

- 21) 羽藤高明. 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2015-2016 PP127-133, 2015 南江堂 東京
- 22) 羽藤高明. HLA検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp134-139, 2015 南江堂 東京
- 23) 岡田陽子、加藤丈陽、山下泰治、越智雅之、永井勲久、越智博文、伊賀瀬道也、羽藤高明、小原克彦. Crescendo TIA を呈した JAK2 陽性本態性血小板血症の1例 脳卒中 37:36-40, 2015
- 24) 羽藤高明. 第9回日本血栓止血学会標準化委員会シンポジウム血小板部会報告 日本血栓止血学会誌 26:470-471, 2015
- 25) 藤森祐多、片桐尚子、涌井昌俊、清水長子、阪田敏幸、三ツ橋雄之、村田満. トロンビン力価の異なるフィブリノゲン測定試薬を用いた直接トロンビン阻害薬モニタリングの基礎的検討. 日本検査血液学会雑誌 16(3): 247-252, 2015
- 26) 谷田部陽子、村田満. 血小板数と血小板形態. 臨床検査. 59(2): 173-179, 2015
- 27) 村田満. 日本人の一次予防におけるアスピリンの位置づけ: JPPP の経験から. Pharma Medica 33(5): 17-20, 2015
- 28) 村田満. 血栓症研究のブレイクスルー. International Review of Thrombosis. 10(2): 24, 2015
- 29) 村田満. 臨床検査の進むべき道. 臨床検査. 60(1): 6-11, 2016
2. 学会発表
- 1) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (Oral) Tomiya Y. Immature platelet fraction (IPF) measurement for the diagnosis of ITP
- 2) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (ポスター) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiya Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders.
- 3) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (Oral) Kato H, Nakazawa Y, Kashiwagi H, Tadokoro S, Morikawa Y, Daisuke M, Yumi K, Kanakura Y, Tomiya Y. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CALDAG-GEFI deficiency

- 4) 5th ICIS Expert Meeting. (2015. 9. Flueli-Ranft, Switzerland). Kuwana M: What do we learn from Immunomodulation?.
- 5) 25th International Society of Thrombosis and Haemostasis Congress, 2015. 6. 22 Toronto, Canada Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M: Association of platelet response to cilostazol with clinical outcome and cyp genotypes in patients with cerebral infarction.
- 6) The 57th annual meeting of American Society of Hematology 2015. 12. 7 Orlando, USA: Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Function of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation
- 7) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) Tozawa K, Ono-Uruga Y, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y: Identification of Megakaryocytic Progenitor Cells among Subcutaneous Pre-adipocytes Thrombopoietin.
- 8) The 57th annual meeting of American Society of Hematology 2015. 12. 7 Orlando, USA. Tozawa K, Ono-Uruga Y, Takizawa N, Horiuchi T, Okamoto S, Murata M, Ikeda Y, and Matsubara Y: Establishment of Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cell Lines: A Culture System to Manufacture Megakaryocytes Releasing Functional Platelets
- 9) 第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム(2015. 2. 28 野村コンファレンスプラザ日本橋, 東京, 羽藤高明) (口演) 富山佳昭. 「抗血小板薬の分子標的とそのリスクベネフィット」 GPIIb-IIIa 阻害薬
- 10) 第 40 回日本脳卒中学会総会 (2015. 3. 26-29 リーガロイヤルホテル広島, 広島, 松本昌泰) (口演) 富山佳昭. 「抗血栓療法 Update」 GPIIb-IIIa 阻害薬の現状と展望
- 11) 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015. 5. 28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治) (口演) 富山佳昭, 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村正, 高 陽淑, 石井博之. 抗 HPA4 b と抗 HPA5 b 抗体を有する NAIT (第一子) : 第二子の経過からの考察
- 12) 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015. 5. 28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治) (口演) 櫻木美基子, 林 悟, 丸山美保, 兜森 修, 中山小太郎純友, 細川美香, 中尾まゆみ, 森川珠世, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 加藤 恒, 柏木浩和, 金倉 讓, 富山佳昭. ITP 診断における網状血小板比率測定 of 臨床的意義 : FCM 法、自

- 動血球分析装置 XE-2100, および XN-1000 の比較検討
- 13) 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015. 5. 28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治) (口演) 細川美香、中山小太郎純友、櫻木美基子、中尾まゆみ、森川珠世、清川知子、青地 寛、永峰啓丞、和田浩志、丸橋 繁、江口英利、永野浩昭、富山佳昭. ABO 血液型メジャー不適合成人生体肝移植におけるリツキシマブ投与例, 非投与例の抗 A, 抗 B 抗体価の推移と FFP の使用状況
- 14) 37 回日本血栓止血学会 (2015. 05. 21-23, 甲府市総合市民会館, 山梨, 尾崎由基男) (口演) 柏木浩和、清水一亘、國島伸司、坂野史明、加藤 恒、森川陽一郎、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉 讓、富山佳昭. α IIb β 3 活性化変異、 α IIb (R990W) KI マウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす
- 15) 第 77 回日本血液学会学術集会 (2015. 10. 16-28、ホテル金沢、石川、中尾真二) (口演) 加藤 恒、中沢洋三、盛田大介、黒川由美、柏木浩和、森川陽一郎、金倉 讓、富山佳昭. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CalDAG-GEFI deficiency
- 16) 第 59 回日本リウマチ学会総会 (名古屋). 2015. 4. (シンポジウム S8-6: SLE の難治性病態) 桑名正隆: 難治性血液障害-免疫性血小板減少症と血球貧食症候群-
- 17) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 (山梨). 2015. 5. 21. (学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 3: 炎症・免疫と血栓を繋ぐ動物モデル) 桑名正隆: A regulatory T cells-deficient mouse model as a useful tool for evaluating the pathophysiology of human immune thrombocytopenia.
- 18) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015. 5. 23 甲府 山之内純、羽藤高明 VASP リン酸化測定によるシロスタゾール薬効判定と脳梗塞再発および CYP 遺伝子多型との関連
- 19) 平成 27 年第 1 回日本手術医学会教育セミナー 2015. 4. 11 松山 羽藤高明 術中大量出血への輸血対応
- 20) 第 77 回日本血液学会学術集会 2015. 10. 16 金沢 山之内純、羽藤高明、中西英元、朝井洋晶、松原悦子、谷本一史、竹内一人、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Effect of calreticulin mutation on the integrin α IIb β 3 function.
- 21) 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015. 5. 23 甲府 戸澤圭一、小野-宇留賀友佳子、堀内正、村田満、岡本真一郎、池田康夫、須田年生、松原由美子: ヒト脂肪前駆細胞からの巨核球分化誘導: トランスフェリン/CD71/TP0 分泌機序を介した高効率産生.
- 22) 第 77 回日本血液学会学術集会 2015. 10. 16-18 金沢 Yukako Ono-Uruga, Keiichi Tozawa, Noriko Takizawa, Tadashi Horiuchi, Mitsuru Murata, Shinichiro Okamoto,

Yasuo Ikeda, Yumiko Matsubara:
Characterization of MPL in human
pre-adipocytes and its role in
megakaryocyte differentiation.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

ITP 診断における新機種を用いた IPF%の有用性および ITP 治療における 血小板機能測定の意義に関する検討

研究分担者：富山 佳昭 大阪大学医学部附属病院 輸血部

研究協力者：柏木 浩和 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病(ITP) 診断において幼若な血小板である網状血小板の測定は有用である。今回、シスメックス社製多項目自動血球分析装置新機種 XN-1000 における幼若血小板分画 (IPF%) 測定の ITP 診断における有用性を、旧機種である XE-2100 および Flow cytometry (FCM)法と比較検討を行ったところ、XN-1000 では FCM 法に匹敵する感度、特異性を得られ、XE-2100 に比べ改善されていることが明らかとなった。また血小板減少患者における血小板機能は通常血小板凝集能検査では評価が困難であったが、FCM を用いることにより血小板機能を検討することが可能となり、ITP 患者では血小板機能が低下している例が多く、またトロンボポエチン受容体作動薬が血小板機能に与える影響は少ないと思われた。

A. 研究目的

ITP の診断の基本は除外診断であるが、特に再生不良性貧血や骨髓異形性症候群との鑑別が問題になることが多い。網状血小板(RP)は細胞内に RNA を豊富に含む幼若な血小板であり、網状血小板比率 (RP%)は血小板寿命を反映していると考えられている。我々は Flow cytometry を用いた RP%測定(FCM 法)が ITP と再生不良性貧血の鑑別に有用であることを報告してきた (Kurata et al. *Am J Clin Pathol* 2001)。しかし、FCM 法は精度は高いものの高価な機器と煩雑な操作のため本法による網状血小板測定が実施可能な施設は限られている。近年、RP の自動測定が試みられ、シスメックス社製多項目自動血球分析装置を用いて、RNA が含ま

れる血小板分画を幼若血小板分画 (immature platelet fraction, IPF) として簡便かつ迅速に測定する方法が開発されている。従来の XE-2100 を用いた IPF%測定は ITP 診断の感度と特異性に難点があったが (林ら、*臨床病理* 2009)、最新機器である XN シリーズにおいては IPF 専用チャンネルを設けたことによりその精度の改善が期待されていた。我々は ITP 症例と、再生不良性貧血あるいは化学療法後の血小板減少患者の IPF%を XE-2100 および XN-1000 を用いて測定し、FCM 法と比較することにより、XN1000 を用いた IPF%の ITP 診断における有用性を検討した。

また ITP の治療は、重篤な出血を回避するため安全と思われる血小板数を維持

することを目標になされるが、出血リスクには血小板数だけでなく血小板機能も関与する。ITP 患者において検出される抗血小板抗体の多くは血小板機能に必須の分子である GPIIb-IIIa (α IIB β 3) や GPIb-IX 複合体を標的していることから、ITP 患者の血小板機能は正常者と異なる可能性がある (Kiyomizu et al. *Blood*2012)。一方、ITP 患者では血栓症の合併が意外に多いこと、また最近、難治性 ITP で広く使用されてきているトロンボポエチン(TPO)受容体作動薬は血小板機能を亢進する可能性があることから、ITP 患者の血小板機能を把握することは重要である。しかし血小板機能検査のゴールドスタンダードとされる比濁法を用いた血小板凝集能検査は血小板減少患者においては信頼できるデータが得られない。我々は FCM を用いることにより血小板減少患者における血小板機能測定法を確立し、ITP 患者における血小板機能の評価を行った。

B. 研究方法

1) IPF%測定に関する検討：ITP症例47例(血小板数 5.68 ± 3.38 万/ μ l)、再生不良性貧血(AA)または化学療法による血小板減少例(CIT)(血小板数 4.25 ± 2.75 万/ μ l)、正常コントロール80例において、FCMを用いたRP%測定、XE-2100およびXN-1000を用いたIPF%測定を同一検体を用いて行い、各検査のITP診断における感度および特異度を検討した。また破碎赤血球の影響をみる

ため、発作性夜間血色素尿症(PNH)患者16例においても検討した。

2) 血小板機能測定に関する検討：ITP患者11例、血小板無力症患者2例およびP2Y₁₂欠損症患者1例において、FCMを用いて α IIB β 3の活性化を、PAC1結合、顆粒放出能をCD62P発現、およびFCMを用いた血小板凝集能検査(FCA法)にて、血小板機能測定を行った。

尚、本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を得ており、患者からは研究協力に関し、十分な説明の上で書面による同意書を得ている。

C. 研究結果

1) IPF%測定に関する検討：FCM法、XE-2100あるいはXN-1000を用いたIPF%測定のいずれにおいてもITP症例では、正常コントロールに比べ有意に増加していた。一方、AAあるいはCIT症例においては、XE-2100では7例が基準値を上回っていたのに対し、XN-1000とFCM法では3例のみであった。この結果、XN-1000では感度・特異度ともにXE-2100よりも良好であり(感度：XE-2100 83.0%, XN-1000 85.1%, 特異度：XE-2100 75.0%, XN-1000 89.3%)、XN-1000の特異度はFCM法と同等であった(FCM法：感度 93.6%, 特異度 89.3%)。ROC解析においても、XN-1000の精度はFCMと同等であり、XN-1000

はXE-2100よりも測定精度が改善されていると考えられた(AUC: RP%; 0.959, XN-1000; 0.956, XE-2100; 0.863)。

またXE-2100では破碎赤血球などの赤血球粒子の影響を受けやすいことが予想される。PNH症例16例を検討した結果、XE-2100ではIPF%の基準範囲を大きく上回る症例が6例認められたのに対し、XN-1000およびFCM法ではすべての症例は正常範囲内にあり、XN-1000の有用性が認められた。

2) 血小板機能測定に関する検討：

Flow cytometryを用いて、ITP症例における血小板機能の検討を行った。FCA法においては多くのITP患者で、PMA、ADPおよびPAR1刺激に対する凝集反応の低下が認められた。ADPおよびPAR1刺激後のPAC1結合およびCD62P発現も同様に低下傾向を示す症例が多かった。これら血小板機能の低下と抗GPIIb-IIIa抗体の有無あるいはそのエピトープと明らかな相関は認めなかったが、抗GPIIb-IIIa抗体を有する1例においてはアゴニスト刺激後のPAC1結合が著明に障害されており、抗体による直接的なリガンド結合の阻害が関与していると考えられた。またITP症例における血小板機能とTPO受容体作動薬の有無との間に明らかな関連は認めなかった。

D. 考察

我々はITP診断においてFCMを用いた網状血小板測定が有用であることを示してきたが、その測定方法の煩雑性から標準化することが困難であった。今回の検討により、新機種であるXN-1000を用いたIPF%測定はFCM法に匹敵する感度と特異度を得られることが明らかとなった。更にXN-1000においては赤血球分画との分離が向上したことから破碎赤血球今後、複数の施設における前向き試験によりそのITP診断への有用性が証明されることが期待される。

ITP症例における血小板機能に関しては、多くの症例において正常例より低下しているという結果であった。この結果がITPに特異的なことであるかどうかは、他の原因による血小板減少例と比較検討する必要がある。また症例によっては抗GPIIb-IIIa抗体により直接的にリガンド結合が影響されている可能性があることが示された。また、今回、TPO受容体作動薬使用により血小板機能に大きな差が見られなかったが、更なる解析が必要である。

E. 結論

ITP診断においてXN-1000を用いたIPF%測定が有用である可能性が示された。今後は、骨髓異形成症候群との鑑別における有用性の検討も加える予定で

ある。またFCMを用いた血小板機能測定により、ITP患者では血小板機能が低下している可能性が示唆された。今後は臨床症状との相関を含めた検討を加えていくことを予定している。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiya Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders. *Int J Hematol*. 101(4): 369-375, 2015.
- 2) Miyakawa Y, Katsutani S, Yano T, Nomura S, Nishiwaki K, Tomiya Y, Higashihara M, Shirasugi Y, Nishikawa M, Ozaki K, Abe T, Kikuchi K, Kanakura Y, Fujimura K, Ikeda Y, Okamoto S. Efficacy and safety of rituximab in Japanese patients with relapsed chronic immune thrombocytopenia refractory to conventional therapy. *Int J Hematol* 102:654-661, 2015
- 3) 柏木浩和、富山佳昭. ITP の病態と治療の進歩. *臨床血液* 56:177-184, 2015
- 4) 富山佳昭. 成人の紫斑・出血傾向. *今日の診断指針 (第7版)* 金沢一郎、永井良三総編集, 医学書院, 東京, 2015, pp54-57
- 5) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *止血・血栓ハンドブック* (鈴木重統、後藤信哉、松野一彦編), 西村書店, 東京, 2015, pp168-175
- 6) 富山佳昭. 脾摘. *血液専門医テキスト* (改訂第2版) (日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp108-110
- 7) 富山佳昭. 血管障害による出血性疾患: 血管性紫斑病. *血液専門医テキスト* (改訂第2版) (日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp371-373
- 8) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *血液専門医テキスト* (改訂第2版) (日本血液学会編), 南江堂, 東京, 2015, pp374-377
- 9) 富山佳昭. 血小板減少の分子機構. *Thrombosis Medicine* 5:34-40, 2015
- 10) 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *最新ガイドライン準拠 血液疾患 診断・治療指針* (金倉 讓編), 中山書店, 東京, 2015, pp498-504
- 11) 富山佳昭. 妊娠合併ITP診療の参照ガイド. *血液内科* 71:529-534, 2015
- 12) 富山佳昭. IgA 血管炎 (旧名称: アレルギー性紫斑病). *診療の手引きと臨床データ集 血液疾患診療ハンドブック 改訂3版* (吉田彌太郎編), 医薬ジャーナル社, 大阪, 2015, pp558-564

2. 学会発表

- 1) The 25th Congress of the

- International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (Oral) Tomiyaama Y. Immature platelet fraction (IPF) measurement for the diagnosis of ITP
- 2) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (ポスター) Sakuragi M, Hayashi S, Maruyama M, Kabutomori O, Kiyokawa T, Nagamine K, Kato H, Kashiwagi H, Kanakura Y, Tomiyaama Y. Clinical significance of IPF% or RP% measurement in distinguishing primary immune thrombocytopenia from aplastic thrombocytopenic disorders.
- 3) The 25th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (2015. 6. 20-25, The Metro Toronto Convention Centre, Tronto, Canada, Schulman S) (Oral) Kato H, Nakazawa Y, Kashiwagi H, Tadokoro S, Morikawa Y, Daisuke M, Yumi K, Kanakura Y, Tomiyaama Y. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CalDAG-GEFI deficiency
- 4) 第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム (2015. 2. 28 野村コンファレンスプラザ日本橋, 東京, 羽藤高明) (口演) 富山佳昭. 「抗血小板薬の分子標的とそのリスクベネフィット」 GPIIb-IIIa 阻害薬
- 5) 第 40 回日本脳卒中学会総会 (2015. 3. 26-29 リーガロイヤルホテル広島, 広島, 松本昌泰) (口演) 富山佳昭. 「抗血栓療法 Update」 GPIIb-IIIa 阻害薬の現状と展望
- 6) 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015. 5. 28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治) (口演) 富山佳昭, 清川知子, 中山小太郎純友, 細川美香, 櫻木美基子, 森川珠世, 中尾まゆみ, 青地 寛, 永峰啓丞, 味村和哉, 木村正, 高 陽淑, 石井博之. 抗 HPA4 b と抗 HPA5 b 抗体を有する NAIT (第一子) : 第二子の経過からの考察
- 7) 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015. 5. 28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治) (口演) 櫻木美基子, 林 悟, 丸山美保, 兜森 修, 中山小太郎純友, 細川美香, 中尾まゆみ, 森川珠世, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 加藤 恒, 柏木浩和, 金倉 譲, 富山佳昭. ITP 診断における網状血小板比率測定 of 臨床的意義 : FCM 法, 自動血球分析装置 XE-2100, および XN-1000 の比較検討
- 8) 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2015. 5. 28-30 京王プラザホテル, 東京, 田所憲治) (口演) 細川美香, 中山小太郎純友, 櫻木美基子, 中尾まゆみ, 森川珠世, 清川知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 和田浩志, 丸橋 繁, 江口英利, 永野浩昭, 富山佳昭. ABO 血液

型メジャー不適合成人生体肝移植におけるリツキシマブ投与例，非投与例の抗 A, 抗 B 抗体価の推移と FFP の使用状況

- 9) 第 37 回日本血栓止血学会
(2015. 05. 21-23, 甲府市総合市民会館, 山梨, 尾崎由基男) (口演) 柏木浩和、清水一亘、國島伸司、坂野史明、加藤 恒、森川陽一郎、田所誠司、小亀浩市、本田繁則、宮田敏行、金倉 讓、富山佳昭. α IIb β 3 活性化変異、 α IIb (R990W) KI マウスは巨大血小板減少症とともに血小板機能障害をきたす
- 10) 第 77 回日本血液学会学術集会
(2015. 10. 16-28, ホテル金沢、石川、中尾真二) (口演) 加藤 恒、中沢洋三、盛田大介、黒川由美、柏木浩和、森川陽一郎、金倉 讓、富山佳昭. Severe bleeding tendency and impaired platelet fuction in a patient with CalDAG-GEFI deficiency

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断にはいまだに血小板減少をきたす多数の疾患の除外に主眼を置いた基準が用いられている。平成16年度に本研究班がITPに感度または特異度の高い臨床検査を組み合わせた診断基準案を提唱したが、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは保険診療上測定できない。そこで、キット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT）を体外診断薬として承認申請することを目指した検討を進めてきた。昨年度は承認までに必要なロードマップを立案し、その上でキットに含めるコントロールを設定した。そこで、今年度は較正用基準物質としてGPIIb/IIIaに対するヒト型モノクローナル抗体産生細胞を作成することを目的とした。ヒトGPIIb/IIIaと反応するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからキメラ型抗体をコードする遺伝子を作成し、CHO細胞に導入することでキメラ型抗GPIIb/IIIa抗体を産生する浮遊細胞株の作成に成功した。今後、臨床検体を用いて至適な測定条件やカットオフを設定した上で多施設臨床試験の実施を目指している。

A. 研究目的

我が国では1990年に厚生省研究班により作成された特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断基準が現状も用いられている。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の減少や他系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他疾患の除外が診断根拠となる。血小板減少をきたす全ての疾患を診療で除外することは現実的に不可能で、そのために数多くの検査を行うことは医療経済上好ましくない。そこで、平成16年度に本研究班で多施設前向き研究を実施し、ITPに感度、特異度の高い臨床検査を組み合わせて積極的にITPを診断する基準案を作成した。本基準は侵襲性の低い血液検査のみで迅速に結果が得られ、感度93%、特異度75%と良好な結果を示した。しかしながら、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗

体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは現状では保険診療で測定できない。抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは研究目的での受託測定が可能になったが、検査費用が発生することから一般診療で普及していない。これら問題点を解決するためには、再現性・汎用性の高い臨床検査キットの作成およびその体外診断用医薬品としての承認が不可欠である。そこで、昨年度からキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たすレベルまで質を高めることを目的として検討を進めてきた。昨年度は、すでにキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の測定系（ITP-ELISPOT；MBL社）を体外診断用医

薬品として申請するためのロードマップを医薬品医療機器総合機構による体外診断用医薬品の承認申請に係わる関連通知 (<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/taigai.html>) に照らし合わせて立案した。その中で必要な改善点を検討し、①キット仕様の確定、②校正用基準物質の設定、③品質管理の確立、④測定範囲の決定の4項目に絞り込んだ。さらに、主にキットに添付する陽性・陰性コントロールを設定することでキット仕様を確定した。そこで、次のステップとして本年度は校正用基準物質の設定を目指した検討を行った。

B. 研究方法

校正用基準物質として陽性および管理検体が必要であるため、ヒト GPIIb/IIIa に対するヒト型 IgG 抗体産生細胞および対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するヒト型 IgG 抗体産生細胞を作成した。マウスのヒト GPIIb/IIIa を免疫することで作成したマウス抗 GPIIb/IIIa モノクローナル抗体のハイブリドーマ (#33 株) を用いて、遺伝子改変後に CHO 細胞に導入することで Fc 領域をヒト IgG に置換したキメラ型抗体産生細胞 (#33 キメラ株) を作成した。さらに、CHO 細胞を無血清培地で培養することで浮遊細胞化した。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞を検出する測定キット (ITP-ELIOSPOT) において、被検末梢血単核球の代わりにキメラ型抗体産生 CHO 細胞 #33 キメラ株、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ #33 株を用いた。

(倫理面に対する配慮)

本研究ではヒト検体を使用しないことから、倫理審査を必要とするいかなる指針にも合致しない。

C. 研究結果

キットの品質管理には校正用基準物質としてヒト型抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する細胞が必要である。そのため、ヒト GPIIb/IIIa と反応するマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (#33 株) から IgG 遺伝子を分離し、Fc 領域をコードする部分をヒト IgG-Fc に置換したキメラ型抗体をコードする遺伝子を作成して CHO 細胞に導入した。遺伝子導入した CHO 細胞 (#33 キメラ株) は上清中にキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体を持続的に産生することを確認した。CHO 細胞は付着細胞であったため、無血清培地での継代培養を繰り返すことで、B 細胞と同様の浮遊細胞への変換に成功した。そこで、#33 キメラ株が ELISPOT における校正用基準物質として使用できるかを ITP-ELISPOT キットを用いて検証した。#33 キメラ株および #33 株 (12.5、25、50 個/ウェル) を GPIIb/IIIa 抗原が固相化された膜上で 4 時間培養し、細胞成分を除去後に 2 次抗体 (酵素標識抗ヒト IgG または抗マウス IgG) を添加し、さらに基質を加えることで発色した。#33 キメラ株、#33 株両者でスポットが観察され、スポット数は培養に加えた細胞数が増えるに従って増加した ($R^2 = 0.99, 0.98$)。#33 キメラ株では #33 株に比べてスポットが大きく判別が容易で、培養に添加した細胞数とほぼ同数のスポットが得られた。したがって、

#33 キメラ株は校正用基準物質として使用可能であった。また、対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するキメラ型抗体を産生する CHO 細胞も作成した。

D. 考察

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キット (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として構成する際の品質管理に用いる校正用基準物質としてキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞株の作成に成功した。本細胞株を用いることで、製造したキットの感度、正確性、同時再現性が確認でき、またキットの検出感度や測定範囲を設定するためにも応用することができる。キット毎に必要な B 細胞の生存性確認方法、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞の陽性、陰性コントロールの設定を昨年度に終えていることから、キット構成に必要な材料を揃えることができた。

今後は昨年度立案した抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞 (ITP-ELISPOT) を診断用医薬品として承認申請するためのロードマップに従って、ITP 患者や健常人末梢血などヒト検体を用いて至適な測定条件 (検体量、保存安定性、抗凝固薬の影響など) やカットオフを設定する必要がある。また、平成 28 年度末までにカットオフの設定と同時に試薬の最終仕様を確定する。さらに、キットの構成が確定した平成 29 年度以降に多施設での臨床性能試験を施設する予定である。

E. 結論

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットを診断用医薬品として承認を受けるために

必要な校正用基準物質の作成に成功した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwana M. What do we learn from immunomodulation in patients with immune thrombocytopenia? Semin Hematol. In press.

2. 学会発表

Kuwana M: What do we learn from Immunomodulation?. 5th ICIS Expert Meeting. (Flueli-Ranft, Switzerland). 2015. 9.

桑名正隆: 難治性血液障害-免疫性血小板減少症と血球貧食症候群-. 第 59 回日本リウマチ学会総会 (名古屋). 2015. 4. (シンポジウム S8-6: SLE の難治性病態)

桑名正隆: A regulatory T cells-deficient mouse model as a useful tool for evaluating the pathophysiology of human immune thrombocytopenia. 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 (山梨). 2015. 5. 21. (学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 3: 炎症・免疫と血栓を繋ぐ動物モデル)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

臨床調査個人票（平成 25 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

研究分担者 羽藤高明 愛媛大学医学部附属病院輸血・細胞治療部准教授
研究協力者 島田直樹 国際医療福祉大学基礎医学研究センター教授
研究協力者 倉田義之 千里金蘭大学看護学部内科学客員教授

研究要旨

我が国における特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の発症頻度、年齢分布、患者の病状や治療、生活状況を平成 25 年度の臨床調査個人票をもとに解析した。年間新規患者数は 3,908 人と推計された。高齢者に多い疾患であり、女性では 35 歳前後にも小ピークがあった。新規患者の約 9 割が血小板数 5 万以下であった。治療ではトロンボポエチン受容体作動薬の投与例が増加していた。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病（以下 ITP）は、しばしば治療に難渋し、長期間にわたって治療を必要とする難治性疾患である。厚生労働省は ITP を特定疾患に指定し、患者への支援を実施してきている。今後の ITP 患者への治療計画、支援計画をたてるにあたりわが国における ITP 患者の実態を把握することは非常に重要であると考え。本研究では ITP 患者より厚生労働省へ提出された臨床調査個人票をもとに平成 25 年度における ITP 患者の実態を解析したので報告する。

B. 研究方法

厚生労働省健康局疾病対策課より平成 25 年度の ITP 症例の臨床調査個人票をもとに入力されたデータの提供を受けた。このデータを用いて入力項目別に診療状況の詳細を解析した。

（倫理面への配慮）

本疫学研究の施行に当たっては愛媛大学

医学部附属病院倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果および考察

1. 臨床調査個人票登録率

都道府県から厚労省に提出された臨床調査個人票は 13,126 人分であった。難病医学研究財団 難病情報センターの資料では平成 25 年度 ITP 医療受給者証交付数は 24,956 人であるので全国 ITP 患者の 52.6%において臨床個人調査票を解析できた。同様な方法で算出した平成 19 年度～25 年度の 7 年間の個人票登録率（解析症例率）を表 1 に示す。登録率は 43-85%の幅があり、平成 25 年度はこれまでと比べると低かった。

2. ITP 患者発症数

平成 25 年度に新規発症した患者数を表 2、3 に示す。新規患者登録数は男女合わせて 2,071 名であった。回収率 52.6%の数値であることを考慮すると本邦における平成 25 年度新規患者数は 3,908 名であると推計された。

表4に平成19年度～25年度の7年間の新規患者発生数の推移を示す。年度別登録率(表1)を考慮した推定新規患者数は約4,000人前後で推移していた。

3. 新規患者年齢分布

急性型の年齢分布を図1に示す。男女とも66～85歳に幅広いピーク(最大ピークは男76～80歳、女71～75歳)があり、加えて女子では26～30歳に小さなピークがあった。男女とも5歳以下にも小さなピークがあった。

慢性型の年齢分布を図2に示す。男女とも61～80歳に大きなピーク(男では76～80歳、女では61～65歳に最大ピーク)を認めた。女では更に21～40歳に幅広いピーク(31～35歳に最大ピーク)を認めた。16～60歳で女は男の約1.7～9.5倍多かった。一方、61歳以上では男女差は1.5倍以下にとどまった。

従来認められた小児ITPのピークは平成25年度も殆ど認められなかった。小児ITPにおいては、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業が行われている。これらの制度や研究事業に申請すると特定疾患に申請するよりも一部負担金の免除など有利との考えで、小児ITP症例は特定疾患に申請せず、小児医療費助成制度や小児慢性特定疾患治療研究事業のほうへ申請が行われていると推測された。そのため小児における発症のピークが消失していると考えられた。

4. ITP更新患者数

平成25年度に更新申請があった患者数を表5、表6に示す。更新患者数は男女合わせて11,055名であった。登録率

52.6%の数値であることを考慮すると本邦における平成25年度更新患者数は20,858名であると推計された。

表7に更新申請症例の平成19年度～25年度の症例数の推移を示す。年度別回収率(表1)を考慮した推定患者数はこの7年間、20,000人前後で推移しているものと思われた。

5. 更新・慢性型患者の年齢分布

慢性型の更新患者の年齢分布を図3に示す。女では56～80歳に大きなピーク(61～65歳に最大ピーク)があり、21～50歳にもなだらかなピークがあった。男では56歳より増加傾向を示し、71～75歳にピークを認めた。女が男の2.1倍多かった。

6. 身体障害者手帳、介護認定、日常生活の不自由度

身体障害者認定の有無を表8に示す。身体障害者手帳を交付されている症例は7.7%で、大多数の症例は身体障害者の認定を受けていなかった。身体障害者の認定がITPによるものか、他の身体的要因によるものかは不明であった。

介護認定の有無を表9に示す。要介護、要支援認定者もごく一部の症例のみであった。

日常生活不自由度を表10に示す。約30%の症例がやや不自由あるいは介護を要するとの回答であったがITP症例が非常に高齢化しているため高齢による身体の不自由さを反映しているのではないかと推測された。

7. 生活状況

生活状況を表11に示す。新規・急性型症例では61%の症例が就労、就学、家事など社会生活を保っていた。一方、新規・

慢性型や更新・慢性型では 67～78%の症例が社会生活を保っていた。

8. 受診状況

受診状況を表 12 に示す。新規・急性型症例では 49%の症例が入院していた。新規・慢性型症例においても 22%の症例が入院していた。一方、更新・慢性型症例では入院中の症例は 1.3%とごく一部で大半の症例は主に通院であった。

9. 出血症状

出血症状を図 4 に示す。新規・急性型では出血症状を呈する症例が多く、紫斑を 79%の症例において認めた。その他、歯肉出血 (29%)、鼻出血 (16%) など、粘膜出血の頻度も高かった。新規・慢性型では紫斑を 58%に認めたが、急性型に比べ粘膜出血の頻度は 14%、10%と低かった。更新・慢性型では紫斑を 35%に認めたが粘膜出血はいずれも 5-6%と新規申請症例に比べると頻度は低かった。治療の結果、出血症状が軽減しているためと思われた。

10. 血小板数

血小板数を図 5 に示す。新規・急性型症例においては血小板数 1 万以下の症例が 68%と多かった。新規・慢性型においても血小板数 1 万以下の症例を 33%に認め、5 万以下の症例が 93%であった。一方、更新・慢性型症例においては血小板数が 5 万以下の症例は少なく、55%の症例で 5 万以上であり、治療の結果を反映しているものと思われた。

11. 特殊検査

新規症例における骨髓検査、PAIgG、抗血小板自己抗体検査、網状血小板検査の実施率を表 13 に示す。骨髓検査は急性型

で 90%、慢性型で 88%とほぼすべての症例で実施されていた。ITP に特異的な検査である抗血小板自己抗体検査は 3～6%、網状血小板検査は 18～22%と実施率は低かった。

表 14 に最近 7 年間における特殊検査の実施率の推移を示す。骨髓検査は 90%前後、PAIgG は約 70%の症例で実施されていた。一方、自己抗体検査は 6%前後と低いままであったが、網状血小板検査は増加の傾向を示しており、5 年前の 2.7 倍に増加していた。この増加は網状血小板数を計測する自動機器の普及と思われた。

12. 治療

新規症例において選択された治療法を図 6、7 に示す。新規・急性型ではプレドニゾン治療が 83%の症例において選択されていた。次いで大量 IgG 療法が 30%、ピロリ除菌が 29%の症例で施行されていた。また新規・慢性型においてもプレドニゾン治療が 58%の症例で選択されていた。次いでピロリ除菌、大量 IgG 療法が実施されていた。

新規症例におけるピロリ除菌療法の年度別の推移を図 8 に示す。この数年間は 30-35%で推移していたが、減少傾向にあった。

図 9 に更新症例でこの 1 年間に試みられた治療法、図 10 に全経過で実施された治療法を示す。更新症例においてもこの 1 年間ではプレドニゾン治療が最多で 56%の症例に実施されていた。これは各種治療に抵抗性でプレドニゾンによる維持療法が行われていた症例を含むためと推察された。一方、全経過でみるとプレドニゾン治療が 76%、次いでピロリ

除菌療法、大量 IgG 療法、摘脾など各種の治療が行われていた。平成 22 年 12 月～平成 23 年 4 月に発売された新規薬剤（レボレード、ロミプレート）であるトロンボポエチン受容体アゴニスト (TRA) はこの 1 年で 11% の症例で使われていた。

TRA を含むその他の薬剤の使用状況を表 15、表 16 に示す。セファランチン、ビタミン C、加味帰脾湯などに変化はなかった。TRA は平成 23 年度以降、急激な増加を示していたが、25 年度は増加が緩やかになった。

1 3. この 1 年間の経過

この 1 年間の経過を表 17 に示す。更新・慢性型症例では、不変 69%、軽快 23%、徐々に悪化 4% であった。ITP は良性疾患ではあるが難治性の疾患であることがうかがわれた。

1 4. 罹病期間

更新症例（慢性型）における罹病期間を図 11 に示す。罹病期間は 1 年未満の症例から 50 年以上に及ぶ症例まで幅広く分布していた。ITP が慢性疾患であることを示しているとともに基本的には予後良好な疾患であることを現しているものと思われた。

1 5. 合併症

ITP は罹病期間が長期にわたることが多い。その間には多くの合併症を併発することが懸念される。特にプレドニゾン治療が長期にわたって行われるためプレドニゾンによる副作用が懸念される。調査表に記載されていた合併症を図 12 に示す。

プレドニゾンの影響と考えられる糖尿病の頻度が高い。またプレドニゾン

や免疫抑制剤の長期投与が原因ではないかと考えられる脊椎骨折や重症感染症も報告されていた。脳出血は原疾患に基づく重篤な合併症であるが、プレドニン等の治療に基づく重篤な合併症である重症感染症は脳出血よりも多く発生していた。その他の合併症として高血圧症、脂質異常症（高脂血症）、大腿骨頭壊死などが報告されていた（図 13 参照）。

1 6. 難治症例の頻度

難治症例の定義は明確ではないが、摘脾を含む各種治療を行っても血小板数が低く（血小板数 2 万以下）、出血傾向を示している症例と考え、臨床調査個人票から上記条件にて絞り込み、難治症例数を推計した。

更新申請症例で慢性型 9,761 例を対象とした（表 18）。まず血小板数 2 万以下の症例に絞り込むと 1,787 例（18.3%）の症例が対象となった。血小板数 2 万以下の症例を、さらに出血傾向を示していた症例に絞り込むと 1,382 例（14.2%）が対象となった。出血傾向を示している症例のうちプレドニゾン治療をされていた症例は 988 例（10.1%）であった。各種治療に抵抗性であるとの考えに従い、摘脾済み症例に絞り込むと大幅に減少し、203 例（2.1%）が難治例に相当すると考えられた。

表 19 に難治症例頻度の年度別推移を示す。難治症例頻度は 2.1～2.8% で推移しており、一定の頻度で存在していた。

E. 結語

1. 新規症例数は 3,908 人と推計された。年間発症者数は最近 7 年間、4,000 人

- 前後で推移しており、発症率に変化はなかった。
2. 更新症例数は 20,858 人と推計された。本邦の患者数は最近 7 年間、20,000 人前後で推移していた。
 3. 特殊検査では、骨髄検査実施率 90%前後、PAIgG 70%前後、自己抗体検査 5%前後、網状血小板 20%前後であった。最近、網状血小板検査が増加傾向を示していた。
 4. 治療ではトロンボポエチン受容体作動薬(TRA)の投与例が増加していた。
 5. 難治症例頻度は 2.1%であった。
- 4) 羽藤高明 輸血・血液型検査 今日の臨床検査 2015-2016 PP127-133, 2015 南江堂 東京
 - 5) 羽藤高明 HLA検査 今日の臨床検査 2015-2016 pp134-139, 2015 南江堂 東京
 - 6) 岡田陽子、加藤丈陽、山下泰治、越智雅之、永井勅久、越智博文、伊賀瀬道也、羽藤高明、小原克彦 Crescendo TIA を呈した JAK2 陽性本態性血小板血症の 1 例 脳卒中 37:36-40, 2015
 - 7) 羽藤高明 第 9 回日本血栓止血学会標準化委員会シンポジウム血小板部会報告 日本血栓止血学会誌 26:470-471, 2015

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamanouchi J, Hato T, Kunishima S, Niiya T, Nakamura H, Yasukawa M: A novel MYH9 mutation in a patient with MYH9 disorders and platelet size-specific effect of romiplostim on macrothrombocytopenia. *Ann Hematol* 94:1599-1600, 2015
- 2) Mori S, Yamanouchi J, Okamoto K, Hato T, Yasukawa M: A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul Fibrin* (in press)
- 3) 羽藤高明 最新の静脈血栓形成機序から治療を考える *静脈学* 26:1-8, 2015

2. 学会発表

- 1) 山之内純、羽藤高明 VASP リン酸化測定によるシロスタゾール薬効判定と脳梗塞再発およびCYP遺伝子多型との関連 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015.5.23 甲府
- 2) 羽藤高明 成人血友病患者の止血管理とターゲットジョイントからの脱却～定期補充療法と滑膜切除術～第 9 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム ランチョンセミナー 2015.2.28 東京
- 3) 羽藤高明 術中大量出血への輸血対応 平成 27 年第 1 回日本手術医学会教育セミナー 2015.4.11 松山
- 4) 羽藤高明 インヒビター保有血友病患者における滑膜切除術の効果と術後止血コントロール 第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会 共催セミナー 2015.5.30 東京

- 5) 山之内純、羽藤高明、中西英元、朝井洋晶、松原悦子、谷本一史、竹内一人、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、安川正貴 Effect of calreticulin mutation on the integrin α I**IIb** β 3 function 第77回日本血液学会学術集会 2015.10.16 金沢
- 6) 羽藤高明 今日における血小板凝集能検査の臨床的意義 平成27年度日本臨床衛生検査技師会中四国支部医学検査学会ランチョンセミナー 2015.11.7 米子
- 7) Yamanouchi J, Hato T, Yasukawa M: ASSOCIATION OF PLATELET RESPONSE TO CILOSTAZOL WITH CLINICAL OUTCOME AND CYP GENOTYPES IN PATIENTS WITH CEREBRAL INFARCTION. 25th International Society of Thrombosis and Haemostasis Congress, 2015.6.22 Toronto, Canada
- 8) Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M: Function of integrin α I**IIb** β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation The 57th annual meeting of American Society of Hematology 2015.12.7 Orlando, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. ITP 患者数

年度（平成）	19	20	21	22	23	24	25
医療受給者証交付人数	23157	22,945	22,853	22,200	23,791	24,100	24,956
臨床個人調査票登録数	10,000	12,034	19,047	15,977	20,129	18,115	13,126
登録率（解析症例率）	43%	52%	83%	72%	85%	75%	53%

表 2. 新規患者数

	全症例	男	女
登録患者数	2,071	853	1,218
推定患者数	3,908	1,609	2,298

表 3. 病型別の患者数（新規患者）

	急性型	男	女	慢性型	男	女	型不明
登録患者数	806	369	437	1,206	461	745	59
推定患者数	1,520	696	825	2,275	870	1,406	111

表 4. 新規患者数の推移

年度（平成）	19	20	21	22	23	24	25
登録患者数	1,955	2,025	2,631	2,695	3,235	3,192	2,071
推定患者数	4,547	3,894	3,170	3,743	3,806	4,256	3908

表 5. 更新患者数

	全症例	男	女
登録患者数	11,055	3,364	7,691
推定患者数	20,858	6,347	14,511

表 6. 病型別の患者数（更新患者）

	急性型	男	女	慢性型	男	女	型不明
登録患者数	1,075	411	664	9,761	2,871	6,884	219
推定患者数	2,028	775	1,253	18,417	5,417	12,989	413

表 7. 更新患者数の推移

年度（平成）	19	20	21	22	23	24	25
登録患者数	8,045	10,009	16,416	13,282	16,894	14,923	11,055
推定患者数	18,709	19,248	19,778	18,447	19,875	19,897	20,858