

TTP サブグループ

研究分担者 藤村 吉博 奈良県立医科大学
和田 英夫 三重大学
小亀 浩市 国立循環器病研究センター

研究協力者 森木 隆典 慶応義塾大学
日笠 聡 兵庫医科大学
上田 恭典 倉敷中央病院
宮田 敏行 国立循環器病研究センター
宮川 義隆 慶応義塾大学
松本 雅則 奈良県立医科大学

総括目標：TTP (TMA) の病態解析と治療法の開発を基礎と臨床の両面から行う。

平成24年度は以下の活動を行う計画であるが、特にリツキサンのTTPへの適応拡大とADAMTS13検査の保険承認取得に向けた活動を重点的に行う予定である。

藤村吉博（松本雅則）

- 1) 奈良医大輸血部 TMA データベースの個別解析（継続）
- 2) 抗 ADAMTS13 抗体の boosting に関する解析とリツキシマブの使用症例の解析
- 3) ADAMTS13 検査の保険適応取得

和田英夫

- 1) 可溶性血小板糖蛋白VI (GPVI) (血小板マーカー)、VWFpp (血管内皮マーカー)、SF (凝固マーカー) を用いたTTPとDICなどの鑑別診断の検討
- 2) 三重大学病院の TMA 症例、特に移植後 TMA の解析

小亀浩市（宮田敏行）

- 1) Upshaw-Schulman症候群患者の遺伝子解析
- 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

森木隆典

RI 標識免疫沈降法による ADAMTS13 自己抗体の定量アッセイ系に関する基礎検討

日笠聡

新規TMA患者の集積

上田恭典

TTP患者集積と、リツキサンのTTPへの適応拡大

宮川義隆

リツキサンのTTPへの適応拡大

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 診療に関して従来の班研究を継続、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 の用語の標準化やガイドラインが作成されており、これらとの整合性につい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ついても検討する（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。

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。

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 of 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。

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。

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 O157 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 万/ μ 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 μ 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 μ 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られ、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。

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 の予知が可能であるかどうか検討する。【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。

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

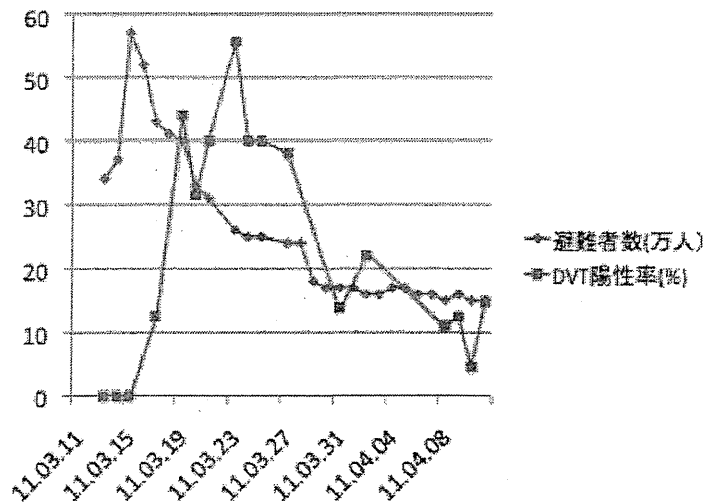
2011 年 3 月 19 日～2012 年 3 月 18 日まで東日本大震災被災地避難所に赴き、エコー検査と血液検査を行った (表 1)。震災 2 週間以内では激甚津波被害の宮城県沿岸部で 30-50% の高い DVT 陽性率を認めたが、宮城県沿岸地域の被災者が避難した内陸部の避難所では 10-15% であった。したがって大きな震災・津波直後ではできるだけ震源地・被災地を離れて避難した方がよいものと考えられ、被災地を封鎖して避難させるなどの措置も今後必要と思われた。

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 倍発生が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。

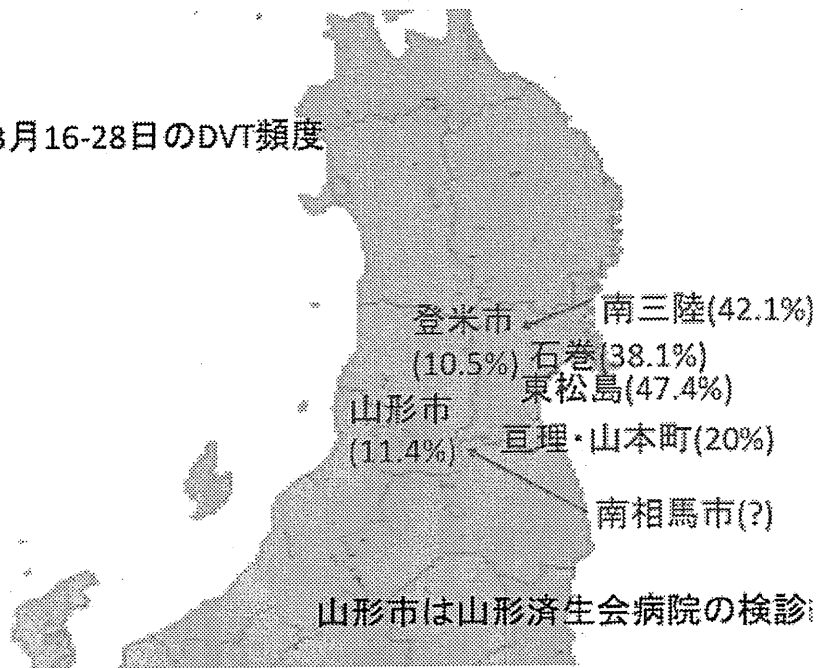
表1 検査を行った期日と場所 (DVT 陽性率)

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%)

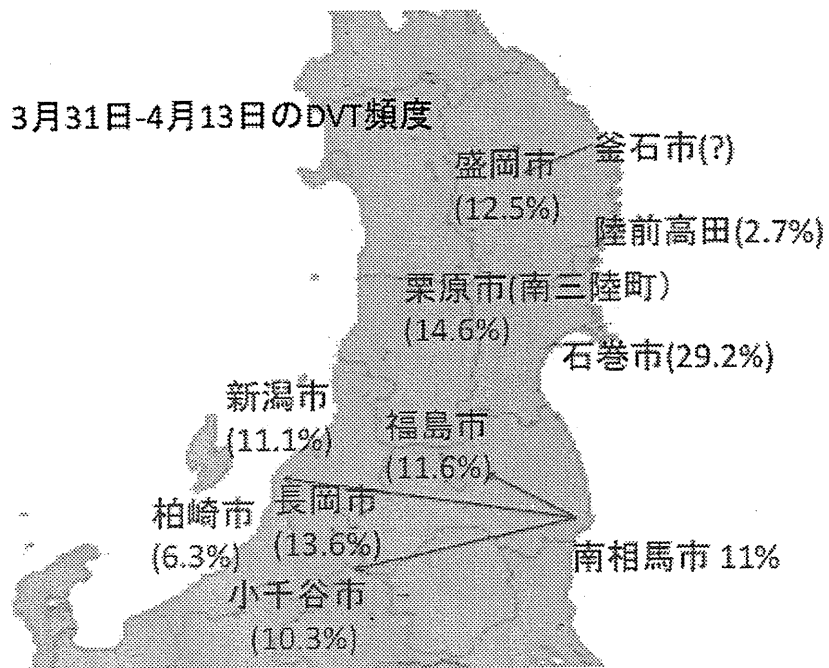
図1. 東日本大震災の避難者数と避難所のDVT陽性率推移



3月16-28日のDVT頻度



3月31日-4月13日のDVT頻度



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。

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、コーンプレート型ず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。

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。

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 FRET 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 sGPVI 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。

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、標的遺伝子の各エキソンを 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、各エキソンの外側に Forward および Reverse 方向の PCR プライマーを設計し、検体 DNA から各エキ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 (TGTA AACGACGGCCAGT) を各エキソン用 Forward プライマー 5' 端に、M13Rev 配列 (CAGGAAACAGCTATGACC) を各エキソン用 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。

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があると思われる.

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