

- 薬一特発性血小板減少性紫斑病. 薬局 Vol. 63, No 1 76-81, 2012
- 24) 藤村欣吾. 特発性血小板減少性紫斑病のヘリコバクター・ピロリ除菌療法は有効か. 血液フロンティア 22 : 1702-1706, 2012
- 25) 藤村欣吾. 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 (大阪) P79-90、2012
- 26) 藤村欣吾. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 治療におけるトロンボポエチン受容体作動薬の位置づけを探る. トロンボポエチン受容体作動薬のすべて (池田康夫編), 先端医学社, 東京, 2012, pp76-86
- 27) 藤村欣吾. トロンボポエチン受容体作動薬の臨床応用に関する Question. ITP 治療におけるトロンボポエチン受容体作動薬に期待される役割 (臨床的意義) を教えてください. トロンボポエチン受容体作動薬のすべて (池田康夫編), 先端医学社, 東京, 2012, p111
- 28) 桑名正隆: 自己免疫疾患—自己抗体の認識抗原と病因的意義; 抗トロンボポエチン受容体抗体と無巨核球性血小板減少症. 医学のあゆみ 242(8): 584-588, 2012.
- 29) 桑名正隆: 膠原病と血液異常; 膠原病に伴う免疫性血小板減少症. 血液フロンティア 22(11): 1643-1650, 2012.
- 30) 宮川義隆. トロンボポエチン受容体作動薬の適応拡大への期待. トロンボポエチン受容体作動薬のすべて (池田康夫編), 先端医学社, 東京, 2012, pp88-98
- 31) 宮川義隆. トロンボポエチン受容体作動薬の臨床応用に関する Question. トロンボポエチン受容体作動薬のすべて (池田康夫編), 先端医学社, 東京, 2012, pp108-110
- 学会発表
- 1) Tomiyama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia (EHA-JSH Joint Symposium) The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands, Green T)
- 2) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. (Poster) Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa autoantibodies in primary immune thrombocytopenia recognize highly restricted regions in the beta-propeller domain of GPIIb with clonality. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands, Green T)
- 3) 第 109 回日本内科学会講演会 (2012. 4. 13-15, 京都, 中尾一和) 富山佳昭 (教育講演) 新規薬剤による免疫性血小板減少症の治療.
- 4) 第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2012. 5. 25-27, 福島, 大戸斉) 富山佳昭 (教育講演) 難治性特発性血小板減少性紫斑病の治療.

- 5) 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (2012. 6. 7-9, 東京, 内山真一郎)
柏木浩和, 清水一亘, 富山佳昭
 (シンポジウム) Abnormal thrombopoiesis associated with integrin α IIb β 3 activating mutations.
- 6) 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (2012. 6. 7-9, 東京, 内山真一郎)
 中澤剛士, 田所誠司, 清水一亘, 柏木浩和, 本田繁則, 金倉 譲, 富山佳昭 (ポスター) ヒト巨核球系細胞株 CMK における α IIb β 3 の活性化には agonist, talin-1, kindlin-3 が必須である.
- 7) 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (2012. 6. 7-9, 東京, 内山真一郎)
 清水一亘, 柏木浩和, 中澤剛士, 田所誠司, 本田繁則, 金倉 譲, 富山佳昭 (口演) ITP 患者の PA anti-GPIIb/IIIa 抗体の多くは GPIIb β プロペラ領域の極めて限定された部位に結合する.
- 8) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
Tomiyama Y, Kiyomizu K, Kashiwagi H (シンポジウム) Pathophysiology and diagnosis of primary immune thrombocytopenia.
- 9) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
 Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Tomiyama Y, Kanakura Y (一般口演) PA anti-GPIIb/IIIa Abs in primary ITP recognize highly restricted regions in GPIIb with clonality.
- 10) 近畿 ITP 研究会 (2012. 3. 17, 大阪)
柏木浩和, 林 悟, 富山佳昭, 西口修平. C 型慢性肝疾患における血小板減少の病態解析.
- 11) Kuwana M. CD4⁺ T regulatory cells in ITP. 4th ICIS Expert Meeting Changes in ITP of Children and Adults (Montreux). 2012. 9.
- 12) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
Miyakawa Y. (シンポジウム) Current management of immune thrombocytopenia in Japan.
- 13) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
宮川義隆, 菊池佳代子, 藤村欣吾, 富山佳昭, 倉田義之, 岡本真一郎, 桑名正隆, 阿部貴行, 村田 満, 佐藤裕史, 金倉 譲, 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に関する調整管理研究.
- 14) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
- 15) Ono Y, Matsubara Y, Iida K, Ikeda Y, Okamoto S, Murata M. Generation of platelets from 3T3-L1 preadipocytes and adipose tissues in the absence of exogenously added thrombopoietin.
- 16) Matsubara Y. Generation of megakaryocytes and platelets from human and mouse adipose tissues. 22th Korean Society on Thrombosis and Hemostasis 2012
- 17) Matsubara Y, Ono Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M.

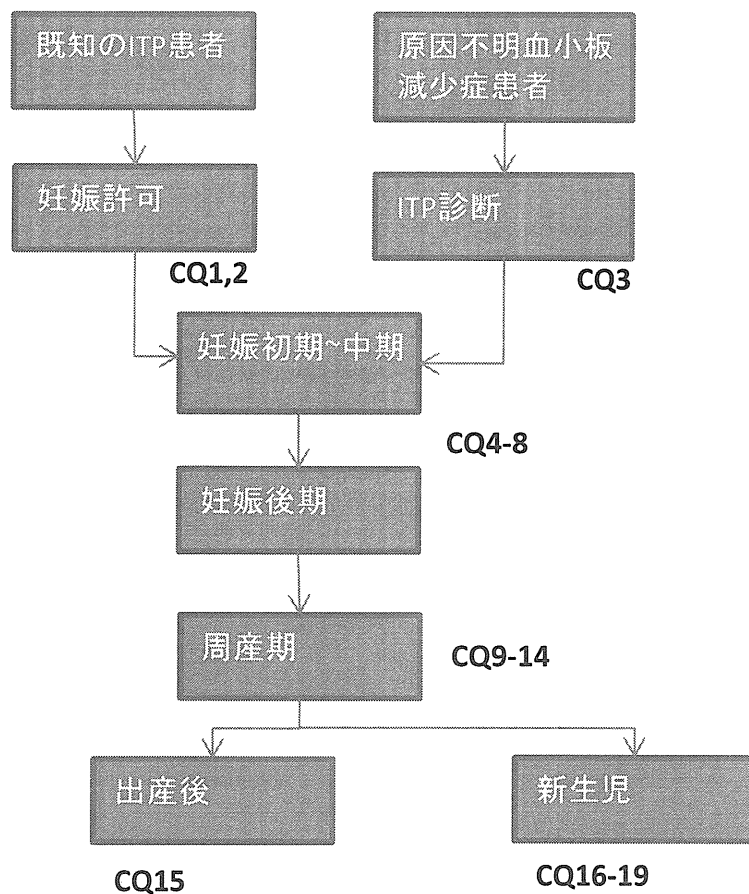
Induction of megakaryocytes and
platelets from fibroblasts by
p45NF-E2/Maf. Platelets
International Symposium 2012

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

表. 妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド作成委員会名簿

専門分野	委員名 (所属)
血液内科	宮川義隆 (慶大)、柏木浩和 (阪大)、高蓋寿朗 (西神戸医療セ)、藤村欣吾 (安田女子大)、桑名正隆 (慶大)、倉田義之 (四天王寺大)、村田満 (慶大)、富山佳昭 (阪大)
小児科	今泉益栄 (宮城県立こども病院)、高橋幸博 (奈良医大)、松原康策 (西神戸医療セ)
産科	小林隆夫 (浜松医療センター)、木村正 (阪大)、安達知子 (愛育病院)、渡辺尚 (自治医科大学)
産科麻酔科	照井克生 (埼玉医大)



- CQ1 妊娠前のITP患者に妊娠を許可する基準はあるか？
- CQ2 妊娠を希望するITP患者に脾摘を勧めるか？
- CQ3 妊婦の血小板減少症の鑑別のために行うべき検査は何か？
- CQ4 妊娠中の血小板数の目標値は？
- CQ5 妊娠中の治療法は？
- CQ6 ピロリ菌陽性患者に対する除菌療法の安全性と施行時期は？
- CQ7 妊娠中のトロンボポエチン受容体作動薬の使用は可能か？
- CQ8 妊娠中における脾摘は？またその適応は？
- CQ9 分娩時期をどのように計画するか？
- CQ10 分娩時の血小板数の目標値は？また治療方法は？
- CQ11 DVT予防を行うべきか？
- CQ12 分娩様式はどのように選択するか？
- CQ13 分娩時の麻酔はどのように選択するか？
- CQ14 帝王切開時にはどのような点に注意すべきか？
- CQ15 ITP治療中の患者に授乳は可能か？
- CQ16 新生児の出血のリスクは？また分娩前に児の血小板数を予測する方法はあるか？
- CQ17 胎児血小板数を測定すべきか？
- CQ18 新生児の採血はいつ行うべきか？
- CQ19 新生児の血小板減少の治療法は？

Primary ITP患者におけるPA anti- α IIb β 3抗体のエピトープ解析

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

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)において、Platelet-associated (PA) IgGは病態に重要な役割を果たしているが、その自己抗体のエピトープについては未だ詳細に解析されていない。本研究ではPA anti- α IIb β 3抗体がマウス α IIb β 3にはほとんど結合しない特性を利用して、ヒト-マウスキメラ α IIb β 3発現細胞を使用して本抗体のエピトープを解析した。15名のprimary ITP患者のPA anti α IIb β 3抗体を解析し、本抗体が主に α IIbのN-terminal half (L1-W235)を認識していることが明らかとなった。さらに自己抗原として3つの主要な部位を同定し、結合に必須となるアミノ酸残基についても同定した。さらに本抗体の大部分において、 κ/λ 鎖の偏りが観察された。以上の結果から、primary ITP患者のPA anti- α IIb β 3抗体は α IIbの極めて限定された領域を認識しているものが多く、一部の症例では強いclonalityが示唆された。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病(ITP) [primary ITP (primary immune thrombocytopenia)と同義語]における血小板減少の主たる病態は網内系での血小板破壊と骨髄における血小板産生の低下にある。すなわち抗血小板自己抗体は血小板をオプソニン化する働きがあり、オプソニン化を受けた血小板は網内系でFc γ 受容体や補体受容体を介してマクロファージなどの貪食細胞に補足され貪食・破壊される。また抗血小板自己抗体はin vitroで巨核球の成熟障害や細胞障害を誘導することが報告されており、こ

れにより血小板産生は低下する。また抗血小板自己抗体のうち血清抗体は親和性が低く病的意義は乏しいとされており、血小板結合抗体(platelet-associated antibody)が病態に重要な役割を果たしていると考えられている。抗血小板抗体の自己抗原としては、GPIIb/IIIa(α IIb β 3)やGPIb/IX/Vなどが報告されているが、特に α IIb β 3抗体は43-57%と最も高率に検出される。PA(platelet-associated) anti- α IIb β 3抗体のエピトープとしては、主に α IIbの β プロペラドメインに位置していると我々も報告をしてきている

が、未だその詳細は明らかとはなっていない。我々はprimary ITP患者のPA anti- α IIb β 3抗体がマウス α IIb β 3にはほとんど結合しないことを見出し、この特性を利用して本研究では、ヒトマウスキメラ α IIb β 3を使用してPA anti- α IIb β 3抗体のエピトープを解析することを目的とした。

B. 研究方法

Primary ITP患者の全血採血より洗浄血小板を作製し、エーテル解離法にてplatelet eluateを得た。また種々のヒトマウスキメラ α IIb cDNAと β 3 cDNAを作製し、発現ベクターに組み込み、293T細胞に発現させた。platelet eluateとヒトマウスキメラ α IIb β 3発現293T細胞を反応させ、フローサイトメトリーで解析した。

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

Primary ITP患者76名中26名(34%)にPA anti- α IIb β 3抗体が認められた。うち十分な検体量の得られた15名についてエピトープ解析を行った。まずこれらの抗体の大部分は α IIb上の β プロペラドメインのN-terminal half (L1-W235; N端側の

W4:4-1 loopまで)のみをマウスに置換するとヒト α IIb β 3と比較して大きく反応性が低下し、さらに同部位のみヒト配列を残した場合には反応性が比較的保たれることから、本抗体は主に α IIbの β プロペラドメインのN-terminal halfを認識していることが明らかとなった(図1)。

さらに詳細な解析を行うことにより、同部位において、次の3つの主要な自己抗体認識領域を同定することができた(図2)。

1) W1:1-2とW2:3-4 loopからなる領域：これらのループは隣り合う構造にあり、2名がこの部位を認識していた。さらに1アミノ酸のみマウス配列に変異させたW1:1-2のS29K、R32S及びW2:3-4のE136Q、R139G変異により、これらの抗体の結合が著明に抑制されたため、これらのアミノ酸残基が結合に必須のアミノ酸残基と考えられた。

2) W1:2-3 loopを含む領域：5名はこの領域を認識しており、うち1名はW1:2-3のみを認識し、W1:2-3内の1アミノ酸変異G44N、P45Aにて結合が著明に低下したため、結合に必須のアミノ酸残基と考えられた。残り4名はW1:2-3に加えてW2:3-4およびW3:3-4により構成される領域を認識すると考えられ、症例によっては結合に必須となるアミノ酸残基も同定された(P135, E136, R139)。

3) W3:4-1 loopを含む領域：

4名はこの領域を認識していた。うち3名はW3:4-1に隣接するW4:4-1も含めた領域を認識すると考えられた。

さらにPA anti- α IIb β 3抗体の大部分において、 κ / λ 鎖の偏りが観察された。

D. 考察

今回我々はprimary ITP患者のPA anti- α IIb β 3抗体が α IIbの β プロペラドメインのN末端前半部の高度に限定された領域にエピトープをもつことを見出した。また、多くの抗体で免疫グロブリン軽鎖の偏位を示すことが明らかとなり、一部の抗体では結合に必須となるアミノ酸残基も判明した。ITPの病因については、一部の二次性ITPではウイルスと α IIb β 3の分子構造の相同性が関係している可能性が報告されているが、未だprimary ITPについては解明されておらず、本研究がprimary ITPの病態解明の一助となることが期待される。

E. 結論

Primary ITP患者のPA anti- α IIb β 3抗体は α IIbの極めて限定された領域を認識しているものが多く、一部の症例では強いclonalityが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* 120:1499-1509, 2012
- 2) Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Shigekawa M, Shimizu S, Hayashi Y, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Kiyomizu K, Tadokoro S, Tomiyama Y, Hayashi N, Takehara T. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. *Cell Death Differ* 19:1856-1869, 2012
- 3) Tomiyama Y, Miyakawa Y, Okamoto S, Katsutani S, Kimura A, Okoshi Y, Ninomiya H, Kosugi H, Nomura S, Ozaki K, Ikeda Y, Hattori T, Katsura K, Kanakura Y. A lower starting dose of eltrombopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* 10:799-806, 2012
- 4) Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, Tomiyama Y, Iwato K, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Hashino S, Ninomiya H, Mori S, Yonemura Y, Usuki K, Wei H, Lizambri R. An open-label extension study evaluating the safety and efficacy of romiplostim for up to 3.5 years in thrombocytopenic Japanese

- patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Int J Hematol* 95:652-659, 2012
- 5) 富山佳昭. ITP における TPO 受容体作動薬の使い方. *Annual Review 血液* 2012 (高久史麿, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉讓, 小島勢二編), 中外医学社, 東京, 2012, pp198-206
- 6) 富山佳昭. 臨床血液学 今後の展望 (2012 年版) —血小板・凝固・線溶系疾患— オーバービュー. *臨床血液* 53:176-177, 2012
- 7) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 治療の参照ガイド. *血液フロンティア* 22:487-493, 2012
- 8) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *内科* 109:1111-1114, 2012
- 9) 富山佳昭. 血小板増加薬としてのトロンボポエチン受容体作動薬とその使い方. *最新医学* 67:124-129, 2012
- 10) 富山佳昭. 新規薬剤による免疫性血小板減少症の治療. *日本内科学会雑誌* 101:2725-2732, 2012
- 11) 富山佳昭. トロンボポエチン受容体作動薬の安全性と副作用をみる —副作用の頻度とその対策—. *トロンボポエチン受容体作動薬のすべて* (池田康夫編), 先端医学社, 東京, 2012, pp62-74
- 12) 富山佳昭. トロンボポエチン受容体作動薬の臨床応用に関する Question. *トロンボポエチン受容体作動薬のすべて* (池田康夫編), 先端医学社, 東京, 2012, pp105-107
- 13) 富山佳昭. P2Y₁₂ 受容体に関する遺伝子関連検査. *血栓止血誌* 23:450-456, 2012
- 14) 柏木浩和, 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *臨床血液* 53:178-184, 2012
- 15) 柏木浩和, 富山佳昭. 血栓形成の分子機構; 血小板機能異常症の解析からみた最近の進歩. *Pharma Medica* 30:9-14, 2012
- 16) 藤村欣吾, 宮川義隆, 倉田義之, 桑名正隆, 富山佳昭, 村田 満. 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012 年版. *臨床血液* 53:433-442, 2012
2. 学会発表
- 1) Tomiyama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia (EHA-JSH Joint Symposium) The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands, Green T)
- 2) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Kanakura Y, Tomiyama Y. (Poster) Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa autoantibodies in primary immune thrombocytopenia recognize highly restricted regions in the beta-propeller domain of GPIIb with clonality. The 17th Congress of the European Hematology Association (2012. 6. 14-17, Amsterdam, Netherlands, Green T)
- 3) 第 109 回日本内科学会講演会 (2012. 4. 13-15, 京都, 中尾一和) 富山佳昭 (教育講演) 新規薬剤による免疫性血小板減少症の治療.

- 4) 第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2012. 5. 25-27, 福島, 大戸 齊)
富山佳昭 (教育講演) 難治性特発性血小板減少性紫斑病の治療.
- 5) 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (2012. 6. 7-9, 東京, 内山真一郎)
柏木浩和, 清水一亘, 富山佳昭
 (シンポジウム) Abnormal thrombopoiesis associated with integrin α IIb β 3 activating mutations.
- 6) 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (2012. 6. 7-9, 東京, 内山真一郎)
 中澤剛士, 田所誠司, 清水一亘, 柏木浩和, 本田繁則, 金倉 謙, 富山佳昭 (ポスター) ヒト巨核球系細胞株 CMK における α IIb β 3 の活性化には agonist, talin-1, kindlin-3 が必須である.
- 7) 第 34 回日本血栓止血学会学術集会 (2012. 6. 7-9, 東京, 内山真一郎)
 清水一亘, 柏木浩和, 中澤剛士, 田所誠司, 本田繁則, 金倉 謙, 富山佳昭 (口演) ITP 患者の PA anti-GPIIb/IIIa 抗体の多くは GPIIb β プロペラ領域の極めて限定された部位に結合する.
- 8) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
Tomiya Y, Kiyomizu K, Kashiwagi H (シンポジウム) Pathophysiology and diagnosis of primary immune thrombocytopenia.
- 9) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
 Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, Tadokoro S, Honda S, Tomiya Y, Kanakura Y (一般口演) PA anti-GPIIb/IIIa Abs in primary ITP recognize highly restricted regions in GPIIb with clonality.
- 10) 近畿 ITP 研究会 (2012. 3. 17, 大阪)
柏木浩和, 林 悟, 富山佳昭, 西口修平. C 型慢性肝疾患における血小板減少の病態解析.
- 11) 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012. 10. 19-21, 京都, 小澤敬也)
 宮川義隆, 菊池佳代子, 藤村欣吾, 富山佳昭, 倉田義之, 岡本真一郎, 桑名正隆, 阿部貴行, 村田 満, 佐藤裕史, 金倉 謙, 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に関する調整管理研究.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
 なし

図1. PA anti- α Ib β 3抗体のエピトープは α Ib: β -propeller領域のN端前半部位に存在する

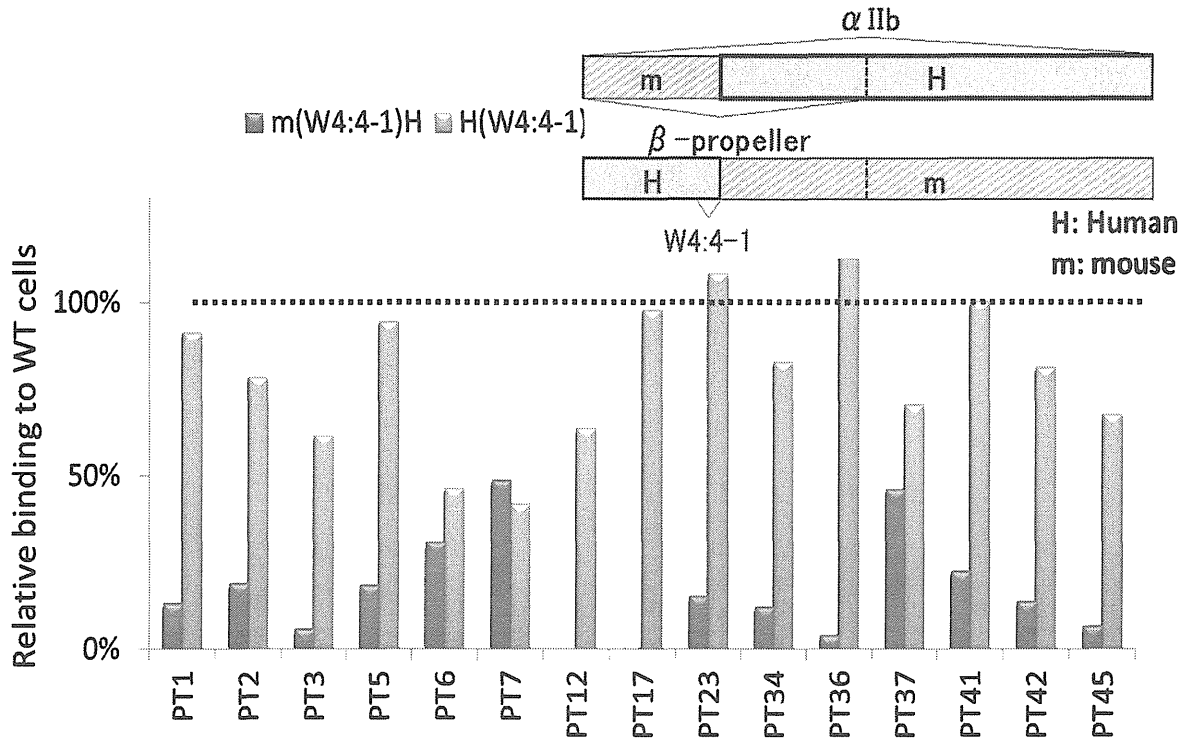
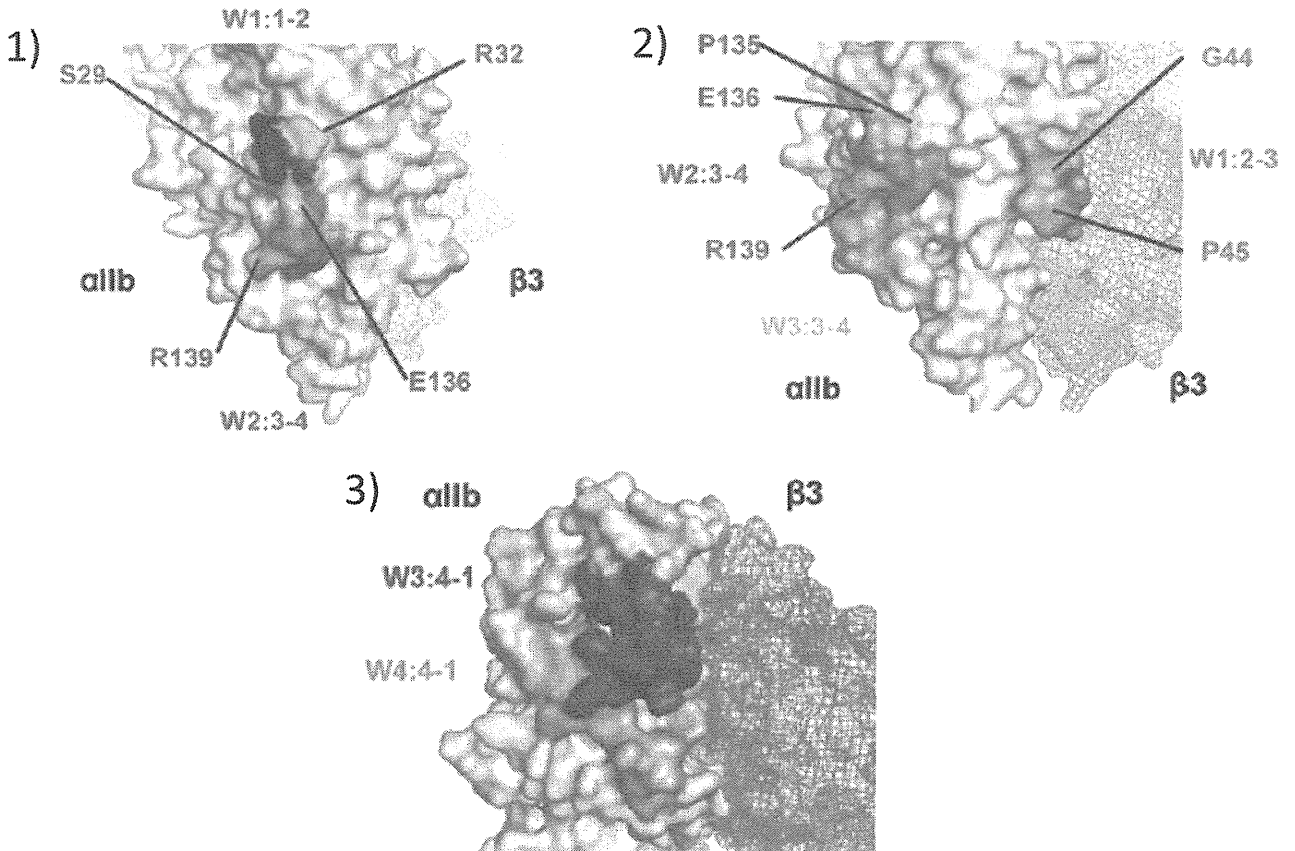


図2. PA anti- α Ib β 3抗体の主要な認識部位



ITPマウスモデルにおけるGPIb反応性CD4⁺T細胞の検出

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

研究要旨

【背景・目的】昨年度までに制御性T細胞（Treg）欠損マウスの約35%がITP病態を自然発症することを報告し、抗血小板自己抗体の主な対応抗原がGPIbであることを同定した。そこで本年度は血小板抗原特異的な自己反応性T細胞の免疫応答を詳細に解析するため、ITPマウスにおけるGPIb反応性T細胞の検出を試みた。【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。また、GPIbを主なドメイン（・1:Leucine-rich repeat、・2:vWF結合部位、・3:Threonine-rich repeat、・4:細胞膜貫通部分、・5:細胞質内部分）ごとに5分割し、マルトース結合蛋白（MBP）融合リコンビナント蛋白として発現させた。ITPマウス、血小板減少のないTreg欠損マウス（コントロールマウス）、BALB/cマウスの脾細胞をGPIbリコンビナント蛋白存在下（10⁶g/mL）で7日間培養し、³H標識Thymidineの取り込みを検出した。【結果】ITPマウスは全例（7/7）でいずれかのGPIbリコンビナント蛋白（・1～・5）に対して増殖反応を認めたが、GPIbに対する反応はコントロールマウスの1/8、BALB/cマウスの1/7でしかみられなかった。ITPマウスでは5種類のGPIb抗原ペプチドのうち、・1、・4、・5に対して高頻度に増殖反応を認めた（すべて5/7）。さらに、これらの抗原により誘導させた細胞増殖は抗MHC class II抗体の添加によりほぼ完全に阻害された。【考察】ITPマウスにおいてGPIbに対する抗原特異的なT細胞を検出するアッセイ系を確立した。T細胞により認識されるGPIb上のエピトープは複数存在し、ITP患者におけるT細胞のGPIIb/IIIaに対する認識パターンと同様であった。また、ITPマウスではin vivoでGPIb反応性CD4⁺T細胞が増殖していた。

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。また、Treg欠損マウスに

対応抗原はGPIbであることが明らかとなった。さらに、Treg欠損マウスの脾細胞を用いて、非特異的な刺激によるT細胞からのサイトカイン産生プロファイルを解析したところ、Th1型の免疫応答がTreg欠損マウスにおけるITP病態の発症を促進するメカニズムが示唆された。そこで本年度は、血小板抗原特異的な自己反応性T細胞の免疫応答を詳細に解析するため、ITPマウスにおけるGPIb反応性T細胞の検出を試みた。

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)から脾臓を採取後、比重遠心法により単核球を採取した。さらに磁気細胞分離により回収した CD4⁺CD25⁻細胞(2×10⁷ 個)を BALB/c ノードマウス(雌、6~8 週齢、日本チャールス・リバー)に移植することで Treg 欠損マウスを作製した。

2. Treg 欠損マウスの ITP 病態評価

マウス眼窩静脈より採血した末梢血を FITC 標識抗マウス CD41 抗体(clone; MWReg30)と反応させた後、FLOW-COUNT[®] Fluorospheres(定量用マイクロビーズ)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。血小板数が正常値の 30%以下のマウスを ITP マウスと定義した。また、血小板減少を呈さなかった Treg 欠損マウスをコントロールマウスとして用いた。

3. GPIIb リコンビナントタンパクの精製

GPIIb をコードする cDNA を主なドメイン(・1:Leucine-rich repeat、・2:vWF 結合部位、・3:Threonine-rich repeat、・4:細胞膜貫通部分、・5:細胞質内部分)ごとに 5 分割し、pMAL-c5x クローニングベクターに組み込んだ後、大腸菌を用いて maltose binding protein (MBP) 融合蛋白として GPIIb リコンビナント蛋白(・1~・5)を発現させた。発現させた GPIIb リコンビナント蛋白はアミロースレジン充填カラムを用いて精製し、以降の検討における抗原として使用した。

4. GPIIb 反応性 T 細胞の検出

BALB/c マウス(n=7)、コントロールマウス(n=8)、ITP マウス(n=7)から脾臓を採取し、比重遠心法により脾細胞単核球を回収した。96well プレートに 2×10⁵/well で脾細胞を播種した後、GPIIb ペプチド(・1~・5)または MBP を抗原として加え(最終濃

度:10・g/mL)、CO₂ インキュベーターを用いて 37°C、5% CO₂、加湿条件下で 7 日間培養した。その際、培養終了 16 時間前に [³H] 標識 Thymidine (37kBq/well) を添加した。培養終了後、96well フィルタープレートを用いて細胞を回収し、マイクロプレートシンチレーションカウンターにより各 well の放射線量を測定した。このとき、同一条件につき各 3well ずつで検討した。また、T 細胞増殖の陽性コントロールとして phytohaemagglutinin (PHA) 存在下(最終濃度 5・g/mL)で 5 日間培養をおこない、同様に放射線量を測定した。一部の実験では、抗 MHC class II 抗体(5・g/mL)の存在下で培養をおこなった。

放射線量の測定後、各条件 3 well から得られた放射線量の平均値を計算し、[Stimulation Index (SI) = GPIIb ペプチド(・1~・5)刺激時の放射線量/MBP 刺激時の放射線量]として各抗原ペプチドに対する反応性を定量化した。PHA に対する反応性は[SI = PHA 刺激時の放射線量/無刺激時の放射線量]として算出した。各抗原に対する反応性は、算出された SI 値が 2 以上のとき、反応性ありと定義した。

5. 統計学的解析

ITP マウス、コントロールマウス、BALB/c マウスの各群間における抗原ペプチドに対する反応性の比較はカイ二乗検定を用いた。(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

BALB/c マウス、コントロールマウス、ITP マウスから採取した脾細胞は全て PHA に対

して増殖反応を示した。ITP マウスは全例(7例/7例)でいずれかの GPIb リコンビナント蛋白(・1～・5)に対して増殖反応を認めたが、コントロールマウスでは8例中1例、BALB/c マウスでは7例中1例でのみ反応を認めた。ITP マウスでは5種類の GPIb リコンビナント蛋白のうち、・1、・4、・5に対して高頻度に増殖反応を認め(すべて5例/7例)、その頻度はコントロールマウス、BALB/c マウスと比較して有意に高かった(すべて $P < 0.05$)。さらに、GPIb リコンビナント蛋白による細胞増殖は MHC class II の阻害により完全に抑制された。

D. 考察

ITP マウスは全例でいずれかの GPIb リコンビナント蛋白に対して増殖反応を認めたが、特に5種類の GPIb リコンビナント蛋白のうち、・1、・4、・5に対して高頻度に増殖反応を認めた。一方、BALB/c マウスとコントロールマウスでは反応がみられたマウスはともに1例だけであり、ITP マウスでは脾臓において GPIb 反応性 T 細胞が増殖していると考えられた。

また、本実験における細胞増殖が大腸菌由来のマイトジェンによる刺激ではなく、抗原特異的であることを確認するために抗 MHC class II 抗体による阻害実験をおこなった。その結果、抗 MHC class II 抗体を添加した well では細胞増殖が抑制されたことから、MHC-T細胞受容体を介した抗原特異的の反応であることが確認された。

今回、・1、・4、・5に対する T 細胞の増殖がみられたことから、ITP マウスにおける GPIb 反応性 T 細胞の抗原認識が多様であることが明らかとなった。一方、ITP 患者で産生される抗 GPIb 自己抗体の主要エピトープ

は326番目から346番目のアミノ酸領域に存在することが報告されており、本検討における・3に含まれる。今後、さらに詳細な T 細胞、B 細胞エピトープの解析をする予定である。

E. 結論

ITP マウスにおいて GPIb 上の特定の部位に対する T 細胞の増殖反応が検出された。GPIb 反応性 T 細胞の検出系は ITP に対する治療効果の評価法として有用と考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, and Kuwana M. Critical role of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp. Hematol.* 2012; 40(4): 279-289.
- 2) 藤村欣吾、宮川義隆、倉田義之、桑名正隆、富山佳昭、村田満: 成人特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) 治療の参照ガイド; 厚生労働省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」. *臨床血液* 53(4): 433-442, 2012.
- 3) 桑名正隆: 自己免疫疾患—自己抗体の認識抗原と病因的意義; 抗トロンボポエチン受容体抗体と無巨核球性血小板減少症. *医学のあゆみ* 242(8): 584-588, 2012.
- 4) Satoh T, Tanaka Y, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y, and Kuwana M. Heparin-dependent and -independent

anti-platelet factor 4
autoantibodies in patients with
systemic lupus erythematosus.

Rheumatology. 2012; 51(9):
1721-1728.

- 5) 桑名正隆: 膠原病と血液異常; 膠原病に伴う免疫性血小板減少症. 血液フロンティア 22(11): 1643-1650, 2012.
- 6) Nishimoto T, Satoh T, Simpson EK, Ni H, and Kuwana M. Predominant autoantibody response to GPIb/IX in a regulatory T-cell-deficient mouse model for immune thrombocytopenia. *J. Thromb. Haemost.* In press.

学会発表

- 1) Kuwana M: CD4⁺ T regulatory cells in ITP. 4th ICIS Expert Meeting Changes in ITP of Children and Adults (Montreux). 2012. 9.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

臨床調査個人票（平成 22 年度）集計による特発性血小板減少性紫斑病の 全国疫学調査および平成 13～22 年度の 10 年間における個別症例解析の試み

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

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 22 年度の臨床調査個人票をもとに解析するとともに平成 13～22 年度の 10 年間における個別症例の臨床経過の解析も試みた。

平成 22 年度における新規患者数は 10 万人あたり 2.3 人であった。日本全体では 2,933 人が発症したと推計された。更新患者数は 10 万人あたり 14.4 人で日本全体では 18,407 人の患者がいたと推計された。

臨床経過の解析は、平成 21 年度、22 年度に脳出血を合併した症例の脳出血前後の 8 年間の血小板数の解析などを試みた。

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を提供するものであると考える。

また、今年度は個々の症例の臨床経過を経時的に解析することが可能かの検証も試みた。

B. 研究方法

1. 平成 22 年度の ITP 症例の解析

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 22 年度の ITP 症例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 24 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、山形県、新潟県、三重県、滋賀県、佐賀県の 6 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北海道、埼玉県、新潟県、愛知県、三重県、滋賀県、岡山県、広島県、福岡県の 9 道県であった。

2. 10 年間の臨床経過の解析

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 13 年度～平成 22 年度の ITP 症例の臨床調査個人票入力データ（症例番号が付与されたもの）の提供を受けた。

C. 研究結果および考察

1. ITP 患者発生数

平成 22 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 2,695 名であった。2,695 名を調査都府県の人口（117,472 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 2.29 人であった。2,695 名は調査都府県での発症数であるので日本の総人口（128,057 千人）をもとに推計するとわが国では 2,933 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 22 年度の新規患者発症数（推計）の推移を示す。この 5 年間では年間 2,405 名～3,220 名の患者が発症したと推計された。

2. 新規患者年齢分布

急性型の年齢分布を図 1 に示す。男女とも 56～85 歳に幅広いピークがあり、加えて女子では 26～35 歳に小さなピークがあった。男女とも 5 歳以下にも小さなピークがあった。

慢性型の年齢分布を図 2 に示す。男女とも 51～85 歳に大きなピークがあり、女子では 21～40 歳にも大きなピークを認めた。男女とも急性型で認めた 5 歳以下のピークは認められなかった。15 歳～75 歳では女子が男子の約 1.9～7.0 倍多かった。一方、76 歳以上では男女差を認めなかった。

小児 ITP においては、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業が行われている。これらの制度や研究事業に申請すると特定疾患に申請するよりも一部負担金の免除などで有利との考えで、小児 ITP 症例は特定疾患に申請せず、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業のほうで申請が行われていると推測される。そのため従来認められた小児における発症のピークが消失したものと考えられた。

3. ITP 更新患者数

平成 22 年度に更新申請があった患者数を表 4、表 5 に示す。更新患者数は男女合わせて 13,282 名であった。13,282 名を調査都府県の人口 (92,428 千人) で除して人口 10 万人あたりの ITP 更新症例数は 14.37 名であった。また 13,282 名は調査都府県での更新数であるので日本の総人口 (128,057 千人) でもって推計するとわが国では平成 22 年度に 18,407 名の患者が更新申請をしたと推計された。

平成 18 年度～平成 22 年度の推計更新患者数の推移を表 6 に示す。更新申請症例数は 18,000 名前後であると考えられた。

4. 更新患者慢性型の年齢分布

慢性型の更新患者の年齢分布を図 3 に示す。女子では 51～85 歳に大きなピークがあり、21～50 歳にも小さなピークがあった。男子では 56

歳より増加傾向を示し、56～80 歳にピークを認めた。女子が男子の 2.54 倍多かった。

5. 身体障害者手帳、介護認定、日常生活の不自由度

身体障害者認定の有無を表 7 に示す。身体障害者手帳を交付されている症例は 4.4%～9.4% のみで、大多数の症例は身体障害者の認定を受けていなかった。身体障害者の認定が ITP によるものか、他の身体的要因によるものかは不明であった。

介護認定の有無を表 8 に示す。要介護、要支援認定者もごく一部の症例のみであった。

日常生活不自由度を表 9 に示す。25.6～32.2% の症例がやや不自由あるいは介護を要するとの回答であったが ITP 症例が非常に高齢化しているため高齢による身体の不自由さを反映しているのではないかと推測された。

6. 生活状況

生活状況を表 10 に示す。新規・急性型症例では 29% の症例が入院状態であった。一方、新規・慢性型では入院症例は 12% と少なかった。更新症例では入院症例は殆どなく、多くの症例は就労、就学、家事労働など日常生活が行えていた。

7. 受診状況

受診状況を表 11 に示す。新規・急性型症例では 54% の症例が入院していた。新規・慢性型症例においても 19% の症例が入院していた。一方、更新・慢性型症例では入院中の症例はごく一部で大半の症例は主に通院であった。

8. 出血症状

出血症状を図 4～6 に示す。新規・急性型では出血症状を示す症例が多く、紫斑を 79% の症例において認めた。その他、歯肉出血、鼻出血など、粘膜出血の頻度も高かった。新規・慢性型では紫斑を 57% に認めたが、急性型に比べ粘膜出血の頻度は低かった。更新・慢性型では紫斑を 39% に認めたが新規申請症例に比べ

と頻度は低かった。治療の結果、出血症状が軽減しているためと思われた。

9. 血小板数

血小板数を図7に示す。新規・急性型症例においては血小板数1万以下の症例が68%と多かった。新規・慢性型においても血小板数1万以下の症例を30%に認めたが、2万～5万を示す症例も多く認められた。一方、更新症例においては血小板数が5万以下の症例は少なく、52%の症例で5万以上であった。

10. 特殊検査

新規症例における骨髓検査、PAIgG、抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率を表12に示す。骨髓検査は急性型、慢性型ともほぼすべての症例で実施されていた。ITPに特異的な検査である抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率は非常に低かった。これらの特殊検査は一部の施設を除き施行できないためと思われた。早急に検査センターなどで可能となることが必要と考えられた。

11. 治療

新規症例において選択された治療法を図8、9に示す。新規・急性型ではプレドニゾロン治療が83%の症例において選択されていた。次いでピロリ除菌、大量IgG療法がともに30%の症例で施行されていた。また新規・慢性型においてもプレドニゾロン治療が59%の症例で選択されていた。次いでピロリ除菌、大量IgG療法が実施されていた。ピロリ除菌療法は、平成22年度から保険適用されるようになった治療法である。

図10が更新症例でこの1年間に試みられた治療法、図11が全経過で実施された治療法を示している。更新症例においてもこの1年間ではプレドニゾロン治療が最多で55%の症例で実施されていた。各種治療法に抵抗性で、プレドニゾロンによる維持療法が行われているものと推察された。一方、全経過でみるとプレドニ

ゾロン治療が78%、次いでピロリ除菌療法、大量IgG療法、摘脾など各種の治療が行われていた。

12. この1年の経過

更新・慢性型症例では、この1年間、不変であった症例が70%、軽快した症例が20%、徐々に悪化した症例が5%などであった。ITPは良性疾患ではあるが治癒する疾患でもないことがうかがわれた。

13. 罹病期間

更新症例（慢性型）における罹病期間を図12に示す。罹病期間は1年未満の症例から50年以上に及ぶ症例まで幅広く分布していた。ITPが慢性疾患であることを示しているとともに基本的には予後良好な疾患であることを意味しているものと思われた。

14. 合併症

ITPは罹病期間が長期にわたることが多い。その間には多くの合併症を併発することが懸念される。特にプレドニゾロン治療が長期にわたって行われるのでプレドニゾロンによる副作用が懸念される。調査表に記載されていた合併症を図13に示す。

プレドニゾロンの影響と考えられる糖尿病の頻度が高い。またプレドニゾロンや免疫抑制剤の長期投与が原因ではないかと考えられる脊椎骨折、重症感染症、悪性腫瘍の合併も報告されていた。最も重篤な合併症である脳出血は32例報告されていた。その他の合併症として高血圧症、高脂血症、骨粗しょう症などが報告されていた（図14参照）。

15. 難治症例の頻度

難治症例の定義は明確ではないが、摘脾を含む各種治療を行っても血小板数が低く（血小板数2万以下）、出血傾向を示している症例と考え、臨床調査個人票から上記条件にて絞り込み、難治症例数を推計した。

更新申請症例で慢性型11,952例を対象とした

(表 13)。まず血小板数 2 万以下の症例に絞り込むと 2,531 例 (21.2%) の症例が対象となった。血小板数 2 万以下の症例を、さらに出血傾向を示している症例に絞り込むと 2,009 例 (16.8%) が対象となった。出血傾向を示している症例のうちプレドニゾロン治療をされている症例は 1,469 例 (12.3%) であった。各種治療に抵抗性であるとの考えに従い、摘脾済み症例に絞り込むと大幅に減少し、306 例 (2.6%) が難治例に相当すると考えられた。

16. ITP 症例の経過解析

1) 年度ごとの登録症例数の解析

年度により登録症例数にバラツキを認めた。平成 13 年度、14 年度は新規登録、更新登録ともに非常に少なく解析に不向きと思われた。平成 15 年度以降は新規登録症例が 2,500 例前後、更新登録症例が 15,000 例前後であった。

2) 脳出血を合併した症例の解析

平成 21 年度、22 年度に脳出血を合併した症例を抽出し、経過中の血小板数の推移を検討した。平成 21 年度、22 年度に更新登録された症例は 29,703 例であった。うち 83 例で平成 21 年度あるいは 22 年度に脳出血を合併していた。これら 83 例のうち継続的に登録されていた 13 例につき血小板数の推移を検討した。

表 14 に 13 症例の概要を示す。平成 21 年度に脳出血を起こした症例が 8 例、平成 22 年度に脳出血を起こした症例が 5 例であった。年齢は 62.6 ± 12.8 歳、発病年齢は 44.2 ± 14.7 歳であり、発症後平均 18.4 年後に脳出血を合併していた。脳出血当時の血小板数は 10 症例で 2 万/ μ l 未満と低かった。血小板数が低値であったにも関わらず症例 2、4、5 の 3 症例ではプレドニゾロンの投与は行われていなかった。

表 15 に血小板数の推移を示す。平成 15 年度より常に血小板数が 2 万/ μ l 未満と低かった症例が 8 例認められた。一方、一部症例 (症例 3、8、9) では血小板数が常に 2 万/ μ l 以上で

あったが脳出血を起こしていた。

D. 結論

今回の調査では ITP の発症頻度は 10 万人あたり 2.29 人、更新患者は 10 万人あたり 14.37 人であった。年齢分布は平成 21 年度とほぼ同じで高齢者への発症のシフトが続いていることが確認できた。特定の症例 (脳出血合併例) に注目しての解析では血小板数や治療経過などが詳細に検討可能であることが確認された。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 藤村欣吾、宮川義隆、倉田義之、桑名正隆、富山佳昭、村田 満：成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイドライン 2012 版。臨床血液、53；433-442。

2) 倉田義之：特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)。新版 日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム、186-188。

3) 倉田義之：血小板の同種抗原。新版 日本輸血・細胞治療学会認定医制度指定カリキュラム、95-97。

2. 学会発表

1) 宮川義隆、菊池佳代子、藤村欣吾、富山佳昭、倉田義之、岡本真一郎、桑名正隆、阿部貴行、村田 満、佐藤裕司、金倉 謙、池田康夫：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に関する調整管理研究。第 74 回日本血液学会学術集会。

G. 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