◆ 総 説 ◆

ヘパリン起因性血小板減少症の診断における酵素免疫吸着測定法による PF4/ヘパリン複合体抗体検査の意義と展望

松尾 武文 *

Perspective on enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies against PF4/heparin complex in laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia

Takefumi MATSUO *

Key words: heparin-induced thrombocytopenia, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), thrombocytopenia, laboratory diagnosis

1. はじめに

ヘパリン起因性血小板減少症の臨床診断は、ヘパリン（未分画，低分子分画を含む）使用開始後 5～10 日に発生する原因不明の 50% 以上血小板減少によりなされている。それに対応する検査には、抗原として血小板第 4 因子（PF4）とヘパリンまたは並列的に硫酸基を持つポリアニオンとの複合体をプレートに固相化した 2 種の酵素免疫吸着法（enzyme-linked immunosorbent assay, 以下 ELISA と略）と、ヘパリン添加による血小板活性化因子を検出するヘパリン惹起性血小板凝集検査が、本邦では用いられている。

本邦で日常的に用いられる ELISA として、PF4/ヘパリン複合体抗体（HIT 抗体と略）検出用キットは、抗原として PF4/ポリアニオン（米国 GTI, 以下 GTI-ELISA と略）と PF4/ヘパリン（フランス Stago, 以下 Stago-ELISA と略）の 2 種があり、いずれも米国 FDA の承認があるが、本邦では 2011 年 6 月現在未承認である。両者とも、定性検査で HIT 抗体の存在の有無のみの検出で、その結果から HIT の臨床診断を確定することはできない。臨床的に HIT の疑いが濃厚で、ELISA が陽性でも、患者 IgG 分画中の

IgG-HIT 抗体による血小板活性化が直接証明されない限り、‘True-HIT’ として診断できない難点がある^{1) 2)}。ヘパリン添加による血小板活性化 IgG-HIT 抗体検出法であるヘパリン惹起性血小板凝集試験、または C¹⁴ セロトニン放出試験（セロトニン放出試験）によって HIT の診断が確定する³⁾。

2. ELISA による HIT 抗体の定量的評価

現行の ELISA は、検体中の IgG, IgA, IgM に含まれるすべての HIT 抗体の存在の有無を検出できるが、HIT の臨床診断と関連した評価はできない。ELISA 陽性イコール HIT との短絡的判断により、臨床現場では少なからず混乱が起きている。この混乱の回避ため、ELISA の結果を単に陽性と陰性のみの判定ではなく、酵素発色基質で発色後の読み取り吸光度（Optical Density : OD）から測定結果の評価法が試みられている。読み取り OD が 1.0 以下の場合、血小板減少の原因が HIT 以外でも、HIT と見誤ることがある⁴⁾。しかし、HIT の臨床症状の出現と関連して OD が上昇し、HIT の診断確率が高くなるので、読み取り OD 値を臨床評価と合わせて判断することが

* 兵庫県立淡路病院 [〒 656-0013 洲本市下加茂 1-6-6]

Hyogo Prefectural Awaji Hospital [1-6-6 Simogamo, Sumoto, 656-0013, Japan]

Tel: 0799-22-1200 Fax: 0799-24-5704 e-mail: t-matsuo@mbf.nifty.com

受付日：2011 年 7 月 7 日，受理日：2011 年 9 月 7 日

動められている⁵⁾。また、OD値とセロトニン放出試験の関係をみると、ODが0.4以上で1.0以下の弱陽性群ではセロトニン放出試験の陽性率は5%以下で、ODが2.0以上ではその陽性率は約90%に達する。すなわち、セロトニン放出試験の陽性率はODの読み取り値からほぼ推測できる。ELISAによって得られたODの高低から、血小板活性化IgG-HIT抗体の出現率が推測できるので、ELISAの結果報告にはOD値の併記が必要である⁶⁾。また、ODと血栓の関係として、OD値が1.27以上であれば30日以内の血栓合併のリスクが有意に高くなる。さらに、読み取りODの定量的評価に加えて、Stago-ELISAでは共通の校正物質を用いて、検量線を作成し、そのOD値を一定の濃度単位に設定すると、ELISAのHIT診断能の改善が認められる^{7) 8)}。また、HITとしての臨床評価が低くODが0.4以下であれば、非HITの可能性が高くなる⁹⁾。血小板減少の原因にDICなど様々な可能性がある患者では、HITを除外する上でも、ELISAの結果は有用とされている¹⁰⁾。

3. ELISAによるHIT抗体測定の特異度の改善

HIT抗体はIgG, IgA, IgMのサブクラスから構成されている。HITではPF4/heparinとIgG-HIT抗体の免疫複合体が形成され、この免疫複合体のIgG-Fc部分とFc受容体を持つ好中球、単球、血小板や血管内皮と結合する。血小板上のFc受容体(FcγRII)に免疫複合体が結合すると、血小板の活性化が誘導され、凝固活性の強いリン脂質を含んだマイクロパティクルが放出され、トロンビンの産生につながる。血小板活性化作用を持つIgG-HIT抗体を血小板活性化IgG因子と称し、この血小板活性化因子を検出することがHITの血清学的診断の基本となる。しかも、Fc受容体は(IgM, IgA)-HIT抗体とは架橋結合はしないので、IgG以外のIgA, IgMについてはHITの病因としての意義に疑問がある。ヘパリン治療中にELISAで検出される(IgM, IgA)-HIT抗体の出現は珍しくないが、HITは発症しないとされている。

IgG-HIT抗体の特異的検出として、セロトニン放出試験、ヘパリン惹起性血小板凝集法とIgG-HIT-ELISAが用いられている。IgG-HIT抗体に特化したIgG-ELISAのHIT診断感度は、セロトニン放出試験と並んで、IgG-ELISA, (IgG, A, M)-ELISAともに優れている。診断特異度はセロトニン放出試験>IgG-ELISA>(IgG, A, M)-ELISA>IgM-ELISA>IgA-ELISAの順に低くなる。特に、HITの非病因性とされるIgA, IgMの産生は、血小板減少が敗血症の様なHIT以外の非HITで起こるので、IgG-ELISAに特化すると診断特異度が向上する¹¹⁾。また、755例のHIT疑いの検体のなかに、(IgG, IgA, IgA)-ELISA陽性者のIgサブクラス別測定で、IgGは陰性でIgA, IgMのみ陽性の血小板減少が10例あり、その9例が感染症など他に明らかな血小板減少の原因あることから、IgA, IgMによるELISA陽性は、血小板減少や血栓とは関係ない偶発症状であるとされている¹²⁾。現行の(IgG, IgA, IgA)-ELISAは、高感度であるが臨床的に関連のない非病因性のHIT抗体を含めて測定するので、過剰なHIT診断の弊害が問題となっている。特異度を改善する目的で、IgG-HIT抗体の検出に特化したELISAの開発が行われている¹³⁾。

また、酵素免疫吸着測定法[(IgG-ELISA), (IgG, IgA, IgM)-ELISA]と微粒子ゲル免疫沈降法(PaGIA; DiaMed 本邦未発売)の比較から、IgG-ELISAはODの上昇に従ってHITの診断確率も高くなるため、その臨床的有用性は比較的良好とされている¹⁴⁾。しかし、IgG-ELISAのODが1.0未満であれば血小板活性化作用を持たないIgG-HIT抗体の出現の可能性もあるので注意すべきである¹⁵⁾。たとえば、(IgG, IgA, IgM)-ELISAが陽性であっても、セロトニン放出試験が陰性例もあるので、陽性がIgG由来かどうかを、IgG-ELISAで確認の必要がある¹⁶⁾。臨床的にHIT疑うに足る血小板減少と(IgG, IgA, IgM)-ELISAでODが2.06と高値陽性を示した心臓外科症例で、Ig-HITの分画測定を行なったところ、IgAが異常高値でIgGは正常例を経験した。セロトニン放出試験で確認すると陰性で、血小板Fc受容体に親和性のないIgAの増加によ

図1 IgA 高値を呈した心房中隔欠損閉鎖術後例 (53 歳, 男) SRA: セロトニン放出試験

る ELISA 偽陽性例と判定できた (図 1). IgG-ELISA による HIT 抗体測定は (IgG, IgA, IgM)-ELISA に比較して, 明らかに偽陽性率の減少を計ることができると思われた¹⁷⁾.

4. IgG-ELISA の改良による定量化測定を目指して

HIT の発症には IgG-HIT 抗体が, 血小板減少とトロンビン生成に関与している. IgG 以外の IgA, IgM-HIT 抗体の増加による ELISA 陽性は単に偶発的で, 血小板減少や血栓とは関係ないことも示されている¹⁸⁾. 現行の IgG-ELISA では血小板減少や血栓合併の有無などの臨床情報を加味しても, 偽陽性による過剰診断のリスクを完全に排除できないため, 現状では確認検査が要求されている¹⁹⁾.

現行の ELISA に改良を加えて, 定量的 ELISA の開発の試みを示す. ヘパリン使用の心臓手術後検体で行った 2 種の ELISA との比較試験がある. IgG-HIT の測定に特化した ELISA (MKI-ELISA) と Stago-ELISA との相関係数 $r=0.80$ ($n=79$), GTI-ELISA とは $r=0.844$ ($n=79$) といずれも相関は良好で, MKI-ELISA は既存の測定試薬と同等の測定精度が示された²⁰⁾.

さらに改良が加えられ, その特徴の一つは, 基準となる HIT 抗体標品の導入である. 市販の ELISA キットには, ロット毎に異なる HIT 由来のプール血清を適宜加工した陽性と陰性のコント

表 1 HIT-IgG 定量測定試薬 (MKI) の特徴

- HIT 抗体標品の採用:
 - 抗ヒトヘパリン・PF4 複合体マウス MoAb 抗体
 - 3 濃度標品 (100, 60, 30 $\mu\text{g/mL}$) をキャリブレーターとして使用
- 検量線の作成:
 - 3 濃度標品を溶解し各測定時に作成
- 検量線の直線性:
 - 3-100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲を超える検体は希釈測定
- HIT 抗体濃度:
 - 検量線から検体濃度を直接読み取り, $\mu\text{g/mL}$ として表記

ロール物質が, 製品校正物質として添付されている. これに対して, マウスをヒト PF4/ヘパリン複合体で感作して得られた抗ヒトヘパリン/PF4 複合体マウス/モノクローナル抗体 (HIT モノクローナル抗体) にヒト IgG-Fc 分画を結合させた安定化物質を, 基準物質として用いて, ロット間の解消が図られた²¹⁾.

第二点として, HIT モノクローナル抗体由来の基準物質を 3 濃度 (100, 60, 30 $\mu\text{g/mL}$) に調整し, 基準標品として, 測定時のキャリブレーターとした. 測定毎に 3 濃度の基準標品を溶解し検量線を作成し, 日差変動の管理が可能となった. HIT-IgG 濃度が 3~100 $\mu\text{g/mL}$ の範囲は直線性が得られるので, 検量線範囲を超える高濃度検体は適宜希釈後測定する. 結果は, 検量線から直接読み取られる検体 HIT-IgG 濃度を $\mu\text{g/mL}$ の重量単位として表記する (表 1).

5. 透析療法中に合併する急性全身性反応 (acute systemic reaction: ASR) に対する定量化 ELISA の応用

ヘパリン一回静注で急激な血小板減少と急性全身性反応を伴って発症するタイプの HIT がある (表 2). その呼称病名も様ざまて, 急性全身性反応 (全身性反応) を始め, アナフラキシー類似反応, 心血管虚脱等がある. 時には呼吸苦や悪寒, 戦慄, 発熱から, 心血管虚脱から時には死亡することがある. また, 肺塞栓症に類似の病態を示すことから, 偽性肺塞栓症として知られている. 一旦, ヘパリンを中止すると急速に回復するのも特徴の一

表2 HIT 急性発症に伴う全身性反応 (ASR) の特徴

- ヘパリン透析開始から 5 ～ 7 回目の透析
- ヘパリン透析開始後: 5 ～ 30 分に全身性反応と時には回路内凝血
- 突発的な血小板の減少 (ヘパリン投与前値より～80 – 95% の低下)
- 全身性の臨床症状が特徴
 - 炎症反応: 悪寒戦慄, 発熱, 発疹
 - 心肺症状: 頻脈, 高血圧 (低血圧), 頻呼吸, 呼吸苦, 気管痙攣, 胸痛, 偽性肺栓塞, 肺不全, 心肺停止
 - 消化器症状: 悪心, 嘔吐, 下痢
 - 神経症状: 頭痛, 一過性健忘

太字: 透析時の ASR に比較的多い症状

図2 透析中の臨床的 HIT 202 例の急性全身性反応 (ASR) 有無による IgG-HIT 値

つである^{22) 23)}。

HIT の全身性反応に対する HIT 抗体の関与を知るために, IgG-HIT 抗体の測定を行った。臨床的に HIT を疑われた透析患者 202 例の内, 全身性反応の合併を認めた 28 例対象とした。全身性反応を示す例の IgG-HIT 抗体は, 非全身性反応例に比較して, 有意に高値である。また, 全身性反応を示した 28 例中, HIT 由来の全身性反応例 (図 2 の白丸) と非 HIT 由来で日常的な透析療法に由来する全身性反応と鑑別することができる。すなわち, HIT 抗体の定量測定により, HIT

表3 定量化 ELISA と GTI-ELISA の HIT 疑い透析急性反応例における比較 (n=27)

	定量化 ELISA	GTI-ELISA
感度 (%)	100	100
特異度	78.5	37.5
陽性反応的中度	81.3	59
陰性反応的中度	100	100

由来の全身性反応と透析由来の全身性反応を識別できた。また, 前者の HIT 抗体量は, 後者に比較して, 有意に高値を示している。すなわち, HIT に全身性反応が合併すると, HIT 抗体量の急激な増加が認められる。透析療法では, 限外濾過による血圧の低下, 呼吸苦, 頻脈などの全身性反応を合併することがある。このような場合には, IgG-HIT 抗体を測定すると, 全身性反応の由来が HIT か非 HIT かを容易に鑑別できる。

ヘパリン使用による体外補助循環時において, IgG-ELISA と (IgG, IgA, IgM)-ELISA を比較すると, 両者の感度はいずれも良好であるが, 特異度は前者がすぐれている²⁴⁾。HIT 疑い透析例で全身性反応を示した 27 例を用いて, 感度, 特異度をみた。両方法とも感度は良好であるが, 特異度に両者の乖離が認められる。(IgG, IgA, IgM)-ELISA の特異度は 40% ぐらいに対して, 定量 IgG-ELISA は約 80% と優れている。また, 両者とも陰性反応的中度は高く, 陰性であれば, 臨床的に HIT をほぼ除外できると予想される。陽性反応的中度は, 定量 IgG-ELISA が (IgG, IgA, IgM)-ELISA よりも優れている。従前の ELISA を基本に改良を加えることによって, よりの確に HIT の臨床診断が可能である (表 3)。

6. HIT 抗体検査としての ELISA の今後の方向性

HIT 検査の ‘gold standard’ として評価のある放射性同位元素をもちいるセロトニン放出試験は, 本邦においては様々な規制のため実施が見送られている。直接的に HIT の病因となる血小板活性化因子の検出には, ヘパリン惹起性血小板凝集試験が, その迅速性と低コストのため本邦や海

外の一部では用いられている^{25) 26)}。しかし、本邦ではドナーの選択や手技の煩雑さと、特異度は良いが感度が必ずしも高くない点から、日常検査として普及していない。また、血小板凝集試験の感度の改善や再現性の向上のために、HIT モノクロナール抗体を活用する方法が試みられている²⁷⁾。

これに対して、IgG, IgA, IgM のサブクラスの HIT 抗体を検出する (IgG, A, M)-ELISA は、1990 年代から定性検査として実用化され今日に至っている。この間に、偽陽性率が高い、測定に長時間を要する、ロット間差や施設間差が大、トレーサビリティの困難性が問題となっている。そして、特異度の改善のため、IgG-HIT 抗体の検出のみに特化した測定法や、ELISA の読み取り吸光度を任意単位に換算する定量法も提唱されている。以上を踏まえて、①病因となる HIT-IgG の検出に特化し、②測定値を単なる吸光度の読み取り値ではなく、HIT-IgG 抗体量を重量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) に換算表記した測定系が作成された。その結果、透析療法中に合併する全身性反応が、HIT 由来であれば、IgG-HIT 抗体の異常高値を示すので、非 HIT 由来の全身性反応と明確に鑑別にできるようになってきた。しかし、ヘパリンの使用が必要な心臓血管外科手術、心血管カテーテルインターベンションでは、HIT の合併が注目されている。これらのリスクの高い病態での定量 IgG-HIT ELISA による評価が期待できる。

今回の ELISA の定量化により、特異度と標準化については若干の進展が得られたが、今後の課題の一つとして簡便化と迅速化がある。迅速化については、短時間に結果の得られる微粒子ゲル免疫沈降法 (PaGIA Heparin/PF4-antibody test)²⁸⁾ や、化学発光を応用した自動分析装置を使用する Hemosil AcuStar HIT-Ab (PF4-H) and HIT-IgG (PF4-H) assays²⁹⁾ がある。後者は GTI-ELISA と同じ PF4/ポリブレンを抗原として使用しているため、約 2 時間を要する GTI-ELISA の結果が 30 分で得られる。しかし、添付の校正液による複雑な準備作業が必要で、その測定結果から HIT の除外診断はほぼできるが、GTI-ELISA と同様の偽陽性の問題が未解決である。当然のことではあるが、単なる迅速性の向上

についてコスト・パフォーマンスの面からの検討がいる。

両アッセイとも短時間で結果が得られる利点があるが、その結果は単に陽性、陰性と定性的判定に留まる。両法とも、HIT の診断の最終確認には血小板活性化 IgG 因子の検出の必要性が、取扱説明書に記載にされている。HIT 抗体の陽性、陰性の結果が迅速に得られるとはいえ、その結果に基づいて現場での診断や治療方針の決定や変更には、いささか躊躇することにもなる。また、HIT 臨床症状の 8 段階によるスコア化 (4T's pre-test probability of the diagnosis of HIT) から十分に HIT の病態を把握の上、迅速検査を含めて ELISA の結果を解釈する必要があることは論をまたない^{30) 31)}。

7. まとめ

現行の HIT 抗体にたいする酵素免疫吸着測定法 (ELISA) は、単に HIT 抗体の有無の判定に留まり、過剰診断等の様々な問題があるので、一部では ELISA の吸光度の読み取り値から病態の把握が行われている。つづいて、血小板活性化因子である IgG-HIT 抗体のみを検出する IgG-ELISA が注目され特異度は向上しているが、血小板活性化 IgG 因子検査 (セロトニン放出試験、血小板凝集検査) による確認を必要とすることは従前と変わりはない。ELISA の特異度向上に向けて、HIT モノクロナール抗体を用いた ELISA の改良による定量法の有用性の概略を紹介し今後の発展に繋げたい。このため、HIT 臨床例の定量化 ELISA による測定経験を積み重ねて、臨床現場において HIT 診断にたいする有用性の検証が求められる。

謝 辞

本総説で紹介した HIT モノクロナール抗体の Fc 部位の修飾に関する研究は、主として三菱化学メディエンス成田研究所星野信広博士のもとで行われた成果である。なお、本稿の作成に際して、HIT 情報センター和中敬子博士の多面的な協力を得た。

Disclosure of Conflict of Interest

The author indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Leo A, Winteroll S : Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia and monitoring of alternative anticoagulants. *Clin Diag Lab Immunol* **10** : 731-740, 2003.
- 2) Warkentin TE, Sheppard JA : Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev* **20** : 259-272, 2006.
- 3) Pouplard C, Amiral J, Borg JY, Laporte-Simitsidis S, Delahousse B, Gruel Y : Decision analysis for use of platelet aggregation test, carbon 14-serotonin release assay, and heparin-platelet factor 4 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* **111** : 700-706, 1999.
- 4) Zwicker JI, Uhl L, Hung WY, Shaz BH, Bauer KA : Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* **2** : 2133-2137, 2004.
- 5) Weiss BM, Shumway NM, Howard RS, Ketchum LK, Reid TJ : Optical density values correlate with the clinical probability of heparin induced thrombocytopenia. *J Thromb Thrombolysis* **26** : 243-247, 2008.
- 6) Warkentin TE, Shenppard JI, Moore JC, Sigouin CS, Kelton JG : The quantitative interpretation of optical density measurement using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost* **6** : 1304-1312, 2008.
- 7) Altuntas F, Matevosyan K, Burner J, Shen YM, Sarode R : Higher optical density of an antigen assay predicts thrombosis in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Eur J Haematol* **80** : 429-435, 2008.
- 8) Janatpour KA, Gosselin RC, Dager WE, Lee A, Owing JT, Zhou J, Wun T : Usefulness of optical density values from heparin-platelet factor 4 antibody testing and probability scoring models to diagnosis heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol* **127** : 429-433, 2007.
- 9) Javela K, Kekomäki R, Koskinen S : Significance of quantitative measurement of heparin-induced platelet antibodies. *Eur J Haematol* **84** : 169-174, 2010.
- 10) Shaheed G, Malkovska V, Mendoza J, Patel M, Rees J, Wesley R, Merryman P, Horne M : PF4 ENHANCED assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in complex medical and surgical patients. *Crit Care Med* **35** : 1691-1695, 2007.
- 11) Warkentin TE, Sheppard JA, Moore JC, Moore KM, Sigouin CS, Kelton JG : Laboratory testing for the antibodies that cause heparin-induced thrombocytopenia : how much class do we need? *J Lab Clin Med* **146** : 341-346, 2005.
- 12) Juhl D, Eichler P, Lubenow N, Strobel U, Wessel A : Greinacher A. Incidence and clinical significance of anti-PF4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA class in 755 consecutive patient samples referred for diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia. *Eur J Haematol* **76** : 420-426, 2006.
- 13) Warkentin TE, Linkins LA : Immunoassays are not created equal. *J Thromb Haemost* **7** : 1256-1259, 2009.
- 14) Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJH : Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost* **7** : 1260-1265, 2009.
- 15) Schenk S, EL-Banayasy A, Morshuis M, Arusoglu L, Eichler P, Lubenow N, Tenderich G, Koerfer R, Greinacher A, Prohaska W : IgG classification of anti-PF4/heparin antibodies with heparin-induced thrombocytopenia during mechanical circulatory support. *J Thromb Haemost* **5** : 235-241, 2007.
- 16) Morel-Kopp MC, Aboud M, Tan CW, Kulathilake C, Ward C : Heparin-induced thrombocytopenia : evaluation of IgG and IgGAM ELISA assays. *Int Jnl Lab Hem* **33** : 245-250, 2011.
- 17) Cuker A, Ortel TL : ASH evidence-based guidelines : is the IgG specific anti-PF4/heparin ELISA superior to the polyspecific ELISA in the laboratory diagnosis of HIT? *Am J Hematol* **250** : 252, 2009.
- 18) Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P, Warkentin TE : 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. *J Thromb Haemost* **1666-1673**, 2007.
- 19) Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE : What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? *Am J Hematol* **82** : 1037-1043, 2007.
- 20) 松尾武文, 星野信弘 : ヘパリン起因性血小板減少症 (HIT) の病因としてのヘパリン・PF4 複合体抗体の検査. *血栓と循環* **16** : 246-250, 2008.
- 21) Reilly MP, Taylor SM, Franklin C, Sachais BS, Cines DB, Williams KJ, McKenzie SE : Prothrombotic factors enhance heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis *in vivo* in a mouse model. *J Thromb Haemost* **4** : 2687-2694, 2006.
- 22) Hartman V, Malbrain M, Daelemans R, Meersman P, Zachee P : Pseudo-pulmonary embolism as a sign of acute heparin-induced thrombocytopenia in hemodialysis patients : safety of resuming heparin after disappearance of HIT antibodies. *Nephron Clin Pract* **104** : c143-148, 2006.
- 23) Davenport A : Sudden collapse during haemodialysis due to immune-mediated heparin-induced thrombocytopenia. *Nephrol Dial Transplant* **21** : 1721-1724, 2006.
- 24) Warkentin TE : PF4-dependent immunoassay and inferential detection of HIT antibodies. *J Thromb Haemost* **5** : 232-234, 2007.
- 25) Rugeri L, Bauters A, Trillot N, Susen S, Decoen C, Watel A, Jude B : Hemostasis and thrombosis : Clinical usefulness of combined use of platelet aggregation test and anti PF4-H. Antibodies elisa test for the diagnosis of heparin induced thrombocytopenia. *Hematology* **4** : 367-372, 1999.
- 26) Price EA, Hayward CP, Moffat KA, Moore JC, Warkentin TE, Zehnder JL : Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia is inconsistent in North America : a survey of North American specialized coagulation laboratories. *Thromb Haemost* **98** : 1357-1361, 2007.
- 27) 浅田玲子, 和中敬子, 松尾美也子, 金子千枝子, 宮下久美子, 星野信弘, 大澤満 : ヘパリン惹起性血小板凝集試験における抗ヒト PF4/ヘパリン複合体マウスモノクローナル抗体の有用性. *検査血液会誌* **12** : 18-25, 2011.
- 28) Schneiter S, Colucci G, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Variability of anti-PF4/heparin antibody results obtained by the rapid testing system ID-H/PF4-PaGIA. *J Thromb Haemost* **7** : 1649-1655, 2009.
- 29) Legnani C, Cini M, Pili, Boggian O, Frascaro M, Palareti G : Evaluation of a new automated panel of assays for the detection of anti-PF4/heparin antibodies in patients suspected of having heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* **104** : 402-409, 2010.
- 30) Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia, diagnosis and treatment. *Circulation* **110** : e454-e458, 2004.
- 31) Lo GK, Juhl D, Warkentin TE, Sigouin CS, Eichler P, Greinacher A : Evaluation of pretest clinical score (4 T's) for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia in two clinical settings. *J Thromb Haemost* **4** : 759-765, 2006.