

肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究

研究責任者 三重大学大学院循環器・腎臓内科学 助教 太田覚史
共同研究者 三重大学臨床心血管病解析学 教授 中村真潮
三重大学大学院循環器・腎臓内科学 講師 山田典一
浜松医療センター 院長 小林隆夫

肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症（両者を合わせて VTE と呼ぶ）は日本人においても急増傾向にあり、その診断・治療・予防法の確立は喫急の課題である。しかし、欧米人と日本人では VTE の特徴が異なる可能性が高いため日本人の発生頻度などわが国独自の情報が必要となるが、日本人を対象とした臨床研究はきわめて少ない。

VTE の確定診断数の調査は、厚生労働省の科学研究などでこれまで数回行われ、日本人での確定診断数は米国の約 20 分の 1 と報告されている。今回の調査は、これまでの発生頻度調査を引き継いで行うアンケート調査であり、本年度 1 年間の全国での VTE の発生数を推定するものである。さらに、発症例に関する病型やリスクも調査し、これまで得られている結果との経年的変化を検討する。具体的には平成 23 年 11 月 1 日から平成 23 年 12 月 31 日まで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収集する。

現段階で一般病院 6568 施設にアンケートを送付し、1759 施設より回答を得ている（アンケート回収率 26.8%）。大学病院 2000 講座のアンケート調査と合わせて最終的に年間の VTE 患者数やそのリスク因子の経年的な変化を明らかとする。わが国における本疾患群の実態や影響を与えている因子を推定でき、本疾患群に対する今後の対策の重要な足がかりとなり得る。

MEMO

VWF 結合型および非結合型の血漿 ADAMTS13 の IEF による解析 -TTP 治療における血漿製剤選択

奈良県立医科大学 輸血部 松本雅則、堀勇二、藤村吉博

ADAMTS13 は *in vitro* で VWF と結合することが示されているが、血漿中での存在様式は明らかになっていない。我々は等電点電気泳動 (IEF) を用いて、血漿中での VWF 結合型と非結合型 ADAMTS13 を解析した。この 2 種類の ADAMTS13 は、クリオ沈殿操作で分離することが可能であり、コーンプレート型すり応力惹起血小板凝集計 (SIPA) を用いてその機能の相違について解析した。

IEF 解析には、0.75%アガロース-1.25%アクリロアミド粗孔複合ゲル (pI 3-10) を用い、ADAMTS13 の検出には抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体 (WH2-11-1) を、VWF の検出には抗 VWF ポリクローナル抗体を使用した。

IEF 解析により健常人血漿中には複数の ADAMTS13 のバンドが認められたが、pI 4.9-5.6、5.8-6.7、7.0/7.5 の 3 群に大別された。精製 ADAMTS13 は 4.9-5.6 バンドを示した。type 3 VWD 患者血漿における ADAMTS13 は、前二者のみで 7.0/7.5 のバンドは認めなかった。しかし、これに精製 ADAMTS13、USS 患者血漿いずれを添加しても 7.0/7.5 バンドが出現することから、7.0/7.5 バンドは VWF 結合型 ADAMTS13 であることが示唆された。

次に正常血漿をクリオ沈殿操作により沈殿分画 (CP) と上清分画 (CS) に分離すると、CS には 7.5/7.5 の ADAMTS13 バンドは認めず、VWF 結合型 ADAMTS13 は CS には存在しないことが示唆された。さらに FFP 120 バッグ (ABO 血液型それぞれ 30 バッグ) から CP と CS を作成したところ、ADAMTS13 活性として 92.7%、VWF 抗原量として 14.0% が CS に含まれた。また、洗浄血小板、ADAMTS13 除去血漿、精製 VWF を用いた SIPA への阻害効果は、FFP、CP、CS とも含有する ADAMTS13 活性値に依存して確認された。しかし、CP による阻害効果は初期には認めず、CP に含まれる VWF の影響や SIPA 下で VWF と ADAMTS13 結合体が解離することなどが予想された。

本研究では、新規に開発した IEF 解析を用いて血漿中の VWF/ADAMTS13 複合体を検出可能であることを示した。また、TTP 治療における血漿交換療法で使用する血漿製剤は、FFP と同様に CS も有効である可能性が示唆された。

MEMO

TTP に対するリツキシマブの臨床開発

研究代表者：村田満

研究分担者：藤村吉博

研究協力者：上田恭典、松本雅則、宮川義隆

1. 研究の背景

TTP に対する血漿交換療法と免疫抑制療法の併用により、80%以上の奏功率が得られる。しかし約 30~50%が再発・難治例となり治療に難渋することが多く、新しい治療法が必要である。海外では再発・難治例に対してリツキシマブが保険償還されているが、国内では適応外使用されている。再発・難治例の救済のためリツキシマブの適応拡大について検討を行うことにした。

2. 公知申請に関する相談

平成 24 年 5 月 10 日 厚生労働省医薬食品局 審査管理課を訪問し、公知申請の可能性について協議した。リツキシマブは海外においても TTP に対して薬事承認されておらず、公知申請は却下される可能性が高いこと、高度先進医療を実施しても GCP に準拠していないことから審査資料になる保証がないこと、未承認・適応外薬検討会議の次回開催が未定であること、以上より薬事承認を得るためには医師主導治験の実施が望ましく、医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談を受けるよう助言を受けた。

3. 薬事戦略相談

平成 24 年 6 月 19 日 医薬品医療機器総合機構を訪問し、薬事戦略相談の事前面談を受けた。試験デザイン（案）として、選択基準は後天性 TTP 患者で再発例、または血漿交換を 5 回施行しても改善を認めない（血小板数 5 万を超えない）、または ADAMTS-13 インヒビターが 2 BU/mL 以上とし、シングルアーム試験（被験者数 5 名）を提案した。機構側から対象疾患が稀少で致命的な場合、リツキシマブの臨床的位置づけを考慮した上で、適切な被験対象を選択すればシングルアーム試験も妥当であること、有効性評価については血小板数に加えて、有効率、必要な血漿交換数など多面的にすることが望ましいと助言を受けた。また、治験を実施する際に用いる ADAMTS-13 診断薬の開発相談は薬事戦略相談の枠内で行い、リツキシマブの医師主導治験については通常の対面助言を別途受けることになった。

4. 今後の予定

ADAMTS-13 試薬の開発とリツキシマブの医師主導治験の計画を並行して進める。

MEMO

TMA における血漿可溶性血小板膜糖蛋白 VI (GPVI) の検討

和田英夫 内藤克樹

はじめに

血栓性微小血管障害 (TMA) は ADAMTS13 の減少、血管内皮細胞障害、血小板の活性化など種々の病態により発症すると考えられている。TMA は予後が悪いため、早期に診断する必要があるが、この研究では血小板活性化のマーカーとして、血漿可溶性血小板膜糖蛋白 VI (sGPVI) を TMA 疾患で測定した。

対象ならびに方法

血漿 sGPVI, ADAMTS13 活性, von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide (VWFpp) を、健常成人 40 例, 非血栓症 46 例, 整形外科術後 15 例, DIC 13 例 and TMA 70 例で測定した。sGPVI ならびに VWFpp は ELISA で、ADAMTS13 は FRETS assay で測定した。TMA の 27 例は ADAMTS13 著明減少 (TMA-ADAMTS13) し、43 例の TMA は著明減少していなかった (TMA-Other)。

結果

健常人血漿の sGPVI (median; 25.0-75.0%tile) は 11.4 ng/mL; 9.1-14.8 ng/mL であり、術後 (31.6 ng/mL; 28.3-35.1 ng/mL)、DIC (44.5 ng/mL; 36.6- 60.8 ng/mL)、TMA (40.8 ng/mL; 32.9-56.7 ng/mL) では著しく増加していた。また、TMA の病態により s GPVI 値は異なった。

結論

sGPVI の測定は TMA の診断に有用である可能性が示唆された。

MEMO

ADAMTS13 遺伝子シーケンシング法の改良

国立循環器病研究センター・分子病態部

小亀浩市

ADAMTS13 は、血小板の凝集過程で重要な役割を果たす von Willebrand 因子を特異的に切断する血漿プロテアーゼである。遺伝子異常や自己抗体の出現などによる ADAMTS13 活性の損失は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の要因となる。本研究事業の3年間では、以下の4項目を主な研究内容としている。(1) Upshaw-Schulman 症候群 (USS) 患者の遺伝子解析、(2) ADAMTS13 の立体構造未決定部分および変異体の構造決定、(3) ADAMTS13 遺伝子変異のタンパク質化学的・生物学的影響の解析、(4) ADAMTS13 活性阻害剤および促進剤の探索。

今回、ADAMTS13 遺伝子の塩基配列決定 (シーケンシング) 法の改良に関して報告する。一般に、遺伝性疾患が疑われる患者の病因候補遺伝子の塩基配列は、標的遺伝子の各エクソンを PCR 法で増幅して解析する方法、すなわちダイレクト・シーケンス法によって決定される。我々も、USS 患者家系の ADAMTS13 遺伝子に対して同法を行ってきた。初期には、定法にしたがい、各エクソンの外側に Forward および Reverse 方向の PCR プライマーを設計し、検体 DNA から各エクソンを特異的に増幅していた。その後、若干の改良を加えてきたが、最近、M13Fwd 配列 (TGTAACGACGGCCAGT) を各エクソン用 Forward プライマー 5' 端に、M13Rev 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を各エクソン用 Reverse プライマー 5' 端にそれぞれ追加することにより、シーケンシング反応のための作業が簡便化できることを確認した。さらに、ADAMTS13 以外の遺伝子に対しても有効であった。

次世代シーケンサーの普及に伴い、遺伝子解析の手法も変化していくことが予想されるが、個別の遺伝子解析では、依然としてサンガー法を利用する第一世代シーケンサーを用いたシーケンシングが主流になる。その方法の簡便化は、解析の迅速化だけでなく、正確性の向上にもつながると考えられる。

MEMO

肺炎球菌による劇症型摘脾後感染症をきたした ITP の 1 症例

高蓋 寿朗 1), 松田 真太郎 2), 藤村 欣吾 3)

1) 西神戸医療センター 免疫血液内科, 2) 同 循環器内科,

3) 安田女子大学薬学部

【症例】64 歳, 女性【主訴】全身脱力【現病歴】1997 年当院にて特発性血小板減少性紫斑病と診断. 2000 年, 脾臓摘出術により寛解状態となり, 2007 年より近医にて経過観察としていた. 肺炎球菌ワクチン接種は受けていなかった. 入院 3 日前から全身脱力を自覚し急速に増悪するため当院受診. 来院時ショック状態で心エコーにて左室駆出率(LVEF)29%と左心機能低下を認めた. CCU 入院の上で IABP を挿入し人工呼吸管理とした. 受診時の血液培養塗抹から肺炎球菌を検出し, 劇症型脾摘後感染症(overwhelming postsplenectomy infection:OPSI), 敗血症性ショックと診断した. 肺動脈カテーテルモニタリング下に IABP, 持続的血液濾過透析(CHDF)など集学的治療にて病態の改善を認め, LVEF も徐々に正常化した. 第 12 病日に人工呼吸器を離脱した. 経過中に電撃性紫斑病, 細菌性眼内炎を併発した. 第 98 病日に独歩退院した. 【考察】敗血症による cold shock に対して IABP の使用が救命に寄与したと考えられた. また OPSI は致死率が高い疾患であり, 特に摘脾後の症例においては, 肺炎球菌ワクチンによる予防が不可欠である. 肺炎球菌ワクチンは 2009 年から再接種が認められているが, それ以前の摘脾例については, 比較的若年者については, 接種を見合わせている症例もあると思われる. 摘脾予定症例に関してはワクチン接種の必要性を再度啓蒙する必要があると共に, 摘脾後症例に対しては感染症に対する日常生活での注意点, また感染症を起こした場合の治療指針などを考える必要性があると思われる.

MEMO

特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査

(2012 年度研究計画)

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. 2010 年度の疫学調査

昨年度と同じく厚生労働省から提供された臨床調査個人表のデータをもとに ITP 患者数、年齢分布、治療法、合併症などを解析する

2. 個々の症例の年度を越えての経過調査

疫学研究班の先生方（杉田先生、島田先生）のご協力を得て個々の ITP 症例の年度を越えての疫学調査を実施し、その経過を解析する

3. 小児 ITP 症例の疫学調査

多くの市町村で小児の医療は無料なので「特定疾患」として申請することはない。

申請するとしても「小児特定疾患」として申請したほうが金銭的に有利とのこと。

これらの事実を踏まえると「特定疾患」の資料をもとに小児 ITP を解析することは困難と思われる。また小児血液学会などでは、2009 年～2013 年の期間における小児 ITP の疫学調査を実施中とのことである。

4. 臨床調査個人表の改訂作業

2011 年 11 月 19 日に最終案を村田先生、富山先生に送付済み

MEMO

妊娠合併ITPの診療ガイドラインの改訂

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）

1. 目的：妊娠合併ITPの診療ガイドラインの改訂
2. 背景：ITPは結婚・出産が多い30歳代の女性に多く発症する。血小板数が少ないITP女性患者の妊娠維持、分娩様式、新生児に対する前向き研究はない。妊婦に対する治療は、副腎皮質ステロイドと免疫グロブリン大量療法が中心となる。1990年代まで帝王切開が推奨されていたが、最近では産科的適応がある場合のみ帝王切開が行われる。医療技術の進歩を受け、妊娠合併ITPの診療ガイドラインの改訂が必要になった。
3. 方法
 - (ア) ガイドライン改訂作業に必要な委員会設立
 - (イ) 文献調査とガイドライン改訂作業
4. 結果
 - (ア) ガイドライン改訂委員

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）、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）
産科麻酔科	照井克生（埼玉医大）

(イ) ガイドライン作成における検討項目

- ① 妊娠を許可する血小板数と時期
- ② 妊娠中の血小板数と治療法
- ③ 妊娠中のヘリコバクター・ピロリ除菌療法の安全性と治療時期
- ④ 周産期の血小板数と治療法
- ⑤ 分娩時に腰椎麻酔を行う血小板数の閾値
- ⑥ ITP合併妊婦から生まれた新生児に対する留意点

5. 今後の予定

1994年に当研究班が作成したITP治療ガイドラインを基に、アメリカ血液学会と英国血液学会のガイドライン、国内の妊娠合併ITP患者を対象とした調査研究（藤村欣吾ら、Int J Hematol 2002）などを参考に、ガイドライン改訂委員会にて作業を行う。

MEMO

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 (R-ITP 試験) への支援

宮川義隆 (慶大)、藤村欣吾 (安田女子大)、倉田義之 (四天王寺大)、
桑名正隆 (慶大)、富山佳昭 (阪大)、村田満 (慶大)

研究目的

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) に対するリツキシマブの適応拡大

研究の背景

血液凝固異常症の調査研究班が作成した ITP 治療ガイドライン (2004 年)、成人 ITP 治療の参照ガイド (2012 年)、米国血液学会 ITP 診療ガイドライン (2011 年) に採用されているリツキシマブは、国内では ITP に対する適応を得ていない。稀少疾患である ITP に対し、製薬企業による開発予定はない。リツキシマブは海外では有効かつ安全性が高いセカンドライン治療として、その臨床的位置づけが明確な薬剤である。国内における難治例の救済、適応外使用の問題を解決するため、ITP に対するリツキシマブの医師主導治験 (厚生労働科学研究 治験推進研究事業、研究代表者：宮川義隆) の支援を行う。

方法

自ら治験を実施する者 (10 施設) との合同ミーティングへの出席、治験審査委員会への申請支援、治験実施体制の整備に必要な情報提供と支援を行う。

結果

平成 23 年 10 月 7 日、医薬品医療機器総合機構に治験届を提出し、10 月 26 日から治験を開始した。平成 24 年 7 月 4 日現在、目標症例数 24 名のうち 14 名が本登録している。本研究では R-ITP 医師主導治験を円滑に進めるための支援を継続する。

MEMO

ITP 患者の PA anti- α IIb β 3 抗体の多くは α IIb の β -プロペラ領域内の極めて限定された部位に結合する

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

清水 一亘、柏木 浩和

大阪大学医学部附属病院 輸血部

富山 佳昭

【諸言】 PA anti- α IIb β 3 抗体は ITP の病因に重要な役割を果たしているが、その epitope の詳細は明らかでない。我々は本抗体がマウス α IIb β 3 にはほとんど結合しないことを見出した。この特性を利用して、ヒト-マウスのキメラ α IIb β 3 を用いて本抗体の epitope を同定した。

【方法】 primary ITP 患者よりエーテル解離法にて platelet eluate を作成し、これを 293T 細胞に発現させたヒト-マウスキメラ α IIb β 3 と反応させ flow cytometry にて解析した。

【結果と考察】 78 名の primary ITP 患者中 29 名に PA anti- α IIb β 3 抗体が認められた。うち十分なサンプルの得られた 15 名について epitope 解析を行った。まずこれらの抗体の大部分は α IIb の β -プロペラ領域の N 端側 (W4:4-1 loop まで) を認識していた。さらに次の 3 つの主要な epitope を発見した。1) W1:1-2 と W2:3-4 loop で構成される epitope : 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 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は著明に抑制された。2) W1:2-3 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 epitope とし、W1:2-3 loop 内の点変異 G44N、P45A にてほとんど結合がみられなくなった。残り 4 名は W1:2-3 に加えて W2:3-4 および W3:3-4 loop により構成される領域を epitope とすると考えられた。3) W3:4-1 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 epitope とすると考えられた。またこれらの患者の 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。

【結語】 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 monoclonality を示すことが明らかとなった。

MEMO