

特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic Thrombocytopenic Purpura : ITP) における PAIgG 値の検討

奈良県立医科大学附属病院輸血部

河本 順雄, 内田 麻里, 西田 幸世
石本 盛治, 吉田 英里, 武田 以知郎
嶋 裕子, 水本 保子, 藤村 吉博

DETECTION OF PLATELET ASSOCIATED IgG (PAIgG) IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC THROMBOCYTOPENIC PURPURA

YOSHIO KAWAMOTO, MARI UCHIDA, SACHIYO NISHIDA, SEIJI ISHIMOTO,
ERI YOSHIDA, ICHIRO TAKEDA, HIROKO SHIMA, YASUKO MIZUMOTO
and YOSHIHIRO FUJIMURA

Department of Blood Transfusion, Nara Medical University

Received March 9, 1992

Summary: Measurement of Platelet Associated IgG (PAIgG) in patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura (ITP) has clinical significance in diagnosis of the disease and evaluation of the prognosis. The value of PAIgG in these patients has been described mostly using fresh washed platelets and enzyme linked immunosorbent assay in previous publications. In this paper, we compare the values using washed frozen-thawed platelets with those of fresh washed platelets in 20 normal individuals. The former value (mean \pm SD) shows 14.9 \pm 4.5 ng/10⁷ pl and the latter 8.0 \pm 5.9 ng/10⁷ pl. The correlation coefficient between them was 0.69.

In 7 patients with acute ITP, the value of PAIgG was 124.6 \pm 94.3 ng/10⁷ pl and the value from 29 patients with chronic ITP was 68.6 \pm 113.7 ng/10⁷ pl. In both instances, there was a significant negative correlation between platelet counts and PAIgG values ($Y=2.69-0.737 X$, $r=-0.70$).

This result indicates that washed frozen-thawed platelets can be conveniently used for the determination of PAIgG instead of fresh washed platelets.

Index Terms

PAIgG, frozen-thawed platelets, ELISA, ITP

緒 言

Harrington ら¹⁾が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と健常人の血小板減少が引き起

こされることを報告し、またこの物質が 7S- γ globulin 分画にあることが判明して以来、ITP は血小板構成成分に対する、自己あるいは同種抗体により引き起こされる自己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、これら血小板抗体の測定法は、従来より血小板凝

集試験, 補体結合試験, セロトニン阻止試験, セロトニン放出試験, 抗グロブリン試験などが用いられてきたが, そのいずれもが感度の低さ, 手技の煩雑さが問題とされてきた²⁾⁻⁵⁾.

1975年 Dixon ら⁶⁾が ITP 患者の血小板表面免疫グロブリン(Platelet Associated IgG: PAIgG)量をヒッジ赤血球溶血試験を用いて直接測定する方法を確立したが, 近年 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Radio Immunoassay (RIA) などを用いて PAIgG を微量検出する方法が開発された⁷⁾⁻¹⁰⁾.

一方, ITP 患者血清中の抗血小板抗体を正常人血小板に吸着せしめ測定する血小板結合性 IgG (Platelet Binding IgG: PBIgG)量は血小板数との間に良好な相関関係なく, むしろ PAIgG 量と血小板数との間に強い相関が認められるとの報告が多い。しかしながら, 新鮮洗浄血小板を用いての PAIgG の測定は, 時間制約および検体数の制限など, 日常検査として行なうには不備な点が多い。今回われわれは micro ELISA 法¹¹⁾にて健常人 20 名の新鮮洗浄血小板および洗浄凍結血小板の PAIgG を比較測定し, それぞれの正常値を決定するとともに ITP 患者の洗浄凍結血小板 PAIgG 値を測定したので, その値と血小板数との相関について報告する。

対 象

対象は昭和 62 年 12 月初めから平成 3 年 3 月末までに当大学附属病院小児科または第二内科を受診した未治療および加療中の ITP 患者 36 名, うち急性型 7 名(男性 6 名, 女性 1 名, 年齢 5 カ月から 63 歳), 慢性型 29 名(男性 14 名, 女性 15 名, 年齢 6 歳から 66 歳)である。対照としては健常成人 20 名(男性 10 名, 女性 10 名: 年齢 22 歳から 45 歳)から得た血小板を用いた。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¹²⁾によった。なお, 測定日を異にして複数回測定している症例では, 血小板数が最低値を示した時の PAIgG 値を統計試料として用いた。

方 法

方法は, 椿尾ら⁷⁾の原法を改変した林ら¹¹⁾の micro ELISA 法を用いた。

1) 血小板浮遊液の調整: 3.8% クエン酸ナトリウムと全血を 1:9 の割合で患者の血小板数に応じ 10 から 20 ml 採血し, 1,400 rpm で 5 分間遠心し platelet rich plasma (PRP) を得た。この PRP を更に 800 rpm で 5 分間遠心し, 混入した赤血球, 白血球を除去した。次に, 得られた上清の血小板浮遊液と同量の 9 mM EDTA 加

0.3% Bovine Serum Albumin (BSA)-Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.3 を加え 3,000 rpm 2 分間遠心し上清を除去した。続いて, 得られた血小板沈渣に上記緩衝液を注入し, ポリスチレンディスプレイザブルビベットにて血小板沈渣を再浮遊させた。同様の操作を更に 5 回繰り返すことにより血小板を洗浄し, 最後に 0.1% BSA-PBS に再浮遊させ, 血小板数を $60-150 \times 10^3 / \mu\text{l}$ に調整し, 血小板浮遊液を作製した。なお, 検体は測定まで -70°C にて凍結保存した。今回, 健常成人の PAIgG に関しては凍結保存した血小板と新鮮な洗浄血小板の両方で測定し, 結果を比較検討した。

2) ヒト IgG のマイクロプレートへのコーティング: ヒト IgG を 0.2 M carbonate buffer pH 9.6, にて $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度に調整し, 各 well に $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し, 4°C over night にて well に吸着せしめた。次に, IgG 溶液を捨て, 0.1% BSA-PBS で well を 3 回洗浄した後, 非特異的な蛋白の吸着を防ぐために 1% BSA-PBS $200 \mu\text{l}$ を加えて室温で 2 時間静置した。その後 0.1% BSA-PBS で 3 回洗浄した。なお, マイクロプレートは使用時まで 4°C にて保存した。

3) PAIgG 量の測定: ヒト IgG を固相化したマイクロプレートを使用前に 0.1% BSA-PBS で 3 回洗浄した。次に各 well に 1) の方法にて調整した洗浄血小板浮遊液 $50 \mu\text{l}$ を加え, 同時に 0.1% BSA-PBS で 2,000 倍に希釈したアルカリフォスファターゼ (ALP) 標識抗ヒト IgG 血清 (LIFE SCIENCE 社, USA) $50 \mu\text{l}$ を加え 37°C で 2 時間反応させた。次に, 0.1% BSA-PBS で 7 回洗浄後, well 側に結合した ALP 量をフェニルリン酸, 4 アミノアンチピリンを含んだ ALP 基質液 (IATRON, 日本 アルカリフォスファターゼ測定用試液 S) $100 \mu\text{l}$ を加え 37°C で 60 分間反応させ, 更に過ヨウ素酸カリウムを含んだ ALP 発色液 (IATRON, 日本) $100 \mu\text{l}$ を加えて室温で 10 分間放置後, 波長 492 nm で吸光度を測定した。PAIgG 量は三重測定し, 血小板 10^7 個当りの IgG 量 ($\text{ng} / 10^7 \text{ platelet}$) で示した。また, 標準曲線は, 洗浄血小板浮遊液の代わりに 0.1% BSA-PBS で段階的に希釈した既知濃度のヒト IgG $50 \mu\text{l}$ を加え, 以下同様の操作を行い得られた吸光度より作製した。

成 績

1) 標準曲線

ヒト IgG 濃度が 0.5 ng 以下, 及び 500 ng 以上では標準曲線は片対数グラフではほぼ横ばい状態となったが, $0.5-500 \text{ ng}$ の間ではやや右方に突出した弧を描いた。これより, 検量線は比較的直線性がよく保たれている $1.0-$

250 ng の範囲の値のものを用いた (Fig. 1).

2) PAIgG の正常値

健康成人 20 名の洗浄凍結血小板を使用した際の PAIgG 値は $14.9 \pm 4.5 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ であり、これより Mean + 2 SD の範囲 $23.9 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ 以下を正常値とした (Fig. 2). 更に、新鮮洗浄血小板を使用した場合の PAIgG 値は $8.0 \pm 5.9 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ であった。この PAIgG 値は洗浄凍結血小板使用時の測定値に対し 1.0 倍から 0.2 倍、平均で 0.4 倍の値であったが、両者の相関関係は回帰式で $Y = 10.47 + 0.533 X$ ($r = 0.69$) であった (Fig. 3). 以後、ITP 患者血小板の PAIgG 値は洗浄凍結血小板を用いて算出した。

3) ITP 患者における PAIgG 値

ITP 患者 36 例の PAIgG の平均値は $79.5 \pm 111.9 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ であり、うち 22 例 61% が PAIgG 高値を示した。この 36 症例を急性および慢性 ITP に分けてみると、急性 ITP 患者では 7 例全例に PAIgG 高値を認め、測定値は $124.63 \pm 94.27 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ と平均値に比し、より高い値を呈した。慢性 ITP 患者では、29 例中 15 例、52% が PAIgG 高値であり、測定値は $68.55 \pm 113.74 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ であった。また、ITP 患者は PAIgG の平均値も急性

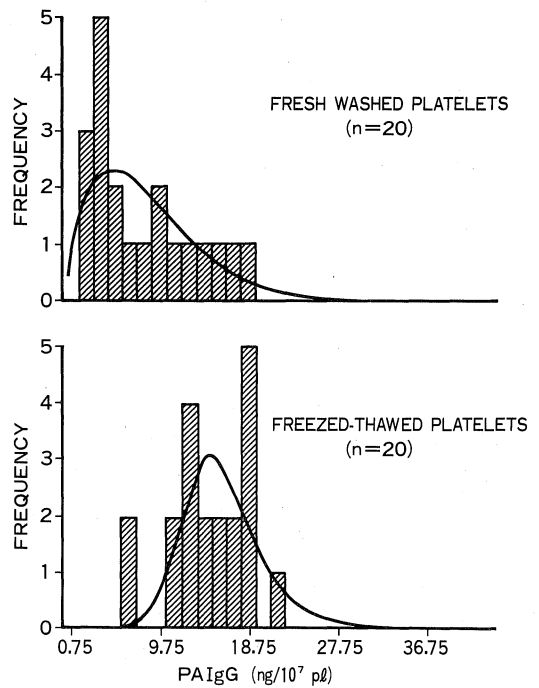


Fig. 2. Distribution of PAIgG value determined by fresh washed platelets (top) and freeze-thawed platelets (bottom) in 20 normal individuals.

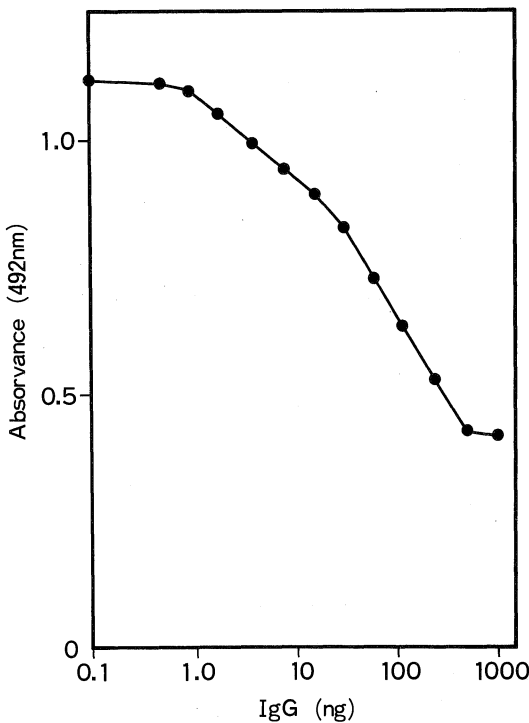


Fig. 1. Standard curve for the determination of PAIgG.

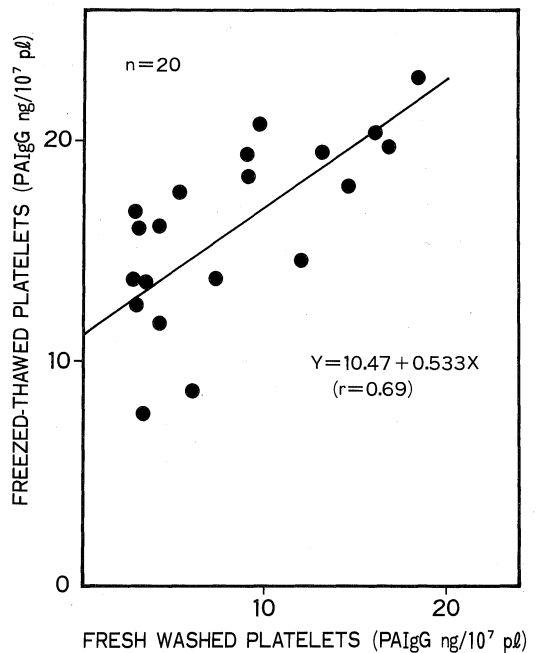


Fig. 3. Relationship between the PAIgG values determined by fresh washed platelets (X-axis) and freeze-thawed platelets (Y-axis).

型, 慢性型ともに正常人の PAIgG 値に比し有意の高値を示した($p < 0.01$). 急性型の値は慢性型よりも高値の傾向にあったが両者の間に有意の差は認められなかった (Fig. 4).

4) ITP 患者における血小板数と PAIgG 値との関係

ITP 患者全例において, 血小板数と PAIgG 値との相関を見てみると Fig. 5 に示す如く有意の負の相関を認めた($Y = 2.69 - 0.737 X$, $r = -0.70$). 急性型における血小板数と PAIgG 値との相関係数もほぼ同値であった.

考 察

従来, ITP 患者における血小板数と PAIgG 値の間には強い相関が認められないことが示唆されていたが, 近年, 洗浄後酸処理した正常血小板と患者血清を用いた flow cytometry による解析にて両者間には負の相関が認められることが判明した¹³⁾¹⁴⁾. 一方, 1975 年 Dixon ら⁶⁾が全ての ITP 患者の PAIgG 値が高値を呈すること, また, これら患者の血小板数と PAIgG 値との間に有意の負の相関が認められることを発表した. これより PBIgG および PAIgG の測定は病態を知る上で重要な検査であるが, 検査をより簡単に行うには後者が有用である.

PAIgG の測定法としてこれまでに complement lysis inhibition assay, Fab-anti-Fab 法, platelet suspension immunofluorescence (PSIFT) 法や radio active anti-immunoglobulin test などが報告されているが, 今回われわれは測定が比較的簡便である林らの micro ELISA 法¹¹⁾をもちいて PAIgG を定量的に測定した.

健常成人の PAIgG 値の測定にあたり, 新鮮洗浄血小板と洗浄凍結血小板を用いて比較検討した. 測定実測値では, 洗浄凍結血小板を用いた方が他方に比し平均で 2.5 倍と高値であった. これは, 血小板を凍結融解することにより, 血小板の α 顆粒などから内因性の IgG が放出されるためではないかと考えられた¹⁵⁾. しかし, Kelton ら¹⁶⁾は, "intact" な血小板と "total" の血小板で PAIgG の測定値を比較したところ両者に有意の差は認められなかったと報告している. われわれの成績においても, 正常ヒト新鮮洗浄血小板と洗浄凍結血小板の間に一定倍数の量的関係は認められなかった. 今回, ITP 患者においては両測定値の比較は行なっていないが, 内因性の IgG の値が一定であることを想定し, 全ての患者血小板 PAIgG 値は一度に大量の検体を処理し得る利点を考慮し, 洗浄凍結血小板を用いた.

1981 年 McMillan ら¹⁷⁾はこれまでの報告を集計し, 慢性型 ITP 患者 299 例のうち 278 例, 93% で PAIgG 値が高値であると報告した. また, Luiken¹⁸⁾, McMillan¹⁷⁾ら

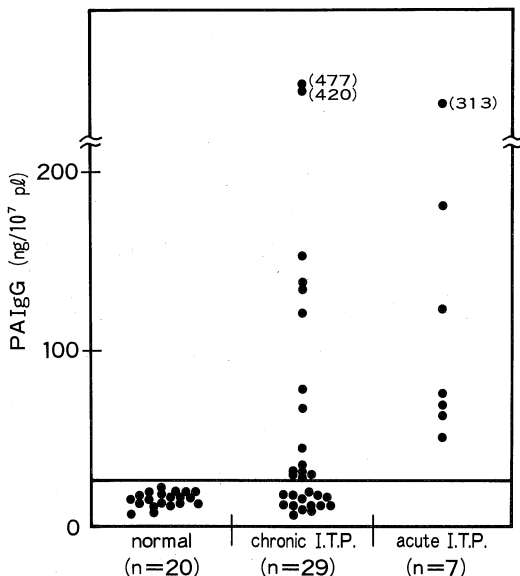


Fig. 4. PAIgG values in 20 healthy normal individuals, 29 patients with chronic ITP and 7 patients with acute ITP.

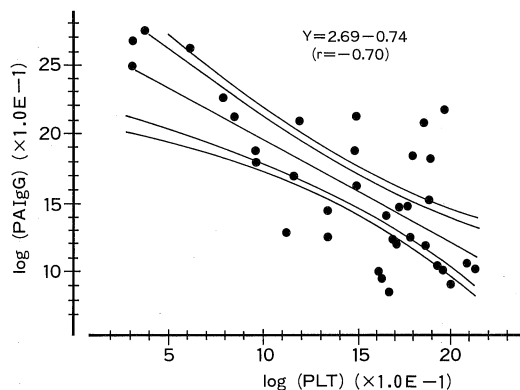


Fig. 5. Relationship between the platelet counts and PAIgG values in 36 patients with acute and chronic ITP.

は小児の ITP において, その PAIgG 値は慢性型が急性型に比し有意に低値であり, PAIgG が病型の判定にも有用である可能性を報告した.

今回のわれわれの成績では, PAIgG の高値を呈する率は急性型, 慢性型でそれぞれ 100%, 52% で慢性型での比率は諸家の報告に比し低値であったが, 両者ともに PAIgG 値は正常人の値に比し有意の高値を示した. 急性型では慢性型に比し PAIgG 値は高い傾向にあったが, 両者間に有意の差は認められなかった. また, 急性型,

慢性型の両型で PAIgG 値と血小板数との間に有意の負の相関を認めた。急性型では全例で PAIgG 値が $50 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ を越すものが多かった。これより、今回のわれわれの成績からも、Luiken, McMillan らが指摘した如く、PAIgG の測定が両病型の鑑別にも一部有用であることが示唆された。

PAIgG は ITP 以外にも、敗血症、癌、白血病、活動性肝炎、即ち血小板減少が免疫の機序で起こらない疾患でも上昇すると報告されている¹⁵⁾¹⁹⁾が、今回われわれの成績でも ITP の病態に強く PAIgG が関与している事が示唆された。micro ELISA 法は再現性がよく、操作が比較的簡単であるという利点をもって PAIgG の測定に適していると考えられる。今後、症例数を増やし更に検討を重ねていきたい。

結 語

1) 洗浄凍結血小板および新鮮洗浄血小板を用いて正常人 20 名の PAIgG 値を測定した。前者を用いた場合の PAIgG 値(mean \pm SD)は $14.9 \pm 4.5 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ 、後者では $8.0 \pm 5.9 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ であり、両者の相関係数は 0.69 であった。これより、洗浄凍結血小板を用い得られた PAIgG 値の mean + 2 SD、即ち $23.9 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ 以下を正常値と定めた。以下の PAIgG 値の測定には洗浄凍結血小板を用い行なった。

2) 急性型 ITP 患者の PAIgG 高値を呈するものは 100%、慢性型は 52% であった。また、測定値はそれぞれ $124.63 \pm 94.27 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ および、 $68.55 \pm 113.74 \text{ ng}/10^7 \text{ pl}$ であり両者ともに正常人に比し有意の高値を示した ($p < 0.05$)。

3) 急性型、慢性型ともに ITP 患者の PAIgG 値と血小板数は負の相関を示した ($Y = 2.69 - 0.74 X$, $r = -0.70$)。

文 献

- 1) Harrington, W. J., Minnich, V., Hollingworth, J. W. and Moore, C. V.: Demontoration of thrombocytopenic factor in blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. Clin. Med.* **38**: 1-10, 1951.
- 2) Steffen, C.: Results obtained with the anti-globulin consumption test and investigations of auto antibody eluates in immunohematology. *J. Lab. Clin. Med.* **38**: 110, 1951.
- 3) Karpatkin, S. and Siskind, G. W.: In vitro detection of platelet antibody in patients with

idiopathic thrombocytopenic purpura and system lupus erythematosus. *Blood* **33**: 795-812, 1969.

- 4) McMillan, R. J., Smith, R. S., Longmire, R. L., Velenosky, R., Reid, R. T. and Craddock, C. G.: Immunoglobulins associated with human platelets. *Blood* **37**: 316-322, 1971.
- 5) Hirschman, R. J. and Shulman, N. R.: The use of platelet serotonin release as a sensitive method for detecting anti platelet antibodies and plasma anti platelet factor in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J. Haematol.* **24**: 793-802, 1973.
- 6) Dixon, R. H., Rosse, W. and Ebbert, L.: Quantitative determination of antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **292**: 220-236, 1975.
- 7) Tsubakio, T., Kurata, Y., Yonezawa, T. and Kitani, T.: Quantification of platelet associated IgG with competitive solidphase enzyme immunoassay. *Acta Haematol.* **66**: 251-256, 1981.
- 8) Yesus, Y. W., David, L. S., Martha, A. M. and Ranadhir, M.: A simplified micro ELISA procedure for the measurement of platelet associated IgG (PAIgG). *Am. J. Clin. Pathol.* **81**: 81-84, 1984.
- 9) Schiffer, C. A. and Young, V.: Detection of platelet antibodies using a micro-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Blood* **61**: 311-317, 1983.
- 10) Sugiura, K., Manfred, S. and Mario, G. B.: Platelet antibody in idiopathic thrombocytopenic purpura and other thrombocytopenias. *J. Lab. Clin. Med.* **96**: 640-653, 1980.
- 11) 林 悟, 押田真知子, 椿尾忠博, 倉田義之: micro ELISA による血小板表面 IgG 量の測定. *臨床病理* **32**: 1253-1257, 1984.
- 12) 特発性血小板減少症の診断基準: 厚生省特研研究業績報告書. p461-463, 1975.
- 13) 水本保子, 西川 潔, 藤村吉博, 森井武志, 成田巨啓, 福井 弘, 倉田義之: 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. *血栓止血誌*. **1**(2): 84-93, 1990.
- 14) Mizumoto, Y., Fujimura, Y., Nishikawa, K., Uchida, M., Morii, T., Narita, N. and Kurata,

- Y. : Flow cytometric analysis of anti-platelet antibodies in patients with chronic thrombocytopenic purpura (ITP) using acid-treated formalin fixed platelets. *Ame. J. Hematol.* **37** : 274-276, 1991.
- 15) **George, J. N., Saucerman, S., Levine, S. P. and Knieriem, L. K.** : Immunoglobulin G is a platelet alpha granule-secreted protein. *J. Clin. Invest.* **76** : 2020-2025, 1985.
- 16) **Kelton, J. G.** : The measurement of platelet bound immunoglobulin. An overview of the methods and the biological relevance of platelet associated IgG. *Prog. Hematol.* **13** : 163-199, 1983.
- 17) **McMillan, R.** : Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.* **304** : 1135-1147, 1981.
- 18) **Luiken, G. A., McMillan, R., Lightsey, A. L., Gordon, P., Zevely, S., Schulman, I., Gribble, T. J. and Longmire, R. L.** : Platelet associated IgG in immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* **50** : 317-325, 1977.
- 19) **Poskitt, T. and Poakitt, P.** : Thrombocytopenia of sepsis. The role of circulating IgG containing immune complexes. *Arch. Intern. Med.* **645** : 891-894, 1985.