

論文記事

表面プラズモン共鳴を応用した新規 IgG 型抗 A, B 抗体価測定法*

万木紀美子¹⁾ 木村 晋也¹⁾ 湯浅 健¹⁾ 瀬川 秀和¹⁾
黒田 純也¹⁾ 佐藤 澄¹⁾ 野河 正輝¹⁾ 江川 裕人²⁾
田中 紘一²⁾ 前川 平^{1)B)}

¹⁾京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部

²⁾同 移植外科

³⁾同 分子細胞治療センター

(平成 17 年 3 月 15 日受付)

(平成 17 年 6 月 11 日受理)

RAPID QUANTITATION OF IgG ANTIBODIES SPECIFIC FOR BLOOD GROUP ANTIGENS A AND B BY SURFACE PLASMON RESONANCE**

Kimiko Yurugi¹⁾, Shinya Kimura¹⁾, Takeshi Yuasa¹⁾, Hidekazu Segawa¹⁾,
Junya Kuroda¹⁾, Kiyoshi Sato¹⁾, Masaki Nogawa¹⁾, Hiroto Egawa²⁾,
Kouichi Tanaka²⁾ and Taira Maekawa^{1)B)}

¹⁾Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, ²⁾Transplant Surgery,
and ³⁾Center for Cell and Molecular Therapy, Kyoto University Hospital

The measurement of anti-blood group A/B (anti-A/B) IgG antibody levels is important for ABO unmatched-organ recipients because the effective removal of the antibodies improves their prognosis. However, currently existing methods to detect anti-A/B IgG antibodies suffer limitations due to high costs, low throughput, and poor adaptability to automation. We have developed a rapid means to quantitate anti-A/B IgG antibodies by surface plasmon resonance (SPR). The change in titers when the same plasma was diluted was precisely reflected by the SPR method. The coefficients of correlation between SPR and test tube (TT) methods for anti-A and -B IgG antibodies were 0.85 and 0.56, respectively. The SPR values also paralleled the TT values that showed a decline in titers after the removal of antibodies by double filtration plasma apheresis or plasma exchange.

** This article is partly based on a study first reported in the Transfusion (Kimura, S., Yurugi, K., Yuasa, T., Tsuji, H., Segawa, H., Kuroda, J., Sato, K., Nogawa, M., Egawa, H., Tanaka, K., Maekawa, T. : Rapid quantitation of IgG antibodies specific for blood group antigens A and B by surface plasmon resonance. Transfusion, 45 (1): 56-62, 2005.)

Key words : Anti-A/B antibodies, ABO unmatched transplantation, Living-donor liver transplantation, surface plasmon resonance, tube test

はじめに

わが国では臓器移植を必要とする患者に対し、脳死ドナーからのグラフトの提供は圧倒的に少なく、生体ドナーに頼らざるを得ない状況にある。

生体ドナーは血縁に限られ、いきおい ABO 不適合移植となることが多い¹⁾。京都大学医学部附属病院では平成 16 年 10 月までに 1,051 例の生体部分肝臓移植（以下、生体肝移植）が実施され、そ



Fig. 1 Biacore X.

の内 143 例 (13.6%) が ABO メジャーミスマッチ移植であった。生体肝移植の場合 ABO 不適合症例は適応ではないとする施設もあるが、当院における最近 1 年間の症例では、その割合が 20% にも達しており、なお上昇傾向にある。ABO 不適合生体肝臓移植、とくにメジャーミスマッチ症例において、術前の IgM 型抗 A、抗 B (抗 A/B) 抗体価が高い場合には胆管の合併症が多く、また IgG 型抗 A/B 抗体価が高い場合には肝細胞壊死を来しやすく、予後に大きく影響すると報告されている²⁾。ABO メジャーミスマッチ移植を成功させるためには 2 重膜濾過 (DFPP) や血漿交換により、レシピエントから抗 A/B 抗体を除去するとともに、B リンパ球の抗体産生を抑制することが肝要である³⁾。そして、ABO 不適合移植の病態を把握し、適切な治療法を選択するためには、抗 A/B 抗体価の測定がきわめて重要である。

現在、抗 A/B 抗体価測定法として、試験管法で行う赤血球凝集法 (tube test: TT 法)⁴⁾、酵素抗体法^{5,6)}、フローサイトメトリー法⁷⁾などが報告されているが、いずれも測定に時間とコストがかかり、自動化は困難である。当院では、標準的な検査法である TT 法を採用しているが、TT 法は IgM 型抗体の処理が不十分で IgG 型抗体価を測定できない症例があること、目視による判定のため客観性に欠けることなどの問題点が指摘されており、新たな検査方法の開発が必要である。そこで、われわれは表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance: SPR) という光学現象を測定原

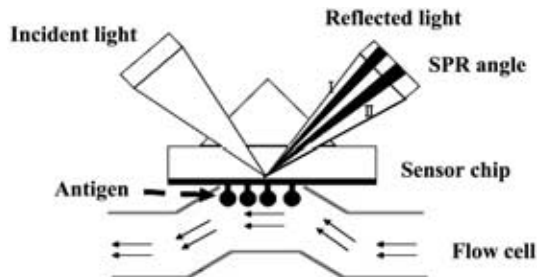


Fig. 2 Schematic view of the optical unit in the Biacore X.

理とし、抗原に結合した抗体量を蛍光や放射性物質の標識を用いずに測定できる装置により、抗 A/B 抗体価を迅速・簡便に測定可能な SPR 法を開発したので報告する^{8,9)}。

材料と方法

1. 測定装置および試薬

SPR 法には、ピアコア X (Uppsala, Sweden) を用い (Fig. 1)、センサーチップは CM5 (Biacore) を選択した。CM5 に固定化する抗原は A または B 抗原トリサッカライドアミン誘導体 (Dextra Laboratories, London, UK) を用いた。ランニングバッファーは HBS-EP バッファー (0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA) を使用した。2 次抗体には抗ヒト IgG 抗体 (MONOSAN, Uden, Netherlands)、IgM 型抗体処理には ABO-index[®] (Inverclyde Biologicals, Scotland, UK) を使用した。

2. 測定検体

45 名の健常成人ボランティア (A, B, AB 型各 10 名, O 型 16 名) の血漿、および 2 名の ABO メジャーミスマッチ生体肝移植患者の血漿を十分なインフォームドコンセントを得て使用した。すべてのサンプルは Rho(D) 陽性であった。血漿は 1ml ずつ分注し測定まで -20℃ で保管した。

3. 測定原理

ピアコア X の光学的検出部の概略図を Fig. 2 に示す。センサーチップはガラス、金膜、デキストラン層 (100nm の直鎖のカルボキシメチルデキストラン) より構成されている。光源部から 760 nm の P-偏光^{脚注1)} を、プリズムを介しセンサーチップの金膜上に照射する。入射角が臨界角^{脚注2)} よりも

大きくなると入射光は総べて反射することになり、この現象を全反射と呼ぶ。全反射が起こったときでも透過光がまったくないわけではなく、誘電率の高い金の表面に全反射の条件で光を当てると、フローセル方向にエバネッセント波^{脚注3}と呼ばれる微弱なエネルギー波を生じる。また、誘電体^{脚注4}に接触した金膜表面では疎密波(表面プラズモン^{脚注5})が発生し両者の波数が一致したときに共鳴して反射光が減衰する現象が生じる(表面プラズモン共鳴現象^{脚注6})。ピアコアでは、抗原分子の固定化されていない側の金薄膜に光を全反射するように当てると、反射光の一部に、反射光強度が低下した部分が観察される(SPR シグナル発生)。この光の暗い部分の現れる角度(=屈折率の変化)はセンサーチップ上での質量に依存する。センサーチップ表面に固定化された抗原に抗体が結合すると質量変化(=質量増)が生じ、光の暗い部分がIからIIにシフトする。逆に解離により質量が減少すれば、IIからIにその分だけ戻る。ピアコアのセンサーグラムは、センサーチップ表面での質量

変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示している。

測定値はレゾナンスユニット(RU)で表され、消失角度0.1度の移動は1,000RUと定義されており、1,000RUは1ng/mm²の質量変化に相当する¹⁰⁾。

4. センサーチップの活性化とリガンドの固定

0.05M N-ヒドロキシスクシイミド(NHS)と0.2M 3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミドヒドロクロリド(DEC)の等量混合溶液でデキストラン層のカルボキシル基を活性化する。次いで1mg/mlのAまたはB型抗原トリサッカライドアミン誘導体をフローセル2の活性化カルボキシル基にアミンカップリング法で固定する。固定後1M エタノールアミンでフローセル1および2の残存活性化エステルを不活化する。

5. 検体測定とセンサーチップ再生

1% デキストラン加HBS-EPバッファーで2倍希釈した被検血漿120μlを注入して、フローセル1および2を20μl/minの流速で5分間通過させる。5分後、自動的に流路はランニングバッファーに切り替わり、非結合抗体は洗浄除去される。抗原を固定化していないフローセル1の測定値はセンサーチップ自体に対する非特異的バックグラウンド(リファレンス)とし、抗原を固定化したフローセル2測定値-フローセル1測定値”を検体の測定値とした。次に10倍希釈抗ヒトIgGモノクローナル抗体120μlを注入して、同様に5分間反応させる。各検体の測定終了後、50mM NaOHでセンサーチップ上の抗原に結合した抗体を解離させ再生する。センサーチップは約1,000回の再使用が可能である。

測定結果であるセンサーグラムのシェーマをFig. 3に示す。ベースライン(a)から被検血漿を流し終えた時点の測定値(b)の上昇分(b-a)A値は、IgM型、IgG型抗A/B抗体+α(固定化抗原に対する少量の非特異的反応)であり、抗ヒトIgG抗体添加時点(c)から抗体添加終了時(d)までの上昇分(d-c)B値は、IgG型抗A/B抗体+αと考えられる。

- 1 p-偏光: 光の電気ベクトルが入射面に平行な成分。
- 2 臨界面角: 光が屈折率の高い材質から低い材質へ伝播する時、入射角によって透過する場合と全反射する場合がある。臨界面角とは、この透過と全反射の境になる角度である。つまり、入射角度が臨界面角に満たないと透過屈折し、臨界面角を超えると全反射する。
- 3 エバネッセント波: 屈折率が異なる界面に入射した光は、反射と屈折を起こし、その屈折率はスネルの法則[光線が平面(屈折率の異なる媒質の境界)に入射した場合の入射角と出射角、および媒質の屈折率との関係を示す法則]を満たす。特に、屈折率が高い側から低い側へと光が入射し、且つ臨界面角以上の角度で入射した場合、すべての光は入射側に反射され全反射を起こす。このとき低い屈折率側では非伝搬光であるエバネッセント波が形成され境界面に垂直方向に対して指数関数的に減衰する。その減衰定数は屈折率と入射角に依存する。
- 4 誘電体: 静電場を加えるとき、電気分極を生ずるが、直流電流を生じない物質である。電氣的絶縁体と同義。
- 5 表面プラズモン: 一般に光は電子波(プラズモン)とはカップリングしないが、表面ではその特殊性から光と共鳴する電子波のモードが生じる。電子波と光の分散関係よりエバネッセント波のみが表面プラズモンと共鳴する。
- 6 表面プラズモン共鳴現象: エバネッセント波と表面プラズモン波の波数が一致したときに共鳴して反射光が減衰する現象。

6. 検討項目

- 1) 10~1,000 倍希釈した同一ドナー由来の O 型血漿について, SPR 法を用い抗 A/B 抗体価を測定した .
- 2) 45 名の健常人ドナー由来血漿を SPR 法および TT 法の 2 法で測定して, 相関の有無を検討した .
- 3) 2 名の ABO メジャーミスマッチ生体肝臓移植患者の血漿を経時的に SPR 法と TT 法の 2 法で測定して, 臨床上の変化を適切に反映するかを検討した .
- 4) AB-index[®]を用い IgM 型抗体を除去した血

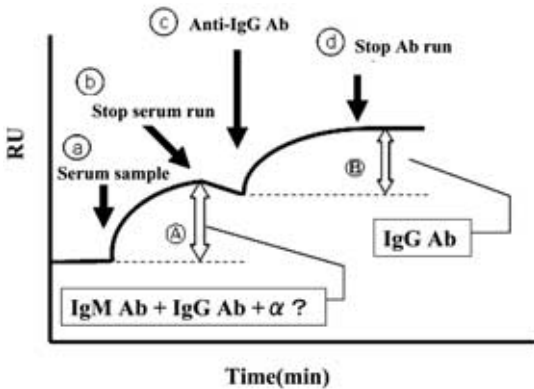


Fig. 3 Depiction of the SPR method used to detect anti-A/B IgG Abs.

漿と未処理の血漿 (抗 A, 抗 B 抗体各 5 検体) を SPR 法で測定して, IgM 型抗体が IgG 型抗体測定におよぼす影響を検討した .

結 果

- ①同一ドナー由来の O 型血漿を段階希釈した検体の測定値 (SPR 法) は, サンプルの抗体濃度に比例した (Fig. 4). 本検体において SPR 法と TT 法での測定値は, IgG 型抗 A/B 抗体ともによく相関した (Fig. 5).
- ② 45 名の健常人ドナー由来の血漿について, SPR 法と TT 法による IgG 型抗 A/B 抗体測定値の相関を示した (Fig. 6). 2 法による相関係数は IgG 型抗 A 抗体では 0.7029, IgG 型抗 B 抗体では 0.5808 であった .
- ③ ABO メジャーミスマッチ生体肝臓移植患者 2 名の抗体価の変化を (Fig. 7) に示す . 患者 A および B はいずれも O 型, ドナーは B 型のため, IgG 型抗 B 抗体価の測定を行った . TT 法とともに SPR 法も, 血漿交換や DFPP による抗体除去後で抗体価の低下が検出された . 患者 A では術後 TT 法による抗体価が上昇し (Fig. 7A), 患者 B では抗体価は低レベルで維持されていた (Fig. 7B). これらの抗体価の変化は, SPR 法でもほぼ同様に検出された .
- ④ IgM 型抗体除去血漿と未除去血漿の SPR 測定値は, ほぼ同様であり SPR 法での IgG 型抗体価

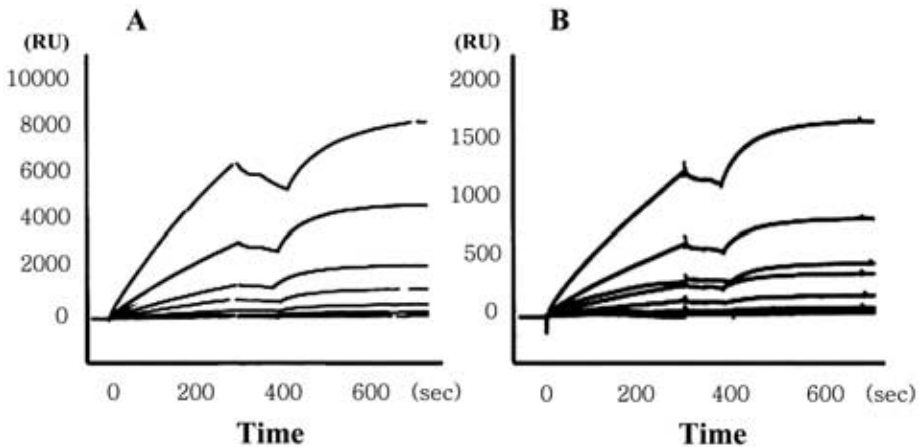


Fig. 4 Overlaid sensorgrams obtained for thman plasma antibodies of different concentrations using sensor chip surfaces bearing A or B antigen.

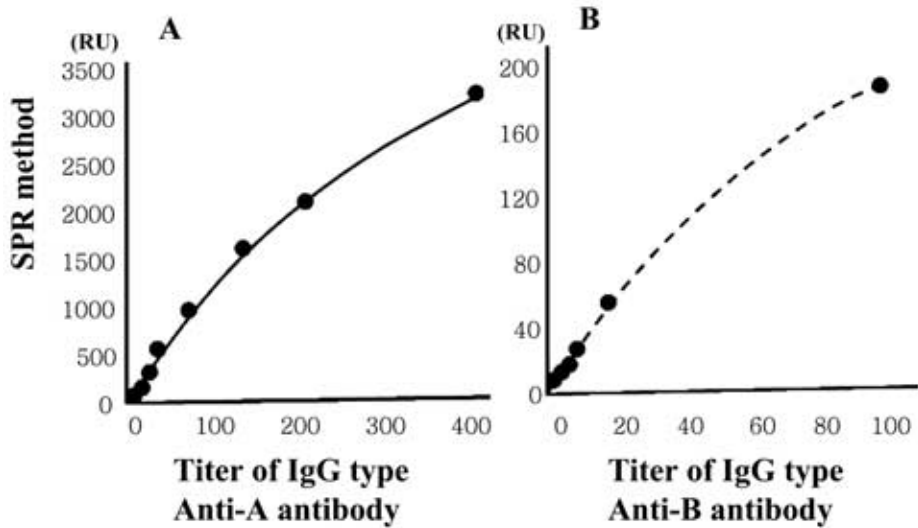


Fig. 5 Calibration curves of the anti-A and anti-B IgGs.

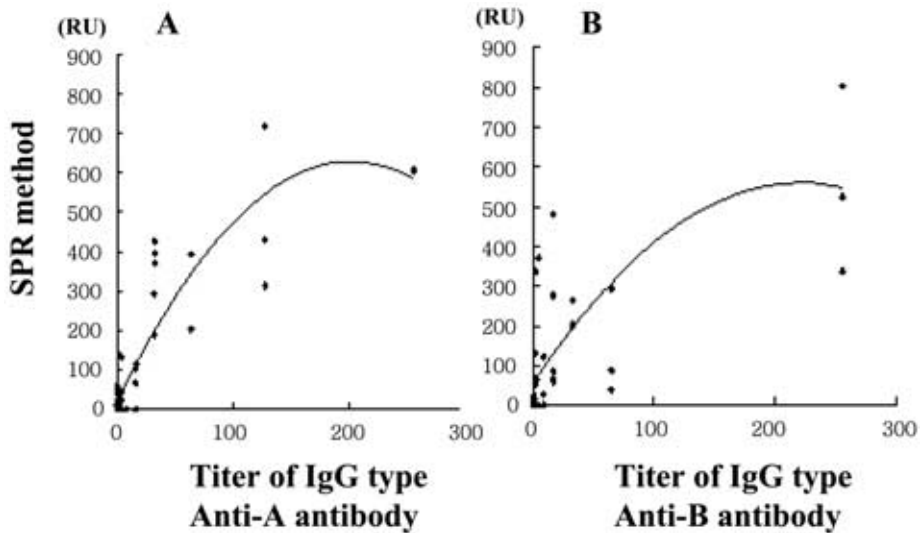


Fig. 6 Correlation between values measured by the SPR and TT methods using plasma specimens from normal subjects.

測定値は IgM 型抗体により影響を受けないことが明らかとなった (Fig. 8)。

考 察

われわれは増加傾向にある ABO 不適合移植に対応するために、IgG 型抗 A/B 抗体価を迅速・簡便に測定できる SPR 法の開発を行った。従来の

TT 法では、血漿の 2 倍連続希釈を 10 段階行い、それぞれに試薬を添加し凝集強度を判定しなければならず、操作が煩雑で約 3 時間を要する。一方、SPR 法は 1 検体の所要時間 15 分、血漿の希釈は 1 段階のみと迅速・簡便であり、さらに試薬コストは TT 法と比較し SPR 法は約 2/3 と廉価であっ

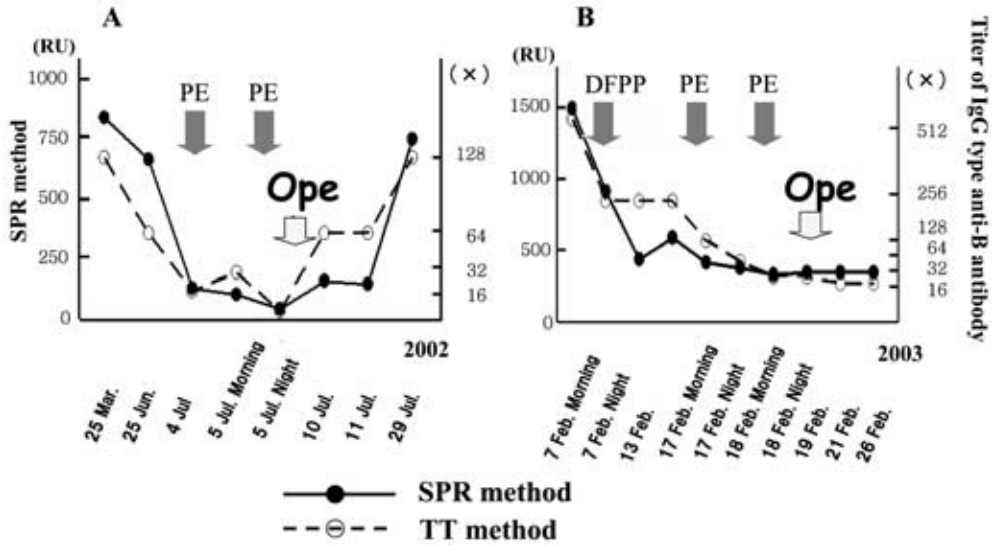


Fig. 7 Changes in anti-B IgG titers in ABO-unmatched LDLT patients before and after PE/DFPP and the LDLT operation.

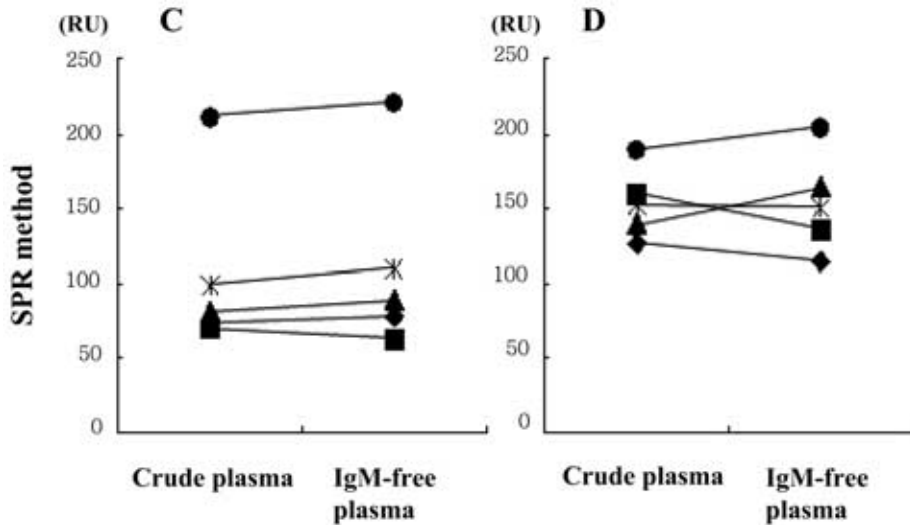


Fig. 8 Comparison of anti-A/B IgG Ab measured by SPR method between Crude plasma and IgM-free plasma in healthy volunteers.

た .精度面では ,TT 法が目視判定であるため客観性および定量性に乏しいのに対し ,SPR 法は定量検査に優れた方法であった .SPR 法は ,IgG 型抗 A/B 抗体価を定量的に RU 単位で測定可能であり ,さらに精製 IgG 型抗 A/B 抗体で検量線を作成することにより抗体量を血漿の希釈倍数である

抗体価ではなく $\mu\text{g}/\text{ml}$ と濃度で示すことも可能である .現在 ,精製抗 A/B 抗体は市販されていないが ,カラムクロマトグラフィーで精製は可能であり¹¹⁾ ,すでにわれわれは精製抗体を作成し SPR 法の完全定量化に成功している (投稿準備中) .

また ,TT 法では IgM 型と IgG 型抗体をそれぞれ

れ正確に測定することに限界がある。その理由は、未処理の血漿による赤血球の凝集は IgM 型抗体によるものだけでなく、正確には IgG 抗体も凝集に関与していること¹¹⁾¹²⁾、また 2-メルカプトエタノールなどでの IgM 抗体の破壊が不完全で、IgG 抗体が測定不能の場合があることである。しかし SPR 法による IgG 型抗体測定値は、IgM 型抗体の影響を受けず、より信頼度の高い測定方法と考えられた (Fig. 8)。45 名の健常人ドナーのサンプルを SPR 法と TT 法で測定すると 2 法に若干の解離を認めたと、同一患者の手術前から術後経過の抗体価の変化を 2 法で測定すると、ほとんど平衡しており、血漿交換や二重膜濾過による抗体除去効果をよく反映していた。これらの結果は SPR 法が TT 法に代わりうる検査法であることを示唆している。

抗 A/B 抗体測定方法として、酵素抗体法やフローサイトメトリー法が開発されている⁵⁾⁻⁷⁾。SPR 法と比し酵素抗体法は抗原抗体反応に時間を要し、抗原を固定化したプレートの再使用ができない。また、フローサイトメトリー法は検査を行う度に A および B 型赤血球の調整が必要であり、洗浄操作が繰返し必要で、約 2~3 時間を要する。ABO 不適合移植例の抗体価測定は血漿交換の適応決定時など至急にデータを必要とされる場合が多く、SPR 法のような迅速・簡便な方法が臨床的により有用であると期待される。

このように SPR 法は有用な検査法であるが、問題点として現状では IgM 型抗体の測定が困難なことが挙げられる。理論上は、Fig. 3 における A 値は IgM 型と IgG 型抗体の合計であり、B 値は IgG 型抗体を反映しているため、IgM 抗体量は A - B で求められるが、このようにして得られた IgM 値と TT 法で得られた値との相関性に乏しかった。また抗ヒト IgG 抗体の代わりに抗ヒト IgM 抗体を用いて IgM 型抗体の検出を試みたが、安定した結果は得られなかった。これらの原因は、IgG 型抗体に比して IgM 型抗体の抗原からの解離速度がきわめて大きいためと考えられた¹³⁾。今後 IgM 型および IgG 型抗体の今回作成した抗原固定化センサーチップにおける解離速度を詳細に

求め、SPR 法の測定結果から数学的解析により IgM 型抗体量を算出することが可能かどうか検討中である。

また SPR 法のもう一つの問題点は、検査法自体は 1 検体 15 分と迅速であるが、1 検体ずつしか測定できないことである。この点においては、一度に多数のサンプルを測定できる酵素抗体法やフローサイトメトリー法に劣る。しかし、今回使用したピアコア X の上位機種 (ピアコア 2000 または 3000) を用いることで、結果の解析まで含め全自動・連続的に 96 検体まで測定可能であり、処理速度の問題も解決できると考えている¹⁴⁾。

結 語

SPR 法による IgG 型抗 A/B 抗体測定方法は、迅速・簡便に定量的な測定が可能であり、今後 TT 法に代わりうる可能性が示唆された。

*本論文内容は、Blackwell Publishing 社の許可のもと Transfusion 45 巻第 1 号 56-62, 2005 に最初に掲載された論文に基づき作成したものである (Kimura, S., Yurugi, K., Segawa, H., Kuroda, J., Sato, K., Nogawa, M., Yuasa, T., Egawa, H., Tanaka, K., Maekawa, T.: Rapid quantitation of IgG antibodies specific for blood group antigens A and B by surface plasmon resonance. Transfusion, 45 (1): 56-62, 2005.)

第 52 回日本輸血学会総会推薦論文

(本論文の要旨は平成 16 年 5 月 30 日、第 52 回日本輸血学会総会 (札幌) で発表した)。

文 献

- 1) Ogura Y, Kaihara S, Haga H, et al: Outcomes for pediatric liver retransplantation from living donors. Transplantation, 76: 943-948, 2003.
- 2) Kozaki K, Kasahara M, Oike F, et al: Apheresis therapy for living-donor liver transplantation: experience for apheresis use for living-donor liver transplantation at Kyoto University. Ther Apher, 6: 478-483, 2002.
- 3) Kobayashi T, Yokoyama I, Morozumi K, et al: Comparative study of the efficacy of removal of anti-ABO and anti-gal antibodies by double filtration plasmapheresis. Xenotransplantation, 7: 101-108, 2000.
- 4) Vengelen-Tyler V editors: AABB TECHNICAL MANUAL 13th Edition. Bethesda, 697-700, 2002.

- 5) Spalter SH, Kaveri SV, Bonnin E, Mani JC, Cart-ron JP, Kazatchkine MD : Normal human serum contains natural antibodies reactive with autologous ABO blood group antigens. *Blood*, 93 : 4418-4424, 1999.
 - 6) Galili U, Ishida H, Tanabe K, Toma H : Anti-gal A/B, a novel anti-blood group antibody identified in recipients of ABO-incompatible kidney allografts. *Transplantation*, 74 : 1574-1580, 2002.
 - 7) Sharon R, Fibach E : Quantitative flow cytometric analysis of ABO red cell antigens. *Cytometry*, 12 : 545-549, 1991.
 - 8) Swanson SJ, Mytych D, Ferbas J : Use of biosensors to monitor the immune response. *Dev Biol (Basel)* 109 : 71-78, 2002.
 - 9) Kimura S, Yurugi K, Segawa H, Kuroda J, et al : Rapid Quantitation of IgG Antibodies Specific for Blood Group Antigens A and B by Surface Plasmon Resonance. *Transfusion*, 45 : 56-62, 2005.
 - 10) Stenberg, E, B. Persson, et al : Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance by using radiolabeled proteins. *Colloid Int Sci*, 143 : 513-526, 1991.
 - 11) van Oss CJ, Mohn JF, Cunningham. Influence of various physicochemical factors on hemmagglutination. *Vox Sang*, 34 : 351-361, 1978.
 - 12) Contreras M, Armitage SE, Hewitt PE : Response to immunization with A and B human glycoproteins for the procurement of blood grouping reagents. *Vox Sang*, 47 : 224-235, 1984.
 - 13) Lee J, Cairns T, McKane W, Rashid M, et al : Demonstration of IgM antibodies of high affinity within the anti-Galalpha 1-3Gal antibody repertoire. *Transplantation*, 66 : 1117-1119, 1998.
 - 14) Ahmad A, Zong Q, Rock M, McLean M, et al : Determination of granulocyte colony stimulating factor and its antibody in human serum samples using the BIAcore 3000 biosensor. *Anal Biochem*, 324 : 304-306, 2004.
-