

・ アンケート回答用紙

貴院で把握されている患者数をご記入下さい。

1. 血小板無力症 (名)
2. Bernard-Soulier 症候群 (名)
3. 先天性 von Willebrand 病 (先天性) (名)
4. 後天性 von Willebrand 病 (名)
5. 先天性 TTP (Upshaw-Schulman 症候群) (名)
6. 後天性 TTP (名)
7. HUS (先天性、後天性) (先天性 名) (後天性 名)

上記の患者さんにつき、詳細なアンケート調査にご協力いただけますか？

(協力する・協力しない)

回答者

施設名 : _____

氏名 : _____

TEL : _____

FAX : _____

E-mail : _____

別添 5

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

ヘリコバクターピロリ菌感染と特発性(免疫性)血小板減少性紫斑病(ITP)
の関連に関する調査(中間報告)

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

病態薬物治療学講座 血液・腫瘍科 藤村 欣吾

協力者 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 桑名 正隆

大阪大学医学部付属病院輸血部 倉田 義之

研究要旨

1. 9施設よりヘリコバクターピロリ菌検査を行った383例の ITP 症例が登録され解析を行った
2. ヘリコバクターピロリ菌(以下 HP 菌)陽性症例 260例(67.9%)、陰性症例 123例(32.1%)
3. ITP における HP 菌陽性率は加齢と共に高くなり一般と変りはない
4. HP 菌陽性群の平均年齢は HP 菌陰性群に比し高い以外は HP 菌感染が ITP の病態に変化をもたらしている所見はない。
5. 除菌により 139 例中 89 例、64%に血小板増加効果を認めた。
 - 1) 除菌前血小板数 1 万以下の群では血小板増加反応が遅く、低い。
 - 2) 除菌前血小板数 1~5 万の群では 70%以上が血小板数 5 万以上に増加し約 50%は 10 万以上に増加した。
 - 3) 血小板増加を示す例では多くは除菌後 1 ヶ月の時点で血小板数の増加傾向を認めている。——増加効果の予測が可能かもしれない
6. 除菌無効例では除菌後 8 例、20%に何らかの血小板増加反応が認められたが、除菌前の血小板数が 3 万以上の症例であった。
7. ITP 罹病期間は除菌効果に関係しない。
8. 除菌療法の副作用は消化器系を中心とするものが 31 例、16.2%に認められたが重篤な症例はなかった。治療を中止した例は出血傾向増悪 1 例、発疹などである。

研究目的:

1998年 Gasbarrini らによって初めてヘリコバクターピロリ菌の除菌によって血小板が増加した ITP 症例が報告されて以来多くの施設で除菌効果が ITP の血小板増加に効果があることが確認され ITP 治療の選択肢の一つとして捕らえられつつある。しかしこれらの報告はいずれも単独施設の報告であり、ITP の診断や、ITP の病態との関連、有効性に関する普遍性については必ずしも明確ではない。そこで本研究班のテーマの一つとして ITP におけるヘリコバクターピロリ菌に対する除菌療法の有用性とその位置付けを明らかにすることを挙げた。

本年度はアンケート調査を行い ITP におけるヘリコバクター感染の実態、除菌療法の ITP に対する有効性、有効症例の臨床的背景を検討した。

方法:

本邦において多くの症例を集積している施設を中心にアンケート調査を依頼した。協力頂いた施設は9施設、登録された症例数は385例である(表 1)。

共同研究施設: 9施設

北海道大学医学部付属病院 血液内科
北海道旭川赤十字病院 内科
東京都立駒込病院 内科
慶応大学医学部付属病院 内科
東京医大付属病院 内科
東京女子医科大学付属病院 血液内科
昭和大学藤が丘病院 血液内科
大阪大学医学部付属病院 内科
広島大学医学部付属病院 血液内科

データが欠落した例、診断が異なっている症例を除きヘリコバクターピロリ菌検

査が施行された ITP383例を解析対象とした。

ヘリコバクターピロリ感染の診断は日本のヘリコバクター学会で 2000 年に示されたヘリコバクターピロリ感染の診断ガイドラインに基づき行った。すなわち今回各施設で行われている呼気テスト、ヘリコバクター血清抗体、生検の3つの検査のうちいずれかの検査が陽性であればヘリコバクターピロリ菌陽性であると診断した。

用いたアンケート調査用紙は匿名化されており解析者には個人が特定できないように配慮した。統計解析はエクセル統計を用いた。

研究結果:

1. ヘリコバクターピロリ菌陽性頻度
(表 2)

アンケート調査(2002. 9~12) :

協力施設: 9施設
登録症例数: 385例
解析可能症例数: 383例

ヘリコバクターピロリ菌
陽性症例: 260例(67.9%)
陰性症例: 123例(32.1%)

ピロリ菌陽性症例は260例、67.9%で陰性例は123例、32.1%であった。

今回のアンケート調査ではヘリコバクターピロリ菌の検索は3つの方法が選択されており、呼気テストとヘリコバクターピロリ抗体の組み合わせが最も多く用いられている。

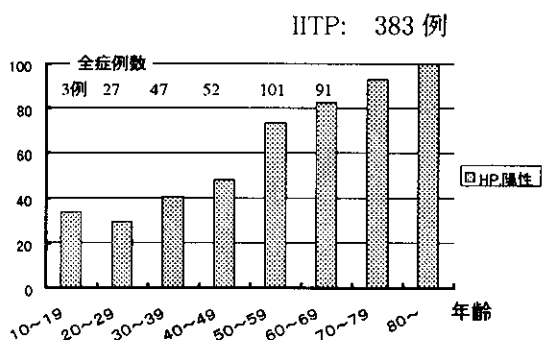
この両試験が陽性例は106例と最も多く両者が陰性例は43例であった。

呼気テストのみ陽性74例、HP抗体のみ

陽性 62例、生検陽性は 18 例であった。診断の精度は複数の検査を組み合わせると上昇することが知られているので 1 種類の検査のみで診断するには問題があるが今回は一つの検査が陽性であればヘリコバクターピロリ菌陽性と判断し以下の検討を行った。ちなみに 224 例が 1 つの検査のみで診断されており、この内 144 例、64%が陽性を示した。一方 2 つ以上の検査を行った 159 例中 116 例、73%が陽性であった。

2. 症例の背景(ヘリコバクターピロリ菌陽性例と陰性例の症例の背景)

平均年齢は陽性例が 58.84±13.37 歳で陰性例の 44.19±14.43 歳に比し 14 歳も高く、これはヘリコバクター陽性例が中年以降に頻度が高く、若年者には陽性頻度が低いことを反映している。(図1)



ITP における年齢と H.P.菌陽性率

両群に男女差を認めない。

ITP 罹病期間については陽性群 8.39 年、陰性群 9.12 年でいずれも長期に患っている症例が多く、慢性に経過する病気であることを示している。HP 陰性群に男女とも罹病期間が若干長い傾向があるが有意差は無い。

初診時血小板数、出血傾向の頻度は両

群間で差はなく、骨髓巨核球数もいずれの群においても正常ないし増加症例が多く、ITP の一般的特徴を示していた。

標準的治療に対する反応性はヘリコバクター陽性群では陰性群に比しステロイド治療に対する反応性や、摘脾に対する反応性が低い傾向にあるが有意差は認めない。

以上からヘリコバクターピロリ菌陽性群と陰性群との間には年齢に差を認めるのみでその他の背景因子や病態に差は認められない。

3. 除菌効果と除菌の ITP への影響(表 3)

H.P.菌陽性と除菌効果

H.P.菌陽性症例 260例

| | | |
|------------|--------------|----------------|
| ・未除菌症例 | : 68例 | |
| ・H.P.菌除菌症例 | : 192例 | |
| 〔除菌効果 | 〔あり | : 139例 (72.4%) |
| | 〔なし | : 40例 (20.8%) |
| 〔未確認 | : 13例 (6.8%) | |

ヘリコバクターピロリ菌陽性症例の内除菌が行われた症例は 260 例中 192 例、74%である。除菌効果は 139 例、72.4%に認められたのに比し除菌効果が認められなかった症例は 40 例、20.8%で未確認症例は 13 例である。除菌効果が見られた 139 例について血小板増加効果を検討した。

効果判定時期は症例によって 1 ヶ月の時点や 1 年後の時点の記入があり、今回は判定時点を決めずに調査表の回答に基づいてまとめた。それによると全体では 89 例、64%に増加効果が認められている。

(表 4)

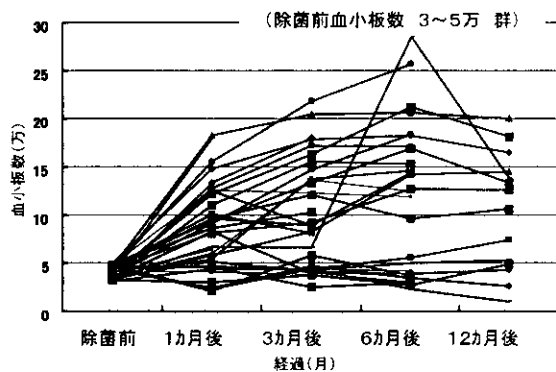
H.P.菌除菌効果と血小板増加効果

除菌有効群(139例)

| 除菌前血小板数 | | 血小板増加効果 89例(64%) | |
|---------|-----|-----------------------------|------|
| | | あり | なし |
| 1万以下 | 3例 | 2例 > x.3 (63%) | 1例 |
| 1~3万 | 44例 | 12例 > 5万 20例 > 10万 (73%) | 12例* |
| 3~5万 | 37例 | 4例 > 5万 22例 > 10万 (70%) | 11例 |
| 5万以上 | 55例 | 3例 > 5万 26例 > 10万 (53%) | 26例 |

*判定不能1例を含む

治療前の血小板数と増加効果の関係については、1万以下の症例3例中2例は血小板数が治療前の3倍以上に増加した。治療前1~3万の群では73%が血小板数5万以上に増加を認め、半数近くが10万以上となった。3~5万の群では70%が血小板数5万以上の増加を認め多くは10万以上に増加している(図2)。5万以上の症例は53%に血小板増加を認め多くは10万以上の増加であった。



H.P.菌除菌後の血小板数の推移

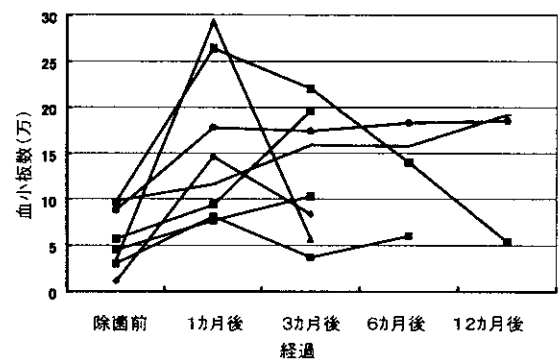
このことから血小板数1万以上5万以下の症例では除菌により血小板増加効果は頻度、血小板数ともに著しい事がわかった。また除菌前血小板数が5万以上の群では血小板増加反応を示す症例が53%と他に比し低いことも判った。

血小板数の推移については血小板数1万以下の症例では症例数が少なく確定できないが除菌後の血小板増加は観察

期間1年未満では全例5万以下に留まっております。血小板数の増加速度は血小板数1万以上の症例に比し緩序であった。

除菌前血小板数1~5万の症例では血小板数の増加する症例の多くは程度は様々であるが除菌後1ヶ月ですでに増加傾向を示している。一方無効例の多くは除菌早期から血小板増加反応が認められない傾向があった。

4. 除菌無効例における血小板増加効果(図3)



H.P.菌除菌無効で血小板増加を認めた例

H.P.除菌無効群40例中8例、20%において除菌後血小板増加効果がみとめられた。多くは除菌前の血小板数3万以上の血小板減少が軽度の症例で除菌療法が影響しているのか、自然経過なのか判定は困難である。また8症例中3例は一過性の血小板数の増加であった。

5. 除菌有効例の背景

罹病期間5年を除いてどの罹病期間においても60~80%前後の除菌有効率でありITP罹病期間と除菌の有効性の間には関連性はないものと考えられた。

ITP罹病期間と除菌による血小板増加反応との関係については一定の傾向を得る事は困難であるが9年以上の罹病期間例

においては除菌効果に差はないが除菌による血小板増加反応例が頻度的に低い傾向があるが今後症例数を重ねて検討したい。

6. 除菌療法の副作用(表 5)

H.P.菌除菌療法による副作用

| 除菌効果 | | 副作用 | | |
|------|------|----------------|-----------------|--------------|
| | | あり | なし | 不明 |
| 有効 | 139例 | 22例 (15.8%) | 114例 (82%) | 3例 (2.2%) |
| 無効 | 40例 | 3例 (7.5%) | 37例 (92.5%) | — |
| 不明 | 13例 | 6例 (46.2%) | 7例 (53.8%) | — |
| 計 | 192例 | 31例 (16.2%) | 158例 (82.3%) | 3例 (1.6%) |

ヘリコバクターピロリ除菌後の副作用、合併症、後遺症については、ITP における除菌療法が必ずしも消化管症状を発現していない症例に行われることが多く、また現時点では健康保険上除菌適応のない症例が対象になっているために副作用や治療後の安全性の確保は重要である。今回除菌の行われた192例において全体として31例、16.2%に何らかの自覚症状が副作用として記載され、この頻度はITP 以外の除菌の報告と大差はない。除菌効果不明群の多くは副作用によって除菌治療の継続が出来なくなった症例が多く、従って副作用の頻度が高くなっている。副作用の多くは下痢、軟便、が12例、皮疹、蕁麻疹が8例、であり重篤なものは殆どないが皮下出血が増悪し除菌療法が中止された例が1例認められた。

考案

ヘリコバクターピロリ菌とITP については1998年の報告以来除菌によって血小板

数が増加する報告が相次いでいる。しかし中にはスペインの Jarqueらは(2001)除菌後の血小板増加は13%にしか認められないと報告し必ずしも世界的に受け入れられているわけではない。またこれまではいずれも単一施設で症例数に限りのある観察期間の短い報告が多い。今回多施設における症例を蓄積し解析することによって除菌のITP 治療に対する有用性をより客観的に検討するとともに、ITP 治療における除菌治療の位置づけを明らかにすることを目的に本邦におけるアンケート調査を行った。血液専門9施設から解析可能症例383症例が登録され解析を行った。

ITP におけるヘリコバクターピロリ菌陽性率は加齢に伴って上昇し本邦における正常例(非ITP 群)の報告と大差はなく中年以降のITP 症例にはヘリコバクター感染率が正常人と同様に高いと言える。

すなわちITP がヘリコバクターの易感染性に関係はなさそうである。(ITP にヘリコバクター感染頻度が高いとは言えない)

今回のヘリコバクターピロリ菌の診断には約半数の198例が血清抗体検査ないし呼気テスト単独での診断であるため精度の上から若干問題はある。複数の検査を組み合わせると精度が高くなるといわれているために本来であれば2つ以上を組み合わせるべきでプロスペクティブには検討する必要がある。出血傾向があるために内視鏡による生検が行われている症例は少ない。今後はHP 菌感染の診断に対してはより精度の高い組み合わせ方法を用いる必要があると思われる。

ヘリコバクターピロリ菌陽性と陰性の間には年齢以外には出血傾向を始め、初診時血小板数や既治療の反応性など臨床病態には差を認めず、このことからヘリコバクターピロリ菌感染が ITP の病態に変化をもたらしている可能性は少ないと考えられた。

一般に除菌は80～90%の症例に有効とされているが今回の調査では除菌有効率が72.4%と低値を示した。この点については多くの症例にステロイドホルモンが長期間使用されたり、使用中の症例が多いのでステロイド治療がその有効性に影響するか否かが今後の検討課題である。

但し罹病期間と除菌の有効率には関連が見られず、罹病期間が有効性を規定する因子となり得ないと考えられた。

除菌後の血小板増加は64%に認められこれまでの除菌が有効とする報告とほぼ一致した頻度である。しかし効果判定時期が報告間で一定しておらず有効率を一概に比較することには問題がある。

今後は除菌後の年限を限ったところでの判定が必要で本研究においても登録された症例の除菌後1年の時点での有効性、再発の有無などを再度アンケート調査し検討する予定である。特に血小板数が1万以下の症例における除菌後の血小板増加は全例4万以下に留まっており1万以上の群と異なった血小板増加の推移をたどっている。症例数が少なくこの傾向が血小板数1万以下の群の特徴であるのか否か明らかでないが今後症例を重ねる必要がある。除菌前血小板数1～5万の群では血小板数が10万以上に増加する症

例の頻度が高く除菌効果が最も顕著な群と考えられる。ヘリコバクターピロリ菌がこの群の血小板減少の原因の多くを占めている可能性が示唆される。又血小板増加を示した多くの例では除菌後1ヶ月の血小板数が程度はまちまちであるが増加しており、除菌後1ヶ月の血小板数から有効性を予測することが可能と思われた。このことは除菌と血小板増加の機序を明らかにする手がかりになる可能性があり重要な点と考えている。

一方除菌前血小板数5～10万の群では除菌後10万以上に血小板数の増加する頻度は思ったよりも低く除菌前の血小板数が5万以上のために血小板数の上昇傾向ははっきりしないのか否かこの原因は不明である。

一方除菌不成功であっても除菌を契機として血小板増加を来す症例があり、一過性の症例や自然経過の一環と捕らえられるべき症例もある。中には除菌不成功でもプロトンポンプインヒビター単独で血小板増加反応を示す症例の報告もあり除菌療法による血小板増加には様々な機序が関係している可能性を示していると思われる。

このような実態を踏まえ次年度にITPの治療プロトコール試案を考えたい。すなわちヘリコバクターピロリ菌感染が関係している ITP か否かをまず検査後感染が確認されればインフォームドコンセントの基に除菌療法を第一選択の治療として行う。除菌療法に反応しない症例に関しては現在の標準的治療を行う事を大枠とした治療プロトコールである。

今回の症例をさらに追跡しプロトコール試案の裏付けにしたいと考えている。
最後に今回アンケート調査にご協力頂いた施設のご協力に感謝致します。

結論:

中間報告ではあるがヘリコバクターピロリ陽性 ITP においてはピロリ菌除菌が血小板減少を改善させる有効な治療法であることを確認した。

健康危険情報:

なし

研究発表:2002年度 ITP に関して

1. K. Fujimura ,Y. Harada, T. Fujimoto, A. Kuramoto, Y. Ikeda., J. Akatuka, K. Dan, M. Omine, H. Mizokuchi Nationwide study of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnant women and the clinical influence on neonates. Int.J. Hematol. 75: 426- 433, 2002
2. S. Nomura, K. Dan, T. Hotta, K. Fujimura, Y. Ikeda Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and Development Factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 100: 728-730, 2002
3. 藤村 欣吾
特発性血小板減少性紫斑病に対する摘脾について 押味 和夫、別所 正美、岡本 真一郎、加藤 淳 編集 EBM 血液疾患の治療 中外医学社 東京、2002、496－507.

4. 藤村 欣吾
特発性血小板減少性紫斑病 山口 真紀、安達 祥子、青木 裕美 編集 SELECTED ARTICLES 2003. 医療情報科学研究所 東京、2002、1141－1152.
5. 藤村 欣吾 疾患別にみた抗血栓療法の実例 TTP/ HUS 臨床医 28:2 322－2323, 2002.

知的財産権の出願・登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

血小板減少症鑑別診断における血中トロンボポエチン、
網状血小板測定の有用性に関する検討

分担研究者氏名 倉田義之

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) を特異的に診断する検査法は確立していない。現在、汎用されている PAIgG 検査は特異性、感度に問題があり診断には使えない。現在注目されている網状血小板 (RP) とトロンボポエチン (TPO) は血小板動態の解析に有用ではないかと考えられている。今回、RP と TPO の測定が ITP と産生低下による血小板減少症 (再生不良性貧血と化学療法後の骨髄抑制例) の鑑別に有用か否か検討した。ITP の 82% の症例で RP 比率 (%RP) 高値、TPO はほぼ正常であった。一方、血小板産生低下例の 93% の症例で TPO 高値、%RP はほぼ正常という成績が得られた。両測定法は血小板動態を正確に反映していると思われ、両者を測定することにより ITP と血小板産生低下例を的確に鑑別可能であると思われた。

A. 研究目的

日常の臨床現場においては血小板減少をきたしている症例にしばしば遭遇する。血液疾患であることが多いが、それ以外にも肝疾患や膠原病、内分泌疾患などで血小板減少をきたすこともある。

血小板減少症を診断するにあたって最初にかなる機序により血小板減少をきたしているかを検討する必要がある。通常は末梢血の血液検査を実施し、貧血の有無、白血球数は正常か、などを検討し白血病などの血液悪性腫瘍ではないか、などを検討する。

一般的な検査で他の疾患は否定的で血小板減少のみである場合には再生不良性貧血 (以下 AA) の初期あるいは骨髄異形性症候群などとの鑑別のため骨髄検査あるいは骨髄生検を実施し、血小板産

生の状態や形態異常、染色体異常の有無を検討する。また特殊検査として血小板表面の IgG (PAIgG) を測定し、抗血小板抗体が存在するか否かを検討、血小板破壊の機序が働いていないかをチェックする。

しかしながら骨髄検査あるいは骨髄生検ならびに血小板破壊の指標とされる PAIgG 検査には大きな問題がある。骨髄検査で得られる成績は穿刺したごく局所の所見であり全身の骨髄の状態を反映しているとは言い難い。一カ所の血小板産生状態でもって血小板産生低下あるいは正常と判断するのに限界がある。

一方、PAIgG は抗血小板抗体の検査法とされ、免疫学的機序により血小板減少をきたしている症例では陽性になるとされている。しかしながら AA など免疫学的

機序によらない血小板減少症例においても陽性を示すことが多いことから特異性に問題があるとされている。

1994年に血小板産生を促進させるサイトカインとしてトロンボポエチン(TPO)がクローニングされた。TPOは血小板産生前駆細胞に作用し、血小板産生を促進させる働きがある。血小板減少を示すAAや抗がん剤などにて治療し、骨髄抑制状態の患者などにおいて血中TPOは著明な高値を示す。一方、血小板破壊が亢進している特発性血小板減少性紫斑病(以下ITP)において血中のTPO値は正常上限のことが多い。これらの事実より血中TPOを測定することにより血小板の動態が解析可能ではないかと推測される。

網状血小板(以下RP)は細胞質にRNAが残存している幼弱な血小板で赤血球における網状赤血球に該当する。血小板寿命が短縮しているときにはRPは増加している。そのことよりRPを測定することにより血小板の寿命、破壊亢進の有無を知ることができる。

今回、われわれは血中TPOの測定とRPの測定が血小板減少症の血小板動態の解明、鑑別診断に有用か否かを検討するためITP症例、AA症例、血液悪性腫瘍症例など血小板減少を示す症例を検討したのでその成績を報告する。

B. 研究方法

1. 対象

血小板数が10万/ μ l以下のITP症例、AA症例および血液悪性腫瘍症例で抗白血病薬の治療により血小板減少をきた

している症例(Chemotherapy-induced thrombocytopenia, 以下ChemoT)とした。ITP症例は65例(年齢 51 ± 16 歳、M/F 17:48、血小板数 4.1 ± 2.3 万/ μ l)、AAが20例(49 \pm 15歳、M/F 7:13、血小板数 5.0 ± 2.2 万/ μ l)、ChemoT例が22例(年齢 41 ± 18 歳、M/F 19:3、血小板数 3.4 ± 1.8 万/ μ l)であった。ChemoTの内訳は急性骨髄性白血病7例、慢性骨髄性白血病4例、急性リンパ性白血病2例、骨髄異形性症候群3例、悪性リンパ腫5例、多発性骨髄腫1例であった。ITPおよびAAの診断は特発性造血器障害調査研究班の診断基準によった。健康人対象として60例(年齢 31 ± 8 歳、M/F 19:41、血小板数 22.4 ± 4.7 万/ μ l)よりインフォームド・コンセント取得後に採血し、基準値とした。

2. 測定法

RP、TPO、血小板の大きさ、PAIgGの測定方法の概略を図1に示す。

| | |
|----------------------|------------------------------------|
| 網状血小板 | TPO |
| 全血 15 μ l | ELISA |
| + 抗GPIIb抗体 5 μ l | (Quantikine Human TPO Immunoassay) |
| + 2%PFA 20 μ l | 血小板の大きさ |
| ↓ RT, 15分 | Flow Cytometryで |
| TO液(x8), 1ml | FSC meanを測定 |
| ↓ 650 G, 30秒, 遠心 | PAIgG |
| 上清を採取 | Flow Cytometryで測定 |
| ↓ RT, 90分 | |
| FACSscanにて測定 | |

図1. 測定方法

1) RP

EDTA採血した血液を用いて測定した。全血15 μ lとPE標識抗GPIIb抗体(SZ2, Immunotech, Marseille, France)5 μ l、2%パラホルムアルデヒド20 μ lを混合後室温で15分間放置。その後、8倍希釈チアゾール・オレンジ(Retic-COUNT, Becton

Dickinson, San Jose, CA) 1 ml を加え 650G、30 秒間遠心し PRP を採取、室温で 90 分間染色後、FACScan (Becton Dickinson)にて測定した。Forward-scatter (FSC)と Side-scatter により血小板サイズをゲーティングした後、FL2 と FSC により再度ゲーティングし血小板を正確に同定した。RP 陽性の判定は同時にチアゾール・オレンジ未染の血小板を FACScan にて測定し、未染血小板が 99%含まれるポイントを陰性の限界とし、それを超える蛍光強度を示す血小板を RP とした。

2) トロンボポエチン(TPO)

EDTA 採血した血液を 10,000G、15 分間遠心し、血漿を得て、サンプルとした。TPO の測定は TPO 測定キット(Quantikine Human TPO Immunoassay, R&D Systems, Minneapolis, MN)を用いた。

3) PAIgG

EDTA 採血した全血より血小板を遠心分離し、6回洗浄後 FITC 標識抗ヒト IgG 抗体を結合させ3回洗浄後 FACScan にて蛍光強度を測定し、FL1 の mean channel で PAIgG 値を表現した。

4) 血小板の大きさ

血小板の大きさは FACScan 測定時の FSC の mean channel を用い指標とした。

C. 研究結果

1. RP、TPO の成績

1) RP の成績

RP の成績を図2に示す。健康人における RP 比率(%RP)は $7.7 \pm 2.7\%$ であった。基準値上限は平均+2SD とし 13.1%以上を陽性とした。ITP 症例での%RP は

$23.8 \pm 11.6\%$ と著明な高値であった。%RP と血小板数は有意の相関を示した ($R=0.52$ 、 $P<0.001$)。一方、AA 例、ChemoT 例の%RP は $8.9 \pm 3.7\%$ 、 $8.2 \pm 4.2\%$ と一部症例を除き基準値以内であった。

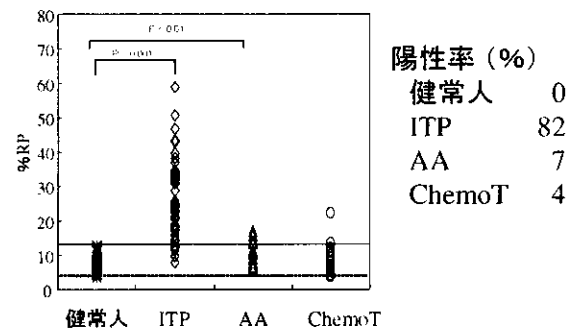


図2. 網状血小板比率(%RP)

2) TPO の成績

TPO の成績を図3に示す。健康人における血中 TPO 値は $43 \pm 29\text{pg/ml}$ であった。基準値上限は平均+2SD とし 101pg/ml 以上を陽性とした。AA 症例では $349 \pm 210\text{pg/ml}$ 、ChemoT 症例では $402 \pm 329\text{pg/ml}$ と著明な高値を示した。一方、ITP 症例では $74 \pm 66\text{pg/ml}$ とほぼ基準値以内であった。

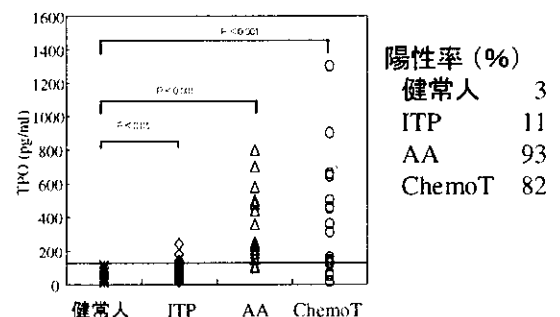


図3. 血中トロンボポエチン値

3) 摘脾前後の RP の動き

ITP 症例で摘脾前後の RP の動きを検討した(図4)。摘脾前は血小板数 $1\text{万}/\mu\text{l}$ 前後と低値で%RP は 40~60%と異常高

値であった。摘脾後血小板数は正常化し%RPもほぼ基準値以内となった。

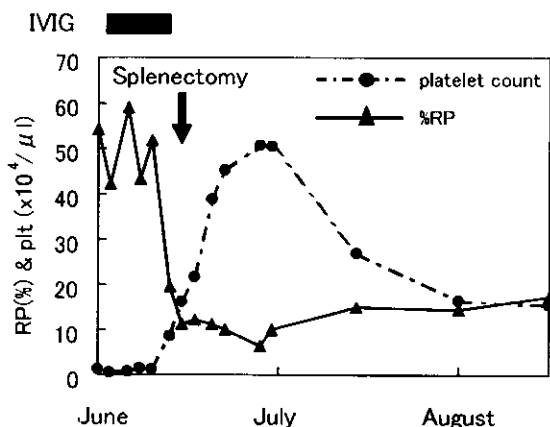


図4. 摘脾前後の血小板数と網状血小板比率

4) 周期性血小板減少症における RP、TPO 値

約一カ月周期で血小板減少、増多を繰り返している周期性血小板減少症の一例で%RP、TPO を測定した(図5)。血小板減少時は血小板数1万/μl 以下であり、紫斑、口腔内に血腫を認める。血小板数がピーク時は70~80万/μl となる。本症例のPAIgGは陰性、抗 GPIIb/IIIa 抗体などは陰性であった。血小板減少期にはTPOは300~400pg/mlと著明な高値であった。一方、%RPはほぼ基準値以内であった。

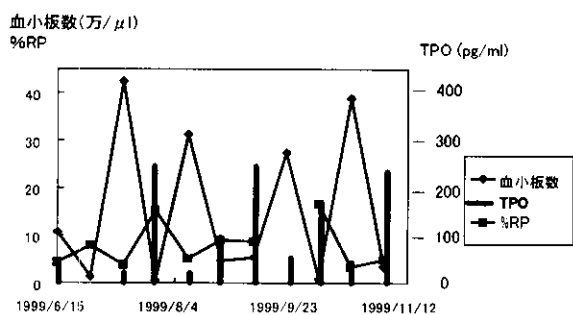


図5. 血小板数、%RP、TPO の経過

2. 各測定法の血小板減少症鑑別における感度、特異度

1) RP、TPO 両者測定による血小板動態の解析

各種血小板減少症例において RP と TPO の両者を測定し、その成績を X 軸に%RP、Y 軸に TPO をとり2次元にグラフ化し図6に示した。ITP 症例は右下の%RP 高値、TPO 正常の領域に集中した。一方、AA 例や ChemoT 例は左上の領域、すなわち%RP 正常、TPO 高値の領域に集中した。健常人は左下の%RP、TPO ともに正常の領域に集中していた。

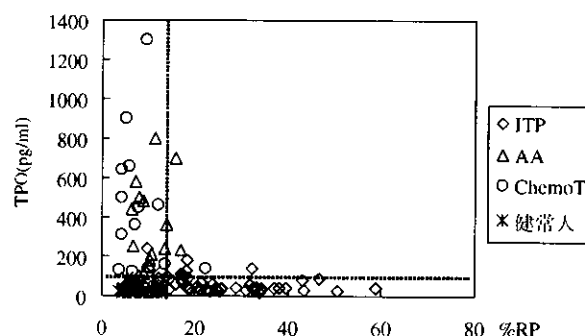


図6. ITP 例、AA+ChemoT 例における網状血小板比率と TPO 値

2) 各種測定法の血小板減少症診断における感度、特異度

ITP を血小板破壊亢進による血小板減少症の代表例、AA と ChemoT を血小板産生低下による血小板減少症例の代表例として各測定法の感度、特異度を検討した成績を図7に示す。

| 検査成績 | 診断 | 感度 (%) | 特異性 (%) | 陽性結果の予測値 (%) | 陰性結果の予測値 (%) |
|----------------|---------------|--------|---------|--------------|--------------|
| PAIgG陽性 | ITP | 53 | 82 | 90 | 43 |
| %RP陽性 | ITP | 82 | 95 | 96 | 80 |
| FSC陽性 | ITP | 43 | 88 | 82 | 54 |
| %RP陽性 TPO陰性 | ITP | 72 | 100 | 100 | 73 |
| TPO陽性 | AA + HypoT | 88 | 89 | 86 | 91 |
| %RP陰性 TPO陽性 | AA + HypoT | 81 | 98 | 97 | 87 |

図7. PAIgG、%RP、TPO、血小板の大きさの感度、特異度

(a) 血小板破壊亢進による血小板減少を検出する際の感度、特異度

ITP 診断に頻用されている PAIgG は感度 53%、特異度 82% で感度が低かった。この成績は PAIgG 陽性とでた場合には ITP である可能性が 90% (陽性結果の予測値) であるが陰性とでた場合に ITP を否定することができない (陰性結果の予測値 43%) ことを意味している。%RP は感度 82%、特異度 95% で感度、特異度ともに非常に良好で陽性の場合には ITP、陰性の場合には ITP の可能性が低いことを意味している。血小板の大きさ (FSC 陽性) による判定では感度 43%、特異度 88% と感度が低い。%RP 陽性でかつ TPO 正常症例を ITP と診断した場合は感度 72%、特異度 100% となる。%RP の成績に比べやや感度が低下するが特異度が 100% と上昇した。

(b) 血小板産生低下による血小板減少を検出する際の感度、特異度

血小板産生低下を診断していくにあたっての各検査法の感度、特異度を検討した。TPO 陽性は感度 88%、特異度 89% とほぼ満足すべき成績を示した。%RP 陰性、TPO 陽性の両者の成績を組み合わせると感度 81%、特異度 98% となり特異度が著明に上昇し、病態解析に非常に有用であると思われた。

D. 考察

わが国において ITP の診断は特発性造血器障害調査研究班の診断基準に則って行われている。この診断基準では血小板減少以外は除外診断が最も重要で

あるとされている。現在のところ ITP 診断に使用しうる特異的な検査法はなく各種の一般的な検査を行い、血小板減少を示す他の疾患を否定して初めて ITP と診断される。従来、ITP の特異的な検査法として提唱されていた PAIgG は特異性に問題があり ITP 診断には使えない。ITP 診断に使用可能な特異的な検査法の確立が急務である。今回、われわれは ITP 症例、AA 症例、血液悪性腫瘍症例など血小板減少を示す症例で血中 TPO と RP を測定し、両測定法が血小板減少症の血小板動態の解明、鑑別診断に有用か否かを検討した。

RP は幼弱な血小板で細胞質に RNA が残存している血小板である。赤血球における網状赤血球に相当し、血小板破壊が亢進している状態のときに %RP は高値を示すとされている。今回のわれわれの検討においても ITP の 82% の症例で %RP 高値であった。一方、AA 例では 7%、ChemoT 例では 4% に高値例を認めるのみであった。この成績は %RP の測定が血小板の破壊の亢進を把握するのに有用な検査法であることを意味している。

TPO は血小板の産生を促進させるサイトカインである。TPO は肝臓で一定量産生されている。TPO は流血中の血小板や骨髓の巨核球に吸着し血中から消失する。TPO の血中レベルは TPO のクリアランス、すなわち流血中の血小板数や骨髓の巨核球数により左右される。AA や ChemoT では血小板数低値で巨核球数も著減しているため TPO は著明な高値をとる。今回のわれわれの検討においても AA 例、

ChemoT 例で TPO 値は著明な高値であった。一方、ITP 例ではほぼ正常範囲であった。ITP 例では末梢の血小板数は低値であるが骨髄の巨核球数は正常あるいは増加している。そのため、TPO レベルはほぼ正常範囲であるとされている。今回のわれわれの成績も従来から報告されている成績に合致するものであった。

ITP の治療法のひとつに摘脾がある。最も信頼できる治療法であり、半数の症例で摘脾後寛解する。今回、経過を追った症例も摘脾前、血小板数低値で%RP 著明な高値であったが、摘脾後、血小板数が上昇した時点では%RP は基準値以内となり血小板破壊の亢進はもはや認められなかった。RP の測定は摘脾前後の血小板の動態を正確に反映しており非常に有用な検査法であると思われた。

周期性血小板減少症は約 30 日の周期で血小板の増減を繰り返す非常にまれな疾患である。血小板減少の機序から血小板産生低下によるものと血小板破壊の亢進による二つのタイプに分けられる。今回示した症例は PAIgG 陰性で抗 GPIIb/IIIa 抗体陰性であること、血小板減少期の骨髄では巨核球が著減していることより血小板産生低下による周期性血小板減少症と考えている。今回の検討においてもすべての血小板減少期に TPO は著明な高値、%RP はほぼ基準値以内であり血小板産生低下が主たる機序と考えられる検査結果であり、抗血小板抗体検査、骨髄検査による臨床的な診断に合致する結果であった。

%RP の測定により血小板破壊の亢進を

感度よく捉えることができる。また TPO 測定により血小板産生低下の状態を捉えることができる。両者を同時に測定すると血小板破壊の亢進の時は%RP 高値、TPO は基準値以内という成績が予測される。一方、血小板産生低下であれば TPO 高値、%RP は基準値以内と予想される。両者を測定し、成績が一致している際は血小板破壊の亢進(陽性結果の予測値 100%)、血小板産生低下(陽性結果の予測値 98%)を正確に診断することができる。

RP や TPO 検査は血小板の動態をよく反映した検査法である。%RP 高値であれば血小板破壊の亢進、正確には血小板回転が亢進していることを意味している。しかしながら血小板破壊の亢進、即 ITP とは診断できない。血小板破壊の亢進状態は ITP 以外にも播種性血管内凝固の際や血栓性血小板減少性紫斑病の際にも認められる。血小板回転の亢進を考えると大量出血時なども含まれる。ただし、播種性血管内凝固や血栓性血小板減少性紫斑病、大量出血は臨床的な特徴から多くの場合容易に否定できる。同様に TPO の検査も血小板産生低下を的確に検出することが可能であるが AA を診断する検査法ではない。両検査法ともに血小板の動態を解析する検査法であることを肝に銘じておく必要がある。

E. 結論

血小板減少の動態を解析する検査法として RP の測定、TPO の測定は非常に有用である。%RP は血小板回転の亢進を

感度および特異性ともに良好に検出することができる。一方、TPOは血小板産生低下の状態を感度および特異性良好に検出することができる。両者を測定すると血小板減少が血小板回転の亢進によるものか、産生低下によるものかを正確に診断可能である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

● 論文発表

1. Tadokoro, S., Tomiyama, Y., Honda, S., Kashiwagi, H., Kosugi, S., Shiraga, M., Kiyoi, T., Kurata, Y., Matsuzawa, Y.: Missense mutations in the $\beta 3$ subunit have a different impact on the expression and function between $\alpha IIb \beta 3$ and $\alpha v \beta 3$. *Blood*, 99; 931-938, 2002.
 2. 倉田義之、林 悟:活性化血小板。血小板血栓形成の分子機構。藤村吉博他編集、p53-57、アイプリコム、2002.
 3. 倉田義之:血液疾患における輸血と輸血副作用。臨床血液、43; 76-79, 2002.
 4. 倉田義之:輸血関連医療ミスの現状。新世紀の血液事業の幕開け。池田久實編集、p207-213、富士書院、2002.
 5. 倉田義之:輸血によって Creutzfeldt-Jakob 病は感染するか? 医学のあゆみ別冊:輸血の現状と課題、p220-224、医歯薬出版、2002.
 6. 倉田義之:輸血領域。Medical Technology, 30; 1388-1389, 2002.
 7. 倉田義之:特発性血小板減少性紫斑病の診断。アルカロイド研究会会誌、28; 18-20, 2002.
- ##### ● 学会発表
1. T. Kiyoi, Y. Tomiyama, S. Honda, S. Tadokoro, M. Arai, H. Kashiwagi, S. Kosugi, M. Shiraga, H. Kato, Y. Kurata, Y. Matsuzawa: A Tyr143His substitution in the αIIb subunit associated with Glanzmann thrombastheia impairs integrin $\alpha IIb \beta 3$ function: Comparison between His143 $\alpha IIb \beta 3$ and KO variant $\alpha IIb \beta 3$. 平成 14 年 2 月 7-8 日 第 1 回 United Kingdom-Japan Platelet Conference(横浜)
 2. H. Kashiwagi, Y. Tomiyama, S. Nozaki, T. Kiyoi, S. Tadokoro, S. Honda, M. Shiraga, H. Kato, S. Kosugi, Y. Kurata, Y. Matsuzawa: Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan. 平成 14 年 2 月 7-8 日 第 1 回 United Kingdom-Japan Platelet Conference(横浜)
 3. 本田繁則、富山佳昭、柏木浩和、小杉 智、白鹿正通、清井映男、加藤恒、倉田義之、松澤佑次:機能欠失 αV インテグリンによる細胞機能抑制効果の誘導 平成 14 年 3 月 1-2 日。第 39 回日本臨床分子医学会(大阪)
 4. 小杉 智、富山佳昭、本田繁則、加藤恒、清井映男、白鹿正通、柏木浩和、倉田義之、松澤佑次:慢性 ITP における血小板結合 GPIIb-IIIa 抗体のエ

- ピトープ解析。平成 14 年3月 28-30 日 第 99 回日本内科学会総会(名古屋)
5. 押田眞知子、清川知子、永峰啓丞、倉田義之:輸血オーダーリング・実施入力システム導入の効果。平成 14 年5月 8-10 日 第 50 回日本輸血学会総会(東京)
 6. S. Kosugi, Y. Tomiyama, S. Honda, H. Kashiwagi, Y. Kurata*, Y. Matsuzawa: Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura recognizing epitopes close to the ligand-binding site of GPIIb. 平成 14 年5月 26-30 日 第 26 回 International Congress of Internal Medicine(横浜)
 7. 倉田義之:ワークショップ:ITPの基礎と臨床。特発性血小板減少性紫斑病の診断。平成 14 年6月 15 日 第 28 回アルカロイド研究会(大阪)
 8. 倉田義之、林 悟、加藤 恒、清井映男、小杉 智、白鹿正通、柏木浩和、本田繁則、富山佳昭:ITP 症例に対するヘリコバクタピロリ除菌療法:網状血小板、TPO 測定による血小板上昇機序の解析。平成 14 年9月 12 日-15 日 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会(東京)
 9. 林 悟、西山美保、倉田義之:自動血球計数器で測定される血小板減少症の血小板数は正確か?FCM 法を含む4法による検討。平成 14 年9月 12 日-15 日 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会(東京)
 10. 柏木浩和、富山佳昭、白鹿正通、本田繁則、小杉 智、清井映男、加藤 恒、倉田義之、松澤佑次:巨核球系 cell line を用いたインテグリン α IIb β 3 の inside-out signal の検討。平成 14 年9月 12-15 日 第 64 回日本血液学会総会/第 44 回日本臨床血液学総会(東京)
 11. 加藤 恒、富山佳昭、本田繁則、吉田均、柏木浩和、白鹿正通、小杉 智、清井映男、倉田義之、松澤佑次:SHPS-1 の CD47 を介した血小板機能抑制の検討。平成 14 年9月 12-15 日 第 64 回日本血液学会総会/第 44 回日本臨床血液学総会(東京)
 12. 倉田義之:シンポジウム「輸血をめぐる問題点 -新しい視点で-」: B-cell mediated GVHD (Passenger lymphocyte syndrome)。平成 14 年 10 月 12 日 第 40 回日本輸血学会東海支部会学術集会(名古屋)
 13. 倉田義之:総説講演:血小板減少症。平成 14 年 11 月 14-16 日 第 25 回日本血栓止血学会学術集会(神戸)
 14. 柏木浩和、富山佳昭、白鹿正通、本田繁則、清井映男、小杉 智、加藤 恒、倉田義之、松澤佑次:インテグリン α IIb β 3 活性化制御分子の同定: Differential Display 法を用いた解析。平成 14 年 11 月 14-16 日 第 25 回日本血栓止血学会学術集会(神戸)
 15. 加藤 恒、富山佳昭、本田繁則、吉田均、柏木浩和、白鹿正通、小杉 智、清井映男、倉田義之、松澤佑次:

SHPS-1 の CD47 を介した血小板機能抑制作用の検討。平成 14 年 11 月 14 - 16 日 第 25 回日本血栓止血学会学術集会(神戸)

16. 西山美保、林 悟、二日市良彰、末久悦次、倉田義之：血小板数著減検体の血小板数測定法の検討：FCM による免疫学的血小板数測定法の有用性。平成 14 年 11 月 22 日-24 日 第 49 回日本臨床検査医学会総会(大阪)
17. H. Kato, Y. Tomiyama, S. Honda, H. Yoshida, H. Kashiwagi, S. Kosugi, M. Shiraga, T. Kiyoi, N. Honma, Y. Kurata, Y. Matsuzawa.: Interaction of CD47 with SHPS-1 negatively regulates platelet function. 平成 14 年 12 月 6 - 10 日 第 44 回 2002 ASH Annual Meeting. America/Philadelphia
18. 永峰啓丞、清川知子、青地 寛、押田眞知子、林 悟、倉田義之：ID-Gelstation と輸血管理システムのオンライン接続による検査結果入力システムの構築。平成 14 年 11 月 30 日 第 46 回日本輸血学会近畿支部総会(奈良)

H. 知的財産権の出願・登録

特になし。

<研究成果の刊行に関する一覧>

「書籍」

特になし

「雑誌」

特になし

厚生労働科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
分担研究報告書

ITP 診断における各種検査法の有用性を検討する前向き調査
(単施設における検討)

分担研究者氏名 桑名 正隆(慶應義塾大学医学部先端医科学研究所)

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の診断は主に血小板減少をきたす他疾患の除外により行われている。最近、ITP 患者に特異的な検査法として抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体、網状血小板比率、血漿 TPO 濃度が報告されている。そこで、これら検査法の ITP 診断における有用性を調べるため、血小板減少のため受診した 69 例を対象として初診時の各種検査結果と最終的な診断 (ITP、骨髄異形性症候群などの非 ITP) との関連を前向きに検討した。初診時における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の増加、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体陽性、網状血小板の増加、血漿 TPO 濃度 300 pg/ml 未満、貧血なしの 5 項目は ITP の診断と強く相関した。これら 5 項目のうち 2 項目以上を満たした場合を ITP とすると、感度は 100%、特異度は 82% と良好な結果が得られた。したがって、これら臨床項目を組み合わせることで ITP と非 ITP 患者の鑑別が可能であり、新しい検査法を加えた ITP の診断基準の作成が可能と考えられた。

A. 研究目的

我が国では特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の診断に 1990 年に厚生省 (当時) 研究班により提案された診断基準が広く用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり、骨髄検査で巨核球が正常または増加して他の系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他の疾患が除外されれば ITP と診断してよい。しかし、血小板減少をきたす全ての疾患を除外することは現実的に困難であり、他疾患の除外のために数多くの検査を行

うことは医療経済上も好ましくない。そのため、専門医の経験に基づいて必要最小限の検査成績により ITP の診断を行っているのが現状である。ITP 診断における大きな問題点は、血小板減少症をきたす他疾患の除外に主眼がおかれていることである。その理由として、1990 年当時は ITP に特異性の高いことが広く認められた臨床検査法がなく、積極的に診断する根拠がなかったことが挙げられる。厚生省の診断基準の項目に含まれる骨髄所見や PAIgG は ITP に対する特異性が低く、そ

これらの所見から ITP の積極的な診断はできない。そのため、アメリカ血液病学会 (ASH) により 1998 年に提唱された ITP の診断、治療のガイドラインでは、PAIgG は不必要で不適切とされており、高齢者や摘脾を考慮する患者以外では骨髄検査は必要ないと明記されている。ITP は比較的頻度の高い疾患で、専門医以外が遭遇する機会も多いことから、より実践的な基準の作成が必要である。ITP の診断に有用な検査法として以前から GPIIb-IIIa や GPIb-IX などに対する血小板特異抗体の検出が知られているが、操作の煩雑さから普及していない。最近、網状血小板比率の増加、血清または血漿中のトロンボポエチン (TPO) 濃度の軽度の上昇が ITP の診断に有用であることが報告されている。さらに、我々は enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT 法) により検出される抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の増加が ITP にきわめて特異的なことを報告している。そこで、本年度はこれら検査法の ITP の診断における有用性を検討するための前向き調査を単施設で行い、その結果をもとに ITP の診断指針の作成を試みた。

B. 研究方法

血小板減少または出血傾向を主訴に平成 12 年 1 月から平成 14 年 10 月の間に慶應義塾大学病院内科を受診した患者のうち、(1) 血小板数 < 10 万/ μl 、(2) 末梢血スメアで異型性がない、(3) 全身性エリテマトーデスなどの血小板減少をきたす全身性の基礎疾患がない、(4) 経過観

察期間が 6 ヶ月以上、のすべてを満たす 69 例を対象とした。ただし、初診時すでに血小板減少症に対して副腎皮質ステロイド療法が開始されていた例は除外した。エントリー症例は初診時に年齢、性別、臨床的な出血症状の有無、末梢血スメア検査結果を登録し、さらに末梢血を用いた以下の解析を行った。

- (1) ELISPOT 法による 10^5 個の末梢血単核球あたりの抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度
- (2) 5×10^7 個の血小板からの溶出抗体を用いた ELISA による血小板結合抗 GPIIb-IIIa 抗体
- (3) 血漿を用いた ELISA による血小板結合抗 GPIIb-IIIa 抗体
- (4) チアゾールオレンジを用いたフローサイトメトリーによる網状血小板比率
- (5) ELISA キット (Quantikine; R&D systems) による血漿 TPO 濃度

計 11 の臨床項目の 2 群間における平均値および頻度の差は Student's t-test、Fisher's 2-tailed exact test を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた末梢血検体はすべて患者からの文書によるインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

初診時に血小板減少を有する 69 例を平均 16.2 ヶ月間 (6~35 ヶ月) 経過観察した。35 例は ITP に矛盾しない骨髄所見と他疾患の除外により ITP と診断され (ITP 群)、18 例は臨床経過から ITP が強く疑