

和田英夫、波部幸司 (三重大学血栓・止血異常症診療センター)

DIC 患者における 血漿中 ADAMTS13, Von Willebrand Factor (VWF) ならびに VWF Propeptide の動態

Plasma ADAMTS13, Von Willebrand Factor (VWF) and VWF Propeptide Profiles in Patients with DIC

ADAMTS13, endothelial VWF and related proteins are involved in the pathogenesis of some life threatening systemic thrombotic coagulopathies. Changes of plasma ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) is well known but is also involved in septic disseminated intravascular coagulation (DIC). Here we investigated the ADAMTS13 activity, Von Willebrand factor (VWF) and VWF propeptide (VWFpp) antigens in 69 patients with DIC, 143 with non-DIC, 21 with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and 23 with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS) for diagnosis of DIC.

The plasma ADAMTS13 activity was significantly decreased in patients with DIC as well as TTP and aHUS patients. In contrast to non-DIC, TTP and aHUS patients, elevation of VWF and VWFpp antigens were observed in DIC patients. The difference in the plasma ADAMTS13, VWF and VWFpp profiles are different between DIC and non-DIC cases, and between patients with infectious and malignant diseases. Thus, VWFpp/ VWF ratio were elevated DIC patients with infectious diseases but not with malignancy. Additionally the plasma levels of VWFpp were significantly higher in non-survivors than in survivors.

These findings suggest that ADAMTS/VWF profiles may have important roles in the onset of DIC, and that ADAMTS13 and VWFpp are useful indicators for the diagnosis and prognosis of DIC.

血栓性血小板減少性紫斑病の責任遺伝子 ADAMTS13 に関する研究

国立循環器病研究センター・分子病態部

小亀浩市

ADAMTS13 は、血小板凝集過程で重要な役割を果たす von Willebrand 因子 (VWF) 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、血栓性微小血管障害症 (thrombotic microangiopathy; TMA) の一形態である血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) の要因となる。

我々はこれまで、基礎科学的見地から ADAMTS13 の作用機構などを解析し、臨床領域への貢献を目指した研究を進めてきた。特に最近の 3 年間では、ADAMTS13 結合タンパク質の探索、日本人一般住民の ADAMTS13 活性と遺伝子多型の関連分析、VWF 認識に関わる ADAMTS13-DTCS ドメインの立体構造決定などに重点を置き、成果をあげた。

今年度から始まる本研究事業の 3 年間では、以下の 4 項目を主な研究内容とする。(1) Upshaw-Schulman 症候群 (USS) 患者の遺伝子解析：新たに見出された USS 患者 (疑い患者を含む) の ADAMTS13 遺伝子を解析し、原因変異を同定する。場合によっては、ADAMTS13 以外の遺伝子を解析する可能性もある。(2) ADAMTS13 の立体構造未決定部分および変異体の構造決定：すでに結晶構造を決定した DTCS ドメイン以外の領域、すなわち、メタロプロテアーゼドメインや C 末端側ドメイン、P475S 変異型 DTCS ドメインなどの結晶構造を決定する。(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：アジア人特有の P475S 多型や、疫学的研究と培養細胞発現実験の結果に不一致がある P618A 多型を中心に、ADAMTS13 分子に対する変異の影響を調べる。(4) ADAMTS13 活性修飾物質の探索：化合物ライブラリーを利用して、ADAMTS13 の活性に強く影響を与える物質を探索し、医学的に有用有益な化合物の開発基盤を作成する。

以上の研究計画を遂行することで、ADAMTS13 に関する知見をさらに集積し、TTP あるいは TMA の診断・治療・予防に役立つ情報を発信したい

後天性 TTP 患者における ADAMTS13 機能ドメイン特異的自己抗体の定量的解析の試み

猪狩敦子¹、森木隆典²

¹ 慶應義塾大学医学部臨床検査医学, ² 慶應義塾大学保健管理センター

ADAMTS13 はマルチドメイン構造を呈するプロテアーゼであるが、後天性 TTP 患者にみられる自己抗体のエピトープはシステインリッチ・スパーサードメインを中心に、各ドメインに存在することが報告されている。近年では、市販の ELISA キットを用いて ADAMTS13 全長に結合する血中自己抗体量を測定することが可能である。

本研究では、後天性 TTP 患者において、ADAMTS13 の機能ドメイン単位に対して特異的に結合する自己抗体を、高感度に定量することができる測定系を開発することを目的とした。この測定により、TTP における自己抗体と病態との更なる詳細な関連が明らかになることを期待している。

方法としては RIA を用いた定量測定系の開発を試みた。無細胞発現系を用いて、ADAMTS13 の MDTCS 領域または T2-8/CUB 領域を ³⁵S メチオニンでラベルして発現し、2 種類の抗原を作製した。RI 標識抗原の確認のため SDS-PAGE を行ったところ、予想していた位置に単一バンドを確認することができた。RIA を用いた定量測定系の検証を行うために、エピトープが判明している抗 ADAMTS13 モノクローナル抗体を用いて 2 種類の抗原を免疫沈降させたところ、抗体濃度依存的に免疫複合体を回収することができた。次に、後天性 TTP 患者由来精製 IgG (n=12) を用いて RI 標識抗原 MDTCS または T2-8/CUB を免疫沈降し、抗原に結合した IgG を定量した。結果として、どちらの抗原に対しても、全ての TTP 患者 IgG は正常コントロール IgG と比較して、明らかに高い抗体価を示す結果が得られた。

今後は、正常人 IgG 等を用いて cut-off 値の検討を行うとともに、RI 標識抗原をさらに細かい機能ドメインごとに作製し、TTP 患者自己抗体を定量することを予定している。

インテグリン α IIb β 3 変異による遺伝性血小板減少症の病態解析

大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 柏木 浩和
大阪大学医学部附属病院輸血部 富山 佳昭

インテグリン α IIb β 3 の発現低下あるいは機能異常により出血傾向をきたす血小板無力症患者や α IIb β 3 ノックアウトマウスの検討から、 α IIb β 3 変異は血小板数や血小板形態には影響を与えないと考えられていた。しかし國島および我々は、本邦における複数の家族性 macrothrombocytopenia 症例において、 α IIb 細胞膜直下の R995W 変異を有することを見いだした。 α IIb (R995W)変異を有する血小板における α IIb β 3 発現は正常の 70%程度に低下しており、また α IIb (R995W)変異を CHO 細胞などに発現させると恒常的な α IIb β 3 活性化が認められた。興味深いことに近年になり α IIb β 3 膜周辺領域において複数の α IIb β 3 活性化変異が見いだされており、いずれも macrothrombocytopenia を示すことが報告されている。今回、我々は macrothrombocytopenia を伴う血小板無力症患者において、新たに α IIb(G991C)変異を見いだした。患者は 9 歳女児。生後 4 ヶ月時に大腿、上肢に皮下出血を繰り返したため近医受診。10 万程度の軽度血小板数減少を認めるのみであったため、それ以上の精査はなされなかった。昨年 6 月に抜歯後の止血困難、頻回の鼻出血、皮下出血斑を主訴に近医受診。血小板数の低下と血小板凝集能の著明な低下を認めたため、病態解析の依頼が当院にあった。患児血小板表面の α IIb β 3 発現は正常の 5-10%程度に低下しており、血小板無力症タイプ II であると診断したが、血小板数は 3 万程度に低下しており、また血小板サイズの増大が認められた。興味深いことに、父親は 10 万程度の血小板減少と血小板サイズの増大を認め、母親においては血小板数、形態ともに正常であった。また両親の血小板の α IIb β 3 発現はともに正常の 70%程度に低下していた。遺伝子解析の結果、患児は父親由来の α IIb(G991C)変異と母親由来の α IIb(R422X)変異の複合ヘテロ接合体であった。 α IIb(G991C)変異を 293T 細胞に発現させたところ、強い α IIb β 3 の活性化が認められた。この結果と従来の報告から膜領域近傍の α IIb β 3 活性化変異を有するヘテロ患者においては、軽度～中等度の macrothrombocytopenia をきたすこと、ホモあるいは本例のように nonsense mutation との複合ヘテロ患者においては、macrothrombocytopenia に加え α IIb β 3 の発現低下が顕著となり血小板無力症様の病態を呈すると考えられる。

今後、そのメカニズムを明らかにすることを目標に、症例における検討を進めるとともに、R995W ノックインマウスを用いた検討を行う予定である。

I T P 治療の参照ガイド作成について

広島国際大学薬学部	藤村 欣吾
慶應義塾大学医学部免疫内科	桑名 正隆
慶應義塾大学医学部血液内科	宮川 義隆
西神戸医療センター 血液免疫内科	高蓋 寿朗
四天王寺大学人文社会学部	倉田 義之
大阪大学医学部附属病院 輸血部	富山 佳昭

I T P 治療に対する治療ガイドラインは、1988年に特発性造血障害調査研究班によって「特発性血小板減少性紫斑病の治療の手引き」として発表されたのが最初である。以来副腎皮質ステロイドホルモン、摘脾が治療の主流として定着してきた。その後ヘリコバクター・ピロリ陽性 I T P 症例に対する除菌治療効果が明らかとなり、本研究班では 2004 年にピロリ除菌療法の位置づけを加えた I T P 治療ガイドライン（案）を作成した。

最近新たな作用機序を持った薬剤、トロンボポエチン受容体作動薬が治療抵抗性 I T P に対し有効性、有用性が明らかとなった。さらに昨年から今年にかけてこれら新薬や I T P の病名での除菌療法が健康保険適応となり、新たな診療ガイドが必要となってきた。

このような背景に基づき本研究班として昨年より治療ガイドライン作成に取り組み、I T P サブグループでは 3 回の会合を重ね「I T P 治療の参照ガイド(案)」として今回提案することにした。

- 特徴は
- 1) ピロリ陽性症例に対してはまずピロリ除菌を行うこと
 - 2) 以後の治療に関しては血小板数と出血症状によって開始する
 - 3) 治療目標を設定し漫然とした治療を避ける
 - 4) **First line** 治療 は副腎皮質ステロイド
Second line 治療 は脾摘
Third line 治療 は今回保健適応となったトロンボポエチン受容体作動薬を始めとした各種薬剤 を使用する
 - 5) これらの治療に対して推奨度(GRADE system による)を付記した
 - 6) 保健適応薬と未承認薬を明確にした

等が挙げられる。

モデルマウスを用いた ITP の根治的治療法の開発
○桑名正隆 西本哲也 慶應義塾大学リウマチ内科

昨年度までに、BALB/c ノードマウスに同系マウス由来 CD4⁺CD25⁺細胞を移入することで作製した 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た。そこで、今年度は ITP モデルマウスを用いて以下の課題を検討する。

1. ITP 免疫病態評価系の確立

- ① 血小板反応性 CD4⁺T 細胞の解析:血小板破碎液もしくは GPIIb/IIIa リコンビナント蛋白を抗原とした T 細胞の増殖反応、サイトカイン産生により血小板反応性 CD4⁺T 細胞を検出する。
- ② 抗血小板抗体産生を誘導する T-B 細胞協調作用の解析: CD4⁺T 細胞、B 細胞を分離し、抗原存在下の共培養で上清中に産生された抗血小板抗体を測定する。さらに、T-B 細胞協調作用に關与するサイトカインや膜蛋白を阻害することで抗血小板抗体の産生を促進する分子メカニズムを解析する。
- ③ 網内系マクロファージの機能解析:脾細胞からマクロファージを分離し、Fcγ受容体発現レベル、貪食能、T 細胞活性化能を解析する。
- ④ 血小板反応性 CD4⁺T 細胞の *in vivo* 動的解析:血小板反応性 CD4⁺T 細胞株を樹立し、個々の血小板反応性 CD4⁺T 細胞株の抗原エピトープや T 細胞受容体を決定する。また、T 細胞株をノードマウスに移植し、抗血小板抗体産生、血小板減少を誘導する病的活性の有無を確認する。

2. 新規治療法の検討

ITP モデルマウスを用いて ITP 病態を是正する根治的治療法の開発を目指す。以下の 2 つの治療戦略を検証する予定である。

- ① TPO 受容体作動薬と抗 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:副刺激遮断による自己反応性 T 細胞の免疫寛容の誘導効果は T 細胞の抗原認識時に発揮される。そこで、TPO 受容体作動薬投与で血小板を増加させ、大量の抗原をマクロファージ、T 細胞に暴露させた状態で抗 CD154 抗体を投与する。
- ② Syk 阻害薬によるマクロファージ Fcγ受容体、B 細胞受容体シグナル同時阻害: Syk はマクロファージの Fcγ受容体と B 細胞受容体に会合して正のシグナルを伝達する。そこで、Syk 阻害により網内系マクロファージ、自己反応性 B 細胞両者の機能を同時に抑制する。

特発性血小板減少性紫斑病の全国疫学調査

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. 2009年度の臨床調査個人表資料を用いての特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の疫学調査
2. 臨床調査個人表の改訂作業
 - (ア) 主な変更点とその理由
 - ① 急性、慢性の病型を廃止
 1. 急性、慢性型の診断は発症後、6カ月が経過しないと確定しない。調査表記載時点では推定でしかない
 2. 国際的にも急性、慢性型の分類が廃止され、発症後3カ月以内、3～12カ月未満、12カ月以上に分類されている
 - ② 骨髄検査を「その他、参考となる所見」欄に移動
 1. 骨髄検査における有核細胞数、巨核球数などは不正確なことが多く、この所見でITPを診断する、あるいは除外することができない
 2. MDSとの鑑別を要する高齢者のITPを除き、国際的にも骨髄検査は不要との見解である
 - ③ PAIgGを削除
 1. PAIgGは、ITP以外に血小板減少をきたす多くの疾患（再生不良性貧血、急性白血病など）で陽性となる
 2. そのためPAIgG陽性をもってITPと診断することができない
 3. 国際的にもPAIgG検査は不要とされている
 - ④ 「その他、参考となる所見」欄に、トロンボポエチン値、HBs抗原、抗HCV抗体、ピロリ菌検査を加えた
 - ⑤ 治療欄にピロリ菌除菌、トロンボポエチン受容体作動薬、血小板輸血、リツキシマブを追加
 - (イ) 認定基準の作成

今回の改訂にあたり、骨髄検査をオプションとしたこと、PAIgG検査を削除したことなどにより臨床調査個人表のどの項目によりITPと判定するか各都道府県の審査委員の方も困られると思われるので、認定基準を作成することとした。また認定基準を作成することにより全国統一的な審査基準を示すこととなり全国どの地域においても同一基準によりITPが判定されることが期待される。

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

研究協力者：宮川義隆（慶應義塾大学医学部 血液内科）

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

血液凝固異常症の調査研究班が 2004 年に発表した ITP 治療ガイドラインにおいて、リツキシマブは、セカンドライン治療として位置づけられている。リツキシマブ治療を受けた 313 名の ITP 患者を対象とした系統的レビューによれば、全奏成功率（血小板数>5 万）は 62.5%、完全寛解率（血小板数>15 万）は 46.3% と有効性が高い (Arnold et al. Ann Intern Med 2007)。英国血液学会による ITP 治療ガイドライン（2003 年）、国際 ITP 診療コンセンサス（2010 年）、米国血液学会 ITP 診療ガイドライン（2011 年）においても、リツキシマブは難治性 ITP に対してセカンドライン治療として採用されている。また、海外の代表的な教科書であるハリソン内科学においても、リツキシマブは ITP に対して効果があり、安全な治療薬として紹介されている。北米においては、公的保険も ITP に対する保険償還をしている。一方、国内においては CD20 抗原陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫に対して承認を受けているが、ITP は保険適応外である。このため、副腎皮質ステロイドと脾臓摘出術が無効で、出血症状が強い難治例に対して、保険適応外で使用されているのが実態である。保険適応外使用については、混合診療、保険病名、重篤な有害事象が生じた際の補償などの諸問題がある。そこでリツキシマブの ITP に対する適応拡大を目的に、平成 23 年度から厚生労働省治験推進研究事業として、医師主導治験「慢性特発性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの有効性と安全性の検討を目的とした第 III 相オープンラベル試験」（研究代表者：宮川義隆）を開始することにした。平成 22 年度よりプロトコルの作成と機構相談について、血液凝固異常症の調査研究班の ITP サブグループから支援を行っている。平成 23 年度以降は、同医師主導治験の円滑な遂行に必要な専門的知識の供与を行いつつ、今年度に改訂予定の「ITP 治療の参照ガイド」におけるリツキシマブの臨床的位置づけについて、海外のガイドラインと臨床治験の成績等を参考に検討を行う。

血小板減少症の病態解明と新しい治療戦略開発を目指した基礎的研究：
皮下脂肪組織からの巨核球分化・血小板産生機構の解明

研究協力者：松原 由美子

血小板減少の原因として、血小板破壊・消費および血小板産生低下のいずれか、あるいは両方が関与している。本研究においては血小板の産生低下に注目し、巨核球分化・血小板産生の分子機序を詳細に解明することを目的とする。

血小板の産生課程は非常にユニークで複雑である。血小板産生研究はこれまで遺伝子改変マウス、初代培養造血幹細胞や細胞株を用いて行われ、多くの知見が集積されているが、未だその産生機序には不明点が多い。我々は、血液細胞とは分化系列が異なると考えられている皮下脂肪組織中の間葉系幹細胞や脂肪前駆細胞、脂肪前駆細胞株 3T3-L1 から *in vitro* 分化誘導にて巨核球・血小板を得た事をこれまでに報告している。この分化誘導法は遺伝子改変を要せず、分化誘導に用いる培地は初代培養造血幹細胞からの血小板産生に用いるものとして既に確立されているものである。一方、3T3-L1 の親細胞株である繊維芽細胞株 3T3 からの *in vitro* 血小板産生は認められない。また、脂肪組織を用いた場合、造血幹細胞を用いる場合に比し、*in vitro* 分化誘導においては高効率に巨核球を得ることが出来る。これら知見は、これまでに解明されていない巨核球・血小板の産生機序のいくつかの研究を行うために発展させる事が出来ると考えている。

本研究3年間では、これまでに集積した 3T3-L1 と 3T3 を用いた研究成果、特に遺伝子発現 profiling の data を基に、巨核球・血小板産生に重要な micro RNA の同定を主として行い、巨核球分化・血小板産生の分子機序、特に遺伝子制御ネットワークの解明と血小板減少に対する新たな治療法の提案につなげた。

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金

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班

第 2 回班会議

日時：平成 24 年 2 月 3 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階大会議室

プログラム

研究代表者 村田 満

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 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班

第 2 回班会議 プログラム

日時：平成 24 年 2 月 3 日（金）午前 10 時～午後 5 時終了予定

場所：慶應義塾大学病院 新棟 11 階大会議室

（サブグループ研究計画：25 分 各個人研究計画：10 分 討論含む）

10：00～ 研究代表者 挨拶 村田 満

10：05～ 厚生労働省健康局疾病対策課 中川 義章 様

10：10～ 特発性血栓症研究班 研究計画 小嶋 哲人

サブグループリーダー：小嶋 哲人 名古屋大学医学部

班員： 坂田 洋一 自治医科大学

川崎 富夫 大阪大学医学部

宮田 敏行 国立循環器病研究センター

横山 健次 慶應義塾大学医学部

小林 隆夫 県西部浜松医療センター

榛沢 和彦 新潟大学教育研究院

研究協力者：

中村 真潮 三重大学大学院／山田 典一 三重大学大学院

平井 久也 浜松医療センター／太田 覚史 三重大学医学部附属病院

10：35～ TMA研究班 研究計画 藤村 吉博

サブグループリーダー：藤村 吉博 奈良県立医科大学

班員： 和田 英夫 三重大学医学部

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 慶應義塾大学医学部／日笠 聡 兵庫医科大学血液内科

松本 雅則 奈良県立医科大学／上田 恭典 倉敷中央病院

11：00～ I T P研究班 研究計画 富山 佳昭

サブグループリーダー：富山 佳昭 大阪大学医学部

班員： 藤村 欣吾 広島国際大学薬学部

桑名 正隆 慶應義塾大学医学部

倉田 義之 四天王寺大学

研究協力者：

降旗 謙一 株式会社エスアールエル／野村 昌作 関西医科大学 第一内科

宮川 義隆 慶應義塾大学医学部／柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科

高蓋 寿朗 西神戸医療センター

11：25～12：30 昼休み

12 : 30 ~ 13 : 50

特発性血栓症班研究報告 : 司会 小嶋 哲人

小嶋哲人 「新規静脈血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビンを検出する
スクリーニング検査法の開発」

坂田洋一・窓岩清治 「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)自己測定の有効性と安全性に関する臨床研究」

川崎富夫 「1. 大阪大学病院ガイドラインの運用結果 2. 血漿の凍結融解における凝固因子
の安定性の検討 3. 司法医療水準と医療ガイドラインの乖離」

宮田敏行 「プロテイン S K196E 変異の血栓症における重要性」

横山健次 「Bortezomibが血小板機能に与える影響の解析」

小林隆夫 「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」

榛沢和彦 「新潟県中越地震7年後のDVT検診結果」

太田覚史 「肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究」

13 : 50 ~ 14 : 30

TMA班研究報告 : 司会 藤村 吉博

藤村吉博・松本雅則 「小児期発症の ADAMTS13 活性著減後天性 TTP の解析」

和田英夫・伊藤尚美 「1. 診断法の検討 2. 対象疾患 3. 薬剤性 TMA の検討」

小亀浩市 「ADAMTS13-P475S 変異体の立体構造解析」

猪狩敦子・森木隆典 「RIPA を用いた ADAMTS13 機能ドメイン特異的自己抗体定量法の検討」

14 : 30 ~ 14 : 50 休憩

14 : 50 ~ 15 : 50

ITP班研究報告 : 司会 富山 佳昭

倉田義之 「臨床個人調査票(平成21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臨床個人調査票の改訂作業進捗状況」

藤村欣吾 「ITP治療の参照ガイド作成について」

宮川義隆 「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」

高蓋寿朗 「当院におけるITP合併妊娠の管理について」

宮川義隆 「妊娠合併ITPの診療ガイドラインの改訂」

富山佳昭・柏木浩和 「インテグリン α IIb β 3変異による遺伝性血小板減少症の病態解析」

桑名正隆・西本哲也 「Th1型の免疫応答がITP病態の発症を促進する」

松原由美子 「血小板減少症の病態解明と新しい治療戦略開発を目指した基礎的研究:
巨核球分化・血小板産生機構の解明」

終了

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 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班 研究代表者: 村田 満

事務局: 慶應義塾大学医学部臨床検査医学富田ゆかり 村田教授室Tel: 03-5363-3838 (62553)

サブグループ研究

特発性血栓症／静脈血栓症サブグループ研究報告

研究分担者

小嶋哲人：名古屋大学医学部
宮田敏行：国立循環器病研究センター研究所
坂田洋一：自治医科大学
川崎富夫：大阪大学大学院医学系研究科
横山健次：慶應義塾大学医学部
小林隆夫：浜松医療センター
榛沢和彦：新潟大学大学院医歯学総合研究科

研究協力者

中村真潮：三重大学大学院医学系研究科
山田典一：三重大学大学院医学系研究科
太田覚史：三重大学大学院医学系研究科
平井久也：浜松医療センター

目的

難治性疾患である先天性血栓性素因に伴う特発性血栓症／静脈血栓塞栓症の日本人での発症原因・メカニズムの解明、その予知・予防対策の確立は、我が国の医療行政上においても重要な課題である。本研究班の全国横断的調査研究は日本人での静脈血栓塞栓症発症のエビデンスを明らかにする貴重なデータであり、これまでに人種間の血栓性素因の違い、とくにプロテイン S K196E 変異が日本人特有な血栓性素因であることを明らかにして来た。日本人での特発性血栓症／静脈血栓塞栓症のエビデンスの収集とともに、その原因・メカニズムを解明し、エコノミークラス症候群として国民から注目される静脈血栓塞栓症の予知・予防対策の確立を本研究の目的とする。

方法・結果

特発性血栓症／静脈血栓塞栓症サブグループでの研究は、全国の医療施設を対象にしたアンケート調査研究と血栓症患者を対象とした研究などから構成され、今年度はそれぞれ以下の研究を行ったので報告する。

- ・プロトロンビン時間 (PT-INR) 自己測定の有効性と安全性に関する臨床研究。
- ・日本人特有血栓性素因・プロテイン S K196E 変異の血栓症における重要性に関する研究。
- ・新規血栓性素因・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビン検出検査法の開発研究。
- ・凝固因子インヒビター測定における血漿pHの安定化法に関する研究。
- ・Bortezomibが血小板機能に与える影響に関する研究。
- ・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。
- ・新潟中越地震後の被災者に発症した静脈血栓塞栓症の調査研究。
- ・肺血栓塞栓症・深部静脈血栓症 発症数の全国調査研究。

TMA 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
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23年度は以下の個別の活動を行ったが、TMAグループとしてTMA症例の集積とリツキサンのTTPへの保険適応拡大を重点的に行った。リツキサンの保険適応の拡大に関しては、別紙のごとく2011年11月11日に会議を行い、今後の活動方針について討議した。

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) ADAMTS13 と VWF の血漿中での存在様式の検討

和田英夫

- 1) 三重県内における TMA 症例の調査・研究の継続
- 2) 他疾患における ADAMTS13、VWF、VWF propeptide (VWFpp) の変動・意義の研究

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

森木隆典

- 1) TTP における ADAMTS13 機能ドメイン特異的自己抗体の定量的測定による解析

日笠聡

- 1) 新規TMA患者の集積

上田恭典

- 1) TTP患者集積と難治例の治療ガイドライン作成
- 2) TTPへのリツキサン適応拡大に向けた症例集積

厚生労働科学研究費補助金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班
「リツキサンのTTPへの適応拡大」に関する会議

日付：平成23年11月11日（金曜）13：30-17：00
場所：慶応大学病院総合医科学研究棟1階ラウンジ奥会議室

参加者

村田 満 慶応義塾大学
藤村 吉博 奈良県立医科大学
和田 英夫 三重大学
森木 隆典 慶応義塾大学
上田 泰典 倉敷中央病院
日笠 聡 兵庫医科大学
松本 雅則 奈良県立医科大学
宮川 義隆 慶応義塾大学

オブザーバー

有田 康弘 全薬工業(株)

プログラム

1. 挨拶 藤村吉博 先生
2. 基調報告（国内外のTTPでのリツキサン使用状況）
上田 泰典 先生
3. 国内患者でのADAMTS13インヒビターブースチングの解析状況
藤村 吉博 先生
4. ITPへのリツキサン適応拡大の状況
宮川 義隆 先生
5. リツキサンのリンパ腫以外の適応拡大の状況
有田 康弘 様
6. 総合討議

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 の用語の標準化やカイドラインが作成されており、これらとの整合性に関する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。特に骨髓穿刺の取り扱いに関して見直しを行なった。骨髓穿刺を必要とする基準を設定した。疫学調査は 2004 年からのデータの蓄積あり。上記の国際作業部会との整合性を考慮しつつ疫学データを蓄積する。

2) ITP 治療の参照ガイド作成

H.Pylori 除菌療法の ITP への適応が追加承認された (2010.6)。さらに、TPO 受容体作動薬も 2011 年に発売され、ITP に関して新たな治療の参照ガイドが必要となっている。この状況を踏まえ、ITP 治療の参照ガイドの改訂を行い、現在「臨床血液」誌に投稿中。今後は妊娠合併 ITP 治療の参照ガイドの作成に向けての準備を行なう。一方、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。

また、医師主導型治験により ITP に対するリツキシマブ投与が進行中であり、本療法の治療上の位置づけに関する検討する。

3) 病態解析

ITP における制御性 T 細胞および Th 細胞異常の解析、GPIIb-IIIa 変異に起因する先天性血小板減少症の病態解析、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

新規静脈血栓症リスク・アンチトロンビン抵抗性プロトロンビンを検出するスクリーニング検査法の開発

名古屋大学医学部 高木明、小嶋哲人

【はじめに】我々は遺伝性静脈血栓症家系のプロトロンビン遺伝子に1アミノ酸置換 Arg>Leu の原因となる1塩基置換を同定した。静脈血栓症の原因を異常プロトロンビン由来のトロンビンが生理的な制御を受けにくいためと想定し、変異トロンビンのアンチトロンビンによる不活化動態解析法を開発した。

【方法】野生型および変異型プロトロンビンは、組換えタンパク発現実験によりリコンビナント分子を作成し検討に用いた。すなわち、野生型プロトロンビンおよび変異型プロトロンビンの発現ベクターを構築してHEK293細胞に導入し、それぞれ安定発現細胞株を樹立した。ビタミンK存在下、無血清培地での培養上清を濃縮し、リコンビナントプロトロンビンとした。また、健常人血漿、擬似患者血漿（プロトロンビン欠乏血漿に各リコンビナントプロトロンビン添加）を検討に用いた。トロンビン不活化動態解析法は、トロンビン生成相、トロンビン不活化相、残存トロンビン測定相の3相とした。希釈検体にプロトロンビンアクチベータ混液（0x 蛇毒、リン脂質、CaCl₂）を加えプロトロンビンを活性化し、アンチトロンビン（±ヘパリン）にて不活化反応後、発色性合成基質 S-2238 にて残存トロンビン活性を初速度法により測定した。

【成績】本解析法において、変異型プロトロンビンではアンチトロンビン単独添加の30分後もほぼ100%（野生型は約20%）、ヘパリン共存下の5分後にも約40%（野生型はほぼ0%）のトロンビン活性が残存した。本解析法は変異プロトロンビン血漿のアンチトロンビン抵抗性を検出することができた。なお、選択的抗トロンビン剤・PPACKは、野生型トロンビンと変異型トロンビンをほぼ同程度に阻害した。リコンビナントプロトロンビンの凝固1段法による活性/抗原量：比活性は、変異型で0.07（野生型は1.18）と低値であったが、本法で測定すると0.5~0.65の比活性を示し、変異型プロトロンビンは野生型に比して活性化に時間を要するが、活性は十分に持っていることが推測された。すなわち、本法は同定した異常プロトロンビン血症のアンチトロンビン抵抗性を検出可能であった。また、ワルファリン服用時においても相対的な残存トロンビン活性を測定することでアンチトロンビン抵抗性の検出が可能であった。

【結論】今回開発したアンチトロンビン抵抗性解析法は静脈血栓症リスクの臨床検査法として有用と考える。

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

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、これまでに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じた用量調節ワルファリン療法が行われていたものの、PT-INR 値が治療域内と思われる症例において出血イベントや血栓症再発がみられた。これらのことは、医療機関受診時と実際のイベント時で PT-INR 値が乖離していたためか、もしくは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可能性を示唆するものである。そこで本研究（自治医科大学臨床研究倫理審査委員会承認 第臨 A10-47 号）では、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を確立するために、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を検討する。コアグチェック群は週に 1 度の自己測定による確認を登録開始日から 6 ヶ月間実施し、対照群は外来受診（1 回/1-2 月）のみに本学附属病院中央検査部において PT-INR 値の測定を実施する。平成 24 年 1 月 27 日の時点で 13 例がエントリーされ調査を継続中である。これらのエビデンスの蓄積により、ワルファリン療法の最も重要な副作用である出血予防案の作成へと研究を展開したい。