

T cells may be related to the effect of these medications. However, the number of CD4⁺CD25⁺ T cells was not significantly high in the patients not demonstrating a recovery of the platelet count. These findings suggest that CD4⁺CD25⁺ T cells play an important role in the recovery of the platelet count.

It is interesting that the number of CD4⁺CD25⁺ cells was found to be significantly high in the patients treated with a splenectomy [22]. Although the detailed mechanisms for the increase of CD4⁺CD25⁺ cells after a splenectomy remain to be elucidated, our results suggest that an increased number of CD4⁺CD25⁺ T cells may possibly have an immunosuppressive effect on ITP.

Foxp3, which encodes a forkhead/winged-helix transcription factor designated as Scurfin [23-26]. IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome), which is characterized by multi-organ autoimmune diseases, allergy and IBD, and XLAAD (X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome) in human, or scurfy, a mouse mutant strain which succumbs to X-linked recessive autoimmune/inflammatory disease, are caused by a mutation of Foxp3 [27]. Recently, Foxp3 has been shown to be specifically expressed in CD4⁺CD25⁺ T cells in thymus and peripheral blood of normal mice, and it is a key regulatory gene for the development of regulatory T cells [28].

In this study, the expression levels of Foxp3 were significantly high in cases with improved platelet counts. In this investigation, CD4⁺CD25⁺ cells closely correlated with Foxp3. These results also suggested that regulatory T cells were thus related to the activity of ITP.

ITP is a very heterogenous disease, which has various clinical features and responses to different therapies. Therefore, further studies are needed to elucidate the role of regulatory T cells on ITP.

Acknowledgements

This study was supported in part by research grants from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and from the Japanese Ministry of Education, Science, Sports and Culture.

Reference

- [1] Craft J, Fatenejad S. Self antigens and epitope spreading in systemic autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1997;40:1374-82.
- [2] Crow MK, DelGiudice-Asch G, Zehetbauer JB, Lawson JL, Brot N, Weissbach H, et al. Autoantigen-specific T cell proliferation induced by the ribosomal P2 protein in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1994;94:345-52.
- [3] Kuwana M, Medsger Jr TA, Wright TM. T cell proliferative response induced by DNA topoisomerase I in patients with systemic sclerosis and healthy donors. *J Clin Invest* 1995;96:586-96.
- [4] Ito Y, Nieda M, Uchigata Y, Nishimura M, Tokunaga K, Kuwata S, et al. Recognition of human insulin in the context of HLA-DRB1*0406 products by T cells of insulin autoimmune syndrome patients and healthy donors. *J Immunol* 1993;151:5770-6.
- [5] Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990;346:183-7.
- [6] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
- [7] Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001;2:816-22.
- [8] Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101:455-8.
- [9] Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1996;9:211-20.
- [10] Lundgren A, Suri-Payer E, Enarsson K, Svennerholm AM, Lundin BS. *Helicobacter pylori*-specific CD4⁺CD25⁺ high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to *H. pylori* in infected individuals. *Infect Immun* 2003;71:1755-62.
- [11] Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756-61.
- [12] Cao D, Malmstrom V, Baecher-Allan C, Hafler D, Klareskog L, Trollmo C. Isolation and functional characterization of regulatory CD25^{bright}CD4⁺ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2003;33:215-23.
- [13] Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002;168:4272-6.
- [14] Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971-9.
- [15] Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998;102:1393-402.
- [16] Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* 1996;88:194-201.
- [17] Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG. A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1999;104:442-7.
- [18] McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* 2003;1:485-91.
- [19] McMillan R. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1981;304:1135-47.
- [20] Karpatkin S. Autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Lancet* 1997;349:1531-6.

- [21] He R, Reid DM, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1994;**83**:1024–32.
- [22] Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Manzano L, Merino JL, Alvarez-Mon M. The clinical outcome of autoimmune thrombocytopenic purpura patients is related to their T cell immunodeficiency. *Br J Haematol* 1993;**84**:464–70.
- [23] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;**27**:68–73.
- [24] Chatila TA, Blaeser F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, et al. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000;**106**:R75–81.
- [25] Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;**27**:18–20.
- [26] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;**27**:20–1.
- [27] Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002;**39**:537–45.
- [28] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;**299**:1057–61.

その他

平成 19 年度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班

第 1 回班会議

日時：平成 19 年 8 月 3 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学医学部新棟 11F 大会議室

プログラム・抄録集

主任研究者 池田 康夫

平成 19 年度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班

第 1 回班会議 プログラム

日時：平成 19 年 8 月 3 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学医学部新棟 11F 大会議室

（サブグループ総括報告：20分 各個人研究：12分 討論含む）

10:00～ 主任研究者 挨拶 池田康夫

10:05～ 厚生労働省健康局疾病対策課 林修一郎課長補佐 ... ご挨拶

10:15～ 特発性血栓症研究班 ... 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

特別協力者：杉田稔 東邦大学医学部・島田直樹 慶應義塾大学医学部（疫学班）

10:35～ TMA 研究班 ... 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 東邦大学医学部・島田直樹 慶應義塾大学医学部（疫学班）

11:05～ ITP 研究班 ... 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

班 員：桑名正隆 慶應義塾大学医学部

倉田義之 四天王寺国際仏教大学

研究協力者：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 東邦大学医学部・島田直樹 慶應義塾大学医学部（疫学班）

11:25～ 静脈血栓塞栓症研究班 ... 総括報告 小林隆夫

サブグループリーダー：小林隆夫 信州大学医学部保健医療学科

研究協力者：山田典一 三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻

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 女川町立病院内科

11:45～12:45 昼休み

12:45～14:00

特発性血栓症班員報告：

宮田敏行「日本人の深部静脈血栓症患者における FV H1299R 変異と TFPIb N221S 変異の頻度」

川崎富夫「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-」

窓岩清治（坂田洋一）「ワルファリン使用に関するアンケート調査結果のまとめ」

小嶋哲人「アンチトロンビン欠損症・拡張型心筋症合併家系の遺伝子解析」

辻 肇「ヘパリンの在宅自己注射に関する治療指針（案）」

14:00～14:40

TMA 班員報告：

藤村吉博「本邦 Upshaw-Schulman 症候群 33 例の Natural History 解析による TMA 発症要因」

和田英夫「アンケート調査の解析、後天性 TMA の分類、診断基準（案）」

小亀浩市（宮田敏行）「日本人一般住民の血漿 ADAMTS13 活性と遺伝子多型」

森木隆典（村田 満）「ADAMTS13 における FcγRIIIb 因子および TTP 患者由来 IgG の結合比トープ」

14:40～15:30

ITP 班員報告：

藤村欣吾「ITP 死亡例の実態 —平成 18 年度アンケート調査のまとめ—」

桑名正隆「特発性血小板減少性紫斑病の新規マウスモデル作成の試み」

倉田義之「ITP の全国疫学調査：平成 15 年度と 16 年度の比較」

降旗謙一「特発性血小板減少性紫斑病に関する新検査の検討」

15:30～15:45 休 憩

15:45～16:45

静脈血栓塞栓症研究班員報告：

小林 隆夫「産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査—2001 年から 2005 年（中間報告）」

佐久間 聖仁「静脈血栓塞栓症の頻度、臨床的特徴（中間報告）」

榛沢 和彦「新潟県中越地震 2 年目における被災者の DVT と血液凝固マーカー」

山田 典一「うっ血性心不全症例における深部静脈血栓症の発生頻度調査」

終 了

平成 19 年度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班 主任研究者：池田康夫

事務局：慶應義塾大学医学部内科池田教授室 Tel: 03-3353-1211 内線 62421

特発性血栓症サブグループ研究報告

◎宮田敏行 国立循環器病センター研究所
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遺伝的背景の検討：宮田

研究班で収集した日本人の静脈血栓症患者の遺伝子を解析し、プロテイン S K196E 変異が静脈血栓症との関連を示した。本変異は、一般住民の約 55 人に 1 人の割合で見られた。この静脈血栓症患者の約 30% に、プロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンのいずれかの遺伝子にアミノ酸が変化する遺伝子変異を同定した。凝固第 V 因子 R 2 多型が、弱いながらも静脈血栓症との関連を示した。TFPIβ の N221S 変異は関連を示さなかった。

(2) 日本人で同定されたプロテイン 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調査：小嶋

これまでに日本人の静脈血栓症患者の遺伝子解析が報告されているが、そのデータベースはない。そこで、これまでに報告された日本人のプロテイン C、プロテイン S、アンチトロンビンの各遺伝子の解析結果を文献的にまとめ、それらをインターネットで公開する。

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

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。班会議で調査結果を検討し、特発性血栓症サブグループとしての治療指針をまとめたい。

(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

大阪大学病院では独自の血栓予防、診断、治療ガイドラインを運用してきた。研究班の最終年度にあたる本年は、それらの運用から導き出される重要な点を考察する。

(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

ワルファリン使用の実態に関するアンケート調査を実施した。この調査結果を報告する。

TMA サブグループ研究報告

◎藤村吉博・松本雅則 奈良県立医科大学輸血部
宮田敏行・小亀浩市 国立循環器病センター研究所
村田 満・森木隆典 慶應義塾大学医学部
和田英夫 三重大学医学部

本研究班は、過去ほぼ10年間に渡って実質的に本邦の TMA referral center として機能してきた奈良医大輸血部で、集積した患者の臨床・検査データ（平成16年末で TMA 783 症例）の解析を中心に、ここから生みだされた基本情報を基盤に世界に発信できる大きな成果をあげてきた。今年度の研究計画は以下のとおりである。

- 1) 宮田敏行：日本人一般住民の血漿 ADAMTS13 活性と遺伝子多型
- 2) 村田 満：ADAMTS13 における VWF および TTP 患者由来 IgG の結合エピトープ
- 3) 藤村吉博：本邦 Upshaw-Schulman 症候群 33 例の NH 解析による TMA 発症要因
- 4) 和田英夫：アンケート調査の解析、後天性 TMA の分類、診断基準（案）

一方、ADAMTS13 活性測定の保険診療への収載が要望として出されている（筈である）が、未だ認可されるに至っていない。しかしかかる状況下で、既に複数の検査会社が同酵素活性やインヒビターの測定を受注しているのが現状であるが、この場合、先天性あるいは後天性 TMA の最終診断はその解釈に不慣れな主治医が行う事になり、せっかくの結果が正しく評価されない事態も生まれうる。この導線を如何に正しく組み立てるかが本研究班の今後の課題でもある。

平成 19 年度 ITP サブグループ研究計画要旨

分担研究者： ◎藤村 欣吾（広島国際大学）
 倉田 義之（四天王寺国際仏教大学）
 桑名 正隆（慶應義塾大学）
研究協力者： 野村 昌作（市立岸和田市民病院）
 降旗 謙一（株式会社 SRL）
特別協力者： 杉田 稔（東邦大学）
 島田 直樹（慶應義塾大学）

目的：ITP の基礎的、疫学的、臨床的研究に基づいた診断、治療法を確立し、QOL の向上を目指す。

これまでの研究概況：

ITP の疫学—大阪大学倉田義之先生により ITP の臨床個人調査表を基に平成 15 年度、16 年度の実態をまとめ、昭和 40 年代に行われた調査に比べ発症年齢の高齢化、罹病期間の長期化、が認められ、日常生活においては自宅での生活が多くの症例で可能となっていることが明らかとなった。

診断基準の提案：慶応大学桑名正隆先生により平成 16 年度に基礎的研究から得られた成果を基に ELISPOT assay を用いた抗体産生 B 細胞の定量や、血小板産生能を指標に除外診断から一歩前進した診断基準を報告した。現在 SRL 降旗謙一先生と共にこの診断基準の中核となる ELISPOT assay の標準化を検討し全国レベルで検査可能な体制の確立を計りつつある。

治療ガイドラインの提案：広島国際大学藤村欣吾による全国的な後ろ向き臨床調査により、ヘリコバクターピロリ菌除菌療法がピロリ陽性 ITP 症例においては有意に血小板増加反応を起こすことから除菌療法を組み入れ、且つ血小板数や臨床症状から治療の層別化を計り、治療の目標を設定した治療ガイドラインを平成 16 年度に提案した。本症例における除菌療法の保険適応を申請中である。

今年度の研究計画：

1. 疫学に関してはさらに経年的調査を行い、ITP 症例の治療内容、効果、合併症、日常生活の QOL 等を解析し、高齢化している ITP 症例への医療介入を検討する。
2. 診断基準に関しては現在進行中の精度管理を分析し、全国的に検査可能な体制を確立し、ITP 診断のための検査として保険収載を行う。
3. 治療ガイドラインについては ITP 治療予後にどの程度貢献しているかを検証する必要がある、本班員の中でこれを実施し有用性を検討する。

静脈血栓症/肺塞栓症グループ 平成 19 年度研究計画報告

◎小林隆夫 信州大学医学部保健学科

静脈血栓塞栓症（深部静脈血栓症/肺塞栓症）は、わが国においては発生頻度の少ない疾患としてこれまで重要視されて来なかったが、生活習慣の欧米化や社会の高齢化、さらには手術を含めた医療処置の複雑化に伴い、その発生数は急激に増加している。この結果、本症は入院患者の突然死の原因として、医療界ばかりでなく社会的にも非常に注目を集める疾患となっている。本研究ではわが国において様々な状況下で発症する本疾患の現況を調査し、「日本人のエビデンスを明確にする」ことにより、「医療従事者はもちろん、国民にも本疾患を広く周知徹底する」とともに、「医療行政や災害対策にも役立て」、「本疾患での死亡例減少に貢献する」ことが研究目的である。静脈血栓症/肺塞栓症グループでは今年度も前年に引き続き研究を継続している。すなわち、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、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の 4 件である。また、新規研究としてうっ血性心不全症例における静脈血栓塞栓症の発生頻度調査を行っている。以下に概要を示すが、日本人にも想像以上に多いことが明らかとなり、今後の予防対策の徹底が重要である。

1. 精神科領域の肺塞栓症発症調査：精神科病棟入院患者において発症した肺塞栓症例では、女性、統合失調症、入院初期、フェノチアジン系抗精神病薬の服用、肥満、活動性低下および臥床例、身体拘束が多かった。

2. 新潟中越地震後の深部静脈血栓症調査：新潟県中越地震から 2 年目でも震災 1 年後に DVT を認めた方のうち 37.2% に認め、さらに初めて検査を受けた方の 5.2% に認められた。DVT(+) では D ダイマー、PIC が有意に高かった。

3. 産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査：21 世紀に入ってからでも発症数は増加したが、産科症例は減少、婦人科症例は増加（術前発症例が一段と増加）、無症候性症例の増加が特徴だった。術後予防のみならず術前評価が重要である。

4. 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：精神科以外の推定した肺塞栓症例数は 10 年で 2.25 倍に増加した。また、深部静脈血栓症単独群は肺塞栓症合併群に比し、左側の静脈に有意に多く、症状を有する比率も有意に高かったが、危険因子を有する割合には差がなかった。

5. うっ血性心不全症例における静脈血栓塞栓症の発生頻度調査：三重大学にうっ血性心不全で入院した連続 131 例に対して、下肢静脈超音波検査にて血栓の有無を検索した結果、12%(15/131)に深部静脈血栓症を認めた。特に NYHA IV 度の重症例では 24% と欧米と同様高頻度に深部静脈血栓症が発生していた。

日本人の深部静脈血栓症患者における FV H1299R 変異と TFPIb N221S 変異の頻度

宮田 敏行 国立循環器病センター

【目的】血栓症の軽度の危険因子とされる H1299R 変異を含む FV R2 haplotype について、日本人の DVT 患者を用いて検討した。また、TFPI 遺伝子は全エクソンをシーケンスし同定した N221S 変異が DVT と関連を示すかを検討した。

【方法】「厚生労働省科学研究費難治性疾患克服研究事業」で収集した 176 名 DVT 患者および一般住民（吹田研究）1499 名を対象に、FV H1299R 変異の検出を行った。また、全 DVT 患者の塩基再配列解析により、TFPIb に特異的なエクソン 7b 内に N221S 変異を同定した。この Asn 残基は、TFPIb に特異的な glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカーが結合する残基であり、本変異を保有する TFPIb は細胞膜上に GPI アンカーされないと予想され、DVT 発症との関連が予想された。そこで、本 N221S 変異を一般住民群 1,684 名を対象にタイピングした。

【成績】 FV H1299R 変異：コントロール群 1499 名中、R1299 変異保有者は 217 名（14.5%）であったのに対し、DVT 群 176 名中の R1299 変異保有者は 36 名（20.5%）検出された（ $\chi^2=7.14$, $P=0.028$ ）。また、R1299 アレル頻度は、コントロール群 7.5%に対し、DVT 群 11.1%であり有意差を認め（ $P=0.021$ ）、オッズ比は 1.54（95% CI=1.08-2.21）であった。TFPIb N221S 変異：一般住民では、NS: 251 名（14.9%）、SS: 8 名（0.5%）であった。一方、DVT 群 176 名では NS: 23 名（13.1%）、SS: 1 名（0.6%）であり、両群間で有意差がなかった。また、S221 アレル頻度は、一般住民群 7.9%に対し、DVT 群 7.1%であり有意差を認めなかった（ $P=0.677$ ）。

【結論】 FV R1299 変異はコントロール群と比較し、日本人の DVT 患者に有意に高頻度に検出された。リコンビナントを用いた実験で FVR2 は血栓傾向を呈するという報告がされていることから、FV R1299 変異が日本人の DVT 発症に関連することが強く示唆された。TFPIb N221S 変異は DVT との関連を示さなかった。

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—
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、弾カ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、弾カ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。

ワルファリン使用に関するアンケート調査結果のまとめ

○窓岩清治、坂田洋一

自治医科大学医学部分子病態研究部

本邦医療機関におけるワルファリン使用の現状を把握することを目的に、大学付属病院及び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(1,269件)と、日本血栓止血学会評議員(201件)の合計1,470件を対象に、「ワルファリン使用に関するアンケート調査」を実施した(回収率33.4%)。ワルファリンの平均使用期間が6ヶ月以上のものは、先天性および後天性血栓性素因を有する症例ではそれぞれ91.9%、84.0%に対して、血栓性素因が明らかでない症例では56.7%であり、基礎疾患を考慮した上でワルファリン使用期間が決定されていた。ワルファリンコントロールの指標は、PT-INR値を1.5-2.5に設定している施設が89.6%と大半を占めており、その多くは1ヶ月ごとにモニタリングされていた(53.4%)。コントロールに用いる検査指標を全く用いていない施設が51.2%であり、FDPあるいはD-ダイマーいずれかを指標としているものが41.6%であった。ワルファリン療法中に血栓症の再発がみられた施設は32.4%あり、その際のPT-INR値が1.0-1.5であるものが29.5%、1.5-2.5が63.3%と、設定したPT-INRを下回ることにより血栓症を発症する傾向がみられ、感染症、脱水、悪性腫瘍および臥床が主な誘因となっていた。一方ワルファリン使用中の出血例は52.8%の施設で経験があり、その際のPT-INR値が2.5以上と設定値を上回る症例が43.5%にみられた。このうち軽度の出血例が63.0%、重要臓器への出血ないし輸血を要する重篤な出血が30.4%にみられた(3施設で死亡例の報告)。本調査結果は、日本人に適した静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法を確立するために、重要な臨床的資料となるものと考えられる。

アンチトロンビン欠損症・拡張型心筋症合併家系の遺伝子解析

小嶋哲人 名古屋大学医学部

【目的】アンチトロンビン (AT) は、血液凝固セリンプロテアーゼを不活化することで血液凝固反応を制御する主要なセリンプロテアーゼインヒビターである。拡張型心筋症 (DCM) は進行性心室拡張と収縮機能障害により心不全あるいは心室性不整脈から突然心臓死に至る疾患で、家族性 DCM の原因遺伝子としてこれまでに少なくとも 24 個の遺伝子での変異が報告されている。今回、我々は家族内発生の見られた AT 欠損症と DCM 合併症例において、それぞれ原因となる遺伝子変異の検索を行なったので報告する。

【方法】DCM 責任遺伝子については、AT 遺伝子と同一染色体 (1 番) 上に存在するトロポニン T (*TNNT2*) 遺伝子、Lamin A/C (*LMNA*) 遺伝子について解析を行なった。【結果・考察】患者 AT 遺伝子には、既報の AT Budapest 5 変異を同定した。また、患者の *TNNT2* 遺伝子には変異は見つからず、*LMNA* 遺伝子に 1283G→C の 1 塩基置換を同定した。これは 357Asp が His へと置換される新規のミスセンス変異であった。357Asp は Lamin 分子の酸性の強いヘリックス部に存在し、塩基性アミノ酸である His への置換は Lamin 分子の構造と機能に大きな影響を及ぼすものと考えられ、DCM 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

前々回の本会議において、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。前回、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）を提示した。

今回、前回の会議において問題点として指摘された安全性に関する部分を中心にさらに検討を加え、改めてヘパリンの在宅自己注射に関する「治療指針（案）」として提案する。

本邦 Upshaw-Schulman 症候群 33 例の Natural History 解析による TMA 発症要因

○藤村吉博・松本雅則 奈良県立医科大学輸血部

Upshaw-Schulman 症候群(USS)は ADAMTS13 遺伝子異常に基づく ADAMTS13 活性欠損症で、先天性 TTP とも呼ばれている。その昔、原因不明の頃は「USS は幼小児期からの慢性血小板減少や反復性 TMA 発作を生じ、これが新鮮血漿の輸注にて劇的に改善するのが特徴である」と報告されていた。またその後、欧州で不十分な Natural History (NH)のもと症例が集積され、その結果、発症時期が幼小児期からの「早期型」と、成人期以降に突然 TMA を発症する「遅発型」があることが報告され、これが信じられるようになった。また、これを裏づけるデータとして、ADAMTS13 遺伝子ノックアウトマウスでは TTP を発症せず、これに血管内皮障害を引き起こすような 2nd hits があって、始めて TTP を発症するとの 2 研究グループの報告もある。一方、我々は本邦 USS を 33 例集積し、その NH を整理すると、患者が女性の場合、妊娠時にはその 20-30 週で 100%血小板減少が起こり、その後の不適切な治療にて TMA に進展する事を見出した。またこの内の 2 例は幼小児期に USS と臨床診断されるも、10 年以上も前に「試験的治療」として DDAVP が投与され、その 30 分後に急激な症状増悪が生じた事も確認し得た。この両者に共通する事は、いずれも急激な血中 VWF 量の増加で、これには UL-VWFM の出現も伴う。さらに、一見、成人期以降に突然 TMA を発症する「遅発型」USS も NH を詳細に調べると、その殆どで幼児期に血小板減少のエピソードがあり、「ITP 又は Evans 症候群」と誤診されていた事も明らかになった。妊娠期の TMA 発症は流産・死産に結びついている例が多く、「習慣性流産」等と意味不明の診断が付けられている例もあった。症状が多彩な USS を臨床症状のみで事前診断する事は困難であることから、女性については生涯に一度、妊娠機会前に ADAMTS13 活性をマスキリング検査として実施導入する事の必要性が、本研究班の成果として見いだされた。

「アンケート調査の解析、後天性 TMA の分類、診断基準（案）」
和田英夫 三重大学

血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) / 溶血性尿毒症症候群 (HUS) / 血栓性微小血管障害症 (TMA) は微小血管障害性の溶血性貧血と消費性の血小板減少とともに、出血症状、精神神経症状、腎機能障害、高熱をきたす病態である。以前までは、臨床症状などによりこれらの病態の診断・鑑別がおこなわれてきた。近年、ADAMTS13 と TMA との関連が報告され、TMA のなかにも ADAMTS13 が低下するものと、低下しないものが存在することがわかってきた。また、TMA の予後はいまだに悪く、精神神経症状が発言する前に血漿交換を行う必要がある。このため、ADAMTS13 を基本とした TMA の診断基準を確立する必要がある。

以前からの報告、厚生労働科学研究費補助金のアンケート調査 195 例、奈良県立医大輸血部の成績、自験成績などをもとに TMA の診断基準案の作成を試みた。臨床症状の出現頻度は、神経症状、腎障害、高熱は 100%ではなかった。RBC、Hb、網状血小板数、LDH、T-Bil、クレアチニン値の中央値は著しい異常を呈したが、95%CI 値は正常範囲内になった。一方、血小板数 10 万以下の減少ならびに破碎赤血球の出現 (FRC>1.0) は 95%以上の症例にみられた。ADAMTS13 の低下は TTP の診断に必要と考えられ、以下の診断基準案を提案した。

破碎赤血球の証明 (FRC>1.0) と血小板減少 (10 万以下) を必須項目とし、ADAMTS13 の低下 (20%以下) がみられれば TTP と診断し、ヴェロトキシン、O-157 の証明、あるいは腎障害が認められれば HUS と診断する。

上記の診断基準案は、さらに data を加えて改訂する予定である。

日本人一般住民の血漿 ADAMTS13 活性と遺伝子多型
○小亀浩市・宮田敏行 国立循環器病センター研究所

VWF 切断酵素 ADAMTS13 の活性著減は、血栓性血小板減少性紫斑病の発症原因である。ADAMTS13 活性は、TTP 以外の病態との関連も多く指摘されるようになり、臨床的意義が注目されている。我々は ADAMTS13 の簡便な活性測定法の開発に成功し、これにより多試料の活性測定を行うことが可能になった。そこで、日本人一般住民における血漿 ADAMTS13 活性の測定を行い、ADAMTS13 遺伝子多型との関連を調べた。対象は、倫理委員会の承認を得た吹田研究の試料である。FRETs-VWF73 法で活性を測定した結果 (n = 3,616)、平均値を 100%とすると、中央値 97%、最大値 242%、最小値 38%、標準偏差 27%であった。男性平均値 93% (n = 1,687)、女性平均値 106% (n = 1,929) で有意な性差を示し、男女とも 60 歳以上で活性低下が観察された。一方、346 人の ADAMTS13 遺伝子全エクソンをシーケンス解析した結果、6 個のミスセンス多型が同定された。ADAMTS13 活性と照合したところ、Q448E 保有者は約 6%の高値を、P475S 保有者は約 15%の低値を示した。以上より、日本人一般住民の血漿 ADAMTS13 活性は、性、年齢、遺伝子多型の影響を受けていることが明らかになった。さらに、活性値の分布を解析したところ、女性の場合はそれら以外の要因の影響もを受けていることが示唆された。

ADAMTS13 におけるフォンビルブランド因子および TTP 患者由来 IgG の結合エピトープ
○森木隆典 慶應義塾大学 保健管理センター
村田 満 慶應義塾大学医学部 中央臨床検査部

マルチマーとして血管内皮細胞から分泌されたフォンビルブランド因子 (VWF) は、ADAMTS13 により適度なサイズに切断されることにより、血流中で適切な機能を発揮することができる。我々は、ファージディスプレイ法を用いて ADAMTS13 を構成するペプチド断片をファージ表面に発現させ (ADAMTS13 エピトープライブラリー)、マイクロタイタープレート上に固相化した VWF に結合するファージを静止系でスクリーニングすることにより、ADAMTS13 分子内に存在する VWF 結合エピトープ配列を探索した。既に、ADAMTS13 における VWF 結合部位としてシステインリッチおよびスパーサー領域の重要性が報告されているが、本法により、システインリッチ領域に 1 ケ所、スパーサー領域に 2 ケ所、それぞれアミノ酸 24 個、24 個、15 個よりなる計 3 ケ所の VWF 結合エピトープを見出した。さらなる VWF 結合配列の存在を探索するため、このエピトープ配列を含む合成ペプチドを作成し、スクリーニング系に添加して探索を行ったが、新たなアミノ酸配列は得られなかった。これらの合成ペプチドに関して、リコンビナント ADAMTS13 を用いた FRETS-VWF73 および VWF マルチマー分解反応に対する競合阻害を検討したところ、各々の合成ペプチドについて異なる程度の阻害効果が確認された。さらに、これらのエピトープ配列を含む合成ペプチドについて、表面プラズモン共鳴法を用いて、センサーチップ上に固定化した VWF に対する結合定数を測定したところ、有意な結合能を有することが確認された。以上より、これらのペプチド配列は ADAMTS13 における VWF 結合エピトープであると考えられる。また、三重大学および奈良県立医大より供与された TTP 患者血液サンプル由来の IgG をマイクロタイタープレート上に固相化し、同様に ADAMTS13 エピトープライブラリーを用いて TTP 患者 IgG が結合するエピトープ配列を探索したところ、VWF 結合領域を含むいくつかのドメインに結合する可能性が示唆された。

「ITP 死亡例の実態 —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：近年の ITP 死亡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 施設から回答を得（回収率 66%）、その内 33 施設より報告された 56 症例の ITP 死亡例について解析を行った。

1. 性別：男性 25 例、女性 30 例、不明 1 例 男女比 1:2.0
2. 死亡時年齢：平均 62.2 歳、男性 65.8 歳、女性 59 歳 で男女とも 50 歳以降に多い。
3. ITP 診断時年齢：平均 55.7 歳、男性 63.4 歳、女性 49.3 歳 で全体的には 20 歳代と 60 歳代前後の 2 つのピークがあり、女性ではこのピークと一致するが男性では 60 歳代を中心とした単一のピークであった。
4. 死亡までの罹病期間：全体として 6 ヶ月以内の死亡が約 30% を占め最も多く、所謂急性 ITP と推測される。以後年月の経過と共に死亡症例は減少する傾向にあるが、男性では 9 年以内に殆どが死亡し、女性は 10 年以上経過後死亡する症例が約 40% 存在した。
5. 死亡時の ITP の臨床状況については約 30% が寛解ないしコントロール良好であるのに対し、60% 以上はコントロール不良時の死亡であった。
6. 死亡原因は出血、感染症、がんの順に多く、この 3 疾患で 90% を占めた。
7. 診断時年齢が若年者では出血による死亡が多く、中年以降の発症例では出血と共に感染症、がんによる死亡が多くなる傾向にあった。
出血による死亡例は当然のことながら ITP のコントロールの不良と関連している。
8. ITP 経過中の治療に関しては、経過が長くなるに伴い多くの治療が施され難治症例であることを伺わせた。

まとめ：ITP 死亡例は全 ITP の 1.1% と推計される。約 30% は急性型であり、急性型に対する対応が重要である。また男性は中高年に多く発症する事から死亡までの経過が短い傾向にある。女性は若年時に発症する症例も多く、従って死亡までの経過は長い。死因は出血、感染症、がんの順に多く原疾患のコントロール状況、原疾患の治療による合併症、年齢が影響していると考えられる。