胎児血小板遺伝子型の羊水を用いた出生前診断

加藤久美子¹⁾ 遠山ゆり子¹⁾ 大戸 斉¹⁾ 元木 良一¹⁾
遠藤 力²⁾ 佐藤 章²⁾ 高崎 克哲³⁾ 星 岩雄³⁾
今村 真哉⁴⁾ 菅藤 満⁵⁾ 森田 庄治⁶⁾ 半戸 啓一⁶⁾
服部 理男⁶⁾

¹⁾福島県立医科大学附属病院輸血部

²⁾福島県立医科大学産婦人科

³⁾福島赤十字病院

⁴⁾小高町立病院

⁵⁾ささや産婦人科

⁶⁾埼玉県伊奈赤十字血液センター

(平成7年10月2日受付)

(平成8年2月26日受理)

PRENATAL HPA-4 GENOTYPING AT RISK FOR NEONATAL ALLOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA USING AMNIOTIC FLUID CELLS

Kumiko Kato¹⁾, Yuriko Tohyama¹⁾, Hitoshi Ohto¹⁾, Ryoichi Motoki¹⁾,
Chikara Endo²⁾, Akira Sato²⁾, Katsunori Takasaki³⁾,
Shinya Imamura⁴⁾, Mitsuru Sugafuji⁵⁾, Shoji Morita⁶⁾,
Keiichi Hando¹⁾ and Masao Hattori⁶⁾

¹⁾Blood Transfusion Service

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical College

³⁾Japanese Red Cross Fukushima Hospital

⁴⁾Odaka Town Hospital

⁵⁾Sasaya Sanfujinka

⁶⁾Japanese Red Cross Saitama-Ina Blood Center

Optimal management of neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) requires the determination of fetal platelet antigen status as early as possible. We explored the feasibility of fetal HPA-4 genotyping by amplification of DNA from amniotic fluid cells using PCR-SSP. Three fetuses in which fetal HPA-4 type from amniotic fluid cells was completely concordant with typing using the blood of these infants were studied. Two babies were shown to be homozygous HPA-4a/a, and had normal platelet counts. The third fetus was heterozygous HPA-4a/b incompatible with maternal antibody, and developed mild thrombocytopenia (116,000/ μ l). These findings suggest that HPA genotype can be reliably and rapidly determined from amniotic fluid by DNA amplification.

Key words: neonatal alloimmune thrombocytopenia, HPA-4, prenatal diagnosis, DNA genotyping, platelet

はじめに

赤血球型 Rho (D) や, ABO 型不適合で新生児溶血性疾患がおけると同様な機序で, 血小板特

異抗原型 human platelet antigen (HPA) の母児間不適合が新生児血小板減少症 neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) の原因となる

ことが知られている。重篤な場合、胎児脳内出血、水頭症を合併することもある¹⁾。NAITが発症し、血小板輸血等が必要となった場合、迅速に対応するためには出生前診断が不可欠となる。しかし、母親の抗HPA抗体価の変動や臍帯血の血小板数から推測する血清学的診断には限界があり、DNAタイピングが有用であると考え、そこで比較的簡単に採取できる羊水を用い、血小板型DNAタイピングをする事により、出生前にNAIT発症の可能性を確認できないか検討を行った。高力価の抗HPA-4b抗体を保有する妊婦3例に羊水穿刺を行い、うち2例ではNAIT発症を否定し、1例にNAIT発症の可能性を予測したので報告する。

方 法

血小板抗体スクリーニング・抗体特異性同定、HPA抗原同定、および抗体価測定には、混合受身凝集法(MPHA法)²⁾を用いた。血小板パネルは、血小板型既知のO型健常人の血小板を使用した。血小板遺伝子型タイピングは、PCR-SSP法³⁾⁴⁾を用いた。末梢血、臍帯血は、単核球層を分離し、DNA抽出試薬(セパジーン：三光純薬)を用いてDNAを抽出した。羊水は2,500rpm 10分間遠心後、沈澱した羊水細胞から同様の方法でDNAを抽出した。抽出したDNAは滅菌水で50ng/mlに調整し、プライマー(Table 1)を加え、Taq polymerase 5Uの存在下で、95°C (1min)、68°C (1min)、72°C (1min)を30cycle繰り返し増幅した。Ethidium Bromideを加えた2%アガロースゲルに増幅産物を添加し、電気泳動した後、紫外線照射下で観察した。

結 果

症例 1

母親：32歳、B型、RhoD (+)、輸血歴なし。5妊2産。妊娠初期(妊娠4週、妊娠12週)に自然流産を2回、人工流産を1回経験している。自然流産の原因として抗HPA抗体の関与は不明である。6度目の妊娠第8週時に抗HPA-4b抗体陽性、抗体価は640倍以上と判明した。妊娠12週時の抗体価は、1,280倍、夫の血小板に対する抗体価は2,560倍と高力価であった。妊娠37週に正常分娩にて女兒を出生した。

児：A型、RhoD (+)

臍帯血血小板数は、 $28.4 \times 10^4/\mu l$ 、生後3日の血小板は、 $19.6 \times 10^4/\mu l$ であった。出血傾向もみられず、その他の異常所見も認めなかった。

血小板型は、MPHA法を用いた表現型、PCR-SSP法を用いた遺伝子型ともに、父親はHPA-4a/b、母親はHPA-4a/aであった。妊娠17週に羊水穿刺を実施し、この羊水細胞を用い血小板遺伝子型タイピングを行った。胎児は、母親と同型のHPA-4a/aであった為、児の血小板は母親の抗HPA-4b抗体に感作、破壊される事はなく、NAITは発症しないと出生前に推測した。出生後、分娩時の臍帯血、児の末梢血についてタイピングを行い、羊水細胞の血小板型と一致することを確認した(Fig. 1)。

症例 2

母親：32歳、B型、RhoD (+)、輸血歴なし。2妊2産。妊娠14週に抗HPA-4b抗体陽性と判明し、妊娠24週時の抗体価は32倍、37週時の抗体価は64倍であった。40週に正常分娩にて女兒を出産した。

児：O型、RhoD (+)

Table 1 Sequence of primers for PCR-SSP (Ref. 4)

	specificity	sequence
HPA-4	4a	5'-GCT GGC CAC CCA GAT GCG-3'
	4b	5'-GCT GGC CAC CCA GAT GCA-3'
	common	5'-TAG CAG GGG TTT TCG AGG GCC TCT-3'

For HPA-4, either 4a or 4b primer was included in the PCR reaction mixture with antisense primer

Fig. 1 Result of genotyping for HPA-4 by PCR-SSP. Specific PCR products were of the expected size of 123bp (HPA-4a and HPA-4b). Some unexpected small bands, which seemed to be nonspecific PCR products, were observed in the result of HPA-4.

Fig. 1a Case 1

F: PCR products of the father's blood; HPA-4a/b heterozygous, M: Mother; HPA-4a/a homozygous, A: PCR products from amniotic fluid cells; HPA-4a/a homozygous, C: (cord blood), and B (infant's peripheral blood) were shown to be homozygous HPA-4a/a

Fig. 1b Case 2

M: Mother; HPA-4a/a homozygous, A: PCR products from amniotic fluid cells; HPA-4a/a homozygous, B: Infant (infant's blood); HPA-4a/a homozygous

Fig. 1c Case 3

M: Mother; HPA-4a/a homozygous, A: PCR products from amniotic fluid cells; HPA-4a/b heterozygous, C: Infant (cord blood); HPA-4a/b heterozygous

臍帯血血小板数は、 $38.4 \times 10^4/\mu l$ 、生後3日の血小板数は、 $40.6 \times 10^4/\mu l$ であった。出血傾向はなく、その他異常所見もみとめなかった。

妊娠36週に羊水穿刺を行った。胎児の血小板型は HPA-4a/a であり、母親と同型であった。また、出生後児の末梢血を用いたタイピング結果と一致することを確認した。

症例3

母親：29歳，A 型，RhoD (+)，輸血歴なし。1 妊 1 産。妊娠 9 週で抗 HPA-4b 抗体陽性と判明

Table 2 Prevalence of Anti-platelet antibodies in 10,880 pregnancies

Antibody specificity	No. (%)	NAIT
Anti-HPA	-4b 24 (0.22)	3
	-5a 2 (0.02)	
	-5b 73 (0.67)	
Anti-NAK ^a	1 (0.01)	
Total	100	3

した。妊娠24週時の抗体価は512倍、分娩直前の抗体価は256倍であった。妊娠40週で正常分娩にて女

児を出生した。

児：O型，RhoD（+）

臍帯血血小板数は $11.6 \times 10^4/\mu l$ と軽度の血小板低下を認めたが，生後3日の血小板数は， $28.2 \times 10^4/\mu l$ に回復した。出血傾向はなかった。

妊娠24週に羊水穿刺し，この羊水細胞を用いて血小板遺伝子型タイピングを行った。胎児のHPA-4型はHPA-4a/bと同定され，出生前に母児間でのHPA型不適合が認められた。

考 察

NAITは稀な疾患とされてきたが，近年実態が解明されると共に報告例数も増加している。本邦ではHPA-4b抗原不適合によるNAIT発症例が最も多く，原因抗原として重要である⁵⁾⁶⁾。当部で，妊婦10,880名を対象に，妊娠初期から中期に抗HPA抗体スクリーニングを行った結果，抗HPA-4b抗体は24名（0.22%）に検出された。又，NAITを3例確診したが，すべて抗HPA-4b抗体によるものだった。NAITはしばしば第1子から罹患し，重篤な場合，胎児脳内出血，水頭症をおこすといわれている⁷⁾。治療法としては，母親への高単位グロブリン投与，子宮内血小板輸血などが考えられる。これら治療を行う場合，妊娠早期にNAIT発症の有無を明らかにすることが重要であり，そのためには妊婦の抗HPA抗体スクリーニングと，出生前の児の血小板遺伝子型タイピングが有用である。血小板遺伝子型は，PCR法を応用することによって簡単に判定できるといわれている。これまでに報告された血小板型遺伝子タイピングには，増幅したDNAを制限酵素による電気泳動パターンの大小差によって判定するRFLP法（restriction fragment length polymorphism）⁷⁾，PCRで増幅したDNAを型特異的なプローブによって判定するSSO法（sequence specific oligonucleotide）⁸⁾，プライマーを同種抗原決定塩基に設定し，その増幅の有無によって判定するSSP法（sequence specific primers）³⁾⁴⁾等が報告されている。胎児DNA情報を得るサンプルとしては羊水穿刺の他に，絨毛採取法，胎児採血法があり，海外では，これら試料を使ったPCRによる各種の胎児血小板型DNA

タイピング法が検討されている^{9)~12)}。いずれも胎児の血小板型を判定する事が可能で，NAITの出生前診断に有用であると報告している。

絨毛採取や胎児血採血は，胎児へのリスクが高く安全性に問題がある。これと比較し，羊水採取は容易で危険性が低いと考えられ，羊水細胞は主として胎児皮膚からの剝脱物，その他胎児の消化管，泌尿器，呼吸器からの脱落上皮など胎児由来の細胞であり，児の遺伝情報を保有している¹³⁾ことから試料として用いた。今回の3症例において，羊水細胞の血小板遺伝子型は，臍帯血，末梢血を用いた児の血小板型と完全に一致し，妊娠早期の胎児血小板型タイピング法として，羊水を用いたDNAタイピングが十分に可能であることを示した。

症例1，症例2は，胎児の血小板遺伝子型がHPA-4a/aであったため，出生前にNAIT発症を否定できた。特に症例1では，高力価の抗HPA-4b抗体を保有していること，自然流産を繰り返していることからNAIT発症が危惧されたが，出生前の予測どおりNAITは発症しなかった。症例3は胎児がHPA-4a/bであり，出生前に母児間血小板型不適合を認めた為，NAIT発症を予測し，十分な経過観察を行うことができた。羊水細胞を用いた血小板型DNAタイピング法は妊娠早期に胎児の血小板型を正確，迅速に同定でき，抗血小板抗体陽性妊婦の出生前にNAITに罹患する可能性を診断する有用な方法であると考えられる。

文 献

- 1) Hermann, J.H., Jumberlic, M.L., Ancona, R.J. and Kickler, T.S.: In utero cerebral hemorrhage in alloimmune thrombocytopenia. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 8: 312—317, 1986.
- 2) 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.
- 3) 島田和典，橋口理宏，高橋智子，品田章二：遺伝子増幅法を用いた血小板特異抗原型判定法の開発。日輸血会誌，39: 486, 1993.
- 4) Tanaka, S., Taniue, A., Nagao, N., Ohnoki, S., Shibata, H., Okubo, H. and Yamaguchi, H.: Simultaneous DNA typing of human platelet antigen 2,3 and 4 by an allelespecific PCR

- method. *Vox Sang.*, 68: 225—230, 1995.
- 5) 佐治博夫：血小板抗原の分類とその遺伝子解析。日輸血会誌, 40(1): 118—121, 1994.
- 6) 林 律子, 青山憲一, 小松孝良, 鈴木六郎, 高倉清, 谷上純子, 永尾暢夫, 犬飼和久, 柴田洋一：3卵性児に認められた抗 HPA-4b 抗体による新生児血小板減少症の1例。日輸血会誌, 40(4): 650—654, 1994.
- 7) Newman, P.J., Derbes, R.S. and R.H.: The human platelet alloantigens, P1^{A1} and P1^{A2}, are associated with a Leucine³³ Proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J. Clin. Invest.*, 83: 1778—1781, 1989.
- 8) Wang, L., Juji, T., Shibata, Y., Kuwata, S. and Tokunaga, K.: Sequence variation of human platelet membrane glycoprotein IIIa associated with the Y^{uk}^a/Y^{uk}^b alloantigen system. *Proc. Japn. Acad.*, 67(ser. B): 102—106, 1991.
- 9) McFarland, J.G., Aster, R.H., Bussel, J.B., Gianopoulos, J.G., Derbes, R.S. and Newman, P.J.: Prenatal diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using allele-specific oligonucleotide probes. *Blood*, 78(9): 2276—2382, 1991.
- 10) Bennett, P.R., Warwick, R., Vaughan, J., Chana, H., Kubenko, A. and Fisk, N.: Prenatal determination of human platelet antigen type using DNA amplification following amniocentesis. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 101: 246—249, 1994.
- 11) Madsen, H., Taaning, E., Georgsen, J., Ryder, L.P., Svejgaard, A. and Bock, J.: PCR for fetal platelet HPA-1 alloantigen typing. *Lancet*, 337: 493, 1991.
- 12) Simsk, S., Christiaens, G.C.L.M., Kanhai, H.H. H., Beekhuis, J.R., Bleeker, P.M.M., Vlekke, A. B.J., Goldschmeding, R. and von dem Borne, A. E.G.Kr.: Human platelet antigen-1(Zw) typing of fetuses by analysis of polymerase chain reaction-amplified genomic DNA from amniocytes. *Transfusion Medicine*, 4: 15—19, 1994.
- 13) 望月真人：妊婦の生理標準産科婦人科学，編者，望月真人，桑原慶紀，医学書院，東京，1994, p. 188—189.
-