

HLA 抗体検査における血清非働化の必要性について

—血清の非働化により HLA 抗体強陽性を判定しえた 2 症例の経験から—

万木紀美子¹⁾ 小島 裕人²⁾ 平位 秀世¹⁾ 菱田 理恵¹⁾ 藤井 直樹²⁾
 大久保和俊³⁾ 三浦 康生¹⁾ 兼松 明弘³⁾⁵⁾ 近藤 忠一⁴⁾ 吉岡 聡¹⁾⁴⁾
 小川 修³⁾ 高折 晃史⁴⁾ 佐治 博夫²⁾ 前川 平¹⁾

HLA 抗体は臓器移植の予後と関連性があり, その測定には高い信頼性が求められる。われわれは, ドナー特異 HLA 抗体 (Donor Specific Antibody : DSA) 弱陽性の状態で腎臓移植を計画中, 血漿交換 (PE) 後に DSA が大きく上昇したにも関わらず LABScreen single-antigen beads class I (LS-Single I) 法で正しく判定しえなかった症例と, 同法により高力価の HLA 抗体を過少評価していた臍帯血移植の症例を経験した。これらの原因を探るため, 測定系の中に含まれる抗原抗体反応が, 被検血清により阻害され得るかどうかを検討した。その結果, 特に HLA 抗体が高力価である場合に, 被検血清が二次抗体の反応を阻害する現象が認められた。この血清による反応阻害作用は EDTA 添加・加熱処理・DTT 処理などの血清の非働化によって減弱することから, 補体が関与するプロゾーン様現象であることが示唆された。血清中の補体が二次抗体の反応を阻害するために HLA 抗体が低力価と判定される場合があるため, LS-Single I 法による HLA 抗体の検査における血清の非働化が必要と考えられた。

キーワード : HLA 抗体, ドナー特異 HLA 抗体, 補体の非働化

はじめに

HLA 抗体は, 腎, 肺, 心, 肝などの臓器移植の液性拒絶の原因となることから, 移植前にドナー特異 HLA 抗体 (Donor Specific Antibody : DSA) の有無を検討することが重要である¹⁾。一方, 造血幹細胞移植においては, 原則的にレシピエントの HLA 型と一致するドナーを選択するため, HLA 抗体は問題とならない。しかし HLA の 1~2 座が不一致でも実施が許容される臍帯血移植や HLA ハプロタイプ半合致造血幹細胞移植においては, 患者が保有する HLA 抗体に対応する HLA 型のドナーを選択しないよう配慮が必要である。このように臓器移植の適応決定において HLA 抗体は重要な意義を持つため, その測定には十分な正確性と信頼性が求められる。われわれは, DSA が弱陽性と判定された腎臓移植予定のレシピエント症例で, 血漿交換 (PE) 後に力価が上昇した DSA を LS-Single I 法で正しく測定しえなかった事例と, HLA 抗体陽性の臍帯血移植症例で, きわめて高力価の HLA 抗体を同じく LS-Single I 法で正

しく測定しえなかった事例を経験した。これら 2 症例に関してその原因究明を行ない, 血清中の補体成分がビーズ上の抗原に結合した一次抗体と二次抗体との反応を阻害したために抗体価が低く評価されていたことを示唆する結果を得た。この結果を踏まえ HLA 抗体の過少評価の防止法について考察したので報告する。

方 法

1. HLA 抗体検査

HLA 抗体のスクリーニングおよび特異性の同定には, TMLABScreen Mixed beads (One Lambda 社), TMLABScreen PRA beads (One Lambda 社), TMLABScreen Single Antigen beads Class I, Class II (One Lambda 社), TMWAKFlow MR (湧永製薬株式会社) をそれぞれの添付の取扱法にしたがって使用した。

2. リンパ球クロスマッチ

ドナーリンパ球とのクロスマッチはフローサイトメトリー法 (Flow Cytometry Crossmatch : FCXM) で

1) 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部

2) 一般財団法人 HLA 研究所

3) 京都大学大学院医学研究科泌尿器科学

4) 京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科学

5) 現 兵庫医科大学泌尿器科

〔受付日 : 2012 年 9 月 27 日, 受理日 : 2012 年 12 月 25 日〕

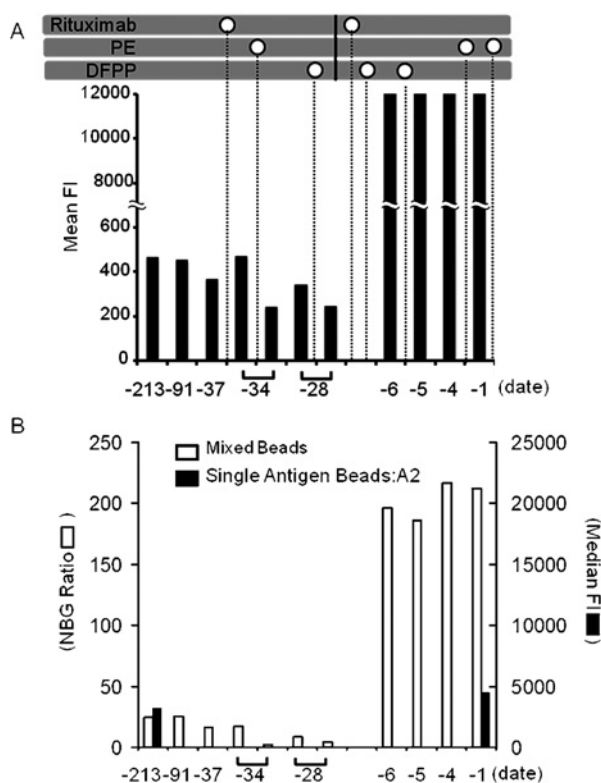


Fig. 1 Detection of HLA antibodies in the clinical course of case 1.

A. Results of flow cytometric crossmatch (FCXM). Mean FI: mean fluorescence intensity, PE: plasma exchange, DFPP: double filtration plasmapheresis. B. HLA antibodies measured by LABScreen Mixed Beads method and LABScreen Single Antigen Beads Class I method. NBG ratio: normalized background ratio. The scheduled date of kidney transplantation is day 0.

実施した。™Easy Sep (STEM CELL 社)を用いてドナ－リンパ球を分離した後に、患者血清と反応させた。その後 FITC-conjugated AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG (Jackson Immuno Research 社), PE Mouse Anti-Human CD19 (BD Biosciences 社), APC Mouse Anti-Human CD3 (BD Biosciences 社)で染色し、FACSCanto II (日本ベクトンデッキンソン社)で解析した。

3. 血清非働化

血漿検体は 1ml あたり 2M CaCl₂ 5μl とトロンビンを 2U 加え、4℃ で一晩放置し、析出したフィブリン塊を除去して血清化を行った。被検血清または血清化処理した血漿検体について、以下のア)～ウ)のいずれかの処理をして HLA 抗体を測定した。

ア) 56℃, 30min 処理。

イ) DTT (dithiothreitol) 処理: 終濃度が 0.005M となるように DTT を加え、37℃, 30min 処理。

ウ) EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 処理: 終濃度が 0.05M となるように EDTA を添加。

症 例

【症例 1】

61 歳女性。慢性糸球体腎炎による腎不全が進行したため、腹膜透析で維持されており、夫をドナ－とする腎移植を計画した。HLA 抗体を LABScreen Mixed beads (LS-Mix) 法で調べたところ、陽性であることが判明した。HLA 抗体の特異性を LS-Single I 法を用いて確認したところ、DSA となる HLA-A2 抗体が検出され、その Median Fluorescence Intensity (MFI) 値は 3,199 であった。リンパ球クロスマッチでは Lymphocyte Cytotoxicity Test (LCT) 法、Anti-human globulin-LCT (AHG-LCT) 法では陰性と判定されたが、FCXM 法のみで陽性となった。腎移植で術前に既存 DSA が存在する場合、術後早期に抗体関連拒絶反応を起こすリスクが高い。そこで HLA 抗体を減少させる脱感作処置を行い、FCXM 法による HLA 抗体の陰性化が確認できた場合に移植を実施する方針とした (Fig. 1A および B)。

HLA 抗体除去の効率について検討するため、まず腎移植前 Day -37 にリツキサン 200mg を投与した後、Day -34 に 3,600ml の新鮮凍結血漿を用いて血漿交換 (plasma exchange: PE) を実施、Day -28 に二重濾過血漿交換 (double filtration plasmapheresis: DFPP) を実施した。これらの各処置前後の抗体価を FCXM 法にて測定し、抗体除去効率を検討した (Fig. 1A)。PE 後に一時的に抗体価が低下し、次の処置までに元のレベル近くまでのリバウンドが認められた。引き続き施行した DFPP により FCXM 法で検出される HLA 抗体の十分な低下を確認した。この結果に基づいて HLA 抗体除去のために、移植 Day -13 にリツキサン 200mg 投与、Day -7 と Day -5 に DFPP を行い、Day -3 と Day -1 に PE を実施した。Fig. 1A は経過中の FCXM 法による測定値の推移である。予想に反して、Day -13 のリツキサン投与以降は、それ以前の抗体除去処理時に比べて反応が強陽性に転じており、その後の PE、DFPP による抗体除去効果は認められず、腎移植は中止となった。

Fig. 2 に本症例における LS-Single I 法による DSA の結果を示す。腎移植初回検討の Day -213 は HLA-A2 ビーズに対する反応が最も高く、その他に A2 と交差反応性のある HLA 抗原の B57, A68, B58, A69 が陽性と判定された。移植前日には FCXM 法では強陽性であったにもかかわらず LS-Single I 法では HLA-A2 抗体のわずかな上昇が確認されたのみであったが、交差反応性の抗原に対する反応の大きな上昇を認めた (Fig. 2)。

本症例の経過中の LS-Mix 法および LS-Single I 法による HLA 抗体の測定結果を比較したものを Fig. 1B に示す。LS-Mix 法による測定は FCXM 法と同じタイ

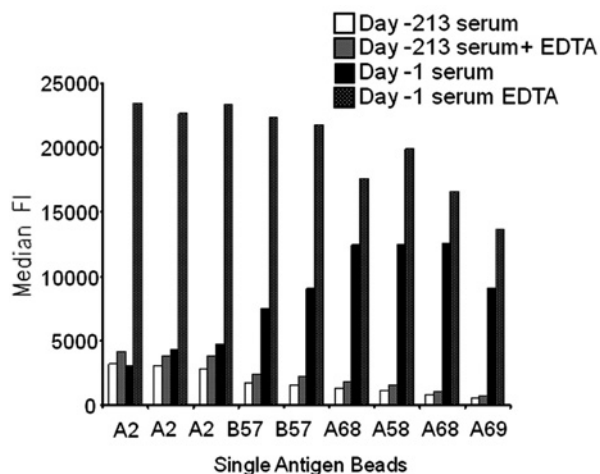


Fig. 2 Effects of EDTA treatment on the titer of HLA antibodies detected by LABScreen Single Antigen beads Class I method (case 1).

Mean FI: mean fluorescence intensity, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid. The scheduled date of kidney transplantation is day 0.

ミングで実施しており、FCXM 法による測定結果と同様の推移となっている。LS-Single I 法の結果は測定期間の最初と最後の 2 点のみであるが、LS-Mix 法や FCXM 法の結果とは大きく乖離していた。

これらの検査結果の乖離の原因として、血清補体成分により一次抗体と二次抗体との反応が阻害されているのではないかと考え、被検血清に EDTA を添加した後に LS-Single I 法により HLA 抗体を測定した (Fig. 2)。Day -213 の初回検計時の血清については EDTA 添加による HLA-A2 の抗体価の変化は認められなかったが、移植前日の血清の抗体価は EDTA 添加により MFI が 4,504 から 22,245 へと大きく上昇した。

【症例 2】

58 歳女性。骨髓異形成症候群から移行した急性骨髄性白血病の治療のために同種造血幹細胞移植が必要となった。骨髓バンクでは HLA 一致ドナーが得られず、臍帯血移植を実施することになった。移植前に LS-Single I 法および LS-Single II 法により HLA 抗体が陽性であることが判明していたため、HLA 不一致抗原が患者の保有する HLA 抗体に対応しないように HLA-DR 一座不一致のドナーが選択された (Fig. 3A および B)。臍帯血移植後 20 カ月で LS-Single I 法により HLA 抗体を測定したところ、HLA-A2 抗体の MFI が移植前の 4,495 から 20,269 へと上昇していた。移植前の LS-Single I 法による検査結果を再確認したところ、HLA-A2 抗原よりも、HLA-A2 抗原と交差反応性のある抗原に強い反応が認められた (Fig. 3B)。そのため、HLA-A2 抗原と強く反応した HLA-A2 抗体と測定試薬中の二次抗体との反応が、被検血清成分により阻害されている可能

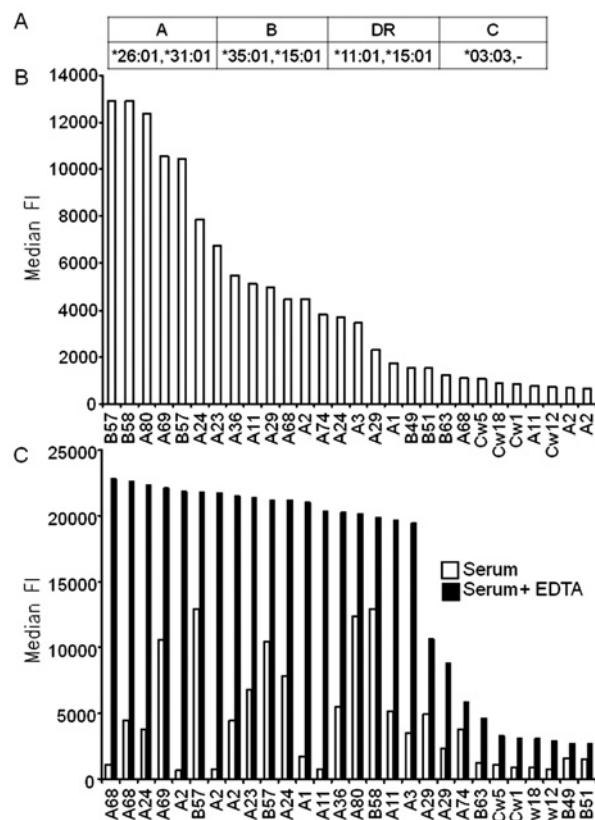


Fig. 3 HLA antibodies detected in case 2.

A. HLA profile of case 2. B. HLA antibodies detected by LABScreen Single Antigen beads Class I method. C. Effects of EDTA treatment on the titer of HLA antibodies detected by LABScreen Single Antigen beads Class I method. Open bars correspond to the bars presented in Figure 3B. Median FI: median fluorescence intensity, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

性を考えた。被検血清に EDTA を添加して LS-Single I 法を実施したところ、移植前の HLA-A2 抗体は移植後 20 カ月の値と同様に高値となった (Fig. 3C)。また、被検血清に EDTA 添加したことにより MFI が大きく変化したのは HLA-A2 抗体と HLA-A11 抗体であった。抗体の測定値が大きく変化したものの、本症例では、選択された臍帯血の HLA クラス I 抗原は一致していたため移植後 17 日に無事生着が確認され、患者への不利益はないと考えられた。

反応阻害の検討結果

HLA 抗体の検出において血清中の補体成分が測定系の反応を阻害している可能性を検討するために、HLA 抗体が高力価を示した 8 検体について、ア)加熱 (56℃, 30min) による補体の非働化、イ) DTT 処理、ウ) EDTA 処理を行い、その前後で LS-Single I 法および LS-Single II 法で HLA 抗体を測定した。8 検体中 7 検体において、補体の非働化、DTT 処理、EDTA 処理をすることによっ

Table 1 The effect of EDTA treatment on the MFI value of HLA antibodies in 8 cases.

				Number of beads exhibiting indicated MFI							
Methods			Sample ID	EDTA treatment	≤1,000	1,001 ~ 5,000	5,001 ~ 10,000	10,001 ~ 15,000	15,001 ~ 20,000	20,001 ~ 25,000	≥25,001
Lab Screen	PRA	Class I	①	-	0	1	8	8	28	0	0
				+	0	3	7	6	12	15	12
		③※		-	3	12	8	11	8	13	0
				+	4	13	6	12	7	12	1
		Class II	⑦	-	1	11	20	3	0	0	0
				+	1	1	9	13	10	1	0
	Single	Class I	②	-	27	22	6	11	25	6	0
				+	24	26	5	3	5	8	26
		③※		-	37	28	11	4	12	5	0
				+	41	24	11	4	12	5	0
		Class II	⑧	-	38	28	6	5	10	5	0
				+	43	19	2	1	7	12	8
WAKFlow MR	PRA	Class I	④	-	0	0	20	16	0	0	0
				+	0	1	3	18	14	0	0
		Class II	⑦	-	2	15	14	0	0	0	0
				+	2	13	7	8	1	0	0

In all cases except case 3 (*), the frequencies of HLA antibodies with higher MFI were increased after treatment with EDTA. Mean FI: mean fluorescence intensity, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid.

て、処理前の検体よりも高い MFI を示す抗原ビーズの頻度が増加する傾向が認められた。Table 1 に LS-Single I 法による測定における EDTA 処理の効果を検討した結果を示す。EDTA 処理によって処理前の検体よりも高い MFI を示す抗原ビーズの頻度が増加している。また、抗原ビーズに対する反応は MFI が高いほど、処理前の血清によって反応が強く抑制されていた。このように HLA 抗体の抗体価が高いほど血清による反応阻害が強い傾向は LABScreen PRA (Class I, Class II) 法、LS-Single I および II 法、WAKFlow MR (Class I, Class II) 法で測定した場合でも認められた。対照的に、Table 1 中の検体③は高い抗体価であるにも関わらず、血清の EDTA 処理による MFI 値の大きな変化はみられなかった。Fig. 4 は LS-Single I 法において、この現象がみられた 1 例で、縦軸に MFI 値、横軸には EDTA 処理時の MFI 値が高い順にビーズの抗原名 (アリル名) を示している。EDTA 処理後の MFI 値が 15,000 よりも高い反応を示すビーズにおいて加熱・DTT 処理あるいは EDTA 処理による抗体価の上昇が認められた。このことから血清の補体成分により、抗原抗体反応が抑制されていたと考えられた。また、いずれの検体においても DTT 処理は EDTA 処理と補体の非働化に比して MFI 値の変化は小幅であった。

考 察

臓器移植に関連した HLA 抗体検査で、検査法により抗体価の変動に乖離が認められる 2 症例を経験した。非働化した血清を用いた結果と処理前の血清での結果とを比較検討したところ、この乖離は抗原の特異性には関係がなく、高力価の抗体ほど未処理の血清検体で力価が下がる傾向が認められた。HLA 抗体の検出は血清中の特異的な HLA に対する抗体 (一次抗体) と反応系中のビーズ上の抗原との反応に引き続いて、抗原に結合した血清中の抗体を認識する二次抗体の反応から構成される。抗原抗体反応において抗体が過剰となった場合に、むしろ反応の抑制が起こる現象は「プロゾーン現象」と呼ばれている。われわれの経験した症例で観察された現象も、この「プロゾーン現象」と類似していることから、本稿では「プロゾーン様現象」と呼称する。このようなプロゾーン様現象は最近になって報告が散見されている^{2)~6)}。プロゾーン様現象には補体 C1 が関与していることが示唆されている。Fig. 5 に補体 C1 の構造と、活性化して一次抗体に結合する様子を示す。補体 C1 は C1q, C1r, C1s のサブユニットから形成され、C1s-C1r-C1r-C1s の一次抗体に対する結合部位が二次抗体結合部位と競合している可能性⁷⁾や、補体の古典的経路の活性化によって母体である C1q の三次元立体構造が大きくなり、物理的に二次抗体の反応を阻害している可能性も考えられた。今回の検討におい

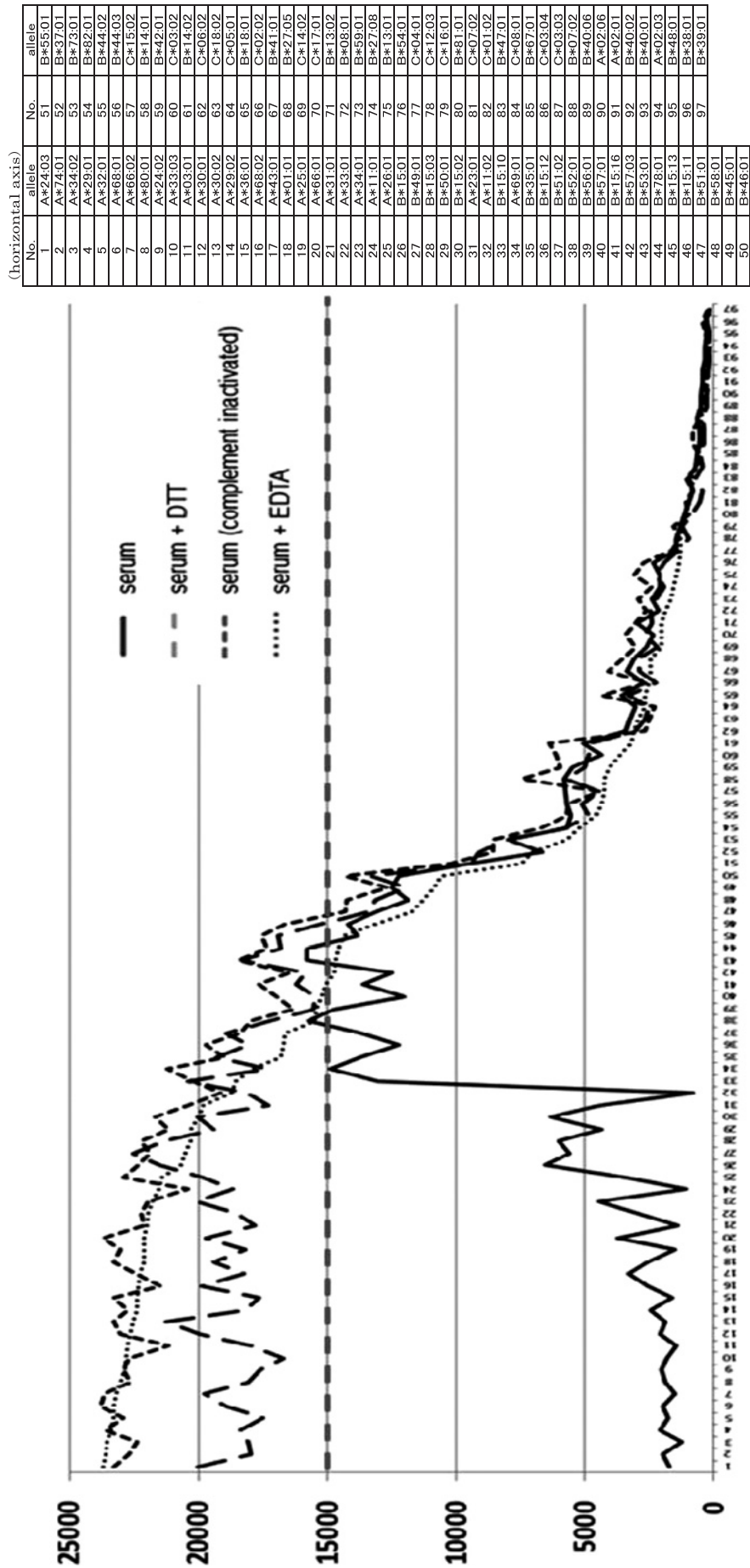


Fig. 4 Prozone phenomenon observed in a representative case with high titer HLA antibodies.
Mean fluorescence intensity (MFI) on the vertical axis and the Luminex bead number (HLA antigen) on the horizontal axis are shown.

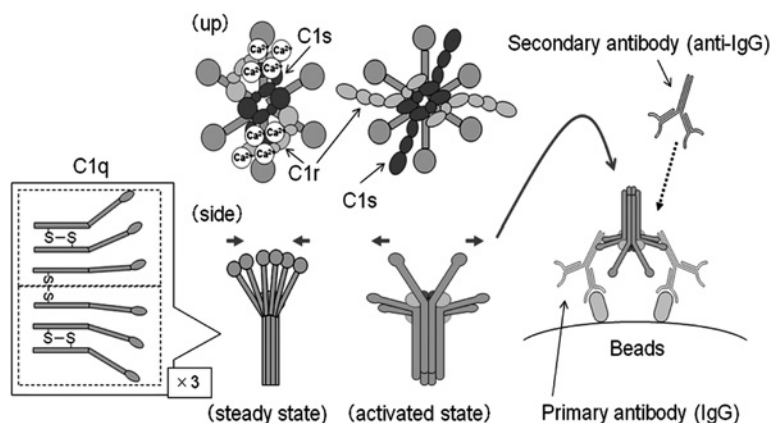


Fig. 5 The structure of complement 1 associated with primary antibodies on the beads.

The complement component 1 (C1) molecule is composed of one C1q subunit (blue) and a tetramer (320 kDa) consisting of two C1s subunits (red) and two C1r subunits (flesh), stabilized by eight Ca^{2+} ions. The C1q molecule forms a hexamer with the aid of disulfide bonds. In the activated state, the binding region in C1q become accessible to highly dense IgG. The binding of the complements interfere with the binding of the anti-IgG detection antibodies in the LABScreen Single Antigen Class I method. The addition of DTT cleaves the disulfide bonds between subunits of C1q. EDTA treatment abrogates the tetramer formation by C1s and C1r by withdrawal of Ca^{2+} .

て DTT 処理でプロゾーン様現象が改善されたのは、C1q の六量体を形成している S-S 結合が切断されたためであると考えられ⁸⁾⁹⁾, EDTA 処理は Ca^{++} をキレートすることにより補体 C1 のサブユニットである C1s-C1r の四量体形成を阻害していたと考えられる¹⁰⁾. LS-Single 法の二次抗体が一次抗体の Fc 部分に結合するのに対して WAKFlow MR 法は Fab 部分に結合するが、プロゾーン様現象は同様に認められたことから、二次抗体の特性 (一次抗体への結合部位; Fc または Fab) には依存しないと考えられる. Table 1 の検体③は高い抗体価を示したにも関わらずプロゾーン様現象が認められなかったが、これは HLA 抗体の中に補体結合性の高いサブクラスである IgG1 や IgG3 の占める割合が少なかった可能性があると考えられている. さらに FCXM 法でプロゾーン様現象が認められなかったのは、リンパ球上の HLA 抗原の密度がビーズに比べて低いためであると考えられる. LS-Mix 法では LS-Single 法よりも各ビーズに表面の同一抗原密度が低く、IgG の二量体化を必要とする補体の開始反応が起こりにくいためにプロゾーン様現象が起こりにくかったと推察された.

今回の症例ではリンパ球クロスマッチを同時に施行していたため、検査法による結果の乖離を明らかにできたが、LS-Single 法のみで測定する場合、特に高力価の HLA 抗体を見落とす可能性がある. これを防ぐためには補体を不活化させる必要があるが、その方法とし

て 56°C, 30min による加熱処理はバックグラウンドが上がる場合があり、常に EDTA 処理をするほうが簡便で安全であると考えられる. また、過去の血清検体での検査結果においては交差反応の妥当性を確認することも有効であり、プロゾーン様現象の有無を疑う判断要素となり得る. 当院での臓器移植症例では、LS-Single 法での DSA の検討とリンパ球クロスマッチである FCXM を並行して実施しており、値が大きく異なった症例は今回報告した症例 1 のみである. しかし、リンパ球クロスマッチを実施しない臍帯血移植症例なども含めて、過去の血清検体での LS-Single 法の結果を検討した結果、MFI が 15,000 以上と抗体価が高く、交差反応により陽性となっているビーズの方が強い MFI を呈しており、プロゾーン様現象が疑われる症例が、約 5% 存在した.

ま と め

臓器移植においては、患者の保有する HLA 抗体が DSA となる可能性が高くその抗体力価が移植の予後に大きく関る. 本稿での検討により、血清中の補体が HLA 抗体の検出を阻害する可能性があることが示されており、検査に用いる検体としては未処理の血清ではなく、EDTA を添加した血清への変更が望まれる.

文 献

- 1) 佐田正晴：HLA 抗体と臓器移植. *Organ Biology*, 14 (1) : 53—64, 2007.
- 2) 黒田ゆかり, 小田秀隆, 浅尾洋次, 他：LABScreen Single Antigen におけるプロゾーン現象への補体の関与. 日本組織適合性学会, 18 (1) : 56—57, 2011.
- 3) 黒田ゆかり, 田原大志, 浅尾洋次, 他：蛍光ビーズ抗体検査法におけるプロゾーン様現象への補体の影響と非働化による現象の抑制効果—第2報—. 日本組織適合性学会, 18 (2) : 158, 2011.
- 4) 小島裕人, 藤井直樹, 二神貴臣, 他：Luminex 法におけるプロゾーン様現象. 日本組織適合性学会, 18(2) : 157, 2011.
- 5) 内田みゆき, 宮城 徹, 寺木佳子, 他：LABScreen Single Antigen にみられる抑制反応の解析. 日本組織適合性学会, 18 (2) : 148, 2011.
- 6) Lowe D, Hathaway M, Briggs D: The high-dose hook effect in the detection and monitoring of HLA specific antibody by Luminex assay. *Int J Immunogenetics*, 34: 288, 2007.
- 7) Weinstock C, Schnaidt M: Luminex-based single-antigen-bead testing: explanation and solution for the prozone phenomenon, *ASHI Quarterly*, 2011, Third Quarter; 8—10.
- 8) Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, et al: Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*, 215 (1): 1—11, 2010.
- 9) Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, et al: Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation*, 87: 813, 2009.
- 10) Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, et al: HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*, 92 (5): 510—515, 2011.

INACTIVATION OF COMPLEMENT IS REQUIRED FOR PRECISE EVALUATION OF Anti-HLA ANTIBODIES: AN IMPORTANT LESSON LEARNED FROM TWO CLINICAL CASES

Kimiko Yurugi¹⁾, Hiroto Kojima²⁾, Hideyo Hirai¹⁾, Rie Hishida¹⁾, Naoki Fujii²⁾, Kazutoshi Okubo³⁾, Yasuo Miura¹⁾, Akihiro Kanematsu³⁾⁵⁾, Tadakazu Kondo⁴⁾, Satoshi Yoshioka¹⁾⁴⁾, Osamu Ogawa³⁾, Akifumi Takaori-Kondo⁴⁾, Hiroo Saji²⁾ and Taira Maekawa¹⁾

¹⁾Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Kyoto University Hospital

²⁾HLA Laboratory

³⁾Department of Urology, Kyoto University Hospital

⁴⁾Department of Hematology and Oncology, Kyoto University Hospital

⁵⁾Present affiliation: Department of Urology, Hyogo College of Medicine

Abstract:

Precise evaluation of donor-specific HLA antibody (DSA) is essential because the existence of DSA is closely associated with poor prognosis in allogeneic transplantation of solid organs such as the kidney, lung, heart and liver, and in non-HLA-matched allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. We experienced two patients whose high level of DSAs were underestimated by LABScreen single-antigen beads class I methods. In contrast, the DSAs were measured precisely by using LABScreen mixed beads methods, as well as flow cytometric crossmatch. Surprisingly, DSAs were measured precisely using single-antigen beads (SAB) assay when the patient sera were treated by heat (56°C, 30 minutes), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) or dithiothreitol (DTT). These results suggest that complements inhibited binding of the secondary antibodies to the primary antibody (DSA) in the detection of DSA using SAB assay. Such inhibition was observed specifically when antibody titers were markedly high. We call the inhibition by complements “prozone-like phenomenon,” and here propose that inactivation of complements in the test serum by treatment with EDTA is mandatory for the precise measurement of DSA using SAB assay.

Keywords:

HLA antibody, donor-specific HLA antibody, inactivation of complement