

MEMO

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 診療に関して従来我班研究を継続、発展すべく、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。欧米を中心とした国際作業部会により ITP の用語の標準化やカイドラインが作成されており、これらとの整合性に関しても議論していく必要あり。

1) 個人調査票の改訂、および疫学研究の継続

ITP に関しての、臨床調査個人票の改訂作業は終了。特に骨髄穿刺の取り扱いに関しては見直しを行なった。骨髄穿刺を必要とする基準を設定した。さらには、小児 ITP のデータの精度向上をめざす。

2) ITP 治療の参照ガイド作成

成人慢性 ITP の診療に関して海外のガイドを参照しつつ、H. Pylori 除菌療法、TPO 受容体作動薬を含めわが国のデータを加味し ITP 治療の参照ガイド 2012 年度を公開した。摘脾の合併症に関してはさらに検討する必要あり。またリツキシマブの治療上の位置づけに関しても検討する（医師主導型治験）。本年度より新たに妊娠合併 ITP 治療の参照ガイドの作成を開始する。

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、標準化が必要であるため、標準化にむけて検討する。

3) 病態解析

ITP における主要な抗体である抗 GPIIb-IIIa 抗体のエピトープ解析、マウスモデルを用いた GPIb 反応性 CD4⁺T 細胞の解析と TPO と抗 CD154 抗体の同時投与による血小板反応性 T 細胞の免疫寛容の誘導、脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導機構の解析を発展させる。

MEMO

個別研究

血栓性素因の分子病態解析

名古屋大学 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) の欠乏は特発性血栓症の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、これら凝固制御因子 AT・PC・PS の欠損症が疑われた症例において、それぞれ欠損症を引き起こす原因の遺伝子変異を同定し、さらに各変異分子の発現実験等を通じた欠損症発症の分子病態解析を行ってきた。これらの特発性血栓症のリスクファクターとなる AT・PC・PS 遺伝子の変異解析結果は、他者からの日本人症例での報告も合わせて、現在までの日本人における Thrombophilia Mutation Database として当研究室のホームページに掲載・公表して来た。

今後の研究活動として、これら従来法 (PCR をもとにした直接塩基配列解析法) による特発性血栓症のリスクファクターとなる凝固関連遺伝子の変異同定解析を継続するとともに、従来法では同定不能な症例においても新たな解析法 (MLPA 法など) による変異同定解析を行う。なお、遺伝子解析にあたっては、名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセントを取得して行う。また、未だ原因同定に至っていない遺伝性血栓症家系における新たな候補遺伝子の変異探索解析を行う。とくに、一昨年来、我々が同定・解析して来たプロトロンビン遺伝子の変異解析症例については、AT 抵抗性を示す新しい血栓性素因の発見は本研究班での大きな研究成果の一つであり、2012. 6. 21 号の *New Engl J Med.* に掲載され、広く新聞・テレビ・インターネットでも取り上げられた。今後も、AT 抵抗性を示す症例における血漿検体を用いたスクリーニング検査法を開発し、特発性血栓症のリスクファクターとなる血栓性素因の未同定症例を含め、AT 抵抗性病態の検索・解析を進めて行く予定である。

MEMO

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) 自己測定の実施の安全性と有効性に関する臨床研究

窓岩清治*、坂田洋一 (*発表者)

自治医科大学分子病態研究部

本研究 (自治医科大学臨床研究倫理審査委員会承認 第臨 A10-47 号) は、特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対する日本人に適したワルファリン療法の確立を主目的とし、自治医科大学病院血液内科外来における特発性血栓症/静脈血栓塞栓症に対してワルファリン療法を施行している患者を対象に、1) PT-INR 自己測定の実施が可能かどうか、PT-INR 値を定常的により予め設定された目標値に近づけられるか、2) PT-INR を週 1 回の間隔で測定することにより医師の指導下において出血、塞栓のイベントが軽減ないしは抑制することが可能か否か、3) 本臨床研究 PT-INR 値の自己測定がワルファリン療法に起因する合併症の軽減に寄与するか否かについて検討した。平成 24 年 7 月 17 日の時点で 16 例が登録され、離脱 3 例を除く 13 例 (男/女=4 例/9 例, 年齢 42.7 ± 10.9 歳) について解析を行った。その結果、自己測定 PT-INR 値と医療機関測定 PT-INR 値との間には $y=0.969x+0.118$, $R^2=0.912$, $p<0.01$ 、Bland-Altman プロットによる両測定値の差が -0.07 ± 0.12 と良好な相関が認められた。また非自己測定期間における time-in therapeutic range (TTR) と自己測定期間 TTR はそれぞれ、 63.1 ± 33.2 および $71.1 \pm 26.8\%$ であり、自己測定により TTR が高くなる傾向が認められた。自己測定実施期間 (160.4 ± 76.8 日) において、手技に伴う合併症や出血および血栓症イベントの再発はみられなかった。ワルファリン療法を施行している特発性血栓症/静脈血栓塞栓症の日本人患者における PT-INR の自己測定は、安全で有効な手法であると考えられた。今後さらなるエビデンスの蓄積により、ワルファリン療法における最も重要な副作用である出血予防案の作成に向けた臨床研究を展開したい。

MEMO

凝固因子インヒビター測定法における血漿 pH の安定化法

竹尾映美 1)、 川崎富夫 2)

1) 大阪大学医学部附属病院医療技術部、 2) 大阪大学医学部附属病院心臓血管外科

【目的】 現在、凝固因子に対するインヒビター測定法として Bethesda 法が広く使用されている。しかし、Bethesda 法で問題となるのが血漿中の pH 上昇により凝固因子活性レベルが自然失活しインヒビター低力価領域において偽陽性を生じることである。また、わが国では凝固因子定量や凝固因子に対するインヒビター測定は外注に出す施設も少なくないことから検体の凍結融解条件も重要となってくる。本研究は pH 上昇を抑制することで凝固因子の安定化を図ることと、検体の凍結融解条件を明らかにすることを目的とし検討を行った。

【方法】 凝固因子の安定化の検討として、総容積の異なる試験管に正常血漿 9.5 に対して 1 M HEPES pH7.35 緩衝液を 0.5 混合した HEPES 緩衝化血漿を添加し 37°C 2 時間加温後の pH 変動を観察した。凍結融解条件の検討として、2.0ml 用凍結容器に 0.5ml, 1.0ml, 2.0ml の非緩衝化血漿と HEPES 緩衝化血漿をそれぞれ添加し -80°C で一週凍結後、37°C 5, 10, 15 分の条件で融解し、F-V, F-VIII 活性を測定した。

【結果】 凝固因子安定化の検討から、回帰式 $y=2.2766x+7.448$ {y ; 37°C 2 時間後の pH, x ; (試験管総容積/血漿容積)/接触面積} の関係を見出し、pH 上昇の抑制を確保することに成功した。さらに、同一試験管(試験管総容積 ; 6.5ml) に異なる容量(0.5ml, 1.0ml)の非緩衝化血漿と HEPES 緩衝化血漿のそれぞれを添加し、37°C 2 時間加温後の F-II, F-V, F-VII, F-VIII, F-IX, F-X, F-XI, F-XII 活性、および ADAMTS13 活性を測定した。F-II, VII, X 活性では非緩衝化血漿と HEPES 緩衝化血漿ともに 0.5ml と 1.0ml 間での有意な変動は認められなかった。F-V, VIII, IX, XI, XII および ADAMTS13 活性の非緩衝化血漿では 1.0ml と比較して 0.5ml で低値であったが、非緩衝化血漿で低値を示したこれらの凝固因子活性は HEPES 緩衝化血漿で改善することが出来た。非緩衝化血漿と HEPES 緩衝化血漿の F-V, F-VIII 活性両者の凍結融解条件について検討したところ、血漿を緩衝化することで凝固因子活性の低下を軽減することができた。

【結語】 今回我々が行った検討から Bethesda 法および検体の凍結融解条件における血漿緩衝化の有用性を明らかにすることが出来た。HEPES 緩衝化血漿と測定に使用する試験管を考慮し、検体量を算出することで凝固因子活性の自然失活を抑制することが可能であり、Bethesda 法による低力価領域における偽陽性や施設間差を軽減できると考えられる。

MEMO

非典型溶血性尿毒症症候群患者の遺伝子解析

宮田敏行¹⁾、本田繁則¹⁾、藤村吉博²⁾

¹⁾国立循環器病研究センター・分子病態部, ²⁾奈良県立医大・輸血部

溶血性尿毒症症候群(HUS)は、腎臓小細動脈ならびに糸球体毛細血管の微小血管障害を原因とする血小板数減少、溶血性貧血、急性腎不全を示す疾患である。HUSは大腸菌 0157 などの感染による志賀毒素での下痢を伴う典型例と、補体制御因子の遺伝子変異により補体系が内皮細胞を攻撃した結果生じる非典型例に分類される。aHUS の発症は、補体調節因子である CFH, MCP, CFI, THBD 遺伝子の機能消失型変異、もしくは補体因子である C3 と CFB 遺伝子の機能亢進型変異が原因となる。これまで欧米を中心に aHUS の遺伝子解析が行われてきたが、本邦での解析例は少ない。本研究では、奈良県立医科大学に集積している微小血管障害症のうち、血小板数減少、溶血性貧血、急性腎不全を示す aHUS を発症した 9 家系 10 名の患者の補体制御遺伝子および補体遺伝子の塩基配列解析を行った。

aHUS と診断された 10 名の患者とその家系構成員の末梢血から DNA を調製し、補体調節因子 (CFH, MCP, CFI, THBD) および補体因子 (C3, CFB) のタンパク質をコードする領域の塩基配列解析、および CFH 遺伝子近傍の Regulators of Complement Activation (RCA) 領域の遺伝子欠失の有無の解析を行った。同定された変異は、RFLP 法を用いて家系構成員に確認した。

患者の遺伝子の塩基配列解析により、複数個のミスセンス変異を同定した。CFH, V62I 変異, Y402H 変異, E936D 変異, MCP, S13F 変異, CFI, R201S 変異, R406H 変異, CFB, R32Q 変異, THBD, A473V 変異は頻度が高く原因変異ではないと判断した。下記の変異は極めて稀であり原因変異と考えた。RCA 領域の欠失は患者には同定しなかった。

患者 X1: CFH, p. R1215Q 変異、患者 AA1: C3, p. I1157T 変異、患者 FF1: C3, p. S562L 変異 (新規)

患者 DD1: MCP, p. Y189D 変異、p. A359V 変異 (新規)、患者 HH1: C3, p. R425C 変異 (新規)

患者 II1: CFH, p. R1215Q 変異、THBD, p. T500M 変異 (新規)、患者 JJ1: C3, p. I1157T 変異

患者 JJ2: C3, p. I1157T 変異、残る 2 名の患者には原因と思われる変異を見いだせなかった。

家系 JJ は aHUS を示す親子に I1157T 変異が同定され、遺伝子変異と疾患の関連が見られたが、それ以外の 6 家系では変異を保有する両親は aHUS 症状が見られていない。CFH, R1215Q 変異は 2011 年信州大学が aHUS 患者 3 名 (2 家系) に報告した変異である。私達の研究と合わせると、本邦の aHUS 患者 5 名 (4 家系) が保有者になる。本変異は HUS/TTP 国際登録研究 (2 名) や米国 (7 名) で既に報告されている。C3, I1157T 変異は aHUS 患者 3 名 (2 家系) に同定したが、本邦では初めての報告になるが、米国 (1 名) などでは既に報告されている。MCP, Y189D 変異は 2006 年にフランスの aHUS 患者 120 名の遺伝子解析で

3名（うち2名は同一家系）に見いだされたが、本邦では初めての報告になる。私達の研究から、日本人 aHUS には、CFH, R1215Q 変異と C3, I1157T 変異の頻度が高い可能性が考えられた。両変異の迅速な判定には、私達が用いた RFLP 法が有用かもしれない。6 遺伝子（エクソン数：110 個）の塩基配列を解析すると幾つかのミスセンス変異が同定される。したがって、本研究で初めて同定された4つの新規ミスセンス変異の意義は、慎重に検討する必要があると考える。

多発性骨髄腫治療薬 Bortezomib が血小板機能に与える影響の解析

慶應義塾大学医学部内科 横山 健次

[背景] 昨年度の班会議で多発性骨髄腫治療薬である bortezomib (BOR) が血小板機能に影響を与える可能性を報告した。今回さらに詳細に検討を加えることを目的として以下の実験を行った。

[方法] 血小板数 $30 \text{ 万}/\mu\text{l}$ に調整した PRP に *in vitro* で BOR を添加、incubate した後にアゴニスト惹起血小板凝集 (ADP、collagen、A23187)、を測定して BOR が血小板機能に与える影響を解析した。

[結果] BOR 濃度最高 $40 \mu\text{M}$ まで、incubate 時間は最長 2 時間までのいくつかの条件で各種アゴニスト惹起凝集を測定した。collagen 凝集では shape change がみられなくなる可能性が示されたが、その他のアゴニスト惹起血小板凝集に対する BOR の影響は明らかではなかった。

collagen 凝集

BOR (-) BOR $20 \mu\text{M}$

[考案] 今回の検討では BOR により collagen 凝集の shape change がみられなくなる可能性が示唆された。しかしその他のアゴニスト惹起血小板凝集には影響はみられず、BOR が血小板機能に与える影響は限定的なものと考えられた。*in vivo* の実験および臨床研究の結果 BOR が血栓症発症を抑制する可能性が示唆されているが、今回の実験結果からは血栓症発症の抑制効果は血小板機能に依存するのではなく、血管内皮細胞に対する影響など他の機序に依存する可能性が高いと考えられた。なお血小板では Ca が proteasome の機能に影響を与えると考えられており、proteasome inhibitor である BOR により shape change がみられなくなったこととの関連はさらに検討が必要である。

本研究は慶應義塾大学医学部臨床検査医学、山口 雄亮とともに行った。

MEMO

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

浜松医療センター 小林 隆夫、平井 久也

【研究目的】浜松医療センターでは入院患者、とくに術前患者において内因性トロンビン産生能 (Endogenous Thrombin Potential : ETP) に基づく、活性化プロテイン C 感受性比 (Activated Protein C sensitivity ratio : APC-sr) を測定し、後天性 APC 抵抗性の状態を把握することによって静脈血栓塞栓症 (VTE) 予知スクリーニング法を確立する研究を行っている。この研究の中でプロテイン S (PS) も測定しているので、APC-sr と PS との関連性、および PS 抗原と PS 活性の比活性から VTE の予知が可能かどうか検討する。【方法】ETP とは、合成基質 (S-2238) を用いて血漿中のトロンビン産生を経時的に測定する方法で、現在では合成基質に変わり蛍光基質 (ZGGR-AMC) を用いた測定法となっている。本測定系に APC を添加・反応させることで ETP を抑制することができるため、患者血漿と正常男性コントロール血漿に 8.7nM の APC を添加した際の ETP の抑制率を比で表したものを APC-sr として算出する。浜松医療センター入院患者において、倫理委員会で承認された本研究に同意が得られた患者血漿の ETP および APC-sr を測定するが、同時にまた、PS 抗原 (total と free) および PS 活性 (シノテスト法) も測定して個々の相関を検討した。手術予定患者は、術前 (入院時)、術後 1 日、(術後 4 日)、術後 7 日、術後 14 日もしくは退院前の 4~5 回の採血となる。なお、研究対象患者は、入院時 (手術前) および退院前に超音波検査で深部静脈血栓症 (DVT) の有無を検索し、臨床経過の参考にする。さらに研究に同意が得られた VTE 患者も同様に測定し、陽性対象として解析した。【結果および考察】現在解析が終了している帝王切開 (6 例)、外科・婦人科悪性腫瘍 (30 例)、整形外科下肢手術 (20 例) の計 56 例、および VTE22 例 (肺塞栓症 16 例、DVT 単独 6 例) で検討した。また悪性腫瘍術後症例で 1 例に DVT が発症した。現在判明していることとして、1) 妊産婦では帝王切開術前術後とも ETP と APC-sr は高い。悪性腫瘍患者では術前の ETP と APC-sr はやや高く、術後 3-4 日目にかけて増加した。整形外科患者では術前の ETP と APC-sr はほぼ正常であるものの術後に増加し、4 日目に最大となった。2) PS 抗原 (total と free) および PS 活性は、悪性腫瘍患者と整形外科患者では術後 1 日目に減少するものの術前および術後 4 日目以降は正常であった。妊産婦では帝王切開術前はいずれも 50%前後と低値を示し、術後 4 日目にかけて回復する傾向にあった。3) PS 抗原と PS 活性の比活性が 0.7 (-3SD) 未満を呈した症例は VTE19 例中 7 例、肺塞栓 16 例中 6 例であり、そのうち PS 活性 60%未満は VTE19 例中 5 例、肺塞栓 16 例中 4 例であであった。PS の II 型欠乏症が疑われた。4) APC-sr と free PS 抗原・PS 活性の間には負の相関がみられ ($P<0.01$)、APC-sr の増加と PS の減少との関連性が示唆された。5) 予防的抗凝固薬投与中は ETP と APC-sr とともに抑制されるが、抗凝固療法施行前に採血できた VTE 患者 14 例の APC-sr は 2.92 ± 1.47 で、悪性腫瘍患者術前の 1.27 ± 0.68 と整形外科患者術前の 1.27 ± 0.69 より有意に高かった ($P<0.01$)。また、術後 DVT 症例では 2.76 と高値で、かつ PS 比活性は 0.61 と低値であった。すなわち、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判明した。

MEMO

東日本大震災後 1 年間の深部静脈血栓症 (DVT) 検診結果

新潟大学大学院呼吸循環外科、新潟大学災害・復興科学研究所 榛沢和彦

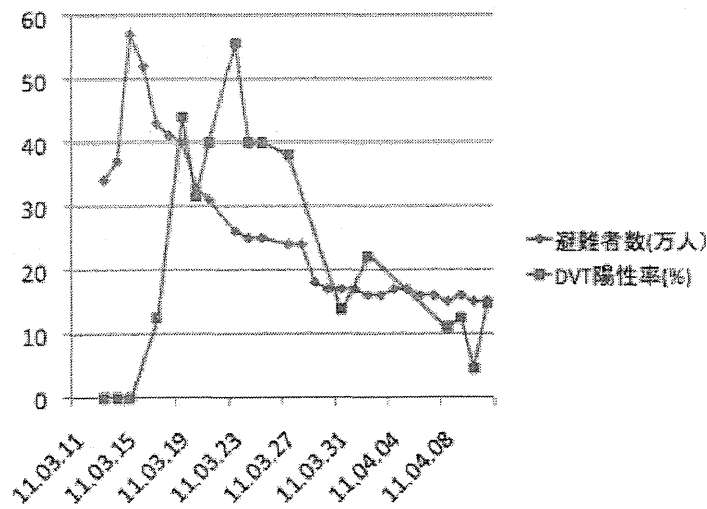
2011 年 3 月 19 日～2012 年 3 月 18 日まで東日本大震災被災地避難所に赴き、エコー検査と血液検査を行った (表 1)。震災 2 週間以内では激甚津波被害の宮城県沿岸部で 30-50% の高い DVT 陽性率を認めたが、宮城県沿岸地域の被災者が避難した内陸部の避難所では 10-15% であった。したがって大きな震災・津波直後ではできるだけ震源地・被災地を離れて避難した方がよいものと考えられ、被災地を封鎖して避難させるなどの措置も今後必要と思われる。

また震災 1 ヶ月後では石巻市を除く沿岸部で低下傾向を認めたが、内陸部の避難所では 10% 台とほぼ震災 2 週間後とほぼ同じであった (図 1)。また新潟県内や群馬県内の遠隔地避難所では同じ時期の被災地沿岸部と同等またはそれ以上の陽性率であった。これは津波の激甚被災地では地震直後はライフラインの途絶、食料不足、物資不足から厳しい避難所環境だったが、復旧が進んだことから食料や物資の供給が進んで避難環境の改善したことから DVT 頻度が低下したものと考えられた。一方、内陸部では最初からライフラインの途絶や食糧不足は少なかったことから DVT 頻度が沿岸部に比較して低かった。しかし時間が経過しても避難環境が変化しないため DVT 頻度が変わらないことから同じ頻度であったと考えられた。一方、新潟県や群馬県の遠隔地避難所は最初から被災しておらず避難所周囲は通常通りの日常生活の様子であったが、避難所の作られている体育館などは一步入るとそこはまさに被災地であった。体育館内に布団や毛布を直接敷いて、その上にジッと座っている、あるいは寝ている様はあたかもバーチャル被災地であった。そのため新潟県内や群馬県の遠隔地避難所の DVT 頻度は同じ時期の被災地の避難所の DVT 頻度と同等あるいは場所によってはそれ以上であるものと思われた。以上のことから現在の日本における避難所では、被災地である無しに関係無く 10% 程度の DVT が発生する可能性があり問題があると考えられた。その原因を考えるには欧米の避難所が参考になる。欧米人は日本人に比べて DVT が 3-5 倍発生の多いことが知られているが、欧米の災害後に DVT や肺塞栓症が問題になったことはほとんど無い。あるとすれば 1940 年のロンドン地下鉄避難所だけである。このときロンドン市民の多くが地下鉄のホームで雑魚寝を繰り返し、その結果肺塞栓症による剖検例が前年の 6 倍になった。そこで避難所に簡易ベッドを 20 万個導入したところ肺塞栓症や循環器疾患、呼吸器疾患が激減したという。欧米の避難所は簡易ベッドの使用が基本である。欧米の災害後の報道を見ると被災者が簡易ベッドで休んでいる姿がよく映っている。これは欧米人がベッドで普段寝ているという文化的背景だけでなく、ロンドン地下鉄避難所の教訓が生かされシステムとして残っているのだと考えられた。したがって日本においても欧米と同様に災害後は簡易ベッドを基本とする避難所作りができるようにしなければならないと考えられた。

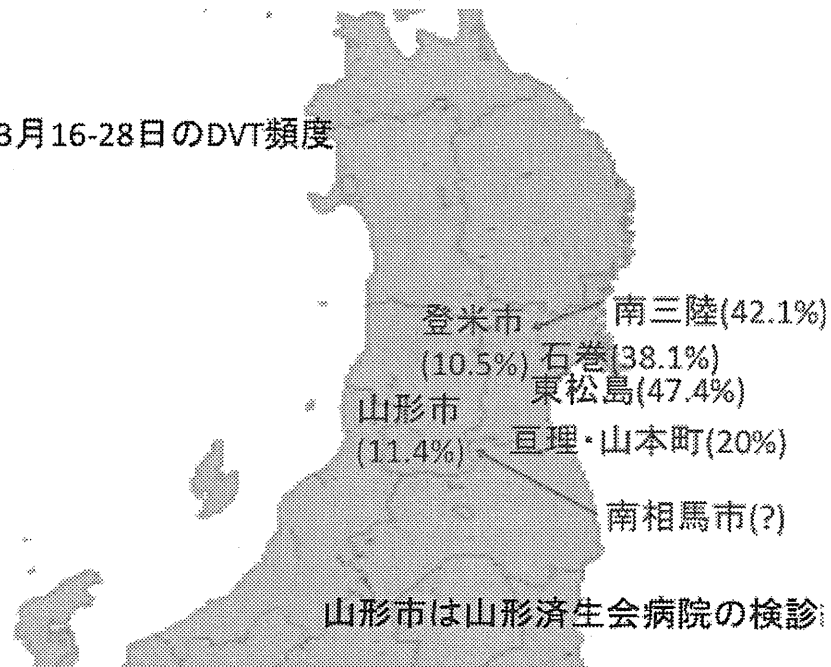
表 1 検査を行った期日と場所 (DVT 陽性率)

2011.3.19	宮城県南三陸町(44.4%)	2011.5.21	盛岡市
2011.3.20	宮城県登米市(9.1%)、石巻市(31.6%)	2011.5.24	長岡市
2011.3.24	宮城県南三陸町(40%)	2011.5.26	岩手県大槌町(3.9%)
2011.3.25	宮城県亶理町	2011.5.27	岩手県大槌町(6.1%)
2011.3.26	宮城県亶理町、名取市(20%)	2011.5.28	岩手県釜石市(5.4%)
2011.3.27	宮城県石巻市(38.1%)	2011.5.29	岩手県釜石市(8.5%)
2011.3.31	福島市(13.8%)	2011.6.11	福島市
2011.4.2	福島市(20%)	2011.6.18	宮城県栗原市、南三陸町
2011.4.8	新潟市(11%)	2011.7.6	群馬県片品村
2011.4.9	長岡市、小千谷市(12.4%)	2011.8.26	石巻市(7.2%)
2011.4.10	石巻市(37%)、柏崎市(4.5%)	2011.8.27	石巻市(2.6%)
2011.4.11	宮城県栗原市(14.8%)	2011.9.1	陸前高田市(10.8%)
2011.4.12	盛岡市(12.5%)、陸前高田市	2011.9.2	陸前高田市(2.2%)
2011.4.16	見附市(5.5%)	2011.9.3	陸前高田市(3%)
2011.4.24	新発田市(12.6%)、聖籠町(8.1%)	2011.9.4	陸前高田市(5.6%)
2011.4.28	陸前高田市(17.1%)	2011.9.24	岩手県大槌町(4.6%)
2011.4.29	陸前高田市(13.6%)、上越市、妙高市(4.8%)	2011.9.25	岩手県釜石市(5.2%)
2011.4.30	陸前高田市(7.4%)	2011.12.10	石巻市
2011.5.3	南三陸町(0%)	2011.12.11	新発田市(0%)
2011.5.4	宮城県栗原市、東松島市(33.3%)	2011.12.23	盛岡市
2011.5.5	三条市(5.6%)	2012.3.17	石巻市(8.7%)
2011.5.8	群馬県片品村(9.3%)	2012.3.18	石巻市(31%)

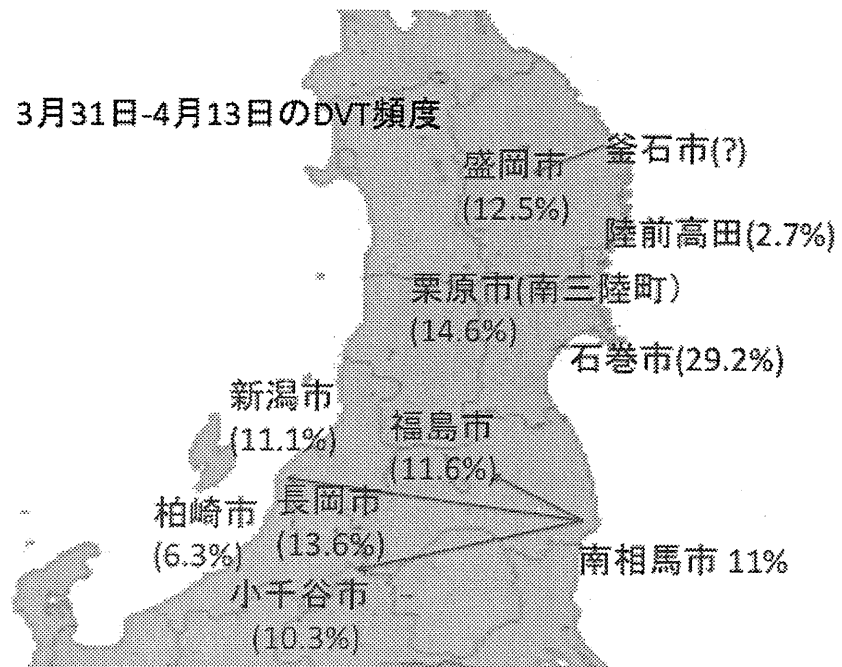
図1. 東日本大震災の避難者数と避難所のDVT陽性率推移



3月16-28日のDVT頻度



3月31日-4月13日のDVT頻度



MEMO