

膠原病および血液疾患における網血小板測定の意味

迫田 裕之^{*1}，西郷 勝康^{*2}，増田 由佳子^{*1}，矢野 美由紀^{*1}，松永 恭子^{*1}，
向井 正彦^{*1}，成田 浩子^{*4}，近藤 信一^{*5}，鎮西 忠信^{*5}，中澤 隆^{*3}，笠木 伸平^{*3}
古形 芳則^{*3}，森信 暁雄^{*3}，河野 誠司^{*1,3}，熊谷 俊一^{*1,2,3}

*1 神戸大学医学部附属病院検査部：神戸市中央区楠町7-5-2 (〒650-0017)

*2 神戸大学医学部附属病院輸血部

*3 神戸大学医学部附属病院免疫内科

*4 神戸協同病院検査部

*5 加古川市民病院内科

SUMMARY

幼若な血小板を網血小板として測定することにより血小板造血能が評価可能であり，XE-2100のRETチャンネルを用いたImmature Platelet Fraction (IPF)は，簡便に使用できる施設間差のない指標になる可能性が期待されている。今回，血液疾患および膠原病における有用性を検討したところ，特発性血小板減少性紫斑病(ITP)ではIPFが高値，再生不良性貧血(AA)や肝硬変では低値で，骨髄異形成症候群では個人差が大きかった。膠原病ではITP様，あるいはAA様の病態を呈する場合には極めて有用な診断・経過観察マーカーであった。しかし，膠原病では血小板減少の要因が複雑であり，評価困難な症例も多かった。

IPFは自動血球分析装置により容易に得られる血小板造血能の指標として有用であり，トロンボポエチン測定の併用，さらに血小板サイズや血小板あたりのRNA量に関する情報などを加味することにより，より有益な検査血液学的指標になるものと考えられた。

Key Words XE-2100, IPF, 網血小板, 膠原病, 血液疾患

はじめに

網血小板(Reticulated platelet)とは，RNA含量の多い血小板であり，網赤血球が赤芽球系造血の指標であるのと同様に，血小板産生能の指標となりえるものと考えられてきた。つまり末梢での血小板破壊や消費の亢進による骨髄での血小板造血亢進時には網血小板比率が増加し，逆に骨髄での血小板産生能低下時にはその比率が小さくなることが知られている^{1,2)}。従来フローサイトメトリを用いて計測されてきたが，研究室毎の測定法，試薬，用いる機器によってデータが乖離し，一般臨床検査としては普及が困難な状況であった^{3,4)}。

フローサイトメトリ技術を応用した多項目自動血球

分析装置XE-2100(シスメックス社)に搭載されている網赤血球測定チャンネル(RET channel)⁵⁾では，血小板も計数されており，網赤血球と同様にRNA含量の多い血小板をImmature Platelet Fraction (IPF)として算出することが可能である。研究目的のこれまでの方法と異なり，一定の基準で判定可能なため広く臨床的にも応用可能ではないかと期待されている⁶⁾。

今回，我々は造血器疾患の他に，血小板減少もしばしばみられる膠原病および膠原病類縁疾患での血小板減少の鑑別診断や経過観察に，本機のIPFデータが有用か否かを検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

1) 血液疾患および肝硬変

神戸協同病院，加古川市民病院，神戸大学病院小児科にて加療中の特発性血小板減少性紫斑病(ITP)11例16検体，再生不良性貧血(AA)4例13検体，骨髓異形成症候群(MDS)10例15検体，肝硬変14例16検体，血栓性血小板減少性紫斑病/溶血性尿毒症症候群(TTP/HUS)13例64検体を対象とした。なお，TTP/HUS症例は，XE-2100 RET channelを用いた破碎赤血球(FRC)測定研究時^{7,8)}に取得したデータを再解析したものである。

2) 膠原病および膠原病類縁疾患

神戸大学病院免疫内科に入院した51症例150検体を対象とした。疾患の内訳は全身性エリテマトーデス(SLE)12例，関節リウマチ(RA)6例，多発性筋炎/皮膚筋炎(PM/DM)6例，全身性強皮症(PSS)4例，大動脈炎6例，Churg Straus症候群2例，悪性関節リウマチ2例，Wegener症候群2例，成人発症Still病2例，および，混合性結合組織病，結節性多発動脈炎，顕微鏡的多発血管炎，バージャー病，ベーチェット病，血清反応陰性脊椎関節症，好酸球性筋膜炎，好酸球増多症候群，シェーグレン症候群の各1例である。

2. 方法

1) IPFの測定

IPFは図1に示したようにRET channelを用いた血小板計測においてRNA含量が多い(横軸)やや大型(縦軸)の血小板として算出される。また，IPF中のRNA含量の高いものは，H-IPFとして算出されるように設定されている⁹⁾。なお，健常人における正常値は和田らにより $3.3 \pm 1.7\%$ と報告されている⁹⁾。

2) 検体の保存

血算測定後のEDTAで抗凝固された血液を，Briggsら⁶⁾の指摘している最も安定な条件である室温で翌朝まで保管後，シスメックス(株)テクノセンターにて計測した。複数回測定時の測定間隔は，原則として週1回とした。

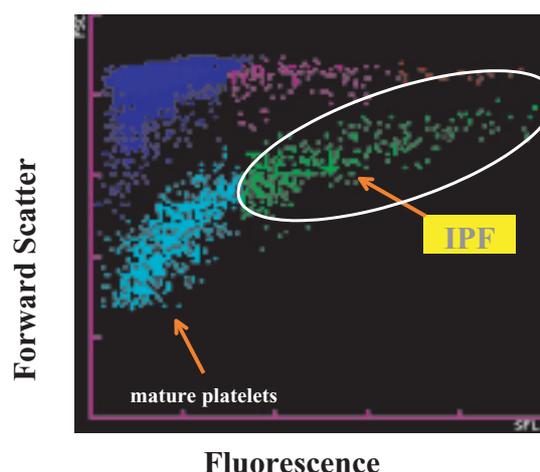


図1．網血小板測定チャンネルスキャッタグラム
縦軸はforward scatterで細胞のサイズを，横軸は蛍光強度を示しRNA量を反映する。

3) 血漿トロンボポエチン(TPO)

一部の症例では血漿中TPOをELISA法でエスアールエル(株)にて測定した¹⁰⁾。

結果

1. 血液疾患および肝硬変症例 (図2: a-e)

図2に各疾患群の血小板数およびIPF%を表示した。血小板数は10万/ μL までの検体について表示した。ITP(a)では血小板数が低値の場合には，IPF20%以上と明らかな上昇がみられる症例が約半数となっておりAA(b)と大きく異なる。ただ，両者の成績の重なる部分も多い。MDS(c)で一部にIPFが高値となる症例がみられた。HUS/TTP(d)ではITP程のIPF上昇はみられなかった。肝硬変(e)ではIPFは極めて低値であり，他疾患との合併時にも有用な指標になるものと思われた。

2. 膠原病および膠原病類縁疾患

1) 全例での成績

図3に膠原病および膠原病類縁疾患全例の成績を示した。血小板減少が5万/ μL と顕著な場合にはIPFは数%の症例から40%近い症例が混在し，血小板減少の原因の多様性が示唆された。

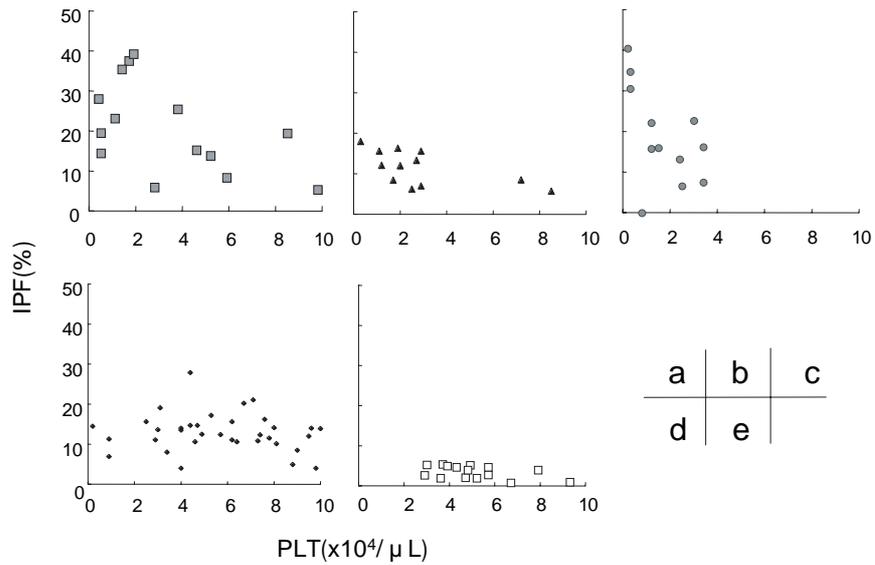


図2．血液疾患，肝硬変での血小板数とIPF

血小板数 10 万/μL 以下の検体のみを表示した。a; 特発性血小板減少性紫斑病(ITP), b; 再生不良性貧血(AA), c; 骨髄異形成症候群(MDS), d; 血栓性血小板減少性紫斑病 / 溶血性尿毒症症候群(TTP/HUS), e; 肝硬変

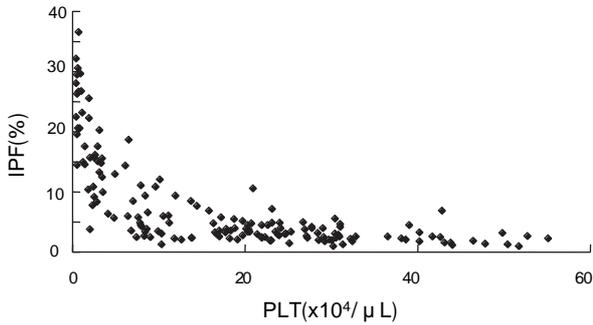


図3．膠原病症例での血小板数とIPF

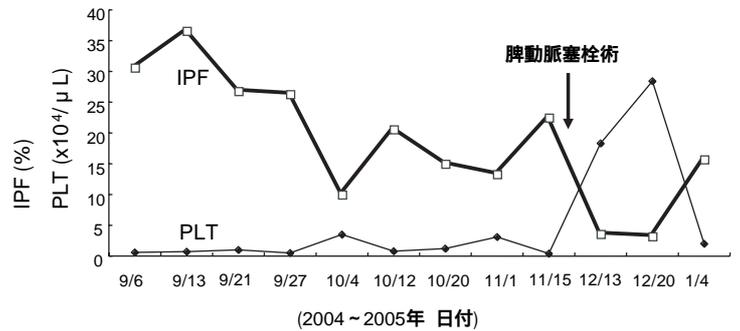


図4．症例1の臨床経過

2) 症例呈示

症例1. 28才女性

SLEとして治療中，ループス腎炎の悪化および肺胞出血にて入院となった。図4の如く血小板減少が進行しIPFも高値であり，肺胞出血による末梢での消費およびITP様病態の混在が示唆された。ITP治療の目的でステロイドパルス療法，リツキサン投与，免疫グロブリン大量療法(IVIG)が行われたが，いずれもごくわずかな反応を呈するのみであった。その後，脾動脈塞栓術において一過性ではあったものの，明らかな血小板数の回復が確認され，同時にIPFの低

下が認められた。本例には，その後再度の脾動脈塞栓術が実施され，4ヶ月以上良好に経過している。血中TPOは2.45Fmol/mLでありITPと同様比較的low値にとどまっていた¹⁰⁾。

症例2. 63才女性 (図5)

多発性筋炎として，治療中急激な血小板減少を認め入院となった。ステロイドは無効であるものの血小板関連IgG(PAIGG)が異常高値であり，IVIGが一過性に有効であったこと等より，ITP様病態の併発と診断，脾臓摘出術を施行，血小板は急激に回復し同時に高値であったIPFは低下した。

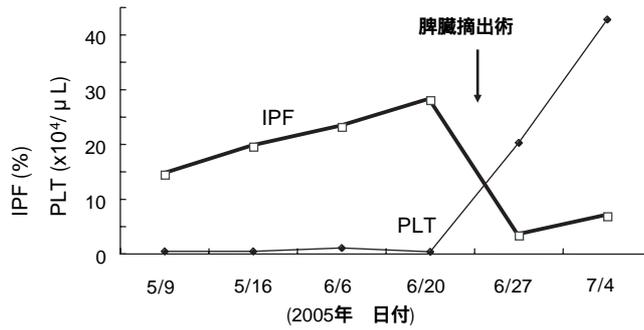


図5．症例2の臨床経過

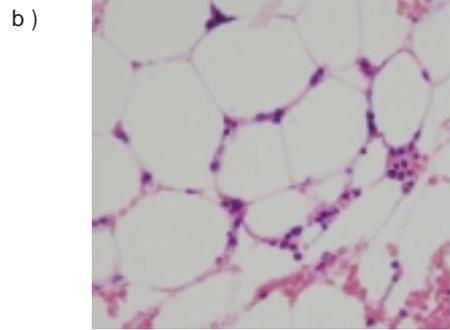
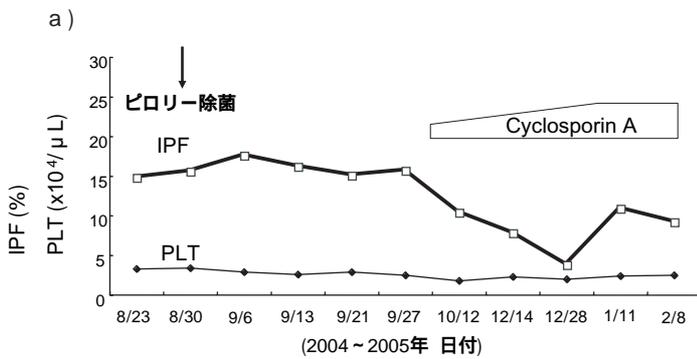


図6．症例3の臨床経過(a)および骨髄 clot section 像(b)

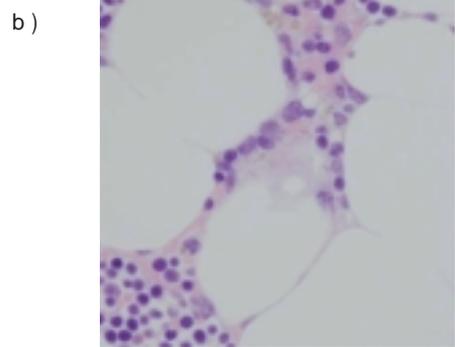
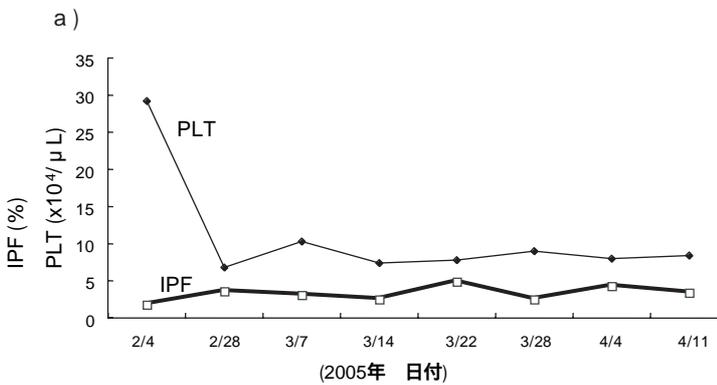


図7．症例4の臨床経過(a)および骨髄 clot section 像(b)

症例3. 55才男性

好酸球性筋膜炎に大球性貧血および血小板減少を合併した症例である。当初IPFは比較的高値でありITP様病態が考えられたが、ピロリ除菌、ステロイド投与に反応しなかった(図6-a)。clot section 像では骨髄が低形成であり、再生不良

性貧血様の病態と診断した(図6-b)。その後サイクロスポリンを併用し貧血は改善(ヘモグロビン 7 10g/dL)したが、血小板数には大きな変化はみられず、IPF値は当初に比べやや低い値を示すようになっている。本例の血中TPOは12.55Fmol/mLと高値を示しており、AA様病態と

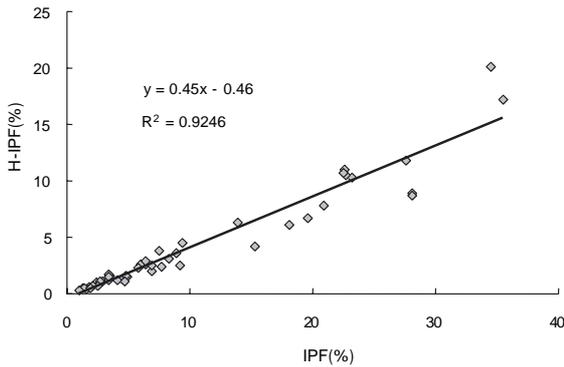


図8 . IPF とH-IPF の関係

合致していた。

症例4 . 70才女性

顕微鏡的多発性血管炎(ANCA陽性)による腎障害の症例で、間質性肺炎の併発が認められた。ステロイドパルス療法にてクレアチニンは5mg/dLから2mg/dLへと改善がみられたものの、血小板減少や貧血が進行した(図7-a)。骨髄では部分的に脂肪髄が萎縮しゼラチン様変性がみられ(gelatinous bone marrow)、薬剤あるいは感染による急激な脂肪化所見と考えられた(図7-b)。本例では血小板減少後IPFの増加はみられず、著しい血小板造血能障害の存在が示唆され、最終的には多臓器不全に陥り永眠された。

3 . IPF とH-IPF

今回H-IPFデータを同時に取得できた113検体について両者の関係を図8に示した。全体に良好な相関を示しており、特定の病態におけるH-IPFの特徴的な変動は確認できなかった。

考 察

1 . XE-2100 RET channel

RET channelは網赤血球の自動計測のみならず、光学的血小板数計測(PLT-O)として大型血小板出現時や血小板数著減時、破碎赤血球出現時などにおける正確な血小板数算定に用いられている⁵⁾。また我々は小型赤血球を破碎赤血球として計測するプログラム

をシスメックス社と共同して開発し、臨床応用が可能であることを示してきた^{7,8,11)}。

RNA含量の多い血小板を網血小板と同様な臨床指標として計測するIPF計測が確立され臨床的有用性が報告されており⁶⁾、今回、膠原病および膠原病類縁疾患を中心とした症例での有用性について検討した。なおIPFについては網血小板と異なり、絶対数は指標になりにくいとの報告があるため、今回はIPF比率のみを評価対象とした⁶⁾。

2 . 血液疾患および肝硬変症例について

これまでの報告と同様ITPでは高値で、AAでは比較的low値にとどまる傾向となることが確認できた^{6,12)}。しかし、しばしばこれらの疾患との鑑別が必要となるMDSにおいては、IPFが低～高値と様々であり、血小板造血の複雑性が伺われる。同時にMDSにおいては、大型血小板の出現もよくみられる現象であり、このような場合には血小板あたりのRNA含量が大きくなる可能性があり、血小板サイズ情報とともに解析し、単位容積あたりのRNA含量についても評価することが望ましいと考えられた。残念ながら今回のMDS症例では、血小板数が少ないため平均血小板容積(MPV)は算出されず、このような観点からの評価はできなかった。今後、RETチャンネル情報として、IPF前方散乱光データ解析が可能になれば、新たな展開が期待できるかもしれない。同時に、RNA含量、すなわち蛍光強度情報が化学療法後の血小板回復の予測に有用との報告¹³⁾もあるが、今回H-IPFとして側方蛍光強度の応用を試みたが、明らかかな有用性は示しえなかった(図8)。今後、さらに詳細な情報提供による臨床応用が期待される。

TTP/HUS症例では、これまでの報告⁶⁾と異なり、ITPほどの高値を呈さなかった。今回の検討症例の多くがHUS小児例であり、成人TTPとは異なった特性を有するためかもしれない。

肝硬変による血小板減少の理由は、脾機能亢進による破壊の増加と同時に骨髄機能の低下が関与すると考えられるが¹⁴⁾、今回の成績においてもIPFは低値であり、骨髄における血小板造血機能の低下が大きな要因と考えられ、他の血小板減少症との鑑別診断に有用と思われる。

Kurataら⁴⁾はITPとAAの鑑別において、網血小板と同時にTPOを併用して評価することが望ましいとしている。今回報告した症例においても一部ではTPOを測定し、Kurataらの報告と同様であることが確認できたので、保険適応はないものの、鑑別困難な症例においては積極的に検討していきたいと考えている。

3. 膠原病および膠原病類縁疾患について

膠原病関連疾患には様々な程度の血液学的異常が出現し、診断・治療に苦慮することが多い。殊に血小板減少は症例1・2に示したようにITPと同様な病態を示す場合と、症例3や4の如く骨髓機能低下を反映する場合があります。本法はこれらの診断や経過観察に一定の役割を果たすことが可能と考えられた。ただ、今回の検討では原因不明の血小板減少症例が多く含まれていたことも事実であり、薬剤による一過性の骨髓機能抑制やアレルギー反応、抗リン脂質抗体症候群、血球貪食症候群、強皮症腎やそのほかの全身性血管炎の存在など、血小板数や血小板活性化に影響を及ぼすと考えられる病態が、複雑に絡み合っているものと推測される。

4. IPF計測の今後の課題と展望

前述の如く、血小板サイズに関する情報が同時に得られるならば、より有用な指標になるのではないかと期待される。一般に幼若な血小板は大型で、かつ機能も相対的に高いこと¹⁵⁾を考えると、血小板輸血の適応を考える際の指標となる可能性が考えられる。実際、連日測定することによって、化学療法後の血小板回復をよりの確に予測することが可能となり、血小板輸血量が節約できる可能性があるとして報告されており、このような観点からの応用についてもさらに検討が必要と思われる^{13,16-18)}。同時に、造血幹細胞移植後の生着の指標としての有用性も示されている^{17,19)}。

また、血小板減少症のみならず、いくつかの血栓性病態においてもMPVの変化²⁰⁾以上に網血小板の増加が認められると報告されており、臨床的な検討が必要である²¹⁻²³⁾。

結 語

IPF測定は血液疾患のみならず、膠原病においても一定の病態解析や臨床経過観察に有用と考えられたが、血小板減少の原因が多岐にわたると推測され、原因の特定が困難な症例が多く認められた。

本論文の要旨は第6回日本検査血液学会学術集会(2005年7月30, 31日, 長崎)にて発表した。

謝 辞

本検討にご協力いただいたシスメックス(株)学術部の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) Ingram M, Coopersmith A: Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol*, 17 : 225 ~ 229, 1969.
- 2) Kienast J, Schmitz G: Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: A diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*, 75 : 116 ~ 121, 1990.
- 3) McCabe DL, et al. : Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischemic attack. *Br J Haematol*, 126 : 861 ~ 869, 2004.
- 4) Kurata Y, et al. : Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycoferritin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*, 115 : 656 ~ 664, 2001.
- 5) シスメックス(株)開発本部: 多項目自動血球分析装置XE-2100の概要, *Sysmex J*, 22 : 76 ~ 84, 1999.
- 6) Briggs C, et al.: Assessment of immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 126 : 93 ~ 99, 2004.
- 7) Saigo K, et al.: Usefulness of automatic detection of fragmented red cells using a hematology analyzer for diagnosis of thrombotic microangiopathy. *Clin Lab Haematol*, 24 : 347 ~ 351, 2002.
- 8) Jiang M, et al.: Quantification of red cell fragmentation by automatic hematology analyzer XE-2100. *Clin Lab Haematol*, 23 : 167 ~ 172, 2001.
- 9) 和田英夫: 血小板減少性疾患における網血小板測定の意

- 義と可能性 . 第 36 回日本臨床検査自動化学会ランチョンセミナー , 2004 年 10 月 1 日 (横浜)
- 10) 臼杵憲祐 , 浦部晶夫: トロンボポエチンの血中濃度 . 血液・腫瘍科, 33 : 11 ~ 15, 1996.
- 11) Imoto S, et al.: Sequential quantitative measurement of fragmented red cells using automatic hematology analyzer XE-2100 is helpful for diagnosing thrombotic microangiopathy after allogeneic stem cell transplantation. *Lab Hematol*, 11 : 131 ~ 136, 2005.
- 12) 阿部泰典, 他: 血小板減少性疾患における網血小板自動測定の有効性 . 医学検査, 53 : 282 ~ 287, 2004.
- 13) Wang C, et al.: Reticulated platelets predict platelet recovery following chemotherapy. *Transfusion*, 42 : 368 ~ 374, 2002.
- 14) Panasiuk A, et al.: Reticulated platelets as a marker of megakaryopoiesis in liver cirrhosis; Relation to thrombopoietin and hepatocyte growth factor serum concentration. *Hepatology*, 51: 1124 ~ 1128, 2004.
- 15) 西郷勝康, 他: ヒト血小板のサイズによる分離 第 2 報 骨髄増殖性疾患血小板の ATP,ADP および TG 含量とサイズとの関係 . 臨床病理, 34 : 1417 ~ 1421, 1986.
- 16) Chaoui D, et al.: Reticulated platelets: a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusion after intensive chemotherapy. *Transfusion*, 45: 766 ~ 772, 2005.
- 17) Consolini R, et al.: Evaluation of thrombopoiesis kinetics by measurement of reticulated platelets and CD34+ cell subsets in patients with solid tumors following high dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell support. *Haematologica*, 86 : 959 ~ 964, 2001.
- 18) Macchi I, et al.: Comparison of reticulated platelet count and mean platelet volume determination in the evaluation of bone marrow recovery after aplastic chemotherapy. *Br J Haematol*, 69 : 152 ~ 157, 2002.
- 19) Figuerres E, Olszewski M, Kletzel M: A flow cytometric technique using thiazole orange to detect platelet engraftment following pediatric stem-cell transplants. *Cytotherapy*, 3 : 277 ~ 283, 2001.
- 20) 西郷勝康, 他: 抗血小板剤による平均血小板容積の増加 . 最新医学, 42 : 783 ~ 788, 1987.
- 21) Henry M, et al.: Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood*, 91 : 1288 ~ 1294, 1998.
- 22) Nakamura T, et al.: Flow cytometric analysis of reticulated platelets in patients with ischemic stroke. *Thromb Res*, 106 : 171 ~ 177, 2002.
- 23) Lakkis N, et al.: Reticulated platelets in acute coronary syndrome: a marker of platelet activity. *J Am Coll Cardiol*, 44 : 2091 ~ 2093, 2004.

Clinical Significance of Measurement of Reticulated Platelets for the Patients with Collagen Diseases or Hematologic Disorders.

Yasuyuki SAKOTA^{*1}, Katsuyasu SAIGO^{*2}, Yukako MASUDA^{*1}, Miyuki YANO^{*1},
Kyoko MATSUNAGA^{*1}, Masahiko MUKAI^{*1}, Hiroko NARITA^{*4}, Shin-ichi KONDO^{*5},
Tadanobu CHINZEI^{*5}, Takashi NAKAZAWA^{*3}, Shinpei KASAGI^{*3}, Yosinori KOGATA^{*3},
Akio MORINOBU^{*3}, Seiji KAWANO^{*1,3}, and Shunichi KUMAGAI^{*1,2,3}

^{*1} Clinical Laboratory, Kobe University Hospital, 7-5-2 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017,

^{*2} Blood Transfusion Division, Kobe University Hospital

^{*3} Department of Immunology, Kobe University Hospital

^{*4} Clinical Laboratory, Kobe Kyodo Hospital

^{*5} Department of Internal Medicine, Kakogawa Municipal Hospital

SUMMARY

Thrombocytopoiesis can be evaluated by detection of the levels of reticulated platelets, immature and young platelets. Immature platelet fraction (IPF) detectable by RET channel equipped to XE-2100 has been expected to be a useful tool because which data can be easily obtainable and essentially has no institutional differences. We evaluated its utility for the patients with hematologic disorders or collagen diseases. IPF in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) was apparently high in comparison with those obtained in the patients with aplastic anemia (AA) or liver cirrhosis, however IPF in myelodysplastic syndrome was variable. In the patients with collagen diseases, IPF was useful especially when thrombocytopenia was considered derived from ITP or AA like conditions. However, as the etiology of thrombocytopenia in the patients with collagen diseases was complicated, there were substantial unevaluable cases.

IPF, easily obtainable by automatic hematology analyzer, is proven to be useful as a marker of thrombocytopoiesis, and which is expected to be more valuable laboratory hematology tool in combination with the evaluation of thrombopoietin levels, platelet size or RNA content in each cell.

Key Words XE-2100, IPF, Reticulated Platelet, Collagen Disease, Hematologic Disorders
