

原 著

抗 CD36 抗体陽性血清による血小板活性化と抗体価との関連性

若本志乃舞¹⁾ 藤原 満博¹⁾ 宮崎 孔¹⁾ 高橋 大輔¹⁾
佐藤進一郎¹⁾ 中島 文明^{2)*} 森田 庄治³⁾ 寺木 佳子⁴⁾
福森 泰雄⁵⁾ 佐藤 博行⁶⁾ 山本 定光¹⁾ 加藤 俊明¹⁾
東 寛¹⁾ 池田 久實¹⁾

¹⁾北海道赤十字血液センター

²⁾神奈川県赤十字血液センター

³⁾埼玉県赤十字血液センター

⁴⁾千葉県赤十字血液センター

⁵⁾大阪府赤十字血液センター

⁶⁾福岡県赤十字血液センター

*日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 (現所属)

(平成 17 年 11 月 7 日受付)

(平成 18 年 3 月 24 日受理)

抗血小板抗体陽性血液製剤が血小板活性化能を有する場合に、血小板減少のみならず、非溶血性輸血副作用 (nonhemolytic transfusion reactions : NHTRs) を誘導する可能性が示唆されている。我々はこれまでに、NHTRs (ショック) と血小板減少を誘導した血液製剤のドナー (イニシャル : SS) 由来抗 CD36 抗体陽性血漿が健常人血小板活性化能を示したことが、本症例のドナー由来抗血清 (SS serum) 以外に、13 例中 1 例の健常人由来抗 CD36 抗体陽性血清 (抗 CD36 血清) において血小板凝集の誘導がみられたことを報告している。各抗 CD36 血清において、血小板活性化能に差がみられたことは、抗 CD36 抗体陽性血液製剤が NHTRs を誘導するか否かを規定する要因が存在することを示唆していると考えられる。今回、抗 CD36 血清中の抗体価が抗血清による血小板活性化能の有無に関与している可能性を調べるため、16 例 (SS serum 及び serum #1~#15) の抗 CD36 血清の血小板活性化能と抗体価を測定し、解析した。血小板活性化は血小板凝集反応に加え、RANTES の放出反応を指標とした。

血小板活性化能を有する 2 例の抗血清 (SS serum と serum #1) の抗体価はいずれも x512 であったのに対し、血小板を活性化しない抗血清では x128 以下であった。SS serum と serum #1 を抗体価 x128 に希釈すると、血小板活性化能はみられなかった。抗血小板抗体の中には、単独では血小板活性化能を示さないが、低濃度の血小板アゴニストの存在下において血小板活性化作用を示す抗体が存在することが知られている。本検討では、SS serum と serum #1 をそれぞれ抗体価 x256 と x341 に希釈すると、血小板凝集は減少するが、低濃度のエピネフリンとの相乗作用により、抗体価 x512 の各抗血清単独による凝集率と同等の値まで増加した。一方、抗体価 x128 に希釈した SS serum, serum #1 及び抗体価 x128 以下の他の抗 CD36 血清は、エピネフリン存在下においても血小板凝集反応は誘導しなかった。

抗 CD36 血清による血小板活性化は抗体価に依存したことから、抗 CD36 抗体陽性血液製剤の輸血により NHTRs が発症するか否かに血液製剤中の抗体価が関与することが示唆された。

キーワード : 抗 CD36 抗体, 非溶血性輸血副作用, 血小板活性化, 抗体価

はじめに

CD36は血小板の膜糖蛋白の一つで、トロンボスポンジンおよびcollagenのレセプターである¹⁾²⁾。血小板の他にもCD36は多岐の細胞に発現しており、マクロファージでは酸化LDLのスカベンジャーレセプター及びアポトーシス細胞の認識、血管内皮ではマラリア感染赤血球との接着を介する分子、脂肪細胞では長鎖脂肪酸のトランスポーターとして機能している¹⁾²⁾。ヒトにおいてCD36欠損があり、血小板、単球をはじめとした、CD36を発現する全ての細胞のCD36が欠損しているI型欠損と、血小板のみのCD36が欠損しているII型欠損が存在する³⁾。CD36のI型欠損者は輸血や妊娠により、CD36に感作されて抗CD36抗体を産生する⁴⁾。輸血においてはレシピエントの抗CD36抗体が血小板輸血不応答⁴⁾、輸血後紫斑病⁵⁾の原因となること、分娩においては妊婦の抗CD36抗体が新生児自己免疫性血小板減少症⁶⁾⁷⁾の原因となることが報告されている。

輸血や妊娠によって産生された抗血小板抗体は血小板に結合するだけでなく、血小板活性化能を有する場合がある^{8)~11)}。血小板は顆粒に種々の炎症性生理活性物質を含有し、活性化に伴って放出するため、非生理的な血小板活性化は炎症反応の誘導につながる可能性が考えられている¹²⁾。これらのことから輸血において、抗血小板抗体は血小板に結合して血小板減少症を引き起こすだけでなく、血小板を活性化することにより、炎症反応を誘導し、非溶血性輸血副作用(nonhemolytic transfusion reactions: NHTRs)の発症にも関与する可能性が示唆される。

我々は、新鮮凍結血漿(fresh frozen plasma: FFP)の輸血により、ショックと血小板減少症を呈したNHTRs症例において、FFP中に抗血小板抗体である、抗CD36抗体(IgG)を検出した¹³⁾。この症例において、副作用の原因製剤となった抗CD36抗体陽性血漿(抗CD36血漿)が、in vitroで血小板に対する生理活性を有し、血小板凝集及び放出反応を誘導することを見出している。さらにこの反応は、血小板上の低親和性Fcレセプター(human platelet Fc receptor; FcγRIIa)依存

性であること、また、抗CD36血漿に対する血小板の反応性に個体差があり、その要因として、血小板とSS plasmaとの交差反応の程度、及び血小板上CD36抗原とFcγRIIaの発現量が関与していることを報告している。これらの結果は、抗CD36抗体がNHTRsの原因となる可能性、及び抗CD36抗体陽性血漿によりNHTRsが発症するかどうかレシピエントの要因が関与する可能性を強く示唆すると推察される¹⁴⁾。さらに、本症例以外の13例の抗CD36抗体陽性血清(抗CD36血清)について、血小板凝集反応を指標とし、生理活性を調べた結果、比較的抗体価の高い1例の抗血清において凝集の誘導がみられることを示した¹⁴⁾。しかしながら、その他の抗CD36血清が血小板凝集を誘導しなかった理由は不明であった。

本検討においては、抗CD36血清の血小板活性化能を規定する因子として抗体価に着目し、抗血清による血小板活性化の抗体価依存性について解析を試みた。これまでの検討に抗CD36血清の例数を追加し、抗血清による血小板凝集反応、血小板からの炎症性ケモカインRANTESの放出反応、及び各抗血清の抗体価を測定した。さらに抗CD36血清と血小板アゴニストであるエビネフリンとの相乗作用と抗体価との関連性について検討を行った。

実験方法

1. 被検血清

(1) NHTRsの原因製剤由来抗CD36血清: レシピエントは、未破裂脳動脈瘤の手術施行6日後に、貧血の改善のため、赤血球製剤及びFFPの輸血を受け、ショックと血小板減少を発症した。輸血に使用された血液製剤を精査した結果、FFP中に抗CD36抗体(IgG₁優位)を検出した。本症例の、抗CD36抗体陽性FFPの血液ドナー(イニシャル: SS)の血清(SS serum)を、同意を得て使用した。血液ドナーは28歳の女性(血液型: B型)で、CD36のI型欠損者であった。2度の出産歴があり、輸血歴は無かった¹³⁾。(2) 健康人由来抗CD36血清: 14例の抗CD36血清(serum #1~#14)。(3) 血小板輸血不応答を来した患者(1例)由来の抗CD36血清(serum #15)⁴⁾。(4) 陰性対照と

して、抗 CD36 抗体陰性 AB 型血清を使用した。

2. 血小板の凝集能および放出反応の測定

B 型の健常人で、SS serum 単独により血小板活性化が誘導されることがわかっている CD36 陽性者 3 名¹⁴⁾、SS serum に対して反応を示さない CD36 陰性者 1 名¹⁴⁾を対象とし、全血(クエン酸三ナトリウム加)から多血小板血漿 (platelet rich plasma; PRP) を調整した。血小板凝集計 (PA-200; KOWA) にて、PRP に抗 CD36 血清 (60 μ l) または陰性対照の AB 型血清を添加して混合し、血小板凝集能を測定した。エピネフリン (アークレイ) の相乗作用の検討においては、予め、エピネフリン単独では血小板凝集を誘導しない濃度を各被検者において決定した。使用したエピネフリンの濃度は 0.125~1 μ M であった。エピネフリンと PRP を 5 分間プレインキュベーションした後、抗 CD36 血清または対照として、AB 型血清を添加した。凝集反応の反応上清を採取し、ELISA kit (R&D Systems) にて RANTES 濃度を測定した。

3. 抗 CD36 血清の抗体価の測定

PRP を 10 mM EDTA-PBS にて 1 回洗浄し、PBS に再浮遊して調整した血小板浮遊液を用いた。x1~x4,096 まで希釈した抗 CD36 血清または陰性対照と血小板を 30 分間、室温にてインキュベートした後、PE 標識抗ヒト IgG と 20 分間、室温にてインキュベートした。蛍光標識抗体による染色後、EDTA-PBS にて 1 回洗浄し、同液 (500 μ l) に再浮遊した。フローサイトメトリー (LSR, BD) にて、Scatter gram 上で血小板高密度領域にゲートを設定し、平均蛍光強度を測定した。平均蛍光強度の比 (抗 CD36 血清/陰性対照) が 2 以上となる最後の希釈倍数を抗体価とした。

4. 抗 HLA 抗体の検出

抗 HLA 抗体の検出は Flow-PRA 法 (One Lambda, Inc.)¹⁵⁾ により行った。

5. 統計学的解析

抗 CD36 血清による血小板の RANTES 放出反応の有意差検定は paired t-test により行った。有意差水準は $p < 0.05$ を用いた。

結 果

1. 抗 CD36 血清による血小板活性化

SS serum 及び 15 例の抗 CD36 血清について、CD36 陽性健常人、3 例に対する血小板活性化能を、血小板凝集反応と血小板の α 顆粒に存在する炎症性ケモカイン RANTES の放出反応を指標として検討した (Fig. 1, Fig. 2)。NHTRs に関与したドナー (SS) 由来抗 CD36 血漿を血清化した SS serum、または serum #1 と PRP のインキュベーションにより、血小板凝集反応 (Fig. 1A, B) 及び RANTES の放出反応 (Fig. 2) が誘導された。SS serum 及び serum #1 は CD36 陰性血小板に対して血小板活性化を誘導しなかった (Fig. 1D, E, Fig. 2)。従って、SS serum 及び serum #1 による血小板活性化の誘導は、CD36 に特異的であると考えられた。serum #2 ~ serum #15 による血小板活性化はみられなかった (Fig. 2)。尚、陰性対照の AB 型血清は、血小板活性化を誘導しなかった (Fig. 1C, F, Fig. 2)。

2. 抗 CD36 血清による血小板活性化と被検血清の抗体価との関連性

被検血清の抗体価を測定した結果、血小板活性化を誘導する抗 CD36 血清の抗体価は x512 であったのに対し、血小板活性化を誘導しない抗血清の抗体価はいずれも x128 以下であった (Fig. 2)。また、serum #2、#3 は抗 HLA class I 抗体も陽性であった (Fig. 2)。

抗 CD36 血清による血小板活性化の抗体価依存性を調べるため、SS serum または serum #1 を希釈し、CD36 陽性被験者 2 例 (subject #1, #2) における血小板活性化能を調べた。Fig. 3A に SS serum による血小板凝集曲線の被験者 2 例の典型例を示した。抗体価 x512 における、被験者 2 例の、血小板の最大凝集率は 54.5% (mean : n=2) であったが、抗体価 x256 では 31.5% に低下し、x128 では凝集反応は消失した。被験者 2 例の RANTES 放出反応も、抗体価 x512 の 54.9 ng/ml (mean : n=2) から、x256 で 46.3 ng/ml、x128 で 20.2 ng/ml に低下した (Fig. 3B)。serum #1 を抗体価 x341、x256 に相当するよう希釈すると、subject #1 の場合は、最大凝集率の低下はないものの、抗

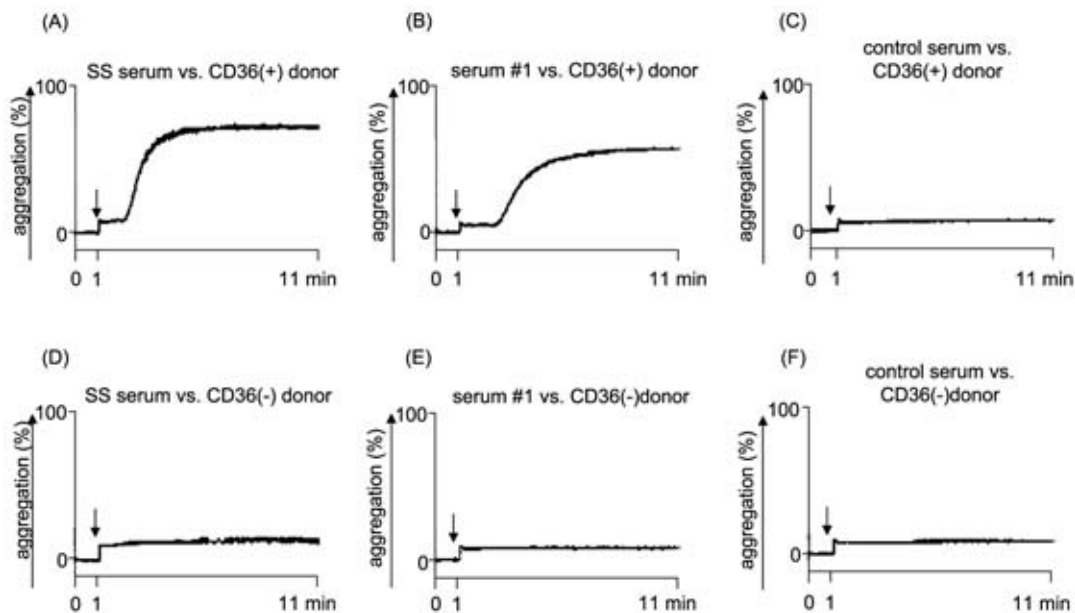


Fig. 1 Effect of anti-CD36 sera on platelet aggregation.

SS serum and anti-CD36 serum #1 induced aggregation in CD36-positive platelets (A, B). SS serum and anti-CD36 serum #1 did not induce aggregation in CD36-negative platelets (D, E). Negative control serum (AB serum) did not cause platelet aggregation (C, F). PRP was incubated with anti-CD36 sera on an aggregometer for the measurement of platelet aggregation. Anti-CD36 sera or negative control serum was added at the time indicated by the arrow. Data on platelet aggregation from CD36-positive platelets are representative of three subjects. The results from CD36-negative platelets are from one subject.

血清添加後10分間における最大凝集率に達するまでの時間に遅延がみられた。最大凝集率の半分の値に達するまでの時間を比較すると、抗体価 x512 で3分23秒 (最大凝集率55%), x341 で5分5秒 (最大凝集率58%), x256 で7分46秒 (最大凝集率57%)であった (Fig. 3C)。subject #2では最大凝集率が抗体価 x512 で55%, x341 で18%, x256 で6%と低下した (Fig. 3C)。さらにSS serumと同様に, serum #1においても, 抗体価 x128に相当するよう希釈すると, subject #1, subject #2のいずれの場合も凝集反応を誘導しなかった (Fig. 3C)。被験者2例の RANTES の放出反応も, 抗体価 x512 の51.2 ng/ml (mean : n=2) から, x341 で41.4 ng/ml, x256 で30.4 ng/ml, x128では12.6 ng/ml (Fig. 3D)と低下した。従って, SS se-

rumまたは serum #1による血小板凝集反応及び RANTES 放出反応はそれぞれの抗血清の抗体価に依存すると考えられた。

3. 抗CD36血清による血小板凝集に対するエピネフリンの相乗作用と被検血清の抗体価との関連性

マウスモノクローナル抗体の研究から, 抗血小板抗体単独では血小板活性化能を示さない抗体, または抗体単独で血小板活性化能を有する抗体を, 血小板凝集を示す閾値下の濃度に希釈した場合に, 低濃度の血小板アゴニストとの相乗作用によってこれらの抗体が血小板活性化能を示すことが報告されている¹⁶⁾¹⁷⁾。そこで, Fig. 3において血小板活性化能の低下及び消失がみられた容量のSS serum, serum #1または, 単独では血小板活

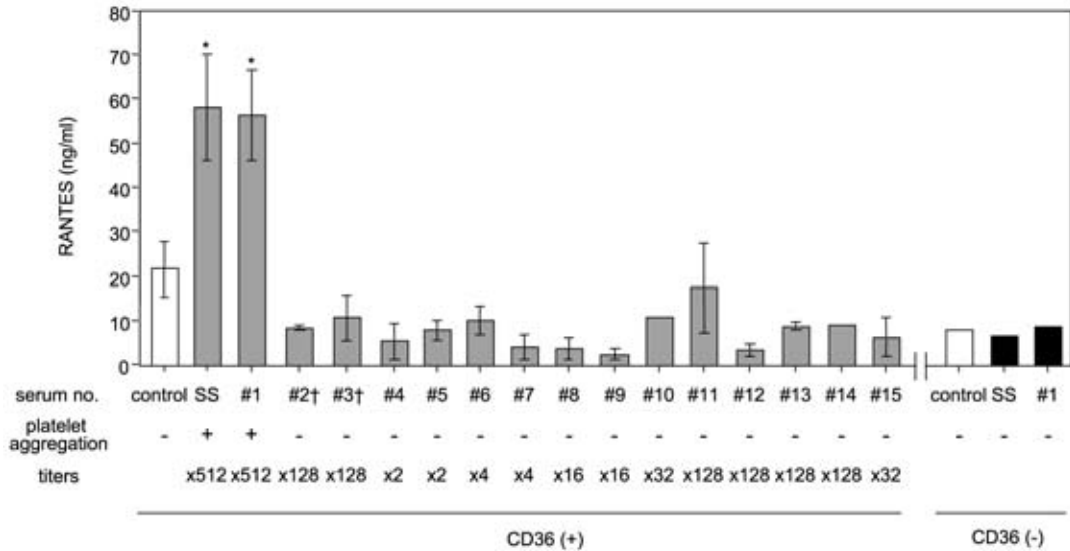


Fig. 2 RANTES release and aggregation response of platelets to anti-CD36 sera and the titer of antibody in sera.

SS serum and anti-CD36 serum #1 induced RANTES release in CD36-positive platelets (gray columns), but not in CD36-negative platelets (black columns). Negative control serum (AB serum) did not cause the release reaction (white columns). The RANTES level in the cell-free supernatant was measured as described in Materials and Methods. The data obtained from CD36-positive platelets are the mean ± SD of three subjects. In the case of sera #10 and #14, data are the mean of two subjects. Platelet aggregation-positive responses are indicated by (+) and -negative responses by (-). The titer of anti-CD36Abs in two platelet-activating sera (SS serum, serum #1) were x512 and those in other sera were x128 or less. *: p < 0.05 vs. control serum (AB serum). †: Serum containing anti-CD36 Abs and anti-HLA class I Abs.

性を誘導しなかった抗体価 x128 以下の抗 CD36 血清 (Fig. 2) と血小板アゴニストであるエピネフリンとの血小板凝集反応に対する相乗作用を検討した. PRP を低濃度のエピネフリンとプレインキュベーションした後, 抗体価 x256 に希釈した SS serum を添加し, 血小板凝集反応を測定した. その結果, 同希釈の SS serum 単独による最大凝集率 31.5% (mean : n=2) は, エピネフリン存在下において 52% に増加し (Fig. 4A), Fig. 3 A にて示した抗体価 x512 の SS serum 単独による最大凝集率 54.5% と同等となった. serum #1 では, subject #2 において, 抗体価 x341 に希釈した serum #1 単独による最大凝集率 18% がエピネフリン存在下において 51% に増加し (Fig. 4

B), x512 の serum #1 単独による最大凝集率 55% (Fig. 3C) と同等となった. subject #1 においては希釈した serum #1 とエピネフリンとの相乗作用はみられなかった.

一方, 抗体価 x128 に希釈した SS serum, serum #1 及び抗体価が x128 以下であった serum #4~#9, #11~13, #15 は, 被検者 2 例のいずれにおいても, エピネフリン存在下において血小板凝集を誘導しなかった (Fig. 4A, B, C). serum #3, #10, #14 はエピネフリンとの相乗作用を検討するための十分な血清量が得られなかったため, 検討はできなかった. また, 陰性対照もエピネフリン存在下において血小板凝集を誘導しなかった (Fig. 4D).

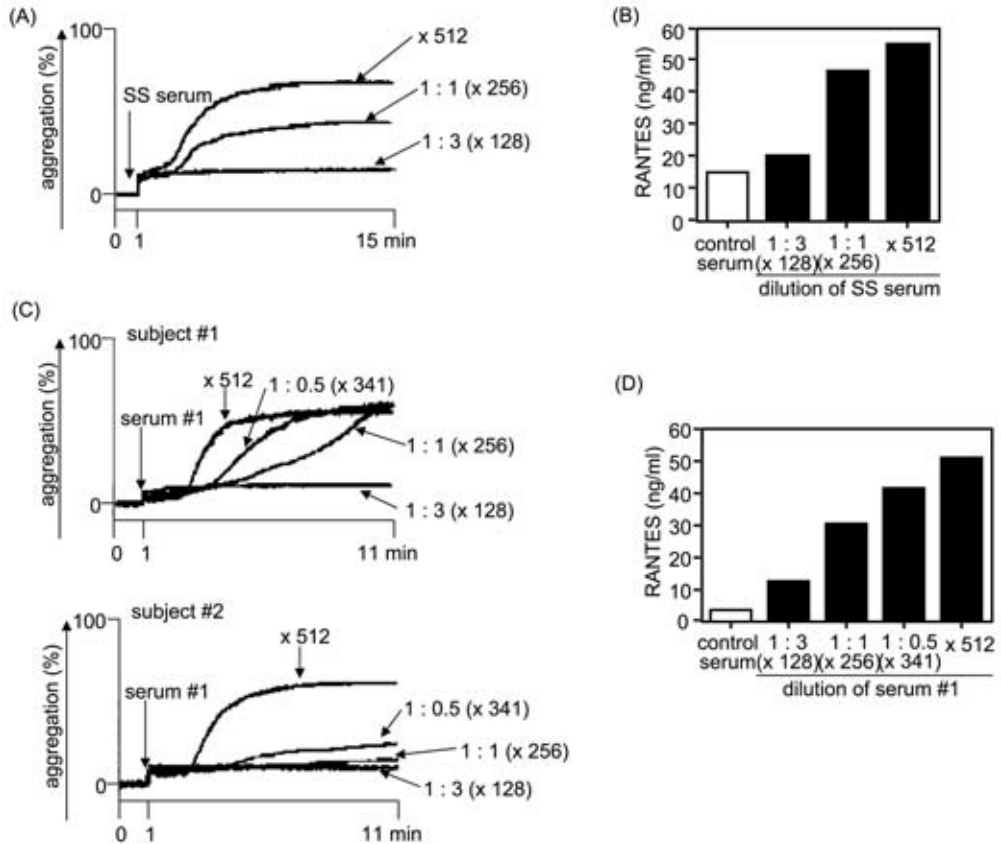


Fig. 3 Relationship between anti-CD36 sera-induced platelet activation and the titer of antibody in sera.

Platelet aggregation and RANTES release induced by SS serum and serum #1 were dependent on titer of antibody against CD36 in sera. SS serum (titer : x512) was diluted to 1 : 1 (titer : x256) or 1 : 3 (titer : x128) (A, B). Serum #1 (titer : x512) was diluted to 1 : 0.5 (titer : x341), 1 : 1 (titer : x256) or 1 : 3 (titer : x128) (C ~ D). PRP obtained from CD36-positive subjects was incubated with the diluted SS serum or serum #1 on an aggregometer for the measurement of platelet aggregation (A, C). Anti-serum was added at the time indicated by the arrow. After the reaction, the RANTES level in the cell-free supernatant was measured as described in Materials and Methods (B, D). Data for A are representative of two CD36-positive subjects (subject #1 and #2), and those for B and D are the means of two CD36-positive subjects (subject #1 and #2).

考 察

我々はこれまでに NHTRs を誘導したドナー由来抗 CD36 血清 (SS serum) 及び 13 例中 1 例の健康人由来抗 CD36 血清が血小板凝集を誘導したことを見出している¹⁴⁾。本検討では、これら複数ドナー由来の抗 CD36 血清に血小板活性化能を示す

ものと示さないものが存在したことの理由を明らかにするため、抗 CD36 血清の血小板活性化能の有無が抗血清中の抗体価に依存するかどうかを検討した。SS serum の他、15 例の抗 CD36 血清の血小板活性化能について、凝集反応に加え、放出反応を測定し、解析を行った。in vitro において輸

血の状況を反映させるため、本検討では精製抗体と洗浄血小板の組み合わせではなく、抗血清とPRPとのインキュベーションを行った。その結果、CD36 特異的に血小板凝集反応を誘導したSS serumおよびserum #1の抗体価はいずれもx512であったのに対し、凝集反応を誘導しない抗血清の抗体価はx128以下であった(Fig. 2)。また、SS serumによる血小板活性化において抗体価依存性がみられ、SS serumを抗体価x256に希釈すると、最大血小板凝集率およびRANTES放出反応は抗体価x512よりも低下し、抗体価x128では、凝集反応は誘導されず、RANTES放出反応も僅かであった(Fig. 3A, B)。serum #1においても、抗体価x341, x256に希釈すると、抗体価依存性に血小板活性化能が低下した(Fig. 3C, D)。この時、血小板凝集曲線のパターンに被験者2例で違いがみられ、x512では2例において同等の凝集反応を誘導したが、抗体価x341, x256に希釈すると、subject #1では抗血清添加後10分間において最大凝集率に達するまでの時間が遅延したのに対し(Fig. 3C)、subject #2では最大凝集率が低下した(Fig. 3C)。血小板凝集反応のパターンに個体差が生じたことのみメカニズムは不明であり、今後の検討課題である。serum #1によるRANTESの放出反応はいずれの被験者においても、抗血清の抗体価に依存して低下した。さらにserum #1を抗体価x128に希釈すると、血小板凝集反応は誘導されず、RANTES放出反応も僅かであった(Fig. 3C, D)。以上のことから、抗CD36血清の血小板活性化能の有無は、抗血清の抗体価に依存すると考えられた。今回検討した検体の中には、抗体価x256以上x512未満の抗CD36血清自体はなかったが、この抗体価の範囲の抗血清は弱いながらも、血小板活性化を誘導し得ることが示唆される。

さらに本検討では、抗CD36血清による血小板活性化に対するエピネフリンのプライミング作用の有無と抗体価との関連性を調べた。その結果、抗体価x256に希釈したSS serum及び抗体価x341に希釈したserum #1による血小板凝集は、エピネフリン存在下において、抗体価x512のSS

serum, serum #1単独による凝集率とそれぞれ、同等の値まで増加したことから、相乗作用がみとめられた(Fig. 4A, B)。一方、抗体価x128に希釈したSS serum, serum #1及び抗体価x128以下の他の抗CD36血清では、エピネフリン存在下においても血小板凝集反応は誘導されなかった(Fig. 4A, B, C)。これらの結果から、抗CD36血清のエピネフリンとの相乗作用の有無についても、抗血清単独作用の場合と同様に、抗血清の抗体価が重要な因子になっていることが推察された。希釈したSS serumまたはserum #1とエピネフリンとの相乗作用がみられたことの臨床的意義として以下のことが考えられる。すなわち、単独では十分な血小板活性化を惹起し得ない抗体価の抗CD36抗体陽性血液製剤であっても、原疾患及び輸血時の状態等によってレシピエントの生体内でエピネフリン分泌が亢進し、その結果、血小板がプライミングされている条件下では、十分な血小板活性化が誘導され、NHTRsが発症するという可能性である。血漿中エピネフリンレベルが増加する状態の一つとして、外科手術時のストレスが報告されている¹⁸⁾。

本検討において、抗体価の測定は、抗CD36血清の希釈系列を作成し、抗血清と被検血小板との交差反応をフローサイトメトリーにて測定する方法を用い、抗CD36血清/陰性対照の平均蛍光強度の比が2以上となる最後の希釈倍数を抗体価とした。今後、純化したCD36抗原を用いた方法にて抗体価の測定を検討することも必要と考えられる。

NHTRsの発症及びその重症度はレシピエント側の要因及び血液製剤(ドナー)側の要因に依存すると考えられる。Toyら¹⁹⁾は同一ドナー由来の抗HLA class I及びII抗体陽性血液製剤が輸血関連急性肺障害を発症させた例(1例)と発症させなかった例(103例)があることを示し、その理由として、ドナー側の抗体価の変動やレシピエント側におけるプライミング作用、遺伝的素因及びHLA抗原の発現量の差が関与することを考察している。我々はこれまでに抗CD36抗体陽性血液製剤によるNHTRsの発症に影響を与え得るレシピエント側の因子として、血小板上のCD36及び

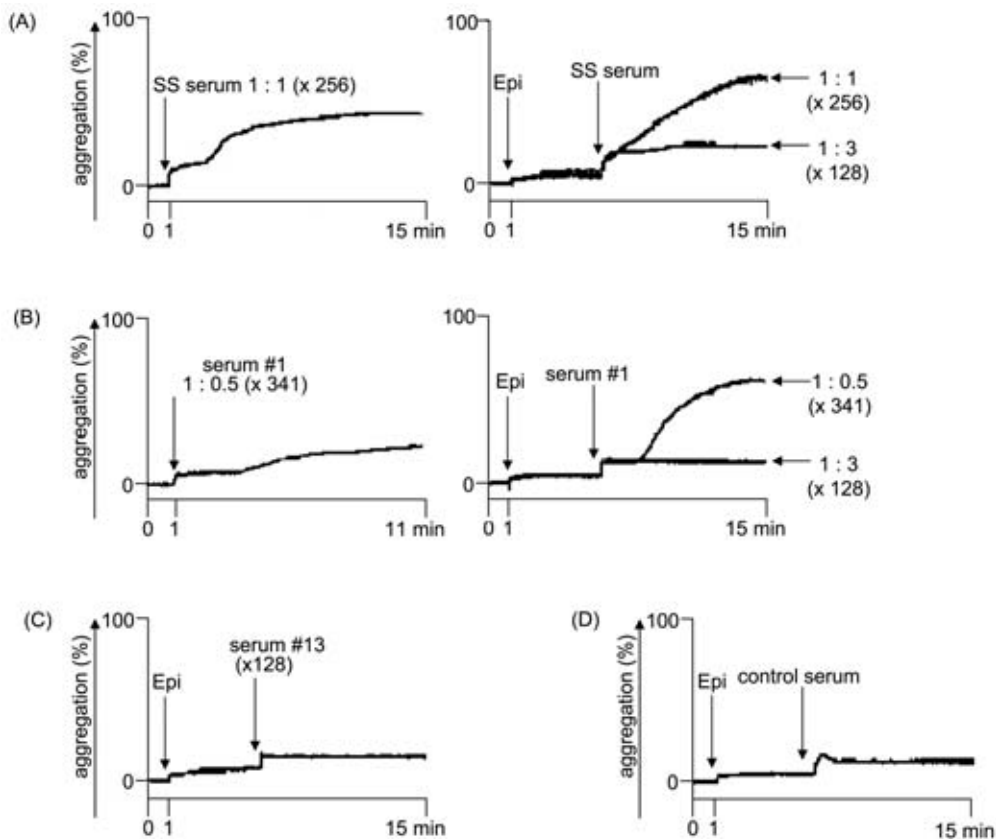


Fig. 4 Synergistic effects of anti-CD36 sera and epinephrine on platelet activation. Addition of a subthreshold concentration of epinephrine (Epi) caused synergistic platelet aggregation with SS serum diluted to a titer of x256 (A : left panel versus right panel) or serum #1 diluted to a titer of x341 (B : left panel versus right panel). There were no synergistic effects between Epi and SS serum or serum #1 diluted to a titer of x128 (right panel of A and B). Anti-CD36 sera that contain antibodies with a titer of x128 or less failed to cause platelet activation in the presence of a subthreshold dose of Epi (C). The aggregation tracing obtained with serum #13 is shown as a representative data of 10 anti-CD36 sera that contain antibodies with a titer of x128 or less (#4 ~ #9, #11 ~ #13, #15) (C). PRP obtained from CD36-positive subjects was stimulated with anti-CD36 sera alone (left panel of A and B) or with pretreatment with Epi for 5 min (right panel of A and B) on an aggregometer for the measurement of platelet aggregation. Negative control serum (AB serum) did not cause the aggregation in the presence of Epi (D). All aggregation tracings were obtained from two subjects (subject #1 and #2), except that data for B, which was obtained from subject #2 only.

FcγRIIIa の発現量の差が関与していることを報告している¹⁴⁾。さらに本検討では、合計 16 例の抗 CD36 血清の血小板活性化能の有無は抗体価に依存することを明らかにした。このことから、抗

CD36 抗体陽性血液製剤による NHTRs 発症においては、レシipient 側の要因に加え、ドナー側の要因として、抗体価が高いことがリスクファクターとなる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ikeda H : Platelet membrane protein CD36. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 74 : 99—104, 1999.
- 2) Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL : CD36 : a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, 108 : 785—791, 2001.
- 3) Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, et al : Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes. *Blood*, 83 : 392—397, 1994.
- 4) Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, et al : A new platelet-specific antigen, Nak³, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang*, 57 : 213—217, 1989.
- 5) Bierling P, Godeau B, Fromont P, et al : Post-transfusion purpura-like syndrome associated with CD36 (Nak³) isoimmunization. *Transfusion*, 35 : 777—782, 1995.
- 6) Kankirawatana S, Kupatawintu P, Juji T, et al : Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-Nak (a). *Transfusion*, 41 : 375—377, 2001.
- 7) Curtis BR, Ali S, Glazier AM, et al : Isoimmunization against CD36 (glycoprotein IV) : description of four cases of neonatal isoimmune thrombocytopenia and brief review of the literature. *Transfusion*, 42 : 1173—1179, 2002.
- 8) Christie DJ, Swinehart CD : Human platelet activating antibodies. *Semin Thromb Hemost*, 18 : 186—192, 1992.
- 9) Christie DJ, Leja DN, Carlson DL, et al : Characterization of platelet activation induced by HLA antibodies associated with alloimmune thrombocytopenia. *J Lab Clin Med*, 121 : 437—443, 1993.
- 10) Brandt JT, Julius CJ, Osborne JM, et al : The mechanism of platelet aggregation induced by HLA-related antibodies. *Thromb Haemost*, 76 : 774—779, 1996.
- 11) Dettke M, Dreer M, Hocker P, et al : Human platelet antigen-1a antibodies induce the release of the chemokine RANTES from human platelets. *Vox Sang*, 81 : 199—203, 2001.
- 12) Klinger MH : Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)*, 196 : 1—11, 1997.
- 13) Morishita K, Wakamoto S, Miyazaki T, et al : Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak³) isoantibody. *Transfusion*, 45 : 803—806, 2005.
- 14) Wakamoto S, Fujihara M, Urushibara N, et al : Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reactions. *Vox Sang*, 88 : 41—51, 2005.
- 15) Moses LA, Stroncek DF, Cipolone KM, et al : Detection of HLA antibodies by using flow cytometry and latex beads coated with HLA antigens. *Transfusion*, 40 : 861—866, 2000.
- 16) Roberts JJ, Rodgers SE, Drury J, et al : Platelet activation induced by a murine monoclonal antibody directed against a novel tetra-span antigen. *Br J Haematol*, 89 : 853—860, 1995.
- 17) Daviet L, Craig AG, McGregor L, et al : Characterization of two vaccinia CD36 recombinant-virus-generated monoclonal antibodies (10/5, 13/10) : effects on malarial cytoadherence and platelet functions. *Eur J Biochem*, 243 : 344—349, 1997.
- 18) Saito T, Tazawa K, Yokoyama Y, et al : Surgical stress inhibits the growth of fibroblasts through the elevation of plasma catecholamine and cortisol concentrations. *Surg Today*, 27 : 627—631, 1997.
- 19) Toy P, Hollis-Perry KM, Jun J, Nakagawa M : Recipients of blood from a donor with multiple HLA antibodies : a lookback study of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 44 : 1683—1688, 2004.

RELATIONSHIP BETWEEN THE ABILITY OF ANTI-CD36 ANTIBODIES-CONTAINING SERA TO INDUCE PLATELET ACTIVATION AND ANTIBODY TITER

Shinobu Wakamoto¹⁾, Mitsuhiro Fujihara¹⁾, Toru Miyazaki¹⁾, Daisuke Takahashi¹⁾, Shinichiro Sato¹⁾, Fumiaki Nakajima^{2)*}, Shoji Morita³⁾, Yoshiko Teraki⁴⁾, Yasuo Fukumori⁵⁾, Hiroyuki Sato⁶⁾, Sadamitsu Yamamoto¹⁾, Toshiaki Kato¹⁾, Hiroshi Azuma¹⁾ and Hisami Ikeda¹⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

²⁾Kanagawa Red Cross Blood Center

³⁾Japanese Red Cross Saitama Blood Center

⁴⁾Chiba Red Cross Blood Center

⁵⁾Osaka Red Cross Blood Center

⁶⁾Fukuoka Red Cross Blood Center

*Present address : Japanese Red Cross Society, Blood Service Headquarters, Central Blood Institute

It has been proposed that anti-platelet antibodies having the ability to induce platelet activation are involved in not only thrombocytopenic states, but also in the pathology of nonhemolytic transfusion reactions (NHTRs). Recently, we reported that anti-CD36 Abs-containing plasma, derived from the donor SS, was implicated in NHTRs, and induced platelet activation, suggesting the involvement of anti-CD36 Abs in the occurrence of NHTRs. In addition to the serum derived from donor SS (SS serum), one of 13 anti-CD36 Abs-containing sera (anti-CD36 sera) also caused platelet aggregation. The factors that determine the platelet-activating abilities of anti-CD36 sera might also influence the occurrence of anti-CD36 Abs-related NHTRs. In this study, we focused on the relationship between the anti-CD36 Ab titer in sera and the platelet-activating ability of sera to elucidate the determinants of the platelet-activating action of anti-CD36 sera.

Sixteen anti-CD36 sera (serum #1~#15), including the SS serum, were incubated with CD36-positive or-negative platelets. Platelet aggregation, the RANTES release and the titer of anti-CD36 Abs in sera were then determined. The two sera (SS serum and serum #1) that induced CD36-specific platelet activation had higher titers (x512) of anti-CD36 Abs than the other sera (less than x128). When SS serum and serum #1 were diluted to a titer of x128, the platelet-activating ability was lost. Furthermore, a subthreshold dose of epinephrine potentiated the platelet aggregation induced by SS serum and serum #1 at a titer of x256 and x341, respectively. When diluted to a titer of x128, however, both sera, failed to induce aggregation even in presence of epinephrine. Similarly, there was no synergistic platelet activation by epinephrine and any of the other anti-CD36 sera showing a titer of x128 or less.

These findings demonstrated that the platelet-activating ability of anti-CD36 serum depends on the anti-CD36Ab titer, suggesting that the titer of anti-CD36 Abs in blood components may determine the occurrence of anti-CD36 Abs-related NHTRs.

Key words : Anti-CD36 Abs, nonhemolytic transfusion reaction, platelet activation, antibody titer
