

制効果の分子メカニズムを検討した。正常マウス血小板を抗原とした免疫ブロット法を行ったところ、血小板減少 Treg 欠損マウス血漿中に GPIIb、GPIIIa と反応する IgG 自己抗体が検出され、その反応パターンは個体により異なっていた。さらに、血小板溶出液と脾細胞培養上清中 IgG の血小板結合能をフローサイトメトリーにより調べたところ、正常マウス血小板に結合する IgG は血小板減少マウスに特異的に検出された。一部の血小板減少マウスの自己抗体は GPIb 欠損マウスもしくは GPIIIa 欠損マウス血小板への結合能を欠如しており、血小板膜上の GPIb-IX や GPIIb/IIIa を認識することが確認された。Treg による ITP 発症抑制効果に CTLA4 を介した CD28 シグナル抑制が関わるかを検討するため、CD4⁺CD25⁺細胞移植時に Treg とともに抗 CTLA-4 阻害抗体またはコントロール抗体を投与した。コントロール抗体投与マウスでは ITP を発症しなかったが、抗 CTLA-4 阻害抗体を投与することで ITP 発症を誘導できた。また、ITP 発症後に Treg を移入しても血小板増加は観察されず、Treg には確立した ITP 病態を是正する治療効果は認められなかった。Treg は CTLA4 を介して ITP 発症を抑制するが、ITP に対する治療標的として CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 単独では不十分と考えられ、今後 Treg に加え何らかのファクターが ITP 発症抑制には必要と考えられる。

3) 遺伝性血小板減少症例に見いだされた α IIb β 3 変異 (富山班員、柏木研究協力者、高蓋研究協力者)

本研究班において、異なる家系における遺伝性血小板減少症の詳細が明らかにされた (柏木研究協力者、高蓋研究協力者)。

第一例目は 31 歳、女性。8 歳の時に他院小児科にて ITP と診断され、 γ グロブリン大量療法など受けたとのことだが

詳細は不明。初回妊娠時 (25 歳) より、当科受診中。非妊娠期は血小板数 5 から 7 万で推移。第 1 子、第 2 子妊娠中ともに血小板数は 3~5 万と減少し、軽度の紫斑、鼻出血などの出血傾向を呈した。妊娠後期に血小板数は 3 万台となり、プレドニゾン、 γ グロブリン大量療法にても効果はなく、血小板輸血の上、帝王切開にて分娩を管理した。2 回の分娩は血小板輸血によって管理が可能であった。第 1 子の出産後の血小板数は 10 万前後であり、出血症状もないため、特別な経過観察はしていなかった。第 2 子の出産後の血小板数は 6 万と低下がみられ、出血症状はなかったが、小児科外来にて経過観察となった。生後 4 か月の時点でも血小板数の回復はみられず、再度家族歴について聴取したところ、発端者の父が軽度の血小板減少のため、他院にて骨髄穿刺を施行されたが、原因がはっきりしなかったことが判明した。3 世代にわたる軽度の血小板減少がみられるため、家族性の先天性血小板減少症を疑った。血小板表面の GPIIb/IIIa の発現量が軽度低下していることが判明し、遺伝子解析を施行したところ、GPIIb の変異 (R995W) が見いだされた。第二例目は、24 歳、女性。15 歳頃、ふらつきあり近医受診した際に、鉄欠乏性貧血とともに軽度血小板減少を指摘。その後、近医にて血小板減少および鉄欠乏性貧血に関し経過をみられていたが、血小板数は常に 7~10 万程度であった。高校生頃までは生理出血が多かった。また時に下肢に紫斑 (petechiae) を認めることあり。家族 (母親および母方祖父) に同様の軽度血小板減少を指摘されている方がいたため、精査をおこない、上記の遺伝子異常 GPIIb (R995W) 変異をヘテロで有することが明らかとなった。患者血小板はやや大型で、血小板数は 7~10 万/ μ l と軽度に低下していた。aIIb (R995W) 変異により aIIbb3 は恒常的に活性化された状態になり、また aIIbb3 活性化後に認め

られる細胞内シグナル、FAKの恒常的な活性化も認められた。更に発現細胞において異常な細胞突起や膜表面の波打ちが認められた。これらの結果から α IIb β 3の活性化制御機構およびシグナル異常が血小板数の恒常性維持に関与している可能性が示された。このように、軽度の血小板減少を呈する家族性血小板減少症がITPとして診断されている可能性が明らかとなった。

4) 血小板産生機構に関する研究とそれに基づく治療戦略の可能性 (松原研究協力者)

ITPの病態解明とより有用なマネジメント法を目指し、血小板産生機序の解明研究を*in vitro*分化誘導システムを用いて行っている。本年度はこれまでの研究成果(皮下脂肪組織からの血小板産生)を発展させ、脂肪前駆細胞株から巨核球分化・血小板産生*in vitro*分化誘導を行った。誘導にて得られた細胞に対し、巨核球・血小板の詳細なcharacterizationを行い、脂肪前駆細胞が血小板産生能を有することを見いだした。この分化は造血幹細胞あるいは多能性幹細胞からの血小板産生とは異なる機序を有することを示唆する結果を得た。

D. 考案

ITPの診療は、近年大きく変化している。特に*H. Pylori*除菌療法や新たなITPO受容体作動薬の登場により、その使用対象や適正使用の正しい情報発信がのぞまれている、この観点から、益々ITP研究班の果たす役割は大きくなっている。次年度以降も、確実に成果をあげ正しい情報を発信していく必要がある。

E. 結論

ITPの現状把握し、問題点を早期把握すると共に、新たな薬剤に関してその適

正使用を含めた情報発信が急務であり、今後の課題として継続して取り組む予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Torita S, Suehisa E, Kawasaki T, Toku M, Takeo E, Tomiyama Y, Nishida S, Hidaka Y. Development of a new modified Bethesda method for coagulation inhibitors: the Osaka modified Bethesda method. Blood Coagul Fibrinolysis. 2011 Jan 17. [Epub ahead of print]

2) Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. A potential role for α -actinin in inside-out α IIb β 3 signaling. Blood 117(1):250-258, 2011

3) Kashiwagi H, Kiyomizu K, Kamae T, Nakazawa T, Tadokoro S, Takiguchi S, Doki Y, Kanakura Y, Tomiyama Y. Molecular analysis of a patient with type I Glanzmann thrombasthenia and clinical impact of the presence of anti- α IIb β 3 alloantibodies. Int J Hematol 93(1):106-111, 2011

4) Bhavaraju K, Georgakis A, Jin J, Kent Gartner T, Tomiyama Y, Nurden A, Nurden P, Kunapuli SP. Antagonism of P2Y12 reduces physiological thromboxane levels. Platelets 21:604-609, 2010

5) Nomura S, Kurata Y, Tomiyama Y, Takubo T, Hasegawa M, Saigo K, Nishikawa M, Higasa S, Maeda Y,

- Hayashi K. Effects of bisphosphonate administration on the bone mass in immune thrombocytopenic purpura patients under treatment with steroids. *Clin Appl Thromb Hemost* 16:622-627, 2010
- 6) Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. Essential in vivo roles of the C-type lectin receptor CLEC-2: Embryonic/Neonatal lethality of CLEC-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of CLEC-2-deficient platelets. *J Biol Chem* 285:24494-24507, 2010
- 7) 富山佳昭. ITPに関する用語の標準化: 国際作業部会からの報告. *日本血栓止血学会誌* 21:278-282, 2010
- 8) 富山佳昭. 第V章 2. 血液・造血器系の検査. 看護学テキストNiCE 疾病と検査 検体検査/生理機能検査/画像診断/内視鏡検査/その他(松田 暉, 荻原俊男, 難波光義, 鈴木久美, 林直子編), 南江堂, 東京, 2010, pp247-248
- 9) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *小児科診療* 73:2193-2196, 2010
- 10) 富山佳昭. P2Y₁₂ receptor occupancy. *International review of thrombosis* 5:34-38, 2010
- 11) 富山佳昭. 抗血小板薬の最近の進歩. *最新医学* 65:90-96, 2010
- 12) 富山佳昭. Atherothrombosisと血小板-動脈硬化病変形成における血小板の関与. *医学のあゆみ* 233:447-450, 2010
- 13) 柏木浩和, 秋山正夫, 富山佳昭. 自己抗体と血小板機能異常. *日本血栓止血学会誌* 21:271-277, 2010
- 14) Sugihara S, Katsutani S, Deckmyn H, Fujimura K, Kimura A. Roles of Src-like adaptor protein 2 (SLAP-2) in GPVI-mediated platelet activation SLAP-2 and GPVI signaling. *Thromb. Res.* 126: e276-e285, 2010
- 15) 藤村欣吾. 特発性血小板減少性紫斑病(山口徹、北原光夫、福井次矢 編) 今日の治療指針 2010 医学書院、東京 2010、pp 562-564
- 16) 杉原清香、藤村欣吾. 紫斑病 横田千津子、池田宇一、大越教夫編) 病気と薬 パーフェクトBOOK 2010 南山堂、東京、2010 pp1225-1228
- 17) 藤村欣吾. 特発性血小板減少性紫斑病(正岡 徹編) 静注用免疫グロブリン製剤ハンドブック メディカルレビュー 一社、大阪、2010、pp79-90
- 18) 藤村欣吾. *Helicobacter pylori*と特発性血小板減少性紫斑病. *臨床検査*、第54巻、187-191, 2010
- 19) 藤村欣吾. 難治性特発性血小板減少性紫斑病に対する治療: 最近の動向. *血液・腫瘍科* 60: 532-538, 2010
- 20) 藤村欣吾. プライマリ・ケア医に必要な血液疾患の知識「特発性(免疫性)血小板減少性紫斑病」治療 *92:2381-2386*, 2010
- 21) Kobayashi I, Okura Y, Yamazaki Y, Takezaki S, Yamada M, Kawamura N, Kuwana M, and Ariga T. Anti-CADM-140/MDA5 antibody in

juvenile dermatomyositis complicated with interstitial lung disease. *J. Pediatr.* In press.

22) Noda S, Asano Y, Tamaki Z, Hirabayashi M, Yamamoto M, Takekoshi T, Hoashi T, Sugaya M, Morimoto R, Eto T, Kaji K, Fujimoto M, Kuwana M, and Sato S. Dermatomyositis with anti-OJ antibody. *Rheumatol. Int.* In press.

23) Gono T, Kawaguchi Y, Ozeki E, Ota Y, Satoh T, Kuwana M, Hara M, and Yamanaka H. Serum ferritin correlates with activity of anti-MDA5 antibody-associated acute interstitial lung disease as a complication of dermatomy. *Mod. Rheumatol.* In press.

24) Yamaguchi Y, Okazaki Y, Seta N, Satoh T, Takahashi K, Ikezawa Z, and Kuwana M. Enhanced angiogenic potency of monocytic endothelial progenitor cells in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res. Ther.* In press.

25) Suzuki S, Utsugisawa K, Nagae Y, Satoh T, Kuwana M, and Suzuki N. Clinical and immunological differences between early and late-onset myasthenia gravis in Japan. *J. Neuroimmunol.* In press.

26) Hamaguchi Y, Kuwana M, Hoshino K, Hasegawa M, Kaji K, Matsushita T, Komura K, Nakamura M, Kodera M, Suga M, Higashi A, Ogusu K, Tsutusi K, Furusaki A, Tanabe H, Sasaoka S, Muro Y, Yoshikawa M, Ishiguro N, Ayano M, Muroi E, Fujikawa K, Umeda Y, Kawase M, Mabuchi E, Asano Y, Sodemoto K, Seishima M, Yamada H, Sato S, Takehara K, and Fujimoto M. Clinical

correlations with dermatomyositis-specific autoantibodies in adult Japanese patients with dermatomyositis: a multi-centre, cross-sectional study. *Arch. Dermatol.* In press.

27) Furuya Y, Okazaki Y, Kaji K, Sato S, Takehara K, and Kuwana M. Mobilization of endothelial progenitor cells by intravenous cyclophosphamide in patients with systemic sclerosis: potential association with efficacy for interstitial lung disease. *Rheumatology.* 2010; 49(12): 2375-2380.

28) Sato S, and Kuwana M. Clinically amyopathic dermatomyositis. *Curr. Opinion Rheumatol.* 2010; 22(6): 639-643.

29) Gono T, Kawaguchi Y, Satoh T, Kuwana M, Katsumata Y, Takagi K, Masuda I, Tochimoto A, Baba S, Okamoto Y, Ota Y, and Yamanaka H. Clinical manifestation and prognostic factor in anti-melanoma differentiation-associated gene 5 antibody-associated interstitial lung disease as a complication of dermatomyositis. *Rheumatology.* 2010; 49(9): 1713-1719.

30) Furuya Y, Satoh T, and Kuwana M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Rheumatol.* 2010; 720305.

31) Seta N and Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14⁺ monocytes. *Exp.*

Hematol. 2010; 38(7): 557-563.

32) Yamaguchi Y, Takahashi H, Satoh T, Okazaki Y, Mizuki N, Takahashi K, Ikezawa Z, and Kuwana M. Natural killer cells control a T helper 1 response in patients with Behçet's disease. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(3): R80.

33) Kuwana M. Sensorineural hearing loss as a common manifestation in patients with mixed connective tissue disease. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 2010; 5(2): 165-167.

34) Koreeda Y, Higashimoto I, Yamamoto M, Takahashi M, Kaji K, Fujimoto M, Kuwana M. and Fukuda Y. Clinical and pathological findings of interstitial lung disease patients with anti-aminoacyl-tRNA synthetase autoantibodies. *Intern. Med.* 2010; 49(5): 361-369.

35) Kaneko Y, Suwa A, Hirakata M, Ikeda Y, and Kuwana M. Clinical associations with autoantibody reactivities to individual components of U1 small nuclear ribonucleoprotein. *Lupus.* 2010; 19(3): 307-312.

36) 桑名正隆: リウマイド因子(RF)、抗シトルリン化ペプチド(CCP)抗体、マトリックスメタロプロテインゼー3(MMP-3). 和田攻、大久保昭行、矢崎義雄、大内尉義監修「臨床検査ガイド2011~2012」、文光堂、東京、印刷中.

37) 桑名正隆: 全身性強皮症. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

38) 桑名正隆: 成人ステイル病. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

39) 桑名正隆: リウマチ性多発筋痛症. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

40) 桑名正隆: アレルギー性肉芽腫性血管炎. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

41) 桑名正隆: ウェゲナー肉芽腫症. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

42) 桑名正隆: 大動脈炎症候群. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

43) 桑名正隆: レイノー症候群. 横田千津子、池田宇一、大越教夫、大井一弥、丸山徹、高村徳人、伊藤由紀監修「病気と薬パーフェクトBOOK 2011」、南山堂、東京、印刷中.

44) 西本哲也、桑名正隆: 血小板系:ITPに関する最近の進歩. 高久史磨、小澤敬也、坂田洋一、金倉譲、小島勢二監修「Annual Review 血液 2011」、中外医学社、東京、印刷中.

45) 桑名正隆: ITPの診断と治療. 監修

「血栓止血の臨床-研修医のために」、日本血栓止血学会、東京、印刷中。

46) 桑名正隆: 抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid Syndrome: APS). 吉田彌太郎監修「血液疾患ハンドブック-日常診療の手引きと臨床データ集-改訂版」、医薬ジャーナル社、大阪、印刷中。

47) 桑名正隆: 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP). 松田暉、荻原俊男、難波光義監修「看護学テキスト 疾患論」、南江堂、東京、印刷中。

48) 桑名正隆: 強皮症. 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢監修「六訂版家庭医学大全科」、法研、東京、pp2660-2662, 2010. 10.

49) 桑名正隆: 好酸球性筋膜炎. 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢監修「六訂版家庭医学大全科」、法研、東京、pp2662, 2010. 10.

50) 桑名正隆: ヒトアジュバント病. 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢監修「六訂版家庭医学大全科」、法研、東京、pp2663, 2010. 10.

51) 桑名正隆: 全身性硬化症 (強皮症). 久保恵嗣、藤田次郎監修「間質性肺疾患診療マニュアル」、南江堂、東京、pp228-233, 2010. 10.

52) 桑名正隆: 好酸球性筋膜炎. 山本一彦、豊島良太監修「リウマチ病学テキスト」、診断と治療社、東京、pp422-424, 2010. 9.

53) 桑名正隆: 強皮症. 三森経世監修「リウマチ・膠原病内科クリニカルスタンダード」、文光堂、東京、pp86-96, 2010. 8.

54) Kurata Y, Fujimura K, Kuwana M, Tomiyama Y, Murata M. Epidemiology of primary immune thrombocytopenia in children and adults in Japan: a population-based study and a literature review. *IJH*, in press

55) Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Murata M: Generation of megakaryocytes and platelets from preadipocyte cell line 3T3-L1, but not the parent cell line 3T3, *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402: 796-800, 2010

56) Mayumi O, Matsubara Y, Shibano Y, Ikeda Y, Murata M: GSK-3 β negatively regulates megakaryocyte differentiation and platelet production from human bone marrow cells *in vitro*. *Platelets in press*

57) Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y: (Book: Platelets and Megakaryocytes, Methods and Protocols) Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and preadipocyte cell line. *in press*

58) 松原由美子: 血小板機能検査で検出できる抗血小板薬レジスタンスと臨床的予後の関連性 血栓と循環 18 (1): 31-35, 2010

59) 松原由美子: 血小板機能検査で検出できる抗血小板薬レジスタンスと臨床的予後の関連性 血栓と循環 18 (1): 31-35, 2010

60) 松原由美子、村田満: 血栓症と検査医学 治療学 44 (6): 21-24, 2010

61) 松原由美子、村田満: 日本人の血栓症 最新医学 65 (6) 1108-1113, 2010

62) 松原由美子: 巨核球・血小板の *in vitro* 分化誘導法 日本血栓止血学会誌 21 (5); 509-513, 2010

2. 学会発表

1) Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyama Y. (Poster) Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a heterozygous mutation in thromboxane A2 receptor. The American Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010.12.4-7, Orlando, USA, Broxmeyer HE)

2) Miyazaki K, Shirasugi Y, Ando K, Tomiyama Y, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Yonemura Y, Mori S, Usuki K, Iwato K, Hashino S, Wei H, Richard Lizambri R. (Poster) Evaluation of Romiplostim in a randomized placebo-controlled phase 3 study of a Japanese population with chronic immune thrombocytopenia (ITP). The American Society of Hematology 52nd Annual meeting (2010.12.4-7, Orlando, USA, Broxmeyer HE)

3) 柏木浩和, 秋山正夫, 中澤剛士, 清水一亘, 釜江剛, 田所誠司, 瀧口修司, 土岐祐一郎, 金倉譲, 富山佳昭. (口演) FACSにて血小板輸血の有用性を検討しえた抗血小板抗体を有する胃癌合併 Glanzmann 血小板無力症の一例. 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4.22-24, 鹿児島, 丸山征郎)

4) 富山佳昭, 宮川義隆, 岡本真一郎, 勝谷慎也, 木村昭郎, 大越靖, 二宮治彦, 小杉浩史, 野村昌作, 尾崎勝俊, 池田康夫, 小尾伸之, 桂幸一, 金倉譲. (口演) 治療抵抗性慢性特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者に対するエルトロ

ンボパグの臨床試験成績. 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4.22-24, 鹿児島, 丸山征郎)

5) 釜江剛, 大塚欣敏, 清水一亘, 中澤剛士, 秋山正夫, 田所誠司, 柏木浩和, 金倉譲, 富山佳昭. (口演) 血小板トロンボキサン受容体異常症患者 (nt.167-8) における1塩基挿入ヘテロ接合体の血小板機能解析. 第33回日本血栓止血学会学術集会 (2010.4.22-24, 鹿児島, 丸山征郎)

6) 柏木浩和, 富山佳昭. (シンポジウム) 血小板異常症における血小板抗体の臨床的意義とその対策. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会 (2010.5.28-30, 名古屋, 高松純樹)

7) 押田眞知子, 永峰啓丞, 清川知子, 青地寛, 池田珠世, 矢尾真希子, 中原千尋, 富山佳昭. (ワークショップ) 輸血の安全性の確保, 適正使用を目的とした輸血オーダリング, 輸血管理システムの構築. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会 (2010.5.28-30, 名古屋, 高松純樹)

8) 池田珠世, 押田眞知子, 永峰啓丞, 清川知子, 青地寛, 矢尾真希子, 中原千尋, 富山佳昭. (口演) 廃棄血削減への取り組み-過去5年廃棄理由の解析-. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会 (2010.5.28-30, 名古屋, 高松純樹)

9) 西山美保, 林悟, 兜森修, 末久悦次, 柏木浩和, 倉田義之, 富山佳昭. (口演) XE-5000を用いた幼若血小板比率測定に及ぼす抗凝固剤および保存温度の影響-検体安定性の検討-. 第57回日本臨床検査医学会学術集会 (2010.9.9-12, 東京, 宮澤幸久)

10) Matsubara K, Kunishima S, Tokafuta

T, Uchida Y, Fukaya T, Inoue D, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Otsu M, Eto K, Onodera M. (口演) R995W mutation in integrin α IIb-gene (ITGA2B) is a novel cause for congenital macrothrombocytopenia. 第72回日本血液学会学術集会(2010.9.24-26, 横浜, 檀和夫)

11) 富山佳昭, 宮川義隆, 岡本真一郎, 勝谷慎也, 木村昭郎, 大越靖, 二宮治彦, 小杉浩史, 野村昌作, 尾崎勝俊, 池田康夫, 小尾伸之, 桂幸一, 金倉謙. (口演) Eltronbopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic ITP. 第72回日本血液学会学術集会(2010.9.24-26, 神奈川, 檀和夫)

12) 本田繁則, 池島裕子, 松田泰幸, 田所誠司, 富山佳昭, 宮田敏行. (ポスター) インテグリン活性化における integrin-linked kinase の役割. 第72回日本血液学会学術集会(2010.9.24-26, 神奈川, 檀和夫)

13) 富山佳昭. (ランチョンセミナー) ITPをめぐり最新の話. 第72回日本血液学会学術集会(2010.9.24-26, 横浜, 檀和夫)

14) 富山佳昭. (シンポジウム) 血小板の活性化機構: ADPの果たす役割. 第17回日本血液代替物学会年次大会(2010.10.18-19, 熊本, 小田切優樹)

15) 野山知美, 福島健太郎, 石橋知彦, 近藤有理, 佐多弘, 南亮太, 徳永正浩, 藤田二郎, 齊藤則充, 前田哲生, 田所誠司, 富山佳昭, 金倉謙. (口演) APTTモニタリングに基づいた第VIII因子製剤の補充で安全に肝、腎腫瘍摘出を行え

た、インヒビター保有血友病Aの1症例. 第94回近畿血液学地方会(2010.11.6, 滋賀, 鈴木孝世)

16) 清川知子, 押田眞知子, 櫻木美基子, 中原千尋, 池田珠世, 青地寛, 永峰啓丞, 林悟, 富山佳昭. (口演) 当院におけるアルブミン製剤管理体制について. 第54回日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会(2010.11.27, 滋賀, 藤山佳秀)

17) Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y: Mouse Preadipocyte Cell Line 3T3L1 Differentiates into Megakaryocytes and Platelets. Platelets 2010 International Symposium

18) Sonoda A, Matsubara Y, Suzuki H, Ikeda Y, Matsuo K, Murata M: Generation of Megakaryocytes from Mouse Subcutaneous Adipose Tissues *in vitro*. 第72回日本血液学会(2010.9.24-26, 横浜, 檀和夫)

19) 松原由美子, 村田満: プロテインS測定法の経験と問題点. 第11回日本検査血液学会ワークショップ

H. 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

様式2号-10-2 10 特発性血小板減少性紫斑病 臨床調査個人票 (案) (1. 更新) 医師記入用

フリガナ 氏名		性別	1. 男 2. 女	生年月日	1. 明治 2. 大正 3. 昭和 4. 平成	年 月 日 (満 歳)
住所	郵便番号 電話 ()	出生 都道府県		発病時在住 都道府県		
発病年月	1. 昭和 年 月 日 2. 平成 (満 歳)	初診年月日	1. 昭和 年 月 日 2. 平成	保険種別	1. 政 2. 組 3. 船 4. 共 5. 国 6. 後	
身体障害者手帳	1. あり (等級.....級) 2. なし	介護認定		1. 要介護 (要介護度.....) 2. 要支援 3. なし		
生活状況	社会活動 (1. 就労 2. 就学 3. 家事労働 4. 在宅療養 5. 入院 6. 入所 7. その他 () 日常生活 (1. 正常 2. やや不自由であるが独力で可能 3. 制限があり部分介助 4. 全面介助)	初回認定年月		1. 昭和 年 月 日 2. 平成		
受診状況 (最近1年)	1. 主に入院 2. 入院と通院半々 3. 主に通院 (/月) 4. 往診あり 5. 入院なし 6. その他 ()					
病状及び所見						
発症と経過 (前回申請からの変化を中心に具体的に記述)						
【WISH入力不要】						
この1年間の出血症状 (複数選択可) 1. 紫斑 2. 歯肉出血 3. 鼻出血 4. 血尿 5. 下血 6. 月経過多 7. 脳出血 8. その他 () 9. なし						
現在の出血症状 (複数選択可) 1. 紫斑 2. 歯肉出血 3. 鼻出血 4. 血尿 5. 下血 6. 月経過多 7. 脳出血 8. その他 () 9. なし						
この1年間の最低値 血小板数 万/ μ l 検査日:平成 年 月 日						
現在の検査成績 血小板数 万/ μ l 検査日:平成 年 月 日						
現在までの治療状況						
治療	現在行っている治療 (記入時点で行っている治療)			全経過での既治療		
1. ビロリ菌除菌				1. 施行 2. 未施行		
2. 副腎皮質ステロイド	プレドニゾン換算	mg/日		1. 施行 2. 未施行		
3. 換脾				1. 施行 2. 未施行		
4. 免疫抑制剤	薬剤名 ()	と投与量 ()		1. 施行 2. 未施行		
5. グロブリン大量療法				1. 施行 2. 未施行		
6. TPO受容体作動薬	薬剤名 ()	と投与量 ()		1. 施行 2. 未施行		
7. 血小板輸血	血小板輸血			1. 施行 2. 未施行		
8. リツキシマブ				1. 施行 2. 未施行		
9. その他 ()	薬剤名 ()	と投与量 ()		1. 施行 2. 未施行		
この1年間の経過	1. 治癒 2. 軽快 3. 不変 4. 徐々に悪化 5. 急速に悪化 6. その他 ()					
現在までの合併症						
合併症	この1年間の合併症			全経過での合併症		
1. 脳出血	1. あり 2. なし	ありの場合、脳出血時の血小板数 万/ μ l		1. あり 2. なし		
2. 重症感染症	1. あり 2. なし	ありの場合、病名 ()		1. あり 2. なし ありの場合、病名 ()		
3. 糖尿病	1. あり 2. なし			1. あり 2. なし		
4. 病的骨折	1. あり 2. なし	ありの場合、骨折部位 ()		1. あり 2. なし ありの場合、骨折部位 ()		
5. 悪性腫瘍	1. あり 2. なし	ありの場合、病名 ()		1. あり 2. なし ありの場合、病名 ()		
6. その他	1. あり 2. なし	ありの場合、病名 ()		1. あり 2. なし ありの場合、病名 ()		
医療上の問題点						
【WISH入力 不要】						
医療機関所在地・医療機関名						
電話番号 ()						
医師の氏名 印 記載年月日:平成 年 月 日						

様式2号-10-1 10 特発性血小板減少性紫斑病 臨床調査個人票(案) (1. 新規、2. 再発) 医師記入用

ふりがな			性別	1. 男 2. 女	生年月日	1. 明治 2. 大正 3. 昭和 4. 平成	年 月 日生 (満 歳)
住所	郵便番号 電話 ()		出生	都道府県		発病時在住	都道府県
発病年月 (再発)	1. 昭和 年 月 (満 歳) 2. 平成	初診年月日	1. 昭和 年 月 日 2. 平成	保険	種別	1. 政 2. 組 3. 船 4. 共 5. 国 6. 後	
身体障害者 手帳	1. あり (等級 級) 2. なし		介護認定	1. 要介護 (要介護度) 2. 要支援 3. なし			
生活状況	社会活動 (1. 就労 2. 就学 3. 家事労働 4. 在宅療養 5. 入院 6. 入所 7. その他 ()) 日常生活 (1. 正常 2. やや不自由であるが独力で可能 3. 制限があり部分介助 4. 全面介助)						
家族歴	1. あり 2. なし 3. 不明 ありの場合 (続柄)	受診状況	1. 主に入院 2. 入院と通院半々 3. 主に通院 (/月) 4. 往診あり 5. 入院なし 6. その他 ()				
発症と経過 (具体的に記述)							
[WISH入力不要]							
発病 (再発) からの期間	1. 3カ月未満 2. 3~12カ月 3. 12カ月以上						
病状及び所見							
A. 出血症状	1. あり 2. なし	1. 紫斑 2. 歯肉出血 3. 鼻出血 4. 血尿 5. 下血 6. 月経過多 7. 脳出血 8. その他 ()					
B. 末梢血検査	平成 年 月 日	C. その他、参考となる検査所見 (検査されている場合はご記入ください)					
(最近6カ月以内で血小板数が最低のもの)		抗血小板自己 抗原検査	抗GPIIb/IIIa抗体	1. 陽性 2. 陰性 3. 不明			
白血球形態異常	1. あり 2. なし	抗GPIIb抗体	1. 陽性 2. 陰性 3. 不明				
赤血球形態異常	1. あり 2. なし	その他の抗GP抗体	1. 陽性 2. 陰性 3. 不明				
白血球数	/mm ³	網状血小板比率	1. 高値 2. 正常 3. 不明				
赤血球数	万/mm ³	トロンボポエチン値	1. 高値 2. 正常 3. 不明				
ヘモグロビン	g/dl	HBs抗原	1. 陽性 2. 陰性 3. 不明				
MCV (平均赤血球容積)	f1	抗HCV抗体	1. 陽性 2. 陰性 3. 不明				
血小板数	万/mm ³	ヘリコバクター・ピロリ菌	1. 陽性 2. 陰性 3. 不明				
白血球分画	好中球	%	骨髄検査 有核細胞数	万/μl	巨核球数	/μl	M/E比
	リンパ球	%	骨髄所見				
	好酸球	%	骨髄染色体検査所見				
	好塩基球	%					
	単球	%					
鑑別診断 (以下の疾患が鑑別できること)							
1. 再生不良性貧血 2. 骨髄異形成症候群 3. 白血病 4. 血栓性血小板減少性紫斑病 5. 薬剤性血小板減少症 6. 膠原病 7. 抗リン脂質抗体症候群 8. 先天性血小板減少疾患 9. 肝硬変 10. HIV感染症							
以上の疾患を 1. 鑑別できる 2. 鑑別できない							
現在までの治療状況							
治療	1. 無治療 2. 治療あり (治療ありの場合、下記の治療した項目に○をしてください)						
実施した治療	1. ビロリ除菌 2. 副腎皮質ステロイド 3. 摘脾 4. 免疫抑制剤 5. 免疫グロブリン大量療法 6. トロンボポエチン受容体作動薬 7. 血小板輸血 8. リンキナーゼ 9. その他 ()						
医療機関名							
医療機関所在地							
医師の氏名	印	電話番号 ()	記載年月日:平成	年	月	日	
(軽快者の症状が悪化した場合のみ記載)							
症状が悪化したことを医師が確認した年月日	平成	年	月	日			
特定疾患登録者証交付年月日	平成	年	月	日			

注) 1. 記入漏れのある場合や鑑別診断が不十分な場合は、認定できないことがありますのでご注意ください。
再生不良性貧血、骨髄異形成症候群などの鑑別診断が必要な場合は、骨髄検査を実施すること。
2. 認定となった場合の有効期間の開始日は、保健所受理日からとなります。早めの手続きにご協力をお願いします。

成人 ITP に対する治療ガイドの作成について —慢性 ITP、並びに妊娠合併 ITP の管理に関する検討—

研究分担者：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

研究班班員の意見をまとめ、さらに研究班で得られた治療エビデンスを取り入れ成人の ITP 治療に関する診療ガイドを作成中で次年度には発表予定である。妊娠合併 ITP に対する妊娠、分娩時の出血管理については今年度本班員の方々から頂いた意見を集約した。

1. 妊娠可否の基準：治療中で出血なし、かつ血小板数 > 5 万/ μ l 或いは無治療で血小板数 > 3 万/ μ l のいずれか、未解決
 2. 治療対象となる場合：何らかの出血傾向がある
 3. 妊娠中の治療開始時期：妊娠初期（15 週以内）を避ける
 4. 治療法：緊急時 免疫グロブリン大量療法、通常は副腎皮質ステロイド
 5. 初回副腎皮質ステロイド使用量：プレドニン換算 20～30 mg/day
 6. 治療目標：出血傾向消失 或いは 血小板数 > 3 万/ μ l
 7. 分娩時出血管理の対象：血小板数 < 5 万/ μ l
 8. 分娩時の治療法：免疫グロブリン大量療法、血小板輸血、副腎皮質ステロイド
 9. 腰椎麻酔、帝王切開時の必要血小板数：血小板数 > 5 万、8 万、10 万/ μ l と様々
 10. 経膈分娩時の必要血小板数：血小板数 > 5 万/ μ l
 11. 妊娠中の児の血小板数の測定：必要なし
 12. 血小板減少児に対する治療適応：出血傾向がある
 13. 血小板減少児に対する治療：免疫グロブリン大量療法
 14. 児に対する副腎皮質ステロイド使用量：プレドニン換算 < 10 mg/day
- 今後の予定として以上の結果をもとに小児科、産科、麻酔科など他分野とも意見交換し妊娠合併 ITP の治療ガイドラインを作成したい。

A. 研究目的

成人 ITP の治療指針は 1982 年厚生省特発性造血器障害調査研究班で定められ、最近までそれに基づいた治療が定着してきた。しかし本邦においてはピロリ菌陽性 ITP 症例が多く、最近になりそれらに対する除菌の有効性や新たな血小板増加薬の効果が立証され臨床現場に登場してきた。これらの新たな治療法や治療薬の位置づけが必要となり成人 ITP に対する治療ガイドを新たに作成することを目標とし現在進行中

である。また同時に妊娠合併 ITP の指針についても従来の案の段階からさらに推し進め時代に即したものを作成する必要が求められ今年度研究班での意見聴取を行った。

B. 研究方法

ITP 治療に関してエビデンスが明らかにされているものは少ない。したがって当面は多くは専門家の経験や主観的な判断を基に作成しなければならない現状がある。今回 ITP 治療経験の豊富な

研究班班員の意見を集約し、また研究班で得られた治療エビデンスを取り入れ、成人の ITP 治療に関する診療ガイドを作成中である（添付資料 1）。

また妊娠合併 ITP に関してはまず必要項目に関して専門家に対して意見聴取表を作成し研究班員にアンケート調査を行い、それに基づいて妊娠合併 ITP に対する治療骨子を作成した。（意見聴取表を資料 2 として添付）

C 研究結果

成人 ITP の診療参照ガイドに関しては資料として“ITP 治療の概略”を添付したので参照していただきたい（資料 1）。ここでは今年度取り組み始めた妊娠合併 ITP の管理について班員の考えをまとめたので報告する。

1. ITP 症例が妊娠可能であるための条件

特に条件を設けないとする意見は少なく圧倒的に血小板数が 5 ないし 3 万/ μ l 以上に維持されている症例で無治療であれば妊娠可能とする意見が多い。従ってこれから妊娠を計画する場合には少なくとも無治療で血小板数 3 万/ μ l 以上が一つの条件となる。しかし問題は妊娠時に ITP と診断された症例においては妊娠継続の可否の判断はこれから議論すべき課題である。

2. 妊娠、分娩時の管理

各妊娠時期に治療内容を定めることが母児の安全を期するためには必要と考えられる。

そのために妊娠前期、中期、後期、さらに分娩時ごとに治療内容を検討することが望ましいが今回は妊娠中、分娩時の 2 つに大別し意見をまとめた。

1) 妊娠中の管理

(1) ITP に対する治療適応基準: ITP 治療の対象となるのは①出血傾向のある場合、或いは②血小板数 3 万/ μ l 未満、の症例に集約された。治療開始時期に

関しては状況によっては時期を考慮せず治療を行う必要があるが、一般的には妊娠 15 週まではなるべく避けることが望ましい傾向にあった。

(2) 治療薬: 妊娠合併 ITP に対する治療薬ないし治療法として①副腎皮質ステロイドホルモン、②免疫グロブリン大量療法、③血小板輸血、が主体である。副腎皮質ステロイドホルモンの初回使用量に関してはプレドニゾロンで 20~30mg/day が最も多かった。また治療目標に関しては出血傾向の消失、或いは血小板数 > 3 万/ μ l の維持が大勢を占めていた。

2) 分娩時の管理

妊娠後期に入り分娩に備えての出血管管理が必要でその対象となる血小板数は 5 万/ μ l ないし 3 万/ μ l 未満とする意見に 2 分されたが 5 万/ μ l 未満を支持する意見が半数以上を占めた。薬剤として副腎皮質ステロイドホルモンを分娩予定日より 3~4 週間前から使用開始、ないし増量する方法をとる意見が多い。分娩方法は産科医の判断により決定され、それに従って分娩時の出血管管理を行う必要がある。経膈分娩では必要血小板数 > 5 万/ μ l が半数、3 万/ μ l 以上或いは 8 万/ μ l 以上がそれぞれ 4 分の 1 と各自の経験により様々であるが、必要血小板数 > 5 万/ μ l が無難であると考えられる。帝王切開の場合も血小板数 > 5 万/ μ l が半数、8 万、或いは 10 万/ μ l 以上がやはり 4 分の 1 と同様な傾向にあり今後さらに検討する必要がある。これに伴って外科的処置時の麻酔を安全に行うために必要な血小板数についても意見がまとまっておらず今後の課題である。

3. 新生児に関する管理

胎児の段階での児の血小板数に関する情報を得る手段に問題があり、妊娠中の児の血小板数の把握は必要ないことで全員の意見は一致している。

新生児の血小板減少に対する治療適応

は①出血傾向があるが、最も多く次いで②血小板数3万/ μ 1未満となっている。いずれにしても積極的な治療介入は少ない印象である。治療薬としては免疫グロブリン大量療法、副腎皮質ステロイドなどが候補として挙げられている。

D. 考案

妊娠合併ITPの治療は1994年8月に特発性造血器障害調査研究班で行われたシンポジウムに取り上げられ、その結果をまとめ妊娠合併ITPのガイドライン(案)として報告書に掲載された。しかし“案”として留まりそれ以上進展することなく今日に至っているのが現状と思われる。この度成人ITPの治療ガイドが完成間近になり、これに伴って妊娠適齢期を発症の一つのピークとする妊娠合併ITPに関しても今回改めて班としてこの疾患に対する取り組み方をまとめる必要性が高まってきた。そこで今期の目標を次期の妊娠合併ITPの治療管理ガイド作成のための基本的情報として班員の意見を集約し骨子をまとめることにした。班員の構成は血液内科医が主体であるが、小児科医、産科医、外科医もそれぞれ1名ずつ含まれており充分ではないが他診療科の意見も採り入れられている。多くの項目で意見の集約は出来ているが、集約が不十分な項目については今後の課題である。その中で妊娠継続の可否については、ITPとして診断されている症例については妊娠許可の条件、初診時に初めてITPと妊娠が判明した症例に対してはITP治療と妊娠継続の問題などについては今後議論をしなければならない。妊娠中の管理についてはほぼ一致を診ているが分娩時の管理については検討が必要である。特に帝王切開時の必要血小板数、また手術時の硬膜外麻酔や腰椎麻酔時の必要血小板数については意見が分かれている。これらは産科医、麻酔医の意見が充分

に反映されていないことに起因しており今後これらの領域との連携が必要である。一方妊娠合併ITPには通常の成人ITPに比し管理上の特異性があることを考慮に入れなければならない。まず妊娠合併時の血小板減少症には妊娠時特有の疾患があり、通常の成人のITPの診断に必要な除外疾患に加え妊娠性血小板減少を始めとした疾患の除外がITPの診断には必要である。また妊娠によりITPの再発、増悪が起こることも念頭に置く必要があり、また一方では妊娠により過凝固状態になることも考慮に入れなければならない。これらの問題は母体のみならず胎児への影響も避けられず、母児の安全性の確保が管理上重要である。従って妊娠合併ITPの管理上必要なガイドラインには今回集約した情報に妊娠特有の病態を加味する必要があり次年度の課題としたい。これらの課題の解決には現在の研究班の班員の方々のさらなる意見集約に加え妊娠合併ITPの管理には血液内科医を始めとして産科医、小児科医中でも新生児専門医、麻酔医などとの連携が必要で今後これら他分野の専門家との意見を交換し、各自の経験を踏まえた診療ガイドを提案したい。

E. 結論

妊娠合併ITPの治療ガイド作成に当たりアンケート調査により本研究班班員から意見を調査し、集約した。その結果特に妊娠可否の基準、分娩時の出血管理、特に帝王切開や麻酔術を含めた外科的処置時の対応について今後検討が必要であることが判明した。次年度は血液内科医を始めとして産科医、小児科医、麻酔医との意見を交換し各分野で納得される診療ガイドを目指したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 藤村欣吾：特発性血小板減少性紫斑病 今日の治療指針 2010（総編集 山口徹、北原光夫、福井次矢）医学書院（562-564）2010

2) 杉原清香、藤村欣吾：紫斑病 病気と薬 パーフェクトBOOK 2010 薬局（2010年3月 増刊号）Vol. 61 No 4（1225-1228）2010

3) 杉原清香、藤村欣吾：出血傾向 病気と薬 パーフェクトBOOK 2010 薬局（2010年3月 増刊号）Vol. 61 No 4（643-644）2010

4) 藤村欣吾 3) 特発性血小板減少性紫斑病 ②成人静注用免疫グロブリン製剤ハンドブック（監修 正岡徹）メディカルレビュー社（79-90）、2010

5) 藤村欣吾：*Helicobacter pylori* と特発性血小板減少性紫斑病 臨床検査 第54巻 第2号（187-191）2010

6) 藤村欣吾：難治性特発性血小板減少性紫斑病に対する治療：最近の動向 血液・腫瘍科 Vol. 60 No 4(532-538) 2010

7) 藤村欣吾：プライマリ・ケア医に必要な血液疾患の知識「特発性(免疫性)血小板減少性紫斑病」治療 Vol. 92 No 10(2381-2386) 2010

8) O Sugihara S., Katsutani S., Deckmyn H., Fujimura K., Kimura A. Roles of Src-like adaptor protein 2 (SLAP-2) in GPVI-mediated platelet activation SLAP-2 and GPVI signaling. Thromb. Res.126 (e276-e285) 2010

2. 学会発表

なし

H. 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

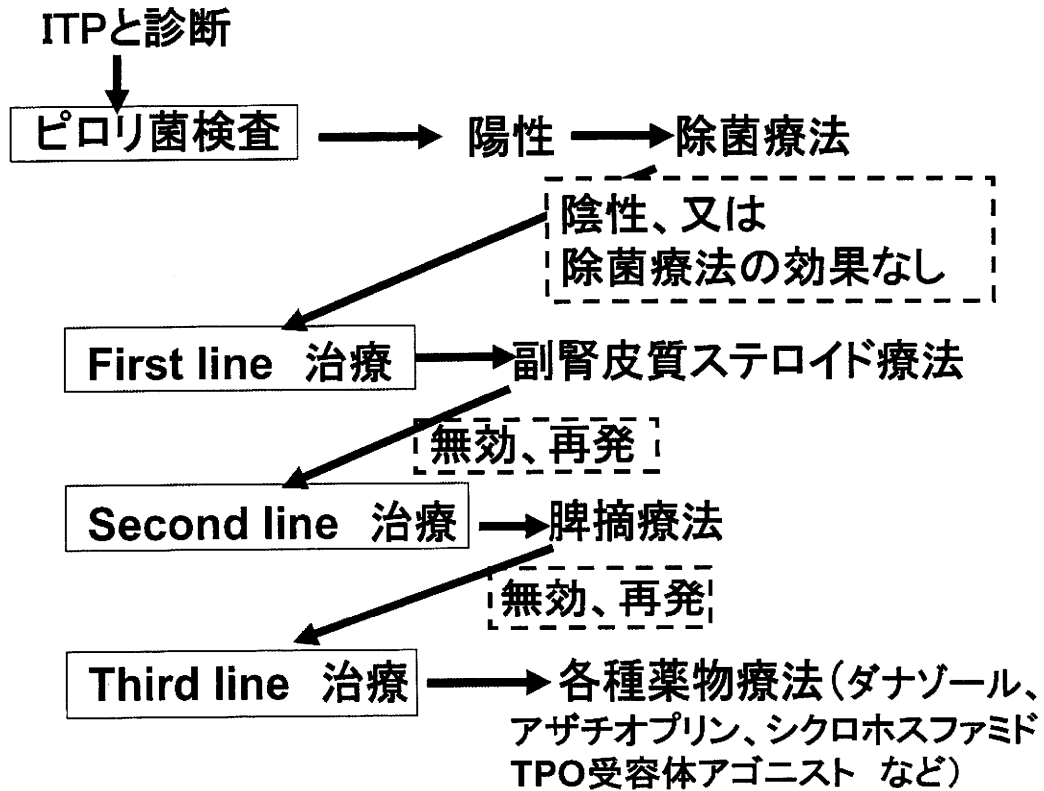
なし

3. その他

なし

ITP治療の概略(案)

(資料1)



添付資料

妊娠合併 I T P の管理に関するガイドライン作成のための意見聴取表 (資料 2)

1. 治療管理を行う医療側の前提条件

妊娠の可否についての基準

- A: 特に基準を設けない (挙児希望であれば基準の必要なし)
- B: 妊娠分娩可能基準を設ける必要がある
 - 1) 無治療で出血傾向なく、血小板数 5 万以上
 - 2) ステロイド或いは何らかの治療中で出血傾向なく、
血小板数 5 万以上
 - 3) その他の条件を提示する

2. 妊娠中の I T P に対する管理

治療の対象となる場合

- 1) 出血傾向のある場合
- 2) 出血症状の有無にかかわらず血小板数 5 万以下の場合
- 3) 出血症状の有無にかかわらず血小板数 3 万以下の場合
- 4) 出血症状の有無にかかわらず血小板数 2 万以下の場合

妊娠中の治療開始時期

- 1) 時期を考慮せず必要に応じて行う
- 2) 妊娠初期 (妊娠 15 週末まで) を出来る限り避ける
- 3) その他 (具体的に記載)

治療目標

- 1) 出血傾向の消失
- 2) 血小板数 5 万以上
- 3) その他 (具体的に記載)

治療法

- 1) 緊急時には γ -グロブリン大量療法
- 2) 一般的には副腎皮質ステロイド療法
- 3) その他の薬剤

治療開始時の副腎皮質ステロイドホルモンの使用量 (プレドニン換算)

- 1) 1mg/kg/day
- 2) 20~30mg/day
- 3) 5~10mg/day
- 4) その他（使用量を記載）

3. 分娩時のITPに対する管理

出血管理の対象となる場合

- 1) 血小板数5万以下、
- 2) 血小板数3万以下
- 3) 血小板数に関わらず出血傾向のある場合
- 4) その他

治療法

- 1) γ グロブリン大量療法
- 2) 副腎皮質ステロイド薬
- 3) 血小板輸血
- 4) その他

腰椎麻酔時、帝王切開時の必要血小板数

- 1) 5万以上
- 2) 8万以上
- 3) 10万以上

経陰分娩時の必要血小板数

- 1) 3万以上
- 2) 5万以上
- 3) 8万以上

4. 児に対する管理

妊娠中の児の血小板数測定の可否

- 1) 不必要
- 2) 必要

前問で2)を選択した施設における

妊娠中の児の血小板測定が必要とされる場合の方法

- 1) 臍帯血採取
- 2) 穿頭術による血液採取
- 3) その他

血小板減少児の治療適応

- 1) 出血傾向がある
- 2) 出血傾向はないが血小板数 5 万以下
- 3) 出血傾向はないが血小板数 3 万以下
- 4) その他

血小板減少児の治療法

- 1) 副腎皮質ステロイドホルモン
- 2) γグロブリン大量療法
- 3) 血小板輸血
- 4) その他

血小板減少児に対する副腎皮質ステロイド使用量 (プレドニン換算)

- 1) 10mg/day 以下
- 2) 10~20mg/day
- 3) 20mg/day 以上
- 4) その他

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リウマチ内科 准教授

研究協力者：西本哲也 慶應義塾大学大学院医学研究科 大学院生

研究要旨

昨年度までの検討により、Treg 欠損マウスの約 1/3 が慢性的な血小板減少を自然発症し、抗血小板自己抗体陽性の特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 病態を呈することを明らかにしてきた。そこで、今年度は ITP モデルマウスにおける抗血小板自己抗体の対応抗原の同定と Treg が ITP の発症を抑制する分子メカニズムを検討した。Treg 欠損マウスから採取した脾細胞の培養上清を作製し、培養上清中 IgG の血小板結合能をフローサイトメトリーにより調べたところ、正常マウス血小板に結合する IgG が血小板減少マウスに特異的に検出された。大部分の血小板減少マウスで産生される抗血小板自己抗体は GPIIb 欠損マウス血小板への結合能が欠如しており、抗血小板抗体の主な対応抗原が GPIIb であることが確認された。一部の血小板減少マウスでは GPIIb/IIIa を認識する自己抗体が存在した。また、Treg 欠損マウスの作製時に Treg と抗 CTLA-4 阻害抗体またはコントロール抗体を投与したところ、抗 CTLA-4 阻害抗体の投与により ITP 発症を誘導できた。また、ITP 発症後に Treg を移入しても血小板増加は観察されず、Treg には確立した ITP 病態を是正する治療効果は認められなかった。Treg 欠損により誘導した ITP では、ITP 患者と同様に複数の血小板膜蛋白に対するポリクローナルな IgG 自己抗体産生応答が誘導された。Treg は CTLA4 を介して ITP 発症を抑制するが、その効果は ITP 発症後にはみられなかった。

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 患者では健常人と比較して 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。昨年度までに、我々は 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作製した Treg 欠損マウスの約 35% が持続的な自己免疫性の血小板減少を自然発症し、その血小板減少は Treg の同時移入により完全に抑制されることを報告した。そこで今年度は、本 ITP モデルマウスにおける抗血小板自己抗体の対応抗

原の同定、Treg による ITP 発症抑制効果の分子メカニズム、ITP マウスに対する Treg 移植の治療効果について検討した。

B. 研究方法

1. 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) 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 ノードマウス (雌、6~8 週齢、日本チャールス・リバー) の尾静脈から 5×10^6 個または 2×10^7 個の CD4⁺CD25⁺細胞を移入し、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 95% 以上であった。作製したマウスは細胞移入後 8 週まで隔週で ITP 病態の評価を行った。

2. ITP 病態の評価

2.1 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。

2.2 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。

2.3 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。

2.4 血小板減少マウスの定義

血小板数が正常値の 30%以下、網状血小板比率が 9%以上、PAIgG の MFI が 3 以上のとき、それぞれ血小板減少、網状血小板比率の増加、PAIgG の増加と定義した。

3. 脾細胞培養上清中における抗血小板自己抗体の検出

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、脾細胞の培養上清を正常 BALB/c マウス、GPIb 欠損マウス(雌、8~11 週齢、トロント大学(Dr. Heyu Ni)より供与)、GPIIIa 欠損マウス(雌、8~

11 週齢、Jackson Laboratory)から採取した血小板と反応させ、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。一部の実験では、正常マウス血小板もしくは GPIIIa 欠損マウス血小板 (10^7 個)と培養上清を反応させた後に、遠心操作により再び上清を回収し、抗血小板抗体の検出をおこなった。

4. Treg 同時移入マウスに対する抗 CTLA-4 抗体の投与

CD4⁺ CD25⁻細胞 (2×10^7 個)と CD4⁺ CD25⁺細胞 (2.5×10^6 個)を同時に移入した BALB/c nu/nu ヌードマウスに対して、抗 CTLA-4 抗体(clone UC10-4F10-11: Bio X cell, West Lebanon, NH)を細胞移入後 0、3、7、11 日に 250mg ずつ投与した。対照群には同量の isotype をマッチさせたコントロールの抗体 (Bio X cell)を投与した。作製したマウスは細胞移入後 8 週まで隔週で ITP 病態の評価を行った。

5. Treg 移植による ITP 病態の治療効果の検討

Treg 欠損マウスの作製から 6 週後、血小板減少を認めたマウスに CD4⁺ CD25⁺細胞 (2.5×10^6 個)を移植し、さらに 6 週後まで隔週で ITP 病態の評価を行なった。このとき、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。

6. 統計学的解析

抗 CTLA-4 抗体もしくはコントロール抗体を投与した Treg 同時移植マウスの血小板減少の発症率は Fisher's 2-tailed test を用いて比較した。

7. 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. 血小板減少マウスにおいて産生される抗血小板抗体の対応抗原の同定