

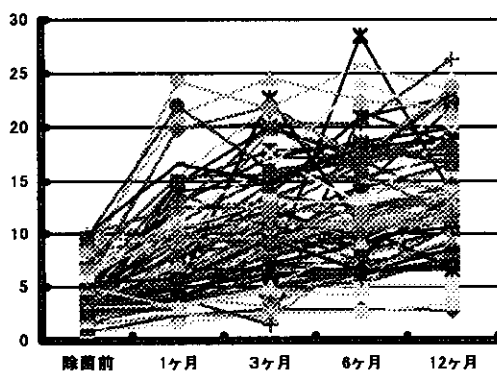
除菌後の血小板増加効果に除菌直前の ITP 治療の有無や年齢は影響を与えなかった。

6. 除菌成功・血小板増加を来す背景性差、平均年齢、除菌前の血小板数などは影響を与えなかった。しかし ITP としての罹病期間に関しては短期間の方が (6.52±4.67) 長い群 (9.85±7.77) に比し有意に除菌成功・血小板増加例が多い (P<0.0001) 事が伺えた。

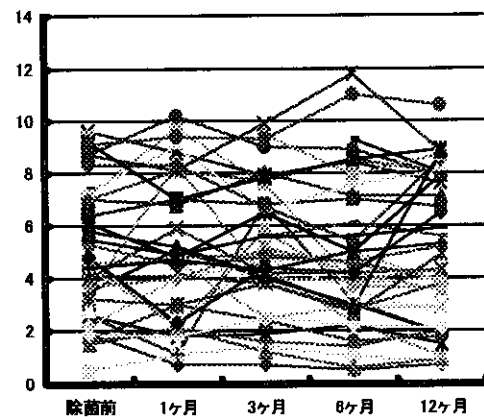
7. 12ヶ月以上観察例の経過

155例が12ヶ月以上経過観察されている。この内80例は除菌成功・血小板増加を維持しており、10例は除菌が不成功にもかかわらず血小板数は12ヶ月後も増加していた。一方42症例は除菌が成功したにもかかわらず血小板数の増加が認められない症例でこの群は除菌を行っても血小板数は殆ど軽微な変動に留まっている。23例は除菌効果なく血小板増加効果も認められなかった症例で、この中には一過性に血小板増加を示した症例がある。

除菌成功・血小板増加80例の12ヶ月の経過 (縦軸：血小板数(万))



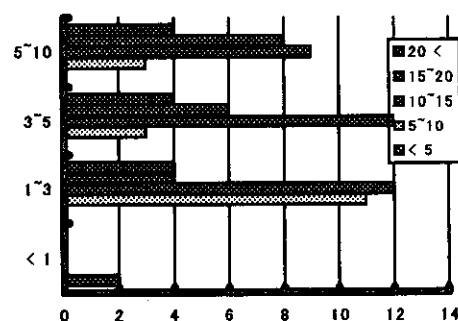
除菌成功・血小板増加無効例42例の経過 (縦軸：血小板数(万))



8. 12ヶ月の時点での血小板増加効果

除菌成功・血小板増加群では80例中61例(71%)が血小板数10万以上となっている。一方除菌不成功・血小板増加群ではやはり10例中7例が(70%)が血小板数10万以上となっている。一般に除菌前血小板数が多い方が除菌後の血小板数も多くなる傾向がある。しかし除菌後20万を越える症例は除菌前血小板数との関連は認められない。また除菌前血小板数が1万未満の症例では除菌後の血小板数が12ヶ月経過しても5万以下に留まっていた。(縦軸：除菌前血小板数、

横軸：症例数)



9. ITP 除菌に対する副作用

222 例中 39 例 (17.6%) に何らかの副作用が認められた。その内訳は軟便、下痢、胃部不快感などの消化器症状が最も多く 25 例 (64%)、ついで蕁麻疹などの皮疹 9 例 (23%) であった。この他除菌療法により血小板減少が増悪し除菌療法を中止した症例が 1 例認められた。

D. 考察

ヘリコバクターピロリ菌と ITP については 1998 年の報告以来除菌によって血小板数が増加する報告が相次いでおり特に本邦において著しい。しかし中にはスペインの Jarque らは (2001) 除菌後の血小板増加は 13% にしか認められないと報告し最近の米国、カナダ、北欧の報告では除菌による血小板増加効果はい。したがって HP 菌除菌による血小板増加効果は必ずしも世界的に受け入れられているわけではない。今回多施設における症例を蓄積し解析することによって除菌の ITP 治療に対する有用性をより客観的に検討するとともに、ITP 治療における除菌治療の位置づけを明らかにすることを目的に本邦におけるアンケート調査を行った。血液専門 11 施設から解析可能症例 438 症例が登録され解析を行った。その結果基本的には昨年度の結果と略一致している。

性、年齢不詳の 2 例を除いて 436 例の解析では男 120 例、女 316 例で通常の ITP 症例と同様に女性が多く認められ、HP 菌陽性 ITP が性差と関連しないことが伺える。今回の HP 検索 ITP 症例の年齢分布は 30 歳代と 50 歳代の 2 つにピークがありそ

の内 50 歳代以上の症例が全体の約 70% を占め、従来の ITP は 20 歳～30 歳代の女性が主体であったのと趣を異にしている。これは本邦の ITP が HP 感染と深いつながりを有していることを伺わせ、興味深い。すなわち ITP 症例における、HP 菌陽性率の年齢分布は 50 歳以降 70% 以上となり、本邦における非 ITP 症例の頻度と同様である。したがって 50 歳以上の ITP には HP 感染が主体で、20～30 才代の ITP には HP 感染率が低く病因に違いがあることが伺えた。

今回のヘリコバクターピロリ菌の診断には 70% 以上が呼気試験を中心に行われており、残りが血清抗体検査或いは生検単独での診断である。複数の検査を組み合わせると精度が高くなるといわれているために本来であれば 2 つ以上を組み合わせるべきで今後検討する必要がある。HP 菌陽性 ITP の背景には、年齢が 50 歳以上の症例が多く、初診時血小板減少の程度が軽く、骨髄巨核球数が増加している症例が多い特徴が明らかとなった。この他出血傾向を始め、既治療の反応性など臨床病態には差を認めず、このことからヘリコバクターピロリ菌感染が ITP の病態に変化をもたらしている可能性は少ないと考えられた。

除菌は 230 例に行われ除菌有効率が 78% であった。除菌の成否にステロイド治療をはじめ ITP 治療は影響せず、除菌成功率が若干低い理由は不明である。除菌後の血小板増加は除菌効果の有無にかかわらず全体として 57% (119 例) に認められた。これまでの除菌が有効とする報告とほぼ一致した頻度である。除菌

により血小板数が増加する症例群は ITP としての罹病期間が短い症例が多く、今後の除菌治療の位置付けに参考になると考えられる。

除菌成功例では非成功例に比し有意に血小板増加効果が認められ（63%）、HP 菌感染が ITP の発症に関連していることを間接的に示すものである。しかし除菌が成功しなくても 32.6%の症例に血小板増加を認め、しかも長期間血小板増加効果を維持していることは、除菌効果の判定が誤りなのか、判定時期が問題なのか、或いは HP 菌感染は関係ないのか、除菌療法薬に血小板増加作用があるのか、自然経過の一環と捕らえられるべきものなのか、等このような症例の解釈は困難である。少なくとも SLE などに伴う ITP や HP 陰性 ITP に除菌療法を行っても血小板増加が見られないことから免疫抑制的作用よりも、HP 菌の減少が何らかの効果をもたらしたと考えるのが妥当であろう。いずれにしても除菌療法による血小板増加には様々な機序が関係している可能性を示していると思われる。

今回 12 ヶ月以上の経過観察症例を中心に解析したところ、除菌成功後に血小板が増加した症例は、除菌後 1 ヶ月頃から血小板が増加し始め、血小板増加の予測が付き易い事が判った。再発症例は数例 6 ヶ月以内で認められるのみで殆ど 12 ヶ月の観察期間では再発は認められなかった。この点からも有用な治療法といえる。12 ヶ月後の血小板数は除菌前の血小板数に比例して増加効果が大きい傾向があるが、20 万以上となる症例に関しては除菌前の血小板数は参考にならないと思われ

た。また血小板数が 1 万以下の症例における除菌後の血小板増加は全例 5 万以下に留まっており 1 万以上の群と異なった血小板増加の推移をたどっている。症例数が少なくこの傾向が血小板数 1 万以下の群の特徴であるのか否か明らかでないが今後症例を重ねる必要がある。

除菌の副作用は 17.6%に認められ多くは消化器症状であった。重篤な症例は血小板減少が増悪した 1 例のみで安全におこなえる治療と思われる。ただし血小板数が 1 万以下の症例に関しては消化管出血、その他出血傾向の増悪など慎重な判断が必要である。

以上を踏まえた ITP 治療ガイドラインの概略として

1. ヘリコバクターピロリ菌感染が関係している ITP か否かをまず検査
 2. 感染が確認されればインフォームドコンセントの基に除菌療法を第一選択の治療として行う。
 3. 除菌療法に反応しない症例に関しては現在の標準的治療を行う
- 、を大枠とした治療プロトコールが考えられる。

最後に今回アンケート調査にご協力頂いた施設のご協力に感謝致します。

E. 結論

ヘリコバクターピロリ陽性 ITP においてはピロリ菌除菌が血小板減少を改善させる有効な治療法であることを確認した。ピロリ菌陽性中高年 ITP においては初回より除菌療法を行うことが得策である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

藤村 欣吾

特発性血小板減少性紫斑病

「薬物療法」—グルココルチコイド療法と
免疫抑制療法 日本臨床 61,
4:593-598, 2003. 5

Toshiro Takafuta, Mari Saeki,
Tetsuro-Takahiro Fujimoto,
Kingo Fujimura, Sandor s.Shapiro
A new member of the LIM protein
Family binds to Filamin B and
localizes at fibers.
J.Biol.Chem. 278(14) 12175-12181,
2003.

Tetsuro-Takahiro Fujimoto,
Shinya Katsutani, Takeshi
Shimomura, Kingo Fujimura
Thrombospondin-bound integrin-
associated protein (CD47) physically
and functionally modifies integrin
 $\alpha_{IIb} \beta_3$ by its extracellular domain.
J.Biol.Chem. 278(29) 26655-26665,
2003.

Tetsuro-Takahiro Fujimoto, Satoshi
Kohata, Hidenori Suzuki,
Hiroshi Miyazaki, Kingo Fujimura
Production of functional platelet by
differentiated Embryonic stem(ES)

cells in vitro.

Blood 102(12) 4044-4051, 2003

藤村 欣吾

血小板減少症

内科学(第2版) II 文光堂 1

421-1425、2003、12

2. 学会発表

岸本 美保、仲村 佳子、藤元 貴啓、
藤村 欣吾、小島 研介、品川 克至、
新谷 憲治、谷本 光音
AMLを発症した GPIIb 遺伝子の新たな
スプライシング異常を持つ血小板
無力症
第4回 中四国 凝固・線溶・血小
板研究会 平成15年2月1日
岡山市

藤村 欣吾

シンポジウム「薬学教育環境の醸
成に向かって」—薬学教育環境は与
えられるものではない、我々で創り
出すものである—
第4部 どこまで教える? 今後の
薬学教育

「実践的薬物治療の学び方」

藤村 欣吾

第123回 日本薬学会 平成15年
3月28日 長崎市

藤村 欣吾

ヘリコバクターピロリ菌感染と ITP
第4回臨床血液談話会 平成15年
4月25日 札幌市

井出 和子、藤元 貴啓、藤村 欣吾
血小板 GPIIb-IIIa 複合体と相互作用する細胞内蛋白群の同定
第 65 回日本血液学会総会、第 45 回
日本臨床血液学会総会 平成 15 年 8
月大阪市

小野 綾、藤元 貴啓、鈴木 英紀、宮
崎 洋、藤村 欣吾
ES 細胞由来血小板の電顕的観察と血
小板機能研究への応用
第 65 回日本血液学会総会、第 45 回
日本臨床血液学会総会 平成 15 年 8
月大阪市

藤村 欣吾、桑名 正隆、倉田 義之、
藤元 貴啓、今村 雅寛、幸田 久平、
坂巻 壽、
寺村 正尚、大屋敷 一馬、原田 浩
史、池田 康夫
免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) に
おけるヘリコバクターピロリ除菌療
法の有用性
—全国多施設共同研究—
第 65 回日本血液学会総会、第 45 回
日本臨床血液学会総会 平成 15 年 8
月大阪市

水島 美代子、松本 卓之、窪田 俊美、
平田 浩司、藤村 欣吾
塩酸チクロピジン誘発障害発現に及
ぼす患者背景因子に関する検討
第 65 回日本血液学会総会、第 45 回
日本臨床血液学会総会 平成 15 年 8
月大阪市

下村 壮司、勝谷 慎也、藤元 哲郎、
藤村 欣吾、木村 昭郎
遺伝子導入リンパ芽球細胞株を利用
した血小板膜糖タンパク反応性 T 細
胞の検出
第 65 回日本血液学会総会、第 45 回
日本臨床血液学会総会 平成 15 年 8
月大阪市

小野 綾、藤元 貴啓、鈴木 英紀、
宮崎 洋、藤村 欣吾
ES 細胞由来血小板の形態的機能的検
討と遺伝子導入血小板の機能研究へ
の応用
第 26 回日本血栓止血学会学術集会
平成 15 年 11 月 東京都

Aya Ono, Tetsuro-Takahiro
Fujimoto, Hidenori Suzuki, Hiroshi
Miyazaki, Kingo Fujimura
Generation of gene-manipulated
platelets from embryonic stem (ES)
cells in vitro : the application for
platelet functional studies .
45th ASH Annual Meeting 2003.
Dec. San Diego Convention Center

- 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. 実用新案特許
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

慢性型特発性血小板減少性紫斑病における血小板結合抗 GPIIb-IIIa 自己抗体のエピトープ解析に関する研究

分担研究者 倉田 義之 大阪大学医学部附属病院輸血部講師

研究要旨

慢性型特発性血小板減少性紫斑病における血小板結合抗 GPIIb-IIIa 自己抗体を解析し、抗 GPIIb-IIIa 自己抗体が約 40% の症例で検出されること、 $\alpha v \beta 3$ とは交叉反応しないことを示した。さらに、抗 GPIIb-IIIa 自己抗体を有する症例において、GPIIb の β -プロペラ構造の W3 4-1 ループ内 2 アミノ酸挿入に起因する機能欠失 GPIIb-IIIa との反応性が約 32% の症例において低下することを明らかにした。これらの成績より、自己抗原として GPIIb の重要性が示唆された。

A. 研究目的

慢性型特発性血小板減少性紫斑病（ITP）は血小板に対する自己抗体が産生され、抗体に感作された血小板が早期に脾臓などの網内系で破壊され血小板減少をきたす自己免疫疾患である。血小板膜糖蛋白である GPIIb-IIIa および GPIb-IX-V が自己抗体の標的である主要な血小板抗原であることが示されている。しかしながら、慢性 ITP においてこれらの抗原のどの領域が自己抗原として認識されているのか？さらにはこれらの抗原がなぜ標的抗原となるのか？に関する詳細はいまだ不明である。本研究では、慢性 ITP の発症機序を明らかにすることを最終目的として、主要な自己抗原である GPIIb-IIIa (α IIb β 3) に注目し、どの領域が自己抗原として認識されているかを検討した。なお、抗体としては慢性 ITP 患

者の血小板に結合している抗血小板自己抗体を血小板からエーテルにて解離して用いた。

B. 研究方法

【対象】

慢性 ITP 患者 101 例、血小板産生障害に起因する血小板減少症例 17 例。患者より血小板を分離し洗浄後、血小板より抗体をエーテルにて溶出し解析に用いた。

【Modified antigen capture ELISA (MACCE)】

抗 GPIIb-IIIa 抗体の検出は modified antigen capture ELISA 法にて行った。具体的には、洗浄血小板に患者血小板より溶出した血小板結合抗体を反応させた後、1% Triton X-100 にて溶解し血小板 lysate とした。96 穴マイクロプレートに予め抗 GPIIb-IIIa モノクローナル抗体を固相化し

ておき、上記 lysate を加え反応させ、GPIIb-IIIa およびそれに結合した抗体をプレートに結合させた。洗浄後、GPIIb-IIIa に結合した抗体を抗ヒト IgG 抗体にて検出した (図 1)。

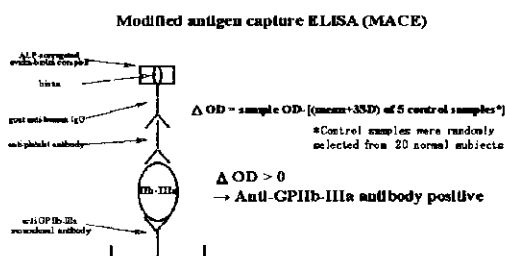


図 1. Modified antigen capture ELISA の模式図

(倫理面への配慮)

患者には書面にてインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1. 抗 GPIIb-IIIa 自己抗体の検出率

慢性 ITP 101 例の血小板結合自己抗体 (platelet-associated autoantibodies) を MACE にて解析した結果、41 例 (41%) において抗 GPIIb-IIIa 抗体が検出された。一方、血小板産生異常に起因する血小板減少症症例 17 例 (再生不良性貧血 11 例、MDS 1 例、化学療法後の血小板減少 5 例) において抗 GPIIb-IIIa 抗体は一例も検出されなかった。

2. 抗 GPIIb-IIIa 抗体の $\alpha v \beta 3$ との反応性

GPIIb-IIIa はインテグリンファミリーの $\alpha IIb \beta 3$ と同一である。 $\beta 3$ が共通のインテグリンとして $\alpha v \beta 3$ が存在し、 αIIb と αv はアミノ酸レベルで 34% の相同性を有

しているため、ITP における抗 GPIIb-IIIa 抗体のエピトープを解析するため、ヒト臍帯静脈由来の血管内皮細胞に発現する $\alpha v \beta 3$ との反応性を MACE にて検討した。その結果、抗 GPIIb-IIIa 抗体は $\alpha v \beta 3$ とは反応しないことが明らかとなった (図 2)。この成績より抗 GPIIb-IIIa 自己抗体は GPIIIa を認識するのではなく、GPIIb 上あるいは GPIIb-IIIa 複合体にて形成される立体構造を認識していることが示唆された。

Reaction of platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies with $\alpha v \beta 3$ on HUVEC

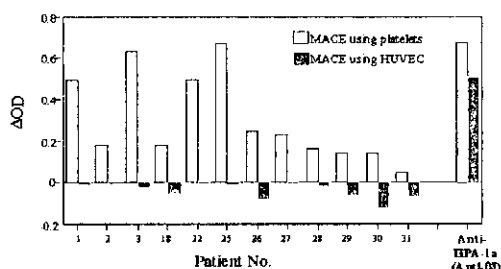


図 2. 血小板結合抗 GPIIb-IIIa 自己抗体と臍帯血管内皮細胞 $\alpha v \beta 3$ との反応性

3. 機能欠失変異 KO との反応性

上記の成績より、GPIIb-IIIa の構造を保持した状態で抗体のエピトープを解析することが必要であると考えられたため、我々が見出した機能欠失変異に起因する血小板無力症 KO の変異 GPIIb-IIIa を 293 細胞に発現させ、antigen capture ELISA にてエピトープ解析を行った。KO は GPIIb-IIIa の機能欠失に起因する血小板無力症であり、その分子異常は GPIIb の β -プロペラ構造の W34-1 ループ内で 160 番と 161 番残基の間に 2 つのアミノ酸が挿入することに起因する。このアミノ酸挿入により GPIIb-IIIa の発現は障害されることなくその機能が特

異的に障害される (図3)。図4に成績の一部を示しているが、34例中11例において KO GPIIb-IIIa への反応性が野生型 GPIIb-IIIa の50%以下に低下した。一方、GPIIIa 上の機能部位の変異 GPIIb-IIIa (GPIIIa の119番の Asp が Tyr に変異) である CAM GPIIb-IIIa に対する反応性は野生型と差を認めなかった (図5)。この成績より、自己抗体の標的抗原としては GPIIIa よりも GPIIb が重要であることが示唆された。

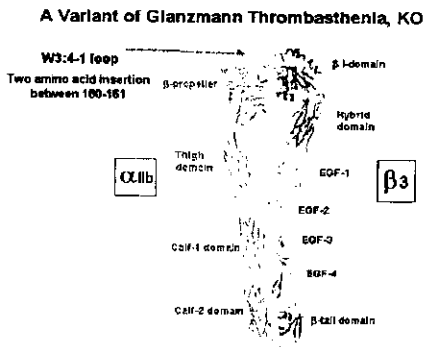


図3. インテグリン α IIb β の立体構造とバリエーション型血小板無力症例、KOのアミノ酸変異部位

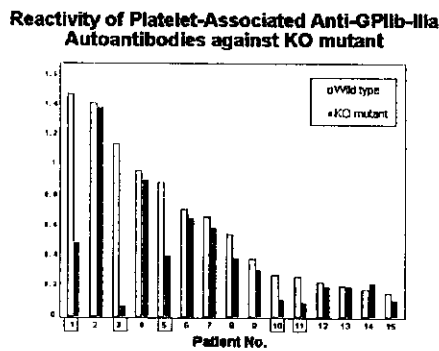


図4. 血小板結合抗 GPIIb-IIIa 自己抗体の KO 変異に対する反応性

Reactivity of Platelet-Associated Anti-GPIIb-IIIa Autoantibodies against CAM mutant (D119Y)* (*Recombinant GPIIb-IIIa having substitution of Asp119 with Tyr in GPIIb)

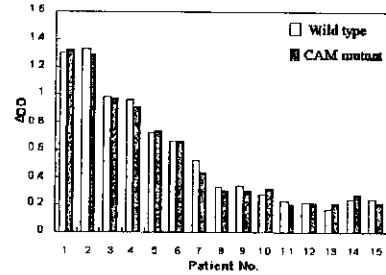


図5. 血小板結合抗 GPIIb-IIIa 自己抗体の CAM 変異に対する反応性

D. 考案

本研究において、慢性 ITP において約 40% の症例において GPIIb-IIIa が標的分子であることが明らかとなり、さらにこれらの抗体は α v β 3 とは交叉反応性は示さず、GPIIb-IIIa 特異的であることが示された。さらに機能欠失変異 GPIIb-IIIa を用いた解析により、ITP の自己抗体のエピトープとして約 1/3 の症例において GPIIb β -プロペラ構造で W3 4-1 ループが重要であることが示唆された。

しかしながら 2/3 症例の標的部位はいまだ不明である。この問題点を解明すべく、現在図6に示すように各ループ構造を α 4 あるいは α 5 と置換しキメラ GPIIb-IIIa を恒常的に発現する細胞を樹立し、さらにエピトープ解析を行っている。

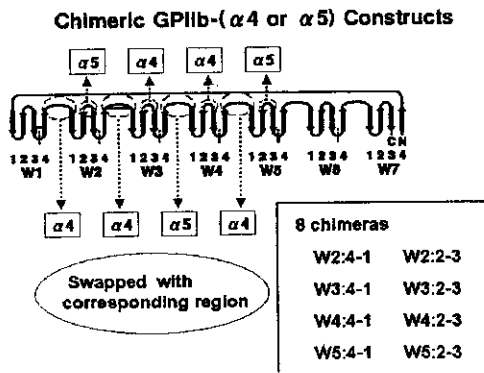


図6. GPIIb- $\alpha 4$ あるいは GPIIb- $\alpha 5$ キメラ蛋白

E. 結語

血小板結合抗 GPIIb-IIIa 自己抗体を有する慢性 ITP において約 1/3 の症例ではそのエпитープとして GPIIb β -プロペラ構造で W3 4-1 ループが重要であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 倉田義之: 血小板減少症鑑別診断における血中トロンボポエチン、網状血小板測定の有用性に関する検討。厚生労働科学研究費補助金 特定疾患対策研究事業 血液凝固異常症に関する調査研究 平成14年度 総括・分担研究報告書、p56-64, 2003.
- 倉田義之: 今後期待される治療法。特集: 特発性血小板減少性紫斑病。日本臨床、61; 664-669, 2003.
- 倉田義之: 輸血実施入力。クリニカルリ

スクマネジメント: ナーシングプラクティス。中島和江他編集、文光堂、p80-81, 2003.

- 倉田義之: 院内医療従事者に対する輸血教育。医学のあゆみ、205; 327-330, 2003.
- 倉田義之、高松純樹: 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、血友病の出血。medicina, 40; 874-877, 2003.
- Kiyoi, T, Tomiyama, Y, Honda, S, Tadokoro, S, Arai, M, Kashiwagi, H, Kosugi, S, Kato, H, Kurata, Y, Matsuzawa, Y.: A naturally occurring Tyr143His α IIb mutation abolishes α IIb β 3 function for soluble ligands but retain its ability for mediating cell adhesion and clot retraction: comparison with other mutations causing ligand-binding defects. Blood, 101; 3485-3491, 2003.
- 倉田義之: 血小板減少症。血栓止血誌、14; 227-237, 2003.
- 倉田義之: 赤血球輸血の適応。Modern Physician, 23; 1465-1468, 2003.
- 倉田義之: 血小板の同種抗原。改訂版日本輸血学会認定医制度指定カリキュラム、日本輸血学会認定医制度審議会カリキュラム委員会編、p73-75, 2003.
- 倉田義之: 輸血の現状と今後の動向。Medical Technol, 31; 1369-1375, 2003.

2. 学会発表

第51回日本輸血学会総会 (北九州)

- 倉田義之: 血小板輸血の適応と問題点
- 倉田義之: 血小板抗原抗体、顆粒球抗原

抗体の臨床的意義

- 倉田義之:日本の輸血医学教育の現状と課題
- 倉田義之、林 悟、清川知子、永峰啓丞、押田眞知子:血小板輸血のトリガーとしての血小板数は自動血球計数器で正確に測定可能か?
- 清川知子、押田眞知子、永峰啓丞、倉田義之:脳死移植における血液製剤使用量について

XIX International Congress of Thrombosis and Haemostasia (UK)

- S. Honda, Y. Tomiyama, H. Kashiwagi, T. Kiyoi, H. Kato, S. Kosugi, M. Shiraga, Y. Kurata & Y. Matsuzawa: Analysis of Arg-Gly-Asp contact sites in the alpha v subunit of integrin alphavbeta3 employing single amino acid mutations.
- H. Kato, Y. Tomiyama, S. Honda, H. Yoshida, H. Kashiwagi, S. Kosugi, M. Shiraga, T. Kiyoi, N. Honma, Y. Kurata, Y. Matsuzawa: Interaction of CD47 with SHPS-1 negatively regulates platelet function.
- H. Kashiwagi, Y. Tomiyama, M. Shiraga, S. Honda, S. Kosugi, T. Kiyoi, H. Kato, Y. Kurata, Y. Matsuzawa: Demonstration of activation of integrin alphaIIb beta3 by inside-out signaling in a megakaryocytic cell line, CMK.

第4回日本検査血液学会学術集会(京都)

- 西山美保、二日市良彰、末久悦次、林 悟、倉田義之:血小板著減検体測定における

破碎赤血球の影響

第65回日本血液学会総会・第45回日本臨床血液学会総会(大阪)

- 白鹿正通、富山佳昭、宮田茂樹、加藤 恒、清井映男、小杉 智、柏木浩和、本田繁則、倉田義之、松澤佑次:開始コドンの変異(ATG→AGG)に起因する血小板ADP受容体P2Y12欠損症の解析
- 加藤 恒、富山佳昭、本田繁則、吉田 均、柏木浩和、白鹿正通、小杉 智、清井映男、本間央之、倉田義之、松澤佑次:SHPS-1のCD47/IAPを介した血小板機能抑制採用の検討
- 藤村欣吾、桑名正隆、倉田義之、藤元貴啓、今村雅寛、幸田久平、逆巻 壽、寺村正尚、大屋敷一馬、原田浩史、池田康夫:免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)におけるヘリコバクターピロリ除菌療法の有用性--全国多施設共同研究--
- 本田繁則、富山佳昭、柏木浩和、清井映男、加藤 恒、小杉 智、白鹿正通、倉田義之、松澤佑次:インテグリン $\alpha v\beta 3$ の αv 鎖におけるArg-Gly-Asp結合部位の解析
- 長谷川 稔、西川政勝、野村昌作、田窪孝行、末廣 謙、西郷勝康、林 邦雄、倉田義之:ITPに対するステロイド治療は骨量に影響を及ぼすか

第26回日本血栓止血学学術集会(東京)

- 小杉 智、本田繁則、白鹿正通、清井映男、加藤 恒、柏木浩和、倉田義之、高田義一、富山佳昭:キメラGPIIb-IIIaを用いたITPにおけるPA抗GPIIb-IIIa自己抗体のエピ

トープ解析

- 加藤 恒、本田繁則、清井映男、小杉 智、白鹿正通、柏木浩和、倉田義之、富山佳昭: SHPS-1 による CD47 を介した血小板活性化抑制メカニズムの検討
- 白鹿正通、宮田茂樹、釜江 剛、加藤 恒、清井映男、小杉 智、柏木浩和、本田繁則、杉本充彦、倉田義之、富山佳昭: ADP 受容体 P2Y12 を欠損する血小板の機能解析

第47回日本輸血学会近畿支部総会(神戸)

- 森杉純子、清川知子、青地 寛、永峰啓丞、林 悟、押田眞知子、白鹿正通、倉田義之: 当院における自己血採血業務開始への取り組み

H. 知的財産権の出版・登録状況
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ITP 診断における各種検査法の有用性を検討する多施設前向き調査
－中間報告－

分担研究者 桑名正隆（慶應義塾大学医学部先端医科学研究所）

研究要旨

本研究班では特発性血小板減少性紫斑病（ITP）に特異的な臨床検査項目を導入した新しい診断基準の作成をめざしている。昨年度は血小板減少症を有する成人患者を対象とした単施設での前向き調査を行った。その結果、ITP と関連する初診時の検査所見として白血球減少なし、貧血なし、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体陽性、網状血小板比率の増加、血漿 TPC 濃度正常または軽度増加の 6 項目が抽出され、その結果をもとに ITP の診断基準案を提案した。そこで、本年度はこの成績をより多数例で確認するために多施設での前向き試験を企画した。解析は現時点で進行中だが、すでに解析を終えた 87 例を診断基準試案にあてはめると感度 91%、特異度 71%と良好な結果であった。特異度をさらに向上する必要があるが、現在の基準案を基本とすることで新しい ITP の診断基準の作成が可能と考えられた。

A. 研究目的

我が国では特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断に 1990 年に厚生省（当時）研究班により提案された診断基準が広く用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり、骨髓検査で巨核球が正常または増加して他の系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他の疾患が除外されれば ITP と診断してよい。しかし、血小板減少をきたす全ての疾患を除外することは現実的に困難であり、他疾患の除外のために数多くの検査を行うことは医療経

済上も好ましくない。そのため、専門医の経験に基づいて必要最小限の検査成績により ITP の診断を行っているのが現状である。そこで、ITP に特異性の高い臨床検査項目を含めた、積極的に ITP を診断する基準の作成が望まれる。昨年度は慶應義塾大学の単施設で血小板減少症のために受診した成人例を対象とした前向き試験を行い、慢性 ITP の診断と関連する初診時の臨床検査所見を検索した。その結果、白血球減少なし、貧血なし、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗

体陽性、網状血小板比率の増加、血漿 TPO 濃度正常または軽度増加の 6 項目が ITP の診断と強く相関する因子として抽出された。この結果をもとに表 1 に示す成人における慢性 ITP の診断基準案を提案した。そこで、本年度はこの基準案を検定するため、8 施設において血小板減少症患者を対象とした前向き試験を行った。現時点で 86 例のデータ解析が終了しており、それらの例を対象とした中間集計を行った。

B. 研究方法

血小板減少または出血傾向を主訴に来院した患者のうち、(1) 血小板数 < 10 万/ μl 、(2) 末梢血スメアで異型性がない、(3) 副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬による薬物療法を現在受けていない、(4) 摘脾を受けていない、のすべてを満たす 87 例を対象とした。参加施設は大阪大学、広島大学、慈恵医科大学、三重大学、慶應義塾大学、筑波大学、関西医科大学、名古屋大学、奈良県立医科大学の 8 施設とした。エントリー時に年齢、性別、出血症状の有無、塗抹も含めた末梢血検査の結果を登録し、さらに末梢血検体を用いた以下の 4 つの検査を行った。

- (1) ELISPOT 法による 10^5 個の末梢血単核球あたりの抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度
- (2) Antigen-capture assay による IgG 抗 GPIIb-IIIa および抗 GPIb-IX 抗体
- (3) フローサイトメトリーによる網状血小板比率
- (4) ELISA キット (Quantikine; R&D

systems) による血漿 TPO 濃度
末梢血検体はブラインドで慶應義塾大学と大阪大学へと送付し、(1)(4)は慶應義塾大学、(2)(3)は大阪大学 (倉田義之先生) で解析した。最終診断は、6 ヶ月以上経過した時点で各施設の担当医により臨床経過および骨髓検査を含めた各種検査所見により行われた。合計 10 の臨床項目の 2 群間における平均値および頻度の差は Mann-Whitney U-test、Fisher's 2-tailed exact test を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

末梢血検体の取り扱いに際しては個人情報保護のため、すべて匿名化し、検査および集計に用いた。

C. 研究結果

6 ヶ月以上の経過観察による最終診断は 68 例が慢性 ITP、10 例が再生不良性貧血、7 例が骨髓異形成症候群、1 例が悪性リンパ腫であった。そこで、再生不良性貧血と骨髓異形成症候群をあわせた 17 例を非 ITP とし、エントリー時の各種臨床項目について比較した (表 2)。ITP 群で女性が多い傾向にあったが、性、年齢ともに有意差はなかった。抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、網状血小板比率、白血球数は ITP 群で有意に高く、血漿 TPO と貧血の頻度は非 ITP 群で有意に高かった。ただし、antigen-capture assay による抗 GPIIb-IIIa または抗 GPIb-IX 抗体の陽性頻度は ITP と非 ITP 群で差を認めなかった。

今回の測定結果を表 1 の診断基準案にあてはめたところ、ITP 68 例中 62 例 (91%)

が基準を満たし、非 ITP17 例のうち基準を満たしたのは 5 例 (29%) にすぎなかった。したがって、感度 91%、特異性 71% と良好な結果であった。非 ITP 群でこの基準を満たした症例のうち 4 例 (再生不良性貧血 3 例、骨髄異形成症候群 1 例) はいずれも抗 GPIIb-IIIa 抗体が ELISPOT 法と antigen-capture assay の両方で陽性であり、自己免疫学的な病態が併存する可能性が考えられた。

D. 考察

本年度の検討では小児例 (慈恵医科大学) を含めた多施設における血小板減少症例を対象とした。現時点では中間報告であるが、昨年度までの単施設で成人例に限定して行った調査とほぼ同様の成績が得られた。したがって、少なくとも慢性 ITP 患者の抽出には現在の診断基準案が有用なことが確認された。ただし、この基準の有用性の確認には多彩な臨床背景を持った多数例での検討が必要であるのみならず、これまで解析していない急性 ITP や先天性血小板減少症などの患者についてのデータ集積が必須である。また、ITP のみならず免疫性血小板減少症も本基準を満たすことが予想されるが、実際に SLE、リンパ増殖性疾患、HIV 感染症で血小板減少を呈する症例での解析も必要である。これらの検討をふまえて、現在の基準を見直していく必要があるが、その基礎としての本基準の有用性が確認された。

今回の調査では診断基準案に当てはめた際に特異度がやや低かった。その原因とし

て、antigen-capture assay により検出された抗 GPIIb-IIIa 抗体、抗 GPIb-IX 抗体の結果が ITP と非 ITP 群で差を認めなかったことが挙げられる。採血からアッセイまで 2 日間経過していたことや、凍結した血小板をそのまま解析に用いたことが原因として推測される。今後、保存血小板を用いて P-GP-ELISA による血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体の測定を再度行う予定である。また、診断基準に用いるアッセイ法は臨床の現場で必要に応じて正確に行える必要があり、そのための検査システムの確立も重要な課題である。今後、現時点で臨床検査として測定できない抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞、網状血小板比率、血漿 TPO とともにキットや標準化試薬の開発が必須であり、診断基準案の評価、改変に加えて、検査システムの早急な開発、保険収載が必要である。

E. 結論

ITP の診断に有用な臨床検査を組み合わせることで ITP の診断基準を作成することが可能と考えられた。今後さらに検討を重ねて診断基準の改訂をめざす。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

論文発表

1) Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by

blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 101:621-623, 2003

2) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y. Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is a sensitive and specific test for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* 114:322-325, 2003

3) Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ishii M, Ikeda Y, Kuwana M. A role of autoantibody-mediated platelet destruction in thrombocytopenia in patients with cirrhosis. *Hepatology* 37:1267-1276, 2003

4) Nomura S, Kuwana M, Ikeda Y. Induction of T-cell tolerance in a patient with idiopathic thrombocytopenic purpura by single injection of humanized monoclonal antibody to CD40 ligand. *Autoimmunity* 36:317-319, 2003

5) Kuwana M, Nomura S, Fujimura K, Nagasawa T, Muto Y, Kurata Y, Tanaka S, Ikeda Y. The effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in

patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 103:1229-1236, 2004

6) 桑名正隆、池田康夫: ステロイド/摘脾抵抗性 ITP-CD40 リガンドを標的とした治療法. *臨床血液* 44: 82-89, 2003.

7) 桑名正隆: ITP に関する免疫学的研究の進歩. *日本臨床* 61: 670-675, 2003.

8) 桑名正隆: CD40/CD154 相互作用遮断による Tr 細胞の誘導. *臨床免疫* 39: 228-231, 2003.

9) 桑名正隆: 自己免疫疾患における CD40/CD154 シグナル阻害療法. *日本臨床免疫学会会誌* 26: 259-266, 2003.

10) 桑名正隆、池田康夫: 自己免疫疾患に対する抗 CD154 抗体療法. *最新医学* 58: 81-87, 2003.

学会発表

Kajihara M, Kato S, Okazaki Y, Kawakami Y, Ikeda Y, Ishii M, Kuwana M: Accelerated platelet turnover in patients with liver cirrhosis. The 54rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (Boston). 2003. 10.

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし。

表 1. 成人における慢性 ITP の診断基準案

1. 血小板減少 (10万 / μ L以下).
2. 末梢血塗沫標本は正常.
3. 以下の検査所見のうち3つ以上を満たす.
 - 1) 貧血がない
 - 2) 白血球減少がない
 - 3) 末梢血中の抗GPIIb/IIIa抗体産生 B 細胞の増加
 - 4) 血小板関連抗GPIIb/IIIa 抗体の増加
 - 5) 網状血小板比率の増加
 - 6) 血漿トロンボポエチンは軽度上昇にとどまる(<300 pg/mL)
4. 他の免疫性血小板減少性紫斑病 (SLE、リンパ増殖性疾患、HIV感染症、肝硬変、薬剤性など) を除外できる.

慢性ITPの診断には、上記の4項目全てを満たすこと.

表 2. ITP と非 ITP における初診時の臨床所見の比較

臨床および検査所見	ITP (n = 68)	非ITP (n = 17)	P
性 (%女性)	60%	39%	0.1
受診時年齢 (歳)	43.7 \pm 23.0	46.8 \pm 25.6	0.5
抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞 (/10 ⁵ PBMC)	9.9 \pm 8.2	6.2 \pm 10.4	0.003
抗GPIIb/IIIa抗体 または抗GPIb/IX抗体	48%	41%	0.7
網状血小板比率 (%)	11.9 \pm 6.1	7.1 \pm 3.1	0.001
血漿TPO濃度 (pg/mL)	108.6 \pm 88.1	591.2 \pm 514.3	<0.001
末梢血白血球数 (/mL)	5.7 \pm 1.7	4.5 \pm 3.5	0.004
貧血の有無	24%	100%	<0.001
血小板数 (/mL)	4.3 \pm 2.4	3.9 \pm 2.4	0.3
出血症状	48%	39%	0.6

分担研究報告書

血液凝固異常症に関する調査研究

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 ADAMTS13 の特異的酵素活性測定法の開発

分担研究者 宮田敏行（国立循環器病センター研究所）

研究要旨

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は異常高分子量フォンビルブランド因子（VWF）マルチマーによる血小板凝集能の亢進により生じる血小板血栓形成が主徴である。異常高分子量 VWF マルチマーの形成は、血漿メタロプロテアーゼである ADAMTS13 の先天性もしくは後天性の欠乏症が原因である。ADAMTS13 は VWF の A2 ドメイン内の Y1605-M1606 結合を特異的に切断することにより異常高分子量 VWF マルチマーの血漿中での蓄積を防ぎ、血小板血栓の形成を回避する。TTP の発症の予知や溶血性尿毒症症候群との鑑別診断には、ADAMTS13 活性の測定が必要とされるものの、従来法は時間と手間、精度に問題があった。我々は VWF のアミノ酸配列に基づいて、ADAMTS13 の基質、VWF73、の開発に成功した。本基質を用いた新規測定法の確立により、TTP の発症前診断の可能性が開かれた。

A. 研究目的

TTP は、VWF 切断酵素である ADAMTS13 の先天性・後天性欠乏症が原因である。ADAMTS13 は、メタロプロテアーゼであり、VWF の A2 ドメイン内のペプチド結合を特異的に切断する。その結果、異常高分子量 VWF マルチマーが適度に分解され、TTP が発症しない。このことは、TTP 発症の予知には血中 ADAMTS13 活性の測定がたいへん有益な

情報を与えると考えられる。これまで、ADAMTS13 の測定法が幾つか報告されているものの、いずれも熟練を要し、時間がかかるものであった。また、その精度には難点があった。我々には、これらの従来法を克服するため、新規の活性測定法を開発した。

B. 研究方法

VWF の A2 ドメインのアミノ酸配列に基づき A2 ドメインの部分 (D1459~R1668) アミノ酸配列を有する 5 種類のペプチド (210 残基長から 64 残基長) を大腸菌で発現させた。これらのペプチドは N 末端側にグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST)、C 末端側に His タグを、それぞれ付加して発現させた。これらの組み換え蛋白質は、グルタチオンカラムおよびニッケルカラムを用いて精製した。これらの基質ペプチド 400ng と血漿 1 μ l を混合し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動-ウェスタンブロット分析にて解析した。検出は、抗 GST 抗体を用い、化学発光により酵素反応産物を検出した。患者血漿中の抗 ADAMTS13 抗体の抗体価は、後天性 TTP 患者血漿を正常血漿と混合し、活性測定を行うことにより求めた。

C. 研究結果

大腸菌を用いて、ADAMTS13 切断部位を含む VWF の A2 ドメインおよびその一部の領域を発現させた。これを基質にして、「研究方法」の項に従って活性を測定したところ、D1459-R1668、E1554-R1668、D1587-R1668、D1596-R1668 は切断されたが、D1596-R1659 は切断されなかった。切断された最小領域 D1596-R1668 は 73 残基であったので、この基質を VWF73 と名付けた。VWF73 は、正常血漿の用量依存的に切断をうけた。しかし、TTP 患者血漿では切断されなかった。また、TTP との鑑別を要する溶血性尿毒症

症候群患者血漿では切断された。後天性 TTP 患者血漿と正常血漿を混合後、本基質とインキュベーションすると、明らかな反応生成物の産生低下が観察された。これにより、後天性 TTP 患者血漿中に存在する ADAMTS13 抗体 (インヒビター抗体) の抗体価を算出することが可能であった。

D. 考察

VWF の A2 ドメインのアミノ酸配列に基づき、ADAMTS13 の新規活性測定法を開発した。本法は、基質として VWF73 を使用し、反応時間は 1 時間であり、全行程が 5 時間で行えるものである。本法は、従来用いられていた測定法を凌駕するものである。抗血小板薬であるチクロピジンは、血栓の再発防止に広く使用されているが、副作用として TTP が問題となっている。我々が開発したこの ADAMTS13 活性測定法は、平成 14 年 7 月から新規チクロピジン投薬患者を対象に、TTP の予知マーカーとして臨床検査で使用され始めた。今後、本法を改良し、簡便でかつ精度の高い測定法を開発するとともに、多くの臨床検体の ADAMTS13 活性を測定することにより、その臨床的意義を明らかにしていきたい。

E. 結論

TTP の診断に重要な血中 ADAMTS13 活性の簡便かつ精度の高い新規測定系の開発に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 学会発表

1. 論文発表

K. Soejima, M. Matsumoto, K. Kokame, H. Yagi, H. Ishizashi, H. Maeda, C. Nozaki, T. Miyata, Y. Fujimura, T. Nakagaki: ADAMTS-13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*, 102, 3232-3237, 2003.

A. Okamoto, T. Sakata, T. Mannami, S. Baba, Y. Katayama, H. Matsuo, M. Yasaka, K. Minematsu, H. Tomoike, and T. Miyata: Population-based distribution of plasminogen activity, and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in Japanese: The Suita Study. *J. Thromb. Haemost.*, 103, 607-612, 2003.

K. Kokame, M. Matsumoto, Y. Fujimura, and T. Miyata. VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*, 103, 607-612, 2003.

M. Matsumoto, K. Kokame, K. Soejima, M. Miura, S. Hayashi, Y. Fujii, A. Iwai, E. Ito, Y. Tsuji, M. Takeda-Shitaka, M. Iwate, H. Umeyama, H. Yagi, H. Ishizashi, F. Banno, T. Nakagaki, T. Miyata, and Y. Fujimura. Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome. *Blood*, 103, 1305-1310, 2004.

T. Sakata, A. Okamoto, T. Mannami, S. Baba, H. Matsuo, H. Tomoike, T. Miyata. Protein C and antithrombin deficiency are important risk factors for deep vein thrombosis in Japanese. *J. Thromb. Haemost.*, In press.

2. 学会発表

Koichi Kokame, Masanori Matsumoto, Yoshihiro Fujimura, and Toshiyuki Miyata: D1596-R1668 of von Willebrand factor is a minimal region recognized as a specific substrate for ADAMTS-13. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, July, 2003.

Fumiaki Banno, Kazuyoshi Kaminaka, Kenji Soejima, Koichi Kokame, and Toshiyuki Miyata: Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, July, 2003.

Masanori Matsumoto, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Tomohiro Nakagaki, Hideo Yagi, Hiromichi Ishizashi, Masayoshi Miura, Shuhei Hayashi, Etsuro Ito, Asayuki Iwai, Yasuhiko Fujii, Toshiyuki Miyata, and Yoshihiro Fujimura: Mutations of ADAMTS13 gene in four Japanese families with Upshaw-Schulman syndrome. XIXth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Birmingham, UK, July, 2003.

脇正人・小亀浩市・宮田敏行・宮田茂樹・窪田良次・徳田道昭・渡辺裕子・廣畑衛: 血栓性血小板減少性紫斑病を合併したシェーグレン症候群の一例第 65 回日本血液学会, 大阪, 2003 年 8 月

小亀浩市・宮田敏行・松本雅則・藤村吉博: ADAMTS-13 活性測定法の開発 ~ 臨床応用をめざして ~ 1 回血液・血管オルビス, 名古屋, 2003 年 9 月

坂野史明・上仲一義・副島見事・小亀浩市・宮田敏行: マウス系統特異的に発現する 2 種類の VWF 切断酵素 ADAMTS-13

第 1 回血液・血管オルビス, 名古屋, 2003 年 9 月

Koichi Kokame, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Kenji Soejima, Masanori Matsumoto, and Yoshihiro Fujimura: ADAMTS-13, a new member of ADAMTS family involved in hemostasis. 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 2003 年 10 月

Fumiaki Banno, Kazuyoshi Kaminaka, Kenji Soejima, Koichi Kokame, and Toshiyuki Miyata: Strain-specific insertion of retrotransposon into the mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 2003 年 10 月

藤村吉博・松本雅則・小亀浩市・宮田敏行・副島見事・中垣智弘・梅山秀明: Upshaw-Schulman 症候群 7 家系の ADAMTS13 遺伝子変異とリモデリングによる立体構造解析 第 45 回日本小児血液学会, 金沢, 2003 年 10 月

奥田智彦、宮田敏行: DNA マイクロアレイを用いた Dahl-S ラットにおける高血圧発症の原因遺伝子の同定の試み 第 26 回日本高血圧学会総会, 宮崎, 2003 年 10 月

宮田敏行: プラスミノーゲン Tochigi 変異とフォンビルブランド因子切断酵素多型 第 44 回脈管学会総会, 福岡, 2003 年 11 月

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行: Specific small substrate to develop a new assay system of ADAMTS-13 activity. 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 東京, 2003 年 11 月

小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・宮田敏行: VWF 切断酵素 ADAMTS-13 の最小人工基質「VWF73」第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 東京, 2003 年 11 月

坂野史明・上仲一義・副島見事・小亀浩市・宮田敏行: C 末端ドメイン欠失型 VWF 切断酵素 ADAMTS-13 のマウス系統特異的発現 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 東京, 2003 年 11 月

阪田敏幸・岡本章・万波俊文・友池仁暢・宮田敏行: 地域住民を対象にしたプロテイン C, プロテイン S, アンチトロンビンの活性と生理的因子との関連 第 26 回日本血栓止血学会学術集会, 東京, 2003 年 11 月

Toshiyuki Miyata, Koichi Kokame, Kenji Soejima, Masanori Matsumoto, and Yoshihiro Fujimura: Genetic analysis, polymorphism, functional domains and novel assay system of ADAMTS13 responsible for thrombotic thrombocytopenic purpura. 3rd General Meeting of the International Proteolysis Society associated with the International Conference on Protease Inhibitors, Nagoya, Japan, November, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2002-111241, 2002 年 4 月 12 日出願
出願人: 国立循環器病センター総長
発明人: 宮田敏行・小亀浩市・松本雅則・藤村吉博・河野雄平

PCT/JP02/10816, 2002 年 10 月 18 日出願
出願人: 国立循環器病センター総長が代表する日本国
発明人: 宮田敏行・小亀浩市

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 研究協力者

小亀浩市、坂野史明

: 国立循環器病センター研究所