Journal of the Japan Society of Blood Transfuston 33(6) : 745—749, 1987

HLA モノクローナル抗体による血小板の HLA 抗原の解析
—酵素抗体法による HLA-A, B interlocus 抗原を中心に—

能勢　義介　　荒木　延夫　　山平　広治　　清水　準也
兵庫県赤十字血液センター
佐藤　　薫　　中辻　孝子　　辻　　公美
東海大学医学部移植学教室
小　野　　一　　男
兵庫県衛生研究所微生物

（昭和62年 6 月22日受付）

ANALYSES OF HLA ANTIGENS, ESPECIALLY HLA-A AND -B INTERLOCUS ANTIGEN, ON PLATELETS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES AND ELISA ASSAY

Yoshisuke Nose, Nobuo Araki, Hiroji Yamahira and Junya Shimizu
Hyogo Red Cross Blood Center
Kaoru Sato, Takako Nakatsuji and Kimiyoshi Tsuji
Department of Transplantation, Tokai University School of Medicine
Kazuo Ono
Division of Microbiology, Public Health Institute of Hyogo Prefecture

HLA class I monomorphic monoclonal antibody Yu-3-20A, HLA class II monomorphic monoclonal antibody TOK39-4, and HLA-A and -B interlocus monoclonal antibody TOK45-3A were used in the ELISA assay of platelets. We used 9 samples from the A24-negative and Bw4-negative, 15 samples from the A24-positive, 10 samples from the Bw4-positive, and 18 samples from the A24-positive and Bw4-positive individuals. The monoclonal antibody Yu-3-20A showed the identical positive reactivity with all of the platelets used. The monoclonal antibody TOK39-4 showed no reactivity with any of the platelets. The monoclonal antibody TOK45-3A showed positive reaction with an O.D. value of 0.741 ± 0.271 with 25 samples of the platelets possessing either A24 or Bw4. It also showed reaction with an O.D. value of 1.535 ± 0.253 with the platelets possessing both of the A24 and Bw4. This results indicate that the reactivity with HLA-A and -B interlocus monoclonal antibody correlates with the HLA phenotype of platelets.

はじめに

血小板膜に血液型[1]，HLA[2]，血小板特異抗原[3]等の同種抗原が存在することはすでに知られており，特に血液型の ABO 式抗原[4]，HLA 抗原[5]は血漿中の遊離抗原が血小板に吸着したものと考えられている．

血小板の HLA 抗原は，HLA クラス I 抗原の HLA-A, B, C 抗原が存在し，HLA 特異性により抗原量に差があることが推測されている．

そこで今回，HLA-A と B 抗原に association する HLA-A, B interlocus モノクローナル抗体（Moab）を使用し，血小板膜の HLA-A, B interlocus 抗原について検討した．

方　法

HLA Moab は，当センターで作製した HLA-9 と Bw4に association する HLA-A, B interlocus Moab の TOK45-3A[6]，HLA クラス I monomorphic Moab の Yu3-20A[7]，HLA クラス II monomorphic Moab の TOK39-4[6]の 3 種を使用した．血小板は A24, Bw4陰性血小板 9 種，A24陽性血小

表1　血小板のHLA-A, B, C抗原（n=52）

A24，Bw4陰性
n=9

cell No.	A	B	Bw4/Bw6	Cw
7	1,2	TS-1,-	6,6	1,3
8	11,31	22,61	6,6	1,3
13	11,-	39,60	6,6	7,-
18	2,31	61,-	6,6	-,-
20	2,31	35,60	6,6	3,-
26	2,-	54,62	6,6	1,3
27	2,-	46,60	6,6	3,X46
49	2,11	46,54	6,6	X46,-
57	26,-	35,-	6,6	3,-

A24陽性
n=15

cell No.	A		B	Bw4/Bw6	Cw
2	2,	24	40,-	6,6	-,-
12	2,	24	62,TS-1	6,6	3,-
15	11,	24	39,48	6,6	-,-
23	2,	24	35,62	6,6	3,-
24	2,	24	35,46	6,6	3,X46
32	26,	24	39,54	6,6	1,7
37	2,	24	55,61	6,6	1,3
44	2,	24	60,61	6,6	3,7
45	2,	24	60,61	6,6	3,7
53	2,	24	46,55	6,6	X46,-
54	2,	24	46,54	6,6	X46,-
58	2,	24	48,54	6,6	1,3
60	2,	24	48,-	6,6	3,4
61	2,	24	48,-	6,6	3,4
64	2,	24	22,62	6,6	1,3

A24，Bw4陽性
n=10

cell No.	A		B	Bw4/Bw6	Cw
1	2,	24	52,55	4, 6	1,-
4	26,	24	52,54	4, 6	1,-
19	31,	24	52,61	4, 6	3,-
25	2,	24	27,54	4, 6	1,-
28	31,	24	51,60	4, 6	3,-
46	33,	24	44,54	4, 6	-,-
62	26,	24	52,35	4, 6	-,-
51	2,	24	51,7	4, 6	7,-
56	2,	24	52,35	4, 6	3,-
59	2,	24	51,-	4, 6	4,-

Bw4陽性
n=10

9	2,11	51,54	4,	6	1,-
10	3,11	44,67	4,	6	-,-
11	11,33	44,61	4,	6	-,-
30	2,33	39,44	4,	6	7,-
34	2,26	51,62	4,	6	3,-
35	26,33	44,61	4,	6	3,-
43	1,2	37,61	4,	6	3,-
47	26,33	44,61	4,	6	3,-
50	2,31	51,39	4,	6	7,-
65	26,33	44,54	4,	6	1,-

A24，Bw4，Bw4陽性
or
A24，A24，Bw4陽性
n=8

6	2,	24	5,-	4, 4	-,-
17	3,	24	51,44	4, 4	-,-
33	2,	24	13,52	4, 4	3,-
48	2,	24	37,44	4, 4	6,-
63	31,	24	5,-	4, 4	3,-
36	-,	24	44,52	4, 4	-,-
39	24,	24	7,52	4, 6	7,-
42	24,	24	52,60	4, 6	7,-

板15種，Bw4陽性血小板10種，A24とBw4陽性血小板10種，そしてA24ホモ接合体とBw4陽性血小板2種，A24とBw4ホモ接合体陽性血小板6種の計52種を使用した（表1）.

血小板の分離方法は，全血にACD液を7：1で混合し400×gで10分間遠心後の上清を，さらに1,100×g 10分間遠心し沈査の血小板をリン酸バッファ溶液（PBS）で3回洗浄後使用した.

酵素抗体法は[8]，96穴フラットプレートの各穴に0.01%ポリエルリジンPBSを50μl加え，室温60分間で各穴のポリエルリジン処理をした．PBSで2回洗浄後採血2時間以内の血小板5×10^6コ/50μlを各穴に加え，1,500rpm 10分間遠心しさらに室温で10分間静置した．0.025%グルタルアルデヒドPBSを各穴の上段まで満たし，室温20分間で血小板の固定をした．PBSで3回洗浄後0.1%フェニルヒドラジンPBSを各穴の上段まで満たし，室温60分間で血小板の内因性ペルオキシダーゼ反応を停止させた．PBSで2回洗浄後1%Bovine serum albumin（BSA）PBSを各穴の上段まで満たし4℃にて18時間静置した．0.1%BSA-PBSで3回洗浄後Moab 100μlを加え，37℃60分間反応させた．0.1%BSA-PBSで3回洗浄後，Cappel社のペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス免疫グロブリン$F(ab')_2$ 400倍稀釈を100μl各穴に加え，室温で120分間反応させた．0.1%BSA-PBSで4回洗浄後，基質溶液（O-フェニレンジアミン＋クエン酸リン酸バッファ＋H_2O_2）を100μl加え室温で10分反応後，2M H_2SO_4を10μl加え反応を停止させた．そしてSLT-EAR400にて490nmで吸光度（OD）を測定した．反応判定は，Moabとの反応から陰性コントロール（20%FBS-RPMI1640）で引いたOD値で検討した.

結　果

TOK45-3A（HLA-A, B interlocus），Yu3-20A（HLAクラスI monomorphic），TOK39-4

(HLA クラスII　monomorphic) 3種のHLA Moabと血小板の反応性を酵素抗体法により解析するために，HLA Moabの濃度を検討した．HLA Moab 10倍濃度でTOK45-3Aが1.831，Yu3-20Aが1.032の1.0以上のOD値を示し，以後の実験はすべて10倍濃度でおこなった．

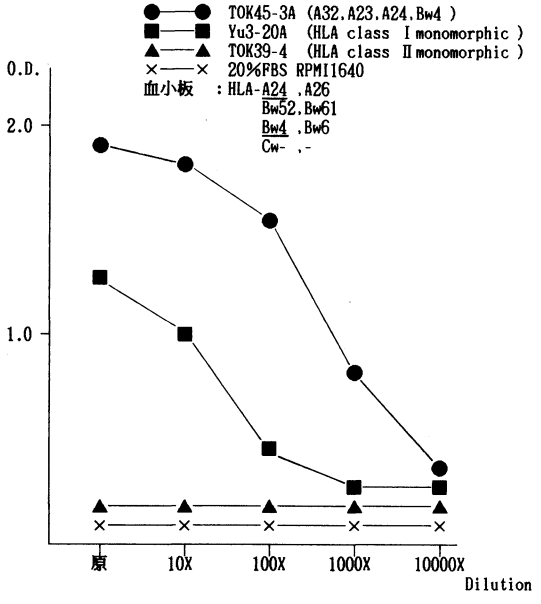

図1　酵素抗体法によるMoab濃度と血小板の反応性

Yu3-20A，TOK39-4 MoabとA24またはBw4陽性血小板，A24とBw4陽性血小板の酵素抗体法による反応性を図2に示した．Yu3-20A Moabは，A24またはBw4陽性血小板の18種が0.819±0.320，A24とBw4陽性血小板の13種が0.795±0.319の反応を示し，HLA クラスⅠmonomorphic Moabでは差は認めなかった．HLA クラスII monomorphic MoabのTOK 39-4は，A24またはBw4陽性血小板の18種が，0.071±0.034，A24とBw4陽性血小板13種が0.060±0.036の陰性反応を示し，血小板にHLA クラスII抗原の存在を否定した．

次に，HLA-A，B interlocus MoabのTOK 45-3AとA24とBw4陰性血小板，A24またはBw4陽性血小板，A24とBw4陽性血小板の反応性を酵素抗体法で検討した(図3)．A24とBw4陽性血小板の9種は0.077±0.65の陰性反応を示した．そしてA24またはBw4陽性血小板の25種は0.741±0.271，A24とBw4陽性血小板の18種は1.535±0.253を示し，A24とBw4の両者が陽性の血小板は，A24またはBw4のいずれか陽性の血小板に対し2倍のOD値を示し，HLA phenotypeと反応性に相関を認めた．

さらにA24陽性血小板，Bw4陽性血小板，A24と

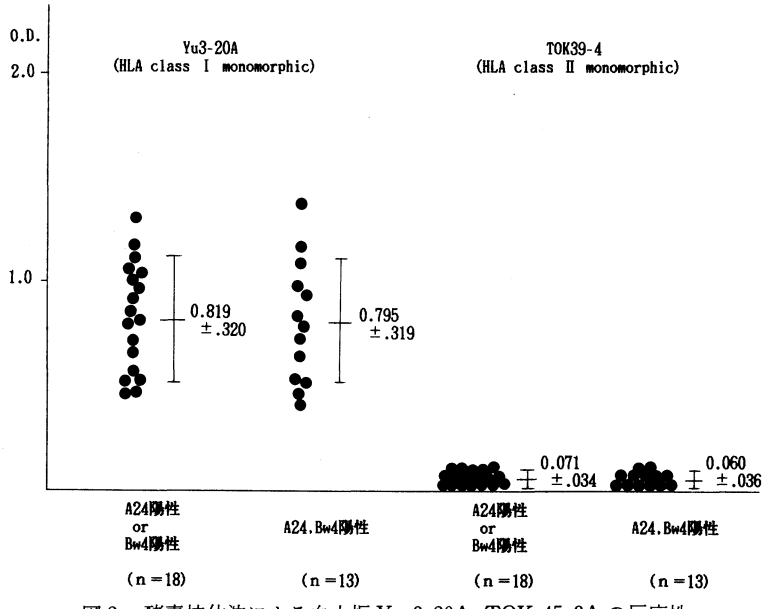

図2　酵素抗体法による血小板Yu 3-20A，TOK 45-3Aの反応性

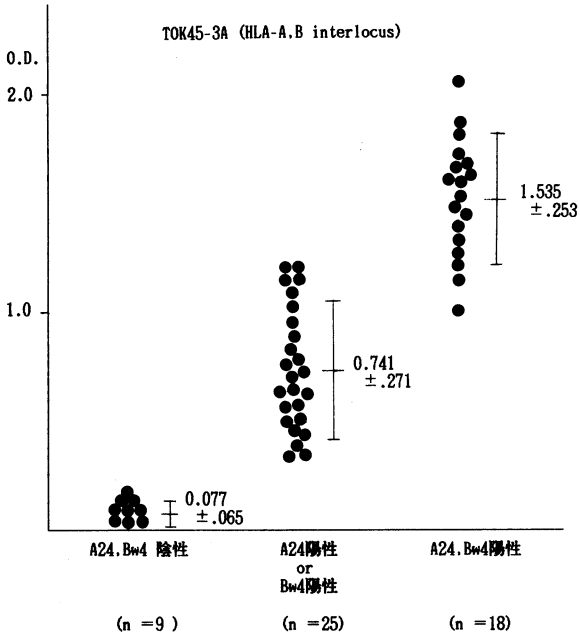

図3 酵素抗体法による血小板とTOK 45-3Aの反応性(1)

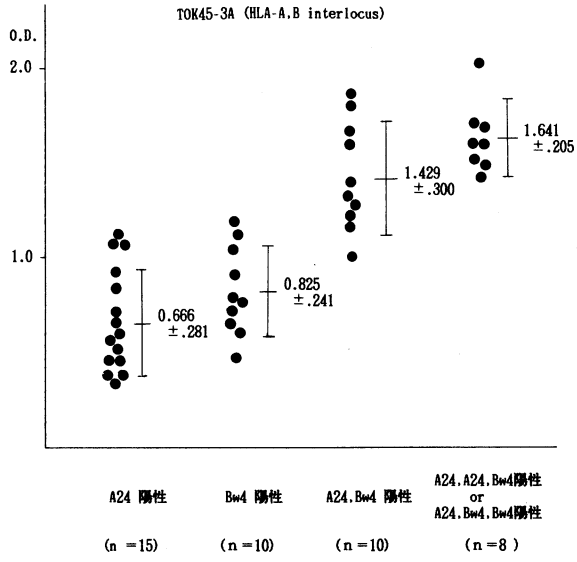

図4 酵素抗体法による血小板とTOK 45-3Aの反応性(2)

Bw4陽性血小板，A24ホモ接合体とBw4陽性もしくはA24とBw4ホモ接合体陽性血小板にて，HLA-A, B抗原のHLA phenotypeによる反応性を検討した(図4)．そしてA24陽性血小板の15種が0.666±0.281，Bw4陽性血小板の10種が0.825±0.241，A24とBw4陽性血小板の10種が1.429±0.300，A24ホモ接合体とBw4陽性血小板または，A24とBw4ホモ接合体陽性血小板の8種が1.641±0.205の反応性を示し，Bw4陽性血小板はA24陽性血小板に対し，またA24ホモ接合体とBw4もしくはA24とBw4ホモ接合体陽性血小板は，A24とBw4陽性血小板に対し反応性が高い傾向を示した．

考　察

HLA-AとB抗原にassociationするHLA-A, B interlocus抗原は，A32とB27，Aw19とB40，Bw41，Aw33とB8，A9とBw4，A2とB16，A2とB17等が報告されている[9]．

我々は独自に作製したA9とBw4にassociationするHLA-A, B interlocus MoabのTOK 45-3Aを報告した[6]．さらに第6回日本赤十字血液センターHLAワークショップで，TOK45-3AがA32にも反応することを確認した[10]．そしてTOK45-3Aと血小板のフローサイトメトリー解析より，HLA-A, B interlocus抗原が血小板に存在することを報告した[11]．そして今回酵素抗体法により，血小板のHLA-A, B interlocus抗原の抗原量を，TOK45-3Aと血小板の反応性より検討した．そしてA24またはBw4を単独に有する血小板に対し，A24とBw4の両者を有した血小板は2倍の反応を示し，血小板が有するHLA phenotypeと反応性が相関する結果を得た．このことは，TOK 45-3AがA24とBw4に共通に存在するエピトープと反応するMoabであることを強く示唆したものと考える．

血小板膜のHLA抗原は，血漿中の遊離HLA抗原が吸着したものと考えられており，HLA特異性により遊離HLA抗原の量に差があることがわかっている[12]．特にA9は血漿中のHLA抗原が多いとの報告から，A9と交叉するHLA-A, B interlocus抗原も血漿中に多く存在し，かつ血小板膜にも多く吸着されていることが予想され，そして今回の酵素抗体法で十分測定可能であった．

血漿中のHLA抗原の生物学的意義は不明であるが，成分輸血特に血小板輸血で，血小板膜の血漿中の吸着した不適合HLA抗原により，患者血

清中にHLA抗体が産生され臨床的に血小板輸血無効状態に陥り，これらの防止，改善をおこなうためにも血小板膜のHLA抗原解析は意義がある．そして今回，血小板が有するHLA phenotypeとHLA抗体との反応に相関を示したことは，血小板が反応するHLA抗原を1種有したときより，2種有したときの方がより高い反応がおきることを示したものである．特に2種以上の特異性を有したA9とBw4にassociationするHLA-A, B interlocus抗体が血小板成分輸血で産生されることは十分に予想され，当センターでもこれらの抗体により，血小板輸血無効状態に陥った患者2例を経験している．

今後血小板成分輸血に際し，HLA-A, B interlocus抗原を考慮したHLA適合血小板輸血の実施が重要と考える．

結　語

HLA-A9とBw4にassociationするHLA-A, B interlocus Moab（TOK45-3A）を使用し，酵素抗体法により血小板膜のHLA-A, B interlocus抗原を解析した．TOK45-3AとA24またはBw4陽性血小板の25種が0.741±0.271を示したのに対し，A24とBw4陽性血小板の18種が1.535±0.253の2倍のOD値を示し，血小板が有したHLA phenotypeと反応性に相関を認めた．

文　献

1) Pirofsky, B. and Rosner, E.R.: DTT test: A new method to differentiate IgM and IgG erythrocyte antibodies. Vox Sang., 27: 480—488, 1974.
2) van Leeuwen, A., Eernisse, J.G. and van Rood, J.J.: A new leucocyte group five. Vox Sang., 9: 431—446, 1964.
3) van Loghem, J.J., Dorfmeijer, N., van der Hart, M. and Schreuder, F.: Serological and genetical studies on a platelet antigen(Zw). Vox Sang., 4: 161—169, 1959.
4) Lewis, J.H., Draude, J. and Kuhns, W.J.: Coating of "O" platelets with A and B group substances. Vox Sang., 5: 434—441, 1960.
5) Lalezari, P. and Driscoll, A.M.: Ability of thrombcytes to acquire HLA specificity from plasma. Blood, 59: 167—170, 1982.
6) 能勢義介，荒木延夫，山平広治，今井英世，佐藤薫，中辻孝子，辻　公美，小野一男：HLA-A9(A23, A24)とBw4にassociationするHLA-A, B interlocusモノクロナール抗体について．日本輸血学会雑誌，33：263—267，1987.
7) 能勢義介，荒木延夫，山平広治，今井英世，小林信昌，渡辺克仁，小野一男：血小板を免疫原としたモノクロナール抗体による血小板膜抗原の解析—HLA，血小板，赤血球モノクロナール抗体の作製—．血液事業，9：431—436，1986.
8) 岩崎辰夫，安東民衛，市川かおる，保井孝太郎：単クローン抗体，ハイブリドーマとELISA．講談社，東京，1984.
9) Richiardi, P., Cambon-Thomsen, A. and Menicucci, A.: HLA-A, B Interlous Specificities. Histocompatibility Testing 1984, ed. by Albert, E.D., Spinger-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1984.
10) 荒木延夫，能勢義介，山平広治，今井英世：HLA class Iモノクロナール抗体の解析，第6回日本赤十字血液センターHLAワークショップ報告．血液事業，印刷中.
11) Nose, Y., Araki, N., Yamahira, H., Imai, H., Sato, K., Nakatsuji, T. and Tsuji, K.: Study on HLA-A and B interlocus specificity (A9 and Bw4) detected by monoclonal antibody. HLA in Asia-Oceania 1986, ed. by Aizawa, M., Hokkaido University, Sapporo, 1986.
12) 辻　公美，渋谷恵子，井上博雄：血漿中遊離HLA抗原の測定方法とその生物学的意義．移植，14：171—176，1979.