

## トピックス

トープ)に関する詳細は未だ明らかではない。ITPにおける自己抗体のエピトープ解析は自己抗原の詳細を明らかにしうするため、ITPの病態解析において重要であると考えられる。筆者らはこの観点より、抗GPIIb-IIIa抗体に関して継続してエピトープ解析を行ってきた。GPIIb-IIIaはGIIbとGPIIIaが1:1の比率で複合体を形成している(図5A)。ITP患者から血小板を分離し血小板に結合している抗体(platelet-associated anti-GPIIb-IIIa autoantibodies)をエーテル解離し、その特性を解析した結果、自己抗体は主としてGPIIbを認識していること、その認識部位はイムノプロットでは検出できず、GPIIbの立体構造依存性であること、一部の症例ではGPIIbのN末端のβプロペラが重要であること、を報告してきた<sup>11)</sup>。

最近、筆者らはITPの抗GPIIb-IIIa抗体はマウスGPIIb-IIIaとの反応性が著明に低下し、この反応性の低下はマウスGPIIbとヒトGPIIbの差違に起因していることを見出した<sup>16)</sup>。ヒトとマウスGPIIbはアミノ酸レベルで81% (核酸レベルで82%)の相同性を有している。N末端には449個のアミノ酸より構成されるβプロペラ構造が存在し(W1~W7の7つのプロペラより構成されている)、特にそのループ構造においてヒトとマウス間でアミノ酸の相違が見られる(図5)。そこでさらにエピトープを限定するため、抗GPIIb-IIIa抗体を有するITP患者15例に関してヒトGPIIbのN末端から各ループ構造までを順番にマウスGPIIbに置換したキメラGPIIbを作製し、ヒトGPIIIaと共に強制発現させ解析した。また、逆にマウスGPIIbのN末端から各ループ構造までをヒトGPIIbに置換したキメラGPIIbも作製し、最終的には関連するアミノ酸を1つずつマウス配列に置換して検討した。その結果、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)が自己抗原として重要であることが明らかとなっ

た(図5B)<sup>16)</sup>。さらに、図6に示すようにβプロペラ領域のN末端から前半部分において主要な自己抗体のエピトープ領域を3カ所同定し(グループA, グループB, グループC)、さらに3例(症例17, 23, 36)においてそのエピトープの局在を限定することが可能であった。図7に症例17と23の成績を示しているが、症例17ではW1:1-2ループ内でのS29K変異、R32S変異およびW2:3-4ループでのE136Q変異、R139G変異にて自己抗体の反応性は完全に消失し、症例23においても同様の結果であった。W1:1-2ループとW2:3-4ループは一次構造では離れた部位であるが、立体構造で見ると両者は互いに近接しておりこれらのループ内においてS29, R32, R139, E136残基が自己抗原として重要であることが明らかとなった(図6)<sup>21)</sup>。このようにITPにおける抗GPIIb-IIIa抗体のエピトープは、GPIIbのβプロペラ構造のごく限定された領域に存在することが示された。これに合致する成績として、血小板関連抗GPIIb-IIIa抗体(IgG)のκとλの比率を検討すると、多くの症例でκあるいはλのみが検出され、ITPにおいて極めて限定されたB細胞が自己抗体を産生していることを示唆する成績と考えられる<sup>16)</sup>。ITPのごく一部の症例ではあるが、このように極めて限定された領域が自己抗原として認識されていることは、なんらかの外来抗原との分子相同性(molecular mimicry)によりITPが発症することを示唆する成績と考えられる。

## 5. T細胞の異常

ITPにおける主要な自己抗原はGPIIb-IIIaやGPIb-IXであるが、これらの抗原に対する抗体産生には自己反応性T細胞の関与が必要であると考えられる。KuwanaらはITP患者からGPIIb-IIIa反応性T細胞の反応性を検討した結果、これらの細胞はCD4<sup>+</sup>T細胞でHLA-DR拘束性を有してい

	patient no.	m(W1:4-1)H	m(W1:1-2)H	m(W1:2-3)H	m(W2:2-3)H	m(W2:3-4)H	m(W3:4-1)H	m(W4:4-1)H
Group A (2)	PT17	99.5	-1.5	-1.7	-4.7	NT	-2.9	0.3
	PT23	72.7	18.9	-25.0	-18.4	-6.6	-20.6	15.2
	PT3	84.4	83.3	19.6	12.7	NT	2.9	7.9
Group B (5)	PT36	134.2	116.6	1.5	NT	1.7	2.6	3.8
	PT41	88.7	97.5	50.3	NT	51.0	44.6	22.3
	PT42	85.6	105.0	47.5	NT	41.3	20.5	13.5
	PT12	89.7	87.1	57.5	30.9	9.1	6.8	-1.7
Group C (4)	PT1	75.2	NT	93.2	93.7	102.2	27.3	13.0
	PT6	109.1	NT	232.2	115.9	103.1	30.7	30.7
	PT34	94.0	91.7	108.5	NT	88.3	-3.4	12.1
	PT45	94.3	91.4	95.3	NT	73.5	13.5	6.5
Others (4)	PT2	87.5	80.3	45.8	36.0	NT	19.6	18.9
	PT5	101.5	82.4	74.0	61.6	43.4	39.7	18.3
	PT7	104.9	NT	111.4	90.5	105.3	60.3	48.6
	PT37	123.5	128.5	102.8	NT	114.1	65.4	45.9 (%)

NT: not tested

図6. ITPにおけるGPⅡb-Ⅲa上での自己抗原の局在部位（文献16を改変し引用）

ヒトGPⅡbのN末端から各ループ構造までを順番にマウスGPⅡbに置換したキメラGPⅡbを作製し、ヒトGPⅢaと共発現させ解析した。m(W1:4-1)Hとは、ヒトGPⅡbのN末端からW1:4-1ループまでをマウスGPⅡbに置換したキメラGPⅡbを意味する（以下同様）。枠で示したように、抗GPⅡb-Ⅲa抗体の反応性が著明に低下する領域が少なくとも3か所存在することが明らかとなった（グループA、グループB、グループC）。

ることを示した<sup>17)</sup>。さらにB細胞と共培養するとIgG型抗GPIIb-IIIa抗体産生を誘導し、ヘルパー活性を有していた。現在考えられている抗血小板自己抗体の産生機序は、GPIIb-IIIaなどの自己抗原はマクロファージに代表される抗原提示細胞（APC）によりプロセッシングを受けHLAクラスII分子上に抗原ペプチドとして表出される。自己反応性のCD4<sup>+</sup> T細胞はこのHLAクラスII分子と抗原ペプチドの複合体を認識し活性化する。このT細胞はさらに自己抗体産生B細胞に対してヘルパー活性を示し、自己抗体の産生が持続すると考えられる。これらの自己抗体産生は主として脾臓において行われている（図

1)。

興味深いことに、これらのGPIIb-IIIa反応性T細胞は血小板に存在する非修飾GPIIb-IIIaをプロセッシングしたAPCに対しては反応せず、還元処理やトリプシン処理など人為的に構造を修飾したGPIIb-IIIaをプロセッシングしたAPCに対して反応するとの成績が示されている<sup>17)</sup>。このことは、自己反応性T細胞は非修飾GPIIb-IIIaのプロセッシングから作製されたペプチドには反応せず、修飾されたGPIIb-IIIaから作製されたペプチド（これらペプチドは通常はAPC上に表出されないため、潜在性ペプチドと呼ばれている）を認識し反応することを示唆している。ITPにおい

トピックス

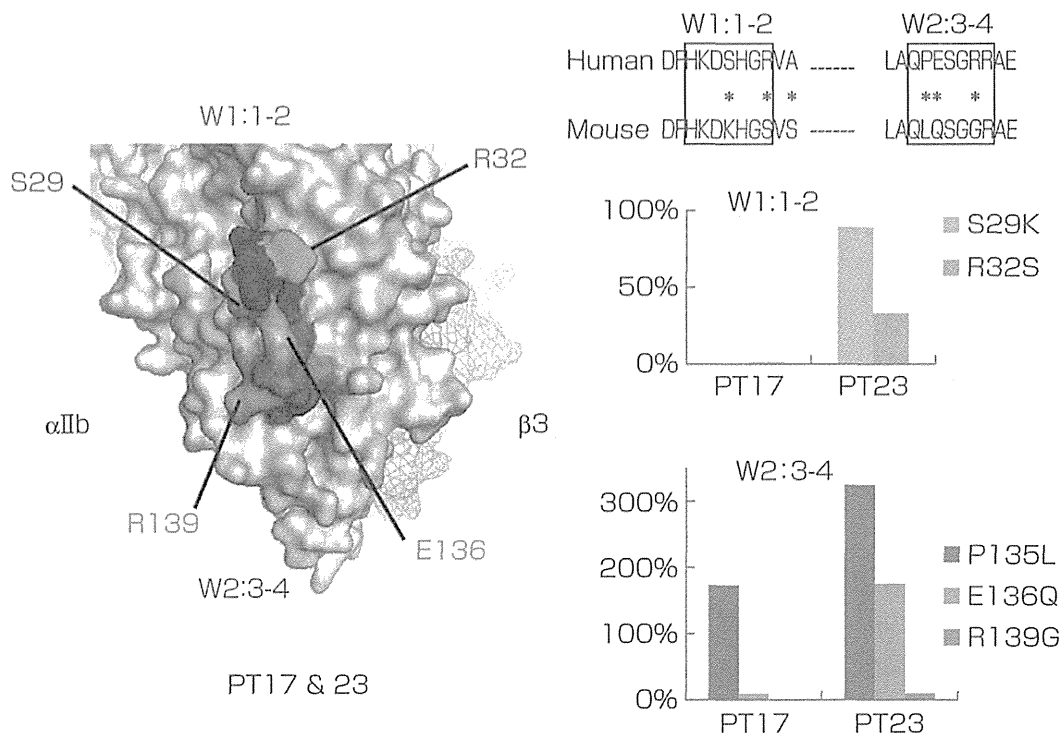


図7. 症例17および23(グループA)における自己抗原の同定(文献16を改変し引用) グループAに属する症例17および23では、その自己抗原としてW1:1-2ループとW2:3-4ループで形成される抗原、特にS29, R32, R139, E136が自己抗原として重要な残基であることが明らかとなった。このように一部の症例では、GPIIb上の自己抗原が極めて限定された部位であることが明らかとなった。

ては、なんらかの病的状態(例えばウイルス感染など)において自己抗原が修飾を受け、その潜在性ペプチドがAPCにより強力に提示されることによりT細胞はそれを非自己として認識し免疫反応が誘導されるのかもしれない。

また、ITP患者におけるTh1/Th2比の増加、Th17細胞およびIL17レベルの増加、oligoclonal T細胞の増加、更に自己血小板(おそらく巨核球に対しても)に対する傷害性T細胞の存在などのT細胞の異常が報告されている<sup>18)</sup>。特に抗血小板自己抗体および自己血小板傷害性T細胞の出現はITP患者における免疫寛容の破綻を意味しており、他の自己免疫疾患と同様に制御性T細胞(Treg)の異常が注目されている。Tregは末梢血CD4陽性細胞の5~10%を占めており、細胞免疫および液性免疫を抑制することにより自己免疫反応からhostを守る上で重要な役割を果たし

ている。ITP患者においてもTreg細胞数の低下やTreg機能の低下が報告されている<sup>19)</sup>。しかし、なぜTregの異常がITPのような臓器特異的自己抗体の産生を促すのかは現時点では不明である。Stasiらは抗CD20抗体であるリツキシマブにてB細胞を除去したITP患者において、特にリツキシマブ有効例でTregの数および機能が回復したことを報告しており<sup>20)</sup>、Tregの異常発現にはB細胞-T細胞相互作用が関与していることが示唆される。

おわりに

本稿では、ITPの自己抗原を中心とした免疫病態に関する最近の知見を筆者らの成績も交え紹介した。ITPにおけるGPIIb-IIIa上の主要な自己抗原は、GPIIb上のN末端領域に局限していることが明らかとなった。さらにITPのごく一部の症

例においては、GPIIb上の自己抗原は極めて限定された部位であった。日常診療においてITPの診断はいまだ除外診断が主体である。ITPのさらなる免疫病態の解析は、ITPに対する特異的検査法の開発のみならず新規治療法の開発に大きく寄与するものと確信する。

本稿の一部は厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患研究克服事業）、「血液凝固異常症に関する調査研究」の助成を受けた。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：富山佳昭；講演料（協和発酵キリン，グラクソ・スミスクライン）

## 文 献

- 1) Harrington WJ, et al: Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 38: 1-10, 1951.
- 2) Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 346: 995-1008, 2002.
- 3) McMillan R: The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 44 (Suppl 5): S3-S11, 2007.
- 4) 富山佳昭：特発性血小板減少性紫斑病. *臨血* 49: 1298-1305, 2008.
- 5) Rodeghiero F, et al: Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood* 113: 2386-2393, 2009.
- 6) McMillan R, et al: Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 103: 1364-1369, 2004.
- 7) 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. *臨血* 52: 627-632, 2011.
- 8) Kelton JG, et al: A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet-associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 60: 1050-1053, 1982.
- 9) McMillan R, et al: Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood* 70: 1040-1045, 1987.
- 10) Kiefel V, et al: Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 79: 256-262, 1991.
- 11) Tomiyama Y, Kosugi S: Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol* 81: 100-105, 2005.
- 12) McMillan R, et al: Prospective evaluation of the immunobead assay for the diagnosis of adult chronic immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* 1: 485-491, 2003.
- 13) Tomiyama Y, et al: Demonstration of platelet antigens that bind platelet-associated autoantibodies in chronic ITP by direct immunoprecipitation procedure. *Br J Haematol* 75: 92-98, 1990.
- 14) Brighton TA, et al: Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. *Blood* 88: 194-201, 1996.
- 15) Fujisawa K, et al: The effect of therapy on platelet-associated autoantibody in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 81: 2872-2877, 1993.
- 16) Kiyomizu K, et al: Recognition of highly restricted regions in the  $\beta$ -propeller domain of  $\alpha$ IIb by platelet-associated anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood* 120: 1499-1509, 2012.
- 17) 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.
- 18) Semple JW, Provan D: The immunopathogenesis of immune thrombocytopenia: T cells still take center-stage. *Curr Opin Hematol* 19: 357-362, 2012.
- 19) Yu J, et al: Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 112: 1325-1328, 2008.
- 20) Stasi R, et al: Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood* 112: 1147-1150, 2008.

## 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の治療

柏木 浩和<sup>1</sup>, 富山 佳昭<sup>1,2</sup>

Key words: Primary ITP, Splenectomy, Rituximab, Thrombopoietin-receptor agonist

### 1. はじめに

特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic thrombocytopenic purpura, primary immune thrombocytopenia, ITP) は抗血小板自己抗体を中心とする免疫的機序により血小板の破壊亢進および産生障害により、血小板減少をきたす自己免疫疾患である。従来、ステロイドおよび脾摘を中心とする治療が行われてきたが、本邦では *Helicobacter Pylori* (HP) 菌感染が原因 (誘因) となっている症例が多数いることが明らかにされ、HP 感染者には除菌療法が最初に行うべき治療となった。また、近年、トロンボポエチン受容体作動薬 (TPO-RA) が使用可能となりステロイドおよび脾摘無効の難治性 ITP に対する治療が大きく変わりつつある。

### 2. ITP の病態と診断

ITP における血小板減少の主たる病態は血小板膜糖蛋白、特に GPIIb-IIIa (インテグリン  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) あるいは GPIIb-IX-V 複合体を標的とする抗血小板自己抗体による血小板破壊の亢進である<sup>1)</sup>。自己抗体に感作された血小板は脾臓を中心とした網内系のマクロファージに捕捉、貪食される。また抗血小板自己抗体は骨髄中の巨核球にも反応し、巨核球成熟障害や細胞死を誘導し血小板産生を抑制する<sup>2)</sup>。我々は血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体のエピトープの多くが GPIIb の N 端側にごく限られた領域に存在することを示した<sup>3,4)</sup>。ITP においては Th1/Th2 バランスの異常、制御性 T 細胞 (Treg) の機能低下などの T 細胞異常が報告されており自己抗体産生に関与していると考えられている<sup>5,6)</sup>。また抗血小板自己抗体以外に、細胞障害性 T 細胞による血小板および巨核球

の破壊が血小板減少に関与している可能性がある<sup>7,8)</sup>。

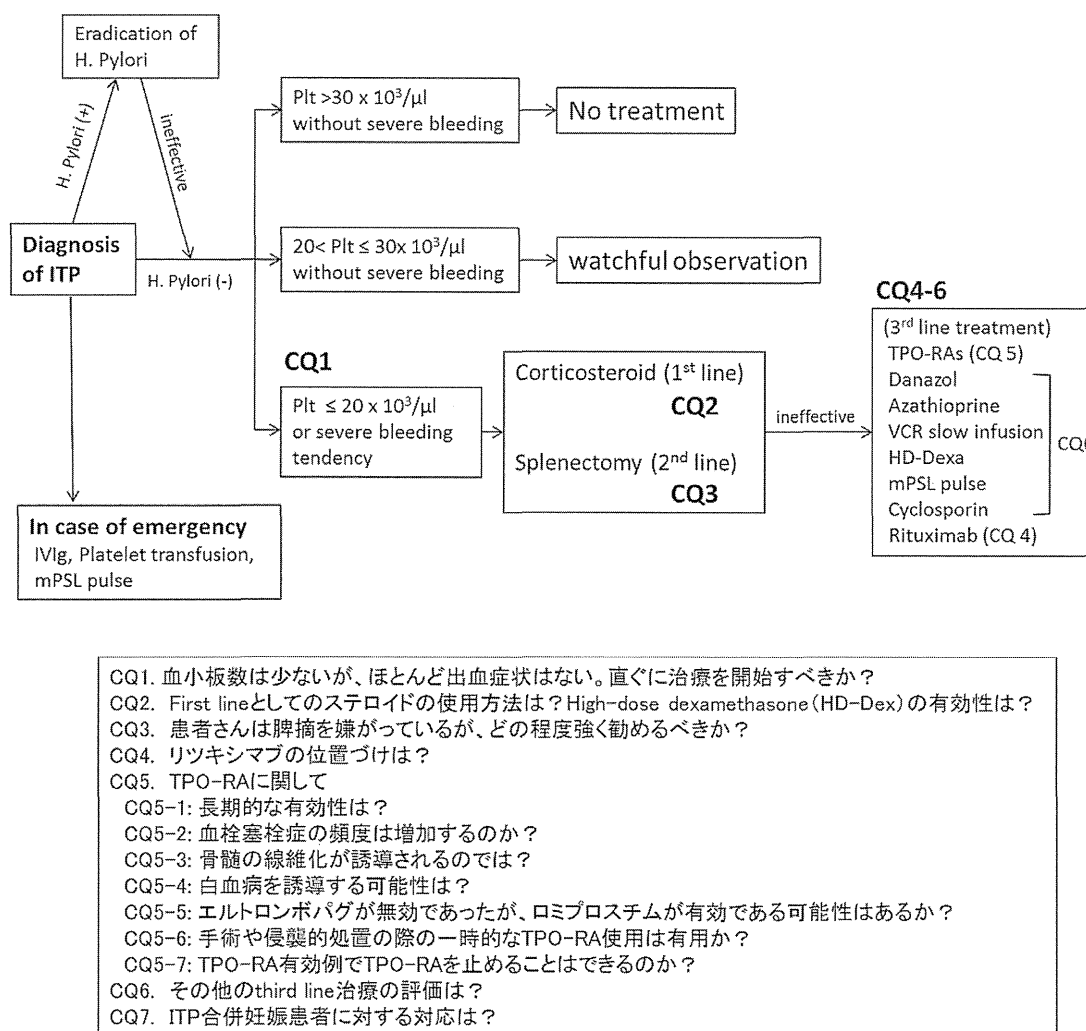
ITP は自己免疫疾患であることからその免疫異常を検出することが診断に有用であると考えられ、血小板関連抗 GPIIb-IIIa 抗体の測定などが限られた施設で行われているがその標準化はなされていない。従って、ITP の診断は依然として除外診断になる。除外すべき疾患は血小板減少をきたすあらゆる疾患であるが、特に EDTA 依存性偽性血小板減少、先天性血小板減少症に注意が必要である。また再生不良性貧血 (AA) などの血小板産生障害による血小板減少との鑑別に、幼若血小板の検出および血中トロンボポエチン (TPO) 濃度測定が有用である<sup>9)</sup>。

### 3. ITP の治療

最近の ITP 治療の進歩を受けて、厚生労働省難治性疾患克服事業「血液凝固異常症に関する調査」ITP 研究班から、成人 ITP 治療の参照ガイド 2012 年版が発表された<sup>10)</sup> (Fig. 1)。その最大の特徴は、最初に HP 感染の有無をスクリーニングし、HP 陽性例では血小板数に関わらず除菌療法を勧めていることである。これは本邦における HP 陽性率の高さ (中高年 ITP 患者の 70% 以上が HP 陽性) と、除菌療法の高い有効性 (血小板増加反応が約 60% に認められ、その効果は長期間持続する) が示されたことによる<sup>11)</sup>。HP 非感染例および除菌無効例では血小板数および臨床症状に応じて治療を開始する。First line は副腎皮質ステロイド (主にプレドニゾロン)、second line は脾摘を推奨し、これらの治療に無効例に対し、TPO-RA、リツキシマブを含む多くの third line 治療を推奨している。この参照ガイドの発表後も特に TPO-RA の使用経験の増加とともに、我々が日常臨床で遭遇するクリニカルクエスチョン (CQ) に関する報告が蓄積されつつある。以下にいくつかの CQ とそれに関する現時点での一般的な考えを概説する。

<sup>1</sup> 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科

<sup>2</sup> 大阪大学医学部附属病院輸血部



**Fig. 1** The 2012 reference guide for management of adult cITP published from the study group of the Specific Disease Treatment Research Program for Intractable Diseases of the Ministry of Health Labour and Welfare of Japan<sup>10)</sup> and clinical questions (CQ). IVIg, intravenous immunoglobulin; mPSL, methylprednisolone; VCR, vincristine; HD-Dexa, high dose dexamethasone.

**CQ1. 血小板数は少ないが、ほとんど出血症状はない。直ぐに治療を開始すべきか？**

慢性 ITP 患者の多くは、極端な血小板低値にもかかわらずほとんど出血症状がないか、軽微な紫斑を認める程度である。参照ガイドにおいては、HP 陰性あるいは HP 除菌無効例においては、血小板数 3 万/μl 以上で出血症状がない場合は無治療経過観察、血小板数 2 万/μl 以下あるいは強い出血症状を認める場合は治療を開始するとしている。これは、複数の疫学調査において血小板数 3 万/μl 以上では一般人口と比べ生命予後に大きな差がないが、2~3 万以下の場合には重篤な出血が増える可能性があることが示されたことに基づく<sup>12, 13)</sup>。現時点でこのような形の治療介入により本当に致命的な出血を減らせるかどうかは不明であるが、2011 年の ASH ガイ

ドラインでは、「多くの臨床医は血小板数 3 万未満を治療開始の閾値と認識しており、この慣習を否定する証拠はない (*we find no evidence to contradict this practice*)」という理由で血小板数 3 万/μl 未満での治療開始を推奨している<sup>14)</sup>。一方、ドイツの最近のガイドラインでは出血症状に主眼をおき、WHO の bleeding grade 3 以上（輸血を必要とする程度の出血）が絶対的な治療適応であり、単なる血小板減少やグレード 1, 2 の軽度な出血症状の場合は経過をみるという選択肢も認めている<sup>15)</sup>。このようなアプローチは特に小児~若年患者においては考慮してもよいかも知れない。実際、Cohen らは、血小板数 3 万/μl 以下の ITP 症例における致死性的あるいは重篤な出血は 60 歳以上の患者において顕著に増加することを示している<sup>12)</sup>。

**CQ2. First line としてのステロイドの使用方法は？  
High-dose dexamethasone (HD-Dex) の有効性は？**

参照ガイドでは、プレドニゾン (PSL) 0.5~1 mg/kg/day で開始し 2~4 週間使用後、漸減するとしている。これにより約 80% の症例で血小板数は 3 万/ $\mu$ l 以上に増加するが、寛解となりステロイドを中止できる症例は 10~20% に過ぎず<sup>10)</sup>、初期治療の有効性を高める必要がある。HD-Dex は初発例における顕著な有効性が報告されており<sup>16, 17)</sup>、またリツキシマブを併用することによって寛解例を増加させうる可能性も報告されている<sup>18)</sup>。しかしこれらの治療法と通常量の PSL 投与との RCT の結果は報告されていない。最近報告された本邦からの HD-Dex と PSL 通常量を比較した後方視的な研究では、相反する結果となっており<sup>19, 20)</sup>、現時点では PSL 通常量で開始することが推奨される。

**CQ3. 患者さんは脾摘を嫌がっているが、どの程度強く勧めるべきか？**

参照ガイドでは、無治療あるいはステロイド維持量で血小板数 3 万/ $\mu$ l 以下の症例、あるいはステロイドによる副作用が強く十分な治療が行えない症例、かつ診断後 6~12 ヶ月以上経過した症例においては second line 治療として脾摘を推奨している。しかし、TPO-RA のように (少なくとも短期的には) 高い有効性と安全性を有する薬剤が保険承認されていること、また脾摘の短期・長期的な合併症が明らかにされてきたこと、さらに患者は侵襲的処置への潜在的な恐れがあることから、医者および患者ともに脾摘を回避する傾向が強くなってきており、その傾向は特に欧米において顕著である<sup>21)</sup>。

脾摘は現時点においても最も治療が期待できる治療法であり、約 60% の患者において長期的な寛解が得られることが繰り返し報告されている<sup>22, 23)</sup>。完全寛解が得られなくとも、多くの症例で部分寛解あるいは一時的な効果が得られることが多い。しかし 12~14% の患者においては無効であり、また有効例のうち 20~30% は数週から数年後に再燃する。高齢者においては合併症の増加が危惧され脾摘が難しい場合も多いが、必ずしも高齢者において脾摘の有効率が大きく低下するわけではない<sup>24)</sup>。ただ脾摘の効果を事前に予測する有効な方法は確立されていない。

脾摘後合併症で特に問題となるのは、感染症と血栓症である。脾摘患者では、莢膜を有する細菌 (肺炎球菌、髄膜炎菌、インフルエンザ桿菌など) による重篤な感染症が増加する可能性があり、急激に発症し、敗血症、髄膜炎そして DIC と進展する予後不良な病態は劇症型脾摘後感染症 (overwhelming postsplenectomy infection, OPSI) として知られている。OPSI は小児に多く、脾摘後の期間を問わず発症し (5 日~35 年)、極めて死亡率が高い (50~70%)<sup>25)</sup>。ITP 患者における OPSI の頻度の報告はないが、Boyle らは、脾摘された ITP 患者における敗血症の累積頻度は 11.1% であり、脾摘されていない ITP 患者の頻度 (10.1%) に比べ、わずかではあるが有意に増加していることを報告している<sup>21)</sup>。OPSI にはワクチン接種による予防と発熱など感染症が疑われる際の早期の抗生剤投与が有効である。また脾摘患者では脾摘後早期における門脈血栓症の増加と、長期的な静脈血栓症の増加が報告されている<sup>21)</sup>。

生存率という観点でみると、デンマークのコホート研究では脾摘を受けた ITP 患者は脾摘を受けなかった ITP 患者と比べて、脾摘後 90 日以内の死亡率は 2 倍ほど増加するが、それ以降は脾摘を受けなかった患者の半分以下に減少すると報告されている<sup>26)</sup>。Boyle らも、脾摘により感染症や血栓症のリスクは増加するにもかかわらず、脾摘患者の長期的な死亡のリスクは脾摘未施行例より有意に低下する (OR 0.8, CI 0.7~0.9) ことを示している<sup>21)</sup>。現時点では患者にこのような情報を提供し、十分な同意の上で脾摘を行うべきであると考えられる。

現時点では患者にこのような情報を提供し、十分な同意の上で脾摘を行うべきであると考えられる。

**CQ4. リツキシマブの位置づけは？**

リツキシマブは短期的には 60% 以上の有効率が報告され大いに期待されたが<sup>27)</sup>、長期的な有効率は 20~30% 程度であることが明らかになってきた<sup>28)</sup>。しかし、脾摘以外に無治療で長期的な寛解を得られる可能性がある魅力的な治療法であることには変わりはない。現時点ではリツキシマブの ITP での使用が承認されている国はないが、国際コンセンサス報告では、second line 治療として grade B、2011 年 ASH ガイドラインでは grade 2C で推奨されている<sup>14, 29)</sup>。本邦でも医師主導治験が終了し<sup>30)</sup>、現在保険申請中であるが、承認された場合にどの段階でリツキシマブを使用するかということが問題となってくる可能性がある。脾摘未施行患者に行ったメタアナリシスでは、リツキシマブを早い段階で使用した方が有効である可能性が指摘されており<sup>31)</sup>、脾摘を回避する目的で早期にリツキシマブが使用されることが多くなることが予想される。しかし、リツキシマブ投与により B 型肝炎ウイルス再活性化の危険性や、脾摘前に行われるワクチンへの反応性が低下する可能性があることを考慮に入れる必要がある<sup>32)</sup>。

**CQ5. TPO-RA に関して**

現在、皮下注製剤であるロミプロスチムと経口薬であるエルトロンボパグの 2 種類の TPO-RA が ITP 患者に使用されている<sup>33)</sup>。参照ガイドでは、TPO-RA は、ステ

ロイドおよび脾摘無効例の third line 治療として、(1)多発する、あるいは重篤な出血症状、ないし血小板数が3万/ $\mu$ l未満の症例に、(2)出血症状の軽減や血小板数を3~5万/ $\mu$ l以上に維持される最少量を使用する、ことが推奨されている。しかし新薬であることから実際に使用するときには多くの未解決な疑問がある。TPO-RAに関するCQを以下にまとめる。

#### CQ5-1. 長期的な有効性は？

昨年までに論文あるいは学会で報告されたこれらの薬剤の長期投与試験の結果では、エルトロンボパグでは最長6.5年間、ロミプロスチムで5年間にわたり高い有効率を維持していることが示されている<sup>34~36</sup>。

#### CQ5-2. 血栓塞栓症の頻度は増加するのか？

TPO-RAにおいて、最も危惧されている副作用のひとつが血栓塞栓症である。エルトロンボパグ長期試験では、血栓症は299例中16例(5.4%) (動脈血栓6例、静脈血栓8例、動脈+静脈血栓2例)、ロミプロスチム長期試験では291例中19例(6.5%) (件数として動脈血栓16件、静脈血栓9件)であったと報告されている<sup>34, 35</sup>。意外なことにITPにおける血栓塞栓症の発症頻度は、一般集団より約2倍程度多く、5.4~6.1%程度であることが複数の疫学調査で示されており<sup>37, 38</sup>、TPO-RAが血栓塞栓症を増加させるという明らかな証拠はない。また、エルトロンボパグは血小板機能に影響を与えないことが *in vivo* および *in vitro* で示されている<sup>39, 40</sup>。しかし一方で、血小板減少を合併した慢性肝疾患患者においては、侵襲的な処置のために短期的なTPO-RA使用の効果のみをみた臨床治験において、処置後に門脈血栓症が増加したことが報告されている<sup>41, 42</sup>。現時点では、抗リン脂質抗体陽性患者や担癌患者などの血栓症のリスクファクターを有する患者、特に血栓症の既往歴のある患者に対しては慎重な投与が必要であると考えらる。

#### CQ5-3. 骨髄の線維化が誘導されるのでは？

コラーゲン合成および沈着は血小板/巨核球に豊富に存在する transforming growth factor (TGF)- $\beta$  や basic-fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF) の影響を受けることから<sup>43</sup>、TPO-RAにより骨髄の線維化が進行する可能性がある。エルトロンボパグおよびロミプロスチム長期試験においては、骨髄生検が行われた約30%の症例で軽度のレチクリン線維の増生が報告されていた<sup>34, 35</sup>。しかし正常人の骨髄においてもレチクリン増生はしばしば認められることから<sup>44</sup>、TPO-RAにより線維化が進行しているかどうかの判断は難しかった。昨年のアメリカ血液学会では、ロミプロスチム投与前後に計画的に骨髄生検を行い、36例は投与前と投与1年後、36

例は投与前と投与2年後の骨髄線維化の状況について比較した結果が報告されている。その結果、投与2年目まではわずかなレチクリン増生の徴候を認めたが、コラーゲン線維の増加は認められなかった<sup>45</sup>。一方、最近報告された単一施設における66例141回行われた骨髄生検の結果では、治療前では67% (10/15)であった‘線維化なし’の割合が、治療後は22% (15/66)に低下し、また治療中に複数回骨髄生検を行った32例中11例において線維化の進行を認め、grade 2~3の線維化(European consensus MF scale<sup>46</sup>)を認める割合が増加していた<sup>47</sup>。線維化を認めた症例の中で骨髄不全の兆候やクローナルな異常を認めた症例はないが、長期使用例では末梢血所見には注意し、異常所見が認められた場合は骨髄生検を積極的に行うべきであろう。

#### CQ5-4. 白血病を誘導する可能性は？

TPO受容体は血液幹細胞や白血病細胞にも発現しているため、TPO-RAの長期使用による血液腫瘍の増加も危惧されている。エルトロンボパグ長期試験では血液腫瘍としては、2例のリンパ腫、ロミプロスチム長期試験でも2例(CLL, リンパ腫)が発症したことが報告されているが、MDSや白血病の発症は認めていない<sup>34, 35</sup>。しかし、FDAの副作用報告集計の解析からは、TPO-RAとAMLの相関が指摘されている<sup>48</sup>。Low-grade MDSにおける血小板減少に対するTPO-RAの有効性やエルトロンボパグの *in vitro* における白血病細胞増殖抑制効果が報告されている一方で<sup>49, 50</sup>、low-intermediate MDSに対するロミプロスチム投与により芽球およびAML発症頻度の増加が報告されている<sup>51</sup>。TPO-RA使用前にはMDSを慎重に否定しておく必要があると考える。

#### CQ5-5. エルトロンボパグが無効であったが、ロミプロスチムが有効である可能性はあるか？

ロミプロスチムとエルトロンボパグの作用機序は必ずしも同一ではないことから、エルトロンボパグ(あるいはロミプロスチム)無効例に対し他剤が有効である可能性がある。実際、最近、TPO-RAの変更が有効であった症例や後方視的な解析結果が複数報告されており、試みる価値はあると思われる<sup>52~56</sup>。

#### CQ5-6. 手術や侵襲的処置の際の一時的なTPO-RA使用は有用か？

TPO-RAの有効性と安全性が実感されてくるとともに、手術や侵襲的処置あるいは抜歯時などの際の一時的な血小板増加の目的でTPO-RAの使用を考えることも多くなってきている。現時点ではTPO-RAの一時的な使用に関するエビデンスが少ないことから参照ガイドではこのような目的での使用に関して言及して



いない。前述したように肝疾患における血小板減少例では、TPO-RA 使用により門脈血栓症の増加を認めしたが、同時に多くの症例が血小板輸血なしで安全に侵襲的処置を行えたことを示している。ITP においてはエルトロンボパグの臨床治験中に手術や各種の処置を行った症例や歯科的処置を行った症例の解析結果が最近報告され、やはり多くの症例で IVIG や血小板輸血を回避でき安全に処置できたことが示されている<sup>57, 58)</sup>。ただし、TPO-RA では中止時に急激な血小板減少をきたす恐れがあるので (rebound thrombocytopenia)、処置後の減量を慎重に行う必要があるかもしれない。また脾摘前にロミプロスチムを使用した症例で、脾摘後に血小板数が 200 万以上まで著増し血小板 apheresis が必要であった症例が報告されている<sup>59)</sup>。

#### CQ5-7. TPO-RA 有効例で TPO-RA を止めることはできるのか？

ロミプロスチム長期試験では、291 例中 9 例 (3%)、エルトロンボパグ長期試験では 299 例中 13 例 (4%) において TPO-RA を中止しても長期的に 5 万以上の安定した血小板数を維持できたことが報告されている<sup>34, 35)</sup>。ごく少数例ではあるが、TPO-RA 中止後も長期的な寛解をえることができる症例は存在するようである。

#### CQ6. その他の third line 治療の評価は？

従来、難治性の ITP に対して、ダナゾール、シクロスポリン、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチル (MMF)、ジアフェニルスルホン (Dapsone)、ピンカルカロイドなど多くの治療が行われてきた。いずれもエビデンスに乏しく、2011 年 ASH ガイドラインでは全く触れられておらず<sup>14)</sup>、また保険承認もされていない。しかし TPO-RA の長期投与の影響が不明であることから、これらの薬剤を選択することも考えられる。特にシクロスポリンは少数例 (12 例) の解析ではあるが、血小板増加反応が 80% 以上に見られ、40% 以上が長期的に完全寛解を維持しているとの報告があり<sup>60)</sup>、良質なエビデンスの蓄積が期待される。しかし、現時点では TPO-RA の高い有効性と安全性が示されていることから、これらの薬剤の効果を検証する臨床治験は困難となっている。

#### CQ7. ITP 合併妊娠患者に対する対応は？

ITP 合併妊娠患者の治療に対するエビデンスは非常に乏しい。一般に治療の開始時期は妊娠していない患者と同様に、血小板数 3 万以下あるいは出血傾向を認める場合であり、ステロイドと IVIG は比較的 safely に使用できると考えられている<sup>14, 29)</sup>。ただし、本邦で行われたアン

ケート調査の結果では、大量のステロイドを長期間使用した場合に新生児に合併症が多かったことから、PSL は 20 mg/日以下で使用することが望ましいとされている<sup>61)</sup>。脾摘は妊娠中期に行われた報告はあるが<sup>62)</sup>、妊娠初期には流産の危険性は高く、また妊娠末期には技術的に困難である。TPO-RA の妊婦に対する安全性は確立されていないため、治療上どうしても必要な場合を除き投与すべきではない。従って、現時点ではステロイドに対する反応が不良である場合、IVIG を繰り返す方法が最も現実的な対応となる。また出産時には一般的には血小板数 5 万/ $\mu$ l 以上を目標として、ステロイドあるいは IVIG が行われることが多いが、これらの治療の有効性と安全性に関するエビデンスもない。ITP 合併妊娠には、内科、産科、麻酔科、小児科など多くの科が関与しており、それぞれの立場により若干の考え方の相違点があり、例えば産科医は内科医に比べ妊娠中の血小板をより高値に維持することを望む傾向にある。ITP 患者がより安心して妊娠、出産されるための診療参照ガイドの作成が厚生労働省難治性疾患克服事業 ITP 研究班で進められている<sup>63)</sup>。

#### おわりに

ITP の治療に関する新たな参照ガイドが作成されたが、エビデンスに乏しいものが多く、現場での臨床医の判断に任される部分が大きい。特に TPO-RA やリツキシマブのような新たな治療法に関しては多くの可能性と疑問点が残っている。本稿が日頃の ITP 診療における疑問解決の一助となれば幸いである。また、HP 除菌療法と脾摘を除き、現在の ITP 治療では治癒を得ることは難しい。今後の基礎研究の発展と良質な臨床研究により ITP 治療がさらに前進していくことを期待する。

著者の COI (conflicts of interest) 開示：富山佳昭；講演料 (グラクソスミスクライン株式会社、協和発酵キリン株式会社)

#### 文 献

- 1) Kashiwagi H, Tomiyama Y. Pathophysiology and management of primary immune thrombocytopenia. *Int J Hematol.* 2013; **98**: 24-33.
- 2) McMillan R, Nugent D. The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol.* 2005; **81**: 94-99.
- 3) Tomiyama Y, Kosugi S. Autoantigenic epitopes on platelet glycoproteins. *Int J Hematol.* 2005; **81**: 100-105.
- 4) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Nakazawa T, et al. Recognition of highly restricted regions in the  $\beta$ -propeller domain of  $\alpha$ IIb by platelet-associated anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 autoantibodies in primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2012; **120**: 1499-1509.

- 5) Cooper N, Bussell J. The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2006; **133**: 364-374.
- 6) Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, Kuwana M. Critical role of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp Hematol.* 2012; **40**: 279-289.
- 7) Olsson B, Andersson PO, Jernås M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med.* 2003; **9**: 1123-1124.
- 8) Chow L, Aslam R, Speck ER, et al. A murine model of severe immune thrombocytopenia is induced by antibody- and CD8<sup>+</sup> T cell-mediated responses that are differentially sensitive to therapy. *Blood.* 2010; **115**: 1247-1253.
- 9) 柏木浩和, 富山佳昭. 特発性血小板減少性紫斑病. *臨血.* 2012; **53**: 178-184.
- 10) 藤村欣吾, 宮川義隆, 倉田義之, 桑名正隆, 富山佳昭, 村田満. 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. *臨血.* 2012; **53**: 433-442.
- 11) 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 Hematol.* 2005; **81**: 162-168.
- 12) Cohen YC, Djulbegovic B, Shamai-Lubovitz O, Mozes B. The bleeding risk and natural history of idiopathic thrombocytopenic purpura in patients with persistent low platelet counts. *Arch Intern Med.* 2000; **160**: 1630-1638.
- 13) Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2001; **97**: 2549-2554.
- 14) Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood.* 2011; **117**: 4190-4207.
- 15) Matzdorff A. Treatment guidelines & algorithm. In: Salama A, ed. *Current & Emerging Treatments for Immune Thrombocytopenia.* London, Future Medicine; 2013: 31-45.
- 16) Cheng Y, Wong RS, Soo YO, et al. Initial treatment of immune thrombocytopenic purpura with high-dose dexamethasone. *N Engl J Med.* 2003; **349**: 831-836.
- 17) Mazzucconi MG, Fazi P, Bernasconi S, et al. Therapy with high-dose dexamethasone (HD-DXM) in previously untreated patients affected by idiopathic thrombocytopenic purpura: a GIMEMA experience. *Blood.* 2007; **109**: 1401-1407.
- 18) Zaja F, Baccarani M, Mazza P, et al. Dexamethasone plus rituximab yields higher sustained response rates than dexamethasone monotherapy in adults with primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2010; **115**: 2755-2762.
- 19) Nakazaki K, Hosoi M, Hangaishi A, Ichikawa M, Nannya Y, Kurokawa M. Comparison between pulsed high-dose dexamethasone and daily corticosteroid therapy for adult primary immune thrombocytopenia: a retrospective study. *Intern Med.* 2012; **51**: 859-863.
- 20) Sakamoto K, Nakasone H, Tsurumi S, et al. Prednisone versus high-dose dexamethasone for untreated primary immune thrombocytopenia. A retrospective study of the Japan Hematology & Oncology Clinical Study Group. *J Thromb Thrombolysis.* 2014; **37**: 279-286.
- 21) Boyle S, White RH, Brunson A, Wun T. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood.* 2013; **121**: 4782-4790.
- 22) Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood.* 2004; **104**: 2623-2634.
- 23) Vianelli N, Palandri F, Polverelli N, et al. Splenectomy as a curative treatment for immune thrombocytopenia: a retrospective analysis of 233 patients with a minimum follow up of 10 years. *Haematologica.* 2013; **98**: 875-880.
- 24) Gonzalez-Porras JR, Escalante F, Pardal E, et al. Safety and efficacy of splenectomy in over 65-yrs-old patients with immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol.* 2013; **91**: 236-241.
- 25) 緒方俊郎, 鹿毛政義. 肝硬変に対する脾摘を再考する その変遷と功罪. *肝臓.* 2010; **51**: 205-218.
- 26) Yong M, Thomsen RW, Schoonen WM, et al. Mortality risk in splenectomised patients: a Danish population-based cohort study. *Eur J Intern Med.* 2010; **21**: 12-16.
- 27) Arnold DM, Dentali F, Crowther MA, et al. Systematic review: efficacy and safety of rituximab for adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med.* 2007; **146**: 25-33.
- 28) Patel VL, Mahévas M, Lee SY, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood.* 2012; **119**: 5989-5995.
- 29) Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2010; **115**: 168-186.
- 30) 宮川義隆, 勝谷慎也, 矢野尊啓, ほか. 慢性型特発性血小板減少性紫斑病に対するリツキシマブの R-ITP 医師主導治験 [抄録]. *臨血.* 2013; **54**: 1198. 抄録番号 OS3-86.
- 31) Auger S, Duny Y, Rossi JF, Quittet P. Rituximab before splenectomy in adults with primary idiopathic thrombocytopenic purpura: a meta-analysis. *Br J Haematol.* 2012; **158**: 386-398.
- 32) Nazi I, Kelton JG, Larché M, et al. The effect of rituximab on vaccine responses in patients with immune thrombocytopenia. *Blood.* 2013; **122**: 1946-1953.
- 33) Tomiyama Y. Thrombopoietin receptor agonists. In: Salma A, ed. *Current & Emerging Treatments for Immune Thrombocytopenia.* London, UK: Future Medicine; 2013: 89-102.
- 34) Kuter DJ, Bussell JB, Newland A, et al. Long-term treatment with romiplostim in patients with chronic immune thrombo-

- cytopenia: safety and efficacy. *Br J Haematol.* 2013; **161**: 411-423.
- 35) Saleh MN, Bussel JB, Cheng G, et al. Safety and efficacy of eltrombopag for treatment of chronic immune thrombocytopenia: results of the long-term, open-label EXTEND study. *Blood.* 2013; **121**: 537-545.
  - 36) Bussel JB, Saleh MN, Wong RS, et al. Update on the safety and efficacy of EXTENDED treatment with eltrombopag (EPAG) in adults with chronic immune thrombocytopenia (ITP) [abstract]. *Blood.* 2013; **122**: Abstract2315.
  - 37) Sarpatwari A, Bennett D, Logie JW, et al. Thromboembolic events among adult patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General Practice Research Database. *Haematologica.* 2010; **95**: 1167-1175.
  - 38) Severinsen MT, Engebjerg MC, Farkas DK, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2011; **152**: 360-362.
  - 39) Psaila B, Bussel JB, Linden MD, et al. *In vivo* effects of eltrombopag on platelet function in immune thrombocytopenia: no evidence of platelet activation. *Blood.* 2012; **119**: 4066-4072.
  - 40) Haselboeck J, Kaider A, Pabinger I, Panzer S. Function of eltrombopag-induced platelets compared to platelets from control patients with immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 2013; **109**: 676-683.
  - 41) Afdhal NH, Giannini EG, Tayyab G, et al. Eltrombopag before procedures in patients with cirrhosis and thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 2012; **367**: 716-724.
  - 42) Dultz G, Kronenberger B, Azizi A, et al. Portal vein thrombosis as complication of romiplostim treatment in a cirrhotic patient with hepatitis C-associated immune thrombocytopenic purpura. *J Hepatol.* 2011; **55**: 229-232.
  - 43) Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol.* 2007; **139**: 351-362.
  - 44) Beckman EN, Brown AW Jr. Normal reticulin level in iliac bone marrow. *Arch Pathol Lab Med.* 1990; **114**: 1241-1243.
  - 45) Janssens A, Rodeghiero F, Anderson D, et al. Results from a phase IV open-label study evaluating changes in bone marrow morphology in adult immune thrombocytopenia (ITP) patients receiving romiplostim: analysis of the 1- and 2-year romiplostim cohorts [abstract]. *Blood.* 2013; **122**: Abstract2312.
  - 46) Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 2005; **90**: 1128-1132.
  - 47) Ghanima W, Geyer JT, Lee CS, et al. Bone marrow fibrosis in 66 patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin-receptor agonists: a single-center, long-term follow-up. *Haematologica.* 2014; **99**: 937-944.
  - 48) Oshima Y, Yuji K, Tanimoto T, Hinomura Y, Tojo A. Association between acute myelogenous leukemia and thrombopoietin receptor agonists in patients with immune thrombocytopenia. *Intern Med.* 2013; **52**: 2193-2201.
  - 49) Sekeres MA, Kantarjian H, Fenaux P, et al. Subcutaneous or intravenous administration of romiplostim in thrombocytopenic patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Cancer.* 2011; **117**: 992-1000.
  - 50) Roth M, Will B, Simkin G, et al. Eltrombopag inhibits the proliferation of leukemia cells via reduction of intracellular iron and induction of differentiation. *Blood.* 2012; **120**: 386-394.
  - 51) Kantarjian HM, Mufti GJ, Fenaux P, et al. Treatment with the thrombopoietin (TPO)-receptor agonist romiplostim in thrombocytopenic patients (Pts) with low or intermediate-1 (int-1) risk myelodysplastic syndrome (MDS): follow-up AML and survival results of a randomized, double-blind, placebo (PBO)-controlled study [abstract]. *Blood.* 2012; **120**: Abstract421.
  - 52) Aoki T, Harada Y, Matsubara E, et al. Thrombopoietin receptor agonists in refractory immune thrombocytopenia: differential responses to eltrombopag and romiplostim: a case report and possible explanations. *J Clin Pharm Ther.* 2012; **37**: 729-732.
  - 53) Khellaf M, Viallard JF, Hamidou M, et al. A retrospective pilot evaluation of switching thrombopoietic receptor-agonists in immune thrombocytopenia. *Haematologica.* 2013; **98**: 881-887.
  - 54) Polverelli N, Palandri F, Iacobucci I, Catani L, Martinelli G, Vianelli N. Absence of bi-directional cross-resistance of thrombopoietin receptor agonists in chronic refractory immune thrombocytopenia: possible role of *MPL* polymorphisms. *Br J Haematol.* 2013; **161**: 142-144.
  - 55) D'Arena G, Guariglia R, Mansueto G, et al. No cross-resistance after sequential use of romiplostim and eltrombopag in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2013; **121**: 1240-1242.
  - 56) Tsukamoto S, Nakaseko C, Takeuchi M, et al. Safety and efficacy of romiplostim in patients with eltrombopag-resistant or -intolerant immune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2013; **163**: 286-289.
  - 57) Tarantino MD, Bakshi KK, Brainsky A. Hemostatic challenges in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with eltrombopag. *Platelets.* 2014; **25**: 55-61.
  - 58) Tarantino MD, Fogarty PF, Shah P, Brainsky A. Dental procedures in 24 patients with chronic immune thrombocytopenia in prospective clinical studies of eltrombopag. *Platelets.* 2014. Jan 16. [Epub ahead of print] as doi: 10.3109/09537104.2013.870333.
  - 59) Raval JS, Redner RL, Kiss JE. Plateletpheresis for postsplenectomy rebound thrombocytosis in a patient with chronic

- immune thrombocytopenic purpura on romiplostim. *J Clin Apher.* 2013; **28**: 321-324.
- 60) Emilia G, Morselli M, Luppi M, et al. Long-term salvage therapy with cyclosporin A in refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2002; **99**: 1482-1485.
- 61) Fujimura K, Harada Y, Fujimoto T, et al. Nationwide study of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnant women and the clinical influence on neonates. *Int J Hematol.* 2002; **75**: 426-433.
- 62) Felbinger TW, Posner M, Eltzschig HK, Kodali BS. Laparoscopic splenectomy in a pregnant patient with immune thrombocytopenic purpura. *Int J Obstet Anesth.* 2007; **16**: 281-283.
- 63) 宮川義隆, 柏木浩和, 高蓋寿朗, 他. 妊娠合併 ITP 診療の参照ガイド作成委員会. 妊娠合併特発性血小板減少性紫斑病診療の参照ガイド. *臨血.* 2014; **55**: 934-947.

# Factors predictive of neonatal thrombocytopenia in pregnant women with immune thrombocytopenia

Koji Kawaguchi · Kousaku Matsubara · Toshiro Takafuta ·  
Isaku Shinzato · Yasuhiro Tanaka · Aya Iwata ·  
Hiroyuki Nigami · Yasuhito Takeuchi · Takashi Fukaya

Received: 19 December 2013/Revised: 21 February 2014/Accepted: 23 February 2014/Published online: 13 March 2014  
© The Japanese Society of Hematology 2014

**Abstract** To determine predictive factors for neonatal thrombocytopenia in deliveries with immune thrombocytopenia (ITP), we conducted a retrospective study at a tertiary hospital between 1997 and 2013. During this period, 30 women with ITP delivered 44 children. Neonatal thrombocytopenia ( $<100 \times 10^9/L$ ) at birth was observed in seven neonates; four of these cases were severe ( $<50 \times 10^9/L$ ). No cases were complicated by intracranial hemorrhage, and there was no neonatal mortality. Platelet counts at birth of neonates born to mothers, who had first been diagnosed with ITP during pregnancy were significantly higher than those born to mothers diagnosed with ITP before pregnancy. There were significant correlations between neonatal platelet counts in the first and second siblings at birth ( $P = 0.015$ ) and at nadir ( $P = 0.035$ ). Platelet counts of neonates born vaginally were significantly more likely to decline after birth than those delivered by cesarean section (13/16 vs. 10/23,  $P = 0.024$ ). In conclusion, diagnosis of ITP before pregnancy was significantly associated with neonatal thrombocytopenia, and the platelet count of an older sibling is a strong predictor for that of the next baby. The delivery mode may be an indicator of the timing of platelet count nadir after birth.

**Keywords** Immune thrombocytopenia · Pregnancy · Neonatal thrombocytopenia · Predictive factor

## Abbreviations

CBC	Complete blood count
emCS	Emergency cesarean section
ITP	Immune thrombocytopenia
IVIG	Intravenous immunoglobulin
mPSL	Methylprednisolone
plCS	Planned cesarean section
PSL	Prednisolone

## Introduction

Immune thrombocytopenia (ITP) is a common hemorrhagic disorder characterized by low platelet counts and the involvement of platelet autoantibodies, which is clinically manifested as mucocutaneous bleeding tendencies. It is estimated that ITP occurs in 1–2 of every 1000 pregnancies, accounting for ~3 % of women, who have thrombocytopenia at the time of delivery [1, 2]. During the past three decades, our understanding of the management of pregnant women with ITP has advanced. Several risk factors to predict severe neonatal thrombocytopenia have been explored. Most consistent is an older sibling with thrombocytopenia [1, 2]. Other factors, such as maternal history of splenectomy for therapy-resistant ITP and the presence of detectable antiplatelet antibodies in maternal serum showed mixed results [1].

The prediction of postnatal platelet counts is also crucial for neonatal management. Some neonates born to women with ITP who have a normal platelet count at birth may subsequently develop severe thrombocytopenia of

K. Kawaguchi (✉) · K. Matsubara · A. Iwata · H. Nigami ·  
T. Fukaya  
Department of Pediatrics, Nishi-Kobe Medical Center,  
5-7-1 Kojidai, Nishi-ku, Kobe 651-2273, Japan  
e-mail: mlc01602@nifty.com

T. Takafuta · I. Shinzato · Y. Tanaka  
Department of Hematology and Clinical Immunology,  
Nishi-Kobe Medical Center, Kobe, Japan

Y. Takeuchi  
Department of Obstetrics and Gynecology, Nishi-Kobe Medical  
Center, Kobe, Japan

$<50 \times 10^9/L$  [3]. Asymptomatic intracranial hemorrhage may be a complication in such neonates [4–6]. Recently, a new hypothesis was proposed that there is a significant correlation between the mode of delivery and the timing of the nadir of platelet count; the nadir of platelet count in neonates born by cesarean section tends to occur just at birth and that in vaginally born neonates is likely to develop several days after birth [7]. Confirmation of this hypothesis is important because neonates who are at risk for progressive thrombocytopenia could be selected.

To determine the predictive factors of neonatal thrombocytopenia and the postnatal course of platelet count, we conducted a retrospective study of 44 consecutive deliveries at a tertiary hospital between 1997 and 2013.

## Materials and methods

A retrospective review was performed for obstetric patients with ITP who were treated and delivered at our hospital from April 1997 to October 2013. Patients were eligible for the study if they met the criteria of ITP during their pregnancy, or pregnancy with a previous history of chronic ITP. It is difficult to differentiate between gestational thrombocytopenia and ITP for the first time during pregnancy. The latter diagnosis was confirmed only for those who developed thrombocytopenia at early gestation and had no history of thrombocytopenia due to other causes, and their platelet counts did not return to normal more than 3 months after delivery.

The following information was extracted from the medical records for each eligible patient: age at delivery, age at diagnosis of ITP, minimum platelet count during pregnancy, platelet count at delivery, treatments for ITP before and during pregnancy, gestational age at delivery, type of delivery (vaginal or cesarean section), and complications during delivery. Information collected for each infant included platelet count at birth and at nadir, the timing of nadir, birth weight, complications at birth and treatment received. Complete blood count (CBC) was examined principally at birth from umbilical cord blood (on day 0), on days 2 and 4–5 (screening period for inherited metabolic disorders), and in addition, in periods of follow-up when newborns showed thrombocytopenia. If thrombocytopenia ( $<100 \times 10^9/L$ ) was observed in umbilical cord blood, it was confirmed using peripheral blood on the same day. Neonatal platelet count was defined as stabilized when a count over  $150 \times 10^9/L$  was observed twice over more than a 1-week interval. In 3 of 19 vaginal deliveries and 2 of 25 cesarean deliveries, CBC was examined only once because the platelet count was normal (more than  $150 \times 10^9/L$ ) at birth. These 5 cases were excluded from the analyses of nadir platelet count.

Statistical comparisons of parameters between two groups were performed using Student's *t* test. Differences in the proportions of two groups were examined using Fisher's exact test. The association of platelet counts between neonates and mothers, and the association of platelet counts among siblings were examined using Pearson's correlation coefficient. Significance was established at  $P < 0.05$ .

## Results

### Maternal characteristics

During the 16-year study period, 30 women with ITP delivered 44 children. Table 1 summarizes the maternal and neonatal characteristics. Laboratory and therapeutic findings on mother–neonate pairs of 44 pregnancies are summarized in Table 2. There was no delivery of twins. The mean age of the women at delivery was  $30.7 \pm 4.4$  years. Twenty-one women (70 %) were diagnosed with ITP before pregnancy, and the remaining 9 (30 %) were identified during pregnancy. Three (10 %) of 30 women had undergone splenectomy before pregnancy.

Of 44 pregnancies, 25 (57 %) and 19 (43 %) were cesarean sections and vaginal deliveries, respectively. Cesarean section was performed for almost all cases based on obstetric indications. Of the 25 cesarean deliveries, 19 and 6 were planned and emergency cesarean sections, respectively. Indications for planned cesarean section included repeated sections ( $n = 10$ ), unstable maternal thrombocytopenia during the third trimester ( $n = 3$ ), cephalopelvic disproportions, breech presentation (2 each), maternal renal failure, and intrauterine growth retardation (one each). Indications for emergency cesarean section included prolonged labor with failure of fetal descent, fetal distress (2 each), placental abruption, and premature rupture of membrane (one each). The mean platelet counts at delivery and at nadir were  $105.8 \pm 40.3 \times 10^9/L$  and  $71.3 \pm 35.0 \times 10^9/L$ , respectively. Only one woman had a platelet count lower than  $50 \times 10^9/L$  at delivery. There was one maternal death, in which the patient was complicated by uterine cervical laceration with massive bleeding of over 10 L, and died of multiple organ failure and disseminated intravascular coagulation (case 26). In this case, the platelet count at delivery was  $109 \times 10^9/L$ , and the thrombocytopenia did not necessarily contribute to the fatal outcome.

### Neonatal characteristics (Tables 1, 2)

Neonatal thrombocytopenia ( $<100 \times 10^9/L$ ) at birth was observed in 7 neonates (16 %), and in 4 (9 %) it was severe

**Table 1** Maternal and neonatal characteristics in a total of 44 pregnancies

Characteristics	Mean $\pm$ SD (range) or number (%)
<b>Maternal characteristics</b>	
Maternal age at delivery (years) ( $n = 44$ )	30.7 $\pm$ 4.4 (21–41)
Diagnosis of ITP before pregnancy ( $n = 30$ )	21 (70 %)
Diagnosis of ITP during pregnancy ( $n = 30$ )	9 (30 %)
Number of pregnancies per mother ( $n = 30$ )	
1 time	19 (63 %)
2 times	8 (27 %)
3 times	3 (10 %)
Platelet count ( $n = 44$ )	
At nadir ( $\times 10^9/L$ )	71.3 $\pm$ 35.0 (13–161)
At delivery ( $\times 10^9/L$ )	105.8 $\pm$ 40.3 (38–248)
Treatment for maternal ITP	
Before pregnancy ( $n = 30$ )	
Splenectomy	3 (10 %)
PSL	2 (7 %)
During pregnancy ( $n = 44$ )	
PSL or mPSL	9 (20 %)
IVIG	1 (2 %)
PSL + IVIG + platelet transfusion	1 (2 %)
Mode of delivery ( $n = 44$ )	
Cesarean section	25 (57 %)
Vaginal	19 (43 %)
Neonatal characteristics ( $n = 44$ , unless otherwise mentioned)	
Gestational age at birth (weeks)	38.2 $\pm$ 1.6 (33–41)
Premature delivery (<37 weeks of gestation)	3 (7 %)
Birth weight (g)	2938 $\pm$ 439 (1668–3706)
Low-birth-weight infant (<2500 g)	6 (14 %)
Neonatal platelet count at birth ( $\times 10^9/L$ )	
$\geq 150 \times 10^9/L$	36 (82 %)
100–149 $\times 10^9/L$	1 (2 %)
50–99 $\times 10^9/L$	3 (7 %)
20–49 $\times 10^9/L$	2 (5 %)
<20 $\times 10^9/L$	2 (5 %)
Neonatal platelet count at nadir ( $\times 10^9/L$ ) ( $n = 39$ )	
$\geq 150 \times 10^9/L$	21 (54 %)
100–149 $\times 10^9/L$	8 (20 %)
50–99 $\times 10^9/L$	3 (8 %)
20–49 $\times 10^9/L$	4 (10 %)
<20 $\times 10^9/L$	3 (8 %)
Treatment for neonatal thrombocytopenia	
IVIG	4 (9 %)
PSL or mPSL + IVIG	2 (4 %)
PSL + mPSL + IVIG + platelet transfusion	1 (2 %)

ITP immune thrombocytopenia, IVIG intravenous immunoglobulin, PSL prednisolone, mPSL methylprednisolone

(less than  $50 \times 10^9/L$ ). Administration of high-dose  $\gamma$ -globulin was performed in all 7 babies with thrombocytopenia. Administration of steroids was performed in 3 babies with severe thrombocytopenia (cases 15, 29<sup>a</sup>, and 29<sup>b</sup>). Platelet transfusion was performed in one case with prolonged severe thrombocytopenia of  $<10 \times 10^9/L$  (case 15). No cases were complicated by intracranial hemorrhage, and there was no neonatal mortality. Petechiae were found in 4 cases (9 %). Neonatal asphyxia was observed in one case (2 %). In this study, CBC was examined principally at birth from umbilical cord blood (on day 0), on days 2 and 4–5, and in addition, in periods of follow-up when newborns showed thrombocytopenia. In 39 cases, the timing of the nadir of platelet counts could be determined. The mean platelet count at nadir was  $157.7 \pm 88.1 \times 10^9/L$  (range 4–351  $\times 10^9/L$ ). The timing of the nadir of platelet counts widely varied, ranging from days 0 to 47, and the median time was at 2 days after birth. Most patients with mild thrombocytopenia spontaneously recovered by day 5, but thrombocytopenia in 3 patients, who had a nadir of  $<30 \times 10^9/L$  was not stabilized until days 31–85 (cases 5, 15, and 29<sup>a</sup>). One infant required 4 courses of intravenous immunoglobulin in combination with steroids and platelet transfusion until stabilization for more than 2 months (case 15) [8].

#### Prediction of neonatal thrombocytopenia

Neonatal platelet counts at birth were compared with maternal platelet counts at nadir during pregnancy or at delivery. A correlation was not found between neonatal platelet counts at birth and maternal platelet counts at nadir during pregnancy or those at delivery. We assessed the effect of maternal treatment for ITP during pregnancy. Mean neonatal platelet counts with any medical treatment for ITP during pregnancy were  $208.5 \pm 79.1 \times 10^9/L$  at birth and  $174.7 \pm 81.5 \times 10^9/L$  at nadir after birth, while those without treatment were  $187.2 \pm 88.0 \times 10^9/L$  at birth and  $163.8 \pm 91.5 \times 10^9/L$  at nadir. There was no significant difference between neonatal platelet counts with and without maternal treatment ( $P = 0.48$  at birth,  $P = 0.73$  at nadir by Student's  $t$  test). In addition, there was no association between a maternal history of splenectomy and neonatal platelet counts at birth. The platelet counts of neonates at birth born to mothers who had first been diagnosed with ITP during pregnancy were significantly higher than those born to mothers diagnosed with ITP before pregnancy ( $244.7 \pm 103.5 \times 10^9/L$  vs.  $179.1 \pm 76.3 \times 10^9/L$ ,  $P = 0.039$ ).

We compared platelet counts between the first and second siblings. There was a strong positive correlation between individual neonatal platelet counts both at birth

**Table 2** Laboratory and therapeutic findings on mother–neonate pairs of 44 pregnancies with ITP

Case	Maternal platelet count ( $\times 10^9/L$ )		Treatment			Type of delivery	Neonatal platelet count ( $\times 10^9/L$ )		Timing of nadir <sup>d</sup>
	At nadir	At delivery	Before pregnancy	During pregnancy	Splenectomy		At birth	At nadir	
#1 <sup>a</sup>	13	81	–	PSL, IVIG, platelet transfusion	–	plCS	225	225	0
#1 <sup>b</sup>	48	111	–	IVIG	–	plCS	256	251	2
#2 <sup>b</sup>	88	121	–	–	–	plCS	190	190	0
#3 <sup>b</sup>	161	248	–	–	+	plCS	149	149	0
#4 <sup>b</sup>	154	172	–	–	–	plCS	230	230	2
#5	109	145	–	–	–	plCS	88	23	28
#6	63	63	–	–	–	plCS	173	173	0
#7 <sup>a</sup>	64	98	–	–	–	plCS	251	251	0
#7 <sup>b</sup>	67	102	–	–	–	plCS	231	231	0
#7 <sup>c</sup>	83	124	–	–	–	plCS	262	262	0
#8 <sup>a</sup>	59	80	–	mPSL	–	plCS	52	23	4
#8 <sup>b</sup>	85	88	–	–	–	plCS	42	38	2
#9	118	137	–	–	–	plCS	216	216	0
#10	116	196	–	–	+	plCS	57	38	4
#11	56	67	–	–	–	plCS	281	NA	NA
#12	64	81	–	–	–	plCS	292	232	2
#13 <sup>b</sup>	90	92	–	–	–	plCS	183	181	1
#13 <sup>c</sup>	80	87	–	–	–	plCS	217	217	0
#14 <sup>a</sup>	52	79	–	–	–	plCS	157	NA	NA
#15	64	84	–	–	+	emCS	4	4	0
#2 <sup>a</sup>	47	66	–	–	–	emCS	220	220	0
#3 <sup>a</sup>	15	70	–	PSL	–	emCS	310	310	0
#16	41	80	PSL	PSL	–	emCS	207	119	2
#13 <sup>a</sup>	59	71	–	PSL, mPSL	–	emCS	224	224	0
#14 <sup>b</sup>	38	38	–	–	–	emCS	207	138	1
#4 <sup>a</sup>	65	88	PSL	PSL	–	Vaginal	158	96	1
#17	39	51	–	PSL	–	Vaginal	180	142	5
#18 <sup>a</sup>	52	121	–	–	–	Vaginal	191	103	5
#18 <sup>b</sup>	33	127	–	–	–	Vaginal	163	83	4
#18 <sup>c</sup>	73	102	–	–	–	Vaginal	216	101	5
#19	52	123	–	PSL	–	Vaginal	161	130	2
#20	135	153	–	–	–	Vaginal	217	217	0
#21 <sup>a</sup>	110	110	–	–	–	Vaginal	240	NA	NA
#21 <sup>b</sup>	110	146	–	–	–	Vaginal	182	182	0
#22	95	107	–	–	–	Vaginal	163	117	4
#23	56	82	–	–	–	Vaginal	166	73	5
#24	110	175	–	–	–	Vaginal	202	187	2
#25	88	110	–	–	–	Vaginal	199	NA	NA
#26	33	109	–	PSL, mPSL	–	Vaginal	268	213	5
#27	42	77	–	–	–	Vaginal	399	351	2
#28	75	76	–	–	–	Vaginal	301	NA	NA
#29 <sup>a</sup>	42	141	–	–	–	Vaginal	29	13	47
#29 <sup>b</sup>	80	95	–	–	–	Vaginal	9	9	0
#30	13	83	–	PSL	–	Vaginal	298	188	2

ITP immune thrombocytopenia, IVIG intravenous immunoglobulin, mPSL methylprednisolone, NA not assessed, PSL prednisolone, plCS planned cesarean section, emCS emergency cesarean section

<sup>a</sup> First pregnancy

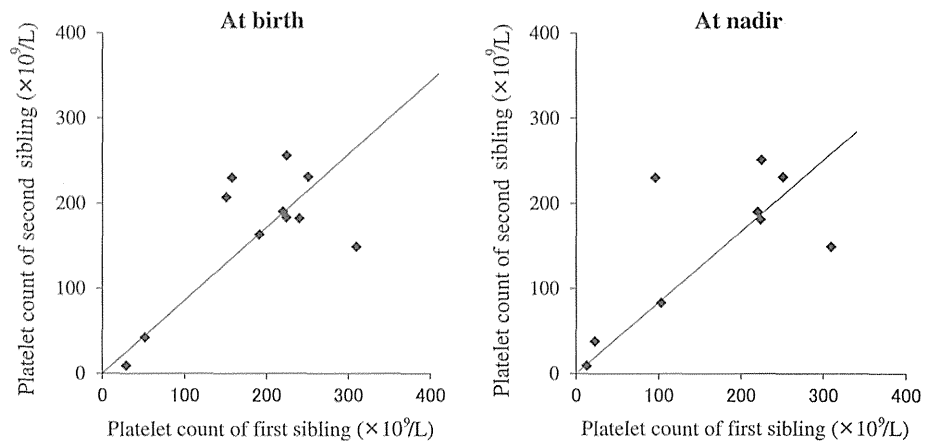
<sup>b</sup> Second pregnancy

<sup>c</sup> Third pregnancy

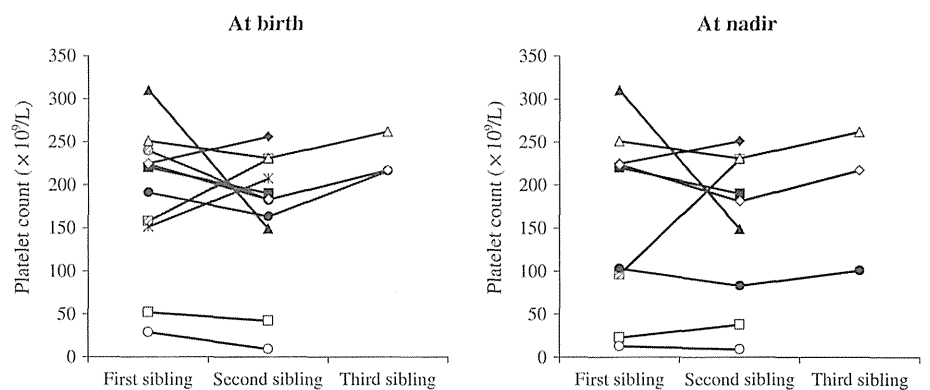
<sup>d</sup> Birth date is defined as day 0



**Fig. 1** Associations between platelet counts of the first sibling and those of the second sibling both at birth and at nadir after birth showing significant positive correlations with Pearson's correlation coefficients of 0.706 ( $P = 0.015$ ) at birth and 0.703 ( $P = 0.035$ ) at nadir after birth



**Fig. 2** Associations between platelet counts of siblings, including the third sibling both at birth and at nadir after birth. Symbols are connected with a straight line between siblings



and at nadir after birth in the first and second siblings, with Pearson's correlation coefficients of 0.706 ( $P = 0.015$ ) at birth and 0.703 ( $P = 0.035$ ) at nadir (Fig. 1). This study included 3 sets of 3 siblings. Despite the small number of cases, platelet counts of the third siblings were well correlated with those in their first and second siblings both at birth and at nadir (Fig. 2).

We investigated a newly proposed hypothesis of a significant correlation between the mode of delivery and the timing of the nadir of neonatal platelet counts; the nadir of platelet counts in neonates born by cesarean section tended to occur just at birth and that in vaginally born neonates was likely to develop several days after birth [7]. In vaginal deliveries, 13 of 16 cases (81 %) showed a decline of platelet counts after birth. Nadir was observed between days 0 and 47. On the other hand, in deliveries by cesarean section, 13 of 23 cases (57 %) showed the lowest platelet counts at birth. A decline of neonatal platelet count after birth showed a significant association with vaginal delivery ( $P = 0.024$ ).

## Discussion

Many studies have revealed that the occurrence of severe thrombocytopenia in a previous neonate is the most useful

parameter for predicting the occurrence of neonatal thrombocytopenia [3, 4, 7, 9–11]. Christiaens et al. [9] demonstrated the platelet count correlations between siblings, with correlation coefficients of 0.73 at birth and 0.76 at nadir using Fisher's Z transformation. We also found strong positive correlations between individual neonatal platelet counts both at birth and at nadir after birth in the first and second siblings (Fig. 1). There are few reports referring to the third sibling [3, 7, 11]. Our study revealed that the platelet count of third siblings is also well correlated to the platelet count of both the first and the second siblings (Fig. 2).

In this survey, ITP identified for the first time during pregnancy was confirmed only for those who developed thrombocytopenia at early gestation and had no history of thrombocytopenia due to other causes, and their platelet counts did not return to normal more than 3 months after delivery. The platelet counts of neonates at birth born to mothers who had been diagnosed with ITP for the first time during pregnancy were significantly higher than those born to mothers diagnosed with ITP before pregnancy. Samuels et al. [12] have also shown that only women with a history of pregestational ITP are likely to have fetuses with severe thrombocytopenia. However, this finding has not been replicated in several studies [7, 13]. There are few reports about the effect of the absence of a history of ITP before

pregnancy on neonatal thrombocytopenia. Further study using strict criteria for a diagnosis of ITP during pregnancy is needed.

The severity of neonatal thrombocytopenia is often most marked a few days after birth. Recently, Koyama et al. [7] proposed the hypothesis of a correlation between the pattern of neonatal thrombocytopenia and the mode of delivery. However, in their study [7], the proportion of postnatal decline of platelet counts did not significantly differ between vaginal (10/13) and cesarean section (4/7) deliveries. In contrast, our data showed that a decline of neonatal platelet count after birth was significantly associated with vaginal delivery when compared with cesarean section ( $P = 0.024$ ), confirming this hypothesis for the first time. Koyama et al. [7] speculate that uterine contraction facilitates a trans-placental transfer of maternal IgG anti-platelet autoantibodies. Maternal IgG transport to the fetus may contribute to the decline of neonatal platelet count after vaginal birth. A recent study showed that 2 of 20 neonates, who developed severe thrombocytopenia of  $<50 \times 10^9/L$  had a normal platelet count at birth [3]. In such cases, asymptomatic intracranial hemorrhage may occur [4–6]. Therefore, it is important to estimate the risk of postnatal thrombocytopenia. Thus, in the case of vaginal delivery, careful attention should be paid to the decline of platelet counts after birth, as well as thrombocytopenia at birth.

In this study, 8 neonates (18 %) had platelet counts of  $<150 \times 10^9/L$ , 7 neonates (16 %) had platelet counts of  $<100 \times 10^9/L$ , and 4 neonates (9 %) had severe neonatal thrombocytopenia ( $<50 \times 10^9/L$ ) at birth (Table 1). These findings are similar to those in prior studies [4, 14–18]. There were no neonatal deaths and none of the infants had serious hemorrhagic complications. However, in three of our cases, thrombocytopenia was not stabilized until days 31–85. Therefore, careful observation should be undertaken until the platelet counts normalize. Indeed, genetic abnormality of glycoprotein IIb/IIIa was recently identified as a cause of sustained thrombocytopenia over 3 months after birth in our hospital [19]. In this case, the mother had been diagnosed with ITP before pregnancy. Owing to the possibility of congenital abnormalities of platelet production, the etiology of prolonged neonatal thrombocytopenia should be investigated.

Although the platelet count often drops in pregnant ITP patients, serious morbidity or mortality is uncommon for the mothers [14]. According to the guidelines of therapy for pregnant patients [15, 20, 21], medical intervention should be considered whenever the platelet counts show  $<20\text{--}30 \times 10^9/L$  or the patients have symptoms. Because neonatal mortality is estimated to be low [12, 16, 17], and there is no evidence that cesarean section is safer for thrombocytopenic neonates than uncomplicated vaginal

delivery, the mode of delivery is currently based almost entirely on obstetric considerations [6, 15, 20, 21]. In this study, cesarean section was performed for almost all cases based on obstetric indications. There was one maternal death in our cases. The main cause of this was uterine cervical laceration with massive bleeding rather than maternal ITP. Our data also support the rarity of maternal morbidity or mortality in pregnant ITP patients.

Several limitations were identified in this study. Although the fact that this study was performed at a single center ensures consistency, the number of cases was relatively small. Because of this, the effects of several parameters, such as splenectomy on neonatal thrombocytopenia might not have been fully examined.

In conclusion, pregnant patients with ITP have generally good maternal and perinatal outcomes. There is very strong correlation between the platelet counts between siblings. The pattern of platelet count in an older sibling is a good predictor of that in the next sibling. In this study, diagnosis of ITP before pregnancy was associated with the development of neonatal thrombocytopenia, when compared with the diagnosis during pregnancy. Platelet counts of neonates born vaginally are more likely to decline after birth than those delivered by cesarean section. Another cohort, including more patients should be studied to evaluate these values.

**Acknowledgment** This work was supported by a research grant from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Gill KK, Kelton JG. Management of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Semin Hematol.* 2000;37:275–89.
- Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002;346:995–1008.
- Van der Lugt NM, van Kampen A, Walther FJ, Brand A, Lopriore E. Outcome and management in neonatal thrombocytopenia due to maternal idiopathic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang.* 2013;105:236–43.
- Webert KE, Mittal R, Sigouin C, Heddle NM, Kelton JG. A retrospective 11-year analysis of obstetric patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2003;102:4306–11.
- Veneri D, Franchini M, Raffaelli R, Musola M, Memmo A, Franchi M, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy: Analysis of 43 consecutive cases followed at a single Italian institution. *Ann Hematol.* 2006;85:552–4.
- Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L Jr, Crowther MA, American Society of Hematology. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood.* 2011;117:4190–207.
- Koyama S, Tomimatsu T, Kanagawa T, Kumasawa K, Tsutsui T, Kimura T. Reliable predictors of neonatal immune thrombocytopenia in pregnant women with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 2012;87:15–21.

8. Iwata A, Matsubara K, Hirata T. Repetitive combined therapy of high-dose immunoglobulins and steroids for a neonate with severe passive autoimmune thrombocytopenia. *J Jpn Soc Perinat Neonatal Med.* 2005;41:85–8 (in Japanese with English abstract).
9. Christiaens GC, Nieuwenhuis HK, Bussel JB. Comparison of platelet counts in first and second newborns of mothers with immune thrombocytopenic purpura. *Obstet Gynecol.* 1997;90:546–52.
10. Roberts I, Stanworth S, Murray NA. Thrombocytopenia in the neonate. *Blood Rev.* 2008;22:173–86.
11. Ajzenberg N, Dreyfus M, Kaplan C, Yvart J, Weill B, Tchernia G. Pregnancy-associated thrombocytopenia revisited: assessment and follow-up of 50 cases. *Blood.* 1998;92:4573–80.
12. Samuels P, Bussel JB, Braitman LE, Tomaski A, Druzin ML, Mennuti MT, et al. Estimation of the risk of thrombocytopenia in the offspring of pregnant women with presumed immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1990;323:229–35.
13. Payne SD, Resnik R, Moore TR, Hedriana HL, Kelly TF. Maternal characteristics and risk of severe neonatal thrombocytopenia and intracranial hemorrhage in pregnancies complicated by autoimmune thrombocytopenia. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:149–55.
14. Kelton JG. Idiopathic thrombocytopenic purpura complicating pregnancy. *Blood Rev.* 2002;16:43–6.
15. Gernsheimer T, James AH, Stasi R. How I treat thrombocytopenia in pregnancy. *Blood.* 2013;121:38–47.
16. Fujimura K, Harada Y, Fujimoto T, Kuramoto A, Ikeda Y, Akatsuka J, et al. Nationwide study of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnant women and the clinical influence on neonates. *Int J Hematol.* 2002;75:426–33.
17. Sharon R, Tatarsky I. Low fetal morbidity in pregnancy associated with acute and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 1994;46:87–90.
18. Fujita A, Sakai R, Matsuura S, Yamamoto W, Ohshima R, Kuwabara H, et al. A retrospective analysis of obstetric patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a single center study. *Int J Hematol.* 2010;92:463–7.
19. Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, et al. Heterozygous ITGA2B R995 W mutation inducing constitutive activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood.* 2011;117:5479–84.
20. 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.
21. Provan D, Stasi R, Newland AC, Blanchette VS, Bolton-Maggs P, Bussel JB, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood.* 2010;115:168–86.

# Detection of Circulating B Cells Producing Anti-GPIIb Autoantibodies in Patients with Immune Thrombocytopenia

Masataka Kuwana<sup>1\*</sup>, Yuka Okazaki<sup>1</sup>, Yasuo Ikeda<sup>2</sup>

**1** Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan, **2** Faculty of Science and Engineering, Waseda University, Japan

## Abstract

**Background:** We previously reported that an enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for detecting anti-GPIIb/IIIa antibody-secreting B cells is a sensitive method for identifying patients with immune thrombocytopenia (ITP). Here we assessed the clinical significance of measuring circulating B cells producing antibodies to GPIb, another major platelet autoantigen.

**Methods:** Anti-GPIb and anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells were simultaneously measured using ELISPOT assays in 32 healthy controls and 226 consecutive thrombocytopenic patients, including 114 with primary ITP, 25 with systemic lupus erythematosus (SLE), 30 with liver cirrhosis, 39 with post-hematopoietic stem cell transplantation (post-HSCT), and 18 non-ITP controls (aplastic anemia and myelodysplastic syndrome).

**Results:** There were significantly more circulating anti-GPIb and anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells in primary ITP, SLE, liver cirrhosis, and post-HSCT patients than in healthy controls ( $P < 0.05$  for all comparisons). For diagnosing primary ITP, the anti-GPIb ELISPOT assay had 43% sensitivity and 89% specificity, whereas the anti-GPIIb/IIIa ELISPOT assay had 86% sensitivity and 83% specificity. When two tests were combined, the sensitivity was slightly improved to 90% without a reduction in specificity. In primary ITP patients, the anti-GPIb antibody response was associated with a low platelet count, lack of *Helicobacter pylori* infection, positive anti-nuclear antibody, and poor therapeutic response to intravenous immunoglobulin.

**Conclusion:** The ELISPOT assay for detecting anti-GPIb antibody-secreting B cells is useful for identifying patients with ITP, but its utility for diagnosing ITP is inferior to the anti-GPIIb/IIIa ELISPOT assay. Nevertheless, detection of the anti-GPIb antibody response is useful for subtyping patients with primary ITP.

**Citation:** Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y (2014) Detection of Circulating B Cells Producing Anti-GPIb Autoantibodies in Patients with Immune Thrombocytopenia. PLoS ONE 9(1): e86943. doi:10.1371/journal.pone.0086943

**Editor:** Frederic Rieux-Laucat, Pavillon Kirmisson, France

**Received:** August 29, 2013; **Accepted:** December 17, 2013; **Published:** January 22, 2014

**Copyright:** © 2014 Kuwana et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by a research grant on intractable diseases by the Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** Masataka Kuwana, the corresponding author, currently serves as an Academic Editor of PLOS ONE. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: kuwanam@z5.keio.jp

## Introduction

Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease in which accelerated platelet consumption and impaired platelet production are mediated primarily by IgG anti-platelet autoantibodies [1]. This condition is seen in patients with various diseases, including systemic lupus erythematosus (SLE) and human immunodeficiency virus infection. It can also occur without an underlying disease, which is known as primary ITP. The production of IgG autoantibodies to platelet surface glycoproteins, such as GPIIb/IIIa and GPIb, is the hallmark of the disease [2]. Several antigen-specific assays for detecting platelet-associated anti-GPIIb/IIIa and anti-GPIb antibodies are reported to be useful for identifying patients with ITP [3–5]. However, no laboratory test for detecting platelet antigen-specific antibodies is used widely in clinical settings, because these assays require

complicated procedures such as platelet solubilization, the use of commercially unavailable monoclonal antibodies, and a relatively large blood sample.

We previously developed an enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for detecting IgG anti-GPIIb/IIIa antibody-secreting B cells in the circulation and spleen of patients with primary ITP [6]. We subsequently showed that the detection of circulating anti-GPIIb/IIIa antibody-producing B cells is a sensitive, specific, and convenient method for evaluating the presence or absence of an anti-platelet autoantibody response [7]. The anti-GPIIb/IIIa antibody response is very common in patients with primary ITP as well as those with various forms of secondary ITP, including thrombocytopenia associated with SLE [8], liver cirrhosis with or without hypersplenism [9], and post-hematopoietic stem-cell transplantation (post-HSCT) [10]. These findings led us to propose preliminary diagnostic criteria for ITP based on a