

VERITAS SCIENCE LETTER

HLA&TRANSPLANTATION

Diagnostic Research

Vol. 4
2012.01

CDC-XM および FCXM の結果の乖離についての検討 —補体結合性 HLA 抗体の検出—

東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター 移植免疫研究室 石塚 敏

はじめに

現在、臓器移植ネットワークでは、リンパ球クロスマッチ検査の T cell が陰性であれば移植は可能とされている。しかし、Complement-dependent cytotoxic crossmatch (CDC-XM) の T cell が陰性であっても Flow cytometric crossmatch (FCXM) の T cell が陽性、あるいはドナーリンパ球を使用しない Panel Reactive Antibody (PRA) 法で HLA Class I 抗体の DSA が陽性の症例も存在する。今回我々は検査結果の乖離について検証するため、新しく開発された C1qScreen (One Lambda) を使用して HLA 抗体の補体依存性および非依存性を調べ、結果の乖離について検討を行った。

I. 対象および材料

東京女子医科大学 腎臓病総合医療センターにて HLA 抗体が FCXM において陽性であった 21 名（男性 8 名、女性 13 名、年齢 49.9 ± 11.1 歳）のレシピエントを対象とし、それらの血清の HLA 抗体の特異性と一致した HLA 抗原を保有するパネルリンパ球を材料とした。

II. 方法

はじめに、FlowPRA Screening (FlowPRA) 陽性のレシピエント血清について LABScreen Single Antigen (LABScreen) および C1qScreen による測定をした。LABScreen で HLA 抗体の特異性を確認し、その特異性と一致する HLA 抗原を保有するパネルリンパ球で FCXM を実施した。FCXM にて陽性判定が確認された検体についても、同じパネルリンパ球で CDC-XM と C1qScreen の結果も合わせて比較検討した。

1. CDC-XM

ドナーリンパ球は、ヘパリン加末梢血液より EasySep (StemCell Technologies) を用いて、T cell または B cell に分離し、 2×10^6 cells/mL に調節した。

60 穴の Terasaki トレー (Greiner Bio-One) にレシピエント血清およびドナーリンパ球を各 $1 \mu\text{L}$ アプライし、流動パラフィン (Wako Pure Chemical Industries) でカバーして、 37°C インキュベーターで 60 分間静置反応した。ウサギ補体 (One Lambda) を加え 120 分間室温にて静置反応した後、エオジン染色液 Stain-Fix (One Lambda) を加えカバーガラスをした。

判定は位相差顕微鏡を使用し、陰性コントロール血清を基準に死細胞数が 10% 以上の検体を陽性とした。

陰性コントロール血清は Normal Human Serum (NHS) である AB 型血清 (DS ファーマバイオメディカル) を使用した。また陽性コントロール血清は、Anti-T cell または B cell Lymphocyte Control Serum (One Lambda) を使用した。

2. FCXM

ドナーリンパ球は、リンパ球分離液 SEPARATE-L (Muto Pure Chemicals) を使用し、ドナーのヘパリン加末梢血液から比重遠心法により分離した。

採取したリンパ球は、タンパク質分解酵素であるプロテアーゼ Type XIV (Sigma) を加え 37°C インキュベーターで 10 分間静置反応し、2 回洗浄後 2×10^6 cells/mL に調整した。

BD Falcon Tube (Becton, Dickinson and Company) に凍結解凍・遠心処理したドナー血清・AB 型血清、レシピエント血清、HLA Class I 陽性コントロール血清 (One Lambda) および Class II 陽性コントロール血清 (One Lambda) を分注し、それぞれにプロテアーゼ処理済ドナーリンパ球を加え、室温にて 30 分間静置反応した。3 回洗浄後 CD19-PE (BD Biosciences) ・ CD3-PerCP (BD Biosciences) ・ FITC conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch) を加え、遮光室温にて静置反応した。

III. 結果

2 回洗浄後、フローサイトメーター FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) にて測定した。

判定は、FITC conjugated goat, anti-human IgG の蛍光強度 (median fluorescence intensity) が陰性コントロールより 10.0 以上シフトを示したものを陽性とした)。

3. FlowPRA

FlowPRA Class I および Class II Screening Beads を各チューブに分注し、陰性コントロール血清 (One Lambda)、HLA Class I または Class II ポジティブコントロール血清 (One Lambda)、レシピエント血清を加え室温反応した。3 回洗浄後、FITC conjugated goat, anti-human IgG (One Lambda) を加え遮光室温反応した。2 回洗浄後、フローサイトメーター FACS Calibur にて測定した。

判定は、陰性コントロール血清から陽性領域に 2 峰性または多峰性シフトを示したものを陽性とした。

4. LABScreen

LABScreen single antigen Class I または Class II Beads を各チューブに分注し、陰性コントロール血清 (NC : One Lambda) ・レシピエント血清を加え室温反応した。3 回洗浄後、PE conjugated anti-human IgG (One Lambda) を加え、遮光室温反応した後 2 回洗浄して LABScan 100 にて測定した。

判定は trimmed mean (MFI) を用いて、median fluorescence intensity (Normalized MFI) = (MFI sample No. bead - MFI sample NC bead) - (MFI NC serum No. bead - MFI NC serum NC bead) が 600 以上を示したものを陽性とした。

5. C1qScreen

陰性コントロール血清 (One Lambda) および非働化したレシピエント血清を各 5 μ L チューブに分注し、C1q 抗体溶液・LABScreen single antigen Class I および Class II Beads を加え 20 分間室温反応した。PE conjugated anti-human C1q を加え、20 分間遮光室温反応し 1 回洗浄後 LABScan 100 にて測定した。

判定は trimmed mean (MFI) を用いて、median fluorescence intensity (Normalized MFI) が 300 以上を示したものを陽性とした。

HLA 抗体が陽性であった 21 症例について、LABScreen で HLA 抗体の特異性を確認した 21 例の血清から、Class I で 26 種類、Class II で 26 種類の HLA 特異性を同定しそれを症例毎に表 1 にまとめた。

さらに Class 毎に抗体特異性の MFI 値を図 1,2 に表した。FlowPRA ・ LABScreen ・ FCXM のいずれも陽性の HLA 抗体について LABScreen Normalized MFI 平均値は、HLA Class I : 10238 \pm 3545 ・ HLA Class II : 9022 \pm 4469 であった。また、同一血清について C1qScreen を実施した結果、HLA Class I 抗体 26 種類中 9 抗体が陽性で 34% 一致し、HLA Class II 抗体では 26 種類中 15 抗体が陽性で 57% 一致していた。

C1qScreen が陽性であった血清中の HLA Class I : 9 種類、HLA Class II : 15 種類の抗体の C1qScreen Normalized MFI 平均値は、HLA Class I : 9911 \pm 6510 ・ HLA Class II : 12351 \pm 7358 であった。

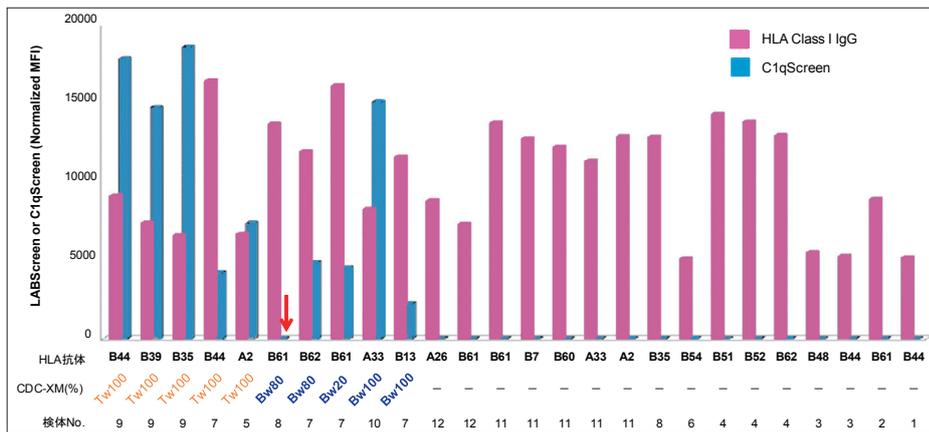
LABScreen 陽性中の C1qScreen 陽性および陰性について LABScreen Normalized MFI を比較したところ、HLA Class II 抗体の Normalized MFI 平均値は、C1qScreen 陽性 : 10407 \pm 381 ・ C1qScreen 陰性 : 10142 \pm 3511 であり P=0.9549 で有意差はなかった。HLA Class II 抗体では、C1qScreen 陽性 : 9880 \pm 4151 ・ C1qScreen 陰性 : 7734 \pm 4836 であり、P=0.2223 で有意差はなかった。さらに、それぞれの HLA 抗原特異性が一致するパネルリンパ球を用いた CDC-XM を実施した結果、HLA Class I 抗体については LABScreen 陽性の 26 種類中パネルリンパ球では 10 種類の抗体が陽性で 38% 一致し、HLA Class II 抗体では 26 種類中 16 種類の抗体が陽性で 61% 一致していた。

CDC-XM 陽性と C1qScreen 陽性で比較すると、CDC-XM 陽性の HLA Class I 抗体 10 種類中 1 抗体が C1qScreen 陰性で (図 1 の \downarrow) 90% 一致し、HLA Class II 抗体 16 種類中 1 種類が C1qScreen 陰性で (図 2 の \downarrow) 93% 一致していた。

IV. 結語

LABScreen など検出される HLA 抗体の多くは補体非依存性であることが示唆された。

今後、補体依存性 HLA 抗体は CDC-XM の結果に加えて C1qScreen を測定することでより確実になる。さらに HLA Class I または HLA Class II の判定も可能になることから FCXM も加えて、より検出精度が向上すると考えられる。また、ドナーリンパ球を使用しない FlowPRA や LABScreen など併用して、それぞれの検出法の特徴から補体依存性の有無や non-HLA 抗体を識別できることが期待される。

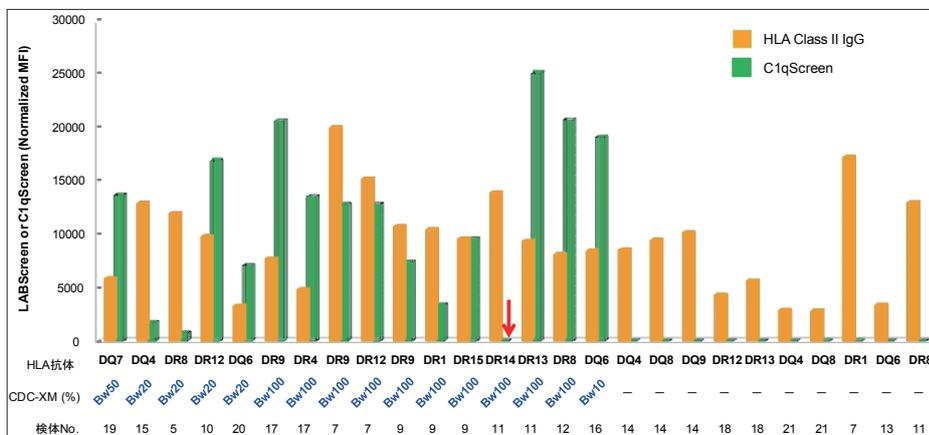


TW・・・T warm,
BW・・・B warm

例) Tw100=T warm が 100%である
ことを示す。

LABScreen Single Antigen で陽性
な HLA Class I 抗体は、FlowPRA
および FCXM も陽性を示した。
FCXM と CDC-XM は、それぞれの
HLA 抗体と抗原が一致するパネル
リンパ球を用いた。

図 1 HLA Class I 抗体が陽性な症例に対する CDC-XM および C1qScreen との反応性



LABScreen Single Antigen で陽性
な HLA Class II 抗体は、FlowPRA
および FCXM も陽性を示した。
FCXM と CDC-XM は、それぞれの
HLA 抗体と抗原が一致するパネル
リンパ球を用いた。

図 2 HLA Class II 抗体が陽性な症例に対する CDC-XM および C1qScreen との反応性

表 1 21 症例の内訳

FL・・・Flow PRA Screening, LS・・・LABScreen Single Antigen
FCXM と CDC-XM には、それぞれの HLA 抗体と抗原が一致するパネルリンパ球を用いた。

検体 No.	性別	年齢	FL, LS, FCXM 陽性 HLA 抗体	C1qScreen	CDC-XM
5	男	19	A2,DR8	A2,DR8	A2,DR8
10	男	51	A33,DR12	A33,DR12	A33,DR12
9	男	46	B44,B39,B35,DR9,DR1,DR15	B44,B39,B35,DR9,DR1,DR15	B44,B39,B35,DR9,DR1,DR15
7	女	36	B61,B62,B44,B13,DR9,DR12,DR1	B61,B62,B44,B13,DR9,DR12	B61,B62,B44,B13,DR9,DR12
15	男	68	DQ4	DQ4	DQ4
16	女	36	DQ6	DQ6	DQ6
20	女	47	DQ6	DQ6	DQ6
19	男	47	DQ7	DQ7	DQ7
17	女	47	DR9,DR4	DR9,DR4	DR9,DR4
11	男	53	B61,B7,B60,A33,A2,DR14,DR13,DR8	DR13	DR14,DR13
12	男	51	A26,B61,DR8	DR8	DR8
8	女	64	B61,B35	—	B61
1	女	61	B44	—	—
2	女	44	B61	—	—
3	女	54	B48,B44	—	—
4	女	48	B51,B52,B62	—	—
6	女	62	B54	—	—
13	男	48	DQ6	—	—
14	女	61	DQ4,DQ8,DQ9	—	—
18	女	58	DR12,DR13	—	—
21	女	46	DQ4,DQ8	—	—

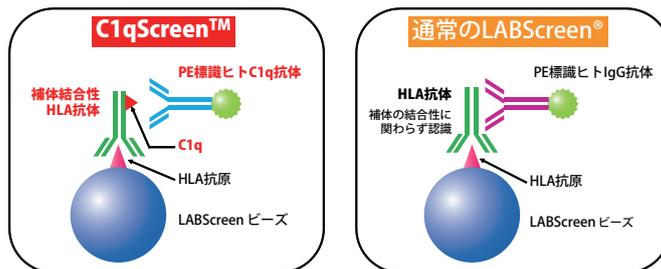


Luminex® 専用 補体結合性 HLA 抗体検出キット

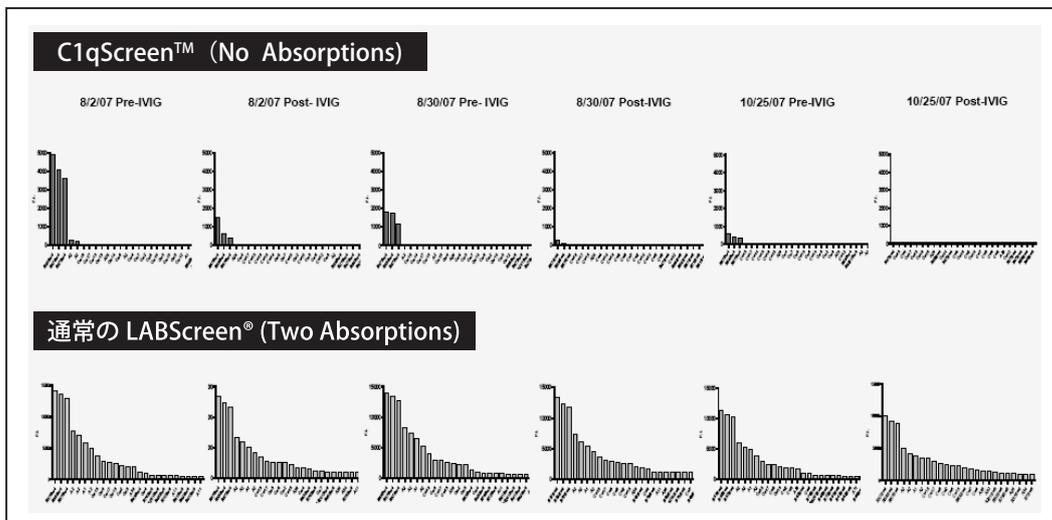
C1qScreen™

C1qScreen™ は、補体の第一成分の一つである C1q を認識する PE 標識抗体を、お手持ちの LABScreen® ビーズと使用することで、血清中の補体結合性 HLA 抗体を特異的に検出するキットです。通常の LABScreen® で得られたデータとの比較解析から、検出された HLA 抗体が補体結合性を有するかを知ることができます。

>> 原理



>> C1qScreen™ と通常の LABScreen® とのデータ比較例



免疫グロブリン療法中の患者血清を使用して、免疫グロブリン剤によるバックグラウンドの影響が低減した例です。
(One Lambda、Product News 2010 Spring より)

商品コード	商品名	梱包単位
PEC1Q	C1qScreen™	25 tests
LS1A04	LABScreen® Single Antigen Class I	25 tests
LS2A01	LABScreen® Single Antigen Class II	25 tests

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>