

原 著

妊娠による血小板反応性抗体(HLA 抗体と human platelet antigens 抗体) の 産生 : 妊娠回数及び週齢と抗体陽性率の解析

榎本 隆行¹⁾ 丸岡 尚子¹⁾ 花垣 澄雄¹⁾ 森田 庄治¹⁾
島村 益広¹⁾ 半戸 啓一¹⁾ 石島あや子¹⁾ 吉川 昭¹⁾
湯浅 晋治¹⁾ 高橋 孝喜²⁾ 大戸 齊³⁾

¹⁾埼玉県赤十字血液センター

²⁾虎の門病院輸血部

³⁾福島医大輸血・移植免疫部

(平成 12 年 4 月 10 日受付)

(平成 12 年 7 月 23 日受領)

要 旨

妊娠や輸血により作られる HLA 抗体は、新生児血小板減少症や血小板輸血不応答の原因となる。輸血の際に白血球除去フィルターを使用する事で HLA 抗原感作は減少している。しかしながら、妊娠による抗原感作を予防する有効な手段がない。また、妊娠歴のある女性は、輸血時に白血球除去フィルターを使用しても HLA 抗体を産生する率が高い。

そこで、我々は、輸血歴のない妊婦 4,069 例の抗体スクリーニングを行い、妊娠回数及びその週齢と抗体陽性率の関係について検討した。

その結果、初回妊娠の初期であっても HLA 抗体や human platelet antigens (HPA) 抗体が検出され、妊婦の HLA 抗体陽性率は、初回妊娠で 3.5% であったが、妊娠回数が増すごとに約 5% 程度上昇し、全体では、9.4% であった。妊婦の HLA 抗体陽性率(9.4%)は、白血球除去フィルターを用いた輸血患者(11.2%)とほぼ同程度であり、出産経験のある献血者(2.6%)に比べると約 4 倍であった。妊婦の HPA 抗体陽性率は 0.6% であり、初回妊娠では 0.2% であるが、妊娠回数とともに陽性率が増加し、この陽性率は、出産経験のある献血者(0.6%)とほぼ同程度で、白血球除去フィルターを用いた輸血患者(1.0%)の約半分であった。HPA 抗体の特異性は HPA-5b に対するものが多く、ついで HPA-4b に対する抗体であった。

PREGNANCY-INDUCED ALLOIMMUNIZATION AGAINST PLATELET ANTIGENS : HLA AND HUMAN PLATELET ANTIGENS (HPA)

Takayuki Enomoto¹⁾, Hisako Maruoka¹⁾, Sumio Hanagaki¹⁾, Shoji Morita¹⁾, Masuhiro Shimamura¹⁾,
Keiichi Hando¹⁾, Ayako Ishijima¹⁾, Akira Yoshikawa¹⁾, Shinji Yuasa¹⁾,
Koki Takahashi²⁾ and Hitoshi Ohto³⁾

¹⁾Saitama Red Cross Blood Center

²⁾Department of Transfusion Medicine and Immunohematology, Toranomon Hospital

³⁾Division of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University

Anti-HLA and HPA antibodies, which are produced during pregnancy and blood transfusion, often cause neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) neonatal alloimmune thrombocytopenic

purpura (NAITP) and platelet transfusion refractoriness (PTR). Such sensitization against HLA through blood transfusion can be partly prevented by leukoreduction filters. However, there is no efficient way to prevent alloimmunization during pregnancy. In addition, women with a history of pregnancy are easily sensitized by blood transfusion even if leukoreduction filters are used.

We studied the incidence of pregnancy-induced alloimmunization among 4,069 women with no history of blood transfusion.

Anti-HLA antibodies were found in 9.4% (384/4,069) of pregnant women; 3.5% in the first pregnancy, 10.5% in the second and 15.6% in the third or more pregnancies. The incidence of anti-HLA antibodies in pregnant women (9.4%) was similar to that in blood transfusion recipients (11.2%) but was approximately 4 times higher than that in female blood donors (2.6%) with a history of delivery. Sensitization against HLA was found in 3% before week 10 of pregnancy and increased to 15% at week 30 or later for those in the first pregnancy. The incidence of anti-HPA antibody was 0.6% (23/4,069) in pregnant women, with 4 cases of anti-HPA-4, 1 case of anti-HPA-5a and 18 cases of anti-HPA-5b. The positive rate was 0.2% in the first pregnancy, but increased in accordance with the number of pregnancies.

In this study, we found that HLA alloimmunization was frequent among pregnant women and that the sensitization rate correlated with the number of pregnancies.

Key words : HLA, HPA, pregnant women, alloimmunization, Neonatal alloimmune thrombocytopenia

はじめに

新生児血小板減少症 (neonatal alloimmune thrombocytopenia : NAIT) や新生児血小板減少性紫斑病 (neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura : NAITP) は、主に血小板型 (human platelet antigens : HPA) の母児間不適合による同種免疫が原因で引き起こされる^{1,2)}が、白血球型 (human leukocyte antigens : HLA) が関与したと思われる症例の報告もみられる³⁾⁻⁷⁾。HLA, HPA 抗体の産生原因である同種抗原感作は、妊娠のほかに輸血によって生じるが、白血球除去フィルターの使用が導入されたことにより、血液疾患受血者の HLA, HPA 抗体の産生率は著しく低下している^{8,9)}。

一方、現在のところ、妊娠による抗体産生予防には有効な手段がない。また、妊娠既往の女性は、輸血時に白血球除去フィルターを使用しても HLA 抗体産生率は高い¹⁰⁾。そこで、我々は、妊娠による抗原感作時期を明らかにする目的で妊婦の妊娠回数及びその週齢と抗体陽性率の関連について検討した。

対象者及び検査方法

対象者

1. 妊婦

福島県内 12 の産科病医院を受診した輸血歴が無く、インフォームド・コンセントが得られた延べ 4,069 名の妊婦であった。

2. 経産献血者

妊婦の比較対象として、埼玉県内の延べ 22,488 名の経産献血者を検査した。

3. 輸血患者

ベッドサイドで白血球除去フィルターを使用して輸血をした虎の門病院の外科系、及び内科系の輸血患者 294 症例について HLA 抗体陽性率を調査した。輸血患者は男性 181 例、女性 113 例で輸血回数は 1 回から 13 回までみられたが、80% 以上が 3 回以下の輸血であった。女性患者の妊娠歴は調査できなかった。

方 法

1. HLA 抗体

HLA 抗体スクリーニングは、その都度、HLA 型既知の新鮮及び凍結したリンパ球 40 パネルを日本人での抗原頻度が約 1% 以上の抗原を含む様に組み合わせ、リンパ球細胞毒試験 (LCT 法) で実

施した。HLA 抗体スクリーニングで陽性の場合には、HLA 抗原既知 150 パネルのリンパ球を用いて特異性を同定した。

2. HPA 抗体

HPA 抗体スクリーニングは日本人での抗原頻度が 0.4% 以下である、HPA 1b 以外の抗原を含む様に組合わせた血小板固層 3 パネルを用いて混合受身凝集法 (Mixed Passive Haemagglutination: MPHA) で抗体スクリーニングを行い、HPA 抗体が陽性の場合には、既知の血小板固層 12 パネルの未処理、クロロキン処理を併用し、特異性を同定した。

HLA, HPA 抗体の鑑別が困難な例では、リンパ球吸収試験を行った。

3. 統計法

日本人の HPA 型抗原頻度から計算した遺伝子頻度をもとに、母児間 HPA 型不適合妊娠の発生頻度を求めた。

a, b の対立抗原がある時に、a 抗原での不適合発生頻度は、女性が a 抗原陰性となる頻度 × (配偶者が a 抗原のホモ接合体、あるいはヘテロ接合体となる頻度) となり、それぞれの遺伝子頻度を a, b とすると

$b \cdot b(a \cdot a + 2ab/2)$ で求められ、 $a + b = 1$ であることから、 $b^2 \times a$ となる。

陽性率の有意差検定には、 χ^2 検定を用いた。

成 績

1) 妊婦の妊娠回数と週齢の内訳 (Table 1)

検体を採取した対象妊婦の妊娠回数は、初回妊娠から 8 回目迄であったが、初回 (1,497 名 36.8%) と 2 回目 (1,387 名 34.1%) が多かった。妊婦の検体採取時の妊娠週齢は、初期の 4 週から出産間近の 40 週までみられたが、全体の 55.2% は 10 ~ 13 週のもので、その中でも、12 週の検体が 19.4% と最も多かった。これらの妊婦を妊娠第 9 週まで、妊娠第 10 週から 19 週まで、妊娠第 20 週から 29 週まで、妊娠第 30 週以降の 4 群に分けて HLA, HPA 抗体陽性率の検討を行った。

2) 妊娠回数と HLA, HPA 抗体陽性率 (Table 2)

妊婦 4,069 例中 384 例 (9.4%) に HLA 抗体が検出された。妊婦の HLA 抗体陽性率は、経産献血者

(2.6%) の約 4 倍と有意に高く ($p < 0.01$)、白血球除去フィルターを用いた輸血患者の 11.2% に次いで多かった。なお、白血球除去フィルターを用いた輸血患者の HLA 抗体陽性率は男性が 11.6%、女性が 8.8% と男女間で有意な差はなかった。

HLA 抗体陽性率を妊娠回数ごとに比較すると、初回妊娠で約 3.5%、2 回目で 10.5%、3 回以上のグループでは 15.6% と、妊娠回数が増す毎に 5% 程度ずつ陽性率が有意に上昇する ($p < 0.01$) が、初回から 2 回目にかけてが 7.0% と増加率が最も高い。しかしながら、妊娠後期にあたる 30 週以降の HLA 抗体陽性率を比較すると、僅かずつ上昇するものの 30 週以前のような明らかな相関性は見られない。

同様に HPA 抗体陽性率も妊娠回数が増えるに従い、初回から順に、0.2%、0.4%、1.2% と明らかに上昇しており ($p < 0.01$)、2 回目から 3 回目にかけての増加が顕著である。しかし、妊婦の HPA 抗体の陽性率は、0.6% (4,069 例中 23 例) で、白血球除去フィルターを用いた輸血患者の 1.0% と比べ少し低いのが、有意な差は認めなかった ($p > 0.05$)。

3) 妊娠週齢による HLA 抗体陽性率の推移 (Fig. 1)

妊婦を妊娠回数別に、その週齢を 10 週ごとに分け、陽性率を比較したところ、HLA, HPA 抗体ともに、初回妊娠の妊婦も含めて、妊娠初期の段階から陽性者が認められた。また、週齢の進行に伴い、HLA 抗体陽性率は妊娠回数に拘わらず有意に増加していた (初回 $p < 0.01$ 、2 回目 $p < 0.05$ 、3 回以上 $p < 0.01$)。初回妊娠では、HLA 抗体陽性率は 19 週迄が 3% 前後で推移しているのに対し、20

Table 1 Pregnant women : Number of pregnancies and weeks of gestation

No. of pregnancies	Weeks of gestation				Total (%)
	~9	10~19	20~29	30~	
First	259	1,109	60	69	1,497 (36.8)
Second	296	982	41	68	1,387 (34.1)
Third or more	200	878	51	56	1,185 (29.1)
Total	755	2,969	152	193	4,069 (100.0)

Table 2 Relationship between positive rate of antibodies and number of pregnancies
(Summary of alloimmunized pregnancies)

		Number tested	Anti-HLA		Anti-HPA		Anti-HLA and anti-HPA
			No. of positive cases	(%)	No. of positive cases	(%)	No. of positive cases
Pregnant women	First pregnancy	1,497	53	3.5	3	0.2	1
	Second pregnancy	1,387	146	10.5	6	0.4	1
	Third or more pregnancy	1,185	185	15.6	14	1.2	2
	Total	4,069	384	9.4	23	0.6	4
Blood donors with prior delivery		22,488	585	2.6	*0.6		NT
Blood transfusion recipients		294	35	11.2	3	1.0	1

* taken from reference 13

Relationship between number of pregnancies and positive rate of antibodies	against HLA	p < 0.01	against HPA	p < 0.01
Difference in alloimmunization rate of HLA or HPA between pregnant women and blood donors with prior delivery	against HLA	p < 0.01	against HPA	p > 0.05
Difference in alloimmunization rate of HLA or HPA between pregnant women and blood transfusion recipients	against HLA	p > 0.05	against HPA	p > 0.05

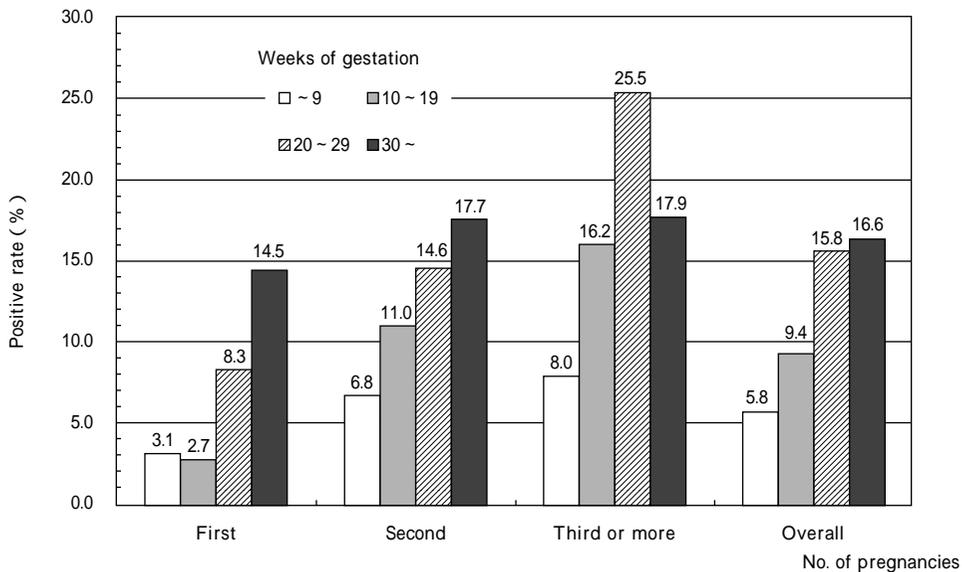


Fig. 1 Effect of gravidity on the positive rate of anti-HLA

週以降では 8.3% とそれまでと比べ明らかに高率となり、40 週以後は 14.5% であった。妊娠経験者では初回妊娠に比べ HLA 抗体陽性率の増加が早まる傾向が認められ、9 週までの群に比べ 10 から 19 週の群の陽性率が高くなっていた。HPA 抗体の推移は、陽性者が少ないため、検討できなかった。

4) HLA 抗体の特異性 (Fig. 2)
 妊婦から検出された HLA 抗体の特異性のうち、A locus, B locus に対する抗体、A + B locus に対する抗体、broad な抗体がそれぞれ 15.1%、51.6%、4.2%、6.3% であった。LCT 法でリンパ球

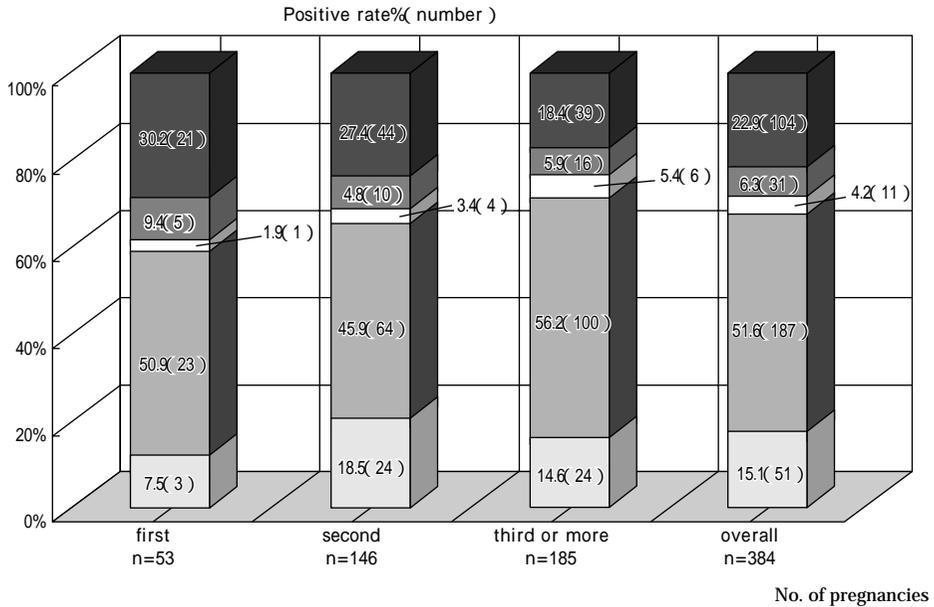


Fig. 2 Specificity of anti-HLA detected in pregnant women

anti-A locus specific
 anti-B locus specific
 anti-A and anti-B locus specific
 multiple specificity
 non-identified specificity

と陽性の反応を示すが対応抗原陽性のリンパ球の一部としか反応せず、特異性が特定できない抗体が22.9%であった。抗体の特異性は、妊娠回数に関わらず、B locus に対するものが45%以上と最も多く、妊娠回数が多くなるにつれて、特異性不明の抗体が占める割合が減少した。また、今回検出された抗体には、C locus の抗原単独に対する特異性は認められなかった。

妊娠回数が増えるに従い、特異性が決定できる抗体の割合が高くなっていく。しかし、いずれの妊娠回数においても、単一の抗原に対しての特異性を示すものは、約20%程度と少なく、複数の抗原に対する broad な特異性を示すものが多かった。

5) 妊婦の HPA 抗体の特異性 (Table 3)

妊婦の HPA 抗体は、HPA 4b 抗体が4例、HPA 5a 抗体が1例、HPA 5b 抗体が18例であった。そのうち、HPA 5b 抗体は初回妊娠の妊婦2名からも検出されたが、HPA 4b 抗体は初回妊娠の妊婦からは検出されなかった。

HPA 抗体陽性妊婦23名のうち、HLA 抗体と

HPA 抗体の共存者は6名(26%)(HPA 4b 抗体が1名、HPA 5b 抗体が5名)であった。

考 察

妊娠における HPA 抗体の出現頻度について永尾¹¹⁾らが輸血歴の無い初妊婦に抗体検出例を多く認め、妊娠第28週以降に抗体陽性となった例が75%であったと報告しているが、HLA 抗体については、産生時期について報告した文献はみられなかった。

HLA 抗体陽性率を妊娠回数別にみると、妊娠回数が一回増えるごとにほぼ一定の割合(約5%ずつ)で HLA 抗体陽性率が増加した。初回の妊娠初期においても陽性者が認められることは、抗体の産生原因となる経胎盤出血が、かなり高率に生じていることを示唆する¹²⁾。

妊娠経験者の HLA 抗体が、初回妊娠に比べ早期に出現するのは、過去の妊娠に拠って既に抗原刺激を受けている事が原因であろう。安田ら⁸⁾は、白血球除去フィルターを用いても、過去に抗原感作があった患者の HLA 抗体陽性率が、フィルターを使用しない場合とほぼ同程度である事を報

Table 3 Anti-HPA detected in pregnant women, blood donors with history of delivery and blood transfusion recipients

Antibodies	Number of pregnancies						* Blood donors with prior delivery (%)	Blood transfusion recipients (%)
	First		Second		Third or higher			
	Number of examples	(%)	Number of examples	(%)	Number of examples	(%)		
HPA-2 b	0		0		0		0.002	0
HPA-4 a	0		0		0		0.001	0
b	0		1	0.072	3	0.253	0.120	0.340
HPA-5 a	1	0.066	0		0		0.005	0
b	2	0.134	5	0.360	11	0.928	0.450	0.680
Nak ^a	0		0		0		0.006	0
Total	3	0.200	6	0.432	14	1.181	0.584	1.020

* taken from reference 13

告している。

HLA 抗体の特異性を解析すると、殆どの妊婦が複数の抗原に対応する特異性を認め、理論上妊娠による抗原感作可能な抗原数を上回るものが多い。これは、それぞれの抗原に対する抗体を産生するのではなく、各々の抗原に共通するエピトープに対する抗体を産生していることを示唆する。

HLA 抗体が単一の特異性を示す経産献血者の割合(30%)は、妊婦(20%)に比べてやや高い。これは、経産献血者では、出産後期間が経過する間に抗体が失活することによって、いわゆる public 抗原反応性が低下し、private 抗原反応性が残るためと思われる。

また、妊婦と経産献血者¹³⁾での HPA 抗体陽性率は差がない。HLA 抗体は、経産献血者の陽性率が妊婦に比べ 1/4 程度である。この理由として、HPA 抗体は一旦感作されると年数を経ても低下しにくく、逆に HLA 抗体は、感作されても、その後抗原刺激がなければ失活し易いと考えられる⁸⁾⁹⁾¹⁴⁾。

日本人の血小板抗原頻度¹⁵⁾から遺伝子頻度と母児不適合の発生頻度を計算した (Table 4)。

母児不適合の発生頻度が高い HPA 3a, 3b や 2b に対する抗体は、妊婦からの検出報告例は少なく、今回の調査でも検出されなかった。妊婦からは永尾¹¹⁾、野口¹⁶⁾の報告と同様に母児不適合の発生頻度の割合とほぼ一致して、HPA 5b,

Table 4 Prediction of HPA mismatch frequency between mother and fetus in Japanese

Antigens	* Antigen frequency (%)	Gene frequency	Frequency of HPA mismatch
HPA- 1a	> 99.9	0.9980	< 0.0001
1b	0.4	0.0020	0.0019
HPA- 2a	98.2	0.8637	0.0155
2b	25.4	0.1342	0.0999
HPA- 3a	78.9	0.5413	0.1142
3b	70.7	0.4593	0.1347
HPA- 4a	99.9	0.9915	0.0007
4b	1.7	0.0085	0.0089
HPA- 5a	99.7	0.9445	0.0028
5b	10.8	0.0548	0.0488

* taken from reference 15

HPA 4b 抗体が多く検出された。また、これらの抗体は、HLA 抗体との複合が多く見られた。血小板膜上の抗原数が少ない HPA 5 に対する抗体が多く検出される原因として、これらの抗原の発現が血小板に限らず他の胎児組織細胞にも分布していることが挙げられる¹⁵⁾。母児不適合の発生頻度が高いにもかかわらず、妊婦や輸血患者で抗体の検出例が少ない HPA 3 の抗原は免疫原性が弱いと考えられる。

週齢別の陽性率の推移から、2 回目以上の妊娠では、25 から 30 週前後までの期間に抗 HLA 抗体を産生する妊婦が最も多く、以後新たに抗体を産生する妊婦は少ないものと推察された。妊娠初期

に抗体陽性者を認めるものの、今回の調査で明らかな NAIT, NAITP を認めた症例はなかった。

まとめ

1. 妊婦の HLA 抗体陽性率は、初回妊娠で 3.5%、妊娠回数が増すごとに約 5% 程度上昇し、全体では、9.4% であった。HLA 抗体の特異性は Blocus に対する特異性を示すものが最も多かった。

2. 妊婦の HLA 抗体陽性率は、経産献血者の約 4 倍で白血球除去フィルターを用いた輸血患者とほぼ同程度であった。

3. HPA 抗体陽性率は、初回妊娠で 0.2%、全体では、0.6% であった。その特異性は HPA 5b に対するものが多く、ついで HPA 4b に対する抗体であった。

4. 妊婦の HPA 抗体陽性率は、0.6% と経産献血者と同率で、白血球除去フィルターを用いた輸血患者の陽性率 1.0% の約半分であった。

本文の要旨は、第 47 回日本輸血学会総会（平成 11 年 5 月 12 日、仙台市）において発表した。

謝辞：なお、検体採取にご協力いただきました先生方に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V., Grubert A., et al. : 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet*, 1 : 364-366, 1989.
- 2) Shibata, Y., Morita, S. : Anti-platelet alloantibodies in Japanese detected by MPHA. 24th Congress of the International Society of Blood Transfusion. 55, 1996.
- 3) 中村幸夫, 大西 淋, 生田 満, 他 : 抗 HLA 抗体によると考えられる同種免疫性新生児血小板減少症の同胞発症例. *日産婦会誌*, 4 : 107-111,

- 1994.
- 4) 小山典久, 高崎二郎, 田中太平, 他 : 抗 HLA 抗体が関与したと思われる新生児血小板減少症の 2 例. *日新生児会誌*, 24 : 440-448, 1998.
- 5) 森田庄治, 本山文子, 半戸啓一, 他 : 抗 HLA 抗体が関与したと思われる新生児血小板減少性紫斑病の 1 例. *日輸血会誌*, 45 : 173, 1999.
- 6) 加藤 道, 大矢健一, 佐藤陽子, 他 : 抗 HLA 抗体が原因と思われる 2 症例の NAITP について. *日輸血会誌*, 45 : 174, 1999.
- 7) 船津理恵, 小西真理恵, 立野順子, 他 : HLA-B70 が原因と考えられる NAITP の一例. *日輸血会誌*, 45 : 174, 1999.
- 8) 安田広康, 大戸 斉, 遠山ゆり子, 他 : 同種免疫予防における白血球除去フィルターの効果について. *日輸血会誌*, 37 : 501-505, 1991.
- 9) 半田 誠, 平野武道, 池田康夫 : 血小板輸血の展望 : 白血球除去フィルターを使用した血小板輸血による HLA 同種免疫の予防. *エフ・コピント富士書院*, 41-49, 1993.
- 10) 平原和子, 安田広康, 遠山ゆり子, 他 : 過去の輸血・妊娠が抗 HLA 抗体産生に及ぼす影響. *医学検査*, 41 : 1825-1828, 1992.
- 11) 永尾暢夫, 谷上純子, 富田信子, 他 : HPA 抗体による新生児血小板減少症と妊婦における HPA 抗体の出現頻度. *日輸血会誌*, 44 : 317-321, 1998.
- 12) 中村幸夫 : 女性への輸血は怖い? . *日輸血会誌*, 43 : 399-402, 1997.
- 13) 森田庄治, 愛敬千絵, 石島あや子, 他 : 経産婦献血者 8 万人からスクリーニングされた抗血小板同種抗体について. *日輸血会誌*, 37 : 40-43, 1991.
- 14) 安田広康, 加藤久美子, 色摩弥生, 他 : 血小板混合凝集法 (MPHA) で検出される低力価抗 HLA 抗体による血小板輸血不応答. *医学検査*, 48 : 1007-1014, 1999.
- 15) 柴田洋一 : 血小板型. *日輸血会誌*, 39 : 204-211, 1993.
- 16) 野口まゆみ, 大戸 斉, 遠山ゆり子, 他 : 血小板型不適合による新生児血小板減少症の頻度 : 予視的研究. *日本新生児学会誌*, 30 : 456-461, 1994.