博士論文

ヘパリン起因性血小板減少症の最適な診断法の確立

前　田　琢　磨

目次

要旨 2

序文 3

ヘパリン起因性血小板減少症の臨床上の問題 3

HIT の病因と病態 5

HIT の診断と臨床症状の特徴 8

1)臨床的診断 8

2)血清学的検査 12

本研究の目的 17

方法 19

患者選択 19

HIT らしさに対する客観的評価 20

HIT 抗体に対する血清学的診断 20

HIT 症例の定義 26

研究デザインおよび統計解析 26

結果 31

1. HIT による PCI 中の血栓症の臨床的特徴 31

2.機能的測定法の HIT 診断の有効性と血栓塞栓症を起こしやすい患者の同定 34

対象患者 34

ELISA の OD 値と PMA における血小板活性化強度の関係 37

HIT に関連する臨床的特徴 37

HIT に関連する血栓塞栓症 41

考察 46

参考文献 56

謝辞 68

要旨

ヘパリン起因性血小板減少症（Heparin induced thrombocytopenia; HIT）は、抗凝固薬ヘパリンが免疫学的機序を介して HIT 抗体を誘導し、血小板等の活性化を促し、血栓塞栓症を高率に合併する疾患である。我々は本邦で初めて HIT 診断における感度・特異度ともに高いとされる改良血小板マイクロパーティクル試験(Modified platelet microparticle assay; Modified PMA)を確立した。本研究は、PMA 強陽性群では血栓塞栓症の発症が多く、PMA は HIT 関連の血栓塞栓症の高リスクとなる患者を同定するのに有効であることを示したものである。

序文

ヘパリン起因性血小板減少症の臨床上の問題

血小板が過剰消費されたり、血小板の産生が阻害されたり、血小板が破壊されたりする状態は出血という合併症を引き起こすが、ヘパリン起因性血小板減少症（Heparin induced thrombocytopenia; HIT）はこれらの病態とは全く逆に、出血を引き起こすことなく過凝固の状態となる[1]。この血栓形成促進性の反応はHITを早期に診断する際に大変重要であり、臨床医はヘパリン投与中の血栓を見た場合にHITを疑う必要がある。

HITはさまざまな背景を持つ入院患者およそ5000人につき1人の割合で発症する[2]。特に未分画ヘパリン(unfractionated heparin; UFH)に7日から10日暴露され続けた場合に最もリスクが高く、心臓血管外科手術後には1-3%の割合でHITを発症すると報告される[3]。HITと確定診断された患者のうち、およそ50%もの患者が血栓塞栓症を発症し、致死的となりうる[4, 5]。下肢の大静脈においての静脈血栓症と肺梗塞が最も頻発する合併症であり、ついで末梢動脈血栓症、脳梗塞が続き、心筋梗塞は海外の報告ではあまりないとされる[4]。血栓症は他の血管、例えば脳静脈洞や腹部内臓静脈にも起こる可能性があり、HITにおいては抗凝固薬ヘパリンを投与しているにも関わらず、血栓症が起こるという矛盾した病態となる。

HITの発症は典型的にはヘパリンを開始して5日目から10日目であり[6]、初めてヘパリンを投与された患者および再投与された患者いずれにも起こりうる。しかしながら、例外がある。第一に、大手術は時の流れをリセットする。すなわち、もし患者が直近でヘパ

リンに暴露されていたとしても、大手術から 5 日目から 10 日目という期間が HIT の好発時期となる[7]。従って、例えば長期に透析をされていた患者において、大手術を行うと、術後 5 日目から 10 日目に HIT を起こす可能性がある。第二に、90 日以内（特に 30 日以内）にヘパリンに暴露された患者では、抗血小板第 4 因子(platelet factor 4; PF4)/ヘパリン抗体が未だに循環している可能性があり、ヘパリンに再度暴露された時に突然 HIT を発症する（rapid-onset HIT）かもしれない。このようなケースでは、しばしば HIT はヘパリンをボーラスで投与された 30 分以内にアナフィラキシー様反応を伴うことがある。[8]これらのケースに当てはまらない場合、典型的には一過性の抗体が消失（使用するアッセイにもよるが、平均で 50-85 日）[6]すれば、再度抗体が産生されるのには少なくとも 5 日かかる（HIT 既往患者と変わらない）[9, 10]。HIT 患者の中には、ヘパリンを中止してから HIT を発症したり、症状が悪化したりするものがいる（delayed-onset HIT）。これらの患者はヘパリン開始後、最大 3 週間後まで血栓症を発症しうる[11]。特筆すべき点として、何例かはたった一度のヘパリンのボーラス投与により HIT を起こしている。したがって、ヘパリンの開始時というのはある瞬間として決定でき、このヘパリン投与開始のタイミングから考えて、HIT の発症時期が好発時期と重なるか否かを臨床医は勘案せねばならない。

しかし、中にはこの好発時期に発症時期があてはまらない HIT もある。稀ではあるものの、重症になりうる HIT の形態として、自然発症型、つまり自己免疫型の HIT があり、ヘパリンの暴露なしに発症しうる。多くは大手術（特に膝関節手術）後であるとか、細菌の

感染の既往がある患者に発症する。代替の抗凝固療法を開始して 2 日から 5 日で血小板が回復する典型的 HIT と違い、自己免疫型 HIT は数週間続くこともある[12]。

このように、HIT は臨床的には半数以上に血栓を起こし、致死的となりうる疾患であるにも拘わらず、その病態は「抗凝固薬ヘパリンを投与しているのに血栓が起こる」という矛盾するものであり、もし、HIT という病気を臨床医が疑わねば、「抗凝固薬ヘパリンの不足のために血栓が生じている。よってヘパリンの増量が必要である」という誤った診断を下しかねない疾患である。従って、臨床医が HIT に対する正しい知識を身につけることと、正確な HIT の診断が治療のための鍵となる。

HIT の病因と病態

HIT は陽性電荷をおびたケモカインである PF4 と多価陰イオン複合体の中の PF4 が新たに抗原決定基を提示し、それを認識する IgG 抗体により引き起こされる[13-15]。陰イオンとして代表的なヘパリンと PF4 の複合体(PF4/ヘパリン複合体)に対する抗体が HIT を引き起こす代表的な抗体である。HIT 抗体は血小板上（Fcγ RIIa）[16]および単球上（Fcγ RI）[17-19]における Fcγ レセプターをクロスリンクし、これらを活性化する。さらに、血管内皮の変化によりさらに血小板および単球の活性化が増強され[20]、さらにトロンビンが産生される。血小板減少症そのものではなく、増加したトロンビンが臨床上の様々な問題を引

き起こす。この過程を図示したものが図 1 である。以下の 5 つの過程を明示した。

①ヘパリンを投与する。

②血小板上や血管内皮上に存在した PF4 とヘパリンが複合体を形成。ヘパリンは PF4 を包み込み、PF4 が構造変化を起こし、新たに抗原を提示し抗体を誘導する。この抗 PF4/ヘパリン IgG 抗体の一部に、強い血小板活性化能を持つものがあり、これが HIT 抗体である。

③HIT 抗体は血小板上の受容体(Fcγ IIa レセプター)を介して血小板を活性化する。

④procoagulant 活性の高いマイクロパーティクルを放出させ、凝固の活性化を引き起こす。

⑤HIT 抗体は単球や血管内皮細胞の活性化[21]により、組織因子を介した凝固因子の活性化を引き起こし、最終的にはトロンビンの過剰産生を生じるが、マイクロパーティクルはこのトロンビンの過剰産生を増幅する。

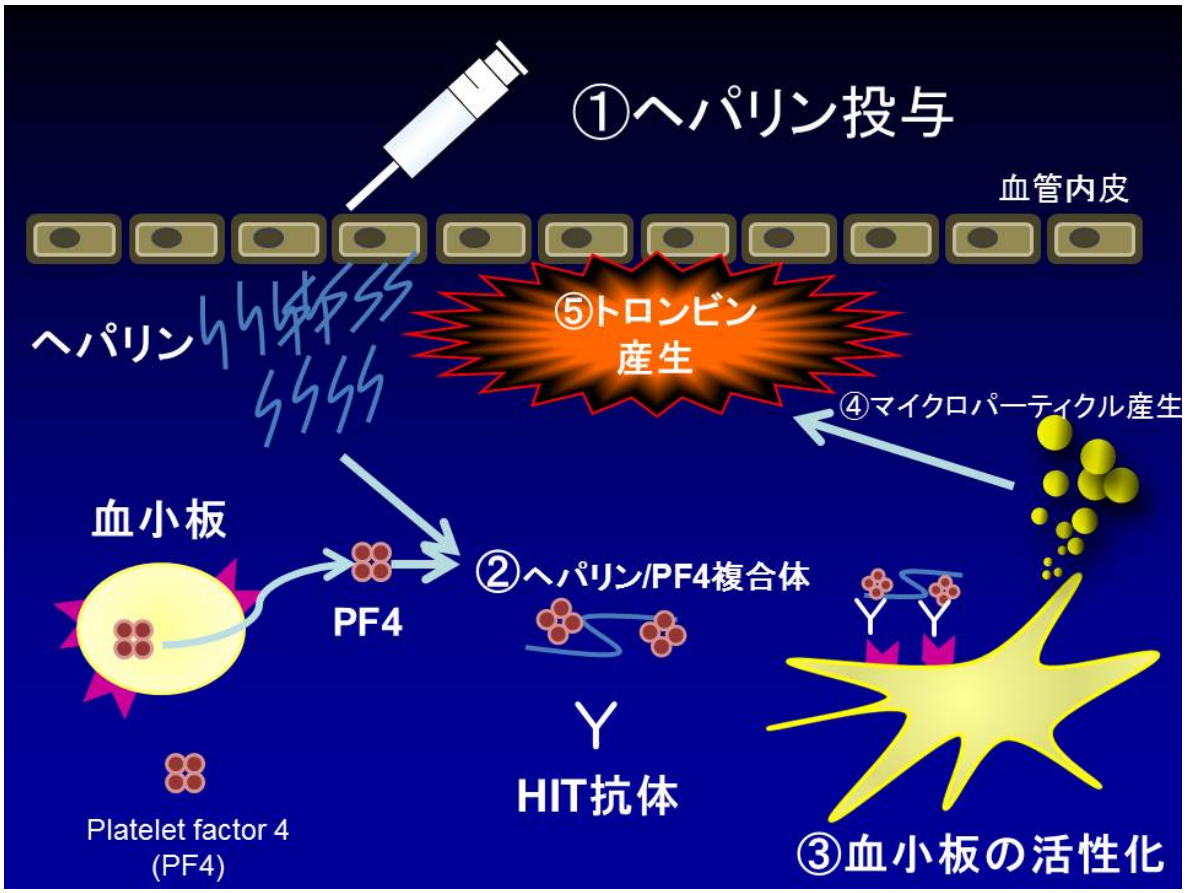


図１：ヘパリン投与から HIT 抗体が産生され、トロンビン過剰産生にいたるまで

陰性荷電を帯びたヘパリンが投与されると、陽性荷電を帯びた PF4 とヘパリンが複合体を形成する。PF4 が構造変化を起こし、新たに抗原を提示し PF4/ヘパリン抗体を誘導する。この一部が強い血小板活性化能を持つ HIT 抗体となる。HIT 抗体は血小板を活性化し、procoaglant 活性の高いマイクロパーティクルを放出させ、凝固因子の活性化を引き起こし、最終的にはトロンビンの過剰産生を生じる。

ヘパリンだけでなく、PF4 は核酸[22]や細菌上のリポポリサッカライド[23]などの多価陰イオンに結合する。この現象は大手術後（大手術では DNA, RNA, グリコサミノグリカンが放出）や細菌感染後に起こる自然発生型 HIT の原因の説明となる可能性がある。面白い概念として、ヘパリン以外の多価陰イオン（例えば、細菌表面など）との複合体を作った PF4 は構造変化し、最初の免疫感作を引き起こす[24, 25]。これらの PF4-多価陰イオン複合体は免疫系に危険と判断され、IgG 抗体の急速な産生を促す。これら IgG 抗体は、免疫系が出会ったことのない病原体に対してさえ、オプソニン作用と貪食作用を容易にする。しかしながら、この機序が誤誘導されると、ヘパリン治療中に免疫系が PF4-ヘパリン複合体に包まれた血小板に対する免疫系の二次応答として早期（5 日目から 14 日目）に高力価の IgG 抗体が産生され HIT を起こすこととなる[24]。抗 PF4/ヘパリン抗体は一過性の抗体反応を司る B 細胞（おそらく濾胞辺縁帯 B 細胞）[26]により産生される。

HIT の診断と臨床症状の特徴

HIT の診断は臨床的診断（臨床的に HIT らしいか）と血清学的診断(免疫測定法と機能的測定法により抗 PF4/ヘパリン抗体や HIT 抗体の測定)を組み合わせて行う。

1)臨床的診断

臨床症状だけで HIT を診断することはほぼ不可能であることは想像に難くない。ヘパリンを投与している患者は抗凝固が必要な重症患者であることも多く、血小板の減少や血栓を呈することはよくあることである。そして、その原因の多くは HIT ではない。このような状況下でも、できるだけ正確に HIT らしい症例を臨床的診断せねばならない。よく汎用さ

れているのは 4Ts スコアリングシステムである(表 1) [27]。これは①相対的血小板減少②血小板減少発症・血栓症のタイミング③血栓症の有無④その他の原因と 4 つの指標をそれぞれ 0-2 点をつけ、高い点数ほど HIT らしいとする。すべての合計スコアが 4 点未満であれば大変高い陰性的中率(97-99%)を有する[28] [29]。一方、陽性的中率としては低い（4-5 点の中間スコアで 10-20%, 6 点以上の高スコアで 40-80%）[30]。従って、低スコア（4 点未満）の時に HIT を否定するという使い方が妥当で、中間スコア以上では血清学的診断と合わせて診断すべきである。日常の臨床においてはこの 4Ts スコアリングシステムで HIT らしさを評価するのがよい。

表 1：4T's スコア

1. Thrombocytopenia（急性血小板減少症） 該当 1 つ選ぶ

2 点：○50 %を超える血小板減少かつ最低値で 2 万/μl 以上かつ過去 3 日以内に手術歴なし

1 点：○50%を超える血小板減少があるが、3 日以内の手術歴ある　○2 点および 0 点のクライテリアに合致しない血小板減少（例；30%-50%の血小板減少、最低値 1 万 - 1.9 万/μl）

0 点：○30%未満の血小板減少、最低値が 1 万/μl を切る血小板減少

2. Timing of platelet count fall or thrombosis（血小板減少、血栓症の発症時期：ヘパリン投与開始日を 0 日とする） 該当 1 つ選ぶ

2 点：○ヘパリン開始後 5－10 日目の血小板減少　○過去 5－30 日以内にヘパリンの投与歴があって今回のヘパリン開始 1 日以内の血小板減少

1 点：○ヘパリン開始後 5－10 日目の不明確な発症（例えば血小板測定がされていないための不明確さ）○または過去 31 日 - 100 日以内にヘパリンの投与歴があり、今回のヘパリン開始 1 日以内の血小板減少　○ヘパリン開始後 10 日目以降の血小板減少

0 点：○過去 100 日以内にヘパリン投与歴がなく、今回のヘパリン投与による 4 日以内の血小板減少

3. Thrombosis or other clinical sequelae（血栓症や皮膚障害、副腎出血などの続発症） 該当 1 つ選ぶ

2 点：○新たな血栓症の発症（動脈性もしくは静脈性）　○注射部の皮膚壊死　○未分画ヘパリンや低分子ヘパリン静注もしくは皮下注時のアナフィラキシー様反応　○副腎出血

1 点：○抗凝固療法を受けている最中の静脈血栓症の再発　○血栓症疑いで画像診断待ちの状況　○ヘパリン注射部位の発赤

0 点：○血栓症疑いなし

4. oTher cause for thorombocytopenia （血小板減少症のほかの原因） 該当 1 つ選ぶ

2 点：○明らかな血小板減少の原因がほかに存在しない

1 点：以下の原因により HIT 以外の疑わしい血小板減少の原因がある可能性があること。○起因菌の証明されていない敗血症　○人工呼吸開始に関連した血小板減少症　○その他の原因

0 点：以下の原因により血小板減少が大変疑わしいこと

○72 時間以内の手術　○細菌や真菌が起因菌として証明された状態　○20 日以内の化学療法もしくは放射線治療　○HIT でない原因による DIC　○輸血後紫斑病　○血栓性血小板減少性紫斑病　○血小板 2 万/μl 以下で、薬剤起因性血小板減少症をおこしうる薬剤[27]を投与していること　○低分子ヘパリン注射部の壊死性でない病変（遅延型過敏症と思われる）○その他の原因

Pretest probability score：HIT である確率

4 項目の合計が

6～8 点：高い　　4～5 点：中間　0～3 点：低い

①相対的血小板減少

HIT における血小板数の低下は急速に起こり（1 日から 3 日程度の期間)、ヘパリン開始後の最高値に対する割合として計算される。典型的には血小板は 50%以上の低下を呈し、最低値は 4 万-8 万/μl であることが多い。血小板数の減少が、それほど明らかではない（最高値の 30%-50%の減少）患者もいるが、そんな患者は HIT 患者全体の 10%以下である。最低値に関しては、稀ではあるが、特に消費性凝固障害のような、HIT 以外の血小板減少症の理由となる疾患を HIT に合併する場合、血小板数が 2 万/μl 以下になることもある。

② 血小板減少・血栓症発症のタイミング

HIT 抗体の産生はヘパリンの暴露を受けてから少なくとも 4 日はかかる[31] [32]。従って、HIT の発症は典型的にはヘパリンを開始して 5 日目から 10 日目である。しかし、いくつか例外がある。術後は、手術から 5 日目から 10 日目という期間が HIT の好発時期となる[7]。また、90 日以内（特に 30 日以内）にヘパリンに暴露された患者では、ヘパリンに再度暴露された時に突然 HIT を発症する（rapid-onset HIT）可能性がある。また、ヘパリンを中止してから HIT する者がいる（delayed-onset HIT)。これらの患者はヘパリン開始後、最大 3 週間後まで血栓症を発症しうる[11]。また、稀ではあるものの、自然発症型の HIT があり、ヘパリンの暴露なしに発症しうる。多くは大手術後であるとか、細菌感染の既往がある患者に発症する[33]。

③血栓症

HIT と確定診断された患者のうち、50%以上もの患者が血栓塞栓症を発症する[4] [5]。下肢の大静脈においての静脈血栓症と肺梗塞が最も頻発する合併症であり、ついで末梢動脈血栓症、脳梗塞が続く。

2)血清学的検査

①免疫測定法

抗原抗体反応を用いて抗 PF4/ヘパリン抗体を検出する。現在汎用されているのは、酵素免疫測定法(ELISA)、ラテックス凝集法、化学発光免疫測定法などがある。このうち、ラテックス凝集法と化学発光免疫測定法は 2012 年に本邦で保険収載されている。原理としては、ELISA と化学発光免疫測定法は同じで、マイクロプレートもしくは磁気粒子に固相化した抗原(PF4/ヘパリン複合体やその代用で PF4/Polyvinyl sulfonate)に抗 PF4/ヘパリン抗体を結合させ、酵素標識または発光物質標識抗ヒト抗体を反応させたのち、基質または trigger を加えて発光強度を測定する(図 2,3)。ラテックス凝集法はラテックス粒子を抗 PF4/ヘパリン複合体マウスモノクローナル抗体でコーティングした第一試薬と第二試薬である PF4/ポリビニルスルホン酸(PVS)を混ぜ合わせると、凝集が起こることを利用している。ここに抗 PF4/ヘパリン抗体が存在すればこの凝集を競合的に阻害する。この凝集の程度(濁度)を測定することで抗体価を求める(図 4)。

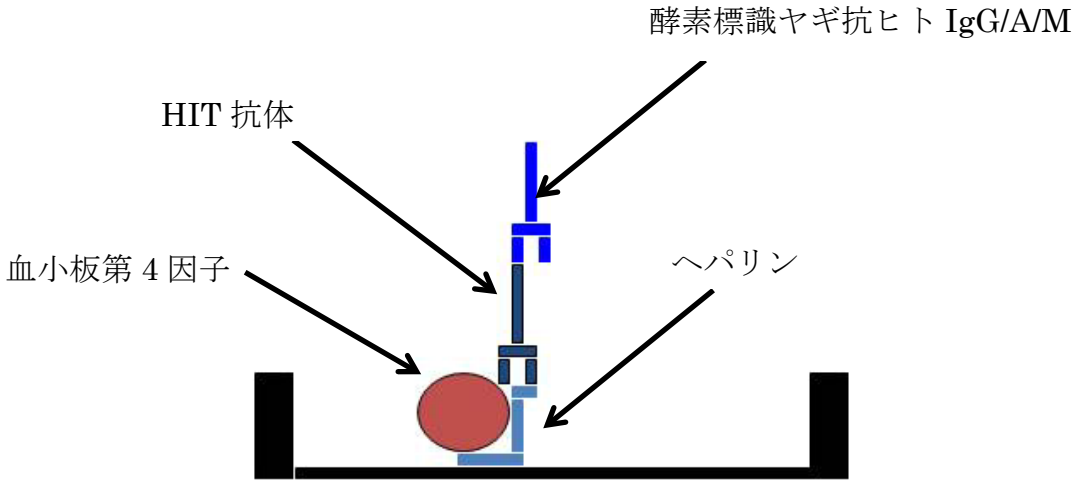


図 2: 酵素免疫測定法(ELISA)の原理

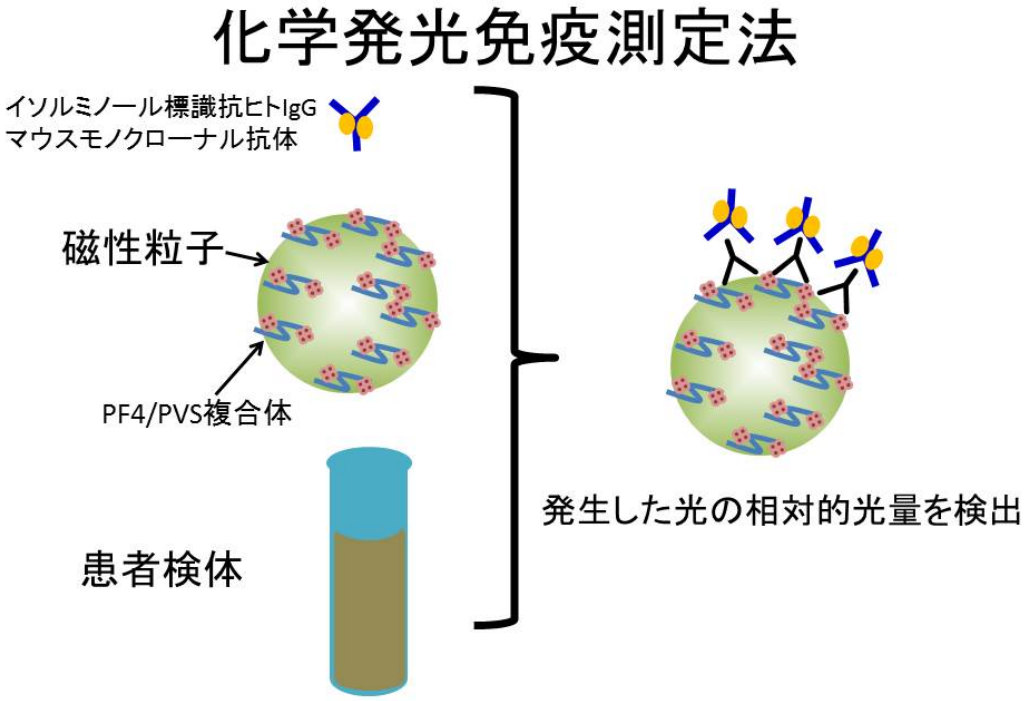


図 3:化学発光免疫測定法の原理

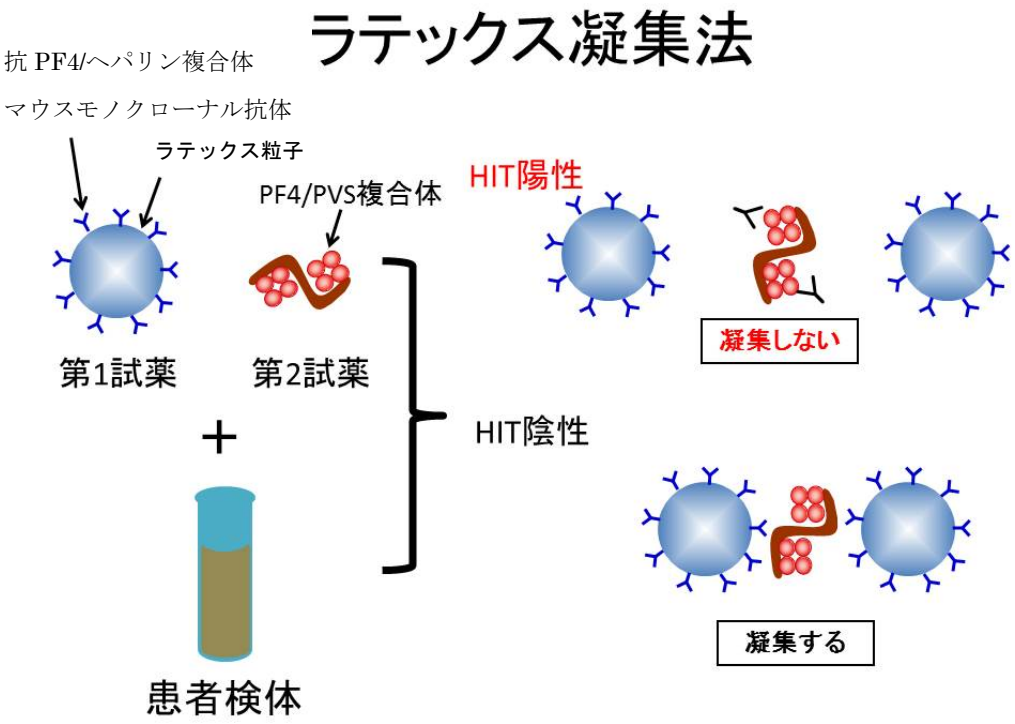


図 4:ラッテクス凝集法の原理

これら免疫測定法は汎用されていて、簡便であるのであるが、陽性であっても HIT を発症する患者はその一部であるという欠点がある[34]。この原因として、臨床的に意義がないとされる IgM, IgA を IgG とともに測定してしまうことが挙げられる[35]。また、抗 PF4/ヘパリン IgG であっても、その一部のみが、血小板活性化能を有することによる[36, 37]。しかし、感度は高い検査であるから、ルールアウトには非常に有効で、免疫測定法による抗 PF4/ヘパリン抗体が陰性の症例では、ほぼ(99%程度)HIT を否定してもよい[35]。このように感度は高いものの特異度は低い免疫測定法であるので、「免疫測定法陽性であるが、偽陽性である」という状況が起こりうる。

②機能的測定法

前述のような問題点を回避するのが機能的測定法(functional assay)である。この方法では、患者の持つ抗 PF4/ヘパリン抗体が生理的意味を持つかどうか、すなわち血小板を強く活性化させる能力があるかどうかを測定する。方法としては洗浄血小板を用いたセロトニン放出試験等が存在する。これらの方法による“HIT 抗体”の検出は、高いクオリティーコントロールのもとに実施できる施設で施行された場合には特異度が高いため、臨床的に HIT が強く疑われ、かつこれら機能的測定法が陽性（特に強陽性）であれば HIT 診断につながる[34]。下記の図 5 に「HIT の氷山モデル」として、検査法と HIT の関係を図示する。

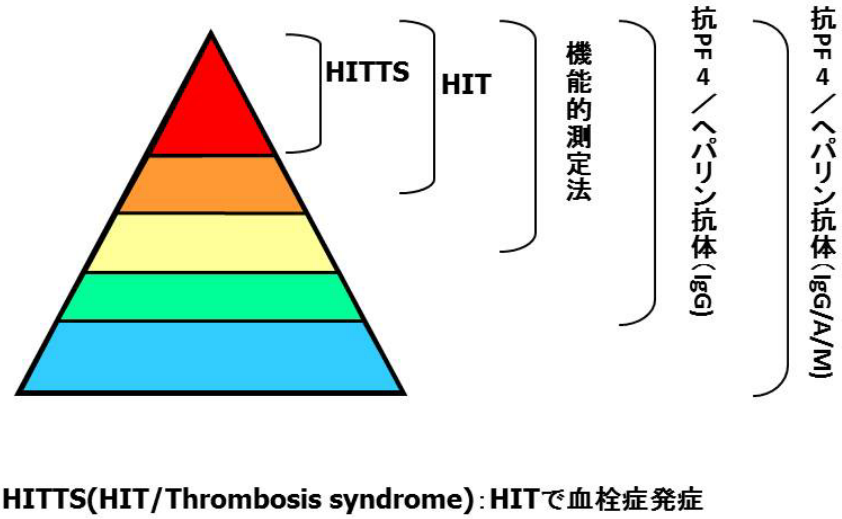


図 5: HIT の氷山モデルと検査法

このように HIT 診断を正確に行うために機能的測定法が大変重要なのであるが、本邦においては機能的測定法の施行は困難であった。その理由として、HIT 抗体の反応性は血小板のドナーによって異なることが知られており、QC として HIT 抗体に対して最適な反応を示すドナーを選択すること、高い技術を要求される洗浄血小板の作成が必要であること、アッセイ系に弱陽性コントロールを必ず含むことなどの施行が非常に困難であったことが挙げられる。加えて、カナダを中心に行われているセロトニン放出試験においてはラジオアイソトープを使用する必要があるが、本邦においては放射性同位元素の使用は「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」によって、厳しく制限されている。

本研究の目的

以上のような背景から、本邦においても正確な HIT 診断方法の確立が喫緊の問題であった。我々は本邦で初めて HIT 診断における感度・特異度ともに高いとされる機能的測定法である、改良血小板マイクロパーティクル試験(Modified platelet microparticle assay; Modified PMA)を確立したが、この結果と HIT の臨床的予後の関係については明らかではなかった。また、無類の経皮的冠動脈インターベンション(percutaneous coronary intervention; PCI)大国である本邦において、この PCI 中の急性冠動脈血栓症は死亡につながる重篤な合併症である[38]。しかし、この急性冠動脈血栓症の背景に HIT がどれほど関与しているのかは大規模なデータはなく、多くは機能的測定法を欠いた HIT 診断に基づい

た症例報告があるのみであった。

そこで、本研究[39] [40]では、「高率に血栓塞栓症を発症する HIT 患者群の抽出」をテーマとし、以下のような 2 つのクリニカルクエスチョンに答える研究を計画した。

①我が国における HIT による PCI 中の血栓症の臨床的特徴はどのようなものか

②我々の開発した PMA の HIT 診断における有効性、特に HIT の中でも血栓塞栓症を起こしやすい患者の同定は可能か

我々は、倫理委員会の承認を得て(国立循環器病研究センター研究課題番号:M20-024-6)、HIT の臨床的疑い症例の全国登録調査を実施しており、本邦で唯一の大規模 HIT 疑い症例のデータベースを構築している。本研究の目的は、この一部を用い、上記 2 つのクリニカルクエスチョンに対する回答を明確化することにある。

方法

患者選択

我々は倫理委員会の承認のもと、全国多施設から HIT が疑われる患者の検体を収集し、臨床情報（血栓症の有無と内容、血小板数の推移、ヘパリン投与のタイミングなどを含む）とともに全国 HIT データベースを構築している。このデータベースは 2008 年 8 月にスタートし、匿名化の元、2017 年 8 月現在 304 施設 731 症例の HIT 疑い症例を含む、本邦で最大のデータベースとなっている。我々の施設は HIT 診断のための、機能的測定法を実施できる本邦でも稀な施設として reference laboratory の役割を果たしており、全国の病院において担当医が HIT を疑った場合、患者の血清および血漿を当施設に送ることができるシステムを整えている。国立循環器病研究センターのウェブページ（http://www.ncvc.go.jp/hospital/section/treatment/laboratorymedicine/bloodmanagement/kentai.html）で搬送の標準プロトコールについて参照が可能である。本プロトコールでは検体は抗凝固剤としてクエン酸採血したスピッツと、抗凝固剤を含まないスピッツの 2 本採血することを推奨しており、採血後、可及的速やかに遠心分離して血清と血漿を得る。これらの検体は搬送まで－20℃で保存される。検体はドライアイスとともに搬送され、冷蔵された状態が保たれる。通常、各地から届く検体は 24 時間以内に国立循環器病研究センターに到着する。検体は測定されるまで、－70℃にて保存される。一般的には、我々は血漿を免疫測定法に用い、血清を機能的測定法に用いている。血清学的診断の結果は、担当医に e-mail で送られる。金曜日の午後以降や土日に検体が到着する場合以外は、通常、血

清学的診断の結果は検体到着から 8-36 時間（検体到着日または翌日）で担当医に伝えられる。患者の治療方針は主治医に任せられる。血清学的診断の如何にかかわらず、およそ 1 か月後に、担当医に匿名化したケースレポートフォームを送ってもらう。患者の基本情報、血小板の推移、ヘパリン投与のタイミング、輸血の有無、血栓塞栓症のイベント、HIT に対する治療、臨床的転帰、HIT 抗体に対する血清学的診断の結果に関するデータが後ろ向きに収集される。この全国登録調査に関して、各病院においても倫理委員会の承認が求められる場合は、承認を取っている。

HIT らしさに対する客観的評価

HIT の血清学的診断結果に対して盲検化された国立循環器病研究センターのレジデント 2 名を選出し、独自に各患者のケースレポートフォームの臨床所見から 4Ts スコアシステム[27]に基づき、HIT らしさのスコアを評価した。各々のスコアが食い違う場合には、議論を行い、さらに HIT に見識のある第三者の意見を仰いで最終的なスコアを決定した。総スコアが 0-3、4-5、6-8 はそれぞれ低スコア、中間スコア、高スコアと診断した[27]。

HIT 抗体に対する血清学的診断

ほぼすべてのアッセイは reference laboratory である国立循環器病研究センターで施行された。免疫測定法は、市販されている抗 PF4/ヘパリン IgG を同定する ELISA キット(PF4-IgG, Genetic Testing Institute, Waukesha, WI, USA)および抗 PF4/ヘパリン

IgG,IgA,IgM を合わせて測定する ELISA キット(HPIA, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine,France)を使用した。ELISA の結果は optical density（OD）値で表示し、PF4-IgG に対するカットオフはメーカー推奨の通り 0.4OD に設定し、HPIA に関しては使用するアッセイキットに応じて 0.5OD 程度に設定した。

機能的測定法は PMA を以前に報告されている方法[41] [42]に改良を加えた方法で行った。洗浄血小板の作成方法および反応環境に関しては表 2 に示すようにセロトニン放出試験(^{14}C-serotonin release assay:SRA)およびヘパリン誘発血小板活性化試験(Heparin-induced platelet activation test ;HIPA)と同様の方法で行ったが、アッセイに関しては反応時間、陽性コントロール、反応の妥当性を確認するための抑制反応、用いるヘパリンの種類、陽性の定義については改良を加えた（表 2 参照)。HIT 抗体と同様なヘパリン依存性に血小板活性化能を持つ抗ヒト PF4/ヘパリン複合体マウスモノクローナル抗体(5A1, Mitsubishi Chemical Medience Corporation,Tokyo, Japan)を終濃度 7.5μg/ml とし、弱陽性コントロールとして用いた[43]。この終濃度 7.5μg/ml は治療濃度域のヘパリン下に、血小板を活性化させうる最小限の濃度である。

表 2: 3 つの洗浄血小板法の比較

	洗浄血小板活性化法		
	セロトニン放出試験 (^{14}C-serotonin release assay:SRA)	ヘパリン誘発血小板活性化試験 (Heparin-induced platelet activation test :HIPA)	改良血小板マイクロパーティクル試験 (Modified platelet microparticle assay :Modified PMA)
欠点	放射性元素の取り扱いが必要	目視による判定	装置が高価 (フローサイトメーター)
血小板ドナー	血小板が HIT 血漿によく反応することが判明している 2 名	ランダムに選出された 4 名	20 人の健康なボランティアから、最も HIT 抗体に反応する 2 名を選出
洗浄血小板準備	洗浄中、高重力で遠心		
アピラーゼ	洗浄液にアピラーゼ使用。最終バッファー内には含まず		
反応環境	最終バッファー内のカルシウムとマグネシウム濃度は生理的濃度とする		
温度	室温		
加熱処理	56℃で 30-45 分加熱しトロンビンと補体の不活化する		
インキュベーションの状態	プレートシェーカーを用いて平底ポリスチレンマイクロタイターウェルの中で反応させる	U 字型のポリスチレンマイクロタイターウェルの中にスタラーを入れ混合する	プレートシェーカーを用いて平底ポリスチレンマイクロタイターウェルの中で反応させる
反応時間	60 分	45 分	60 分
陽性コントロール	弱陽性コントロール (HIT 血清)	コラーゲン	弱陽性コントロール [PF4/heparin 複合体に対するマウスモノクローナル抗体(MoAb)]
確認ステップ	高濃度の未分画ヘパリン (100 U/ml), 血小板 Fc 受容体阻害 MoAb (IV.3)	高濃度の低分子ヘパリン(100 U/ml)	高濃度の未分画ヘパリン (100 U/ml), 血小板 Fc 受容体阻害 MoAb (IV.3)
使用ヘパリンの種類	未分画ヘパリン	低分子ヘパリン(レビパリン)	未分画ヘパリン、低分子ヘパリン(レビパリン)
陽性の定義	セロトニン放出率 >20%	混合反応物が混濁状態から透明に変化しているか否か	血小板活性化指数:Platelet activation index >10%

SRA and HIPA に関するアッセイ法の要約は“Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia” (Warkentin TE and Greinacher A) In: Warkentin TE, Greinacher A, editors. Heparin-Induced Thrombocytopenia, 5th ed. 内の pp. 272–314 を参照した。

HIT 抗体に対する洗浄血小板の反応性が個々人で異なることが知られており、洗浄血小板を用いたアッセイにおいては、ドナーの選択により結果が異なる可能性が報告されている[44]。このため、慎重なドナー選択がクオリティコントロールのために必須である。我々は以下の方法で 20 名の健常ボランティアから HIT 抗体に反応性のよいドナー2 名を選出した。まず治療濃度域下のヘパリン存在下に終濃度 7.5μg/ml の 5A1 に対して最も安定して血小板が反応する 2 名を 17 人の非喫煙健常ボランティアから選出した。次に、この 2 名を含む非喫煙健常ボランティア 5 名から洗浄血小板を作成し、4 名の HIT 患者の血清と反応させたが、前述の 2 名の洗浄血小板はやはり安定して強く活性化された（データ表示なし）。以上から、我々はこの 2 名を HIT 抗体に反応性のよいドナーと同定し、洗浄血小板をすべての機能的測定法について用いている。それぞれのドナーから採取した洗浄血小板は終濃度 40 万/μl 以上となるように調整した。熱処理し、トロンビンを不活化した患者血清(20μl)もしくは弱陽性コントロールと洗浄血小板 75μl に加え、以下の 5 種類の異なる溶質(5μl)を添加した。

i)バッファーのみ

ii)未分画ヘパリン終濃度 0.1U/ml

iii) 低分子ヘパリン,Low molecular weight heparin(LMWH) 終濃度 0.3U/ml

(一般名：reviparin sodium; 商品名：Clivarine, Abbott Japan, Tokyo, Japan)

iv)未分画ヘパリン 100U/ml

v)未分画ヘパリン 0.1U/ml＋血小板の Fc 受容体を介した活性化を阻害する抗 Fcγ RIIa モノクローナル抗体(IV.3, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)

これらの混合物を平底ポリステレンマイクロタイタープレートの中で緩やかに室温で 60 分反応させた。反応が終了したのち、これらの検体はフローサイトメトリーで洗浄血小板の活性化度合いを platelet activation index (PAI)として定量化した。（表 3 参照）

UFH 0.1U/ml もしくは 0.3U/ml において PAI≥10%かつ、UFH100U/ml において PAI<10%かつ UFH0.1U/ml とモノクローナル抗体 IV.3 添加において PAI<10%の場合を陽性と定義した。陰性は弱陽性コントロールにおいて PAI>10%かつ、すべての反応条件において PAI<10%と定義した。

さらに、陽性症例についてはその血小板活性化能の強さに応じて以下の 4 つのレベルに分類した（表 3 参照）。

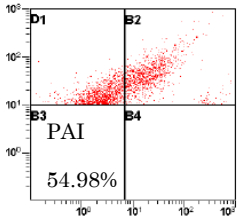
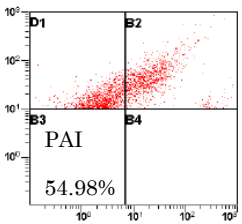
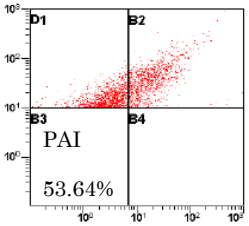
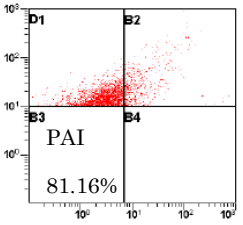
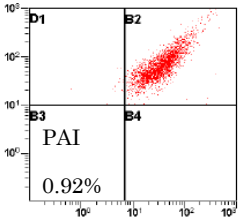
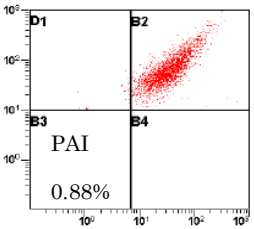
i)最も高い血小板活性化能を持つ抗体(ヘパリン添加なしに、すなわちコントロールバッファー内で洗浄血小板を活性化させる場合)

ii)高い血小板活性化能を持つ抗体(0.1U/ml のヘパリン添加により反応時間 30 分で洗浄血小板を活性化させる場合

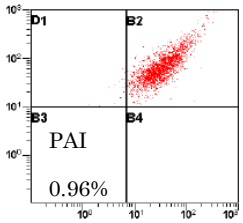
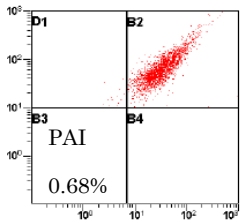
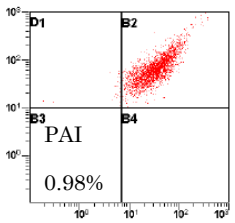
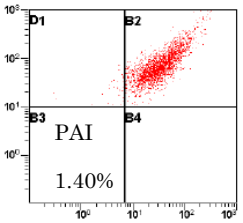
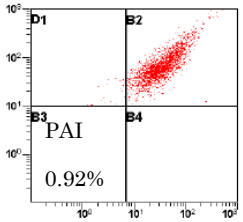
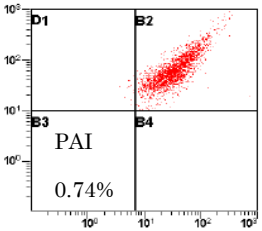
iii)低い血小板活性化能を持つ抗体(0.1U/ml のヘパリン添加により反応時間 60 分で洗浄血小板を活性化させる場合)

iv)最も低い血小板活性化能を持つ抗体(0.3U/ml の LMWH 添加によるときのみ反応時間 60 分で洗浄血小板を活性化させる場合)

表 3:

	ヘパリン無し	未分画ヘパリン 0.1U/ml (30 分)	未分画ヘパリン 0.1U/ml (60 分)	低分子ヘパリン 0.3U/ml (60 分)	未分画ヘパリン 100U/ml	未分画ヘパリン 0.1U/ml+IV.3
最も高い血小板活性	A 	B 	C 	D 	E 	F 

血小板活性化	再分類	ヘパリン無し	未分画ヘパリン 0.1U/ml (30 分)	未分画ヘパリン 0.1U/ml (60 分)	低分子ヘパリン 0.3U/ml (60 分)	未分画ヘパリン 100U/ml	未分画ヘパリン 0.1U/ml+IV.3
最も高い	強陽性	＋	＋	＋	＋	－	－
高い		－	＋	＋	＋	－	－
低い	弱陽性	－	－	＋	＋	－	－
最も低い		－	－	－	＋	－	－
無し	陰性	－	－	－	－	－	－

陰性	G 	H 	I 	J 	K 	L 

*IV.3: 抗 Fc γ RIIa 受容体抗体

HIT 症例の定義

前述の 2 名の医師により判定された 4Ts スコアが 4 以上でかつ、機能的測定法が陽性の場合に HIT と診断した。

研究デザインおよび統計解析

我々は序論で述べた通り、研究テーマのクリニカルクエスチョンとして以下の 2 つを掲げた。

①我が国における HIT による PCI 中の血栓症の臨床的特徴はどのようなものか

②我々の開発した機能的測定法の HIT 診断における有効性、特に HIT の中でも血栓塞栓症を起こしやすい患者の同定は可能か

まず、最初のクリニカルクエスチョンに答える研究として、2008 年 8 月～2012 年 7 月までに HIT 全国登録調査に登録された HIT 疑い患者 300 人のうち、PCI もしくは冠動脈造影を施行し、ヘパリン投与後 24 時間以内に冠動脈血栓を起こした 21 名を抽出した。これらの患者につき、上記の血清学的診断にて HIT を確定診断し、その臨床経過を調査した。

次に 2 つ目のクリニカルクエスチョンに答えるため、2008 年 8 月～2014 年 5 月までに HIT 全国登録調査に登録された HIT 疑い患者のうち、機能的測定法で陽性となった患者を以下の 2 つの群に分類した。

(i)PMA 強陽性群：抗体の血小板活性化能が最高レベルから高レベル

(ii)PMA 弱陽性群：抗体の血小板活性化能が低レベルから最低レベル

我々は HIT に関連する血小板減少やヘパリン投与後の血栓塞栓症といった臨床症状を以下

の 4 群において比較検討した。

1)PMA 強陽性群（strong PMA）

2)PMA 弱陽性群（weak PMA）

3)ELISA のみ陽性群（Only ELISA-positive）

4)PMA, ELISA いずれも陰性である群（double negative）

(図 6 参照)

連続変数については中央値と範囲を示し、カテゴリカル変数に関しては数と割合を示した。カテゴリカル変数に関しては、Fisher の正確性検定を用いて、血清学的診断(免疫測定法と機能的測定法）に基づき分類した各群間の比較を行った。多重比較におけるすべての P 値はボンフェローニの補正法を用いて補正を行った。連続変数に関しては一元配置分散分析を用いて解析し、多重比較においては Tukey の補正法を用いて補正を行った。

我々は、ヘパリンを投与したのちに発症した、新規の血栓、増悪する血栓、血栓の再発を HIT 関連血栓塞栓症と定義した。透析の回路内の血栓で血管内には血栓を認めないものは予後にあまり影響を及ぼさないものと考え、今回の解析からは除外した。血小板減少率に関しては以下のごとく定義した。

（血小板減少率）(%)＝100 x（ヘパリン投与直前の血小板数 - ヘパリン投与後の血小板の最低数）/（ヘパリン投与直前の血小板数）(%)

術後の患者については、HIT が疑われる前の術後における血小板の最高値をヘパリン投与直前の血小板数の代わりとして用いた。血小板減少を認めないケースにおいては、血小板減少率は 0%と定義した。

我々は HIT 関連血栓症予防に対する、アルガトロバンなどの代替抗凝固薬の影響を調べるため、HIT が臨床的に疑われた時点で血栓塞栓症を発症していない患者群を解析した。（図 6）ヘパリンに暴露される以前に血栓塞栓症が発症していた患者もこの解析には含めた。HIT が臨床的に疑われてから、累積血栓塞栓症発症率を解析した。PMA 強陽性および弱陽性群間の比較については Gray テストを用いた。アルガトロバンなどの代替抗凝固薬が HIT が疑われたその日に開始されている場合と、HIT が疑われた日の翌日以降に開始されている場合において解析を行った。アルガトロバンなどの代替抗凝固薬を全く行っていない患者は後者の群に含めた。臨床的に HIT を疑った日の定義は「ヘパリンの投与が中止された日もしくは HIT 抗体の評価のために採血がされた日いずれか早い方」とした。さらに、PMA 陰性であった患者に関しても、HIT を疑った日以降の累積血栓塞栓症発症率に関して、PMA 陽性患者と同様の方法で検討を行った。（図 7）

統計解析には EZR を使用した。EZR は R および R コマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアであり、自治医科大学付属さいたま医療センターのホームページで無償配布されている[45]。P 値<0.05 を統計学有意差ありと考えた。

図 6： 本研究のフローダイアグラム 1

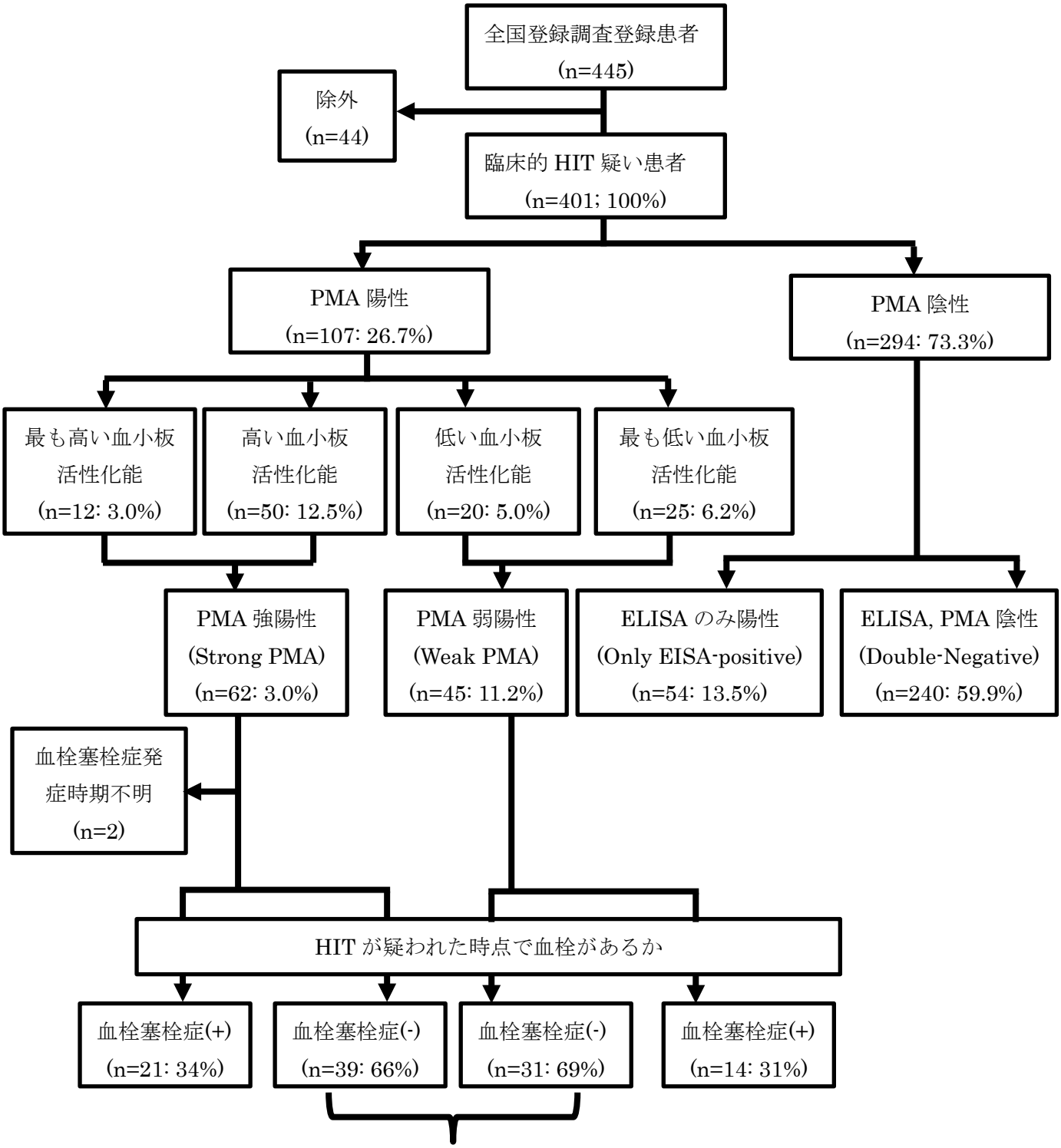
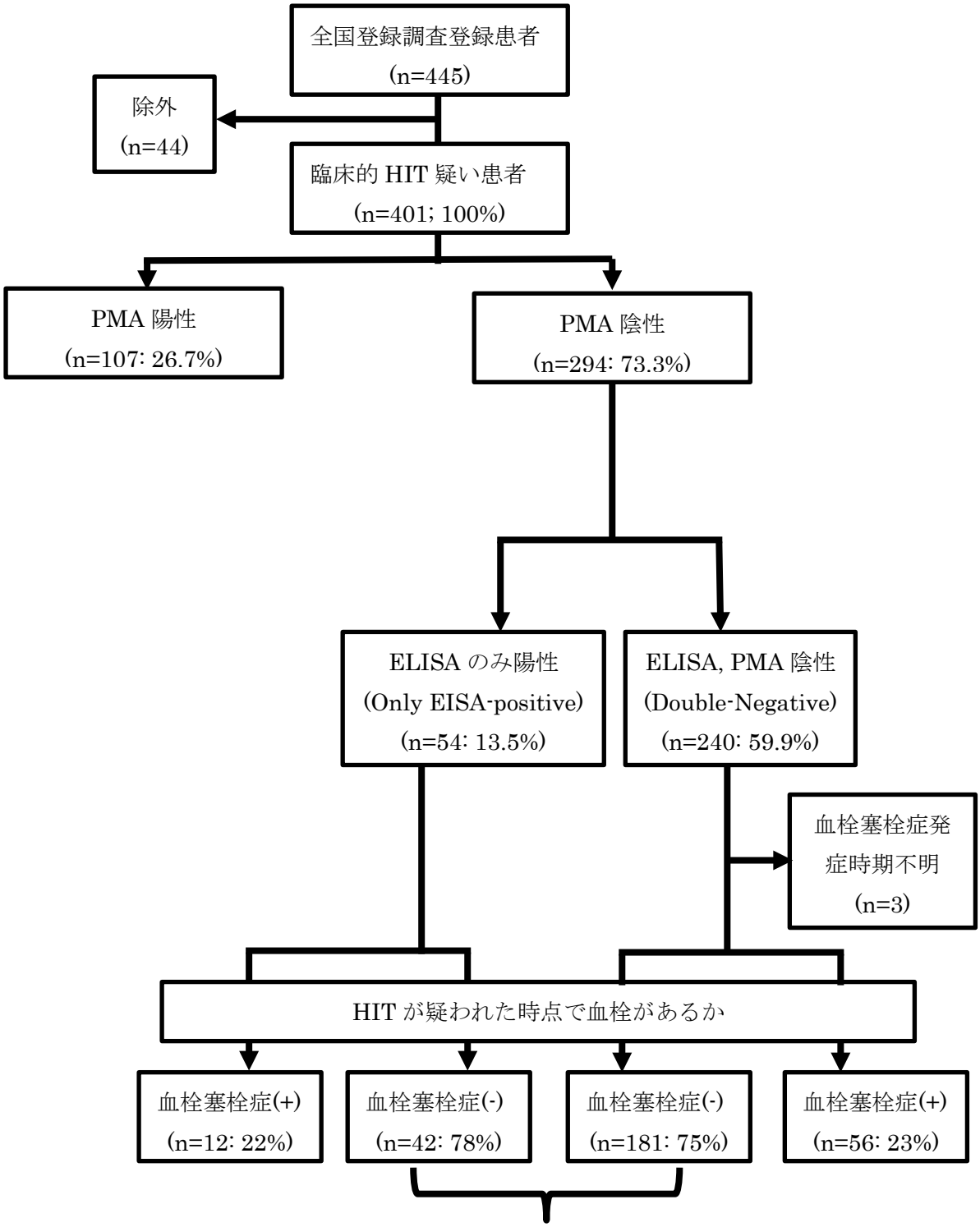


図 7：本研究のフローダイアグラム 2



結果

1. 我が国における HIT による PCI 中の血栓症の臨床的特徴

ヘパリン投与後 24 時間以内に冠動脈血栓を起こした 21 名のうち、最終的に PMA で HIT と診断されたのは 5 名(23.8%)であった。表 4 にこれら HIT 患者 5 名と non-HIT 患者 16 名の血清学的検査の結果を記す。興味深いことに、5 名の HIT 患者のうち 3 名はヘパリンの添加なしに血小板活性化を認める”delayed onset HIT”と言われるパターンを示した。16 名の non-HIT 患者の内 PMA 陽性患者はおらず、冠動脈血栓の原因は HIT 以外にあると考えられた。5 名の HIT 患者の臨床経過を図 8 にまとめた。これら 5 名はすべて HIT 発症のおよそ 1 か月前（11-32 日前）に心筋梗塞からヘパリンの投与を伴う PCI を受けていた。すなわち、5 名全員が 2 度目の PCI で HIT を発症していたことになる。5 人の HIT 患者のうち、2 人は冠動脈血栓以外の血栓を合併していた。また、患者 3 については、すぐにヘパリンの投与を中止し、アルガトロバンを開始したにもかかわらず亡くなった。このヘパリンの投与を中止し、アルガトロバンを開始するという戦略は、他の 4 人に関しては有効であったと考えられた。

表 4：HIT 患者および Non-HIT 患者の血清学的検査の結果

	ELISA (OD value)		改良血小板マイクロパーティクル試験(% platelet activation index)						
	抗 PF4/heparin 抗体		ヘパリン無	未分画ヘパリン (0.1 U/ml)		低分子ヘパリン (0.3 U/ml)	未分画ヘパリン (100 U/ml)	未分画ヘパリン (0.1 U/ml) +IV.3	
	IgG/IgA/IgM	IgG	60 分	30 分[1]	60 分[1]	60 分	60 分	60 分	結果
患者 1	3.113	2.795	54.06	82.74	84.8	82.88	0.76	0.84	delayed-onset pattern[2]
患者 2	3.711	2.553	1.82	54.98	53.64	81.16	0.92	0.88	強陽性
患者 3	3.225	2.234	85.64	90.00	87.38	88.38	0.74	1.88	delayed-onset pattern[2]
患者 4	1.918	1.622	0.78	32.78	38.78	82.38	0.74	1.38	強陽性
患者 5	2.425	0.89	88.49	81.23	87.73	84.79	0.66	1.12	delayed-onset pattern[2]
Non-HIT (n=16)									
平均	0.220	0.115	1.048	0.868	1.084	1.33	0.78	0.75	
最小値	0	0.019	0.4	0.68	0.52	0.66	0.22	0.44	
最大値	2.11	0.431	2.38	1.32	3.16	5.24	1.82	1.3	

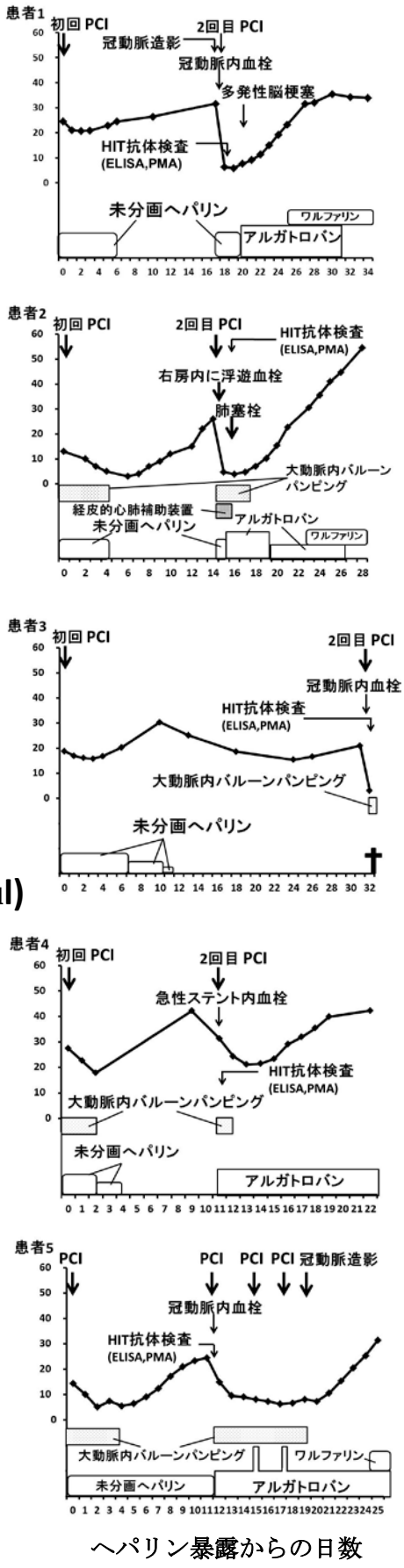
注釈: 免疫測定法は、市販されている抗 PF4/ヘパリン IgG を同定する ELISA キット(PF4-IgG, Genetic Testing Institute, Waukesha, WI, USA)および抗 PF4/ヘパリン IgG,IgA,IgM を合わせて測定する ELISA キット(HPIA, Diagnostica Stago, Asnières sur Seine,France)を使用した。

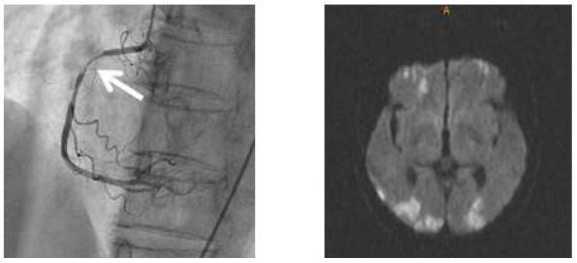
1: もし、患者が PMA 強陽性であれば、反応時間 30 分で血小板の活性化が認められる。

2: 5 人の HIT 患者のうち 3 人は、ヘパリンの添加無しに血小板を活性化しうる、所謂 delayed-onset HIT に見られる強い血小板活性を示した。

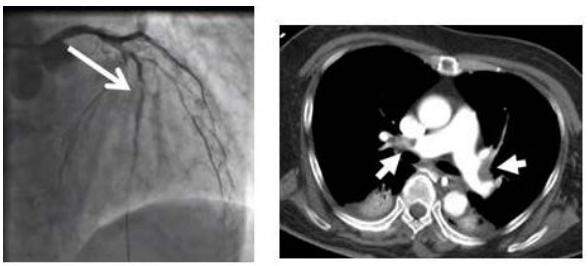
結果につき、HIT 患者 5 名はそれぞれ個別に上記表に結果を記載した。16 名の non-HIT 患者については、平均値、最小値、最大値を記載した。

略語: IV.3, 抗 Fcγ RIIa モノクローナル抗体(IV.3, Stemcell Technologies, Vancouver,BC, Canada)

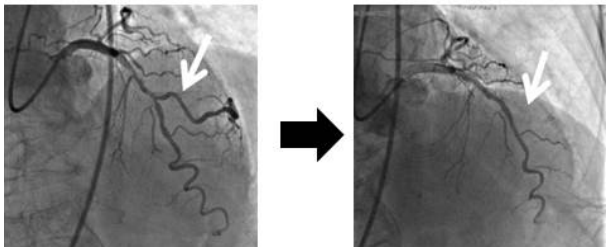




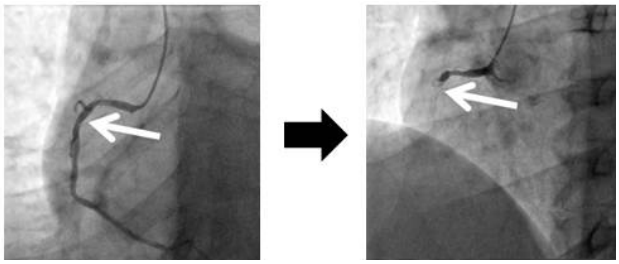
患者 1: 右冠動脈血栓および多発性脳梗塞(MRI 核酸強調画像)



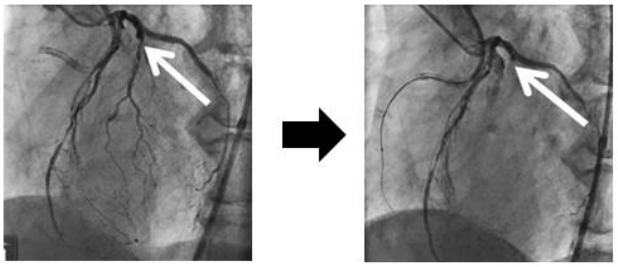
患者 2: 左冠動脈血栓および肺塞栓



患者 3: 第一対角枝の閉塞



患者 4: 右冠動脈の閉塞



患者 5: 鈍角辺縁枝の閉塞

図 8 : PCI 最中もしくは直後に HIT 関連冠動脈内血栓を発症した 5 名の臨床経過。
略語: PCI, 経皮的冠動脈インターベンション;ELISA, 酵素免疫測定法;PMA, 修正血小板マイクロパーティクル試験

2.機能的測定法の HIT 診断の有効性と血栓塞栓症を起こしやすい患者の同定

対象患者

全国の 181 病院から 445 名が HIT 疑いの患者として全国登録調査に登録された。このうち、44 名は HIT が疑われた時期が不詳であることと、PMA の結果が無かったため、解析から除外された。結果、401 名が解析に含まれ、107 名(26.7%)が PMA 陽性で 294 名(73.3%)が PMA 陰性であった。(図 6)HIT が疑われてからのフォローアップ期間は平均 38 日(範囲: 1-820 日; 四分位範囲, 25-90 日)であった。HIT が疑われるに至ったヘパリン投与の背景の内訳は内科疾患(n=205,51%)(血栓塞栓症に対する抗凝固、カテーテル治療における抗凝固、IABP などデバイスの挿入に伴う抗凝固など)、透析(n=85,21.2%)、心臓血管外科手術(n=59,14.7%)、一般外科手術(n=19,4.3%)、整形外科もしくは外傷による手術(n=13,3.2%)、および手術患者でない患者における血栓塞栓症の予防や動脈ライン、静脈ラインの点滴ルート確保後の抗凝固、産婦人科領域における抗凝固などその他の患者(n=20,5%)となった。(表 5)

最終的に、102 名(25.4%)が HIT と診断された。内訳は内科(n=51,50%)、透析(25,24.5%)、心臓血管外科(10,9.8%)、整形外科もしくは外傷(8,7.8%)、その他(4,3.9%)である。(表 5)

表 5: 患者背景およびヘパリン起因性血小板減少症に関連する特徴

	PMA 強陽性 (n=62)	PMA 弱陽性 (n=45)	ELISA のみ陽性 (n=54)	PMA, ELISA いずれも陰性 (n=240)
年齢(才)	69.5 (22–90)	68.0 (28–90)	65.0 (0–93)	69.0 (0–89)
性別(女性)	29 (46.8%)	18 (40%)	17 (31.5%)	95 (39.6%)
Body mass index (kg/m^2)	23.1 (13.7–35.1)	22.7 (15.9–35.4)	22.0 (13.3–37.1)	21.8 (8.1–33.9)
高血圧	43 (69.4%)	26 (57.8%)	33 (61.1%)	141 (58.8%)
脂質異常症	20 (32.3%)	12 (26.7%)	13(24.1%)	65 (27.1%)
糖尿病	20(32.3%)	15 (33.3%)	12 (22.2%)	73 (30.4%)
4T's score 低 (0–3)	2 (3.2%)	3 (6.7%)	24 (44.4%)	128 (53.3%)
中間 (4–5)	27 (43.5%) ***	25 (55.6%) ***	19 (35.2%)	88 (36.7%)
高 (6–8)	33 (53.2%)	17 (37.8%)	11 (20.4%)	24 (10.0%)
OD value(IgG)	2.072 (0.059–3.168) ***	1.298 (0.129–2.889) ***	0.675 (0.400–2.362) ***	0.083 (0–0.389)
背景疾患				
内科系疾患 (n=205)	33	19	27	126
心臓血管外科手術 (n=59)	5	6	10	38
一般外科手術 (n=19)	4	1	2	12
整形外科/外傷 手術 (n=13)	6	3	0	4
透析(n=85)	10	16	15	44
その他 (n=20)	4	0	0	16
ヘパリンもしくはヘパリノイドの種類				
未分画ヘパリン	57	39	50	222
低分子ヘパリン	5	6	4	17
ダナパロイド	0	0	0	1
血小板最低値 (×10^4/μl)	3.5 (0.8–21.1)	4.4 (0.1–10.7)	5.9 (0.2–27.6)	0.43 (0.1–31.6)
血小板減少率 (%)	80.1 (30.6–96.3) ***	76.7 (28.4–99.6) *	68.0 (0–96.8)	72.2 (0–99.5)
血栓塞栓症発症	38 (61.3%)***	18 (40.0%)	15 (27.8%)	71 (29.6%)
死亡	8 (12.9%)	6 (13.3%)	10 (18.5%)	46 (19.2%)

連続変数は中央値（範囲)を記載した。カテゴリー変数は割合を%表示した。

統計解析: 一元配置分散分析(one-way analysis of variance; ANOVA）を行い、連続変数に関しては、Tukey's test で補正した。カテゴリー変数に関しては Fisher's exact test を行い、Bonferroni correction で補正した。しかるのち、「PMA, ELISA いずれも陰性」群に対して $p<0.05$ の場合に*を、$p<0.01$ の場合に**を、$p<0.001$ の場合に***を付した。

略語: 改良血小板マイクロパーティクル試験（platelet microparticle assay, PMA）；酵素免疫測定法(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)；ボディマス指数(body mass index, BMI)；光学濃度(optical density, OD)

ELISA の OD 値と PMA における血小板活性化強度の関係

PMA 陽性であった 107 名(26.7%)の患者（これらの中には PMA では陽性であったものの、ELISA 陰性であった 3 名、および 4Ts スコアが 4 点未満で non-HIT とされた 5 名を含む）のうち、12 名(3.0%)の血清は最も高い血小板活性を持つ抗体を、50 名（12.5%）の血清は高い血小板活性を持つ抗体を、21 名(5.2%)は低い血小板活性を持つ抗体を、24 名(6.0%)は最も低い血小板活性を持つ抗体を HIT が疑われた時点で含有していた。

PMA 陰性であった患者のうち、54 名(13.5%)は ELISA 陽性（ELISA のみ陽性群)であり、240 名(59.9%)は ELISA も陰性(PMA, ELISA いずれも陰性群)であった。(図 6)

抗 PF4/ヘパリン IgG を測定する ELISA の OD 値と PMA の強さは有意な相関関係にあった($p<0.001$)。高い血小板活性化能を持つ血清は、OD 値も高かった（図 9）

ELISA の OD 値が 0.4 から 1.0 であった 56 人のうち、19 人(34%)が PMA で陽性であったことは、本 PMA が HIT 抗体弱陽性をもとらえることができる高い感度を有するとして特筆すべき点と考える。

HIT に関連する臨床的特徴

さらに、我々は PMA 陽性であった患者を以下の 2 群に分けた。(図 6)

i) PMA 強陽性群(n=62)

ii)PMA 弱陽性群(n=45)

これら群間の患者背景および HIT に関連する特徴を表 5 にまとめた。これらの群間において、4T's スコアや ELISA の OD 値、血小板の減少率、ヘパリン開始後の血栓塞栓症の発症割合など、HIT に関連する臨床的特徴は統計学的有意差を持って異なっていた。しかしながら、血栓塞栓症に対する古典的リスクファクターとされる、年齢、糖尿病、脂質異常症などは群間に差を認めなかった。HIT らしさを臨床的に診断する 4Ts スコアは PMA 強陽性群で高かった。4Ts スコアが低い患者は血小板活性化抗体を持たない患者群において多く認めた。4Ts スコアの分布（低・中間・高）は PMA, ELISA いずれも陰性群と比べて PMA 強陽性群($p<0.001$)および PMA 弱陽性群($p<0.001$)で有意に異なった。最終的に、PMA 強陽性群において 97%(60/62)、PMA 弱陽性群において 93%(42/45)の患者が HIT と診断された。

群間において、血小板最低値の差は統計学的に有意ではなかった。PMA 強陽性および弱陽性群の血小板の減少率は ELISA のみ陽性群および PMA, ELISA いずれも陰性群よりも有意に高かった（図 10）。しかしながら、PMA 強陽性および PMA 弱陽性の群間には統計学的に有意な差は無かった。

PMA 陽性のうち 3 名は抗 PF4/ヘパリン IgG 抗体の ELISA 陰性であった（図 9）。このうち 2 名については 4Ts スコアリングシステムでそれぞれ 5 点、4 点であり、さらに抗 PF4/ヘパリン IgG/IgA/IgM を測定する ELISA については、OD 値が 2.989(カットオフ 0.533)、

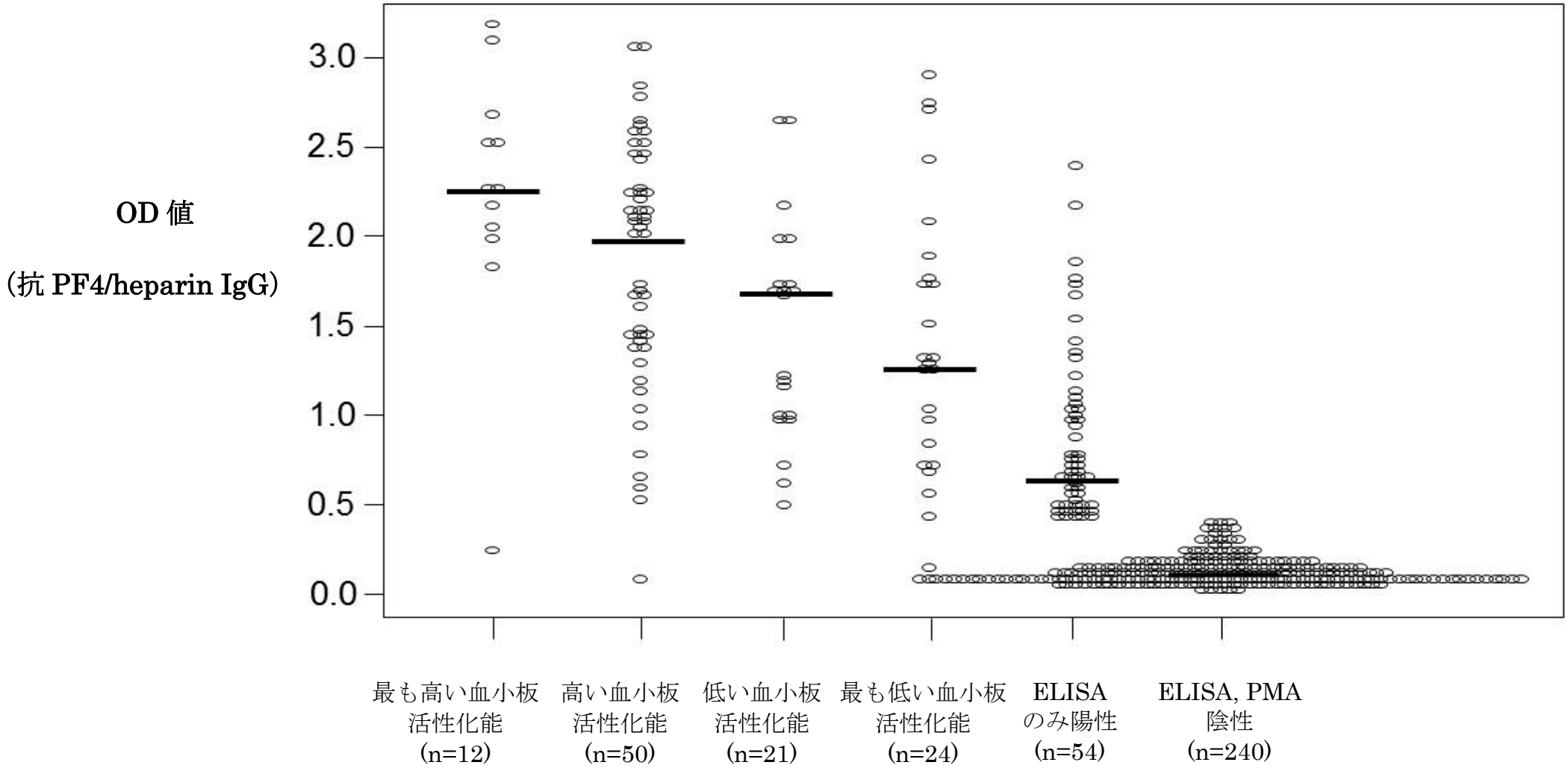


図 9：抗 PF4/ヘパリン IgG に対する ELISA の OD 値と血小板活性化能の関係

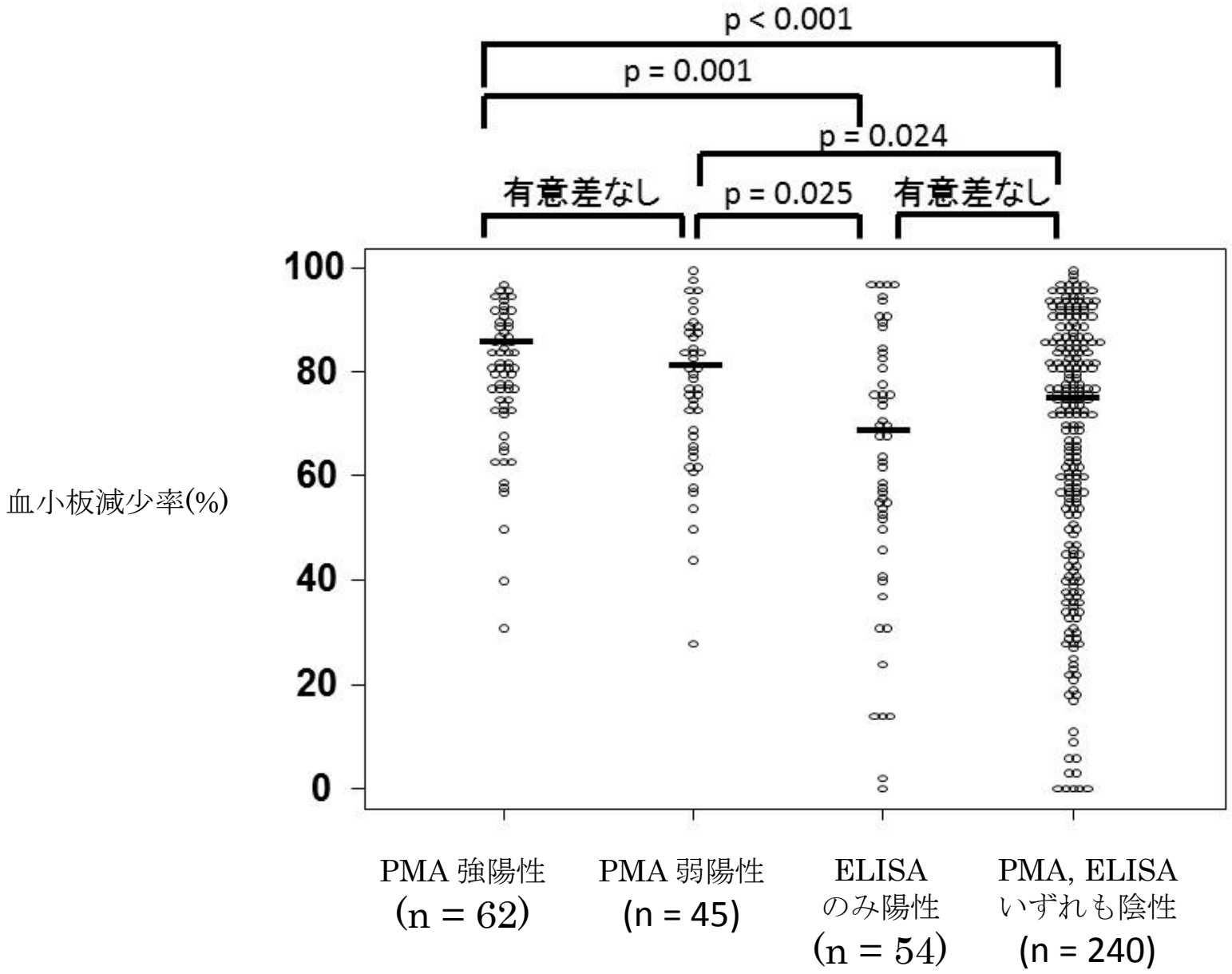

p < 0.001
p = 0.001
p = 0.024
有意差なし
p = 0.025
有意差なし
100
80
60
40
20
0
血小板減少率(%)
PMA 強陽性
(n = 62)
PMA 弱陽性
(n = 45)
ELISA
のみ陽性
(n = 54)
PMA, ELISA
いずれも陰性
(n = 240)

図 10：血小板減少率

および 1.175(カットオフ 0.535)と陽性であった。残った 1 名については、4Ts スコアリングシステムにおいては 5 点と高値であったが、いずれの ELISA においても陰性であった。

HIT に関連する血栓塞栓症

ヘパリンを開始してからの血栓塞栓症の発症は、ELISA のみ陽性群および PMA,ELISA いずれも陰性群と比較し、PMA 強陽性群で有意に高かった（図 11)。しかしながら、PMA 弱陽性群と ELISA のみ陽性群、PMA, ELISA いずれも陰性群との間には血栓塞栓症の発症率に統計学的に有意な差はなかった。

PMA 強陽性群と PMA 弱陽性群における臨床的な転帰を調べるため、我々は HIT が疑われた時点で血栓塞栓症のない患者群について、その後の血栓塞栓症に対する代替抗凝固療法の効果を調査した。この解析において、血栓塞栓症の発症時期が不明であった 2 名は除外した(図 6)。PMA 強陽性群の 21 名(33.9%)の患者および PMA 弱陽性における 14 名(31.1%)の患者については、HIT が疑われた日もしくはそれ以前に血栓塞栓症を発症していたため、この解析から除外した。従って、PMA 強陽性群の 39 名および PMA 弱陽性群の 31 名がこの解析対象となった(図 6)。日本において HIT に対する抗凝固療法として認可されているのはアルガトロバンのみであるので、この対象患者についてはアルガトロバンが代替抗凝固療法として使用されていた。HIT が疑われた日にアルガトロバンが代替抗凝固療法として開始された患者群(PMA 強陽性 21 名、PMA 弱陽性 14 名)における累積血栓塞栓症の発症率を図 12A に示す。アルガトロバンが当日に開始された場合、累積血栓塞栓症発症率は

PMA 強陽性群(19.0%)と PMA 弱陽性群(7.1%)において、統計学的な有意差は認めなかった(p=0.313)。対照的に、アルガトロバンの開始が HIT が疑われた日より 1 日以上遅れた、もしくは開始されなかった群(PMA 強陽性群 14 名、PMA 弱陽性群 12 名)においては PMA 強陽性群は PMA 弱陽性群よりも血栓塞栓症発症率は有意に高かった(61.1% vs 17.6%; p=0.007: 図 12B)。

我々は PMA 陰性群においても同様に HIT が疑われた日以降の累積血栓塞栓症の発症率について調べた(図 13A および B)。この PMA 陰性群においては ELISA のみ陽性群および PMA, ELISA いずれも陰性群においては HIT が疑われた日以降の累積血栓塞栓症の発症率は ELISA の結果や代替抗凝固療法を始めた時期などによらず、同等に低かった。

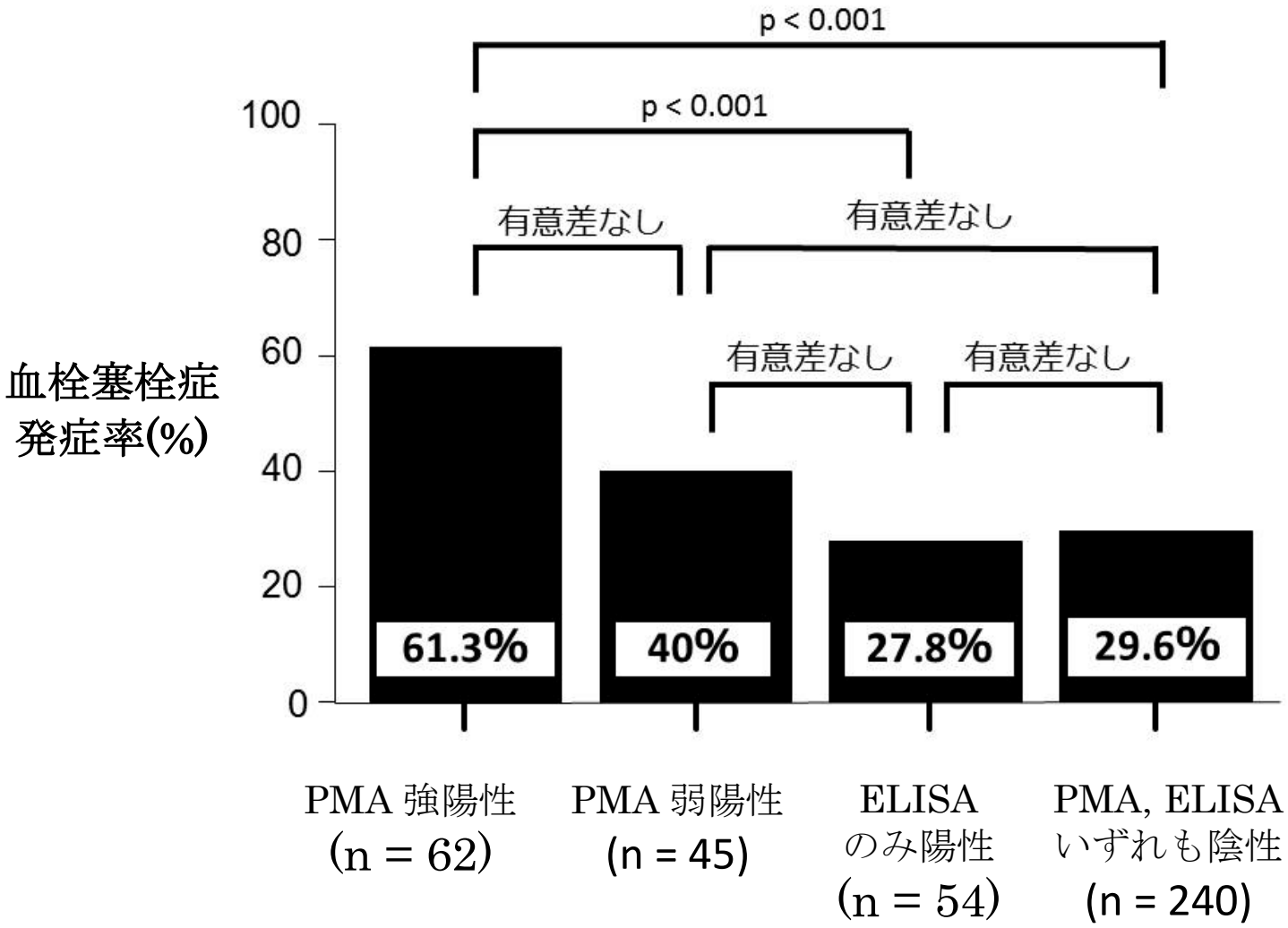
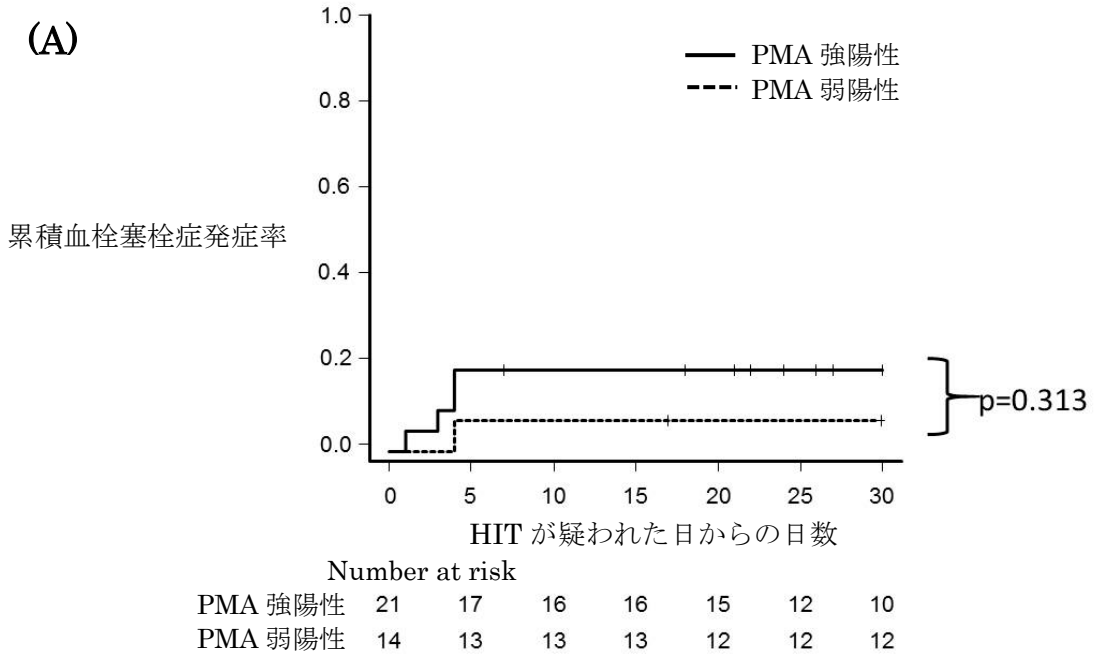


図 11： 血栓塞栓症発症率



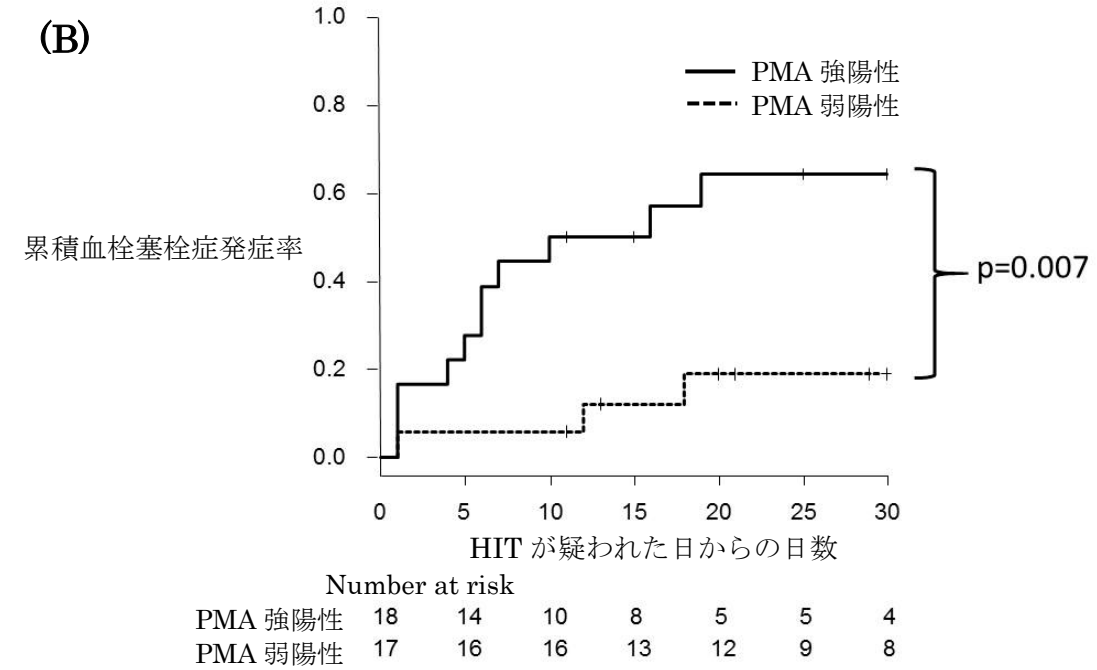
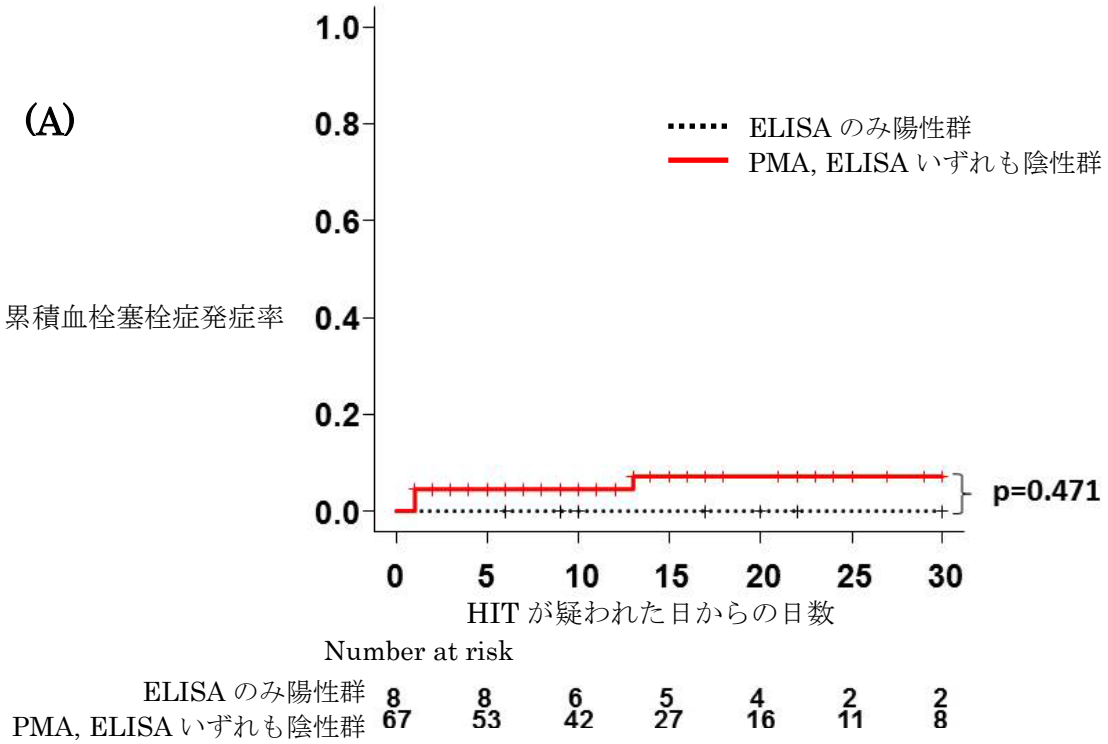


図 12: PMA 陽性群における HIT が疑われた後の累積血栓塞栓症発症率
(A)アルガトロバン療法を HIT が疑われた当日に開始
(B)アルガトロバン療法を HIT が疑われた日から 1 日以上遅れて開始
もしくは開始なし



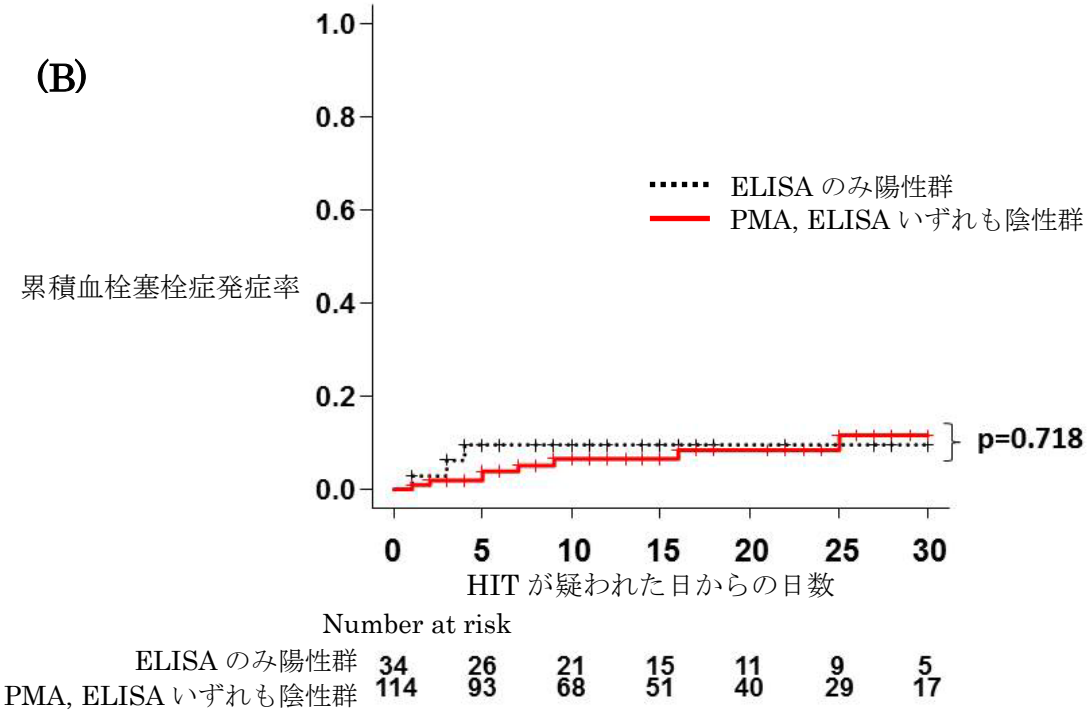


図 13:　PMA 陰性群における HIT が疑われた後の累積血栓塞栓症発症率
(A)アルガトロバン療法を HIT が疑われた当日に開始
(B)アルガトロバン療法を HIT が疑われた日から 1 日以上遅れて開始
もしくは開始なし

考察

我々は今回、以下のような 2 つのクリニカルクエスチョンに答える研究を計画した。

①我が国における HIT による PCI 中の血栓症の臨床的特徴はどのようなものか

②我々の開発した機能的測定法の HIT 診断における有効性、特に HIT の中でも血栓塞栓症を起こしやすい患者の同定は可能か

まず、最初のクリニカルクエスチョンに関して、解析対象となった PCI もしくは冠動脈造影を施行し、ヘパリン投与後 24 時間以内に冠動脈血栓を起こした 21 名のうち、5 名が PMA 陽性で HIT と診断された。そしてこれら 5 名全員が、過去 1 か月以内にヘパリンに暴露されていた。従って、PCI や冠動脈造影を行う場合、過去 1 か月以内にヘパリンに暴露されている場合は、HIT に関連する冠動脈血栓症は重篤な合併症として考慮すべき疾患と考えられる[39]。

近年の研究で、中程度から高度の非 ST 上昇型急性冠症候群に対する PCI 施行中の血栓塞栓症の発症率はおよそ 3.5%で、その中に 0.9%の新規の血栓症を認め、そのような場合には主要有害心イベントや 30 日死亡率との相関が認められたと報告されている[38]。PCI 中の血管造影での可視血栓の存在は患者予後を有意に悪化させることがわかっている[46]。我々の研究においても、可視血栓を認めた 5 名すべてが循環虚脱に陥っている(図 8)。そのうち 4 名は補助循環装置を必要とし、1 名は死亡している。これらの事実から、HIT は PCI 関連の重症血栓塞栓症を引き起こす原因となったと考えられる。抗 PF4/ヘパリン抗体のセロコンバージョンは PCI においてヘパリンを使用したのち、およそ 10%に起こると報告さ

れており[47, 48]、特に過去 1 か月以内に PCI を行った場合には PCI 中の合併症として HIT を考慮すべきと考える。HIT 抗体はヘパリンを開始して 5 日目以降に産生される[31]。突然の血小板低下と予期せぬ血栓塞栓症の発症は、過去(多くは一か月以内）にヘパリン投与を受けて、HIT 抗体をすでに保有する患者において再度ヘパリンを投与して 24 時間以内に早期発症型の HIT として起こるとされる[6]。我々の研究はこの観察研究と合致するものである。HIT 関連急性冠動脈血栓症は初回 PCI の最中もしくは直後には起こっておらず、ヘパリンを用いた PCI を過去 1 か月以内に行った患者において発症していた。さらに、今回 PCI 中に HIT をおこした 5 人のうち 3 人までが、ヘパリンの添加無しに血小板を活性化しうる”delayed onset pattern”と呼ばれる強い HIT 抗体を保持していた。我々の結果は、患者が強い血小板活性化能を持つ HIT 抗体を保持している場合、PCI は血栓塞栓症の大きなリスクファクターになることを示唆している。

次に、2 つ目のクリニカルクエスチョンに対し、本研究により、PMA が HIT の診断に有効であることが示された[40]。PMA で陽性であった患者のほとんどは、HIT に特徴的である臨床症状[4, 5]を有していた。すなわち、99%以上(106/107)の PMA 陽性患者が血小板減少率が 30%以上であり、92.5%(99/107)が 50%以上の減少率であった(図 10)。およそ半数の患者が、動脈性もしくは静脈性の血栓塞栓症のいずれかまたは両方を発症していた(図 11)。実際、PMA 強陽性および PMA 弱陽性の患者の中で、4Ts スコアリングシステムで低スコアであったのは、それぞれたった 3.2%および 6.7%に過ぎなかった。PMA 強陽性群におけ

るヘパリン投与開始後の血栓塞栓症の発症率は ELISA のみ陽性群や ELISA、PMA いずれも陰性群に比較し、有意に高かった(図 11)。我々の知る限り、本研究は初めて in vitro における HIT 抗体の血小板活性化能の強さが、ヘパリン以外の代替抗凝固薬(アルガトロバン)療法に対する HIT の転帰と有意に相関することを示したものである。従って、PMA は HIT 関連の血栓塞栓症の高リスクとなる患者を同定するのに有効であり、このような患者は HIT が疑われた時点で可及的速やかにヘパリン以外の代替抗凝固薬を開始すれば、血栓塞栓症のリスクを回避できる。

臨床的診断の根拠となる 4Ts スコアリングシステムや抗 PF4/ヘパリン抗体の免疫測定法は診断特異度が低い[29] [34] [36]ため、HIT の診断はいまだに難しいものとなっている。この 4Ts スコアリングシステムと免疫測定法を併用しても、診断の難しさは同様である。我々のコホートでは、30 名の患者が 4Ts スコアリングシステムにおいて 4 点以上で、かつ ELISA で陽性であったが PMA 陰性であった(表 5)。血栓塞栓症の発症率(図 11)と血小板の減少率(図 10)においては ELISA のみ陽性群と PMA、ELISA いずれも陰性群の間に差は無かった。さらに、ELISA のみ陽性群の ELISA の OD 値は PMA 強陽性群と PMA 弱陽性群とオーバーラップしていた(図 9)。これらの結果は、従来通りの見解、すなわち酵素免疫測定法は HIT を過剰診断してしまうことを支持するものである。

PMA 陽性で、かつ抗 PF4/ヘパリン IgG 抗体の ELISA 陰性であった患者は 3 名いた(図 9)。このうち 4Ts スコアリングシステムで中間スコアであった 2 名は、IgG, IgA, IgM を合

わせて測定する ELISA において陽性であった。この結果は最近のメタアナリシス[49]が示すように、ELISA は製造会社により、抗原性などの違いがあることを表している。従って、この患者 2 名については血小板活性化能をもつ PF4/ヘパリン抗体を保有していた可能性は否定できないと考える。残った 1 名については、インターロイキン 8 や好中球活性化ペプチド 2 [50]といった PF4 非依存性抗原を標的とする稀な HIT 抗体の関与[51] [35]が考えられるが、このような PF4 非依存性の発症機序をもつ HIT が存在するかどうかは、いまだに議論のあるところである[52]。従って、これらの結果は、近年のメタアナリシス[49]の結果と同様、免疫測定法(ELISA）は HIT の診断において、高い感度を持つものの、100%ではないということを示す。

洗浄血小板を用いた機能的測定法が血小板活性化能を有する HIT 抗体の同定に、感度・特異度ともに優れることはいくつかの研究で示されている[53] [54]。しかしながら、洗浄血小板を用いた機能的測定法としては、セロトニン放出試験とヘパリン誘発血小板活性化試験のみが汎用されてきた[36] [53] [55]。洗浄血小板を用いた機能的測定法における適切な HIT 抗体の測定のために、洗浄血小板を提供する適切なドナーの選出と、弱陽性コントロールをアッセイ内に含むことが大変重要であることがわかっている[52] [55]。我々は HIT 抗体に反応性のよいドナーを 20 人の健常非喫煙者から選出している。それに対し、ヘパリン誘発血小板活性化試験においては 4 人のドナーがランダムに抽出されている(表 2)。さらに、我々は反応条件として、ヘパリン誘発血小板活性化試験同様に低分子ヘパリンである

レビパリンナトリウムを加えた。低分子ヘパリンは PF4/ヘパリン複合体をより確実に形成するため、アッセイの HIT 抗体検出感度を高めるとされる[56]。一方、セロトニン放出試験においては、低分子ヘパリンは通常含まれない。従って、我々の PMA は HIT 抗体の検出に対して、より感度が高いと考えられる。実際、抗 PF4/ヘパリン IgG 抗体に対する ELISA で低 OD 値(0.4 から 1.0)であった 56 人の患者のうち、19 名(34%)が PMA 陽性であった(図 9)が、これは抗 PF4/ヘパリン IgG 抗体に対する酵素免疫測定法で OD 値が 0.45 から 1.0 であった患者のうち、たった 3.2%がセロトニン放出試験で陽性であったとする過去の報告[57]よりも多い。しかしながら、この違いは、使用する免疫測定法の違いによるものである可能性はある。

HIT が臨床的に疑われた日に血栓塞栓症を発症していなかった患者群の中でさえ、アルガトロバン療法が一日以上遅れた場合、PMA 強陽性群においては累積血栓塞栓症発症率(61.1%)が PMA 弱陽性群の累積血栓塞栓症発症率(17.6%)よりも有意に高かった(図 12B)。逆に、アルガトロバン療法を HIT が臨床的に疑われた日に開始した場合は、PMA 強陽性群と PMA 弱陽性群の累積血栓塞栓症発症率に統計学的有意差はなかった(図 12A)。過去にヘパリン誘発血小板活性化試験により HIT と診断された患者においてレピルジンを使用した場合の研究で、同様の結果が報告されている[58] [59]。ヘパリン誘発血小板活性化試験によって HIT が確認されてからレピルジンが開始されたため、新規血栓塞栓症の発症のリスクは、臨床的に HIT が疑われた日からレピルジン療法を開始する日までの間が最も高かった。

臨床的に HIT が疑われてからレピルジン療法を開始するまでの間の新規血栓塞栓症発症リスクが 1 人日あたり 5.1%であるのに対して、レピルジン療法中のそれは 0.4%であった[58]。これらの結果を合わせると、我々の研究結果は、特に血小板活性化能を持つ抗体を十分に保有する HIT 患者においては、ヘパリン以外の代替抗凝固療法を可能な限り早く開始することの重要性を示唆していると考えられる。我々の PMA は HIT の中でも、血栓塞栓症を発症するリスクが高く、より早く強力な代替抗凝固療法を必要とする可能性を秘めた患者群を同定し、治療法の決定に役立つ可能性がある。

アルガトロバン療法の転帰が PMA 強陽性群と PMA 弱陽性群で違うことは、HIT 抗体による血小板活性化の閾値は、血小板減少を起こす閾値よりも高い可能性が考えられる。血小板減少率は PMA 強陽性群と PMA 弱陽性群の間で差は無かった。対照的に、ヘパリン開始後の血栓塞栓症の発症率や、血栓塞栓症回避のための代替抗凝固療法が遅れた場合の影響に関しては、この 2 群間での差を認めた。これらの結果は、PMA 弱陽性群の中の大部分の HIT 抗体の血小板活性化レベルは血小板減少を起こす閾値よりは高いが、血栓塞栓症を引き起こす程は高くないということを示唆する。最近の研究では、ヘパリンが存在しなくても血小板上のコンドロイチン硫酸が PF4 に結合することでわずかな構造変化を起こし、この構造変化により生じた抗原を抗 PF4/ヘパリン IgG 抗体のみが認識することで、血小板に結合し、その活性化を引き起こすとされる[60]。著者らは、この知見は、洗浄血小板による機能的測定法において、ヘパリンを添加せずとも血小板の活性化を認める、いわゆ

る”delayed onset pattern“[11]と呼ばれる HIT のメカニズムを説明するものであるとしている。この知見は、我々の研究において、PMA 強陽性群においてはヘパリン中止後、数週間後の血栓塞栓症の発症率が高いことや、代替抗凝固療法の遅れが血栓塞栓症のより高率な発症に関与していること(図 12B)のメカニズムである可能性がある。

これらの観察に基づき[60]、近年、HIT の洗浄血小板を用いた機能的測定法による診断において、外的に PF4 を添加することによる有効性が検討されている[61] [62]。Nasi らは洗浄血小板を用いて、外的に PF4 を添加するセロトニン放出試験に類似した機能的測定法を開発した[61]。結果、このアッセイでは通常のセロトニン放出試験では陰性となるような患者群の中にさえも血小板活性化能を持つ抗体を検出することができた。彼らは、このアッセイは HIT を引き起こさない、閾値以下のレベルの血小板活性化抗体を検出してしまうことで、HIT の過剰診断をしてしまうと結論している。我々の研究結果と合わせると、アッセイの HIT 抗体を同定する感度を上げれば上げるほど、特に血栓塞栓症を発症するような HIT 患者の同定の特異度を下げてしまう結果になる可能性がある。HIT 患者においては、重度の血小板減少症であったとしても出血は稀であるために、血小板減少症自体は臨床的に重要ではない。加えて、HIT 以外で、血小板減少のある患者は、ヘパリン中止期間には血栓塞栓症のリスクが、ヘパリン以外の代替抗凝固療法中には大出血のリスクがある。従って、このような患者群に対して、HIT の過剰診断は、臨床上重大な問題となる。一方で、HIT 患者における血栓塞栓症の発症は、予後の悪化に直結するため、より一層重要である。

従って、洗浄血小板を用いた機能的測定法において、HIT 関連の血栓症の発症を引き起こす閾値より上で、診断において最適な感度と特異度のバランスを取ることが、実臨床において重要となる。この点において、臨床医に「強陽性」であるのか「弱陽性」であるのか、といった血小板の活性化能の強さまで含めた情報を提供することが重要と考えられる。現在のところ、我々は PMA 陽性を強陽性と弱陽性に分類している(表 2)。ヘパリン誘発血小板活性化試験のような、患者血清を目視して血小板の活性化が有るか否かを判断する判定量的なアッセイでは、4 人中最低 3 人の血清で 30 分で血小板活性化が認められる時に強陽性としており、これにより HIT 関連血栓が発症高リスク群を同定できるとする[51]。本アッセイのより詳細な特徴、例えば、診断の正確性の向上のための PAI の適切なカットオフ値の選定などは、我々の全国登録調査が継続する限り、さらなるデータを集めて検討する必要がある。

HIT の正確な診断のためには PMA のような機能的測定法の標準化と普及が望まれるが、そのためには高いクオリティコントロールのもとに機能的測定法が実施できなければ、機能的測定法の結果の質が担保されない。このクオリティコントロールとして、①HIT 抗体に対して最適な反応を示すドナーを選択すること②洗浄血小板を用いること③アッセイ系に弱陽性コントロールを必ず含むことが重要となる[52]。ドナーに依存するアッセイであることは研究室間の定量的標準化を難しくし、操作の煩雑性は、機能的測定法の普及を阻害している。将来的にはこれらを解決した、ドナーに依存しない簡便な機能的測定法の開発

が待たれる。新規の診断アッセイの開発に際しては、その感度・特異度の検定が必要になるが、HIT の希少性から確実に診断のとれた血清標準パネル（陽性検体・弱陽性検体・陰性検体）の収集は容易ではない。我々は、全国から HIT 疑い症例の検体を集めているが、その際には検体の二次利用に同意いただいている（国立循環器病研究センター倫理委員会承認済み、改正個人情報保護法に対応済）。これらの血清パネルを使用することで、弱陽性に反応するドナーの選択を標準化、また簡便な機能的測定法を開発することを目指し、研究を継続している。

本研究にはいくつかの限界がある。まず、一つ目のクリニカルクエスチョンに対する研究においては、HIT が疑われた患者のみが対象となっているため、選択バイアスが否定できない。HIT 関連の冠動脈血栓症の発症率を正確に求めるには、前向きの大規模コホート研究が必要である。また、日本においてはグリコプロテイン IIb/IIIa 受容体拮抗薬が承認されていないことが、HIT 関連の冠動脈血栓症の発症率に影響を与えた可能性がある。

次に二つ目のクリニカルクエスチョンにおいては、対象患者の中で PMA、ELISA いずれも陰性であった群においてさえ、血栓塞栓症の発症率が 29.6%と、過去の報告よりも高率であった[36] [61]。これは、我々の全国調査に含まれる患者が、実際の日常臨床における患者群よりもより重篤であること、すなわち選択バイアスの存在を示唆する。しかしながら、このような重篤な患者群の中においてさえ、PMA によって HIT 関連の血栓塞栓症の高リスク群を同定することができた。さらに、この研究では 400 名以上の HIT 疑いの患者を日本

全国の 181 施設から集めており、普遍性のある結果であると考える。もう一つの限界として、HIT に対するヘパリン以外の代替抗凝固療法としてはアルガトロバンのみが日本では承認されているため、我々の結果はアルガトロバンに特異的なものである可能性がある。

結論として、我々の研究により、PCI や冠動脈造影を行う場合、過去 1 か月以内にヘパリンに暴露されている場合は、HIT に関連する冠動脈血栓症は重篤な合併症として考慮すべき疾患であること、また、PMA は HIT 関連の血栓塞栓症の高リスクとなる患者を同定するのに有効であり、このような患者は HIT が疑われた時点で可及的速やかにヘパリン以外の代替抗凝固薬を開始すれば、血栓塞栓症のリスクを回避できる可能性があることが判明した。我々は、PCI や冠動脈造影を行う患者において過去 1 か月以内にヘパリンに暴露されている場合は、事前に ELISA 等で HIT 抗体をスクリーニングすることで、患者の予後改善できる可能性があることや、PMA によりヘパリン起因性血小板減少患者の中でも特に血栓塞栓症を起こしやすい患者を同定し、その情報を現場の医師に提供することで、HIT 患者の予後改善に貢献している。

参考文献

1 Greinacher A, Warkentin TE, BH Chong. Heparin-induced thrombocytopenia. In :Platelets, Greinacher A, Warkentin TE, BH Chong, 851-882, 2012.

2 Greinacher A. CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia. The New England journal of medicine; 373: 252-61, 2015.

3 Warkentin T. E., Levine M. N., Hirsh J., Horsewood P., Roberts R. S., Gent M., Kelton J. G. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. The New England journal of medicine; 332: 1330-5, 1995.

4 Warkentin T. E., Kelton J. G. A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. The American journal of medicine; 101: 502-7, 1996.

5 Greinacher A., Farner B., Kroll H., Kohlmann T., Warkentin T. E., Eichler P. Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. Thrombosis and haemostasis; 94: 132-5, 2005.

6 Warkentin T. E., Kelton J. G. Temporal aspects of heparin-induced thrombocytopenia. The New England journal of medicine; 344: 1286-92, 2001.

7 Tholl U., Greinacher A., Overdick K., Anlauf M. Life-threatening anaphylactic reaction following parathyroidectomy in a dialysis patient with heparin-induced

thrombocytopenia. Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association; 12: 2750-5, 1997.

8 Warkentin T. E., Greinacher A. Heparin-induced anaphylactic and anaphylactoid reactions: two distinct but overlapping syndromes. Expert opinion on drug safety; 8: 129-44, 2009.

9 Potzsch B., Klovekorn W. P., Madlener K. Use of heparin during cardiopulmonary bypass in patients with a history of heparin-induced thrombocytopenia. The New England journal of medicine; 343: 515, 2000.

10 Warkentin T. E., Sheppard J. A. Serological investigation of patients with a previous history of heparin-induced thrombocytopenia who are reexposed to heparin. Blood; 123: 2485-93, 2014.

11 Warkentin T. E., Kelton J. G. Delayed-onset heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. Annals of internal medicine; 135: 502-6, 2001.

12 Warkentin T. E., Basciano P. A., Knopman J., Bernstein R. A. Spontaneous heparin-induced thrombocytopenia syndrome: 2 new cases and a proposal for defining this disorder. Blood; 123: 3651-4, 2014.

13 Brandt S., Krauel K., Gottschalk K. E., Renne T., Helm C. A., Greinacher A., Block S.

Characterisation of the conformational changes in platelet factor 4 induced by polyanions: towards in vitro prediction of antigenicity. Thrombosis and haemostasis; 112: 53-64, 2014.

14 Ziporen L., Li Z. Q., Park K. S., Sabnekar P., Liu W. Y., Arepally G., Shoenfeld Y., Kieber-Emmons T., Cines D. B., Poncz M. Defining an antigenic epitope on platelet factor 4 associated with heparin-induced thrombocytopenia. Blood; 92: 3250-9, 1998.

15 Li Z. Q., Liu W., Park K. S., Sachais B. S., Arepally G. M., Cines D. B., Poncz M. Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. Blood; 99: 1230-6, 2002.

16 Kelton J. G., Sheridan D., Santos A., Smith J., Steeves K., Smith C., Brown C., Murphy W. G. Heparin-induced thrombocytopenia: laboratory studies. Blood; 72: 925-30, 1988.

17 Gruel Y., Pouplard C., Lasne D., Magdelaine-Beuzelin C., Charroing C., Watier H. The homozygous FcgammaRIIIa-158V genotype is a risk factor for heparin-induced thrombocytopenia in patients with antibodies to heparin-platelet factor 4 complexes. Blood; 104: 2791-3, 2004.

18 Kasthuri R. S., Glover S. L., Jonas W., McEachron T., Pawlinski R., Arepally G. M., Key N. S., Mackman N. PF4/heparin-antibody complex induces monocyte tissue factor expression and release of tissue factor positive microparticles by activation of

FcgammaRI. Blood; 119: 5285-93, 2012.

19 Rauova L., Hirsch J. D., Greene T. K., Zhai L., Hayes V. M., Kowalska M. A., Cines D. B., Poncz M. Monocyte-bound PF4 in the pathogenesis of heparin-induced thrombocytopenia. Blood; 116: 5021-31, 2010.

20 Cines D. B., Tomaski A., Tannenbaum S. Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. The New England journal of medicine; 316: 581-9, 1987.

21 Visentin G. P., Ford S. E., Scott J. P., Aster R. H. Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. The Journal of clinical investigation; 93: 81-8, 1994.

22 Jaax M. E., Krauel K., Marschall T., Brandt S., Gansler J., Furll B., Appel B., Fischer S., Block S., Helm C. A., Muller S., Preissner K. T., Greinacher A. Complex formation with nucleic acids and aptamers alters the antigenic properties of platelet factor 4. Blood; 122: 272-81, 2013.

23 Krauel K., Weber C., Brandt S., Zahringer U., Mamat U., Greinacher A., Hammerschmidt S. Platelet factor 4 binding to lipid A of Gram-negative bacteria exposes PF4/heparin-like epitopes. Blood; 120: 3345-52, 2012.

24 Krauel K., Potschke C., Weber C., Kessler W., Furll B., Ittermann T., Maier S., Hammerschmidt S., Broker B. M., Greinacher A. Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. Blood; 117: 1370-8, 2011.

25 Kreimann M., Brandt S., Krauel K., Block S., Helm C. A., Weitschies W., Greinacher A., Delcea M. Binding of anti-platelet factor 4/heparin antibodies depends on the thermodynamics of conformational changes in platelet factor 4. Blood; 124: 2442-9, 2014.

26 Zheng Y., Yu M., Podd A., Yuan L., Newman D. K., Wen R., Arepally G., Wang D. Critical role for mouse marginal zone B cells in PF4/heparin antibody production. Blood; 121: 3484-92, 2013.

27 Warkentin T. E., Linkins L. A. Non-necrotizing heparin-induced skin lesions and the 4T's score. Journal of thrombosis and haemostasis; 8: 1483-5, 2010.

28 Lo G. K., Juhl D., Warkentin T. E., Sigouin C. S., Eichler P., Greinacher A. Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. Journal of thrombosis and haemostasis; 4: 759-65, 2006.

29 Cuker A., Gimotty P. A., Crowther M. A., Warkentin T. E. Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and

meta-analysis. Blood; 120: 4160-7, 2012.

30 Cuker A., Arepally G., Crowther M. A., Rice L., Datko F., Hook K., Propert K. J., Kuter D. J., Ortel T. L., Konkle B. A., Cines D. B. The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. Journal of thrombosis and haemostasis; 8: 2642-50, 2010.

31 Warkentin T. E., Sheppard J. A., Moore J. C., Cook R. J., Kelton J. G. Studies of the immune response in heparin-induced thrombocytopenia. Blood; 113: 4963-9, 2009.

32 Greinacher A., Kohlmann T., Strobel U., Sheppard J. A., Warkentin T. E. The temporal profile of the anti-PF4/heparin immune response. Blood; 113: 4970-6, 2009.

33 Okata T., Miyata S., Miyashita F., Maeda T., Toyoda K. Spontaneous heparin-induced thrombocytopenia syndrome without any proximate heparin exposure, infection, or inflammatory condition: Atypical clinical features with heparin-dependent platelet activating antibodies. Platelets; 26: 602-7, 2015.

34 Warkentin T. E., Sheppard J. A., Horsewood P., Simpson P. J., Moore J. C., Kelton J. G. Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. Blood; 96: 1703-8, 2000.

35 Greinacher A., Juhl D., Strobel U., Wessel A., Lubenow N., Selleng K., Eichler P., Warkentin T. E. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the

incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. Journal of thrombosis and haemostasis; 5: 1666-73, 2007.

36 Lo G. K., Sigouin C. S., Warkentin T. E. What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? American journal of hematology; 82: 1037-43, 2007.

37 Warkentin T. E., Sheppard J. I., Moore J. C., Sigouin C. S., Kelton J. G. Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. Journal of thrombosis and haemostasis; 6: 1304-12, 2008.

38 McEntegart M. B., Kirtane A. J., Cristea E., Brener S., Mehran R., Fahy M., Moses J. W., Stone G. W. Intraprocedural thrombotic events during percutaneous coronary intervention in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes are associated with adverse outcomes: analysis from the ACUITY (Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy) trial. Journal of the American College of Cardiology; 59: 1745-51, 2012.

39 Maeda T., Noguchi T., Saito S., Yoshioka R., Horibe E., Miyanaga S., Seguchi S., Kanaumi Y., Kawai T., Okazaki H., Miyata S. Impact of heparin-induced thrombocytopenia on acute coronary artery thrombosis in patients undergoing PCI. Thrombosis and haemostasis; 112: 624-6, 2014.

40 Maeda T., Nakagawa K., Murata K., Kanaumi Y., Seguchi S., Kawamura S., Kodama M., Kawai T., Kakutani I., Ohnishi Y., Kokame K., Okazaki H., Miyata S. Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry. Thrombosis and haemostasis; 117: 127-138, 2017.

41 Hughes M., Hayward C. P., Warkentin T. E., Horsewood P., Chorneyko K. A., Kelton J. G. Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. Blood; 96: 188-94, 2000.

42 Lee D. H., Warkentin T. E., Denomme G. A., Hayward C. P., Kelton J. G. A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. British journal of haematology; 95: 724-31, 1996.

43 Asada R., Wanaka K., Walenga J., Prechel M., Miyashita K., Escalante V., Kaneko C., Hoshino N., Oosawa M., Matsuo M. Murine monoclonal antibody to platelet factor 4/heparin complexes as a potential reference standard for platelet activation assays in heparin-induced thrombocytopenia. Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis; 19: 37-41, 2013.

44 Warkentin T. E., Hayward C. P., Smith C. A., Kelly P. M., Kelton J. G. Determinants of

donor platelet variability when testing for heparin-induced thrombocytopenia. The Journal of laboratory and clinical medicine; 120: 371-9, 1992.

45 Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone marrow transplantation; 48: 452-8, 2013.

46 Fefer P., Daoulah A., Strauss B. H., Chisholm R., Sparkes J. D., Segev A. Visible angiographic complications predict short and long-term outcomes in patients with post-procedural creatine-phosphokinase elevation. Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions; 76: 960-6, 2010.

47 Williams R. T., Damaraju L. V., Mascelli M. A., Barnathan E. S., Califf R. M., Simoons M. L., Deliargyris E. N., Sane D. C. Anti-platelet factor 4/heparin antibodies: an independent predictor of 30-day myocardial infarction after acute coronary ischemic syndromes. Circulation; 107: 2307-12, 2003.

48 Foo S. Y., Everett B. M., Yeh R. W., Criss D., Laposata M., Van Cott E. M., Jang I. K. Prevalence of heparin-induced thrombocytopenia in patients undergoing cardiac catheterization. American heart journal; 152: 290 e1-7, 2006.

49 Nagler M., Bachmann L. M., ten Cate H., ten Cate-Hoek A. Diagnostic value of immunoassays for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and

meta-analysis. Blood; 127: 546-57, 2016.

50 Amiral J., Marfaing-Koka A., Wolf M., Alessi M. C., Tardy B., Boyer-Neumann C., Vissac A. M., Fressinaud E., Poncz M., Meyer D. Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. Blood; 88: 410-6, 1996.

51 Greinacher A., Ittermann T., Bagemuhl J., Althaus K., Furll B., Selleng S., Lubenow N., Schellong S., Sheppard J. I., Warkentin T. E. Heparin-induced thrombocytopenia: towards standardization of platelet factor 4/heparin antigen tests. Journal of thrombosis and haemostasis; 8: 2025-31, 2010.

52 Warkentin T. E., Arnold D. M., Nazi I., Kelton J. G. The platelet serotonin-release assay. American journal of hematology; 90: 564-72, 2015.

53 Greinacher A., Michels I., Kiefel V., Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. Thrombosis and haemostasis; 66: 734-6, 1991.

54 Warkentin T. E. How I diagnose and manage HIT. Hematology American Society of Hematology Education Program; 2011: 143-9, 2011.

55 Eichler P., Budde U., Haas S., Kroll H., Loreth R. M., Meyer O., Pachmann U., Potzsch B., Schabel A., Albrecht D., Greinacher A. First workshop for detection of

heparin-induced antibodies: validation of the heparin-induced platelet-activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA. Thrombosis and haemostasis; 81: 625-9, 1999.

56 Greinacher A., Feigl M., Mueller-Eckhardt C. Crossreactivity studies between sera of patients with heparin associated thrombocytopenia and a new low molecular weight heparin, reviparin. Thrombosis and haemostasis; 72: 644-5, 1994.

57 Nazi I., Arnold D. M., Moore J. C., Smith J. W., Ivetic N., Horsewood P., Warkentin T. E., Kelton J. G. Pitfalls in the diagnosis of heparin-Induced thrombocytopenia: A 6-year experience from a reference laboratory. American journal of hematology; 90: 629-33, 2015.

58 Lubenow N., Eichler P., Lietz T., Greinacher A., Hit Investigators Group. Lepirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia - results of the third prospective study (HAT-3) and a combined analysis of HAT-1, HAT-2, and HAT-3. Journal of thrombosis and haemostasis; 3: 2428-36, 2005.

59 Greinacher A., Eichler P., Lubenow N., Kwasny H., Luz M. Heparin-induced thrombocytopenia with thromboembolic complications: meta-analysis of 2 prospective trials to assess the value of parenteral treatment with lepirudin and its therapeutic aPTT range. Blood; 96: 846-51, 2000.

60 Padmanabhan A., Jones C. G., Bougie D. W., Curtis B. R., McFarland J. G., Wang D., Aster R. H. Heparin-independent, PF4-dependent binding of HIT antibodies to platelets: implications for HIT pathogenesis. Blood; 125: 155-61, 2015.

61 Nazi I., Arnold D. M., Warkentin T. E., Smith J. W., Staibano P., Kelton J. G. Distinguishing between anti-platelet factor 4/heparin antibodies that can and cannot cause heparin-induced thrombocytopenia. Journal of thrombosis and haemostasis; 13: 1900-7, 2015.

62 Padmanabhan A., Jones C. G., Curtis B. R., Bougie D. W., Sullivan M. J., Peswani N., McFarland J. G., Eastwood D., Wang D., Aster R. H. A Novel PF4-Dependent Platelet Activation Assay Identifies Patients Likely to Have Heparin-Induced Thrombocytopenia/Thrombosis. Chest; 150: 506-15, 2016.

謝辞

本研究の遂行に際し、二年間に渡り、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科・医学部　内科学専攻病態診断医学講座輸血医学　教授　岡崎仁先生に心から感謝致します。

本研究の遂行に際し、四年間に渡り、研究の場を提供していただき、懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました国立循環器病研究センター輸血管理室　医長　宮田茂樹　先生に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行ならびに酵素免疫測定法の施行にご協力いただいている国立循環器病研究センター輸血管理室　主任　角谷勇実　先生に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行ならびに機能的測定法の施行にご助言を賜りました国立循環器病研究センター輸血管理室　技師　児玉眞由美　先生に心から感謝申し上げます。

酵素免疫測定法の施行ならびに機能的測定法の施行にご協力いただいている国立循環器病研究センター輸血管理室　技師　瀬口周　先生に心から感謝申し上げます。

酵素免疫測定法の施行ならびにその緻密なクオリティコントロールにご協力いただいて

います国立循環器病研究センター輸血管理室　技師　金海仁在　先生に心から感謝申し上げます。

研究全般に渡りまして、器具使用から物品管理にいたるまで細やかな助言をいただきました国立循環器病研究センター輸血管理室　技師　川村知織　先生に心から感謝申し上げます。

機能的測定法の施行にご協力いただいている国立循環器病研究センター非常勤技師　杉森英里　先生、中井一吉　先生に心から感謝申し上げす。

データの管理ならびに整理にご協力いただいています国立循環器病研究センター輸血管理室　秘書　田邉奈津子　様、丸山淳子　様に心から感謝申し上げます。

最後に、著者の研究生活を精神的に支えていただきました妻の映美、娘の伶奈に心から感謝申し上げます。