

## 補体 C1q を用いた血液型抗 A/B-IgG 抗体検出の有用性

石塚 敏<sup>1)</sup>・安尾美年子<sup>1)</sup>・小林 悠梨<sup>1)</sup>・三浦ひとみ<sup>1)</sup>・甲斐耕太郎<sup>2)</sup>・  
岩藤 和広<sup>2)</sup>・村上 徹<sup>2)</sup>・北島久視子<sup>2)</sup>・中島 一郎<sup>2)</sup>・瀧之上昌平<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室

<sup>2)</sup> 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター腎臓外科

ABO 血液型不適合生体腎移植は、術前に血液型抗 A/B 抗体を出来るだけ除去することが移植腎生着には重要であると  
考えられてきた。しかし、抗体価に関係なく稀に超急性拒絶反応により移植腎喪失症例が存在する。

我々は、血液型抗 A/B-IgG 抗体の免疫学的なメカニズムを解明するため補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体を測定  
した。その結果から補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体の陽性率が高い症例は移植後の腎機能不良または腎機能  
喪失症例であった。今後、ABO 血液型不適合生体腎移植において重要な検査法になると示唆される。

**キーワード：**抗 A/B 抗体、補体結合性抗 A/B 抗体、FCM-C1q、FCM-IgG、血液型不適合腎移植

### はじめに

ABO 血液型不適合腎移植では、以前は急性期の液性  
拒絶反応を抑制する目的で脾臓摘出を余儀なくされてい  
たが、キメラ型抗 CD20 モノクローナル抗体 (Rituximab:  
Genetech, San Francisco, CA, USA) を使用することによ  
り脾臓摘出を行うことなく移植が可能になった<sup>1)</sup>。そ  
して、血液型不適合で問題となる血液型抗 A/B 抗体は、  
二重濾過血漿交換療法 (DFPP: Double Filtration Plasma-  
pheresis) や血漿交換 (PE: Plasma Exchange) などによ  
る抗体除去療法を行うことで移植腎生着率が著しく向上  
した。しかし、これらの前処置は完全な抗体除去ではな  
いにも関わらず、多くの症例で移植後の腎機能は良好で  
ある。稀に超急性拒絶反応による移植腎機能喪失症例が  
存在するが、この免疫学的なメカニズムは未だ解明され  
ていないのが現状である。

筆者らは、以前にドナー・レシピエント間におけるミ  
スマッチ HLA 抗原に対するドナー特異的抗 HLA-IgG 抗  
体 (DSA: donor specific alloantibody) において補体結合

性のある DSA が液性拒絶反応と強い関連性があることを  
報告している<sup>2)</sup>。

筆者らは、自然免疫抗体である血液型抗 A/B-IgG 抗  
体に関しても同様に補体結合性の有する抗体が液性拒絶  
反応に対する強い関連性があると推察した。そこで、本  
研究では新たに補体の第一成分であるヒト補体 C1q を  
用いた (FCM-C1q: flow cytometry method for complement  
C1q test) を考案し、その有用性について臨床症例によ  
る検討を行った。

### 1. 対象および方法

東京女子医科大学腎臓外科にて ABO 血液型不適合生  
体腎移植目的で来院されたドナー (健常者 A 型・B 型・  
O 型それぞれ 10 例) とレシピエント (透析患者 A 型・  
B 型・O 型それぞれ 10 例) の血液型抗 A/B 抗体測定  
(FCM-IgG: flow cytometry method for IgG test・FCM-C1q)  
および ABO 血液型不適合生体腎移植を施行した症例の  
うち術前検査において CDC-XM: Complement-Dependent  
Cytotoxic Crossmatch test・FCXM-IgG: flow cytometry lym-

受付日: 2015 年 11 月 6 日, 受理日: 2016 年 2 月 22 日

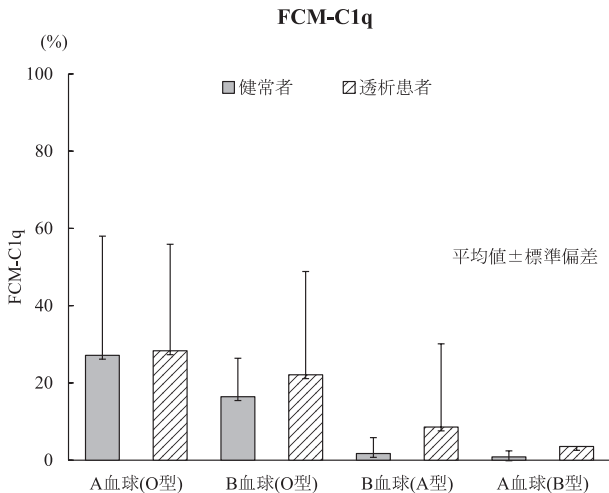
代表者連絡先: 石塚 敏 〒162-8666 東京都新宿区河田町 8-1 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室  
TEL: 03-3353-8111 FAX: 03-5269-7534 内線 35033 E-mail: ishizuka.tsutomu@twmu.ac.jp

phocyte crossmatch-IgG test • LABScreen: LABScreen single antigen (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA) がすべて DSA 陰性の 6 症例について血液型抗 A/B 抗体測定(間接抗グロブリン法 ID-AGT: Indirect anti-globulin test • FCM-C1q) に同意を得た患者を対象とした。

結果は、平均値±標準偏差(最小値-最大値)で示し、有意差検定は、JMP Pro11.2.0 を使用し Wilcoxon rank sum test で有意確率 5% 未満を有意差ありと定義した。

### 1) flow cytometry method for complement C1q test

被検血清、補体結合性のある抗 A/B-IgG 抗体陽性血清について抗 A/B-IgM 抗体を処理するため最終濃度 5 mM (DTT: dithiothreitol) 37°C, 30 分静置反応した<sup>3,4)</sup>。陰性コントロールとして AB 型ヒト血清 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, United States), DTT 処理した被検血清および補体結合性のある抗 A/B-IgG 抗体陽性血清 50  $\mu$ l と赤血球浮遊液 DiaCell ABO A1-B (DiaMed AG, Switzerland) 50  $\mu$ l を加え、室温 30 分静置反応した。反応させた赤血球を洗浄し、Complement component C1q from human serum (Sigma-Aldrich) 5  $\mu$ l を加え、室温 20 分静置反応した。Dako REAL Antibody Diluent (Dako Denmark A/S Code: S2022) で Anti-Human-C1q-FITC (Medical and Biological Laboratories Co. Ltd)  $\times$  400 倍 100  $\mu$ l を加え、室温遮光 20 分静置反応した。反応させた赤血球を洗浄し、FACS-Calibur HG (Becton Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) にて測定した。FCM-C1q 判定は、陽性率 % で評価した。



### 2) flow cytometry method for IgG test

被検血清、抗 A/B-IgG 抗体陽性血清について抗 A/B-IgM 抗体を処理するため 5 mM DTT 37°C, 30 分静置反応した。DTT 処理被検血清は、倍々希釈系列を作製した。AB 型ヒト血清を陰性コントロールとして DTT 処理倍々希釈被検血清および抗 A/B-IgG 抗体陽性血清 50  $\mu$ l と赤血球浮遊液 ABO A1-B 50  $\mu$ l を加え、室温 30 分静置反応した。反応させた赤血球を洗浄し、fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Penn, United States)  $\times$  50 倍 20  $\mu$ l を加え、室温遮光 20 分静置反応した。

反応させた赤血球を洗浄し、FACS-Calibur HG にて測定した。FCM-IgG 判定は、反応した最終希釈系列 (2<sup>n</sup>) で評価した<sup>5)</sup>。

## II. 結 果

### 1) 健常者および透析患者の血液型抗 A/B 抗体の検討

健常者は、O 型男性:女性 (7:3), 年齢 52.6 $\pm$ 13.9 (25-70), A 型男性:女性 (5:5), 年齢 55.0 $\pm$ 12.7 (26-67), B 型男性:女性 (6:4), 年齢 55.4 $\pm$ 13.6 (38-75) であった。

透析患者は、O 型男性:女性 (8:2), 年齢 55.8 $\pm$ 11.9 (34-75), A 型男性:女性 (9:1), 年齢 58.5 $\pm$ 10.4 (37-70), B 型男性:女性 (7:3), 年齢 49.1 $\pm$ 11.9 (24-66) であった。

図 1 に健常者・透析患者の血液型抗 A/B 抗体 (FCM-IgG • FCM-C1q) を示す。

健常者の FCM-IgG 抗体価 (2<sup>n</sup>) は、O 型抗 A 抗体 6.4 $\pm$ 2.1

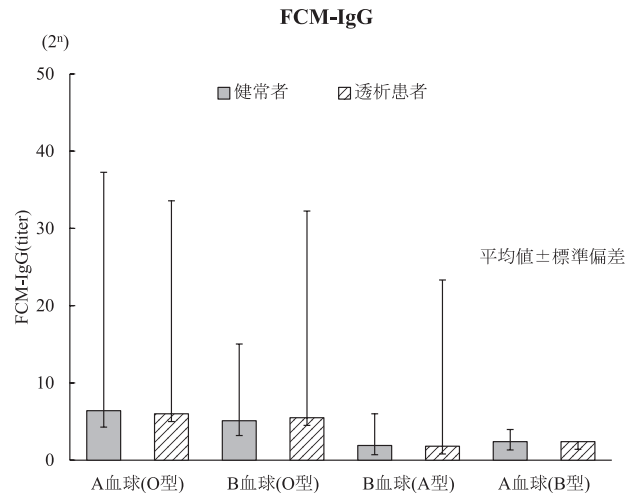


図 1 健常者・透析患者の血液型抗 A/B 抗体の検討

健常者・透析患者の A 型, B 型では、個人差が若干認められたが O 型と比べると統計学的有意差 (5% 未満) を持って FCM-IgG 抗体価・FCM-C1q 陽性率共に低い傾向であることが認められた。

表 1 ABO 血液型不適合生体腎移植症例の検査所見

症例 No.	血液型 (ドナー・レシピエント)	ID-AGT (2 <sup>n</sup> )			FCM-C1q (%)			術後腎機能
		術前最高	術直前	術後最高	術前最高	術直前	術後最高	
症例 1	A→O	6	2	5	14.2	0.3	0.4	良好
症例 2	A→O	7	4	8	1.4	0.2	2.5	良好
症例 3	B→O	4	2	5	17.3	0.2	72.2	不良
症例 4	A→O	8	6	8	10.8	1.1	40.5	喪失
症例 5	A→O	7	6	9	75.2	25.4	79.4	喪失
症例 6	A→B	7	6	7	75.1	68.1	48.7	喪失

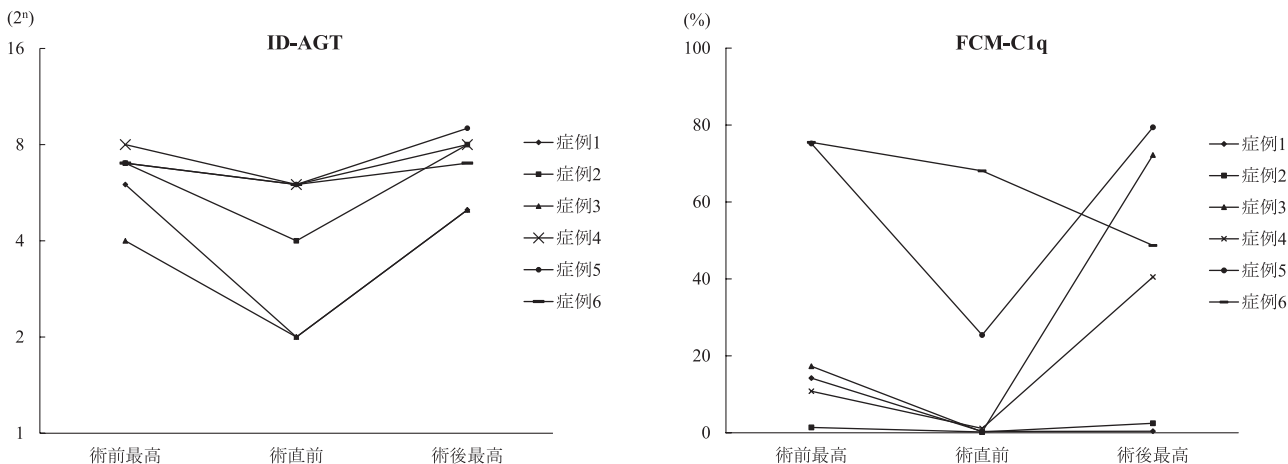


図 2 ABO 血液型不適合生体腎移植症例の血液型抗 A/B 抗体の検討

ID-AGT は、液性拒絶反応に関係なく術後抗体価の上昇を認めた。

FCM-C1q は、術後陽性率が低い症例では移植後の腎機能は良好であり、術後陽性率が高い症例では移植予後の腎機能不良または腎機能喪失症例であり移植腎生検においても抗体関連型拒絶反応を疑う所見であることが認められた。

(3-11), 抗 B 抗体 5.1±1.9 (2-8), A 型抗 B 抗体 1.9±1.2 (1-3), B 型抗 A 抗体 2.4±1.1 (1-5) であった。

健常者の FCM-C1q 陽性率 (%) は、O 型抗 A 抗体 27.2±30.9 (0.4-95.5)・抗 B 抗体 16.4±9.9 (0.7-31.0), A 型抗 B 抗体 1.7±4.1 (0.3-13.4), B 型抗 A 抗体 0.8±1.6 (0.1-5.3) であった。

透析患者の FCM-IgG 抗体価 (2<sup>n</sup>) は、O 型抗 A 抗体 6.0±1.3 (4-8)・抗 B 抗体 5.5±2.0 (2-8), A 型抗 B 抗体 1.8±1.9 (1-6), B 型抗 A 抗体 2.4±2.0 (1-7) であった。

透析患者の FCM-C1q 陽性率 (%) は、O 型抗 A 抗体 28.3±27.6 (0.3-82.8)・抗 B 抗体 22.1±26.7 (0.4-78.3), A 型抗 B 抗体 8.6±21.5 (0.1-68.2), B 型抗 A 抗体 3.5±10.5 (0.1-33.5) であった。

2) ABO 血液型不適合生体腎移植を施行した 6 症例

表 1 に ABO 血液型不適合生体腎移植症例の検査所見を示す。

ID-AGT 抗体価 (2<sup>n</sup>) は、症例 1-6 すべてにおいて術前抗体価に比べると抗体除去療法により術直前では一旦

低下を示したが術後再び抗体価の上昇を認めていた。

FCM-C1q は、ID-AGT と同様に症例 1-6 すべてにおいて術前抗体陽性率に比べると抗体除去療法により術直前では一旦低下を示した。しかし、術後の腎機能不良または移植腎喪失症例では術後再び抗体陽性率の上昇を認めていたが、術後腎機能良好症例では抗体陽性率の上昇を認めなかった (図 2)。

III. 考 察

Alexandre GP らは、術前の十分な抗血液型抗体除去療法と脾臓摘出が ABO 血液型不適合腎移植の成功につながると報告している<sup>6,7)</sup>。

日本では、腎移植のドナープール拡大の目的で 1989 年から ABO 血液型不適合生体腎移植が施行されるようになり、測之上らは、抗体除去療法と Rituximab 投与を併用することで ABO 血液型適合生体腎移植よりも ABO 血液型不適合生体腎移植の方が移植腎生着率が有意に良好であったと報告している<sup>8)</sup>。そして現在では、抗血液

型抗体除去を完全にする必要がないことが疫学的研究から明らかになった<sup>9)</sup>。しかし、どの程度抗体除去することが移植腎生着の成功につながるか未だ科学的な根拠はなく、経験に基づく抗体除去率で施行されている。

血液型抗 A/B 抗体測定法には、ID-AGT、ゲルカラム遠心凝集法 (MTS: DiaMed-ID Micro Typing System, DiaMed AG, Switzerland)、ビーズカラム遠心凝集法 (CAT: BioVue Column Agglutination Technology, Ortho-Clinical-Diagnostics, Tokyo, JPN)、flow cytometry 法などがある。しかし、どの検査法も IgG サブクラス (IgG1-4) をすべて検出する方法であり測定法に対する考え方も従来からほとんど変わっていないのが現状である。

筆者らは、本研究を進めるにあたりどの程度血液型抗 A/B-IgG 抗体を除去するかではなく、術前に補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体<sup>10)</sup>を除去出来るかの方が移植腎生着の成功につながるのではないかと仮説を立てた。

本研究結果より、健常者 A 型、B 型では個人差が若干認められたが O 型と比べると統計学的有意差 (5% 未満) を持って血液型抗 A/B-IgG 抗体価と共に FCM-C1q 陽性率も低い傾向であることが認められた。

透析患者では、O 型、A 型および B 型の血液型抗 A/B-IgG 抗体価は健常者とほぼ変わらない傾向であることが認められた。しかし、FCM-C1q 陽性率は O 型、A 型および B 型すべてにおいて健常者と比べると統計学的有意差 (5% 未満) を持って高い傾向であることが認められた。

preliminary study として本研究では健常者と透析患者を対象としたが、平均年齢はほぼ同一であったが特に透析患者について男女比に差を生じてしまった。性差による血液型抗 A/B-IgG 抗体への影響として男性に比べると女性の方がやや高値であったとする報告<sup>11,12)</sup>を確認出来たが本邦での検討結果は見当たらなかった。女性の場合、特に妊娠などにより男性に比べて血液型抗原に免疫される機会が多いためではないかと推測されるが、本研究結果では健常者と透析患者の血液型抗 A/B-IgG 抗体価に統計学的有意差を認めなかったこと、補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体に関しては女性の比率が低いにも関わらず透析患者が有意に健常者よりも高いことから性差による結果への影響は少ないのではないかと考えられる。

ヒト血清中 IgG 抗体のサブクラス比率は、およそ IgG1 : 60%, IgG2 : 29%, IgG3 : 7%, IgG4 : 4%, その中で古典的経路の補体結合能は、IgG1, IgG3 が強く IgG2 は中間、IgG4 はないと報告されている<sup>13)</sup>。

FCM-C1q による本研究結果から A 型、B 型の抗 A/B 抗体は、ほとんどが IgG4 優位ではないかと筆者らは推察した。しかし、実際 IgG サブクラスを解析してみると IgG4 優位の結果ではなく、FCM-C1q と一致しないことから今後 IgG サブクラス測定法の再検討が必要であると考えている (data not shown)。

矢部らは、日本人の血液型抗 A/B 抗体価が近年低下傾向にあると報告している<sup>14)</sup>。本研究結果においても A 型、B 型の血液型抗 A/B 抗体価は従来よりも抗体価の平均値で低い傾向が認められた。しかし、O 型の抗 A/B 抗体に関しては抗体価が高く維持されており FCM-C1q 陽性率も高く A 型、B 型と比較すると補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体の割合が高いことが認められた。

石田らは、ABO 血液型不適合腎移植の脱感作において O 型は A 型、B 型の透析患者と比較すると有意差をもって脱感作後のリバウンドの頻度が高く O 型は免疫応答の感受性に相違があるのではないかと推測している<sup>15)</sup>。この推測こそが筆者らの仮説とした補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体によるものではないかと推察される。

ABO 血液型不適合生体腎移植を施行した 6 症例の ID-AGT と FCM-C1q を比較すると、ID-AGT 抗体価は移植後の腎機能と関係なく術後抗体価の上昇を認めていた。しかし、FCM-C1q では、ID-AGT 抗体価が高くても術後 FCM-C1q 陽性率が低い症例では移植後の腎機能は良好であり、術後 FCM-C1q 陽性率が高い症例では移植予後の腎機能不良または腎機能喪失症例であり移植腎生検においても抗体関連型拒絶反応を疑う所見であることが認められた。

ABO 血液型不適合生体腎移植において補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体に関する先行技術文献は確認出来なかった。しかし、筆者らは本研究の結果から、新しい知見としてこの補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体の有無が液性拒絶反応と強い関連性があると推察される。

今後、術前や術後の血液型抗 A/B-IgG 抗体価の高い症例に対する抗体除去療法について、補体結合性のある血液型抗 A/B-IgG 抗体陽性率を測定することにより Ritux-



imab 投与や抗体除去療法を減らすことが出来る可能性が示唆される。

#### IV. 結 語

今後、症例検討を重ねる必要性はあるが、FCM-C1q は新しい血液型抗 A/B 抗体測定法として ABO 血液型不適合生体腎移植には重要な検査法になる可能性があるとして示唆される。

本研究に関して関連企業との利益相反はありません。

#### 引用文献

- 1) Sawada T, Fuchinoue S, Kawase T, *et al.*: Preconditioning regimen consisting of anti-CD20 monoclonal antibody infusions, splenectomy and DFPP-enabled non-responders to undergo ABO-incompatible kidney transplantation. *Clin Transplant* (18): 254–260, 2004.
- 2) 石塚 敏, 安尾美年子, 石田悠梨 他: 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—. *移植* 48: 033–041, 2013.
- 3) Knight RC: Measuring IgG anti-A/B titres using dithiothreitol (DTT). *Journal of Clinical Pathology* (31): 283–287, 1978.
- 4) Olson PR, Weiblen BJ, O’Leary JJ, *et al.*: A simple technique for the inactivation of IgM antibodies using Dithiothreitol. *Vox Sanguinis* (30): 149–159, 1976.
- 5) 石塚 敏, 石田英樹, 安尾美年子 他: フローサイトメーターを使用した抗 A/B 抗体価測定法の確立. *医学検査* 58: 827–831, 2009.
- 6) Alexandre GP, De Bruyere M, Squifflet JP, *et al.*: Human ABO-incompatible living donor renal homografts. *Neth J Med* (28): 231–234, 1985.
- 7) Alexandre GP, Squifflet JP, De Bruyere M, *et al.*: ABO-incompatible related and unrelated living donor renal allografts. *Transplantation Proceedings* (18): 452–455, 1986.
- 8) Fuchinoue S, Ishii Y, Sawada T, *et al.*: The 5-Year Outcome of ABO-Incompatible Kidney Transplantation With Rituximab Induction. *Transplantation* (91): 853–857, 2011.
- 9) Aikawa A, Kawamura T, Shishido S, *et al.*: ABO-incompatible living-donor pediatric kidney transplantation in Japan. *Clinics* (69): 22–27, 2014.
- 10) Duncan AR, Winter G: The binding site for C1q on IgG. *Nature* 1988, 332, 738–740.
- 11) McVey J, Baker D, Parti R, *et al.*: Anti-A and anti-B titers in donor plasma, plasma pools, and immunoglobulin final products. *Transfusion* (55): S98–104, 2015.
- 12) Grundbacher FJ: Genetics of anti-A and anti-B levels. *Transfusion* (16): 48–55, 1976.
- 13) Baldwin WM 3rd, Pruitt SK, Brauer RB, *et al.*: Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. *Transplantation* (59): 797–808, 1995.
- 14) 矢部隆一, 藤坂盛次, 増野敦子 他: 健常人の抗 A および抗 B 抗体価の変動—17 年前と現在, およびラオス人との比較—. *日本輸血学会雑誌* 50: 350, 2004.
- 15) 石田清人, 高橋祐司, 川上麻衣 他: ABO 不適合腎移植における術前抗体価と AMR リスクの検討. *日本臨床腎移植学会雑誌* 2: 62–67, 2014.

## Novel Flow Cytometry Method for Detecting Complement C1q Bound to Anti-blood Group A/B-IgG Antibody in ABO-incompatible Renal Transplantation

Tsutomu Ishizuka<sup>1)</sup>, Mineko Yasuo<sup>1)</sup>, Yuri Kobayashi<sup>1)</sup>, Hitomi Miura<sup>1)</sup>, Kotaro Kai<sup>2)</sup>, Kazuhiro Iwadoh<sup>2)</sup>, Toru Murakami<sup>2)</sup>, Kumiko Kitajima<sup>2)</sup>, Ichiro Nakajima<sup>2)</sup> and Shohei Fuchinoue<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Transplant Immunology, Central Clinical Laboratories, Tokyo Women's Medical University

<sup>2)</sup>Department of Surgery, Kidney Center, Tokyo Women's Medical University

It has been widely believed that it is critical to remove as much anti A/B blood group antibody as possible before ABO incompatible renal transplantation (ABOI-RTx) for renal graft survival. We, however, report a rare case that implied a presence of hyperacute rejection in ABOI-RTx leading to graft loss, in a way, regardless of titers of blood group antibody before transplantation.

We newly developed a method for measuring a complement-fixing ability of anti A/B blood group IgG antibody to elucidate an immunological mechanism of how anti A/B blood group antibody works in ABOI-RTx. Results of such measurements revealed that a high positive rate of complement-fixing ability of anti A/B IgG antibody was predictive of poor graft survival or graft loss. This method, therefore, might turn out to be an important laboratory test before ABOI-RTx.

**Key words:** anti-A/B blood type antibody, complement-fixing ability of anti-A/B antibody, FCM-C1q, FCM-IgG, ABO incompatible renal transplantation