

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

I. DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR DETECTION OF ANTI-PLATELET ANTIBODIES USING ACID TREATED AND FORMALIN FIXED PLATELETS

YASUKO MIZUMOTO

The 2nd Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received May 31, 1989

Summary : Flow cytometry (FCM) has recently been used to determine the epitopes of mouse monoclonal antibodies against platelets glycoproteins (GP). However, the utilization of this technique to detect the autologous anti-platelet antibody has been limited, because a high frequency of non-specific reaction has been observed in serum from healthy individuals. One reason for this has been thought to be related to the surface bound HLA antigens. To overcome this problem I have used acid treatment of platelets. The platelet pellets prepared by albumin density gradient separation were first treated with 0.123 M citric acid- Na_2HPO_4 , pH 3.0 for 10 min. at 0°C followed by formalin fixation. Using these platelets, the percentage of fluorescence positive cells (%FPC) for HLA-A, B, C antigens markedly decreased from 97.0 to 21.3, whereas that for platelet surface IgG slightly decreased from 40.4 to 28.8. On the other hand, %FPCs of platelet GPIb and GPIIb/IIIa complex remained almost unchanged, suggesting that the respective epitopes remain intact. The level of platelet bound IgG (PBIgG) of healthy adults and the multi transfused patients were determined. For healthy adults (n=10), the %FPC was 46.5 ± 10.7 (mean \pm SD) before treatment, and 10.3 ± 2.9 after treatment. Thus the %FPC after acid treatment were significantly decreased. In multi transfused patients (n=5), the %FPCs were almost unchanged before and after acid treatment, from 86.6 ± 21.3 to 84.3 ± 25.6 .

The average %FPC value in 50 healthy adults (25 males and 25 females) was 12.6 ± 6.6 and the cut off value was 20.0.

These results clearly indicate that acid treatment of platelets increases the availability and specificity for the detection of allo and autologous anti-platelet antibodies.

Index Terms

acid-treatment, flow cytometry, anti-platelet antibody, %FPC

緒 言

血小板組成に対する自己あるいは同種抗体の出現により血小板減少が惹起されうることは特発性血小板減少性紫斑病, 全身性紅斑性狼瘡, 新生児血小板減少性紫斑病, 輸血後紫斑病などの観察で明らかにされてきた^{1)~4)}. これらの疾患のうち特発性血小板減少性紫斑病を中心とした血小板抗体の検出は1960年代から血小板凝集試験, 補体結合試験, 抗グロブリン試験, 放出試験などが用いられてきたが, そのいずれも感度は低く, 同種抗体の検出率に比べ抗血小板自己抗体の検出率は低い欠点があった^{5)~8)}. 近年, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) あるいは immunofluorescence test (IFT) により, 自己の血小板に結合している IgG (platelet associated IgG, PAIgG) や, 同種血小板に結合しうる血清中の IgG (platelet bound IgG, PBIgG) の微量検出法が開発され^{9)~14)}, 血小板抗体の解析は著しく進展した.

一方, Herzenberg ら¹⁵⁾(1976)によって, fluorescence activated cell sorter (FACS) が開発され, 細胞を特異性の高い抗体を用いて蛍光標識し, FACS で解析することにより細胞表面抗原の状態を定量的に検討することが可能となり, さらに最近, cell sorter なしの flow cytometry 装置が作製され, 各種細胞表面抗原の検討が迅速に行えるようになった.

血小板膜表面の構成組成についてもモノクローナル抗体を用い FACS による解析が進みつつある. 血小板膜表面には自己抗原をはじめとして, ABO 式血液型, 血小板特有抗原および白血球抗原である HLA クラス I 抗原 (HLA-A, B および C) も存在していることが知られている¹⁶⁾. HLA 抗原の不適合により生じた抗体は血小板減少惹起の要因の一つと考えられている. Flow cytometry ではその感度のよさから血小板特異抗体のみならず, HLA-A, B, C に対する抗体も検出している可能性が大きく, 特異抗体の検出には血小板表面より HLA-A, B, C 抗原の除去が必要である. 菅原ら¹⁷⁾(1987) はリンパ球を酸処理しその表面より HLA-A, B, C 抗原を除去し得たことを報告した. 今回著者は血小板に酸処理法を行い, 酸処理の血小板に対する影響として主に血小板表面の HLA-A, B, C 抗原および血小板膜糖蛋白 (glycoprotein, GP) Ib, および GPIIb/IIIa complex

と血小板膜表面の IgG の変化につき検討した. 更にこの酸処理血小板と flow-cytometric analysis とを用いることにより, 抗血小板抗体, 特に PBIgG をより特異的に検出する方法を開発したので報告する.

材料および方法

1. 血小板の分離, 酸処理および固定: 下記の順序で行った.

1) 血小板の分離: O型健康人男性10名より acid citrate dextrose (ACD, pH 4.5) 液と全血を各々1:5の割合で採血し, 続いて2,300回転(1,000g)で40秒間遠心し上清を採取した. 同様の遠心を更に2回繰り返して platelet rich plasma (PRP) をえた. 採取した PRP を Walsh ら¹⁸⁾のアルブミン勾配遠心法にて洗浄した. 即ち, 平底試験管に下層より 290~320 mOsm に調製した仔牛血清アルブミン原液 (bovine serum albumin (BSA), Fraction V, Calbiochem, La Jolla, CA) 0.3 ml, Ca-free Tyrode's buffer (pH 6.5) にて2倍希釈した BSA 0.3 ml, および3倍希釈した BSA 0.3 ml を重層し, 上の2層を静かに攪拌した. その上に終濃度 5 U/ml となる Apylase (Sigma Chem, St. Mo) を添加した PRP を静かに重層し, 2,300回転(1,000g)15分間遠心し上清を除去し血小板沈渣を得た. 続いて得られた血小板沈渣を Ca-free Tyrode's buffer (pH 6.5) で再浮遊し終濃度 1 U/ml となるように Apylase を添加し上記と同様の遠心を行い血小板沈渣を得た. 更に得られた血小板沈渣を再び Ca-free Tyrode's buffer (pH 6.5) に浮遊し, 終濃度 0.2 U/ml となるように Apylase を加え, 同様の遠心操作を繰り返すことにより洗浄血小板沈渣をえた.

2) 血小板酸処理方法および固定: 氷槽中で, 1)で得られた洗浄血小板沈渣に 0.236 M citric acid と 1% BSA を含んだ 0.123 M Na₂HPO₄ を等量に混合したクエン酸リン酸緩衝液 (pH 3.0) 1 ml を注入し, 10分間ポリスチレンディスポーザブルビベットでゆっくりと攪拌し, その後 0.1 M citrate buffer (pH 6.4) 12 ml を加え溶液の pH を 6.4 に上昇せしめた. 次いで終濃度 1% となるようにホルマリンを加え 37°C 30分間 incubation 後 4°C にて一夜保存固定した. 翌日, 0.02% NaN₃ を含んだ phosphate buffered saline (PBS) にて3回洗浄後, 同様の溶媒にて再浮遊させ解析に用いるまで 4°C

にて保存した。なお、対照血小板としては酸処理を行わず1)の方法で得られた洗浄血小板をホルマリン固定したものを用いた。

2. 血小板表面の HLA-A, B, C 抗原および膜表面糖蛋白 GPIb, IIb/IIIa complex の測定: 上記方法で酸処理後, ホルマリン固定した血小板, および酸処理をせずホルマリン固定した血小板それぞれ 10^6 個と HLA-A, B, C に対するモノクローナル抗体である clone W6/32 (Serotec, Kidlington, Oxford), GPIb に対するモノクローナル抗体 Ib1 あるいは GPIIb/IIIa complex に対するモノクローナル抗体 CP 8 (Dr. Zimmerman, Scripps Clinic and Research Foundation, La Jolla, CA 供与) をそれぞれ 37°C 30 分間反応させた。0.5 M LiCl

を含んだ 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.3) にて 2 回洗浄後, 更に 0.02% NaN_3 PBS にて 1 回洗浄し血小板沈渣を得た。この血小板沈渣に 2 次抗体として 20 倍希釈した FITC 標識抗マウス IgG (TAGO, Burlingame, CA) を室温にて 30 分間反応させた。上記と同方法にて 3 回洗浄後, 得られた血小板沈渣を 500 μl の PBS に浮遊後, FITC 蛍光陽性率 (% of Fluorescence Positive Cells: % FPC) を FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA) にて測定した。%FPC の検出方法の詳細は 5. に述べるが, HLA-A, B, C および GPIb, GP IIb/IIIa complex の抗原量は %FPC としてあらわした。

3. 血小板表面 IgG 量の測定: 血小板表面 IgG 量に

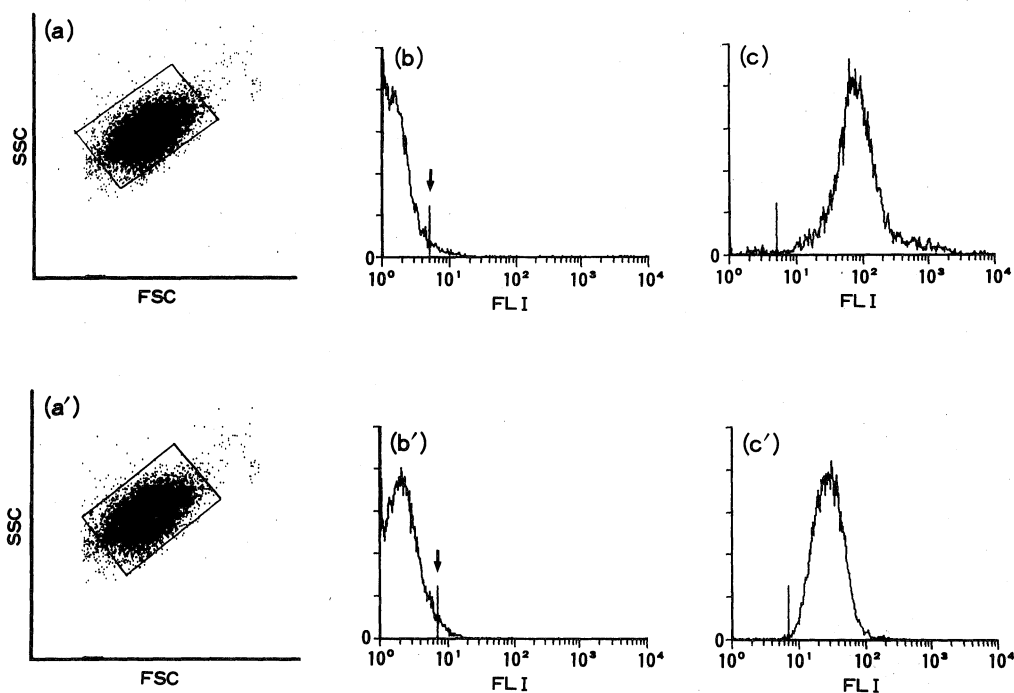


Fig. 1. The measurement of %FPC of HLA-A, B, C antigens, GPIb, GPIIb/IIIa complex and PBIgG.

(a) (a'); Dot blots of platelets stained with FITC-conjugated anti-mouse IgG (a) or anti-human IgG (a') with FSC indicated on the x-axis. A rectangular gate was setted. (b) (b'); The histogram of the gated platelets. The relative fluorescence intensity (FLI) is indicated on the x-axis and cell number on the y-axis. A marker (straight line) was setted. (c) (c'); The histogram of the platelets stained with FITC-conjugated anti-mouse IgG (c) or anti-human IgG (c') after incubation with a monoclonal antibody (c) or tested serum (c'). %FPC was measured as % of cells that had higher fluorescence intensity than the setted marker.

ついて上記と同様、酸処理後ホルマリン固定血小板および非酸処理ホルマリン固定血小板を用いて検討した。それぞれの血小板 10^6 個と20倍希釈したFITC標識抗ヒトIgG(F(ab')₂, TAGO, Burlingame, CA)を室温にて30分間反応させた後、0.5 M LiCl Tris-HCl buffer および0.02% NaN₃ PBSにて洗浄後、得られた血小板沈渣を500 μ lのPBSに浮遊後、%FPCをFACScanにて測定して、血小板表面IgG量とした。

4. 健常人血清中の抗血小板抗体(PBIgG)の測定：健常人男性10名、および頻回の血小板輸血歴のある血液疾患患者5名について酸処理後ホルマリン固定血小板および非酸処理ホルマリン固定血小板の両者に対して検討した。酸処理後ホルマリン固定血小板および非酸処理ホルマリン固定血小板 5×10^6 個に、56°C30分間にて非動化させた被験血清20 μ lと、PBS 180 μ lを37°C30分間反応させた。次いで0.5 M LiCl. Tris-HCL bufferで2回、更に0.02% NaN₃. PBSにて1回洗浄した。得られた血小板沈渣に2次抗体として20倍希釈したFITC標識抗ヒトIgGを室温にて30分間反応させた。上記と同様に洗浄し、血小板沈渣を500 μ lのPBSに再浮遊後、%FPCをFACScanにて測定しPBIgG値として表した。

更に、健常人男性25名、女性25名の血清について酸処理後ホルマリン固定した血小板を用いてPBIgGを測定した。

5. FITC 蛍光陽性率(%FPC)の検出方法：下記の2方法による。

1) 間接蛍光抗体法の場合：血小板表面の HLA-A,

B, Cならびに GPIb, GPIIb/IIIa complex の抗原量および PBIgG 値を表わす %FPC の検出方法は次の如くである。まず、2次抗体である FITC 標識抗マウス IgG を反応させた血小板 10^4 個について Fig. 1(a)に示すような dot blot を描き、右上方に現われる血小板凝集塊及び左下方に現われる血小板 debris を除外し図の如く血小板集団に gate を設定し、この gate 内の血小板を解析に用いた。同様に FITC 標識抗ヒト IgG のみを反応させた血小板について Fig. 1(a')の如く dot blot を描いて gate 内の血小板を解析した。gate 内の血小板について Fig. 1(b)(b')に示すように縦軸に度数を横軸には FITC 蛍光強度を対数で表した histogram を作成し、常法によりこの %FPC が 4~5 となる場所に marker を設定した。Fig. 1(b)(b')では縦の実線として表わした。次いで、モノクローナル抗体および被験血清を反応させたのちに2次抗体を反応させた血小板 10^4 個についても同様に gate を設定後、gate 内の血小板について Fig. 1(c)(c')に示したような histogram を作成した。この histogram において Fig. 1(b)(b')で設定された marker より高い蛍光を示す細胞の割合を %FPC とした。Fig. 1(a)(b)(c)は血小板膜糖蛋白 GPIb による血小板 dot blot, 及び histogram を Fig. 1(a')(b')(c')は flow cytometry にて血清中の抗血小板抗体が強陽性を示した者の % FPC を検出した際の血小板 dot blot 及び histogram を実例として示した。

2) 直接蛍光抗体法の場合：血小板表面上 IgG 値を表わす %FPC の検出方法は以下に述べる如くである。まず、Fig. 2(a)に示した何とも反応させていない血小板

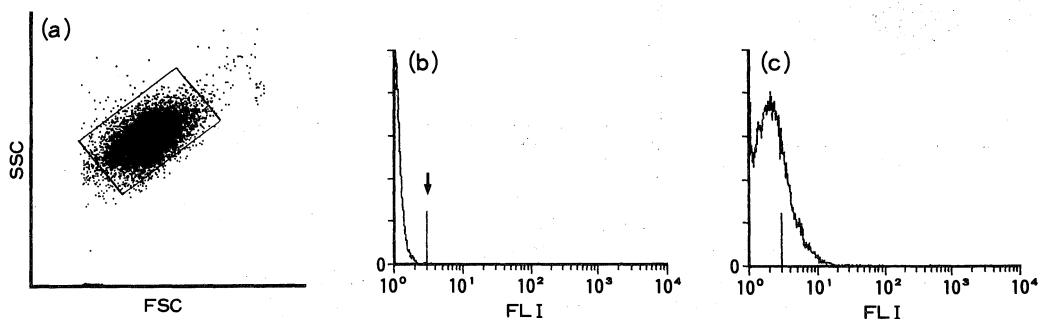


Fig. 2. The measurement of %FPC of platelet surface IgG. (a); Dot blot unstained platelets. A rectangular gate was setted. (b); The histogram of gated unstained platelets. A marker was setted on the point that was the highest autofluorescence of platelets. (c); The histogram of the platelets stained with FITC-conjugated anti-human IgG. %FPC was measured as % of cells that had higher fluorescence intensity than the setted marker.

10⁴個について5. 1)と同方法にて Fig. 2(b)に示した血小板 histogram を作成し, その autofluorescence (自家蛍光) に marker を設定した. ついで, Fig. 2(c)に示した FITC 標識抗ヒト IgG を反応させた血小板 histogram を描き, この histogram で autofluorescence より高い蛍光を示す細胞の割合を %FPC とした. なお, 検定は student t test を用いた.

結 果

1. 酸処理による血小板表面 HLA-A, B, C 抗原量, GPIb および GPIIb/IIIa complex の変化

O型健康成人より採取した1例の洗浄後ホルマリン固定した血小板を抗 HLA-A, B, C モノクローナル抗体の clone W6/32, 次いで FITC 標識抗マウス IgG と反応後, FACScan を用いた flow cytometric analysis で FITC 陽性率(%FPC)を測定したところその histogram は Fig. 3(a)の如くで %FPC で求めた HLA-A, B, C は 97.0 であった.

一方, 洗浄後クエン酸処理を行いホルマリン固定した血小板についての HLA-A, B, C 抗原の histogram は Fig. 3(b)の如く左に偏位し %FPC は 21.3 であった.

O型健康成人男性10名についての非酸処理ホルマリン固定血小板による HLA-A, B, C の FITC 蛍光陽性率(%FPC)は 96.5±8.7 (mean±SD) であった. 一方, 酸処理後ホルマリン固定血小板を用いて求めた %FPC は 20.2±3.5 と著明な減少をみとめた.

Fig. 4(a)に示した洗浄後ホルマリン固定血小板の GPIb の %FPC は 99.0 で, 一方, Fig. 4(b)に示した酸処理後ホルマリン固定血小板では GPIb の %FPC は 98.3 と差異を認めなかった. また, Fig. 4(c)に示した非酸処理後ホルマリン固定血小板中の GPIIb/IIIa complex の %FPC は 98.5 で, 一方, Fig. 4(d)に示した, 酸処理後ホルマリン固定血小板の GPIIb/IIIa complex の %FPC は 98.7 と差を認めなかった.

2. 酸処理による血小板表面 IgG 量

O型健康成人男性10名の非酸処理ホルマリン固定血小板における血小板表面 IgG 量を FITC 標識抗ヒト IgG で標識後 flow cytometry で %FPC を求めたところ 38.4±10.4 であった. 酸処理後ホルマリン固定した血小板を用いて求めた IgG 量は 25.8±5.6 と軽度に減少した. この血小板 histogram を Fig. 5(a)(b)に示したが (b)の histogram は(a)の histogram に比し僅かに左側へ偏位した.

3. 酸処理による血小板への血清 IgG の結合能

正常人よりの platelet rich plasma を洗浄後にホルマリン固定した非酸処理血小板サンプルに正常人10名より採取した血清を添加し, 37°C 30分反応後血小板を洗浄し, FITC 標識抗ヒト IgG を30分反応せしめた後, 血小板結合 IgG (PBIgG) 量を flow cytometry で測定した. この PBIgG 値は 39.4 から 50.7 (46.5±10.7) と高値を示した. 一方, 酸処理後ホルマリン固定した血小板を用いて求めた PBIgG 値は 7.8 から 16.0 (10.3±2.9)

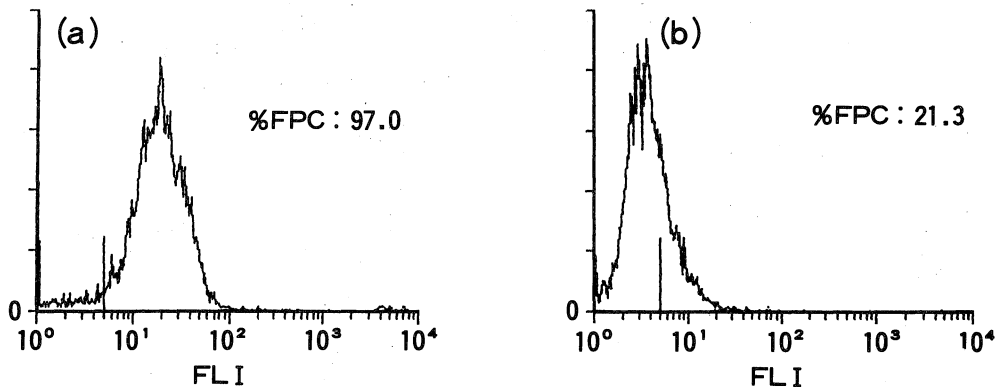


Fig. 3. The change of platelet surface HLA-A, B, C antigens by acid-treatment.

The histogram of NATFFP (Not Acid Treated, Formalin Fixed Platelet)(a) and ATFFP (Acid Treated, Formalin Fixed Platelet)(b) stained with FITC-conjugated anti-mouse IgG after incubation with W6/32.

The histogram of ATFFP was markedly shifted to left and %FPC was decreased from 97.0 to 21.3.

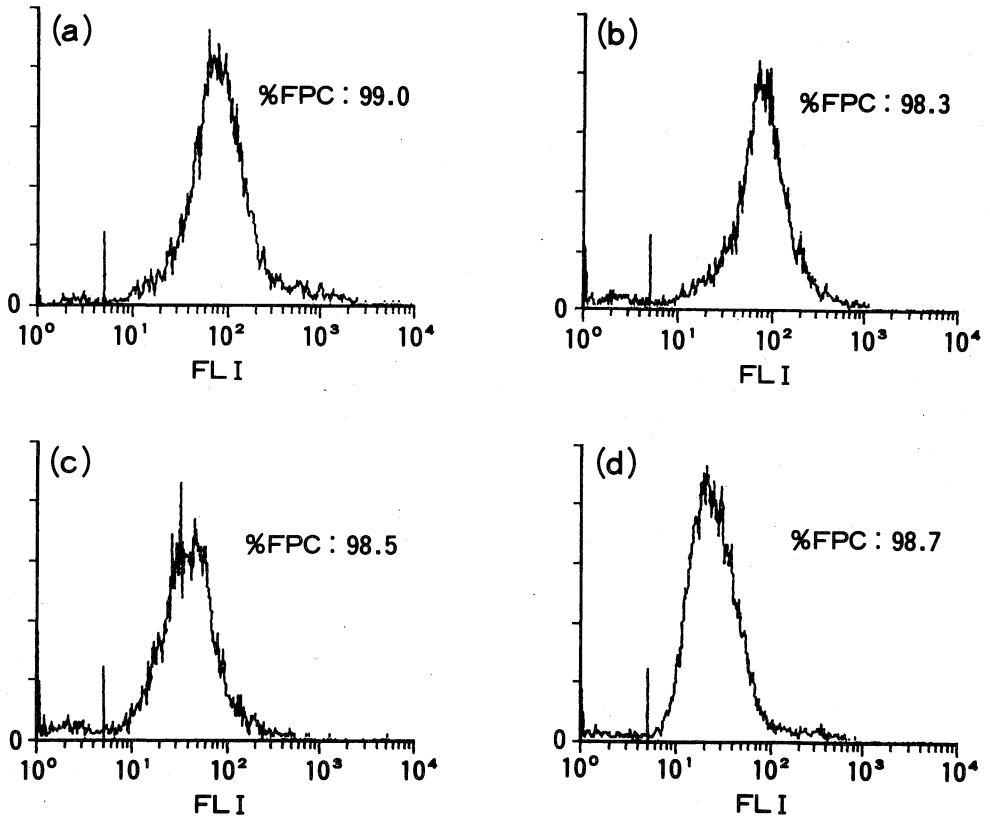


Fig. 4. The change of platelet surface GPIb and GPIIb/IIIa complex by acid-treatment. Green fluorescence histograms display of NATFFP or ATFFP incubated with Ib1 and CP8. (a); NATFFP incubated with Ib1. (b); ATFFP incubated with Ib1. (c); NATFFP incubated with CP8. (d); ATFFP incubated with CP8. %FPC of GPIb and GPIIb/IIIa complex remained almost no changed.

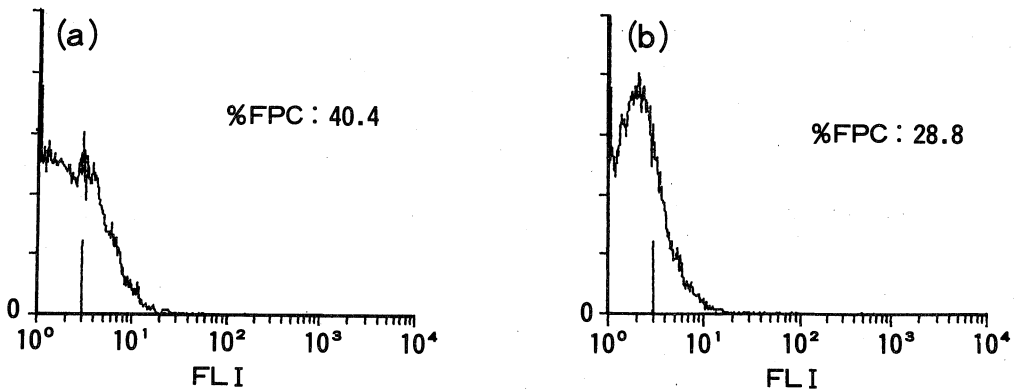


Fig. 5. The change of platelet surface IgG by acid-treatment. The histogram of NATFFP (a) and ATFFP (b) stained with FITC-conjugated anti-human IgG. The histogram of ATFFP was slightly shifted to left and %FPC of IgG was slightly decreased after acid-treatment.

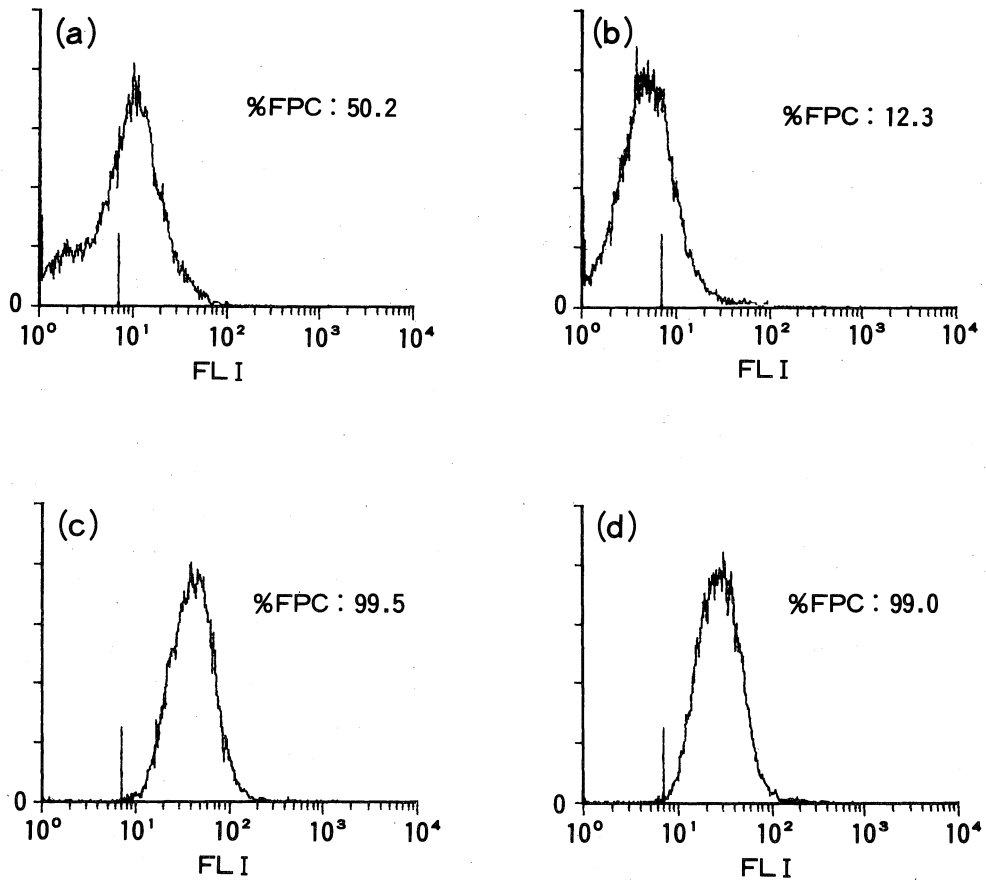


Fig. 6. The change of PBIgG by acid-treatment.

Green fluorescence histograms of NATFFP or ATFFP incubated with tested serum of a healthy adult or of a patient with several transfused of platelets. (a)(b): NATFFP (a) and ATFFP (b) incubated with tested serum of a healthy adult. (c)(d); NATFFP (c) and ATFFP (d) incubated with tested serum of a patient. %FPC of PBIgG in healthy adults were decreased after acid-treatment.

と酸処理をしない血小板を用いた時に比し有意の減少をみとめた ($p < 0.01$). その典型的な 1 例を Fig. 6(a)(b) に示した。

しかし、頻回の血小板輸血歴があり lymphocytotoxicity test (LCT) あるいは mixed passive haemagglutination (MPHA) 陽性で血小板輸血効果のみられない血液疾患患者 5 名については、その PBIgG 値は、非酸処理および酸処理血小板のどちらを用いてもとめても、それぞれ 98.5 から 69.5 (86.6 ± 21.3), また 98.7 から 59.8 (84.3 ± 25.6) と差をみとめなかった。

その典型的な 1 例を Fig. 6(c)(d) に示した。

更に、健康人 1 名、前述の血液疾患患者 1 名について、酸処理後ホルマリン固定血小板を用いて 5 日間の日差変動を検討したところ、それぞれ 10.2 ± 1.2 , 96.3 ± 5.4 と良好な再現性をみとめた。

4. 健康成人の PBIgG 値

酸処理後ホルマリン固定血小板を用い上記の如く flow cytometry で求めた健康成人男性 25 名、女性 25 名の PBIgG 値は Fig. 7 に示した如くであり、男性は 7.2 から 13.6 の間にあり、平均では 10.2 ± 1.7 、女性では 8.6

考 察

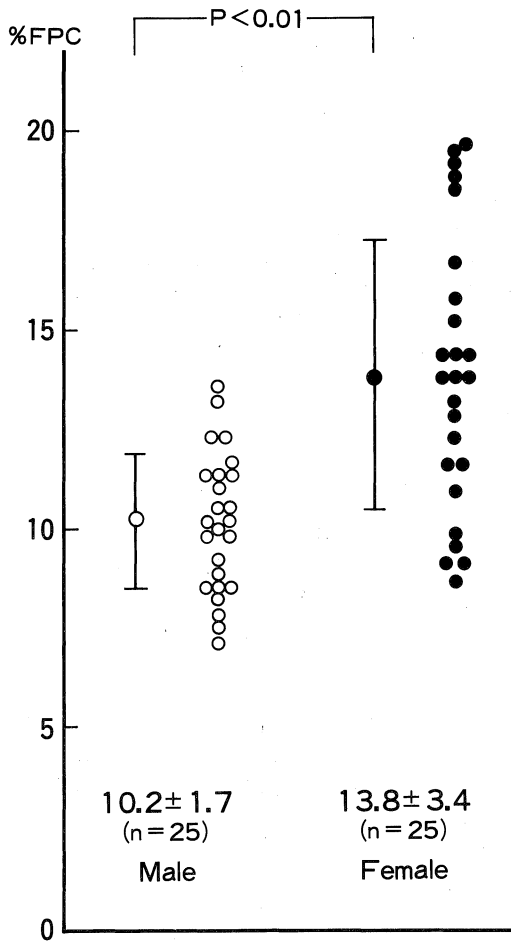


Fig. 7. %FPC of PBIgG in 25 males and 25 females.

The %FPC in 50 healthy adults were determined using ATFFP. The mean ± SD was 10.2 ± 1.7 for male, and 13.8 ± 3.4 for female. The %FPC of female was significantly higher than that of male. The average value was 12.0 ± 6.6. Thus, the cut off value was 20.0.

から 19.5 の値を示し、平均では 13.8 ± 3.4 であった。また、女性の PBIgG 値は男性に比し有意の上昇をみとめた (p < 0.01)。これら健康人 50 名の PBIgG 値は 12.0 ± 3.3 であった。健康人 50 名の PBIgG 値の平均 + 2 SD と女性 25 名の上限值を考えあわせ 20 を cut off 値と設定した。

近年、特異性の高い抗体を用いて細胞を蛍光染色し、flow cytometry 装置により細胞表面の抗原解析が比較的容易に且つ迅速に行えるようになった。血小板膜表面の抗原 epitope、構成組成の解析もモノクローナル抗体を用いた flow cytometry で進められている。

また、血小板膜表面に結合している免疫蛋白 (Immunoglobulins, Igs) についても flow cytometry による検討がなされている¹³⁾¹⁴⁾。著者も、洗浄後ホルマリン固定正常血小板を用い、これに結合する自己あるいは同種抗血小板抗体を有すると思われる患者血清中の IgG 即ち、Platelet bound IgG (PBIgG) を flow cytometry で測定することを試みた。しかし、予備検討段階で正常血清を用いた場合も明かな蛍光陽性像を示すことを観察した。これは血清蛋白が非特異的に血小板膜表面に吸着しないし結合することによると考えられ、血清中の抗血小板特異抗体の検出にあたり、このような血清中蛋白の非特異的吸着ならびにすでに血小板膜表面に非特異的に吸着されている抗原、あるいは蛋白の影響を除去するために血小板膜表面の処理方法の検討が必要と思われた。

血小板膜表面には粘着、凝集惹起物質に対する受容体機能をもつ諸種の糖蛋白 (GPIa, Ib, IIB/IIIa complex, IV など) が固有成分として存在しているが、血小板特有抗原、自己抗原および白血球抗原である HLA-A, B, C など存在している。菅原ら¹⁷⁾(1987)は cytotoxic T リンパ球 (CTL) や Natural Killer (NK) 細胞などの機能的特異性を知る目的でリンパ球を酸処理すると、これら細胞表面の HLA-A, B, C 抗原が殆ど除去しうることを報告した。著者は血小板表面の非特異的吸着抗原あるいは蛋白を除去し、自己あるいは同種抗体をより特異的に検出することを目的とし、血小板をクエン酸リン酸緩衝液で処理後ホルマリンで固定し、この処理血小板表面上の同種抗体の主な抗原となる HLA-A, B, C 抗原、血小板膜糖蛋白 GPIb, GPIIb/IIIa complex および血小板膜表面 IgG について検討した。酸処理後ホルマリン固定血小板浮遊液を抗 HLA-A, B, C モノクローナル抗体を反応後、二次抗体の FITC 標識抗マウス IgG で反応せしめ、FITC 蛍光陽性率 (%FPC) を flow cytometry で測定し、HLA-A, B, C 抗原量として表現した。O 型健康人男性 10 名についての非酸処理ホルマリン固定血小板の %FPC は 96.5 ± 8.7 であったが酸処理後ホルマリン固定血小板では 20.2 ± 3.5 と著しく減少した。これに対し、血小板膜固有の組成である GPIb および GPIIb/IIIa complex 抗原の酸処理による影響を抗

GPIb モノクローナル抗体ならびに抗 GPIIb/IIIa complex モノクローナル抗体を用い、flow cytometry による %FPC を検討したところ非酸処理ならびに酸処理のホルマリン固定血小板表面の %FPC は両者ともに全く変化を認めなかった。これは酸処理にても ADP, collagen, ristocetin による血小板凝集能には変化を認めなかったという 1988 年の倉田ら¹⁹⁾の報告と一致するものである。また、非酸処理あるいは酸処理血小板に FITC 標識抗ヒト IgG を反応させた直接蛍光抗体法により血小板表面上の IgG 量を %FPC で求めたところ、酸処理血小板での IgG 量は非酸処理血小板でのそれより軽度減少することを認めた。この減少は非酸処理血小板に非特異的に結合していた IgG の除去によるものと推察された。これらの所見から正常血小板膜表面固有の糖蛋白質は酸処理によって影響をうけないが、膜表面上の HLA-A, B, C および特異的抗血小板抗体ではなくて非特異的に吸着ないし結合した IgG の多くは酸処理で除去されるものと考えられた。従って血清中に生じた抗血小板抗体の測定にあたり、酸処理血小板は非酸処理血小板に比して血清蛋白の非特異的吸着の影響がより少なく、かつ、血清中の特異的抗血小板抗体の吸着、結合がより高められうる可能性が想定された。

そこで著者は、健康人男性 10 名と頻回の血小板輸血歴のある血液疾患患者 5 名について非酸処理および酸処理後ホルマリン固定血小板を用いてこれらの PBIgG を測定し %FPC として表わしたところ、患者 5 名では非酸処理血小板を用いた場合は 86.6 ± 21.3 、また、酸処理血小板を用いた場合には 84.3 ± 25.6 とほとんどその差をみとめなかった。一方、健康人 10 名においてはその %FPC はそれぞれ 46.5 ± 10.7 および 10.3 ± 2.9 と酸処理血小板を用いて求めた %FPC は非酸処理血小板を用いて求めたものに比し著しく減少した。酸処理血小板を用いることにより %FPC が減少したことについては以下のことが考えられる。1) 酸処理により血小板上 HLA-A, B, C 抗原量が著しく減少した、2) 血小板上 IgG 量が減少した。3) 血小板上で起こる非特異的な免疫反応を抑制した、などである。酸処理血小板を用いることにより健康人の PBIgG 値を減少させた一方において、特異的免疫反応(真の PBIgG 値)には変化をみとめなかった。以上より flowcytometric analysis を用いた PBIgG の測定において酸処理ホルマリン固定血小板は優れた基質になり得ると考えられる新しい知見を得た。この酸処理後ホルマリン固定血小板を用いて健康人男性 25 名、女性 25 名の PBIgG 値を測定したところ、女性が男性に比し有意の上昇をみとめた。女性が男性に比し有

意の上昇をみとめた原因については、1) 妊娠歴がある、2) 血清中 IgG 値が男性に比し高い、などが考えられるが、今回の検討では妊娠歴のない女性を対象にしているためまず 1) は否定できる。また、同一の対象を用いて血清中 IgG 値を測定したところ男性では 1617.9 ± 189.5 mg/dl、女性では 1502.7 ± 453.1 mg/dl で両者に差はみとめられず 2) についても考えられず、現在のところ女性により高い PBIgG 値をみとめたことの原因は不明であり、今後の検討が必要であると考ええる。

結 語

血小板に酸処理を行い、この酸処理法の血小板に及ぼす影響として血小板表面の HLA-A, B, C 抗原, GPIb, GPIIb/IIIa complex および IgG 量の変化について検討した。

更に、酸処理後ホルマリン固定正常ヒト血小板を用いての flow cytometry 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方法を開発し、以下の結果を得た。

1) 酸処理を行なった血小板表面上の HLA-A, B, C 抗原量は著減した。

2) 酸処理を行なっても血小板の膜表面糖蛋白 GPIb および GPIIb/IIIa complex は変化しなかった。

3) 酸処理を行なった血小板表面上の IgG 量は軽度減少した。

4) 酸処理後ホルマリン固定した血小板を用いて PBIgG を測定したところ、頻回血小板輸血歴のある血液疾患患者 5 名については非酸処理後ホルマリン固定血小板を用いた時に比し、その %FPC は変化しなかったが、健康人男性 10 名においては、その %FPC は著減した。

5) 酸処理後ホルマリン固定血小板を用いて求めた健康人 50 名の PBIgG 値は平均 12.0 ± 3.3 であった。ただし男性は 10.2 ± 1.7 、女性は 13.8 ± 3.4 と女性が有意に高値を示した ($p < 0.01$)。従って、50 名の mean \pm 2SD および女性の上限值を考えあわせ健康人 PBIgG 値の cut off 値を 20.0 と設定した。

以上より、酸処理した血小板は血清蛋白の非特異的吸着などの影響を少なくしうると想定され、flow cytometry を用いての抗血小板抗体の検出に有用な素材であると考えられた。更に、それを用いて健康人の PBIgG 値の cut off 値を設定することができた。

尚、本論文の要旨は第 11 回日本血栓止血学会総会(昭和 63 年 12 月、東京)にて発表した。

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 潔助手に對し心から感謝いたします。なお, 種々御援助いただいた輸血部部員および澤木政好講師をはじめ第2内科学教室の諸兄姉に感謝いたします。

VI 文 献

- 1) **Harrington, W. J., Sprague, C. C., Minnich, V., Moore, C. V., Aulvin, R. C. and Dubach, R.:** Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann. Intern. Med.* **38**: 443-469, 1953.
- 2) 藤村欣吾, 水野尚士, 安部 勉, 蔵木 淳: SLE と ITP. *最新医学* **38**: 1350-1357, 1983.
- 3) **Kaplan, C.:** Antiplatelet antibodies in systemic lupus erythematosus: An overview. *Curr. tud. Hematol. Blood Transf.* **55**: 90-93, 1988.
- 4) **Soulier, J. P., Patereau, C., Gobert, N., Achach, P. and Muller, J. Y.:** Posttransfusional immunologic thrombocytopenia. *Vox. Sang.* **37**: 21-19, 1979.
- 5) **Steffen, C.:** Results obtained with the antiglobulin consumption test 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) **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.
- 10) **von dem Borne, A. E. G. K., Verheugt, F. W. A., Oosterhof, F., von Riesz, F., de ra Riviere, A. B. and Engelfriet, C. P.:** A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br. J. Haematol.* **39**: 195-207, 1978.
- 11) **von dem Borne, A. E. G. K., Helmerhorst, F. M., van Leeuwen, E. F., Pegels, H. G., von Riesz, E. and Engelfriet, C. P.:** Autoimmune thrombocytopenia: Detection of platelet autoantibodies with the suspension immunofluorescence test. *Br. J. Haematol.* **45**: 319-327, 1980.
- 12) 林 悟, 青地 寛, 永峰啓丞, 押田真知子, 倉田義之: 血小板固相化プレートによる血清中の抗血小板抗体測定法の検討. *臨床病理* **34**: 162-166, 1986.
- 13) **Lazarchick, J. and Hall, S. A.:** Platelet-associated IgG using flow cytometric analysis. *J. Immunol. Method* **87**: 257-265, 1986.
- 14) **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. Jpn.* **51**: 118-129, 1988.
- 15) **Herzenberg, L. A. and Sweet, R. G.:** Fluorescence-activated Cell Sorting. *Sci. Am.* **234**: 108-117, 1976.
- 16) 倉田義之, 押田真知子: 輸血と HLA. *総合臨床* **35**: 2813-2818, 1986.
- 17) **Syngawara, 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.
- 18) **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.
- 19) 倉田義之, 押田真知子, 青地 寛, 永峰啓丞, 林 悟, 古林孝保, 富山圭昭: 酸処理による細胞表面の HLA クラス I 抗原の除去に関する検討. *日本輸血学会雑誌* **34**: 213, 1988.