

ワークショップ2

抗体同定検査への新しいアプローチ

宮崎 孔(日本赤十字社北海道ブロック血液センター)

【はじめに】

血液型検査においては、近年の遺伝子検査の発展は目覚ましく、ABO, Rh以外についても検査可能になっている。一方、輸血検査で最も重要な血清学的検査では、カラム法やPEGによる不規則抗体検査の高感度化や簡易化はなされてきたが、新たな抗体同定技術は生まれていない。また、現行の不規則抗体の同定はパネル血球に依存しているため、高頻度あるいは低頻度抗原に対する抗体などパネル血球の入手が困難な場合は血液センターであっても苦慮する。

ICFA (immunocomplex capture fluorescence analysis) は、特異性の高いHPA抗体検査法である MAIPA (monoclonal antibody immobilized platelet antigen) 法を Luminex 用に改良した検査法である¹⁾。ICFA 法は、免疫沈降法と同様に抗原抗体複合物の抗原を特異的なマウスモノクローナル抗体 (MoAb) で検出するため、抗原陽性細胞があれば抗体と反応する抗原分子を特定できる。我々は ICFA 法を不規則抗体検査に応用したので、その有用性について報告する。

【方 法】

抗原分子が同定されている血液型抗原のうち、タンパク抗原であり、対応するマウス MoAb が入手可能である 30 種類を解析対象とした (図 1)。Luminex 社の標準プロトコールに準じて、血液型抗原分子に対する 204 種類のマウス MoAb を直接、あるいは抗マウス IgG/M を介して Luminex ビーズに結合した。

ICFA 法は以下の手順で実施した。不規則抗体とパネル血球を反応させ、洗浄後、PE 標識抗ヒト IgG を含む可溶化バッファーで赤血球を溶血させた。高速遠心後、抗原抗体複合物を含む上清をマウス MoAb 結合ビーズ Mix と反応させ、洗浄後、Luminex 装置で各ビーズの蛍光強度を測定した (図 2)。

【結果および考察】

ICFA 法により MNS (M, S, St^a, Hut, Hil, Vw, Td), LU (Lu^a, Lu^b), KEL (K, k, Kp^a, Kp^b, Js^a, Js^b, K14), FY (Fy^a, Fy^b), DI (Di^a, Di^b), LW, GE (Ge2, Ls^a), CROM (IFC, Dr^a,

血液型システム	MoAb 種	血液型システム	MoAb 種	血液型システム	MoAb 種
<u>002 MNS</u>	59	017 CH/RG	6	034 VEL	0
004 RH	5	019 Kx	1	035 CD59	0
<u>005 LU</u>	4	<u>020 GE</u>	8	036 AUG	1
<u>006 KEL</u>	22	<u>021 CROM</u>	15	<u>HLA class-I</u>	2
<u>008 FY</u>	8	<u>022 KN</u>	6	Unknown	14
009 JK	1	023 IN	5		
<u>010 DI</u>	9	<u>024 OK</u>	3	Total	204
<u>011 YT</u>	1	025 RAPH	2		
012 XG/CD99	4	<u>026 JMH</u>	4		
013 SC	1	029 GIL	0	主要な糖タンパク抗原分子 30	
014 DO	1	030 RHAG	0	種を標的とする (糖脂質抗原	
015 CO	2	<u>032 JR</u>	6	は除外)	
<u>016 LW</u>	11	033 LAN	3		

図 1 使用したマウスモノクローナル抗体種

CROZ), KN (Yk^a), Ok^a, JMH, Jr^a, Bgに対する不規則抗体が、それぞれ対応するマウスMoAbビーズで特異的に検出された。測定対象の30種類の血液型抗原のうち15種類の抗原に対する不規則抗体が検出できた(図1の下線の抗原)。

ICFA法による抗LWの検出例では、LW抗原分子であるICAM-4に対するマウスMoAbを結合したビーズにのみ反応が認められ、他の不規則抗体

を検出するビーズの反応はすべて陰性であつた(図3)。

当センターで依頼検査として不規則抗体検査を実施した患者血清409例のうち、同定不能の抗体を含む20例についてICFA法による解析を実施した。いずれも一部の同定用パネル赤血球とのみ反応し、低頻度抗原に対する抗体が疑われていた。ICFA法により検出された不規則抗体は、抗Knops

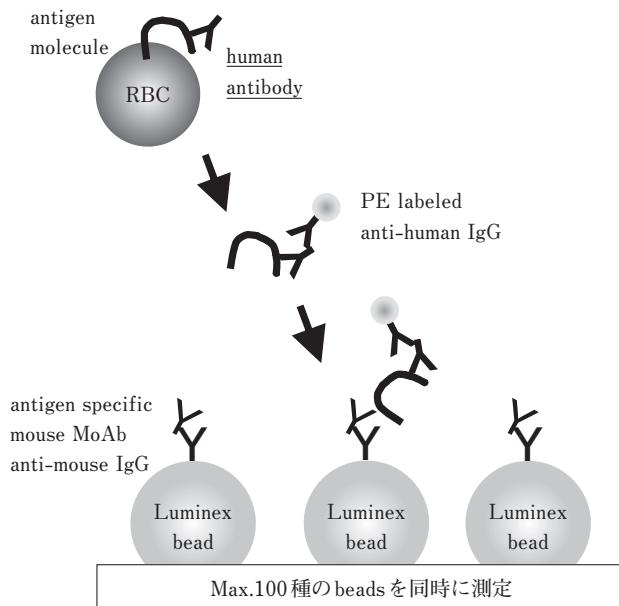


図2 ICFA法の原理

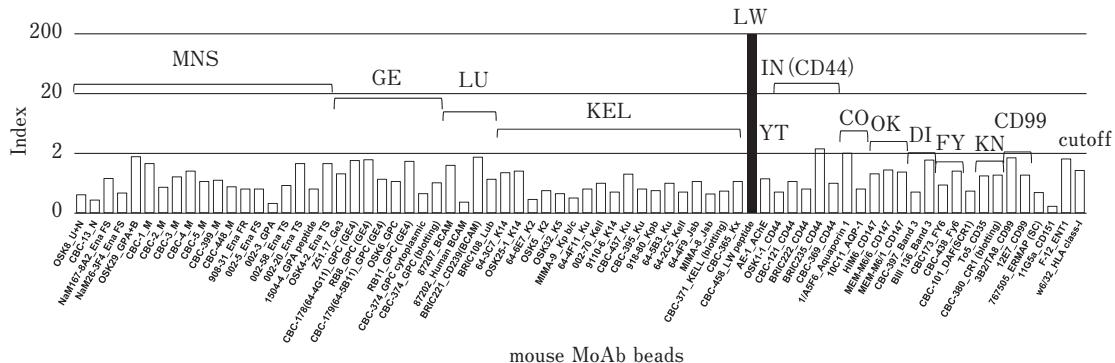


図3 ICFA法による抗体検出例(抗LW)

5例、抗Knops+HLA(Bg) 2例、抗HLA(Bg) 2例、抗LW 2例、抗LU 1例、陰性8例であった(図4)。

Knops血液型に関する不規則抗体を保有する6例を用いて、Knops血液型のYk^a抗原に対する特異性をKnops抗原分子であるCR1(CD35)に対するマウスMoAb(To5, CBC-380)を結合したビーズで検出した。Yk(a+)パネル赤血球では6例の抗体はすべてTo5、あるいはCBC-380ビーズと反応したが、Yk(a-)パネル赤血球ではいずれも陰性であったため、6例すべて抗Yk^a抗体であることが確

認された。また、抗Jr^a抗体を含む1例ではJR抗原分子であるABCG2に対するマウスMoAb(BXP-34, BXP-21)を結合したビーズで抗Jr^a抗体を検出できた(図5)。

未同定の血液型抗原であるSUMI²⁾を解析するため、抗SUMI感作血球をICFA法で検査すると、MNS血液型を担うGlycophorin Aに対するマウスMoAbビーズと強い反応を示した(図6)。SUMI陽性例のGlycophorin Aのアミノ酸配列を確認するとp.Thr31Proのアミノ酸置換が認められ、

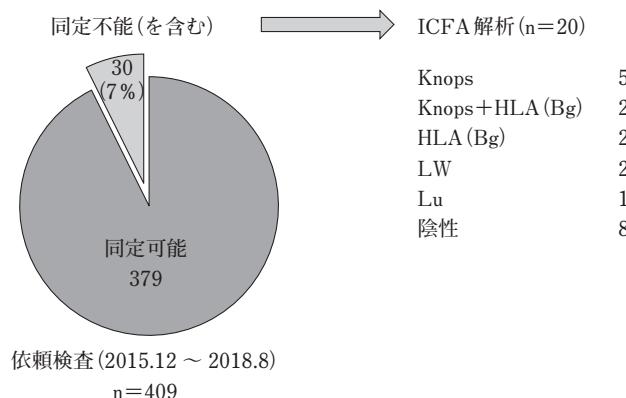


図4 同定不能となった不規則抗体のICFA解析

Yk(a+) RBC	CD35	CD35	ABCG2	ABCG2
	(KN)	(KN)	(JR)	(JR)
	To5	CBC-380	BXP-34	BXP-21
anti-Knops #1	+	+	-	-
anti-Knops #2	+	+	-	-
anti-Knops #3	+	+	-	-
anti-Knops #5	+	+	-	-
anti-Knops #4	+	-	-	-
anti-Jr ^a #1	+	-	+	+
Yk(a-) RBC	CD35	CD35	ABCG2	ABCG2
	(KN)	(KN)	(JR)	(JR)
	To5	CBC-380	BXP-34	BXP-21
anti-Knops #1	-	-	-	-
anti-Knops #2	-	-	-	-
anti-Knops #3	-	-	-	-
anti-Knops #5	-	-	-	-
anti-Knops #4	-	-	-	-
anti-Jr ^a #1	-	-	+	+

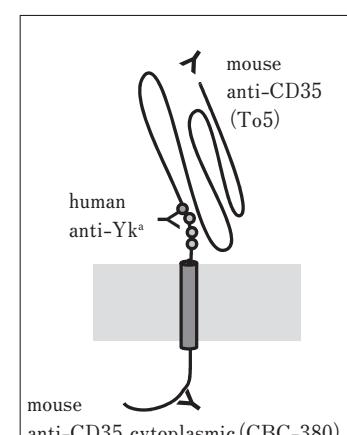


図5 ICFAによる抗Yk^a(Knops)の検出

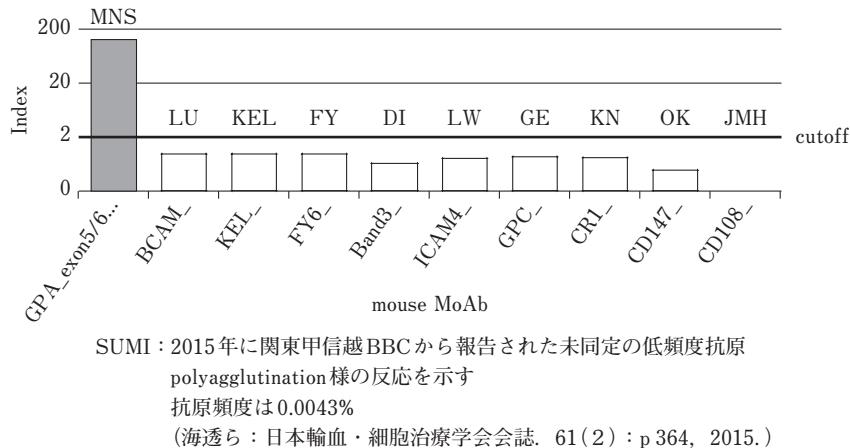


図6 未同定の血液型抗原SUMIの解析

SUMIがMNS血液型に属する新たな低頻度抗原であることが明らかとなった³⁾。

現在のICFA試薬は抗マウスIgG/Mを介してMoAbを結合したビーズを主に使用しているため、ビーズMixの状態で保存すると経時に各MoAbがビーズから解離して異なるビーズに再結合する現象が認められる。そのため、使用直前にビーズを混合しており、調整に1時間以上かかるのが欠点である。MoAbの解離を防止するためにすべてのマウスMoAbを精製して直接ビーズに結合できれば、ビーズMixでの保存が可能となり、ICFA法の操作性が格段に向かうことが期待される。

【結論】

ICFA法では不規則抗体が認識する血液型抗原を特定できるため、陰性パネルがなくても高頻度抗原に対する抗体や同定不能抗体の解析が可能となる有用な検査法である。

また、同定に使用する検体量は従来の血清学検査の1/10以下であり、異なる血液型に対する抗体混在例では個別に抗体検出が可能である。

ただし、一部の血液型に対する不規則抗体はいまだICFA法で検出できていないため、ICFA法に適したマウスMoAbの選択は今後の重要な課題である。

参考文献

- 1) Fujiwara K, Shimano K, Tanaka H, et al.: Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. Vox Sang, 96: 244-251, 2009.
- 2) 海透紗弥佳, 鈴木由美, 川端美香, 他: 新たな遺

伝性polyagglutination—低頻度抗原SUMIの血清学的性状—. 日本輸血・細胞治療学会会誌, 61 : p364, 2015.

- 3) 伊藤正一, 海透紗弥佳, 宮崎孔, 他: MNS血液型の新たな低頻度抗原SUMI. 日本輸血・細胞治療学会会誌, 64 : p303, 2018.