

VERITAS SCIENCE LETTER

～ HLA & TRANSPLANTATION ～

Diagnostic Research Vol.3 2011.08

HLA-Specific Antibodies Developed in the First Year Posttransplant are Predictive of Chronic Rejection and Renal Graft Loss

Po-Chang Lee,1,3 Lan Zhu,2 Paul I. Terasaki,2 and Matthew J. Everly2

Transplantation 2009;88: 568-574

背景

腎移植後に抗体が産生されると、同種移植片の生着不全を招くとのエビデンスが示されているが、移植から抗体産生までの期間が同種移植片の生着率に影響を及ぼすかどうかは明らかにされていない。

本試験は、抗体産生時期の重要性を示した初めての試験である。

方法

慢性的な拒絶反応によって同種移植片の生着不全を来したレシピエント 25 例 (230 血清検体) と、移植日が生着不全レシピエントとマッチする移植片が機能しているレシピエント 25 例 (305 血清検体) からなる対照群から、17 年間にわたって (1991 年～2008 年) 血清を採取した。

結果

生着不全レシピエントの追跡調査期間の中央値は 7.1 ± 4.8 年、対照群の追跡調査期間の中央値は 11.8 ± 4.4 年であった。ヒト白血球抗原 (HLA) 同種抗体を認めたのは、生着不全レシピエント 25 例中 24 例 (96%)、対照群では 48% であった (P<0.0001)。抗体産生までの期間も、群間に差があった。生着不全群 15 例 (60%) が 1 年以内に抗体を産生したのに対し、このようなものは対照群になかった。多変量解析に基づく移植後 1 年後の抗体産生の同種移植片の喪失に対するハザード比は、7.77 (P_0.001) であった。早期に抗体産生した (1 年以内) レシピエントにおける 10 年間の同種移植片生着率が 27% であったのに対し、遅れて抗体産生したレシピエントでは 80% であった。

結論

全般に、HLA 抗体を移植後 1 年以内に産生すると、遅れて抗体産生された例に比べて同種移植片の生着率が著しく低い。このことから、早期に抗体をモニタリングすることは有用である。

腎移植後に出現した HLA 抗体は、拒絶につながると考えられ、拒絶兆候を把握するモニタリングとして術後 HLA 抗体検査は有用と考えられています。

本論文では、移植腎が生着不全となった患者群の多くが術後 1 年以内に HLA 抗体が検出されている事を報告しています。つまり、術後 1 年以内に新たな HLA 抗体が検出されるようになった患者では、移植腎の長期生着のためには 1 年以降も定期的な HLA 抗体検査の実施が、不可欠との Evidence が示されたものです。

EBM (Evidence-based medicine) が重視される時勢ですが、日本でも HLA 抗体検査が EBM として、重要性が認識されてくるものと思っています。

株式会社ベリタス

はじめに

ワンラムダ社主催 Advanced Flow Cytometry Workshop は、アメリカ合衆国カリフォルニア州の STANFORD Blood Center で、年 1 回行われます。

このセンターは、NMDP（骨髄バンク）HLA ラボとしてアメリカ国内でも有名で、かなりの数の HLA タイピングをしています。このラボで C1q と結合する抗体（C1q 補体と結合する抗体を検索する LABScreen キット）が研究され、ワンラムダ社から C1qScreen として、最近発売されました。

ワークショップでは

ワークショップは、FlowPRA Screening、FlowPRA Single Antigen、Flow クロスマッチについて、レクチャーとウェットトレーニングを行います。フローサイトメーターは、ベクトンデッキンソン社製 FACSCAN、FACSCalibur、FACSCanto、ベックマンコールター社製 FC500、XL がそれぞれ数台あり、20 人の参加者が調整した検体を同時に測定することができます。

フローサイトメーターは参加者全員のラボにあります。アメリカでは LABScreen の使用が普及しており、ワークショップに参加した殆どが LABScreen Single Antigen で測定を行っているようです。

テクニカルなポイント

FlowPRA のデータを正しく出すために、いろいろな工夫をしています。

— 血清の処理 —

まず、サンプルとなる血清です。

FlowPRA は、2 次抗体に FITC conjugated F(ab)2 anti human IgG Fc γ を使用します。もし、サンプルが IgM を含んでいると IgM の影響で偽陰性のようになり、IgG で正しいデータが出ません。多くのラボで、検体を DTT 処理して IgM を不活性化することをルーチンに取り入れているそうです。しかし、DTT 濃度が濃すぎると IgG も壊してしまうので気を付けなければいけません。

ある大学では、サンプルに必ず FBS を加えています。加えることにより FlowPRA Screening のピークがより精密になるからです。

血清を高回転で遠心するのは必須です。日本では、販売されていないのが残念ですが、ベックマンコールター社の Air Fuge という卓上の遠心分離器で、バキュームしながら遠心することにより、100,000 g で遠心することができます。どのラボも 100,000 g 以上で、10 分間血清を遠心しているそうです。

— 血清反応 —

反応に使用する血清量は、50 μ L です。より精度の高いデータを得るためにこの量で FlowPRA Screening のビーズと反応させます。この時に使用するチューブですが、かなり特徴的です。Fisher Scientific 社から販売している直口フリントガラスチューブで、サイズ 6 \times 50Hmm の透明のガラスチューブです。このチューブは透明ですから、遠心後のビーズの塊がよく見え、また静電気がおこらず、操作性が良いのでお勧めします。(Cat.No.14-958A)

— 洗浄 —

このチューブを使用する際の洗浄は、200 μ L Wash buffer を加え、ボルテックス後、再度 Wash buffer を 200 μ L 加えボルテックスします。その後、1-2 分 7,000 g で遠心、または 3-5 分 1,200 g で遠心します。上清を除去した後ドライボルテックスをします。洗浄回数は、血清反応後 3 回、2 次抗体反応後 3 回です。

FlowPRA Specific Test や Single Antigen は、96 ウェルの U 底プレートを使用します。

U 底の場合も使用する血清量は 50 μ L と FlowPRA Screening と同じですが、洗浄時は 70 μ L の Wash buffer を加え、ボルテックス後また 70 μ L 加えます。コンタミを防ぐためにシールをして、ボルテックスをします。上清はフリックによって除去します。フリック後ドライボルテックスをします。洗浄回数は、血清反応後 3 回、2 次抗体反応 4 回行います。2 次抗体は、どのキットも 20 μ L 加えます。

最終溶液は 500 μ L に調整し、各機械で読み取ります。

終わりに

このワークショップで行うプロトコールは、ワンラムダが発行している添付文書とは、異なる点が多いですが、よりよいデータを出すために改良されたプロトコールです。よって確立されたプロトコールというものが存在する訳ではなく、上記はワークショップで得られた US での状況を記載している限りでございますので、ご了承下さい。

【DTT 処理をした検体の前後】

