

末梢血血小板減少患者における 未成熟血小板分画(IPF)の評価

Carol Briggs^{*1}, Stefan Kunka^{*1}, Dan Hart^{*1}, Shinichiro Oguni^{*2}, and Samuel J. Machin^{*1}

^{*1} Department of Haematology, University College London Hospital, London, UK

^{*2} シスメックス株式会社：神戸市西区高塚台4-4-4 (〒651-2271)

SUMMARY

アップグレードしたソフトウェアを搭載した多項目自動血球分析装置XE-2100(シスメックス社)を用いて、網血小板を未成熟血小板分画(Immature Platelet Fraction: IPF)として測定する信頼性の高い自動定量法が、新たに開発された。IPFは、フローサイトメトリー技術と網赤血球/光学的血小板チャンネルでの核酸の特異的染色により同定される。末梢血血小板破壊の亢進による血小板減少症、特に自己免疫性血小板減少性紫斑病(AITP)及び血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の臨床診断におけるこのパラメータの臨床的有用性が確立された。再現性及び48時間保存での安定性は良好であった。健常人におけるIPFの基準範囲は1.1~6.1%であり、平均値は3.4%であった。血小板破壊が異常と思われる患者を検討対象とし、また、このうちの2症例については、治療経過を追跡調査した。IPFは、いくつかの病態で上昇が見られ、AITP患者(9.2~33.1%, 平均22.3%)及び急性TTP患者(11.2~30.9%, 平均17.2%)では、最も有意な上昇が認められた。治療経過を追跡した患者では、血小板数が回復するとIPF%が低下することが証明された。これらの結果より、この迅速かつ安価なIPF%自動測定法は実用に耐えるものであり、血小板減少患者の評価における標準的パラメータとすべきであることが示された。

Key Words 網血小板, 未成熟血小板分画, 多項目自動血球分析装置, XE-2100, 自己免疫性血小板減少性紫斑病, 血栓性血小板減少性紫斑病

はじめに

血小板減少患者における出血の可能性については、血小板数からは限定的な情報しか得られない²⁾。

血小板産生を迅速に評価すれば、出血の可能性が高い骨髓機能不全による血小板減少と、化学療法後の骨髓回復あるいは末梢血血小板の破壊及び代謝回転の亢進による血小板減少症とを、識別することができると思われる。後者の場合、感染がない限り血小板数に関わらず出血の発生は少ない^{15, 16)}。

急性失血状態におかれたビーグル犬において、ニューメチレンブルーで染色可能かつ超生体染色により光学顕微鏡で認識できる粗い斑点状の凝縮物を含んだ新生血小板が観察されたのが、初めである¹²⁾。

この新生血小板は、成熟血小板と比べて大きく、反応性も高かった。また、これらの血小板はRNAを含んでおり、「網血小板」と命名された。網血小板数は血小板新生の速度を反映しており、血小板産生が亢進すると増加し、低下すると減少する。

この血小板に含まれているRNAは、様々な色素を用いて調べることができるので、RNAと結合する何らかの蛍光色素を用いて、網血小板をフローサイトメトリーで定量することができる。網血小板は、色素を取り込まない成熟血小板と識別することが可能である。KienastとSchmitz(1990)¹⁴⁾は、血小板減少患者の血小板にチアゾールオレンジを取り込ませて、フローサイトメトリーで分析する方法を開発し、

*本稿は、ブラックウェルパブリッシング株式会社の許諾を受け、British Journal of Haematology Vol.126 Issue 1, 2004より翻訳・転載いたしました。
Web公開日：2005年2月1日

様々な臨床症状について検討した。我々のグループは、デュアルカラーフローサイトメトリーを用いて、この分析法の変法を公表した⁷⁾。この変法もチアゾールオレンジを使用するものであるが、さらにフィコエリスリンを標識した抗Gp1b (CD42) 抗体を組み合わせた簡便かつ迅速な全血用網血小板分析法である。チアゾールオレンジは最も普及している蛍光色素であるが、他の色素も使用されている。このパラメータについての健常被験者での基準範囲が公表されているが、使用したフローサイトメトリー法によるばらつきが大きく、また同じ方法であっても測定施設間でばらつきが見られる^{9, 23)}。

過去10年間に、網血小板分析についての数多くの論文^{3, 17, 20, 21)}が公表され、血小板減少状態において、血小板RNA含有量が巨核球活性と直接関連することが明らかにされた。巨核球活性が低下している患者では血小板中のRNA増加はないが、巨核球活性が亢進している患者では、RNA染色される血小板数が有意に増加する。これにより、血小板減少の原因が骨髓機能不全によるものか、末梢における破壊及び代謝回転の亢進によるものなのかを判定できるので、不必要な骨髓検査を回避することができる。血小板の産生及び代謝回転に関するその他のパラメータ、すなわち血小板寿命²⁶⁾、もっと最近ではグリコカリシン²⁵⁾やトロンボポエチン¹⁸⁾の測定についても研究されている。しかし、血小板寿命には血小板の取り扱い及び放射能の使用などの問題があるため、普及していない^{8, 19)}。グリコカリシン指数(個々の患者の血小板数について正規化したグリコカリシンレベル)は、血小板代謝回転の指標であるが、再生不良性貧血における偽高値が報告されており¹¹⁾、また自己免疫性血小板減少性紫斑病(AITP)では極めて広い数値範囲が認められている²⁴⁾。トロンボポエチンは、巨核球の発達及び血小板産生の主要調節因子であるので¹³⁾、血小板の動態を評価する上で有用な検査である。これらの検査は、通常は研究部門に限られており、ルーチン検査として容易にモニタリングすることはできない。

網血小板を表現する他の方法として、これらを未成熟血小板分画(Immature Platelet Fraction: IPF)として分離する方法が考えられる。血小板RNAを正確に

測定することは技術的に困難であるので、IPFは網血小板の状態をより良く示す検査項目となりうる。現在、IPFは市販の血球分析装置を用いて測定可能であり、これが本稿の検討対象である。

方法及び患者

1. 自動測定法

XE-2100(シスメックス社)は幅広く用いられている全自動ルーチン血液分析装置である⁵⁾。XE-2100の光学式(蛍光)網赤血球/血小板チャンネルに特定のゲートを定め、現在、最新版ソフトウェア(XE-Proシリーズ;シスメックス社)を用いることにより、信頼性の高いIPF定量が可能となっている。フローサイトメトリーによるIPF測定では、ポリメチン系色素及びオキサジン系色素を含有する専用の染色液を使用する。これら2種類の色素は細胞膜を通過し、網赤血球及び網血小板のRNAを染色する。染色された細胞は、半導体レーザーを透過し、そのときに発生する前方散乱光(細胞容積)及び蛍光強度(RNA含有量)が測定される。図1は、光学的(蛍光)血小板のスキヤッタグラムであり、Y軸が前方散乱光、X軸が蛍光強度を示す。コンピューターアルゴリズムを用いて、前方散乱光と蛍光の強度により成熟血小板とIPFを識別する。本検討で使用したXE-2100は、IPFを分析する最新版ソフトウェアを搭載しており、

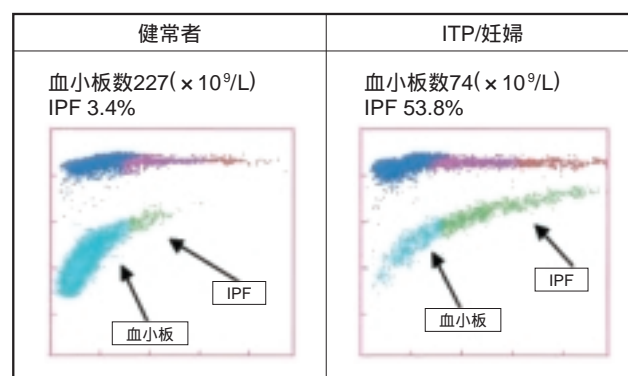


図1. 健常者とIPFが上昇している患者のPLT-Oスキヤッタグラム。成熟血小板は青い点で、成熟血小板よりも細胞容積が大きく蛍光強度が強いIPFは緑の点で表示される。

2つの血小板集団を分離するために、予め設定されたゲーティングを適用する。スキャッタグラム上、成熟血小板は青い点で、未成熟血小板は緑の点で示され、後者がIPFパラメータを構成する。図1は、健常者1例及びIPFが上昇しているAITP罹患妊婦1例のPLT-Oスキャッタグラムである。

絶対数も測定することができるが、通常、未成熟血小板分画は血小板産生速度を示すために、光学的血小板総数に対する比率として表される。現在、ルーチン用血球分析装置の一部としてIPF測定が可能であり、結果も他の数値と同時に知ることができる。

網血小板測定の標準法は、まだ確立されていないので、本検討においては、IPFデータとフローサイトメトリー法との比較検討は実施していない。

2. 患者

本検討には、ロンドン大学のルーチン血液検査室で検査に使われたEDTA-K₂採血管(Beckton Dickinson)で採血した末梢血検体を用いた。全ての検体は採血後2～4時間以内に分析した。

健常と思われる成人(血小板数を含む全ルーチン血球数検査結果は正常範囲内)から採血した50検体を用いて、IPF%の基準範囲を求めた。

初回診断による患者群の構成は、イギリス血液学標準化委員会(British Committee for Standards in Haematology; BCSH)の「成人、小児及び妊婦における特発性血小板減少性紫斑病の研究及び治療ガイドライン⁶⁾」に従って診断されたAITP患者22例、BCSHの「血栓性微小血管症性貧血の診断及び治療

ガイドライン¹⁾」に従って診断された血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)患者11例、妊娠第3期の妊婦12例[健常妊婦6例及び妊娠誘発性高血圧(PIH)患者6例]及び血小板数減少により化学療法を受けている患者13例であった。2例の患者については、治療及び回復の過程を通じて連続的に追跡検討した(1例は急性TTP患者、もう1例は骨髄移植より9ヶ月後に血小板減少を示した患者)。感染症に関する情報は、IPFに対する影響を指摘するために血漿交換あるいは薬物療法と同様に記録した。

血小板数が $50 \times 10^9/L$ 未満の検体はすべて2回測定し、平均IPF%を算出して解析に用いた。

結果

1. 再現性/精密度

表1に示すとおり、7検体による10回測定での再現性は良好であった。血小板数が健常者基準範囲内にあった3検体の平均CVは9.05%であり、血小板数高値検体のCVは2.04%であった。血小板数の低い3検体(平均 $44 \times 10^9/L$)はIPFが高く、CVは10.78%であった。全検体ともIPFの絶対数が非常に少ないため、CVが高くなると予測されたが、IPF%が高い検体でのCVは低いものであった。

2. 安定性

血液検体を室温で保存した場合、IPF値は2日間安定であった。採血後0.5時間から48時間まで、一定の傾向は見られなかった(図2)。これらの検体の

表1. 血小板数及びIPF%の異なる7被験者についての10回の反復測定による再現性

サンプル番号	平均値(IPF%)	SD	CV%
健常者1	2.4	0.16	6.82
健常者2	3.7	0.33	8.94
健常者3	2.6	0.30	11.39
高血小板, 高IPF	8.7	0.18	2.04
低血小板, 高IPF 1	8.4	0.58	6.92
低血小板, 高IPF 2	35.1	3.92	11.15
低血小板, 高IPF 3	43.9	6.26	14.27

IPFは総血小板数(plt)に対する百分率として表している。健常者1, 2及び3は健常供血者より採取した検体である。

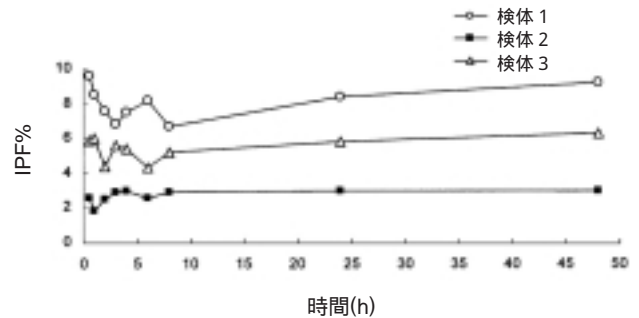


図2. IPF%の安定性。室温に48時間放置した3検体の測定結果

SD及びCV%は、再現性試験の結果よりわずかに高値を示したに過ぎないことは注目すべきである。

3. 健常対照群と患者群のIPF値

50例の健常成人についてIPF値を測定した。平均血小板数は $260 \times 10^9/L$ で、その範囲は $154 \sim 391 \times 10^9/L$ であった。IPFの平均値は3.4%（絶対数 $8.6 \times 10^9/L$ ），範囲は1.1～6.1%（絶対数 $3.1 \sim 16.4 \times 10^9/L$ ）であった。

4. 血小板減少患者のIPF値 - 診断

AITP患者群のIPF%は、検討対象とした全患者群中最高となり、血小板産生が活性化していることを示した。IPF%の最高値はAITP罹患妊婦の54%であった。活動性TTP患者も極めて高いIPF%を示したが、AITP患者と同様に血小板数が少ないためにIPFの絶対数は上昇しなかった。AITP患者及びTTP患者の寛解期におけるIPF測定結果は全般的に正常であったが、当該患者群の平均IPF%及び絶対数はともに健常被験者群より若干高いものもあった。

化学療法を受けている患者群のIPF%は、健常者基準範囲の下限であったが、血小板減少との関連性については、骨髄での血小板産生不全が示唆された。

妊娠第3期の妊娠は、全般的にIPF%及び絶対数の上昇を示した。PIHを伴う6例では、正常妊婦よりもIPF%が高かった（平均IPF 10.8%，範囲7.2～14.6%）。一方、正常妊婦6例のIPF%は平均6%（3.2～9.7%）であった（4例は健常者基準範囲内であり、2例がわずかな上昇を示した）。PIH患者の平均血小板数は $192 \times 10^9/L$ ，範囲 $110 \sim 216 \times 10^9/L$ ，正常妊婦の平均値は $230 \times 10^9/L$ ，範囲は $176 \sim 310 \times 10^9/L$ であった。

図3には、次の各患者群におけるIPF%を示す。すなわち、血小板数が $50 \times 10^9/L$ 未満のAITP患者群、血小板数が $50 \times 10^9/L$ 以上のAITP患者群、治療開始前の急性TTP患者群、寛解期のTTP患者群、妊娠第3期にある妊婦患者群及び化学療法を受けている患者群である。

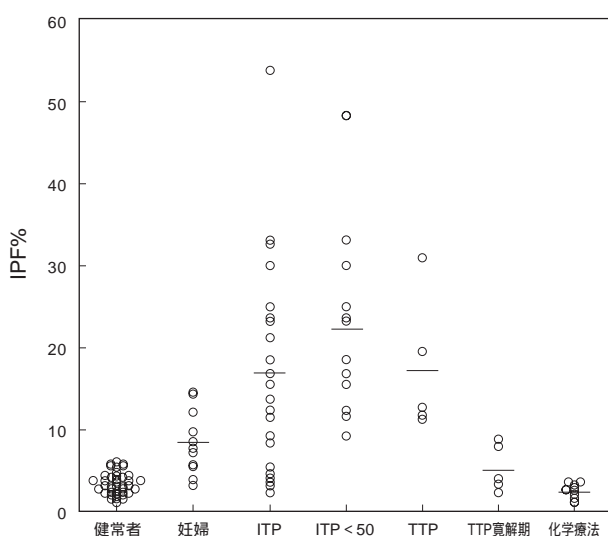


図3. 全被験患者群におけるIPF%の平均値及び範囲。妊婦 = 妊娠第3期検体，ITP < 50 = 血小板数 $50 \times 10^9/L$ 未満のAITP患者，化学療法 = 化学療法を受けている患者

表2は、各患者群についての平均値、範囲及び異常値を示した患者の割合を示したものである。

AITP患者の血小板数とIPF%間には、図4に示すとおり逆相関関係が見られた ($P < 0.0001$)。

5. IPF値 - 患者モニタリングにおける役割

長期治療を受けている患者2例について、IPF%が取りうる値を追跡調査した。

図5は、一過性の神経学的衰弱を伴う急性TTPを呈した60歳の女性患者の追跡結果を示したもので

ある。

82日間の治療過程におけるIPF%を、血小板数と対比して図示した。治療法は、30日間毎日血漿交換を実施し、次に寛解が始まるまで血漿交換の間隔を延長して実施し、最終的には持続的寛解を達成するというものであった。高いIPF%あるいはその上昇は、血小板数が正常化する前に行った3回の測定時のいずれにおいても血小板消費が亢進していたことを表している。

図6は、骨髓線維症のため不適合非血縁ドナーに

表2. 各検討群におけるIPF (%及び $\times 10^9/L$)の平均値及び範囲ならびに各群で高値を示した患者の割合

検討群	IPF%			IPF高値患者の割合(%)	IPF ($\times 10^9/L$)		
	平均値	最小値	最大値		平均値	最小値	最大値
健常者	3.4	1.1	6.1		8.6	3.1	16.4
妊婦	8.4	3.2	14.6	75	15.0	8.6	27.7
AITP	16.8	2.3	52.1	73	8.4	1.6	38.6
AITP < ($50 \times 10^9/L$)	22.3	9.2	48.3	100	7.8	1.6	34.3
TTP	17.2	11.2	30.9	100	5.4	1.2	9.1
TTP (寛解期)	5.0	2.3	8.8	33	10.4	5.4	16.5
化学療法	2.4	1.1	3.8	0	0.7	0.2	1.4

妊婦 = 妊娠第3期の妊婦検体, AITP < 50 = 血小板数 $50 \times 10^9/L$ 未満のAITP患者

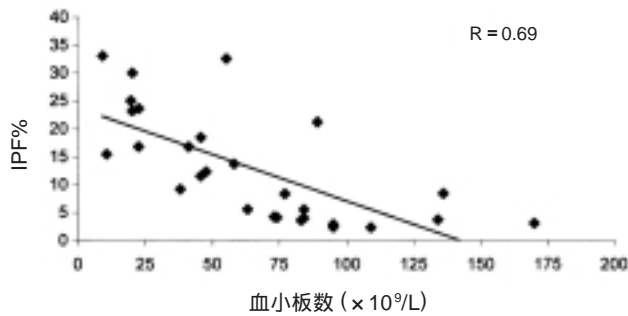


図4. 全AITP患者における血小板数とIPF%との相関

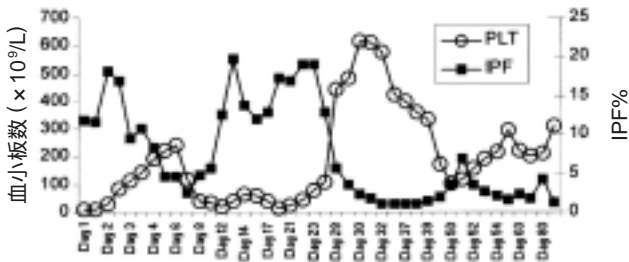


図5. TTP患者の血小板数及びIPF%の追跡測定結果

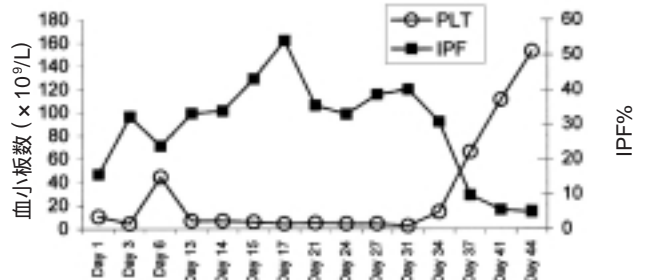


図6. AITP患者の血小板数及びIPF%の追跡測定結果

よるミニ移植を受けた9ヶ月後に、今回の急性血小板減少を呈した50歳の男性患者の追跡結果を示したものである。

移植血小板は、移植後間もない時期には确实、迅速に奏効し、血小板数は正常値を維持していたので血小板補充は不要であった。患者は、その後急性紫斑病を呈し、血小板減少症であることが判明した。2週間前の患者の血小板数は正常であった。当初は、原因が免疫破壊または移植片機能不全のいずれか分からなかったため治療法を決定できなかった。そのため、骨髄穿刺、生検及びキメラ分析が必要であった。まず骨髄穿刺により末梢血血小板の破壊であることが裏付けられ、5日後に得られた生検の結果でこの事が確認され、6日後には完全ドナーキメラ状態が確認された。患者に対してプレドニゾロンを経口投与(1 mg/kg)すると同時に γ -グロブリンを静脈内投与したところ、当初は改善したが、再発後にはリツキシマブが必要となり、同時にステロイドも徐々に減量した。35日間に渡るIPF%の持続的増加は、重篤な血小板減少が長期間続いたことを反映し、その後、血小板数が回復すると同時にIPF%は正常化した。患者はその後、完全な寛解期に達し、現在の血小板数及びIPF%は正常値の範囲内にある。IPF%の上昇がみられたことで、移植片機能不全でなく末梢免疫破壊であることが裏付けられた。

考 察

現在、フローサイトメトリーによる網血小板の測定精度は低く、費用と時間がかかると共に、相当な専門知識を要し、十分な精度管理も行われていない。フローサイトメトリーで測定した網血小板の健常者基準範囲はまだ明確に定義されていないが^{3,10)}、1%未満²¹⁾から16.4%²³⁾と見積もられている。RNA染色の種類、その濃度、血小板細胞膜を通しての取り込み、インキュベーション時間及び網血小板群のゲーティングは、すべてに問題をはらんでおり、網血小板測定がルーチン臨床検査手法となるには慎重な標準化が必要である。国際臨床血液学会血小板分科会(The International Society of Laboratory Hematology Platelet Task Force)は、現在、多施設試験

を実施し、健常者検体の網血小板数を決定しようとしているが¹⁰⁾、施設内及び施設間で許容し得る結果を与えるフローサイトメトリー法の合意には至っていない。

我々は、XE-2100及びRNA蛍光染色を用いて、IPFとして表される網血小板の全自動迅速測定法の開発について助言し、初期評価を実施した。再現性及び安定性は十分であった。

本法での健常者IPF%の基準範囲は1.1~6.1%となった。末梢での血小板消費及び破壊の亢進もしくは血小板産生不全による各血小板減少患者群を対象とした検討で、IPFが血小板減少患者の診断及びモニタリングに有益であることが示唆された。

現在は、骨髄中の正常あるいは増加した巨核球数により、血小板形成不全による血小板減少を診断から除外しているが、骨髄吸引には採取ミスや結果の遅延が起こりやすく、解釈も主観的である。一方、過剰破壊による血小板減少を確認する簡便な試験法は存在しない。また、AITPが疑われる患者に対する骨髄検査の実施には異論がある。BCSHガイドラインでは、60歳以上であり、特異像あるいは第1選択的治療法に対する反応が不良である場合に検査を実施するよう提言している⁶⁾。本検討に基づけば、AITPが疑われるがIPFの有意な上昇のない患者には、年齢に関わらず骨髄検査を実施すべきである。我々は、本法が特殊症例における早期の骨髄検査を促し、「典型的な」AITPでの不要な骨髄検査を回避する上で、重要なパラメータであると提言する。また、特に免疫抑制療法を変更する場合には、患者の反応をモニタリングする非侵襲パラメータとしても適している。IPFの測定は簡便かつ非侵襲的であり、骨髄巨核球活性及び血小板寿命についての情報が迅速に得られる。網血小板百分率の感度及び特異度は、それぞれ、91~96%及び67~100%と報告されている^{20,21)}。本検討においては、AITP患者の73%にIPF%の上昇が見られ、総血小板数が $50 \times 10^9/L$ 未満の患者では100%にIPF%の上昇が見られた。また、血小板数とIPF%とは有意な逆相関関係にあり、血小板数が低いほどIPF%は高値であった。IPF%の値は血小板破壊の重篤度を反映していた。AITP及び急性TTP患者ではIPF%の上昇が見られたものの、絶対数

はやや低値または正常範囲内に止まっていた。血小板数が低い場合には、百分率とは対照的に、IPF絶対値は必然的に低い値をとり、たとえIPFが100%近い場合でも同様である。我々は、IPF%は血小板新生速度に関する有益な情報を提供すると共に、個別の診断及びモニタリングにとって重要であると結論する。

しかし、網血小板の絶対数が血小板産生速度を反映しているという報告がある¹⁴⁾。また、少数のAITP患者において、血小板産生が健常被験者よりも低下するのみならず、クリアランス率の上昇も見られることが報告されている⁴⁾。末梢免疫破壊の診断におけるIPF%の有用性は、骨髄移植後に低血小板数を呈した患者によって明確に示されている。当初は、骨髄機能不全が懸念されたが、初回の血球数測定でIPFが15.5%、血小板数が $11 \times 10^9/L$ 、次の2日後の測定値はIPF 32%、血小板数 $5 \times 10^9/L$ となり、明らかに骨髄機能不全ではないことが示された。血小板数の回復と共にIPF%が低下することは、血小板寿命の延長により、血液中の若い血小板が古い血小板で希釈されることとも整合する。

急性TTP患者のIPFも、AITPと同様であった。血小板が過剰に消費されるためにIPF%が上昇し、その後、可変的な周期での血漿交換により疾患の経過が管理可能となるにつれ¹⁾、IPF%は血小板数の上昇とともに低下した。IPF%が高いうちは、血小板数の回復は見られないので、治療を続ける必要がある。TTP寛解期にある患者のIPF値は比較的正常である。

化学療法を受けている患者13例については、全般的に血小板数が低下しており、IPF値は検討患者群中最低であった。現在、我々はIPF%が血小板回復のタイミングを予測できるかどうか、また、当該患者に対する濃厚血小板輸血の頻度を低下させるために、予防的血小板輸血の指針となり得るかどうかを検討するために、末梢血幹細胞移植及び骨髄移植を受けている患者を対象とした研究を開始している。IPF%は、血小板産生に影響する様々な成長因子に対する反応を評価する上で有用なパラメータとなり得る可能性がある。

妊娠第3期にある妊婦、特にPIHに罹患した妊婦は、IPF%及び絶対数の顕著な増加を示した。この結

果は、網血小板数により健常妊婦と前子癇あるいはPIHを発症しやすいと思われる妊婦の識別可能性を示唆した他の報告²²⁾と一致している。

本検討では、蛍光度の高い血小板を分析するアップグレード版ソフトウェアを搭載したXE-2100を用いて、IPFの全自動迅速測定法の有用性を実証した。測定結果は他の血球数と同時に得られ、再現性も良く、EDTA血では室温で48時間保存しても安定であった。IPF%は、消費亢進による血小板減少と形成不全による血小板減少を明確に識別する有用な診断手法を提供すると考えられる。

IPFは血小板減少患者の診断及び連続的モニタリングにおける標準的ルーチンパラメータとなるであろう。

謝 辞

本研究は、シスメックス・ヨーロッパの非制限教育助成金による援助を受けた。

R.M. Rowan 博士に対し、本測定法の開発における有益な論評及び本稿のレビューをいただいたことに謝意を表す。

参考文献

- 1) Allford, S.L., Hunt, B.J., Rose, P. & Machin, S.J. (2003) BCSH Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic microangiopathic anaemias. *British Journal of Haematology*, 120 : 556 ~ 573.
- 2) Ancliff, P.J. & Machin, S.J. (1998) Trigger factors for the prophylactic platelet transfusion. *Blood Reviews*, 12 : 234 ~ 238.
- 3) Ault, K.A., Rinder, H.M., Mitchell, J.G., Carmody, M.B., Vary, C.P.H. & Hillman, R.S. (1992) The significance of platelets with increased RNA content (reticulated platelets) : a measure of the rate of thrombopoiesis. *American Journal of Clinical Pathology*, 98 : 637 ~ 646.
- 4) Ballem, P.J., Segal, G.M., Stratton, J.R., Gernsheimer, T., Adamson, J.W. & Slichter, S.J. (1987) Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura : evidence of both impaired platelet production and

- increased platelet clearance. *The Journal of Clinical Investigation*, 80 : 33 ~ 40.
- 5) Briggs, C., Harrison, P., Grant, D., Staves, J., Chavda, N. & Machin, S.J. (2000) New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter—the XE-2100. *Clinical Laboratory Haematology*, 22 : 345 ~ 350.
 - 6) British Committee for Standards in Haematology (2003) Guidelines for investigation and management of idiopathic thrombocytopenia purpura in adults, children and pregnancy. *British Journal of Haematology*, 120 : 574 ~ 596.
 - 7) Chavda, N., Mackie, I.J., Porter, P., Harrison, P., Patterson, K. & Machin, S.J. (1996) Rapid flow cytometric quantitation of reticulated platelets in whole blood. *Platelets*, 7 : 189 ~ 194.
 - 8) Danpure, H.J., Osman, S. & Brady, F. (1982) The labelling of blood cells in plasma with 111 In-tropolonate. *British Journal of Radiology*, 55 : 247 ~ 249.
 - 9) Harrison, P. (1997) Variables affecting flow cytometric analysis of platelets. *Laboratory Hematology*, 3 : 167.
 - 10) Harrison, P. (2003) Reticulated Platelet Taskforce Report. *Laboratory Hematology*, 9 : 91.
 - 11) Hayashi, S., Oshida, M., Kiyoi, T., Todokoro, S., Kashiwagi, H., Honda, S., Tomiyama, Y. & Kurata, Y. (2000) Comparison of reticulated platelet count with plasma glycoalbumin concentration as a marker of platelet turnover in patients with thrombocytopenic disorders. *Rinsho Ketsueki*, 41 : 705 ~ 711.
 - 12) Ingram, M. & Coopersmith, A. (1969) Reticulated platelets following acute blood loss. *British Journal of Haematology*, 17 : 225 ~ 229.
 - 13) Kaushansky, K., Lin, N., Grossman, A., Humes, J., Sprugel, K.H. & Brudt, V.C. (1996) Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte and megakaryocyte progenitor cells in normal and myelosuppressed mice. *Experimental Haematology*, 23 : 265 ~ 269.
 - 14) Kienast, J. & Schmitz, G. (1990) Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets : a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*, 75 : 116 ~ 121.
 - 15) National Institutes of Health Consensus Conference (1987) Platelet Transfusion Therapy. *Transfusion Medicine Reviews*, 1 : 195 ~ 200.
 - 16) Norfolk, DR, Ancliffe, PJ, Contreras, M, Hunt, BJ, Machin, SJ, Murphy, WG. & Williamson, LM. (1997) Consensus Conference on Platelet Transfusion, Royal College of Physicians of Edinburgh 27 ~ 28 November. *British Journal of Haematology*, 101 : 609 ~ 617.
 - 17) O ' Malley, CJ, Rasko, JE, Basser, RL, McGrath, KM, Cebon, J, Grigg, AP, Hopkins, W, Cohen, B, O ' Byrne, J, Green, MD, Fox, RM, Berndt, MC & Begley, CG (1996) Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood*, 88 : 3288 ~ 3298.
 - 18) Porcelijn, J.L., Folman, C.C., Bossers, B. Huiskes, E., Overbeeke, M.A., v d Schoot, C.E., de Haas, M. & von dem Borne, A.E. (1998) Thrombosis and Haemostasis, 79 : 1101 ~ 1110.
 - 19) van Reenan O.R., Lotter M.G., Minnaar P.C., Heynes Adu P., Badenhorst P.N. & Pieters H. (1980) Radiation dose from human platelets labelled with indium 111. *British Journal of Radiology*, 53 : 790 ~ 795.
 - 20) Richards, E.M. & Baglin, T.P. (1995) Quantitation of reticulated platelets : methodology and clinical application. *British Journal of Haematology*, 91 : 445 ~ 451.
 - 21) Rinder, H.M., Munz, U.J., Ault, K.A., Bonan, J.L. & Smith, B.R. (1993a) Reticulated Platelets in the Evaluation of Thrombopoietic Disorders. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 117 : 606 ~ 610.
 - 22) Rinder, H.M., Bonan, B.S., Anandan, M.P.H., Rinder, S.C., Rodrigues, P.A. & Smith, B.R. (1993b) Noninvasive measurement of platelet kinetics in normal and hypertensive pregnancies. *American Journal Obstetrics and Gynecology*, 170 : 117 ~ 122.
 - 23) Robinson, M.S.C., Mackie, I.J., Khair, K., Liesner, R., Goodall, A.H., Savidge, G.F., Machin, S.J. & Harrison, P. (1998) Flow cytometric analysis of reticulated platelets : evidence for a large proportion of non-specific labelling of dense granules by fluorescent dyes. *British Journal of Haematology*, 100 : 351 ~ 357.
 - 24) Steffan, A., Pradella, P., Cordiano, I., Girolami, A., de Marco,

L. & Fabris, F. (1998) Glycocalicin in the diagnosis and management of immune thrombocytopenia. *European Journal of Haematology*, 6 : 77 ~ 83.

25) Steinberg M.H., Kelton J.G. & Collier B.S. (1987) Plasma glycocalicin-an aid in the classification of thrombocytopenic

disorders. *New England Journal of Medicine*, 17 : 1037 ~ 1042.

26) de Vries, R.A., Bruin de, M., Marx, J.J.M. & Weil van de, A. (1993) Radioisotopic labels for blood cell survival studies : a review. *Nuclear Medicine and Biology*, 20 : 809 ~ 817.

Assessment of an Immature Platelet Fraction (IPF) in Peripheral Thrombocytopenia

Carol BRIGGS*¹, Stefan KUNKA*¹, Dan HART*¹, Shinichiro OGUNI*², and Samuel J. MACHIN*¹

*¹Department of Haematology, University College London Hospital, London, UK

*²Sysmex Corporation, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, Japan.

SUMMARY

A new automated method to reliably quantify reticulated platelets, expressed as the immature platelet fraction (IPF), has been developed utilizing the XE-2100 blood cell counter with upgraded software (Sysmex, Kobe, Japan). The IPF is identified by flow cytometry techniques and the use of a nucleic acid specific dye in the reticulocyte/optical platelet channel. The clinical utility of this parameter was established in the laboratory diagnosis of thrombocytopenia due to increased peripheral platelet destruction, particularly autoimmune thrombocytopenic purpura (AITP) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Reproducibility and stability results over 48 h were good. An IPF reference range in healthy individuals was established as 1.1-6.1%, with a mean of 3-4%. Patients in whom platelet destruction might be abnormal, were studied and two of these patients followed serially during the course of treatment. The IPF was raised in several disease states. The most significant increases in IPF values were found in patients with AITP (mean 22.3%, range 9.2-33.1%) and acute TTP (mean 17.2%, range 11.2-30.9%). Following patients during treatment demonstrated that as the platelet count recovered the IPF% fell. These results show that a rapid, inexpensive automated method for measuring the IPF% is feasible and should become a standard parameter in evaluating the thrombocytopenic patient.

Key Words Reticulated Platelet, Immature Platelet Fraction, Automated Hematology Analyzer, XE-2100, Autoimmune Thrombocytopenic Purpura, Thrombotic Thrombocytopenic Purpura.