◆原 著◆

Flow Cytometry を用いた血清中血小板結合性 IgG の 測定における血小板酸処理法の有用性

—特発性血小板減少性紫斑病患者における検討—

水 本 保 子^{*1} 西 川 潔^{*1} 藤 村 吉 博^{*2}
森 井 武 志^{*1} 成 田 亘 啓^{*1} 福 井 弘^{*2}
倉 田 義 之^{*3}

Acid Treatment of Platelets Increases the Specificity for the Detection of Platelet Binding IgG in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura by Flow Cytometry

Yasuko MIZUMOTO^{*1}, Kiyoshi NISHIKAWA^{*1}, Yoshihiro FUJIMURA^{*2},
Takeshi MORII^{*1}, Nobuhiro NARITA^{*1},
Hiromu FUKUI^{*2} and Yoshiyuki KURATA^{*3}

Key words: acid treatment, flow cytometry, PBIgG, captured-ELISA, ITP

Flow cytometry has recently been used to determine the characterization of platelet surface membrane. However, the utilization of this technique to detect the platelet binding IgG (PBIgG) has been limited, because a high frequency of non-specific reaction has been observed on the platelet membranes when reacted with sera from healthy individuals. One reason for this may be related to the surface bound HLA-A, B, C. To overcome this problem we have used the method of acid treatment of platelets. The platelet pellets prepared by albumin density gradient separation were first treated with 0.123M citric acid- Na_2HPO_4 , pH 3.0, for 10 min on ice, followed by formalin fixation. In the present study we have performed the flow cytometry analysis and have used the parameter, delta mean fluorescence intensity channel number (Δ MFI) which corresponds to the relative amounts of antigens on the platelet membrane. By acid treatment of platelets, Δ MFI for HLA-A, B, C markedly reduced. Δ MFI for platelet surface IgG also reduced. Then, the levels of

^{*1} 奈良県立医科大学第二内科学教室〔〒634 橿原市四条町840〕; The Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Kashihara City, Nara, Japan.

^{*2} 奈良県立医科大学付属病院輸血部〔〒634 橿原市四条町840〕; Department of Blood Transfusion, Nara Medical University Hospital.

^{*3} 大阪大学医学部付属病院輸血部〔〒553 大阪市福島区福島1-1-50〕; Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, Osaka, Japan. 受付: 1989.8.7, 受理: 1990.2.6.

PBIgG in healthy adults and patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) were determined. For healthy adults, the Δ MFI reduced significantly by acid treatment. We then determined the levels of PBIgG (Δ MFI) in 20 patients with chronic ITP using acid-treated platelets. The levels of PBIgG in chronic ITP was significantly higher than healthy controls. In the ITP patients, a clearly inverted correlation was observed between the platelet count and the levels of PBIgG ($r = -0.7242$, $P < 0.01$). The captured enzyme linked immunosorbent assay (captured-ELISA) was also performed in the same 20 ITP patients. Monoclonal antibodies against GPIb or IIb/IIIa complex were used. Anti GPIb antibody activity was detected in seven of 20 patients. Anti GPIIb/IIIa complex antibody activity was detected in two patients. These results clearly indicate that acid treatment of platelets increases the availability and specificity for the detection of anti-platelet antibodies.

緒 言

Harrington ら¹⁾ (1951) は特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: ITP) 患者の血清を健常人に輸注することにより健常人の血小板減少が引き起こされたと報告した。以降, この物質が 7S γ -globulin 分画にあることが判明し²⁾, ITP は血少板組成に対する自己あるいは同種抗体により血小板減少が惹起される免疫性疾患の一つであると考えられるようになった。一方, ITP を中心にしたこれら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かった^{3)~6)}。近年, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) あるいは immunofluorescence test (IFT) による血小板抗体の微量検出法が中心となってきた^{7)~11)}, なかでも, flow cytometry を用いた IFT 法は迅速にしかも一度に大量の検体を測定し得る最良の方法であると思われる。しかし, ITP の原因として自己あるいは同種抗体が考えられているにもかかわらず, これらの方法を用いた諸家の報告では, ITP 症例では血小板数と血小板関連 IgG (Platelet associated IgG, PAIgG) との相関は認められるが, 血小板結合性 IgG (Platelet binding IgG, PBIgG) との相関は認められないとされてきた^{11)~13)}。

我々はこの原因としてこれらの方法では血小板特異抗体のみならず, 血小板表面に付着している HLA-A, B, C に対する抗体も同時に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からの HLA-A, B, C 抗原の除去が必要であると考えた。菅原ら¹⁴⁾ (1987) はリンパ球を酸処理しその表面より HLA-A, B, C の抗原性を失活し得たことを報告したが, 我々は血小板に同様の酸処理を行い, この方法にて血小板上の HLA-A, B, C 抗原が失活し, しかも GPIb, GPIIb/IIIa complex がほとんどその影響を受けないことをすでに報告した¹⁵⁾。今回我々はこの酸処理血小板と flow cytometry を用いて健常人および ITP 患者血清中の PBIgG について検討し, 次いで, ITP 患者血清中の PBIgG が認識している血小板膜対応抗原に関しても検索し興味ある知見を得たので報告する。

対 象

対象は当大学付属病院第二内科と, 小児科に通院している未治療の慢性の特発性血小板減少性紫斑病患者 20 名 (年齢 5 歳から 67 歳) で, 対照として健常人男性 25 名 (年齢 23 歳から 58 歳) および妊娠歴のない女性 25 名 (年齢 25 歳から 48 歳) の血清を用いた。なお, 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による診断基準¹⁶⁾ によった。

材料および方法

1. 血小板の分離、酸処理および固定

1) 血小板の分離：O 型健常人男性 10 名より acid citrate dextrose (ACD, pH 4.5) 液と全血を 1:5 の割合で採血し、続いて 1,000 g で 40 秒間遠心し上清を採取した。同様の遠心をさらに 2 回繰り返し platelet rich plasma (PRP) を得た。採取した PRP を Walsh ら¹⁷⁾ のアルブミン勾配遠心法にて洗浄し、洗浄血小板沈渣を得た。

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 Na_2HPO_4 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ピペットで攪拌し、その後 0.1 M citrate buffer (pH 6.4) を 12 ml 加え溶液の pH を 6.4 に上昇させた。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% NaN_3 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) で得られた洗浄血小板をホルマリン固定したものをを用いた。

2. Platelet lysate の作製

上記の方法にて洗浄後、酸処理した血小板を 10^{10} 個/ml に調整した。続いて、精製する過程での血小板膜蛋白の分解を防ぐために EDTA 50 mM, PMSF 10 mM, leupeptin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に PBS を加えて全容 10 ml となる蛋白分解防止溶液を作成した。濃度を調整しておいた血小板浮遊液 9 ml に上記の蛋白分解防止溶液 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 分間放置し血小板を溶解した。このサンプルを 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 にて行った。

3. Flow cytometry による血小板表面抗原の解析—酸処理による影響の検討

1) 血小板表面 HLA-A, B, C 抗原量の測

定：上記の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 10^6 個に、HLA-A, B, C に対するモノクローナル抗体 W6/32 (Serotec 社) を 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 社) を室温にて 30 分間反応させた。上記と同様の方法にて 3 回洗浄後、得られた血小板沈渣を 500 μl の PBS に浮遊後 FAC-Scan (Becton Dickinson 社) にて測定し、平均蛍光強度のチャンネル数 (Mean Fluorescence Intensity channel number: MFI) を求め、2 次抗体のみと反応させた場合の MFI との差を ΔMFI とした。

2) 血小板表面 IgG 量の測定：血小板表面 IgG 量について上記と同様、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比較検討した。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 社) 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% NaN_3 PBS にて洗浄後、MFI を測定し、血小板自家蛍光での MFI との差を ΔMFI とした。

3) 健常人血清中の PBIgG 値の測定：健常人男性 10 名の血清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血小板に対する反応性を比較検討した。酸処理後ホルマリン固定血小板および非酸処理後ホルマリン固定血小板 5×10^6 個に、PBS にて 10 倍希釈した被検血清を 37°C 30 分間反応させた。洗浄後、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。洗浄後、血小板沈渣を 500 μl の PBS に浮遊し MFI を測定した。2 次抗体のみと反応させた場合の MFI との差を ΔMFI とし、この ΔMFI を PBIgG 値とした。

4. 酸処理血小板を用いた健常人および ITP 患者血清中の PBIgG 値の測定

Fig. 1 The change of platelet surface HLA-A, B, C by acid treatment. FLI: Fluorescence intensity. Δ MFI: delta mean fluorescence intensity channel number. Non acid-treated platelets (a) and acid-treated platelets (b) were stained with W6/32, followed by staining with FITC-conjugated anti mouse IgG. The Δ MFI reduced markedly from 17.6 to 2.3 by acid treatment.

Fig. 2 The change of platelet surface IgG by acid treatment. FLI: Fluorescence intensity. Δ MFI: delta mean fluorescence intensity channel number. Non acid-treated platelets (a) and acid-treated platelets (b) were stained with FITC-conjugated goat anti human IgG. Δ MFI reduced by acid treatment.

Fig. 3 The change of PBIgG in healthy adults by acid treatment. FLI: Fluorescence intensity. Δ MFI: delta mean fluorescence intensity channel number. Non acid-treated platelets (a) and acid-treated platelets (b) were incubated with serum of a healthy adult, followed by staining with goat anti human IgG. In this case, the relative amounts of PBIgG represented as Δ MFI reduced from 6.1 to 2.4 by acid treatment.

Fig.4 The levels of PBIgG (Δ MFI) in healthy adults and patients with chronic ITP. Δ MFI: delta mean fluorescence intensity channel number. ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura.

The Δ MFI in 20 patients with chronic ITP was 7.9 ± 5.6 (mean $\pm$ SD) and ranged from 1.4 to 18.8. The Δ MFI in the ITP patients was significantly higher than healthy adults ($p < 0.01$).

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血小板を用いて PBIgG 値を測定した, この成績より健常人の PBIgG 値の cut off 値を設定した。

ITP 患者 20 名についても酸処理後ホルマリン固定血小板を用いて PBIgG 値を測定した。

5. 血清中の抗 GP Ib 抗体, 抗 GP IIb/IIIa complex 抗体の検出

Wood ら¹⁸⁾¹⁹⁾の方法に準じて captured-ELISA 法にて測定した。

成 績

1. 酸処理による血小板表面 HLA-A, B, C 抗原量の変化

非酸処理固定血小板の HLA-A, B, C の抗原量は Δ MFI で表わしたところ 17.6 であった。一方, 酸処理血小板では HLA-A, B, C 抗原量は 2.3 と著明に減少した (Fig. 1)。

2. 酸処理による血小板表面 IgG 量の変化

非酸処理血小板では, その Δ MFI は 1.6 であり, 酸処理後血小板では 0.8 であった。血小板表面 IgG 量は酸処理後減少した (Fig. 2)。

3. 酸処理による血清 IgG の血小板への結合量の変化

非酸処理血小板を用いて測定した Δ MFI は 5.9 ± 2.3 (mean $\pm$ SD) であり, 一方, 酸処理後ホルマリン固定血小板を用いた Δ MFI は 2.8 ± 1.2 (mean $\pm$ SD) であった。血清 IgG の血小板への結合量は酸処理後, 有意の減少をみとめた ($P < 0.01$)。この内の典型的な 1 例を Fig. 3 に示した。

4. 健常成人の PBIgG 値

酸処理後ホルマリン固定血小板と flow cytometry を用いて求めた健常成人 50 名 (男性 25 名, 女性 25 名) の Δ MFI の平均は 3.1 ± 1.1 であった。50 名の Δ MFI の平均 $+ 2$ SD である 5.3 を cut off 値と設定した。

5. ITP 患者の PBIgG 値

ITP 患者の PBIgG 値を酸処理後ホルマリン固定血小板と flow cytometry を用いて測定し Δ MFI として表した。Fig. 4 に示すように患者 20 名の Δ MFI は 1.4 から 18.8 の範囲にあり, この内健常成人 50 名より求めた cut off 値である 5.3 以上の陽性値を示した者は 11 名であった。また, その mean $\pm$ SD は 7.9 ± 5.6 であり健常成人の Δ MFI に比し有意の高値を示した ($P < 0.01$)。更に, ITP 患者血清の Δ MFI と血小板数との関係は Fig. 5 の如く両者の間に有意な負の相関を認めた ($r = -0.7242$, $P < 0.01$)。

6. Captured-ELISA 法による血清中抗 GP Ib 抗体および抗 GP IIb/IIIa complex 抗体の検出

健常成人 25 名, ITP 患者 20 名について captured-ELISA 法で血清中抗 GPIb 抗体および抗 GPIIb/IIIa complex 抗体の活性を測定した. ITP 患者の血清中 PBIgG 値 (Δ MFI), 抗 GPIb 抗体活性, 抗 GPIIb/IIIa complex

抗体活性の値は **Table.1** に示した如くである. 抗 GPIb 抗体活性は健常成人 25 名の mean+2SD である 5.3% 以上を示した者を抗 GPIb 抗体陽性者とした. また, GPIIb/IIIa complex 抗体活性では同様に健常成人 25 名の mean+2SD, すなわち 10.2% 以上の値を示した者を抗 GPIIb/IIIa complex 抗体陽性者とした. ITP 患者 20 名の内, 抗 GPIb 抗体陽性を示した者は 7 名 (**Fig. 6**), 抗 GPIIb/IIIa complex 抗体陽性者は 2 名であった (**Fig. 7**). この内, 両抗体陽性者は 2 名であった.

考 察

これまで PBIgG が認識する血小板側の対応抗原に対する研究の報告として, Van Leeuwen²⁰⁾ (1983) が ITP 患者血清中に正常血小板とは反応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, ITP 患者の血小板対応抗原の多くは GPIIb または GPIIIa であろうと報告した. その後, Woods¹⁸⁾¹⁹⁾, 村上²¹⁾, 富山²²⁾ によって ITP 患者血清中に低頻度ながらも抗 GPIb 抗体, 抗

Fig. 5 The relationship between the Δ MFI (PBIgG) and the platelet count in the patients with chronic ITP.

Δ MFI: delta mean fluorescence intensity channel number. PLT: platelet count.

There was a clearly inverted correlation between the Δ MFI and the platelet count ($r = -0.7242$, $p < 0.01$).

Table 1 The levels of PBIgG (Δ MFI), anti-GPIb and anti-GPIIb/IIIa complex antibody activity in 20 patients with chronic ITP.

Case	Name	Sex	Age	Δ MFI	Anti-GPIb (%)	Anti-GPIIb/IIIa (%)	PLT ($\times 10^3/\mu l$)
1	Y.U.	F	24	15.1	-12.6	9.7	10.0
2	A.S.	M	8	17.8	16.1	11.2	30.0
3	Y.M.	F	20	16.2	8.3	3.2	27.0
4	H.O.	M	62	13.4	24.3	-0.1	21.0
5	S.N.	M	45	18.8	33.6	0.1	20.0
6	K.Y.	M	15	11.6	17.3	14.4	16.0
7	M.T.	F	5	9.3	11.2	-14.3	48.0
8	H.S.	M	39	8.2	-5.0	-5.0	53.0
9	R.T.	F	36	5.8	-7.7	-13.4	90.0
10	H.F.	M	40	6.6	9.6	-28.9	55.0
11	H.N.	M	58	6.3	-29.8	-19.5	76.0
12	T.Y.	M	35	3.7	-15.5	-17.4	61.0
13	H.O.	F	42	3.5	1.3	6.0	29.0
14	E.K.	F	27	5.2	0.4	-12.3	25.0
15	Y.K.	M	67	2.5	-25.3	-22.3	80.0
16	Y.I.	F	34	3.9	-10.3	-4.3	73.0
17	K.S.	F	48	2.4	0.0	0.5	75.0
18	S.A.	M	36	1.4	-20.9	-18.7	73.0
19	Y.M.	F	27	2.8	-25.6	-22.7	58.0
20	Y.O.	F	25	4.1	-5.4	-15.1	50.0

Δ MFI: delta mean fluorescence intensity channel number.

PLT: platelet count.

Fig. 6 Anti-GPIIb antibody activity in patients with chronic ITP. ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura. The value of anti-GPIIb antibody activity in 25 healthy controls was -10.1 ± 7.7 (mean $\pm$ SD)%. Thus, the cut off value should be set on 5.3% (mean + 2SD). Seven of 20 patients with chronic ITP had the values above 5.3%.

Fig. 7 Anti-GPIIb/IIIa complex antibody activity in patients with chronic ITP. ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura. The value of anti-GPIIb/IIIa complex antibody activity in 25 healthy controls was -7.4 ± 8.8 (mean $\pm$ SD). Thus, the cut off value should be 10.2 (mean + 2SD)%. Two of 20 patients with chronic ITP had the values above 10.2%.

GPIIb/IIIa complex 抗体活性の認められる症例の存在することが報告されている。

近年、特異性の高いモノクローナル抗体を用いて、血小板膜表面の抗原 epitope などが flow cytometry を使用することにより高感度に解析されるようになり、また血小板膜表面に結合している免疫グロブリン (Immunoglobulins, Igs) についても flow cytometry による検討がなされている。われわれも、洗浄後ホルマリン固定血小板を用い、自己あるいは同種抗血小板抗体を有すると考えられる ITP 患者

血清中の PBIgG を flow cytometry で測定することを試みた。しかし、洗浄後ホルマリン固定した血小板を用いて健康成人血清と反応させ、PBIgG を測定した場合にも明らかな蛍光陽性像を示した。これは血清中のグロブリンが非特異的に血小板膜表面に結合した現象と考えられた。血清中の抗血小板特異抗体の検出のためには、このような血清中蛋白の非特異的結合を除去することが必要であり、そのためには血小板膜表面の処理方法の工夫が肝要と考えられた。

血小板膜表面には、種々の糖蛋白 (GP I a, I b, IIb/IIIa complex, IV など) が固有成分として存在しているが、白血球抗原である HLA-A, B, C など存在している。菅原ら¹⁴⁾ はリンパ球を酸処理することによりリンパ球表面の HLA-A, B, C の抗原性をほとんど失活し得たと報告したが、我々も血小板を酸処理することによって血小板表面上の HLA-A, B, C 抗原は失活し、しかも血小板膜固有糖蛋白 GP I b, GPIIb/IIIa complex はほとんどその影響を受けないことをすでに報告した¹⁵⁾。今回使用した O 型健康成人の非酸処理固定血小板においても HLA-A, B, C 抗原量は ΔMFI として表すと 17.6 であったが、酸処理固定血小板では 2.3 と著明に減少した。また血小板表面の IgG 量についても同様の検討を行ったところ酸処理後の血小板表面 IgG 量は減少し、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。以上の所見から、血小板膜表面固有の糖蛋白は酸処理によって影響を受けないが、膜表面上の HLA-A, B, C は酸処理によりその抗原性はほとんど失活し、また非特異的に結合した IgG の多くは酸処理により除去されるものと考えられた。したがって、血清中の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 IgG の非特異的な結合がより減少しうる可能性が想定された。

そこで我々は、健康成人 10 名の血清について非酸処理ホルマリン固定血小板と酸処理後ホルマリン固定血小板を用いてその血清中の PBIgG 値を ΔMFI として測定したところ、それぞれ 5.9 ± 2.3 および 2.8 ± 1.2 であり、酸処理血小板を用いて求めた ΔMFI は非酸処理血小板を用いて求めた ΔMFI に比し有意に減少した。酸処理血小板を用いることにより ΔMFI が減少した事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表面 HLA-A, B, C の抗原性が著しく減少した、2) 血小板上 IgG 量が減少した、3) 血小板上でおこる非特異的な結合反応が抑制された、などである。

我々は以上に述べた如く、酸処理血小板は非

特異的反応がおこりにくく、flow cytometry を用いた血清中の PBIgG の測定に酸処理血小板が有用になりうると考え、この酸処理血小板を用いて ITP 患者血清中の PBIgG を flow cytometry で測定することを試みた。まず健康人血清中の PBIgG 値 (ΔMFI) を測定し、その cut off 値を 5.3 と設定した。次に ITP 患者血清中の PBIgG 値 (ΔMFI) を測定し、20 名のうち 11 名に血清中の PBIgG 値が cut off 値以上の陽性者を認め、更に ITP 患者の血小板数と PBIgG 値の間に有意の負の相関を認めた。このように血小板数と PBIgG の有意の関連性について明らかにした報告はこれまでにはみられず、本成績は新しい知見と思われる。これは酸処理血小板と flow cytometry を用いることにより、より特異的に、より高感度で PBIgG を測定し得たためと考えられた。

また、我々は患者血清中の PBIgG の血小板膜上の対応抗原部位の検索のため、captured-ELISA 法にて ITP 患者 20 名の血清について抗 GP I b 抗体活性、抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性を測定した。抗 GP I b 抗体活性は 20 名中 7 名、また ΔMFI が 5.3 以上の陽性値を示した患者のみについては 11 名中 7 名と高率に抗体活性陽性者を認め、GPIIb/IIIa complex 抗体活性は 20 名中 2 名に陽性を認めた。これら抗 GP I b 抗体陽性者、または抗 GPIIb/IIIa complex 抗体陽性者はいずれも ΔMFI が 5.3 以上の陽性値を示した者であり、この事からも、我々の開発した酸処理血小板と flow cytometry を用いた血清中の PBIgG の測定法は、PBIgG をより特異的に検出し得る方法であることを示唆していると考えられる。

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血小板と flow cytometry を用いて血清中の PBIgG を測定した。また、ITP 患者血清についてはこれら PBIgG が認識している血小板膜対応抗原についても検索し、以下の結果を得た。

1) 酸処理を行った血小板膜上の HLA-A, B, C 抗原量は著減した。IgG 量も減少した。

2) 酸処理後ホルマリン固定血小板を用いて求めた ITP 患者 20 名の PBIgG 値 (Δ MFI) は、健常人 50 名の PBIgG 値に比し有意の上昇を認めた ($P < 0.01$)。PBIgG 値の cut off 値 ($\text{mean} + 2\text{SD}$) 以上を示した者は 11 名であった。また、ITP 患者 20 名の PBIgG 値と血小板数は有意の負の相関を示した ($r = -0.7242$, $P < 0.01$)。

3) Captured-ELISA 法にて健常人 25 名の抗 GPIIb 抗体活性、抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性を測定した。抗 GPIIb 抗体活性または抗 GPIIb/IIIa complex 抗体活性が陽性であった患者はすべて Δ MFI で表した PBIgG 値が cut off 値以上の陽性値を示した者であった。

以上より、酸処理血小板は PBIgG の測定において、より特異的な抗体を検出し得る有用な素材であると考えられた。我々はこの酸処理血小板を用いることによって、はじめて PBIgG 値と血小板数との間に有意な相関を認めたが、同方法は今後 ITP の診断と病態の解析に有用な、新たな検出法であると思われる。

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。

文 献

- Harrington, W. J., Minnich, V., Horringsworth, J. W. and Moore, C. V.: Destruction of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.*, **38**: 1~10, 1951.
- Shulman, N. R., Marder, V. J. and Weinrach, R. S.: Similarities between known antiplatelet antibodies and the factor responsible for thrombocytopenia in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Ann. New York. Acad. Sci.*, **124**: 499~542, 1965.
- Steffen, C.: Results obtained with the antigen consumption test and investigations of autoantibody eluates in immunohematology. *J. Lab. Clin. Med.*, **55**: 9~28, 1960.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 織田一弘, 野村昌作, 永田博一, 粉川皓年, 安永幸二郎: Flow Cytometry による血小板抗体の測定. *血液と脈管*, **17**: 509~520, 1986
- 椿尾忠博, 倉田義之, 米沢毅, 木谷照夫: ITP におけ

- る血小板抗体の解析—血小板表面 IgG と血清血小板結合性 IgG の比較検討. 臨床血液, **23**: 40~45, 1982.
- 13) McMillan, R.: Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. N. Eng. J. Med., **304**: 1135~47, 1981.
- 14) 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. Methods, **100**: 83~90, 1987.
- 15) Kurata, Y., Oshida, M., Take, H., Furubayashi, T., Nakao, H., Tomiyama, Y., Kanayama, Y., Nagao, N., Okubo, Y., Yonezawa, T., Tarui, S.: New Approach to Eliminate HLA Class I Antigens from Platelet Surface without Cell Damage: Acid Treatment at pH 3.0. Vox Sang., **57**: 199~204, 1989.
- 16) 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, 461~463, 1976.
- 17) 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.
- 18) Woods, V. L., Jr., Oh, E. H., Mason, D. and McMillan, R.: Autoantibodies against the platelet glycoprotein II b/III a complex in patients with chronic ITP. Blood, **63**: 368~375, 1984.
- 19) Woods, V. L., Jr., Kurata, Y., Montgomery, R. R., Tani, P., Mason, D., Oh, E. H. and McMillan, R.: Autoantibodies against platelet glycoprotein I b in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. Blood, **64**: 156~160, 1984.
- 20) Van Leeuwen, E. F., Van der Ven, J. Th. M., Engelfriet, C. P. and von dem Brone, A. E. G. K.: Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. Blood, **59**: 23~26, 1982.
- 21) Murakami, H., Ikeda, Y., Satoh, K., Toyama, K. and Watanabe, K.: Antibodies against platelet major glycoproteins in patients with chronic thrombocytopenic purpura. Keio J. Med., **34**: 153~160, 1985.
- 22) 富山圭昭, 金 鎮敬, 本田繁則, 水谷 肇, 椿尾忠博, 米沢 毅, 垂井清一郎: 慢性 ITP における抗 GP I b 抗体の検討. 臨床血液, **28**: 386~391, 1987.