

■ 原 著

Complement-dependent cytotoxic crossmatch および Flow cytometric crossmatch の結果の乖離についての検討 —補体結合性 HLA 抗体の検出—

石塚 敏¹, 安尾美年子¹, 石田悠梨¹, ニツ山和也¹,
吉野敏栄¹, 岩藤和広², 中島一朗², 瀧之上昌平²

Is the discrepancy between complement-dependent cytotoxic crossmatch and flow cytometric crossmatch due to the difference in complement-binding capacity of HLA antibodies?

¹Department of Transplant Immunology, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University,

²Department of Surgery, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University

Tsutomu ISHIZUKA¹, Mineko YASUO¹, Yuri ISHIDA¹, Kazuya FUTATSUYAMA¹,
Toshie YOSHINO¹, Kazuhiro IWADO², Ichiro NAKAJIMA², Shohei FUCHINOUE²

【Summary】

【Objective】 There may be a discrepancy in the results between the complement-dependent cytotoxic crossmatch test (CDC-XM) and the flow cytometry crossmatch test (FCXM) for the detection of HLA antibodies (HLA-Abs). We investigated the cause of this discrepancy using the solid-phase assay method with the LABScreen single antigen (LABScreen) and the LABScreen single C1q (C1qScreen).

【Methods】 Twenty-one candidates for renal transplantation who visited our outpatient clinic in 2011 were HLA-Abs positive by FlowPRA. Their serums underwent the LABScreen test and the C1qScreen test. The specificity of the Abs in these serums was determined using LABScreen and lymphocyte cells (LCCs) of a third party that had the same antigen as the specified Abs that were selected. Then these LCCs underwent FCXM and CDC-XM. The results of the tests were compared with each other. Moreover, we studied the clinical outcomes of 9 recipients that had tested positive by FCXM and negative by CDC-XM preoperatively. We also studied 3 cases as references of poor graft that had tested negative by FCXM and CDC-XM and developed rejection.

【Results】 HLA-Abs that were positive by FCXM using LCCs exhibited 26 kinds of class I and II antibodies, and the results of C1qScreen and CDC-XM showed significant correlation with them ($p < 0.001$). Those of C1qScreen and LABScreen, however, showed no significant correlation. In 12 recipients who were all CDC-XM negative before transplantation, 9 became LABScreen positive; postoperatively, 4 recipients became C1qScreen positive. Graft loss and C1qScreen of chronic-AMR cases were all positive after transplantation.

【Conclusion】 C1qScreen was not always positive, even when FCXM was positive and LABScreen detected a high quantity of HLA-Abs, but C1qScreen was almost always positive when CDC-XM was. That indicates that discrepancy in the results of CDC-XM and FCXM was caused to some extent by the dependency of HLA-Abs on complement. Furthermore, C1qScreen showed positive results in all chronic AMR and graft loss cases, suggesting that complement-dependent donor specific antibodies were partially involved in chronic-AMR and graft loss.

Keywords: Complement-dependent cytotoxic crossmatch test (CDC-XM), Flow cytometry crossmatch test (FCXM), LABScreen single antigen, LABScreen single C1q (C1qScreen), HLA antibodies (HLA-Abs)

¹ 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター移植免疫研究室,

² 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター腎臓外科

(2012・2・20 受領; 2012・10・25 受理)

I. はじめに

臓器移植では、移植前に donor specific alloantibody (DSA) の有無を確認することが抗体関連型拒絶反応 antibody-mediated rejection (AMR) を回避することにつながるため、この DSA を検出する検査精度および感度が重要になる。

現在、臓器移植ネットワークでは、リンパ球クロスマッチ検査の T cell が陰性であれば移植は可能とされている。しかし、complement-dependent cytotoxic cross-match test (CDC-XM)¹⁻²⁾ の T cell が陰性であっても flow cytometry crossmatch test (FCXM)³⁻⁵⁾ の T cell が陽性あるいは、ドナーリンパ球を使用しない panel reactive antibody (PRA) 法で HLA Class I 抗体の DSA が陽性の症例も存在する。

近年では、CDC-XM よりも FCXM の検出感度が高いと考えられ普及してきている⁶⁾。しかし、CDC-XM と FCXM の結果の乖離については検出感度の違い以上に、捕らえている HLA-IgG 抗体のサブクラスが異なっていることも原因の一つと考えられている。

今回筆者らは、CDC-XM と FCXM の検査結果の乖離について検証するため、solid phase assay を用いた LABScreen single antigen (LABScreen, One Lambda)⁷⁾ および補体結合性 HLA 抗体検出試薬 LABScreen single C1q (C1qScreen, One Lambda)⁸⁾ を使用し、HLA 抗体の補体結合性の有無を確認し結果の乖離について検討を行った。

II. 対象および材料

2011年に東京女子医科大学腎臓病総合医療センター腎臓外科にて外来受診された腎移植希望患者のうち、flow panel reactive antibody (FlowPRA) が陽性である21名(男性8名、女性13名、年齢49.9±11.1歳)のレシピエントを対象とし、それらの血清の HLA 抗体の特異性と一致した HLA 抗原を保有する第三者のリンパ球を材料とした。また、移植予後の検討のため移植前 CDC-XM 陰性、FCXM 陽性の9症例と腎生検所見より拒絶と診断された3症例を対象症例とした。

III. 方 法

FlowPRA Screening (FlowPRA, One Lambda) 陽性のレシピエント血清について LABScreen にて HLA 抗体の特異性を確認し、その特異性と一致する HLA 抗原 (A, B, DR, DQ 抗原) を保有する第三者のリン

パ球を用いて FCXM を実施した。

さらに、FCXM にて陽性判定が確認された検体について、同じリンパ球で CDC-XM を実施し、C1qScreen の結果も合わせて比較検討した。

また、腎移植を施行した12症例について移植前および移植後の HLA 抗体の推移と移植後の腎生検所見などを基に C1qScreen と LABScreen による DSA との関連性について検討した。

HLA 抗体検査

1) CDC-XM

ドナーリンパ球および第三者のリンパ球は、ヘパリン加末梢血液より EasySep 法 (StemCell Technologies) を用いて、T cell または B cell に分離し、 2×10^6 cells/ml に調節した。

60穴の Terasaki tray (Greiner Bio-One) にレシピエント血清および末梢血リンパ球を各1μl、流動パラフィン (Wako Pure Chemical Industries) でカバーして、37°C インキュベーターで60分間静置反応した。ウサギ補体 (One Lambda) を加え120分間室温にて静置反応した後、エオジン染色液 Stain-Fix (One Lambda) を加えカバーガラスをした。

判定は、位相差顕微鏡を使用し、negative control serum を基準に原液血清による反応を平均死細胞割合 (%) として目視により10%以上を陽性とした。

Negative control serum は、nomal human serum (NHS) である AB 型血清 (DS ファーマバイオメディカル) を使用した。

Positive control serum には、Anti-T cell・B cell lymphocyte control serum (One Lambda) を使用した。

2) FCXM

FCXM に使用したリンパ球は、リンパ球分離液 SEPARATE-L (Muto pure Chemicals) を使用し、ドナーのヘパリン加末梢血液から比重遠心法により分離した。

採取したリンパ球は、タンパク質分解酵素であるプロテアーゼ protease type XIV (Sigma) を加え37°C インキュベーターで10分間静置反応し、2回洗浄後、 $2-3 \times 10^6$ cells/ml に調節した。

BD Falcon Tube (Becton, Dickinson and Company) に凍結解凍・遠心処理したドナー血清・AB型血清 (DS ファーマバイオメディカル)・レシピエント血清および HLA Class I および II Positive control serum (One Lambda) を100μl分注し、それぞれに調整した pro-

tease 処理済リンパ球 100 μ l を加え^{9,10)}、室温にて 30 分間静置反応した。3 回洗浄後 FITC conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch)・CD19-PE (BD Biosciences)・CD3-PerCP (BD Biosciences) を加え、4°C 遮光にて静置反応した。2 回洗浄後、フローサイトメーター FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) にて測定した。

判定は、横軸を Linear Values 設定で FITC conjugated goat, anti-human IgG の蛍光強度 median fluorescence intensity が陰性コントロールより 10.0 以上のシフトを示したものを T cell・B cell ともに陽性とした¹¹⁾。

3) FlowPRA

FlowPRA Class I・Class II Screening Beads¹²⁾, negative control serum (One Lambda), HLAClass I・Class II positive control serum (One Lambda), レシピエント血清を各チューブに分注し、室温反応した。3 回洗浄後、FITC conjugated goat, anti-human IgG (One Lambda) を加え、遮光室温反応して 2 回洗浄後、フローサイトメーター FACS Calibur にて測定した。

判定は、negative control serum から positive 領域に 2 峰性または多峰性シフトを示したものを陽性とした。

4) LABScreen

LABScreen single antigen Class I・Class II Beads, negative control serum (NC: One Lambda)・レシピエント血清を各チューブに分注し、室温反応した。3 回洗浄後、PE conjugated anti-human IgG (One Lambda) を加え、遮光室温反応した後、2 回洗浄して LABScan 100 にて測定した。

判定は、trimmed mean fluorescence intensity (MFI) を用いて Normalized MFI = (MFI sample No.bead - MFI sample NC bead) - (MFI NC serum No.bead - MFI NC serum NC bead) で Class I・Class II ともに 600 以上を示したものを陽性とした。

5) C1qScreen

Negative control serum (One Lambda) および非働化したレシピエント血清 5 μ l, C1q 抗体溶液・LABScreen single antigen Class I および Class II Beads をチューブに分注し、20 分間室温反応した。PE conjugated anti-human C1q を加え、20 分間遮光室温反応し 1 回洗浄後 LABScan 100 にて測定した。

判定は、trimmed mean fluorescence intensity (MFI) を用いて Normalized MFI = (MFI sample No.bead - MFI sample NC bead) - (MFI NC serum No.bead - MFI NC serum NC bead) で Class I・Class II ともに 300 以上を

示したものを陽性とした。

IV. 統計解析

結果は、すべて mean \pm SD で示した。有意差検定には、JMP 9.0.2 を使用し Wilcoxon signed-rank tests, Fisher's exact test で有意確率 5% 未満を有意差ありと判定した。

CDC-XM は、HLAClass I の弱い抗体を含めて検出するため、Bwarm の判定を用いた。

V. 結果

1. HLA 抗体が陽性であった 21 症例について

LABScreen にて HLA 抗体の特異性を確認した 21 例の血清から HLA Class I で 26 種類、HLA Class II で 26 種類の HLA 特異性を同定し、それぞれの検査法による結果を症例ごとに表記した (表 1)。

FlowPRA・LABScreen・FCXM のいずれも陽性の HLA 抗体について LABScreen Normalized MFI 平均値は、HLA Class I では 10,238 \pm 3,545, HLA Class II では 9,022 \pm 4,469 であった。

C1qScreen Normalized MFI 平均値は、HLA Class I では 9,911 \pm 6,510, HLA Class II では 12,351 \pm 7,358 であった。

FlowPRA・LABScreen・FCXM のいずれも陽性であった HLA Class I & II 抗体 52 種類中 24 抗体 (46.2%) が C1qScreen 陽性であった。そのうち HLA Class I 抗体は 26 種類中 9 抗体 (34%) が C1qScreen 陽性、HLA Class II 抗体では 26 種類中 15 抗体 (57%) が陽性であった。

CDC-XM (Bwarm) について FlowPRA・LABScreen・FCXM のいずれも陽性であった HLA Class I & II 抗体 52 種類中 26 抗体 (49.9%) が CDC-XM 陽性であり、HLA Class I 抗体 26 種類中 10 抗体 (38%) が CDC-XM (Bwarm) 陽性、HLA Class II 抗体 26 種類中 16 抗体 (61%) が CDC-XM (Bwarm) 陽性であった。

C1qScreen 陽性および陰性について LABScreen Normalized MFI と比較したところ、HLA Class I 抗体の Normalized MFI 平均値 10,238 \pm 3,545 であるのに対し、C1qScreen 陽性では LABScreen が 10,407 \pm 3,811, C1qScreen 陰性では 10,348 \pm 3,504 であり、LABScreen の蛍光強度と C1qScreen の陽性・陰性との間には P = 0.9570 で有意差はなかった。HLA Class II 抗体では、Normalized MFI 平均値 9,022 \pm 4,469 に対して C1qScreen 陽性では 9,880 \pm 4,151, C1qScreen 陰性では

表 1 21 症例の内訳

性別	年齢	FCXM 陽性 HLA 抗体	LABScreen Normalized MFI	C1qScreen Normalized MFI	CDC-XM Twarm (%)	CDC-XM Bwarm (%)
女	61	B44	5,147	-	-	-
女	44	B61	8,871	-	-	-
女	54	B48	5,467	-	-	-
		B44	5,242	-	-	-
女	48	B51	14,258	-	-	-
		B52	13,767	-	-	-
		B62	12,915	-	-	-
男	19	A2	6,644	7,331	100	100
		DR8	11,939	771	-	20
女	62	B54	5,085	-	-	-
女	36	B61	16,059	4,515	-	20
		B62	11,881	4,839	-	80
		B44	16,386	4,209	100	100
		B13	11,538	2,227	50	100
		DR9	20,018	12,805	-	100
		DR12	15,180	12,805	-	100
		DR1	17,229	-	-	-
女	64	B61	13,636	-	-	80
		B35	12,813	-	-	-
男	46	B44	9,065	17,792	100	100
		B39	7,356	14,699	100	100
		B35	6,538	18,547	100	100
		DR9	10,731	7,415	-	100
		DR1	10,452	3,391	-	100
		DR15	9,579	9,579	-	100
男	51	A33	8,204	15,047	-	100
		DR12	9,795	16,889	-	20
男	53	B61	13,706	-	-	-
		B7	12,700	-	-	-
		B60	12,166	-	-	-
		A33	11,275	-	-	-
		A2	12,846	-	-	-
		DR14	13,901	-	-	100
		DR13	9,346	2,505	-	100
		DR8	8,157	20,740	-	100
男	51	A26	8,752	-	-	-
		B61	7,277	-	-	-
		DR8	12,987	-	-	-
男	48	DQ6	3,354	-	-	-
女	61	DQ4	8,528	-	-	-
		DQ8	9,461	-	-	-
		DQ9	10,157	-	-	-
男	68	DQ4	12,921	1,745	-	20
女	36	DQ6	8,450	1,906	-	10
女	47	DR9	7,702	20,636	-	100
		DR4	4,843	13,520	-	100
女	58	DR12	4,312	-	-	-
		DR13	5,653	-	-	-
男	47	DQ7	5,855	13,678	-	50
女	47	DQ6	3,234	7,082	-	20
女	46	DQ4	2,855	-	-	-
		DQ8	2,812	-	-	-

FCXM と CDC-XM は、それぞれ LABScreen により検出した HLA 抗体の特異性と一致した HLA 抗原を保有する第三者のリンパ球を用いた。-は陰性を示す。

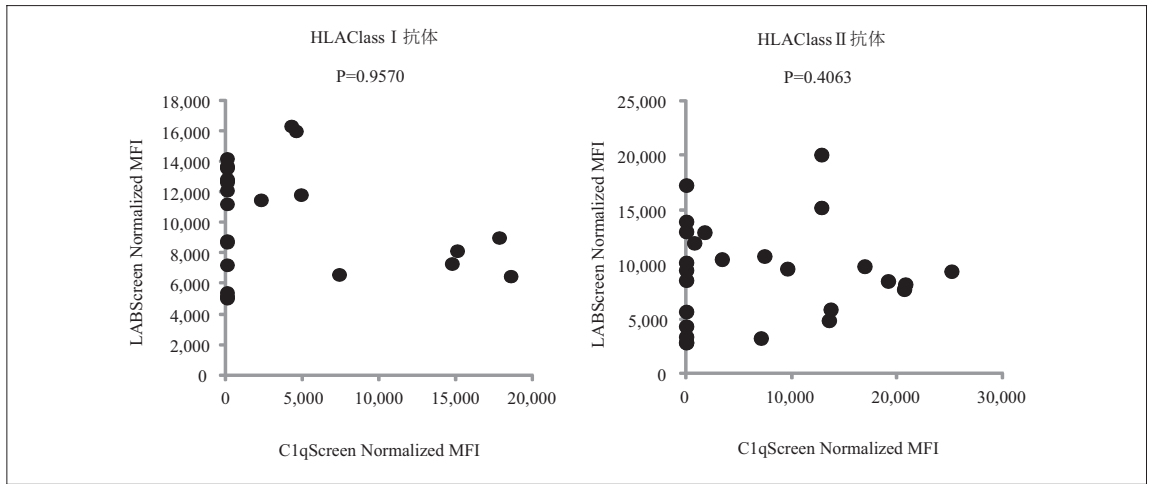


図1 C1qScreen Normalized MFI と LABScreen Normalized MFI の比較

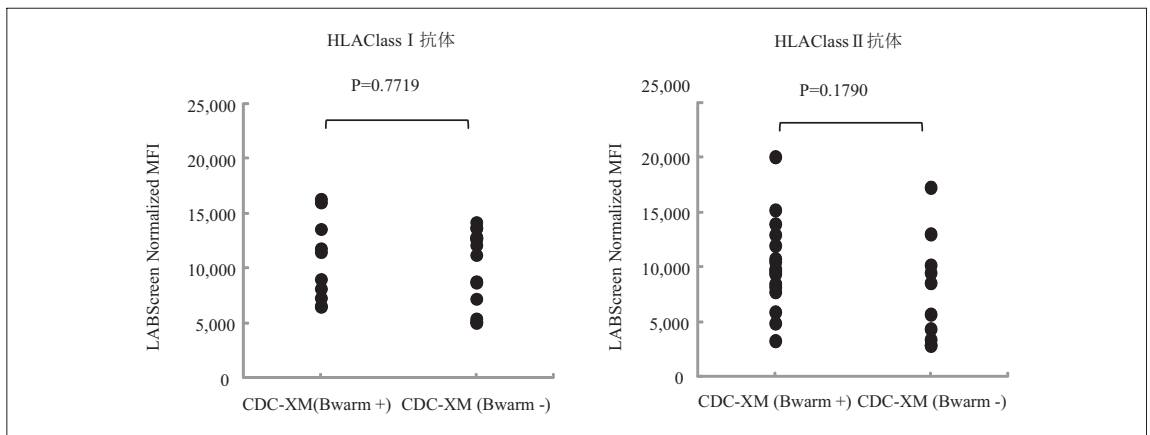


図2 CDC-XM (Bwarm) の抗体有無と LABScreen Normalized MFI の比較

8,295±4,950であり、LABScreenの蛍光強度とC1qScreenの陽性・陰性との間にはP=0.4063で有意差はなかった(図1)。

CDC-XM陽性および陰性についてLABScreen Normalized MFIを比較したところ、HLA Class I抗体のNormalized MFI平均値10,238±3,545であるのに対し、CDC-XM陽性ではLABScreenが10,730±3,735、CDC-XM陰性では10,142±3,511であり、LABScreenの蛍光強度とCDC-XMの陽性・陰性との間にはP=0.7719で有意差はなかった。HLA Class II抗体では、Normalized MFI平均値9,022±4,469に対してCDC-XM陽性ではLABScreenが10,131±4,134、CDC-XM陰性では7,734±4,836であり、LABScreenの蛍光強度

とCDC-XMの陽性・陰性との間にはP=0.1790で有意差はなかった(図2)。

CDC-XM (Bwarm) とC1qScreenで比較するとCDC-XM (Bwarm) 陽性のHLA Class I抗体10種類中9抗体(90%)がC1qScreen陽性であった。HLA Class II抗体では、16種類中15抗体(93%)がC1qScreen陽性であった。また、CDC-XM (Bwarm) とC1qScreenのHLA Class IとClass IIではともに有意な相関性がみられた(P<0.001)(図3)。

2. 腎移植を施行した12症例について

症例1から12は、移植前検査においてすべてCDC-XMは陰性であり、そのうち症例1から9は、術前

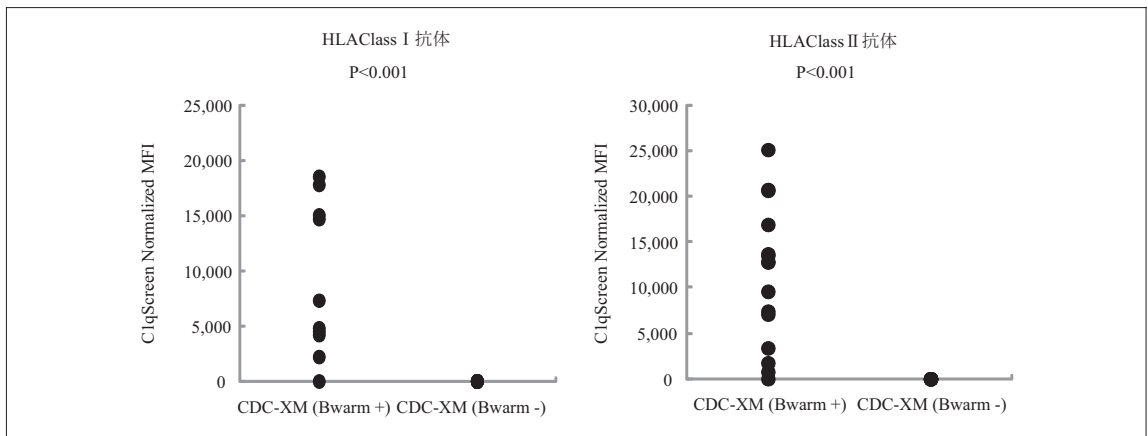


図3 DC-XM (Bwarm) の抗体有無と C1qScreen Normalized MFI の比較

FCXM がすべて陽性症例で脱感作療法を施行していた (表 2)。また、症例 1 から 5 は、腎移植後経過良好群で、腎生検所見では症例 6 から 8 は Acute-AMR、症例 9 と 10 は Chronic-AMR、また症例 11 と 12 は graft loss であった。

LABScreen による移植前の DSA は、症例 1 から 9 まですべて陽性であったが、移植後では症例 1 と 5 と 9 以外 DSA は陰性化していた。

症例 1 から 8 は、移植前および移植後の DSA は C1qScreen ですべて陰性であったが、Chronic-AMR および graft loss 症例の 9 から 12 までは移植後 C1qScreen はすべて陽性であった。

VI. 考 察

今回 solid phase assay である LABScreen および C1qScreen を用いて CDC-XM と FCXM の結果の乖離について検証を行った。

FCXM の蛍光強度については反応条件など多くの要因により施設間差が大きく標準化が難しい現状にある。そのため、今回筆者らは、LABScreen Normalized MFI を基準に比較検討した。

筆者らは、検出結果の乖離について各検査法の検出感度の違い以上に捕らえている HLA IgG 抗体のサブクラスが異なっていることが原因の一つと考えている。HLA IgG 抗体のサブクラスについてはまだ検証できていないが、今回 C1qScreen を使用することにより HLA 抗体の補体結合性を確認することが可能になった。

CDC-XM は、ウサギ補体を使用する検出法であり

補体結合性抗体を検出するが、一方、FCXM は、ヒトリンパ球の細胞膜表面抗原との反応を検出し、FlowPRA、LABScreen はヒトリンパ球を使用せずに抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子などの反応を検出する測定法であるため、補体結合性および非結合性抗体の両方が検出可能である。それらに対し、C1qScreen は、HLA 抗体に C1q 抗体を反応させ、anti-human C1q 抗体によって検出する方法であるため、補体結合性抗体を特異的に検出できる。

検証に用いた FlowPRA・LABScreen・FCXM 陽性の HLA 抗体は、LABScreen Normalized MFI において HLA Class I・Class II 抗体ともに高い蛍光強度であった。そのため、本来なら CDC-XM でも十分陽性反応を示すと予想されるが、そうではなかった。つまり、HLA Class I・Class II 抗体ともに LABScreen Normalized MFI の強弱は CDC-XM とは一致しない結果であった。

同じく FlowPRA・LABScreen・FCXM のいずれも陽性の HLA 抗体に対しては、HLA Class I・Class II 抗体ともに C1qScreen の方が陽性検出率が低かった。しかしながら、CDC-XM と C1qScreen とでは、一部に結果の乖離を認めたものの HLA Class I・Class II 抗体ともに陽性反応が 90% 以上一致していた。一部乖離を生じた原因として測定法による検出感度の問題または自然抗体、自己抗体、Lewis 抗体など non-HLA 抗体が関与したと考えられる¹³⁻¹⁴⁾。

今回の結果から、移植前および移植後に CDC-XM や C1qScreen で検出される HLA-IgG 抗体のうち補体結合性抗体は 50% 以下であると考えられた。

表 2 腎移植 12 症例の内訳

症例	ABO 血液型		RIT	CDC-XM		FCXM		HLA 抗体		LABScreen		CIqScreen		腎生検所見	Cr 経過日数	Cr eGFR	
	Donor →Recipient	脱感作 療法		Tcell	Tcell	Bcell	DSA	post 経過日数	pre	post	pre	post	pre				post
症例 1	A→A	+	-	-	+	B48	66	2,398	4,598	-	-	-	-	394	1.0	47	
症例 2	O→A	+	-	+	+	B44	295	2,939	-	-	-	-	-	516	1.6	27	
症例 3	B→B	+	-	+	+	A24	321	1,228	-	-	-	-	-	663	1.1	40.3	
症例 4	AB→A	+	-	+	+	B51	116	6,156	-	-	-	-	-	324	0.8	59.9	
症例 5	O→O	+	-	-	+	DR12	534	5,992	1,113	-	-	-	-	735	1.0	46.3	
症例 6	AB→O	+	-	-	+	B56	402	3,100	-	-	-	-	Acute-AMR (7POD)	600	1.6	26.9	
						DR9		2,400	-	-	-	-					
症例 7	A→A	+	-	-	+	DR9	407	2,131	-	-	-	-	Acute-AMR (8POD)	696	0.8	60.1	
症例 8	A→O	+	-	-	+	A2	365	806	-	-	-	-	Acute-AMR (7POD)	654	0.8	58.2	
						DR4		10,553	-	-	-	-					
症例 9	O→B	+	-	-	+	B61	423	4,433	-	-	-	-	Chronic-AMR (692POD)	786	1.8	41.5	
						DR4		3,935	-	-	-	-					
						DQ4		5,540	9,764	9,768	24,240						
症例 10	B→B	-	-	-	-	DQ4	689	-	12,922	-	1,745	Chronic-AMR (678POD)	1,231	2.3	23.4		
症例 11	O→B	-	-	-	-	A2	1,377	-	7,104	-	11,455	graft loss (863POD)	1,590	12.2	5.3		
						B48		-	3,492	-	-						
						DR14		-	10,349	-	1,361						
症例 12	O→O	-	-	-	-	A24	1,267	-	3,495	-	18,062	graft loss (340POD)	1,266	11.4	4.5		
						B52		-	4,710	-	16,524						
						DR15		-	7,905	-	13,039						

一般に、ヒト血清中 IgG 抗体の補体結合能についての IgG サブクラス比率は、IgG1 : 60%, IgG2 : 29%, IgG3 : 7%, IgG4 : 4% であるといわれているが、古典的経路の補体活性は、IgG1, IgG3 が強く、IgG2 は中間、IgG4 はないとされていることから、今回確認された補体結合性のない HLA 抗体は IgG4 が多く含まれると推察される。しかし、補体結合性および非結合性 HLA 抗体が産生されるメカニズムはまだ解明されていない。また、これらの HLA 抗体の蛍光強度について同一検体の LABScreen と C1qScreen とで Normalized MFI を比較してみると、C1qScreen 陽性の Normalized MFI は LABScreen Normalized MFI の 2 倍以上を示す抗体から 5 分の 1 程度の抗体まであり、さらに LABScreen Normalized MFI が 10,000 以上でも C1qScreen が陰性、または LABScreen Normalized MFI が 5,000 以下でも C1qScreen が陽性を示す抗体が検出された。そして、LABScreen Normalized MFI を C1qScreen 陽性と陰性で比較すると HLA Class I・Class II 抗体ともに有意差はなかった。

Clifford Chin らは、C1qScreen と LABScreen の結果を分析することで移植後の AMR を予測するマーカーになりうると報告している¹⁵⁾。本研究において腎移植を施行した 12 症例について検討した結果では、抗体陽性 9 例のうち、5 例が Acute-AMR を引き起こし、そのうち 4 例は C1qScreen が陰性であり、AMR を予測するマーカーとはならない結果であり、Clifford Chin らの報告とは整合しなかった。また、LABScreen 陽性と腎生検所見との関連は認められなかったが抗体陰性移植の維持期の腎生検病理組織検査で Chronic-AMR および graft loss の 3 例では移植後 C1qScreen はすべて陽性であり補体結合性 HLA 抗体の DSA が関与している可能性が示唆された。

移植後の抗体関連拒絶反応は一般に HLA 抗体に補体が関与すると考えられていることから、HLA 抗体の補体結合性を確認することは重要であると考えられる。

今後、移植後モニタリングとして補体結合性抗体を検出する際は CDC-XM ではドナーリンパ球確保の点で困難な場合があるため、C1qScreen モニタリングは有用になると考えられる。さらに、C1qScreen は HLA Class I・Class II 抗体の判定も可能であることから FCXM に加えて、より検出精度が向上すると期待される。また、FlowPRA、LABScreen なども併用できれば、それぞれの検出法の特徴から HLA 抗体の補体結

合性の有無だけでなく non-HLA 抗体であるか否かを判断することも可能になると思われる。

VII. 結 語

LABScreen で検出される HLA 抗体 (DSA) 量が多くても、CDC-XM が陽性とならない症例も存在する。これは、C1qScreen で検出されない補体非結合性 HLA 抗体であることか推測され、CDC-XM と FCXM の結果の乖離の原因の一つとして考えられた。さらに、臨床症例の検討では、LABScreen 陽性と腎生検所見との関連は認められなかったが、Chronic-AMR の 2 症例および graft loss の 2 症例では移植後 C1qScreen はすべて陽性であり、補体結合性 HLA 抗体の DSA が関与している可能性が示唆された。

本研究に関して関連企業との利益相反はありません。

文 献

- 1) Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998-1000.
- 2) Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739.
- 3) Lobo PI, Spencer CE, Stevenson WC, *et al.* The use of pronase-digested human leukocytes to improve specificity of the flow cytometric crossmatch. *Transplant Int* 1995; 8: 472-480.
- 4) Bearden CM, Agarwal A, Book BK, *et al.* Pronase treatment facilitates alloantibody flow cytometric and cytotoxic crossmatching in the presence of rituximab. *Hum Immunol* 2004; 65: 803-809.
- 5) Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, *et al.* Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase: potential implications in renal transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 422-428.
- 6) 石塚 敏, 石田英樹, 古澤美由紀, 他. 腎移植における液性抗体検査法の検出感度試験. *移植* 2005; 40: 527-532.
- 7) Fuggle SV, Martin S. Tools for human leukocyte antigen antibody detection and their application to transplanting sensitized patients. *Transplantation*

- 2008; 86: 384-390.
- 8) Fontaine MJ, Kuo J, Chen G, *et al.* Complement (C1q) fixing solid-phase screening for HLA antibodies increases the availability of compatible platelet components for refractory patients. *Transfusion* 2011; 51: 2611-2618.
 - 9) Lobo PI, Isaacs RB, Spencer CE, *et al.* Improved specificity and sensitivity when using pronase-digested lymphocytes to perform flow-cytometric crossmatch prior to renal transplantation. *Transplant Int* 2002; 15: 563-569.
 - 10) Park H, Lim YM, Han BY, *et al.* Frequent false-positive reactions in pronase-treated T-cell flow cytometric cross-match tests. *Transplant Proc* 2012; 44: 87-90.
 - 11) Abe M, Kawai T, Futatsuyama K, *et al.* Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation* 1997; 63: 1616-1619.
 - 12) Pei R, Wang G, Tarsitani C, *et al.* Simultaneous HLA Class I and Class II antibodies screening with flow cytometry. *Human Immunol* 1998; 59: 313-322.
 - 13) 佐治博夫. シリーズ: 各臓器移植についての拒絶反応の解説・移植の新しい治療法の紹介第4回: 移植における液性免疫抑制の重要性と HLA 血清学: 直接クロスマッチから HLA タイプ&スクリーンへ. *日本組織適合性学会誌* 2011; 18: 31-46.
 - 14) Poli F, Benazzi E, Innocente A, *et al.* Heart transplantation with donor-specific antibodies directed toward denatured HLA-A*02:01: a case report. *Hum Immunol* 2011; 72: 1045-1048.
 - 15) Chin C, Chen G, Sequeria F, *et al.* Clinical usefulness of a novel C1q assay to detect immunoglobulin G antibodies capable of fixing complement in sensitized pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2011; 30: 158-163.