◆原 著◆

固相化血小板を用いた酵素免疫測定法による 血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa の測定

第2報 Glanzmann 型血小板無力症 9 家系 10 症例とその両親 12 例の解析

武田 以知郎^{*1} 藤村 吉博^{*2} 水本 保子^{*2}
金 廣 昭 美^{*1} 吉 岡 章^{*1} 福 井 弘^{*1}
富 山 佳 昭^{*3} 倉 田 義 之^{*3} 内 田 和 人^{*4}

Whole Platelet Captured Enzyme Linked Immunosorbent Assay (WPC-ELISA) for Glycoprotein (GP) IIb/IIIa

II. Analysis on 10 Patients with Glanzmann Thrombasthenia belonging to 9 Families and their Parents

Ichiro TAKEDA^{*1}, Yoshihiro FUJIMURA^{*2}, Yasuko MIZUMOTO^{*2},
Terumi KANEHIRO^{*1}, Akira YOSHIOKA^{*1}, Hiromu FUKUI^{*1},
Yoshiaki TOMIYAMA^{*3}, Yoshiyuki KURATA^{*3}, Kazuto UCHIDA^{*4}

Key words: Glanzmann thrombasthenia, ELISA, GPIIb/IIIa.

In the first paper of this issue, we have described the establishment of whole platelet-captured enzyme-linked immunosorbent assay (WPC-ELISA) for the determination of platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa antigen. Using this method, we now analyzed the amount of GP IIb/IIIa antigen in 10 patients with Glanzmann thrombasthenia (GTA) belonging to 9 different families and their parents. In 6 patients with type I GTA who show a total lack of clot retraction, the GPIIb/IIIa antigen level ranged from 0.01% to 0.6%, and their parents (n=8) 9.3-64.9%. In 3 out of 4 patients with type II GTA who showed almost normal clot retraction indicated the level ranging from 3.6% to 5.0%, and their parents (n=4) 11.1%-35.3%. Another patient with type II GTA showed a level of 150% GPIIb/IIIa antigen, indicating that this case is a variant form of GTA.

^{*1} 奈良県立医科大学小児科学教室〔〒634 奈良県橿原市四条町840〕; Department of Pediatrics, Nara Medical College, 840 Shijo-cho, Kashihara City, Nara, Japan

^{*2} 同 輸血部; Department of Blood Transfusion, Nara Medical College

^{*3} 大阪大学医学部附属病院輸血部〔〒553 大阪市福島区福島1-1-50〕; Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, 1-1-50 Fukushima, Osaka City, Japan

^{*4} 奈良県赤十字血液センター〔〒639-11 奈良県大和郡山市筒井町6000-1〕; Nara Red Cross Blood Center, 600-1 Tsutsui-cho, Yamatokooriyama City, Nara, Japan 受付: 1992. 7. 23, 受理: 1993. 2. 10.

緒 言

Glanzmann 型血小板無力症 (GTA) は 1918 年に Glanzmann¹⁾ により記載された出血時間の延長と血餅退縮能の不全を特徴とする常染色体劣性遺伝形式を示す先天性血小板機能異常症で、両親はその保因者と考えられる。血小板機能検索の進歩と共に、本症のガラス面への血小板粘着能の低下や、ADP, collagen, adrenarin, thrombin などの血小板凝集惹起物質での凝集能の欠如が観察され、これらの異常は血小板膜糖蛋白 (glycoprotein: GP) IIb/IIIa 複合体の量的ないし質的異常による事が明らかにされるようになった。Inceman ら²⁾ (1962) は血小板の粘着、凝集が不良であるが、血餅退縮は正常に近い出血性素質を Essential athrombia と呼んだが、Hardisty ら³⁾ (1964), Caen ら⁴⁾ (1972) により、血餅退縮の欠如ないし著しく低下しているものは GTA の type I に、血餅退縮が正常か僅かに低下しているものは type II に分類されるようになった。本症の詳細な診断のためには GPIIb/IIIa の定性ないしは定量的解析が必要とされるが、Nurden ら⁵⁾ (1974) は SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 後に periodic acid-Schiff (PAS) 染色を用いて血小板膜の糖蛋白染色を行ったところ、GTA では GPIIb/IIIa の欠如が見られることを明らかにした。その後 Hagen ら⁶⁾ (1980) は 2 次元交差免疫

電気泳動 (crossed immunoelectrophoresis: CIE) によって type I, type II の GPIIb/IIIa の量的な差異を証明した。また近年 GPIIb/IIIa など血小板表面抗原に対する monoclonal 抗体 (MoAb) を利用し、flow cytometry によって血小板膜表面の抗原量の解析が可能となってきた⁷⁾。我々は洗浄血小板を可溶化せず、抗ヒト血小板 polyclonal 抗体を吸着せしめた polystyrene plate (以下 plate) に血小板を捕捉せしめ、二次抗体として peroxidase で標識した抗 GPIIb/IIIa MoAb (3F11) を用いた sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) により血小板膜表面上の GP IIb/IIIa 量を定量する方法 (whole platelet-captured ELISA: WPC-ELISA) を確立し、本号の第 1 報に報告した。今回、この方法を用いて 9 家系 10 例の GTA 患者とその両親 (12 例) について解析したので報告する。

試材および方法

1. 対象

奈良県立医科大学小児科および国立大阪病院小児科にて観察中の GTA 患者 9 家系 10 例と、その両親 12 例 (父 5 名, 母 7 名)。個々の患者の止血機能検査を Table 1 に示す。

2. 被検洗浄血小板の作成ならびに固相化血小板を用いた酵素免疫測定法による GPIIb/IIIa の測定

本号第 1 報に記載した方法によった。

Table 1 Clinical symptoms and laboratory findings on 10 patients with GTA

No.	Type	Case	Age/ Sex	Symptoms	Bleeding time (min)	Clot retraction (%)	Platelet count	Platelet aggr.
1	I	M. I	17/M	Epi., GIH	>30	0	Normal	Defect
2	I	M. N	16/F	Epo., GB	>30	0	Normal	Defect
3	I	S. M	15/M	Epi., GB	>30	0	Normal	Defect
4	I	K. O	17/M	Epi.	>30	0	Normal	Defect
5	I	A. K	5/F	Epi., GIH	>30	0	Normal	Defect
6	I	K. M	16/F	Epi.	>30	0	Normal	Defect
7	II	A. F	19/M	Epi., GB	>30	3	Normal	Defect
8	II	T. F	20/M	Epi., GIH	>30	5	Normal	Defect
9	II	K. S	20/F	Epi., Meno	>30	25	Normal	Defect
10	II	H. M	33/F	Epi., Ge. B.	>30	28	Normal	Defect

Epi.: epistaxis, GIH: gastrointestinal hemorrhage,

Pur.: purpura, GB: gingival bleeding, Meno.: menorrhagia Ge. B.: gestational bleeding,

Platelet aggr.: platelet aggregation by ADP, collagen, thrombin

Fig. 1 Determination of platelet GPIIb/IIIa antigen using WPC-ELISA in a typical case with type I GTA and its parents.

成 績

i) 典型的な type I GTA 症例とその両親の血小板膜 GPIIb/IIIa の WPC-ELISA : GTA type I とされる 1 家系の患者 (M.I.) とその両親よりそれぞれ血小板を採取し、血小板数 $10^4/\mu\text{l}$ – $10^6/\mu\text{l}$ の濃度について GPIIb/IIIa 抗原量を WPC-ELISA で測定した。type I 患者の各血小板数における吸光度は著しく低下しており、正常検量線より算定した抗原量は 0.12% であった。両親の吸光度は正常検量線と患児検量線の間の中間の曲線を呈し、抗原量は父親 13.8%，母親 12.1% であった。Fig. 1 に本症例の家系図と検量曲線を示した。

ii) 典型的な GTA type II の同胞患者例とその両親の血小板膜 GPIIb/IIIa の WPC-ELISA : GTA type II と考えられる同胞例 (T.F., A.F.) とその両親についても WPC-ELISA で GPIIb/IIIa の解析を試みた。この

Fig. 2 Determination of platelet GP II b/III a antigen using WPC-ELISA in typical cases with type II GTA and their parents.

同胞症例は共に正常吸光度より明らかに低下していたものの、算定した抗原量は兄が 4.8% と弟が 5.0% であった。両親は正常検量曲線と患児曲線の間の中間の曲線を示し、抗原量も父親 11.1% と母親 24.2% であった。Fig. 2 に症例の家系図と検量曲線を示した。

iii) GTA type II と考えられたが、WPC-ELISA にて変異病型と判明した 1 症例：臨床的にも、血餅退縮能を含む止血検査所見からも GTA type II と考えられていた 1 症例で、本法による GP II b/III a の解析を試みたところ 150% と正常レベルを示す結果が得られた。この症例は第 1 報で述べた radio-electroimmunoassay でも 120% の GPIIb/IIIa 抗原量を呈した (データ省略)。また本患者の子供 1 例についても検索し得たが、140% とやはり正常レベルを示した。Fig. 3 に本症例の家系図と検量曲線を示した。

iv) 9 家系 10 症例の GTA 患者およびその両親の血小板膜 GPIIb/IIIa 抗原量：正常人の血小板より作成した GPIIb/IIIa の標準検量曲線から、GTA 患者及びその両親の GPIIb/IIIa

Fig. 3 Determination of platelet GPIIb/IIIa antigen using WPC-ELISA in a variant case with GTA.

抗原量を求めた (Fig. 4). 正常人 30 名 (男 15 名, 女 15 名) の平均値 (mean $\pm$ 2SD) は第 1 報のごとく 105.2 $\pm$ 30.7% であったが, GTA type I 6 例は 0.2 $\pm$ 0.2% (0.01%~0.6%), type II 4 例中 3 例は 4.5 $\pm$ 0.8% (3.6%~5.0%) で明らかに低下し, type I と type II との間にも GP IIb/IIIa 抗原量において統計学的に有意差 ($P<0.001$) が見られた. GTA type I の両親 8 名は 9.3%~64.9% の値を示し, その平均値は 28.8 $\pm$ 20.3%, また type II 患者の両親 4 名 (変異病型を含まず) は 11.1%~35.3% でその平均値は 23.0 $\pm$ 9.9% であった. 統計学的にも両親群と患者群の間に明かな有意差 (それぞれ $P<0.001$) を認めた.

考 察

われわれは第 1 報にて報告した WPC-ELISA を用いて GTA 患者及びその両親についての GP IIb/IIIa 抗原量の測定をおこなっ

Fig. 4 Quantitative analysis of GP II b/III a antigen in platelets from patients with GTA and their parents.

た. まず, 正常人 30 名の血小板 GP IIb/IIIa 抗原量の平均値は 105.2 $\pm$ 30.7% であったが, GTA type I と思われる 6 例では 0.01~0.6% (0.2 $\pm$ 0.2%), また type II と思われる 3 例でも 3.6%, 4.8%, 5.0% といずれも明らかに低下しており, 既に臨床的および止血検査により診断された病型と一致した. しかし type II と診断されていた症例の中に正常レベルの GP IIb/IIIa (150%) を示すものを認めた. この症例は radio-electroimmunoassay でも 120% と正常血小板の GP IIb/IIIa レベルとほぼ同等の値が得られ, また木下らも flow cytometry を用いて本症例の GP IIb/IIIa を解析しているが, やはり 100% 以上の正常レベルを示したと報告している⁸⁾. すなわち本症例の GP IIb/IIIa は, 量的には正常を示すものの, 血小板凝集機能障害が明かな点より, 質的に異常が存在するものと考えられた. GTA 変異病型は 1982 年以降少なくとも 8 例報告されており, このうち 5 例でほぼ正常値の GP IIb/IIIa が認められて

いる。さらに木下らは本症例について種々の MoAb を用いた解析を試み、thrombin, ADP などの刺激によって fibrinogen 結合部位が活性化されないことによるものではないかと報告している⁹⁾。

本症例は今後、分子生物学的な検討によりさらに詳細な機能異常の解析がなされる必要があると思われる。一方、今回 GTA 患者家系のうちそれぞれの両親の GPIIb/IIIa についても測定したが、成績に示したようにいずれも有意に低値を示した。本症は先に述べたように常染色体劣性遺伝形式を示すとされ、保因者は理論上正常の 50% と考えられるが、今回の結果はこれに近い値が得られた。GTA 保因者の解析は Herrmann¹⁰⁾ や Coller¹¹⁾ らによって報告されているが、保因者の血小板 GPIIb/IIIa 抗原量は正常人の 30%~65% 程度の範囲にあり、患者と正常人のほぼ中間の値を示している。われわれの結果からは type I と type II の保因者の間に特に差は認められなかったが、WPC-ELISA 測定法の検量曲線の性質から、これら中間領域での軽微な差を検出するのに困難があるためと思われた。しかし type I, type II GTA の保因者は共に正常人群とは明らかに有意差がみられ、保因者診断の一助になるものと考えられた。以上の成績から本法は GTA の診断及び病型分類、さらには保因者診断にも有用な方法と考えられた。また本法は、GPIb の異常症である Bernard-Soulier 症候群など他の血小板機能異常症の解析にも応用でき得ると考えられ、今後これらを含めた様々な疾患についても検討して行きたい。

結 果

WPC-ELISA を用いて GTA 患者および両親についての血小板膜 GPIIb/IIIa の検討をおこなった。この結果、患者およびその両親はいずれも有意に低値を示し、本法が GTA の診断ならびに保因者の診断に有用であると考えられた。

文 献

- 1) Glanzmann E: Hereditäre hamorrhagische Thrombasthenie. Ann. Paediatr., 88: 113~212, 1918.
- 2) Inceman S, Unugur A, Aran M: Essential thrombophilia. Thromb. Diathes. Haemorrh., 8: 502~510, 1962.
- 3) Hardisty RM, Dormandy KM, Hutton RA: Thrombasthenia: Studies on three cases. Brit. J. Haemat., 10: 371~387, 1964.
- 4) Caen JP: Glanzmann's thrombasthenia. Clin. Hematol., 1: 383~392, 1972.
- 5) Nurden AT, Caen JP: An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann thrombasthenia. Br. J. Haematol., 28: 233~253, 1974.
- 6) Hagen I, Nurden AT, Bjerrum OJ, Solum NO, Caen JP: Immunochemical evidence for protein abnormalities in platelets from patients with Glanzmann's thrombasthenia and Bernard-Soulier syndrome. J. Clin. Invest., 65: 722~731, 1980.
- 7) Jennings LK, Ashmun RA, Wang WC: Analysis of human glycoproteins IIb/IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. Blood, 68: 173~179, 1986.
- 8) 木下清二, 吉岡慶一郎, 新堂隆人, 笠原素子, 田中恒二: 血小板無力症の Flow cytometry を用いた検討. 臨床血液, 32: 951~957, 1991.
- 9) 木下清二, 吉岡慶一郎, 辻野儀一, 新堂隆人, 笠原素子, 田中恒二: 血小板無力症亜型例の Flow cytometry を用いた検討. 臨床血液, 33: 430~435, 1991.
- 10) Herrmann FH, Meyer M, Gogstad GO, Solum NO: Glycoprotein IIb/IIIa complex in platelets of patients and heterozygotes of Glanzmann's thrombasthenia. Thromb. Res., 32: 615~622, 1973.
- 11) Coller BS, Seligsohn U, Zivelin A, Zwang E, Lusky A, Modan M: Immunologic and biochemical characterization of homozygous and heterozygous Glanzmann thrombasthenia in the Iraqi-Jewish and Arab populations of Israel: comparison of techniques for carrier detection. Br. J. Haematol., 62: 723~735, 1986.