

クリニカルパスに準拠した治療法が行われるようになり、クリニカルパス作成のための基本となるべき最新の情報に基づいた治療ガイドラインが必要である。

新 ITP ガイドラインの特徴：

本邦の ITP の多くを占めるピロリ菌陽性 ITP 症例の約 60%に副腎皮質ステロイド療法による副作用が回避可能となる。

また治癒症例頻度が増すと共に部分寛解症例においても維持療法を必要としない症例が増す。

血小板数と自覚症状、客観的所見、出血傾向増悪に関する因子、等から治療の必要性を選択することで臨床実態に即した適格な治療が行われる。

薬物療法による初回療法、維持療法をみ直し、特に副腎皮質ステロイド療法を極力短期間にし長期投与による副作用の軽減に努めた。

外科的、或いは出産時、重篤な出血傾向時などには積極的にガンマグロブリン大量療法、血小板輸血を行い致死性出血を避けると共に出血による機能障害を出来る限り避ける様に務める。

全体として ITP 治療費の削減が期待できる。

ガイドライン適応症例：

原則として 18 歳以上の慢性 ITP 症例。

初診時に当たっては慢性、急性の区別は必ずしも容易ではなく、両者を区別することなく緊急療法、その他を行う。

小児 ITP に関しては、急性型が多い、ピロリ菌感染症例が少ない、血小板数と出血傾向が必ずしも相関せず軽微な例が多い、等の特質があり本ガイドラインを適応しないものとする。

小児 ITP に関しては日本小児血液学会 ITP 委員会作成の「小児特発性血小板減少性紫斑病診断・治療・管理ガイドライン」日小血会誌 18: 210~218, 2004 を参照して頂きたい。

ガイドライン使用に当たって：

本ガイドラインは過去の治療データと臨床経験、研究論文に基づいて作成した平均的指針である。従って当該症例に画一的診療を規定するものではなく、個々の症例の臨床上、社会生活上の個別性を考慮した上で柔軟に用いるべきである。

ガイドラインの保守、点検について：

本ガイドラインは変化する臨床情報に対応するため、また本ガイドラインの有用性を検証するために原則として3～5年に1度見直しを行う。
また実情にそぐわない点が生じた場合には随時変更に努力する。

参考文献：

1. Portielje J.E.A. Westendorf R.G.J. Kluin-Nelemans H.C., Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 97: 2549-2554, 2001
2. Cortelazzo ., Finazzi G., Buelli M., Molteni A., Viero P., Barbui T. High risk of severe bleeding in aged patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 77:31-33,1991
3. Cohen Y.C., Djulbegovic B., Shamaï-Lubovitz O., Mozes B. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch. Intern. Med.* 160: 1630-1638. 2000
4. George J.M., Woolf S.H., Raskob G.E., Wasser J.S., Aledort L.K., Ballem P.J., Blanchette V.S., Bussel J.B., Cines D.B., Kelton J.G., Lichitin A.E., McMillan R., Okerbloom J.A., Regan D.H., Warrier I. Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the American Society Hematology. *Blood* 88: 3-40, 1996.
5. Kuwana M., Nomura S., Fujimura K., Nagasawa T., Muto Y., Kurata Y., Tanaka S., Ikeda Y. 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. 藤村 欣吾 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菌除菌療法の有用性 —多施設共同研究報告—
厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
平成15年度 総括・分担研究報告書 血液凝固異常症に関する調査研究 (主任研究者 池田康夫) 平成16年3月

平成 16 年 9 月 30 日

厚生労働省 「難治性疾患克服研究事業」血液凝固異常症に関する調査研究

班長 慶應大学医学部 内科

池田 康夫

班員 広島大学 医歯薬総合研究科 血液・腫瘍科

藤村 欣吾

班員 大阪大学医学部付属病院 輸血部

倉田 義之

班員 慶應大学医学部先端医科学研究所

桑名 正隆

(資料2)

成人 ITP 治療ガイドライン (2004 年度)

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

血液凝固異常症に関する調査研究班

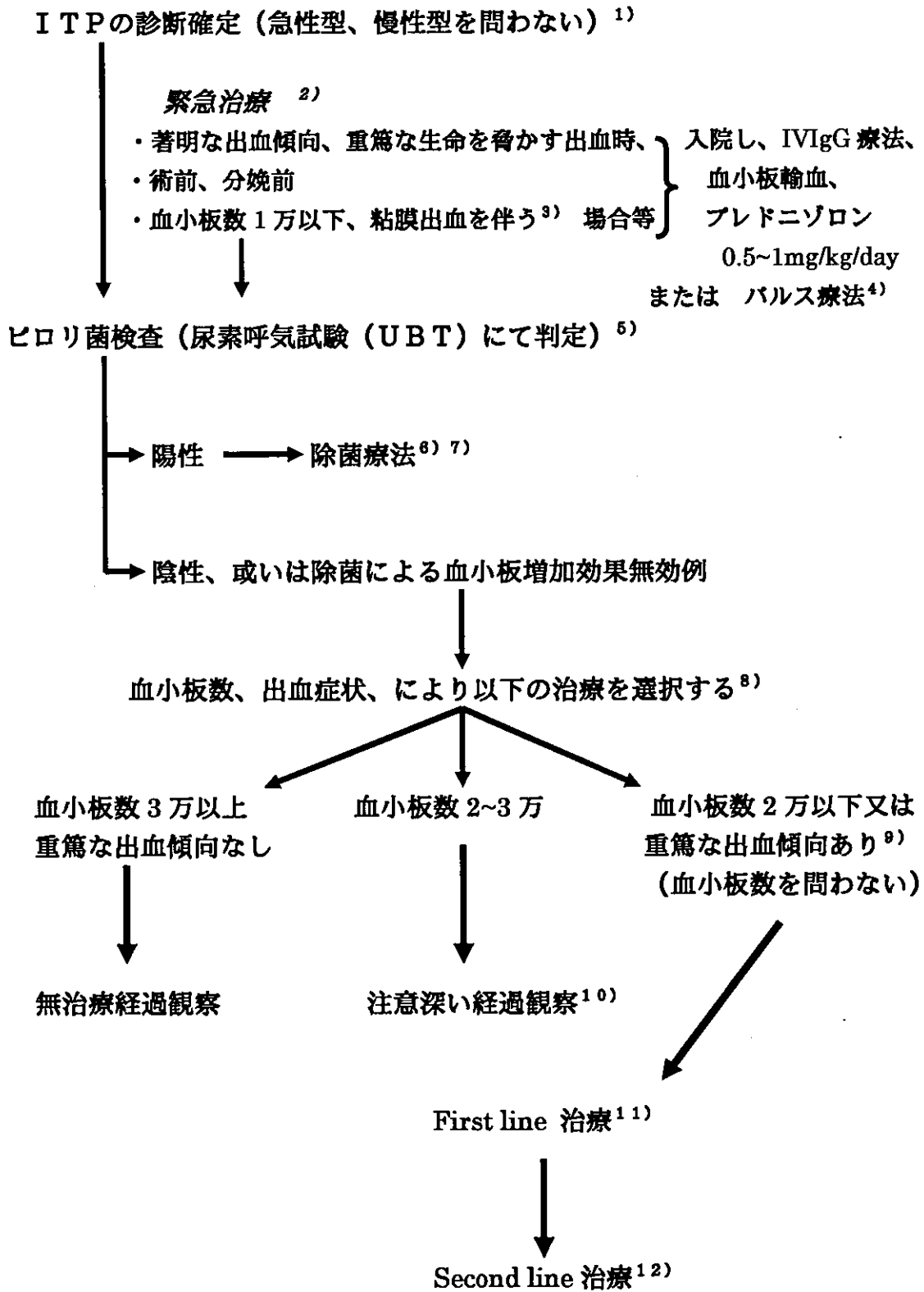
(班長 池田 康夫)

ITP 研究班

藤村 欣吾、倉田 義之、桑名 正隆、

藤沢 康司、降旗 謙一、野村 昌作、

I T P 治療ガイドライン (2004 年試案改定版)



付記：

- 1) 診断時に慢性型、急性型の区別がつきにくい場合があり臨床症状、検査所見が該当すれば本ガイドラインを適応する。
- 2) 緊急に止血が必要時（脳内出血、胸腔内、腹腔内出血など）、重篤な出血のリスクが高い確率で予測される場合、には緊急治療を適応し出血による障害、生命危機を回避するように務める。具体的治療は“緊急治療”に記す。
- 3) 鼻出血、消化管出血、生理出血、口腔内出血、 など
- 4) これらの治療により一時的に血小板数を増加させ事態を終息させた後に以下の検査、治療に進む
- 5) UBT 以外に糞便中のヒロリ抗原、生検などでヒロリ菌の診断を行っても良い
- 6) 除菌療法の副作用（皮疹、消化器症状、出血傾向の悪化など）に注意
血小板数 >1 万で除菌療法を行うことが望ましい
除菌療法例：アモキシシリン 750mg/day,
クラリスロマイシン 200mg/day,
プロトンポンプ阻害剤(ランソプラゾール 30mg/day)の3剤を1日2回、
同時併用7日間（各用量は1回量を示す）
- 7) 除菌4～6週間後に除菌効果を判定する（UBTによる）
除菌不成功例では再除菌を行い血小板増加効果の有無を確認する
- 8) 血小板数は1回の測定ではなく数回の測定で判断する
出血傾向は軽微な機械的刺激や、自然出血によるものを意味する。
強力な外力によって生じたものは除く
- 9) 大きな血腫、溢血斑、鼻出血、消化管出血、生理出血、口腔内出血、多発する点状出血、など臓器障害や貧血、出血傾向の増悪をきたす恐れのある状態
- 10) 少なくとも1ヶ月に1回は診察を行い、連絡を密にする。
- 11)、12) 治療内容は以下に示す。

First line 治療

A 副腎皮質ステロイドホルモン療法

プレドニゾン 0.5~1mg/kg/day 2~4週間 経口

(但し 最大 70mg/body 以下とする)

以後血小板数にかかわらず漸減し

維持量 5~10mg/day とする。

治療目標：

レベル1：血小板数正常化し無治療となる（期待値は30%以下）

レベル2：治療中止、或いは維持量で血小板数3万以上を目指すことが望ましい

レベル3：血小板数は3万以下であるが維持療法で出血傾向を減少させることを最低目標にせざるを得ない場合

付記：

- 1) 高齢（70歳以上）、骨粗鬆症、コントロール不良高血圧症、糖尿病予備群、肥満、免疫機能低下状態、ウイルス性肝炎、慢性感染症など要注意群では投与量を1/2に減じて慎重に行うか、当面の出血傾向の軽減を目的にプレドニゾン維持量を最初から用いてもよい。
このような状況下では摘脾、或いはSecond line治療を選択する場合もありうる。
- 2) 活動性感染症保有状態や消化性潰瘍保有者ではこれら病態が完治した後或いは病態をコントロールしながら治療を行う。
- 3) 要注意群では併存疾患の治療を併用しながら行う。
- 4) 副腎皮質ステロイドによる副作用が問題となる治療法であるため、出現する副作用に対する対策を考慮しながら行う。
レベル3で出血傾向の軽減が維持できれば副作用の点から無治療を選択する場合もありうる。

B 摘脾

対象：

- ・ ITP 診断後 6 ヶ月以上経過した症例であること
- ・ 副腎皮質ステロイド療法により治療目標レベル 3 の症例、
- ・ 或いはレベル 2 の中で無治療、維持量で血小板数 5 万以下の症例
- ・ 副腎皮質ステロイド療法の副作用が強い場合
- ・ 副腎皮質ステロイド不適応症例 など

方法：

腹腔鏡下内視鏡手術（副脾を残さない様に注意する）

（ただし術式は外科の判断にゆだね腹腔鏡下内視鏡手術にこだわらない）

目標：

レベル 1：血小板数正常化

レベル 2：薬物療法中止後も血小板数 3 万以上

レベル 3：薬物療法中止後も血小板数は 3 万以下であるが
出血傾向が認められなくなる

付記：

- 1) 摘脾後の感染症に注意し発熱など感染症が疑われる場合には早め
まずペニシリン系の抗生剤の使用を考慮する。
- 2) レベル 2、3 を保つために維持量の副腎皮質ステロイド
(5~10mg/day) を用いる場合もある。

Second line 治療

対象：

- ・副腎皮質ステロイド治療や摘脾効果が不十分の症例（無反応例、あるいはレベル3）
- ・摘脾の了解が得られない症例
- ・first line の薬物治療が選択されにくい症例

治療目標：

レベル1：血小板数正常化

レベル2：維持療法中止あるいは維持療法にて血小板数を3万以上に維持する。

レベル3：維持療法中止あるいは維持療法にて出血傾向軽減（血小板数は3万以下）

この場合の維持療法は副腎皮質ステロイド或いは当該薬物療法の維持量を示す。

Second line 治療に当たって以下の点に留意する

- ・ Second line 治療法はいずれもエビデンスレベルIV,Vである事。
- ・ これらの薬剤はすべてITPに対し保険適応となっていない。
- ・ それぞれ特有の副作用が知られており注意を払う必要がある。
- ・ これらの治療は1~2クール、或いは1.5~2ヶ月行い効果が無ければ中止し他の治療法を選択する。
- ・ 以下の Second line 治療を2~3試みた後、無効であればプレドニン維持量（5~10mg/day）のみで経過観察する選択肢もある。

*ダナゾール（ボンゾール）：100~400mg/day 経口

*デキサメサゾン大量療法（デカドロン）：40mg/day 4日間

経口或いは静注

*ステロイドパルス療法（ソルメドロール）：500~1000mg/day 3日間

点滴静注、以後漸減

*シクロスポリン（サンデュミン、ネオーラル）：4~6mg/kg/day 経口

血中濃度を200ng/ml 前後にコントロールする量を用いる

*サイクロフォスファミド (エンドキサン) : 50~100mg/day 経口

*アザチオプリン(イムラン) : 50~100mg/day 経口

*Rituximab(リツキサン) : 375mg/m² 点滴静注 週1回 4週間

等から適宜選択する。

緊急治療

対象 :

- 1) 緊急時
- 2) First, Second line いずれの治療中であっても出血傾向の悪化や血小板数の急激な減少時、
- 3) 出産、外科的処置前

対応 : 入院し以下の治療を一つないし複数選択する

- IVIgG 療法 : 完全分子型ヒト免疫グロブリン
400mg/kg/day 5日間 点滴静注
或いは、急ぐときは
1000mg/kg/day 2日間 点滴静注
(本投与法は保健適応はない)

いずれも指定された静注速度を守りゆっくり時間をかけて行う。
(400mg/kg/day の場合、初日は4時間半以上かけ、2日目は3時間、
3日以降は2時間半以上を目安とする)

- 血小板輸血 : 10~20 単位/day
- ステロイドパルス療法 (既述)

特発性血栓症サブグループ研究報告

- 国立循環器病センター研究所、部長 宮田 敏行
京都府立医科大学、助教授 辻 肇
自治医科大学、教授 坂田 洋一
名古屋大学医学部、教授 小嶋 哲人
慶應義塾大学医学部、講師 村田 満
大阪大学医学部、助手 川崎 富夫
- 研究協力者
国立循環器病センター研究所、室員 木村 利奈

研究要旨

日本人の静脈血栓症の発症原因を明らかにし、血栓症の予防や予知に資するため、多施設共同研究として静脈血栓症患者試料 161 例を収集し、データベースを作成した。この試料を対象に血栓症にかかわると考えられる 5 つの候補遺伝子多型をタイピングし、地域一般住民約 3,650 名のタイピングで得られた遺伝子型頻度と比較した。その結果、プロテイン S 徳島変異（開始 Met からの番号では Lys196Glu 変異、成熟型での番号では Lys155Glu 変異）が静脈血栓症患者群で有意 ($P < 0.001$) に高いことが判明した。本変異の地域一般住民でのアレル頻度は 0.009 であり、約 55 人に 1 人がヘテロ接合体であった。

1. 研究目的

本研究は、特発性血栓症の発症メカニズムを解明し、発症を予防する方策を検討するため、多施設共同で静脈血栓症患者を大規模に収集する。収集した血栓症患者の臨床情報をデータベース化しパネルを作成する。この静脈血栓症患者群を対象に、血栓に関連する次の 5 つの遺伝子多型をタイピングし、一般住民を対象にして得られた遺伝子頻度と比較することにより、静脈血栓症の遺伝的背景を検討する。

血栓に関連する候補遺伝子多型は下記の 5 多型である。なお、多型番号は「ヒト遺伝子変異の命名法の勧告」(1)にしたがい、アミノ酸番号は、翻訳開始 Met を 1 とし、塩基番号はこの ATG の A を 1 とした。

1) ADAMTS13、Pro475Ser 変異。

国立循環器病センター研究所の研究から、日本人の約 10 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であり、変異体はフォンビルブランド因子切断活性が著減することが明らかになっている (2)。

2) プラスミノゲン Ala620Thr 変異

(成熟型での番号は Ala601Thr 変異)。

自治医科大学の研究から、日本人の 30-40 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であり、変異体は酵素活性が著減することが明らかになっている (3)。

3) プロテイン S Lys196Glu 変異

(成熟型での番号は Lys155Glu 変異。

プロテイン S 徳島変異ともよばれる)。名古屋大学の研究から、日本人の約 80 人に 1 人が本変異のヘテロ接合体であることが明らかとなっている。その後、鈴木らの研究により、本変異体はプロテイン S 活性が著減することが明らかになっている (4, 5)。

4) XII 因子 C46T 変異。

九州大学の研究からアレル頻度は C/T = 0.27/0.73 であり、変異により新しくできた開始 Met からフレームがずれて転写され、その結果本来の XII 因子の転写が低下し、血中 XII 因子量が低下することが明らかになっている (6)。

5) プラスミノゲン活性化因子インヒビター-1 (PAI-1) 4G/5G。

スウェーデンの研究から、プロモーター領域にある 5G アレルは、転写抑制因子が結合することにより転写が抑制され、その結果血中 PAI-1 が低値を示すことが明らかとなっている (7)。

2. 研究方法

特発性血栓症サブグループを構成する 6 施設で静脈血栓症患者を対象に試料と臨床情報を収集した。遺伝子試料は試料採取施設にて匿名化後、国立循環器病センター-研究所に移送し、5 遺伝子多型のタイピングを行った。多型タイピングは TaqMan 法を用いた。即ち、6ngDNA を用いて、PCR 法にて多型部位を含む領域を増幅し、多型を識別できる蛍光標識されたプローブを用いてタイピングを行った。静脈血栓症群の遺伝子型頻度を、既に決定済みの一般住民 (約 3,650 名) を対象として得られた遺伝子頻度 χ^2 検定により比較することにより、静脈血栓症の遺伝的背景に検討を加えた。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日)」を遵守して行う。各施設は研究計画の倫理面を倫理委員会で承認を受けた。試料の外部機関への移送に先立ち、施設間で Material Transfer Agreement を交わし、試料管理の責任などを明確にした。

3. 研究結果

特発性血栓症サブグループとして静脈血栓症 161 例を収集した。患者群の特徴を表 1 に示した。この患者群を対象に 5 多型の遺伝子タイピングを施行した。その結果、ADAMTS13-Pro475Ser 変異、PP : 139 名、PS : 20 名、SS : 1 名、プラスミノゲン-Ala620Thr 変異、AA : 152 名、AT : 9 名、TT : 0 名、プロテイン S-Lys196Glu 変異、KK : 146 名、KE : 13 名、EE : 2 名、XII 因子 C46T、CC : 23 名、CT : 75 名、TT : 63 名、PAI-1-4G/5G、4G4G : 61 名、4G5G : 69

名、5G5G : 30 名、であった。この頻度を約 3,650 名の一般住民で求めた頻度と比較したところ、唯一プロテイン S Lys196Glu 変異が $P < 0.001$ で有意差を示した。すなわち、静脈血栓症患者群に Glu アレルが多いことが明らかとなった。

4. 考察

日本人の静脈血栓症患者 161 名を対象に 5 つの遺伝子多型のタイピングを行い、プロテイン S Lys196Glu 変異の遺伝子型の頻度が、静脈血栓症患者群と一般住民群の間で有意な差が観察された。静脈血栓症患者群で Glu アレルが多く、Glu アレルが静脈血栓症の遺伝的背景になることが明らかとなった。

Glu196 をもつプロテイン S 変異体は、プロテイン S 徳島として知られている。本変異は第 2EGF 様ドメイン内に位置し、異常プロテイン S として血中に存在する。日本人での本変異のアレル頻度は 0.82% と報告され、当初は機能に影響を与えない変異と考えられたが (4)、その後の発現実験により、本プロテイン S 変異体は活性化プロテイン C に対するコファクター活性を示さないことが明らかとなった (5)。

Glu アレル頻度は本研究のコントロールに用いた一般住民群でも 0.90% であり、名古屋大学の結果とよく一致した。このアレル頻度から計算すると、約 55 人に 1 人はプロテイン S Lys196Glu 変異のヘテロ接合体であると推察され、約 12,000 人に 1 人はホモ接合体であると推察される。日本人の人口を 1 億 2000 万人とすると、約 1 万人が、ホモ接合体と推定された。このように多くの日本人がプロテイン S Lys196Glu 変異により血栓症のリスクに晒されていると考えられた。日本人の血栓症患者にプロテイン S 活性の低下が多く見られるとのこれまでの報告とよく一致する (8)。

Glu196 をもつプロテイン S は異常分子として血中に存在するため、血中プロテイン S 抗原量は正常値を示す。本異常分子は活性化プロテイン C のコファクター活性に障

害を示すので、血中プロテイン S 活性は低値を示すと考えられる。現在、プロテイン S 抗原量の測定は保険収載されているものの、活性測定は保険外となっている。日本人の血栓症発症を未然に防ぐため、プロテイン S 活性の保険収載が必要と考える。

5. 結論

日本人の静脈血栓症発症には、プロテイン S Lys196Glu 変異が遺伝的背景になる可能性を明らかにした。

参考文献

- (1) Antonarakis SE: Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat*, 11:1-3, 1998.
- (2) Kokame K, et al.: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:11902-11907, 2002.
- (3) Sakata Y, et al.: Molecular abnormality of plasminogen. *J Biol Chem*, 255:5442-5447, 1980.
- (4) Yamazaki T, et al.: A phenotypically neutral dimorphism of protein S: the substitution of Lys155 by Glu in the second EGF domain predicted by an A to G base exchange in the gene. *Thromb Res*, 70:395-403, 1993.
- (5) Hayashi T, et al.: Protein S Tokushima: abnormal molecule with a substitution of Glu for Lys-155 in the second epidermal growth factor-like domain of protein S. *Blood*, 83:683-690, 1994.
- (6) Kanaji T, et al.: A common genetic polymorphism (46 C to T substitution) in the 5'-untranslated region of the coagulation factor XII gene is associated with low translation efficiency and decrease in plasma factor XII level. *Blood*, 91:2010-2014, 1998.
- (7) Eriksson P, et al.: Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:1851-1855, 1995.
- 8) Tsuda H, et al.: Screening for aetiology of thrombophilia: a high prevalence of protein S abnormality. *Ann Clin Biochem*, 36 (Pt 4):423-432, 1999.

6. 健康危険情報

なし

7. 研究発表

1. 論文発表

Sakata T, et al.: Prevalence of protein S deficiency in the Japanese general population: the Suita Study. *J Thromb Haemost*, 2:1012-1013, 2004.

Okada H, et al.: Identification of protein Sa gene mutations including four novel mutations in eight unrelated patients with protein S deficiency. *Br J Haematol*, 126: 219-225, 2004.

辻 肇. アンチトロンビン欠損症、平井久丸、押味和夫、坂田洋一編. 血液の事典. 東京:朝倉書店、340-342、2004.

辻 肇. Part 5 DIC 治療薬の将来展望を探る. DIC 治療薬の新しい動向から治療戦略を探る. 丸藤哲編. DIC 治療の新たなストラテジー. 東京:先端医学社、140-145、2004.

辻 肇. 特集・血液疾患と救急医療. 第1部一般的救急医療の代表的症候と救急医療. 3. 呼吸困難-血栓症-. 血液フロンティア. 14(4):29-35, 2004.

辻 肇. 血栓症を治療する-エビデンスを活かしたアプローチ [基本的な診療の進め方] 抗血栓薬の治療モニタリング. *Medicina* 41 (6): 958-960, 2004.

2. 学会発表

T. Miyata. Genetic studies on thrombotic diseases, Symposium 2: Genetic studies on thrombotic diseases. Third Asian Pacific Congress of Thrombosis and Hemostasis, Bangkok, October 14-16, 2004.

M. Murata. Genetic studies on thrombotic diseases, Symposium 2: Polymorphism in thrombotic diseases. Third Asian Pacific

Congress of Thrombosis and Hemostasis,
Bangkok, October 14-16, 2004.

H. Okada, et al.: Four novel mutations in
eight unrelated Japanese subjects with
protein S deficiency. The Xth Congress of
the International Society of Hematology,
Asian-Pacific Division Nagoya, September
1-4, 2004.

辻 肇:「血栓症に対する抗凝固療法の
新しい展開」第52回日本心臓病学会学
術集会. 2004年9月15日; 京都.

京谷麻由、池尻 誠、山影 望、奥村 薫、
堀尾裕美、元山正子、岡田浩美、山田貴
之、高木 明、村手 隆、杉村 基、小
林隆夫、金山尚裕、足立達哉、山本晃士、
松下 正、高松純樹、齋藤英彦、小嶋哲
人: 妊娠中に深部静脈血栓症を発症した
アンチトロンビン欠損症3例の遺伝子
解析 第27回日本血栓止血学会学術集
会 2004年11月18-20日; 奈良

窓岩清治、坂田洋一:「新しい分子マー
カーと新しいDIC診断基準の作成」線溶
系分子マーカー. 第27回日本血栓止血
学会学術集会 コンセンサス・シンポジ
ウム 2004年11月18-20日;

奈良

8. 知的財産権の出願・登録

なし

表 1

	静脈血栓症患者 (n=161)
採血時年齢(平均±SD)	56.4±15.3
性別 (男/女)	78 / 83
発症年齢(平均±SD)	49.5±16.8
50歳未満発症(%)	46.0
40歳未満発症(%)	29.2
家族歴 (有/無)	21 / 106

血栓性血小板減少性紫斑病サブグループ報告書

奈良県立医科大学輸血部 藤村吉博

国立循環器病センター研究所 宮田敏行

慶應大学医学部内科 村田 満

三重大学医学部臨床検査医学科 和田英夫

研究協力者：

東邦大学医学部衛生学 杉野 稔

伊津野 孝

要旨

TTP グループでは、全国から TTP/HUS 症例を集積して、ADAMTS13 活性および同インヒビターの測定を行い、平成 16 年末で 493 例となった。このうち、先天性および後天性 TTP の活性著減例において ADAMTS13 遺伝子の解析を行っている。一方で、全国の医療機関にアンケート調査を行い TTP/HUS の実態調査を行った。以上の結果から TTP/HUS の病型分類と診断基準の作成を目指している。また、FRETS VWF73 および新規 ELISA 法を使った ADAMTS13 活性測定法の開発に成功し、ベットサイドでの TTP/HUS の診断が可能になることが期待される。また、上記の 493 例中 ADAMTS13 活性が著減しない症例が約 2/3 あり、factor H などの ADAMTS13 以外の原因も含めた TMA の系統的診断法の確立を目指している。

1. 研究目的

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）は血小板減少、動揺性精神神経症状などの所謂 Moschowitz の 5 徴候からなる全身性重篤疾患で、血漿交換療法が導入される以前の死亡率は 90% を超える予後不良疾患であった。TTP は腎症状優位とされる溶血性尿毒症症

候群（HUS）と臨床的にはしばしば鑑別が困難であるが、共に細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、血栓による臓器障害を 3 主徴とする血栓性微小血管障害症（TMA）のカテゴリーに分類されている。近年、von Willebrand 因子切断酵素（VWF-CP、別名 ADAMTS13）の発見とその活性測定

Willebrand 因子切断酵素 (VWF-CP、別名 ADAMTS13) の発見とその活性測定が可能となった事より、TTP では同活性が著減し HUS では略正常との報告がなされるようになった。しかし、このアッセイは技術的に大変困難であるという事情から、本邦では測定可能な施設が極めて制限されており、TTP 患者の頻度、診断、治療、予後等の実態は殆ど不明である。

奈良医大輸血部では 1998 年にこのアッセイを確立し、全国の医療機関から同活性測定の依頼を受け付け、まず臨床診断にて TMA と判定され、且つ ADAMTS13 活性が解析された数は平成 16 年末で 493 例になる。このような背景のもと、本研究サブグループは、1) 前記 493 例の解析による TMA の病型分類と TTP の診断基準の作成、2) ADAMTS13 抗原/遺伝子解析、3) アンケート調査による TTP の発症頻度と治療法の確立、4) 同酵素活性の簡便・迅速測定法の確立と評価、5) ADAMTS13 以外の原因も含めた TMA の系統的診断法の確立、の 5 項目を研究目的に掲げている。

2. 研究方法 (倫理面への配慮)

1. ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定: 精製 VWF を基質に用い、SDS アガロースゲル電気泳動で解析する VWF マルチマー法。

2. ADAMTS13 遺伝子解析: 奈良医大輸血部 HP (<http://www.naramed-u.ac.jp/~trans/>) を介して全国の医療機関から同活性測定依頼を受け、臨床症状から TMA と診断された 493 例について、ADAMTS13 活性著減 (正常の <3%) と同インヒビター陰性 (<0.5 Bethesda U/ml) 所見から先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群: USS) が疑われた症例については各依頼と解析施設の双方で倫理委員会承認を得た後、ADAMTS13 遺伝子解析を行った (国立循環器病センター研究所の宮田班員が担当)。一方、ADAMTS13 活性著減で同インヒビター陽性の後天性 TTP で、患者の同意が得られたものについても前記と同じ手続きを経て遺伝子解析を行った (慶応大学の村田班員が担当)。(図 1 のフローチャート参照)

3. ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立: ADAMTS13 による VWF-A2 ドメインの切断部位 (サブユニットのアミノ酸残基 Tyr842-Met843) を含む人工基質を作成し、これを利用したアッセイ法について検討した。

4. ADAMTS13 抗原の解析: HeLa 細胞で発現した recombinant (r)ADAMTS13 を抗原とし、常法にてマウスモノクローナル抗体を作成し、これを用いた western blot 並びに酵素免疫測定法 (ELISA) による ADAMTS13 抗原の量的、

質的解析を行った。

5. アンケート調査:平成14年度に行ったTTP/HUS患者の一次調査によって報告された症例に対して二次調査を行った。(調査表は添付)

3. 研究結果

1. ADAMTS13 活性と同インヒビターの測定:表1に結果を示す。先天性TMAと考えられる症例は計41例であった。うち26例(21家系)は同活性著減のUSSで、残り15例は原因不祥であった。USSの10家系についてはADAMTS13遺伝子解析を終了し、その異常部位を同定した(後述)。後天性TMAは452例で、この診断並びにTTPとHUSのふり分けは紹介医からの臨床経過と基本検査所見をベースに行った。うちTTPは381例(特発性166例、膠原病111例、悪性腫瘍36例、造血幹細胞移植26例、妊娠12例、薬物12例、その他18例)、またHUSは71例(特発性48例、O157感染17例、マイトマイシン6例)であった。TTPの中で、特発性の93例(56%)ではADAMTS13インヒビターが陽性で、同活性著減が確認された。膠原病では18例(16%)が同活性著減、また造血幹細胞移植では同活性著減例はなかった(0%)。一方、HUSではADAMTS13活性著減例は認められなかった。

2. ADAMTS13 遺伝子解析:USS10家系(Family A~J)11症例についての家系図と遺伝子解析の結果を図2と3に示す。ADAMTS13 遺伝子は染色体9q34にあるが、両方のアレルに異なった変異部位を持つ「複合型ヘテロ接合体」は8家系9症例に見られ、患者の両親はいずれも非血縁結婚であった。一方、両方のアレルの変異が同一である「ホモ接合体」は2家系(Family BとC)2症例に見られ、Family Cの患者の両親は血縁結婚(いとこ)であった。Family B患者(札幌在住)もホモ接合体変異であったが、両親は非血縁結婚であった。しかし、その後の詳細な家系ルーツ調査によって、この御両親の各々の曾祖父母は19世紀末に東北地方のある同村から札幌に移住された方である事が判明し、元々は近縁であった事が考えられる症例である。更に、Family A家系の解析から日本人の9.6%にヘテロ接合体が存在する事が確認されたP475Sという潜在的な血栓症リスクファクターの多型が発見された。後天性TTPでの遺伝子解析は現在進行中であるが、先天性TTPに比べて遥かに少ない。

3. ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の確立:国立循環器病センター研究所の宮田班員とその共同研究者であ

る小亀らは ADAMTS13 による切断部位 Tyr842-Met843 を含む VWF-A2 ドメインの両端を各々 GST と His タグで挟み込んだ大腸菌発現蛋白を数種作成し、切断に必須である VWF サブユニットの最小アミノ酸残基数は 73 で、またその残基番号は 833-905 である事を示した。この基質 (GST-VWF73-His と命名) を用いた ELISA による活性測定系は米国の研究者が先行する形になったが、基質が両端標識されているため、検量線は切断されない残量を測定する逆勾配となり、その感度は必ずしも満足できるものではない。最近、小亀らは VWF73 に蛍光基と消光基を組み込んだ合成ペプチド (FRETS-VWF73 と命名) を作成し、同酵素切断にて発する蛍光を直接測定するという画期的な方法を構築した。このアッセイの有用性、特に従来法との精度比較は対価面も含めて現在世界的規模で検討が行われつつある。

一方、より最近藤村らの研究グループは Tyr842-Met843 結合が切断される事によって生ずる N 末端側の -Tyr842 を特異的に認識するモノクロナール抗体 (N10 抗体と命名) を 24 種類作成する事に成功した (図 4)。この N10 抗体は正常 VWF とは ELISA や western blot では殆ど反応しないことから、マイクロプレート上に前記 GST-VWF73-His 基質を固相化し、正常

血漿 (希釈) 添加 によるペプチド切断反応を行い、生じた N 末端側の -Tyr842 ペプチドを N10 標識抗体で検出する測定系を構築した。本測定系の検出感度は 0.5% で、また inhibition assay でも TTP 患者の IgG で濃度依存性阻害が確認された事から、今後、迅速、高精度、安価な ADAMTS13 活性測定系のルーチン検査化が可能になるものと考えられる。

4. ADAMTS13 抗原の解析: rADAMTS13 にて作成したモノクロナール抗体は 2 種 (A10 と C7) で、それぞれのエピトープは、A10 が disintegrin-like ドメイン、C7 が thrombospondin-1 (T) ドメインの 7 と 8 番目 (T7/T8) であった。さらに A10 は正常血漿中の ADAMTS13 活性の完全中和抗体であり、C7 は非中和抗体であった。(WH2-11-1 は化学血清療法研究所で作成され、そのエピトープは T4 にある。) A10 は血漿中の ADAMTS13 抗原を western blot で直接検出する事ができ、USS や後天性 TTP 患者検体についての解析が現在進行中である。一方、A10 を用いた肝組織の免疫染色、mRNA の in situ hybridization、そして A10 (IgG) と α SMA モノクロナール抗体 (IgG) をそれぞれ蛍光標識した二重免疫染色にて、ADAMTS13 の肝臓での産生主細胞は類洞壁細胞で、しかも非実質細胞であ

る星状細胞（旧 伊東細胞）である事を同定した（論文投稿中）。星状細胞は肝繊維化の鈎をにぎる重要な細胞であり、古来、慢性肝疾患と TTP 様症状の関連については多くの議論がなされたが決定的な証拠は提示されていない。今回の発見は両病態の関連を直接結び付ける重要な発見と考えられる。

5. アンケート調査: 一次調査では、USS 14 症例、後天性 TTP 167 例、先天性 HUS 17 例、後天性 HUS 223 例の回答があった。これをもとに本年度二次調査を実施し、各施設から回答を得られたものは先天性 TTP/HUS 18 例(58%)、後天性 TTP/HUS 177 例(51.5%)であった。

4. 考察

TTP 研究サブグループ代表である藤村は 1998 年に本邦で最初にこの酵素活性測定法を確立し(Int J Hematol 2001, Br J Hematol 2001)、以後今日迄全国の医療施設から依頼された TMA 患者について ADAMTS13 解析を行った。この結果、同活性著減例は TMA 全体の 1/3、中等度低下例が 1/3、そして軽度低下ないし正常例が残り 1/3 である事を示した(途中経過を Sem Hematol 2004 で報告)。著減例の中から先天性 TTP (別名 USS) を 21 家系 26 症例発

見し、うち 10 家系については宮田班員を中心に ADAMTS13 遺伝子解析を行い、また後天性 TTP についても村田班員を中心に同遺伝子解析を実施し、これらの結果は既報 (PNAS 2003, Blood 2004, Blood 2004) もしくは論文投稿中である。また後天性 TTP の中で原因不詳(特発性)のものはその 56% に ADAMTS13 自己抗体が検出される事から自己免疫疾患のカテゴリーに入るが、基礎疾患に併発するものは極めて多彩であり、これらの中で初期、多発性硬化症が疑われた血管内リンパ腫に合併した TTP 症例と、C 型肝硬変経過中に定型的 TTP を発症した症例について、いずれも ADAMTS13 インヒビターの存在を証明し、これら患者に見られる血小板減少の原因を明らかにした (Neurology 2004, J Hepatology 2005)。また後天性 TTP の IgG 型インヒビターのエピトープは共通して ADAMTS13 の Cys-rich/Spacer ドメインにある事を同定 (Blood 2003) し、今後本所見の診断への利用が示された。

一方で、宮田班員らは ADAMTS13 で切断される VWF サブユニットの 73 アミノ酸残基(VWF73)を同定し、これは現在 ADAMTS13 の最小 VWF 基質単位と考えられている (Blood 2004)。さらにこの VWF73 を蛍光標識した合成ペプチドを作成し、短時間で ADAMTS13 活