

- ・鎮痛薬、解熱薬は血小板機能を傷害するため、できる限り服用を避けること。
- ・血小板数の増加がなくても、治療により出血傾向の改善がみられることが多いため、身体所見を注意深く観察すべきである。とくに下肢の点状出血は見落とすことが多いため、注意深く診察する。

治療の具体例

血小板破壊を抑制するため、ガンマグロブリン大量療法 (IVIg) を行う。ガンマグロブリン製剤 (献血ベニロン-I 注, 献血グロベニン-I 注, 献血ヴェノグロブリン-IH 注など) を、400 mg/kg/day にて連続 5 日間点滴静注する。早ければ 3~4 日で血小板数が上昇する。

同時に、血小板抗体産生抑制のためステロイドパルス療法を行う。ソル・メドロール注 1 日 1 g の点滴静注を 3 日間行い、その後、1 日 500 mg の点滴静注を 1 日間、1 日 250 mg の点滴静注を 1 日間、以後経口投与 (prednisolone 60 mg) と漸減する。

血小板輸血は一般には行わないが、活動性の出血がある場合には血小板輸血も積極的に行う。

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS : Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med **346** : 995, 2002
▶ ITP の病態に関するのすぐれた総説。
- 2) George JN et al : Idiopathic thrombocytopenic purpura : a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. Blood **88** : 3, 1996
▶ 米国血液学会の ITP 治療のガイドライン。
- 3) Vesely SK et al : Management of adult patients with persistent idiopathic thrombocytopenic purpura following splenectomy : a systematic review. Ann Intern Med **140** : 112, 2004
▶ 難治性 ITP の治療に関するのレビュー。
- 4) 富山佳昭 : 特発性血小板減少性紫斑病. 臨血 **49** (10) : 14, 2008
▶ 日本語での ITP の総説。

原 著

網状血小板測定法 2 法の比較検討と臨床的有用性の検討
—フローサイトメトリー(FCM)法と
多項目自動血球分析装置 XE-2100 による自動測定(IPF)法—

林 悟*1 西山美保*2 末久悦次*3
柏木浩和*4 倉田義之*5 富山佳昭*6

Comparison between Two Methods for the Measurement Reticulated Platelet
and Their Clinical Significance—Flow Cytometry (FCM) Method and IPF Method
Using Automated Hematology Analyzer (XE-2000)

*Satoru HAYASHI*1, Miho NISHIYAMA*2, Etsuji SUEHISA, PhD*3,
Hirokazu KASHIWAGI, MD*4, Yoshiyuki KURATA, MD*5 and Yoshiaki TOMIYAMA, MD*6*

Reticulated platelet (RP) is thought to be a useful marker for differential diagnosis and analysis of platelet kinetics in patients with thrombocytopenia. In this study, we compared two methods for the measurement of RP: flow cytometric (FCM) method and immature platelet fraction (IPF) method using automated hematology analyzer (XE-2000). There was a relatively good correlation between RP% measured by FCM method and IPF% measured by IPF method in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) ($Y = 0.806X - 0.050$, $r = 0.634$, $p < 0.001$). We then measured RP% and IPF% in 61 patients with ITP and 27 patients with aplastic anemia (AA). For the differential diagnosis for ITP, the sensitivity (82%) and specificity (93%) of FCM method were better than those of IPF method (sensitivity 67% and specificity 63%). Our data demonstrate the significant difference between two methods by analyzing clinical samples in parallel. [Rinsho Byori 57 : 1039~1044, 2009]

Corresponding author: *Satoru HAYASHI*, Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, Suita 565-0879, Japan. E-mail: hayashi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

【Key Words】 thrombocytopenic disorder (血小板減少症), idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP (特発性血小板減少性紫斑病), aplastic anemia: AA (再生不良性貧血), reticulated platelet: RP (網状血小板), immature platelet fraction: IPF (未熟血小板分画)

受付 2009 年 4 月 9 日・受理 2009 年 9 月 7 日

*1,6 大阪大学医学部附属病院輸血部, *2,3 同 臨床検査部 (〒565-0871 吹田市山田丘 2-15)

*4 同 大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科 (〒565-0871 吹田市山田丘 2-2)

*5 四天王寺大学人文社会学部人間福祉学科 (〒583-8501 羽曳野市学園前 3-2-1)

網状血小板 (reticulated platelet: RP) は細胞質に RNA が豊富に存在する血小板で、網状赤血球が幼若赤血球であるのと同様に、新たに産生された幼若血小板であると考えられている¹⁾。血小板減少症の病態としては、再生不良性貧血 (aplastic anemia: AA) で代表される血小板産生低下、慢性特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP) で代表される血小板の消費・破壊亢進、脾機能亢進で代表される血小板分布異常などが挙げられるが、RP 測定はこれら血小板減少症における血小板動態の解析や鑑別診断に有用とされている²⁾。RP の測定法としては分離血小板や全血を用いて血小板 RNA をチアゾールオレンジなどの蛍光色素で染色し、フローサイトメトリー (flow cytometry: FCM 法) により測定する方法が知られている^{3)~5)}。しかしながら操作が煩雑で測定に時間を要し、施設間で基準値のバラツキが認められる。また高価な FCM 機器が必要なため標準法として各施設で行うには若干の問題がある。

最近、多項目自動血球分析装置 XE-2100 (シスメックス[®]) を用いて RP を未熟血小板分画 (immature platelet fraction: IPF 法) として測定する迅速かつ簡便な自動定量法が用いられるようになった。Briggs ら⁶⁾ は ITP、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) などの血液疾患や妊婦を対象として、診断・経過モニタリングとしての有用性を報告している。また本邦においても我々の報告も含め XE-2100 を用いた IPF 測定が血小板減少症の鑑別診断に有用であると報告されている⁷⁾⁸⁾。

本研究では同一検体に対し、従来の FCM 法と多項目自動血球分析装置 XE-2100 を用いた IPF 法を比較検討し、さらにその臨床的有用性を解析した。

I. 対象および方法

A. 対象

血小板数が $10 \times 10^4/\mu\text{l}$ 以下の、ITP 61 例 (mean \pm SD; 年齢: 52 ± 15 歳, 血小板数: $4.7 \pm 2.8 \times 10^4/\mu\text{l}$, 男女比: 11:50), AA 27 例 (年齢: 46 ± 16 歳, 血小板数: $4.6 \pm 2.9 \times 10^4/\mu\text{l}$, 男女比: 10:17), および正常対照として健常人 58 例 (年齢: 40 ± 10 歳, 血小板数: $24.3 \pm 5.0 \times 10^4/\mu\text{l}$, 男女比: 30:28) を対象とした。これら対象の IPF 測定結果は既に報告しているが⁸⁾, 本研究では FCM 法と IPF 法とを同一検体で比較検討した。なお、ITP と AA の診断は厚生

省特発性造血器障害調査研究班の診断基準によった⁹⁾¹⁰⁾。検体は日常診療の残余検体を用い、研究に用いる場合があることを依頼文書に明記し、不承諾書の提出がある場合には検体は使用しないこととした¹¹⁾。本研究は大阪大学医学部医学倫理委員会の承認を得ている。

B. FCM 法

既に我々が報告している方法にて測定した⁵⁾。方法の概略は、EDTA-2K 加末梢血を用い全血 $15 \mu\text{l}$, 血小板モニター用モノクローナル抗体として PE 標識 CD42b 抗体 (BD Pharmingen 社) $5 \mu\text{l}$ と 2% PFA・PBS $20 \mu\text{l}$ 加えて 30 分間反応する。チアゾールオレンジ (TO: Retic-COUNT 試薬, 日本ベクトン・ディッキンソン[®]) を 1 ml 加えて、350G で 30 秒間遠心して赤血球を除き、上清を室温 90 分反応させる。検体対照には TO の代わりに PBS を入れ 90 分反応させた。反応後、FACSCalibur (日本ベクトン・ディッキンソン[®]) を用いて、それぞれの血小板数を 1 万個測定し、RP% の解析には CellQuest Pro を使用した。

C. IPF 法

既に我々が報告している方法にて測定した⁸⁾。概略は、EDTA-2K 加末梢血を用い、IPF 解析用ソフトウェア XE-Pro シリーズを搭載した多項目自動血球分析装置 XE-2100 (シスメックス[®]) にて血小板数、IPF% を求めた。IPF は本装置の網状赤血球測定チャンネルにて測定・解析した。

D. 統計処理の方法

平均値の差の検定は Student の対応のない T 検定を、また相関検定はスピアマンの順位相関係数検定を用いた。

II. 結果

A. 基準値

FCM 法を用いて健常人 ($n=58$) の網状血小板値 (%) を検討すると、その RP% 値は $4.6 \pm 1.4\%$ (mean \pm 1SD) であり mean + 3SD 以下つまり 8.7% 以下を基準値とした。

一方、多項目自動血球分析装置 XE-2100 において同一検体を検討すると IPF% 値は、 $2.7 \pm 1.4\%$ (mean \pm 1SD) であり、mean + 3SD 以下つまり 7.0% 以下を基準値とした。

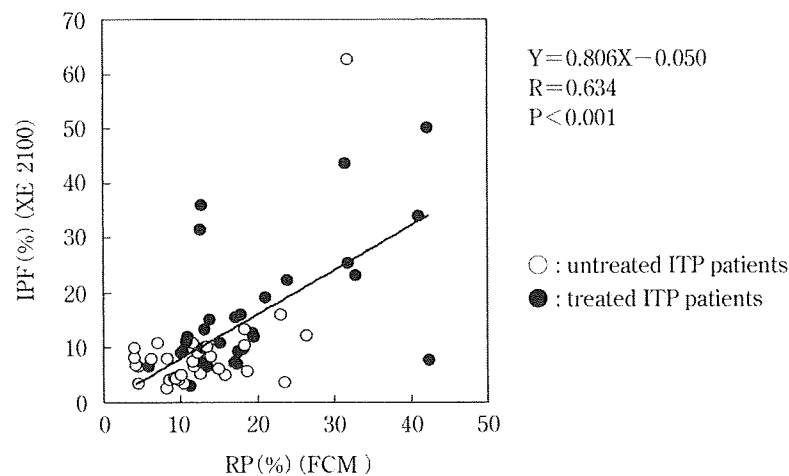


Figure 1 Relationship between RP% measured by FCM method and IPF% measured by IPF method in patients with ITP (n=61).

B. ITP 症例における FCM 法 (RP%) と IPF 法 (IPF%) の相関関係

次に ITP 61 例の検体に関して FCM 法および IPF 法の両者を用いて測定し、RP% と IPF% を比較検討した。Fig. 1 に示すように、両者には $Y=0.806X-0.050$ ($r=0.634$, $p<0.001$) と比較的良好な相関を認めた。しかしながら、その式から大きくずれる検体も若干存在した。RP% が IPF% より高値になった 2 例と、逆に IPF% が RP% より高値になった 2 例に関して、その再現性を別の採血時に再検討したが、同様の傾向が再現された(成績示さず)。この原因に関しては今後の課題と考える。

また、ITP 症例を治療の有無で比較すると、治療群 29 例の血小板数は $2.8 \pm 2.3 \times 10^4 / \mu\text{l}$ (mean \pm 1SD) と未治療群 32 例の血小板数 $5.7 \pm 1.9 \times 10^4 / \mu\text{l}$ の約半分であった ($p<0.001$)。この成績は、治療中の患者はより重篤な患者であることを示していると考えられる。事実、RP% の陽性率は、治療群 97% (28/29 例) で高率であったのに対して未治療群は 69% (22/32 例) であった。一方、IPF% の陽性率は、治療群で 86% (25/29 例)、未治療例で 50% (16/32 例) であった。また両群において、RP% と IPF% の関連に関しては、際立った差異は認めなかった。

C. ITP および AA 症例における RP% と IPF% の比較検討

上記 ITP 症例と AA 症例の RP% と IPF% の陽性率を比較検討した。

FCM 法による RP% は ITP 症例では $15.5 \pm 19.1\%$ (mean \pm 1SD) であり、健常人 ($4.6 \pm 1.4\%$) に比

して有意 ($p<0.001$) に増加していた。AA 症例では $4.0 \pm 1.6\%$ であり健常人と較べると統計上有意に ($p<0.05$) 低下していた。また基準値以上であった症例数、即ち陽性率は健常人で 2% (1/58)、ITP で 82% (50/61)、AA で 7% (2/27) と ITP で高値であった。

一方、IPF 法における IPF% は ITP では $12.7 \pm 11.6\%$ と健常人 ($2.7 \pm 1.4\%$) に比して有意 ($p<0.001$) に高値であった。それに対して AA では FCM 法とは異なり $6.2 \pm 3.7\%$ と健常人に比較し軽度上昇 ($p<0.001$) していた。また基準値以上であった症例数、即ち陽性率は健常人で 2% (1/58)、ITP で 67% (41/61)、AA で 37% (10/27) と ITP で高値であった (Fig. 2)。

D. ITP における血小板数と RP%、IPF% との相関関係

次に ITP 患者において、その血小板数と網状血小板数との相関関係の有無につき検討した。血小板数と FCM 法による RP% との間には $R=-0.537$ の負の相関が認められた。一方血小板数と IPF 法における IPF% との間においても、 $R=-0.623$ の負の相関が認められた。以上より、FCM 法および IPF 法によって、ITP 症例において血小板数が減少するに従い網状血小板比率が増加することが示された (Fig. 3)。

E. ITP の鑑別診断における FCM 法と IPF 法の比較

血小板の破壊亢進状態である ITP 症例と血小板産生低下である AA 症例に対して、FCM 法と IPF 法の ITP 診断法としての感受性、特異性および予測値を比較検討した (Table 1)。その結果、FCM 法の ITP 診断の感受性 82%、特異性 93% であり、一方 IPF 法は感受性 67%、特異性 63% であった。このように、

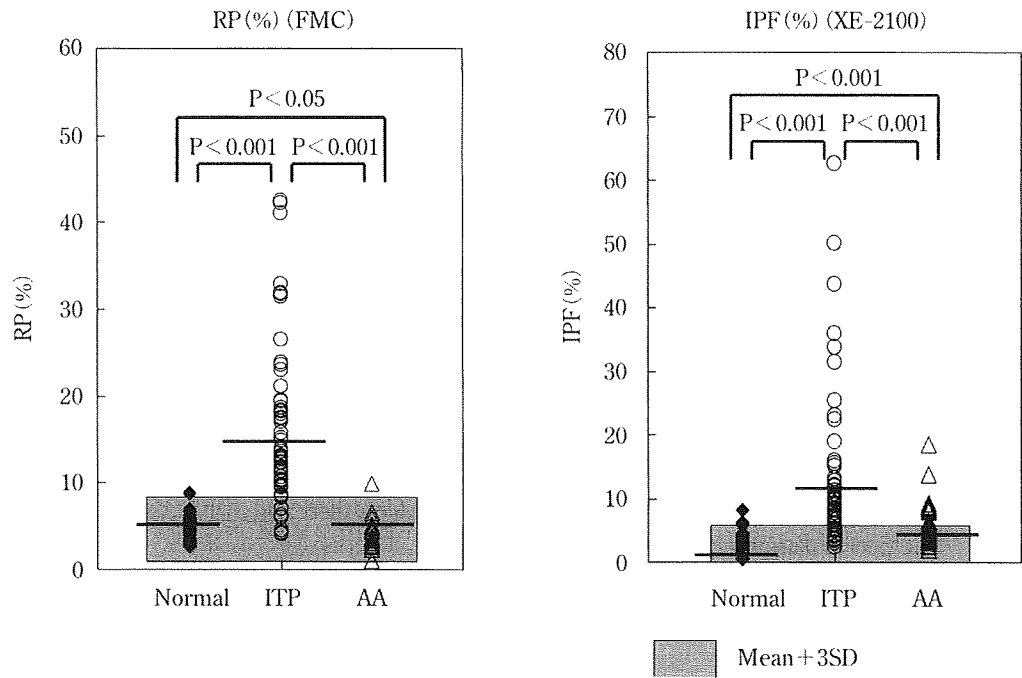


Figure 2 Clinical significance of RP% and IPF% in patients with ITP and AA.

Shaded area shows mean value \pm 3SD.

In FCM method mean value for AA was significantly lower than normal mean value, whereas in IPF method mean value for AA was significantly higher than normal mean value.

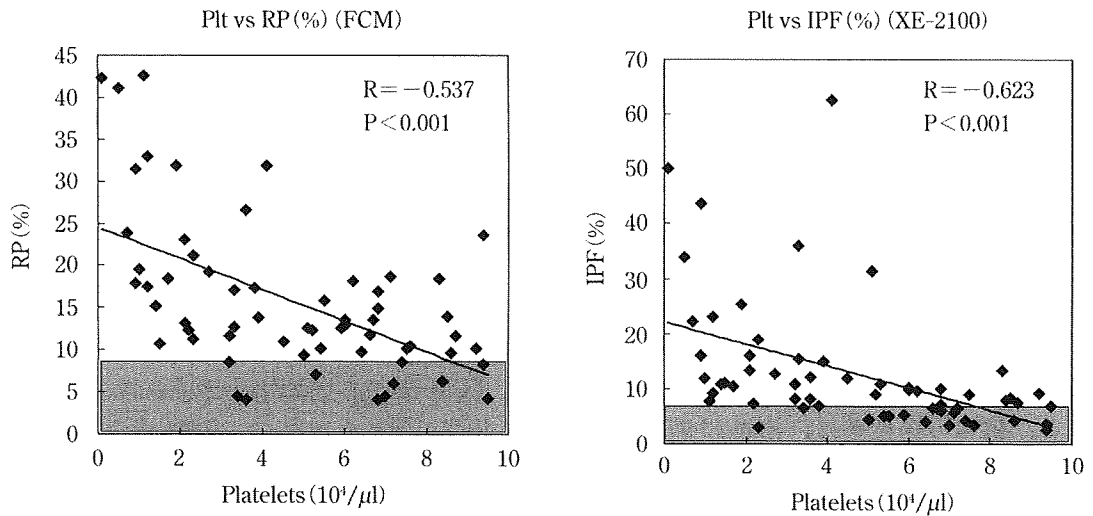


Figure 3 Inverse correlation between platelet counts and RP% (FCM method) and IPF% (IPF method) in ITP.

Table 1 Sensitivity, specificity, and predictive values of reticulated platelet (RP) percentage, immature platelet fraction (IPF) percentage for idiopathic thrombocytopenic purpura

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive Value (%)	
			Positive	Negative
Elevated RP percentage	82	93	98	69
Elevated IPF percentage	67	63	80	46

Table 2 Comparison between FCM method and IPF method

	FCM	IPF
Handling	Some difficulty (take 2 hours)	Easy (only take several minutes)
Reproducibility	Good	Good (moderate when reticulated platelet number is very low)
Timing to examine	Up to 4 days after blood drawing	On that day
Specificity, sensitivity, and predictive values (Between ITP and AA)	Good (80~90%)	Moderate (60~70%)

その感受性、特異性さらには予測値においても FCM 法が IPF 法に比較し優れていることが明らかになった (Table 1)。

III. 考 察

本研究では、同一の患者検体に対し網状血小板測定法として FCM 法と IPF 法の両者を用いて測定し、その相関および臨床的有用性を比較検討した。その結果、両者には相関を認めたものの、検査法により大きく値が異なる検体も散見された。さらに、ITP と AA との鑑別診断における感度、特異性および予測値において、FCM 法が IPF 法に比べ優れていることが明らかになった。

網状血小板は骨髓より末梢血へ放出された幼若血小板と考えられており、血小板減少症における血小板の動態を解析する有用な指標となることから^{12)~14)}、様々な RP 測定法が検討報告されている^{3)~5)}。主な RP 測定法としては FCM 法が挙げられるが、XE-2100 などを用いた IPF 法は迅速かつ簡便な自動定量法であるため最近汎用されており、日常のルーチン業務にも使用できる利点がある⁸⁾。実際、IPF 法では全血と試薬を混ぜるだけであり、数分で解析が完了する。しかしながら IPF 法では、我々が既に報告しているように検体の保存が困難であり、室温、4°C 保存のいずれの条件でも翌日になると IPF% に変動が見られており、検体を中央検査機関に依頼し測定することは困難であると考えられる⁸⁾。一方、FCM 法では 4°C 保存にて 4 日間安定である⁵⁾。

今回の我々の検討にて、IPF 法では AA 症例の 37% で IPF% 高値を示し、ITP 診断における感度、特異性などが FCM 法より成績が劣っていた。実際、FCM 法では ITP 診断の感受性および特異性はそれ

ぞれ 82% および 93% であったのに対し、IPF 法ではそれぞれ 67% および 63% であった。その原因の一つに多項目自動血球分析装置の閾値の問題が挙げられる。計数器は通常の場合は基準値内の精度管理は著しく良好であるが、基準値より異常な低値の場合には正確度、再現性が悪くなる。また、検体における大量処理を行うために、検体量の微量化に伴う再現性の不安定化の問題点がある。我々は既に、IPF% の連続 10 回測定での同時再現性の検討にて IPF の絶対数が保たれている検体 (例えば $1.53 \times 10^4/\mu\text{l}$) の変動係数 (coefficient variation; CV) は 10% 未満と良好であったが、IPF 絶対数の少ない検体 (例えば $0.32 \times 10^4/\mu\text{l}$) では 20% と不安定であることを報告している⁸⁾。正常対照の IPF 絶対数の平均 \pm SD は $0.63 \pm 0.29 \times 10^4/\mu\text{l}$ であったのに対し、今回検討した AA 症例においては 1 例 ($1.23 \times 10^4/\mu\text{l}$) を除き IPF 絶対数は $0.04 \times 10^4/\mu\text{l} \sim 0.53 \times 10^4/\mu\text{l}$ であり、AA 症例全体の IPF 絶対数の平均 \pm SD は $0.25 \pm 0.22 \times 10^4/\mu\text{l}$ と著減していた。このように IPF 絶対数が著減している AA 症例においてはその精度に問題があり、37% の AA 症例で IPF% が高値となった一因と考えられる。また、破碎赤血球・細胞破壊などによる細胞膜断片が流血中に放出されている場合、これらの細胞成分の IPF 分画への混入により IPF% の異常高値を呈する可能性も考えられる。

一方、今回対比した FCM 法は、測定血小板をモノクローナル抗体で捕捉して、一万個を測定・解析している。また検体のコントロールとして TO を入れない試験管を同時に測定し、個々の検体の基準として RP% を測定している。この条件においては、たとえ網状血小板数が著減している検体においても高い精度で測定が可能であった⁵⁾。

上記のように FCM 法は IPF 法に比べ精度は優れているが、IPF 法に較べると、①高価であり小規模の施設において自動血球分析装置との両機種を導入することは困難である、②操作が煩雑であるため熟練した技師であっても測定に長時間を要する、③標準的な測定プロトコールが確立されていないため基準値が施設間で異なる、などの問題点が依然存在している。本研究で明らかになった FCM 法、IPF 法の利点および欠点を考慮しつつ (Table 2)、検査データを解析する必要があると考えられる。また、FCM 法での測定では、保存 4 日目までは安定して測定できることから、中央検査機関での測定も可能であり今後標準化に向けて考慮すべき点と考えられる。

IV. 結 語

FCM 法と IPF 法を用いて、臨床検体を用いた検討にて両者の間には比較的良好な相関を認めた。しかしながら、ITP 症例および AA 症例間での診断における感度、特異度および予想値に関しては IPF 法に比べ FCM 法が優れていることが明らかとなった。一方、操作の簡便性、迅速性は IPF 法が優れており、両測定法の特性を考慮しつつ、測定結果を解釈すべきであると考えられる。

本論文の要旨は第 52 回日本臨床検査医学会総会にて発表した。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働科研費補助金難治性疾患対策研究事業および文部科学省学術フロンティア推進事業の助成による。

文 献

- 1) Dale GL, Friese P, Hynes LA, et al. Demonstration that thiazol-orange-positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood* 1995; 85: 1822-5.
- 2) Kuwana M, Kurata Y, Fujimura K, et al. Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1936-43.
- 3) Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *Br J Haematol* 1995; 91: 445-51.
- 4) 林 悟, 押田真知子, 清井映男, 他. 網状血小板測定法の基礎的検討および各種血小板減少症における網状血小板比率の測定. *臨床血液* 1999; 40: 205-12.
- 5) 西山美保, 林 悟, 二日市良彰, 他. 全血法による網状血小板測定法の基礎的・臨床的検討. *臨床病理* 2000; 48: 872-6.
- 6) Briggs C, Kunka S, Hart D, et al. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004; 126: 93-9.
- 7) 戸松宏明, 坂口 茜, 和田英夫, 他. 血小板減少性疾患における幼若血小板全自動測定法の臨床的有用性—XE-2100/IPF の基礎的検討と臨床応用—. *日本検査血液学会雑誌* 2005; 6: 238-45.
- 8) 西山美保, 林 悟, 二日市良彰, 他. 血小板減少症患者における多項目自動血球分析装置 XE-2100 を用いた未熟血小板分画の測定—基礎的検討および血小板減少症鑑別診断における有用性の検討—. *日本検査血液学会雑誌* 2006; 7: 313-8.
- 9) 高久史磨. 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班平成 2 年度研究業績報告集. 1991. p.57-8.
- 10) 吉田弥太郎. 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班平成 7 年度研究業績報告集. 1996. p.133-4.
- 11) 林 貞夫, 末久悦次, 浅利誠志, 他. 臨床検査部における残余検体の教育・研究および精度管理への利用についてのインフォームドコンセント. *臨床病理* 2001; 49: 273-7.
- 12) Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, et al. Reticulated platelets in the evaluation of thrombopoietic disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 606-10.
- 13) Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, et al. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987; 80: 33-40.
- 14) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycofibrin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 656-64.

トピックス

IV. 後天性疾患の診断と治療
1. 特発性血小板減少性紫斑病

藤村 欣吾

要 旨

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura) には急性型と慢性型があり、前者は5歳以下の小児に、後者は中高年齢者に、発症が多い。慢性型の診断には免疫学的特徴と血小板産生動態を反映する検査を取り入れた感度、特異度が高い診断基準が提案されている。治療目標は薬物治療による副作用との兼ね合いから、血小板数を3~5万以上に維持することにおく。

緊急時を除いて、ピロリ陽性症例では除菌療法を行い、除菌効果のない症例やピロリ菌陰性症例に対して副腎皮質ステロイド療法、これに続く摘脾療法を行う。これらに反応しない症例は難治性ITPとして種々の治療法を選択するが、保険適応、効果のエビデンス、副作用などから最終的には副腎皮質ステロイド維持量で経過を観察する症例も多い。

〔日内会誌 98: 1619~1626, 2009〕

Key words : 疫学, 診断基準, 治療ガイドライン, ピロリ除菌

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura) は紫斑を主体として皮膚や粘膜に種々の出血症状を示す後天性の血小板減少症である。

日常臨床における出血性疾患の中で最も遭遇する機会の多い血液疾患で、近年その発症年齢の変化、病態解析の進歩に基づいた診断基準の提案、新たな治療法の展開が見られている。

本稿ではこれに伴った疫学、診断、治療に関する最近の状況を述べる。

1. 疫学

厚生労働省における平成17年度臨床個人調査表を基にした解析では人口10万人に対して13.9人のITP患者が存在し、年間の新患発生は10万人当たり2.4人である¹⁾。

外国に比し年間発生は約1/2である。発症年齢は本邦では慢性型では20歳から40歳くらいに女性が男性の約4倍多いピークがあり、さらに大きなピークが男性、女性とも51~70歳に認められるが男女比は少なくなっている。これは世界的傾向でもあり、ITPが特徴的に20~40歳にかけて女性に多い疾患であった昭和40~50年代とは全く異なり、最近では中高年齢者を主体とする年齢分布を示し、治療をする上で考慮すべき点である。

ふじむら きんご：広島国際大学薬学部病態薬物治療学講座，広島赤十字原爆病院内科

急性型は5歳以下の小児に最も大きなピークを認め、次いで50歳以上に二つめのピークがある。5歳以下では男児が優位に多く、50歳以上では性差はなくなる傾向にある¹⁾。

一般に予後は良好で、長期予後として30~40%が完全寛解となるが残りは不完全寛解で無治療例、及び何らかの形で治療を継続されている症例が多く、10~30%は難治性ITPとなる。死亡の危険率は血小板数3万以下の症例であれば正常人に比し4.2と高くなり、かつ60歳以上であれば致死性出血のリスクは約30倍高い^{2,3)}。死亡率は3~9%で、死因は原疾患による出血(特に脳出血)、治療に伴う感染症、さらには中高年が多いことに因る悪性腫瘍、脳、心血管障害である。

2. 病因・病態

急性型と慢性型に分類され、急性型は小児に多く、ウイルス感染などの後に急激に出血傾向を伴って発症し6カ月以内に治癒することが特徴であるが、初期においては慢性型と区別をつけることが困難であることが多い。

以下成人の慢性ITPについて記載する。

本症における血小板減少の本態は血小板膜特異抗原に対する自己抗体が血小板表面に結合し、そのFc部分を介して脾を中心とするFcレセプターを有する網内系細胞に貪食され、或いは一部の症例ではこれに加え血小板自己抗体が骨髓巨核球と反応し血小板産生障害を引き起こす結果、血小板減少が生じる自己免疫疾患である⁴⁾。従ってITPのIはimmuneとし最近ではimmune thrombocytopenic purpura (免疫性血小板減少性紫斑病) とする考えが主体である。

3. 臨床所見

臨床症状は紫斑を主体として皮膚や粘膜に種々の出血症状を示す。皮下出血は点状出血から紫

斑、溢血斑、血腫まで様々であるが、最近ではこれら出血症状の見られない症例も多い。

皮膚の紫斑、鼻出血、歯肉出血、月経過多が4大出血症状である。重篤な出血として脳出血、消化管出血、口腔粘膜出血、血尿、喀血、網膜出血など臓器出血も経験されている。血小板数によって出血傾向の頻度が異なり、血小板数5万以上であれば無症状のことが多く、3万~5万であれば機械的刺激による出血症状は多いが自然出血の頻度は少ない。血小板数1万~3万では自然出血の頻度が高くなり、月経過多、外傷による出血が止血しにくく、1万以下であれば鼻出血、消化管出血、性器、尿路出血など粘膜出血が生じやすく、脳出血なども起こる。また加齢と共に出血傾向の頻度が増す。

4. 診断指針

従来より厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究班によるITP診断基準(1990年に改定)が広く定着している。しかし特異的な免疫学的診断に乏しく、この中で用いられているPAIgG (platelet-associated IgG, 血小板結合IgG) は感度は良いが特異性に問題があり、診断的意義は少ないとされている。

近年の病態解析技術の進歩からより積極的にITPの特徴を考慮して診断する試みがなされ、厚生労働省難治性疾患克服事業「血液凝固異常症に関する調査研究」班で2004年にまとめられた^{5,6)}(表1)。

この診断基準は従来末梢血検査の特徴に加え、末梢血中の血小板抗体産生B細胞数の測定、或いは血小板膜表面上の血小板特異抗原(GPIIb/IIIa)に対する血小板抗体をモノクローナル抗体を用いて測定する項目を入れ免疫性血小板減少であることを確認する。さらに血小板産生動態を反映する血漿TPO (Thrombopoietin, トロンボポエチン) 値、網血小板数を組み込んだ診断基準である。

表 1. 成人における慢性 ITP の診断基準案 (2005 年試案)

1. 血小板減少 (10 万/ μ l 以下)
2. 末梢血塗抹標本で 3 系統すべてに明らかな形態異常を認めない。
3. 以下の検査の内 3), 4), 5) のいずれかを含む 3 項目以上を満たす。
 - 1) 貧血がない
 - 2) 白血球減少がない
 - 3) 末梢血中の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の増加
 - 4) 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体の増加
 - 5) 網血小板比率の増加
 - 6) 血漿トロンボポエチンは軽度上昇にとどまる (< 300 pg/ml)
4. 他の免疫性血小板減少性紫斑病 (SLE, リンパ増殖性疾患, HIV 感染症, 肝硬変, 薬剤性 など) を除外できる。慢性 ITP の診断には, 上記の 4 項目全てを満たすこと。但し 4 項目を満たしても ITP として非典型的な所見を認める場合は骨髓検査を行う事が望ましい。

表 2. 鑑別診断のための補助検査

他の血小板減少を来す疾患を除外する検査

- ・他の自己免疫に関する検査: 抗核抗体, 抗リン脂質抗体などほかの自己免疫疾患に関する自己抗体検査や, 血清補体価の測定など
- ・肝疾患による血小板減少: HBs 抗原, HCV 抗体, 門脈圧亢進症の検索 など
- ・消費性血小板減少による血小板減少: APTT, PT, D-D ダイマー, FDP, TTP が疑われれば ADAMTS13 の測定など
- ・悪性腫瘍に伴う血小板減少: DIC, 骨転移, 骨髓抑制, 等を考慮する。
- ・HIV 検査
- ・薬物性の血小板減少も考慮し, 薬物服薬歴の聴取も重要である。

この基準によると ITP 診断に対する感度は 98%, 特異度は 79% となり, ITP として 95% の予測値で診断可能となり, 90% の予測値で ITP を除外することが出来る⁵⁾。

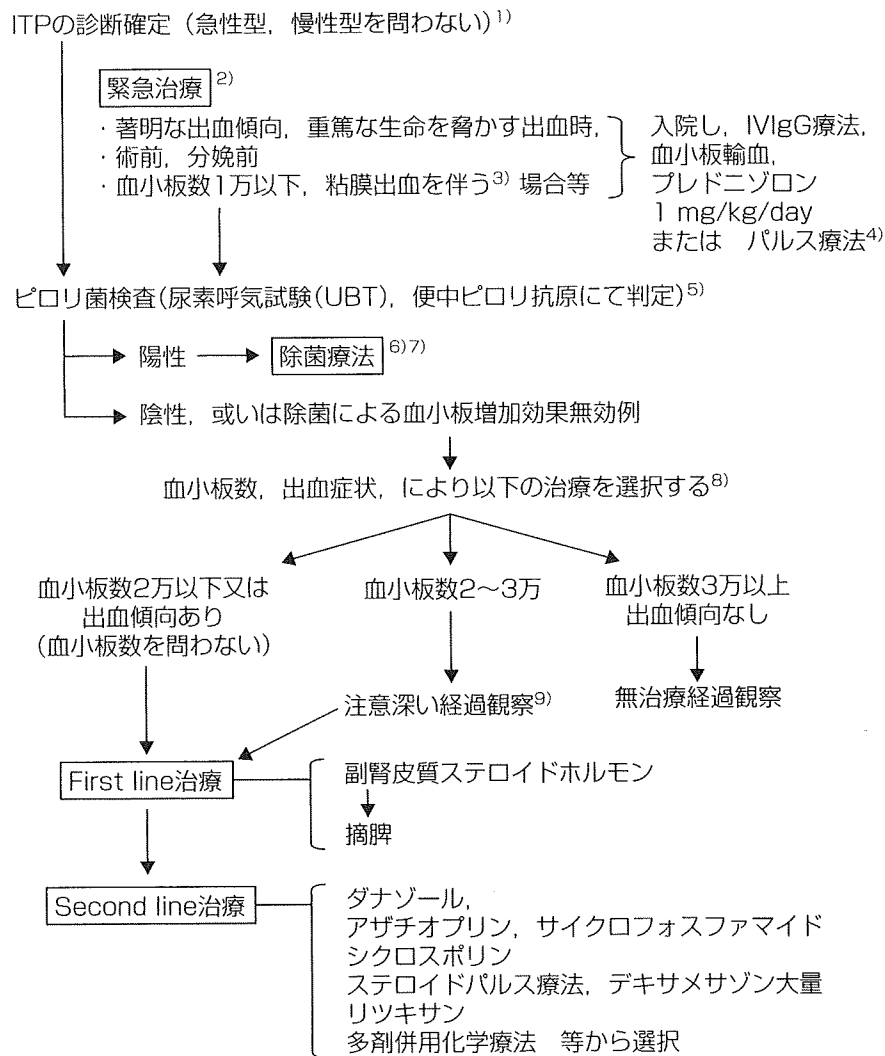
しかしこの診断基準における末梢血中の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の測定や, 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体の測定などは精度管理に問題があり, これらの検査については中央化し全国どこからでもアクセス可能な検査体制が確立されつつある。一般化にはもう少し時間が必要であり, しばらくは従来の診断基準に血小板産生動態を参考にして診断するのが良いと考えている。末梢血検査では標本上でも血小板減少を確認し, 偽性血小板減少症や, 異常細胞を含めた質的異常の有無を見だし除外診断に役立てる。骨髓穿刺に関しては必ずしも必須ではないが, 50 歳以上や初回ステロイド治療に反応が悪い症例,

他の血液疾患が疑われる場合には積極的に行う。

またこの診断基準は免疫性血小板減少症に関して有用であるために表 2 に掲げたような検査を行い他の基礎疾患に生じる 2 次性免疫性血小板減少症を除外する必要がある。

5. 治療

本邦ではヘリコバクタピロリ菌陽性 ITP 症例が中高年齢者に多く, それら症例に対する除菌成功により血小板数が増加する症例が 5~6 割に達することが厚労省の研究班で明らかにされた。そこで 1982 年に旧厚生省研究班で定められた治療指針を基に, 米国の治療ガイドラインを参考に除菌療法を組み入れた新しい ITP 治療ガイドラインが提案された^{7,8)} (図)。



付記：

- 1) 診断時に慢性型，急性型の区別が付きにくい場合があり臨床症状，検査所見が該当すれば本ガイドラインを適応する。
- 2) 緊急に止血が必要時（脳内出血，胸腔内，腹腔内，消化管出血，多数の口腔粘膜出血斑や皮下点状出血斑など），重篤な出血のリスクが高い確率で予測される場合には緊急治療となり，入院して出血による障害，生命危機を回避するように務める。
- 3) 鼻出血，消化管出血，生理出血，尿路出血，口腔内出血，など
- 4) これらの治療により一時的に血小板数を増加させ事態を終息させた後に以下の検査，治療に進む
- 5) これら以外に生検などでピロリ菌の診断を行っても良いが出血傾向を考慮する。
- 6) 除菌療法の副作用（皮疹，消化器症状，出血傾向の悪化など）に注意
血小板数 > 1万で除菌療法を行うことが望ましい
除菌療法例：アモキシシリン750 mg/day，
クラリスロマイシン200 mg/day，
プロトンポンプ阻害剤（ランソプラゾール30 mg/day）の3剤を1日2回，同時併用7日間（各用量は1回量を示す）
- 7) 除菌4～6週間後に除菌効果を判定する（UBTによる）
除菌不成功例では再除菌を行い血小板増加効果の有無を確認する
- 8) 血小板数は1回の測定ではなく数回の測定で判断する
出血傾向は軽微な機械的刺激による出血や，自然出血によるものを意味する。例えば軽微な外力や自然に生じる紫斑をはじめとして，大きな血腫，溢血斑，鼻出血，消化管出血，生理出血，血尿，口腔内出血，多発する点状出血，など臓器障害や貧血，出血傾向の増悪をきたす恐れのある状態
強力な外力によって生じたものは除く
- 9) 少なくとも1カ月に1回は診察，検査を行い，連絡を密にする。
60歳以上，高血圧など合併症を持つ症例，勤労者などにおいては出血のリスクが高く，合併症の治療と合わせてfirst line 治療を行うことが多い。

図． ITP 治療ガイドライン（2004 年提案）

1) 治療目標, 治療方針

血小板数が3万以上であれば健常人と死亡の危険率は変わらないとする欧米からの報告がある²⁾. 従って治療目標は血小板数を少なくとも3万~5万以上に維持することが出来, かつ薬剤による副作用が最小限にとどまる治療である.

このような観点から治療対象を血小板数と出血症状から層別化している. 薬物治療対象となる場合は血小板数が2万/ μ l以下もしくは血小板数に関係なく出血症状が認められる症例である. 治療薬の副作用並びに長期の服薬が必要であることから血小板数2~3万では, 出血傾向が認められなければ注意深く無治療で観察し必要に応じて治療を行い, 血小板数3万/ μ l以上で出血傾向の認められない症例は無治療で経過を観察する.

2) 緊急治療(緊急出血時あるいは外科的処置, 分娩時, 急性ITPなどにおける治療)

入院治療が必要となる場合で, 急性ITPや, 慢性ITPの経過中重篤な出血症状(脳, 肺, 消化管, 腹腔内, 血尿など主要臓器内への出血や口腔粘膜への多数の出血斑, 無数の皮下点状出血斑など)を示す症例などには一時的にでも血小板数を増加させ止血することが必要である. また血小板数5万以下の手術, 分娩時では血小板数は可能であれば10万/ μ lが望ましいが, 8万/ μ l以上でも脳出血など頭部手術を除いて良好な経過をたどることが多い. 特に分娩時には血小板数5万/ μ l前後でも自然分娩が可能で, 子宮収縮がよければ出血量は必ずしも多くなならない.

以下の治療のいずれかを適宜組み合わせる.

(1) 血小板輸血

緊急時に止血効果を得るには有効であるが, 血小板抗体が存在するので輸注血小板の寿命は短く血小板数はわずかしこ増加しない. したがって時間的余裕があれば後述する γ -グロブリン大量療法を併用すると血小板増加効果が上がる.

(2) γ -グロブリン大量療法 (IVIgG)

完全分子型免疫グロブリン 400 mg/kg/day を5日間連続点滴静注する. 治療開始後平均7日後に一過性に血小板数は最大値に達するが, 持続日数は数日である. 64%の症例は血小板数が10万/ μ l以上となり, 5万以上の増加を示す例は83%で, 有用性が高い. 抗GPIb血小板抗体を有する症例では本療法の効果が出にくいと報告されている.

(3) メチルプレドニンパルス療法

メチルプレドニゾロン 1 g/day点滴静注を3日間行い, 以後漸減する. 急性ITPに使用され効果が上がっているが最近慢性ITPにも用いられ, 約80%の症例で10万/ μ l以上に血小板数の増加が認められている. 反応は3日目くらいより現れるが急性ITPを除いて一過性である事が多い. 副作用は副腎皮質ステロイドに準じる.

3) 標準的治療

(1) ピロリ除菌療法

ITPと診断された症例に関しては(特に中高年齢者)ピロリ菌の検査を行い陽性であれば血小板数が3万以上であっても除菌療法の対象となる. ピロリ菌の検査は尿素呼気試験, もしくは便中のピロリ抗原の検出が勧められる. 除菌療法にて皮疹, 消化器症状, 出血傾向の悪化などが稀に経験されるため除菌治療を行う場合には, 血小板数は1万以上であることが望ましい.

通常の除菌療法, 例えば, アモキシシリン 750 mg, クラリスロマイシン 200 mg, プロトンポンプ阻害剤(ランソプラゾール 30 mg)の3剤を1日2回, 7日間服用する.

効果があれば除菌後1カ月より血小板数は増加傾向を示し, 除菌成功例では殆ど再発はなく血小板増加効果が持続する. 全体の60%以上の症例は血小板数が5万以上に維持され, 20%以上が血小板数15万以上の完全寛解状態となる⁹⁾. 除菌不成功例では血小板減少が再発し, この様な症例では再除菌を試みる. 現在ITPに関しての除菌療法の保険適応を申請中である. ピロリ菌

感染とITP発症との関連は明確ではないが、ピロリ菌のCag A抗原と血小板膜抗原との間の分子相同性機序により血小板と反応する抗体が作られ血小板減少が生じると推測されている⁹⁾。

以上除菌療法に反応する症例はピロリ関連ITPとして位置づけ今後は2次性のITPに組み入れられるべきものと考えている。

(2) First line治療と治療目標 (図)

ピロリ菌陰性症例, 除菌効果無効例, 除菌療法のために血小板数を増加させる必要のある症例, 除菌療法が不適切な症例などが対象となる。

治療目標として血小板数が正常化し無治療となることが望ましいが, 初回治療で寛解が得られなくとも治療による副作用を増大させてまでも血小板数を正常域に維持する必要はなく, 治療中止, 或いは維持量で血小板数3万以上, 又は出血傾向の軽減を目標とする。

①副腎皮質ステロイド療法

初回使用量はプレドニゾロン換算1mg/kg/dayを4週間用いる。その後4~8週かけて維持量のプレドニゾロン10mg/day以下にまで漸減する。本療法により80%の症例で血小板数の増加が認められるが, 多くの症例はステロイドの減量に従って血小板数は減少し, ステロイド療法単独で完全寛解に達する症例は33.1%, 部分寛解が16%である。2万以下の血小板減少や出血傾向が増悪する場合にはステロイドの増量や再投与を行う。60歳以上では, 糖尿病, 高血圧, 不眠, 骨粗鬆症の進展など, 副作用を考慮して, 初回副腎ステロイド投与量は0.5mg/kg/dayから開始することが多い。

②摘脾療法

ステロイドの維持量で血小板数, 出血傾向のコントロールが困難な症例, ステロイドによる副作用が強い症例などが適応となる。摘脾の時期は診断から6カ月を経過した後で, 2年以内で効果が良いとされている。外国におけるメタ解析では60%以上の完全寛解率が示されている¹⁰⁾が, 2年以内の再発は本邦では27%に認められ

る。

摘脾の有効性に対する予知因子は明確でないが, 罹病期間が短い例, IVIg療法やステロイドに反応例, 脾臓へのアイソトープ標識血小板の取り込み増加例, 40歳以下の症例などを有効因子としている報告がある。

摘脾の合併症として, 消化管癒着, 胸水貯留, 門脈血栓症等があるが頻度は少ない。さらに頻度は少ないが摘脾後肺炎球菌, 髄膜炎菌による重症感染症の報告がある。肺炎球菌に対する予防ワクチンとしてニューモバックスが保険適応となっており, あらかじめ摘脾1カ月前に行う。摘脾効果を挙げるために副脾(16%)の除去に努める。最近では腹腔鏡下手術が多く, 合併症や, 手術侵襲が少なく, 美容上の利点や入院期間の短縮の結果, 医療費が安価となっている。

4) Second line治療 (図, 表3)

副腎皮質ステロイド薬や摘脾など通常の治療法に反応せず血小板数が2~3万/ μ l以下に留まり, 出血傾向を認める所謂難治性ITP症例が対象となる。これらに対しては表3に示すような各種治療法が試みられているが以下の点に注意すべきである。

①Second line治療法はいずれもエビデンスレベルIV, Vであること。

②これらの薬剤はITPに対して保険適応になっていない。

③それぞれ特有の副作用が知られており注意を払う必要がある。

等で個々の症例に適切と思われる治療を選択する事になる。それに当たっては1剤につき1~2クール, 或いは1.5~2カ月使用し効果がなければ中止し他の治療法を選択する。或いはSecond line治療薬を2~3剤試みた後, 無効であればプレドニン維持量(5~10mg/day)のみで経過観察し, 出血傾向増大時に副腎皮質ステロイドの増量や γ グロブリン大量療法で出血傾向を軽減させるような選択肢もある。

これらの薬剤の中で最近Bリンパ球に発現して

表 3. Second line 治療薬

薬剤	使用量	主たる副作用
ダナゾール	200 ~ 400 mg/day	肝障害, 嚔声, 男性化
アザチオプリン	50 ~ 100 mg/day	造血器障害, 肝障害 感染症
サイクロフォスファミド	50 ~ 100 mg/day	造血器障害, 出血性膀胱炎 感染症
シクロスポリン 血中トラフ値を 100 ~ 200 ng/ml になるように調節	100 ~ 200 mg/day	腎障害, 肝障害, 血圧上昇 多毛, 感染症
デキサメサゾン大量療法	40 mg/day, 4 日間 4 週間に 1 回 4 ~ 6 回	骨粗鬆症, 耐糖能異常, 感染症, 消化管潰瘍他
メチルプレドニゾロン大量療法	500 ~ 1,000 mg/day 連続 3 日間 点滴	高血圧, 精神障害, 座瘡, 脂質代謝 異常, 白内障 緑内障, 満月様顔貌, 多毛
ビンカアルカロイド緩速点滴静注 ビンクリスチン 0.02 ~ 0.04 mg/kg 点滴 1 週間に 1 回 4 ~ 6 週		末梢神経障害, イレウス, 造血器障 害
リツキシマブ	375 mg/m ² 点滴 1 週間に 1 回 4 週	アナフィラキシー様症状 肺障害, 心障害, 肝障害 感染症
多剤併用化学療法 など		

いる CD20 抗原を標的としたマウス-ヒトキメラモノクローナル抗体 (Rituximab ; リツキシマブ) は, CD20 陽性悪性リンパ腫の治療薬としてのみならず抗体産生に関わる非悪性 B リンパ球に対しても標的となり種々の自己免疫疾患へ使用され, 難治性 ITP に対しても多くの報告がなされている. 投与方法としてはリツキシマブ 375 mg/m² 週 1 回 4 週間点滴静注する. メタ解析の結果血小板数 15 万以上の完全寛解 43.6%, 血小板数 5 万以上になった症例は全体で 62.5%, 再発は少ない傾向にあり期待しうる薬剤である. しかし薬剤の性格上生命に関わる重篤な副作用が 2.9% に認められ, むやみな使用に警笛がなされている¹¹⁾.

5) 難治性 ITP に対する本邦での治験状況

トロンボポエチン受容体アゴニストが開発され巨核球への分化, 成熟を促進し, 血小板産生が亢進することが確認され難治性 ITP に対して, 二つの臨床治験が行われている (AMG531 アムジェン, Eltrombopag GSK). ITP に対する根治

療法ではないがいずれも 80% 以上の症例に一時的に血小板を増加させ出血を回避することが出来, また使用し続けることにより血小板数を一定のレベルに保つことが可能である^{12, 13)}. しかし長期の使用による骨髄でのレチクリン線維の増加や, 中止により再び血小板数は減少するため今後本剤の使用に関する位置づけを明らかにする検討がなされている.

6. 今後の展開

自己免疫の成立機序や免疫学的貪食機構の解明が進みつつある中で, これら基礎研究成果が臨床研究に応用されようとしている. 前者においては免疫制御性 T 細胞 (CD4 + CD25 + Fox P3+) を効率良く増加させる治療が確立すれば完治も可能になる (リツキシマブ治療もその一つと報告されている). また後者において貪食時のシグナル伝達を抑制する薬剤 (Syk inhibitor) の効果が ITP の動物モデルで確認され, ヒト難治性

ITPで効果が示されつつある。このように標的に対しの確に作用する薬剤が開発され、根本的な治療法が確立されることを望んでいる。

(疫学的研究, 診断基準や治療ガイドラインの作成は厚生労働省科学研究費補助金を受けて行なわれました。)

文 献

- 1) 倉田義之：臨床個人調査票(平成17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, 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成19年度報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」(班長 池田康夫). 90-94, 2008. 3.
- 2) Cohen YC, et al: The bleeding risk And natural history of ITP in patients with persistent low platelet counts. Arch Intern Med 160: 1630-1638, 2000.
- 3) Portielje JEA, et al: Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 97: 2549-2554, 2001.
- 4) McMillan R, et al: Suppression of in vitro Megakaryocyte production by antiplatelet antibodies from adult patients with Chronic ITP. Blood 103: 1364-1369, 2003.
- 5) 桑名正隆：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—中間報告—, 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成15年度報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」(班長 池田康夫). 57-61, 2004. 3.
- 6) Kuwana M, et al: Preliminary laboratory diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. J Thromb Haemost 4: 1936-1943, 2006.
- 7) George JN, et al: Idiopathic Thrombocytopenic Purpura; A Practice Guideline Developed by Explicit Methods for the American Society of Hematology. Blood 88: 3-40, 1996.
- 8) 藤村欣吾：免疫性血小板減少性紫斑病 (ITP) における治療ガイドライン (案) の提案—ヘリコバクター除菌療法の成績を踏まえて—, 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 平成16年度報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」(班長 池田康夫). 2005, 53-69.
- 9) 藤村欣吾：ITP(特発性血小板減少性紫斑病)と*Helicobacter pylori*除菌療法について. 日本内科学会雑誌 95: 2310-2320, 2006.
- 10) Kojouri K, et al: Splenectomy for adult patients with ITP: A systematic review to assess long-term platelet count responses, production of response, and surgical complications. Blood 104: 2623-2634, 2004.
- 11) Arnold DM, et al: Systematic review: Efficacy and safety of Rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 146: 25-33, 2007.
- 12) Bussel JB, et al: Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 357: 2237-2247, 2007.
- 13) Bussel JB, et al: AMG531, a thrombopoiesis stimulating protein, for chronic ITP. N Engl J Med 355: 1672-1681, 2006.

日本人の血栓性素因

宮田 敏行¹, 岡田 浩美¹, 川崎 富夫², 辻 肇³
 窓岩 清治⁴, 坂田 洋一⁴, 小嶋 哲人⁵, 村田 満⁶
 池田 康夫⁷

Key words : Venous thromboembolism, Thrombophilia, Protein S

はじめに

静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism, VTE) は環境因子と遺伝因子からなる多因子疾患として知られている¹⁾。VTE の遺伝因子として、凝固制御因子であるアンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S の先天性欠損症が広く知られている^{2,3)}。また、白人種では、比較的頻度の高い第 V 因子 Leiden 変異⁴⁾とプロトロンビン G20210A 変異⁵⁾が VTE の遺伝因子として知られている。日本人にはこれらの変異は見いだされておらず^{6~8)}、本研究で同定された日本人約 55 名に 1 人見られるプロテイン S Lys196Glu 変異が遺伝因子と考えられる^{9,10)}。VTE の環境因子として、手術、外傷、がん、脊椎損傷、長期臥床、経口避妊薬、妊娠、産褥期が知られている¹¹⁾。このように、VTE の発症に関する遺伝因子および環境因子が危険因子として明らかになっているにもかかわらず、米国では VTE は依然として患者数が減っていないようである。こうしたことを背景として、2007 年に Blood 誌の Perspective に VTE が取り上げられ¹²⁾、2008 年 3 月号の Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 誌には、VTE に関する 8 つの総説が掲載された¹³⁾。こういった背景には、VTE という疾患の重要性を米国で喚起し啓蒙する目的があるようである。

VTE の発症は加齢で増加する。米国ミネソタ州の

1966 年~1990 年の統計によると、VTE 発症者数は 55 歳から増加し、80 歳では約 100 人年に 1 回の発症となり、80 歳以上では 45 歳以下と比べて約 1,000 倍上昇するという¹²⁾。フランスのブレスト地区の 34.2 万人を対象に、1998 年度の 1 年間に行われた VTE 発症の調査結果でも、VTE 発症は加齢により大きく増加し、75 歳以上の年間発症率は 100 人に 1 人に達していた¹⁴⁾。超高齢化社会を迎えた本邦でも、VTE 発症は診断法の普及とともに増加すると考えられ、VTE 発症に関する因子を、日本人を対象に調査することは、本疾患の予防と治療を考える上で重要であろう。

本稿では、厚生労働省調査研究班で行った日本人の VTE 発症に関する遺伝因子に関する研究を紹介する。

1. 研究対象集団

厚生労働省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 (班長: 池田康夫慶応大学教授) では「特発性血栓症サブグループ」を組織し、VTE の発症原因と発症メカニズムを明らかにし、VTE の治療と予防のための方策を検討するため、多施設共同で VTE 患者の遺伝因子に関する研究を進めてきた。本サブグループは 6 施設 (大阪大学: 川崎富夫, 京都府立医科大学: 辻肇, 名古屋大学: 小嶋哲人, 自治医科大学: 坂田洋一, 慶応義塾大学: 村田満, 国立循環器病センター: 宮田敏行) で構成された。本サブグループで VTE 患者約 170 名を登録し、一般住民を対象として VTE の遺伝的背景を調査した。本研究の対照となる一般住民集団は、国立循環器病センター予防検診部が行っている都市部地域一般住民のコホート集団を用いた¹⁵⁾。

¹ 国立循環器病センター研究所

² 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科

³ 京都府立医科大学輸血細胞医療部

⁴ 自治医科大学分子病態治療研究センター

⁵ 名古屋大学医学部保健学科

⁶ 慶応義塾大学医学部臨床検査学

⁷ 慶応義塾大学医学部内科学

2. VTE の候補遺伝子解析

2-1. プロテイン S 遺伝子

2-1-1. 5 個の候補遺伝子多型解析

候補遺伝子アプローチでは、機能との関連が明らかになっている次の 5 つの遺伝子変異を検討した⁹⁾。ADAMTS13 Pro475Ser 変異は、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) の原因遺伝子 ADAMTS13 に見られる変異である。本変異は国立循環器病センターが同定したミスセンス変異である。これによりプロテアーゼ活性は低下するが、TTP の発症をおこすまでには至らず、疾患との関連は明らかになっていない¹⁶⁾。ADAMTS13 活性を蛍光合成基質で測定すると、変異体は約 30% の活性低下を示す¹⁷⁾。プラスミノゲン Ala620Thr 変異は、約 30 年前に自治医科大学により変異保有患者が報告された¹⁸⁾。変異プラスミノゲンは活性低下を示す^{19~22)}。プロテイン S Lys196Glu 変異は、名古屋大学および徳島大学・三重大学で同定された変異で、活性低下を示す^{23~25)}。第 XII 因子 -4C>T 変異は九州大学で見いだされた変異である。変異により本来の ATG 配列より上流に新しい ATG ができるので、ここから翻訳が始まり本来の ATG から翻訳量が減少するため血中の第 XII 因子量が低下する²⁶⁾。Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) 4G/5G はスウェーデンで同定された変異である。この変異はプロ

モーター領域にあり、転写因子の結合に影響を与え、PAI-1 mRNA 量が変化する²⁷⁾。後 2 者は、白人種にも見られるが、前 3 者は白人種にはみられず、人種特異的な変異と思われる。

これら 5 多型を VTE 患者群 (161 名) と一般住民群 (3,651 名) でタイピングし、多型頻度を比べた結果、プロテイン S Lys196Glu 変異の変異 Glu アレル頻度が、一般住民群より VTE 群で有意に高く、変異 Glu アレルが VTE の危険因子であることが判明した (オッズ比, 5.6, 95% 信頼区域, 2.90~9.46) (表 1)⁹⁾。他の 4 多型は、一般住民群と VTE 群で頻度に差が見られず、VTE と関連を示さなかった。同じ時期に、九州大学濱崎直孝教授も日本人の VTE の遺伝因子の研究を発表し、プロテイン S Lys196Glu 変異が危険因子であることを報告した (オッズ比, 3.7)²⁸⁾。このように、2 つの独立した研究から本変異と VTE の関連が明らかになった。

私達の研究では、一般住民 3,651 人中にヘテロ接合体が 66 名、ホモ接合体はいなかったため、アレル頻度は 0.9% と計算された。これは、以前名古屋大学が算出したアレル頻度 0.8%²³⁾、今回九州大学が求めたアレル頻度 0.8%²⁸⁾ とよく一致した。これより、一般住民の約 55 人に 1 人がヘテロ接合体と算出された。この頻度から、約 12,000 人に 1 人がホモ接合体と計算された。日本人総人口を 1 億 2,000 万人とすると、約 1 万人がホモ接合体で

表 1 VTE 患者を対象とした 5 遺伝子多型の症例対照研究

		ADAMTS13 Pro475Ser	PLG Ala620Thr	PS Lys196Glu	FXII -4C>T	PAI-1 4G/5G
VTE 群	Major homo	139	152	146	63	61
	Hetero	20	9	13	75	69
	Minor homo	1	0	2	23	30
Total		160	161	161	161	160
MAF		0.069	0.028	0.053	0.376	0.403
一般 住民群	Major homo	3290	3501	3585	1513	1468
	Hetero	332	149	66	1651	1686
	Minor homo	17	0	0	486	497
Total		3639	3650	3651	3650	3651
MAF		0.05	0.02	0.009	0.359	0.367
χ^2		2.179	0.987	75.464	0.372	3.402
P		0.336	0.32	<0.0001	0.83	0.183
Major allele		Pro	Ala	Lys	T	4G
Minor allele		Ser	Thr	Glu	C	5G

MAF: minor allele frequency Kimura et al., Blood, 2006.

表 2 プロテイン S K196E 変異

Characteristics	Description
遺伝子変異部位	cDNA, 586A>G ²³⁾ genomic DNA, 67951A>G ²³⁾
アミノ酸変異	第 2 EGF 様ドメイン内にある Lys196Glu (K196E) 変異。成熟蛋白質のアミノ末端を 1 番とした場合は、Lys155Glu になる。
アレル頻度	日本人 3,651 人中では 0.009 ⁹⁾ 日本人 183 人中では 0.008 ²⁸⁾ 日本人 304 人中では 0.008 ²³⁾
VTE に対するオッズ比 (95% 信頼区域)	5.58 (3.11~10.01) ⁹⁾ 3.74 (1.06~13.2) ²⁸⁾
血漿中のプロテイン S 活性	34 人のヘテロ接合体では 71.9±17.6% (平均±SD), 正常人の平均値より 16% 低い活性を示す ³⁰⁾
遺伝子変異の検出法	検出法 1: 変異プライマーを用いた Restriction fragment length polymorphism 法 ²³⁾ 次のプライマーを使って PCR で 434-bp を増幅し, <i>Hinf</i> I 切断の違いを見る。E-allele は 404-bp と 30-bp に分解される。 PCR primer 5'-CAATTTTAGAATTCCATGACATGAGA and mutagenic primer 5'-CCATCCTGCTCTTACCTTTACAATCTGACT. 検出法 2: TaqMan 法 ⁹⁾ PCR primers, 5'-ACCACTGTTCCCTGTAAAAATGGTTT, 5'-TGTGTTTTAATTCTACCATCCTGCT. Probes, 5'-VIC-CAAATGAGAAAAGATTGTAAAG-MGB (mutant E-allele)/ 5'-FAM-CAAATAAGAAAAGATTGTAAAG-MGB (wild-type allele)
組み換えプロテイン S Glu 196 変異体を用いた機能解析	分子量: 野生型と同 ²⁴⁾ 活性化プロテイン C は結合しない ²⁵⁾

あると推定された¹⁰⁾。プロテイン S Lys196Glu 変異に関する情報を表 2 にまとめた。プロテイン S Lys196Glu 変異は、これまでのところ日本人にしか同定されていないが、韓国人や中国人にも本変異は存在するものと考えられる。

2-1-2. プロテイン S Lys196Glu を保有するヘテロ接合体のプロテイン S 活性

プロテイン S Lys196Glu 変異は、1993 年に名古屋大学と徳島大学・三重大学がそれぞれ独立に VTE 患者に同

定したミスセンス変異である。本変異はプロテイン S 分子の第 2EGF 様ドメイン内にある (表 2)。本変異は変異を同定した地名に因んで、プロテイン S Tokushima 変異とも呼ばれる。血中に本変異を有する異常分子が存在するので、血中の抗原量の低下は見られない^{23~25, 29)}。本変異体は活性化プロテイン C (APC) のコファクター活性を示さないことが発現実験で明らかとなっている²⁵⁾。

本変異のヘテロ接合体保有者の血中プロテイン S 活性を調べるため、一般住民 1,862 人の活性を測定し、遺伝

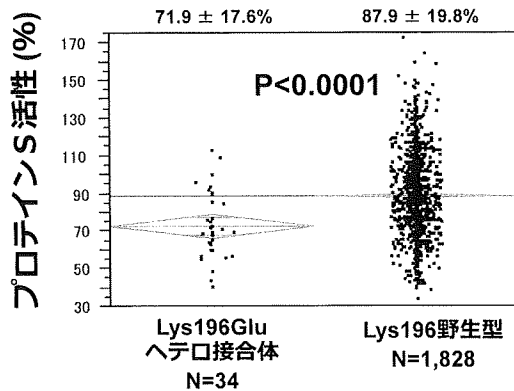


図1 プロテインS Lys196Glu 変異保有者の血中プロテインS活性³⁰⁾。一般住民1,862名の血中プロテインS活性を測定し、Lys196Glu 変異の遺伝型に分けて活性を比較した。ヘテロ接合体(34名)のプロテインS活性(71.9±17.6%, 平均値±SD)は野生型(1,828名)のプロテインS活性(87.9±19.8%)より有意に低い($p < 0.0001$)。

型との関連を調べた³⁰⁾。この研究では、34人がヘテロ接合体であり、ヘテロ接合体者のプロテインS活性は40%から110%まで広い範囲を示した(図1)。一方、野生型プロテインSをもつ1,828人の活性も40%から170%までの広い活性分布を示した。両群の活性値は、大きく重複しているため、血中のプロテインS活性だけではLys196Glu 変異を識別できないことを示唆した。しかし、遺伝型に分けて活性を比較すると、変異Glu アレルのヘテロ接合体者は平均16%の活性低下を示すことが明らかとなった(プロテインS LysLys 型, 1,828名: プロテインS活性 87.9±19.8%, 平均±SD, プロテインS LysGlu 型, 34名: プロテインS活性 71.9±17.6%, $P < 0.0001$)³⁰⁾。

プロテインS Lys196Glu 変異はプロテインS活性を低下させることから、日本人に見いだされた血栓性素因と考えられる。このことから、本変異は他の血栓性疾患の素因になる可能性が考えられる。また、本変異は日本人だけでなく東アジア人に共通に見られる変異と考えられるので、韓国人や中国人を対象にした研究も進められるべきであろう¹⁰⁾。本変異は白人種には見られない。白人種に見られる第V因子 Leiden 変異とプロトロンピン G20210A 変異は、保因者のハプロタイプ解析から、それぞれ21,340年前および23,720年前に生じた変異に由来する推定され、今日白人種に広く分布していることから、両変異の選択的な進化上の優位性(けがなどの出血性疾患に対する優位性)が考えられる³¹⁾。同様の手法を用いると、プロテインS Lys196Glu 変異が生じた年代の推定も可能であろう。

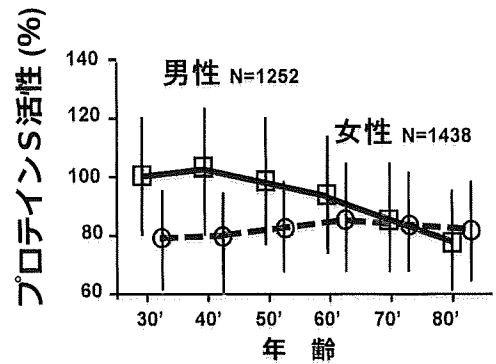


図2 プロテインS活性の性差と年齢差¹⁰⁾。一般住民2,690名(男性1,252名, 女性1,438名)のプロテインS活性を測定し、男女別に10歳毎に示した。男性は実線, 女性は点線で示す。四角は男性の活性平均値, 丸印は女性の活性平均値, SDは縦線で示した。

図2に、一般住民2,690人を対象に測定したプロテインS活性を、性と年齢に分けて表示した¹⁰⁾。プロテインS活性は、大きな性差が見られ、30歳代と40歳代の女性は同年代の男性より約20%活性が低い。男性は加齢によりプロテインS活性は低下するが、女性では加齢による変化は見られない。こういったプロテインS活性の変化により、活性値による欠損症の同定を難しくしている。また、プロテインS活性は多くの後天性因子の影響を受ける事が知られている。特に、妊娠時のプロテインS活性は、欠損症に匹敵する程度にまで低下することが知られており、注意が必要である^{32, 33)}。

プロテインSの抗凝固活性は、APC依存性と非依存性がある。APC依存性抗凝固活性は、APCによる活性型第V因子および活性型第VIII因子の分解を促進する。最近、APC非依存性のプロテインSの機能として、Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)の活性型第X因子阻害の促進活性が報告された³⁴⁾。このプロテインS活性は、組織因子経路の凝固活性を抑制することにより抗凝固として働き、大変注目される。プロテインS Lys196Glu 変異体のAPC非依存性の機能はまだ調べられていない。

プロテインSは血中では補体制御因子であるC4BPと複合体を形成する。この親和性はとても強い。複合体のプロテインSは抗凝固能を持たず、遊離型だけが抗凝固能を示す。C4BPは α 鎖だけで構成される分子と β 鎖を含む分子がある。プロテインSは β 鎖にのみ結合する。 α 鎖は炎症で増加するが β 鎖は増加しない。したがって、炎症時でも遊離プロテインS量は大きな変動はなく、プロテインSによる抗凝固能も大きく変化するものではないといわれている³⁵⁾。プロテインS活性を測定する際、

C4BP との複合体が解離しない条件で活性測定する必要がある。このため、37℃での測定は避けるように報告されている³⁶⁾。

プロテイン S 欠損症は、欧米人に比べ、日本人に多く見られるという報告が相次いでいる^{37~39)}。既に述べたように、一般住民を対象に測定した結果では、プロテイン S 活性は幅広い値を示すため、欠損症を定義する客観的な明確な値がない。こういった、測定法の限界を勘案してもなお、プロテイン S 欠損症は日本人に多いようである。

2-1-3. プロテイン S 欠損症患者における *PROS1* 遺伝子欠損

プロテイン S 欠損症とみなされる程度にまで活性が低下した患者のプロテイン S 遺伝子の解析を行っても、その半数にしか原因変異は同定されず、残りの症例には変異を同定できないことが大きな問題になっている^{40~42)}。これは、重症血友病患者の遺伝子解析を思い起こさせる。この場合、第Ⅷ因子遺伝子の Alu 配列特異的逆位 (inversion) で説明された⁴³⁾。しかし、プロテイン S 遺伝子近傍には Alu 配列は存在しない。そこで、プロテイン S 遺伝子の大きな欠失を想定し、VTE 患者 163 名のプロテイン S 遺伝子欠損の解析を multiplex ligation-dependent probe amplification 法で行った⁴⁴⁾。その結果、プロテイン S 活性 21% を示す 1 名の患者の 1 アレルに遺伝子全域の欠失を認めた。163 名中に 1 名に欠失を認めたので、高頻度に認められることにはならないが、プロテイン S 活性が 50% 以下で、かつミスセンス変異が同定されない患者とすると 6 名に絞られ、そのうちの 1 名が遺伝子欠失を保有していたことになる。プロテイン S の遺伝子欠失は VTE 患者に広く認められるものではないが、活性低下症例には存在することが明らかとなった。今後、プロテイン S 活性が低下しており、かつミスセンス変異が同定されない患者を対象に、プロテイン S 遺伝子の欠失を探索する必要があるかもしれない。

2-2. アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S の遺伝子変異

アンチトロンビン、プロテイン C、プロテイン S の遺伝子変異は、VTE の遺伝的背景として知られているが、どれくらいの頻度でこういった変異が存在するのかについての研究はなかった。そこで、サブグループで収集した VTE 患者 173 名を対象に 3 つの遺伝子の蛋白質コード全領域の DNA シークエンスを行った⁴⁵⁾。その結果を表 3 に示す。VTE 患者 54 名にミスセンス変異などのアミノ酸変化を伴う遺伝子異常を同定した。プロテイン S 遺伝子欠損患者 1 名を加えると、総計 55 名、約 32% の患者に、39 種のアミノ酸の変化を伴う変異が同定された。

表 3 173 名の VTE 患者に見られたアミノ酸配列が変化する変異を有する患者数

遺伝子名	患者数
プロテイン S	24*
プロテイン C	12
アンチトロンビン	14
プロテイン S+プロテイン C	5
合計	55

*1 名のプロテイン S 遺伝子欠失患者を含む

表 4 2 つの遺伝子に変異を有する 5 名の患者

プロテイン S	プロテイン C	VTE 発症年齢	家族歴
Lys196Glu	Lys193del	57	情報なし
Lys196Glu	Arg221Trp	40	なし
Lys196Glu	Arg27Trp	39	あり
Lys196Glu	Val339Met	25	あり
Lys196Glu	Val339Met	55	なし

なかでも、プロテイン S Lys196Glu は前述のように最も多くの患者に見られ、次いでプロテイン C の Lys193del 変異と Val339Met 変異が 4 名ずつの患者に同定された。このことから、これら 3 つの変異は日本人の VTE の危険因子として重要であることが明らかとなった。Val339Met 変異保有者のプロテイン C アミド活性は 1 名 (77%) を除き、低い活性を示したが、Lys193del 変異保有者はいずれもアミド活性は 90% 以上を示した。九州大学も本変異保有者を同定しているが、その抗凝固活性は低値を示していた²⁸⁾。このことから、Lys193del 変異はプロテイン C の抗凝固活性を低下させるがアミド活性には影響しないものと考えられた。プロテイン C アミド活性は、その簡便性と優れた定量性から、血栓性素因のスクリーニングとして広く使われているが、Lys193del 変異を持つ血漿は、アミド活性が低下しないことを理解する必要がある。ちなみに、Lys196 残基はプロテイン C 軽鎖の C 末端から 6 残基目に位置する。

VTE 患者のうち、5 名はプロテイン S とプロテイン C の 2 つの遺伝子に変異を保有していた (表 4)。この 5 名の患者はいずれもプロテイン S Lys196Glu 変異を保有していた。このことから、プロテイン S Lys196Glu 変異は他の変異と重複することにより VTE 発症のリスクを上げると考えられた。

VTE 患者 55 名にアミノ酸変化を伴う遺伝子変異を同定した (表 3) ので、次にこれら遺伝子変異保有者の