

11:30~12:30 昼休み

12:30~13:30

TMA班研究報告：司会 藤村 吉博

藤村吉博・松本雅則 「血漿由来 ADAMTS13 の3種類のプロテアーゼによる切断反応と
その臨床的意義」

和田英夫・伊藤尚美 「三重大学ならびに関連病院で経験した血栓性微小血管障害症 (TMA)
例の解析途中経過と VWF プロペプチド (VWFpp) 値の解析」

小亀浩市 「ADAMTS13 活性測定に用いる標準試料の調製について」

森木隆典 「ADAMTS13 機能と関連する重要なアミノ酸配列の探索」

13:30~14:30

I T P班研究報告：司会 富山 佳昭

富山佳昭 「インテグリン α IIb(R995W) 変異をもつ血小板減少症例の解析」

藤村欣吾 「妊娠合併 I T P の治療ガイドライン作成に関するコンセンサス」

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」

倉田義之 「臨床調査個人票集計による特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査」

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」

14:30~14:45 休憩

14:45~15:45

特発性血栓症班研究報告：司会 小嶋 哲人

小嶋哲人 「血栓傾向の分子病態解析」

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の簡易モニタリングに
関する臨床研究の展開」

川崎富夫・末久悦次 「静脈血栓症の基礎研究と医療訴訟問題解決
深部静脈血栓症のリスクとしての凝固第 V 因子量」

宮田敏行 「アンチトロンビン欠損症 I 型は静脈血栓症リスクが極めて高い」

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-最終報告-

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 「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

—内因性トロンビン産生能 (ETP) を用いた活性化プロテインC感受性比 (APC-sr) —」

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」

佐久間聖仁 「院外発症静脈血栓塞栓症の危険因子：検診症例との比較」

榛沢和彦 「地震後深部静脈血栓症 (DVT) についての検討」

終了

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 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

TMA サブグループ研究計画

研究分担者 藤村 吉博 奈良県立医科大学
和田 英夫 三重大学
小亀 浩市 国立循環器病研究センター

研究協力者 森木 隆典 慶応義塾大学
日笠 聡 兵庫医科大学
上田 恭典 倉敷中央病院
松本 雅則 奈良県立医科大学

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。

個別計画

藤村吉博 (松本雅則)

- 1) 奈良医大輸血部 TMA データベースの個別解析 (継続)
 - (1) USS の phenotype 追跡調査
 - (2) 後天性妊娠関連 TMA の解析
- 2) ADAMTS13 と同インヒビター複合体の可視化法の開発
- 3) インフルエンザ重篤化要因としての TMA 解析

和田英夫

- 1) ADAMTS13に起因しないTMAの解析ならびにVWFppの意義
- 2) 三重大での TMA 症例の解析

小亀浩市

- 1) ADAMTS13の立体構造解析 (構造未決定のドメインおよび変異体)
- 2) ADAMTS13 活性測定法の改良

研究協力者

森木隆典

- 1) VWF および TTP 患者 IgG と ADAMTS13 の反応に関連するアミノ酸配列の解析

日笠聡

- 1) 新規TMA患者の集積
- 2) 妊娠USS患者のFFP定期補充とADAMTS13解析

上田恭典

- 1) 新規TMA患者の集積
- 2) 新たな治療法の検討

ITP サブグループ

班員： 富山佳昭 大阪大学医学部附属病院 輸血部
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
桑名正隆 慶應義塾大学医学部 リウマチ内科

研究協力者：降旗謙一 SRL
松原由美子 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学
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
柏木浩和 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科
野村昌作 関西医科大学 第一内科
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

ITP 診療に関して従来の班研究を継続した形において、ITP に関する国際的な新しい名称も考慮しつつ、疫学研究、診断および治療の標準化、病態解析を柱として ITP の解析を行なう。最近、欧米を中心とした国際作業部会により ITP の用語の標準化やガイドラインが作成されており、これらとの整合性についても議論していく必要あり。

1) 疫学研究

2004 年からのデータの蓄積あり。上記の国際作業部会との整合性を考慮しつつ臨床調査個人票の改訂作業を行なう。

2) ガイドライン作成

H. Pylori 除菌療法の ITP への適応が追加承認された (2010.6)。妊娠合併 ITP の治療ガイドラインの作成を行なう。一方、ITP の診断基準案に関してその基盤となる検査法の一般化、標準化が必要。

3) 病態解析

ITP における制御性 T 細胞の役割、GPIIb-IIIa 変異に起因する血小板減少症の病態解析、脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導機構の解析を行なう。

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 国立循環器病研究センター
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発症の原因とメカニズムを明らかにし、日本人におけるVTEの予知・予防のための対策確立を目指す。

特発性血栓症サブグループは、これまでに、

- 1) 日本人の静脈血栓症の遺伝的背景の検討
- 2) 特発性血栓症予防法として「ヘパリンの在宅自己注射」に関するアンケート調査

- 3) 特発性血栓症再発予防に対するワルファリン療法に関するアンケート調査

- 4) 先天性血栓傾向（AT、PC、PS欠乏症）日本人患者の実態調査

等を行ってきた。これらの活動を今後更に発展させ、日本人を対象としたエビデンスの収集とそれに基づいた対策指針の策定を目指す。

計画・方法

特発性血栓症サブグループは、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研究から構成される。

- 1) アンケート調査研究：

平成20年度より「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]欠乏症）日本人患者の実態調査」を実施しており、日本人における先天性血栓傾向のエビデンスを収集・解析する。ワルファリンの適正使用の指針づくりのため実施した「ワルファリンの使用に関するアンケート調査」、および「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」の解析結果に基づき、日本人に適したワルファリン療法の確立を目指す。

- 2) 日本人VTEの遺伝的背景に関する調査研究：

これまでの研究により、凝固制御因子の先天性欠乏症が静脈血栓症の高リスク群であることが確認された。この高リスク群の患者の同定を進めると共に、再発予防に関するエビデンスを収集し、再発予防の対策指針策定を目指す。

静脈血栓症/肺塞栓症グループ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。なお、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、各参加施設の倫理委員会の承認を得た後に実施される。

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年計画のうち平成22年度は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。研究はできるだけ今年度で終了する予定であるが、次年度以降の継続の有無は今年度末に検討する。

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. 地震と深部静脈血栓症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）—本研究は前年度に終了した。
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に最大限の配慮と対策を講じる。

7) 研究結果（研究結果の詳細は個々の抄録を参照のこと）

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）

外来新患患者を対照とした場合、静脈血栓塞栓症の危険因子として長期臥床、活動性癌が有意な危険因子であったが、住民検診症例との比較では、長期臥床、活動性癌、最近の大手術、骨折・外傷が有意な危険因子であり、血液型との関連も示唆された。

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）

県西部浜松医療センター入院患者（産婦人科、整形外科、外科等）で検討中である。

3. 地震と深部静脈血栓症との関連についての研究（継続、複数年：榛沢和彦）

震災後の深部静脈血栓症は震災後早期の肺塞栓症や慢性期の血栓後症候群だけでなく脳梗塞とも関連がある可能性が示唆され、震災後の避難生活における予防が重要であることが再確認された。また、深部静脈血栓症を認めた大部分の被災者にはPS/PCなどの血栓性素因は見つからなかったため、震災後では環境要因が強い影響をもつ可能性が示唆された。

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）

日本人においても、うっ血性心不全症例、特にNYHA機能分類IV度の重症例

では 25.5%と欧米と同様の高頻度に深部静脈血栓症が発生していた。また、NYHA 機能分類以外にも、超音波検査上、右房圧上昇が疑われる例では DVT 発生のリスクが高く、今後はこうした症例に対して一次予防の徹底が重要と考えられた。

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）

日本人においても、ネフローゼ症候群患者では欧米と同程度の高頻度 (12/42：28.6%) に深部静脈血栓症が発生しており、内科領域における危険因子として捉え、一次予防の徹底が必要と考えられた。

個別研究

血漿由来 ADAMTS13 の 3 種類のプロテアーゼによる切断反応とその臨床的意義

奈良県立医科大学 輸血部 松本 雅則, 藤村 吉博

ADAMTS13 の生理的な分解酵素として、トロンビンやプラスミンが報告されており、また敗血症性 DIC 患者においては顆粒球エラスターゼの関与が示唆されている。しかし、これらの検討は recombinant ADAMTS13 を用いて実施されており、糖鎖の違いから血漿中の ADAMTS13 とは動態が異なる可能性がある。今回我々は、モノクローナル抗体を用いて血漿から ADAMTS13 を精製する方法を確立し、上記 3 種類のプロテアーゼによる血漿由来 ADAMTS13 の切断部位を同定した。さらに、重症急性膵炎における ADAMTS13 活性低下の機序を検討するため、顆粒球エラスターゼを測定した。

血漿由来 ADAMTS13 のトロンビンによる切断部位は R257, R459, R888, R1176 の 4 カ所で、うち R459 と R888 は今までに報告のない切断部位であった。また、プラスミンの切断部位は、R459 を除きトロンビンの 3 ヶ所と同じであった。顆粒球エラスターゼの切断部位は、前 2 者と異なる I380 と T874 であった。以上より、基礎病態によって異なったプロテアーゼ切断を受け、ADAMTS13 活性が低下する可能性が示唆された。

また、重症急性膵炎 13 例において顆粒球エラスターゼを測定した。これらの症例では、急性期において ADAMTS13 活性は平均 37% に低下し、VWF 抗原は平均 402% と健常人と比べて有意に上昇していた。また、顆粒球エラスターゼは、急性期で健常人に比べ約 5 倍に有意に上昇していたが、病状の軽快とともに低下した。また、急性期の ADAMTS13 活性と顆粒球エラスターゼは負の相関関係が認められた。

後天的に ADAMTS13 活性が低下する機序として、自己抗体（主として IgG 型）によるものが有名であるが、これ以外の機序の詳細は不明である。今回顆粒球エラスターゼによる ADAMTS13 切断とそれに伴う活性低下を血漿由来 ADAMTS13 で確認した。顆粒球エラスターゼは様々な炎症性疾患で上昇することから、このような病態では顆粒球エラスターゼが ADAMTS13 活性低下に関与している可能性が示唆された。

三重大学ならびに関連病院で経験した血栓性微小血管障害症（TMA）例の解析途中経過と VWF プロペプチド (VWFpp) 値の解析

波部一伊藤尚美（三重大学大学院血液腫瘍内科）、和田英夫（同検査医学）

三重大学ならびに関連病院で経験した血栓性微小血管障害症（TMA）を、ADAMTS13 値 10%以下を TMA/ADAMTS13 群、10%以上を TMA/other 群として比較検討した。三重大では、これまで 75 例の TMA 例を経験した。33 例は TMA/ADAMTS13 群であり、42 例が TMA/other 群であった。TMA/ADAMTS13 群の基礎疾患では、特発性、自己免疫疾患が多く、TMA/other 群では、特発性、自己免疫疾患、HELLP 症候群、腎疾患などが見られた。TMA/other 群でも、HUS 症状を何回も再発する症例がみられた。

VWFpp は GTI 社の ELISA キットにて測定され、トロンボモジュリン (TM) や VWF 値との比較検討を行った。VWFpp は TM と同様に、TMA 症例特に TMA/other 群で有意に高値を示し、TMA/other 群の診断に有用な可能性が示唆された。また、VWFpp は TMA の死亡群で有意に増加し、TMA の生命予後を反映するマーカーとしても有用と考えられた。

進捗状況

1) 三重大学での TMA 例の検討

現在 70 例近く解析していますが、肝移植例、骨髄移植例、癌に伴う TMA 例にまで広げて約 100 例程度の解析を目指します。

アンケート調査成績などとの比較・検討

2) VWFpp の解析・評価

TMA 例の測定はほぼ終了

非 TMA 例の測定を行い。感度、特異度、カットオフ値の決定などを行う。

その他、TM との比較、腎機能との関係など検討する。

3) 習慣性、遺伝性 TMA/other 群の検討

とりあえず、病歴等をしっかりまとめる。

具体案なし

今までの三重大の仕事結果

1) アンケート調査にて、最近の TMA 発症状況を報告した。

2) 三重大での ADAMTS13 の解析

3) 肝移植症例にて、TMA の発症と VWF ならびに ADAMTS13 との関係を報告した。

4) TMA 診断における VWF プロペプチドの有用性を検討中

ADAMTS13 活性測定に用いる標準試料の調製について

小亀浩市・宮田敏行（国立循環器病研究センター・分子病態部）

血漿の ADAMTS13 活性を測定することは、血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP）の診断を行う上で、きわめて重要である。しかしながら、現在、ADAMTS13 活性を U/ml などの絶対単位で表すための国際標準試料は存在しないため、各施設内で確保したプール正常血漿や、市販の正常血漿などの ADAMTS13 活性を 100%とみなした相対単位が用いられている。実際のところ、国際標準血漿や精製 ADAMTS13 標品を標準試料として入手することが可能になるまでは、プール正常血漿を使用することが実状に即している。ただし、標準試料としてプール血漿を調製する場合には、何人以上の血漿試料を混和すべきであるかという検討はまだなされていない。そこで今回、本研究事業で測定していた日本人一般住民の ADAMTS13 活性データを利用して、その答えを理論的に導き出した。

吹田市一般住民 3486 人（男女同数）の血漿 ADAMTS13 活性を蛍光基質 FRETS-VWF73 を用いて測定し、全検体の活性平均値を 100%と設定した場合、標準偏差（SD）26.8%、標準誤差 0.5%であり、男性群の平均値 93.5%（SD, 24.6%）と女性群の平均値 106.5%（SD, 27.3%）には有意差（ $P < 0.0001$ ）が見られた。したがって、プール血漿の調製には男女同数の血漿試料を用いるべきであると考えられた。そこで、男性群および女性群からそれぞれ無作為に 5 試料ずつ、計 10 試料を抽出したときの活性平均値を算出する作業を 10 回繰り返したところ、活性値の 10 回平均値と SD は 102.3%と 11.1%であった。つまり、男女各 5 試料でプール血漿を調製した場合、20 ロットに 1 ロットの割合で、80%（=平均値-2SD）～125%（=平均値+2SD）の範囲を逸脱する可能性が高いと考えられた。さらに、無作為抽出する試料数を増やして同様に算出したところ、平均値±2SD の範囲は、男女各 10 試料の抽出で 89～113%、男女各 20 試料で 91～108%、男女各 50 試料で 94～104%となった。

以上の結果から、被検試料の ADAMTS13 活性値をほぼ正確に得たい場合、少なくとも男女各 20 試料以上からなるプール正常血漿を調製すべきであると考えられた。一方、TTP 診断の指標として重要な低活性領域（10%未満）に照準をあてた測定では、男女各 10 試料からなるプール正常血漿でも使用可能であろう。

ADAMTS13 機能と関連する重要なアミノ酸配列の探索

慶應義塾大学 保健管理センター 森木 隆典

平成 20 年度より、ADAMTS13 機能解析を目標として、以下に示すテーマを設定して研究を行ってきた。

1. モノクローナル抗体エピトープマッピングによる ADAMTS13 機能ドメインの解析
2. TTP 患者 IgG が結合する ADAMTS13 アミノ酸配列の解析
3. TTP 患者における新規自己抗体探索の試み
4. VWF における ADAMTS13 結合アミノ酸配列の探索

以下、現時点での進行過程と今後の予定を各テーマ別にまとめる。

モノクローナル抗体エピトープマッピングによる ADAMTS13 機能ドメインの解析
抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体 14 種類（化血研副島先生、奈良県立医大藤村先生より供与）につき、ADAMTS13 フェージライブラリーを用いて抗体エピトープマッピングを行ったところ、11 種類の抗体についてエピトープが判明した（2009 年アメリカ血液学会発表）。現在は、ディスインテグリン領域に注目し、VWF との結合に重要と考えられるアミノ酸配列を解析中である（2010 年日本血栓止血学会発表）。

TTP 患者 IgG が結合する ADAMTS13 アミノ酸配列の解析

TTP 患者 IgG（三重大学和田先生、奈良県立医大藤村先生より供与）につき、ADAMTS13 フェージライブラリーを用いてエピトープマッピングを行ったところ、スパーサー領域に重要と考えられるアミノ酸配列を見出した（2008 年アメリカ血液学会発表）。現在、このアミノ酸配列に結合する自己抗体を定量的に検出する系を作成中である。

TTP 患者における新規自己抗体探索の試み

肝細胞や骨髄細胞由来の cDNA フェージライブラリーを作成し、TTP 患者 IgG によるスクリーニングを試みたが、有意と考えられる新規自己抗原は得られなかった。ひとえにライブラリーの性能によるところが大きいのと思われるため、高性能ライブラリー作成のための条件検討が必要と考えられる。

VWF における ADAMTS13 結合アミノ酸配列の探索

VWF 側の ADAMTS13 結合アミノ酸配列探索を目的とし、VWF 由来のペプチド配列を発見するフェージライブラリーを作成した。ADAMTS13 全長やドメインごとのリコンビナント蛋白などを用いてスクリーニングを予定している。

以上。

インテグリン α IIb (R995W) 変異をもつ血小板減少症例の解析

大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科、大阪大学医学部附属病院輸血部
柏木 浩和、富山 佳昭

先天性の血小板減少症をきたす疾患として、May-Hegglin 異常や BSS などが知られており、時に ITP と誤診されることもある。最近、integrin α IIb β 3 の β 3 細胞膜直下の β 3 (D723H) 変異による家族性血小板減少例が報告された。 β 3 (D723) は α IIb (R995) と水素結合を形成し、 α IIb β 3 を非活性化状態に保つために重要であることが明らかにされているが、我々は、その α IIb (R995) において、Arginine が Tryptophan に変異した α IIb (R995W) 変異を有する家族性血小板減少例を見いだした。【症例】24 歳女性。15 歳時に近医を受診した際に、鉄欠乏性貧血および軽度血小板減少を指摘。その後も血小板数は常に 6-10 万/ μ l 程度であった。高校生頃まではやや生理出血が多く、また紫斑を認めることが多かった。骨髄検査等施行され ITP と診断、無治療にて経過をみられていたが、母親および母方祖父において、発端者と同様の軽度血小板減少 (6-10 万) が指摘されたことから、先天性血小板減少症が疑われ当院に紹介された。【結果】一般検査では、軽度の血小板減少およびやや大型の血小板を認める以外に異常認めず。網状血小板、TPO は正常範囲内。コラーゲンおよび ADP による血小板凝集は軽度の障害が疑われた。血小板表面の α IIb β 3 発現は正常例の 60-70% 程度であった。患者遺伝子を検討した結果、患者は α IIb (R995W) 変異のヘテロ接合体であり、母親において同じ変異の存在が確認された。患者血小板は未刺激状態において PAC-1 の軽度の結合を認めた。 α IIb (R995W) を β 3 とともに 293T 細胞に発現させて検討を行った結果、PAC-1 およびフィブリノゲン結合の増加および未刺激状態における FAK のリン酸化が認められた。【考察】 α IIb (R995W) 変異は、國島らにより本例を含めて本邦において既に 4 家系において認められている。すべて本例と同様の軽度血小板減少およびやや大型の血小板を認めており、本邦における先天性血小板減少の主要な原因のひとつである可能性がある。我々は α IIb (R995W) 変異において α IIb β 3 の細胞表面での発現低下、 α IIb β 3 および FAK の恒常的な活性化を認めたが、 α IIb (R995W) 変異が血小板数低下、血小板サイズ増大をきたすメカニズムの解明、さらにこの変異が生理的病的血栓形成に影響を与えるかどうかは今後の検討課題である。

妊娠合併 I T P の治療ガイドライン作成に関するコンセンサス

藤村欣吾 広島国際大学

I T P の治療の今年度の目標は 1) 妊娠合併 I T P の治療ガイドラインの作成、
2) I T P 治療ガイドラインの作成を掲げた。この内妊娠合併 I T P の治療ガイドライン作成の手順として今回本研究班員に主要項目に関する意見聴取を行ったのでその結果を報告する。

8名の班員の意見のまとめは以下の如くである。

1. 妊娠可否の基準： 治療中で出血なし、かつ血小板数 > 5万 或いは
無治療で血小板数 > 3万 のいずれか
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 I V I g G, 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 20～30mg/day
6. 治療目標：出血傾向消失 或いは 血小板数 > 3万
7. 分娩時出血管理の対象：血小板数 < 5万
8. 分娩時の治療法：I V I g G, 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
10. 経膈分娩時の必要血小板数：血小板数 > 5万
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：I V I g G
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 < 10mg/day

今後の予定として以上の結果をもとに妊娠合併 I T P の治療ガイドライン原案を作成し、班としての意見統一を計り、班員以外の専門家へ意見聴取を行う方向を考えている。

ご意見を頂いた班員、研究協力者（敬称略）：富山佳昭（大阪大学）、桑名正隆（慶應大学）、宮川義隆（慶應大学）、倉田義之（四天王寺大学）、小島哲人（名古屋大学）、小林隆夫（県西部浜松医療センター）、高蓋寿朗（西神戸医療センター）

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 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⁺CD25⁺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⁺CD25⁺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。また、Treg 欠損マウスでみられる血小板減少は移植細胞数に依存すること、他の自己免疫症状とは独立して起きていることがわかった。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。

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、GPIIb/IIIa の発現を欠く GPIIIa 欠損マウス由来の血小板表面を用いて、Treg 欠損マウスで産生される抗血小板抗体の対応抗原が GPIIb/IIIa であるか調べる。

② Treg 移植による血小板減少の治療効果の検討

Treg 欠損マウスにおける血小板減少は Treg の移入により発症を抑制することができた。そこで、血小板減少した Treg 欠損マウスに対して Treg を移植することで治療効果の検討をおこなう。

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。ブロック作用を有する抗 CTLA-4 抗体を用いて、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を確認する。

臨床調査個人票集計による特発性血小板減少性紫斑病の

全国疫学調査

研究分担者：倉田義之 四天王寺大学人文社会学部人間福祉学科 教授

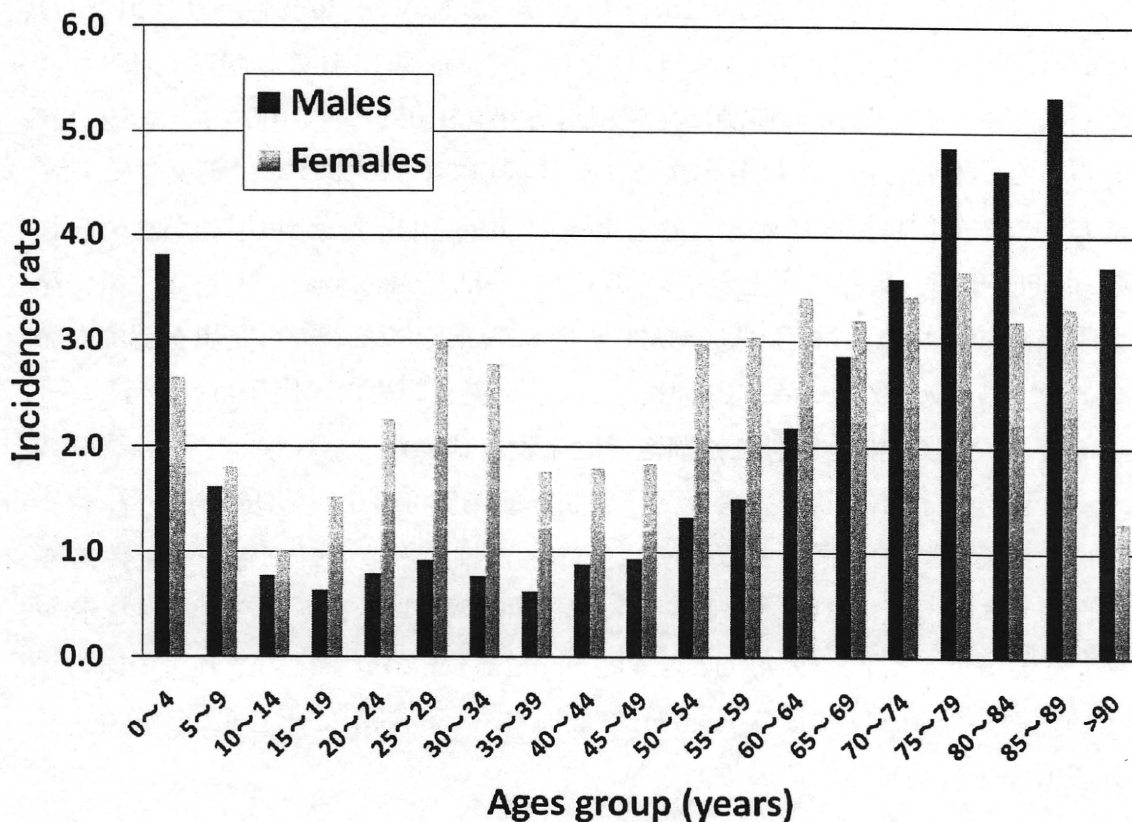
1. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の発症率 (2004 年～2007 年)

Table 1. Overall and sex-specific incidence rates of childhood and adult ITP

	Overall		Childhood		Adult	
	Number of patients	Incidence rate	Number of patients	Incidence rate	Number of patients	Incidence rate
Overall ITP	7,774	2.16	929	1.91	6,845	2.20
Male	3,043	1.72	505	2.01	2,538	1.68
Female	4,731	2.58	424	1.79	4,307	2.69

発症率：10 万人当たりの発症者数/年

2. 年齢別・性別発症率 (2004 年～2007 年)



3. 臨床個人調査票の改訂作業を開始

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

研究協力者：松原 由美子

血小板減少の原因として、血小板破壊・消費および血小板産生低下のいずれか、あるいは両方が関与している。本研究においては血小板の産生低下に注目し、巨核球分化・血小板産生の分子機序を詳細に解明することを目的とする。

これまでの班会議において、(1) 造血幹細胞から *in vitro* 分化誘導にて巨核球・血小板産生を得るシステムを確立した事、(2) この血小板産生システムを応用した *in vitro* 分化誘導法により、ヒト正常皮下脂肪組織から巨核球・血小板を得た事、(3) 脂肪前駆細胞株 3T3-L1 から *in vitro* にて巨核球・血小板を得た事、を報告した。現在、3T3-L1 から巨核球への分子機序を解明するための検討を重ねており、今回はその進行状況について報告したい。

3T3-L1 細胞を巨核球への分化誘導培地で約 12 日間培養し、培養中の細胞の細胞表面マーカー（フローサイトメトリー法）や発現遺伝子（リアルタイム定量 PCR）の候補因子解析を経時的に行った。分化誘導前細胞は CD45(-)、c-Kit(-)、CD41(-)、CD42b(-)、CD11b、CD44、CD73 は僅かに発現細胞あり、CD105(+)、CD106(+)、CD90(+)、CD29(+)、Sca-1(+)を示した。誘導 12 日の細胞は CD45(+)、CD41(+)、CD42b(+)、CD90 は僅かに発現細胞あり、CD105(-)、CD106(-)、CD29(-)、Sca-1(-)を示した。c-Kit は分化誘導 4 日目細胞で(-)であった。発現遺伝子解析において、分化誘導前に比し、分化誘導 4~5 日、11 日で発現増加が認められたのは NFE2-p45、発現に変化の認められないのは PPARgamma、FOG1、c-mpl、発現低下が認められたのは Fli1、GATA2、いずれの細胞においても発現を認めない因子は GATA1、Oct3/4、Sox2 であり、これら発現を認めない因子はコントロールとして用いた ES 細胞や造血幹細胞では発現を認めた。

今回の検討により認められた、脂肪前駆細胞 3T3-L1 細胞の *in vitro* 分化誘導による巨核球分化の pathway は、3T3-L1 細胞→造血幹細胞や多能性幹細胞→巨核球ではなく、3T3-L1 細胞→巨核球の機構が関与している可能性を示唆している。また、今回認めた transdifferentiation の効率は、これまで報告されたいくつかの study による transdifferentiation 効率に比し高い。現在、この分子機序を解明するための検討を重ねている。

血栓傾向の分子病態解析

名古屋大学医学部 小嶋哲人

生理的凝固制御因子であるアンチトロンビン (AT)、プロテインC (PC)、プロテインS (PS) の欠乏は血栓症の発症リスクファクターとなることが知られている。我々は、これまでにこれら凝固制御因子欠損症が疑われた症例において、それぞれ原因遺伝子変異を同定し、さらに変異分子の発現実験などを通して欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。これらの結果は、他者からの報告も合わせて現在までの日本人における変異としてまとめ、我々のホームページ (http://hes.met.nagoya-u.ac.jp/KENSAWEB/lab0/blood/bunshi_hp/mutation.html) に掲載している。

今年度はさらに遺伝子解析を進め、AT 欠損症と PC 欠損症の各 2 例に原因と予想される変異を認めた。AT 欠損症 1 例目はイントロン 5 に一塩基置換 (c. 1154-14G>A) を認め、新たなアクセプターサイト (AG) を生ずる既報 (日本人では初) のスプライシング異常 (p. Pro384_Gly385insValPheLeuPro) が同定された。AT 欠損症 2 例目はエクソン 2 に一塩基置換 (c. 269T>G) をヘテロに認め、これは新規のミスセンス変異 (p. Phe90Cys) で健常人の RFLP 解析にてポリモルフィズムでないことを確認した。一方、PC 欠損症 1 例目はエクソン 9 に一塩基置換 (c. 1000G>A) をヘテロに認め、これは既報のミスセンス変異 (p. Gly334Ser) であった。PC 欠損症 2 例目はエクソン 9 に 2 つの一塩基置換 (c. 1075G>A, c. 1218G>A) を認め、サブクローニング解析の結果これらは別々のアレルに存在することは明らかとなった。前者は既報のミスセンス変異 (p. Met406Ile: Osaka 2) で、後者は新規のミスセンス変異 (p. Val1359Ile) で健常人の RFLP 解析にてポリモルフィズムでないことを確認した。

しかし、PCR をもとにしたこれらの直接塩基配列解析法では遺伝子変異を同定できていない症例もあり、今後、MLPA 法など他の手法や他の候補遺伝子解析の必要性があると思われた。

「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の簡易モニタリングに関する臨床研究」の展開

窓岩清治*、坂田洋一 (*発表者)

自治医科大学分子病態研究部

我々はこれまでに、全国の臨床研修医療機関を対象とした「ワルファリン使用に関するアンケート調査」や、二次調査として実施した「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」から、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るものの、血栓症再発例や出血合併症が大きな問題となっていることを明らかにしてきた。本年度はこれらの調査結果を踏まえて、ワルファリン療法中の合併症の軽減を目的とした「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法の簡易モニタリングに関する臨床研究」へと展開することにより、個々の症例に応じたより安全なワルファリン療法確立するためのエビデンスを蓄積していく予定である。