

## 成人免疫性血小板減少症（ITP）の診断基準の策定と二次性 ITP における検証

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 年度に本研究班が免疫性血小板減少症（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ために普及しなかった。そのため、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血漿トロンボポエチン（TPO）の測定系を構築し、ITP と再生不良性貧血を明確に区別できることを示した。その上で、サブグループとして再現性・汎用性の高い TPO と網状血小板比率（RP%）を含む幼若血小板比率を用いた新たな成人 ITP の診断基準案を作成した。さらに、血小板減少を伴った全身性エリテマトーデス（SLE）患者を対象として、本基準案の診断フローチャートは二次性 ITP においても病態鑑別に役立つ可能性が示した。

#### A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病の診断には今なお 1990 年に厚生省研究班により作成された診断基準が用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり骨髓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。本研究班では平成 16 年度に多施設前向き研究を実施し、特発性血小板減少性紫斑病に感度、特異度の高い血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞、網状血小板比率（RP%）、トロンボポエチン

（TPO）を組み合わせ特発性血小板減少性紫斑病を診断する診断基準案を作成した。本基準で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が、項目に含まれる検査は標準化されてない上に保険診療で測定できない

ため一般診療で普及していない。そこで、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の構築を目指してきた。その上で検査項目の中で再現性・汎用性の高い臨床検査法が開発された血漿 TPO および RP% を含む幼若血小板比率を用いた新たな成人免疫性血小板減少症（ITP）の診断基準案の策定を目指している。また、新しい診断基準案の普及にあたって、二次性 ITP の代表的疾患である全身性エリテマトーデス（SLE）において新たな診断基準案の血小板減少症の病態鑑別における有用性も検討した。

#### B. 研究方法

##### 1) 対象

TPO 測定系の構築には ITP 患者血漿 312 例、再生不良性貧血患者血漿 9 例

体、骨髓異形成症候群血漿 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。

また、本研究班で 2009 年度から 2012 年度に実施した研究のために収集、保存した血小板減少（10 万/ $\mu\text{L}$  以下）を伴う SLE 患者連続 41 例の臨床情報も診断基準案の有用性の検討に用いた。これら症例では、担当医が 6 ヶ月後に臨床経過を踏まえて後ろ向きに臨床診断を行った。

## 2) TPO 測定

化学発光試薬（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、新たに作成したリコンビナントヒト TPO（rTPO）を用いた。抗 TPO モノクローナル抗体結合磁性粒子（110  $\mu\text{L}$ ）、HRP 標識抗 TPO モノクローナル抗体 Fab'（100  $\mu\text{L}$ ）と検体（血清または血漿 40  $\mu\text{L}$ ）を液相で 37°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  $\mu\text{L}$ ）を添加して 37°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 キャリブレーション

（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。

## 3) 評価項目

データベースにはベースラインで収集された以下の情報が含まれていた：偽性血小板減少症検査、末梢血検査（血算、塗抹）、生化学検査（間接ビリルビン、フェリチン、ハプトグロビンなど）、凝固機能検査（APTT、PT、D-dimer、FDP）、抗リン脂質抗体（IgG 抗カルジオリピン体、ループス抗凝固因子）、抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞（ELISPOT 法）、RP%（フローサイトメトリー）、血漿 TPO 濃度（R&D システムキット）、抗 TPO 受容体抗体、ADAMTS13 活性、ADAMTS13 インヒビター。

### （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  $11.7 \pm 27.0$  pg/mL、再生不良性貧血患者 9 検体では  $207.7 \pm 87.7$  pg/mL、健常人血漿 100 検体では  $12.8 \pm 9.0$  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。骨髓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、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%)、骨髓異形成症候群 (MDS) で 20/38 (52.6%)、健常人で 0/100 (0%) であり、ITP と低形成性血小板減少症の鑑別が可能であることが確認された。

血小板減少を伴う SLE 患者 41 例の 6 ヶ月後の臨床診断は、偽性血小板減少症 2 例、MDS 1 例、血栓性微小血管障害症 (TMA) 2 例、播種性血管内凝固症 (DIC) 3 例、ITP 24 例、無巨核球性血小板減少症 (AMT) 2 例、血球貪食症候群 2 例、薬剤性血小板減少症 5 例であった。

ITP 診断基準案の各項目を満たす割合を調べると、「血小板減少を認める (10 万/ $\mu$ L 以下)」は 41/41 (100%)、「貧血を認めない (出血性あるいは鉄欠乏性貧血は可とする)」は 15/41 (37%)、「白血球数は正常である (ただし軽度

の白血球増減を示すことがある)」は 25/41 (61%)、「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」は 41/41 (100%)、「血漿 TPO 濃度は軽度上昇にとどまる (<300pg/ml)」は 33/41 (80%)、「幼若血小板比率 (RP%または IPF%) が増加する」は 16/41 (39%) であった。「血小板減少をきたしうる各種疾患を否定できる」を除いた ITP 診断基準案を満たした割合は 4/41 (10%) であったが、全例の臨床診断は ITP であった。

ITP 診断基準には診断フローチャートが含まれており、診療における他疾患の鑑別、除外のフローが示されている。今回対象とした 41 例のうち 15 例は偽性血小板減少症、MDS、TMA、DIC、血球貪食症候群などで、フローチャートでは最初に除外される。そこで、他疾患の除外後に残された 26 例 (ITP 24 例、AMT 2 例) で血漿 TPO と RP%での結果で層別化すると、TPO<300 pg/ml かつ RP%上昇の「ITP」は 9 例、TPO<300 pg/ml または RP%上昇のいずれしか満たさない「ITP 疑い」は 15 例、TPO<300 pg/ml、RP%上昇いずれも満たさない

「低形成性血小板減少」は 2 例であった。「ITP 疑い」とされた 15 例中 13 例で ELISPOT 法による抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞が上昇していた。一方、「低形成性血小板減少」に分類された 2 例はいずれも抗 TPO 受容体抗体陽性、骨髓巨核球がほぼ消失した AMT であった。以上より、血小板減少をきたす他疾患が除外された例に限れば、ITP と AMT の鑑別が可能なが示された。

#### D. 考察

今回、CLEIA法を用いた汎用性の高い、かつ大量の検体を迅速に処理できるTPO測定系を確立した。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。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。

SLE患者では40%以上に多彩な機序で血小板減少を伴うことが知られている。ITPの頻度が高いが、それ以外にAMT、TMA、血球貪食症候群、免疫複合体による非特異的血小板破壊、抗リン脂質抗体症候群、DIC、門脈圧亢進症などによる血小板減少症がみられる。そのため、診療における血小板減少症の鑑別はきわめて重要である。

ITPの診断基準案で取り込む対象は指定難病の特発性血小板減少性紫斑病、あるいは原発性ITPを想定しており、二次性ITPは除外される。実際に診断基準案には「血小板減少をきたしうる各種疾患を否定できる」という項目が含まれ、SLE患者であれば除外される。今回の検討では、対象がSLEであっても血漿TPOとRP%の測定によりITP、AMTの鑑別が可能

なことが明らかにされた。成人ITP診断基準案は指定難病のITPの診断目的に作成されているが、SLEを含めた二次性ITPの病態評価にも役立つ可能性がある。

#### E. 結論

TPO測定CLEIAキットを構築した。また、SLEに伴う血小板減少症の鑑別にITP診断フローチャートが有用であった。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

論文発表

Nishikawa Y, Nishida S, Kuroda K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kuwana M. Development of an automated chemiluminescent enzyme immunoassay for measuring thrombopoietin in human plasma. *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(2): 313. doi: 10.3390/diagnostics12020313. PMID: 35204403

学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出現・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