

VERITAS SCIENCE LETTER

HLA&TRANSPLANTATION

Diagnostic Research

Vol. 5
2012.04

C1qScreen の使用に関する考察

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 中島文明

背景：

今や、LABScreen Single antigen 試薬（以下、LS-SA）は高い検出感度と明確な特異性同定で最高水準の HLA 抗体検出試薬と位置付けられる。一方で、自然抗体による過剰反応や補体が原因とされる抑制反応で、真の HLA 抗体を捉えるにはどうしたら良いか、その判断に迷いも生じてきている。

C1qScreen は、補体結合性 HLA 抗体を検出する目的で、LABScreen などの bead-based assay と組み合わせで使用される試薬として登場し、これまでに、C1qScreen を使用した移植や輸血の臨床成績に関する論文で、その有意性がベリタスサイエンスレターでも紹介されてきた。そこで、LCT 法¹⁾ や bead-based assay で検出した HLA 抗体について、C1qScreen での抗体特異性の違いを検証し、どのように使用すべきか考察した。

検証：

C1qScreen は、陰性コントロールをどうするか、また何を基準に判定すべきか使用説明書に記載がない。次のような評価方法を試みた。まず、検出系の異なる anti-IgG と anti-C1q の蛍光値を単純に比較することは妥当ではないと考え、コントロールとの反応比率（NBG Ratio）で比較した。その場合の陰性コントロールは、判定ソフトウェア（HLA Fusion）で default 設定されている陰性血清データを使用した。血清サンプルは、①自然抗体と思われる血清サンプル、② LCT 及び LS-SA で HLA 特異性を示す血清サンプル、③同じく、IgM 特異性のみ示す血清サンプルを使用した。

検証（続き）：

①は、予想どおり C1qScreen 陰性であった。この血清は、LS-SA のみ A30+A31 に対する強い陽性反応を示し（グラフ 1a）、FCM 法²⁾ や ICFA 法³⁾ など cell-based assay では全く反応しない（グラフ 1b）。②は、C1qScreen の反応は A3 に対する LCT 特異性と同等の結果であった（グラフ 2a、表）。LS-SA のみが検出する抗体特異性である A11 と A24 について、FCM で検証したところ反応が認められた（グラフ 2b）。

③は、C1qScreen で検出できる抗体とできない抗体が存在した。

結論からすると、この試薬の検出結果は LCT 同等と見た。ただし、LCT より感度は高く、安定的な結果が得られる。最近、あまり聞かれなくなったが CYNAP (Cytotoxicity Negative Absorption Positive) 現象をご存知だろうか。要するに、細胞傷害は起こさないが、細胞に吸着（結合）する抗体反応のことである。細胞傷害は IgM 性抗体あるいは 2 価の IgG 性抗体の相互作用により C1q が安定結合することで惹起される。CYNAP 状態では、近くに相互作用をもたらす別の IgG 結合抗体が存在しないため、C1q 結合が不十分なため細胞傷害に至らないとされる。つまり、1 分子の IgG に C1q が結合しても、結合状態が不安定なためすぐに解離してしまう。ふたつの IgG 分子が近接して HLA に結合していないと、C1q 結合の安定性が保てないということである。C1qScreen の検出も同様で、補体活性を惹起できる安定的な C1q 結合をもたらす IgG 性抗体の結合状態を検出していると考えられる。AHG-LCT 法は AHG (L 鎖) の添加でそれを補っている。②の C1qScreen で検出できない特異性は正にこの CYNAP 現象である。①の自然抗体と明らかに異なる点は細胞膜上の HLA と結合することであり、臨床的 중요性は軽視できないと思われる。

結論：

1. C1qScreen 陽性となるサンプルは、補体活性をもたらす抗体成分を含んでいるため、その臨床的重要性は高い。
2. C1qScreen は CYNAP と見られる IgG 性の HLA 抗体特異性を検出しない。ただし、intact cell に吸着(結合)する抗体であるため、その臨床的重要性は軽視できない。
3. C1qScreen は bead-based assay で検出する IgG 性自然抗体を検出しない。
4. C1qScreen で検出できない IgM 性抗体が認められ、その臨床的重要性は不明である。

多くの血清サンプルは、上記の 1～4 が複合している状態であり、C1qScreen で何らかの HLA 特異性を検出した場合は臨床的に重要と考えられるが、陰性の場合に問題があるかどうかは、この試薬だけでは判断できないと結論付けた。

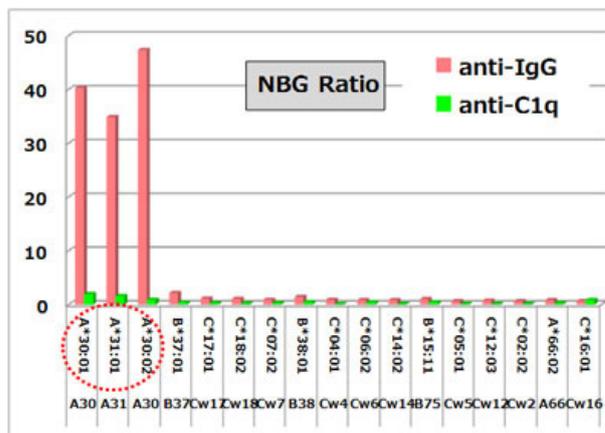
用語説明：

- 1) LCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test) 法は、リンパ球と血清を反応させた後、ウサギ血清を添加して補体活性を促し、細胞膜を傷害したところで染色して HLA 抗体の存在を検出する古典的な HLA 検査方法である。
- 2) FCM (Flow Cytometry) 法は、フローサイトメーターを使用し、細胞や抗体に標識したシグナルを測定する方法。この場合は、間接蛍光抗体法の応用で、リンパ球と被検血清を反応させた後、PE (Phycoerythrin) 標識 CD3 (T 細胞) /CD19(B 細胞) を結合させ、さらに FITC (Fluorescein Isothiocyanate) 標識抗ヒト IgG でリンパ球に結合している被検血清中の抗体を検出する方法のことをいう。測定では、散乱光 (FSC vs. SSC) ドットプロットでリンパ球のゲート領域をセットし、さらに CD3/CD19 標識領域を分離した後、その領域の FITC シグナルをヒストグラムに展開し、陰性コントロール血清シグナルとの比率が通常 2.0 以上の場合を HLA 抗体陽性と判定する。抗体検出では、LIFT 法 (Lymphocyte Immunofluorescence Test)、交差適合試験では FCXM (Flow Cytometry Crossmatch) などと呼ぶ。
- 3) ICFA (Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis) 法は、Luminex 装置を使用し、抗原抗体反応を検出する方法。この場合は、リンパ球と被検血清を反応させた後、リンパ球を detergent で溶解し、そこに含まれる抗原抗体複合体を HLA 特異的のモノクローナル抗体結合 Luminex ビーズで捕捉する。さらに、PE 標識抗ヒト IgG で、ビーズに結合している抗原抗体複合体の抗体部分を標識して、Luminex 装置で測定する。陰性コントロール血清のシグナルを元に Index 計算して、通常 2.0 以上の場合を HLA 抗体陽性と判定する。

図表説明：

グラフ 1a. サンプル①

LABScreen® Single Antigen HLA Class I – Combi ; Lot.006
C1qScreen™ ; Lot.001 [OneLambda]

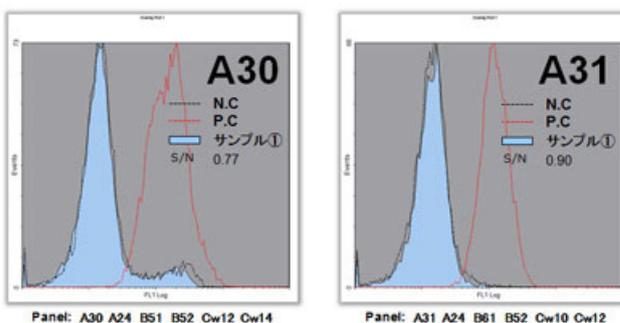


サンプル①血清について、LABScreen Single Antigen ビーズとの反応をみている。

Anti-IgG は、ビーズに直接結合した HLA 抗体のシグナル、Anti-C1 q は、ビーズに結合した HLA 抗体に補体 (C1q) を反応させ、HLA 抗体に結合した C1q のシグナルを示している。どちらも、陰性コントロール血清との比率 (NBG Ratio) で表示。Anti-IgG では、HLA-A30 や A31 の抗原に対して高い Ratio が認められるが、Anti-C1q では数値の上昇はない。したがって、この抗体は、補体結合性抗体ではない。

グラフ 1b. サンプル①

Lymphocyte Immunofluorescence Test [In-house]

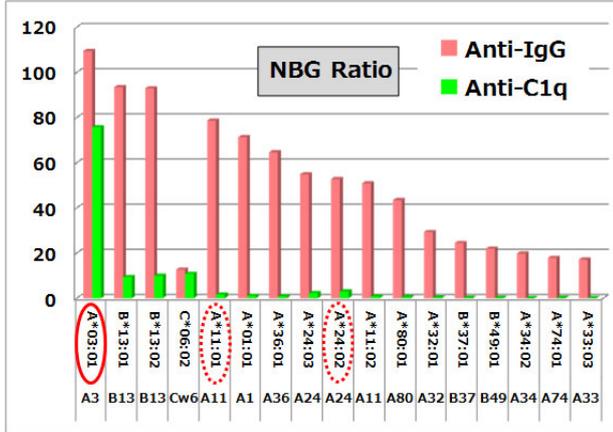


サンプル①血清について、パネルリンパ球との反応を FCM 法でみている。図中の黒点線が陰性コントロール血清の反応、赤点線が陽性コントロール血清の反応、水色のヒストグラムがサンプル血清の反応で、陰性コントロール血清と、ほぼ同じ位置に認められるので、HLA 抗体陰性と判定される。

図表説明（続き）：

グラフ 2a. サンプル②

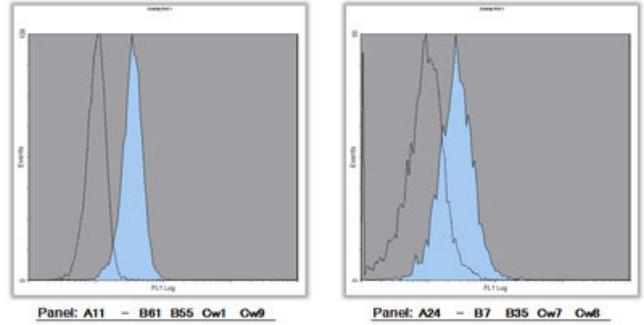
LABScreen® Single Antigen HLA Class I – Combi ; Lot.006
C1qScreen™ ; Lot.001 [OneLambda]



見方はグラフ 1a. と同様である。サンプル②血清について、Anti-IgG では、強弱はあるものの広域に高い Ratio が観察される。Anti-C1q では HLA-A3 のみ強い Ratio の上昇が認められるが、HLA-A11 や A24 では Anti-IgG 陽性であっても Anti-C1q のシグナルは検出されていない。

グラフ 2b. サンプル②

Lymphocyte Immunofluorescence Test [In-house]



見方はグラフ 1b. と同様である。サンプル②血清について、HLA-A11 や A24 では陰性コントロール血清と比較して 3 倍前後のシグナルが観察され HLA 抗体陽性と判定される。サンプル①血清と異なる点は、このように細胞との反応が認められることであり、この領域の反応が CYNAP 現象といえる。

表

Lymphocyte Cytotoxicity Test [In-house]

Panel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
HLA-A	A3								A30	A30	A11						A24
	A24	A2	A68	A26	A2	A1	A2	A24	A2	A2	A34	A26	A203	A31	A2	-	
HLA-B	B35	B7	B35	B44	B44	B8	B44	B13			B75	B56	B38	B44	B55	B59	
	B37	B35	B62	B51	B61	B60	B56	B51	B50	B55	-	B62	B62	B55	B60	B61	
HLA-C	Cw4	Cw9	Cw4	Cw4	Cw5	Cw7	Cw4	Cw6			Cw4	Cw7	Cw9	Cw1	Cw1		
	-	-	-	-	Cw8	Cw10	Cw1	Cw10	-	Cw9	Cw8	Cw7	Cw1	-	Cw7	Cw8	
Score	x1	8	8	8	8	8	8	8	2	2	2	2	2	2	1	1	
	x2	8	8	8	8	8	8	8	2	1	1	1	1	1	1	1	
	x4	8	8	8	8	8	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	

サンプル②血清について、数種類のパネル細胞との反応を LCT 法で検出した結果である。Score8 が強陽性、Score2 は擬陽性、Score1 は陰性と判定する。HLA-A3 を持つパネル細胞とのみ強陽性を示し、C1qScreen の結果と一致することが判る。

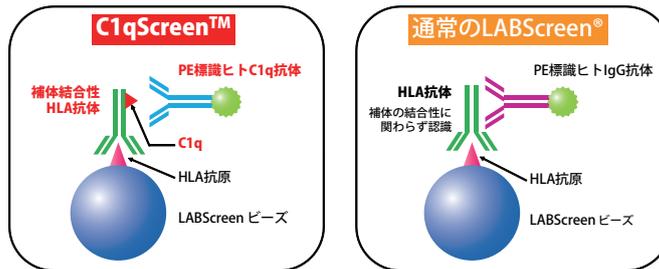


Luminex® 専用 補体結合性 HLA 抗体検出キット

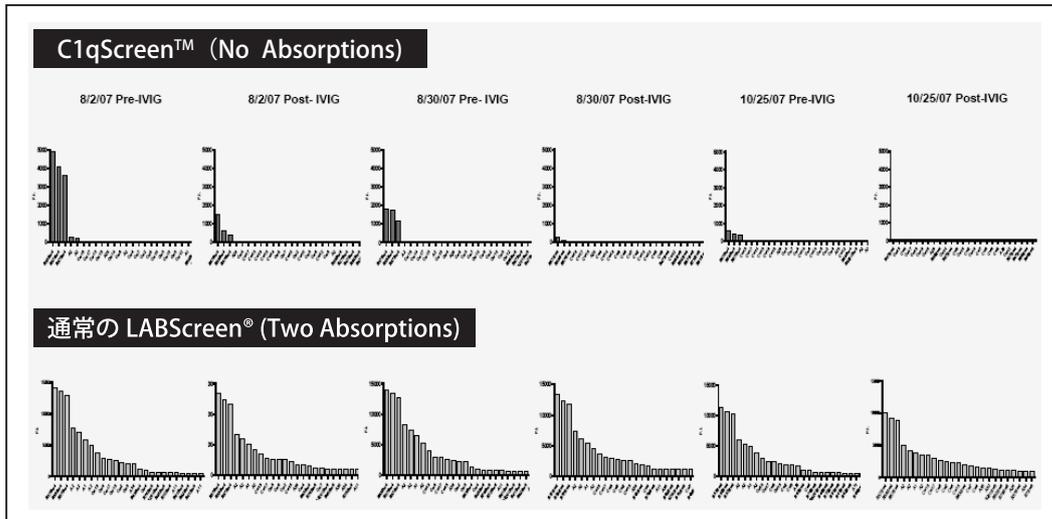
C1qScreen™

C1qScreen™ は、補体の第一成分の一つである C1q を認識する PE 標識抗体を、お手持ちの LABScreen® ビーズと使用することで、血清中の補体結合性 HLA 抗体を特異的に検出するキットです。通常の LABScreen® で得られたデータとの比較解析から、検出された HLA 抗体が補体結合性を有するかを知ることができます。

>> 原理



>> C1qScreen™ と通常の LABScreen® とのデータ比較例



免疫グロブリン療法中の患者血清を使用して、免疫グロブリン剤によるバックグラウンドの影響が低減した例です。
(One Lambda、Product News 2010 Spring より)

商品コード	商品名	梱包単位
PEC1Q	C1qScreen™	25 tests
LS1A04	LABScreen® Single Antigen Class I	25 tests
LS2A01	LABScreen® Single Antigen Class II	25 tests

日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL.03-3593-3211 (代) FAX.03-3593-3216
E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>