

## Bernard-Soulier 症候群様疑似検体を用いた 血小板凝集能検査実習の試み

登尾 一平\*<sup>1</sup> 田邊 香野\*<sup>1</sup> 山本 隆敏\*<sup>1</sup> 南部 雅美\*<sup>1,2</sup>  
 檜原 真二\*<sup>1,2</sup> 川口 辰哉\*<sup>1,2</sup> 上妻 行則\*<sup>1,2</sup> §

**要旨** 血小板凝集能検査は、血小板数が正常であるにも拘らず出血時間が延長している疾患を鑑別するための検査であり、将来臨床検査技師として働く学生にとってその検査の意義を十分に理解することは不可欠である。しかし、現在、異常臨床検体の入手が困難であり、本学では正常検体のみを用いた実習となっているため、血小板凝集能検査に対する理解が深まらないことが教育的課題となっている。今回我々は、Bernard-Soulier 症候群 (BSS) 様疑似検体を作製し、学内実習で使用した。その結果、BSS でみられる ristocetin 凝集のみ欠如する血小板凝集パターンが認められ、実習後のアンケートからも血小板凝集能検査の意義の理解が深まったことが確認された。以上より、作製した BSS 様疑似検体は、学内実習における血小板凝集能検査の理解を深める有用なツールの一つとして使用できると考えられた。

**キーワード** 血小板凝集能検査 (platelet aggregation)、Bernard-Soulier 症候群 (BSS)、O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGEP)、学内実習

### 緒 言

Bernard-Soulier 症候群 (BSS) は、glycoprotein (GP) Iba、GPIbβ、GPIX のいずれかの遺伝子異常により GPIb/IX/V 複合体が欠如することにより von Willebrand 因子依存性の血小板粘着に異常をきたし、重篤な出血症状を呈する常染色体劣性の遺伝性疾患である<sup>1)2)</sup>。BSS を疑う場合、出血時間や血小板粘着能に加え、血小板凝集能検査を実施する。BSS では collagen 等の生理的 agonist による凝集は正常だが、ristocetin 凝集は欠如するため、von Willebrand 病 (VWD) と鑑別する必要があるものの、疾患を推定するために血小板凝集能

検査は重要な検査となっている<sup>2)</sup>。

血小板凝集能検査は、臨床検査技師を目指す学生にとって疾患を理解するためにも重要であり、検査の知識と意義を十分に理解することは、診療現場や患者にとっても有益である。しかし、本学では血小板凝集能異常の臨床検体が入手困難であり、正常検体のみを用いた実習を行ってきたため、検査の意義や重要性についての理解が十分に深まらないことが課題であった。

2000 年、Kinlough-Rathbone らは、O-sialoglycoprotein endopeptidase (OSGEP) によって GPIba (CD42b) を切断し、ristocetin 凝集が欠如する血小板の作製方法を報告している<sup>3)</sup>。彼らが作製した

\*<sup>1</sup> 熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科 § kozuma18@kumamoto-hsu.ac.jp

\*<sup>2</sup> 熊本保健科学大学大学院 保健科学研究科 保健科学専攻

OSGEP 処理血小板は、BSS 様疑似検体として学内実習に応用可能であると考えられるが、我々が知る限り教育への応用例の報告は見当たらない。そこで本報告では、OSGEP 処理血小板が BSS 血小板と同様の機能異常を有しているか検証するとともに、学内実習で使用し、その教育的効果について検討した。

## I. 対象と方法

### 1. 対象

2020 年度当学科 2 年次に在籍する学生 (112 名) を対象とした。実習後に血小板凝集能検査について理解できたか、理解できなかったかを選択させる形式で無記名によるアンケートを実施した。

### 2. ヒト血小板の採取方法

健康人ボランティアより得た血液 (3.2% クエン酸ナトリウム溶液 : 血液 = 1 : 9) を 200 g、10 分間、22°C で遠心し、platelet rich plasma (PRP) を回収した。残りの血液を 2,000 g、10 分間、22°C で遠心し、platelet poor plasma (PPP) を回収した。PRP は、1% シュウ酸アンモニウム液で希釈し、Bürker-Türk 式血球計算板を用いて血小板数を計測し、Plt-HEPES 緩衝液 (1 mM MgCl<sub>2</sub>、20 mM HEPES、136 mM NaCl、2 mM KCl、400 μM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) を用いて  $2 \times 10^5$  個/μL に調整した。なお本研究は、ヒト血液を用いるため熊本保健科学大学 人を対象とする医学系研究に関する倫理審査に申請し、承認を受け実施した (承認番号 : 18055)。

### 3. OSGEP 処理条件の検討

#### A. 至適温度の検討

洗浄血小板 ( $2 \times 10^5$  個/μL) に OSGEP (CEDAR-LANE) 2.4 mg/mL、対照として Plt-HEPES 緩衝液を添加し、22°C または 37°C で 30 分間反応後、1% FBS/Plt-HEPES 緩衝液に浮遊させた。OSGEP 処理による血小板膜蛋白の評価は、GPIIb を APC 結合抗ヒト CD41 抗体 (Becton, Dickinson and Company : BD) で、GPIbα を PE-Cy<sup>™</sup>5 結合抗ヒト CD42b 抗体 (BD) で染色した後、FACSVerse<sup>™</sup> flow cytometer (FCM) (BD) を用いて測定した。

#### B. 至適濃度の検討

Plt-HEPES 緩衝液で希釈した各濃度の OSGEP (0、0.024、0.24、1.2、2.4 mg/mL) と洗浄血小板を 37°C で 30 分間反応後、1% FBS/Plt-HEPES 緩衝液に浮遊させた。なお、OSGEP 処理に伴う血小板への影響は、FITC 結合マウス抗ヒト P-selectin (CD62P) 抗体 (BD) で染色し、CD62P 発現を FCM で測定し、さらに Mean platelet volume (MPV) を多項目自動血球計数装置 XN-1000 (Sysmex) を用いて測定し、評価した。

#### 4. 血小板凝集能検査

洗浄血小板に OSGEP 2.4 mg/mL、対照として Plt-HEPES 緩衝液を添加し、37°C で 30 分間反応後、10% ACD-A 液添加 Plt-HEPES 緩衝液を加え、600 g、20 分間、22°C で遠心し、洗浄した。洗浄血小板は PPP で再浮遊させた。血小板凝集率測定用ガラス試験管 (タイヨウ) に検体を分注後、血小板凝集能測定装置 PRP313M (タイヨウ) で 37°C、1 分間加温後に agonist を添加し、凝集を測定した。agonist は、collagen、ADP、ristocetin を使用した。

#### 5. 統計処理

今回の報告では、血小板凝集能検査以外の各測定は各々 3 回繰り返し、結果は平均 ± 標準偏差 (SD) で示した。2 群の平均値の比較には、Microsoft Excel (Microsoft) を用いて、Student *t* 検定を行った。p < 0.05 を統計学的有意とした。

## II. 結果

### 1. OSGEP 処理条件の検討

OSGEP 処理至適温度を決定するために 22°C または 37°C、30 分条件下で検討を行ったところ、いずれの温度でも CD41 の発現は OSGEP 処理前後で変化しないにも拘らず、CD42b の発現は OSGEP 処理後で低下した (図 1-A-i)。しかし、CD41<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup>血小板の割合を比較したところ、22°C 条件下では OSGEP 添加群で  $18.6 \pm 0.9\%$  であったのに対して、37°C 条件下では  $1.3 \pm 0.2\%$  となり、37°C 条件下で CD41<sup>+</sup>CD42b<sup>+</sup>血小板の割合が有意に低下していた (図 1-A-ii)。次に、OSGEP 至適濃度を検討したところ、CD41<sup>+</sup>

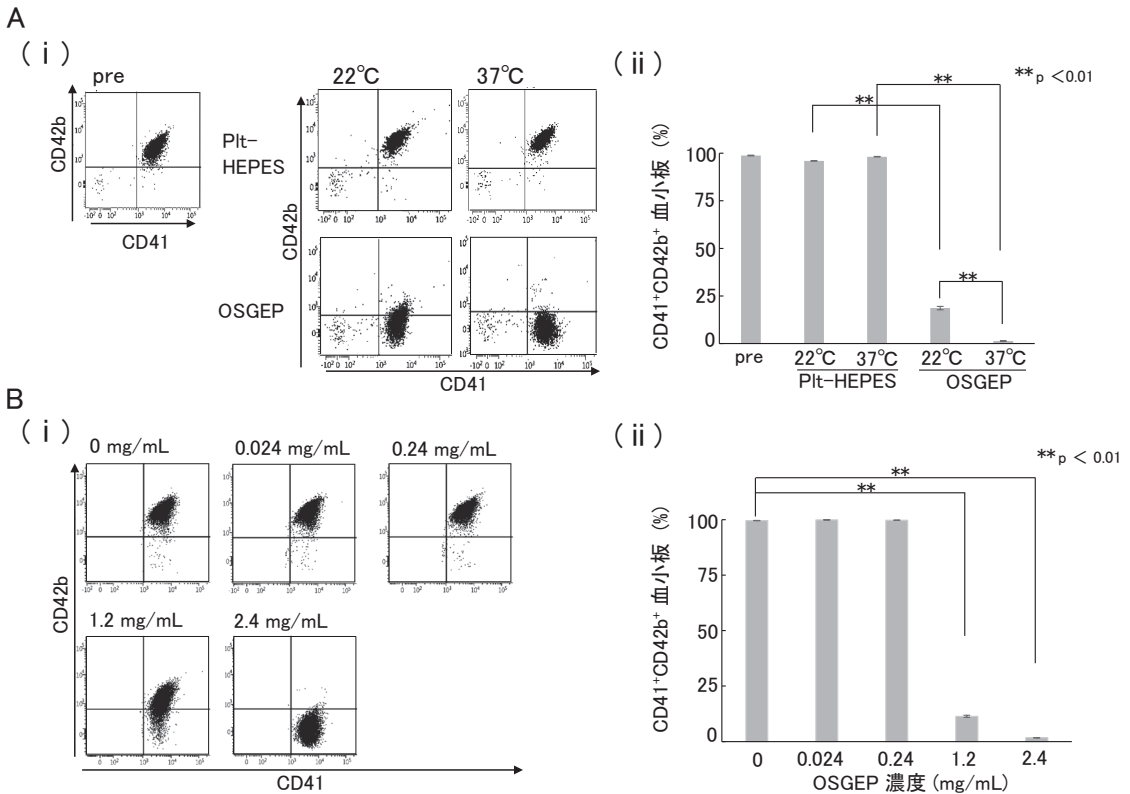


図1 血小板膜糖蛋白 CD42b 切断のための OSGEP 処理条件の検討

A: 22°Cまたは37°C、30分間の条件下で洗浄血小板と OSGEP (2.4 mg/mL) または Pit-HEPES 緩衝液を反応後、APC 結合抗ヒト CD41 抗体および PE-Cy<sup>TM</sup>5 結合抗ヒト CD42b 抗体で染色し、FCM で測定した。

B: 各濃度の OSGEP (0, 0.024, 0.24, 1.2, 2.4 mg/mL) と洗浄血小板を 37°C、30 分間反応後、APC 結合抗ヒト CD41 抗体および PE-Cy<sup>TM</sup>5 結合抗ヒト CD42b 抗体で染色し、FCM で測定した。

CD42b<sup>+</sup>血小板の割合は、OSGEP 濃度 0 mg/mL では 99.6 ± 0.1% であったのに対して、2.4 mg/mL では 1.7 ± 0.0% と濃度依存的に低下していた (図 1-B)。以上の結果より、以降の検討における処理条件を反応温度 37°C、OSGEP 濃度 2.4 mg/mL とした。

## 2. OSGEP 処理に伴う血小板への影響

OSGEP 処理が、血小板の CD42b 発現低下以外に何らかの影響を与えた場合、血小板凝集能検査実習には使用できない。そこで、OSGEP 処理による血小板への影響を日本赤十字社が血小板製剤の品質を保証するために実施している CD62P 陽性血小板の割合と MPV により評価したが<sup>4)</sup>、共に OSGEP 処理の前後で変化はみられなかった (図 2)。

## 3. OSGEP 処理血小板凝集能の評価

次に、OSGEP 処理血小板の凝集能を評価するために agonist の条件を検討した。正常血小板を collagen 8.0 μg/mL で刺激したところ、血小板最大凝集率は 70%、4.0 μg/mL では 68%、1.0 μg/mL では 8% であった (図 3-A-i)。また、ADP 刺激では 20.0 μM で 66%、10.0 μM で 62%、1.0 μM で 1% (図 3-A-ii)、ristocetin 刺激では 2.4 mg/mL で 85%、1.2 mg/mL で 69% であった (図 3-A-iii)。そこで、OSGEP 処理検体を collagen 4.0 μg/mL、ADP 10.0 μM で刺激したところ、Pit-HEPES 処理との間で血小板最大凝集率および凝集パターンに変化はなかったが (図 3-B-i, ii)、ristocetin 刺激では 2.4 mg/mL で 62% であった血小板最大

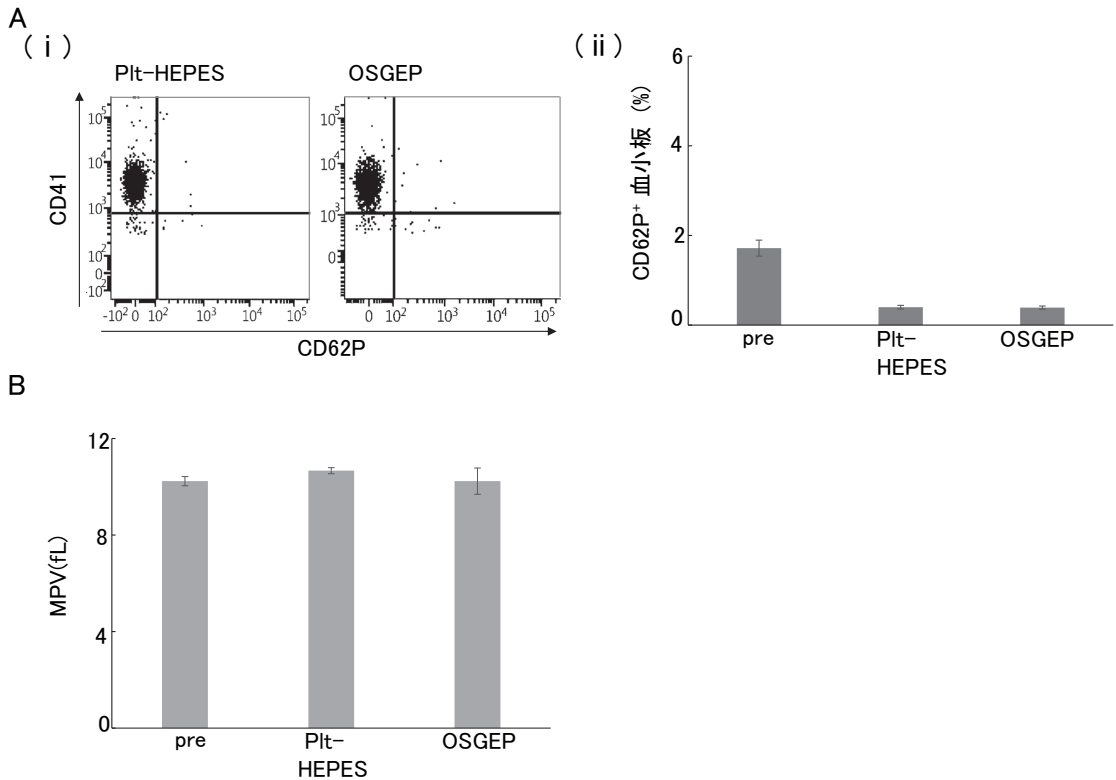


図2 OSGEP処理に伴う血小板への影響

OSGEP処理後の血小板のCD62P発現をFITC結合マウス抗ヒトCD62P抗体で染色後、FCMにて(A)、MPVをXN-1000(B)で測定した。

凝集率が、OSGEP処理により4%に低下していた(図3-B-iii)。

#### 4. BSS様疑似検体を用いた学内実習の試みとアンケート結果

学内実習では新鮮正常検体と作製したOSGEP処理血小板(BSS様疑似検体)を配布し、各班順番に血小板凝集能検査を行ったところ、正常検体では全てのagonistで血小板凝集が認められたのに対して(図4-A-i)、BSS様疑似検体ではristocetin凝集が欠如するBSS様パターンを呈していた(図4-A-ii)。また、実習後のアンケートでは、血小板凝集能検査について実習前の段階で「理解できた」と回答した学生が60.7%、「どちらともいえない」が31.3%、「理解できなかった」が8.0%であったのに対して、実習を通して「理解できた」と回答した学生が78.6%、「どちらともいえない」が

16.1%、「理解できなかった」が5.3%となり、「理解できた」と回答した学生が実習後に17.9%増加した(図4-B)。

### III. 考 察

現在、異常臨床検体が入手困難であるため、学内実習での血小板凝集能検査の実施に苦慮する臨床検査技師養成施設は少なくない。そこで本報告では、OSGEP処理することにより作製したBSS様疑似検体を学内実習で使用し、その教育的効果について検証したところ、BSS様疑似検体は、ristocetin刺激で血小板凝集率が欠如し、BSS様のパターンを呈した(図3-B)。また今回の学内実習では、血小板凝集能検査時のレポートとして、「血小板凝集から推定される疾患とその根拠」「追加検査」について課題を与えたところ、多く

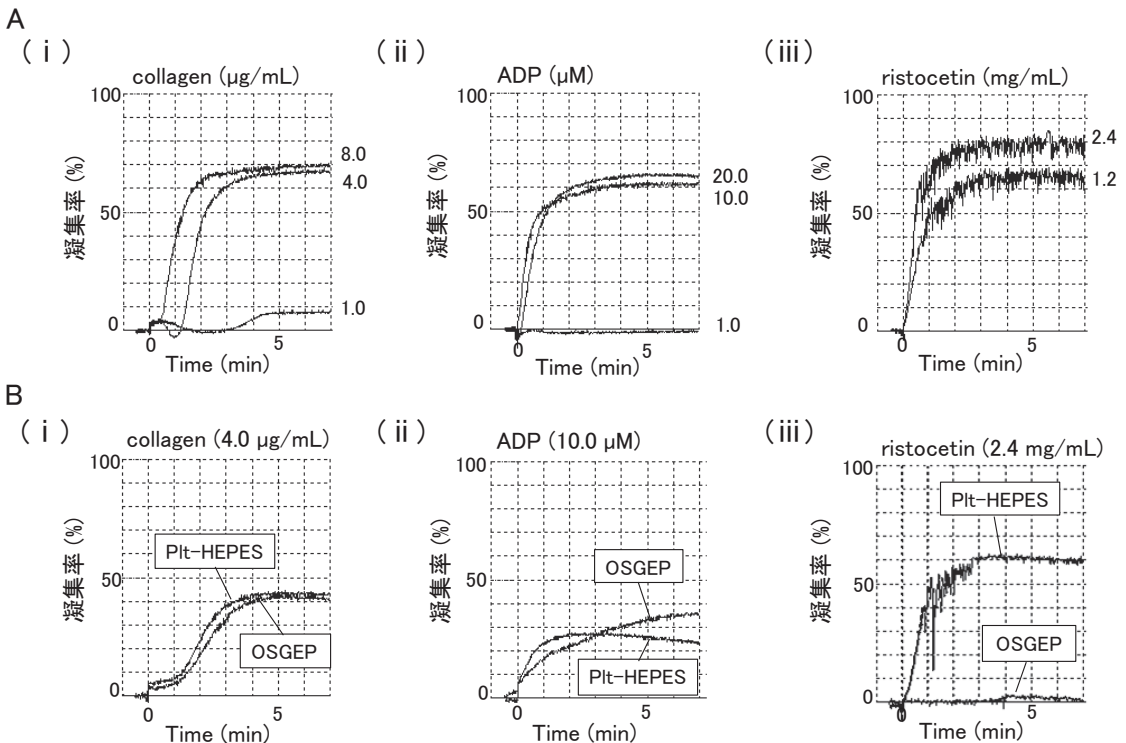


図3 OSGEP処理検体の血小板凝集能

A : PRP を (i) collagen (1.0、4.0、8.0  $\mu\text{g/mL}$ )、(ii) ADP (1.0、10.0、20.0  $\mu\text{M}$ )、(iii) ristocetin (1.2、2.4  $\text{mg/mL}$ ) で刺激した。

B : OSGEP 処理検体を (i) collagen (4.0  $\mu\text{g/mL}$ )、(ii) ADP (10.0  $\mu\text{M}$ )、(iii) ristocetin (2.4  $\text{mg/mL}$ ) で刺激した。

の学生が BSS 様疑似検体の結果から「BSS または VWD」を推定できる疾患として、追加検査として「FCM による GPIb/IX/V 複合体の発現確認」を挙げている。実際、BSS の診断には、FCM または ウェスタンブロットによる GPIb/IX/V 複合体の欠損または低下を証明することが不可欠である<sup>3)</sup>。さらに「欠如した ristocetin 凝集が正常血漿添加により補正されるか検証すること」等 VWD との鑑別の重要性を述べているレポートもあり、BSS 様疑似検体を用いた実習は極めて教育的効果が高いことが推察された。

しかしながら、実習後のアンケート調査では、実習を通して血小板凝集能検査が「理解できた」と回答した学生は実習前より増加したものの、「どちらともいえない」が 16.1%、「理解できなかった」が 5.3% であった (図 4-B)。この結果は、教科書

では BSS の血小板凝集のパターンは、「ristocetin 凝集のみ欠如」となっているのに対して、今回提供した BSS 様疑似検体では ristocetin 凝集は欠如しているものの、collagen または ADP 刺激による最大凝集率も正常新鮮検体と比較して低下しており、BSS の典型的なパターンではなかったことが原因と考えられる (図 4-A-ii)。さらに、OSGEP 処理時の加温や洗浄操作により血小板が、MPV や CD62P 発現では検出できないレベルでダメージを受け、血小板凝集能に影響している可能性も完全には否定できない。また今回の学内実習では、採血から測定まで最長 7 時間かかった班もあり、測定までに時間を要したことも血小板凝集能が低下した一因となったかもしれない。今後は、学生の理解度向上を目指し、collagen または ADP 刺激時において BSS 疑似検体でも新鮮正

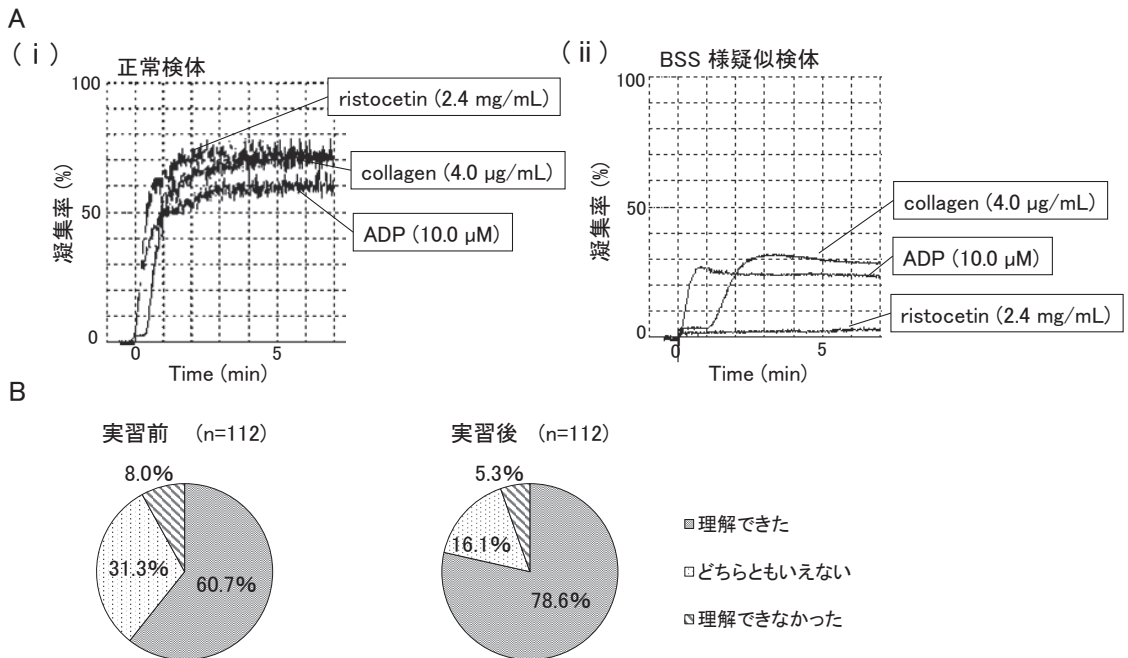


図4 学内実習におけるBSS様疑似検体を用いた血小板凝集能検査結果と理解度に関するアンケート結果  
 A: 正常検体(i)とBSS様疑似検体(ii)をcollagen(4.0 µg/mL)、ADP(10.0 µM)、ristocetin(2.4 mg/mL)で刺激した血小板凝集能検査結果の一例を示す。  
 B: 実習後に実施した血小板凝集能検査の理解度アンケートの結果を示す。

常検体と同等レベルの血小板凝集率となるよう、OSGEP処理時の加温時間や洗浄方法、実習手順等を再検証する予定である。

#### IV. 結 論

作製した疑似検体は、BSSでみられる血小板凝集パターンを呈し、実習を通して血小板凝集能検査の意義が「理解できた」と回答した学生の割合は増加したことから、BSS様疑似検体は、学内実習における血小板凝集能検査の理解を深める有用なツールとして使用できる可能性が示唆された。

#### 謝 辞

本研究はJSPS科研費JP20K17597の助成を受けたものです。

#### 文 献

- 藤村欣吾, 藤元貴啓, 下村壮司. Bernard-Soulier 症候群. 日本血栓止血学会誌 2000; 11: 411-9.
- 藤元貴啓. 2 血小板. 7. 血小板の膜蛋白 GPIb/IX と Bernard-Soulier 症候群. 編著 一瀬白帝, 図説 血栓・止血・血管学 血栓症制圧のために. 東京: 中外医学社 2005; 174-82.
- Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rand ML, Packham MA. Responses to aggregating agents after cleavage of GPIb of human platelets by the O-sialoglycoprotein endoprotease from Pasteurella haemolytica-potential surrogates for Bernard-Soulier platelets? Thromb Res 2000; 99: 165-72.
- 血小板製剤(未照射)の安定性試験成績, 日本赤十字社.  
[http://www.jrc.or.jp/mr/product/list/pdf/result\\_pc-1r100205.pdf](http://www.jrc.or.jp/mr/product/list/pdf/result_pc-1r100205.pdf)