

原 著

抗 HLA クラス I 抗体の方法別検出感度と血小板輸血患者における 方法別抗体検出率 AHG-LCT , LIFT , PIFT , M-MPHA および FlowPRA の比較

斉藤 敏¹⁾ 太田 正穂¹⁾ 勝山 善彦²⁾ 牧島 秀樹³⁾
玉井 豊広⁴⁾ 高柳カヨ子¹⁾ 浅村 英樹¹⁾ 福島 弘文¹⁾

¹⁾信州大学医学部, 法医学

²⁾信州大学医学部附属病院, 薬剤部

³⁾信州大学医学部, 第二内科

⁴⁾オリンパス株式会社

(平成 16 年 5 月 7 日受付)

(平成 16 年 8 月 2 日受理)

SENSITIVITY OF VARIOUS METHODS FOR DETECTING HLA CLASS I ANTIBODIES
AND SCREENING FOR ALLOANTIBODIES IN 145 SERA SAMPLES FROM PATIENTS
RECEIVING PLATELET TRANSFUSIONS : A COMPARISON OF AHG-LCT, LIFT, PIFT,
MAGNETIC MPHA AND FlowPRA METHODS

Satoshi Saito¹⁾, Masao Ota¹⁾, Yoshihiko Katsuyama²⁾, Hideki Makishima³⁾, Toyohiro Tamai⁴⁾,
Kayoko Takayanagi¹⁾, Hideki Asamura¹⁾ and Hirofumi Fukushima¹⁾

¹⁾Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto

²⁾Department of Pharmacy, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto

³⁾Second Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto

⁴⁾Product Development Department, Olympus Corporation, Hachioji

A total of 15 distinct human sera that did not exhibit reactivity against HPA antibodies but contained HLA-specific antibodies were used for sensitivity analysis of the AHG-LCT, LIFT, PIFT, M-MPHA and FlowPRA methods. The HLA antibody titer of each serum sample was defined as the highest dilution of serum that became positive to each method. 145 sera samples from patients receiving platelet transfusions were also screened to detect HLA antibodies by these methods. Results showed that FlowPRA was the most sensitive for identifying HLA antibodies. Although FCM is generally considered the most sensitive method, our analysis suggests that M-MPHA is as useful as FCM in both sensitivity and screening tests. PIFT sensitivity was slightly less than that of LIFT and M-MPHA. AHG-LCT sensitivity was significantly less than that of the other methods.

Key words : FlowPRA, HLA class I antibody, M-MPHA, Platelet transfusion, Sensitivity

はじめに

造血器疾患患者では、血小板減少や出血予防のため、血小板輸血が必要となる。しかしながら、十分な輸血効果の得られない症例が20～50%存在し、その内の30%前後が抗HLA抗体による血小板輸血不応状態(platelet transfusion refractoriness: PTR)と考えられている^{1)~3)}。PTRの改善には、患者が保有している抗HLA抗体を検出し、対応抗原陰性の血小板輸血を行うことが有効である⁴⁾⁵⁾。現在、一般的に行われている抗HLA抗体スクリーニング、クロスマッチの方法は、リンパ球細胞障害性試験(LCT)⁶⁾と抗ヒト免疫グロブリン-LCT(AHG-LCT)⁷⁾である。しかしながら、PTRを少なくするためには、より検出感度の高い方法で検査することが重要であり、そのためにMixed passive hemagglutination test(MPHA)⁸⁾、磁性粒子を使用するMPHA(M-MPHA)⁹⁾¹⁰⁾、Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay(MAIPA)¹¹⁾、Platelet immunofluorescence test(PIFT)¹²⁾、Lymphocyte immunofluorescence test(LIFT)¹³⁾等の方法を検査に用いている施設もある。抗HLA抗体の検出感度については、MPHAがAHG-LCTよりも検出感度が高いこと⁹⁾¹⁴⁾、LIFTの際にリンパ球をプロナーゼ処理することが偽陰性を減らし、これまで最も高いとされていたこの方法の検出感度を更に高めること¹⁵⁾、Flow Cytometric Reagents for Detection of Panel-Reactive antibody against HLA Class I antigens(FlowPRA)¹⁶⁾が、LIFTでも検出できない抗HLA抗体を検出できること、等が報告されている。これまでの報告は、LevinらによるQuickScreen(commercially available ELISA)、LCT、PIFT、LIFTの4方法の比較¹⁷⁾を除いては、LCT、AHG-LCTとMPHAの比較、LIFTとFlowPRAの比較等、2～3方法の比較がほとんどで、AHG-LCT、LIFT、PIFT、M-MPHA、FlowPRAの5方法の検出感度を比較した報告はない。そこで、これら5方法の抗HLA抗体検出感度を比較することは、患者の抗HLA抗体スクリーニングや血小板輸血時のクロスマッチに有益な情報を示すと考え検討を行った。

材料と方法

既知血清の力価測定

力価測定用抗血清として、HLA特異性が確認されている15種類の抗血清(抗HLA-A2、-A11、-A24、-A26、-A31、-B15 Cross Reactive Group Antigens(CREG)、-B16CREG、-B35、-B40CREG、-B54、-Cw1、-Cw3、-Cw4、-Cw7、-Cw8)を用いた。それぞれの血清を対応抗原の反応が陰性化するまでPBSまたは低イオン強度食塩液(LISS)で倍数希釈し、陰性直前の力価を最終力価とした。細胞は、それぞれの抗HLA抗体に対し、対応する抗原を持つO型5人から得たリンパ球および血小板を用いた。それぞれの方法により力価測定を行い、5人の最終力価の平均値をその方法の検出感度とした。

臨床検体の抗HLA抗体スクリーニング

臨床検体として、-80℃に凍結保存していた過去10年間の患者血清の中から、血小板輸血歴のある145人の患者血清を用いた。細胞は、日本人における表現型頻度が1%以上のHLAクラスI抗原が入るように選択したO型20人から得たリンパ球、血小板を使用した。抗HLA抗体検出率は、それぞれの方法によりスクリーニングを行い、方法別陽性数から算出した。

抗HLA抗体測定方法

AHG-LCTは荒木らのmodified AHG-LCT¹⁸⁾を用いた。

M-MPHAは、森田らによる方法⁹⁾に準じ次のように行った。1.5～2.5×10⁶の血小板をレクチン固相したプレートのwellに分注し、500rpm 5分間で付着させた後、0.05% Tween20PBS(PBS-T)で5回洗浄する。LISSで2⁰に希釈した被検血清100μlをwellに分注し、37℃ 60分間反応させる。PBS-Tで5回洗浄後、抗ヒトIgG感作磁性粒子25μlを磁石板上で3分間反応させ、目視により結果判定を行った。患者血清のスクリーニングに際しては、Edwardsらの方法¹⁹⁾によりクロロキン処理を施した血小板によるM-MPHAも実施した。

LIFT及びPIFTはフローサイトメトリー(FCM)にて行った。2×10⁷の血小板または37

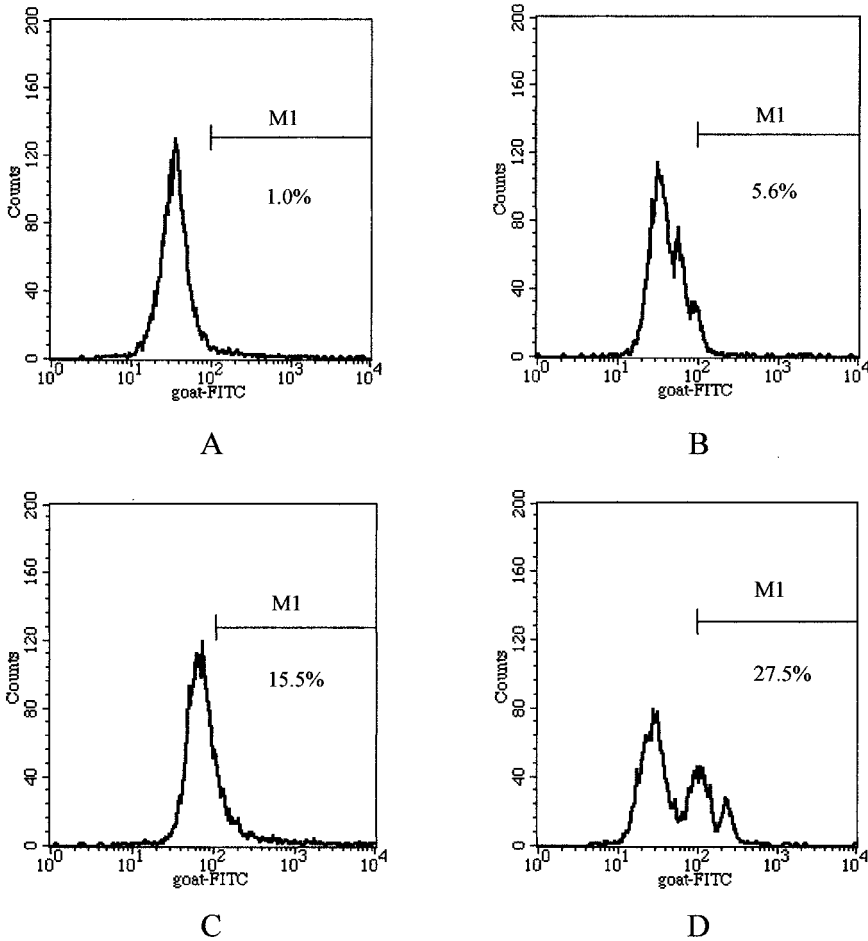


Fig. 1 Histograms of FlowPRA class I beads reacting with negative control serum (A) positive serum showing M1 regions less than 10% (B) negative serum showing M1 regions more than 10% (C) and positive serum (D)

30分間プロテナーゼ処理を施した 2×10^6 のリンパ球と $30 \mu\text{l}$ の対象血清を混合後 4 30分間反応させる。10ml の EDTA 入り PBS (PBS-E) で 2 回洗浄後、 $30 \mu\text{l}$ の FITC-conjugated goat F(ab')₂ anti-human IgG (Biosource, CA) を混合後 4 30分間反応させる。10ml の PBS-E で 2 回洗浄後 1 ml の PBS-E に浮遊させ FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., Sunnyvale, CA) により測定した。患者血清のスクリーニングに際しては、倉田らの方法²⁰⁾による酸処理を施した血小板を用いた PIFT も実施した。解析は、被検血清により感作を

受けた細胞の蛍光強度を陰性対照 (5 人の AB 型男性健常者のプール血清) と比較した。すなわち、陰性領域を陰性対照血清により感作された細胞の 99% 以上を含む領域、M1 領域を陰性領域以外の領域とし、それぞれのサンプルの M1 領域を比較した。FCM では機械的ノイズとして 1~7% の陽性反応が出ることが知られているので、陰性陽性の閾値を 10% に設定した。

FlowPRA (One Lambda Inc., Canoga Park, CA) は、精製 HLA 抗原を結合した直径 2~4 μm のマイクロビーズで抗 HLA 抗体を FCM 法によ

り測定する試薬である¹⁶⁾。5 μ l の FlowPRA ビーズと 30 μ l の被検血清を混ぜた後、室温で 30 分間混和しながら反応させる。1ml の洗浄液で 2 回洗浄後、100 μ l のヤギ抗ヒト IgG (Fc fragment specific) FITC-conjugated F(ab') を混ぜた後、室温で 30 分間混和しながら反応させる。1ml の洗浄液で 2 回洗浄後、0.5ml の固定液 (PBS with 0.5% formaldehyde) を加え、FACSCalibur で FL1 の 10,000 events の蛍光量を測定後解析した。陰性陽性の閾値は 10% に設定したが、試薬の特性から、M1 値が 10% に満たない場合でもピークが 2 峰以上ある場合には陽性とし、逆に M1 値が 10% を超えた場合でもピークが 1 峰性の場合には陰性とした (Fig. 1)。

結 果

抗 HLA-A 抗体の方法別検出感度測定において、AHG-LCT は、LIFT、PIFT および M-MPHA より検出感度が 4 管以上低かった。LIFT、PIFT、M-MPHA 間において差は認められなかったが、これらの方法は、FlowPRA と比べると検出感度が 2 管低かった (Fig. 2)。AHG-LCT、LIFT、PIFT、M-MPHA の検出感度には、使用したパネルの違いにより差があり、5 パネル間で 1~

2 管の差が認められた。抗 HLA-B 抗体においても、AHG-LCT は LIFT、PIFT、M-MPHA より検出感度が 3 管以上低かった。FlowPRA の検出感度は、抗 B54 抗体では LIFT、PIFT、M-MPHA と同等であったが、それ以外の抗体では 2 管高かった (Fig. 3)。LIFT、PIFT および M-MPHA の検出感度には、使用したパネルの違いにより差があり、5 パネル間で、抗 B16CREG、抗 B40 CREG、抗 B54 抗体では 1 管、抗 B35 抗体では 2 管、抗 B15CREG 抗体では 3 管の差が認められた。抗 HLA-C 抗体でも、AHG-LCT は他法に比べ検出感度が 2 管以上低く、また PIFT も LIFT、M-MPHA より 1 管低かった。FlowPRA の検出感度は、抗 Cw1 では、LIFT、M-MPHA よりも高く、抗 Cw4 抗 Cw7 抗 Cw8 では差がなく、抗 Cw3 では低かった (Fig. 4)。LIFT、PIFT および M-MPHA の検出感度には、使用したパネルの違いにより差があり、5 パネル間で 1 管の差が認められた。

血小板輸血歴のある患者 145 血清の抗体スクリーニングにおける方法別抗体検出数は、AHG-LCT : 28 (19.4%)、LIFT : 40 (27.8%)、PIFT : 32 (22.2%)、M-MPHA : 38 (26.4%)、FlowPRA :

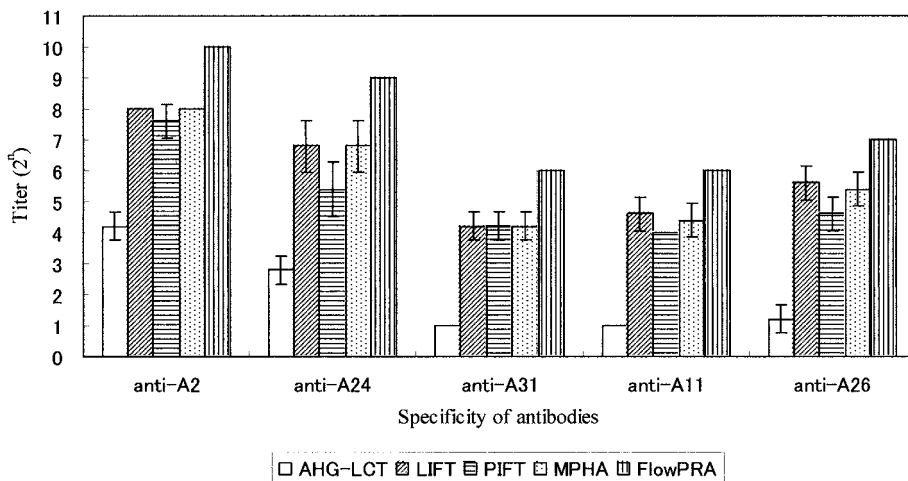


Fig. 2 Titers of anti-HLA-A-specific antibodies by various measurement methods. Antibody titers are expressed as the reciprocal of the dilution times of the serum causing a negative reaction. Error bars indicate SD in 5 trials. Absence of error bars indicates zero SD.

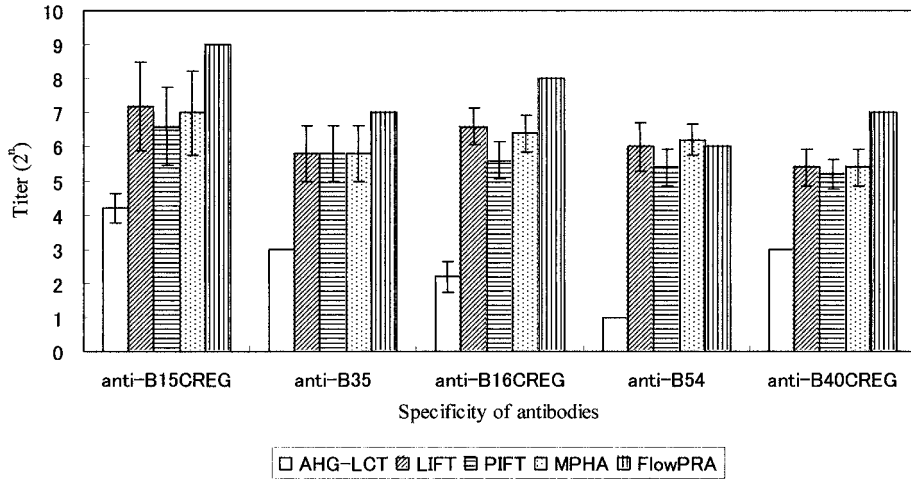


Fig. 3 Titers of anti-HLA-B-specific antibodies by various measurement methods. Antibody titers are expressed as the reciprocal of the dilution times of the serum causing a negative reaction. Error bars indicate SD in 5 trials. Absence of error bars indicates zero SD.

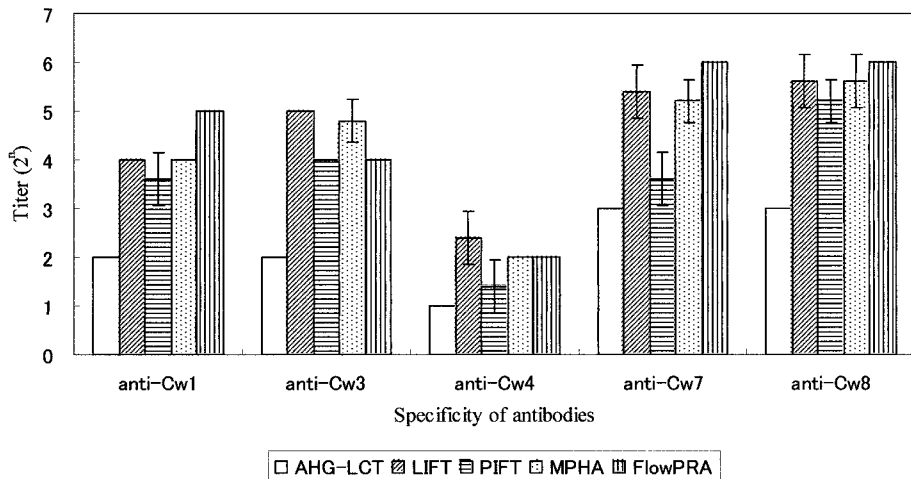


Fig. 4 Titers of anti-HLA-C-specific antibodies by various measurement methods. Antibody titers are expressed as the reciprocal of the dilution times of the serum causing a negative reaction. Error bars indicate SD in 5 trials. Absence of error bars indicates zero SD.

44(30.1%)であった(Table 1). PIFT , M-MPHA で検出された抗体の全ては、酸処理もしくはクロロキン処理をした血小板では検出されなかった . AHG-LCT により、LIFT で検出された抗体の 70.0% , PIFT の 81.2% , M-MPHA の 68.4% ,

FlowPRAの59.1%が検出可能であった . AHG-LCT , PIFT ,M-MPHA で検出された全ての抗体は、LIFT により検出された . 一方PIFTでは、LIFT , M-MPHA で検出された抗体の約 80% しか検出できなかった . M-MPHA は、AHG-LCT ,

Table 1 Comparison of antibody detection rate for various methods in 145 sera samples from patients receiving platelet transfusions.

Antibodies detected by each method				Detection rate by other methods compared to that of the method at left				
Cell	Method	Number	%	AHG-LCT	LIFT	PIFT	MPHA	FlowPRA
Lymphocytes	AHG-LCT	28	19.4	/	28 (100)	26 (92.9)	26 (92.9)	26 (92.9)
	LIFT	40	27.8	28 (70.0)	/	32 (80.0)	38 (95.0)	38 (95.0)
Platelets	PIFT	32 (0)*	22.2	26 (81.2)	32 (100)	/	32 (100)	32 (100)
	MPHA	38 (0)*	26.4	26 (68.4)	38 (100)	32 (84.2)	/	38 (100)
Beads	FlowPRA	44	30.1	26 (59.1)	38 (86.4)	32 (72.7)	38 (86.4)	/

* : Number of detected antibodies after the use of acid-or chloroquine-treated platelets

Table 2 Characteristics of the various methods.

Method	sample	running time (minutes)	sensitivity	detection of HPA antibodies	influence of anti-A, B antibodies	influence of lymphocyte-specific antibodies	influence of ALG *	special equipment
AHG-LCT	Lymphocytes	120	very low	Not possible	Not affected	Affected	Affected	Not necessary
LIFT#	Lymphocytes	150	high	Not possible	Not affected	Affected	Affected	FCM
PIFT#	Platelets	120	low	Possible	Affected	Not affected	Not affected	FCM
M-MPHA	Platelets	90	high	Possible	Affected	Not affected	Not affected	Not necessary
FlowPRA	Beads	80	very high	Not possible	Not affected	Not affected	Not affected	FCM

* : Anti-lymphocyte globulin

: Use of FCM

LIFT の 2 法でのみ検出された 2 抗体を検出できなかったが、それ以外の LIFT で検出された抗体は検出可能であった。FlowPRA においても、AHG-LCT, LIFT の 2 法でのみ検出された 2 抗体は検出できなかったが、それ以外は、他の方法で検出された全ての抗体を検出可能であった。

考 察

血小板輸血や臓器移植に際し、患者血清中の抗 HLA 抗体の有無を正確に検査することは、その後の治療方針に影響を与え大変重要である。そのため抗 HLA 抗体スクリーニングには、より検出感度が高く偽陽性の少ない方法を実施する必要がある。

今回の既知血清を使用した検出感度測定において、LCT の感度不足を補うために開発された AHG-LCT の感度が 2~4 管、他法と比較し低いことがあらためて確認された。

MPHA は以前から検出感度において AHG-LCT

を凌ぐという報告が出されているにもかかわらず⁹⁾¹⁴⁾、プレートの準備から結果判定までに時間がかかることから、限られた施設でしか実施されていない。この欠点を改良した M-MPHA は、FCM を用いる PIFT と比較して 検出感度が同等かそれ以上であった。また FCM を用いる LIFT との比較においても、ほとんど同等と考えられた。

FlowPRA は、一部の抗 HLA 抗体において、M-MPHA や LIFT より検出感度の低い場合があったが、ほとんどの抗 HLA 抗体の検出能力において、他法と比較し、検出感度が 1 管から 2 管高く、M-MPHA や LIFT に見られた検出感度の差もなかった。

臨床検体の抗 HLA 抗体スクリーニングにリンパ球を用いて検査した際に、抗 HLA 抗体以外の抗リンパ球抗体や、anti lymphocyte globulin (ALG) のような投与された薬剤の影響により、非特異的陽性反応が起こる症例を経験することがあ

る。今回の臨床検体のスクリーニングにおいても、AHG-LCT, LIFT が陽性、MPHA, PIFT および FlowPRA が陰性を示す血清が2種類検出された。これら血清の症例における全ての血小板輸血時のクロスマッチはMPHA, PIFT が陰性であり、AHG-LCT, LIFT が陽性であったが、CCI_{24h}は全例で10.0以上であった。輸血効果があったこと及び、抗HLA抗体検出において最も検出感度の高いと考えられるFlowPRAも陰性であったことから、この2症例から検出された抗体は、抗HLA抗体以外の抗リンパ球特異抗体である可能性が高いと考えられる。

一般に抗HLA抗体スクリーニングには、FCM法が最も検出感度が高いと報告されているが⁽¹³⁾⁽¹⁵⁾、高価なFCMは何れの検査室にも設置されているとは限らない。一方、M-MPHAは、特別な機器を必要とせず、試薬も比較的安い。さらに、抗血小板抗体を持つ患者のスクリーニングにおいても有効な方法であり、クロロキン処理、未処理の血小板を使用することにより、抗HLA、抗血小板抗体の識別が可能な場合もある。また、森田らが報告しているように⁽⁹⁾、輸血時のクロスマッチにも使用することが可能で、効果的な輸血を行う指標になりうると考えられる。しかし、M-MPHAでは、抗A、抗Bによる疑陽性反応が起こることが第14回日本血小板型ワークショップで報告され、我々も第52回日本輸血学会総会において、血小板上のA、B抗原がM-MPHA判定結果に影響を及ぼすことを報告している。M-MPHAによる検査においては、抗A、抗Bの影響を受けないパネルの選択が必要となる。

FlowPRAは、試薬が大変高価であり、交差試験には利用できないが、臨床検体のスクリーニングにおいても、抗HLA抗体検出数が最も多く、さらに、抗HLA抗体以外の抗体や薬剤による偽陽性もないことから⁽¹⁶⁾、抗HLA抗体スクリーニングに最適な方法と考えられる。

今回の臨床検体のスクリーニングにおいては、IgM型の抗HLA抗体は検出されなかったが、稀に患者がIgM型の抗HLA抗体を保有することがある。一般に、IgM型の抗HLA抗体は、洗浄操

作により、細胞表面からはがれるため、PIFT, LIFTでは検出感度がAHG-LCTよりも低くなると考えられている。しかし、IgM型のモノクローナル抗体を使った力価試験において、AHG-LCTによる力価が2⁹であったのに対し、二次抗体に抗ヒトIgM抗体を使用したPIFTでは力価が2¹¹と、PIFTの検出感度が、AHG-LCTより高かった。一方で、患者が保有するIgM型の抗HLA-A2抗体を、AHG-LCTでしか検出できなかった症例も経験している(データ未提示)。IgM型の抗HLA抗体検出においても、二次抗体に抗ヒトIgM抗体を使用したFCMは有用と考えられるが、AHG-LCTが必要な症例もある。

まとめとして、AHG-LCT, LIFT, PIFT, M-MPHA, FlowPRA間の主な特性の比較をTable 2に示すが、患者血清中の抗HLA抗体の有無を正確に検査するためには、これら検査法の特徴を考慮し、複数の検査法を実施する必要がある。

文 献

- 1) Dougty HA, Murphy MF, Metcalfe P, et al. : Relative importance of immune and non-immune causes of platelet refractoriness. *Vox Sang*, 66 : 200-205, 1994.
- 2) Legler TJ, Fischer I, Dittmann J, et al. : Frequency and causes of refractoriness in multiply transfused patients. *Ann Hematol*, 74 : 185-189, 1997.
- 3) Fabris F, Soini B, Sartori R, et al. : Clinical and laboratory factors that affect the post-transfusion platelet increment. *Transfus Sci*, 23 : 63-68, 2000.
- 4) Moroff G, Garratty G, Heal JM, et al. : Selection of platelets for refractory patients by HLA matching and prospective crossmatching. *Transfusion*, 32 : 633-640, 1992.
- 5) Gelb AB, Leavitt AD. : Crossmatch-compatible platelets improve corrected count increments in patients who are refractory to randomly selected platelets. *Transfusion*, 37 : 624-630, 1997.
- 6) Terasaki PI, McClelland JB : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204 : 998-1000, 1964.
- 7) Johnson AH, Rossen RD, Butler WB : Detection of alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test. *Tissue Antigens*, 2 : 215

- 226, 1972.
- 8) Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, et al. : Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang*, 41 : 25 - 31, 1981.
- 9) 森田庄治, 井上 進, 川田紀子, 他 : 磁性粒子を使用した迅速な血小板抗体検出の試み . 血液事業 , 25 : 33 - 40, 2002.
- 10) Ohgama J, Yabe R, Tamai T, et al. : A new solid-phase assay system using magnetic force on blood group serology. *Transfusion Medicine*, 6 : 351 - 359, 1996.
- 11) Kurz M, Knobl P, Kalhs P, et al. : Antibodies associated with low posttransfusion platelet increments. A comparison between the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test. *Transfusion*, 41 : 771 - 774, 2001.
- 12) Sintnicolaas K, Lowenberg B : A flow cytometric platelet immunofluorescence crossmatch for predicting successful HLA matched platelet transfusions. *Br J Haematol*, 92 : 1005 - 1010, 1996.
- 13) Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM : The flow cytometric crossmatch. *Transplantation*, 48 : 834 - 840, 1989.
- 14) 安田広康, 加藤久美子, 色摩弥生, 他 : 血小板混合凝集法(MPHA)で検出される低力価 HLA 抗体による血小板輸血不応答 . 医学検査 , 48 : 1007 - 1014, 1999.
- 15) Vaidya S, Cooper YT, Avandsalehi J, et al. : Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase. *Transplantation*, 71 : 422 - 428, 2001.
- 16) Pei R, Wang G, Tarsitani C, et al. : Simultaneous HLA class I and class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol*, 59 : 313 - 322, 1998.
- 17) Levin MD, de Veld J, van der Holt B, et al. : Screening for alloantibodies in the serum of patients receiving platelet transfusions : a comparison of the ELISA, lymphocytotoxicity, and the indirect immunofluorescence method. *Transfusion*, 43 : 72 - 77, 2003.
- 18) 荒木千枝子, 十字猛夫 : 抗白血球抗体検査法 . 日本臨床 , 42 : 1499 - 1504, 1984.
- 19) Edwards J M, Moulds J J, Judd W J. : Chloroquine dissociation of antigen / antibody complexes. A new technique for typing red blood cells with a positive direct antiglobulin test. *Transfusion*, 22 : 59 - 61, 1982.
- 20) Kurata Y, Oshida M, Take H, et al. : New approach to estimate HLA class I antigens from platelet surface without cell damage : Acid treatment at pH 3.0. *Vox Sang*, 57 : 199 - 204, 1989.
-