

## ITPを中心とした血小板減少症の病因および病態に関する解析

大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

柏木 浩和、清水 一亘

大阪大学医学部附属病院 輸血部

富山 佳昭

我々はこの3年間にITPを中心に血小板減少症の病因および病態に関する検討を行い、以下のような結果を得た。

1. 血小板関連 (PA) anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 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 $\alpha$ IIb $\beta$ 3にはほとんど結合しなかったことを利用して、ヒト・マウスのキメラ $\alpha$ IIb $\beta$ 3を用いて本抗体のepitopeの解析を行った。78名のprimary ITP患者中PA anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3抗体を有し、かつ十分なサンプルの得られた15名について、エーテル法にてPA anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3抗体を解離させ、293T細胞に発現させたヒト・マウスキメラ $\alpha$ IIb $\beta$ 3との反応をフローサイトメトリー(FCM)にて解析した。その結果、これらの抗体の大部分は $\alpha$ IIb :  $\beta$ -プロペラ領域のN端側(W4:4-1 loop まで)内の主に3つの領域を認識すること、またこれらの患者のPA anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3抗体の大部分において、 $\kappa/\lambda$ 鎖の偏りがあることが明らかとなった (Kiyomizu et al. *Blood*2012; 120: 1499-1509)。
2. 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。我々は、本邦における遺伝性巨大血小板減少症の解析からインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3変異を複数見だし、これらの変異の特徴を明らかにした(Kashiwagi et al. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 2013; 1(2): 77-86)。
3. 遺伝性血小板減少症やITP患者における出血傾向は、血小板減少だけではなく血小板機能異常が関与している可能性があるが、従来の血小板凝集能検査で血小板減少患者の血小板機能を正確に評価できない。我々はFCMを用いることにより血小板減少患者における血小板機能を解析する方法を確立した。各種アゴニストに対する $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化はPAC1結合、 $\alpha$ 顆粒放出はCD62P発現、 $\delta$ 顆粒放出はメパクリン染色にて評価した。またアゴニスト刺激後の血小板凝集塊の産生をFCMで検出することにより経時的な血小板の活性化の検討も可能となった。これらの方法を用いてITP症例や遺伝性血小板減少症例における血小板機能解析を行った結果を紹介する。

## 造血幹細胞移植後の致死的合併症である 移植後 TMA と肝中心静脈閉塞症の病態解析

奈良県立医科大学 輸血部 早川正樹、松本雅則、藤村吉博

造血幹細胞移植後の TMA (移植後 TMA) や肝中心静脈閉塞症 (肝 VOD) では、定型的 TTP と異なり ADAMTS13 活性は著減していないことが報告されている。一方で、血管内皮細胞障害により超高分子量 von Willebrand 因子マルチマー (UL-VWFM) が著増することが知られている。移植後 TMA では、血漿交換の有効性は低く、免疫抑制剤の減量や中止などが行われるのみであり、現状では致死率が 0-100% (中央値 75%) と予後不良の疾患である。移植後 TMA の類縁疾患として、移植後早期に肝限局性の臓器障害から多臓器不全へ移行する肝 VOD が存在する。いずれの疾患も予後不良であるが、早期診断、早期治療が予後改善に重要である。

今回我々は、2012 年と 2013 年の 2 年間に当院で行われた同種造血幹細胞移植後に肝 VOD を発症した 6 症例と移植後 TMA 1 例において、ADAMTS13 活性、VWF 抗原量、VWF マルチマー解析を行い、臨床経過と照合した。特に、UL-VWFM の推移と、血小板輸血後の効果判定の基準として広く活用されている補正血小板増加数 (corrected count increment : CCI) に注目して解析した。

肝 VOD では、全症例で発症前に UL-VWFM の出現を認め、3 症例で肝機能障害時に高分子 VWF マルチマーの欠損を認めた。ADAMTS13 については、6 症例すべてで活性の軽度低下を認めたが著明な低下は認めず、インヒビターも認めなかった。TMA の重要な指標となる血小板減少について、移植後早期であるため発症前より低値であり、発症に伴う急激な低下は認めなかった。しかし、経過中に出血予防として頻回の血小板輸血が行われていたが、CCI は肝 VOD 発症前に低下していた。また、移植後 TMA についても同様に発症前に UL-VWFM の出現し、ADAMTS13 活性は軽度の低下しか認めず、発症時に CCI が低下していた。

造血幹細胞移植後には、移植前処置や GVHD などによって、高サイトカイン血症となり、血管内皮細胞が障害される。それによって、UL-VWFM が血液中に放出され、血栓傾向となる。また、移植早期のこの時期は、血小板数は低値で血小板が輸血されるが、移植後 TMA や肝 VOD を発症すると血栓へ消費されるため血小板数は増加せず CCI は低値となる。さらに、VWF も血栓へ消費されるため高分子量 VWFM が欠損する。この血栓形成が、全身で発生すれば TMA、肝臓に限局すれば肝 VOD が発症すると考えられる。以上より、造血幹細胞移植後には、血小板輸血の効果確認を行うことが重要で、CCI などで客観的に評価することで移植後 TMA や肝 VOD の早期診断が可能であると考えられる。

# 血栓性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの 第II 相医師主導治験

宮川義隆、松本雅則、上田恭典、藤村吉博

再発・難治性の血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）に対するリツキシマブは、英国ガイドラインにおいて高いエビデンスレベルで推奨されている。リツキシマブ治療を受けた約100名のTTP患者を対象にした系統的レビューにおいても有効率は約100%と高い。欧米では約10年前からリツキシマブが保険適用されており、ドラッグラグ解消のため医師主導治験を行うことにした。平成25年度から2ヶ年計画で、新たな難治性疾患克服研究事業として同治験を計画した。平成25年9月に機構相談を行い、再発・難治性の6名を対象とするシングルアーム試験を承認申請資料とすることで合意した。平成26年1月より全国11施設で治験を開始予定である。治験の対象である再発・難治例の国内患者数は約100～200名と著しく少ない。同治験を成功させるため、本研究班から被験者候補を集める支援を予定している。

添付資料：

1. 治験実施施設一覧
2. 治験実施計画書（概要版）

# 治験施設

慶應義塾大学病院(事務局)

奈良県立医科大学附属病院

札幌北榆病院

近畿大学医学部奈良病院

群馬大学医学部附属病院

兵庫医科大学病院

金沢大学附属病院

倉敷中央病院

関西医科大学附属枚方病院

広島大学病院

三重大学病院

## 治験実施計画骨子（案）

### 1 治験課題名

血栓性血小板減少性紫斑病（thrombotic thrombocytopenic purpura、以下 TTP）に対するリツキシマブの医師主導治験

### 2 治験の目的

再発又は難治性の TTP 患者を対象として、リツキシマブの有効性と安全性を検討する。

### 3 対象

#### 3.1 対象

再発又は難治性の TTP 患者

#### 3.2 選択基準

以下の選択基準をすべて満たす患者。

- (1) 血液凝固異常症に関する調査研究班（厚生労働省）の診断ガイドライン（案）に基づき確定例又は疑い例と診断された日本人の後天性 TTP 患者。
- (2) 特発性 TTP のみを対象とする。薬剤、造血幹細胞移植、臓器移植、膠原病、がん、妊娠に伴う続発性 TTP は除外する。

#### 【診断ガイドライン（案）】

- ①確定例: ADAMTS13 活性<5%かつ ADAMTS13 インヒビター陽性、又は ADAMTS13 活性にかかわらず 5 徴候\*すべてを認める。
  - ②疑い例: ADAMTS13 活性にかかわらず 5 徴候\*のうち血小板減少と細血管障害性溶血性貧血を認める。
- \*: 血小板減少、細血管障害性溶血性貧血（破碎赤血球の出現を伴う溶血性貧血）、腎機能障害、発熱、動揺性精神神経症状
- (3) 20 歳以上 79 歳以下の患者。
  - (4) 以下の難治例又は再発例の基準を満たす患者。

#### 1) 難治例の定義

以下の①又は②を満たす患者

- ① 血漿交換を 5 回以上施行しても血小板数が 5 万/ $\mu$ L を超えない。
- ② ADAMTS13 インヒビターが 2 bethesda unit (BU)/mL 以上

#### 2) 再発例の定義

- ① 前回の発症から少なくとも 30 日以上経過して再発した患者

- (5) 本治験への参加について、本人又は代諾者から文書同意が得られた患者。

### 3.3 除外基準

以下の除外基準に1つでも該当する患者は対象から除外する。

- (1) 薬剤性、膠原病、造血幹細胞移植、臓器移植、妊娠が原因と考えられる TTP
- (2) HIV 抗体を有することが判明している患者
- (3) HBs 抗原、HBs 抗体、HBc 抗体及び HCV 抗体の1つ以上で陽性が確認された患者  
(ただし、B 型肝炎検査が陽性の場合で、ワクチン接種によることが明らかな場合は、本規定による除外の対象とはしない。)
- (4) 悪性腫瘍に罹患している患者
- (5) 重大な疾患を合併している患者
- (6) 過去にリツキシマブの投与を受けた患者
- (7) 治験期間中、避妊することに同意が得られない男性患者又は妊娠を希望する女性患者
- (8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性患者
- (9) 同意取得前 12 週以内に他の治験に参加し、治験薬の投与を受けた患者
- (10) その他、治験責任（分担）医師が本治験の対象として不適格であると判断した患者

## 4 治験のデザイン

非対照、オープンラベル、多施設共同試験

## 5 治験薬、投与量及び投与方法

### 5.1 治験薬の名称

名称 : IDEC-C2B8  
一般名 : リツキシマブ（遺伝子組換え）  
剤形及び含量 :

1 バイアル（10mL）中にリツキシマブを 100mg/10mL を含有する注射剤。

1 バイアル（50mL）中にリツキシマブを 500mg/50mL を含有する注射剤。

### 5.2 投与量、投与方法及び投与期間

観察期間中に測定した各被験者の身長及び体重に基づき、治験薬 375 mg/m<sup>2</sup> 体表面積を登録当日、7 日後、14 日後、21 日後に点滴静注する。治験薬は用時生理食塩液又は 5%ブドウ糖注射液にて 10 倍に希釈調整して使用する。

また、治験薬の輸注に伴う infusion reaction の予防目的として、治験薬の各投与 30 分前にアセトアミノフェン 500mg とジフェンヒドラミン 30mg を内服する。経口投与が不可能な場合、又は治験責任（分担）医師の判断でヒドロコルチゾン 50mg を静注する。

## 6 併用薬剤・療法

### 6.1 併用禁止薬剤・療法

以下に示す薬剤・療法は、治験期間を通じて併用を禁止する。

- (1) 血小板輸血（但し、致死的な出血を合併した場合は、治験責任医師の判断で血小板輸血を可能とする）
- (2) シクロホスファミド
- (3) ビンクリスチン、ビンブラスチンなどのビンカルカロイド製剤
- (4) シクロスポリン
- (5) 脾臓摘出術

### 6.2 併用可能薬剤・療法

- (1) 血漿交換療法（施設の治療基準を優先するが、参考として最初は血小板数が5万/ $\mu$ Lを超えるまで連続して行い、以後は血小板数が2日間連続して15万/ $\mu$ Lを超えるまで隔日で行う。血漿交換に用いる新鮮凍結血漿の用量は、最初の3日間は循環血漿量の1.5倍、4日目以降は同1倍を目安とする。抗凝固薬はメシル酸ナファモスタットを用いる）。血小板が2日間連続して15万/ $\mu$ Lを超えた後は、血漿交換を中止してよい。
- (2) ステロイドパルス療法（メチルプレドニゾン1,000mg/日を3日間）を併用する。ステロイドパルス療法後のプレドニゾン後療法は、プレドニゾン1mg/kg/日を2週間内服、その後1週間毎に10mg減量。10mgから1週間毎に1mgずつ減量し中止を目標とする。なお、ステロイドパルス療法の忍容性に問題がありプレドニゾン1mg/kg/日を開始した場合、同用量を2~4週間継続し、治療経過に応じて適宜減量し中止を目指す。
- (3) 赤血球輸血

## 7 評価項目

### 7.1 有効性評価項目

#### (1) 主要評価項目

治験薬投与開始4週後（後観察期間）に以下の全てを満たした場合に有効と判定する。

- 1) 血小板数の正常化：15万/ $\mu$ L以上（又は施設正常値の下限を上回る）
- 2) 血漿交換の中止：血小板数が2日間連続して $\geq$ 15万/ $\mu$ Lに達し、血漿交換を中止した場合
- 3) 臨床症状の改善：貧血の改善（血清ヘモグロビン値の正常化又は2g/dL以上の改善）、精神神経症状（Coma（昏睡）スケールの軽減）

(2) 副次評価項目

- 1) 血中 B 細胞 (CD20 陽性細胞、CD19 陽性細胞)、T 細胞 (CD3 陽性細胞) の推移
- 2) 血小板数のベースラインからの変化率 (%)
- 3) 血小板数の正常化: 15 万/ $\mu$ L 以上 (又は施設正常値の下限を上回る)
- 4) 血漿交換の中止: 血小板数が 2 日間連続して  $\geq$ 15 万/ $\mu$ L に達し、血漿交換を中止した場合
- 5) 臨床症状の改善: 貧血の改善 (血清ヘモグロビン値の正常化又は 2 g/dL 以上の改善)、精神神経症状 (Coma (昏睡) スケールの軽減)

7.2 安全性評価項目

有害事象及び副作用

7.3 探索的評価項目

- 1) 治療に要した血漿交換療法の回数
- 2) 初回の血漿交換から血小板数が 15 万/ $\mu$ L 以上 (又は施設正常値の下限を上回る) に至るまでの治療日数
- 3) 血中 IgG、IgM、IgA の推移
- 4) 治療に要した新鮮凍結血漿の用量 (入院時の体重 Kg あたり)
- 5) ADAMTS13 インヒビター力価
- 6) ADAMTS13 活性

8 目標症例数

評価可能症例として 6 例

9 治験実施期間

2014 年 1 月～2015 年 1 月 (登録期限: 2014 年 12 月を予定)



10 検査・観察スケジュール

観察項目	前観察期間		治療期間				後観察期間	中止時
	—	1	2	3	4	5	6	
Visit	—	1	2	3	4	5	6	
(週)	—	-1	0	1	2	3	4	
来院許容範囲 (日)	—	+7	0	±1	±1	±1	±2	
同意取得	●							
登録			●					
選択/除外基準確認	●		●					
既往歴・合併症		●						
前治療薬		●						
一般症状 (ECOG)		●						
身長・体重測定		●						
身体的検査		●						
バイタルサイン		●		●	●	●	●	●
意識障害の評価 (Coma Scale)		●		●	●	●	●	●
血液学的検査		●		●	●	●	●	●
血液生化学的検査		●		●	●	●	●	●
ADAMTS13 検査		●		●	●	●	●	●
免疫学的検査		●					●	●
尿検査		●		●	●	●	●	●
心電図検査		●						
妊娠検査		●						
併用薬・併用療法		●	●	●	●	●	●	●
治験薬投与			●	●	●	●		
有害事象				←—————→				

## 「H23-25 年度の研究報告」 TMA 診断ならびに診断マーカーの検討

三重大学医学系研究科 検査医学 和田英夫

国立循環器病センター研究所 分子病態部 宮田敏行

奈良県立医大輸血部 藤村吉博

血栓性微小血管障害 (TMA) には、志賀トキシン産生出血性病原性大腸菌 (STEC) による溶血性尿毒症症候群 (STEC-HUS)、先天性ならびに後天性の ADAMTS13 著減性の TMA (A-TMA)、非 ADAMTS13 著減性 TMA (NA-TMA)、非定型性 HUS (aHUS) に分けられる。A-TMA を血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) とする考え方もあるが、NA-TMA がすべて aHUS に分類するのは問題がある。そこで、TMA の診断法について以下の検討を行った。

### 1) TMA に共通して異常を呈するもの

#### a) von Willebrand factor propeptide (VWFpp)

血管内皮細胞障害を反映し、TMA ならびに DIC でも著増した。

#### b) 血小板膜糖蛋白 VI (GPVI)

血小板活性化を示すマーカーであり、TMA や DIC などの血栓性疾患で増加した。

### 2) A-TMA に起因するもの

#### a) ADAMTS13

A-TMA では著しく低下し、NA-TMA や TMA 関連疾患でも相対的に低下した。

### 3) NA-TMA に起因するもの

#### a) C5b-9

EDTA 採血に比べて、血清検体や凍結融解を繰り返した検体では、高値を示した。aHUS 症例で増加を示さなかった。

#### b) 遺伝子診断

現在 aHUS10 家系を同定し、そのうち 6 家系で遺伝子検査を行った。幾つかの変異が同定されたが、特筆すべきことは、全家系で C3 p.I1157T mutation が認められた。

## USS 患者の ADAMTS13 遺伝子解析における次世代シーケンサーの利用

国立循環器病研究センター・分子病態部

小亀浩市・樋口(江浦)由佳・宮田敏行

ADAMTS13 は von Willebrand 因子を特異的に切断する血漿プロテアーゼである。ADAMTS13 遺伝子異常や自己抗体の出現などによる ADAMTS13 活性の著減は、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、USS 患者の遺伝子解析において次世代シーケンサーを利用した経過を報告する。

我々は奈良医大・輸血部と共同で、USS が強く疑われた 49 患者に対してダイレクト・シーケンシング法を実施し、46 患者に複合ヘテロあるいはホモ接合性の原因変異を同定した。残り 3 患者 (3 家系) のうち 2 患者にはそれぞれヘテロ接合性のミスセンス変異を同定した。さらに本年度は定量 PCR による相対的コピー数分析を実施し、その 2 患者に 1,782 bp あるいは 729 bp の欠失変異を見出した [Mol Genet Genomic Med, in press]。残る 1 患者では、ダイレクト・シーケンシング法でも定量 PCR 法でも遺伝子異常は見られなかった。いずれの方法もエクソン領域を対象を絞った解析であるため、イントロン等に変異が伏在している可能性がある。そこで今回、次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ) を利用し、プロモーターやイントロンを含む ADAMTS13 遺伝子全体の塩基配列を解析した。陽性対照試料を含めても解析対象者が少数であることや、解析範囲が約 45 kbp で比較的小さいこと、両アレルとも ADAMTS13 遺伝子全体を漏れなく解析したいことなどを考慮し、複数のロングレンジ PCR 産物を MiSeq に供する方法を選択して実施した。ダイレクト・シーケンシング法でも定量 PCR 法でも異常が見られなかった患者では、予想通り、次世代シーケンサーでも全エクソン領域に異常は認められなかった。現在、イントロン領域の分析を進めているところである。

## 当院における後天性TTPの治療経験

倉敷中央病院 血液内科 血液治療センター 外来化学療法センター

上田恭典

当院で2003年1月から、2012年12月まで10年間に経験した血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)について検討した。

【方法】ADAMTS13活性が10%以下で抗体価が0.5BU/ml以上、もしくはクームス試験陰性の自己免疫性溶血性貧血と血小板減少を呈しTTPの5徴のうち4徴以上を呈する症例をTTPと診断、移植後TMA、溶血性尿毒症症候群は除外した。血漿交換(PE)は診断後速やかに開始し、免疫抑制療法(IS)としてPrednisolone(PSL)1mg/kgを併用した。1-1.5循環血漿量のPEを連日行い、原則としてPlt10-15万/ $\mu$ l前後へ回復した後に最低2日程度は継続しその後中止もしくは間隔をあけて終了した。早期に再燃を認めた場合はPEにbolus Cyclophosphamide(CPM) (10-15mg/kg, 1 day)もしくはbolus mPSL(0.5 g or 1g/day 3days)を追加、無効例にはRituximab(375mg/m<sup>2</sup> 4回)投与を行った。ADAMTS13の測定は奈良県立医科大学輸血部で行われた。

【結果】ADAMTS13関連は21例中17例で、うち活性5%以上10%以下の症例は1例のみで、その抗体価は1.3BU/mlであった。PEは20例(1例は早期死亡)に施行、15例でPSLが併用された。入院後からPE開始までの期間中央値2日(1-11日)で、PE回数中央値は6.5回(1-22回)であった。TTPによる死亡は2例で、生存期間は1-2日、ともに来院時すでに全身状態不良で十分な治療が行えなかった。治療中の再燃(boosting)は9例で、PEと追加ISにて全例PEから離脱可能であった。追加ISは8例にCPMが含まれ、2例ではRituximab追加を要した。IS終了後の再発は3例で、IS終了後から再発までの期間中央値646日(281-672日)であった。

【結論】原因不明の血小板減少に遭遇した場合の早期の診断とIS併用下でのPEが必要であるが、しばしばboostingを生じる。その場合はISの強化が重要である。

また最近、boostingを生じたためRituximabを開始、一旦血小板数は上昇したものの、PEとRituximab継続中に再燃、CPMの追加にてようやく軽快した例を経験したので、あわせて報告する。

## 後天性 TTP における抗 ADAMTS13 自己抗体の定量的測定

慶應義塾大学医学部臨床検査医学 猪狩敦子

慶應義塾大学保健管理センター 森木隆典

後天性 TTP の病態生理に強く関連する抗 ADAMTS13 自己抗体を定量することは、TTP の診断のみならず、予後や治療効果の判定に有用であると考えられる。そこで我々は無細胞蛋白質発現系を用いてアイソトープ標識した ADAMTS13 抗原を合成し、免疫沈降法により後天性 TTP 患者に存在する抗 ADAMTS13 自己抗体の定量を試みることにした。

初年度の 23 年度は無細胞蛋白質発現系で一般的に使用されるウサギ網赤血球由来の発現系を使用し、<sup>35</sup>S メチオニン標識 ADAMTS13 抗原を作製した。作製した抗原を抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体により免疫沈降したところ、抗体濃度依存的に免疫複合体を回収することができた。そこで、後天性 TTP 患者由来精製 IgG および患者血漿を用いて本測定系による抗 ADAMTS13 自己抗体の定量を試みたところ、IgG サンプルでは健常人コントロールより高い抗体価を示す測定値が得られたが、血漿サンプルでは測定感度が低下し有用なデータが得られなかった。

24 年度は測定感度を上昇させる目的で、ウサギ網赤血球系よりも合成効率が高く、収量の増加が期待できるヒト由来細胞株抽出液を用いた無細胞蛋白質発現系を使用し ADAMTS13 全長、MDTCS、T2-8/CUB の 3 種類の <sup>35</sup>S メチオニン標識抗原を作製した。TTP 患者初診時血漿 5 名について本アッセイ系により抗 ADAMTS13 自己抗体を定量したところ ADAMTS13 全長および MDTCS 抗体では全て、T2-8/CUB 抗体では 5 名中 4 名の測定値が健常人コントロールの平均値 2SD より高い測定値を示した。次いで治療経過中に血漿を採取した 1 例の TTP 患者において、初診時・血漿交換治療後・リツキサン投与後の各血漿中の抗 ADAMTS13 自己抗体を定量したところ、リツキサン投与後に減少を示す結果が得られた。以上より、ヒト由来細胞株抽出液を用いた無細胞蛋白質発現系は有用であると判断した。

25 年度は RI 標識抗原を ADAMTS13 全長・MDT・CS・T2-8・CUB と、さらに細分化して作製し、経時的にサンプル採取した 1 例の TTP 患者血漿中の抗 ADAMTS13 自己抗体の定量を試みた。血漿交換後の測定値を初診時と比較すると抗 MDT 抗体は著減したが、抗 CS 抗体は半分程度残存、抗 T2-8 抗体と抗 CUB 抗体はほとんど減少しなかった。リツキサン投与後には、抗 MDT 抗体はさらに減少し、抗 T2-8 抗体と抗 CUB 抗体は初診時の 1/2 から 1/3 程度まで減少したが、抗 CS 抗体の減少は軽度にとどまった。以上より本患者の CS 領域の自己抗体は、血漿交換およびリツキサン投与に抵抗性を示す可能性が示唆された。

今回の結果より、ヒト由来細胞株抽出液を用いた無細胞蛋白質発現系により合成した RI 標識抗原 (ADAMTS13 全長・MDT・CS・T2-8・CUB) を用いて、後天性 TTP 自己抗体を定量することは臨床的な意義を有する可能性があり、今後サンプル数を増やして解析したいと考えている。

## 日本人血栓症患者における血栓性素因の調査研究

名古屋大学大学院医学系研究科 小嶋哲人

【はじめに】我々はこれまで先天性血栓性素因の原因となるアンチトロンビン(AT) プロテイン C (PC)、プロテイン S (PS) 欠損症の遺伝子異常解析、さらに新たな先天性血栓性素因のアンチトロンビンレジスタンスの原因遺伝子異常としてプロトロンビン異常症を報告してきた。今回、本研究班の3年間にそれぞれAT欠損症11家系、PC欠損症11家系、PS欠損症10家系の遺伝子解析を行ったので報告する。

【方法】各症例のゲノム遺伝子を用い、それぞれ *SERPINC1*、*PROC*、あるいは *PROS1* の全エクソンをそのイントロンとの境界領域を含めて PCR 増幅後、直接シーケンス法により塩基配列を解析した。さらに、遺伝子変異を同定されなかった症例では MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) 法にて遺伝子欠失の解析を行った。なお、本研究は名古屋大学医学部倫理委員会の承認のもとに行った。

【結果および考察】各エクソン PCR 産物のダイレクトシーケンス法では AT 欠損症 11 家系中 8 家系 (73%) に、PC 欠損症 11 家系中 5 家系 (45%) に、PS 欠損症 10 家系中 2 家系 (20%) にそれぞれ原因と思われる遺伝子変異を同定した。また、MLPA 法にて遺伝子欠失解析を行った症例には現在のところ遺伝子欠失の同定症例はなく、現在も解析を継続中である。なお、1 家系において、当初すでにワルファリン治療中の父親が PS 欠損症を疑われた (PT-INR 2.1, PC 活性 40%、PS 活性 16%) が、*PROS1* 遺伝子配列解析に異常がなく、10 年後にその家族の解析から *PROC* 遺伝子変異が同定された家族を経験した。なお、同家系での *PROS1* 遺伝子の異常は未だ同定に至っていない。

【結論】特発性血栓症を発症し AT 欠損症、PC 欠損症、PS 欠損症の疑われた症例家系において、それぞれ *SERPINC1*、*PROC*、あるいは *PROS1* 遺伝子解析を行った結果、合計 31 家系中 15 家系 (48%) に遺伝子変異を同定した。また、これらの症例のうち 1 家系では当初 PS 欠損症を疑われたが、*PROC* 遺伝子変異が同定され、PS、PC の合併欠損症家系であることが示唆された。

## 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の

### 有効性と安全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

背景：本邦における静脈血栓塞栓症に対する抗凝固療法の現状と問題点を把握するために、本研究班において全国の臨床研修医療機関を対象とした「静脈血栓塞栓症に対するワルファリン療法に関する全国実態個別調査」を実施した。その結果、静脈血栓塞栓症予防ガイドラインに準拠した用量調節ワルファリン療法が実施されているにも関わらず、出血合併症 (2.4%) や血栓症再発 (1.1%) がみられた。これらのことは、医療機関受診時と実際のイベント発症時の PT-INR 値が乖離していたためか、血栓症再発予防に対するワルファリンの用量設定が適切でないことを示唆する。

目的：本臨床研究 (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、PT-INR の自己測定を導入により特発性血栓症/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を確立することを主たる目的とした。

方法：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、コアグチェック XS による PT-INR の自己測定を 1 回/週の頻度で PT-INR 自己測定群と中央検査部のみで PT-INR 測定する対照群に分けて、それぞれ 6 ヶ月間ずつ実施するクロスオーバー研究とし、1) PT-INR 自己測定の安全性、2) PT-INR 自己測定値と医療機関での測定値との乖離の有無、3) PT-INR 自己測定による出血および血栓症合併症の発症をした。

結果：登録症例は 17 例で、離脱 2 例を除く 15 例 (男/女=5 例/10 例、年齢  $44.4 \pm 11.2$  歳) を解析した。1) 自己測定 PT-INR 値と医療機関測定 PT-INR 値との間には  $y=0.940x+0.141$ 、 $r^2=0.893$ 、 $p<0.001$ 、Bland-Altman プロットによる両測定値の差が  $-0.08 \pm 0.28$  と極めて良好な相関関係が認められた。2) 自己測定実施期間 ( $273.7 \pm 91.5$  日) において、手技に伴う合併症や出血性合併症および血栓症の再発はみられなかった。

結語：ワルファリン療法における PT-INR 自己測定の導入は、安全で有効な手法であることを明らかにした。本臨床研究をさらに展開すべく、静脈血栓塞栓症等を合併しワルファリン療法を施行されている血液透析患者を対象に、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進めている (自治医科大学倫理委員会申請中)。

## 平成23—25年度のまとめ

川崎 富夫：厚生会第一病院

### 1. 大阪大学病院肺塞栓症予防ガイドライン（阪大ガイドライン）

予防戦略の意義と実施結果

### 2. ガイドラインと裁判

医療と司法の架橋研究会

大阪地判平 21・9・29 判決, 川崎富夫評釈, 年報医事法学 26, 2011

### 3. 止血関連研究

血漿の凍結・融解が凝固因子の安定性に与える影響

竹尾映美、末久悦次、徳 雅幸、林 貞夫、日高 洋：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 第 14 回日本検査血液学会学術集会 学術賞受賞講演、平成 25 年 7 月 27 日-28 日 東京

竹尾映美、末久悦次、川崎富夫、徳 雅幸、林 貞夫、日高 洋：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. 日本検査血液学会雑誌 第 14 巻第 1 号 2013 年

経口抗凝固薬であるダビガトラン

岸可那子、末久悦次、徳 雅幸、竹尾映美、日高 洋：ダビガトラン服用患者における PT, APTT の測定値について 第 13 回日本検査血液学会学術集会、平成 24 年 7 月 28 日 高槻



## 日本人の血栓性遺伝素因を持つモデルマウスの樹立と解析

宮田敏行、坂野史明

国立循環器病研究センター分子病態部

血液凝固、線溶やその制御に関わる因子の先天的異常は血栓症のリスクとなるが、原因となる遺伝子変異は人種間で異なる。白人では凝固第 V 因子 (FV) R506Q 変異 (マウスでは R504Q 変異) が血栓症の遺伝的背景となっており、変異を保有するモデルマウスも確立されているが、この変異は日本人には存在しない。日本人には凝固制御因子プロテイン S (PS) の K196E 変異が約 55 人に 1 人に認められ、静脈血栓症発症に対してオッズ比 3.7~8.6 を示す。私達は、日本人の血栓性遺伝素因を持つモデルマウスとして、PS-K196E 変異のノックインマウスを樹立し、次の手法を用いて血栓能を評価した。本研究により、Factor V Leiden マウスと比較することにより、日本人と白人の血栓性素因を比較することが可能となった。この結果を紹介する。

- 1) 急性肺塞栓モデル：組織因子または内因系凝固活性化因子である長鎖無機ポリリン酸投与後の肺塞栓症状
- 2) 深部静脈血栓症モデル：ステンレス電極の電気分解で生じるフリーラジカルにより下大静脈内皮細胞を活性化する深部静脈血栓の大きさを評価
- 3) 脳虚血再灌流モデル実験：両側総頸動脈と一側中大脳動脈を閉塞して一過性局所脳虚血を惹起し再灌流 24 時間後の脳梗塞を評価

## 多発性骨髄腫治療薬 Bortezomib (BOR) が巨核球分化に与える影響の解析

特発性血栓症サブグループ 慶應義塾大学医学部内科 横山 健次

[背景] Proteasome 阻害薬 (PSI) である BOR は多発性骨髄腫治療に重要な役割を果たしている。本薬剤投与患者では投与後早期に血小板数が低下することが知られているが、その機序は解明できていない。血小板における proteasome の役割を検討した報告は限られているが、最近血小板 proteasome は血小板の細胞寿命の調節に関与しており、PSI 投与により apoptosis 関連因子 Bax の発現が亢進して、血小板寿命が短縮することが報告された (Nayak MK, et al. J Biol Chem 2013)。一方で Bax ノックアウトマウスでは血小板寿命が延長して血小板数が増加すること、抗癌剤投与後の血小板回復が早くなること、などが報告されている (Joseffson EC, et al. J Exp Med 2011)。また PSI が巨核芽球性白血病細胞株の apoptosis をおこすことは報告されているが (Galimberti S, et al. Leuk Res 2008)、PSI が正常巨核球に与える影響を解析した報告はない。BOR が巨核球に与える影響を解析することを目的として本研究を行なった。[方法] BOR 存在下 (20nM) および非存在下で既報の方法に従って脂肪前駆細胞を巨核球に分化、血小板産生を誘導して、BOR が巨核球分化に与える影響を CD41 陽性細胞レベル評価により解析した。

[結果] BOR (20nM) 存在下では 10% および 15% の細胞が巨核球系細胞に分化した。非存在下では 10% の細胞が巨核球系細胞に分化した。血小板産生効率にも差はみられなかった。

[考案] 今回の実験系では、BOR は巨核球分化、血小板産生には影響を与えなかった。

従来報告および我々の今までの検討から BOR は血小板機能に何らかの影響を与えると考えられる。今回の検討では産生された血小板数が少なく、血小板機能の解析は行えていない。今後 BOR 存在下で産生された血小板が非存在下で産生された血小板と質的にどのような差がみられるのか、その差が血小板減少、機能低下にどのように関連するのか検討することを考慮している。また今回は脂肪前駆細胞を使用した検討であり、骨髓造血幹細胞からの巨核球分化に与える BOR の影響も同様であるか、も検討する必要がある。

なお本研究は慶應義塾大学医学部発生分化学松原由美子博士と共同で行った。

## 『肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究

### －肺血栓塞栓症治療の現状と変遷－』

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

【背景および目的】 これまでに本研究班々会議において、全国の医療機関に対して行ったアンケート調査をもとに肺血栓塞栓症 (PTE) および深部静脈血栓症 (DVT) の発症頻度、背景となるリスク等報告してきた。引き続き今回は PTE に対する治療に焦点をあてて評価することを目的とし検討を行った。

【方法】 日本国内の入院病床を有するすべての医療機関 9383 施設に対し、平成 23 年 11 月から 12 月の 2 か月間で発症した静脈血栓塞栓症 (VTE) について調査したアンケートを後ろ向きに解析した。

【結果】 9383 施設にアンケートを送付し 2722 施設 (29.0%) から回答をいただいた。VTE は 1964 例 (PTE: 778 例, DVT: 1186 例) 発症しており、全国での年間発症数に換算すると 40634 例 (PTE: 16096 例, DVT: 24538 例) であった。PTE では、92.5% で抗凝固療法が施行されており、血栓溶解療法は 14.0% で施行されていた。血栓溶解療法施行頻度は、発症時心停止例の 33.3%、広範型の 23.4%、亜広範型の 17.8%、非広範型の 8.2% であり、重症ほど高い傾向がみられた。下大静脈フィルターは 29.4% で使用されており (永久型: 46.6%、回収可能型: 30.1%、一時留置型: 23.3%)、近位下肢静脈に血栓を有する症例 (62.1%) の 38.9% に使用されていたのに対し、それ以外では 17.3% で両群間には有意差が認められた ( $p < 0.0001$ )。2006 年に行われた調査と比較したところ抗凝固療法施行頻度には差を認めない (2011 年: 92.4% vs 2006 年: 92.5%,  $p = n.s$ ) が血栓溶解療法施行頻度は有意に減少しており (14.0% vs 27.4%,  $p < 0.0001$ )、下大静脈フィルター使用頻度も減少していた (30.3% vs 37.7%,  $p < 0.05$ )。【結語】 PTE の治療において抗凝固療法は高率に施行されていた。血栓溶解療法は重症例において施行され、下大静脈フィルターは近位下肢静脈に血栓が残存している症例で使用される頻度が高いことが示された。また、5 年前と比較し抗凝固療法の施行頻度は変わらないが、血栓溶解療法および下大静脈フィルターの使用は減少していることが示された。

## 女性ホルモン剤と血栓症に関する全国調査研究

### 最近10年間における女性ホルモン剤使用による静脈血栓症及び動脈血栓症の後方視的研究

研究分担者： 浜松医療センター 院長 小林 隆夫  
研究協力者： 浜松医科大学健康社会医学講座教授 尾島 俊之  
浜松医科大学健康社会医学講座 杉浦 和子

【目的】日本人には血栓性素因としてのプロテイン S 異常症（徳島変異は日本人 55 人に 1 人と推定）が多く、女性ホルモン剤使用中に血栓症を発症することがある。また、この 10 年間で女性ホルモンの処方の種類が増えさらに処方数が増えていること、そして 2007 年には女性ホルモン剤の一部は月経困難症の保険適用を取得し、ここ数年で処方量が増加し女性ホルモン剤投与中の血栓症は今世紀に入って増加していると予測できる。本研究目的は、日本における 2003 年以降現在までの約 10 年間における女性ホルモン剤使用中に発症した静脈血栓症及び動脈血栓症の発症頻度とその記述疫学像を明らかにし、もって安全な女性ホルモン剤使用に資することである。

【方法】研究対象は以下の 3 つの条件の全てに当てはまる症例である。すなわち、①2003 年から調査時点までの発症、②女性ホルモン剤使用中の発症、③静脈血栓症例（肺血栓塞栓症、深部静脈血栓症、その他の静脈血栓症）または動脈血栓症例（脳梗塞、心筋梗塞、その他の動脈血栓症）（疑い症例を含む）。浜松医療センターおよび浜松医科大学の倫理委員会の承認を得た後に、郵送法により、一次調査（全体票）及び二次調査（個人票）を行う。具体的には、まず全国の入院病床を有する一般病院施設に一次調査を実施し、上記の選択基準に合致する症例数を把握する。次に、症例報告のある施設に対し、二次調査を実施し、症例毎の基本属性、発症日、処方されている女性ホルモン剤の種類及び危険因子等を把握し、解析する。

【結果】調査対象施設を 2,136 施設に絞り込み、最終的に 9,318 診療科を抽出し（産婦人科、内科、外科、循環器内科、循環器外科、心臓血管外科または血管外科、呼吸器内科、呼吸器外科、脳神経外科、神経内科、救急科または救命救急センター等）、一次調査票を送付した。2013 年 12 月 31 日現在、3,983 診療科から回答が得られ、現時点での回答率は 42.7% (3,983/9,318) となっている。次に、血栓症の「症例あり」との回答が得られた施設・診療科に対して順次二次調査票を発送しているが、2014 年 1 月 1 日現在、依頼した 487 診療科のうち 251 診療科から回答を得ており、現時点での回答率は 51.5% (251/487) である。なお、血栓症の「症例あり」の診療科は、一次調査回答診療科の 12.2% (487/3,983) に当たる。今後二次調査票の再依頼を行い、最終的に得られた調査結果を解析する予定である。