

201128158A

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

平成 23 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 村田 満

慶應義塾大学 医学部

平成 24 年 3 月

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

平成 23 年度

総括・分担研究報告書

平成 24 年 3 月

## 目次

### 血液凝固異常症に関する調査研究

I. 総括研究報告書	村田満 慶應義塾大学 ----- 7
------------	--------------------

#### II. 分担研究報告書

##### ITP（特発性血小板減少性紫斑病）研究グループ

グループリーダー：富山佳昭 大阪大学

班員：桑名正隆 慶應義塾大学

倉田義之 四天王寺大学

藤村欣吾 広島国際大学

研究協力者：降旗謙一 株式会社エスアールエル

宮川義隆 慶應義塾大学医学部

野村昌作 関西医科大学

西本哲也 慶應義塾大学大学院

松原由美子 慶應義塾大学医学部

高蓋寿朗 西神戸医療センター

柏木浩和 大阪大学医学部

特別協力者(疫学班)：杉田稔 東邦大学医学部衛生学

島田直樹 昭和大学医学部公衆衛生学

**ITP グループ研究総括：富山佳昭** -----15

**分担研究報告**

富山佳昭：インテグリン・IIb・3変異による遺伝性血小板減少症の病態解析

桑名正隆：Th1型の免疫応答がITP病態の発症を促進する

倉田義之：臨床調査個人票（平成21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

藤村欣吾：ITP治療の参照ガイド作成について

**TMA（血栓性微小血管障害症）研究グループ**

グループリーダー：藤村吉博 奈良県立医科大学

班員：和田英夫 三重大学

小亀浩市 国立循環器病センター研究所

研究協力者：森木隆典 慶應義塾大学

日笠聡 兵庫医科大学

松本雅則 奈良県立医科大学

上田恭典 倉敷中央病院

**TMA グループ研究総括：藤村吉博** ----- 79

**分担研究報告**

藤村吉博：小児期発症のADAMTS13活性著減後天性TTPの解析

和田英夫：DICにおけるADAMTS13、VWFプロペプチドの変動に関する研究

小亀浩市：ADAMTS13-P475S変異体の構造と機能に関する解析

**特発性血栓症 研究グループ**

グループリーダー：小嶋哲人 名古屋大学

班員：坂田洋一 自治医科大学

宮田敏行 国立循環器病センター研究所

川崎富夫 大阪大学  
横山健次 慶應義塾大学  
小林隆夫 県西部浜松医療センター  
榛沢和彦 新潟大学  
研究協力者：窓岩清治 自治医科大学  
中村真潮 三重大学大学院  
山田典一 三重大学大学院  
太田覚史 三重大学医学部附属病院  
平山久也 県西部浜松医療センター

特発性血栓症グループ研究総括：小嶋哲人 ----- 109

分担研究報告

小嶋哲人：新規静脈血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビンを検出  
するスクリーニング検査法の開発

坂田洋一：特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法施行患者における  
プロトロンビン時間(PT-INR)自己測定の有効性と安全性に関する臨床研究

宮田敏行：プロテインS K196E 変異の血栓症における重要性に関する研究

川崎富夫：日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略

横山健次： bortezomib が血小板機能に与える影響の解析

小林隆夫：入院患者における静脈血栓塞栓症（VTE）発症予知に関する研究

榛沢和彦：新潟県中越地震7年後のDVT 検診結果

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 165

V. 研究成果の刊行物・別冊 ----- 179

VI. その他

# 総括研究報告書

# 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

## 平成 23 年度総括研究報告書

### 「血液凝固異常症に関する調査研究班」

研究代表者 村田 満 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 教授

#### 研究要旨

本調査研究班は特定疾患治療研究対象事業である 3 つの疾患、すなわち特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性微小血管障害症（TMA）、特発性血栓症について、それぞれ 3 つのサブグループに分かれ課題に取り組むとともにグループ間の相互議論を活発に行うことによって、(1)分子病態解析に基づいた診断基準、治療指針の確立と普及、そしてその効果の検証、(2)大規模な疫学的解析による我が国での発症頻度、予後などの正確な把握、を目指している。平成 23 年度は、新たな研究班が組織された最初の年度である。過去に確立された研究調査体制を踏襲しつつ、より多くの成果、具体的には診療ガイドの作成や臨床的有用性の高いデータベース化システムの構築、そして新規治療薬の検証と保険適応へ向けての検討を班全員の参加のもとに行った。疫学研究は臨床個人調査表を基に平成 21 年度の本邦における ITP の実態を調査把握した。また TMA 患者の集積を続行した。また診断・治療ガイドライン等については、ITP 治療の参照ガイドの改訂を完了したこと、ITP 臨床調査個人票の改訂を行ったことが挙げられる。また特発性血栓症／静脈血栓症グループにおいては深部静脈血栓症へパリン在宅自己注射の保険適応が重要な成果である。

#### ITP（特発性血小板減少性紫斑病）研究グループ

ITP は特定疾患治療研究事業の対象で公費助成対象疾患である。診断基準に関しては、その病態に即した診断法を検討し、除外診断のみの診断法ではなく、より正確に ITP を診断できるような診断基準を目指した。治療に関しては治療プロ

トコールを履行するに当たり保険医療上の制約を克服すると共に、難治症例に対する新たな治療法の確立、さらには妊娠合併 ITP に対する妊娠、分娩管理ガイドライン作成へ向けての意見集約などを行った。

1. 疫学研究に関しては、特定疾患治療研究事業の対象疾患にもなって毎年行われる ITP 臨床個人調査表を基に、新

規発症症例数、更新症例数、発症年齢、性、分布、さらには罹病期間、治療内容、合併症、現在の QOL, 等を解析した。さらに ITP 臨床個人調査表の改訂作業を計画した。その結果、平成 15 年から開始し本年は平成 21 年度をまとめることが出来た。平成 21 年度の推定新規発症症例は 2,881 名と昨年と比べ約 340 名の減少であった。その内訳は急性型 1,033 名、慢性型 1,848 例であった。ここ数年の傾向であるが、急性型の申請人数の減少が続いている。

2. 診断基準に関しては、ITP の病態に立脚した検査項目のうち、網状血小板比率に関して、IPF 法の弱点の一つである経時的変化について、検体保存液の検討を行った。2006 年に提案した I T P 診断基準は I T P の病態に基づいたもので、特異度、感度に関しても従来の基準に比し有用性が高い。この基準を一般化するためには一部の特異的検査項目を中央化し全国どこからでも検査可能にする必要がある。そのために約 5 年前から S R L との共同研究を開始し準備は整いつつあるが、若干の問題点が残っている。血小板抗体産生 B 細胞の定量化法に関しては、SRL での体制は整ってきているが、いまだその精度管理に若干の問題が残っている。網状血小板比率の測定に関しては、簡便法であるシスメックスの機器を用いる I P F 法は、検体の保存状況、保存期間の影響を受けやすいことがあきらとなり、遠隔地からの輸送検体では精度が低下する問題が生じている。一方、血清トロンボポエチン (T P O) 値を測定は安定した結果が得られ、さらに今後使用頻度が増すと考えられる T P O 受容体作動薬の

適応を考える上でも、有用な検査であると考えられる。

3. 治療プロトコールに関しては、H. Pylori 除菌療法の保険適用、難治症例に対する治療薬として承認されたトロンボポエチン受容体作動薬の使用基準を啓蒙すべく、ITP 診療の参照ガイドを作成した。のべ 3 回にわたり作業部会を開催し、各委員の意見を集約した。2004 年に提案した治療ガイドライン (案) はピロリ関連 I T P を診断し除菌を優先する治療が特徴である。これにより中高年齢の I T P の治療成績は格段に向上している。昨年、ようやく除菌療法が保険適応となり、さらに新規薬剤である T P O 受容体作動薬も承認された。これらの変化を受け、研究班では、前回の治療ガイドラインのような司法においても用いられる可能性のある拘束性の強いメッセージではなく、拘束性を若干弱めた形での治療の参照ガイドを作成した。妊娠合併 ITP の管理については従来のガイドラインを核として各施設での現状をまとめ、その後の知見を取り込んだガイドラインとした。

4. その他、個人研究として、難治性 I T P に対する取り組み (藤村班員、倉田班員、桑名班員、富山班員、宮川研究協力者)、遺伝性血小板減少症例に見いだされた  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 変異 (富山班員、柏木研究協力者、高蓋研究協力者)、制御性 T 細胞 (Treg) と I T P の発症について (桑名班員、西本研究協力者)、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) が施行され着実な成果が挙げられた。



## TMA(血栓性血小板減少性紫斑病)研究グループ

血栓性微小血管障害症(TMA)グループは、TMAおよび血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の病態解析と新規の治療法の開発を目標としている。平成23年度は、TMA患者の集積を続行するとともに、抗CD20に対するモノクローナル抗体リツキシマブのTTPへの保険適応拡大を目指した活動を重点的に行った。リツキシマブのTTPへの保険適応の拡大は、企業治験の可能性は少ないため、高度医療評価制度の利用、もしくは公的研究費を用いた医師主導治験の可能性を探ることとした。

TMAの症例集積：奈良医大輸血部では1998年よりADAMTS13解析を通じて本邦TMA解析センターとして活動を行い、2011年12月末までに1085例のTMAの解析を終了した。最近、ADAMTS13活性と同インヒビターの測定は、検査会社でも検査可能となったため、我々の集積症例数は減少しているが、診断が困難な症例や治療不応例を中心に現在も当ラボへ紹介されてきていると思われる。

ADAMTS13活性著減症例の国際比：1998年から2008年に当ラボで集積した919例のうち、後天性特発性(ai)TTPが284例であった。その中にADAMTS13活性著減例が195例登録されていたが、この活性著減は3%未満と定義した。3%とした理由は、2005年まで使用していたADAMTS13活性測定法の測定限界が3%であったことによる。しかし、海外からの報告では、測定方法の感度の違いがあるため、5%未満を活性著減としている場合が多い。そこ

で、国際的な比較を行うため、今回我々は活性著減を5%未満とし、初発例のみを対象とした186例のai-TTPについて解析した。ADAMTS13に対する自己抗体(インヒビター)に関して、0.5 BU/ml以上の陽性例は97.8% (182/186)に認めた。0.5~<1.0 8.1%, 1.0~<2.0 35.5%, 2.0~<5.0 33.3%, 5.0~<10.0 12.9%, 10 BU/ml以上は8.1%であり、5 BU/ml以上の高力価インヒビター症例が約20%に存在することを明らかにした。年齢別に比較すると、高齢者になるほど腎機能が悪く、精神神経症状の発現率が高い傾向を認めた。また、高齢者ほどTTPによる短期死亡率が高かった。

リツキシマブのTTPへの保険適応拡大：本年度から重点的に取り組んだ課題はリツキシマブのTTPへの適応拡大である。リツキシマブは、Bリンパ球上に発現しているCD20に対するモノクローナル抗体製剤である。ADAMTS13活性著減後天性TTPの多くは、ADAMTS13に対する自己抗体による自己免疫疾患であるので、抗体産生を抑制することで後天性TTPが治療可能と考えられる。実際、国内外から後天性TTPにおけるリツキシマブの治療効果が報告されており、特異的な治療法として効果が期待される。平成23年11月11日に慶応大学病院でリツキシマブのTTPへの適応拡大に関するサブグループ会議を行った。適応拡大への方法としては、1) 企業治験、2) 公知申請、3) 高度医療評価制度、4) 社会保険診療報酬支払基金審査情報提供事例、5) 医師主導治験がある。1)はTTPの症例数が少なく、採算性から製薬会社が実施する可

能性は少ない。2) は、欧米で公的医療保険の適応になっている必要があるが現状では該当しないので、可能性は少ないと考えている。現段階では3) もしくは5) の可能性がもっとも高いと考えられる。5) となった場合は、厚生労働科研の研究費を申請し、研究グループを組織して実施したいと考えている。

## 特発性血栓症研究グループ

特発性血栓症／静脈血栓症サブグループ研究は、近年増加している我が国における静脈血栓塞栓症のエビデンスを収集するとともに、静脈血栓塞栓症の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防のための対策の確立を目的とする。数年来の本研究班活動を通じた特発性血栓症／静脈血栓症患者での診療・予後改善に向けた医療行政上での成果として、昨年度の「日本人に多いプロテイン S 異常症の診断に欠かせないプロテイン S 活性測定検査の保険収載」、ならびに今年度の「ヘパリン在宅自己注射の保険適応」の2つがあげられる。また全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究として「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究」が計画され、大学病院約 2000 講座、および一般病院の約 6000 施設にアンケート調査書を送付し、2 か月間（平成 23 年 11 月 1 日から平成 23 年 12 月 31 日を予定）に診断された肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の患者数、ならびにそのリスク

因子などの基本情報を後ろ向きに収集するもので、平成 24 年 1 月に調査票を各施設に送付した。個別研究として、「日本の現状に即した肺血栓塞栓症の予防戦略」では、血漿の緩衝化により検体保存の安定性の問題と、研究班での提言やガイドラインの位置づけを司法側が理解しやすい形で説明する必要を指摘した。「プロテイン S K196E 変異の血栓症における重要性に関する研究」ではプロテイン S K196E 変異は遺伝因子として日本人の静脈血栓塞栓症発症に関わっていることが示された。

「ワルファリン療法施行患者におけるプロトロンビン時間 (PT-INR) 自己測定の有効性と安全性に関する臨床研究」では平成 24 年 1 月 27 日の時点で 15 例が登録され、臨床研究を継続中である。「新規静脈血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビン検出スクリーニング検査法の開発」では静脈血栓症発症メカニズムの解明にも有効なツールとなることが期待された。「bortezomib (BOR) が血小板機能に与える影響の解析」では BORgain vitro で血小板機能に影響を与える可能性が示唆された。「入院患者における静脈血栓塞栓症 (VTE) 発症予知に関する研究」では VTE 高リスク患者の APC-sr および PS 抗原と PS 活性の比活性測定が VTE 予知に寄与する可能性が示唆された。「新潟県中越地震 7 年後の DVT 検診結果」では DVT 保有者の脳梗塞・TIA と狭心症・心筋梗塞は有意に頻度が多く、「震災被災者の肺塞栓症予防のための DVT 治療についてのガイドライン (案)」が提唱された。

プロテイン S K196E 変異の血栓症との関連を調べるには、ホモ接合体の血栓症

の解析が重要であるが、ホモ接合体は稀なため研究が進んでいないのが現状で、本変異と静脈血栓塞栓症に関するより詳しい研究が必要である。自己測定 PT-INR 値のエビデンスをさらに蓄積することにより、ワルファリン療法の最も重要な副作用である出血予防案の作成へと研究を進展させる必要がある。アンチトロンビン抵抗性プロトロンビン検出スクリーニング検査法は今まで原因が特定できていない遺伝性の静脈血栓症症例における血栓発症メカニズムの解明に本検査法は有用と思われる。APC-sr および PS 抗原と PS 活性の比活性測定による VTE リスク判定ができれば、予防的抗凝固療法の選択が可能となることが期待できる。「震災被災者の肺塞栓症予防のための DVT 治療についてのガイドライン (案)」の作成は厚労行政上、有用と思われる。

日本人での静脈血栓塞栓症のエビデンスを収集するとともに、発症原因・発症メカニズムの解明は、我が国における静脈血栓塞栓症の予知・予防のための対策の確立に重要な知見が得られたと考えられる。

## グループ研究報告書

## ITP（特発性血小板減少性紫斑病）サブグループ研究報告

グループリーダー： 富山 佳昭 大阪大学医学部附属病院 病院教授  
班員： 藤村 欣吾 広島国際大学薬学部 教授  
桑名 正隆 慶應義塾大学医学部 准教授  
倉田 義之 四天王寺国際大学 教授  
研究協力者： 降旗 謙一 株式会社エスアールエル  
宮川 義隆 慶應義塾大学医学部  
野村 昌作 関西医科大学 第一内科  
西本 哲也 慶應義塾大学医学部  
松原 由美子 慶應義塾大学医学部  
高蓋 寿朗 西神戸医療センター血液免疫内科  
柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科  
特別協力者（疫学班）： 杉田 稔 東邦大学医学部衛生学  
島田 直樹 昭和大学医学部公衆衛生学

## グループ総括

分担研究者： 富山 佳昭

### 研究要旨

ITP に関して、疫学調査、病態解析とその診断、治療に関してグループ研究を継続して行っていく。疫学研究は臨床個人調査表を基に平成 21 年度の本邦における ITP の実態を調査把握した。平成 21 年度においても発症年齢、更新年齢とも中高年の男女に最も多い事が確認された。国際的には ITP 国際作業部会において本疾患の呼称や、急性および慢性 ITP の定義の見直しが提唱されたこと、および本邦においてヘリコバクタ・ピロリ除菌療法の保険適用やトロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬が ITP に承認されたことに対応すべく、本研究班にて前年度も含め計 3 回の作業部会を開催し、ITP 治療の参照ガイドの改訂を完了し(「臨床血液」誌掲載予定)、臨床個人調査表の改訂案も作成した。一方、妊娠合併 ITP 診療の参照ガイドの作成にむけての検討を開始した。診断に関しては、引き続き検査の標準化を検討した。網状血小板比率については IPF 法では IPF% が経日的に変化するため、検体保存ができないことが問題となっている。IPF 法に関して、検体保存に関する至適条件を明らかにした。個人研究では、臨床的に ITP と鑑別すべき先天性血小板減少症の分子機構に関して、一部の症例において GPIIb-IIIa の変異が関与していることを明らかにした。さらに ITP マウスモデルを用いて調節性 T 細胞の減少により Th1/Th2 バランスが Th1 細胞優位に変化すること、また血小板産生系として脂肪細胞由来の細胞から血小板産生の分子機構を解析した。

#### A. 研究目的

ITP は特定疾患治療研究事業の対象疾患であり、本研究班では本疾患の疫学を初めとして、その診断ならびに治療法を向上させることは急務の課題であることを常に念頭おいている。この目的のために、本研究班では ITP に関して、その疫学調査、病態に則した新たな診断基準の作成、および治療薬の副作用を含めた総合的な治療目標の設定などを検討してきた。

まず特定疾患治療研究事業の対象疾患であることから、ITP の臨床疫学的研究を経年的に行い最近の ITP の臨床実態を明らかにする。診断基準に関しては、その

病態に即した診断法を検討し、除外診断のみの診断法ではなく、より正確に ITP を診断できるような診断基準を目指す。治療に関しては治療プロトコルを履行するに当たり保険医療上の制約を克服すると共に、難治症例に対する新たな治療法の確立、さらには妊娠合併 ITP に対する妊娠、分娩管理ガイドライン作成へ向けての意見集約などを行う。

#### B. 研究方法

1. 疫学研究に関しては特定疾患治療研究事業の対象疾患にともなう毎年行われる ITP 臨床個人調査表を基に、新規発

症例数、更新症例数、発症年齢、性、分布、さらには罹病期間、治療内容、合併症、現在の QOL, 等を解析した。さらに ITP 臨床個人調査表の改訂作業を計画した。

2. 診断基準に関しては ITP の病態に立脚した検査項目のうち、網状血小板比率に関して、IPF 法の弱点の一つである経時的変化について、検体保存液の検討を行った。

3. 治療プロトコールに関しては、H. Pylori 除菌療法の保険適用、難治症例に対する治療薬として承認されたトロンボポイエチン受容体作動薬の使用基準を啓蒙すべく、ITP 診療の参照ガイドを作成する。のべ3回にわたり作業部会を開催し、各委員の意見を集約した。

妊娠合併 ITP の管理については従来のガイドラインを核として各施設での現状をまとめ、その後の知見を取り込んだガイドラインにする。

## C. 研究結果

### 1. ITP の疫学研究 (倉田班員)

#### 1) 登録症例数と性差

平成 15 年から開始し本年は平成 21 年度をまとめることが出来た。平成 21 年度の推定新規発症症例は 2,881 名と昨年に比べ約 340 名の減少であった。その内訳は急性型 1,033 名、慢性型 1,848 例であった。ここ数年の傾向であるが、急性型の申請人数の減少が続いている。

推定更新症例は 16,374 名であった。これらの症例数は平成 16 年度より低下傾向にあったが平成 19 年度、20 年度の解析では再び増加し平成 16 年のレベルに近似し

あるいは増加していたが、平成 20 年には減少に転じた。

#### 2) 年齢分布

発症年齢分布についてはここ 5 年間変化なく、ITP は中高年齢者に多い疾患であることが定着している。しかし、前述のように急性型の申請人数の減少が続いており、実患者数の減少か、申請者のみの減少かを検証する必要がある。

#### 3) 治療

治療に関してはピロリ除菌療法が第一選択治療として定着していることが明らかとなり、平成 22 年に除菌療法が保険承認されたことは、ITP 診療にとって福音となる。さらには、除菌療法は安価に行なえるため、医療経済的にも画期的である。

#### 4) 新規症例の検査

骨髓検査は急性型で 89%、慢性型で 96%が施行されていた。PAIgG は急性型で 63%、慢性型で 66%が測定されていたが、血小板自己抗体検査や網状血小板比率検査は保険適用ではないこともあり、実施率は 10%以下であった。

臨床調査表に基づく疫学研究の問題点はすべての都道府県からのデータが含まれていないことである。これらの欠損データを補うために、人口統計から補正を行い本邦の推定データとしている。従って発症例数が年によって変動するのは欠損データの数に関係している可能性もある。いずれにしてもより多くの都道府県に協力していただきより正確な傾向を把握したい。さらに、この調査表は基本的には治療が必要となる ITP 患者の実数の把握という理解である。

#### 5) 個人調査表の改訂作業

国際的見地からすると、最近 ITP 国際作業部会において本疾患の呼称や、急性および慢性 ITP の定義の見直しが提唱された。ITP は、血小板減少が 6 ヶ月以内に寛解する急性 ITP と 6 ヶ月以上持続する慢性 ITP に分類されている。しかしながら急性との表現は、その曖昧さと 6 ヶ月経過後にレトロスペクティブに診断されるという理由により、その使用は好ましくないと判断された。ITP がどのぐらいの期間持続するかを予測するマーカーが無い場合、新規の ITP はすべて newly diagnosed ITP と表記する。また新たなカテゴリーとして血小板減少が 3 ヶ月～12 ヶ月持続する場合は、persistent ITP と表記する。この範疇には自然寛解しなかった症例や治療を止めた後に血小板が減少した症例も含む。Persistent ITP では自然寛解する可能性がまだ残っていると考えられる。そのため摘脾などのより強力な治療法は persistent ITP に関しては延期しても良いとの意見である。また、この期間設定により chronic ITP は 12 ヶ月以上持続する場合、としている。研究班として、これらの国際的な動向を考慮し、さらに臨床医に対して調査票記入の労力を軽減すべくより簡便に記載できるように配慮し、個人調査表の改訂を協議しその案をまとめた。今後、厚生労働省とも改訂案を協議予定である。

## 2. ITP の診断基準の設定と問題点 (富山班員、桑名班員、降旗研究協力者)

2006 年に提案した ITP 診断基準は ITP の病態に基づいたもので、特異度、感度に関しても従来の基準に比し有用性

が高い。この基準を一般化するためには一部の特異的検査項目を中央化し全国どこからでも検査可能にする必要がある。そのために約 5 年前から SRL との共同研究を開始し準備は整いつつあるが、若干の問題点が残っている。血小板抗体産生 B 細胞の定量化法に関しては、SRL での体制は整ってきているが、いまだその精度管理に若干の問題が残っている。

網状血小板比率の測定に関しては、簡便法であるシスメックスの機器を用いる IPF 法は、検体の保存状況、保存期間の影響を受けやすいことがあきらとなり、遠隔地からの輸送検体では精度が低下する問題が生じている。IPF 法では、その疾患感受性および特異性は、どちらも 60% 台であり、研究室で行うチアゾールオレンジ染色と血小板膜蛋白 GPIb を染める 2 重染色で測定する FCM 法では感受性 82%、特異性 93% に比較して、若干劣っていることが明らかとなっている。IPF 法を採血後短時間内で測定すれば研 FCM 法とは相関があるため、簡便な点を考慮すると、特異性は低いことを十分理解した上において、ITP 診断に利用できる可能性はある。しかし IPF 法では抗凝固薬として EDTA を使用していることにより網状血小板比率が高めに測定される。これを克服するためには他の血球計の測定にも影響しない抗凝固薬への変更が必要である。シスメックス機種を使用している施設では網血小板測定は行えるがそれ以外の施設では網血小板測定項目が使用出来ない可能性がある。この問題を克服するため、種々の凝固薬を用いて IPF 法による網状血小板比率



測定を検討した。その結果、検体を室温保存し、抗凝固薬としてクエン酸、テオフィリン、アデノシン、ジピリダモールの混合液にて保存すると、採血4日目まで網状血小板比率が安定することが明らかになった。

一方、血清トロンボポエチン（TPO）値を測定は安定した結果が得られ、さらに今後使用頻度が増すと考えられるTPO受容体作動薬の適応を考える上でも、有用な検査であると考えられる。

### 3. ITP治療の参照ガイドと妊娠合併ITP管理の参照ガイド（藤村班員、桑名班員、倉田班員、富山班員、村田班長、宮川研究協力者、高蓋研究協力者、柏木研究協力者）

2004年に提案した治療ガイドライン（案）はピロリ関連ITPを診断し除菌を優先する治療が特徴である。これにより中高年齢のITPの治療成績は格段に向上している。昨年、ようやく除菌療法が保険適応となり、さらに新規薬剤であるTPO受容体作動薬も承認された。これらの変化を受け、研究班では、前回の治療ガイドラインのような司法においても用いられる可能性のある拘束性の強いメッセージではなく、拘束性を若干弱めた形での治療の参照ガイドを作成した。その理由のひとつには、実際にITPに用いられている薬剤の保険適用が無いことがあげられる。昨年度も含め計3回の作業部会を開催し、治療の参照ガイドを完成させた。その内容は「臨床血液」誌に掲載予定である。

今年度は新たに妊娠合併ITPの妊娠、

分娩、出産後の管理ガイドラインを作成する準備を開始した。若年ITPは女性に多く出産適齢期であるためにこのような管理ガイドラインは必要である。約15年前にも特発性造血器障害調査研究班で提案されたが、医療環境、医療に対する意識、医療手段の変化により必ずしも適切なガイドラインとはいえない状況となってきた。そこで医療環境の異なる各班員の施設で行っている方法をそれぞれ論じ、従来のガイドラインを基本に種々の医療環境でも施行可能な新たな妊娠合併ITP診療の参照ガイドを作成する事を目指すことにしている。

### 4. 個人研究

#### 1) 難治性ITPに対する取り組み（藤村班員、倉田班員、桑名班員、富山班員、宮川研究協力者）

重篤な出血傾向を伴い、時には血小板輸血も必要となる難治症例を救うことがITPの治療予後の改善には必要である。新たな治療ガイドラインに準じて治療を行っても約5%位の難治症例（通常の副腎皮質ステロイド療法および摘脾療法に反応しない血小板数3万以下の症例）が推定されている。最近これらの症例に対してTPOレセプター作動薬が承認され使用されている。これらの薬剤はITPに対して投与量依存的に血小板増加反応を示し、出血傾向は軽快し、併用薬剤の治療が不要となり患者さんのQOLが著しく改善することが臨床治験の段階で明らかとなった。しかし薬理作用から血栓症の発症や、骨髄線維症、白血病を始めとする造血器腫瘍の発症、等の懸念

は残されている。またこれらの薬剤は多くの I T P 症例に対して治癒を誘導するものではなく、長期に渡って使用し続けなければならない治療法である事も従来の治療とは異なっている。これらの点から今後本治療法の I T P に対する位置づけ、投与量、投与方法、長期使用による副作用などを加味し、前述の I T P 治療の参照ガイドに反映した。

根治的治療を目指した治療薬としてリツキシマブが諸外国では使用され約 50% に有効性が認められている。本邦でも難治症例に対し要望は多いが、臨床治験は計画されていない状況である。今後、班研究と連動しながら、医師主導型の臨床治験中である。

## 2) 遺伝性血小板減少症例に見いだされた $\alpha$ IIb $\beta$ 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、その原因としてインテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 (血小板膜糖蛋白 GPIIb-IIIa) の変異が関与していることが明らかとなってきた (柏木研究協力者、高蓋研究協力者)。

インテグリン  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 (GPIIb-IIIa) 変異は、血小板無力症の原因であり、従来血小板数や血小板形態には影響を与えないと考えられていた。しかしながら  $\alpha$  IIb (R995W) 変異が本邦の複数の先天性巨大血小板減少症家系に存在することが明らかとなってきた。 $\alpha$  IIb (R995W) 変異をヘテロで有すると  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の発現は正常の 70% 程度に低下し、また  $\alpha$  IIb (R995W) 変異を CHO 細胞などに発現させる

と恒常的な  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化が認められ、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 活性化が巨大血小板減少症と関連していると考えられる。

本年度では、巨大血小板減少症を伴う血小板無力症様患者において新たな変異  $\alpha$  IIb (G991C) を見いだした。本患者では、 $\alpha$  IIb のナンセンス変異と G991C の複合ヘテロであった。その結果、患者では巨大血小板減少症に加え、 $\alpha$  IIb  $\beta$  3 の発現低下が顕著となり血小板無力症様の病態を呈すると考えられた。

本研究成果により、軽度の血小板減少を呈する家族性血小板減少症が I T P として診断されている可能性が明らかとなった。

## 3) 制御性 T 細胞 (Treg) と I T P の発症について (桑名班員、西本研究協力者)

I T P 患者では、制御性 T 細胞 (Treg) の減少や機能障害が報告され、病態との関連が考えられている。昨年度までの検討により、BALB/c ヌードマウスに同系マウス 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 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 I T P 病態を呈することを明らかにしてきた。本年度は I T P モデルマウスにおけるヘルパー T 細胞 (Th) のサイトカイン産生プロファイルの解析を行った。Treg 欠損マウスの脾細胞を用いてサイトカイン産生 CD4 陽性細胞を解析すると、IFN- $\gamma$  産生 CD4 陽性細胞 (Th1) が IL4 再生細胞 (Th2) や IL17 産生細胞 (Th17) に比べ増加していることが示された。今回の検討より、Treg 欠損マウスをもちいた I T P モデル動物において Th1 優位の免

疫応答が起こっていることが示された。

#### 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）を進展させ、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。さらに、ヒト皮膚繊維芽細胞に p45NF-E2/MafG/MafK を遺伝子導入すると、巨核球・血小板に分化することを明らかにした。さらに、今年度は p45NF-E2/MafG/MafK 遺伝子導入ヒト皮膚繊維芽細胞と遺伝子導入していないヒト皮膚繊維芽細胞間で microRNA 解析を行った。3D-Gene chip を用いて約 1,700 因子を解析し、遺伝子導入ヒト皮膚繊維芽細胞において 6 因子が有意に増加し 325 因子が有意に減少していた。特に MafB を標的とする miR-130a の減少や c-mpl 発現を調節する miR708 や miR151 の減少が検出された。

#### 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 TPO 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) 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- $\alpha$  IIb  $\beta$  3 alloantibodies. *Int J Hematol* 93:106-111, 2011
- 2) Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. A potential role for  $\alpha$ -actinin in inside-out  $\alpha$  IIb  $\beta$  3 signaling. *Blood* 117:250-258, 2011
- 3) Kamae T, Kiyomizu K, Nakazawa T, Tadokoro S, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Bleeding tendency and impaired platelet function in a patient carrying a

- heterozygous mutation in the thromboxane A<sub>2</sub> receptor. *J Thromb Haemost* 9:1040-1048, 2011
- 4) 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 literature review. *Int J Hematol* 93:329-335, 2011
- 5) Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, Tomiyama Y, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Yonemura Y, Mori S, Usuki K, Iwato K, Hashino S, Wei H, Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial. *Int J Hematol* 94:71-80, 2011
- 6) 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* 22:185-189, 2011
- 7) Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H. Heterozygous ITGA2B R995W mutation inducing constitutive activation of the  $\alpha$ IIb  $\beta$ 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117:5479-5484, 2011
- 8) Nishida S, Kawasaki T, Kashiwagi H, Morishima A, Hishitani Y, Kawai M, Hirano T, Ishii T, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Ogata A, Oka Y, Kishimoto T, Tanaka T. Successful treatment of acquired hemophilia A, complicated by chronic GVHD, with tocilizumab. *Mod Rheumatol* 21:420-422, 2011
- 9) Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, Kuwana M. Critical role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* In press.
- 10) Ono M, Matsubara Y, Shibano Y, Ikeda Y, Murata M: GSK-3beta negatively regulates megakaryocyte differentiation and platelet production from human bone marrow cells *in vitro*. *Platelets*. 22: 196-203, 2011
- 11) Arai T, Kawamura A, Matsubara Y, Yokoyama K, Ikeda Y, Fukuda K, Murata M. Effect of chronic kidney disease on platelet reactivity to dual-antiplatelet therapy in patients treated with drug-eluting stents. *Heart Vessels*. 2011 Aug 12. [Epub ahead of print]
- 12) Matsubara Y, Murata M, Ikeda Y. Culture of megakaryocytes and platelets from subcutaneous adipose tissue and a preadipocyte cell line. *Methods Mol Biol*. 2012;788:249-58.