

血小板輸血不応答 (PTR) 患者における anti-PLT・MPHA・スクリーンを用いた MPHA 法と M-MPHA 法の陽性率及び抗体価の比較

森田 庄治 井上 進 飯野 美穂 二上 由紀 小林 洋紀
 榎本 隆行 石島あや子 柴田 洋一 溝口 秀昭 南 陸彦

我々は市販血小板抗体検査キットである anti-PLT・MPHA・スクリーンを用いて、血小板輸血不応答患者 151 例を対象に MPHA 法と M-MPHA 法の 2 法で血小板抗体スクリーニング検査を実施した。MPHA 法での陽性率は、49.0% (74/151 例) で、M-MPHA 法では 52.3% (79/151 例) であった。陽性の症例について抗体価を比較したところ、M-MPHA 法は MPHA 法に比べ抗体価が高かった。

キーワード：血小板輸血不応答, MPHA 法, M-MPHA 法

はじめに

血小板膜表面には HLA クラス I, HPA, ABO などの同種抗原が存在し、頻回血小板輸血患者では、これらに対する抗体が産生され血小板輸血不応答(以下 PTR)に陥る。anti-PLT・MPHA・スクリーン(ベックマン・コールター・バイオメディカル株式会社：以下スクリーン)は 3 名の血小板抽出抗原を混合し HPA-1 から HPA-6 の各抗体, Nak^a 抗体を検出することができる。HPA 抗体の検出を目的としているため、HLA クラス I 抗体は頻度の低い抗原に対する抗体は検出することができないが、操作が簡便で特別な機器を必要としないことから、一部の医療機関や検査施設で血小板抗体スクリーニングに用いられている。当血液センターでも PTR の検査依頼等で血小板抗体スクリーニング(主に HPA 抗体の検出用)に使用している。スクリーンの支持体は抗ヒト IgG 結合ヒツジ血球を用い、自然落下(重力)により反応像を形成させるため判定に 6 時間以上必要である(MPHA 法)¹⁾。この支持体の代わりにゼラチンとアラビアゴムで形成された抗ヒト IgG 結合磁性粒子を支持体として用いると検査所要時間が短縮できる利点がある(M-MPHA 法)^{2)~4)}。

我々はスクリーンを用いた MPHA 法と M-MPHA 法の感度について比較を行ったので報告する。

1. 対象および方法

当血液センター管内の医療機関から、PTR のため血小板抗体検査依頼があった患者 151 例を対象として、スクリーンの MPHA 法と M-MPHA 法の 2 法および AHG-

LCT 法で血小板抗体スクリーニングを実施し、MPHA 法と M-MPHA 法の陽性率を比較した。

MPHA 法又は M-MPHA 法で陽性となった検体は抗体価を測定した。抗体価の測定は、患者血清を希釈液で 2nd 希釈した後、3 倍量の希釈液を加え、これをウェルに 25 μ l 分注し室温・湿潤状態で 2 時間血清感作を行い洗浄後、MPHA 法は抗ヒト IgG 結合ヒツジ血球を 25 μ l 加え、6 時間以上静置後判定した。M-MPHA 法は抗ヒト IgG 結合磁性粒子を 25 μ l 加え、磁石板上で 3 分間静置後判定した。抗体価は血清希釈倍数 2nd とし、抗体価 0 は血清未希釈時のみ陽性を意味することとした。

スクリーンの HLA 抗体の鑑別はクロロキン処理⁵⁾で行い、反応が陰性化したものを HLA 抗体とした。クロロキン処理で陽性の症例は、ELISA 法を利用した市販抗血小板抗体測定キット PAKPLUS[®](イワキ株式会社)を用いて同種抗体と自己抗体を鑑別した。HPA 抗体特異性の確認は、anti-HPA・MPHA・パネル(ベックマン・コールター・バイオメディカル株式会社：以下パネル)を用いた。

また、PC-HLA を供給した医療機関から、輸血前後の患者血小板数の情報提供があった患者について輸血効果を検討した。効果判定は 1 時間後の補正血小板増加数(以下 CCI)が 7,500/ μ l 以上、24 時間後が 4,500/ μ l 以上を有効とした。

2. 結 果

1) 2 法の血小板抗体スクリーニング陽性率

MPHA 法での血小板抗体スクリーニング陽性率は、

Table 1 Anti-platelet antibody detection rate by MPHA and M-MPHA

		MPHA		
		+	-	Total
M-MPHA	+	74 (49.0%)	5 (3.3%)	79
	-	0	72 (47.7%)	72
Total		74	77	151

49.0% (74/151 例)であったのに対し、M-MPHA 法では 52.3% (79/151 例)であった。MPHA 法陽性の症例は、全て M-MPHA 法も陽性であり、MPHA 法陰性で M-MPHA 法のみ陽性は 5 例に認められた (Table 1)。

AHG-LCT 法で HLA 抗体を認め、スクリーンの MPHA 法及び M-MPHA 法で陰性となった症例は 9 例であった。これらの抗体の特異性は、ほぼ単一抗原に対する特異性であった。スクリーンでは対応する抗原を含まなかったため、検出できなかったが、8 名の血小板抽出抗原から成るパネルとの反応ではいずれも陽性となった。

2) スクリーン陽性例の抗体特異性

スクリーンの M-MPHA 法で陽性を示した 79 例の抗体特異性の内訳は、HLA 抗体 67 例 (84.8%)、GPIIb/IIIa 関連の血小板自己抗体 6 例 (7.6% HLA 抗体との複合 1 例を含む)、特異性不明の自己抗体 4 例 (5.1% HLA 抗体との複合 1 例を含む) HPA-5b 抗体 2 例 (2.5% HLA 抗体との複合 1 例を含む) であった (Table 2)。

また、MPHA 法陰性で M-MPHA 法陽性 5 例の抗体特異性は、HLA 抗体 4 例と GPIIb/IIIa + Ia/IIa 抗体 1 例であった。この 5 例の抗体特異性は AHG-LCT 法及び PAKPLUS で確認した。

3) 2 法の抗体価の比較

2 法が陽性となった 74 例中 69 例について、抗体価 (2^n) を測定し比較した。2 法の抗体価が同等であったのは 6 例 (8.7%) であった。M-MPHA 法 > MPHA 法の 1 管差は 27 例、2 管差 17 例、3 管差 8 例、4 管差 8 例、5 管差 2 例の計 62 例 (89.9%) であった。MPHA 法 > M-MPHA 法は 1 例 (1.4%) のみであった (Table 3)。

MPHA 法陰性で M-MPHA 法陽性 5 例のうち、抗体価を測定できた 2 例の M-MPHA 法の抗体価 (2^n) は 2^4 であった。抗体価と特異性との関連性については、特に認められなかった。

4) スクリーン陽性例における PC-HLA の輸血効果

スクリーンの M-MPHA 法で陽性を示した 79 例のうち、PC-HLA を供給し、輸血前後の患者血小板数の情報提供があった 16 人の患者について輸血効果を検討した。CCI が算出可能であった輸血回数 127 回のうち、輸血効果有り 80 回 (63.0%)、輸血効果無し 47 回 (37.0%)

であった。また、患者別では毎回輸血効果有り 6 人、輸血効果有りとなしとの混在例 8 人、毎回輸血効果無しは 2 人であった。M-MPHA 法のみ陽性の 5 例の輸血効果は不明であった。

3. 考 察

スクリーンを用いた血小板抗体スクリーニング陽性率は、MPHA 法が 49.0% で、M-MPHA 法では 52.3% であった。PTR 患者から検出される抗体の大部分は、HLA 抗体である。今回の結果でも PTR 患者から検出される抗体は、HLA 抗体が最も多く全体の 9 割を占めていた。次に血小板自己抗体、HPA 抗体の順であった。M-MPHA 法は抗体特異性に関係なく、HLA 抗体、血小板自己抗体、HPA 抗体全てで感度よく検出でき、PTR の血小板抗体スクリーニングに適していると思われた。ただし、MPHA 法陰性で M-MPHA 法のみ陽性の 5 例 (HLA 抗体 4 例、GPIIb/IIIa + Ia/IIa 抗体 1 例) の PC-HLA 輸血効果は不明であったため、PTR に関与しているか確認できなかった。

MPHA 法に比べ、M-MPHA 法の方が高感度である理由として、支持体の凝集像を形成させるまでの時間が関与していると思われる。MPHA 法は、抗ヒト IgG 結合血球を自然落下 (重力) により、反応像を形成させるのでプレートの底部に達するまでに 6 時間以上必要である。一方、磁性粒子は自然落下では長時間静置しても沈降しないので、磁力により反応像を形成させる。この特性を利用して血清感作後磁性粒子を加え、磁石板上で反応像を形成させるまでの時間を比較すると、磁性粒子を加えて長時間静置した場合は、抗体価が著しく低下する (未発表データ)。したがって、反応像の形成に長時間を要する MPHA 法は、一度血小板に結合した抗体が剥がれ、抗ヒト IgG 結合血球が中和されるのではないかと考えられた。

スクリーンを血小板抗体スクリーニングに用いる場合、以下の点に注意が必要である。スクリーンは 3 人の血小板抽出抗原が固相されているので、検出される抗体が限定され、低頻度な HLA 抗原に対する抗体は検出困難であると予想される。今回の結果でも AHG-LCT 法により HLA 抗体と確認されているにもかかわらず、9 例がスクリーンの M-MPHA 法で陰性であった。押田ら⁷⁾は LCT 法とスクリーンの MPHA 法との比較において、60% の一致率で LCT 法に用いるリンパ球の陽性数が高いほど、スクリーンでの陽性率も高く、リンパ球の陽性率が低下するとスクリーンの陽性率も低下し、有意の相関を認めたと報告している ($P < 0.01$)。また、谷脇⁸⁾中満⁹⁾によれば、それぞれの一致率は 79% と 88% と報告している。このように報告者によって一致率が異なるのは、スクリーンに含まれる HLA 抗原の違いと

Table 2 Comparison of the sensitivity and antibody specificity of MPHA and M-MPHA

Case No.	Antibody titers (2 ⁿ)		Antibody specificity	Case No.	Antibody titers (2 ⁿ)		Antibody specificity	
	MPHA	M-MPHA			MPHA	M-MPHA		
1	0	2	HLA	41	8	10	HLA	
2	0	4		42	8	10		
3	0	4		43	9	10		
4	0	4		44	9	10		
5	0	5		45	10	12		
6	1	2		46	11	12		
7	1	5		47	11	12		
8	1	5		48	12	11		
9	2	3		49	12	13		
10	2	5		50	12	14		
11	2	5		51	13	14		
12	3	4		52	14	15		
13	3	6		53	14	15		
14	3	7		54	14	15		
15	3	8		55	14	15		
16	4	4		56	14	15		
17	4	4		57	14	16		
18	4	5		58	15	16		
19	4	5		59	17	17		
20	4	6		60	n.t	n.t		
21	4	7		61	n.t	n.t		
22	4	7		62	n.t	n.t		
23	5	7		63	n.t	n.t		
24	5	7		64	Neg	4		
25	5	7		65	Neg	4		
26	5	8		66	n.t	n.t		
27	5	9		67	n.t	n.t		
28	6	7		68	4	6		HLA + HPA-5b
29	6	7		69	3	5		HLA + Autoantibody?
30	6	7		70	7	10		HLA + GPIIb/IIIa + Ia/IIa
31	6	8		71	0	4		HPA-5b
32	7	8		72	4	7		GPIIb/IIIa
33	7	9		73	5	5		
34	7	9		74	5	7		
35	8	8		75	6	8		GPIIb/IIIa + Ia/IIa
36	8	9		76	n.t	n.t		
37	8	9		77	4	5		Autoantibody?
38	8	9		78	8	8		
39	8	9		79	n.t	n.t		
40	8	9						

Cases with discrepant results by the two methods.

n. t not tested

それぞれに用いた患者血清の反応性の違いが一致率に
関係していると思われる。これらの報告は MPHA 法で

あるが, M-MPHA 法でも同様の傾向であると考えられ
る。スクリーンの M-MPHA 法で陰性であった 9 例もパ

Table 3 Antibody titration of 69 cases—Comparison between the two methods

	Titer (2 ⁿ)	n (%)
M-MPHA > MPHA	5	2
	4	8
	3	8
	2	17
	1	27
M-MPHA = MPHA		6
M-MPHA < MPHA	1	1
		69

ネルでは全例陽性であったことから、HLA 抗体検出の目的では、スクリーンやパネルに使用する血小板抽出抗原は HLA 抗原を加味しなければならないと考えられた。

血小板輸血は多くの医療機関で実施されているが、血小板抗体スクリーニングを日常検査に取り入れている医療機関は少ない。スクリーンはパネル数が少ないことにより抗原頻度の高い HLA 抗体しか検出できないという課題はあるものの、特別な機器を必要としないため、医療機関でも導入可能な検査法である。現行のスクリーンを抗ヒト IgG 結合磁性粒子に変更するだけで、検査所要時間が短縮され感度面でも優れていることが分かった。

当センターでは PC-HLA を供給する患者には、輸血毎に輸血効果票の記入を医療機関にお願いしている。臨床的輸血効果の有無と輸血後 1 時間(または 24 時間)値を医療機関に記載してもらい、センターが総血小板数から CCI 値を求めて医療機関に CCI の情報提供を行っている。医療機関とセンターが情報共有することで、PTR の原因特定や輸血効果の向上に努めており、PTR の依頼検査において免疫蛍光ビーズ法などの高感度な HLA 抗体検査法とこのスクリーンの改良法による HPA

抗体検査法を組み合わせることで、より有効な PC-HLA の供給が期待できると思われた。

文 献

- 1) Shibata Y, Juji T, Tohyama H, et al: Mixed passive hemagglutination with soluble platelet antigens. *Int Archs Allergy appl Immun*, 74: 93—96, 1984.
- 2) Tamai T, Mazda T: A method for drying red blood cells for solid-phase immunoassay. *Transfusion medicine*, 9: 343—349, 1999.
- 3) Tamai T, Ishii Y, Mazda T: IgM alloantibody detection by M-MPHA, a new solid-phase assay system. *Transfusion Science*, 23: 47—54, 2000.
- 4) 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.
- 5) Nordhagen R, Flaathen ST: Chloroquine removal of HLA antigens from platelets for the platelet immunofluorescence test. *Vox Sang*, 48: 156—159, 1985.
- 6) Allen DL, Murphy MF: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit (GTI PAKPLUS[®]) for the detection of antibodies against human platelet antigens. *Transfusion medicine*, 9: 384—385, 1999.
- 7) 押田真知子, 清川知子, 青地 寛, 他: 抗血小板抗体検出用キット anti-PLT・オリビオ・MPHA の抗 HLA 抗体検出としての評価—LCT, FCM との比較検討—. *日本輸血学会雑誌*, 39 (4): 703—707, 1993.
- 8) 谷脇清助: オリビオ・MPHA 法を用いた抗血小板抗体検査法の検討. *医学検査*, 42 (6): 1124—1128, 1993.
- 9) 中満三容子, 吉木景子, 福岡直美, 他: MPHA 法による抗血小板抗体の検討. *医学検査*, 42 (2): 168—171, 1993.

COMPARISON OF ANTIBODY DETECTION RATES AND THE ANTIBODY TITERS WITH THE ANTI-PLT/MPHA/SCREEN USING MPHA OR M-MPHA IN PATIENTS WITH PLATELET TRANSFUSION REFRACTORINESS (PTR)

Shoji Morita, Susumu Inoue, Miho Iino, Yuki Futakami, Hironori Kobayashi, Takayuki Enomoto, Ayako Ishijima, Yoichi Shibata, Hideaki Mizoguchi and Mutsuhiko Minami
Saitama Red Cross Blood Center

Abstract:

Samples from 151 patients with platelet transfusion refractoriness were screened for anti-platelet antibodies by MPHA and M-MPHA, using the anti-PLT-MPHA-Screen.

The antibody detection rate was 49.0% (74/151) by MPHA and 52.3% (79/151) by M-MPHA. Comparison of antibody titration between the two methods revealed higher detection levels by M-MPHA than MPHA.

Keywords:

PTR, MPHA, M-MPHA (magnetic mixed passive hemagglutination)