

Title	特発性血小板減少性紫斑病の血小板抗体に関する研究
Author(s)	椿尾, 忠博
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33770">https://hdl.handle.net/11094/33770</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#"></a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	つばき 椿	お 尾	ただ 忠	ひろ 博
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6272	号	
学位授与の日付	昭和59年1月9日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	特発性血小板減少性紫斑病の血小板抗体に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教授 垂井清一郎			
	(副査)			
	教授	岸本	進	教授 木谷 照夫

### 論文内容の要旨

#### (目的)

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) の成立機序として自己免疫学的機作の関与が考えられ、ITP 患者血清中に血小板減少を起させる因子 "ITP factor" の存在が報告されて以来、患者血清中の抗血小板抗体の検出法が数多く報告されてきた。しかし、これらの検出法は特異性、陽性率および疾患の重症度との相関などの点でなお多くの問題点を残しており確立された検査法とは言い難い。近年、血小板表面 IgG (platelet-associated IgG, PAIgG) の微量測定法が報告され、ITPの診断ならびにその病態解析に用いられつつある。本研究では、PAIgG測定のために感度、再現性に秀れ、簡便に施行できる enzyme immunoassay (EIA) を用いた測定法を開発し、それがITPの診断ならびにその病態解析に重要な手段になり得ることを証明した。さらに、ITPの血小板減少に主要な役割を演ずるとされている網内系における血小板の貪食をモデル化した *in vitro* での血小板貪食法を用いてITP血小板の被貪食性について検討し、そして、この血小板の被貪食性とPAIgGの関係についても分析を加えた。

#### (方法ならびに成績)

PAIgG測定法 (competitive solid-phase EIA) : polystyrene tube (1×7cm) に至適量の IgG を固相し、非特異的反應を避けるために 1% bovine serum albumin 加 PBS で処理した。2.5×10<sup>7</sup> /ml の洗浄血小板浮遊液 0.2ml と至適濃度に希釈されたペルオキシダーゼ標識抗 IgG 血清 0.1ml を tube に入れ 4°C over night で反応させた。同時に standard curve 作成のために段階希釈した既知濃度の IgG と抗血清を入れた tube を作成した。反応後、tube を洗浄し、tube 側に結合したペルオキシ

ダーゼ量を測定した。standard curve から PAIgG 量を求め、血小板  $10^7$  個当たりの IgG 量 ( $\text{ng}/10^7 \text{pl}$ ) で表わした。

in vitro 血小板貪食測定法：貪食細胞として正常人 (O 型) からの ACD-A 加末梢血を Dextran 法および遠沈により得た白血球を用いた。好中球と単球数を  $5 \times 10^6/0.4 \text{ml}$  に調整した。ITP 患者から得た血小板に 1 検体当たり  $^{51}\text{Cr}$  を約  $50 \mu\text{Ci}$  加え、室温で 30 分間混和し、残っている RBC を 1% ammonium oxalate で溶血させた。2 回洗浄し血小板数  $5 \times 10^7/0.4 \text{ml}$  に Hanks' balanced salt solution (HBSS) で調整した。ITP 血清による O 型正常人血小板の感作は、血小板を  $^{51}\text{Cr}$  で標識した後、その  $1 \times 10^8/0.4 \text{ml}$  と  $\text{BaSO}_4$  処理した血清  $0.4 \text{ml}$  を混和し洗浄後 HBSS で  $0.8 \text{ml}$  とした。測定法は、調整された血小板と白血球を各々  $37^\circ\text{C}$  で preincubation した後、混和し 10 分間振盪した。同時に血小板のみの control tube も作成した。反応終了後、直ちに氷冷中に移し各 tube に  $1 \text{mM}$  EDTA saline  $10 \text{ml}$  を加え、 $150 \text{G}$ 、10 分間遠沈する操作を 2 回繰り返した。tube 内沈渣の放射活性 (cpm/WBC) を測定した。測定量は  $\text{cpm/WBC} - \text{cpm Platelet control} / \text{cpm Total count}$  で求めた。そして測定毎に正常人の平均で sample の測定値を除いた値 (phagocytosis ratio) を求め、正常人の 2SD を正常範囲とした。

正常人の PAIgG は  $21.6 \pm 6.6$  (SD)  $\text{ng}/10^7 \text{pl}$  で、2SD の範囲を正常範囲とした。血小板数  $15 \times 10^4/\text{mm}^3$  以下の慢性 ITP 29 例の PAIgG は 27 例 (93%) に高値をしめした。その範囲は 25 ~ 1300, 平均は  $205.5 \pm 323.0$  であった。血小板数  $10 \times 10^4/\text{mm}^3$  以下の症例は全例高値であった。再性不良性貧血 5 例は正常範囲で、血小板減少を伴う SLE 2 例は高値であった。ITP 患者血小板数と PAIgG は高い逆相関をしめした。 ( $r = -0.84, P < 0.001$ )。摘脾例の検討では、摘脾直後血小板数が正常になった時、PAIgG も正常値まで減少した。このことは、脾臓の役割が単に血小板の貪食のみでなく、血小板抗体産生のものであることもしめしている。

ITP 患者の血小板を用いた貪食測定法 (direct assay) の結果は、血小板数  $10 \times 10^4/\text{mm}^3$  以下の 13 例中 12 例 (92%) に陽性で、phagocytosis ratio は  $3.03 \pm 1.10$  (SD) であった (正常範囲  $< 1.83$ )。血小板数が  $10 \times 10^4/\text{mm}^3$  以上の 7 例では 3 例に軽度の上昇がみられた。次に正常血小板を ITP 血清で感作した貪食測定法 (indirect assay) では血小板数  $10 \times 10^4/\text{mm}^3$  以下の 15 例中 10 例に phagocytosis ratio の上昇がみられた (正常範囲  $< 1.88$ )。血小板数  $10 \times 10^4/\text{mm}^3$  以上の 2 例は正常範囲であった。患者血小板数と direct assay の phagocytosis ratio 間に  $r = -0.8, P < 0.001$  と高い逆相関が得られた。

Vincristine 投与により血小板数の増加した ITP 症例において治療前後の PAIgG と direct assay の phagocytosis ratio をみると、両者とも治療後の方が低値をしめした。このことより、Vincristine の作用機序として血小板抗体産生の抑制か、血小板への抗体の結合抑制が考えられた。

(総括)

1) ITP の診断ならびに病態の解明を目的として、competitive solid-phase EIA を用いた PAIgG 測定法を考案した。本法は、感度、再現性に秀れ、簡便に施行できる特徴を有する。

2) ITP 症例の PAIgG は 93% に高値を示し、患者血小板数とは高い逆相関が認められた。このこ

とはPAIgGがITPの重症度を反映し、免疫性血小板減少性の診断に有用であることをしめしている。

3) in vitro 血小板貪食法 (direct assay)において、ITP症例の92%にphagocytosis ratio の高値が認められ、患者血小板数とは高い逆相関をしめた。このことからITPの血小板減少は、PAIgGの結果とも関連してimmunophagocytosisの亢進によることが示唆された。

4) PAIgGおよびin vitro 血小板貪食法は、ITPにおける種々の治療法の作用機序、並びにその病態解析に有用であることがしめされた。

### 論文の審査結果の要旨

本研究では、血小板表面IgG (PAIgG)の微量測定法として感度、再現性に秀れ、簡便に施行できるenzyme immunoassayの開発がなされた。

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP)のPAIgG値は、本症の重症度を良く反映し、さらに陽性率も高いこと等より、本法はITPの診断、病態解析に重要な手段になりえることが明らかにされた。

さらに、In vitro 血小板貪食法を用いてITP血小板の被貪食性について検索し、その結果、PAIgGの成績とも関連して、ITPの血小板減少はimmunophagocytosisの亢進によることが示された。

以上の諸所見により、本研究は学位に値すると考える。