うことが有用であると考えられる。さらに、ワルファリンと同様 NOAC などが使用される場合も、PC・PS 欠損症の診断を困難にする可能性があることに留意すべきだと思われる。

E . 結論

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

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Nishida Y, Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Minami Y, Ohnishi K, Naoe T, Murate T: Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia

- cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1839(4): 265-274, 2014.
- 2) Kato I, Takagi Y, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Nakashima T, Kojima T: A complex genomic abnormality found in a patient with antithrombin deficiency and autoimmune disease-like symptoms. *Int J Hematol*. 100: 200-205. 2014
 - 3) 高木夕希、小嶋哲人: 新規血栓性素因アンチトロンビン抵抗性の発見と今後の展望 *日本臨牀* 72(7), 1320-1324, 2014.
 - 4) 小嶋哲人: 徹底ガイド DICのすべて2014-15 (丸藤哲編) ヘパリン類似物質 救急・集中治療 26(5-6), 887-892, 2014.
 - 5) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Sezuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, and Maruyama M: RhoF Promotes Murine Marginal Zone B Cell Development. *Nagoya J Med Sci*. 2014 Aug; 76(3-4): 293-305.
 - 6) Takagi Y, Kato I, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Kojima T: Antithrombin-resistant prothrombin Yukuhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation. *Thromb Res*. 134(4): 914-917, 2014.
 - 7) 村田萌、小嶋哲人: 深部静脈血栓症に対する対策と治療 V. 出血・血栓性疾患「EBM血液疾患の治療2015-2016」金倉譲/木崎昌弘/鈴木律朗/神田善伸: 編 中外医学社 東京pp 439-442, 2014.
 - 8) 小嶋哲人: 新たな血栓性素因: アンチトロンビンレジスタンス *日本検査血液学会雑誌* 15(3), 289-296, 2014.
 - 9) Kovac M, Elezovic I, Mikovic Z, Mandic V, Djordjevic V, Radojkovic D, Lalic-Cosic S, Murata M, Takagi A, Kojima T: High prophylactic LMWH dose successfully suppressed hemostatic activation in pregnant woman with a new prothrombin c.1787G>A mutation. *Thromb Res*. in press.
 - 10) 榛沢和彦: 深部静脈血栓症・糖尿病医療者のための災害時糖尿病診療マニュアル p68-71 日本糖尿病学会編・著 文光堂 2014
 - 11) 榛沢和彦: 災害時の循環器疾患対応: 災害と肺塞栓症(静脈血栓症). *心臓* 2014, vol.46, No5, 569-573
 - 12) 榛沢和彦: 災害と静脈血栓塞栓症. 石丸 新 編集、新しい診断と治療のABC 86, 循環器14, 静脈血栓塞栓症、下肢静脈; p102-111 最新医学社 2014
 - 13) 榛沢和彦: 震災(災害)と静脈血栓塞栓症. *International Review of Thrombosis*, 2014, vol. 9 No.4, 26-31
 - 14) Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K, Fujita D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res*, 133(5), 914-918, 2014
 - 15) Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F,

- Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol Genet Genomic Med*, 2(3), 240-244, 2014
- 16) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol*, 100(5), 437-442, 2014
- 17) Mitsuguro M, Okamoto A, Shironouchi Y, Sano M, Miyata S, Neki R, Araki T, Hamamoto T, Yoshimatsu J, Miyata T: Effects of factor VIII levels on the APTT and anti-Xa activity under a therapeutic dose of heparin. *Int J Hematol*, 2014 Nov 23. [Epub ahead of print]
- 18) 宮田敏行, 丸山慶子「日本人における先天性血栓性素因 -欧米との比較-」臨床血液、第55巻、第8号、908-916頁(2014)
- 19) 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 鈴木重統, 後藤信哉編集, 止血・血栓ハンドブック. 西村書店, 東京 (in press)
- 20) 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬とVTE. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第1章 静脈血栓塞栓症の病理と病態. 医薬ジャーナル社, 大阪 (in press)
- 21) 小林隆夫: 妊娠中および産褥期のVTE. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第6章 特殊な病態下の静脈血栓塞栓症 (VTE) の診断と治療. 医薬ジャーナル社, 大阪 (in press)
- 22) 小林隆夫, 杉浦和子: 日本人に多い先天性凝固阻止因子欠乏症について教えてください. 特集/OC・LEPの静脈血栓塞栓症リスクQ&A. 産科と婦人科 (in press)
- 23) 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と活性化プロテインC凝固制御系. *Thrombosis Medicine* (in press)
- 24) 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症の歴史. *Thrombosis Medicine* 4(4): 69-73, 2014
- 25) 小林隆夫: 妊娠中の血栓塞栓症. 産婦人科分野監修: 小西郁生. 今日の臨床サポート(改訂第2版). 永井良三, 木村健二郎, 上村直実, 桑島巖, 今井靖, 名郷直樹, 編. エルゼビア・ジャパン, 2014
(<http://clinicalsup.jp/jpoc/>)
- 26) 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の治療と予防指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療最新ガイドライン2014-'15, 総合医学社, 東京, pp303-307, 2014
- 27) 小林隆夫: 検査値のみかた Dダイマ- . 最新女性医療 1(1): 52-53, 2014
- 28) 小林隆夫: わが国における静脈血栓塞栓症の最近の動向. 産科と婦人科 81(8): 933-938, 2014
- 29) 小林隆夫: 癌関連血栓症患者の血栓

- 予防に関するガイドンス(再発血栓症と出血を含む). ISTH(国際血栓止血学会のSSC版). International Review of Thrombosis 9(2): 48-51, 2014
- 30) 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防対策. 日本臨牀 72(7): 1303-1308, 2014
- 31) 小林隆夫: 特集 管理法はどう変わったか?: 温故知新 産科編. 妊婦血栓塞栓症. 周産期医学 44(3): 391-395, 2014
- 32) 小林隆夫: 低用量ピルによる血栓症リスク. 日本医事新報 No4690: 60-61, 2014
- 33) Hayashi T, Nakagawa N, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H: Rivaroxaban in a patient with disseminated intravascular coagulation associated with an aortic aneurysm: a case report, Ann Intern Med 161(2):158-159, 2014.
- 34) Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S: Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. J Atheroscler Thromb (in press).
- 35) Yoshikawa Y, Kitayama J, Ishikawa H, Nakamura A, Taniguchi F, Morishita E, Ago T, Nakane H, Kitazono T: Fulminant bilateral cerebral infarction caused by paradoxical embolism in a patient with protein S Ala525Val substitution. Neurology and Clinical Neuroscience. (in press).
- 36) 森下英理子: まれな凝固因子異常症. プリンシプル血液疾患の臨床: よくわかる血栓・止血異常の臨床. 金倉譲, 富山佳有昭 編集, p.67-80, 中山書店. 2014.11.20.
- 37) 森下英理子: 徹底ガイド DICのすべて2014-15, . 基礎病態と治療 - 血管性病変. 救急・集中治療 26(5-6): 851-855, 2014.
- 38) 森下英理子: 徹底ガイド DICのすべて2014-15, . 治療薬 - 抗線溶薬(内科系). 救急・集中治療 26(5-6):929-934, 2014.
- 39) 森下英理子: 新しい経口抗凝固薬のモニタリング検査. 臨床検査 58(8): 979-986, 2014.
- 40) 森下英理子: 遺伝子検査. 日本臨牀 72(7):1237-1242, 2014.
- 41) 林朋恵, 森下英理子: 造血幹細胞移植後関連TMA. 日本血栓止血学会誌, 2014.

2. 学会発表

- 1) 中村友紀、村田萌、安藤裕実、加藤衣央、高木夕希、高木明、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、齋藤英彦、小嶋哲人: 血友病 B・40 家系における血液凝固第 IX 因子遺伝子解析 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大阪、平成 26 年 5 月 29-31 日 (ポスター優秀賞: P-058)
- 2) 村田萌、高木夕希、中村友紀、長谷部瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、高木明、村手隆、松下正、小嶋哲人: アンチトロンビン抵抗性検出検査法の自動凝固検査機器への最適化 第 15 回日本検査血液検査血液学会学術集会、仙台、平成 26 年 7 月 20-21 日
- 3) 村田萌、高木明、岸本磨由子、清井

- 仁、松下正、小嶋哲人：原因不明であった静脈血栓塞栓症にみられたアンチトロンビン抵抗性を示す本邦2家系目のプロトロンビン異常症 第33回日本臨床検査医学会東海・北陸支部例会、名古屋、平成26年8月2日
- 4) M Murata, Y Takagi, Y Nakamura, R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, A Takagi, T Kojima: Optimization of the antithrombin resistance assay for the automated analyzer. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 5) Y Nakamura, M Murata, Y Takagi, T Kozuka, Y Nakata, R Hasebe, A Takagi, T Matsushita, T Kojima: Precise genetic abnormalities in four hemophilia B patients with large deletions of X-chromosome including entire F9. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 6) R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: A wide variety of F8 gene abnormality of hemophilia A in Nagoya. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 7) T Kozuka, R Hasebe, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: Skewed X chromosome inactivation caused moderately severe hemophilia B in a Japanese female. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成26年10月9-11日
- 8) T Kojima : Symposium 9 / The front line of thrombosis and hemostasis research: Antithrombin resistance. 第76回日本血液学会学術集会、大阪、平成26年10月30-11月1日
- 9) 中村友紀、村田萌、高木夕希、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、高木明、村手隆、山崎鶴夫、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人: Gene analysis in an unprecedented rare case of mild hemophilia A combined with factor V deficiency. [PS-2-264: 優秀ポスター賞] 第76回日本血液学会学術集会、大阪、平成26年10月30-11月1日
- 10) Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Symposium 2, Thrombosis, leukocytes and vascular cells, Registry of hereditary thrombotic microangiopathies in Japan, The 18th *International Vascular Biology Meeting*, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan.
- 11) 宮田敏行: シンポジウム「TTPとHUS(総会長シンポジウム)」、「TTP/HUSの遺伝子解析」、第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014年5月16日、奈良市
- 12) 宮田敏行: プロテインS研究会シンポジウム、APC凝固制御異常と血栓性素因、「プロテインS徳島は日本人に特有の変異なのか?」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月30日、大阪市
- 13) 宮田敏行、Wanyang Liu、Tong Yin、奥田裕子、原田浩二、Xinping Fan、小泉昭夫: 「静脈血栓症のリスクとなるプロテインS K196E変異の地理的分布」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29日-31日、大阪市

- 14) 宮田敏行、内田裕美子、吉田瑤子、池島裕子、Fan Xinping、芦田明、和田英夫、大塚泰史、中村健治、石川智朗、八田和大、服部元史、久野正貴、才田謙、西尾健治、瀧本智仁、幡谷浩史、大原敦子、川村尚久、波多江健、松本雅則、加藤秀樹、南学正臣、藤村吉博：「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者 41 人の遺伝子解析」第 51 回補体シンポジウム、2014 年 8 月 22-23 日、神戸市
- 15) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症に関する最近の話題。第 6 回関西凝固線溶研究会学術講演会特別講演。大阪，2015.1.31
- 16) 小林隆夫：OC・LEP 製剤と血栓症 - 安全処方のために - 。第 36 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会ランチョンセミナー。東京，2015.1.25
- 17) Kazuko Sugiura, Toshiyuki Ojima, Takao Kobayashi. Risk of thromboembolism and other adverse events by body mass index in Japanese oral contraceptive users. The 25th Annual Scientific Meeting of the Japan Epidemiological Association, Nagoya, 2015.1.23
- 18) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症 - 安全処方に向けて - 。平成 26 年度岩手産科婦人科学会集談会。盛岡，2015.1.17
- 19) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症 - 安全処方に向けて - 。第 224 回大分市医師会産婦人科臨床検討会。大分，2015.1.16
- 20) 小林隆夫：血栓症と検査。第 2 回薬の安全処方を考える会。大阪，2014.12.5
- 21) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症。第 1 回薬の安全処方を考える会。大阪，2014.11.21
- 22) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症。第 29 回日本女性医学会学術集会教育講演。東京，2014.11.1
- 23) 小林隆夫：知られていない？日常生活とエコノミークラス症候群 - 女性ホルモン剤と静脈血栓塞栓症 - 。世界血栓症デー。東京，2014.10.13
- 24) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話。新潟県産婦人科医会研修会。新潟，2014.10.4
- 25) 小林隆夫：血栓症と検査。第 2 回薬の安全処方を考える会。福岡，2014.10.3
- 26) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話。第 3 回女性内分泌診療研究会。大阪，2014.9.27
- 27) 小林隆夫：血栓症と検査。第 2 回薬の安全処方を考える会。横浜，2014.9.26
- 28) 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症 - その安全処方に向けて - 。尼崎産婦人科医会。尼崎，2014.9.20
- 29) 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話。札幌市産婦人科医会学術講演会。札幌，2014.8.23
- 30) 小林隆夫：血栓症と検査。第 2 回薬の安全処方を考える会。東京 B，

- 2014.8.22
- 31) 小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓症. 第 1 回薬の安全処方を考える会. 東京 B, 2014.7.19
- 32) 小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓症に関する最新の話題. 第 302 回奇松会学術講演会. 浜松, 2014.7.18
- 33) 小林隆夫: 静脈血栓症予防の現状 ~ 院内での取り組みと安全対策の重要性について ~. COVIDEIN 第 10 回 VTE 医療安全セミナー in 栃木, 下野, 2014.7.5
- 34) 小林隆夫: LEP 製剤の血栓症リスクに関する話題. 柏市地区産婦人科医会学術講演会. 柏, 2014.7.1
- 35) 杉浦和子、尾島俊之、小林隆夫: 日本における過去 10 年間の血栓塞栓症患者数の推移. 第 60 回東海公衆衛生学会学術大会, 名古屋, 2014.7.19
- 36) 杉浦和子、尾島俊之: 日本における血栓塞栓症患者死亡数の推移. 第 73 回日本公衆衛生学会総会, 宇都宮, 2014.11.5
- 37) 小林隆夫: わが国における肺塞栓症予防の変遷. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会教育講演 2. 大阪, 2014.5.30
- 38) 小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓症の最近の話題. 第 41 回品川地区産婦人科臨床研究会. 東京, 2014.5.22
- 39) 小林隆夫: 血栓症と検査. 第 2 回薬の安全処方を考える会. 仙台, 2014.5.10
- 40) 小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓症 ~ その安全処方のためにも ~. 弘前市医師会産婦人科部会講演会. 弘前, 2014.5.2
- 41) 小林隆夫: 血栓症と検査. 第 2 回薬の安全処方を考える会. 広島, 2014.4.26
- 42) 小林隆夫: 女性ホルモン剤と血栓症. 第 1 回薬の安全処方を考える会. 福岡, 2014.4.4
- 43) Kosugi I, Matano A, Morishita E, Taniguchi F. An uncommon case of deep venous thrombosis and pulmonary thromboembolism in a juvenile with compound heterozygous congenital protein S deficiency. XXVI World Congress of the International Union of Angiology, August 10-14, 2014, Sydney, Australia.
- 44) Nomoto H, Morishita E, Takami A, Katsu S, Yamaguchi D, Yasuo Morishima M, Onizuka M, Kashiwase K, Fukuda T, Kodera Y, Suzuki Y, Nitta N, Nakao S, Ohtake S. Thrombomodulin has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. American Society of Hematology, December 6-9, 2014, San Francisco, USA. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-9, 2014, San Francisco, USA.

- 45) 森下英理子:抗凝固薬と血液凝固線溶系検査。B I・生活習慣病セミナー, 2014.4.15, 金沢.
- 46) 森下英理子, 林朋恵: 大動脈瘤・大動脈解離に伴う止血・凝固異常(慢性DIC).(シンポジウム). 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2014.7.10, 東京.
- 47) 森下英理子:血液凝固異常症に遭遇した場合の臨床診断の進め方. 第9回四国ナノピア凝固・線溶研究会, 2014.9.27, 松山.
- 48) 森下英理子:活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)測定値の解釈ー臨床の現場からー. 平成26年度日臨技中部圏支部 医学検査学ランチョンセミナー, 2014.9.28, 富山.
- 49) 森下英理子:ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)/一酸化炭素(CO)による抗血栓作用の調節. 第19回近畿血栓症研究会 北浜フォーラム, 2014.10.11, 大阪.
- 50) 森下英理子:静脈血栓塞栓症の危険因子. 第2回日本肺高血圧学会・第3回日本肺循環学会合同学術集会教育セミナー, 2014.10.4, 東京.
- 51) 森下英理子:なぜ血は固まるの?ー血が固まらないはずの血管の中で血が固まる話ー. 世界血栓症デー日本 市民公開講座2014, 2014.10.13, 東京.
- 52) 林朋恵, 門平靖子, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二:抗リン脂質抗体症候群における抗リン脂質抗体のプロファイル. 第111回日本内科学会学術集会(東京), 2014.4.11-13.
- 53) 關谷暁子, 林朋恵, 川野充弘, 津田友秀, 金秀日, 野本明華, 谷口文苗, 山口大介, 朝倉英策, 大竹茂樹, 森下英理子:血中可溶性Merチロシンキナーゼは妊娠中に増加する, 第36回日本血栓止血学会学術集会, 大阪国際交流センター, 2013年5月29日~31日
- 54) 谷口文苗, 山口大介, 關谷暁子, 野本明華, 小杉郁子, 朝倉英策, 大竹茂樹, 森下英理子:広範な下肢深部静脈血栓症を呈した, 複合ヘテロ接合体先天性プロテインS欠損症の一例, 第15回日本検査血液学会学術集会, 仙台国際センター, 2014年7月20日~21日
- 55) 山口大介, 谷口文苗, 關谷暁子, 野本明華, 佐藤那美, 森永浩次, 岩澤仁, 大竹茂樹, 森下英理子:当研究室におけるアンチトロンビン遺伝子解析の総括, 第15回日本検査血液学会学術集会, 仙台国際センター, 2014年7月20日~21日
- 56) 谷口文苗, 山口大介, 野本明華, 高田麻央, 小林英里奈, 關谷暁子, 門平靖子, 林朋恵, 朝倉英策, 中尾眞二, 大竹茂樹, 森下英理子:当研究室における先天性プロテインS, プロテインC, アンチトロンビン欠損症の遺伝子解析の総括, 第76回日本血液学会学術集会, 大阪国際会議場, 2014年10月31日~11月2日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

プロテインS K196E 変異検出法、
2014年9月24日国内出願、特許出願
2014-194080

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

先天性（家族性 / 遺伝性）血栓性素因

< 疾患概念 >

先天性（家族性 / 遺伝性）血栓性素因は、血液凝固とその制御に関わる因子の遺伝的障害により血栓傾向を示す病態で、時に致死性となる静脈血栓塞栓症の若年発症や繰り返す再発の原因となる。静脈血栓（塞栓）症の発症原因は多因性で、発症リスクとなる先天性血栓性素因をもつ場合は、発症前でも身体的な予防的対処が望まれる。また、先天性血栓性素因の保因者では、静脈血栓（塞栓）症を一度発症すると再発リスクが高いため、身体的な予防的対処に加えて抗凝固薬投与などによる積極的な長期予防が必要な場合がある。

1. 主要項目

(1) 臨床所見

静脈血栓（塞栓）症の家系内多発、若年性（40歳以下）発症、繰り返す再発、まれな部位発症（上矢状洞静脈洞、上腸間膜静脈など）などの特徴や、まれに動脈血栓症もみられる。

(2) 血液・生化学的検査所見

生理的血液凝固阻止因子（アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S など）の活性が健常人の 50%程度 of 家族性 / 遺伝性低下を示し、診断の参考となる。この場合、ビタミン K 拮抗薬服用、肝機能障害、妊娠、女性ホルモン剤使用、ネフローゼ症候群、静脈血栓症の発症急性期、感染症などによる二次的活性低下の除外診断が必要となる。また、参考事項にあげる血液凝固とその制御に関わる因子の遺伝子解析により、確定診断を下すことができる。

(3) 除外事項

血小板障害、血管障害、血流障害、抗リン脂質抗体症候群、および悪性腫瘍に伴う血栓傾向を除く。

2. 参考事項

静脈血栓（塞栓）症の発症リスクとなる遺伝子異常が同定されている血液凝固とその制御に関わる因子の主なものを以下にあげる。

- a. 凝固阻止因子（アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 欠乏症など）
- b. 血液凝固第 V 因子（活性化プロテイン C 抵抗性）
- c. プロトロンビン（アンチトロンビン抵抗性）
- d. その他（F2 G20210A、FIX Padua など）

3. 診断基準

確実例：

血液凝固とその制御に関わる因子の遺伝子解析もしくは活性測定（複数回測定で二次的異常を除外）により、先天性（家族性 / 遺伝性）に静脈血栓（塞栓）症の発症リスクをもつと診断されるもの。

ほぼ確実例：

静脈血栓（塞栓）症を発症*、かつ以下項目の2つ以上を示すもの。

（*CT、MRI、超音波等の画像検査にて確認された無症候性のものも含む）

1. 家系内多発
2. 若年性（40歳以下）発症
3. 繰り返す再発
4. まれな静脈（上矢状洞静脈洞、上腸間膜静脈など）での発症

発性血栓症リスク・AT resistance 検出検査

研究分担者 小嶋 哲人 名古屋大学医学部 教授

研究要旨

本研究班で我々は、プロトロンビン・Yukuhashi 変異 (c.1787G>T, p.R596L) による新しい静脈血栓素因・アンチトロンビン抵抗性 (AT resistance : ATR) を報告した。今回、我々は ATR 検出検査法を開発し、原因不明であった日本人 VTE 2 家系に新たな ATR 症例を同定した。症例 1 は 22 歳女性、13 歳時に VTE 発症。症例 2 は 45 歳男性、発症後内服していたワルファリンを自己中断して VTE 再発。いずれも VTE の家族歴があったが、原因は不明であった。今回の ATR 検出検査では、ともに患者由来トロンビン活性は明らかな AT による不活化不良を示し、ATR と診断された。また、F2 遺伝子解析では、ともにプロトロンビン Belgrade 変異 (c.1787G>A, p.R596Q) を検出した。これまで原因不明とされた血栓性素因の中には ATR が潜在するものと考えられ、血漿検体を用いて解析する我々の開発した ATR 検出法は簡便かつ遺伝子変異が異なる ATR も検出可能であることから、日常診療での静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用である。

A . 研究目的

我々は、長らく原因が不明であった静脈血栓塞栓症 (VTE) 家系において、発端者のプロトロンビン遺伝子に血栓症の原因となるミスセンス変異 (c.1787G>T, p.R596L : プロトロンビン Yukuhashi) を同定し、本研究班でも報告してきた。変異由来の異常トロンピンは、重要な生理的凝固抑制因子であるアンチトロンビン (AT) による不活化に抵抗性 (AT resistance : ATR) を示し凝固活性が持続するため、血栓性素因となることも判明している。また、我々は、この ATR が既存の臨床検査では検出が困難であったため、ATR 異常を血漿検体で簡便に検出する検査法を開発し、やはり本研究班で報告して来た。

今回は、我々が開発したこの ATR 検出検査法により、原因不明であった日本人

VTE 症例に新たな ATR 症例を同定したので報告する。

B . 研究方法

従来の臨床検査法では原因の特定に至らなかった VTE 発症患者血漿を用い、我々の開発した ATR 検出検査法にて ATR 異常の有無を検討した。また、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、患者の白血球よりゲノム DNA を抽出した。さらに、他施設からの検査依頼については、依頼施設での倫理審査の承認のもとでインフォームドコンセントを得た後、患者から採血した匿名化検体から、同じく白血球よりゲノム DNA を抽出した。各解析検体のプロトロンビン遺伝子 (F2) の全エクソンをそのイントロンとの境界領域を含めて PCR 増幅後、直接シーケ

ンス法により塩基配列解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成16年度文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守するとともに、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て解析した。

C . 研究結果

症例1 : 患者は22歳女性、13歳時に原因不明のVTEを発症した。患者家系の母方に深部静脈血栓症(DVT)の家族歴があり先天性血栓性素因が疑われたが、血栓症初発当時の各種凝血学的検査には異常がなく原因が不明であった。今回、ATR検出検査の結果、患者血漿由来のトロンビン活性は明らかにATによる不活化不良を示しATRと診断された。患者F2遺伝子の解析では、2013年にセルビアから報告されたプロトロンビンBelgrade変異(c.1787G>A, p.R596Q)をヘテロ接合体として日本で初めて検出した(図1)。

症例2 : 45歳男性、2年前にVTEを発症してワルファリンを内服していたが、自己中断してVTEが再度した。母、兄、甥にDVT、VTEの既往があり、先天性血栓性素因が疑われたが、各種凝血学的検査に異常を認めず原因不明であった。今回、ATR検出検査の結果、患者血漿由来のトロンビン活性は明らかにATによる不活化不良を示しATRと診断された(図2)。また、患者F2遺伝子解析では、日本で2例目のプロトロンビンBelgrade変異を検出した。

D . 考察

VTEの発症リスクファクターとしてアンチトロンビン(AT)、プロテインC(PC)、プロテインS(PS)などの生理的凝固制御因子の欠乏症が広く知られている。我々も、これまでこれら凝固制御因子の先天性欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因となる遺伝子変異を解析し、さらに同定した変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。一方、静脈血栓塞栓症173名を対象とした全国的共同研究の解析結果では、約32%(55名)に原因と思われるAT、PC、PS遺伝子変異を同定したが、残り2/3以上の症例では原因同定に至っていない。

今回、従来の凝血学的検査では異常を検出できなかったVTE患者において、我々の開発した検査法にてAT-Rを検出し、F2遺伝子解析にて日本人で初めてR596Q変異、プロトロンビンBelgrade変異を2家系に同定した。この変異は現在までにセルビア人のほかインド人にも報告されており、国内外を問わず、AT-Rは原因不明のVTE患者の中に潜在しているものと考えられる。

このAT-R検出検査法は、患者由来トロンビン活性のアンチトロンビンによる不活化動態を評価する方法であり、ワルファリン服用中での検体においても解析が可能であることよりその利便性が高く、実臨床においても有用な検査法であると考えられる。

E . 結論

今まで原因不明とされた血栓性素因

の中には ATR が潜在するものと考えられる。我々の開発した ATR 検出法は血漿検体を用いて解析するもので、遺伝子変異が異なる ATR でも検出可能であることから、日常診療での静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用である。

F . 健康危険情報

特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Nishida Y, Mizutani N, Inoue M, Omori Y, Tamiya-Koizumi K, Takagi A, Kojima T, Suzuki M, Nozawa Y, Minami Y, Ohnishi K, Naoe T, Murate T: Phosphorylated Sp1 is the regulator of DNA-PKcs and DNA ligase IV transcription of daunorubicin-resistant leukemia cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1839(4): 265-274, 2014.
- 2) Kato I, Takagi Y, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Nakashima T, Kojima T: A complex genomic abnormality found in a patient with antithrombin deficiency and autoimmune disease-like symptoms. *Int J Hematol*. 100: 200-205. 2014
- 3) 高木夕希、小嶋哲人: 新規血栓性素因アンチトロンビン抵抗性の発見と今後の展望 *日本臨牀* 72(7), 1320-1324, 2014.
- 4) 小嶋哲人: 徹底ガイド DICのすべて2014-15 (丸藤哲編) ヘパリン類似物質 救急・集中治療 26(5-6), 887-892, 2014.
- 5) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Sezuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, and Maruyama M: RhoF Promotes Murine Marginal Zone B Cell Development. *Nagoya J Med Sci*. 2014 Aug; 76(3-4): 293-305.
- 6) Takagi Y, Kato I, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Kojima T: Antithrombin-resistant prothrombin Yukuhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation. *Thromb Res*. 134(4): 914-917, 2014.
- 7) 村田萌、小嶋哲人: 深部静脈血栓症に対する対策と治療 V. 出血・血栓性疾患「EBM血液疾患の治療2015-2016」金倉譲/木崎昌弘/鈴木律朗/神田善伸: 編 中外医学社 東京pp 439-442, 2014.
- 8) 小嶋哲人: 新たな血栓性素因: アンチトロンビンレジスタンス *日本検査血液学会雑誌* 15(3), 289-296, 2014.
- 9) Kovac M, Elezovic I, Mikovic Z, Mandic V, Djordjevic V, Radojkovic D, Lalic-Cosic S, Murata M, Takagi A, Kojima T: High prophylactic LMWH dose successfully suppressed hemostatic activation in pregnant

woman with a new prothrombin c.1787G>A mutation. Thromb Res. in press.

2. 学会発表

- 1) 中村友紀、村田萌、安藤裕実、加藤衣央、高木夕希、高木明、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、齋藤英彦、小嶋哲人：血友病 B・40 家系における血液凝固第 IX 因子遺伝子解析 第 36 回日本血栓止血学会学術集会、大阪、平成 26 年 5 月 29-31 日 (ポスター優秀賞：P-058)
- 2) 村田萌、高木夕希、中村友紀、長谷部瞭、小塚敏弘、中田悠紀子、高木明、村手隆、松下正、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性検出検査法の自動凝固検査機器への最適化 第 15 回日本検査血液検査血液学会学術集会、仙台、平成 26 年 7 月 20-21 日
- 3) 村田萌、高木明、岸本磨由子、清井仁、松下正、小嶋哲人：原因不明であった静脈血栓塞栓症にみられたアンチトロンビン抵抗性を示す本邦 2 家系目のプロトロンビン異常症 第 33 回日本臨床検査医学会東海・北陸支部例会、名古屋、平成 26 年 8 月 2 日
- 4) M Murata, Y Takagi, Y Nakamura, R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, A Takagi, T Kojima: Optimization of the antithrombin resistance assay for the automated analyzer. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 5) Y Nakamura, M Murata, Y Takagi, T Kozuka, Y Nakata, R Hasebe, A Takagi, T Matsushita, T Kojima: Precise genetic abnormalities in four hemophilia B patients with large deletions of X-chromosome including entire F9. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 6) R Hasebe, T Kozuka, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: A wide variety of F8 gene abnormality of hemophilia A in Nagoya. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 7) T Kozuka, R Hasebe, Y Nakata, Y Nakamura, Y Takagi, M Murata, A Takagi, T Kojima: Skewed X chromosome inactivation caused moderately severe hemophilia B in a Japanese female. The 8th Congress of APSTH, Hanoi、平成 26 年 10 月 9-11 日
- 8) T Kojima : Symposium 9 / The front line of thrombosis and hemostasis research: Antithrombin resistance. 第 76 回日本血液学会学術集会、大阪、平成 26 年 10 月 30-11 月 1 日
- 9) 中村友紀、村田萌、高木夕希、小塚敏弘、中田悠紀子、長谷部瞭、高木明、村手隆、山崎鶴夫、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人：Gene analysis in an unprecedented rare case of mild hemophilia A combined with factor

V deficiency. [PS-2-264 : 優秀ポ
スター賞] 第 76 回日本血液学会学
術集会、大阪、平成 26 年 10 月 30-11
月 1 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。

図1. 症例1のATR解析, F2 遺伝子解析

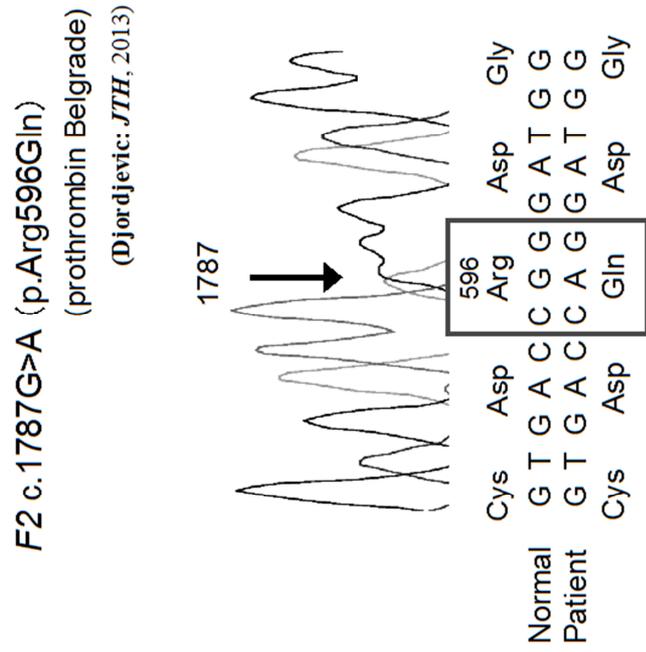
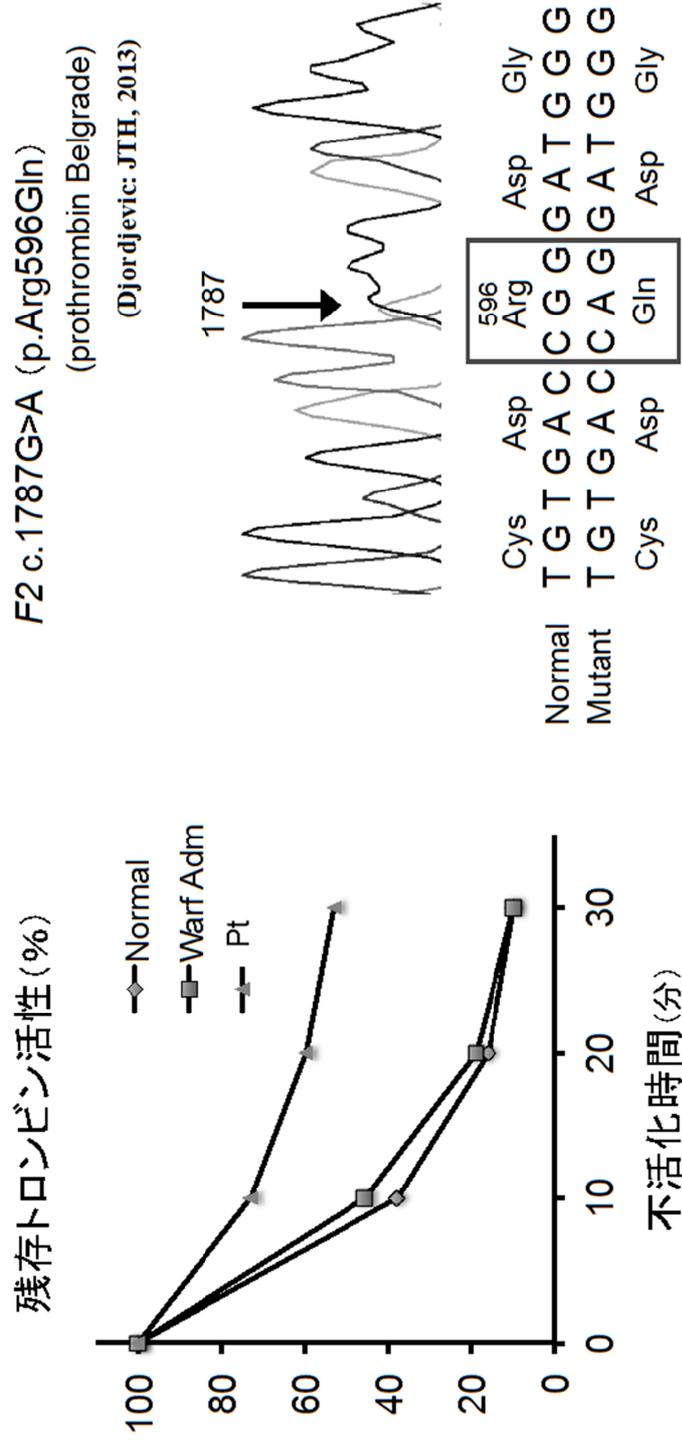


図2. 症例2のATR解析. F2 遺伝子解析



日本人静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるプロテインS K196E 変異の
ELISA法を用いた検出法の確立に関する研究

研究分担者 宮田 敏行 国立循環器病研究センター 分子病態部 部長
研究協力者 丸山 慶子 国立循環器病研究センター 分子病態部 研究員
研究協力者 秋山 正志 国立循環器病研究センター 分子病態部 室長
研究協力者 小亀 浩市 国立循環器病研究センター 分子病態部 室長
研究協力者 關谷 暁子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査学 助教
研究協力者 森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査学 教授

研究要旨

プロテイン S (PS) の機能低下を伴う K196E 変異は、日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクである。PS K196E 変異は日本人の約 55 人に 1 人の頻度で存在する。本変異保有者の PS 活性値は、平均で約 16% 低下しているが、非保有者の値と大きくオーバーラップするため、活性測定では変異の有無を識別できない。本研究では、PS K196E 変異特異的モノクローナル抗体を用いて、血中に存在する異常 PS K196E 分子を検出することにより、変異保有者を同定する系を確立した。本測定法は、遺伝子解析を行わずに変異の同定ができるため、本邦における血栓症診療に有用であると考えられる。

A . 研究目的

静脈血栓塞栓症は加齢で発症が増加し、欧米では80歳を超えると約100人に1人が起こすといわれている。超高齢化を迎えた本邦でも、静脈血栓塞栓症の予防と治療は重要な研究課題である。静脈血栓塞栓症は環境因子と遺伝因子が絡み合って発症する多因子疾患であり、生活習慣の欧米化などにより、近年本邦で急速に増加している。静脈血栓塞栓症の環境因子として、加齢、がん、長期臥床、妊娠、経口避妊薬、ホルモン補充療法、などがあげられており、遺伝因子として血液凝固、線溶やその制御に関わる因子

の先天性異常があげられる。

私達は、難治性疾患研究事業の成果として、これまでに日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的背景としてPS K196E 変異を同定し(オッズ比:3.74-8.56)、本変異は日本人約55人に1人の頻度で認められ(アレル頻度:0.0089)、約1万人がホモ接合体であると報告してきた。本変異は白人種には見られず、加えて中国人と韓国人にも見られないことから、日本人に特有の血栓性変異であることも明らかにした。本変異保有者のPS活性値は、平均で約16%低下しているが、非保有者の値と大

きくオーバーラップするため、
活生測定では変異の有無を識別できない。

本研究では、PS K196E 変異の保有者を
同定するため、PS K196E 変異特異的モノ
クローナル抗体を用いて、血中の異常
PS-K196E 分子を検出する簡便な系を確
立する。PS K196E 変異の有無を識別する
ことで、血栓症の高リスク群の抽出が可
能となり、血栓症の発症を予防すること
が期待できるため、本研究の臨床的意義
は大きいと考える。

B . 研究方法

血中 PS K196E 変異体を ELISA 系で同定
するため、PS K196E 変異特異的モノク
ローナル抗体を作製した。抗体可変領域
に高頻度で突然変異が誘発される GANP マ
ウスは、通常のマウスに比べて多様な抗
体産生細胞が出現する。そこで GANP マウ
スを抗原ペプチド C¹⁸⁶KNGFVMLSNE¹⁹⁶（下
線で示す Glu 残基が変異部位）を共有結
合したヘモシアニンで免疫し、B 細胞より
抗体産生ハイブリドーマを作製した。組
み換えヒト PS 変異 EGF 様ドメイン 1-4
を HEK293S 細胞で発現精製し、これを用
いて作製した 1,672 クローンをスクリー
ニングし変異 EGF 様ドメイン 1-4 に反応
する 3 クローンを樹立した。次いで、組
み換えヒト野生型 PS および変異型 PS を
HEK293S 細胞で発現精製し、これを抗原と
して用いて 3 種のモノクローナル抗体の
特異性を検討した。このうち、変異型 PS
に最も反応性が高いモノクローナル抗体
を用いて血中 PS K196E 変異体の ELISA 系
を確立した。すなわち、PS ポリクローナ
ル抗体を固相化し、モノクローナル抗体

15C8 を用いてサンドウィッチ ELISA を確
立した。モノクローナル抗体の作製はト
ランスジェニック社に委託した。

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

C . 研究結果

組み換えヒト野生型 PS および変異型 PS
を HEK293S 細胞で発現させ精製し、これを
抗原に 3 種のモノクローナル抗体の特異
性を検討した。3 種のモノクローナル抗
体はいずれも野生型 PS には反応しなかつ
たが、変異型 PS には良く反応した。なか
でも、モノクローナル抗体 15C8 は変異型
PS に最も高い反応性を示した。この 15C8
を用いて、血中 PS K196E 変異体検出のた
めのサンドウィッチ ELISA 法を確立した。
本法を用いて遺伝型を同定済みの 33 検体
（野生型 25 名、変異ヘテロ接合体 8 名）の
変異の有無を調べたところ、野生型であ
る正常者は ELISA での吸光度はすべて 0.1
未満であり、変異保有者の吸光度は
0.3-1.0 と明らかに高い値を示し、全ての
検体で変異を同定できた。ワルファリン
加療中の変異保有者や妊娠中の変異保有
者（各 1 人）も 0.3-0.4 の吸光度を示し、
野生型保有者と明確に識別が可能であつ
た。

D . 考察

本研究により、血漿中の PS K196E 変異
体を検出する簡便な ELISA 法を確立した。

入院患者の院内での静脈血栓塞栓症発症の予防や、最近大きな社会問題になっている低用量ピルによる血栓症発症の予防などに対して、本法を用いると血栓症の高リスク群を抽出できることとなり、多方面で血栓症の発症予防が期待できるため、臨床的意義は大きいと考えられる。

E . 結論

日本人の静脈血栓塞栓症の遺伝的リスクであるPS K196E 変異の有無を、血漿を用いて簡便に検出する系を確立した。今後、血栓症の予防のため、広く使用されることを期待している。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Neki R, Miyata T, Fujita T, Kokame K, Fujita D, Isaka S, Ikeda T, Yoshimatsu J: Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes. *Thromb Res*, 133(5), 914-918, 2014
- 2) Eura Y, Kokame K, Takafuta T, Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Mol Genet Genomic Med*,

2(3), 240-244, 2014

- 3) Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, Matsumoto M, Fujimura Y, Ikejiri M, Wada H, Miyata T: Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: concentration of C3 p.I1157T mutation. *Int J Hematol*, 100(5), 437-442, 2014
 - 4) Mitsuguro M, Okamoto A, Shironouchi Y, Sano M, Miyata S, Neki R, Araki T, Hamamoto T, Yoshimatsu J, Miyata T: Effects of factor VIII levels on the APTT and anti-Xa activity under a therapeutic dose of heparin. *Int J Hematol*, 2014 Nov 23. [Epub ahead of print]
 - 5) 宮田敏行、丸山慶子「日本人における先天性血栓性素因 -欧米との比較-」臨床血液、第55巻、第8号、908-916頁(2014)
- ### 2. 学会発表
- 1) Toshiyuki Miyata, Yoshihiro Fujimura, Symposium 2, Thrombosis, leukocytes and vascular cells, Registry of hereditary thrombotic microangiopathies in Japan, The 18th *International Vascular Biology Meeting*, April 14-17, 2014, Kyoto, Japan.
 - 2) 宮田敏行、シンポジウム「TTPとHUS

(総会長シンポジウム)」、「TTP/HUS の遺伝子解析」、第62回日本輸血・細胞治療学会総会、2014年5月16日、奈良市

- 3) 宮田敏行、プロテイン S 研究会シンポジウム、APC凝固制御異常と血栓性素因、「プロテインS徳島は日本人に特有の変異なのか?」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月30日、大阪市
- 4) 宮田敏行、Wanyang Liu、Tong Yin、奥田裕子、原田浩二、Xinping Fan、小泉昭夫、「静脈血栓症のリスクとなるプロテインS K196E 変異の地理的分布」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29日-31日、大阪市
- 5) 宮田敏行、内田裕美子、吉田瑤子、池島裕子、Fan Xinping、芦田明、和田英夫、大塚泰史、中村健治、石川智朗、八田和大、服部元史、久野正貴、才田謙、西尾健治、瀧本智仁、幡谷浩史、大原敦子、川村尚久、波多江健、松本雅則、加藤秀樹、南学正臣、藤村吉博、「日本人の非典型溶血性尿毒症症候群患者41人の遺伝子解析」、第51回補体シンポジウム、2014年8月22-23日、神戸市
- 6) Toshiyuki Miyata, “ Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13 ” , 2014 Suzhou International Symposium on Basic and Translational Vascular Research, October 11-13, 2014, Suzhou, China
- 7) 宮田敏行、2014年度千里ライフサイ

エンスセミナー「血栓症形成の分子メカニズムとその制御」基礎：凝固系、「静脈血栓症」、2014年11月6日、吹田市

- 8) 宮田敏行、「血栓症はどのように起こるのか」、奈良女子大学 共生自然科学専攻 ライフサイエンスセミナー、2014年11月28日、奈良市

H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

プロテインS K196E 変異検出法、2014年9月24日国内出願、特許出願2014-194080

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

研究分担者 小林 隆夫 浜松医療センター 院長
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 浜松医科大学健康社会医学講座

研究要旨

【目的】日本人には血栓性素因としてのプロテイン S (PS) 欠損症が多く、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殆どなく、対応に苦慮することが多い。本研究では、先天性 PS 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定を目的とする。【方法】研究方法としては、まずは下記の厚生労働科学研究費補助金難治疾患克服研究事業のデータベースから血栓性素因患者を抽出し、その背景を探り、診療ガイドラインの策定の一助とする。1 .産婦人科領域の静脈血栓塞栓症(VTE)の調査、2 .肺塞栓症(PE)と深部静脈血栓症(DVT)の頻度、臨床的特徴に関する研究、3 .入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究、4 .院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子、5 .肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究、6 .不育症を対象とした先天性血栓性素因に関する研究、7 .女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究。【結果】1 .の調査結果から産科症例の解析によれば、妊産褥婦に発症する VTE では、血栓性素因を有する患者は、妊娠中発症が 15.4%、産褥期発症が 6.9%であり、妊娠中発症が多い。とくに PS 欠損症や AT 欠損症を有する妊婦は妊娠中発症が多い。また、VTE 症例で血栓症の家族歴・既往歴を有する患者のオッズ比は 209.7 (95%CI:130.5-337.0)と極めて高く、とくに妊娠中発症の方が産褥期発症よりも高い。5 .のデータでは、血栓性素因を有する患者の発症時の平均年齢は 46.9 歳と若年者に多かったが、血栓性素因を有する患者は、PE で 2.1%、DVT で 1.8%であり、妊産褥婦に比し低い傾向にあった。3 .と 7 .の研究から、女性ホルモン剤使用中に発症した PE の 1 例では、活性化プロテイン C 感受性比 (APC-sr) 3.15 (高値) PS 比活性 0.87 (正常) もう 1 例では、APC-sr 4.48 (極めて高値) PS 比活性 0.14 (極めて低値) であり、後者では PS 欠損症が疑われた。これらは非常に有用な予知マーカーになり得ると考えられる。【考察及び結論】血栓性素因を有する妊婦は妊娠中に VTE を発症することが多いため、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要である。また、APC-sr および PS 比活性 の測定が、妊婦や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に有用の可能性がある。

A . 研究目的

日本人には血栓性素因としてのプロテイン S (PS) 欠損症 (PS 徳島変異は日本人 55 人に 1 人と推定) が多く、妊娠中や女性ホルモン剤使用中に血栓症を発症することがある。しかし、妊娠前や女性ホルモン剤使用前に本症と診断されていることはほとんどなく、対応に苦慮することが多い。本研究では、先天性 PS 欠損症患者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定を目的とする。

B . 研究方法

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

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

上記研究事業のデータベース以外の

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

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

すべての解析は終了していないが、まず、「産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査（2001年から2005年）」から産科症例のみで見ると、静脈血栓塞栓症（VTE）は187例が登録され、妊娠中発症が130例、産褥期発症が58例であった（1例は妊娠中にDVT発症し、産褥期にPEを発症したので、重複）。この中で血栓性素因を有する患者は、妊娠中発症が20例（15.4%）、産褥期発症が4例（6.9%）であった。妊娠中発症は、PS欠損症が7例、アンチトロンビン（AT）欠損症が6例、プロテインC（PC）欠損症が3例、抗リン脂質抗体症候群が4例で、産褥期発症はPC欠損症が2例、抗リン脂質抗体症候群が2例であった。また、上記すべてのVTEにおいて、日本産科婦人科学会の周産期委員会が行った2005年の周産期統計からVTE未発症者110,092件の分娩症例をコントロールとして血栓症の家族歴・既往歴のオッズ比を計算すると、VTE全体では209.7（95%信頼区間：130.5-337.0）、妊娠中発症では247.1（同：146.3-417.3）、産褥期発症では111.0（同：39.1-314.6）であった。

次に、「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究」のデータでは、血栓性素因を有する患者は24例（男性10例、女性14例）で、PEは16例（うち13例はDVT合併）、DVT21例であった。発症時の平均年齢は46.9歳（21歳 - 85歳）であった。この調査では全体でPEが778例、DVTが1186例登録されたので、血栓性素因を有する患者は、PEで2.1%、DVTで1.8%であった。なお、PE

とDVT合併の1例は経口避妊薬と関連性があった。

また、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」では、結果の解析は終了していないので詳細は今後の解析を待たなければならないが、月経困難症の治療薬であるLEP（low-dose estrogen progestin）製剤服用中に発症したPE症例に関して興味深い2症例を紹介する。APC-srとPS比活性に関しては、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」で得られた結果から、血栓症の予知マーカーとして有用との結論を得ている。

【症例1】：20歳代後半、産婦人科医師、BMI=21.8、リスク因子なし
発症（診断）日：平成××年12月26日
診断名：PE（観戦初日から歩くと息切れがした）+総腸骨静脈血栓症
LEP服用歴：平成××年8月8日～同年12月26日（約5か月）
誘因：スポーツ観戦3日間（5時間以上水分控え、トイレに行かず座って観戦）
診断に至る経緯：定期検査で、Dダイマーが12μg/mLと上昇していたため、CT検査を行い診断
治療：ヘパリン、ワルファリンにて治療
血栓症予知検査：APC-sr 3.15、PS活性80%、PS比活性0.87

【症例2】：10歳代後半、高校生、BMI=19.6、リスク因子なし
発症（診断）日：平成××年2月21日
診断名：PE（急性、右心負荷、呼吸困難。ただし、DVT症状はなし）
LEP服用歴：平成××年11月15日～平成××年2月21日（約3か月）

誘因：受験勉強（1日10時間、水分摂取は食事の際のみ、トイレに行くとき以外は座位）

診断に至る経緯：駅のエレベーター内で呼吸困難と胸痛を来し、救急搬送

治療：ヘパリン、ワルファリンにて治癒

血栓症予知検査：APC-sr 4.48、PS 活性 13%、PS 比活性 0.14

D . 考察

平成 26 年度は今回の研究の初年度であり、十分な結果が得られていない。しかし、「産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査（2001 年から 2005 年）」から産科症例の解析によれば、妊産褥婦に発症する VTE では、血栓性素因を有する患者は、妊娠中発症が 15.4%、産褥期発症が 6.9%であり、妊娠中発症が多い傾向にある。とくに PS 欠乏症や AT 欠乏症を有する妊婦は妊娠中発症が多いものと思われる。また、VTE 症例で血栓症の家族歴・既往歴を有する患者のオッズ比は 209.7（95%信頼区間：130.5-337.0）と極めて高く、とくに妊娠中発症の方が産褥期発症よりも高かった。すなわち、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要である。

「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症発症数の全国調査研究」のデータでは、血栓性素因を有する患者の発症時の平均年齢は 46.9 歳と若年者に多かったが、血栓性素因を有する患者は、PE で 2.1%、DVT で 1.8%であり、妊産褥婦に比し低い傾向にあった。このデータをみても、血栓性素因を有する患者が妊娠すると初

期からの注意が必要と思われる。

上記調査では、PE と DVT 合併の 1 例は経口避妊薬使用が認められたが、現時点では「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」からの詳細なデータは得られていない。しかし、「入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」で得られた血栓症の有用な予知マーカーである APC-sr、PS 活性および PS 比活性 の測定が、女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に資する可能性があり、さらには PS 欠乏症等の血栓性素因を有する場合は、極めて有用である可能性を秘めている。今後は蓄積されたデータの解析をはじめ適切な予知方法を盛り込んだ診療ガイドラインの策定を行いたい。

E . 結論

血栓性素因を有する妊婦は妊娠中に VTE を発症することが多いため、血栓性素因を有する妊婦を含め血栓症の家族歴・既往歴を有する妊婦は妊娠初期からの注意が必要である。また、APC-sr および PS 比活性 の測定が、妊婦や女性ホルモン剤使用中患者の血栓症予知に有用の可能性はある。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

- ・ 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症. 鈴木重統, 後藤信哉編集, 止血・血栓ハンドブック. 西村

- 書店, 東京 (in press)
- ・ 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と VTE. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第 1 章 静脈血栓塞栓症の病理と病態. 医薬ジャーナル社, 大阪 (in press)
 - ・ 小林隆夫: 妊娠中および産褥期の VTE. 福田幾夫責任編集, 臨床医のための静脈血栓塞栓症診断・治療マニュアル. 第 6 章 特殊な病態下の静脈血栓塞栓症(VTE)の診断と治療. 医薬ジャーナル社, 大阪 (in press)
 - ・ 小林隆夫, 杉浦和子: 日本人に多い先天性凝固阻止因子欠乏症について教えてください. 特集/OC・LEP の静脈血栓塞栓症リスク Q&A. 産科と婦人科 (in press)
 - ・ 小林隆夫, 杉浦和子: 経口避妊薬と活性化プロテイン C 凝固制御系. Thrombosis Medicine (in press)
 - ・ 小林隆夫, 杉浦和子: 女性ホルモン剤と血栓症の歴史. Thrombosis Medicine 4(4): 69-73, 2014
 - ・ 小林隆夫: 妊娠中の血栓塞栓症. 産婦人科分野監修: 小西郁生. 今日の臨床サポート (改訂第 2 版). 永井良三, 木村健二郎, 上村直実, 桑島巖, 今井靖, 名郷直樹, 編. エルゼビア・ジャパン, 2014
(<http://clinicalsup.jp/jpoc/>)
 - ・ 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の治療と予防指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療最新ガイドライン 2014- '15, 総合医学社, 東京, pp303-307, 2014
 - ・ 小林隆夫: 検査値のみかた D ダイマ
- ー. 最新女性医療 1(1): 52-53, 2014
 - ・ 小林隆夫: わが国における静脈血栓塞栓症の最近の動向. 産科と婦人科 81(8): 933-938, 2014
 - ・ 小林隆夫: 癌関連血栓症患者の血栓予防に関するガイドンス (再発血栓症と出血を含む). ISTH (国際血栓止血学会の SSC 版). International Review of Thrombosis 9(2): 48-51, 2014
 - ・ 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防対策. 日本臨床 72(7): 1303-1308, 2014
 - ・ 小林隆夫: 特集 管理法はどう変わったか?: 温故知新 産科編. 妊婦血栓塞栓症. 周産期医学 44(3): 391-395, 2014
 - ・ 小林隆夫: 低用量ピルによる血栓症リスク. 日本医事新報 No4690: 60-61, 2014
- ## 2. 学会発表
- ・ 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症に関する最近の話題. 第 6 回関西凝固線溶研究会学術講演会特別講演. 大阪, 2015.1.31
 - ・ 小林隆夫: OC・LEP 製剤と血栓症 - 安全処方のために -. 第 36 回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会ランチオンセミナー. 東京, 2015.1.25
 - ・ Kazuko Sugiura, Toshiyuki Ojima, Takao Kobayashi. Risk of thromboembolism and other adverse events by body mass index in Japanese oral contraceptive users. The 25th

- Annual Scientific Meeting of the Japan Epidemiological Association, Nagoya, 2015.1.23
- 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症 - 安全処方に向けて - . 平成 26 年度岩手産科婦人科学会集談会. 盛岡, 2015.1.17
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症 - 安全処方に向けて - . 第 224 回大分市医師会産婦人科臨床検討会. 大分, 2015.1.16
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第 2 回薬の安全処方を考える会. 大阪, 2014.12.5
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第 1 回薬の安全処方を考える会. 大阪, 2014.11.21
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第 29 回日本女性医学会学術集会教育講演. 東京, 2014.11.1
 - 小林隆夫：知られていない？日常生活とエコノミークラス症候群 - 女性ホルモン剤と静脈血栓塞栓症 - . 世界血栓症デー. 東京, 2014.10.13
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話題. 新潟県産婦人科医会研修会. 新潟, 2014.10.4
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第 2 回薬の安全処方を考える会. 福岡, 2014.10.3
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話題. 第 3 回女性内分泌診療研究会. 大阪, 2014.9.27
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第 2 回薬の安全処方を考える会. 横浜, 2014.9.26
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症 - その安全処方に向けて - . 尼崎産婦人科医会. 尼崎, 2014.9.20
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と肺塞栓症に関する最新の話題. 札幌市産婦人科医会学術講演会. 札幌, 2014.8.23
 - 小林隆夫：血栓症と検査. 第 2 回薬の安全処方を考える会. 東京 B, 2014.8.22
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症. 第 1 回薬の安全処方を考える会. 東京 B, 2014.7.19
 - 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症に関する最新の話題. 第 302 回奇松会学術講演会. 浜松, 2014.7.18
 - 小林隆夫：静脈血栓症予防の現状～院内での取り組みと安全対策の重要性について～. COVIDIEN 第 10 回 VTE 医療安全セミナー in 栃木, 下野, 2014.7.5
 - 小林隆夫：LEP 製剤の血栓症リスクに関する話題. 柏市地区産婦人科医会学術講演会. 柏, 2014.7.1
 - 杉浦和子、尾島俊之、小林隆夫：日本における過去 10 年間の血栓塞栓症患者数の推移. 第 60 回 東海公衆衛生学会学術大会, 名古屋, 2014.7.19
 - 杉浦和子、尾島俊之：日本における血栓塞栓症患者死亡数の推移. 第 73 回 日本公衆衛生学会総会, 宇都宮, 2014.11.5
 - 小林隆夫：わが国における肺塞栓症予防の変遷. 第 36 回日本血栓止血学会学術集会教育講演 2. 大阪, 2014.5.30

- ・ 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症の最近の話題．第41回品川地区産婦人科臨床研究会．東京，2014.5.22
- ・ 小林隆夫：血栓症と検査．第2回薬の安全処方を考える会．仙台，2014.5.10
- ・ 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症～その安全処方のためにも～．弘前市医師会産婦人科部会講演会．弘前，2014.5.2
- ・ 小林隆夫：血栓症と検査．第2回薬の安全処方を考える会．広島，2014.4.26
- ・ 小林隆夫：女性ホルモン剤と血栓症．第1回薬の安全処方を考える会．福岡，2014.4.4

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

先天性アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S 欠損症の
臨床症状・検査所見、ならびに新規経口抗凝固薬が活性測定におよぼす影響

分担研究者 森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査 教授
研究協力者 關谷 暁子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 病態検査 助教
研究協力者 三澤 絵梨 シスメックス株式会社 商品開発グループ
研究協力者 鈴木 健史 シスメックス株式会社 データ保証グループ
研究協力者 新井 信夫 シスメックス株式会社 データ保証グループ 課長

研究要旨

110 家系 170 症例中、59 家系 93 症例に遺伝子変異を同定した。静脈血栓症が中心であったが、PC 欠損症では動脈血栓症が 20%みられた。AT 欠損症は PC・PS 欠損症と比較してより若年性の血栓症を引き起こした。また PC 欠損症は青壮年期に血栓症を発症するという従来の認識とは異なり、10 代での発症例も数例みられた。血栓症のリスクファクターとしては、妊娠および長距離移動が重要であると考えられた。AT は血栓症発症に遺伝的要因が大きく寄与しているのに対し、PS は遺伝的要因よりも環境要因の影響が大きいことが示唆された。先天性 AT・PC・PS 欠損症は発症年齢、血栓症の起こしやすさ、血栓症の種類などが異なっており、その病態を各々正確に把握することが重要と考えられた。また、Xa 阻害剤の内服にて AT・PC・PS 活性は 1.2~1.5 倍偽高値となった。このように、活性値は、測定法・抗凝固薬内服などにより大きく値が変わることを十分認識して、検査結果を解釈する必要があると考えられた。

A. 研究目的

先天性血栓性素因の診断基準を作成するに際して、その臨床症状、検査所見などを詳細に検討することは意義がある。今回、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)欠損症患者について、血栓症症状、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、などについて総括した。また、今後血栓症の治療薬としてワルファリンの代わりに新規経口抗凝固薬

(NOAC)を内服する症例が増加する可能性があるため、NOAC が PC・PS・AT 活性値におよぼす影響について検討した。

B. 研究方法

(1) 先天性凝固阻止因子欠損症患者の総括：

先天性 AT, PC, PS 欠損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、110 家系 170 症例 (AT: 17 家系 34 症例、PC: 41 家系 63 症例、PS: 52 家系 73 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索した。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) NOAC が AT・PC・PS 活性に及ぼす影響

NOAC 内服者としては、リバーロキサバン内服心房細動(af)患者 8 例(男女各 4 例ずつ、平均年齢 69 歳(年齢幅: 53~76 歳))を対象とした。前投与薬として、ワルファリン内服者は除外した。活性測定試薬は、AT 活性: 合成基質法 2 試薬; Berichrom ATIII (トロンビン法) (シーメンス)、テストチーム S ATIII (Xa 法) (セキスイ)、PC 活性: 凝固時間法 3 試薬; STA Protein C clot II (ロシュ) Protein C Reagent (シーメンス) Protein C Reagent (ハイフェン) 合成基質法 2 試薬; Berichrom Protein C (シーメンス) Biophen Protein C LRT (ハイフェン) PS 活性: 凝固時間法 3 試薬; STA Protein S clot (ロシュ) Protein S Ac (シーメンス) Hemoclot Protein S (ハイフェン) 遊離型 PS 抗原量: ラテックス法 2 試薬; LIATEST Free PS II (ロシュ) Innovance Free PS Ag (シーメンス) を用いた。また、NOAC の血中濃度測定試薬はダビガトランは

Hemoclot Thrombin Inhibitor (ハイフェン)、リバーロキサバンは、Biophen DiXal (ハイフェン) を用いた。測定機器は全自動血液凝固測定装置 CS-5100 (シスメックス) を使用した。

(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損症患者の総括:

59 家系 93 症例に遺伝子変異を認め、変異同定率は AT 88%、PC 49%、PS 46% であった。臨床症状は全ての因子で静脈血栓症が多数を占めたが、PC 欠損症では動脈血栓症が全体の約 20%と、AT および PS 欠損症と比較して多かった。発端者の血栓症初発年齢は AT では 20 代、PS では 40 代に発症のピークがみられたのに対し、PC では 10 代と 40 代に二峰性のピークが認められた。血栓症を発症した患者には様々な背景因子が認められたが、特に妊娠、長距離移動が主要なリスクファクターであった。また変異が同定された発端者の家系内血栓症の有無を検索したところ、AT 欠損症では 7 割で家族歴が認められた。また、AT 欠損症では spontaneous mutation を 1 例認めた。

(2) NOAC が AT・PC・PS 活性に及ぼす影響

服用後の検体において、PS 活性は 3 種類の試薬のうち 2 試薬で 1~2.5 倍程度偽高値となり、PC 活性は 2 試薬とも 1.4 倍程度偽高値となった。AT 活性はトロンビン法ではリバーロキサバン服用前後で変化をみとめなかったが、Xa 法では服用後に 1.3 倍程度高値を示した。リバーロキサバン服用後に高値を示した項目の測定値は、いずれも検体中のリバーロキサバン濃度と正の相関を示し、リバーロキサバンによる抗 Xa 活性とそれに伴う APTT 延長が、PC、PS 活性の偽高値をもたらしたと考えられた。

D . 考察

本研究により、先天性 AT、PC、PS 欠損症は、発症年齢、血栓症の起こしやすさ、症状、などがそれぞれ異なっていた。今回、PS 活性 40%以上の症例では変異を同定することができなかった (PS K196E を除く) が、40%未満の活性を示しかつ血栓症の家族歴があるにも関わらず変異が同定されない症例もあり、PS の現行の遺伝子解析方法には限界があることが示された。血栓症発症には AT 欠損症では遺伝的要因が大きく寄与しており、血栓症発症を未然に防ぐためには、家系調査を行い保因者に予防的指導を行うことが有用であると考えられた。

血栓症の原因検索を、ワルファリンなどの抗凝固剤投与後に行わざる負えないことは多々あり、PC・PS 欠損症の診断をより困難にしてきた。今後、ワルファリンの代わりに NOAC などが使用される場合もあり、活性が偽高値となり診

断を見落とす可能性があることに留意すべきであろう。

E . 結論

先天性 AT・PC・PS 欠損症は発症年齢、血栓症の起こしやすさ、血栓症の種類などが異なっており、その病態を各々正確に把握することが重要と考えられた。

また、Xa 阻害剤の内服にて AT・PC・PS 活性は 1.2~1.5 倍偽高値となった。このように、活性値は、測定法・抗凝固薬内服などにより大きく値が変わることを十分認識して、検査結果を解釈する必要があると考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hayashi T, Nakagawa N, Kadohira Y, Morishita E, Asakura H: Rivaroxaban in a patient with disseminated intravascular coagulation associated with an aortic aneurysm: a case report, *Ann Intern Med* 161(2):158-159, 2014.
- 2) Sekiya A, Morishita E, Maruyama K, Torishima H, Ohtake S: Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* [Advance Publication] Released: January 16, 2015.
- 3) Yoshikawa Y, Kitayama J, Ishikawa H, Nakamura A, Taniguchi F, Morishita E, Ago T, Nakane H, Kitazono T: Fulminant bilateral

- cerebral infarction caused by paradoxical embolism in a patient with protein S Ala525Val substitution. **Neurology and Clinical Neuroscience**. (in press).
- 4) 森下英理子：「まれな凝固因子異常症」。「プリンシプル血液疾患の臨床：よくわかる血栓・止血異常の臨床」 金倉譲，富山佳有昭 編集，p.67-80，中山書店．2014.11.20．
 - 5) 森下英理子：徹底ガイド DIC のすべて 2014-15， 基礎病態と治療 - 血管性病変 .**救急・集中治療** 26(5-6): 851-855, 2014.
 - 6) 森下英理子：徹底ガイド DIC のすべて 2014-15， 治療薬 - 抗線溶薬(内科系) .**救急・集中治療** 26(5-6):929-934, 2014.
 - 7) 森下英理子：新しい経口抗凝固薬のモニタリング検査 .**臨床検査** 58(8): 979-986, 2014.
 - 8) 森下英理子：遺伝子検査 . **日本臨床** 72(7):1237-1242, 2014.
 - 9) 林朋恵、森下英理子：造血幹細胞移植後関連 TMA . **日本血栓止血学会誌** 25(6):725-731 , 2014.
- ## 2. 学会発表
- 1) Kosugi I, Matano A, Morishita E, Taniguchi F. An uncommon case of deep venous thrombosis and pulmonary thromboembolism in a juvenile with compound heterozygous congenital protein S deficiency. XXVI World Congress of the International Union of **Angiology**, August 10-14, 2014, Sydney, Australia.
 - 2) Nomoto H, Morishita E, Takami A, Katsu S, Yamaguchi D, Yasuo Morishima M, Onizuka M, Kashiwase K, Fukuda T, Koderu Y, Suzuki Y, Nitta N, Nakao S, Ohtake S. Thrombomodulin has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. **56th American Society of Hematology Annual Meeting**, December 5-9, 2014, San Francisco, USA.
 - 3) 森下英理子：抗凝固薬と血液凝固線溶系検査 . **B I ・生活習慣病セミナー** , 2014 . 4.15, 金沢.
 - 4) 森下英理子，林朋恵： 大動脈瘤・大動脈解離に伴う止血・凝固異常(慢性 DIC).(シンポジウム). **第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会** , 2014 . 7 . 10 , 東京 .
 - 5) 森下英理子：血液凝固異常症に遭遇した場合の臨床診断の進め方 . **第 9 回四国ナノピア凝固・線溶研究会** , 2014 . 9 . 27 , 松山 .
 - 6) 森下英理子：活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 測定値の解釈 -臨床の現場から- .**平成 26 年度日臨技中部圏支部 医学検査学 ランチョンセミナー** , 2014. 9.28 , 富山 .
 - 7) 森下英理子：ヘムオキシゲナーゼ - 1 (HO-1)/一酸化炭素(CO)による抗

- 血栓作用の調節 **第 19 回近畿血栓症研究会 北浜フォーラム**, 2014. 10.11, 大阪.
- 8) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の危険因子. **第 2 回日本肺高血圧学会・第 3 回日本肺循環学会合同学術集会教育セミナー**, 2014. 10. 4, 東京.
- 9) 森下英理子: なぜ血は固まるの? - 血が固まらないはずの血管の中で血が固まる話 -. **世界血栓症デー日本市民公開講座 2014**, 2014. 10. 13, 東京.
- 10) 林朋恵, 門平靖子, 森下英理子, 朝倉英策, 中尾眞二: 抗リン脂質抗体症候群における抗リン脂質抗体のプロファイル. **第 111 回日本内科学会学術集会**, 2014. 4. 11-13, 東京.
- 11) 關谷暁子, 林朋恵, 川野充弘, 津田友秀, 金秀日, 野本明華, 谷口文苗, 山口大介, 朝倉英策, 大竹茂樹, 森下英理子: 血中可溶性 Mer チロシンキナーゼは妊娠中に増加する, **第 36 回日本血栓止血学会学術集会**, 2013. 5. 29- 31, 大阪.
- 12) 谷口文苗, 山口大介, 關谷暁子, 野本明華, 小杉郁子, 朝倉英策, 大竹茂樹, 森下英理子: 広範な下肢深部静脈血栓症を呈した, 複合ヘテロ接合体先天性プロテイン S 欠損症の一例, **第 15 回日本検査血液学会学術集会**, 2014. 7. 20-21, 仙台.
- 13) 山口大介, 谷口文苗, 關谷暁子, 野本明華, 佐藤那美, 森永浩次, 岩澤仁, 大竹茂樹, 森下英理子: 当研究室におけるアンチトロンビン遺伝子解析の総括 **第 15 回日本検査血液学会学術集会**, 2014. 7. 20-21, 仙台.
- 14) 谷口文苗, 山口大介, 野本明華, 高田麻央, 小林英里奈, 關谷暁子, 門平靖子, 林朋恵, 朝倉英策, 中尾眞二, 大竹茂樹, 森下英理子: 当研究室における先天性プロテイン S, プロテイン C, アンチトロンビン欠損症の遺伝子解析の総括 **第 76 回日本血液学会学術集会**, 2014. 10. 31-11. 2, 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

プロテイン S K196E 変異検出法、
2014 年 9 月 24 日国内出願、特許出願 2014 - 194080

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

<書籍>

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
小野-宇留賀友佳子, 村田満	MicroRNA と血小板	高久史磨, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉讓, 小島勢二	Annual Review 血液 2015	中外医学社	東京	2015	206-210
富山佳昭	免疫性血小板減少性紫斑病	直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二編	血液疾患最新の治療-2014-2016	南江堂	東京	2014	221-224
富山佳昭	特発性血小板減少性紫斑病	門脇孝, 小室一成, 宮地良樹監修	診療ガイドライン UP-TO-DATE 2014-2015	メディカルレビュー社	大阪	2014	429-434
富山佳昭	ITP の治療指針	金倉讓, 木崎昌弘, 鈴木律朗, 神田善伸編	EBM 血液疾患の治療 2015-2016	中外医学社	東京	2014	408-412
富山佳昭	特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)	金倉讓, 富山佳昭編	よくわかる血栓・止血異常の診療	中山書店	東京	2014	80-91
桑名正隆	免疫性血小板減少症		血栓止血血管学(分冊1)	金芳堂	京都	2015	印刷中
羽藤高明	血栓性血小板減少性紫斑病	福井次矢, 高木誠, 小室一成	今日の治療指針 2014	医学書院	東京	2014	654-655
羽藤高明	先天性および後天性血管障害による出血	直江知樹, 小澤敬也, 中尾眞二	血液疾患最新の治療 2014-2016	南江堂	東京	2014	217-220
羽藤高明	血小板輸血の適応とそのピットフォール	矢富裕, 大森司	出血性疾患の実践診療マニュアル	南江堂	東京	2014	59-64
羽藤高明	新鮮凍結血漿の適応とそのピットフォール	矢富裕, 大森司	出血性疾患の実践診療マニュアル	南江堂	東京	2014	65-70
羽藤高明	凝固因子製剤の分類とその適応	矢富裕, 大森司	出血性疾患の実践診療マニュアル	南江堂	東京	2014	71-77

村田萌， 小嶋哲人	深部静脈血栓症 に対する対策と 治療	編： 金倉謙， 木崎昌弘， 鈴木律朗， 神田善伸	EBM 血液疾患 の治療 2015-2016	中外医学 社	東京	2014	439-442
小林隆夫， 杉浦和子	女性ホルモン剤 と血栓症	鈴木重統， 後藤信哉	止血・血栓ハ ンドブック	西村書店	東京	2015	印刷中
小林隆夫， 杉浦和子	経口避妊薬と VTE	福田幾夫	臨床医のため の静脈血 栓塞栓症診 断・治療マニ ュアル	医薬ジャ ーナル社	大阪	2015	印刷中
小林隆夫	妊娠中および産 褥期の VTE	福田幾夫	臨床医のため の静脈血 栓塞栓症診 断・治療マニ ュアル	医薬ジャ ーナル社	大阪	2015	印刷中
小林隆夫	妊娠中の血栓塞 栓症	永井良三， 木村健二 郎， 上村直実， 桑島巖， 今井靖， 名郷直樹	今日の臨床 サポート (改訂第 2 版)	エルゼビ ア・ジャ パン	東京	2014	http:// clini cal sup. jp /jpoc/
小林隆夫	肺血栓塞栓症の 治療と予防指針	岡元和文	救急・集中治 療最新ガイ ドライン 2014- ' 15	総合医学 社	東京	2014	303-307
森下英理子	まれな凝固因子 異常症	金倉謙， 富山佳昭 編集	プリンシ プル血液疾患 の臨床： よくわかる 血栓・止血異 常の臨床	中山書店		2014	67-80

< 雑誌 >

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
宮川義隆, 柏木浩和, 高蓋寿朗, 藤村欣吾, 倉田義之, 小林隆夫, 木村正, 安達知子, 渡辺尚, 今泉益栄, 高橋幸博, 松原康策, 照井克生, 桑名正隆, 金川武司, 村田満, 富山佳昭	妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド	臨床血液	55(8)	934-947	2014
谷田部陽子, 村田満	血小板数と血小板形態	臨床検査	59(2)	173-179	2015
Ikeda Y, Shimada K, Teramoto T, Uchiyama S, Yamazaki T, Oikawa S, Sugawara M, Ando K, Murata M, Yokoyama K, Ishizuka N	Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular events in Japanese patients 60 years or older with atherosclerotic risk factors: a randomized clinical trial.	JAMA	312 (23)	2510-2520	2014
Kamoshita M, Matsumoto Y, Nishimura K, Katono Y, Murata M, Ozawa Y, Shimmura S, Tsubota K	Wickerhamomyces anomalus fungal keratitis responds to topical treatment with antifungal micafungin.	Journal of Infection and Chemotherapy	21(2)	141-143	2015
Kiyokawa T, Koh Y, Mimura K, Nakayama K, Hosokawa M, Sakuragi M, Morikawa T, Nakao M, Aochi H, Fukumori Y, Kanagawa T, Nagamine K, Kimura T, Tomiyama Y.	A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy.	Int J Hematol	100	398-401	2014
富山佳昭	自己抗体の標的抗原 - ITPを中心に -	日内会誌	103	1570-1579	2014
柏木浩和, 富山佳昭	特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の治療	臨床血液	55	2087-2094	2014

Kawaguchi K, Matsubara K, <u>Takafuta T</u> , Shinzato I, Tanaka Y, Iwata A, Nigami H, Takeuchi Y, Fukaya T	Factors predictive of neonatal thrombocytopenia in pregnant women with immune thrombocytopenia.	Int J Hematol	99	570-576	2014
<u>Kuwana M</u> , Okazaki Y, and Ikeda Y	Detection of circulating B cells producing anti-GPIb autoantibodies in patients with immune thrombocytopenia.	PLoS One	9(1)	e86943.	2014
<u>Kuwana M</u>	Dysregulated negative immune regulators in immune thrombocytopenia.	ISBT Sci. Ser	9	217-222	2014
Nishimoto T, Numajiri M, Nakazaki H, Okazaki Y, and <u>Kuwana M</u> .	Induction of immune tolerance to platelet antigen by short-term thrombopoietin treatment in a mouse model of immune thrombocytopenia.	Int. J. Hematol	100 (4)	341-344	2014
Yamanouchi J, <u>Hato T</u> , Niiya T, Sato Y, Onishi S, Yasukawa M	Development of exogenous FVIII-specific inhibitor in a mild hemophilia patient with Glu272Lys mutation	Haemophilia	20	e179-182	2014
Yamanouchi J, <u>Hato T</u> , Niiya T, Azuma T, Yasukawa M	Severe immune thrombocytopenia secondary to Waldenström's macroglobulinemia with anti-GPIb/IX monoclonal IgM antibody	Ann Hematol	93	711-712	2014
Yamanouchi J, Azuma T, Yakushijin Y, <u>Hato T</u> , Yasukawa M	Dramatic and prompt efficacy of Helicobacter pylori eradication in the treatment of severe	Ann Hematol	93	1779-1780	2014

	refractory iron deficiency anemia in adults				
<u>羽藤高明</u>	止血異常に対する輸血療法の基本 - 適切な血小板製剤、新鮮凍結血漿の入手と適切な使い方 -	Medical Practice	31	110-114	2014
Yada N, Fujioka M, Bennett C, Hayakawa M, <u>Matsumoto M</u> , Inoki K, Miki T, Watanabe A, Yoshida T, <u>Fujimura Y</u> .	The STEC-HUS followed by acute encephalopathy in a young girl was favorably treated on a basis of hemodiafiltration, steroid pulse, and soluble thrombomodulin, under plasma exchange.	Clinical Case Reports	In press		2015
Ogawa Y, <u>Matsumoto M</u> , Sadakata H, Isonishi A, Kato S, Nojima Y, <u>Fujimura Y</u> .	A unique case involving a female patient with Upshaw-Schulman syndrome: low titers of antibodies against ADAMTS13 prior to pregnancy disappeared after successful deliver.	Transfusion Med and Hematol	42	59-63	2015
Matsumoto T, Fan X, Ishikawa E, Ito M, Amano K, Toyoda H, Komada Y, Ohishi K, Katayama N, Yoshida Y, <u>Matsumoto M</u> , <u>Fujimura Y</u> , Ikejiri M, <u>Wada H</u> , <u>Miyata T</u> .	Analysis of patients with atypical hemolytic uremic syndrome treated at the Mie University Hospital: Concentration of C3 p.I1157T mutation.	Int J Hematol	100	437-442	2014
Muroi C, Fujioka M, Mishima K, Irie K, <u>Fujimura Y</u> , Nakano T, Fandino J, Keller E, Iwasaki K, Fujiwara M.	Effect of ADAMTS13 on cerebrovascular microthrombosis and neuronal injury after experimental subarachnoid hemorrhage.	J Thromb Haemost	12	505-514	2014

Sorvillo N, Kaijen PH, Matsumoto M, <u>Fujimura Y</u> , van der Zwaan C, Verbij FC, Pos W, Fijnheer R, Voorberg J, Meijer AB.	Identification of N-linked glycosylation and putative O-fucosylation, C-mannosylation sites in plasma derived ADAMTS13.	J Thromb Haemost	12	670-679	2014
<u>藤村吉博</u> , <u>松本雅則</u> , <u>石西綾美</u> , <u>八木秀男</u> , <u>小亀浩市</u> , <u>宮田敏行</u>	血栓性血小板減少性紫斑病	臨床血液	55	93-104	2014
<u>宮川義隆</u>	ITP と TTP に対するリツキシマブ	日本内科学会雑誌	103	1654-1659	2014
<u>宮川義隆</u>	特発性血小板減少性紫斑病	内科	114 (2)	209-213	2014
<u>宮川義隆</u>	TTP と非典型 HUS の最新治療	医学のあゆみ	251 (2)	149-156	2014
<u>宮川義隆</u>	血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの医師主導治験	血液内科	69(5)	688-692	2014
<u>宮川義隆</u>	妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド	Thrombosis Medicine	4(4)	388-394	2014
<u>Wada H</u> , Matsumoto T, Yamashita Y	Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation (DIC) according to four DIC guidelines	Journal of Intensive Care	2	15	2014
<u>Wada H</u> , Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T	Disseminated Intravascular Coagulation: Testing and Diagnosis.	Clin Chim Acta	436C	130-134	2014
<u>Wada H</u> , Matsumoto T, Yamashita Y, Hatada T	Is early treatment of DIC beneficial in septic patients?	Crit Care	18	447	2014
<u>Wada H</u> , Okamoto K, Iba T, Kushimoto S, Kawasugi K, Gando S, Madoiwa S, Uchiyama T, Mayumi T, Seki Y, Japanese Society	Addition of recommendations for the use of recombinant human thrombomodulin to the "Expert consensus for	Thromb Res	134	924-925	2014

of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee	the treatment of disseminated intravascular coagulation in Japan".				
<u>Wada H</u> , Matsumoto T, Yamashita Y	Natural History of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Hemolytic Uremic Syndrome.	Semin Thromb Hemost	40	866-873	2014
Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, <u>Wada H</u>	Antithrombin and mortality in severe pneumonia patients with sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: an observational nationwide study: comment	J Thromb Haemost		In press	2015
Ota S, <u>Wada H</u> , Mastuda A, Ogiwara Y, Yamada N, Nakamura M, Ito M	Anti-Xa activity in VTE patients treated with fondaparinux.	Clin Chim Acta	442	22-23	2015
<u>Wada H</u> , Aota T, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N	Antithrombin or thrombomodulin administration in severe pneumonia patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation: comment on two papers.	J Thromb Haemost		In press	2015
Yamashita Y, Naitoh K, <u>Wada H</u> , Ikejiri M, Matsumoto T, Ohishi K, Hosaka Y, Nishikawa M, Katayama N	Elevated plasma levels of soluble platelet glycoprotein VI (GPVI) in patients with thrombotic microangiopathy.	Thromb Res	133	440-444	2014
Yamashita Y, <u>Wada H</u> , Nomura H, Mizuno T, Saito K, Yamada N, Asanuma K, Usui M, Kamimoto Y,	Elevated Fibrin-related Markers in Patients with Malignant Diseases Frequently Associated	Intern Med	53	413-419	2014

Matsumoto T, Ohishi K, Katayama N	with Disseminated Intravascular Coagulation and Venous Thromboembolism.				
Aota T, Naitoh K, <u>Wada H</u> , Yamashita Y, Miyamoto N, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Asanuma K, Matsumoto T, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Nishikawa M, Katayama N, Uchida A, Sudo A	Elevated soluble platelet glycoprotein VI is a useful marker for DVT in postoperative patients treated with edoxaban.	Int J Hematol	100	450-456	2014
Masanobu Morioka, <u>Masanori Matsumoto</u> , Makoto Saito, <u>Koichi Kokame</u> , <u>Toshiyuki Miyata</u> , <u>Yoshihiro Fujimura</u>	A first bout of thrombotic thrombocytopenic purpura triggered by herpes simplex infection in a 45-year-old nulliparous female with Upshaw-Schulman syndrome	Blood Transfus	12 (S1)	s153-s155	2014
Hirokazu Tanaka, Chiaki Tenkumo, Nobuhiro Mori, <u>Koichi Kokame</u> , <u>Yoshihiro Fujimura</u> , Toshiyuki Hata	Case of maternal and fetal deaths due to severe congenital thrombotic thrombocytopenic purpura (Upshaw-Schulman syndrome) during pregnancy	J Obstet Gynaecol Res	40(1)	247-249	2014
Jacob Larkin, Baosheng Chen, Xiao-Hua Shi, Takuya Mishima, <u>Koichi Kokame</u> , Yaacov Barak, Yoel Sadovsky	NDRG1 deficiency attenuates fetal growth and the intrauterine response to hypoxic injury	Endocrinology	155 (3)	1099-1106	2014
<u>Reiko Neki</u> , <u>Toshiyuki Miyata</u> , Tomio Fujita, <u>Koichi Kokame</u> , Daisuke Fujita, Shigeyuki Isaka, Tomoaki Ikeda, Jun Yoshimatsu	Nonsynonymous mutations in three anticoagulant genes in Japanese patients with adverse pregnancy outcomes	Thromb Res	133 (5)	914-918	2014

樋口(江浦)由佳, 小亀浩市, 宮田敏行	ターゲット領域の異常 を見逃さないゲノム定 量 PCR 法の確立	日本血栓 止血学会 誌	25(5)	615-618	2014
小亀浩市	TTP の分子診断	日本血栓 止血学会 誌	25(6)	689-696	2014
小亀浩市	血栓性血小板減少性紫 斑病	血液フロ ンティア	25(1)	51-57	2015
Kato I, Takagi Y, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, Matsushita T, Nakashima T, <u>Kojima T</u>	A complex genomic abnormality found in a patient with antithrombin deficiency and autoimmune disease-like symptoms.	Int J Hematol	100	200-205	2014
高木夕希, <u>小嶋哲人</u>	新規血栓性素因アンチ トロンビン抵抗性の発 見と今後の展望	日本臨牀	72(7)	1320-13 24	2014
<u>小嶋哲人</u>	徹底ガイド DIC のすべ て 2014-15 (丸藤哲編) ヘパリン類似物質	救急・集中 治療	26 (5-6)	887-892	2014
Takagi Y, Kato I, Ando Y, Nakamura Y, Murata M, Takagi A, Murate T, <u>Kojima T</u>	Antithrombin-resistan t prothrombin Yukhashi mutation also causes thrombomodulin resistance in fibrinogen clotting but not in protein C activation.	Thromb Res	134 (4)	914-917	2014
<u>小嶋哲人</u>	新たな血栓性素因: アン チトロンビンレジスタ ンス	日本検査 血液学会 雑誌	15(3)	289-296	2014
Eura Y, <u>Kokame K</u> , <u>Takafuta T</u> , Tanaka R, Kobayashi H, Ishida F, Hisanaga S, <u>Matsumoto M</u> , <u>Fujimura Y</u> , <u>Miyata T</u>	Candidate gene analysis using genomic quantitative PCR: identification of ADAMTS13 large deletions in two patients with Upshaw- Schulman syndrome	Mol Genet Genomic Med	2(3)	240-244	2014

Mitsuguro M, Okamoto A, Shironouchi Y, Sano M, Miyata S, <u>Neki R</u> , Araki T, Hamamoto T, Yoshimatsu J, <u>Miyata T</u>	Effects of factor VIII levels on the APTT and anti-Xa activity under a therapeutic dose of heparin	Int J Hematol	Nov 23. [Epub ahead of print]		2014
<u>宮田敏行</u> , 丸山慶子	日本人における先天性血栓性素因 -欧米との比較-	臨床血液	55(8)	908-916	2014
<u>小林隆夫</u> , <u>杉浦和子</u>	日本人に多い先天性凝固阻止因子欠乏症について教えてください. 特集/OC・LEPの静脈血栓塞栓症リスク Q&A	産科と婦人科	84(4)	印刷中	2015
<u>小林隆夫</u> , <u>杉浦和子</u>	経口避妊薬と活性化プロテインC凝固制御系	Thrombosis Medicine	5(1)	印刷中	2015
<u>小林隆夫</u> , <u>杉浦和子</u>	女性ホルモン剤と血栓症の歴史	Thrombosis Medicine	4(4)	69-73	2014
<u>小林隆夫</u>	検査値のみかた D ダイマー	最新女性医療	1(1)	52-53	2014
<u>小林隆夫</u>	出血性疾患・血栓性疾患の妊娠・分娩管理	臨床血液	55(8)	925-933	2014
<u>小林隆夫</u>	わが国における静脈血栓塞栓症の最近の動向	産科と婦人科	81(8)	933-938	2014
<u>小林隆夫</u>	癌関連血栓症患者の血栓予防に関するガイドランス(再発血栓症と出血を含む)	International Review of Thrombosis	9(2)	48-51	2014
<u>小林隆夫</u>	静脈血栓塞栓症の予防対策	日本臨牀	72(7)	1303-1308	2014
<u>小林隆夫</u>	特集 管理法はどう変わったか?: 温故知新 産科編 妊婦血栓塞栓症	周産期医学	44(3)	391-395	2014
<u>小林隆夫</u>	低用量ピルによる血栓症リスク	日本医事新報	No4690	60-61	2014
<u>森下英理子</u>	徹底ガイド DIC のすべて 2014-15 基礎病態と治療 - 血管性病変	救急・集中治療	26 (5-6)	851-855	2014
<u>森下英理子</u>	徹底ガイド DIC のすべて 2014-15 治療薬 -	救急・集中治療	26 (5-6)	929-934	2014

	抗線溶薬（内科系）				
<u>森下英理子</u>	新しい経口抗凝固薬のモニタリング検査	臨床検査	58(8)	979-986	2014
<u>森下英理子</u>	遺伝子検査	日本臨床	72(7)	1237-1242	2014
林朋恵, <u>森下英理子</u>	造血幹細胞移植後関連TMA	日本血栓止血学会誌	25(6)	725-731	2014
Hayashi T, Nakagawa N, Kadohira Y, <u>Morishita E</u> , Asakura H	Rivaroxaban in a patient with disseminated intravascular coagulation associated with an aortic aneurysm: a case report,	Ann Intern Med	161(2)	158-159	2014
Sekiya A, <u>Morishita E</u> , Maruyama K, Torishima H, Ohtake S	Fluvastatin upregulates the expression of tissue factor pathway inhibitor in human umbilical vein endothelial cells.	J Atheroscler Thromb	in press		2015
Yoshikawa Y, Kitayama J, Ishikawa H, Nakamura A, Taniguchi F, <u>Morishita E</u> , Ago T, Nakane H, Kitazono T	Fulminant bilateral cerebral infarction caused by paradoxical embolism in a patient with protein S Ala525Val substitution.	Neurology and Clinical Neuroscience	in press		2015

<その他（メディア）>

発表者氏名		
宮川義隆	TBSテレビ 報道特集、「難病女性 決意の出産」	2014年 12月20日
宮川義隆	産経新聞、「特発性血小板減少性紫斑病」	2014年 4月22日
宮川義隆	中国新聞、「血液の難病「ITP」新診療指針：妊娠・出産 恐れなくて」	2014年 11月4日
宮川義隆	Medical Tribune、「TTPに対するリツキシマブの医師主導治験： 12月26日までに「あと3例」募集」	2014年 11月27日
宮川義隆	Medical Tribune、「ITP患者の妊娠・出産に20年ぶり新指針」	2014年 12月18日