

CD36 抗体検出のための新たな検査方法の樹立

尼岸 悦子 林 智也 高 陽淑 松山 宣樹 石井 博之

松倉 晴道 保井 一太 平山 文也

背景と目的：CD36 抗体は、新生児同種免疫性血小板減少症、血小板輸血不応症、非溶血性輸血副作用などの疾患や病態を引き起こす重要な抗体であるが、抗体検出に当たってはゴールドスタンダードといえる検査方法はない。

材料と方法：抗原捕捉原理に基づくモノクローナル抗体を必要とせず、標的細胞としては遺伝子導入細胞を使用する、CD36 抗体検出のための新たな検査方法を樹立することを目的とした。また、同法と MAIPA 法とを感度と特異性の 2 点において比較した。

結果：今回の新たな検査法は、(1) 血小板パネルの替りに遺伝子導入細胞を使用し、(2) HLA 抗体の混在に影響を受けず、(3) 特異性を高めるために通常用いられる CD36 モノクローナル抗体が不要であるという 3 点の特徴を持つ。また、MAIPA 法に比して、特異性、感度共に非常に良好な成績を示した。

結論：今回の新たな検査法は、CD36 抗体検出において感度、特異性共に優れた検査方法である。

キーワード：CD36 抗体, antigen capture, モノクローナル抗体, 遺伝子導入細胞株

本論文内容は、Wiley-Blackwell Publishing 社の許可のもと Vox Sanguinis 誌 (第 106 巻第 4 号 368—371, 2014) に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。(A new transfectant panel cell line-based MoAb-independent antigen capture assay system for detection of CD36 antibody.)

はじめに

CD36 は GPIV としても知られ、血小板細胞表面上に発現する重要な糖タンパクであり、単球にも発現している¹⁾。CD36 の欠損は人種間で大きくその頻度が異なり、アジア人で 3~11%、サハラ砂漠以南のアフリカ人で 8%、白人で 0.4% 以下と報告されている^{1)~3)}。CD36 を欠損するヒトは輸血や妊娠により感作され、CD36 抗体、所謂 Nak^a 抗体を産生する可能性がある⁴⁾。CD36 抗体は新生児同種免疫性血小板減少症⁵⁾や血小板輸血不応症⁶⁾の原因となりうる。稀ではあるが、CD36 抗体は輸血関連肺障害などの命を脅かすような重篤な非溶血性輸血副作用を誘発することも知られている⁶⁾⁷⁾。

血小板抗体を検出するための検査方法はさまざま報告されている。代表的な方法としては、the platelet suspension immunofluorescence test (PIFT 法)⁸⁾、monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay (MAIPA 法)⁹⁾、the modified antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (MACE 法)¹⁰⁾、the mixed passive haemagglutination test (MPHA 法)¹¹⁾ 等が挙げられる。しかし、これらの方法は広く使われ

ているものの、以下のような欠点が知られている。

まず、これらの方法は何れも標的細胞としてタイピングされた血小板パネルを必要としている。しかし、血小板抗原の種類によっては極めて低頻度にしか認められず、従ってそのようなタイプの血小板を標的細胞として用意することは時に極めて困難である。次に、検査試料に HLA 抗体が混在する場合には、PIFT 法や MPHA 法では目的の血小板抗体が検出できない。更に、標的血小板抗原を捕捉する為にモノクローナル抗体を使用する MAIPA 法や MACE 法では、使用したモノクローナル抗体が時に検出すべき血小板抗体と競合してしまい、検査結果が偽陰性となることがある。MAIPA 法では、検出すべきヒト CD36 抗体と同法で用いられる CD36 モノクローナル抗体が CD36 分子上の抗原エpiteopへの結合において競合し、結果的に CD36 抗体が検出できなくなる場合があることが広く知られている¹²⁾。このように、いずれの検査方法も問題点を抱えているのが現状である。

ELISA 法を原理とする GTI PakPlus[®] やルミネックス法を原理とする LIFECODES_Pak LxTM は今や市販検

査キットとなっており、血小板抗体や CD36 抗体の検出に利用されている。これらの検査キットのバリデーションデータに関する論文も 2, 3 報告されているが¹³⁾¹⁴⁾、いずれも血小板抗体検出に関してのみであり、CD36 抗体検出にかかるバリデーションデータの報告は未だされていない。

我々は最近、遺伝子導入技術を用いて作成した CD36 発現細胞株 (HP-CD36) とそのコントロールとなる細胞株 (HP-mock) を用いて PIFT 法のようにフローサイトメーターを用いて CD36 抗体を検出する検査法を樹立した¹⁵⁾。同細胞株の親株は HLA 分子を発現しておらず、従って本法では HLA 抗体が混在する試料であっても目的の CD36 抗体を検出することが可能である。HP-CD36 細胞における CD36 の発現は強く、また安定的な発現が細胞株樹立以降少なくとも 5 年間継続して観察されている。しかし、一方では、フローサイトメーターは高価な機器であり、従って一部の施設でしか使用できないという欠点を本法は抱えている。そこで本研究では、上記フローサイトメーターを用いる方法に一工夫を加え、MAIPA 法のように多くの施設で実施可能な検査方法に改良した。HP-CD36 細胞を用いることで特異性の担保が取れやすくなったことが功を奏し、MAIPA 法に似た検査方法ではあるが、はからずも CD36 モノクローナル抗体の使用を不要とする検査法が樹立できた。

材料と方法

1. 血清試料

健康人血清は当血液センターの健康な職員から採取した。HLA Class I 抗体含有血清は血小板輸血不応患者由来血清を用いた。CD36 抗体含有血清は非溶血性輸血副作用患者由来血清、血小板輸血不応患者由来血清、新生児同種免疫性血小板減少症症例由来血清や献血者由来血清を用いた。それぞれの血清試料中の抗体特異性は、抗 HPA 抗体同定パネルキット (日本 オリンパス製) を用いて、MPHA 法により以前既に同定している。

2. HP-CD36 細胞を用いるがモノクローナル抗体を不要とする検査法 (HP cell-based MoAb-independent immobilization of platelet antigens assay [HP-IPA])

HP-CD36 細胞およびそのコントロールの HP-mock 細胞を 96 穴プレート (5.0 × 10⁵/well) を用いて 37 度で 3,000g、1 分間遠心した。検査対象血清を 25 μl 加えた後に 37 度で 30 分インキュベートした。その後、0.2% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) を添加したトリスバッファー生理食塩水 (Tris-buffered saline : TBS) [以下 TBS/BSA と呼ぶ] を用いて細胞を洗浄し、細胞ペレットに peroxidase 結合マウス抗ヒト IgG を添加し、37 度で 30 分間インキュベートした。細

胞を 3 回、TBS/BSA で洗浄し、0.5% Triton-X 100 を含む PBS (PBS/X-100) を 200 μl 加え、室温で 15 分間インキュベートすることにより細胞を可溶化した。可溶化後に 3,000g、15 分間の遠心でデブリスを除去し、予めヤギ抗マウス IgG をコートしておいた 96 穴プレートに可溶化上清を 150 μl 加えた。洗浄後に peroxidase 基質を加え発色を促した後に、450nm の吸光度を日立製 MTP-120 で測定した。シグナル対ノイズ比 (signal-to-noise ratio : SNR) を下記のように算出した。HP-CD36 細胞が入っていたウェルでの 450nm の吸光度 (signal) を HP-mock 細胞が入っていた対応するウェルでの 450nm の吸光度 (noise) で除した値を SNR とした。

3. MAIPA 法

用いた 3 種類のモノクローナル抗体は 10.5 (フランス BioCytex 社製)、FA6.152 (米国 Beckman Coulter 社製) および TR9 (米国 Acris Antibodies 社製) である。HP-CD36 細胞と HP-mock 細胞を用いた MAIPA 法を簡潔に以下に記す。HP 細胞を 96 穴プレート (5.0 × 10⁵/well) を用いて 3,000g、1 分間遠心した。検査対象血清を 25 μl 加えた後に 37 度で 30 分インキュベートした。TBS/BSA を用いた洗浄により血清を除去した後に細胞ペレットを 10.5, FA6.152 あるいは TR9 と 37 度で 30 分間インキュベートした。細胞を 3 回洗浄した後に、PBS/X-100 を 200 μl 加え 15 分間インキュベートすることにより細胞を可溶化した。可溶化後は遠心でデブリスを除去したうえで、150 μl の可溶化上清を予めヤギ抗マウス IgG をコートしておいた 96 穴プレートに加えた。洗浄後に、プレートに捕捉されたヒト IgG を peroxidase 結合ヤギ抗ヒト IgG (米国 Jackson ImmunoResearch Laboratories 社製) を添加することにより検出した。peroxidase 基質を加えた後に得られる発色を 450nm の吸光度で捉えた。

結 果

CD36 抗体含有血清 9 検体と健康人血清 24 検体を用いて、HP-IPA 法および 3 種の MAIPA 法の適正なカットオフ値を算出した。算出に当たっては、カットオフ値を順次推移させて行った際に得られる感度 (縦軸) と [1 - 特異度] (横軸) をグラフに表した receiver operating characteristic (ROC) 曲線を基にした (図 1)。ROC 曲線を描いた後に、感度が「1」、[1 - 特異度] が「0」であるポイントからもっとも近い ROC 曲線上のポイントを計算式 [(1 - 感度)² + (1 - 特異度)²] が最小値となるカットオフ値として求めた。この際のカットオフ値を至適カットオフ値とした。表 1 に示したように、HP-IPA 法、モノクローナル抗体 10.5 を用いた MAIPA 法、モノクローナル抗体 FA6.152 を用いた MAIPA 法および

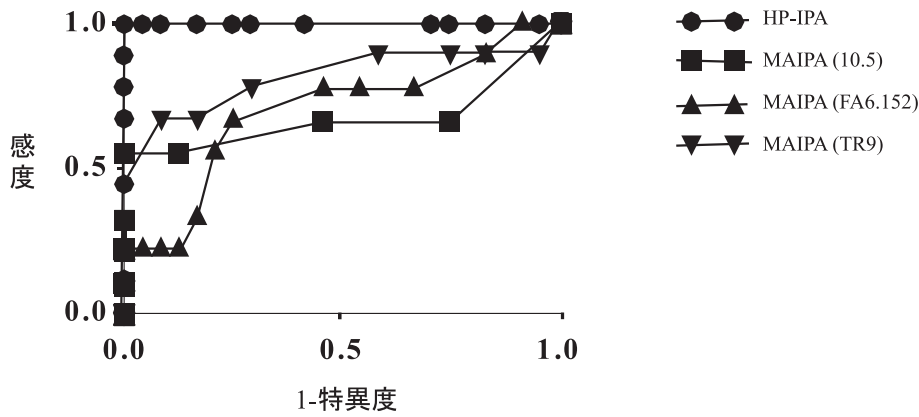


図1 ROC curve を用いた各検査法の評価

表1 CD36 検出のための新たな方法 (IPA 法) と MAIPA 法の比較

| 血清 ナンバー | Condition | HP-CD36 を 用いた IPA 法 Cutoff: 2.55 | HP-CD36 を用いた MAIPA 法* | | | |
|------------|-----------|--|-----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------|
| | | | 10.5 Cutoff: 1.25 | FA6.152 Cutoff: 1.45 | TR9 Cutoff: 1.45 | TOTAL |
| # 1 | NAIT | 3.0 + | 1.3 + | 1.6 + | 2.8 + | + |
| # 2 | NAIT | 9.2 + | 1.1 - | 1.6 + | 0.7 - | + |
| # 3 | NAIT | 48.7 + | 1.9 + | 4.3 + | 3.7 + | + |
| # 4 | NAIT | 17.2 + | 0.9 - | 1.0 - | 1.5 + | + |
| # 5 | PTR | 6.8 + | 1.3 + | 1.5 + | 1.6 + | + |
| # 6 | PTR | 7.0 + | 1.7 + | 1.4 - | 1.3 - | + |
| # 7 | PTR | 34.8 + | 0.9 - | 1.8 + | 1.2 - | + |
| # 8 | † NHTRs | 10.2 + | 24.2 + | 21.4 + | 28.2 + | + |
| # 9 | Donor | 4.0 + | 0.8 - | 1.1 - | 1.5 + | + |
| 感度 | | 9/9 (1.00) | 5/9 (0.55) | 6/9 (0.66) | 6/9 (0.66) | 9/9 (1.00) |
| 特異性 | | 24/24 (1.00) | 24/24 (1.00) | 18/24 (0.75) | 22/24 (0.91) | 18/24 (0.75) |

*450nm における HP-CD36 細胞 と HP-mock 細胞の吸光度の比率

†日本赤十字社中央血液研究所 中島文明先生より分与されたサンプル

モノクローナル抗体 TR9 を用いた MAIPA 法の至適カットオフ値, 感度, 特異度はそれぞれ, (2.55, 1.00, 1.00), (1.25, 0.55, 1.00), (1.45, 0.66, 0.75), (1.45, 0.66, 0.91) となった. この結果は, HP-IPA 法が 3 種の MAIPA 法の何れよりも感度, 特異度において明らかに優れていることを示している. HLA 抗体を含有する 50 種類の血清試料を HP-IPA 法で検査したところ, 1 検体のみ弱陽性を示した (SNR=3.8).

CD36 分子上には, 免疫した場合に特異抗体が産生され易い領域がある. アミノ酸配列で 155 番から 183 番の領域で, 多くの CD36 抗体はこの領域を認識するが¹⁶⁾, 抗原エピトープは若干異なるようである¹⁷⁾. CD36 モノクローナル抗体のうち少なくとも 10.5 と FA6.152 は異なる抗原エピトープを認識すると報告されている¹⁷⁾. 異なる抗原エピトープを認識するのであればそれぞれの CD36 モノクローナル抗体がヒト CD36 抗体とエピトープ

競争を起す際のエピトープも異なるはずであり, 従って複数の CD36 モノクローナル抗体を用いて MAIPA 法を行いその結果を総合的に判定すれば, ヒト CD36 抗体とのエピトープ競争の問題を回避することができる可能性が生まれてくる. この仮説が正しければ, MAIPA 検査においては複数の CD36 モノクローナル抗体を用い, その内少なくともひとつの系で陽性となれば総合的に陽性とするという基準を設ければ, 結果として感度が上昇するはずである. 図 1 で行った実験の SNR の生データを表 1 に示した. 異なる CD36 モノクローナル抗体を用いた MAIPA 法を個別に判定するとその感度は 0.55 (5/9) から 0.66 (6/9) の間に位置したが, 上記の総合判断を採用するとその感度は一機に 1.00 (9/9) に跳ね上がった. しかし, その特異度は 0.75 (18/24) と低いままであり, HP-IPA の 1.00 (24/24) と比べると依然として劣っていた.

考 察

我々は、CD36 抗体検出のための新たな検査法である HP-IPA 法を樹立した。本法は、(1) 血小板パネルの替りに遺伝子導入細胞を使用し、(2) HLA 抗体の混在に影響を受けず、(3) 特異性を高めるために通常用いられる CD36 モノクローナル抗体が不要であるという 3 点の特徴を持つ。複数の CD36 モノクローナル抗体を用いて行った MAIPA 法に比して、より良好な感度と特異度を示した。複数の CD36 モノクローナル抗体を用いて行った MAIPA 法について、少なくとも一つの系で陽性であればその検体は陽性と判定するという総合的な判定基準を導入すれば、MAIPA 法の感度は HP-IPA 法と同程度に良好な結果を示したが、その場合にも特異度は改善しなかった。

HP-IPA 法にも 2 点の解決すべき点がある。まず、パネル細胞株の維持が必要であり、これにはコストと多大な労力がつきまとう。第二に、新生児同種免疫性血小板減少症、血小板輸血不応症や非溶血性輸血副作用事例に於いては CD36 抗体以外にも検出すべき抗体があり、可能ならこれらの抗体も含めて全ての抗体を同一の方法で検査できるようになれば実務的な運用への道が開かれる。しかし、CD36 抗体以外の抗体検出には未だ HP-IPA 法は開発できていない。今後はこの問題を解決すべく、努力していく所存である。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, et al: Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV. *Blood*, 75: 684—687, 1990.
- Yamamoto N, Ikeda H, Tandon N, et al: A platelet membrane glycoprotein (GP) deficiency in healthy blood donors: Naka-platelets lack detectable gpIV (CD36). *Blood*, 76: 1698—1703, 1990.
- Lee K, Godeau B, Fromont P, et al: CD36 deficiency is frequent and can cause platelet immunization in Africans. *Transfusion*, 39: 873—879, 1999.
- Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, et al: A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang*, 57: 213—217, 1989.
- Kankirawatana S, Kupatawintu P, Juji T, et al: Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-Nak (a). *Transfusion*, 41: 375—377, 2001.
- Morishita K, Wakamoto S, Miyazaki T, et al: Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of fresh frozen plasma containing anti-CD36 (Nak) isoantibody. *Transfusion*, 45: 803—806, 2005.
- Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, et al: Role of anti-Nak (a) antibody, monocytes and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang*, 95: 318—323, 2008.
- von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, et al: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol*, 39: 195—207, 1978.
- 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.
- Fabris F, Scandellari R, Ruzzon E, et al: Platelet-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 103: 4562—4564, 2004.
- 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.
- Kaplan C, Freedman J, Foxcroft Z, et al: International Society of Blood Transfusion—Working Party on Platelet Immunology. Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: a statement. *Vox Sang*, 93: 298—299, 2007.
- Lucas GF, Rogers SE: Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay kit (GTI PakPlus) for the detection of antibodies against human platelet anti-gens. *Transfus Med*, 9: 63—67, 1999.
- Lubenko A, Savage J: Antigen capture ELISA for platelet antibody detection: choice of conjugate influences assay result. *Transfus Med*, 10: 213—218, 2000.
- Hayashi T, Yasui K, Matsuyama N, et al: Establishment of a novel method for detecting Nak antibodies by using a panel cell line. *Transfusion*, 49: 390—392, 2009.
- Daviet L, Morel-Kopp MC, Kaplan C, et al: A structural/functional domain on human CD36 is involved in the binding of anti-Nak (a) antibodies. *Thrombosis and Haemostasis*, 73: 543—545, 1995.
- Morel-Kopp MC, Daviet L, McGregor J, et al: Drawbacks of the MAIPA technique in characterising human anti-platelet antibodies. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 7: 144—146, 1996.

A NEW TRANSFECTANT PANEL CELL LINE-BASED MOAB-INDEPENDENT ANTIGEN CAPTURE ASSAY SYSTEM FOR DETECTION OF CD36 ANTIBODY

*Etsuko Amakishi, Tomoya Hayashi, Yangsook Koh, Nobuki Matsuyama, Hiroyuki Ishii,
Harumichi Matsukura, Kazuta Yasui and Fumiya Hirayama*

Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

Keywords:

CD36 antibody, antigen capture, monoclonal antibody, gene-transfected cell lines

©2014 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/>