

原著

フローサイトメトリーによる補体結合性血液型抗 A/B-IgG 抗体検出法の開発

石塚 敏¹⁾, 安尾 美年子¹⁾, 小林 悠梨¹⁾, 甲斐 耕太郎²⁾, 岩藤 和広²⁾, 村上 徹²⁾,
北島 久視子²⁾, 中島 一朗²⁾, 瀧之上 昌平²⁾

Development of a new detection method of anti-blood type A/B antibody that has complement-binding affinity using flow cytometry test

Tsutomu Ishizuka M.T., C.C.,¹⁾ Mineko Yasuo Ph.D.,¹⁾ Yuri Kobayashi M.T.,¹⁾ Kotaro Kai M.D.,²⁾,
Kazuhiro Iwadoh M.D.,²⁾ Toru Murakami M.D., Ph.D.,²⁾ Kumiko Kitajima M.D., Ph.D.,²⁾,
Ichiro Nakajima M.D., Ph.D.,²⁾ Shohei Fuchinoue M.D., Ph.D.²⁾

¹⁾ Division of Transplant Immunology, Central Clinical Laboratories, Tokyo Women's Medical University.

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

Abstract

In ABO-incompatible live renal transplantation (ABOI-RTx), anti-blood type A/B antibody (anti-A/B Ab) depletion is performed before transplantation to avoid humoral rejection caused by anti-A/B Ab. In a quite rare case, so severe a hyperacute rejection occurs in ABOI-RTx as to result in graft loss, regardless of titer of anti-A/B Ab.

We newly developed a flow cytometry-based detection method of anti-blood type A/B IgG antibody (anti-A/B IgG Ab) that has complement-binding affinity using human complement C1q to elucidate immunological mechanism of humoral rejection caused by anti-A/B Ab in ABOI-RTx. This method revealed that positivity rate of C1q-binding affinity in anti-A/B IgG Ab was higher in patients of ABOI-RTx whose graft function was lost, while that rate was lower in those with stable renal function.

We, therefore, suggest that this method might have a possibility to become a useful test in ABOI-RTx to avoid humoral rejection.

Key words : flow cytometry; ABO-incompatible live renal transplantation; complement-fixing ability of anti-A/B antibody

I. 緒言

日本では、腎臓移植の適応拡大を目的とし1989年からABO血液型不適合生体腎臓移植 ABO-incompatible live renal transplantation (ABOI-RTx) が施行されるようになった¹⁾。

ABOI-RTx では、移植前に抗 A/B 抗体を除去する二重濾過血漿交換療法 Double Filtration Plasmapheresis (DFPP) や血漿交換 Plasma Exchange (PE) など抗体除去療法が行なわれている。また、以前はレシピエントの脾臓摘出を余儀なくされてきたが、キメラ型抗 CD20 モノクローナル抗体 (Rituximab : Genetech, San Francisco, CA, USA) を使用することで脾臓摘出を行うことなく腎臓移植が可能となった²⁾。そして、現在では Rituximab 投与と抗体除去療法を併用することで ABO 血液型適合生体腎臓移植 ABO-compatible live

¹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

²⁾ 東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター 腎臓外科

受付日 : 平成 28 年 3 月 10 日 受理日 : 平成 28 年 4 月 21 日

renal transplantation (ABO-RTx) よりも ABOI-RTx の方が移植した腎臓の生着率が有意に良好であったとの報告がなされるまでになっている³⁾。しかし、移植直前検査においてドナー特異的抗HLA抗体陰性症例で抗A/B抗体価が低くても稀に超急性拒絶反応により移植した腎臓機能を喪失する症例が存在する。

筆者らは、ABOI-RTxにおいて移植前に自然免疫抗体である抗A/B抗体除去が完全な抗体除去療法ではないにもかかわらず、免疫学的順応 Accommodation が誘導されることについて、液性拒絶反応を引き起こす免疫学的なメカニズムの違いは補体結合性を有する抗A/B-IgG抗体量が関与するのではないかと推察した。そこで、本研究では補体結合性を有する抗A/B-IgG抗体検出を目的として補体の第一成分であるヒト補体C1qを用いた flow cytometry method for complement C1q test (FCM-C1q)を開発し、基礎的検討および臨床症例による解析を行った。

II. 対象

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 ABOI-RTx 目的で来院されたドナー（健常者 A 型・B 型・O 型）とレシピエント（透析患者 A 型・B 型・O 型）を対象とし、抗 A/B 抗体測定法である flow cytometry method for IgG test (FCM-IgG)・FCM-C1q を行なった。また、ABOI-RTx を施行した移植直前検査にてドナー特異的抗HLA抗体陰性であった2症例を対象とし、抗A/B抗体測定法である間接抗グロブリン法 Indirect anti-globulin test (ID-AGT)・生理食塩水法

saline test・FCM-C1qを行なった。

III. 方法

1) flow cytometry method for complement C1q test

Figure 1 に反応原理を示す。

被検血清および補体結合性を有する抗A/B-IgG抗体陽性血清について抗A/B-IgM抗体を還元処理するため最終濃度5mM dithiothreitol (DTT) 37℃, 30分静置反応した^{4,5)}。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を有する抗A/B-IgG抗体陽性血清50ulと赤血球浮遊液 DiaCell ABO A1-B (DiaMed AG, Switzerland) 50ul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) 5ul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) ×400倍100ul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、FACSCalibur 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

被検血清および抗A/B-IgG抗体陽性血清について抗A/B-IgM抗体を還元処理するため最終濃度5mM DTT 37℃, 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

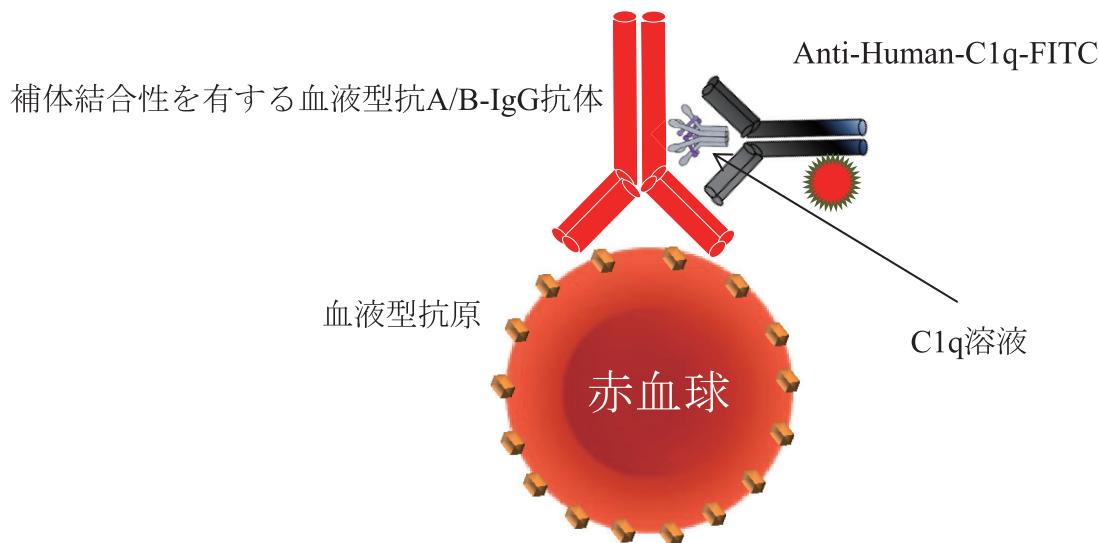


Figure 1 flow cytometry method for complement C1q test 反応原理

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 50ul と赤血球浮遊液 ABO A1-B 50ul 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) ×50倍 20ul 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、FACSCalibur HG にて測定した。FCM-IgG 判定は、反応した最終希釈系列で評価した⁶⁾。

IV. 統計学的処理

統計学的処理において、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。

V. 結果

1) 健常者および透析患者の抗 A/B-IgG 抗体の基礎的検討

健常者と透析患者の内訳は Table 1 に示す。

健常者と透析患者の A 型・B 型では、FCM-IgG 抗体価・FCM-C1q 陽性率において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 陽性率共に低かった。また、健常者と透析患者の FCM-IgG 抗体価・FCM-C1q 陽性率は共にほぼ変わらない傾向であることが認められた。

2) ABO 血液型不適合生体腎臓移植を施行した 2 症例

Figure 2 は、A 型ドナーから O 型レシピエントへ ABOI-RTx を施行した移植後腎臓機能良好な症例である。

移植前に DFPP を 4 回施行し、移植当日 ID-AGT8 倍で移植、その後急激に ID-AGT の上昇を認めたがクレアチニン値 1.7mg/dL 付近を推移し、FCM-C1q 陽性率は移植前後において上昇を認めていなかった。

Figure 3 は、A 型ドナーから O 型レシピエントへ ABOI-RTx を施行し移植後腎臓機能が喪失した症例である。

移植前に DFPP を 4 回施行し、移植当日 ID-AGT 32 倍で移植、その後 27 日目付近から徐々に FCM-C1q 陽性率の上昇を認め 50 日目まで ID-AGT128 倍、FCM-C1q 陽性率 40.5% で腎生検を施行した結果、急性抗体関連型拒絶反応 Acute antibody-mediated rejection (acute-ABMR) と診断され 51 日目に Graft loss となった。

Table 1 健常者と透析患者の内訳

健常者 A 型、B 型では、FCM-IgG 抗体価と FCM-C1q 陽性率において個人差が若干認められたが O 型と比べると抗 A/B-IgG 抗体価と補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体陽性率は共に統計学的有意差をもって低かった。

		健常者						透析患者			
血液型	年齢	FCM-C1q(%)		FCM-IgG(titer)		血液型	年齢	FCM-C1q(%)		FCM-IgG(titer)	
		A血球	B血球	A血球	B血球			A血球	B血球	A血球	B血球
A	57		0.4		×4	A	46		0.2		×64
A	67		0.4		×2	A	37		0.1		×4
A	64		0.4		×8	A	59		0.1		×2
A	64		0.3		×4	A	53		0.4		×2
A	49		0.4		×1	A	60		0.2		×4
A	62		0.4		×8	A	65		68.2		×16
A	53		13.4		×8	A	68		16		×2
A	41		0.5		×1	A	62		0.3		×1
A	26		0.5		×4	A	70		0.2		×1
A	47		0.6		×8	A	65		0.2		×2
B	60	0.2			×4	B	45	0.3			×2
B	74	0.3			×4	B	41	0.3			×16
B	75	0.4			×4	B	46	0.1			×8
B	40	0.3			×8	B	51	0.1			×4
B	44	5.3			×32	B	54	33.5			×128
B	55	0.6			×4	B	24	0.2			×8
B	66	0.5			×4	B	48	0.2			×4
B	38	0.5			×8	B	52	0.2			×2
B	58	0.2			×2	B	66	0.3			×1
B	44	0.1			×4	B	64	0.3			×2
O	46	0.4	22.7		×64	O	75	32.8	9.1		×128
O	44	29.9	29.4		×64	O	63	18.6	8.3		×128
O	70	1.2	14.7		×64	O	60	9.4	36.4		×64
O	50	95.5	4.87		×256	O	62	16	0.4		×32
O	69	3.35	22.8		×32	O	55	63.9	78.3		×256
O	58	46.3	13.5		×128	O	34	12.9	9.3		×128
O	25	50.1	13.2		×2048	O	61	82.8	0.6		×64
O	57	10.5	31		×32	O	60	44.5	56		×16
O	43	0.35	0.7		×8	O	44	1.9	22.2		×64
O	64	33.9	11.5		×128	O	44	0.3	0.5		×16

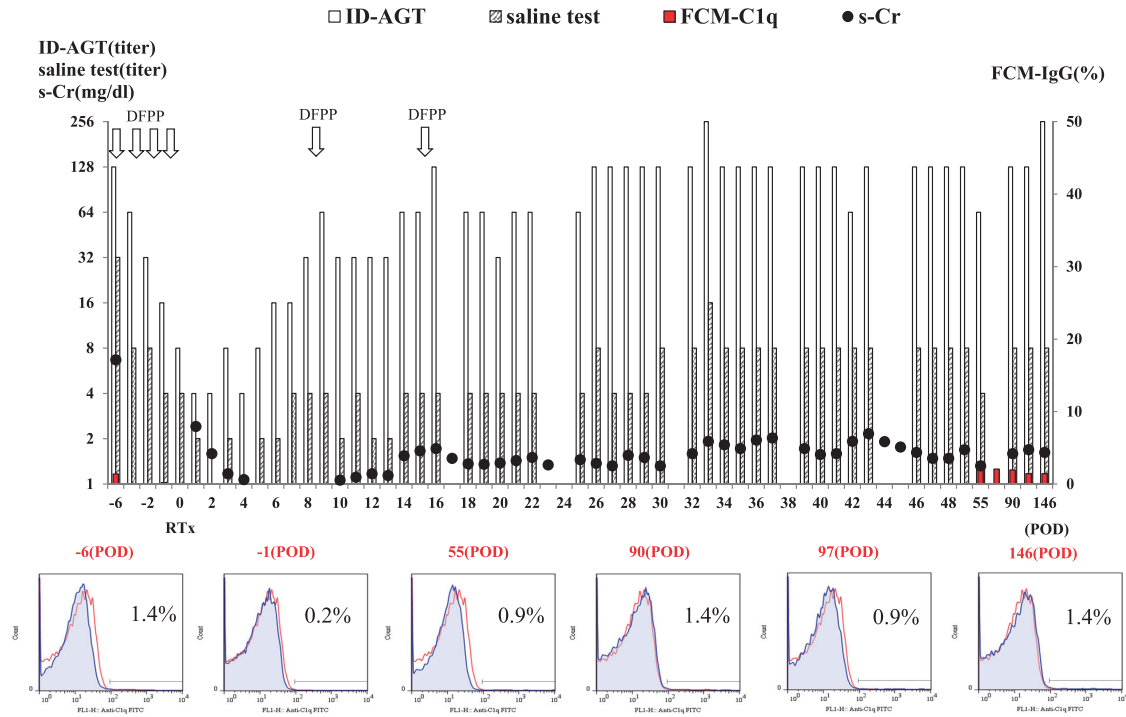


Figure 2 ABO 血液型不適合生体腎臓移植を施行した移植後腎臓機能良好症例

A 型ドナーから O 型レシピエントへ ABOI-RTx を施行した移植後腎臓機能良好な症例である。ヒストグラムの赤線は陰性コントロールを示す。ID-AGT は移植後上昇を認めていたが、FCM-C1q は上昇していなかった。

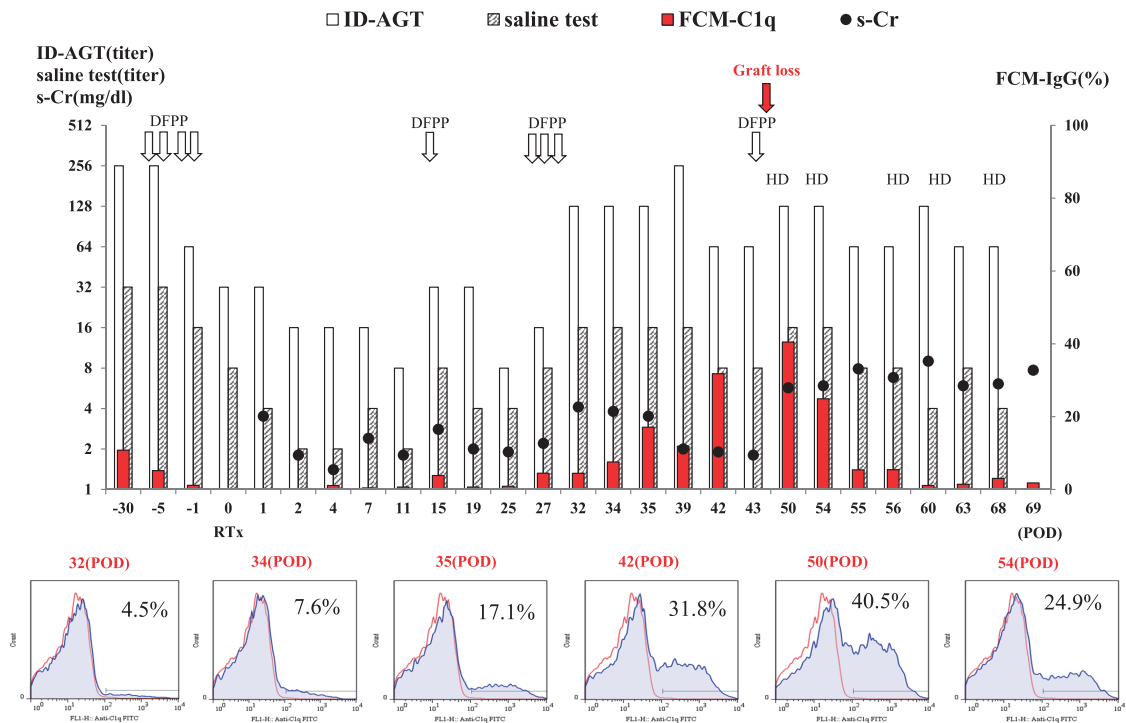


Figure 3 ABO 血液型不適合生体腎臓移植を施行し移植後腎臓機能喪失症例

A 型ドナーから O 型レシピエントへ ABOI-RTx を施行し移植後腎臓機能が喪失した症例である。ヒストグラムの赤線は陰性コントロールを示す。ID-AGT は移植後上昇を認めていたが、FCM-C1q は上昇していた。

VI. 考 察

ABOI-RTx では、血液型抗原に対する抗 A/B 抗体価を移植前後において確認することが重要であると考えられている。しかし、抗 A/B 抗体価に関係なく免疫学的順応 Accommodation が誘導される症例または稀に超急性拒絶反応により移植後腎臓機能を喪失する症例が存在する。

抗 A/B 抗体のうち補体結合性を有する自然免疫抗体である IgM 抗体価が液性拒絶反応の判断基準として明確に書かれた文献は見当らなかったが、急性抗体関連型拒絶反応は自然抗体によって引き起こされるのではなく、移植してから de novo の抗 A/B 抗体によって引き起こされること、そして、IgG 抗体価に関しては抗体除去療法の移植基準とした研究報告⁷⁾ がなされている。

筆者らは、この抗 A/B-IgG 抗体のうち血中補体蛋白が関与する補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体量と液性拒絶反応との関連性について解析するにあたり、FCM-C1q 測定法の開発を行なった。

FCM-C1q は、本研究において補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体の定性試験を目的とし % 陽性率による結果判定を採用したが、本来定量評価するのであれば血清を希釈する抗体価を採用する必要があると考える。また、ヒト補体 C1q は補体結合性を有する抗 A/B-IgG・IgM 抗体の両方と反応するため、DTT による還元処理を行なうことにより抗 A/B-IgG 抗体を的確に検出出来るようにした。しかし、DTT 処理された単量体もしくは半量体の IgM 分子は赤血球膜上抗原に反応することも考えられるが、本研究結果ではフローサイトメトリー法の赤血球ゲートにおいて Anti-Human-C1q-FITC には反応しないことを確認した。

FCM-C1q の基礎的検討として健常者と透析患者の血液型別による FCM-C1q 陽性率の比較解析を行なった結果では、健常者 A 型と B 型では FCM-IgG 抗体価と FCM-C1q 陽性率において個人差が若干認められたが O 型と比べると抗 A/B-IgG 抗体価と補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体陽性率は共に統計学的有意差をもって低かった。また、透析患者においても健常者とほぼ変わらない傾向であることが認められた。

抗 A/B 抗体の大部分は IgM 抗体であると今まで考えられてきた。しかし、本研究結果から抗原刺激によりクラススイッチが起こり産生される IgG 抗体は、健常者や透析患者において特に O 型が実際には抗体産生が少なくないことが確認出来た。

IgM 抗体は、補体結合性を有する抗体であるが IgG

抗体はサブクラスにより補体結合性に違いがある。一般にヒト血清中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⁸⁾。しかし、腎臓疾患関連では IgG4 サブクラスが高値を示す報告もあり疾患特異性が報告されている^{9,10)}。透析導入の腎不全患者でも筆者らは、A 型と B 型の抗 A/B 抗体についてほとんどが IgG4 優位ではないかと推察した。しかし、補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体陽性率と IgG サブクラスを解析してみると必ずしも一致した結果ではなく、現時点で乖離する原因が究明できないことから今後、FCM-IgG サブクラス測定系の確認を含め継続再検討を考えている。(data not shown)。

血液型抗原は、赤血球のみならず多くの上皮細胞にも発現がある¹¹⁾。特に A 型抗原は B 型抗原よりも抗原数が多く抗原性も強いとされているが ABOI-RTx において統計学的有意差は認められないとの報告がなされている¹²⁾。また、抗 A/B 抗体は、腸内細菌の糖鎖などに対して産生された自然免疫抗体であると考えられているが、特に O 型は、A 抗原・B 抗原を保有しないため抗 A/B 抗体産生に対する抑制機構が減弱しているのか A 型、B 型と比較すると抗 A/B 抗体をより多く産生している可能性が示唆される。また、ABOI-RTx の脱感作療法において 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た報告もある¹³⁾。

ABOI-RTx を施行した A 型ドナーから O 型レシピエントへの 2 症例による解析では、2 症例とも抗 A-IgG 抗体価と抗 A-IgM 抗体価はほぼ同じ推移を示しており、この 2 法では的確に液性拒絶反応を見極めるのは難しいのではないかと考えられる。しかし、抗 A-IgG 抗体価と補体結合性を有する抗 A-IgG 抗体陽性率を比較すると、2 症例とも抗 A-IgG 抗体価は移植後上昇を認めていたが、補体結合性を有する抗 A-IgG 抗体陽性率が低い症例では移植後の腎臓機能は良好であり、陽性率が高い症例では移植した腎臓機能を喪失していた。この結果から液性拒絶反応の免疫学的なメカニズムには、補体結合性を有する血液型抗体の関与が示唆されると共に、補体結合性を有しない抗 A-IgG 抗体の上昇は必ずしも液性拒絶反応と関連しない根拠であると考えられ、抗血液型抗体除去を完全に行なう必要性がないことを疫学的研究¹⁴⁾ から近年明らかにされたことと一致すると考えられる。

現在使用されている抗 A/B-IgG 抗体検出法には、試験管法 tube technique (TT 法)・ゲルカラム遠心凝集法 DiaMed-ID Micro Typing System (MTS法, DiaMed AG, Switzerland)・ビーズカラム遠心凝集法 BioVue Column Agglutination Technology (CAT法, Ortho-Clinical-Diagnostics, Tokyo, JPN), そして flow cytometry 法などが用いられている。しかし、これらは IgG サブクラス抗体 (IgG1-4) を区別なくすべて検出する方法である。そのため、今回筆者らが開発した FCM-C1q は補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体検出法として移植前後の抗体除去療法の確認や液性拒絶反応の診断に有用であると考えられる。

Ⅶ. 結 語

今後、FCM-C1q 陽性率ではなく抗体価としての定量評価を含め症例検討を重ねる必要性はあるが、補体結合性を有する抗 A/B-IgG 抗体検出法は ABOi-RTx の新たな臨床判断の一つとして有用になる可能性が示唆される。

利益相反

本研究にかかる利益相反はありません。

文 献

1. 太田和夫, 高橋公太, 大場忍, 他. ABO 血液型不適合腎移植の 1 例. 腎と透析 27 : 117-21, 1989.
2. 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: 254-60, 2004.
3. 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.
4. Knight RC.: Measuring IgG anti-A/B titres using dithiothreitol (DTT). J Clin Pathol 31: 283-287, 1978.
5. Olson PR, Weiblen BJ, O'Leary JJ, et al.: A simple technique for the inactivation of IgM antibodies using Dithiothreitol. Vox Sang 30: 149-159, 1976.
6. 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.
7. 高橋公太. ABO 血液型不適合腎移植 : なぜ超急性拒絶反応は発生しないのか Organ Biology. 18 : 11-32, 2011.
8. Baldwin WM 3rd, Pruitt SK, Brauer RB, et al.: Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. Transplantation 59: 797-808, 1995.
9. 日本腎臓学会 IgG4 関連腎臓病ワーキンググループ. IgG4 関連腎臓病診療指針 53: 1062-1073, 2011.
10. 川野充弘 : IgG4 関連疾患の腎病変. 医学のあゆみ 236: 193-197, 2011.
11. 藤井寿一. ABO 式血液型 に関する分子遺伝学的知見. 今日の移植 4: 141-146, 1961.
12. Takahashi K, Saito K, Tanabe K et al. First report of a 7-year survey on ABO-incompatible kidney transplantation in Japan. Clin Exp Nephrol 5: 119-125, 2001.
13. 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.
14. Aikawa A, Kawamura T, Shishido S, et al.: ABO-incompatible living-donor pediatric kidney transplantation in Japan. Clinics 69: 22-27, 2014.