フローサイトメトリーを用いた機能的測定法による ヘパリン起因性血小板減少症関連血栓塞栓症リスクの 高い患者の同定

前田琢磨*

Identifying patients at high risk of heparin-induced thrombocytopenia-associated thrombosis with a platelet activation assay using flow cytometry

Takuma MAEDA

Key words: heparin induced thrombocytopenia, thrombosis, functional assay

1. はじめに

ヘパリン起因性血小板減少症 (heparin induced thrombocytopenia: HIT) は血小板の減少を伴うにもかかわらず、多くは出血を引き起こすことなく過凝固の状態となる¹⁾。HIT を早期に診断するために、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 の発症頻度は、さまざまな背景を持つ入院患者およそ 5000 人につき 1 人とされる²⁾。とくに未分画ヘパリン (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% の患者が血栓塞栓症を発症し、致死的となりうる^{4,5)}。

以上のように、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。しかし、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。したがって、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。

2. HIT の診断の難しさ

HIT の診断は難しい。理由はつい最近まで HIT 診断のゴールドスタンダードとも言うべき機能的測定法が本邦では不可能であったからである。

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が、臨床症状だけで HIT を診断することはほぼ不可能である。よく汎用されているのは 4 Ts スコアリングシステムである (表 1)⁶⁾。4 Ts スコアリングシステムの合計スコアが 4 点未満であれば大変高い陰性的中率 (97~99%) を有する^{7,8)}。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%)⁹⁾。したがって、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。その血清学的診断は免疫測定法と機能的測定法に分かれるが、免疫測定法で現在汎用されているのは、酵素免疫測定法

*責任者連絡先：
国立循環器病研究センター
〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1
Tel: 06-6833-5012, Fax: 06-6872-8175
E-mail: takuma@ncvc.go.jp

表1 4Ts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/ μ L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/ μ L)0点: ○30%未満の血小板減少, 最低値が1万/ μ L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つ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31~100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 thrombocytopenia(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/ μ L以下で, 薬剤起因性血小板減少症を起こしうる薬剤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

(ELISA), ラテックス凝集法, 化学発光免疫測定法などである。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。これらの方法は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¹⁰⁾。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¹¹⁾。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^{12, 13)}。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¹¹⁾。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。

3. HIT診断のゴールドスタンダードである機能的測定法

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(QC)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(とくに強陽

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 activa- tion test: HIPA)	修正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 名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ー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。

性)であれば HIT 診断につながる¹⁰⁾。

われわれは本邦で初めて 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、修正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。以下に、PMA の HIT 診断における有効性や PMA を用いた血栓塞栓症を起こしやすい HIT 患者の同定方法について述べる。

4. PMA の方法

われわれは、機能的測定法は PMA を以前に報告

されている方法^{14, 15)}に改良を加えた方法で行っている。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(¹⁴C-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ているが、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ている(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 Corpo-

表 3

*IV.3：抗 FcγRIIIa 受容体抗体

ration, Tokyo, Japan) を終濃度 7.5 μg/mL とし、弱陽性コントロールとして用いている¹⁶⁾。この終濃度 7.5 μg/mL は治療濃度域のヘパリン下に、血小板を活性化させる最小限の濃度である。HIT 抗体に反応する健常ボランティアを 2 名選出し、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 (20 μL) もしくは弱陽性コントロールと洗浄血小板 75 μL に加え、以下の 5 種類の異なる溶質 (5 μL) を添加した。

- i) バッファーのみ
- ii) 未分画ヘパリン終濃度 0.1 U/mL
- iii) 低分子ヘパリン, Low molecular weight heparin (LMWH) 終濃度 0.3 U/mL (一般名: reviparin sodium; 商品名: Clivarine, Abbott Japan, Tokyo, Japan)
- iv) 未分画ヘパリン 100 U/mL
- v) 未分画ヘパリン 100 U/mL+ 血小板の Fc 受容体を介した活性化を阻害する抗 FcγRIIIa 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 分反応させたのち、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) として定量化している (表 3 参照)。

UFH 0.1 U/mL もしくは 0.3 U/mL において PAI ≥ 10% かつ、UFH 100 U/mL において PAI < 10% かつ UFH 0.1 U/mL とモノクローナル個体 IV.3 添加において PAI < 10% の場合を陽性と定義している。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% と定義している。

さらに、陽性症例についてはその血小板活性化能力の強さに応じて強陽性と弱陽性に分類している (表 3 参照)。

5. ELISA の OD 値と PMA 強度の関係

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 疑い患者のデータを用いて、われわれは HIT に関連する血小板減少やヘパリン

図 1 本研究のフローダイアグラム

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) (n=62)
- 2) PMA 弱陽性群(Weak PMA) (n=45)
- 3) ELISA のみ陽性群(Only ELISA-positive) (n=54)
- 4) PMA, ELISA いずれも陰性である群(Double-Negative) (n=240)

(図 1 参照)

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 4 Ts 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 1)。

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 2)。

ELISA の OD 値が 0.4~1.0 であった 56 名のうち、19 名(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。

6. PMA 陽性ならば臨床的にも HIT らしい

前述の 4 群間の患者背景および HIT に関連する特徴を表 4 にまとめた。これらの群間において、4 Ts 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

図2 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

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3)。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なかった。

7. PMA 強陽性ならば、血栓塞栓症を発症しやすい

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4)。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機を調べるため、われわれは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。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5A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5B)。

8. PMA に関する考察と展望

以上のようなわれわれの解析により、PMAがHITの診断に有効であることが示された。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3)。およそ半数の患者が、動脈性もしくは静脈性の血栓

表4 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(歳)	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%)
4 Ts 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ンノイドの種類				
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：修正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)

塞栓症のいずれかまたは両方を発症していた(図4)。実際、PMA 強陽性およびPMA 弱陽性の患者の中で、4 Ts 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4)。われわれの知る限り、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。したがって、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。

図3 血小板減少率

図4 血栓塞栓症発症率

われわれは、PMAによりヘパリン起因性血小板減少患者の中でもとく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。また、HIT患者においていつまで抗凝固が必要であるかや、HIT既往患者で人工心肺が必要な心臓手術を要する場合にヘパリンの使用の可否のコンサルトを受けている。今後も研究費が続く限りは、引き続き臨床医に有益な情報を発信し続ける所存である。も

し、HIT疑い患者さんの担当となった場合、国立循環器病研究センターのホームページ(<http://www.ncvc.go.jp/hospital/section/treatment/laboratorymedicine/bloodmanagement/heparin.html>)からコンサルトいただければ幸いである。

謝辞

本研究の遂行に際し、研究の場を提供していただ

図5 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。

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 宮田茂樹 先生に心から感謝申し上げます。

また、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 先生に心から感謝いたします。

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 角谷勇実 先生、児玉真由美 先生、瀬口周 先生、金海仁在 先生、川村知織 先生、杉森英里 先生、中井一吉 先生に心から感謝申し上げます。

データの管理ならびに整理にご協力いただい

ます国立循環器病研究センター輸血管理室 秘書 田邊奈津子 様、丸山淳子 様に心から感謝申し上げます。

著者の利益相反開示(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- 1) Greinacher A, Warkentin TE, BH Chong. Heparin-induced thrombocytopenia. Platelets, Greinacher A, Warkentin TE, BH Chong, 851–882, 2012.
- 2) Greinacher A: CLINICAL PRACTICE. Heparin-Induced Thrombocytopenia. N Engl J Med **373**: 252–261, 2015.

- 3) Warkentin TE, Levine MN, Hirsh J, Horsewood P, Roberts RS, Gent M, Kelton JG: Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. *N Engl J Med* **332**: 1330–1335, 1995.
- 4) Warkentin TE, Kelton JG: A 14-year study of heparin-induced thrombocytopenia. *Am J Med* **101**: 502–507, 1996.
- 5) Greinacher A, Farner B, Kroll H, Kohlmann T, Warkentin TE, Eichler P: Clinical features of heparin-induced thrombocytopenia including risk factors for thrombosis. A retrospective analysis of 408 patients. *Thromb Haemost* **94**: 132–135, 2005.
- 6) Warkentin TE, Linkins LA: Non-necrotizing heparin-induced skin lesions and the 4T's score. *J Thromb Haemost* **8**: 1483–1485, 2010.
- 7) 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.
- 8) Cuker A, Gimotty PA, Crowther MA, Warkentin TE: Predictive value of the 4Ts scoring system for heparin-induced thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Blood* **120**: 4160–4167, 2012.
- 9) Cuker A, Arepally G, Crowther MA, Rice L, Datko F, Hook K, Probert KJ, Kuter DJ, Ortel TL, Konkle BA, Cines DB: The HIT Expert Probability (HEP) Score: a novel pre-test probability model for heparin-induced thrombocytopenia based on broad expert opinion. *J Thromb Haemost* **8**: 2642–2650, 2010.
- 10) Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG: Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* **96**: 1703–1708, 2000.
- 11) 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* **5**: 1666–1673, 2007.
- 12) Lo GK, Sigouin CS, Warkentin TE: What is the potential for overdiagnosis of heparin-induced thrombocytopenia? *Am J Hematol* **82**: 1037–1043, 2007.
- 13) Warkentin TE, Sheppard JI, Moore JC, Sigouin CS, Kelton JG: Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost* **6**: 1304–1312, 2008.
- 14) Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG: Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* **96**: 188–194, 2000.
- 15) Lee DH, Warkentin TE, Denomme GA, Hayward CP, Kelton JG: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. *Br J Haematol* **95**: 724–731, 1996.
- 16) 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. *Clin Appl Thromb Hemost* **19**: 37–41, 2013.