

シンポジウム II : 私の研究

2. 輸血学領域の研究 私と血小板抗原・抗体

松橋 美佳*

はじめに

私が血小板抗原・抗体の世界に足を踏み入れたのは、東京大学医学部附属病院輸血部に入職した約 19 年前になる。本邦における血小板抗原・抗体研究の第一人者である柴田洋一先生が輸血部で教授をされていた。入職して数ヶ月たった頃、教授室に呼ばれ「これから血小板抗原・抗体の検査および研究を担当してほしい」と言って頂いた。本研究の第一人者で、本邦において抗血小板抗体検査のスタンダード法となっている MPHA (Mixed Passive Hemagglutination) 法の開発者である柴田教授の下で臨床および研究を開始することは、非常に嬉しいことでもあり同時に、身の引き締まる思いであったことが思い出される。それでも当時は、自分が約 19 年近くに渡って血小板抗原・抗体に関連する研究を続けることになるとは考えていなかった。柴田先生が開発された MPHA 法は、血小板を固相した U 底マイクロプレートに被検血清を感作した後、抗ヒト IgG を感作した固定ヒツジ赤血球 (指示血球) を反応させ、被検血清中にある抗血小板抗体の有無を確認する方法である。今でこそ安定した検査方法で、キット化もされており、日本国内で広く使用されているが、この安定した MPHA 法が確立されるまでには長い年月を要したことを伺った。検査法が安

定せず、4 ヶ月に 1 回程度しか実験が成功しなかった時期もあったそうである。「実験は、1 ヶ月に 1 回成功すればいい方だよ」と良く言っておられたのが今でも記憶に残っている。

I. 血小板抗原・抗体の臨床的意義

血小板は止血過程において中心的な役割を担い、血小板減少は止血障害や出血のリスクに関与する。ヒト血小板特異抗原 (human platelet antigen; HPA) は、止血機能や血栓作用に重要な役割を果たしている血小板膜糖タンパク (glycoprotein; GP) 上に発現しており、HPA の抗原性の変化は、血小板膜タンパクの 1 塩基置換 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) による 1 アミノ酸置換によってもたらされる。現在までに 35 種類の HPA が報告されているが、2 対立抗原システムは 6 種類 (HPA-1~5 および -15) 確認されており、抗原頻度の高い方が「a」、低い方が「b」と規定されている。この HPA 型が異なる、いわゆる HPA 型不適合の妊娠や輸血、移植などにより HPA 抗原に対する同種抗体 (抗 HPA 抗体) が産生されることがあり、新生児血小板減少症 (neonatal alloimmune thrombocytopenia; NAIT) や血小板輸血不応 (platelet transfusion refractoriness; PTR) を引き起こすことがある。NAIT は、新生児溶血性疾患と同様の機序で発症し、母親が持たない児の HPA 抗

*埼玉県立大学 保健医療福祉学部 健康開発学科 matsuhashi-mika@spu.ac.jp

原に対して同種免疫が誘導されることにより生じる。母体が産生した同種免疫性抗体(IgG 性)が胎盤を通過し胎児に移行して、胎児の血小板に結合する。抗体が結合した血小板は、児の単球貪食系によって破壊される結果、胎児または新生児の血小板減少症が生じる。NAIT では通常、無症候に経過するか、出血や紫斑が認められるなどであるが、重症例では胎児・新生児の脳内出血による神経学的な後遺症や死亡の原因となる。また、PTR は、頻回の血小板輸血により産生された抗血小板抗体が原因で、輸血をしても期待する血小板数の増加が得られない状態である。抗血小板抗体には抗 HLA 抗体と抗 HPA 抗体の 2 種類があり、多くの場合(約 80%)は抗 HLA 抗体が関与するが、一部(約 20%)は抗 HPA 抗体によるとされている。白血病治療のための化学療法中に PTR が発症すると、出血リスクが高まり、患者の生命を脅かす。これらの病態の診断や治療、さらに予防のためには、原因となる抗体を確実に検出することが必要不可欠である。

II. 私の研究

1. 研究の開始

私が東大病院に入職した当時、NAIT 診断における抗 HPA 抗体の測定は、国内では限られた施設でしかおこなわれていなかった。そのため、日本全国の医療機関から NAIT が疑われる患者血清について抗体測定の依頼を受けていた。ところが、

検査をおこなっていく中で、原因となる抗体が検出されない症例(抗体陰性症例)が約半数近くあることに気づき、「臨床的に NAIT が疑われるにも関わらず、抗体が検出されない原因は何であるのか」、「本当に陰性なのだろうか」、「陽性であるにも関わらず、陰性を示しているのではないか」という疑問を持つようになった。当初、これらの抗体陰性症例をもう一度、検査しなおすことを考えたが、その前にこのようなことが生じる可能性(原因)について調べようと考えた。当然、教科書にはこの疑問点を解決する方法は載っておらず、論文から情報を得ようと多くの文献検索をおこない、論文を読み漁ることから始めた。また、海外の研究者とも積極的に交流し、情報を交換するなどした。その結果、本邦においては、抗 HPA 抗体検出方法として MPHA 法が広く用いられている一方、欧米では MAIPA(monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigens)法が広く用いられていること、同じ抗体検出方法(MAIPA 法)を用いる場合でも全く同一のプロトコルが存在していないこと、また、人種によって HPA 型の臨床的意義が異なること、すなわち「国内外における検出方法の相違」、「バリエーションに富んだプロトコルの存在」、「国内外で検出されている抗 HPA 抗体の特異性(種類)の相違」などについて知ることが出来た(図 1)。そこから「検出方法によって検出感度、特異度に相違があるのではないか」、「抗体の特異性により検出感度、特異度に相

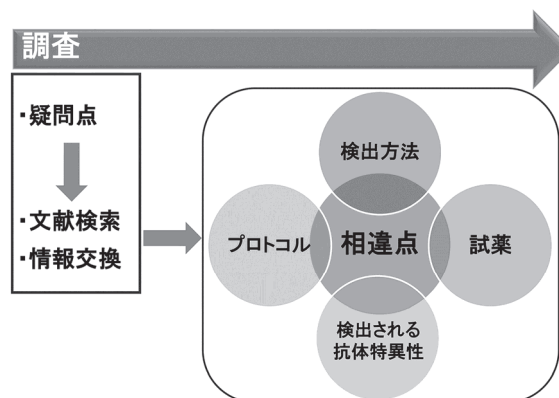


図 1 研究の開始～疑問点からの出発

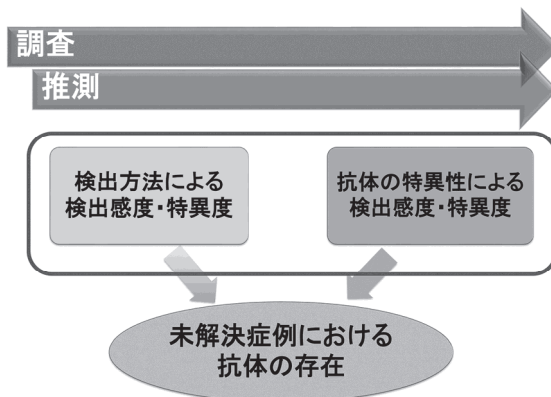


図2 疑問点から研究テーマの構築

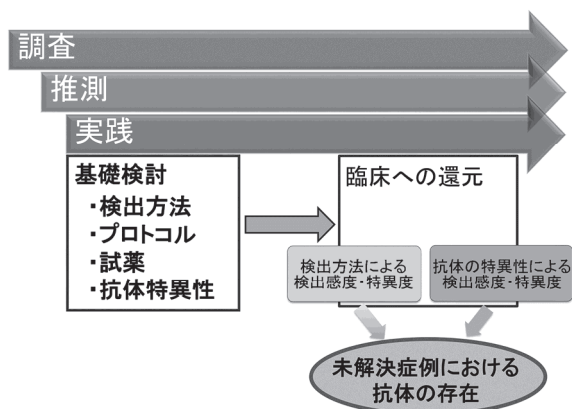


図3 基礎検討から臨床へ

違があるのではないか]、「プロトコルのバリエーションが検出感度に影響を与えているのではないか」と推測し、これらの推測が正しく、適切なプロトコル、適切な検出方法を用いれば、「これまで陰性と判定されていた症例から陽性例を見つけることが出来るのではないか」などの着想を得るに至った(図2)。

2. 検査方法の検討と改良

先に述べた推測が正しいか否かを証明するため、基礎検討に着手した。まず、最初に、MPHA法とMAIPA法を中心に現在までに報告されている複数の抗体検出法について比較検討することから始めた。様々な抗体特異性を有する血清を用いて検出方法間の検出感度および特異度の比較をおこなった結果、何れも単一の方法では、すべてのHPA

型に対する抗体を検出、同定するための十分な感度、特異度を有していないことがわかり、「検出方法によって検出感度、特異度に相違があるのではないか」、「抗体の特異性により検出感度、特異度に相違があるのではないか」という推測が正しいことを明らかにすることが出来た。また、検査方法の最適化を図るべく、それぞれの検査法について、「試薬の濃度や種類」、「サンプル量」、「反応時間や温度」、「血小板浮遊液の濃度」など様々な条件について幾重にも検討を重ねた。その結果、「プロトコルのバリエーションが検出感度に影響を与えているのではないか」という推測が正しいことを示すと同時に、最適なプロトコルを作成することが出来た(図3)。

3. 臨床への還元

基礎検討より、自身の推測が正しいことを確認することが出来たことから、臨床的に NAIT が疑われるにも関わらず原因抗体が検出されていなかった NAIT 症例の血清をレトロスペクティブに再検査することを考えた。検出方法によって検出感度、特異度に相違があることがわかったので、日本と欧米で抗原頻度がほとんど変わらないにも関わらず、抗体検出頻度に差がみられる抗 HPA-15 抗体に着目して調べてみることにした。というのも、主に MAIPA 法を用いている欧米では NAIT や PTR の原因抗体として抗 HPA-15 抗体の報告が数多くされている一方で、MPHA 法を主に用いている日本ではその抗体検出の報告がみられなかったこと、また、基礎検討から MPHA 法の改良により、抗 HPA-15 抗体の検出は可能であるが、確実な検出系とは言い難く、MAIPA 法がより適していることがわかってきたからである。具体的には、MPHA 法で原因抗体が検出されなかった NAIT 疑い症例の母親血清 90 例について MAIPA 法を用いて抗 HPA-15 抗体を検査した。その結果、90 例中 1 例において、本邦初となる抗 HPA-15b 抗体を検出することが出来た。抗 HPA-15 抗体が重篤な NAIT 発症の原因となることはすでに海外から論文報告されており、日本におけるこの検出が今後の NAIT 診断のために非常に有用であったと思う。これを契機に、日本国内でも MPHA 法に加え、MAIPA 法が用いられるようになり、抗 HPA-15 抗体以外の新たな特異性(種類)の抗 HPA 抗体も検出されるようになり、本研究が臨床的に重要な意義を果たすことが出来たものと考えている。さらに、PTR 症例についても NAIT 症例と同様に調べようと、頻回に血小板を輸血している患者 305 症例の血清(MPHA 法にて抗 HPA 抗体検査済み)について、抗 HPA-15 抗体の検出を試みた結果、複数の抗 HPA-15 抗体を検出した。この抗体検出例について臨床データを詳細に解析した結果、これまで本邦では確認されていなかった抗 HPA-15 抗体の PTR への関与についても確認することが出来た(図 3)。これらの成果については、論文報告もおこなってきた。

研究結果は、論文化されてしまえば、一見、きれいな研究のようにみえる。しかし、実際には基礎検討の過程から、いくつもの試行錯誤を繰り返してきた。中には、「予想した通り」の結果が得られなかったこともあり、条件変更をしなくてはならないこともままあったが、それが逆に興味深い結果に結び付いたこともあった。予備実験から始まり、論文中の結果に至るまでには検出条件の変更や方法の改良など多大な労力と時間を要してきたのが真実である。一篇の論文にはデータが山のように隠れており、結果に直接結びつかないことが少なくないが、すべては地道な積み重ねによって得られるものであると考えている。

4. 社会への還元

これまで、基礎検討の成果について、日本輸血細胞治療学会や国際輸血学会(International society of blood transfusion; ISBT)などの学会や日本血小板ワークショップなど研修会等で発表してきた。さらには、その成果を臨床にまで発展させることが出来、輸血領域における著名雑誌である Transfusion 誌においても論文報告させて頂いた。私自身が論文から様々な知見を得て、それを研究につなげ、さらには臨床への貢献につなげていくこと出来たように、単に自己満足のために研究するのではなく、成果およびその有用性を必ず社会に発信することが重要なことであると感じている。

また、国内では、2005 年、2006 年、2008 年に、血小板抗原・抗体検査法に関する技術講習会を開催し、日本国内の技術者に検査手技を伝授し、講習会後も知識および技術についてフォローしてきた。さらに、国際的には、国際輸血学会(ISBT)の国際血小板ワーキング・パーティのメンバーとして積極的に活動してきた。2010 年には、国際血小板ワーキング・パーティの会長と共にアジア血小板ワーキング・パーティの発足にも貢献し、その後のアジア血小板ワークショップの開催に中心的な役割を果たしてきたと思う。2011 年には、東京大学医学部附属病院輸血部において、第一回アジア血小板検査研修会(参加 5 ヵ国、7 名)を、2013 年には、中国広州において、広州血液センターの共同研究者と共に第 2 回血小板検査研修会

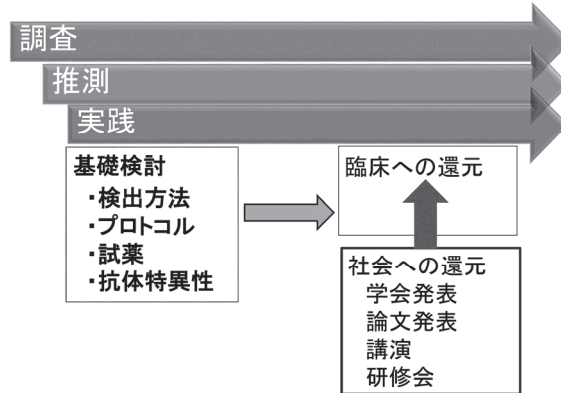


図4 社会への発信を通じた臨床への貢献

(参加7カ国、18名)を開催し、アジア諸国の研究者達にも検査法に関する知識および技術を伝授してきた。また、研修会後も e-mail 等を活用し、知識および技術についてフォローし続けた。そのような経緯もあり、国内および海外から研究協力や検査の依頼が多くあり、現在も日々対応し続けている。このような努力は、ひとつひとつは本当に小さな積み重ねであり、すぐさま成果に結び付くものは多くはなかったかもしれない。しかし、この積み重ねこそが研究の発展ひいては医療の発展に必要不可欠であると考え、惜しみなく自分の知識や技術を提供してきた(図4)。実際に共同研究者が学会発表や論文発表などを行うことで、自分の小さな努力が報われたと感じることも多々あった。これまで有意義な研究が出来たのも、他の施設の研究者とも共同で研究が出来たおかげであるということも忘れてはいけないと思っている。

おわりに

研究を始めるにあたり、最初は何をどうすれば良いのか右も左もわからないといった状態であったが、臨床の中で疑問点という気づきの中から研究テーマを見つけ、「その問題を解決するにはどのような方法があるのか」、「どのようなデータを必要とするか」などを考えて基礎的なアプローチをおこなってきた。そして、「それらをどのように医療、医学に適用出来るのか」を考えて研究を存続させてきた結果、血小板抗原・抗体研究の推進ひいては患者の病態診断、治療および予防に貢献することが出来たものと考えている。しかし、本領域においてはまだ解決しなくてはならない課題がいくつもあるのが現状である。今後もさらに研究に励み、医学・医療に少しでも貢献出来るよう努めていきたいと考えている。