

## 蛍光ビーズ法を応用した高感度 HLA・HPA 抗体同時解析法の開発

藤原 孝記 島野 佳恵 田中 秀則 関根みゆき 柏瀬 貢一  
内川 誠 佐竹 正博 中島 一格

背景：HLA・HPA 抗体の検出は、血小板輸血不応症例において極めて重要である。しかし、信頼性が高くハイスルーブットな HLA 交差適合試験法や HPA 抗体検出法に関する報告はされていない。

方法：高感度 HLA・HPA 抗体同時解析法としてビーズアレイを応用した immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA) 法を開発した。患者血清と反応させた血小板を可溶化し、モノクローナル抗体結合蛍光ビーズを反応させることにより、血小板膜糖タンパク質および HLA クラス I 分子のモノクローナル抗体エピトープを介して抗原抗体複合物を特異的に捕捉した。フローサイトメトリー解析により蛍光ビーズが捕捉した免疫複合体を検出し、抗体特異性を判定した。

結果：HLA 抗体を含む血清 50 例および HPA 抗体を含む血清 20 例を用いて検討した結果、ICFA 法は FlowPRA (One Lambda) と同程度の検出感度で HLA 抗体を検出することが可能であった。また、本法は MPHA 法より高い検出感度で HPA 抗体を検出することが可能であった。

考察：ICFA 法は、迅速・簡便かつ信頼性の高い、高感度 HLA・HPA 抗体同時解析法であり、AHG-LCT 法に代わる HLA 交差適合試験の標準法として期待される。

キーワード：ビーズアレイ、フローサイトメトリー解析、ハイスルーブット、HLA 抗体、HPA 抗体

本論文内容は、Wiley-Blackwell 社の許可のもと Vox Sanguinis 誌 (第 96 巻 第 5 号 244—251 2009 年) に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。(Fujiwara, K., Shimano, K., Tanaka, H., Sekine, M., Kashiwase, K., Uchikawa, M., Satake, M., Nakajima, K.: Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. Vox Sanguinis. 96 (5) : 244—251, 2009)

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会推薦論文「Luminex システムを応用した HPA 抗体解析法」

### はじめに

血小板に対する抗体 (HLA 抗体を含む) は、母児血小板型不適合による新生児血小板減少症や、血小板輸血不応などの原因である<sup>1)</sup>。さらに HLA 抗体は、輸血関連急性肺傷害 transfusion-related acute lung injury (TRALI) の主な原因と考えられている<sup>2)3)</sup>。HLA 抗体および HPA 抗体の検出は、このような疾患に対する診断や治療上、重要である。したがって、信頼性が高くハイスルーブットにこれらの抗体を検出する方法が必要とされている。しかし、HLA 抗体検出の標準法は lymphocyte cytotoxicity test (LCT : 以下、LCT 法)<sup>4)</sup>であり、2つの問題がある。: 1) 日常の HLA 抗体検査に必要となる厳選されたリンパ球パネルを確保するのは困難である。2) non-HLA 抗体、抗胸腺細胞グロブリン (anti-thymocyte globulin : ATG) や CAMPATH-1H

(抗 CD52 モノクローナル抗体 : alemtuzumab) などリンパ球を抑制する抗体が患者に投与されている場合、LCT 法では HLA 抗体との判別が不可能である。一方、HPA 抗体を検出する方法として、わが国では Mixed passive haemagglutination (MPHA : 以下、MPHA 法)<sup>5)</sup>が主流であり、簡便かつ高感度に HPA 抗体を検出する方法として広く用いられている。しかし、HPA 複合抗体を保有している場合や同時に HLA 抗体を保有している場合など、MPHA 法だけでは抗体の特異性を判定することが困難な場合がある。

最近、HLA 抗体の検出においてフローサイトメトリーを応用した高感度 HLA 抗体検査法が開発され、精製した HLA 抗原をマイクロビーズに結合した試薬を用いた間接蛍光抗体法<sup>6)7)</sup>や、Luminex<sup>®</sup> (Luminex, TX, USA) のような新技術の導入により HLA 抗体の検出が容易に

Table 1 Human platelet antigens

System	Antigens	Gene Frequencies (%)		Glycoprotein	CD	Chromosome	Amino Acid Substitution
		Caucasian	Japanese				
HPA-1	HPA-1a	85.0	>99.0	GPIIIa	CD61	17q	Leu33 Pro33
	HPA-1b	15.0	<0.1				
HPA-2	HPA-2a	93.0	87.9	GPIba	CD42b	17p	Thr145 Met145
	HPA-2b	7.0	12.1				
HPA-3	HPA-3a	61.0	55.5	GPIIb	CD41	17q	Ile843 Ser843
	HPA-3b	39.0	44.5				
HPA-4	HPA-4a	>99.9	99.0	GPIIIa	CD61	17q	Arg143 Gln143
	HPA-4b	<0.1	1.0				
HPA-5	HPA-5a	89.0	95.4	GPIa	CD49b	5q	Glu505 Lys505
	HPA-5b	11.0	4.6				
HPA-6	HPA-6bw	>99.7 <0.3	97.7 2.3	GPIIIa	CD61	17q	Arg489 Gln489
	Nak <sup>a</sup>	>99.9	95.0				

なった<sup>8)</sup>。しかし、信頼性が高くハイスループットな HLA 交差適合試験法や HPA 抗体検出法についての報告はされていない。本研究において我々は、迅速・簡便かつ信頼性の高い、高感度 HLA・HPA 抗体同時解析法である immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA：以下、ICFA 法)を開発した。ICFA 法は、Luminex ビーズアレイに antigen capture 法を応用した方法で、被検血清と反応させた血小板を可溶化し、HLA クラス I 分子や血小板膜糖タンパク質に特異的なモノクローナル抗体を結合させた多色の Luminex 蛍光ビーズを用いて、多種類の抗原抗体複合物を特異的に捕捉し、Luminex<sup>®</sup>100 (Luminex, TX, USA) を用いたフローサイトメトリー解析によって各ビーズが捕捉した抗原抗体複合物を同時に検出することにより、血小板上の抗原に対する抗体の検出および特異性解析を行う方法である。本法は、交差適合試験に適用することから anti-human immunoglobulin lymphocyte cytotoxicity test (AHG-LCT：以下、AHG-LCT 法)に代わる HLA 交差適合試験の標準法として期待される。また、本法は使用するモノクローナル抗体の種類を増やすことにより、HLA 抗体と同時に顆粒球抗原 human neutrophil antigens (HNA) に対する抗体の解析を行うなど、幅広い応用が可能な技術である。

## 方 法

### 1. 被検血清

血小板輸血患者または新生児血小板減少症患者血清より、HLA 抗体を含む血清 50 例および HPA 抗体を含む血清 20 例を用いて ICFA 法の有用性について検討した。HLA 抗体は、AHG-LCT 法、FlowPRA<sup>®</sup> Class I Screening (One Lambda, CA, USA, 以下、FlowPRA)、LABScreen<sup>®</sup> Class I Single Antigen (One Lambda, CA,

USA, 以下、LABScreen)を用いて解析を行い、ICFA 法の解析結果と比較した。また、HPA 抗体は、MPHA 法 (anti-HPA MPHA Panel, Olympus, Tokyo, Japan) および、National Institute of Biological Standards and Control (NIBSC) の標準プロトコルに基づき monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA 以下、MAIPA 法)<sup>9)</sup>を実施して、ICFA 法の結果と比較した。

ICFA 法による HLA・HPA 抗体の検出では、パネルとして血小板を用い、HLA 抗体を含む血清 20 例、HPA 抗体を含む血清 20 例を用いた。また、ICFA 法の HLA・HPA 抗体検出感度は、MPHA 法の検出限界まで希釈した 8 種類の検体を用いて検討した。抗 HPA-5b と抗 Nak<sup>a</sup> の検出感度については、MPHA 法の検出限界より 4 倍希釈した 2 種類の検体を用いて検討した。

ICFA 法を用いた HLA 交差適合試験における HLA 抗体の検出では、パネルとして白血球を用い、FlowPRA にて低力価 HLA-IgG 抗体が検出された患者血清 30 例を用いた。また、ICFA 法の HLA 抗体検出感度について、AHG-LCT 法の検出限界より 4 倍および 8 倍希釈した患者血清 7 例を用いて AHG-LCT 法と比較した。

### 2. モノクローナル抗体

Table 1 に主な血小板抗原を示す<sup>10)</sup>。これらの血小板抗原は各血小板膜糖タンパク質に局在していることから、CD36 (anti-GPIV, Clone: FA 6-152, IMMUNOTECH, Marseille, France), CD49b (anti-GPIa/IIa, Clone: Gi9, IMMUNOTECH, Marseille, France), CD61 (anti-GPIIb/IIIa, Clone: SZ21, IMMUNOTECH, Marseille, France), CD41 (anti-GPIIb/IIIa, Clone: P2, IMMUNOTECH, Marseille, France), CD42b (anti-GPIb/IX, Clone: SZ2, IMMUNOTECH, Marseille, France), HLA クラス I (Clone: W6/32) に特

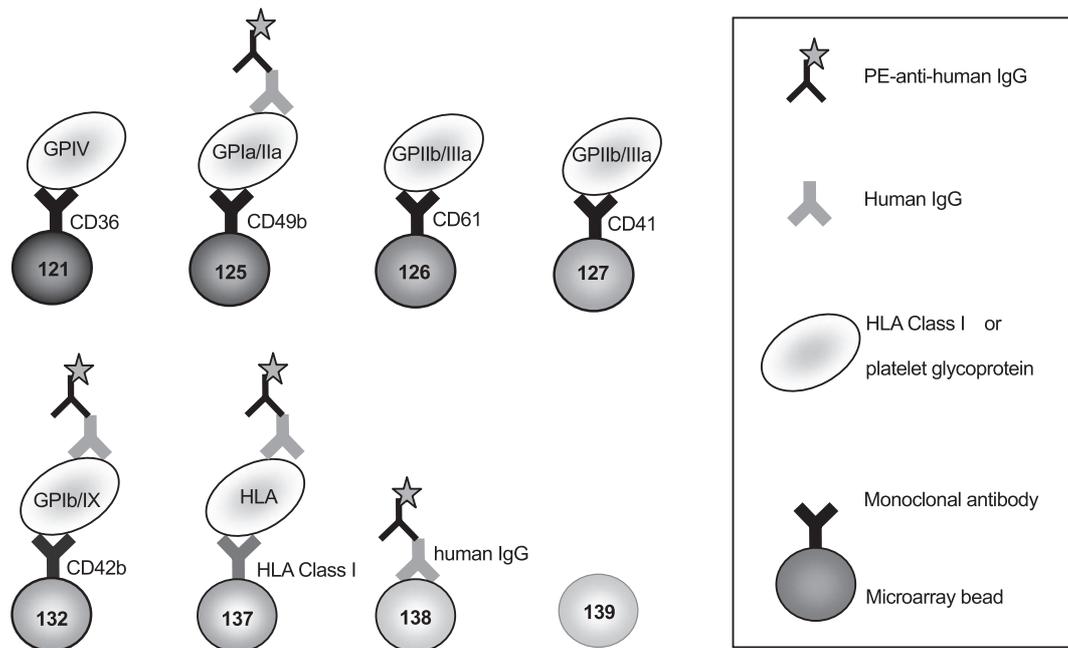


Fig. 1 Overview of immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA). Six types of bead (Luminex bead Lot Nos. 121, 125, 126, 127, 132, and 137) were coupled with monoclonal antibodies specific for CD36 (GPIV), CD49b (GPIa/IIa), CD61 (GPIIb/IIIa), CD41 (GPIIb/IIIa), CD42b (GPIb/IX), and HLA class I, respectively. As references, two types of bead (Luminex bead Lot Nos. 138 and 139) were coupled with human IgG (positive control beads) and BSA (background beads), respectively. The bead mixtures were incubated with lysate and subjected to flow cytometric analysis. Platelet glycoproteins, HLA Class I molecules, or antigen-antibody complexes were obtained by solubilization of platelets that had been reacted with a patient's serum.

異なる6種類のモノクローナル抗体を用いた。

### 3. Luminex ビーズ

8種類のLuminexビーズ(Luminex, TX, USA)を用意し、CD36, CD49b, CD61, CD41, CD42b, HLAクラスIに特異的なモノクローナル抗体を6種類の各ビーズ(Luminex bead Lot Nos. 121, 125, 126, 127, 132, 137)にそれぞれ結合させた。また、2種類のコントロールビーズとして、2次抗体陽性コントロールビーズ(Luminex bead Lot No. 138)にヒトIgG(ZYMED, CA, USA)、バックグラウンドビーズ(Luminex bead Lot No. 139)にBSA(FrV Serologicals Proteins, IL, USA)をそれぞれ結合させた。モノクローナル抗体およびコントロールは、Luminexの添付マニュアルにしたがってビーズに結合させた。

目的に合わせて2種類のビーズミックスを作製した。一方はHLA・HPA抗体検出用で、8種類のビーズをそれぞれ約 $1.2 \times 10^6$ 個/mlになる様に等量混合して調整した。もう一方はHLA抗体検出用(HLA交差適合試験)で、HLAクラスI分子に対するモノクローナル抗体を結合させたビーズ、ヒトIgGを結合させたビーズ、BSAを結合させたビーズをそれぞれ約 $4 \times 10^5$ 個/mlになる様に等量混合して調整した。

### 4. ICFA : HLA・HPA抗体同時検出

Fig. 1にICFA法の原理を示す。HLA・HPAタイピング済みのドナーより末梢血5mlをEDTA採血し、1,800gで5分遠心した。上清(platelet-rich plasma: PRP, 多血小板血漿)50 $\mu$ lを96ウェルマイクロプレート(Greiner, Frickenhausen, Germany: 96 Well Polystyrene Microplates 300 $\mu$ l U-bottom)に加え、0.5% EDTA-PBS (pH6.0), 200 $\mu$ lにて2,000g, 2分遠心による洗浄を2回行って洗浄血小板(血小板数, 約 $1 \times 10^7$ 個)を調整した。被検血清・陰性コントロール血清を25 $\mu$ lずつ加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。0.05% Tween 20-PBS (以下PBS-T), 200 $\mu$ lにて2,000g, 2分遠心による洗浄を2回行い、lysis buffer(0.005 M Tris, 0.25% TritonX-100, 0.9% NaCl, pH 7.4)を50 $\mu$ l加え、室温で10分間振盪しながら可溶化した後、2,000gで5分遠心した。HLA・HPA抗体検出用のLuminexビーズミックスを5 $\mu$ lおよび、あらかじめPBS-Tにて50倍希釈したPE標識抗ヒトIgG抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, PA, USA)を50 $\mu$ l加えた96ウェルマイクロプレート(Whatman, NJ, USA: UNIPLATE V-bottom, 96 wells, 250 $\mu$ l)に可溶化した検体の遠心上清30 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後、室温

で10分間振盪しながら反応させた。抗原抗体複合物を捕捉したLuminex ビーズをPBS-T, 200 $\mu$ lにて2,000g, 2分遠心による洗浄を2回行い, PBSを50 $\mu$ l加えて蛍光ビーズを再浮遊させ, Luminex<sup>®</sup>100(Luminex, TX, USA)にてフローサイトメトリー解析を行った。HLA・HPA同時検出では, 各ビーズを1,000イベントまでカウントし, 各ビーズの蛍光強度 median 値を測定した。

### 5. ICFA : HLA 交差適合試験

HLA タイピング済みのドナーより末梢血5mlをEDTA採血した。96ウェルマイクロプレート(96 Well Polystyrene Microplates 300 $\mu$ l U-bottom)にTris-NH<sub>4</sub>Clを200 $\mu$ l分注し, EDTA加全血25 $\mu$ lを加え, 混和後, 37 $^{\circ}$ Cにて10分間溶血させた。0.5%EDTA-PBS, 200 $\mu$ lにて2,000g, 2分遠心による洗浄を2回行い, 被検血清・陰性コントロール血清を25 $\mu$ lずつ加え, 37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。PBS-T, 200 $\mu$ lにて2,000g, 2分遠心による洗浄を2回行い, lysis bufferを50 $\mu$ l加え, 室温で10分間振盪しながら可溶化した後, 2,000gで5分遠心した。HLA抗体検出用(HLA交差適合試験用)のLuminexビーズミックスを5 $\mu$ lおよび, あらかじめPBS-Tにて50倍希釈したPE標識抗ヒトIgG抗体を50 $\mu$ l加えた96ウェルマイクロプレート(UNIPLATE V-bottom)に可溶化した検体の遠心上清30 $\mu$ lを加え, 37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた後, 室温で10分間振盪しながら反応させた。抗原抗体複合物を捕捉したLuminexビーズをPBS-T, 200 $\mu$ lにて2,000g, 2分遠心による洗浄を2回行い, PBSを50 $\mu$ l加えて蛍光ビーズを再浮遊させ, Luminex<sup>®</sup>100(Luminex, TX, USA)にてフローサイトメトリー解析を行った。HLA交差適合試験では, 各ビーズを100イベントまでカウントし, 各ビーズの蛍光強度 median 値を測定した。

### 6. Cut-off Index

判定方法は, LABScreen Single Antigenにて使用されている計算式および判定基準を用いた。Cut-off Indexは, 各ビーズの蛍光強度 median 値を用い, 検体と陰性コントロール血清における実測値とバックグラウンドの比率からIndex(以下の計算式)を算出し, 2.0以上の場合を陽性とした。

(検体実測値 $\div$ 陰性コントロール血清実測値) $\div$ (検体バックグラウンド $\div$ 陰性コントロール血清バックグラウンド)

## 結 果

### 1. HLA・HPA抗体同時検出

被検血清とパネル血小板が反応している場合, 血清の特異性に対応する抗原を捕捉するビーズが抗原抗体複合物を捕捉しているため, 高い蛍光強度が認められた。ICFA法によるHLA・HPA抗体同時検出の検討で

Table 2 Reactivities determined by MAIPA, MPHA, and ICFA in 20 serum samples containing HLA antibodies and 20 serum samples containing HPA antibodies

	MAIPA	MPHA	ICFA
Positive	39	40	40
Negative	1	0	0

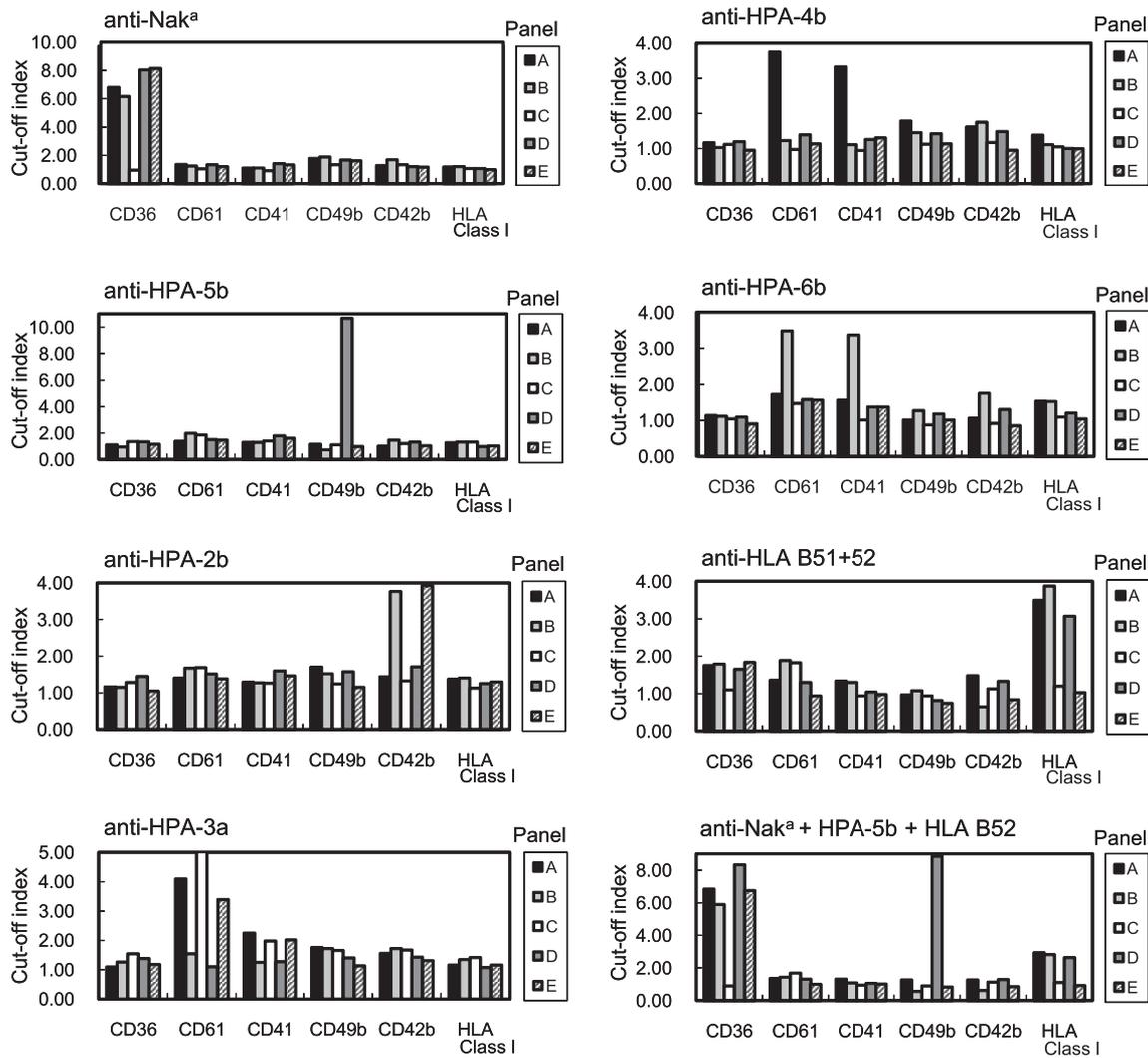
Validation study shows that there were essentially no discrepancies among the results of these methods except for MAIPA. The specificity of antibodies undetectable by MAIPA was the HPA-3a.

は, パネルとして血小板を用い, HLA抗体を含む血清20例, HPA抗体を含む血清20例を用いた。ICFA法によるHPA抗体特異性の確認では, HPA-1a, -2b, -3a, -3b, -4a, -4b, -5a, -5b, -6b, Nak<sup>a</sup>に対する抗体について検証した。HPA-15システムに対する抗体を検出するためにCD109(Clone: B-E47)に特異的なモノクローナル抗体を結合させたビーズを作製したが, 抗HPA-15aおよび抗HPA-15bを入手することは困難であり, 確認することができなかった。ICFA法によるHLA・HPA抗体の検出精度を確認するため, ICFA法による検出結果をMAIPA法, MPHA法による検出結果と比較したところ, MAIPA法において40例中1例が陰性と判定された以外, 各方法の結果において相違は認められなかった(Table 2)。MAIPA法で検出できなかった抗体の特異性は抗HPA-3aであった。

Fig. 2に希釈した検体を用いたICFA法によるHLA・HPA抗体検出感度の検討結果を示した。MPHA法の検出限界まで希釈した検体を用いてHLA抗体およびHPA抗体の検出を行った結果, ICFA法は全ての特異性のHLA抗体およびHPA抗体を検出することが可能であった。予備的な検討において, CD41(Clone: P2)に特異的なモノクローナル抗体を結合させた抗GPIIb/IIIa結合ビーズは抗HPA-3aに対する検出感度が低いことが分かった(Fig. 2)。抗HPA-3aの検出感度を上げるために, CD61(Clone: SZ21)に特異的なモノクローナル抗体を結合させた抗GPIIb/IIIa結合ビーズを追加することにより, 高感度に抗HPA-3aを検出することが可能になった(Fig. 2)。ICFA法は抗HPA-5bおよび抗Nak<sup>a</sup>を除く全ての特異性のHPA抗体をMPHA法と同程度の感度で検出することが可能であった。抗HPA-5bおよび抗Nak<sup>a</sup>の検出感度を確認するため, MPHA法の検出限界より4倍希釈した検体を用いて検討した結果, ICFA法はMPHA法と比較して4倍以上検出感度が高いことが確認された(Fig. 3)。

### 2. HLA交差適合試験

ICFA法によるHLA抗体検出の検討では, FlowPRAにて低力価HLA-IgG抗体が検出された患者血清30



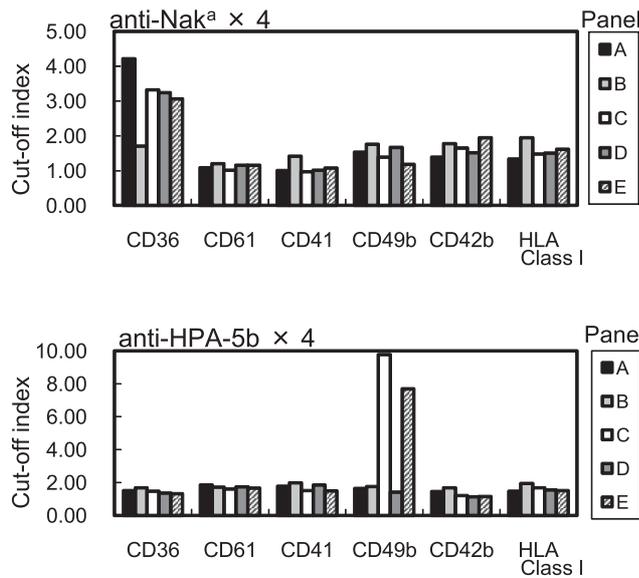
	HPA type						HLA type		
A	1a+b-	2a+b-	3a+b-	4a+b+	5a+b-	6a+b-	Nak <sup>a</sup> +	A 2, 24	B52, 70
B	1a+b-	2a+b+	3a-b+	4a+b-	5a+b-	6a+b+	Nak <sup>a</sup> +	A24, 31	B46, 52 Cw1
Panel C	1a+b-	2a+b-	3a+b+	4a+b-	5a+b-	6a+b-	Nak <sup>a</sup> -	A24, 26	B39, 46 Cw1, 7
D	1a+b-	2a+b-	3a-b+	4a+b-	5a+b+	6a+b-	Nak <sup>a</sup> +	A11, 24	B39, 52 Cw7
E	1a+b-	2a-b+	3a+b+	4a+b-	5a+b-	6a+b-	Nak <sup>a</sup> +	A26, 33	B44, 54 Cw1

Fig. 2 Detection of HLA and HPA antibodies by ICFA using antiserum samples diluted below the detection limit of MPFA. ICFA was capable of the specific detection of all the relevant HLA and HPA antibodies with a high fluorescence value. A cut-off index of more than 2.0 was used to identify samples positive for the antibodies.

例について、特異性である HLA 抗原を持つパネルを用い、ICFA 法にて交差適合試験を実施した結果、30 例全てが陽性であった (Table 3)。一方、同一パネルを用いて AHG-LCT 法を実施した結果、30 例中 6 例が抗  $\kappa$  のみに弱い反応が認められた (Table 3)。AHG-LCT 法にて抗  $\kappa$  のみに反応が認められた 6 例は、ICFA 法において比較的高い Cut-off Index を示す検体であった。また、特異性である HLA 抗原を持たないパネルとの反応は、ICFA 法、AHG-LCT 法いずれの方法でも全て陰

性であった。この患者血清 30 例について、FlowPRA および LABScreen にて HLA 抗体検査を行った結果、30 例全てが陽性であった (Table 3)。

Fig. 4 に ICFA 法の検出感度について AHG-LCT 法と比較した結果を示した。AHG-LCT 法の検出限界より 4 倍および 8 倍希釈した患者血清 7 例を用い、特異性である HLA 抗原を持つパネルと交差適合試験を実施した結果、AHG-LCT 法の検出限界より 8 倍希釈した患者血清 7 例全てに対して陽性反応が認められたことから、



	HPA type						HLA type		
	A	1a+b-	2a+b-	3a+b-	4a+b+	5a+b-	6a+b-	Nak <sup>a+</sup>	A 2, 24 B52, 70
	B	1a+b-	2a+b-	3a+b+	4a+b-	5a+b-	6a+b-	Nak <sup>a-</sup>	A24, 26 B39, 46 Cw1, 7
Panel	C	1a+b-	2a+b-	3a+b+	4a+b-	5a+b+	6a+b-	Nak <sup>a+</sup>	A11, 24 B39, 52 Cw7
	D	1a+b-	2a+b+	3a+b+	4a+b-	5a+b-	6a+b-	Nak <sup>a+</sup>	A26, 33 B44, 54 Cw1
	E	1a+b-	2a+b-	3a+b+	4a+b-	5a+b+	6a+b-	Nak <sup>a+</sup>	A24, 33 B44, 52

Fig. 3 Sensitivity for the detection of anti-HPA-5b and anti-Nak<sup>a</sup> by ICFA. Antiserum samples were diluted from the detection limit of MPHA to a fourfold dilution and subjected to ICFA. The sensitivity of ICFA for anti-HPA-5b and anti-Nak<sup>a</sup> was verified to be >fourfold higher than that of MPHA. A cut-off index of more than 2.0 was used to identify samples positive for the antibodies.

Table 3 Reactivities determined by AHG-LCT, FlowPRA, LABScreen, and ICFA in 30 serum samples containing HLA antibodies

	AHG-LCT	FlowPRA	LABScreen	ICFA
Positive	0	30	30	30
Weakly positive	6	0	0	0
Negative	24	0	0	0

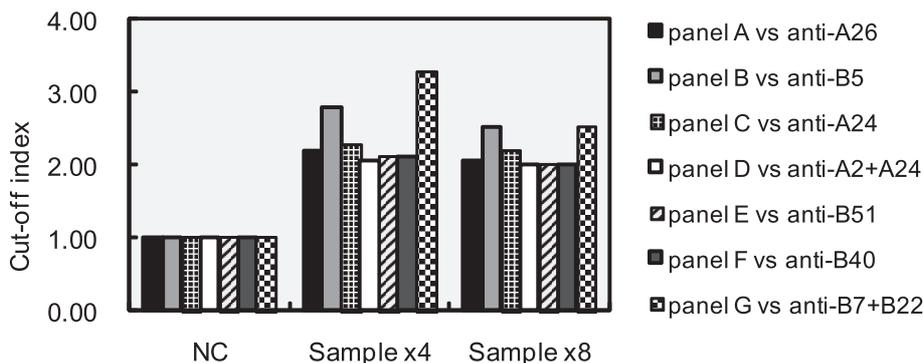
ICFA was validated using 30 serum samples containing HLA antibodies that were detectable by FlowPRA Class I Screening. There were no discrepancies among the results by FlowPRA, LABScreen, and ICFA.

ICFA法はAHG-LCT法より8倍以上検出感度が高く、FlowPRAと同程度の検出感度であった。

考 察

最近、HLA抗体の検出においてフローサイトメトリーを応用した高感度HLA抗体検査法が開発され、精製HLA抗原をマイクロビーズに結合した試薬を用いた間接蛍光抗体法や、Luminex<sup>®</sup>のような新技術の導入によりHLA抗体の検出が容易になった<sup>6)~8)</sup>。しかし、信頼性が高くハイスループットなHLA交差適合試験法やHPA抗体検出法についての報告はされていない。

HPA抗体を検出する方法として、わが国ではMPHA法<sup>5)</sup>が主流であり、簡便かつ高感度にHPA抗体を検出する方法として広く用いられている。しかし、HPA複合抗体を保有している場合や同時にHLA抗体を保有している場合など、MPHA法だけでは抗体の特異性を判定することが困難な場合がある。MAIPA法は、HPA抗体の解析に広く用いられており、その原理は、モノクローナル抗体を用いて血小板膜糖タンパク質をマイクロプレートに固定し、酵素抗体法にてHPA抗体を検出する方法である<sup>9)</sup>。MAIPA法は、検出感度が高く幅広い特異性のHPA抗体を解析することが可能であるが、



		HLA type			
Panel	A	A26, -	B39, 61	Cw7	
	B	A24, 2	B51, -		
	C	A24, -	B60, 71	Cw7, 10	
	D	A 2, -	B61, 62	Cw7	
	E	A24, 2	B51, -		
	F	A24, 26	B61, -	Cw9	
	G	A11, 24	B54, -	Cw1	

Fig. 4 Detection of HLA antibodies in diluted antiserum samples by ICFA. Serum samples containing HLA antibodies were diluted to a level not detectable by AHG-LCT and were tested by ICFA. The sensitivity of ICFA was verified to be >eightfold higher than that of AHG-LCT, which is comparable to that of FlowPRA Class I Screening. A cut-off index of more than 2.0 was used to identify samples positive for the antibodies.

モノクローナル抗体が認識する血小板膜糖タンパク質のエピトープとアロ抗体が競合して MAIPA が成立しない場合や、モノクローナル抗体エピトープとアロ抗体の認識部位が近接しているため結合力の弱い抗 HPA-3a などの抗体が検出できない場合がある。また、MAIPA 法は操作が煩雑で検査に時間を要する上、習熟した検査技術が必要である。Campbell らは最近、modified rapid MAIPA について報告している<sup>11)</sup>。この方法は、従来の MAIPA 法の検出感度を低下させることなく、検査所要時間を短縮させ、操作を簡便にするために改善された方法であるが、検査所要時間は約 5 時間で習熟した検査技術が必要である。一方、ICFA 法は迅速かつ簡便な方法であり、その手順は 2 つのステップのみで：1) 血清中の抗体と反応させた血小板を可溶化し、2) 可溶化物中の抗原抗体複合体をビーズにて特異的に捕捉すると同時に PE 標識抗ヒト IgG 抗体にて HPA 抗体を標識する。ICFA 法では、MAIPA 法において必要ないいくつかの感作や洗浄のステップを省略することが可能であることから、MAIPA 法と比較して検査所要時間が短かく、約 2 時間で全ての工程が終了する。ステップの簡略化は、検査所要時間の短縮だけでなく、洗浄などの影響により捕捉した免疫複合体がビーズから剝離する頻度を減少させることになり、ICFA 法において高い検

出感度が得られる要因であることが示唆される。最近、遺伝子導入による組み換え型抗原を用いた HPA 抗体検査法が報告されている<sup>12)13)</sup>。この方法は、従来の MAIPA 法や MPHA 法と異なり、HPA タイピング済みの血小板パネルを必要としないことや、ICFA 法のようにフローサイトメトリー解析に適用する可能性があることから有望な方法である。この組み換え型抗原を用いた方法よりも ICFA 法が有用な点は、HLA や HPA の交差適合試験に用いることが可能な点である。

我々は、希釈した患者血清を用いて ICFA 法と MPHA 法の HPA 抗体検出について比較し、2 つの方法の検出感度が一部の特異性を除いて同程度であることを確認している。また、MPHA 法と MAIPA 法の HPA 抗体検出感度について比較した結果は、抗 HPA-3a を除いてほぼ同程度であり抗 HPA-3a の検出感度は、MPHA 法が MAIPA 法より高いことを確認している。以上の結果は、ICFA 法の HPA 抗体検出感度が、欧米諸国で一般的に用いられる MAIPA 法と同程度以上であることを示している。Campbell らは、MAIPA 法と modified rapid MAIPA を比較するために抗 HPA-1a モノクローナル抗体：CamTran007 を用いている<sup>11)</sup>。モノクローナル抗体を用いた検出感度の分析は、安定した定量性の高い結果につながることから有用であるが、患者由来

の血清を用いた検出感度の分析では、より臨床に関連した結果をもたらす可能性がある。このような目的で、我々の研究では特異性の異なる8例の希釈した患者由来の血清を用いてICFA法とMPHA法の検出感度を比較し、一部の特異性を除いて同程度の検出感度が得られている。

HPA抗体の解析では、ほとんどの特異性において1,000イベントまでビーズを測定する必要があったが、抗HPA-5aおよび抗Nak<sup>a</sup>では、血小板上の発現量が他の血小板抗原よりもHPA-5aおよびNak<sup>a</sup>では低いにもかかわらず100イベントまで測定することで解析することが可能であった。明確な理由は解っていないが、リガンドとなる抗原量が少ないため形成される免疫複合体が少なく、ビーズの捕捉効率が上がることにより少量のビーズで解析することが可能であったと考えられる。同様に明確な理由は解っていないが、HLA交差適合試験ではビーズのカウントを100イベントまで測定することで解析することが可能であった。

現在、HLA交差適合試験は、AHG-LCT法を標準法としているが、検出感が低く、最終的な確認検査として十分な検出感度が得られていない。また、AHG-LCT法は検査の工程が煩雑で3時間以上要するため、高感度かつハイスループットな検査法の開発が望まれている。近年、HLA交差適合試験にフローサイトメーターを用いたリンパ球間接蛍光抗体法 lymphocytes indirect immune fluorescence test (LIFT: 以下、LIFT法)を用いる施設が増えている<sup>14)15)</sup>。LIFT法は、AHG-LCT法と比較すると約4倍検出感度が高く、検査所要時間が1時間以上短いなどの利点がある<sup>16)17)</sup>。本研究において我々が開発したICFA法は、AHG-LCT法より8倍以上検出感度が高く、精製HLA抗原を用いた高感度HLA抗体検査法であるFlowPRAと同程度の検出感度であった。さらに本法は、全ての工程を96ウェルマイクロプレートによる処理が可能であることから大量検体に適応し、検査所要時間が約2時間でハイスループットな方法である。以上の結果からICFA法は、確認検査法として日常検査におけるHLA交差適合試験に用いることが可能である。ICFA法は、患者血清中のHLA抗体を白血球と反応させた後に白血球を可溶化し、蛍光ビーズを用いて抗原抗体複合物を特異的に捕捉・濃縮して抗体を検出する方法である。一方、LIFT法は、患者血清中のHLA抗体をリンパ球と反応させ、リンパ球に結合した抗体をフローサイトメーターで直接検出する方法である。この可溶化および抗原抗体複合物の精製・濃縮のプロセスの違いによりICFA法は、LIFT法と比較して2倍以上高い検出感度が得られている。また、LIFT法で認められる非特異的な反応は、1次反応で非特異的に結合した抗体が2次反応において検出

されるために生じるが、ICFA法では1次反応後の可溶化物中にHLAクラスI分子とHLAクラスI抗体による抗原抗体複合物が形成されていなければ2次反応において抗体が蛍光ビーズに捕捉されないため非特異的な反応は認められない。さらにICFA法は、LIFT法やAHG-LCT法と異なり、パネル細胞の生存率による影響を受けにくい特徴があり、メリットとして極めて大きい。また、精製HLA抗原結合ビーズを用いたビーズアレイに対するICFA法の原理的アドバンテージとして、患者抗体が目的とする抗原と結合した後に白血球を可溶化することである。FlowPRAなど精製HLA抗原結合ビーズを用いた方法では、リンパ球の可溶化とHLA分子をビーズに結合する手順において、HLA分子の立体構造が変化している可能性が高いが、ICFA法において精製されるHLA分子は、患者血清中の抗体と結合した後、モノクローナル抗体で捕捉するため、よりインタクト白血球に近い状態でHLA分子の立体構造を維持していると考えられる。したがって、FlowPRAでは検出できない臨床的意義の高いHLA抗体をICFA法では検出する可能性がある。また、FlowPRAは、HLA様の抗原に対する抗体との反応や、実際に抗体が反応を示すエピトープと部分的にアミノ酸配列が共通である抗原との過剰反応(インタクト白血球との反応が認められない臨床的意義の低い抗体)を示す可能性がある。しかし、この理論は、交差適合試験や臨床成績に関する多くのデータの蓄積により確認する必要がある。

本研究において我々は、迅速・簡便かつ信頼性の高い、高感度HLA・HPA抗体同時解析法を開発した。ICFA法は、AHG-LCT法に代わるHLA交差適合試験の標準法として期待される。また、本法は使用するモノクローナル抗体の種類を増やすことにより、HLA抗体と同時にHNA抗体の解析を行うなど、幅広い応用が可能な技術である。既に我々は、ICFA法を用いたHLAクラスII抗体、HNA抗体の検出法を開発している。

日本赤十字社では、濃厚血小板HLA「日赤」の出荷可否を判定する交差適合試験の標準法として本法の導入準備を進めている。

## 文 献

- 1) von dem Borne AEGKr, Ouwehand WH: Immunology of platelet disorders. *Baillieres Clin Haematol*, 2: 749—781, 1989.
- 2) Popovsky MA, Abel MD, Moore SB: Transfusion-related acute lung-injury associated with passive transfer of anti-leukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis*, 128: 185—189, 1983.

- 3) Popovsky MA, Moore SB: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung-injury. *Transfusion*, 25: 573—577, 1985.
- 4) Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204: 998—1000, 1964.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Pei R, Lee J, Chen T, et al: Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol*, 60: 1293—1302, 1999.
- 8) El-Awar N, Lee JH, Tarsitani C, et al: HLA Class I epitopes: recognition of binding sites by mAbs or eluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. *Hum Immunol*, 68: 170—180, 2007.
- 9) Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, et al: Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 70: 1722—1726, 1987.
- 10) Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al: Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*, 85: 240—245, 2003.
- 11) Campbell K, Rishi K, Howkins G, et al: A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. *Vox Sang*, 93: 289—297, 2007.
- 12) Stafford P, Ghevaert C, Campbell K, et al: Immunologic and structural analysis of eight novel domain-deletion  $\beta 3$  integrin peptides designed for detection of HPA-1 antibodies. *J Thromb Haemost*, 6: 366—375, 2008.
- 13) Stafford P, Garner SF, Huiskes E, et al: Three novel  $\beta 3$  domain-deletion peptides for the sensitive and specific detection of HPA-4 and six low frequency  $\beta 3$ -HPA antibodies. *J Thromb Haemost*, 6: 376—383, 2008.
- 14) Cook DJ, Terasaki PI, Iwaki Y, et al: The flow cytometry crossmatch in kidney transplantation. *Clin Transpl*, 1: 409—414, 1987.
- 15) LeFor WM, Ackermann JR, Alveranga DY, et al: Flow cytometry crossmatching and primary cadaver kidney graft outcome: relevance of T and B cell targets, historic sera and autologous controls. *Clin Transpl*, 10: 601—606, 1996.
- 16) Garovoy MR, Rheinschmidt MA, Bigos M, et al: Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc*, 15: 1939, 1983.
- 17) Bray RA, Lebeck LK, Gebel HM: The flow cytometric crossmatch. Dual-color analysis of T cell and B cell reactivities. *Transplantation*, 48: 834—840, 1989.

## APPLICATION OF BEAD ARRAY TECHNOLOGY TO SIMULTANEOUS DETECTION OF HUMAN LEUCOCYTE ANTIGEN AND HUMAN PLATELET ANTIGEN ANTIBODIES

*Koki Fujiwara, Kae Shimano, Hidenori Tanaka, Miyuki Sekine, Koichi Kashiwase, Makoto Uchikawa, Masahiro Satake and Kazunori Nakajima*  
Japanese Red Cross Tokyo Blood Center

### **Keywords:**

HLA antibodies, HPA antibodies, Bead array, Flow cytometric analysis, High-throughput