

試験管法と比較したカラム凝集法による抗 A/B 抗体価時系列変化の有用性

熊谷 優 中嶋 萌夏 坂本 悠斗 野村 勇介 石原 慶子
村上 和代

ABO 不適合腎移植の患者に対して血漿交換などの治療選択や術前術後の経過観察の評価のため抗 A/B 抗体価測定が行われる。我々は試験管法 (TT) とカラム凝集法 (CAT) における ABOi-LKT 患者 5 名の抗 A/B 抗体価の経時的推移を比較し、CAT の時系列変化における有用性を検討した。時系列変化における CAT の抗体価推移は TT とほぼ同等の推移を示した。また、脱感作療法実施後の抗体価は低下しており、この変化は TT で得られたものと一致していた。TT から CAT へ測定法を変更した後も同等の抗体価モニタリングができる可能性が示唆されたことから、抗 A/B 抗体価の時系列変化の観察に CAT は有用であると考えられる。

キーワード：抗体価、腎移植、カラム凝集法、全自動輸血検査装置

はじめに

ABO 不適合腎移植 (ABO-incompatible living kidney transplantation, 以下 ABOi-LKT) の患者では、抗 A/B 抗体価測定を血漿交換などの治療選択や術前術後の経過観察の目的で実施することから重要な検査項目である^{1)~4)}。ABOi-LKT に対する脱感作療法が進歩する前はレシピエントの抗血液型抗体によって移植後早期に強い拒絶反応が起き、生着率や生存率を低下させる要因となっていた。しかし現在では移植前に強力な免疫抑制剤を使用することで抗体産生を抑え、血漿交換によってレシピエントが保有する抗血液型抗体の力価を下げるといった脱感作療法により、術後の拒絶反応を抑制することができるようになってきている⁵⁾⁶⁾。

我が国の腎移植に関する登録データ (2001 年~2017 年) が Yagisawa らによって報告されている。それによると、1989 年に日本で初めて ABOi-LKT が実施された後から ABOi-LKT 数は年々増加傾向となっている⁷⁾。当院においても、2001 年に 6 件であった ABOi-LKT 数は 2017 年には 34 件と 5 倍以上増加しており、それに伴い抗 A/B 抗体価測定の依頼件数も年々増加している。多くの検査件数を処理するためには検査の自動化がより一層必要となる。また ABOi-LKT では、単純に抗体価が高いか低いといった単発的な抗体価の値だけではなく、抗体価の経時的な推移が重要であるため、再現性と精度の高い検査法が求められる⁸⁾。

抗体価測定において従来から主流で使用されている

試験管法 (Tube test, 以下 TT) は、検査者の目視によって判定が行われるため、主観に左右されやすく客観的な結果判定が困難であることから検査者間において判定結果に差が生じてしまう可能性がある。一方で、カラム凝集法 (Column agglutination technology, 以下 CAT) は全自動検査装置にて検査が可能であり、再現性と客観性に優れていることから抗体価測定に適していると言える。

近年、抗 A/B 抗体価測定において、TT と CAT の一致率の比較検討に関して様々な見解が示されている⁹⁾¹⁰⁾。その一方で、時系列変化を比較した報告はまだ少ない状況である。そこで我々は抗 A/B 抗体価測定において CAT が日常検査に使用可能か評価することを目的として、TT と CAT における患者毎の抗 A/B 抗体価の経時的推移を比較し、時系列変化における CAT の有用性を検討した。

対象および方法

1. 対象

2021 年 12 月から 2022 年 3 月の間に、当院輸血検査室に提出された抗体価検体 73 例 (表 1: ABOi-LKT 患者 25 名) のうち、対象期間中に抗 A/B 抗体価検体が 3 回以上提出され、術前に 1 回以上の脱感作療法および腎移植を実施した ABOi-LKT 患者 5 名を対象として、TT と CAT における抗体価の時系列変化を比較した。なお、今回は時系列変化を検討する必要があるた

表1 抗 A/B 抗体価測定患者の背景

No.	年齢	性別	血液型	抗体価検査 提出回数	対象期間中 手術有無
1	56	M	A+	1	無
2	76	M	B+	9	有
3	7	F	O+	1	無
4	40	F	O+	10	有
5	54	M	O+	1	無
6	42	M	O-	2	有
7	60	F	O+	1	無
8	42	F	O+	8	有
9	55	F	B+	1	無
10	54	M	B+	2	有
11	52	M	B+	1	無
12	50	M	B+	2	無
13	43	F	O+	1	無
14	60	M	O+	8	有
15	62	F	O+	1	無
16	69	M	A+	6	有
17	73	M	A+	1	有
18	3	M	O+	4	有
19	51	M	A+	5	無
20	49	F	A+	1	無
21	41	M	B+	1	無
22	49	F	O+	1	無
23	55	F	O+	1	無
24	63	F	O+	1	無
25	60	F	A+	1	無

め、検体提出回数が2回以下の症例に関しては対象から除外した。また、脱感作療法による抗体価の推移を確認するために1回以上の脱感作療法を実施した症例を対象とした。

2. 方法

検体は抗凝固剤を含まないブレーン採血管（真空密封型採血管 ニプロネオチューブ、ニプロ株式会社）に約5.5ml採取し、室温にて2,330g、5分間遠心して得られた血清を使用した。IgG抗体価は、事前に0.01Mに調整したDTT試薬（ジチオスレイトール（DTT）キット、Ortho Clinical Diagnostics社）と等量の血清を反応（37℃、30分）させた後、測定した。

2.1 CAT

測定装置はORTHO VISION®（Ortho Clinical Diagnostics社）を用い、希釈系列作製・分注・遠心分離・判定をすべて全自動で実施した。カラムカセットはIgM抗体価ではオーソ®バイオビュー™リバーサカセット（Ortho Clinical Diagnostics社）、IgG抗体価ではオーソ®バイオビュー™抗IgGカセット（Ortho Clinical Diagnostics社）を使用した。血清はOV希釈トレイ（Ortho Clinical Diagnostics社）にて、リン酸緩衝生理食塩液（Phosphate-buffered saline, 以下PBS, ユーアイ化成株式会社）（pH7.4）を用いて2°希釈系列の作製が行われた。IgM抗体価では希釈検体40μl、赤血球試薬（オーソ®オートビュー®用アフターマジエン®, Ortho Clinical

Diagnostics社）10μlを分注後、5分間遠心し反応強度を判定した。これに加えてIgG抗体価では、低イオン強度溶液（オーソ®オートビュー®用BLISS, Ortho Clinical Diagnostics社）50μlを各カラムへ分注後、37℃、10分間インキュベーションを行い、5分間遠心し反応強度を判定した。

今回使用したCATのカットオフ値は、愛知県多施設共同研究¹¹⁾にて1+とw+で比較検討した際に、当院においてTTとの一致率が高かった1+を用いて、反応強度が1+となる最終希釈倍数を抗体価とした。

2.2 TT

血清はPBSを用いて2°希釈系列を作製し、TTに使用した。IgM抗体価は血清を用いて生理食塩液法にて測定した。血清と赤血球試薬（オーソ®アフターマジエン®, Ortho Clinical Diagnostics社）を室温にて15分間インキュベーション後、1,000g、15秒間遠心して反応強度を判定した。IgG抗体価はDTT処理した血清を用いて、間接抗グロブリン試験にて測定した。血清と赤血球試薬（オーソ®アフターマジエン®, Ortho Clinical Diagnostics社）を混和した試験管を37℃、30分間インキュベーションし、3回洗浄を行った後、抗ヒトIgG血清（ウサギ）（Ortho Clinical Diagnostics社）を2滴添加して1,000g、15秒間遠心して反応強度を判定した。TTのカットオフ値は1+を使用し、反応強度が1+となる最終希釈倍数を抗体価とした。

2.3 検討項目

1) 時系列における患者毎の抗体価推移

周術期におけるABOi-LKT患者5名のTTおよびCATの抗体価結果が、どのような時系列推移を示すのか患者毎に比較検討した。また、異なる3方法（単純血漿交換（PE：plasma exchange）、選択的血漿交換（SePE：selective plasma exchange）、二重膜濾過血漿交換（DFPP：double-filtration plasmapheresis））の脱感作療法がTTおよびCATで測定した抗体価推移に影響があるかを確認した。

2) TTとCATにおける抗体価の相関関係

ABOi-LKT患者5名のTTとCATの抗体価一致率を求めるために、検査法間の抗体価の差を用いて解析を実施した。TTとCATの抗体価の差が完全に一致している場合を0、1管差の場合を1、2管差の場合を2として検査法間の抗体価別平均管差を求めた。また、TTとCATによる相関関係は抗体価を二進対数変換し、単回帰分析を用いて行い相関係数rを求めた。1倍未満、2倍未満の抗体価については結果を0として解析を実施した。危険率5%未満を統計学的に有意とした。

本研究は日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号1343）。

表2 対象患者5名の症例背景

No.	性別/年齢		血液型 Do → Re	原疾患	IgM 抗体価		IgG 抗体価		抗体価 検査 提出 回数	PE 回数	SePE 回数	DFPP 回数
	Re	Do			最高値	最低値	最高値	最低値				
A	M/76	F/71	A+ → B+	腎硬化症	16	2	32	4	9	0	2	0
B	F/40	F/60	A+ → O+	IgA 腎症	32	1 未満	64	2	10	1	0	3
C	F/42	F/43	B+ → O+	多発性嚢胞腎	16	1 未満	64	2 未満	8	0	2	0
D	M/60	F/62	A+ → O+	常染色体優性 多発嚢胞腎症	16	1 未満	32	2 未満	8	1	0	3
E	M/69	F/67	AB+ → A+	不明	4	1 未満	2 未満	2 未満	6	0	2	0

Re : Recipient, Do : Donor

PE : plasma exchange, SePE : selective plasma exchange, DFPP : double-filtration plasmapheresis

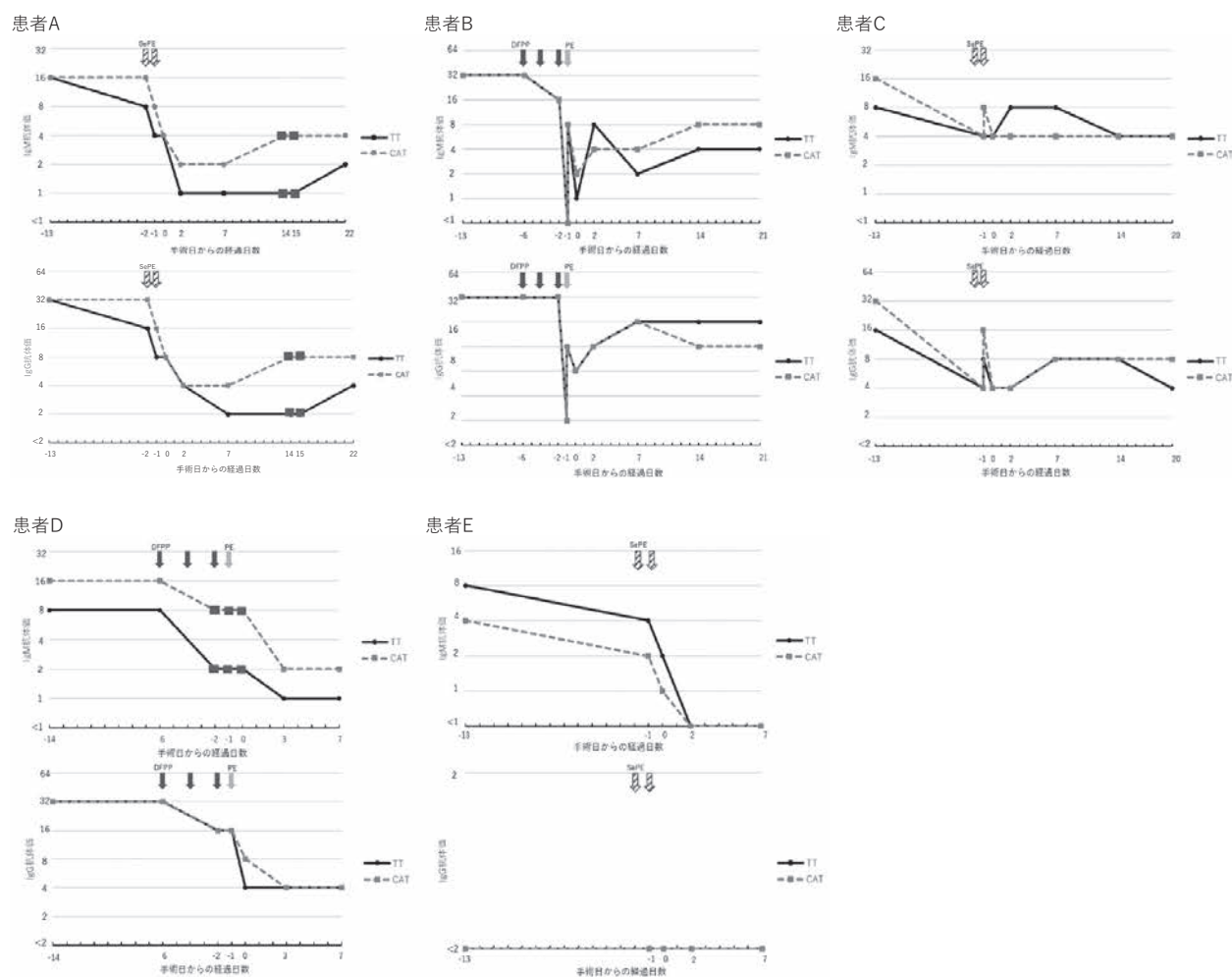


図1 術前脱感作療法と TT および CAT の抗体価変動

(患者 A) A 型ドナーから ABOi-LKT を受けた, B 型患者の抗 A 抗体価変動. 期間中に実施した感作療法: SePE2 回

(患者 B) A 型ドナーから ABOi-LKT を受けた, O 型患者の抗 A 抗体価変動. 期間中に実施した感作療法: DFPP3 回, PE1 回

(患者 C) B 型ドナーから ABOi-LKT を受けた, O 型患者の抗 B 抗体価変動. 期間中に実施した感作療法: SePE2 回

(患者 D) A 型ドナーから ABOi-LKT を受けた, O 型患者の抗 B 抗体価変動. 期間中に実施した感作療法: DFPP3 回, PE1 回

(患者 E) AB 型ドナーから ABOi-LKT を受けた, A 型患者の抗 B 抗体価変動. 期間中に実施した感作療法: SePE2 回

上段に IgM 抗体価, 下段に IgG 抗体価の時系列推移を示す. 実線は TT による抗体価変動, 点線は CAT による抗体価変動であり, グラフの Y 軸は抗体価倍率, X 軸は手術日を 0 とした経過日数を示した. 上部には術前に実施した脱感作療法の種類とタイミングを示す. グラフ内の■は, TT と CAT の抗体価が 2 管差以上の箇所を示す.

結 果

対象患者 5 名 (A~E) の症例背景を表 2 に示す. 年

齢の中央値は 60 歳 (40 歳~76 歳), 性別は男性 3 例, 女性 2 例であった. 血液型の分布は, A 型 1 例, B 型

TT と CAT の一致率の結果が由来¹¹⁾していると考えられる。カットオフ値設定時に TT と CAT の一致率を検討した際、IgM 抗体価では完全一致率 40.0%, 1 管差以内を許容とした場合の一致率 63.3%, IgG 抗体価では完全一致率 60.0%, 1 管差以内を許容とした場合の一致率 93.3% という結果であった (表 5)。抗体価推移における IgG 抗体価の良好な相関結果は、IgM 抗体価と比較して IgG 抗体価の検査法間における一致率が高いことが影響していると考えられる。これは過去の報告¹⁰⁾と同様の結果であり、今回の検討でも IgG 抗体価は IgM 抗体価に比べて良好な相関が認められた。その大きな理由としては、IgG 抗体価の測り込みや反応時間、反応温度などの影響が考えられるが、正確な理由は不明である。

また、抗体価推移において 2 つの検査法におけるすべての抗体価の値は完全に一致しているわけではなく、一部に相関のない箇所も認められた。この結果について、TT は検査者の目視によって判定が行われるため客観的な結果判定が困難であることから 1 管差以内を許容と設定した場合、今回の検討において相関がみられなかったのはすべて TT および CAT の抗体価が 8 倍以下の低抗体価の箇所であった。これは IgM 抗体価、IgG 抗体価それぞれに認められた。8 倍以下の低抗体価において相関が認められなかった原因は正確には不明であるが、愛知県多施設共同研究においても低力価抗体の検体では TT と CAT の一致性が低いことが報告されている¹¹⁾。また、TT と CAT の抗体価に 2 管差はあるものの、前後の抗体価推移は 1 管差以内に収まっており大きな変動は示していない。8 倍以下の低抗体価における相関については、今後サンプル数を増やしてさらなる検討をしていく必要があると考える。

さらに、CAT における異なる 3 方法の脱感作療法実施後の抗体価について検討した結果、すべての方法で抗体価が低下しており、これは TT で得られた変動と一致していた。脱感作療法後に抗体価がリバウンドした場合には、十分な免疫抑制に加え、追加で頻回の血漿交換を実施して抗体価を下げる必要がある¹⁵⁾ため、治療選択に直結する脱感作療法後の抗体価は臨床的に重要である。今回の検討では脱感作実施後、CAT において TT と同様に抗体価が低下していることが認められており、脱感作療法等の臨床を指標にした抗体価変動の観察において CAT は使用可能であると考えられる。

ABOi-LKT における後方視的な研究結果から、移植日の抗体価が 16 倍～32 倍以上であった場合に抗体関連型拒絶や血栓性微小血管症の有意なリスク因子となることが報告されている^{12)~14)}ことから、移植日までに 16～32 倍を目安に抗体価を減弱する必要があると考えられている¹⁵⁾。また、IgG 抗体価が 128 倍を超える患者では、

IgG 抗体価が 64 倍未満の患者と比較して、拒絶反応の発生率が非常に高いことが報告されている¹⁶⁾。以上のことから、今回の検討で 2 管差以上の差が見られた 8 倍以下の低抗体価における検査法間の相関がみられなかった箇所は、脱感作療法等の治療選択や腎移植実施の判断に影響はないという理由から臨床的に大きな問題はないと言える。

今回の検討において、CAT のカットオフ値は、以前 TT と CAT の一致率を確認した際に最も TT との一致率が高かった 1+ を使用した¹¹⁾。CAT を導入する前には、TT から測定法を変更した後も同等の結果が提供できるように、まずはカットオフ値を各施設で設定しなければならない¹⁰⁾。使用する装置や各施設における TT の特性によって使用すべきカットオフ値が異なるので注意が必要である。

抗 A/B 抗体価測定は一致率ではなく検査法の検出感度と臨床的相関を指標として用いるべきであると Shimらは提唱している⁸⁾。このことから ABOi-LKT ではその時点での単発的な抗体価だけではなく、抗体価の値を時系列で確認したときに抗体価の増減傾向に関する経時的な推移が重要である。そのためには再現性と精度の高い検査法である、標準化された CAT を使用することが最適である¹¹⁾。抗体価測定に CAT を用いることで、TT による測定で問題となっていた抗体価測定における測定者間差や施設間差を解消することができ、抗体価測定を標準化することが可能となる。今後抗体価測定において CAT が主流となれば、どの施設においても同等の結果を提供することできる。

また、本研究の限界として対象患者数が少ないことが挙げられる。これは今回の検討内容を抗 A/B 抗体価の経時的推移の観察を目的としていたことから、検体提出回数が 2 回以下の症例および 1 回以上の脱感作療法を実施した症例に関しては対象から除外したためである。今後、サンプル数を増やしてさらなる検討が必要であると考ええる。

本検討では ABOi-LKT 症例の抗体価測定において、CAT の抗体価推移は TT とほぼ同等の推移を示しており、CAT へ移行後も TT と同等の抗体価モニタリングができる可能性が示唆された。

結 語

ABOi-LKT 症例の抗体価測定において CAT の抗体価推移は TT とほぼ同等の推移を示していたことから、CAT は日常検査に使用可能であり、抗 A/B 抗体価の時系列変化の観察に有用であると考えられる。

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) 中谷達也：腎移植を受けるための条件. 透析会誌, 41 (2) : 103—109, 2008.
- 2) 石川雅巳, 安保佳苗, 鈴木理恵, 他：ABO 不適合生体腎移植後に血管型拒絶が疑われたが8回の血漿交換で治療し得た1症例. 日集中医誌, 10 : 33—37, 2003.
- 3) Uchida J, Iwai T, Kato M, et al: A novel approach to successful ABO-incompatible high-titer renal transplantation. Transplant Proc, 40 (7): 2285—2288, 2008.
- 4) Bentall A, Barnett AN R, Braitch M, et al: Clinical outcomes with ABO antibody titer variability in a multicenter study of ABO-incompatible kidney transplantation in the United Kingdom. Transfusion, 56 (11): 2668—2679, 2016.
- 5) 高橋公太：ABO 血液型不適合腎移植 Update. 日腎会誌, 50 (7) : 880—886, 2008.
- 6) Alexandre GPJ, Squifflet JP, De Bruyere M, et al: Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. Transplant Proc, 19: 4538—4542, 1987.
- 7) Yagisawa T, Mieno M, Ichimaru N, et al: Trends of kidney transplantation in Japan in 2018: data from the kidney transplant registry. Renal Replacement Therapy, 5 (1): 3, 2019.
- 8) Shim H, Hwang JH, Kang SJ, et al: Comparison of ABO isoagglutinin titres by three different methods: tube haemagglutination, micro-column agglutination and automated immunohematology analyzer based on erythrocyte-magnetized technology. Vox Sang, 115 (3): 233—240, 2020.
- 9) 加藤千秋, 渡邊友美, 遠藤比呂子, 他：全自動輸血検査システム ORTHO VISION™を使用した抗体価測定. 日本輸血細胞治療学会誌, 63 : 585—591, 2017.
- 10) 松浦秀哲, 赤塚美樹, 松野貴洋, 他：健常人における試験管法とカラム遠心凝集法の抗 A/B 抗体価測定の比較検討. 日本輸血細胞治療学会誌, 65 : 634—641, 2019.
- 11) Matsuura H, Sugiura Y, Matsuno T, et al: Feasibility of the automated column agglutination technique for titration of anti-A/B antibodies in ABO-incompatible living kidney transplantation. Ther Apher Dial, 26 (4): 827—835, 2022.
- 12) 田崎正行, 齋藤和英, 富田善彦：多様化した腎移植 ABO 血液型不適合腎移植. 泌尿器外科, 35 (12) : 1265—1271, 2022.
- 13) Asaki M, Saito K, Nakagawa Y, et al: Analysis of the prevalence of systemic de novo thrombotic microangiopathy after ABO-incompatible kidney transplantation and the associated risk factors. Int J Urol, 26: 1128—1137, 2019.
- 14) Toki D, Ishida H, Setoguchi K, et al: Acute antibody-mediated rejection in living ABO-incompatible kidney transplantation: long-term impact and risk factors. Am J transplant, 9: 567—577, 2009.
- 15) 今井直彦：腎臓内科医のための腎移植の診かた, 中外医学社, 2015, 74—75.
- 16) Shimmura H, Tanabe K, Ishikawa N, et al: Role of antiA/B antibody titers in results of ABO-incompatible kidney transplantation. Transplantation, 70 (9): 1331—1335, 2000.

USEFULNESS OF TIME-SERIES CHANGES IN ANTI-A AND ANTI-B ANTIBODY TITER BY COLUMN AGGLUTINATION TECHNOLOGY IN ABO-INCOMPATIBLE LIVING DONOR KIDNEY TRANSPLANTATION

Yu Kumagai, Moeka Nakashima, Yuto Sakamoto, Yusuke Nomura, Keiko Ishihara and Kazuyo Murakami

Department of Clinical Laboratory, Japanese Red Cross Aichi Medical Center Nagoya Daini Hospital

Abstract:

Anti-A antibody and anti-B antibody titer tests are used for ABO-incompatible living donor kidney transplant patients in selecting treatments such as plasma exchange and in preoperative and postoperative follow-up. We compared time-series changes in anti-A antibody and anti-B antibody titers between the Tube test (TT) and column agglutination technology (CAT) in five ABO-incompatible kidney transplant recipients, and examined the usefulness of CAT in time-series changes. The variation in antibody titers by CAT in time-series changes was similar to that by TT. Furthermore, antibody titer decreased after desensitization therapy, and this change was consistent with that obtained by TT. These results suggest that CAT may be useful for monitoring antibody levels in time-series changes, even after changing from TT to CAT.

Keywords:

antibody titration, kidney transplantation, column agglutination technology, fully automatic blood transfusion test device