

- Medical Practice 編集委員会編、  
文光堂、p688~689 2007
- 8) 倉田義之  
c-Mpl に結合するペプチドおよび  
ノンペプチド化合物の臨床応用  
の動向 *Mebio Oncology*、  
4; 64-72 2007
- 9) 富山佳昭、倉田義之  
血小板減少症  
*Modern Physician*, 27; 511-514  
2007
- 10) 藤村 欣吾  
消化器外疾患に対する  
*Helicobacter pylori* 除菌療法の適  
応  
*Helicobacter Research* 11:  
237-246, 2007
- 11) Yamaguchi M., Fujimura K.,  
Toga H., Khwaja A., Okamura N.,  
Chopra R.  
Shwachman-Diamond syndrome  
is not necessary for the terminal  
maturation of neutrophils but is  
important for maintaining  
viability of granulocyte  
precursors.  
*Experimental Hematology*  
35: 579-586, 2007
- 12) Kodama M., Kitadai Y., Ito M.,  
Kai H., Masuda H., Tanaka S.,  
Yosihara M., Fujimura K.,  
Chayama K.  
Immune response to CagA protein is  
associated with improved platelet  
count after *Helicobacter pylori*  
eradication in patients with  
idiopathic thrombocytopenic  
purpura.  
*Helicobacter* 12: 36-42, 2007
- 13) 藤村 欣吾  
消化器外疾患に対する *Helicobacter  
pylori* 除菌療法の適応  
*Helicobacter Research* 11: 237-246,  
2007
- 14) 藤村 欣吾  
特発性血小板減少性紫斑病  
「DATA で読み解く内科疾患」  
総合臨床 56: 1436-1444, 2007
- 15) 藤村 欣吾  
薬剤性血小板減少症  
治療 89: 3241-3248, 2007
- 16) 藤村 欣吾  
特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)  
の最新治療  
*Medical Practice(M.P.)* 24 :  
2171-2178, 2007
- ## 2. 学会発表
- 1) 白杉 由香里、小川 吉明、  
安藤 潔、橋野 聡、長澤 俊郎、  
小島 寛、倉田 義之、富山 佳昭、  
岸本 祐司、岩戸 康治、  
藤村 欣吾、北村 聖、  
曾根原 裕介、大倉 征幸、  
大津 智子、Nichol J.L.  
新規血小板造血刺激たん白製剤  
AMG 531 の慢性 ITP に対する安全  
性と有効性に関する検討  
第 69 回日本血液学会・第 49 回日本  
臨床血液学会合同総会  
パシフィコ横浜 (横浜市)

平成 19 年 10 月 11 日 (木)

**知的財産権の出願・登録状況**

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実案新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

施設名:

症例番号

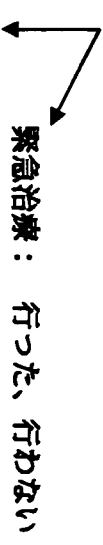
生年月日 西暦 年 月 日 性別 男 女

ITP診断時: 西暦 年 月 日 血小板数 万 出血症状: 皮下出血 あり なし、粘膜出血 あり なし

ITP治療開始時期 西暦 年 月 日 血小板数 万 出血症状: 皮下出血 あり なし、粘膜出血 あり なし

治療経過: 初診時から行ってきた治療およびその効果について、該当する項目に○印を付け、現在進行中の治療には◎印をつける。

ITPの診断確定



陽性 除菌成功 不成功 行わない ; 治療効果 レベル 1, 2, 3

陰性

無治療経過観察 ; 最近の血小板数 万、出血傾向 あり なし

注意深い経過観察 ; 最近の血小板数 万、出血傾向 あり なし

First line 治療 副腎皮質ステロイド ; 治療効果 レベル 1, 2, 3

摘脾 ; 治療効果 レベル 1, 2, 3

Second line 治療 行っている (治療薬を記載)、 行っていない

1) 治療効果 レベル 1, 2, 3

2) 治療効果 レベル 1, 2, 3

3) 治療効果 レベル 1, 2, 3

最終観察時点 ( 年 月 日)での 血小板数 万、

出血傾向 : 皮下出血 あり なし ・ 粘膜出血 あり なし ・ 臓器出血 あり なし

合併症 : なし あり ( ) ( ) ( ) ( )

状況 : 血小板数>15万 : 無治療、何らかの治療中

血小板数3~15万 : 無治療、何らかの治療中

血小板数<3万 : 無治療、何らかの治療中

## ITP 死亡症例調査表 (2 次調査)

施設名 :

症例番号 : \_\_\_\_\_

性別 :        男                      女

生年月日 :    1 9            年    月    (年齢    才)

ITP 発症時期 :            年    月    (年齢    才)

死亡年月日 :            年    月    (年齢    才)

死亡時の ITP の臨床状態 (該当するものに○印) :

寛解中、        薬物でコントロール良好、        不良

この間行った治療に○印をつけてください (複数可)

副腎皮質ステロイド、摘脾、ダナゾール、ピンカアルカロイド、

ビタミンC、ダブソン、エンドキサン、イムラン、IFN- $\alpha$ 、

デカドロン大量、ステロイドパルス、リツキサン、IVI gG,

サイクロスポリン、ピロリ除菌、血小板輸血、

その他 \_\_\_\_\_

死因 : \_\_\_\_\_

ITP 関連死:        Yes            No

合併症 : \_\_\_\_\_

## 新規 ITP 治療ガイドラインによる治療成績 —平成 19 年度班員アンケート調査から—

### 分担研究者

藤村 欣吾	広島国際大学 薬学部 教授 広島赤十字原爆病院 総合内科
桑名 正隆	慶応義塾大学医学部 内科 准教授
倉田 義之	四天王寺国際仏教大学 教授
小嶋 哲人	名古屋大学医学部 保健学科 教授
和田 英夫	三重大学医学部 臨床検査科 准教授

### 研究協力者

野村 昌作	岸和田市民病院 血液内科部長
-------	----------------

### 研究要旨

平成 16 年 (2004 年) に提案した ITP 治療ガイドラインによる治療効果を明らかにするためにパイロット研究を行った。方法は班員の施設に対してアンケート調査を行い解析した。

新規治療ガイドラインに登録された新患 ITP 症例は 5 施設 57 症例で、発症年齢は中高年齢者にピークがあり、男女比などは最近の本邦での傾向と変わりなかった。ピロリ陽性 ITP が 25 例、54% に認められ依然として本邦 ITP にはピロリ菌陽性症例が多い。この内除菌により血小板増加反応を示す所謂ピロリ関連 ITP 症例は 15 症例で全体の 26% を占めた。血小板数と出血傾向による治療の層別化の結果無治療で経過観察可能症例が 20 例、全体の 35% を占めた。最終的に無治療で経過観察された症例の血小板数は 3~15 万となり、3 例が無治療で血小板数 15 万以上となった。無治療観察症例の中で経過観察中治療が必要となる症例は注意深い観察症例中の 1 例のみであり、層別化によって無治療とされた症例は観察期間が短いものの、多くは安定した経過をとっている。first line 治療における副腎皮質ステロイド療法や摘脾療法は全体の 30% が対象となったが、効果は従来とほぼ同等であった。最終的に 95% の症例が血小板数 3 万以上にコントロールされ、86% が無治療となり出血傾向も減少し、ITP としての QOL に大きな改善が認められた。

以上から今回提案した新規 ITP 治療プロトコールは ITP のコントロールには満足すべきものと考えられる。

### 研究目的

平成 16 年 (2004 年) に提案した ITP 治療ガイドラインによる治療効果を

明らかにするためにパイロット研究として班員の施設において新規治療ガイドラインに準じて行われた症例について検討した。

## 研究方法

新規ガイドラインによる治療効果を明らかにするために、取りあえず班員の施設を対象にパイロット研究を行った。各班員の施設に別紙のアンケート調査用紙（新規 ITP 治療ガイドラインの実行・検証表）を発送した（資料 1）。表 1 は協力施設を示します。

表 1

### アンケート調査協力施設

慶応義塾大学医学部  
名古屋大学医学部  
三重大学医学部  
岸和田市民病院血液内科  
広島赤十字原爆病院

調査項目は年齢、性別、ITP 診断時期、初診時血小板数、初診時出血傾向、ITP 治療開始時血小板数、治療経過と各治療に対する治療効果レベル、最終観察時期と最終血小板数、臨床症状、等で、個人が特定できない様に留意した。これらの内容は stand-alone のコンピューターに入力し解析した。

## 研究結果

新規 ITP 治療ガイドラインが 2004 年に提案されているので対象症例は 2004 年から 2007 年に新規治療ガイドラインよって行われた症例となる。

5 施設に協力を頂き、ITP 症例 57 例が以下の解析対象となった。従って観察期間が短く、対象症例も限りのある所謂パイロット研究である。

### 初診時の患者背景（表 2）：

平均年齢は 55.9 歳で ITP が中年から高年にかけての疾患となっていることが確認された。男性 26 例、女性 31 例、男女比は 1:1.19 で若干女性が多く、男女比が接近していることも最近の傾向である。

平均血小板数は 4.2 万と比較的血小板数が保たれている症例が多い傾向にあり、初診時年齢や血小板数に男女間に有意差は認められない。

表 2

### 初診時所見

	男性	女性	総計
症例数	26	31	57
平均年齢(歳)	57.2	54.7	55.9
血小板数(万)	4.5	3.9	4.2
皮下出血症例(%)	10(38)	18(58)	28(49)
粘膜出血症例(%)	6(23)	5(16)	11(19)

初診時出血傾向については皮下出血が 28 例 49%に認められ、粘膜出血は 11 例 19%に認められている。出血傾向が約半数に認められることから重症例から比較的軽症例までを含んでいる集団であることが推測された。

このような背景を持つ症例に対して新たな ITP 治療ガイドラインに準じた治療が行われた。

### ガイドラインに基づく治療経過（表

3):

1. 緊急治療—γグロブリン大量療法、  
やステロイドパルス療法、あるいは血  
小板輸血が行われた症例は 12 例で、  
急激な出血傾向や血小板減少に対処  
された。2. ピロリ菌の検査—46 例  
81%に行われ、25 例 54%が陽性で男性  
に陽性例の頻度が高かった。除菌は 21  
例に行われ 18 例 85,7%に除菌が成功  
している。男性は 100%に除菌が成功  
しているが、女性は 73%に留まってい  
る。除菌未施行症例が 4 例あったがそ  
の理由は問い合わせしていない。  
除菌による血小板増加効果はレベル  
1が8例44%、レベル2が7例39%、  
で除菌成功例 18 例中 15 例 83%がいわ  
ゆるピロリ関連 ITP と考えられた。3  
例はレベル3で除菌による血小板増  
加反応は認められていない。

表 3

	男性	女性	総計
緊急治療例	6	6	12
ピロリ菌陽性	13/21	12/25	25/46
(%)	(62)	(48)	(54)
除菌成功例	10/10	8/11	18/21
(%)	(100)	(72.7)	(85.7)
除菌未施行	3	1	4
治療効果(%)			
レベル1	4(40)	4(50)	8(44)
レベル2	4(40)	3(38)	7(39)
レベル3	2(20)	1(13)	3(17)

3. 血小板数と出血症状による ITP の  
層別化—緊急治療に反応し無治療と  
なった症例4例は恐らく急性 ITP と考  
えられる症例、さらに除菌により血小  
板増加反応が認められた所謂ヘリコ  
バクタピロリ関連 ITP15 例を除いた  
38 症例が血小板数と出血症状により

治療の層別化が行われた。この中には  
ピロリ陰性症例、ピロリ未検査症例、  
除菌無効症例、緊急治療無効例が含ま  
れている (表4)。

1) 無治療観察症例

血小板数3万以上で重篤な出血傾向の  
ない症例 18 例は (男 10 例、女 8 例)  
無治療で経過観察が行われた。以後最  
長2年間の経過中全例無治療が維持さ  
れ経過観察開始時の血小板数は平均 5.  
2 万である。

2) 注意深い経過観察症例

血小板数が 2~3 万の症例は女性 3 例  
に認められ、皮下出血などの出血症状  
が認められたが注意深い経過観察が  
行われた。この内2例はその後も無治  
療観察が継続されているが1例はその  
後 first line 治療が行われている。

表 4

	男性	女性	総計
無治療例	10	8	18
(%)	(63)	(40)	(50)
血小板数(万)	5.1	5.5	5.2
出血傾向(例)	0	0	0
経過観察例	0	3	3
(%)	(0)	(15)	(8)
血小板数(万)	0	3.0	
出血傾向(例)	0	2	2

(%): 未除菌症例を対象として算出

3) First line 治療症例 (表 5)

血小板数が 2 万以下、或いは重篤な出  
血傾向を認める症例 17 例 (男 5 例、  
女 12 例) に対して first line 治療が  
行われた。これはピロリ関連 ITP を除  
いた症例の 47%にあたる。副腎皮質ス  
テロイドに対して1例がレベル1、す  
なわち血小板数が正常化し無治療と

なったが、9例はレベル2（治療中止、  
 或いはプレドニン維持量で血小板数3  
 万以上となる）に、残り7例はレベル  
 3でステロイドに反応しない症例と  
 なった。ステロイドに対する反応率は  
 59%である。

レベル3の症例の内6例（男2例、女  
 4例）に摘脾が行われている。摘脾の  
 効果は1例がレベル1で完全寛解と考  
 えられ、4例がレベル2で何らかの反  
 応が診られているが、1例がレベル3  
 で無効であった。結局レベル1と2を  
 合わせると摘脾の効果は83%に認め  
 られた。

表5

ガイドラインに準じた治療(3)			
First line 治療 (%)は全末除菌総数を母集団として算出			
	男性	女性	総計
副腎皮質ステロイド	5	12	17
(%)	(31)	(60)	(47)
レベル1	0	1	1
レベル2	3	6	8
レベル3	2	5	7
摘脾	1	4	5
(%)	(6)	(20)	(14)
レベル1	0	1	1
レベル2	1	2	3
レベル3	0	1	1

#### 4) Second line 治療

副腎皮質ステロイドによりレベル3の  
 症例、摘脾後レベル3の症例それぞれ  
 1例、計2例にsecond line 治療が行  
 われているがいずれの治療にもレベ  
 ル3の反応しか得られていない。

#### 最終転帰 (表6) :

各段階の治療による最終の転帰（最長  
 約2年の観察期間）については以下の  
 ようになった。緊急治療で4例が無治  
 療となり8例が治療の層別化群に組み  
 入れられた。除菌成功群の中の1例(レ

ベル3) はその後 first line 治療に  
 より無治療となり、最終的に16例が  
 無治療となっている。

層別化により無治療観察された18例  
 は最終時点でも無治療を維持されて  
 いる。注意深い経過観察症例3例中2  
 例は無治療で経過し1例はfirst line  
 治療へ移行している。

first line 治療が行われた17例中6  
 例がその後無治療となり、さらに摘脾  
 が行われた6例中3例が無治療となっ  
 ている。

最終的に無治療で経過観察されてい  
 る症例は49例、86%となり残り8例、  
 14%が何らかの治療を継続している  
 ことになる。

最終観察時点での血小板数は15万以  
 上維持している症例は(レベル1)1  
 5例、26%、血小板数3万から15万  
 を無治療ないし維持量のステロイド  
 で治療されている症例(レベル2)は  
 39例、68%でこのグループの中で治療  
 を受けている症例は5例で殆どが無治  
 療である。

表6

#### 新治療ガイドラインによる治療転帰

- ・緊急治療 12例 → 無治療: 4例
- ・HP 除菌成功例 18例 → 無治療: 15例
- 除菌不成功、未除菌、陰性、上記治療無効例 38例
- ・無治療: 18例
- ・経過観察 3例 → 無治療: 2例
- ・First line治療 17例
  - 無治療: 6例
  - 摘脾 6例 → 無治療: 3例
  - 治療中: 8例

血小板数3万以下の症例(レベル3)  
 は3例、5%でこれらの症例が所謂難



治性 ITP の範疇に入るものと考えられる。

### 初診時と最終観察時点での血小板数、臨床症状の比較 (表 7) :

初回 (治療前) の血小板数、出血症状を最終観察時点と比較してみると全体の平均血小板数は治療前 (初診時) が 4.2 万であったのに対し最終時点では 10.3 万と平均して倍以上に増加している。これを裏付ける所見として血小板数 15 万以上の症例が 15 例となり、3~15 万の症例が初診時は 37 例であったが最終的には 39 例、血小板数 3 万以下の症例が初診時は 20 例であったが最終段階では 3 例と各治療に反応していることが明らかとなった。また出血傾向も皮下出血が 28 例から 5 例に、粘膜出血は 11 例から 0 例となり血小板増加反応によって出血症状も改善している。

表 7

ガイドラインに準じた治療(最終状況)				
	男性	女性	総計	治療前
最終血小板数(万)	10.6	10.0	10.3	4.2
15万≦(例)	6	9	15	0
3~15万	19	20	39	37
3万>	1	2	3	20
皮下出血(例)	1	4	5	28
粘膜・臓器出血(例)	0	0	0	11
合併症(例)	5	7	12	
無治療(例)	22	27	49	
治療中(例)	3	5	8	

### 考案

ITP 治療に関して従来は血小板数の改善を目標に治療が行われてきた傾向がある。今回のプロトコールは治療内容を血小板数、出血傾向によって具体的に層別化することにより、治療対

症症例を厳密に規定したことから、無治療症例が従来の治療ガイドラインによる治療に比べ多くなっている。これらの症例は短い経過観察期間ではあるが無治療でも明らかに憎悪傾向はなく、逆に 15 万以上に増加する症例も認められた。

このことから ITP の治療は血小板数にとられるのみでなく臨床症状を含め総合的に診てゆく必要があることが改めて明らかとなった。以前のプロトコールも同様に出血症状が認められない症例については無治療観察の選択肢が作られているが、具体性に乏しいために血小板数に囚われやすくなり、多くの症例に何らかの治療が行われてきた傾向があるのではないかと考えている。

また今回の調査でピロリ除菌による血小板増加効果の認められる、ピロリ関連 ITP 症例が全 ITP の 4 分の 1 を占めた。また除菌により血小板数のコントロールが容易になるため first line 治療などから免れる例が多いと考えられ、長期にわたるステロイドなどの副作用に対する心配がなくなったことはこれらの症例の予後を考える上で重要である。

副腎皮質ステロイド治療や摘脾に対する反応性は従来との報告と大差ないが、ピロリ関連 ITP や無治療症例の増加によりこれらの治療対象となる症例が減少している。

本邦の ITP の発症年齢は治療の副作用が出やすく、また合併症を持つ頻度の高い中高年齢にそのピークが変化し

ていることからその治療内容も従来のプロトコルを適応することには問題がある。そのような中で今回の結果は中高年 ITP にも適切なプロトコルと判断される。ピロリ菌陽性 ITP は中高年に多く、それに伴いピロリ関連 ITP が認められたことや、無治療 ITP 症例が3分の1存在し、しかも臨床上問題なく生活が維持できていることが新規治療プロトコルによる治療で確認された。従って新規プロトコルは当面本邦の ITP 治療に対して有効と考えられ今後さらに広く受け入れられその有用性が確認されることを望んでいる。

またこの治療プロトコルを用いても約 5%の症例が難治性の ITP に該当し、難治症例を極端に減らすことは出来なかった。今後多くの症例で検討し難治例の動向を見極める必要があると考えられる。

## 結論

以上の結果から

1. 今回新たな治療ガイドラインに登録された新規 ITP 症例は 5 施設 57 症例で、発症年齢、男女比などは最近の本邦での傾向と変わりなかった。すなわち中高年齢者に発症のピークがあり、男女比が接近してきている。

2. ピロリ陽性 ITP が 25 例、54%に認められ依然として本邦 ITP にはピロリ菌陽性症例が多い。この内除菌により血小板増加反応を示す所謂ピロリ関連 ITP 症例は 15 症例で全体の 26%を占めた。

3. 血小板数と出血傾向による治療の層別化の結果無治療で経過観察可能症例が 20 例、全体の 35%を占め、最終的に無治療で経過観察され多くは血小板数 3~15 万であるが、中には 3 例が無治療で血小板数 15 万以上となった。無治療症例の中に経過観察中治療が必要となる症例は注意深い観察症例の中の 1 例のみであり、層別化によって無治療とされた症例は観察期間が短いものの、多くは安定している症例と考えられた。

4. 全体の 30%が first line 治療の適応となり副腎皮質ステロイド療法や摘脾療法が行われたが、効果は従来とほぼ同等と考えられる。

5. 最終的に 95%の症例が血小板数 3 万以上にコントロールされ、86%が無治療となり出血傾向も減少しており ITP としての QOL に大きな改善が認められた。

6. 以上から今回提案した新規 ITP 治療プロトコルは ITP のコントロールには満足すべきものと考えられる。

## 健康危険情報

なし

## 研究発表

### 論文発表

1. Yamaguchi M., Fujimura K., Toga H., Khwaja A., Okamura N., Chopra R.

Shwachman-Diamond syndrome is not necessary for the terminal

maturation of neutrophils but is important for maintaining viability of granulocyte precursors.

Experimental Hematology  
35: 579-586, 2007

2. Kodama M., Kitadai Y., Ito M., Kai H., Masuda H., Tanaka S., Yoshihara M., Fujimura K., Chayama K.

Immune response to CagA protein is associated with improved platelet count after *Helicobacter pylori* eradication in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.

Helicobacter 12: 36-42, 2007

3. 藤村 欣吾  
消化器外疾患に対する *Helicobacter pylori* 除菌療法の適応 *Helicobacter Research*  
11: 237-246, 2007

4. 藤村 欣吾  
特発性血小板減少性紫斑病  
「DATA で読み解く内科疾患」  
総合臨床 56: 1436-1444, 2007

5. 藤村 欣吾  
薬剤性血小板減少症  
治療 89: 3241-3248, 2007

6. 藤村 欣吾  
特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の最新治療  
Medical Practice(M.P.) 24 :  
2171-2178, 2007

白杉 由香里、小川 吉明、安藤 潔、橋野 聡、長澤 俊郎、小島 寛、倉田 義之、富山 佳昭、岸本 祐司、岩戸 康治、藤村 欣吾、北村 聖、曾根原 裕介、大倉 征幸、大津 智子、Nichol J.L.

新規血小板造血刺激たん白製剤 AMG 531 の慢性 ITP に対する安全性と有効性に関する検討

第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会

パシフィコ横浜 (横浜市)

平成 19 年 10 月 11 日 (木)

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実案新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

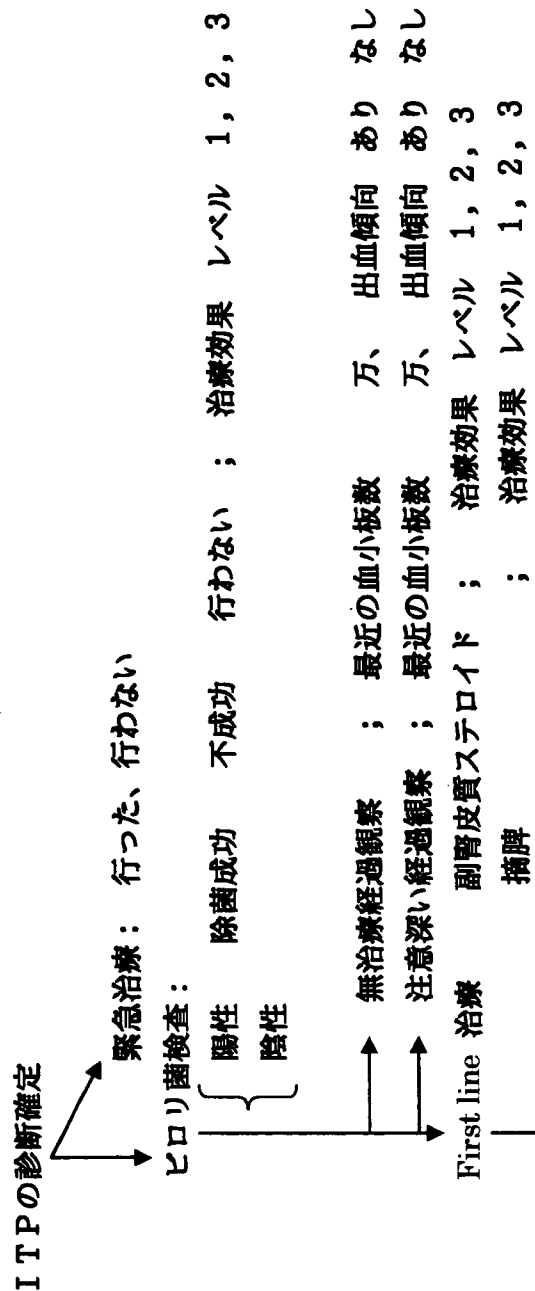
## 学会発表

施設名：

症例番号

ITP診断時：	西暦	年	月	西暦	年	月	性別	男	女	出血症状：	皮下出血	あり	なし	粘膜出血	あり	なし
ITP治療開始時期	西暦	年	月	西暦	年	月	性別	男	女	出血症状：	皮下出血	あり	なし	粘膜出血	あり	なし

治療経過：初診時から行ってきた治療およびその効果について、該当する項目に○印を付け、現在進行中の治療には◎印をつける。



Second line 治療 行っている（治療薬を記載）、行っていない

- 1) 治療効果 レベル 1, 2, 3
- 2) 治療効果 レベル 1, 2, 3
- 3) 治療効果 レベル 1, 2, 3

最終観察時点（ 年 月 日）での 血小板数 万、

出血傾向： 皮下出血 あり なし・粘膜出血 あり なし・臓器出血 あり なし

合併症： なし あり（ ）（ ）

状況： 血小板数>15万： 無治療、何らかの治療中  
 血小板数3~15万： 無治療、何らかの治療中  
 血小板数<3万： 無治療、何らかの治療中

## 平成 19 年度 血栓性微小血管障害症 (TMA) サブグループ

### 研究報告

#### 分担研究者

- 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 慶応義塾大学医学部検査医学 教授  
和田英夫 三重大学医学部臨床検査医学 准教授

#### 研究協力者：

- 杉野 稔・伊津野 孝 東邦大学医学部衛生学  
小亀浩市 国立循環器病センター研究所 室長  
松本雅則 奈良県立医科大学輸血部 准教授  
森木隆典 慶応義塾大学保健管理センター 講師

#### 要旨

TMA グループでは、簡便で迅速に結果の得られる ADAMTS13 活性測定法を開発し、この方法を用いて全国の医療機関から解析依頼を受けた 861 例の TMA について ADAMTS13 活性および同インヒビター測定を行った。この中に先天性 TMA が 59 例あり、うち ADAMTS13 活性が著減する Upshaw-Schulman 症候群 (USS) は 35 例であった。35 例のうち 29 症例で ADAMTS13 遺伝子解析を終了した。このうち、4 例がホモ変異、24 例が複合ヘテロ複合変異、1 例では責任遺伝子変異を同定できなかった。複合ヘテロの 1 例は *de novo* 変異であることを報告した。また、後天性 TMA は 802 例あり、これらは特発性 370 例、膠原病 206 例などであった。後天性特発性 TTP では ADAMTS13 活性が著減する症例が 68% 存在し、これらの症例のインヒビターの認識部位のエピトープ解析をフェージディスプレイ法を用いて行った。また、後天性の薬剤性の中で、チクロピジン TTP が 20 例、クロピドグレル TTP が 1 例含まれ、これを基にした日米共同研究でチクロピジン TTP とクロピドグレル TTP の臨床的相違について報告した。

## A. 研究目的

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(特に腎臓)機能障害の3主徴を呈する病理学的診断名で、この代表疾患に神経症状優位の血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)と腎臓症状優位の溶血性尿毒症症候群(HUS)が含まれる。1998年に von Willebrand 因子切断酵素(VWF-CP)活性とそのインヒビター力価の測定法が確立され、TTPではこの酵素活性の著減が、また典型的な病原大腸菌0157:H7株感染による急性腸炎に合併するHUSではこの酵素活性の低下がない事から、VWF-CP活性の測定は両疾患の鑑別に重要との見解が示された。VWF-CP活性欠損下では切断されない超巨大分子量VWFマルチマー(UL-VWFM)が微小循環環境下に生じる「高ずり応力 high shear force」のもとで、過剰な血小板凝集・血栓を生じるためと説明されている。2001年にはこのVWF-CPがADAMTS13に分類されるメタロプロテアーゼである事が示され、様々なADAMTS13関連マーカーの解析が可能になり、その結果、TTPとHUSを臨床像でふり分けする事は殆ど意味ない事と判断されるに至った。これより、今日ではTTP-HUSと表現する場合や、あるいは病理学的診断名TMAを両者の包括的診断名として使用

している場合が多い。

奈良医大輸血部では1998年以降、全国の医療機関から依頼された検体について同酵素活性測定を行い、その後2004年に宮田(小亀)班員らが同定したADAMTS13によって切断されるVWF-A2ドメインの最小基質VWF73を利用した迅速鋭敏測定法(Transfusion 46:1444, 2006)を開発した。これを利用して、2007年末迄に臨床・検査データからTMAと診断できた患者総数861名について、全例ADAMTS13活性を測定し、うち286例(約1/3)は同活性が著減する「定型的」TTPである事を示した。この「定型的」TTPにはADAMTS13遺伝子異常による先天性TTP(Upshaw-Schulman症候群、USS)と、ADAMTS13インヒビター(主にIgG型自己抗体)が後天性に生じるために起こるものがある。ADAMTS13が同定されてから、先天性TTPに対する治療は新鮮凍結血漿による酵素補充で十分であり、またインヒビターを有する後天性TTPに対しては血漿交換が卓効するEBM(Evidence-Based Medicine)が確立され、(1)同酵素補充、(2)インヒビターの除去、(3)UL-VWFMの除去、そして、(4)止血に必要な正常VWFの補充、で説明されるようになった。

このような背景の中で本TMA/TTP研究班は、1) TMAの多数例解析による

病型分類、2) ADAMTS13 抗原・遺伝子解析、3) 確立された ADAMTS13 活性の簡便・迅速測定法の評価と普及、4) ADAMTS13 インヒビターのエピトープ解析、5) TMA(または TTP)の診断・治療ガイドラインの確立、の5項目を初期からの一貫した研究目的として掲げている。

## B. 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：本年度は、基質に大腸菌発現蛋白 GST-VWF73-His を用いた chromogenic ADAMTS13-act-ELISA 法 (Kato et al, Transfusion 2006 年) を主として用いた。

2. TMA 患者登録：奈良医大輸血部 HP (<http://www.naramed-u.ac.jp/~trans/>) を介して1998年7月から2007年12月末までに全国の医療機関から ADAMTS13 活性測定依頼を受け、臨床症状とラボ検査成績から TMA と診断されたのは 861 例であった。うち ADAMTS13 活性著減例 (正常の<3%) は 286 例と、全体の 1/3 であった。

3. ADAMTS13 遺伝子解析：登録 TMA 患者 861 例中、ADAMTS13 活性著減例 (正常の<3%) は 286 例であったが、この中で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施設と

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 (主に宮田班員が担当、一部は委託検査にて実施)。

4. ADAMTS13 抗原量の測定：遺伝子発現 (r)ADAMTS13 を抗原とし、常法にて二種類 (A10 と C7) の抗 ADAMTS13 マウスモノクローナル抗体を作成し、これらを用いたサンドイッチ型酵素免疫測定法 (ELISA) を確立し、これにて ADAMTS13 抗原量の測定を行った (Yagi et al, Int J Hematol 2007)。A10 のエピトープは disintegrin-like ドメインに、また C7 のエピトープは Tsp7/8 ドメインにある。また A10 は ADAMTS13 酵素活性阻害抗体であり、同 IgG の終濃度 20 ug/ml で同活性 (under static conditions) を完全阻害した。また化血研の副島見事博士から供与された抗 ADAMTS13 マウスモノクローナル抗体 (WH2-11-1) を用いて、還元条件下で患者血漿の SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、その後 western blot (WB) によって、患者血漿中の ADAMTS13 抗原の存在様式を直接的に解析した。ちなみに、WH2-11-1 のエピトープは Tsp4 ドメインにある。

## 倫理面への配慮

ADAMTS13 遺伝子解析は、奈良県立医大、国立循環器病センター、慶応義塾大学および依頼病院の倫理委員会の承認を得た後、対象者に書面での同意

を得た。

### C. 研究結果と考察

1. ADAMTS13 活性測定法の評価: 現行の ADAMTS13 活性測定法には、①基質に VWF を用いるものと、②基質に小亀らが同定した VWF-A2 ドメインの Tyr1605-Met1606 結合を含むポリペプチド(VWF73 等)を用いる方法がある。この内、前者の VWF 基質を用いるものとして、SDS アガロースゲル電気泳動解析法やコラーゲン結合法を利用した方法が今日でも使用されている。また後者のポリペプチド基質を用いるものとして、FRETS-VWF73 蛍光測定法 や chromogenic ADAMTS13-act-ELISA 法があり、これらはいずれもキット化され市販されている状況となっている。とりわけ前者の FRETS-VWF73 法は開発早期から世界の研究者が利用可能な体制がとられたので、今日では世界的規模で使用されている。以上の4法に加えて、より最近には VWF73 類似であるが、異なるポリペプチド VWF78 をビオチン化したものを基質に用い、これが切断された後、ビオチン化部分はアビジンアガロースで吸着・分離されるので、この原理を利用した ADAMTS13 活性測定法がワシントン大学のグループから報告された(Wu et al, J Thromb Haemost, 2006)。これら5方法を中心とした測

定値の比較検定試験が国際血栓止血学会の SSC 委員会で Tripoli 博士の指導のもとに進められ、いずれのアッセイも信頼すべきデータが得られるとの中間報告がしめされている(論文は投稿準備中)。これらの測定法については、汎用化に向けて、その精度、また測定に要する時間や費用などが今後さらに検討される必要がある。一方で、現時点の解釈としては、異なった基質や測定法を用い、それぞれ異なった結果がでた場合、どれを ADAMTS13 活性の正しい値か? を考えるよりも、現に TMA 症状を呈する患者がおり、前記のいずれかの測定法で著減が確認された場合には、そのデータをそのまま受け入れて、いずれの方法であっても「定型的」TTP と判断して良いのではないかという結論が導き出されている。これは、ADAMTS13 が UL-VWF を切断する反応において、① 効果的な切断のために ADAMTS13 が血管内皮細胞などへ結合し固相化酵素となる、② 同酵素が基質 UL-VWF に結合し、これを捕捉する、③ 捕捉した UL-VWF を酵素ドメインが切断する。などの三段階機構が想定されているため、このいずれかが障害されれば、UL-VWF が蓄積し TTP を発症しうると考えられるからである。

### 2. TMA 患者登録と ADAMTS13 活性



と同インヒビターの測定：表 1 に chromogenic ADAMTS13-act-ELISA の結果を示す。先天性 TMA と考えられる症例は計 59 例であった。うち 35 例 (30 家系) は同活性著減の USS で、残り 24 例は原因不祥であった (うち一例は別の厚労省研究班研究費にて Factor H 遺伝子解析を行い、複数の異常部位の存在を確認した)。USS の 24 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 802 例で、うち特発性 TMA は 370 例 (臨床症状による分類で、TTP 265 例、HUS 105 例) であり、二次性 TMA は 432 例であった。二次性 TMA の内訳は、薬物 33 例 (うちチエノピリジン誘導体 21 例、マイトマイシン C 10 例、他の薬物 2 例)、膠原病 206 例、悪性腫瘍 58 例、造血幹細胞移植 54 例、妊娠 14 例、病原大腸菌 0157 感染 30 例、その他 37 例であった。

3. ADAMTS13 遺伝子解析：USS35 例中、遺伝子解析は 29 症例についてなされたが、Family X の USS 患者 (X-5) については責任変異部位を同定できなかった。残り 23 家系 28 例中、「ホモ接合体変異」は 4 家系 4 例で、残りの 19 家系 24 例は「複合型ヘテロ接合体」であった。この中には 1 例 (Family P) が *de novo* 変異を示した (表 2 参

照)。

4. USS の臨床症状の特徴 (表 2): 古典的成書では USS について、「新生児期に Coombs 試験陰性で、交換輸血が必要な重症黄疸で発症するのが特徴」と記載されていることが多い。しかし、本研究ではこれに該当する症例は 35 例中 14 例 (40%) のみで、残り 60% の症例はこの時期以降に診断されていた。また USS は先天性 TTP とともに称されるが、所謂 TTP の古典的 5 徴候 (Amorosi & Ultman, 1966) を小児期から示したのは 2 例のみであった。一方、小児期に血小板減少症のエピソードを確認できた症例は 35 例中 27 例 (77%) と高率であった。また残り 8 例はこの時期に血小板減少症が無かったという訳ではなく、血小板数そのものを検査したか否かが不明というものであった。不幸な事に、小児期に血小板減少症に気づかれていても、これが「ITP」と診断されている例が多く、この診断のもとで成人期を迎えている例が多々あった。この典型例が妊娠を契機に突然 TTP を発症したかに思える USS である。

【USS と妊娠】USS 6 家系 9 例の女性患者で合計 16 回の妊娠歴が確認できた。驚いた事にこれらの全ての妊娠機会において、妊娠 8-36 週 (多くは 20-30 週) に血小板減少が生じ

ていた。このうち、9回で妊婦側の TTP 発症が確認され、いずれも発症予防目的の新鮮凍結血漿の輸注は実施されていなかった。一方、TTP を発症しなかった残り7回のうち、3例(3回)では予防的新鮮凍結血漿輸注がなされていた。また大変興味有る事に、同一患者で3回の妊娠歴に対していずれも血小板減少時にアスピリンが投与され、なんとか30週迄妊娠継続が出来、最後にはいずれも帝王切開で生児を得ている症例があった。この時のアスピリンの効用についてはEBMは確立されていないが、今後検証されるべき重要な課題と考えられる。一方、USS患者の両親は基本的にはいずれも無症候性キャリアーである。これらの無症候性キャリアーの両親間で妊娠が確認出来たのは19回(19名)で、1回(1名)は妊娠20週で子宮内死亡、もう1回(1名)は妊娠32週時に子宮胎盤溢血で流産となっていた。この2名の胎児がUSSであったか否かは現時点では検証不可能である。しかし以上の事実は、無症候性USSキャリアーの両親間で、「USS患者を」妊娠した場合、「超最重症」の症例は、1)妊娠初期～中期に死産、また2)「重症」の症例は新生児期発症のTTPを、さらに、3)「中等症」の症例は新生児期には異常を認めないが、これ以降に血小板減少やTTP症状を反復する、

そして、4)一見「軽症」と考えられる症例は、成人期以降にTTPを発症するのように見える。国内外の複数の研究者は、初期のFurlanの観察報告(2001)を基盤に、「先天性ADAMTS13活性欠損であっても、全く症状の無い症例がある」という事を固く信じているようであるが、本邦のUSS症例の詳細なNatural Historyを検証すると、殆どの症例で「小児期の(仮面)血小板減少症を誤診あるいは看過している」と考えられる。

5. ADAMTS13 抗原の解析: 前記のように、(1)モノクローナル抗体A10とC7を用いたサンドイッチELISAと、(2)WB解析の二法で行なった。まず(1)の方法において、A10をELISAプレートに固相化し、C7をhorseradish peroxidaseで標識したantigen-ELISAでは、そのADAMTS13抗原量の測定下限が0.1%(正常値100%)と超高感度であった。また、正常人でのこれらの値はchromogenic act-ELISAで得られたADAMTS13活性と一定の相関を示した( $r^2=0.33$ )。しかし、C7を固相化し、A10を酵素標識した場合のantigen-ELISAの値は同酵素活性とは相関は、認められなかった。このように活性阻害抗体を固相化し、一次抗体として使用した場合、得られた抗原量はその活性値を比較的良

く反映するという成績はVWFでも証明されており (Murdock PJ, et al. Thromb Haemost, 1997)、今後このA10-C7 sandwich antigen-ELISAは同活性と抗原の自動化迅速測定法の開発にも寄与できるものと考えられる。

次にWBによる抗原解析であるが、既にそのADAMTS13遺伝子異常部位を明らかにし論文報告したUSS A<sup>~</sup>Iの患者家族について行った。USS患者は全てにおいて血漿中のADAMTS13抗原量も著減しており、この結果はin vitroでの発現実験結果と略一致していた (Ishizashi et al, Thromb Res 2007)。しかし、Q449Xホモ変異はin vitroでは発現されるものの、in vivoの患者血漿中には確認できなかった。この差は恐らく、Q449X蛋白はin vivoで発現されていても、その分解が亢進しているため、血中からは消失しているものと推察された。

6. チェノピリジン誘導体に関連したTTPの日米共同研究(SERF-TTP Study I) : 詳細は平成19年度報告に記載するが、Northwestern大学(シカゴ)のCharles N. Bennett教授からの申し入れにより、前記の共同研究を行い、同じチェノピリジン誘導体でありながらチクロピジンTTPは症例の約80%が抗ADAMTS13自己抗体を生じる「定型的」TTPであり、しかもその発現は

投薬後2-4週の間には殆ど生じる事、また一方、クロピドグレルTTPは前者よりも発生頻度の絶対数は遥かに低く、また抗ADAMTS13自己抗体を生じる「定型的」TTPは20%に過ぎず、残り80%はADAMTS13活性が略正常の「非定型」TTPである事が明らかにされた (Bennett et al, JACC 2007)。

7. 生体肝移植時のTMA病態解析 : ADAMTS13のcDNAクローニングがなされる1999年に、藤村らは先天性胆道閉鎖症による胆汁性肝硬変の末期患者(主に小児)ではADAMTS13活性(当時はVWF切断酵素と呼称)が著減するが、かかる患者に生体肝移植を行い、その経過が良好であると同酵素活性は急激に上昇し、そうでない場合には活性回復が著しく遅延する事を報告した (Matsumoto et al, Blood 抄録 2000)。この観察はADAMTS13の主産生臓器が肝臓である事を示しており、実際その後間もなく3研究グループにより、いずれも肝ライブラリーから同酵素のcDNAクローニングがなされた。その後、藤村らは肝硬変患者に生体肝移植を行うと、直後から約1週間でADAMTS13活性が著減し、同時に血小板数低下を伴う事を自験例3症例で見出した (Ko et al, Liver Transplantation, 2006)。この現象は和田らによって、異なった施設での多

数例解析でも追認された。さらに、この時のTMA病態のモニタリングには全自動機器による破碎赤血球と網状血小板の測定が有用である事が報告された(論文未発表)。これらの結果は肝臓の虚血再灌流障害により同所でのADAMTS13産生能が大きく損なわれる事を示し、肝臓での微小循環障害は肝繊維化などの肝機能障害の原因となりうる事を示唆している。ADAMTS13活性低下が諸臓器での微小循環障害をもたらし、臓器によって腎臓、心臓、脳神経、脾臓などではそれぞれ異なった疾患名として診断されている可能性が示唆されるが、このような病態が全身性に生じたものがTTPとも表現できる。それ故、ADAMTS13を中心とする【TTP】から解析するのではなく、末端の【微小循環障害】の立場から捉える研究アプローチはとてつもなく大きな展開が期待される。

8. フェージディスプレイ法によるADAMTS13のエピトープ解析:村田班員(研究協力者 森木隆典)は新しい試みとしてこの解析を行った。原理はまずADAMTS13cDNAを断片化してフェージに導入し、その表面で様々なペプチドを発現させたフェージライブラリーを作成する。一方で、マイクロプレートに抗ADAMTS13抗体やVWFをコーティングし、これに結合するフェージ

を同定し、これに関与する内因性ADAMTS13遺伝子を解析する事により、対応するそれらのエピトープを同定するというものである。詳細は個別報告に記載されるであろうが、大まかにADAMTS13のN末端(MPドメイン領域)、Cys-rich/Spacerドメイン領域、そしてC末端(CUBドメイン領域)の3ヶ所に、高張り応力下にこの酵素が基質VWFに結合し、これを消化するに必須の部分がある事が示されている。これらの結果がTTP患者の予後にどのように反映されるかは次世代の本研究班の重要な課題でもある。

#### D. 結論

簡便なADAMTS13活性測定法の開発により、多数のTMA患者を迅速に診断可能となり、適切な治療法が選択できるようになった。TMAグループでは、この方法を用いて全国の医療機関から、平成19年末までにTMAを861例集積した。この中からUSSを35例発見し、妊娠発症などの問題点を指摘した。後天性の中からは、薬剤性のチクロピジンとクロピドグレルTTPの臨床的特徴を明らかにした。本研究での患者集積は現在も継続されており、今後も新たな疾患概念の発見など、さらなる発展が期待される。

#### E. 健康危険情報