

3種類のHPA抗体, HPA-4b, HPA-5a, HPA-15b抗体を有したNAIT症例

清川 知子¹⁾ 高 陽淑²⁾ 桑鶴知一郎³⁾ 中山小太郎純友¹⁾ 細川 美香¹⁾
 櫻木美基子¹⁾ 森川 珠世¹⁾ 中尾まゆみ¹⁾ 青地 寛¹⁾ 石井 博之²⁾
 木瀬 康人³⁾ 永峰 啓丞¹⁾ 木村 正³⁾ 富山 佳昭¹⁾

母児不適合に起因する新生児同種免疫性血小板減少症 (neonatal alloimmune thrombocytopenia : NAIT) は、時に複数のHPA抗体が検出される場合があるが、本論文では3種類のHPA抗体に起因するNAIT症例を提示する。当該症例(第2子)の出生時血小板数は $7.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ と中等度の血小板減少を認めたが、出血斑などは認めなかった。血小板抗体検査ではHLA抗体は陰性であり、MPHA法にてHPA-5a抗体を中心に複数の抗体の存在が示唆された。母親血清と父親血小板の交差試験はMAIPA法で陽性であり、HPA-4, HPA-5, HPA-6, HPA-15抗体の存在が示唆された。さらに、血小板ジェノタイプおよびそれぞれのHPA発現K562細胞での解析より、母親血清はHPA-4b, HPA-5a, HPA-15b抗体を有することが明らかとなった。欧米では3種類の複合抗体を有する症例は報告されているが、本邦では本例は初めての症例である。本症例はMPHA法とMAIPA法の併用によりHPA-4b, HPA-5a, HPA-15b抗体を検出できたと考える。

キーワード : NAIT, MPHA, MAIPA, 複合抗体

はじめに

新生児同種免疫性血小板減少症(neonatal alloimmune thrombocytopenia : NAIT)は赤血球血液型不適合と同様に、母親が児の血小板に対してIgG抗体を産生し、胎盤経路で移行した抗体が児の血小板を破壊することに起因する。NAITの発症頻度は1,000~3,000分娩に1例とされており¹⁾、重篤な場合、脳出血を起こす場合もある。欧米ではHPA-1a抗体²⁾³⁾に起因するNAITが最も多いが、本邦ではHPA-4b抗体に起因するNAITが最も多く^{4)~6)}、これらの抗体は臨床上重要と考えられる。Davorenらは欧米人においてHPA抗体が検出された1,162例のNAIT症例を解析した結果、その80%がHPA-1a抗体に起因しており、2種類のHPA抗体が検出されたNAIT例は34例(3%)であったが、3種類のHPA抗体によるNAITはわずかに2例のみと報告している²⁾。一方、本邦においては3種類の複合抗体を有するNAIT例はいまだ報告されていない。本論文では3種類のHPA抗体(HPA-4b, HPA-5aおよびHPA-15b抗体)を保有する母親から出生したNAIT症例を報告する。

症 例

症例の母親は30歳代。1経妊1経産で輸血歴は無し。第1子妊娠中28週頃から血小板数が緩やかに低下していたが、41週に経膈分娩で第1子を出産した。第1子出産時に特に異常はなく、第1子についても特記すべき事項はなかった。

第2子妊娠20週に子宮頸管の短縮を認めたため、他院より当院転院となり、外来にて経過観察されていた。妊娠25週に母体緊急搬送で他院に搬送され、血小板減少傾向と血小板抗体検査が陽性の結果であった(検査法、特異性等詳細は不明)。当院での管理を希望され36週に再び当院転院となった。

当該症例(第2子)は、在胎週数39週3日に経膈分娩にて出生。出生時の体重は3,370g。Apgar score 1分9点、5分10点であった。患児には出血斑など易出血性の臨床症状はなかったが、出生時の血小板数は $7.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ と軽度の血小板減少を認め、NICU管理となった。出生時 $7.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ であった血小板数は徐々に増加し生後4日目には $14.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ となり、5日目には退院となった。

1) 大阪大学医学部附属病院輸血部

2) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

3) 大阪大学医学系研究科産婦人科学

第65回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

〔受付日：2018年3月4日，受理日：2018年4月6日〕

	HPA-1		HPA-2		HPA-3		HPA-4		HPA-5		HPA-6		Nak ^a	判定結果
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b		
A	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
B	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
C	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	++
D	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	++
E	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
F	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
G	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	++
H	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	++

図1 Anti-PLT・MPHA・パネルの判定結果

Anti-PLT・MPHA・パネルを用いて母親血清中の HPA 抗体を検査した。HPA-5a 抗体の存在が疑われるも、HPA-4b 抗体や HPA-6a 抗体の存在も示唆された。

検査方法

1. HLA 抗体検査

One Lambda 社 LABScreen PRA Class I を使用し Luminex 200 で測定した。

2. 血小板抗体検査

1) MPHA 法

ベックマンコールター社のキット anti-PLT・MPHA・スクリーンおよびパネルを用いてスクリーニングと抗体同定を実施した。

2) Modified Rapid MAIPA 法

HPA 発現 K562 細胞を用い、血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa, GPIa, GPIb, CD109 に対するモノクローナル抗体を使用した MAIPA 法⁷⁾で測定した。HPA 発現細胞と反応させた吸光度を Signal (S) とし、Mock 細胞と反応させた吸光度を Noise (N) とし、S/N 比が 2 以上を陽性とした⁸⁾。

3. HPA ジェノタイプング

WAKFlowHPA タイピング試薬を用いた PCR-rSSO 法にて実施した。

4. 血小板抗体の力価測定

MAIPA 法で実施し、S/N 比が 2 以上の最高希釈倍数を抗体価とした。

5. 交差試験

父親血小板を対象に、GPIIb/IIIa, GPIa, GPIb, CD109 に対するモノクローナル抗体を使用し MAIPA 法で実施した。

以上の NAIT 関連検査は書面により母親および父親より同意を得た。

検査結果

本例の血小板減少の原因に関しては、感染症等の血小板減少をきたす原因は明らかではなく、また母親が抗血小板抗体を有していたことより NAIT が強く疑われた。

母親の抗体を検討したが、HLA 抗体は陰性であった。次に HPA 抗体に関して解析した。スクリーニングでの反応は 2+, パネルでは CDGH の 4 ウェルが 2+, ABF の 3 ウェルが 1+, E の 1 ウェルは陰性であった(図1)。この結果はパネルの抗原表から HPA-5a と一致した。しかしながら HPA-5a は高頻度抗原であることに加え、CDGH ウェルで判定が 2+ となったことより他の HPA 抗体の存在の可能性が示唆された。HPA 抗体をより詳細に解析するため MAIPA 法を用いて解析した。さらに MPHA では検出が困難である HPA-15 抗体についても解析した⁹⁾。

初めに、父親血小板を用いた MAIPA 法による交差試験では、母親の血清中抗体は、GPIIb/IIIa, GPIa, CD109 に対する抗体で capture した父親血小板抗原に対して陽性を示したが、GPIb 抗体を用いた MAIPA では陰性であった。なお臍帯血中に抗体は検出されなかったが、これは抗体が患児血小板と結合し消費されたためと考えられた(図2)。この結果より、患児の血小板減少は母親の血清抗体による NAIT に起因することが示され、パネル血球での MPHA での結果を合わせると、母親血清には HPA-4b, HPA-5a, HPA-6b および HPA15b 抗体が存在することが示唆された。それぞれの HPA を発現する K562 細胞を用いた MAIPA での成績より、母親の血清中には HPA-4b, HPA-5a および HPA-15b 抗体が存在することが明らかとなった(図2)。HPA-

6b 抗体は検出されなかった。

表1に HPA のジェノタイプを示すが、母親と患児は HPA-4b, -5a, -15b 不適合であった(表1)。HPA-6 のジェノタイプは母親と父親では一致しており不適合は存在しなかった。

以上の結果から、血小板減少の原因は HPA-4b+5a +15b 抗体による NAIT であると判断した。出産前(37週)に測定した抗体価は HPA-4b 抗体が512倍、HPA-5a 抗体が64倍、HPA-15b 抗体が64倍とすべての抗体が高力価であった(図3)。

考 察

本論文において、我々は3種類の HPA 抗体 (HPA-4b+5a+15b 抗体) を有した NAIT 症例を報告した。3種類の HPA 抗体を有した NAIT 症例は、海外においては若干例の報告があるものの²⁾、本邦においては検索した範囲においては本例が第一例であった。複合抗体を有する症例は、欧米では HPA-1a 抗体を含む症例が多く²⁾、本邦では HPA-4b 抗体を含む症例が多い¹¹⁾。本例における NAIT を惹起した主要な抗体を同定することは困難であるが、それぞれの HPA 抗体の抗体価は、HPA-4b 抗体が512倍であり HPA-5b 抗体と HPA-15b 抗体がそれぞれ64倍であり、HPA-4b 抗体の抗体価が最も高値であったことは興味深い。以下にそれぞれの抗体の頻度や臨床的意義に関して考察する。

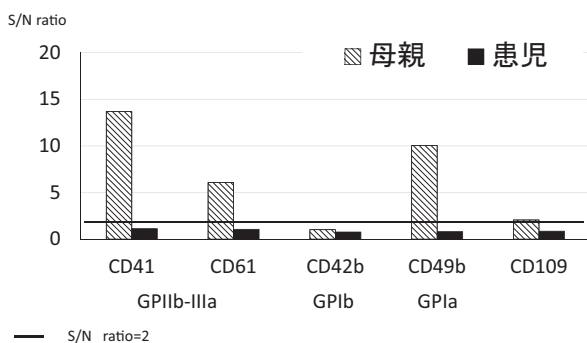


図2 父親血小板との交差試験

父親血小板を用いたMAIPA法にて交差試験をおこなった。母親血清と父親血小板との反応は陽性であり、GPIIb-IIIa に存在する HPA-3 あるいは HPA-4、GPIa に存在する HPA-5、CD109 に存在する HPA-15 の抗体の存在が示唆された。患児の血清(臍帯血)中には HPA 抗体は検出されなかった。

上記3種類の抗体のうち本邦では HPA-4b 抗体による NAIT 発症例が最も多く臨床的重要とされている^{4)~6)}。HPA-4b 抗原は血小板膜糖蛋白 GPIIIa 上に存在し、血小板1個あたりの分子数は約80,000分子である¹⁰⁾。24,630例の妊婦の血清をMPHA法にて解析したOhtoらの報告では⁴⁾、223例(0.91%)に HPA 抗体が検出されている。その内訳は HPA-5b 抗体が最も多く168例、HPA-4b 抗体は49例、HPA-4b+5b 複合抗体は1例であった。しかしながら、これらの抗体陽性の母親からの新生児がすべて NAIT (血小板数15万/ μ l未滿)を発症するわけではなく、NAIT 発症頻度は HPA-5b 抗体陽性例では17%(8例)であったが、HPA-4b 抗体では64%(9例)と高率であった⁴⁾。以上の成績より、HPA-4b 抗体を検出した場合は高率に NAIT を誘導すると考えられる。さらに日本血小板・顆粒球型ワークショップを初めとした本邦における NAIT を発症した症例の解析においても、HPA-4b 抗体が最も高頻度に検出されている⁵⁾⁶⁾¹¹⁾。HPA-4b 抗体による NAIT は欧米での HPA-1a 抗体に起因するような重症例は少ないものの、高橋ら¹²⁾は、抗体価が512倍と高力価で児の血小板数が0.6万/ μ lと著減し、くも膜下出血をきたした症例を報告している。竹内ら¹³⁾による HPA-4b 抗体の予視的スタディでは妊娠回数が増えるほど抗体価が上昇し、MPHA法で64倍以上の場合は血小板数の回復が遅くなる傾向にあるとしている。測定方法は異なるが本症例は抗体価が512倍のため、NAIT の原因抗体としての可能性は十分にあると考えられる。

HPA-5a 抗原は、本邦での抗原頻度が99%以上で陽性であるため、HPA-5a 不適合は極めて稀である。HPA-5a 抗原は血小板膜糖蛋白 GPIa 上に存在し、血小板1個あたり約1,000~2,000分子とその発現数は HPA-4b に較べて、その1/40と極めて少ない¹⁰⁾。しかしながら、抗原の発現量は少ないものの、本例で示しているようにMPHA法により HPA-5a 抗体は良好に検出した。本邦における HPA-5a 抗体による NAIT は2例報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾が、抗体価はそれぞれ32倍と64倍であり、児の最低血小板数は、1.8万/ μ lと0.5万/ μ lと極めて低値であり、HPA-5a 抗体は高度の血小板減少を伴う NAIT を誘導しうると考えられる。

HPA-15b 抗原は GPI アンカー型糖蛋白である CD109 上に局在し、CD109 のトロンビン刺激血小板上の発現

表1 HPA ジェノタイプ

HPA type	HPA-1	HPA-2	HPA-3	HPA-4	HPA-5	HPA-6	HPA-15
母親	a/a	a/b	b/b	a/a	b/b	a/a	a/a
父親	a/a	a/a	a/b	a/b	a/a	a/a	b/b
患児	a/a	a/a	b/b	a/b	a/b	a/a	a/b

母親と患児のジェノタイプで HPA-4b, HPA-5a, HPA-15b が不適合であった。

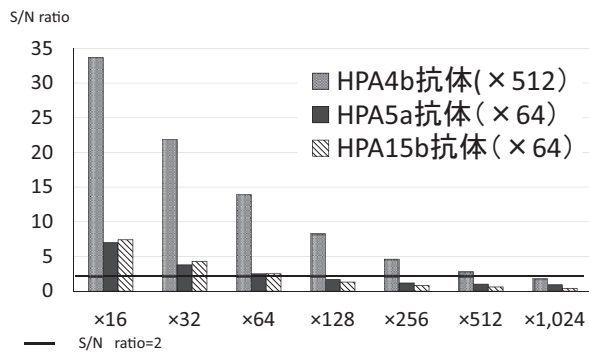


図3 HPA 発現 K562 細胞を用いた HPA 抗体の力価測定 HPA-4b, HPA-5a あるいは HPA-15b 発現 K562 細胞を用いて, MAIPA 法にて母親血清中の HPA 抗体価を測定した. Signal (S)/Noise (N) 比 ≥ 2 を陽性とした.

量は約 2,000 分子と少ない. HPA-15b 抗体においても NAIT 症例が報告されている. Ertel ら¹⁶⁾は HPA-15b 抗体による 2 例の NAIT 症例を提示しており, どちらも児の血小板数の最低値は約 2 万/ μl であった. 血小板における発現量は HPA-5b と HPA-15b は同程度であるが, HPA-15b 抗体は MPHA 法では検出されにくいとされている. 従って, HPA-15 に対する抗体の検出には, MPHA 法単独ではなく, MAIPA 法など標的となる抗原を単離し capture する方法を併用することが必要であると考えられる⁹⁾. これらの検査法の併用により, 3 種類以上の複合抗体による NAIT の報告はさらに増加すると推察する.

上記のように, その抗体価や発症頻度からは HPA-4b 抗体が本例の NAIT の主たる抗体と推察されるが, 今回検出した 3 種類のどの抗体でも NAIT を惹起する可能性があり原因抗体の同定は困難である. 我々は, 2 種類の抗体を有し, その原因抗体検索に関して示唆に富む NAIT 症例を報告している¹⁷⁾. 第 1 子が 2 種類 (HPA-4b と HPA-5b 抗体) の HPA 抗体による NAIT 症例であったが, 第 2 子は母親とは HPA-5b は適合, HPA-4b が不適合であった. 第 2 子の出生時の血小板数は 21.4 万/ μl であり, NAIT は発症しなかった. 第 2 子では母児間で HPA-4b の不適合があるにも関わらず NAIT を発症しなかったことより, 第 1 子での NAIT に関しては HPA-4b 抗体の関与は低く, その主たる抗体は HPA-5b 抗体であることが示唆された¹⁷⁾. 我々の既報の NAIT 例のように, 次の妊娠の検査成績や臨床経過より原因抗体の概要が示唆される場合があると推察する.

前述の我々の既報例とは異なり, 前児が NAIT 児であった場合, 次の妊娠時の 75~90% に同様あるいは重症化する可能性があると言われている¹⁸⁾. 特に今回報告した症例では母親と父親では HPA-5 と HPA-15 の抗原系が全く異なっており, HPA-5b 抗体と HPA-15b 抗体価が上昇すると推察される. 従って, 次回妊娠時には

抗体価の経時的測定, 羊水細胞による胎児の血小板ジェノタイプの同定など, 嚴重な母体および胎児の管理対策が必要と考えられる¹⁹⁾.

著者の COI 開示: 本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞: 本論文の一部は厚生労働科学研究費補助金 (H29-難治等 (難)-一般-012) および日本学術振興会科学研究費助成金 (18K08326) の助成を受けた.

文 献

- 1) Dreyfus M, Kaplan C, Verdy E, et al: Frequency of immune thrombocytopenia in newborns: A prospective study. *Blood*, 89: 4402—4406, 1997.
- 2) Davoren A, Curtis BR, Aster RH, et al: Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 44: 1220—1225, 2004.
- 3) Ghevaert C, Campbell K, Walton J, et al: Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 47: 901—910, 2007.
- 4) Ohto H, Miura S, Ariga H, et al: The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med*, 14: 399—408, 2004.
- 5) 森田庄治, 井上 進, 花垣澄雄, 他: 新生児同種免疫性血小板減少症 (NAIT) の抗体分析: 1985~2005. *日輪血会誌*, 52: 678—683, 2006.
- 6) 飯野美穂, 井上 進, 二上由紀, 他: 本邦における新生児血小板減少症の集計調査. *日輪血会誌*, 56: 508—514, 2010.
- 7) Campbell K, Rishi G, Howkins G, et al: A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. *Vox Sanguinis*, 93: 289—297, 2007.
- 8) Hayashi T, Amakishi E, Matsuyama N, et al: Establishment of a cell line panel as an alternative source of platelet antigens for a screening assay of anti-human platelet antibodies. *Transfusion Medicine*, 21: 199—204, 2011.
- 9) Matsuhashi M, Tsuno NH, Sone S, et al: The role of alloantibodies against human platelet antigen-15 in multiply platelet transfused patients. *Transfusion*, 54: 1093—1099, 2014.
- 10) 富山佳昭: 血小板の分子生物学, 高橋孝喜, 十字猛夫, 柴田洋一, 他監修. 血小板/顆粒球 抗原・抗体検査標準マニュアル, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2009, 52—58.
- 11) 2017 年度 日本血小板・顆粒球型ワークショップ資料.

- 12) 高橋朋子, 関口隆憲, 秋田裕司, 他: 抗 HPA4b 抗体による新生児同種免疫性血小板減少性紫斑病の1例. 小児科臨床, 60: 979—984, 2007.
- 13) 竹内千華子, 大戸 齊, 山口富子, 他: 抗 HPA4b (Yuka) 抗体保有妊婦からの新生児血小板減少症についての予視的スタディ. 日輸血会誌, 46: 463—466, 2000.
- 14) Yoshikane Y, Takahashi Y, Seki M, et al: Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura associated with HPA-5a. *Pediatrics International*, 46: 363—365, 2004.
- 15) Imamura T, Honda Y, Ariga H, et al: Second Japanese case of neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-human platelet antigen-5a. *Pediatrics International*, 51: 585—587, 2009.
- 16) Etrek K, Al-Tawil M, Santoso S, et al: Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*, 45: 366—373, 2005.
- 17) Kiyokawa T, Kho Y, Mimura K, et al: A case of neonatal thrombocytopenia in the presence of both anti-HPA-4b and anti-HPA-5b antibody: clinical and serological analysis of the subsequent pregnancy. *Int J Hematol*, 100: 398—401, 2014.
- 18) Ahya R., Turner M.L., Urbaniak S.J., et al: Fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Trans Aphe Sci*, 25: 139—145, 2001.
- 19) 大戸 齊: 新生児同種免疫性血小板減少症. 日小血会誌, 17: 418—421, 2003.

A CASE OF NEONATAL ALLOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA IN THE PRESENCE OF THREE DIFFERENT anti-HPA ANTIBODIES: HPA-4b, HPA-5a, AND HPA-15b ANTIBODIES

Tomoko Kiyokawa¹⁾, Yongsook Koh²⁾, Tomoichiro Kuwazuru³⁾, Kotarosumitomo Nakayama¹⁾, Mika Hosokawa¹⁾, Mikiko Sakuragi¹⁾, Tamayo Morikawa¹⁾, Mayumi Nakao¹⁾, Hiroshi Aochi¹⁾, Hiroyuki Ishii²⁾, Yasuto Kinose³⁾, Keisuke Nagamine¹⁾, Tadashi Kimura³⁾ and Yoshiaki Tomiyama¹⁾

¹⁾Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital

²⁾Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

³⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Graduate School of Medicine

Abstract:

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) is caused by the formation of maternal alloantibodies against fetal platelet antigens. Multiple anti-human platelet antigen (HPA) alloantibodies have occasionally been detected in maternal sera. In this case report, we present the first Japanese NAIT case with three different anti-HPA antibodies. The proband (second sibling) showed mild thrombocytopenia ($73 \times 10^3/\mu\text{l}$) without any bleeding tendency at birth. Human leukocyte antigen (HLA) antibodies were negative. A screening assay employing the mixed-passive hemagglutination (MPHA) method suggested the presence of multiple anti-HPA antibodies including anti-HPA-5a antibodies. A monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) assay demonstrated a reaction between maternal antibodies and paternal platelets and suggested the presence of alloantibodies against HPA-4, HPA-5, HPA-6, and HPA-15. We also determined the maternal, paternal, and proband's HPA genotype. Furthermore, a MAIPA assay using K562 cells expressing each HPA confirmed the presence of three different alloantibodies, HPA-4b, HPA-5a, and HPA-15b antibodies, in maternal serum. This case strongly suggests that the combined use of MPHA and MAIPA assays may be powerful for detecting and identifying multiple alloantibodies.

Keywords:

NAIT, MPHA, MAIPA, Multiple alloantibodies