

り、治療の参照ガイドを適宜改訂して行く予定である。

(今回は成人の主として慢性、一部急性 ITP を対象とし、妊娠合併 ITP の治療ガイドに関しては計画中である)

謝辞

この ITP 治療の参照ガイドは厚生労働省難治性疾患克服事業「血液凝固異常症調査研究班」(研究代表者 村田 満)のもとで作成された。本研究班からの ITP アンケート調査に協力頂いた全国の日本血液学会血液専門医の方々、また研究協力者である三重大学 和田英夫先生、名古屋大学 小嶋哲人先生、関西医科大学病院 野村昌作先生、西神戸医療センター 高蓋 寿朗先生から多大な協力を頂きここに深甚なる謝意を捧げます。

文 献

- 1) 野村 武夫 特発性血小板減少性紫斑病 診断・治療の手引き 厚生省特定疾患「特発性造血障害調査研究班」昭和 63 年度研究業績報告書(班長野村武夫) 平成元年 3 月(1989 年) 付表 3 38-60
- 2) 野村武夫、厨信一郎、蔵本淳、前川正 特発性血小板減少性紫斑病の治療に関する多施設共同プロスペクティブ研究 特発性造血障害調査研究班(班長 野村武夫) 昭和 63 年度研究業績報告書 平成元年 3 月(1989 年) 136-137
- 3) Cohen Y. C., Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, Mozes B. The bleeding risk and natural history of ITP in patients with persistent low platelet counts. Arch. Intern. Med. 2000;160:1630-1638.
- 4) Portielje J. E. A, Westendorp R. G. J, Kluin-Nelemans H. C, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 2001;97: 2549-2554.
- 5) Frederiksen H. & Schmidt K. The incidence of ITP in adults in cases with age. Blood 1999;94:909-913.
- 6) 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. 2011; 93: 329-335.
- 7) Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione R, Landolfi R, Pola P, Gasbarrini G. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 1998;352:878.
- 8) Emillia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara L, Amarri S, Gagossi K, and Torelli G. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura.

Blood 2001;97: 812-814.

- 9) Fujimura K, Kuwana M, Kurata Y, Imamura M, Harada H, Sakamaki H, Teramura M, Koda K, Nomura S, Sugihara S, Shimomura T, Fujimoto T-T, Oyashiki K, Ikeda Y.
Is eradication therapy useful as the first line of treatment in *Helicobacter Pylori*-positive idiopathic thrombocytopenic purpura ?
Analysis of 207 Eradicated chronic ITP cases in Japan.
Int. J. Hematol. 2005;81: 162-168.
- 1 0) 桑名 正隆 池田 康夫 ITPにおける *Helicobacter pylori* 除菌効果
発現機序の解析 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
平成 18 年度報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」(主任研究者 池
田 康夫) 2007. 3:83-88.
- 1 1) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, et al. Preliminary laboratory
diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura : evaluation
by multi-center prospective study.
J. Thromb. Haemost. 2006;4:1936-1943.
- 1 2) McMillan R, Durette C. Long-term outcomes in adults with chronic
ITP after splenectomy failure. Blood 2004;104:956-960.
- 1 3) Clines D. B. and Bussel J. B.
How I treat idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP).
Blood 2005;106: 2244-2251.
- 1 4) George J. N.
Management of patients with refractory immune thrombocytopenic
purpura. J. Thromb. Haemost. 2006;4: 1664-1672.
- 1 5) George JN, Woolf S. H, Raskob G. E, et al. Idiopathic Thrombocytopenic
Purpura; A Practice Guideline Developed by Explicit Methods for the
American Society of Hematology. Blood 1996;88: 3-40.
- 1 6) British Committee for Standards in Haematology General Haematology
Task Force. Guideline : Guidelines for the investigation and
management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children
and in pregnancy. Brit. J. Haematol. 2003;120: 574-596.
- 1 7) Provan D, Stasi R, Newland A. C, et al. International consensus
report on the investigation and management of primary immune
thrombocytopenia. Blood 2010;115:168-186.
- 1 8) Neunert C, Lim w, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther M.
The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice

- guideline for immune thrombocytopenia. Blood 2011;117: 4190-4207.
- 1 9) 藤村 欣吾 免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) における治療ガイドライン (案) の提案 —ヘリコバクターピロリ菌除菌療法の成績を踏まえて— 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16年度報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」(主任研究者 池田 康夫) 2005. 3;53-69
 - 2 0) 日本ヘリコバクター学会ガイドライン 2009、
日本ヘリコバクター学会 “*H. pylori* 感染の診断と治療のガイドライン “2009 改訂版 Helicobacter Research vol.12 no.6 pp386-460 別冊 2009
 - 2 1) Stasi R, Sarpatwari A, Segal J.B, et al. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review
Blood 2009;113:1231-1240.
 - 2 2) Kojouri K, Vesely S.K, Terrell D.R, George J.N. Splenectomy for adult patients with ITP: A systematic review to assess long-term platelet count responses, production of response, and surgical complications.
Blood 2004;104:2623-2634.
 - 2 3) 蔵本淳、小田健司、川野宏則、ほか。
多施設共同研究による摘脾療法の遠隔成績
厚生省特定疾患 特発性造血障害調査研究班 平成4年度研究業績報告書
(班長 野村 武夫) 1993. 3;130-133.
 - 2 4) 藤村 欣吾 —難治性 ITP の実態調査— 平成 18 年度アンケート調査の報告— 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 18 年度報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」(主任研究者 池田 康夫) 2007. 3;73-82.
 - 2 5) Bussel J.B, Kuter D.J, Phil D, et al. AMG531, a thrombopoiesis stimulating protein, for chronic ITP.
N. Engl.J.Med. 2006 ;355:1672-1681.
 - 2 6) Jenkins J.M, Williams D, Deng Y, et al. Phase I clinical study of eltrombopag , an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist.
Blood 2007;109:4739-4741.
 - 2 7) Bussel J.B, Cheng G, Saleh M.N, et al.
Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl.J.Med. 2007;357:2237-2247.
 - 2 8) Kuter D.J, Bussel J.B, Lyons R.M, et al. Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a

- double-blind randomised controlled trial.
Lancet 2008;371:395-403.
- 29) Maloisel F, Andres E, Zimmer J, et al. Danazol therapy in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura : Long-term results. Am. J. Med. 2004;116:590-594.
- 30) 野村武夫、前川正、檀和夫：特発性血小板減少性紫斑病に対するダナゾール療法—多施設共同研究— 特発性造血障害調査研究班 昭和59年度研究業績報告書（班長 前川 正） 1985.3;344-350.
- 31) McMillan R. Therapy for adults with refractory chronic ITP. Ann. Int. Med. 1997;126:307-314.
- 32) Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Feuerstein M. A, Leonard J. P, Amandori S, Bussel J. B. The efficacy and safety of B-cell depletion with antiCD-20 monoclonal antibody in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. Brit. J. Haematol. 2004;125:232-239.
- 33) Arnold D.M, Dentali F, Crowther M.A, et al. Systematic review: Efficacy And Safety of Rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann. Intern. Med. 2007;146:25-33.
- 34) Penalver F. J., Jimenez-Yuste V., Almagro M., et al. Rituximab in the management of chronic immune thrombocytopenic purpura :An effective and safe therapeutic alternative in refractory patients. Ann. Hematol. 2006; 85: 400-406
- 35) Godeau B, Porcher R, Fain O, et al. Rituximab efficacy and safety in adult splenectomy candidates with chronic immune thrombocytopenic purpura—results of a prospective multicenter phase 2 study. Blood 2008; 112: 999-1004.
- 36) Carson K. R, Evens A. M, Richey E. A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. Blood 2009; 113: 4834-4840.
- 37) Emillia G, Morselli M, Luppi M, et al. Long-term salvage therapy with cyclosporin A in refractory idiopathic Thrombocytopenic purpura. Blood 2002; 99: 1482-1485.
- 38) Vesely S. K, Perdue J. J, Rizvi M. A, Terrell D. R, George J. N. Management of adult patients with persistent idiopathic thrombocytopenic purpura following splenectomy: a systematic review. Ann. Intern. Med. 2004; 140: 112-120.

- 3 9) Anderson J.C. Response of resistant ITP to pulsed high-dose dexamethasone therapy. *N.Engl.J.Med.* 1994; 330:1560-1564.
- 4 0) Cheng Y, Wong R. S. M, Sou Y. O. Y, et al. Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone. *N.Engl.J.Med.* 2003; 349:831-836.
- 4 1) Busse J.B, Pham L.C. Intravenous treatment with gammaglobulin in adults with immune thrombocytopenic purpura : Review of the literature. *Vox Sang.* 1987; 52: 206-211.

表1

GRADE systemによる推奨度

推奨度の強さ

1: 強い推奨

殆どの患者において、良好な結果が不良な結果より明らかに勝っており、その信頼度が高い

2: 弱い推奨

良好な結果が不良な結果より勝っているが、その信頼度は低い

推奨の基になったエビデンスの質

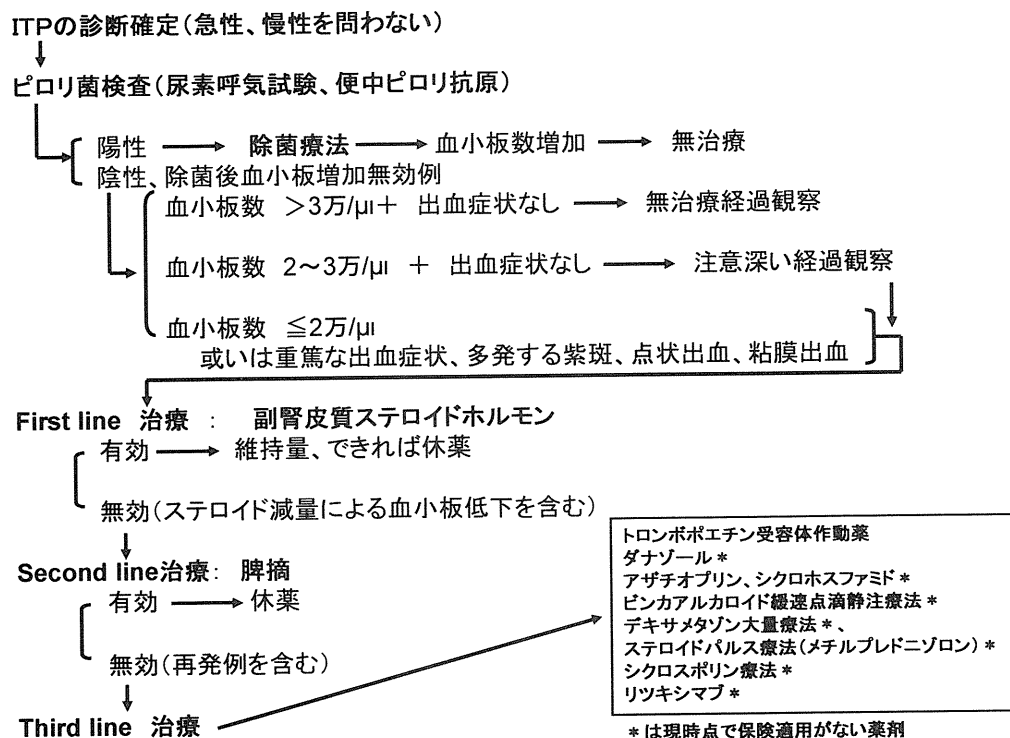
A: 複数のRCTsにおいて確立したエビデンス、
あるいは観察研究による極めて強いエビデンス

B: RCTsによる限定的なエビデンス、
あるいは観察研究による強いエビデンス

C: 重大な弱点のあるRCTsによるエビデンス、
観察研究による弱いエビデンス、
あるいは間接的エビデンス

成人ITP治療の流れ(1) (2011)

図1



成人ITP治療の流れ(2) (2011)

緊急時或いは外科的処置などに対する対応

入院管理下で行う

- ・血小板輸血
- ・免疫グロブリン大量療法
- ・ステロイドパルス療法(メチルプレドニゾン)

再発、急性増悪ITP症例に対する治療

- ・緊急性がある場合： 緊急時の治療で対応
- ・緊急性を要さない場合： 副腎皮質ステロイド量の増量、あるいは
Third line治療を行う

I T P 治療及び使用薬剤一覧 (表 2)

(薬剤は使用順序を示しているわけではない)

緊急時、外科的処置時、など

血小板輸血

免疫グロブリン大量療法 (H I V G) (推奨度 2 B)

ステロイドパルス (メチルプレドニゾロン) 療法*

除菌療法 (推奨度 1 B)

3 剤併用療法

〔アモキシシリン
クラリスロマイシン
プロトンポンプ阻害薬

First line 治療薬

副腎皮質ステロイドホルモン (推奨度 2 B)

Second line 治療

脾摘 (推奨度 1 B)

Third line 治療 脾摘無効例、脾摘回避例——治療抵抗性症例

トロンボポエチン受容体作動薬 (推奨度 1 B)

ダナゾール*

アザチオプリン、シクロホスファミド*

ビンカアルカロイド緩速点滴静注療法*

デキサメタゾン大量療法*、

ステロイドパルス療法 (メチルプレドニゾロン) *

シクロスポリン療法*

リツキシマブ*

*は現時点で本邦において保険適用がない薬剤

成人 I T P の各種外科的処置時に推奨される血小板数 (表 3)

外科的処置	推奨血小板数
予防歯科的処置 (歯石除去など深部クリーニング)	$\geq 2 \sim 3$ 万/ μ l
簡単な抜歯	≥ 3 万/ μ l
複雑な抜歯	≥ 5 万/ μ l
局所歯科麻酔	≥ 3 万/ μ l
小手術	≥ 5 万/ μ l
大手術	≥ 8 万/ μ l
主要脳神経手術	≥ 10 万/ μ l
脾摘	≥ 5 万/ μ l
分娩 (経膈分娩)	≥ 5 万/ μ l
(帝王切開)	≥ 8 万/ μ l

文献 17 を引用し一部改変

(Provan D. et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia
Blood 2010 ;115:168-186)

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

研究分担者： 富山 佳昭 大阪大学医学部附属病院輸血部

研究協力者： 柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科

研究要旨

慢性ITPの診断においては、遺伝性血小板減少症を鑑別する必要がある。近年、血小板膜糖蛋白・IIb・3変異を有する遺伝性血小板減少症が明らかとなってきたが、我々は、新たな変異、・IIb(G991C)をもつ遺伝性血小板減少症を見いだした。患者は9歳女児。血小板は大型であり、血小板数は3万/ μ lに低下していた。更に血小板表面の・IIb・3発現は著減していた。父親も大型の血小板を認め、血小板数が10万程度に低下していた。遺伝子解析の結果、患児は父親由来の・IIb(G991C)変異と母親由来の・IIb(R422X)変異の複合ヘテロ接合体であった。293T細胞に発現させた・IIb(G991C)・・3は恒常的に活性化されていた。以上の結果から・IIb・3の活性化異常が血小板数および形態異常に関与する可能性が示された。

A. 研究目的

慢性の血小板減少例の中に、稀に遺伝性(家族性)血小板減少例が存在し、ITPと誤診され無効な治療を受けることがある。遺伝性血小板減少症の原因としてはMay-Hegglin異常に代表されるMYH9異常症やBernard-Soulier症候群などが知られているが、原因遺伝子が不明であるものも多い。血小板インテグリン・IIb・3(GPIIb/IIIa)はフィブリノゲンやフォンウィレブランド因子(VWF)の受容体として血栓止血に必須の分子であり、その先天性異常であるGlanzmann血小板無力症の解析などから・IIb・3の発現や機能に影響する多くの遺伝子異常が報告されて

いる。これら・IIb・3遺伝子異常を有する患者における血小板数や血小板形態は通常正常であったことから、・IIb・・は血小板数の恒常性維持やその形態には関与しないと考えられてきた。しかし、我々および國島らは、遺伝性巨大血小板減少症例の解析から・IIb・・活性化変異、・IIb(R995W)を明らかにし、・IIb・・活性化異常が血小板数および形態異常に関与する可能性を示した。本研究では、・IIb・・変異と血小板減少および形態異常の関連およびそのメカニズムを明らかにすることを目的としている。

本年度は我々が遺伝性血小板減少家系の解析から新たに見いだした

・II(G991C) 変異を有する血小板の表現型の詳細な検討および・IIb・3の活性化への影響に関する検討を行った。

B. 研究方法

血小板の・IIb・3発現はflow cytometryおよびWestern blotにて確認した。また・IIb・3の活性化をリガンド類似抗体PAC1を用いて検討した。・IIbおよび・3 遺伝子およびcDNA塩基配列を直接シーケンス法にて検討した。見いだされた遺伝子異常、・IIb(G991C)を発現ベクターに組み込んだのち293T細胞に発現させ、・IIb・3の活性化を検討した。

尚、本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を得ており、患者からは研究協力に関し、十分な説明の上で書面による同意書を得ている。

C. 研究結果

(症例) 患者は9歳女児。生後4ヶ月時に大腿、上肢に皮下出血を繰り返したため近医受診。10万程度の軽度血小板数減少を認めるのみであったため、それ以上の精査はなされなかった。2010年6月に抜歯後の止血困難、頻回の鼻出血、皮下出血斑を主訴に近医受診。血小板数の低下と血小板凝集能の著明な低下を認めたため、病態解析の依頼が当院にあった。

(解析結果) 患児血小板表面の・IIb・3

発現は正常の5-10%程度に低下しており、血小板無力症タイプIIであると診断した。Western blotでは、血小板内における・IIb・3発現は正常の65%程度であった。血小板数は3万程度に低下しており、また血小板サイズの増大が認められた。興味深いことに、父親は10万程度の血小板減少と血小板サイズの増大を認め、母親においては血小板数、形態ともに正常であった。また両親の血小板の・IIb・3発現はともに正常の70%程度に低下していた。遺伝子解析の結果、患児は父親由来の・IIb(G991C)変異と母親由来の・IIb(R422X)変異の複合ヘテロ接合体であり、患者血小板cDNAにおいては・IIb(G991C)のみの発現を認めた。・IIb(G991C)変異を293T細胞に発現させたところ、強いPAC1結合を認め、・IIb(G991C)・3は恒常的に活性化されていることが明らかとなった。

D. 考察

近年になり・IIb・3の膜近傍領域における活性化変異が遺伝性巨大血小板減少症をきたす可能性が報告されてきている。今回、我々は見いだした・IIb(G991C)変異も・IIbの膜近傍領域に存在し発現細胞においては・IIb・3の著明な活性化を誘導した。更に、興味深いことに・IIb(G991C)変異のみが発現している患児血小板においては、血小

板内と血小板表面における・IIb・3発現の乖離が認められた。・IIb・3活性化異常とこれら血小板表現型異常の関連およびそのメカニズムについて、今後・IIb・3活性化変異ノックインマウスを用いた検討を進めていく予定である。

E. 結論

遺伝性血小板減少症家系において・IIb(G991C)変異を見いだした。本変異により誘導される・IIb・3の恒常的活性化が血小板減少および形態異常の原因となっている可能性がある。

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- α IIb β 3 alloantibodies. *Int J Hematol* 93(1):106-111, 2011
- 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 $\alpha_{IIb}\beta_3$ signaling. *Blood* 117(1):250-258, 2011

- 3) 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
- 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(3):329-335, 2011
- 5) 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_2 receptor. *J Thromb Haemost.* 9(5):1040-1048, 2011
- 6) 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(20):5479-5484, 2011
- 7) 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(1):71-80, 2011
- 8) Sasamoto N, Tomimatsu T, Nagamine K, Oshida M, Kashiwagi H, Koyama S, Kanagawa T, Arahori H, Tomiyama Y, Kimura T. Fetal and neonatal anemia associated with anti-Jr(a) : A case report showing a poorly hemolytic mechanism. *J Obstet Gynaecol Res.* 37(8): 1132-1136, 2011
- 9) Schipperus MR, Fijnheer R, Pabinger I, Godeau B, Michel M, Tomiyama Y, Imbach P, Cuker A, Cines B, Panzer S, Reesink HW. Treatment of primary autoimmune thrombocytopenia (AITP). *Vox Sang.* 2011 Nov 4. doi: 10.1111/j.1423-0410.2011.1552.x .
- 10) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 - 最近の話題. *細胞* 43(2):18-21, 2011
- 11) 富山佳昭. 第II章 薬物編 1. 抗血小板薬. 抗血栓薬の最前線 -基礎と臨床- (斎藤英彦編), 医薬ジャーナル社, 大阪, 2011, pp36-72
- 12) 富山佳昭. 血小板凝集能の標準化に対して、国内、国外でどのような取り組みをしていますか. *血栓と循環* 19:65-66, 2011
- 13) 富山佳昭. 血小板の活性化機能: ADPの果たす役割. *人工血液* 18:151-153, 2010
- 14) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 - 最近の話題. *Medicament News* 2049: 5-6, 2011
- 15) 富山佳昭. II. 臨床 脾臓と関連した疾患. 成人を中心とした特発性血小板減少性紫斑病. 脾臓 -基礎と臨床- (沖永功太編), へるす出版, 東京, 2011, pp131-135
- 16) 西山美保、林 悟、兜森 修、山西 八郎、末久悦次、倉田義之、柏木浩和、富山佳昭. 多項目自動血球分析装置XE-5000を用いた幼若血小板比率 (IPF%) 測定における抗凝固剤と保存温度の影響 -抗凝固剤CTADと室温保存の有用

- 性一. 臨床病理 59(5): 452-458, 2011
- 17) 富山佳昭. 出血斑の種類と病因. わかりやすい血栓と止血の臨床 (日本血栓止血学会編), 南江堂, 東京, 2011, pp70-72
- 18) 富山佳昭. P2Y₁₂受容体阻害抗血小板薬. カレントセラピー 29(6):59-63, 2011
- 19) 富山佳昭. 今後の抗血小板療法. 血栓と循環 19:305-310, 2011
- 20) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療戦略と血小板増加薬の適応. 血液フロンティア 21(7):997-1003, 2011
- 21) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の病態と新規治療法. SRL 宝函 32(2):33-42, 2011
- 22) 富山佳昭. トロンボポエチン受容体作動薬による難治性ITPの治療. 臨床血液52(8):627-632, 2011
- 23) 富山佳昭. 新規抗血小板薬の開発. 脈管学 51:301-307, 2011
- 24) 富山佳昭. 血管障害による出血性疾患: 血管性紫斑病. 血液専門医テキスト(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2011, pp359-361
- 25) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. 血液専門医テキスト(日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2011, pp362-365
- 26) 池田珠世、押田眞知子、帰山ともみ、櫻木美基子、館農美香、中尾まゆみ、清川知子、青地 寛、永峰啓丞、富山佳昭. 廃棄血削減への取り組み-過去6年廃棄理由の解析-. 日本輸血細胞治療学会誌57(6):484-489, 2011
2. 学会発表
- 1) Tomiyama Y (Oral) Where are we now?: Biology and development of ITP treatment. Symposium "For Better Life of Adult Chronic ITP" (2011.9.30, Seoul, Korea)
- 2) Nakazawa T, Tadokoro S, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y. (Poster) Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for α IIb β 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK. The 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology (2011.12.10-13, San Diego, USA, J. Evan Sadler)
- 3) Tadokoro S, Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K, Kashiwagi H, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. (Oral) α -actinin stabilizes integrins to a low-affinity ligand-binding state in resting platelets. XXIII Congress of the international Society on Thrombosis and Haemostasis. (2011.7.23-28, Kyoto, Japan, Hidehiko Saito)
- 4) Nakazawa T, Kamae T, Kiyomizu K,

- Tadokoro S, Honda S, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kanakura Y. (Poster) Agonist induced α IIb β 3 activation in genetically engineered human megakaryocytic cell line, CMK. XXIII Congress of the international Society on Thrombosis and Haemostasis. (2011.7.23-28, Kyoto, Japan, Hidehiko Saito)
- 5) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Kamae T, Tadokoro S, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y. (Poster) Identification of epitopes and critical residues for binding of platelet-associated anti-GPIIb/IIIa autoantibodies in patients with chronic immune thrombocytopenia. XXIII Congress of the international Society on Thrombosis and Haemostasis. 2011.7.23-28, Kyoto, Japan, Hidehiko Saito)
- 6) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Kamae T, Tadokoro S, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y. (Poster) Identification of epitopes and critical residues for binding of PA anti-GPIIb/IIIa Abs in chronic ITP. 第 73 回日本血液学会学術集会. (2011.10.14-16, 名古屋, 直江知樹)
- 7) 宮川義隆、藤村欣吾、富山佳昭、倉田義之、岡本真一郎、桑名正隆、菊池佳代子、阿部貴行、佐藤裕史、村田 満、金倉 讓、池田康夫. (口演) 特発性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの医師主導治験の研究計画第 73 回日本血液学会学術集会. (2011.10.14-16, 名古屋, 直江知樹)
- 8) Katsutani S, Tomiyama Y, Kimura A, Miyakawa Y, Okamoto S, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Ishii K, Ikeda Y, Hattori T, Katsura K, Kanakura Y. (口演) Long-term safety and efficacy of eltrombopag in patients with previously treated chronic ITP. 第 73 回日本血液学会学術集会. (2011.10.14-16, 名古屋, 直江知樹)
- 9) 富山佳昭. ITP における TPO 受容体作動薬の治療選択 (コーポレートセミナー) 第 73 回日本血液学会学術集会. (2011.10.14-16, 名古屋, 直江知樹)
- 10) 富山佳昭. 血小板減少/機能異常症治療の最近の話題 (シンポジウム) 第 18 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム (2011.10.21、埼玉、藤井寿一)
- 11) 富山佳昭. (教育講演) ITP 治療におけるトロンボポエチン受容体作動薬の位置付け. 第 96 回近畿血液学会地方会 (2011.11.12、大阪、通堂 満)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Th1型の免疫応答がITP病態の発症を促進する

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
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

【背景・目的】昨年度までの研究で、人為的に制御性 T 細胞 (Treg) を欠損させたマウスの約 35% が ITP 病態を自然発症することを明らかにし、ITP 発症抑制に Treg が重要な役割を果たすことを示した。ただし、Treg 欠損マウスの一部しか ITP 病態を発症しないことから、ITP 発症に関わる他の要因の存在が考えられた。そこで、今年度は Treg 欠損マウスにおけるヘルパー T 細胞 (Th) のサイトカイン産生バランスに着目し、ITP の発症との関わりを検討した。

【方法】BALB/c マウスの脾細胞から CD4⁺CD25⁻細胞を分離し、同系ヌードマウスに移入することで Treg 欠損マウスを作製した。細胞移入 4 週後の血小板数から ITP マウスと非 ITP コントロールマウスに分類した。Th 細胞からのサイトカイン産生は脾細胞を用いた細胞内染色とフローサイトメトリー、脾細胞由来 CD4⁺細胞の培養上清中に産生されたサイトカイン濃度により検討した。さらに、脾細胞の培養上清を正常マウス血小板と反応させ、血小板に結合した IgG のサブクラスの分布をフローサイトメトリーで解析した。

【結果】Treg 欠損マウスのうち、ITP マウス 16 匹とコントロールマウス 10 匹を用いた。細胞内染色では、ITP マウスにおいて CD4⁺T 細胞中における Th1 細胞の割合が増加していた ($P < 0.05$)。さらに、Th1/Th2 比、Th1/Th17 比も上昇していた (ともに $P < 0.05$)。脾 CD4⁺細胞の培養上清では、ITP マウスでコントロールマウスに比べて IL-4 濃度が低下していた ($P < 0.05$)。また、IFN- γ /IL-4 比、IFN- γ /IL-17 比が上昇していた (ともに $P < 0.05$)。細胞内染色による Th1/Th2 比と培養上清中の IFN- γ /IL-4 比は強く相関していた ($r=0.84$, $P < 0.01$)。ITP マウスの抗血小板自己抗体の IgG サブクラス分布は多様であったが、Th1 関連の IgG2a が主要なサブクラスのマウスが多かった。

【考察】ITP マウスにおける Th1 バランスや抗血小板自己抗体の IgG サブクラスは多様であったが、ITP 患者と同様に Th1 が優位であった。Th1 の免疫環境が Treg 欠損マウスにおける ITP 発症を促進する可能性が示唆された。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP) は血小板膜糖蛋白に対する自己抗体の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、我々は CD4⁺ CD25⁺制御性 T 細胞

(Treg) を欠損したマウスの約 35% が慢性的な血小板減少を呈すことを報告した。これらマウスは血小板に対する自己抗体を産生することから、ITP の新規マウスモデルとして有用と考えられた。

しかし、半数以上の Treg 欠損マウスは ITP 病態を発症せず、Treg 欠損マウスにおいて

ITP発症を規定する因子は明らかではなかった。そこで今年度は、Treg欠損マウスにおけるヘルパーT (Th)細胞のサイトカイン産生バランスに着目し、Treg欠損マウスにおいてITP発症を促進する免疫病態を解析した。

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 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。

細胞移入4週後に抗マウスCD41モノクローナル抗体による染色と蛍光ビーズFLOW-COUNT[®]による定量を組み合わせ、血小板数を測定した。血小板数が $0.33 \times 10^6/\mu\text{l}$ 以下をITPマウス、それ以外を非ITPコントロールマウスとした。

2. フローサイトメトリーによる脾細胞のThバランスの検出

脾細胞のThバランスはMouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit (Becton Dickinson)を用いて検出した。すなわち、比重遠心法で採取した脾細胞(1×10^6 個/ μL)をPMA(50ng/mL)、Ionomycin($1 \mu\text{g/mL}$)、BD GolgiStop[™] Protein Transport Inhibitor存在下で4時間培養した。その後、回収した細胞を固定、透過処理後、Antibody cocktail(抗CD4抗体、抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体、抗IL-17抗体)と反応させ、フローサイトメ

トリーで蛍光強度を測定した。IFN- γ ⁺IL-4⁻細胞をTh1、IFN- γ ⁻IL-4⁺細胞をTh2、IFN- γ ⁺IL-4⁺細胞をTh0、IFN- γ ⁻IL-17⁺細胞をTh17と定義した。

3. 脾由来CD4⁺T細胞培養上清中におけるサイトカイン濃度の測定

磁気細胞分離法を用いて脾細胞よりCD4⁺細胞を回収した。このとき、回収したCD4⁺細胞の純度は90%以上であった。その後、分離したCD4⁺細胞(2×10^6 個/ μL)をPMA(50ng/mL)、Ionomycin($1 \mu\text{g/mL}$)存在下で4日間培養し、上清を回収した。脾細胞CD4⁺細胞の培養上清中のIFN- γ 、IL-4、IL-17濃度はBD Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson)とフローサイトメトリーにより測定した。

4. 抗血小板自己抗体のIgGサブクラスの検討

ITPマウスから比重遠心法で採取した脾細胞(5×10^6 個/ μL)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マウスから採取した血小板と反応させた後、ヤギ抗マウスIgG₁抗体、ヤギ抗マウスIgG_{2a}抗体、ヤギ抗マウスIgG_{2b}抗体、ヤギ抗マウスIgG₃抗体(Jackson Immuno Research)と反応させた。さらにFITC抗ヤギIgG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。

5. 統計学的解析

ITPマウスとコントロールマウスにおける比較にはMann-Whitney testを用いた。

(倫理面に対する配慮)

本研究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. フローサイトメトリーによる脾細胞 Th バランスの検討

Treg 欠損マウスのうち、ITP マウス 16 匹とコントロールマウス 10 匹を用いた。CD4⁺ 細胞にゲートをかけて IFN- γ 、IL-4、IL-17 の発現を調べたところ、ITP マウスでは対照マウスに比べて Th1 細胞比率が有意に増加していた ($6.5 \pm 2.6\%$ vs $3.9 \pm 2.9\%$, $P < 0.05$)。一方、Th2, Th0, Th17 細胞比率に有意な差を認めなかった。また、Th バランスを求めると、ITP マウスでコントロールマウスに比べて Th1/Th2 比 (7.7 ± 4.7 vs 3.2 ± 1.0 , $P < 0.01$)、Th1/Th17 比 (11.8 ± 12.1 vs 3.2 ± 2.4 , $P < 0.05$) はともに増加していた。

2. CD4⁺T 細胞の培養上清中における Th サイトカイン濃度の検討

脾由来 CD4⁺T 細胞の培養上清中の各サイトカイン濃度を比較したところ、ITP マウスでは対照マウスに対して IL-4 の産生が有意に減少していた (150.4 ± 93.9 ng/mL vs 644.6 ± 686.7 ng/mL, $P < 0.05$)。一方、IFN- γ と IL-17 の濃度に差はなかった。サイトカイン発現比を求めると、ITP マウスでコントロールマウスに比べて、IFN- γ /IL-4 比 (17.0 ± 12.7 vs 5.2 ± 4.7 , $P < 0.01$)、IFN- γ /IL-17 比 (28.4 ± 29.5 vs 7.0 ± 5.4 , $P < 0.05$) とともに増加していた。

フローサイトメトリーによる細胞内染色と培養上清中に産生されたサイトカイン濃度測定から得られた Th バランス結果の関連を調べたところ、Th1/Th2 比と IFN- γ /IL-4 比は統計学的に正に相関していた ($r=0.84$, $P < 0.01$)。

3. 抗血小板抗体の IgG サブクラス解析

ITP マウス 9 匹における抗血小板自己抗体

の IgG サブクラスを解析し、Th サイトカインバランスとの関連を検討した。IgG サブクラスの分布には多様性を認めたが、Th1 関連 IgG_{2a} が抗血小板抗体の主要なサブクラスを占めるマウスが多かった。しかし、Th1/Th2 比の低い ITP マウスでは Th2 関連 IgG₁ サブクラスの抗血小板抗体が主に産生されていた。

D. 考察

Th1/Th2 比や IFN- γ /IL-17 比から、ITP マウスは血小板減少を呈さなかったコントロールマウスと比較して Th1 型の免疫環境を示していた。Th バランスは多くの自己免疫疾患の病態形成に関与することが知られており、ITP 患者でのこれまでの検討では Th1 への偏倚が報告されている。Treg 欠損マウスで誘導された ITP 病態でも同様の傾向を認め、Th1 への偏倚が ITP 発症を促進する因子の 1 つと考えられた。

IgG サブクラスは Th バランスによって制御されることが知られている。すなわち、Th2 優位では IgG₁ 産生、Th1 優位では IgG_{2a} 産生を促進する。ITP マウスにおける抗血小板抗体の IgG サブクラスは多様であったが、多くのマウスは Th1 関連の IgG_{2a} サブクラスの抗血小板自己抗体が主たるレパートリーであった。ただし、少数ながら、Th2 関連の IgG₁ が主な抗血小板自己抗体レパートリーを占めるマウスが存在した。したがって、Th1 偏倚が ITP 病態を促進することは間違いないが、それは必ずしも必須な要因ではないことは明白であった。今後、Th バランス以外の ITP 誘導に関わる要因の同定が必要である

E. 結論

Treg を欠損する ITP モデルマウスにおける Th バランスは ITP 患者と同様に Th1 優位であった。ただし、Th1 偏倚が必ずしも必要条件ではなく、Th2 優位でも ITP 病態が成立する。これら Th バランスが ITP 病態に及ぼす影響については今後のさらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

論文発表

1. Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, Kuwana M. Critical role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* In press.
2. 桑名正隆: ここまでわかった自己免疫疾患; 免疫性血小板減少症. 臨床検査 55(11): 1212-1219, 2011.
3. 桑名正隆: 免疫性血小板減少症の病態. 臨床血液 52(6): 350-355, 2012.

学会発表

1. Nishimoto T, Satoh T, Simpson E, Ni H, Takeuchi T, Kuwana M: Emergence of polyclonal autoantibody responses to multiple platelet surface glycoproteins in regulatory T cell-deficient mice. The 98th Annual Meeting of American Association of Immunology (San Francisco). 2011. 5.

2. 桑名正隆: 免疫性血小板減少症の病態における *H. pylori* の役割. 第 17 回ヘリコバクター学会学術集会 (富山). 2011. 6.
3. Nishimoto T, Satoh T, Simpson E, Ni H, Takeuchi T, Kuwana M: Emergence of polyclonal autoantibody responses to multiple platelet surface glycoproteins in regulatory T cell-deficient mice with immune thrombocytopenia. The 23rd Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (Kyoto). 2011. 7.
4. Nishimoto T, Kumagai F, Monno M, Takeuchi T, Kuwana M: T helper type 1-bias in a regulatory T cell-deficient mouse model for immune thrombocytopenia. The 53rd Annual Meeting of American Society of Hematology (San Diego). 2011. 12.

H. 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

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

分担研究者 倉田義之 四天王寺大学人文社会学部人間福祉学科教授

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 21 年度の臨床調査個人票をもとに解析した。

平成 21 年度における新規患者数は 10 万人あたり 2.41 人であった。日本全体では 3,075 人が発症したと推計された。更新患者数は 10 万人あたり 14.09 人で日本全体では 17,966 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、慢性型ともに 21～40 歳に小さなピークと 51～80 歳に大きなピークを認めた。急性型において従来認められた 10 歳以下のピークは非常に小さく、幼児期の発症が大幅に減少していた。更新患者においては 31～35 歳のピークはさらに小さくなっており、51～75 歳に大きなピークを認めた。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

特発性血小板減少性紫斑病（以下 ITP）は比較的まれな疾患である。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資料になると考える。厚生労働省に集められた臨床調査個人票をもとに解析し、患者数の年次推移、生活・受診状況、治療状況などを解析した。

B. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 21 年度の ITP 患者の臨床調査個人票入力データの提供を受けた。

データの提供を受けた時点（平成 23 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、三重県、滋賀県、奈良県、岡山県、高知県、佐賀県、熊本県、宮崎県、鹿児島県の 10 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大阪

府、奈良県、佐賀県の 3 府県であった。

C. 研究結果および考察

1. ITP 患者発症数

平成 21 年度に発症した患者数を表 1、表 2 に示す。新規患者登録数は男女合わせて 2,631 名であった。2,631 名を調査道府県の人口（109,118 千人）で除し人口 10 万人あたりで計算すると発症頻度は 10 万人あたり 2.41 人であった。また 2,631 名は調査道府県での発症数であるので日本の総人口（127,510 千人）をもとに推計するとわが国では 3,075 名の患者が発症したと推計された。

表 3 に平成 18 年度～平成 21 年度の新規患者発症数（推計）の推移を示す。この 4 年間では年間 2,405 名～3,220 名の患者が発症していると推計された。

2. 新規患者年齢分布

急性型の年齢分布を図 1 に示す。男子では、10 歳以下、31-40 歳、66-85 歳にピークを認めた。特に 66-85 歳の高齢者のピークが大きかつ