

VI. FLOW CYTOMETRY

B. FLOW CYTOMETRY XROSSMATCH AND ANTIGODY DETECTION

2. 1 抗原コーティングビーズを用いた

フローサイトメトリーによる抗体検出

目的

抗体検出とその特異性の同定は常に HLA 検査室の主要な業務として位置づけられてきた。輸血、出産、移植といった感作歴を有する患者は抗 HLA 抗体を産生するリスクを負っている。それ故患者が臓器移植（再移植）を受ける前に HLA 検査室が抗体の検出や同定を行うことは重要な業務である。

過去数年の間にクロスマッチ検査感度のレベルはフローサイトメトリーの利用により飛躍的に高まっている。しかしながら抗体スクリーニングの分野では、方法が補体依存性細胞障害（CDC）検査しかないため抗体検出感度は依然として低いままであった。しかも HLA 検査室は CDC による PRA 検査で PRA0% の患者がドナー候補との最終的なクロスマッチ検査で CDC クロスマッチ陰性、Flow 陽性という結果に直面する機会が増加している。この現象は、クロスマッチ検査を行う際には HLA 抗体スクリーニング検査も同程度の感度を担保することが重要であることを示唆している。

この要望に応えるために HLA 検査室はフローサイトメトリーを用いた抗体スクリーニング法を模索していた。ある方法は複数の既知のドナー細胞を用いて flowPRA パネルを作成しようとするもので、実際には CDC アッセイの概念をただフローサイトメトリーによる同定方法に拡張しようとしたに過ぎなかった。効果的ではあったが、パネル細胞を維持するためには相当の時間を要し、設定と解析には多大な労力を必要とした。新たな方法として近年移植の分野で利用可能となったのは特異的 HLA 抗体の存在を同定できる抗原を表面にコーティングしたラテックスビーズ法である。抗原コーティングビーズ技術が免疫学的手法として認知されるまでに多くの時間を要したが、ついに HLA に新たな地平を開くことになった。

HLA ビーズアッセイは精製 HLA 抗原をコーティングしたマイクロ微粒子（直径 2～4 μ m）を用いる。個々のビーズには単一のセルラインから抽出された抗

原がコートされ、30 種類のビーズが混合され一つのプールとなっている。このプールには最も一般的な HLA 抗原同様きわめて稀なタイプの抗原も含まれている。広範な抗原をカバーしようという一方で、母集団を代表するような抗原頻度にも配慮している。ビーズにはクラス I、クラス II 抗原のいずれかがコートされており、いずれの抗体も同様に同定できるようになっている。ビーズを用いた抗体スクリーニング法は陽性か陰性を判定するだけでなく、陽性率を算出することも可能となっている。しかしながら、特異性の同定には更なる検査が必要とされる。

フローサイトメトリー法によるスクリーニングは CDC アッセイよりも明らかに優れており、同様に抗体同定にビーズを用いることはパネル細胞を用いるより有用である。フローサイトメトリーは標準的な CDC アッセイよりも感度が高く、補体依存性テストでは見逃される補体非結合性抗体の同定も可能である。方法そのものの優位性に加えてフロービーズには精製された抗原がコートされている。それ故、パネル細胞を用いたときに問題となる非 HLA 抗体による非特異反応も除外できる。フロービーズアッセイはクラス I、クラス II 抗体を同時に同定できるし、患者検体も少量ですむ。

フロービーズスクリーニングはまずビーズと被験血清をインキュベートする。被験血清中にいずれかの抗体が存在すれば短いインキュベーション時間の間にビーズと結合し、それ以外の血清成分は複数回の洗浄により除去される。FITC 標識抗ヒトヒツジ抗体を加えることにより HLA 抗体の存在が同定される。二次抗体の種類によって IgG 抗体か IgM 抗体を同定することが可能である。余分な二次抗体を洗浄により除去した後で、検体はフローサイトメーターに取り込まれ、結果は陰性コントロールの蛍光値のシフトと比較した上で陰性と判定されるか、陽性の場合には陽性率が算出される。

検体

患者血清（新鮮あるいは凍結）25 μ l（テスト毎に）。

検体は反応を阻害するような凝固成分や巨大な免疫複合物を除くために事前に高速遠心しておくのが望ましい。

試薬類

試薬

One Lambda Class I and/or Class II Flow PRA beads (cat.#FL12-60)

One Lambda flow bead wash buffer (working solution)

(cat.#FL12-60キットに同梱)

wash bufferは10倍に希釈して使用 (常温)

FITC conjugated goat, anti-human IgG [F(ab)'₂ Fc specific]

(cat.#FL12-60キットに同梱)

あるいはFITC conjugated goat anti-human IgM [F(ab)'₂ Fc specific]

陰性コントロール血清

陽性コントロール血清

発売元: One Lambda, Inc. (818)702-0042

消耗品

チューブ法 (少量検体用)

Gel loading pipette tips

6x50 mm glass tubes (Fisher cat.#1496210M)

Gilson Pipetteman あるいは同種の可変用量 pipette (可変量 1-20 µl)

1-250 µl pipette tips (Robbins cat.#1017-01-1)

トレイ法 (大量検体用)

96 well U-bottom tissue culture tray (Costar cat.#3799)

Eppendorf multichannel pipettor Reagent reservoir (Costar cat.#4870)

Eppendorf pipette tips (cat.#22-35-137-1)

共用品

Polyethylene Micro ultra centrifuge tubes (Robbins cat.#1013-00-0)

Eppendorf repeating pipette Eppendorf Combitips plus 5 ml

(cat.#22-26-640-3)

Eppendorf Combitips plus 0.5 ml (cat.#22-49-604-2)

機器/器具

Fisher卓上遠心器

真空吸引器

FACScanとMACコンピュータ(Becton Dickinson (800)448-2347)

あるいは他のフローサイトメータ(Coulter Epics XL, B-D FACScalibur, 等)

とデータ処理コンピュータ

真空遠心器

Beckman 卓上遠心器

タイマー

ボルテックス・ミキサー

室温孵卵器

キャリブレーション

FACScan は毎日 Becton-Dickinson calbrite beads

(Becton-Dickinson cat# 340486)を用いて File-Comp を行うこと。

他のフローサイトメータも各々の使用手順に従って較正を行うこと。

検査手順

設定

1. 被験血清を解凍しよく混和する。
マイクロ遠沈管に区別できるように番号を振り 100 μ l の血清を分注。
遠沈管を真空遠心器で 28PSI、10 分間遠心。
2. 6×50mm ガラスチューブに番号を書く。
1 番=NHS：正常ヒト血清（陰性コントロール 1）
2 番=NHS：プールヒト血清（陰性コントロール 2）
3 番=NHS：プール陽性コントロール
4 番以降：患者検体

あるいは

- 96 ウェルトレイに番号を振る。
ウェル A1=NHS：正常ヒト血清（陰性コントロール 1）
ウェル A2=NHS：プールヒト血清（陰性コントロール 2）
ウェル A3=NHS：プール陽性コントロール
ウェル A4 以降：患者検体
3. ビーズが完全に懸濁するまでボルテックス・ミキサーでよく混ぜる。
4. Eppendorf 連続ピペットを使って各チューブ/ウェルに ClassI 及び/あるいは ClassII ビーズ試薬 5 μ l を分注する。
注意：Gilson あるいは同種の連続ピペットを用いても良い。また、
ClassI と ClassII ビーズをあらかじめ混ぜ合わせて、その試薬 10 μ l を各チューブ/ウェルに分注してもよい。
5. Gilson ピペットを用いてコントロール血清あるいは患者血清を分注。
6. 各チューブ/（シールした）トレイをボルテックスし、室温・暗所で 30 分間インキュベーション。
7. サンプルの洗浄

ガラスチューブ（2回）

- a. 400 μ l の One Lambda flow beads wash buffer を加えボルテックス。
- b. 6,000rpm 1 分間 Fisher 卓上遠心器で遠心。
- c. きれいに上清を除去（ビーズを吸ってしまわないように注意）。
- d. 上記操作を繰り返す。

96 ウェルトレイ（3回）

- a. 75 μ l の One Lambda flow beads wash buffer を各ウェルに加える。
Eppendorf 連続ピペットにマルチチャンネルアダプターを装着して使用。

- b. トレイをボルテックスしてビーズをよく混和する（ウェル間で buffer がはねるのを防ぐためトレイをシールでカバーする）。

- c. さらに 75 μ l の buffer を各ウェルに加える。

注意： buffer がはねる危険があるのでここではボルテックスしない。

- d. 再度カバーをして Beckman 卓上遠心器で 900G 3 分間ブレーキオンで遠心。

- e. トレイを卓上遠心器から取り出し、“flick” で上清を除去する。

flick：シールを外し、トレイを上向きから下向きに手首のスナップをきかせてひねり上清を除去する。トレイを下向きにしたままで広げたペーパータオルの上に置きウェルに残った水分を取り除く。

- f. 再度カバーしビーズのペレットを崩すためにゆっくりボルテックス。

8. 抗ヒト FITC 標識抗体（IgG か IgM）20 μ l を各ウェルに分注。
9. トレイをボルテックスして室温・暗所で 30 分間インキュベーション。
10. 再度 One Lambda flow beads wash buffer を加えボルテックス。

チューブ：200 μ l

トレイ：75 μ l 加えボルテックスして再度 75 μ l。

11. マルチチャンネルピペッターを使って検体をウェルから 6x50 mm ガラスチューブに移す。

注意：サンプルは直ちにに取り込むか 1 %パラホルムアルデヒド溶液で固定 4℃に保管し 24 時間以内に取り込むこと。固定には flow beads wash buffer と 1 %パラホルムアルデヒドを等量混合して用いる。

12. 検体をフローサイトメータに取り込む準備はこれで完了。操作方法は個々の機器によって異なるが、基本的原理は同じである

注意：以下は BD FACScan と Macintosh/CELLQuest のための一般的な操作方法である。他の機器を使用する場合でも同様であるが、実際に患者検体を取り込む前に準備・設定は終わっていないといけない。

FACScan ACQUISITION と解析

13. フローサイトメータを起動し、通常のメンテナンスとキャリブレーションを実施する。
14. CELLQuest を立ち上げる。
15. フロービーズ取り込み画面や必要に応じたセットアップ画面を開く。

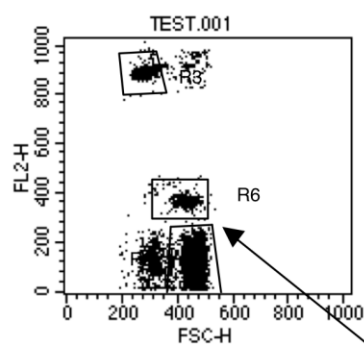
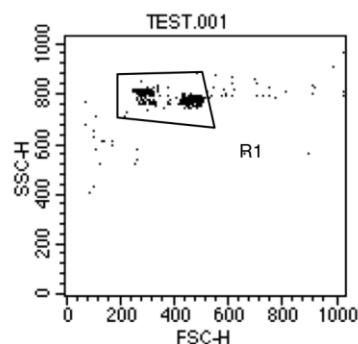
NHS negative control

CLASS I: _____

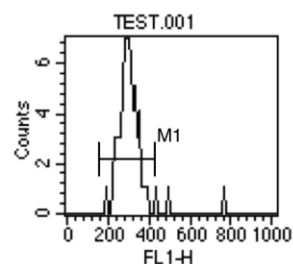
CLASS II: _____

TECH _____

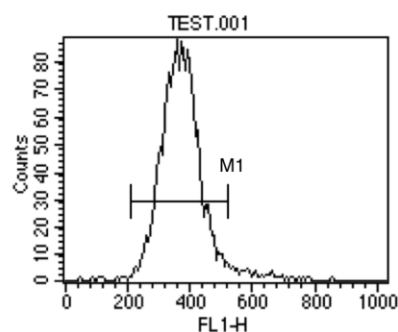
DIRECTOR _____



NSA CONTROL BEADS



CLASS I



Histogram Statistics

File: TEST.001

Sample ID: CLASS I / II LOT#

Acquisition Date: 30-May-00

Gated Events: 9850

X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Channel Values

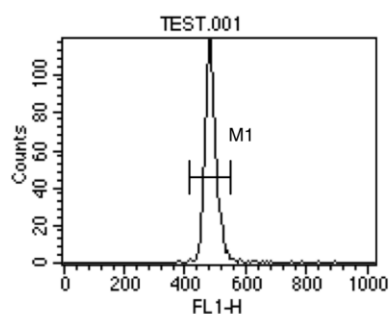
Patient ID: CONTROL BDS LOT # :

Gate: G4

Total Events: 15882

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Median	Peak Ch
All	0, 1023	9850	100.00	62.02	364.00	353
M1	211, 521	9680	98.27	60.95	363.00	353

CLASS II



Histogram Statistics

File: TEST.001

Sample ID: CLASS I / II LOT#

Acquisition Date: 30-May-00

Gated Events: 3954

X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Channel Values

Patient ID: CONTROL BDS LOT # :

Gate: G5

Total Events: 15882

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Median	Peak Ch
All	0, 1023	3954	100.00	24.90	476.00	470
M1	416, 552	3917	99.06	24.66	476.00	470

図 1. 取込及び解析画面

16. ビーズのサイズが小さいので画面上に表示させるためには、Instrument setting を最適なものにする必要がある。

FSC detector voltage を E00 から E01 に変更する。

SSC detector mode を LIN から LOG に変更する。

SSC detector voltage を 250 あるいは FSC/SSC dot plot 上にビーズが

表示されるようになるまで下げる。

R1 ゲート内 Event 数を 15,000 に設定する。

Channel value を LOG に設定する。

17. データを格納するフォルダーを作り名前をつける。
18. セットアップ画面を切り替え、陰性コントロールチューブをセットし、ビーズを取り込む。正しい設定になっているかどうかは、FSC/SSC と FSC/FL2 の dot plot 画面で gate 内に ClassI、ClassII ビーズが収まっているかで確認する (Fig.1)。陰性コントロールが setup データ上で正しく設定されていれば、gate を再度動かす必要はない。setting データを Comp file に保存してから、陰性コントロールを取り込む。

R1 ClassI (右側の集団) と ClassII (左側の集団) 双方を含む領域

R2 ClassI のみを含む領域

R3 ClassII のみを含む領域

19. 陰性コントロールを取り込んだら ClassI、ClassII のヒストグラムに陰性マーカーを設定する。一度設定したらマーカーを動かさずに検体の取り込みを行う。
20. dot plot、histogram、統計データおよび患者情報を含む報告書を印刷する (Fig.1)。
21. 以上の方法で各検体を取り込み、解析の際には陰性コントロール上に設定した M1 region を変更しない。取り込み終了後、M1 region の他に患者の陽性ビーズ部分に新たな region (M2) を設定する。「結果」の陽性ビーズ集団についての記述を参照のこと
22. コントロール同様患者毎の報告書を印刷する。

結果

flow beads screening assay では %PRA は患者毎に算出される。陰性コントロールと比較してピークがシフトしているということは、抗体が結合しそれが標識抗体によって同定されたことを示唆している。この試薬は各々異なる HLA 抗原がコーティングされたビーズがプールされているため、あるビーズは陰性でも他のビーズが右にシフトしたとすればそれは陽性である。 %PRA は ClassI および ClassII の histogram で陽性領域 (M2 marker 内) に gate されたビーズのパーセンテージによって決定される。このパーセントはヒストグラムの統計データとして最終報告書に印刷される。理論上はこのフロースクリーニング

結果の解析と解釈は単純であるべきである。抗体がビーズに結合しそのアロ抗体を FITC で標識し、結果としてフローサイトメトリー上でビーズのピークがシフトする。ただ様々な要因が絡むため理論と異なり実際の結果は曖昧なものとならざるを得ない。ある患者は陰性ビーズと陽性ビーズがはっきりと区別される。一方、別の患者はわずかにシフトするのみで実際には陰性ビーズの集団と区別が付かない。さらに事態を混乱させるのは、抗体陰性にもかかわらずカットオフラインの右側にヒストグラムがシフトする患者の存在である。はっきりと陰性、陽性の区別が付かないような患者の場合には、その結果の解釈には経験が必要である。以下に flow beads スクリーニングにおいて読者の参考になるような事例を紹介する。

1 例目は陰性症例である（図 2）。この患者のヒストグラムは単一ピークで陰性コントロールと形状も似ており M1 marker 内に概ね収まっている。時折単一ピークが陰性コントロールよりも左や右にずれる場合があるが、やはり陰性と解釈すべきである。この原因は患者検体中のタンパク濃度が陰性コントロールよりも高いか低いことによると考えられる。鍵は陰性コントロールのヒストグラムと同様に単一ピークのままでシフトすることである。

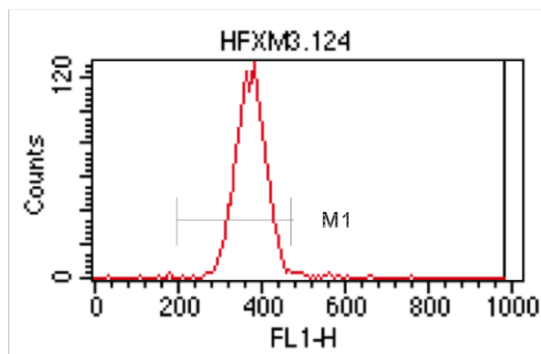


図 2. PRA0%の患者サンプル

ヒストグラムのピークは多峰性を示しているが二番目のピークは陰性 M1 marker 内に収まっており、陰性ビーズ集団と一体化している例である（図 3）。このような検体を解析するにはまず陽性と陰性の境界を、特にピークの尾根の部分に探すことである、そしてそれに合わせてカットオフラインを設定する。重要なのはこのような患者の場合、タンパク濃度が高いためにバックグラウンドも高くそのため陰性集団のピークが陰性 M1 marker の外側にシフトする傾向があり、カットオフラインの設定には留意する必要がある（図 4）。このタイプの患者の場合、陰性集団のピークの区別が付くようになれば、解析方法は

上記（図3）と同様である。

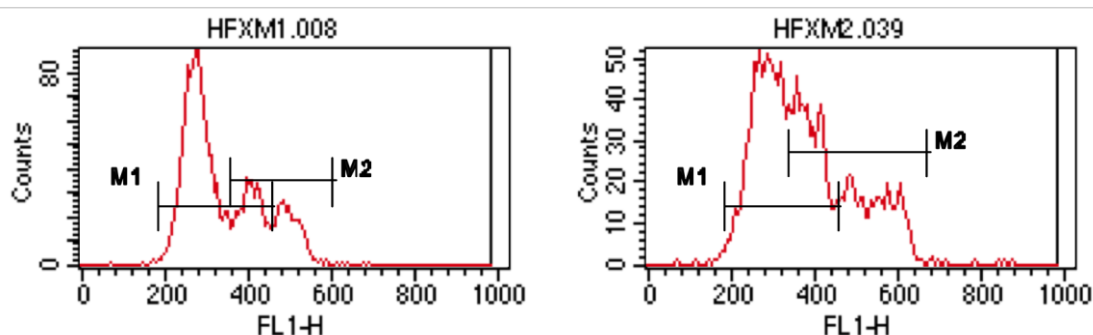


図3．左のヒストグラムはビーズの大多数は陰性で（第1ピーク）一部が右にシフトしている（第2、第3ピーク）。たとえ第2ピークが陰性 M1 marker 内に収まっていたとしても第1ピークとは明らかに別れており陽性と考えるべきである。右のヒストグラムは陽性 marker（M2）が陰性ビーズ集団と一部重なっている。

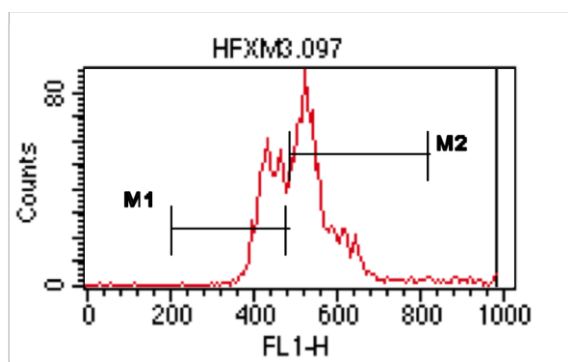


図4．このヒストグラムはバックグラウンドが高い患者の例である。陰性集団のピークが陰性 M1 marker 内の右側にシフトしており M2 内に陽性のピークがある。

最後に、陽性と陰性のピークがはっきりと分かれた例を示す（図5）。このような場合だと陽性、陰性集団が全く重なることがないため、解析するのも% PRA を算出するのも最も容易である。

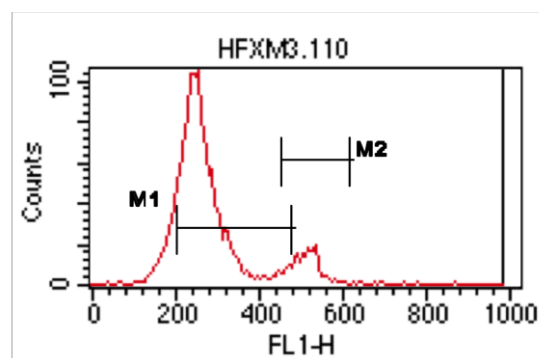


図5．陽性患者のヒストグラム（M2 部分）。陽性集団は完全に陰性集団からシフトしている。

溶血あるいは細菌がコンタミした患者検体を解析する際には注意すべきである（図6）。このような場合、特に血清に凝集塊が生じている場合には不適切な結果を招く場合がある。高度の溶血検体が結果にどのような影響を与えるか不明ではあるが、細菌のコンタミは偽陽性の原因となり得る。検体を再度遠心して再検すべきである。

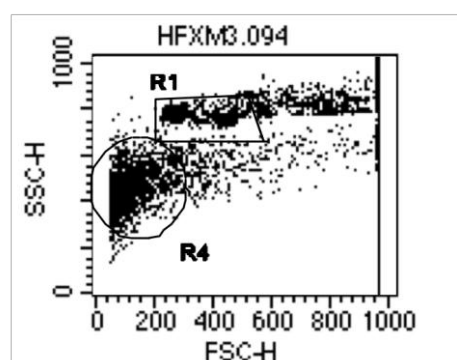


図6．細菌がコンタミした検体のプロット（R4 領域）。

異常検体

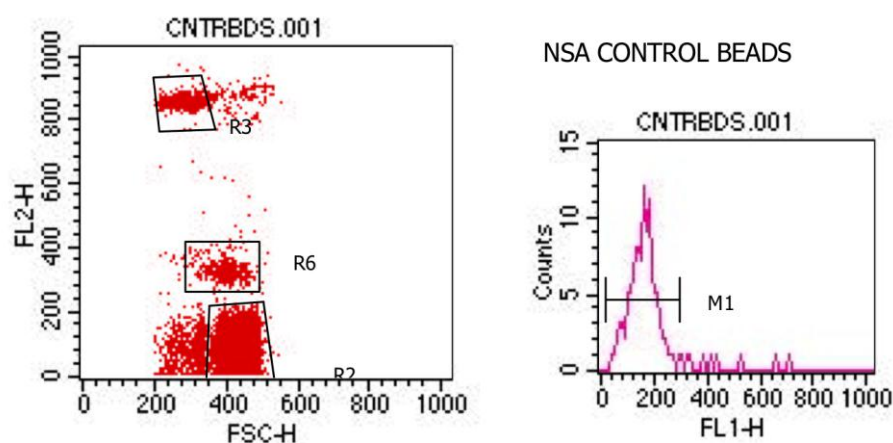
時に、患者検体の中には陰性コントロールの集団よりも右にシフトするものもある。ヒストグラムは単一ピークでありビーズ表面の HLA 抗原と反応した抗体によるものではないと考えられる。こんな場合には、One Lambda 社のコントロールビーズを用いると有用な場合がある。このコントロールビーズは ClassI、ClassII ビーズと同じラテックスビーズで HLA 抗原はコーとされていない。代わりにヒト血清アルブミン（HSA）がコーとされている。コントロールビーズを用いた FlowPRA bead protocol の変法は以下の通りである。

- ClassI/ClassII ビーズをガラスチューブ/ウェルに分注。
- コントロールビーズの入ったチューブをよくボルテックス。
- コントロールビーズ 1 μ l を各チューブ/ウェルに分注。
- 以下、インキュベーション時間、洗浄、FITC 標識抗体の分注等は標準法の手順に従う。
- FACScan 用取り込み・解析画面は図1と同様。ただしコントロールビーズ集団を gate できるように FSC/FL2 dot plot 上に R6 region を付け加える。また、HLA 特異抗体によるものではなくビーズ自体の FITC 蛍光を確認できるように

コントロールビーズ用ヒストグラムを付け加える。

--コントロールビーズのヒストグラムに陰性コントロール用 M1 marker を表示し、これは他の検体の場合も動かさないこと。それ以外の marker は不要。

--患者検体でこのヒストグラムが陰性コントロールより右にシフトしていないか確認すること。



--患者検体でコントロールビーズのピークがシフトしている場合は、FITC 蛍光によるシフトであり、non-HLA 因子の関与が疑われる。結果を評価する時に、陽性でかつシングルピークのままシフトしている場合などはこれらのことも考慮する必要がある。コントロールビーズが non-HLA 因子の関与によってシフトしていても、それ以上に ClassI/ClassII ビーズがシフトしている場合には、HLA 抗原抗体反応の証左であることを覚えておく必要がある。

参考文献

1. Bray RA, Cook DJ, Gebel HM. Flow cytometric detection of HLA alloantibodies using Class I coated microparticles. Human Immunol. 55;36, 1997.
2. Pei R, Wang C, Tarsitani S, et al: Simultaneous HLA Class I and Class II antibody screening with flow cytometry. Human Immunol. 59;313-322, 1998.
3. One Lambda, Inc., Flow PRA Screening Test package insert,. One Lambda, Inc., Canoga Park CA, 1998.
- 4.

