

原 著

新生児同種免疫性血小板減少症 (NAIT) の抗体分析 : 1985~2005

森田 庄治 井上 進 花垣 澄雄 榎本 隆行
石島あや子 柴田 洋一 溝口 秀昭

埼玉県赤十字血液センター

(平成 18 年 2 月 27 日受付)

(平成 18 年 6 月 12 日受理)

われわれは過去 20 年間に NAIT の疑いで、医療機関から精査依頼があった 111 症例について、MPHA 法または M-MPHA 法、一部の症例に ELISA 法を実施して、NAIT 111 症例中 74 症例 (66.7%) に同種抗体 (一部自己抗体を含む) が検出された。方法別の抗体検出率は、MPHA 法の血小板固相で 56.9%、血小板抽出抗原で 60.0%、M-MPHA 法の血小板固相で 63.2%、血小板抽出抗原で 60.3% であった。

キーワード : 新生児同種免疫性血小板減少症, ヒト血小板抗原, ヒト白血球抗原, 混合受身血球凝集反応, 磁性混合受身血球凝集反応

はじめに

血小板膜表面に存在する血小板の同種抗原には、ABO 血液型、HLA クラス I 抗原、HPA 抗原が発現している。NAIT はこれらの血液型の母児不適合が原因で、母体に産生された抗体が胎児に移行し発症する。わが国では HPA-4b 抗体による NAIT が最も多く臨床的に重要で、初産から発症することも多い。患児は出産時から日齢数日にかけて著しい血小板減少を伴い、その病態は重度のものから軽度のものまで様々である。発症を予見する有効な手段は、HPA 抗体のスクリーニング以外にない。これまで NAIT の原因抗体は、主に HPA 抗体との関連から論じられてきたが、実際の症例では HLA 抗体しか検出されないことも多く、陰性例も少なくない。わが国において多数例の NAIT について分析した報告はなく、NAIT 全体の背景を知る上で臨床的に重要であると思われるので報告する。

材料および方法

試薬 : anti-PLT・オリビオ・MPHAI I と anti-HPA・MPHA・パネル (オリンパス株式会社) の 2 つのキットを使用した。ELISA 法は GTI 社の

PAKPLUS (イワキ株式会社) を使用した。

検体 : 過去 20 年間に医療機関から NAIT の疑いで検査依頼のあった 111 症例について分析した。

方法 :

1. MPHA 法 : 全血から分離調整した血小板を固相後、グルタルアルデヒド固定したプレート (以下血小板固定)、および血小板抽出抗原を固相した 2 つのキット (以下血小板抽出抗原) に血清を反応させ洗浄後、抗ヒト IgG 抗体をコートしたヒツジ赤血球を反応させ、生じた凝集像を判定した。

2. M-MPHA 法による交差試験¹⁾

1) レクチン付着プレートの作製 : ACD-A 液 1 mL に父親血液 7 mL を採血し、1,400rpm 10 分遠心し PRP を分離する。PRP に ACD-A 液を 15% 加え、1,400rpm 10 分遠心し血漿を除く。PC に 2 mM の EDTA-PBS を加え上清を捨てる。再度 2 mM の EDTA-PBS を加え血小板数を 2 万/μL に調整する。レクチンが固相されているプレートに血小板浮遊液 50μL を加え、500rpm 5 分間プレートを遠心する。

2) 検出法：プレートを0.05% Tween—生食水で洗浄する。母親血清を低イオン強度溶液で4倍希釈し、プレートに25 μ L加える。37 $^{\circ}$ C 30分間反応させた後、0.05% Tween—生食水で5回洗浄し、抗ヒトIgGをコートした磁性粒子25 μ Lを加える。プレートを磁石板上で3分静置後、凝集像を判定した。

3. 血小板抽出抗原を用いたM-MPHA法による抗体スクリーニング²⁾

anti-PLT・オリビオ・MPHAIとanti-HPA・MPHA・パネルを0.05% Tween—生食水に5分間浸し抗原を還元する。母親血清を低イオン強度溶液で4倍希釈し、それぞれのプレートに25 μ L加える。37 $^{\circ}$ C 15分間反応させた後、0.05% Tween—生食水で5回洗浄し、抗ヒトIgGをコートした磁性粒子25 μ Lを加える。プレートを磁石

板上で3分静置後、凝集像を判定した。

4. ELISA法：添付のプロトコールに準じて実施した。

結 果

1. 抗体特異性の内訳

NAIT 111症例中74症例(66.7%)に同種抗体(一部自己抗体を含む)が検出された。その内訳は3a (HLA含む)：9例(8.1%)、3b：1例(0.9%)、4a：3例(2.7%)、4b (HLA含む)：15例(13.5%)、5a：2例(1.8%)、5b：1例(0.9%)、6b (HLA含む)：3例(2.7%)、Nak^a (自己+HLA含む)：3例(2.7%)、HLA：37例(33.3%)、陰性：37例(33.3%)であった。

2. 方法別の抗体検出率

NAITの111症例中実施できた方法別の抗体検出数(検出率)は、MPHA法の血小板固定で56.9%、血小板抽出抗原で60.0%、M-MPHA法の血小板未固定で63.2%、血小板抽出抗原で60.3%であった。

3. 各方法の結果と抗体特異性

111症例中、MPHA法の血小板固定と血小板抽出抗原、及びM-MPHA法の血小板未固定と血小板抽出抗原の4法全て実施できたのは50症例であった。4法全て陰性は50例中24例、全て陽性は50例中17例で、このうち13例がHPA抗体であった。

4. 父親血小板と母親血清の交差試験

父親血小板を用いたMPHA法の血小板固定とM-MPHA法の血小板未固定による交差試験が実施できたのは、111症例中12症例であった。

Table 1 Specificity of the antibodies in NAIT sera (111cases)

Ab specificity	No. cases	%
HLA	37	33.3
3a (+ HLA)	9	8.1
3b	1	0.9
4a	3	2.7
4b (+ HLA)	15	13.5
5a	2	1.8
5b	1	0.9
6b (+ HLA)	3	2.7
Nak ^a (+ HLA + Auto + α)	3	2.7
Negative	37	33.3

Allo-antibodies (some with auto-antibodies) were detected in 74 among the 111 cases (66.7%) of NAIT.

Table 2 Antibody detection rate (%) of each method

	MPHA		M-MPHA		ELISA
	Fixed platelets	Platelet membrane extract	Unfixed platelets	Platelet membrane extract	
Positive	58 (56.9%)	42 (60.0%)	55 (63.2%)	35 (60.3%)	4 (22.2%)
Negative	44 (43.1%)	28 (40.0%)	32 (36.8%)	23 (39.7%)	14 (77.8%)
Not tested	9	41	24	53	93

The antibody detection rate of each method was as follows. MPHA using fixed intact platelets, 56.9% ; MPHA using platelet homogenate, 60.0% ; M-MPHA using fixed intact platelets, 63.2% ; M-MPHA using platelet homogenate, 60.3%.

Table 3 Results of each method and the specificity of the antibodies

MPHA		M-MPHA		No. cases	%	Ab specificity
Fixed platelets	Platelet membrane extract	Unfixed platelets	Platelet membrane extract			
+	+	+	+	17	34.0	3a
						3a
						3a
						4a
						4a
						4a
						4b
						4b
						4b
						4b
						4b
						4b
						4b
						5a
-	-	+	+	2	4.0	3b
						Nak ^a + HLA + GPIIb + IIIa
+	-	-	+	2	4.0	HLA
						HLA
+	+	+	-	1	2.0	Nak ^a
+	+	-	+	1	2.0	HLA
-	+	+	+	1	2.0	HLA
-	+	-	+	1	2.0	HLA
-	-	+	-	1	2.0	HLA
-	-	-	-	24	48.0	Negative

Among the 50 cases, 24 were negative by all the 4 methods, and 17 were positive by all of them. Among the positive cases, 13 were anti-HPA-antibodies.

MPHA 法と M-MPHA 法の不一致例は未検査を除くと 2 例認め、ケース 7(HPA-3b)では、MPHA 法は検出されず M-MPHA 法のみで検出された。これとは対照的にケース 8(Nak^a)では、M-MPHA 法の血小板抽出抗原のみが検出されなかった。また、ケース 9 (HLA) では、MPHA 法の血小板固定と M-MPHA 法の血小板未固定のいずれもが検出されなかったが、父親血小板ではいずれも検出

された。

5. 抗凝固剤と検体保存温度および保存期間の検討

2つの抗凝固剤(ACD-A と EDTA)と検体保存温度(4℃ と 22℃)さらに保存期間(当日と翌日)について、ケース 7 の HPA-3b 抗体を用いて検討した結果、当日 ACD-A 採血から分離された血小板が最も反応性が強く、次いで翌日 22℃ 保存の

Table 4 Comparison of results in 12 cases in which cross-matching against the father's platelets could be performed using the 2 methodologies

Case no.	MPHA			M-MPHA			Ab specificity
	Fixed platelets of father	Fixed platelets	Platelet membrane extract	Unfixed platelets of father	Unfixed platelets	Platelet membrane extract	
1	+	+	+	+	+	+	4a
2	+	+	+	+	+	+	HLA
3	+	n.t.	+	+	+	+	HLA
4	+	n.t.	n.t.	+	+	+	3a
5	+	n.t.	+	+	+	n.t.	3a
6	+	+	n.t.	+	+	n.t.	HLA
7	-	-	-	+	+	+	3b
8	+	+	+	+	+	-	Nak ^a
9	+	-	+	+	-	+	HLA
10	-	-	-	-	-	-	Negative
11	-	-	-	-	-	-	Negative
12	-	-	-	-	-	-	Negative

n.t. : not tested

Discrepancy between MPHA and M-MPHA was observed in cases 7 (HPA-3b), 8 (Nak^a), and 9 (HLA).

ACD-A 採血の反応性が強かった。一方、EDTA 採血は当日のみ反応性が強く、翌日 4℃ 保存は反応性を示さなかった。翌日 22℃ 保存は血小板のバックグラウンドが高く検査には使用できなかった。

考 察

わが国で最も NAIT から検出される HPA 抗体は、HPA-4b 抗体であることが、今回の結果からも裏付けられ、わが国の NAIT の特徴でもある。次に多く検出されたのは HPA-3a 抗体であり、14 例中 4 例 (28.6%) が頭蓋内出血を伴っていた。Mueller-Eckhardt³⁾は NAIT が疑われた母親 348 例を解析したところ、HPA-1a 抗体が最も多く、次いで HPA-5b 抗体が多く検出され、HLA 抗体単独例は 10 例 (2.9%) であったと報告している。また、HPA-1a 抗体による頭蓋内出血を伴った NAIT は 14% にみられたとしている。わが国の HPA-3a 抗体による頭蓋内出血の頻度は HPA-1a 抗体に比べ高いのかもしれない。欧米人では、HPA-3a 抗体による NAIT は少ない。しかし、わが国では HPA-4b に次いで多く検出される事実は、

わが国の NAIT における 2 つ目の特徴である。

HLA 抗体は予想以上に多く HPA 抗体と同程度に検出された。NAIT における HLA 抗体の関与は、議論の分かれるところである。King⁴⁾によるプロスペクティブな血小板減少症における HLA 抗体の研究では、HLA 抗体陽性の母親から出生した児に NAIT のみられる頻度は、13% であるのに対して、臍帯血中の HLA 抗体が陽性であった児では、25% であり HLA 抗体が児に移行することによって、NAIT をきたす率が上昇するとしている。胎盤機能不全の存在は、NAIT 発症要因の 1 つであると思われるが、おそらく NAIT 発症には、何らかの要因が同時に関係していると考えられる。

方法別の抗体検出率では、血小板抽出抗原を用いた MPHA 法と M-MPHA 法に差は認められなかった。一方、M-MPHA 法を用いた血小板未固定では、MPHA 法の血小板固定に比べやや高い検出率を示した。特筆すべきはケース 7 の HPA-3b 抗体のように MPHA 法 (血小板固定や血小板抽出抗原) では検出されず、M-MPHA 法で検出され

る抗体の存在である⁵⁾⁶⁾。HPA-3は安定した抗原性を示すものと、不安定な抗原性を示すものがあり、Linら⁷⁾は抗原性が非常に弱いHPA-3aによるNAITを報告している。HPA-3aの抗原エピトープには、固定や可溶化したりすると消失する不安定な部分があるので、抗体の検出には注意が必要である。検討結果からも分かるように、安定的にこのような抗体を検出するには、ACD-Aで採血した後、できるだけ早くPRPに分離して、血小板が新鮮なうちにM-MPHA法を実施することである。この条件で採血、分離された血小板は、おそらく生体にある血小板の状態と近似していると考えられる。

NAITの抗体検出を困難にしている原因は、血小板側(抗原)の問題と血清側(抗体)の2つの問題が複雑に関係しているように思われる。今回の症例の中にも同胞間でNAITを発症しながら結果が乖離(抗体陽性と陰性)する症例や出産前後で著しく抗体価の変動を示す症例が存在している⁸⁾。このような症例では、ある時点では抗体が検出できないことも予想される。われわれは現在このような症例に対して、短時間で実施できる遠心濾過チューブによる血清濃縮を検討している。

NAITでは父親血小板と母親血清の交差試験が重要な検査法である。今回111症例中実際に父親血小板と母親血清の交差試験がMPHA法とM-MPHA法の2法実施できたのは、最近依頼された12症例に過ぎない。この12症例を除く陰性例の中には、父親血小板を用いた交差試験を実施していれば抗体(HPA, HLA, ABO)が検出された可能性もある。用いた2つのキットはO型血小板パネルを使用し、主に既知のHPA抗体を検出目的にしていることから、仮に母親血清に抗体があっても父親固有のHPA, HLAにしか反応しない抗体は、キットでは見逃される可能性がある。したがって、NAITの抗体検索では、MPHA法とM-MPHA法の2法を併用し、キットによる抗体スクリーニングの他に父親血小板を用いた交差試

験を実施すれば、陽性例は多くなると予想され、少なくとも70%以上の症例から何らかの抗体(HPA, HLA, ABO, 自己)が検出されると期待される。

おわりに

NAIT症例111症例から検出された血小板抗体の全体像は、HPA抗体およびHLA抗体が各30%前後で、残り30%前後が陰性であることが判明した。

本論文の要旨は第54回日本輸血学会(大阪)において発表した。

謝辞：本研究に際してご協力いただきましたオリンパス株式会社の玉井豊広氏に深謝致します。

文 献

- 1) 森田庄治, 本山文子, 花垣澄雄, 他：磁性粒子を用いた血小板の交差試験の検討. 日輸血会誌, 46(2)：266, 2000.
- 2) 森田庄治, 井上 進, 川田紀子, 他：磁性粒子を応用した迅速な血小板抗体検出の試み. 血液事業, 25：33—40, 2002.
- 3) Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al：348 cases of suspected neonatal thrombocytopenia. *Lancet*, 1：363—366, 1989.
- 4) King KE, Kao KJ, Bray PF, et al：The role of HLA antibodies in neonatal thrombocytopenia：a prospective study. *Tissue antigens*, 47：206—211, 1996.
- 5) 小林洋紀, 松山雄一, 山際 仁, 他：MPHA法では検出できず、磁性粒子法で検出されたHPA-3b抗体が原因であった新生児同種免疫性血小板減少症. 日輸血会誌, 49(2)：317, 2003.
- 6) Kataoka S, Kobayashi H, Chiba K, et al：Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to an antibody against a labile component of human platelet antigen-3b (Bak^b). *Transfusion Medicine*, 14：419—423, 2004.
- 7) Lin M, Shieh SH, Liang DC, et al：Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Taiwan due to an antibody against a labile component of HPA-3a (Bak^a). *Vox Sanguinis*, 69：336—340, 1995.
- 8) 森田庄治, 愛敬千絵, 石島あや子, 他：出産前後で著しい抗体価の変動を示した抗HPA-5a, -5b抗体について. 日輸血会誌, 38(2)：308, 1992.

ANTIBODY DETECTION IN SERA OF PATIENTS WITH NEONATAL
ALLOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA (NAIT) IN 1985 TO 2005

Shoji Morita, Susumu Inoue, Sumio Hanagaki, Takayuki Enomoto,
Ayako Ishijima, Yoichi Shibata and Hideaki Mizoguchi
Saitama Red Cross Blood Center

Samples from 111 patients with a diagnosis of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) obtained from various medical services in the past 20 years were simultaneously evaluated by the mixed-passive hemagglutination (MPHA) and magnetic-MPHA (M-MPHA) methods. Some samples were also tested by the ELISA method. Alloantibodies were detected in 66.7% (74/111) of cases, some of which also contained autoantibodies. Detection rate with the MPHA method was 56.9% when intact platelet-coated plates were used, and 60.0% with platelet homogenate-coated plates. For M-MPHA, the detection rate was 63.2% with intact platelet-coated plates, and 60.3% with platelet homogenate-coated plates.

Key words : NAIT, HPA, HLA, MPHA, M-MPHA (magnetic mixed passive hemagglutination)
