原 著

β -トロノグロブリン放出テストによる 抗血小板抗体の検出法について

寮 隆吉 橋本 誠 棕本 芳樹 山口 延男

神戸大学医学部附属病院輸血部

(昭和61年 4 月23日受付)

THE DEVELOPMENT OF β -THROMBOGLOBULIN RELEASE TEST FOR DETECTING ANTI-PLATELET ANTIBODY

Ryukichi Ryo, Makoto Hashimoto, Yoshiki Mukumoto and Nobuo Yamaguchi

Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital

β -thromboglobulin (β -TG) release test was developed to detect heterologous anti-human platelet antibody (hetero-antibody) derived from rabbits and alloantibody obtained from multi-transfused patients refractory to random platelets. The highest dilution of hetero-antibody that gave a positive result was found to be 1:512 in the PSIFT. At a 1:32 dilution, β -TG release and ^{14}C -5-HT release from PRP were 1,292 ng/ml and 31%, respectively. At a 1:512 dilution, β -TG release and ^{14}C -5-HT release were 172 ng/ml and 4.8%. With higher concentration of antibody, LDH in plasma was 128 IU/L. It seems likely that β -TG release induced by higher concentrations of hetero-antibody was mediated in part by platelet lysis, as judged by LDH loss. The plasma from patients with alloantibody detected using PSIFT caused more significantly β -TG release (308 ± 63 ng/ml, N:14) than control plasma (38 ± 12 ng/ml, N:6). The results have suggested that β -TG release test is a reliable and sensitive marker for detecting platelet antibody.

緒 言

近年抗血小板抗体は血小板表面の免疫グロブリンを測定して検討されているが^{1)~6)}、抗体による血小板からのセロトニン (5-HT) 放出の程度から、抗体の有無を検索できることが報告されている⁷⁾⁸⁾。抗血小板抗体は血小板に結合して血小板機能に影響を与えるので、抗体の生体内での働きを考える上でも、抗体の血小板機能に及ぼす影響をみて、抗血小板抗体の測定をおこなうのは意義あることと考えられる。そこで5-HTと同様に血小板から放出されることが知られている β -トロノグロブリン(β -TG)⁹⁾¹⁰⁾の放出の程度から、抗血小板抗体の検出が可能かどうか検討した。

方 法

1. 多血小板血漿 (PRP) と乏血小板血漿 (PPP) の作製: 1/10容3.8%クエン酸ソーダ (ミドリ十字) で採血し、直ちにパラフィルムで密閉して氷

中に保存した。1,100rpm, 10分間, 4℃で遠沈(日立05PR-2遠心機)してPRPを得た。さらに2,500rpm, 15分間, 4℃で遠沈してPPPを得て、氷中に保存した。2. β -TGの測定: 50 μl の被検血漿を β -TG リアバック (The Radiochemical Centre 社) で測定した。時に検体を生食で希釈して測定に供した。一部は-20℃で保存して、凍結融解後 β -TG量を測定した。3. 5-HT放出テスト: 既報¹¹⁾に準じて ^{14}C -5-HT (Amersham 社) 10 μCi を10ml PRPに添加して、上清中の5-HTの放射活性を測定して、血小板中に摂取された5-HTの放射活性から上清中の5-HT放出率を求めた。なお β -TGと5-HT放出は0.5ml PRPに被検血清あるいは血漿を10~500 μl 添加してstirrer barを1,100rpmで覚拌して、37℃で反応させて、上清中の β -TGと5-HTの放出量を求めた。4. 抗血小板抗体の作製: 5×10^8 個のO型洗浄人血小板を

complete Freund Adjuvant (Difco 社) に混じて家兎を免疫した後、2 週間毎に同量の血小板と incomplete Freund Adjuvant と混じて計 5 回免疫した後、血清を分離して AB 型赤血球の stroma で吸収した後、56℃で30分間加熱して非働化して、抗人異種血小板抗体（ヘテロ抗体）を得た。血清中の ADP を除去するために 80 μ g/ml apyrase (Sigma 社) を添加して放出テストに供した。又頻回血小板輸血を受けて 1 時間後の血小板回収率が 0 % となった患者から得られた血漿を抗血小板同種抗体（アロ抗体）として用いた。5. 抗血小板抗体の力価の測定：Borne の PSIFT²⁾ でおこなった。FITC 標識抗ヒト Ig はヤギ由来の Kallestad 社のものを用いた。蛍光を flow cytometry

(Ortho Spectrum III)¹²⁾ で検討した。6. LDH の測定：Wacker¹³⁾ の方法の変法で SMAC (Technicon 社) を用いて測定した。

prostaglandin E₁ (PGE₁) は小野薬品の G501 をアスピリンは Sigma 社のものを用いて、同時生食に溶解した。

成 績

1. β -TG の自然放出：採血後直ちに得られた 0.5ml PRP (30~40 $\times 10^4/\mu$ l) に正常 AB 型血漿 0.5ml を添加して、キュベットを密閉して stirrer bar を 1,100rpm で攪拌した際の放出された β -TG を求めた。攪拌後の上清中の β -TG は添加した PPP 中の β -TG の値を差し引いて求めると 5 分後 26 ± 11 ng/ml (N: 12) で 30 分後 38 ± 21 ng/ml であった(図 1)。採血後 0℃で PRP を保存して、空気との接触を避けて pH を一定に保つと、従来考えられている程 β -TG の自然放出は高値でなかった。

2. ヘテロ抗体の力価：家兎で作製した抗体は既報¹⁴⁾の如く血小板蛋白 50K に比較的特異性のある性状を有していて、PSIFT による抗体力価の検討によって 512 倍まで血小板に結合することが明らかとなった(図 2)。

3. ヘテロ抗体による β -TG 放出の経時的変化：0.5ml PRP (34 $\times 10^4/\mu$ l) に 1/50 容のヘテロ抗血清を添加すると図 3 に示した如く、5 分後 1,050ng/ml、10 分後 1,250ng/ml、20 分後 1,263ng/ml そして 30 分後 1,270ng/ml の β -TG 放出を

図 1 Release of β -thromboglobulin with time by normal plasma
PRP (34 $\times 10^4 \sim 42 \times 10^4/\mu$ l) 0.5ml と同じ血液型の PPP 0.5ml を加えて 5 分そして 30 分後の β -TG 放出を観察した。

図 2 Analysis of titres of anti-human platelet rabbit serum by flow cytometry
ヘテロ抗血清を 32 倍から 2,048 倍まで希釈して PFA 固定血小板と反応させて FITC-抗ヒト IgG で血小板表面の蛍光を flow cytometry で検討した。128 倍で 61.2%、256 倍で 32%、512 倍で 4.6% そして 1,024 倍で 0.6% の蛍光陽性の血小板が存在していた。横軸は蛍光の強度を縦軸は細胞数を示している。

図3 Time course of β -thromboglobulin release by anti-human platelet rabbit serum

PRP 0.5ml に apyrase 80 μ g/ml を加えたヘテロ抗血清を添加して、5分、10分、20分そして30分後の β -TG 放出の程度を観察した。○-○は抗血清による放出、●-●は正常家兎血清による β -TG 放出を示している。

認めた。正常家兎血清添加でもある程度の β -TG 放出があるので、以後 β -TG 放出量は、検体添加20分後の上清中の β -TG 量から非特異的 β -TG 放出量を差し引いた値で示した。

4. ヘテロ抗体による β -TG 放出、5-HT 放出及びLDH 放出：32倍希釈になるようヘテロ抗体を0.5ml PRP ($38 \times 10^4/\mu$ l) に添加すると、 β -TG 放出は1,292ng/ml であり、その際の5-HT 放出は31%であった(図4)。同時に測定した上清中のLDH は128IU/l で、無処置の血漿中に存在する102IU/l に比較して高値であるので、32倍のヘテロ抗体存在下の β -TG と5-HT 放出は一部血小板の融解によるものと考えられた。抗体を希釈すると、濃度依存性に β -TG と5-HT 放出が認められ、放出の低下と同時に上清中のLDH は正常化した(図4)。PSIFT で抗体が血小板に結合していることが確認できた最大希釈の512倍希釈の抗体は β -TG を172ng/ml そして5-HT 放出を4.8%惹起した。

4. ヘテロ抗体による β -TG 放出と5-HT 放出に及ぼすPGE₁とアスピリンの影響：64倍希釈の抗体のPRP ($40 \times 10^4/\mu$ l) からの β -TG 放出は1,320ng/ml で1 μ g/ml PGE₁ 存在下では1,300 ng/ml で、0.5mM アスピリンでは1,310ng/ml で、 β -TG 放出はこれらの薬物で抑制されなかつ

図4 Effect of anti-human platelet rabbit serum on β -thromboglobulin release, 14 C-5-HT release and LDH loss

PRP ($38 \times 10^4/\mu$ l) 0.5ml に apyrase 80 μ g/ml で処理したヘテロ抗体を32倍から1,024倍に希釈するよう加えて20分後の上清中の β -TG 放出、 14 C-5-HT 放出とLDH を検討した。○-○は β -TG 放出を、●-●は5-HT 放出を示している。その際の上清中のLDH とPSIFTの結果は図の上段に示した。

図5 Effect of refractory patient's plasma on β -thromboglobulin release

PRP 0.5ml ($32 \times 10^4/\mu\text{l} \sim 40.0 \times 10^4/\mu\text{l}$) に正常 AB 型血漿 0.5ml あるいは血小板輸血無効になった 3 名の患者から得られた血漿を PSIFT で抗体に対応する抗原の確認できた PRP と反応させて 20 分後の β -TG 放出を観察した。

た。抗体によって惹起される放出反応は、トロンボキセン A_2 代謝や、cyclic AMP 代謝と無関係であると考えられた。

5. アロ抗体による β -TG 放出：血小板輸血が無効となった患者 3 名から得られた血漿 0.5ml を PSIFT で、これらの患者血清中に存在する抗体に対応する抗原を有していることが確認できた供血者 14 名の PRP 0.5ml と 20 分間反応させると $308 \pm 63 \text{ ng/ml}$ (N : 14) の β -TG 放出が認められた。正常 AB 型血漿による β -TG 放出は $38 \pm 12 \text{ ng/ml}$ (N : 6) で、明らかに血小板輸血無効例に β -TG 放出が高かった (図 5)。

考 案

血小板放出反応は種々の刺激によって惹起されるが、1973 年 Shulman ら⁷⁾は ITP 患者血漿や、同種抗体そして薬物依存性抗血小板抗体によっても血小板から 5-HT が放出されることを報告し、1982 年 Harker ら¹⁵⁾は、5-HT 放出テストで ITP の診断ができることを確認している。又血小板第 3 因子放出テスト¹⁶⁾によっても、抗血小板抗体の検索が可能であるので、抗血小板抗体が血小板放出反応を惹起することは明らかである。血小板は 5-HT や ADP を貯留している dense body と、

β -TG, PF-4, PDGF などの血小板特異蛋白を貯留している α -顆粒があり、何らかの刺激によって血小板が活性化されると、5-HT, ADP そして β -TG などが放出される¹⁷⁾。しかも興味あることに 5-HT に比較して β -TG や PF-4 は血小板から容易に放出されることが知られており¹⁸⁾、又 5-HT のように一度放出された後、再摂取されることがないので、抗血小板抗体の検索のために β -TG 放出は 5-HT 放出テストより鋭敏であると推測される。今回ヘテロ抗体を用いて β -TG 放出テストを実施すると、抗体が血小板に結合することが確認できる場合、抗血小板抗体が β -TG 放出を惹起することが明らかとなった。しかし予測に反して β -TG 放出がある時は、5-HT 放出も認められ、抗体によって β -TG が 5-HT より容易に放出されるとは考え難かった。ただ抗体の力価が弱い場合は、5-HT 放出が有意と判断するのにちゅうちょされる場合でも、 β -TG 放出は 172 ng/ml の値が得られるので、抗体検出として 5-HT 放出テストを用いるより、 β -TG 放出テストの方がより正確に陽性と判定できることが明らかとなった。

又頻回輸血後に生じたアロ抗体も同様に血小板から β -TG 放出を惹起することが認められた。しかも β -TG 放出を惹起する血漿は血小板に結合する IgG 抗体を有していることが PSIFT で確認できるので、アロ抗体の血小板への結合によって β -TG 放出が誘発されると考えられた。アロ抗体が β -TG 放出を惹起するという成績は、頻回輸血によって生じた血小板同種抗体は、in vivo でも輸注血小板に結合して放出反応をおこし、血小板を消費していることを示唆していると考えられ興味を持たれた。事実既報¹⁹⁾の如く、 β -TG 放出テスト陽性の血小板は輸注するとすみやかに患者の中で消失するのが認められる。

従来抗血小板抗体の有無は血小板表面に結合した免疫グロブリンを測定して判定されていたが、その抗体が血小板機能にどのような影響を与えるかについての情報は得られない。しかし β -TG 放出テストを測定すると、抗体が血小板に結合して血小板にどのような障害を与えるかを知ることが出来るので、放出テストによる抗体検出は、血小

板表面免疫グロブリン測定と違った臨床的な意義を有していると考えられる。血小板表面の免疫グロブリンを測定すると同時に、抗体による β -TG放出を検討することが必要であろう。

なおITP患者の血漿中に存在する自己血小板抗体を β -TG放出テストで検出出来るかどうかについても興味あるところである。しかし血小板は自己抗体のみならず、免疫複合体などを容易に吸着する性質を持っているので、これらの血小板に影響を与える因子は、*in vivo*では流血中に存在しない可能性が高い。従って血漿を用いて抗体の有無を検索する β -TG放出テストは、自己抗体を検出するためにはアロ抗体を検出する程鋭敏な方法でないかもしれない。今後、 β -TG放出テストがこれらの抗体とどのように関り合っているか明らかにしたいと考えている。

結 語

家兎由来抗人血小板抗体（ヘテロ抗体）と、頻回輸血によって血小板輸血が無効となった人から得られた血小板同種抗体（アロ抗体）を含む血漿による、血小板からの β -TG放出反応を検討した。PSIFTで512倍まで陽性のヘテロ抗体は32倍希釈で1,292ng/mlの β -TG放出を、又512倍希釈で172ng/mlの β -TG放出を惹起した。その際 ^{14}C -5-HT放出は31%と4.8%であり、同時に測定したLDHは128IU/lと1,021IU/lであった。ヘテロ抗体による β -TG放出は5-HT放出と同じ程度放出され、高力価の抗体による β -TG放出は一部血小板融解に由来していると考えられた。アロ抗体はPSIFTで陽性を示す血小板を用いると、 β -TG放出は $308 \pm 63 \text{ ng/ml}$ （14例）であり、正常対照の $38 \pm 12 \text{ ng/ml}$ （6例）に比較して有意に高値であった。以上 β -TG放出テストは抗血小板抗体検出に有用であることを報告した。

文 献

- 1) Dixon, R., Rosse, W. and Ebbert, L.: Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura. Correlation of serum and platelet-bound antibody with clinical response. *New Eng. J. Med.*, 292: 230—236, 1975.
- 2) Borne, A.E.G. Kr., von dem, Verheugt, F.W.A.,

- Oosterhof, F., von Riesz, E., Brutel de la Rivière, A. and Engelfriet, C.P.: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Brit. J. Haemat.*, 39: 195—207, 1978.
- 3) Nel, J.D. and Stevens, K.: A new method for the simultaneous quantitation of platelet bound immunoglobulin (IgG) and complement (C3) employing an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. *Brit. J. Haemat.*, 44: 281—290, 1980.
- 4) Shibata, Y., Juji, T., Nishizawa, Y., Sakamoto, H. and Ozawa, W.: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang.*, 41: 25—31, 1981.
- 5) Kunicki, T.J., Koenig, M.B., Kristopeit, S.M. and Aster, R.H.: Direct quantitation of platelet-associated IgG by electroimmunoassay. *Blood*, 60: 54—58, 1982.
- 6) Lobuglio, A.F., Court, W.S., Vinocur, L., Maglott, G. and Shaw, G.M.: Immune thrombocytopenic purpura. Use of a ^{125}I -labeled anti-human IgG monoclonal antibody to quantify platelet-bound IgG. *New Eng. J. Med.*, 309: 459—463, 1983.
- 7) Hirschman, R.J. and Shulman, N.R.: The use of platelet serotonin release as a sensitive method for detecting anti-platelet factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Brit. J. Haemat.*, 24: 793—802, 1973.
- 8) Heinrich, D., Gutschank, S. and Mueller-Eckhardt, C.: HLA-antibody induced ^{14}C -serotonin release from platelets. A methodological analysis. *Vox Sang.*, 33: 65—78, 1977.
- 9) Kaplan, K.L., Broekman, M.J., Chernoff, A., Lesznik, G.R. and Drillings, M.: Platelet α -granule proteins: Studies on release and subcellular localization. *Blood*, 53: 604—618, 1979.
- 10) 寮 隆吉, 西郷勝康: 血小板第4因子。β-トロノボグロブリンの作用機序。血小板1984—血小板放出反応一, 科学評論社, 東京, 1984, 95—104.
- 11) Ryo, R.: Studies on the role of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in platelet functions with special reference to aggregation and serotonin release of human blood platelets. *Acta Haemat. Jap.*, 39: 85—96, 1976.
- 12) 西郷勝康, 中谷洋子, 山口延男, 橋本 誠, 寮 隆吉: 抗血小板抗体の*in vivo*での巨核球への結合。血液と脈管, 16: 187—190, 1985.
- 13) Wackery, W.E.C., Ulmer, D.D. and Vallee, B. L.: Metalloenzymes and myocardial infarction, malic and lactic dehydrogenase activities

and zinc concentrations in serum. *New Engl. J. Med.*, 255: 449—456, 1956.

- 14) 西郷勝康, 寮 隆吉, 橋本 誠, 上田耕蔵, 中谷洋子, 平居啓治, 山口延男: EDTA 依存性偽性血小板減少症の抗血小板抗体の認識する抗原について. *臨床血液*, 27: 1305—1309, 1986.
 - 15) Schwartz, K.A., Slichter, S.J. and Harker, L. A.: Immune-mediated platelet destruction and thrombocytopenia in patients with solid tumors. *Brit. J. Haemat.*, 51: 17—24, 1982.
 - 16) Karparkin, M., Siskind, G.W. and Karptakin, S.: The platelet factor 3 immunoinjury technique re-evaluated. Development of a rapid test for antiplatelet antibody. Detection in various clinical disorders, including immunologic drug-induced and neonatal thrombocytopenias. *J. Lab. Clin. Med.*, 89: 400—408, 1977.
 - 17) 寮 隆吉, 神崎光也: 血小板放出反応. *臨床病理*, 29: 344—349, 1981.
 - 18) Ryo, R., Proffitt, R.T. and Deuel, T.F.: Human platelet factor 4: Subcellular localization and characteristics of release from intact platelets. *Thromb. Res.*, 17: 629—644, 1980.
 - 19) 寮 隆吉, 橋本 誠, 西郷勝康, 中谷洋子, 山口延男: 血小板輸血無効状態の患者中の抗 HLA-BW4 抗体の検出. *臨床血液*, 26: 1974—1978, 1985.
-