

- 31 回日本血栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)
19. 白鹿正通, 釜江 剛, 中澤剛士,
秋山正夫, 田所誠司, 柏木浩和,
本田繁則, 富山佳昭, 金倉 譲:
血小板インテグリンと Rap1 の機能
における P2Y12 の役割. 第 31 回日
本血栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)
20. 秋山正夫, 柏木浩和, 東道公人,
諸井将明, 小島 寛, 中澤剛士,
田所誠司, 白鹿正通, 金倉 譲,
富山佳昭: ITP 合併 GPVI 欠損例の解
析?GPVI 欠損発症メカニズムに関す
る検討. (ポスター) 第 31 回日本血
栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)
21. 田 繁則, 池島裕子, 田所誠司,
前田祐輔, 木下タロウ, 富山佳昭,
宮田敏行: 発現クローニングによる
インテグリン機能発現分子の同定.
(学術推進 SPC シンポジウム) 第 31
回日本血栓止血学会学術集会
(2008. 11. 20-22, 大阪, 松尾 理)
22. 野村昌作: 血小板数異常を呈する疾
患の病態ならびに診断 ITP 診療の
診断と進歩 (シンポジウム) 第 55
回 日本臨床検査医学学術集会 平
成 20 年 11 月 28 日、名古屋
- F 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. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

難治性 ITP の治療

分担研究者 藤村 欣吾

広島国際大学薬学部 病態薬物治療学講座 教授

研究要旨

除菌療法を加えた新たな ITP 治療プロトコールによってパイロット研究ではあるが ITP 治療成績は大幅に向上している。従って生命予後が問題になるのは ITP の約 5% を占める難治性 ITP の治療である。従来から種々の治療が提案されたが満足のものはない。最近治験を行っている TPO アゴニストは確実に血小板を増加させ QOL を向上させ有用であるが、治癒を目指した薬剤でなく、一時しのぎの薬剤である。また今回経験した症例は一時的ではあるが骨髄線維化を示した。今後さらに長期使用による骨髄の線維化をはじめとする未知の副作用にも注意が必要である。最近報告された Syk inhibitor は現在良好な成績が示されているが、治癒症例は不明で今後大規模の治験結果にその有用性はゆだねられている。この他には ITP 発症原因の一つである調節性 T 細胞 (Treg) を増加させる、或いは機能を上げる薬剤の探索が必要であろう。

A. 研究目的

ITP の治療成績はピロリ除菌療法を導入し大幅に改善してきたことはこれまでの本研究班でのパイロット研究で明らかとなっている。すなわちピロリ除菌療法を組み込んだ治療ガイドラインにより 95% の症例は血小板数が 3 万以上にコントロールされ、この内で治療を継続している症例は 5 例、9% にすぎず、多くの症例が無治療となっている。しかし 3 例、5% の症例は所謂難治症例で、難治症例を克服することは出来ていない。出血による ITP 死亡例の殆どが血小板数のコントロールが不良の難治例であり、難治例の治療成績の向上が ITP の予後を改善する上で重要である。このような背景に基づき現在難治症例に適応されようとしている TPO アゴニストの問題点と位

置づけを自験例から考察すると共に、今後期待される治療薬について言及する。

B. 研究方法

TPO アゴニストを約 10 ヶ月から 2 年間使用している症例 3 例についての治療効果、副作用、有用性などをまとめた。

ITP の病態研究から導き出されたマクロファージの食食作用を発揮するシグナル伝達を抑制する Syk 抑制剤についての効果を文献的にまとめた。

C. 研究結果

症例の背景：

約 2 年前から難治性 ITP 3 症例に対して TPO アゴニストの皮下注射を週 1 回の割合で行った。これらの内 2 症例は男性で糖尿病を合併しており十分なステロイ

ド治療が行いにくく、摘脾するにも血小板数が1万以下の状態が殆どで、さらに γ グロブリン大量療法に対する反応も不十分で中々摘脾に踏み切れない症例である。長期間の副腎皮質ステロイド少量、維持量には全く反応を示していない。自然出血としての紫斑は時々軽度なものが認められる。機械的刺激時の重大出血時や急を要するイベントに対しては γ グロブリン大量療法と血小板輸血で対応してきた。残り1症例は女性で摘脾を除いて種々の治療が行われたが反応せず、摘脾を計画されたが γ グロブリン大量療法にもわずかな反応しか見られないために摘脾が見送られている症例である。

治療効果：

血小板数は5万以上から20万以内を維持するように投与量を毎週の血小板数に応じて変更する方法で投与設計がなされた。3症例ともTPOアゴニストに反応良好で副腎皮質ステロイドをはじめとする血小板増加に関連した薬剤はすべて途中から中止することが出来た。TPOアゴニストは使用量 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ から始め約6ヶ月間は同一量で血小板数を目標値に維持可能であったが、時間の経過に伴って投与量を増量する必要が3症例ともに認められた。すなわち投与量に対する治療抵抗性？を思わせる傾向が現れた。いずれも薬剤の増量に伴って血小板数は再び目標値を維持することが可能になったがその後投与量は増加する傾向にある。最長は110週、最短は40週以上投与している。この間皮下投与の場合一定量の薬剤が体内に入るはずであるが、投与量は一定でも血小板数は5万以上の範囲で大きく変動する傾向がある。

また長期間投与している1症例では投与量を増加しても血小板数の上昇が見られない時期に骨髓穿刺を行ったところ、治療前に比しレチクリン線維が大幅に増加し、また巨核球も数多く認められ、あたかも骨髓線維症を疑わせるような所見を得た。その後この症例は初回投与量の3倍量を維持することにより変動しながらも血小板数は目標値を保っていた。最近では投与量を減らしても血小板数は目標値以内で推移するようになり、この時点での骨髓生検ではレチクリン線維は減少していた。すなわち可逆的にレチクリン線維が増加する症例を経験した。

3症例ともに毎週皮下注射に通院しているが、慢性にしかも中止の目途がないままに使用する薬剤であるために治療のコンプライアンスからは不十分な薬剤である。

新たな薬剤の有用性について：

細胞生物学の進歩に伴って、種々の生物反応、機能が分子レベルで明らかにされつつある。この基礎的情報に基づいて臨床分野の問題点が解決される道筋が確立して来た。このような状況の中で最近シグナル伝達に関する役者とその役割が明らかとなっている。マクロファージのFcレセプターを介する貪食機構もその一つである。Fc γ レセプターに抗原と結合した抗体がFc部分を介して結合すると、Fc γ レセプターは集合しFc γ レセプターの細胞内ドメインに結合しているFcレセプター γ 鎖がSRCファミリーキナーゼによりリン酸化される。リン酸化されたFcレセプター γ 鎖にチロシンキナーゼであるSykが結合し、それによりPLCやRACが活性化され貪食能、サイト

カインの分泌、活性酸素反応などが起こる。

ITPは血小板に結合した血小板特異抗体を介して血小板がマクロファージなどの貪食細胞に取り込まれ破壊され血小板減少を来すことが主たる血小板減少機序である。この点から貪食細胞の機能を低下させることは血小板減少を防ぐ事になり、治療戦略の一つになりうる。このような背景から Syk 抑制剤の効果、有用性が検討された。現在2つの会社から Syk inhibitor が開発され動物モデルで効果の検討や、一部では第 II 相臨床試験が行われている。

血小板抗体を静脈注射して作成した ITP モデル動物に Syk 抑制剤を投与するとコントロールに比し血小板減少は回復しており、ITP に有用な結果が示されている。この他にも AIHA や RA のモデル動物に対しても有効性が認められ、Syk を抑制することが種々の自己免疫疾患の治療に新たな展開をもたらすものと期待される。

この中で Syk inhibitor (R788) (Rigal Pharmaceutical Inc.) の難治性 ITP に対する第 II 相臨床試験が行われその結果が報告されている。

それによると16例中12例75%に血小板増加効果が認められている。この内8例50%は血小板数が5万以上に維持され、最大血小板数は18万を越えている。

この中には2例の TPO アゴニスト不応例が含まれており、さらにはステロイドの減量が可能になったり、IVIgG 療法が不要になるなど有効性が認められている。4例25%は一過性に血小板数が増加しその後減少した症例であるが、出血傾向は改善し服薬が続けられている。不応例は

4例25%で投与量を増やしても効果がなないと報告されている。

考案：

TPO アゴニストに関してはすでに外国では多施設で、長期使用の臨床試験が終了し、臨床的に使用が認可されている。すなわち難治性 ITP の 80%以上に血小板増加効果が認められ、出血傾向が回避され日常生活の改善が認められる等の有用性が高いことから認可されたものである。今回 TPO アゴニストを使用した症例はいずれも血小板数2万以下の難治性の症例で、出血のイベントを繰り返していた。しかし本剤により血小板数はもとより、出血傾向が全く見られなくなった事は QOL が格段に向上し日常生活にゆとりが出てきている。インスリンの自己注射を行っている症例では注射部位の紫斑は殆ど見られなくなり血小板増加効果が実感出来ている。

本剤は2年以上使用し続けても難治症例に対して有用性が高く、現時点ではコンプライアンスも週1回の皮下注射であるが保たれており、既報のデータを確認することが出来た。

しかしながら多数例の検討では示されていないが、一定の血小板数を維持するためには使用薬剤量が時間の経過と共に少しずつ増加する傾向が認められ、血小板増加反応も鈍くなる。その中には投与量を上げて血小板増加反応が不充分的時期があり、このような時の骨髓生検ではレチクリン線維の増加が見られた。しかしレチクリン増加反応も一時的なものでその後線維化は少量残存するものの血小板は増加し、また投与量を減らしても目標の血小板数が維持できている。従ってレチクリン線維の増加は一

過性との報告がなされており、本例もそれに合致しているものと考えている。しかし線維化は最も危惧する副作用の一つであり今後も注意深く経過を診る予定である。一方では骨髄線維症の発症には腫瘍化に近い何らかの増殖のイベントが必要で、通常のITPでは増殖イベントが加わらない限りTPOアゴニストによるレチクリン線維が増殖しても一過性に終わる可能性が高い事を示しているとも推測される。

しかし治癒を目的とした薬剤でないために長期に渡る使用を必要とし、今後さらなる長期使用に関する追跡が必要である。難治性ITPの中にはMDSとの鑑別が困難な症例もあり、このような症例に対するTPOアゴニストの使用は芽球の増加なども考えられ慎重に対応する必要がある。

またTPOアゴニストによる血小板増加には約7~12日必要とし救急時にはやはり血小板輸血の代替とはならず、計画性を持って血小板を増加させる場合には有用である。従ってγグロブリン大量療法とほぼ同等の位置づけに加え、経口剤であること、注射剤については自己注射が検討されておりγグロブリン大量療法に比し治療に関してのコンプライアンスが格段に良い点から、長期に血小板数をコントロールすることを可能にする薬剤である。しかし前述のような副作用の懸念があり、治癒が期待できる薬剤でないために、ITPの病態に作用しITPの治癒率を向上させる新たな薬剤が出現するまでの一時しのぎ的薬剤と思われる。

このような観点からはSyk inhibitorは治癒の可能性を期待させる薬剤であり

今後の臨床治験データの集積が必要である。この他制御性T細胞(Treg)を増加させたり、機能を上げる治療も治癒を期待させるものであるが、現時点ではこのような作用を的確にTregに示す薬剤は知られていない。デキサメサゾン大量療法やリツキサン療法によりTregが増加するとの報告があり、今後これらの治療を再検討する必要がある。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. 杉原清香、藤村欣吾：紫斑病 病気と薬「パーフェクトBOOK 2008」 南山堂 657-662、2008
2. 杉原清香、藤村欣吾：出血傾向 病気と薬「パーフェクトBOOK 2008」 南山堂 54-56、2008
3. 藤村欣吾：特発性血小板減少性紫斑病 講義録「血液・造血管疾患学」メディカルビュー（東京）247-249、2008
4. 藤村欣吾：ITP 治療の進歩 medicina 45; 12: 2244-2247、2008

2. 学会発表

1. 藤村欣吾：免疫学的血小板減少症の最新の臨床 第2回広島膠原病フロンティア（広島）平成20年9月19日
2. 杉原清香、勝谷慎也、藤村欣吾、木村昭郎：血小板GPVIシグナル伝達系におけるSLAP-2の役割 第70回日本血

液学会総会（京都市）平成 20 年 10 月 11 日

3. 山口雅史、藤村欣吾、榎 英恵、岡村直樹：先天性好中球減少症における SBDS の臨床的意義：SBDS 変異体の細胞内局在の変化と好中球分化抑制 第 70 回日本血液学会総会（京都市）平成 20 年 10 月 11 日

4. Kingo Fujimura, Fumiyoshi Kasagi, Chikako Ito, Hideo Sasaki : Prevalence and Cause of Death in Patients with Monoclonal Gammopathy in Atomic Bomb Survivors in Hiroshima. 50th ASH Annual Meeting and Exposition (San Francisco, CA) Dec. 7, 2008

5. Masafumi Yamaguchi, Kingo Fujimura, Hanae Toga-Yamaguchi, Valentina Svetic, Naoki Okamura, Rajesh Chopra : Mutations of the SBDS Gene Results in Nuclear Mislocalization. 50th ASH Annual Meeting and Exposition (San Francisco, CA) Dec. 7, 2008

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

トロンボポエチン受容体作動薬の開発動向

研究分担者 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科学 教授

研究協力者 宮川義隆 慶應義塾大学医学部内科学

研究要旨

標準的治療とされるステロイド製剤、脾臓摘出術などが無効な難治性の特発性血小板減少症（ITP）患者は、臨床個人調査表で更新される約 16,000 名のうち約 7% に相当すると考えられる。難治性 ITP 患者の血小板は 1 万/ml 以下になることが多く、脳出血、肺出血、消化管出血など致命的な出血を合併する危険性があるため、画期的な治療薬の開発が必要とされてきた。2008 年に米国とオーストラリアで、難治性 ITP を対象として血小板増加薬ロミプロスチムとエルトロンボパグが新規承認された。国内では両薬剤の第 3 相臨床試験が進行中であるが、開発が先行した欧米における臨床試験結果を検証し、その効果と有害事象について考察する。また、私達を含めた複数の研究施設と企業において類似の血小板増加薬の開発が進められている。国内外における新薬の開発動向を調査し、難治性の ITP 患者さんに対する新規治療法の確立を目指す。

A. 研究目的

本研究では難治性の ITP を対象とする新規血小板減少症治療薬の開発について検証する。巨核球造血に必須な造血因子トロンボポエチンの受容体を標的とする薬剤のロミプロスチムとエルトロンボパグが 2008 年に米国で承認された。他にも RWJ-800088, AKR-501, LGD-4665, S-888711, NIP-004, Butyzamide などの開発が進められており、これら新規化合物の薬効、有害事象について公開されている情報を収集の上検討し、今後日本で承認された場合の適切な使用指針について検討を行う。

B. 研究方法

前臨床試験と臨床試験が進められて

いる様々な血小板増加薬の効果、有害事象、適切な使用指針について考察する。また、トロンボポエチン受容体を刺激する活性をもつ低分子化合物 NIP-004, butyzamide の開発を行い、同薬剤による巨核球造血の仕組みを解明、さらに血小板減少症モデル動物と治療モデルの作成、薬効評価をあわせて行う。

C. 研究成果

海外においては 2008 年にロミプロスチムとエルトロンボパグが難治性 ITP 患者を対象として米国とオーストラリアで新規承認された。欧州でも近々承認見込みである。国内では両薬剤とも第 3 相臨床試験が進められており、数年後には承認されると予想する。海外においては、

難治性 ITP 患者を対象とした第 3 相無作為化二重盲検プラセボ対照試験が終了しており、難治性患者を対象にした難しい臨床研究にも関わらず、治療前の血小板数が 3 万未満の患者が 5-20 万に安定して増加する割合が約 8 割に達した。また、血小板増加薬の使用により、ステロイドなどの前治療を減らし、さらに経過観察中にステロイドの増量、血小板輸血などの救援措置を取る割合がプラセボ群と比較して、統計学的に有意に減少した。また、治験に参加した ITP 患者の生活の質も向上していることが確認された。国内では低分子化合物 NIP-004, butyzamide の前臨床開発が進み、研究成果の報告を行った。

D. 健康危険情報

2008 年に米国とオーストラリアにおいて、難治性の ITP 患者に対して新しい血小板増加薬ロミプロスチム (Nplate®) とエルトロンボパグ (プロマクタ®) が承認された。両薬剤とも ITP 患者を対象とした第 3 相 無作為化二重盲検プラセボ対照試験を実施済みである。治験当初は、これら薬剤が巨核球の増殖と成熟を促進し、一部の症例で骨髄中の細網線維が増加し、骨髄線維症への病型移行が懸念されたが、薬剤の投与中止により細網線維が消失することが米国血液学会で報告されている。トロンボポエチン受容体が巨核球に加え、造血幹細胞にも発現していることから、有害事象については米国における販売承認後も継続した観察が必要であると考えられる。

E. 研究発表

論文発表

Yamane A, Nakamura T, Suzuki H, Ito M, Ohnishi Y, Ikeda Y, Miyakawa Y. Interferon-alpha2b-induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. BLOOD 2008, 112, 542-550.

Nogami W, Yoshida H, Koizumi K, Yamada H, Abe K, Arimura A, Yamane N, Takahashi K, Yamane A, Oda A, Tanaka Y, Takemoto H, Ohnishi Y, Ikeda Y, Miyakawa Y. The effect of a novel, small non-peptidyl molecule butyzamide on human thrombopoietin receptor and megakaryopoiesis. Haematologica 2008, 9310, 1495-1504.

Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y., Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. J Throm Haemost 2008, e-pub

Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y,

Ikeda Y, Kuwana M. Helicobacter pylori eradication shifts monocyte Fc gamma receptor balance toward inhibitory Fc gamma RIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. J Clin Invest 2008, 118, 2939-2949.

学会発表

1. 該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

制御性T細胞が特発性血小板減少性紫斑病の発症を抑制する

研究分担者 桑名正隆 慶應義塾大学医学部内科 准教授
研究分担者 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科 教授
研究協力者 佐藤隆司 慶應義塾大学医学部内科
研究協力者 西本哲也 慶應義塾大学大学院医学研究科

研究要旨

【目的】特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者において制御性 T 細胞 (Treg) の減少や機能異常が報告され、病態との関連が考えられている。そこで、動物モデルを用いた *in vivo* 解析により ITP の病態における Treg の役割を検証した。

【方法・結果】BALB/c ノードマウスに同系マウス由来 CD4⁺CD25⁺ 細胞を移入することで Treg 欠損マウスを作製し、血小板数、網状血小板比率、血小板関連 IgG (PAIgG) を経時的に測定した。Treg 欠損マウスの約 35% は持続的な血小板減少を自然発症し、網状血小板比率と PAIgG の増加を伴っていた。フローサイトメトリーによる検討では、血小板減少マウス由来の血小板溶出液もしくは脾細胞の培養上清中から正常マウス血小板に結合する抗血小板抗体が検出された。さらに、免疫プロット法により血小板減少マウス血漿中に GPIIb または GPIIIa に対する自己抗体が検出された。Treg 欠損マウスの作製時に Treg を同時に移植すると、血小板減少の発症が完全に抑制された。

【考察】Treg 欠損により血小板に対する免疫寛容が破綻し ITP 病態が発症した。したがって ITP 発症抑制に Treg が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP) は血小板膜糖蛋白 (glycoprotein: GP) に対する自己抗体産生により、血小板の破壊が亢進し、血小板減少をきたす自己免疫疾患である。

近年、ITP 患者では健康人と比較して CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の数の減少や獲得免疫を抑制する機能の低下が報告され、Treg 異常

と ITP の病態との関連が考えられている。

そこで本研究では、動物モデルを用いた *in vivo* 解析により ITP の病態における Treg の役割を検証した。

B. 研究方法

1. マウスにおける ITP 病態の評価

1.1 血小板数

マウス眼窩静脈より採血した末梢血を FITC 標識ラット抗マウス CD41 モノクローナル抗体 (clone MWReg30: Becton

Dickinson, San Diego, CA)と反応させた後、FLOW-COUNT® Fluorospheres (Beckman Coulter, Hialeah, FL)を加え、フローサイトメトリーを用いて、CD41⁺細胞とFLOW-COUNT® Fluorospheresとの比により血小板数を測定した。

1.2 網状血小板比率

末梢血を Retic-COUNT™ Reagent (Becton Dickinson)と反応させた後、フローサイトメトリーを用いて、スキャッターで血小板領域に含まれる染色細胞の割合を網状血小板比率として測定した。

1.3 血小板関連 IgG (PAIgG)

末梢血を Alexa Fluor®488 ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA)と反応させた後、フローサイトメトリーによりスキャッターで血小板領域に含まれる細胞の蛍光強度を MFI (mean fluorescence intensity)として測定した。コントロールには Alexa Fluor®488 ヤギ抗ヒト IgG ポリクローナル抗体 (Invitrogen)を反応させた血小板を用いた。

1.4 ITP 病態評価項目のカットオフ値の設定

遺伝的に抗血小板抗体による血小板減少を自然発症する雄性 (NZW/BXSB) F1 マウス (9 週齢、日本エスエルシー、静岡)の血小板数 (n=11)、網状血小板比率 (n=5)、PAIgG (n=7)を毎週経時的に測定し、統計解析により有意差が認められた時点での数値を、血小板数、網状血小板比率、PAIgG のカットオフとした。

2. Treg 欠損マウスの作製

BALB/c マウス (雌、8~11 週齢、日本

チャールス・リバー、神奈川)の末梢血、脾臓より比重遠心法で採取した単核球から、磁気細胞分離により CD4⁺CD25⁻細胞を回収した。その後、BALB/c nu/nuヌードマウス (雌、6~8 週齢、日本チャールス・リバー)の尾静脈から 2×10^7 個の CD4⁺CD25⁻細胞を移植し Treg 欠損マウスを作製した。磁気細胞分離により回収した CD4⁺CD25⁻細胞の純度は 90%以上であった。また、細胞移植後 3~4 週目に末梢血中の CD4⁺細胞を検出することで、移植細胞の生着を確認した。Treg 欠損マウスは移植後 8 週まで毎週 ITP 病態の評価を行った。

3. Treg 欠損マウスにおける抗血小板抗体の検出

3.1 免疫プロット法

正常 BALB/c マウス血小板を抗原として使用し、SDS 7%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後、5%スキムミルク/TBS でブロッキングした。マウス血漿、陽性コントロールとしてラット抗マウス GPIIb α モノクローナル抗体 (clone Xia.G7: Emfret, Eibelstadt, Germany)、ウサギ抗 GPIIb ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、ウサギ抗 GPIIIa ポリクローナル抗体 (Chemicon, Temecula, CA)を反応させた後、化学発光により結合した抗体を検出した。

3.2 フローサイトメトリー法

マウス血小板 (10^7 個)をジエチルエーテルと混和することで血小板溶出液を作成した。また、Treg 欠損マウスから比重遠心法で採取した脾細胞 (5×10^6 個

/ml)を無刺激条件下で4日間培養し、その培養上清を回収した。その後、血小板溶出液または脾細胞の培養上清を正常BALB/cマウス血小板と反応させ、さらにAlexa Fluor[®]488 ヤギ抗マウスIgGポリクローナル抗体を反応させた後にフローサイトメトリーで血小板の蛍光強度を測定した。

4. Treg 同時移植による ITP 病態の発症抑制効果の検討

Treg 欠損マウスの作製時に CD4⁺CD25⁺細胞 (2.5×10^6 個)を同時に移植する群としない群を作成し、細胞移植後8週までITP病態の評価を行なった。

磁気細胞分離により回収した CD4⁺CD25⁺細胞の純度は85%以上であった。

5. 統計学的解析

血小板減少マウスと血小板非減少マウスにおける血小板数、網状血小板比率、PAIgG と抗血小板抗体の結合量(フローサイトメトリー法)は平均±標準偏差であらわし、Mann-Whitney U-test を用いて比較した。血小板減少マウスと血小板非減少マウスにおける抗血小板抗体陽性率(免疫プロット法)、Treg 欠損マウスと Treg 同時移植マウスにおける血小板減少の自然発症率は Fisher's 2-tailed test を用いて比較した。

6. 倫理面に対する配慮

本研究課題はマウスを用いた動物実験を含むため、文部科学省の指針に沿った学内の委員会での承認を受けた。

C. 研究結果

1. マウスにおける ITP 病態の定義

9週齢の雄性(NZW/BXSB)F1マウスの血

小板数、網状血小板比率、PAIgG を毎週経時的に測定した。生後9週齢をベースラインとして有意に変化したポイントをカットオフとすると、血小板数の下限値は 3.7×10^6 /ul であり、網状血小板比率とPAIgGの上限值は9%とMFI=3であった。

2. Treg 欠損マウスにおける ITP 病態の評価

Treg 欠損マウスの作製後3~4週目に血小板減少を自然に発症するマウスが69例中25例(36%)でみられた。これらマウスでは網状血小板比率とPAIgGの増加を伴っていた(図1)。血小板減少は1ヶ月以上持続することを確認した。さらに、一部の血小板減少マウスは紫斑を呈した。これらのことから、Tregの欠損によりITP病態が誘導されることが確認された。

3. Treg 欠損マウスにおける抗血小板抗体の検出

3.1 免疫プロット法

血小板減少マウス13例中5例(38%)が抗GPIIb抗体陽性、2例(15%)が抗GPIIIa抗体陽性であったが、抗GPIb抗体は検出されなかった(図2)。一方、対照として用いた血小板非減少マウス14例からはGPIb、GPIIb、GPIIIaに対する抗体は検出されなかった。抗GPIIb抗体または抗GPIIIa抗体の陽性頻度は血小板減少マウス(54%)で非減少マウス(0%)に比べて有意に高かった(p=0.002)。

3.2 フローサイトメトリー法

血小板に結合する活性をもつ抗体を検出するため、血小板溶出液または脾細胞の培養上清を用いた検討を行った(図

2)。血小板溶出液を用いると血小板減少マウスで血小板非減少マウスに比べ血小板結合活性が有意に高かった(2.4±2.4 vs 1.0±0.1, p<0.001)。脾細胞の培養上清においても同様の結果が得られた(6.3±8.2 vs 1.0±0.1, p=0.002)。これにより、Treg 欠損マウスの血小板溶出液と脾細胞の培養上清から native な血小板に結合できる抗血小板抗体の存在を確認した。

4. Treg 同時移植による ITP 病態の発症抑制効果

CD4⁺CD25⁻細胞移植時に CD4⁺CD25⁺ Treg 同時移植の ITP 病態に与える影響を調べた。その結果、Treg 同時移植マウス(n=17)では血小板減少を認めなかった。一方、対照の Treg 欠損マウス(n=19)において血小板減少の発症を 6 匹(32%)で認めた。血小板減少の発症頻度は 2 群間で有意に異なっていた(p=0.02)。したがって、Treg は自己血小板反応性 T 細胞の抑制に寄与しており、ITP の発症抑制に重要な役割を持つことが示唆された。

D. 研究発表

論文発表

1. Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, and Kuwana M. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocytes' Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura. *J. Clin. Invest.* 2008; 118(8): 2939-2949.
2. Kuwana M, Okazaki Y, and Ikeda Y. Splenic macrophages maintain the

anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J. Thromb. Haemost.* 2009; 7(2): 322-329.

3. Satoh T, Pandey JP, Okazaki Y, Asahi A, Kawakami Y, Ikeda Y, and Kuwana M. Single nucleotide polymorphism of interleukin-1β associated with *Helicobacter pylori* infection in immune thrombocytopenic purpura. *Tissue Antigens*. In press.
4. 桑名正隆: ITP の診断と治療. 血栓止血学会誌 19(2): 199-201, 2008.
5. 桑名正隆: 免疫抑制薬の臨床応用実践論; 特発性血小板減少性紫斑病. 炎症と免疫 16(5): 91-96, 2008.
6. 桑名正隆: *H. pylori* 感染はどのようにして ITP を誘導するのか? 分子消化器病 5(3): 52-59, 2008.
7. 桑名正隆: 新しい抗血小板抗体検査. 検査と技術 37(2): 123-128, 2009.
8. 桑名正隆: 話題の疾患と治療; 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) と *H. pylori* 除菌療法. 感染・炎症・免疫 39(1)、印刷中.
9. 桑名正隆: 日本人のヒット作品; *H. pylori* 除菌は単球における Fcγ受容体バランスを抑制に偏倚させることで ITP 病態を是正する. 分子消化器病 6(1)、印刷中.

学会発表

1. Kuwana M: Is immune thrombocytopenic purpura always

- idiopathic? XXIst International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer - European *Helicobacter* Study Group (Riga). 2008. 9.
2. 桑名正隆: 血小板減少症と自己抗体. 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会 (東京). 2008. 11. (シンポジウム: 膠原病の病態解明と新しい治療戦略)
3. 西本哲也、佐藤隆司、桑名正隆: CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-deficient mice as a novel mouse model for immune thrombocytopenic purpura. 第38回日本免疫学会総会 (京都). 2008. 12.
4. Arnold DM, Bernotas A, Nazi I, Stasi R, Kuwana M, Kelton J, Crowther M: The efficacy of *H. pylori* eradication therapy regardless of *H. Pylori* infectivity, as a treatment of immune thrombocytopenic purpura: A Systematic Review. The 50th Annual Meeting of American Society of Hematology (San Francisco). 2008. 12.
- E. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

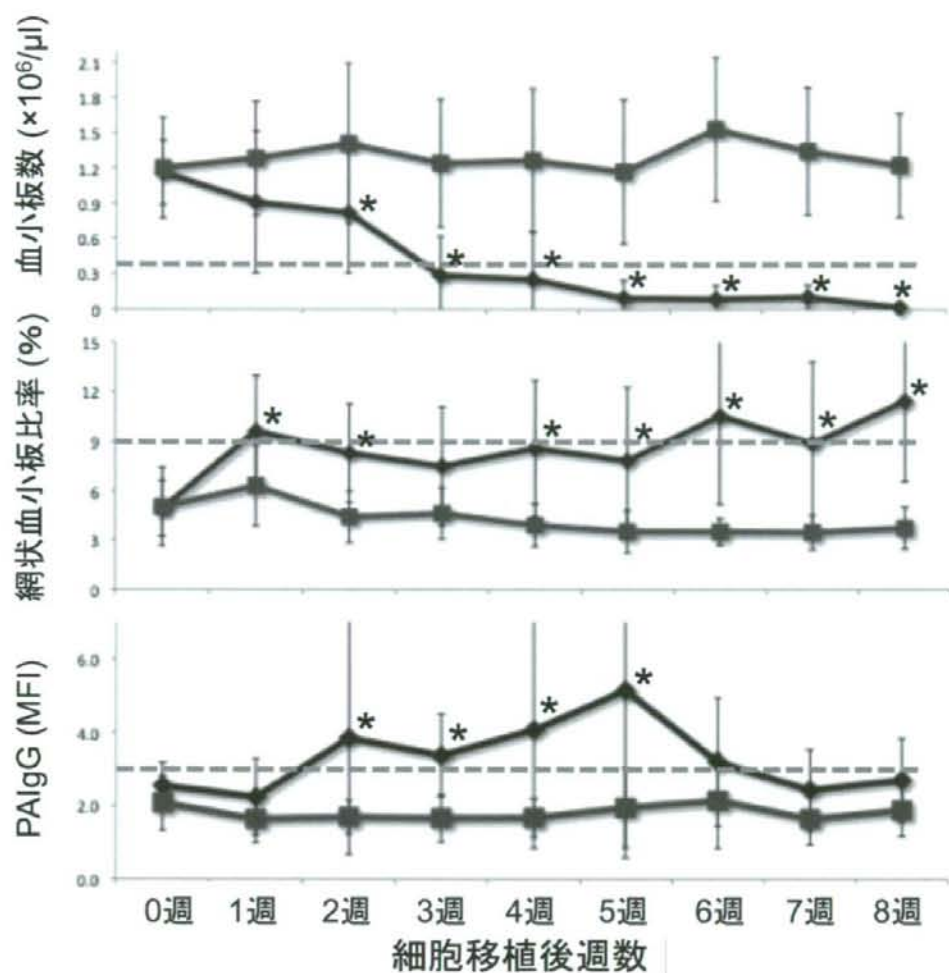
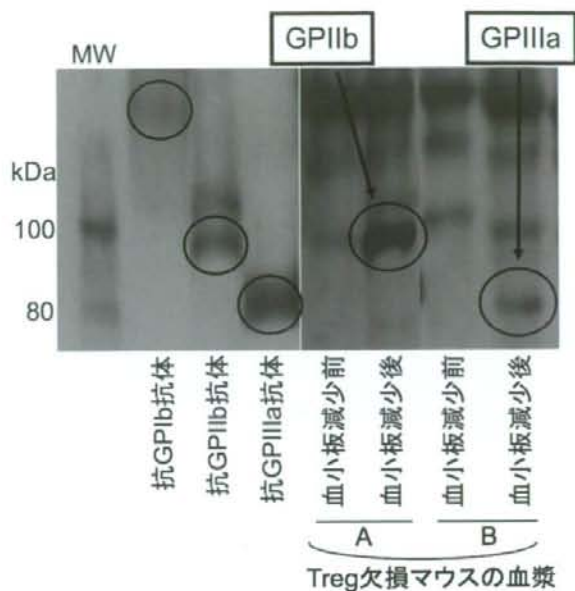


図1 Treg 欠損マウスの ITP 病態評価

それぞれの数値は平均±標準偏差で表し、 は血小板減少群、 (n=25) は血小板非減少群(n=44)を示す。破線はそれぞれ血小板減少、網状血小板比率増加、PAIgG 増加の定義を示す。* p<0.01

(A)



(B)

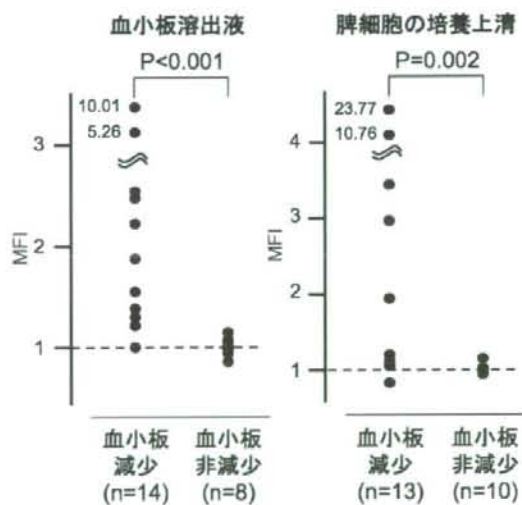


図2 Treg 欠損マウスにおける抗血小板抗体の検出

(A)免疫プロット法により Treg 欠損マウスの血漿における抗血小板抗体を検出した。陽性コントロールとして抗 GPIb、GPIIb、GPIIIa 抗体を用いた。(B)フローサイトメトリー法により Treg 欠損マウスの血小板溶出液、脾細胞の培養上清から抗血小板抗体を検出した。抗血小板抗体の抗体量は MFI を用いて定量化した。

臨床調査個人票（平成 18 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 四天王寺大学人間福祉学科 教授

研究要旨

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 18 年度の臨床調査個人票をもとに解析した。

平成 18 年度における新規患者数は 10 万人あたり 1.88 人であった。日本全体では 2,405 人が発症したと推計された。更新患者数は 10 万人あたり 13.21 人で日本全体では 16,873 人の患者がいたと推計された。新規患者の年齢分布では急性型は 5 歳以下の小児に多く、慢性型は 26～35 歳のピークとともに 51～80 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 31～45 歳のピークは小さく 51～75 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。

A. 研究目的

ITP は比較的新しい疾患である。わが国における実態を把握することは今後の ITP 患者への治療計画、支援計画などをたてるにあたり非常に重要なデータであると考えられる。

今回の調査では、1) 平成 18 年度における ITP 患者の新規発症数ならびに年齢分布、2) ITP 更新患者数と年齢分布、3) ITP 患者の治療内容、生活状況、受診状況などを中心に検討した。

B. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 18 年度の ITP 患者の臨床調査個人票が入力されたデータの提供を受けた。データには新規申請患者と更新申請患者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 20 年 11 月）では一部の都道府県のデータが厚生労働省に届

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都道府県は北海道、茨城、新潟、静岡、愛知、島根、高知、佐賀、熊本、大分、宮崎の 11 道県であった。更新申請分で届いていなかった都道府県は北海道、福島、茨城、東京、長野、静岡、愛知、大阪、奈良、島根、福岡、大分の 12 都道府県であった。

C. 研究結果及び考察

ITP 患者発症数

平成 18 年度に発症した患者数を表 1 に示す。新規発生患者数は男女合わせて 1,865 名であった。1,865 名を調査道府県の人口（99,096 千人）で除し人口 10 万人あたりで計算すると 1.88 人であった。また 1,865 名は調査道府県での発症数であるので日本の総人口（127,770 千人）でもって推計するとわが国では年間 2,405 名の患者が発生したと推計された。

図1に平成17年度と平成18年度のITP新規患者推計発生数を示す。平成18年度の患者発生数(2,405名)は平成17年度(3,107名)に比べ702名減少していた。平成18年度のITP新規患者発生数の減少が真に減少傾向なのか、あるいはITP患者は発生しているが申請される率が低下したためかは現在のところ不明である。平成19年度以後の調査成績を待ち検討したい。

表1. ITP患者発生数(平成18年度)

	全発生数		急性型発生数		慢性型発生数	
	男	女	男	女	男	女
患者数	1,855	1,143	691	301	1,082	694
10万人あたり	1.86	1.48	0.70	0.62	1.09	1.37
推計患者数	2,405	1,475	891	388	1,395	895

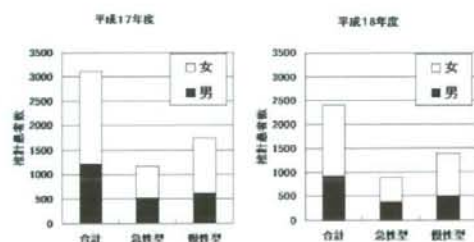


図1. ITP患者発生数(推計)(平成17、18年度)

表2に外国と日本におけるITP患者の10万人当たりの発症数の比較を示す。

表2. 患者発生数の比較

	10万人あたり		
	全	男	女
高知県のデータ(2001~2002)	2.28	1.70	2.80
デンマークのデータ(1973~1995)	2.88		
イギリスのデータ(1993~1999)	1.8		
平成16年度の全国調査	2.56	2.08	3.03
平成17年度の全国調査	2.43	1.95	2.90
平成18年度の全国調査	1.88	1.49	2.25

イギリスやデンマークにおいてもITP患者の発症数は10万人あたり2人前後で我が国における発症率と差はなかった。

2) 新規患者年齢分布

新規患者急性型の年齢分布を図2に示す。

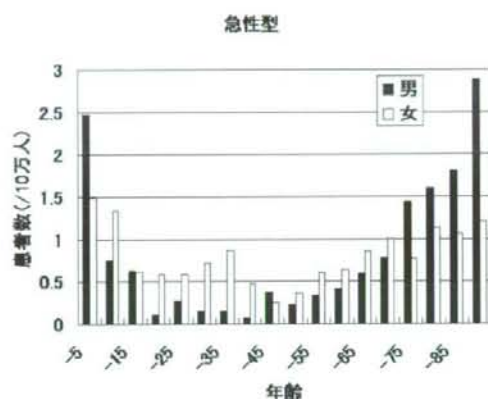


図2. 新規患者年齢分布(10万人)(急性型)

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1.7倍多かった。また70歳以後にもピークがあった。

新規患者慢性型の年齢分布を図3に示す。

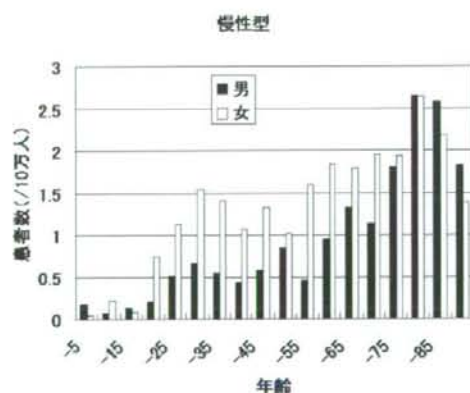


図3. 新規患者年齢分布(10万人)(慢性型)

女性では26歳~45歳と56歳~90歳にピークがあった。高齢者のピークは26

歳～45歳のピークよりも高かった。男性では56歳～90歳にほぼ単一のピークを認めた。20歳～65歳では女性が男性の約2～3倍多かった。一方、76歳以上では男女差を認めなかった。

3) ITP 更新患者数

平成18年度に更新申請があった患者数を表3に示す。

表3. ITP更新患者数(平成18年度)

	合計患者数	男	女	急性型患者数	男	女	慢性型患者数	男	女	型不明
患者数	9,764	2,803	6,895	912	347	565	8,546	2,427	6,121	304
10万人あたり	13.21	7.97	18.18	1.23	0.96	1.49	11.56	8.14	16.14	
推計患者数	16,873	4,960	11,897	1,576	601	975	14,772	4,201	10,561	

更新患者数は男女合わせて9,764名であった。9,764名を調査道府県の人口(73,937千人)で除して人口10万人あたりで計算すると13.21名であった。また9,764名は調査道府県での更新数であるので日本の総人口(127,770千人)でもって推計するとわが国では平成18年度に16,873名の患者が更新申請をしたと推察された。

平成18年度の推計更新患者数を平成17年度の更新患者数と比較した成績を図4に示す。

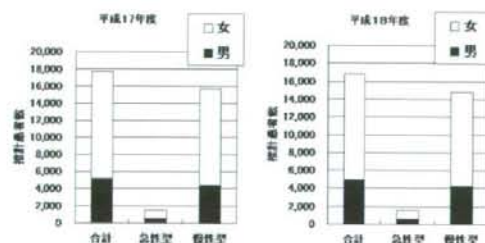


図4. ITP更新患者数(平成17、18年度)

平成17年度の更新患者数は17,709名で平成18年度は836名の減少であった。

4) 更新患者年齢分布

慢性型の更新患者の年齢分布を図5に示す。男女とも20歳ごろより増加し始め、51歳以後での増加が顕著であった。女性が男性の約2.5倍多かった。女性においては36～40歳にも小さなピークを認めた。

更新患者年齢分布

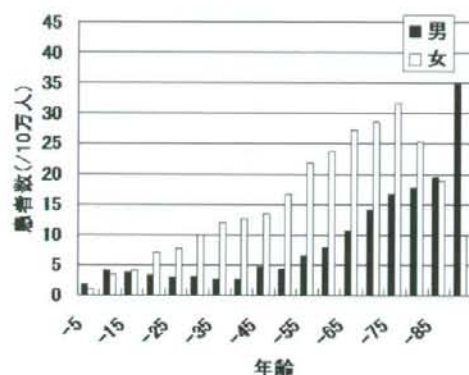


図5. 更新患者年齢分布(慢性型)

5) ITP 患者数

新規、更新 ITP 患者、急性型、慢性型をまとめた ITP 患者数(10万人あたり)は14.09人であった。平成15年度からの患者数を表4に示す。

表4. ITP患者数の比較

	10万人あたり(人)
平成15年度の全国調査	14.14
平成16年度の全国調査	16.86
平成17年度の全国調査	16.29
平成18年度の全国調査	14.09

患者数は14.09人～16.86人とこの4年間で少しの増減はみられるがほぼ同じ患者数であると思われた。

6) 罹病期間

更新患者(慢性型)における罹病期間を図6に示す。21年以上の患者においては5年ごとにまとめて示している。罹病

期間は1年未満の患者から50年以上に及ぶ患者まで幅広く分布している。ITPが慢性疾患であることを示しているとともに基本的には予後良好な良性疾患であることを意味しているものと思われる。

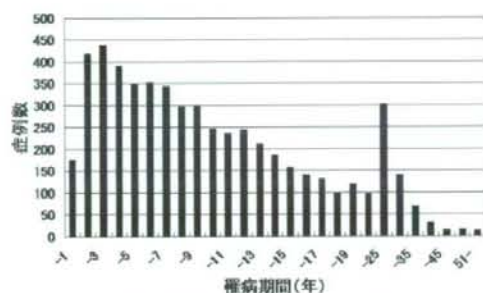


図6. 罹病期間(慢性型・更新症例)

7) 血小板数

新規症例における血小板数を図7に示す。新規症例においては急性型、慢性型ともに血小板数2万以下の症例が多かった。特に急性型においては66%の症例、慢性型では31%の症例が1万以下であった。一方、更新患者において血小板数が1万以下の症例は11%と少なく、25%の症例が10万以上であった。

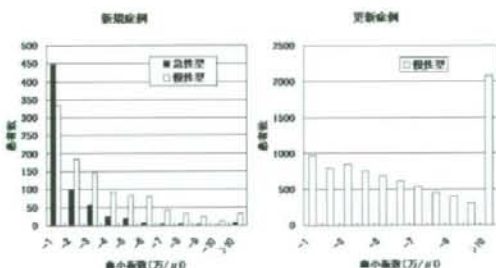


図7. 血小板数(平成18年度)

8) 特殊検査

新規症例における骨髓検査、PAIgG、抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率を表5に示す。骨髓検査は急性型、慢性型ともにほぼすべての症例で実

施されていた。ITPに特異的な検査である抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率は非常に低かった。

表5. 特殊検査実施率(新規症例)

検査項目	急性型(%)	慢性型(%)
骨髓検査	87.3	90.0
PAIgG	43.1	62.4
抗GP抗体	2.2	2.0
網状血小板	2.6	3.8

9) 治療

新規症例において選択された治療法を図8に示す。新規・急性型ではプレドニゾン治療が80%の症例において選択されていた。次いで大量IgG療法、ピロリ除菌と続いていた。急性型では出血症状が強いことと小児が多いことからプレドニゾン治療に次いで大量IgG療法が選択されているものと思われる。また新規・慢性型においてもプレドニゾン治療が61%の症例に選択されていた。次いでピロリ除菌、大量IgG療法が実施されていた。ピロリ除菌療法は保険適応はないが多くの症例ですでに実施されていた。

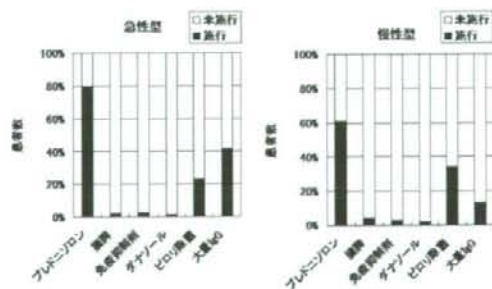


図8. 選択されている治療法(新規症例)

図9左が更新症例でこの1年間に試みられた治療法、右が全経過で実施された治療法を示している。更新症例においてもこの1年間ではプレドニゾン治療が最多で55%の症例でプレドニゾン