◆原 著◆

免疫磁気分離法を用いた Bernard-Soulier 症候群, 血小板無力症の解析

阿久津 保 之* 森 和 夫* 鈴木 宗 三*
石 川 正 明* 酒 井 秀 章* 豊 田 隆 謙*

Characterization of Bernard-Soulier
syndrome, Glanzmann's thrombasthenia using
immunomagnetic cell separation technique

Yasuyuki AKUTSU*, Kazuo MORI*, Sozo SUZUKI*
Masaaki ISHIKAWA*, Hideaki SAKAI* and Takayoshi TOYOTA*

Key words: platelet membrane glycoprotein, monoclonal antibody,
immunomagnetic isolation

To characterize human platelet membrane glycoprotein (GP), we developed an immunomagnetic cell isolation method using monoclonal antibodies (MoAbs) that specifically bind to Ib and IIb-IIIa complexes of GP. When added to platelet-rich plasma (PRP), anti-GPIb MoAb inhibited ristocetin-induced platelet aggregation, and anti-GPIIb-IIIa MoAb inhibited ADP- and collagen-induced platelet aggregation. Each MoAb was incubated with monosized polystyrene beads (4.5 μ m in diameter) coated with secondary antibody and then with normal PRP for 30 minutes. More than 90% of the platelets bound to the beads and were eliminated from PRP. However, the binding between the platelets and the beads coated with each MoAb was inhibited by pretreatment of PRP with the same type of MoAb.

Platelets from patients with Bernard Soulier syndrome (BSS) and Glanzmann's thrombasthenia (GT) were added to the beads coated with each MoAb. BSS platelets with defective GPIb and GT platelets with defective GPIIb-IIIa did not bind to the beads coated with anti-GPIb MoAb and those coated with anti-GPIIb-IIIa MoAb, respectively.

Our immunomagnetic isolation method using anti-GP MoAbs is very simple and useful for detecting abnormalities such as GP deficiency and especially diagnosing BSS and GT.

* 東北大学医学部第三内科 [〒980 仙台市青葉区星陵町1-1]: The Third Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan. 受付: 1990.5.11, 受理: 1990.9.6.

はじめに

本邦においても, Glanzmann's thrombasthenia (GT) や Bernard-Soulier syndrome (BSS), Storage-pool disease (SPD) を含め多数の先天性血小板機能異常症が報告¹⁾ されており, なかでも GT や BSS は, 血小板膜に存在する糖蛋白質 (Glycoprotein: GP) の欠損や低下²⁾³⁾ が, それぞれの血小板機能異常の主要な原因になるとされている。その分析法として SDS-polyacrylamide 電気泳動/PAS 染色による検討⁴⁾ が広く行われてきたが, 最近では複数の GP に対する特異 monoclonal 抗体 (MoAb) が作成され, それらを用いた ELISA 法⁵⁾ や, Flow cytometry⁶⁾⁷⁾ による同定が診断のうえで重要な手法と認識されている。しかし, 使用機器や簡便性などの点では, さらに改良すべき問題も残されている考えられる。

われわれは, 簡便なリンパ球分離法として報告されている可磁化物質 (Fe_3O_4) を含有するポリスチレンビーズと, 血小板膜糖蛋白質に対する MoAb を用いた免疫磁気分離法⁸⁾⁹⁾ により, 短時間かつ簡便に, 血小板膜表面に存在する GP の異常を同定しうるか, 否かにつき検討を行ったので報告する。

I. 対 象

基礎的検討では, 健常人 10 例 (男 8 例, 女 2 例, 24~61 歳, 平均年齢 38.1 ± 12.6 歳) を, また先天性血小板機能異常症症例としては, BSS 1 例と GT の Type-I, II それぞれ 1 例の計 3 例を対象とした。

II. 材料と方法

免疫磁気分離においては, 可磁化物質 (Fe_3O_4) が一様に分布した core を親水性ポリマーで覆ったポリスチレンビーズである, DYNABEADS™ (DYNAL A.S, Norway) を用いた。本検討で使用した beads は直径 $4.5 \mu\text{m}$, その変動係数 (C. V.) 値は 5% 以下と均一であり, 超常磁性で粒子間の相互作用や, 非特異的な細胞吸着がきわめて少ないとされている。なお, 本検討ではすでに 2 次抗体として sheep anti

mouse IgG が標識されている beads を用いた。

1 次抗体としては血小板膜糖蛋白 Ib (GPIb) に対する抗 GPIb-MoAb: CD42b¹⁰⁾ (Isotype: IgG₁, Immunotech S.A., France) と, 血小板膜糖蛋白 IIb-IIIa (GPIIb-IIIa) に対する抗 GPIIb-IIIa MoAb: CD41a¹¹⁾ (Isotype: IgG₁ kappa, Immunotech S.A., France) を 0.01 M PBS buffer (pH 7.4) に溶解し用いた。両 MoAb とも免疫蛍光・沈降法により対象 epitope である各 GP との specific affinity が確認されている。

分離手法としては, 今回は採血以後の血小板に対する刺激を最小限にするために, 2 次抗体標識 beads と 1 次抗体を結合させた後に細胞懸濁液と混合し, 標的細胞 (本検討では血小板) のみが抗体を介して beads に結合する直接法を用いた (図 1)。

$20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$, および $10.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ に希釈調整された PRP $100 \mu\text{l}$ に, 1 次抗体結合 beads 懸濁液 $100 \mu\text{l}$ を添加し, beads に結合した血小板は, 強力な永久磁力を有する Magnetic particle concentrator (MPC) により, beads 非結合血小板と分離した。1 次抗体非結合 beads 懸濁液 $100 \mu\text{l}$ を添加した対照と比較しながら, beads と結合できず残存した血小板数を Baker 810 型全血血小板数算定装置にて測定し, 血小板除去率 (1 次抗体結合 beads 添加時の残存血小板数/1 次抗体非結合 beads 添加時の残存血小板数 $\times 100\%$) として評価した。

III. 血小板分離に関する基礎的検討結果

1. 血小板凝集検査 (表 1) および SDS-PAGE/PAS 染色による GP 分析結果 (図 2)

対象症例は, 全血: 3.8% クエン酸ナトリウム 9:1 容採血後に, 多血小板血漿 (PRP: $20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$) を調整し, Lumi-aggregometer (Chrono Log 社, USA) にて, ADP $5 \mu\text{M}$, collagen $5 \mu\text{g/ml}$ および ristocetin 1.2 mg/ml 刺激時の血小板凝集能を測定した (表 1)。

正常例 10 例の最大凝集の平均値は, ADP 刺激時 $56.2 \pm 9.2\%$, collagen 刺激時 $56.4 \pm 15.5\%$, ristocetin 刺激時に $55.7 \pm 18.5\%$ であった。一方, BSS 例は ADP, collagen 凝集

$$\text{Removed-platelet(\%)} = \frac{\text{Residual PLT count after mixing with MoAb-coated beads}}{\text{Residual PLT count after mixing with uncoated beads}} \times 100$$

Fig. 1 Direct method for immunomagnetic cell separation of platelet from platelet rich plasma by immunoadsorption with monoclonal mouse IgG against platelet membrane glycoprotein.

Table 1 Platelet aggregation in normal, Bernard-Soulier syndrome (BSS) and Glanzmann's thrombasthenia (GT).

Inducer (final concentration)	Maximum aggregation (%)		
	ADP 5 μ M	Collagen 5 μ g/ml	Ristocetin 1.2 mg/ml
Normal (n=10)	56.2 $\pm$ 9.2	56.4 $\pm$ 15.5	55.7 $\pm$ 18.5
BSS	36	36	0
GT (Type-I)	0	0	18
GT (Type-II)	0	0	43

がともに 36% と軽度低下しており, ristocetin 凝集は完全に欠如していた. GT 例では type I, II ともに ADP, collagen 凝集は完全に欠如しており, さらに I 型の ristocetin 凝集は 18% と低下していた.

また, 正常例, BSS, GT 各症例血小板における 7.5% SDS-polyacrylamide 電気泳動/PAS 染色時¹²⁾ の densitometry 像では, BSS では GPIb, また GT では Type I, II ともに GPIIb-IIIa ピークの欠損を認めた (図 2).

Fig. 2 Densitometry scans of PAS-stained platelet membrane glycoproteins by SDS-7.5% polyacrylamide gel electrophoresis.

Fig. 3 Effect of monoclonal antibodies to platelet membrane glycoprotein (GPIb and GPIIb-IIIa) on platelet aggregation. Platelet rich plasma (Plt.c.: $25 \times 10^4/\mu\text{l}$, $400\mu\text{l}$) was mixed with each antibody dissolved in 0.01M PBS buffer ($200\mu\text{g}/\text{ml}$, $50\mu\text{l}$) for 5 minutes at 37°C .

2. 正常 PRP 凝集への MoAb 添加の効果 (図3)

抗 GP MoAb による beads 標識に先立ち、両 MoAb の生物学的性状を確認するために正常人血小板凝集への添加試験を行った (図3)。正常人 PRP $400\mu\text{l}$ と 0.01 M PBS buffer (pH 7.4) に溶解した MoAb $50\mu\text{l}$ ($20\mu\text{g}/\text{ml}$, 終

濃度) を 37°C で 5 分間 incubate した後、血小板凝集物質を $50\mu\text{l}$ 加えた。

抗 GPIb MoAb を添加した PRP では、ristocetin 凝集だけが明らかに抑制された。また抗 GPIIb-IIIa MoAb を添加した PRP では、ADP, collagen 凝集に対して強い抑制がみられた。

以上、既報¹⁰⁾¹¹⁾のごとく本検討で用いられた両 MoAb が、前者は血小板膜表面上の von Willebrand 因子の結合部位とされる GPIb を、また後者が fibrinogen 受容体とされる GPIIb-IIIa を対象 epitope として十分認識していると推察された。

3. 2次抗体標識 Beads と1次抗体の結合 (図4)

2次抗体標識 beads に1次抗体を混和し 4°C で 8 時間 incubation した後に MPC で beads を集め、上清を静かに除去する。0.1% BSA を含む 0.01 M PBS buffer (pH 7.4) で 4 回、 4°C で各 30 分間づつ洗浄し、MPC で回収後に同じ PBS buffer で後記のごとく目的とする beads 数調整のために再懸濁した。本 beads を用いた種々の細胞分離の検討では、2次抗体標識 beads 1 mg あたり $0.2 \sim 2.0\mu\text{g}$ の1次 MoAb が有効な結合濃度¹³⁾とされており、われわれも $0.33 \cdot 0.67 \cdot 1.33 \cdot 2.0\mu\text{g}/1\text{mg beads}$ の4濃度での incubation をおこない、血小板数:beads 数 = 1:3 (添加 beads 数 6×10^8 個/ml) の条件下に検討を行った。

抗 GPIb-MoAb を用いた検討で、 $0.67\mu\text{g}/1\text{mg beads}$ 以上の抗体濃度では、MoAb 濃度にはほぼ比例して血小板除去率の上昇が認められ、

Fig. 4 Effect of anti-GPIIb monoclonal antibody concentration on platelet separation.

Fig. 5 Effect of concentration of anti-GPIIb or anti-GPIIb-IIIa coated beads on cell separation. Platelet rich plasma (Plt.c. $20 \times 10^4/\mu l$) was mixed with monoclonal antibody coated beads ($2 \mu g/1 \text{ mg beads}$) at room temperature up to 60 minutes (vol: vol = 1: 1).

また 30, 60 分の incubation 時間では直線的な上昇であった。2.0 $\mu g/1 \text{ mg beads}$ では、最大の除去率を示したことから、基本的分離条件は抗 GPIIb, 抗 GPIIb-IIIa 抗体濃度が 2.0 $\mu g/1 \text{ mg beads}$, 血小板との incubation 時間を最大

Fig. 6 Effect of incubation temperature on cell separation. Platelet rich plasma (Plt.c. $20 \times 10^4/\mu l$) was mixed with monoclonal antibody coated beads ($2 \mu g/1 \text{ mg beads}$, $1.2 \times 10^9/\text{ml}$) up to 60 minutes (vol: vol = 1: 1).

60 分間とした。本条件における血小板除去率をさらに改善するために、添加 beads 数に關する以下の検討を実施した。

4. 血小板分離時の Beads 添加量と Incubation 時間 (図 5), および Incubation 温度の影響 (図 6)

$20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ に希釈調整された PRP に対し, 1 次抗体 ($2.0 \mu\text{g}/1 \text{ mg beads}$) の結合した beads $1.2 \times 10^8/\text{ml}$, $3.0 \times 10^8/\text{ml}$, $6.0 \times 10^8/\text{ml}$, 1.2×10^9 個/ ml を PRP (それぞれ $\text{vol}:\text{vol}=1:1$) に添加し, 15・30・60 分間の室温での incubation をおこない, 前述の血小板除去率より至適 beads 添加量に関し検討した (図 5)。

抗 GPIbMoAb 結合 beads においては incubation 時間, beads 濃度に依存した血小板除去が見られたが, 1.2×10^9 個/ ml の beads を用いた場合, すべての条件で 90% 以上の血小板が除去された。一方, 抗 GPIIb-IIIa の MoAb 結合 beads では, 一様な incubation 時間, beads 濃度に依存した血小板除去が見られたが, とくに 1.2×10^8 個/ ml の低 beads 量では, 除去率が低値であった。

また $20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ に希釈調整した PRP に対し, 1.2×10^9 個/ ml の 1 次抗体 ($2.0 \mu\text{g}/1 \text{ mg beads}$) の結合した beads を $\text{vol}:\text{vol}=1:1$ に添加し, 4°C ・室温・ 37°C の条件下に 15・

30・60 分間の incubation をおこない, 前述の血小板除去率より温度条件に関する検討を行った (図 6)。

抗 GPIbMoAb 結合 beads と正常血小板の結合・除去率は, 4°C ・室温・ 37°C でいずれの条件下でも incubation 時間 30 分以上ではほぼ 90% 以上であり, 時間に依存する傾向が見られた。一方, 抗 GPIIb-IIIaMoAb 結合 beads は, 4°C ではいずれの incubation 時間でも 80% 台, あるいはそれ以下とやや除去率の低下が見られた。

5. 抗 GPIb MoAb, 抗 GPIIb-IIIa MoAb の血小板膜表面上 GPIb, GPIIb-IIIa の認識 (図 7)

本検討に用いた両 MoAb の性状に関する詳細は既に報告されているが¹⁰⁾¹¹⁾, 臨床応用への前段階として, 正常血小板と抗 GPIb-MoAb または抗 GPIIb-IIIa MoAb を別々に前処理し対応する GP を覆うことで, 前者は BSS 血小板に, また後者は GT 血小板に近似した膜蛋白欠損状態を作成した。すなわち, $25.0 \times 10^4/$

Fig. 7 Reaction between normal PRP treated with anti-GPIb or GPIIb-IIIa MoAb and beads coated with each MoAb. Results were expressed as platelet particle size distribution and platelet elimination rate. Platelet rich plasma (Plt.c. $25 \times 10^4/\mu\text{l}$, $200 \mu\text{l}$) was pretreated with monoclonal antibody ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$, $50 \mu\text{l}$) to GPIb or GPIIb-IIIa for 30 minutes at 37°C . Monoclonal antibody treated PRP were mixed with monoclonal antibody coated beads ($2 \mu\text{g}/1 \text{ mg beads}$, $1.2 \times 10^9/\text{ml}$) for 30 minutes at room temperature.

μl に調整された正常例 PRP $150\ \mu\text{l}$ に $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 GPIb MoAb, あるいは抗 GPIIb-IIIa MoAb 溶液を $50\ \mu\text{l}$ ずつ加え 37°C で 30 分間 incubation し, それぞれの MoAb 処理 PRP を作成した. その後, 2 種類の 1 次抗体結合 beads を個々に添加し, 血小板除去率と粒度分布図より MoAb 処理血小板と 1 次抗体結合 beads 間の interaction を観察した.

あらかじめ抗 GPIb MoAb を処理した PRP は, 抗 GPIb MoAb 結合 beads とは十分に結合せず, また抗 GPIIb-IIIa MoAb を処理した PRP でも抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads とは反応せず, 血小板除去率の低下と血小板粒度分布の残存が見られたが, 一方交差する MoAb 間では十分な血小板除去と血小板粒度分布の消失が認められた. 以上, 免疫磁気分離法は, 用いる MoAb の GP に対する特異性が強く表現される分離法と考えられ, さらに BSS や GT の血小板に近似したモデルにおける検討結果としてみた場合, 血小板の GP 欠損分析にも血小板除去率の低下を指標とする応用が可能と思われる.

IV. 臨床応用に関する検討

1. 正常例, 先天性血小板機能異常症 (BSS, GT) 例の検討 (表 2)

免疫磁気分離法の臨床応用への可能性を検討するために, BSS, GT 症例血小板での分析を実施した. 条件設定に関する基礎検討より, 1 次抗体結合 beads 数 $1.2 \times 10^9/\text{ml}$ を $20.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ もしくは $10.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ の PRP に直接添加し, 室温で静かに攪拌しながら $15 \cdot 30 \cdot 60$

分間 incubation した.

正常例 10 例を対象とした抗 GPIb MoAb, および抗 GPIIb-IIIa MoAb を用いた検討では, incubation 30 分間以後に, $20 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整された正常血小板の 90% 以上が, beads との結合により除去された.

BSS 症例においては, 抗 GPIb MoAb 結合 beads との混合では, incubation 30 分以後の除去率が 10% 以下と著しく低下していたが, 抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads を用いた場合には, 正常例の除去率と同様であった. また, GT 症例においては, Type I, II とともに抗 GPIb MoAb 結合 beads による検討では, 正常例と同様の除去率がみられたが, 抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads との混合では, Type I は除去率はほぼ 0% と著明な低下が認められ, Type II では正常例よりは低値ではあるものの, Type I よりもその程度は軽度であった.

2. Beads-血小板結合の光顕像 (図 8)

1 次抗体結合 beads と血小板の混和 60 分後の状態を, 光学顕微鏡観察下に検鏡・撮影した. beads はきわめて均一な形状を呈しており, 1 次抗体非結合 beads と正常血小板の混和では, それぞれ結合する様子は認められず, beads の間に血小板が点在していた. 抗 GPIb・抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads と正常血小板の混和では, とともに rossete 様や葡萄房状の集合体が多数見られ, 明らかな血小板数の減少が認められた.

BSS 血小板においては, 大型血小板の存在が見られるが, 抗 GPIb MoAb 結合 beads と結合を示す集合体は, ほとんど見られない. し

Table 2 Removed-platelet (%) in normal individuals, Bernard-Soulier syndrome (BSS) and Glanzmman's thrombasthenia (GT) patients. Platelet rich plasma (Plt.c. $20 \times 10^4/\mu\text{l}$) was mixed with monoclonal antibody coated beads ($2\ \mu\text{g}/\text{mg}$ beads, $1.2 \times 10^9/\text{ml}$, vol: vol=1:1) at room temperature.

Removed-PLT (%)	anti-GPIb MoAb coated beads			anti-GPIIbIIIa MoAb coated beads		
	Incubation time			Incubation time		
	15 min.	30 min.	60 min.	15 min.	30 min.	60 min.
Normal (n=10)	88.9 ± 5.3	94.2 ± 1.7	93.4 ± 2.1	85.2 ± 9.1	91.5 ± 5.9	92.8 ± 3.7
BSS	0	6.9	1.4	80.4	93.1	83.8
GT (Type-I)	95.8	95.8	95.8	0	0	3.1
GT (Type-II)	93.8	97.0	95.7	18.8	21.2	20.4

Fig. 8 Binding of monoclonal antibody coated beads to platelets. A, B-1 ; BSS, A, B-2 ; GT Type-I, A, B-3 ; GT Type-II, A, B-4 ; Normal. A : anti GPIb monoclonal antibody coated beads. B : anti GPIIb-IIIa monoclonal antibody coated beads.

かし, 抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads とは, 巨大な beads 集合体を形成していた。

GT Type I 血小板では, 抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads と結合する像は見られず, beads 間に大小様々な血小板が点在していたが, Type II は, 視野中に僅かながら小さな rosette 様集合体が認められた。また, 抗 GPIb MoAb 結合 beads とは正常血小板に対するものと同様な集合体を形成していた。

考 案

特異 monoclonal 抗体作成法の開発は, 血液凝固学の中で凝固・線溶因子を始めとするきわめて微量の蛋白質や, 血小板の生化学的研究にも多大なる変革をもたらした。一方で 1980 年, Ugelstad¹⁴⁾ らにより報告され, その後磁気化改良をうけた DYNABEADS™ は, 細胞分離法の中に, 免疫磁気分離法という新しい手技をもたらした。MoAb を結合した DYNABEADS™ を用いることで, きわめて簡単かつ細胞に対する影響がないままに目的とする細胞を分離でき, 現在ではおもにリンパ球を対象とする応用がなされているが, 血小板に関する基礎的・臨床的応用は現在まで報告されていない。

1986 年の安永¹⁾ の調査によると, 本邦においても, GT が Type-I, II あわせて 222 例, BSS 43 例, SPD 60 例を含めた血小板放出機能異常症 84 例, その他合計で 374 例の先天性血小板機構異常症が報告されている。既に複数の GP に対する特異 MoAb が作成され, ELISA 法⁶⁾ や, Flow cytometry^{6,7)} による検討がなされており, 現在では GT や BSS 診断のうえで重要な手法と認識されている。しかし, 血小板に対する煩雑な前処理・操作や高額な機器・装置, さらに判定に要する時間など改善すべき点も多く残されているものと考えられる。

本研究においては, 前述のような問題を解決するために, 血小板膜糖蛋白質に対する MoAb と magnetic beads による細胞の免疫磁気分離を用いることで, specificity が高く, 短時間かつ簡便に, 血小板膜表面に存在する GP

の量的異常を同定しうるか否かを目的として行われた。また BSS や GT の診断に関する臨床応用の可能性についても検討を加えた。

DYNABEADS™ を用いる細胞分離が, リンパ球を中心に広く応用^{9,15)} されていることから, 血小板分離に関する条件設定などの基礎検討は, それらの既報をもとに行った。本検討に用いた市販 MoAb (抗 GPIb MoAb, 抗 GPIIb-IIIa MoAb) は, 1 次抗体として 4°C・8 時間で十分に 2 次抗体標識 beads に結合することが認められ, 測定の前段階においても試薬調整や前処理に要する時間がかなり簡略化されると思われた。さらに, 採血から血小板分離, 血小板数の調整に至るまでの手技も, 広く行われている血小板凝集能測定に準ずるものであり, 免疫磁気分離法の特徴のひとつである, 細胞に対する刺激を可能な限り除去した条件下での細胞分離ができるものと思われた。また, 血小板数の測定も, 今回はその粒度分布状態を併せて観察するために Baker 810 型全血血小板算定装置にて測定したが, Brecher-Cronkite 法など顕微鏡観察下においても十分測定可能であり, 一般研究施設でも広く導入できる方法と思われた。

今回われわれが設定した 1.2×10^9 個の beads と PRP を 1:1 で混和する条件は, 日常的に実験が行われる室温で, 30 分間というきわめて短時間に, 用いた抗 GPIb MoAb, 抗 GPIIb-IIIa MoAb を介して正常血小板を 90% 以上結合・除去した。MoAb の activity を保持するためには, 4°C incubation も有用と思われるが, 血小板自体の cold activation を防ぐためにも室温での分離が望ましいと考えられた。

臨床応用として, 既に SDS-polyacrylamide 電気泳動/PAS 染色により分析していた, BSS・GT 症例で検討を行ったが, BSS 症例では抗 GPIb MoAb 結合 beads に, また GT 症例では抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads に対しては, それぞれの血小板結合は完全に欠如, またはわずかに認められただけであった。一方, BSS 血小板と抗 GPIIb-IIIa MoAb 結合 beads, GT 血小板と抗 GPIb MoAb 結合

beads は十分結合したことから、本法は GPIb・GPIIb-IIIa の欠損・低下を明確に表現し、BSS・GT の診断を検討¹⁶⁾ する上で、十分有用性があるものと思われた。また、GT 例では、Flow cytometry を用いた報告⁶⁾⁷⁾ と同様に、Type I と II の間で血小板除去率の差異がみられ、一部欠損した GP が残っているような病態検索も可能であり、比較的高い測定感度をも有するものと推察された。

以上、血小板膜糖蛋白に対する MoAb と magnetic beads を用いる免疫磁気分離法を組み合わせた本法は、従来の分析法に比べ膜糖蛋白の欠損や低下などの異常を知るうえで、操作の簡便化・時間の短縮といった点で非常に有用と思われた。しかし、多くの施設から報告された血小板膜糖蛋白に対する MoAb には、認識 epitope 部位や生物学的活性の差異もみられ、今後さらに多種の MoAb を用いた検討や、後天性血小板機能異常症を含めた臨床応用に関するいっそうの検討が必要と考えられた。

文 献

- 1) Yasunaga, K.: Congenital platelet function disorders: Survey findings and pathophysiology. *Acta Haematol Jpn*, **49**: 1499~1508, 1986.
- 2) Nurden, A.T., Caen, J.P.: Specific roles of platelet surface glycoproteins in platelet function. *Nature* **255**: 720, 1975.
- 3) Nurden, A.T., Caen, J.P.: Different glycoprotein abnormalities in thrombasthenic and Bernard-Soulier platelets. *Semi Hematol* **16**: 234~250, 1979.
- 4) Jenkins, C.S.P., Ali-Briggs, E.F., Zonneveld, G.T.E., Sturk, A., Clemetson, K.J.: Human blood platelet membrane glycoproteins: Resolution in different polyacrylamide gel electrophoretic systems. *Thrombos. Haemostas.* **42**: 1490~1502, 1979.
- 5) Luige, D.M., Fabrizio, F., Alessandra, C., Pietro, F., Maria, G.D.B., Antonio, G.: Bernard-Soulier syndrome: Diagnosis by an ELISA method using monoclonal antibody in 2 new unrelated patients. *Acta Haematol* **75**: 203~208, 1986.
- 6) Adelman, B., Michelson, A.D., Handin, R.I., Ault, K.A.: Evaluation of platelet glycoprotein Ib by fluorescence flow cytometry. *Blood* **66**: 423~427, 1985.
- 7) Jennings, L.K., Ashmum, R.A., Wang, W.C., Dockter, M.E.: Analysis of human platelet glycoproteins IIB-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood* **68**: 173~179, 1986.
- 8) Funderud, S., Nustad, K., Lea, T., Vartdal, F., Gaudernack, G., Stenstad, P., Ugelstad, J.: Fractionation of lymphocyte by immunomagnetic beads. In: Klaus GGB (ed). *Lymphocytes-a practical approach*. IRL press, Oxford, 55~65, 1987.
- 9) Ugelstad, J., Berge, A., Ellingsen, T., Aune, O., Kilaas, L., Nilsen, T.N., Schmid, R., Stenstad, P., Funderud, S., Kvalheim, G., Nustad, K., Lea, T., Vartdal, F.: Monosized magnetic particles and their use in selective cell separation. *Macromol. Chem., Macromol. Symp.* **17**: 177~211, 1988.
- 10) Ruan, C., Du, X., Xi, X., Castaldi, P.A., Berndt, C.: A murine antiglycoprotein Ib complex monoclonal antibody, SZ 2, inhibits platelet aggregation induced by both ristocetin and collagen. *Blood* **69**: 570~577, 1987.
- 11) McGregor, J.L., Brochier, J., Wild, F., Follea, G., Trzeciak, M.C., James, E., Dechavanne, M., McGregor, L., Clemetson, K.J.: Monoclonal antibodies against platelet membrane glycoproteins. *Eur. J. Biochem* **131**: 427~436, 1983.
- 12) 渡辺清明: 血小板膜蛋白分析法. 臨床病理 特集第 71 号: 139~150, 1987.
- 13) Vartdal, F., Kvalheim, G., Lea, T.E., Bosnes, V., Graudernack, G., Ugelstad, J., Albrechtsen, D.: Depletion of T lymphocytes from human bone marrow. Use of magnetic monosized polymer microspheres coated with T lymphocyte-specific monoclonal antibodies. *Transplantation* **43**: 366~371, 1987.
- 14) Ugelstad, J., Mork, P.C.: Swelling of oligomer-polymer particle. New methods of preparation of emulsions and polymer dispersions. *Advances in Carvid and Interface Science*. **13**: 101~140, 1980.
- 15) Lea, T., Smeland, E., Funderud, S., Vartdal, F., Davies, C., Beiske, K., Ugelstad, J.: Magnetic

monosized polymer particle for fast and specific fractionation of human mononuclear cells. Scand. J. Immunol. **22**: 207~216, 1985.

16) Montgomery, R.R., Kunicki, T.J., Pidard, D.,

Corcoran, M.: Diagnosis of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombasthenia with a monoclonal assay on whole blood. J. Clin. Invest. **71**: 385~389, 1983.