

## FlowPRA<sup>®</sup>を用いた抗 HLA 抗体検出における血清と血漿検体種間の統計学的比較検討

西本奈津美<sup>1)</sup> 丸橋 隆行<sup>1)</sup> 岩原かなえ<sup>1)</sup> 石川怜依奈<sup>1)</sup> 須佐 梢<sup>1)</sup>  
 関根 芳岳<sup>2)</sup> 半田 寛<sup>3)</sup> 横濱 章彦<sup>1)</sup>

Flow cytometry を用いた抗 HLA 抗体の検出法である FlowPRA<sup>®</sup>法には、まだ標準化された検査方法がなく、使用する検体も統一されていない。今回、血清および血漿の異なる検体種間での検査結果を比較検討した。55 例の患者及び健常人から血清、血漿を同時に採取し、抗 HLA 抗体の測定を行なった。抗 HLA 抗体と反応した陽性ビーズの割合である %PRA は class I、II とともに両検体のあいだに強い相関が見られた(それぞれ  $r = 0.8570$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r = 0.7529$ ,  $p < 0.0001$ )。抗 HLA 抗体の有無の判定も、class I では 55 例全例で、class II では 54 例で一致した。しかし、1 例で、血清で陰性、血漿で陽性だった。一方、Mean Fluorescence Intensity 値は class I および II とともに血漿検体で有意に高かった。また、2 例で血漿検体に非特異反応が見られた。よって FlowPRA<sup>®</sup>法による抗 HLA 抗体測定は血清でも血漿でもほぼ同等の結果が期待でき、血清で判定困難な例では血漿の測定が有用である可能性がある。一方、血漿では高いバックグラウンドや非特異反応が見られる場合もあり、検体種の特性を考慮し検査する必要がある。

キーワード：FlowPRA<sup>®</sup>、抗 HLA 抗体、検体種間差、Flow cytometry、移植

### はじめに

抗 HLA 抗体は、過去の輸血や妊娠、移植により感作されて検出され、急性拒絶の原因となる抗体である<sup>1)</sup>。当院でも造血幹細胞移植、腎移植時に抗 HLA 抗体測定の必要があり、既存の Flow cytometer を使用して抗 HLA 抗体を検出できる FlowPRA<sup>®</sup>法の検査を導入した。本法は HLA 抗原を固相化したビーズを用いる抗体検出法であるが、標準的な検査法がなく、結果の解釈も測定者に一任されている。そのため、実際に測定を行ってみても判定に苦慮する症例があり、偽陰性や偽陽性と判定される場合がある。FlowPRA<sup>®</sup>法の添付のマニュアルでは血清検体を使用するように記載されているものの、組織適合性学会の提唱する標準法案では、使用検体として血清でも血漿でも検査可能であるとされている<sup>2)3)</sup>。しかし、我々の調べた範囲で検体種間の異同を証明した報告はない。一方、同様の原理を利用している LABScreen Single antigen<sup>®</sup>にて補体が関与して起こる阻害反応（プロゾーン現象）により偽陰性となる症例があり、血清非働化の必要性が報告されている<sup>4)5)</sup>。補体不活化剤として知られる EDTA を用いた血漿検体

を使えばこうした判定困難例の一助になる可能性がある。また、輸血部門では輸血検査の一部として血漿検体を用いることも多く、血漿検体を用いることができれば輸血検査の一部として実施でき簡便である。そこで同一患者から同時に採血した血清と EDTA を添加した血漿検体を用いた検体種間の検査結果の比較検討をしたので報告する。

### 材料と方法

あらかじめ研究同意の得られた健常人 3 例（平均年齢  $32 \pm 3$  歳）、血小板輸血不応症 8 例（平均年齢  $50 \pm 14$ ）、腎移植患者 5 例（平均年齢  $47 \pm 9$ ）、造血器腫瘍患者 39 例（平均年齢  $59 \pm 16$ ）を対象にし、同日に採取できた血清と血漿を  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結保管した（Table 1）。翌日以降 FlowPRA<sup>®</sup> Screening Test (FL12, One Lambda, Mountview, CA) を用いて添付マニュアルに従って測定を行なった。FlowPRA<sup>®</sup> class I & class II ネガティブコントロール血清 (FL-NC, One Lambda)、FlowPRA<sup>®</sup> Class I ポジティブコントロール血清 (FL1-PC, One Lambda) と FlowPRA<sup>®</sup> Class II ポジティブコントロー

1) 群馬大学医学部附属病院輸血部

2) 群馬大学大学院医学系研究科泌尿器科学

3) 群馬大学大学院医学系研究科血液内科学

〔受付日：2017 年 6 月 30 日、受理日：2017 年 11 月 10 日〕

Table 1 Patient Characteristics

	Male	Female	Total
Healthy volunteer	1	2	3
Platelet transfusion refractoriness	3	5	8
Kidney transplantation	1	4	5
Hematologic malignancy	17	22	39
Total	22	33	55

ル血清 (FL2-PC, One Lambda) を等量ずつ混合したポジティブコントロール血清, 被検者の血清及び血漿について, HLA 抗原が固相化してある FlowPRA<sup>®</sup>I ビーズ (class I 用) および FlowPRA<sup>®</sup>II ビーズ (class II 用) に反応させて抗 HLA 抗体を測定した. 二次抗体は FL12 付属の fluorescein isothiocyanate (FITC) のラベルされた抗ヒト IgG 抗体を使用した. FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズ (FLCNTBD, Veritas) を用いて非特異的反応の指標とした. 機器は FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用した. 解析ソフト FACSDiva (version 2.1.1) にて以下の通り解析を行った.

FlowPRA<sup>®</sup>の添付マニュアルでは, FlowPRA<sup>®</sup> class I & class II ネガティブコントロール血清と反応させたビーズのピーク終わりに cut-off ポイントを置き, それより陽性側のビーズの比率を percentage of panel-reactive antibodies (%PRA) として, 10% を超えた場合は陽性, それ以下では波形を参考に陽性か陰性か判断することが記載されている. 上記の cut-off ポイントで HLA 抗原の固相化されていない FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズを検体と反応させたときに %PRA が 7% を超える場合非特異反応陽性とし, ピークの形や FlowPRA<sup>®</sup>I および II ビーズの反応性を参考に総合的に陽性, 陰性の判定を行った. 今回測定結果は (1) 血清と血漿検体における %PRA 値の比較, (2) 血清と血漿検体における判定基準を用いた結果の比較, (3) 波形全体の Mean Fluorescence Intensity (MFI) 値の 3 つの値を解析した. また, 4 つ目の解析として, (4) 非特異反応で判断が難しい症例を示した. (1) 上述のように %PRA 値の算出は, FlowPRA<sup>®</sup> class I & class II ネガティブコントロール血清のピークの終了ラインに cut-off を設定した. (2) 本法はヒストグラム波形からも抗 HLA 抗体の有無を判定するため, 判定基準を以下のように定めた. ヒストグラム波形が FlowPRA<sup>®</sup> class I & class II ネガティブコントロール血清と同様の波形 (シングルピーク) の場合を陰性, それ以外を陽性 (2 峰性, 多峰性, 右シフト, 膨らんだシングルピーク) と判定した. 判定の中でも波形の形が何種類も観察されたため, それぞれ比較するために便宜上, 陰性同様のシングルピークを A, 2 峰性が観察された場合を B, 多峰性が観察さ

れた場合を C, ABC に分類できないものを D とし比較検討した (Fig. 1). (3) FSC-SSC プロットにてビーズ集団をゲーティングし, その集団の PE 蛍光強度の差により, FlowPRA<sup>®</sup>I ビーズ, FlowPRA<sup>®</sup>II ビーズ, FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズの領域を分けヒストグラムに展開し, 各ヒストグラム全体の FITC-MFI 値を測定した (Fig. 2). (4) FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズのヒストグラムにて %PRA 値が 7% を超える場合は非特異的反応ありと判定した (Fig. 3).

### 統計解析

連続変数の解析には Wilcoxon 符号付き順位検定と Spearman の順位相関分析, Bland-Altman 解析を行った. 判定基準を元にした結果については  $\kappa$  検定, Bowker 検定をそれぞれ行った. 統計解析には JMP version 12 (SAS Institute Inc, Cary, NC) を用いた.

本研究は群馬大学医学部の疫学研究に関する倫理審査委員会の承認を得て行った.

### 結 果

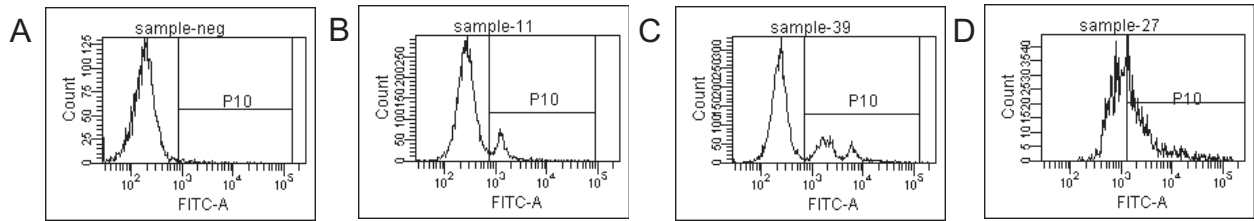
#### (1) 血清と血漿検体における %PRA 値の比較

Bland-Altman 解析の結果, %PRA は, class I にて血清の結果と血漿の結果には有意差があり ( $p = 0.0031$ ), class II では有意差はなかった ( $p = 0.1904$ ) (Fig. 4). 相関分析では class I, II ともに血清, 血漿の結果は強い相関を示した (class I  $r = 0.8570$ ,  $p < 0.0001$ , class II  $r = 0.7529$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 5).

#### (2) 血清と血漿検体における判定基準を用いた結果の比較

FlowPRA<sup>®</sup>では, %PRA とともにヒストグラムの形で最終的な抗 HLA 抗体の存在を判定するとされており, 上記の判定基準を用いた抗 HLA 抗体陽性, 陰性結果が重要である. A から D の 4 つのカテゴリーの一致性, A を抗 HLA 抗体陰性, それ以外を抗 HLA 抗体陽性とした時の定性検査としての一致性を検討した. 設定した判定基準に従って判定した結果,  $\kappa$  係数は class I で 1.000 ( $p < 0.0001$ ), class II で 0.9551 ( $p < 0.0001$ ) と血清と血漿の結果はいずれも良好な一致性であった (Table 2). 一方, class II の検査で結果が一致しなかった 1 例は血清で陰性, 血漿で陽性であった. 波形の判

**Class I**



**Class II**

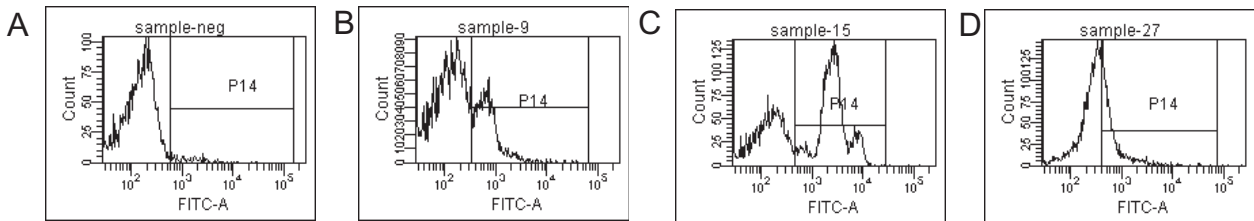


Fig. 1 Wave patterns of histograms derived from flow cytometric analysis of class I and class II anti-HLA antibodies

A: negative, B-D: positive

A: single peak, B: two peaks, C: multiple peaks, D: right-shifted pattern

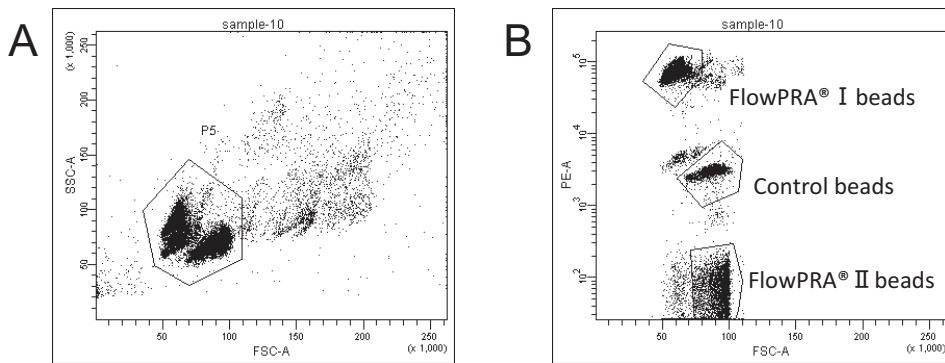


Fig. 2 Flow cytometric analysis gating strategy

A: Gating strategy in FSC-SSC plot.

B: Among groups of P1, three populations were delineated according to the intensity of PE fluorescence: FlowPRA® I>control beads>FlowPRA® II beads

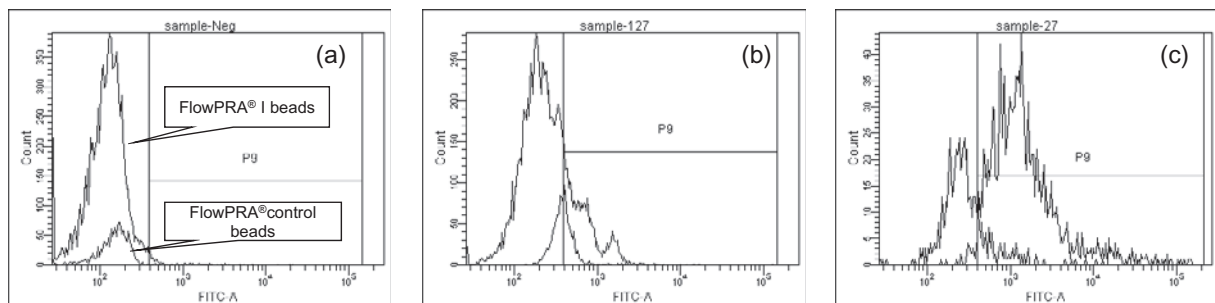


Fig. 3 Non-specific reaction (2 cases)

(a) A negative control sample. (b-c) Cases that had non-specific reaction. The black histogram indicates data from FlowPRA® control beads, and the gray histogram indicates data from FlowPRA® I beads. The histograms from the control beads (black histogram) in (b) and (c) were shifted to the right compared to the histogram from the negative control sample (a). % PRA (P9) of (b) and (c) control beads were 25.0% and 10.6%, respectively, and these samples were considered to have non-specific reactions. However, these two cases were considered to be positive for class I antibodies according to the histogram pattern of FlowPRA® I beads (gray histogram).

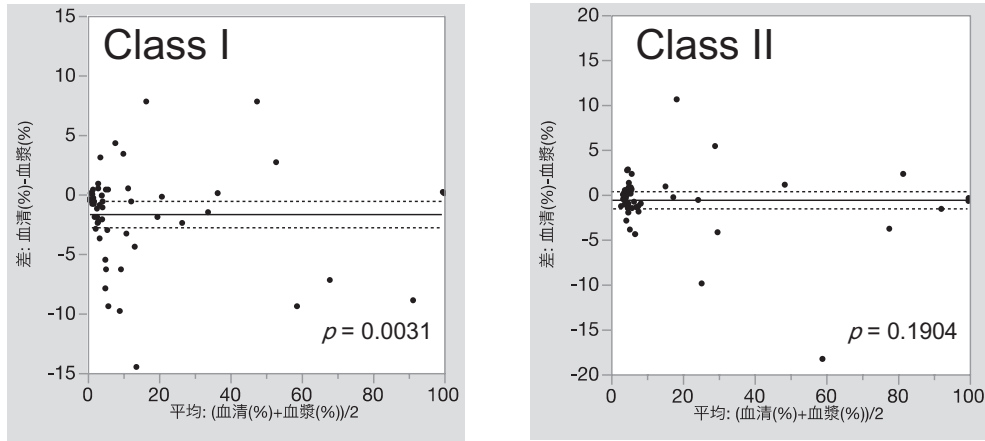


Fig. 4 Bland-Altman analysis  
Interspecimen differences between serum and plasma were significant for class I (n=55) but not class II anti-HLA antibodies (n = 55).

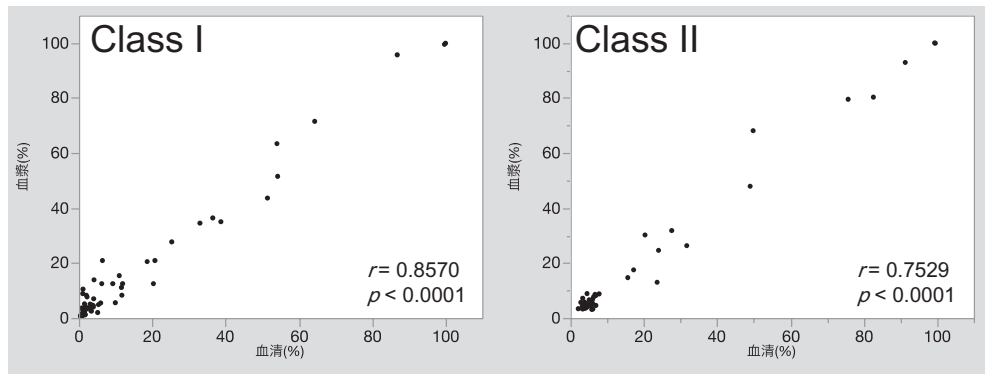


Fig. 5 Correlation of %PRA between serum and plasma  
%PRA of serum samples was strongly correlated with that of plasma samples for both class I (n = 55) and class II anti-HLA antibodies (n = 55).

Table 2 κ test between serum and plasma samples

		Plasma	
		Positive	Negative
Class I	Positive	21	0
	Negative	0	34

$\kappa = 1.000, p < 0.0001$

		Plasma	
		Positive	Negative
Class II	Positive	15	0
	Negative	1	39

$\kappa = 0.9551, p < 0.0001$

定基準では class I で血漿は A 34 例, B 9 例, C 10 例, D 2 例, 血清は A 35 例, B 7 例, C 11 例, D 2 例という結果になった (Table 3). class II では, A 39 例, B 5 例, C 9 例, D 2 例, 血清は A 40 例, B 4 例, C 9 例, D 2 例という結果になり, Bowker 検定の結果, class I では  $p = 0.8912$ , class II で  $p = 0.9935$  ともにいずれにも有意な差が認められなかった (Table 3).

**(3) 波形全体の Mean Fluorescence Intensity (MFI) 値**

血清と血漿の MFI は, class I, class II ともに血漿の

方が有意に高かった (Wilcoxon 符号付き順位検定, class I  $p < 0.0001$ , class II  $p = 0.0005$ ), (Table 4). 一方, 相関分析では class I, II とも血清, 血漿検体の結果の間に強い相関を示した (class I,  $r = 0.7945, p < 0.0001$ , class II,  $r = 0.8336, p < 0.0001$ ) (Fig. 6).

**(4) 非特異反応で判断が難しい症例**

非特異的の反応ありと判定した 2 例はともに血漿検体であった. 1 例は, FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズの %PRA が 25.0% であり, 非特異反応ありと判定したものの FlowPRA<sup>®</sup>I ビーズでは 2 峰性のピークが見られ陽

Table 3 Classification according to the wave pattern in histograms derived from flow cytometric analysis of class I and class II anti-HLA antibodies

Class I	Plasma	Serum	Class II	Plasma	Serum
A	34	35	A	39	40
B	9	7	B	5	4
C	10	11	C	9	9
D	2	2	D	2	2

$p=0.8912$   $p=0.9935$

Table 4 Statistical comparison of Mean Fluorescence Intensity (MFI) between serum and plasma

		MFI median	Range	<i>p</i>
Class I	Serum	2.476	2.140 - 4.372	<0.0001
	Plasma	2.662	2.260 - 4.510	
Class II	Serum	2.427	2.045 - 4.250	0.0005
	Plasma	2.662	2.260 - 4.510	

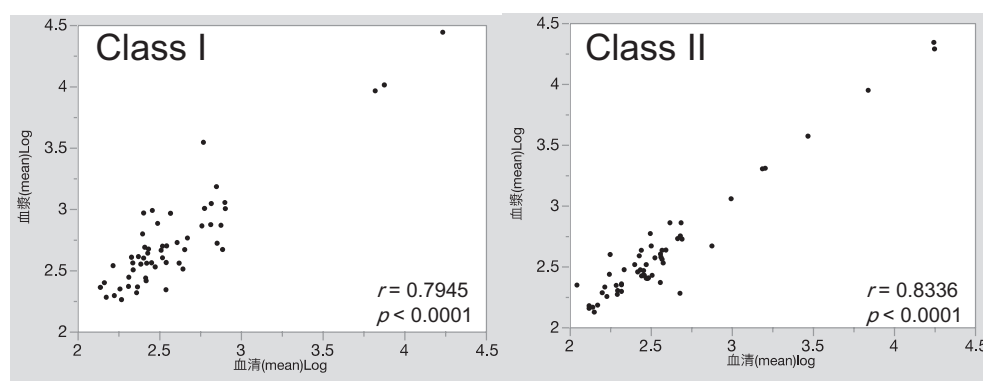


Fig. 6 Correlation of Mean Fluorescence Intensity (MFI) between serum and plasma  
MFI of serum samples was strongly correlated with that of plasma samples for both class I (n = 55) and class II anti-HLA antibodies (n = 55).

性と判定し, FlowPRA<sup>®</sup>II ビーズの%PRA が4.2%でFlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズよりも低く, かつシングルピークであったことより class II に対する抗体は陰性と判断した. 2 例目は, FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズの%PRA が10.6% であり, やはり非特異反応ありと判定されたが, FlowPRA<sup>®</sup>I ビーズでは2 峰性のピークがあり陽性, FlowPRA<sup>®</sup>II ビーズの%PRA が7.7%とFlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズよりも低かったことより class II に対する抗体は陰性と判断した (Fig. 3).

## 考 察

抗 HLA 抗体は, 過去の輸血や妊娠, 移植の際に抗原に感作されることにより産生されるもので<sup>1)</sup>, 急性拒絶の原因となる抗体である. Terasaki らの報告によれば, 腎移植においては, 抗 HLA 抗体陽性例の生着率は58%

であり, 抗 HLA 抗体陰性例の81% に対して有意に低い結果となっている<sup>6)</sup>. 腎移植が拒絶された患者の血清中には抗 HLA 抗体が高率に認められている報告もあり, 移植前後に行う抗 HLA 抗体スクリーニング検査が重要である<sup>7)</sup>. Terasaki らの報告以来40年以上も complement-dependent cytotoxic (CDC) assay が抗 HLA 抗体の検出法のゴールドスタンダードであったが, 近年抗原固相化技術の進歩により抗 HLA 抗体をより高感度に簡便に検出することが可能になった. その方法は, 一般に solid phase assay (SPA) と呼ばれているマイクロプレートに固相化した Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) やマイクロビーズに固相化した Luminex technology や本研究の FlowPRA<sup>®</sup>法である. その簡便さからか Luminex technology を用いた研究が多く見られるが, その結果は FlowPRA<sup>®</sup>法と同等とされている<sup>8)</sup>.



こうした検査法で抗 HLA 抗体を検出した腎移植, 心移植では CDC assay 陰性かつ SPA 陽性症例は CDC assay のみ陽性症例と比べて, 移植片生存や生命予後が同等か悪いことが報告された<sup>9)10)</sup>. このことは, SPA が CDC assay よりも検出感度が高いことを示唆している. いずれにしても後方視的な研究であり臨床的な妥当性の検証は十分とは言えないが, FlowPRA<sup>®</sup>法を含む SPA は移植時に行うべき検査としてすでに標準的な検査法になりつつある<sup>11)</sup>.

本法の添付文章では, 血清での測定を標準としているが, 組織適合性学会標準法(案)では, FlowPRA<sup>®</sup>測定の使用検体として血漿と血清どちらの使用も可能としている. このように現在まだ統一された標準的な検査法が存在しないのが現状であるため, 今回我々は抗 HLA 抗体の保有率が高いと想定されるグループでの血清と血漿検体を同時に測定することにより, 検体種による違いがあるのか, 判定困難な場合に検体種を変えることは有用なのかといった視点から解析を行った. 同一条件で測定したため, 蛍光強度は当然同じ値がであることを予想していたが, MFI 値は class I, II ともに有意に血漿検体で高かった. 非特異反応の影響が原因とも考えられたが, FlowPRA<sup>®</sup>コントロールビーズに非特異反応を示したのは, 2 例だけであり, 血清に比べて血漿検体ではバックグラウンドが高いのではないだろうか. 他の検査においても血漿中に含まれる抗凝固剤により検査値に影響がでた報告もあるが<sup>12)</sup>, 今回の検査で何が影響したのかは分からなかった. %PRA に関しては, class I で Bland-Altman 解析で有意差を認めた. FlowPRA<sup>®</sup>法では, 判定者がその波形を判断し, %PRA 値の算出のピーク終了ラインを設定しなおすために, 仮にバックグラウンドが高めでも %PRA 値は MFI に比べて差は出にくいと考えた. しかしながら相関分析では両クラスの結果とも強い相関を示しており, 2 つの検体間で全く同じ値を示さないまでも定性としての結果はほぼ同等と考えた.

最終的な抗 HLA 抗体の有無に関する結果も 1 例を除き一致した. 一致しなかった 1 例は, 血清では陰性と判定したが, 血漿で陽性と判定されたものだった. 残念ながら残余検体はなく他の方法で抗 HLA 抗体の有無を確認することはできなかった. 検出方法は異なるが, 同様の原理を使用している LabScreen Single antigen 法では, 血清中の補体成分が抗 HLA 抗体検出の測定系を阻害する可能性があることが報告されている<sup>4)5)</sup>. 今回の研究での乖離例についても同様の機序で阻害され

た可能性はあり, 血清検体では検出できないときは検体種を変えることが有用である可能性がある.

今回の検討から, 血清と血漿の %PRA は全く同じ値にならないものの, 結果を総合的に判断した場合には, 血清と血漿のどちらを使用した場合でも, 影響は少ないことがわかった. 一方, 血漿では高いバックグラウンドや非特異反応が見られる場合もあり, 検体種の特性を考慮し検査する必要がある.

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

- 1) Scornik JC: Blood transfusions in organ transplant patients. *Am J Transplant*, 11: 1785—1791, 2011.
- 2) FlowPRA SCREENIG TEST 添付文書, ベリタス.
- 3) 日本移植学会, 組織適合性学会プロトコル集(標準法)(案), [http://www.asas.or.jp/jst/pdf/info\\_20130115.pdf](http://www.asas.or.jp/jst/pdf/info_20130115.pdf) (2017 年 5 月現在).
- 4) 万木紀美子: 抗 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抗 HLA 抗体強陽性を判定しえた 2 症例の経験から. *日本輸血細胞治療学会*, 59: 462—469, 2013.
- 5) 黒田ゆかり: LABScreen Single antigen におけるプロゾーン現象への補体の関与. *MHC*, 18: 56—57, 2011.
- 6) Terasaki PI: Four year follow-up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on Kidney graft survival. *Am J Transplant*, 7: 408—415, 2007.
- 7) Lee PC: All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*, 74: 1192—1194, 2002.
- 8) Tait BD: Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol*, 21: 573—577, 2009.
- 9) Gibney EM: Detection of donor specific antibodies using HLA coated microspheres: Another tool for kidney transplant risk stratification. *Nephrol. Dial. Transplant*, 21: 2625—2629, 2006.
- 10) Smith JD: C4d fixing Luminex antibodies—A new tool for prediction of graft failure after heart transplantation. *Am J Transplant*, 7: 2809—2815, 2007.
- 11) Tait BD: Luminex technology for HLA antibody detection in organ transplantation. *Nephrology*, 14: 247—254, 2009.
- 12) 上尾八郎: 血清検査成績における血清と血漿の違い. *臨床検査*, 17: 848—854, 1973.

## INTERSPECIMEN STATISTICAL COMPARISON OF ANTI-HLA ANTIBODIES USING THE FLOW CYTOMETRIC METHOD, FlowPRA<sup>®</sup>

Natsumi Nishimoto<sup>1)</sup>, Takayuki Maruhashi<sup>1)</sup>, Kanae Iwahara<sup>1)</sup>, Reina Ishikawa<sup>1)</sup>, Kozue Susa<sup>1)</sup>, Yoshitaka Sekine<sup>2)</sup>, Hiroshi Handa<sup>3)</sup> and Akihiko Yokohama<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Transfusion Service, Gunma University Hospital, Gunma University

<sup>2)</sup>Department of Urology, Gunma University Graduate School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Hematology, Gunma University Graduate School of Medicine

### **Abstract:**

Flow cytometric detection of anti-HLA antibodies has yet to be optimally standardized. There is no consensus on whether serum or plasma specimens should be used. We studied interspecimen differences in anti-HLA antibody levels between serum and plasma using the flow cytometric method FlowPRA<sup>®</sup>. We simultaneously examined the serum and plasma of a total of 55 cases that were positive or negative for anti-HLA antibodies. The percentage of class I and class II beads that reacted with plasma was significantly correlated with those that reacted with serum (class I:  $r = 0.8570$   $p < 0.0001$ , class II:  $r = 0.7529$   $p < 0.0001$ ). Plasma and serum, samples that were positive for anti-HLA antibodies were identical in all 55 cases for class I and in 54 cases for class II. In one case, class II anti-HLA antibodies were detected in plasma but not in serum. Mean fluorescence intensity in plasma samples was significantly higher than that in serum. Non-specific reaction due to high background intensity was seen in 2 plasma specimens out of 55 cases. Therefore, both serum and plasma specimens are useful for detecting anti-HLA antibodies using Flow PRA<sup>®</sup>, although the features of each specimen should be considered.

### **Keywords:**

Flow PRA<sup>®</sup>, Anti-HLA antibodies, Flow cytometry

---

©2018 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

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