

## 日本血液学会 研修施設

病院 血液内科 御中

先生

拝啓

秋晴れの候、ますますご健勝のことと拝察申し上げます。

さて難治性 ITP 症例の治療に関しては従来種々の治療研究がなされましたが有用な治療成績は世界的にも得られていないと考えます。

このような状況下で、この度厚生労働省 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」班では“難治性 ITP” 症例に対する実態調査を行うと共に新たな治療研究を行い ITP の治療成績を向上させることを計画致しました。

つきましては大変ご多忙中と存じますが下記の点について貴診療科にご協力をお願いしたいと存じます。

- ・ 別紙の定義に基づく難治性 ITP 症例数について
- ・ 現在貴病院に通院中の I T P 症例数について
- ・ 1 年間（平成 16 年 9 月～17 年 8 月）に受診された新規 ITP 症例数について

上記 3 点について別紙調査表にご記入後、返送頂きますようお願いいたします。

以上ご迷惑とは存じますが今回の主旨にご賛同頂き是非ご協力賜りますようお願い申し上げます。

敬具

平成 17 年 10 月 28 日

血液凝固異常症研究班 班長

慶應大学医学部 内科

池田 康夫

血液凝固異常症研究班 班員

広島国際大学 病態薬物治療学講座

藤村 欣吾

血液凝固異常症研究班 班員

慶應大学医学部先端医科学研究所

桑名 正隆

血液凝固異常症研究班 班員

大阪大学医学部付属病院 輸血部

倉田 義之

## 調査用紙記入についての説明

### 難治性 ITP の基準：以下の 3 項目を満足する症例

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  
さらには 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症例。

### 新規 ITP 症例と通院中の I T P 症例調査：

- ・新規 I T P 症例：平成 16 年 9 月から平成 17 年 8 月の 1 年間に貴施設を受診した新規 ITP 症例数
- ・現在通院中の総 I T P 症例数

以上ご不明な点、調査表の返送先は下記へお願い致します。

〒737—0112

広島県呉市広古新開 5-1-1

広島国際大学 薬学部 病態薬物治療学講座  
藤村 欣吾

電話 0823 - 73 - 8296

FAX 0823 - 73 - 8981

E-mail [k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp](mailto:k-fujimu@ps.hirokoku-u.ac.jp)

## ITP 患者における抗血小板自己抗体産生機序の解明

分担研究者 桑名 正隆 慶應義塾大学医学部内科 助教授  
主任研究者 池田 康夫 慶應義塾大学医学部内科 教授

### 研究要旨

ITP 患者では血小板膜蛋白 GPIIb/IIIa に対する自己反応性 T 細胞が抗血小板抗体産生を誘導することで病態の中心的役割を果たす。本研究では、GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の活性化機構を ITP 患者由来の GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞株と自己脾抗原提示細胞を用いて追究した。GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞株を脾より分離した自己マクロファージ、B 細胞、樹状細胞と共培養すると、脾マクロファージのみが抗原添加なしでも T 細胞株の増殖を誘導した。ITP 患者および健常人由来の血小板と前処置した培養マクロファージを自己 GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞株と共培養すると、ITP 患者由来の血小板と前処置した場合にのみ T 細胞株の増殖がみられ、この反応は抗 FcγRI 抗体により抑制された。さらに、GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞株、末梢血 B 細胞、血小板を培養マクロファージ上で共培養すると上清中への抗 GPIIb/IIIa 抗体産生が誘導された。以上の結果より、FcγRI を介してオプソニン化血小板を大量に取り込んだ網内系マクロファージが、潜在性ペプチドを発現することで ITP 患者における GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の活性化と自己抗体産生を維持することが明らかにされた。

### A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) は薬剤などの原因や基礎疾患が明らかでないにもかかわらず、血小板の破壊が亢進し、血小板減少をきたす後天性疾患である。ITP における血小板破壊の機序は、血小板膜表面の GPIIb/IIIa など糖蛋白に対する自己抗体が結合してオプソニン化された血小板が網内系で Fcγ 受容体を介してマクロファージなどの貪食細胞に捕捉され、貪食・破壊される自己免疫病態である。

私たちはこれまで抗血小板抗体の主要な標的抗原 GPIIb/IIIa を認識する CD4<sup>+</sup>T

細胞についての詳細な解析を行い、それらが抗血小板抗体産生を誘導するヘルパー活性を有すること、native な GPIIb/IIIa からのプロセッシングでは作られない潜在性 (cryptic) ペプチドを認識すること、その活性化レベルは健常人に比べて ITP 患者で高いことを報告してきた。さらに、活性化した GPIIb/IIIa 反応性 T、B 細胞は脾臓でのみ検出され、GPIIb/IIIa 由来の潜在性ペプチドは主に脾臓で発現されると推測された。本研究では、GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の脾臓における活性化機構を ITP 患者由来の GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞株と自

己脾抗原提示細胞（APC）を用いて追究した。

## B.研究方法

### 1. 対象

当院通院中のITP患者3例を対象とした。いずれの症例も末梢血からのGPIIb/IIIa反応性T細胞株の樹立に成功し、その後治療の一環として摘脾を受けた。

### 2. GPIIb/IIIa反応性T細胞株の樹立

GPIIb/IIIaのトリプシン断片で患者末梢血T細胞を繰り返し刺激し、限界希釈法によりGPIIb/IIIa反応性T細胞株を樹立した。APCとしてEBウイルスでトランスフォームした自己B細胞株を用いた。得られたT細胞株は、抗原特異性を確認した後に液体窒素中で凍結保存した。

### 3. 脾APCの調整

脾臓組織片を細胞に分離し、さらに磁気ビーズ結合モノクローナル抗体（MACS）を用いてCD14<sup>+</sup>マクロファージ、CD19<sup>+</sup>B細胞、Lin<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>樹状細胞を精製した。フローサイトメトリーにより各分画ともに95%以上の純度を確認した。さらに、脾細胞をM-CSF存在下で7日間培養することで培養マクロファージを得た。

### 4. T細胞株の抗原特異的増殖能の検討

GPIIb/IIIa反応性T細胞株をGPIIb/IIIaのトリプシン断片（2.5 μg/ml）の存在、非存在下で各種自己APC（脾マクロファージ、B細胞、樹状細胞、培養マクロファージ）とともに3日間培養した。T細胞の増殖は<sup>3</sup>Hサイミジンの取り込みにより評価

した。一部の実験では、トリプシン断片の代わりに自己を含むITP患者由来の血小板、健常人由来の血小板、ITP患者血小板より溶出した分画で前感作した健常人血小板を添加した。また、本培養系における抗HLA-DR、HLA-DQモノクローナル抗体（2.5 μg/ml）、FcγRIまたはFcγRIIIに対するモノクローナル抗体（10 μg/ml）の影響も調べた。

### 5. *in vitro*でのT、B細胞の協調による抗GPIIb/IIIa抗体産生の評価

GPIIb/IIIa反応性T細胞株と自己B細胞をGPIIb/IIIaのトリプシン断片（2.5 μg/ml）の存在下で10日間培養し、上清中に産生されたIgG抗GPIIb/IIIa抗体を酵素免疫測定法により測定した。一部の実験では、本培養系における抗FcγRI、FcγRIII抗体の影響を調べた。

### （倫理面への配慮）

すべての検体は学内の倫理委員会で承認された文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

## C.研究結果

3例のITP患者から樹立した計6つのGPIIb/IIIa反応性CD4<sup>+</sup>T細胞株（NE1、BE4、SuM7、SuM8、MH3、MH6）を用いた。いずれもHLA-DR拘束性のTh0株であったが、抗原特異性は多様であった。SuM7を除く5株が抗GPIIb/IIIa抗体産生を誘導するヘルパー活性を有していた。

自己脾由来の分離直後のマクロファージ、B細胞、樹状細胞をAPCとして用いてGPIIb/IIIa反応性T細胞株と共培養す

ると、外来抗原の添加なしでもマクロファージはT細胞株の増殖を誘導した(図1)。この反応は抗HLA-DR抗体により完全に阻害された。一方、B細胞、樹状細胞はGPIIb/IIIa抗原存在下でのみT細胞の増殖を誘導した。同様の結果は解析に用いた6株全てで観察された。したがって、脾マクロファージは*in vivo*でGPIIb/IIIa反応性T細胞を活性化するGPIIb/IIIaの潜在性エピトープを提示していることが明らかとなった。

分離直後のマクロファージと異なり、培養マクロファージは外来抗原添加なしではGPIIb/IIIa反応性T細胞株の増殖を誘導しなかった。そこで、培養マクロファージに自己を含めたITP患者由来の血小板および健常人由来の血小板を加え、さらにGPIIb/IIIa反応性T細胞株と共培養した。その結果、ITP由来血小板のみがT細胞株の増殖を誘導した。次に、T細胞の認識における血小板オプソニン化の重要性を調べるため、健常人由来血小板をITP血小板から溶出した分画と反応させた後に培養マクロファージ、GPIIb/IIIa反応性T細胞株と培養した。ITP血小板溶出分画で前感染した健常人血小板はT細胞株の増殖を誘導し、この反応は抗FcγRI抗体により抑制されたが、抗FcγRIII抗体による影響は受けなかった。同様の結果は解析に用いた4株全てで観察された。したがって、血小板のオプソニン化が、FcγRIを介したマクロファージによる取り込み、さらにはGPIIb/IIIaの潜在性エピトープの発現誘導に必要であることが確認された。

GPIIb/IIIa反応性T細胞株を自己B細胞、GPIIb/IIIaのトリプシン断片とともに

培養すると、上清中に抗GPIIb/IIIa抗体の産生が観察される。この実験系において、GPIIb/IIIa抗原の代わりに自己血小板を加えると抗GPIIb/IIIa抗体の産生はみられない。この培養系を自己培養マクロファージ上で行うと、ITP血小板を添加した場合にのみ上清中に抗GPIIb/IIIa抗体が産生された(図2)。健常人血小板では抗GPIIb/IIIa抗体産生はみられなかったが、前もってITP血小板溶出分画と反応させた健常人血小板を用いると抗体産生がみられた。この*in vitro*での抗GPIIb/IIIa抗体産生は抗FcγRI抗体の添加により抑制された。同様の結果は解析に用いた2株のいずれにおいても観察された。

#### D. 考察

本研究結果から、ITP患者においてGPIIb/IIIa反応性T細胞の活性化を維持しているのは脾臓をはじめとした網内系のマクロファージであることが示された。ただし、マクロファージがGPIIb/IIIaの潜在性エピトープを発現するためには、FcγRIを介してオプソニン化された血小板を取り込むことが必要であった。ITP患者の網内系マクロファージはFcγRIを介してオプソニン化血小板を大量に貪食することが知られており、その際に大量に取り込まれるGPIIb/IIIaをはじめとした血小板膜糖蛋白のプロセッシングにより、本来は潜在性のペプチドが免疫応答を誘導するのに十分量発現される可能性が想定される。

以上の結果から慢性期のITP患者において、以下のような抗血小板抗体の産生機序が考えられる。抗血小板抗体が産生され

ると、オプソニン化血小板を貪食した網内系マクロファージが GPIIb/IIIa 由来潜在性ペプチドを発現し、それを認識した GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞が活性化され、B 細胞からの自己抗体産生を誘導する。ITP 患者では、この GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞、B 細胞、網内系マクロファージのサイクルが成立し、その結果抗血小板抗体の産生が持続する。したがって、このサイクルをいずれかのポイントで阻止することが有効な治療法になると考えられる。

#### E. 結論

ITP 患者における自己免疫病態の維持に網内系マクロファージによる自己反応性 T 細胞の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of ITP. *Int J Hematol* 2005; 81(2): 106-112.
2. Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med* 2005; 118(9): 1026-1033.
3. Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Miyazaki H, Ikeda Y. Two types of

autoantibody-mediated thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*. In press.

4. 桑名正隆: 自己免疫性血小板減少症. 血液フロンティア 15(5):53-62, 2005.
5. 桑名正隆, 池田康夫: 病態解析と治療の進歩 -ITP. 総合臨床 54(6):1871-1875, 2005.
6. 桑名正隆, 池田康夫: 特発性血小板減少性紫斑病. 最新医学 60(6):231-240, 2005.
7. 桑名正隆: *Helicobacter pylori* 感染と ITP の関連を解析する-抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞より-. *Helicobacter Research* 9(4):13-18, 2005.
8. 桑名正隆: 自己反応性 T 細胞 -自己免疫疾患における役割 -. 炎症と免疫 13(6):114-116, 2005.
9. 桑名正隆, 朝日厚子, 池田康夫: ITP と *Helicobacter pylori* 感染. 日本検査血液学会雑誌 6(3):325-331, 2005.

##### 2. 学会発表

1. Kuwana M: Cryptic nature of epitopes recognized by autoreactive T cells in human autoimmune diseases. International Symposium: Autoimmunity in Intractable Diseases: From Bench to Clinic (Hakone). 2005 年 10 月
2. Kuwana M, Kaburaki J, Okazaki Y, Ikeda Y: Two type of autoantibody-mediated thrombocytopenia in patients with systemic lupus erythematosus. The

69th Annual Scientific Meeting of  
American College of Rheumatology  
(San Diego). 2005年11月

3. Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y:  
Splenic macrophages maintain the  
anti-platelet autoimmune response  
via uptake of opsonized platelets in  
patients with chronic ITP. The 47th  
Annual Meeting of American  
Society of Hematology (Atlanta).  
2005年12月

4. 桑名正隆: 自己反応性T細胞がどのよ  
うに病気をおこすのか? 第49回日本  
リウマチ学会総会(横浜). 2005年4月

5. 桑名正隆: 自己反応性T細胞の解析に  
よる難治性自己免疫疾患の病態解明と  
治療. 第69回日本皮膚科学会東京支部  
学術大会(横浜). 2006年2月

H.知的財産権の出願・登録状況(予定も含  
む)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

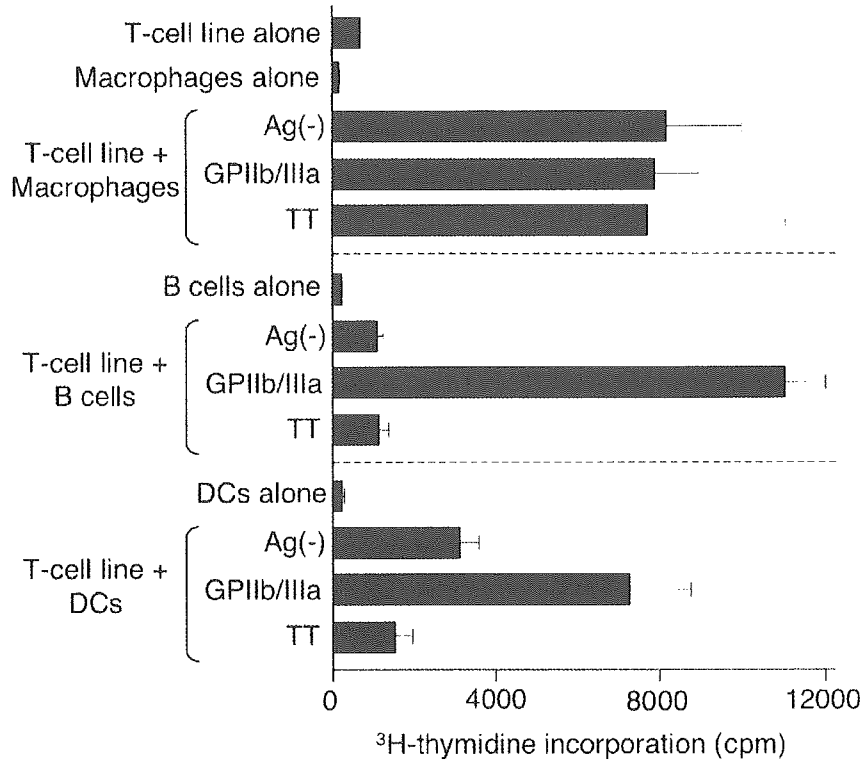


図1. ITP患者由来の GPIIb/IIIa 反応性 T細胞株 NE1 を GPIIb/IIIa のトリプシン断片の存在, 非存在下で自己脾由来の分離直後のマクロファージ, B細胞, 樹状細胞と共培養し, 3日後に<sup>3</sup>Hサイミジンの取り込みにより増殖反応を調べた。

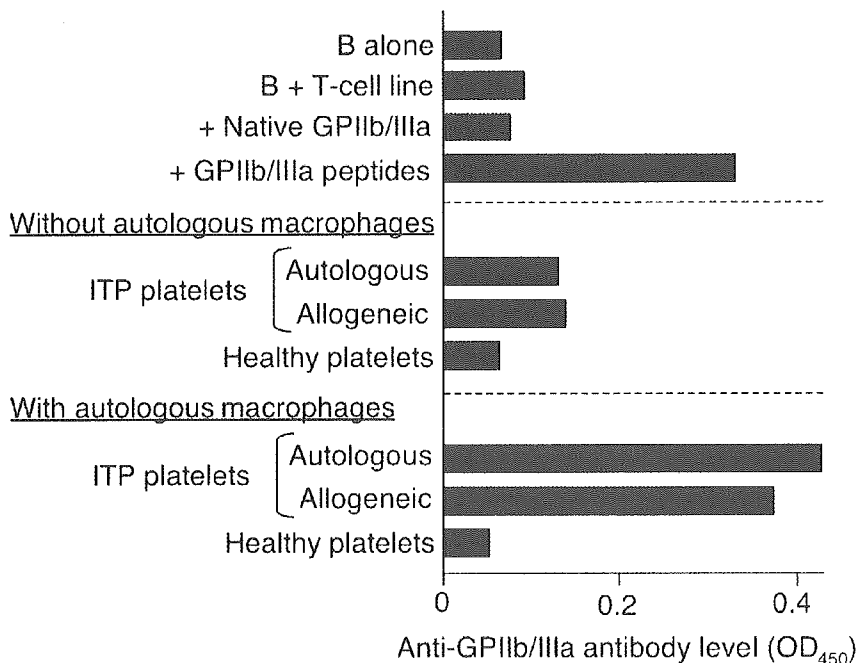


図2. ITP患者由来の GPIIb/IIIa 反応性 T細胞株 SuM8 を GPIIb/IIIa のトリプシン断片, ITP患者あるいは健康人由来血小板の存在下で自己脾 B細胞と共培養し, 10日後に上清中に産生された抗 GPIIb/IIIa 抗体を調べた。また, 一部の実験では本培養を自己培養マクロファージ上で行った。



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

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

我が国における特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症頻度、年齢分布、患者の病状や治療、生活状況を平成15年度の臨床個人調査票をもとに解析した。

平成15年での新規ITP患者発症数は10万人あたり1.25人であった。日本全体では1,595人が発症したと推計された。更新患者数は10万人あたり12.89人で日本全体では16,450人の患者がいたと推計された。発症年齢の分布では急性型は5歳以下の小児に多く、慢性型は20-35歳のピークとともに55-70歳にも大きなピークが認められた。更新患者においてはさらに顕著で急性型、慢性型ともに20-40歳のピークは小さく50-70歳に大きなピークがみられた。高齢発症、患者年齢の高齢化が進んでいると思われた。

1. 研究目的

我が国における特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の新規発症例数や患者数などの疫学的データは20数年前に調査され、報告されているがその後のデータはない。我が国においては人口の高齢化が急速に進んでおりITP患者の年齢構成にも大きな変化がおきているのではないかと推察される。今後のITP患者への支援計画などをたてるにあたりその実態を把握することは非常に重要である。今回、平成15年度におけるITP患者の実態を臨床個人調査票をもとに分析したのでその成績を報告する。

2. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成15年度の全国のITP患者の臨床個人調査表のデータの提供を受けた。データには新規申請患者分と更新申請患者分のデータが含まれていた。データの提供を受けた時点（平成17年11月）では一部の都道府県のデータが厚生労働省には届いていなかった。

新規申請分でデータが届いていなかった道府県は北海道、埼玉、山梨、三重、京都、大阪、徳島、香川、愛媛、福岡、熊本、大分、宮崎、鹿児島、沖縄の15道府県であった。更新申請分で届いていなかった道府県は北海道、青森、宮城、秋田、栃木、山梨、三重、京都、徳島、大分、宮崎の11道府県であった。

3. 研究結果

1) ITP患者発症数

平成15年に発症した患者数を表1に示す。

表1. ITP患者発症数

	全 発症数	男	女	急性型 発症数	男	女	慢性型 発症数	男	女	型不 明
患者数 (人)	1,065	455	610	382	207	175	628	222	408	55
10万人 あたり	1.25	1.08	1.41	0.45	0.50	0.40	0.74	0.53	0.94	0.08
推計 患者数 (人)	1,595	679	921	574	312	261	944	330	614	77

新規発生患者数は男女合わせて1,065名であった。1,065名を調査道府県の人口

(84,995 千人) で除して人口 10 万人あたりで計算すると 1.25 名であった。また 1,065 名は調査道府県での発生数であるので日本の総人口 (127,621 千人) でもって推計するとわが国では年間 1,595 名の患者が発生していると推察された。

### 2) ITP 更新患者数

平成 15 年度に更新申請があった患者数を表 2 に示す。

表2. ITP更新患者数

	全更新患者数		急性型患者数		慢性型患者数		型不明	
	男	女	男	女	男	女	男	女
患者数 (人)	13,705	9,844	1,331	536	12,072	3,422	8,650	302
10万人あたり	12.89	17.77	1.25	1.03	11.35	6.57	15.04	0.28
推計患者数 (人)	4,860	11,606	1,595	642	14,485	4,093	10,411	357

更新患者数は男女合わせて 13,705 名であった。13,705 名を調査道府県の人口 (106,360 千人) で除して人口 10 万人あたりで計算すると 12.89 名であった。また 13,705 名は調査道府県での更新数であるので日本の総人口 (127,621 千人) でもって推計するとわが国では平成 15 年度に 16,450 名の患者が更新申請をしていると推察された。

### 3) 新規患者年齢分布

新規発症患者の年齢分布を図 1 に示す。

上が急性型、下が慢性型の年齢分布である。急性型では 5 歳以下の小児にピークがあった。男児が女児の約 2 倍多かった。慢性型では 21 歳～35 歳と 51 歳～70 歳にピークがあった。20 歳～35 歳では女が男の約 3～5 倍多かった。一方、50 歳以上では女のほうが約 1.5 倍多い程度であった。

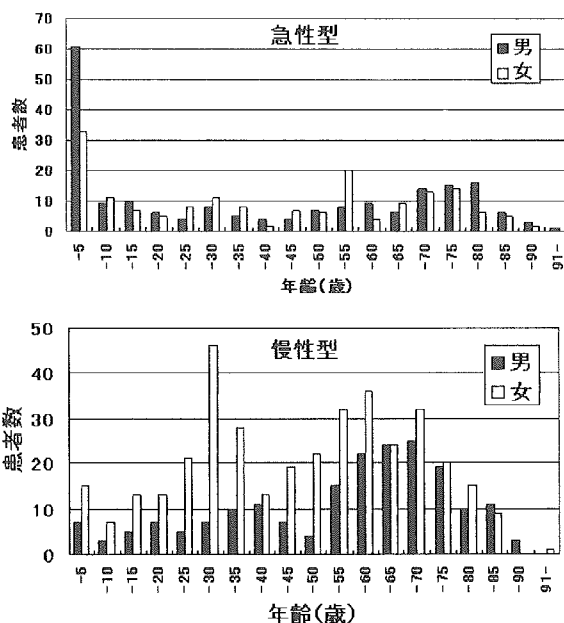


図1. 新規患者年齢分布

新規患者の年齢分布を 10 万人あたりで解析してみると図 2 のようになる。

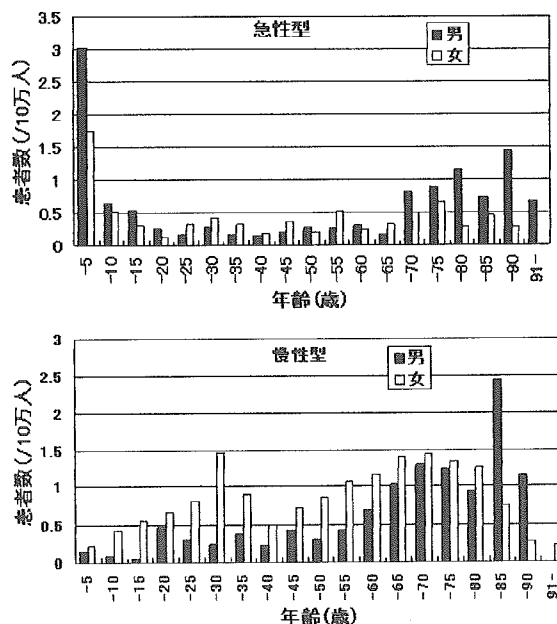


図2. 新規患者年齢分布(10万人)

上が急性型、下が慢性型の年齢分布である。急性型では 5 歳以下にピークがあり、男では 66 歳～90 歳にも軽いピークがみられた。一方、慢性型においては女では 21 歳～35 歳と 60 歳～75 歳にピークが見られた。男

では60歳ごろより増加し始め81歳～85歳にピークがみられた。

#### 4) 更新患者年齢分布

更新患者の年齢分布を図3に示す。

上が急性型、下が慢性型の年齢分布である。急性型の患者数は慢性型の患者数に比べ約1/10と少ない。急性型では新規患者と同様5歳以下にピークがあり、男児のほうが約2倍多かった。男女とも51歳～75歳にもピークを認めた。女が男より約1.5～2倍多かった。一方、慢性型では男女とも20歳ごろより増加し始め、51歳～70歳にピークがあった。女が男の約2.5倍多かった。新規患者の際にみられた21歳～35歳のピークは明瞭ではなかった。

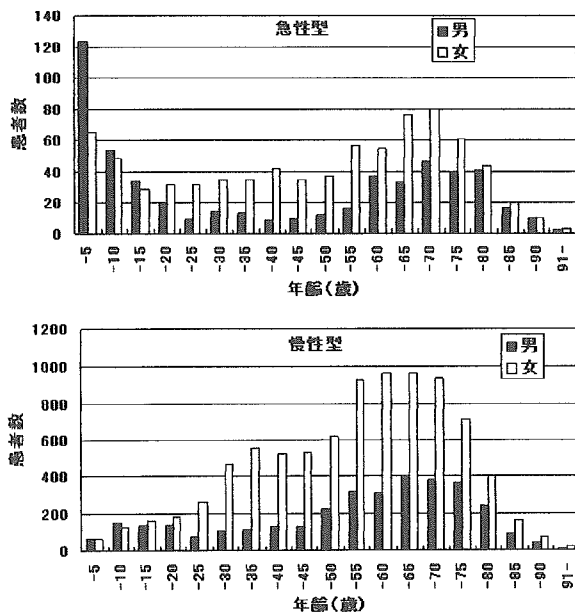


図3. 更新患者年齢分布

更新患者の10万人あたりの年齢分布を図4に示す。

上が急性型、下が慢性型の年齢分布である。急性型では5歳以下にピークがあるのは同じであるが高齢者では男女差がなくなる傾向にあった。慢性型では女が男の約2

～5倍多く、特に21～60歳では男女差が大きかった。女では20歳より増加し始め66歳～70歳にピークがあった。一方、男では46歳ごろより増加し始め、ピークは71歳～75歳であった。81歳以上では男女差がなかった。

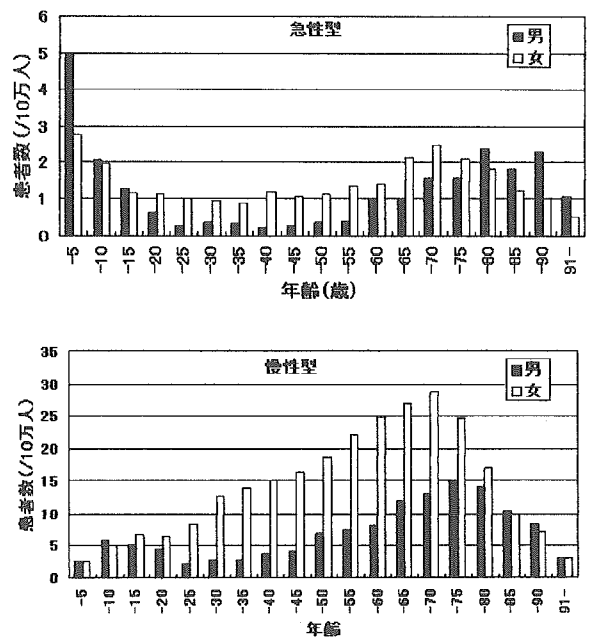


図4. 更新患者年齢分布(10万人)

#### 5) 出血症状

出血症状を図5に示す。

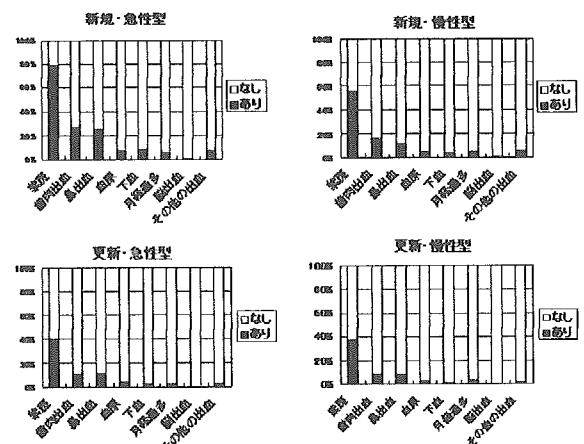


図5. 出血症状の頻度

グラフで上段が新規症例、左が急性型、

右が慢性型である。下段のグラフは更新患者で、左が急性型、右が慢性型である。

新規患者では急性型のほうが出血症状の頻度は高かった。出血の症状は急性型・慢性型ともに紫斑が主で、次いで歯肉出血、鼻出血であった。血尿や下血などの症状は少なかった。

更新患者では新規患者に比べ出血症状の頻度は低かった。出血症状は急性型、慢性型ともに紫斑が主であった。

### 6) 血小板数

新規患者、更新患者の血小板数の分布を図6に示す。

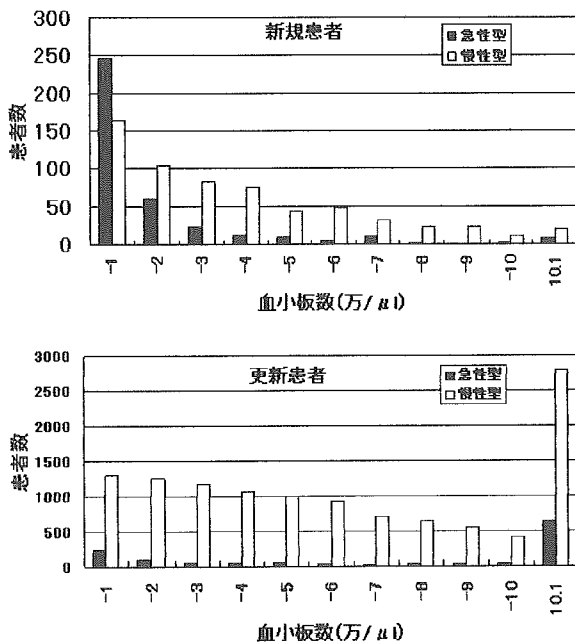


図6. 血小板数

上が新規患者、下が更新患者の血小板数の分布である。新規症例においては急性型、慢性型ともに血小板数1万以下の症例が多かった。特に急性型においては66%の症例が1万以下であった。一方、更新患者においては血小板数は急性型、慢性型ともに10万以上の症例が多かった。

### 7) 骨髄検査成績

新規患者の骨髄検査成績を図7に示す。

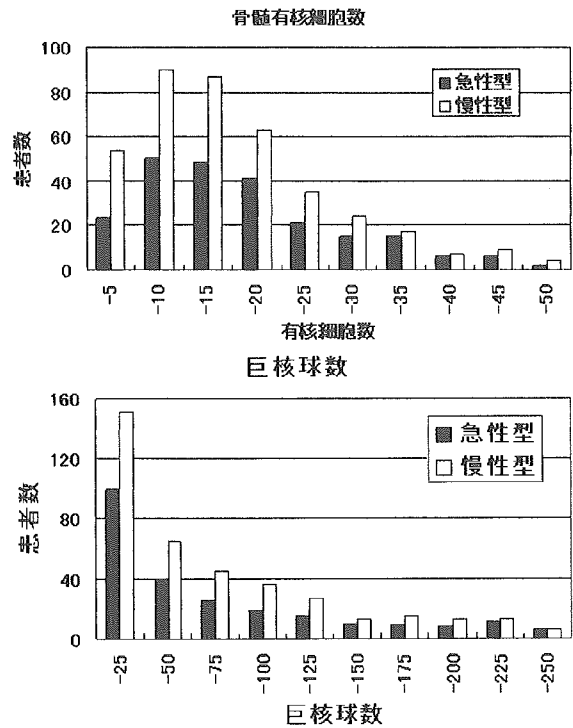


図7. 骨髄検査(新規症例)

上が有核細胞数、下が巨核球数の分布である。有核細胞数では急性型、慢性型とも過半数の症例が減少していた。正常あるいは増加している症例は約4割の症例にとどまっていた。また巨核球数も急性型、慢性型ともに減少している症例が多かった。

### 8) PAIgG

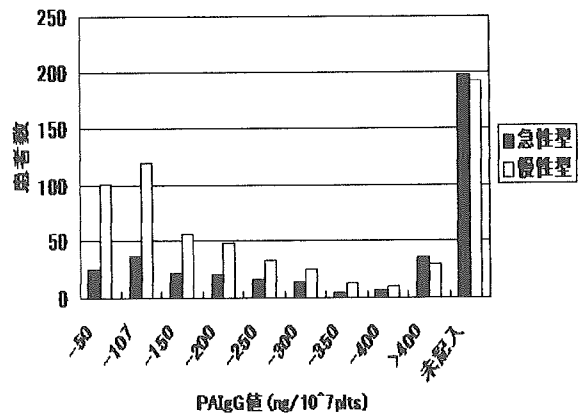


図8. PAIgG値(新規症例)

PAIgG 値の分布を図8に示す。

多くの症例（急性型で 50%、慢性型で 70%の症例）で PAIgG は測定されていた。PAIgG が増加している (>107ng/10<sup>7</sup>plts) 症例が急性型で 66%、慢性型で 49%に認められた。

### 9) 治療

新規症例において試みられた治療法を図 9 に示す。

上が急性型、下が慢性型の分布である。急性型ではプレドニン治療が 70%の症例において試みられていた。次いで大量 IgG 療法、ピロリ除菌と続いていた。一方、慢性型ではプレドニン治療が 53%の症例に試みられていた。次いでヘリコバクタピロリ除菌療法（ピロリ除菌）、大量 IgG 療法が実施されていた。

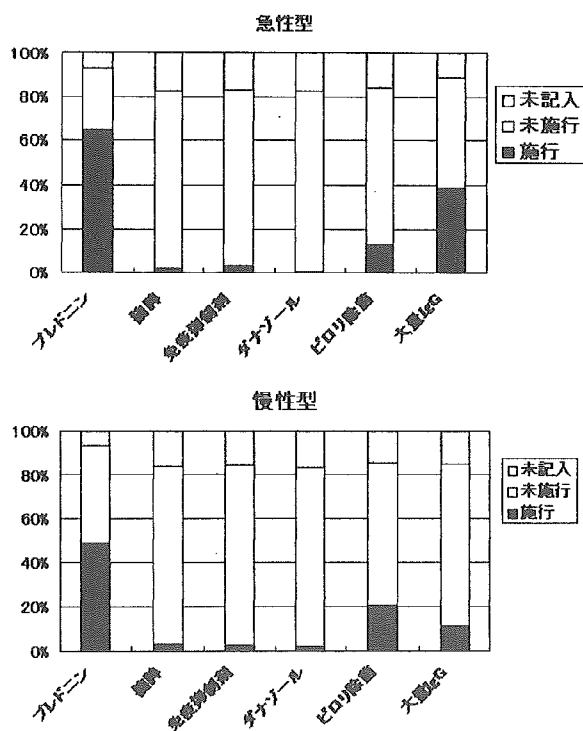


図9. 選択されている治療法(新規症例)

### 10) 生活状況

ITP 患者の生活状況を図 10 に示す。

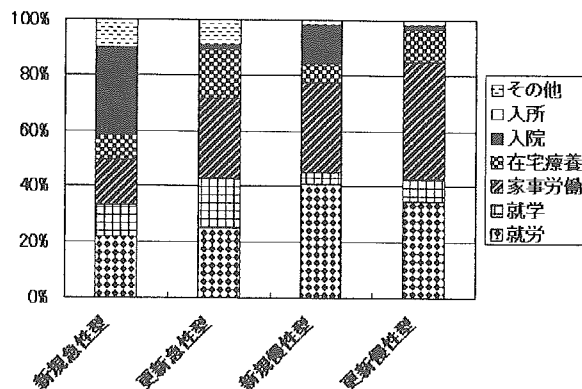


図10. 生活状況

新規患者で急性型では約 3 割が入院していた。就労、就学、家事労働など日常生活が行なえている患者は約半数であった。一方、更新患者で急性型では入院している症例はごく一部で約 7 割の症例は日常生活を保っていた。

新規患者で慢性型では入院が約 15%、8 割弱の症例は日常の生活を維持していた。更新患者では急性型、慢性型ともに入院中の症例はごく一部で大半の症例が日常生活を維持していた。

### 11) 受診状況

受診状況を図 11 に示す。

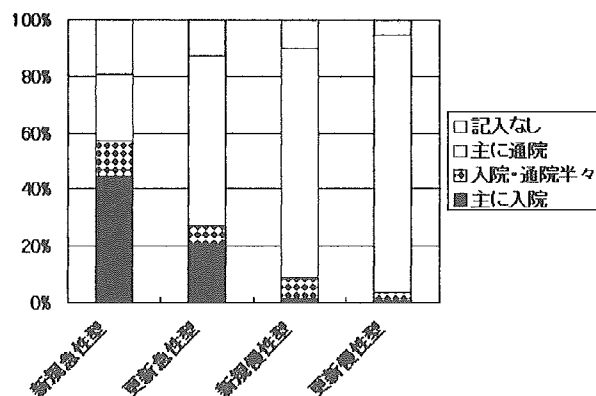


図11. 受診状況

新規患者で急性型では主に入院とする症例が半数弱の症例にみられた。更新患者に

においても急性型の患者は入院が約2割であった。一方、慢性型の症例では新規、更新患者とも大半の症例が主に通院という結果であった。

#### 4. 考察

##### 1) 推計方法

今回得られたデータは全国の患者のデータではなく、一部の道府県のデータが欠如していた。そのため得られていた患者実数をもとに人口比で全国の患者数を推計した。ITPの発症に地域差が存在すればこのような推計は成立しないが現在まで地域差があるとの報告は見当たらないため大きな問題はないと考えている。

##### 2) 過去の成績との比較

今回の調査でITPの発症頻度は10万人あたり1.25人であった。昭和49年の全国調査では10万人あたり1.47人～3.30人と報告されている。また最近では高知県でのITP発症数は2.28人(2001年～2002年)であったと報告されている。欧米においても発症頻度の報告がありデンマークでは2.68人(1973年～1995年)、イギリスでは1.6人(1993年～1999年)と報告されており、ほぼ日本人と同じ発症頻度であった。

更新患者数は今回の調査では全国で16,450人と推計された。10万人あたりでは12.89人であり、新規発症者数の約10倍であった。昭和49年の全国調査では10万人あたり5.5人～11.5人と報告されており、患者数は少し増加しているのかも知れない。

##### 3) 新規症例の年齢分布

新規申請症例の年齢分布を過去(昭和49年と昭和59年)と比較した成績を図12に示す。

昭和49年では5歳以下の小児と女では20歳～30歳にピークがあったが、昭和59年

では小児のピークとともに20歳～40歳、45～49歳にもピークがみられている。今回の調査では発症年齢のピークが高齢者に大きくシフトしていた。人口の高齢化とともに高齢発症のITPが今後増加するものと推察される。

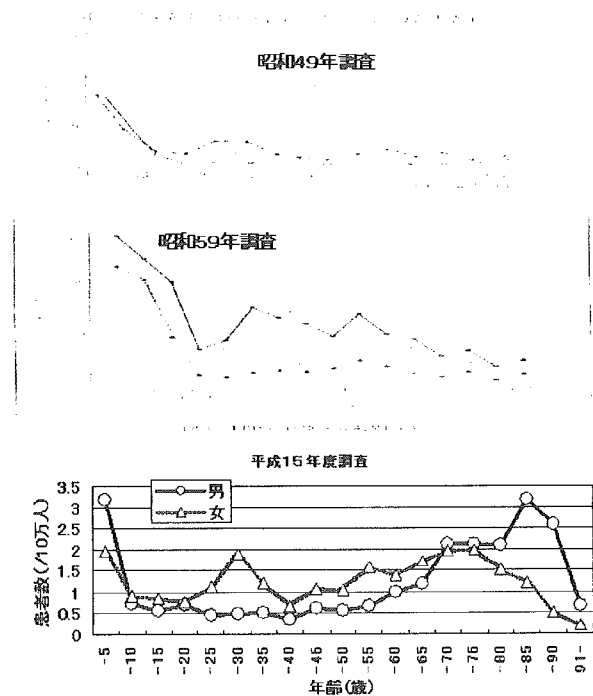


図12. 性・年齢別新患発生数

##### 4) 更新症例の年齢分布

更新症例の年齢分布を過去(昭和49年)の成績と比較した成績を図13に示す。

昭和49年では20歳～40歳の女に発症のピークがある。しかしながら今回の調査では20歳～40歳のピークは小さく60歳～85歳の高齢に男女ともピークを認めた。高齢で発症したITP症例が長期にわたって経過観察されている結果と考えられた。

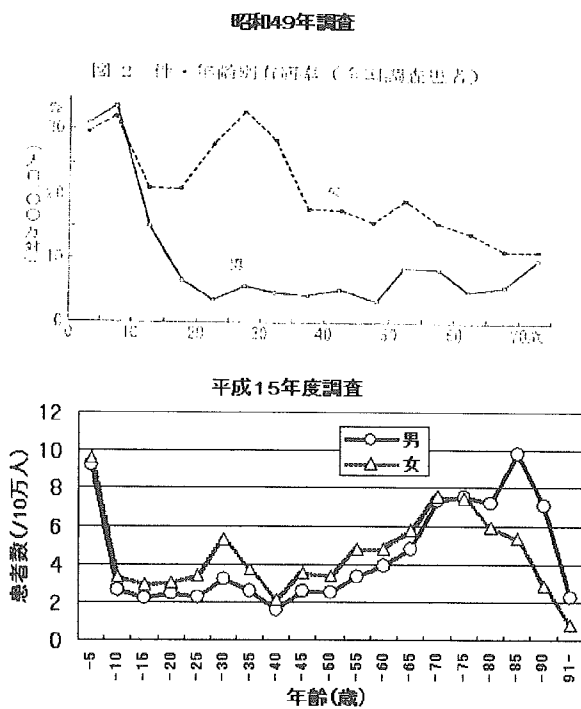


図13. 性・年齢別患者数

### 5) 血小板数

新規患者では血小板数  $1 \text{ 万}/\mu\text{l}$  以下の症例が多かった。一方、更新患者では治療などにより軽快し、血小板数は  $10 \text{ 万}/\mu\text{l}$  以上の症例が多かった。

### 6) 骨髄検査

骨髄検査で有核細胞数、巨核球数ともに減少している症例が多かった。ITP の診断基準では有核細胞数、巨核球数ともに正常あるいは増加していることとなっている。しかしながら骨髄穿刺検査では末梢血の混入などの技術的な問題があり正確な細胞数を反映しないことが多い。有核細胞数、巨核球数が低いからといって ITP を否定することはできないであろう。

### 7) ピロリ除菌と大量 IgG 療法

急性型ではプレドニンに続き大量 IgG 療法が選択されていた。急性型では出血症状が強いことと小児が多いことから大量

IgG 療法が選択されたと思われる。慢性型ではプレドニンに続いてピロリ除菌が実施されていた。ピロリ除菌療法は現在の ITP 治療ガイドラインに含まれておらず、保険適応もないが多くの症例ですでに実施されていた。早期の保険適応、治療ガイドラインの改定が必要であると思われる。

### 8) 生活状況・受診状況

急性型では入院症例が多かった。出血傾向が高度のためと思われる。更新症例では入院中の症例は殆どなく大多数の症例が入院せず、外来通院で加療されていた。

### 5. 結論

今回の調査では ITP の発症頻度は昭和49年調査と変わらなかった。しかしながら発症年齢分布では大きく異なっており、高齢者での発症が増加していた。また罹病患者の年齢分布においても高齢者に大きくシフトしていた。

### 6. 健康危険情報

特になし。

### 7. 研究発表

#### 1) 論文発表

- 長谷川 稔、西川政勝、野村昌作、田窪孝行、末廣 謙、西郷勝康、林 邦夫、玉木茂久、水谷 実、上村泰弘、倉田義之、ITP 研究会：特発性血小板減少性紫斑病に対するステロイド治療の骨量への影響。臨床血液、46; 121-126, 2005.
- 倉田義之：抗血小板抗体。臨床検査ガイド 2005~2006 これだけは必要な検査のすすめかた・データのよみかた。p684-685, Medical Practice 編, 集委員会編、文光堂, 2005.
- Fujimura, K, Kuwana, M, Kurata, Y,

- Imamura, M, Harada, H, Sakamaki, H, Teramura, M, Koda, K, Nomura, S, Sugihara, S, Shimomura, T, Fujimoto, TT, Oyashiki, K, Ikeda, Y: 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 Hematol*, 81; 162-168, 2005.
- 倉田義之：血小板著減検体における正確な血小板数測定法の確立に関する研究—血小板測定への破碎赤血球の影響についての検討—。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 平成16年度 総括・分担研究報告書、p70-77, 2005.
  - 倉田義之：特発性血小板減少性紫斑病の病態、診断、治療法に関する研究（3年間の総括）。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 平成14～16年度 総括・分担研究報告書、p82-85, 2005.
  - 倉田義之：血小板抗原・抗体の臨床的意義。血小板及び顆粒球抗原・抗体の臨床と技術、日本血小板・顆粒球ワークショップ編、p36-45, 2005.
  - 倉田義之：*Helicobacter pylori* 感染とITPの関連を解析する—網状血小板・トロンボポエチンより。*Helicobacter Research*, 9; 305-311, 2005.
  - Kashiwagi, H, Shiraga, M, Kato, H, Kamae, T, Yamamoto, N, Tadokoro, S, Kurata, Y, Tomiyama, Y, Kanakura, Y: Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A. *Blood*, 106; 913-921, 2005.
  - 林 悟、西山美保、城崎 潔、富山佳昭、倉田義之：血小板寒冷凝集素により偽性血小板減少症を呈した1例。臨床病理、53; 703-707, 2005.
  - 倉田義之：ITP。血液疾患—state of arts Ver.3 医歯薬出版、p744-747, 2005.
  - Shiraga, M, Miyata, S, Kato, H, Kashiwagi, H, Honda, S, Kurata, Y, Tomiyama, Y, Kanakura, Y: Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost*, 3; 2315-2323, 2005.
  - 西山美保、林 悟、二日市良彰、末久悦次、倉田義之：破碎赤血球出現例において自動血球計数器でみられる血小板数偽性高値の主因は破碎赤血球である。臨床病理、53; 898-903, 2005.
- ## 2) 学会発表
- 西山美保、林 悟、二日市良彰、末久悦次、倉田義之：XE-2100による幼弱血小板の測定。2005年7月30日—31日 第6回日本検査血液学会学術集会（長崎）
  - 柏木浩和、白鹿正通、加藤 恒、田所誠司、釜江 剛、山本直子、倉田義之、富山佳昭、金倉 謙：Semaphorin 3Aはアゴニスト刺激によるRac1を介した血小板アクチン再構成を阻害する。2005年9月17日—19日 第67回日



本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会・合同総会（横浜）

- 加藤 恒、柏木浩和、白鹿正通、田所誠司、釜江 剛、宮田茂樹、本田繁則、山本順一郎、倉田義之、船橋 徹、下村伊一郎、富山佳昭、金倉 譲：アディポネクチンノックアウトマウスを用いたアディポネクチンの抗血栓作用の検討。2005 年 9 月 17 日－19 日 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会・合同総会（横浜）
- 釜江 剛、白鹿正通、山本直子、加藤 恒、田所誠司、柏木浩和、倉田義之、富山佳昭、金倉 譲：インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化維持機構に P2Y12 依存性シグナルが重要である。2005 年 9 月 17 日－19 日 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会・合同総会（横浜）
- 倉田義之、林 悟、西山美保、二日市良彰、末久悦次、富山佳昭：ITP と再生不良性貧血鑑別診断における網状血小板測定 2 法、FCM 法と XE-2100 による自動測定法の比較検討。2005 年 9 月 17 日－19 日 第 67 回日本血液学会・第 47 回日本臨床血液学会・合同総会（横浜）
- 林 悟、西山美保、倉田義之：網状血小板測定 2 法の比較検討：FCM 法と XE-2100 による自動測定法。2005 年 11 月 17 日－20 日 第 52 回日本臨床検査医学会総会（福岡）
- 釜江 剛、白鹿正通、秋山正夫、山本直子、加藤 恒、田所誠司、柏木浩和、倉田義之、富山佳昭、金倉 譲： $\alpha$ IIb $\beta$ 3 活性化維持機構における P2Y12 の重要性－Rap1b の関与－。2005 年 11 月

23 日－25 日 第 28 回日本血栓止血学術集会（福岡）

- Kashiwagi, H, Shiraga, M, Kato, H, Kamae, T, Yamamoto, N, Tadokoro, S, Kurata, Y, Tomiyama, Y, Kanakura, Y: Negative Regulation of Platelet Function by a Secreted Cell Repulsive Protein, Semaphorin 3A. 20th ISTH Congress, 6-12 th Aug, 2005. (Sydney)
- Kato, H, Kashiwagi, H, Shiraga, M, Tadokoro, S, Kamae, T, Honda, S, Miyata, S, Yamamoto, J, Kurata, Y, Funahashi, T, Shimomura, I, Tomiyama, Y, Kanakura, Y. Enhanced Platelet Aggregation and Thrombogenic Tendency in Adiponectin-Deficient Mice. 20th ISTH Congress, 6-12 th Aug, 2005. (Sydney)
- Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, Kato H, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y: Critical Role of Endogenous ADP Via P2Y12 Receptor in Maintenance of  $\alpha$  IIb $\beta$ 3 Activation. 47<sup>th</sup> ASH Annual Meeting, 10-13<sup>th</sup> Nov 2005. (Atlanta)

## 肝疾患における ADAMTS13 動態解析

分担研究者 藤村 吉博 奈良県立医科大学 輸血部 教授

協力者 松本 雅則 奈良県立医科大学 輸血部 講師

### 研究要旨

私共の研究グループは、昨年、ADAMTS13の肝臓での産生細胞が星細胞（旧伊東細胞）であることを明らかにした。本年は、肝疾患におけるADAMTS13活性について検討するため、アルコール性肝疾患と生体部分肝移植症例でのADAMTS13動態について検討した。

まず、アルコール性肝炎(AH) 28例と重症アルコール性肝炎(SAH) 5例では、ADAMTS13活性は、AH極期62%、SAH極期24%とSAHで著明な低下を認めた。VWF抗原は、AH極期で405%、SAH極期では806%と著増しており、VWF/ADAMTS13比を検討すると、AHで8.9、SAHでは102と著増していた。極期と治療後を比較すると、生存例では治療後にはADAMTS13活性が上昇し、VWF抗原量が低下しているのに対し、死亡例ではADAMTS13活性は上昇せず、VWF抗原量は高値のままであった。

次に、生体部分肝移植例3例では、全例ADAMTS13活性は肝移植直後で著減していた。ADAMTS13活性が移植後7日目に3%未満低下した症例1では、VWF抗原が368%と著増しUL-VWFmが確認された。同時に、血小板が2.4万/u1まで低下したが、血小板輸血は行わず、新鮮凍結血漿(FFP)の輸注のみで治療を行い、軽快した。このように、肝移植後に血小板減少が認められる機序として、ADAMTS13の関与が示唆され、肝移植後の血小板減少時には血小板輸血ではなく、FFPの輸注もしくは血漿交換が有効であることが示された。

### A. 研究目的

我々は、独自に作成した ADAMTS13 モノクローナルを用いた免疫組織学的検討で、ADAMTS13 の産生細胞が肝星細胞であることを明らかにした (Uemura M, et al. Blood 106:922-924, 2005)。その後、慢性肝疾患の病状の進展に伴い ADAMTS13 活性が低下する

ことを確認した。今回、アルコール性肝疾患と生体部分肝移植症例での ADAMTS13 活性を測定し、同酵素の病態への関与について検討した。

### B. 研究方法

対象は、アルコール性肝炎(AH)28例と重症アルコール性肝炎(SAH)5例、

および当院で生体部分肝移植を実施した3例である。これらの症例で、ADAMTS13活性、VWF抗原量およびVWFマルチマー解析を行った。ADAMTS13活性測定は、マルチマー法および一部ELISA法で測定した。VWF抗原量は、ELISA法で測定した。VWFマルチマー解析は、unusually large VWF multimerを確認するため、SDS-0.9% agarose電気泳動で行い、一部垂直型電気泳動装置を用いた方法でも検討した。

### C. 研究結果

アルコール性肝炎でのADAMTS13活性は、AH極期62%、SAH極期24%とSAHで著明な低下を認めた。VWF抗原は、AH極期で405%、SAH極期では806%と著増しており、VWF/ADAMTS13比を検討すると、AHで8.9、SAHでは102と著増していた(図1)。ADAMTS13活性値とVWF抗原量の関連を検討すると、ADAMTS13活性が低下するに従いVWF抗原量が上昇する負の相関が認められた(図2)。SAH極期では5例中4例にUL-VWFMが認められ、AHでADAMTS13活性が50%以下に低下している症例では9例中5例でUL-VWFMが認められた。極期と治療後を比較すると、生存例では治療後にはADAMTS13活性が上昇し、VWF抗原量が低下しているのに対し、死亡例ではADAMTS13活性は上昇せず、VWF抗原量は高値のままであった(図

3)。(Matsuyama T, et al. Alcohol Clin Exp Res, in press, 2006)。

次に、生体部分肝移植例について、1例目は27才の男性でBudd-Chiari症候群で兄をドナーとした生体部分肝移植が施行された。移植後血小板減少が進行し、移植前の8.3万/u1から、Day7で2.4万/u1となったため、ADAMTS13活性を測定した。同酵素は3%未満に著減しており、VWF抗原量が368%と著増していた。そこで、新鮮凍結血漿(FFP)をDay7-30まで連日4-20単位投与した。それによって、血小板輸血を一度も行うことなく、Day20には血小板が9万/u1まで上昇した(図4)。UL-VWFMは、移植前には認めなかったが、移植後に出現し、病状の悪化と関連していた(図5)。

2例目は、52才の男性で、成人型シトルリン血症のため、妻をドナーとした生体部分肝移植が行われた。ADAMTS13活性は移植前110%であったが、Day1には9%低下した。血小板数は、Day3に3.8万/u1まで低下したが、血小板輸血は行わず、FFP輸注のみでDay14に18.2万/u1まで上昇した。この症例は、移植後の経過は順調で、UL-VWFMは経過中一度も認めなかった。

3例目はB型肝硬変のため息子をドナーとして生体部分肝移植が施行された。ADAMTS13活性は移植前からB

型肝硬変のため 32%と低下していたが、Day2 には 14%まで低下し、血小板数 1.3 万/uI となった。以前の症例と同様に血小板輸血は行わず、FFP で治療した。Day13 に B 細胞性の GVHD が認められたが、順調に回復し、UL-VWFM は経過中に認めなかった。

肝移植症例の対照として、肝切除例 4 例で ADAMTS13 活性を測定したところ、全例ともに 20%以下に低下した症例は認めなかった (Ko S, et al. Liver Transplant, in press, 2006)。

(倫理面への配慮)

対象患者から、インフォームド・コンセントを得て、解析を行った。

#### D. 考察

アルコール性肝疾患では、ADAMTS13 活性低下、VWF 抗原上昇の ADAMTS13/VWF の不均衡が認められた。AH から SAH に病状が進行するに従い、この ADAMTS13/VWF の不均衡は増大した。また、同一患者でも、病状の悪化に伴って不均衡は増大した。このように ADAMTS13/VWF の不均衡は、微小循環障害をもたらし、病状の進行と密接な関連があることが予想された (図 6)。

生体部分肝移植後には、原因の明らかでない血小板減少が認められ、血小板輸血が行われている現状である。今回の我々の検討では、3 例全例

で移植後 ADAMTS13 活性が 20%未満に低下した。このうち、症例 1 は、同活性が 3%未満に著減し、UL-VWFM が認められた。血小板数は、最低値 2.5 万、3.8 万、1.3 万/uI まで低下したが、3 例とも血小板輸血は行わず FFP 輸注のみで軽快した。以上の経験より、肝移植後の血小板減少時には血小板輸血ではなく、FFP の輸注もしくは血漿交換が有効であることが示された。

#### E. 結論

アルコール性肝疾患や肝臓移植後では、ADAMTS13 活性の低下が認められ、これらの疾患の病態に同酵素の関与が示された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

#### 英文原著

1. Furukoji E, Matsumoto M, Yamashita A, Yagi H, Sakurai Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Morishita K, Fujimura Y, Tamura S, Asada Y. Adenovirus-mediated transfer of human placental ecto-ATP diphosphohydrolase I to vascular smooth muscle cells suppresses platelet aggregation in vitro and arterial thrombus