

TMA 患者における血漿 ADAMTS13 抗原解析  
奈良県立医科大学 藤村 吉博、○松本 雅則

【緒言】TTP や HUS などの TMA 患者での ADAMTS13 活性やインヒビター測定については多くの報告があるが、これら患者における ADAMTS13 抗原解析については全く報告がない。我々は、recombinant ADAMTS13 を用いて同モノクローナル抗体(mAb)を3種類作成した。うち、2種類(A10, C7)は奈良医大で、1種類(WH2-11-1)は化血研で作成されたものである。これらの抗体の性状を検討し、Western blot 法(WB)により ADAMTS13 抗原を解析した。

【方法】対象は、健常人 60 人、Upshaw-Schulman 症候群(USS)患者 19 家系 24 症例およびその家族 49 人、特発性 TTP 96 症例、薬剤性 TTP 11 症例、O157:H7 による HUS 8 症例。非還元条件下 WB では A10 を、還元条件下 WB では WH2-11-1 を用いた。

【結果】ADAMTS13 mAb の認識部位は、A10: ディスインテグリンドメイン、WH2-11-1: TSP-1 の 4 番目、C7: TSP-1 の 7/8 番目とすべて異なっていた。いずれの抗体も非還元 WB で血漿中の抗原と反応し、うち WH2-11-1 のみが還元 WB でも抗原と反応した。A10 は IgG 終濃度 50 ug/ml で完全に酵素活性を阻害した。C7 は 100 ug/ml でも部分阻害しか示さず、WH2-11-1 は阻害活性を認めなかった。非還元および還元 WB では、先天性、後天性 TTP ともに ADAMTS13 抗原量の低下と分解亢進像が確認された。一方、O157:H7 陽性 HUS では、このような分解亢進像は認められなかった。

【まとめ】TTP 患者では、血漿 ADAMTS13 の分解亢進によって同酵素活性が低下していることが予想され、今後この分解亢進がどのような機序か検討する予定である。

## ADAMTS13 の消光性蛍光基質の開発と血栓症の解析への応用

国立循環器病センター研究所 宮田敏行、○小亀浩市

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) は、先天性もしくは後天性の ADAMTS13 欠乏症により起こる。ADAMTS13 は、フォンビルブランド因子 (VWF) 切断酵素活性を示す血漿プロテアーゼであり、超巨大 VWF マルチマーを適度に切断することにより、過度の血小板凝集を抑制している。本酵素の活性測定法は数種類報告されているものの、時間がかかり精度にも問題があった。そこで私達は、VWF の A2 ドメインのアミノ酸配列をもとに基質領域の絞り込みを試み、73 残基が最小であることを見出し、これを VWF73 と命名した (Kokame et al, Blood, 2004)。本法は 5 時間で測定を終了できるものの、ウエスタンブロット法を使用するために操作がやや煩雑で、更なる改良が待たれていた。そこで今回、VWF73 に蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET 原理) に基づいた蛍光基と消光基を導入することにより、ADAMTS13 の新しい基質 FRETS-VWF73 の合成に成功した。本基質は、正常血漿の用量依存性および反応時間依存性の蛍光強度の増大を示し、96 穴プレートを用いて 1 時間以内での定量が可能となった。反応条件を検討した結果、5mM Bis-Tris, 25mM CaCl<sub>2</sub>, 0.005% Tween 20, pH 6.0 が最も適した緩衝液であった。VWF マルチマーの減少を観察する SDS-アガロース電気泳動法 (Furlan 法) と本法は  $R^2=0.75$  を示し、良い相関関係を示した。TTP 患者血漿では蛍光の増大を示さず、HUS・DIC・ITP の患者血漿では蛍光の増大が見られた。本法を用いて、一般住民 (男性 167 名、女性 214 名) の活性を測定したところ、活性は 30%~150%以上の広い分布を示し、男性の平均活性値は女性より有意に低く、男女ともに加齢による活性の減少を示した。FRETS-VWF73 は、日本・米国・ヨーロッパで販売が開始され、ADAMTS13 活性の測定に広く使用されると期待される。

## ADAMTS13 と血栓症

慶應義塾大学医学部内科 村田 満

Von Willebrand factor切断酵素 (VWF-CP : ADAMTS-13) の著明な活性低下はHUS/TTPの発症に関与することが知られている。一方、本酵素の軽度の低下が血栓症の発症に及ぼす影響については必ずしも明確ではない。軽度の低下は各種後天的要因や疾患のみならず、先天的な要因、特にADAMTS13遺伝子多型によっても起こりうる。VWFと血栓性疾患の関連に関しては、血中VWFの上昇は心筋梗塞の危険因子あるいは予後不良因子であり、動物実験でVWFに対するモノクローナル抗体が動脈血栓の発症を抑えたとの報告もあるが、VWF活性を生理的に制御する筈のADAMTS13と、体内でのVWF活性や血小板機能との関連はこれまで十分に検討されていなかった。これまでの国立循環器病センターや我々の研究で、頻度の高い一塩基置換が日本人で数種類同定されており、これらの多型が血栓性疾患に及ぼすインパクトを見極める事は日本人における血栓症の原因を探る上で甚だ重要である。

ここでは、(1) ADAMTS13遺伝子多型 vs ADAMTS13活性、(2) ADAMTS13活性 vs 血中VWF (抗原量、活性)、(3) ADAMTS13遺伝子多型 vs 血中VWF (抗原量、活性)、(4) 血中VWF vs ずり依存性血小板機能、(5) ADAMTS13遺伝子多型 vs ずり依存性血小板機能、など、in vivoにおける関連について健常人検体を用いて検討した。さらにADAMTS13の産生組織に関して、特異抗体による免疫組織学的方法等を用いて正常細胞や培養細胞について検討した。これらの成績について報告する。

TTP 二次アンケート調査の解析途中経過  
三重大臨床検査医学 ○和田英夫、森 美貴

血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）ならびに/溶血性尿毒症症候群（HUS）に対する 2 次調査の解析結果を報告する。

回収された 182 例の内訳は、女性 103 例、男性 79 例であり、原因ならびに基礎疾患は、家族性 17 例、薬剤性 6 例、妊娠 2 例、自己免疫性疾患 16 例、悪性腫瘍 9 例、移植症例 9 例、病原性大腸菌性 60 例、原発性 60 例であった。死亡率は全体で 19.8%であり、それぞれ家族性 5.9%、薬剤性 16.7%、妊娠 0%、自己免疫性疾患 31.3%、悪性腫瘍 85.7%、移植症例 77.8%、病原性大腸菌性 1.7%、原発性 23.1%で、悪性腫瘍や移植による TTP/HUS が最も悪く、典型的 TTP と考えられる自己免疫性ならびに原発性の死亡率は 23-31%であった。

ADAMTS13 活性は 70 例で測定されており、10%以下が 37 例(52.9%)、10-50%が 19 例(27.1%)、50%以上が 14 例(20%)であった。家族性では 6 例で ADAMTS13 活性は著減し、3 例が中等度低下し、2 例が正常値であった。ADAMTS13 の著明減少は、薬剤性、妊娠、悪性腫瘍、移植例では認められず、自己免疫性では 50%、原発性では 61%に認められた。1 例のみ測定された病原性大腸菌性では、ADAMTS13 活性が著明減少していた。

先天性ならびに後天性とも、ADAMTS13 の低下例と非低下例が見られたが、自己免疫性ならびに原発性 TTP/HUS の約 50%以上が ADAMTS13 の著減により発症したことが示唆された。また、TTP/HUS 例での ADAMTS 測定はいまだ 50%以下であり、今後さらに ADAMTS13 測定の普及が必要と考えられた。

また、網血小板（RP）は骨髄での血小板産生を反映し、特発性血小板現象性紫斑病（約 80 例）での検討では、感度 80%、特異度 90%、NPV85%であり、小数例での検討であるが TTP でも有意に増加した。

日本の現状に即した新しい発想の肺塞栓症予防戦略—大阪大学病院の試み—

大阪大学病態制御外科、大阪大学附属病院心臓血管外科 川崎富夫

日本では血栓症の頻度や発生機序が欧米と異なることが明らかになり、欧米の予防ガイドラインをそのまま日本に当てはめることはできないことが分かってきた。2004年に肺塞栓症研究会と日本循環器学会から発表されたガイドラインはいずれも日本のデータが無く限られた内容となっている。そのため、大学病院を中心にEBMに基づいた実用的な日本のガイドライン作成が急務となっている。大阪大学病院では、ガイドラインが日本の現状に即していること、普遍性を有していること、実効性を有していることを必要条件と判断し、内容の改善方法を含めた病院の安全管理システムとして構築した。内容は、ハイリスク患者の選定、予防法の選択、診断と治療、看護介入マニュアル、院内体制、ガイドラインの改訂方法より構成されている。またエビデンスとして、2002年7月から2003年6月まで1年間の大阪大学婦人科悪性腫瘍手術患者の下肢周囲径測定データ、1スライス単純CT像の応用結果、止血機能と分子マーカーから見たカプロシン皮下注射の安全性についての結果を使用した。2003年12月から2004年6月までの大阪大学における運用結果では、深部静脈血栓症/肺塞栓症患者は36名であった。そのうち、入院時点（手術前、長期臥床前）の超音波検査で発見された患者数は11例のうち6例は既往歴が明らかであったが、他の5例は既往歴が不明であった。ガイドラインによるスクリーニングが行われなかった場合には、これら5例の診断が遅れて院内発症症例として扱われる可能性や、より重篤な血栓症を発症する可能性が高いと考えられる。従って、詳細な既往歴の聴取や触診や視診等の基本的診察が特に重要であると考えられた。このように大阪大学では、得られたデータに基づき様々な情報を現場に戻すとともに、システムとしてのガイドラインの完成をめざしている。

## 敗血症 DIC の病態と線溶系因子

自治医科大学分子病態研究部 坂田洋一 ○窓岩清治

重症感染症に伴う DIC は、微小血栓に起因する虚血障害により多臓器不全を合併することが多い。重症感染症に対する治療が肝要であるものの、そのコントロールは容易ではない。このような場合、併発する DIC に対して可及的に抗凝固療法を施されなければ、致命的な病態へと進展することが多い。旧厚生省 DIC 診断で用いられているグローバルマーカー（血小板数、プロトロンビン時間比、血漿フィブリノゲン値および血清 FDP）のみを用いた診断基準は、感染症に併発する DIC を至適な時期に診断し抗凝固療法を開始するための十分な基準とは必ずしもいえない。本研究では、感染症症例で Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) 基準を満たした病態、いわゆる敗血症を基礎疾患とする敗血症 DIC に対して、その早期診断および病態を把握する上で有用な新規線溶系分子マーカーを検討する。旧厚生省の診断基準で DIC ないしは DIC 疑いと診断された症例をもとに、凝固線溶系検査項目、補助的検査項目（トロンビン-アンチトロンビン III 複合体：TAT, プラスミン- $\alpha$ 2 プラスミンインヒビター複合体：PIC, D-ダイマー）、および PAI-1 について非敗血症 DIC と敗血症 DIC の 2 群間での比較検討を行った。その結果、次のようなことが明らかとなった。(1) グラム陰性菌による敗血症 DIC は、グラム陽性菌と比較して臓器障害を合併する頻度が有意に高い。(2) 敗血症 DIC では、非敗血症 DIC と比較して、血漿フィブリノゲン値が高く、血清 FDP の増加が抑制されている状態にある。(3) 線溶系分子マーカーである PIC、D ダイマー変動が少ない。(4) これら線溶反応の抑制は、血漿 PAI-1 の増加に起因する。血漿 PAI-1 は、敗血症 DIC における臓器障害の程度および予後と良く相関する。以上より、敗血症 DIC を早期診断するためには、血漿 PAI-1 等の新規線溶系分子マーカーを加えた診断が有用である可能性が示された。現在これらの臨床解析をもとに、種々の線溶系因子ノックアウトマウスを利用して、敗血症に伴う多臓器不全の病態に果たす線溶系因子の役割を解析中である。

## 先天性アンチトロンビン欠損症の遺伝的背景

京都府立医科大学輸血部 辻 肇

アンチトロンビン (AT) は、トロンピンをはじめとする血液凝固セリンプロテアーゼに対する生理的インヒビターとして重要な役割を果たしており、その欠損は主として静脈系血栓症の原因となり、特発性血栓症の一つとして位置づけられている。

昨年度の調査研究において、独立した先天性AT欠損家系(32家系)の欠損患者64名を対象に、血栓症発症の臨床的背景を中心に検討を行い報告した。欠損者における血栓症の既往は、男性に多く、その平均初発年齢は35.4才であった。血栓症の内訳では、静脈血栓症、特に下肢深部静脈血栓が最も多く、他の静脈系血栓の重複を認めた。また、その76%は誘因なく発症した。

先天性AT欠損症患者の遺伝子解析によって、多くの遺伝子異常が国内外において報告され、欠損症における血栓症の発症機序を解明するうえで、また診断を確定するうえで遺伝子解析は必須のものと考えられている。欧米人を中心として、海外で同定された遺伝的背景は必ずしも日本人集団に適用できるものではないと考えられ、血栓症の発症に関与すると考えられる血栓性素因の遺伝子異常を日本人で明らかにし、血栓発症との関連を明らかにすることを目的として検討した。また、ヒトの肝細胞(HuH-7)を用いた基礎的研究において、RNA/DNAオリゴヌクレオチド(RDO)法により変異遺伝子の修正が可能であり、本欠損症における遺伝子治療の可能性も報告した。今回、現在まで進められた先天性AT欠損症のType I及びType IIに関する遺伝子解析の成績をまとめ報告する。

## 血栓性素因プロテイン S 欠損症の遺伝子解析

名古屋大学医学部保健学科 小嶋哲人

**【緒言】** プロテイン S (PS) はビタミン K 依存性凝固制御因子の一つで活性化プロテイン C が活性化第 V 因子および第 VIII 因子を不活化する際に補酵素として機能しており、PS 欠損症は血栓症を起こすことが知られている。我々は、先天性 PS 欠損症 8 症例について遺伝子解析を行い、計 8 種類の PS $\alpha$  遺伝子の変異を同定した。

**【方法】** 症例はいずれも深部静脈血栓症または肺梗塞を発症、精査の結果 PS 欠損症と診断された。インフォームドコンセントを得た後、患者あるいはその家族から末梢白血球より DNA を抽出し、各 PS $\alpha$  遺伝子の全エクソンをイントロンとの境界領域を含め PCR 増幅、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を解析した。変異の家族内伝播様式解析は PCR-RFLP にて試行した。なお、本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得て施行。

**【結果】** 解析の結果、PS $\alpha$  遺伝子の新規ミスセンス変異を 2 種類 G508A (C80Y)、G1210A (R314H)、5 塩基欠失 887CTCTG-del (C206X) とナンセンス変異 G891T (E208X) を各 1 例ずつ同定。また、既報の G405C (V46L)、Ex10+5A→G、C2147T (P626L) を各 1 例、A732G (K155E) を 2 例に検出した。なお、症例 2 の発端者は A732G と 887CTCTG-del の複合ヘテロ接合体であった。

**【考察】** 先天性 PS 欠損症解析の結果、計 8 種の PS $\alpha$  遺伝子変異を同定した。家族内解析の結果、症例 1 家系で G405C をもつ発端者、父親、長兄はいずれも PS 活性が低く、この変異は PS 欠損症の病因と考えられた。A7321G と 877CTCTG-del の複合ヘテロ接合体であった症例 2 家系では、PS 活性低下は後者と一致し、前者と一致しなかった。一方、症例 5 家系では A732G をもつ発端者と母親、娘はいずれも PS 活性が低値で、これは A732G の伝播と一致した。A732G に伴う PS 活性値は家系により異なり、症例 2 家系には PS 活性変動に関与する A732G 以外の要因の存在が示唆され、今後さらに解析が必要である。



## ITP の診断基準改定をめざして

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 桑名正隆

我が国では 1990 年に厚生省研究班により作成された ITP の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、骨髄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不可能で、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。そこで、近年 ITP に特異性の高いとされる各種検査法が報告されたことから、それらを導入することで ITP を積極的に診断する基準の作成を試みた。最初のステップとして、まず血小板減少症のために初診した成人 61 例を対象とした単施設での前向き試験を行った。その結果、6 ヶ月以降の ITP の診断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、血漿トロンボポエチン正常または軽度増加の 6 項目が抽出された。これら 6 項目のうち 3 項目以上を満たす場合を ITP とすると、感度は 96%、特異度 94% と良好な結果が得られた。さらに、この基準案の検定を目的として、異なる血小板減少症患者群を対象とした多施設前向き試験を行った。1 年間で小児を含む 113 例がエントリーされ、上記基準にあてはめると感度 93%、特異度 75% であった。特異度の低下は、主に免疫性血小板減少症を合併したと考えられる再生不良性貧血、骨髄異形成症候群症例に起因していた。さらに多彩な臨床背景を持った多数例での検討が必要であるが、現在の基準案を基礎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。また、診断基準に含まれる検査法は臨床の場で必要に応じて正確に行える必要があり、そのための臨床検査システムの確立、保険収載も重要な課題である。

血小板数著減検体における正確な血小板数測定法の確立  
—血小板数測定への破碎赤血球の影響についての検討—  
大阪大学医学部附属病院輸血部 倉田義之

【目的】血小板数はITPの重症度・治療法を考慮する上で重要なマーカーである。しかしながら臨床現場で汎用されている血球自動計数装置では見かけ上血小板数が高値（血小板偽性高値）となり、患者血小板数を正確に測定できない問題点がある。今回、われわれは破碎赤血球が血小板偽性高値の原因か否かについて検討した。

【対象および方法】塗沫標本上で破碎赤血球を認める血小板数6万以下の40例（ITP 13例、その他の血液疾患18例、その他の疾患9例）を対象とした。血小板数の測定はNE-8000、H-2を用いての自動血球計数装置による方法、検鏡による目視法、抗GPIIb抗体と標準粒子を用いフローサイトメトリーにて測定するFCM法によった。破碎赤血球の測定は塗沫標本で検鏡する視算法とPE標識抗Glycophorin A抗体を用いFCMにより測定するGPA法によった。

【結果】1) 破碎赤血球測定法間の相関：視算法とGPA法間で破碎赤血球% ( $R=0.64$ ,  $P<0.001$ )、破碎赤血球絶対数 ( $R=0.57$ ,  $P<0.001$ )とも良好な相関が得られた。2) 血小板数偽性高値分と破碎赤血球数間の相関：NE-8000、H-2にて測定した血小板数の偽性高値分と視算法にて測定した破碎赤血球絶対数間に有意の相関を認めた（NE-8000、H-2ともに $R=0.60$ ,  $P<0.001$ ）。またGPA法にて測定した破碎赤血球絶対数間とも有意の相関あるいは傾向を認めた（NE-8000 ;  $R=0.45$ ,  $P<0.005$ , H-2 ;  $R=0.30$ ,  $P<0.06$ ）。

【結語】自動血球計数装置にて血小板数測定時は破碎赤血球が血小板として算定され、血小板数は偽性高値となる。

## 検査センターにおける ITP 診断検査の準備状況について

エスアールエル 降旗謙一

我々は特発性血小板減少性紫斑病（以下 ITP）の診断に関して、除外診断によらない新たな診断基準の作成のために、すでに本研究班で検討された以下の検査項目に関して、一般の検査センターでの実施の可能性に関して検討中である。

- 1 血漿トロンボポエチン濃度の測定
- 2 網状血小板比率（IPF）の測定
- 3 抗血小板 GPIIb-IIIa 抗体産生リンパ球の頻度（ELISPOT）
- 4 抗血小板 GPIIb-IIIa 抗体の直接検出

まず1の血漿トロンボポエチン濃度の測定に関しては、すでに当センターで測定系が完成しており、一般の検体を受け入れている。

2の網状血小板比率の測定に関しては、シスメックス社と共同で基礎的な検討を行った。XE-2100 に新たに開発されたプログラムをインストールし、RET の測定データを解析することにより Immature Platelet Fraction を算出することが可能である。本件に関しては、参加施設との実際的な調整が終わり次第、検査として実施可能である。

3の ELISPOT アッセイに関しては MBL 社が検査キットを開発し、慶応大学、MBL および当社で検査の実施に向けて最後の調整段階に入っている。近々参加施設の協力により、実際の患者検体を用いて検査としての信頼性の検証を行う予定である。

4に関しては、2および3に関する検討が終了しだい、アッセイ系の開発に取り掛かる予定である。

## グループ研究報告書・分担研究報告書

## 免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）サブグループ研究報告

### 分担研究者

○藤村欣吾 広島大学大学院病態薬物治療学講座 教授  
倉田義之 大阪大学医学部附属病院輸血部 講師  
桑名正隆 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 講師

### 研究協力者

野村昌作 岸和田市民病院血液内科 部長  
藤沢康司 東京慈恵会医科大学小児科 助教授

### 要旨

3年間の目標としてITPの診断基準の作成、治療ガイドラインの作成、疫学調査を3つの柱として揚げた。診断基準に関しては白血球減少なく、貧血なく、血小板抗体産生B細胞の増加、抗血小板抗体（GPIIb/IIIa抗体）陽性、網状血小板増加、トロンボポイエチン正常ないし軽度増加、の6項目が診断基準として抽出された。多施設からの検体による検討では感度96%、特異性79%と良好な結果を得た。これに基づきこれらの検査がどこでも行えるように検査のセンター化を行うため現在精度管理を行っている。治療に関しては、全国調査の結果ピロリ菌陽性ITP症例における除菌療法の有用性が明らかになった事を受けてピロリ菌感染の有無の検索と除菌療法の実施を治療ガイドラインの中に明確に位置づける提案を行った。

ITPの疫学研究については、計画した時期が遅く具体的なものはないが、今後特定疾患調査票を利用した解析を行う事を確認している。

### 背景：

我が国では、1990年に改訂された旧厚生省の特発性造血器障害研究班による診断基準がITPの診断に用いられている。しかし、基準改訂後10年以上が経過し、その間にITPにおける抗血小板自己抗体の特異性や血小板産生動態に関する知見が集積されてきた。抗血小板抗体の主要な対応抗原としてGPIIb-IIIa、GPIb-IXが同定され、血小板膜表面に結合した特異抗体あるいは特異抗体産生B細胞を検出するアッセイ法が確立された。また、血小板産生を誘導する成長因子トロンボポエチン（TPO）の血漿中濃度や網状

血小板比率がITPと血小板減少をきたす他の疾患との鑑別に有用なことも報告された。これら最近の知見を導入することにより、ITPの診断がよりの確に行える可能性がある。

一方治療に関しても本邦のみならず欧米でも定着している副腎皮質ステロイド療法、次いで摘脾療法による標準的治療に反応しない所謂難治性ITP症例に対する治療法の開発や、さらには最近ヘリコバクターピロリ菌陽性ITP症例における除菌療法の有効例の報告など、新たな治療法の検討や治療ガイドラインのみ直しが必要となってきた。

疫学に関しては本邦では昭和 40 年代から 50 年の初めにかけての報告があるがその後の研究は認められない。環境、人口構成、医療内容、の変化などによる疾病内容の変遷例えば、年間発生率、発生年齢、死亡原因と死亡率、日常生活上の問題点など最近の本邦のデータは皆無である。本研究班では 2 年目からこれらの問題について検討を重ね日本人のデータを作り上げ、長期的な ITP の医療上の管理に役立てることを目標に疫学研究を行うことにした。このような背景に基づき以下の研究を行った。

## 研究目的

1. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の新しい診断基準の作成
2. 新たな治療プロトコルの作成
3. I T P の疫学的研究

## 方法

1. 診断基準の作成：

従来より除外診断に頼ることが多かった ITP の診断基準に対して本研究班では ITP の診断に有用な新規の検査項目を取り入れ病態に立脚した精度、特異性が高い ITP の新しい診断基準を作成することを目的とした。最初に慶応義塾大学でパイロット的に行った診断項目の抽出(白血球数、貧血の有無、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体、網状血小板比率、血漿 TP0 濃度の 6 項目)

が妥当であるか検討するために 100 例程度を対象とした多施設での前向き試験を行った(調査依頼、調査票は資料 1, 2 として添付)。すなわち、血小板減少症を主訴として来院した患者を対象として、初診時の出血症状の有無、末梢血検査に加えて抗血小板抗体産生 B 細胞の定量、血小板特異抗体(血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体)、血漿 TP0 濃度、網状血小板比率を測定し、その後の ITP の診断に対するそれぞれの臨床項目の感度、特異性を調べた。検査法を統一するため、血小板抗体産生 B 細胞、血小板関連抗血小板特異抗体、血漿 TP0 は慶應義塾大学、網状血小板比率は大阪大学にて測定した。

## 2. 治療プロトコルの作成

治療プロトコル作成のために各施設で問題となっているヘリコバクター陽性 ITP 症例に対する除菌療法の有効性を確認し除菌療法の ITP 治療における有効性とその位置付けを明らかにすることにした。本邦での I T P に対する除菌療法に関する実情を明らかにするために、アンケート調査を行うことにした。

目標症例数を 300 例以上とし除菌療法を積極的に行っている 11 施設に対し資料 3, 4, に示すアンケート調査を平成 14 年 10 月に依頼し平成 15 年 9 月末に回収し解析をおこなった。その結果解析可能症例 436 例を集積し統計解析に多変量解析を取り入れ解析した。

## 3. I T P の疫学

平成15年度から計画をはじめた。今後の研究の進め方について疫学研究班との打ち合わせを行い、特定疾患の調査票をもとに集計する。ITP患者は特定疾患として全国の保健所に登録されており、各保健所では調査票をもとにデータベースが作成されているものを使用する。

## 結果

### 1. 診断基準作成に関して

単施設で血小板減少のために来院した成人61名を対象に前向き試験を行った結果では、6ヶ月以降のITPの診断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TPO濃度正常または軽度増加の6項目が抽出された。これら6項目の内3項目以上を満たす場合をITPとすると、感度は96%、特異度94%と良好な結果が得られた。

これを踏まえてこの診断基準案が妥当なものであるか否か検討するために多施設での前向き試験を行った。平成14年11月の登録開始から約1年間に小児を含む113例の患者が登録され解析した。その結果単施設の検討と同様に6項目中3項目以上陽性を満たす場合をITPとすると感度96%、特異度79%となった。単施設での検討に対して特異度が低下したのは主として免疫性血小板減少症を合併した再生不良性貧血や骨髓異形成症候群症例に

起因していた。従って免疫性の血小板減少の診断には十分な診断基準と考えている。

### 2. ITP治療ガイドラインの作成に関して

1) ヘリコバクター除菌がITPの血小板数増加に対する有効性のレトロスペクティブな検討を(資料3.4)平成14年から約1年間に渡って行い11施設から435例の症例が登録され解析対象とした。

#### その結果

(1) ヘリコバクター菌(以下HP菌)陽性症例300例(69%)でITPにおけるHP菌陽性率は加齢と共に高くなり非ITP症例と変りはない

(2) HP菌陽性群の平均年齢はHP菌陰性群に比し有意に高い以外はHP陽性ITPに特別な背景因子は見当たらなかった。またHP菌感染がITPの病態に変化をもたらしている所見はない。

(3) 除菌は207例中161例(79%)に成功し、このうち101例、63%に血小板増加効果を認めた。

(4) 血小板増加効果は除菌後1ヶ月の早期より認められ始める例が多く、12ヶ月以上の経過観察79例では再発例がなく、血小板数は経時的に増加を示した。

12ヶ月の時点での完全寛解率23%(血小板数15万以上、無治療)、部分寛解率42%(血小板数5万以上15万以下、無治療)、無効例35%である。

(5) 除菌療法の副作用については消化器系を中心とするものが31例、16.2%に認められたが重篤な症例はなかった。治療を中止した例は出血傾向増悪症例1例である。

## 2) 治療ガイドライン(2004年案)(資料5, 6)

本邦における除菌療法の有用性が多施設の検討で明らかになり除菌療法を組み込んだガイドラインを資料5、6に示すように作成した。

## 3. 21世紀のITP疫学調査

調査研究項目として、全国より集められたデータベースをもとにITPの発症率、発症年齢、男女比、罹病期間、血小板数、通院状況、治療の有無などを検討することにした。この目的のために現在各医療施設から提出されている特定疾患の調査票を解析することから開始することにした。

## 考案及び今後の計画

### 1. 診断基準作成

今回の検討から免疫性血小板減少症の診断に対しては満足の行く特異性、感度などが明らかになった。少なくとも従来の除外診断に重きを置く診断基準とは異なり病態に立脚した診断基準であると考えている。今後は運用上今回診断基準として有用であった6項目の内、現時点で臨床検査としてこの施設でも測定できない抗GPIIb-IIIa抗体産生B細胞頻度、血小板関連抗GPIIb-IIIa抗体、網状血小板比率、血漿TPOの測定など特殊な検査についての対応が問題となる。

また検体輸送による影響、新鮮検体でない場合の影響などを含め検査の精度、再現性などの検討も必要である。これらの点に関してはこれら特殊検査のセンター化を行い全国どこからでも検査が可能になるようなシステムづくりを始めている。そのためには検査のキット化や標準試薬の開発が必須であると共に、検査の方法論の習得、結果の判定の基準作りなど研究室レベルからセンター化を計るにはクリアしなければならない点がある。どこの施設からでも一定の基準で検査可能な体制が出来れば本症の診断の確立に伴う治療法の選択が確実なものになり医療経済にも好影響を及ぼすと考えられる。

もう一つの問題としてこれらの検査の保険収載である。検査体制が構築されつつある中で従来の検査に代わってこれらの検査の収載が早期に認められることを望んでいる。

### 2. 治療ガイドラインの作成

有用ないし有効と期待されていた治験薬が副作用の問題で治療現場から遠ざかりの新薬の登場がないまま経過していた。1998年のガスバリニのピロリ菌除菌療法の血小板増加に対する有用性の報告以来本邦でも多くの施設で検討され除菌療法の位置づけ、長期の有用性、除菌療法の副作用などの情報が必要であった。

今回の調査結果よりヘリコバクターピロリ陽性ITPに関しては除菌療法が有用であることが確認された。その特徴として有効率が摘脾に匹敵する



かそれ以上の有効率を示し、早期に有効性の判定が可能で、有効例には除菌が成功すれば殆ど再発がない、除菌の副作用は軽微で頻度的に副作用が問題となる症例は少ない、など臨床上有効であることが判明した。

従って除菌療法の位置付けとして ITP が疑われた場合にはまずピロリ菌の検査を精度、特異性の高い方法で検査し、陽性であれば病状が許せばまず除菌療法を行うガイドラインを作成した。

すなわち除菌療法を第一段階に位置づけた点が特徴でこれにより ITP 全体の約 40% の症例に副腎皮質ステロイドの副作用が回避可能となる。各治療に治療目標を定め QOL の向上に重点を置き、ステロイドの漫然とした長期の使用を少なくすることにも重点を置いた。付記を多く付け具体的に病態把握、治療選択を行いやすいようにした。など実地医家にも使用可能なものにするよう配慮した。

今後はこの ITP 治療ガイドラインによりどの程度 ITP の治癒率や QOL が向上するのかプロスペクティブな研究を行い有用性を検証する必要がある。またこの結果場合によっては改定を行うこともガイドラインの運用の中に記載した。

さらに ITP 治療に除菌療法の保険適応がなければ実質的にはこのガイドラインは運用できないので早期にピロリ菌陽性 ITP に対する除菌療法の健康保険適応拡大を各学会長に要望するよう働きかけを行っている。

### 3. 疫学研究

今回設定した調査項目により、我が国において毎年 ITP 症例は何名発生しているのか、現在 ITP に罹患している患者数は何名か、血小板数はどの程度か、どのような治療を受けているのか、等を検討する。

また個々の症例のデータを毎年追跡することにより ITP 症例の予後に関する検討を行うことが可能となる。など ITP の新たな側面、また時代の変遷による疾病統計の変化などを明らかにする目的で計画しているが今期には立案時期が遅かったせいもあり計画案を提示するに留まっている。次年度にはデータ開示の問題はあるが実行に移せることを願っている。

### 結論

診断基準については血小板減少の原因が少なくとも免疫性の血小板減少である症例の診断には十分な特異性と感度が認められ診断基準として有用度が高い、血小板減少の病態に立脚した診断基準が出来上がった。今後は検査項目の普遍化と保険適応の問題を解決する必要がある。

治療ガイドラインについてはピロリ陽性 ITP 症例に対する除菌療法を早い段階に位置づけた ITP 治療ガイドライン 2004 (案) を作成した。運用には ITP に対する除菌療法の保険適応が問題となる。また承認後はこの治療ガイドラインの有用性の検証を行ってゆく必要がある。

拝啓

初秋の候、ますます御健勝のこととお慶び申し上げます。

ご承知のように ITP は厚生労働省特定疾患に指定されている疾病で、診断や治療ガイドラインが出されています。しかしいずれも 10 年以上経たものであり、その後新たな診断手法の開発や治療エビデンスが集積され、これらガイドラインを考え直す時期にきていると考えます。特に診断に関しては、血小板特異自己抗体の検出、網状血小板比率、血漿トロンボポエチンなどの診断における有用性が報告されています。これらの新しい検査法を導入することにより、従来の除外診断でなく、より積極的に ITP を診断する基準の作成が可能と思われれます。そこで、血小板減少症で来院された無治療の患者さんにこれら新しい検査法を行い、後の最終診断と照らし合わせることで、それぞれの検査法の感度、特異性を調査したいと思えます。今回の結果をもとに、厚生労働省の研究班として新しい ITP の診断基準の試案を作成したいと考えております。

本調査研究の概略は以下の通りです。

調査法： 多施設前向き試験

対象： 無治療の血小板減少症患者（小児も含む）

患者選択基準

1. 白血病を除く血小板減少症（血小板数 10 万/ $\mu$ l 以下）。  
（DIC、TTP、MDS などが強く疑われる症例や肝硬変、SLE などの基礎疾患を有する症例も含む）
2. 副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬による薬物療法、摘脾を受けていない。

調査項目：

1. 出血症状の有無
2. 末梢血検査（白血球数、赤血球数、血小板数）
3. 血小板結合抗 GPIIb-IIIa 抗体、抗 GPIb-IX 抗体（MACE 法）
4. 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度
5. 血漿トロンボポエチン濃度
6. 網状血小板比率

手順：

選択基準を満たす血小板減少症患者の選択（初診患者に限りません）



以下の採血を行い SRL 病院間メールで 2 カ所に検体を送付

検体処理の関係から検体の送付は月、火、水曜日に限る。

ヘパリン採血 10mL（抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞、トロンボポエチン測定用）  
無菌試験管または注射器による採血をお願いします。

→ 室温で慶應義塾医学部先端医科学 桑名正隆宛に送付

EDTA 採血 10mL（抗 GPIIb-IIIa/GPIb-IX 抗体、網状血小板比率測定用）

→ 4℃で大阪大学医学部附属病院輸血部 倉田義之宛に送付



臨床調査票の表を記入し、以下の 2 カ所に fax で通知

慶應義塾医学部先端医科学 桑名正隆

fax 番号 03-5362-9259

大阪大学医学部附属病院輸血部 倉田義之

fax 番号 06-6879-5889



確定診断後に調査票の裏面を記入して、貴施設で保管しておいてください。後日まとめて回収いたします。

目標症例： 100 例

SRL からは病院間メールの利用に関してご協力いただけるとの承諾をいただいております。また、今回測定した検査結果は貴施設での最終診断を伺ってからご報告申し上げます。ご多忙中とは存じますが、研究主旨をご理解頂き、患者登録にご協力頂きたく存じます。

敬具

平成 14 年 10 月 1 日

大阪大学医学部附属病院・輸血部

血液凝固異常症に関する調査研究班 分担研究者 倉田 義之

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 病態薬物治療学講座 血液・腫瘍科

血液凝固異常症に関する調査研究班 分担研究者 藤村 欣吾

慶應義塾大学医学部内科、先端医科学

血液凝固異常症に関する調査研究班 分担研究者 桑名 正隆

血液凝固異常症に関する調査研究班 主任研究者 池田 康夫

なお、ご不明な点などがありましたら慶應義塾大学先端医科学 桑名正隆までご連絡下さい (tel: 03-5363-3778 fax: 03-5362-9259 e-mail: kuwanam@sc.itc.keio.ac.jp)。

# 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の診断基準作成のための 前向き調査の臨床調査表 (資料 2)

厚生労働省科学研究 「血液凝固異常症に関する調査研究」班

## 患者選択基準

- 1. 白血病を除く血小板減少症 (血小板数 10 万/ $\mu$ l 以下)
- 2. 副腎皮質ステロイド、免疫抑制薬による薬物療法、摘脾を受けていない

以上 2 項目を満たす症例について以下の検体を採取し、SRL の病院間メールで送付してください。  
検体処理の都合上、検体の送付は月、火、水曜日をお願いします。またお手数ですが、症例登録と検査もれ防止のため、この調査票の表を記入して、それぞれの施設まで検体採取日に必ず fax でご通知下さい。裏面は最終診断が確定した後で記入してください。後日、この調査票はまとめて回収致します。

ヘパリン採血 10mL (抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞、血漿トロンボエチン測定用)

→ 室温で慶應義塾医学部先端医科学 桑名正隆 まで送付  
fax で通知 (03-5362-9259)

EDTA 採血 10mL (血小板結合抗 GPIIb-IIIa/GPIb-IX 抗体、網状血小板比率測定用)

→ 4℃で大阪大学医学部付属病院輸血部 倉田義之 まで送付  
fax で通知 (06-6879-5889)

## 登録症例

施設名: \_\_\_\_\_

患者番号: \_\_\_\_\_

氏名 (イニシャルでも可): \_\_\_\_\_

性別: 男 女

生年月日 (西暦): 19 \_\_\_\_ 年 \_\_\_\_ 月 \_\_\_\_ 日

検体採取日 (西暦): 200 \_\_\_\_ 年 \_\_\_\_ 月 \_\_\_\_ 日

登録時点での診断名 (疑い病名でも可) \_\_\_\_\_