

図3 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最優先し、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。

表3 ITPに対する新しい分子標的療法とその作用標的

治療法	商品名	投与量	作用標的	主な副作用
cyclosporin A	サンディミュン	2.5-3 mg/kg/day	T細胞機能抑制	感染症 悪性腫瘍
mycophenolate mofetil	ネオーラル セルセプト	1.5-2 g/day	T, B細胞機能抑制	感染症, 悪性腫瘍
anti-CD20 chimeric antibody (rituximab)	リツキサン	375 mg/m ² weekly を4週間	B細胞除去	感染症
TNF receptor p75-Ig fusion (etanercept)	エンブレル	25 mg/day を週2回	TNF α , TNF β 活性阻害	感染症 (特に結核)
anti-CD52 humanized antibody (campath-1H)	—	10 mg/day を10日間	T, B細胞除去	感染症 投与時反応
anti-CD40 ligand humanized antibody (IDEC-131/E6040)	—	10 mg/kg を反復	副刺激阻害	感染症 血栓症?
CTLA4-Ig	—	10 mg/kg を2週ごとに3回, 以後は4週に1回	副刺激阻害	投与時反応

が、悪寒や発熱など強い投与時反応を伴い、リンパ球着減による感染症のリスクも高い。一方、T細胞とAPCの相互作用に必須な副刺激を標的とした手法も有効な治療の候補である。副刺激なしにT細胞受容体からの主シグナルが伝わり、T細胞はその後の適正な刺激に対しても反応できない不応答状態(アナジー)に陥る。この

性質を利用して、副刺激を遮断することで抗原に曝露されているT細胞の不活化が可能である。このような副刺激阻害薬として臨床試験が進行中のものに抗CD40L抗体とCTLA4-Igがある。抗CD40L抗体は活性化T細胞に発現するCD40LとAPC上のCD40との結合を阻害する。この作用によりT細胞ヘルパー活性阻害と調節性T細胞

胞誘導を介した免疫抑制の異なる機序により抗血小板抗体産生が抑制される¹³⁾。また、難治性ITPを対象としたヒト化抗CD40L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¹⁴⁾。ただし、抗CD40L抗体療法と血栓症との関連が疑われ、現在臨床試験が一時中断されている。CTLA4は活性化T細胞に発現される分子で、CD28より高い親和性でCD80/CD86に結合する。CTLA4-IgはCTLA4をヒトIgGのFc部分との融合蛋白として発現させたりコンビナント蛋白で、CD28とCD80/CD86との結合を阻害する。現時点でITP患者を対象とした報告

はないが、CTLA4-Ig存在下でITP患者由来の血小板反応性T細胞のトランスが誘導されることが*in vitro*の実験系で示されている¹⁵⁾。今後、これらの分子標的療法が臨床に応用されることが期待される。

d. 予 後

ITPの全経過における出血による死亡率は2%以下で、決して生命予後の悪い疾病ではない。しかし、標準的治療に反応しない難治例に限定すると出血に加えて治療による影響もあり死亡率が10%近くまで上昇する。高齢者ほど予後が悪く、死因の多くは頭蓋内出血である。

■ 文 献

- 1) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 346: 995-1008, 2002.
- 2) Gasbarrini A, et al: Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 352: 878, 1998.
- 3) McMillan R, et al: Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult chronic ITP patients. *Blood* 103: 1364-1369, 2004.
- 4) Olsson B, et al: T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 9: 1123-1124, 2003.
- 5) McMillan R: Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 37: 239-248, 2000.
- 6) Kuwana M, et al: Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest* 102: 1393-1402, 1998.
- 7) Kuwana M, Ikeda Y: The role of autoreactive T cells in the pathogenesis of ITP. *Int J Hematol*. (in press)
- 8) George JN, et al: Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 88: 3-40, 1996.
- 9) Kuwana M, et al: Detection of circulating B cells secreting platelet-specific autoantibody is useful in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med* 114: 322-325, 2003.
- 10) 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* 115: 656-664, 2001.
- 11) Cooper N, 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* 125: 232-239, 2004.
- 12) McMinn JR Jr, et al: Complete recovery from refractory immune thrombocytopenic purpura in three patients treated with etanercept. *Am J Hematol* 73: 135-140, 2003.
- 13) Kuwana M, et al: Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 101: 621-623, 2003.
- 14) Kuwana M, 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* 103: 1229-1236, 2004.
- 15) Peng J, et al: Effects of B7-blocking agent and/or CsA on induction of platelet-specific T-cell anergy in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 101: 2721-2726, 2003.

特発性血小板減少性紫斑病

桑名正隆

概念

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura ; 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、血小板破壊が亢進して血小板減少をきたす後天性疾患である。主体となる血小板破壊機序は血小板に対する自己抗体を介した免疫反応による。抗血小板抗体が結合した血小板が脾臓などの網内系でFc γ レセプターを介してマクロファージに捕捉され、貪食される。抗血小板抗体により高頻度に認識される抗原はGPIIb-IIIaである。発症様式と経過から、6カ月以内に自然寛解する急性型と6カ月を超えて持続する慢性型に分類される(表1)。

頻度

わが国における発症数は年間500～2,000例、人口10万人当たりの有病率は10～15人程度である。急性型の多くは16歳未満で、慢性型はすべての年齢層にみられる。

診断のポイント

- ① 血小板減少単独で、末梢血塗抹標本で形態異常を認めない。
- ② 出血症状以外の症状や検査異常を欠く。
- ③ 小児では急に出現する出血症状を初発とするが、成人では無症状の場合も多い。

主要症状

唯一の症状は出血傾向だが、検診などで偶然に血小板減少を指摘される場合もある。皮下、歯肉、鼻粘膜、性器出血が4大症状である。点状または斑状の皮下出血が最も多く、粘膜出血はときに血尿、下血、吐血、喀血として現れる。高度の粘膜出血を認めるときは頭蓋内などの重篤な出血をきたす危険がある。若年女性では月経過多や鉄欠乏性貧血を高率に伴う。

★注意：関節内出血や血腫をみたらITPでなく血友病などの凝固異常を疑う。

表1 ITPの急性型と慢性型

	急性型	慢性型
好発年齢	2～5歳	20～40歳
男女比	1：1	1：2～4
好発する時期	冬～春	特になし
発症様式	急性の発症 発症時期が明確なことが多い	発症時期が不明確なことが多い 検診などでみつかることがあり
先行感染	80%で上気道炎や胃腸炎	通常はない
出血症状	強い	欠く場合もあり
自然寛解	6カ月以内に全例 慢性型に移行することあり(約20%)	<2%
予後	良好(死亡率は1%未満)	良好(ただし難治例では死亡率5～10%)

主要検査成績

末梢血検査

血小板単独の減少が基本だが、約30%で鉄欠乏による小球性低色素性貧血を伴う。末梢血塗抹で白血球、赤血球の形態異常を認めない。血小板数は標本上も激減し、大型血小板が散見される。

骨髓検査

有核細胞数は正常ないし過形成を示し、巨核球数も正常あるいは増加する。巨核球の著明な形態異常を認めず、血小板付着像を欠く場合が多い。顆粒球、赤芽球、リンパ球系細胞の形態に異常を認めない。

血小板関連免疫グロブリン

血小板関連IgG (PAIgG) のITPにおける検出感度は80~90%と高いが、他の血小板減少をきたす疾患でも上昇例が多く、診断に有用でない。一方、血小板に結合しうる血清中抗体である血小板結合性IgG (PBIgG) のITPでの陽性率は低い。

抗血小板膜糖タンパク特異抗体の検出法

GPIIb-IIIaなど血小板膜糖タンパクに対する特異自己抗体の検出法が数多く考案され、特にモノクローナル抗体を用いて血小板膜上の抗原-抗体複合体を検出する方法や抗体産生B細胞を検出する方法の有用性が報告されている。

血小板回転

アイソトープ標識血小板を用いた血小板寿命は著明に短縮し、血小板回転は亢進する。網状血小板は幼弱な血小板で、ITPでは血小板に占める網状血小板の比率が高くなる。トロンボポエチンは巨核球の増殖・分化を促進する因子で、その血中濃度は骨髓巨核球数を反映する。巨核球低形成を呈する再生不良性貧血などでトロンボポエチンは著増し、ITPでは正常あるいは軽度の上昇にとどまる。

血清学的検査

抗核抗体は約半数で陽性となるが、抗体価は低い(160倍以下)。ときに抗SSA抗体、

抗甲状腺ペルオキシダーゼ抗体、間接クームス試験、抗リン脂質抗体陽性となるが、抗Sm, U1RNP, SS-B, 二本鎖DNA抗体が陽性であれば、むしろ膠原病に伴う血小板減少を考える。

診断

診断は主に血小板減少をきたす他疾患の除外による。骨髓検査は他疾患の除外が目的であることから、ITPとして非典型的な臨床所見がある場合は、骨髓異形成症候群の好発年齢である60歳以上、脾摘を考慮する場合を除いて診断に必須でない。

鑑別すべき疾患

血小板数に比して出血症状が欠如する際には、血小板数がみかけ上少なくカウントされる偽性血小板減少を除外する必要がある。抗凝固薬としてクエン酸ナトリウムを用いることで正確にカウントできることが多い。リンパ系造血器腫瘍や全身性エリテマトーデスなどの膠原病に伴う血小板減少症では体重減少、発熱などの全身症状や検査所見の異常を有する。血小板以外の血球細胞に形態や数の異常があれば、骨髓異形成症候群や再生不良性貧血の除外のため骨髓検査が必要である。血小板減少との関連が疑われる薬剤は中止または他剤へ変更する。先天性血小板減少症を除外するために家族歴も重要である。ヒト免疫不全ウイルス感染者でもITP類似の血小板減少をきたす。

治療

基本方針

診断されればすぐに治療を開始するのではなく、血小板数、出血症状、ライフスタイルや合併症を考慮して治療方針を決める。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、治療による効果と副作用のバランスを考える。最近 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 陽性例における

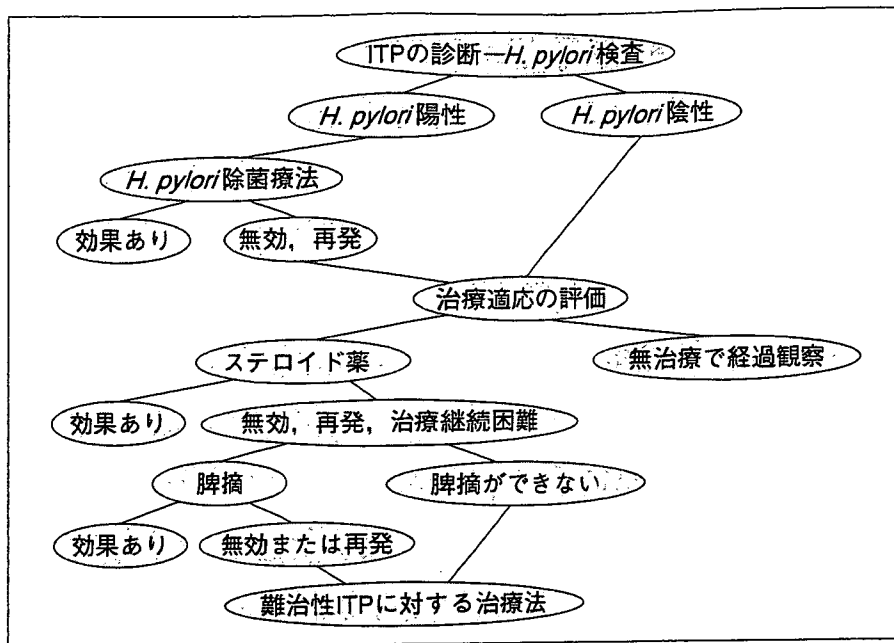


図1 ITPの新しい治療指針案(試案)

除菌療法の有効性が示され、治療指針が大きく変わった(図1)。全例で診断と同時に *H. pylori* を検索し陽性例ではまず除菌療法を行う。*H. pylori* 除菌無効例と *H. pylori* 陰性例では、表2に示す指針に従って治療適応を決める。原則的に血小板数5万/ μ lを超える場合は経過観察する。

治療法の実際

● *H. pylori* 除菌療法

H. pylori 陽性ITPの約半数で除菌により血小板が増加し、反応例の多くで長期の寛解が得られる。通常はプロトンポンプ阻害薬、アモキシシリン、クラリスロマイシンの3剤を7日間服用する。

● 標準的治療法

治療適応例では、まずステロイド療法を行う。プレドニゾン換算0.5~1mg/kg/日を2~4週間用いる。約80%の症例で血小板が増えるが、多くは減量に伴い減少し、本剤を中止または少量(10mg/日以下)で血小板が安定する症例は20~30%にすぎない。メチルプレドニゾン0.5~1g/日を3日間点滴静注するパルス療法も行われる。

ステロイド薬投与にもかかわらず血小板数3万/ μ l以下で出血症状を伴う場合は脾摘の

適応である。脾摘の有効率が高い群として若年者、発症から5年以内、免疫グロブリン大量静注療法(intra-venous immunoglobulin; IVIG)有効例が報告されている。診断時に慢性、急性の鑑別が困難なため、原則的に脾摘は発症6カ月以降に行う。脾摘直後には90%以上の症例で血小板が増加するが、永続的寛解率は約60%にとどまる。脾摘後の再発は通常1年以内に起こり、半数は副脾が原因である。副脾の摘出により高率に再寛解が得られる。最近では侵襲が少なく短期間の入院ですむ腹腔鏡下脾摘術が広く行われている。脾摘後のリスクとして敗血症と門脈血栓症が挙げられる。

● 難治例に対する治療法

ステロイド薬、脾摘で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例と呼び、慢性ITPの約10%を占める。非難治例に比べて出血および治療による副作用のため予後が悪い。難治例に対する治療として各種免疫抑制薬、ダナゾールなどが用いられるが、有効例は存在するものの寛解率は低い。最近、悪性リンパ腫治療薬の抗CD20モノクローナル抗体(リツキシマブ)の有効性も示されている。

表2 血小板数と出血症状に基づいた慢性ITPの初回治療方針

	血小板数 (μl)		
	<2万	2~3万	3~5万
出血傾向なし	ステロイド薬	経過観察	経過観察
紫斑のみ	ステロイド薬	ステロイド薬	経過観察
粘膜出血 (口腔, 鼻腔, 性器)	入院管理 ステロイド薬 (パルス療法も含む) IVIG	ステロイド薬 (パルス療法も含む)	ステロイド薬
重篤な出血* (頭蓋内, 消化管)	入院管理 ステロイド薬 (パルス療法も含む) IVIG	入院管理 ステロイド薬 (パルス療法も含む) IVIG	入院管理 ステロイド薬 (パルス療法も含む) IVIG

IVIG = 免疫グロブリン大量静注療法
*必要に応じて血小板輸血を行う。

●緊急時, 外科的処置時の治療

脳, 消化管など主要臓器での出血, 血小板数 $5\text{万}/\mu\text{l}$ 以下での手術や分娩時には, IVIGとして完全分子型免疫グロブリン $400\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ を5日間あるいは $1\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を2日間ゆっくりに点滴静注する。80%以上の症例で血小板数が $5\text{万}/\mu\text{l}$ を超えるが, 2~6週で前値に戻る。血小板輸血は血小板数が増加しなくても止血効果を認める。

●妊娠合併例に対する治療

妊娠中は原則的にステロイド薬とIVIGで対処する。母体の抗血小板抗体は胎盤を通過して胎児にも血小板減少をきたすため, 分娩時に胎児の出血(特に頭蓋内出血)に注意する。新生児の血小板数は通常3カ月以内に正常に戻るが, 血小板数 $2\text{万}/\mu\text{l}$ 以下あるいは出血症状が顕著であればIVIGで対処する。

●小児の急性ITP

小児ITPは治療に関係なく6カ月以内に約80%が完全寛解となる。血小板減少の出現は急激, 高度で, ときに消化管出血, 血尿が

初発症状となる。死亡率は0.5%以下と低い。重篤な出血の危険は発症1~2週間が高いため, この期間は入院安静が必要である。血小板数 $1\text{万}/\mu\text{l}$ 未満または $2\text{万}/\mu\text{l}$ 未満で粘膜出血を伴う場合はIVIGまたはステロイド薬を短期間用いる。

日常生活指導

血小板数 $5\text{万}/\mu\text{l}$ 以下あるいは出血症状を有する場合は, 出血を助長する激しい運動やアスピリンなどのNSAIDsの服用を避けるように指導する。

予後

出血による死亡率は2%以下で, 生命予後は悪くない。しかし, 難治例に限ると出血に加えて治療による影響もあり, 死亡率が10%近くまで上昇する。特に高齢者ほど予後が悪い。出血による死因の多くは頭蓋内出血である。

参考文献

1) 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.
2) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002; 346: 995-1008.

特異的検査法に基づくITP診断

Diagnosis of ITP based on disease-specific laboratory tests

Key point

- 抗血小板特異抗体およびそれを産生する末梢血 B 細胞の検出は ITP 診断に有用である。
- 血小板回転を反映する簡便な指標である網状血小板比率、血漿 TPO 濃度の測定は ITP 診断に有用である。
- 抗血小板抗体、血小板回転を評価する臨床検査を導入することで、ITP を積極的に診断する基準の作成が可能である。

ITP診断の現状と問題点

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⁾。ITP は単一の病因により規定された疾患概念ではないが、血小板に対する自己抗体により誘発される自己免疫疾患と考えられている。抗血小板抗体は血小板膜表面に結合し、Fcγ受容体を介した網内系マクロファージによる血小板の貪食・破壊を誘導する。

ITP の診断には 1990 年に厚生省(当時)研究班により作成された診断基準が広く用いられている。この基準では出血症状と血小板減少があり、末梢血、骨髓、血小板結合性免疫グロブリン 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う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²⁾。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、血小板減少をきたすすべての疾患の除外は現実的に困難で、そのためには多数の検査を必要とすることから時間・費用を要し、患者に対する侵襲も増す。この問題点は、ITP に特異的な臨床項目を診断基準に導入することで解決可能と考えられる。

抗血小板自己抗体の検出法

ITP ではその病態から抗血小板自己抗体の存在が疾患を特徴づける標識となる。抗血小板抗体の標的抗原として GP IIb/IIIa, GP I b/IX, GP I a/IIa など各種血小板膜糖蛋白が同定されており、とくに抗 GP IIb/IIIa 抗体の頻度が高い(陽性頻度は 90%以上)³⁾。ただし、抗血小板抗体の標準的な臨床検査法はいまだ確立していない。抗血小板抗体検出を目的として、従来は 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⁴⁾。PAIgG は GP IIb/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している IgG 成分も同時に検出してしまうことがその原因である。

そこで、血小板に対する自己抗体に選択性の高い手法として、GP IIb/IIIa など血小板膜糖蛋白に対する自己抗体の検出法が数多く考案されてきた。とく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⁵⁾。

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あるい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あげられている。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 は感度 78%、特異度 19%であったのに対して、血小板関連抗 GP IIb/IIIa 抗体を検出する MAIPA は感度 39%、特異度 91%であった⁶⁾。同時に血小板関連抗 GP I b/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ことで検出感度を改善できることが示された。ただし、用い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、この手法が普及されるには標準化が必須である。現時点で antigen-capture assay は研究室レベルでしか行われていない。本法の普及を妨げているおもな理由は、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、血小板の分離・溶解など操作が煩雑なことである。今後、本検出法を臨床に導入するためには汎用性のあるキットの開発が必要である。

ITP における抗血小板抗体のほとんどは流血中で血小板に結合した形で存在する。したがって、血清や血

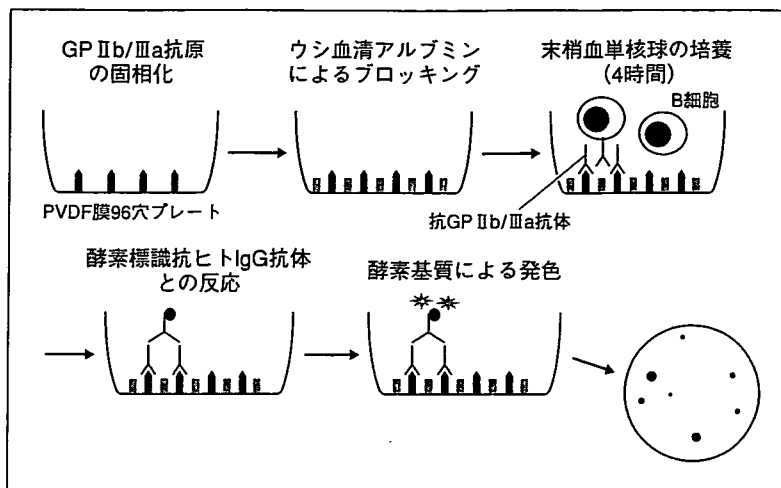


図 1 抗GP IIb/IIIa抗体産生B細胞を検出するアッセイ法の原理
PVDF膜96穴プレート上に精製GP IIb/IIIa抗原を固相化し、ウシ血清アルブミンでブロックする。その後に膜上で患者末梢血から分離した単核球を4時間培養する。その間にB細胞から分泌された抗GP IIb/IIIa抗体を酵素標識抗ヒトIgG抗体、酵素基質によりスポットとして検出する。

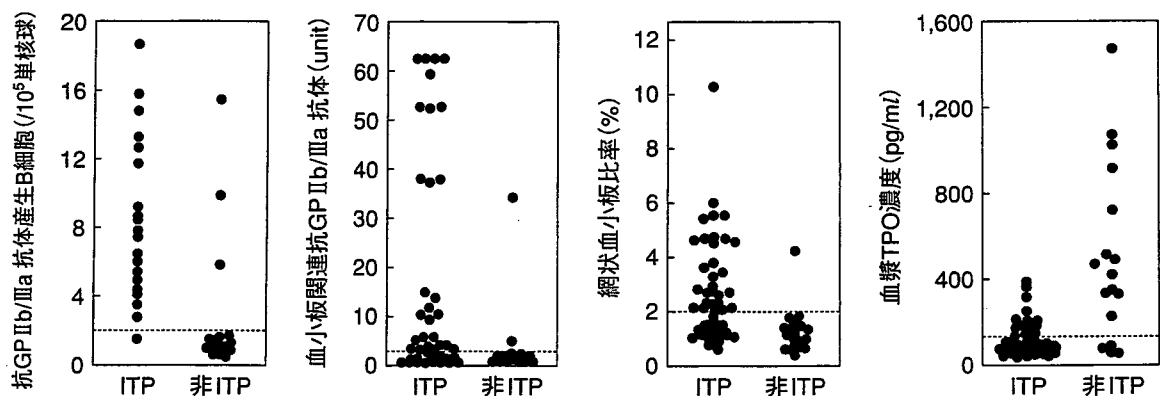


図 2 血小板減少のため受診した症例における最終診断と初診時のITP特異的検査結果

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ITP 46例、非ITP(骨髓異形成症候群、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GP IIb/IIIa抗体産生B細胞、血小板関連抗GP IIb/IIIa抗体、網状血小板比率、血漿TPO濃度を比較した(すべて $p < 0.001$)。

漿を検体として用いた検出法では病態と関連する抗血小板抗体の検出はできない。この点を解消するため、著者らは抗血小板抗体ではなく、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⁷⁾。この手法はenzyme-linked immunospot (ELISPOT)法の原理を用いている(図1)。患者末梢血から分離した単核球をGP IIb/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GP IIb/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GP IIb/IIIa抗体産生B細胞を調べたところ、抗GP IIb/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GP IIb/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、近日中に検査センターでの測定が可能となる予定である。

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髓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⁸⁾。網状血小板は幼弱な血小板で

表 1 ITPの診断基準案

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

慢性ITPの診断には上記の4項目すべてを満たすこと。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。

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、flow cytometry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であるが、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働き、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濃度はおも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濃度は骨髓での血小板産生をある程度反映し、骨髓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は上昇し、ITP患者では正常あるいは軽度の上昇を示す。

ITPの新しい診断基準作成の試み

上述したとおり、近年ITPにある程度の特異性をもつ臨床検査法として抗血小板抗体(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)が報告されてきた。そこで、これら検査法のITP診断における有用性を調べるため、血小板減少のため受診した

62例を対象とした前向き調査を行った⁹⁾。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、6カ月以降の最終診断(ITP、骨髓異形成症候群などの非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の最終診断と強く関連した。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。表1に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示す。今後、この試案をもとにITPを積極的に診断する新しい基準作成をめざしている。

文献

- 1) Cines, D. B. et al. : *N. Engl. J. Med.*, **346** : 995-1008, 2002.
- 2) George, J. N. et al. : *Blood*, **88** : 3-40, 1996.
- 3) McMillan, R. : *Semin. Haematol.*, **37** : 239-248, 2000.
- 4) Chong, B. H. et al. : *Semin. Haematol.*, **37** : 249-260, 2000.
- 5) Keifel, V. et al. : *Blood*, **70** : 1722-1726, 1987.
- 6) Warner, M. N. et al. : *Br. J. Haematol.*, **104** : 442-447, 1999.
- 7) Kuwana, M. et al. : *Am. J. Med.*, **114** : 322-325, 2003.
- 8) Kurata, Y. et al. : *Am. J. Clin. Pathol.*, **115** : 656-664, 2001.
- 9) Kuwana, M. et al. : *Am. J. Med.*, 2005. (in press)

* * *

はじめに

血小板の量的異常は様々な疾患に伴って生じる(表 2-16)。血小板数の減少は出血傾向, 増加は血栓症をきたす。本稿では, それぞれの代表的な疾患として特発性血小板減少性紫斑病と本態性血小板血症について疾患概念, 病態, 診断, 治療について最新の動向を含めて概説する。

A. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)

■ 1. 疾患概念と分類

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る¹⁾。主体となる血小板破壊の機序は, おもに血小板に対する自己抗体を介した免疫反応による。本邦における発症数は年間

2000 例程度, 人口 10 万当たりの有病率は 10~15 名程度と推測される。本症患者の出血による死亡率は 2% 以下で, 決して生命予後の悪い疾病ではない²⁾。しかし, 標準的治療に反応しない難治例に限定すると, 出血に加えて治療による影響もあり死亡率が 10% 近くまで上昇する。

ITP はその発症様式と経過から, 6 カ月以内に自然寛解する急性型と 6 カ月を越えて血小板減少が持続する慢性型に分類される(表 2-17)。急性型の多くは小児例で先行感染を認めることが多い。一方, 慢性 ITP は成人女性に好発し, 自然寛解はまれである。

■ 2. 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が結合してオプソニン化された血小板が網内系で Fc 受容体を介してマクロファージなどの

表 2-16 血小板の量的異常の成因と代表的な疾患

血小板数減少

1. 血小板産生障害

- a) 巨核球低形成—再生不良性貧血, 骨髄障害(化学療法薬, 放射線, 免疫機序などによる), 先天性(トロンボポエチン受容体異常など)
- b) 無効血小板産生—巨赤芽球性貧血, 先天性(May-Hegglin 異常など)

2. 末梢での血小板の消費・破壊

- a) 免疫学的機序—特発性血小板減少性紫斑病, 膠原病や HIV に伴う血小板減少
- b) 消費の亢進—播種性血管内凝固症, 血栓性血小板減少性紫斑病
- c) 機械的傷害—人工弁, 人工血管

3. 血小板分布異常—脾腫を伴う疾患(肝硬変など)

4. 循環血液希釈—保存血の大量輸血

血小板数増加

1. 骨髄増殖性疾患—本態性血小板血症, 真性多血症, 慢性骨髄性白血病

2. 反応性(二次性)

- a) 慢性炎症性疾患—関節リウマチ, リウマチ性多発筋痛症, 血管炎症候群
- b) 慢性感染症—結核, 細菌性心内膜炎
- c) 血小板減少状態からの回復期—化学療法後, 放射線治療後, 摘脾後

3. 先天性—トロンボポエチン遺伝子異常による発現亢進

表 2-17 ITP の急性型と慢性型

	急性型	慢性型
好発年齢	2～5 歳	20～40 歳
男女比	1：1	1：2～4
好発する時期	冬～春	特になし
発症様式	急性の発症 発症時期が明確なことが多い	発症時期が不明確なことが多い 検診などでみつかることあり
先行感染	80%で上気道炎や胃腸炎	通常はない
出血症状	強い	欠く場合もあり
自然寛解	6 カ月以内に全例 慢性型に移行することあり(約 20%)	<2%
予後	良好 (死亡率は 1%未満)	良好 (ただし難治例では死亡率 5～10%)

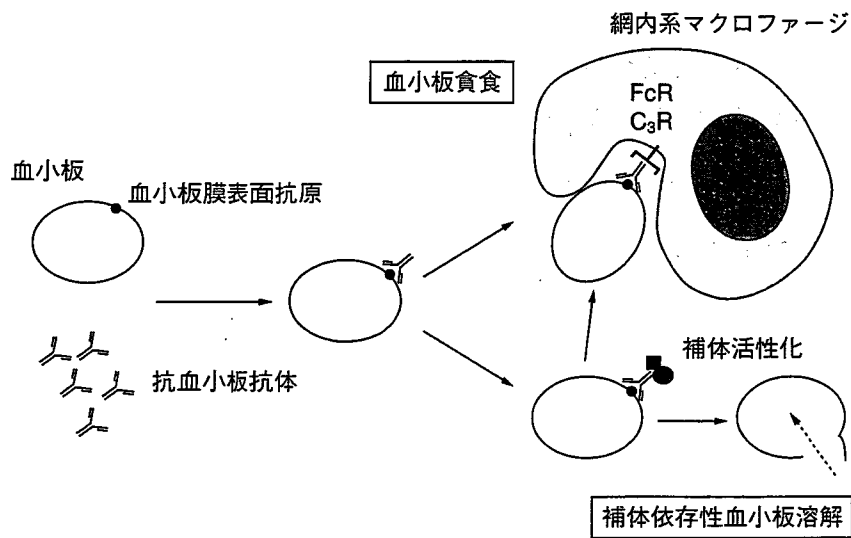


図 2-81 ITP における血小板破壊機序

貪食細胞に捕捉され、貪食、破壊される病態である(図 2-81)¹⁾。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 患者では脾臓がおもな血小板破壊場所であるとともに血小板抗体産生部位であり³⁾、その摘出が ITP に対して有効率の高い治療であることが実証されている。一方、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ことから、これら自己抗体は巨核球の成熟障害や細胞障害を誘導し、血小板産生も抑制する⁴⁾。急性 ITP では感染症回復期に形成された免疫複合体による血小板の非特異的な破壊、ウイルスによる直接的な巨核球傷害の関与も示されている。

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⁵⁾。特に抗 GPIIb/IIIa 抗体の頻度が高く、感度の高い検出法を用いると 90%以上の患者で陽性となる⁶⁾。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⁷⁾。抗血小板抗体の産生機構については、自己反応性 CD4⁺T 細胞の役割が詳細に検討されている^{8,9)}。それによると、GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞は抗原提示細胞により提示された GPIIb/IIIa 由来のペプチドを認識することで活性化され、サイトカインや CD40 リガンドなどの発現を介して特異的 B 細胞からの抗血小板抗体産生を誘導する(図 2-82)。自己抗原である GP

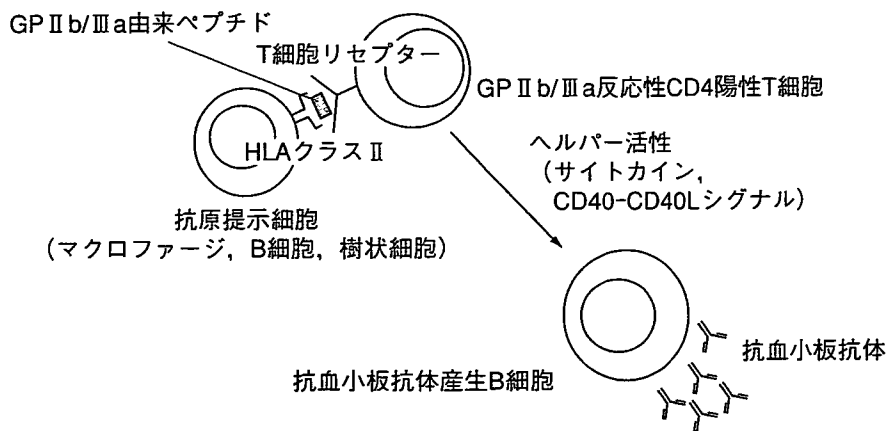


図 2-82 抗血小板自己抗体の産生機構

IIb/IIIa に対する免疫寛容が破綻するメカニズムとして、化学物質などによる GPIIb/IIIa 自身の分子修飾や交差反応性 B 細胞による自己抗原の濃縮などの機序を介した GPIIb/IIIa 反応性 T 細胞の活性化などが想定されている¹⁰⁾。

図 3. 臨床症状および診断

主要症状は紫斑を主体とした皮下出血だが、健康診断などにより偶然に血小板減少を指摘される無症候例が増えている。粘膜出血は血尿、消化管出血、吐血、喀血、網膜出血として現れる場合があり、高度の粘膜出血を認める際には頭蓋内などの重篤な出血をきたす危険があるため早急な対処が要求される。若年女性では月経過多とそれに基づく鉄欠乏性貧血が唯一の症状の場合もある。致死的な出血は頭蓋内出血がほとんどである。

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。特に、同様の免疫学的機序により血小板減少をきたす全身性エリテマトーデスをはじめとした膠原病、リンパ系腫瘍、HIV 感染との鑑別は重要である。欧米で作成されたガイドラインに従うと、病歴、身体所見、末梢血塗抹標本で ITP に矛盾せず、他の疾患を疑う所見がなければ ITP と診断してよい^{2,11)}。ITP として非典型的な臨床所見がある場合、骨髓異形成症候群の好発年齢である 60 歳以上、摘脾を考慮する場合を除いて骨髓検査は不要とされる。ITP 患者の骨髓では巨核球数は正常あるいは増加し、血小板付着像を欠くことが多いが、これら所見は確かに ITP に特異的でない。骨髓検査の必要性

に関して議論があるが、ITP として疑わしい点があしでもあれば他疾患除外を目的とした骨髓検査を行うべきと思われる。一方、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 の診断のために不要な検査とされている^{2,11)}。測定原理上、PAIgG は抗血小板抗体のみ検出しているのではない。そのため、ITP における検出感度は 80~90% と高いが、他の血小板減少症でも上昇することが多いため特異性は低い¹²⁾。そこで、以下に示す ITP に特異的な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。

a) 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^{6,13,14)}。特にモノクローナル抗体を用いた手法が広く行われている。この検出法の特異性は高いが、検出感度が 30~60% と低い欠点がある。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あげられている。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はなく血小板を用いる必要があり、操作が煩雑となる。それらの欠点を補うため、GPIIb/IIIa に対する特異抗体を産生する末梢血 B 細胞を直接検出する方法が考案され、感度、特異性ともに良好な結果が報告されている¹⁵⁾。

b) 血小板回転

ITP の多くでは血小板寿命が著明に短縮し(正常

の8~10日に対して1日以内), 血小板回転が亢進している。従来のアイソトープで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かった。そこで, 血小板回転を反映する簡便な方法として網状血小板と血中トロンボポエチン(TPO)の ITP 診断における有用性が検討されてきた^{16,17)}。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, TPO 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上昇し, ITP では正常あるいは軽度の上昇にとどまる。そのため, TPO の著増があれば ITP を除外できる。

■ 4. 治療

ITP 治療の基本方針は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, 常に治療による効果と副作用のバランスを考える。血小板数が5万/ μ l以上で出血傾向をほとんど認めないことから, そのレベルを最低限の目標とする。血小板数と出血症状の程度に基づいて初回治療方針を決定し, 血小板数が5万/ μ l以上であれば経過観察とする^{2,11)}。主要臓器(脳, 消化管など)での出血や血小板数5万/ μ l以下での手術や分娩時には, 血小板輸血や免疫グロブリン大量静注療法(IVIG)を行う。

治療の適応となる症例では, まず副腎皮質ステロイド, 次いで摘脾による標準的治療を行う(図2-83)。副腎皮質ステロイド療法により約80%の症例で血小板数が増加するが, 多くは減量に伴い血小板数が減少し, 本剤を中止または少量で維持できる症例は20~30%にすぎない。副腎皮質ステロイドの効果が不十分な症例では摘脾を考慮する。術前に摘脾の効果を予測することは困難だが, 有効率が高い群として若年者, 発症5年以内の早期例, IVIG 有効例¹⁸⁾が報告されている。開腹摘脾術は安全だが, 最近では侵襲が少なく短期間の入院ですむ腹腔鏡下摘脾術が広く行われている。摘脾直後には90%以上の症例で血小板数が増加し, 1~2週間後にピークとなる。その後徐々に血小板数が減少する例があり, 永続的寛解率は50~60%にとどまる。摘脾後の再発時

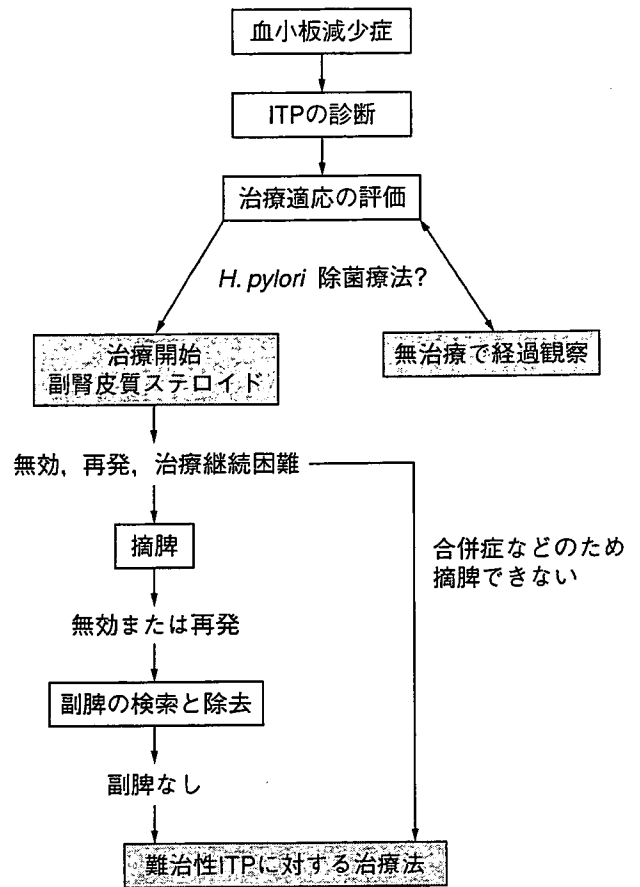


図 2-83 慢性 ITP の治療指針

にはシンチグラムにより副脾を検索する。約半数で副脾が検出され, 副脾摘出により高率に寛解が得られる。

副腎皮質ステロイド, 摘脾で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, 慢性 ITP の 10%程度を占める^{2,11)}。難治例に対して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はない¹⁾。難治例に対する新しい治療法として以下が目ざされている。

a) 分子標的療法

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治療法が開発され, ある程度の臨床効果が報告されている。rituximab は元来 B 細胞系悪性リンパ腫に対する治療法として開発された成熟 B 細胞に発現する CD20 を標的としたキメラ型モノクローナル抗体である。本抗体が結合した B 細胞は生体内で貪食細胞により除去されることから, 効果発現機序として抗血小板抗体産生 B 細胞の除去, IVIG と

同様の網内系機能抑制が考えられている¹⁹⁾。約半数の症例で血小板数が増加し、そのうち半数では長期にわたる寛解が得られる¹⁹⁾。ただし、本剤投与後に末梢血 B 細胞数が著減することから、感染症に対する注意が必要である。一方、活性化 T 細胞に一過性に発現される CD40 リガンドを標的としたヒト化モノクローナル抗体も検討されている²⁰⁾。CD40 リガンドは B 細胞の分化、増殖や T 細胞プライミングなど獲得免疫応答に重要な役割をはたすことから、それを標的とすることで自己反応性 T・B 細胞の不活化を期待する。

b) *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 除菌療法

H. pylori は胃粘膜に持続感染するグラム陰性桿菌で、消化性潰瘍、慢性萎縮性胃炎などの原因となる。Gasbarrini らは *H. pylori* 陽性 ITP 11 例に除菌療法を行い、除菌に成功した 8 例全例で血小板数が増加したことを報告した²¹⁾。この報告は世界中で追試され、*H. pylori* 陽性 ITP 患者の約半数で除菌により血小板数が増加することが確認されている²²⁾。反応例の多くは長期にわたって寛解が維持される。本療法が ITP に効く機序は明らかでないが、*H. pylori* の菌体成分と血小板膜抗原の交差反応などが想定されている²³⁾。ランソプラゾール、アモキシシリン、クラリスロマイシンを 7 日間服用するのみで 90% 近くで除菌できる。*H. pylori* 陽性例に対する有効率と安全性の高さは副腎皮質ステロイドや摘脾に比べて遜色なく、画期的な治療法である。特に我が国では一般人口における *H. pylori* 保菌率が高いことから、除菌療法は難治例に対する治療法でなく、*H. pylori* 陽性 ITP 症例に対して最初に行うべき治療との意見もある(図 2-83)。今後、ITP 治療における *H. pylori* 除菌療法の位置づけの確立が望まれる。

B. 本態性血小板血症(ET)

■ 1. 疾患概念と病態

慢性骨髄性白血病(CML)や骨髄線維症とともに慢性骨髄増殖性疾患に分類される疾患である。多能性幹細胞レベルで生じた clonal hemopathy と考えられてきたが、最近では巨核球系細胞の polyclonal な増

殖を示唆する成績が増えている²⁴⁾。巨核球系細胞の自律的な増殖の機序として、前駆細胞レベルでの TPO などの分化・増殖因子に対する感受性の亢進²⁵⁾、TGF- β を介した巨核球への分化抑制機構の破壊などが提唱されている²⁶⁾。

□ 2. 臨床症状および診断

生理的または病的に血小板数が 40 万/ μ l 以上となる場合を血小板増多症とよぶ。血小板増多症は、ET を中心とした骨髄増殖性疾患、反応性(二次性)、先天性の 3 種に分類されるが(表 2-16)、原因として反応性が 80% 近くを占め、ET は 20% 程度にすぎない²⁷⁾。

本症の診断は他の骨髄増殖性疾患と反応性血小板増多症の除外が基本である²⁸⁾。表 2-18 に反応性血小板増多症と ET の臨床所見の比較を示す²⁹⁾。ET では血小板数が 100 万/ μ l を超えることが多く、血小板の径、容積ともに大小不同が大きく、血小板分布幅も大きい。血小板機能にも異常が認められ、出血時間は多くの例で延長する。血小板の自然凝集がしばしば観察されるが、一方で α アドレナリン受容体を欠如するためエピネフリンに対して全く反応しない特徴を有する。ET では血栓症と出血がよくみられるが、反応性血小板増多症で血栓症をきたすことはまれである。出血傾向は血小板の機能異常のためであり、反応性ではみられない。血中 TPO の上昇を伴うことが多く³⁰⁾、血小板や巨核球における TPO 受容体(c-Mpl)の発現低下と TPO に対する感受性亢進がみられる。

□ 3. 治療

ET は骨髄増殖性疾患の中でも比較的予後良好であり、急性転化もまれである(3%以下)。特に 40 歳以下の若年者で無症状の場合は予後がよいことから無治療で経過をみる。治療の適応となる因子として、高齢者、血栓または出血症状の存在、血小板数 150 万/ μ l 以上が知られている³¹⁾。さらに、凝固因子異常などの他の血栓素因や冠動脈疾患の危険因子が存在する場合も治療を考慮する。

治療の基本は血小板数のコントロールと血栓症予防の 2 点である。血小板数のコントロールを目的と

表 2-18 反応性血小板増多症と本態性血小板血症の比較

	反応性血小板増多症	本態性血小板血症
血小板数	40~100 万/ μ l	100 万/ μ l を超えることが多い
血小板の形態	正常~やや小型	著しい大小不同
出血時間	正常	延長のことが多い
血小板凝集検査		
自然凝集	ない	しばしばあり
エピネフリンによる凝集	正常	多くで欠如
出血および血栓症	まれ	しばしばあり
脾腫	通常はない	しばしばあり
血中 TPO 濃度	正常~軽度増加	多くで増加
血小板における TPO 受容体の発現	正常	低下

した骨髓抑制療法として以前はブスルファンやメルファランなどのアルキル化薬が用いられてきたが、二次性悪性腫瘍を誘発する危険性が指摘されたため使用頻度は減っている。代わりに代謝拮抗薬のヒドロキシウレアが頻用されている。IFN α の高い有効性も示されている³²⁾。血栓症の既往あるいは血小板自然凝集が著明な例ではアスピリンなどの抗血小板剤を使用する。

C. 最新の動向・展望

ITP, ET を含めた血小板の量的異常は頻度の高い病態であり、その迅速な診断と病態に基づいた治療の開発が臨床的に重要な課題である。近年、従来の知見を集積することで診断や治療に関するガイドラインが欧米で作成され、診療に大きく貢献した。ただし、病因、病態に関するブレイクスルーはなく、難治性病態に対する治療が大きな課題として残っている。今後のさらなる基礎研究による病態解明が進み、その成果が臨床へと還元されることが期待される。

●文献

- 1) Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002; 346: 995-1008.
- 2) 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.
- 3) 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: 3675-82.
- 4) 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: 1364-9.
- 5) McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2000; 37: 239-48.
- 6) He R, Reid DM, Jones CE, et al. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1994; 83: 1024-32.
- 7) McMillan R, Bowditch RD, Tani P, et al. A non-thrombocytopenic bleeding disorder due to an IgG4- κ anti-GP IIb/IIIa autoantibody. *Br J Haematol.* 1996; 95: 747-9.
- 8) 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: 1393-402.
- 9) 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: 130-9.
- 10) 桑名正隆. 特発性血小板減少性紫斑病の分子病態. 炎症と免疫. 2004; 12: 16-23.
- 11) British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol.* 2003; 120: 574-96.

- 12) Chong BH, Keng TB. Advances in the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2000; 37: 249-60.
- 13) Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, et al. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA); A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood.* 1987; 70: 1722-6.
- 14) Hürlimann-Forster M, Steiner B, von Felten A. Quantitation of platelet-specific autoantibodies in platelet eluates of ITP patients measured by a novel ELISA using the purified glycoprotein complexes GPIIb/IIIa and GPIb/IX as antigens. *Br J Haematol.* 1997; 98: 328-35.
- 15) 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: 322-5.
- 16) Koike Y, Yoneyama A, Shirai J, et al. Evaluation of thrombopoiesis in thrombocytopenic disorders by simultaneous measurement of reticulated platelets of whole blood and serum thrombopoietin concentrations. *Thromb Haemost.* 1998; 79: 1106-10.
- 17) Kurata Y, Hayashi S, Kiyoi T, et al. Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycolocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol.* 2001; 115: 656-64.
- 18) Law C, Marcaccio M, Tam P, et al. High-dose intravenous immune globulin and the response to splenectomy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1494-8.
- 19) 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: 232-9.
- 20) 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: 1229-36.
- 21) Gasbarrini A, Franceschi F, Tartaglione R, et al. Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1998; 352: 878.
- 22) 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: 162-8.
- 23) 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: 91-6.
- 24) Shih LY, Lin TL, Lai CL, et al. Predictive values of X-chromosome inactivation patterns and clinicohematologic parameters for vascular complications in female patients with essential thrombocythemia. *Blood.* 2002; 100: 1596-601.
- 25) Kawasaki H, Nakano T, Kohdera U, et al. Hypersensitivity of megakaryocyte progenitors to thrombopoietin in essential thrombocythemia. *Am J Hematol.* 2001; 68: 194-7.
- 26) Kuroda H, Matsunaga T, Terui T, et al. Decrease of Smad4 gene expression in patients with essential thrombocythemia may cause an escape from suppression of megakaryopoiesis by transforming growth factor- β 1. *Br J Haematol.* 2004; 124: 211-20.
- 27) Buss DH, Cashell AW, O'Connor ML, et al. Occurrence, etiology, and clinical significance of extreme thrombocytosis: a study of 280 cases. *Am J Med.* 1994; 96: 247-53.
- 28) Murphy S, Peterson P, Iland H, et al. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol.* 1997; 34: 29-39.
- 29) Schafer AI. Thrombocytosis and thrombocythemia. *Blood Rev.* 2001; 15: 159-66.
- 30) Wang JC, Chen C, Novetsky AD, et al. Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis. *Am J Med.* 1998; 104: 451-5.
- 31) Barbui T, Barosi G, Grossi A, et al. Practice guidelines for the therapy of essential thrombocythemia. A statement from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation. *Haematologica.* 2004; 89: 215-32.
- 32) Griesshammer M, Langer C. Pharmacotherapy of essential thrombocythemia: economic considerations. *Expert Opin Pharmacother.* 2003; 4: 1499-505.

〈桑名正隆〉



ELSEVIER

CLINICAL RESEARCH STUDY

Initial laboratory findings useful for predicting the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura

Masataka Kuwana, MD, PhD,^a Yuka Okazaki,^a Takashi Satoh, PhD,^a
Atsuko Asahi, MD,^a Mikio Kajihara, MD, PhD,^b Yasuo Ikeda, MD^b

^aInstitute for Advanced Medical Research, and

^bInternal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

KEYWORDS:

Autoantibody;
Diagnosis;
Idiopathic
thrombocytopenic
purpura;
Reticulated platelet;
Thrombopoietin

ABSTRACT

PURPOSE: To identify initial laboratory findings useful for the later diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) in adult patients with thrombocytopenia.

SUBJECTS AND METHODS: We studied 62 consecutive adult patients who had thrombocytopenia and whose peripheral blood film was normal except for thrombocytopenia at presentation. Each patient underwent physical examination and routine laboratory tests and was prospectively followed for 22.5 ± 9.8 months (range, 8 to 41 months). The frequency of antiglycoprotein (GP) IIb/IIIa antibody-producing B cells, the presence of platelet-associated and plasma anti-GPIIb/IIIa antibodies, the percentage of reticulated platelets, and the plasma thrombopoietin level were examined at the first visit. The final diagnosis was based on the clinical history, physical examination, complete blood test, bone marrow findings, and the clinical course at last observation.

RESULTS: Forty-six patients were diagnosed as having ITP and 16 as having another disorder, including myelodysplastic syndrome, aplastic anemia, amegakaryocytic thrombocytopenia, and reduced platelet production, with or without other cytopenias, and without dysplasia or evidence for destruction. Six initial laboratory findings discriminated ITP from other diagnoses: the absence of anemia, absence of leukocytopenia, increased frequency of anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells, increased platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibodies, elevated percentage of reticulated platelets, and a normal or slightly increased plasma thrombopoietin level. Three or more of these ITP-associated findings were found at presentation in 44 patients (96%) with thrombocytopenia later diagnosed as ITP, compared with only 1 patient (6%) whose disorder was non-ITP.

CONCLUSION: Initial laboratory findings can well predict future diagnosis of ITP. Further studies prospectively evaluating these same diagnostic criteria on another, independent set of patients are necessary.
© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Supported by a grant from the Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor and Nagao Memorial Fund.

Requests for reprints should be addressed to Masataka Kuwana, MD, PhD, Institute for Advanced Medical Research, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

E-mail address: kuwanam@sc.itc.keio.ac.jp.

Thrombocytopenia is a common clinical manifestation of many diseases and has various causes, including decreased bone marrow production, increased splenic sequestration, and accelerated destruction of platelets.¹ One of the major causes of accelerated platelet consumption is immune thrombocytopenia, in which platelet destruction is mediated by antiplatelet autoantibodies.^{1,2} This condition is seen in patients with various diseases, such as systemic lupus ery-

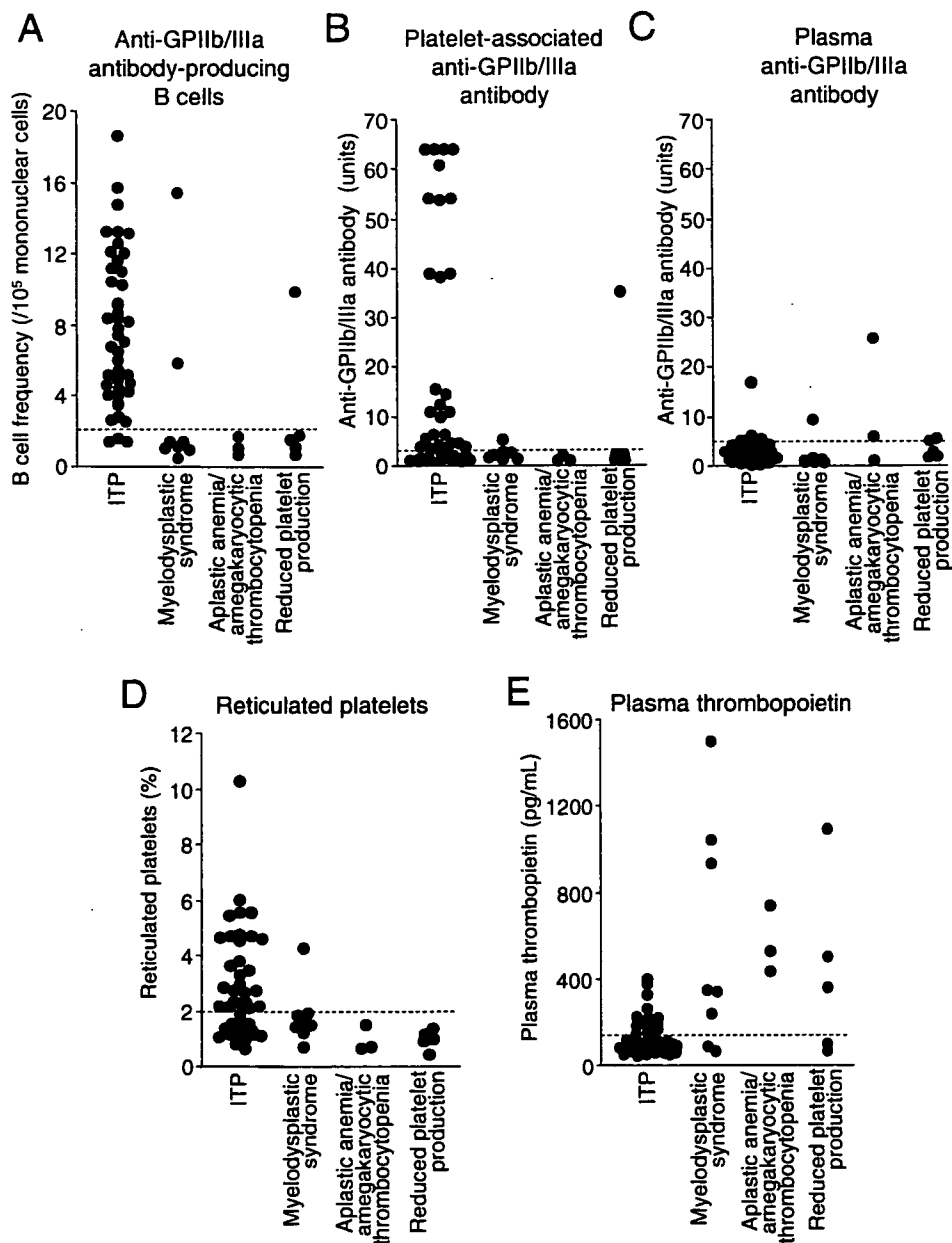


Figure 1 Anti-glycoprotein (GP) IIB/IIIa antibody-producing B cell frequency (A), platelet-associated anti-GP IIB/IIIa antibodies (B), plasma anti-GPIIb/IIIa antibodies (C), percentage of reticulated platelets (D), and plasma thrombopoietin level (E) in 62 patients with thrombocytopenia at first visit, grouped according to the final diagnosis. Forty-six patients received the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), 8 patients received the diagnosis of myelodysplastic syndrome, 3 patients received the diagnosis of aplastic anemia/amegakaryocytic thrombocytopenia, and 5 patients received the tentative diagnosis of reduced platelet production, with or without other cytopenias, without dysplasia or evidence for destruction. Broken lines in individual panels denote cut-off levels that were based on the results of healthy controls: anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cell frequency, $2.0/10^5$ peripheral blood mononuclear cells; platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibodies, 3.3 units; plasma anti-GPIIb/IIIa antibodies, 5.0 units; percentage of reticulated platelets, 2.0%; and plasma thrombopoietin level, 142 pg/mL.

thematosus and infection with the human immunodeficiency virus, and it can also occur without an underlying disease, in which case it is known as idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP).² Currently, the diagnosis of ITP is principally based on the exclusion of other possible concurrent causes of thrombocytopenia.^{2,3} In the guidelines proposed by the American Society of Hematology,⁴ the panel recommended that the diagnosis of ITP be made in patients who

have thrombocytopenia and who lack findings that are atypical for ITP or that suggest another diagnosis by history, physical examination, complete blood count, or peripheral blood film. No further laboratory tests are considered necessary. A similar guideline has been reported by the British Committee for Standards in Haematology General Haematology Task Force.⁵ However, there are potential problems with a diagnosis of exclusion, as noted by Chong and Keng⁶

Table 1 Demographic and laboratory findings at first visit of 46 patients later diagnosed as having ITP and 16 later diagnosed as having a non-ITP disorder

Demographic and laboratory findings	Number (%), Mean \pm SD		P value
	ITP (n = 46)	Non-ITP (n = 16)	
Women	33 (72)	8 (50)	0.2
Age at first visit (years)	50.2 \pm 18.2	59.0 \pm 17.4	0.09
Anemia	11 (24)	14 (88)	<0.001
Leukocyte count ($\times 10^9/L$)	5.3 \pm 1.5	4.0 \pm 0.9	<0.001
Platelet count ($\times 10^9/L$)	46 \pm 24	59 \pm 20	0.04
Anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells (/10 ⁵ peripheral blood mononuclear cells)	7.6 \pm 4.2	2.9 \pm 4.1	<0.001
Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibodies (units)	16.3 \pm 22.3	4.2 \pm 8.3	0.01
Plasma anti-GPIIb/IIIa antibodies (units)	2.9 \pm 2.5	4.1 \pm 5.9	0.8
Reticulated platelets (%)	2.8 \pm 1.9	1.4 \pm 0.9	0.001
Plasma thrombopoietin (pg/ml)	126 \pm 85	525 \pm 429	<0.001

GP = glycoprotein; ITP = idiopathic thrombocytopenic purpura.

and by McMillan et al,⁷ who suggested that the guideline's recommendations are not rigorous enough to make an accurate diagnosis of ITP. In addition, this diagnostic process largely relies on the experience of hematologists who specialize in this field, whereas many less experienced physicians see patients with decreased platelet counts. Therefore, other practical criteria are needed for diagnostic accuracy in clinical settings.

The presence of anti-platelet antibodies is a hallmark of the autoimmune nature of ITP.⁸ Anti-platelet antibodies in patients with ITP preferentially recognize platelet surface glycoproteins (GP), and the most common target is GPIIb/IIIa.⁸ Several antigen-specific assays are reported to be useful in identifying patients with ITP.^{7,9,10} We have also reported that an enzyme-linked immunospot assay for the detection of circulating B cells secreting anti-GPIIb/IIIa antibodies is a sensitive, specific, and convenient method for evaluating the presence or absence of autoantibody-mediated thrombocytopenia.¹¹ In addition, the percentage of reticulated platelets and the circulating thrombopoietin level are reported to be useful in discriminating a state of accelerated platelet destruction from that of decreased platelet production.¹²⁻¹⁵ To evaluate the potential usefulness of these laboratory tests for the diagnosis of ITP, we conducted a prospective study of patients who had thrombocytopenia without any other morphologic abnormalities in their peripheral blood film at first visit.

Subjects and methods

Subjects

We prospectively investigated all 62 adult patients who had thrombocytopenia, who first visited the outpatient clinic at Keio University Hospital during a 3-year period

(from January 2000 to December 2002), and who met the inclusion criteria: thrombocytopenia $<100 \times 10^9/L$; the absence of any other morphologic abnormalities in the peripheral blood film; exclusion of pseudothrombocytopenia; no clinical or serologic evidence of associated conditions or factors that can cause thrombocytopenia, such as systemic lupus erythematosus, infection with the human immunodeficiency virus, lymphoproliferative disorders, liver cirrhosis, or therapy with drugs such as heparin or quinidine; and no previous treatment with corticosteroids or splenectomy. In our outpatient clinic, antinuclear antibody testing was routinely performed on patients with thrombocytopenia, and serologic tests for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus were performed on patients who were judged to be at clinical risk. At the first visit, a detailed history and physical examination and routine laboratory tests, including complete blood count and peripheral blood film, were performed on all patients. At the same time, 20 mL of peripheral blood was obtained for the evaluation of the anti-GPIIb/IIIa antibody response and platelet turnover. A total of 10 demographic and laboratory findings were recorded for each patient at study entry. These included sex, age at first visit, erythrocyte count, leukocyte count, platelet count, anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cell frequency, platelet-associated and plasma anti-GPIIb/IIIa antibodies, percentage of reticulated platelets, and plasma thrombopoietin level. An erythrocyte count $<4.3 \times 10^{12}/L$ (men) or $<3.7 \times 10^{12}/L$ (women) was regarded as anemia. All blood samples were obtained after the patients gave written informed consent, as approved by the Keio University Institutional Review Board.

All patients underwent a bone marrow examination and were followed by one of the investigators for 22.5 ± 9.8 months (range, 8 to 41 months). The investigator was blinded to the results of the 5 specialized tests for evaluating

Table 2 Sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of initial laboratory findings associated with a later diagnosis of ITP

Laboratory findings	Number		Percentage (95% confidence interval)						
	ITP (n = 46)		Non-ITP (n = 16)		P value	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
	Positive	Negative	Positive	Negative					
Erythrocyte count $\geq 4.3 \times 10^{12}/L$ (male)	35	11	2	14	<0.001	76 (61-87)	88 (62-98)	95 (82-99)	56 (35-76)
Erythrocyte count $\geq 3.7 \times 10^{12}/L$ (female)	38	8	5	11	<0.001	83 (69-92)	69 (41-89)	88 (75-96)	58 (33-80)
Leukocyte count $\geq 4 \times 10^9/L$	43	3	3	13	<0.001	93 (82-99)	81 (54-96)	93 (82-99)	81 (54-96)
Anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells $\geq 2/10^5$ peripheral blood mononuclear cells	28	18	2	14	0.002	61 (45-75)	88 (62-98)	93 (78-99)	44 (26-62)
Platelet-associated anti-GPIIb/IIIa antibodies ≥ 3.3 units	27	19	1	15	<0.001	59 (43-73)	94 (70-100)	96 (82-100)	44 (27-62)
Percentage of reticulated platelets $\geq 2\%$	43	3	5	11	<0.001	93 (82-99)	69 (41-89)	90 (77-97)	79 (49-95)
Plasma thrombopoietin <300 pg/mL									

GP = glycoprotein; ITP = idiopathic thrombocytopenic purpura.

the anti-GPIIb/IIIa antibody response and platelet turnover, which were done for this study.

Diagnosis

A diagnosis of ITP was made on the basis of clinical history, physical examination, complete blood count, bone marrow findings, and the clinical course for at least 8 months; the diagnosis was not based on the results of any of the 5 specialized studies done as part of this study. All patients with ITP fulfilled the criteria advised by the American Society of Hematology Practice Guidelines⁴ and had chronic ITP based on thrombocytopenia persisting longer than 6 months. Diagnoses of myelodysplastic syndrome, aplastic anemia, and amegakaryocytic thrombocytopenia were based principally on bone marrow findings and cytogenetic analysis.¹⁶⁻¹⁸

Sample preparation

Platelet-rich plasma was prepared from heparinized venous blood by centrifugation at 120 g for 10 minutes, and the remaining cell component was subjected to a Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) density gradient centrifugation to isolate the peripheral blood mononuclear cells. After 10^6 platelets were used in the assay for reticulated platelets, the remaining platelet-rich plasma was spun to separate the platelets from platelet-poor plasma.

Evaluation of anti-GPIIb/IIIa antibody responses

B cells producing immunoglobulin G (IgG) anti-GPIIb/IIIa antibodies were detected using the enzyme-linked immunospot assay.^{11,19} Briefly, affinity-purified human GPIIb/IIIa was coated onto a polyvinylidene difluoride-bottomed 96-well microplate. Peripheral blood mononuclear cells were pipetted into the wells (10^5 /well) and cultured at 37°C for 4 hours. During this incubation period, secreted anti-GPIIb/IIIa antibodies were bound to the immobilized GPIIb/IIIa in the immediate vicinity of the secreting cells. After washing away the cells, the membranes were incubated with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG, and anti-GPIIb/IIIa antibodies bound to the membrane were visualized as spots by incubation with a substrate. Blue-purple spots that were round and had a dark center with slightly fuzzy edges were regarded as the sites of anti-GPIIb/IIIa antibody-secreting B cells. Each assay was conducted in 5 independent wells, and the results represent the mean of the 5 values. The frequency of circulating anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells was calculated as the number per 10^5 peripheral blood mononuclear cells, and an abnormal value was defined as ≥ 2.0 based on 5 standard deviations above the mean obtained from 52 healthy individuals.¹¹

IgG anti-GPIIb/IIIa antibodies in platelet eluates (from 5×10^7 platelets) and plasma were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using purified human GPIIb/IIIa as the