

# 透析患者の血小板減少症の解析

岩本 祐介 安藤 稔 土谷 健 二瓶 宏

Clinical analysis of thrombocytopenia in chronic dialysis patients

Yusuke IWAMOTO, Minoru ANDO, Ken TSUCHIYA, and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Thrombopoietic status in dialysis patients is controversial. This study addressed this issue by analyzing factors associated with thrombopoiesis. One hundred and fifty-one dialysis patients (119 HD and 32 CAPD) and 41 age-matched control subjects were studied. Thrombocytopenia was defined as a platelet count less than  $150 \times 10^9/l$ . Reticulated platelets (RET), a marker for marrow megakaryopoiesis, were measured using thiazole orange dye by flowcytometry. Serum thrombopoietin (TPO) level was measured by ELISA. Hepatitis C virus (HCV) antibody, platelet-associated IgG (PAIgG), and other clinical parameters were examined in the patients. The platelet counts in the HD patients were significantly lower than those in the CAPD or controls. The incidence of thrombocytopenia was 30.0% in the HD patients. Thrombocytopenia was more prominent in the HCV-infected HD patients in whom PAIgG was mostly positive (81.8%) and its titer was remarkably high ( $102.9 \pm 92.7$  pg/ml). There were significant differences in the RET counts between patients with and without thrombocytopenia. None of the other parameters, such as iPTH,  $\beta_2$ microglobulin, and Kt/V, nor any prescribed drugs were related to thrombocytopenia. Serum TPO was significantly higher in HD patients ( $135.9 \pm 60.1$  pg/ml) than in the controls ( $97.0 \pm 53.4$  pg/ml).

In conclusion, thrombocytopenia is frequent in HD patients, especially in HCV-infected HD patients. Reduced marrow megakaryopoiesis is mostly responsible for thrombocytopenia and peripheral destruction of platelets could be, in part, involved. Mild elevation of serum TPO possibly indicates a counter-response to decreased mass of megakaryocyte in bone marrow.

Jpn J Nephrol 1999 ; 41 : 712-718.

**Key words** : thrombocytopenia, reticulated platelet, thrombopoietin, hepatitis C virus

## はじめに

慢性腎不全状態における出血、凝固系異常は臨床的に大きな問題であり、その明確な成立機序も血小板機能を中心に明らかにされつつある<sup>1,2)</sup>。脳卒中や心筋梗塞などは生命予後を脅かしかねない重篤な合併症であり、シャントやグラフトの血栓や閉塞は安定した維持透析を考えるうえでQOL上大きな障害となる。血液凝固を検討するうえで、血小板は正常な止血過程において重要な役割を演じるが、反面、病的血栓、塞栓形成が心血管系合併症を、その機能低下が出血性疾患を引き起こす要因ともなる。

最近、血小板の構造や機能の新しい知見が報告されており、例えば網血小板の測定は骨髄での巨核球産生の指標となることが報告されている<sup>3)</sup>。さらにエリスロポエチンなどの造血に関与するサイトカインがクローニングされるなか、漸く血小板のhematopoietic growth factorである trombopoietin (TPO) もその遺伝子構造が決定され、血小板の産生と活性化のメカニズムが解明されつつある<sup>4,5)</sup>。腎不全時の造血障害である腎性貧血に関しては、合成エリスロポエチン投与により著明な改善が認められ、その強いサイトカイン依存性が確認された。しかしながら、透析患者における血小板産生のコントロールにお

ける TPO の役割については、ほとんど検討がなされていない。また、この問題の解明には、尿毒症性物質や長期透析時に問題となるアミロイド、parathyroid hormone (PTH) などの関連物質の関与の検討などを含めた多角的なアプローチが必要と考えられる。本研究では、これまで曖昧であった慢性透析患者における血小板産生状態を詳細に評価するとともに、それにかかわる因子を臨床的視点から包括的に検討した。

## 対象および方法

症例からの血液のサンプリングに際しては、測定の内容、結果の処理、統計的算出などの方法につき説明し informed consent を確立した。

当院および関連病院の慢性血液透析患者 (HD) 119 名 (男性 67 名, 女性 52 名) および健常者 (control) 41 名を対象とした。透析方法の相違を比較する目的で、血小板数を含む一部のパラメーターを CAPD 患者 32 名についても測定した。平均年齢はそれぞれ control  $49.6 \pm 7.46$  歳, HD  $51.1 \pm 14.6$  歳, CAPD  $46.5 \pm 10.5$  歳で一致させた。HD 患者の原疾患は慢性糸球体腎炎 91 名, 妊娠中毒症 6 名, 嚢胞腎 5 名, 慢性腎盂腎炎 4 名, 腎硬化症 4 名, アルポート症候群 2 名, 痛風腎 2 名, 低形成腎 2 名, 水腎症 2 名, 糖尿病 1 名であった。原疾患が膠原病によると考えられる患者は、自己抗体などの造血系への影響を与える因子を有する可能性があり対象外とした。

血小板数および白血球数を算定し、Kt/V (Daugirdas の式),  $\beta_2$  ミクログロブリン, 副甲状腺ホルモン (PTH) などの臨床的各種パラメーター, C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染の有無, 網血小板数, 血清 TPO 濃度, 抗血小板抗体 (platelet-associated IgG : PAIgG) および血清抗カルジオリピン抗体 (anti-cardiolipin antibody : 抗 CL 抗体) を測定した。偽性血小板減少などの影響を避けるため、血小板数は最近 3 カ月間, 計 6 回分のデータの平均値を用いた。HCV 抗体陽性例はこれまでに肝酵素上昇を一度も認めず (当院正常上限値 ; 31 IU/l), 超音波検査または CT 検査でも肝線維症, 肝硬変のないことが確認された症例を対象とした。また, 各種薬剤の投与状況も併せて調査を行った。血小板数  $150 \times 10^9/l$  以下を血小板減少症例と定義した。採血は週初めの透析開始前に施行した。静脈血を EDTA 採血管でサンプリングしたものを, 末梢血球数算定とフローサイトメトリーによる解析に用いた。また血清は  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存し, TPO を同一キット内で測定し

た。血液生化学データは, 院内の自動分析装置で,  $\beta_2$  ミクログロブリン, intact PTH はそれぞれ RIA 法, IRMA 法で測定した。HCV 抗体価は第三世代の ELISA 法により測定した。

### 1. 網血小板数の測定

Manufacturer's protocol 通りにポリエチレンチューブに thiazole orange (Retic-Count™, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を 1 ml 入れ, EDTA-2K 採血管で採血した全血液  $50 \mu\text{l}$  を混合し, 遮光して室温にて 30 分間インキュベート後, フローサイトメトリー (FACSscan, Becton Dickinson) にて測定した。前方散乱光と側方散乱光で展開し, 血小板の細胞集団にゲートをかけた後, 血小板数 5,000 個で fluorescence-1 detector で測定される Retic-Count 反応液陽性の細胞数をカウントした。網血小板陽性率 (%reticulated platelet) と絶対数 (末梢血小板総数  $\times$  陽性率 / 100) (reticulated platelet number) を測定した。網血小板陽性率の intra-assay の平均変動率 (CV) は 8.4 % (n=6) であった。

### 2. PAIgG の測定

競合的 micro ELISA 法によった<sup>6)</sup>。血小板を分離し, 1.1 % ウシ血清アルブミンを含む PBS 溶液で洗浄後, ヒト IgG でコーティングされた microplate で ELISA を施行した。horseradish peroxidase-conjugated 抗ヒト IgG 抗体とともにインキュベートし, o-phenylenediamine で染色し, 吸光度を 480 nm filter の microplate reader で測定した。

### 3. 抗 CL 抗体の測定

ELISA 法を用いて測定した (MESACUP カルジオリピンテスト, MBL, Japan)。101 倍希釈血清を 1 時間反応させ, 洗浄後 peroxidase 標識抗ヒト IgG マウスモノクローナル抗体を 1 時間反応させた。洗浄後, 発色液を 30 分間反応させ, 反応停止後 450 nm の吸光度を測定し, 抗体価は陽性標準血清による標準曲線より求めた<sup>7)</sup>。

### 4. 血清 TPO の測定

ELISA 法を用いて測定した (Quantikine Human TPO Immunoassay, R & D System, Minn., USA)。各 well あたり  $200 \mu\text{l}$  の TPO 標準液と血清サンプルをあらかじめ抗 TPO モノクローナル抗体でコーティングした microtiter plate に入れ,  $4^\circ\text{C}$  で 3 時間インキュベートした。各々の well を吸引し洗浄, 各 well に horseradish peroxidase conjugated TPO 抗体  $200 \mu\text{l}$  を加え, 再び  $4^\circ\text{C}$  で 1 時間インキュベートし, tetramethylbenzidine で発色させ, 反応停止後, その吸光度を 450 nm filter の microplate reader で測定した。

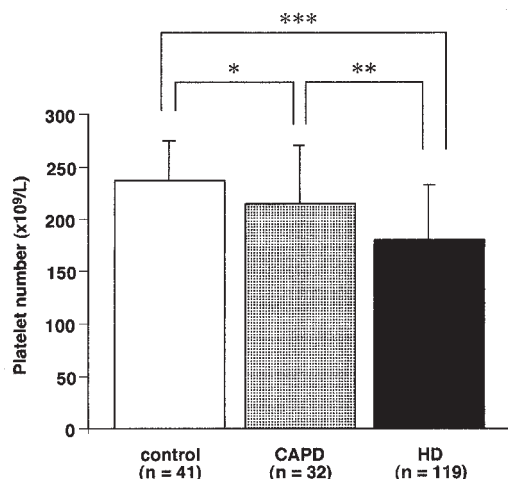


Fig. 1. Platelet number in control subjects, HD and CAPD patients

Data are mean ± SD. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.0001

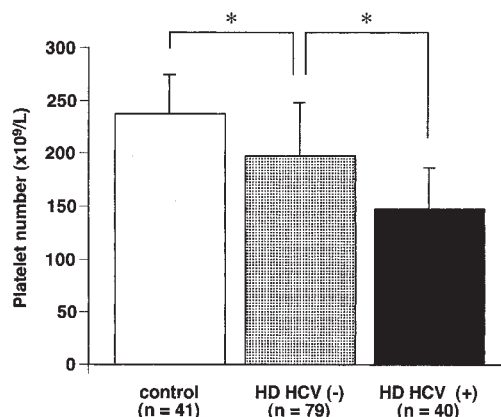


Fig. 2. Platelet number in HD patients with or without HCV infection

Data are mean ± SD. \* p < 0.0001

Table 1. Prevalence of PAIgG and anti-cardiolipin antibody in HD patients with thrombocytopenia

HD patients	PAIgG (9.0~30.0 ng/10 <sup>7</sup> cells)			Anti-cardiolipin antibody (IgG) (< 10 U/ml)	
	Frequency	Mean ± SD	Range	Frequency	Mean ± SD (positive)
HCV positive (n=22)	81.8% (18/22)	102.9 ± 92.7	20.0~362.5	9.09% (2/22)	20.5 ± 0.71
HCV negative (n=14)	21.4% (3/14)	27.6 ± 18.2	10.2~86.9	not done	not done

## 5. 統計

数値は平均値 ± 標準偏差で示した。検定は対応のない two-tailed Student's *t* test で行い、p < 0.05 を有意とした。

## 結 果

### 1. 血小板数

健常者および透析患者での血小板数を Fig. 1 に示す。control 群  $235.6 \pm 38.0 \times 10^9/l$  ( $187.0 \sim 359.0 \times 10^9/l$ ) に比較して、CAPD 群 ( $212.9 \pm 56.1 \times 10^9/l$ ;  $115.0 \sim 403.0 \times 10^9/l$ )、HD 群 ( $178.7 \pm 42.9 \times 10^9/l$ ;  $60.5 \sim 351.8 \times 10^9/l$ ) とともに有意に低下していた。さらに CAPD 群と HD 群の 2 群間でも有意差をもって HD 群で減少が認められた。

しかし、この血小板減少は HCV 抗体陽性者で顕著であり、Fig. 2 に示すように、HD 患者中 HCV 抗体が陰性群では  $195.6 \pm 51.4 \times 10^9/l$  ( $91.0 \sim 351.8 \times 10^9/l$ ) に対し、陽性群では  $145.3 \pm 38.3 \times 10^9/l$  ( $60.5 \sim 235.7 \times 10^9/l$ ) とさらに有意な低下を示した。また、HCV 抗体陰性の HD 群と CAPD 群間に血小板数に有意な差はなかった。血小板減少症の出現頻度は CAPD 群(全例が HCV 抗体陰性)では

3/32 人 (9.4%) に比して、HCV 抗体陽性の HD 群では 22/40 人 (55.0%)、陰性例では 14/79 人 (17.7%) と、HCV 抗体陽性の HD 群では極めて高頻度に血小板減少症が認められた。血小板減少症例中での HCV 抗体の有無による PAIgG、抗 CL 抗体の陽性率、抗体価との関係を Table 1 に示す。HCV 抗体陽性例では、PAIgG は 81.8% に陽性で、抗体価も  $102.9 \pm 92.7$  pg/ml と高値であった。高 CL 抗体は 2 例 (9.1%) のみに陽性で、平均血清濃度は  $20.5 \pm 0.71$  U/ml 程度であった。

また、血小板数は透析年数に負の相関を認め、透析期間が長期化するにつれて減少する傾向が認められた ( $r = -0.349$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 3a)。骨髄機能の評価のパラメーターとして、同様に末梢白血球数についても透析年数との相関を検討すると、Fig. 3b に示すように、長期化するにつれてやはり減少が認められた ( $r = -0.261$ ,  $p < 0.01$ )。

血小板数は、intact PTH、 $\beta_2$  ミクログロブリン、Kt/V などの各透析のパラメーターや、合成エリスロポエチン使用量、アロプリノール、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、H<sub>2</sub> 阻害剤などの薬剤使用との有意な関連は見出せなかった。

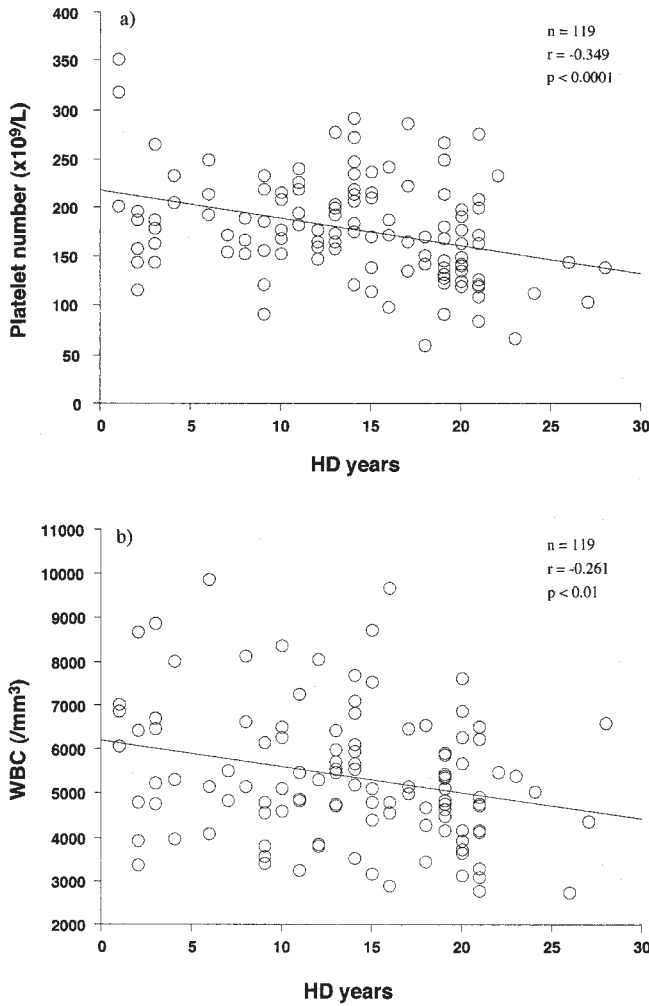


Fig. 3. Correlation between platelet number (a), peripheral white blood cell (WBC) number (b) and HD years in HD patients

2. 網血小板数

健常群に比較してHD, CAPD群では絶対数も、その陽性率も有意に低下していたが、HDとCAPD群間には両パラメーターとも有意差は認められなかった (Fig. 4)。網血小板陽性率に関しては、血小板減少症の有無群間で有意な変化は認められなかったが、その絶対数では有意差が認められた ( $13.6 \pm 10.9 \times 10^9/l$  vs.  $8.04 \pm 4.74 \times 10^9/l$ ;  $p < 0.05$ )。HCV感染の有無と網血小板陽性率、絶対数に関連はなかった。

3. 血清 TPO 値

血清 TPO 値は健常人に比較してHD患者では約1.4倍の上昇が認められた ( $97.0 \pm 53.4$  pg/ml vs.  $135.9 \pm 60.1$  pg/ml,  $p < 0.002$ )。血清 TPO 値とHD患者中のHCV感染および血小板減少症との関係を Table 2 に示す。HCV感染の有無および血小板減少症の有無では血清 TPO 値に有

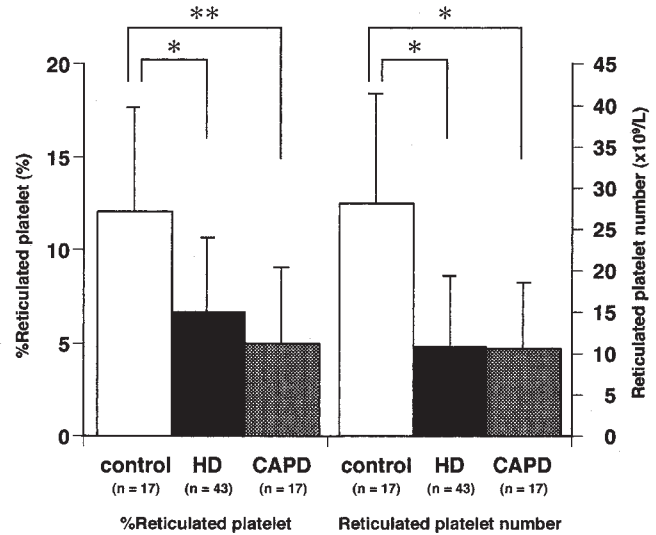


Fig. 4. Comparison of reticulated platelets between dialysis patients and control subjects

Data are mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.001$

Table 2. Serum TPO levels in HD patients

	Serum TPO (pg/ml)	Serum TPO/platelet number
Control (n=33)	$96.958 \pm 53.411$	$4.29 \pm 2.39$
HD patients (n=76)	$135.886 \pm 60.091^b$	$8.88 \pm 5.65^b$
HCV positive (n=27)	$127.537 \pm 51.010^a$	$10.4 \pm 5.87^b$
HCV negative (n=49)	$140.486 \pm 64.590^b$	$8.04 \pm 5.40^b$
Thrombocytopenic (n=35)	$131.628 \pm 54.565^a$	$11.6 \pm 6.47^{b,c}$
Non-thrombocytopenic (n=41)	$139.520 \pm 64.887^b$	$6.57 \pm 3.53^b$

Data are mean  $\pm$  SD. <sup>a)</sup>  $p < 0.05$  vs. control, <sup>b)</sup>  $p < 0.01$  vs. control, <sup>c)</sup>  $p < 0.01$  vs. non-thrombocytopenia

意差は認められなかった。しかしながら、血清 TPO 値を血小板数で除した指標 (TPO/platelet) を算定すると、HCV感染の有無では有意差を認めなかったが、血小板減少症の症例群では有意な上昇が認められた ( $11.6 \pm 6.47$  vs.  $6.57 \pm 3.53$ ,  $p < 0.0001$ )。

考 察

慢性維持透析状態ではしばしば血液学的異常を合併し、腎性貧血は最も顕著な臨床上的問題である。さらに止血、凝固系の異常にも遭遇するが、血小板はその過程で重要な役割を演じる。現在まで透析患者で血小板数が減少するかどうかは議論が分かれている<sup>8,9)</sup>。したがって、本研究では維持透析患者での血小板数の異常を産生、破壊両面のパラメーターをもとに明確にするのが主たる目的であった。



今回われわれは、151例の透析患者症例について検討した結果、透析の modality にかかわらず慢性透析患者では、健常者に比し明らかな血小板の減少がみられることが確認された。特に HCV 抗体陽性の HD 患者ではより一層の低下が認められた。近年 HCV 抗体陽性の慢性肝炎患者では、血小板減少症を合併することが知られており、その原因の一つとして、PAIgG、抗 CL 抗体などの自己抗体の出現率が高いとされている<sup>10-13</sup>。その機序の明確な理由はいまだに不明であるが、こうした自己抗体が高頻度に出現することに、HCV の血小板およびリンパ球、骨髄細胞への感染が関連している可能性も推測されている<sup>11-13</sup>。

われわれのデータは、HD 患者は HCV 抗体の陽性率が高く、また、PAIgG も高頻度、高力価で陽性であることを示していた。また、HCV 抗体陽性 HD 患者群で血小板減少の程度が明らかに強く、HCV 感染のない CAPD 患者と HD 患者では血小板数に差異を認めなかった。血小板の機械的な破壊、透析膜への固着など、体外循環、透析回路の影響なども血小板数の減少にかかわる因子として疑われるものであるが、CAPD および HCV 抗体陰性 HD の両群で有意差がなく、長期的な視点にたつ血小板減少症に対する影響は大きくないものと推測された。さらに、血小板減少症の出現率も HCV 感染のある HD 患者群で 55% と最も高率であった。

以上より、HD 患者と特に HCV 抗体陽性群の血小板減少のメカニズムに関しては、以下に述べる骨髄レベルでの血小板産生低下とともに PAIgG などの抗血小板抗体の出現による末梢における脾臓などでの血小板破壊の機序が相まって、血小板数が一層減少している可能性が明らかにされた。

骨髄における血小板の産生状態に関しては、実際に骨髄での所見が重要である。しかしながら、多くの臨床症例での骨髄検査を施行することは困難が多い。網血小板は Ingram ら<sup>14</sup>)により、色素により濃染する細網を有する血小板として報告された。赤血球系における網状赤血球に相当して、骨髄での巨核球の turnover の指標と現在では意義づけられている。最近では、RNA 染色色素の thiazole orange を用いてフローサイトメトリーで検出することが可能である<sup>3,15</sup>。末梢血小板数に対する網血小板陽性率またはその絶対数で評価されることが多いが、低巨核球形成状態の把握には陽性率ではなく、むしろ絶対数が優れていることが報告されている<sup>16</sup>。Himmelfarb ら<sup>17</sup>)は透析患者で網血小板陽性率のみを測定し、透析患者では骨髄での血

小板の turnover が亢進していると報告しているが、その評価のためには網血小板絶対数も測定すべきであり、やや不十分な報告であったと思われる。一方、Tassies ら<sup>18,19</sup>)は、HD、CAPD 患者とも網血小板陽性率、絶対数ともに減少していることを報告した。彼らは、方法論的に platelet-rich plasma を用いており、全血を用いたわれわれの測定法と異なるものの、今回の結果を強く支持し、ともに透析患者の骨髄での巨核球の低形成状態の存在を示唆するものである。また、骨髄疾患などで血小板減少症を呈する症例で網血小板絶対数が有意に低いことも、透析患者の骨髄での血小板産生状態を把握する指標としては、網血小板絶対数がより有用であることを支持するものである。

血小板の骨髄での産生を促すサイトカインである TPO は最近その遺伝子構造が決定され、生理作用や血清レベルの動態の把握が可能になりつつある。TPO は肝、腎などで産生され血小板の分化、成熟にかかわるサイトカインであるが<sup>5,20</sup>、TPO の産生調節と血清レベルの意義についてはまだ不明の点が多い。造血因子は目的とする細胞数の減少による feedback により、産生の亢進、血中レベルの上昇が予想されるが、TPO の場合必ずしも上昇を認めないとする報告もみられる<sup>21</sup>。再生不良性貧血、化学療法後の骨髄抑制期などで上昇が報告されているが<sup>22,23</sup>、特発性血小板減少性紫斑病などでは軽度の上昇にとどまるとされている<sup>24</sup>。さらに血清レベルに関しては、血小板、巨核球の c-mpl 蛋白(いわゆる TPO 受容体)への結合により血清中から除去されて調節を受けるメカニズムも報告され<sup>25,26</sup>、このため血清 TPO は血小板、巨核球全体の細胞 mass を反映し決定されるとも考えられている。実際に HD 患者における TPO/血小板数が血小板減少群で有意に上昇していたことは、このことを示唆している (Table 2)。

腎不全時の TPO に関しては、尿毒症血清をマウスに投与した bioassay 法による検討から、それが低下しているとの報告もあるが<sup>8</sup>、今回の ELISA 法による HD 患者での検討では約 1.4 倍の上昇が認められた。TPO の産生部位が腎のみに限らず肝にも認められることから、骨髄での産生低下に伴い代償的に増加している可能性も考えられる。また、分子量サイズ(血中では、glycosylated form で存在し、その分子サイズは約 70 kDa)から透析でのクリアランス除去が不十分なことによる蓄積の可能性、さらに血小板、巨核球数の減少に伴う受容体と TPO 結合減少などにより、血清 TPO 値の高値を引き起こしたことも推測される。腎不全時の TPO 動態の詳細については、今後、透析の modality による差異、透析による除去などの検討が

必要である。一方、慢性腎不全時の骨髄での巨核球産生の低下をきたす要因に関しては今回の検討では明らかではないが、少なくとも TPO 産生の絶対的不足は否定的である。20 年を超える長期透析例がみられるようになり、この間、透析技術の進歩や、合成エリスロポエチンの開発など、一概に透析期間と造血機能の相関関係を特定することは困難である。しかしながら白血球数および血小板数と透析期間との間に有意な負の関係が存在すること (Fig. 3)、いわゆる尿毒症性物質に造血系細胞の抑制作用があるとの報告<sup>27)</sup>などから、現今の透析療法では十分除去しえず蓄積する尿毒症性骨髄抑制物質の存在が最も推測されるが、明確な説明は今後の検討も待たねばならない。

## 結 語

- 1) 血小板減少症は慢性透析患者にしばしば認められ、特に HCV 抗体陽性の HD 患者で顕著であった。
- 2) 血小板減少の基本的な要因は骨髄における巨核球の産生低下と考えられるが、それに加えて抗血小板抗体の出現による末梢での破壊も一部関与していると推測された。
- 3) 血小板産生因子である TPO の欠乏が血小板減少の原因ではなく、むしろ血清 TPO は上昇が認められ、骨髄での巨核球産生の低下を反映した代償上昇や TPO 受容体との結合の減少による増加と考えられた。

## 謝 辞

本研究にあたり、多数の症例にご協力頂きました須田内科クリニック須田昭夫先生に心から感謝の意を表します。また本稿を終えるにあたり、ご校閲、ご助言を賜りました東京女子医科大学第 4 内科久保和雄先生、木全直樹先生に深謝いたします。

なお、本研究の一部は、腎性貧血研究会の助成によった。

## 文 献

1. Sreedhara R, Itagaki I, Hakim RM. Uremic patients have decreased shear-induced platelet aggregation mediated by decreased availability of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Am J Kid Dis* 1996 ; 27 : 355-64.
2. Escolar G, Cases A, Bastida E, Garrido M, Lopez J, Revert L, Castillo R, Ordinas A. Uremic platelets have a functional defect affecting the interaction of von Willebrand factor with glycoprotein IIb-IIIa. *Blood* 1990 ; 76 : 1336-40.
3. Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets : methodology and clinical application. *Br J Haematol* 1995 ; 91 : 445-51.
4. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathewes SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production *in vivo*. *Nature* 1994 ; 369 : 565-8.
5. Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using *in situ* hybridization. *Blood* 1997 ; 89 : 101-7.
6. 林 悟, 押田真知子, 椿尾忠博, 倉田義之 : Micro ELISA による血小板表面 IgG 量の測定. *臨床病理* 1984 ; 32 : 1253-7.
7. 岡田 純, 渡辺清明, 山本美保子, 籾木淳一, 市川幸延, 市川陽一, 大矢和彦, 木村祐章 : MESACUP カルジオリピンテストの有用性. *医学と薬学* 1996 ; 36 : 1389-94.
8. Gafter U, Bessler H, Malachi T, Zevin D, Djaldetti M, Levi J. Platelet count and thrombopoietic activity in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1987 ; 45 : 207-10.
9. Larsson SO : On coagulation and fibrinolysis in renal failure. *Scand J Haematol* 1971 ; 15 (Suppl) : 1-59.
10. Pereira J, Accatino L, Alfaro J, Brahm J, Hidalgo P, Mezzano D. Platelet autoantibodies in patients with chronic liver disease. *Am J Hematol* 1995 ; 50 : 173-8.
11. Bordin G, Ballare M, Zigrossi P, Bertocelli MC, Pacagnino L, Baroli A, Brambilla M, Monteverde A, Inglesse E. A laboratory and thrombokinetic study of HCV-associated thrombocytopenia : a direct role of HCV in bone marrow exhaustion? *Clin Exp Rheumatol* 1995 ; 13 (Suppl) : S39-43.
12. Nagamine T, Ohtuka T, Takehara K, Arai T, Takagi H, Mori M. Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 1996 ; 24 : 135-40.
13. Priero J, Yuste JR, Belouqui O, Civeira PM, Riezu JJ, Aguirre B, Sangro B. Anticardiolipin antibodies in chronic hepatitis C : Implication of hepatitis C virus as the cause of the antiphospholipid syndrome. *Hepatology* 1996 ; 23 : 199-204.
14. Ingram M, Coopersmith S. Reticulated platelets following acute blood loss. *Br J Haematol* 1969 ; 17 : 225-8.
15. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets ; A diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic patients. *Blood* 1990 ; 75 : 116-21.
16. Ault KA. Flow cytometric measurement of platelet function and reticulated platelets. *Ann NY Acad Sci* 1993 ; 677 : 293-308.
17. Himmelfarb J, Holbrook D, McMonagle E, Ault K. In-

- creased reticulated platelets in dialysis patients. *Kidney Int* 1997 ; 51 : 834-9.
18. Tassies D, Reverter JC, Cases A, Escolar G, Villamor N, Lopez-Pedret J, Castillo R, Ordinas A. Reticulated platelets in uremic patients : effect of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Hematol* 1995 ; 50 : 161-6.
  19. Tassies D, Reverter JC, Cases A, Calls J, Escolar G, Ordinas A. Effect of recombinant human erythropoietin treatment on circulating reticulated platelets in uremic patients : association with early improvement in platelet function. *Am J Hematol* 1998 ; 59 : 105-9.
  20. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin N, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994 ; 369 : 568-71.
  21. Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, Meng G, Young NS, Dunbar CE, Shulman NR. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996 ; 87 : 4068-71.
  22. Kojima S. Hematopoietic growth factors and marrow stroma in aplastic anemia. *Int J Hematol* 1998 ; 68 : 19-28.
  23. Kuter DJ, Rosenberg RD. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 1995 ; 85 : 2720-30.
  24. Mukai HY, Kojima H, Todokoro K, Tahara T, Kato T, Hasegawa Y, Kobayashi T, Ninomiya H, Nagasawa T, Abe T. Serum thrombopoietin (TPO) levels in patients with amegakaryocytic thrombocytopenia are much higher than those with immune thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 1996 ; 76 : 675-8.
  25. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, de Sauvage FJ. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* 1996 ; 87 : 2154-61.
  26. Stoffel R, Wiestner A, Skoda RC. Thrombopoietin in thrombocytopenic mice : evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* 1996 ; 87 : 567-73.
  27. Wallner SF, Ward HP, Vautrin R, Alfrey AC, Mishell J. The anemia of chronic renal failure : *in vitro* response of bone marrow to erythropoietin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975 ; 149 : 939-44.