

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 29 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 30 年 3 月

# 目次

## 血液凝固異常症等に関する研究

I. 総括研究報告書 村田 満 慶應義塾大学 -----1

### II. 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	千里金蘭大学
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 -----8

#### 分担研究報告

富山佳昭：成人ITP治療ガイド改訂に向けての検討

桑名正隆：ITP診断に有用な臨床検査法の実用化に向けた試み

羽藤高明：臨床調査個人票集計による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：松本雅則	奈良県立医科大学
班員：小亀浩市	国立循環器病研究センター
宮川義隆	埼玉医科大学
研究協力者：藤村吉博	日本赤十字社近畿ブロック血液センター
和田英夫	三重大学
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	奈良県総合医療センター

TTP グループ研究総括：松本雅則 -----28

### 分担研究報告

松本雅則：ADAMTS13による von Willebrand 因子切断生成物の定量的 ELISA の確立

宮川義隆：TTPに対する血漿交換と抗体医薬リツキサンの薬事対応

小亀浩市：先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析

## aHUS（非典型溶血性尿毒症症候群）研究グループ

グループリーダー：南学正臣	東京大学
班員：香美祥二	徳島大学
研究協力者：丸山彰一	名古屋大学
伊藤秀一	横浜市立大学
芦田 明	大阪医科大学
加藤秀樹	東京大学

aHUS グループ研究総括：南学正臣 -----54

### 分担研究報告

南学正臣：本邦における非典型溶血性尿毒症症候群患者の疫学的・遺伝的背景の解析

香美祥二：本邦における非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診療の現状

及び診療ガイドライン策定への動き

## 特発性血栓症 研究グループ

グループリーダー：	森下英理子	金沢大学
班員：	津田博子	中村学園大学
	小嶋哲人	名古屋大学
	宮田敏行	国立循環器病研究センター
	小林隆夫	浜松医療センター
	大賀正一	九州大学
研究協力者：	宮田敏行	国立循環器病研究センター
	坂田洋一	自治医科大学
	横山健次	東海大学
	中村真潮	村瀬病院
	榛沢和彦	新潟大学
	尾島俊之	浜松医科大学
	杉浦和子	浜松医科大学
	根木玲子	国立循環器病研究センター
	辻 明宏	国立循環器病研究センター

特発性血栓症グループ研究総括：森下英理子 -----75

### 分担研究報告

- 森下英理子：アンチトロンビン抵抗性を示す無症候性の  
先天性プロトロンビン異常症の解析
- 津田博子：伝性血栓性素因の人種差および血中プロテイン S 濃度の予測因子の解明
- 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適用
- 小林隆夫：先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に  
関する診療ガイドラインの策定
- 大賀正一：新生児・乳児に発症するプロテイン C 欠乏症の早期診断と治療管理法の確立

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----117

# 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）  
平成29年度総括研究報告書 「血液凝固異常症等に関する研究」

研究代表者：村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授

研究要旨

本研究班は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。血液凝固異常と関連する4疾患、すなわち特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）、特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）、を対象としている。ITP、TTP、aHUSは平成27年1月より、特発性血栓症（遺伝性血栓性素因による。）は平成29年より指定難病医療費助成制度の対象疾患として位置づけられた。4疾患について、それぞれのサブグループに分かれて課題に取り組むとともに、グループ間の相互議論を活発に行うことによって、(1)分子病態に基づいた診断基準、治療指針の確立/普及およびその効果の検証、改正、(2)大規模な疫学的解析による我が国での発症頻度、予後の把握と治療の標準化などを目標とした。平成29年度は3年計画の1年目として、診断基準の改定、診療ガイドの改訂、指定難病検討資料の作成、臨床情報に基づく病態解明に注力した。また臨床的有用性の高いデータベース化システムの構築、そして新しい体外診断薬の開発や検証、新規治療の検証と保険適応へ向けての検討を班全員の参加のもとに行った。結果は執筆活動や市民公開講座を行うことにより、その啓発に努めた。疫学研究については特定疾患治療研究事業の対象疾患にともなう毎年行われるITP臨床個人調査表を基に、平成17年度から26年度の10年間におけるITPの実態を調査把握した。血栓性血小板減少性紫斑病については、レジストリーの継続、ADAMTS13遺伝子解析の継続、ADAMTS13検査(活性とインヒビター)の保険適用の取得、リツキシマブの後天性TTPへの保険適用拡大、後天性TTPに対する血漿交換の回数制限の撤廃、TTP診療ガイドラインの改定、を計画として設定した。aHUSについては日本国内のaHUS症例の疫学的・蛋白質学的・遺伝学的解析を通して、本研究班独自のaHUS診療ガイドラインを作成することを目的とした。特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）は平成29年4月より厚労省の指定難病として認定されたばかりであることから、全国の症例数や実態は十分に把握することが取り組むべき課題である。先天性血栓性素因患者の診療ガイドラインの策定、先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイドラインの策定、妊娠合併先天性血栓性素因患者の診療ガイドラインの策定、を目指した。

当研究班の活動はホームページに公開されている。

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

## ITP（特発性血小板減少性紫斑病）

### 研究グループ

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継続的に行っている。

平成 29 年度においては、特定疾患治療研究事業の対象疾患であることから、ITP の臨床疫学的研究を経年的に行い最近の ITP の臨床実態を明らかにした。治療に関しては治療プロトコルを履行するに当たり保険医療上の制約を克服すると共に、本疾患の治療の標準化をめざし「成人 ITP 治療の参照ガイド」、「妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド」の作成および公開を行ってきた。本年度は、「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」の改訂に向けて論点の整理など、改訂作業に取り組んだ。

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。新規登録患者数は 21,811 人であり、更新登録患者数はのべ 126,009 人であった。各年度別登録患者数は平成 19 年度を除くとほぼ一定の範囲の登録数であった。

ITP 治療の参照ガイドと妊娠合併

ITP 診療の参照ガイドの作成に関して、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。また班会議の枠を超え、産科、小児科、麻酔科の専門家も参画し専門家のコンセンサスの形で診療の参照ガイドを作成し、「臨床血液」誌に掲載した（妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド. 臨床血液 55:934-947, 2014）。これらの成果はすべてオープンアクセス化している。そのダウンロード数は当該雑誌における年度の 1 位と 2 位を占めた。

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

### TTP(血栓性血小板減少性紫斑病)研究グループ

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

平成 29 年度は、1) TMA レジストリーの継続、2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続、3) ADAMTS13 検査の保険適用の取得、

4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大、5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更、6) TTP 診療ガイドラインの改定、を行った。

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

奈良県立医科大学輸血部では、1998 年以降 ADAMTS13 の検査を通じて、日本全国の医療機関から TMA 症例の集積を行ってきた。その症例数は 2017 年 12 月末で 1474 例となった。遺伝子解析について、先天性 TTP は本年度 3 例新たに同定し、全部で 64 例となった。ADAMTS13 遺伝子解析を本年度 2 例で行い、1 例は複合ヘテロ接合体異常、1 例がホモ接合体異常であった。これまでに、61 例について ADAMTS13 遺伝子解析を行い、57 例(93.4%)で責任遺伝子変異を同定した。10 例がホモ接合体異常、47 例が複合ヘテロ接合体異常であった。一方、ADAMTS13 活性とインヒビターの保険適用について日本血液学会を通じて提案し、平成 30 年度 4 月から保険適用となった。また難治性、再発性 TTP に対するリツキシマブの保険適応拡大については、リツキシマブの TTP への保険適用拡大のため 2014 年に医師主導治験を実施し、その結果を 2015 年に論文報告した。この結果をもとに PMDA に保険適用の拡大を申請し

ている。また後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更について活動し、成果を得た。

#### **aHUS(非典型溶血性尿毒症症候群)研究グループ**

非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) は血栓性微小血管症 (TMA) に含まれる疾患であり、補体関連因子の遺伝的・後天的異常により発症する。約 60% の症例で補体や補体制御因子 (H 因子、I 因子、C3、MCP) の遺伝子異常、H 因子に対する自己抗体の存在が報告されているが、近年では凝固系因子の異常も原因となりうるようになってきた。当研究班平成 29 年度は、aHUS コホート研究、蛋白質学的解析、遺伝学的解析、genotype-phenotype の関連性解析が行われた。研究班では aHUS 診断のための体系的な検査体制を構築しており、本邦最大の aHUS 患者コホートを有する唯一の組織である。集積患者数は日本国内における推定 aHUS 患者の約 8 割を占めることから、当研究班の解析データは、本邦における aHUS の疾患背景を反映すると言っても過言ではない。したがって、本研究班における aHUS サブグループの目的は、当研究班の解析システムを用いて aHUS の疫学的、蛋白質学的、遺伝学的なデータの集積を継続し、得られた知見をもとに本邦独自の aHUS 診療ガイドラインを作成することにある。東京大学医学部附属病院は平成 26 年 9 月に奈良県立医科大学輸血部から aHUS 患者コホートならびに



診断システムを引き継ぎ、2017年12月末までに180例の臨床的aHUS患者を同定した(うち77例は、奈良医大診断例)。200例近いaHUS症例のコホートを樹立したことにより、本邦におけるaHUS患者の実情をより正確に把握できることが可能となったと言える。

そしてaHUS解析活動を通して本邦におけるaHUS患者の独自の疾患背景が明らかにされつつある。これらの成果を通して、本邦独自の診療ガイドライン策定を目指す。今後も引き続き、各々の原因因子ごとの解析を推し進め、どういった症例にどのような治療が必要か、という点を明らかにしていく必要がある。

#### 特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る。)グループ

特発性血栓症は、先天性プロテインC(PC)、プロテインS(PS)、アンチトロンビン(AT)欠乏症により新生児・乳児期から成人期に亘って重篤な血栓症を発症する疾病である。若年性発症で、再発を繰り返し、重篤な機能障害を合併する。本サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症(VTE)のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診療ガイドの作成を通して、VTEの予知・予防の対策確立を目的としている。本疾患は平成29年4月より、厚労省の指定難病に「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因によるものに限る。)」として認定されたばかりである。した

がって、全国の症例数や実態は十分に把握しきれていない。本研究班は研究課題として「先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイドライン」の策定、「妊娠合併先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、を目指した。

個別研究として、新生児・乳児に発症するPC欠乏症の早期診断と治療管理法の確立、先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定、遺伝性血栓性素因の人種差および血中PS濃度の予測因子の解明、AT抵抗性(ATR)検出検査法の自動凝固検査機器への適用、ATRを示す無症候性の先天性プロトロンビン異常症の解析が行われた。

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

## 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	准教授
班員：	桑名正隆	日本医科大学	教授
	羽藤高明	愛媛大学医学部附属病院	准教授
	村田 満	慶應義塾大学医学部	教授
研究協力者：	藤村欣吾	安田女子大学	教授
	倉田義之	千里金蘭大学	
	高蓋寿朗	国立病院機構呉医療センター	科長
	柏木浩和	大阪大学大学院医学系研究科	講師
特別協力者（疫学班）：	島田直樹	国際医療福祉大学	教授

## グループ総括

分担研究者：富山佳昭

### 研究要旨

ITP に関して、1) 疫学調査、2) 治療の標準化（特に ITP 治療の参照ガイドの作成および改訂）、3) ITP 診断法の標準化と病態解析を基盤とした新規診断法の検討、を中核としてグループ研究および個別研究を行った。平成 17 年度から 26 年度（10 年間）の ITP 臨床調査個人票のデータを用いて消化管出血と脳出血の実態と脾臓摘出術（脾摘）の実施状況について調査した。治療の標準化に関しては、本研究班にて作成した「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」の改訂に向けて論点を整理し、治療アルゴリズム改定案の作成および主要な評価項目に関する検討を班員間で行った。さらに執筆活動や市民公開講座により、その啓発に努めた。個別研究では、診断に関して構成仕様を確立した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの感度を高める改良を行った。また、TPO を測定するサンドイッチ ELISA 系を構成する固相抗体、二次抗体、校正用基準物質の作成をほぼ終了した。

#### A. 研究目的

ITP は平成 26 年度までは特定疾患治療研究事業の対象疾患であり、平成 27 年 1 月よりは指定難病医療費助成制度の対象疾患として、難病に位置づけられる疾患である。本研究班では本疾患を克服すべくその疫学を初めとして、治療ならびに診断を向上させることを課題として継続して検討を重ねている。この目的のために、本研究班では ITP に関して、1) 疫学調査、2) 治療の標準化とその啓発（治療の参照ガイドの作成および改訂）、3) ITP 診断法の標準化と病態解析を基盤とした新規診断法の検討（特に病態に則した新たな診断基準の作成）を大きな柱として検討してきた。

平成 29 年度においては、特定疾患治療研究事業の対象疾患であることから、ITP の臨床疫学的研究を経年的に行い最近の ITP の臨床実態を明らかにした。治療に関しては治療プロトコールを履行するに当たり保

険医療上の制約を克服すると共に、本疾患の治療の標準化をめざし「成人 ITP 治療の参照ガイド」、「妊娠合併 ITP 治療の参照ガイド」の作成および公開を行ってきた。本年度は、「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」の改訂に向けて論点の整理など、改訂作業に取り組んだ。ITP に関する新たな診断法として、ELISPOT 法の改良、血中 TPO 測定キット開発に向けての検討を行った。

#### B. 研究方法

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

2. 治療の標準化に関しては、「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」、の公開と啓発に努めたが、今年度より 2012 年版の改訂準備に取り組んだ。方法としては、班員間でのメール審議を通して、参照ガイド改訂に向けての論点の整理、今後の改訂の進め方に関する討議を行った。

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

ITP の補助診断法として抗血小板抗体検出法である ELISPOT 法のキット化の推進、新たに企業とともに血中トロンボポエチン (TPO) 濃度測定キットの開発を開始した。

#### (倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### 1. ITP の疫学研究 (羽藤、倉田、島田)

##### 1. 臨床調査個人票登録数

平成 17 年度から 26 年度の 10 年間における新規登録患者数は 21,811 人であり、更新登録患者数はのべ 126,009 人であった。各年度別登録患者数は平成 19 年度を除くとほぼ一定の範囲の登録数であったが、平成 19 年度は ITP 医療受給者証保持者の約 12%の臨床調査個人票しか回収できておらず、極端に少なかった。これは都道府県から厚労省への臨床調査個人票データの入力率が低下したため、厚労省データベースのデータ量が減少したことによるものと推察された。

#### 2. 消化管出血 (下血)

重篤な出血合併症である消化管出血の発生状況とリスク因子について検討した。消化管出血発生時に近いデータを得るためには出血発生時に登録がなされる新規登録患者のデータベースを用いることとした。平成 17~26 年度の 10 年間における新規登録 ITP 患者 21,811 人中 1,291 人 (5.9%)に消化管出血がみられた。消化管出血は男性比率 52.3%とやや男性に多く、平均年齢は 67.5 歳と高齢者に多かった。血小板数は平均  $0.76$  万/ $\mu$ l であり、血小板数  $5000/\mu$ l 以下の患者が 59%と多数を占めていた。消化管出血非合併例と比較するため、カイ 2 乗検定による単変量解析を行うと、男性、60 歳以上、血小板数  $1$  万/ $\mu$ l 以下であることが消化管出血発症の有意なリスク因子であった。また、検査値では網状血小板比率上昇が有意に相関していたが、これは消化管出血の結果として引き起こされた変化の可能性もある。さらに、皮下出血や粘膜出血などの出血症状との相関を解析すると、単変量解析では紫斑、歯肉出血、鼻出血、血尿、月経過多、脳出血の存在が消化管出血の発生と相関していた。月経過多は閉経後の女性には当然見られないため、年齢バイアスが大きく関与していると推察された。月経過多を除いて単変量解析で有意差が見られた項目について多変量ロジスティック回帰解析を行うと、男性、60 歳以上、血小板数  $1$  万/ $\mu$ l 以下、歯肉出血、鼻出血、血尿が独立リスク因子として同定された。

#### 3. 脳出血

重篤な出血合併症である脳出血の発生状況とリスク因子について検討した。平成 17~26 年の 10 年間における新規登録 ITP 患者 21,811 人中 233 人 (1.1%)に脳出血が

みられた。脳出血例の男性比率 45.9%であり、平均年齢は 71.2 歳であった。血小板数は平均 1.03 万/ $\mu$ l であり、血小板数 5000/ $\mu$ l 以下の患者が 49%を占めていた。脳出血非合併例と比較するため、カイ 2 乗検定による単変量解析を行うと、男性、60 歳以上、血小板数 1 万/ $\mu$ l 以下であることが脳出血発症の有意なリスク因子であった。また、検査値では網状血小板比率上昇が有意に相関していた。さらに、皮下出血や粘膜出血などの出血症状との相関を解析すると、単変量解析では歯肉出血、鼻出血、血尿、消化管出血の存在が脳出血の発生と相関していた。これら単変量解析で有意差が見られた項目について多変量ロジスティック回帰解析を行うと、60 歳以上、血小板数 1 万/ $\mu$ l 以下、血尿が独立リスク因子として同定された。

#### 4. 脾臓摘出術（脾摘）

平成 17～26 年度の 10 年間における更新患者データベースから、脾摘実施日を基に脾摘を実施した患者を抽出した。この 10 年間に脾摘が行われた患者は 715 名であり、要治療 ITP 患者の約 0.7%が脾摘治療を受けていた。年度別の脾摘率は平成 17 年度から 20 年度の間は 0.92-1.08%であったが、その後、徐々に減少し、平成 21 年度から 26 年度の間は 0.61-0.77%に微減していた。脾摘患者の平均年齢は 49.4 $\pm$ 19.3 歳（6-88 歳、中央値 53 歳）、女性が 65%とやや多く、発症から脾摘までの期間は 5.0 $\pm$ 6.7 年（0-52 年、中央値 2 年）であった。発症から 5 年以内に脾摘された患者のうち、患者の 41%は発症から 1 年以内に脾摘されていた。脾摘を実施した年度における血小板最低値は 0.9 $\pm$ 0.9（0-7、中央値 0.6）万/ $\mu$ l であり、70%の症例が血小板数 1 万/ $\mu$ l 以下

であった。これらのことから、高度な血小板減少例で脾摘以外の治療法が無効な症例では診断から 1 年以内の早期に脾摘治療が選択されている可能性が示唆された。

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

研究班では、司法においても用いられる可能性のある拘束性の強いメッセージではなく、拘束性を若干弱めた形での治療の参照ガイドを作成し「臨床血液」誌（53 巻 4 号：433-442, 2012; 2012 年 4 月）に掲載し公開した。これらの成果はすべてオープンアクセス化している。

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

本研究班では、「参照ガイド」との名称を意識して使用しているが、その理由としては、エビデンスレベルが高くなく専門家のコンセンサスにて作成していること、ITP に用いられている薬剤に関して保険適用が無い薬剤が多いこと、があげられ、あくまで標準的な目安を提示している。個別の症例に対しては、個々に存在する状況を鑑み、総合的に診療を行うべきである。本年度においても研究班が作成した上記参照ガイドの普及、啓発に学会シンポジウムや総説原稿にて活発に行った。実際「臨床血液」誌のダウンロード数において、一位が成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012 年版であり、二位は妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイドであり、この 2 編が圧倒的なダウンロード数（約 1,500/月）であり、その使命を果たしていることが裏付けられた。さらに本年度では、新たに市民公開講座を開催し、ITP を初めとして当班会議が担当する血液難病についての教育と啓発に努め、参加者から高評価

を得た。

「参照ガイド」の改訂案としては、ステロイド不応例に対して、脾摘、TPO 受容体作動薬およびリツキシマブを 2nd Line として併記すること、各々の治療の有効性と安全性に関し文献的検索を行い、それぞれの治療の長所・短所を提示する必要があることで合意した。また 1st Line 治療としての副腎皮質ステロイドの投与方法、およびステロイド、脾摘、TPO 受容体作動薬、リツキシマブ以外の 3rd Line 治療に関する 2012 年以降の文献的検討を追加することで合意した。

治療の各論においては、i) 基本的には、前回の参照ガイドをベースに、最初に各治療について概論（有効性、安全性）を記載する、ii) 次に、一般的な投与方法を具体的に記載する、iii) 次に Question に関して、Answer（および可能であれば推奨度）を記載し、その後に解説を加える（文献の選択は筆者に一任するが、RCT は原則すべて検討する。それを基に推奨度を Grade に準拠し決定する。）ことを確認した。

### 3) 病態解析に基づいた ITP 診断法の標準化

#### 1) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定法（桑名、富山、柏木）

本年度は、プロトタイプではあるがキット化に成功している抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞（ITP-ELISPOT、MBL 社）を体外診断薬として精度を高めることを目的とした。まずキット化した ITP-ELISPOT 法を用いて、大阪大学にて IRB 審査後に、ITP 患者検体を用いたパイロットスタディを施行したが、残念ながら良好な結果が得られなかった。その原因は検出感度の低下であった。そのため、検出感度の改善を目的に以下の改良

を加えた。キメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生株 OPG2 を用いてキットと in-house 法を比較したところ、キットに比べて従来の in-house 法が検出感度が優れていることが確認された。そこで、プレート、基質液、標識二次抗体、Tween 20 洗浄の有無の条件を組み合わせ、最適な測定条件を検討した。その検討結果を踏まえ、キット仕様を変更し、感度を高める改良を行った。キット改良版を用いて ITP 患者 3 名と健常人 6 名で抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定法を測定したところ、全例でスポットが検出された。ただし、スポット数は健常人では  $2.0 \pm 0.4$  に対して ITP 患者で  $12.8 \pm 4.2$  と明らかに多かった。

#### 2) TPO 測定キットの開発（桑名、富山、柏木）

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

サンドイッチ ELISA の構成内容として以下の作成に成功した。

- ・固相抗体 - TN1 を安定産生する CHO 細胞株を作成した。培養上清中には固相化した rTPO、抗マウス IgG 抗体に結合活性を有するマウス抗ヒト TPO モノクローナル抗体の産生を確認した。

- ・rTPO - TN1 が認識するエピトープは高次構造依存的であることから、糖鎖修飾を含めた native な構造を持つ rTPO を取得する必要がある。そこで、組換え rTPO を安定産生する CHO 細胞株を限界希釈法で複数樹立した。その中で安定して増殖し、rTPO を発

現する細胞株 TPO-50-1-9 を選択した。培養上清を抗 His タグ抗体によるアフィニティで精製することで、90%以上の純度の高い rTPO を得ることができた。免疫プロットでは抗 His タグ抗体、抗 TPO 抗体と反応する約 80kDa の蛋白 (rTPO) が確認された。

・二次抗体 - TPO-50-1-9 細胞株上清から精製した rTPO をウサギに免疫し、脾臓から抗体ファージライブラリを構築した。rTPO を抗原としたパンニングにより、結合親和性の高いクローンを複数取得した。現在、そのうち 4 クローンの IgG 組換え抗体を作成中である。

#### D. 考案

ITP の診療は、近年大きく変化している。新たに ITP に対するリツキシマブの医師主導型治験の成績も本班員が中心となり遂行しその成果を発表している。リツキシマブは 2017 年 3 月に ITP に対して保険収載されたこと、さらに 2012 年に参照ガイドを公開してから 5 年が経過していることより、改訂の至適時期であると考えている。

ステロイド不応性の ITP 患者における 2nd Line 治療としての TPO 受容体作動薬の安全性に関しては、メタアナリシスの結果から (Wang, et al. Sci Rep. 2016 Dec 19;6:39003)、その有効性と安全性が確立されてきている。またリツキシマブに関しては、欧米の報告では短期的には 60%程度、長期的には 20-30%程度の有効率であり、本邦における臨床治験においても 30%程度の有効率が報告されている (Miyakawa Y, et al. Int J Hematol 2015, 102: 654-661)。脾摘に関しては、現時点においても最も有効率が高い治療法ではあるが、敗血症や血栓症の頻度の増加が報告されてきている (Boyle S et al. Blood

2013;121:4782-4790)。以上のような点から、2nd Line 治療として、TPO 受容体作動薬、リツキシマブ、脾摘の選択は個々の症例毎に考慮することが望ましいということで合意を得た。今後、それぞれの治療の有効性、安全性を含めた特徴を文献的に考察し提示していく予定である。また、1st Line 治療および 3rd Line 治療に関しても、最新の情報を整理して提示し、臨床家が使用しやすい参照ガイドの改訂を目指したい。

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

以上のように今後も、研究班として確実に成果をあげ正しい情報を発信していく予定である。

#### E. 結論

ITP の現状を把握し、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「ITP 治療の参照ガイド」を改訂し、継続して情報発信に努めていく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tomiyama Y. Autoantigens in ITP. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p53-62, 2017
- 2) Tomiyama Y. Thrombopoietin



- receptor agonists. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p171-181, 2017
- 3) Tomiyama Y, Differential diagnosis: Hypoplastic thrombocytopenia. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p107-114, 2017
  - 4) Kashiwagi H, Tomiyama Y. ITP in adults. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p75-84, 2017
  - 5) Kashiwagi H, Tomiyama Y. Diagnosis in General. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p87-95, 2017
  - 6) Hato T, Kurata Y: Epidemiology. Autoimmune Thrombocytopenia. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p41-49, 2017
  - 7) Hato T: Transfusion. Autoimmune Thrombocytopenia. (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, pp191-197, 2017
  - 8) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kiyokawa T, Nagamaine K., Fujita J, Maeda T, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. Immature platelet fraction (IPF) as a predictive value for thrombopoietic recovery after allogeneic stem cell transplantation. Int J Hematol, 2018;107(3):320-326.
  - 9) Morikawa Y, Kato H, Kashiwagi H, Nishiura N, Akuta K, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Protease-activated receptor-4 (PAR4) variant influences on platelet reactivity induced by PAR4-activating peptide through altered Ca<sup>2+</sup> mobilization and ERK phosphorylation in healthy Japanese subjects. Thromb Res. 162:44-52, 2018
  - 10) Casey N, Fujiwara H, Azuma T, Murakami Y, Yoshimitsu M, Masamoto I, Nawa Y, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: An unusual, CD4 and CD8 dual-positive, CD25 negative, tumor cell phenotype in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. Leuk Lymphoma 2018 in press
  - 11) Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. Blood Coagul Fibrin 28:189-192, 2017
  - 12) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 臨床検査 61: 124-130, 2017
  - 13) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 内科学第 11 版 (矢崎義雄総編集)、朝倉書店、東京、2017, p2023-2025
  - 14) 富山佳昭. ワンポイントアドバイス. 出血傾向のない見かけ上の血小板減少症. Medical Practice34:1211, 2017
  - 15) 富山佳昭. ITP-最新の話題-. 臨床血液 58:537-541, 2017
  - 16) 富山佳昭. 参照ガイドに基づいた成人

特発性血小板減少性紫斑病の治療戦略.  
臨床血液 58:843-848, 2017

- 17) 酒井道生、天野景裕、小川孔幸、高見昭良、徳川多津子、野上恵嗣、羽藤高明、藤井輝久、松本功、松本剛史 後天性血友病A診療ガイドライン 2017年改訂版 日本血栓止血学会誌 28:715-747, 2017
- 18) 羽藤高明、横山健次、國島伸治 2016 Hot Topics 血小板分野 日本血栓止血学会誌 28:79-82, 2017
- 19) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2017-2018 pp129-136, 2017 南江堂 東京
- 20) 羽藤高明 HLA 検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp137-142, 2017 南江堂 東京

## 2. 学会発表

- 1) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** (Poster) Kato H, Ito Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Akuta K, Nishiura N, Honda S, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiya Y. Complete failure of integrin  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding tendency in a patient with Kindlin-3 deficiency.
- 2) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** (Poster) Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N,

Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiya Y. Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 expression with non function blocking anti- $\alpha$ Ib $\beta$ 3 antibodies.

- 3) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** (Poster) Morikawa Y, Kato H, Akuta K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiya Y. The association of PAR4 polymorphism with human platelet reactivity in Japanese.
- 4) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** Yamanouchi J, Hato T, Ikeda Y, Takeda H, Yasukawa M: A heterozygous mutation of G-protein-coupled receptor 25 in a family with thrombocytopenia and thrombosis.
- 5) **The 32<sup>nd</sup> Annual Congress of Korean Society on Thrombosis and Hemostasis (2017.9.8, Seoul National University, Seoul, Korea).** Tomiya Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia.
- 6) **第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (2017.6.8-10. 名古屋国際会議場)** (口演) 加藤恒、伊藤康彦、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、金倉讓、富山佳昭. Kindlin-3 欠損に起因

- した血小板無力症/白血球接着不全症 (LAD-III) の解析
- 7) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (2017. 6. 8-10. 名古屋国際会議場) (口演) 芥田敬吾、柏木浩和、湯尻俊昭、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉讓、富山佳昭。 GPIIb/IIIa の著明な発現低下を認めた後天性血小板無力症.
- 8) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (2017. 6. 8-10. 名古屋国際会議場) 山之内純、池田祐一、羽藤高明。 ゲノム定量PCR 法と X 染色体不活化偏位解析が有用であった女性血友病 B 患者の遺伝子解析
- 9) 第 79 回日本血液学会学術集会 (2017. 10. 20-22, 東京フォーラム、東京、木崎昌弘) (口演) 加藤恒、伊藤康彦、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、本田繁則、小亀浩市、金倉讓、富山佳昭。  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 activation kinetics reveals distinctive roles of critical molecules in inside-out signaling.
- 10) 第 79 回日本血液学会学術集会 (2017. 10. 20-22, 東京フォーラム、東京、木崎昌弘) (口演) 芥田敬吾、柏木浩和、湯尻俊昭、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉讓、富山佳昭。 非機能阻害抗体により血小板表面の著明なインテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 発現低下を来した後天性血小板無力症
- 11) 第 79 回日本血液学会学術集会 (2017. 10. 20-22, 東京フォーラム、東京、木崎昌弘) 山之内純、羽藤高明、池田祐一、竹田浩之、安川正貴 先天性血小板減少症と血栓症を有する家系における GPR25 遺伝子変異
- 12) 第 24 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム (2017. 10. 13, ホルトホール大分, 大分, 佐分利能生) (シンポジウム) 富山佳昭。 血小板の質的・量的異常症と血小板輸血
- 13) 第 24 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム (2017. 10. 13, ホルトホール大分, 大分, 佐分利能生) 羽藤高明 急性白血病における血小板輸血 第 24 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム 2017. 10. 13 大分
- 14) 羽藤高明 血小板減少と出血傾向 第 11 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2017. 1. 21 東京
- 【市民公開講座】
- 1) 市民公開講座 血液の難病に挑む-出血と血栓に関連する血液難病について- (2018. 2. 3. 大手町サンケイプラザ、東京、村田満) 富山佳昭：特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

## 成人 ITP 治療ガイド改訂に向けての検討

研究分担者：富山佳昭 大阪大学医学部附属病院 輸血部

研究協力者：柏木浩和 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

### 研究要旨

当研究班から 2012 年に発表された「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」は、実臨床において広く利用されてきている。しかし、参照ガイド作成後、既に 5 年が経過し、当時保険収載された直後であったトロンボポエチン受容体作動薬の長期的な有効性や安全性に関するデータが蓄積されてきた。また 2017 年には新たにリツキシマブが保険適用となったこともあり、参照ガイドの改訂が必要な時期となってきている。本年度は、ガイド改訂に向けて論点を整理し、治療アルゴリズム改定案の作成および主要な評価項目に関する検討を班員間で行った。

#### A. 研究目的

当研究班から「成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版」が発表されてから、既に 5 年以上が経過しようとしている。この 5 年間に於いて成人 ITP 治療の治療適応、治療目標、治療の流れにおいて大きな変化はなく、大筋において本参照ガイドは現時点でも有用なものであると考える。ただ、2012 年は承認発売された直後であったトロンボポエチン(TPO)受容体作動薬も、その長期的な有効性と安全性が明らかにされ、使用例が増えてきている。また、欧米のガイドラインではステロイド不応例の 2nd Line に位置づけられていたリツキシマブが、2017 年、本邦において保険適用となった。一方で、従来、不動の 2nd Line 治療に位置付けられていた脾摘は、TPO 受容体作動薬の普及および感染症や血栓症の増加などの問題点が指摘されてきたこともあり、実施例は減少傾向にある。2012 年版ガイドでは 2nd Line として脾摘を推奨し、TPO 受容体作動薬およびリツキシマブは脾摘不応の場合の 3rd Line として推奨して

いるが、以上のような状況から 2nd Line 治療に関し、臨床現場ではその選択に悩む症例が増えてきている。そこで、本改訂の第 1 の目的は、ステロイド不応例の 2nd Line 治療として脾摘、TPO 受容体作動薬およびリツキシマブをどのように位置づけるか、各々の治療の有効性と安全性に関し、文献的検索を行い、その指針を提示したい。また、新規発症 ITP におけるステロイド療法においても、主に海外からデキサメタゾン大量療法の有効性が報告されてきている。また 3rd Line 治療に関しても新たな知見が蓄積されつつある。これらの情報を整理し、参照ガイドに提示していきたい。

#### B. 研究方法

班員間でのメール審議を通して、参照ガイド改訂に向けての論点の整理、今後の改訂の進め方に関する討議を行った。

#### C. 研究結果

ステロイド不応例に対して、脾摘、TPO 受容体作動薬およびリツキシマブを 2nd

Lineとして併記すること、各々の治療の有効性と安全性に関し文献的検索を行い、それぞれの治療の長所・短所を提示する必要があることで合意した(下図)。また1st Line治療としての副腎皮質ステロイドの投与方法、およびステロイド、脾摘、TPO受容体作動薬、リツキシマブ以外の3rd Line治療に関する2012年以降の文献的検討を追加することで合意した。

治療の各論においては、i) 基本的には、前回の参照ガイドをベースに、最初に各治療について概論(有効性、安全性)を記載する、ii) 次に、一般的な投与方法を具体的に記載する、iii) 次にQuestionに関して、Answer(および可能であれば推奨度)を記載し、その後解説を加える(文献の選択は筆者に一任するが、RCTは原則すべて検討する。それを基に推奨度をGradeに準拠し決定する。)ことを確認した。

#### D. 考察

ステロイド不応性のITP患者における2nd Line治療としてのTPO受容体作動薬の安全性に関しては、メタアナリシスの結果から(Wang, et al. Sci Rep. 2016 Dec 19;6:39003)、その有効性と安全性が確立されてきている。また本邦において保険適用となったリツキシマブに関しては、欧米の報告では短期的には60%程度、長期的には20-30%程度の有効率であり、本邦における臨床治験においても30%程度の有効率が報告されている(Miyakawa Y, et al. Int J Hematol 2015, 102: 654-661)。脾摘に関しては、現時点においても最も有効率が高い治療法ではあるが、敗血症や血栓症の頻度の増加が報告されてきている(Boyle S et al. Blood 2013;121:4782-4790)。以上のよ

うな点から、2nd Line治療として、TPO受容体作動薬、リツキシマブ、脾摘の選択は個々の症例毎に考慮することが望ましいということで合意を得た。今後、それぞれの治療の有効性、安全性を含めた特徴を文献的に考察し提示していく予定である。また、1st Line治療および3rd Line治療に関しても、最新の情報を整理して提示し、臨床家が使用しやすい参照ガイドの改訂を目指したい。

#### E. 結論

ITP治療参照ガイド改訂に向けて、その大枠に関する検討を終了した。今後、個々の治療に関するガイドの作成を進めていく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tomiyama Y. Autoantigens in ITP. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p53-62, 2017
- 2) Tomiyama Y. Thrombopoietin receptor agonists. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p171-181, 2017
- 3) Tomiyama Y. Differential diagnosis: Hypoplastic thrombocytopenia. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p107-114, 2017
- 4) Kashiwagi H, Tomiyama Y. ITP in adults. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y,

- Tomiyaama Y ed.) Springer nature, Singapore, p75-84, 2017
- 5) Kashiwagi H, Tomiyama Y. Diagnosis in General. “Autoimmune thrombocytopenia” (Ishida Y, Tomiyama Y ed.) Springer nature, Singapore, p87-95, 2017
  - 6) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kiyokawa T, Nagamaine K., Fujita J, Maeda T, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyaama Y. Immature platelet fraction (IPF) as a predictive value for thrombopoietic recovery after allogeneic stem cell transplantation. Int J Hematol, 2018;107(3):320-326.
  - 7) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 臨床検査 61: 124-130, 2017
  - 8) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 内科学第11版(矢崎義雄総編集), 朝倉書店, 東京, 2017, p2023-2025
  - 9) 富山佳昭. ワンポイントアドバイス. 出血傾向のない見かけ上の血小板減少症. Medical Practice34:1211, 2017
  - 10) 富山佳昭. ITP-最新の話題-. 臨床血液 58:537-541, 2017
  - 11) 富山佳昭. 参照ガイドに基づいた成人特発性血小板減少性紫斑病の治療戦略. 臨床血液 58:843-848, 2017
2. 学会発表
- 1) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** (Poster) Kato H, Ito Y, Kashiwagi H, Morikawa Y, Akuta K, Nishiura N, Honda S, Kokame K, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyaama Y. Complete failure of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding tendency in a patient with Kindlin-3 deficiency.
  - 2) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** (Poster) Akuta K, Kashiwagi H, Yujiri T, Nishiura N, Morikawa Y, Kato H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyaama Y. Acquired Glanzmann thrombasthenia due to marked reduction of surface  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 expression with non function blocking anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 antibodies.
  - 3) **International Society on Thrombosis and Hemostasis 2017 Congress (2017.7.8-13, City Cube Berlin and Messe Berlin, Berlin, Germany)** (Poster) Morikawa Y, Kato H, Akuta K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyaama Y. The association of PAR4 polymorphism with human platelet reactivity in Japanese.
  - 4) **The 32<sup>nd</sup> Annual Congress of Korean Society on Thrombosis and Hemostasis (2017.9.8, Seoul National University, Seoul, Korea).** Tomiyaama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia.
  - 5) **第 39 回日本血栓止血学会学術集会**

- (2017. 6. 8-10. 名古屋国際会議場)  
 (口演)加藤恒、伊藤康彦、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、金倉讓、富山佳昭. Kindlin-3 欠損に起因した血小板無力症/白血球接着不全症 (LAD-III) の解析
- 6) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会 (2017. 6. 8-10. 名古屋国際会議場)  
 (口演)芥田敬吾、柏木浩和、湯尻俊昭、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉讓、富山佳昭. GPIIb/IIIa の著明な発現低下を認めた後天性血小板無力症.
- 7) 第 79 回日本血液学会学術集会 (2017. 10. 20-22, 東京フォーラム、東京、木崎昌弘) (口演)加藤恒、伊藤康彦、柏木浩和、森川陽一郎、芥田敬吾、西浦伸子、本田繁則、小亀浩市、金倉讓、富山佳昭. aIIb3 activation kinetics reveals distinctive roles of critical molecules in inside-out signaling.
- 8) 第 79 回日本血液学会学術集会 (2017. 10. 20-22, 東京フォーラム、東京、木崎昌弘) (口演)芥田敬吾、柏木浩和、湯尻俊昭、西浦伸子、森川陽一郎、加藤恒、本田繁則、金倉讓、富山佳昭. 非機能阻害抗体により血小板表面の著明なインテグリン aIIb3 発現低下を来した後天性血小板無力症
- 9) 第 24 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム (2017. 10. 13, ホルトホール大分, 大分, 佐分利能生) (シンポジウム) 富山佳昭. 血小板の質的・量的異常症と血小板輸血
- 【市民公開講座】
- 1) 市民公開講座 血液の難病に挑む-出血と血栓に関連する血液難病について- (2018. 2. 3. 大手町サンケイプラザ、東京、村田 満) 富山佳昭: 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)
- G. 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

## ITP診断に有用な臨床検査法の実用化に向けた試み

研究分担者：桑名正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科 教授

研究分担者：富山佳昭 大阪大学医学部附属病院輸血部 部長

### 研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断には、いまだ血小板減少をきたす他疾患の除外に主眼を置いた基準が用いられている。平成 16 年度に本研究班が ITP に感度または特異度の高い臨床検査を組み合わせた診断基準案を提唱したが、含まれる項目の多くが保険診療上測定できない。そこで、すでにキット化に成功している抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞およびトロンボポエチン（TPO）測定法の体外診断薬としての承認申請を目指した検討を進めている。本年度は、構成仕様を確立した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットの感度を高める改良を行った。また、TPO を測定するサンドイッチ ELISA 系を構成する固相抗体、二次抗体、校正用基準物質の作成をほぼ終了した。これらキット最終仕様のカットオフ値の設定、保存性や安定性など詳細な条件設定を行うプレ臨床試験の実施に向けた準備が完了した。

#### A. 研究目的

我が国では 1990 年に厚生省研究班により作成された特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断基準が現状も用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり骨髓検査で巨核球の減少や他系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他疾患の除外が診断根拠となる。血小板減少をきたす全ての疾患を診療で除外することは現実的に不可能で、そのために数多くの検査を行うことは医療経済上好ましくない。そこで、平成 16 年度に本研究班で多施設前向き研究を実施し、ITP に感度、特異度の高い臨床検査を組み合わせて積極的に ITP を診断する基準案を作成した。本基準は侵襲性の低い血液検査のみで迅速に結果が得られ、感度 93%、特異度 75%と良好な結果を示した。しかしながら、項目に含まれる抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb/IIIa

抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチン（TPO）は保険診療で測定できない。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、網血小板比率、血漿 TPO は研究目的での受託測定が可能になったが、検査費用が発生することから一般診療で普及していない。これら問題点を解決するためには再現性・汎用性の高い臨床検査キットの作成およびその体外診断用医薬品としての承認が不可欠である。そこで、すでにキット化されている抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出試薬（ITP-ELISPOT; MBL 社）、TPO 測定試薬（エスアールエル社）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たし、体外診断用医薬品として申請することを目的とした検討を行ってきた。GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検出キットについては、昨年度までに陽性コントロールや標準化のために必要な校正用基準物質としてヒト GPIIb/IIIa に対するキメラ抗体産生細胞



および陽性・陰性コントロールビーズの作成に成功し、キット構成仕様を確立した。また、TPO 測定は 2 種類の抗 TPO 抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA として測定系が構築されているが、現状でまだキット化されていない。そこで、今回新たに TPO 測定系を体外診断用医薬品として申請するために必要なキット仕様の構築を同時に行う。

## B. 研究方法

### 1) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定法

キメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生株 OPG2 を用いて昨年度までに構築したキット仕様の性能を評価した。一部の実験では ITP 患者および健康人サンプルを用いて抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞を測定した。また、従来研究室で測定してきた方法 (in-house 法) とキットでの測定を同時に行い比較した。さらに、測定結果の差に関与する要因を検討するため、プレート (96 穴プレート、8 列スプリットプレート)、基質液 (キット、in-house 法)、標識二次抗体 (Capel 社製、MBL 社製)、Tween 20 洗浄 (有、無) の複数の条件を組み合わせた検討を行った。

### 2) TPO 測定法

TPO 測定系はサンドイッチ ELISA であることから、その構成内容として固相抗体 (抗ヒト TPO 抗体)、二次抗体 (標識抗ヒト TPO 抗体)、較正用基準物質としてリコンビナントヒト TPO (rTPO) が必要である。固相抗体はマウス抗ヒト TPO モノクローナル抗体クローン TN1 の配列を入手し、それを基に発現ベクターを構築して CHO 細胞に遺伝子導入して安定細胞株を樹立した。さらに、ヒト TPO をコードする遺伝子の C 末端に His タグを付加した

ベクターを作成し、CHO 細胞に遺伝子導入して rTPO を安定的に産生する細胞株を樹立した。また、得られた rTPO をウサギに免疫して、抗体ファージライブラリを構築し、パンニングにより rTPO に結合親和性の高いクローンを得た。

### (倫理面に対する配慮)

本研究では一部でヒト検体を使用することから、学内倫理委員会で承認済みである。患者本人に対して研究内容を説明し、文書による同意を得た上で実施した。

## C. 研究結果

### 1) 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定法

キメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生株 OPG2 を用いてキットと in-house 法を比較したところ、キットに比べて in-house 法の方でスポット数が  $2.2 \pm 0.3$  倍多く検出された。また、in-house 法ではキットに比べてスポットが大きく、より鮮明であった。そこで、プレート、基質液、標識二次抗体、Tween 20 洗浄の有無の条件を組み合わせ、最適な測定条件を検討した。その結果、プレートでは 8 列スプリットプレート、基質液は in-house 法、標識二次抗体は MBL 社製、Tween 20 洗浄有りの条件でスポットがより明瞭であった。そこで、これら条件を組み合わせ、キット仕様を変更し、感度を高める改良を行った。キット改良版を用いて ITP 患者 3 名と健康人 6 名で抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定法を測定したところ、全例でスポットが検出された。ただし、スポット数は健康人では  $2.0 \pm 0.4$  に対して ITP 患者で  $12.8 \pm 4.2$  と明らかに多かった。

### 2) TPO 測定法

サンドイッチ ELISA の構成内容として以下の作成に成功した。

・固相抗体 - TN1 を安定産生する CHO 細胞株を作成した。培養上清中には固相化した rTPO、抗マウス IgG 抗体に結合活性を有するマウス抗ヒト TPO モノクローナル抗体の産生を確認した。

・rTPO - TN1 が認識するエピトープは高次構造依存的であることから、糖鎖修飾を含めた native な構造を持つ rTPO を取得する必要がある。そこで、組換え rTPO を安定産生する CHO 細胞株を限界希釈法で複数樹立した。その中で安定して増殖し、rTPO を発現する細胞株 TPO-50-1-9 を選択した。培養上清を抗 His タグ抗体によるアフィニティーで精製することで、90%以上の純度の高い rTPO を得ることができた。免疫プロットでは抗 His タグ抗体、抗 TPO 抗体と反応する約 80kDa の蛋白 (rTPO) が確認された。

・二次抗体-TPO-50-1-9 細胞株上清から精製した rTPO をウサギに免疫し、脾臓から抗体ファージライブラリを構築した。rTPO を抗原としたパンニングにより、結合親和性の高いクローンを複数取得した。現在、そのうち 4 クローンの IgG 組換え抗体を作成中である。

#### D. 考察

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットを改良することで感度を上昇させることができた。パイロット検討では ITP 患者末梢血サンプルで多数のスポットが検出できたが、健常人サンプルでも少数のスポットが観察された。そのため、診断用医薬品として開発するためにはカットオフの設定が必要になる。今後は ITP に加えて骨髄異形成症候群、再生不良性貧血など疾患対照、さらには健常人検体を用いた検討で、至適なカットオフを設定する必要がある。

一方、TPO 測定系の構成する固相抗体、二次抗体、校正用基準物質 rTPO の作成はほぼ終了した。これらを組み合わせたキット構成を行い、改良版抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットとともにヒト検体を用いた検証を行いたい。その結果に基づき最終仕様を確定し、多施設での臨床性能試験を実施する予定である。

平成 16 年度に提案した ITP 診断基準案に含まれる抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、TPO 測定に、自動血球計測器による幼若血小板比率を加えることで、わが国の保険診療下で実施可能な診断基準の策定を今後も進める予定である。

#### E. 結論

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞および TPO の測定キットのキット構成仕様がほぼ完了した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

## 臨床調査個人票集計による特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査

研究分担者：羽藤高明 愛媛大学医学部附属病院輸血・細胞治療部 特任教授

研究協力者：島田直樹 国際医療福祉大学基礎医学研究センター 教授

研究協力者：倉田義之 千里金蘭大学看護学部内科学 客員教授

### 研究要旨

平成 17 年度から 26 年度（10 年間）の ITP 臨床調査個人票のデータを用いて消化管出血と脳出血の実態と脾臓摘出術（脾摘）の実施状況について調査した。消化管出血および脳出血の頻度はそれぞれ 5.9%, 1.1%であり、これら重篤な出血のリスク因子として男性、60 歳以上、血小板数  $1 \text{ 万}/\mu\text{l}$  以下、血尿が同定された。脾摘率は約 0.7%であり、発症から脾摘までの期間中央値は 2 年であった。

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 17 年度から 26 年度の間提出された ITP 症例の臨床調査個人票をもとに入力されたデータの提供を受けた。このデータを用いて重篤な出血をきたすリスク因子の同定と脾臓摘出術（脾摘）の実施状況について調査した。（倫理面への配慮）

本疫学研究の施行に当たっては愛媛大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得た。

#### C. 研究結果および考察

##### 1. 臨床調査個人票登録数

平成 17 年度から 26 年度の 10 年間における新規登録患者数は 21,811 人であり、更新登録患者数はのべ 126,009 人であった。各年度別登録患者数は平成 19 年度を除くとほぼ一定の範囲の登録数であったが、平成 19 年度は ITP 医療受給者証保持者の約 12%の臨床調査個人票しか回収できておらず、極端に少なかった。これは都道府県から厚労省への臨床調査個人票データの入力率が低下したため、厚労省データベースのデータ量が減少したことによるものと推察された。

##### 2. 消化管出血（下血）

重篤な出血合併症である消化管出血の発生状況とリスク因子について検討した。消化管出血発生時に近いデータを得るためには出血発生時に登録がなされる新規登録患者のデータベースを用いることとした。平成 17～26 年度の 10 年間における新規登録 ITP 患者 21,811 人中 1,291 人（5.9%）に消化管出血がみられた。消化管出血は男性比率 52.3%

とやや男性に多く、平均年齢は 67.5 歳と高齢者に多かった。血小板数は平均 0.76 万/ $\mu$ 1 であり、血小板数 5000/ $\mu$ 1 以下の患者が 59%と多数を占めていた。消化管出血非合併例と比較するため、カイ 2 乗検定による単変量解析を行うと、男性、60 歳以上、血小板数 1 万/ $\mu$ 1 以下であることが消化管出血発症の有意なリスク因子であった。また、検査値では網状血小板比率上昇が有意に相関していたが、これは消化管出血の結果として引き起こされた変化の可能性もある。さらに、皮下出血や粘膜出血などの出血症状との相関を解析すると、単変量解析では紫斑、歯肉出血、鼻出血、血尿、月経過多、脳出血の存在が消化管出血の発生と相関していた。月経過多は閉経後の女性には当然見られないため、年齢バイアスが大きく関与していると推察された。月経過多を除いて単変量解析で有意差が見られた項目について多変量ロジスティック回帰解析を行うと、男性、60 歳以上、血小板数 1 万/ $\mu$ 1 以下、歯肉出血、鼻出血、血尿が独立リスク因子として同定された。

### 3. 脳出血

重篤な出血合併症である脳出血の発生状況とリスク因子について検討した。平成 17～26 年の 10 年間に於ける新規登録 ITP 患者 21,811 人中 233 人 (1.1%)に脳出血がみられた。脳出血例の男性比率 45.9%であり、平均年齢は 71.2 歳であった。血小板数は平均 1.03 万/ $\mu$ 1 であり、血小板数 5000/ $\mu$ 1 以下の患者が 49%を占めていた。脳出血非合併例と比較するため、カイ 2 乗検定による単変量解析を行うと、男性、60 歳以上、血小板数 1 万/ $\mu$ 1 以下であることが脳出血発症の有意なリスク因子であった。また、検査値では

網状血小板比率上昇が有意に相関していた。さらに、皮下出血や粘膜出血などの出血症状との相関を解析すると、単変量解析では歯肉出血、鼻出血、血尿、消化管出血の存在が脳出血の発生と相関していた。これら単変量解析で有意差が見られた項目について多変量ロジスティック回帰解析を行うと、60 歳以上、血小板数 1 万/ $\mu$ 1 以下、血尿が独立リスク因子として同定された。

### 4. 脾臓摘出術 (脾摘)

平成 17～26 年度の 10 年間に於ける更新患者データベースから、脾摘実施日を基に脾摘を実施した患者を抽出した。この 10 年間に脾摘が行われた患者は 715 名であり、要治療 ITP 患者の約 0.7%が脾摘治療を受けていた。年度別の脾摘率は平成 17 年度から 20 年度の間は 0.92-1.08%であったが、その後、徐々に減少し、平成 21 年度から 26 年度の間は 0.61-0.77%に微減していた。脾摘患者の平均年齢は 49.4  $\pm$  19.3 歳 (6-88 歳、中央値 53 歳)、女性が 65%とやや多く、発症から脾摘までの期間は 5.0  $\pm$  6.7 年 (0-52 年、中央値 2 年) であった。発症から 5 年以内に脾摘された患者のうち、患者の 41%は発症から 1 年以内に脾摘されていた。脾摘を実施した年度における血小板最低値は 0.9  $\pm$  0.9 (0-7、中央値 0.6) 万/ $\mu$ 1 であり、70%の症例が血小板数 1 万/ $\mu$ 1 以下であった。これらのことから、高度な血小板減少例で脾摘以外の治療法が無効な症例では診断から 1 年以内の早期に脾摘治療が選択されている可能性が示唆された。

## D. 結語

1. ITP で消化管出血を併発する率は 5.9%

であり、男性、60歳以上、血小板数1万/ $\mu$ l以下、歯肉出血、鼻出血、血尿が独立リスク因子として同定された。

2. ITPで脳出血を併発する率は1.1%であり、60歳以上、血小板数1万/ $\mu$ l以下、血尿が独立リスク因子として同定された。
3. 平成17~26年の10年間における脾摘実施率は約0.7%であり、近年、徐々に低下傾向にある。
4. 脾摘患者の平均年齢は53歳と比較的高齢で、血小板数中央値は0.6万/ $\mu$ lと極めて低く、発症から脾摘までの中央値は2年であるが1年以内の症例が相当数あったことから、脾摘以外の治療に不応で高度の血小板減少が持続している患者に脾摘が実施されている可能性が示唆された。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Casey N, Fujiwara H, Azuma T, Murakami Y, Yoshimitsu M, Masamoto I, Nawa Y, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M: An unusual, CD4 and CD8 dual-positive, CD25 negative, tumor cell phenotype in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2018 in press
- 2) Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul Fibrin*

28:189-192, 2017

- 3) 酒井道生、天野景裕、小川孔幸、高見昭良、徳川多津子、野上恵嗣、羽藤高明、藤井輝久、松本功、松本剛史 後天性血友病A診療ガイドライン 2017年改訂版 *日本血栓止血学会誌* 28:715-747, 2017
- 4) 羽藤高明、横山健次、國島伸治 2016 *Hot Topics 血小板分野 日本血栓止血学会誌* 28:79-82, 2017

##### 2. 著書

- 1) Hato T, Kurata Y: *Epidemiology. Autoimmune Thrombocytopenia* pp41-49, 2017 Springer
- 2) Hato T: *Transfusion. Autoimmune Thrombocytopenia* pp191-197, 2017 Springer
- 3) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2017-2018 pp129-136, 2017 南江堂 東京
- 4) 羽藤高明 HLA検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp137-142, 2017 南江堂 東京

##### 2. 学会発表

- 1) 羽藤高明 血小板減少と出血傾向 第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2017.1.21 東京
- 2) 羽藤高明 急性白血病における血小板輸血 第24回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム 2017.10.13 大分
- 3) 山之内純、池田祐一、羽藤高明 ゲノム定量PCR法とX染色体不活化偏位解析が有用であった女性血友病B患者の遺伝子解析 第39回日本血栓止血学会学

術集会 2017.6.9 名古屋

- 4) Ikeda, Y., Yamanouchi, J., Hato, T., Yasukawa, M: A favorable subpopulation of MDS with thrombocytopenia may have high serum thrombopoietin levels. 2017 Highlight of ASH in Asia-Pacific, 2017.3.10-12, Hong Kong, China
- 5) Yamanouchi J, Hato T, Ikeda Y, Takeda H, Yasukawa M: A heterozygous mutation of G-protein-coupled receptor 25 in a family with thrombocytopenia and thrombosis. The 26th congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2017.7.10 Berlin, Germany
- 6) Nakao A, Yamanouchi J, Hato T, Ishii E, Yasukawa M: Participation of

clonical psychologist in a non-hemophilic treatment center. The 26th congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2017.7.11 Berlin, Germany

- 7) 山之内純、羽藤高明、池田祐一、竹田浩之、安川正貴 先天性血小板減少症と血栓症を有する家系における GPR25 遺伝子変異 第 79 回日本血液学会学術集会 2017.10.22 東京

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

TTP（血栓性血小板減少性紫斑病）サブグループ報告書

グループリーダー：	松本雅則	奈良県立医科大学輸血部	教授
班員：	宮川義隆	埼玉医科大学総合診療内科・血栓止血センター	教授
	小亀浩市	国立循環器病研究センター研究所 分子病態部	部長
研究協力者：	八木秀男	奈良県総合医療センター血液・腫瘍内科	部長
	日笠 聡	兵庫医科大学 血液内科	講師
	上田恭典	倉敷中央病院 血液内科	部長
	森木隆典	慶應義塾大学	准教授
	和田英夫	三重大学医学部 臨床検査医学	准教授
	宮田敏行	国立循環器病研究センター	前部長
	藤村吉博	日本赤十字社近畿ブロック血液センター	所長

## グループ総括

分担研究者：松本雅則

### 研究要旨

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

本年度は、1) TMA レジストリーの継続、2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続、3) ADAMTS13 検査(活性とインヒビター)の保険適用の取得、4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大、5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の撤廃、6) TTP 診療ガイドラインの改定、を計画として設定した。

このうち TTP 診療ガイド 2017 の中で今後解決すべき課題としている 3) -5) を本年度の重点項目とした。平成 29 年度第 2 回診療報酬調査専門組織・医療技術評価分科会の資料によると、診療報酬改定において対応する優先度が高い技術として 3) と 5) が挙げられており、2018 年度の保険改定で認められることになった。4) に関しては医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に要望している。1) 2) に関しては、1998 年以降継続しており、1) の TMA 症例数は本年度 54 例増加し、1474 例となった。このうち、ADAMTS13 活性が 10%未満の TTP は 30 例増加し、全部で 637 例となった。また、先天性 TTP は 64 例となり、このうちで ADAMTS13 遺伝子解析を実施した症例は本年度 2 例増えて、61 例となった。57 例(93.4%)で責任遺伝子変異を同定したが、10 例がホモ接合体異常、47 例が複合ヘテロ接合体異常であった。6) に関しては、我々の活動によりガイドラインを改定しなければならない項目が出て来たが、今後どのような頻度で改定するのか、すぐに改定しない場合の追補事項をどのように公表するのか、などを検討する必要がある。

#### A. 研究の目的

##### 目的

日本国内の TMA (血栓性微小血管症) 症例の集積と病態解析を行い、TTP (血栓性血小板減少性紫斑病) の実態を明らかにし、予後の改善を図る。

- 2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続
- 3) ADAMTS13 検査の保険適用の取得
- 4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大
- 5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更
- 6) TTP 診療ガイドラインの改定

#### B. 研究方法

平成 29 年度の計画

- 1) TMA レジストリーの継続

(倫理面への配慮)

検体採取に際しては、主治医より十分な説



明を行い、同意を得た。また、TMA コホート研究は奈良医大と倫理委員会、遺伝子解析は奈良医大、国立循環器病研究センターのヒトゲノム倫理委員会の承認を得ている。

## C. 研究成果

### 1) TMA レジストリーの継続

奈良県立医科大学輸血部では、1998 年以降 ADAMTS13 の検査を通じて、日本全国の医療機関から TMA 症例の集積を行なってきた。その症例数は 2017 年 12 月末で 1474 例となった。その基礎疾患別の内訳を表 1 に示す。この 1 年間の症例数の増加は 54 例で、そのうち ADAMTS13 活性が 10%未満の TTP 症例の増加は 30 例であった。TTP 全体の症例のまとめを表 2、3 に示す。最も症例数が多いのは、基礎疾患の明らかでない原発性で、TTP 全体の 60.3%であった。先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群:USS) は 64 例同定しているが、我々が ADAMTS13 活性を確認しているのが 63 例(9.9%)であった。それ以外の後天性二次性 TMA の中で、最も症例数が多いのが全身性エリテマトーデス (SLE) などの膠原病 103 例であり、TTP の中で 16.2% を占めた。それに続いて、チクロピジンなどの薬剤 27 例 (4.2%) であった。

### 2) ADAMTS13 遺伝子解析の継続

先天性 TTP は本年度 3 例新たに同定し、全部で 64 例となった。そのうち ADAMTS13 遺伝子解析を本年度 2 例で行い、1 例は複合ヘテロ接合体異常、1 例がホモ接合体異常であった。これまでに、61 例について ADAMTS13 遺伝子解析を行い、57 例(93.4%)で責任遺伝子変異を同定した。10 例がホモ接合体異常、47 例が複合ヘテロ接合体異常であった。

### 3) ADAMTS13 検査の保険適用の取得

平成 30 年 1 月 15 日に公表された平成 29 年度第 2 回診療報酬調査専門組織・医療技術評価分科会の医療の技術の評価(案)によると、診療報酬改定において対応する優先度が高い技術に、ADAMTS13 活性測定と同一インヒビター力価測定が含まれている。これは、我々が日本血液学会を通じて提案したもので、平成 30 年度 4 月から保険適用となる予定である。

### 4) リツキシマブの後天性 TTP への保険適用拡大

後天性 TTP に対するリツキサンの保険適用は、2014 年に医師主導治験を実施したが、2017 年 8 月に日本血液学会を通じて、医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に、保険適用の拡大を要望した。特発性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの保険適用拡大も同様の要望により、2017 年 4 月から適用拡大となったので、1、2 年後に適用拡大となることを期待している。

### 5) 後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更

日本国内で後天性 TTP の治療として保険でカバーされる血漿交換の回数は、1 週間に 3 回までで 3 ヶ月を限度とされている。英国のガイドラインでは、血小板数が 15 万/uL を超えて 2 日目まで連日実施することとされており、日本では治療開始直後の血漿交換の回数は少ない。そのため、海外のガイドラインと同様の血漿交換の回数にするため、日本血液学会を通じて要望し、ADAMTS13 検査と同様に診療報酬改定において対応する優先度が高いものとして認定され、平成 30 年 4 月から海外のガイドラ

インと同様の血漿交換の回数が保険で認められる予定となった。

#### 6) TTP 診療ガイドラインの改定

TTP 診療ガイド 2017 を 2017 年 4 月に日本血液学会雑誌「臨床血液」公表し、その英語版を同年 7 月に International Journal of Hematology にも発表した。英語のガイドラインの作成の目的は、日本での TTP 診療における血漿交換などによる治療法の制限について広く海外に知らしめるためであった。その後の我々の活動により ADAMTS13 検査の保険収載、後天性 TTP における血漿交換の回数制限の撤廃などが予定されており、診療ガイドの改定が必要となってきた。ただ、頻回のガイドラインの改定は混乱を招くとの意見もあり、慎重に改定の時期を判断したい。

#### D. 考察

本年度は TTP の診療ガイドラインの発表に続いて、ADAMTS13 検査の保険収載や後天性 TTP に対する血漿交換の回数制限の変更など我々のグループの活動により大きな成果を上げることができた。とりわけ、診断と治療に関するガイドラインの作成は、日本国内での最初のものであり、意義深い。TTP 診断基準としての ADAMTS13 活性 10%未満は、海外のガイドラインとの整合性を重視したが、TTP の古典的 5 徴候を持つにもかかわらず、ADAMTS13 活性が著減しない症例の取り扱いが問題となる。このような症例は TTP 類縁疾患として、TTP と同様の治療ができるように配慮した。このような症例も血漿交換などの TTP と同様の治療が奏功することがあり、何らかの自己免疫疾患である可能性が高い。現在までに報告のある CD36 などに対する自己抗体の存在など

が病因である可能性があるが、今後も病態解析を継続し行きたい。

また、ADAMTS13 検査の保険収載や血漿交換の回数制限の変更など日常診療にも大きく貢献することができた。ただ、このことにより TTP 診療ガイド 2017 において改定すべき項目が出てきた。すぐに改定すべきであるが、頻回のガイドラインの改定は現場の混乱を招くとの意見も聞かれ、慎重に対応したい。追補版などにより部分的に追加することも可能であるが、タイムリーな情報を効果的にどのような方法で現場に届けるのか、今後検討する予定である。

#### E. 結論

本年度は診療ガイドラインの発表、保険診療改定への関与など非常に成果の多い 1 年となった。これによって、TTP の日常診療のレベルが上がり、患者予後の改善につながることを期待している。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

1. Matsumoto M, Fujimura Y, Wada H, Kokame K, Miyakawa Y, Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, Miyata T, Murata M; For TTP group of Blood Coagulation Abnormalities Research Team, Research on Rare and Intractable Disease supported by Health, Labour, and Welfare Sciences Research Grants. Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in

- Japan. **Int J Hematol** 106:3-15, 2017
2. Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J, Lämmle B, Matsumoto M, Pavenski K, Sadler E, Sarode R, Wu H, on behalf of the international working group for Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. **J Thromb Haemost** 15:312-322, 2017
  3. Matsui T, Hori A, Hamako J, Matsushita F, Ozeki Y, Sakurai Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. Mutant botrocetin-2 inhibits von Willebrand factor-induced platelet agglutination. **J Thromb Haemost** 15: 538-548, 2017
  4. Yoshii Y, Fujimura Y, Bennett CL, Isonishi A, Kurumatani N, Matsumoto M. Implementation of a rapid assay of ADAMTS13 activity was associated with improved 30-day survival rate in patients with acquired primary thrombotic thrombocytopenic purpura who received platelet transfusions. **Transfusion**. 57:2045-2053, 2017
  5. Akutagawa T, Shindo T, Yamanouchi K, Hayakawa M, Ureshino H, Tsuruoka N, Sakata Y, Shimoda R, Noguchi R, Furukawa K, Morita S, Iwakiri R, Kimura S, Matsumoto M, Fujimoto K. Persistent Gastro-intestinal Angiodysplasia in Heyde's Syndrome After Aortic Valve Replacement. **Intren Med** 56:2431-2433, 2017
  6. Yoshida Y, Matsumoto M, Yagi H, Isonishi A, Sakai K, Hayakawa M, Hori Y, Sado T, Kobayashi H, YFujimura Y. Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome. **Blood Advances** 1:1628-1631, 2017
  7. Takaya H, Yoshiji H, Kawaratani H, Sakai K, Matsumoto M, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 are related to enhanced cytokinemia and endotoxemia in patients with acute liver failure. **Biomed Rep** 7:277-285, 2017
  8. Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, Matsumoto M. Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity. **Thromb Res** 159:91-95, 2017
  9. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients with age-related macular degeneration. **Sci Rep** 24:1491, 2018
  10. Kawano N, Yokota-Ikeda N, Kawano S, Kuriyama T, Yamashita K, Ono N,

- Ueda N, Ochiai H, Ishikawa F, Kikuchi I, Shimoda K, Matsumoto M. Clinical effect of rituximab as early administration for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with connective tissue diseases. **Modern Rheumatology Case Reports** 2:59-67, 2018
11. Takaya H, Kawaratani H, Kubo T, Seki K, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Takeda K, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. Platelet hyperaggregability is associated with decreased ADAMTS13 activity and enhanced endotoxemia in patients with acute cholangitis. **Hepatology Res** 48:E52-E60, 2018
  12. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. **Pediatr Neonatol**. In press
  13. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. **Clin Exp Nephrol**. In press
  14. Wada H, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Iba T, Matsumoto M. Differences and similarities between disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy. **Thromb J**. In press
  15. 松本雅則、藤村吉博、和田英夫、小亀浩市、宮川義隆、上田恭典、日笠聡、森木隆典、八木秀男、宮田敏行、村田満：血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）診療ガイド 2017. **臨床血液** 58:271-281, 2017
  16. 船越康智、岡田雅彦、松本雅則、小亀浩市、森内浩幸：先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. **臨床血液** 58 :933-937, 2017
  17. Takuma Maeda, Katsura Nakagawa, Kuniko Murata, Yoshiaki Kanaumi, Shu Seguchi, Shiori Kawamura, Mayumi Kodama, Takeshi Kawai, Isami Kakutani, Yoshihiko Ohnishi, Koichi Kokame, Hitoshi Okazaki, and Shigeki Miyata: Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia - associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. **Thromb. Haemost.** 117 (1), 127-138 (2017)
  18. Nirav Dhanesha, Prakash Doddapattar, Mehul R Chorawala, Manasa K. Nayak, Koichi Kokame, Janice M. Staber, Steven R. Lentz, and Anil K. Chauhan: ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 37 (7), 1332-1338 (2017)
  19. Natalia Torrealba, Mario Navarro-

- Marquez, Valeria Garrido, Zully Pedrozo, Diego Romero, Yuka Eura, Elisa Villalobos, Juan Carlos Roa, Mario Chiong, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. **Sci. Rep.** 7 (1), 13402 (2017)
20. Mario Navarro-Marquez, Natalia Torrealba, Rodrigo Troncoso, Cesar Vasquez-Trincado, Marcelo Rodriguez, Pablo E Morales, Elisa Villalobos, Yuka Eura, Lorena Garcia, Mario Chiong, Amira Klip, Enrique Jaimovich, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells by controlling the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin - Akt axis. **Biochim. Biophys. Acta**, In press.
21. Abe T, Sasaki A, Ueda T, Miyakawa Y, Ochiai H. Complement-mediated thrombotic microangiopathy secondary to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation successfully treated with eculizumab: A case report. **Medicine** 96, e6056 (2017)
22. Yamada Y, Abe R, Okano Y, Miyakawa Y. Long-term eculizumab treatment contributes to recovery from end-stage renal disease caused by atypical hemolytic uremic syndrome. **Intern Med** 56, 1085-1088 (2017)
- 学会発表
1. 矢田憲孝、松本雅則、酒井和哉、早川正樹、藤村貴則、藤本隆、小野史郎、吉本清巳、西尾健治. 膠原病の血管炎予測における von Willebrand factor propeptide の有用性. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  2. 久保政之、酒井和哉、早川正樹、松本雅則、八木秀男. 本態性血小板症におけるフォンウィルブランド因子マルチマー解析の重要性について. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  3. Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame. A proposal of VWF large multimer index for standardization of the quantitative description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, July 8th, 2017.
  4. J. T. Tiao, D. Oh, P. Angchaisuksiri, J. Sathar, M. Yap, C. Ruan, Z. Yu, K. Dai, R. Yang, M. Smith, E. Merriman, S. McRae, R. Wong, A. Enjeti, J. Curnow, J. Joseph, A. Davies, G. Chan, C. McLintock, L. Young, P. Maijer, N. Binder, M. Matsumoto, T. S. Leng, S. C. Nair, M. -C. Shen, R. Bird, T. Brighton, G. V. D' Aulerio, G. Gilmore, J. Tay, Q. Hughes, R. I. Baker. Successful International Standardisation of the ADAMTS13 Assays-Results from the APMAT (Asia Pacific Microangiopathic Thrombo -

- cytopenia) Network. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
5. N.Yada, M.Matsumoto, K.Sakai, M.Hayakawa, T.Fujimura, T.Fujimoto, S.Ono, K.Yoshimoto, Y.Urizono, K.Nishino. Von Willebrand Factor Propeptide May Identify the Patient Susceptible for Renal Dysfunction in Collagen Disease. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
  6. 松本雅則. HELLP 症候群の病態解析. 第 38 回日本妊娠高血圧学会(シンポジウム)、熊本、2017 年 9 月 23 日
  7. 松本雅則. 血小板減少症における輸血療法. 第 69 回日本輸血・細胞治療学会 東海支部例会(特別講演)、2017 年 10 月 14 日
  8. 吉井由美、酒井和哉、松浦佳代子、三浦侑子、早川正樹、松本雅則. Risk factors of ADAMTS13 inhibitor boosting in primary acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  9. 酒井和哉、藤村義弘、石西綾美、早川正樹、八木秀男、松本雅則. The retrospective analysis of prognostic factors of Japanese patients with congenital TTP. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  10. Takahiro Yoshikawa, Takeo Nomi, Kazuya Sakai, Masaki Hayakawa, Daisuke Hokuto, Satoshi Yasuda, Masayuki Sho, Masanori Matsumoto. Ischemia-Reperfusion Injury with Pringle's Maneuver Induces Increasing of Unusually Large Von Willebrand Factor Multimers after Hepatectomy. 59th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta. December 11<sup>th</sup>, 2017
  11. 小亀浩市: 先天性 TTP の遺伝子解析を通して分かること. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017 年 6 月 8 日-10 日
  12. Hisashi Kato, Y Ito, Hirokazu Kashiwagi, Yoichiro Morikawa, Keigo Akuta, N Nishiura, Shigenori Honda, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, and Yoshiaki Tomiyama: Complete failure of integrin  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding problems in a patient with kindlin-3 deficiency. The 26th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
  13. 大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二: 活性化プロテイン C (APC) の臨床的用量が実験的脳梗塞の進展を抑制する. 第 40 回日本神経科学大会、千葉、2017 年 7 月 20-23 日
  14. 菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣: 全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回日本補体学会学術集会、福島、2017 年 9 月 1-2 日

15. Koichi Kokame: Platelet aggregation balanced by von Willebrand factor (VWF) and ADAMTS13. ACCDiS Workshop, Santiago, Chile, September 25, 2017.
16. Koichi Kokame and Yuka Eura: Genetic, biochemical, and physiological approach to understanding the function of Herp and Derlin family proteins in ER-associated degradation machinery. XL Annual Meeting of Chilean BMB Society, Puerto Varas, Chile September 26-29, 2017.
17. Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Hiroharu Kataoka, Jun C. Takahashi, and Hiroji Yanamoto: A clinically relevant dose of activated protein C (APC) suppresses the development of experimental cerebral infarction. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA, November 11-15, 2017.
18. 大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：活性化プロテイン C (APC) の脳梗塞縮小効果とそのメカニズム：マウスを用いた検討。第 60 回日本脳循環代謝学会学術集会、大阪、2017 年 11 月 3-4 日
19. 根木玲子、伊田和史、光黒真菜、岡本章、小亀浩市、宮田敏行：稀な部位で静脈血栓症を発症した発端者を契機に遺伝子解析を行った先天性アンチトロンビン欠乏症タイプ I 家系の検討。日本人類遺伝学会 第 62 回大会、神戸、2017 年 11 月 15-18 日
20. 伊田和史、根木玲子、光黒真菜、岡本章、辻明宏、小亀浩市、宮田敏行：静脈血栓症の再発を認めたプロテイン S 欠乏症患者における PROS1 遺伝子解析。日本人類遺伝学会 第 62 回大会、神戸、2017 年 11 月 15-18 日
21. 大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：エダラボンとの比較における活性化プロテイン C (APC) の脳保護効果の検討。第 43 回日本脳卒中学会学術集会、福岡、2018 年 3 月 15-18 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表1 TMAのADAMTS13活性別症例数 (n=1474)  
(奈良医大輸血部1998. 7-2017. 12)

	Congenital TMAs (n=158)		Acquired TMAs (n=1316)											Total (n=1474)
	USS (n=64)	aHUS (n=94)	Primary (n=682)			Secondary (n=734)								
			TTP (n=457)	HUS (n=125)	Drug-induced (n=45)			CTD/AD (n=334)	Malignancies (n=86)	H SCT (n=97)	Pregnancy (n=31)	STEC-HUS (n=48)	Others (LC, etc) (n=93)	
			TC(n=25)/CL(n=4)	MMC (n=12)	Others (n=4)									
ADAMTS13:AC (%)	(n=63)	(n=94)	(n=457)	(n=125)	(n=25/n=3)	(n=12)	(n=4)	(n=324)	(n=86)	(n=91)	(n=27)	(n=47)	(n=87)	(n=1473)
<10	63	0	384	0	24	0	3	103	11	5	8	2	34	637
1年間の増加数	3	0	20	0	0	0	0	4	0	1	0	1	1	30
10~<25	0	5	35	15	3	2	0	68	22	29	3	7	15	204
25~<50	0	20	29	62	1	6	0	110	33	46	13	23	25	368
≥50	0	65	9	48	1	4	1	53	20	17	7	16	19	260
全体の年間増加数	3	3	20	0	1	0	0	10	0	6	4	1	6	54

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

表2 TTP (<ADAMTS13活性10%) 症例のまとめ (n=637)  
(奈良医大輸血部1998. 7-2017. 12)

	Congenital TMAs (n=63)	Acquired TMAs (n=574)									Total (n=637)
	USS (n=63)	Primary (n=384)	Secondary (n=190)								
		TTP (n=384)	Drug-induced (n=27)	CTD/AD (n=103)	Malignancies (n=11)	H SCT (n=5)	Pregnancy (n=8)	STEC-HUS (n=2)	Others (LC, etc) (n=34)		
ADAMTS13:AC (%)	(n=63)	(n=384)	(n=27)	(n=103)	(n=11)	(n=5)	(n=8)	(n=2)	(n=34)	(n=637)	
< 0.5	36	322	22	77	5	0	7	0	26	495	
0.5~< 5	25	27	5	15	4	1	1	0	5	83	
5~< 10	2	22	0	11	0	4	0	2	3	44	
マルチマームのみ <3(3~10)	0	12(1)	0	0	1(1)	0	0	0	0	15	
ADAMTS13:INH (BU/ml)	(n=63)	(n=383)	(n=27)	(n=101)	(n=10)	(n=2)	(n=8)	(n=2)	(n=31)	(n=627)	
> 5	0	80	6	16	4	0	1	0	6	113	
2~< 5	0	136	13	32	2	0	3	1	11	198	
0.5~< 2	7	156	7	42	3	0	4	1	13	233	
< 0.5	56	11	1	11	1	2	0	0	1	83	

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

表3 TTP (<ADAMTS13 10%) の基礎疾患の割合

	分類	症例数	割合(%)
先天性	USS	63	9.9
後天性	原発性	384	60.3
	二次性	190	29.8
	膠原病	103	16.2
	薬剤	27	4.2
	悪性腫瘍	11	1.7
	妊娠	8	1.3
	その他	41	6.4
	肝硬変・肝炎	8	1.3
	計	637	100



## ADAMTS13 による von Willebrand 因子切断生成物の定量的 ELISA の確立

研究分担者： 松本雅則 奈良県立医科大学 輸血部 教授  
研究協力者： 藤村吉博 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 所長  
早川正樹 奈良県立医科大学 輸血部 助教

### 研究要旨

ADAMTS13 は、von Willebrand 因子 (VWF) A2 ドメインにある 1605 番目のアミノ酸チロシン (Y1605) と 1606 番目のメチオニン (M1606) 間を特異的に切断する酵素である。我々は、Y1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (N10) を作成し、ADAMTS13 活性測定用 ELISA を確立した。今回この N10 を用いて、ADAMTS13 による VWF 切断生成物 (VWF-DP) を定量する ELISA を確立した。N10 をウエルに固相化し、被験血漿を反応させ、VWF の N 末端領域を認識するモノクローナル抗体で検出するサンドイッチ ELISA である。

VWF は ABO 血液型糖鎖を持つ数少ない血漿タンパク質で、O 型の血漿 VWF 抗原量 (VWF:Ag) は他の血液型に比べて約 25%程度低いことが知られている。今回我々は、血液型別の VWF 抗原量の違いを明らかにするため、ABO 血液型別に健常人の VWF-DP を検討した。A 型 87 名、AB 型 45 名、B 型 52 名、O 型 75 名の計 259 名の健常人で検討したところ、O 型の VWF:Ag は中央値 70.9%と他の血液型に比べて有意に低値であった。O 型の VWF-DP は、AB 型や B 型に比べて有意に低値であったが、VWF-DP と VWF:Ag が正の相関を示すため、VWF-DP/VWF:Ag 比を検討した。この比は、O 型では A 型や AB 型に対して有意に高く、同様に B 型でも A 型や AB 型に対して有意に高かった。最終的に O=B>AB=A の順に高値であった。このことから、A 型血液型糖鎖は ADAMTS13 による VWF 切断に阻害的に働くのではないかと考えられた。

今後 VWF-DP を TTP など血栓性微小血管症 (TMA) においても検討する予定である。具体的には、ADAMTS13 活性が著減している TTP において VWF-DP の違いによって重症度が異なるのか、ADAMTS13 が著減しない TMA において VWF-DP を測定することで新たな病態解析を行うことなどを計画している。

#### A. 研究の目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は、von Willebrand 因子 (VWF) 特異的切断酵素である ADAMTS13 活性が著減することで発症する。ADAMTS13 は VWF の A2 ドメイン内の 1605 番目のアミノ酸チロシン (Y) と 1606 番目のメチオニン (M) の間を切断するメタロプロテアーゼである。我々は、

Y1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体 N10 を作成し、ADAMTS13 活性測定 ELISA を開発した。この N10 は、ADAMTS13 による切断が行われないと反応しないが、切断後に反応する抗体である。本研究では N10 を用いて、ADAMTS13 による VWF 切断生成物 (VWF-degradation product: VWF-DP) を定量する ELISA を確立した。こ

の VWF-DP を測定することで、VWF の切断状況を明らかにし、TTP を含む微小血管症 (TMA) の病態解析、重症度解析に利用することを考えている。

一方 VWF は、血漿蛋白には非常に珍しいことであるが、ABO 血液型糖鎖を持つことが報告されている。また、O 型の健常人は他の血液型の人に比べて VWF の抗原量が 25% 程度低いことが明らかになっている。この ABO 血液型別の VWF の抗原量の違いに、ADAMTS13 による VWF の切断効率が関与している可能性がある。そこで今回 ABO 血液型別に VWF-DP を検討した。

## B. 研究方法

対象は 259 名の健常人で、年齢は 18 歳から 40 歳で、男性 168 名、女性 91 名であった (Table 1)。

血漿 VWF-DP の測定は、モノクローナル抗体 N10 を ELISA プレートに固相化し、それに血漿を反応させ、VWF の ADAMTS13 切断部位より N 末端に反応するモノクローナル抗体にて検出するサンドイッチ ELISA 法を用いた。VWF 抗原量 (VWF:Ag) は、VWF に対するポリクローナル抗体 2 種類を用いたサンドイッチ ELISA で測定した。結果は、中央値 (範囲) で示した。

(倫理面への配慮)

本研究は、奈良医大の倫理委員会の許可を受けて実施した。また、検体採取に際しては、主治医より被験者に十分な説明を行い、文書による同意を得た。

## C. 研究成果

Fig 1 に示すように O 型の血漿中の VWF:Ag (中央値 70.9%) は、他の 3 つの血液型に比べて有意に低いことが認められた。

また、AB 型は A 型に比べて有意に高かった。この結果は、現在までに報告されているものと同様の結果であった。

血漿中の VWF-DP に関して、Fig 2A に示すように O 型 (53.2%) が AB 型 (81.2%) や B 型 (83.1%) に比べて有意に低かった。また、A 型 (63.8%) は B 型に比べて有意に低いことが示された。

一方、VWF 抗原と VWF-DP との関連は、全 259 例において有意な正の相関 ( $r=0.737$ ,  $p<0.01$ ) を認めるため、VWF-DP の結果は VWF 抗原量によって大きな影響を受ける可能性がある。そのため我々は、VWF 抗原量に対する VWF-DP 比 (VWF-DP/VWF:Ag) を計算した。その結果を Fig 2B に示すが、O 型 (0.72) が A 型 (0.62) や AB 型に (0.59) 比べて有意に高いことが明らかになった。また、B 型 (0.75) も A 型や AB 型に比べて有意に高いことが示された。VWF-DP/VWF:Ag 比は  $O=B>AB=A$  という順となり、O 型が ADAMTS13 により切断されやすことで VWF 抗原量が低くなることが予想された。

この結果より、A 型、B 型の両者の抗原を持たない O 型 VWF では、ADAMTS13 による切断を受けやすいこと、さらに B 型より A 型糖鎖を持つことにより ADAMTS13 による切断を受けにくくなることが予想された。

## D. 考察

ABO 血液型の前駆物質は H 抗原で非還元末端の糖はフコースであり、O 型では何も付加されるものは無いので、このままである。A 型では、H 抗原に N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が、B 型ではガラクトース (Gal) がそれぞれ付加される。このように ABO 血液型は、糖鎖の違

いによって決定される。O型血液型のVWF抗原量は他の血液型と比較すると25-30%程度低いことが知られている。血液中のVWF抗原の違いは、VWFの生成、分泌、クリアランスによることが予想されるが、ABO血液型はVWFの生成、分泌には影響しないことが報告されている。

VWFの血液中からのクリアランスにおけるABO血液型の関与に関して、血液型糖鎖によって肝細胞やマクロファージを介するクリアランスの違いが報告されている。しかし、現状では結合するレセプターなどは明らかになっておらず、詳細は不明である。他の経路としてADAMTS13によるVWF切断もABO血液型によるクリアランスの違いを説明できる可能性がある。ABO血液型によって、ADAMTS13のVWF切断に対する感受性が異なり、クリアランスが変化することが予想される。実際、VWFがADAMTS13によって切断されるA2ドメイン内には2つのN結合糖鎖が存在し、ABO血液型糖鎖が存在している可能性があり、それによってクリアランスに影響を与えている可能性がある。

血漿中のVWF-DP自体の測定値は、VWF抗原量が少なくなるとDPも比例して低くなることから、我々はVWF-DP/VWF:Ag比を血液型別に比較した。その結果、O型でこの比が高く、A型、AB型で低かった。このことより、VWFにA型の血液型糖鎖が存在することで、ADAMTS13による切断を阻害する可能性が示唆された。

今後、このVWF-DPは、過度のずり応力が発生する病態で、ADAMTS13によってVWFが過剰に切断される後天性 von Willebrand 症候群 (AVWS) などの診断に利用できると考えている。AVWSは、大動脈弁狭窄症による Heyde 症候群が有名であ

るが、僧帽弁閉鎖不全症や閉塞性肥大型心筋症などの疾患に伴うことも報告されている。さらに、経皮的心肺補助(PCPS)や補助人工心臓によってもAVWSが発生することが明らかになっており、ますます対象となる症例が増える可能性が高く、VWF-DP測定の実用性は増すものと思われる。

TMAにおいては、ADAMTS13活性が著減しているTTPにおいても、VWF-DPの違いによって重症度が異なるのか検討予定である。また、ADAMTS13が著減しないTMAにおいて、VWF-DPを測定することでVWF切断が起こりにくい新たな機序を発見し、さらなる病態解析を継続していく予定である。

## E. 結論

ADAMTS13によりVWFが切断された産物(VWF-DP)を測定できるELISA法を確立した。この方法を用いて、ABO血液型によるVWF抗原量の違いを明らかにするため、VWF-DPを測定した。その結果、A抗原が存在することによってVWF-DPの産生が抑制されることを明らかにした。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Matsumoto M, Fujimura Y, Wada H, Kokame K, Miyakawa Y, Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, Miyata T, Murata M; For TTP group of Blood Coagulation Abnormalities Research Team, Research on Rare and Intractable Disease supported

- by Health, Labour, and Welfare Sciences Research Grants. Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in Japan. **Int J Hematol** 106:3-15, 2017
2. Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J, Lämmle B, Matsumoto M, Pavenski K, Sadler E, Sarode R, Wu H, on behalf of the international working group for Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic micro-angiopathies. **J Thromb Haemost** 15:312-322, 2017
  3. Matsui T, Hori A, Hamako J, Matsushita F, Ozeki Y, Sakurai Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Fujimura Y. Mutant botrocetin-2 inhibits von Willebrand factor-induced platelet agglutination. **J Thromb Haemost** 15: 538-548, 2017
  4. Yoshii Y, Fujimura Y, Bennett CL, Isonishi A, Kurumatani N, Matsumoto M. Implementation of a rapid assay of ADAMTS13 activity was associated with improved 30-day survival rate in patients with acquired primary thrombotic thrombocytopenic purpura who received platelet transfusions. **Transfusion**. 57:2045-2053, 2017
  5. Akutagawa T, Shindo T, Yamanouchi K, Hayakawa M, Ureshino H, Tsuruoka N, Sakata Y, Shimoda R, Noguchi R, Furukawa K, Morita S, Iwakiri R, Kimura S, Matsumoto M, Fujimoto K. Persistent Gastro-intestinal Angiodysplasia in Heyde's Syndrome After Aortic Valve Replacement. **Intren Med** 56:2431-2433, 2017
  6. Yoshida Y, Matsumoto M, Yagi H, Isonishi A, Sakai K, Hayakawa M, Hori Y, Sado T, Kobayashi H, YFujimura Y. Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome. **Blood Advances** 1:1628-1631, 2017
  7. Takaya H, Yoshiji H, Kawaratani H, Sakai K, Matsumoto M, Fujimura Y, Fukui H. Decreased activity of plasma ADAMTS13 are related to enhanced cytokinemia and endotoxemia in patients with acute liver failure. **Biomed Rep** 7:277-285, 2017
  8. Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, Matsumoto M. Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity. **Thromb Res** 159:91-95, 2017
  9. Yamashita M, Matsumoto M, Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N. Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients

- with age-related macular degeneration. **Sci Rep** 24:1491, 2018
10. Kawano N, Yokota-Ikeda N, Kawano S, Kuriyama T, Yamashita K, Ono N, Ueda N, Ochiai H, Ishikawa F, Kikuchi I, Shimoda K, Matsumoto M. Clinical effect of rituximab as early administration for refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with connective tissue diseases. **Modern Rheumatology Case Reports** 2:59-67, 2018
  11. Takaya H, Kawaratani H, Kubo T, Seki K, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Takeda K, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H. Platelet hyper-aggregability is associated with decreased ADAMTS13 activity and enhanced endotoxemia in patients with acute cholangitis. **Hepatology Res** 48:E52-E60, 2018
  12. Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Tanoue Y, Hayakawa M, Matsumoto M, Hara T, Ohga S. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. **Pediatr Neonatol**. In press
  13. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome. **Clin Exp Nephrol**. In press
  14. Wada H, Matsumoto T, Suzuki K, Imai H, Katayama N, Iba T, Matsumoto M. Differences and similarities between disseminated intravascular coagulation and thrombotic microangiopathy. **Thromb J**. In press
  15. 松本雅則、藤村吉博、和田英夫、小亀浩市、宮川義隆、上田恭典、日笠聡、森木隆典、八木秀男、宮田敏行、村田満：血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 診療ガイド 2017. **臨床血液** 58:271-281, 2017
  16. 船越康智、岡田雅彦、松本雅則、小亀浩市、森内浩幸：先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. **臨床血液** 58: 933-937, 2017
- 学会発表
1. 矢田憲孝、松本雅則、酒井和哉、早川正樹、藤村貴則、藤 隆、小野史郎、吉本清巳、西尾健治. 膠原病の血管炎予測における von Willebrand factor propeptide の有用性. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  2. 久保政之、酒井和哉、早川正樹、松本雅則、八木秀男. 本態性血小板症におけるフォンウィルブランド因子マルチマー解析の重要性について. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場、2017 年 6 月 10 日
  3. Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, Koichi Kokame: A proposal of VWF large multimer index for standardization of the

- quantitative description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, July 8th, 2017.
4. J. T. Tiao, D. Oh, P. Angchaisuksiri, J. Sathar, M. Yap, C. Ruan, Z. Yu, K. Dai, R. Yang, M. Smith, E. Merriman, S. McRae, R. Wong, A. Enjeti, J. Curnow, J. Joseph, A. Davies, G. Chan, C. McLintock, L. Young, P. Maijer, N. Binder, M. Matsumoto, T. S. Leng, S. C. Nair, M. -C. Shen, R. Bird, T. Brighton, G. V. D' Aulerio, G. Gilmore, J. Tay, Q. Hughes, R. I. Baker. Successful International Standardisation of the ADAMTS13 Assays—Results from the APMAT (Asia Pacific Microangiopathic Thrombocytopenia) Network. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
  5. N. Yada, M. Matsumoto, K. Sakai, M. Hayakawa, T. Fujimura, T. Fujimoto, S. Ono, K. Yoshimoto, Y. Urizono, K. Nishino. Von Willebrand Factor Propeptide May Identify the Patient Susceptible for Renal Dysfunction in Collagen Disease. XXVI ISTH Congress and 63rd Annual SSC Meeting. Berlin. July 10<sup>th</sup>, 2018.
  6. 松本雅則. HELLP 症候群の病態解析. 第 38 回日本妊娠高血圧学会(シンポジウム)、熊本、2017 年 9 月 23 日
  7. 松本雅則. 血小板減少症における輸血療法. 第 69 回日本輸血・細胞治療学会東海支部例会(特別講演)、2017 年 10 月 14 日
  8. 吉井由美、酒井和哉、松浦佳代子、三浦侑子、早川正樹、松本雅則. Risk factors of ADAMTS13 inhibitor boosting in primary acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  9. 酒井和哉、藤村吉博、石西綾美、早川正樹、八木秀男、松本雅則. The retrospective analysis of prognostic factors of Japanese patients with congenital TTP. 第 79 回日本血液学会、東京、2017 年 10 月 21 日
  10. Takahiro Yoshikawa, Takeo Nomi, Kazuya Sakai, Masaki Hayakawa, Daisuke Hokuto, Satoshi Yasuda, Masayuki Sho, Masanori Matsumoto. Ischemia-Reperfusion Injury with Pringle's Maneuver Induces Increasing of Unusually Large Von Willebrand Factor Multimers after Hepatectomy. 59th ASH Annual Meeting and Exposition. Atlanta. December 11<sup>th</sup>, 2017
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

Table 1 患者背景

Blood group	A	AB	B	O
number	87	45	52	75
age (median)	23	23	23	23
age (range)	18-33	20-40	18-33	19-35
male/female	56/31	30/15	34/18	48/27

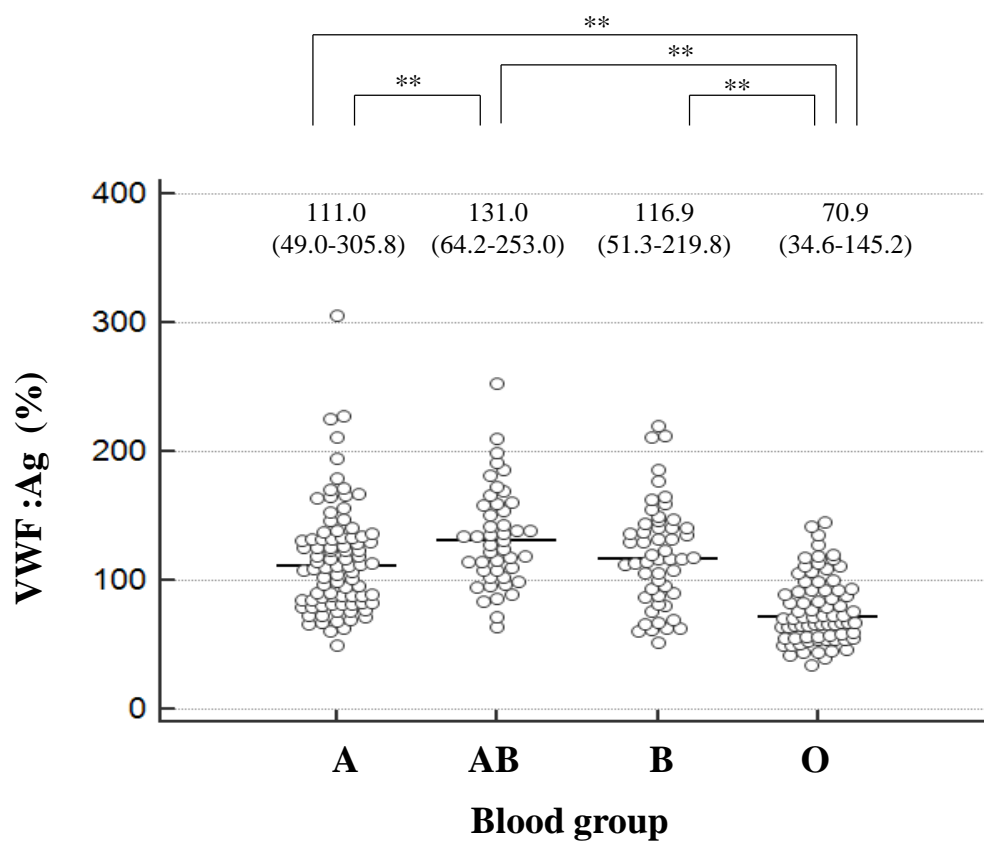
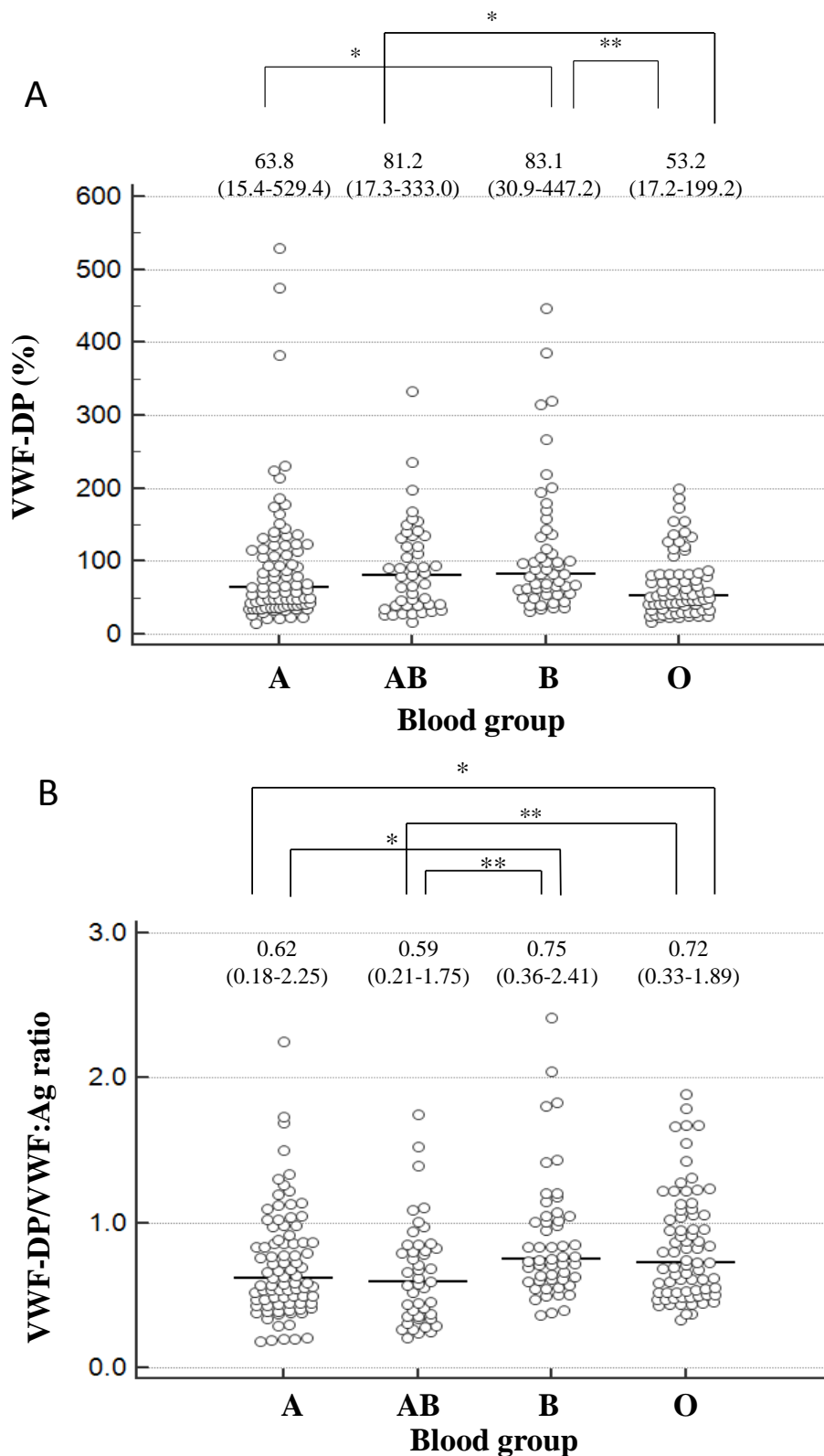


Figure 1 ABO 血液型別の VWF 抗原量

VWF 抗原量は O 型が他の血液型に比べて有意に低かった。  
また AB 型が A 型に比べて有意に高かった。

\*\* p<0.01



**Figure 2** ABO 血液型別の VWF-DP と VWF 抗原との比

A, VWF 切断生成物 (VWF-DP) および B, VWF 抗原量との比を示す。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$



## TTP に対する血漿交換と抗体医薬リツキサンの薬事対応

研究分担者：宮川義隆 埼玉医科大学病院 総合診療内科 教授

### 研究要旨

難治性の TTP 患者の救命のため、血漿交換の回数撤廃について薬事対応をした。内保連を通じて、診療報酬調査専門組織医療技術評価分科会に諮り、平成 30 年 4 月より回数制限の撤廃に至った。再発・難治例に有効性が高い抗体医薬リツキサンの TTP に対する適応拡大については、国内で実施した医師主導治験の研究成果をもとに、医療上の必要性が高い未承認薬・適応外薬検討会議に要望書を提出した。

#### A. 研究目的

血液難病 TTP の死亡率は 2 割と高い。従来、国内の血漿交換の回数は、週 3 回、最高 3 ヶ月間と健康保険で規定されていた。また、難治例に有効な抗体医薬リツキサンは、TTP に未承認である。難治例の救命のため、欧米の医療環境を参考に、血漿交換の回数撤廃とリツキサンの適応拡大を目的とする。

#### B. 研究方法

血漿交換の回数撤廃については、日本血液学会 診療委員会より、内保連を通じて診療報酬調査専門組織医療技術評価分科会に要望書を提出する。リツキサンの適応拡大は、本研究班が支援を行い、国内で行われた第 II 相医師主導治験の研究成果をもとに、医療上の必要性が高い未承認薬・適応拡大検討会議に要望する。  
(倫理面への配慮)  
なし。

#### C. 研究結果

平成 30 年 4 月より、血漿交換の回数が撤廃された。これにより、欧米並みに救命率の向上と入院期間の短縮が期待され

る。なお、リツキサンの適応拡大については、医療上の必要性が高い未承認薬・適応拡大検討会議にて、医療上の必要性について審議中である。今後、1~2 年かけて公知性が審議され、適応拡大に至ることが期待される。

#### D. 考察

平成 30 年度より血漿交換の回数が撤廃されることが公示された。これにより、難病患者の救命率が向上することが期待される。

#### E. 結論

TTP に対する血漿交換の回数制限が撤廃された。抗体医薬リツキサンの適応拡大については、厚生労働省の専門会議で継続審議中である。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Abe T, Sasaki A, Ueda T, Miyakawa Y, Ochiai H. Complement-mediated

- thrombotic microangiopathy syndrome. Intern Med 56, 1085-1088 (2017)
- secondary to sepsis-induced disseminated intravascular coagulation successfully treated with eculizumb: A case report. Medicine 96, e6056 (2017)
2. Yamada Y, Abe R, Okano Y, Miyakawa Y. Long-term eculizumab treatment contributes to recovery from end-stage renal disease caused by atypical hemolytic uremic

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析

研究分担者：小亀浩市 国立循環器病研究センター分子病態部 部長

### 研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) は、von Willebrand 因子切断酵素 ADAMTS13 の活性著減で発症する指定難病である。ADAMTS13 活性を著減させる原因の一つとして ADAMTS13 遺伝子異常があり、これは先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) を引き起こす。本研究では、日本における先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析を行い、発症メカニズムの解明とともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改訂に寄与することをめざしている。今年度は、先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) を対象として ADAMTS13 遺伝子解析を行った。ダイレクト・シーケンシング法による塩基配列解析の結果、1 名は p. S397F と p. Q892\* の複合ヘテロ接合体であり、もう 1 名は p. C908Y のホモ接合体であった。p. S397F と p. Q892\* は海外も含めて未報告の変異であり、p. C908Y はこれまでに日本の先天性 TTP 患者 9 家系に同定されていた原因変異であった。

### A. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の発症は、フォンビルブランド因子 (von Willebrand factor; VWF) を特異的に切断する血漿プロテアーゼ ADAMTS13 の活性著減で起こる。ADAMTS13 活性の損失は、先天的な ADAMTS13 遺伝子異常あるいは後天的に生じる抗 ADAMTS13 自己抗体 (インヒビター) によって起こる。特に ADAMTS13 遺伝子異常によって劣性遺伝形式で発症する TTP を先天性 TTP あるいは Upshaw-Schulman 症候群 (Upshaw-Schulman syndrome; USS) と呼ぶ。我々は、先天性 TTP 患者の ADAMTS13 遺伝子解析、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の分析、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、ADAMTS13 分子の立体構造解析などに重点をおいて研究を進めてきた。本研究事業では、先天性 TTP 患

者の遺伝子解析を継続的に行い、遺伝子異常の特徴や発症メカニズムに関する知見を蓄積することとともに、TTP を含む疾患群である血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の診療ガイド作成・改訂に寄与することをめざしている。

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

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

本研究では、新たに見出された先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 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 genomic Prep Mini Spin Kit (GE ヘルスケア) を使用した。血液からの調製を前提とした試薬キットなので、凍結血球 (約 200  $\mu$ L) を解凍しながら約 100  $\mu$ L の生理食塩水で懸濁して約 300  $\mu$ L の血液と見なし、マニュアルに従って調製した。

全 29 個のエクソンを PCR で増幅するために、24 ペアのプライマーを用いた。センス方向プライマーの 5' 側に M13F 配列 (TGTAACGACGCGCCAGT) を、アンチセンス方向プライマーの 5' 側に M13R 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を、それぞれ付加しておいた。これは、あとのシーケンシング反応を効率的に行うためである。

エクソン 7 以外は一般的な PCR 条件で容易に増幅させることができた。エクソン 8 および 26-27 の増幅では反応液に DMSO 1  $\mu$ L を添加した。エクソン 7 は GC 塩基の割合が非常に高いため、GC-RICH PCR System (ロッシュ) を使用した。PCR 終了後、1  $\mu$ L を用いてアガロース電気泳動でバンドを確認した。次に、PCR 反応液に残った過剰プライマーの除去と未反応 dNTP の不活化を目的として、ExoSAP-IT (アフィメトリクス) 1  $\mu$ L を加え、37°C/30 分間、80°C/15 分間反応させた。このうち 1  $\mu$ L を鋳型にして、M13F および M13R プライマーでシーケンス反応を行った。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシステムズ) 試薬の 4 倍希釈液を用いて 5  $\mu$ L/反応で行った。反応終了後、CleanSEQ ダイターミネータ精製試薬キット (ベックマン・コールター) で精製し、Genetic Analyzer 3730xl (アプライド・バイオシステムズ) に供して波形データを得た。

解析ソフトウェア Sequencher (ジーンコード) を用いて波形データを観察し、対象領域 (各エクソンとその前後約 20 塩基) のレファレンス配列と比較した。エクソンに変異が見つかった場合、cDNA 配列 (GenBank: AB069698.2) と照合してアミノ酸配列への影響などを調べた。イントロンに変異が見つかった場合、スプライシングに対する影響等を検討した。なお、エクソンの異常でもスプライシングに影響をおよぼす可能性もあるので、注意深く検討した。変異が先天性 TTP の原因として既知であれば、それを原因変異として確定した。未報告の変異であれば、アミノ酸レベルでの変異の特徴から

機能への影響を類推した。日本人の ADAMTS13 遺伝子に存在する 6 個のミスセンス多型、p. T339R、p. Q448E、p. P475S、p. P618A、p. S903L、p. G1181R は原因変異から除外した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病研究センターおよび奈良県立医科大学の倫理委員会で研究計画の承認を受けた上で実施した。研究参加者からは書面でのインフォームドコンセントを得た。

### C. 研究結果

USS-2A 家系の患者は女性で、19 歳時に両上肢の点状出血を呈し、近医受診での血液検査で血小板減少と高ビリルビン血症が認められた。当初は特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) と診断されたが、治療効果等から TTP の可能性が疑われた。奈良医大輸血部で血漿検体を解析したところ、ADAMTS13 活性は 0.5%未満、インヒビター力価は 0.3 BU/mL であった。両親および妹の ADAMTS13 活性は、父 32%、母 53%、妹 46%と低下しており、いずれもインヒビターは陰性 (力価 0.5 BU/mL 未満) であったため、患者は先天性 TTP であると診断された。ダイレクト・シーケンシング法による解析の結果、c. 1190C>T (p. S397F) および c. 2674C>T (p. Q892\*) のヘテロ接合体であった。いずれも国外含めて未報告の変異である。父に c. 2674C>T (p. Q892\*) が、母に c. 1190C>T (p. S397F) が同定されたため、患者はこれらの複合ヘテロ接合体と考えられた。妹には母由来の c. 1190C>T (p. S397F) が同定された。遺伝型と ADAMTS13 活性との関連から、いずれの変異も機能欠失型の原因変異と推定された。

USS-3B 家系の患者は男性で、心窩部痛・嘔吐・軟便・食思不振、無尿状態で入院し、HUS の臨床診断で腎代替療法により改善し退院した。約 6 年後、嘔吐・下痢で近医受診し、血小板減少と腎障害が見られたため総合病院に入院した。当初 HUS 再燃と考えられたが、絶食補液による対症療法で改善し退院した。後日、入院時採血の血漿 ADAMTS13 活性著減 (2.3%)・インヒビター陰性が判明した。その後複数回の測定で、ADAMTS13 活性 1.3~2.0%・インヒビター陰性が確認された。患者の父母弟の ADAMTS13 活性は、それぞれ 34%、17.7%、22.4%で、いずれもインヒビター陰性であった。先天性 TTP の可能性が強く推定されたため、ダイレクト・シーケンシング法による解析を行った結果、患者に c. 2723G>A (p. C908Y) 変異がホモ接合体で同定された。父母とも同変異がヘテロ接合体で同定されたため、患者は本変異のホモ接合体であると確認された。弟にも同変異がヘテロ接合体で同定され、保因者であることが判明した。このミスセンス変異は、日本の先天性 TTP 患者 9 家系に同定されていた原因変異である。

### D. 考察

遺伝性希少疾患の診断を確定する際、原因変異を特定することはきわめて重要である。次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の方法は変化していくと予想されるが、希少疾患で、かつ、先天性 TTP のように責任遺伝子が限定されている場合、依然としてダイレクト・シーケンシング法がコスト面等で優れている。本研究では、種々の工夫により効率化したダイレクト・シーケンシング法を行い、

先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) に、発症原因と考えられる ADAMTS13 遺伝子異常を同定した。今回同定されたのは、2 種のミスセンス変異と 1 種のナンセンス変異であった。いずれも、ADAMTS13 の本来の機能、すなわち VWF 切断活性を発揮できなくなる変異であると考えられる。これまでの知見から考えると、いずれもタンパク質が細胞外に分泌されなくなる変異である可能性が高い。

## E. 結論

先天性 TTP 疑い患者 2 名 (2 家系) の ADAMTS13 遺伝子をダイレクト・シーケンシング法で解析した結果、両名に両アレル性の異常が同定された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Takuma Maeda, Katsura Nakagawa, Kuniko Murata, Yoshiaki Kanaumi, Shu Seguchi, Shiori Kawamura, Mayumi Kodama, Takeshi Kawai, Isami Kakutani, Yoshihiko Ohnishi, Koichi Kokame, Hitoshi Okazaki, and Shigeki Miyata: Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. *Thromb. Haemost.* 117 (1), 127-138 (2017)

Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, Hideo Wada, Koichi Kokame, Yoshitaka Miyakawa, Yasunori Ueda,

Satoshi Higasa, Takanori Moriki, Hideo Yagi, Toshiyuki Miyata, and Mitsuru Murata: Diagnostic and Treatment Guidelines for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) 2017 in Japan. *Int. J. Hematol.* 106 (1), 3-15 (2017)

Nirav Dhanesha, Prakash Doddapattar, Mehul R Chorawala, Manasa K. Nayak, Koichi Kokame, Janice M. Staber, Steven R. Lentz, and Anil K. Chauhan: ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (7), 1332-1338 (2017)

Natalia Torrealba, Mario Navarro-Marquez, Valeria Garrido, Zully Pedrozo, Diego Romero, Yuka Eura, Elisa Villalobos, Juan Carlos Roa, Mario Chiong, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation. *Sci. Rep.* 7 (1), 13402 (2017)

Mario Navarro-Marquez, Natalia Torrealba, Rodrigo Troncoso, Cesar Vasquez-Trincado, Marcelo Rodriguez, Pablo E Morales, Elisa Villalobos, Yuka Eura, Lorena Garcia, Mario Chiong, Amira Klip, Enrique Jaimovich, Koichi Kokame, and Sergio Lavandero: Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle

cells by controlling the  $Ca^{2+}$ -calcineurin-Akt axis. *Biochim. Biophys. Acta*, In press.

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

松本雅則、藤村吉博、和田英夫、小亀浩市、宮川義隆、上田恭典、日笠聡、森木隆典、八木秀男、宮田敏行、村田満：血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）診療ガイド 2017. *臨床血液* 58 (4), 271-281 (2017)

船越康智、岡田雅彦、松本雅則、小亀浩市、森内浩幸：先天性血栓性血小板減少性紫斑病の兄弟例. *臨床血液* 58 (8), 933-937 (2017)

## 2. 学会発表

小亀浩市：先天性 TTP の遺伝子解析を通して分かること. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017 年 6 月 8 日-10 日

Hisanori Horiuchi, Masanori Matsumoto, and Koichi Kokame: A proposal of VWF large multimer index for standardization of the quantitative

description of VWF multimers among laboratories. The 63rd Annual Scientific and Standardization Committee Meeting, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.

Hisashi Kato, Y Ito, Hirokazu Kashiwagi, Yoichiro Morikawa, Keigo Akuta, N Nishiura, Shigenori Honda, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Yuzuru Kanakura, and Yoshiaki Tomiyama: Complete failure of integrin  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 activation in kinetic assay associates with severe bleeding problems in a patient with kindlin-3 deficiency. The 26th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.

大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：活性化プロテイン C (APC) の臨床的用量が実験的脳梗塞の進展を抑制する. 第 40 回日本神経科学大会、千葉、2017 年 7 月 20-23 日

菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣：全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回日本補体学会学術集会、福島、2017 年 9 月 1-2 日

Koichi Kokame: Platelet aggregation balanced by von Willebrand factor (VWF) and ADAMTS13. ACCDiS Workshop,

Santiago, Chile, September 25, 2017.

Koichi Kokame and Yuka Eura: Genetic, biochemical, and physiological approach to understanding the function of Herp and Derlin family proteins in ER-associated degradation machinery. XL Annual Meeting of Chilean BMB Society, Puerto Varas, Chile September 26-29, 2017.

Keiko Yamato, Yukako Nakajo, Hitomi Yamamoto-Imoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Hiroharu Kataoka, Jun C. Takahashi, and Hiroji Yanamoto: A clinically relevant dose of activated protein C (APC) suppresses the development of experimental cerebral infarction. Neuroscience 2017, Washington, DC, USA, November 11-15, 2017.

大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：活性化プロテインC(APC)の脳梗塞縮小効果とそのメカニズム：マウスを用いた検討。第60回日本脳循環代謝学会学術集会、大阪、2017年11月3-4日

根木玲子、伊田和史、光黒真菜、岡本章、小亀浩市、宮田敏行：稀な部位で静脈血栓症を発症した発端者を契機に遺伝子解析を行った先天性アンチトロンビン欠乏症タイプ I 家系の検討。日本人類遺伝学会 第62回大会、神戸、2017年11月15-18日

伊田和史、根木玲子、光黒真菜、岡本章、辻明宏、小亀浩市、宮田敏行：静脈血栓症の再発を認めたプロテイン S 欠乏症患者における PROS1 遺伝子解析。日本人類遺伝学会 第62回大会、神戸、2017年11月15-18日

大和恵子、中城有香子、井本(山本)ひとみ、小亀浩市、宮田敏行、片岡大治、高橋淳、柳本広二：エダラボンとの比較における活性化プロテインC (APC) の脳保護効果の検討。第43回日本脳卒中学会学術集会、福岡、2018年3月15-18日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



aHUS（非典型溶血性尿毒症症候群）サブグループ研究報告

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

## aHUS グループ統括

研究分担者：南学正臣

### 研究要旨

非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）は補体関連因子の遺伝的・後天的異常により発症する疾患である。平成 29 年度より aHUS は本研究班のサブグループに加わり、日本国内の aHUS 症例の疫学的・蛋白質学的・遺伝学的解析を通して、本研究班独自の aHUS 診療ガイドラインを作成することを目的として研究活動を開始した。

東京大学医学部附属病院は平成 26 年 9 月に奈良県立医科大学輸血部から aHUS 患者コホートならびに診断システムを引き継ぎ、2017 年 12 月末までに 180 例の臨床的 aHUS 患者を同定した（うち 77 例は、奈良医大診断例）。急性期に検体が得られた aHUS 47 例の溶血試験の結果、溶血度の中央値は 39.8%であり正常人や 2 次性 TMA のそれに比べ有意に高い値を示したが、遺伝的・後天的異常を持たない aHUS 症例と 2 次性 TMA との溶血度による鑑別は困難であった。50%以上の溶血度を認めた 16 例中、14 例が H 因子関連異常を有しており、残りの 2 例は C3 の K1105Q 変異を有していた。今回、145 例にもものぼる多数例の遺伝子解析を実施し、これまでの結果と同様に本邦では C3 変異の頻度が欧米諸国や米国に比べて高く、中でも C3 1157T 変異の頻度が高い（C3 変異例の約 6 割）という傾向を得た。これより、本邦と諸外国では遺伝的背景に差を認めることが強く示唆された。さらに I1157 変異同定例は、その他の C3 変異例に比べ腎予後が良好であるという重要な知見が得られた。

多数例の解析により、本邦における aHUS 患者の独自の疾患背景が明らかにされつつある。今後も引き続き病態解明・疫学調査に努め、本邦の疾患背景を考慮した独自の診療ガイドライン策定に向け研究を継続する。

#### A. 研究目的

非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）は血栓性微小血管症（TMA）に含まれる疾患であり、補体関連因子の遺伝的・後天的異常により発症する。約 60%の症例で補体や補体制御因子（H 因子、I 因子、C3、MCP）の遺伝子異常、H 因子に対する自己抗体の存在が報告されているが、近年では凝固系因子の異常も原因となりうるようになってきた。

当研究班は aHUS 診断のための体系的な検査体制を構築しており、本邦最大の

aHUS 患者コホートを有する唯一の組織である。集積患者数は日本国内における推定 aHUS 患者の約 8 割を占めることから、当研究班の解析データは、本邦における aHUS の疾患背景を反映すると言っても過言ではない。したがって、本研究班における aHUS サブグループの目的は、当研究班の解析システムを用いて aHUS の疫学的、蛋白質学的、遺伝学的なデータの集積を継続し、得られた知見をもとに本邦独自の aHUS 診療ガイドラインを作成することである。

## B. 研究方法

### 疫学調査

東大病院、腎臓・内分泌内科において臨床所見、検査所見、薬剤使用状況などを記載する質問票と家系図を作成、これらの書式を各解析依頼施設の主治医に送付し、データの集積を行った。

### 蛋白質学的解析

#### 1. 羊赤血球溶血試験

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

#### 2. 抗H因子抗体解析

Abnova社のCFH Ab ELISA kit (cat no. KA1477) を用いて測定した。抗体陽性の判定はkitのプロトコルを参考に、正常人検体における平均値+3SDより高い値を陽性と判断とした。強陽性、弱陽性を示したものについては、ウェスタンブロット法を併用して抗体の有無を判断した。

### 遺伝子解析

共同研究先である国立循環器病研究センター研究所 (研究責任者: 宮田敏行) において、aHUS発症に関連する6因子 (CFH, CFI, MCP, C3, CFB, THBD) のエクソン領域をサンガーシークエンス法で

解析した。なお、2歳以下でaHUSを発症した例については、凝固因子であるDGKEも解析対象に含めた。

#### (倫理面への配慮)

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

各医療機関でaHUS疑い患者が発生した場合、患者、家族の同意が得られた症例については東大病院の専門外来を受診していただき、詳細な問診、家族歴の聴取、検査に関する説明を行ったうえで、同意が得られた症例について採血を行った。しかしながら実際は、重症であることや遠方であること等の理由により東大病院への受診が困難であった症例が多かったため、各医療機関において、東大病院で解析を施行することについての倫理委員会承認・患者の同意を得たうえで採血検体を送付してもらい、解析を実施した。

## C. 研究結果

### aHUS コホート患者背景

2017年12月末までに集積した臨床的aHUS例は180例であった (うち、77例は1998年から2014年8月末の間に奈良県立医科大学輸血部で診断された症例)。180例のうち、100例 (57%) が小児期発症 (<18歳) であった (なお、180例中4例は正確な発症年齢が不明であった)。コホート全体における男性の割合は約60%であったが、成人例に特化すると男女比率は同じであった。

妊娠はaHUS発症の1つのトリガーであ

ることが報告されているが、当研究班のコホートで妊娠を契機に TMA を発症した症例は 6 例存在していた。そのうち 3 例で aHUS の原因と考えられる遺伝子変異が同定された。なお、3 例の症例はいずれも出産後に aHUS を発症しており、妊娠関連 aHUS は産褥期に多いとする諸外国からの報告と一致していた。

### 蛋白質学的解析結果

集積した 180 例のうち、急性期の採血検体が得られた症例は 47 例であった。47 例の溶血試験の結果を解析すると、溶血度の中央値は 39.8% (7.2-98.5%, 25-75 パーセントイル値) であり、正常人 (5.2% (3.8-5.9%), n=20) や 2 次性 TMA 症例 (11.9% (1.6-19.2%), n=19) に比べ、有意に高い値を示した。ROC 曲線による解析の結果、aHUS と 2 次性 TMA を区別する溶血度のカットオフ値は 42.7% であったが、aHUS 症例に関して、この 42.7% を上回る溶血度を示した症例は 1 例を除いて全例で何らかの遺伝子変異や抗 H 因子抗体を有していた。よって、遺伝的・後天的異常を有する症例では、溶血試験の溶血度で aHUS と 2 次性 TMA を鑑別しうる可能性があるが、異常を有さない症例については溶血度での鑑別は困難であることが示唆された。

異常因子別に見ると、CFH 遺伝子変異、抗 H 因子抗体陽性例で高い溶血度 (>50%) を示した。CFH 変異について、7 例中 6 例で溶血亢進を認めたが、溶血を認めた変異はいずれも C 末領域に存在したのに対し、溶血を示さなかった 1 例の変異は N 末領域に存在していた。また、C3 変異の多くは溶血試験で溶血亢進を認めなかったが、p. K1105Q という変異のみ CFH 関連

異常と同等の溶血亢進を示した。

抗 H 因子抗体は 16 例に同定され、急性期に検体が得られた症例における抗体価の中央値は 2882 AU/mL (正常人: 約 8~15 AU/mL) であった。抗体陽性例の 20% は成人期に aHUS を発症していたが、小児例に比べ溶血や血小板減少の程度が軽度であるという特徴を示した。

### 遺伝学的解析結果

145 例の患者について解析を実施した結果、遺伝子異常の内訳は次に示す通りであった: C3 (29%)、CFH (9%)、MCP (5%)、DGKE (1%)、THBD (0.7%)、combined mutation (5%)、遺伝子変異未同定 (40%)。以前より、本邦では欧米諸国や米国に比べ CFH 変異の割合が低く、C3 変異の割合が高い (諸外国における CFH 変異の割合: 20-30%、C3 変異の割合: ~10%) ことが報告されていたが (Fan X, et al. *Mol Immunol* 54, 238-246, 2013, Yoshida Y, et al. *PLoS One* 10, e0124655, 2015)、いずれも少数例での報告であった。今回、100 例を上回る症例の遺伝的背景を明らかにしたことで、信憑性が高いデータを得ることができたと言える。また本邦好発変異として知られる C3 p. I1157T は、C3 変異を有していた 43 例中 27 例の患者に認められた。従来、本変異は三重を中心とする関西地域にのみ確認されていたが、27 例中 4 例の患者は関西地方以外の出身であった。

### genotype-phenotype の関連性

小児例と成人例に分けて解析をすると、CFH 変異を有していた 14 例中 12 例は成人期に aHUS を発症していることが特徴的であった。60 代や 70 代で発症する例も散

見され、遺伝的素因がある場合においても必ずしも小児期に aHUS を発症するわけではない状況が伺える。

2016 年 9 月末の時点で集積した 104 例について解析を行った症例について腎予後を解析したところ、CFH 変異あるいは変異未同定例は C3 や MCP 変異、抗 H 因子抗体陽性例と比べて腎死の割合が有意に高いことが明らかとなった。また興味深いことに、C3 の I1157T 変異を有する症例では、I1157T 以外の変異を有する症例に比べて有意に高い再発率を示したものの、多くは支持療法や血漿療法のみで寛解に至っており、予後が良好であった。なお、本結果を含めた本邦 aHUS 患者の疫学的・遺伝学的解析の結果については論文化し、本邦で初めて 100 例を超える aHUS 患者の実態を報告し得た。

#### D. 考察

200 例近い aHUS 症例のコホートを樹立したことにより、本邦における aHUS 患者の実情をより正確に把握できることが可能となった。本国の特徴的な所見としては C3 変異の割合が多いこと、その中でも最も頻度の高い I1157T 変異は比較的腎予後が良いことが挙げられた。これらのデータは、新たな診療ガイド作成に向けて非常に重要な知見となると考えられる。検査の面に関しては、溶血試験の有用性が明らかになりつつあることから、より正確な診断につながることを期待される。

aHUS 解析システムが東京大学医学部附属病院へ移行した 2014 年以降、当 aHUS コホートに占める成人例の割合が飛躍的に増加した。成人例 aHUS は小児に比べて疾患背景が複雑であり、2 次性 TMA との鑑別が困難である場合が多い。今後、当研究班

のコホートにおける成人例 aHUS の臨床的特徴や解析結果を詳細に分析することで、aHUS と 2 次性 TMA との鑑別に有用な情報を得られることが期待される。

#### E. 結論

本研究班での aHUS 解析活動を通して、本邦における aHUS 患者の独自の疾患背景が明らかにされつつある。今後も引き続き、各々の原因因子ごとの解析を推し進め、どういった症例にどのような治療が必要か、という点を明らかにしていく必要がある。これらの成果を通して、本邦独自の診療ガイドライン策定を目指す。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文)

1. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Uchida Y, Miyata T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic background of atypical HUS in Japanese patients. Clin Exp Nephrol 2018. doi: 10.1007/s10157-018-1549-3 (in press)
2. Ashida A, Matsumura H, Sawai T, Fujimaru R, Fujii Y, Shirasu A, Nakakura H, Iijima K. Clinical features in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy, Clin Exp Nephrol. 2018, doi:

- 10.1007/s10157-018-1531-0. (in press)
3. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. Clin Exp Nephrol 2017. doi: 10.1007/s10157-017-1524-4. (in press)
  4. Yamaguchi M, Hori M, Hiroshi N, Maruyama S. Postpartum atypical hemolytic uremic syndrome with complement factor H mutation complicated by reversible cerebrovascular constriction syndrome successfully treated with eculizumab. Thromb Res 151, 79-81, 2017
- (和文)
1. 吉田瑤子、加藤秀樹、非典型溶血性尿毒症症候群. 腎と透析 83 巻 4 号 p. 593-598, 2017.
  2. 菅原有佳、加藤秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS). 腎臓内科・泌尿器科 6 巻 4 号, p. 278-285, 2017
  3. 加藤秀樹、菅原有佳、南学正臣. 次世代シーケンサーを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断. 日本血栓止血学会誌 28 巻 1 号, p. 33-40, 2017.
  4. 菅原有佳、加藤秀樹. 補体制御異常の検査. 腎と透析 82 巻増刊, p. 320-325, 2017.
  5. 長谷川頌、加藤秀樹. 血栓性微小血管症(解説/特集). 薬事 59 巻 10 号, p. 2149-2155, 2017.
  6. 芦田明. 腸管出血性大腸菌感染症 小児臨床検査ガイド第 2 版 文光堂 346-351, 2017.
  7. 芦田明、玉井浩. 溶血性尿毒症症候群. 小児科診療 80, suppl 338-342, 2017.
  8. 芦田明、玉井浩: 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診療ガイド 2015 の概要. 日本小児腎不全学会雑誌 37, 20-23, 2017.
- (書籍)
1. 芦田明. 腸管出血性大腸菌感染症. 小児臨床検査ガイド第 2 版. 水口雅、岡明、尾内一信 編. 文光堂, 346-351, 2017.
  2. 芦田明. 溶血性尿毒症症候群. 小児腎臓学 改訂第 2 版. 日本小児腎臓病学会編. 診断と治療社, 304-9, 2017
2. 学会発表
1. 芦田明. 集中治療領域における非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS). 第 45 回日本集中治療医学会. 2018 年 2 月、幕張メッセ ホテルニューオータニ幕張、千葉
  2. Akira Ashida, Hideki Matsumura, Toshihiro Sawai, Rika Fujimaru, Yuko Fujii, Akihiko Shirasu, Hyogo Nakakura, Kazumoto Iijima. Clinical presentation and outcome in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy: a nationwide survey during 2012-2015. 51th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2017. 11, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans

3. 加藤秀樹、南学正臣. aHUS と C3 腎症の検査と診断. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会、シンポジウム、2017 年 10 月、パシフィコ横浜、横浜
  4. 加藤秀樹、吉田瑤子、藤澤まどか、菅原有佳、南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 診療ガイド 2015. 第 47 回日本腎臓学会西部学術大会、教育講演、2017 年 10 月、岡山コンベンションセンター、岡山
  5. 芦田明、玉井浩. 溶血性尿毒症症候群. 第 38 回 日本アフェレシス学会. 2017 年 10 月、東京ディズニースター・ホテルミラコスタ、千葉
  6. 菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣. 全ゲノム解析により CFHR 領域の新規融合遺伝子を認めた C3 腎症例. 第 54 回 日本補体学会学術集会、2017 年 9 月、コラッセふくしま、福島
  7. 芦田明、松村英樹、中倉兵庫、白数明彦、澤井俊宏、藤丸季可、山崎哲司、藤井裕子、飯島一誠. 我が国における小児期発症血栓性微小血管障害症に関する全国調査. 第 52 回 日本小児腎臓病学会、2017 年 6 月、京王プラザホテル、東京
  8. 加藤秀樹、南学正臣. 補体系腎疾患における診断プロセスと最終診断. 第 60 回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム、2017 年 5 月 28 日、仙台国際センター、仙台
  9. 加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、宮田敏行、香美祥二、南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の診断・全国調査研究. 第 60 回日本腎臓学会学術総会 公的研究報告-5. 2017 年 5 月 26 日、仙台国際センター、仙台
  10. 芦田明、松村英樹、中倉兵庫、白数明彦、藤丸季可、澤井俊宏、山崎哲司、藤井裕子、飯島一誠. 日本人小児における血栓性微小血管障害症に関する全国調査. 第 60 回日本腎臓学会、2017 年 5 月. 仙台国際センター、仙台
3. その他  
特になし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)  
特になし。

## 本邦における非典型溶血性尿毒症症候群患者の疫学的・遺伝的背景の解析

研究分担者：南学正臣	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	教授
研究協力者：藤村吉博	日本赤十字社近畿ブロック血液センター		所長
宮田敏行	国立循環器病研究センター	脳血管外科	シニア研究員
伊藤秀一	横浜市立大学	小児科	教授
丸山彰一	名古屋大学	腎臓内科	教授
芦田 明	大阪医科大学	小児科	講師
加藤秀樹	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	講師
藤澤まどか	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	病院診療医
吉田瑤子	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	研究員

### 研究要旨

非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）の多くは補体関連因子の遺伝子変異やH因子に対する自己抗体によって発症する。aHUSは原因因子によって臨床症状や腎予後が異なることが報告されているが、本邦での実態は明らかでない。そこで本研究は、当研究班で集積したaHUSコホートについて疫学的・遺伝子学的解析を行い、原因因子ごとに臨床症状や予後、治療実態を明らかにすることを目的とした。

1998年から2016年9月末までに集積した臨床的aHUS患者は118例であり、うち104例の遺伝子解析の結果、本邦では諸外国に比べC3変異の割合が高い（31%）ことが分かった。さらに32例のC3変異保有例のうち、16家系24例の患者がI1157Tという同一の変異を有していた。遺伝子背景と臨床症状との相関を解析したところ、最も再発率が高い変異はC3（77%）であったが、腎死の割合に関してはCFHや原因未同定例で有意に高かった。治療の面では、再発例も含め計41例でエクリズマブが使用されており、13例で中断され、27例で維持療法として継続使用されていた。なお、観察期間において中止例のうち再発を認めた症例は1例であった。また、本邦好発のC3 p. I1157T変異はそれ以外のC3変異に比べて有意に高い再発率を示したが、予後が良好であるという特徴的所見が得られた。

本研究により、本邦においてもaHUSの原因遺伝子別に予後が大きく異なることが示唆された。将来的には全ての症例に一樣にエクリズマブ治療を行うのではなく、個々の症例に応じた治療法の確立が重要となることが推測される。今後も原因因子別の自然史を明らかにし、本邦独自の診療ガイドライン策定に向けたデータ集積に努める。

#### A. 研究目的

非典型溶血性尿毒症症候群（aHUS）は何らかの遺伝的・後天的要因により、補体活性化経路の制御機構に異常が生じることで

発症する疾患である。約60%の症例で補体関連因子（H因子、I因子、MCP、C3、B因子）の遺伝子変異や主要な補体制御因子であるH因子に対する自己抗体の存在が報告



されているほか、最近では凝固関連因子である THBD や DGKE の遺伝子変異も発症に関与することが明らかになってきた。

aHUS は原因因子によって臨床症状が異なるため、遺伝的背景と臨床的特徴の関連性を明らかにすることは、治療や予後を考えるうえで非常に重要である。しかしながら、これらの関連性を調べた研究報告の多くは白人集団を対象としたものであり、本邦における現状は未だ明らかでない。また近年、aHUS の治療には抗 C5 モノクローナル抗体（エクリズマブ）が使用されるが、本邦での治療実態は未だ不明な部分が多い。

そこで本研究は、当研究班で集積した本邦最大の aHUS コホートについて疫学的・遺伝子学的解析を行い、原因因子ごとに臨床症状や予後、治療実態を明らかにすることを目的として行った。

## B. 研究方法

### 対象患者

1998 年から 2016 年 9 月の間に、奈良県立医科大学（1998 年～2014 年 8 月）と東京大学医学部附属病院（2014 年 9 月～2016 年 9 月）で臨床的に aHUS と診断した症例について解析を実施した。aHUS の診断は、当研究班の活動を通して作成された aHUS 診療ガイド 2015 (Kato H, et al. Clin Exp Nephrol 20, 536-543, 2016) に沿って行った。

### 疫学調査

奈良県立医科大学で集積した症例については、検査依頼時に各主治医に記載して頂いた検査依頼用紙の臨床情報をもとにデータの集積を行った。東京大学医学部附属病院で集積した症例については、臨床所見、検査所見、薬剤使用状況などを記載する質

問票と家系図を各主治医に送付し、これを用いてデータの集積を行った。

### 蛋白質学的解析：抗 H 因子抗体解析

Abnova 社の CFH Ab ELISA kit (cat no. KA1477) を用いて測定した。kit のプロトコルに沿って正常人検体における平均値+3SD より高い値を陽性としたが、最終的にはウェスタンブロット法を併用して抗体陽性の有無を判断した。

### 遺伝子解析

国立循環器病研究センター研究所（研究責任者：宮田敏行）において、CFH, CFI, MCP, C3, CFB, THBD のエクソン領域を解析した。なお、2 歳以下で aHUS を発症した例については DGKE も解析対象に含めた。

同定された遺伝子の判定は健常者のゲノム配列を解析したデータベースである dbSNP や HGVD、1000 ゲノムプロジェクトを参考に、MAF (minor allele frequency) スコアが 0.005 未満のものを aHUS の原因と考えられる遺伝子変異 (predisposing variant) と判断した。

### (倫理面への配慮)

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

各医療機関で aHUS 疑い患者が発生した場合、患者・家族の同意が得られた症例については東大病院の専門外来を受診していただき、詳細な問診、家族歴の聴取、検査に関する説明を行ったうえで、同意が得られた症例について採血を行った。実際は東大病院への受診が困難な症例が多かったため、各医療機関において東大病院で解析を

施行することについての倫理委員会承認ならびに患者の同意を得たうえで採血検体を送付してもらい、解析を実施した。

### 統計学的解析

統計解析は全て JMP® pro 11.2 を用いて行った。結果は特に記載のない限り連続変数は中央値(範囲)、カテゴリー変数はパーセンテージで表記した。2 群間の統計学的な有意差は  $\chi^2$  乗検定または Fisher 検定を用いて解析した。累積腎生存率は死亡者を除外した上で Kaplan-Meier 分析を用いて算出し、2 群間の比較には log-rank 検定を用いた。P<0.05 を統計学的に有意と考えた。

## C. 研究結果

### 患者背景及び臨床的特徴

1998 年から 2016 年 9 月末で集積した臨床的 aHUS 患者は 118 例であり(表 1)、うち 65%は小児期(<18 歳)発症であった。118 例について初診時に得られた臨床データを解析した結果、75%の症例が何らかのトリガーを契機に aHUS を発症しており、感染性胃腸炎(21%)や上気道感染(20%)の頻度が高かった。なお、TMA の 3 徴を全て満たさない症例は 25%存在したが、急性腎障害は全例で認められ(ただし 1 例は aHUS 発症前から末期腎不全を呈していた)、48%の症例で腎代替療法による治療を必要とした。従来、aHUS の尿所見は着目されていなかったが、当研究班のコホートでは多くの症例が高度蛋白尿(中央値:11.7 g/gCre)を呈しており、85%の症例で血尿がみられた。また凝固線溶系データを DIC の診断基準を参考に評価を行ったところ、FDP の増加(>10 mg/dl)は 72%の症例で認めたが、PT-INR 延長(>1.25)を示した症例は 13%、

Fibrinogen の軽度低下(100-150 mg/dl)は 8%、著明な低下(<100 mg/dl)は 2%のみであった。

### 遺伝子背景

104 例の遺伝子解析の結果、本邦では欧米諸国や米国に比べ C3 変異の割合は高く(31%)、CFH 変異の割合は低い(10%)ことが分かった(表 1)。本邦では C3 変異が多いという傾向は以前より報告されていたが(Fan X, et al. *Mol Immunol* 54, 238-246, 2013, Yoshida Y, et al. *PLoS One* 10, e0124655, 2015)、いずれも少数例での結果であった。今回のように 100 例を超えるコホートでもなお、C3 変異が多いという傾向が得られたことから、本邦と欧米諸国や米国とでは遺伝的背景が異なることが強く示唆された。また C3 変異を有していた 32 例のうち、16 家系 24 例の患者で 1157 番目のイソロイシン(I1e, I)がスレオニン(Thr, T)に置換する I1157T 変異を認めた。なお今回の研究では、CFI や CFB に変異を有する症例は同定されなかった。

### 遺伝子背景と臨床症状との関連性

C3 や MCP 変異を有する症例の多くは小児期に aHUS を発症していたが、一方で CFH 変異の多くは成人期発症であった。抗 H 因子抗体陽性例の発症年齢は二相性を示し、80%の症例が小児期に、残りの 20%は成人期に発症していた。臨床検査値に関して、CFH 変異の約 40%は重症の貧血(Hb<6 g/dL)を呈することが特徴的所見であった。

### 遺伝子背景と治療及び予後との関連性

転帰の判明した 104 例の症例において、急性期の死亡率は 3.3%、腎死率は 12.8%であり、中央値 2.5 年の追跡では全死亡率

は5.4%、腎死率は15%であった。腎死の割合に関してはCFHや原因未同定例で有意に高かった(図1)。再発はC3変異例の77%、MCP変異例の50%、CFH変異例の38%でみられ、それ以外では認めなかった。

治療に関する詳細な情報は101例で得られ、74例の患者は初回発作時に血漿療法を施行され、うち33例でエクリズマブが併用されていた。再発後に使用開始された例も含め、エクリズマブ使用例全例のうち維持療法として継続使用されていた27例中1例(DGKE変異例)で投与期間中に再発を認めたが、投与期間の短縮により寛解を得ている。エクリズマブ中止例は13例存在し、うち1例(C3変異例)で再発を認めた。

#### C3 p. I1157T変異とそれ以外のC3変異を有する症例との臨床的特徴の比較

C3変異に焦点を当ててその臨床的特徴を解析した(表2)。興味深いことにI1157T以外のC3変異を有する症例は全例でC3の低下を認めたのに対し、I1157T変異を有する症例でC3低下を認めた症例は1例も存在しなかった。さらにI1157T変異を有する症例では、そうでない症例に比べて有意に高い再発率を示したものの、多くは支持療法や血漿療法のみで寛解に至っており、予後が良好であった。

#### D. 考察

100例を超えるaHUS症例の解析を通して、本邦では諸外国とは異なる遺伝的背景を有することが示唆された。また本邦好発のC3 p. I1157T変異は頻回な発作を認めるものの、他のC3変異に比べ予後が良好であることを明らかにした。本結果は、aHUSの予後は原因因子によるだけでなく、変異の種類もまた症状や予後に影響を与える可

能性を示唆している。

臨床的特徴として、本邦aHUS患者は諸外国と比べて腎予後が良い傾向を示したが、これは本邦好発のC3 p. I1157Tの腎予後が良好であることに起因すると考えられた。またC3 p. I1157T変異保有例の多くは血漿療法や保存的治療によって寛解を得ていたことから、aHUSの治療法の選択や治療期間は、今後の検討課題であると考えられる。

#### E. 結論

本邦独自の遺伝子背景が、本邦aHUS患者の臨床的特徴や予後に影響を与えていることが分かってきた。今後も引き続き、原因別のコホートや自然史を解析し、本邦独自の診療ガイドライン改訂に向け研究活動を進めていく。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文)

1. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Uchida Y, Miyata T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic background of atypical HUS in Japanese patients. Clin Exp Nephrol 2018. doi: 10.1007/s10157-018-1549-3 (in press)
2. Ashida A, Matsumura H, Sawai T, Fujimaru R, Fujii Y, Shirasu A, Nakakura H, Iijima K. Clinical features in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy, Clin

Exp Nephrol. 2018, doi: 10.1007/s10157-018-1531-0. (in press)

3. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. Clin Exp Nephrol 2017. doi: 10.1007/s10157-017-1524-4. (in press)
4. Yamaguchi M, Hori M, Hiroshi N, Maruyama S. Postpartum atypical hemolytic uremic syndrome with complement factor H mutation complicated by reversible cerebrovascular constriction syndrome successfully treated with eculizumab. Thromb Res 151, 79-81, 2017

(和文)

1. 吉田瑤子、加藤秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群. 腎と透析 83 巻 4 号 p. 593-598, 2017.
2. 菅原有佳、加藤秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS). 腎臓内科・泌尿器科 6 巻 4 号, p. 278-285, 2017
3. 加藤秀樹、菅原有佳、南学正臣. 次世代シーケンサーを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断. 日本血栓止血学会誌 28 巻 1 号, p. 33-40, 2017.
4. 菅原有佳、加藤秀樹. 補体制御異常の検査. 腎と透析 82 巻増刊, p. 320-325, 2017.
5. 長谷川頌、加藤秀樹. 血栓性微小血管症(解説/特集). 薬事 59 巻 10 号, p. 2149-2155, 2017.
6. 芦田明、玉井浩. 溶血性尿毒症症候群. 小児科診療 80, suppl 338-342, 2017.
7. 芦田明、玉井浩: 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診療ガイド 2015 の概要. 日本小児腎不全学会雑誌 37, 20-23, 2017.

(書籍)

1. 芦田明. 腸管出血性大腸菌感染症. 小児臨床検査ガイド第 2 版. 水口雅、岡明、尾内一信 編. 文光堂, 346-351, 2017.
2. 芦田明. 溶血性尿毒症症候群. 小児腎臓学 改訂第 2 版. 日本小児腎臓病学会 編. 診断と治療社, 304-9, 2017

2. 学会発表

1. 芦田明. 集中治療領域における非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS). 第 45 回日本集中治療医学会. 2018 年 2 月, 幕張メッセ ホテルニューオータニ幕張, 千葉
2. Akira Ashida, Hideki Matsumura, Toshihiro Sawai, Rika Fujimaru, Yuko Fujii, Akihiko Shirasu, Hyogo Nakakura, Kazumoto Iijima. Clinical presentation and outcome in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy: a nationwide survey during 2012-2015. 51th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2017. 11, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans
3. 加藤秀樹、南学正臣. aHUS と C3 腎症の検査と診断. 第 47 回日本腎臓学会東部学術大会、シンポジウム、2017 年 10 月、

パシフィコ横浜、横浜

4. 加藤秀樹、吉田瑤子、藤澤まどか、菅原有佳、南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 診療ガイド2015. 第47回日本腎臓学会西部学術大会、教育講演、2017年10月、岡山コンベンションセンター、岡山
5. 芦田明、玉井浩. 溶血性尿毒症症候群. 第38回日本アフェレシス学会. 2017年10月、東京ディズニースター・ホテルミラコスタ、千葉
6. 菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣. 全ゲノム解析によりCFHR領域の新規融合遺伝子を認めたC3腎症例. 第54回日本補体学会学術集会、2017年9月、コラッセふくしま、福島
7. 芦田明、松村英樹、中倉兵庫、白数明彦、澤井俊宏、藤丸季可、山崎哲司、藤井裕子、飯島一誠. 我が国における小児期発症血栓性微小血管障害症に関する全国調査. 第52回日本小児腎臓病学会、2017年6月、京王プラザホテ

ル、東京

8. 加藤秀樹、南学正臣. 補体系腎疾患における診断プロセスと最終診断. 第60回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム、2017年5月28日、仙台国際センター、仙台
9. 加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、宮田敏行、香美祥二、南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の診断・全国調査研究. 第60回日本腎臓学会学術総会 公的研究報告-5. 2017年5月26日、仙台国際センター、仙台
10. 芦田明、松村英樹、中倉兵庫、白数明彦、藤丸季可、澤井俊宏、山崎哲司、藤井裕子、飯島一誠. 日本人小児における血栓性微小血管障害症に関する全国調査. 第60回日本腎臓学会、2017年5月. 仙台国際センター、仙台

3. その他  
特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)  
特になし。

表 1. 遺伝子変異別の臨床的特徴

	全体	遺伝子変異				抗 II 因子抗体	非特定例	未解析例
		C3	CFH	MCP	DGKE			
患者数	118	32	10	5	1	20	36	14
発症年齢, 年	6.0 (0.3-84.0)	6.0 (0.3-70.0)	26.5 (0.3-75.0)	6.0 (1.0-50.0)	0.3	6.0 (4.0-75.0)	15.0 (0.3-80.0)	4.0 (0.5-84.0)
子供 (<18 歳), %	65	66	20	80	100	80	56	93
男性, %	64	66	60	100	100	60	64	57
aiUS 家族歴, %	25	47	10	40	0	0	3	79
初発時初診時臨床データ								
Hb, g/dl	7.4 (3.2-14.5)	8.1 (5.3-12.7)	7.2 (5.0-14.5)	10.2 (10.0-10.3)	8.9	6.4 (4.2-13.5)	7.6 (3.2-13.2)	9.1 (7.0-11.0)
Hb<10 g/dl, %	75	62	75	0	100	89	75	75
Plt, ×10 <sup>4</sup> /ul	3.4 (0.2-24.4)	3.9 (1.3-9.8)	3.0 (1.2-7.4)	4.7 (2.0-7.3)	4.1	2.6 (0.2-11.5)	4.0 (0.8-24.4)	4.1 (1.1-8.5)
Plt<15×10 <sup>4</sup> /ul, %	97	100	100	100	100	100	94	100
LDH, U/l	2051 (276-8800)	3069 (1165-6290)	2009 (1261-3940)	2156 (428-3884)	1830	2983 (299-8800)	1470 (392-4511)	2323 (276-7966)
eGFR, ml/min per 1.73m <sup>2</sup>	19.5 (2.2-105.3)	13.0 (7.5-62.6)	14.5 (2.7-25.1)	24.0 (2.2-45.8)	13.4	31.5 (8.6-56.9)	16.8 (4.0-105.3)	50.7 (21.1-69.8)
BUN, mg/dl	60.0 (11.7-174.0)	54.0 (24.3-134.0)	56.0 (31.2-121.0)	71.9 (41.0-102.7)	38.8	64.8 (28.0-136.7)	60.5 (11.7-174.0)	38.5 (30.0-54.4)
急性腎障害, %	99	100	100	100	100	100	97	100
補体								
C3 低下 (<73 mg/dl), %	47	56	25	50	100	89	23	50
C4 低下 (<11 mg/dl), %	8	14	13	0	0	6	7	0

文献 1 より改変

表 2. C3 p. I1157T 変異とその他の C3 変異の比較

C3 変異を有する患者	p. I1157T	その他の変異	P 値
患者数	24	8	
発症年齢, 年	6.0 (1.0-70.0)	5.1 (0.3-18.0)	0.57
子供 (<18 歳), %	67	63	0.99
男性, %	71	50	0.40
aiUS 家族歴, %	58	13	0.011
フォロー期間, 年	21.0 (3.0-54.0)	2.3 (0.1-35.0)	0.012
初診時所見, %			
貧血 (Hb<10 g/dl)	29	100	0.021
血小板減少 (Plt<15×10 <sup>4</sup> /ul)	100	100	
急性腎障害	100	100	
腎代替療法を要する急性腎障害	41	50	0.99
C3 低下	0	100	0.008
治療			
急性期: Ob / PT / ECZ±PT	11 / 6 / 0	1 / 4 / 3	0.008
維持療法: ECZ 使用なし / ECZ 使用あり	21 / 3	5 / 3	0.12
急性期予後, n (%)			
寛解	24 (100)	6 (75)	
腎死	0 (0)	1 (13)	
生命死	0 (0)	1 (13)	
長期的予後			
再発, %	88	33	0.016
再発回数	2 (0-9)	0 (0-3)	0.003
初発 1 年以内での再発, %	25	0	0.99
初発から再発までの期間, 年	3.0 (0.4-13.0)	4.0	0.38
再発に対する治療: Ob / PT / ECZ±PT	5 / 7 / 5	0 / 1 / 0	0.86
最新の報告における状況, n (%)			
寛解	22 (92)	4 (50)	0.023
腎死	2 (8)	3 (38)	0.041
生命死	0 (0)	1 (13)	0.012

注釈: Ob, observational therapy; PT, plasma therapy (血漿輸注または血漿交換); ECZ, eculizumab

文献 1 参照

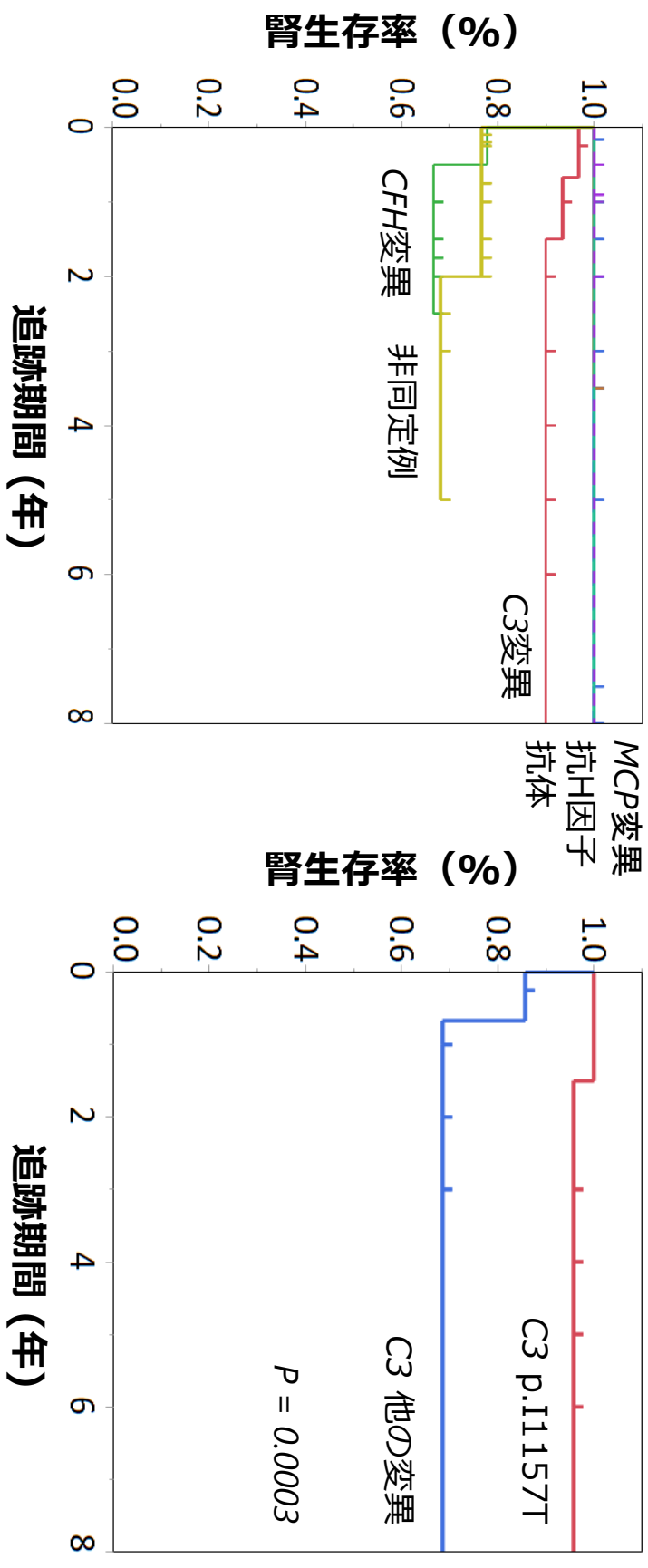


図1. 本邦aHUS患者の異常因子別の腎予後(文献1参照)

## 本邦における非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診療の現状 及び診療ガイドライン策定への動き

研究分担者：	香美祥二	徳島大学	小児科	教授
研究協力者：	芦田 明	大阪医科大学	小児科	講師
	加藤秀樹	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	講師
	池田洋一郎	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	助教
	吉田瑤子	東京大学医学部附属病院	腎臓・内分泌内科	研究員

### 研究要旨

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

本研究では最新知見を基にした新規aHUS診療ガイドライン策定に向け調査を行なった。方法として、奈良県立医科大学輸血部及び東京大学、腎臓・内分泌内科にて臨床的aHUSと診断された症例のデータベースに加え、本邦における小児TMA患者の臨床調査(2017)、aHUSに関するKDIGO controversies conference(2017)等の報告内容を参考にしてaHUS臨床の現状とガイドライン策定に向けてCQとなりうる課題を探索した。

#### A. 研究目的

非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)は、補体活性化経路の1つである第二経路の制御異常によって生じる疾患である。我々は日本腎臓学会と日本小児科学会の合同委員会を立ち上げ、2013年に「非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診断基準」を、さらに2016年には「非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診療ガイド2015」を公表した。

現在、我々は新たなaHUS診療ガイドライン策定に向けて活動しているが、策定に際しての現状の課題として、1) aHUSの定義の見直し、2) エクリズマブの適応症例の明確化、3) クリニカルクエスト(CQ)の設定が挙げられる。特に希少疾患のCQ設定にあたっては、希少疾患に対して実施され

た全国調査の成績や患者登録のデータを元に疾病の自然史を理解し、重要臨床課題を抽出することの必要性が提言されている(EBM普及推進事業、Minds)。

そこで今回我々はaHUSにおけるCQの設定に焦点をあて、奈良医大及び東大病院で蓄積したaHUS症例のコホート解析、研究協力者である芦田らが報告した本邦における小児TMA患者の臨床調査、そしてKDIGO controversies conference(2017)の文献等のデータから、aHUS臨床の現状と最近のトピックスを探索した。

#### B. 研究方法

下記の3文献をもとに、(1)本邦における疫学の現状と国際的報告との差異、(2)



エクリズマブの開始、中断の判断について  
(3)エクズマブ治療の髄膜炎菌感染症の予防、3 点に焦点をあて、治験のデータの収集を行った。

1. 1998 年から 2016 年 9 月の間に、奈良県立医科大学（1998 年～2014 年 8 月）と東京大学医学部附属病院（2014 年 9 月～2016 年 9 月）で臨床的に aHUS と診断した 118 例の疫学的・遺伝学的解析の結果に関する論文報告：Fujisawa M, et al.

Clinical characteristics and genetic background of atypical HUS in Japanese patients. Clin Exp Nephrol (in press)

2. 本邦における小児 TMA 患者の臨床調査：Ashida A, et al. Clinical features in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy. Clin Exp Nephrol (in press)

3. KDIGO controversies conference：Goodship TH, et al. Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. Kidney Int 91, 539–551, 2017

### C. 研究結果

1. 本邦における疫学の現状と国際的報告との差異

奈良医大と東大病院で集積した aHUS 患者についての疫学的・遺伝学的解析の報告をみると、本邦では諸外国に比して C3 変異の割合が高く（約 30%）、中でも C3 p. I1157T 変異の頻度が最も高かった。また、

この C3 p. I1157T 変異例はそれ以外の C3 変異例に比べて有意に高い再発率を示したものの、多くは支持療法や血漿療法のみで寛解に至っており、予後が良好であった（再発率 77%、ESRD・死亡率が 6%）。KDIGO の集計では C3 変異例では再発率は 50%、中長期（3～5 年での）ESRD・死亡率が 75%とされていることから、前述の変異は本邦に特徴的な変異の可能性が高いと考えられる。

抗 H 因子抗体陽性例では KDIGO の集計にて再発率 40～60%、中長期 ESRD・死亡率が 35～60%とされているが、本邦では再発例を認めず、ESRD・死亡率が 11%と低かった。抗 CFH 抗体陽性例も諸外国と比較して予後が違ふことが示唆された。

H 因子の変異・異常例では KDIGO の集計では再発率が 50%、中長期 ESRD・死亡率が 75%とされているが、本邦では再発率 33%、ESRD・死亡率が 40%であり、前者はエクリズマブ非使用群、後者は 7 割がエクリズマブを使用していたため、同薬剤の影響でも説明は可能である。

また芦田らも、小児において TMA を来す原疾患が欧米と比べて違うこと報告した。欧米の報告では小児では TMA の約 9 割が STEC-HUS によるものであるが、本邦での解析では 258 例の TMA のうち、STEC-HUS が 166 例（64%）、aHUS が 40 例（16%）、TTP が 15 例（5.8%）、二次性 TMA が 27 例（10%）、と諸外国と比べて TMA の原疾患の割合が異なることを報告した。

これらのことから、本邦における TMA の原疾患、さらに aHUS の原因因子も、諸外国と異なり、本邦独自の特徴を有しており、さらなる解析が必要と考えられる。

2. エクリズマブの開始、中断の判断について

補体関連の aHUS、すなわち膠原病や薬剤、妊娠などの基礎疾患に伴わない補体制御因子や凝固関連因子の異常による aHUS の診断がついた時点で基本的には全例エクリズマブ投与の対象となるが、感染症の有無(特に髄膜炎菌、インフルエンザ桿菌、肺炎球菌などの莢膜を有する細菌の感染症) など事前のスクリーニングが必要となる。

奈良医大-東大病院の aHUS コホートにおいて、101 例の患者で治療に関する詳細な情報が得られた。このうち、74 例の患者は初回発作時に血漿療法を施行され、33 例でエクリズマブが併用されていた。なお、血漿交換が開始されてからエクリズマブ投与までの期間の中央値は 10 日であった。再発後に使用開始された例も含めると計 41 例でエクリズマブ治療がなされ、投与中止例は 13 例存在した。13 例の内訳は C3 変異：4 例、抗 H 因子抗体陽性：6 例、異常因子未同定：3 例であった。このうち、C3 p. I1157T を保有していた 1 例の患者で再発を認めた。その一方で、欧米では再発のリスクが高いとされる抗 H 因子抗体陽性例では再発を認めた症例は 1 例も存在しなかった(なお、観察期間の中央値は 1 年(0.5 年から 3 年)であった)。

KDIGO の集計報告ではエクリズマブ投与の目標として CH<sub>50</sub> 正常値の 10%未満および AH<sub>50</sub> 正常値の 10%未満、そしてエクリズマブ血中濃度トラフ 100 μg/mL 未満を指標にエクリズマブの投与量減量または投与間隔の延長を検討することが提案されている。またエクリズマブ投与の中断判断基準についてはコンセンサスがないが、これについては発症原因によって再発率に違いが生じてくると考えられ、発症原因別の再発率に応じて中止すべきか継続すべきか議論されるべきであると考えられる。今後のさらな

るデータ蓄積・解析によりエクリズマブ投与の必要性および中断のタイミングが発症原因ごとに明らかにされていくと思われる。

### 3. エクリズマブ治療の髄膜炎菌感染症の予防について患者背景及び臨床的特徴

エクリズマブの投与は莢膜を有する細菌、その中でも特に髄膜炎菌感染のリスクを増大させることが知られており、同薬剤の使用に際しては髄膜炎菌ワクチンの投与が必須となっている。しかしながら、本邦で使用が認められている 4 価髄膜炎菌ワクチンは、国内で分離されている主な血清型 B に起因する侵襲性髄膜炎菌感染症を予防することができないと予想されるが、エクリズマブ使用例においては補体活性がなくなるためにワクチンの効果が減弱するという意見もある(Clinical and Experimental Immunology 114.3 (1998): 327-329.)。

最近、本邦のエクリズマブ投与患者 3 例において重篤な髄膜炎菌感染症が報告された。このうち 2 例は発作性夜間血色素尿症(PNH) 患者であり、1 例は aHUS 例であった。国内でエクリズマブを使用されている総患者数は数百名と推測されるが、このうち 3 例で髄膜炎菌感染を認めたことから、その発症リスクは決して低いとは言えない。2016 年 10 月までの集計によると全世界で約 29000 人にエクリズマブが投与され 82 例、92 件の髄膜炎菌感染症の報告があり、100 人年あたり 0.29 の発症率となる。この感染症の臨床的特徴は髄膜炎よりも敗血症となることが多く、臨床症状として高度の発熱のみを呈することがあり診断に苦慮することが多いこと、また非常に急性の経過をたどることである(発症後 24 時間以内に死亡することもある)。このような致死性の重篤な感染症の発症リスクがあるが、抗生

剤の予防的投与、スタンバイ投与（患者に抗生剤を持たせておき発熱時にすみやかに内服してもらう方法）の是非については未だにコンセンサスは得られていない。

#### D. 考察

本研究において本邦の報告では、海外とは疫学が異なることが考えられた。また aHUS の定義自体が異なることが明らかとなった。本邦独自のさらなる疫学的調査が必要であるとともにそれらに基づいたエビデンスの構築、ガイドライン策定、aHUS のさらなる定義の検討が必要であると考えられる。

#### E. 結論

蓄積されたデータ、エビデンスの解析や文献調査を行い、診療ガイドラインが取り上げるべきトピックスやクリニカルクエスチョン(CQ)を決定したい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(英文)

1. Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Uchida Y, Miyata T, Matsumoto M, Fujimura Y, Nangaku M. Clinical characteristics and genetic background of atypical HUS in Japanese patients. Clin Exp Nephrol 2018. doi: 10.1007/s10157-018-1549-3 (in press)
2. Ashida A, Matsumura H, Sawai T, Fujimaru R, Fujii Y, Shirasu A,

Nakakura H, Iijima K. Clinical features in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy, Clin Exp Nephrol. 2018, doi: 10.1007/s10157-018-1531-0. (in press)

3. Kato H, Nangaku M, Okada H, Kagami S. Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS. Clin Exp Nephrol 2017. doi: 10.1007/s10157-017-1524-4. (in press)
4. Yamaguchi M, Hori M, Hiroshi N, Maruyama S. Postpartum atypical hemolytic uremic syndrome with complement factor H mutation complicated by reversible cerebrovascular constriction syndrome successfully treated with eculizumab. Thromb Res 151, 79-81, 2017

(和文)

1. 吉田瑤子、加藤秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群. 腎と透析 83 巻 4 号 p. 593-598, 2017.
2. 菅原有佳、加藤秀樹. 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS). 腎臓内科・泌尿器科 6 巻 4 号, p. 278-285, 2017
3. 加藤秀樹、菅原有佳、南学正臣. 次世代シーケンサーを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断. 日本血栓止血学会誌 28 巻 1 号, p. 33-40, 2017.
4. 菅原有佳、加藤秀樹. 補体制御異常の検査. 腎と透析 82 巻増刊, p. 320-325, 2017.

5. 長谷川頌、加藤秀樹. 血栓性微小血管症(解説/特集). 薬事 59 卷 10 号, p. 2149-2155, 2017.
  6. 芦田明、玉井浩. 溶血性尿毒症症候群. 小児科診療 80, suppl 338-342, 2017.
  7. 芦田明、玉井浩. 非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)診療ガイド2015の概要. 日本小児腎不全学会雑誌 37, 20-23, 2017.
  8. 香美祥二. 溶血性尿毒症症候群 (HUS) とペロ毒素 腎臓内科・泌尿器科 6 卷 4 号 : p273-277, 2017
- (書籍)
1. 芦田明. 腸管出血性大腸菌感染症. 小児臨床検査ガイド第2版. 水口雅、岡明、尾内一信 編. 文光堂, 346-351, 2017.
  2. 芦田明. 溶血性尿毒症症候群. 小児腎臓学 改訂第2版. 日本小児腎臓病学会編. 診断と治療社, 304-9, 2017
  3. 香美祥二. 溶血性尿毒症症候群と非典型溶血性尿毒症症候群 内科学第11版 p1449-1451, 2017 朝倉書店
2. 学会発表
    1. 芦田明. 集中治療領域における非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS). 第45回日本集中治療医学会. 2018年2月、幕張メッセ ホテルニューオータニ幕張、千葉
    2. Akira Ashida, Hideki Matsumura, Toshihiro Sawai, Rika Fujimaru, Yuko Fujii, Akihiko Shirasu, Hyogo Nakakura, Kazumoto Iijima. Clinical presentation and outcome in a series of 258 Japanese pediatric patients with thrombotic microangiopathy: a nationwide survey during 2012-2015. 51th Annual Meeting of American Society of Nephrology. 2017. 11, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans
    3. 加藤秀樹、南学正臣. aHUS と C3 腎症の検査と診断. 第47回日本腎臓学会東部学術大会、シンポジウム、2017年10月、パシフィコ横浜、横浜
    4. 加藤秀樹、吉田瑤子、藤澤まどか、菅原有佳、南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) 診療ガイド2015. 第47回日本腎臓学会西部学術大会、教育講演、2017年10月、岡山コンベンションセンター、岡山
    5. 芦田明、玉井浩. 溶血性尿毒症症候群. 第38回日本アフェレシス学会. 2017年10月、東京ディズニーシー・ホテルミラコスタ、千葉
    6. 菅原有佳、加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、内田裕美子、小亀浩市、宮田敏行、秋岡祐子、三浦健一郎、服部元史、南学正臣. 全ゲノム解析によりCFHR 領域の新規融合遺伝子を認めたC3腎症例. 第54回日本補体学会学術集会、2017年9月、コラッセふくしま、福島
    7. 芦田明、松村英樹、中倉兵庫、白数明彦、澤井俊宏、藤丸季可、山崎哲司、藤井裕子、飯島一誠. 我が国における小児期発症血栓性微小血管障害症に関する全国調査. 第52回日本小児腎臓病学会、2017年6月、京王プラザホテル、東京
    8. 加藤秀樹、南学正臣. 補体系腎疾患における診断プロセスと最終診断. 第60

回日本腎臓学会学術総会、シンポジウム、2017年5月28日、仙台国際センター、仙台

9. 加藤秀樹、藤澤まどか、吉田瑤子、宮田敏行、香美祥二、南学正臣. 非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS) の診断・全国調査研究. 第60回日本腎臓学会学術総会 公的研究報告-5. 2017年5月26日、仙台国際センター、仙台
10. 芦田明、松村英樹、中倉兵庫、白数明彦、藤丸季可、澤井俊宏、山崎哲司、

藤井裕子、飯島一誠. 日本人小児における血栓性微小血管障害症に関する全国調査. 第60回日本腎臓学会、2017年5月. 仙台国際センター、仙台

3. その他  
特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)  
特になし。

特発性血栓症／先天性血栓性素因サブグループ研究

グループリーダー：森下英理子 金沢大学

研究分担者：小嶋哲人 名古屋大学 津田博子 中村学園大学

大賀正一 九州大学 小林隆夫 浜松医療センター

研究協力者：坂田洋一 自治医科大学 宮田敏行 国立循環器病研究センター

横山健次 東海大学 中村真潮 なかむら内科

榛沢和彦 新潟大学 辻 明宏 国立循環器病研究センター

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

尾島俊之 浜松医科大学 和田英夫 三重大学

## 特発性血栓症／先天性血栓性素因サブグループ研究

研究分担者：森下英理子

### 研究要旨

特発性血栓症サブグループは、静脈血栓塞栓症を対象とし、エビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診療ガイドラインの作成を通して、特発性血栓症の予知・予防の対策確立を目的としている。個別研究としては、診療ガイドライン策定に向けて、新生児・乳児に発症する PC 欠乏症の早期診断と治療管理法の確立の検討（大賀ら）、「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」の追加解析（小林ら）、遺伝性血栓性素因の人種差および血中 PS 濃度の予測因子の解明（津田ら）、AT 抵抗性(ATR) 検出検査法の自動凝固検査機器への適用の検討（小嶋ら）、ATR を示す無症候性の先天性プロトロンビン異常症の解析（森下ら）を行った。また、「先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドライン」の策定については、実態調査に基づいて診療指針（私案）を提案した。（小林ら）。

#### A. 研究目的

特発性血栓症サブグループ研究は、近年我が国でも増加している静脈血栓塞栓症 (VTE) のエビデンス収集とともに、その発症要因である先天性血栓性素因の診療ガイドの作成を通して、VTE の予知・予防の対策確立を目的としている。

特発性血栓症は、血液凝固制御因子のプロテインC (PC)、プロテインS (PS) およびアンチトロンビン (AT) の先天的な欠乏などにより、若年性に重篤な血栓症を発症する疾患群である。新生児・乳児期には脳出血・梗塞や電撃性紫斑病などを引き起こすが、小児期・思春期・成人では時に致死性となるVTEの若年発症や繰り返す再発の原因となる。平成29年4月より、厚労省の指定難病に「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）」として認定されたばかりである。したがって、全国の症例数や実態は十分に把握しきれていない。

本研究班の最終的な研究課題として、(a) 「先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、(b) 「先天性血栓性素因患者の周術期診療ガイドライン」の策定、(c) 「妊娠合併先天性血栓性素因患者の診療ガイドライン」の策定、を目指している。

#### B. 研究方法

個別研究として、以下の研究を行った。

1. 新生児・乳児に発症する PC 欠乏症の早期診断と治療管理法の確立（大賀ら）
2. 先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定（小林ら）
3. 遺伝性血栓性素因の人種差および血中 PS 濃度の予測因子の解明（津田ら）
4. AT 抵抗性(ATR) 検出検査法の自動凝固検査機器への適用（小嶋ら）
5. ATR を示す無症候性の先天性プロトロン

ンビン異常症の解析（森下ら）

### （倫理面への配慮）

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して、各施設の倫理委員会の承認を得た後に実施した。研究対象者には人権を配慮し、研究への参加は自由意思で書面にてインフォームドコンセントを得て施行した。

## C. 研究結果

### 1. 新生児・乳児に発症するPC欠乏症の早期診断と治療管理法の確立（大賀ら）

本年度遺伝子解析を行った 21 歳未満の PC 欠乏症 24 名を加えて、総数 74 名を対象として検討したところ、29 名 (39%) に遺伝子変異を認めた。うちヘテロ変異が 17 名 (59%)、両アレル変異異常者が 12 名 (49%) であり、ヘテロ接合体症例の方が若干多かった。さらに、妊娠・産褥期の母体血栓症から遺伝性 PC 欠乏症の診断に至った 3 家系を経験した。3 名の母はいずれも妊娠を契機に血栓症を発症し、1 名の児が日齢 1 に頭蓋内出血をおこした。

### 2. 先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定（小林ら）

2009 年から 2013 年の 5 年間における「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」の一次調査と二次調査を行ったが、今年度の追加解析により次のような新たな知見を得た。二次調査における血栓塞栓症症例の内訳は、VTE では肺塞栓症 (PE) 232 件、深部静脈血栓症 (DVT) 369 件、その他の静脈血栓症 76 件であった。動脈血栓塞栓症では

脳梗塞 200 件、心筋梗塞 38 件、その他の動脈血栓症 26 件であった。なお、The Japan VTE Treatment Registry Study (急性 VTE の他施設共同観察研究 2009-2010 年) および日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査 (2002 年-2015 年) の結果からみると、全 VTE 患者に占める血栓性素因保有者の割合は 4%前後、周術期 PE では 2%弱であった。

また、現時点での血栓性素因保有妊婦のおおまかな診療指針（私案）は以下の通り提案した。すなわち、妊娠中は通常の臨床的観察に加え、分娩後まで低用量未分画ヘパリンの予防的皮下注射を行うことが推奨される。AT 欠乏症妊婦では、基本的なヘパリン投与に加え、妊娠中に VTE を発症している場合は AT 活性が 70%以上になるように、AT 製剤 1500 単位/日を適宜投与する。しかし、VTE を発症していない場合の併用投与に関する見解は一致していないので、臨床症状で判断することになる。PS 欠乏症およびプロテイン C 欠乏症妊婦も AT 欠乏症妊婦と同様、ヘパリン投与が基本である。VTE を合併した場合は活性化プロテイン C 濃縮製剤も使用可能であるが、半減期が短く高価なため、臨床的にはヘパリン投与が推奨される。

### 3. 遺伝性血栓性素因の人種差および血中 PS 濃度の予測因子の解明（津田ら）

日本に多い PS 遺伝子多型 (PS p. Lys196Glu) と中国に多い PC 遺伝子多型 (PC p. Arg189Trp および PC p. Lys193del) について、多民族国家シンガポールの VTE 患者と健常人について、その発現頻度を検討した。その結果、中華系 (Hun Chinese) の遺伝性血栓性素因として PC p. Arg189Trp と PC p. Lys193del が重要であること、PC



p.Arg189Trp はマレー系 (Malay) やその他の民族にも同定されたが、PS p.Lys196Glu はいずれの民族にも同定されないことが明らかとなった。

次に、PS p.Lys196Glu 変異アレル保持者を除外した日本人女性を対象に、血中 PS 濃度に関連する心血管病の危険因子 (脂質・糖質代謝、炎症、肥満関連因子) を検討した。心血管病を発症していない中年肥満女性では、血中総 PS 濃度の正の予測因子として PC、apoC-II、fibrinogen が選択され ( $R^2=0.519$ )、遊離型 PS 濃度では apoC-II のみが選択された ( $R^2=0.123$ )。若年非肥満女性でも総 PS 濃度の予測因子として apoC-II が選択されたが、遊離型 PS 濃度では選択されなかった。

#### 4. AT 抵抗性 (ATR) 検出検査法の自動凝固検査機器への適用 (小嶋ら)

ATR 検出検査法としてトロンビン不活性化動態解析法の多数検体処理や一般病院でのスクリーニング検査に用いることを目的に、血液凝固自動分析装置に対して本法適用を検討した。検体希釈液における至適 pH は 8.1、NaCl 至適濃度は 0.2 mol/L で、希釈倍率は 200 倍が適当であった。リン脂質・Ca・FVa 混液 20  $\mu$ L 中のリン脂質は 25%PTT 試薬 RD、CaCl<sub>2</sub> は 15 mmol/L、ウシ FVa 濃度は 1  $\mu$ g/mL、FXa 液 20  $\mu$ L 中のウシ FXa は 0.05  $\mu$ g/mL が至適であった。プロトロンビン活性化時間は 2 分、AT 液 20  $\mu$ L 中の AT 濃度は 75  $\mu$ g/mL を至適とし、不活化時間は 0、10、20、30 分の経時的観察が適していた。

#### 5. ATR を示す無症候性の先天性プロトロンビン異常症の解析 (森下ら)

無症候性のプロトロンビン (PT) 異常症

である PT Salakta (E509A 変異) および PT Greenville (R560Q 変異) について遺伝子組み換え変異 PT 蛋白を作成し、フィブリノゲン活性化能ならびに ATR について検討を行った。PT 活性 (凝固一段法) 値は、両変異 PT 共に著明に低下していた。一方、変異トロンビンと AT との結合能 (トロンビン-AT 複合体: TAT) は、両変異トロンビン共に有意に低下していた。また、AT による変異トロンビン不活性化能は、両変異トロンビンは AT 存在下においても活性の低下が見られなかった。以上の結果から、両変異トロンビンは高い ATR を示すことが確認された。

#### D. 考察

大賀らの小児血栓症患者を対象として研究により、小児期血栓症においても、PROC ヘテロ変異が重要であることが示された。さらに、血栓症を発症した母に対して行った母子同時解析から、周産期における母子の遺伝子解析の有用性が示された。逆に、新生児発症例から母親の遺伝性血栓性素因が明らかになった例もあるため、今後これらの家系解析も進めて、周産期の母子に対する血栓性素因スクリーニングのあり方を検討することが必要になると思われる。

小林らの全国アンケート調査の追加解析から、日本人の女性ホルモン剤使用中の静脈及び動脈血栓塞栓症は、年々増加している傾向が示された。従来の結果と併せて言えることは、死亡率は極めて低いが、月経困難症患者に女性ホルモン剤を処方する際には、そのリスクとベネフィットを十分に説明し、リスクである血栓塞栓症も常に念頭に置いて、安全な処方と血栓塞栓症の早期発見・早期診断を心がけることが肝要

である。また、「血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドライン」についての私案を提唱したが、今後、蓄積されたデータの解析や文献を参考にし、産婦人科・小児科・血液内科医などから幅広い意見を取り入れ、2年以内に適切な予知方法を盛り込んだQ & A方式の診療ガイドラインの策定を行う予定である。

津田らの検討により、遺伝性血栓性素因には人種差が存在することが確認され、また血中PS濃度の予測因子としてはtriglyceridesを多く含むリポタンパク質に存在するapoC-IIが重要であることが明らかになった。

ATRは、変異プロトロンビンから生じた異常トロンビンがATによる不活化に抵抗性をもつため血栓リスクとなるが、従前の臨床検査法ではこのATRを検出できない。小嶋らが提案した血液凝固自動分析装置を用いたATR検出法は、多数検体処理や一般病院でのスクリーニング検査法としても使用可能であることが示された。

森下らの検討により、先天性PT異常症PT Salakta (E509A 変異) およびPT Greenville (R560Q 変異) が、臨床的に無症候となる原因の可能性が明らかとなった。両異常トロンビンは、ATに対する不活化障害により過剰に血中に残存するが、この異常トロンビンはフィブリノゲン結合能が著減しているため過剰なフィブリン産生をきたさない。一方、わずかに産生されたフィブリンにより止血異常もきたさない。両者が同時におこっているために、血栓症も異常出血もきたさず、無症候である可能性が推測された。

## E. 結論

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

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, Shibayama M, Tsuda T, Jin X, Nomoto H, Asakura H, Wada T, Ohtake S, Morishita E: Thrombosis prediction based on reference ranges of coagulation-related markers in different stages of pregnancy. Clin Appl Thromb Hemost. 23(7):844-850, 2017.
- 2) Kadohira Y, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Nakao S, Asakura H: A case of aortic aneurysm-associated DIC that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban. Int Med. 56(21), 2913-2917, 2017.

- 3) Sugiura-Ogasawara M, Omae Y, Kawashima M, Toyo-Oka L, Khor SS, Sawai H, Horita T, Atsumi T, Murashima A, Fujita D, Fujita T, Morimoto S, Morishita E, Katsuragi S, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y, Tokunaga K: The first genome-wide association study identifying new susceptibility loci for obstetric antiphospholipid syndrome. *J Hum Genet.* 62(9):831-838, 2017.
- 4) Ando J, Masuda A, Iizuka K, Ochiai T, Shingai N, Yasuda H, Homma Y, Kobayashi E, Morishita E, Komatsu N: Factor XI deficiency as a result of a novel Tyr347Stop nonsense mutation in an elderly Japanese woman. *Geriatr Gerontol Int.* 17(6):1029-1031, 2017.
- 5) Kadohira Y, Yamada S, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Nakao S, Asakura H: Aortic aneurysm-associated disseminated intravascular coagulation that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban. *Intern Med.* 56(21):2913-2917, 2017.
- 6) Kamijima S, Sekiya A, Takata M, Nakano H, Murakami M, Nakazato T, Asakura H, Morishita E: Gene analysis of inherited antithrombin deficiency and functional analysis of abnormal antithrombin protein (N87D). *Int J Hematol.* 107(4):490-494, 2018.
- 7) 森下英理子: 深部静脈血栓症・肺塞栓症の発症機序と危険因子. *日本医師会雑誌* 146(1):22-26, 2017.
- 8) 森下英理子: 遺伝性血栓性素因の診断と治療. *臨床血液*58(7):866-874, 2017.
- 9) 森下英理子: 動脈・静脈の疾患(上)ー最近の診断・治療動向ー静脈疾患の検査, *日本臨床* 75(増刊号4):196-200, 2017.
- 10) 森下英理子: 周術期に留意すべき凝固異常 第1回 先天性血栓性素因～先天性プロテインC・プロテインS欠損症. *Thrombosis Medicine* 12月, 2017.
- 11) 森下英理子: Diagnosis and treatment of inherited thrombophilia. *臨床血液* 58(7):866-874, 2017.
- 12) 門平靖子、森下英理子: DOAC療法が先天性血栓性素因に及ぼす影響. *日本血栓止血学会誌*29(1):20-27, 2018.
- 13) Moriyasu F, Furuichi Y, Tanaka A, Takikawa H, Yoshida H, Sakaida I, Obara K, Hashizume M, Kage M, Ohfuji S, Kitano S, Kawasaki S, Kokubu S, Matsutani S, Eguchi S, Shiomi S, Kojima T, Maehara Y, Kuniyoshi Y: Diagnosis and treatment guidelines for aberrant portal hemodynamics. *Hepatol Res.* 47(5):373-386, 2017.
- 14) Miljic P, Gvozdenov M, Takagi Y, Takagi A, Pruner I, Dragojevic M, Tomic B, Bodrozic J, Kojima T, Radojkovic D, Djordjevic V: Clinical and biochemical characterization of the Prothrombin Belgrade mutation in a

- large Serbian pedigree: new insights into antithrombin resistance mechanism. *J Thromb Haemost.* 15(4):670-677, 2017.
- 15) 田村彰吾、井上克枝、小嶋哲人: 巨核球造血の微小環境 特集・巨核球造血と血小板産生の新知見 血液フロンティア Vol. 27(6): 811-820, 2017.
- 16) 高木夕希、小嶋哲人: アンチトロンビンレジスタンス *Coagulation & Inflammation* 3(1): 27-31, 2017.
- 17) 小嶋哲人: 血栓止血学のトピックス *Cardio-Coagulation* 4(2), 53-58, 2017.
- 18) Yamashita A, Nagae C, Mori M, Ashikaga T, Kojima T, Taki M.: First case report of hemophilia B Leyden in Japan. *Int J Hematol.* 106(1):135-137, 2017.
- 19) Tamura S, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Suzuki S, Katsumi A, Takagi A, Kojima T: In vitro exploration of latent prothrombin mutants conveying antithrombin resistance. *Thromb Res.* 159:33-38, 2017.
- 20) Suzuki S, Nakamura Y, Suzuki N, Yamazaki T, Takagi Y, Tamura S, Takagi A, Kanematsu T, Matsushita T, Kojima T: Combined deficiency of factors V and VIII by chance coinheritance of parahaemophilia and haemophilia A, but not by mutations of either *LMAN1* or *MCFD2*, in a Japanese family. *Haemophilia.* 24(1): e13-e16, 2018.
- 21) Tamura S, Suga Y, Tanamura M, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Hattori Y, Kakihara M, Suzuki S, Takagi A, Kojima T: Optimisation of antithrombin resistance assay as a practical clinical laboratory test: development of prothrombin activator using factors Xa/Va and automation of assay. *Int J Lab Hematol.* 2018, in press.
- 22) Sanda N, Suzuki N, Suzuki A, Kanematsu T, Kishimoto M, Hasuwa H, Takagi A, Kojima T, Matsushita T, Nakamura S. vWF K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice. *Int J Hematol.* 2018, in press
- 23) Kobayashi T, Kajiki M, Nihashi K, Honda G. Surveillance of the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with obstetrical disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 159: 109-115, 2017.
- 24) 朝倉英策、高橋芳右、内山俊正、江口豊、岡本好司、川杉和夫、小林隆夫、瀧正志、辻仲利政、松下正、松野一彦、窓岩清治、矢富裕、和田英夫: 日本血栓止血学会 DIC 診断基準 2017 年版. 日本血栓止血学会誌 28(3): 369-391, 2017.
- 25) 小林隆夫: 産褥期の静脈血栓塞栓症. 猿田享男、北村惣一郎監修、私の治療 2017-2018 年度版. 日本医事新報社、東京、pp1541-1543, 2017.
- 26) 小林隆夫: 産科 DIC. 日本産婦人科・新生児血液学会編集 (小林隆夫、瀧正志、

- 板倉敦夫編集委員)、産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き. メディカルビュー社、東京、pp97-108, 2017.
- 27) 小林隆夫: 血栓塞栓症合併妊娠. 日本産婦人科・新生児血液学会編集 (小林隆夫、瀧正志、板倉敦夫編集委員)、産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き. メディカルビュー社 東京、pp41-52, 2017.
- 28) 小林隆夫、杉浦和子: わが国における女性ホルモン剤使用に関連する血栓塞栓症の現況. 日本生殖内分泌学会雑誌 22: 9-15, 2017.
- 29) 小林隆夫: 診療ガイドに基づいた静脈血栓塞栓症の予防と治療. 臨床血液 58(7): 875-882, 2017.
- 30) 小林隆夫: (2) 静脈血栓塞栓症の危険因子 7) 妊娠. 動脈・静脈の疾患 (上). 日本臨床 75 巻増刊号: 120-123, 2017.
- 31) 小林隆夫: 遺伝子組換え活性型血液凝固第VII因子製剤. 産科と婦人科 84(5): 547-552, 2017
- 32) 小林隆夫: 女性と静脈血栓塞栓症. 日本医師会雑誌 146(1): 42, 2017.
- 33) 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の予防と治療指針. 岡元和文編著, 救急・集中治療最新ガイドライン 2018-'19、総合医学社、東京、pp327-331, 2018.
- 34) 小林隆夫: 産科領域における血栓塞栓症に対する薬物療法. 周産期医学 48(1): 92-94, 2018
- 35) Ota S, Matsuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Mori T, Hamada M, Kobayashi T, Ito M: Incidence, characteristics and management of venous thromboembolism in Japan during 2011. Circ J. 82(2): 555-560, 2018.
- 36) Otsuka Y, Ueda M, Nakazono E, Tsuda T, Jin X, Noguchi K, Sata S, Miyazaki H, Abe S, Imai K, Iwamoto M, Masuda T, Moriguchi R, Nakano S, Tsuda H: Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women. Blood Coagul Fibrinolysis. 20(1):39-47, 2018.
- 37) Yasutake K, Moriguchi R, Kajiyama T, Miyazaki H, Abe S, Masuda T, Imai K, Iwamoto M, Tsuda H, Obe M, Kawate H, Ueno H, Ono M, Goromaru R, Ohe K, Enjoji M, Tsuchihashi T, Nakano S: Interannual Study of Spot Urine-evaluated Sodium and Potassium Excretion in Young Japanese Women. J Clin Hypertens. 19:653-660, 2017.
- 38) 津田博子: 特発性血栓症. 臨床血液、58 (10): 279-287, 2017.
- 39) 津田博子: 特発性血栓症 (遺伝性血栓性素因による) の診療ガイドライン策定に向けて. 第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム報告. 日本血栓止血学会誌、28 (4): 566-567, 2017.
- 40) 津田博子: 静脈血栓症の遺伝要因, in 「動脈・静脈の疾患 (上) -最新の診断・治療の動向-」. 日本臨床、75 (増刊号4): 129-134, 2017
- 41) Inoue H, Terachi S, Uchiumi T, Sato T, Urata M, Ishimura M, Koga Y,

- Hotta T, Hara T, Kang D, Ohga S: The clinical presentation and genotype of protein C deficiency with double mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 64(7): 2017.
- 42) Inoue H, Ochiai M, Yasuoka K, Tanaka K, Kurata H, Fujiyoshi J, Matsushita Y, Suga S, Nonaka K, Taguchi T, Kato K, Ohga S, on behalf of the Neonatal Research Network of Japan (NRNJ): Early Mortality and Morbidity of the Infants with Birth Weight of 500 grams or less in Japan. *J Pediatr*. 190: 112-117. e3, 2017.
- 43) 市山正子、井上普介、井上裕文、落合正行、石村匡崇、楠田剛、山下博徳、佐藤和夫、堀田多恵子、内海健、康東天、大賀正一: 新生児のプロテインC活性基準値と遺伝性プロテインC欠乏症の診断. *日本産婦人科新生児血液学会雑誌*. 26:17-22, 2017.
- 44) Kirino M, Ochiai M, Ichiyama M, Inoue H, Kusuda T, Kinjo T, Ishimura M, Ohga S: Transient hemi-lower limb ischemia in the newborn; arterial thrombosis or persistent sciatic artery? *Am J Perinatol Reports*. 7:e13-16, 2017.
- 45) Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Ohga S, Tanoue Y, Matumoto M, Hara T: Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol* 2017 (in press).
2. 学会発表
- 1) Abe N, Oku K, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Bohgaki T, Yasuda S, Mori R, Morishita E, Suzuki-Inoue K, Atsumi T. Possible therapeutics for antiphospholipid antibody related thrombocytopenia: A systemic review and meta-analysis. The American College of Rheumatology/Association of Rheumatology Health Professionals 2017 annual meeting. San Diego Convention Center (San Diego), November 3-8, 2017.
- 2) 森下英理子: 知っておきたい静脈血栓塞栓症の傾向と対策、血栓塞栓症を考える会、仙台、2017年4月6日.
- 3) 門平靖子、林朋恵、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二: 当院で経験した第V因子インヒビター4例の特徴. 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場(名古屋)、2017年6月8日~10日.
- 4) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療~悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に~、iMET in KOBE, 神戸、2017年6月22日.
- 5) 森下英理子: APTT延長を認めたらどんな病態を考えますか? 45<sup>nd</sup> SEKISUI Coagulation Seminar in Ariake、東京、2017年7月1日.
- 6) 關谷暁子、森下英理子、朝倉英策: 先天性血栓性素因の病態と解釈~臨床検査技師の視点から~、第18回日本検査血液学会学術集会ワークショップ、札幌、2017年7月22日.

- 7) 本木由香里、吉田美香、關谷暁子、原和冴、家子正裕、森下英理子、野島順三: EliAによる自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体価測定の有用性、第18回日本検査血液学会学術集会、札幌コンベンションセンター(札幌)、2017年7月22日~23日.
- 8) 森下英理子: 血栓・止血のピットフォーラム、トロンボモジュリンフォーラム in Fukushima、郡山、2017年8月25日.
- 9) 村上森花、中野明華、上島沙耶香、關谷暁子、森下英理子: 当研究室で解析した先天性アンチトロンビン(AT)・プロテインC(PC)・プロテインS(PS)欠損症の遺伝子解析ならびに所見、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
- 10) 上島沙耶香、宮崎香織、關谷暁子、村上森花、中野明華、森下英理子: 先天性プロテインC欠損症の遺伝子解析および異常プロテインC蛋白(K437E)の機能解析、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
- 11) 河内佑紀、佐藤祐樹、片桐孝和、森下英理子: ヒト iPS 細胞由来造血幹細胞を用いた 6pLOH マウスモデルの作製、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
- 12) 佐藤祐樹、片桐孝和、小川恵子、森下英理子: 十全大補湯によるNK細胞機能増強効果の検討、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
- 13) 寺上貴子、森下英理子、關谷暁子、森三佳、林研至、末武司、鈴木健史、小濱聖佳、古莊浩司、朝倉英策、和田隆志: 直接経口抗凝固薬が血中アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS活性測定値に与える影響、第79回日本血液学会学術集会、東京国際フォーラム(東京)、2017年10月20日~22日.
- 14) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療~悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に~、東葛 HEART 研究会、千葉、2017年11月14日.
- 15) 森下英理子: 悪性腫瘍に関連する血栓症、第17回群馬血栓止血研究会、高崎、2017年11月16日.
- 16) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療~悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に~、VTE BOARD FORUM 2017、東京、2017年12月4日.
- 17) 森下英理子: 播種性血管内凝固症候群(DIC)と輸血、愛知県臨床検査技師輸血研究班講演会、名古屋、2017年12月9日.
- 18) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の成因と治療、緩和ケアカンファレンス、神戸、2018年1月25日.
- 19) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の成因と治療、骨髄腫治療のトータルマネジメント~VTEとSREへの対応~、大阪、2018年2月1日.
- 20) 森下英理子: 特発性血栓症/先天性血栓性素因、市民公開講座 血液の難病に挑む、大手町サンケイプラザ(東京)、2018年2月3日.
- 21) 森下英理子: 部会活動の紹介ならびに指定難病「特発性血栓症」の診断に際しての問題点、第12回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジ

- ウム、東京、2018年2月10日.
- 22) 長屋聡美、朝倉英策、森下英理子：先天性第X因子欠乏症5症例のphenotypeおよびgenotype、第12回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム、東京、2018年2月10日.
- 23) 森下英理子：遺伝性血栓性素因と検査. 石川県医師会臨床検査制度管理調査合同報告会、石川県医師会館(金沢)、2018年2月11日
- 24) 森下英理子：基礎から学ぶ播種性血管内凝固症候群(DIC)、血液・凝固セミナー、日本医科大学医学部教育棟講堂(東京)、2018年2月20日.
- 25) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療、第五回抗凝固療法セミナー、福山、2018年2月26日.
- 26) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療－悪性腫瘍を中心に－、Cancer VTE Seminar in Yokohama、横浜、2018年3月1日.
- 27) 山田真也、門平靖子、荒幡昌久、林朋恵、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二：ヘパリンからDOACへの変更に伴い治療効果が著変下血管腫に伴う慢性DICの一例、第18回TTMフォーラム、大手町サンケイプラザ(東京)、2018年3月3日.
- 28) 佐藤祐樹、片桐孝和、森広太郎、小川恵子、森下英理子：十全大補湯によるNK細胞機能増強効果の検討. 第57回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会、第336回日本臨床化学会東海・北陸支部例会、金沢勤労者プラザ(金沢)、2018年3月11日.
- 29) 森下英理子：先天性血友病の診断と治療、中外製薬研修会、金沢、2018年3月14日.
- 30) Takagi Y, Kawamura N, Makiyama A, Hashimoto E, Tamura S, Takagi A, Kojima T: Prothrombin missense mutations at 596Arg reduced the affinity of mutant thrombin to thrombomodulin controlled by Na<sup>+</sup> concentration. XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (ISLH), Milano, Italy, May 12-14, 2017.
- 31) 垣原美紗樹、田村彰吾、服部有那、坂根寛人、橋本恵梨華、藤岡亮也、槇山愛弓、河村奈美、鈴木幸子、高木夕希、高木明、小川実加、松下正、小嶋哲人：Inv22の逆位型および健常型ゲノム構造が同時に検出された重症血友病A症例、第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日.
- 32) 坂根寛人、田村彰吾、橋本恵梨華、藤岡亮也、槇山愛弓、河村奈美、鈴木幸子、高木夕希、高木明、兼松毅、岸本磨由子、小川実加、鈴木伸明、松下正、矢田弘史、嶋緑倫、小嶋哲人：血友病Bにおける血液凝固第IX因子遺伝子変異とインヒビターの関連性の検討、第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日.
- 33) 高木夕希、鈴木幸子、河村奈美、槇山愛弓、坂根寛人、橋本恵梨華、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性はトロンビン生成試験(TGA)により検出可能か、第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋



- 屋、2017年6月8-10日。
- 34) 藤岡亮也、中田悠紀子、坂根寛人、橋本恵梨華、河村奈美、榎山愛弓、鈴木幸子、高木夕希、田村彰吾、高木明、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性凝固第 Xa 因子検出法の開発、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 35) 兼松毅、鈴木伸明、小川実加、岸本磨由子、村田萌、三田直美、鈴木敦夫、小嶋哲人、清井仁、松下正：インヒビター保有 von Willebrand 病 type3 の止血治療の検討、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 36) 橋本恵梨華、高木夕希、鈴木幸子、河村奈美、榎山愛弓、坂根寛人、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、上原貴博、國島伸治、小嶋哲人：新規変異 *ITGA2B* p. Cys198Ser を含む複合ヘテロ変異をもつ血小板無力症の一例、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 37) 小川実加、鈴木伸明、竹下享典、内藤真理子、平川晃弘、笹木優賢、兼松毅、小嶋哲人、若井建志、清井仁、松下正：血友病患者における加齢性変化と動脈硬化の検討、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 38) 小川実加、鈴木伸明、鈴木敦夫、垣原美紗樹、村田萌、田村彰吾、兼松毅、岸本磨由子、小嶋哲人、清井仁、松下正：血友病患者の出血頻度と相関する因子の検討、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 39) 長江千愛、山下敦己、梅沢陽太郎、森美佳、足利朋子、秋田美恵子、鈴木典子、山崎哲、小嶋哲人、瀧正志：当院で経験した血友病 B Leyden 変異の兄弟例、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 40) 鈴木幸子、兼松毅、岸本磨由子、高木夕希、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、坂根寛人、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、小川実加、津田弘之、小谷友美、鈴木伸明、小嶋哲人、松下正：活性化プロテイン C 抵抗性(Activated Protein C Resistance: APCR)と産科関連静脈血栓症、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 41) 服部有那、垣原美紗樹、高木夕希、鈴木幸子、榎山愛弓、河村奈美、橋本恵梨華、坂根寛人、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人：フィブリノゲン低下症 3 症例における遺伝子解析、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 42) 榎山愛弓、田村彰吾、村田萌、橋本恵梨華、高木夕希、河村奈美、鈴木幸子、坂根寛人、藤岡亮也、高木明、小嶋哲人：F9 全欠失を伴う X 染色体の複雑な遺伝子再構成を認めた血友病 B の一症例、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017年6月8-10日。
- 43) 鈴木幸子、高木夕希、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、坂根寛人、藤岡亮也、垣原美紗樹、服部有那、田村彰吾、高木明、小川実加、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人：血

- 友病 A 患者における血液凝固第 VIII 因子の遺伝子解析、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、2017 年 6 月 8-10 日.
- 44) Sakane H, Tamura S, Hashimoto E, Fujioka A, Makiyama A, Kawamura N, Suzuki S, Takagi Y, Kanematsu T, Kishimoto M, Ogawa M, Suzuki N, Matsushita T, Yada H, Shima M, Kojima T: Assessment of *F9* mutation associated with inhibitor development in Japanese hemophilia B patients. XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
- 45) Takagi Y, Suzuki S, Kawamura N, Makiyama A, Sakane H, Hashimoto E, Fujioka A, Tamura S, Takagi A, Djordjevic V, Kojima T: Thrombin generation assay CANNOT identify antithrombin resistance during anticoagulant therapy. XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
- 46) Hashimoto E, Kunishima S, Takagi Y, Suzuki S, Makiyama A, Sakane H, Fujioka A, Uehara T, Tamura S, Takagi A, Kojima T: Compound heterozygosity for mutations in *ITGA2B* including a novel p.Cys198Ser in Glanzmann Thrombasthenia (PB 755) XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
- 47) Tamura S, Kakihara M, Hattori Y, Hashimoto E, Sakane H, Takagi Y, Ogawa M, Kanematsu T, Suzuki N, Takagi A, Matsushita T, Kojima T: Unusual Genomic Rearrangement combined with Inv22 and wild-type X-chromosome in severe hemophilia A patients. XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
- 48) 橋本恵梨華、高木夕希、鈴木幸子、坂根寛人、田村彰吾、高木明、金子誠、勝見章、松下正、小嶋哲人：新規大欠失症例を含む先天性アンチトロンビン欠乏症の *SERPINC1* 解析. 第 18 回日本検査血液検査血液学会学術集会、札幌、2017 年 7 月 22-23 日.
- 49) Hattori Y, Kakihara M, Sakane H, Fujioka A, Hashimoto E, Makiyama A, Suzuki S, Takagi Y, Tamura S, Takagi A, Kanematsu T, Suzuki N, Matsushita T, Kojima T: Recent decade data of *PROS1* abnormality analysis in Nagoya University、第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017 年 10 月 20-22 日.
- 50) Murata M, Katsumi A, Kato K, Matsuda A, Nishioka T, Amano M, Matsushita T, Kiyoi H, Naoe T, Maruyama M, Kojima T, Kaibuchi K: Arachidonate 12-lipoxygenase binds to GTP-RhoA through Daam1、第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017 年 10 月 20-22 日.

- 51) Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T. The number of thromboembolism patients among of female hormone users estimated from a national epidemiological survey in Japan. The 21st International Epidemiological Association (IEA) World Congress of Epidemiology (WCE2017), Saitama, August 21, 2017.
- 52) Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T, Urano T. The incidence and prognosis of venous thromboembolism (VTE) and arterial thromboembolism (ATE) associated with oral contraceptives by age groups in Japan. XXVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
- 53) Kobayashi T, Sugiura K, Ojima T. Risks of thromboembolism associated with hormonal contraceptives in Japanese women compared to Western women. Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, 63rd Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. Berlin, Germany, July 8-13, 2017.
- 54) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 湘南藤沢徳洲会病院 VTE 医療安全セミナー、藤沢、2018年3月13日.
- 55) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第33回 VTE 医療安全セミナー in 福岡. 福岡、2018年3月3日.
- 56) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第32回 VTE 医療安全セミナー in 茨城. 筑波、2018年2月15日.
- 57) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 名古屋. 名古屋、2018年2月10日.
- 58) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 徳島. 徳島、徳島、2018年1月27日.
- 59) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 平成29年度長崎県臨床工学技士会主催 第3回 医療機器関連学術セミナー. 長崎、2018年1月20日.
- 60) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第28回 VTE 医療安全セミナー in 山口. 山口、2017年12月16日.
- 61) 小林隆夫：月経困難症治療におけるルナベル配合錠 ULD の安全処方とは？～血栓症リスクを回避するコツ～. ルナベル Web カンファ. 浜松、2017年11月9日.
- 62) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 熊本、熊本、2017年10月14日.
- 63) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 順天堂大学静岡病院医療安全セミナー. 長岡、2017年9月25日.
- 64) 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～

- スク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 仙台. 仙台, 2017年9月2日.
- 65) 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第23回VTE医療安全セミナー in 大分. 大分, 2017年7月22日.
- 66) 小林隆夫: わが国におけるOC/LEP使用時の血栓塞栓症の現状と課題. 中部地区産婦人科医会研修会. 東広島, 2017年6月28日.
- 67) 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第22回VTE医療安全セミナー in 東京, 東京, 2017年5月27日.
- 68) 小林隆夫: 静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 福岡. 福岡, 2017年4月2日.
- 69) 小林隆夫: エコノミークラス症候群ってどんな病気?なぜなるの?第94回日本生理学会大会記念市民公開講座. 浜松, 2017年3月27日.
- 70) Tsuda H: Racial differences. “Plasma coagulation inhibitors”, 63<sup>rd</sup> Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Berlin (CityCube Berlin), Germany, July 8, 2017.
- 71) 津田博子: 特発性血栓症. 第79回日本血液学会学術集会「教育講演」、東京(東京国際フォーラム)、2017年10月22日.
- 72) 津田博子: 特発性血栓症(遺伝性血栓性素因による)の指定難病認定、第6回プロテインS研究会シンポジウム「特発性血栓症(遺伝性血栓性素因による)の診断と治療」、第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋(名古屋国際会議場)、2017年6月9日.
- 73) 津田博子: 血栓症と栄養学の関わり. 第71回日本栄養・食糧学会大会「教育講演」、沖縄(沖縄コンベンションセンター)、2017年5月20日.
- 74) Otsuka Y., Ueda M, Nakazono E., Tsuda T., Jin, X., Noguchi K., Miyazaki H., Nakano S., Tsuda H.: Positive correlation of plasma protein S levels to apolipoprotein C-II in middle-aged obese women and young non-obese women. XXVI Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Berlin (CityCube Berlin), Germany, July 11, 2017.
- 75) 宮真南、能口健太、宮崎瞳、中野修治、津田博子: 女子大学生における $\beta 3$  アドレナリン受容体遺伝子多型 Trp64Arg の検討. 第64回日本栄養改善学会学術総会、徳島(アスティとくしま)、2017年9月15日.
- 76) 能口健太、宮真南、佐田志穂子、津田博子: 韓国とハンガリーの健常者におけるプロテインS、プロテインC遺伝子多型の検討. 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋(名古屋国際会議場)、2017年6月9日.
- 77) 宮真南、能口健太、宮崎瞳、中野修治、津田博子: 若年成人女性における $\beta 3$  アドレナリン受容体遺伝子多型 Trp64Arg の検討—身体指標および血液検査データとの関連—、第71回日本栄養・食糧学会大会、沖縄(沖縄コンベンションセンター)、2017年5月20

- 日.
- 78) Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Tanaka K, Matsunaga Y, Kusuda T, Inoue H, Ishimura M, Takimoto T, Koga Y, Hotta T, Kang D, Hara T: Age-specific onset and distribution of the natural anticoagulant deficiency in pediatric thromboembolism. 28<sup>th</sup> Fukuoka International Symposium on Pediatric/ Maternal-Child Health Research, Fukuoka, Aug 27, 2017.
- 79) 市山正子、石村匡崇、落合正行、井上裕文、井上普介、楠田剛、金城唯宗、高畑靖、内海健、堀田多恵子、康東天、大賀正一：日本人における遺伝性血栓症～新生児・小児と成人の比較～. 第9回福岡県医学会総会、福岡、2017年2月5日.
- 80) 市山正子、井上普介、藤吉順子、山下博徳、佐藤和夫、落合正行：新生児のプロテインC活性値と遺伝性プロテインC異常症患者の効果的スクリーニング. 第62回日本新生児成育医学会学術集会, さいたま、2017年10月12-14日.
- 81) 落合正行、倉田浩昭、安岡和昭、井上普介、藤吉順子、松下悠紀、石村匡崇、大賀正一：極低出生体重児における高フェリチン血症. 第27回日本産婦人科・新生児血液学会、福島、2017年6月2日.
- 82) 松隈知恵、川原紘子、木村献、高橋一雅、楠田剛、大賀正一、長谷川俊史：胎児母体間輸血症候群5例の臨床的特徴. 第27回日本産婦人科・新生児血液学会、福島、2017年6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  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

## アンチトロンビン抵抗性を示す無症候性の先天性プロトロンビン異常症の解析

研究分担者：森下英理子 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科病態検査学 教授

### 研究要旨

今回、無症候性のプロトロンビン(PT)異常症である PT Salakta (E509A 変異) および PT Greenville (R560Q 変異) について遺伝子組み換え変異 PT 蛋白を作成し、フィブリノゲン活性化能ならびにアンチトロンビン抵抗性 (ATR) について検討を行った。PT 活性 (凝固一段法) 値は、両変異 PT 共に著明に低下していた。一方、変異トロンビンとアンチトロンビン(AT)との結合能 (トロンビン—AT 複合体: TAT) は、両変異トロンビン共に有意に低下していた。また、AT による変異トロンビン不活性化能は、両変異トロンビンは AT 存在下においても活性の低下が見られなかった。以上の結果から、両変異トロンビンは高い ATR を示すことが確認された。今回作成した 2 種類の変異 PT E509A 変異および R560Q 変異から生じた異常トロンビンは、AT による不活性化に抵抗性を示したが、一方でこれらの異常トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに活性化させる凝固能が低下していた。今回解析を行った 2 つの変異が無症候性であった理由として、トロンビンの凝固活性化障害と AT によるトロンビン不活性化障害が同時に起きているために、過剰なトロンビンが残存するも過剰なフィブリン形成には至らず、出血症状も血栓症状もきたさなかったと推測される。

### A. 研究目的

近年、プロトロンビン (PT) 異常症において血栓傾向を示すアンチトロンビン抵抗性 (ATR) という概念が提唱され、新たな先天性血栓性素因として注目されている。ATR とは、AT によるトロンビン不活性化が障害されることによって引き起こされる血栓性疾患である。これまでに PT Yukuhashi (R596L 変異) を代表とする ATR 表現型を有するいくつかの変異が報告されているが、すべて発端者は静脈血栓症を発症している。われわれは以前、無症候性の PT 異常症 (PT Himi) を経験し、M380T および R431H の 2 種類の変異を同定した。さらに、それぞれの変異蛋白を発現させ機能解析を行ったところ、両変異 PT 蛋白は共にフィブリノゲン活性化能の低下と ATR を示した。そこで、今回 PT Himi と同様に無症候性の PT 異常症であ

る PT Salakta (E509A 変異) および PT Greenville (R560Q 変異) について変異 PT 蛋白を作成し、同様に機能解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. 遺伝子組換え変異PTの作成

野生型および変異型 PT ベクターを、リポフェクション法にて、CHO 細胞へ導入し、安定発現株を選別した。野生型および変異型発現細胞をビタミン K 含有 FBS free Ham's F-12 培地で培養した後、培養上清を回収し濃縮後、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

#### 2. リコンビナントPTの抗原量、活性値の測定

リコンビナント PT の抗原量は、Matched-pair antibody set for ELISA of human Prothrombin antigen (FII) (Affinity Biologicals) を用いて測定した。検量線は

標準ヒト血漿を用いて作成し、標準曲線からPT抗原量を求めた。

リコンビナントPT蛋白の凝固活性は、フィブリン析出までの時間を測定する凝固時間法（凝固一段法）にて測定した。

### 3. トロンビン・AT複合体（TAT）形成能解析

リコンビナントPTを希釈バッファー（100 mmol/L NaClを含む50 mmol/L Tris-HCl（pH7.4））で1 µg/mLに希釈したものをサンプルとした。活性測定時と同様の方法でPTを十分に活性化した後、10 µg/mL ATを加えて37°Cインキュベートし、トロンビンの不活化反応を行った。100 mM Phenylmethane-sulfonyl fluorideを加えて反応を停止し、全自動分析装置 HISCL-800による化学発光免疫測定法にてTAT濃度を測定した。

### 4. ATR解析

リコンビナントPTと第II因子欠乏血漿とを混和し、希釈バッファー（200 mmol/L NaClを含む50 mmol/L Tris-HCl（pH8.22））で濃度を標準ヒト血漿の1/100（およそ1 µg/mL）となるように調整しサンプルとした。PT活性化剤として、ウシFVa、ウシFXa、リン脂質、5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>溶液を加え37°Cで2分インキュベートしPTを十分に活性化した後、ATを加えて、0分、10分、20分、30分の4つの時間で37°Cインキュベーションし不活化反応を行った。0.5 mM S-2238を加え、直ちに反応液を吸光度405 nmで測定した。残存トロンビン活性（RRTA）を以下の計算式にて算出した。

$RRTA (\%) = (\text{各時点における残存トロンビン活性}) / (\text{0分におけるトロンビン活性}) \times 100$

（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25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守するとともに、遺伝子組換え実験は金沢大学大学院医学系研究科倫理審査委員会の承認（金大6台1774号）のうえ、行った。

## C. 研究結果

凝固時間法によるリコンビナント変異PT蛋白の活性値は、野生型の活性値を100%としたときE509A変異型では26.4±4.7%、R560Q変異型では16.0±5.8%であり、ともに活性値が有意に著減していた。変異トロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに変換する機能が低下していることが示された。

野生型、E509A変異型、R560Q変異型のリコンビナントPTにおいて、TAT量は時間経過とともに増加した。AT添加後120分経過時のTAT濃度は、野生型では450.6±36.0 ng/mLであったのに対し、E509A変異型は60.6±28.8 ng/mL、R560Q変異型は70.7±23.1 ng/mLであり、野生型の13~15%と有意に減少していた。

野生型ではATによる不活化30分後の残存トロンビン活性（30' RRTA）は6%にまで低下していた。一方、E509A変異型の30' RRTAは85.1%、R560Q変異型の30' RRTAは81.6%ほどであり、トロンビンがATによって十分に不活化されず、高度なATRを有することが示された。

## D. 考察

今回作成した2種類の変異PTから生じた異常トロンビンは、ATによる不活化に抵抗性（ATR）を示したが、一方でこれらの異常ト

ロンビンはフィブリノゲンをフィブリンに活性化させる凝固能が低下していた。したがって、今回解析を行った2つのPT異常症が無症候性であった理由として、トロンビンの凝固活性化障害とATによるトロンビン不活化障害(ATR)が同時に起きているために、過剰なトロンビンが残存するも過剰なフィブリン形成には至らず、出血症状も血栓症状もきたさなかったと推測される。ATRを示す異常トロンビンのフィブリノゲン活性化能がどの程度低下すると、その過剰な残存トロンビンによる血栓傾向をきたすのかは不明であり、今後の研究課題である。

また、異常トロンビンのトロンボモジュリンとの結合能や、FVIIIやFV、FXIII活性化能などについても今後検討する必要がある。

## E. 結論

先天性PT異常症において、臨床的に無症候である理由として、ATに対する不活化障害により異常トロンビンが過剰に血中に残存するが、この異常トロンビンはフィブリノゲン結合能が著減しているため過剰なフィブリン産生をきたさない。一方、わずかに産生されたフィブリンにより止血異常もきたさない。両者が同時におこなっているために、血栓症も異常出血もきたさず、無症候である可能性が推測された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sekiya A, Hayashi T, Kadohira Y, Shibayama M, Tsuda T, Jin X, Nomoto H, Asakura H, Wada T, Ohtake S,

Morishita E: Thrombosis prediction based on reference ranges of coagulation-related markers in different stages of pregnancy. Clin Appl Thromb Hemost. 23(7):844-850, 2017.

- 2) Kadohira Y, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Nakao S, Asakura H: A case of aortic aneurysm-associated DIC that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban. Int Med. 56(21), 2913-2917, 2017.
- 3) Sugiura-Ogasawara M, Omae Y, Kawashima M, Toyo-Oka L, Khor SS, Sawai H, Horita T, Atsumi T, Murashima A, Fujita D, Fujita T, Morimoto S, Morishita E, Katsuragi S, Kitaori T, Katano K, Ozaki Y, Tokunaga K: The first genome-wide association study identifying new susceptibility loci for obstetric antiphospholipid syndrome. J Hum Genet. 62(9):831-838, 2017.
- 4) Ando J, Masuda A, Iizuka K, Ochiai T, Shingai N, Yasuda H, Homma Y, Kobayashi E, Morishita E, Komatsu N: Factor XI deficiency as a result of a novel Tyr347Stop nonsense mutation in an elderly Japanese woman. Geriatr Gerontol Int. 17(6):1029-1031, 2017.
- 5) Kadohira Y, Yamada S, Matsuura E, Hayashi T, Morishita E, Nakao S, Asakura H: Aortic aneurysm-associated disseminated intravascular coagulation that responded well to a switch from warfarin to rivaroxaban. Intern Med.



56(21):2913-2917, 2017.

- 6) Kamijima S, Sekiya A, Takata M, Nakano H, Murakami M, Nakazato T, Asakura H, Morishita E: Gene analysis of inherited antithrombin deficiency and functional analysis of abnormal antithrombin protein (N87D). *Int J Hematol.* 107(4):490-494, 2018.
  - 7) 森下英理子: 深部静脈血栓症・肺塞栓症の発症機序と危険因子. *日本医師会雑誌* 146(1):22-26, 2017.
  - 8) 森下英理子: 遺伝性血栓性素因の診断と治療. *臨床血液*58(7):866-874, 2017.
  - 9) 森下英理子: 動脈・静脈の疾患(上) —最近の診断・治療動向—静脈疾患の検査. *日本臨床* 75(増刊号4):196-200, 2017.
  - 10) 森下英理子: 周術期に留意すべき凝固異常 第1回 先天性血栓性素因～先天性プロテインC・プロテインS欠損症. *Thrombosis Medicine* 12月, 2017.
  - 11) 森下英理子: Diagnosis and treatment of inherited thrombophilia. *臨床血液*58(7):866-874, 2017.
  - 12) 門平靖子, 森下英理子: DOAC療法が先天性血栓性素因に及ぼす影響. *血栓止血誌* 29(1):20-27, 2018.
2. 学会発表
- 1) Abe N, Oku K, Amengual O, Fujieda Y, Kato M, Bohgaki T, Yasuda S, Mori R, Morishita E, Suzuki-Inoue K, Atsumi T. Possible therapeutics for antiphospholipid antibody related thrombocytopenia: A systemic review and meta-analysis. The American College of Rheumatology/Association of Rheumatology Health Professionals 2017 annual meeting. San Diego Convention Center (San Diego), November 3-8, 2017.
  - 2) 森下英理子: 知っておきたい静脈血栓塞栓症の傾向と対策、血栓塞栓症を考える会、仙台、2017年4月6日.
  - 3) 門平靖子、林朋恵、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二: 当院で経験した第V因子インヒビター4例の特徴. 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋国際会議場(名古屋)、2017年6月8日～10日.
  - 4) 森下英理子: 静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療～悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に～、iMET in KOBE、神戸、2017年6月22日.
  - 5) 森下英理子: APTT延長を認めたらどんな病態を考えますか? 45<sup>nd</sup> SEKISUI Coagulation Seminar in Ariake、東京、2017年7月1日.
  - 6) 關谷暁子、森下英理子、朝倉英策: 先天性血栓性素因の病態と解釈～臨床検査技師の視点から～、第18回日本検査血液学会学術集会ワークショップ、札幌、2017年7月22日.
  - 7) 本木由香里、吉田美香、關谷暁子、原和冴、家子正裕、森下英理子、野島順三: EliAによる自動分析装置を用いた抗リン脂質抗体価測定の有用性、第18回日本検査血液学会学術集会、札幌コンベンションセンター(札幌)、2017年7月22日～23日.
  - 8) 森下英理子: 血栓・止血のピットフォール、トロンボモジュリンフォーラム

- in Fukushima、郡山、2017年8月25日.
- 9) 村上森花、中野明華、上島沙耶香、關谷暁子、森下英理子：当研究室で解析した先天性アンチトロンビン(AT)・プロテインC(PC)・プロテインS(PS)欠損症の遺伝子解析ならびに所見、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
  - 10) 上島沙耶香、宮崎香織、關谷暁子、村上森花、中野明華、森下英理子：先天性プロテインC欠損症の遺伝子解析および異常プロテインC蛋白(K437E)の機能解析、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
  - 11) 河内佑紀、佐藤祐樹、片桐孝和、森下英理子：ヒト iPS 細胞由来造血幹細胞を用いた 6pLOH マウスモデルの作製、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
  - 12) 佐藤祐樹、片桐孝和、小川恵子、森下英理子：十全大補湯によるNK細胞機能増強効果の検討、第42回北陸臨床病理集談会、北陸大学(金沢)、2017年9月2日.
  - 13) 寺上貴子、森下英理子、關谷暁子、森三佳、林研至、末武司、鈴木健史、小濱聖佳、古莊浩司、朝倉英策、和田隆志：直接経口抗凝固薬が血中アンチトロンビン、プロテインC、プロテインS活性測定値に与える影響、第79回日本血液学会学術集会、東京国際フォーラム(東京)、2017年10月20日～22日.
  - 14) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療～悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に～、東葛 HEART 研究会、千葉、2017年11月14日.
  - 15) 森下英理子：悪性腫瘍に関連する血栓症、第17回群馬血栓止血研究会、高崎、2017年11月16日.
  - 16) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の病態・診断・治療～悪性腫瘍および先天性血栓性素因を中心に～、VTE BOARD FORUM 2017、東京、2017年12月4日.
  - 17) 森下英理子：播種性血管内凝固症候群(DIC)と輸血、愛知県臨床検査技師輸血研究班講演会、名古屋、2017年12月9日.
  - 18) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療、緩和ケアカンファレンス、神戸、2018年1月25日.
  - 19) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療、骨髄腫治療のトータルマネジメント～VTEとSREへの対応～、大阪、2018年2月1日.
  - 20) 森下英理子：特発性血栓症/先天性血栓性素因、市民公開講座 血液の難病に挑む、大手町サンケイプラザ(東京)、2018年2月3日.
  - 21) 森下英理子：部会活動の紹介ならびに指定難病「特発性血栓症」の診断に際しての問題点、第12回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム、東京、2018年2月10日.
  - 22) 長屋聡美、朝倉英策、森下英理子：先天性第X因子欠乏症5症例のphenotypeおよびgenotype、第12回日本血栓止血学会学術標準化委員会(SSC)シンポジウム、東京、2018年2月10日.
  - 23) 森下英理子：遺伝性血栓性素因と検査、石川県医師会臨床検査制度管理調査合同報告会、石川県医師会館(金沢)、2018年2月11日.
  - 24) 森下英理子：基礎から学ぶ播種性血管内凝固症候群(DIC)、血液・凝固セミ

ナー、日本医科大学医学部教育棟講堂  
(東京)、2018年2月20日。

- 25) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療、第五回抗凝固療法セミナー、福山、2018年2月26日。
- 26) 森下英理子：静脈血栓塞栓症の成因と治療—悪性腫瘍を中心に—、Cancer VTE Seminar in Yokohama、横浜、2018年3月1日。
- 27) 山田真也、門平靖子、荒幡昌久、林朋恵、森下英理子、朝倉英策、中尾眞二：ヘパリンから DOAC への変更に伴い治療効果が著変下血管腫に伴う慢性 DIC の一例、第 18 回 TTM フォーラム、大手町サンケイプラザ(東京)、2018年3月3日。
- 28) 佐藤祐樹、片桐孝和、森広太朗、小川恵子、森下英理子：十全大補湯による

NK細胞機能増強効果の検討. 第 57 回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会、第 336 回日本臨床化学会東海・北陸支部例会、金沢勤労者プラザ(金沢)、2018年3月11日。

- 29) 森下英理子：先天性血友病の診断と治療、中外製薬研修会、金沢、2018年3月14日。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

## 遺伝性血栓性素因の人種差および血中プロテイン S 濃度の予測因子の解明

研究分担者：津田 博子 中村学園大学大学院栄養科学研究科 教授

### 研究要旨

静脈血栓塞栓症 (VTE) は、遺伝性血栓性素因と環境要因の相互作用により発症する。遺伝子多型としての遺伝性血栓性素因は、単独での VTE 発症の相対リスクは低い、遺伝子変異の重複や環境要因が加わるとリスクが増大する。日本人ではプロテイン S (PS) 遺伝子多型 (PS Tokushima, PS p.Lys196Glu)、中国人ではプロテイン C (PC) 遺伝子多型 (PC p.Arg189Trp および PC p.Lys193del) が報告されている。そこで、多民族国家シンガポールの VTE 患者と健常人について検討したところ、中華系 (Hun Chinese) の遺伝性素因として PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del が重要であり、PC p.Arg189Trp はマレー系 (Malay) やその他の民族にも同定されたが、PS Tokushima はいずれの民族にも同定されなかった。次に、PS Tokushima 変異アレル保持者を除外した日本人女性を対象に、血中 PS 濃度に関連する心血管病の危険因子 (脂質・糖質代謝、炎症、肥満関連因子) を検討した。心血管病を発症していない中年肥満女性では、血中総 PS 濃度の正の予測因子として PC、apoC-II、fibrinogen が選択され ( $R^2=0.519$ )、遊離型 PS 濃度では apoC-II のみが選択された ( $R^2=0.123$ )。若年非肥満女性でも総 PS 濃度の予測因子として apoC-II が選択されたが、遊離型 PS 濃度では選択されなかった。したがって、遺伝性血栓性素因には人種差が存在し、血中 PS 濃度の予測因子としては triglycerides を多く含むリポタンパク質に存在する apoC-II が重要であることが明らかになった。

### A. 研究目的

静脈血栓塞栓症 (VTE) は、遺伝性血栓性素因と環境要因の相互作用により発症する。遺伝性血栓性素因としては、アンチトロンビン、プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) などの血液凝固制御因子の稀な遺伝子変異があり、若年期より VTE のリスクが著しく増大する。一方、遺伝子多型としての遺伝性血栓性素因としては、血液凝固第 V 因子遺伝子多型 (FV Leiden) と第 II 因子遺伝子多型 (FII G20210A) が白人に存在するが、日本人などの東アジア人やアフリカ黑人には同定されない。東アジア人では、PS 遺伝子多型 (PS Tokushima, PS p.Lys196Glu) が日本人一般集団の 2% に存在し、中国人

では 2 種の PC 遺伝子多型 (PC p.Arg189Trp および PC p.Lys193del) が一般集団にそれぞれ 0.9%、2.4% 存在する。これらの遺伝子多型は単独での VTE 発症の相対リスクは低い、遺伝子変異の重複や環境要因が加わるとリスクが増大する。

今回は、1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明、2) 血中 PS 濃度の予測因子の解明、の 2 つの課題について研究した。研究の目的は、1) 多民族国家のシンガポールにおいて、日本人や中国人に報告されている PS、PC 遺伝子多型が他の民族においても同定されるかを明らかにする、2) 血中 PS 濃度は高エストロゲン状態で低下するだけでなく、心血管病の危険因子 (脂質・糖質代謝、

炎症、肥満関連因子)との関連が報告されていることから、日本人女性を対象として血中 PS 濃度の予測因子を明らかにする、である。

## B. 研究方法

### 1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明

Singapore General Hospital の A/Prof. Lai Heng Lee から送付された VTE 患者 83 名 (58.4±13.8 歳:男性 46 名、女性 37 名)、健常人 74 名 (42.7±16.2 歳:男性 26 名、女性 48 名)の血液検体から gDNA を抽出し、PS Tokushima、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del について real time PCR 法により検討した。シンガポールは多民族国家であり、中華系 (Hun Chinese) 74%、マレー系 (Malay) 13%、インド系 (Indian) 9% で全体の 96% を占めるが、今回の VTE 患者、健常人においても同様の分布であった。

### 2) 血中 PS 濃度の予測因子の解明

中村学園大学健康増進センターの疫学研究の対象者で心血管病を発症していない日本人中年肥満女性 62 名 (48.5±7.8 歳、BMI: 28.9 (26.6, 30.8)) および若年非肥満女性 160 名 (20.0±0.3 歳、BMI: 20.0 (18.9, 21.6)) について、身体計測、体脂肪測定、血液検査を実施し、血中総 PS 濃度 (Tsuda T. et al. Blood Coagul Fibrinolysis. 2012) と遊離型 PS 濃度 (Tsuda T. et al. Clin. Chem. Lab. 2002) を測定した。なお、事前に遺伝子解析を実施し、PS Tokushima 変異アレル保持者は対象から除外した。

(倫理面への配慮)

- 1) Singapore General Hospital が所属する Singapore Health Services の CIRB および中村学園大学倫理審査委員会で承認、
- 2) 中村学園大学倫理審査委員会で承認の後、

すべての対象者に紙面にて説明し同意書を得た。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明

シンガポールの VTE 患者の病態は、DVT 50 名 (60.2%)、PE 30 名 (36.1%)、その他 3 名 (3.6%) であった。遺伝子解析の結果、PS Tokushima は VTE 患者、健常人ともに同定しなかった。PC p.Lys193del は VTE 患者にヘテロ接合体 6 名 (7.2%) を同定したが、すべて中華系であり、病態としては DVT 4 名、PE 2 名であった。PC p.Arg189Trp は VTE 患者 83 名中にホモ接合体 1 名 (中華系)、ヘテロ接合体 16 名 (中華系 10 名、マレー系 5 名、その他 1 名) を同定し、変異アレル保持者の割合は 20.5% だった。ホモ接合体 1 名は DVT、ヘテロ接合体 10 名は DVT、6 名は PE を発症しており、このうち DVT 1 名は PC p.Lys193del と PC p.Arg189Trp の複合ヘテロ接合体であった。一方、健常人 74 名では、PC p.Arg189Trp のヘテロ接合体 2 名 (中華系 1 名、その他 1 名) を同定し、変異アレル保持者の割合は 2.7% であった。

### 2) 血中 PS 濃度の予測因子の解明

中年肥満女性 62 名、若年非肥満女性 160 名の血中 estradiol 濃度はそれぞれ 17 (10, 84) pg/ml、69 (37, 154) pg/ml で若年非肥満女性が有意に高値であり、中年肥満女性の約半数は閉経後で脂質異常症に罹患していた。中年肥満女性、若年非肥満女性の血中総 PS 濃度はそれぞれ 25.4±3.2 mg/ml、23.7±2.6 · g/ml、血中総遊離型 PS 濃度は 10.3±1.7 · g/ml、8.7±1.3 · g/ml で、若年非肥満女性が有意に低値であった。

中年肥満女性の血中総 PS 濃度は、estradiol と負に、triglycerides、total

cholesterol、LDL cholesterol、apoA-II、apoB、apoC-II、apoC-III、apo E、lipoprotein (a)、遊離脂肪酸、空腹時血糖、HbA1c、fibrinogen、PC と正に関連していたが、HDL cholesterol、apoA-I、BMI、ウエスト周囲長、体脂肪率、内臓脂肪面積、血圧、insulin、HOMA-IR、HMW adiponectin、total PAI-1、FVII活性とは関連しなかった。遊離型 PS 濃度もほぼ同様の傾向を示した。重回帰分析の結果、総 PS 濃度の予測因子として PC、apoC-II、fibrinogen が選択され ( $R^2=0.519$ )、遊離型 PS 濃度では apoC-II のみが選択された ( $R^2=0.123$ )。

次に、若年非肥満女性 160 名を対象に、同様の分析を実施した。重回帰分析の結果、総 PS 濃度の正の予測因子として apoC-II のほかに fibrinogen、PC、HbA1c、ウエスト周囲長が選択され ( $R^2=0.346$ )、遊離型 PS 濃度では HbA1c、BMI が選択された ( $R^2=0.102$ )。

以上の結果から、中年肥満女性、若年非肥満女性のいずれにおいても、血中 PS 濃度と apoC-II との間に強い関連があることが分かった。中年肥満女性では、約半数が高 apoC-II 血症 ( $\geq 3.9$  mg/dL) であり、総 PS 濃度と apoC-II の単回帰式の決定係数は、中年肥満女性は 0.278、若年非肥満女性では 0.083 であった (図 1)。

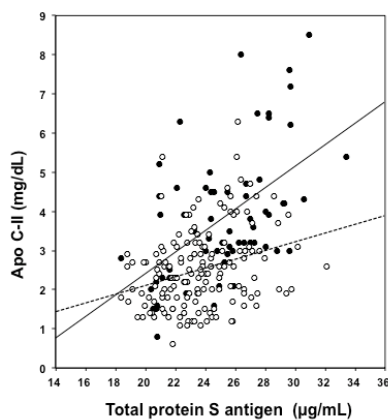


図 1. 血中プロテイン S 濃度とアポリポ  
プロテイン C-II 濃度の関連

●: 中年肥満女性、○: 若年非肥満女性

## D. 考察

### 1) 遺伝性血栓性素因の人種差の解明

PS Tokushima はシンガポールの VTE 患者、健常人のいずれにも同定しなかった。一方、PC p.Arg189Trp と p.Lys193del は中華系シンガポール人の遺伝性血栓性素因であり、VTE 患者 1 名は複合ヘテロ接合体であった。PC p.Arg189Trp はマレー系やその他の民族でも遺伝性血栓性素因であることが示唆された。

### 2) 血中 PS 濃度の予測因子の解明

日本人女性を対象にして、血中 PS 濃度と心血管病の危険因子 (脂質・糖質代謝、炎症、肥満関連因子) との関連を検討した結果、血中プロテイン S 濃度が血中 apoC-II 濃度と強く正に関連することを見出した。ApoC-II は、triglycerides を多く含むリポタンパク質 (VLDL、キロミクロン、それらのレムナント) に存在するアポリポタンパク質であり、lipoprotein lipase の補酵素として triglycerides 異化を促進することから、血液凝固制御系と脂質代謝系との関連が示唆された。

## E. 結論

多民族国家シンガポールにおいて最も多くの割合をしめる中華系の遺伝性血栓性素因として、PC p.Arg189Trp、PC p.Lys193del が重要であることがわかった。PC p.Arg189Trp はマレー系やその他の民族にも同定されたが、PS Tokushima はいずれの民族にも同定されなかった。

血中 PS 濃度は、triglycerides を多く含むリポタンパク質に存在する apoC-II と強く正に関連し、その傾向は若年非肥満女性に比べて、高 apoC-II 血症をきたしている中年肥満女性でより強かった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Otsuka, Y., Ueda, M., Nakazono, E., Tsuda, T., Jin, X., Noguchi, K., Sata, S., Miyazaki, H., Abe, S., Imai, K., Iwamoto, M., Masuda, T., Moriguchi, R., Nakano, S., and Tsuda, H. Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 20(1):39-47, 2018.
- 2) Yasutake K., Moriguchi R., Kajiyama, T., Miyazaki H., Abe S., Masuda T., Imai K., Iwamoto M., Tsuda H., Obe, M., Kawate, H., Ueno H., Ono M., Goromaru, R., Ohe, K., Enjoji, M., Tsuchihashi, T., Nakano S. Interannual Study of Spot Urine-evaluated Sodium and Potassium Excretion in Young Japanese Women. *J Clin Hypertens*. 19:653-660, 2017.
- 3) 津田博子：特発性血栓症. *臨床血液*, 58 (10): 279-287, 2017.
- 4) 津田博子：特発性血栓症（遺伝性血栓性素因による）の診療ガイドライン策定に向けて. 第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム報告. *日本血栓止血学会誌*, 28 (4): 566-567, 2017.
- 5) 津田博子：静脈血栓症の遺伝要因、in 「動脈・静脈の疾患（上）-最新の診断・治療の動向-」. *日本臨床*, 75 (増刊号4): 129-134, 2017.

### 2. 学会発表

- 1) Tsuda H.: Racial differences. "Plasma coagulation inhibitors", 63<sup>rd</sup> Annual SSC Meeting of Int. Soc. Thromb. Haemost., Berlin (CityCube Berlin), Germany, July 8, 2017.
- 2) 津田博子：特発性血栓症. 第79回日本血液学会学術集会「教育講演」、東京(東京国際フォーラム)、10月22日2017年
- 3) 津田博子：特発性血栓症（遺伝性血栓性素因による）の指定難病認定、第6回プロテインS研究会シンポジウム「特発性血栓症（遺伝性血栓性素因による）の診断と治療」、第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋(名古屋国際会議場)、6月9日2017年
- 4) 津田博子：血栓症と栄養学の関わり. 第71回日本栄養・食糧学会大会「教育講演」、沖縄(沖縄コンベンションセンター)、5月20日2017年
- 5) Otsuka Y., Ueda M, Nakazono E., Tsuda T., Jin, X., Noguchi K., Miyazaki H., Nakano S., Tsuda H.: Positive correlation of plasma protein S levels to apolipoprotein C-II in middle-aged obese women and young non-obese women. XXVI Congr. Int. Soc. Thromb. Haemost., Berlin (CityCube Berlin), Germany, July 11, 2017.
- 6) 宮真南、能口健太、宮崎瞳、中野修治、津田博子：女子大学生におけるβ3アドレナリン受容体遺伝子多型 Trp64Arg の検討. 第64回日本栄養改善学会学術総会、徳島(アスティとくしま)、9月15日2017年
- 7) 能口健太、宮真南、佐田志穂子、津田博子：韓国とハンガリーの健常者におけ

るプロテインS、プロテインC遺伝子多型の検討. 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋(名古屋国際会議場)、6月9日2017年

- 8) 宮真南、能口健太、宮崎瞳、中野修治、津田博子:若年成人女性におけるβ3アドレナリン受容体遺伝子多型 Trp64Argの検討—身体指標および血液検査データとの関連—. 第71回日本栄養・食糧学会大会、沖縄(沖縄コンベンションセンター)、5月20日2017年

#### 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



**血栓性素因の調査研究：  
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適用**

研究分担者：小嶋 哲人 名古屋大学大学院医学系研究科 教授  
研究協力者：田村彰吾、高木明（名古屋大学大学院医学系研究科）

**研究要旨**

アンチトロンビン抵抗性（ATR）は、変異プロトロンビンから生じた異常トロンビンがアンチトロンビン（AT）による不活化に抵抗性をもつため血栓リスクとなるが、従前の臨床検査法ではこのATRを検出できない。我々は、ATR検出検査法としてトロンビン不活化動態解析法を開発・改良を報告してきた。今回、多数検体処理や一般病院でのスクリーニング検査に用いることを目的に、血液凝固自動分析装置に対して本法適用を検討した。その結果、変異型プロトロンビン由来トロンビンのATによる不活化不良を検出できる条件を設定でき、これはプロトロンビンが低値となるワルファリン服用時検体においてもトロンビン残存率の算出によるATR検出が可能であった。ATR検出検査法を血液凝固自動分析装置に適用した本研究成果は、少量検体や多数検体の解析処理も可能とし、一般病院でのスクリーニング検査法として使用可能であることを示した。

**A. 研究目的**

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

我々は長らく原因不明であった遺伝性静脈血栓症家系において、通常は出血症状を示すプロトロンビン異常症で逆に血栓症の原因となる遺伝子変異を発見した。これはプロトロンビン遺伝子（*F2*）のミスセンス変異（c. 1787G>T, p. Arg596Leu）・プロトロンビンYukuhashi変異で、変異型トロンビンがアンチトロンビン（AT）抵抗性（ATR）で、その活性が異常に長時間持続するために血栓症

の原因となる。また、トロンビンと結合してその凝固活性を阻害する生理的凝固制御因子・トロンボモジュリン（TM）による凝固抑制作用に対しても、変異型トロンビンは抵抗性（TMR）を示すことも明らかになっている。

本研究班で昨年我々は、*F2*でのArg596コドン（CGG）の一塩基置換により生ずる596Leu（CTG）以外のミスセンス変異体（596Gln（CAG）、596Trp（TGG）、596Gly（GGG）、596Pro（CCG））がATならびにTMによる抗凝固作用に及ぼす影響を評価し、すべてのArg596ミスセンス変異型プロトロンビン（596Gln、596Trp、596Gly）は、AT抵抗性（ATR）ならびにTM抵抗性（TMR）を示し、生体内では各変異型プロトロンビンの凝固能に依存して血栓症の引き起こしやすさにつながることを報告した。

今年度は、ATR検出検査法としてトロンビン不活化動態解析法を開発・改良し、多数検

体処理や一般病院でのスクリーニング検査に用いることを目的に、血液凝固自動分析装置に対して本法適用を検討した。

## B. 研究方法

血液凝固自動分析機器として、今回はACL TOP500 CTS (IL) を使用した。希釈検体反応液量は用手法の約5分の1 (100  $\mu$ L) とした。検体希釈液は50 mmol/L Tris-HCl とし、NaCl でイオン強度を調整した。希釈検体100  $\mu$ Lにリン脂質 $\cdot$ CaCl<sub>2</sub> $\cdot$ ウシFVa混液20  $\mu$ L、ウシFXa液20  $\mu$ Lを加えプロトロンビンを一定時間活性化した。AT液20  $\mu$ Lを添加し不活化反応後、発色性合成基質S-2238液40  $\mu$ Lを添加し、経時的に残存トロンビン活性を測定した。HEK293細胞を用いて作製した野生型および変異型リコンビナント $\cdot$ プロトロンビンをプロトロンビン欠乏血漿に添加し再構成血漿としてそれぞれ検討に用いた。さらに、ワルファリン服用時血漿検体の検討も行った。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

各反応系成分等における検討を行ったところ、検体希釈液における至適pHは8.1、NaCl至適濃度は0.2 mol/Lで、希釈倍率は200倍が適当であった。リン脂質 $\cdot$ Ca $\cdot$ FVa混液20  $\mu$ L中のリン脂質は25%PTT試薬RD、CaCl<sub>2</sub>は15 mmol/L、ウシFVa濃度は1  $\mu$ g/mL、FXa液20  $\mu$ L中のウシFXaは0.05  $\mu$ g/mLが至適であった。プロトロンビン活性化時間は2分、AT液20  $\mu$ L中のAT濃度は75  $\mu$ g/mLを至適とし、不活

化時間は0、10、20、30分の経時的観察が適していた。(図1)

以上の設定条件において、変異型プロトロンビン由来トロンビンのATによる不活化不良を検出できた。プロトロンビンが低値となるワルファリン服用時においても、トロンビン残存率の算出によりATRの検出が可能であった。(図2)

## D. 考察

ATRは、変異プロトロンビンから生じた異常トロンビンがATによる不活化に抵抗性をもつため血栓リスクとなるが、従前の臨床検査法ではこのATRを検出できない。我々は、ATR検出検査法としてトロンビン不活化動態解析法を開発 $\cdot$ 改良を報告してきた。今回、多数検体処理や一般病院でのスクリーニング検査に用いることを目的に、血液凝固自動分析装置に対して本法適用を検討した結果、変異型プロトロンビン由来トロンビンのATによる不活化不良を検出できる条件を設定し、これはワルファリン服用時検体においてもトロンビン残存率の算出によるATR検出でき、かつ少量検体や多数検体の解析処理も可能な一般病院でのスクリーニング検査法としても使用でき、極めて有用な検査法であると考えられる。

## E. 結論

ATR検出検査法を血液凝固自動分析装置に適用し、少量検体や多数検体の解析処理が可能となり、一般病院でもスクリーニング検査として使用可能であることが示された。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Moriyasu F, Furuichi Y, Tanaka A, Takikawa H, Yoshida H, Sakaida I, Obara K, Hashizume M, Kage M, Ohfuji S, Kitano S, Kawasaki S, Kokubu S, Matsutani S, Eguchi S, Shiomi S, Kojima T, Maehara Y, Kuniyoshi Y: Diagnosis and treatment guidelines for aberrant portal hemodynamics. *Hepatol Res.* 2017 Apr;47(5): 373-386.
- 2) Miljic P, Gvozdenov M, Takagi Y, Takagi A, Pruner I, Dragojevic M, Tomic B, Bodrozic J, Kojima T, Radojkovic D, Djordjevic V: Clinical and biochemical characterization of the Prothrombin Belgrade mutation in a large Serbian pedigree: new insights into antithrombin resistance mechanism. *J Thromb Haemost.* 2017 Apr;15(4):670-677.
- 3) 田村彰吾、井上克枝、小嶋哲人: 巨核球造血の微小環境 特集・巨核球造血と血小板産生の新知見 血液フロンティア Vol. 27(6), 811-820, 2017
- 4) 高木夕希、小嶋哲人: アンチトロンビンレジスタンス *Coagulation & Inflammation* 3(1), 27-31, 2017. June. 20.
- 5) 小嶋哲人: 血栓止血学のトピックス *Cardio-Coagulation* 4(2), 53-58, 2017. July. 31.
- 6) Yamashita A, Nagae C, Mori M, Ashikaga T, Kojima T, Taki M.: First case report of hemophilia B Leyden in Japan. *Int J Hematol.* 2017 Jul;106(1):135-137.
- 7) Tamura S, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Suzuki S, Katsumi A, Takagi A, Kojima T: In vitro exploration of latent prothrombin mutants conveying antithrombin resistance. *Thromb Res.* 2017 Nov;159:33-38.
- 8) Suzuki S, Nakamura Y, Suzuki N, Yamazaki T, Takagi Y, Tamura S, Takagi A, Kanematsu T, Matsushita T, Kojima T: Combined deficiency of factors V and VIII by chance coinheritance of parahaemophilia and haemophilia A, but not by mutations of either *LMAN1* or *MCFD2*, in a Japanese family. *Haemophilia.* 2018 Jan;24(1): e13-e16.
- 9) Tamura S, Suga Y, Tanamura M, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Hattori Y, Kakihara M, Suzuki S, Takagi A, Kojima T: Optimisation of antithrombin resistance assay as a practical clinical laboratory test: development of prothrombin activator using factors Xa/Va and automation of assay. *Int J Lab Hematol.* 2018 Feb 13. in press.
- 10) Sanda N, Suzuki N, Suzuki A, Kanematsu T, Kishimoto M, Hasuwa H, Takagi A, Kojima T, Matsushita T, Nakamura S. Vwf K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice. *Int J Hematol.* 2018 Feb 1. in press.

### 2. 学会発表

- 1) Takagi Y, Kawamura N, Makiyama A, Hashimoto E, Tamura S, Takagi A, Kojima T: Prothrombin missense mutations at 596Arg reduced the affinity of mutant thrombin to

- thrombomodulin controlled by Na<sup>+</sup> concentration. XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology (ISLH), Milano, Italy、平成28年5月12-14日
- 2) 垣原美紗樹、田村彰吾、服部有那、坂根寛人、橋本恵梨華、藤岡亮也、槇山愛弓、河村奈美、鈴木幸子、高木夕希、高木明、小川実加、松下正、小嶋哲人：Inv22の逆位型および健常型ゲノム構造が同時に検出された重症血友病A症例(0-005、P-047) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 3) 坂根寛人、田村彰吾、橋本恵梨華、藤岡亮也、槇山愛弓、河村奈美、鈴木幸子、高木夕希、高木明、兼松毅、岸本磨由子、小川実加、鈴木伸明、松下正、矢田弘史、嶋緑倫、小嶋哲人：血友病Bにおける血液凝固第IX因子遺伝子変異とインヒビターの関連性の検討(0-007、P-037) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 4) 高木夕希、鈴木幸子、河村奈美、槇山愛弓、坂根寛人、橋本恵梨華、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性はトロンビン生成試験(TGA)により検出可能か(0-015、P-025) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 5) 藤岡亮也、中田悠紀子、坂根寛人、橋本恵梨華、河村奈美、槇山愛弓、鈴木幸子、高木夕希、田村彰吾、高木明、小嶋哲人：アンチトロンビン抵抗性凝固第Xa因子検出法の開発(0-016、P-026) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 6) 兼松毅、鈴木伸明、小川実加、岸本磨由子、村田萌、三田直美、鈴木敦夫、後藤辰徳、入山智沙子、小嶋哲人、清井仁、松下正：原発性マクログロブリン血症に合併した後天性 von Willebrand 症候群の1例(0-034、P-076)
  - 7) 兼松毅、鈴木伸明、小川実加、岸本磨由子、村田萌、三田直美、鈴木敦夫、小嶋哲人、清井仁、松下正：インヒビター保有 von Willebrand 病 type3 の止血治療の検討(0-035、P-077) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 8) 橋本恵梨華、高木夕希、鈴木幸子、河村奈美、槇山愛弓、坂根寛人、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、上原貴博、國島伸治、小嶋哲人：新規変異 *ITGA2B* p. Cys198Ser を含む複合ヘテロ変異をもつ血小板無力症の一例(0-047、P-064) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 9) 小川実加、鈴木伸明、竹下享典、内藤真理子、平川晃弘、笹木優賢、兼松毅、小嶋哲人、若井建志、清井仁、松下正：血友病患者における加齢性変化と動脈硬化関連疾患の検討(0-076) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 10) 小川実加、鈴木伸明、鈴木敦夫、垣原美紗樹、村田萌、田村彰吾、兼松毅、岸本磨由子、小嶋哲人、清井仁、松下正：血友病患者の出血頻度と相関する因子の検討(0-077、P-038) 第39回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成29年6月8-10日
  - 11) 長江千愛、山下敦己、梅沢陽太郎、森美佳、足利朋子、秋田美恵子、鈴木典子、山崎哲、小嶋哲人、瀧正志：当院で経験した血友病B Leyden 変異の兄弟例(0-082、P-036) 第39回日本血栓止血学会

- 学術集会、名古屋、平成 29 年 6 月 8-10 日
- 12) 鈴木幸子、兼松毅、岸本磨由子、高木夕希、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、坂根寛人、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、小川実加、津田弘之、小谷友美、鈴木伸明、小嶋哲人、松下正：活性化プロテイン C 抵抗性 (Activated Protein C Resistance: APCR) と産科関連静脈血栓症 (P-021) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 29 年 6 月 8-10 日
- 13) 服部有那、垣原美紗樹、高木夕希、鈴木幸子、榎山愛弓、河村奈美、橋本恵梨華、坂根寛人、藤岡亮也、田村彰吾、高木明、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人：フィブリノゲン低下症 3 症例における遺伝子解析 (P-027) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 29 年 6 月 8-10 日
- 14) 榎山愛弓、田村彰吾、村田萌、橋本恵梨華、高木夕希、河村奈美、鈴木幸子、坂根寛人、藤岡亮也、高木明、小嶋哲人：*F9* 全欠失を伴う X 染色体の複雑な遺伝子再構成を認めた血友病 B の一症例 (P-043) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 29 年 6 月 8-10 日
- 15) 鈴木幸子、高木夕希、河村奈美、榎山愛弓、橋本恵梨華、坂根寛人、藤岡亮也、垣原美紗樹、服部有那、田村彰吾、高木明、小川実加、兼松毅、岸本磨由子、鈴木伸明、松下正、小嶋哲人：血友病 A 患者における血液凝固第 VIII 因子の遺伝子解析 (P-044) 第 39 回日本血栓止血学会学術集会、名古屋、平成 29 年 6 月 8-10 日
- 16) Hiroto Sakane, Shogo Tamura, Erika Hashimoto, Akiya Fujioka, Ayumi Makiyama, Nami Kawamura, Sachiko Suzuki, Yuki Takagi, Tsuyoshi Kanematsu, Mayuko Kishimoto, Mika Ogawa, Nobuaki Suzuki, Tadashi Matsushita, Hiroshi Yada, Midori Shima, Tetsuhito Kojima: Assessment of *F9* mutation associated with inhibitor development in Japanese hemophilia B patients (PB 1988) XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany 平成 29 年 7 月 8-13 日
- 17) Yuki Takagi, Sachiko Suzuki, Nami Kawamura, Ayumi Makiyama, Hiroto Sakane, Erika Hashimoto, Akiya Fujioka, Shogo Tamura, Akira Takagi, Valentina Djordjevic, Tetsuhito Kojima: Thrombin generation assay CANNOT identify antithrombin resistance during anticoagulant therapy (PB 2123) XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany 平成 29 年 7 月 8-13 日
- 18) Erika Hashimoto, Shinji Kunishima, Yuki Takagi, Sachiko Suzuki, Ayumi Makiyama, Hiroto Sakane, Akiya Fujioka, Takahiro Uehara, Shogo Tamura, Akira Takagi, Tetsuhito Kojima: Compound heterozygosity for mutations in *ITGA2B* including a novel p.Cys198Ser in Glanzmann Thrombasthenia (PB 755) XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany 平成 29 年 7 月 8-13 日
- 19) Shogo Tamura, Misaki Kakihara, Yuna Hattori, Erika Hashimoto, Hiroto Sakane, Yuki Takagi, Mika Ogawa,

- Takeshi Kanematsu, Nobuaki Suzuki, Akira Takagi, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima: Unusual Genomic Rearrangement combined with Inv22 and wild-type X-chromosome in severe hemophilia A patients (PB 10765) XXVI Congress of International Society on Thrombosis and Haemostasis, Berlin, Germany 平成 29 年 7 月 8-13 日
- 20) 橋本恵梨華、高木夕希、鈴木幸子、坂根寛人、田村彰吾、高木明、金子誠、勝見章、松下正、小嶋哲人：新規大欠失症例を含む先天性アンチトロンビン欠乏症の *SERPINC1* 解析。第 18 回日本検査血液検査血液学会学術集会、札幌、平成 29 年 7 月 22-23 日
- 21) Yuna Hattori, Misaki Kakihara, Hiroto Sakane, Akiya Fujioka, Erika Hashimoto, Ayumi Makiyama, Sachiko Suzuki, Takagi Yuki, Shogo Tamura, Akira Takagi, Tsuyoshi Kanematsu, Nobuaki Suzuki, Tadashi Matsushita, Tetsuhito Kojima: Recent decade data of *PROS1* abnormality analysis in Nagoya University (PS-2-34-4) 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、平成 29 年 10 月 20-22 日
- 22) Moe Murata, Akira Katsumi, Katsuhiko Kato, Asami Matsuda, Tomoki Nishioka, Mutsuki Amano, Tadashi Matsushita, Hitoshi Kiyoi, Tomoki Naoe, Mitsuo Maruyama, Tetsuhito Kojima, Koza Kaibuchi: Arachidonate 12-lipoxygenase binds to GTP-RhoA through Daam1 (PS-1-33-2) 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、平成 29 年 10 月 20-22 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

図1

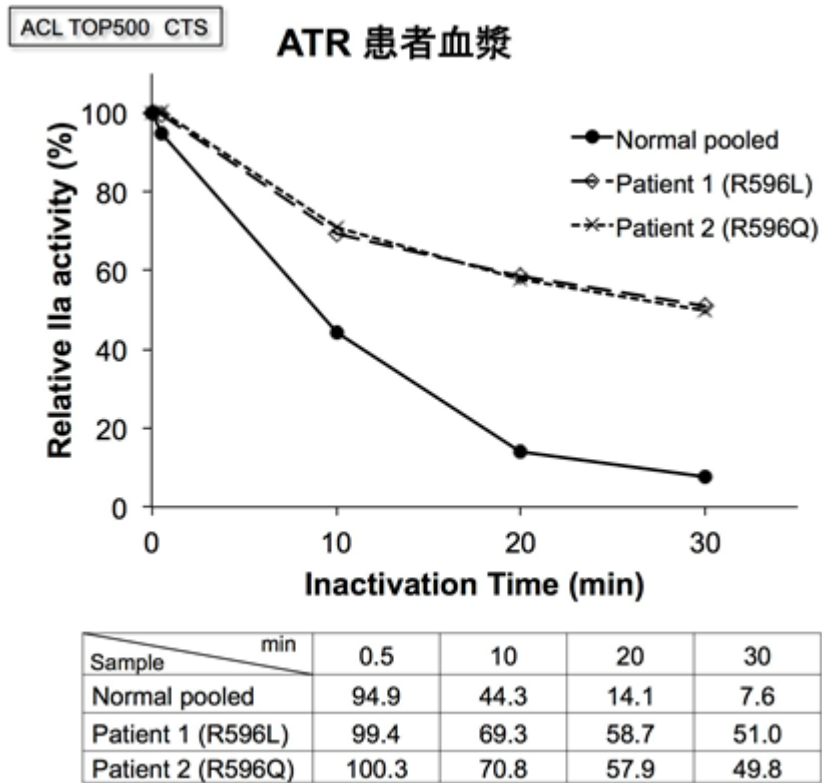
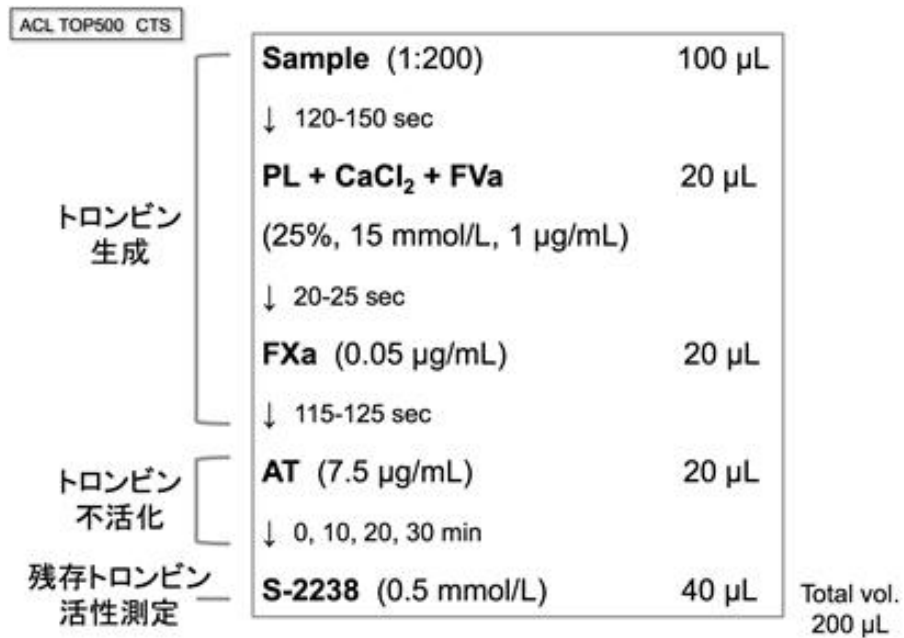


図2



## 先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する 診療ガイドラインの策定

研究分担者：小林隆夫 浜松医療センター 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 名古屋市立大学大学院看護学研究科 講師

### 研究要旨

【目的】本研究では、先天性血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定を目的とする。【方法】研究方法としては、まずは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などから血栓性素因保有者を抽出し、その背景を探るとともに、欧米の論文報告や指針などを参考に診療ガイドラインを策定する。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、8. The Japan VTE Treatment Registry Study（急性VTEの他施設共同観察研究2009-2010）、9. 日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査（2002年-2015年）などである。【結果】今年度は「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」に関して、全国アンケート調査から新たな知見が得られたので、追加報告する。また、全VTE患者に占める血栓性素因保有者の割合は4%前後で、周術期PEでは2%弱であった。【考察及び結論】現時点でわれわれが考えている血栓性素因保有妊婦の診療指針（私案）は、基本的には妊娠中は通常の臨床的観察に加え、分娩後まで低用量未分画ヘパリンの予防的皮下注射を行うことが推奨される。アンチトロンビン（AT）欠乏症妊婦でのAT濃縮剤の投与等付加的治療に関しては今後検討を重ねなければならないが、蓄積されたデータの解析や文献を参考にしながら、適切な予知方法を盛り込んだ診療ガイドラインの策定を行いたい。

#### 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）欠乏症（PS徳島変異は日本人55人に1人と推定）が多く、妊娠中や女性ホルモン剤使用中に血栓症を発症することがある。しかし、妊娠前や女性ホルモン剤使用前に本症と診断されていることはほとんどなく、対応に苦慮することが多い。本研究では血栓性素因保有者の妊娠管理およ

び女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定を目的とする。

#### B. 研究方法

研究方法としては、まずは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などから血栓性素因保有者を抽出し、その背景を探るとともに、欧米の論文報告や指針などを参考に診療ガイド



ラインを策定する。

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)
8. The Japan VTE Treatment Registry Study (急性 VTE の他施設共同観察研究 2009-2010)
9. 日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査 (2002 年-2015 年)

血栓性素因保有者の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。経口避妊薬 (OC) に関連した血栓塞栓症の報告は海外では多いものの日本人における実態は不明である。この実態調査としてわれわれは 2 つの研究を行ってきた。一つは「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」、もう一つは「独立行政法人医薬品医療機器総合機構のデータベースを用いた日本における OC の副作用としての血栓塞栓症」である。これらの調査結果から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

今年度は「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」に関して、全国アンケート調査から新たな知見が得られたので、追加報告する。2009 年から 2013 年の 5 年間ににおける一次調査と二次調査を行ったが、二次調査における血栓塞栓症症例の内訳は静脈血栓塞栓症では PE232 件、DVT369 件、その他の静脈血栓症 76 件であった。動脈血栓塞栓症では脳梗塞 200 件、心筋梗塞 38 件、その他の動脈血栓症 26 件であった。血栓性素因患者の頻度に関しては次回報告する。なお、The Japan VTE Treatment Registry Study および日本麻酔科学会周術期肺塞栓症調査の結果からみると、全 VTE 患者に占める血栓性素因保有者の割合は 4%前後、周術期 PE では 2%弱である。

現時点での血栓性素因保有妊婦のおおまかな診療指針 (私案) は以下の通りである。すなわち、妊娠中は通常臨床的観察に加え、分娩後まで低用量未分画ヘパリン

の予防的皮下注射を行うことが推奨される。アンチトロンビン (AT) 欠乏症妊婦では、基本的なヘパリン投与に加え、妊娠中に VTE を発症している場合は AT 活性が 70%以上になるように、AT 製剤 1500 単位/日を適宜投与する。しかし、VTE を発症していない場合の併用投与に関する見解は一致していないので、臨床症状で判断することになる。PS 欠乏症およびプロテイン C 欠乏症妊婦も AT 欠乏症妊婦と同様、ヘパリン投与が基本である。VTE を合併した場合は活性化プロテイン C 濃縮製剤も使用可能であるが、半減期が短く高価なため、臨床的にはヘパリン投与が推奨される。今後、蓄積されたデータの解析や文献を参考にし、産婦人科・小児科・血液内科医などから幅広い提案をいただき、2 年以内に適切な予知方法を盛り込んだ Q & A 方式の診療ガイドラインの策定を行いたい。

#### D. 考察

今年度は「女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究」に関して、全国アンケート調査から日本人の女性ホルモン剤使用中の静脈及び動脈血栓塞栓症は、年々増加している傾向がみられた。従来の結果と併せて言えることは、死亡率は極めて低いが、月経困難症患者に女性ホルモン剤を処方する際には、そのリスクとベネフィットを十分に説明し、リスクである血栓塞栓症も常に念頭に置いて、安全な処方と血栓塞栓症の早期発見・早期診断を心がけることが肝要である。

また、全 VTE 患者に占める血栓性素因保有者の割合は 4%前後で、周術期 PE では 2%弱であった。今回の検討では血栓性素因保有者に特化した結果は得られていないものの、従来報告してきたように、「入院患者に

おける静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究」で得られた血栓症の有用な予知マーカーである APC-sr、PS 活性および PS 比活性の測定が、妊婦や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る。

現時点でわれわれが考えている血栓性素因保有妊婦の診療指針としては、基本的には妊娠中は通常の臨床的観察に加え、分娩後まで低用量未分画ヘパリンの予防的皮下注射を行うことが推奨される。現在考えている Q & A 方式の診療ガイドラインの項目としては、

- 1) AT 欠乏症とは (タイプ別の特徴など)
  - 2) PS 欠乏症とは
  - 3) PC 欠乏症とは
  - 4) 妊娠前もしくは経口避妊薬 (以下 OC) 使用前スクリーニングの必要性
  - 5) 妊娠中もしくは OC 使用中に VTE が発症したら
  - 6) 血栓性素因保有妊婦の妊娠中の管理は
  - 7) 血栓性素因保有妊婦の分娩時の管理は
  - 8) 血栓性素因保有妊婦の分娩後の管理は
  - 9) 血栓性素因保有妊婦から出生した新生児の管理は
  - 10) 血栓性素因保有女性に対する OC 使用の可否は
  - 11) 血栓性素因保有女性に対する不妊治療の注意点は
- などである。

#### E. 結論

血栓性素因保有者の妊娠管理および女性ホルモン剤使用に関する診療ガイドラインの策定に関しては、引き続き十分に検討を重ねなければならないが、蓄積されたデータの解析や文献を参考にしながら、適切な予知方法を盛り込んだ診療ガイドラインの策定を行いたい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Ota S, Matsuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Mori T, Hamada M, Kobayashi T, Ito M. Incidence, characteristics and management of venous thromboembolism in Japan during 2011. *Circ J* 82(2): 555-560, 2018 doi: 10.1253/circj.CJ-17-0579. Epub 2017 Oct 25.
- Kobayashi T, Kajiki M, Nihashi K, Honda G. Surveillance of the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with obstetrical disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 159: 109-115, 2017. doi: 10.1016/j.thromres.2017.08.017.
- 小林隆夫: 肺血栓塞栓症の予防と治療指針. 岡元和文編著、救急・集中治療最新ガイドライン 2018-'19、総合医学社、東京、pp327-331, 2018
- 朝倉英策、高橋芳右、内山俊正、江口豊、岡本好司、川杉和夫、小林隆夫、瀧正志、辻仲利政、松下正、松野一彦、窓岩清治、矢富裕、和田英夫: 日本血栓止血学会 DIC 診断基準 2017 年版. *日本血栓止血学会誌* 28(3): 369-391, 2017
- 小林隆夫: 産褥期の静脈血栓塞栓症. 猿田享男、北村惣一郎監修、私の治療 2017-2018 年度版. 日本医事新報社、東京、pp1541-1543, 2017
- 小林隆夫: 産科 DIC. 日本産婦人科・新生児血液学会編集 (小林隆夫、瀧正志、板倉敦夫編集委員)、産婦人科・新生児領

域の血液疾患診療の手引き. メディカルビュー社、東京、pp97-108, 2017

- 小林隆夫: 血栓塞栓症合併妊娠. 日本産婦人科・新生児血液学会編集 (小林隆夫、瀧正志、板倉敦夫編集委員)、産婦人科・新生児領域の血液疾患診療の手引き. メディカルビュー社、東京、pp41-52, 2017
- 小林隆夫: 産科領域における血栓塞栓症に対する薬物療法. *周産期医学* 48(1): 92-94, 2018
- 小林隆夫、杉浦和子: わが国における女性ホルモン剤使用に関連する血栓塞栓症の現況. *日本生殖内分泌学会雑誌* 22: 9-15, 2017
- 小林隆夫: 診療ガイドに基づいた静脈血栓塞栓症の予防と治療. *臨床血液* 58(7): 875-882, 2017
- 小林隆夫: (2) 静脈血栓塞栓症の危険因子 7) 妊娠. 動脈・静脈の疾患 (上). *日本臨床* 75 巻増刊号: 120-123, 2017
- 小林隆夫: 遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子製剤. *産科と婦人科* 84(5): 547-552, 2017
- 小林隆夫: 女性と静脈血栓塞栓症. *日本医師会雑誌* 146(1): 42, 2017

### 2. 学会発表

- Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T. The number of thromboembolism patients among of female hormone users estimated from a national epidemiological survey in Japan. The 21st International Epidemiological Association (IEA) World Congress of Epidemiology (WCE2017). Saitama, 2017. 8. 21
- Sugiura K, Kobayashi T, Ojima T, Urano

- T. The incidence and prognosis of venous thromboembolism (VTE) and arterial thromboembolism (ATE) associated with oral contraceptives by age groups in Japan. XXVIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Berlin, 2017. 7. 11
- Kobayashi T, Sugiura K, Ojima T. Risks of thromboembolism associated with hormonal contraceptives in Japanese women compared to Western women. Women's Health Issues in Thrombosis and Haemostasis, 63rd Annual Meeting of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. Berlin, 2017. 7. 8
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 湘南藤沢徳洲会病院 VTE 医療安全セミナー. 藤沢、2018. 3. 13
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第 33 回 VTE 医療安全セミナー in 福岡. 福岡、2018. 3. 3
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第 32 回 VTE 医療安全セミナー in 茨城. つくば、2018. 2. 15
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 名古屋. 名古屋、2018. 2. 10
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 徳島. 徳島、2018. 1. 27
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 平成 29 年度 長崎県臨床工学技士会主催 第 3 回 医療機器関連学術セミナー. 長崎、2018. 1. 20
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第 28 回 VTE 医療安全セミナー in 山口. 山口、2017. 12. 16
  - 小林隆夫：月経困難症治療におけるルナベル配合錠 ULD の安全処方とは？～血栓症リスクを回避するコツ～. ルナベル Web カンファ. 浜松、2017. 11. 9
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 熊本. 熊本、2017. 10. 14
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 順天堂大学静岡病院医療安全セミナー. 伊豆長岡、2017. 9. 25
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 仙台. 仙台、2017. 9. 2
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第 23 回 VTE 医療安全セミナー in 大分. 大分、2017. 7. 22
  - 小林隆夫：わが国における OC/LEP 使用時の血栓塞栓症の現状と課題. 中部地区産婦人科医会研修会. 東広島、2017. 6. 28
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. 第 22 回 VTE 医療安全セミナー in 東京. 東京、2017. 5. 27
  - 小林隆夫：静脈血栓塞栓症の予防～リスク評価と予防対策～. VTE 医療安全セミナー in 福岡. 福岡、2017. 4. 2
  - 小林隆夫：エコノミークラス症候群ってどんな病気？なぜなるの？第 94 回日本生理学会大会記念市民公開講座. 浜松、2017. 3. 27

## 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

## 新生児・乳児に発症するプロテイン C 欠乏症の早期診断と治療管理法の確立

研究分担者：大賀正一 九州大学大学院成長発達医学  
研究協力者：落合正行 九州大学病院・総合周産期母子医療センター  
石村匡崇 九州大学大学院成長発達医学  
市山正子 九州大学病院・総合周産期母子医療センター  
堀田多恵子 九州大学病院・検査部  
康 東天 九州大学大学院医学研究院・臨床検査医学  
内海 健 九州大学病院・検査部

### 研究要旨

私たちは、20 歳までに発症する血栓症は①新生児期と Adolescents and Young Adults (AYA) 世代の発症が多いこと、②新生児にプロテイン C (PC) 欠乏症、AYA 世代にプロテイン S (PS) とアンチトロンビン (AT) 欠乏症が増えてくること、③新生児は頭蓋内病変や電撃性紫斑病など成人と異なる発症様式を呈することを報告してきた。本年度は 2016–2017 年に遺伝子解析を行った 21 歳未満 PC 欠乏症 24 名を加えて解析した。総数 74 名を集積し 29 名 (39%) に遺伝子変異を認めた。うちヘテロ変異は 17 名 (59%) に増加し、両アレル変異異常者 12 名を越えた。さらに妊娠・産褥期の母体血栓症から遺伝性 PC 欠乏症の診断に至った 3 家系を経験した。3 名の母はいずれも妊娠を契機に血栓発症し、1 名の児が日齢 1 に頭蓋内出血をおこした。周産期領域で母子の血栓性素因を早期に診断し、適切な急性期治療と長期管理を行う全国規模の解析ネットワーク拡充が必要である。

#### A. 研究目的

新生児・小児期発症の血栓症は稀であるが、集中治療や外科手術の進歩を背景に増加している。本邦の新生児集中治療室における発症頻度はこの 10 年で約 2 倍に増加した。私たちはこれまで小児血栓症について、①新生児期と Adolescents and Young Adults (AYA) 世代に発症が多く、②新生児・乳児期発症例にはプロテイン C (PC) 欠乏症が、AYA 世代発症例にはプロテイン S (PS) とアンチトロンビン (AT) 欠乏症が増加してくること、③胎児水頭症、頭蓋内出血、電撃性紫斑病など成人とは異なる発症様式を呈することを報告してきた。しかしながら、新生児期は PC や PS の活性値の基準範

囲は広く、これらの遺伝子のヘテロ異常が発症に関与する遺伝子効果も明らかではなかった。私たちは、2011 年より前向きに新生児血栓症患者の PC 欠乏例を集積し、PC/PS 活性比が診断に有用であることを示してきた。今年度さらに症例を集積して解析を行った。

#### B. 研究方法

2016 年 1 月から 2017 年 11 月までに血栓症を発症、あるいは PC、PS および AT 欠乏症の家族歴のために遺伝子検査を施行された 21 歳未満の小児 36 名のうち、PC 遺伝子 (PROC) 解析を施行された 24 名を加え、総数 74 名の小児 PC 欠乏症患者を集積した。

## C. 研究結果

### 1) PC 欠乏症の遺伝子型

期間内に遺伝子検査を施行された 21 歳未満の小児例は 36 名で、その内訳は PC 24 名、PS 11 名と AT 1 名であった。うち遺伝子変異を PC 24 名中 9 名 (37.5%)、PS 11 名中 4 名 (36.3%) と AT 1 名中 1 名 (100%) に認めた。遺伝子変異の検出率はこれまでの報告と同様であった。

PC 変異 9 名のうち 4 名は新生児期発症例で、内訳はホモ変異 1 名、複合ヘテロ変異 3 名とヘテロ変異 5 名であった。さらに本研究班開始 2011 年までの症例を文献より集積し、両親の活性から遺伝子変異を推定した。2011 年以前のヘテロ変異は 35% であったが、2011 年移行の 74 名のうち 29 名 (39%) に遺伝子変異を認め、59% がヘテロ変異であった (図 1)。

表 1 小児血栓症患者における PC ヘテロ変異検出患者率の増加

患者数	2011 以前 27 名	2011 以降 74 名
ホモ変異	2	3
複合ヘテロ変異	11	9
ヘテロ変異	7 → 35%	17 → 59%
変異なし	2	45
その他不明	5 } 26%	0 } 61%

2017 年 11 月 15 日現在

- a) 2011 年以前は両親の活性からの推定  
b) 2011 年以降は全例遺伝子解析による確定

### 2) 母体血栓症における遺伝子解析の有用性

妊娠あるいは産褥期に血栓症を発症した母 3 名の家系解析を実施した (表 2)。症例 1 と 2 の児は、いずれも未発症であった。症例 3 は母児ともに妊娠中と出生後に発症した PROC ヘテロ変異例であった。

表 2 遺伝性 PC 欠乏症の母児例

	症例 1	症例 2	症例 3
母 症状	第 1 子妊娠中 DVT	第 1 子出産後 DVT	妊娠中 心内血栓
PC 活性値	52%	10-40%	51%
PROC 変異	ヘテロ変異	複合ヘテロ変異	ヘテロ変異
児 年齢	8 歳	11 か月	日齢 1
症状	未発症	未発症	脳室内出血 (在胎 25 週出生)
PC 活性値		12% (新生児期) 31% (6 か月)	
PROC 変異	ヘテロ変異	ヘテロ変異	ヘテロ変異

DVT: Deep Vein Thrombosis

## D. 考察

2011 年以降、小児 PC 欠乏症におけるヘテロ変異が年々増加傾向にあった。今回の結果から、小児期血栓症においても、PROC ヘテロ変異が重要であることが示された。さらに、血栓症を発症した母に対して行った母子同時解析から、周産期における母子の遺伝子解析の有用性が示された。逆に、新生児発症例から母親の遺伝性血栓性素因が明らかになった例もあるため、今後これらの家系解析も進めて、周産期の母子に対する血栓性素因スクリーニングのあり方を検討することが必要になると思われる。

## E. 結論

新生児血栓症患者が増加しており、PROC ヘテロ変異の意義を明らかにした。周産期の母子における遺伝性血栓性素因を適切に見出し、予防と先制医療を行う体制の確立ことが今後の課題である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Inoue H, Terachi S, Uchiumi T, Sato T, Urata M, Ishimura M, Koga Y, Hotta T, Hara T, Kang D, Ohga S. The clinical presentation and genotype of protein C deficiency with

- double mutations. *Pediatr Blood Cancer* 2017 Jul;64(7).
- 2) Inoue H, Ochiai M, Yasuoka K, Tanaka K, Kurata H, Fujiyoshi J, Matsushita Y, Suga S, Nonaka K, Taguchi T, Kato K, Ohga S, on behalf of the Neonatal Research Network of Japan (NRNJ). Early Mortality and Morbidity of the Infants with Birth Weight of 500 grams or less in Japan. *J Pediatr* 2017 Nov;190: 112-117.e3.
  - 3) 市山正子、井上普介、井上裕文、落合正行、石村匡崇、楠田剛、山下博徳、佐藤和夫、堀田多恵子、内海健、康東天、大賀正一. 新生児のプロテイン C 活性基準値と遺伝性プロテイン C 欠乏症の診断. 日本産婦人科新生児血液学会雑誌.2017.Vol.26,17-22.
  - 4) Kirino M, Ochiai M, Ichiyama M, Inoue H, Kusuda T, Kinjo T, Ishimura M, Ohga S. Transient hemi-lower limb ischemia in the newborn; arterial thrombosis or persistent sciatic artery? *Am J Perinatol Reports* 2017; 7:e13-16.
  - 5) Matsunaga Y, Ishimura M, Nagata H, Uike K, Kinjo T, Ochiai M, Yamamura K, Takada H, Ohga S, Tanoue Y, Matumoto M, Hara T. Thrombotic microangiopathy in a very young infant with mitral valvuloplasty. *Pediatr Neonatol* 2017 (in press).
2. 学会発表
    - 1) Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Tanaka K, Matsunaga Y, Kusuda T, Inoue H, Ishimura M, Takimoto T, Koga Y, Hotta T, Kang D, Hara T. Age-specific onset and distribution of the natural anticoagulant deficiency in pediatric thromboembolism. 28<sup>th</sup> Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health Research Aug 27, 2017 Fukuoka, Japan
    - 6) 市山正子、石村匡崇、落合正行、井上裕文、井上普介、楠田剛、金城唯宗、高畑靖、内海健、堀田多恵子、康東天、大賀正一 日本人における遺伝性血栓症～新生児・小児と成人の比較～. 第9回福岡県医学会総会 2017年2月5日 福岡市
    - 7) 市山正子、井上普介、藤吉順子、山下博徳、佐藤和夫、落合正行 新生児のプロテインC活性値と遺伝性プロテインC異常症患者の効果的スクリーニング. 第62回日本新生児成育医学会学術集会 2017年10月12-14日 さいたま市
    - 8) 落合正行、倉田浩昭、安岡和昭、井上普介、藤吉順子、松下悠紀、石村匡崇、大賀正一 極低出生体重児における高フェリチン血症. 第27回日本産婦人科・新生児血液学会 2017年6月2日 福島市
    - 9) 松隈知恵、川原紘子、木村猷、高橋一雅、楠田剛、大賀正一、長谷川俊史 胎児母体間輸血症候群5例の臨床的特徴. 第27回日本産婦人科・新生児血液学会 2017年6月2日 福島市
- G. 知的財産権の出現・登録状況**
1. 特許取得
    - なし
  2. 実用新案登録
    - なし
  3. その他
    - なし



## 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
Satoh T and <u>Kuwana M</u>	T cell abnormalities	Ishida Y and Tomoyama Y	Autoimmune Thrombocytope nia	Springer	London, UK	2017	63-74
Satoh T and <u>Kuwana M</u>	Differential diagnosis: secondary ITP	Ishida Y and Tomoyama Y	Autoimmune Thrombocytope nia	Springer	London, UK	2017	97-106
<u>Hato T</u> , Kurata Y:	Epidemiology.	Ishida Y, Tomiyama Y	Autoimmune Thrombocytope nia	Springer	Singapor e	2017	41-49
<u>Hato T</u>	Transfusion	Ishida Y, Tomiyama Y	Autoimmune Thrombocytope nia	Springer	Singapor e	2017	191- 197
<u>羽藤高明</u>	輸血・血液型 検査	櫻林郁之介	今日の臨床検 査 2017-2018	南江堂	東京	2017	129- 136
<u>羽藤高明</u>	HLA検査	櫻林郁之介	今日の臨床検 査 2017-2018	南江堂	東京	2017	137- 142
Fujimura Y, <u>Kokame K</u> , Matsumoto M	Upshaw- Schulman syndrome	Nima Rezaei	Genetic Syndromes: A Comprehensive Reference Guide	Springer	In press	In press	In press
<u>香美祥二</u>	溶血性尿毒症症 候群と非典型溶 血性尿毒症症候 群	矢崎義雄	内科学第11版	朝倉書店	東京	2017	1449- 1451
<u>小林隆夫</u>	肺血栓塞栓症の 予防と治療指針	岡元和文	救急・集中治 療最新ガイド ライン 2018-' 19	総合医学 社	東京	2018	327- 331
<u>小林隆夫</u>	産褥期の静脈血 血栓塞栓症	猿田享男, 北村惣一郎	私の治療2017- 2018年度版	日本医事 新報社	東京	2017	1541- 1543
<u>小林隆夫</u>	産科DIC	日本産婦人 科・新生児 血液学会	産婦人科・新 生児領域の血 液疾患診療の 手引き	メディカ ルビュー 社	東京	2017	97-108
<u>小林隆夫</u>	血栓塞栓症合併 妊娠	日本産婦人 科・新生児 血液学会	産婦人科・新 生児領域の血 液疾患診療の 手引き	メディカ ルビュー 社	東京	2017	41-52

<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
Ebara Y, Morozumi M, Sato M, Moritoki N, Toyofuku M, Takata M, <u>Murata M</u> , Ubukata K, Iwata S	Enhancement of bactericidal activity against group B streptococci with reduced penicillin susceptibility by uptake of gentamicin into cells resulting from combination with $\beta$ -lactam antibiotics.	J Infect Chemother.	23 (5)	312-318.	2017
Azuma K, Osawa Y, Tabata S, Katsukawa F, Ishida H, Oguma Y, Kawai T, Itoh H, Okuda H, Oguchi S, Ohta A, Kikuchi H, <u>Murata M</u> , Matsumoto H	Decrease in regional body fat after long-term high-intensity interval training.	The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine.	Vol. 6	103-110	2017
Fujio Y, Kojima K, Hashiguchi M, Wakui M, <u>Murata M</u> , Amagai M, Yamagami J	Validation of chemiluminescent enzyme immunoassay in detection of autoantibodies in pemphigus and pemphigoid.	J Dermatol Sci	85/ 3	208-215	2017
Toyofuku M, Morozumi M, Hida M, Satoh Y, Sakata H, Shiro H, Ubukata K, <u>Murata M</u> , Iwata, S.	Effects of Intrapartum Antibiotic Prophylaxis on Neonatal Acquisition of Group B Streptococci.	The Journal of Pediatrics.	190	169-173	2017
大平賢太郎、藤森祐多、片桐尚子、清水長子、三ツ橋雄之、涌井昌俊、 <u>村田満</u>	Xa阻害薬のPT, APTTと抗Xa活性測定法によるモニタリングの有用性検討	日本検査血液学会雑誌	第58巻 第4号	271-281	2017
<u>村田満</u>	《特集》血栓止血の臨床化学	臨床化学	Vol. 46 No. 2	94	2017
Rubic-Schneider T, <u>Kuwana M</u> , Christen B, Assenmacher M, Hainzl O, Zimmermann F, Fischer R, Koppenburg V, Chibout SD, Wright TM, Seidl A, and Kammüller M	T cell assays confirm immunogenicity of tungsten-induced erythropoietin aggregates associated with pure red cell aplasia	Blood Adv	1 (6)	367-379	2017

Nishimoto T, Okazaki Y, Numajiri M, and <u>Kuwana M</u>	Mouse immune thrombocytopenia is associated with Th1 bias and expression of activating Fc $\gamma$ receptors.	Int. J. Hematol	105(5)	598-605	2017
Salem D, Subang R, <u>Kuwana M</u> , Levine JS, and Rauch J	T cells from induced and spontaneous models of SLE recognize a common T cell epitope on $\beta$ 2-glycoprotein I	Cell. Mol. Immunol			In press
Casey N, Fujiwara H, Azuma T, Murakami Y, Yoshimitsu M, Masamoto I, Nawa Y, Yamanouchi J, Narumi H, Yakushijin Y, <u>Hato T</u> , Yasukawa M	An unusual, CD4 and CD8 dual-positive, CD25 negative, tumor cell phenotype in a patient with adult T-cell leukemia/lymphoma.	Leuk Lymphoma	in press		2018
Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, <u>Hato T</u> , Yasukawa M	A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency.	Blood Coagul Fibrin	28	189-192	2017
酒井道生、天野景裕、小川孔幸、高見昭良、徳川多津子、野上恵嗣、 <u>羽藤高明</u> 、藤井輝久、松本功、松本剛史	後天性血友病A診療ガイドライン 2017年改訂版	日本血栓止血学会誌	28	715-747	2017
<u>羽藤高明</u> 、横山健次、 <u>國島伸治</u>	2016 Hot Topics 血小板分野	日本血栓止血学会誌	28	79-82	2017
<u>Matsumoto M</u> , Fujimura Y, Wada H, <u>Kokame K</u> , <u>Miyakawa Y</u> , Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, Miyata T, <u>Murata M</u> ; For TTP group of Blood Coagulation Abnormalities Research Team, Research on Rare and Intractable Disease supported by Health, Labour, and Welfare Sciences Research Grants.	Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in Japan.	Int J Hematol	106	3-15	2017

松本雅則、藤村吉博、 和田英夫、 <u>小亀浩市</u> 、 <u>宮川義隆</u> 、上田恭典、 日笠聡、森木隆典、 八木秀男、宮田敏行、 村田満	血栓性血小板減少性紫斑 病 (TTP) 診療ガイド 2017.	臨床血液	58	271-281	2017
Yoshii Y, Fujimura Y, Bennett CL, Isonishi A, Kurumatani N, <u>Matsumoto M.</u>	Implementation of a rapid assay of ADAMTS13 activity was associated with improved 30-day survival rate in patients with acquired primary thrombotic thrombocytopenic purpura who received platelet transfusions.	Transfusion	57	2045- 2053	2017
Yoshida Y, <u>Matsumoto M</u> , Yagi H, Isonishi A, Sakai K, Hayakawa M, Hori Y, Sado T, Kobayashi H, Y Fujimura Y.	Severe reduction of free-form ADAMTS13, unbound to von Willebrand factor, in plasma of patients with HELLP syndrome.	Blood Advances	1	1628- 1631	2017
Yagi H, Yamaguchi N, Shida Y, Sugimoto M, Tubaki K, Fujimura Y, <u>Matsumoto M.</u>	Highly elevated plasma level of von Willebrand factor accelerates the formation of platelet thrombus under high shear stress in plasma with deficient ADAMTS13 activity.	Thromb Res	159	91-95	2017
Yamashita M, <u>Matsumoto M</u> , Hayakawa M, Sakai K, Fujimura Y, Ogata N.	Intravitreal injection of aflibercept, an anti-VEGF antagonist, down-regulates plasma von Willebrand factor in patients with age- related macular degeneration.	Sci Rep	24	1491	2018
Maeda T, Nakagawa K, Murata K, Kanaumi Y, Seguchi S, Kawamura S, Kodama M, Kawai T, Kakutani I, Ohnishi Y, <u>Kokame K</u> , Okazaki H, Miyata S	Identifying patients at high risk of heparin- induced thrombocytopenia- associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry	Thromb Haemost	117 (1)	127-138	2017

<u>Matsumoto M</u> , Fujimura Y, Wada H, Kokame K, Miyakawa Y, Ueda Y, Higasa S, Moriki T, Yagi H, <u>Miyata T</u> , <u>Murata M</u>	Diagnostic and treatment guidelines for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) 2017 in Japan	Int J Hematol	106 (1)	3-15	2017
Dhanesha N, Doddapattar P, Chorawala MR, Nayak MK, <u>Kokame K</u> , Staber JM, Lentz SR, Chauhan AK	ADAMTS13 retards progression of diabetic nephropathy by inhibiting intrarenal thrombosis in mice	Arterioscle r Thromb Vasc Biol	37 (7)	1332- 1338	2017
Torrealba N, Navarro-Marquez M, Garrido V, Pedrozo Z, Romero D, Eura Y, Villalobos E, Roa JC, Chiong M, <u>Kokame K</u> , Lavandero S	Herpud1 negatively regulates pathological cardiac hypertrophy by inducing IP3 receptor degradation	Sci Rep	7 (1)	13402	2017
Navarro-Marquez M, Torrealba N, Troncoso R, Vasquez-Trincado C, Rodriguez M, Morales PE, Villalobos E, Eura Y, Garcia L, Chiong M, Klip A, Jaimovich E, <u>Kokame K</u> , Lavandero S	Herpud1 impacts insulin-dependent glucose uptake in skeletal muscle cells by controlling the Ca <sup>2+</sup> - calcineurin-Akt axis	Biochim Biophys Acta	In press	In press	In press
Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Fujimoto M, Wada H, Uchida Y, <u>Kokame K</u> , Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T, <u>Nangaku M</u>	Clinical characteristics and genetic backgrounds of Japanese patients with atypical hemolytic uremic syndrome	Clin Exp Nephrol	In press	In press	In press
船越康智、岡田雅彦、 <u>松本雅則</u> 、 <u>小亀浩市</u> 、 森内浩幸	先天性血栓性血小板減少 性紫斑病の兄弟例	臨床血液	58 (8)	933-937	2017
Fujisawa M, Kato H, Yoshida Y, Usui T, Takata M, Uchida Y, Miyata T, Matsumoto M, Fujimura Y, <u>Nangaku M</u> .	Clinical characteristics and genetic background of atypical HUS in Japanese patients.	Clin Exp Nephrol.	in press	in press	2018
Kato H, <u>Nangaku M</u> , Okada H, Kagami S.	Controversies of the classification of TMA and the terminology of aHUS.	Clin Exp Nephrol	in press	in press	2017

加藤秀樹、菅原有佳、 南学正臣	次世代シーケンサーを用いた非典型溶血性尿毒症症候群の遺伝子診断	日本血栓止血学会誌	28 (1)	33-40	2017
香美祥二	溶血性尿毒症症候群 (HUS) とペロ毒素	腎臓内科・泌尿器科	第6巻 第4号	273-277	2017
Otsuka, Y., Ueda, M., Nakazono, E., Tsuda, T., Jin, X., Noguchi, K., Sata, S., Miyazaki, H., Abe, S., Imai, K., Iwamoto, M., Masuda, T., Moriguchi, R., Nakano, S., and Tsuda, H.	Relationship between plasma protein S levels and apolipoprotein C-II in Japanese middle-aged obese women and young nonobese women.	Blood Coagul Fibrinolysis	20(1)	39-47	2018
Yasutake K., Moriguchi R., Kajiyama, T., Miyazaki H., Abe S., Masuda T., Imai K., Iwamoto M., Tsuda H., Obe, M., Kawate, H., Ueno H., Ono M., Goromaru, R., Ohe, K., Enjoji, M., Tsuchihashi, T., Nakano S.	Interannual Study of Spot Urine-evaluated Sodium and Potassium Excretion in Young Japanese Women.	J Clin Hypertens.	19	653-660	2017
津田博子	特発性血栓症	臨床血液	58 (10)	279-287	2017
津田博子	特発性血栓症（遺伝性血栓性素因による）の診療ガイドライン策定に向けて。第11回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム報告	日本血栓止血学会誌	28 (4)	566-567	2017
津田博子	静脈血栓症の遺伝要因	in「動脈・静脈の疾患（上）-最新の診断・治療の動向-」。日本臨床	75（増刊号4）	129-134	2017

Moriyasu F, Furuichi Y, Tanaka A, Takikawa H, Yoshida H, Sakaida I, Obara K, Hashizume M, Kage M, Ohfuji S, Kitano S, Kawasaki S, Kokubu S, Matsutani S, Eguchi S, Shiomi S, <u>Kojima T</u> , Maehara Y, Kuniyoshi Y.	Diagnosis and treatment guidelines for aberrant portal hemodynamics.	Hepatol Res.	47(5)	373-386	2017
Miljic P, Gvozdenov M, Takagi Y, Takagi A, Pruner I, Dragojevic M, Tomic B, Bodrozic J, <u>Kojima T</u> , Radojkovic D, Djordjevic V.	Clinical and biochemical characterization of the Prothrombin Belgrade mutation in a large Serbian pedigree: new insights into antithrombin resistance mechanism.	J Thromb Haemost.	15(4)	670-677	2017
Yamashita A, Nagae C, Mori M, Ashikaga T, <u>Kojima T</u> , Taki M.	First case report of hemophilia B Leyden in Japan.	Int J Hematol.	106(1)	135-137	2017
Tamura S, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Suzuki S, Katsumi A, Takagi A, <u>Kojima T</u> .	In vitro exploration of latent prothrombin mutants conveying antithrombin resistance.	Thromb Res.	159	33-38	2017
Suzuki S, Nakamura Y, Suzuki N, Yamazaki T, Takagi Y, Tamura S, Takagi A, Kanematsu T, Matsushita T, <u>Kojima T</u> .	Combined deficiency of factors V and VIII by chance coinheritance of parahaemophilia and haemophilia A, but not by mutations of either <i>LMAN1</i> or <i>MCFD2</i> , in a Japanese family.	Haemophilia.	24(1)	e13-e16	2018
Sanda N, Suzuki N, Suzuki A, Kanematsu T, Kishimoto M, Hasuwa H, Takagi A, <u>Kojima T</u> , Matsushita T, Nakamura S.	Vwf K1362A resulted in failure of protein synthesis in mice.	Int J Hematol.	in press		2018
Tamura S, Suga Y, Tanamura M, Murata-Kawakami M, Takagi Y, Hattori Y, Kakihara M, Suzuki S, Takagi A, <u>Kojima T</u> .	Optimisation of antithrombin resistance assay as a practical clinical laboratory test: development of prothrombin activator using factors Xa/Va and automation of assay.	Int J Lab Hematol.	in press		2018



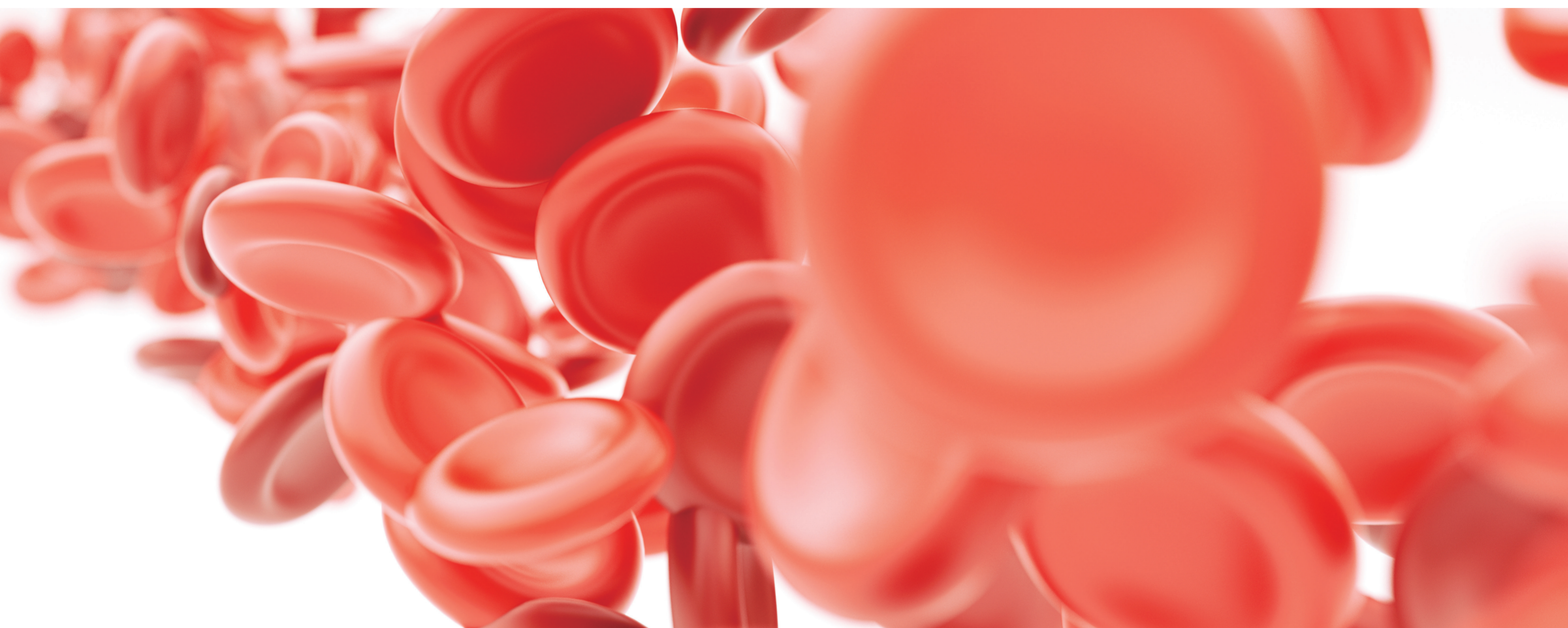
Ota S, Matsuda A, Ogihara Y, Yamada N, Nakamura M, Mori T, Hamada M, <u>Kobayashi T</u> , Ito M.	Incidence, characteristics and management of venous thromboembolism in Japan during 2011.	Circ J	82 (2)	555-560	2018
<u>Kobayashi T</u> , Kajiki M, Nihashi K, Honda G.	Surveillance of the safety and efficacy of recombinant human soluble thrombomodulin in patients with obstetrical disseminated intravascular coagulation.	Thromb Res	159	109-115	2017
<u>Kobayashi T</u> , Sugiura K, Ojima T	Risks of thromboembolism associated with hormone contraceptives in Japanese compared with Western women	J Obstet Gynaecol Res	43 (5)	789-797	2017
朝倉英策、高橋芳右、内山俊正、江口豊、岡本好司、川杉和夫、 <u>小林隆夫</u> 、瀧正志、辻仲利政、松下正、松野一彦、窓岩清治、矢富裕、和田英夫	日本血栓止血学会DIC診断基準2017年版	日本血栓止血学会誌	28 (3)	369-391	2017
<u>小林隆夫</u>	産科領域における血栓塞栓症に対する薬物療法	周産期医学 泌学会雑誌	48 (1)	92-94	2018
<u>小林隆夫</u> 、 <u>杉浦和子</u>	わが国における女性ホルモン剤使用に関連する血栓塞栓症の現況	日本生殖内 分泌学会雑誌	22	9-15	2017
<u>小林隆夫</u>	診療ガイドに基づいた静脈血栓塞栓症の予防と治療	臨床血液	58 (7)	875-882	2017
<u>小林隆夫</u>	(2) 静脈血栓塞栓症の危険因子 7) 妊娠. 動脈・静脈の疾患 (上)	日本臨床	75巻増 刊号	120-123	2017
<u>小林隆夫</u>	遺伝子組換え活性型血液凝固第VII因子製剤	産科と婦人 科	84 (5)	547-552	2017
<u>小林隆夫</u>	女性と静脈血栓塞栓症	日本医師会 雑誌	146 (1)	42	2017
Inoue H, Terachi S, Uchiumi T, Sato T, Urata M, Ishimura M, Koga Y, Hotta T, Hara T, Kang D, <u>Ohga S.</u>	The clinical presentation and genotype of protein C deficiency with double mutations.	Pediatr Blood Cancer	Jul; 64 (7)	doi: 10.1002/ pbc.2640 4	2017

Kirino M, Ochiai M, Ichiyama M, Inoue H, Kusuda T, Kinjo T, Ishimura M, <u>Ohga S.</u>	Transient hemi-lower limb ischemia in the newborn; arterial thrombosis or persistent sciatic artery?	Am J Perinatol Reports	7	e13-16	2017
市山正子、井上普介、井上裕文、落合正行、石村匡崇、楠田剛、山下博徳、佐藤和夫、堀田多恵子、内海健、康東天、 <u>大賀正一</u>	新生児のプロテインC活性基準値と遺伝性プロテインC欠乏症の診断.	日本産婦人科新生児血液学会雑誌	Vol. 26	17-22	2017

## 市民公開講座

# 血液の難病に挑む

～出血と血栓に関連する血液難病について～



日時 **平成30年2月3日(土)** 13:00～16:30 (受付開始12:30)

会場 **大手町サンケイプラザ** 東京都千代田区大手町1-7-2

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 研究代表者 **村田 満**  
血液凝固異常症等に関する研究班 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学 教授

**1** テーマ: **特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)**

演者: **富山 佳昭**

大阪大学医学部附属病院輸血部 病院教授

**2** テーマ: **血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)**

演者: **松本 雅則**

奈良県立医科大学附属病院輸血部 教授

**3** テーマ: **非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)**

演者: **南学 正臣**

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 教授

**4** テーマ: **特発性血栓症/先天性血栓性素因**

演者: **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

### 〈参加申込方法〉

下記項目を記載(入力)の上、ハガキまたはE-mailにて、2018年1月26日(金)までに着くようお送りください。

#### 【記載項目】

- ◎氏名・同伴者氏名(いる場合)
- ◎郵便番号および住所
- ◎電話番号 ◎メールアドレス(ある場合)

#### 〈ハガキでの送付先〉

〒110-0015  
東京都台東区東上野1-6-10 ARTビル4F  
(株)コンベンションアカデミア  
上野分室「市民公開講座」係

#### 〈E-mailでの送付先〉

shimin0203@media-ps.jp

※定員に達し次第、締め切ります。  
※お席に余裕がある場合、当日受付も行います。

〈お問い合わせ〉(株)コンベンションアカデミア 上野分室「市民公開講座」係 TEL: 03-5816-1058 E-mail: shimin0203@media-ps.jp

主催: 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業  
**血液凝固異常症等に関する研究班**

<http://ketsuekigyoko.org/>