

- 2005.
- 23) Kuwana M, et al: Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is a sensitive and specific test for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* 114: 322—325, 2003.
- 24) Takahashi T, et al: Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 124: 91—96, 2004.

Abstract

ITP and *Helicobacter pylori* infection

Masataka Kuwana, MD, PhD¹⁾, Atsuko Asahi, MD¹⁾, and Yasuo Ikeda, MD²⁾

¹⁾Institute for Advanced Medical Research and ²⁾Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is an acquired thrombocytopenia caused by autoantibodies to platelet surface glycoproteins such as GPIIb/IIIa. Recently, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), a gram-negative bacterium, has been suspected of involvement in the pathogenesis of ITP. Recent studies conducted in Japan confirmed that more than half of *H. pylori*-positive patients with ITP achieved a partial or complete platelet recovery after *H. pylori* eradication therapy consisting of two antibiotics and a proton pump inhibitor. ITP patients without *H. pylori* infection showed no response to a standard eradication regimen, indicating a direct role of *H. pylori* infection in the pathogenesis of ITP. However, the mechanisms through which *H. pylori* infection influences the pathogenic processes of ITP remain unclear.

Anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells were significantly reduced after successful eradication of *H. pylori*, and the frequency of these autoreactive B cells in the majority of the patients fell to within the normal range at 24 weeks. In nearly half of responders, increase in platelet count preceded suppression of anti-GPIIb/IIIa antibody production, suggesting that the platelet recovery after *H. pylori* eradication is likely to be mediated through complex processes. In summary, eradication of *H. pylori* is an effective and safe therapy for ITP and should be selected as a first-line treatment.

Key words: ITP, *Helicobacter pylori*, Autoantibody, Eradication, Anti-GPIIb/IIIa antibody

◆ 総 説 ◆

特異的検査法を取り入れた新しいITPの診断基準

桑名正隆*¹, 池田康夫*²

New diagnostic criteria for ITP based on disease-specific laboratory tests

Masataka KUWANA *¹, Yasuo IKEDA *²

Key words: idiopathic thrombocytopenic purpura, anti-platelet autoantibody, reticulated platelet, thrombopoietin, diagnostic criteria



桑名正隆

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所専任講師
1988年 慶應義塾大学医学部卒業
1992年 慶應義塾大学大学院医学研究科博士課程(内科学)修了
1992年 慶應義塾大学医学部内科学助手
1993-1996年 米国ピッツバーグ大学内科・臨床免疫学教室ポスドク
1996年 慶應義塾大学医学部内科学助手
1999年 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所助手
2000年より現職

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) は明らかな原因や基礎疾患がなく, 免疫学的機序を介した血小板破壊の亢進により血小板減少症をきたす後天性疾患である¹⁾. ただし, ITP は単一の病因により規定された疾患概念ではなく, 成人と小児でも病型が大きく異なる. また, ITP と同様の病態は全身性エリテマトーデス (SLE) などの膠原病, 慢性リンパ性白血病などのリンパ増殖性疾患, 肝硬変などに伴ってみられる場合がある. したがって, その診断は専門医が経験的に行ってきたのが実状である.

1990年に厚生省(当時)研究班によりITPの診断基準が作成され, 現在も広く用いられている(表1)²⁾. この基準では, 出血症状と血小板減少があり, 末梢血, 骨髄, 血小板結合免疫グロブリンG (PAIgG) 検査でITPに矛盾する所見がなく, 血小板減少をきたし得る他の疾患が除外されればITPと診断してよいとされる.

アメリカ血液病学会により作成されたITPの診断・治療のガイドラインでも, 基本的な姿勢は厚生省基準と同様で, 血小板減少をきたす他疾患の除外である³⁾. このように, 現状のITPの診断基準は血小板減少症をきたす他の疾患の除外に主眼をおいているが, 現実的に臨床の場でそれを厳格に行うのは困難で, そのためには多数の検査, 時間, 費用を要する. そこで, 我々はITPの病態を反映し, かつITPに特異的な臨床項目を導入することで, ITPを積極的に診断する基準の作成をめざしている.

ITPの病態

ITPにおける血小板破壊の主たる機序は抗血小板抗体が結合してオプソニン化した血小板が網内系でFcγ受容体を介してマクロファージに捕捉・貪食される病態である¹⁾. したがって, ITPは末梢での血小板破壊と血小板に対する自己免疫応答という2つの側面をもつ. 前者を反映して, ITP患者の多くで血小板回転の亢進と

*¹ 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所, *² 同 内科 [〒160-8582 東京都新宿区信濃町35]

*¹ Institute for Advanced Medical Research and *² Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, [35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.]

Tel: 03-3350-3567 Fax: 03-3350-3567 e-mail: kuwanam@sc.itc.keio.ac.jp

表1 ITPの診断基準(厚生省研究班による, 1990年改訂)

1. 出血症状がある。
出血症状は紫斑(点状出血および斑状出血)が主で, 歯肉出血, 鼻出血, 下血, 血尿, 月経過多などもみられる。関節出血は通常認めない。出血症状は自覚していないが血小板減少を指摘され, 受診することもある。
2. 下記の検査所見を認める。
 - 1) 末梢血液
 - (1) 血小板減少
100 × 10⁹/L 以下。自動血球計数のときは偽性血小板減少に留意する。
 - (2) 赤血球および白血球は数, 形態ともに正常。
ときに失血性または鉄欠乏性貧血を伴い, また軽度の白血球増減をきたすことがある。
 - 2) 骨髄
 - (1) 骨髄巨核球は正常ないし増加
巨核球は血小板付着像を欠くものが多い。
 - (2) 赤芽球および顆粒球の両系統は数, 形態ともに正常
顆粒球/赤芽球比(M/E比)は正常で, 全体として正形成を呈する。
 - (3) 血小板結合免疫グロブリンG (PAIgG) 増量
ときに増量を認めないことがあり, 他方, 本症以外の血小板減少症においても増量を示しうる。
3. 血小板減少を来しうる各種疾患を否定できる。(注)
4. 1および2の特徴を備え, さらに3の条件を満たせば特発性血小板減少性紫斑病の診断をください。除外診断に当たっては血小板寿命の短縮が参考になることがある。
5. 病型鑑別の基準
 - 1) 急性型: 推定発病または診断から6カ月以内に治癒した場合
 - 2) 慢性型: 推定発病または診断から経過が6カ月以上遷延する場合
* 小児においては, ウィルス感染症が先行し発症が急激であれば急性型のことが多い。

注): 血小板減少を来す疾患としては, 薬物または放射線障害, 再生不良性貧血, 骨髄異形成症候群, 発作性夜間血色素尿症, 全身性エリテマトーデス, 白血病, 悪性リンパ腫, 骨髄癌転移, 播種性血管内凝固症候群, 血栓性血小板減少性紫斑病, 脾機能亢進症, 巨赤芽球性貧血, 敗血症, 結核症, サルコイドーシス, 血管腫などがある。感染症については, とくに小児ウィルス性感染症やウィルス生ワクチン接種後に生じた血小板減少は本症に含める。先天性血小板減少症としては Bernard-Soulier 症候群, Wiskott-Aldrich 症候群, Kasabach-Merritt 症候群などがある。

血小板寿命の短縮を認める。一方, 抗血小板抗体の標的抗原として GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPIa/IIa など各種血小板膜糖蛋白が同定されており, 特に抗 GPIIb/IIIa 抗体の頻度が高い(陽性頻度は90%以上)⁴⁾。これら自己抗体は血小板に結合して血小板の網内系での破壊を誘導するだけでなく, 骨髄巨核球に結合して血小板産生を阻害したり⁵⁾, 血小板凝集を阻害することで出血傾向を助長する⁶⁾。したがって, 血小板回転の亢進および GPIIb/IIIa など血小板膜糖蛋白に対する自己抗体の存在が ITP を特徴づける所見であり, それらを反映した臨床検査を組み合わせることで ITP を積極的に診断する基準の作成が可能と考えられる。

抗血小板自己抗体の検出法

GPIIb/IIIa など血小板膜糖蛋白と反応する抗血小板抗体を検出する臨床検査法はいまだ確立していない。従来は抗血小板抗体の検出を目的として PAIgG が測定されてきたが, ITP における検出感度は約90%と高いものの, 血小板減少をきたす他の疾患でも上昇する例が多いために特異性は低い⁷⁾。PAIgG は GPIIb/IIIa など血小板膜蛋白に対する自己抗体を含むが, 非特異的に血小板に結合する IgG 成分も同時に検出することがその原因である。そのため, PAIgG は米国のガイドラインで ITP の診断に「不要かつ不適切な検査」とされている³⁾。

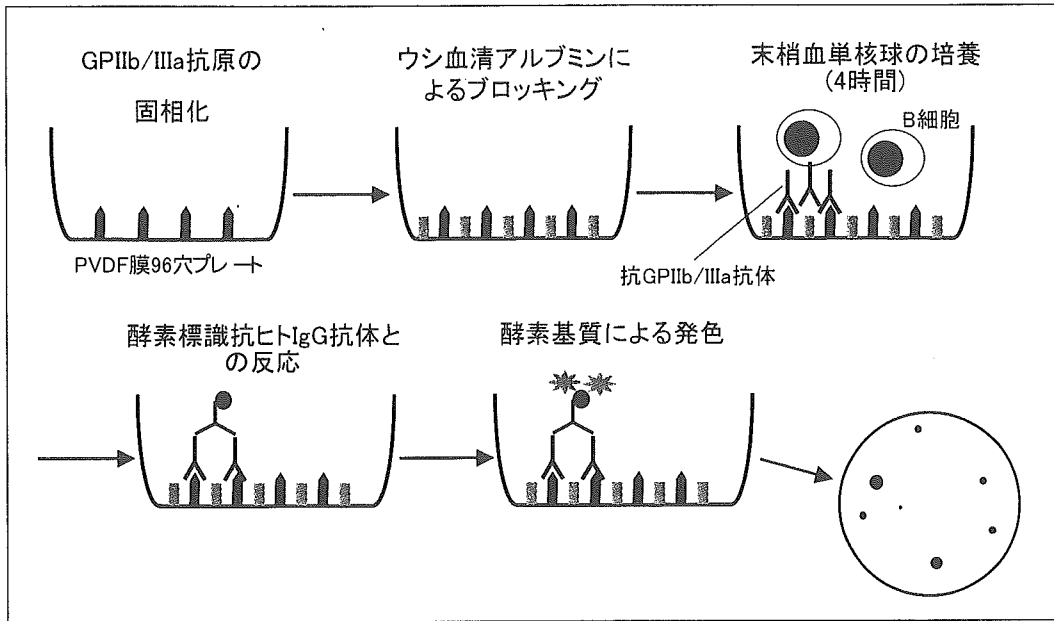


図1 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞を検出するアッセイ法の原理

PVDF 膜 96 穴プレート上に精製 GPIIb/IIIa 抗原を固相化し、ウシ血清アルブミンでブロックする。さらに、抗原を固相化した膜上で患者末梢血から分離した単核球を 4 時間培養する。その間に B 細胞から分泌されて膜上の GPIIb/IIIa に結合した抗 GPIIb/IIIa 抗体を酵素標識抗ヒト IgG 抗体、酵素基質によりスポットとして検出する。

これまで GPIIb/IIIa など血小板膜糖蛋白に対する特異抗体の検出法が数多く考案されてきた。特にモノクローナル抗体を用いた antigen-capture assay が広く行われ、代表的な monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA) では被検血小板を溶解して得られた血小板膜抗原とそれに対する自己抗体の複合体を固相化した血小板膜抗原に対するモノクローナル抗体により捕捉する⁸⁾。この血小板関連抗血小板抗体の検出法は特異性が高く偽陽性は少ないが、ITP における検出感度は 30-60% と高くない。その理由のひとつとしてモノクローナル抗体と自己抗体が同一もしくは近傍のエピトープを認識する場合に結合部位を競合することが報告されている。PAIgG と antigen-capture assay の ITP 診断における有用性を調べた報告では、PAIgG の感度 78%、特異度 19% に対し、血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体を検出する MAIPA は感度 39%、特異度 91% であった⁹⁾。同時に血小板関連抗 GPIb/IX 抗体も測定すると、いずれかが陽性の場合の感度は 66% まで

上昇し、複数の血小板膜蛋白に対する抗体を同時に測定すると検出感度が向上することが示された。ただし、使用するモノクローナル抗体や検出法の違いにより検査結果にばらつきがあり、この手法の普及には標準化が必須である¹⁰⁾。本法の普及を妨げている主な理由は、使用可能と報告されているモノクローナル抗体のほとんどが市販されていないこと、血小板の溶解など操作が煩雑なことである。

ITP における抗血小板抗体のほとんどは流液中で血小板に結合した状態で存在するため、血清や血漿でなく血小板を検体として用いる必要がある。これが抗血小板抗体検出の操作を煩雑にし、定量性を欠く原因である。これらを解決するため、我々は enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法の原理を用いた抗血小板抗体を産生する B 細胞を検出するアッセイ法を考案した (図 1)¹¹⁾。患者末梢血から分離した単核球を GPIIb/IIIa 抗原を固相化した膜上で培養し、B 細胞から分泌された抗 GPIIb/IIIa 抗体を検出する。ITP と非免疫性血小板減少症 (骨髓異

形成症候群，再生不良性貧血，血栓性血小板減少性紫斑病，播種性血管内凝固症)の患者で末梢血中の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞を調べたところ，抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞増加の ITP における感度は 91%，特異度は 94%であった。この結果は，同時に測定した血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体と特異性は同等で，感度は PAIgG に匹敵した。すでにこのアッセイ法はキット化され，検査センターでの測定をめざした予備検討を行っている。

血小板回転の簡便な指標

血小板回転は末梢での血小板破壊と骨髄での血小板産生低下を鑑別するよい指標であることが知られている。しかし，従来のアイソトープ標識した血小板を用いる方法は操作が煩雑で，特定の施設でしか行えない欠点があった。最近，血小板回転の簡便な指標として網状血小板比率や血中トロンボポエチン (TPO) 濃度の有用性が報告された^{12) 13)}。網状血小板は幼弱な血小板で，RNA を多量に含むことからチアゾールオレンジに対する染色性を示し，フローサイトメトリーや血球自動解析装置により容易に検出できる。ITP 患者では末梢での血小板の破壊亢進を反映して血小板寿命が短縮し，流血中に残存する血小板に占める網状血小板の比率が高くなる。そのため，ITP 患者における網状血小板比率は上昇する。ただし，ITP 患者の 20-40% で網状血小板比率は正常範囲のため，網状血小板比率は血小板産生が低下する病態の除外に有用だが，その増加がないことで ITP を否定できない点に留意する必要がある。

一方，TPO は巨核球とその前駆細胞にはたらき，増殖および巨核球への分化を促進する成長因子である。末梢血中の TPO 濃度は，主に巨核球に発現される TPO 受容体への結合による消費により規定される。すなわち，巨核球が減少すれば受容体に結合する TPO が減少し，TPO 濃度は上昇し，巨核球が増加すれば受容

体への結合が増えるために TPO 濃度は低下する。したがって，TPO 濃度は骨髄での血小板産生をある程度反映し，巨核球低形成を呈する再生不良性貧血や無巨核球性血小板減少症の患者で TPO は著増し，ITP 患者では正常あるいは軽度の上昇を示す。

骨髄検査

ITP の診断に骨髄検査が必須かどうかという問に対する明確な答えはない。ITP 患者にみられる骨髄所見は巨核球数は正常または増加，赤芽球や顆粒球系に異常がなく，全体として正形成である。巨核球の細胞質は好塩基性で，顆粒に乏しく，血小板付着像を欠く場合が多いが，これら所見は ITP に特異的でない。また，骨髄穿刺では正確な有核細胞数や巨核球数を測定できない場合があり，有核細胞数や巨核球の減少だけで ITP を否定できない。米国のガイドラインでは，ITP として非典型的な臨床所見がある場合，骨髄異形成症候群 (MDS) の好発年齢である 60 歳以上，摘脾を考慮する場合を除いて骨髄検査は不要とされている³⁾。臨床的に ITP として矛盾のない症例では骨髄検査を行わずに ITP と診断しても大きな問題はないことが示されているが^{14) 15)}，当初 ITP と診断されていた症例の中に後に再生不良性貧血や MDS と診断されるケースが少数ながら存在するのも事実である。しかし，これらの例では定期的な末梢血検査で ITP に一致しない所見が出現したり，副腎皮質ステロイド療法に対する反応性が悪かった時点で骨髄検査を行っても臨床の上で大きな問題は生じない。したがって，専門医により注意深く行われた問診，身体所見，末梢血塗沫で ITP に矛盾する所見がなければ，診断のために骨髄検査を行う根拠は乏しい。

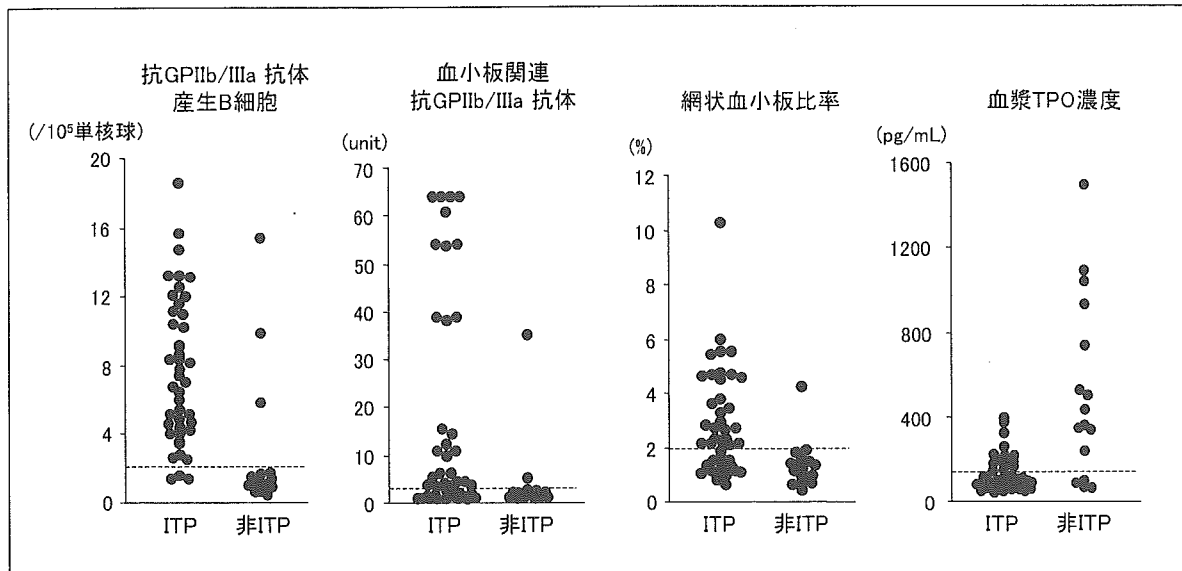


図2 血小板減少のために受診した症例における最終診断と初診時の ITP 特異的検査結果

血小板減少のために受診した 62 例の 6 カ月以降の最終診断は、慢性 ITP46 例、非 ITP (MDS, 再生不良性貧血, 無巨核球性血小板減少症, 骨髓低形成のみで確定診断に至らなかった例) 16 例であった。ITP, 非 ITP の 2 群間で初診時の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞, 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体, 網状血小板比率, 血漿 TPO 濃度を比較した (すべて $P < 0.001$)。

ITP の新しい診断基準作成の試み

ITP にある程度の特異性を持つ臨床検査として報告されている抗血小板抗体 (血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体, 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞) と血小板回転の指標 (網状血小板比率, 血中 TPO 濃度) の ITP 診断における有用性を調べるため, 血小板減少のために受診した 62 例を対象とした単施設での前向き調査を行った¹⁶⁾。初診時に末梢血検査に加えて抗血小板抗体, 血小板回転を反映する上記 4 検査を行い, 全例で骨髓検査を行い, 6 カ月以降の最終診断 (ITP および MDS, 再生不良性貧血などの非 ITP) との関連を検討した (図 2)。その結果, 初診時の貧血なし, 白血球数正常, 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の増加, 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体陽性, 網状血小板比率の増加, 血漿 TPO 正常あるいは軽度増加の 6 項目は ITP の最終診断と強く相関した。これら 6 項目のうち 3 項目以上を満たした場合を ITP とすると, 感度は 96%, 特異度は 94% と良好な結果が得られた。したがって, 初診時のこれら臨床項目を

組み合わせることで ITP と非 ITP 患者の鑑別が可能と考えられた。

この成績を確認するため, 全国 9 施設でエントリーした 113 例の血小板減少症患者を対象として同様の多施設前向き試験を行った。この検討では成人例だけでなく, 小児 20 例も含めた。6 カ月以降の最終診断は 89 例が ITP, 24 例が他の疾患であった (再生不良性貧血, MDS, Fanconi 貧血, May-Hegglin 異常, 骨髓線維症)。その結果, 単施設での解析と同様に初診時の貧血なし, 白血球数正常, 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の増加, 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体陽性, 網状血小板比率の増加, 血漿 TPO 正常あるいは軽度増加の 6 項目の頻度が ITP と非 ITP 群で有意に異なっていた。多変量解析では, 最終的な ITP の診断と関連する初診時の所見として貧血の有無, 抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞, 網状血小板比率, 血漿 TPO の 4 項目が抽出された (表 2)。単施設での検討と同様に, 有意差のあった 6 項目の臨床検査項目のうち抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の増加, 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体の

表2 多変量解析によるITPと関連する初診時臨床項目の抽出

臨床および検査所見	P	オッズ比	95%CI
性	0.72	0.74	0.14-3.86
受診時年齢	1.0	0.94	0.89-0.98
出血症状の有無	0.9	0.85	0.12-6.32
貧血の有無	0.005	0.051	0.006-0.41
白血球数	0.6	1.0	1.0-1.0
血小板数	0.9	0.97	0.62-1.53
抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞	0.02	1.19	1.02-1.40
血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体	1.0	1.00	0.96-1.04
網状血小板比率	0.04	1.30	1.01-1.66
血漿 TPO 濃度	0.005	0.025	0.002-0.32

表3 ITPの診断基準試案

1. 血小板減少 (10万/ μ L以下).
2. 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.
3. 以下の検査所見のうち3), 4), 5)のいずれかを含む3つ以上を満たす.
 - 1) 貧血がない
 - 2) 白血球数が正常
 - 3) 末梢血中の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の増加
 - 4) 血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体の増加
 - 5) 網状血小板比率の増加
 - 6) 血漿トロンボポエチンは軽度上昇にとどまる (<300 pg/mL)
4. 他の免疫性血小板減少性紫斑病 (SLE, リンパ増殖性疾患, HIV 感染症, 肝硬変, 薬剤性など) を除外できる.

ITPの診断には上記の4項目全てを満たすこと.

ただし, 4項目を満たしてもITPとして非典型的な所見を認める場合は骨髓検査を行うことが望ましい.

増加, または網状血小板比率の増加を含む3項目以上を満たした場合をITPとすると感度は94%と良好であったが, 特異度は79%と低かった. 特異度が低い原因を検索するため, 非ITPで3項目以上を満たした症例に注目した. 再生不良性貧血とMDSの2例ずつが抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞の増加, 血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体陽性を示し, 免疫性血小板減少性紫斑病が併存する可能性が考えられた.

これら2つの前向き研究の結果に基づいて, ITPに特異的な検査項目を取り入れたITPの新しい診断基準の試案を作成した(表3). 血小板減少および末梢血塗抹で異常がないことを基本とし, 貧血なし, 白血球数正常, 抗GPIIb/

IIIa抗体産生B細胞の増加, 血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体陽性, 網状血小板比率の増加, 血漿TPO正常あるいは軽度増加のうち3項目以上満たす場合をITPとした. ただし, May-Hegglin異常の症例でみられたように, すべての項目が正常でも3項目を満たすため, 陽性所見であるGPIIb/IIIa抗体産生B細胞の増加, 血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体陽性, 網状血小板比率の増加のうち少なくとも1項目を満たすことを条件に加えた. 一方, 1-3の項目はITPでなくても基礎疾患を伴う免疫性血小板減少性紫斑病患者でも満たすことが予測され, 実際にSLEや肝硬変患者での検討では2/3以上の症例がこの基準を満たした. そのため, やむ

を得ず免疫性血小板減少性紫斑病を伴う可能性のある基礎疾患を除外項目とした。骨髓検査の必要性にはなお議論があるが、診断基準の項目には含めず、ITP として非典型的な所見を認める場合は骨髓検査を行うことが望ましいという注釈を加えた。現時点でこの基準はあくまで試案であり、これを元に ITP 診療に携わる方々の意見を取り入れて修正していくつもりである。ご意見などがあれば、連絡していただければ幸いである。

さらに、本診断基準を一般化するには、項目として含まれる臨床検査が臨床の場で行えること、保険収載されていることが要求される。現時点で網状血小板比率および血漿 TPO は研究目的であれば測定可能であり、また抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞の測定キットも発売された。血小板関連抗 GPIIb/IIIa 抗体の測定に関しては使用するモノクローナル抗体や標準化など課題が残されているが、今後はこれらアッセイ法の普及と保険収載が急務である。

文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* **346**: 995-1008, 2002.
- 2) 蔵本惇: 特発性血小板減少性紫斑病分科会報告. 厚生省特定疾患特発性造血障害調査研究. 平成 2 年度研究業績報告書, p59, 1991.
- 3) George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, Blanchette VS, Bussel JB, Cines DB, Kelton JG, Lichtin AE, McMillan R, Okerbloom JA, Regan DH, Warrior I: Idiopathic thrombocytopenic purpura: A practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* **88**: 3-40, 1996.
- 4) McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* **37**: 239-248, 2000.
- 5) McMillan R, et al: Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult chronic ITP patients. *Blood* **103**: 1364-1369, 2004.
- 6) McMillan R, et al: A non-thrombocytopenic bleeding disorder due to an IgG4-k anti-GPIIb/IIIa autoantibody. *Br J Haematol* **95**: 747-749, 1996.
- 7) Chong BH, Keng TB. Advances in the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* **37**: 249-260, 2000.
- 8) Keifel V, Santoso S, Kaufmann E, Muller-Eckhardt C: Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* **70**: 1722-1726, 1987.
- 9) Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG: A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* **104**: 442-447, 1999.
- 10) Berchtold P, Muller D, Beardsley D, Fujisawa K, Kaplan C, Kekomaki R, Lipp E, Morell-Kopp MC, Kiefel V, McMillan R, von dem Borne AE, Imbach P: International study to compare antigen-specific methods used for the measurement of antiplatelet autoantibodies. *Br J Haematol* **96**: 477-483, 1997.
- 11) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y. Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is a sensitive and specific test for the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* **114**: 322-325, 2003.
- 12) Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, Ishida T, Shoda E, Miyazaki K, Sunaga S, Horie R, Aoki K, Koike K, Ogata I, Tahara T, Kato T, Nakahara K, Kariya T, Higashihara M: Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost* **79**: 1106-1110, 1998.
- 13) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, Kosugi S, Kashiwagi H, Honda S, Tomiyama Y: Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycoalbumin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* **115**: 656-664, 2001.
- 14) Westerman DA, Grigg AP: The diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults: does bone marrow biopsy have a place? *Med J Aust* **70**: 216-217, 1999.
- 15) Jubelirer SJ, Harpold R: The role of the bone marrow examination in the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura: case series and literature review. *Clin Appl Thromb Hemost* **8**: 73-76, 2002.
- 16) Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, Asahi A, Kajihara M, Ikeda Y: Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Med*, **118**: 1026-1033, 2005.

特発性血小板減少性紫斑病と *Helicobacter pylori*

桑名正隆¹

キーワード： ITP (特発性血小板減少性紫斑病)、*Helicobacter pylori*、抗血小板抗体

はじめに

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の感染は胃粘膜局所の慢性炎症を引き起こし、慢性萎縮性胃炎、腸上皮化生、さらには胃・十二指腸潰瘍や胃癌発生と関与する。一方、*H. pylori* は消化管疾患のみならず、慢性蕁麻疹、動脈硬化、シェーグレン症候群、ベーチェット病、アレルギー性紫斑病など多彩な消化管以外の疾患との関連も報告されている¹⁾。ただし、これら関連の多くは疾患群で *H. pylori* に対する抗体価が高いことや *H. pylori* 除菌療法後に症状が改善するなどの間接的な所見に基づくもので、信頼性の高いエビデンスがないのが現状である。唯一の例外は *H. pylori* との関連が従来の治療指針に大きな変革をもたらした特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) である。ITP と *H. pylori* との関連が注目されたきっかけは、イタリアの Gasbarrini らによる *H. pylori* を保菌する ITP 患者で除菌療法後に血小板が増加したという短報である²⁾。この成績は世界中で追試され、複数の報告で *H. pylori* を保菌する ITP 患者の半数程度で除菌療法後に血小板が増加することが確認された³⁻⁷⁾。ITP は薬剤などの原因や基礎疾患が明らかでないにもかかわらず血小板の破壊が亢進し、血小板減少をきたす後天性疾患であり、血小板に対する自己抗体を介した自己免疫疾患と考えられている⁸⁾。ITP に対する *H. pylori* 除菌療法の有効性は明らかであるが、*H. pylori* 除菌療法が ITP の病態を改善する機序についてはいまだ不明である。本稿では ITP の病態、診断、治療について概説し、さらに ITP における *H. pylori* 除菌療法の位置づけと *H. pylori* が ITP の病態に与える影響について最近の知見をまとめた。

ITP の病態

ITP における血小板破壊の機序は、血小板に対する自己抗体 (抗血小板抗体) が結合してオプソニン化された血小板が網内系で Fcγ 受容体を介してマクロファージなどの貪食細胞に捕捉され、貪食・破壊される病態である (図 1)⁸⁾。IgM 型あるいは大量の IgG 型抗血小板抗体が血小板に結合すれば補体活性化を介して血小板の血管内破壊が起こる可能性もある。多くの ITP 患者で脾臓がおもな血小板破壊場所であるとともに抗血小板抗体の産生部位であり⁹⁾、その摘出が ITP に対して最も有効な治療である⁸⁾。血小板を直接傷害する CD8+ 細胞障害性 T 細胞の存在も報告されているが¹⁰⁾、現時点でその抗原特異性は不明である。

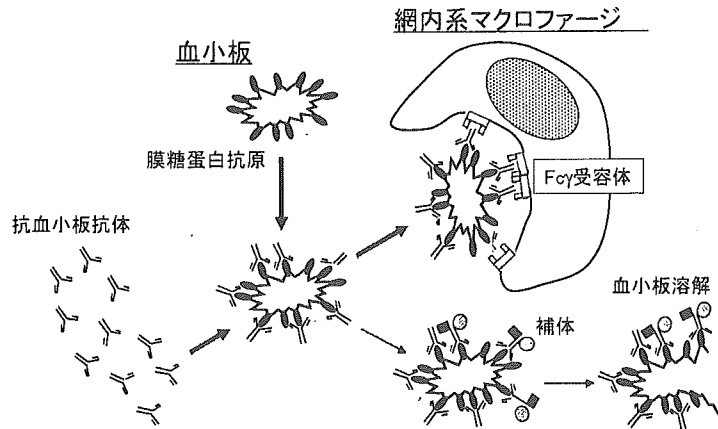


図1. ITPにおける血小板破壊の機序

抗血小板抗体が血小板膜表面の糖蛋白抗原に結合し、オプソニン化された血小板は Fc γ 受容体を介して網内系マクロファージにより貪食、破壊される。IgM または大量の IgG 抗血小板抗体が血小板に結合すれば、補体活性化を介して血管内での血小板溶解がみられる。

抗血小板抗体の標的抗原として GPIIb/IIIa、GPIb/IX、GPIa/IIa など各種血小板膜糖蛋白が同定されている⁸⁾。特に抗 GPIIb/IIIa 抗体の頻度が高く、高感度な検出法を用いると 90% 以上で陽性となる。これら対応抗原はいずれも血小板凝集にかかわるリガンドの受容体のため、自己抗体による血小板機能障害も出血傾向を助長する¹¹⁾。また、抗血小板抗体の対応抗原は血小板のみならず骨髓巨核球にも発現するため、抗血小板抗体は巨核球の成熟障害や細胞傷害を誘導することで血小板の産生も抑制することが示されている¹²⁾。

ITP における抗血小板抗体の産生機序について、血小板に対する自己反応性 T 細胞に関する知見が集積されてきた。血小板との共培養で IL-2 を産生する自己反応性 CD4⁺T 細胞の報告に始まり¹³⁾、その後 GPIIb/IIIa を認識する CD4⁺T 細胞について詳細な解析が行われた¹⁴⁾¹⁵⁾。網内系マクロファージは抗血小板抗体が結合してオプソニン化された血小板を貪食し、GPIIb/IIIa 由来ペプチドを発現する。それを認識した GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞が活性化し、B 細胞からの自己抗体産生を誘導することで抗血小板抗体の産生が持続する¹⁶⁾。

ITP の診断

ITP の診断は主に血小板減少をきたす他疾患の除外による。すなわち、病歴、身体所見、末梢血塗抹標本で ITP に矛盾せず、他の疾患を疑う臨床所見がなければ ITP と診断する¹⁷⁾。我が国で広く測定されている血小板関連 IgG (PAIgG) は、欧米のガイドラインで ITP の診断には不要とされている¹⁷⁾。測定原理上、PAIgG は抗血小板抗体だけでなく、血小板に非特異的に結合あるいはプールされている免疫グロブリン成分も同時に検出する。実際に PAlgG は原因を問わず血小板減少症で上昇するため、ITP の診断における特異性は低い。そこで、ITP に選択的な以下の臨床検査を取り入れることで積極的に ITP を診断する試みが検討されている¹⁸⁾。

1) 抗血小板膜糖蛋白特異抗体の検出

GPIIb/IIIa など血小板膜糖蛋白に対する自己抗体の検出は ITP に特異的なことから、その検出法が数多く考案されてきた。特に血小板膜糖蛋白に対するモノクローナル抗体を用いた antigen-capture assay が広く行われ、特異性は高いものの検出感度は 30～60% 程度である¹⁹⁾。その理由として、モノクローナル抗体と自己抗体が同一もしくは近傍のエピトープを認識する場合に偽陰性となることが挙げられる。また、患者における抗血小板抗体の多くは流血中で血小板に結合した状態で存在することから、検体として血清や血漿でなく

血小板を用いる必要があり、操作が煩雑となる。これらの要因が本検出法の普及を妨げてきた。最近、私たちは enzyme-linked immunospot (ELISPOT) 法の原理を用いて抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する末梢血 B 細胞を直接検出する方法を考案した²⁰⁾。抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の上昇は ITP における感度、特異度ともに 90% 以上と良好なことが示された。すでに本測定法のキット化に成功している。

2) 血小板回転の簡便な指標

ITP 患者の多くで血小板寿命の短縮と血小板回転の亢進がみられ、それら所見は ITP の診断に有用である。しかし、従来のアイソトープで標識した血小板を用いる手法は操作が煩雑で、特定の施設でしか施行できなかった。近年、血小板回転を反映する簡便な指標として網状血小板比率と血中トロンボポエチンが報告され、それらの ITP 診断における有用性が示された²¹⁾。網状血小板は幼弱な血小板で、ITP 患者では末梢での血小板破壊亢進を反映して流血中に残存する血小板に占める網状血小板の比率が高くなる。一方、トロンボポエチン濃度は巨核球低形成を呈する再生不良性貧血や無巨核球症で著増し、ITP では正常あるいは軽度の上昇にとどまる。そのため、トロンボポエチンの著増があれば ITP を除外できる。これらアッセイ法についても、臨床検査として測定可能になることが期待されている。

ITP の治療

ITP 治療の基本方針は 20 年近く変わっていない。すなわち、血小板数を正常に戻すのではなく、出血症状の改善、重篤な出血の予防を目標とし、血小板数と出血症状の程度に基づいて治療適応を決定する。適応となる症例では、まず副腎皮質ステロイド、次いで摘脾を行う⁸⁾¹⁷⁾。一方、副腎皮質ステロイド、摘脾を行っても血小板数を出血の危険の少ないレベルに維持できない症例を難治性とよび、免疫抑制薬やダナゾールなど様々な治療法が試みられているが、現時点で確立された治療法がない。ITP 患者では頭蓋内出血などの重篤な出血による死亡はまれだが、難治例では治療に関連した副作用の影響も加わり決して予後はよくない²²⁾。最近、難治性 ITP に対する治療として、抗血小板抗体産生にかかわる免疫担当細胞を標的とした分子標的療法が注目されている。例えば、B 細胞に特異的に発現する CD20 を標的としたキメラ型モノクローナル抗体 rituximab の有効性が報告されている。rituximab を投与された ITP 症例の約半数で血小板数が増加し、そのうち半数で長期に渡る寛解が得られる²³⁾。一方、活性化 T 細胞に一過性に発現される副刺激分子 CD40 リガンドを標的としたヒト化モノクローナル抗体の ITP に対する有効性も報告されている。抗 CD40 リガンド抗体は CD40 リガンドと CD40 の結合を選択的に抑制し、B 細胞分化・増殖や T 細胞プライミングなど獲得免疫応答に重要なシグナル伝達を遮断する。難治性 ITP 患者を対象としたヒト化抗 CD40 リガンド抗体の単回投与により、GPIIb/IIIa に対する T 細胞、B 細胞の抑制とともに一過性の血小板数の増加が報告されている²⁴⁾。

ITP と *H. pylori* 除菌療法

Gasbarrini らの報告²⁾の後、*H. pylori* を保菌する ITP 患者の半数程度で除菌療法後に血小板が増加する報告が日本とイタリアから相次いだ³⁻⁷⁾。一方、スペインや米国からの報告では有効率は 10% にも満たない²⁵⁾²⁶⁾。平成 15 年度に我が国の厚生労働省研究班が ITP 患者における *H. pylori* 感染状況に関するアンケート調査を行った²⁷⁾。その結果、ITP 患者 435 例中 300 例 (69%) が *H. pylori* 陽性で、陽性率は年齢と共に上昇し、我が国の一般人口における年齢毎の陽性率と大差なかった。この知見は *H. pylori* 感染が ITP の直接的な原因ではないことを示唆する。*H. pylori* 陽性 ITP 患者の中で除菌療法を受け、後に除菌が確認された 163 例のうち 103 例 (63%) で血小板数の増加がみられた。また、除菌が不成功に終わった症例の 33% でも血小板数の増加が

認められた。18%で副作用がみられ、通常の消化性潰瘍に対する除菌療法と同様に下痢、軟便、胃不快感などの胃腸障害が最も多かった。一過性の血小板減少により出血症状が悪化した症例がみられたが、その他に重篤な副作用は報告されていない。*H. pylori* 除菌療法の有効性を予測する背景因子を検索したところ、罹病期間が短い症例ほど有効率が高かったが、血小板数や摘脾の有無などの治療歴との相関はみられなかった。注目すべき点は、副腎皮質ステロイド、摘脾に反応せず、その他の免疫抑制薬などの治療でも安全な血小板数を維持できなかった難治例の中にも有効例がみられたことである。ただし、従来の報告では *H. pylori* の検索方法、除菌療法の使用薬剤や期間、血小板数増加の効果判定が統一されておらず、個々の報告間の比較は慎重に行わなければならない。

このように、プロトンポンプ阻害薬と2種類の抗菌薬を1週間服用するだけの除菌療法のITPにおける有効性は特筆に値する。また、最近では除菌後3年を越えて経過観察できた症例が増えており、有効例における血小板増加効果は長期に渡って持続することも明らかになってきた。*H. pylori* 除菌療法は従来用いられてきた副腎皮質ステロイドに比べて寛解導入率が高く、副作用もはるかに少ない。そのため、*H. pylori* 陽性例では除菌療法を第一選択とする新しい治療指針が提案されている(図2)²⁸⁾。すなわち、ITPと診断されれば全例でまず *H. pylori* の検索を行い、陽性であれば血小板数や出血症状と関係なく *H. pylori* 除菌療法を行う。除菌に成功したにもかかわらず血小板が増加しない無効例は、*H. pylori* 陰性例とともに従来の治療指針に従って治療の適応を判断し、治療を必要とする場合は副腎皮質ステロイド療法を開始する。この指針に従って *H. pylori* 除菌療法を最初に行うことにより、副腎皮質ステロイド以下の従来の治療法を受ける患者数は確実に減ると考えられる。その結果、従来の治療に伴う副作用の軽減、医療費の削減に貢献することが予想される。現在の日本ヘリコバクター学会によるガイドラインでは、*H. pylori* 除菌が勧められる疾患あるいは望ましい疾患にITPが含まれていない。今後、ガイドラインの変更とともにITPに対する *H. pylori* 除菌療法の保険収載が待たれる。

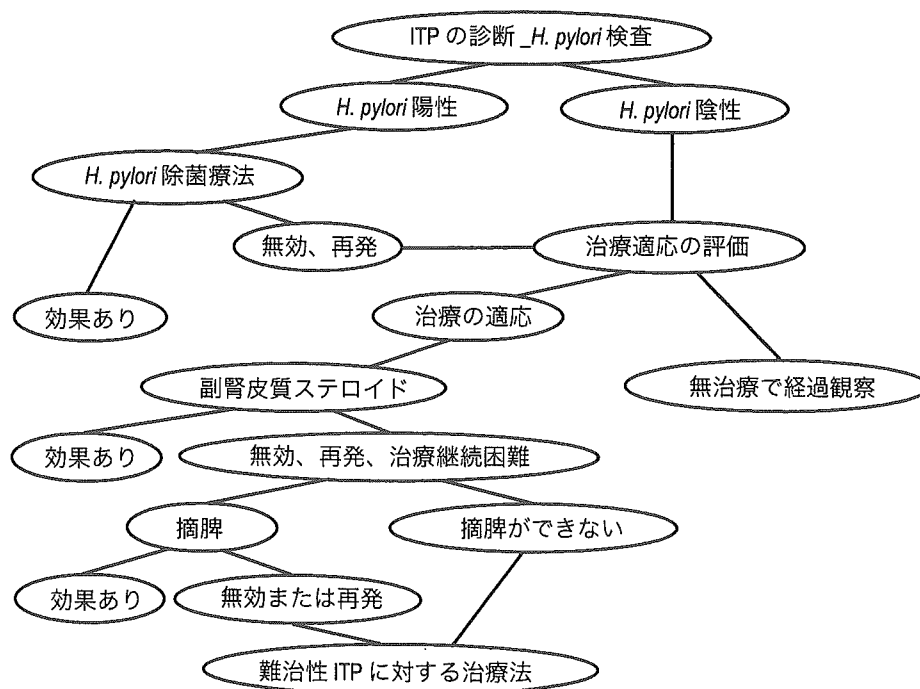


図2. ITPの新しい治療指針案(試案)

H. pylori を保菌するITP患者に対する除菌療法を優先し、除菌無効例および *H. pylori* 陰性例に対して従来の副腎皮質ステロイド療法、摘脾を行う。

ITP 患者に対する *H. pylori* 除菌療法については、いまだ不明な点が多く存在する。民族間の効果の差もそのひとつである。これまで *H. pylori* 除菌療法の奏効率が高いことが知られているのは日本とイタリアである。ヨーロッパでもスペイン、フランス、イギリスでの有効率はイタリアに比べてはるかに低い。日本とイタリアはいずれも先進国の中で *H. pylori* 保菌率が高い点は共通しているが、遺伝背景や *H. pylori* 菌株は異なる。今後、開発途上国を含めた多くの国でのデータが蓄積され、宿主側の遺伝・環境要因、*H. pylori* の遺伝子型などを比較することで、この点について回答が得られることが期待される。また、ITP と同様の自己抗体を介した機序で血小板減少をきたす他の疾患、例えば全身性エリテマトーデスなど膠原病では *H. pylori* の除菌により血小板数が増加することはきわめてまれである。その理由も明らかでない。

H. pylori の除菌が血小板数を増やす

ITP 患者の中に *H. pylori* 除菌療法が有効な一群が存在することは明白だが、ITP の病態に *H. pylori* がどのように関わっているかは明らかでない。除菌失敗例でも血小板数の増加がみられる場合があり、*H. pylori* 菌数の減少を反映した現象と解釈されている。また、除菌療法後の寛解期に *H. pylori* の再感染により ITP が再発した症例も報告されている。このような臨床観察から、*H. pylori* 感染そのものが ITP の病因と考え、*H. pylori* 陽性 ITP を *H. pylori* 関連 ITP (*H. pylori*-associated ITP) とよぶ研究者もいる²⁹⁾。ただし、*H. pylori* の感染頻度は ITP 患者と一般人口で差はなく、ITP そのものの有病率から考えても *H. pylori* 感染そのものが直接 ITP の発症を誘発するとは考えづらい。したがって、*H. pylori* は多因子疾患である ITP の病態を促進する主要な要因の一つと考えるのが妥当と思われる。

ITP 患者の多くで *H. pylori* 除菌療法後に血小板数が増えることは事実だが、その効果が本当に *H. pylori* を除菌した結果によるかを確認する必要がある。抗生物質 2 剤を 1 週間服用すれば *H. pylori* 以外の細菌も除菌され、それらの中に ITP と関連する真の病原体が含まれる可能性も否定できない。また、抗生物質投与により正常細菌叢も大きく変化し、特にリンパ組織である腸管の細菌叢の変化は免疫応答に影響を及ぼす可能性もある。さらに、除菌に用いるクラリスロマイシンやプロトンポンプ阻害薬固有の免疫調節作用が報告されている。したがって、現時点でこれら *H. pylori* 除菌以外の機序を介した効果を排除できない。そこで、私たちは *H. pylori* 感染の有無にかかわらず ITP 患者にアンピシリン、クラリスロマイシン、プロトンポンプ阻害薬による標準的除菌療法を行い、その効果を調べる前向き調査を行った。26 例の *H. pylori* 陽性患者を含む 37 例に除菌療法を行い、*H. pylori* 陽性の全例で除菌に成功した。血小板増加は *H. pylori* 陽性の 56% にみられたが、陰性 11 例全例で血小板増加はみられなかった。すなわち、*H. pylori* 除菌療法による血小板増加効果は *H. pylori* そのものの除菌によることが確認された。

ITP における *H. pylori* 除菌の作用機序

従来の ITP に対する治療の主な作用点としては、T、B 細胞からの抗血小板抗体産生の抑制、網内系マクロファージによるオプソニン化血小板破壊の抑制の 2 つがある。副腎皮質ステロイドや免疫抑制薬は前者、免疫グロブリン大量静注療法は後者が主な作用機序だが、*H. pylori* 除菌療法がいずれの作用機序を介して血小板数を増やすかは明らかでない。そこで、ELISPOT 法の原理を用いて末梢血中の抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞を定量的に検出することで *H. pylori* 除菌療法前後での抗血小板抗体産生の変化を検討した。*H. pylori* 除菌が有効であった ITP 患者 16 例の全例で抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞は除菌後徐々に減少し、24 週後には 75% の症例で正常化した。このように *H. pylori* 除菌後に抗 GPIIb/IIIa 抗体の産生が抑制されたが、多くの症例で

血小板数増加が抗血小板抗体産生の抑制に先行した。そのため、*H. pylori* 除菌と抗血小板抗体産生抑制の間に別のプロセスが介在する可能性が考えられる。最近、抗血小板抗体が *H. pylori* の構成蛋白 CagA と交差反応し、除菌後に交差反応を示す抗体が消失することが報告された³⁰⁾。ただし、血小板数が増加する除菌療法開始1～2週間後には CagA に対する抗体価の顕著な減少はみられない。そのため、*H. pylori* 菌体成分との交差反応のみで *H. pylori* 除菌療法の効果発現機序を説明するのは困難と思われる。

おわりに

H. pylori 除菌療法の高い有効率は従来の ITP 治療指針を変えるインパクトを持つブレイクスルーであった。今後の課題は *H. pylori* 除菌療法が血小板数を増やす機序の解明である。この課題が解決されれば、そのメカニズムを利用して *H. pylori* 陰性例や除菌療法無効例に対する新たな ITP の治療法の開発につながる可能性がある。さらに、これらの成果は *H. pylori* が宿主の免疫系に及ぼす影響の解明にもつながる。

文献

- 1) Wedi B, Kapp A. *Helicobacter pylori* infection in skin diseases: a critical appraisal. *Am J Clin Dermatol* 2002; 3: 273-282
- 2) Gasbarrini A, Serricchio M, Tondi P, et al. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1998; 352: 878
- 3) Emilia G, Longo G, Luppi M, et al. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001; 97: 812-814
- 4) Kohda K, Kuga T, Kogawa K, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on platelet recovery in Japanese patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura and secondary autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002; 118: 584-588
- 5) Hashino S, Mori A, Suzuki S, et al. Platelet recovery in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura after eradication of *Helicobacter pylori*. *Int J Hematol* 2003; 77: 188-191
- 6) Ando K, Shimamoto T, Tauchi T, et al. Can eradication therapy for *Helicobacter pylori* really improve the thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura? Our experience and a literature review. *Int J Hematol* 2003; 77: 239-244
- 7) Franchini M, Veneri D. *Helicobacter pylori* infection and immune thrombocytopenic purpura: an update. *Helicobacter* 2004; 9: 342-346
- 8) Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002; 346: 995-1008
- 9) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, et al. Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol* 2002; 168: 3675-3682
- 10) Olsson B, Andersson PO, Jernas M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003; 9: 1123-1124
- 11) McMillan R, Bowditch RD, Tani P, et al. A non-thrombocytopenic bleeding disorder due to an IgG4-k anti-GPIIb/IIIa autoantibody. *Br J Haematol* 1996; 95: 747-749
- 12) McMillan R, Wang L, Tomer A, et al. Suppression of *in vitro* megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult chronic ITP patients. *Blood* 2004; 103:1364-1369
- 13) Semple JW, Freedman J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia. *Blood* 1991; 78: 2619-2625
- 14) Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic

- purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 1998; 102: 1393-1402
- 15) Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, et al. Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001; 98: 130-139
 - 16) Kuwana M, Ikeda Y. The role of autoreactive T-cells in the pathogenesis of ITP. *Int J Hematol* 2005; 81:106-112
 - 17) George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996; 88: 3-40
 - 18) Kuwana M, Okazaki Y, Satoh T, et al. Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study. *Am J Med* 2005; 118: 1026-1033
 - 19) Berchtold P, Muller D, Beardsley D, et al. International study to compare antigen-specific methods used for the measurement of antiplatelet autoantibodies. *Br J Haematol* 1997; 96: 477-483
 - 20) Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, et al. Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is useful in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* 2003; 114: 322-325
 - 21) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, 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
 - 22) Cohen YC, Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, et al. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1630-1638
 - 23) Cooper N, Stasi R, Cunningham-Rundles S, et al. The efficacy and safety of B-cell depletion with anti-CD20 monoclonal antibody in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2004; 125: 232-239
 - 24) Kuwana M, Nomura S, Fujimura K, et al. Effect of a single injection of humanized anti-CD154 monoclonal antibody on the platelet-specific autoimmune response in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004; 103: 1229-1236
 - 25) Jarque I, Andreu R, Llopis I, et al. Absence of platelet response after eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001; 115: 1002-1003
 - 26) Michel M, Cooper N, Jean C, et al. Does *Helicobacter pylori* initiate or perpetuate immune thrombocytopenic purpura? *Blood* 2004; 103: 890-896
 - 27) Fujimura K, Kuwana M, Kurata Y, et al. Is eradication therapy useful as the first line of treatment in *Helicobacter pylori*-positive idiopathic thrombocytopenic purpura? Analysis of 207 eradicated chronic ITP cases in Japan. *Int J Haematol* 2005; 81: 162-168
 - 28) 藤村欣吾：免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）における治療ガイドライン（案）の提案。厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業平成 16 年度総括・分担研究報告書「血液凝固異常症に関する調査研究」p53-69, 2005
 - 29) Fujimura K. *Helicobacter pylori* infection and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2005; 81: 113-118
 - 30) Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, et al. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2004; 124: 91-96

Is Eradication Therapy Useful as the First Line of Treatment in *Helicobacter pylori*-Positive Idiopathic Thrombocytopenic Purpura? Analysis of 207 Eradicated Chronic ITP Cases in Japan

Kingo Fujimura,^a Masataka Kuwana,^b Yoshiyuki Kurata,^c Masahiro Imamura,^d Hiroshi Harada,^e Hisashi Sakamaki,^f Masanao Teramura,^g Kyuhei Koda,^h Shosaku Nomura,ⁱ Sayaka Sugihara,^j Takeshi Shimomura,^k Tetsuro-Takahiro Fujimoto,^a Kazuma Oyashiki,^l Yasuo Ikeda^m

^aDepartment of Hematology and Oncology, Division of Clinical Pharmacotherapeutics, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima; ^bInstitute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine, Tokyo; ^cDepartment of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, Suita; ^dDepartment of Hematology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo; ^eDepartment of Hematology, Showa University Fujigaoka Hospital, Yokohama; ^fDepartment of Internal Medicine, Tokyo Komagome Metropolitan Hospital, Tokyo; ^gDepartment of Hematology, Tokyo Women's Medical University School, Tokyo; ^hDepartment of Internal Medicine, Asahikawa Red Cross Hospital Asahikawa; ⁱDepartment of Hematology, Kansai Medical School, Osaka; ^jDepartment of Hematology, Hiroshima Red Cross Hospital Hiroshima; ^kDepartment of Hematology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Hiroshima; ^lDepartment of Hematology, Tokyo Medical School, Tokyo; ^mDepartment of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Received September 27, 2004; received in revised form November 4, 2004; accepted November 10, 2004

Abstract

A retrospective study was performed to determine the prevalence of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection, the effect of *H pylori* eradication on platelet counts, and the characteristic clinical features of chronic immune or idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) with *H pylori* infection. *H pylori* infection was found in 300 patients, a group that was significantly older ($P < .005$) and had more cases of hyperplastic megakaryocytes in the bone marrow ($P = .01$) than patients without *H pylori* infection. *H pylori* eradication therapy was performed in 207 *H pylori*-positive ITP cases, and the platelet count response was observed in 63% of the successful eradication group and in 33% of the unsuccessful eradication group ($P < .005$). In the successful group, the complete remission and partial remission rates were 23% and 42%, respectively, 12 months after eradication. In the majority of responders, the platelet count response occurred 1 month after eradication therapy, and the increased platelet count continued without ITP treatment for more than 12 months. *H pylori* eradication therapy was effective even in refractory cases, which were unresponsive to splenectomy. In conclusion, *H pylori* infection was involved in most ITP patients older than 40 years in Japan, and eradication therapy should be the first line of treatment in *H pylori*-positive ITP patients.

Int J Hematol. 2005;81:162-168. doi: 10.1532/IJH97.04146

©2005 The Japanese Society of Hematology

Key words: ITP; *Helicobacter pylori*; Eradication; Older ITP patients

1. Introduction

The pathological mechanisms of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) have not been clearly determined;

however, the immunological platelet destruction mechanism is accepted in most cases as immune thrombocytopenic purpura [1-3]. The etiology and mechanism of induction of immune mechanisms against platelets are unknown.

In 1998, Gasbarrini et al reported that in ITP cases with *Helicobacter pylori* (*H pylori*) infection, the platelet count was elevated after eradication of this bacterium [4]. That report presented some interesting problems to us. One was whether *H pylori* infection is involved in the pathological mechanisms of some cases of immune thrombocytopenia, and the other was whether eradication therapy is effective for treatment of ITP cases with *H pylori* infection.

Correspondence and reprint requests: Kingo Fujimura, MD, PhD, Department of Hematology and Oncology, Division of Clinical Pharmacotherapeutics, Program for Applied Biomedicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima, 734-8551, Japan; 81-82-257-5295; fax: 81-82-257-5299 (e-mail: fujimura@hiroshima-u.ac.jp).

H pylori is a gram-negative bacterium that causes gastritis and is an important risk factor for gastric ulcers, duodenal ulcers, gastric cancer, and gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma [5]. However, recent reports have suggested that *H pylori* infection can cause immune diseases not related to the gastric mucosa, such as chronic thyroiditis, rheumatoid arthritis, and Sjögren syndrome [6-8]. Several reports from Italy and Japan appear to confirm the effect of *H pylori* eradication on platelet count in *H pylori*-positive ITP cases [9-13]. Therefore *H pylori* eradication in *H pylori*-positive ITP is likely to be an effective ITP treatment strategy. On the other hand, reports from Spain, northern Europe, and the United States did not support the effectiveness of *H pylori* eradication in *H pylori*-positive ITP [14-16]. The cause of this discrepancy and the mechanisms by which eradication is effective in ITP patients are not clear. The questions then are whether specific characteristic backgrounds are present in *H pylori*-positive ITP and eradication-effective ITP cases and whether eradication therapy is useful for thrombocytopenia.

We designed a nationwide retrospective study in Japan to answer these questions, to evaluate the incidence of *H pylori*-positive ITP cases and the effect of eradication on platelet count, and to determine whether the eradication procedure can be included in the standard regimen of ITP treatment.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

ITP patients older than 18 years who were examined for *H pylori* infection in 11 hospitals in Japan from July 2002 to December 2003 were enrolled in this study. The diagnosis was made and management provided by a hematologist in each hospital.

Questionnaires were used to gather the following data: age, sex, laboratory data for ITP (white blood cell count, hemoglobin concentration, red blood cell count, platelet count, bone marrow findings such as megakaryocyte poiesis expressed as decrease, normal, or increase as found with marrow smears), bleeding symptoms including all forms and grades, ITP disease duration, previous and recent medication for ITP, whether splenectomy had been performed, laboratory data for diagnosis of *H pylori* infection, whether eradication therapy was used, the protocol used for eradication, the effect of eradication on *H pylori* infection, the effect of eradication on platelet count, and side effects of the eradication procedure. Platelet count was measured with an automatic blood cell count analyzer in each hospital.

From the enrolled patients the following groups were selected for analysis of the involvement of *H pylori* in ITP: (1) Platelet counts were monitored for at least 3 months after eradication therapy, counts being measured every 4 or 8 weeks. (2) To evaluate the eradication effects, the dose of the ongoing medication was maintained for at least 4 weeks after eradication therapy. (3) After informed consent was obtained, the eradication therapy was selected by *H pylori*-positive ITP patients themselves. Approval for the

eradication treatment of ITP was obtained at each hospital before the start of the study, and informed consent was provided by all patients in each hospital according to the Declaration of Helsinki.

2.2. Diagnosis and Evaluation of Effectiveness

Diagnosis of ITP was performed according to the diagnostic criteria for ITP determined by the Research Committee for ITP supported by the Ministry of Health and Welfare of Japan (1990). The main points were as follows: thrombocytopenia was less than $10 \times 10^4/\mu\text{L}$; no other hematological abnormalities were present in peripheral blood; whenever other diseases were suspected bone marrow was examined to exclude them; no underlying diseases were causing thrombocytopenia; and thrombocytopenia had been present for at least 6 months.

The hematological response after eradication therapy was assessed during the final examination in each case, and the effectiveness was determined by the following criteria: If the platelet count before eradication therapy was less than $1 \times 10^4/\mu\text{L}$ and the platelet count had increased to more than 3 times the pre-eradication level after eradication therapy, the case was considered a responder case. If the initial platelet count was $1 \times 10^4/\mu\text{L}$ or greater and less than $3 \times 10^4/\mu\text{L}$ and the platelet count had increased to more than $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ after eradication or if the initial platelet count was $3 \times 10^4/\mu\text{L}$ or greater but less than $10 \times 10^4/\mu\text{L}$ and the platelet count had increased to greater than $3 \times 10^4/\mu\text{L}$ of the pre-eradication level, the case also was considered to be a responder case. Responder cases with platelet counts less than $15 \times 10^4/\mu\text{L}$ were referred to as partial remission (PR). Complete remission (CR) was defined as platelet counts greater than $15 \times 10^4/\mu\text{L}$ after eradication without maintenance therapy. Nonresponder (NR) cases were defined as cases in which the platelet count did not meet the above criteria after eradication therapy.

H pylori infection was diagnosed according to the *H pylori* diagnostic guidelines established in 2003 by the Japan *Helicobacter pylori* Research Association [17]. That is, *H pylori* infection was diagnosed when the result of at least 1 or more of the following 3 tests was positive: serum *H pylori* antibody test, ^{13}C urea breath test (UBT), and detection of *H pylori* in gastric mucosa biopsy specimens. Four or more weeks after eradication treatment, the effect of eradication on *H pylori* infection was assessed with the ^{13}C UBT.

2.3. Analysis

We used a multiple logistic regression model and extended Poisson regression model on the *H pylori* data to examine the effect of background factors on the following binary response variables: whether the patient had positive or negative results for *H pylori*, whether platelet count increased, and whether eradication was successful. The background factors considered were sex, age, duration of ITP, tendency to bleed, platelet count, megakaryocyte count, treatment of ITP, and whether splenectomy had been performed. For category variables, we used dummy values.

3. Results

3.1. Patient Numbers and Prevalence of *H pylori* Infection

We enrolled 467 patients over 18 months. However, the following 32 cases were excluded: 6 cases in the CR state of ITP, 2 cases of acute ITP, 17 cases diagnosed as myelodysplastic syndrome or systemic lupus erythematosus, 4 cases of Evans syndrome, and 3 cases in which results of *H pylori* examinations were not adequate. Thus the final total was 435 cases. Previous ITP management of the enrolled cases was as follows: 70 cases were refractory cases to steroids and splenectomy. A total of 181 cases were treated with steroids; 48 cases were treated with ascorbate or cepharanthine (plant alkaloid agent) without steroids; 133 cases were fresh ITP

cases or had not been treated, and 3 cases had unknown previous management. The age distribution in 435 ITP cases showed 2 peaks. One peak was small in the 31- to 40-year age group, and the other was large in the 51- to 60-year age group (Figure 1A). The average age among the patients was relatively high, and approximately 70% of the patients in this study were older than 50 years. The male to female ratio was 1/2.63.

UBTs in conjunction with *H pylori* antibody tests were performed in 152 cases. The remaining cases were diagnosed with either a UBT (154 cases) or a *H pylori* antibody test (92 cases), or a biopsy was performed in addition to 1 of the other tests (37 cases).

Three hundred cases were diagnosed as *H pylori* positive (positive rate, 69%), including the cases of 217 female patients (68.8% positive in female patients) and those of 83 male patients (69.2% positive in male patients), and 135 cases were found to be *H pylori* negative, including those of 98 female and 37 male patients. The *H pylori*-positive rate did not differ between female and male patients (Table 1).

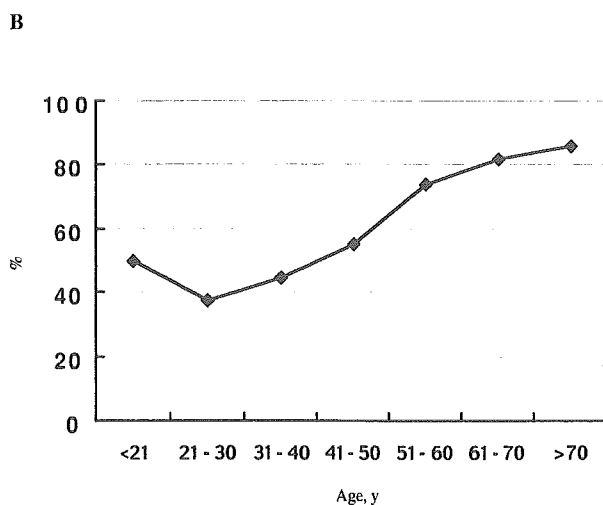
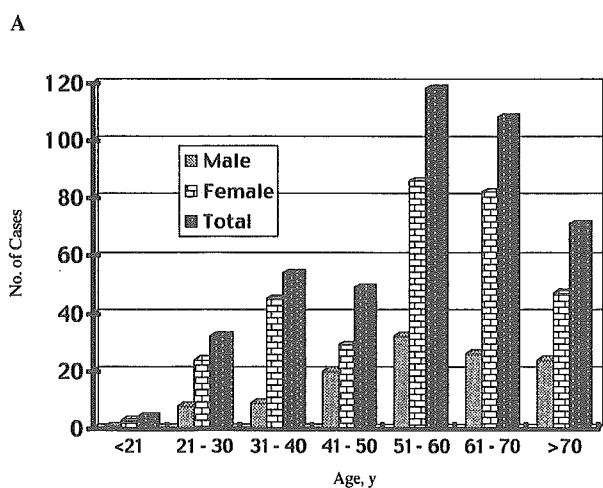


Figure 1. A, Age distribution of 435 patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). There are 2 waves in the total number of patients. The first is patients 21 to 50 years old, and the second is patients 41 years and older. More than 70% of patients are in the second wave. B, *Helicobacter pylori* infection-positive rates in each age population of ITP patients. The *H pylori*-positive rate increased gradually between the ages of 41 and more than 71 years.

3.2. Comparison of the Backgrounds between *H pylori*-Positive and -Negative Groups

As shown in Table 1, there was no difference in sex ratio between the groups. The mean age of the *H pylori*-positive patient group (58.92 ± 13.76 years) was significantly higher than that of the *H pylori*-negative patient group ($47.36 \pm$

Table 1.

Initial Background Factors of *Helicobacter pylori*-Positive and -Negative Groups

	<i>H pylori</i> Positive	<i>H pylori</i> Negative
No. of cases	300	135
Male/female ratio	1/2.6	1/2.65
Mean age, y*	58.92 ± 13.76	47.36 ± 15.87
Disease period, y	8.18 ± 6.80	8.74 ± 7.23
Bleeding tendency		
+	161 (54.8%)	85 (64.9%)
-	133 (45.2%)	46 (35.1%)
Unknown	6	4
Initial platelet count		
$5-10 \times 10^4$	61 (21.1%)	24 (18.6%)
$3-5 \times 10^4$	76 (26.3%)	25 (19.4%)
$1-3 \times 10^4$	115 (39.8%)	53 (41.1%)
<1	37 (12.8%)	27 (20.9%)
Unknown	11	6
Bone marrow megakaryocytes		
Increased†	140 (54.9%)	51 (44.7%)
Normal	110 (43.1%)	59 (51.8%)
Decreased	5 (2.0%)	4 (3.5%)
Unknown	5	21
Treatment before eradication		
No treatment	91	42
Steroid treatment	122	59
Other treatment	40	8
Splenectomy	45	25
Unknown	2	1

*P < .005 (odds ratio, 1.72/10 y).

†P = .011 (odds ratio, 2.03).

Table 2.

Eradication Effects on Platelet Response*

<i>Helicobacter pylori</i> -negative ITP cases, n	135 (31%)	
<i>H pylori</i> -positive ITP cases, n	300 (69%)	
Eradication cases, n	228	
Eradication successful group, n	161 (78%)	}†
Platelet count { Response cases, n	101 (63%)	
Nonresponse cases, n	60	
Eradication unsuccessful group, n	46 (22%)	
Platelet count { Response cases, n	15 (33%)	}†
Nonresponse cases, n	31	
Unknown cases, n	19	
Previous treatment unknown cases, n	2	
Noneradication cases, n	72	

*ITP indicates idiopathic thrombocytopenic purpura.

† $P < .005$ (odds ratio, 4.45).

15.87 years). The estimated regression coefficients were 0.054 ($P < .005$), and the odds ratio was 1.72 (per 10 years). The durations of ITP in the *H pylori*-positive and -negative patient groups were 8.18 ± 6.80 and 8.74 ± 7.23 years, respectively, and were not significantly different. The clinical features and laboratory findings at diagnosis of ITP showed that there were trends among the patients with fewer bleeding events (55% versus 65%) and that there were fewer platelet counts less than $1 \times 10^4/\mu\text{L}$ (13% versus 21%) in *H pylori*-positive ITP cases than in *H pylori*-negative cases, but the estimated regression coefficient and odds ratio were not significant. However, in the *H pylori*-positive group there were significantly more cases of hyperplastic megakaryocytes in the bone marrow, an estimated regression coefficient of $P = .01$ and odds ratio of 2.03. The cases of ITP that had not been treated, had been treated with steroids, or had been treated with splenectomy before enrollment did not differ significantly, but more patients in the *H pylori*-positive group received other treatment during ITP (Table 1).

3.3. Age Distribution in *H pylori*-Positive and -Negative ITP Cases

The rate of positive results for *H pylori* infection in this study increased with age (Figure 1B). *H pylori*-positive ITP was found more frequently in patients older than 41 years; that is, 55% of the patients in the 41-year age group had positive results. This rate increased to 73% in 51-year-old patients and to more than 80% in the group older than 61 years.

Most *H pylori*-negative ITP cases were found in patients younger than 50 years. The peak of negative cases was found in the 21- to 40-year age group. No difference between male and female patients in *H pylori*-positive rate was found in any age group.

3.4. Use of Eradication Treatment in *H pylori*-Positive ITP Cases

As shown in Table 2, 228 (76%) of 300 *H pylori*-positive ITP patients consented to eradication treatment, and treatment was performed. The standard eradication regimen in Japan (lansoprazole 60 mg/d, clarithromycin 400 mg/d, and

amoxicillin 1500 mg/d, taken together twice a day for 7 days) was selected in most cases. Twenty-one cases were excluded after analysis because the eradication effect was not evaluated or because previous ITP treatments were unclear. Eradication of *H pylori* infection succeeded in 161 (78%) of 207 cases. The success rate did not differ between male (success rate, 78.8%) and female (success rate, 77.2%) patients or between age groups.

The initial ITP treatment regimen or treatment immediately before eradication by steroids or other immunosuppressive agents had no significant influence on the success rate of the eradication treatment.

3.5. Eradication Effects of *H pylori* Infection on Platelet Count

A significant increase in platelet count at the final observation was found in 101 (63%) of the 161 cases in which eradication of *H pylori* was successful and in 15 (33%) of the 46 cases in which eradication was not successful. These findings showed that the increase in platelet count correlated with successful eradication treatment of *H pylori*-positive ITP cases with an estimated regression coefficient of $P < .005$ and an odds ratio of 4.45 (Table 2).

The background characteristics of the increased platelet and NR groups with successful eradication treatment were compared (Table 3). The shorter duration of ITP (6.52 ± 4.67 years versus 9.85 ± 7.77 years) in the increased platelet group was significant with an estimated regression coefficient of $P < .005$ and an odds ratio of 0.34 (per 10 years), but age did not influence the platelet count response after eradication. The results of platelet count recovery were not affected by platelet count immediately prior to eradication or by ITP treatment before eradication whether or not eradication was successful.

3.6. Follow-up Study

Overall, 155 (75%) of all eradicated ITP cases were followed up for 12 months after eradication, 42 (20%) of the cases for 6 months, and 10 (5%) of the cases for 3 months.

The platelet count responses at 12 months after successful eradication (122 cases) were as follows (Table 4): 28 (23%) of

Table 3.

Backgrounds of the Platelet Count Response Group and the Nonresponse Group in Eradication-Effective Cases*

	Platelet Count	
	Response	Nonresponse
No. of cases	101	60
Male/female ratio	37/64 (0.58)	15/45 (0.33)
ITP duration, y†	6.52 ± 4.67	9.85 ± 7.77
Mean age, y	58.70 ± 12.6	56.73 ± 14.31
Mean platelet count immediately before eradication, $\times 10^4$	4.01 ± 2.22	5.18 ± 5.68
Treated ITP cases immediately before eradication, n	52 (50.5%)	27 (45.0%)

*ITP indicates idiopathic thrombocytopenic purpura.

† $P < .005$ (odds ratio, 0.34/10 years).

Table 4.
Platelet Count Response 12 Months after Eradication Therapy*

Platelet Count Immediately before Eradication, $\times 10^4$	Complete Remission	Partial Remission	No Response	Total
Eradication successful group, n = 122 cases				
<1	0	2 (67)	1 (33)	3
1-3	8 (20)	23 (58)	9 (23)	40
3-5	8 (21)	16 (42)	14 (37)	38
5-10	12 (29)	10 (24)	19 (46)	41
Total	28 (23)	51 (42)	43 (35)	122
Eradication unsuccessful group, n = 33 cases				
<1	0	0	2 (100)	2
1-3	1 (11)	1 (11)	7 (78)	9
3-5	1 (7)	3 (21)	10 (71)	14
5-10	3 (38)	0	5 (63)	8
Total	5 (15)	4 (12)	24 (73)	33

*Values in parentheses are percentages.

the cases were in CR, 51 (42%) of the cases were in PR, and 43 of the cases were NR. In all, 79 (65%) of the cases showed a response in platelet count (Table 4). In most of the PR cases in which platelet count increased to more than $5 \times 10^4/\mu\text{L}$, ITP treatment was discontinued after eradication. The cases in which platelet counts were less than $1 \times 10^4/\mu\text{L}$ just before eradication did not show an increase in platelet count above $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ at 12 months after eradication, although the platelet count had increased to at least 3 times the initial count and the tendency toward bleeding had disappeared in 2 cases (Figure 2A).

We used the extended Poisson regression model to analyze the relation between the previous ITP treatment or platelet count immediately prior to eradication and the platelet count response after eradication. At 12 months the relation between platelet count before eradication and the effect of platelet count response on CR and PR rate after eradication was not significant (Table 4). The PR and CR rates tended to be higher in the nontreatment (40 cases) and the steroid treatment groups (52 cases) before eradication than in the splenectomy (12 cases) or other treatment groups (18 cases); however, there were no significant differences between these groups (Table 5).

In the group in which eradication was not successful (33 cases), 5 cases were in CR (15%), 4 cases were in the increased platelet response group (PR, 12%), and 24 cases were NR (Tables 4 and 5). The 9 responder cases were previously diagnosed as *H pylori* infection by UBT or UBT plus stomach biopsy. In all, the response rate in this group was 27% at 12 months after eradication. The clinical course of platelet count in these 9 platelet count response cases is shown in Figure 2B.

Most platelet count response cases showed that the increase in platelet count occurred 1 month after eradication and then gradually increased further for 12 months (Figure 2A). To examine the increase in platelet count for success status data, we used the paired *t* test for each neighbor time point. The increase in platelet count was significant ($P < .01$) in every span.

In the NR group, there were 6 cases in which platelet counts increased transitionally and returned to the baseline level within 6 months, even though eradication had been successful. There were no relapse cases after 6 months regardless of the success of the eradication treatment.

3.7. Adverse Effects of Eradication Treatment

Adverse effects of eradication treatment were found in 39 (17.6%) of 222 cases. These adverse effects were gastrointestinal trouble, such as discomfort at the epigastrium and diarrhea. Soft stool and rash occurred in 64% and 23%,

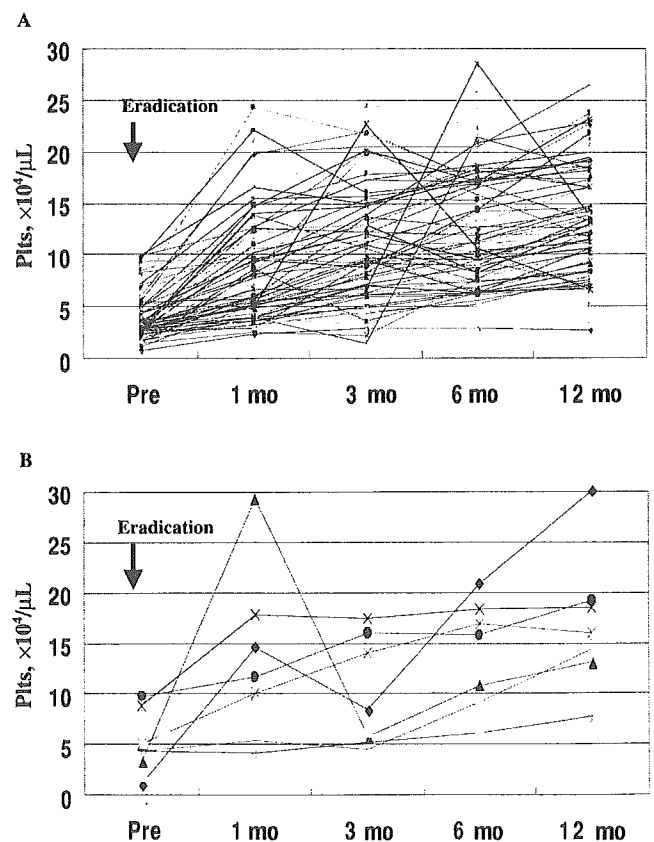


Figure 2. Laboratory course of platelet count responders in successful eradication cases (79 cases) (A) and unsuccessful eradication cases (9 cases) (B) followed for more than 12 months. The platelet count in most responder cases began to increase 1 month after eradication and continued to increase gradually.