

第19回 近畿HLA研究会記録

会 期 : 2002年2月2日(土)
 会 場 : 大阪府赤十字血液センター
 世話人 : 永尾 暢夫
 大阪府赤十字血液センター

HLA適合血小板

秋田真哉

兵庫県赤十字血液センター

1960年代から可能となった血小板輸血は、血小板減少を伴う造血系疾患や、化学療法時の止血管理にきわめて有効な療法として確立され、今日では国内で年間800万単位前後にまでその需要を伸ばしてきました。その一方で、頻回血小板輸血患者の中に、しばしば非溶血性副作用を伴い、血小板輸血不応状態 (platelet transfusion refractoriness ; PTR) に陥る患者が報告され、その原因の多くが抗HLA抗体に起因することから、対応と対策が検討されてきました。1973年、Yankeeらによる“患者HLA抗原適合血小板輸血の有効性”が報告され、本邦でも1990年よりドナー確保のための『成分献血登録制度』の確立、そして『HLA適合血小板製剤』の供給が実施されています。

HLA適合血小板は、その有効性が実証されるとともに需要が増大、またレアタイプへの対応をも含めて、登録ドナーの確保が急務でありました。さらに本年度からは、臨床効果や副作用回避の見地から、ABO式血液型の同型供給が原則となり、いっそうの供給努力が必要となるなかで、現在まで順調に登録ドナーは推移し、全国的な需給調整システムも構築され、安定的な供給体制が可能となっています。次に、患者側からみたHLA適合血小板は、1990年

前後に“白血球除去フィルターの使用が、抗HLA抗体産生の抑制・遅延に有効である”との報告が相次ぎ、臨床現場に浸透するとともに、抗体産生患者数の発生率は減少傾向にあると考えられます。そこで今回は、当施設における過去12年間の抗HLA抗体検査を実施した頻回血小板輸血患者を対象として、その抗体産生の傾向と疾患別、HLAタイプ別との相関を検討しました。

疾患においては、近年骨髄異形成症候群に正の相関 ($p=0.0016$) がみられ、このことは今後治療経過や輸血量、輸血製剤の種別などを加味した上で検討する必要があると考えます。またHLAタイプについては、HLA-DR2保持者が通年において、疾患、年齢、性別に関係なく高い陽性率 ($p=0.012$) を示しており大変興味深い現象です。

HLA-DR2は他の免疫疾患 (多発性硬化症、SLE、潰瘍性大腸炎など) とともに正の相関が認められ、また近年一部の血小板抗体 (HPA-4b) の産生とも有意差が考えられており、今後の免疫応答における“キー”となるHLAタイプである可能性があります。

以上、『HLA適合血小板』の歴史と現状を踏まえて、“白血球除去フィルターの使用を中心とした抗体産生の抑制”、“臨床効果や副作用の評価による病態把

握”，“ドナー登録の推進”を『HLA適合血小板』のより安全で安定した供給のための現状課題とし、

次に“抗体産生における有意差”を医療へ反映させていくことが、将来への課題と考えております。

母児不適合妊娠（新生児血小板減少症）

谷上 純子

大阪府赤十字血液センター 検査二課

血小板型ならびにHLA型の母児不適合妊娠は、赤血球型（Rh, ABO, その他）の不適合妊娠と同様の機序で母児間の血液型が異なることにより起こる。その結果、児の血小板や白血球が母親から移行してきた抗体の攻撃を受け、出生後まもなく出現する新生児の体躯の出血斑から、血小板数の低下に気付かれることが多い。なかでも、血小板数が $1.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以下の症例については臨床症状が重篤な場合が多いことから、速やかな原因究明と対応が求められる。

医療機関から新生児血小板減少症（NAIT）の疑いで精査依頼を受けた101件中、血小板抗体の関与はHPA-3a：3例、-4a：1例、-4b：20例、-5b：2例、-6b：4例であった。

また、妊婦4,586件の抗体スクリーニングで検出した血小板抗体の内訳は、HPA-2b：1例、-4a：1例、-4b：5例、-5b：24例、Naka：3例（HPA-6bについては未検査）であった。

NAITの疑いで精査依頼を受けた症例のうちHPA-3a抗体が検出された3例中2例は姉弟で、元来健康な母親から在胎41週2日、3,222gで出生した第1子が全身に紫斑を認め、血小板数は $0.9 \times 10^4/\mu\text{L}$ と低値であった。出生2日は $0.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ で血小板と赤血球輸血を行うも改善を認めなかった。HPA適合血小板輸血と γ -グロブリン投与等の治療により徐々に回復した。母親の抗体価は512倍、児は128倍であった。第2子は母親の抗体価測定を定期的に行ったが、際だった上昇は認めなかった。しかし、39週0日に行った臍帯穿刺の血小板数は $0.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ と非常に低値であったため、帝王切開による娩

出後直ちにHPA-3a陰性の血小板輸血を行い、その後は3回の適合血小板輸血で順調な回復をみた。

HPA-4b抗体によるNAITの場合も第1子は、出生直後より全身に紫斑を認め、血小板数は $3.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、出生2日目が $0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ と低下。母親の抗体価2,048倍、児は1倍。 γ -グロブリン投与（400mg/kg/day×5日）と血小板輸血を行った。第2子は帝王切開で出生。血小板数 $0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、児血清中の4b抗体価は64倍で適合血小板輸血を開始した。その後、児の抗体価は出生22日目で16倍、41日目2倍であった。

在胎39週、自然分娩で出生したHPA-6(a+b+)の姉妹は、第1子の血小板数 $0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、点状出血斑を認め、血小板輸血と γ -グロブリン等の治療が行われた。しかし、第2子は血小板数 $7.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、紫斑は認めず無治療であった。母親の保有するHPA-6b抗体価は第1子出産直後256倍、児は32倍。2年7カ月後（第2子出産直後）は32倍、児1倍であった。

HLA抗体の関与が疑われた症例は第3子で、37週0日、頭位自然分娩、2,862gで出生。血小板数 $3.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、白血球数 $7.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ 。日齢3日目の血小板数は $1.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、白血球数 $5.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ であった。4日目から γ -グロブリン投与（400mg/kg/day×5日）を開始。6日目 $2.1 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $2.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ となり、その後は徐々に回復をみた。母親の夫リンパ球に対するHLA抗体価は2,048倍、児の血清中にも256倍の抗体が検出された。第2子は9カ月に胎児水腫で死産していた。

NAITは、このような同種免疫抗体によるもの

外に、児の感染や母親の自己免疫疾患など様々な原因で起こるが、平成元年より医療機関の依頼を受け精査した101件の内、約半数にHLA、HPA抗体が存在していた。今回、妊婦の抗体スクリーニングとNAITから検出された抗体について比較を行いまとめた。

① 妊婦の抗体スクリーニングで最も多く検出されるHPA-5b抗体は、NAIT例から2例検出されたが、児の血小板数はともに $7.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ 前後あり、臨床上特に問題にならなかった。妊婦からは24例と高率に検出されたが、臨床では何ら問題にならなかった。このことから

HPA-5b抗体による母子不適合妊娠の重篤例にはあまり遭遇しそうにない。

- ② NAIT例からはHPA-4抗体が21例と最も多く検出されており注意を要する抗体である。また、この抗体を産生しているヒトには従来からの報告通りHLA-DR2を有意に認めた。
- ③ LCT法を用いて行った妊婦のHLA抗体スクリーニングでは約25%が陽性であったが、臨床問題になる症例はなかった。しかし、NAIT例の中には高力価のHLA抗体が母児ともに検出され、治療を要した症例があり、HLA抗体による血小板減少症にも注意を要する。

抗HLA抗体が原因と考えられるNAIT 3例の免疫血清学解析とHLA Matchmakerによる母児HLA型不適合とHLA抗体産生について

齊藤敏^{1,2)}、青木盛³⁾、小池健一³⁾、徳永泉美⁴⁾、津野隆久⁴⁾、鶴田悟郎⁵⁾、久保徹夫⁵⁾、瀬下秀幸¹⁾、山崎雄一郎¹⁾、太田正穂²⁾、福島弘文²⁾、野村節夫¹⁾

¹⁾ 長野県赤十字血液センター、²⁾ 信州大学医学部法医学教室、³⁾ 信州大学医学部附属病院小児科
⁴⁾ 飯田市立病院小児科、⁵⁾ 厚生連北信総合病院小児科

【目的】

抗HLA抗体が原因と考えられる同種免疫性新生児血小板減少症 (NAIT) の3症例について免疫血清学解析を行うとともに、過去のNAITにおける母児HLA型不適合とHLA抗体産生の関係を検討したので報告する。

【方法】

HLAタイピングにはLCT法を用い、HPAタイピングはPCR-SSP法を用いて行った。両親・児のHLA-CタイピングはPCR-SSP法を使用し血清学でタイプできない抗原も判定した。抗HLA抗体検査にはLCT法、AHG-LCT法、クロロキン未処理MPHA法を実施し、抗血小板抗体検査はクロロキン処理MPHA法を実施した。顆粒球抗体検査にはFCM法を実施し、父親、患児の細胞を用いた母親血清とのクロスマッチはLCT法、AHG-LCT法、クロロキン未処理MPHA法、クロロキン処理MPHA法及びFCM法を実施した。更

に父親のリンパ球・血小板を使用し母親血清の吸収分離試験も実施した。

検索可能であった30例の抗HLA抗体が原因と考えられるNAITにおいて、児のHLA型が母のHLA型とアミノ酸抗原決定部がいくつ違うかHLA Matchmakerにより算出し、産生された抗HLA抗体とアミノ酸抗原決定部の違いをHLAの座別に比較検討を行った。

【結果】

すべての症例において抗血小板抗体、抗顆粒球抗体は検出されなかった。症例1において母の血清中にLCT抗体価32倍、MPHA抗体価1000倍以上の抗B5CREG+B40CREG抗体が検出された。一方、患児血清中には抗B5CREG抗体のみが検出され、この抗体は誕生2ヵ月後にも検出された。症例2においては母血清中にLCT抗体価1倍、MPHA抗体価256倍の抗B5抗体が検出された。患児血清中にもAHG-

LCT抗体価1倍, MPHA抗体価1倍の抗B5抗体が検出された。症例3においては母親血清中にAHG-LCT抗体価1倍, MPHA抗体価2倍の抗B39抗体が検出されたが, この抗体は出産1ヵ月後には検出されなかった。症例1, 2において母親血清中のHLA抗体は父親のリンパ球, 血小板により完全に吸収され, そのHLA抗体は解離液中に解離された。

30症例のNAITでの母児間HLA不一致はABC座不一致13例, AB座6例, BC座8例, A座1例, B座2例であった。産生された抗体数は抗HLA-Aが9, 抗HLA-Bが18, 抗HLA-Cが3であり, 不一致座が2座以上あった27例中22例(81%)においてアミノ酸抗原決定部の多い座の抗原に対する抗体が産生されていた。アミノ酸抗原決定部の不一致数が少ないにも

関わらず産生された抗体は抗B5が3例, 抗B7が1例, 抗Cw7が1例であった。

【結論】

NAIT3症例中2例の患児に母親由来のHLA抗体が検出され, うち1例では母親の持つ抗体の一部のみが検出された。この2例は抗HLA抗体によりNAITが起こった可能性が高い。3症例目については臨床所見及び母親が抗HLA抗体を保有することから抗HLA抗体が関与したNAITの可能性があると思われる。

母児間HLA不一致と産生された抗HLA抗体の特异性をHLA Matchmakerにより比較することで, HLA抗体産生のメカニズムの一端を解明できる可能性があると思われる。

ミニ移植について

畑中 一生

りんくう総合医療センター市立泉佐野病院内科

近年, 同種造血幹細胞移植療法の発展により, 免疫療法の意味合いの強いミニ移植が広く施行されるようになってきた。当院でも, 移植適応疾患で, 高齢者や前治療が多い治療関連死のハイリスクの患者さんを対象に, 99年12月よりHLA一致の血縁者間で12例施行している。

(症例1) 62歳/男性。原発性マクログロブリン血症。発症7年後, 化学療法抵抗性, 重症汎血球減少のため実弟よりPBSCT施行。前処置:L-PAM+Flu。GVHD予防:CyA+sMTX。day29に混合キメラでの生着を確認。day45に間質性肺炎, day70に皮膚, 肝臓の「度GVHD出現。day131に完全キメラを確認。Day521現病以外の理由で死亡。(症例2) 61歳/女性。AML(M0)。大量療法後CR維持。17ヶ月後NHL (diffuse mixed B cell) 発症。CHOP無効。非寛解期に実弟よりBMT施行。前処置:L-PAM+Flu。

GVHD予防:CyA単独。day33完全キメラを確認。CT上リンパ節は著明に縮小。day35皮膚, 肝臓「度GVHD出現。Day115にMRSA敗血症にて死亡。病理解剖でも完全寛解を確認。(症例3) 56歳, 女性。H10年3月よりC型慢性肝炎について通院中, H10年9月CML (第一慢性期)と診断。IFN療法では効果不十分であったため, 実兄よりL-PAM+Fluの前処置でH13年6月22日BMTを施行。血型主不適合のため, 採取有核細胞数は $3.2 \times 10^8/\text{kg}$ であったが, 処理後輸注CD34陽性細胞は $0.5 \times 10^6/\text{kg}$ 。day22に好中球 $>500/\mu\text{l}$ 。day35に生着確認し, 同時にM-bcr-abl(PCR定量)は感度以下。血球回復期にCMV肝炎発症し, GCVにて軽快するも, 血球回復が遅延し, 長期間輸血を要した。GVHD予防はCyA+s-MTXで, day480現在GVHDを認めず, 生存中。(症例4) 44歳男性。H7年5月発症のNHL(Follicular mixed, B cell

type)stage、B。CHOP、ProMACE療法など8コース後、部分寛解でH8年11月自家PBSCTを施行。H11年10月再発。Flu+L-PAMによる前処置でH13年1月15日HLA一致の弟より同種PBSCTを施行。輸注CD34陽性細胞は 4.94×10^6 /kg。day15に好中球 $>500/\mu\text{l}$ 。day29に骨髄で完全キメラ。GVHD予防はCyA+s-MTX。day55より腸管に「度GVHD。Day390現在、完全寛解で生存中。(12例の結果)平均年齢51.7歳、治療関連死3/12、再発1/7、急性GVHD5/7、慢性GVHD4/5、生着(完全キメラ; 4/7、混合キメラ; 3/7)、VOD1/12、生着不全1/12、

間質性肺炎1/12、移植後1年生存率46.3%であった。(まとめ)ミニ移植には前処置の方法により、様々な違いがあるが、我々は個々の条件や、疾患の特性に合わせ異なった前処置を選択している。また、対象患者の多くは高齢者であったり、非寛解期であったりと、移植におけるリスクが高く、決して簡単な治療法ではない。NIHのBarrettらも、50歳以上では30%以上の治療関連死と報告している。しかし、通常の移植を受けることの出来ない患者には、予後の改善につながる可能性が十分にある。

造血幹細胞移植 (造血幹細胞の数の増幅と生着能亢進という質の向上の試み)

平山 文也

大阪府赤十字血液センター

造血幹細胞移植は今や日常の臨床の中に組み込まれている。造血幹細胞の源として、骨髄、末梢血、臍帯血が挙げられるが、臍帯血はその採取の安全性、GVHDが軽度であることなどから近年注目を集めている。しかし、含まれる造血幹細胞の数が少なく、その適応患者は小児や体重の軽い成人に限られることが多いという欠点がある。そのため、造血幹細胞の数を体外(ex vivo)で増幅する培養法の研究が盛んに行われるようになり、近年我々を含め、既に施設でそのような培養系が樹立され、一部のグループはその臨床応用に着手している。このような増幅方法が臍帯血造血幹細胞だけでなく骨髄や末梢血造血幹細胞にも応用されれば、採取量が軽減されドナーの負担が緩和され、より安全な造血幹細胞採取が可能となることが期待される。しかし、ヒトの寿命を考えると移植後数年、数十年の長期に渡り造血能が維持されなければならないが、いずれの報告でも免疫不全マウスであるNOD/SCIDマウスをレシピエントとした、2-6ヵ月程度の短期の移植実験から

造血幹細胞の増幅判定を行っているため、数年ないし数十年に渡る長期造血維持能を持った真の造血幹細胞が果たして増幅されているかは明らかではない。増幅のための一週間前後の培養期間中に長期造血維持能が失われる可能性が危惧される。

NOD/SCIDマウスを用いた移植実験により算出された、CD34陽性細胞中の造血幹細胞の頻度は、骨髄、末梢血で低く、臍帯血ではそれらの約10倍高いと報告されている。しかし、このような移植実験で造血幹細胞として評価されるのは、骨髄への生着能を有した幹細胞のみであり、生着能のないあるいは低い幹細胞は評価されない。実際、造血幹細胞の中で骨髄への生着能を有する細胞はわずか20個に1個程度の低頻度でしか存在しない。従って、生着能のない造血幹細胞に生着能を付与すること、即ち数の増幅ではなく、生着能のない幹細胞を新たにリクルートすることによって造血幹細胞活性の増幅が可能となることが十分考えられる。しかもそれが長期造血維持能に影響を及ぼさない程度の短時間の処

理で実現されるならば、数の増幅よりも安全な方法と考えられる。

本シンポジウムでは、従来の造血幹細胞増幅法と

生着能亢進という質の向上の試みについて、経験を含めて概説したい。

臓器移植ネットワークにおける移植関連検査について

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態分野

現状におけるHLAタイピングの応用で最も重要なものは、移植における組織適合の程度をHLA型によって判定することである。このHLAによる組織適合度の判定は、血清学的HLAタイピング手法を用いて、以前より広く行われて来た。しかしながら、HLA型の一致が全ての臓器移植において同等に重要視される訳ではなく、肝移植ではHLA型一致と移植臓器の生着予後にはほとんど関連がないとされ、心臓、肺、小腸などではHLA型一致と生着予後にある程度の関連はあるものの、それほど大きなものではないと考えられている。また、現実問題として、心臓、肺、小腸などの移植では、HLA型の一致するドナー/レシピエントの組み合わせを選択することは極めて困難である。さらに、HLA一致の重要性が特に重要であるとされていた腎移植においても、近年の免疫抑制剤の開発に伴い、HLA型一致の臨床予後における意義が次第に薄れつつある。一方、HLAタイピング技術については、従来の血清学的タイピングに代わって、試薬の安定供給、

タイピング結果の再現性、高精度タイピングの可能性などの観点から、DNAタイピングに比重が移されて来ている。DNAタイピングでは、原理の異なる複数の方法論があるが、それぞれの特徴を生かしたキットが多種市販されているが、これらのキットを適切に選択することで、血清学レベルでのタイピング精度（2桁レベル）から高精度タイピング（4—5桁以上）までのユーザーのニーズに応じたタイピング結果を得ることが可能である。（社）臓器移植ネットワークは脳死移植を含めた臓器移植のあっせん組織であり、公平、公正な臓器配分を行うために、移植ドナーの感染症検査、HLA検査、レシピエントのHLA検査、ドナー/レシピエント間のダイレクトクロスマッチ、レシピエントのPRA検査などの移植関連検査を行っている。本シンポジウムでは、臓器移植ネットワークにおいて行われている移植関連検査のうち、特に腎臓移植におけるHLA検査について、その実施方針やレシピエント選択における意義などについて、その現状を紹介する。

膀胱尿管逆流症におけるHLA抗原の疾患感受性の検討

河内明宏¹⁾、三木恒治¹⁾、高原史郎²⁾、矢澤浩治²⁾、佐田正晴³⁾

¹⁾ 京都府立医科大学泌尿器科, ²⁾ 大阪大学泌尿器科,
³⁾ 国立循環器病センター・実験治療開発部

【目的】

HLA抗原は高度の遺伝的多型性を示し、免疫応答に重要な役割を担っていることから、疾患感受性について多くの検討がなされてきた。今回、膀胱尿管逆流症患者において、HLA-DR抗原の疾患感受性を検討したので報告する。

【対象と方法】

対象は膀胱尿管逆流症患者40例（男性27例、女性13例、平均年齢9.2歳）であった。PCR-SSP法を用いてHLA-DR low-resolutionタイピングを行った。また、PCR-SSP法およびInno-LiPA法を用いてHLA-DRB1 alleleのhigh-resolutionタイピングを行った。以上の結果を健康な日本人493人における報告と比較した。

【結果】

膀胱尿管逆流症患者におけるlow-resolutionタイピングではDR11抗原が、high-resolutionタイピングにおいてはDRB1*1101および1502 alleleが有意に高頻度に出現していた。また腎癬痕がある患者においてはDR11抗原およびDRB1*1101 alleleの頻度が有意に少なかった。尿路感染症を主訴とする患者においてはDR13抗原およびDRB1*1302抗原の頻度が有意に少なかった。

【考察】

膀胱尿管逆流症の一部は、HLA遺伝子かその近くに存在する未知の遺伝子と関係がある可能性が示唆された。

妊娠中毒症胎盤におけるHLA-G発現の消失について

下嶋典子、中西真理、大村素子、石谷昭子、羽竹勝彦

奈良県立医科大学法医学教室

HLA class Ib 遺伝子の一つであるHLA-Gは、多型性が乏しいことと、胎盤トロホプラストに強く発現していることから、妊娠を制御し、その維持に深く関与する分子であると考えられている。さらに、妊娠中毒症胎盤においてHLA-G発現が消失したトロホプラストが見いだされ、HLA-Gが胎盤トロホプラストに発現していないことが、妊娠維持の免疫を

破綻させ、妊娠中毒症などの疾患を引き起こす原因になると考えられるようになった。

しかし、我々もこれまでHLA-Gの胎盤における発現を調べてきたが、HLA-Gの発現が直接的に疾患に関与しているような所見はえられなかった。そこでさらに胎盤トロホプラストにおけるHLA-Gの発現を詳細な検討を行った。

【方法】

インフォームドコンセントを得て採取された正常満期胎盤、妊娠中毒症胎盤を用いた。これらの胎盤について抗HLA-Gモノクロナル抗体87Gを用いた免疫染色、コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) 活性の検出を行った。また妊娠中毒症胎盤の超薄切切片を作製し電子顕微鏡観察を行った。

【結果】

正常および妊娠中毒症胎盤において胎盤 extravillous trophoblastにHLA-Gは発現していた。しかし正常満期胎盤において一部HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastが存在した。このextravillous trophoblastはサイトケラチン陽性であるが、HE染色において細胞質がエオジン陰性で、ミトコンドリアの呼吸系酵素の一つであるSDHの活性が認められなかった。一方、HLA-Gを発現しているextravillous trophoblastはサイトケラチン陽性で、HE染色において細胞質はエオジン陽性であり、さらにSDH活性も陽性であった。妊娠中毒症胎盤のextravillous trophoblastにも一部HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastが存在し、これらについてもHE染色、SDH活性を調べたところ、正常胎盤

と同様にHLA-Gを発現しているextravillous trophoblastはSDH陽性、エオジン陽性であり、HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastはSDH陰性、エオジン陰性であった。この2種のextravillous trophoblastについて電子顕微鏡観察を行ったところ、HLA-Gを発現しているextravillous trophoblastの細胞質には多くのミトコンドリアが認められ、細胞膜の構造も保持されているのに対し、HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastは、ミトコンドリアが膨化し、細胞膜が破壊されているというネクローシスの組織像を示した。

【考察】

extravillous trophoblastにおけるHLA-Gの発現の消失は、ネクローシスあるいは細胞死を起こしている細胞にみられる現象であって、妊娠中毒症胎盤に特異的に存在するものではない。しかし、抗サイトケラチン抗体は生・死細胞のいずれにも反応しうることから、それだけで生細胞か死細胞かを見極めるのは困難である。このような事もふまえた上で妊娠中毒症等におけるHLA-Gの発現の検討を行うべきである。

NIMA同胞間・母子間マイクロキメリズムと HLAミスマッチ造血幹細胞移植

丸屋悦子¹⁾、一戸辰夫²⁾、玉木茂久³⁾、渡辺新⁴⁾、佐治博夫¹⁾

¹⁾ 特定非営利活動法人HLA研究所, ²⁾ 京都大学医学部附属病院第一内科
³⁾ 山田赤十字病院内科, ⁴⁾ 中通総合病院小児科

【はじめに】

同種造血幹細胞移植が悪性腫瘍・白血病の唯一の根治療法である。この治療法には三大予後要因がある。それは病態/病期・年齢・組織適合性で、前者の2要因についてはかえようのない制約条件である。組織適合性については人知が及ぶ範囲の要因と考えられる。適合ドナーが得られない患者には適合

性のより良いミスマッチドナーの選択が必須となる。我々はNIMA (non-inherited maternal antigens) 相補同胞間・母子間マイクロキメリズムを免疫寛容の傍証として、NIMA相補同胞や母 (または子) が最良のミスマッチドナーと考えている。母子・同胞間の相互micro chimerismを検出し、その頻度および持続期間などを検討した結果および移植成績につい

て報告する。

【方法】

標的alleleとして、子の血中にnon-inherited maternal haplotype由来allele (NIMHA)が、また母血中に子に遺伝したpaternal haplotype由来alleleを選択した。子(母)の爪DNAを体細胞コントロールとした。1st PCRは標的に選択したHLA locus specific primerを用い、産物を滅菌蒸留水で $10^2 \sim 10^4$ に希釈し、2nd PCRはallele specific primerを用いて行なった。爪由来DNA陰性で、末梢血由来DNAから特異的増幅産物が得られた場合をmicro chimerism陽性とした。感度は1st PCRにアプライできる鋳型DNA量に依存し、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ であった。

【結果・考察】

52例の母子間・同胞間(132人)を検査した結果、28例(54%)に母児双方向のmicro chimerismが検出された。Micro chimerismが母に検出され子に検出されなかった例が10例(19%)で、その逆が5例(10%)で、双方向とも検出されなかった例が9例(17%)であった。母子では最長50年、同胞では25年間micro chimerismが存続していることが解った。移植成績からNIMA相補同胞・子・母の順でHLAミスマッチ度にかかわりなく、非血縁1ミスマッチドナーより適合性の良いドナーとして選択できる。

兵庫さい帯血バンクにおける移植状況について

国分寺 晃¹⁾、本河亜紀³⁾、谷脇清助¹⁾、甲斐俊朗¹⁾、原 宏^{1,2,3)}
皆森久美子⁴⁾、秋田真哉⁴⁾、荒木延夫⁴⁾、能勢義介⁴⁾、山岡正暢⁵⁾、仁田 浩⁵⁾

¹⁾ 兵庫医科大学病院輸血部、²⁾ 同細胞移植部、³⁾ 兵庫さい帯血バンク
⁴⁾ 兵庫県赤十字血液センター、⁵⁾ 京都府赤十字血液センター

造血幹細胞移植(SCT)による造血器悪性腫瘍の治療は、同種骨髄移植(BMT)として既に確立している。しかし、HLA適合血縁者ドナーがいる患者は約30%であり、骨髄バンクを介した移植を希望しても受けられない患者も多く、移植を待てない場合や造血幹細胞を高頻度に含む臍帯血の有用性から近畿臍帯血バンクが発足(平成9年9月より提供を開始)した。その後、平成11年8月に「日本さい帯血バンクネットワーク」が設立され、近畿臍帯血バンクは、兵庫さい帯血バンクとしてネットワークの参加が認められた。

近畿臍帯血バンクとして約2年間に35標本(33症例)の提供を行い、ネットワーク開始後は、2001年12月現在42標本(42症例)を提供している。また2002年1月現在655標本を公開している。

移植の成否を左右する主な因子は、移植前の患者

の状態、移植細胞数、HLAの一致率などであるが、平成9年9月～平成12年12月までの症例について検討してみると、44標本を提供し、24施設にて42症例の臍帯血移植(CBT)が行われた。年齢は中央値7歳(4ヶ月～36歳)で、男性23症例、女性19症例、体重の中央値は20kgであり、疾患はALL 16症例、AML 11症例、FEL 2例、SCID 3症例、WA-S 2症例、CML、NK-Cell Leukemia、NHL、CGD、CDA、SAA、PRCA、AMT各1症例であった。また、Second SCTとしてのCBTは6症例、Third SCTは2症例であった。

HLAの適合は表1に示したが、輸注量の中央値は79ml(50～145ml)、患者体重あたりの輸注有核細胞数は中央値 3.99×10^7 cells/kg(1.69～ 15.5×10^7 cells/kg)、CFU-GM数は中央値 2.78×10^4 /kg(0.2～ 30.8×10^4 /kg)、CD34陽性細胞数は中央値

1.24×10⁵ cells/kg (0.3~38.3×10⁵ /kg)であった。また、GVHDは表2のような結果であった。

厚生労働省は平成11年度から全国で、5年間に2万件的臍帯血を保存する計画を立てている。これにより、移植を希望する患者さんの90~95%に臍帯血が提供できるとしている。非血縁者間の移植数は平成12年度では、骨髄移植715件(82%)、臍帯血移植160件(18%)であったが、平成13年度の臍

帯血移植は数も比率も伸びている。今後は臍帯血の選択基準(細胞数、HLA適合度等)の明確化、前処置の工夫、ex vivo増幅、複数標本のCBTによる生着不全防止や生着の促進や科学的なデータに基づいたCBTとBMTとの比較、更にPBSCTとの検討を行い幹細胞移植のそれぞれの役割を明確にして行く事が重要と考えられる。

表1 HLA compatibility

(HLA-A, B; serological typing, DRB1; high resolution DNA typing) n=42

	GVH direction	HVG direction
3/6	10	11
4/6	16	15
5/6	13	12
6/6	3	4

(HLA-A, B, DRB1; high resolution DNA typing) n=34

	GVH direction	HVG direction
2/6	3	3
3/6	11	12
4/6	10	9
5/6	8	9
6/6	2	1

表2 Clinical results

Acute GVHD

(HLA-A, B; serological typing, DRB1; high resolution DNA typing) n=42

HLA compatibility	0	I	II	III	IV	NE
3/6	1	2	6	0	0	1
4/6	2	4	6	1	0	3
5/6	2	7	1	1	0	2
6/6	1	1	1	0	0	0
total	6	14	14	2	0	6

(GVHD prophylaxis and AGVHD)

HLA compatibility	GVHD prophylaxis	
	CSA n=27	FK506 n=15
3/6	7	3
4/6	10	6
5/6	9	4
6/6	1	2
AGVHD II ≤	14/25 (56%)	3/11 (27%)

Chronic GVHD

Yes	6	
	Extensive type	2
	Limited type	4
No	19	
NE	19	

血清学的検査でHLA-B座が検出できなかったT-ALLの1症例

皆森久美子, 秋田真哉, 荒木延夫, 能勢義介, 井本しおん, 三戸 壽

兵庫県赤十字血液センター

【目的】

今回、我々はHLA-B座が血清学的検査で検出できなかったT-ALL (L3) の症例に遭遇したので報告する。

【方法】

血清学的検査は、LCT法を用い、日赤共通トレイJRT20, JRT22の2種を用いた。患者検体は化学療法前の検体 (Blast細胞91%, リンパ球7%, 単球

2%)と化学療法後37日目 (Blast細胞0%, リンパ球17%, 顆粒球73%, 単球10%)を使用した。化学療法前の検体からのリンパ球分離は比重液で分離後、リンフォクイックで3回処理し、純度97%のリンパ球分画を得た。DNA検査は、PCR-SSPを使用した。また、患者の父、母、妹の血清学的検査、DNA検査も実施した。

【結果】

血清学的検査では、患者（化学療法前の検体）が A2, A2, B-, B-, Cw10, Cw10, 父がA2, A33, B44, B61, Cw10, Cw-, 母がA2, A24, B48, B61, Cw10, Cw-, 妹がA2, A24, B48, B61, Cw10, Cw-を示し、患者本人のB座が検出されなかった。また、化学療法後の検体では、A2, A2, B61, B61, Cw10, Cw10を示し、B座が検出された。

DNA検査では、患者がA*02, A*02, B*4002, B*4002, Cw*0302, Cw*0302, 父がA*02,

A*33, B*44, B*4002, Cw*0302, Cw:14, 母が A:02, A*24, B*48, B*4002, Cw*0302, Cw:08, 妹がA*02, A*24, B*48, B*4002, Cw*0302, Cw*08を示し、患者本人のB座は、父、母から B*4002(B61)が遺伝していた。

【結論】

今回のT-ALLの症例は、リンパ球分画に腫瘍細胞が存在し、その細胞上にB座が発現されていなかったと考える。

HLA MatchmakerによるHLA適合血小板ドナーの許容抗原選択について —HLA適合血小板輸血において輸血効果を妨げた交差反応抗原

斉藤敏, 瀬下秀幸, 山崎雄一郎, 野村節夫

長野県赤十字血液センター

【目的】

PRA (Panel-reactive activity) 90%以上の抗HLA抗体を保有した患者に、交差反応性からHLA適合血小板ドナーを選択すると、交差試験が陽性になる場合や、輸血効果が得られない場合がある。我々は、Duchesnoyが移植適合ドナー検索を目的として開発したエクセルプログラムHLA Matchmakerを使用することでこの問題が解決できると考え検討を行ったので報告する。

【方法】

HLA MatchmakerはHLA分子の α ヘリックス及びエクソン4上でアミノ酸多型が存在する位置を中心とする連続3個のアミノ酸を一つの抗原決定部と考え、患者のHLA型と比較して、ドナーのHLA抗原にいくつ抗原決定部の違いがあるかを算定するプログラムである。患者のHLA-A, B, Cいずれかの抗原分子上に、ドナーの抗原決定部が存在すれば、その抗原決定部を自分自身と考え、その抗原決定部に対しては抗体を作らないだろうという原理に基づいている。HLA-Aで30か所、Bで24か所、Cで19か所の位

置で172の抗原決定部を比較の対象とする。

このプログラムを使用して、HLA抗体により新生児血小板減少を引き起こさせた母28人とその子（免疫原）のHLA抗原の比較、HLA適合血小板使用中に新たな抗体を産生した血液疾患患者13人のHLA型と新たに産生された抗体に対する抗原との比較を行った。また、AHG-LCT, MPHA, FCMにて保有している抗体がHLA抗体のみであることが確認されているPRA90%以上の患者34人のHLA適合血小板 (HLA-PC) 輸血効果とドナーのHLA抗原決定部の違いについての検討も行いプログラムの有用性を検討後実際のドナー選択にも使用した。

【結果】

新生児血小板減少を引き起こさせた母28人中25名にA, B, C座のいずれか2座以上の不適合があり、そのうち21例においては、抗原決定部の違いの多い抗原に対する抗HLA抗体が産生されていた。残り4例中2例はA24-B52, 1例はA31-B52, 1例はA24-B7の免疫原に対し抗原決定部の違いがA座抗原の方が多いい関わらず抗B52あるいは抗B7抗体が

産生されていた。一方HLA-PC使用群では2カ所の抗原決定部の違いで新たな抗体が産生されていた。PRA90%以上の患者34人中6人で67輸血中28例のHLA適合血小板輸血不応答が認められ、不応答の全症例において2カ所以上の抗原決定部の違いがあった。これら症例すべてのAHG-LCT, MPHAによるクロスマッチは陰性であったが不応答例にはB61に対するB60, B39に対するB67等の特定抗原が関与し、これら抗原は抗原決定部が患者のHLA型と2カ所以上違っていた。

患者のドナー選択においては交差反応性検索により適合ドナー数が12人しかいない患者のドナー数が40人に増え、検索された新たな抗原を持つドナーを使用しての輸血効果も良好であった。

【考察】

交差反応性からドナーを選択した症例においてAHG-LCT, MPHAによるクロスマッチが陰性であるにも関わらず血小板輸血不応答例が存在した場合や、PRA (Panel-reactive activity) 90%以上でドナー選択が難しい場合にHLA Matchmakerを使用してドナー選択をすることによりHLA適合血小板がより効果的に使用される可能性と、ドナー数を新たなスクリーニングなしで増やすことができる可能性が示唆された。母児不適合妊娠の抗HLA抗体産生においては妊婦のHLA型と免疫原のHLAに不一致抗原が2抗原以上存在した場合、不一致抗原決定部の多い抗原に対する抗体産生が起こる可能性が高いと思われる。今後妊婦と免疫原の比較を多くすることで抗HLA抗体産生の機序の一端を解明できる可能性がある。