

V 血小板の異常

血小板減少症

特発性血小板減少性紫斑病

難治性特発性血小板減少性紫斑病

Refractory ITP

Key words : トロンボポエチン(TPO), TPO 受容体作動薬, リツキシマブ,
副腎皮質ステロイド, 脾臓摘出

富山佳昭

V

血小板の異常

1. 概念・定義

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP) は、ほかに明らかな基礎疾患を有さず、抗血小板自己抗体により主として脾臓での血小板破壊が亢進し血小板減少をきたす後天性の自己免疫疾患であり、厚生労働省の特定疾患治療研究事業対象疾患(特定疾患)に認定されている^{1,2)}。最近ではITPに関する国際作業部会(International Working Group: IWG)において、特発性血小板減少性紫斑病に対して primary ITP(primary immune thrombocytopenia)との名称が提唱されており、SLEやHIVなど他の疾患に伴うITPは secondary ITPとして区別するとしている³⁾。

難治性ITPの定義として、はっきりした基準はないが、‘各種治療法に抵抗性であり、かつ出血傾向を伴う症例’と考えるのが一般的である。‘各種治療法’を具体的に記述すると、*H. Pylori* 除菌療法やステロイド療法および脾臓摘出術(脾摘)であり、血小板数は3万/ μL 未満で出血傾向にある症例が該当する(治療と予後の項を参照されたい)。

2. 疫 学

難治性ITPについては定義がはっきりしないため、その頻度については各報告によってまちまちでありITP症例の5-30%とされている。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’班の

調査では、副腎皮質ステロイド療法、あるいは脾摘療法、その他の治療にも反応せず2万/ μL 以下の血小板減少が6カ月以上続く症例と定義すると、ITPの約5%が難治症例と推計された⁴⁾。ITPの臨床調査個人表を解析すると、我が国におけるITP患者数は約2万人であり⁵⁾、難治症例は約1,000人と推計される。

3. 病 態

ITPにおける血小板減少の主たる病態は、血小板の破壊亢進である。慢性ITPでは自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓を中心とした網内系においてマクロファージのFc受容体を介して捕捉され、破壊され血小板減少をきたす。血小板自己抗体の主要な標的抗原としては、血小板膜糖タンパク GP IIb-IIIaおよびGP Ib-IXが明らかにされている^{1,2)}。これらの標的抗原は抗原提示細胞であるマクロファージによりプロセッシングを受け、そのHLA上に表出され、抗体産生を誘導する。このようにITPでは、脾臓が主な血小板破壊部位であるとともに、血小板抗体産生部位でもある。一方、血小板破壊亢進に加え、ITPにおいては巨核球の成熟障害や細胞障害を生じており、血小板産生も抑制されていることが明らかにされている。血小板自己抗体が骨髄巨核球にも結合し、血小板の産生障害を引き起こしていると考えられる^{1,2)}。脾摘無効例の場合、血小板は肝臓や骨髄の網内系細胞により貪食されていると考えられる。

再生不良性貧血など造血障害による血小板減

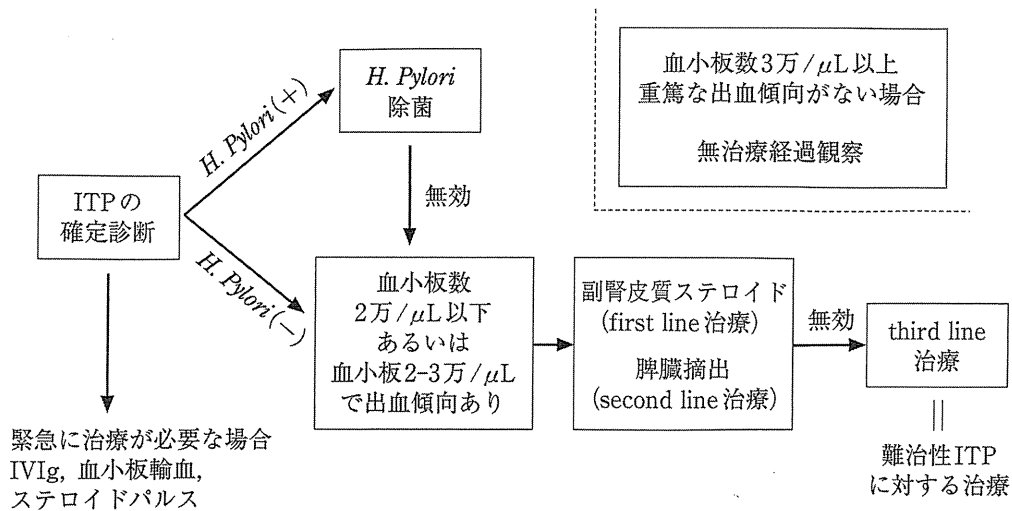


図1 ITP治療の参照ガイド2012年版の概要

「血液凝固異常症に関する調査研究」班で作成したITP治療の参照ガイド2012年版の概要。難治性ITPに対してはthird line治療にて対応する。

少症では血漿トロンボポエチン(TPO)濃度は著明に増加しているが、ITPでは血漿TPO濃度は正常ないしは軽度増加しているのみである⁶⁾。新規薬剤としてTPO受容体作動薬が開発されているが、難治ITPに対しての有効性が示されている。

4. 治療と予後

図1に「血液凝固異常症に関する調査研究」班で作成したITP治療の参照ガイドの概要を示す。初診時血小板が $30,000/\mu\text{L}$ 以上あり出血傾向を認めない場合は、無治療での経過観察を推奨している^{4,7)}。H. Pylori感染を伴う場合は、緊急性を要さないときは血小板数に関係なく、まずH. Pylori除菌療法を試みる。無効な場合、第一選択薬として副腎皮質ステロイドを試みる。しかし、血小板数を正常に維持するために高用量の副腎皮質ステロイドを長期に使用すべきではなく、1カ月程度で減量する。副腎皮質ステロイドが無効の場合、第二選択として脾臓摘出が挙げられる。

副腎皮質ステロイドが無効、あるいは糖尿病合併などで副腎皮質ステロイドに対する忍容性がない、脾摘が無効あるいは脾摘施行が困難な状態にある(あるいは脾摘を患者が拒否している)場合で、血小板数 $30,000/\mu\text{L}$ 未満で出血傾向

表1 ITPにおけるthird line治療

トロンボポエチン受容体作動薬
ダナゾール*
アザチオプリン*
シクロホスファミド*
ピンカアルカロイド緩速点滴静注療法*
デキサメタゾン大量療法*
ステロイドパルス療法(メチルプレドニゾン)*
シクロスポリン療法*
リツキシマブ*

*現時点で保険適用がない薬剤。

を呈する症例が、難治性ITPである。難治性ITPにおける治療目標は、血小板数を正常化させることではなく、危険な出血を予防することである⁴⁾。言い換えると、危険な出血を予防する最小限の血小板数を維持することを目標に、必要最小限の治療薬の処方にとどめるべきであり、血小板を $100,000/\mu\text{L}$ 以上に増加させるためだけに副腎皮質ステロイドなどを多量に使用し続けることは、逆にその副作用のために患者のquality of lifeの低下につながるため避けるべきである。具体的には、血小板数 $30,000/\mu\text{L}$ 以上を維持するように努める。難治性ITPに対するthird line治療薬を表1に示す。これらの薬剤の中でTPO受容体作動薬のみが保険適用となっている。

TPO 受容体作動薬は巨核球前駆細胞, 更には造血幹細胞の TPO 受容体に結合し TPO 受容体を活性化し血小板造血を刺激するが, その血小板数の増加作用は薬剤開始後 5-7 日で認められ, 血小板数のピークは約 10-14 日後に得られる特徴を有する⁷⁾. つまり TPO 受容体作動薬の最大効果発現には 2 週間かかることに留意すべきである. TPO 受容体作動薬としては, エルトロンボパグ(経口剤, 1 日 1 回)とロミプロスチム(皮下注製剤, 1 週 1 回)が市販されている.

エルトロンボパグは現在までに血小板数 3 万/ μL 以下の治療抵抗性 ITP 症例を対象に前向き二重盲検法での臨床試験が行われ, 約 80%と高い有効性(血小板数が一度でも 5 万/ μL 以上となった場合を有効と判断)が示されている⁷⁾. 血小板数 3 万/ μL 以下の難治性 ITP 症例 118 例を対象に行われた前向き二重盲検法での用量設定試験では, 6 週間にわたるエルトロンボパグ服用群(30mg/日, 50mg/日, 75mg/日)およびプラセボ服用群において 43 日目の血小板数が 5 万/ μL 以上となることを一次エンドポイントとすると, その有効率はプラセボ群 11%に対し, エルトロンボパグ 30mg 群 28%, 50mg 群 70%, 75mg 群 81%と良好な成績であった. 一方, 副作用の発生や程度はプラセボ群とほぼ同程度であったが, 副作用としては頭痛が多かった⁸⁾. 興味深いことに日本人を対象とした臨床試験において, エルトロンボパグは日本人では欧米人と比べより低用量で同等の効果を発揮することが明らかとなった⁹⁾. その結果, 我が国における投与開始量は安全性を重視し 12.5mg/日に設定され, 最大用量は 50mg/日までとなった(欧米では 50mg/日が開始量, 最大 75mg/日). なお, 12.5mg 錠は日本のみの発売となっている.

皮下注製剤のロミプロスチムにおいても, 治療抵抗性 ITP に対する優れた有効性が示されている⁷⁾. ロミプロスチムの開始量は 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり, 最大投与量は欧米と同様に 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となっている. 血小板数 3 万/ μL 以下の摘脾 ITP 患者 63 例, 非摘脾 ITP 患者 62 例を対象に行われた臨床試験において, 本剤の有効性は摘脾群

79%, 非摘脾群 89%の有効性を示し, 平均の投与量は摘脾群では約 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 非摘脾群では約 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった¹⁰⁾.

上記のように TPO 受容体作動薬の有効性は明らかでありその忍容性も高いが, 長期安全性はいまだ確立していない. そのため, 現時点では third line 治療との位置付けである⁴⁾. この TPO 受容体作動薬の ITP 治療における位置付けは, 最近発表されたアメリカ血液学会のガイドラインでも同様の位置付けである¹¹⁾. 使用に際しては, 以下の点に留意すべきである. ①血小板数が正常範囲以下であっても血栓症, 血栓塞栓症を起こすことがある. ②脳梗塞, 心筋梗塞, 肺塞栓などの血栓症の既往のある症例や抗リン脂質抗体を有する症例には血栓症を生じる可能性があるため, 慎重投与する. ③ITP 以外の血小板減少症には使用が認められていない. つまり再生不良性貧血, 骨髓異形成症候群には適用はない. ④腎機能障害あるいは肝機能障害のある症例に対しては, 慎重投与が必要. ⑤妊娠 ITP への適用はない.

難治性 ITP の治療薬としては, TPO 受容体作動薬以外に抗 CD20 抗体(リツキシマブ)が注目されているが, 我が国ではいまだ保険適用外である. 抗 CD20 抗体は B 細胞性リンパ腫に対して開発されたが, 自己抗体産生 B 細胞に対しても細胞傷害作用を有することより現在までに種々の自己免疫疾患に対してその有効性が示されている. ITP に対しては, 欧米における後方視的解析では, 48%に完全寛解(血小板数 15 万/ μL 以上), 60%に部分寛解以上(5 万/ μL 以上)の効果を誘導しうるとされている. しかしながら, ウイルスの再活性化や進行性多巣性白質脳症の発症などの発症が問題となっている¹²⁾. 我が国においては, 医師主導型治験において難治性 ITP に対するリツキシマブの有効性と安全性を検討する第 III 相試験が 2011 年 10 月より施行中である. 今後の結果が待たれる.

ITP では血小板数が 3 万/ μL 以上では死亡率は健常人の死亡率と同じであるが, 3 万/ μL 以下だと出血や感染が多くなり死亡率が約 4 倍に増加すると報告されており, 3 万/ μL 以上を維

持できれば比較的予後は良好である¹³⁾。

疾患克服研究事業), 「血液凝固異常症に関する調査研

[本稿の一部は厚生労働省科学研究費補助金(難治性 究)の助成を受けた。]

■ 文 献

- 1) 富山佳昭: 特発性血小板減少性紫斑病. 臨床血液 49: 1298-1305, 2008.
- 2) Cines DB, et al: Immune thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 346: 995-1008, 2002.
- 3) Rodeghiero F, et al: Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. Blood 113: 2386-2393, 2009.
- 4) 藤村欣吾ほか: 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド2012年版. 臨床血液 53: 433-442, 2012.
- 5) Kurata Y, et al: Epidemiology of primary immune thrombocytopenia in children and adults in Japan: a population-based study and literature review. Int J Hematol 93: 329-335, 2011.
- 6) Kurata Y, 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 115: 656-664, 2001.
- 7) 富山佳昭: トロンボポエチン受容体作動薬による難治性ITPの治療. 臨床血液 52: 627-632, 2011.
- 8) Bussel JB, et al: Eltrombopag for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med 357: 2237-2247, 2007.
- 9) Tomiyama Y, et al: A lower starting dose of eltrombopag is efficacious in Japanese patients with previously treated chronic immune thrombocytopenia. J Thromb Haemost 10: 799-806, 2012.
- 10) Kuter DJ, et al: Efficacy of romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: a double-blind randomised controlled trial. Lancet 371: 395-403, 2008.
- 11) Neunert C, et al: The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. Blood 117: 4190-4207, 2011.
- 12) Arnold DM, et al: Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Ann Intern Med 146: 25-33, 2007.
- 13) Portielje JE, et al: Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. Blood 97: 2549-2554, 2001.

特発性血小板減少性紫斑病の病態と診断

富山佳昭^{1,2}, 清水一亘², 柏木浩和²

Key words: Thrombopoietin, Percentage of reticulated platelets, Anti-GPIIb-IIIa, Autoantigenic epitope

1. はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura, ITP) は、他の基礎疾患や薬剤などの原因が明らかではないにもかかわらず、血小板の破壊が亢進し血小板減少を来す後天性の疾患であり、血小板に対する自己抗体に起因する自己免疫疾患と考えられている^{1,2)}。そのため、欧米では特発性 (idiopathic) というよりは免疫性 (immune) あるいは自己免疫性 (autoimmune) という表現が用いられることが多く、最近では本疾患に対して primary immune thrombocytopenia (primary ITP) との名称が提案されている³⁾。しかしながら、現在においても本疾患の診断は除外診断が主体となっている^{1,2)}。本稿では、ITP の病態解析の最近の進歩について解説するとともに、その病態解析に基づいて開発されている補助診断法の現状について紹介する。

2. ITP の病態

まず本疾患の診断基準には、血小板数は 10 万/ μ l 未満と記載されている³⁾。ITP における血小板減少の主たる病態は、血小板の破壊亢進である。慢性 ITP では自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓を中心とした網内系においてマクロファージの Fc 受容体を介して捕捉され、破壊され血小板減少をきたす。血小板自己抗体の主要な標的抗原としては、血小板膜糖蛋白 GPIIb-IIIa および GPIb-IX が明らかにされている^{4,5)}。これらの自己抗体は主として脾臓で産生される。このように ITP では脾臓が主要な血小板抗体の産生部位であると共に、血小板の破壊部位でもある。一方、以前より ITP の骨髓

では血小板を豊富に含有する成熟巨核球の比率が減少し未熟な巨核球の比率が増加することが知られていたが、ITP 血漿により巨核球の増殖および成熟障害を来すことが実験的にも明らかにされている。このように、ITP においては血小板破壊亢進に加え、血小板産生も障害されていることが明らかとなってきた (図 1)⁶⁾。

3. ITP の病態に則した補助診断法

a) 血漿トロンボポエチン (TPO) 濃度

TPO はアミノ酸 332 残基よりなる分子量 95kDa の蛋白であり、血小板造血因子として 1994 年に同定された。TPO はその大部分が肝臓で産生されており、血小板数の変動に関係なくその産生量は一定に保たれている。TPO 受容体である c-Mpl は、造血幹細胞にもその発現は見られるが主として血小板/巨核球系に発現しており、c-Mpl による TPO 吸着が血漿 TPO レベルを制御している。そのため、化学療法などで血小板が減少すると血漿 TPO 濃度は著明に増加し、血小板輸血にて血小板数が増加すると血漿 TPO 濃度は低下する⁷⁾。種々の血小板減少病態で血漿 TPO 濃度を測定すると、再生不良性貧血や化学療法後の血小板減少では巨核球も減少し血小板産生が低下しているため血漿 TPO 濃度は著増する。一方 ITP においては、血小板減少にも関わらず血漿 TPO 濃度は正常ないしは軽度増加しているのみであった⁸⁾。ITP では血小板破壊亢進状態であり、巨核球の分化・成熟障害は認められるものの、その数は低下していないため c-Mpl としての減少は僅かであるため、血漿 TPO 濃度の増加は軽度に留まると考えられる。また、ITP 血小板に結合した TPO が早期に網内系にて血中から除去されることも、ITP において血漿 TPO が増加しない一因であると考えられている。

以上のように血漿 TPO 濃度測定は、再生不良性貧血

¹ 大阪大学医学部附属病院輸血部

² 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科

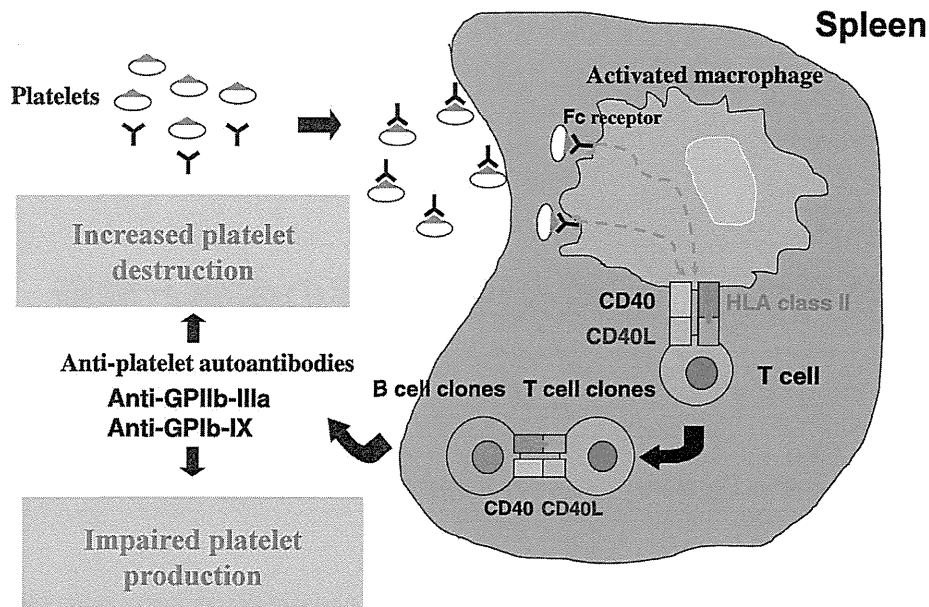


図1 ITPの病態（文献6より引用）

主に脾臓で産生された抗血小板自己抗体（主にIgG）は血小板膜 GPIIb-IIIa あるいは GPIb-IX に結合し、感作血小板は主として脾臓内でマクロファージ上の Fc 受容体を介して捕捉され、破壊される。血小板を取り込んだマクロファージは GPIIb-IIIa あるいは GPIb-IX の抗原ペプチドを HLA 抗原上に表出し、HLA class II-CD4 に加え副刺激経路（ここでは CD40-CD40L を提示）などを介して自己反応性ヘルパー T 細胞を活性化し、さらには B 細胞を活性化し抗体産生を誘導する。一方では、これらの抗体は巨核球の成熟障害などを誘導し、血小板産生を抑制する。

などの血小板産生低下の病態と、ITP などの血小板破壊亢進の病態を区別しうるマーカーとなる可能性がある。しかしながら、国内には薬事法で承認された TPO 測定キットすら無い状態であり、筆者らを含め一部の大学研究室および（株）SRL が個別対応にて TPO 濃度を測定しているのが現状である。

b) 網状血小板比率

網状血小板は細胞質に RNA が豊富に存在する大型血小板で、巨核球から新たに産生された幼若血小板と考えられる。事実、ITP では血小板数あたりの網状血小板数である網状血小板比率が増加しており、再生不良性貧血ではそのような増加は検出されない。

筆者らの検討では、血小板産生低下症例（再生不良性貧血および化学療法後の血小板減少症）と ITP の鑑別において、網状血小板比率が増加し且つ血漿 TPO 濃度が正常である場合を ITP と診断すると、その疾患感受性は 69%、特異性は 100% であり、ITP などの血小板破壊亢進に起因する血小板減少と再生不良性貧血などの骨髓低形成による血小板減少の鑑別診断に有用であった⁹⁾。

c) GPIIb-IIIa (α IIb β 3) もしくは GPIb-IX に対する自己抗体検出

PAIgG (Platelet-associated IgG, 血小板関連 IgG) の測定は、2006 年に保険収載された。ITP においてはその 90% 以上の症例において PAIgG が上昇しておりその疾患感受性は高いが、PAIgG は血小板に結合した（あるいは付着した）非特異的な IgG も測定するため再生不良性貧血などの血小板減少時にも PAIgG が高値になることがあり、その特異性は低く 27% とも報告されている⁹⁾。そのため ITP の診断において PAIgG の診断的意義は少なく、PAIgG が高値であっても ITP とは診断できない。PAIgG に代わり、より ITP に特異性の高い検査として抗 GPIIb-IIIa 抗体あるいは抗 GPIb-IX 抗体検出法がある。前述のように ITP における自己抗体の主要な標的抗原として GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX が明らかにされている。これらの抗原特異的な抗体検出の ITP の診断特異性は 80~90% と高いため、これらの抗体が陽性であれば積極的に ITP と診断しうると考えられる^{10, 11)}。しかしながら、モノクローナル抗体を用いて血小板膜蛋白を固相化する modified antigen-captured ELISA や immunobead assay での抗体検出感度は ITP の約 40~60% と低く、これらの抗体が陰性であっても

ITP は否定できない^{10,11)}。また、これらの検査はいまだ研究室レベルでの検査であり、実地臨床においては測定されていない。

4. 網状血小板比率測定法の比較検討

網状血小板比率は、現在大きく分けて2種類の方法で測定されている。一つは、フローサイトメトリーを用いた方法 (FCM 法) であり、以下本法を用いた測定結果は percentage of reticulated platelets (RP%) と略す。もう一つは、多項目自動血球分析装置 XE-2100 や XE-5000 [(株)シスメックス] を用いて、網状血小板比率を immature platelet fraction (IPF) として自動測定する方法である (以下 IPF 法と略す)¹²⁾。両者の測定法の相違点を図2に示す。FCM 法では、抗 CD42b 抗体を用いて血小板分画をモニターし1万個の血小板を確実に解析するのに対し、IPF 法では患者の血小板数が減少していても全血 120 μ l のみを用いて血算を含めた多項目の検査を限られた時間内で行う方法である。そのため IPF 法では IPF の絶対数が減少している検体の同時再現性が劣っていることが示されている¹³⁾。そこで筆者らは ITP61 例と再生不良性貧血 27 例の検体に関して FCM 法と IPF 法の両者を用いて ITP 診断の感受性と特異性を比較検討した。FCM 法を用いた RP% では、ITP61 例中 50 例 (82%) が高値を示したのに対し再生不良性貧血 27 例中 2 例 (7%) でのみ高値であった。一方、IPF 法での結果は ITP61 例中 41 例 (67%) で高値を示したが、再生不良性貧血 27 例においても 10 例 (37%) で高値であった。網状血小板比率が増加している検体を ITP

と診断することとすると、ITP 診断における感受性、特異性ともに FCM 法が 82%、93% と優れていた。一方 IPF 法では、それぞれ 67% と 63% であった (表1)。

FCM 法はその精度は高いものの、時間と手間がかかる、フローサイトメーターが必要である、などの欠点もある。日常診療においては自動分析という簡便さのため IPF 法が汎用されているのが現状であるが、その感受性および特異性は 60% 台であり IPF 法の精度は決して高くはなく、再生不良性貧血を ITP と誤診する可能性があることに留意すべきとの成績である。

5. ITP の病態解析の進歩：

抗 GPIIb-IIIa 自己抗体のエピトープ解析

ITP においては、抗血小板自己抗体の産生がその病態の中核を担っている。ITP の約 40~60% の症例において血小板関連抗 GPIIb-IIIa 自己抗体 (Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies) が検出されるが、抗 GPIIb-IIIa 抗体の認識部位 (エピトープ) に関しては未

表1 ITP と再生不良性貧血の鑑別における FCM 法と IPF 法の感度および特異性

	Sensitivity	Specificity
FCM method (RP%)	82%	93%
IPF method (IPF%)	67%	63%

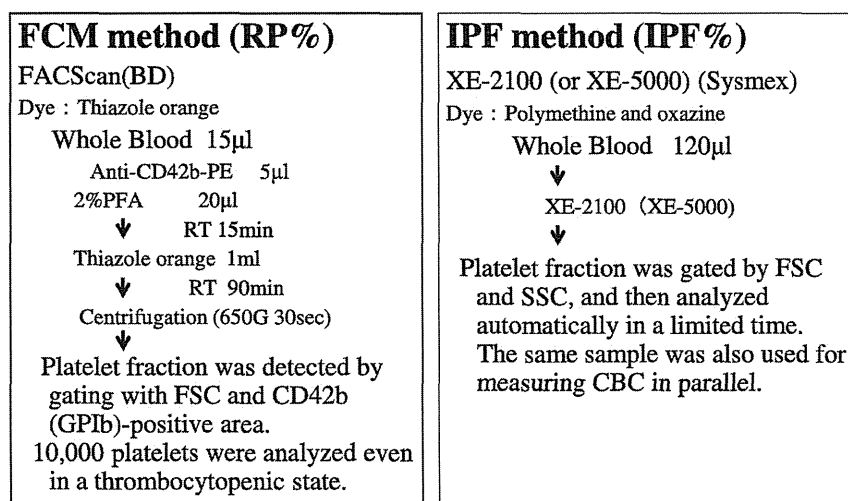


図2 網状血小板比率の測定法の比較

網状血小板比率測定法には、フローサイトメトリー法 (FCM 法) と多項目自動血球分析装置 XE-2100 や XE-5000 [(株)シスメックス] を用いた IPF 法がある。

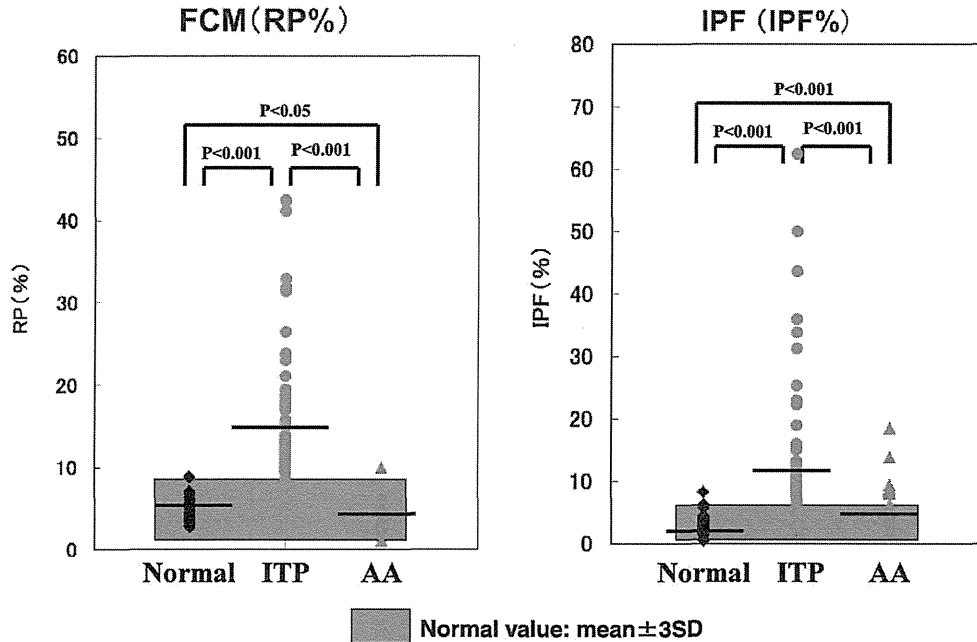


図3 FCM法とIPF法を用いた網状血小板比率の比較 (文献12より引用)
ITP61例と再生不良性貧血27例の検体に関してFCM法とIPF法の両者を用いてITP診断の感受性と特異性を比較検討した。

だ明らかではない。血小板関連抗 GPIIb-IIIa 自己抗体とは、すでに患者血小板に結合している抗体であり自己抗体の要件を満たしている。一方、血清(血漿)中にも血小板抗体は存在するがその陽性率は低く、また抗 HLA 抗体など同種抗体も含まれるため注意が必要である。そのため筆者らは、ITP 患者から血小板を分離し血小板に結合した抗体 (Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies) をエーテル解離し、その特性を解析している⁵⁾。ITP における自己抗体のエピトープ解析は自己抗原の詳細を明らかにしうるため、ITP の病態解析において重要であると考えられる。筆者らはこの観点より、抗 GPIIb-IIIa 抗体のエピトープ解析を行ってきた。その結果、自己抗体は主として GPIIb を認識していること、その認識部位はイムノプロットでは検出できず、GPIIb の立体構造依存性であることをすでに明らかにしている^{14~16)}。

最近、筆者らは ITP の抗 GPIIb-IIIa 抗体はマウス GPIIb-IIIa との反応性が著明に低下し、この反応性の低下はマウス GPIIb とヒト GPIIb の差違に起因していることを見出した¹⁷⁾。ヒトとマウス GPIIb はアミノ酸レベルで 81% (核酸レベルで 82%) の相同性を有している。N 末端には 449 個のアミノ酸より構成される β プロペラ構造が存在し (W1~W7 の 7 つのプロペラより構成されている)、特にそのループ構造においてヒトとマウス間でアミノ酸の相違が見られる (図 4)。そこでさら

にエピトープを限定するため、抗 GPIIb-IIIa 抗体を有する ITP 患者 15 例に関してヒト GPIIb の N 末端から各ループ構造までを順番にマウス GPIIb に置換したキメラ GPIIb を作製し、ヒト GPIIb と共発現させ解析した。また、逆にマウス GPIIb の N 末端から各ループ構造までをヒト GPIIb に置換したキメラ GPIIb も作製し、最終的には関連するアミノ酸を 1 つずつマウス配列に置換して検討した。その結果、 β プロペラ領域の N 末端から前半部分 (W1~W4 4-1 ループ、N 末端から 235 番のトリプトファン残基まで) が自己抗原として重要であることが明らかとなった (図 4B)¹⁷⁾。さらに、図 5 に示すように β プロペラ領域の N 末端から前半部分において主要な自己抗体のエピトープ領域を 3 か所同定し (グループ A, グループ B, グループ C)、さらに 3 例 (症例 17, 23, 36) においてそのエピトープの局在を限定することが可能であった。図 6 に症例 17 と 23 の成績を示しているが、症例 17 では W1: 1-2 ループ内での S29 K 変異, R32S 変異および W2: 3-4 ループでの E136Q 変異, R139 G 変異にて自己抗体の反応性は完全に消失し、症例 23 においても同様の結果であった。W1: 1-2 ループと W2: 3-4 ループは一次構造では離れた部位であるが、立体構造で見ると両者は互いに近接しておりこれらのループ内において S29, R32, R139, E136 残基が自己抗原として重要であることが明らかとなった (図 6)¹⁷⁾。このように ITP における抗 GPIIb-IIIa 抗体の

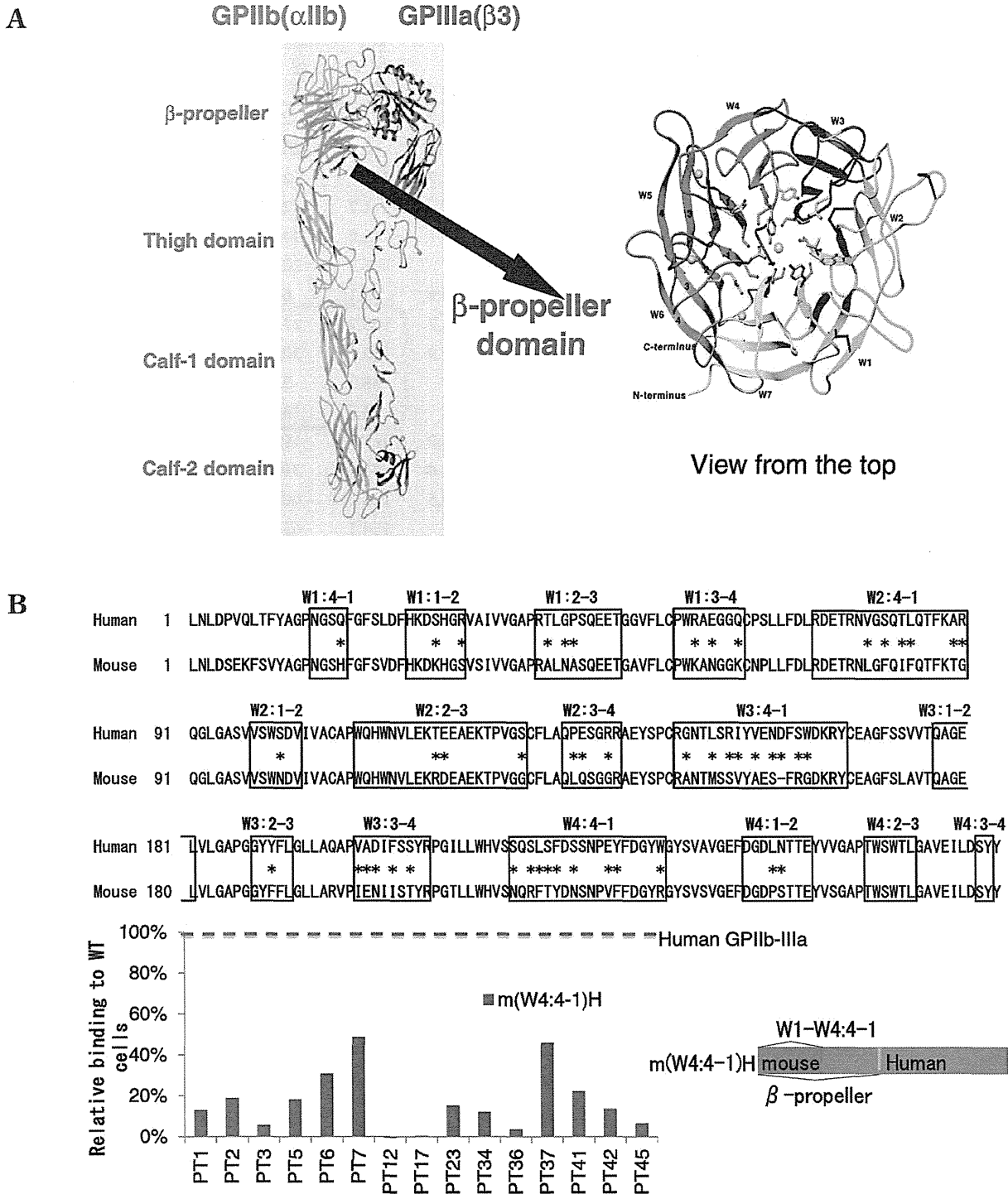


図4 GPIIb-IIIa (α IIB β 3) の構造と ITP の自己抗原の部位

- A) GPIIb の N 末端には 449 個のアミノ酸より構成される β プロペラドメインが存在する。 β プロペラドメインは、W1~W7 の 7 つのプロペラより構成されている。
- B) 上図： β プロペラ領域の N 末端から W4:3-4 ループにおけるヒトとマウス GPIIb のアミノ酸の比較。枠で囲んだ領域がループ構造部分。
 下図： β プロペラ領域の N 末端から前半部分 (W1~W4 4-1 ループ、N 末端から 235 番のトリプトファン酸残基まで) をマウス GPIIb に置換し、ヒト GPIIIa と共発現して検討した。解析した ITP15 例全例において抗 GPIIb-IIIa 抗体の反応性が著明に低下した。

	patient no.	m(W1:4-1)H	m(W1:1-2)H	m(W1:2-3)H	m(W2:2-3)H	m(W2:3-4)H	m(W3:4-1)H	m(W4:4-1)H
Group A (2)	PT17	99.5	-1.5	-1.7	-4.7	NT	-2.9	0.3
	PT23	72.7	18.9	-25.0	-18.4	-6.6	-20.6	15.2
	PT3	84.4	83.3	19.6	12.7	NT	2.9	7.9
Group B (5)	PT36	134.2	116.6	1.5	NT	1.7	2.6	3.8
	PT41	88.7	97.5	50.3	NT	51.0	44.6	22.3
	PT42	85.6	105.0	47.5	NT	41.3	20.5	13.5
	PT12	89.7	87.1	57.5	30.9	9.1	6.8	-1.7
	PT1	75.2	NT	93.2	93.7	102.2	27.3	13.0
Group C (4)	PT6	109.1	NT	232.2	115.9	103.1	30.7	30.7
	PT34	94.0	91.7	108.5	NT	88.3	-3.4	12.1
	PT45	94.3	91.4	95.3	NT	73.5	13.5	6.5
	PT2	87.5	80.3	45.8	36.0	NT	19.6	18.9
Others (4)	PT5	101.5	82.4	74.0	61.6	43.4	39.7	18.3
	PT7	104.9	NT	111.4	90.5	105.3	60.3	48.6
	PT37	123.5	128.5	102.8	NT	114.1	65.4	45.9 (%)

NT: not tested

図5 ITPにおける GPIIb-IIIa 上での自己抗原の局在部位

ヒト GPIIb の N 末端から各ループ構造までを順番にマウス GPIIb に置換したキメラ GPIIb を作製し、ヒト GPIIIa と共発現させ解析した。m(W1:4-1)H とは、ヒト GPIIb の N 末端から W1:4-1 ループまでをマウス GPIIb に置換したキメラ GPIIb を意味する (以下同様)。枠で示したように、抗 GPIIb-IIIa 抗体の反応性が著明に低下する領域が少なくとも 3 か所存在することが明らかとなった (グループ A, グループ B, グループ C)。

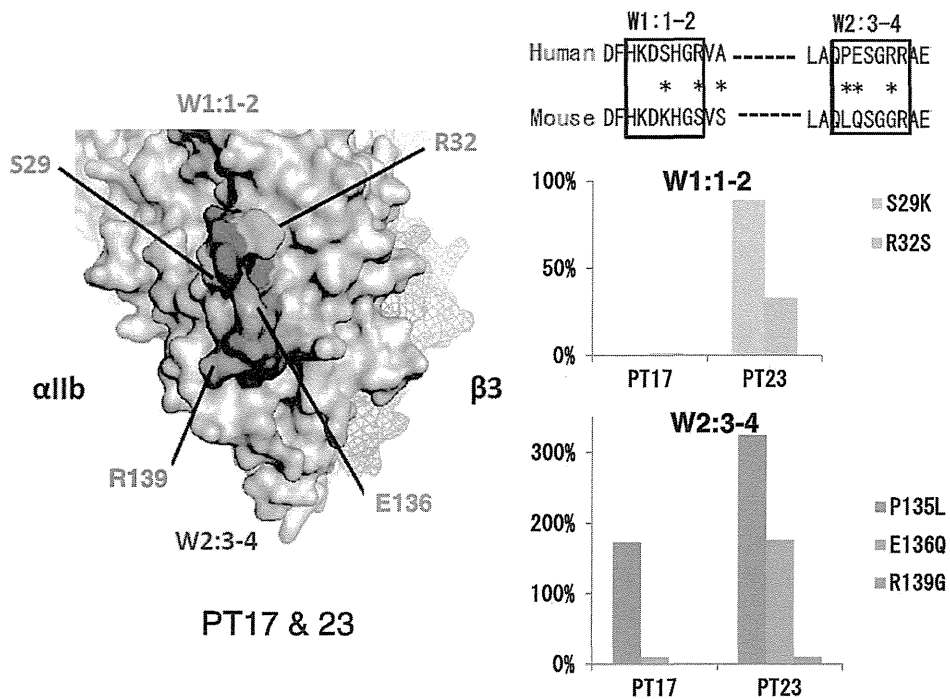


図6 症例17および23 (グループA) における自己抗原の同定

グループAに属する症例17および23では、その自己抗原としてW1:1-2ループとW2:3-4ループで形成される抗原、特にS29, R32, R139, E136が自己抗原として重要な残基であることが明らかとなった。

エピトープは、GPIIb の β プロペラ構造の限定された領域に存在することが示された。これに合致する成績として、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体 (IgG) の κ と λ の比率を検討すると、多くの症例で κ あるいは λ のみが検出され、ITP において極めて限定された B 細胞が自己抗体を産生していることを示唆する成績と考えられる¹⁷⁾。

6. おわりに

本稿では、ITP の病態解析の進歩ならびにそれを基盤とした診断法の開発状況とその問題点に関して概説した。日常診療において、ITP を除外診断ではなくこれらの補助検査により積極的に診断できる日が来るように、さらなる検討が必要と考える。

7. 謝 辞

網状血小板比率ならびに血漿 TPO 測定に尽力頂いた大阪大学医学部附属病院輸血部 林 悟氏にこの場を借りて深謝する。本稿の一部は厚生労働省科学研究費補助金 (難治性疾患研究克服事業)、「血液凝固異常症に関する調査研究」の助成をうけた。

著者の COI (conflicts of interest) 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002; **346**: 995-1008.
- 2) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *臨血.* 2008; **49**: 1298-1305.
- 3) Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood.* 2009; **113**: 2386-2393.
- 4) McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL Jr. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood.* 1987; **70**: 1040-1045.
- 5) Tomiyama Y, Kosugi S. Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol.* 2005; **81**: 100-105.
- 6) 富山佳昭. トロンボポエチン受容体作動薬による難治性 ITP の治療. *臨血.* 2011; **52**: 627-632.
- 7) Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood.* 2002; **100**: 3457-3469.
- 8) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycolocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 2001; **115**: 656-664.
- 9) Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ. A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1982; **60**: 1050-1053.
- 10) Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, Chesterman CN, Chong BH. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood.* 1996; **88**: 194-201.
- 11) McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost.* 2003; **1**: 485-491.
- 12) 林悟, 西山美保, 末久悦次, 柏木浩和, 倉田義之, 富山佳昭. 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. *臨病理.* 2009; **57**: 1039-1044.
- 13) 西山美保, 林悟, 二日市良彰, 末久悦次, 倉田義之. 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. *日検血会誌.* 2006; **7**: 313-318.
- 14) Kosugi S, Tomiyama Y, Shiraga M, et al. Platelet-associated anti-glycoprotein (GP) IIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura mainly recognize cation-dependent conformations: comparison with the epitopes of serum autoantibodies. *Thromb Haemost.* 1996; **75**: 339-345.
- 15) Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, et al. Anti- $\alpha v \beta 3$ antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 2001; **85**: 36-41.
- 16) Kosugi S, Tomiyama Y, Honda S, et al. Platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura recognizing epitopes close to the ligand-binding site of glycoprotein (GP) IIb. *Blood.* 2001; **98**: 1819-1827.
- 17) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, et al. Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2012; **120**: 1499-1509.

特集I 血液疾患と免疫

免疫性血小板減少性紫斑病の
免疫病態*

富山佳昭^{**,***}
清水一亘^{***}
柏木浩和^{***}

Key Words : GPIIb-IIIa, thrombopoietin, reticulated platelets, autoantigens

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura ; ITP) は, 自己血小板に対する抗体が産生され, 抗体に感作された血小板が早期に網内系で破壊され血小板減少をきたす自己免疫疾患と考えられている^{1)~3)}. そのため, 欧米では特発性 (idiopathic) というよりは免疫性 (immune) 血小板減少性紫斑病という表現が用いられることが多く, 最近では本疾患に対して primary immune thrombocytopenia (primary ITP) との名称が提唱されている⁴⁾.

ITPの成因はいまだ不明であるが, ITPの病態さらにはその成因を解析するためには, まずITPにおける自己抗体の特性を明らかにする必要がある. 全身性エリテマトーデス (SLE) ではその異常が全身に及ぶ全身性自己免疫疾患であるのに対し, バセドー病や橋本病ではその異常が甲状腺に限定され, ITPでは血小板に限定されるため, これらは臓器特異的な自己免疫疾患といえる. つまり, ITPにおいては, 自己抗体の標的抗原は血小板特異的な抗原であることが容易に理解できる.

本稿では, ITPの病態解析の最近の進歩につい

て解説するとともに, その病態解析に基づいて開発されている補助診断法についても紹介する.

ITPの病態

ITPにおける血小板減少の主たる病態は, 血小板の破壊亢進である. 慢性ITPでは自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓を中心とした網内系においてマクロファージのFc受容体を介して捕捉・破壊され血小板減少をきたす. さらに, 脾臓は抗血小板自己抗体を産生する主要な臓器である. このようにITPにおいては, 脾臓がその病態形成の中核を形成しており, 血小板抗体の主要な産生臓器であるとともに血小板の破壊臓器でもある^{1)~3)}.

一方, 以前よりITPの骨髄では血小板を豊富に含有する成熟巨核球の比率が減少し未熟な巨核球の比率が増加することが知られていたが, 患者自身の血小板を用いた血小板カイネティックス研究において血小板産生能の指標としての血小板回転率を解析すると, 多くのITPでは予想に反して血小板の回転率は亢進しておらず正常から低下していること, さらに培養系においてITP血漿により巨核球の増殖および成熟障害をきたすことが明らかにされている²⁾⁵⁾. このように, ITPにおいては血小板破壊亢進に加え, 血小板産生も障害されていることが明らかとなってきた (図1)⁶⁾.

* Pathophysiology of primary ITP.

** Yoshiaki TOMIYAMA, M.D.: 大阪大学医学部附属病院輸血部 (☎565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15); Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

*** Kazunobu KIYOMIZU, M.D. & Hirokazu KASHIWAGI, M.D.: 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科学

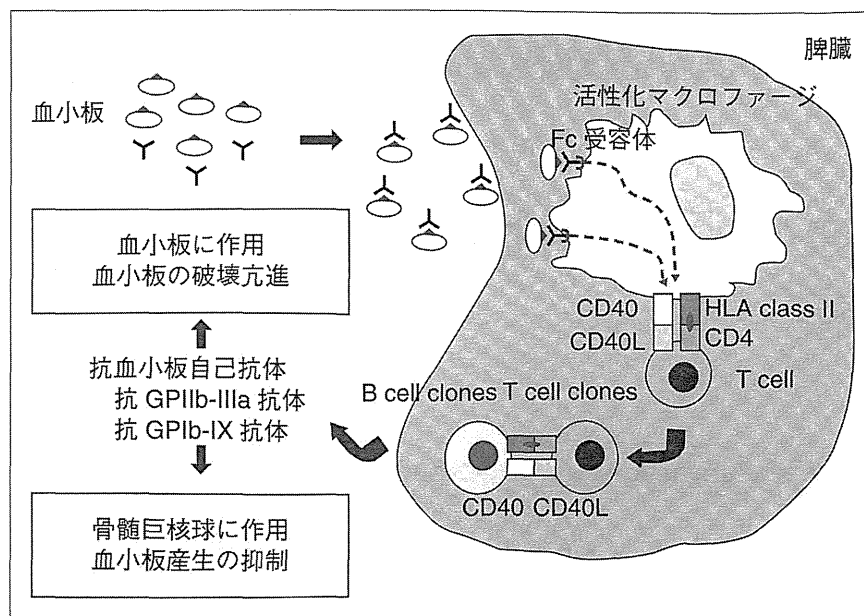


図1 ITPの免疫病態

主として脾臓で産生された抗血小板自己抗体(主にIgG)は血小板膜GPIIb-IIIaあるいはGPIb-IXに結合し、自己抗体に感作された血小板の大部分は脾臓内でマクロファージ上のFc受容体を介して捕捉され、破壊される。血小板を取り込んだマクロファージはGPIIb-IIIaあるいはGPIb-IXの抗原ペプチドをHLA抗原上に出し、HLA classII-CD4に加え副刺激経路(ここではCD40-CD40Lを提示)などを介して自己反応性ヘルパーT細胞を活性化し、さらにはB細胞を活性化し抗体産生を誘導する。一方では、これらの抗体は巨核球の成熟障害などを誘導し、血小板産生を抑制する。(文献⁶⁾より引用)

ITPにおける抗血小板抗体と血小板関連IgG (platelet-associated IgG ; PAIgG)

1951年、Harringtonらの歴史的なITP患者血漿の輸注試験によりITPの原因が血漿中の血小板減少因子であることが示され⁷⁾、その後血小板減少因子がIgG分画に存在する抗血小板抗体に起因することが示唆された。

一方、1970年代になりITP患者血小板においてPAIgGが増加していることが多くのグループにより報告され、本邦においてもITPの補助診断として2006年に保険収載されるに至った。当初、PAIgGが血小板自己抗体量を反映していると考えられていた。しかしながら、PAIgGはITP症例の90%以上に上昇しているものの、再生不良性貧血など他の疾患でもPAIgGが高値になることがあり、その疾患特異性は低く27%とも報告されている⁸⁾。そのため、現在ではITPにおけるPAIgGの診断的意義は少ない。その理由は、PAIgGは血

小板自己抗体のみならず血小板に結合した(あるいは付着した)非特異的なIgGも測定していることに起因している。抗血小板抗体の標的抗原(=自己抗原)を同定することは、PAIgGの欠点を補いITPの自己抗原に対する特異的な抗体を検出することを可能にするのみならず、ITPにおいて自己血小板に対する免疫応答機序を明らかにする上で必要不可欠である。

そのため、PAIgGに代わり血小板抗体をより特異的に検出する測定系として、標的抗原をモノクローナル抗体で捕捉しELISAで検出するmonoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen (MAIPA)法やmodified antigen capture ELISA (MACE)法などが開発され、ITPの血小板抗体は主として血小板膜糖蛋白であるGPIIb-IIIaあるいはGPIb-IXを標的としていることが明らかにされた^{9)~11)}。これらの抗原は血小板/巨核球系に特異的に発現している。自己抗体が検出されるのはITPの50~60%の症例であり、そのうちの67.9%に抗GPIIb-IIIa抗体が、17.6%に抗GPIb-IX

抗体が、14.5%にその両方の抗体が検出されたとの成績が示されている¹²⁾。これらの抗原以外にも GPIIb-IIIa や GPIV も自己抗原として報告されているが、その頻度は低い。一方、ITP および非免疫性血小板減少症を対象とした prospective study 解析で、GPIIb-IIIa および GPIb-IX に対する抗体検出法の ITP の疾患感受性 (ITP 患者群における陽性%) は 49~66% であった。すべての ITP 症例において自己抗体が同定されるには至っていないため、抗体が陰性であっても ITP は否定できないが、これら血小板抗原に対する抗体検出の ITP に対する診断特異性は 80~90% と高いため、陽性であれば積極的に ITP と診断しうると考えられる¹²⁾¹³⁾。しかしながら現時点では、これらの抗体測定はまだまだ研究室レベルでの検査であり、実地臨床まで普及していない。

血小板結合抗体 vs 血清 (血漿) 抗体

ITP に関する Harrington らの成績は患者血清 (血漿) 抗体が重要であることを示唆しているものの⁷⁾、ITP においては血小板自己抗体の大部分がすでに患者血小板に結合しており、血清中には親和性の弱い抗体しか存在していないと考えられる。実際、血清抗体よりも血小板結合抗体のほうが検出率は高く、治療により血小板数が増加すると血小板結合抗体は減少するが、血清中の抗体はほとんど変化しない¹¹⁾¹⁴⁾。さらに、血清中の抗体と血小板結合抗体は必ずしも同一ではなく、血清中には GPIIb-IIIa の細胞内領域を認識する抗体や細胞内蛋白である vinculin に対する抗体が存在しており、これらは血小板破壊により二次的に誘導された可能性が考えられる¹¹⁾。これらの成績より血清抗体よりも血小板結合抗体が密接に ITP の病態と関連しており、血小板破壊に主要な役割を果たしていると考えられる。そのため、血小板に結合した抗血小板自己抗体の標的抗原を解析することが重要である。

T 細胞の異常

前述のように GPIIb-IIIa や GPIb-IX が ITP における主要な自己抗原であることが明らかとなったが、これらの抗原に対する抗体産生には自己反応性 T 細胞の関与が必要であると考えられる。

Kuwana らは ITP 患者から GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞の反応性を検討した結果、これらの細胞は CD4⁺ T 細胞で HLA-DR 拘束性を有していることを示した¹⁵⁾。さらに、B 細胞と共培養すると IgG 型抗 GPIIb-IIIa 抗体産生を誘導し、ヘルパー活性を有していた (図 1)。現在考えられている抗血小板自己抗体の産生機序は、GPIIb-IIIa などの自己抗原はマクロファージに代表される抗原提示細胞 (APC) によりプロセッシングを受け HLA クラス II 分子上に抗原ペプチドとして表出される。自己反応性の CD4⁺ T 細胞はこの HLA クラス II 分子と抗原ペプチドの複合体を認識し活性化する。この T 細胞はさらに自己抗体産生 B 細胞に対してヘルパー活性を示し、自己抗体の産生が持続すると考えられる。これらの自己抗体産生は主として脾臓において行われている。

興味深いことに、これらの GPIIb-IIIa 反応性 T 細胞は血小板に存在する非修飾 GPIIb-IIIa をプロセッシングした APC に対しては反応せず、還元処理やトリプシン処理など人為的に構造を修飾した GPIIb-IIIa をプロセッシングした APC に対して反応するとの成績が示されている¹⁵⁾。このことは、自己反応性 T 細胞は非修飾 GPIIb-IIIa のプロセッシングから作製されたペプチドには反応せず、修飾された GPIIb-IIIa から作製されたペプチド (これらペプチドは通常は APC 上に表出されないため、潜在性ペプチドと呼ばれている) を認識し反応することを示唆している。ITP においては、なんらかの病的状態 (たとえばウイルス感染など) において自己抗原が修飾を受け、その潜在性ペプチドが APC により強力に提示されることにより T 細胞はそれを非自己として認識し免疫反応が誘導されるのかもしれない。

また、ITP 患者における Th1/Th2 比の増加、Th17 細胞および IL17 レベルの増加、oligoclonal T 細胞の増加、さらに自己血小板 (おそらく巨核球に対しても) に対する傷害性 T 細胞の存在などの T 細胞の異常が報告されている¹⁶⁾。特に抗血小板自己抗体および自己血小板傷害性 T 細胞の出現は ITP 患者における免疫寛容の破綻を意味しており、他の自己免疫疾患と同様に制御性 T 細胞 (Treg) の異常が注目されている。Treg は末梢血 CD4⁺ 細胞の 5~10% を占めており、細胞免疫および液性

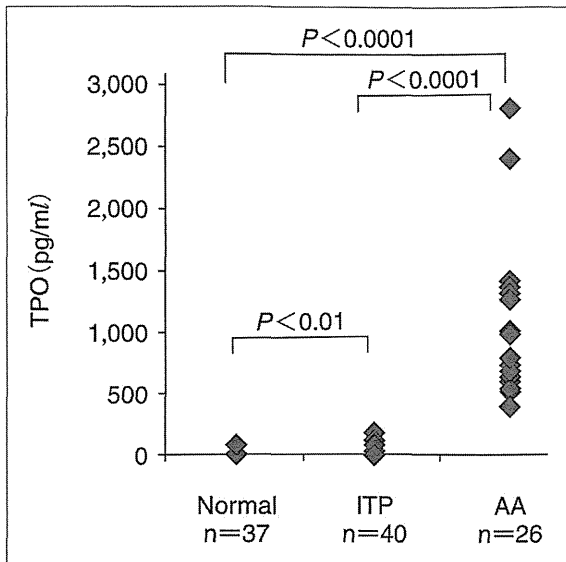


図2 ITPおよび再生不良性貧血(AA)における血漿トロンボポエチン(TPO)濃度の比較検討
TPOはその大部分が肝臓で産生されており、血小板数の変動に関係なくその産生量は一定に保たれている。TPO受容体であるc-Mplは血小板/巨核球系に発現しており、c-MplによるTPO吸着が血漿TPOレベルを制御している。AAでは巨核球が減少し血小板産生が低下しているため血漿TPO濃度は著増する。一方、ITPにおいては、血小板減少にもかかわらず血漿TPO濃度は正常ないしは軽度増加しているのみであることが特徴である。

免疫を抑制することにより自己免疫反応からhostを守る上で重要な役割を果たしている。ITP患者においてもTreg細胞数の低下やTreg機能の低下が報告されている¹⁷⁾。しかし、なぜTregの異常がITPのような臓器特異的自身抗体の産生を促すのかは現時点では不明である。Stasiらは抗CD20抗体であるリツキシマブでB細胞を除去したITP患者において、特にリツキシマブ有効例でTregの数および機能が回復したことを報告しており¹⁸⁾、Tregの異常発現にはB細胞—T細胞相互作用が関与していることが示唆される。

ITPの病態解析と それをういた補助診断法

1. 血漿トロンボポエチン(TPO)濃度

TPOはアミノ酸332残基よりなる分子量95kDaの蛋白であり、血小板造血因子として1994年に同定された。TPOはその大部分が肝臓で産生されており、血小板数の変動に関係なくその産生量は一定に保たれている。TPO受容体であるc-Mpl

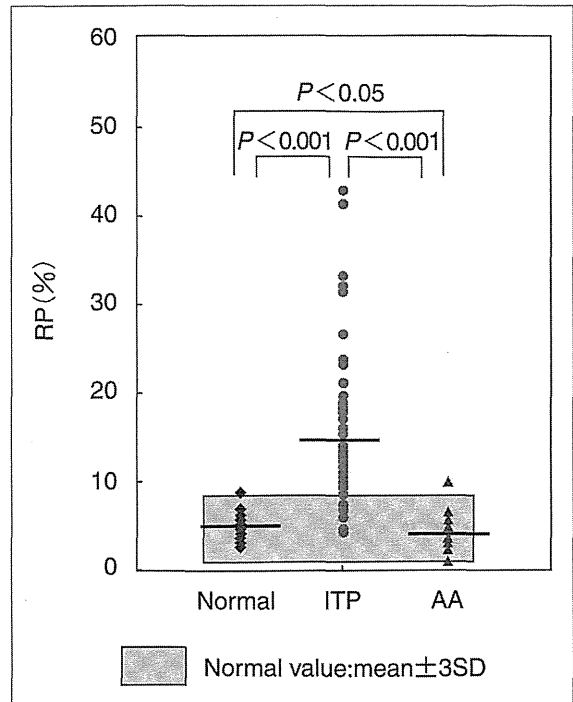


図3 ITPおよびAAにおける網状血小板(reticulated platelets; RP)比率の比較検討
RPはRNAが豊富に存在する大型血小板で、巨核球から新たに産生された幼若血小板である。患者血小板数あたりのRP比率(RP%)を検討すると、ITPではRP%は著明に増加しているが、AAでは、そのような増加はみられない。

は、造血幹細胞にもその発現はみられるが主として血小板/巨核球系に発現しており、c-MplによるTPO吸着が血漿TPOレベルを制御している。そのため、化学療法などで血小板が減少すると血漿TPO濃度は著明に増加し、血小板輸血で血小板数が増加すると血漿TPO濃度は低下する¹⁹⁾²⁰⁾。種々の血小板減少病態で血漿TPO濃度を測定すると、再生不良性貧血や化学療法後の血小板減少では巨核球も減少し血小板産生が低下しているため血漿TPO濃度は著増する。一方ITPにおいては、血小板減少にもかかわらず血漿TPO濃度は正常ないしは軽度増加しているのみであった(図2)¹⁹⁾²⁰⁾。ITPでは血小板破壊亢進状態であり、巨核球の分化・成熟障害は認められるものの、その数は低下しておらずc-Mplとしての減少はわずかであるため、血漿TPO濃度の増加は軽度にとどまると考えられる。また、ITP血小板に結合したTPOが早期に網内系で血中から除去されることも、ITPにおいて血漿TPOが増加しない一因であると考えられている。

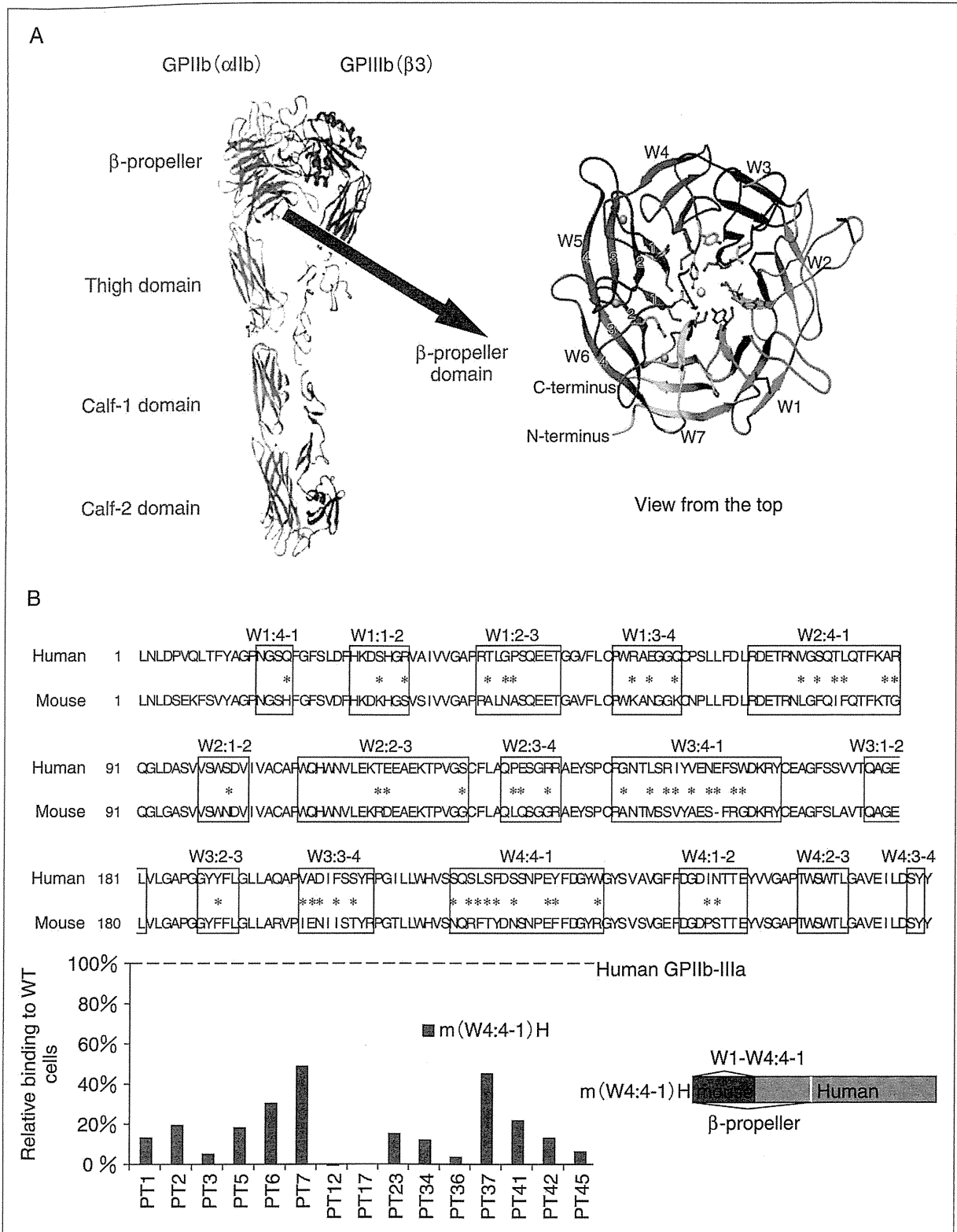


図4 GPIIb-IIIa(α Ib β 3)の構造とITPの自己抗原の部位

A: GPIIbのN末端には449個のアミノ酸より構成される β プロペラドメインが存在する。 β プロペラドメインは、W1~W7の7つのプロペラより構成されている。

B: β プロペラ領域のN末端からW4:3-4ループにおけるヒトとマウスGPIIbのアミノ酸の比較。枠で囲んだ領域がループ構造部分(上図)。 β プロペラ領域のN末端から前半部分(W1~W4:4-1ループ、N末端から235番のトリプトファン残基まで)をマウスGPIIbに置換し、ヒトGPIIIaと共発現して検討した。解析したITP15例全例において抗GPIIb-IIIa抗体の反応性が著明に低下した(下図)。

	patient no.	m(W1:4-1)H	m(W1:1-2)H	m(W1:2-3)H	m(W2:2-3)H	m(W2:3-4)H	m(W3:4-1)H	m(W4:4-1)H
Group A (2)	PT17	99.5	-1.5	-1.7	-4.7	NT	-2.9	0.3
	PT23	72.7	18.9	-25.0	-18.4	-6.6	-20.6	15.2
	PT3	84.4	83.3	19.6	12.7	NT	2.9	7.9
Group B (5)	PT36	134.2	116.6	1.5	NT	1.7	2.6	3.8
	PT41	88.7	97.5	50.3	NT	51.0	44.6	22.3
	PT42	85.6	105.0	47.5	NT	41.3	20.5	13.5
	PT12	89.7	87.1	57.5	30.9	9.1	6.8	-1.7
	PT1	75.2	NT	93.2	93.7	102.2	27.3	13.0
Group C (4)	PT6	109.1	NT	232.2	115.9	103.1	30.7	30.7
	PT34	94.0	91.7	108.5	NT	88.3	-3.4	12.1
	PT45	94.3	91.4	95.3	NT	73.5	13.5	6.5
	PT2	87.5	80.3	45.8	36.0	NT	19.6	18.9
Others (4)	PT5	101.5	82.4	74.0	61.6	43.4	39.7	18.3
	PT7	104.9	NT	111.4	90.5	105.3	60.3	48.6
	PT37	123.5	128.5	102.8	NT	114.1	65.4	45.9 (%)

NT: not tested

図5 ITPにおけるGPIIb-IIIa上での自己抗原の局在部位

ヒトGPIIbのN末端から各ループ構造までを順番にマウスGPIIbに置換したキメラGPIIbを作製し、ヒトGPIIIaと共発現させ解析した。m(W1:4-1)Hとは、ヒトGPIIbのN末端からW1:4-1ループまでをマウスGPIIbに置換したキメラGPIIbを意味する(以下同様)。枠で示したように、抗GPIIb-IIIa抗体の反応性が著明に低下する領域が少なくとも3か所存在することが明らかとなった(グループA, グループB, グループC)。

以上のように血漿TPO濃度測定は、再生不良性貧血などの血小板産生低下の病態と、ITPなどの血小板破壊亢進の病態を区別しうるマーカーとなる可能性がある。しかしながら、国内には薬事法で承認されたTPO測定キットすらない状態であり、筆者らを含め一部の大学研究室および(株)SRLが個別対応でTPO濃度を測定しているのが現状である。

2. 網状血小板比率

網状血小板は細胞質にRNAが豊富に存在する大型血小板で、巨核球から新たに産生された幼若血小板と考えられる。事実、ITPでは血小板数あたりの網状血小板数である網状血小板比率が増加しており、再生不良性貧血ではそのような増加は検出されない(図3)。

筆者らの検討では、血小板産生低下症例(再生不良性貧血および化学療法後の血小板減少症)とITPの鑑別において、網状血小板比率が増加し、

かつ血漿TPO濃度が正常である場合をITPと診断すると、その疾患感受性は69%、特異性は100%であり、ITPなどの血小板破壊亢進に起因する血小板減少と再生不良性貧血などの骨髓低形成による血小板減少の鑑別診断に有用であった¹⁹⁾。

ITPにおける 抗GPIIb-IIIa自己抗体のエピトープ解析

前述のように、ITPの約40~60%の症例において血小板関連抗GPIIb-IIIa自己抗体(platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies)が検出されるが、抗GPIIb-IIIa抗体の認識部位(エピトープ)に関しての詳細はいまだ明らかではない。筆者らは、ITP患者から血小板を分離し血小板に結合した抗体(platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies)をエーテル解離し、その特性を解析している¹⁴⁾。ITPにおける自己抗体のエピトープ解析は自己抗原の詳細を明らかにしうするため、

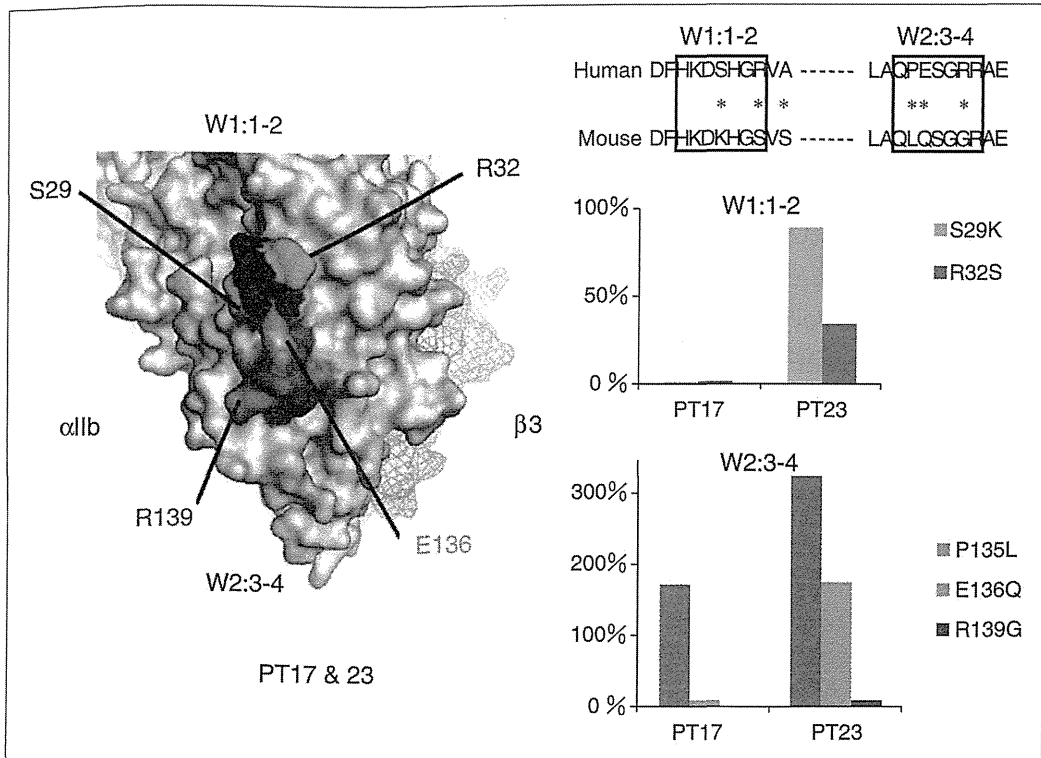


図6 症例17および23(グループA)における自己抗原の同定
 グループAに属する症例17および23では、その自己抗原としてW1:1-2ループとW2:3-4ループで形成される抗原、特にS29, R32, R139, E136が自己抗原として重要な残基であることが明らかとなった。

ITPの病態解析において重要であると考えられる。筆者らはこの観点より、抗GPIIb-IIIa抗体のエピトープ解析を行ってきた。その結果、自己抗体は主としてGPIIbを認識していること、その認識部位はイムノブロットでは検出できず、GPIIbの立体構造依存性であることをすでに明らかにしている¹¹⁾。

最近、筆者らはITPの抗GPIIb-IIIa抗体はマウスGPIIb-IIIaとの反応性が著明に低下し、この反応性の低下はマウスGPIIbとヒトGPIIbの差違に起因していることを見出した²¹⁾。ヒトとマウスGPIIbはアミノ酸レベルで81%(核酸レベルで82%)の相同性を有している。N末端には449個のアミノ酸より構成されるβプロペラ構造が存在し(W1~W7の7つのプロペラより構成されている)、特にそのループ構造においてヒトとマウス間でアミノ酸の相違がみられる(図4-A)。そこで、さらにエピトープを限定するため、抗GPIIb-IIIa抗体を有するITP患者15例に関してヒトGPIIbのN末端から各ループ構造までを順番にマウスGPIIbに置換したキメラGPIIbを作製し、ヒトGPIIIaと共

発現させ解析した。また、逆にマウスGPIIbのN末端から各ループ構造までをヒトGPIIbに置換したキメラGPIIbも作製し、最終的には関連するアミノ酸を一つずつマウス配列に置換して検討した。その結果、βプロペラ領域のN末端から前半部分(W1~W4 4-1ループ、N末端から235番のトリプトファン残基まで)が自己抗原として重要であることが明らかとなった(図4-B)²¹⁾。さらに、図5に示すようにβプロペラ領域のN末端から前半部分において主要な自己抗体のエピトープ領域を3か所同定し(グループA, グループB, グループC)、さらに3例(症例17, 23, 36)においてそのエピトープの局在を限定することが可能であった。図6に症例17と23の成績を示しているが、症例17ではW1:1-2ループ内でのS29K変異, R32S変異およびW2:3-4ループでのE136Q変異, R139G変異で自己抗体の反応性は完全に消失し、症例23においても同様の結果であった。W1:1-2ループとW2:3-4ループは一次構造では離れた部位であるが、立体構造で見ると両者は互いに近接しておりこれらのループ内において

S29, R32, R139, E136残基が自己抗原として重要であることが明らかとなった(図6)²¹⁾. このようにITPにおける抗GPIIb-IIIa抗体のエピトープは, GPIIbの β プロペラ構造のごく限定された領域に存在することが示された. これに合致する成績として, 血小板関連抗GPIIb-IIIa抗体(IgG)の κ と λ の比率を検討すると, 多くの症例で κ あるいは λ のみが検出され, ITPにおいてきわめて限定されたB細胞が自己抗体を産生していることを示唆する成績と考えられる²¹⁾. ITPのごく一部の症例ではあるが, このようにきわめて限定された領域が自己抗原として認識されていることは, なんらかの外来抗原との分子相同性(molecular mimicry)によりITPが発症することを示唆する成績と考えられる.

おわりに

本稿では, ITPの免疫病態に関する最近の知見ならびにそれを基盤とした補助診断法を概説した. 日常診療においてITPの診断ははまだ除外診断が主体である. ITPのさらなる免疫病態の解析は, ITPに対する特異的検査法の開発のみならず最近診療に用いられるようになったTPO受容体作動薬などの新規治療法の開発に大きく寄与するものと確信する. 本稿の一部は厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患研究克服事業), 「血液凝固異常症に関する調査研究」の助成を受けた.

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 995.
- 2) McMillan R. The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2007 ; 44 (Suppl 5) : S3.
- 3) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *臨血* 2008 ; 49 : 14.
- 4) Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children : report from an international working group. *Blood* 2009 ; 113 : 2386.
- 5) McMillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004 ; 103 : 1364.
- 6) 富山佳昭. トロンボポエチン受容体作動薬による難治性ITPの治療. *臨血* 2011 ; 52 : 627.
- 7) Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, et al. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 1951 ; 38 : 1.
- 8) Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ. A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1982 ; 60 : 1050.
- 9) McMillan R, Tani P, Millard F, et al. Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 1987 ; 70 : 1040.
- 10) Kiefel V, Santoso S, Kaufmann E, et al. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX : a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 1991 ; 79 : 256.
- 11) Tomiyama Y, Kosugi S. Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* 2005 ; 81 : 100.
- 12) McMillan R, Wang L, Tani P. Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* 2003 ; 1 : 485.
- 13) Brighton TA, Evans S, Castaldi PA, et al. Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* 1996 ; 88 : 194.
- 14) Fujisawa K, Tani P, Piro L, et al. The effect of therapy on platelet-associated autoantibody in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 1993 ; 81 : 2872.
- 15) Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura : role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998 ; 102 : 1393.
- 16) Semple JW, Provan D. The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia : T cells still take center-stage. *Curr Opin Hematol* 2012 ; 19 : 357.
- 17) Yu J, Heck S, Patel V, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic

- immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008 ; 112 : 1325.
- 18) Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* 2008 ; 112 : 1147.
- 19) 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.
- 20) Kuter DJ. New thrombopoietic growth factors. *Blood* 2007 ; 109 : 4607.
- 21) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, et al. Recognition of highly restricted regions in the β -propeller domain of α IIb by platelet-associated anti- α IIb β 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2012 ; 120 : 1499.

* * *