

Flow cytometry による同種および

自己抗ヒト血小板抗体の解析

II. 特発性血小板減少性紫斑病および全身性紅斑性狼瘡患者血清中の抗血小板抗体の検出

奈良県立医科大学第2内科学教室

水 本 保 子

DETECTION OF ALLO AND AUTO ANTI-PLATELET ANTIBODIES BY FLOW CYTOMETRY

II. MEASUREMENT OF ANTI-PLATELET ANTIBODIES OF SERA IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

YASUKO MIZUMOTO

Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received July 28, 1989

Summary : In a previous paper, I have shown evidence that acid treatment of washed normal platelets followed by formalin-fixation serves as a suitable material to detect auto and allo antibodies to platelets by flow cytometry. The percentage of fluorescence positive cells (% FPC) was less than 20.0 for fifty healthy adults. In this paper, I determined the levels of platelet bound IgG (PBIgG) in 20 patients with chronic ITP and in 27 patients with SLE. The % FPC in chronic ITP ranged from 97.1 to 8.3 (44.7 ± 29.4 , mean \pm SD), and that for SLE from 99.5 to 9.3 (38.8 ± 23.9 , mean \pm SD). In the patients with chronic ITP, a clearly inverted correlation was observed between platelet count and % FPCs ($r = -0.6511$, $p < 0.01$).

Next, the captured enzyme linked sorbent assay (ELISA) and the immunoblotting assay were performed on these serum specimens. In captured ELISA, anti GPIb or IIb/IIIa complex, mouse monoclonal antibodies designed by Ib1 and CP8 (provided by Dr. Zimmerman at Scripps Clinics), were used as the solid phase antibody to micro plate and 1 % Triton X-100 soluble fraction of platelet lysate was used for epitope antigen to these MoAbs. Allo antibodies bound to respective antigens were detected ALP conjugated anti mouse IgG. By this procedure, in seven of 20 patients with chronic ITP and 4 out of 27 patients with SLE anti GPIb antibody were detected. Similarly, in two patients with chronic ITP and in 4 patients with SLE, anti GPIIb/IIIa complex antibody were detected.

Of these patients, only one patient with SLE had specific antibody against 45Kd fraction of platelet lysate which was shown by immunoblotting assay.

Index Terms

ITP, SLE, PBIgG captured ELISA, immunoblotting

緒 言

特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) は日常臨床でよく遭遇する後天性出血性疾患の一つである。Harrington ら(1951)¹⁾ は ITP 患者血漿を正常人に輸注すると急激な血小板減少が惹起されることを観察し、この血漿成分を血小板障害因子と名付けた。その後、shulman ら(1965)²⁾ によりこの障害因子が 7S γ -globulin 分画に含まれる抗体であることが明かにされ、ITP は自己抗体が関与する自己免疫疾患ではないかとの見解が示されるようになった。

一方、全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus; SLE) は自己免疫の関与した代表的疾患で、臨床症状の一つとして血小板減少を伴うこともあり、また、ITP として経過観察中に SLE が発症する症例も知られている³⁾。両疾患の血小板減少機序について、患者血清中の抗血小板抗体の検索が諸種の方法^{4)~8)} でなされてきたが、検出率はそれほど高くなく、感度、再現性に優れた特異的検出法は未だ確立されていないのが現況である。

著者は第一報⁹⁾ で酸処理後ホルマリン固定した正常ヒト血小板を用いての flow cytometry (FCM) による血清中の同種、あるいは自己抗ヒト血小板抗体の検出法を開発したことを報告した。この際、健常成人血清の percentage of fluorescence positive cells (% FPC) で表わした抗血小板抗体 (platelet bound IgG; PBIgG) の cut off 値を 20.0 と設定し得ることを報告した。今回、この方法を用い ITP および SLE 患者血清中の PBIgG を測定した。更に、これら患者血清中の抗血小板抗体が血小板膜上の糖蛋白である GPIb あるいは GPIIb/IIIa complex に対応した抗体活性か否かについてそれぞれのモノクローナル抗体を用いた captured-ELISA 法で検討した。また、これら患者の抗血小板抗体に対応する血小板膜上の抗原部位について Immunoblotting 法で検討したので報告する。

対象ならびに方法

1. 対象：奈良県立医科大学付属病院第 2 内科および小児科で経過観察中の慢性型の ITP 患者 20 例と第 2 内科、第 1 内科および皮膚科にて経過観察中の SLE 患者

27 例を対象とした。ITP の診断は厚生省特発性血小板減少性紫斑病調査研究班の診断基準¹⁰⁾、SLE の診断はアメリカリウマチ協会の SLE 診断基準¹¹⁾ に従い行なった。これらの血清は分離後、 -80°C に凍結保存した。尚、対照としては抗血小板抗体の測定に当たっては健常人 50 名 (男性 25 名、女性 25 名) を、また抗 GPIb 抗体、抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の検出時には上記 50 名の内 25 名 (男性 13 名、女性 12 名) の血清を用いた。

2. Platelet lysate の作製：O 型健常人 5 名より既報の方法にて血小板を採取し、Walsh らのアルブミン勾配遠心法¹²⁾ にて血小板を洗浄後、得られた血小板沈渣を citric acid Na_2HPO_4 buffer (pH 3.0) にて酸処理を行なった。続いて、精製する血小板膜蛋白の分解を防ぐために EDTA 50mM, PMSF 10mM, leupeptin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に PBS を加えて全容 10 ml となる溶液を作成した。洗浄後酸処理した血小板を 10^{10} 個/ml に調整し、この血小板浮遊液 9ml に対し前述した蛋白分解防止溶液 1 ml を加えた後、終濃度 1% となるように Triton X-100 を加え 4°C で 30 分間放置することにより血小板を溶解した。このサンプルを 40,000 rpm (100,000 g) にて 60 分間遠心し、上清を採取し platelet lysate とした。保存は -80°C にて行なった。

3. 血清中の抗血小板抗体 (PBIgG) の測定：Flow cytometry と酸処理血小板を用いた抗血小板抗体の測定法によった。方法の詳細は第一報で述べたので省略する。

4. 抗 GPIb 抗体および抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の検出：これら血小板膜糖蛋白に対する抗体の検出には captured-ELISA 法¹³⁾¹⁴⁾ を用いて行なった。その概略は以下に述べる如くである。まず 96 穴マイクロプレートに GPIb および GPIIb/IIIa complex に対するモノクローナル抗体である Ib1 および CP8 (Dr. Zimmerman, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA 供与) を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整後 4°C にて一晚放置し固相化した。翌日 0.1% の bovine serum albumin (BSA) を含んだ PBS にて 3 回洗浄し、2% BSA. PBS を 200 μl 加え室温にて 1 時間放置することにより非特異的な結合を抑制した。続いて、0.01M Tris-buffered saline (TBS) にて 10 倍希釈した platelet lysate 100 μl を加え、 4°C にて 2 時間反応させ GPIb および

GPIIb/IIIa complex を固相化させた, 0.1% BSA.PBS にて 6 回洗浄した後, PBS にて 5 倍希釈した血清 100 μ l を添加し室温にて 1 時間反応させた, 0.1% BSA および 0.05% Tween 20 を含んだ PBS にて 6 回洗浄し, 3,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ (ALP) 標識抗ヒト IgG 抗体 100 μ l を反応させた後 ALP 量を Kind-King 法にて測定し optical density (OD) として表した. 尚, 対照の OD は platelet lysate の代わりに 0.1% Triton X-100 を含んだ 0.01 M TBS 100 μ l を用いて同様の操作を行い得られた OD とした. 抗 GPIb 抗体, 抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の活性は以下の式により求めた.

$$\frac{\text{被検血清の OD} - \text{対照の OD}}{\text{対照の OD}} \times 100 (\%)$$

尚, 測定は triplicate で行い, 検定は student t test を用いた.

5. Immunoblotting 法による血小板膜上の対応抗原の検索: 2.の方法にて作製した platelet lysate (0.4 mg/ml) 0.5 ml に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) サンプルバッファー (蒸留水 4.7 ml/0.5 M Tris-HCL, pH6.8, 1.0 ml/10% グリセロール 1.0 ml/10% SDS 1.0 ml) を 0.5 ml 加え, 56°C, 30 分間放置し, スラブゲル 1 枚分の試料とした. SDS-PAGE は Laemmli の方法¹⁵⁾ に準じ, 7.5% スラブゲルを用いて行なった. SDS-PAGE 施行後, Burnette の方法¹⁶⁾ により 4°C 250 mA, 18-20 時間にてニトロセルロース膜 (BIORAD 社) に electroblot した. このニトロセルロース膜を 5% のスキムミルクを含んだ PBS (pH7.5) に室温で 1 時間浸すことにより非特異的蛋白結合をブロックした後 7-8 mm の短冊に切断した. それぞれの短冊に被験血清 30 μ l, 羊血清 30 μ l と 5% スキムミルク PBS 3 ml を室温にて 2 時間反応させた後 0.05% Tween 20 を含んだ PBS にて 2 回洗浄した. ついでビオチン-アビジンシステム (Vectastain ABC kit, Vector 社) によりニトロセルロース膜上の血小板膜蛋白を同定した. すなわち, 被験血清を反応させたそれぞれの短冊とビオチン化抗ヒト IgG 3 μ l, 羊血清 30 μ l, 5% スキムミルク PBS 3 ml を室温にて 1 時間放置した後, 0.05% Tween 20.PBS にて 2 回洗浄後, 0.05% Tween 20.PBS にて 500 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ試薬と室温で更に 30 分間反応させた. 0.05% Tween 20.PBS にて 3 回洗浄後, 発色基質 (PBS 100 ml, diaminobenzidine 60 mg, H₂O₂ 5 μ l) 5 ml を加え diaminobenzidine を酵素反応により発色させ, 血小板膜上の対応抗原を検出した.

更に, 同方法にて血小板膜上の対応抗原を検出し得た症例では患者自身の platelet lysate を用いて Im-

munoblotting 法による検討を行なった.

成 績

1. ITP および SLE 患者血清中の抗血小板抗体クエン酸処理後ホルマリン固定した正常血小板浮遊液と患者血清を反応させた.

次いで, FITC 標識抗ヒト IgG と反応せしめた後, 洗浄した血小板浮遊液について % of fluorescence positive cells (% FPC) を FACScan で測定した.

ITP 患者 20 例の % FPC は 97.1 から 8.3 の値を示し

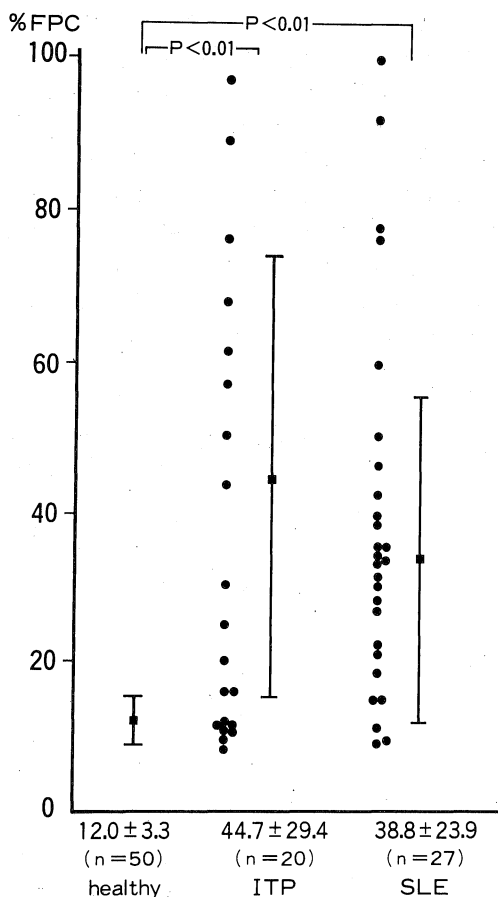


Fig. 1. The levels of %FPC in patients with chronic ITP and SLE.

The levels of %FPC in 50 healthy controls, 20 patients with chronic ITP and 27 patients with SLE. The %FPC in 20 patients with chronic ITP ranged from the value 97.1 to 8.3 (mean \pm SD: 44.7 \pm 29.4). The %FPC in 27 patients with SLE ranged from the value 99.5 to 9.3 (mean \pm SD: 38.8 \pm 23.9).

た。第一報で報告した健常人 50 名より求めた % FPC の cut off 値である 20.0 以上の陽性値を示した者は 11 例であった。また、その mean±SD は 44.7±29.4 であり健常人の % FPC に比し有意の高値を示した (p<0.01) (Fig. 1.)

SLE 患者 27 例の % FPC 値は 99.5 から 9.3 の間にあり 20.0 以上の陽性値を示した者は 21 例であった。また、その mean±SD は 38.8±23.9 であり健常人の値に比し有意の上昇を認めた (p<0.01) (Fig. 1.)

ITP 患者血清中の % FPC と血小板数については両者の間に有意な負の相関を認めた (r=-0.6511, p<0.01) (Fig. 2.)。図には示さないが SLE 患者血清中の % FPC と血小板数の間には何らかの相関も認めなかった。

2. captured-ELISA 法による抗 GPIb 抗体および抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の検出

ITP 患者 20 例、SLE 患者 27 例および健常人 25 名について captured-ELISA 法で抗 GPIb 抗体および抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の活性を測定した。GPIb 抗体活性では、ITP 患者は -29.8 % から 33.6 % で、SLE 患者は -29.8 % から 15.4 % であった。健常人 25 名の mean+2SD は、-10.1+15.4 (%) で、すなわち 5.3 % 以

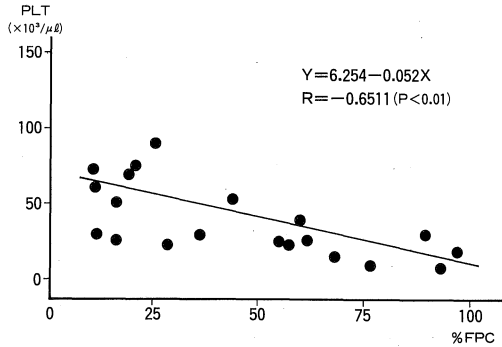


Fig. 2. Anti-GPIb antibodies in patients with ITP and SLE.

The levels of anti-GPIb antibodies in 25 healthy controls, 20 patients with chronic ITP and 27 patients with SLE. The average value of 25 healthy controls was -10.1+15.4 (mean+2SD)%. Thus, the cut off value was 5.3%. Seven of 20 patients with chronic ITP and 4 of 27 patients with SLE had anti-GPIb antibodies.

Table 1. The levels of %FPC, anti-GPIb and anti-GPIIb/IIIa complex antibodies in 20 patients with chronic ITP

| Case | Name | Sex | Age | %FPC | Anti-GPIb (%) | Anti-GPIIb/IIIa (%) | PLT (×10 ³ /μl) |
|------|------|-----|-----|------|---------------|---------------------|----------------------------|
| 1 | Y.U. | F | 24 | 76.2 | -12.6 | 9.7 | 10.0 |
| 2 | A.S. | M | 8 | 89.0 | 16.1 | 11.2 | 30.0 |
| 3 | Y.M. | F | 20 | 61.5 | 8.3 | 3.2 | 27.0 |
| 4 | H.O. | M | 62 | 57.2 | 24.3 | -0.1 | 21.0 |
| 5 | S.N. | M | 45 | 97.1 | 33.6 | 0.1 | 20.0 |
| 6 | K.Y. | M | 15 | 68.1 | 17.3 | 14.4 | 16.0 |
| 7 | M.T. | F | 5 | 50.8 | 11.2 | -14.3 | 48.0 |
| 8 | H.S. | M | 39 | 43.7 | -5.0 | -5.0 | 53.0 |
| 9 | R.T. | F | 36 | 24.8 | -7.7 | -13.4 | 90.0 |
| 10 | H.F. | M | 40 | 30.5 | 9.6 | -28.9 | 55.0 |
| 11 | H.N. | M | 58 | 20.3 | -29.8 | -19.5 | 76.0 |
| 12 | T.Y. | M | 35 | 11.1 | -15.5 | -17.4 | 61.0 |
| 13 | H.O. | F | 42 | 11.7 | 1.3 | 6.0 | 29.0 |
| 14 | E.K. | F | 27 | 16.0 | 0.4 | -12.3 | 25.0 |
| 15 | Y.K. | M | 67 | 11.7 | -25.3 | -22.3 | 80.0 |
| 16 | Y.I. | F | 34 | 10.5 | -10.3 | -4.3 | 73.0 |
| 17 | K.S. | F | 48 | 11.3 | 0.0 | 0.5 | 75.0 |
| 18 | S.A. | M | 36 | 8.3 | -20.9 | -18.7 | 73.0 |
| 19 | Y.M. | F | 27 | 11.9 | -25.6 | -22.7 | 58.0 |
| 20 | Y.O. | F | 25 | 16.1 | -5.4 | -15.1 | 50.0 |

上を示した者を抗 GPIIb 抗体活性陽性者とした。ITP 患者 20 例の内、7 例(case 2, case 3, case 4, case 5, case 6, case 7, case 10)に、また SLE 患者 27 例の内、4 例(case 1, case 5, case 13, case 15)に抗 GPIIb 抗体陽性値を認めた (Table 1., Table 2., Fig. 3.).

抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性では、ITP 患者は -28.9% から 14.4% で、SLE 患者は -27.5% から 18.6% であった。健康人 25 名の mean+2SD である $-7.4+17.6$ (%) より求めた 10.2% 以上の値を示した者を抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性の陽性者とした。ITP 患者の 2 例 (case 2, case 6)、また SLE 患者の 4 例 (case

4, case 5, case 9, case 10) が抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性陽性者であった (Table 1., Table 2., Fig. 4.).

ITP 患者の 2 例 (case 2, case 6)、SLE 患者の 1 例 (case 5) は抗 GPIIb 抗体、抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の両者ともに反応陽性であった。

captured-ELISA 法にて抗 GPIIb 抗体活性または抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性が陽性であった者は、いずれも % FPC で表した PBIgG 値が 20.0 以上の陽性値を示した者であった。

3. Immunoblotting 法による血小板膜上対応抗原部位の検出

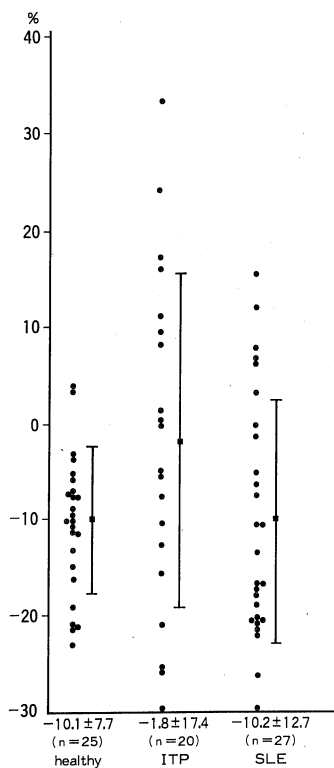


Fig. 3. Anti-GPIIb/IIIa complex antibodies in patients with chronic ITP and SLE. The levels of anti-GPIIb/IIIa complex antibodies in 25 healthy controls, 20 patients with chronic ITP and 27 patients with SLE. The average value of 25 healthy controls was $-7.4+17.6$ (mean+2SD)%. Thus, the cut off value was 10.2%. Two of 20 patients with chronic ITP and 4 of 27 patients with SLE had anti-GPIIb/IIIa complex antibodies.

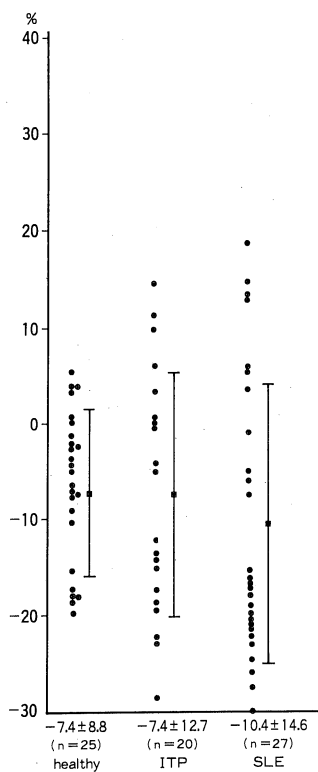


Fig. 4. The %FPCs of 20 patients with chronic ITP were plotted against platelet count and there was an inverse correlation between the two parameters ($r = -0.6511$, $p < 0.01$).

前述の方法にて ITP 患者 20 例, SLE 患者 27 例に対して Immunoblotting 法を施行し, SLE 患者 1 例の血清 (case 5) には血小板膜上の分子量約 45 Kd の蛋白バンド抗原に対応して生じた抗体が検出された (Fig. 5). 更に, この患者の自己血小板を用い Immunoblotting 法を施行したところ, 自己血小板に対しても同部位に抗体活性を認め, 自己抗体であることを確認し得た (Fig. 6). 同

じ患者の血清を用いて求めた PBIgG 値は, O 型健常人血小板を用いて求めた % FPC は 77.2 であり, 一方酸処理した患者血小板を用いて求めた % FPC は 40.3 であり, とともに 20.0 以上の陽性値であった (Fig. 7). これらの事より, 患者の血清中には同種のみならず自己に対する血小板抗体をも含んでいると考えられた. なお, ITP 患者では Immunoblotting 法にては対応抗原を検出で

Table 2. The levels of %FPC, anti-GPIb and anti-GPIIb/IIIa complex antibodies in 27 patients with SLE

| Case | Name | Sex | Age | %FPC | Anti-GPIb (%) | Anti-GPIIb/IIIa (%) | PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$) |
|------|------|-----|-----|------|---------------|---------------------|-----------------------------------|
| 1 | S.I. | F | 36 | 34.4 | 15.4 | -19.1 | 220.0 |
| 2 | K.I. | F | 42 | 38.2 | - 1.4 | 6.0 | 180.0 |
| 3 | T.K. | F | 66 | 92.0 | - 5.1 | -21.2 | 209.0 |
| 4 | M.K. | F | 40 | 39.9 | -20.4 | 13.0 | 164.0 |
| 5 | T.K. | F | 45 | 77.2 | 12.2 | 14.7 | 89.0 |
| 6 | M.Y. | F | 53 | 76.2 | -13.4 | -16.7 | 189.0 |
| 7 | Y.K. | F | 30 | 50.1 | -20.4 | 5.4 | 288.0 |
| 8 | J.M. | F | 46 | 46.2 | -26.2 | 3.6 | 162.0 |
| 9 | A.H. | F | 41 | 99.5 | - 6.4 | 18.6 | 223.0 |
| 10 | S.F. | F | 34 | 39.8 | -10.6 | 13.2 | 35.0 |
| 11 | C.M. | F | 29 | 35.0 | -20.6 | -15.3 | 186.0 |
| 12 | S.K. | F | 36 | 42.4 | - 7.5 | -16.4 | 256.0 |
| 13 | Y.F. | F | 28 | 30.6 | 7.9 | -20.6 | 165.0 |
| 14 | N.T. | F | 64 | 59.1 | -16.8 | -22.8 | 174.0 |
| 15 | K.O. | F | 42 | 31.3 | 6.8 | -24.5 | 365.0 |
| 16 | K.K. | F | 52 | 33.8 | - 0.1 | -27.5 | 110.0 |
| 17 | K.M. | F | 60 | 35.0 | -16.8 | -20.7 | 199.0 |
| 18 | T.K. | F | 60 | 28.1 | -21.3 | -25.9 | 236.0 |
| 19 | I.N. | M | 47 | 29.7 | -10.5 | -17.2 | 180.0 |
| 20 | T.K. | F | 45 | 30.2 | -20.3 | -19.7 | 328.0 |
| 21 | E.S. | F | 36 | 22.3 | 3.3 | 0.9 | 360.0 |
| 22 | C.M. | F | 34 | 10.9 | -21.9 | - 6.0 | 220.0 |
| 23 | Y.U. | F | 22 | 9.3 | - 6.3 | -17.8 | 288.0 |
| 24 | T.Y. | F | 46 | 13.8 | -17.9 | -22.1 | 185.0 |
| 25 | E.S. | F | 52 | 9.6 | -18.9 | -7.6 | 245.0 |
| 26 | J.K. | F | 48 | 14.5 | -29.8 | -29.2 | 213.0 |
| 27 | Y.N. | F | 46 | 19.1 | -16.9 | - 5.0 | 246.0 |

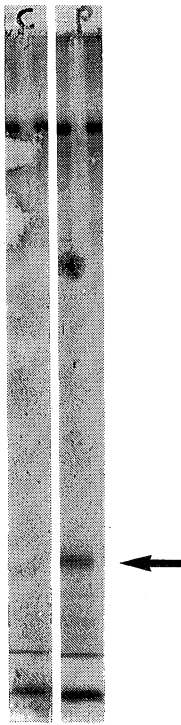


Fig. 5. Immunoblotting pattern using pooled O platelets.

The antibody from one patient with SLE was reacted with platelet membrane antigen, protein of molecular weight 45 kd. C: Reaction with serum of a healthy control R: Reaction with serum of the patient

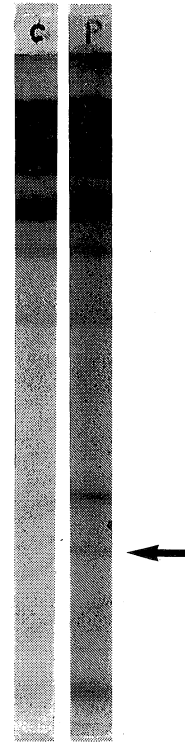


Fig. 6. Immunoblotting pattern using patient's own platelets.

The antibody from the patient with SLE was also reacted with patients own platelets. This data indicated that this patient with SLE had autologous anti-platelet antibodies. C: Reaction with serum of a healthy control R: Reaction with serum of the patient

きなかった。

考 案

血清中の抗血小板抗体の検出法は1960年代より多数のものが報告されている^{4)~8)}が、近年本邦における代表的検出法はenzyme linked Immunosorbent assay (ELISA)¹⁷⁾およびplatelet suspension immunofluorescence test (PSIFT)法¹⁸⁾によるものである。特に、PSIFT法のなかでもその感度のよさからflow cytometerを用いた検出法¹⁹⁾が開発されより精度の高い測定が可能となった。しかし、flow cytometerを用いた場合、血小板表面に付着したHLA-A, B, C抗原に対

する抗体を中心にした非特異的の抗体をも測定するため、この方法では血小板の処理方法が必要であった。著者はすでにこの血小板の処理方法として血小板に酸処理²⁰⁾を行い、血小板表面のHLA-A, B, C抗原を除去することにより特異的な抗血小板抗体を測定する方法を開発し報告している。更に、健常人50名の血清を用いて%FPCで表したPBIgG値のcut off値を設定し報告した。今回著者は前回報告した酸処理血小板とflow cytometry (FCM)を用いてITP患者20例とSLE患者27例のPBIgG値を測定し、またこれら抗血小板抗体の血小板膜上の対応抗原部位を検索した。

著者はITP患者20例のうち11例(55%)に血清中の

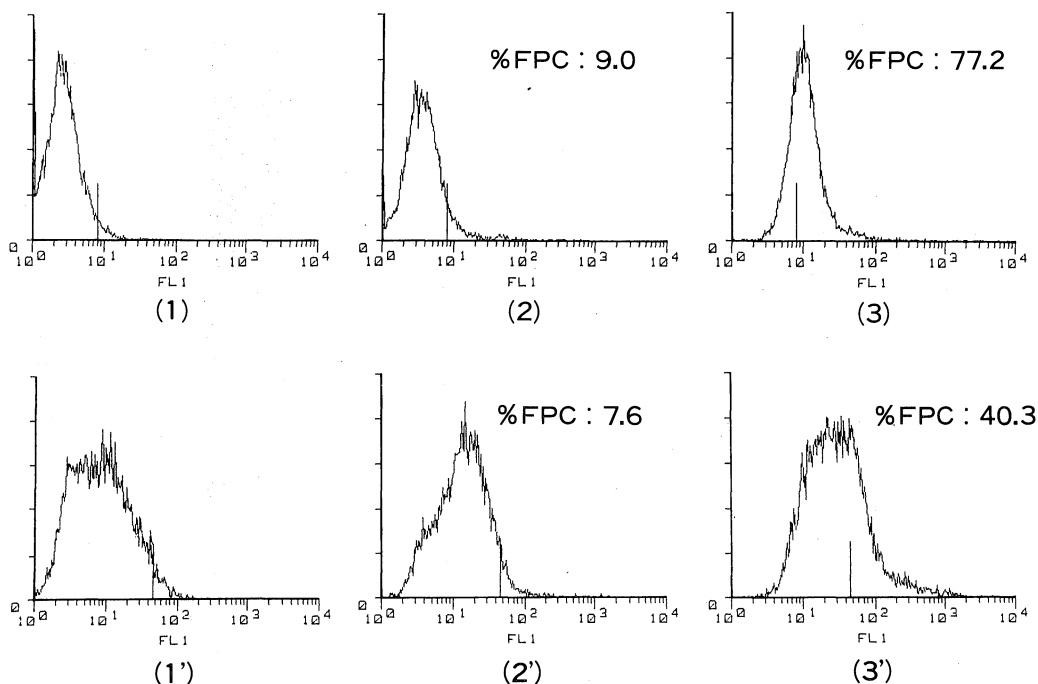


Fig. 7. The %FPC in this one patient with SLE.

The %FPC in this one patient with SLE measured using pooled O acid-treated platelets by FCM was 77.2 and the %FPC using patient's own acid-treated platelets by FCM was 40.3. Green fluorescence histogram of pooled O acid-treated platelets incubated with FITC conjugated anti-human IgG (1), with serum of a healthy control (2), with serum of this patient with SLE (3). Green fluorescence histogram of patient's own acid-treated platelets incubated with FITC conjugated anti-human IgG (1'), with serum of a healthy control (2'), with serum of this patient with SLE (3').

抗血小板抗体陽性を認め、更に、この患者の血小板数とPBIgGの間に有意の負の相関を認めた。PBIgGと血小板減少に関しては免疫の関与している血小板減少患者の血清中のPB-IgGは、免疫の関与がないと考えられる血小板減少患者の血清中PBIgGに比し有意の上昇を示したというCourtら²¹⁾の報告以外にはみられず、今回著者の得たPBIgGと血小板数の間の有意の逆相関の成績は新しい知見と思われる。これは酸処理血小板とFCMを用いることにより、より感度よく、さらにより特異的な抗血小板抗体を測定し得たためと考えられた。

SLE患者血清中の抗血小板抗体が種々の方法により報告されているが、著者の成績のみみられたようにSLE患者の27例中21例に抗血小板抗体陽性を認めたというような高率の陽性値の報告は殆どみられなかった。これも著者の開発した抗血小板抗体測定法の感度のよさによるものと考えられた。しかし、抗血小板抗体陽性例21例の

中で血小板数が $100 \times 10^9 / \mu\text{l}$ 以下の血小板減少を示した例は2例にすぎず、SLE患者における抗血小板抗体と血小板減少との関わり、またこれらに加えて血小板回転についても今後の検討が必要であると思われた。

近年の血小板表面結合IgG (PAIgG) および血小板に結合する血清IgG (PBIgG) の測定法の進歩に比べて、これらの抗体が認識する血小板側の対応抗原に対する研究の報告は極めて少ない。Van Leeuwenら(1983)²²⁾はITP患者血清中に正常血小板とは結合するが血小板無力症患者血小板とは結合しない抗体の存在することを観察し、この抗体はGPIIbまたはGPIIIaに対する抗体であると推察し、ITP患者の自己抗体の対応抗原の多くはGPIIbもしくはGPIIIaであろうと報告した。その後、Woodsら¹³⁾¹⁴⁾、村上ら²³⁾、富山ら²⁴⁾によってITP患者血清中に低頻度ながら抗GPIIb抗体、抗GPIIb/IIIa complex抗体活性の認められるものが存在することが報告

されている。著者は ITP 患者について captured-ELISA 法で抗 GPIb 抗体, 抗 GPIIb/IIIa complex 抗体を検索し, ITP 患者 20 例中 7 例, 35% に, また % FPC が 20.0 以上の陽性値を示した患者のみについてその比率を求めると 11 例中 7 例, 即ち 67% に抗 GPIb 抗体を認めた。この成績は諸家の報告に比し高率であったが, その原因として 1) 使用したモノクローナル抗体 Ib1 が GPIb に強い affinity を持っている 2) 血小板処理中の血小板膜上の GPIb の分解を抑えた などのことが考えられる。また抗 GPIIb/IIIa complex 抗体について検討した結果 ITP 患者 20 例のうち 2 例に陽性値を認め, これは諸家の報告した成績と一致するものであった。今回の成績では ITP 患者血清中の抗血小板抗体は GPIIb/IIIa complex よりも GPIb を特異抗原にしている場合の方が多しと考えられるが, 今後さらに症例数を増やし検討する必要があると思われた。

SLE 患者についての血小板膜上の対応抗原部位に関する成績についての報告はさらに少なく殆どみられない。著者は SLE 患者 27 例のうち 4 例に抗 GPIb 抗体を, さらに 4 例に GPIIb/IIIa complex 抗体を認めた。このうち 1 例は両者ともに陽性であった。抗 GPIb 抗体を認めた 4 例中 2 例に, また抗 GPIIb/IIIa complex 抗体を認めた 4 例中 1 例(この 1 例は抗 GPIb 抗体も陽性)に血小板減少を認めた。この事よりこれら両者の抗体が SLE の部分症としての血小板減少に深く関与している可能性があると考えられた。

ITP 患者, SLE 患者ともに抗 GPIb 抗体陽性者, 抗 GPIIb/IIIa complex 抗体陽性例は % FPC が 20.0 以上の陽性値を示した例であった。この事からも, 著者が開発した酸処理血小板と FCM を用いた血清中の抗血小板抗体の測定法は, 抗血小板抗体をより特異的に検出し得ることが示唆された。

血小板膜上の対応抗原部位を検出する方法としてさらに Immunoblotting 法にて検討した。降旗ら²⁵⁾はこの方法にて ITP 患者 46 例中 20 例に分子量 15-160.0 Kd の対応抗原を同定している。しかし, 著者が ITP 患者 20 例について検討したところでは 1 例も同定し得ず, SLE 患者 27 例についても 1 例に分子量約 45 Kd のところに同定し得たのみである。Immunoblotting 法にて抗原部位を同定し得た SLE の 1 例は captured-ELISA 法にても抗 GPIb 抗体, 抗 GPIIb/IIIa complex 抗体ともに陽性で, 血小板数は $100 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 以下の減少を示した症例であり, 複数の抗原に対する抗体を有していると思われた。また, 自己血小板を用いて行った Immunoblotting 法および FCM を用いた方法にて検討した結果, これらの抗

体の一部は自己抗体である事が示唆され, これら抗体が患者の血小板減少に少なからず関与していると考えられた。今回の著者の検討において抗原部位を同定し得た症例数が少なかったことの原因としては検討した患者の症例数が少ないことに依るところが大きいと思われるが, 著者の開発した方法で求めた抗血小板抗体の特異性をさらに確実にするためには, 今後さらに患者の症例数を増やすとともに, Immunoprecipitation などの比較的血小板膜抗原が温存される方法で検討を加える必要があると思われた。

結 語

著者の開発した酸処理血小板と flow cytometry を用いて ITP 患者 20 例および SLE 患者 27 例について血清中の抗血小板抗体を測定した。さらに, これら抗体の血小板膜上の対応抗原部位について captured-ELISA 法および Immunoblotting 法にて検討し以下の結果を得た。

1) ITP 患者 20 例, SLE 患者 27 例の PBIgG 値はそれぞれ 44.7 ± 29.4 , 38.8 ± 23.9 (M \pm SD) であり, ともに健常人に比し有意の上昇を示した ($p < 0.01$)。また ITP 患者 20 例中 11 例が, SLE 患者では 27 例中 21 例が抗血小板抗体陽性者であった。

2) ITP 患者 20 例の PBIgG 値と血小板数は有意の負の相関を示した ($p = -0.6511$, $p < 0.01$)。

3) Captured-ELISA 法にて健常人 25 名の抗 GPIb 抗体活性, 抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性を測定し, cut off 値をそれぞれ 5.3%, 10.2% と決定した。

4) Captured-ELISA 法にて患者血清中の抗 GPIb 抗体および抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の活性を求めたところ, ITP 患者 20 例中 7 例に, SLE 患者 27 例中 4 例に抗 GPIb 抗体活性陽性を認めた。また ITP 患者の 2 例に, SLE 患者の 4 例に抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性陽性を認めた。これら患者の内 ITP 患者の 2 例, SLE 患者の 1 例は両抗体ともに陽性であった。

5) Immunoblotting 法にて SLE 患者の 1 例に分子量約 45 Kd の血小板膜部位を対応抗原と認識する抗体を証明した。更に, 患者の自己血小板を用いて Immunoblotting 法を行いこの抗体が自己抗体であることを証明した。

尚, 本論文の要旨は第 11 回日本血栓止血学会総会 (1988 年 12 月, 東京) および第 37 回日本輸血学会総会 (1989 年 5 月, 神戸) において発表した。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を戴いた第 2 内科学教室成田亘啓教授, 御校閲を賜った小児科学教室

福井 弘教授, 法医学教室廣田忠臣教授に深謝申し上げます。また研究の遂行について細部にわたり御指導戴いた輸血部 藤村吉博助教授, 第2内科学教室西川 潔助手に心から感謝いたします。また, 症例を御貸与戴いた本学皮膚科宮川幸子助教授, 第1内科土肥和弘講師に厚く御礼申し上げます。なお, 種々御援助いただいた輸血部部員および第2内科学教室の諸兄姉に感謝いたします。

文 献

- 1) **Harrington, W. J., Minnich, V., Hollingsworth, J. W. and Moore, C. V.:** Detection of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* **38**: 1-10, 1951.
- 2) **Shulman, N. R., Marder, V. J. and Weinrach, R. S.:** Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenic in idiopathic purpura. *Ann. New York Acad. Sci.* **124**: 499-542, 1965.
- 3) 藤村欣吾, 水野尚士, 安部勉, 蔵本淳: SLEとITP. 最新医学 **38**: 1350-1357, 1983.
- 4) **Kaplan, C.:** Antiplatelet antibodies in systemic lupus erythematosus: An overview. *Curr. tud. Hematol Blood Transf.* **55**: 90-93, 1988.
- 5) **Steffen, C.:** Results obtained with the antiglobulin consumption est and investigations of autoantibody eluates in immunohematology. *J. Lab. Clin. Med.* **55**: 9-28, 1960.
- 6) **Karpatkin, S. and Siskind, G. W.:** In vitro detection of platelet antibody in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. *Blood* **33**: 795-812, 1969.
- 7) **McMillan, R. J., Smith, R. S., Longmire, R. L., Yelenosky, R., Reid, R. T. and Craddock, C. G.:** Immunoglobulins associated with human platelets. *Blood* **37**: 316-322, 1971.
- 8) **Hirschman, R. J. and Shulman, N. R.:** The use of platelet serotonin release as a sensitive method for detecting antiplatelet antibodies and plasma antiplatelet factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **24**: 793-802, 1973.
- 9) 水本保子: Flow cytometry による同種および自己抗ヒト血小板抗体の解析 I. 酸処理後ホルマリン固定血小板を用いての抗体測定法の開発. 奈良医学雑誌印刷中
- 10) **安永幸二郎:** 特発性血小板減少性紫斑病の診断基準. 特発性血小板減少性紫斑病調査研究班, 昭和50年度業績報告書, p 461-463, 1976.
- 11) **Dubois, E. L.:** Differential diagnosis. Criteria for diagnosis and classification of systemic lupus erythematosus. *in* *Lupus Erythematosus* (Dubois, E. L., ed.). 2nd ed., University of Southern California Press Los Angeles, California, p534-536, 1976.
- 12) **Walsh, P. N., Millis, D. C. B. and White, J. G.:** Metabolism and function of human platelets washed by albumin density gradient separation. *Br. J. Haematol.* **36**: 281-296, 1977.
- 13) **Woods, V. L., Jr., Oh, E. H., Mason, D. and McMillan, R.:** Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood* **63**: 368-375, 1984.
- 14) **Woods, V. L., Jr., Kurata, Y., Montgomery, R. R., Tani, P., Mason, D., Oh, E. H. and McMillan, R.:** Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* **64**: 156-160, 1984.
- 15) **Laemmli, U. K.:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- 16) **Burnette, W. N.:** "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**: 195-203, 1981.
- 17) **Nel, J. D. and Stevens, K.:** A new method for simultaneous quantitation of platelet-bound immunoglobulin (IgG) and complement (C₃) employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. *Br. J. Haematol.* **44**: 281-290, 1980.
- 18) **von dem Borne, A. E. G. K., Helmerhorst, F. M., van Leewen, E. F., Pegels, H. G., von Riesz, E. and Engelfriet, C. P.:** Autoimmune throm-

- bocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* **45**: 319-327, 1980.
- 19) **Nomura, S., Nagata, H., Sone, N., Oda, K., Kokawa, T. and Yasunaga, K.**: Analysis of platelet antigen for anti-platelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura using flow cytometry. *Acta Haematol. Japn.* **51**: 118-129, 1988.
- 20) **Sugawara, S., Abo, T. and Kumagai, K.**: A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *J. Immunol. Method* **100**: 83-90, 1987.
- 21) **Court, W. S., Bozeman, J. M., Soong, S., Salch, M. N., Shaw, D. R. and LoBuglio, A. F.**: Platelet surface bound IgG in patients with immune and non immune thrombocytopenia. *Blood* **69**: 278-283, 1987.
- 22) **Van Leeuwen, E. F., Van der Ven, J. Th. M., Engelfriet, C. P. and von dem Brone, A. E. G.**: Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* **59**: 23-26, 1982.
- 23) **Murakami, H., Ikada, Y., Satoh, K., Toyama, K. and Watanabe, K.**: Antibodies against platelet major glycoproteins in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Keio. J. Med.* **34**: 153-160, 1985.
- 24) 富山佳昭, 金鎮敬, 本田繁則, 水谷肇, 椿尾忠博, 倉田義之, 米沢毅, 垂井清一郎: 慢性 ITP における抗 GPIb 抗体の検討. *臨床血液* **28**: 386-391, 1987.
- 25) 降旗謙一: 慢性特発性血小板減少性紫斑病における抗血小板対応抗原に関する研究. *慶応医学* **61**: 537-548, 1984.