Platelet Fluorochromasia Cytotoxicity Test (PFCT 法) に よる血小板 HLA 抗原の解析

能見 智子 森島 泰雄 植田 米男
白木 透 長谷川岩三

愛知県赤十字血液センター

(昭和60年12月27日受付)

THE ANALYSIS OF HLA ANTIGENS ON PLATELETS BY PLATELET FLUOROCHROMASIA CYTOTOXICITY TEST (PFCT)

Tomoko Noumi, Yasuo Morishima, Yoneo Ueda, Tohru Shiraki
and Iwazo Hasegawa
Aichi Red Cross Blood Center

Platelet fluorochromasia cytotoxicity test (PFCT) was employed for the detection of HLA antigens on platelets. 5×10^4 platelets which were incorporated with carboxyfluorescein diacetate (C-FDA), were at first incubated with $1 \mu\text{l}$ of antiserum for 60 min at room temp, and $5 \mu\text{l}$ of rabbit complement was added. After 2 hrs incubation at room temp, the viability of platelets was counted by inverted fluorescent microscope.

The sensitivity of PFCT was compatible with that of lymphocyte microcytotoxicity test with 30 min preincubation and 1 hr incubation, when HLA-A2 antisera was used. ABO blood group anti-sera were shown to be weakly cytotoxic to ABO mismatched platelets.

HLA-ABC typing of platelets from 7 type O donors was done by PFCT using standard HLA-ABC typing trays. Almost all HLA-A and -B antigens defined by lymphocyte cytotoxicity, were identified by PFCT, while 3 HLA-A and -B antigens failed to be typed because anti-sera of these HLA specificities showed no or weak cytotoxicity. All of HLA-Bw4 and Bw6 were well typed. However, none of HLA-C antigen could be detected with platelets.

These data indicate that the quantitative differences of HLA-A, -B and -C antigens on platelets should be taken into consideration for HLA-compatible platelet transfusion.

はじめに

白血病, 再生不良性貧血患者をはじめとし頻回血小板輸血を受けた患者には, しばしば血小板に反応する抗体が出現し, 血小板の輸注効果を妨げ治療上大きな障害となっている。我々は, 血小板フェレーシスにて輸血を受けた白血病患者について, リンパ球細胞毒性試験 (LCT 法)¹⁾により HLA 抗体の有無を検索した結果, その29%に HLA 抗体が認められた²⁾。また柴田らは, 血小板輸血患者に出現した抗体の85%が HLA 抗体であると報告しており³⁾, 患者と同一の HLA 型を有するドナーよりの血小板輸血が必要となってく

る⁴⁾⁻⁶⁾。しかしながら, Herzig らは, LCT クロスマッチ陰性ドナーによる輸血のうち40%が無効であり, さらに LCT 陽性ドナーの67%は輸血が有効であったと報告している⁷⁾。また Duquesnoy らは, HLA 適合輸血において, 血小板輸血無効例が45~50%存在すると報告している⁸⁾。このように, LCT 法のみによるクロスマッチは, 必ずしも十分な臨床効果との相関が得られておらず, この理由として, ① HLA 抗体以外の血小板に特異的に向けられた抗体の存在, ②血小板上とリンパ球上の HLA 抗原の出現の違い③従来の LCT 法では十分に検索できない低抗体価の抗体や, 補体非結合

性抗体の存在等が考えられている。このため③に対して、荒木・十字らは、LCT法に二次抗体を加えた anti-human globulin (AHG)-LCT法を実施している⁹⁾。①②に関しては、標的細胞に血小板自身を用いた種々の検査法が試みられている。すなわち、柴田らの抗ヒト IgG 結合ヒツジ赤血球を用いた mixed passive haemagglutination test (MPHA法)¹⁰⁾、酵素抗体法¹¹⁾¹²⁾、アイソトープラベル抗グロブリン法¹³⁾¹⁴⁾、蛍光抗体法¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾などである。一方 Stux¹⁸⁾、Lizak¹⁹⁾らは、血小板を標的細胞とした補体障害性殺細胞試験 (platelet fluorochromasia cytotoxicity test: PFCT法)を報告している。この方法は、LCT法と同じ原理に基づくものである。今回我々は、この PFCT法につき検討するとともに、PFCT法により、すなわち血小板により HLA typing が可能かどうかを、LCT法と比較検討したので報告する。

方 法

1) 血小板およびリンパ球の調整

健常人の10%ACD-A加末梢血を室温で300×g、10分遠心して多血小板血漿 (PRP)を分離し、ACD-A/PBS (ACD-A 10% (v/v)を含む0.01Mリン酸緩衝生理食塩液、PH7.4~7.45)で2回洗滌後、PBSで 4×10^8 /mlに調整し血小板浮遊液とした。

リンパ球は、PRP採取後のbuffy coat層からFicoll-Conray比重遠心法にて600×g、10分遠心分離し、中間層を3回PBSで洗滌後10% fetal calf serum (FCS)加RPMI 1640で $2 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$ /μlに調整した。

2) 被検血清

PFCT法及びLCT法に用いた血清として

① 血小板輸血後の患者血清

② A, O, B, AB各血液型健常人の血清

③ HLA-ABC typing用抗血清120種(陰性コントロール血清1種を含む)を使用した。同定し得るHLA型はA1・A2・A3・A11・A23・A24・A25・A26・A28・A29・A30・A31・A32・Aw33・Aw34・Aw36・B7・B8・B13・B14・B17・B18・B21・B27・B35・B37・B38・B39・Bw41・Bw42・B44・B45・Bw46・Bw47・Bw48・B51・Bw52・Bw54・Bw55・

Bw56・Bw59・Bw60・Bw61・Bw62・Bw63・Bw67・Bw70・TS-1・Bw22 New・Cw1・Cw2・Cw3・Cw4・Cw5・Cw6・Cw7・Cw8の計57種であった。

3) Platelet fluorochromasia cytotoxicity test (PFCT法)

a) 血小板への蛍光色素の取り込み

80μg/mlに調整した蛍光色素 carboxyfluorescein diacetate (C-FDA: Molecular Probes No. C-195)と血小板浮遊液を500μlずつ加え、37℃30分インキュベートして色素を生細胞内に取り込ませる。余剰色素をPBSで3回洗滌 (Fisher Centrifuge Model 59で2,500×g 2分)して取り除き、血小板をPBSで 5×10^4 /μlに調整した。なおC-FDAは粉末をアセトンで5mg/mlに溶解したものを原液とし、ガラスチューブに入れ-80℃で保存したものを、試験時毎にPBSで80μg/mlに希釈して用いた。

b) 被検血清の分注

被検血清あるいは健常人血清は、ハミルトンマイクロナシリンジを用い、テラサキトレイのウエルに1μlずつ分注し、その上に乾燥を防ぐ目的でミネラルオイルを5~6μl分注した。被検血清の希釈は、あらかじめ白血球・血小板抗体のないことが確認されている人AB血清を用いた。

c) 反応

テラサキトレイに分注した被検血清の各ウエルに、前述の蛍光色素C-FDAを取り込ませた血小板浮遊液をマイクロナシリンジで1μlずつ分注し、室温1時間反応後、補体としてウサギ血清 (ペルフリーズ製)5μl添加し、さらに室温で2時間反応させた後、プレートを遠心して浮遊血小板をウエルの底面に付着させ直ちに検鏡した。

d) 判定

倒立蛍光顕微鏡 (Nikon, DIAPHOT-TMD)×100倍にて血小板の生死を判定した。血小板表面の抗原と血清中の抗体が結合したところに補体が発作用すると、血小板が破壊されて取り込んだ蛍光色素が細胞外に放出される。このため生きている血小板は蛍光を発し、死んだ血小板は蛍光が失われる。反応の強さは、陰性コントロールを基準にし、蛍光量の減少に応じて陰性 (-)・弱陽性

(±)・陽性(+)・強陽性(++)の4段階に分けて判定した。

4) Lymphocyte cytotoxicity test (LCT 法)

HLA typing に用いる通常の NIH 標準法¹⁾を用いた。すなわち、血清分注済みのテラサキプレートにリンパ球浮遊液を1 μ l ずつ分注し、室温30分反応後、ウサギ血清5 μ l を加え室温で1時間反応させ、5%エオジン溶液2 μ l を加え2分後中性ホルマリン約8 μ l を加えて固定し、カバーガラスをかぶせ倒立位相差顕微鏡にてリンパ球の生死を判定した。判定は、スコア 1 (死細胞% < 10%), 2 (10~19%), 4 (20~49%), 6 (50~79%), 8 (80~100%) という判定基準で行なった。

結 果

1. PFCT 法における各条件の検討

a) インキュベーション時間

抗 HLA-A2 血清 (JR31-111) を倍々希釈して 6 段階の抗血清濃度をつくり、テラサキプレートに分注して被検血清とした。HLA-A2 抗原をもつ O 型健康人の末梢血から血小板とリンパ球を分離し、血小板は PFCT 法、リンパ球は LCT 法にてそれぞれインキュベーション時間を、30分前処置+60分補体処理と60分前処置+120分補体処理の2通りについて検討した。図1上段に示したように、60分・120分処理血小板と30分・60分処理リンパ球は、8倍希釈まで陽性反応を示したが、30分・60分処理血小板は、2倍希釈で反応性の低下を示した。また、リンパ球とは反応せず血小板と反応する血小板フェレーシス輸注後の患者血清を用いた検討では、30分・60分処理血小板で、1倍希釈で20%の殺細胞率が、60分・120分処理血小板では90%と高い殺細胞効果が得られた(図1下段)。以上の結果より、インキュベーション時間は60分・120分と設定した。

b) 補体

HLA-ABC 用家兎補体と DR 用家兎補体、及び baby rabbit 補体計 3 種を比較検定した。この結果、HLA-ABC 用補体及び baby rabbit 補体は同程度の補体価を有し、DR 用補体はその作用が劣っていた。また補体のみによる非特異的殺細胞効果は、baby rabbit > ABC 用 > DR 用の順に高

図1 PFCT 法におけるインキュベーション時間の検討

かったため、ABC 用補体を用いた。

c) 抗 A 抗 B 抗体の影響

血小板上に ABO 型赤血球抗原が出現していることが報告されている²⁰⁾。そこで本法による患者血清中の血小板抗体、白血球抗体の検索に関して、人血清中の抗 A 抗 B 抗体の影響があるかどうかを検討する目的で、各型 2 名の血小板を用い、各型 5 名の血清と反応させた。その結果を表 1 に示したが、抗原と抗体が反応する組み合わせでは、大半に弱陽性の血小板殺細胞効果が認められた。そこで血小板を用いた HLA typing には、O 型血小板を用いて実施した。

d) 被検血清による O 型血小板に対する非特異的殺細胞効果の有無

表1 PFCT 法における抗A, 抗B抗体の影響

血小板ドナー* の ABO 型	血清**	判定***
AB	AB	—
	A	—～±
	B	—
	O	—～±
A	AB	—
	A	—
	B	—～±
	O	—～±
B	AB	—
	A	—～±
	B	—
	O	—～±
O	AB	—
	A	—
	B	—
	O	—

*各 ABO 型 2 人 **各 ABO 型 5 検体使用.
***—: 陰性 ±: 弱陽性

血小板は凝集により血小板内成分を放出する。故に抗原抗体反応によらない被検血清中の凝集物質による非特異的の反応が生ずるか否かを患者血清 10 検体を用いて、O 型血小板と 3 時間インキュベーションすることにより検討したが、全検体陰性であった。

2. PFCT 法による血小板 HLA typing 結果

PFCT 法は、HLA typing に用いる LCT 法と同一手技である。そこで LCT 法による HLA typing 抗血清を用いて血小板による HLA typing が可能かどうか、及びリンパ球と血小板との HLA 抗原の出現の違いにつき比較検討した。HLA typing 用抗血清に対する血小板の反応の一例として、表 2 に Y.M. 例における個々の抗血清に対する血小板 (PFCT 法) とリンパ球 (LCT 法) の反応結果を示したが、反応様式は以下の如く 2 つのパターンに分類できた。

第 1 ; 図 1 の HLA-A2 に対する抗血清でみられた如く、PFCT 法と LCT 法とで同程度の殺細胞効果を呈するパターンで、表 2 の HLA-A9 抗血清に対する反応が相当する。

第 2 ; LCT 法においては強陽性を示すが、PFCT 法では陰性又は弱陽性を呈するパターンで、表 2 では HLA-A26, Cw3 抗血清に対する反

表 2 PFCT 法(血小板)と LCT 法(リンパ球)による HLA-A, B, C タイピング結果の 1 例

Serum No.	HLA Specificity	LCT	PFCT
31-85	A24 + Aw23	8	++
31-36	A24	8	++
31-447	A24	8	++
31-298	A26 + A25	8*	+
MOT-6	A26	8	—
50-97	A26 + A28 + Aw33	8	—
31-407	B35	8	+
31-86	B35 + B15 + TS-1 + α	8	—
31-389	B35 + B15 + TS-1 + α	8	±
31-23	Bw61 + Bw48 + Bw47 + Bw60	8	++
31-168	Bw61 + Bw60 + B13 + Bw41 + Bw47	8	++
50-1052	Bw61 + B12	8	—
02-191	Bw6	8	±
31-57	Bw6	8	++
31-83	Bw6	8	++
DPA08	Bw6	8	+
50-127-2	Cw3	8	+
AY531	Cw3	8	—
02-201	Cw3	8*	—

Case Y.M. (Cell No. 540). HLA-A24, A26, B35, Bw61, Bw6, Cw3.

*抗血清は LCT 法で 2 倍以上の力価を示した

表 3 PFCT 法(血小板)と LCT 法(リンパ球)による HLA-A, B, C タイピングの比較

Cell No.	A locus	B locus		C locus
539 Ly.	A11, Aw33	B44 , B51	Bw4,	BL
Pl.	A11, Aw19	B12 , B51	Bw4,	BL
317 Ly.	A24,	B7 , Bw61	Bw6	Cw3
Pl.	A24,	B7 , B40	Bw6	N.D.
530 Ly.	A24, Aw33	B44 , Bw61	Bw4, Bw6	BL
Pl.	A24, Aw33	B44 , B40	Bw4, Bw6	BL
528 Ly.	A2 , A24	Bw67, Bw70	Bw6	Cw7
Pl.	A2 , A24	Bw67, N.D.	Bw6	N.D.
540 Ly.	A24, A26	B35 , Bw61	Bw6	Cw3
Pl.	A24, N.D.	B35 , B40	Bw6	N.D.
322 Ly.	A24,	Bw48, TS-1	Bw6	Cw3
Pl.	A24,	Bw48 N.D.	Bw6	N.D.
906 Ly.	A24, A26	Bw61, Bw62	Bw6	Cw3
Pl.	A24, A26	B40 , Bw62	Bw6	N.D.

Ly.: lymphocytes. Pl.: platelets. BL: Blank.
N.D.: not detected

応が相当する。

O 型血小板とリンパ球を用いて、実際に 7 例の HLA typing を行なった結果を表 3 に示した。HLA type は、使用した抗血清の半数以上が反応した場合に typing 可能とした。HLA-A, -B 抗原

表4 Bw61およびCw3抗血清に対するPFCT法(血小板)とLCT法(リンパ球)の反応性

Serum No.	HLA Specificity	530		317		906		540		322	
		Ly.	Pl.	Ly.	Pl.	Ly.	Pl.	Ly.	Pl.	Ly.	Pl.
31-23	Bw48+Bw47+Bw60+Bw61	8	+	8	+	8	+	8	++	1	-
31-168	Bw60+Bw61+B13+Bw41+Bw47	8	+	8	+	8	++	8	++	1	-
50-1052	Bw61+B12	8	-	8	-	6	-	8	-	1	-
01-220	Cw3	1	-	6	+	8	+	8	+	8	+
50-127-2	Cw3	1	-	8	-	8	-	8	+	8	+
AY531	Cw3	1	-	8	±	8	-	8	-	8	-
02-201	Cw3	1	-	8	-	6	-	8	-	8	-

においては、LCT法で判明した延べ34抗原中25抗原が、血小板を用いてもほぼ typing することができた。表4に示したリンパ球にてBw61と typing された抗原の場合のように、3本の抗血清のうち2本(JR31-23, JR31-168)は血小板でも反応するが、抗血清JR50-1052の如く血小板には全く反応しないものがあり、PFCT法では、B40グループのスプリット抗原を決定できなかった。また、HLA型 typing 不可能な抗原は、先に示したY.M.例のA26の他にBw70, TS-1等があった。リンパ球において、これらBw70, TS-1といった抗原はmono specificな抗血清がないため、複数の特異性を持つ抗血清との反応パターンから typing されるが、血小板においては、この解析は不可能であった。HLA-B抗原のsuper typicな抗原決定基であるBw4 Bw6は、血小板においても全例十分 typing 可能であった。HLA-C抗原は、リンパ球においてはCw3が4例(表4)、Cw7が1例 typing ができたが、血小板においては typing できなかった。

考 察

今回検討したPFCT法は、HLA typingと同様の手技を用いる血小板の補体障害性殺細胞試験であり、他の血小板を用いた抗体の検査法と比較し、以下のような特色を有すると考えられた。①リンパ球と同一手技で比較検討することが可能である。②従来の血小板を用いた血小板検査法(蛍光抗体法^{15)~17)}、MPHA法¹⁰⁾等)に比し、はるかに少量の被検血清(1 μ l)と血小板(5 $\times$ 10⁴)しか必要とせず、多数検体を処理することができる。このことが、今回血小板によるHLA typingを可能に

した。③しかしながら本法は、補体障害性殺細胞試験であるため、補体を結合しない抗体は検出できないという欠点をもっている。

本法における非特異的な陽性反応は、①使用するウサギ補体の種類、②被検血清の不完全な血清化によるフィブリンの析出、③血清希釈にRPMI 1640等を用いること等により起こると考えられ、上記項目を考慮することにより非特異反応は減少し、血小板抗体検査法として有用と考えられた。

血小板にABO型赤血球抗原が出現していることは既に知られているが²⁰⁾、PFCT法においても、抗A抗B抗体により血小板の殺細胞効果が認められた。このことは、血小板クロスマッチ・HLA typingにおいて、抗A抗B抗体によるfalse positiveが出ることを考慮すべきであることを示している。さらに、ABO異型血小板輸血の臨床効果については議論^{9)21)~25)}のあるところであるが、本成績は、血小板上への抗A抗B抗体の結合・補体の結合が生じ、血小板輸血臨床効果を減弱せしめる可能性を示唆している。

今回のO型健常人7名における、血小板によるHLA typingの検討では、HLA-A、-B抗原は一部を除きほぼ typing でき、特にBw4, Bw6抗原は全例 typing できた。しかし、HLA-C抗原は typing できなかった。PFCT法による血小板のHLA抗血清に対する反応が、リンパ球の反応と同一ではなかったこと、すなわちLCT法で明確に typing できた抗血清あるいはHLA型が、PFCT法で陰性~弱陽性を示した原因として、使用した抗血清がリンパ球を用いた typing に最も適したようにスクリーニングされた抗血清で、血

小板を用いた typing 用に選択された抗血清ではないことに加え、表 2, Y.M.例で示したように、抗血清 31-298 と 02-201 で LCT の力価が 2 倍以上でも PFCT が陰性であることより、HLA 型により、リンパ球と血小板ではその抗原分布量が異なり、血小板上の HLA 抗原が少ないために、陽性反応を示すのに十分な補体を結合させ得なかったことが考えられる。この様に、リンパ球と血小板とで HLA 抗原の出現の仕方が異なるという所見は、既に諸家により報告^{26)~28)}されており、HLA-C 抗原については、Stux らは我々と同様の結果を示している¹⁸⁾。また Mueller-Eckhardt らは、血小板上には HLA-C 抗原が存在するが、リンパ球と比べて少量であると報告している²⁹⁾。すなわち、LCT 法とは反応するが platelet radioimmune anti-IgG test (PRAT 法)³⁰⁾ platelet complement fixation test (PCFT 法)³¹⁾とは反応しない抗 HLA-C 血清の抗体濃度を高め、抗血清として使用したところ、PRAT 法の反応が陽性化する例を示している。HLA-A、-B 抗原については、Liebert らは、HLA-B12 抗原がリンパ球上ではその抗原量に個人的な差がみられないのに比し、血小板では量的に少ないものから多いものまで出現量にかなり差があり、特に A locus 抗原がその量的変化に関係しており、たとえば A11 を有する場合には B12 抗原が増加すると報告している。我々の検討でも、A locus に A11 を有する症例で B12 が血小板で typing できた。同一抗原で、血小板で typing できる場合とできない場合 (表 3 cell 906 と 540 における A26 抗原)があるのも、この様な他の locus の抗原の影響等により、各個人で血小板上の抗原量に差があるためとも推測される。Bw4, Bw6 抗原について Szatkowski ら²⁶⁾や Duquesnoy²⁸⁾らは、B locus 抗原の種類により血小板上の Bw4, Bw6 の抗原量に差がでくと報告している。この様に HLA 抗原の出現の仕方に違いがあることから、HLA 適合血小板輸血のためのドナー選択に際して、実際に血小板上に出現している HLA 型を基準にすることにより、より臨床的に有効な HLA 適合ドナーを選択できる可能性、すなわち血小板上に表われない HLA 型は考慮することな

く選択できる可能性を示している。事実 Lee ら³²⁾や荒木らは、HLA-B12 ミスマッチ輸血が有効であった症例を報告している。

従来の血小板抗体検査法は、被検血清や血小板が多量に必要で、同種血小板抗原である PI^{A1}, Ko^b, PI^{E1}, BaK^a等の同定がきわめて困難である。しかし本法は、LCT 法と併用し、PFCT 法陽性、LCT 法陰性反応として、血小板特異抗体を検出できる可能性があり、また PFCT 法に 2 次抗体を加えることにより、抗体検出感度を高める試みもなされている³³⁾。臨床的に本法によるクロスマッチと血小板輸血効果との関連につき検討中である²⁾。

文 献

- 1) Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S., et al.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *Am. Soc. Clin. Path.*, 69: 103-120, 1978.
- 2) 緒方完治, 南 三郎, 森島泰雄: 白血病患者における血小板輸注療法の効果に関する検討. *日血会誌*, 29: 428-432, 1983.
- 3) 柴田洋一: HLA 抗体と血小板特異抗体. *日血会誌*, 29: 437-439, 1983.
- 4) Yankee, R.A., Grumet, F.C. and Rogentine, G. N.: Platelet transfusion therapy. The selection of compatible platelet donors for refractory patients by lymphocyte HL-A typing. *N. Engl. J. Med.*, 281: 1203-1212, 1969.
- 5) Yankee, R.A., Graff, K.S., Dowling, R., et al.: Selection of unrelated compatible platelet donors by lymphocyte HL-A matching. *N. Engl. J. Med.*, 208: 760-764, 1973.
- 6) Lohrmann, H.P., Bull, M.I., Decter, J.A., et al.: Platelet transfusion from HL-A compatible unrelated donors to alloimmunized patients. *Ann. Intern. Med.*, 68: 643-648, 1974.
- 7) Herzig, R.H., Terasaki, P.I., Trapani, R.J., et al.: The relationship between donorrecipient lymphocytotoxicity and the transfusion response using HLA-matched platelet concentrates. *Transfusion*, 17: 657-661, 1977.
- 8) Duquesnoy, R.J., Filip, D.J., Rodey, G.E., et al.: Successful transfusion of platelets "mismatched" for HLA antigens to alloimmunized thrombocytopenic patients. *Am. J. Hematol.*, 2: 219-226, 1977.
- 9) 荒木千枝子, 佐藤周平, 真野能陳, 他: HLA match 血小板輸注効果について. *日血会誌*, 29: 491-493, 1983.

- 10) Shibata, Y., Juji, T., Nishizawa, Y., et al.: Detection of platelet antibodies by newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang.*, 41: 25—31, 1981.
- 11) Gudino, M. and Miller, W.V.: Application of the enzyme linked immunospecific assay (ELISA) for the detection of platelet antibodies. *Blood*, 57: 32—37, 1981.
- 12) Schiffer, C.A. and Young, V.: Detection of platelet antibodies using a micro-enzyme linked immunosorbent assay. *Blood*, 61: 311—317, 1983.
- 13) Kickler, T.S., Braine, H.G., Ness, P.M., et al.: A radiolabeled antiglobulin test for crossmatching platelet transfusion. *Blood*, 61: 238—242, 1983.
- 14) Ware, R., Reisner, E.G. and Rosse, W.F.: The use of radiolabeled and fluorescein-labeled antiglobulins in assays to predict platelet transfusion outcome. *Blood*, 63: 1245—1248, 1984.
- 15) von dem Borne, A.E.G. Kr., Verhegt, F.W.A., Oosterhof, F., et al.: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Brit. J. Haemat.*, 39: 195—207, 1978.
- 16) Brand, A., Van Leeuwen, A., Eernisse, J.G., et al.: Platelet transfusion therapy. Optimal donor selection with a combination of lymphocytotoxicity and platelet fluorescence tests. *Blood*, 51: 781—788, 1978.
- 17) Myers, T.J., Byung, K.K., Steiner, M., et al.: Selection of donor platelet for alloimmunized patients using a platelet-associated IgG assay. *Blood*, 58: 444—450, 1981.
- 18) Stux, S., Pitman, T., Dubey, D., et al.: Platelet HLA typing and cross-matching by a direct microcytotoxic assay. *Vox Sang.*, 39: 16—21, 1980.
- 19) Lizak, G.E. and Grumet, F.C.: A new micro-method for the in vitro detection of anti-platelet antibodies: C-FDA thrombocytotoxicity. *Human Immunol.*, 1: 87—96, 1980.
- 20) Kelton, J.G., Hamid, C., Aker, S., et al.: The amount of blood group A substance on platelets is proportional to the amount in the plasma. *Blood*, 59: 980—985, 1982.
- 21) Skinnider, L.F. and Taylor, D.: The in vitro effect of anti-A and anti-AB alloantibodies on group A and AB platelet. *Transfusion*, 21: 706—708, 1981.
- 22) Tosato, G., Applebaum, F.R. and Deisseroth, A. B.: HLA-matched platelet transfusion therapy of severe aplastic anemia. *Blood*, 52: 846—854, 1978.
- 23) Aster, R.H.: Effect of anticoagulant and ABO incompatibility on recovery of transfused human platelets. *Blood*, 26: 732—743, 1965.
- 24) McElligott, M.C., McFarland, J.G., Anderson, A.J., et al.: ABO incompatibility in HLA-matched platelet transfusion. *Transfusion*, 64(Suppl.): 228a, 1984.
- 25) McElligott, M.C., Menitove, J.E., Duquesnoy, R. J., et al.: Effect of HLA Bw4/Bw6 compatibility on platelet transfusion responses of refractory thrombocytopenic patients. *Blood*, 59: 971—975, 1982.
- 26) Szatkowski, N.S. and Aster, R.H.: HLA antigens of platelets IV. Influence of "Private" HLA-B locus specificities on the expression of Bw4 and Bw6 on human platelets. *Tissue Antigen*, 15: 361—368, 1980.
- 27) Liebert, M. and Aster, R.H.: Expression of HLA-B12 on platelets, on lymphocytes and in serum: A quantitative study. *Tissue Antigens*, 9: 199—208, 1977.
- 28) Duquesnoy, R., Testin, J. and Aster, R.H.: Variable expression of W4 and W6 on platelets: possible relevance to platelet transfusion therapy of alloimmunized thrombocytopenic patients. *Transplant. Proc.*, 9: 1829—1831, 1977.
- 29) Mueller-Eckhardt, G., Hauck, M., Kayser, W., et al.: HLA-C antigens on platelets. *Tissue Antigens*, 16: 91—94, 1980.
- 30) Mueller-Eckhardt, C., Schlz, G., Sauer, K.H., et al.: Studies on the platelet radioactive anti-immunoglobulin test. *J. Immunol. Methods*, 19: 1—11, 1971.
- 31) Colombani, J., D'Amato, J., Gabb, B., et al.: International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C Fix.). *Transplant. Proc.*, 3: 121—126, 1971.
- 32) Lee, E.J. and Schiffer, C.A.: Management of platelet alloimmunization. I.: McEathery, L.J., ed., Immunologic aspects of platelet transfusion. American Association of Blood Banks, Virginia, 1985, 3—8.
- 33) Lizac, G.E. and Grumet, F.C.: Detection of platelet antibodies by anti-kappa light chain facilitation of C-FDA (KC-FDA) thrombocytotoxicity. *Human Immunol.*, 8: 265—271, 1983.