

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790615

研究課題名(和文)ヘパリン起因性血小板減少症の検査における分子病態解析と新規検査法の開発

研究課題名(英文)An analysis of the molecular pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia in the development of a novel clinical assay

研究代表者

金子 誠 (Makoto, Kaneko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00377491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)の病態の本態であるHIT抗体による健常者血小板に対する感受性差異は、検査検体の血小板を用いたflow cytometryや血漿中の血小板第4因子・ β -thromboglobulin測定により、物理的な刺激に対して活性化しやすいものが反応しやすいことが判明した。検体調整後の血小板活性化マーカーを確認することで、検査のための適切なドナー選択が可能である。またHIT抗体の機能検査法については、放射性同位体を使用せず、HIT抗体により活性化した血小板から放出されるセロトニンを生化学的に測定して、機能的HIT抗体の判定が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The responsiveness of platelets isolated from healthy subjects to platelet activating antibodies that develop during heparin-induced thrombocytopenia (HIT) is affected by the activation sensitivity difference of their platelets. Suitable platelets donor samples for use in HIT functional assays can be selected following the confirmation of the sensitivity of platelet activation using both releasing markers from platelets and flow cytometer of platelets. A novel serotonin release assay, i.e., a representative functional HIT antibody (Ab) detection assay, was established using an HPLC-based serotonin level measurement method, without the use of a radioisotope. This novel assay is useful for the detection of functional HIT Abs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：ヘパリン起因性血小板減少症 HIT抗体機能検査法 セロトニン放出試験 活性化血小板

1. 研究開始当初の背景

ヘパリン起因性血小板減少症 (Heparin-induced thrombocytopenia; HIT) は、血小板減少、血栓塞栓症を招くヘパリンの重篤な副作用である。HIT 診断には抗血小板第4因子 (platelet factor 4: PF4) /heparin 複合体抗体 (HIT 抗体) の検出が重要であるが、その検査法には一長一短があり、免疫学的測定法や、HIT 抗体活性を測定する機能検査法などの各検査法の特質を生かして、検査を組み合わせながら実施する必要があった。ELISA 法による検査は簡便で感度が良いが、ヘパリンを投与されただけの症例でも陽性となることがあり、必ずしも病態を反映しないことがあるため、通常は機能検査法も確認する。機能検査法に関して欧米では、HIPA の代わりに洗浄血小板を用いた 14C セロトニン放出試験 (SRA) がゴールドスタンダードになっている。しかし、アイソトープを用いるために研究室レベルの検査であり臨床検査に向かないこと、洗浄血小板などを作成するために遠心作業が多く操作が煩雑であるにもかかわらず、健常者血小板の選択により感度が左右される等の難点がある。本邦では、一部の施設でヘパリン惹起血小板凝集試験 (heparin-induced platelet aggregation; HIPA) が行われているが、多血小板血漿を用いた Born 法による HIPA では、診断に対する特異度は高いが、健常者血小板の選択により感度が異なる上、SRA よりもさらに感度が劣ることが問題となっており、新しい検査法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

また、その他、HIT を診断するための既存の検査法の検討、もしくは新しい検査法の開発を実施して、有用な検査方法を開発することを試みた。

これまで HIT の血栓形成の機序として、HIT 抗体が PF4 とヘパリンの複合体を抗原として出現し、抗体が血小板 Fc IIa レセプターを介して血小板活性化を促し発症し、また、monocyte に抗体が結合し、活性化が起こることで組織因子の誘導から procoagulant 活性 [Blood. 2001;97:3300-2.] が機序として考えられていた。この機序のいずれかが血小板との反応性に差異を生じさせていると考えられたため、私たちは、PF4、Fc IIa レセプター、他血球との関係に着目した。PF4 に関しては、血小板が活性化されると顆粒から放出されるが、この PF4 とヘパリンとの比が至適な場合に血小板が活性化させやすい ultralarge complexes が形成される。これが、血小板を活性化させやすく放出反応を亢進させる [Blood. 2005;105:131-8] ことが報告されている。また、血小板膜状に放出されてきた PF4 に HIT 抗体が結合し、血小板を活性化させる [Blood. 2000;96:182-7.]. さら

に、使用する健常者血小板は、冷却化して活性化することにより感度を上げることができる [日本検査血液学会雑誌. 2006;7:32-38.] という報告から、健常者血小板から放出された PF4 が重要であることに仮説を立てた。Fc IIa レセプターに関しては、親和性は低く血小板上の発現は少ないこと [Blood. 2008;112:2607-16.] polymorphisms は HIT の発症に関連がないこと [Blood. 1997;89:370-5., Blood. 2004;104:2791-3.] が報告されていた。

これらは HIT 発症の原因となるかを確認したものであるが、検査上においても PF4 による血小板活性化に差異が認められるのか再確認し、その有用性を確認することとした。また、代表的な HIT 抗体機能測定法である SRA は、放射性同位元素の使用により臨床応用が難しいため、SRA 測定法を改良した新たな検査法を確立するための検討をした。

3. 研究の方法

1) HIT 抗体と健常者血小板の反応性の差異については、健常者から作成した検体血漿中に含まれる PF4 や、刺激後に放出される PF4 の相関関係を確認し、どの程度の PF4 が至適もしくは必要なのか、HIT 抗体と血小板の反応性は変化するのか明らかにする。また、精製した PF4 を添加して、その感受性の改善が見込まれるか検討を行う。この検討に平行して、各健常者の Fc IIa レセプターに関する解析も行い、血小板との反応性を確認する。

2) 代表的な HIT 抗体機能測定法である SRA は、放射性同位元素の使用量により病院検査室での測定は敷居が高く、臨床応用が難しい。そのため、活性化血小板から放出されるセロトニンを生化学的に測定し、新たな SRA 測定法として確立できるよう検討した。

4. 研究成果

1) HIT 発症症例から得られた血漿と数名の健常者血小板を混合し、HIPA を検討した。各健常者検体の血小板をヘパリンにより刺激したところ、健常者血小板膜上受容体 Fc 受容体の発現の差異ではなく、HIT 検査用に作成した多血小板血漿中に含まれる PF4 に差を認めた。これは、検体調整時に刺激を受けて放出する PF4 と考えられ、物理的な刺激に対する反応性に差異があり、刺激に関して、血小板活性化が鋭敏であることが示唆された。調整前に丁寧に採取した血漿では、PF4 に差は認められず、検体作成時の変化を確認することが可能となる。このことは、HIPA を洗浄血小板で実施した方が、HIT 抗体検出の感度が高いという報告があり、検査前に物理的な刺激を加えることが重要である点と一致し

ていた。

2) 活性化血小板から放出されるセロトニンを生化学的に測定し、HIT 抗体の存在が判定可能かどうか検討した。ヒト健常者洗浄血小板に、マウスをもちいて作成した HIT 抗体（モノクローナル抗体）とインキュベーションしてヘパリンで刺激したあとで、ゆっくり攪拌した（60 分間室温）。この検体の上清を回収し、セロトニンを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にて測定した。洗浄血小板からヘパリン惹起セロトニン放出は HIT 抗体存在下で認められ、これらの反応は抗 Fc 抗体（IV .3）とのプレインキュベーションおよびヘパリンの高濃度により抑制された。この検出法を用いても、機能的 HIT 抗体の判定が有用であることが示された。今後は、この測定法を臨床応用できるよう検証予定である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Makoto Kaneko, Keiko Wanaka, Nelson H. Tsuno, Nobuko Kanno, Ryoko Nonobe, Chiharu Takahashi, Takefumi Matsuo, Hitoshi Okazaki, Yutaka Yatomi. The diagnosis and management of heparin-induced thrombocytopenia in Japan. ISBT Science Series (2014), 査読有, 2014 inpress.

〔学会発表〕(計 6 件)

金子 誠, 菅野 信子, 鈴木 明子, 矢富 裕. ヘパリン惹起血小板凝集試験における HIT 抗体の健常者血小板に対する感受性の差異. 第 34 回日本血栓止血学学会. 2012 年 06 月 07 日~2012 年 06 月 09 日, 東京.

Makoto Kaneko, Nobuko Kanno, Ryoko Tanaka, Akiko Suzuki, Yutaka Yatomi. Difference in the Sensitivity of Donor-Platelet Responsiveness of Anti- Heparin/Platelet Factor 4 Complex Antibody in Heparin- induced Platelet Aggregation Assay. 7th Congress of the Asian- Pacific Society on Thrombosis and Haemostasis. 2012 年 10 月 28 日~2012 年 10 月 31 日. Melbourne, Australia.

金子 誠, 和中 敬子, 菅野 信子, 金子 知枝子, 宮下 久美子, 久米 幸夫, 松尾 武文, 矢富 裕. ヘパリン起因性血小板減少症に対する臨床診断(4T' S スコア)と免疫学的測定結果との比較. 第 35 回日本血栓止血学学会. 2013 年 05 月 30 日~2013 年 06 月 01 日. 山形.

野々部 亮子, 金子 誠, 菅野 信子, 久米

幸夫, 小野 佳一, 横田 浩充, 矢富 裕. ラテックス凝集法による抗血小板第 4 因子/ヘパリン複合体抗体測定の評価. 第 14 回日本検査血液学会学術集会. 2013 年 07 月 27 日~2013 年 07 月 28 日. 東京.

Makoto Kaneko, Keiko Wanaka, Yutaka Yatomi Y. Heparin- induced thrombocytopenia in Japan. 24th Regional Congress of the International Society Blood Transfusion (ISBT)(招待講演). 2013 年 12 月 01 日~2013 年 12 月 04 日. Kuala Lumpur, Malaysia.

金子 誠, 菅野 信子, 高橋 千春, 野々部 亮子, 矢富 裕. HIT 診断適正化の現状と今後の動向. 2014 年 日本血栓止血学会 SSC シンポジウム HIT 部会. 2014 年 02 月 22 日. 東京.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 誠 (KANEKO, Makoto)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00377491

(2)研究協力者

菅野 信子 (KANNO, Nobuko)
東京大学・臨床検査技師 研究者番号なし

和中 敬子 (WANAKA, Keiko)
東京大学・客員研究員 研究者番号なし

野々部 亮子 (NONOBE, Ryoko)

東京大学・臨床検査技師 研究者番号なし