

## 第35回 シスメックス学術セミナー／質疑応答

## 1. 血栓性素因の成因と病態

宮田 敏行

**【神戸座長・村田】** 宮田先生，大変分かりやすいお話をどうもありがとうございました。前半は凝固のメカニズムを中心にお話しいただき，その後，特に日本人によく見られる，静脈血栓症としてのプロテインSの欠損症についてお話しいただきました。後半は，血栓性血小板減少性紫斑病の分子メカニズムについて，また，最近の疫学も含めた臨床の状況をお話しいただきました。

私の方から少しだけ先生に質問させていただきます。最初の方のプロテインSのお話ですが，平均で言うと活性が十数パーセントの低下ですね。徳島変異は点変異ですが，このぐらいの低下で発症するのかということ，また，これはあくまで平均ということであれば，同じ変異を持っていてもより低下がひどい方のほうが発症しやすいのかということに少し疑問に思ったのですが，その辺はいかがでしょうか。

**【宮田】** ご質問ありがとうございます。まず，プロテインSの抗凝固活性は，あくまでも一般住民を対象に測定させていただきました。すなわち，静脈血栓症を起こした方ではないため，プロテインSの活性が40～170%ぐらいまで，非常に幅広い値が出てきたのだと思います。

また，プロテインSのK196E変異をお持ちの方の中で静脈血栓症を起こされる方は，抗凝固活性が低い方ではないかと思っておりますが，残念ながら低い人が起こしやすいというエビデンスはまだデータとしてはありません。

**【神戸座長・村田】** 妊娠や産褥期の血栓症を調べられて，その中でかなりの頻度でプロテインSの欠損症があったということは，大変驚きでした。静脈血栓症を起こすには，いろいろなトリガーがあると思います。もともとそういう素因あるいは遺伝的なバックグラウンドを持っていて，プロテインSのK196E

変異を持った方が静脈血栓症を起こす要因として，例えば長期臥床など様々な要因が考えられますが，妊娠がより強い要因となるのでしょうか。

**【宮田】** ありがとうございます。講演の途中でも少し申し上げましたが，妊娠中にプロテインS活性が下がることは既に広く報告されています。妊娠するとプロテインSの抗凝固活性が下がるため，遺伝子変異があるとより下がると考えても良いと思います。その二つが重なると，妊娠初期に静脈血栓症を起こしやすいのではないかと思います。

私が18人の遺伝子を解析したところ，5人がプロテインSの遺伝子変異を持っていて，1人がプロテインCの変異で，アンチトロンビンの変異は見られませんでした。プロテインSの抗凝固活性が妊娠のときに下がり，それに遺伝子変異が重なったことが，やはり大きなトリガーになるのではないかと感じています。

**【神戸座長・村田】** ありがとうございます。ここで東京会場に回したいと思います。浅野先生，いかがでしょうか。

**【東京座長・浅野】** 宮田先生，本当に難しいお話を非専門家にも分かりやすく解説いただき，ありがとうございました。大変勉強になりました。

私から一つよろしいでしょうか。先生が最初にお話しになったように，血栓症は最近，ストレスとの関係が言われていますが，その辺の研究は進んでいるのでしょうか。特に心的外傷後ストレス(PTSD)との関係性について教えていただきたいと思っております。

もう一点は，人類学的な興味ですが，韓国や中国における血栓症の頻度は，日本に比べて高いか低いかについても教えていただければと思います。

**【宮田】** まず、ストレスの方から、私の知る限りでお答えさせていただきたいと思います。静脈血栓症のリスクの一つとして、例えば、エコノミークラス症候群という言葉でよく言われていますが、長距離のフライトも一種のストレスだということは、皆さんご存じかと思います。

例えば、アメリカの雑誌「ATVB (Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology)」は、毎年3月号で静脈血栓症の特集をしています。なぜその特集号を始めたかという、NBCのレポーターがイラク戦争の頃、凝固V因子ライデン変異をお持ちで、かつクウェートとアメリカの長距離フライトをよくされていて、水もあまり飲まずに脱水症状もあって静脈血栓症を起こし、残念ながらお亡くなりになったという、このことが、「ATVB」が特集号を創設する契機になったと伺っています。その方を考えると、ストレスがかなり大きい要因になったのではないかとも思います。

先ほど浅野先生がおっしゃったPTSDなども、多分、静脈血栓症を起こしやすいとは思いますが、PTSDと血栓症の関係を論じた研究はまだないと思います。震災などの自然災害後では、避難所で水をあまり飲まなく、血が固まりやすくなります。

それから、中国や韓国での静脈血栓症については、スライドでお見せした血栓症の頻度はアメリカ・ミネソタ州の結果で、日本を含めて韓国、中国において同様な結果を存じませんので、どちらが多いのか少ないのかを正確にはお答えできません。申し訳ございません。

**【東京座長・浅野】** どうもありがとうございます。

**【神戸座長・村田】** それでは、神戸会場から一つご質問をいただいているので読み上げます。「ADAMTS13に対する自己抗体は、どのようなメカニズム（因子）があって作られるのでしょうか」というご質問です。

**【宮田】** 申し訳ございません。私自身にもよく分かりません。後天性TTPのADAMTS13の自己抗体を持つ患者も実は頻度としてはあまり多くないため、

何が原因で起こりやすいのか、私にもよく分かっていません。ADAMTS13の自己抗体のエピトープの解析などの研究は進んでいます。何が原因かについて、村田先生の方がご存じかもしれませんが、どちらかという感染などが先に立つということではよろしいのでしょうか。

**【村田】** 申し訳ございません。私もトリガーになっているものが何かは、まだこれからだと理解しています。

**【宮田】** 抗体ができるときに何がトリガーかというのは非常に難しいのですが、TTPが起こるかどうかと言い換えると、TTPは血管内皮細胞にたまっている超高分子量VWFがリリースしないと起こらないため、例えば、内皮細胞障害、つまりTTPに先立って感染が起こっているとも言われますし、そういうもので内皮細胞に蓄えられているVWFがリリースし、そのときにADAMTS13の活性が低いと切れないので、血栓ができてしまうという流れになると思います。そのため、後天性に抗体ができてい場合に感染などが起こり、何らかの刺激があると超高分子量VWFが分泌されて、TTPの血栓が起こってしまうというのが、正しいかと思います。

**【神戸座長・村田】** その他の質問はございますでしょうか。齋藤先生、どうぞ。

**【企画委員会 顧問・齋藤】** 例えば、静脈血栓症を起こした患者さんを診た場合に、先生が示されたような血栓を起こしやすい色々な遺伝的な異常を、果たしてどこまで調べるのか。今言った抗凝固因子の欠乏以外にも、例えば、ある種の凝固因子活性が非常に高いとか、抗リン脂質抗体があるかないかといったことを、臨床的にどこまで調べるのが現在の標準でしょうか。

**【宮田】** ご質問どうもありがとうございます。静脈血栓症を起こした患者さんには、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの活性の測定および抗リン脂質抗体症候群の検査があります。ここ

までは一般的に行う検査だと思えます。その他の検査についてですが、家族性が強く疑われる場合は、更に検査をすることがあるかと思えますが、家族性が見られない場合は、前述の検査で終わるだろうと思えます。

活性を測る方法が確立できている場合は、それぞれを測定することが可能かと思えますが、齋藤先生がおっしゃったように、例えばファクターⅧ(第8因子)の高い人が静脈血栓症を起こしやすいという報告もありますし、調べると、色々な因子が低下したり増加したりすると、静脈血栓症のリスクが上がったり下がったりしているという報告は研究レベルでたくさんあります。従って、それらをすべて測定する意味があるのかという点非常に難しく、全部を測ってもなかなか明確に出ない場合もあるだろうと思えます。

今日、私がお話しした中で、オッズ比をお示しました。オッズ比が例えば1.2や1.3でもリスクとなり、10倍、20倍でもリスクとなるため、それぞれがどれくらいリスクを示すかをきちんと明らかにしていくことが、今後の研究で非常に重要だと思っています。

例えば今日お話ししたK196E変異ですが、欧米のライデン変異と比べて、それよりも強いのか弱いのか、それとも同じぐらいなのかをはっきりさせれば、白人のライデン変異ではこのようなリスクマネジメントをしているので、K196E変異ならこれくらいでいいだろうということになってくると思います。日本人で見つかった変異は非常に重要ですが、多くのエビデンスを集めるには大変な労力と時間を必要とするため、既に分かっている変異と比べてどれくらいリスクが強いのか弱いのかを評価しながら、これは臨床検査レベルで調べた方がいい、これは調べなくてもいいということが言えればいいと思えます。特に、プロテインSに関しては、活性測定法、抗原量の市販のキットもそれぞれあるので、そういうものをうまく使えば、今日お話ししたK196E変異のキャリアの人を同定できる可能性があると思えます。今日は抗凝固活性しかお見せしなかったため、ワイルドタイプの人の中にヘテロの人が混じってしまい、判別

がつかないというお話をさせていただきましたが、活性を抗原量で割るとか、何らかのもう少し鋭敏な方法を取り入れていけば、これまで行われている測定法でキャリアの人の同定ができてくるのではないかと考えていますし、今後そのようになっていけばいいなと考えています。

**【神戸座長・村田】** 神戸会場からもう一つ質問がきています。「非定型的HUSの場合、PNHのようにGPIアンカーは正常でしょうか。また、C5単クローン抗体には、PNHと同様の治療効果を期待できるでしょうか」というご質問です。

**【宮田】** 私も論文で発表されているレベルの知識しかありませんが、C5単クローン抗体はPNHに使われていて、劇的に効くと理解しています。同じ薬を補体系が働きすぎるaHUSの患者さんに使うと症状が改善できるという報告が複数出ているため、この薬は将来、日本でもaHUS患者に使われて症状を改善するようになるのではないかと考えています。最初のご質問をもう一度お願いします。

**【神戸座長・村田】** PNHのようにGPIアンカーは正常でしょうかという質問です。

**【宮田】** GPIアンカーは全部正常です。aHUSに関しては、GPIアンカーに関係する酵素の欠損ではありませんので正常なのですが、例えば補体H因子や補体I因子などのタンパク質にアミノ酸変異を伴う変異があるため、機能が低下してしまって、補体反応が自己細胞の上で進んでしまうということです。従って、aHUS患者さんのGPIアンカータンパク質はすべて正常だと考えています。

**【神戸座長・村田】** そろそろ時間となってまいりましたので、これで宮田先生のご講演を終了したいと思います。大変長い間、また分かりやすいご講演を本当にありがとうございました。

## 【後日ご回答をいただいた質問】

**【質問】** PS異常症において、活性抗原量が低下している場合の方が、活性のみの低下を示すⅡ型の異常より症状が発現しやすい理由は何でしょうか。これはPC、ATにも当てはまることでしょうか。

**【回答】** 一般に、凝固制御因子の先天性欠損症では、活性と抗原量が共に低下するⅠ型欠損症の方が、活性のみ低下するⅡ型異常症より、症状が厳しいようです。たとえば、ATのⅡ型異常症でヘパリン結合部位に変異がある場合は、ヘパリン依存性の活性は低下しますが、トロンビンやXaの阻害活性は残っています。こういったATⅡ型異常症の患者は、Ⅰ型欠損症患者より静脈血栓症のリスクは低いとの報告があります。PSの場合は、PS K196E変異(PS徳島変異)はⅡ型異常症に分類され、Ⅰ型欠損症より血栓症のリスクが低いです。このメカニズムは十分には検討されていませんが、恐らくK196E変異をもつPSは低ながらも抗血栓能を持っているかもしれません。

**【質問】** TTP患者の中で、ADAMTS13活性がある程度保たれている患者がたまにおり、膠原病の方が多いように思います。膠原病の患者および妊婦では、UL-VWFが高いと聞いたことがあります。健康人と比較してどれくらい高いのでしょうか。

**【回答】** 血栓性微小血管障害症(TMA)を合併していない膠原病や妊婦ではVWFの抗原量は多いですが、UL-VWFマルチマーが多いという報告はないと思います。正常妊娠で高分子量VWFマルチマーは妊娠週期とともに増えます。膠原病では、TMAを合併していない症例がないので、UL-VWFマルチマーの解析はできていないと思います。

両者にTMAが合併した場合は、病態により異なると思います。基本的にUL-VWFマルチマーが増えているはずですが、急性期には血小板血栓を形成してUL-VWFマルチマーどころか、高分子の

VWFを認めない(消費されて血中に見られない)ことがあります。

SLE患者ではADAMTS13活性は25%(平均値)であり、関節リウマチ患者では13%(平均値)との報告があります。これらの患者には活性が0.5%以下の患者もみられ、こういった活性著減例がTTPを示します<sup>1)</sup>。

1) Matsuyama T et al. Heterogeneous pathogenic processes of thrombotic microangiopathies in patients with connective tissue diseases. *Thromb Haemost.* 2009; **102**: 371-378

**【質問】** 血栓症リスクの一覧に腫瘍を挙げておられましたが、腫瘍が原因で血栓症が起こるメカニズムをご教授ください。また、特に血栓症のリスクが高い腫瘍にはどのようなものがありますでしょうか(関連書籍、文献等をご存知でしたら、合わせてお示しただけですと幸いです)。

**【回答】** 腫瘍細胞は凝固開始因子である組織因子を発現します。この組織因子は腫瘍細胞由来のマイクロパーティクルに乗って血中を流れる可能性が指摘されています。この組織因子が腫瘍細胞の血栓症の原因と考えられます<sup>1)</sup>。

腫瘍関連システインプロテイナーゼは癌細胞由来の凝固促進因子でX因子活性化能があるといわれています。このシステインプロテイナーゼは組織因子ではないかとも疑われており、その事態は未だに明らかではありません。

癌患者に静脈血栓症が多いですが、これは化学療法中の静脈血栓症です。化学療法により細胞が死に組織因子の増加により静脈血栓症が生じるものです。癌と血栓に関しては、最近の学会の抄録号をご覧ください<sup>2)</sup>。

- 1) Ruf W et al. Tissue factor and cell signaling in cancer progression and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2012 ; **9** (Suppl 1) : 306-315
- 2) Papers and abstracts of the 6<sup>th</sup> International Conference on Thrombosis and Hemostasis Issues in Cancer, April 20-22, 2012, Bergamo, Italy, *Thromb Res.* 2012 ; **129** (Suppl 1) .

**【質問】**

- 1) ADAMTS13の活性低下をみたとき、どのくらいまで活性低下するとTTPに有意といえますでしょうか。
- 2) ADAMTS13の一過性低下はありますか。それはTTP発症に影響するのでしょうか。セカンドトリガーが作用するのでしょうか。

**【回答】**

- 1) TTPに特異的な所見とされるADAMTS13活性著減の定義としては、国際的には5%未満が最も広く使われています。10%という意見もありますが、これは活性測定法の感度によるものであり、日本国内では3%未満や0.5%未満が使われています。
- 2) 一過性にADAMTS13活性を低下させるものとして、アルコールの多量飲酒が予想されますが、明確に低下させるとの報告はありません。TTP発症のセカンドトリガーは、血管内皮細胞に蓄えられているUL-VWFを分泌する刺激が考えられます。具体的には、妊娠と感染です。UL-VWFが多量に放出されるとTTPを発症する可能性が高くなります。

**【質問】** 堺市でO-157による児童の食中毒が発生した際、児童の中にはHUSを発症し、重症化して死に至るケースも数例ありました。この児童について、HUSを発症しやすい素因、また、それに関連する遺伝子変異があった可能性については、どのようにお考えになりますか。

**【回答】** 大腸菌O-157によるHUSの発症は、大腸菌が分泌するシガ毒素が原因として同定されています。シガ毒素によるHUSの発症には、患者の素因は関

係しないと思います。非典型HUSを発症する補体系因子の遺伝子変異は、極めてまれな変異で頻度は低いので、シガ毒素によるHUSの発症には関連しないだろうと思います。

**【質問】** ADAMTS13は肝星細胞から産生され、肝の線維化に大きく関与しているという論文を読みました。今、肝線維化のマーカーとして用いられているヒアルロン酸、コラーゲンと関連するのでしょうか。肝線維化段階との相関はありますか。

また、ADAMTS13もプロテインC、プロテインS同様に、活性だけでなく抗原量も重要なのでしょうか。

**【回答】** ADAMTS13は肝星細胞から産生され、肝炎や肝硬変の進行により産生量は低下します。肝硬変が進むと、ADAMTS13活性は30%程度にまで低下します<sup>1)</sup>。このADAMTS13産生低下が肝の繊維化にどのように関わっているかはまだ分かっていません。ADAMTS13の活性低下と、ヒアルロン酸やコラーゲンとの関連に関して報告はないと思います。

ADAMTS13は活性が重要です。抗原量を測定する必要はありません。後天性TTPの場合、活性が著減していても抗原ははっきり残っている場合がありますが、そういった場合でも、臨床的に抗原量を調べる必要はないと思います。

- 1) Uemura M et al. Comprehensive analysis of ADAMTS13 in patients with liver cirrhosis. *Thromb Haemost.* 2008 ; **99** : 1019-1029

**【質問】** 先日、採血した患者の血液が真空採血で採取したにも関わらず、すぐに固まってしまい測定できない状態でした。偽性血小板減少症を疑い、もう一度EDTA, K, フッ化Na, クエン酸, ヘパリン管等で採血しましたが、いずれも凝固してしまい測定できませんでした。次に生血をすぐに測定してみましたが、同様に凝固していました。このような場合の採血方法をご教授いただけますでしょうか。

**【回答】** かなり採血が難しい方なのですが、

1. 血管が出にくい場合、お湯で暖かくしたタオルで数分まいて、採血してみる。
2. 一度採血を失敗した腕で採血しない。
3. 2シリンジ法、即ち真空管採血で、1本目は捨て、2本目で検査する。
4. 誘導針（通常のアダプターより細い針）を用いて採血し、最初少し捨てた後の血液をすぐに、抗凝固剤入りの試験管に入れる。

このうち、1と2を考慮して、3か4の方法で試して頂ければと思います。

また、EDTA依存性偽血小板減少症の場合、EDTA2K フッ化Na クエン酸 ヘパリンいずれも凝固することはあるようです。このような場合、採血から測定までの時間をできるだけ短くすること（5分以内）が重要です。EDTA2Kにカナマイシンをいれた採血管（国循ではこの方法、カナマイシン加EDTA（EDTA+カナマイシン（20～40mg/mL））、EDTA2K増量法（EDTA+EDTA（20～40mg））、FC管（テルモ社）血糖検査用（EDTA2Na+NaF+クエン酸+クエン酸Na）を使用するなどを試してみたいかがでしょうか。カナマイシンをいれた採血管は中原先生のご発表を参考にさせて頂いています。

A-1) 偽血小板減少が初めて観察された日が明らかで、発現前後の各種臨床処置も明らかな例を調べたところ、多くの症例で発現の1週間前ごろより手による感染予防のための各種抗生物質投与が行われていた。このため、投与された抗生物質がハプテンとして抗原性を獲得し、産生された抗体が偽血小板減少を引き起こすと仮定し、投与されたものと同種の抗生物質とEDTA塩の混和物を偽血小板減少者用抗凝固剤として使用し、中和反応により血小板集塊を形成しなくなるかどうか検討した。その結果、投与されたものと同種の抗生物質を添加した抗凝固剤では血小板集塊形成阻止効果は認められなかった。しかし、カナマイシン投与歴がない多くの症例で、カナマイシンを添加した抗凝固剤では明らかな集塊形成阻止効果を認めた。カナマイシンはア

ミノグリコシド系抗生物質の1種であるが、他の多くのアミノグリコシド系抗生物質も偽血小板減少による血小板集塊形成を阻止し、さらに一旦形成された血小板集塊をただちに離散させる効果を示した。この血小板集塊形成阻止および集塊離散効果の機序についてはいまだに不明のままである。一旦形成されていた血小板集塊を、添加によりただちに離散させることから、偽血小板減少を引き起こす因子にカナマイシンが競合的に結合している可能性が示唆される。アミノグリコシド系抗生物質と偽血小板減少の関連が明らかになれば、偽血小板減少における血小板集塊の形成機序の解明に大きな手がかりを与えるものと考えられる。

（2001年04月03日 東京大学医学部附属病院検査部 櫻井進、中原一彦）

**【質問】** 最近、新しい血小板凝集能の装置を再導入しましたが、以前は、脳外科、神経内科、整形外科等から「ADP」の依頼が結構ありましたが、この一年依頼がありません。

- 1) 現実、必要がなくなってきたのでしょうか。それとも他施設では充実した依頼があるのでしょうか。
- 2) 凝集能検査について、様々な使い方の紹介のようなお話（アピール）はございますでしょうか（血液内科から、ADP、コラーゲン、エピネフリン等の依頼もなくなり、ある程度の予測や他の検査で済んでしまっているように思います）。

**【回答】** 血小板凝集能測定の依頼数が減っているとお話しですが、この背景には抗血小板療法の効果を血小板凝集能で評価すべきである、という確たる研究成果が出ていない点にあると思います。

この10年間に、アスピリンやクロピドグレルの抗血小板療法に対し抵抗性を示す症例があると報告され、抵抗例はイベント再発率が高いという報告が出ました。こういった研究が出てきた時期は、抗血小板療法のモニターとして血小板凝集能を測

定する依頼があったと思います。この種の研究が進み、現在では血小板凝集能を測定しても、再発イベントの高い患者を絞ることができない、という発表が主流を占めるようになってきました。こういった研究の成果を背景にして、抗血小板療法中の患者の血小板凝集能の測定件数が減っているのかもしれない。

血小板数は正常ですが出血傾向を示す患者では、血小板凝集能は重要な検査法です。こういった患者さんの数は多くないと思いますが、出血傾向を調べるには血小板凝集能の測定は欠かせません。

- 1) Van Ryn J et al. Dabigatran etexilate--a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor : interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 2010 ; **103** (6) : 1116-1127
- 2) Lindahl TL et al. Effects of the oral, direct thrombin inhibitor dabigatran on five common coagulation assays. *Thromb Haemost.* 2011 ; **105** (2) : 371-378

**【質問】** プラザキサはモニタリングの必要ないとされていますが、主治医がオーダーを出されることが多くあります (PT, APTT)。その際、APTTの延長を見ることが多いようですが、この理由についてご教授いただけますでしょうか。

**【回答】** プラザキサ (ダビガトラン) は抗トロンビン薬なので、各種の測定法で凝固時間を延長します。ダビガトランは、TT (トロンビン時間)、ECT (エカリン凝固時間) で評価できるといわれています。しかし、トロンビン時間は感度が良すぎてルーチンのモニターには適していないといわれています。エカリン凝固時間は特殊な検査なので、普通は使いません。aPTT (活性化部分トロンボプラスチン時間) は高濃度のダビガトランでは感度が悪いようですが抗凝固能の評価に使えるといわれていますので<sup>1)</sup>、主治医はこれをオーダーしていると思います。aPTTはキットにより凝固開始物質が異なりますので、ダビガトランの効果も使用するaPTT試薬により少し違うことも報告されていますが、どのキットを使ってもだいたい良いという報告があります<sup>2)</sup>。