

1. 網状血小板比率測定法に関する比較検討
2. ITP の病態解析

大阪大学医学部附属病院 輸血部 富山佳昭

昨年の班会議において、網状血小板測定法の標準化が必要であることを報告した。IPF法は簡便であるが、日差再現性に問題があること、FCM法に比べ精度に若干の問題があることが明らかとなった。

一方、個別研究としてITPの病態解析を行っている。GPVI欠損症はITPに合併することが多い。血漿中に抗GPVI抗体が証明される例が多いが、必ずしも血漿抗体が検出されるわけではない。新たなGPVI欠損症を見出したが、本例は血漿中に抗GPVI抗体が検出されず、またGPVIやFcR $\cdot$ に遺伝子異常は見出さなかった。興味深いことに、本例の血小板結合抗体を解析すると、抗GPIIb-IIIa抗体に加え抗GPVI抗体が検出された。本例の病態に関して考察する。

## 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

○桑名正隆 西本哲也 佐藤隆司 慶應義塾大学内科

近年、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 患者において CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>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。これまでに、BALB/c ノードマウスに同系マウス由来 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞を移入することで作製した Treg 欠損マウスの約 35% は慢性的な血小板減少を自然発症することを示してきた。血小板減少マウスでは、網状血小板比率と PAIgG の増加を伴い、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、自己抗体産生による血小板減少病態であることを確認した。Treg 欠損マウスの作製時に Treg を同時移植すると、血小板減少の発症が完全に抑制されることから、Treg が ITP の発症抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

そこで、今年度は以下の課題について検討する。

### ① Treg 欠損マウスで産生される抗血小板抗体の対応抗原の同定

ITP 患者でみられる抗血小板抗体は血小板膜糖蛋白である GPIIb/IIIa を高頻度に認識する。そこで、マウス GPIIb、GPIIIa に対するモノクローナル抗体を用いた抗原補足法 (MAIPA 法) を確立し、Treg 欠損マウスで産生される抗血小板抗体の抗原同定を試みる。

### ② Treg 欠損マウスにおいて血小板減少発症率を規定する因子の探索

ITP 患者においては自己血小板反応性 T 細胞が病態形成に重要な役割を果たしている。Treg 欠損マウスにおいても移入細胞中の自己血小板反応性 T 細胞が血小板減少の発症に必要であると考え、移入細胞数の異なる Treg 欠損マウスを作製し、血小板減少の発症率の変化を検討する。

### ③ Treg が自己血小板反応性 T 細胞の活性化を抑制する分子メカニズムの追究

Treg の細胞表面に発現している CTLA-4 の関与について検討する。CTLA-4 を阻害することで Treg 移植による血小板減少の発症抑制効果が失われること、CTLA-4 の細胞外部分を発現するアデノウィルスの投与により血小板減少の発症が抑制されることを *in vitro*、*in vivo* において確認する。

## 当院における ITP 合併妊娠の管理について

西神戸医療センター 免疫血液内科<sup>1)</sup>, 小児科<sup>2)</sup>,

広島国際大学 薬学部<sup>3)</sup>

高蓋寿朗<sup>1)</sup>, 松原康策<sup>2)</sup>, 藤村欣吾<sup>3)</sup>

ITP 合併妊娠の妊娠, 分娩管理については, すでに内外のガイドラインが示されているが, 施設間, 症例間で様々な管理方法が実施されていると考えられる. 当院で経験した ITP 合併妊娠例について, 妊娠, 分娩管理に加え, 新生児の血小板減少の管理の実際をまとめ報告する. 1997 年から 2009 年 6 月までに当院で出産した 19 名 (28 例: 複数出産 9 例) の分娩について解析した. 17 例は無治療, 11 例において妊娠後期以降に血小板増加のための治療 (ステロイド 10 例, IVIG 3 例, 血小板輸血 3 例) が必要であった. また, 初回分娩後に 1 例では摘脾を, 3 例ではピロリ除菌療法を施行し, いずれも血小板数の増加を認め, より安全な管理が可能であった. 8 例は経膈分娩, 20 例が帝王切開を施行した. 2 例の経膈分娩において重大な出血がみられたが, その他の例では赤血球輸血は不要であった. 新生児については, 5 例で血小板数 10 万以下に低下し, うち 2 例は 1 万以下となったため積極的な治療が必要であったが障害なく回復した. 新生児の血小板数については, 先行子で血小板減少がみられた場合, 母体の PA-IgG が高値であった場合に低値をきたす傾向があり, 妊娠中に初めて血小板減少を指摘された例では減少が軽微であった. 当院では, 免疫血液内科, 産婦人科, 小児科が緊密に連携する体制をとっており, 本邦のガイドラインに基づいた管理方針を作成している. 帝王切開については, 原則産科的適応がある場合に施行することとしているが, 他施設よりも頻度が高いと思われる. その背景なども考察し報告したい. 当院の経験が, 今後の新ガイドラインの作成の一助となればと考えている.

## ADAMTS13 活性を阻害するモノクローナル抗体のエピトープマッピングによる機能ドメイン解析（継続研究）

慶應義塾大学医学部 臨床検査医学教室  
山口雄亮、森木隆典

ADAMTS13 は VWF を特異的に切断するメタロプロテアーゼである。昨年度、我々は計 14 種類の抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体（化血研、奈良県立医大より供与）を対象としたエピトープ解析の結果を報告した。今回、その中の 1 つである W688X③-91A について詳細に検討したので報告する。

W688X③-91A についてファージディスプレイ法によりエピトープ解析をおこなったところ、エピトープはメタロプロテアーゼドメイン内の 8 アミノ酸<sup>159</sup>Gln-<sup>166</sup>Asp (QTINPEDD) であることが見出された。さらに、本抗体が ADAMTS13 活性に及ぼす影響を FRETS-VWF73 により評価したところ、活性を抑制することが判明した。これらの結果より、本抗体のエピトープ配列である<sup>159</sup>Gln-<sup>166</sup>Asp (QTINPEDD) が呈する立体構造は、ADAMTS13 活性と強く関連する可能性があると考えられた。

次に、W688X③-91A のエピトープ配列を構成する<sup>159</sup>Gln-<sup>166</sup>Asp ペプチド配列 (QTINPEDD) において、どのアミノ酸が特に ADAMTS13 活性と強く関連するのかを、アラニンスキャニング法を用いて検討した。<sup>159</sup>Gln-<sup>166</sup>Asp (QTINPEDD) の 8 アミノ酸を 1 つずつアラニンに置換した 8 種類の変異型 ADAMTS13 プラスミド pcDNA3.1 myc-His/ -Q159A, -T160A, -I161A, -N162A, -P163A, -E164A, -D165A, -D166A を作製した。これら 8 種類のプラスミドを HEK293 にそれぞれトランスフェクションし、72 時間後に培養上清を回収した。変異型リコンビナント ADAMTS13 の活性を FRETS-VWF73 により測定し、野生型リコンビナント ADAMTS13 の活性と比較した。

野生型および変異型リコンビナント ADAMTS13 の抗原量は ELISA にて 4 nM に調整した。結果、野生型の活性値は  $96.3 \pm 3.0\%$  であったのに対し、E164A、D165A、D166A の変異型の活性値はそれぞれ  $56.1 \pm 1.4\%$ 、 $59.1 \pm 11.2\%$ 、 $46.2 \pm 5.0\%$  と減少していた。他の変異体 Q159A, T160A, I161A, N162A, P163A の活性値は、それぞれ  $85.8 \pm 7.9\%$ 、 $119 \pm 7.0\%$ 、 $125.6 \pm 8.8\%$ 、 $82.4 \pm 3.5\%$ 、 $81.6 \pm 19.2\%$  であった。このことから、<sup>164</sup>Glu、<sup>165</sup>Asp、<sup>166</sup>Asp は、ADAMTS13 活性と強く関連する重要なアミノ酸である可能性が示唆された。

## TMA 患者における VWF propeptide の測定

三重大学医学部附属病院  
伊藤尚美、和田英夫

【背景】 ADAMTS13 測定法の開発により、thrombotic microangiopathy (TMA) の診断は著しく向上したが、TMA の鑑別診断には種々の問題が残っている。今回は、TMA 診断における von Willbrand factor propeptide (VWF propeptide) 測定の有用性について検討したので報告する。

【対象。方法】 三重大学医学部附属病院にて 2007 年 4 月～2009 年 4 月までに ADAMTS13 を測定した患者 56 例 (ADAMTS13 の著明な低下を認める TMA 群 (TMA/ADAMTS13 群) : 13 例、ADAMTS13 の著明な低下を認めない TMA 群 (TMA/other 群) : 6 例、非 TMA 群 : 37 例) と健常人 25 例に対し、VWF propeptide の測定を行った。VWF propeptide は GTi DIAGNOSTiCs の VWF&Propeptide assay キットを用い、ELISA 法 (サンドイッチ法) にて測定した。

【結果】 健常人群の VWF propeptide の中央値は 70.0U/dl であり、95%CI は 38.3U/dl～148.8U/dl であった。患者群の VWF propeptide {中央値 (25%tile～75%tile)} は、TMA/ADAMTS13 群 : 233.0U/dl (142.0U/dl～396.0U/dl)、TMA/other 群 : 180.5U/dl (102.0U/dl～201.0U/dl)、非 TMA 群 : 171.0U/dl (132.0U/dl～258.8U/dl) であり、健常人群と比べてそれぞれ有意に高値であった。

【結語】 以上、VWF propeptide の測定は、TMA の診断に有用な可能性が示唆された。

## ADAMTS13-DTCS ドメインの結晶構造解析と von Willebrand 因子結合エキソサイトの同定

宮田敏行<sup>1</sup>、秋山正志<sup>1</sup>、武田壮一<sup>1</sup>、小亀浩市<sup>1</sup>、高木淳一<sup>2</sup>

1 国立循環器病センター研究所

2 大阪大学、蛋白質研究所、プロテオーム物質創製研究系

メタロプロテアーゼ ADAMTS13 は、von Willebrand 因子 (VWF) を特異的に切断し VWF 依存性の血小板凝集を制御する。ADAMTS13 活性の欠損は、超高分子量 VWF 多量体の蓄積を起こし、その結果、細小血管に過剰な血小板血栓が生じ、血栓性血小板減少性紫斑病を発症させる。我々は ADAMTS13 の VWF 認識の分子機構を明らかにするために、ディスインテグリン様 (D) ドメイン、TSP1 (T) ドメイン、Cys-rich (C) ドメイン、スパーサー (S) ドメインから構成される ADAMTS13-DTCS (Arg287-Ala685) の立体構造を、X線結晶構造解析により決定した。その結果、(1) D ドメインはディスインテグリン様の立体構造ではないこと、(2) T ドメインの立体構造はトロンボスポンジン-1 の type-1 repeat とよく一致すること、(3) アミノ酸配列の相同性は低いにもかかわらず、C ドメインは D ドメインと立体構造が相同であること、(4) S ドメインは 10 本の  $\beta$  ストランドからなる 2 層の  $\beta$  シート構造をとることが分かった。今回決定した ADAMTS13 の DTCS の構造と、既に報告されている ADAMTS1、4、5 のメタロプロテアーゼ (M) と D ドメインの立体構造を用いて、ADAMTS13-MDTCS モデルを構築した。続いて、この構造をもとに、DTCS 領域に変異を導入した 25 種の ADAMTS13-MDTCS (Ala75-Ala685) を調製し、蛍光合成基質 FRETS-VWF73 を用いて酵素活性を測定した。その結果、D、C、S 各ドメイン上に、空間的に隔たりながらも直線状に並ぶ、3 か所のエキソサイトの存在が推定された。以上の結果より、ADAMTS13 は、DTCS 領域内にある複数のエキソサイトで、ずり応力等でほどけた VWF を広範囲で認識し、VWF に対する特異的な親和性を高めていると考えられた。

## 地震と DVT との関連についての研究

新潟大学大学院呼吸循環外科 榛沢和彦

岩手・宮城内陸地震被災者の DVT 検査を栗原市と共同で継続して行っている。昨年は 2008 年 6 月 20 日、21 日、6 月 28 日、7 月 5 日、7 月 12 日、7 月 20 日、8 月 30 日、11 月 23 日に行った。2009 年は 3 月 6 日、28 日、6 月 27 日に行い 12 月初旬に行う予定である。2009 年 3 月 6 日、28 日には瀬峰保健センター、栗駒保健センター、花山石楠花センターで行い避難所経験者及び仮設住宅入居者 36 人に検査を行った。その結果、血栓陽性者は 11 人でそのうち 5 人は浮遊血栓であった。2009 年 6 月 17 日には栗駒保健センターで 12 人、花山石楠花センターで 22 人に検査を行い、血栓陽性者は 9 人でそのうち 2 人に浮遊血栓を認めた。新潟県中越沖地震被災者の DVT 検査を新潟県と共催で行っている。2009 年 7 月 18 日、19 日に柏崎市の国立病院機構新潟病院で被災者の DVT 検査を行った。検査受診者は 300 人(平均年齢 65.7 才、男 82 人、女 215 人、不明 3 人)、血栓陽性者は 20 人(6.6%)、そのうち浮遊血栓は 9 人(3%)であった。その中で検査を地震後初めて受けた方は 80 人で、血栓陽性者 5 人(5.6%)、そのうち浮遊血栓は 2 人(2.2%)であった。初めて検査を受けた方の頻度は中越地震対照地である新潟県阿賀町で行った住民健診における DVT 頻度 1.8%よりも有意に高く、地震の影響が現在でも残っていると考えられた。これらの被災者の血液検査も行っているが現在分析中である。

## 院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子（中間報告）

佐久間聖仁（国立循環器病センター心臓血管内科）、中村 真潮（三重大学大学院医学系研究科循環器内科）、中西 宣文（国立循環器病センター心臓血管内科）、小林 隆夫（県西部浜松医療センター院長）

### 【目的】

本邦での院外発症静脈血栓症の危険因子は明確でなく、この危険因子を明らかにすることが目的である。

### 【方法】

全国医療機関への前向きアンケート調査により、平成21年2月と3月（2ヶ月間）の新規発症の肺塞栓症と深部静脈血栓症の症例を登録した。今回の解析対象者は院外発症静脈血栓塞栓症であり、matched case-control studyの研究デザインとした。マッチする対照者の条件は同性、年齢差5歳以内とした。

### 【結果及び考察】

平成20年12月にアンケート用紙を発送した。平成21年7月10日の時点での全症例登録数は499例、この内今回の解析は院外発症が明らかな194ペアで実施した。女性が121/194（62%）、肺塞栓症単独が25例、深部静脈血栓症単独が102例、両者を伴うものが66例であった（1例は問い合わせ中）。

有意の危険因子としては長期臥床（オッズ比 2.63、95%信頼区間 1.12-6.86、 $p=0.02$ ）、活動性の癌（オッズ比 5.33、95%信頼区間 2.20-15.60、 $p<0.0001$ ）を認めた。外傷・骨折もオッズ比 2.60であったが、症例数が少なく、統計学的に有意には至らなかった（95%信頼区間 0.87-9.32、 $p=0.10$ ）。以前報告した肺塞栓症（院内、院外発症を含む）のリスクである最近の大手術（今回の解析ではオッズ比 0.60、95%信頼区間 0.18-1.82、 $p=0.45$ ）やBMI 25以上の肥満（今回の解析ではオッズ比 1.28、95%信頼区間 0.73-2.25、 $p=0.43$ ）は院外発症静脈血栓塞栓症での有意の危険因子ではなかった。

### 【まとめ】

以上の成績を得たが、まだ登録症例は増えており、今回の成績は暫定的なものである。



平成 21 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 2 回班会議

日時：平成 22 年 1 月 22 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階中会議室

プログラム・抄録集

研究代表者 村田 満

平成 22 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 2 回班会議 プログラム

日時：平成 22 年 1 月 22 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階中会議室

（サブグループ研究計画：20 分 各個人研究計画：10 分 討論含む）

10：00～ 研究代表者 挨拶 村田 満  
厚生労働省健康局疾病対策課 御挨拶

10：10～ 特発性血栓症研究班 研究計画 小嶋 哲人  
サブグループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学医学部  
班員： 坂田 洋一 自治医科大学  
川崎 富夫 大阪大学医学部  
宮田 敏行 国立循環器病センター研究所  
横山 健次 慶應義塾大学医学部

10：30～ TMA研究班 研究計画 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  
和田 英夫 三重大学医学部  
研究協力者：森木 隆典 慶應義塾大学医学部・日笠 聡 兵庫医科大学血液内科

10：50～ I T P研究班 研究計画 藤村 欣吾  
サブグループリーダー：藤村 欣吾 広島国際大学薬学部  
班員： 池田 康夫 早稲田大学理工学術院  
桑名 正隆 慶應義塾大学医学部  
富山 佳昭 大阪大学医学部  
倉田 義之 四天王寺国際仏教大学  
研究協力者：降旗 謙一 株式会社エスアールエル  
野村 昌作 市立岸和田市民病院

11：10～ 静脈血栓塞栓症研究班 研究計画 小林 隆夫  
サブグループリーダー：小林 隆夫 県西部浜松医療センター  
班員： 榛沢 和彦 新潟大学教育研究院  
研究協力者：佐久間聖仁 国立循環器病センター心臓血管内科  
中村 真潮 三重大学大学院・山田 典一 三重大学大学院

11：30～12：30 昼休み

12：30～13：30

**特発性血栓症班研究報告：司会 小嶋 哲人**

小嶋哲人 「高濃度エストロゲンによるプロテインS発現低下の分子機構」

坂田洋一・窓岩清治 「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する

全国実態個別調査の解析」

川崎富夫・鳥田澄子 「凝固因子インヒビター測定の問題点と新たなベセスダ法変法の開発」

宮田敏行 「妊娠および産褥期の深部静脈血栓症における血栓性素因」

横山健次 「先天性血栓傾向（アンチトロンビン[AT]、プロテインC[PC]、プロテインS[PS]

欠損症）日本人患者の実態調査」

13：30～14：30

**TMA班研究報告：司会 藤村 吉博**

藤村吉博・松本雅則 「後天性・特発性TTPにおけるADAMTS13活性著減例と古典的5徴候で

診断された症例の比較検討」

和田英夫 「TMA患者におけるVWF propeptideの測定」

森木隆典・猪狩敦子 「ADAMTS13活性部位に付随するC末領域がVWF切断反応に及ぼす効果について」

日笠聡 「造血幹細胞移植後のvWF、ADAMTS-13活性、その他血栓マーカーと

造血幹細胞移植関連TMA」

14：30～14：45 休憩

14：45～15：45

**ITP班研究報告：司会 藤村 欣吾**

藤村欣吾 「血小板輸血が必要であったITP症例の検討」

池田康夫・宮川義隆 「難治性ITPを対象とするトロンボポエチン受容体作動薬の

海外における使用状況」

池田康夫・松原由美子 「血小板減少症の病態解明と新しい治療戦略開発を目指した基礎的研究」

桑名正隆・西本哲也 「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」

富山佳昭 「ITPの病態解析」

倉田義之 「臨床個人調査票（平成19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」

15：45～16：45

**静脈血栓塞栓症班研究報告：司会 小林 隆夫**

小林隆夫 「産科領域における活性化プロテインC感受性比（APC-sr）と静脈血栓塞栓症リスク」

榛沢和彦 「岩手・宮城内陸地震1年後及び新潟県中越地震5年後の検診結果」

山田典一 「ネフローゼ症候群患者における深部静脈血栓症の発生頻度調査（中間報告）」

佐久間聖仁 「院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子」

終了

平成21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 研究代表者：村田 満

事務局：慶應義塾大学医学部臨床検査医学 村田教授室TEL：03-5363-3838 内線 62553

# サブグループ研究

## 特発性血栓症研究班サブグループ研究報告

班員 小嶋哲人 名古屋大学医学部  
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  
川崎富夫 大阪大学医学部  
横山健次 慶應義塾大学医学部

### 目的

近年増加している静脈血栓塞栓症（VTE）のエビデンスを収集するとともに、VTEの発症原因と発症メカニズムを明らかにし、VTEの予知・予防のための対策の確立を目指す。

### 方法・結果

特発性血栓症サブグループの調査研究は、主に全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究と血栓症患者を対象とした調査研究から構成される。

#### 1) アンケート調査研究：

平成18年度の「ワルファリンの使用に関するアンケート調査」に続き、平成21年度の二次調査「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する全国実態個別調査」を実施し38施設58診療科から678症例の調査票が回収され、日本人に適したワルファリン療法を確立するための重要な知見が得られるものと考えられた。また、「先天性血栓傾向（アンチトロンビン[AT]、プロテインC[PC]、プロテインS[PS]欠損症）日本人患者の実態調査」を実施し、計162例（AT欠損症42例、PC欠損症54例、PS欠損症55例、複数因子欠損症12例）の詳細な情報が得られた。さらに、全国アンケート調査をもとに昨年まとめられた「ヘパリン在宅自己注射療法の指針（改定案）」の広報計画検討も含め、これらの調査を継続して日本人におけるVTEのエビデンスを収集し、その予知・予防のための対策を講ずる予定である。

#### 2) 日本人VTEの遺伝的／後天的背景に関する調査研究：

妊娠と関連したVTEと血栓性素因を検討する目的で、妊娠中および産褥期に深部静脈血栓症（DVT）を発症した44名を対象に、血栓性素因とDVTの発症時期との関連を調べた。血栓性素因として、AT、PC、PS各欠損症ならびに、抗リン脂質抗体症候群について検討した。また、 $17\beta$ -estradiolによるPS $\alpha$ 遺伝子（*PROS1*）発現抑制分子機構を明らかにし、妊娠や経口避妊薬服用による女性ホルモン $17\beta$ -estradiolの上昇は、PS血中濃度低下をもたらすVTEリスクとなることが示唆された。

#### 3) その他：

凝固因子のインヒビター測定法として、より簡便でより低コストのBethesda法の変法を開発した。

## TMA サブグループ

### 班員：

藤村吉博（奈良医大）サブグループ長  
和田英夫（三重大学）  
宮田敏行（国立循環器病センター研究所）

### 協力者：

森木隆典（慶応大学）  
日笠 聡（兵庫医大）  
小亀浩市（国立循環器病センター研究所）  
松本雅則（奈良医大）

総括目標：TMA（TTP）の病態解析と治療法の開発を基礎と臨床の両面から行う。

### 藤村吉博

- 1) 奈良医大輸血部 TMA データベース 919 例の個別解析（継続）
  - ① 新たに発見された USS 数例の遺伝子異常の論文報告
  - ② 本邦 USS 41 例の phenotype-genotype 特性の論文化
  - ③ 後天性・特発性 TTP 284 例の ADAMTS13 依存性と非依存性の 2 型比較解析
  - ④ 後天性 TTP の ADAMTS13 遺伝子変化の網羅的解析（予算範囲内で）
  - ⑤ 至適 USS/TTP 治療剤の検証
- 2) 抗 ADAMTS13 自己抗体の IgG サブクラス解析
- 3) ADAMTS13 と同インヒビター複合体の可視化法の開発

### 宮田敏行

- 1) ADAMTS13 の立体構造に基づく後天性 T T P 発症機構の解明
- 2) ADAMTS13 の立体構造に基づくフォンビルブランド因子切断の特異性の解明

### 和田英夫

- 1) TMA 診断における VWF propeptide の有用性
- 2) 三重大における TMA 発症例の調査と全国調査との比較
- 3) 新しい TMA 診断マーカーの検討

### 研究協力者

#### 森木隆典

- 1) モノクローナル抗体結合エピトープ解析による ADAMTS13 機能と構造に関する検討

#### 日笠 聡

- 1) USS および後天性 TTP 患者の発掘
- 2) 後天性 TTP における治療と ADAMTS13 活性とインヒビターの経過観察

## I T Pサブグループ研究要旨

|       |       |                   |        |
|-------|-------|-------------------|--------|
| 研究分担者 | 藤村 欣吾 | 広島国際大学            | 薬学部    |
|       | 倉田 義之 | 四天王寺大学            | 人間福祉学科 |
|       | 富山 佳昭 | 大阪大学医学部附属病院       | 輸血部    |
|       | 桑名 正隆 | 慶應義塾大学医学部         | リウマチ内科 |
|       | 池田 康夫 | 早稲田大学理工学術院・先進理工学部 | 生命医科学科 |
| 研究協力者 | 降旗 謙一 | S R L             |        |
|       | 野村 昌作 | 岸和田市民病院血液内科       |        |
|       | 宮川 義隆 | 慶應義塾大学医学部         | 血液内科   |
|       | 高蓋 寿朗 | 西神戸医療センター         | 免疫血液内科 |
| 特別協力者 | 杉田 稔  | 東邦大学医学部           | 衛生学    |
|       | 島田 直樹 | 昭和大学医学部           | 衛生学    |

従来の研究を継続しつつ新たな研究テーマを掲げ I T P病態の解析と Q O Lをより高めることを目的とした。

疫学研究、診断基準の確立、治療研究を3つの柱としてこれに関連した研究を行った。

- 1) 疫学研究については臨床個人調査表を基に解析を継続し、平成18年度までの解析が終了した。ここ数年、中高年に多い疾患である傾向に変わりはない。日本全体をほぼ網羅した疫学研究として貴重で今後も継続すると共に、新たな病態解析が可能となるように調査表の項目を一部改める事を次年度検討する。
- 2) 診断基準に関してはS R Lとの共同作業で特異性と感度が向上してきたが、網状血小板数の測定に関してはチアゾールオレンジ法と自動測定装置による I P F測定法により差が認められた。重要な検査項目であるため今後この差の原因を明らかにし、精度向上に努める。次年度 I P F法での診断感度、特異度を、T P O測定を加味してS R Lの協力を得て検討する予定。
- 3) 治療研究については研究班で作成した治療プロトコールを再調整し、公開する計画を立てる。また難治症例に対しての選択肢として治験が進んでいる血小板増加因子製剤の有用性が明確になったので本剤の使用、位置づけを検討する。妊娠 I T Pの管理・治療経験が集積されたのでプロトコール作成への検討を開始する。
- 4) この他 I T P成因における抑制性T細胞の関与、in vitroでの効率よい血小板産生の  
検討、GPVI欠損症と I T P発症の関連など、I T P成因、病態、治療に将来に  
役立つ  
基礎研究が行われた。

## 静脈血栓症/肺塞栓症グループ平成 21 年度総括抄録および今後の研究計画

分担研究者： 県西部浜松医療センター 小林隆夫

新潟大学大学院医歯学総合研究科呼吸循環外科 榛沢和彦

研究協力者： 国立循環器病センター心臓血管内科

佐久間聖仁

三重大学大学院医学系研究科循環器内科

中村真潮、山田典一

### 1) 研究要約

わが国における静脈血栓塞栓症（深部静脈血栓症/肺塞栓症）発症の実態調査を行う。

### 2) 研究概要

本研究はわが国において様々な状況下で発症する深部静脈血栓症/肺塞栓症の現況を調査することであるが、引き続き研究を継続するとともにその臨床的特徴を明らかにし、入院患者のリスク評価および静脈血栓塞栓症の予知・予防にまで研究を発展させたい。

### 3) 研究の目的・必要性・特色・独創的な点

前年度までに産婦人科領域の静脈血栓塞栓症の調査、肺塞栓症と深部静脈血栓症の頻度・臨床的特徴に関する研究、精神科病棟入院患者における肺塞栓症に関する検討、新潟中越地震など震災後の被災者における深部静脈血栓症調査、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を行い、日本人の特徴を明らかにし得た。特に精神科領域での調査および地震後の発症調査は海外でも例がなく、極めて独創的である。今後はさらに研究を発展させ、医療や福祉行政にも反映させたい。

### 4) 研究の目的・必要性・期待される成果

本研究ではわが国において様々な状況下で発症する深部静脈血栓症/肺塞栓症の現況を調査し、「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」ことが本研究の目的である。なお、平成 19 年度には震災被災者における静脈血栓塞栓症の調査結果をもとに「災害緊急避難時の静脈血栓塞栓症（いわゆるエコノミークラス症候群）発症予防指針」の提言を行った。

### 5) 研究計画・方法

3年計画として以下の研究を計画している。研究施設・研究環境は整っており、調査のフィールド確保も問題ない。分担研究者および研究協力者各自の担



当は計画末尾に記載した。研究は単年度で終了するものもあるが、多くは複数年を要し、その継続の有無は各年度末に検討する。平成22年度も下記の研究を継続する。

1. 院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子（継続、複数年：佐久間聖仁、中村真潮）
2. 入院患者における静脈血栓塞栓症発症予知に関する研究（継続、複数年：小林隆夫）
3. 地震とDVTとの関連についての研究（継続、複数年：榛沢和彦）
4. 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（継続、複数年：山田典一、中村真潮）
5. ネフローゼ症候群症例における深部静脈血栓症の発生頻度調査（新規、複数年：山田典一、中村真潮）

#### 6) 倫理面への配慮

本研究は、厚生労働省の臨床研究の倫理指針および疫学研究の倫理指針に則って施行される。また、本研究は、各参加施設の倫理委員会の承認を得た後に実施される。すべての研究協力は十分なインフォームド・コンセントに基づいてのみ施行される。個人情報及び個人情報の漏洩による研究協力者の心理的・社会的不利益が生じないよう最大限の配慮と対策を講じる。

#### 7) 研究結果

現在中途解析中であり、研究結果の詳細は個々の抄録を参照のこと

# 個別研究

## 高濃度エストロゲンによるプロテイン S 発現低下の分子機構

名古屋大学医学部 小嶋哲人

後天性血栓傾向の一つである妊娠、とりわけ妊娠時の PS 低下は血栓傾向の大きな要因と考えられ、女性ホルモン増加による PS 発現低下が推測されてはいるが、その詳細なメカニズムは未だ明らかではない。今回、我々はエストロゲンの一種で estrogen receptor (ER) を介して種々の遺伝子の発現調節に寄与することが報告されている  $17\beta$ -estradiol (E2) を用い、PS $\alpha$  遺伝子 (*PROS1*) 発現への影響とその分子機構の解明を試みたので報告する。初期培養肝細胞、ならびに ER $\alpha$  高発現株・HepG2-ER $\alpha$  (+) 細胞において、E2 添加により PS mRNA と PS 蛋白の産生抑制が認められた。ルシフェラーゼ・レポーターによる *PROS1* プロモーター解析においても、E2 添加による抑制効果がみられ、これには *PROS1* プロモーター領域の-172 と-162 に存在する GC-rich motif が重要であることが明らかとなった。さらにゲルシフトアッセイおよび DNA pull-down assay において、転写因子 Sp1 と Sp3、および ER $\alpha$  がこの GC-rich motif に結合することが判明した。一方、ChIP 解析において、E2 添加により GC-rich 領域への Sp1、ER $\alpha$  の結合が高まるとともに、転写抑制因子である NCoR と SMRT、さらには HDAC3 の結合増強が認められ、histone H4 の脱アセチル化が観察された。この E2 添加による PS mRNA 発現抑制は、HDAC 阻害剤である trichostatin A 処理によりキャンセルされた。一方、siRNA を用いた Sp1、Sp3 ノックダウン解析では、共にプロモーター活性の顕著な低下が見られたが、E2 添加による活性抑制は前者では消失し、後者では残存し、Sp1 が基本的 *PROS1* 発現に重要で、かつ E2 添加による *PROS1* 発現抑制にも関与することが示唆された。以上より、E2 は Sp1/ER $\alpha$  相互作用により転写抑制因子 NCoR、SMRT、HDAC3 をリクルートし、ヒストン脱アセチル化を通して *PROS1* の転写を抑制していると推察された。妊娠や経口避妊薬服用は、エストロゲンにより PS 発現抑制をきたし、VTE リスクの一因となることが示唆された。

## 静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する全国実態個別調査の解析

窓岩清治\*、坂田洋一 (\*発表者)

自治医科大学分子病態研究部

静脈血栓塞栓症 (VTE) の治療および予防において広く用いられているワルファリンのエビデンスを集積するために、全国の臨床研修医療機関を対象とした実態調査を進めている。これまでに実施した「ワルファリン使用に関するアンケート調査」から、多くの医療機関において静脈血栓塞栓症予防ガイドラインに準じた用量調節ワルファリン療法が行われていたが、調査施設の 32.4%においてワルファリン療法中の血栓症再発例がみられ、52.8%の施設でワルファリン療法に伴う出血症例を経験していた。これらの調査結果を踏まえて、ワルファリン療法中にみられる血栓症再発と出血症例や、併用薬剤、基礎疾患および誘因などの背景因子との関連を明らかにすることを目的に、二次調査への協力に同意した 268 施設を対象に「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する全国実態個別調査」を実施した。調査対象は、協力施設において平成 21 年 4 月 1 日から 6 月 30 日までの 3 ヶ月間に静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法を施行した全症例とした。平成 21 年 12 月 28 日現在において、38 施設 58 診療科から 678 症例 (男性 260 例、女性 418 例) の調査票が回収された。調査対象者の平均年齢は  $61.8 \pm 16.9$  歳 (男性  $61.4 \pm 16.6$  歳、女性  $62.2 \pm 17.1$  歳) であり、罹患部位は深部静脈血栓症 (DVT) 単独 432 例、DVT+肺動脈血栓塞栓症 (PTE) 141 例、PTE 単独 48 例などであった。ワルファリン療法は  $3.2 \pm 4.8$  年と長期間にわたり施行されていた。VTE の先天性危険因子として、プロテイン S 欠乏 41 例、アンチトロンビン III 欠乏 24 例、プロテイン C 欠乏 16 例であり、抗リン脂質抗体症候群 50 例、担癌症例や周術期などの後天性危険因子を有する症例が 199 例であった。ワルファリン療法施行中において 8 例に出血症状、17 例に血栓症再発の合併症がみられた。本実態調査により日本人に適したワルファリン療法を確立するための重要な知見が得られるものと考えられる。