

原 著

[原著]

血小板輸血患者から検出されたHPA-15抗体について

関東甲信越ブロック血液センター¹⁾，東京大学医学部附属病院輸血部²⁾
田原綾乃¹⁾，井上 進¹⁾，小山邦子¹⁾，永守拓哉¹⁾，岡崎晃士¹⁾，小林洋紀¹⁾，加藤尚美¹⁾，
森田庄治¹⁾，峰岸 清¹⁾，柴田洋一¹⁾，南 陸彦¹⁾，松橋美佳²⁾，津野寛和²⁾，高橋孝喜²⁾

Alloantibodies against Human Platelet Antigen (HPA)-15 detected in Japan from the patients with platelet transfusion refractoriness

*Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center¹⁾,
Department of Transfusion Medicine, the University of Tokyo²⁾*

Ayano Tahara¹⁾, Susumu Inoue¹⁾, Kuniko Koyama¹⁾, Takuya Nagamori¹⁾, Koji Okazaki¹⁾,
Hironori Kobayashi¹⁾, Naomi Kato¹⁾, Shoji Morita¹⁾, Kiyoshi Minegishi¹⁾, Yoichi Shibata¹⁾,
Mutsuhiko Minami¹⁾, Mika Matsuhashi²⁾, Hirokazu Tsuno²⁾ and Koki Takahashi²⁾

抄 録

血小板特異抗原 (Human platelet specific antigen : HPA) に対する同種抗体は，新生児同種免疫性血小板減少症 (Neonatal alloimmune thrombocytopenia : NAIT)，輸血後紫斑病 (Post-transfusion purpura : PTP)，血小板輸血不応答 (Platelet transfusion refractoriness : PTR) を引き起こす。血小板糖蛋白 CD109上に存在するHPA-15 (Gov^{a/b}) に対する抗体の本邦における報告例は NAIT症例のみである。

今回，我々は PTR 患者 568 例を対象に混合受身凝集法 (Mixed passive hemagglutination : MPHA法) およびModified rapid monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigens (MR-MAIPA) 法を用いて，レトロスペクティブにHPA-15抗体の検出を試みた。その結果，HPA-15抗体が 4 例に検出された。

Key words: HPA-15, PTR, MPHA, MR-MAIPA

はじめに

血小板糖蛋白 (Platelet glycoprotein : GP) 上には HPA，HLA クラス I，ABO 血液型などの同種抗原が存在する。HPA は現在，HPA-27 まで報告されている¹⁾。HPA に対する同種抗体は NAIT，PTP，PTR の原因となることが知られている²⁾。

HPA-15 は分子量約 175 kDa の GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー結合型糖

蛋白である CD109 分子上に存在する。CD109 蛋白の 703 番目のアミノ酸がセリンかチロシンにより HPA-15a，HPA-15b が決定される^{3), 8)}。欧米では NAIT，PTR，PTP の病態に HPA-15 抗体の関与が報告されている^{3), 4), 5)}。本邦では NAIT から HPA-15 抗体を検出した報告⁶⁾はあるが，PTR での HPA-15 抗体の報告例はない。今回，我々は PTR 患者から HPA-15 抗体を検出したので報告す

る。

対 象

医療機関からHLA抗体およびHPA抗体の検査依頼のあった患者568例を対象とした。依頼時の抗体検査はリンパ球細胞傷害試験 (Lymphocyte cytotoxicity test : LCT) 法⁷⁾, AHG-LCT (Anti-human immunoglobulin-LCT) 法, 血小板抽出抗原を用いた抗血小板抗体キット (anti-PLT・MPHA・スクリーン, ベックマン・コールター社製) でM-MPHA法を実施した。この依頼時の検査結果をもとにHLAおよびHPA抗体陰性と判定した351例を抗体陰性群, HLAまたはHPA-15以外のHPA抗体陽性と判定した217例を抗体陽性群に今回分類し, 抗体陰性群についてはMPHA法とMR-MAIPA法を, 抗体陽性群についてはMR-MAIPA法を用いてレトロスペクティブにHPA-15抗体の検出を試みた。

方 法

1) HPA-15抗体検出用パネルの選択

①HPA-15遺伝子タイピング

HPA-15抗体を検出するためにインフォームドコンセントが得られたボランティアドナーの血液を対象としてHPA-15のタイピングを実施した。EDTA加血液検体をQuick Gene DNA whole blood kit S (倉敷紡績社製) を用いてゲノムDNAを抽出し, Andre⁸⁾らが報告したPCR-SSP法用のプライマー (Gov^aおよびGov^b特異的アンチセンスプライマー, Gov^{a/b}共通センスプライマー) を用いて井上らの方法⁹⁾に準じ, 増幅を行った。次に増幅産物を2%アガロースゲルで電気泳動後, 0.5 μ g/mLエチレンジウムブロマイドで染色した。UV照射下でバンド (225 base pair) の有無を観察し, HPA-15型の判定を行った。

②発現量の確認

タイピングの結果よりHPA-15a/a, HPA-15b/bであった血液よりPRP (platelet rich plasma) を採取し, これを血小板パネルとして10mmol/L EDTA/phosphate-buffered saline

(PBS) で $3 \times 10^4/\mu$ Lに調整し, グルタルアルデヒド固定をした固相プレートを作製した。この血小板固相プレートを用いてMPHA法¹⁰⁾を行った。抗CD109マウスモノクローナル抗体 (clone : W7C5, MBL社製) を生理食塩液で 2×10^5 希釈し, 血小板固相プレートに25 μ L分注した。室温, 湿潤で4時間感作後, 抗マウスIgG抗体結合ヒツジ血球 (ベックマン・コールター社製) を25 μ L分注し6時間以上静置後, 凝集像を判定した。被凝集価 1×10^4 倍以上を示したHPA-15a/a, HPA-15b/bの血小板パネルを抗体陰性群のスクリーニングおよびMR-MAIPA法用のパネルとして使用した。

2) 抗体陰性群のHPA-15抗体のスクリーニング

1) で選択したHPA-15a/a, HPA-15b/b血小板パネルのグルタルアルデヒド固定した血小板固相プレートを用い, 抗体陰性群351例について, MPHA法でHPA-15抗体のスクリーニングを実施した。患者血清は生理食塩液で2倍希釈し, 血小板固相プレートに25 μ L分注した。室温, 湿潤で4時間感作後, 抗ヒトIgG抗体結合ヒツジ血球 (ベックマン・コールター社製) を25 μ L分注し6時間以上静置後, 凝集像を判定した。

3) 抗体陰性群のHPA-15抗体の確認

抗体陰性群の中で2) のグルタルアルデヒド固定した血小板固相プレートを用いたMPHA法で陽性を示した症例は, 松橋らの方法¹¹⁾に準じMR-MAIPA法を行った。10mmol/L EDTA/PBSで $2 \times 10^5/\mu$ Lに調製したHPA-15a/aとHPA-15b/bの血小板100 μ LをU底プレート内で患者血清50 μ Lと37℃, 30分間反応させた。Tris-buffered saline (TBS)/BSAで2回洗浄後, 5 μ g/mLに希釈した抗CD109マウスモノクローナル抗体40 μ Lと37℃, 30分反応させた。TBS/BSAで3回洗浄後, 0.5% Nonidet P40で血小板を可溶化し (4℃, 30分), 上清100 μ Lを3 μ g/mLに希釈したヤギ抗マウスIgG抗体 (Jackson Immuno Research社製) を固相した平底プレートに加え, 4℃, 90分で反応後, Tween/TBS/BSA buffer (0.05% Tween20, 0.5% Nonidet P40, 0.2%

BSA, 0.5mol/L CaCl₂) で6回洗浄した。6000倍に希釈したperoxidase標識ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Jackson Immuno Research社製) 100 μ Lと4℃, 90分反応後, 6回洗浄した。OPD基質溶液 (Dako社製) で発色させ, 室温30分後0.5MH₂SO₄で反応を停止させ, マイクロプレートリーダーにて490nm (対照波長655nm) で吸光度を測定した。判定は陰性コントロール (HLAおよびHPA抗体陰性血清) のOD値10倍以上を陽性とした。

また今回, 2) のMPHA法で陽性と判定し, MR-MAIPA法で陰性を示した症例については, 蛍光マイクロビーズ法を用いたWAKFlow[®] HLA抗体クラス I (湧永製薬社製) を実施した。

4) 抗体陽性群のHPA-15抗体の確認

依頼時の検査結果で陽性と判定された抗体陽性群217例について, 全例MR-MAIPA法を実施した。

結 果

MPHA法およびMR-MAIPA法の結果を表1に, HPA-15抗体検出結果を表2に示す。

1. 抗体陰性群

抗体陰性群351例についてゲルタールアルデヒド固定した血小板固相プレートを作製してMPHA法を実施した結果, HPA-15a/aパネルのみ陽性を示したのは5例, HPA-15b/bパネルのみ陽性を示したのは2例, HPA-15a/aとHPA-15b/bパネルの両方に陽性を示したのは1例であった。

MPHA法で陽性となった8例についてMR-MAIPA法を実施した結果, 8例すべて陰性でHPA-15抗体は検出されなかった。また, この8例についてWAKFlow[®] HLA抗体クラス Iを用いてHLA抗体検査を実施した結果, 6例にHLA

表1 MPHA法, MR-MAIPA法の結果

	MPHA法 (ゲルタールアルデヒド固定)				MR-MAIPA法*2			
	15a/a		15b/b		15a/a		15b/b	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
抗体陰性群 (n=351)	6*1	345	3*1	348	0	6	0	3
抗体陽性群 (n=217)			n.t.		2	215	2	215

n.t. : not tested

*1 : HPA-15a/a, HPA-15b/bパネル両方に反応した1例を含む。

*2 : 抗体陰性群は, MPHA法 (+) の症例についてMR-MAIPA法を実施した。

表2 HPA-15抗体検出結果

抗体特異性	N	Anti HPA-15a	Anti HPA-15b
HLA	193	2	2
HLA+HPA-5b	2		
HLA+GP II b/III a	1		
HLA+自己抗体	2		
自己抗体	3		
HPA-3b	1		
HPA-5b	4		
GP I b/IX	1		
GP II b/III a	10		
陰性	351		
計	568	2	2

抗体が検出された。

2. 抗体陽性群

抗体陽性群217例についてMR-MAIPA法を実施した結果、HPA-15a 抗体 2例とHPA-15b抗体 2例が検出された。この4例はいずれもHLA抗体陽性であった。

考 察

抗体陽性群217例についてレトロスペクティブにMR-MAIPA法を実施した結果、HPA-15a抗体 2例とHPA-15b抗体 2例を検出した。4例すべてにHLA抗体が確認された。この結果はHPA-15抗体の症例の多くは、HLA抗体や他のHPA抗体と複合しているとの欧米での報告¹²⁾と一致する。この4例は依頼時の結果からはHPA-15抗体は検出されず、HLA抗体のみ陽性と判断されていたので、濃厚血小板HLA-LR「日赤」が供給されていた。今回の検討で新たにHPA-15抗体の存在が確認されたので、過去に供給された濃厚血小板HLA-LR「日赤」のHPA-15タイピング結果の有無と輸血効果について遡及調査したが、当該患者の輸血前後の血小板数の算定や供給された濃厚血小板HLA-LR「日赤」のHPA-15タイピング結果が不明等により、どの程度HPA-15抗体が輸血効果に関与したか不明であった。

諸外国ではHPA-15抗体はMAIPA法やRIAを用いた免疫沈降法で検出されている^{3), 4), 12)}。本邦での血小板抗体検査は血小板抽出抗原を用いた抗血小板抗体キットが汎用されている。本キットでHPA-15抗体が検出可能かを自験例により確認したところ、HPA-15抗体は検出できなかった。今回対象としたPTR患者568例は検査依頼時に本キットが用いられていたことから、HPA-15抗体は検出できなかったと推測する。

一方、グルタルアルデヒド固定した血小板固相プレートを用いたMPHA法、または未固定の血小板固相プレートを用いたM-MPHA (magnetic-mixed passive hemagglutination) 法ではHPA-15抗体は検出可能であると報告されている¹³⁾。今回、我々はPTR患者568例中、抗体陰性群351例についてHPA-15抗体を検出するためにグルタルア

ルデヒド固定した血小板固相プレートを作製し、レトロスペクティブにスクリーニングをMPHA法で実施したが、抗体陰性群351例からはHPA-15抗体は検出されなかった。

抗体陰性群351例中、MPHA法で陽性と判定しMR-MAIPA法陰性となった8例について蛍光マイクロビーズ法を用いたWAKFlow[®] HLA抗体クラス I を実施したところ、6例にHLA抗体が検出された。WAKFlow[®] HLA抗体クラス I は、LCT法およびAHG-LCT法と比較して高感度なHLA抗体検出法であると考えられており¹⁴⁾、検出された6例のHLA抗体は検査依頼時に実施したLCT法とAHG-LCT法では検出できなかったと推測され、今回のMPHA法の反応はHLA抗体によるものと考えられた。またHLA抗体を保有している場合、抗血小板抗体キットによるMPHA法も陽性になる場合があるが、この6例は検査依頼時の抗血小板抗体キットによるMPHA法の結果は陰性であった。結果が乖離した原因は、今回MPHA法に用いたグルタルアルデヒド固定した血小板パネルと検査依頼時の抗血小板抗体キットに固相された血小板のHLA型の相違によるものと推測される。MPHA法で陽性、MR-MAIPA法で陰性を示した8例のうち、蛍光マイクロビーズ法を用いたWAKFlow[®] HLA抗体クラス I が陰性であった2例は、血清量が少なくMPHA法で陽性を示した原因は確認できなかった。

前述のとおりHPA-15抗体の症例の多くはHLA抗体や他のHPA抗体と複合することを前提に考えると、MR-MAIPA法は煩雑な方法ではあるが有用な確認検査である。血小板抽出抗原ではHPA-15抗体は検出できないことから、固定または未固定の血小板を用いたMPHA法またはM-MPHA法でスクリーニングを行い、陽性を示したものについてMR-MAIPA法で確認検査を実施するなど検査方法の組み合わせが重要であると考ええる。

血小板上のCD109の発現には個人差があり⁸⁾、特に低温保存では抗原性が減弱するという¹²⁾。このような不安定な抗原性に対してはPCR法によるタイピング結果に加え、抗原の発現量を重視した血小板パネルの選択が抗体検出上重要であると

考える。近年、分子生物学的手法により作製されたHPA-15発現細胞はヒトの血小板に比べ発現量が高く、保存に対しても長期間抗原性が減弱されないとの報告があり、MR-MAIPA法でも安定した結果を得ることができ有用であるという¹⁵⁾。今回、我々はPTR患者からHPA15-抗体を検出した

が、HPA-15抗体はこれまでの既存の抗体とは異なり、検出するための至適条件の検討が重要であると考え。今後、本邦でもMR-MAIPA法が普及し、PTR患者におけるHPA-15抗体の臨床的意義が明らかにされることが期待される。

文 献

- 1) Jeremiah ZA. *et al.*: Alloantibodies to human platelet glycoprotein antigens (HPA) and HLA class 1 in a cross section of Nigerian antenatal women. *Human Antibodies*, 20 (3-4): 71-75, 2011
- 2) Kroll H. *et al.*: Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang*, 74 (Suppl.2): 345-354, 1998
- 3) Smith J.W. *et al.*: Characterization and localization of the Gov^{a/b} alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood*, 86: 2807-2814, 1995
- 4) Kelton J.G. *et al.*: Gov^{a/b} alloantigen system on human platelets. *Blood*, 75: 2172-2176, 1990
- 5) Bordin J.O. *et al.*: Maternal immunization to Gov system alloantigens on human platelets. *Transfusion*, 37: 823-828, 1997
- 6) Matsuhashi M. *et al.*: The first case of alloantibody against human platelet antigen-15b in Japan: possible alloimmunization by a hydatidiform mole. *Transfusion*, 50: 1126-1130, 2010
- 7) Terasaki, P.I. *et al.*: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *American Journal of Clinical Pathology*, 69: 103-120, 1978
- 8) Andre C.S. *et al.*: A tyrosine 703 serine polymorphism of CD109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood*, 99: 1692-1698, 2002
- 9) 井上進ほか：日本人におけるGov血小板同種抗原の遺伝子頻度. *日本輸血学会誌*, 49 (6) : 757-760, 2003
- 10) Shibata Y. *et al.*: Mixed passive hemagglutination with soluble platelet antigens. *International Archives of Allergy and applied Immunology*, 74: 93-96, 1984
- 11) 高橋孝喜ほか：血小板／顆粒球 抗原・抗体検査標準マニュアル. 初版, 168-173, 医歯薬出版, 東京都, 2009
- 12) Berry J.E. *et al.*: Detection of Gov system antibodies by MAIPA reveals an immunogenicity similar to the HPA-5 alloantigens. *British Journal of Haematology*, 110: 735-742, 2000
- 13) 松橋美佳ほか：MPHA法による抗HPA-15 (Gov) 抗体の検出. *日本輸血細胞治療学会誌*, 54 (2) : 262, 2008
- 14) 藤原孝記ほか：蛍光ビーズ法を応用した高感度PC-HLA交差適合試験法の開発. *血液事業*, 30 (2) : 333, 2007
- 15) Hayashi T. *et al.*: Detection of antibodies against human platelet antigens 15a and 15b by using a cell line panel. *British journal of Haematology*, 151: 402-412, 2010