

原 著

## IgM 型 HLA クラス I 抗体の血小板輸血不応状態への関与 —PTR 患者における免疫グロブリンクラス別 HLA 抗体陽性率

斉藤 敏<sup>1)3)</sup> 玉井 豊広<sup>2)</sup> 太田 正穂<sup>3)</sup> 大田 智<sup>1)</sup>  
小松 政義<sup>1)</sup> 平林 盛人<sup>1)</sup> 玉木 啓子<sup>1)</sup> 瀬下 秀幸<sup>1)</sup>  
清水 寿<sup>1)</sup> 浅村 英樹<sup>3)</sup> 福島 弘文<sup>3)</sup> 野村 節夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>長野県赤十字血液センター

<sup>2)</sup>オリンパス株式会社

<sup>3)</sup>信州大学医学部, 法医学

(平成 17 年 10 月 20 日受付)

(平成 17 年 12 月 19 日受理)

HLA クラス I 抗体が血小板輸血不応状態 (platelet transfusion refractoriness : PTR) に関与することについては数多くの報告があるが, IgM 型の HLA クラス I 抗体 (IgM-HLA 抗体) の PTR への関与についての報告はほとんどない. そこで, PTR 患者 121 人の凍結保存血清の HLA 抗体スクリーニングを, 磁性粒子を用いた Mixed passive hemagglutination assay (M-MPHA) 法, Flow cytometric reagents for detection of panel-reactive antibody against HLA Class I antigens (FlowPRA) 法, Anti-human immunoglobulin lymphocyte cytotoxicity test (AHG-LCT) 法により行い, IgM-HLA 抗体の PTR への関与については, 輸血 24 時間後の補正血小板増加数 (CCI<sub>24hours</sub>) による血小板輸血効果から推測した. その結果, M-MPHA 法により 121 症例中 48 症例から IgM-HLA 抗体が検出された. 一方, FlowPRA 法により検出できた IgM-HLA 抗体は, それら 48 例中 35 例, AHG-LCT 法では 20 例のみであった. 血小板輸血効果は, IgM-HLA 抗体を保有する, 48 症例中 7 症例 74 輸血において判定できた. IgM-HLA 抗体の特異性に対応する抗原を持たない輸血では, CCI<sub>24hours</sub> が  $19.7 \pm 4.7 (\times 10^9/L)$  を示し輸血効果を得ることができたが, 対応する抗原を持つ輸血では, CCI<sub>24hours</sub> が  $2.0 \pm 1.9 (\times 10^9/L)$  を示し輸血効果を得られなかった. PTR 患者に高頻度に存在する IgM-HLA 抗体は, PTR の原因になると考えられ, その半数以上は AHG-LCT 法により検出できなかった. M-MPHA を HLA 抗体スクリーニング, 血小板輸血の際の交差試験に用いることで, PTR 症例の原因解析と輸血効果の向上に貢献できる可能性がある.

キーワード : IgM-HLA 抗体, IgG-HLA 抗体, 血小板輸血不応状態 (PTR), 磁性粒子混合受身赤血球凝集法 (M-MPHA), FlowPRA

### はじめに

患者が保有する HLA クラス I 抗体の免疫グロブリン (Ig) クラスについてはいくつかの報告があり, IgM 型の HLA クラス I 抗体 (IgM-HLA 抗体) が HLA クラス I 抗体全体の 38~71% 存在することが報告されている<sup>1)~3)</sup>. 一般に, IgM-HLA 抗体は, リンパ球細胞毒試験 (LCT) もしくは抗ヒト免疫グロブリン-LCT (AHG-LCT) により検

出できると考えられ, また, 低温反応性であり<sup>1)</sup>, 多くは自己抗体であることから<sup>4)</sup>, 血小板輸血不応状態 (platelet transfusion refractoriness : PTR) への関与等, 臨床的には重要視されてこなかった. そのため多くの施設では, HLA 抗体スクリーニングに際し, non-cytotoxic HLA 抗体の検出のために, LCT 法に加え, Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA),

Lymphocyte immunofluorescence test (LIFT), Flow Cytometric Reagents for Detection of Panel-Reactive antibody against HLA Class I antigens (FlowPRA) 等の高感度法を用いても, IgG 型の HLA クラス I 抗体 (IgG-HLA 抗体) のみを検出の対象とし, IgM-HLA 抗体は検出対象としていない<sup>5)</sup>.

一方, Miller ら, Godeaus らは, IgM-HLA 抗体の PTR への関与の可能性を示唆し<sup>11)</sup>, また藤野 らは, IgM-HLA-A24 抗体による PTR 症例を報告した<sup>6)</sup>.

今回, IgM-HLA 抗体が PTR の原因として強く関与している可能性と, PTR に関与する IgM-HLA 抗体の多くが AHG-LCT 法では検出できないことが明らかになったので報告する.

## 方 法

### 1. 対象

2002 年 4 月から 2005 年 3 月までの 3 年間で, 長野県内の医療機関から PTR の原因究明のため, 検査依頼があった 121 症例 (男性 49, 女性 72) の保存凍結血清について, HLA 抗体, HPA 抗体スクリーニングを行った.

### 2. HLA タイピング

患者およびドナーの HLA クラス I タイピングは, 日赤共通トレイおよび自家製トレイを用い, LCT 法<sup>7)</sup>により行った.

### 3. 抗体スクリーニング

#### 1) HLA 抗体

12 種類の O 型リンパ球, 血小板を用い, 抗ヒト IgM 抗体感作磁性粒子ならびに抗ヒト IgG 抗体感作磁性粒子を使用する Mixed passive hemagglutination assay (IgM-M-MPHA, IgG-M-MPHA) 法<sup>8)~10)</sup>, FlowPRA 法<sup>11)</sup>, AHG-LCT 法<sup>12)</sup>の 4 法により一次スクリーニングを行った. また, 一次スクリーニングの結果から, 症例ごとに特異性同定に必要な抗原を持つパネルを新たに選択し, IgM-M-MPHA 法, IgG-M-MPHA 法, AHG-LCT 法の 3 法による二次スクリーニングを行った.

IgM-M-MPHA 法における感作温度と感作時間は, AHG-LCT 力価 8 倍の IgM 型 HLA-A2 抗体を用いて至適条件を検討後, 37°C 60 分とした.

FlowPRA 法はフローサイトメトリー (FCM: FACSCalibur: Becton Dickinson & Co., Sunnyvale, CA) を使用した. 二次抗体として, FITC-conjugated goat F (ab')<sub>2</sub> anti-human IgM (Biosource, CA: IgM-FlowPRA) と FITC-conjugated goat F (ab')<sub>2</sub> anti-human IgG (Biosource, CA: IgG-FlowPRA) を用い, IgM-HLA 抗体と IgG-HLA 抗体を別々にスクリーニングした.

#### 2) HPA 抗体

HPA-1a, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6a, 6b, Nak<sup>a</sup> 抗原を網羅した 12 種類の O 型血小板をクロロキン処理し, IgM-M-MPHA 法, IgG-M-MPHA 法によるスクリーニングを行った.

### 4. HLA 適合血小板 (HLA-PC) 供給時の交差試験

IgM-M-MPHA 法, IgG-M-MPHA 法, AHG-LCT 法を用いた.

### 5. 輸血効果の判定

輸血 24 時間後の CCI (補正血小板増加数) 値を次の式により求め判定した (CCI<sub>24hours</sub>).

$$CCI (10^9/L) = [\text{輸血後血小板数} (10^9/L) - \text{輸血前血小板数} (10^9/L)] \times \text{体表面積} (m^2) \div \text{輸血血小板数} (10^{11})$$

また, IgM-HLA 抗体が存在した症例については, 過去にさかのぼり, 輸血に用いられた血小板製剤 (PCs) の HLA 型とその PCs による輸血効果を調べ, IgM-HLA 抗体の特異性に対応する抗原を持つ PCs が輸血された症例の CCI<sub>24hours</sub> と, 対応する抗原を持たない PCs が輸血された症例の CCI<sub>24hours</sub> を比較検討した.

## 結 果

### 1. IgM-M-MPHA 検査至適条件の検討

37°C 60 分または 37°C 90 分の感作条件により, 32 倍希釈までの HLA-A2 抗体を検出できたが, 4°C, 22°C では, それぞれ 4 倍, 8 倍希釈までの HLA-A2 抗体しか検出できなかった (Table 1).

### 2. 抗体スクリーニング

IgM-M-MPHA 法により 121 症例中 48 症例 (39.7%) から IgM-HLA 抗体が検出され, そのうち 25 症例では IgG-M-MPHA 法により IgG-HLA 抗体も検出された (Table 2). これら 48 例中, IgM-

FlowPRA 法のみ陽性 3 例, IgM-FlowPRA 法と IgG-FlowPRA 法ともに陽性 32 例, IgG-FlowPRA 法のみ陽性 8 例であった. IgM-FlowPRA 法では, IgM-M-MPHA 法により検出された 48 例中 13 例の IgM-HLA 抗体が検出できなかった. 逆に, IgM-FlowPRA 法により検出された 35 例の IgM-HLA 抗体はすべて, IgM-M-MPHA 法により検出することができた. 一方, AHG-LCT 法では, IgM-M-MPHA 法により検出された 48 例のうち, 20 例の IgM-HLA 抗体しか検出できなかった.

IgM-M-MPHA 法または IgM-FlowPRA 法が陽性, もしくは両法が陽性の場合を IgM-HLA 抗体陽性とし, IgG-M-MPHA 法または IgG-FlowPRA 法が陽性, もしくは両法が陽性の場合を IgG-HLA 抗体陽性とすることによりクラス分けした HLA 抗体陽性数は, IgM-HLA 抗体のみ陽性が 8 例 (9%), IgM-HLA 抗体+IgG-HLA 抗体陽性が 40 例 (43%), IgG-HLA 抗体のみ陽性が 45 例 (48%) であった (Table 3).

IgM-M-MPHA 法が陽性で, IgG-M-MPHA 法が

陰性の 23 症例中, AHG-LCT により, 既に抗 HLA-A2 が同定されていた症例 A22 を除く 12 症例において, IgM-M-MPHA 法を用いることで, これまで同定することができなかった HLA 抗体の特異性を同定することができた (Table 4). また, これら 13 症例の IgM-M-MPHA 法による陽性反応は, 症例 A1 を除き, 血小板をクロロキン処理することにより全て陰性化した.

M-MPHA 法により, IgM-HLA 抗体と IgG-HLA 抗体が検出された 25 症例中 13 症例において, IgM-HLA 抗体と IgG-HLA 抗体の特異性をそれぞれ同定できた (Table 5). IgM-HLA 抗体と IgG-HLA 抗体の特異性が同じ症例が 5 症例, 特異性が全く異なる症例が 7 症例, 一部が異なる症例が 1 症例であった. IgM-HLA 抗体と IgG-HLA 抗体の特異性が同じ症例の男女比は 2 : 3 であったが, 特異性の異なる症例では全てが女性であった. IgM -, IgG-M-MPHA 法の全ての陽性反応は, 血小板をクロロキン処理することにより陰性化した.

### 3. 輸血効果

IgM-M-MPHA 法により, IgM-HLA 抗体の特異性が同定できた 26 症例中 7 症例の PCs 輸血において, IgM-HLA 抗体の特異性に対応する抗原陰性 PCs と, 対応する抗原陽性 PCs の輸血効果を検討できた (Table 6). IgM-HLA 抗体の特異性に対応する抗原陰性の PCs では,  $CCI_{24\text{hours}}$  が  $19.7 \pm 4.7 (\times 10^9/L)$  を示し輸血効果を得ることができたが, IgM-HLA 抗体の特異性に対応する抗原陽性の PCs では,  $CCI_{24\text{hours}}$  が  $2.0 \pm 1.9 (\times 10^9/L)$  を示し輸血効果を得られなかった.

抗体スクリーニングにより, IgM-HLA-B5 Cross Reactive Group Antigen (CREG) 抗体のみ

Table 1 Optimum conditions for the IgM-M-MPHA screening test using IgM anti-HLA-A2 serum

Temperature	Minutes	Negative control	Serum titration			
			1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
4°C	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	60	(-)	(W)	(-)	(-)	(-)
22°C	30	(-)	(W)	(-)	(-)	(-)
	60	(-)	(2+)	(W)	(-)	(-)
37°C	30	(-)	(2+)	(W)	(-)	(-)
	60	(-)	(2+)	(2+)	(2+)	(W)
	90	(-)	(2+)	(2+)	(2+)	(W)

Table 2 Comparison of IgM-HLA antibody detection in 121 sera samples from PTR patients

Method	Number detected	Number detected by other methods compared to the method at left						AHG-LCT
		M-MPHA			FlowPRA			
		IgM-	IgM- & IgG-	IgG-	IgM-	IgM- & IgG-	IgG-	
IgM-M-MPHA	48	23	25	0	3	32	8	20
IgM-FlowPRA	35	12	23	0	3	32	0	18

Table 3 Summary of the estimated immunoglobulin classes of 93 HLA antibodies detected in 121 sera samples from PTR patients

Ig class of HLA antibodies	Number (%)	Number of reaction patterns	M-MPHA		FlowPRA	
			IgM-	IgG-	IgM-	IgG-
IgM	8 (9)	5	(+)	(-)	(-)	(-)
		3	(+)	(-)	(+)	(-)
IgM+IgG	40 (43)	9	(+)	(-)	(+)	(+)
		6	(+)	(-)	(-)	(+)
		2	(+)	(+)	(-)	(+)
		23	(+)	(+)	(+)	(+)
IgG	45 (48)	38	(-)	(+)	(-)	(+)
		7	(-)	(-)	(-)	(+)
Total	93 (100)					

Table 4 Specificities of IgM-HLA antibodies positive on IgM-MPHA and negative on IgG-M-MPHA

Patient I.D.	Blood Type	Gender	Patient HLA type						M-MPHA			FlowPRA		AHG-LCT	Specificity
			A			B			IgM-		IgG-	IgM-	IgG-		
			24	11	51	52	10	9	4	NT †	T ‡				
A1	O+	M	24	11	51	52			20/20*	20/20	0/20	(-)	(-)	0/20	(Anti-HPA3b+anti-HLA-A2)
A3	B+	M	2		54		1	9	10/20	0/20	0/20	(-)	(-)	0/20	Anti-HLA-B13+B60+B61
A4	A+	F	2	24	61	52	10		6/20	0/20	0/20	(-)	(-)	0/20	Anti-HLA-A31+A33
A5	A+	F	26	31	35	62	9	4	5/20	0/20	0/20	(-)	(-)	0/20	Anti-HLA-B7+B48+B60
A6	A+	F	2		35	48	9		8/20	0/20	0/20	(+)	(-)	0/20	Anti-HLA-B51+B52
A9	O+	F	24	31	48	52			12/20	0/20	0/20	(-)	(+)	0/20	Anti-HLA-Cw3
A10	A+	M	1	11	7	35	7	9	10/20	0/20	0/20	(-)	(+)	0/20	Anti-HLA-A26+A31+A33
A11	A+	M	11	33	58	55	1	10	12/20	0/20	0/20	(-)	(+)	0/20	Anti-HLA-A2+B60
A19	B+	F	24	26	52	62	8		10/20	0/20	0/20	(+)	(+)	0/20	Anti-HLA-B13+B60+B61
A20	A+	F	2	24	52	54	1		5/20	0/20	0/20	(+)	(+)	0/20	Anti-HLA-B48+B60+B61
A21	A+	F	2	24	61	55	1	9	6/20	0/20	0/20	(+)	(+)	0/20	Anti-HLA-A26+A33
A22	O+	M	24	11	51	52	1		10/20	0/20	0/20	(+)	(+)	10/20	Anti-HLA-A2
A23	B+	F	2	24	35	46	1	8	10/20	0/20	0/20	(+)	(+)	0/20	Anti-HLA-B13+B60+B61

† : M-MPHA with chloroquine-untreated platelets

‡ : M-MPHA with chloroquine-treated platelets

\* : Number of positive panels/Number of tested panels

が検出され、輸血に際し交差試験を実施した症例 A6 において、IgG-M-MPHA 法と AHG-LCT 法がともに陰性、IgM-M-MPHA 法が陽性を示した 3 例の PCs 輸血では、いずれも CCI<sub>24hours</sub> が 0 を示し輸血効果が得られなかったが、陰性を示した 3 例の PCs 輸血では CCI<sub>24hours</sub> がそれぞれ、22.7, 19.6, 27.8 (×10<sup>9</sup>/L) を示し輸血効果を得られた (Table 7).

## 考 察

### 1. IgM-HLA 抗体の検出至適温度

IgM-HLA 抗体の検出至適温度について Miller らは、アイソトープを用いた抗グロブリン試験において 4℃ が最適であったと報告しているが<sup>1)</sup>、今回、我々が用いた IgM-M-MPHA 法では、比較を行った 3 種類の温度のうち、37℃ において最も検出感度が高かった。しかし、検討に用いた IgM-HLA 抗体が HLA-A2 抗体 1 種類だけであることから、さらに多数の IgM-HLA 抗体を用いた検討

Table 5 Specificities of IgM- and IgG-HLA antibodies positive on IgM- and IgG-M-MPHA

Patient I.D.	Blood Type	Gender	Patient HLA type					Screening method										
								IgM-M-MPHA			IgG-M-MPHA			AHG-LCT		FlowPRA		
			A	B	Cw	NT †	T ‡	Specificities	NT	T	Specificities	P/N	Specificities	IgM	IgG			
						P/N *	P/N		P/N	P/N								
B10	O+	M	2	24	67	55	1	7	4/14	0/14	B51+B52	4/14	0/14	B51+B52	0/14		(+)	(+)
B22	B+	F	2	24	39	52	7		4/12	0/12	A26	4/12	0/12	A26	0/12		(+)	(+)
B25	O+	M	24	11	51	52			6/12	0/12	A2	6/12	0/12	A2	0/12		(-)	(+)
B7	O+	F	24	26	52	61	10		6/12	0/12	A2	6/12	0/12	A2	6/12	A2	(-)	(+)
B16	A+	F	1	2	37	62	6		6/20	0/20	B48+B60+B61	6/20	0/20	B48+B60+B61	6/20	B48+B60+B61	(+)	(+)
B15	B+	F	26	33	44	61	10		4/20	0/20	B60	6/20	0/20	B35+B51	0/20		(+)	(+)
B21	A+	F	2	24	52	54	1		4/16	0/16	B44	4/16	0/16	A33	0/16		(+)	(+)
B23	O+	F	2	24	61	55	1	9	3/14	0/14	B60	4/14	0/14	B51+B52	0/14		(+)	(+)
B9	B+	F	24	11	54		1		6/20	0/20	B51+B52	6/20	0/20	B13+B60+B61	6/20	B13+B60+B61	(+)	(+)
B24	O+	F	2	26	39	62	7		7/20	0/20	A24	13/20	0/20	B13+B60+B61+Cw3	13/20	B13+B60+B61+Cw3	(+)	(+)
B6	O+	F	2	26	44	61	10		8/20	0/20	B7+B48+B60	4/20	0/20	A11	12/20	A11+B7+B48+B60	(+)	(+)
B14	B+	F	2	31	51	35	9		8/20	0/20	A24	6/20	0/20	B44	14/20	A24+B44	(-)	(+)
B19	O+	F	2	24	52	46	1		3/20	0/20	B54	6/20	0/20	B7+B54	6/20	B7+B54	(+)	(+)

† : M-MPHA with chloroquine-untreated platelets  
 ‡ : M-MPHA with chloroquine-treated platelets  
 \* : Number of positive panels/Number of tested panels

Table 6 Response (mean ± SD) to platelet transfusion in patients with IgM HLA antibodies

Patient I.D.	Blood Group	Patient HLA type					Specificities of IgM HLA antibodies	PCs without corresponding antigens		PCs with corresponding antigens		
		A	B	Cw	Number*	CCI <sub>24</sub> hours (×10 <sup>9</sup> /L)		number	CCI <sub>24</sub> hours (×10 <sup>9</sup> /L)			
A3	B+	2	54	1	9	Anti-HLA-B13 + B60 + B61	6	22.7 ± 4.3	2	0		
A4	A+	2	24	61	52	10	Anti-HLA-A31 + A33	8	20.2 ± 2.9	3	1.3 ± 1.9	
A5	A+	26	31	35	62	9	4	Anti-HLA-B7 + B48 + B60	5	25.2 ± 6.1	2	0.6 ± 0.6
A6	A+	2	35	48	9	Anti-HLA-B51 + B52	24	21.9 ± 4.1	6	0.5 ± 1.9		
B9	B+	24	11	54	1	Anti-HLA-B51 + B52	15	14.2 ± 3.2	13	0.7 ± 0.5		
B23	O+	2	24	61	55	1	9	Anti-HLA-B60	10	24.9 ± 4.1	8	5.4 ± 4.7
B24	O+	2	26	39	62	7	Anti-HLA-A24	6	16.0 ± 3.9	4	0.7 ± 1.4	
Total							74	19.7 ± 4.7	38	2.0 ± 1.9		

\* : Number of transfusions

が必要と考えられる。

## 2. 抗体スクリーニング

IgM-HLA 抗体は、AHG-LCT 法により検出できると考えられていたが、今回の解析により、AHG-LCT 法では IgM-M-MPHA 法で検出できた 48 例中 20 例しか検出することができなかった。IgG-HLA 抗体検出においては FlowPRA 法が最も感度が高く、M-MPHA 法は FCM を用いた LIFT

法と同程度と報告されている<sup>13)</sup>。しかし、IgM-HLA 抗体検出における IgM-FlowPRA 法では、IgM-M-MPHA 法で検出できた 48 例中 35 例が検出できたただけであった。

HLA クラス I 抗体の Ig クラス別検出頻度については、Miller ら<sup>1)</sup>、Godeau ら<sup>2)</sup>、Laundry ら<sup>3)</sup>により、IgM 抗体のみ陽性がそれぞれ 28%、46%、23%、IgM 抗体 + IgG 抗体ともに陽性がそれぞれ

Table 7 Response to platelet transfusion in patient A6 with IgM-HLA-B5CREG antibodies

Patient		Blood type	HLA-A	HLA-B			HLA-Cw		Crossmatch-test				CCI <sub>24hours</sub> (×10 <sup>9</sup> /L)
				35	48	9	8	M-MPHA			AHG-LCT		
								IgM-		IgG-			
				NT †	T ‡	NT							
Donor	6907	A+	2	51	48	8		(+)	(-)	(-)	(-)	0	
	4390	A+	2	51				(+)	(-)	(-)	(-)	0	
	2994	A+	2	51	48	8		(+)	(-)	(-)	(-)	0	
	9417	A+	2	35	48	8	9	(-)	(-)	(-)	(-)	22.7	
	1093	AB+	2	35				(-)	(-)	(-)	(-)	19.6	
	1170	O+	2	35	60	9		(-)	(-)	(-)	(-)	27.8	

† : M-MPHA with chloroquine-untreated platelets

‡ : M-MPHA with chloroquine-treated platelets

36%, 8%, 15%, IgG抗体のみ陽性がそれぞれ28%, 46%, 62%と報告されている。今回の解析においては、IgM抗体のみ陽性が8例(9%), IgM抗体+IgG抗体ともに陽性が40例(43%), IgG抗体のみ陽性が45例(48%)であり、IgM抗体単独、あるいはIgG抗体を伴ったIgM-HLA抗体が52%の高率で検出された。単独のIgM抗体が9%と他の報告に比べ少ないのは、IgG-HLA抗体検出に、検出感度の高いFlowPRA法を用いたことによると考えられる。またMillerら<sup>1)</sup>は、HLAクラスI抗体の7%にIgM+IgA抗体が存在することも報告しているが、本研究においてはIgAのHLAクラスI抗体については検討を加えなかった。

血小板をクロロキン処理しても陰性化しないIgG-HLA抗体の存在が知られているが、IgM-HLA抗体においても、血小板をクロロキン処理した後に反応が陰性化しないHLA抗体が存在した。症例A1では、リンパ球による吸収試験によりHPA-3b抗体が同定され、HPA-3b陰性血小板を用いたスクリーニングによりHLA-A2抗体の存在が推定されたが、クロロキン処理後もHLA-A2抗体に対する反応は陰性化しなかった(データ未提示)。一次スクリーニングにおいては、用いた20パネルのHPA-3b陰性パネルが全てHLA-A2抗原陽性であったため、クロロキン処理後も全パネルが陽性反応を示し、抗体の同定ができな

かった。多くの症例においては、HLA抗体、HPA抗体の識別にクロロキン処理血小板を用いることは有用と考えられるが、このような珍しい症例も存在するため、クロロキン処理血小板の反応だけでHLA抗体、HPA抗体の識別を行うべきではないと考えられる。

IgM-HLA抗体とIgG-HLA抗体がともに検出され、それぞれの特異性が同定できた13症例において、IgM-HLA抗体とIgG-HLA抗体の特異性が同じ症例、全く異なる症例、一部が異なる症例の3群が存在した。免疫抗体産生機序において、IgM抗体が最初に産生され、その後IgGにスイッチするのが一般的と考えられていることから、今後、IgM-HLA抗体の不変性もしくはIgG-HLA抗体へのスイッチについて、症例ごとの経時的变化を追うことによって、3群の詳細について検討を加える必要があると考える。

### 3. 輸血効果

血小板輸血効果の判定は、輸血1時間後、16~24時間後の血小板増加数の比較をCCIもしくは%recoveryにより行うことが一般的である<sup>14)</sup>。Bishopらは、輸血後1時間と20時間の血小板増加数を比較し、両者において血小板増加数に影響を与える臨床要因に差はなく、CCI<sub>20hours</sub>はCCI<sub>1hour</sub>の約64% (r=0.67, P<0.001)と報告しているが<sup>15)</sup>、免疫学的要因によるPTRを正しく評価するためには、CCI<sub>1hour</sub>とCCI<sub>24hours</sub>の解析を行う必要

がある。しかし多くの医療機関では、HLA-PC 輸血効果の向上、患者の負担、血算の保険点数等の理由から、輸血後1時間の血小板数測定が行われていない。そのため、本研究においてはCCI<sub>24hours</sub>のみの解析しか行えなかった。今後、免疫学的PTRと考えられる症例の解析、改善のためには、更なる臨床サイドとの密接な連携が必要と考える。

抗イデオタイプIgM抗体は、移植免疫学において重要な役割を果たすことが知られており、腎臓移植においては、IgM-HLA抗体が原因の交差試験陽性は拒絶に影響せず、むしろ安全で長期生着の成功の可能性を示唆しているとさえ言われている<sup>16)</sup>。一方、肝臓移植においてのIgM-HLA抗体が原因の交差試験陽性は、悪影響を与えることが報告されている<sup>17)</sup>。

血小板輸血におけるIgM-HLA抗体の臨床的意義については、Godeauらが、50人の血小板輸血患者について、prospectiveにHLA抗体の産生を解析した結果、PTRへの影響については更なる検討が必要であると報告している<sup>2)</sup>。また、Millerらは、赤血球抗体同様に、低温反応性のHLA抗体は臨床的に意味がない可能性があるとしながらも、IgM-HLA抗体のみが検出された4症例においてPTRが存在したことから、IgM-HLA抗体がPTRに関与している可能性もあり、更なる検討が必要であるとコメントしている<sup>1)</sup>。わが国においては藤野らが、IgM-HLA-A24抗体によるPTR症例を大変まれな症例として報告しているが<sup>6)</sup>、今回の解析により、輸血効果が検討できたIgM-HLA抗体を持つ7症例全てにおいて輸血効果が得られなかったことから、IgM-HLA抗体は多くの症例においてPTRの原因となる可能性が高い。

CCI<sub>24hours</sub>が $5.4 (\times 10^9/L)$ で、標準偏差が $\pm 4.7$ と大きい症例B23では、患者がIgG-HLA抗体を有していたことから、患者のHLA-B61抗原のCREG抗原であるHLA-B60のHLA-PCが輸血され、はじめの4回は輸血効果が得られた。しかし、5回目以降のHLA-B60のHLA-PCでは輸血効果を得ることができなかった(データ未提示)。これは、新たにIgM-HLA-B60抗体が産生されたため

と考えられる。このように、頻回にHLA-PC輸血がされる患者においては、CREG抗原に対しても抗体が産生される場合があり、IgM-M-MPHA法を用いることで、新たに産生しはじめたIgM-HLA抗体を検出できる可能性がある。

また、PTR患者において検出された48例のIgM-HLA抗体のうち、特異性が同定できたのは26例で、残りの22例では特異性が同定できなかった。このように抗体の特異性が同定できない症例や、症例A6のように、他の方法では検出できないHLA抗体を保有している症例に対するPCs輸血に際し、IgM-M-MPHA法を交差試験に用いることで、これまで輸血効果を予測できなかった症例においても、有効な輸血ができると考えられる。

## 結 語

IgM-HLA抗体がPTR患者の52%に存在し、IgG-HLA抗体と同様にPTRの原因になる可能性があることが示唆された。IgM-HLA抗体の半数以上がAHG-LCT法では検出できなかったことから、IgM-M-MPHAをHLA抗体、HPA抗体スクリーニング、血小板輸血の際の交差試験に用いることで、PTR症例の原因解析と輸血効果の向上に貢献できる可能性がある。

謝辞：論文のご高閲を賜りましたメルボルン赤十字血液センターのLinda Cantwell先生、HLA適合血小板輸血に際し、輸血効果の判定にご協力くださいました長野県内13病院の先生方に感謝いたします。

第53回総会推薦論文(本論文の要旨は平成17年5月28日、第53回日本輸血学会総会(浦安)で発表した。)

## 文 献

- 1) Miller K, Kickler TS, Ness PM, et al : Immunoglobulin class heterogeneity of platelet antibodies. Vox Sang, 47 : 421—426, 1984.
- 2) Godeau B, Fromont P, Seror T, et al : Platelet alloimmunization after multiple transfusions : a prospective study of 50 patients. Br J Haematol, 81 : 395—400, 1992.
- 3) Laundry GJ, Bradley BA, Rees BM, et al : Incidence and specificity of HLA antibodies in multi-transfused patients with acquired aplastic anemia. Transfusion, 44 : 814—825, 2004.
- 4) Iwaki Y, Lau M, Terasaki PI : Successful trans-

- plants across T warm-positive cross-matches due to IgM antibodies. *Clin Transplant*, 2 : 81—84, 1988.
- 5) International forum : Detection of platelet-reactive antibodies in patients who are refractory to platelet transfusions, and the selection of compatible donors. *Vox Sang*, 84 : 73—88, 2003.
  - 6) 藤野恵三, 北橋 繁, 村井順一郎, 他 : anti-PLT・オリビオ・MPHA で検出できない IgM タイプ HLA 抗体による血小板輸血不応症例 (抄録). *日本輸血学会誌*, 50 : 296, 2004.
  - 7) Terasaki PI, McClelland JB : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204 : 998—1000, 1964.
  - 8) Ohgama J, Yabe R, Tamai T, et al : A new solid-phase assay system using magnetic force on blood group serology. *Transfusion Medicine*, 6 : 351—359, 1996.
  - 9) 森田庄治, 井上 進, 川田紀子, 他 : 磁性粒子を使用した迅速な血小板抗体検出の試み. *血液事業*, 25 : 33—40, 2002.
  - 10) Tamai T, Ishii Y, Mazda T : IgM alloantibody detection by M-MPHA, a new solid-phase assay system. *Transfusion Science*, 23 : 47—54, 2000.
  - 11) Pei R, Wang G, Tarsitani C, et al : Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol*, 59 : 313—322, 1998.
  - 12) Johnson AH, Rossen RD, Butler WB : Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test. *Tissue Antigens*, 2 : 215—226, 1972.
  - 13) 齊藤 敏, 太田正穂, 勝山善彦, 他 : 抗 HLA クラス I 抗体の方法別検出感度と血小板輸血患者における方法別抗体検出率—AHG-LCT, LIFT, PIFT, M-MPHA および FlowPRA の比較. *日輸血学会誌*, 50 (6) : 753—760, 2004.
  - 14) Novotny VMJ : Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sang*, 76 : 1—13, 1999.
  - 15) Bishop JF, Matthews JP, McGrath K, et al : Factors influencing 20-hour increments after platelet transfusion. *Transfusion*, 31 : 392—396, 1991.
  - 16) McCalmon RT Jr, Tardif GN, Sheehan MA, et al : IgM antibodies in renal transplantation. *Clin Transplant*, 11 : 558—564, 1997.
  - 17) Katz SM, Kimball PM, Ozaki C, et al : Positive pretransplant crossmatches predict early graft loss in liver allograft recipients. *Transplantation*, 57 : 616—620, 1994.

PLATELET TRANSFUSION REFRACTORINESS ASSOCIATED  
WITH IGM-HLA-CLASS I ANTIBODIES  
—IMMUNOGLOBULIN CLASS HETEROGENEITY OF HLA CLASS I  
ANTIBODIES IN PTR PATIENTS

Satoshi Saito<sup>1)3)</sup>, Toyohiro Tamai<sup>2)</sup>, Masao Ota<sup>3)</sup>, Satoshi Ota<sup>1)</sup>, Masayoshi Komatsu<sup>1)</sup>,  
Morito Hirabayashi<sup>1)</sup>, Keiko Tamaki<sup>1)</sup>, Hideyuki Seshimo<sup>1)</sup>, Hisashi Shimizu<sup>1)</sup>,  
Hideki Asamura<sup>3)</sup>, Hirofumi Fukushima<sup>3)</sup> and Setsuo Nomura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Nagano Blood Center

<sup>2)</sup>Diagnostic Systems Department, Olympus Corporation

<sup>3)</sup>Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Although HLA-class I antibodies (Abs) are considered one of the major obstacles in posttransfusion platelet increments for platelet transfusion refractory (PTR) patients, whether IgM-HLA-class I Abs are associated with accelerated platelet destruction and transfusion failure remains unclear. Accordingly, we assessed the frequency of IgM-HLA-class I Abs development in 121 PTR patients using the magnetic-mixed passive hemagglutination assay (M-MPHA), flow cytometric reagents for detection of panel-reactive antibody against HLA Class I antigens (FlowPRA) and the anti-human immunoglobulin lymphocyte cytotoxicity test (AHG-LCT). The relationship between IgM-HLA-class I Abs and PTR was assessed by calculating 24 h post-transfusion corrected platelet count increments ( $CCI_{24\text{hours}}$ ). Result showed that IgM-HLA-class I Abs were detected in 48 of 121 patients using the M-MPHA. Only 20 and 35 of these 48 IgM-HLA-class I Abs were detected using the AHG-LCT and FlowPRA respectively. In 7 of 48 patients positive for IgM-HLA-class I Abs, 74 transfusions without corresponding antigen for specificities of IgM-HLA-class I Abs had  $CCI_{24\text{hours}}$  of  $19.7 \pm 4.7 (\times 10^9/L)$ . In contrast, 38 transfusions with corresponding antigens for specificities of the same Abs had  $CCI_{24\text{hours}}$  of  $2.0 \pm 1.9 (\times 10^9/L)$ . Collectively, IgM-HLA-class I Abs were detected in 39.7% of PTR patients, and were considered to play a role in mediating refractoriness to platelet transfusions. In 28 of 48 cases, IgM-HLA-class I Abs could not be detected by the AHG-LCT. Detection of IgM-HLA-class I Abs using the M-MPHA may clarify the as yet unknown mechanism of the pathogenesis of PTR.

**Key words** : IgM-HLA-class I antibodies, IgG-HLA-class I antibodies, Platelet transfusion refractoriness (PTR), Magnetic-mixed passive hemagglutination assay (M-MPHA), Flow Cytometric Reagents for Detection of Panel-reactive antibody against HLA Class I antigens (FlowPRA)

---