本邦第一例の抗 HPA-2a の検出と性状及び HPA-2抗原系頻度

荒木 延夫¹⁾ 成瀬 妙子¹⁾ 坊池 義浩¹⁾
清水 準也¹⁾ 能勢 義介¹⁾ 谷協 清助²⁾
原 宏²⁾ 金 信子³⁾ 柴田 洋一³⁾

兵庫県赤十字血液センター¹⁾

兵庫医科大学病院輸血部²⁾

虎の門病院輸血部³⁾

(平成3年8月3日受付)

FIRST CASE WITH ANTI-HPA-2a AND HPA-2 PHENOTYPE FREQUENCY IN JAPANESE

Nobuo Araki¹⁾, Taeko Naruse¹⁾, Yoshihiro Bouike¹⁾, Junya Shimizu¹⁾, Yoshisuke Nose¹⁾,
Kiyosuke Taniwaki²⁾, Hiroshi Hara²⁾, Nobuko Kim³⁾ and Yoichi Shibata³⁾

¹⁾Hyogo Red Cross Blood Center

²⁾Division of Blood Transfusion, Hyogo College of Medicine

³⁾Department of Immunohaematology, Toranomon Hospital

Anti-HPA-2a (Miy), IgG class, was detected in a woman with platelet-transfusion refractoriness. The reaction pattern was the same as that of original anti-HPA-2a (reported by van der Weerdt) against 65 platelet panels by the MPHA (mixed passive haemagglutination) test ($r=1.0$). This is the first report on anti-HPA-2a in Japan. The dosage effect was observed, thus the titer of Miy serum was 1:64 against heterozygous for HPA-2a and 1:256 against homozygous for HPA-2a. We examined 500 Japanese voluntary blood donors using anti-HPA-2a and anti-HPA-2b. The phenotype frequencies were for HPA-2a as 98.2% and for HPA-2b as 26.6%. We suppose anti-HPA-2a antibody plays an important role in platelet transfusion refractoriness like anti-HPA-2b antibody.

はじめに

HPA-2¹⁾ (Ko^{2,3)}, Sib⁴⁾) 血小板同種抗原系は、1962年、Van der Weerdt ら^{2,3)}により初めて報告された抗原系で、HPA-2a (Ko^{b)}) と対立抗原の HPA-2b (Ko^{a)}) がある。van der Weerdt らが検出した抗体はいずれも IgM 抗体で、その抗原頻度¹⁾は欧米人で HPA-2a が99.3%、HPA-2b が14.6%の頻度と報告されている。その後、30年を経て同様の抗血清の報告は殆どなく HPA-2の臨床的意義や日本人の頻度も不明のままであったが、1989年、本邦において Saji ら⁴⁾が頻回血小板輸血患者から IgG 型の抗 HPA-2b を検出した。今回我々は、同じく頻回血小板輸血患者から抗 HPA-2a を本邦において最初に検出した。そこで、抗 HPA-2a の検出経過並びに血清学的性状、及び

我々が既に報告した抗 HPA-2b⁵⁾を用いた日本人の HPA-2 抗原系頻度そして抗 HPA-2a 保有患者への HPA-2a 抗原陽性血小板輸血を施行した臨床例についての検討を行った。

対象と方法

抗 HPA-2a は、我々が本邦において最初に検出した日本人女性 Miy の血清である。Miy は30歳再生不良性貧血の患者で150単位の血小板輸血により血小板輸血無効状態に陥り、血清中に抗 HPA-2a 及び抗 HLA (multispecific) を認めた。Miy の血液型は A 型、Rho+, HLA 型は A2, A11, B35, Bw67, Bw6, Cw3, Cw7, DR2, DR4.1, DRw53, DQw1, DQw4を示した。

抗 HPA-2a の検出とその血清学的性状の検討は Miy 血清の原液及び64倍希釈血清と我々が既

表1 Miy 血清の血小板同種抗原持異性(MPHA 法)

panel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
HPA-1a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(使用抗原)(指示血球)
HPA-3a	0	+	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	血小板 抗ヒト IgG
HPA-4a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HPA-4b	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Nak ^a	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HPA-2b	0	0	0	+	+	0	0	0	+	0	0	+	0	+	0	0	
Miy (×1)	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-	2+	2+	2+	2+	血小板 抗ヒト IgG
Miy (×1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	血小板 抗ヒト IgM
Miy (×64)	2+	2+	2+	W+	1+	2+	2+	2+	1+	2+	2+	-	2+	1+	2+	2+	血小板 抗ヒト IgG
Ura (×64)	-	-	-	2+	2+	-	-	-	2+	-	-	2+	-	2+	-	-	血小板 抗ヒト IgG
Miy (×1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	抽出抗原 抗ヒト IgG
Ura (×64)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	抽出抗原 抗ヒト IgG

に報告した Ura 血清⁵⁾(抗 HPA-2b)に加え表 1 に示した既知血小板特異抗原(HPA-1a⁶⁾, HPA-2b, HPA-3a⁷⁾, HPA-4a⁸⁾, HPA-4b⁹⁾, Nak^{a10)}O 型クロロキン処理¹¹⁾, 血小板パネル16種(No. 1~16)と上記血小板パネルより抽出した O 型クロロキン処理血小板抽出抗原¹²⁾¹³⁾パネル16種を用いて, 混合受身凝集法¹⁴⁾(mixed passive haemagglutination test: MPHA 法)にて実施した。指示血球は抗ヒト IgG セル及び IgM セルを使用した。さらに Miy 血清を共著者の柴田が入手した van der Weerd¹⁵⁾ 検出のオリジナル抗 HPA-2a³⁾を対照として上記 No. 1~16の O 型クロロキン処理血小板パネル16種と既知 HPA-2a 抗原の O 型クロロキン処理血小板パネル7種(No. 17, 19, 20, 21, 22, 23: HPA-2a+, No. 18: HPA-2a-)及びランダム O 型クロロキン処理血小板パネル42種の計65種を用いて MPHA 法にて解析した。Miy 血清の抗 HPA-2a 抗体価の測定は既知 HPA-2 抗原系 O 型クロロキン処理血小板パネル HPA-2 (a+b-) ホモ型の No. 1, 2, 3, 6, 7 の5種, HPA-2(a+b+)ヘテロ型の No. 4, 5, 9 の3種の計8種を用いて MPHA 法にて実施した。

日本人の HPA-2 抗原系頻度(HPA-2a, HPA-2b)は O 型献血者500名を Miy 血清及び Ura 血清を使用し, MPHA 法にて検討した。

抗 HPA-2a 保有患者への HPA-2a 抗原陽性血小板輸血を施行した臨床例は Miy について検討した。その臨床効果は輸血24時間後の補正血小板増加数¹³⁾(corrected platelet increment: CPI 値)を指標とし, CPI 値が0.6以上を臨床的に有効とした。

結 果

1. 抗 HPA-2a の検出とその血清学的性状

Miy 血清(原液)は, 既知血小板特異抗原 O 型クロロキン処理血小板パネル No. 1~16の16種中15種が指示血球抗ヒト IgG セルに2+の強陽性を示し, 1種が陰性を示した。また, 指示血球抗ヒト IgM セルとの反応は16種すべてが陰性を示した。Miy 血清と既知血小板特異抗原パネルとの反応はいずれの既知血小板特異抗原とも相関を示さなかった(表1)。Miy 血清の抗体価は上記 O 型クロロキン処理血小板パネルの No. 1, 2, 3, 6 の4種が256~512倍を示し, No. 4, 5 の2種が64倍の抗体価を示した。No. 1, 2, 3, 6 は HPA-2b-,

No. 4, 5は HPA-2b+で Miy 血清は抗 HPA-2a であることが予測された。64倍希釈の Miy 血清を上記 O 型クロロキン処理血小板パネル16種に反応させたところ、HPA-2b-の11種には 2 +の強陽性反応を示し、HPA-2b+の 5 種には 1 +〜の弱陽性または陰性反応を示した(表 1)。16種の同血小板由来の O 型クロロキン処理血小板抽出抗原パネルと Miy 血清及び Ura 血清(抗 HPA-2 b)の反応は指示血球抗ヒト IgG, IgM 共に16種すべてに陰性を示した(表 1)。Ura 血清が O 型クロロキン処理血小板抽出抗原パネル16種すべてに陰性を示したことより、血小板抽出抗原中には HPA-2抗原系が存在する可能性は少ないと考えられているので、Miy 血清の抗 HPA-2a の可能性を示唆した。そこで、Miy 血清をオリジナル抗 HPA-2a を対照として上記の O 型クロロキン処理血小板パネル16種と既知 HPA-2a 抗原の O 型クロロキン処理血小板パネル No. 17~23の 7 種(HPA-2a+ 6 種、HPA-2a- 1 種)とランダム O 型クロロキン処理血小板パネル42種の計65種を用いて解析した。Miy 血清とオリジナル抗 HPA-2a は65種中62種に陽性、3 種に陰性を示し、1 : 1 の相関を示した(写真 1, 表 2)。このことより、Miy 血清は抗 HPA-2a であることが確認された。O 型クロロキン処理血小板パネル 8 種を用いた MPFA 法による Miy 血清の抗体価の測定は HPA-2 (a+b-) ホモ型の No. 1, 2, 3, 6, 7 の 5 種が256~512倍の抗体価を示したのに対し、

HPA-2 (a+b+) ヘテロ型の No. 4, 5, 9の 3 種が64倍の抗体価を示した(表 3)。このことより、HPA-2a ホモ、ヘテロの反応性は明らかな量的効果を示すことが確認された。

2. 日本人の HPA-2抗原系頻度

Miy 血清(抗 HPA-2a)は、O 型献血者500名中 491名(98.2%)、Ura 血清(抗 HPA-2b)は、500 各中133名(26.6%)の陽性を示し、その表現型は HPA-2 (a+b-) 367名(73.4%)、HPA-2 (a+b+) 124名(24.8%)、HPA-2 (a-b+) 9 名(1.8%)、HPA-2 (a-b-) 0 名(0 %)を示した。この結果、遺伝子頻度は HPA-2a が0.866、HPA-2b が0.143と計算された(表 4)。

3. 輸血後臨床経過

患者 Miy は1977年、再生不良性貧血発症のため、国立某病院入院。1988年より血小板輸血が必要となり、150単位の濃厚血小板輸血を実施したところ、血小板輸血無効状態に陥った。同年、兵庫医科大学病院に骨髓移植のため、転院。当センターに HLA 適合血小板製剤の依頼があった。LCT 法¹⁵⁾、AHG-LCT 法(κ , λ)¹⁶⁾を用いて成分献血登録者70名との交差試験を実施したところ、70名中 66名が陽性(LCT 法力価64倍、AHG-LCT 法力価

表 3 Miy 血清の HPA-2a 抗原に対する抗体価 (MPHA 法)

panel	×32	×64	×128	×256	×512	×1024
1 HPA-2(a+b-)	2+	2+	2+	1+	-	-
2 HPA-2(a+b-)	2+	2+	2+	1+	W+	-
3 HPA-2(a+b-)	2+	2+	2+	1+	-	-
6 HPA-2(a+b-)	2+	2+	2+	1+	W+	-
7 HPA-2(a+b-)	2+	2+	2+	1+	1+	±
4 HPA-2(a+b+)	1+	W+	-	-	-	-
5 HPA-2(a+b+)	2+	1+	-	-	-	-
9 HPA-2(a+b+)	2+	1+	-	-	-	-

表 4 HPA-2抗原系の抗原頻度、遺伝子頻度 及び表現型頻度(N=500)

抗原	抗原頻度 %	遺伝子頻度	表現型	表現型頻度 %
HPA-2a	98.2	0.866	HPA-2(a+b-)	73.4
HPA-2b	26.6	0.143	HPA-2(a+b+)	24.8
			HPA-2(a-b+)	1.8
			HPA-2(a-b-)	0

写真 1 Miy 血清と抗 HPA-2a の相関 (MPHA 法)

表 2 Miy 血清と抗 HPA-2a の相関(MPHA 法)

		抗 HPA-2a	
		+	-
Miy	+	62	0
	-	0	3

R=1.00

図1 患者(Miy)とHLA適合血小板の臨床効果

κ : 128倍, λ : 128倍)を示した。そこで, LCT法, AHG-LCT法(κ , λ)共に陰性の4名の供血者(適合度¹⁷⁾: A適合1名, B2U適合2名, B1X適合1名)を選び, 骨髄移植前に1回, 骨髄移植後に3回の計4回供給し, 輸血した。しかし, 24時間後のCPI値は1回目が-0.43, 2回目が0.14, 3回目が-0.21, 4回目が0と効を奏さず, また1回目が吐き気, 2回目が倦怠感, 3回目が悪寒, 発熱の副作用を伴い患者は移植57日目に死亡した。そこで, Miy血清と4名の供血者をMPHA法を用いて交差適合試験を実施したところ4名すべてに指示血球抗ヒトIgGセルが陽性, IgMセルが陰性を示した(図1)。

考 察

HPA-2抗原系は1962年, van der Weerdtら²⁾が頻回輸血患者の血清を血小板凝集法にて抗体スクリーニングした結果, オランダ人の21%に反応するIgM型の抗体を発見し, この抗体によって同定される抗原をKo^a抗原と命名した。1965年同じく, van der Weerdt³⁾は頻回輸血患者血清中よりKo^aと対立する遺伝子で規定されるKo^b抗原に対するIgM型の抗体を発見した。Ko系は, 1990年, ICSH, ISBTのWorking Party on Platelet Serology¹⁾のメンバーによってKo^aがHPA-2b, Ko^bがHPA-2aと命名された。1989年, 本邦に於いてSajiら⁴⁾がHLA適合血小板輸血無効患者

からIgG型の抗HPA-2bをMPHA法及び血小板間蛍光抗体法¹⁸⁾(platelet suspension immunofluorescence test: PSIFT法)を用いて検出し, 抗Sib^aと命名した。三谷らもIgM型の抗HPA-2bを同様の患者からPSIFT法を用いて検出し, 抗Koz^aと命名していた。1988年の第1回日本血小板型ワークショップに於いて抗Sib^aと抗Koz^aは同一の特異性であることが確認された¹⁹⁾。さらに, von der Borneによって抗Sib^aは抗Ko^aと同一であることが確認された²⁰⁾。その後, 本邦において抗HPA-2bは血小板輸血無効患者から35例, 女性献血者から4例検出されたことが報告された²¹⁾。今回, 我々は, 頻回の血小板輸血によりHLA抗体が産生されたため, HLA適合血小板輸血を施行したにも係わらず, 効を奏さなかった患者血清から原因と考えられる本邦第1例目の抗HPA-2aを検出した。我々が検出した抗HPA-2aはIgG型の抗体でその抗体及び同じく我々が検出したUra血清⁵⁾(抗HPA-2b)を用いたMPHA法による日本人献血者のHPA-2抗原系頻度はHPA-2(a+b-)73.4%, HPA-2(a+b+)24.8%, HPA-2(a-b+)1.8%, HPA-2(a-b-)0%でHPA-2aが98.2%, HPA-2bが26.6%を示した。欧米人のHPA-2抗原系の頻度HPA-2a 99.3%, HPA-2b 14.6%と比較すると日本人の方がHPA-2bの頻度が約2倍高く, HPA-2aの頻度が欧米人より1%低い結果が得られた。このことより, 抗HPA-2a, 抗HPA-2bは日本人の方が欧米人より産生されやすいと予想された。

抗HPA-2aの血清学的性状はMPHA法においてHPA-2aホモ, ヘテロ型の違いにより明らかな量的効果を示した。血小板抽出抗原とのMPHA法による反応は抗HPA-2a, 2b共にHPA-2a, 2b陽性パネルに陰性反応を示したことからHPA-2抗原系は血小板抽出抗原中に存在する可能性は少ないことが明らかとなった。臨床的意義としては抗HPA-2aを保有する患者にHPA-2a陽性の血小板を輸血すると悪寒, 発熱, 倦怠感, 吐き気の副作用を伴う血小板輸血無効状態を引き起こすことより, 抗HPA-2aは抗HPA-2b同様⁴⁾⁵⁾, 血小板輸血不適合の一因となることが

推定された。本邦に於いて抗 HPA-2b が39例、抗 HPA-2a が1例検出されたことは、その免疫原性の強さと血小板輸血における臨床的意義の重要性が示唆された。

まとめ

抗 HPA-2a は現在までに von der Weerd が頻回輸血患者より検出した IgM 型の抗体の1症例が報告されているに過ぎず、その抗血清は現在殆どなく、臨床的意義も不明であり、また日本人の HPA-2a の抗原頻度も確認されていなかった。今回、我々は本邦最初の抗 HPA-2a を頻回血小板輸血により血小板輸血無効状態に陥った患者血清より検出した。抗 HPA-2a の血清学的性状は MPFA 法を用いた HPA-2a ホモ、ヘテロ型の違いにより反応性に明らかな量的効果を示した。HPA-2抗原系は血小板抽出抗原中に抽出される可能性は少ないと考えられた。日本人の HPA-2抗原系の頻度は HPA-2a 抗原が98.2%、HPA-2b 抗原は26.6%を示した。そして、抗 HPA-2a は抗 HPA-2b 同様、血小板輸血無効症状状態の一因となることが十分に示唆された。

尚、本論文の要旨は第3回日本血小板型ワークショップ、第14回日本血液事業学会総会において報告した。

謝辞：貴重な血小板抗原パネルを御提供いただいた埼玉県赤十字血液センターの森田庄治先生に深謝致します。

文 献

- 1) von dem Borne, A.E.G. and Décar, F.: ICSH/ISBT working party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox Sang.*, 58: 176, 1990.
- 2) van der Weerd, C.M., van de Wiel-Dorfmeier, H., Engelfriet, C.P. and van Loghem, J.J.: A new platelet antigen. *Proc. 8th Congr. Europ. Soc. Hematol.*, Vienna 1961, Basel, Karger, 1962, p379.
- 3) van der Weerd, C.M.: Platelet antigens and isoimmunization. Doctoral Thesis University of Amsterdam, 1965.
- 4) Saji, H., Maruya, E., Fujii, H., Maekawa, T., Akiyama, Y., Matsuura, T. and Hosoi, T.: New platelet antigen, Sib^a, involved in platelet transfusion refractoriness in a Japanese man. *Vox Sang.*, 56: 283—287, 1989.
- 5) 荒木延夫, 船江博幸, 成瀬妙子, 能勢義介, 清水準也, 谷脇清助, 甲斐俊朗, 原 宏: 頻回血小板輸血患者からの血小板同種抗体について. 第32回日本輸血学会近畿支部総会抄録. 日輸血会誌, 35: 406, 1989.
- 6) van Loghem, J.J., Dorfmeier, H. and van der Hart, M.: Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang.*, 4: 161—169, 1959.
- 7) von dem Borne, A.E.G.K., von Riesz, E., Verheugt, F.W.A., ten Cate, J.W., Koppe, J.G., Engelfriet, C.P. and Nijenhuis, L.E.: Bak^a, a new platelet-specific antigen involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang.*, 39: 113—120, 1980.
- 8) Friedman, J.M. and Aster, R.H.: Neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura and congenital porencephaly in two siblings associated with a "new" maternal antiplatelet antibody. *Blood*, 65: 1412—1415, 1985.
- 9) Shibata, Y., Matsuda, I., Miyaji, T. and Ichikawa, Y.: Yuk^a, a new platelet antigen involved in two cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang.*, 50: 177—180, 1986.
- 10) Ikeda, H., Mitani, T., Ohnuma, M., Haga, H., Ohtzuka, S., Kato, T., Nakase, T. and Sekiguchi, S.: A new platelet-specific antigen, Nak^a, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang.*, 57: 213—217, 1989.
- 11) 森田庄治, 柴田洋一: クロロキン処理法による MPFA. 第2回日本血小板型ワークショップ報告. 日輸血会誌, 35: 488, 1989.
- 12) 柴田洋一, 金 信子: 血小板同種抗原パネルの作成. 第36回日本輸血学会総会抄録集, 34: 272, 1988.
- 13) 荒木延夫, 能勢義介: 血小板抗原系と HLA 適合血小板輸血. *Medical Technology*, 18: 947—952, 1990.
- 14) Shibata, Y., Juji, T., Nishizawa, Y., Sakamoto, H. and Ozawa, N.: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang.*, 41: 25—31, 1981.
- 15) Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M., Ozturk, G. and Iwaki, Y.: Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C and -D antigens. *Am. J. Clin. Path.*, 69: 103—120, 1978.
- 16) Johnson, A.H., Rossen, R.D. and Butler, W.T.: Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: Identification of low levels of pre-formed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens*, 2: 215—226, 1972.

- 17) Duquesnoy, R.J., Filip, D.J., Rodey, G.E., Rimm, A.A. and Aster, R.H.: Successful transfusion of platelets "mismatched" for HLA antigens to alloimmunized thrombocytopenic patients. *Am. J. Hematol.*, 2: 219—226, 1977.
 - 18) von dem Borne, A.E.G.K., Verheugt, F.W.A., Oosterhof, F., von Riesz, E., Brutel de la Rivière, A. and Engelfriet, C.P.: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br. J. Haematol.*, 39: 195—207, 1978.
 - 19) 柴田洋一, 池田久実, 品田章二, 佐治博夫, 十字猛夫: 第1回日本血小板型ワークショップ報告, 日輸血会誌, 35: 392—395, 1989.
 - 20) 佐治博夫: 血小板型. *Modern Physician*, 9: 1615—1619, 1989.
 - 21) 日本血小板型ワークショップ: Identified anti-platelet antibodies in Japan, 日本血小板型ワークショップ・ニュースレター, No. 29, 1991.
-