

厚生省特定疾患

血液系疾患調査研究班
血液凝固異常症分科会

平成12年度研究業績報告書

平成13年3月

分科会会長 中 川 雅 夫

目次

I.	分科会員構成	3
II.	総括研究報告	7
	(京都府立医科大学第二内科 中川雅夫)	
III.	分科会員分担研究報告	13
1.	遺伝子組み替えファージ抗体を利用した I T P 患者の自己抗体の分離	15
	(広島大学大学院医学系研究科病態薬物治療学 藤村欣吾)	
2.	抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞検出法の I T P 診断における有用性の検討	18
	(慶応義塾大学医学部内科 池田康夫)	
3.	フォンビルブランド因子特異的プロテアーゼの欠損による血栓性疾患の病態解析に関する研究	24
	(奈良県立医科大学輸血部 藤村吉博)	
4.	血小板凝集に対するメイラード反応後期生成物 (A G E) の影響	27
	(兵庫医科大学第二内科 垣下榮三)	
5.	ポジショナルクローニングによる May-Hegglin Anomaly 責任遺伝子の同定	30
	(名古屋大学医学部保健学科 小嶋哲人)	
6.	播種性血管内凝固症候群の発症頻度と臨床症状における多様性	33
	(熊本大学医学部臨床検査医学 岡嶋研二)	
7.	ラット D I C モデルにおける血管作動性物質の役割	36
	(金沢大学医学部附属病院高密度無菌治療部 朝倉英策)	
8.	フィブリン高値の D I C 症例に関する研究	39
	(三重大学医学部臨床検査医学 和田英夫)	
9.	血管内皮細胞における血栓制御系に及ぼす H M G - C o A 阻害剤の影響	42
	(京都府立医科大学第二内科 中川雅夫)	
10.	急性深部静脈血栓症の実践的診断法	45
	(大阪大学医学部病態制御外科学 川崎富夫)	
11.	先天性凝固因子欠乏症と血栓症	48
	(国立循環器病センター研究所 宮田敏行)	

12.	軽症型凝固X因子欠損症の病態解析	51
	(九州大学大学院医学研究院病態修復内科学 岡村 孝)	
13.	プラスミン非依存性血栓溶解	54
	(自治医科大学分子病態研究部 坂田洋一)	
14.	変異プラスミンインヒビターの分解	59
	(東京医科歯科大学学生体応答調節学 広沢信作)	
15.	ATIII欠損症の遺伝子解析プロトコール	64
	(京都府立医科大学輸血部 辻 肇)	
IV.	発表文献	67

I. 分科会構成員

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	中川 雅夫	京都府立医科大学 第二内科	教 授
分担研究者	朝倉 英策	金沢大学医学部附属病院 高密度無菌治療部	助教授
	池田 康夫	慶応義塾大学医学部 内科	教 授
	岡嶋 研二	熊本大学医学部 臨床検査医学	助教授
	岡村 孝	九州大学大学院医学研究院 病態修復内科学	講 師
	垣下 榮三	兵庫医科大学 第二内科	教 授
	川崎 富夫	大阪大学医学部 病態制御外科学	助 手
	小嶋 哲人	名古屋大学医学部 保健学科	教 授
	坂田 洋一	自治医科大学分子病態研究部	教 授
	辻 肇	京都府立医科大学 輸血部	助教授
	広沢 信作	東京医科歯科大学 生体応答調節学	助教授
	藤村 欣吾	広島大学大学院医学系研究科 病態薬物治療学	教 授
	藤村 吉博	奈良県立医科大学 輸血部	教 授
	丸山 征郎	鹿児島大学 臨床検査医学	教 授
	宮田 敏行	国立循環器病センター研究所	室 長
和田 英夫	三重大学医学部 臨床検査医学	講 師	
(事務局)	本郷佐都子	京都府立医科大学 第二内科 〒602-8566 京都市上京区河原町広小路上る梶井町 465 TEL (075) 251-5511 FAX (075) 251-5514	

Ⅱ．総括研究報告

平成 12 年度総括研究報告

分科会長 中川雅夫

京都府立医科大学第二内科

I. 研究目標

本分科会は、特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) および特発性血栓症を調査研究の対象疾患とし、これらの病態解明、診断ならびに治療法の確立に寄与する基礎的並びに臨床的研究を幅広く研究することを目標とする。

II. 研究成果のまとめ

平成 13 年 2 月 10 日に、平成 12 年度分科会が京都で開催され、調査研究報告がなされた。

1) ITP, TTP 等関連の研究

ITP 患者においては、これまで血小板糖タンパク GPIIb-IIIa や GPIb などに対する自己抗体が約半数の患者で検出されているが、血清や血小板溶出抗体を用いた検索では十分なエピトープ解析が困難とされてきた。そこで、藤村らはフェージディスプレイ法を用いて患者由来ヒト型抗体ライブラリーを作製し、血小板に反応する抗体を単離し、ITP における抗体エピトープあるいは新規自己抗原を検出することを試み報告した。今回は血小板への結合性は固相化血小板を用いた分析で検出できたものの他の解析方法で検出できるほど十分ではなかった。今後、抗体重鎖可変領域のみでなく軽鎖部分もクローン化し完全型抗体に近い親和性を持たせる研究を進める予定とされた。また、池田らは、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞検出の ITP 診断における有用性を検討した。精製ヒト GPIIb-IIIa を抗原として用いた enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT 法) により、末梢血単核球 (PBMC) 中の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の頻度を調べ、PBMC 10^6 個中の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の頻度は、ITP では ITP 以外の血小板減少症、健常人に比べて有意に高率であり、健常人 50 例における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の平均+3SD (20/10 6 PBMC) をカ

ットオフ値とすると、ITP における陽性頻度は 91%であり、ITP 以外の血小板減少症と健常人では陽性例はなく、特異度は 100%であったと報告した。従って、ELISPOT 法により抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞を検出することで ITP の診断が可能になるものと考えられ、今後の臨床応用が期待される。

近年、造血器腫瘍をはじめとした種々の悪性腫瘍の治療に造血幹細胞移植術(SCT)が実施される。その後の肝中心静脈閉塞症(VOD)や血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は致死的であるため、その対策が検討されているが、病態生理が不明なため有効な治療法が未だ確立されていない。そこで、藤村らは、SCT 後のこれらの血栓性疾患において、von Willebrand 因子特異的切断酵素(vWF-CPase)活性を測定し、その臨床的意義を検討し報告した。SCT 後の VOD においては、移植前より有意に vWF-CPase 活性が低下していることより、移植前に本酵素活性を測定することにより VOD 発症予測が可能であろうと考えられた。また、VOD ではインヒビターが存在せず vWF-CPase 活性が低下していることより、FFP の輸注によって、VOD の発症予防ならびに治療が可能であると報告された。また、SCT 後の TTP は、従来から報告されている vWF-CPase 活性が正常であるもの以外に、酵素活性が低下している症例も存在することが判明した。特に酵素活性が著明に低下していた症例は、高力価のインヒビターが存在し、古典的 TTP と同様の病態であることが示唆され、このような症例においては血漿交換が絶対的に有用であると考えられた。即ち、SCT の実施前後において vWF-CPase 活性とインヒビターの測定・検索を行うことが VOD あるいは TTP の発症予防並びに治療に有用であるとされ、有意義な報告であると思われた。

生体内において蛋白質とグルコースの非

酵素的糖付加反応（いわゆるメイラード反応）の終末産物の総称であるメイラード反応後期生成物Advanced Glycation End-products（以下AGE）が、糖尿病をはじめとする種々の病態に関連することが近年明らかにされつつある。AGEは血小板に関連して血栓形成を促進し、糖尿病等の血栓性合併症の発症に関与するものと推察されるが、その詳細は不明である。そこで、垣下らはセロトニン及びADP刺激血小板凝集に対するAGEの作用を、レーザー散乱光凝集測定装置を用い測定するとともに、糖尿病患者における血小板機能亢進との関連性について報告した。その結果、AGEはin vitroで血小板凝集を亢進させ、これには何らかのセロトニン受容体を介する伝達系が関与すると想定された。また、糖尿病患者において血中AGE濃度と血小板凝集との間に正の相関関係が認められたことより、AGEは老化による血栓傾向の増大や糖尿病における血栓性合併症の発症に関与するものと考えられた。

常染色体優性遺伝形式をとる血小板異常症で、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球Döhle様封入体を3主徴とするとされるMay-Hegglin血小板異常症(MHA)は、特発性血小板減少性紫斑病との鑑別や輸血の適応について問題となることがある疾患である。小嶋らは、ポジショナルクローニング法によってMHA/Sebastian症候群の原因遺伝子をnonmuscle myosin heavy chain-A (NMMHCA) 遺伝子(MYH9)と同定し、6家系で5種類の異なる変異を見出したと報告した。NMMHCA 蛋白の基本的機能を知ることが血小板および顆粒球生成の理解を深める一助になると考えられ、今後の研究が期待される。

2) 播種性血管内凝固 (DIC) の病態と診断

播種性血管内凝固 (DIC) の病態は、基礎疾患の種類により大きく異なる可能性があり、この多様性を明らかにすることで、それぞれの基礎病態の種類に応じた適切な治療を行うことが可能であろうと考えられる。そこで、岡嶋らは、基礎疾患別のDIC

の発症頻度や臨床症状を解析し、DIC病態の多様性の有無につき検討し、報告した。産科疾患に伴うDIC例では、すべての症例で出血症状を認めたが、臓器症状は、その20.0%にしか認められず、逆に、感染症に伴うDIC例では、出血症状は15.4%にしか認められなかったが、臓器不全症状は、その76.9%に認められた。即ち、DICの発症頻度や臨床症状は、微小血栓形成に加えて基礎疾患の病態に応じて多様であり、そのため、これらに対する治療も基礎疾患の病態に応じてなされるべきであると考えられた。

このような病態の相違は動物実験モデルの作成とその評価においても重要で、DICの研究をin vivoで進める上で、注意すべきと思われる。朝倉らは、DIC誘発物質として用いられる組織因子(TF)とLipopolysaccharide (LPS)を比較し、前者は臨床の線溶優位型DICに、後者は凝固優位型DICに類似したモデルであると前年度の分科会において報告した。今年度は、血管作動性物質に注目し、TF誘発DICモデルにおいては、相対的に血管拡張性物質である一酸化窒素(NO)の産生が亢進しており、LPS誘発DICモデルにおいては、相対的に血管収縮性物質であるエンドセリン(ET)の産生が亢進していることを明らかにした。即ち、血管作動性物質の観点から、前者では血流維持・血栓形成阻止の方向に作用し、後者では微小循環障害・臓器障害の進展の方向に作用しているのではないかと思われ、両モデルの相違点が一層明らかになるとともにDIC治療を開発する上でもDICの病態の差を考慮することが重要であると示唆された。

3) 特発性血栓症の病態と診断

「特発性血栓症 (Idiopathic thrombosis)」は、血栓症の発症において先天性もしくは後天性の血栓形成素因の存在が強く推定されるが、その詳細な機序を明らかにし得ないものと暫定的に定義され、本分科会の臨床調査研究における対象疾患を明確にするうえで提唱された疾患概念である。

その一つの危険因子として、高脂血症の存在が知られ、虚血性心疾患をはじめとす

る種々の動脈硬化性の血栓性疾患の原因の一つと考えられている。近年、HMG CoA reductase inhibitor (statin) が虚血性心疾患や脳血栓症などの特発性血栓症の予防に有効であると報告されるが、その機序には高脂血症の是正以外のメカニズムが推察される。中川らは、血管内皮細胞において産生される凝固・線溶系調節因子の発現に及ぼす statin の影響をレニン-アンギオテンシン系との関連において検討し、報告した。培養ラット血管内皮細胞において angiotensin II により誘導される TF や PAI-1 の発現亢進を、mRNA ならびに蛋白レベルにおいて statin は添加濃度に依存して抑制し、TFPI, tPA の発現には影響を及ぼさないことが明らかとされた。即ち、statin は血管内皮細胞を抗血栓性に誘導する作用を有していると考えられ、その機序には GGPP の産生抑制を介した Rho 活性化の阻害が関与しているものと推察された。特発性血栓症は複数の疾患群を包括的に捉えた疾患概念であり、今後、特発性血栓症の内いずれの疾患に対して statin がその発症予防に有効であるか、検討を重ねる必要があると考えられた。

未治療の下肢中枢型の急性深部静脈血栓症 (DVT) は、肺塞栓を引き起こして、重篤になりやすいため、早期に診断し治療を開始することが、生命予後を改善するのみでならず、医療経済面においても合理的と考えられる。しかしながら、DVTの早期の診断は、専門医以外の医師には比較的困難であるため、簡便かつ一般的な診断法の確立が望まれている。そこで川崎らは、一般医療施設が現状で受け入れやすく、精度が高く、安全で、簡便かつ迅速に施行できる方法として、CT scanの単純撮影を使用した実践的な方法を考案し報告した。初診時のD-Dimerおよび下肢単純CT画像上で患側の断面積を健側の断面積で割った値(大腿筋束断面積比:FMR)を比較したところ、D-DimerよりもFMRの方がDVTの診断能力は高いと考えられた。また、画像をコンピューター処理して得られたFMR値を、患側および健側の大腿部筋束の断面積の差を視覚にて認識可能かど

うかという点から検討した結果、FMR値1.1から判定可能でありこの時の周径差は約2cmであった。これらの結果から、左右の大腿周径差を測定して2cm以上あれば1スライスの単純CTを撮影する。その大腿筋束断面積に視覚的に左右差があればFMRは1.1以上であることを意味しており、DVTと診断できると報告した。この方法を用いることで、今後DVTの診断が比較的容易になるものと期待される。

特発性血栓症における静脈血栓症は、凝固制御因子の先天性欠乏症がその一因であることが多くの研究から明らかとされている。欧米では凝固制御因子であるプロテインC(PC)やアンチトロンビン(AT)の欠乏症の一般人口における頻度が求められており、静脈血栓症発症の基礎資料となっている。しかし、日本ではそのような頻度は求められていないため、宮田らは、大規模な日本人一般人口を対象として、PC、AT及びプラスミノゲン(PLG)の各欠乏症の頻度を求め、報告した。約4500人の活性を測定することにより、各欠乏症(それぞれ9名、8名、189名)を同定し、一般人口における各欠乏症の頻度は、0.20%、0.18%及び4.18%であった。この結果から、PC欠乏症とAT欠乏症は日本人の約500人に1人みられ、PLG欠乏症は約25人に1人であると結論された。

また、血栓症に関与すると考えられる血栓性素因の遺伝子型を日本人で求め、血栓症との関連を明らかにする研究が進められている。辻らは、先天性AT欠乏症のType I及びType IIに関する遺伝子解析をすすめ、本分科会において報告してきたが、本年度も新たな遺伝子変異を報告すると共に、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が提唱されたことを受けた患者の人権とインフォームド・コンセントを尊重した解析プロトコルを提唱した。今後、特発性血栓症における各種遺伝子解析研究を推進して行くに当たり、患者のプライバシーの配慮と、検体の取り扱いに十分注意していくことは、欠かすことができない重要な課題と思われる。

III. 分科會員分擔研究報告

遺伝子組み替えファージ抗体を利用した特発性血小板紫斑病 (ITP)
患者の自己抗体の分離
(分担) 研究者 藤村 欣吾
広島大学大学院医学系研究科 病態薬物治療学

研究要旨

ITP 患者に見出される自己抗体の特異性やエピトープをより詳細に解析する目的で、ファージディスプレイ法を用いて患者脾細胞よりヒト型抗体ライブラリーを作製し血小板親和性クローンを単離した。血小板への結合性は固相化血小板を用いた分析で検出できるものの他の解析方法で検出できるほど十分でなかった。今後、抗体重鎖可変領域のみでなく軽鎖部分もクローン化し完全型抗体に近い親和性を持たせる必要があると思われた。

A. 研究目的

ITP 患者ではこれまで血小板糖タンパク GPIIb-IIIa や GPIb などに対する自己抗体が約半数の患者で検出されているが、血清や血小板溶出抗体を用いた検索では十分なエピトープ解析が困難である。そこで今回我々は、ファージディスプレイ法を用いて患者由来ヒト型抗体ライブラリーを作製し、血小板に反応する抗体を単離し ITP における抗体エピトープあるいは新規自己抗原を検出することを試みた。

B. 研究方法

ITP 患者から摘出した脾臓より RNA を抽出し、RT-PCR 法で抗体重鎖可変領域を各サブファミリーの共通配列をもとに作成したプライマーを用いて増幅し (図 1、図では重鎖および軽鎖可変領域をリンカーでつないだ Single chain variable region fragment (ScFv) を示した。今回我々が合成したのは重鎖部分だけである) ファージミドベクター pCANTAB5E に挿入する。E.Coli TG1 に形質転換しヘルパーファージを用いて抗体重鎖可変領域を g3p 融合蛋白として発現するファージ抗体ライブラリーを得る。固相化した血小板上でパンニングし血小板に親和性のある抗体を発現するファージを濃縮する。数回パンニングを繰り返した後、最終的にコロニー単離したファージミドよりそれぞれのファージ上清を回収し、ELISA などで抗体の特異性を確認する。

C. 研究結果

固相化血小板でのパンニングを繰り返すことにより回収されるファージの数は漸増した (1 回パンニング後 1.5×10^6 colony forming unit (cfu)、2 回目 1.5×10^7 cfu、3 回目 4×10^6 cfu、4 回目 1.7×10^7 cfu、5 回目 2×10^7 、6 回目 5×10^7 cfu、7 回目 5×10^7 cfu) (図 2)。最終パンニング後コロニー単離した 48 個のクローンについて血小板を固相化したマイクロタイタープレートを用いファージの結合性を ELISA でスクリーニングしたところ 2 個のクローンで比較的明瞭な結合を認めた (図 3、F6 および B10、M13Ab は陽性対照)。フローサイトメトリーやウェスタンブロットで血小板特異性を確認したが、通常の完全型抗体と違い親和性が低く (図 4、B10 クローンの結合を ELISA で解析、BSA は牛アルブミン、M13Ab はファージ g8p 抗体、PLT は固相化血小板) 検出が困難であった。

D. 考察

これまで報告されたファージ抗体ライブラリーは抗体重鎖および軽鎖可変領域を可動性リンカーでつないだ Single chain variable region fragment (ScFv) を利用したものが多い。その後 SLE 患者における抗 DNA 抗体は特異性が主に重鎖にあり軽鎖の特異性が低いことやまた、血小板同種抗体を重鎖可変領域のみのファージ抗体ライブラリーでクローン化した報告があり、今回我々は重鎖のみのライブラリーを作製した。残念ながら親和性が弱く十分な検討が

困難であった。自己抗体は同種抗体と比較し低親和性のものが多いとの報告もあり、今後は前述の ScFv 抗体ライブラリーを用いた検討を試みるべきと思われる。

E. 結論

患者脾細胞由来重鎖可変領域抗体ファージライブラリーを作製し固相化血小板に親和性のあるクローンを単離した。低親和性であるため今後さらに軽鎖可変領域も合わせてクローン化する必要があると考えられた。

F. 研究発表

論文発表

1. Kim Hyun-Guell, Une M., Hino A., Wada H., Yoshii M., Kuramoto T., Fujimura K. Bile acid sulfonate and 7-alkylated bile acid analogs: effect on intestinal absorption of teurocholate and cholesterol 7 α -hydroxylase activity in cultured rat hepatocytes. *Steroids* 65: 24-28, 2000
2. Fujii T., Shimomura T., Fujimoto T.t., Kimura A., Fujimura K. A new approach to detect reticulated platelets stained with Thiazole Orange in thrombocytopenic patients. *Thromb. Res.* 97: 431-440, 2000.
3. 藤村 欣吾. 血小板膜糖蛋白、GPIIb/IIIa 複合体、GPIb/IX、V の分離、精製法、血液・腫瘍科、40:49-56, 2000
4. 藤村 欣吾. 巨大血小板症候群、血液・腫瘍科 40:242-250, 2000
5. 藤村 欣吾. 血栓性素因患者のマネジメント, *medicina* 37:802-804, 2000
6. 藤村 欣吾. 本態性血小板血症治療の考え方, *日本内科学会雑誌*, 89:69-73, 2000
7. 池田 康夫, 刘家 利承, 井口 豊崇, 藤村 欣吾, 安藤 泰彦. 日常診療における血小板疾患, *日本内科学会雑誌*, 89:97-115, 2000
8. 藤村 欣吾. ITP のヒトモノクローナル抗体による治療, *日本医事新報* 3972:108-109, 2000
9. 藤村 欣吾. 血小板減少症の臨床, 第 2 回赤十字血漿分画シンポジウム, 18-30, 2000
10. 藤村 欣吾. 特発性血小板減少性紫斑病, *仔ノート*, 1031-1041, 2000
11. 藤村 欣吾, 藤元 貴啓, 下村 壮司. Bernard-Soulier 症候群, *日本血栓止血*

rd-Soulier 症候群, *日本血栓止血学会誌* 11:411-419, 2000

12. Une M, Takenaka S, Kuramoto T, Fujimura K, Hoshita T, Kihira K. Structural and biosynthetic studies of a principal bile alcohol, 27-nor-5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α , 24, 25-pentol, in human urine. *J. Lipid Res.* 41: 1562-1567, 2000
13. 藤村 欣吾. 良性単クローン性ガンマグロブリン血症, *日本医師会雑誌特別号, 血液疾患診療マニュアル*, 124:228-229, 2000

学会発表

1. 藤村 欣吾, 藤元 貴啓, 下村 壮司. ITP における Fc γ R の遺伝子多型に関する研究, 第 39 回日本血液学会中国・四国地方会, 高知市, 2000.2
2. 藤元 貴啓, 勝谷 慎也, 下村 壮司, 藤村 欣吾. β 3-endonexin の各種 form の細胞内局在と GP IIIa との相互作用. 第 62 回日本血液学会総会, 福岡市, 2000.3
3. 藤村 欣吾. ITP 治療の現状と進歩(教育講演) 第 42 回日本臨床血液学会総会, 倉敷市, 2000・11
4. 藤元 貴啓, 藤村 欣吾, 下村 壮司. CD98 リガンド Galectin-3 による血小板 GP IIb-IIIa 複合体の活性化. 第 42 回日本臨床血液学会総会 倉敷市, 2000・11
5. 木口 亨, 新谷 憲治, 原田 実根, 藤村 欣吾, 藤元 貴啓, 飯島 憲司. 3 例の I 型 β 2-糖タンパク欠損症の遺伝子解析. 第 42 回日本臨床血液学会総会 倉敷市, 2000・11
6. 藤元 貴啓, 榎 由佳里, 勝谷 慎也, 下村 壮司, 藤村 欣吾. 血小板 GP IIb-IIIa 複合体の活性化による MAP kinase (ERK) のリン酸化. 第 23 回日本血栓止血学会総会, 名古屋市, 2000・11
7. 藤元 貴啓, 肘岡 洋子, 勝谷 慎也, 下村 壮司, 藤村 欣吾. CD98 リガンド, Galectin-3 による血小板 GPIIb-IIIa 複合体の活性化. 第 23 回日本血栓止血学会総会, 名古屋市, 2000・11
8. Kingo FUJIMURA, Takeshi SHIMOMURA, Tetsuro T. FUJIMOTO. Involvement of Fc gamma receptor polymorphism in therapeutic response in idiopar-

thic thrombocytopenic purpura. The 42nd ASH Annual Meeting. San Francisco, Dec.2000

9. Tetsuro T.FUJIMOTO, Takeshi SHIMOMURA, Youko HIJIOKA, Kingo FUJI-

MURA. Galectin-3, a CD98 ligand, upregulates platelet adhesion and spreading through GPIIb-IIIa complex. The 42nd ASH Annual Meeting. San Francisco, Dec.2000

抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞検出法の ITP 診断における有用性の検討 (分担) 研究者氏名 池田 康夫 慶應義塾大学医学部 内科

研究要旨

抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞検出の特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の診断における有用性を検討した。精製ヒト GPIIb-IIIa を抗原として用いた enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT 法) により、末梢血単核球 (PBMC) 中の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の頻度を調べた。PBMC 10^6 個中の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の頻度は ITP 47 例で 94.0 ± 56.6 (range 9-216)、ITP 以外の血小板減少症 18 例で 8.5 ± 5.0 (range 2-18)、健常人 50 例は 3.7 ± 3.2 (range 0-15) であり、ITP では ITP 以外の血小板減少症、健常人に比べて有意に高率であった (いずれも $P < 0.00001$)。健常人 50 例における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の平均 + 3SD ($20/10^6$ PBMC) をカットオフ値とすると、ITP における陽性頻度は 91% であり、ITP 以外の血小板減少症と健常人には陽性例はなく、特異度は 100% であった。以上の成績より、ELISPOT 法による抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出は ITP の診断に有用と考えられた。

A. 研究目的

特発性血小板減少性紫斑病(ITP) の診断に 1990 年に厚生省研究班により提案された診断基準¹⁾が、我が国では広く用いられている。この基準を当てはめると、出血症状と血小板減少症があり、骨髓検査では巨核球が正常または増加し、他の系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他の疾患が除外できれば ITP と診断してよい。しかし、一般診療の場では血小板減少をきたす全ての疾患を除外することは困難である。また、そのために数多くの検査を行うことは医療経済上も好ましくない。そのため、実際には医師の経験に基づいて必要最小限の検査成績により ITP と診断しているのが現状である。この ITP の診断における問題点は、ITP の診断が血小板減少症をきたす他の疾患の除外に主眼がおかれていることに起因する。診断基準の項目に含まれる骨髓所見や PAIgG は ITP に対する特異性が低く、その所見から ITP の積極的な診断はできない。そのため、アメリカ血液病学会 (ASH) により最近提唱された ITP の診断、治療のガイドラインでは、PAIgG については触れておらず、高齢者や摘脾を考慮する患者以外では骨髓検査も必要ないと明記されている²⁾。ITP は比較的頻度の高い疾患

であり、血液専門医以外が診療する機会も多いことから、より実践的な診断の基準あるいはガイドラインの作成が必要と考えられる。そのためには、ITP を積極的に診断するための ITP に特異的な検査所見が必要とされる。本研究では、血小板膜蛋白 GPIIb-IIIa に対する自己抗体を産生する B 細胞を検出するアッセイ法を確立し、その ITP の診断における有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. 対象

厚生省の診断基準¹⁾を満たす ITP 患者 47 例を対象とした。コントロールとして、ITP 以外の血小板減少症患者 18 例(再生不良性貧血 3 例、骨髓異形成症候群[MDS]10 例、血栓性血小板減少性紫斑病 2 例、薬剤性 3 例) および健常人 50 例を用いた。

2. 抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出

Nishifuji らの方法³⁾に準じて、enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT 法) を用いて抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞を検出した。ヘパリン採血で得られた末梢血 10ml より比重遠心法により末梢血単核球分画 (PBMC) を分離し、RPMI1640 に 10% 子牛血清を添加した培地

に 10%子牛血清を添加した培地中で細胞濃度を調整した。96 ウェルメンブレンプレートの各ウェルに、ヒト血小板よりアフィニティーで精製した GPIIb-IIIa を 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加え、4°Cで一晩放置した。各ウェルを 0.5mM CaCl_2 添加 PBS (PBS-Ca) で 3 回洗浄後、1%ウシ血清アルブミン含有 PBS-Ca を加え、室温で 30 分間の放置した。PBS-Ca で 2 回洗浄後、10 ウェルにそれぞれ 10^5 個の PBMC を加え、37°C、5% CO_2 、加湿条件下で 4 時間培養した。ウェルの液を捨て、0.05% Tween 20 入りの PBS-Ca で 3 回洗浄し、1,000 倍希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗ヒト IgG 抗体 (ICN/Cappel, Aurora, OH) を加えて室温で 2 時間放置した。各ウェルを 0.05% Tween 20 入りの PBS-Ca で 4 回洗浄し、アルカリフォスファターゼ基質 (NBT/BCIP) を加えて、発色させた。蒸留水で 10 回洗浄した後にメンブレンを室温乾燥させ、実体顕微鏡で各ウェルのスポット数を観察した。結果は 10 ウェルのスポット数の合計を 10^6 個の PBMC あたりの抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞数として表した。なお、コントロールとして GPIIb-IIIa を固相化せず、ウシ血清アルブミンのみを抗原とした解析も同時に行った。

一部の検体において、PBMC を抗 CD19 または抗 CD3 モノクローナル抗体結合マグネティックビーズと反応させ、ビーズに結合した細胞を磁気装置により取り除き、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出における B 細胞または T 細胞の除去の影響を検討した。

3. 血小板溶出液、血漿中の抗 GPIIb-IIIa 抗体の測定

末梢血 10 ml より回収した血小板から酸性の条件下で溶出した抗体および血小板除去血漿を用いて抗 GPIIb-IIIa 抗体を測定した。IgG 抗 GPIIb-IIIa 抗体は精製ヒト GPIIb-IIIa を固相化したプレートを用いた ELISA で測定した⁴⁾。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた末梢血検体はすべて患者

からのインフォームドコンセントを得た上で提供を受けた。

C. 研究結果

1. ELISPOT 法による抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出

ITP 5 例と健常人 5 例の PBMC を用いて抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出を試みた (表 1)。GPIIb-IIIa を固相化したメンブレンを用いると、ITP 5 例では 20-216 個のスポットが検出されたが、健常人でのスポット数は 1-4 個であった。BSA のみを固相化したウェルにおけるスポット数は ITP、健常人いずれも 4 個以下であり、バックグラウンドの非特異的なスポットは少なかった。また、ITP の PBMC から B 細胞を除去するとスポット数は著明に減少したが、T 細胞を除去しても影響はなかった。したがって、4 時間の培養における B 細胞からの抗 GPIIb-IIIa 抗体産生は T 細胞非依存性と考えられた。以上の成績から、精製 GPIIb-IIIa を抗原として用いた ELISPOT 法により検出されたスポット数は B 細胞からの抗 GPIIb-IIIa 抗体の産生を反映すると考えられた。

2. ITP における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の検出

抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞検出の ITP における感度、特異性を調べるため、ITP 47 例、ITP 以外の血小板減少症 18 例、健常人 50 例において PBMC 中の抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞の頻度を調べた。PBMC 10^6 個における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞数は ITP で 94.0 ± 56.6 (range 9-216)、ITP 以外の血小板減少症で 8.5 ± 5.0 (range 2-18)、健常人では 3.7 ± 3.2 (range 0-15) であった (図 1)。ITP における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度は ITP 以外の血小板減少症、健常人に比べて有意に高かった (いずれも $P < 0.00001$ 、t 検定)。健常人 50 例における抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞頻度の平均 + 3SD (20 個/ 10^6 PBMC) をカットオフ値とすると、ITP における陽性頻度は 91%であり、ITP 以外の血小板減少症と健常人での陽性例はなかった (表 2)。したがって、抗 GPIIb-IIIa 抗体産生 B 細胞