

ITP 診断に有用な臨床検査法の実用化に向けた試み

研究分担者：桑名正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科 教授

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断には、いまだ血小板減少をきたす他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、含まれる項目の多くが保険診療下で測定できない。そこで、トロンボポエチン（TPO）測定法を体外診断薬として製造承認を得ることを目指し、全自動検査システムで短時間に大量の検体測定が可能な化学発光試薬として測定系を構築してきた。本年度は ITP、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群患者の臨床検体を用いて本測定系の性能評価を行い、70 pg/mL をカットオフとすることで、ITP と再生不良性貧血を明確に区別することができた。これをもって本キットの構築は完了した。

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ることで積極的に 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（TPO）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 TPO 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、すでに測定系が構築済みの TPO 測定試薬（エスアールエル社）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たし、体外診断用医薬品として申請することを目的とした検討を行ってきた。当初は 2 種類の抗 TPO 抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）を構築したが、臨床検査試薬として展開するためには汎用

性が高く、迅速かつ大量の検体を同時測定できる化学発光試薬（CLEIA; Chemiluminescent Enzyme Immunoassay）に変更した。昨年度は少数例を用いた基礎性能評価試験で、同時再現性試験、日差再現性試験、希釈直線性試験、測定上限の確認（プロゾン確認）、添加回収試験、共存物質の影響確認、保存試験を完了し、良好な結果が得られた。本年度はITP、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群の多数の臨床検体を用いてTPO測定系の性能評価を行った。

B. 研究方法

1) 対象

ITP患者血漿312例、再生不良性貧血患者血漿9検体、骨髄異形成症候群血漿38例健常人血漿100検体を用いた。患者検体は本研究班で平成18-24年に実施した診断基準策定研究で収集したものをを使用した。健常人ボランティア検体は国外ベンダーより購入した。

2) TPO測定

CLEIA測定系の構築のため、昨年度に作成したマウス抗ヒトTPOモノクローナル抗体クローンTN1結合磁性粒子、horshradish peroxidase (HRP) 標識抗ヒトTPOモノクローナル抗体一本鎖IgG-Fab'を用いた。また、較正用基準物質として、新たに作成したりコンビナントヒトTPO (rTPO) を用いた。抗TPOモノクローナル抗体結合磁性粒子(110 μ L)、HRP標識抗TPOモノクローナル抗体Fab' (100 μ L)と検体(血清または血漿40 μ L)を液相で37 $^{\circ}$ C、10分反応後に磁石により免疫複合体を固定することで未反応物を

除去、洗浄した。発光基質(100 μ L)を添加して37 $^{\circ}$ C、2.7分反応後に蛍光カウントを測定した。すべての過程を全自動診療検査システムSTACIA[®](LSIメディエンス)で行い、19分で結果が得られた。蛍光カウントはrTPOキャリブレータ希釈系列(0、17.5、70、280、700 pg/mL)を用いて標準化した。健常人およびITP検体の平均値+2SDまたは3SD値を算出し、暫定的なカットオフ値とした。なお、同時に市販キット(R&D社)でもTPO測定を行い、結果を比較した。なお、これまでの検討からR&D社キットから本測定系への変換係数は4.286と設定した。

(倫理面に対する配慮)

本研究ではヒト検体を使用することから学内倫理委員会で承認済みである(慶應義塾大学)。今回の検体使用に当たってはオプトアウトを行った。

C. 研究結果

ITP患者312例でのTPO濃度は 11.7 ± 27.0 pg/mL、再生不良性貧血患者9検体では 207.7 ± 87.7 pg/mL、健常人血漿100検体では 12.8 ± 9.0 pg/mLであった。ITPおよび健常人検体の平均値+2SDから算出したカットオフ値は、それぞれ65.7 pg/mL、30.9 pg/mL、平均値+3SDから算出したカットオフ値は、それぞれ92.6 pg/mL、40.0 pg/mLであった。そこで、暫定的なカットオフをITP検体の平均値+2SDから算出した65.7 pg/mL(≒70 pg/mL)に設定したところ、カットオフを越えた検体はITPで12例(3.8%)、再生不良性貧血では9例全例(100%)、健常人では0例であった。骨髄異形成症候群患者ではTPO

濃度は患者毎に大きく異なり、70 pg/mL を境に高値群 20 例と低値群 18 例に分けられた。そこで、カットオフを超えた ITP 検体 12 例、再生不良性貧血では 9 例全例検体を用いて R&D 社キットで TPO 濃度を測定した。CLEIA 測定系と R&D 社キットでの測定値はよく相関し、これら血漿は TPO は高値であることが確認された。R&D 社キットの測定値が 300 pg/mL を越えた ITP 検体 5 例を非典型的な症例をみなして解析から除外すると、ITP 307 例の平均+3SD は 70.4pg/mL となり、暫定カットオフとほぼ一致した。そこで、70 pg/mL をカットオフに設定してカットオフを越えた割合を検討したところ、ITP で 5/307(1.6%)、再生不良性貧血で 9/9 (100%)、骨髄異形成症候群で 20/38(52.6%)、健常人で 0/100 (0%) であった。

D. 考察

今回、CLEIA 法を用いた汎用性の高い体量の検体を迅速に処理できる TPO 測定系を確立した。昨年度の検討で、基礎性能評価試験で大きな問題はなく、測定範囲は 1.6-700 pg/mL と広範囲で健常人から再生不良性貧血患者検体まで幅広くカバーできた。また、既存の R&D 社キットの結果とおおむね相関することから、従来の研究成果との比較も可能である。今回、多

数例の検討により ITP と再生不良性貧血を区別する暫定的なカットオフを設定することができた。すでにキット最終仕様が確立できたことから、今後は ITP、再生不良性貧血など血小板減少症患者を対象とした臨床性能試験の実施に向けた準備が完了した。

E. 結論

TPO 測定 CLEIA キットを構築した。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし