

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
(研究課題番号：H16-難治-002)

平成 17 年度
総括・分担研究報告書

平成 18 年 3 月

目 次

血液凝固異常症に関する調査研究

I. 総括研究報告書 池田康夫

II. グループ研究報告

ITP（特発性血小板減少性紫斑病）研究グループ ... 総括報告 藤村欣吾

サブグループリーダー：藤村欣吾 広島国際大学薬学部
班 員：桑名正隆 慶應義塾大学医学部
倉田義之 大阪大学医学部
研究協力者：藤沢康司 慈恵会医科大学
降旗謙一 エスアールエル
野村昌作 岸和田市民病院
特別協力者：杉田稔・伊津野孝 東邦大学医学部（疫学班）

特発性血栓症グループ ... 総括報告 宮田敏行

サブグループリーダー：宮田敏行 国立循環器病センター研究所
班 員：小嶋哲人 名古屋大学医学部
坂田洋一 自治医科大学
辻 肇 京都府立医科大学
村田 満 慶應義塾大学医学部
川崎富夫 大阪大学医学部
研究協力者：猪子英俊 東海大学医学部
特別協力者：杉田稔・伊津野孝 東邦大学医学部（疫学班）

TMA 研究グループ ... 総括報告 藤村吉博

サブグループリーダー：藤村吉博 奈良県立医科大学
班 員：宮田敏行 国立循環器病センター研究所
村田 満 慶應義塾大学医学部
和田英夫 三重大学医学部
特別協力者：杉田稔・伊津野孝 東邦大学医学部（疫学班）

静脈血栓塞栓症研究グループ ... 総括報告 小林隆夫

サブグループリーダー：小林隆夫 信州大学医学区部
班 員：中野尅 三重大学医学部
研究協力者：榛沢 和彦 新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科
佐久間 聖仁 東北大学大学院医学系研究科循環器病態学
黒岩 政之 国立病院機構相模原病院麻酔科
中村 真潮 三重大学大学院医学系研究科循環器内科学

疫学研究グループ ... 調査報告 杉田稔

杉田稔・伊津野孝 東邦大学医学部（難治性疾患克服研究事業疫学調査研究班より）

III. 分担研究報告

- 藤村欣吾 「難治性 ITP の実態調査」
桑名正隆 「ITP 患者における抗血小板自己抗体産生機序の解明」
倉田義之 「臨床個人調査票(平成 15 年度)集計による
特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査」
藤村吉博 「肝疾患における ADAMTS13 動態解析」
坂田洋一 「敗血症 DIC の臓器障害における PAI-1 と vWF 切断酵素(ADAMTS-13)の役割」
村田 満 「危険因子の同定と介入による静脈血栓症のテイラーメード予防」
和田英夫 「TTP、TMA における全自動測定器機による FRC (破碎赤血球) の測定
ならびに ADAMTS13 値の評価」
宮田敏行 「血漿プロテイン S 活性と遺伝型との関連」
小嶋哲人 「変異型プロテイン S 分子の発現解析」
川崎富夫 「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略
—診療と訴訟とガイドライン—」
佐久間聖仁 「新潟中越地震後の肺塞栓症発症症例の検討」
中村真潮 「精神科病棟入院患者における肺塞栓症に関する検討」
榛沢和彦 「新潟県中越地震における深部静脈血栓症/肺塞栓症：エコー診療による検討」
黒岩政之 「本邦の周術期肺塞栓症発症頻度とその特徴
—2002年から2004年日本麻酔科学会アンケート調査」

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

V. 研究成果の刊行物・別冊

VI. その他

総括研究報告書

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 17 年度総括研究報告書

「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 慶應義塾大学医学部内科 教授

分担研究者

藤村 欣吾 広島国際大学薬学部 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内科 助教授
藤村 吉博 奈良県立医科大学輸血部 教授
宮田 敏行 国立循環器病センター研究所 部長
村田 満 慶應義塾大学医学部中央臨床検査部 教授
和田 英夫 三重大学医学部臨床検査医学科 助教授
坂田 洋一 自治医科大学分子病態研究部 教授
小嶋 哲人 名古屋大学医学部保健学科 教授
川崎 富夫 大阪大学大学院医学研究科外科 助手
小林 隆夫 信州大学医学部保健学科小児母性看護学講座 教授
中野 赴 三重大学大学院医学系研究科循環器内科学 教授

研究協力者

藤沢 康司 東京慈恵会医科大学小児科学 助教授
野村 昌作 市立岸和田市民病院血液内科 部長
降旗 謙一 株式会社エスアールエル 理事
猪子 英俊 東海大学医学部分子生物学系遺伝情報部門 教授
辻 肇 京都府立医科大学附属病院輸血部 助教授
佐久間 聖仁 東北大学大学院医学系研究科循環器病態学
榛沢 和彦 新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科
黒岩 政之 国立病院機構相模原病院麻酔科
中村 真潮 三重大学大学院医学系研究科循環器内科学

特別協力者（難治性疾患克服研究事業疫学班）

杉野 稔 東邦大学医学部衛生学
伊津野 孝 東邦大学医学部衛生学

研究要旨

本調査研究班では、特定疾患治療研究対象事業である特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の他に血栓性微少血管障害症（TMA）、特発性血栓症を対象とし、平

成 17 年度から新たに深部静脈血栓症／肺塞栓（DVT/PE，いわゆるエコノミークラス症候群）を調査対象に加えた。研究班をこれら 4 つテーマ毎にサブグループに分け、それぞれの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出血性疾患・血栓性疾患の理解を深めるように計画した。本研究班では、これら疾患の分子病態解析に基づいた診断基準，治療指針の確立および我が国における正確な発症頻度や予後の把握を目指している。

A. ITP サブグループ

新たな診断基準の確立，エビデンスに基づいた治療ガイドラインの作成，疫学解析を主な目的としている。本年度は以下の成果が得られた。

1. 診断基準

今年度は前年度に提案した新しい ITP 診断基準の普及のため，現状で一般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，血中トロンボポエチン濃度の臨床検査化を目指した検討を行った。まず，(株)医学生物学研究所と共同で抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞検査のアッセイ系 (ELISPOT 法) のキット化に成功した。また，網状血小板比率はシスメックス社の血球自動解析機器のソフトウェアのアップグレード，血中トロンボポエチン濃度は(株)エスアールエルにより開発された酵素免疫測定法により再現性をもって測定できることを確認した。そこで，これら 3 種のアッセイを(株)エスアールエルで一般臨床検査として実施することを目標とし，まず(株)エスアールエル担当者の測定技術向上をめざした検討を行い，慶應義塾大学と(株)エスアールエルでの測定結果がある程度一致するまでレベルが向上した。ITP 診断に有用な臨床検査の実用化，さらには保険収載を進める一歩となった。

2. 治療ガイドライン

前年度に作成した治療ガイドラインを公表する準備を整えると共に，ITP に対して有効性，安全性の高いヘリコバクター・ピロリ除菌療法の保健収載の要望書を作成し，日本ヘリコバクター学会など関連各方面へ働きかけた。本ガイドラインに従って ITP と診断されたヘリコバクター・ピロリ陽性例に対して最初に除菌療法を行うことにより，ステロイドや免疫抑制薬による副作用の軽減，治療期間の短縮，医療費の減少をもたらすことが期待される。また，新規治療法の適応となる患者数の実態を明らかにするため，難治症例の全国アンケート調査を実施した。今年度は 1 次調査として全国の日本血液学会認定の教育・研究施設，487 施設の血液指導医宛に調査表を発送し，193 施設から調査表を回収し（回収率 40%），難治症例は 4.6%と従来予測に比べて少ない事が明らかとなった。

3. 疫学解析

臨床個人調査票（特定疾患調査表）に基づく全国レベルでの疫学調査を 30 年

ぶりに行った。手始めに平成 15 年度に 36 都道府県で申請された症例について解析した。有病率は 10 万人当たり 12,89 人, 新規症例は 10 万人当たり 1.25 人, 男女比は約 1:2.3 であった。慢性型における年齢分布では従来通り 20 歳代女性に小さいピークを認めたが, 50 歳以降の中高年に最も大きなピークが存在し, 年齢分布が様変わりしていた。ヘリコバクター・ピロリ保菌者の高齢化など様々な要因が推測されるが, ITP は若年女性に多い疾患という従来の認識を変える必要がある。

4. 病態解析

ITP 患者から樹立した血小板反応性 T 細胞株を用いた病態解析研究で抗血小板自己抗体の産生機序が明らかにされた。すなわち, ITP 患者の脾臓など網内系ではマクロファージが FcγRI を介してオプソニン化された血小板を貪食すると同時に血小板自己抗原由来の潜在性ペプチドを発現することで GPIIb/IIIa など血小板自己抗原を認識する自己反応性 T 細胞の活性化を誘導する。活性化 T 細胞は特異 B 細胞を刺激して抗血小板抗体の産生を誘導する。このように, 一度抗血小板抗体が産生されると, 網内系マクロファージ, 血小板反応性 T 細胞, B 細胞により病的サイクルが形成され, 抗血小板自己抗体の産生が半永久的に持続する。本研究により ITP が慢性化する機序が初めて明らかにされ, その成果は病的サイクルの遮断による新たな治療法の開発につながる。

B. TMA サブグループ

本研究サブグループではこれまで TMA の中でも特に先天性の血栓性血小板減少性紫斑病 (Upshaw-Schulman 症候群, USS) の患者発掘とその遺伝子解析に焦点を合わせて多大な成果を挙げてきた。本年度は研究領域を広げ, ADAMTS13 に注目して後天性の血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の病態を解析し, その成果を臨床に応用することを目的として以下の検討を行った。

1. TMA 患者の発掘・登録

平成 13 年から奈良医大輸血部に臨床情報および臨床検体を送付された TMA 症例数は平成 17 年 11 月末までに 643 例に達した。このような多数例をまとめたデータベースは他に類を見ない。先天性 TMA は 46 例で, うち 28 例 (23 家系) は ADAMTS13 活性著減の USS で, 残り 16 例は原因不明であった。妊娠中に血小板減少が生じ, その後に TTP を発症した USS 症例が 5 家系 8 症例あり, 注目された。妊娠中に出現した血小板減少症では, USS に加えて ITP, Evans 症候群, 妊娠中毒症, HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count) 症候群との鑑別が重要であり, 本研究成果により ADAMTS13 活性の測定が鑑別に有用なことが示された意義は大きい。妊娠中に顕性化した USS 症例では妊娠 20 週以降に血小板減少が顕著となり, 高率に早産や死産を来した。生児を得るために, アスピリン内服あるいは凍結新鮮血漿の定期輸注の有効性が示唆

された。

2. ADAMTS13 活性と同インヒビターの迅速測定法の確立

平成 16 年に ADAMTS13 により切断される VWF-A2 ドメインの最小基質領域を発現させたリコンビナント蛋白 (GST-VWF73-His) を用いた ADAMTS13 活性の測定法が開発された。本年度は、さらに簡便・迅速なモノクローナル抗体を用いた ELISA 法 (ADAMTS13act-ELISA) の開発に成功した。この方法は高感度で、従来の測定法との相関もきわめて良好であり、今後の一般臨床検査としての普及が期待される。

3. ADAMTS13 産生細胞の同定

新規に作成した抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を用いた解析により、肝臓の実質細胞と類洞内皮細胞の間に形成される Disse 腔内の伊東細胞が ADAMTS13 産生細胞であることを世界に先駆けて発見した。本成果により肝硬変をはじめとした肝疾患に伴う TMA の病態解析が進むことが予想される。

4. ADAMTS13 遺伝子ノックアウトマウス

マウスでは ADAMTS13 遺伝子を欠損させると血中に unusually large vWF が検出され、高ずり応力を負荷すると血小板血栓が出来やすい。しかし、妊娠しても TMA は発症せず、ADAMTS13 活性や血栓形成の制御機能に動物種差がみられることが示され、動物モデルでの解析結果をヒトに応用する際に考慮すべき知見である。

C. 特発性血栓症サブグループ

静脈血栓症の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、血栓症発症の予知、予防のための方策を検討することを目的としている。そのため、静脈血栓症の治療と予防に関するアンケート調査を行うとともに、多施設共同で静脈血栓症患者を大規模に収集して候補遺伝子アプローチおよびゲノム網羅的アプローチを用いて遺伝子解析を行っている。

1. 日本人の静脈血栓症の治療に関する調査研究

ヘパリン自己注射および DVT 後のワーファリン治療の実態を明らかにするためのアンケート調査を実施中である。ヘパリン自己注射の調査については、大学附属病院および 500 床以上一般病院の血液内科・循環器内科・心臓血管外科・産婦人科合計 1265 診療科に対してアンケートを送付し、平成 18 年 2 月 24 日現在 602 件 (48%) が回収された。平成 18 年 5 月をめどにアンケート調査をまとめる予定である。一方、静脈血栓塞栓症の院内発症による訴訟問題の解決に向けて、大阪大学附属病院独自の「肺塞栓症と深部静脈血栓症に対する予防・診断・治療ガイドライン」の運用結果から、各学会および研究会のガイドラインの限界を明らかにした。今後、より正確な情報を社会に発信して誤解を解消し、医師と患者の相互理解を高めて医療の信頼性を高めることが必要であることが

認識された。

2. 日本人の血栓症の背景に関する調査研究

候補遺伝子解析では、静脈血栓症患者と地域一般住民を対象に、日本人に広くみられる凝固関連遺伝子の多型タイピングを行い、プロテインSのK196E変異が静脈血栓症と関連することを報告した。プロテインS K196E変異のヘテロ接合体の血中プロテインS活性は野生型アレル保有者の活性より低値であることから、ヘテロ接合体を有する者はプロテインS活性が低く、妊娠などの後天要因が加わると静脈血栓症を発症しやすいことを明らかにした。

一方、ゲノム網羅的手法を用いた日本人の静脈血栓症の遺伝的背景に関する調査研究のために収集した遺伝子解析試料数は215となった。今後も検体収集を続け、早急にゲノム解析に着手する予定である。

D. DVT/PE サブグループ

欧米では頻度の高い重篤な疾患と認識されているDVT/PEはわが国では頻度は高くはないと考えられており、これまで重要視されなかった。しかし、生活習慣の欧米化、社会の高齢化、手術を含めた医療処置の複雑化に伴い、その発症数は急激に増加している。平成16年10月の新潟中越地震の被災者にPEが多発したことから、社会的にも注目を集めている。そこで、本年度は様々な状況下で発症する本疾患の現況を明らかにするため、以下の調査研究を行った。

1. 新潟県中越地震後のPE症例の調査

新潟県中越地震がPE発症数に与えた影響を検討したところ、地震発生後に院外発症したPEは10例で、女性と車中泊が独立した危険因子であった。今後、災害に関連して類似した状況が発生した際には、車中泊を避けることが第一で、やむを得ず車中泊を繰り返す場合には積極的な予防法を取り入れるべきである。

2. 新潟県中越地震後に発生したDVTのエコーによる調査

新潟県中越地震では車中泊避難が原因と考えられるPEが多発したため、その原因を調査するため住民を対象とした下肢エコー検査を行った。その結果、震災1週間後では車中泊避難者の約30%に下腿静脈血栓を認め、時間経過と共に血栓陽性率は低下したが、半年後でも10%程度であった。車中泊数が長いほどDVTを起こす危険が高く、年齢と相関しなかった。車中泊によるDVTの原因として震災によるストレスに加えて、窮屈な姿勢による車中泊で下肢下垂状態を繰り返したことによりヒラメ筋静脈に血栓が発生した可能性が考えられた。

3. わが国の周術期PE発症頻度の調査

日本麻酔科学会は周術期のPE発症の頻度やその特徴を調査する目的で、平成14年から16年にかけて日本麻酔科学会全会員施設を対象に1年ごとに詳細なアンケート調査を行っており、そのデータをもとに経年変化を検討した。周術期PE発症頻度は2002年から2003年にかけて4.41-4.76(1万症例対)であったが、

2004年調査には3.62人（1万症例対）に減少した。その理由として、多くの学会が横断的に協力しPE/DVT予防ガイドラインを作成したことと、肺血栓塞栓症予防管理料が新設されて弾性ストッキングや間欠的空気圧迫法などの周術期肺塞栓症予防を行った際にはその管理料を請求できるようになったことが挙げられる。調査では、実際にこれは理学的予防法の実施例が増加していた。しかし、依然として周術期PEの発症数は顕著には減少しておらず、今後は抗凝固療法の積極的な導入についても論議する必要がある。

4. わが国の精神科病棟入院患者におけるPEの調査

精神科を標榜する2,432病院に対してPE発症に関するアンケート調査表を送付し、806病院から返信を得た（回収率33%）。その結果、平成16年のPE発症数は51例（死亡例14：死亡率27.5%）、精神科入院患者一人当たりの発生率は0.043%であった。この頻度は周術期の発症頻度と同等であり、精神科病棟でも早急に予防対策を講じる必要があることが明らかにされた。

グループ研究報告書

平成 17 年度免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) サブグループ研究報告書

藤村 欣吾* 広島国際大学薬学部 教授 *サブグループ長
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内科 助教授
(研究協力者)
藤沢 康司 東京慈恵会医科大学小児科 助教授
野村 昌作 市立岸和田市民病院血液内科 部長
降旗 謙一 エスアールエル

研究要旨

本研究班では ITP の診断、治療のガイドラインの作成と疫学調査を行う事を目的としている。今年度は前年までの研究班において提案した新しい ITP 診断基準の普及のために検査の実用化を検討し、目的に合った検査キットの準備と全国的に臨床検査として行える体制作りに着手した。前年度に作成した治療ガイドラインに関しては有用性の検討を行う準備を整えると共に、難治症例の実態調査を開始し約 5% の割合で認められることが判明した。特定疾患調査表に基づく全国レベルでの疫学調査が可能となり平成 15 年度の ITP の実態がまとめられた。慢性型における年齢分布が従来調査に比し年齢ピークが 50 歳以降にピークが変位し、女性では 20 歳代にも従来通りピークが認められた。急性型は小児期と 60 歳代に多く認められた。今後は診断基準、ピロリ除菌の ITP における保健適応を獲得し、臨床検査としての体制の確立と治療ガイドラインの有用性を検討すると共に疫学からの情報を基に、本症の QOL の向上を目指したい。

目的

感度、特異性の高い、ITP 診断基準の確立と新しいエビデンスに基づいた ITP 治療ガイドラインの作成、及び疫学研究から QOL の改善を計画する事を目的としている。本年度は診断基準項目中の特殊な検査項目の臨床検査化、治療ガイドラインに関しては ITP 除菌の保健適応取得依頼、難治性 ITP の実態調査を行うと共に、特定疾患調査表による全国 ITP を集計し疫学的な面から疾病動態について検討した。

研究方法

1) 診断基準の実用化に向けて (慶応大学桑名班員、SRL 降旗班員担当) :

まず診断基準項目の中で最も問題となる抗血小板抗体産生 B 細胞検査のアッセイ系 (ELISPOT 法) の SRL での確立を目指した。このためには ELISPOT 法のキット化が必要であり、MBL との共同研究により桑名班員の指導によって ELISPOT 法のキットが完成した。このキットを用いて慶応大学症例について同一検体を慶応大学桑名研究室と SRL 降旗研究室の 2 カ所でアッセイしその結果を互いに公表し一貫性について検討を行った。

2) 治療ガイドラインの保健適応と難治性 ITP の実態調査 (藤村班員担当): ピロリ除菌療法の ITP への保健適応に向けて要望書を班長に提出し、現在各方面への働きかけが行われている。難治性 ITP 症例の実態調査に関してはアンケート調査をもって行うことにした。今年度は 1 次調査として全国の日本血液学会認定、血液教育・研究施設の病院 487 施設の血液指導医宛に調査表を発送した。調査表の内容は現在通院中の ITP 症例数、その内難治性 ITP 症例数 (難治性の定義は表 1 に定めた)、これまでの死亡症例数、平成 16 年 9 月から平成 17 年 8 月までの 1 年間に受診した新規 ITP 症例数 (慢性型、急性型それぞれの症例数) である。

回答をエクセルで集計した。

3) 臨床個人調査票 (特定疾患調査表) による疫学調査 (倉田班員担当): 厚生労働省に保管されている全国からの個人調査票を用いて解析を行った。今回は平成 15 年度の調査票について入力されている 36 都道府県について患者数、年齢分布、血小板数、治療状況、生活状況、等についての集計をエクセルで行った。

結果

1) 抗血小板抗体産生 B 細胞検査のアッセイ系 (ELISPOT 法) の実用化について:

ELISPOT 法に用いるキットについては感度の良いものが完成した。これを用いて SRL にて慶応大学との同一サンプルについてアッセイを行ったが当初は結果に相当のずれがあった。結果が解離する問題点としてアッセイ系の操作、抗体産生 B 細胞の集団 (スポット) の判定、の 2 点が考えられた。アッセイ系そのものの操作は問題ないことが明らかとなったのでスポット確認をデジタル画像で行い、両施設で持ち寄って検討したところ、抗体産生 B 細胞スポットの判定に誤差があることが判明した。現在はデジタル画像を用いて修練した結果、習熟度が増し判定技術の向上が認められ、慶応大学とのデータの解離が解消されつつある。それに伴い遠方からの検体輸送が検査結果に影響する可能性を検討するために広島、大阪及び東京近辺より検体を

SRLと慶応大学へ輸送し検査結果を検討するシステムを作成した。

2) ITP 治療ガイドラインの中で問題となる難治性 ITP の実態調査：

ITP の治療でピロリ除菌が有用であることから治療選択肢が広がり有効例が増すと考えられる。しかし一方ではこれら新しい治療ガイドラインに反応しない難治例に対する治療が問題となる。今回難治性 ITP 症例の実態調査として 1 次アンケート調査を施行し 43 都道府県 193 施設 (回収率 39.6%) から回答を得た。難治症例は成人では 302 例、4.6%と従来予測されていた頻度からは低い事が判明した。死亡症例は成人例で 71 例が集計された。

3) 臨床個人票による ITP の全国疫学調査 (平成 15 年度)：

36 都道府県からの更新例の集計では 13,705 例 (10 万人当たり 12.89 人)、男 4,061 例 (7.80 人/10 万人)、女 9,644 例 (17.77 人/10 万人)であった。また新規症例は 32 府県の集計で 1,065 例 (10 万人当たり 1.25 人)、男 455 例 (1.09 人/10 万人)、女 610 例 (1.41 人/10 万人)となった。新規症例では急性 ITP は 5 歳以下にピークを、慢性 ITP は男では 55~75 歳、女は 25~30 歳、50~70 歳にピークを認めた。更新症例では慢性型は 55~70 歳に男女ともピークがあった。血小板数は新規症例では急性、慢性型共に 1 万以下が多く、更新症例では 10 万以上例が多い。骨髓検査では急性型、慢性型共に正形成がそれぞれ 48、47%、低形成が 32、37%、過形成が 20、16%であった。PAIgG は多くの症例で測定されており、急性型、慢性型はそれぞれ 32%、34%が高値を示した。

治療法については新規症例において、急性型ではプレドニン 70%、大量 IVIgG 43%、ピロリ除菌が 15%の症例に行われていた。慢性型ではプレドニン 53%、ピロリ除菌 24%、大量 IVIgG が 13%の症例に実施されていた。入院状況に関しては新規の急性型で 31%、慢性型では 14%が入院治療を受けていた。

4) 病態研究においては桑名班員によって ITP 症例における抗血小板自己抗体産生機序が *in vitro* で明らかにされた。すなわち ITP 症例の末梢血から GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞株を樹立した。これらの症例の内摘脾を行った症例から脾臓由来の抗原提示細胞 (マクロファージ、B 細胞、樹状細胞) を取り出し、樹立した自己 T 細胞株と共培養した。抗原提示細胞としてマクロファージを用いると GPIIb/IIIa 抗原を加えることなく T 細胞は増殖し、抗 HLA-DR 抗体添加により抑制された。脾臓由来の他の抗原提示細胞を用いた場合には GPIIb/IIIa 抗原添加が T 細胞の増殖には必要であった。末梢血 B 細胞、自己由来マクロファージ、さらに自己 GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞

株に自己血小板を加え共培養すると、上清中に抗 GPIIb/IIIa 抗体が誘導された。この反応は Fc γ RI 抗体によって抑制されることから、マクロファージが Fc γ RI を介してオプソニン化血小板を貪食し、さらに血小板抗原ペプチドを HLA 上に発現することで GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の活性化を維持し、自己抗体産生が継続する過程を *in vitro* で極めてクリアに証明した。

考案

今年度は前節に行った研究の継続、並びに新たな研究の基礎造りに当たる。すなわち診断基準に関しては、病態研究から得られた ITP の免疫学的特異性を加えた新しい診断基準の定着へ向けての実用化を計った。この診断基準の中で ELISPOPT アッセイ系を用いる抗血小板抗体産生 B 細胞の半定量化を臨床検査専門会社 SRL へ委託するに当たっては、SRL の方で相当な訓練を要した。しかし慶応大学桑名班員の指導の基、今年度末には検査精度はほぼ満足行くものとなり、両研究室間では結果に差がなくなっている。これを踏まえて臨床検査としての体制を整えるために、また検体輸送の問題、輸送が検査データへ及ぼす影響の有無などを明らかにするためにパイロット研究システムを確立した。すなわち大阪大学、広島日本赤十字原爆病院、慈恵医科大学から ITP 症例、その他の血小板減少症例の検体を SRL と慶応大学へ輸送し、SRL では MBL キットを、慶応大学では MBL キットと従来からの慶応方式用いてそれぞれ ELISPOT アッセイを行い、検体輸送などの影響を明らかにすると共に、再度両研究室間の整合性、MBL キットの妥当性について検証する事にしている。これらの結果により全国からの検体を SRL で検査可能か否か判断したい。この他網状血小板については恐らく検体輸送により時間が経過すると検査結果に影響が出る懸念があるので今回の輸送検体であわせてその点についても検討し結論を出す予定である。

治療ガイドラインについてはピロリ菌陽性 ITP に対する除菌療法が健康保健適応になるべく申請中である。認可された後には今回の新たな治療ガイドラインの有用性に関する検証が必要となる。ピロリ陽性例に対しては除菌療法を最初に行うよう定めてあり、ステロイド治療による副作用の軽減、難治例の減少などの効果が予測され、これに加え治癒例が多く認められる点から治療期間の短縮、終局的には医療費の軽減へと繋がってくれることを期待している。

一方今後の問題点として QOL の良くない難治性 ITP の治療が残ってくる。従来からこの群の治療に関しては多くの試みがなされているが一長一短があり的確な治療法が確立されているとは言い難い。事実その選択は主治医に

一存されており、ガイドライン的なものはない。このような背景から今回新ガイドラインに難治性 ITP の治療について新たな道筋を付け加える目的で難治性 ITP の実態調査を開始した。方法は全国の日本血液学会研修施設で血液学会認定指導医が勤務する病院 487 施設に対するアンケート調査である。一次調査で成人では 302 例の難治例が存在し、その頻度は現在通院中の ITP 症例の 4.6% に相当する。難治性の定義の問題もあって文献的に難治症例の頻度が明らかにされておらず今回の頻度についてのコメントは難しい。しかし多くの報告で NR 症例を難治に近い症例とすると今回の頻度は厳格な定義のためかはるかに低いと思われた。これらの症例に対しては今後 2 次調査で臨床病態を明らかにする予定である。

ITP の臨床個人調査票による全国的な疫学調査は約 30 年ぶりのこととなる。今回の調査による年間発生数、罹病者数は欧米や過去の報告と大差はないように思われた。しかし罹病者の年齢分布においては慢性型では 30 年前に比し、50 歳以降の中高年に最も大きなピークが認められ、様変わりしている印象が裏付けられた。新規発症例においては女性では中高年例のピークと共に 25 歳～30 歳にもピークがあった。このような好発年齢のズレが人口構成の変化によるものなのか今後補正をして検討する予定である。また治療に関しては慢性型では除菌療法がプレドニンに次いで多くの症例で施行されており、除菌療法が浸透していることが伺えた。しかし正式には健康保険適応がなされていない現状ではどのようにコメントしたらよいか苦慮するところである。

更新例における血小板数が 10 万以上の症例が多いことは多くの症例が良好に管理されていることを示しており、また慢性型での入院症例の頻度が 14% と少ないこともこれを裏付けている。従って多くの ITP 症例は全国的に差がなく良好に治療されていると思われる。この調査票をさらに詳しく解析し、難治症例相当する症例、罹病期間、合併症等が明らかとなるか検討したい。

桑名班員による *in vitro* での自己抗原提示細胞による自己 GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の増殖、さらには B 細胞による GPIIb/IIIa 抗体産生を明らかにしたことは画期的なことである。また脾臓の ITP の病態における役割も再認識することが出来た。摘脾の有効性、妥当性を改めて認識した研究でもある。

今後の方針：

次年度は提案した診断基準、治療ガイドラインの有用性に関する検証、臨床個人調査票による疫学調査の継続、難治性 ITP の臨床病態を明らかにし、

死亡例に関しても詳細な検討を行う予定である。またこの他今回の班会議で妊娠中の血小板減少症の中に TMA が混在する可能性が指摘されたのを機に、妊娠時の血小板減少の頻度を含め、その内 TAM の発生がどのくらいあるのか等 ITP 研究班員の中で検討する予定である。TAM は ITP の除外すべき疾患の中にすでに挙がってはいるが、従来妊娠時の血小板減少に関しては TAM を念頭に置くことには疎かになっていたきらいがあるのでその存在の有無を明らかにすることは重要と考えている。

まとめ

1. 診断基準の実用化、臨床検査化にむけてネックとなる抗体産生 B 細胞の定量化(ELISPOT)を委託する事に成功しつつあり、全国レベルでの検査が可能になる道が開けた。
2. 43 都道府県から難治性 ITP 症例 301 例、死亡症例 71 例をアンケート調査で集積した。2 次調査で臨床病態を明らかにする予定である。
3. ITP の臨床個人調査票による全国疫学調査が可能となり、発症年齢の高齢化、除菌療法の浸透、病態管理の向上等に従来とは異なった状況が認められた。

健康危険情報

なし

発表論文

1. Kingo Fujimura
Helicobacter pylori infection and idiopathic thrombocytopenic purpura.
Int. J. Hematol. 2005 ; 81 : 113-118.
2. Kingo Fujimura, Masataka Kuwana, Yoshiyuki Kurata, Masahiro Imamura, Hiroshi Harada, Hisashi Sakamaki, Masanao Teramura, Kyuhei Koda, Shosaku Nomura, Sayaka Sugihara, Takeshi Shimomura, Tetsuro-Takahiro Fujimoto, Kazuma Oyashiki, Yasuo Ikeda
Is eradication therapy useful as the first line of treatment in *Helicobacter pylori*-positive idiopathic thrombocytopenic purpura? Analysis of 207 eradicated chronic ITP cases in Japan.
Int. J. Hematol. 2005 ; 81 : 162-168.

3. Kuwana M, and Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of ITP. *Int. J. Hematol.* 2005; 81(2): 106-112.
4. Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, and Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am. J. Med.* 2005; 118(9): 1026-1033.
5. Nakamura M, Tanaka Y, Satoh T, Kawai M, Hirakata M, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y, and Kuwana M. Autoantibody to CD40 ligand in systemic lupus erythematosus: association with thrombocytopenia, but not thromboembolism. *Rheumatology.* 2006; 45(2): 150-156.
6. Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Miyazaki H, and Ikeda Y. Two types of autoantibody-mediated thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* In press.

知的財産権の出願・登録

1. 特許取得 なし
2. 実案新案登録 なし
3. その他 なし

表 1

難治性 I T P の取り決め(案)

難治性 I T P の基準： 以下の 3 項目を満たす症例

1. 少なくとも発症から 1 年以上経過している症例。
2. 次の治療法に反応しない症例。
 - (1) **ピロリ菌陰性或いは不明の I T P 例**： 副腎皮質ステロイド療法、
或いは、これに加え摘脾療法にも反応せず、
 - (2) **ピロリ陽性 I T P 例**： 除菌療法さらに副腎皮質ステロイド療法
或いは、これらに加え摘脾療法にも反応せず、これらの症例に対し
さらに 1 つ以上の難治性薬物療法（ダナゾール、他の免疫抑制剤など）に
反応しない症例
3. 治療に対する**反応性**について。
上記治療中にもかかわらず**血小板数 2 万以下**の回数が観察回数
（少なくとも 6 ヶ月以上の期間で）の半分以上を数える。

平成17年度 特発性血栓症サブグループ研究報告書

宮田敏行* 国立循環器病センター研究所

*サブグループ長

坂田洋一 自治医科大学

小嶋哲人 名古屋大学医学部

村田 満 慶應義塾大学医学部

川崎富夫 大阪大学医学部

(研究協力者)

辻 肇 京都府立医科大学

研究要旨

静脈血栓症の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、血栓症発症の予知、及び、予防のための方策を検討することを目的とする。この目的のため、静脈血栓症の治療と予防に関するアンケート調査を行うとともに、多施設共同で静脈血栓症患者を大規模に収集し、候補遺伝子アプローチおよびゲノム網羅的アプローチを用いて遺伝子解析を行う。また、これまで日本人を対象に行われた静脈血栓症患者の遺伝子解析の結果を調査する。特に、日本人の静脈血栓症はプロテイン S K196E 変異の寄与が考えられ、プロテイン S 研究の重要性が増してきた。

研究項目と役割分担

1. 日本人の血栓症の背景に関する調査研究

(1) ゲノム網羅的手法を用いた日本人の静脈血栓症の遺伝的背景に関する調査研究

特発性サブグループとして収集した遺伝子解析試料数は215となった。

(2) 候補遺伝子アプローチを用いた日本人の静脈血栓症の遺伝的背景に関する調査研究

平成14-16年度の本研究班の研究で、静脈血栓症患者と地域一般住民を対象に、日本人に広くみられる5つの遺伝子多型(プラスミノーゲン A620T、プロテイン S K196E、XII 因子 -4C>T、PAI-1 4G/5G、ADAMTS13 P475S)のタイピングを行い、プロテイン S K196E 変異が静脈血栓症に関連することを報告した。また、これまで日本人では調べられていなかったトロンボモジュリン遺伝子を調べたところ、血中トロンボモジュリン量と関連を示す遺伝子多型は同定できたものの、静脈血栓症との関連は弱かった。本邦でも欧米でも、プロテイン S 欠損症にもかかわらず、プロテイン S 遺伝子の翻訳領域には責任変異を同定できない症例が多く見られる。こういった症例の解析が今後の重要課題である。