

第6回「今後の輸血・細胞治療検査室のあり方を考える」セミナー

臓器移植におけるリンパ球交叉試験

令和6年5月29日（水）

熊本赤十字病院 検査部 吉田雅弥

第6回「今後の輸血・細胞治療検査室のあり方を考える」セミナー

COI開示

吉田 雅弥

演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。

組織適合性検査（HLA検査）の種類

□ HLAタイピング

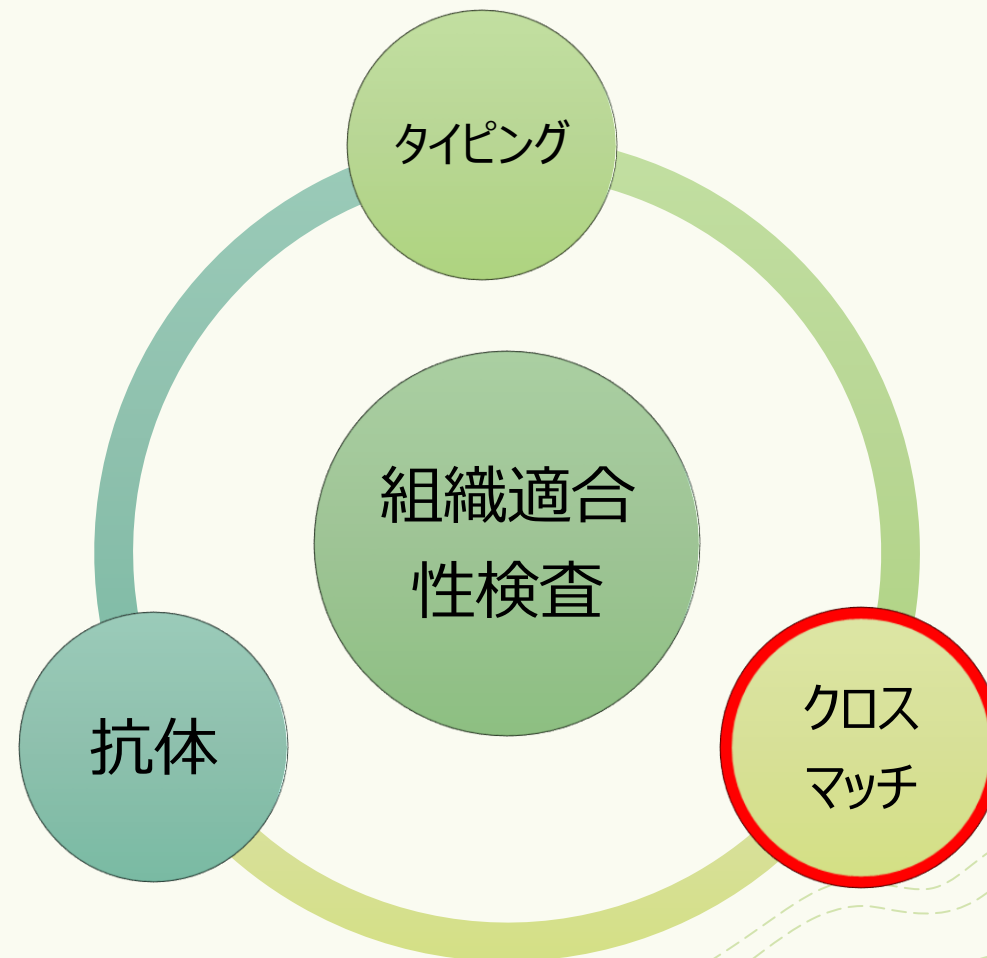
- ✓ PCR-rSSO法が主流
- ✓ 他にPCR-SSP,-SSP,NGSなど

□ 抗HLA抗体検査

- ✓ スクリーニング
- ✓ 特異性同定検査

□ リンパ球交叉試験 = クロスマッチ

- ✓ LCT法（CDC法）
- ✓ FCXM



クロスマッチの目的・意義

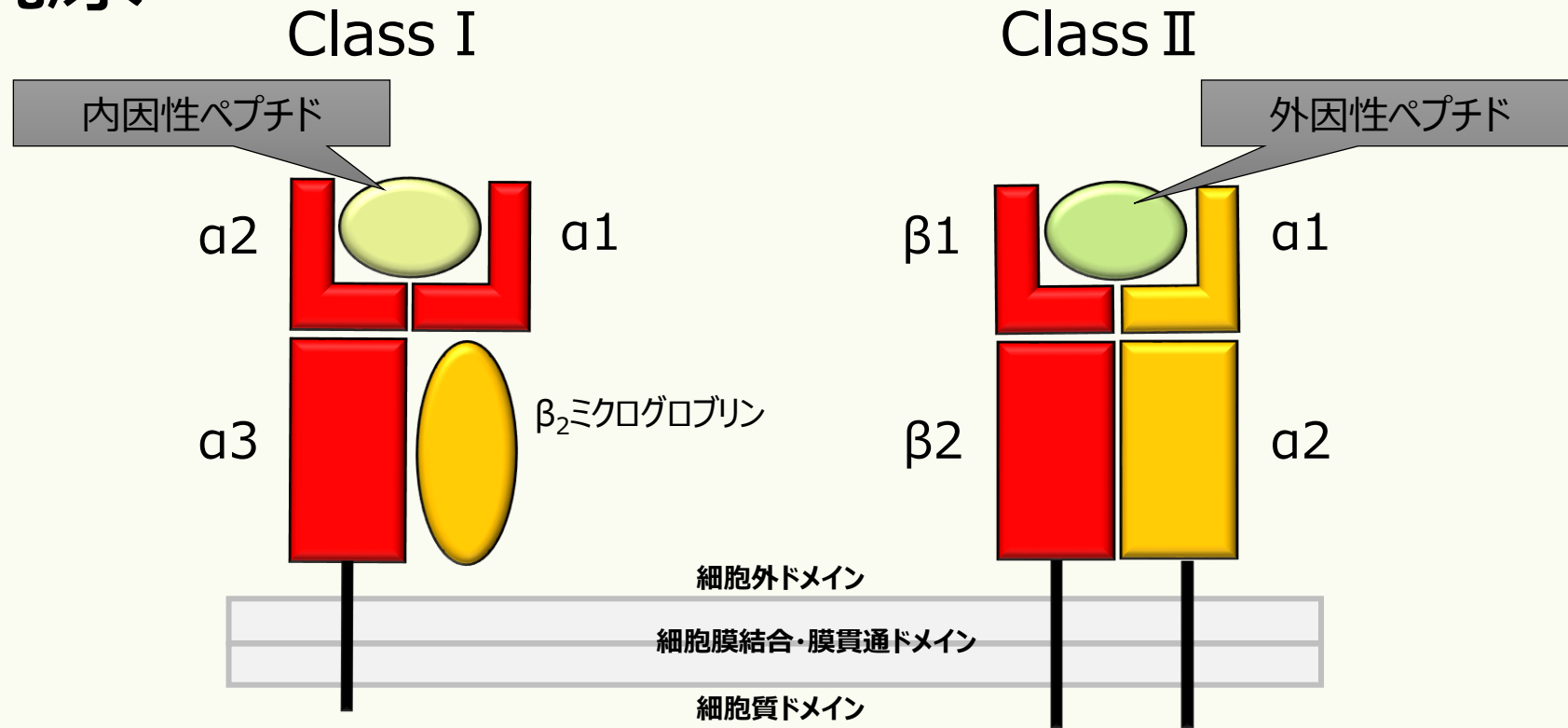
□ Donor臓器（抗原）とRecipientの血清（抗体）を用いて抗原抗体反応の有無を確認し、拒絶反応のリスクを調べる

✓ 臓器を使用することはできないため、血液中のリンパ球で代用する。

※ 供血者の赤血球と患者の血漿(清)を使用するクロスマッチと考え方は同じ

なぜ、リンパ球を使用するのか？

HLA抗原



Class I : 赤血球と角膜を除くほとんどの細胞に発現

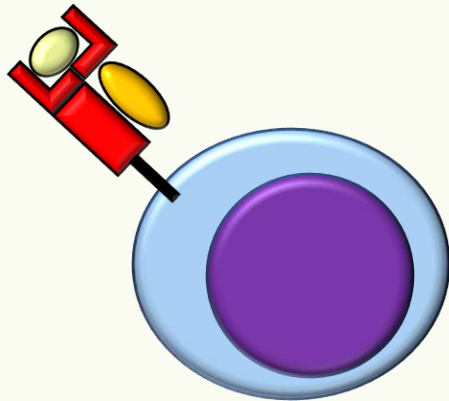
※赤血球膜のBg抗原はHLAクラス I 分子が赤血球に発現したものと
して知られており、Bg^a, Bg^b, Bg^cはHLA-B7, -B17, -A28に対応

Class II : 抗原提示細胞(マクロファージ、単球、B細胞など)に発現

リンパ球

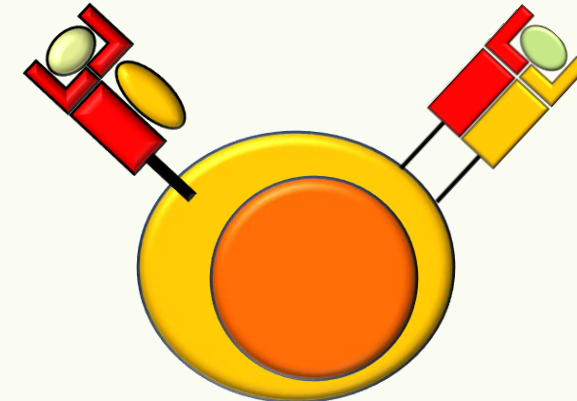
末梢血液中のリンパ球の
約75%がTリンパ球、約25%がBリンパ球

Tリンパ球



□ Class1のみ発現

Bリンパ球



□ Class1及びClass2を発現

※ Class1発現量：Bリンパ球 > Tリンパ球

クロスマッチの結果を解釈する上で重要な知識

クロスマッチの種類

□リンパ球細胞傷害試験 (lymphocyte cytotoxicity test; LCT)

※CDCクロスマッチ(Complement dependent cytotoxicity crossmatch; CDC)とも言われている

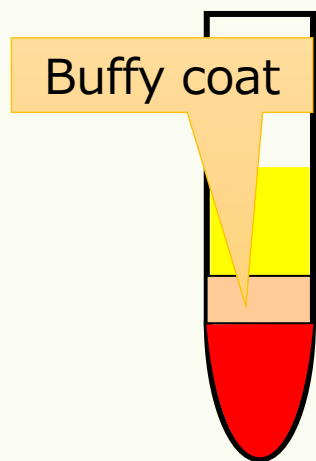
- ✓顕微鏡を用いる (感度低い)
- ✓判定は検査者の主観、熟練度などの影響を受ける

□FCXM (Flow Cytometry Cross match)

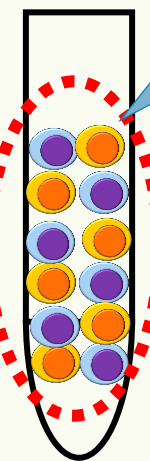
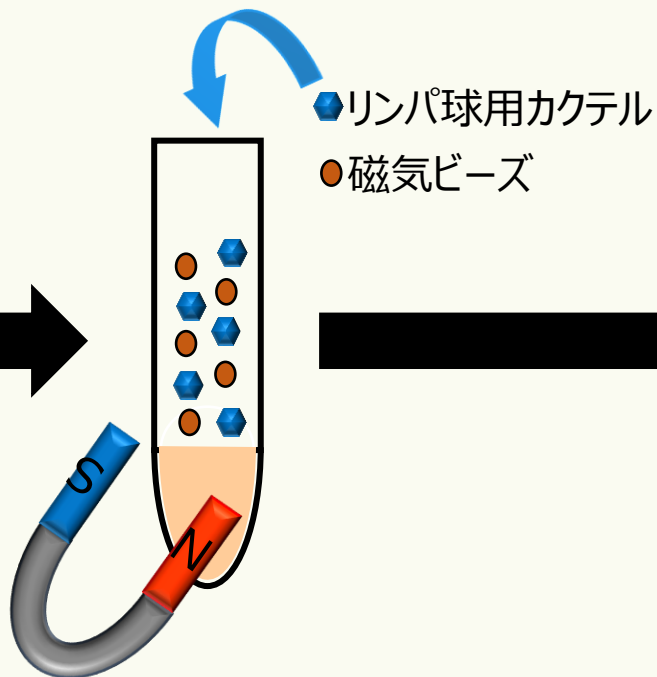
- ✓フローサイトメーターを用いる (感度高い)
- ✓偽陽性もあり、総合的な判定が必要

□ICFA (Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis)

リンパ球分離



Buffy coat
を利用



カクテルの種類でTリンパ球、
Bリンパ球に分けて分離も可能



EasySep Direct



EasySep Direct

□特徴

- ✓処理時間が短い
 - 約1時間で終了（従来試薬：1時間20分程度）
- ✓操作ステップが少ない
 - 遠心分離操作が少なく、試薬添加・静置の繰り返し
- ✓目的細胞（リンパ球）を高純度で回収可能
 - 常に95%以上の純度で回収可能

□注意点

- ✓回収率を上げようとするとう純度が落ちる
- ✓洗浄操作がなく、血漿成分が残る
 - 分離後にPBSで洗浄操作を加えると解決



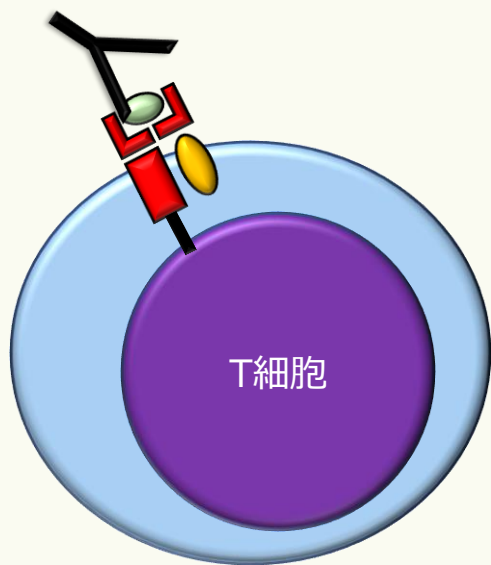
LCT (CDC)

EasySep Direct

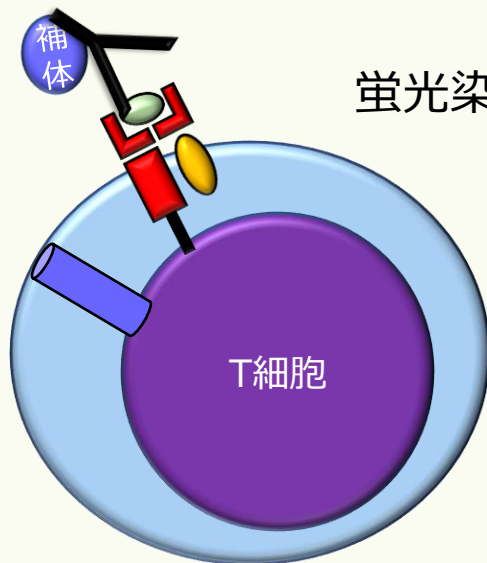
Tリンパ球とBリンパ球に分離して実施

例：Tリンパ球

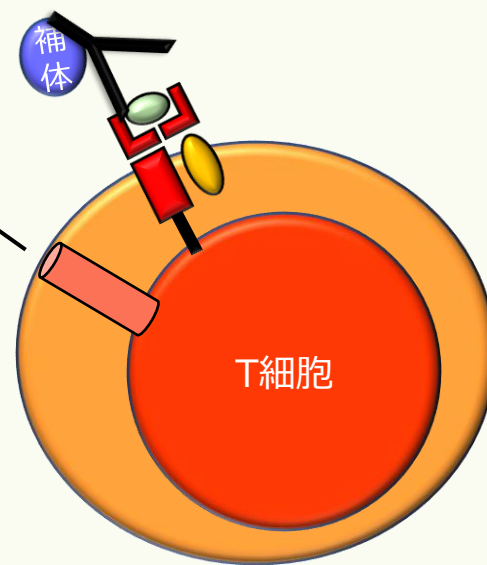
抗HLA抗体



抗原抗体反応
37℃ 60分



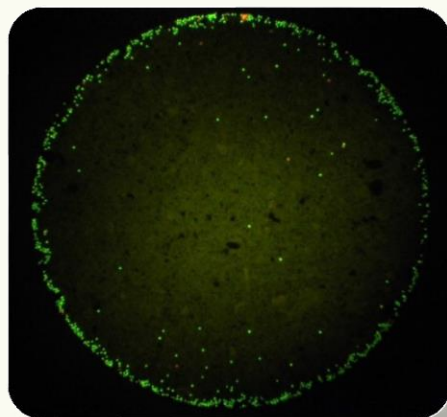
補体活性化
室温 120分



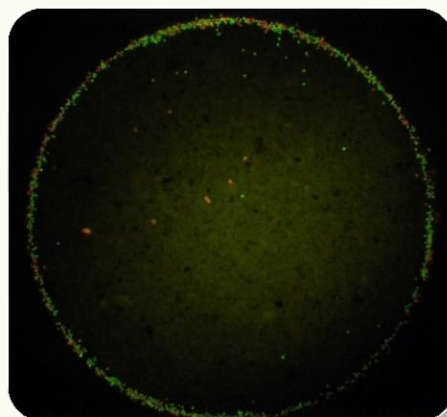
染色

LCT (CDC) の判定

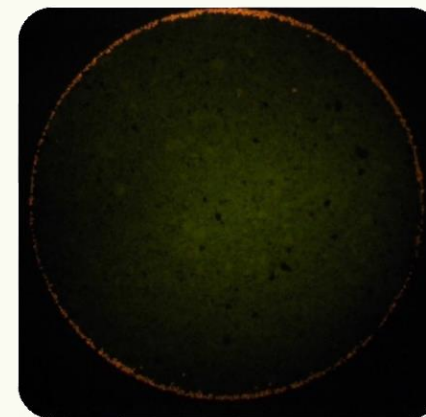
陰性



陽性



強陽性



テラサキプレート

検査者の力量に影響される

感度悪いが、補体結合性抗体を検出



倒立位相差蛍光顕微鏡

LCT (CDC) の判定

Score	死細胞率	判定
1	0-10%	陰性
2	11-20%	弱陽性 (疑陰性)
4	21-50%	陽性
6	51-80%	陽性
8	81-100%	陽性 (強陽性)
0	判定不能	判定不能

陽性

アメリカ組織適合免疫遺伝学会 ASHI Standards for Histocompatibility Testing

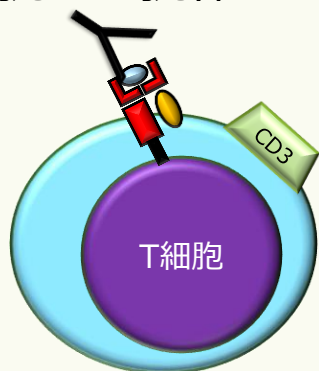
- IgMの影響を受けることがある→血清をDTT処理して再検
- 検出感度の問題で低～中等度力価のDSAは検出できない場合がある (MFI \geq 8,000～10,000ぐらいが陽性になる目安)

FCXM

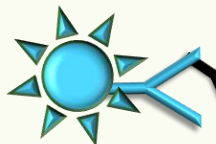
例：2 color

Tリンパ球

抗HLA抗体



FITC-anti human IgG

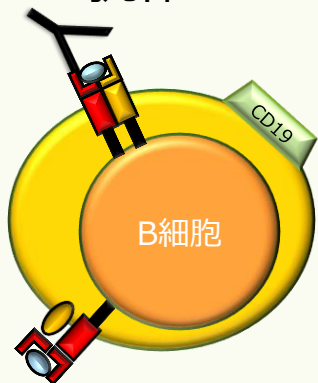


PE-anti CD3



Bリンパ球

抗HLA抗体



FITC-anti human IgG



PE-anti CD19



感度良いが、非特異反応による偽陽性あり

EasySep Direct

2 color

□ Tリンパ球

✓ FITC-anti human IgG

✓ PE-anti CD3

□ Bリンパ球

✓ FITC-anti human IgG

✓ PE-anti CD19

3 color

□ Totalリンパ球

✓ FITC-anti human IgG

✓ PerCP-anti CD3

✓ PE-anti CD19

リツキサン（CD20抗体）の影響を受ける

FCXMの判定

Tリンパ球	Bリンパ球	Class1抗体	Class2抗体	解釈
+	+	○	○	Class I またはClass I + II
-	+	○	○	Class I またはClass II、Class I + II
+	-	△	×	非特異反応の可能性
-	-	×	×	検出感度以下の可能性あり

□判定時の注意点

- ✓ Bリンパ球はClass1及びClass2を発現
※Class1発現量：Bリンパ球>Tリンパ球
- ✓ 非特異反応の可能性を常に考える
- ✓ 低力価の抗HLA抗体は検出できない可能性がある（MFI<1,000~1,500）

Bリンパ球の非特異反応

□非特異反応の原因

- ✓血清中の免疫グロブリン塊や免疫複合体が、B細胞のFcレセプターに結合することで生じる

□非特異反応の軽減策

✓プロナーゼ(pronase)処理

※細胞膜に取り込まれた免疫グロブリン，リンパ球細胞膜のFcレセプター，CD20を除去する蛋白分解酵素。

リツキサンの（CD20抗体）の影響を軽減できる

クロスマッチの解釈（まとめ）

LCTとFCXM

LCT	FCXM	解釈
+	+	<ul style="list-style-type: none"> 補体結合性の抗HLA抗体 高力価の抗HLA抗体
+	-	<ul style="list-style-type: none"> IgMの抗HLA抗体 ※DTT処理後に再検査
-	+	<ul style="list-style-type: none"> 抗HLA抗体、非特異反応 ※抗HLA抗体以外の影響あり
-	-	<ul style="list-style-type: none"> 陰性 ※検出感度以下の可能性あり

FCXM

T細胞	B細胞	解釈
+	+	Class I またはClass I + II ※
-	+	Class I またはClass II、 Class I + II ※
+	-	非特異反応の可能性
-	-	検出感度以下の可能性あり

総合的に判断

- HLAタイピング：4桁で報告（DSAの判断に必要）
- クロスマッチ：LCTとFCXMを総合的に判断（移植可否の判断）
- 抗HLA抗体：DSAの有無、クロスマッチ結果の裏付け（抗体量の把握）

まとめ

- 移植医療は発展途上
- 臓器移植は抗HLA抗体のモニタリングも必要とされている
- 需要は高まることが予想される

- Epitope Analysis
- 補体結合性の確認

- DSAの有無
- MFIによる抗体量の
大まかな推測
- モニタリング



- Alleleレベルのマッチング

- Epitope Matching

- 適合性の判断

- バーチャルクロスマッチ

ありがとうございました。