

# HLA 交差適合性試験試薬 ICFA( I & II ) の 改良と移植後モニタリング検査

白水 隆喜

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部

2017年43巻11月臨時増刊号(通巻572号)

Medical Science Digest (p.56 ~ p.59)

ニューサイエンス社

## HLA 交差適合性試験試薬 ICFA( I & II ) の改良と移植後モニタリング検査

Improvement of HLA crossmatch test reagent : ICFA( I & II ) and its application for post-transplant monitoring of de novo donor-specific HLA antibodies

白水 隆喜

Key Words: ICFA, HLA, DSA, Transplantation, AMR

### ■はじめに

ヒト白血球抗原 (HLA) はヒトの主要組織適合遺伝子複合体のことであり、クラス I とクラス II に大別される (図 1 参照)。HLA は免疫応答において、抗原提示に関する役割を果たすとともに、非常に多くの多型を持つため、自己・非自己の認識に利用される。そのため、輸血、臓器移植、妊娠などにより非自己の HLA に暴露された場合、その非自己の HLA に対する抗体 (HLA 抗体) が産生される。Donor Specific HLA Antibodies (DSA) は臓器移植時の抗体関連拒絶反応 (AMR) の主要な原因であるため、AMR を回避するためには臓器移植前にレシピエント血清中 DSA の有無を確認する必要がある。

我々の開発した WAKFlow HLA 抗体 クラス I & II ICFA (Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis) [ICFA( I & II )] は、ドナーの血球細胞とレシピエント血清を用いた HLA 交差適合性試験試薬である。本稿では、この ICFA( I & II ) について、近年の改良検討の成果と、移植後 DSA 産生のモニタリング検査への使用について紹介する。

### ■ ICFA( I & II ) とは

検出システムとしては Luminex 社の xMAP テク

ノロジー\* を利用している。

ICFA( I & II ) の原理を図 2 に示す。ドナー白血球細胞とレシピエント血清を反応させることで形成された HLA とアロ抗体の複合体を Luminex ビーズ上に固定した HLA モノクローナル抗体によりキャプチャーし、蛍光標識抗ヒト IgG 抗体により検出する。Luminex システムで検出された蛍光強度から、DSA の有無を判定する。ICFA( I & II ) の特長として、① HLA 抗体を特異的に検出できること、② クラス I とクラス II に対する抗体を区別して検出できること、などが挙げられる。一方、クラス II 抗体の検出感度が低いことが課題として挙げられていたため、近年改良を実施している。

### ■ クラス II 抗体検出感度改善

クラス II 抗体の検出感度が低い原因として、A). クラス II はクラス I に比べ、発現細胞が限られているために絶対的な抗原量が少ない (図 1 参照)、B). 血清中のアロ抗体とビーズ上の HLA モノクローナル抗体によるエピトープの競合が生じている、といったことが考えられる。A). については 2015 年に検討済みであり、現状の血液を使用したプロトコル上での最適化は行えていると考えている<sup>1)</sup>。2015 年および 2017 年には B). のエピト-

Takayuki Shirouzu  
湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部  
Molecular Diagnostics Division, Wakunaga Pharmaceutical  
Co., Ltd.

注\* xMAP テクノロジー: 2 種類の蛍光色素を様々な混合比で着色することにより、数 100 種類のビーズを識別可能。このビーズを用いたフローメトリー解析により、1 ウェルあたり最大 500 項目を同時に解析可能。

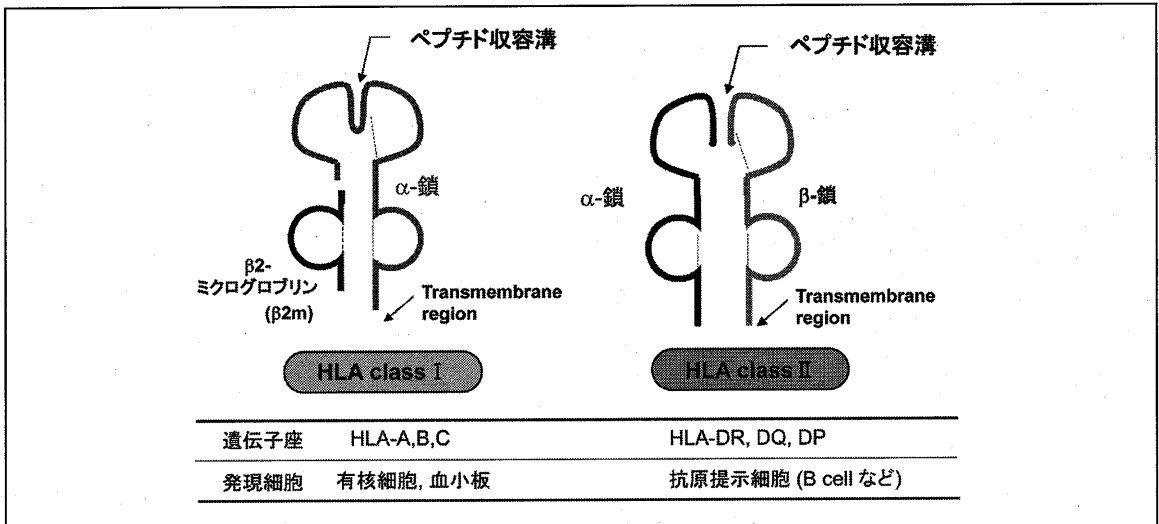


図1 HCAの分類と構造

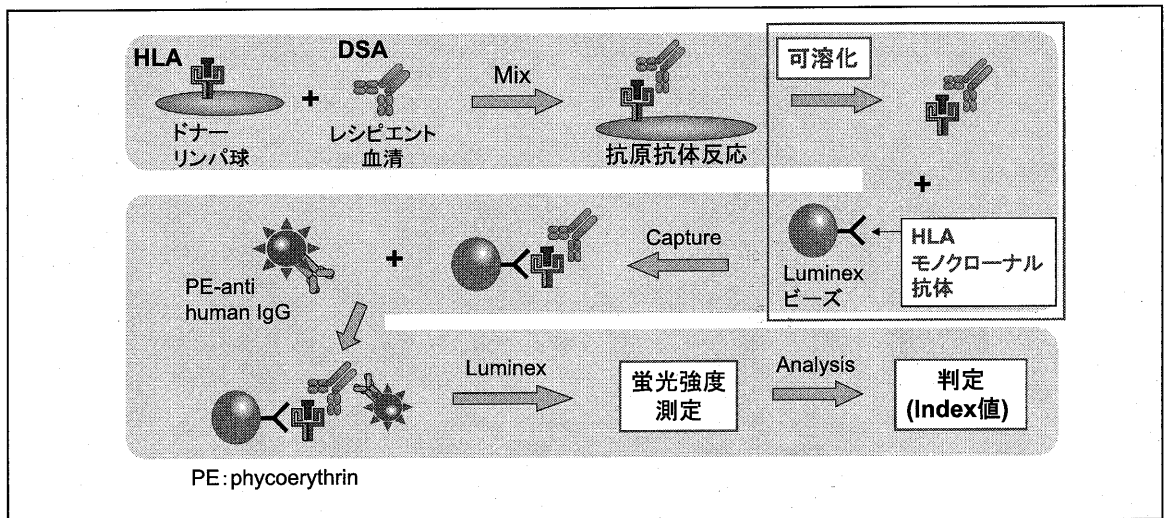


図2 ICFA法の測定原理

アの競合について改良を実施した<sup>2,3)</sup>。このエピトープの競合とは、血清中のアロ抗体が認識するエピトープとビーズ上のHLAモノクローナル抗体のエピトープが立体的に近接していた場合、立体障害により、アロ抗体を検出できないことを想定している(図3のA参照)。

そこで、我々は複数のエピトープが異なるモノクローナル抗体をビーズに固定することで、エピトープの競合を回避することが可能となると考え

た。クラスI抗体の検出は以前より2種類のビーズで行っていたため、エピトープの競合によるものと思われる偽陰性反応の報告例は無い。一方、クラスIIについては、1種類のビーズしか搭載していなかったため、2015年に2種類のビーズ(DQ抗体検出ビーズ)を追加し、エピトープの競合による偽陰性判定が回避できることが確認された(図3B)。2017年には、さらに3種類のビーズ(DR抗体検出ビーズ2種類とDP抗体検出ビーズ1種

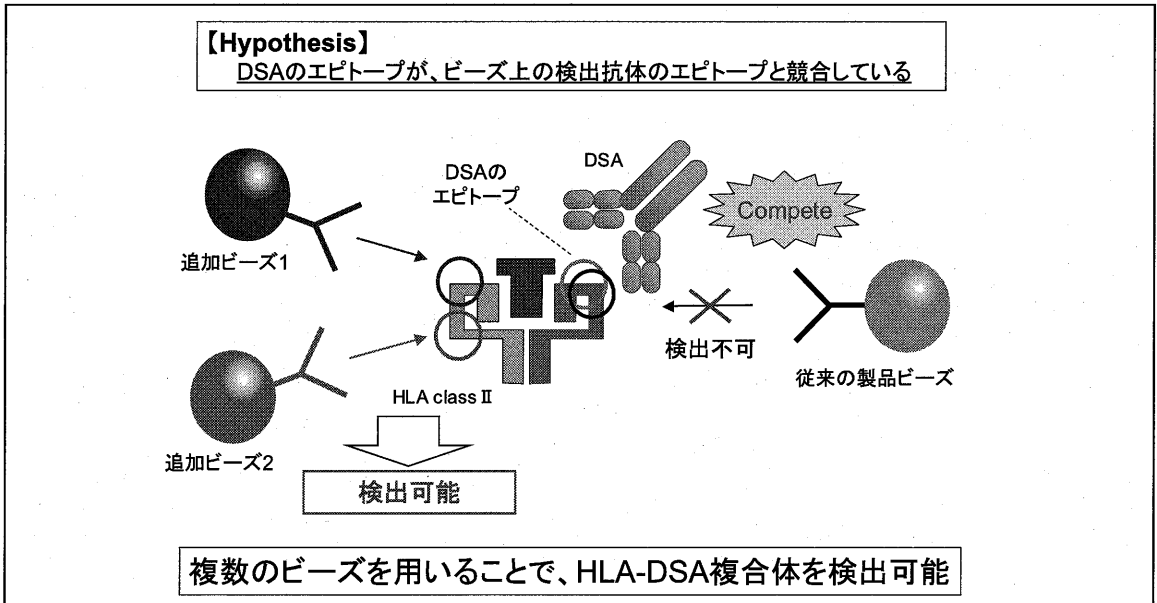


図 3A エピトープの競合

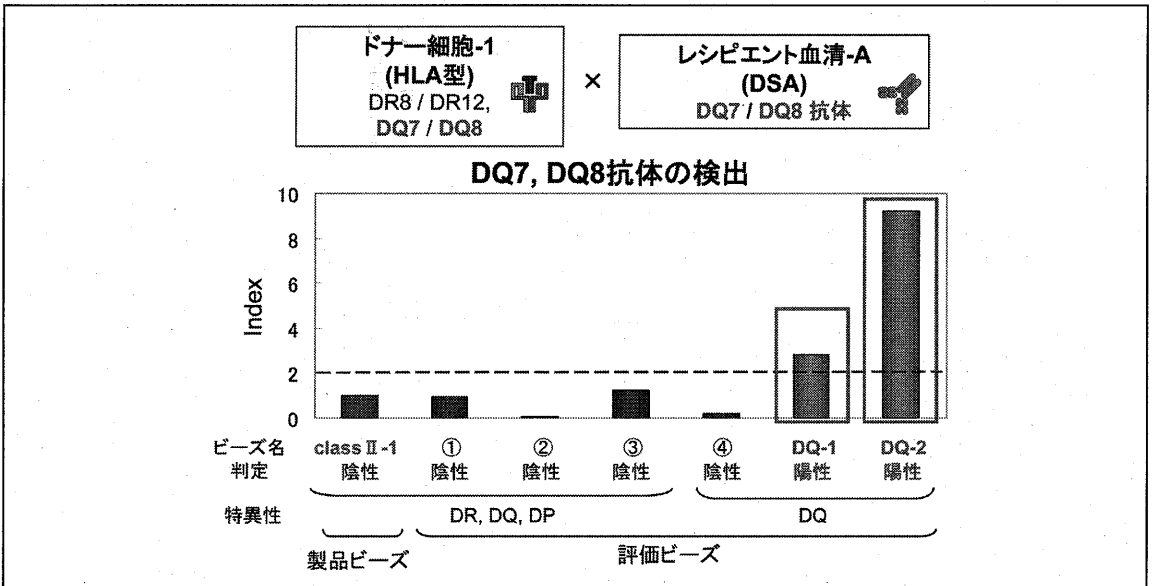


図 3B DQ 抗体検出ビーズの追加検討 (Index 値 2.0 をカットオフ値とする)

類)を追加することにより、検出感度を向上することができた(図 3C)。また、これらのビーズの追加により、DR、DQ 及び DP 抗体を区別して検出が可能となり、解像度の向上も達成できた。以上の改良により HLA 交差適合性試験による DR、

DQ 及び DP 抗体それぞれと AMR の関係を個別に解析することも可能になった。

■ HLA アロ抗体の移植後モニタリング検査  
 臓器移植時に DSA が存在しない場合でも、移

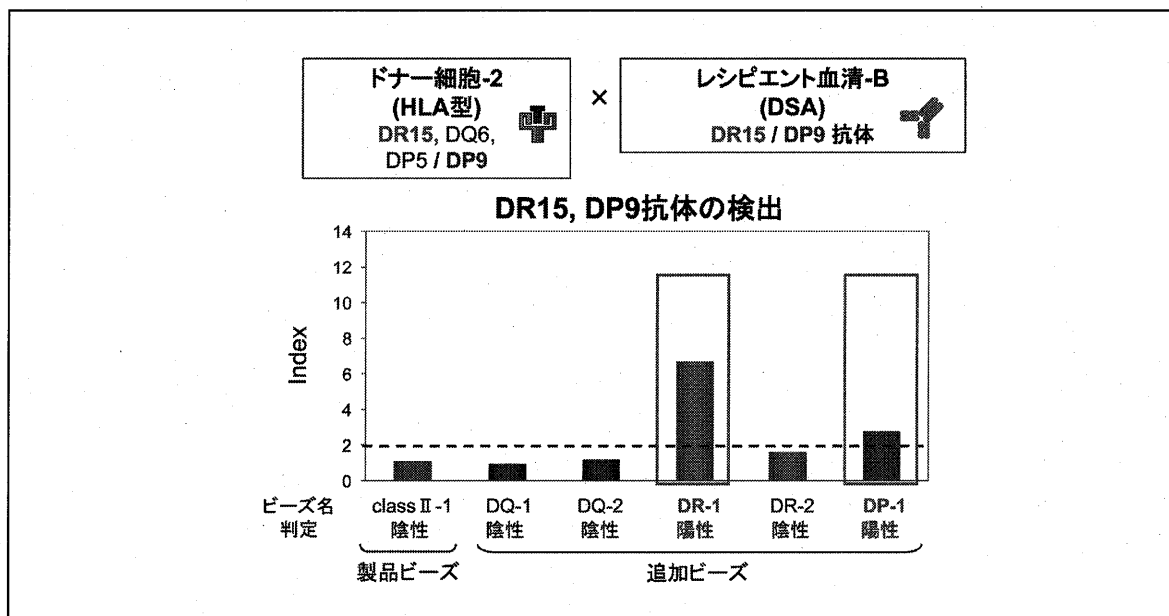


図3C CR・DP抗体検出ビーズの追加検討  
(Index値2.0をカットオフ値とする)

植後に新たに産生されたDSAがAMRを引き起こすことが知られている。このため、移植後のDSA産生をモニタリングすることは、移植臓器の生着の成否にとって非常に重要である。ICFA(I & II)以外にもHLA交差適合性試験法は存在する[Lymphocyte Cytotoxicity Test(LCT)法やフローサイトメーターを用いたFlow Cytometry CrossMatch(FCXM)試験法]が、それらの方法は新鮮な血液細胞を用いる必要があるため、検査の度に採血が必要となり、モニタリングには適していない。

一方、ICFA(I & II)ではドナーのリンパ球を凍結保存して使用することができるため、ドナーの負担が軽く、DSA産生のモニタリングに向いている<sup>1,2)</sup>。この点もICFA(I & II)の大きな特長である。

ICFA(I & II)のモニタリング検査への応用として、近年、京都府立医科大学の中村らが、移植患者の生検時に得られた移植組織片をICFA(I & II)に用いる方法を報告している<sup>4)</sup>。この方法は移植臓器に吸着したDSAを直接モニタリングす

ることが可能であり、DSA産生とAMRのモニタリングに適した方法として注目されている。

#### ■おわりに

近年の改良検討により、ICFA(I & II)の特長として、前述の①、②に加え、③モニタリング検査が可能であること、④クラスIIについてはDR、DQ及びDP抗体を特異的に検出可能であること、といった従来のHLA交差適合性試験法にはない特長が加えられた。今後も更なる検討を実施し、臓器移植分野の研究に貢献できる試薬の開発を進めていきたいと考えている。

#### 文 献

- 1) 第13回日本組織適合性学会近畿地方会, 2015年2月.
- 2) 第24回日本組織適合性学会大会, 2015年9月.
- 3) 第15回日本組織適合性学会近畿地方会, 2017年2月.
- 4) T. Nakamura, *et al.*, *Immunological Investigations*, 2017, 46, 295-304.