

## 特発性血栓症サブグループ研究報告

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	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
	辻 肇	京都府立医科大学

### 目的

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。

### 研究項目と役割分担

#### 日本人の血栓症の背景に関する調査研究

- (1) 日本人の静脈血栓症におけるプロテイン S 徳島変異に関する調査研究として、周産期領域での試料の収集：宮田
- (2) 日本人の静脈血栓症を consecutive に収集する
- (3) 日本人でのプロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの欠乏症の遺伝子変異の調査研究：小嶋

#### 日本人の静脈血栓症の治療に関する調査研究

- (1) ヘパリン自己注射に関する治療指針（案）：辻、全員
- (2) 静脈血栓塞栓症の予防・診断・治療ガイドライン（阪大）の完成：川崎
- (3) 本邦における静脈血栓症に対するワルファリン使用の実態調査研究：坂田

### 研究内容とこれまでの成果

#### 日本人の血栓症の遺伝的背景に関する調査研究

特筆すべき成果：日本人の静脈血栓症の遺伝的要因として、プロテイン S K196E 変異を同定。本変異は、約 55 人に 1 人に見られる。白人種にはなし。

#### 日本人の静脈血栓症の治療に関する調査研究

特筆すべき成果：ヘパリンの在宅注射に関するアンケート調査を実施した。血栓性素因を有する妊娠経過中の抗凝固療法などにおいて、本ヘパリン療法は不可欠であり、その有効かつ安全な実施ガイドラインが強く望まれた。

## TMA 研究班サブグループ研究報告

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
	村田 満	慶應義塾大学医学部
	和田英夫	三重大学医学部

血栓性微小血管障害症(TMA)は細血管障害性溶血性貧血、破壊性血小板減少、そして血小板血栓による臓器機能障害を3主徴とする病態で、これに含まれる疾患として代表されるのが血液難病である血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)と溶血性尿毒症症候群(HUS)である。本 TMA 研究班はこの病態の解析、診断、治療法の確立を目的としている。

まず本病態の解析・診断については、サブグループリーダーである藤村班員が所属している奈良医大輸血部で、同ホームページを介して集積された TMA 患者の血液検体と臨床症状を中心に行われてきたが、その登録患者数は過去9年間で740例となった(平成18年8月末)(研究補助員 松本雅則)。TMAには特発性(一時性)のものと、基礎病態に関連して起こるもの(二次性)があり、共に von Willebrand 因子切断酵素(ADAMTS13)の活性著減が病態に重要との事が示された例が全体の1/3を占めていた。このように ADAMTS13 活性測定は診断に重要且つ必須であるが、従来の測定法はその技術的難度が高く汎用化困難であった。これより、宮田班員ら(研究補助員 小亀浩市)は2004年に ADAMTS13 で切断される VWF 最小基質(VWF-A2 ドメインペプチド)を同定し、これを GST-VWF73-His と命名した。その後、彼らは合成 VWF73 基質に蛍光基と消光基を導入した FRETs-VWF73 測定法を確立し、同活性の測定迅速化に成功した。この測定法で得られた結果は従来の VWF マルチマー (VWFM) 法とも良く相関する事が欧米日の研究者により確認され、現在世界の研究室で使用される状況となっている。一方、最近、患者血漿中にヘモグロビン(溶血)やビリルビンが高濃度に含まれていると、既存の方法ではその測定が部分的に阻害されるとの事が指摘されるようになった。藤村班員ら(研究補助員 加藤誠司)は宮田班員らの GST-VWF73-His を基質に用い、一方でこの基質が ADAMTS13 で切断される事により新たに露出する断端アミノ酸 Tyr1605 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作成に成功し、これを用いた新規 ADAMTS13act-ELISA を完成した。また、この新規 act-ELISA は前記阻害物質の影響を殆ど受け無い事が示された。さらに FRETs-VWF73 蛍光基質は開発後間もなく市販されるようになり、またこれを用いた同酵素活性測定や、あるいは前記の新規 act-ELISA を用いた ADAMTS13 とそのインヒビター活性測定は、最近、本邦の複数検査会社が受託事業として請け負う体制ができ、一般臨床医が広く活用できるようになり、その測定の重要性が臨床医にも広く浸透するようになった。しかし、これら検査は未だ保健適応とはなっておらず、この厚生労働省の池田班からの提言により、速やかに「適応認可」がされる事を望む。

次に臨床面においては、後天性・定型的 TTP は ADAMTS13 自己抗体陽性の自己免疫性疾患であるとのコンセンサスが得られ、その血漿交換療法(PE)の有用性の EBM も確立されたかに思えるが、難治反復例のため頻回の PE が必要とされる例がある事(現行では保健適用は3回/週のみ)、またこれら難治例にキメラモノクローナル抗体である rituximab が卓効することも明らかになり、治療の選択、方法、回数などについても徹底した検証が必要とされる状況となっている。これらの意識変革は先天性疾患の病態解明についてもなされ、1960年以降、原因不明の先天性出血・血栓症とされた Upshaw-Schulman 症候群(USS)が ADAMTS13 活性を遺伝性に欠く先天性 TTP のカテゴリーに入る疾患である事が藤村班員らにより示されたが、彼らは既に本邦で同患者33名とそのファミリー(キャリアー)約50名を同定している。ヨーロッパからの最新情報では、欧州全体で USS 登録患者数は現在44名ということなので、人口比で本研究班が如何に多くの USS 患者を効果的に発掘・診断しているかが判る。このように本研究班が TMA 研究の進歩に果たした歴史的役割を顧みると、USS という新規疾患を、患者家族に代わって「難病」として厚生労働

省に申請し、認定して頂く事の責務を果たす義務がある事を痛感する次第である。

藤村班員はこの他、(1) USS 女性では妊娠を経験するとほぼ全例 TMA 症状を出現し、この態度は ADAMTS13 遺伝子 KO マウスとは根本的に異なる事、(2) 生体部分肝移植症例で、移植直後一早期に血小板減少と共に ADAMTS13 活性が著減する事を 3 例で観察し、これら症例に対して血小板輸血は行わず、血漿輸血のみで良好な成績が得られる事を示した。また重要な発見として、

(3) 生後 9 ヶ月から 1 才 7 ヶ月の乳幼児 5 例に見られた発熱後の血小板減少症が当初診断された「ITP」ではなく、ADAMTS13 自己抗体が陽性でしかもその持続期間が 6 ヶ月以上の長期という特徴を持つ特異的な後天性・定型的 TTP である事を明らかにし、新しい小児疾患のカテゴリーを発見した。さらに (4) 乳児期の症状発現、その反復性と家族性より先天性 TMA が疑われるも、ADAMTS13 活性が正常で、他の TMA 原因としての補体調節因子 Factor H の遺伝子解析を行い、その異常を確認した一家系を発見した (研究補助員 松本雅則、加藤誠司)。今迄に奈良医大輸血部で集積した TMA 患者の全検体の残り 2/3 は ADAMTS13 活性が軽度低下ないし略正常である事から、これら補体調節因子の解析を本研究班で取り扱う事は当初のスコープを遥かに超えるもので、TMA をカテゴリー別に解析する体制の整合性が求められている。

この他、村田班員はファージ・ディスプレイ法を用いた ADAMTS13 抗体のエピトープ解析手法を確立し、これを後天性 TTP の自己抗体の解析に応用することを、また和田班員は現在利用可能な内外の ADAMTS13 測定キットの臨床的有用性を検定した。和田班員はさらに全国の医療機関に患者実態について第一次アンケート調査を、またその後大規模アンケート調査が東邦大学のグループにより実施され、本邦の TMA 患者数の推計が行われた。

## ITP（特発性血小板減少性紫斑病）サブグループ研究報告

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

**目的：** 近年の ITP の実態を疫学調査から明らかにする。ITP の病態解析から導かれた診断基準の全国的普及の可能性を検討する。提案した新たな ITP 治療ガイドラインの検証を行いガイドラインの有用性を明らかにする。本邦における難治性 ITP の現状把握を行い、治療法の検討を開始する。

### これまでの成果と役割分担：

1. ITP 疫学調査（大阪大学 倉田先生）：今回は前回に行った平成 15 年度の解析に引き続いて平成 16 年度の全国的解析を特定疾患調査表に基づいて行った。基本的には平成 15 年度と変化はないが、新患発生が約 2 倍と増加し 10 万人当たり 2.56 となった。慢性型における新規発症例の年齢分布は平成 15 年度と同様で、昭和 40 年代における調査に比し中高齢者（50 歳台以降）に変移している。女性は 20～40 歳にも発症のピークが認められた。その他新規発症例の初診時血小板数、治療内容、生活状況などについても報告する予定である。
2. 新たな診断基準の作成（慶應義塾大学 桑名先生、SRL 降旗先生）：これまで提案してきた ITP の病態に則した新たな ITP 診断基準の全国的な実用化を目指して基礎的検討を行ってきた。特に抗血小板抗体産生 B 細胞を ELISPOT 法で測定する際の精度に関して SRL と慶応大学との間でダブルチェック方式により検討し良好な成績が得られた。現在同時並行で検討している幼若血小板とともに、検査制度等の最終確認を行っている。基礎研究としてピロリ除菌による血小板増加の機序について単球の機能、Fc R の発現状況の変化が関係している事を示した
3. 治療ガイドライン（広島国際大学 藤村）：除菌療法を組み入れた ITP 治療プロトコールに引き続き、難治例の治療ガイドラインを提案する目的で今年度は難治性 ITP 症例の実態調査をアンケート方式で行った。72 施設から 188 例が登録され男女比は 1：2.4、平均年齢は成人では男；58.1 歳（診断時年齢 45.7 歳）、女 54.8 歳（診断時年齢 41.6 歳）。初回治療は 64% が副腎皮質ステロイド単独、54% に摘脾が行われていた。この他 ITP の経過年数、摘脾までの期間、セカンドラインの治療、出血症状、死因などについても解析を行ったので報告する。

## 静脈血栓症/肺塞栓症グループ抄録

分担研究者： 信州大学医学部保健学科 小林隆夫  
研究協力者： 中村真潮 三重大学大学院循環器内科学  
佐久間聖仁 女川町立病院内科  
黒岩政之 北里大学麻酔科  
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

静脈血栓症/肺塞栓症グループでは、平成 17 年度に引き続き研究を継続しているものが 3 件、平成 18 年度から新たに調査研究を開始したものが 2 件である。継続研究としては、精神科領域の肺塞栓症発症調査、新潟中越地震後の深部静脈血栓症調査、日本麻酔科学会による周術期肺塞栓症の全国調査であり、新規研究としては、産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査および全国医療機関における深部静脈血栓症および肺塞栓症の前向き調査である。

## 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)／溶血性尿毒症症候群(HUS)の全国疫学調査

研究者： 杉田稔、伊津野孝 東邦大学医学部社会医学講座衛生学  
協力者： 池田康夫、村田満 慶應義塾大学医学部内科学  
藤村吉博 奈良県立医科大学輸血部  
官田敏行 国立循環器病センター研究所  
和田英夫 三重大学医学部臨床検査医学

緒言：近年、難病対策事業において対象疾患の見直しが求められている。そこで、特定疾患の疫学に関する研究班では、特定疾患治療研究事業対象疾患以外の特定疾患について、全国疫学調査を行い、臨床疫学像を明らかにしている。本研究では、血栓性血小板減少性紫斑病(thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)／溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome; HUS)の受療患者数の推計と臨床像の把握を目的として、血液凝固異常症に関する調査研究班と共同で全国疫学調査を行った。

研究方法：2004年1年間の受療患者を対象とし、診断基準とともに2005年1月に患者数調査のための第一次調査を実施した。対象としたのは難病疫学班が実施する全国疫学調査の標準的な方法により、全国の病院から抽出したりウマチ・膠原病科、内科、小児科、泌尿器科、救急科、透析科・腎センターとした。

対象 12,594 科から 3,301 科を抽出(抽出率 26.2%)し、先天性と後天性の患者数を質問した。一次調査で患者なしと回答した診療科には礼状を、患者ありと回答した診療科にはさらに患者の臨床疫学像を把握するための第二次調査を依頼した。

研究結果及び考察：調査対象数 3,301 科のうち 2,275 科(68.9%)から先天性 20 名、後天性 437 名計 457 名の報告があった。2004 年中の患者数は先天性 110 名(60-160 名)、後天性 2,420 名(2,080-2,760 名)と推計された。二次調査は 2005 年 4 月から 12 月にかけて、患者 457 名に対し行い、212 名分を回収した(回収率 46.3%、うち 1 名分無効回答)。

患者の年齢は先天性男性(N=6, M±SD=13.0±10.7, Range=2-33 歳)、先天性女性(N=4, M±SD=27.3±13.3, Range=18-47 歳)、後天性男性(N=71, M±SD=28.9±24.8, Range=1-80 歳)、後天性女性(N=130, M±SD=28.6±25.1, Range=0-90 歳)となった。

### 日本人の静脈血栓症患者の遺伝的背景：

プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの遺伝子変異は約 35%の患者に見られる

分担研究者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所・病因部・部長

目的：静脈血栓症の危険因子として、プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの先天性欠乏症が知られている。欧米での研究では、これらの欠乏症は静脈血栓症患者の3.2%、2.2%、1.1%に見られ、45歳以下の静脈血栓症や再発する静脈血栓症患者では1.4-8.6%、1.4-7.5%、0.5-4.9%に見られるという。本研究は日本人静脈血栓症患者のプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子をシーケンスし、機能に障害を与えると考えられるミスセンス変異などを同定し、日本人の静脈血栓症の遺伝的背景を明らかにする。方法：「厚生労働省科学研究費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」で収集した168名の日本人静脈血栓症患者を対象とする。プロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの各遺伝子の全エクソンをPCRで増幅し塩基配列を決定した。結果・考察：プロテインC遺伝子のシーケンスにより9個の機能に影響を与えると考えられる変異を同定した。これらの変異は、静脈血栓症患者の11%に相当する19名に見られた。なかでも、Lys193欠失とV339Mは4名、R348Qは3名に同定された。プロテインS遺伝子のシーケンスにより13個の機能に影響を与えると考えられる変異を同定した。このうち、K196E変異は13名、V87Lは2名に見られた。アンチトロンビン遺伝子のシーケンスにより11個の機能に影響を与えると考えられる変異を同定した。なかでもミスセンス変異は10種あり、これらはいずれも1人だけに同定された。したがって、ミスセンス変異の保有者は、静脈血栓症の7%に相当する12名であった。以上、168名の静脈血栓症患者のプロテインC、プロテインS、アンチトロンビンの遺伝子のシーケンスにより、患者の11%、17%、7%、即ち、合わせると約35%の患者が3つの遺伝子のいずれかに、アミノ酸配列レベルで変化を伴う変異を有していた。また、変異保有者は非保有者に比べ、DVTを若年で発症していた ( $p=0.025$ )。

## 肺血栓塞栓症の予防戦略

### —診療とガイドラインと遺伝子解析のあるべき姿—

分担研究者：川崎 富夫 大阪大学医学部

肺塞栓症研究会が各学会名でガイドラインを配布している。最近、この通りの予防が行われなかったことを理由に医療訴訟が発生している。これを受けて、弾力ストッキングの着用厳守や低分子量ヘパリンの導入などが求められるに至っている。一方、さらにこのガイドラインが発表される以前、2003年12月、から大阪大学病院は独自で作成した血栓症予防・診断・治療ガイドラインを運用している。遺伝子解析対象例の臨床情報の収集と診断治療の最適化による効果が確認され、当初の目的を達した。そして、少なくともこれまで約3万人の入院患者を対象とした大阪大学の結果では、低分子量ヘパリンの導入が必要不可欠であるという結論は得られていない。さらに、弾力ストッキングの着用対象者も制限する方向で検討を始めようとしている。今後の厚生労働省の決定をゆるぎないものとするためには、我々は各予防手段の必然性と血栓症の予防対費用効果比を明らかにする必要がある。また、本調査研究事業では日本の遺伝学的な血栓症危険因子が欧米と異なることが明らかになった。だが、血栓症の発生と病態とその病態と予防にどのような特異的影響があるのかについてはまだ明らかでない。本研究では、厚生労働省研究班としての『診療とガイドラインと遺伝子解析のあるべき姿』について、今後の方向性を示したい。



## 本邦における静脈血栓症に対するワルファリン使用のアンケート調査

坂田洋一、○窓岩清治 自治医科大学医学部分子病態研究部

本邦の静脈血栓塞栓症予防ガイドライン2004年度版では、静脈血栓症の再発や進展予防に対するワルファリン療法について、危険因子の強度や持続性、および再発の有無を考慮した投与方法が提言されている。しかしながら実際の抗凝固療法を施行している医療機関において、ワルファリンの投与量および投与期間、あるいは治療中の合併症などについての詳細は、必ずしも十分に明らかにされていない。静脈血栓症に対する日本人に適したワルファリン療法を確立するためには、このようなワルファリン使用の現状を把握することは極めて重要であり、適正使用の指針づくりのための基礎データを収集する意義は深い。アンケート調査の対象は、先天性および後天性要因による静脈血栓塞栓症症例でワルファリン療法を施行している大学付属病院本院及び500床以上の一般病院の血液内科・循環器内科・心臓血管外科・産婦人科施設（1269件）と、血栓症研究の主導的立場を担う日本血栓止血学会評議員（199件）の合計1468件とした。調査項目は、ワルファリンの抗凝固能の指標を設定するための検査方法（プロトロンビン時間 INR 値、トロンボテスト）およびその指標値、血栓症分子マーカー（Dダイマー）の併用の有無と検査間隔である。さらに危険因子（先天性、後天性）によるワルファリン使用期間との関連、ワルファリン使用時の併用薬（とくに抗血小板剤）と指標設定値との関係、観血的処置（特に抜歯）時の対応、およびワルファリン使用中の出血例および血栓症再発例の有無などを調査した。（本アンケート票は、平成19年1月31日を返信期限とし、平成18年12月15日に発送された。）

今後の展開としては、この結果を基に、出血という副作用の形でひとまとめにされているワルファリンによる出血の実態をさらに検討する予定である。つまり、実際はワルファリンが不足で血栓が生じ、梗塞後出血を助長したのか、純粹に過量であったのか、だとすればその出血の契機は何かまで解析したいと考えている。

## 妊娠を契機に深部静脈血栓症を発症した先天性 AT 欠損症の分子病態解析

小嶋哲人 名古屋大学医学部保健学科

【目的】アンチトロンビン (AT) 欠損症は、先天性血栓性素因となるまれな疾患である。今回、我々は妊娠中に深部静脈血栓症を発症し AT 欠損症と診断された 4 症例において、AT 欠損症の分子病態解明を目的に AT 遺伝子変異同定解析を行い、さらに同定した変異 AT 分子の *in vitro* 発現解析を行った。

【方法】IC 取得後、患者末梢血白血球より DNA を抽出し、AT をコードする各エクソンおよびそのイントロンとの境界領域について PCR を用いたダイレクトシーケンシング法にて解析を行った。また、同定した各 AT 遺伝子変異を AT cDNA に導入して発現ベクターに組み込み、HEK293 細胞での発現解析を行った。

【結果および考察】症例 1 では一塩基置換 (T346C) を認め、これはヘパリン結合ドメインに位置する既報のミスセンス変異 (Ser116Pro/AT Nagasaki) であった。症例 2 ではやはり既報のミスセンス変異 (Met-32 Thr) の一塩基置換 (T2C) を認めた。症例 3 では一塩基欠失 (47Tdel) を認め、この変異はフレームシフトを起こして-16Tyr 以降が 13 個の異常アミノ酸配列に置換する新規変異 (FS-3Stop) であった。症例 4 では新規のミスセンス変異 (Ala59Val) の一塩基置換 (C2640T) を認めた。それぞれの変異 AT 発現実験の結果、Ser116Pro 変異および Ala59Val 変異 AT は野生型 AT と同様培養上清中に分泌されたが、Met-32Thr 変異ならび FS-3Stop 変異 AT は変異蛋白をほとんど検出できなかった。分泌された Ser116Pro 変異および Ala59Val 変異 AT の機能解析の結果、前者はヘパリン親和性の低下、後者はヘパリン親和性およびプロテアーゼ阻害活性はほぼ正常であるが、ヘパリンコファクター活性は著しく低下し、ヘパリン結合後の立体構造変化異常による活性低下が推測された。以上より、今回同定された変異はいずれも AT 欠損症の原因と思われた。

## 「ヘパリンの在宅自己注射に関する」治療指針（案）

辻 肇 京都府立医科大学

前回、特発性血栓症の予防（および再発予防）法の確立を目的として、大学附属病院(78)およびベッド数500床以上の一般病院(238)の専門医(計1,265名)を対象に実施した「ヘパリンの在宅自己注射に関する」アンケート調査結果のまとめを報告した。この調査において、対象者全体の51%において、ヘパリンの在宅自己注射の必要性が認められたが、実際に行っているものは、8%に過ぎなかった。その理由として、保険適応がない、投与方法に関するエビデンスや指針がない、また出血性副作用に対する危惧などが挙げられた。今回、治療指針のないことが、ヘパリンの在宅自己注射実施の障害のひとつと考えられたため、アンケート調査結果のまとめを踏まえて、「ヘパリンの在宅自己注射に関する」治療指針（案）の設定を試みた。

また、ヘパリンの在宅自己注射により無事出産し得た特発性血栓症のひとつである先天性アンチトロンビン欠損症の例を供覧し、ヘパリンの在宅自己注射が必要不可欠な治療法であり安全かつ有効に実施し得ることを提示する。

## 肝移植症例における ADAMTS13、フォンウイルブランド因子、破碎赤血球の変動についての検討

○和田英夫<sup>1,2</sup>、小林稔彦<sup>1</sup>、登 勉<sup>2</sup>、森 美貴<sup>3</sup>、白井正信<sup>4</sup>、伊佐地秀司<sup>4</sup>、上本伸二<sup>4</sup>  
三重大学大学院医学系研究科<sup>1</sup>血液・腫瘍内科、<sup>2</sup>臨床検査医学、<sup>4</sup>肝胆膵外科、<sup>3</sup>三重県血液センター

【目的】近年、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の原因分子として、ADAMTS13 が同定されたが、この ADAMTS13 は骨髄移植後や肝移植後の VOD(veno-occlusive disease)や TMA(thrombotic microangiopathy)にも関与するとされ、注目を受けている。今回、肝移植前後の ADAMTS13、Von Willebrand factor (VWF)、破碎赤血球 (FRC) の変動を測定し、病態との関係を検討したので報告する。

【方法】対象症例は 81 例の肝移植例 (女:男=35:46) で、その基礎疾患は肝癌 24 例、ウイルス性肝炎・肝硬変 20 例、原発性胆汁性肝硬変 11 例、その他の原因による肝硬変・重症肝炎 10 例、先天性胆道閉鎖症 7 例、胆汁うっ滞 6 例、その他 3 例であった。ADAMTS13 活性ならびに VWF 抗原の測定は、それぞれ FRETS-VWF73 ならびにバイダスアッセイキット vWF によりおこなった。FRC の測定は全自動血球計測器 (XE-2100) にて行った。

【結果】FRC は肝移植後で高頻度に高値を呈し、多くの症例は移植後 14-28 日に増加を示した。一方、ADAMTS13 は術後 1 日目で全例著しい低下を示し、7 日目には増加を示すが、TMA 合併例では 14 日以降も著しい低値を示した。VWF 抗原は移植前より高値を示し、移植後種々の変動を呈したが、ADAMTS13 低値例では VWF 抗原はより増加傾向を示した。

【考案】以上、肝移植後の TMA の診断に、ADAMTS13、VWF 抗原、FRC の測定は有用と考えられた。

## ADAMTS13 活性測定の実状

藤村吉博、○加藤誠司、松本雅則 奈良県立医科大学 輸血部

従来の ADAMTS13 活性の測定法は、煩雑な手技と長い反応時間から汎用性を欠くという問題点があった。2004 年に国立循環器病センターの小亀らにより ADAMTS13 で切断される最小基質は、VWF A2 ドメインの 73 アミノ酸残基 (VWF73) であることが明らかにされた。その後彼らは、化学合成により VWF73 に蛍光基と消光基を導入した FRET-S-VWF73 を開発した。この方法は 1 時間で測定が可能であり、かつ VWF マルチマー法との相関も良いことから世界中の研究室で使用され、高い評価を受けている。奈良医大においても、ADAMTS13 の切断により新たに露出する断端アミノ酸 Tyr 1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、大腸菌発現の基質 (GST-VWF73-His) を使用した ADAMTS13act-ELISA を構築した。本法は、VWF マルチマー法と良好な相関を示し、正常血漿の 0.5% まで測定可能と高感度であり、かつ汎用の機器で測定が可能である。従来の活性測定法では、ヘモグロビン (溶血) やビリルビンが高濃度に含まれるとその測定が阻害されるとの報告がある。ADAMTS13act-ELISA においては、ヘモグロビンで 500mg/dL まで、ビリルビン (遊離型、包合型ともに) で 50mg/dL まで測定系自身の阻害は無いことを確認した。FRET-S-VWF73 の基質およびそのキット、また ADAMTS13act-ELISA のキットが市販されるようになり、さらに最近、複数の検査センターによって外注検査の体制が構築されている。当研究班の ADAMTS13 および TMA の研究成果によって、一般臨床医にも ADAMTS13 活性測定の重要性が認識されつつあるが、今後更なる普及のためには、早期に ADAMTS13 活性測定が保険診療として認可されるように努力する必要がある。

## ファージディスプレイ法による ADAMTS13 のエピトープ解析

班 員 村田 満（慶應義塾大学医学部中央臨床検査部）

研究協力者 森木隆典（慶應義塾保健管理センター）

ファージディスプレイ法は、ファージ表面上に結合した形で極めて多数の異なるアミノ酸配列を有するペプチドを発現させ、リガンドと結合するファージをスクリーニングし、選別されたファージにクローニングされている遺伝子配列を検索することにより、リガンドと結合する蛋白ペプチドのアミノ酸配列を決定する極めて有用な方法である。

我々は ADAMTS13 cDNA を断片化し、対応するペプチドを表面に発現したエピトープライブラリーの作成に成功した。マイクロタイタープレートに抗 ADAMTS13 抗体（マウス、ラビット）、VWF などのリガンド、TTP 患者由来血漿などを固相化し、本エピトープライブラリーをスクリーニングすることにより、ADAMTS13 内の結合エピトープを得る。

抗 ADAMTS13 抗体および VWF に関しては、エピトープと考えられるアミノ酸配列の情報がもたらされた。現在、TTP 患者血漿を用い、自己抗体のエピトープを解析中である。

## 「難治性 ITP の実態 —平成 18 年度アンケート調査のまとめ—」

藤村 欣吾 広島国際大学 薬学部

目的：難治性 ITP に対する臨床的介入を計画するために本邦症例の実態を明らかにする。

方法：第 1 次難治性 ITP アンケート調査に因る数的把握に基づき、各症例の実態を明らかにするために第 2 次アンケート調査を行い解析する。

結果：72 施設から 188 例の回答を得、以下の項目について解析を行った。(回収率 66%)

1. 性別：男性 54 例性、女 132 例、不明 2 例 男女比 1 : 2.44
2. 調査時年齢：女性 18 歳以下 6 例、18 歳以上 126 例 平均 54.8 歳  
男性 18 歳以下 3 例、18 歳以上 51 例 平均 58.1 歳  
ITP 診断時平均年齢：女性 18 歳以上 41.6 歳 18 歳以下の発症 8 例  
男性 18 歳以上 45.7 歳 18 歳以下の発症 4 例
3. 初回治療：ステロイド単独療法が 121 例 (64.4%) で最も多く、他はステロイドに他の治療が併用され、97%がステロイドを基軸とした治療がなされていた。
4. 摘脾：101 例 53.7% に行われている。
5. 診断後から摘脾までの期間は半数以上が 3 年以内に行われ、1 年以内の摘脾が最も多い。
6. その他の治療：IVI gG, 除菌、ダナゾール療法などが行われている頻度が高く、ついでパルス療法や免疫抑制療法が行われている。
7. 出血症状：脳出血 13 例 (6.9%), 他の臓器出血 29 例 (15.4%) に認められ消化管出血が 50%以上を占めていた。  
最近 6 ヶ月の出血については 74%に皮下出血が、46%に粘膜出血が認められている。
8. 観察期間：平均 12.4 年で 20 年以上経過を追跡されている症例は 38 例であった。
9. 合併症：60%に認められ、糖尿病、高血圧、高脂血症が多く治療に起因している。

まとめ：難治性 ITP は中高年に多く、長期間経過を観察されており、この間各種治療が可能な範囲で試みられていることが明らかとなった。また重篤な臓器出血を来した症例が 22%以上に認められ、また日常的にも皮下、粘膜出血を来している症例が多く、QOL に影響していることが伺えた。

## ITP における *Helicobacter pylori* 除菌効果発現機序の解析

池田康夫 ○桑名正隆 慶應義塾大学内科

ITP の病態における *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の役割を追究するため、*H. pylori* 除菌の自己免疫応答、血小板回転、単球フェノタイプに与える影響を検討した。成人 ITP34 例 (*H. pylori* 陽性 23 例) を対象とし、*H. pylori* 感染の有無にかかわらず全例で標準的除菌療法を施行した。0, (1), 12, 24 週後の血小板数、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体、GPIIb/IIIa に対する T 細胞増殖反応、網状血小板比率、血漿トロンボポエチン、末梢血単球における活性型 Fc $\gamma$ RI, 抑制型 Fc $\gamma$ RII, CD86 発現レベルおよび非特異的貪食能を調べた。単球における Fc $\gamma$ RIIB/IIA 発現比は定量的 PCR により評価した。【成績】*H. pylori* 陽性全例で除菌に成功し、うち 13 例 (57%) が血小板反応例であった。一方、*H. pylori* 陰性 11 例はすべて無効例であった。除菌療法前には *H. pylori* 陽性例は陰性例に比べて単球における Fc $\gamma$ RI 発現と貪食能が高く、Fc $\gamma$ RII の発現が低かった。各指標の除菌療法後の経時的な変化を調べると、*H. pylori* 陽性反応例でのみ抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体、網状血小板比率、単球での Fc $\gamma$ RI 発現と貪食能が減少し、Fc $\gamma$ RII 発現が増加した。*H. pylori* 陽性反応例の除菌 1 週目に有意な変化を示したのは血小板数と単球の貪食能のみであった。単球の Fc $\gamma$ RIIB/IIA 比は *H. pylori* 陽性例で陰性例に比べて高く、除菌による反応例では上昇した Fc $\gamma$ RIIB/IIA 比が有意に低下した。【結論】*H. pylori* 陽性 ITP では単球における非特異的貪食能が亢進し、除菌後に Fc $\gamma$ RIIB の発現上昇とともに是正された。*H. pylori* 感染が貪食細胞の Fc $\gamma$  受容体発現を変化させることで ITP の病態を促進する可能性が考えられた。



## 臨床個人調査票集計による特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の全国疫学調査（平成16年度）

倉田義之 大阪大学医学部附属病院輸血部

【目的】我が国における ITP 患者の平成 16 年度における実態を把握する。

【方法】厚労省に集められた ITP 患者の臨床個人調査票をもとに患者数、年齢分布、血小板数、治療状況、生活状況などを解析した。47 都道府県中厚労省にデータが送付されている 30 府県（新規症例）、36 府県（更新症例）のデータが今回の集計対象。

### 【成績】

1. 新規患者発生数（推計）：新規患者は 3,277 名（10 万人あたり 2.56 人）と平成 15 年度の 1,598 名に比べ倍増。男 1,300 名（2.08 人/10 万人）、女 1,980 名（3.03 名/10 万人）。
2. 更新患者数（推計）：更新患者は 18,261 名（10 万人あたり 14.30 人）で平成 15 年度の 16,446 名に比べ少し増加。男 5,350 名（8.55 人/10 万人）、女 12,927 名（19.77 名/10 万人）。
3. 新規患者年齢・性別分布：急性型は男女とも 5 歳以下にピーク。慢性型は男では 60～75 歳、女では 20～40、50～75 歳にピーク。平成 15 年度とほぼ同じパターン。
4. 更新患者年齢・性別分布：慢性型は男女とも 50～75 歳にピーク。平成 15 年度と同じパターン。
5. 血小板数：新規症例では急性型、慢性型ともに 1 万以下にピーク。更新症例では血小板数 10 万以上にピーク。
6. 新規症例での治療法：急性型ではプレドニン 76%、大量 IgG 46%、ピロリ除菌 18%。慢性型ではプレドニン 54%、ピロリ除菌 26%、大量 IgG 15%。平成 15 年度と顕著な差を認めず。
7. 更新・慢性型症例全経過での治療：プレドニン 64%、大量 IgG 22%、摘脾 18%、ピロリ除菌 18%、免疫抑制剤 11%、ダナゾール 9%の順であった。
8. 更新・慢性型患者における罹病期間：10 年以内；64%、11 年～20 年；27%、21 年以上；8%。
9. 生活状況：新規急性型では入院 35%、就労・就学・家事労働など社会生活保たれている患者は 47%、慢性型では入院 12%、社会生活が保たれているのは 76%。

## 特発性血小板減少性紫斑病に関する新検査の検討

降旗謙一 株式会社エスアールエル

血液凝固異常症に関する調査研究班の一員として、ITPの新しい診断基準の確立のために抗血小板抗体産生B細胞および幼若血小板の測定を検査センターとしての立場から検討している。

### 1. 測定法

#### (1) 抗血小板抗体産生B細胞 [ELISPOT法]

測定試薬：ITP ELISPOT kit (株式会社医学生物学研究所)

#### (2) 幼若血小板 [フローサイトメトリー法]

多項目自動血球分析装置XE-2100 (シスメックス株式会社)

### 2. 活動状況

抗血小板抗体産生B細胞に関しては、討第1段階として慶應義塾大学医学部の桑名先生の指導によりELISPOT法アッセイ手技を習得し、第2段階として慶應義塾大学病院に通院中の患者血液を用いてアッセイ技術を習熟するとともに判定技術を習得した。第3段階として本研究班ITPサブグループの4施設（広島国際大学、慶應義塾大学、大阪大学、東京慈恵会医科大学）より血小板減少症患者の血液を20症例ずつ提供していただき、慶應義塾大学オリジナル法の結果と弊社の検査結果との相関を確認し、その結果を平成18年度第1回班会議にて報告した。

現在は検討第4段階としてITPサブグループの上記4施設以外の研究班施設からも検体を受付け、弊社における検査の基準値を設定するための検討およびITPにおける感度・特異性などの精度確認を行っている。

幼若血小板に関しは、前述の検討第2段階よりELISPOT法と同じ症例の検体を用いて検討を続けており、血小板減少症患者では健常者に比べ、幼若血小板比率が有意に高値であることを確認している。

### 3. 今後の活動

検討第4段階を継続し、検査センターとしての受託体制の確立を目指す。

## 産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査—2001年から2005年

小林隆夫 信州大学医学部保健学科

【目的】静脈血栓塞栓症（肺血栓塞栓症/深部静脈血栓症）はこれまでわが国では比較的稀であるとされてきたが、生活習慣の欧米化などに伴い近年急速に増加している。日本産婦人科新生児血液学会がはじめて行った産婦人科領域における静脈血栓塞栓症の調査によれば、1991年に比し2000年では深部静脈血栓症例全体では3.5倍に、肺血栓塞栓症例全体では6.5倍に増加したことが明らかになった。2004年に肺血栓塞栓症/深部静脈血栓症（静脈血栓塞栓症）予防ガイドラインが刊行され、欧米より20年以上遅れてわが国でもやっと静脈血栓塞栓症予防対策の新しい時代が始まったが、本予防ガイドライン刊行から2年が経過した現在でも不幸な転帰をとる多くの肺血栓塞栓症が発症している。その中の多くの症例は理学的予防対策を講じても発症しているため、薬剤による予防対策の重要性が今後の主な検討課題である。そこで今回、21世紀に入った5年間（2001年から2005年）に新たに発症した産婦人科領域における静脈血栓塞栓症の調査を行い、発症数、発症頻度、リスク因子、予防対策等を明らかにすることを目的としてアンケート調査を実施した。この調査結果をもとに広く社会に情報発信し、今後の学術行政や医療行政に反映されるよう活動する方針である。

【方法】アンケート内容は全体票と個人票の2つからなっている。全体票は、2001年から2005年までの各施設での分娩件数（経膈分娩、帝王切開）、手術件数（良性疾患、悪性疾患）、静脈血栓症（骨盤内や下肢深部静脈血栓症以外の静脈血栓症も含む）症例数、肺血栓塞栓症症例数の調査および当該施設での血栓症予防法の調査であり、個人票は、個々の症例の具体的な調査票（年齢・身長・体重・診断部位・治療・予防・背景・分娩や手術との関連の有無・予後等）である。調査票は、全国すべての大学病院（分院も含む）および500床以上の総合病院など、計322施設である。

【結果】現在アンケート結果の返信中であり、結果の解析は次年度に行う。

## 肺塞栓症と深部静脈血栓症の頻度、臨床的特徴（中間報告）

○佐久間聖仁 女川町立病院内科

中村 真潮 三重大学大学院循環器内科学

【目的】肺塞栓症（PE）と深部静脈血栓症（DVT）は基本的に同一の疾患の異なった臨床型と考えられ静脈血栓塞栓症（VTE）として取り扱われることがある。確かにPEの直接的原因としてDVTがあり、VTEという概念は有用であるが、一方で肺塞栓症を起こすDVTと臨床的に単独でDVTとして発見される場合にはDVT発生機序が異なる可能性がある。今回の研究の目的は以下の3点である。1. PEとDVTの発生頻度を明らかにする。2. PEを伴ったDVTとDVT単独例での下肢の症状、所見に相違が無いかを明らかにする。3. VTEの危険因子の頻度に相違が無いかを明らかにする。

【方法】全国医療機関への前向きアンケート調査を実施した。アンケート用紙は平成18年7月上旬に発送済みである。PE、DVTとも平成18年8月と9月（2ヶ月間）の新規発症症例とする。

【結果】 報告された症例とアンケートの回収率から推定したPE年間症例数は精神科以外で6704人、精神科で442人、DVTは精神科以外で11020人であった。精神科からのDVT登録例はなかった。

【考察】1996年に実施した精神科以外の推定したPE年間症例数は3492人であり、10年で1.92倍に診断症例数が増加した。なお、アンケートの返信はまだ続いており、この結果は中間解析結果である。また、研究目的の2、3については解析中である。