

令和元年6月13日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08968

研究課題名(和文)フローサイトメトリー解析による赤血球結合IgG定量法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the measurement of autoantibodies against red blood cells by flow cytometry

研究代表者

山城 安啓 (YAMASHIRO, Yasuhiro)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50243671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はクームス試験に代わるフローサイトメーターを用いた赤血球結合IgG測定法を確立した。AIHA(自己免疫性溶血性貧血)の診断にはクームス試験が使用されているが、赤血球結合IgGを定量的に測定することができない。RIA法による赤血球結合IgG測定法があるが放射性同位元素を使用するため日常検査としては不向きである。平均赤血球結合IgG数はMFIDを単位として表した。健常人80検体から基準値を9.72以下とした。クームス陽性および陰性AIHAではMFIDは基準値を超えていた。クームス試験が陰性化した治療中の患者でMFIDが基準値を超えている症例があった。MFIDは治療効果の判定にも有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したクームス試験に代わるフローサイトメトリーによる赤血球結合IgG測定法は日常検査として導入が可能である。また、感度もクームス試験より高く、定量性もあるためAIHAなどの診断、治療効果や予後判定に利用可能である。新規の検査法として広く利用されることを期待する。

研究成果の概要(英文)：Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is a hemolytic disease where autoantibody against self is produced, and it gives rise to in vivo hemolysis. Coombs test is employed for the diagnosis of the AIHA. However, Coombs test can't quantitatively measure the antibody (IgG). A method that measures quantitatively red cell-bound antibody by RIA is useful in that respect. However, it is difficult for the RIA method to be applied to routine analysis. Therefore, we developed a flow cytometric assay. Average red blood cell bound IgG numbers were expressed in units of MFID. MFID of normal individuals (n=80), demonstrates normal distribution, and reference value was set to less than 9.72. Coombs negative and positive AIHA cases were beyond it. Some AIHA samples that became Coombs negative after steroid treatment also displayed positive in the MFID. It is available for estimation of effectiveness of the therapy for AIHA.

研究分野：血液学

キーワード：赤血球結合IgG クームス試験 フローサイトメトリー AIHA MFID

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 自己免疫性溶血性貧血 autoimmune hemolytic anemia(AIHA)

AIHA は赤血球に対する自己抗体により溶血を来たす後天性の溶血性疾患である。溶血性貧血の約 52% が広義の AIHA、約 25% が PNH、約 17% が先天性溶血性貧血で原因不明の溶血性貧血が約 5% 存在する。AIHA は温式 AIHA が最も多く全溶血性貧血の約 47%、冷式抗体による AIHA である寒冷凝集素症が約 4%、発作性寒冷ヘモグロビン尿症が約 1% を占める。

### (2) AIHA の診断

AIHA の診断は溶血性貧血の診断基準を満たすことを確認したのち、Coombs 試験で溶血の原因が免疫反応であるということを確認する。さらに、不適合輸血や新生児溶血性疾患等の同種免疫性溶血性貧血や、薬剤起因性溶血性貧血を除外することにより自己免疫の関与を確認する。

### (3) Coombs 試験の問題点

Coombs 試験には試験管法とカラム法がある。AIHA の診断基準で言われている Coombs 試験は試験管法である。試験管法は簡便だが、赤血球結合 IgG の検出閾値が 200 IgG 分子/RBC と感度が低い。カラム法は赤血球結合 IgG の検出閾値が 100 IgG 分子/RBC と 2 倍の感度があるが、特殊な機器を必要とする。Coombs 試験は AIHA の診断におけるゴールドスタンダードとなっており、貧血と黄疸があり Coombs 試験が陽性の場合、比較的容易に AIHA の診断が可能である。しかし、AIHA の 5~10% は Coombs 試験が陰性を呈する Coombs 陰性 AIHA である。Coombs 陰性 AIHA の診断には、赤血球結合 IgG (RBC-IgG) の定量が有用である。また、AIHA の第一選択剤である副腎皮質ステロイド治療の効果の判定も Coombs 試験が定性法であるため、困難である。

### (4) 赤血球結合 IgG の定量

現在、共同研究者である自治医科大学の亀崎らにより、Radioimmunoassay (RIA) 法による RBC-IgG の定量が行われている。RIA 法では、赤血球 1 個あたりに結合している IgG 分子数を実数で表すことができ、高感度で定量的な RBC-IgG の測定が可能である。健常日本人成人の RBC-IgG は、赤血球 1 個あたり平均  $33 \pm 13$  (SD) 分子で、79 IgG 分子以上であれば AIHA が強く示唆される。しかし、RIA 法は手技が煩雑で特殊な機器や施設を要し、コストがかかることや放射性物質を使用することによる安全性の問題などの理由から、日常検査として導入することは困難である。

したがって、RIA 法に代わる簡便で迅速な赤血球結合 IgG の測定法の開発が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、放射性物質を使わず日常検査として導入可能なフローサイトメトリーによる赤血球結合 IgG の定量法の開発が目的である。

本法は、蛍光色素で標識した抗ヒト IgG 抗体を被検赤血球上に結合した抗赤血球自己抗体と反応させ、反応後の赤血球平均蛍光強度 (Mean fluorescence intensity; MFI) をフローサイトメーターで測定する方法である。RBC-IgG を表す値として MFID (Mean fluorescence intensity difference) を用いて、RBC-IgG の定量的な測定やサブクラス別の測定を簡便かつ安価に行うことである。

まず、測定方法の最適化をはかり、健常者検体による MFID の基準範囲を設定する。次に Coombs 陽性患者検体や Coombs 陰性 AIHA 患者検体を測定することで、設定した基準範囲の妥当性を検証し、AIHA の診断における有用性を確認することを目的とした。

AIHA 患者の治療効果の判定への有用性も確認する。

また、赤血球結合 IgG のサブタイプの関与を解析することで、臨床的にも有用なデータを提供する。

## 3. 研究の方法

### (1) Coombs 試験

使用する検体はフローサイトメトリーを行う日と同日に Coombs 試験を行う。Coombs 試験には試験管法とカラム法があるが、感度の高いカラム法を採用した。カラム法はオーソ バイオピュー クームス カセット(オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社)を使用した。自動機器の購入が困難であったためプレート専用遠心機 PlateSpin1 (KUBOTA) を改良し使用した。判定基準はオーソ バイオピュー クームス カセットの添付文書を参考に目視により凝集強度を 0 (陰性)、1+~4+ の 5 段階で判定した。1+ とは判定できないが、カラム中に非常に細かい凝集塊が認められる場合は ± と判定した。

### (2) フローサイトメトリーによる赤血球結合 IgG 測定

全血から血清を取り除くための洗浄方法を検討した。低親和性 IgG が赤血球から剥がれない洗浄の条件を検索した。洗浄血球に結合した IgG を検出するための蛍光標識抗体の種類や使用濃度を検討した。反応時間、反応温度など最適化を図った。フローサイトメーターも Cytomics FC500 (BECKMAN COULTER) と MACSQuant Analyzer10 (Miltenyi Biotec) を用いて機種の違いを検討した。赤血球は蛍光標識抗体と反応させていない状態でもレーザー光線を反射 (自家蛍光) し蛍光標識抗体と反応後の蛍光強度に影響を及ぼすため、RBC-IgG に結合した蛍光標識抗体の蛍光強度を評価するには、自家蛍光の影響を排除する必要があった。そこで、蛍光標識抗体と反応させた MFI (MFI Ig+) から蛍光標識抗体と反応させない MFI (MFI Ig-) を差し引

いた値 MFI Difference ( MFID ) を RBC-IgG を表す値とした。

$$\begin{aligned} \text{MFID} &= (\text{MFI Ig+}) - (\text{MFI Ig-}) \\ \text{RBC-IgG 量} &= \text{平均 MFID} \\ &= (\text{MFI Ig+の平均値}) - (\text{MFI Ig-の平均値}) \end{aligned}$$

### ( 3 ) 健常検体を用いた測定

EDTA・2K 採血管に採血した健常者検体を用いて基準範囲の設定を試みた。また、検体の保存性の検討も行った。カラム法で Coombs 陰性であると確認された健常者検体のみを使用した。ここでは、健常者とは顕在的な溶血性貧血を有さない者を指す。使用するまでは全血の状態を冷蔵保存した。

### ( 4 ) 患者検体の測定

福山臨床検査センターや自治医科大学に検査目的で送られてきた余剰検体を用いて測定を行った。RIA 法により定量された RBC-IgG や、Coombs 陽性度と MFID の関係性を確認した。

## 4 . 研究成果

フローサイトメーターは Cytomics FC500 よりも MACSQuant Analyzer10 の方が短時間で精度よく測定可能であった。したがって MACSQuant で測定を進めることとした。各検体につき、測定細胞数を 2 万個、4 万個、8 万個と変化させ、5 重測定し、MFI の実測値、平均値、SD、CV を求めた。大きな差は無かったが、健常者検体の MFI の CV は測定細胞数が多いほど小さくなった。また、健常者検体で測定細胞数が 4 万個以下の場合、検体によっては CV が大きい検体が見られたため、測定細胞数は 10 万個に設定した。Flow rate の検討では、流速が遅い方がばらつきが小さく安定した結果が得られると考えていたが、あまり差がなかったため、より短時間で測定できるように Med に設定した。

### ( 1 ) 健常検体の測定

男性 20 検体、女性 60 検体、合計 80 検体の Coombs 陰性であると確認された健常者検体を測定した。これらの検体の MFID は正規分布する傾向が確認された。MFID の平均値は 6.15、最大値は 9.69、最小値は 1.80、95%信頼区間は 2.590 ~ 9.716 であったため、基準範囲は上限の値を用いて 9.72 以下と設定した。MFID を男女別にみると男性の方がやや低値であるように思えたが、Mann-Whitney U 検定では有意差はみられなかった。今回使用した男性検体数は女性の 1/3 であったため、男性の検体数を増加させると有意差がみられるようになる可能性があると考えられる。

### ( 2 ) 患者検体の測定

福山臨床検査センターまたは自治医科大学より提供された患者検体の測定を行った。Coombs 陽性 AIHA 検体の全てが、基準範囲を超過する MFID を示した。RIA 法による RBC-IgG も全ての検体がカットオフ値を超過しており、妥当な結果だと言える。このことから、AIHA の診断における MFID の基準範囲の有用性が示唆された。Coombs 試験が陽性だが補体成分のみが検出されている PNH 検体においては、全て MFID は基準範囲内となった。Coombs 陰性 AIHA 検体においては、多くの検体が基準範囲を超過する MFID を示し、Coombs 陰性 AIHA の診断における MFID の基準範囲の有用性が示唆された。MFID が基準範囲内で RIA 法による RBC-IgG がカットオフ値を下回っているが、カラム法で陽性が出ている検体が存在した。乖離の原因としては、カラム法では赤血球の洗浄操作を必要としないため低親和性抗体が保持されたが、フローサイトメトリー法及び RIA 法では赤血球の洗浄を行うため低親和性抗体が赤血球から解離したことが考えられる。RBC-IgG と MFID 間の関係性を調べたところ、Spearman 順位相関係数は 0.4893、Spearman 順位相関係数検定表より有意確率  $P < 0.05$  となり、RBC-IgG と MFID 間に有意な正の相関を認めた。しかし、データの分布より、2 つのグループがあるように思われた。原因としては、RIA 法とフローサイトメトリー法では、赤血球の洗浄方法や使用している抗体が異なるということが考えられる。RBC-IgG と Coombs 試験の結果に乖離がしばしば見受けられるため、やはり RIA 法の RBC-IgG の妥当性の検討も必要である。治療中の検体に関しては、試験管法およびカラム法で共に陰性であったが、MFID は基準範囲を超過していた。RIA 法による RBC-IgG もカットオフ値以下ではあるがやや高値であった。Coombs 試験であっても正常より多くの RBC-IgG を有する状態であると考えられる。したがって、フローサイトメトリー法では Coombs 試験では検出できないわずかな RBC-IgG の増減を検出することができ、治療効果の判定にも有用であるということが示唆された。余剰検体を用いた測定であるため、継続的な変化が追えなかった。

本研究により、RBC-IgG を表す値として MFID を用いたフローサイトメトリー法による RBC-IgG 測定法の有用性が明らかになった。MFID の基準範囲は、Coombs 陽性 AIHA 及び Coombs 陰性 AIHA の診断に有用である。また、Coombs 試験のみでは診断が困難な症例の診断の一助となり得る。さらに、AIHA の経過の観察や治療効果の判定にも有用である。今回は、IgG のサブクラスである IgG1、IgG3 の測定法の確立までは行えなかった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

- 1) Ohto Fukumi、Quantitative measurement of autoantibodies on RBC by flow cytometry、第 80 回日本血液学会、2018
- 2) Ohto Fukumi、Establishment of the measurement of autoantibodies against red blood cells by flow cytometry、第 79 回日本血液学会、2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：亀崎 豊実  
ローマ字氏名：KAMESAKI, Toyomi  
所属研究機関名：自治医科大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：90316513

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：服部 幸夫  
ローマ字氏名：HATTORI, Yukio

研究協力者氏名：中森 義季  
ローマ字氏名：NAKAMORI, Yosiki

研究協力者氏名：大峠 ふくみ  
ローマ字氏名：OHTO, Fukumi

研究協力者氏名：高木 文也  
ローマ字氏名：TAKAGI, Fumiya

研究協力者氏名：森 健太郎  
ローマ字氏名：MORI, Kentaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。