

総説

XE-2100 RET チャンネルを用いた新しい指標の臨床的有用性

西郷 勝康^{*1,3}, 迫田 裕之^{*2}, 増田 由佳子^{*2}, 松永 恭子^{*2}, 成田 浩子^{*4},
橋本 誠^{*1}, 炬口 真理子^{*2}, 窪田 良次^{*5}, 野村 努^{*5}, 信原 由実子^{*3},
杉本 健^{*3}, 井本 しおん^{*6}, 熊谷 俊一^{*1,2,3}

*1 神戸大学医学部附属病院 輸血部：兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2（〒650-0017）

*2 神戸大学医学部附属病院 検査部

*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 香川大学医学部附属病院 輸血部

*6 兵庫県赤十字血液センター

Key Words XE-2100, RET チャンネル, 破碎赤血球, 幼若血小板 (IPF), 臨床的有用性

はじめに

多項目自動血球分析装置 XE-2100 (シスメックス社, 以下 XE-2100) の網赤血球測定チャンネル (RET チャンネル) は, 網赤血球の自動計数を目的としたものであるが, 近年このチャンネルを用いた新たな臨床指標が開発され, 臨床的有用性が種々報告されている。本稿では, 筆者らも開発時から関与した破碎赤血球の定量システム (RET マスター), および最近発表された幼若血小板測定システム (IPF マスター) の使用経験, 有用性について紹介する。

XE-2100 の機能および RET チャンネルの解析項目

XE-2100 には, 白血球 4 分類を行う DIFF チャンネル, 白血球 / 好塩基球数を測定する WBC/BASO チャンネル, 有核赤血球を測定する NRBC チャンネル, 幼若白血球や造血前駆細胞を検出する IMI チャンネルの他に, 網赤血球 / 光学式血小板数測定のための

RET チャンネルが搭載されている¹⁾。

RET スキャッタグラム¹⁾の 1 例を図 1 に示した。横軸は蛍光強度で RNA 量を反映し, 縦軸は前方散乱光 (Forward scatter) で細胞のサイズを反映している。すなわち, 蛍光量が多く RNA 含量の多い赤血球を網赤血球として定量できるシステムである。さらに RNA 含量の程度から, 網赤血球を Low, Middle, および High-fluorescence ratio に分類することも可能である。

同時に本スキャッタグラム上には, 赤血球の下方に血小板が計数されており, 血小板数の算定にも応用されている (PLT-O, 光学式血小板)。血小板数は従来インピーダンス法により計数され, XE-2100 でも同様であるが, 大型血小板の出現例あるいは血小板に近似したサイズの粒子 (破碎赤血球や白血病細胞断片など) の存在時に, 正確な血小板数を算出するのに有用である。これは, 一定の RNA を含有している血小板を, 横軸の蛍光強度により明瞭に他の粒子と区別可能なためである。現にごく最近でも, イン

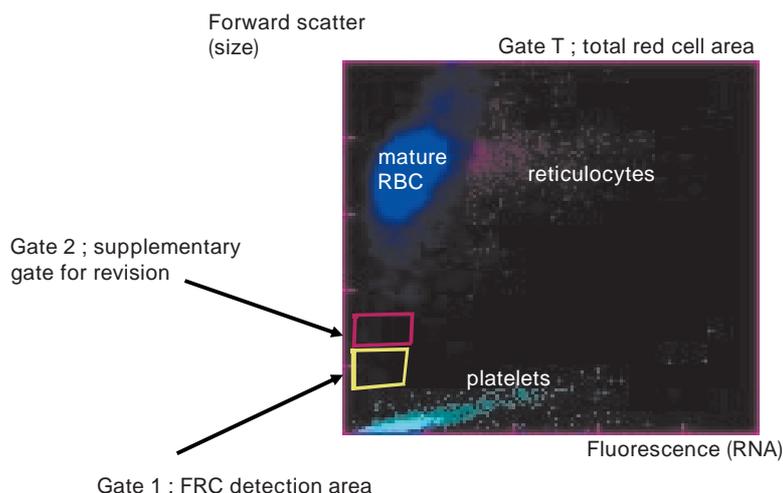


図1 . XE-2100 RET チャンネルの scatter gram
 横軸蛍光強度は核酸量を反映し、縦軸前方散乱光 (forward scatter) は細胞のサイズを反映する。
 Mature RBC ; 成熟赤血球, Reticulocytes ; 網赤血球, Gate T ; 赤血球検出エリア全体,
 Gate 1 ; 破碎赤血球検出エリア, Gate 2 ; 小型赤血球の影響を補正するための検出エリア。

ピーダンス法による粒度計測のみでは、破碎赤血球の存在のために偽性に血小板が高値であった造血幹細胞移植 (SCT) 後の血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 症例が報告されており、PLT-O の有用性がうかがわれる²⁾。

RET マスターの原理と臨床応用

1 . 破碎赤血球定量システム

1) 破碎赤血球定量の目的

破碎赤血球が末梢血に増加して出現する病態 (赤血球破碎症候群) をきたす基礎疾患には種々のものが知られている (表1)³⁾ が、このうち微小血管障害症に起因する病態では、特に早急な鑑別診断と治療が必要となることが多い。

SCT 後にも、TTP に類似した病態 (移植後血栓性微小血管障害, stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy, 移植後 TMA) が併発し、免疫抑制剤の減量や中止を含む、早急な対策が必要のため、経時的な破碎赤血球のモニタリングが必要といわれている。以前より臨床診断に用いられている Zeigler の基準 (表2)⁴⁾、あるいはごく最近のコンセンサスメーティングの報告 (表3)⁵⁾ に

おいても、その診断には破碎赤血球のある一定の出現が最も重要な指標であることが示されている。

しかしながら、標本観察から頻回に破碎赤血球を定量することは日常多忙な検査技師に大きな負担をかけることになり、また観察者により破碎赤血球の鑑別が異なることも考えられ、自動計測法の確立が望まれていた。

なお、最近、移植後 TMA は必ずしも血栓症が存在するわけではなく⁶⁾、stem cell transplant-associated microangiopathy (TAM) とも呼ばれている⁵⁾。

2) 破碎赤血球の測定法

前項のような状況の中、XE-2100 RET チャンネル上で検出される小型の赤血球を指標にできないかとの検討が開始され、鉄欠乏性貧血などに出現する小型の正常赤血球の影響を最小にするための補助 gate (gate 2) を含む検出システムが考案された (図1)⁷⁾。すなわち、小型の赤血球が多く gate 2 に含まれる赤血球の比率がある程度高くなると、破碎赤血球検出 gate (gate 1) のカウントを直接破碎赤血球とするのではなく、gate 2 に出現するカウント数を用いて、実験的に得られた両者の関係から gate 1 の値を補正し、破碎赤血球を算出するよう工夫されている。

表1 . 赤血球破碎症候群 (文献3より, 一部改変)

心および大血管障害に関連したもの <ul style="list-style-type: none"> ・人工弁 ・弁形成術後 ・弁膜症 ・腱索断裂 ・感染性心内膜炎 ・大動脈瘤 ・大動脈縮窄症
小血管障害に関連したもの; 微小血管障害症 <ul style="list-style-type: none"> ・血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) ・溶血性尿毒症症候群 (HUS) ・播種性癌腫症 (胃癌, 乳癌, 肺癌, 膵臓癌, ほか) ・化学療法後 (マイトマイシン, シスプラチン, プレオマイシン, ほか) ・妊娠, 産褥期 (子癇, 子癇前症, ほか) ・播種性血管内凝固症候群 (DIC) ・感染症 ・自己免疫疾患 ・血管腫 ・悪性高血圧 ・熱傷 ・造血幹細胞移植 ・行軍血色素尿症

表2 . Zeigler の分類 (文献4より)

Grade	LD	% of FRC	Clinical TMA
0	正常範囲または上昇	1.2%以下	否定
1	正常範囲	1.3%以上	前臨床期
2	上昇	1.3~4.8	軽症
3	上昇	4.9~9.6	中等症
4	上昇	9.7%以上	重症

表3 . 新しいTMA 診断基準案 (文献5より)

1	末梢血破碎赤血球が4%より多い
2	遷延あるいは進行性血小板減少 (血小板50,000/ μ L以下または前回検査の50%以上減少)
3	突然あるいは持続したLD (LDH) の上昇
4	貧血の進行または輸血必要性の増加
5	ハプトグロビンの減少

測定原理から明らかなように、本法ではあくまで細胞のサイズにのみ依存した計測となっていることを認識しながら臨床応用することが必要であり、他の自動計測法⁹⁾で示されているのと同様に、偽陽性を呈しやすい傾向にあるものと考えられる。今後の対応の一つとして、破碎赤血球の特徴的な形態を反映させるため、固定した血液を用い、粒子の形状を考慮した自動計測法の可能性も指摘してきたが⁹⁾、日常臨床への応用は困難なのが現状である。

なお、762名の健常人検体から得た正常値は0.03～0.56%と算出され、教科書的な数値と同様であった。

3) 破碎赤血球比率(%)の微小血管障害症への応用
 (1) 血栓性血小板減少性紫斑病 / 溶血性尿毒症症候群 (TTP/HUS)
 代表的な微小血管障害性溶血性貧血である小児

のHUSを中心にTTPを含む14症例において臨床応用の可能性を検討した¹⁰⁾。典型的な症例(25歳、女性、TTP)を図2に示したが、自動計測による破碎赤血球(FRC)の低下と共に血小板数(PLT)の回復やクレアチニン、トロンボモジュリンの低下が観察された。

これらのTTP/HUS症例で、目視による破碎赤血球比率と自動計測による比率をプロットしたところ、両者は良好に相関しており臨床応用が可能であることが示された(図3)。

ただし、まれとは考えられるが、目視上破碎赤血球の出現があるにもかかわらず自動計測で判別できなかった症例があるのも事実である。図4は全身性エリテマトーデス(SLE)で経過観察中に、原因不明の血小板減少をきたした症例である。当初は比較的緩徐な経過をとっていたものの、ある時期、破碎赤血球が急激に増加しており、経時的

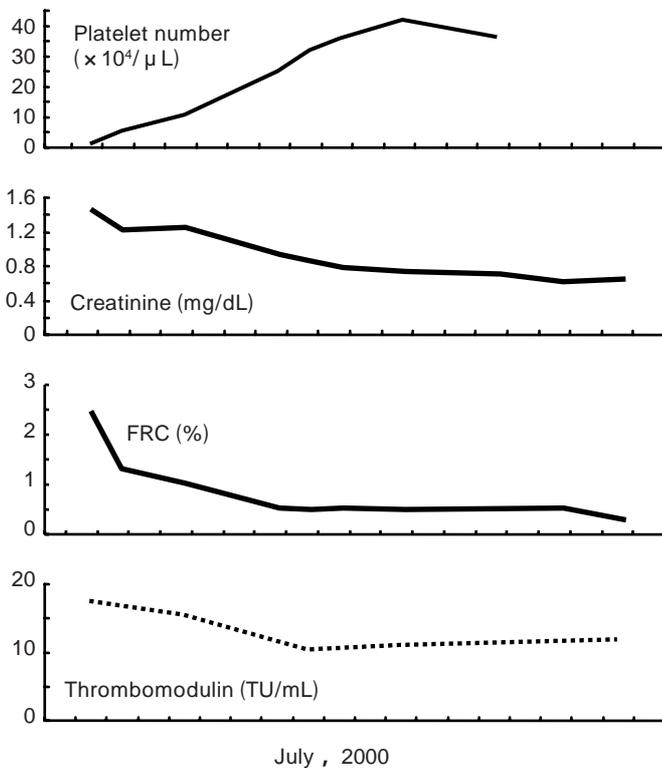


図2 . TTP 症例 (25 歳 , 女性) の経過

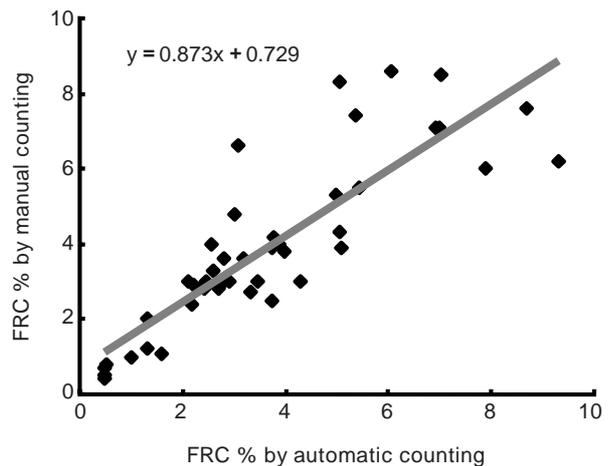


図3 . 破碎赤血球検出における目視法と自動計測法の結果の相関関係 (文献10より)

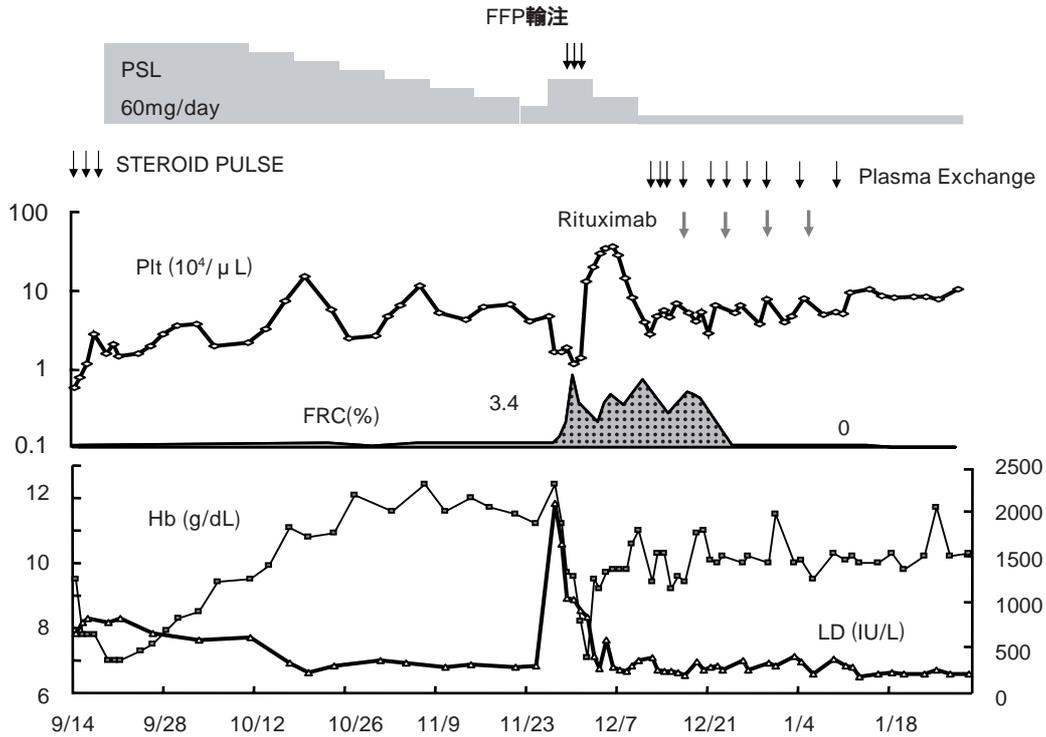


図4 . 頑固な血小板減少にて再発したSLE 症例
 PSL ; プレドニソロン , STEROID PULSE ; メチルプレドニソロン大量療法 , Plasma Exchange ; 血漿交換 ,
 Rituximab ; リツキサン (抗CD20モノクロナル抗体)

な観察が必要であることを示す症例といえる。しかしながら本例では、自動計測値は0.1 ~ 0.5 %程度と極めて低値に止まり、自動計測が偽陰性を呈する場合もあることを示した症例であり注意が必要である。なお、本例では当初から、血漿交換やリツキサン治療が奏功し血小板数に改善が得られた後でも、一貫してADAMTS13活性は低値のままであり病勢との関連は不明瞭であった。現状ではこの病態を常に反映する指標はなく、総合的な判断が必要であることを痛感させられた。なお、ADAMTS13活性は一部の膠原病で低下傾向を示すこと¹¹⁾、播種性血管内凝固症候群 (DIC) でも極低値例が存在すること¹²⁾が示されている。

(2) 移植後TMA

筆者らは、SCTのTMA診断に破碎赤血球が有用か否かを検討するため、33症例 (27例が同種移植、6例は自家移植) の経過を観察した¹³⁾。自家末梢血

幹細胞移植 (auto-PBSCT) 例では、破碎赤血球の増加をみた症例はなかったが、27同種移植例中2例では移植前に、自動計測 / 目視法のいずれにおいても破碎赤血球増加が認められ、生着後に破碎赤血球が消失する現象がみられた¹⁴⁾。骨髓異形成症候群 (MDS) 症例等でも時に観察されるように、血液疾患においては原疾患による破碎赤血球出現も考慮しておく必要がある。すなわち治療前、移植前の血球計測時から破碎赤血球を定量測定することが的確な診断のために必要である。

その他の25症例中23例では経過中破碎赤血球が正常値を越え、Zeiglerの基準 (1.3%) を越えた症例が11例 (44%) にみられた。この11例中5例ではLDの上昇もみられTMAの可能性が示唆されたが、血小板数の変化などから、2例においてはTMAと診断され、本シリーズでのTMA合併率は8%であった。

症例提示 (図5)

症例は34歳男性。急性骨髄性白血病再発後に、HLA, ABO同型の姉から末梢血幹細胞移植を受けた。下痢出現の原因が当初GVHDと考えられ、ステロイド治療が開始されるも、破碎赤血球の急激な上昇と大腸ファイバーの生検結果がTMAを示唆していたことから移植後TMAと診断し、サイクロスポリンやステロイドを中止あるいは減量することにより軽快した症例である。このように、頻回に測定することによりタイミングよく破碎赤血球の変動を捉えることができれば、早期診断とはいえなくとも正確な診断を得る上で極めて有用と期待される。

なお、Kanamoriら¹⁵⁾は同種移植後の目視による破碎赤血球観察の結果を報告しているが、多くの症例

で破碎赤血球が増加していること、またTMA合併例ではその出現比率が高いことを示しており、我々と同様の成績であった。ただし、彼らの形態観察成績は2週間に1度の成績であり、リアルタイムな変化を目視のみで追求することは、現実的には困難であることを反映しているものと推察される。

4) 今後の展望

最近では本邦でも種々の臓器移植療法が進歩し、免疫抑制剤の大量使用例が増加している。伊藤らは¹⁶⁾、本法による自動計測が有効に利用された生体肝移植後のTMA例を報告しており、破碎赤血球の自動計測法は移植療法全体の安全性向上に貢献できるものと期待される。

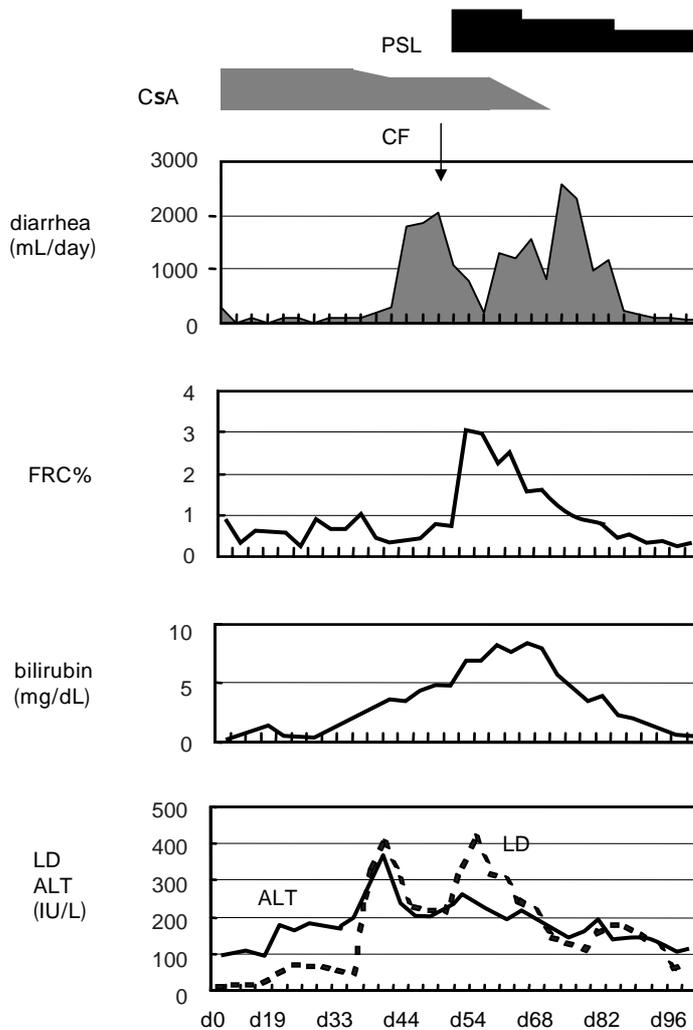


図5 . 造血幹細胞移植後TMA症例 (文献13より)

CyA ; サイクロスポリン, PSL ; プレドニソロン, CF ; 大腸ファイバー, Diarrhea ; 下痢, Bilirubin ; ビリルビン

2. 網赤血球ヘモグロビン等量 (RET-He)

網赤血球のサイズ情報 (Forward scatter) から、網赤血球内のヘモグロビン量を推測し、機能鉄欠乏症の診断が可能となることを見いだされた¹⁷⁾。バイエル社のADVIA120のCHr (網赤血球ヘモグロビン含量) に相当する指標と考えられる¹⁸⁾。透析患者へのエリスロポエチン使用時の適切な鉄剤投与の指標になることが示されており、今後より広い範囲での有用性について、さらに検討の必要な領域といえる。

IPF マスターの意義と臨床応用

1. 網血小板

Ingramら¹⁹⁾は1969年、脱血したビーグル犬から得た末梢血のニューメチレンブルー染色標本により、2種類の網細胞の存在を報告した。1種類は幼若赤血球の『網赤血球』であり、赤血球造血の指標として臨床検査学上極めて有用な貧血の診断・経過観察項目である。超生体染色法を用いた目視法のみならず、最近では自動計測装置の普及により、さらに汎用されている。

もう1種類は幼若血小板である『網血小板』であり、血小板減少症における臨床的有用性は認識されつつも、定量法が容易でないこと、フローサイトメトリー (FCM) 等の高価な測定機器が必要であること、さらに施設間での検出方法も様々で標準化が困難なことから、臨床的にはほとんど利用されてこなかったのが実情である。

2. 幼若血小板の定量法

RETチャンネルに表現される血小板は、PLT-Oとして臨床上有用な指標であることは前述した。さらに血小板のRNA含量が多くやや大型の分画 (図6) を、幼若血小板 (IPF, immature platelet fraction) としてXE-2100で定量するプログラムが開発された。これまでFCMで計測されてきた網血小板の代替項目として利用可能と考えられる。なお、血小板サイズにはheterogeneityがあり、幼若な血小板はそのサイズが大きい方に分画され、かつその機能も高いことが知られており²⁰⁾、網血小板やIPFには、大型血小板がより多く含まれるものと考えられる。

IPFが従来どの測定法の網血小板に一致するものかは明らかではないが、自動計測法の開発は、網血小板計測を世界共通の指標として標準化し、臨床応用をめざす上では極めて有用なことといえる。現在、多くの施設でその臨床応用について解析がなされ報告されつつある。

IPF比率 (%) の正常範囲は、男では3.29% (1~10.3)、女では3.28% (1.1~9.5) とされ、血小板数と負の相関を示すこと²¹⁾、あるいは男女差無く $2.7 \pm 1.4\%$ (SD)、基準値6.9%以下 (3SD) とも報告されている²²⁾。以下本稿では、特別な場合を除き、IPFは比率 (%) を意味するものとする。

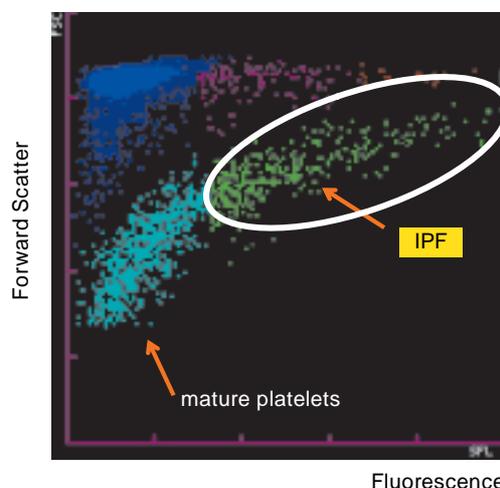


図6. 幼若血小板検出用のRETチャンネルscatter gram
IPF; immature platelet fraction, 幼若血小板

3 . IPF の血小板減少症鑑別診断への応用

1) 血小板減少症の分類

真の血小板減少症の原因別分類は、従来より表 4 に示すように骨髄での血小板産生の低下によるもの、末梢での破壊亢進によるもの、および分布の異常によるものと、分類されており、厳密には血小板減少症の鑑別診断のために、骨髄での造血状態の把握(骨髄穿刺など)が必要となる。しかし現実的には、末梢血あるいは非侵襲的な検査のみで正確な診断にいたることが望ましい。倉田らは^{23, 24)}、再生不良性貧血(AA)と特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の鑑別診断においては、血小板サイズやPAIgG(血小板表面免疫グロブリン)では十分な鑑別は不可能であり、FCM法による網血小板の測定と、血中トロンボポエチン(TPO)の定量を組み合わせることが有用であるとしている。すなわちITPでは前者が高値で後者はほぼ正常、AAでは前者が低値で後者が高値、というものである(図 7)。

なお、最近ITPの鑑別診断にはエリスポットアッセイによる抗グリコプロテインIIb/IIIa抗体産

生リンパ球の測定が有効であることが示され、新たな診断基準も提唱されている²⁵⁾。

2) 血小板減少症鑑別診断へのIPFの応用

前項に示したように、血小板減少症の鑑別診断に網血小板測定が有用であることは明らかであり、XE-2100のIPFが、どの程度有用であるかの検討が進行中である。

Briggsら²⁶⁾はIPF計測の臨床について報告し、10回計測でのCV(%)が2.04~14.17%であること、室温保存では48時間は比較的安定であること、ITPの急性期にはIPFが著増し、ITPやTTPでの経時的観察では、血小板減少時にIPFが高値を示すこと、などを示した。なお、検体の保存期間については、1日以内がよい、との報告もあり²²⁾、可及的速やかに測定するようにしたい。

筆者らも、血小板減少症でのIPF測定結果を報告した²⁷⁾(図 8)。ITPでは血小板減少が著明な時期には異常高値を呈し、AAではわずかに高値、TTP/HUSでは中等度高値、MDSでは症例間差が大きくなっていった。肝硬変症では、他の疾患に比べ明らかにIPFは低値となっていた。

表 4 . 血小板減少をきたす疾患

1 . 血小板産生の低下による疾患	2 . 血小板寿命の短縮をきたす疾患
1) 他系統の血球減少も伴うもの 再生不良性貧血 急性白血病 骨髄異形成症候群 巨赤芽球性貧血 癌の骨髄転移 薬剤性 など 2) 血小板のみの減少 無巨核球性血小板減少症	1) 免疫性機序 特発性血小板減少性紫斑病 薬剤性 など 2) 消費の亢進 血栓性血小板減少性紫斑病 溶血性尿毒症症候群 播種性血管内凝固症候群 大量出血 など 3) 分布の異常 脾腫 血管腫 など

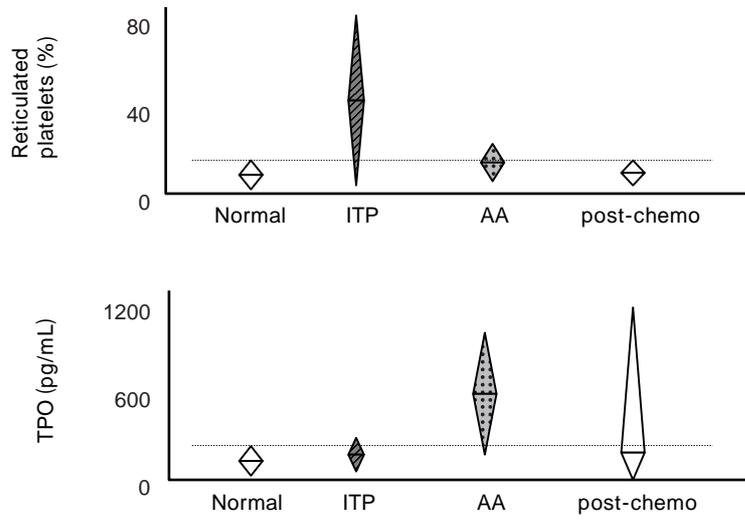


図7. 網血小板比率, トロンボポエチンレベルによる血小板減少症の鑑別診断 (文献23より, 一部改変)
 ITP; 特発性血小板減少性紫斑病, AA; 再生不良性貧血, post-chemo; 化学療法施行後の症例。
 各表中の横軸は基準値上限を示す。

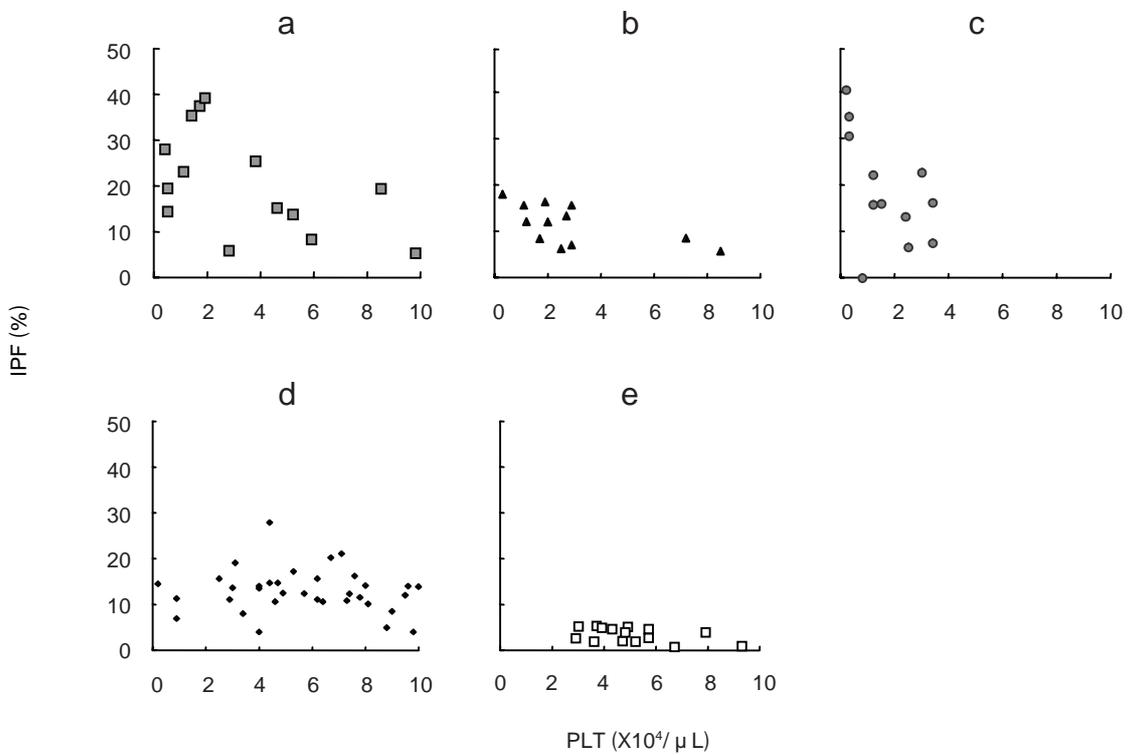


図8. 諸種疾患における, 血小板数とIPF比率(%)の関連 (文献27より)
 a; 特発性血小板減少性紫斑病, b; 再生不良性貧血, c; 骨髄異形成症候群,
 d; 血栓性血小板減少性紫斑病 / 溶血性尿毒症症候群, e; 肝硬変

ITPの成績はこれまでの報告と同様であったが、抗血小板抗体が骨髓巨核球にも到達する²⁸⁾ことも関与するためか、末梢での破壊による骨髓での血小板産生刺激のみならず、他の要因の関与についての検討が必要である。逆に西山ら²²⁾は、IPF絶対数の検討から、ITPでも必ずしも血小板産生が亢進しているとはいえない、としておりさらに異なった角度からの検討が必要であろう。

MDSでは症例間の差異が大きく、診断の複雑性が示唆された。本症では時に巨大血小板が産生されるが、IPF計測にあたっては血小板1個あたりのRNA含量で判定されているためバラツキが大きくなる可能性がある。今後は、さらに単位容積あたりのRNA含量を算出するプログラムが必要ではないかと考えられる。実際、Wongら²⁹⁾は、化学療法後の血小板回復予測に、平均蛍光強度(MFI)を併用することの有用性を指摘している。なお、今回の症例では、血小板数が少ないため、平均血小板容積(MPV)を計測することができず、単位容積あたりの指標を算出することはできなかった。

肝硬変症による血小板減少については、従来、脾機能亢進によるもの、すなわち末梢性破壊による血小板減少が中心的要因と記載されてきたが、Panasjukら³⁰⁾も指摘しているように、骨髓機能の低下が強く関与しているという成績に合致するものと思われる。実際、肝硬変症の骨髓検査では、骨髓低形成であることが示されており³¹⁾、肝硬変においてはIPF低値という事実は、鑑別診断上有用と考えられる。

3) 膠原病症例での成績²⁷⁾

膠原病症例にはしばしば血球減少、血小板減少が合併し、その診断基準に含まれる疾患もある。神戸大学免疫内科症例51例での検討では図9に示すように、血小板減少時にはIPFが数%の症例から40%近い症例までであるなど、多様なことがうかがわれた。

代表的な2例を図10、図11に示す。図10はSLE症例、IPFは著しい高値を呈し、脾動脈塞栓術により一時的に血小板数が回復した時にはIPFが低下したことから、ITPと同様な病態と考えられた。

図11は好酸球性筋膜炎の症例、当初はIPFが15

~20%とやや高値でありITP様変化と考えられ加療したが無効であり、その後の骨髓クロットセクション標本にてAA様の骨髓低形成が確認された症例である。

今回提示した病態の他に、TMAや血球貪食症候群、多種類の薬剤による影響などが絡み合い病態は複雑であるが、IPFが血小板減少の鑑別診断において有効な場合があることが示された。各種病態、ことに血球貪食症候群などしばしば遭遇する病態における動態を明らかにするため、今後も症例の蓄積が必要である。

4. IPFの血小板輸血時期決定への応用の可能性

1) 血小板輸血の実際

血小板輸血の多くは、血液疾患等における化学療法時の血小板減少時に予防的に用いられる。理想的には、朝の採血データをみて必要時にのみ血小板を輸血する方法、すなわちトリガー輸血が望ましいと考えられるが、現実的には困難である³²⁾。

その理由の一つは、出血を防止できる血小板数の最低値がいくつなのかが明らかでないこと、もう一つの主な理由は、血小板製剤の使用期限がわずか72時間しかないため、前日までに予約オーダーすることが原則となっていることである。前者については欧米でいくつかのコントロールスタディが行われており、輸血トリガー値が10,000/ μ Lでも20,000/ μ Lに比べて出血リスクに変化はなく、当然トリガー値が低く設定された方が輸血コストは小さくなるということがいくつかの報告で確認された。なお本邦の輸血ガイドラインでは、化学療法時の血小板数が10,000~20,000/ μ L未満に低下した場合に血小板輸血の適応があると記載されている。

2) 血小板輸血時期決定の指標としての可能性

Stohlawetzら³³⁾は、FCMによる網血小板測定を用いて、急性骨髓性白血病症例での化学療法後網血小板比率(%)はday 17~24に上昇し1~3日後には血小板数回復がみられることを7症例の観察で報告した。Wangら²⁹⁾は、やはりFCM法の網血小板測定法で、前述のようにMFIを併用することにより42時間以内の血小板回復を予測できている。陽性的中率は82%、陰性的中率は91%で

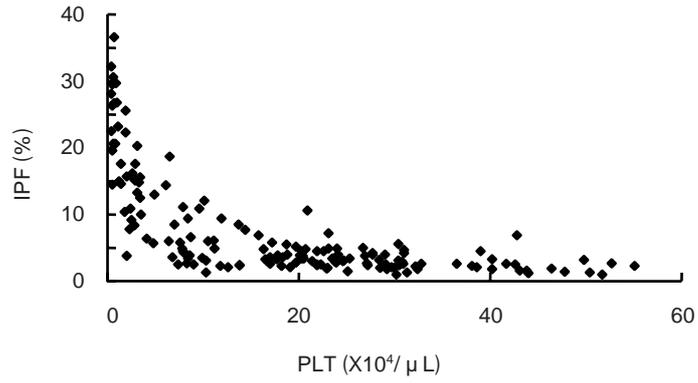


図9．各種膠原病症例での血小板数とIPF (%) の関連 (文献27より)

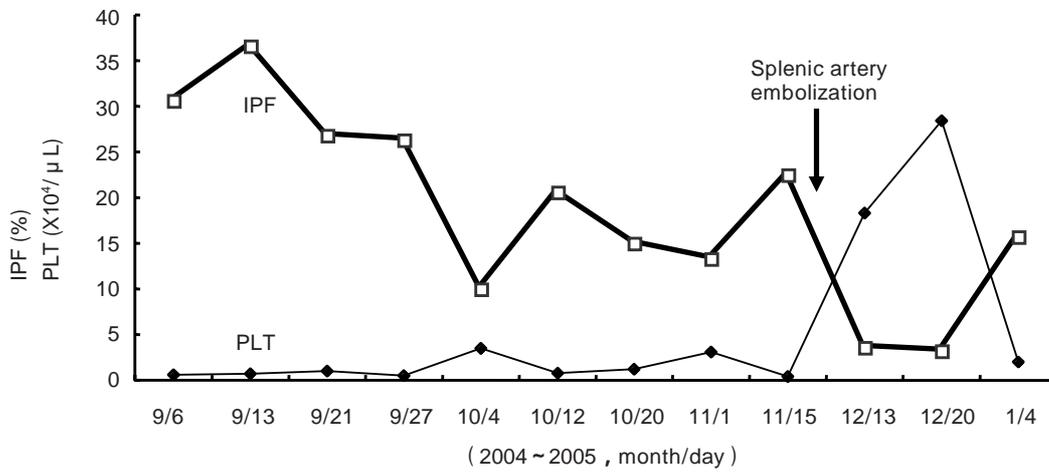


図10．血小板減少を伴ったSLE症例の臨床経過 (文献27より)

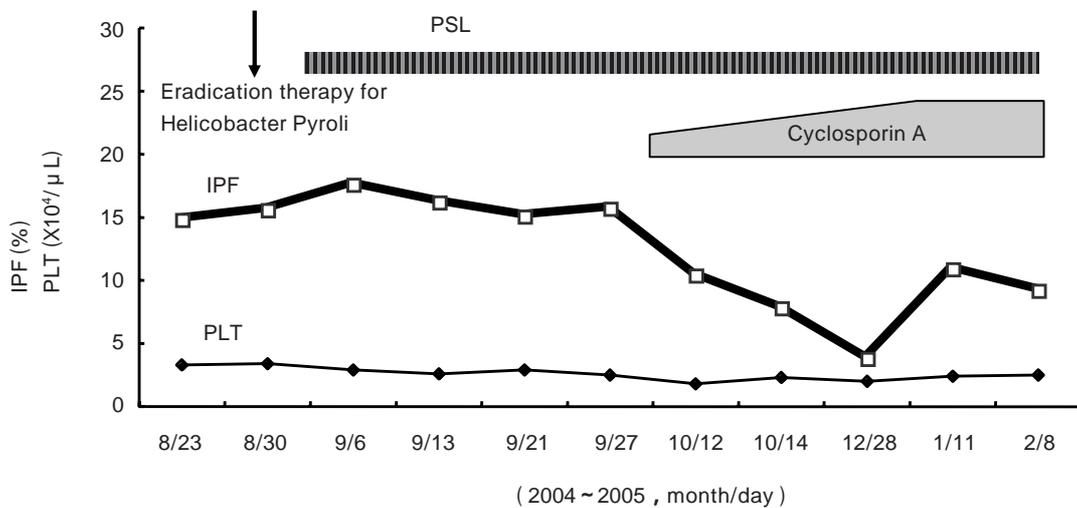


図11．血小板減少を伴った好酸球性筋膜炎症例の臨床経過 (文献27より)

あった。Chauら³⁴⁾はauto-PBSCT症例をFCM法で計測し、day 8で網血小板比率が一定以上になれば76%の症例で4日以内に骨髄回復による血小板数増加が期待できることを示した。Briggsら³⁵⁾は、XE-2100のIPFを血液疾患に応用し報告している。化学療法後は血小板回復の数日前にIPF%の上昇があること、auto-PBSCT症例では血小板回復の1~2日前にIPFが増加(7.7~18.9%)することを示し、血小板輸血時期決定への応用の可能性を指摘した。さらに本文献では、敗血症の存在時には、おそらくインターロイキン6などのサイトカインを介して血小板回復を伴わないIPF%の上昇がみられること、また、血小板輸血後には、おそらくTPOの産生低下を介してIPFの低下がみられることを示しており、臨床評価上留意すべき点と考えられる。なお、有効な血小板輸血により、血中TPOレベルが有意に低下することが確かに報告されている³⁶⁾。

本邦からは、金沢大学のTakamiら³⁷⁾が同種SCT後のIPF%値について報告している。IPFが3%を超えるのは、PBSCTで11日目、骨髄移植(BMT)

で18日目、臍帯血移植(CBT)で19日目であった。そして各々は血小板生着の1,4,そして14日前で、骨髄機能の評価に応用可能であることを示した。しかし、PBSCTやCBTでは血小板輸血の実施時期決定への応用意義は大きくないものと推測される。

3) 小児化学療法症例での観察

我々は神戸大学小児科症例11例、17コースの化学療法後の経過を観察し、血小板輸血の時期決定に応用可能か否かを検討した。対象は0~15才、6例の急性白血病の他、種々の固形腫瘍例である。治療後、血小板の20,000/ μ L以下への減少の有無、IPF増加ピーク値の有無から表5のように4群に分け解析したところ、Group 2の6コースの化学療法では3日以内に血小板が30,000/ μ L以上に回復したが、Group 3, 4ではさらに長期間を要していた。各々のIPFピーク値の平均はGroup 2, 3, 4でそれぞれ12.1, 8.3, 4.6%であり、小児科領域での化学療法では、IPFピーク値が10%を越えると血小板の回復は数日以内と推測でき、無駄な血小板輸血を回避できる可能性が高いと考えられた。

表5. 小児化学療法後の臨床経過による分類

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
血小板減少*1	なし	あり	あり	あり
IPF増加	-	++	+	-
血小板回復日数*2	-	<3日	5~6日	3~7日
IPFピーク値平均(%)		12.1	8.3	4.6

*1 <20,000/ μ L

*2 IPFピークから、輸血によらずに血小板数30,000/ μ L以上になるまでの日数

症例提示 (図 12)

13才，横紋筋肉腫症例。化学療法開始後10日目にIPFピークが11.3%を示した。この間，（図中，矢印）のように3回の血小板輸血が実施されていたが，IPFが10%を越えてからの3回目の血小板輸血は，すでに血小板数の回復が始まってから実施されており，不要であったといえる。ただし本例では，血小板減少を予測しあらかじめオーダされていたものが投与されたものである。临床上はこのようなケース

が多いが，発熱や播種性血管内凝固症候群（DIC）合併など，他の出血リスクがない場合は，IPF値をリアルタイムに参照しながら血小板輸血を有効に利用し，資源の適正使用，副作用の回避，さらに医療費の削減に努めるようにしたい。

今後，IPFを臨床サイドが参照する場合としない場合で血小板輸血の量に差が出るか否か，出血リスクに差がないかどうか，の臨床的検討を計画中である。

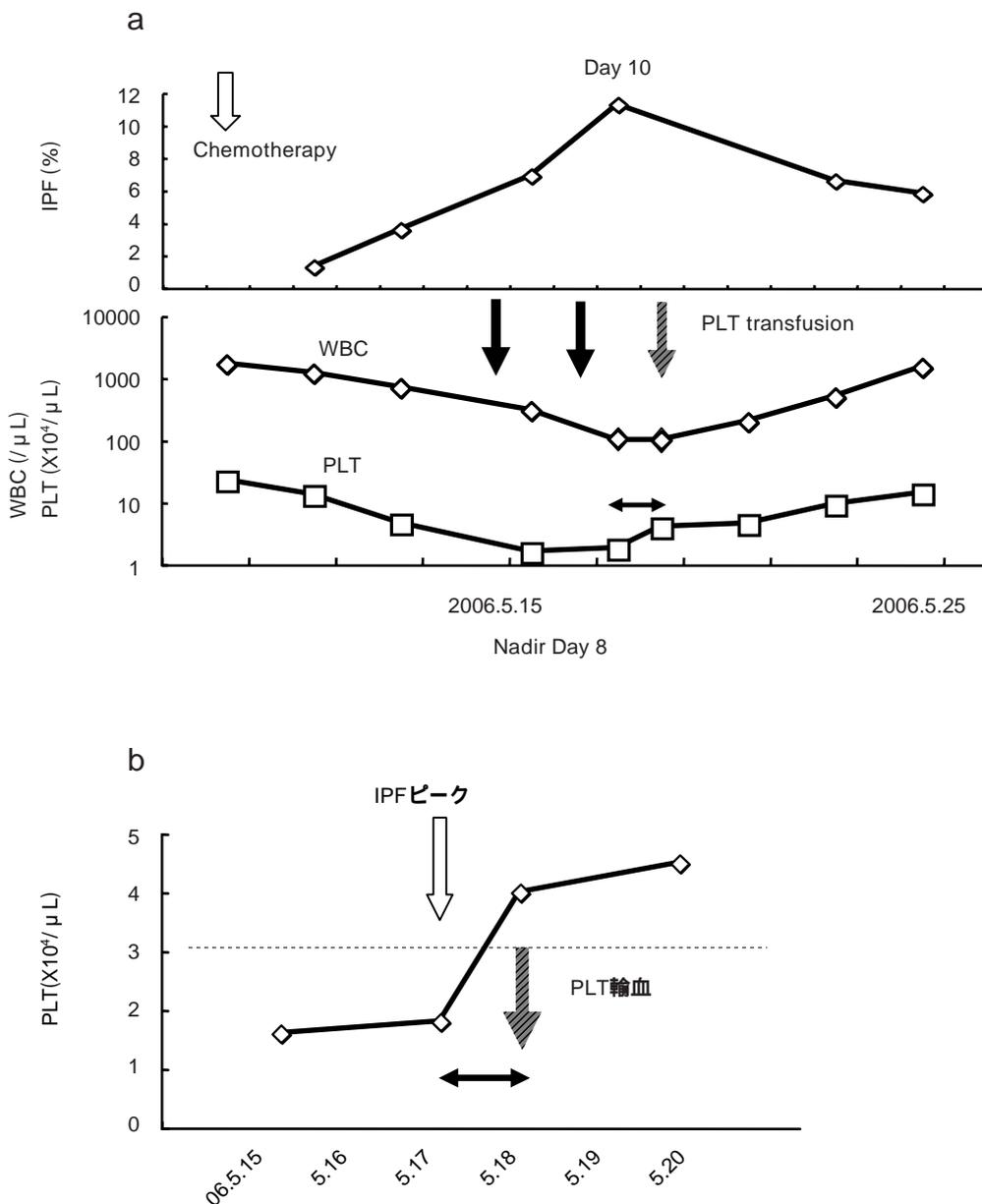


図 12 . 小児横紋筋肉腫症例の IPF 値，血小板数と血小板輸血の臨床経過 (文献 31 より)
a ; 全体経過，b ; 血小板減少時期の拡大図

5. 血栓性疾患への適応の可能性

1) 平均血小板容積

筆者らは血小板粒度分布に興味を抱き、平均血小板容積 (MPV) 測定の臨床的意義についてかつて報告した。前述の如く、幼若な血小板はやや大型で、血小板内生理活性物質が相対的に多く含まれる一方、細胞表面荷電は小さいことから、血栓性イベント発生時にはまず大型血小板の方から消費されるものと考えた。そこで、慢性期脳梗塞患者に抗血小板剤を投与し、MPVの変化を観察したところ確かにMPVが小さくなる症例が50%にみられ、抗血小板剤効果の評価法の一つとして使用可能ではないかと考えてきた³⁸⁾。同様の報告も散見されているが³⁹⁾、残念ながらMPVがそのような観点から真に有効か否かは未だ明らかにされていない。

2) 網血小板と血栓性疾患

Rinderら⁴⁰⁾は、血小板増多症例で血栓性合併症を併発した群では、血小板数に変わりはないもののFCM法による網血小板比率が高かったことを示した。この変化は血栓症合併24時間前の検索例においても認められたという。さらに、前項のMPVの変化との関連は不明であるが、アスピリン投与群では有意に網血小板数が減少したことを示している。ただし、これらの現象は、血小板数正常の深部静脈血栓症や動脈血栓症症例では認められていない。Nakamuraら⁴¹⁾は心原性ストローク症例でもやはり網血小板比率が上昇していたと報告している。

逆にMcCabeら⁴²⁾は、脳梗塞または一過性脳虚血症例での網血小板比率を測定し、年齢で調整した場合には有意に ($p=0.047$) 網血小板比率が疾患群で高かったものの、全体としては有意な変化としては捉えられず、有用性は小さいと考えている。

このようにこれまでの報告の成績は一致していないが、他の指標との併用等によって新たな血栓性疾患モニタリング法としての利用価値もあるのではないかと期待したい。

6. その他の応用

Stieglerら⁴³⁾は甲状腺機能亢進患者の網血小板をFCMで測定し、機能亢進状態時には網血小板が明ら

かに増加し、血小板回転が亢進していることを示した。薬剤の効果判定にも使用できる可能性を示唆しており興味深い。

おわりに

XE-2100のRETチャンネルを応用した新しい機能について、我々の経験を中心に紹介した。これらのマーカーの臨床応用はまだまだ広がる可能性があり、検査血液学的研究のさらなる進展が望まれる。同時にさらに新たな指標の開発にも眼を向けていきたい。

参考文献

- 1) シスメックス開発本部. 多項目自動血球分析装置XE-2100の概要. *Sysmex J.* 1999; 22: 76-84.
- 2) Vall-Llovera F, et al. Interference of schistocytes on platelet count by a Beckman Coulter counter. *Lab Hematol.* 2006; 12: 242-243.
- 3) Foerster J. Red cell fragmentation syndromes. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. 1305-1328.
- 4) Zeigler ZR, et al. Bone marrow transplant-associated thrombotic microangiopathy: a case series. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 15: 247-253.
- 5) Ruutu T, et al. Diagnostic criteria for hematopoietic stem cell transplant-associated microangiopathy: results of a consensus process by an International Working Group. *Haematologica.* 2007; 92: 95-100.
- 6) George JN, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome following allogeneic HPC transplantation: a diagnostic dilemma. *Transfusion.* 2004; 44: 294-304.
- 7) Jiang M, et al. Quantification of red blood cell fragmentation by automated hematology analyzer XE-2100. *Clin Lab Haematol.* 2001; 23: 167-172.
- 8) Lesesve JF, et al. Comparative evaluation of schistocyte counting by an automated method and by microscopic determination. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121: 739-745.
- 9) Saigo K, et al.: Usefulness of particle image analyzer for evaluation of fragmented red cells. *Transfus Apher Sci.* 2005;

- 33 : 71-73.
- 10) Saigo K, et al.: Usefulness of automatic detection of fragmented red cells using a hematology analyzer for diagnosis of thrombotic microangiopathy. *Clin Lab Haematol.* 2002 ; 24 : 347-351.
 - 11) Mannucci PM, et al. Von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) in 123 patients with connective tissue diseases (systemic lupus erythematosus and systemic sclerosis). *Haematologica.* 2003 ; 88 : 914-918.
 - 12) Ono T, et al. Severe secondary deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in patients with sepsis-induced disseminated intravascular coagulation : its correlation with development of renal failure. *Blood.* 2006 ; 107 : 528-534.
 - 13) 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.* 2005 ; 11 : 131-136.
 - 14) Imoto S, et al. Marked RBC fragmentation before HPC transplantation. *Transfusion.* 2004 ; 44 : 1791-1793.
 - 15) Kanamori H, et al. Clinical significance of fragmented red cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* 2003 ; 77 : 180-184.
 - 16) 伊藤嘉規, 他. 生体肝移植症例における XE-2100 を用いた破碎赤血球定量測定の検討. *日本検査血液学会誌.* 2003 ; 4 : 384-389.
 - 17) Briggs C, et al. XE-2100 に基づく機能鉄欠乏症の潜在マーカーとしての新規赤血球パラメータ. *Sysmex J.* 2002 ; 24 : 115-123.
 - 18) 和田英夫. 赤血球関連パラメーター. *日本臨床検査自動化学会誌.* 2007 ; 32 : 135-137.
 - 19) Ingram M, Coopersmith A. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol.* 1969 ; 17 : 225-229.
 - 20) 西郷勝康, 他. ヒト血小板のサイズによる分離 第2報 骨髓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.* 1986 ; 34 : 1417-1421.
 - 21) 戸松宏明, 他. 血小板減少性疾患における幼若血小板全自動測定の臨床的有用性-XE-2100 IPF の基礎検討と臨床応用-. *日本検査血液学会誌.* 2005 ; 6 : 238-245.
 - 22) 西山美保, 他. 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-. *日本検査血液学会誌.* 2006 ; 7 : 313-318.
 - 23) 倉田義之, 他. 血小板減少症鑑別診断における各種検査成績 (PAIgG, 網状血小板, 血中トロンボポエチンおよび血小板の大きさ) の感度と特異性, 予測値. *臨床血液.* 1999 ; 40 : 1152-1159.
 - 24) 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.* 2001 ; 115 : 656-664.
 - 25) Kuwana M, et al. Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura : evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost.* 2006 ; 4 : 1936-1943.
 - 26) Briggs C, et al. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2004 ; 126 : 93-99.
 - 27) 迫田裕之, 他. 膠原病および血液疾患における網血小板測定の意義. *Sysmex J.* 2005 ; 28 : 26-33.
 - 28) 西郷勝康, 他. 抗血小板抗体の in vivo での巨核球への結合. *血液と脈管.* 1985 ; 16 : 187-190.
 - 29) Wang C, et al. Reticulated platelets predict platelet recovery following chemotherapy. *Transfusion.* 2002 ; 42 : 368-374.
 - 30) Panasiuk A, et al. Reticulated platelets as a marker of megakaryopoiesis in liver cirrhosis; relation to thrombopoietin and hepatocyte growth factor serum concentration. *Hepatology.* 2004 ; 51 : 1124-1128.
 - 31) Batista JN, et al. Evaluation of marrow cellularity in alcoholism and hepatic cirrhosis, by aspiration, biopsy and histomorphometric. *Drug Alcohol Depend.* 1988 ; 22 : 27-31.
 - 32) 西郷勝康, 橋本誠. 血小板濃厚液の適正使用. *Medical Technology.* 2006 ; 34 : 1136-1141.
 - 33) Stohlawetz P, et al. The rise of reticulated platelets after intensive chemotherapy for AML reduces the need for platelet transfusions. *Ann Hematol.* 1999 ; 78 : 271-273.
 - 34) Chaoui D, et al. Reticulated platelets : a reliable measure to reduce prophylactic platelet transfusion after intensive chemotherapy. *Transfusion.* 2005 ; 45 : 766-772.
 - 35) Briggs C, et al. Immature platelet fraction measurement : a future guide to platelet transfusion requirement after

- haematopoietic stem cell transplantation. *Transfus Med.* 2006 ; 16 : 100-109.
- 36) Moller P, et al. Plasma thrombopoietin concentrations in response to platelet transfusion therapy. *Acta Haematol.* 2000 ; 102 : 131-134.
- 37) Takami A, et al. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 ; 39 : 501-507.
- 38) 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.* 1987 ; 42 : 783-788.
- 39) Yamazaki H, et al. Consumption of larger platelets with decrease in adenine nucleotide content in thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and postoperative state. *Thromb Res.* 1980 ; 18 : 77-88.
- 40) Rinder HM, et al. Correlation of thrombosis with increased platelet turnover in thrombocytosis. *Blood.* 1998 ; 91 : 1288-1294.
- 41) Nakamura T, et al. Flow cytometric analysis of reticulated platelets in patients with ischemic stroke. *Thromb Res.* 2002 ; 106 : 171-177.
- 42) McCabe DL, et al. Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischemic attack. *Br J Haematol.* 2004 ; 126 : 861-869.
- 43) Stiegler G, et al. Elevated numbers of reticulated platelets in hyperthyroidism : direct evidence for an increase of thrombopoiesis. *Br J Haematol.* 1998 ; 101 : 656-658.

Clinical Utility of New Parameters Provided by XE-2100 RET Channel

Katsuyasu SAIGO^{*1,2}, Yasuyuki SAKOTA^{*2}, Yukako MASUDA^{*2}, Kyoko MATSUNAGA^{*2}, Hiroko NARITA^{*4}, Makoto HASHIMOTO^{*1}, Mariko TAKENOKUCHI^{*2}, Yoshitsugu KUBOTA^{*5}, Tsutomu NOMURA^{*5}, Yumiko NOBUHARA^{*3}, Takeshi SUGIMOTO^{*3}, Shion IMOTO^{*6} and Shunichi KUMAGAI^{*1,2,3}

^{*1} Blood Transfusion Division, Kobe University Hospital
7-5-2, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017

^{*2} Clinical Laboratory, Kobe University Hospital

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

^{*4} Clinical Laboratory, Kobe Kyodo Hospital

^{*5} Department of Transfusion Medicine, Kagawa University

^{*6} Hyogo Red Cross Blood Center

Key Words XE-2100, RET Channel, Fragmented Red Cells, Immature Platelet Fraction, Clinical Utility