

母親血清がインタクト血小板 MPHA 法において プロゾーン現象を示した NAIT 症例について

西村 千恵¹⁾ 稲葉 洋行¹⁾ 南 裕史¹⁾ 荒木 延夫¹⁾ 井本しおん¹⁾
馬淵 理¹⁾ 井上 進²⁾ 森田 庄治²⁾ 溝口 秀昭²⁾ 前田 真治³⁾

NAIT (新生児同種免疫性血小板減少症) は抗 HPA 抗体や稀に抗 HLA 抗体が原因で発症する。今回、母親血清がインタクト血小板を用いた MPHA 法において、プロゾーン現象を示した NAIT 症例を経験した。患児は初産で、出生時の血小板数は 11,000/ μ l。父親および母親間のリンパ球交差試験は陰性、血小板交差試験は母親の原血清で陰性、2 倍～8 倍希釈で 1+、16 倍～64 倍希釈で 2+ を示し、プロゾーン現象を観察した。

母親と患児の抗 HLA クラス I 抗体検査は、Luminex 法により実施し、陰性を示した。母親の抗 HPA 抗体は、血小板抽出抗原 MPHA 法 (n=8) と MACE 法で陰性を示した。また、患児の抗 HPA 抗体も血小板抽出抗原 MPHA 法で陰性を示した。

母親血清の 18 種のインタクト血小板 M-MPHA (magnetic-mixed passive hemagglutination) 法による population study は、18 種中 16 種が陽性でプロゾーン現象が観察され、残る 2 種には陰性を示した。また、これらの陽性反応はクロロキン処理により、減弱もしくは消失した。

今回の症例は、MPHA 法において、インタクト血小板ではプロゾーン現象を示して反応するが、血小板抽出抗原では反応を示さず、クロロキン処理により反応性が減弱する性質をもった抗原に対する抗体を、NAIT 症例患児の母親血清から検出し、この抗体が NAIT の原因であるかもしれないと推察した。

キーワード：新生児同種免疫性血小板減少症、混合受身血球凝集法、血小板抽出抗原、インタクト血小板、プロゾーン現象

はじめに

血小板膜上には ABH, Lewis, P, Ii などの血液型抗原, HLA-class I 抗原, HPA 抗原などが発現している。母児不適合妊娠では、母親が保有しない児の細胞上の抗原に対して同種免疫が誘導されることがあり、母親が産生した同種免疫抗体は、胎盤を通過して胎児に移行し、児の血小板、或いは血球を破壊することがある。この血小板を標的として発症する病態を NAIT (neonatal alloimmune thrombocytopenia : 新生児同種免疫性血小板減少症) という。NAIT の原因抗体としては、抗 HPA 抗体として抗 HPA-1a, 抗 HPA-1b, 抗 HPA-2a, 抗 HPA-2b, 抗 HPA-3a, 抗 HPA-3b, 抗 HPA-4a, 抗 HPA-4b, 抗 HPA-5a, 抗 HPA-5b, 抗 HPA-6bw, 抗 HPA-7bw, 抗 HPA-8bw, 抗 HPA-9bw, 抗 HPA-10bw, 抗 HPA-11bw, 抗 HPA-12bw, 抗 HPA-13bw, 抗 HPA-14bw, 抗 HPA-15a, 抗 HPA-15b, 抗 HPA-16bw, そし

て抗 Nak^a が報告されている¹⁾。また、稀に抗 HLA 抗体による症例も報告されている²⁾。

本邦においては、抗 HPA-4b 抗体が最も高頻度に検出され、母児不適合の原因として特に重要な HPA 抗原であるとされている³⁾。

今回、我々は NAIT と疑われる症例患児の母親血清から、MPHA 法⁴⁾においてプロゾーン現象を示した抗体症例に遭遇したので報告する。

症 例

母親は 30 歳、Apgar score 9/9、初産。患児は在胎 38 週 6 日で出生。出生時の患児の血小板数は 11,000/ μ l、血液凝固因子は正常。出血斑なし、肝臓脾臓の腫大なし、CRP 陰性。 γ -グロブリン点滴投与後の血小板数は 20,000/ μ l。その後、交差試験未実施のランダム濃厚血小板 50cc を輸血後、血小板数は 137,000/ μ l に上昇。NAIT

1) 兵庫県赤十字血液センター検査一課

2) 埼玉県赤十字血液センター検査一課

3) 兵庫県立塚口病院小児科

〔受付日：2008 年 3 月 19 日、受理日：2008 年 12 月 2 日〕

HLA-Type

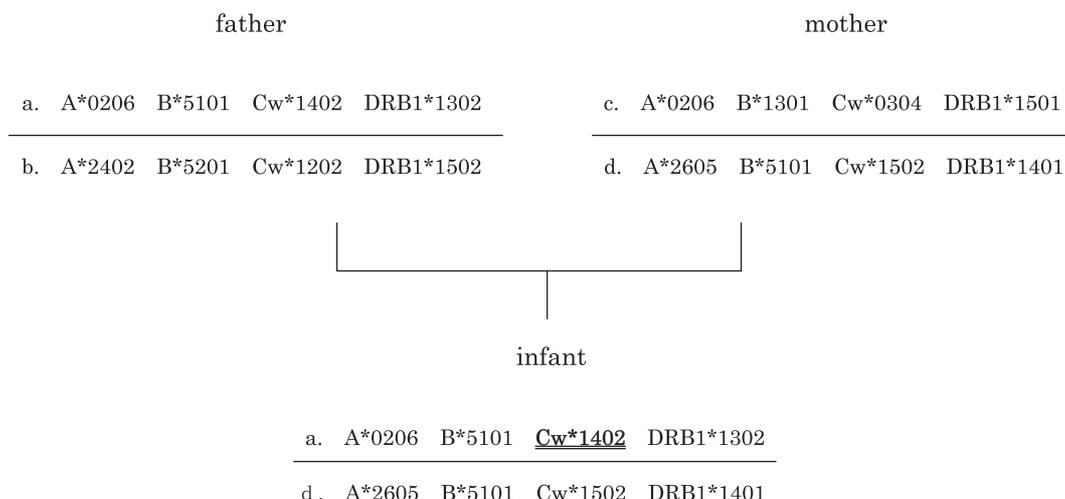


Fig. 1A HLA typing of the case family by the PCR-reverse-SSOP-Luminex method.

HPA-Type

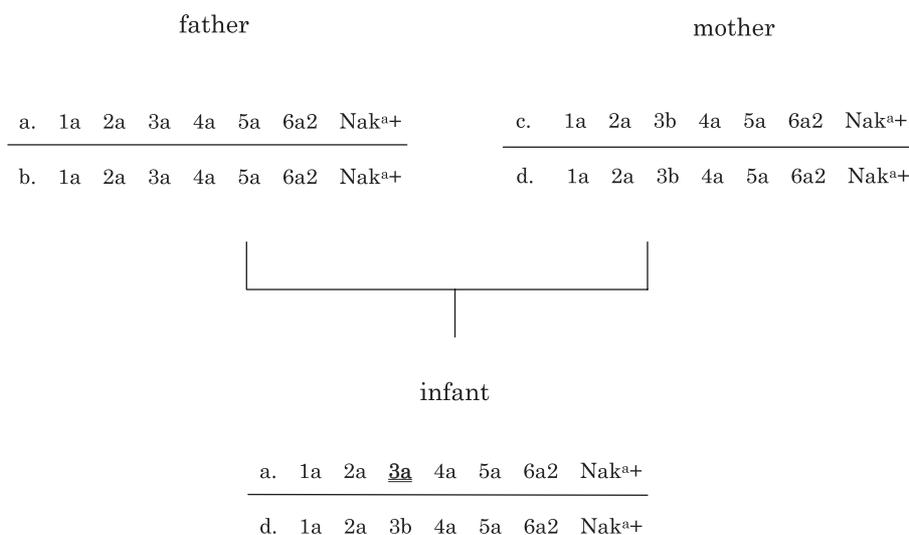


Fig. 1B HPA typing of the case family by the PCR-reverse-SSOP-Luminex method.

の疑いで、以下の方法により検査を実施した。

方 法

患児と母親のHLA, HPAタイプはPCR-reverse-SSOP-Luminex 法⁵⁾による DNA タイピングを実施し、HLAタイプはHLA-A, B, C, DRB1(MBL, Nagoya, Japan ; ジェノサーチ HLA-A, B, C, DRB1), HPAタイプはHPA-1~6, Nak^a(MBL, Nagoya, Japan ; ジェノサーチ HPA)⁶⁾について検査した。

父親および母親間の交差試験はリンパ球交差試験が

LCT法, AHG-LCT法, そして血小板交差試験はインタクト血小板を用いたMPHA法により実施した。MPHA法の指示血球は抗ヒトIgGを使用した(OLYMPUS, Tokyo, Japan)。

患児の日齢5日のγグロブリン投与前検体と母親の抗HLA抗体検査は、精製HLA抗原を用いたLuminex法⁷⁾(ONE LAMBDA, Calif., USA ; LABScreen PRA Class I)を用いた。2次抗体はPE標識IgG抗体を用い(ONE LAMBDA, Calif., USA), 抗体の検出は解析ソフト(Software Version3.0 ONE LAMBDA, Calif., USA)

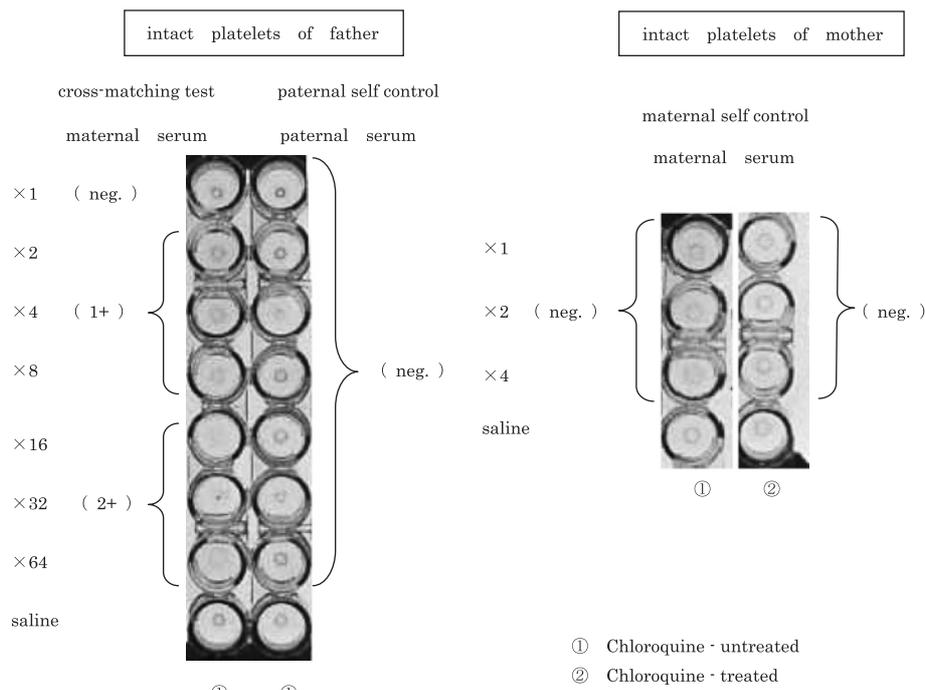


Fig. 2A Result of cross-matching testing of the father and mother by the MPHA method with intact platelets at birth.

を用いて実施した。

また、抗 HPA 抗体検査については血小板抽出抗原 MPHA 法⁸⁾(OLYMPUS, Tokyo, Japan; Anti-HPA・MPHA パネル), MACE (modified antigen capture ELISA) 法⁹⁾の原理を用いた PAKPLUS (GTI, Wisc., USA)を、そして 18 種のインタクト血小板を用いた M-MPHA 法¹⁰⁾の 3 法により抗ヒト IgG 抗体について測定した。また、抗 HLA 抗体と抗 HPA 抗体の鑑別にはクロロキン処理法¹¹⁾を用いた。

結 果

出産時検査所見

1. 父親および母親と患児の HLA, HPA タイプ

父親および母親と患児は、いずれも A 型, Rho (D) 陽性で, HLA, HPA タイピングの結果を Fig. 1A~Fig. 1B に示したが, HLA タイプは母親と患児の相違が Cw 座と DRB1 座の 2 カ所に認められた。A 座, B 座に関してはアリルレベルにおいて母親と異なる抗原は認めなかった。また, HPA タイプは母親と患児の相違が HPA-3a のみに認められた。

2. 交差試験

1) リンパ球交差試験 (LCT 法・AHG-LCT 法)

母親血清と父親リンパ球の反応は陰性を示した。また, 母親血清と母親リンパ球との反応も陰性を示した。

2) 血小板交差試験 (インタクト血小板 MPHA 法)

父親のクロロキン未処理インタクト血小板と母親原血清は陰性, 2~8 倍希釈血清は 1+ の陽性, 16~64

倍希釈血清は 2+ の陽性を示し, プロゾーン現象を観察した。また, 父親自己対照として父親のクロロキン未処理インタクト血小板と父親血清は, 原血清~64 倍希釈血清においてすべて陰性を示した。そして, 母親自己対照として母親インタクト血小板と母親原血清~4 倍希釈血清の反応は, クロロキン処理および未処理のいずれも陰性を示した (Fig. 2A)。

なお, 母親血清と患児血小板の反応については, 血小板数回復後の当該患児が他府県在住の理由により, サンプル入手不能のため検査を実施していない。

3. 母親, 患児の抗 HLA 抗体スクリーニング

LABScreen PRA Class I を用いた結果, 抗 HLA-class I 抗体は, 母親および患児ともに陰性を示した。

4. 母親, 患児の抗 HPA 抗体検査

1) 血小板抽出抗原 MPHA 法 (n=8)

クロロキン未処理パネルでは, 母親および患児ともに原血清と 4 倍希釈血清で陰性を示した。さらに, 母親の 100 倍希釈血清において, クロロキン未処理および処理後パネルの反応は, いずれも陰性を示し, 血小板交差試験で観察されたプロゾーン現象は観察されなかった (Fig. 2B)。

2) インタクト血小板 M-MPHA 法 (n=18)

クロロキン未処理パネルでは, 母親の原血清~16 倍希釈血清において, 18 種中 16 種が陽性を示し血小板交差試験で観察されたプロゾーン現象を認めた。残る 2 種には陰性を示した。また, クロロキン処理後の反応は減弱, または陰性化することから抗 HLA 抗体の可能

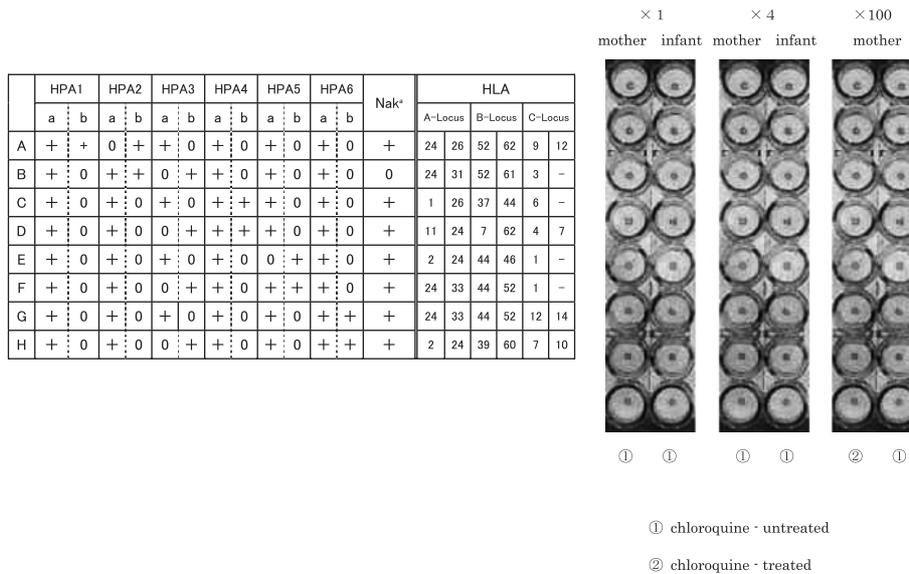


Fig. 2B Result of anti HPA antibody examination of the patient and mother by the MPHA method with extracted platelet antigen at birth (n = 8)

Table 1 Anti HPA antibody examination of the mother by the MPHA method with intact platelets at birth (n=18)

Panel	HPA1		HPA2		HPA3		HPA4		HPA5		HPA6		Nak ^a	HLA	maternal serum								
	a b		a b		a b		a b		a b		a b				Chloroquine-untreated					Chloroquine-treated			
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b			×1	×2	×4	×8	×16	×2	×4	×8	
①					+	0									±	++	++	++	+s				
②					0	+									±	++	++	++	+s				
③	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0			0	A24, 33B52, 62Cw9	0	+	+	+	+	±	-	-	
④					0	0		+	0	+	0		0	A2, 24B35, 52Cw9	0	±	±	-	-	±	-	-	
⑤	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0			+	A2, 24B51, -Cw-	0	+	+	+	+	±	±	-	
⑥	+	0	+	0	0	+	+	0	+	+	+	0	+	A2, 3B13, 51Cw6	0	+s	++	++	++	-	-	-	
⑦					0	0		+	0	+	0		+	A2, 24B52, 54Cw1	0	+s	++	++	+s	±	±	-	
⑧	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	A24, -B54, 62Cw1, 9	0	+	+	+	-	±	±	-	
⑨					0	0		+	0	+	0		0	A11.1, 24B46, 75Cw1, 8	0	+	+	+	±	±	-	-	
⑩					0	0		+	0	+	0		+	A24, 26B46, 3901Cw1, 7	0	++	++	++	++	+	±	-	
⑪														A1, 11.1B37, 48Cw6, 8	0	+s	+	+	+	-	-	-	
⑫					0	+		+	0	+	0		0	A26, 33B35, 58Cw9	0	+	±	-	-	-	-	-	
⑬														A11, 24B46, 59Cw1	0	+s	++	++	+	-	-	-	
⑭														A24, 33B7, 44Cw7	0	+s	++	++	+	-	-	-	
⑮					0	+		+	0	+	0		+	A2, 24B51, 52Cw-	0	++	++	++	++	+w	±	-	
⑯														A2, 26B60, -Cw8, 10	0	+s	++	+s	+s	+	±	±	
⑰														A2, -B51, 61Cw10	0	±	-	-	-	-	-	-	
⑱					0	+		+	0	+	0		+	A2, 33B44, 51Cw-	0	+w	±	-	-	-	-	-	

性が示唆された。また、母親および患児間で HPA タイプが不一致となる抗原である HPA-3a に対しては陰性を示した (Table 1)。

なお、患児血清と上記パネルの反応については当該患児のサンプル量不足のため、検査をしていない。

3) MACE 法

母親血清の抗 HPA 抗体は陰性を示した。

考 察

今回、NAIT の疑われる症例において、出産時のリンパ球交差試験は陰性を示したが、インタクト血小板 MPHA 法による血小板交差試験で陽性を示し、プロゾー

ン現象を観察した。そして、出産時の抗 HPA 抗体検査においても、血小板抽出抗原 MPHA 法は陰性を示したが、インタクト血小板 M-MPHA 法は陽性を示し、プロゾーン現象を観察した。プロゾーン現象とは、抗体過剰状態での沈降反応、或いは凝集反応の抑制を意味する地帯現象の一種である。通常、被検血清を希釈測定すると、本来の陽性反応を呈する。MPHA 法と同様の抗体検出法の原理である ELISA 法においても、プロゾーン現象が報告されている¹²⁾。本症例が、インタクト血小板 MPHA 法において、プロゾーン現象を引き起こした原因として、その抗体に対する血小板膜上の該当抗原量が少ないために生じた可能性が推定される。インタクト血小板を用いた場合と血小板抽出抗原を用いた場合との乖離については、以下のような推測が可能である。例えば、血小板膜糖タンパク GPIb α は血小板内に存在する自己融解酵素である Ca²⁺ 依存性タンパク質分解酵素 (calpain) によって分解されて Glycocalicin となる¹³⁾。そのため、血小板抽出抗原中には GPIb α 上に存在する HPA-2 抗原⁹⁾が存在しにくい¹¹⁾¹⁴⁾。また、この該当糖タンパクは、MACE 法が陰性を示したことから、HPA 抗原が存在する既知の血小板膜上の糖タンパク (GPIa, GPIb α , GPIIb, GPIIIa, GPIV) は否定されると考える。

一方、インタクト血小板 M-MPHA 法でクロロキン処理後の反応が減弱、または陰性化することから抗 HLA 抗体の可能性が示唆されたが、クロロキン処理は HLA-class I 抗原以外に顆粒球膜抗原の CD11b も不活化する¹⁵⁾。

LABScreen PRA Class I を用いた抗 HLA 抗体スクリーニングと、インタクト血小板 MPHA 法の反応性の乖離が認められたことから、本症例のプロゾーン現象を起こした抗体に対応する血小板膜抗原上の抗原は、HLA-class I 抗原ではないと考える。以上の結果から、本症例の NAIT の原因は、抗 HLA 同種抗体ではなく、血小板膜上に存在する抗原に対する抗体であるが、その抗原が分布する糖タンパクは、血小板内に存在する自己融解酵素で分解されやすいと考えるならば、血小板抽出抗原を用いた反応は、陰性を示すと推論される。また、その抗原は、HLA-class I 抗原や CD11b のように、クロロキン処理によって不活化されるのではないかと考える。よって、今回、NAIT の原因抗体に対する対応抗原は、患児の血小板と母親血清との交差試験は実施出来なかったため、母親血清と父親血小板の交差試験結果からの推論であるが、血小板抽出抗原 MPHA 法で陰性、インタクト血小板 MPHA 法でプロゾーン現象が観察され、クロロキン処理により反応性が減弱する抗原であるかもしれない。また、患児に交差試験未実施のランダム濃厚血小板の輸血効果が有効であったことについては、児の血清中の血小板同種抗体は、既に児

の血小板によって吸着され、陰性もしくは僅かしか残存しなかったのではないかと推測される¹⁶⁾。

結 語

今回の、NAIT 症例患児の母親血清から、血小板抽出抗原 MPHA 法で陰性、インタクト血小板 MPHA 法でプロゾーン現象が観察され、クロロキン処理により反応性が減弱する抗体を検出した。この母親の抗体が NAIT の原因であるかもしれないと推察された。

本論文の要旨は第 55 回日本輸血・細胞治療学会 (愛知) において発表した。

文 献

- 1) Ouwehand WH, Smith G, Ranasinghe E: Management of severe alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 82: 173—175, 2000.
- 2) Tanaka T, Umesaki N, Nishio J, et al: Neonatal thrombocytopenia induced by maternal anti-HLA antibodies: a potential side effect of allogenic leukocyte immunization for unexplained recurrent aborters. *Journal of Reproductive Immunology*, 46: 51—57, 2000.
- 3) 竹内千華子, 大戸 齊, 山口富子, 他: 抗 HPA-4b (Yuk^a) 抗体保有妊婦からの新生児血小板減少症発症についての予視的スタディ. *日本輸血学会雑誌*, 46: 463—466, 2000.
- 4) Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, et al: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang*, 41: 25—31, 1981.
- 5) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, et al: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics*, 57: 717—729, 2005.
- 6) 稲葉洋行, 西村千恵, 荒木延夫, 他: Luminex 法を用いたジェノサーチ HPA (プロトタイプ) による HPA-1~6 遺伝子タイピング, Nak^a 関連抗原タイピングの検討. *血液事業*, 30: 533—538, 2008.
- 7) Colombo MB, Haworth SE, Poli F, et al: Luminex Technology for anti-HLA antibody screening: evaluation of performance and of impact on laboratory routine. *Cytometry. Part B. Clinical cytometry*, 72: 465—471, 2007.
- 8) Araki N, Shibata Y, Inaba H, et al: Anti-HLA antibody with extracted platelet HLA antigens by the mixed passive hemagglutination method. *Vox Sang*, 69: 222—230, 1995.

- 9) Ishida F, Saji H, Maruya E, et al: Human platelet-specific antigen, Sib^a, is associated with the molecular weight polymorphism of glycoprotein Ib alpha. *Blood*, 78: 1722—1729, 1991.
- 10) 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. *日本輸血学会雑誌*, 46: 266, 2000.
- 11) 荒木延夫, 成瀬妙子, 坊池義浩, 他: MPHA 法に用いる血小板抽出抗原クロロキン処理法の確立. *日本輸血学会雑誌*, 37: 803—810, 1991.
- 12) Gerna G, Sarasini A, Di Matteo A, et al: Rapid detection of human rotavirus strains in stools by single-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay systems using monoclonal antibodies. *J Virol Methods*, 24: 43—56, 1989.
- 13) McGowan EB, Yeo KT, Detwiler TC, et al: The action of calcium-dependent protease on platelet surface glycoproteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 227: 287—301, 1983.
- 14) 荒木延夫, 成瀬妙子, 坊池義浩, 他: MPHA 法のショ糖生食水による HPA-2a, 2b 抽出抗原の確立. *日本輸血学会雑誌*, 38: 467—474, 1992.
- 15) Araki N, Nose Y, Kohsaki M, et al: Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive hemagglutination method. *Vox Sang*, 77: 44—51, 1999.
- 16) Kiefel V, Bassler D, Kroll H, et al: Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood*, 107: 3761—3763, 2006.

FALSE-NEGATIVE REACTION DUE TO THE PROZONE PHENOMENON IN PLATELET CROSS-MATCH TESTING BY THE MPHA METHOD: A CASE OF NEONATAL ALLOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA (NAIT)

Chie Nishimura¹, Hiroyuki Inaba¹, Hiroshi Minami¹, Nobuo Araki¹, Shion Imoto¹, Osamu Mabuchi¹, Susumu Inoue², Syouji Morita², Hideaki Mizoguchi² and Shinji Maeda³

¹Hyogo Red Cross Blood Center

²Saitama Red Cross Blood Center

³Department of Pediatrics, Hyogo Prefectural Tsukaguchi Hospital

Abstract:

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) mainly results from anti-HPA antibodies, and occasionally from anti-HLA antibodies. We present a NAIT case in which the mother's antibody showed the prozone phenomenon by MPHA with intact platelets.

The patient, the mother's first child, had a platelet count of 11,000/ μ l at birth. Lymphocyte cross-matching tests between parents was negative. Platelet cross-matching of the mother's serum was negative without dilution, but positive with a score of 1+ after 2 to 8 times dilution, and with a score of 2+ after 16 to 64 times dilution, thus showing the prozone phenomenon.

Anti-HLA-Class I antibodies by Luminex assay were negative for both mother and infant. Anti-HPA antibodies in the mother was negative by MPHA with extracted platelet antigen (n = 8) and the MACE method. Anti-HPA antibodies in the infant were negative by MPHA with extracted platelet antigen (n = 8). When the mother's serum was tested by M-MPHA with 18 types of intact panel platelets, 16 of the 18 panels showed a positive reaction with the prozone phenomenon. The other 2 panels showed a negative reaction. The positive reactions were attenuated or disappeared by chloroquine treatment.

These results suggest that the antibody which may be a cause of NAIT is reacting with platelet antigens which show the prozone phenomenon on intact platelet surface but are lost by the extraction process, and are denatured by chloroquine treatment.

Keywords:

NAIT, MPHA, extracted platelet antigen, intact platelet, prozone phenomenon