

② ITP の分類

	急性 ITP	慢性 ITP
好発年齢	幼児 (2~5 歳)	20~40 歳, 60~80 歳
性差	男 1 : 女 1	若年発症例では男 1 : 女 3 高齢者では性差なし
好発時期	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	発症時期が不明なことが多い 検診などで見つかることがある
先行事象	ウイルス感染 予防接種	なし
出血症状	強い	症状を欠く場合もある
経過	6 か月以内に寛解	慢性に経過し 6 か月以上

病態生理^{1,2)}

抗血小板自己抗体

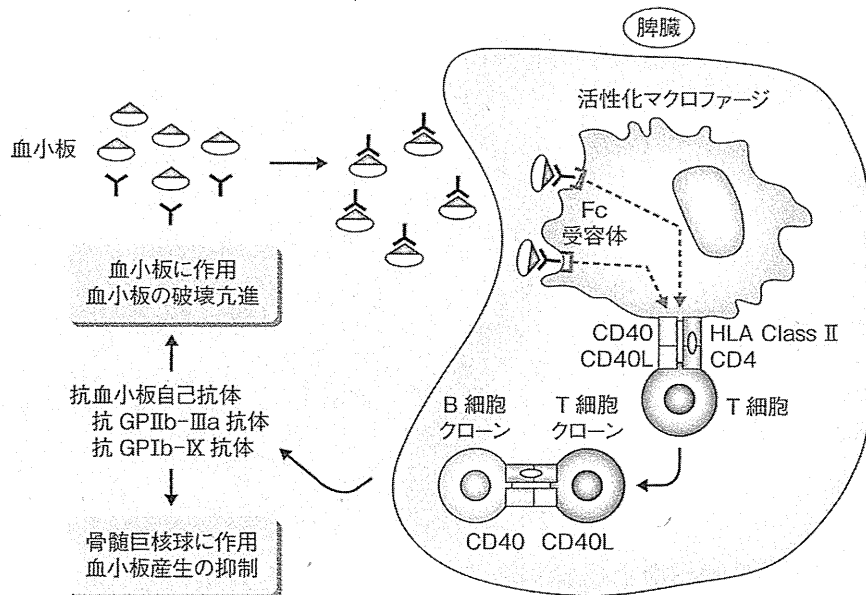
1951 年, Harrington らは彼自身も含め健常者に対し ITP 患者血漿の輸注試験を行い, ITP の原因が血漿中の血小板減少因子 (後に抗血小板自己抗体と判明) であることを初めて示した. 抗血小板自己抗体の主要な標的抗原に関しては, 1982 年の von Leeuwen らの論文に端を発し, 現在では血小板膜糖蛋白 (GP) IIb-IIIa および GPIb-IX が ITP の主要な標的抗原であることが明らかにされている.

血小板結合抗体 vs 血清抗体

Harrington らの成績は患者血清 (血漿) 抗体が重要であることを示唆しているものの, ITP においては血小板自己抗体の大部分がすでに患者血小板に結合しており, 血清中には親和性の弱い抗体しか存在していないと考えられる. 実際, 血清抗体よりも血小板結合抗体のほうが検出率は高く, さらに治療により血小板数が増加すると血小板結合抗体は減少するが, 血清中の抗体はほとんど変化しない. これらの成績から, 血清抗体よりも血小板結合抗体が密接に ITP の病態と関連しており, 血小板破壊に主要な役割を果たしていると考えられる.

血小板減少機序

ITP における血小板減少の主たる病態は, 血小板の破壊亢進である. 血小板の寿命は健常者において 8~10 日であるが, ITP 患者では血小板寿命は短縮しており, 血小板数が減少するに従い血小板寿命は著明に短縮する. 慢性 ITP では, 血小板は抗血小板自己抗体 (主に IgG) により感作されており, 自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓を中心とした網内系においてマクロファ-



③ ITP の病態生理

主に脾臓で産生された抗血小板自己抗体（主に IgG）は、血小板膜 GPIIb-IIIa あるいは GPIb-IX に結合し、感作血小板は主として脾臓内でマクロファージ上の Fc 受容体を介して捕捉され、破壊される。血小板を取り込んだマクロファージは、GPIIb-IIIa あるいは GPIb-IX の抗原ペプチドを HLA 抗原上に表示し、HLA Class II-CD4 に加え副刺激経路（ここでは CD40-CD40L を提示）などを介して自己反応性ヘルパー T 細胞を活性化し、さらには B 細胞を活性化し抗体産生を誘導する。一方では、これらの抗体は巨核球の成熟障害などを誘導し、血小板産生を抑制する。（富山佳昭, 臨床血液 2011⁴⁾より）

ジの Fc 受容体を介して捕捉され、破壊され血小板減少をきたす。抗血小板自己抗体の主要な標的抗原が GPIIb-IIIa および GPIb-IX であることはすでに述べたが、これらの標的抗原は抗原提示細胞であるマクロファージによりプロセッシングを受け、その HLA 上に表出され、自己反応性の CD4⁺T 細胞を活性化し、そのヘルパー活性により自己抗体産生 B 細胞を刺激し抗体産生を誘導する。このように ITP では、脾臓が主な血小板破壊部位であるとともに、血小板抗体産生部位でもある。

血小板破壊亢進に加え、ITP においては巨核球の成熟障害や細胞障害を生じており、血小板産生も抑制されていることが明らかにされている。血小板自己抗体が骨髓巨核球にも結合し、血小板の産生障害を引き起こしていると考えられる (④)⁴⁾。

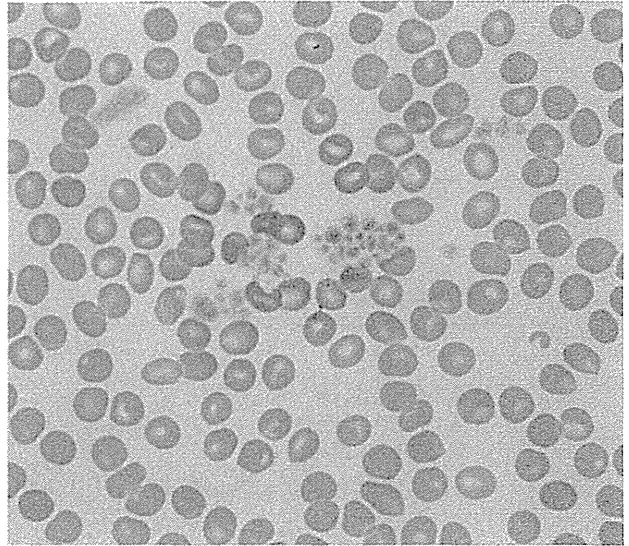
臨床症状

個人差はあるものの、一般的には血小板数が 5 万/ μ L 以上あれば出血傾向は明らかではなく、打撲時に四肢を中心に紫斑が出現する程度である。3 万~5 万/ μ L であれば易出血性を自覚することが多く、3 万/ μ L 未満であれば出血傾向が明らかとなる。症状は皮下出血、歯肉出血、鼻出血、性器出血など皮膚粘膜出血が主症状である。血小板数が 1 万/ μ L 未満となると血尿、消化管出血、吐血、

a

	血小板数
抗凝固薬(一)	22.6 万/ μ L
EDTA-2K	
採血後 1 分	20.4 万/ μ L
15 分	8.5 万/ μ L
30 分	5.2 万/ μ L
1 時間	3.5 万/ μ L
2 時間	3.3 万/ μ L
3 時間	3.2 万/ μ L

b



④ EDTA 依存性偽性血小板減少症

EDTA 採血時、EDTA 依存性の抗体により血小板が採血後時間とともに凝集するため、見かけ上血小板数が低値となる。治療は不要である。

a：自験例における血小板減少の経時的变化。

b：採血 1 時間後の末梢血塗抹標本。

網膜出血を認めることもある。口腔内に高度の粘膜出血を認める場合は、消化管出血や頭蓋内出血をきたす危険があり、早急な対応が必要である。血友病など凝固因子欠損症では関節内出血や筋肉内出血を生じるが、ITP では通常これら深部出血は認めない。

診断¹⁾

ITP の診断は除外診断が主体

ITP の診断に関しては、いまだに他の疾患の除外診断が主体となる。血小板減少の基準は、10 万/ μ L 未満である。出血の持続により貧血を示すことがある。凝固検査は正常である。骨髓検査は必須ではないが、高齢者 (60 歳以上) や骨髓異形成症候群などが疑われる場合は、積極的に行うべきである。

また、血小板数が 5 万/ μ L 未満の症例で出血傾向がまったくみられない場合や末梢血の検査コメントに血小板凝集 (+) とある場合は、EDTA (エチレンジアミン四酢酸) 依存性偽性血小板減少症を積極的に疑うべきである (④)。

ITP と同様の免疫学的機序で血小板が減少する病態として、SLE などの膠原病やリンパ系腫瘍、HIV 感染などがあげられるが、これらの疾患に伴う血小板減少は二次性 ITP として分類される。詳しい病歴の聴取や身体所見、検査成績などにより、先天性血小板減少症や薬剤性血小板減少症、さらには血小板産生障害に起因する骨髓異形成症候群や再生不良性貧血などの鑑別を行う。

PAIgG の ITP 診断における臨床的意義

PAIgG (platelet-associated IgG；血小板関連 IgG) は、ITP の補助診断として 2006 年に保険取載された。ITP においてはその 90% 以上の症例におい

MEMO

EDTA 依存性偽性血小板減少症

末梢血用のスピッツには抗凝固薬 EDTA-2K が含まれているため、EDTA 依存性の抗体により血小板が採血後時間とともに凝集し、自動血球計算器において白血球と認識され、見かけ上血小板数低値となることがある。塗抹標本や抗凝固薬なしの採血直後に測定し、血小板数が正常であることを確認する。治療は不要である。

PAIgG (platelet-associated IgG ; 血小板関連 IgG)

1970年代に ITP 患者の血小板において PAIgG が増加していることが多くのグループにより報告され、わが国においても ITP の補助診断として 2006 年に保険収載されるに至った。当初、PAIgG が血小板自己抗体量を反映していると考えられていた。しかしながら、PAIgG は ITP 症例の 90% 以上に上昇しているものの、再生不良性貧血など他の疾患でも PAIgG が高値になることがあり、その疾患特異度は低く 27% とも報告されている。そのため、現在では ITP における PAIgG の診断的意義は少ない。その理由は、PAIgG は血小板に結合した IgG を測定しているため、血小板自己抗体のみならず血小板に結合した（あるいは付着した）非特異的な IgG も測定しているためである。

PAIgG に代わり血小板抗体をより特異的に検出する測定系として、ITP の標的抗原 (GPIIb-IIIa や GPIb-IX) をモノクローナル抗体で捕捉し ELISA にて検出する MAIPA (monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen) 法や MACE (modified antigen capture ELISA) 法などが開発されている。これらの感度は 50~60%、特異度は 80~90% であるが、いまだ研究室レベルでの検査法である。

で PAIgG が上昇しておりその疾患感度は高いが、PAIgG は血小板に結合した（あるいは付着した）非特異的な IgG も測定するため、ITP のみならず再生不良性貧血などの血小板減少時にも PAIgG が高値になることが多い。そのため、ITP の診断において PAIgG の診断的意義は少ない (Basic Point 参照)。

ITP の病態に即した新たな診断法 (2014 年現在, 保険未収載)

ITP の病態に即した新たな診断法として、以下のような検査が行われている。しかしながら、これらの検査の保険適用はなく、日常臨床での使用には至っていない。

網状血小板比率

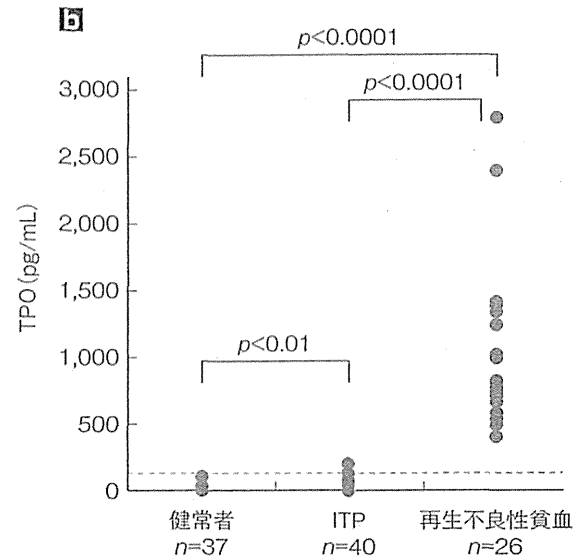
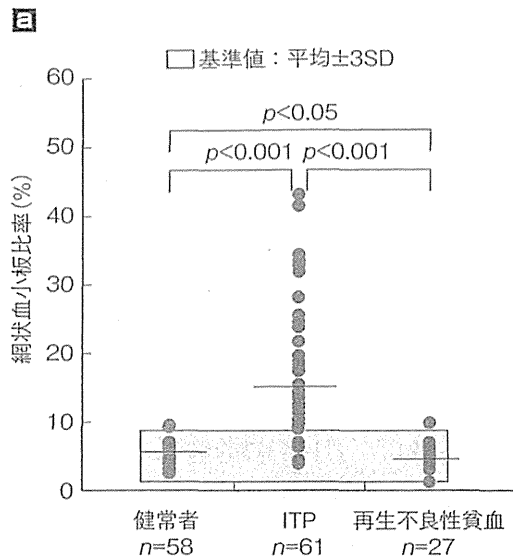
網状血小板比率 (%) は、新たに産生された幼若血小板の指標として用いられる。ITP など血小板破壊亢進時では網状血小板比率が増加するが、再生不良性貧血など血小板造血障害においては増加しない。このように、網状血小板比率は血小板減少の病態を解析するうえで有力な検査法と考えられる (⑤ a)¹⁾。

血漿トロンボポエチン (TPO) 濃度

ITP では、血小板造血因子である TPO 値は正常ないしは軽度増加しているのみである。一方、再生不良性貧血など造血障害による血小板減少では血漿 TPO 値は著増する (⑤ b)¹⁾。ITP においては巨核球の成熟障害や細胞障害が示されているが、巨核数は正常~増加していること、また、ITP 血小板に結合した TPO は早期に血管内からクリアされることなどにより、ITP では血小板減少にもかかわらず TPO 値が正常範囲ないしは軽度増加にとどまると考えられる。

GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX に対する自己抗体検出

GPIIb-IIIa もしくは GPIb-IX に対する自己抗体が検出されれば、その診断



④ ITP および再生不良性貧血における網状血小板比率および血漿トロンボポエチン (TPO) 濃度の比較検討

a: 網状血小板比率. 網状血小板 (reticulated platelets ; RP) は RNA が豊富に存在する大型血小板で, 巨核球から新たに産生された幼若血小板である. 患者血小板数あたりの網状血小板比率 (RP %) を検討すると, ITP では RP % は著明に増加しているが, 再生不良性貧血ではそのような増加はみられない.

b: 血漿 TPO 濃度. TPO はその大部分が肝臓で産生されており, 血小板数の変動に関係なくその産生量は一定に保たれている. TPO 受容体である c-Mpl は血小板/巨核球系に発現しており, c-Mpl による TPO 吸着が血漿 TPO レベルを制御している. 再生不良性貧血では, 巨核球が減少し血小板産生が低下しているため血漿 TPO 濃度は著増する. 一方, ITP においては, 血小板減少にもかかわらず血漿 TPO 濃度は正常ないしは軽度増加しているのみであることが特徴である. ----- は基準値上限を示す.

(富山佳昭ほか. 臨床免疫・アレルギー科 2013¹⁾ より)

特異性は 80~90% と高いが, ITP の約 40~60% にしか検出されない点の問題である. また, これらの自己抗体の測定は, いまだ研究室レベルでの検査法である (Basic Point 参照).

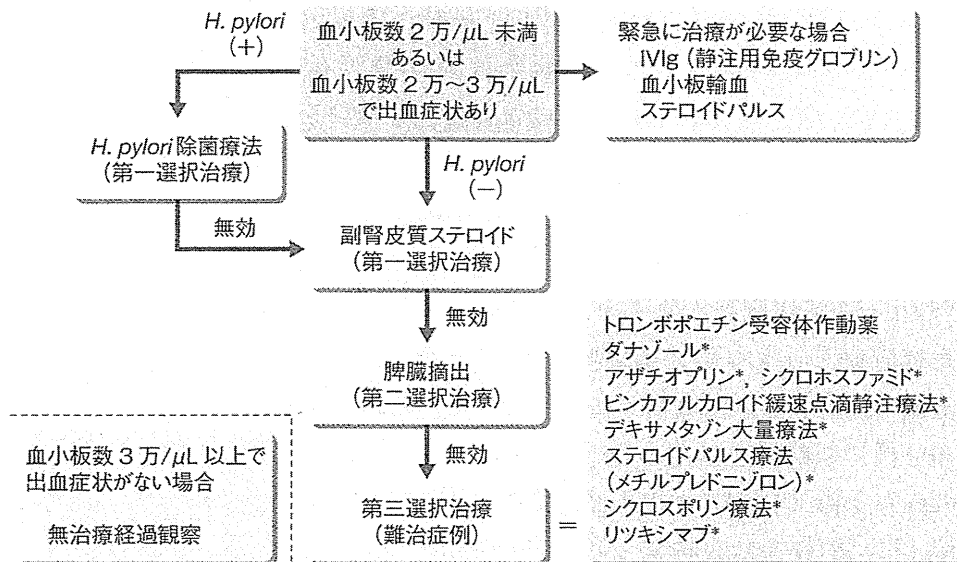
治療⁵⁾

治療目標

治療目標は, 血小板数を正常化させることではなく, 危険な出血を予防することである. ITP では, 血小板数が 3 万/ μ L 以上では死亡率は正常コントロールと同じであるが, 3 万/ μ L 未満だと出血や感染が多くなり死亡率が約 4 倍に増加すると報告されており, 3 万/ μ L 以上であれば比較的予後は良好であると考えられる. そのため, 当面の目標は血小板数 3 万/ μ L 以上であり, 可能なら 5 万/ μ L 以上を目指す. 一方, 初診時血小板が 3 万/ μ L 以上あり出血傾向を認めない場合は, 無治療での経過観察とする. 血小板数を正常に維持するために高用量の副腎皮質ステロイドを長期に使用すべきではない. ⑥に「成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012 年版」の概要を示す⁵⁾.

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

ITP において *H. pylori* 感染陽性の場合は, 緊急時を除き血小板数に関係な



⑥ 血液凝固異常症に関する調査研究班で作成した「成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド 2012年版」の概要

*：現時点で保険適用のない薬剤。

く、*H. pylori* 除菌療法を行う。除菌療法奏効例のうち約 60~70% において血小板増加が認められる。2010 年 6 月から保険適用となっている。興味深いことに、日本およびイタリアでは ITP における *H. pylori* 除菌療法の有効性は高いが、アメリカやスペインでは除菌療法の ITP への有効性は低く、除菌療法の効果は一定ではない。*H. pylori* 感染と ITP 発症の詳細はいまだ不明であるが、*H. pylori* 陽性 ITP ではマクローファージの血小板貪食能が亢進しており、除菌療法が奏効した *H. pylori* 陽性 ITP ではその貪食能が抑制され、血小板が増加することが示されている。*H. pylori* 除菌により ITP が寛解すれば、正確には *H. pylori* 感染に起因する二次性 ITP ということになるが、治療前に primary ITP か二次性 ITP かを予測することは困難である。

副腎皮質ステロイド療法（第一選択治療）

ITP は血小板に対する自己抗体が産生される自己免疫疾患であるため、その治療には副腎皮質ステロイド（プレドニゾン）が有効であり、治療の第一選択薬である。副腎皮質ステロイドは、網内系における血小板の貪食および血小板自己抗体の産生を抑制する。血小板数 2 万/μL 未満の症例、2 万~3 万/μL で出血症状を伴う症例が対象である。特に口腔内や鼻腔内の出血を認める場合は積極的に治療を行う。50~75% において血小板が増加するが、多くは副腎皮質ステロイド減量に伴い血小板が減少する。4~6 週間投与後、血小板数の増加がなくても徐々に減量する。血小板数および出血症状をみながら 5 mg の割合でゆっくり減量し、10 mg/日で維持し、経過が良ければさらに減量する。

脾臓摘出術（脾摘）（第二選択治療）

ITP において脾臓は主たる自己抗体産生の部位であるとともに、血小板破壊

の場合である。発症後6か月以上経過し、副腎皮質ステロイドの維持量にて血小板数3万/ μL 以上を維持できない症例、副腎皮質ステロイドの副作用が顕著な症例は積極的に脾摘を行う。寛解率は約60%である。Vianelliらは、脾摘ITP 402例に関して長期間の有効性と安全性を検討している⁶⁾。脾摘により約86%の症例が一時的に血小板数5万/ μL 以上に増加するがそのうちの23%が再発し、再発例の多くは脾摘後4年以内に起こっていた。しかしながら、脾摘後再発ITPにおいては、治療に対する反応性も改善していることが多く、再発例の約68%が副腎皮質ステロイド投与再開などにより血小板数3万/ μL 以上を維持でき、さらに脾摘が無効であった57例においても、約50%の症例が治療に反応したとの成績であった。一方、懸念される感染症に関しては、上記402例での解析では認めなかったものの、文献的考察にて脾摘後ITP 785例のうち4例(0.5%)が重症感染症にて死亡したと報告している⁶⁾。

難治ITP症例への治療法(第三選択治療)

ここで述べる薬剤の対象は、副腎皮質ステロイドおよび脾摘療法が無効の症例、脾摘の了解が得られない症例もしくは合併症により脾摘が困難な症例、副腎皮質ステロイド不耐容症例で、血小板が3万/ μL 未満であり出血症状を伴う症例、である。このような症例には第三選択治療を行うが、保険収載されているのは現時点ではTPO受容体作動薬のみである。

TPO受容体作動薬^{4,7)}

リコンビナントTPOの開発中止：ITPでは血小板造血が障害されていること、また血漿TPO濃度が正常～軽度上昇にとどまることから、治療薬としてTPOが期待されていた。しかしながら、健常者を対象にしたペグ化リコンビナントMGDF(pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF)、TPOのN末端163個のアミノ酸残基から構成されている)の治験にて、血小板は増加したものの、投与を繰り返すとTPOに対する抗体が産生され内因性TPOも抑制された結果、血小板減少をきたす重篤な有害事象が発生しPEG-rHuMGDFおよびリコンビナントTPOの開発が中止となった。

TPO受容体作動薬の種類と作用機序：上記の有害事象を克服する薬剤として、TPOとは構造的に異なるTPO受容体作動薬が開発され、難治性ITPに保険適用となっている。経口薬のエルトロンボパグ(毎日内服〈空腹時服用〉)と皮下注製剤のロミプロスチム(週1回投与)の2種類がある。⑦に両剤のTPO受容体(c-Mpl)への結合部位を示す(Advice from Expert参照)。TPO受容体作動薬はc-Mplに結合し、巨核球の成熟を促進し血小板産生を亢進させる薬剤である(⑧)⁷⁾。いずれも用量依存的に血小板増加反応を示す。一定用量投与により5~7日目から血小板数が増加し始め、12~16日目に最大の血小板数となる。継続使用により血小板数の増加効果を維持することができる。難治症例の80%以上に有効であり、血小板数が5万/ μL 以上に増加し、出血が回避される。

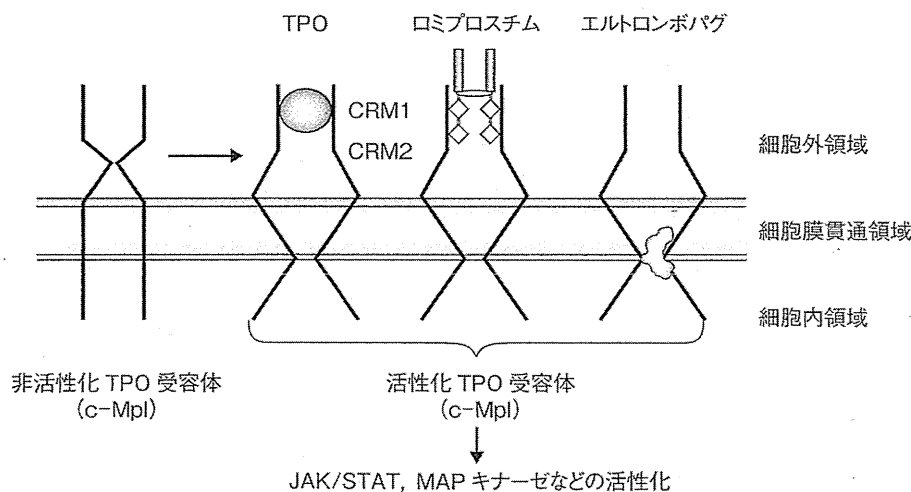
MEMO

日本人におけるエルトロンボパグの用量

日本人を対象とした臨床試験において、エルトロンボパグは日本人では欧米人と比べより低用量で同等の効果を発揮することが明らかとなった。その結果、わが国における投与開始量は安全性を重視し12.5mg/日に設定され、最大用量は50mg/日までとなった(欧米では50mg/日が開始量、最大75mg/日)。なお、12.5mg錠は世界でも日本のみの発売となっている。

エルトロンボバグの TPO 受容体, c-Mpl における作用部位

エルトロンボバグをはじめとして、非ペプチド化合物 TPO 受容体作動薬の特徴として、種特異性があること、TPO とは異なる機序で TPO 受容体である c-Mpl を活性化させること、TPO に相加的作用を有することがあげられる。エルトロンボバグはヒトおよびチンパンジーには作用を有するが、マウス、ラット、カニクイザルに対する作用は有さない。ヒトとカニクイザルの c-Mpl の swapping 実験にて、膜貫通領域をカニクイザルの構造に変えるとエルトロンボバグの作用は消失し、逆にカニクイザルの膜貫通領域をヒト型にするとエルトロンボバグに反応するようになることが示されている。この反応性の違いは、主として膜貫通領域における 1 アミノ酸の相違により規定されている。ヒトおよびチンパンジーの c-Mpl の 499 番目は His であるが、他の種では Leu であり、このアミノ酸を入れ替えることにより、エルトロンボバグへの反応性を変化させることができる。これらの成績から、TPO がその受容体である c-Mpl の細胞外領域の CRM1 (cytokine receptor homology module 1) がその作用点であるのに対して、エルトロンボバグは膜貫通領域がその結合部位である、あるいはその作用を発現させるのにきわめて重要な部位であると考えられる。



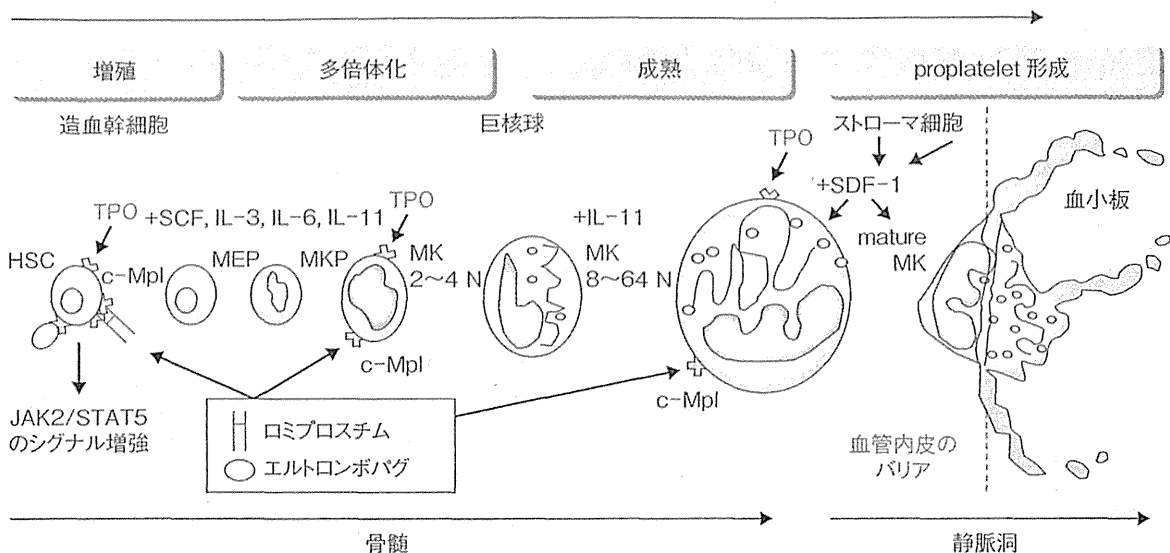
⑦ トロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬の作用部位

ロミプロスチムは c-Mpl の細胞外領域に、一方、エルトロンボバグは c-Mpl の細胞膜貫通領域に作用すると考えられている。

CRM : cytokine receptor homology module

• エルトロンボバグ (レボレード®)

エルトロンボバグは分子量 546 Da の小さな非ペプチド化合物で、経口製剤である。その吸収は食事やミネラルに影響されるため空腹時に服用する。この化合物は、TPO 依存性の細胞株においてレポーターとして STAT (signal transducer and activator of transcription) などのリン酸化を誘導する非ペプチド化合物ライブラリーから同定され、TPO との相同性はない。



③ トロンボポエチン (TPO) 受容体作動薬の巨核球系細胞への作用

TPO 受容体作動薬は、巨核球のみならず造血幹細胞にも作用し巨核球分化を促進する。血小板数のピークは薬剤開始後、約 10~14 日で得られる。

HSC : hematopoietic stem cells (造血幹細胞), MEP : megakaryocyte and erythroid progenitors, MKP : megakaryocyte-committed progenitors, MK : megakaryocytes (巨核球), SDF-1 : stromal-derived factor-1 (Nurden AT, et al. Lancet 2009⁷⁾ より)

・ロミプロスチム (ロミプレート®)

ロミプロスチムは、ヒト免疫グロブリンの Fc 領域に TPO 様ペプチドを遺伝子組換え技術で融合させ作製された分子量約 59,000 Da の遺伝子組換え融合蛋白で、皮下注射製剤である。TPO 様ペプチドのみでは不安定であるため、Fc 領域と結合させることにより製剤を安定化させ、1 週間に 1 度のみの投与を可能にしている。TPO 様ペプチドと TPO とは、アミノ酸配列上の類似性はない。ロミプロスチムの開始量は 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、最大投与量は欧米と同様に 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、日本人への投与量の平均は 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった。

TPO 受容体作動薬使用の留意点：TPO 受容体作動薬の効果発現まで約 2 週間を要することに注意すべきである。即効性はない。

TPO 受容体作動薬は、第三選択治療のなかでは唯一保険適用のある薬剤であるが、作用機序から ITP を治癒させる根本治療ではなく、出血症状をコントロールすることに主眼を置いた治療薬剤で、長期に使用し続ける必要がある。発売から 3 年が経過し、比較的安全な薬剤であることが示されつつあるが、長期の安全性を今後検証する必要がある。

懸念される副作用としては、以下のものがあげられている。

- ①血栓症、血栓塞栓症を誘発する可能性があり、血小板数が正常以下でも起こる場合がある。そのため、脳梗塞、心筋梗塞、肺塞栓などの血栓症の既往のある症例、抗リン脂質抗体を有する症例や担がん症例には慎重投与すべきである。
- ②肝障害 (特にエルトロンボパグ)。

- ③使用中止後に血小板数は治療前値よりも低下する可能性がある。
- ④骨髄でレチクリン（細網）線維が増加する可能性がある（投与を中止すれば回復するとの報告がある）。
- ⑤白血球細胞の増殖を刺激する可能性がある。

TPO 受容体作動薬の投与量に関しては、初めに記載したように血小板数を正常化することを目標とせず、出血症状の軽減や血小板数が3万~5万/ μL 以上に維持されるように、投与量を最小にすべきである。エルトロンボパグに関しては、血中濃度が併用薬や食事の影響を受けやすく、使用については服薬時間、併用薬などの注意点を確認し処方する。

抗 CD20 抗体（リツキシマブ）（保険適用外）

抗 CD20 キメラ抗体であるリツキシマブは、B 細胞性リンパ腫に対して開発されたが、自己抗体産生 B 細胞に対しても細胞傷害作用を有することから現在までに種々の自己免疫疾患に対してその有効性が示されている。欧米における後方視的解析では、48% に完全寛解（血小板数15万/ μL 以上）、60% に部分寛解以上（5万/ μL 以上）の効果を誘導しうるとされている。しかしながら、肝炎ウイルス再活性化などに留意する必要がある。

わが国において、ITP に対するリツキシマブの医師主導型治験が2013年9月に終了し、2014年現在保険収載に向け申請準備中である。

緊急時の治療

診断時消化管出血や頭蓋内出血などの重篤な出血を認める症例や、脾摘など外科的処置が必要な症例には、 γ グロブリン大量療法やメチルプレドニゾロンパルス療法にて血小板数を速やかに増加させ出血をコントロールする必要がある。血小板輸血は一般には行わないが、急性ITPの重症例では治療抵抗性であることもあり、このような場合には血小板輸血も考慮する。

（富山佳昭）

文献

- 1) 富山佳昭ほか. 免疫性血小板減少性紫斑病の免疫病態. 臨床免疫・アレルギー科 2013; 59: 649-57.
- 2) McMillan R. The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. Semin Hematol 2007; 44 (Suppl 5): S3-11.
- 3) Kurata Y, et al. Epidemiology of primary immune thrombocytopenia in children and adults in Japan: a population-based study and literature review. Int J Hematol 2011; 93: 329-35.
- 4) 富山佳昭. トロンボポエチン受容体作動薬による難治性ITPの治療. 臨床血液 2011; 52: 627-32.
- 5) 藤村欣吾ほか. 成人特発性血小板減少性紫斑病治療の参照ガイド2012年版. 臨床血液 2012; 53: 433-42.
- 6) Vianelli N, et al. Efficacy and safety of splenectomy in immune thrombocytopenic purpura: long-term results of 402 cases. Haematologica 2005; 90: 72-7.
- 7) Nurden AT, et al. New-generation drugs that stimulate platelet production in chronic immune thrombocytopenic purpura. Lancet 2009; 373: 1562-9.

A case of neonatal alloimmune thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy

Tomoko Kiyokawa · Yangsook Koh · Kazuya Mimura · Kotarosumitomo Nakayama · Mika Hosokawa · Mikiko Sakuragi · Tamayo Morikawa · Mayumi Nakao · Hiroshi Aochi · Yasuo Fukumori · Takeshi Kanagawa · Keisuke Nagamine · Tadashi Kimura · Yoshiaki Tomiyama

Received: 7 March 2014/Revised: 10 June 2014/Accepted: 11 June 2014/Published online: 28 June 2014
© The Japanese Society of Hematology 2014

Abstract Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) is induced by maternal alloantibodies raised against fetal platelet antigens inherited from the paternal parent. In contrast to Caucasians, in Asians, predominantly in Japanese, most frequently detected antibodies in NAIT are anti-HPA-4b and anti-HPA-5b. In some NAIT cases multiple alloantibodies are detected. In such cases it is very difficult to determine which antibody is the dominant antibody in NAIT. In this case report, we describe a NAIT case (first sibling) with severe thrombocytopenia and cephalhematoma in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibodies in the maternal serum. We carefully examined titers of anti-HPA antibodies during the subsequent pregnancy with HPA-4b-positive and HPA-5b-negative fetus determined by amniocentesis at gestational week 16. We administered IVIG (1 g/kg/w) to the mother from gestational week 32 to 35. The mother subsequently delivered a second sibling with normal platelet count by cesarean section. Although we could not completely rule out the involvement of anti-HPA-4b, our findings suggested that anti-HPA-5b was implicated in the NAIT in the first sibling.

Keywords NAIT · Anti-HPA-5b · Anti-HPA-4b · Multiple alloantibodies · Amniocentesis · IVIG

Introduction

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) is caused by transplacental transfer of maternal alloantibodies raised against fetal platelet antigens inherited from the paternal parent [1]. Antigens capable of triggering NAIT due to a biallelic polymorphism are carried on platelet membrane glycoprotein (GP) Ib-IX-V, GPIIb-IIIa, GPIa-IIa, and CD109. In Caucasians, the most frequent and clinically relevant cause of NAIT is the incompatibility of human platelet antigen (HPA)-1 due to the leucine33/proline33 polymorphism of GPIIIa, and previous analyses on NAIT cases demonstrated that anti-HPA-1a was the dominant alloantibody, and anti-HPA-5b due to the glutamic acid505/lysine505 polymorphism of GPIa was the second most commonly implicated antibody [2, 3]. In contrast, in Asians HPA-1 incompatibility is extremely rare because almost all Asians possess HPA-1a antigen. A prospective study demonstrated that the most common anti-HPA alloantibody raised against fetal HPA was anti-HPA-5b in Japanese. Although anti-HPA-5b antibody induced NAIT in only a few of affected infants, NAIT cases with intracranial hemorrhage due to anti-HPA-5b have been reported [4, 5]. Occasionally, multiple alloantibodies were detected in NAIT cases. In such cases it is very difficult to determine which antibody is the dominant antibody in NAIT.

We have detected both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibodies in the maternal serum in a case of NAIT with a severe thrombocytopenia and cephalhematoma. Careful examination of the subsequent pregnancy with HPA-4b-positive and HPA-5b-negative fetus determined by

T. Kiyokawa · K. Nakayama · M. Hosokawa · M. Sakuragi · T. Morikawa · M. Nakao · H. Aochi · K. Nagamine · Y. Tomiyama (✉)
Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, 2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
e-mail: yoshi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

Y. Koh · Y. Fukumori
Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center, Osaka, Japan

K. Mimura · T. Kanagawa · T. Kimura
Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

amniocentesis and the delivery of the neonate with normal platelet count suggested that the dominant antibody in the previously affected sibling with NAIT was anti-HPA-5b.

Methods

Anti-platelet and anti-human leukocyte antibodies

Anti-platelet antibodies were initially examined by anti-PLT MPHA screen (Beckman Coulter, Tokyo, Japan). Titers of anti-HPA-4b and anti-HPA-5b alloantibodies were further examined by serial dilution in modified monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen (MAIPA) assay employing anti-CD61 and anti-CD49b monoclonal antibodies, respectively. HPA-transfectants instead of platelets were used as the source of HPA, as previously described [6, 7]. The signal to noise (S/N) ratio, defined as the reactivity of alloantibodies with HPA-transfectants (signal)/the reactivity of alloantibodies with mock-transfectants (noise), greater than 2.0 was considered as positive [6].

Anti-HLA antibodies were examined by LABScreen PRA Class I (One Lambda, California, USA).

HPA and HLA typing

HPA and human leukocyte antigens (HLA) were genotyped using WAKFlow HPA Typing kit (Wakunaga, Hiroshima, Japan) and GenoserachHLA kit (MBL, Nagoya, Japan), respectively, based on the polymerase chain reaction-reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-rSSO) method.

Results

Case report

A 20-year-old healthy Japanese woman with gravida 3 para 0 delivered a baby (male) weighing 3,032 g with an Apgar score of 8/9 with vacuum extraction at week 38 of gestation. She had no history of transfusion. The first sibling showed huge cephalhematoma (7.5 cm) but no intracranial hemorrhage, and was referred to a city hospital because of anemia (hemoglobin 8.4 g/dL) at day 4. He also showed a severe thrombocytopenia ($12.0 \times 10^9/L$), and was transfused with platelet concentrates as well as red cell concentrates. He was discharged from the hospital, because his anemia and thrombocytopenia gradually improved (hemoglobin 10.1 g/dL, platelet count $91.0 \times 10^9/L$) on day 16. NAIT was considered as the cause of his thrombocytopenia, and the analyzed data were shown in detail in the

following section. Eight months later, the mother was referred to Osaka University Hospital to manage her subsequent pregnancy (gravida 4 para 1) because of high risk of NAIT. The HPA and HLA of the second fetus were genotyped employing cells obtained by amniocentesis at week 16 of gestation with written informed consent.

Alloantibodies in the maternal serum and typing of HPA and HLA

Because of the possibility of NAIT as a cause of the severe thrombocytopenia observed in the first sibling, we examined alloantibodies in the maternal serum. As an initial step, we confirmed that the cross-match test between maternal serum and paternal platelets was positive in mixed passive hemagglutination (MPHA) assay. Anti-HPA antibodies were then screened by anti-PLT MPHA screen kit, and the titers of the antibodies were examined by MAIPA assay employing HPA-transfectants as a source of HPA. Our assays revealed that the maternal serum obtained 5 days after the delivery contained anti-HPA-4b ($\times 1$), anti-HPA-5b ($\times 64$), and anti-HLA antibodies. MAIPA assay using intact platelets showed that the titer of anti-HPA-5b was $\times 128$, which was comparable with the data obtained MAIPA using transfectants ($\times 64$). Consistent with the detection of anti-HPA antibodies, significant differences in genotypes of HPA exist between mother and the first sibling: HPA-3, HPA-4, and HPA-5 incompatibilities. In addition, genotyping of rare HPA, such as HPA-6, -7, -15, and -21, denied the possibilities of these rare HPA incompatibilities (Table 1). There was no anti-HPA-3b antibody detected despite HPA-3-incompatibility. Anti-HPA-3b antibody was still undetectable even by MAIPA assay using intact platelets instead of HPA-3b transfectants or by magnetic-MPHA assay using intact HLA-matched platelets instead of fixed platelets. Anti-HLA antibodies contained anti-HLA A24, anti-HLA B54, and additional unspecified antibodies. Any anti-HPA or anti-HLA antibody was undetectable in the first sibling's serum in our assay. Nonetheless, it is probable that the thrombocytopenia of the first sibling was due to NAIT caused by anti-HPA-4b and/or anti-HPA-5b.

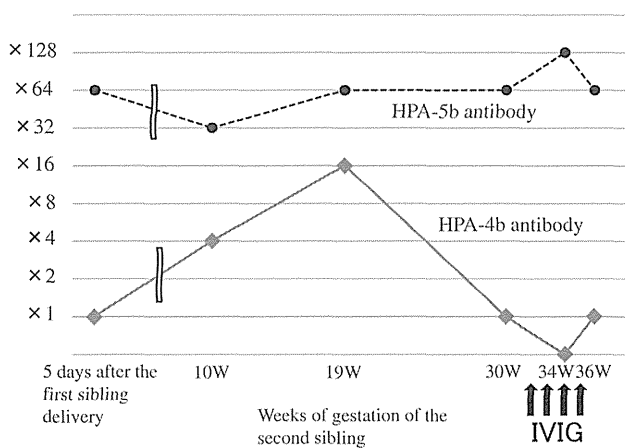
Since the subsequent pregnancy after NAIT runs the high risk of NAIT [8], we analyzed HPA and HLA genotypes of the second fetus employing amniotic cells at week 16 of gestation, which was confirmed employing blood cells obtained from the neonate after birth. HPA-3 and HPA-4 incompatibility between mother and the second baby existed, whereas their HPA-5 antigens were compatible (Table 1). As shown in Fig. 1, at gestational week 10 the mother contained anti-HPA-4b with $\times 4$ titer and anti-HPA-5b with $\times 32$ titer, and the titer of anti-HPA-4b elevated to $\times 16$ at gestational week 19. To reduce the

Table 1 HPA and HLA typing of the family

HPA type	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5	HPA-6	HPA-7	HPA-15	HPA-21	Nak ^a
Mother	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	a/a	+
Father	a/a	a/a	b/b	a/b	a/b	a/a	a/a	a/b	a/a	+
First sibling	a/a	a/a	a/b	a/b	a/b	a/a	a/a	a/a	n.t.	n.t.
Second sibling	a/a	a/a	a/b	a/b	a/a	a/a	a/a	a/a	n.t.	n.t.

HLA type	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw
Mother	2	7	46
Father	11	54	1
First sibling	2	46	54
Second sibling	2	7	54

n.t. not tested

**Fig. 1** Transition of anti-HPA antibodies during pregnancy of the second sibling. Titers of Anti-HPA-4b and anti-HPA-5b alloantibodies were examined by serial dilution in modified monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen (MAIPA) assay employing anti-CD61 and anti-CD49b monoclonal antibodies, respectively. HPA-transfectants instead of platelets were used as the source of HPA

severity of NAIT in the second fetus, we started intravenous immunoglobulin (IVIG, 1 g/kg/w) from gestational week 32 to 35 despite a spontaneous reduction in the titer of anti-HPA-4b to $\times 1$ at week 30 [9]. At 36 weeks the mother was delivered of second sibling by cesarean section. Platelet count of the second sibling (female) in her peripheral blood was within normal range ($214 \times 10^9/L$), and thrombocytopenia was not developed during follow-up (up to 7 days after birth). In the serum obtained from the second neonate, we detected anti-HPA-5b antibody with $\times 32$ titer, but not anti-HPA-4b antibody.

Discussion

NAIT cases with severe thrombocytopenia due to either anti-HPA-4b or anti-HPA-5b have been well documented as

case reports [5, 10]. In the prospective study in Asians, predominantly in Japanese, anti-HPA antibodies were detected in 0.91 % (223/24,630) of pregnant women's samples, and the most frequently detected antibody was anti-HPA-5b (168 samples), followed by anti-HPA-4b (49 samples). However, the presence of these anti-HPA antibodies did not necessarily induce NAIT. Only 12 % of HPA-5b-positive neonates developed thrombocytopenia ($<150 \times 10^9/L$) even in the presence of anti-HPA-5b antibodies, while 54 % of HPA-4b-positive neonates developed thrombocytopenia in the presence of anti-HPA-4b antibodies [4]. Thus, anti-HPA-4b antibody appears more potent than anti-HPA-5b to induce NAIT. By contrast, in Caucasians anti-HPA-1a is the dominant antibody, followed by anti-HPA-5b in NAIT, while NAIT due to anti-HPA-4b antibody was very rare [3]. Multiple anti-HPA antibodies were detected in some NAIT cases [3, 4]. In such cases, it is extremely difficult to determine which antibody is dominant in NAIT. In this case report, we demonstrated a NAIT patient whose mother had both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibodies. In the subsequent pregnancy, the mother delivered a HPA-4b-positive and HPA-5b-negative neonate with normal platelet counts despite the presence of anti-HPA-4b antibody. Although we could not completely rule out the possibility of the incompatibilities of other rare HPA, there were no incompatibilities regarding HPA-6, -7, -15, -21 and Nak^a (Table 1). Anti-HLA A24 and B54 antibodies were detected in the maternal serum. However, it is unlikely that anti-HLA antibodies contributed to the NAIT, because in our case HLA B54 from the father was present in both siblings. Although both siblings did not possess HLA A24, the mother had anti-HLA A24 antibody without any transfusion history. Thus, the anti-HLA A24 antibody was probably induced by previous 2 pregnancies (2 abortions). Taken together, although the involvement of anti-HPA-4b could not completely be ruled out, the severe thrombocytopenia in the elder sibling is likely due to anti-HPA-5b antibodies.

Administration of IVIG (1 g/kg/w) from gestational week 32 to 35 to the mother in our case may increase the platelet count in the second neonate. However, the effect of IVIG on increasing the fetal platelet count was inconsistent, and mean platelet increase was only $35.7 \times 10^9/L$ after 4–6 doses of IVIG [11, 12]. In addition, in our case the titer of anti-HPA4b decreased spontaneously before starting IVIG and maintained low level until the delivery. Thus, the effect of IVIG is only minimal, if any, and it is unlikely that anti-HPA-4b alone has a capacity to induce NAIT in our case. Interestingly, the titer of anti-HPA-5b was $\times 64$ after the birth of the NAIT neonate and maintained high levels ($\times 32$ to $\times 128$) during the subsequent pregnancy even with the HPA-5b-negative fetus, which is consistent with the data that high titer of anti-HPA-5b may be related to the development of NAIT [13]. As the mother possessed anti-HLA A24 antibody in the absence of HLA A24 in both siblings, it is possible that the mother may already be immunized by HPA-5b before the pregnancy of first sibling through previous abortions, which may lead to severe thrombocytopenia in the first sibling.

In addition to the incompatibility of HPA-4 and HPA-5, HPA-3 incompatibility exists between the mother and fetuses (Table 1). Because the genotype of the mother and the father were HPA-3a/a and HPA-3b/b, respectively, fetuses should be HPA-3a/b. However, anti-HPA-3b was never induced during multiple pregnancies (gravidia 4 para 2). Neither MAIPA assay using intact platelets instead of HPA-3b-transfectants nor magnetic-MPHA assay using intact HLA-matched platelets instead of fixed platelets detected any anti-HPA-3b. In the prospective study, anti-HPA-3b was not detected in pregnant women's samples with HPA-3b incompatibility (0/3308) [4]. Although anti-HPA-3b induced NAIT cases have been reported, the development of anti-HPA-3b is extremely rare in Asians [3, 4].

In summary, we have reported NAIT with anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibodies. Although anti-HPA-4b appears more potent to induce NAIT, our careful examination of the subsequent pregnancy with HPA-4b-positive and HPA-5b-negative fetus and the delivery of the neonate with normal platelet count suggested that anti-HPA-5b was implicated in the NAIT in the first sibling.

The identification of anti-HPA-5b as the dominant antibody regarding our NAIT case with multiple alloantibodies would contribute to a better understanding of the pathogenesis of NAIT as well as the management of subsequent pregnancies of the mother.

Acknowledgments This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology in Japan and from the Ministry of Health, Labor and Welfare in Japan.

Conflict of interest All authors have no conflict of interest.

References

- Peterson JA, McFarland JG, Curtis BR, Aster RH. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. *Br J Haematol.* 2013;161:3–14.
- Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, Kroll H, Weisheit M, Schmidt S, Mueller-Eckhardt G, Santoso S. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet.* 1989;1:363–6.
- Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion.* 2004;44:1220–5.
- Ohto H, Miura S, Ariga H, Ishii T, Fujimori K, Morita S, Collaborative Study Group. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med.* 2004;14:399–408.
- Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, Kiefel V, Schlegel N, Chesnel N, Mueller-Eckhardt C. HPA-5b (Br^a) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *Br J Haematol.* 1991;78:425–9.
- Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, Furuta RA, Hori Y, Tanaka S, Fukumori Y, Hirayama F, Inoue M. Establishment of a cell line panel as an alternative source of platelet antigens for a screening assay of anti-human platelet antibodies. *Transfus Med.* 2011;21:199–204.
- Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, Yasui K, Furuta RA, Hori Y, Tanaka S, Fukumori Y, Hirayama F. Detection of anti-human platelet antibodies against integrin $\alpha\beta 1$ using cell lines. *Blood Transfus.* 2014;12 Suppl 1:s273–80.
- Bussel JB, Zabusky MR, Berkowitz RL, McFarland JG. Fetal alloimmune thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 1997;337:22–6.
- Pacheco LD, Berkowitz RL, Moise KJ Jr, Bussel JB, McFarland JG, Saade GR. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a management algorithm based on risk stratification. *Obstet Gynecol.* 2011;118:1157–63.
- Shibata Y, Miyaji T, Ichikawa Y, Matsuda I. A new platelet antigen system, Yuk^a/Yuk^b. *Vox Sang.* 1986;51:334–6.
- Bussel JB, Berkowitz RL, Lynch L, Lesser ML, Paidas MJ, Huang CL, McFarland JG. Antenatal management of alloimmune thrombocytopenia with intravenous gamma-globulin: a randomized trial of the addition of low-dose steroid to intravenous gamma-globulin. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174:1414–23.
- Silver RM, Porter TF, Branch DW, Esplin MS, Scott JR. Neonatal alloimmune thrombocytopenia: antenatal management. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:1233–8.
- Ohto H, Yamaguchi T, Takeuchi C, Tohyama Y, Sato A, Morita S. Anti-HPA-5b-induced neonatal alloimmune thrombocytopenia: antibody titre as a predictor. Collaborative Study Group. *Br J Haematol.* 2000;110:223–7.

トピックス

I. 病態の基礎

2. 自己抗体の標的抗原—IPTを中心—to

富山 佳昭

要 旨

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) は、血小板が自己抗体により早期に網内系にて破壊される自己免疫疾患である。全身性エリテマトーデス (SLE) が全身性疾患であるのに対し、バセドー病やITPは臓器特異的な自己免疫疾患である。ITPの病態さらにはその成因を解析するためには、ITPにおける自己抗体の標的抗原 (= 自己抗原) を明らかにする必要がある。本稿では、ITPにおける標的抗原の詳細を中心に、その病態解析に関する最近の進歩につき概説する。

〔日内会誌 103 : 1570~1579, 2014〕

Key words 自己抗原, GPIIb-IIIa, PAIgG, T細胞異常

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP) は、1951年Harringtonらの患者血漿の健常者への歴史的な輸注試験により、本疾患の原因が血漿中の血小板減少因子であることが示され¹⁾、その後血小板減少因子がIgG分画に存在する抗血小板抗体であることが示された。

現在、ITPは自己血小板に対する抗体が産生され、抗体に感作された血小板が早期に網内系にて破壊され血小板減少を来す自己免疫疾患と考えられている²⁻⁴⁾。欧米では特発性 (idiopathic) というよりは免疫性 (immune) あるいは自己免疫性 (autoimmune) という表現が用いられるこ

とが多く、最近では本疾患に対して primary immune thrombocytopenia (primary ITP) との名称が提唱されている⁵⁾。

ITPの成因はいまだ不明であり、その診断は今日においても除外診断が主体となっている。しかしながら、ITPの病態さらにはその成因を解析するためには、ITPにおける自己抗体の標的抗原 (= 自己抗原) を明らかにする必要がある。全身性エリテマトーデス (SLE) ではその異常が全身におよぶ全身性自己免疫疾患であるのに対し、バセドー病や橋本病ではその異常が甲状腺に限定され、ITPでは血小板に限定されるため、これらは臓器特異的な自己免疫疾患と言える。つまりITPにおいては、自己抗体の標的抗原は血小板特異的な抗原であることが容易に理解できる。

本稿では、自己免疫性血液疾患としてITPに焦

大阪大学附属病院輸血部

Recent Progress of Diagnosis and Treatment for Immune-mediated Hematological Diseases. Topics : I. Basis of Pathophysiology ; 2. Autoantigens in primary immune thrombocytopenia.

Yoshiaki Tomiyama : Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, Japan.

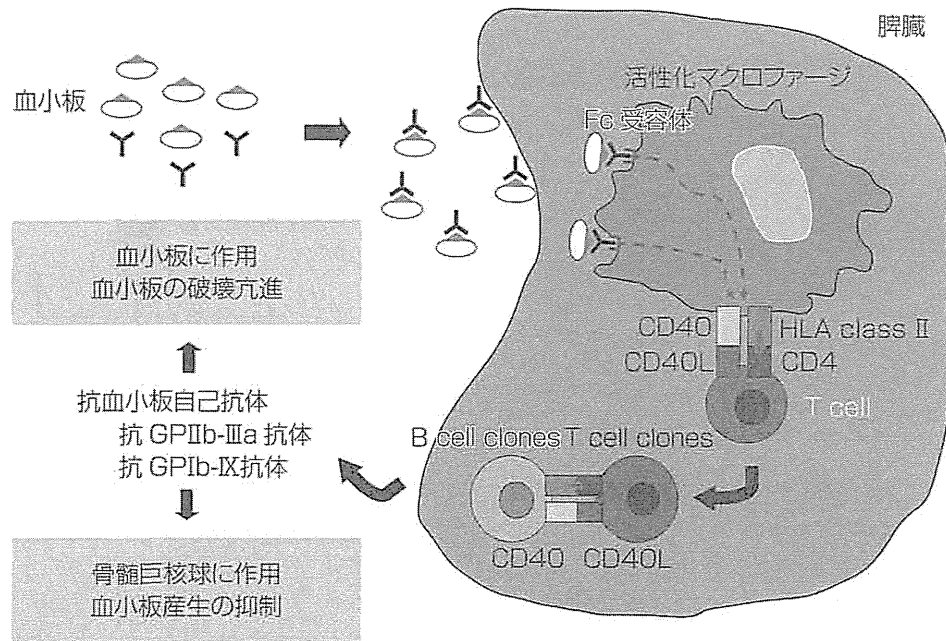


図 1. ITPの免疫病態 (文献7より引用)

主として脾臓で産生された抗血小板自己抗体 (主にIgG) は血小板膜GP II b-III aあるいはGP I b-IXに結合し、自己抗体に感作された血小板の大部分は脾臓内でマクロファージ上のFc受容体を介して捕捉され、破壊される。血小板を取り込んだマクロファージはGP II b-III aあるいはGP I b-IXの抗原ペプチドをHLA抗原上に表出し、HLA class II-CD4に加え副刺激経路 (ここではCD40-CD40Lを提示) などを介して自己反応性ヘルパーT細胞を活性化し、さらにはB細胞を活性化し抗体産生を誘導する。一方では、これらの抗体は巨核球の成熟障害などを誘導し、血小板産生を抑制する。

点を当て、その自己抗原の解析を中心に、その病態解析について解説する。

1. ITPの病態

ITPにおける血小板減少の主たる病態は、血小板の破壊亢進である。慢性ITPでは自己抗体に感作された血小板は早期に脾臓を中心とした網内系においてマクロファージのFc受容体を介して捕捉・破壊され血小板減少をきたす。さらに脾臓は抗血小板自己抗体を産生する主要な臓器である。このようにITPにおいては、脾臓がその病態形成の中核を形成しており、血小板抗体の主要な産生臓器であると共に血小板の破壊臓器でもある²⁻⁴⁾。

一方、以前よりITPの骨髄では血小板を豊富に

含有する成熟巨核球の比率が減少し未熟な巨核球の比率が増加することが知られていたが、患者自身の血小板を用いた血小板カイネティックス研究において血小板産生能の指標としての血小板回転率を解析すると、多くのITPでは予想に反して血小板の回転率は亢進しておらず正常～低下していること、さらに培養系においてITP血漿により巨核球の増殖および成熟障害を来たすことが明らかにされている^{3,6)}。このように、ITPにおいては血小板破壊亢進に加え、血小板産生も障害されていることが明らかとなってきた (図1)⁷⁾。

トピックス

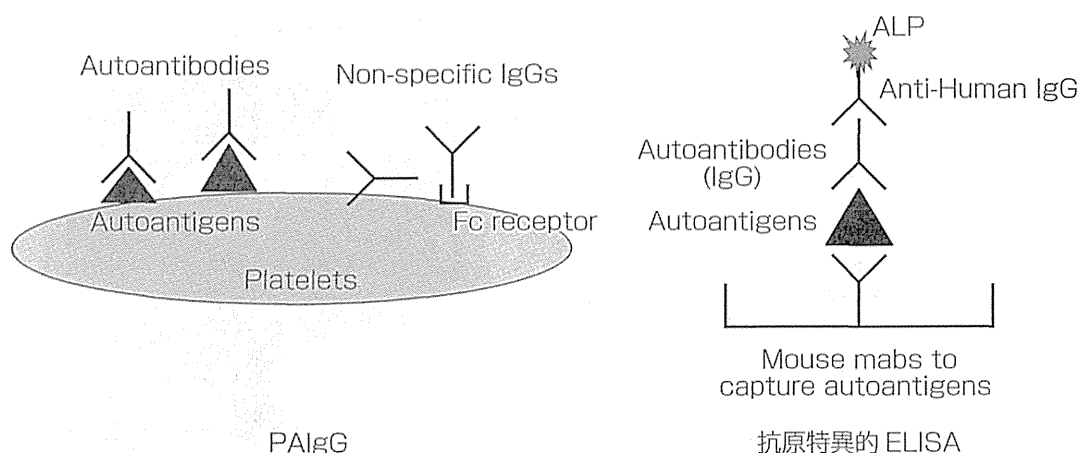


図 2. 血小板関連IgG (PAIgG) と抗原特異的抗体測定法の比較

左：PAIgGは血小板を分離後、血小板に結合しているIgG量を測定するため、自己抗体以外にも非特異的なIgGも測定する。そのため、ITP診断における特異性は低い

右：PAIgGに替わる自己抗体測定法。自己抗原をマウスモノクローナル抗体 (mAbs) にて捕捉して、抗原特異的な自己抗体を測定するELISA法の概略 (MAIPA法, MACE法)。

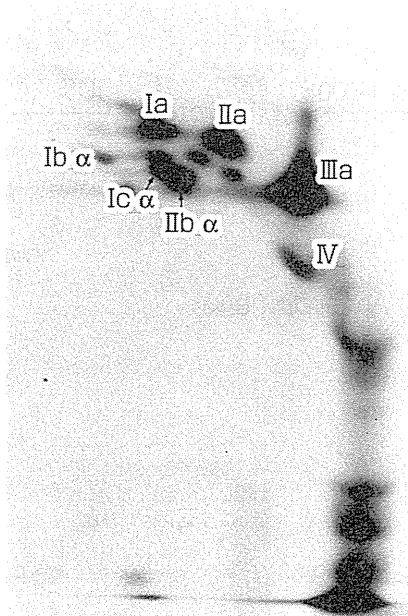
ALP：Alkaline phosphataseの略

2. ITPにおける抗血小板抗体と血小板関連IgG (Platelet-associated IgG : PAIgG)

1970年代にITP患者血小板においてPAIgGが増加していることが多くのグループにより報告され、本邦においてもITPの補助診断として2006年に保険収載されるに至った。当初、PAIgGが血小板自己抗体量を反映していると考えられていた。しかしながら、PAIgGはITP症例の90%以上で上昇しているものの、再生不良性貧血など他の疾患でもPAIgGが高値になることがあり、その疾患特異性は低く27%とも報告されている⁸⁾。そのため現在ではITPにおけるPAIgGの診断的意義は少ない。その理由としては、血小板は極めて粘着性の高い細胞であるため、PAIgGには血小板自己抗体のみならず血小板に付着した非特異的なIgGが含まれること、血小板上に存在するIgGのFc受容体に結合したIgGも測定していること、などが考えられている (図2)。このPAIgGの非特異性は、自己免疫性溶血性貧血における診断特異性の高いクームス試験と対比をなしている。

抗血小板抗体の標的抗原 (= 自己抗原) を同定することは、PAIgGの欠点を補いITPの自己抗原に対する特異的な抗体を検出することを可能にするのみならず、ITPにおいて自己血小板に対する免疫応答機序を明らかにする上で必要不可欠である。

血小板表面には図3に示すように種々の血小板膜糖蛋白が存在する。これらの血小板膜糖蛋白 (Glycoprotein : GP) でどのGPが主要な自己抗原であるかを解析するため、PAIgGに代わり標的抗原をモノクローナル抗体で捕捉しELISAにて検出するMAIPA法 (monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen) やMACE (modified antigen capture : ELISA) 法などが開発され (図2)、ITPの血小板抗体は主として血小板膜糖蛋白であるGPIIb-IIIaあるいはGPIb-IXを標的としていることが明らかにされた⁹⁻¹¹⁾。これらの抗原は血小板/巨核球系に特異的に発現している。自己抗体が検出されるのはITPの50~60%の症例であり、その内の67.9%に抗GPIIb-IIIa抗体が、17.6%に抗GPIb-IX抗体が、14.5%にその両方の抗体が検出されたとの成



Integrins

 β_1 -integrinsGPIa-IIa ($\alpha_2\beta_1$)GPIC-IIa ($\alpha_5\beta_1$)GPIC'-IIa ($\alpha_6\beta_1$) β_3 -integrinsGPIIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) $\alpha\nu\beta_3$

Leucine-rich motif Family

GPIb-IX

GPV

GPIV (CD36)

GPVI

図3. 血小板表面に発現している主要な血小板膜糖蛋白

左：血小板表面に発現している糖蛋白 (Glycoprotein, GP) を放射性ヨードにて標識し二次元電気泳動にて解析した成績

右：血小板膜糖蛋白の多くは、インテグリンなどの接着レセプターファミリーに分類される。インテグリンの代表格であるGPIIb-IIIaはGPIIbとGPIIIaが1:1の比率で非共有結合した複合体である (図5A参照)。

績が示されている¹²⁾。これらの抗原以外にもGPIa-IIaやGPIVも自己抗原として報告されているが、その頻度は低い。筆者らもITPの自己抗原を直接可視化する方法として、ITP患者血小板そのものを用いたdirect immunoprecipitation法を考案し、6例中4例のITP血小板においてPAIgGの著増と共にGPIIb-IIIaが免疫沈降することを示し、ITP血小板に抗GPIIb-IIIa自己抗体が結合していることを示した (図4)¹³⁾。

一方、ITPのみならず再生不良性貧血などの非免疫性血小板減少症を対象としたprospective study解析にて、GPIIb-IIIaおよびGPIb-IXに対する抗体検出法のITPの疾患感受性 (ITP患者群における陽性パーセント) は49~66%であった。すべてのITP症例において自己抗体が同定されるには至っていないため、抗体が陰性であってもITPは否定できないが、これら血小板抗原に対する抗体検出のITPに対する診断特異性は80~90%

と高いため、陽性であれば積極的にITPと診断しうると考えられる^{12, 14)}。しかしながら現時点では、これらの抗体測定はいまだ研究室レベルでの検査であり、実地臨床まで普及していない。

3. 血小板結合抗体vs血清 (血漿) 抗体

ITPに関するHarringtonらの成績は患者血清 (血漿) 抗体が重要であることを示唆しているものの¹⁾、ITPにおいては血小板自己抗体の大部分が既に患者血小板に結合しており、血清中には親和性の弱い抗体しか存在していないと考えられる。実際、血清抗体よりも血小板結合抗体のほうが検出率は高く、治療により血小板数が増加すると血小板結合抗体は減少するが、血清中の抗体はほとんど変化しない^{11, 15)}。さらに血清中の抗体と血小板結合抗体は必ずしも同一ではなく、血清中にはGPIIb-IIIaの細胞内領域を認識す

トピックス

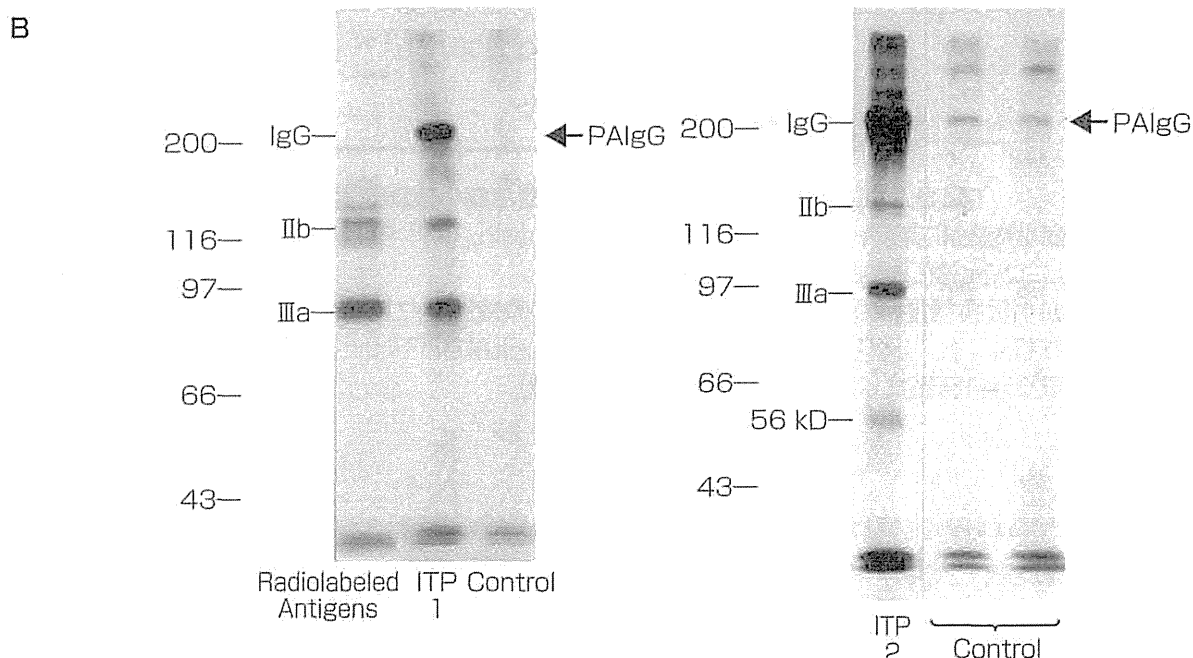
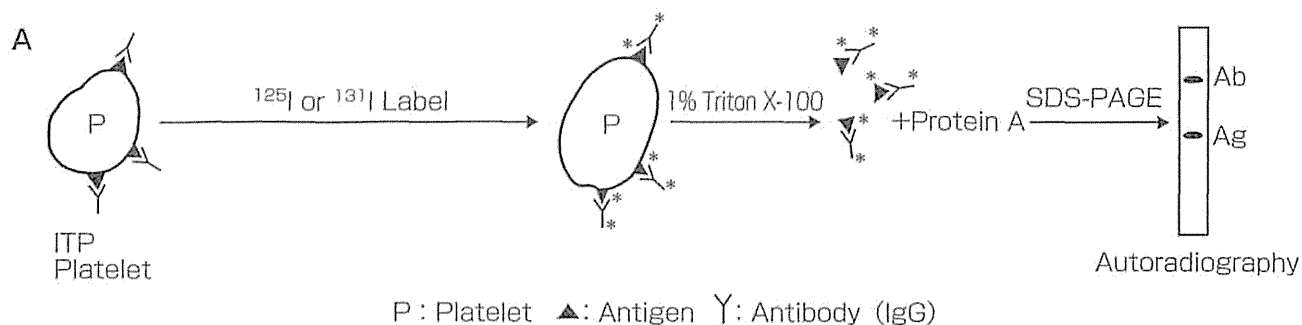


図4. Direct immunoprecipitation法

A) ITP患者より血小板を分離し血小板膜糖蛋白を放射性ヨードにて標識し、可溶化後、抗原抗体複合体をProtein Aにて沈降させ、電気泳動で解析する。抗体とそれが結合している抗原 (= 自己抗原) が検出される。

B) 抗GPIIb-IIIa抗体を有するITP 2 症例の成績

ITP1 およびITP2 において正常血小板 (control) と比べ患者血小板ではPAIgGが著増すると同時に、GPIIb-IIIaが免疫沈降されている。

る抗体や細胞内蛋白である vinculin に対する抗体が存在しており、これらは血小板破壊により二次的に誘導された可能性が考えられる¹¹⁾。これらの成績より血清抗体よりも血小板結合抗体が密接にITPの病態と関連しており、血小板破壊に主要な役割を果たしていると考えられる。そのため、血小板に結合した抗血小板自己抗体の標的抗原を解析することが重要である。

4. ITPにおける抗GPIIb-IIIa自己抗体のエピトープ解析

上述のように、ITPの約40~60%の症例において血小板関連抗GPIIb-IIIa自己抗体 (platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies) が検出されるが、抗GPIIb-IIIa抗体の認識部位(エピ

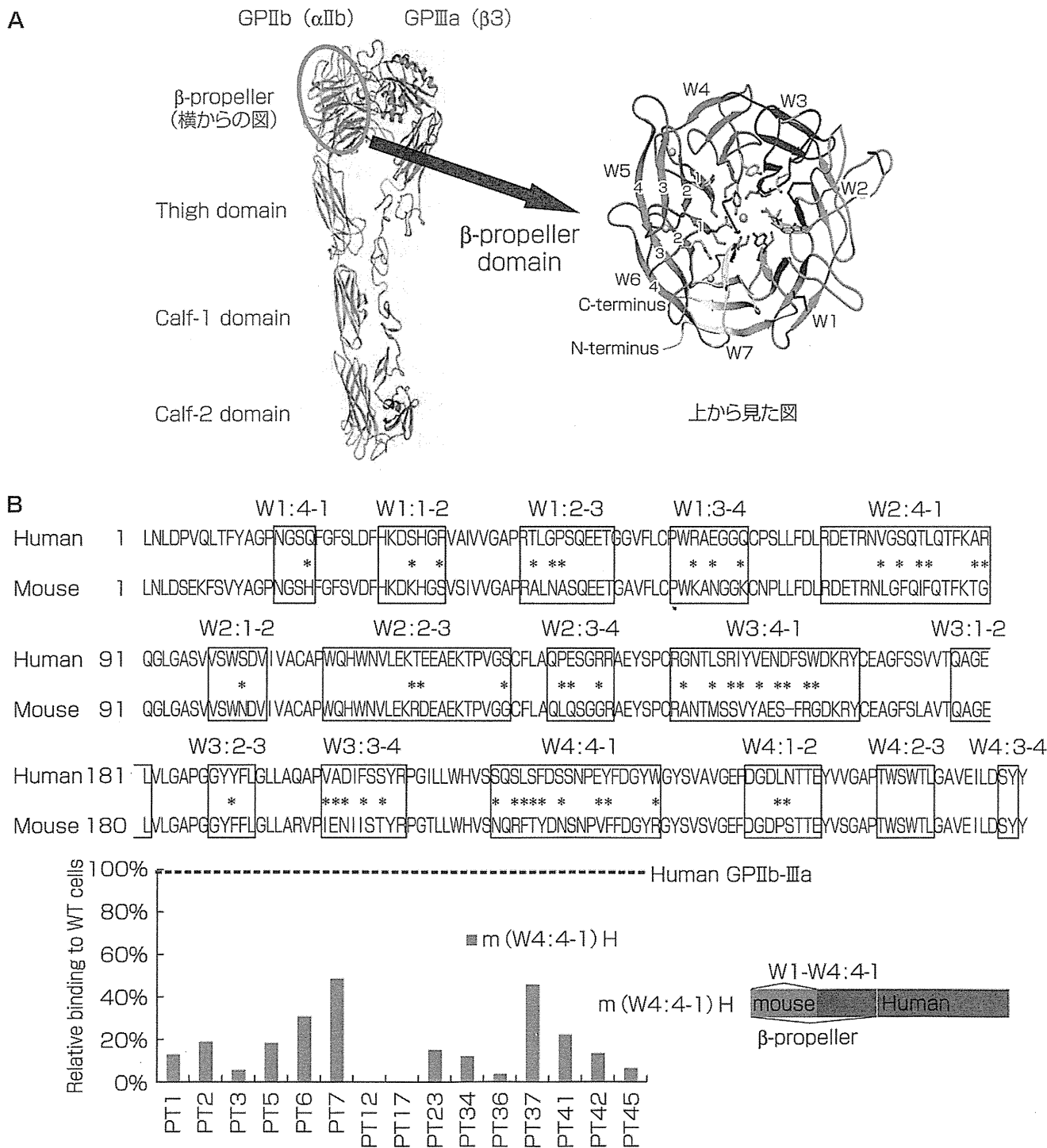


図5. GPIIb-IIIa (α IIb β 3) の構造とITPの自己抗原の部位

A) GPIIbのN末端には449個のアミノ酸より構成される β プロペラドメインが存在する。 β プロペラドメインは、W1～W7の7つのプロペラより構成されている。

B) 上図： β プロペラ領域のN末端からW4:3-4ループにおけるヒトとマウスGPIIbのアミノ酸の比較。枠で囲んだ領域がループ構造部分。*印はヒトとマウスでアミノ酸が異なっている部位を示す。

下図： β プロペラ領域のN末端から前半部分(W1～W4 4-1ループ、N末端から235番のトリプトファン残基まで)をマウスGPIIbに置換し、ヒトGPIIIaと共に強制発現して検討した。解析したITP15例全例において抗GPIIb-IIIa抗体の反応性が著明に低下した。この成績より、GPIIbの β プロペラ領域のN末端から前半部分がITPの自己抗原として重要であることが明らかとなった。