

第2回日本組織適合性学会近畿地方会抄録

会 期： 2004年2月7日(土)
 会 場： 参天製薬株式会社本社
 世話人： 椿 和央
 近畿大学医学部奈良病院 血液内科
 共 催： 財団法人 大阪腎臓バンク

●教育プログラム●

臨床に貢献するための HLA 検査とは

丸屋 悦子

特定非営利活動法人 HLA 研究所

造血幹細胞移植 (SCT) 法の多様化が進んでいる。幹細胞ソースや前処置と GVHD 予防 Regimen の組み合わせは膨大な選択肢を可能にした。にもかかわらず、SCT の三大予後要因(年齢・病態・HLA 適合性)は不変のままである。年齢・病態は制限条件であり、これらに適應する Regimen の開発が求められる。組織適合性は工夫が可能と考える。臨床に貢献するための HLA 検査について考察し提案する。

1. HLA 基本編

HLA の命名法, 機能, マイナー組織適合性抗原や

NK とのかかわりなどについて概論を述べる。

2. 組織適合性検査材料について

DNA を用いた検査法により使用できる検査材料も多様化し, 患者やその家族に有利な検査材料の選択が可能になっている。この実情を紹介する。

3. SCT ドナー別, 組織適合性検査について

SCT 法の多様化に伴い, ドナー別に必須となる検査項目について提案する。

● 特別講演 ●

ゲノム多様性と疾患: HLA 領域内のどの遺伝子(群)がどのように疾患とかかわるのか?

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

HLA 領域は、移植や輸血の際などに認められる非自己抗原に対する免疫応答性の個体差を規定する遺伝子座として発見されたが、そこには HLA 分子をコードする HLA クラス I およびクラス II 遺伝子群以外にも、HLA クラス I 分子で提示されるペプチドの産生に関わるプロテアゾームやトランスポーターの遺伝子、TNF や LTA などのサイトカイン、C4 などの補体その他の免疫関連遺伝子や、機能未知の遺伝子を含めた極めて多数の遺伝子が存在する。それらの遺伝子群の多くは、HLA 遺伝子群ほどではないにしても、それぞれが著明な遺伝的多型を示す。また、HLA 領域は遺伝子重複によって生じたと考えられる多重遺伝子族を形成するが、その重複数にも多型がある。さらに HLA 領域の多様性のあり方は、人種や民族によってアレルの頻度分布がかなり異なると共に、座位間の連鎖不平衡が存在し、人種や民族に特徴的なハプロタイプを形成する。

このように HLA 領域は著明な多型性を有する免疫関連遺伝子群が多数存在することから、これまでに自己免疫疾患、感染症、悪性腫瘍など種々の疾患との相関が検討され、特定のアレルと特定の疾患との相関が見い出されている。このことは、HLA 遺伝

子ないし HLA 分子そのものが疾患感受性を規定するものと推定されているが、疾患によっては相関を示すアレルが人種毎に異なることは良く知られた事実である。また HLA 領域の座位間の連鎖不平衡は極めて強く、疾患関連遺伝子のマッピングはそれほど容易ではない。また、我々は日本人の一般集団を対象として HLA 遺伝子自体の多型解析と合せてマイクロサテライトの多様性を解析しているが、HLA 領域内の連鎖不平衡ブロックの長さは一様ではなく、ハプロタイプ毎にかなり異なっていることを見い出している。一般に、アレル間の連鎖不平衡の強さは、そのアレルの形成時期や頻度、さらには集団間の混血のあり様にも左右される。このため、HLA 領域内の連鎖不平衡の強さは必ずしも一様ではない。このことは、疾患との強い相関を示す領域であっても、必ずしもその連鎖不平衡ブロック内に疾患関連遺伝子があるとは限らないことを示唆する。

本講演では、HLA 領域におけるゲノム多様性のあり方と座位間の連鎖不平衡の特徴を疾患原因遺伝子マッピングとの関連で考察すると共に、我々の行っている最近の疾患研究と HLA との関連研究について紹介する。

● 特別企画 ●

『遺伝子解析をめぐる倫理問題』

1. 遺伝子解析をめぐる倫理的・歴史的・社会的課題

小原 克博

同志社大学神学部

1 はじめに——遺伝子解析の周辺

- 1) 一般社会における不安
- 2) 医学的見地からの欲求

事例「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」

(文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省, 2001年)

1. 基本的考え方: 「人間の尊厳」「人権」の尊重
2. 研究者等の責務: 通常の職業倫理
3. 提供者に対する基本姿勢: インフォームド・コンセントの細則。「提供者が被る可能性のある不利益」の説明が必要であるとされているが、具体的な言及は見あたらない。そもそも「説明文書」を理解できる人はどれほどいるのか。

4. 資料等の取り扱い: 技術的な問題。連結不可可能匿名化と連結可能匿名化。

- 3) 倫理およびアカウンタビリティ(説明責任)の必要性

異なる関心と欲求を、どのように橋渡ししていくのか。

科学的(医学的)探求心と、市民レベルでの安心感情の折り合いの付け方。

- (a) こっそりと実施する。
- (b) アリバイ作りを精緻化する。
- (c) 内実を伴ったインフォームド・コンセント, 社会への情報開示。

2 倫理的課題

- 1) 価値多元社会における倫理とは何か

選択可能なものの中から(当事者にとって)最善のものを選択する方法を示すこと。可能な限りの選択可能性を示さなければ、結果的に、誘導・強制した

のと同じになる(パターンリズム [paternalism, 父親的温情主義]の危険性)。

遺伝カウンセリングにおいても誘導は可能。

- 2) (医療)技術と倫理

潜在的マイナス効果を悪用させないための倫理が必要。

潜在的プラス効果を妨害させないための倫理が必要。

- 3) 技術のジレンマ

病を治療し、人々を健康にするはずの医療技術が、同時に、新たな問題を引き起こす原因にもなっている。

- 4) 健康への欲求

遺伝子解析は健康の追求の最先端に立つ技術の一つである。それは、様々な欲望に取り囲まれており、価値中立的な技術として規定することはできない。

3 歴史的課題

- 1) 人間の「本質」をめぐる問い

社会的・生物学的特質による区別(自由人と奴隷, 白人と黒人, 男性と女性, 健常者と障がい者, 優秀な人種と劣等な人種, 等)。

存在に値する生命(人間)と存在に値しない生命(人間)の区別。

遺伝子解析が高度化し、一般化していくプロセスの中で、どのような新たな区別が生じるのか。

- 2) 遺伝学とナショナリズム

純化された健康志向は、健康と見なされない者の排除と、しばしば表裏一体の関係にあった。

ナチス時代、多くの研究者は善意に基づいて、黙々と研究を進め、ナチスに協力した。小さな善意

の集積が、巨大な悪のメカニズムを支えるという歴史的事例は多数ある。

【参考文献】

R. N. プロクター 『健康帝国ナチス』 草思社, 2003年。

藤野 豊 『強制された健康——日本ファシズム下の生命と身体』 吉川弘文館, 2000年

4 社会的課題

遺伝子解析, 遺伝子診断が高度化・一般化してい

く中で、次のような課題が生じてくる。

1) 人間は生まれたときから平等ではないことを明確に語られる。

2) 「内なる自然」としての人間の身体がバイオテクノロジーのフロンティアとされる。

3) DNA を操作することによって人間性そのものを操作することが可能となる。

4) 病気の変容する。

小原克博 On-Line <http://www.kohara.ac/>

E-mail: katsuhiko@kohara.ac.jp

● 特別企画 ●

『遺伝子解析をめぐる倫理問題』

2. 近代医学と遺伝子医療の倫理

村岡 潔

佛教大学文学部

(1) 近代医学の思想的基盤

近代医学・現代医療の領域は、19世紀以降、自然科学(生物学, 生理学, 細菌学, 統計学等)にその基本思想を依拠しつつ、20世紀には北米を中心に世界的に展開される「科学的医学」「生物医学」として発展してきた。これと並行して従来の全体論的生命観は、還元主義的な眼差しの下に変貌し、特に19世紀以降、臓器・組織から細胞レベルへ、さらに20世紀以降はDNAレベルへと還元可能な存在となっている。

近代医学の思想的基盤は、こうした人間機械論と特定病因論からなる。

「特定病因論」では、19世紀末の細菌学の確立以降、西洋近代医学が採用した疾病原因の説明体系で、人間を臓器別系統別に解釈し(人間機械論)、それぞれの「故障した」部分に病気の原因を定め、その部分を改善することで病気が治るとする。また、この理論では、感染症、例えば結核の根本原因は結核菌

という「病原体」の一点に集約され、病者から病原体を一掃することが正しい治療戦略とされる。

遺伝的疾患(ガンや高血圧症などの生活習慣病ないしは多因子遺伝病も含め)の根本原因は「擬似病原」として認知される遺伝子レベルの変異に求められる。その是正が根源的治療法(= 遺伝子治療)。医療者・研究者がもつ、こうした信念は特定病因論という生物医学モデルから必然的に形成されたものである。

(2) 生命倫理・医療倫理

20世紀後半以降、こうした生物医学の背景のもと北米を中心に出現した学際的領域であり、生命科学と現代医療において人間の行為を倫理原則から検討するために様々の人々が専門領域を超えて研究し合う学際的学問研究の領域である。周知のように、生命倫理は、体外受精や胎児診断、「脳死」と臓器移植といった、現代の死生観に関わる先端医療技術の検討から発展してきた。

生命倫理には①死の再定義(「脳死・植物」状態)、②終末期医療(安楽死・尊厳死、ホスピス)、③胎児診断と人工妊娠中絶、④生殖技術(体外受精、代理母)、⑤遺伝子医療(診断・治療)、⑥臓器移植と医療資源の配分など、幅広い課題が含まれる。

(3) 遺伝子医療の倫理的諸問題

後半では、以上の前提をふまえ、次の遺伝子医療に関わる生命倫理的諸問題について検討する。

① 遺伝子診断

遺伝子診断は、(1)被検者の血液をはじめ、あらゆる組織・細胞を検体(検査対象)にできる点;(2)ヒトの一生のどの時期でも診断可能で、発症前診断や胎児診断もできる点;(3)多くが、被検者本人だけでなく家族・親族の検体が必要になる点などの特徴があり、倫理的問題につながっている。それゆえに、被検者(や家族)が診断結果を利用する上で遺伝カウンセリングは重要な役割を担っている。

遺伝子診断は、多くの場合、従来の検査と違い、病気を患っている患者の現状を診断するのではなく、(A)検出された遺伝子変異から、今後、被検者に発現するであろう形態上の変化を予測する発症前診断であること。および、(B)得られる遺伝情報が、被検者本人だけでなく親・兄弟など親族の遺伝情報でもあること。こうした特性が、遺伝子診断がもたらす社会的・倫理的・経済的問題の根底にある(例:結果が生命保険や医療保険の契約時に利用される場合)。また、(C)予測の確度という点でも、高脂血症や高血圧症が示す漠然としたものではなく、ハンチントン病のように「遺伝子診断は未来を確実に決定付けているかのような印象」を与えるという特性もある。

このことは、多くの医療情報に対して「知る権利」が強調される今日でも、遺伝情報に関しては「知らないでいる権利」が主張される理由の一つだと言える。

② 遺伝子治療・遺伝子工学(生命操作)

ヒトゲノム解析によって、従来の遺伝病だけでなく、高脂血症などこれまで環境要因が強調されてきた生活習慣病さえも、その発現に関わる遺伝子「異常」が次々と識別されている。遺伝子治療とは、こ

うして解析され識別された遺伝子変異の知見に基づいて、標的とする「異常な遺伝情報のプログラム(擬似病原)」をDNAレベルで書き直そうとする治療戦略である。現時点では、ADA欠損症、家族性高コレステロール血症、従来の治療法でも難治の肺癌などの悪性腫瘍、エイズなどが対象である。また、広義には、動脈硬化、糖尿病の治療、あるいは心筋梗塞の治療の補強策、骨髄移植後の合併症対策なども含まれる。さらに、異種間の臓器移植(異種移植)をめざし拒絶反応のないブタとヒトのキメラ動物の研究なども行なわれている。

周知のように、遺伝子治療の研究は、次の条件下で慎重に推進されている。A)生命に危険が迫っている患者に限る(致死性の遺伝子疾患や従来の治療で無効ながん患者にも実験治療として試みられている)、B)患者本人の体細胞に限る(導入した遺伝子が将来の世代に受継がれる危険性がある精子、卵子、受精卵等は除く)、C)病気でない人の機能強化(例えば、身長を高くする目的で成長ホルモン遺伝子を入れる)や、知能・人格・器官形成などの人間特性の変更を意図する優生学的遺伝子操作は認めない、D)患者や被験者のインフォームド・コンセントを重視・確保し人権を保護する、などである。

③ 再生医療(細胞治療 Cell Therapy)

再生医療とは、自然には再生しない組織・臓器を再生させて、それによって、失われた機能を回復させようとする「人体改造」の試みである。近年、とくに注目されているのが成長して様々な組織・臓器を形成する能力を秘めた受精卵(胚)の研究から、その一部(胚性幹細胞;ES細胞;俗称「万能細胞」)を取り出し、希望どおり組織・臓器を培養育成し、それで患者本体の欠けた部分や機能を補おうとするアイデアである。この場合、幹細胞の遺伝子組成が患者と同じであれば、幹細胞からできた細胞・組織・臓器、および修復される患者本体は同一のクローンであり、本体への移植の際にも拒絶反応などの問題は極めて起こりにくいことが期待されている。

再生医療は、目下、3通りのやり方で研究が進められている。(1)生体外で組織を再生させる方法で、皮膚が試みられている。(2)生体内で、生体のもっている自己修復力(自然治癒力)を何らかの方法で引

き出して再生をはかる方法がある。再生の足場を築いたり，組織成長因子を使ったり，さらには，その組織成長因子をつくる遺伝子を導入する方法である。(3) 自分または他人の(分化能力のある)幹細胞を用いる方法である。この場合，すでに臨床応用されているのが，末梢の血液や臍帯血からの骨髄輸血(骨髄幹細胞の移植)である。

目下，幹細胞から組織再生までには多くの解決すべき問題がある。また，胚性幹細胞を培養して複雑な臓器をつくり，臓器移植にもちいることは現実からほど遠い。しかし，神経細胞などに分化させて細胞移植を行えば，パーキンソン病などの神経病の治療に応用できると考えられている。

(4) 倫理問題解決のためのアプローチ

大別すると，次の二つがある。

- ① 義務論的アプローチ: マクロ的・集団主義的
 - * 規範(ルール, ガイドライン)に照合させて，その行為が正しいかどうかを決める。
 - * 規範に合致している場合には，正しいこと(善)としてその行為を選択する。
 - * 評価の確定した「通常の」医療に適しているが，評価の未定な先端医療には適用しにくい。
- ② 目的論(帰結主義)的アプローチ: ミクロ的・個人主義的

* とり得る行為の選択肢をいくつか考慮し，それぞれの結果から生み出される価値(幸福)の度合いを予測・予想する。そのうちで，当事者にとって最も望ましい価値をもたらす選択肢(最も幸福をもたらすと予測されるもの;あるいは害が最少のもの)を善いこととして採択する。先端医療・実験的治療向き。

* 口演では，こうした観点をふまえ，次のような課題にも言及したい。

【主たる課題】

- ① 遺伝子診断・解析で得られた遺伝子情報は誰のものか?
- ② インフォームド・コンセント(情報開示)と「知らないでいる権利」は両立するか?
- ③ 遺伝子情報による差異化・差別化(新・優生学?)にはどう対処すべきか?
- ④ 再生医療(ES細胞)のために，受精卵は操作してよいか?
- ⑤ 遺伝子工学: キメラ動物(異種移植)やクローン人間を産み出すことはよいか?
- ⑥ 社会や医学界でコンセンサスが得られるのか?(あるいは，それは必要か?)
(佛教大学・文学部: 医学概論・医療思想史, E-mail: muraoka@bukkyo-u.ac.jp)

● シンポジウム『臓器移植に対して組織適合はどこまで必要か』 ●

臓器移植と HLA 検査

佐田 正晴

国立循環器病センター再生医療部

同種臓器移植は難治性の末期臓器不全に対する治療法として広く実施され，生命維持と QOL の改善を目的に定着してきた。現在，世界 50 ヶ国以上で腎臓，心臓，肝臓を中心に多種多様な臓器移植が年間 4 万例以上実施されている。

1970 年代に新しい特異的免疫抑制剤として開発されたシクロスポリンを皮切りに多くの免疫抑制剤が開発され移植医療に応用され，症例数も飛躍的に増加すると共に，移植成績も著しく向上してきた。移植成績の向上に伴い，それまで厳格に規定されてい

たレシピエントの年齢・原疾患などの移植条件が大幅に緩和されると同時に、HLA 完全不一致症例、ABO 型不適合症例や直接交差試験陽性例にまで移植適応が拡大された。

しかしこの適応拡大がその後の深刻な提供臓器不足を招いたことは歪めない事実でもある。

本シンポジウムのテーマ「臓器移植に対して組織適合はどこまで必要か」について、臓器移植前後に

施行されている、

1. HLA 適合度
2. 前感作抗体、直接交差試験
3. 移植後の抗体スクリーニング

と移植成績について症例数が一番多く組織適合に関する解析が正確になされている腎移植を中心に検証していく。

臍帯血移植と HLA 適合性

甲斐 俊朗

兵庫医科大学輸血部

わが国の非血縁臍帯血移植は、HLA (A, B, DR) が血清学的に 4 抗原以上適合かつ 2×10^6 /kg 以上の細胞数を含むさい帯血を用いて行われている。このことは、さい帯血 T 細胞の特性、主にその未熟性故にさい帯血移植では重症移植片対宿主病の発症頻度が少ないとの欧米の報告に基づいて開始されたものであり、現在ではその殆どが HLA 不適合移植である。

本シンポジウムでは、兵庫さい帯血バンクから提供した造血器悪性疾患に対する初回移植としての骨髄破壊的さい帯血移植 91 例を対象とし、HLA 適合度と移植成績について解析したので報告する。

対象: 造血器悪性疾患 91 例 (AML 30, ALL 30, CML 17, 悪性リンパ腫 5, その他 9), 年齢中央値は 21 歳(範囲; 4 ヶ月-60 歳, 移植病期はスタンダードリスク 36, ハイリスク 55 例であった。HLA 適合度 (A, B; 血清学的, DRB1 high resolution DNA typing) は 3/6 適合 16 例, 4/6 適合 43 例, 5/6 適合 27 例, 6/6 適合 5 例である。

方法: 年齢, 性, 体重, ABO および HLA 適合度, 疾患, 移植病期, 移植細胞数(凍結保存時核細胞数, CD34+細胞数, CFU-GM 数), GVHD 予防法が移植成績(好中球および血小板生着, GVHD 発症

頻度, event free survival (EFS), 移植関連死 (TRM), 再発)に及ぼす影響を Kaplan-Meier 法によりまた log-rank test で $p < 0.10$ 以下の因子に関しては Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析により有意な因子を解析した。

成績: 単変量解析では、HLA 適合度が高いほど(5-6 適合 vs 3-4 適合)好中球生着率が高く(90.3% vs 74.4%, $p = 0.0040$), TRM が低く(9.6% vs 41.3%, $p = 0.0077$), EFS が良好(54.4% vs 22.6%, $p = 0.0146$)であった。重症 AGVHD の発症も有意に低かった(4% vs 24%, $p = 0.0150$)。5/6 適合移植(class I 不適合 vs class II 不適合)あるいは 4/6 適合移植(Class I vs class II vs class I+I 不適合)の中ではそれぞれ有意差は認めなかった。多変量解析では、好中球生着 (HR 1.746; 95%CI, 1.083-2.816, $p = 0.022$), 重症 AGVHD の発症 (HR 0.120; 95% CI; 0.015-0.936, $p = 0.0431$) に有意な影響を及ぼし、EFS には有意でないものの適合度が高いほど良好な成績が得られる傾向を認めた (HR 0.559; 95% CI 0.278-1.121, $p = 0.1013$)。

結論: 臍帯血移植においても HLA 適合性は重要である。今後症例数の蓄積が必要であるが、成人に対しては 3×10^6 /kg 未満の症例が多くこのような症例

に対しては HLA3-4 match より 5-6 match のさい帯 血を選ぶことにより成績の向上が期待される。

造血細胞移植と母子間免疫寛容

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

20世紀初頭まで、「組織適合性」とは組織自体の類似性と理解され、異種動物も「適合した」ドナーとして皮膚や腎臓のみならず、睾丸の移植にまで用いられていた。この混沌の時代は、C. C. リトルの「移植の法則」の定式化、P. メダワーによる免疫学的現象としての拒絶の再発見を経て、はじめて終焉を迎える。その後「生物学革命」の揺籃期、ドウセによる白血球凝集素の発見を受けて、テラサキによって開発された“microdroplet assay”が、現代的な組織適合性の概念への扉をこじ開ける。そして、その確立に重要な役割を果たしたのが、経産婦の約30%に見られる配偶者由来 HLA 抗原 (inherited paternal HLA antigens, IPA) に対する同種抗体であった。一方、HLA の一致による自己と非自己の区別、という基準の出現は、同時に妊娠という現象を免疫学的なパラドクスとして再認識させることとなる。メダワーらによる「在胎期に暴露された同種抗原に対して、児は免疫寛容を獲得する」ことの発見は、クラスらによる「非遺伝母 HLA 抗原 (non-inherited maternal HLA antigens, NIMA) への抗体産生能の

低下」の発見へと受け継がれ、ここに「個体の免疫応答は、ゲノム上で規定されている HLA ばかりではなく、妊娠中に経験した NIMA によっても修飾されている」、という「もうひとつの」組織適合性基準が提唱されることとなる。これまで、同種移植における母子間免疫寛容効果を検討した研究は数多く実施されてきたが、その結果は玉石混交とでもいべきものであった。しかし、1990年代後半以降、再び NIMA 効果に対する見直しを開始され、腎移植や造血幹細胞移植の解析から NIMA への寛容効果を示唆する報告が相次いでなされている。この可能性をさらに押し進めるものとして、最近、本邦の臨床研究者たちは、母子間マイクロキメリズムを NIMA や IPA に対する免疫寛容の指標と見なす新しいドナー選択方法によって、HLA の一致していない血縁者間においても造血幹細胞移植が実施可能であることを報告している。本講演では、このような母子間免疫寛容仮説に基づいた造血幹細胞移植の現状を報告し、今後その確立へ向けて解決すべき課題のいくつかを提示したい。

造血幹細胞移植における組織適合性戦略を展望する

佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

臓器移植と造血幹細胞移植 (SCT) では次の点で異なる戦略が必要になる。

1. SCT では Donor 免疫担当細胞によって Recipient の免疫が再構築される
2. 腫瘍症例の SCT では Graft versus Tumor (GVT) 効果を期待する
3. SCT では拒絶より GVHD 制御に重点が置かれる

以上の観点から, GVHD 方向の HLA-A, B, DR 適合性が重視され, HVG 方向の不適合性は, 骨髄廃絶を含む, 強い免疫抑制によって制御可能である。Non-myeloablative transplantation (ミニ移植)や, 弱前処置による SCT (RIST) という選択肢も採られるようになり, 免疫抑制剤の進歩は HLA ミスマッチ donor からの移植を可能にしつつある。加えて Donor ソースも多様化した。とくに非血縁間移植は臓器移植よりハードルが低い。

マイナー組織適合性抗原 (mHA) は HLA 適合 SCT における GVHD や GVT の主要な標的分子である。GVHD 発症へのマグニチュードは HLA と同等またはそれ以上と評価される。遺伝学的観点から, 非血縁間の mHA 不適合確率は, 近縁係数の高い同胞や親子間の約 2 倍と計算される。血縁 haploidentical で HLA-A, B, DR の 1 抗原ミスマッチは, 非血縁間フルマッチと同等またはそれ以上の総合的適合性と評価される。後方視的臨床解析もそれを肯定する。

スタンダード・リスク症例への SCT はほぼ標準

化され改善の途上にある。予後不良ハイリスク症例の救済に照準が当てられつつある。ハイリスク症例の腫瘍細胞は高い変異能を獲得した「進化した腫瘍」であり, 治療により進化的に選択された「治療抵抗性の腫瘍」である。強くて広範囲特異的な GVT 効果(が得られる戦略)を必要とする。単一分子標的治療はライフルのように強烈な一撃を加えることができるが, 「進化した腫瘍」は変異を得意とするゆえにこれだけでは制御できない。SCT はミスマッチ mHA という多数の標的をもつアロ免疫療法であり, いわばショットガンのようなものである。変異能の高い腫瘍の制御に適していると思われる。

以上の視点は「血縁 haploidentical ミスマッチ移植」の適用を促進することになる。

1. IPA/ NIMA コンセプト(母児免疫寛容)による GVHD の軽減と GVT 効果の増強
2. Haploidentical による免疫再構築の保証
3. HLA ミスマッチによる, GVT 効果への HLA の関与
4. HLA ミスマッチによる, NK や NKT 細胞の GVT への関与, Cw 座の重要性などについて述べる。

SCT の最大の問題点は治療関連死亡 (TRM) 率が高いことであり, 慢性 GVHD を含む長期予後の改善が必要なことである。それが制御可能になれば難治性 / 進行期の固形腫瘍へ SCT が適用される時代が来る。

● 一般演題 ●

自動 DNA 分離装置 (BioRobot EZ1) を用いた 濾紙血痕・スワブ・組織・血液からの DNA 分離

二神 貴臣, 二家本 哲生, 大沼 豪, 辻野 貴史, 丸屋 かおり,
宮崎 豊人, 丸屋 悦子, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

近年 PCR 法を用いた種々の臨床検査法の確立により, 高感度で精度の良い臨床検査が可能となり, 医療への貢献度を増している。種々の材料より純度の高い DNA を迅速かつ簡単に自動分離できることは PCR を用いた医療検査全体にとって有用なことである。我々は自動 DNA 分離装置, BioRobot EZ1 (キアゲン社) を用い, 濾紙血痕・口腔内粘膜細胞・爪・血液などからの DNA を分離し, 組織適合性検査に使用可能な DNA が得られるか検証した。

【材料・方法】

血液腫瘍患者およびその家族の血液・濾紙血痕・口腔内粘膜・爪, total 100 サンプルを用い, BioRobot 法と用手法 (Jet Quick 法・GENOMED 社) で分離した DNA の収量を比較した。さらに HLA-class I and II typing に使用可能か否かを検討した。

【結果・考察】

• 各種材料より抽出された DNA 量(平均)を以下の表に示す。

材料	数	BioRobot	Jet Quick
血液 200 μ l	43	3.5 μ g	3.8 μ g
血液 2 ml	24	17.8 μ g	17.7 μ g
口腔内粘膜	19	5.2 μ g	2.9 μ g

濾紙血痕からの DNA 抽出量は微量であるため, 濃度測定は行なわず, 精製 DNA 泳動像および HLA-class I/II typing test 用増幅実験と検査のみ行なった。

• 工程は血液: 15 分, 濾紙血痕・スワブ: 30 分であった。

• HLA-Class I and II typing kit (Wakunaga MPH-2) による増幅像

精製口紙 DNA; 径 2 mm 濾紙血痕 (HLA LabCard) をパンチ・洗浄・乾燥し, パンチ濾紙片 1 個を PCR に直接アプライして増幅させる。

• HLA-A, B, C, DR and DQ とともに従来法での精製 DNA と変わらず増幅できた。

• HLA-class I and II typing 結果は従来法と変わりがなく, すべてタイプ可能であった。

Luminex による HLA-A, B, C, DR, DQ typing の試み

丸屋 悦子, 二神 貴臣, 二家本 哲生, 大沼 豪, 辻野 貴史,
丸屋 かおり, 宮崎 豊人, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

造血幹細胞移植の多様化が進んでいる。治療の導入部ともいえる組織適合性検査についてより患者サイドに立った検査方法の開発が必要である。組織適合性検査のコスト削減と検査に使用可能な DNA 材料の多様化による患者家族の負担軽減をめざし、Luminex を用いた HLA-A, B, C, DR, DQ typing の検討をおこなった。

【材料・方法】

材料の多様化をめざして: ろ紙血痕・口腔内粘膜細胞・末梢血を検査検体として使用した。

- ろ紙血痕の有利性: DNA を用いた検査法はごく微量の DNA 材料で検査を可能にする。血痕(100 μ l)をつけたろ紙検体はドナー候補者への採血量に対する圧迫感を軽減し・採血時期を問わず、検体輸送とその保存が簡単で安価(室温保存)である。
- 口腔内粘膜細胞の有利性: 患者家族が国内・海外と散在する場合、口腔内粘膜細胞はドナー自身で採取可能であり、採血に対する恐怖感・痛感もなく特に小児ドナーに有利、輸送も常温・封書で送ることができ、患者とその家族に経済的な負担を軽減できる。

Luminex による HLA-typing: LAB Type (One

Lambda 社)を用い、使用ビーズを通常法の半量にし、ハイブリダイゼーションに用いる増幅産物の増幅効率や使用量を検討することにより、コストダウンを試みた。HLA-class I, II の結果を従来法 (MPH-2) と比較した。

【結果・考察】

HLA-class I typing:

DNA 材料に適した増幅条件の設定により十分な増幅産物が得られた。半量のビーズでも従来法で得られる結果と同等またはより resolution の高い結果が得られた。

HLA-class II typing:

HLA-DQ typing については class I と同様な結果が得られた。HLA-DR typing については現在検討中である。

解析ソフトについて

結果を解析するソフトは NMDP 用に構築されたもので、改良・改変が望まれる。今後、その問題点を整理し、メーカー側へ伝え理解を求め、改良を検討していく。組織適合性検査は益々需要が見込まれる。十分な社会貢献を果たすためにはより安価で正確・迅速な検査法の樹立が責務である。

セルラインを用いた HLA 領域内マイクロサテライト解析

太田 正穂¹⁾, 齊藤 敏¹⁾, 福島 弘文¹⁾, 勝山 善彦²⁾,
成瀬 妙子³⁾, 猪子 英俊³⁾, 佐田 正晴⁴⁾

1) 信州大学医学部法医学教室, 2) 信州大学医学部付属病院薬剤部,
3) 東海大学医学部分子生命科学, 4) 国立循環器病センター再生医療部

【目的】

染色体上に比較的均一に分布し、高度な多型性を示すマイクロサテライト多型形質は、疾患感受性遺伝子や原因遺伝子の検索、親子鑑定や個人識別をはじめ多くの分野で活用されている。しかし、精度の高い解析結果を得るためには、構造が解明されているマイクロサテライトや単純繰り返し構造で多型性に富むマイクロサテライトを用いることが望ましい。このような事情を踏まえて、我々は HLA 領域内に見つけたマイクロサテライトの中で有効なものを検索し、第 10 回国際組織適合ワークショップで配布された B セルラインについて解析し、HLA 遺伝子との連鎖を調べた。

【材料と方法】

検査に用いたサンプルは、第 10 回国際組織適合ワークショップで配布された 74 種類の B セルラインから抽出した DNA を用いた。マイクロサテライトは HLA 遺伝子領域内にある 38 種類を選んだ。マイクロサテライト多型は、プライマーの一方に蛍光

色素 FAM, TET, HEX を標識し、PCR を行った後、ABI377 自動シーケンサーを用いたフラグメント解析で決定した。また、アレル決定のためのコントロールには、遺伝子配列が既知の B セルライン PGF と COX の DNA を用いた。

【結果と考察】

HLA-A の 265 Kb テロメア側にある D6S2972 から HLA-DQB1 の 329 Kb セントロメア側にある M2-2-22 まで、ほぼ 3.3 Mb の間に設定したマイクロサテライト解析では、HLA 型が全く同じセルライン (MOU と PIPOUT や SCHU と HO104) のアレルは総て同型であった。各 HLA ローカスを基にその周辺のマイクロサテライトのアレルを解析すると、200 Kb から 600 Kb に渡る様々な長さをもった特徴的なハプロタイプが見られた。特に HTC を用いたセルラインのマイクロサテライト多型解析結果は、HLA と連鎖するハプロタイプの判定や、移植医療での検査に有効な情報をもたらすと考えられる。

非血縁者間骨髄移植におけるゲノムワイドな マイナー組織適合抗原遺伝子の検索

成瀬 妙子¹⁾, 李 素雲¹⁾, 佐々木 佳奈¹⁾, 志知 大輔¹⁾, 河田 寿子¹⁾,
猪子 英俊¹⁾, 勝山 善彦²⁾, 太田 正穂²⁾, 森島 泰雄³⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系, 2) 信州大学医学部法医学教室, 3) 愛知県がんセンター

【目的】

造血幹細胞移植は、移植後の拒絶や重篤な GVHD の発症を防ぐため、ドナーと患者の HLA を適合させて行われる。しかし、HLA が適合した組み合わせであっても、GVHD を発症する場合があります、重症度に差が見られることが報告されている。この原因として HLA 以外のマイナー組織適合性抗原 (mHA) の存在が考えられるが、これまで mHA に関する研究は散発的に行われているのみで、遺伝子座の同定や詳細な存在箇所は不明なものが多いのが現状である。

我々は、ヒト染色体上に我々が設定した 30,000 個の多型マイクロサテライトマーカーを用いて、骨髄移植におけるドナーと移植患者の DNA 多型を検索し、両者で不適合が見られる遺伝子領域を特定することにより、mHA 遺伝子を同定することを試みている。今回は第 6 番および 22 番染色体について報告する。

【材料と方法】

日本骨髄バンクを介して非血縁者間骨髄移植が施行された、HLA-A-B, -C, -DRB, -DQB 遺伝子完全一致の白血病患者と骨髄提供者 100 組を対象とし、

急性 GVHD 発症度 0 から IV 度に分類した。方法は、第 6 番染色体 HLA 領域に存在する 13 種、および第 22 番染色体長腕 13.0 Mb から 23.0 Mb に存在する 37 種のマイクロサテライトマーカーを用いて、個々のマーカーにおける患者とドナーの繰り返し数を検出後、患者、ドナー間での繰り返し数の差異を検討した。

【結果および考察】

第 6 番染色体においては、それぞれのマーカーにおいて 46%–97% の一致率を示したが、HLA 遺伝子との距離が短いマーカーほど一致率が高値を示し、マイクロサテライトマーカーが遺伝子多型の一致、不一致を検索する上で有用な指標となりうることを示した。第 22 番染色体における不一致では、37 種のうち 3 種に正の相関が認められたが、この中で 17.89 Mb, 21.54 Mb に存在する 2 種については、既知、新規遺伝子が密に存在している領域であることから、この付近に急性 GVHD の発症に関与するなんらかの遺伝子が存在する可能性が示された。今後、移植後 GVHD とこれら遺伝子の関係が明らかになれば、重篤な GVHD の予防や治療法の確立につながると期待される。

HLA 遺伝子欠損; ハプロおよび座位特異的 LOH と DRB 欠損遺伝子を疑う症例(予報)

二家本 哲生, 二神 貴臣, 大沼 豪, 辻野 貴史, 丸屋 かおり, 丸屋 悦子, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

【はじめに】

造血幹細胞移植を目的とした家族の組織適合性検査の結果, HLA-DRB 欠損遺伝子の存在が示唆された1家系と, 造血器腫瘍の急性期に HLA の LOH (loss of heterozygosity) がみられた3症例について予報する。

【材料・方法】

• Case 1: 悪性リンパ腫の患者(16♀)とその両親の血液・爪を用い HLA-A, B, DR and DQ typing を行なった。さらに9種のマイクロサテライトを用い親子の遺伝関係を確認した。

• Case 2: 急性期 ATLL (blast 70%) の患者およびその兄弟の血液および患者の口腔内粘膜細胞を用い HLA-A, B, C, DR typing を行なった。

• Case 3: 再生不良性貧血 (MDS の疑い) の患者の血液と口腔内粘膜およびその家族の血液を用い HLA-A, B, DR typing をおこなった。

• Case 4: AML 患者とその同胞7名の HLA-A, B, DR typing を行なった。

【結果・考察】

Case 1: 患者および両親の HLA typing の結果, HLA-DR 座において父子間にその遺伝関係が否定される結果が得られた。患者の体細胞由来 DNA を用い検査した結果, LOH 現象はみられなかった。9種のマイクロサテライトを用い患者と父の多型性を検査した結果, 父子関係は否定されなかった。HLA-

DRB 座に欠損遺伝子の存在が示唆された。

Case 2: ATL 細胞が末梢血液に70%存在時の血液由来 DNA と口腔内粘膜(体細胞)由来 DNA を用い HLA-typing をおこなった。体細胞 DNA では B*5901-C*0102 が検出され, 血液由来 DNA では検出されなかった。HLA-B, C 座で LOH 現象が見られた。

Case 3: case 2 と同様に, 血液由来 DNA と体細胞由来 DNA で HLA-typing をおこなった。血液由来 DNA ではハプロタイプ HLA-A*2601-B*4002/3-DRB1*1405 が体細胞由来 DNA で検出できるおよそ 1/3 から 1/4 の強度で検出可能であった。

Case 4: 患者とその同胞7名の HLA-A, B, DR typing 結果より4種のハプロタイプが検出され, 患者の HLA-B 座に B35 が loss していると考えられる結果が得られた。体細胞 DNA による確認はできなかった。

造血幹細胞移植目的の家族検査およそ400件中に検出された症例である。わが国では HLA-B61 の LOH が多数報告されているが, 本報告では3例中1例が B61 ハプロタイプ LOH であった。癌細胞の免疫監視機構からのエスケープ戦略とされる LOH 現象はそれほどまれな現象ではない。造血幹細胞移植目的のタイピングでは LOH 検出が, ドナー選択と GVL 効果の評価に重要と考える。

HLA 全領域における SNPs による口唇口蓋裂症 感受性遺伝子の検索

中西 真理¹⁾, 実藤 信之¹⁾, 下嶋 典子¹⁾, 羽竹 勝彦¹⁾, 石谷 昭子¹⁾, 志田 裕子²⁾,
高戸 毅²⁾, 玉置 盛浩³⁾, 徳永 勝士⁴⁾, Daniel E. Geraghty⁵⁾

1) 奈良県立医科大学法医学, 2) 東京大学医学部顎口腔外科, 3) 奈良県立医科大学口腔外科,
4) 東京大学人類遺伝学, 5) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】

口唇裂 (CL) あるいは口蓋裂症 (CP) の発生は一卵性双生児においても 100% 一致せず, また単純にメンデル遺伝に従ってはいない。このことから, この疾患は環境要因と遺伝的要因の相互作用による多因子疾患であると考えられている。病因に関してはこれまでの研究において, HLA 遺伝子の関与が報告されている。Sakata らによると, CL/P と HLA-B*1501 (女性), B*5101 (男性) が相関を示すと報告された。我々は, これまで全 HLA 領域にわたる single nucleotide polymorphisms (SNPs) を検索し, これら SNPs のタイピングを SSP 法により行うための primer をデザインしてきた。今回, 口唇口蓋裂と強い相関があると言われている, HLA-B1501 や B5101 が真の責任遺伝子か, あるいは近辺の他の遺伝子かを調べる目的で, これら SNPs primer set のうち 100 SNPs の primer set を用いて SNPs タイピ

ングを行い, 疾患との相関解析を行った。

【材料・方法】

患者群としては, 東京大学顎口腔外科における手術例より 70 名, 健常対照群として, 東京都近辺在住者 70 名より, インフォームドコンセントを得て末梢血を採取し, それより DNA を抽出した。

SNPs タイピングは SSP 法により 100 SNPs をタイピングした。HLA タイピングは HLA-B ローカスについては, PCR-SSO 法で行った。

【結果および考察】

健常群を対照として相関解析を行ったところ, HLA-B51 ($\chi^2 = 6.8$), HLA-B 遺伝子に近い SNP JD40 ($\chi^2 = 3$), MICA に近い SNP JD44 ($\chi^2 = 12$), MICA 遺伝子内 SNP ($\chi^2 = 6.6$) で相関が認められた。現在, この結果が HLA-B が原因であるか MICA が原因であるかの検討中である。

非寛解期造血器腫瘍に対する母児間免疫寛容による 血縁者間 HLA 不適合移植

芦田 隆司, 川西 一信, 杉山 昌史, 玉置 千勢,
宮武 淳一, 内木 義人, 松田 光弘, 金丸 昭久

近畿大学 血液・腎臓・膠原病内科

【はじめに】

近年, 母児間免疫寛容の観点から, HLA が不適合であっても血縁者間移植が施行できる可能性が拡大してきた。今回われわれは適切なドナーがなく, 早急に造血幹細胞移植が必要と考えられた4例の非寛解期造血器腫瘍に対して母あるいは児をドナーとして移植を行ったので報告する。

【対象症例】

症例 1) 23 歳, 男性。AML, 第 1 再発期。ドナー: 母。症例 2) 19 歳, 男性。ALL, 骨髄移植後再発。ドナー: 母。症例 3) 39 歳, 女性。MDS overt。ドナー: 児。症例 4) 25 歳, 女性。非ホジキンリンパ

腫, 非寛解期。ドナー: 母。

【結果】

症例 1 は速やかに生着するとともに完全寛解となり, 生存中である。急性 GVHD (grade I) を認めた。症例 2 は一時寛解となったが, その後再発し死亡した。症例 3 および 4 は病勢の進行が顕著で評価不能であった。

【考察】

HLA 不適合母児間移植は非寛解期造血器腫瘍に対して完全寛解を達成し, 長期生存可能な症例が得られた。今後適応条件を明確にする必要があると思われる。

進行期造血器悪性腫瘍に対する母児免疫寛容に基づく T 細胞非除去 HLA 不一致造血幹細胞移植

淵田 真一¹⁾, 山田 紀子¹⁾, 内田 亮¹⁾, 岡野 晃¹⁾, 岡本 雅司¹⁾,
落合 直也¹⁾, 島崎 千尋¹⁾, 丸屋 悦子²⁾, 佐治 博夫²⁾

1) 京都府立医科大学大学院医学研究科血液病態制御学, 2) HLA 研究所

【目的】

母児間マイクロキメリズムは母児間の免疫寛容の存在を示唆する。この仮説に基づき進行期造血器悪性腫瘍に対して母児間, 児母間, NIMA 不一致同胞間における T 細胞非除去 HLA 不一致造血幹細胞移植を行ったので報告する。

【対象・方法】

適切なドナーの得られない進行期造血器悪性腫瘍(非寛解期) 12 例。男性 6 例, 女性 6 例。年齢 17-64 歳。慢性骨髄性白血病(急性転化) 2 例, リンパ芽球性リンパ腫 3 例, 非ホジキンリンパ腫 2 例, 多発性骨髄腫(形質細胞性白血病を含む) 3 例, 急性骨髄性

白血病2例。HLAはGVHD方向に3座不一致9例、2座不一致3例。母児間4例、児母間3例、NIMA不一致同胞間5例。移植前処置はCA+CY+TBI6例、Ful+MeI5例、BU+CY1例。GVHD予防は全例FK 506+mini dose MTX。幹細胞は11例がPBSC、1例がPBSC+BM。輸注CD34陽性細胞数は $1.26\text{--}3.57 \times 10^6/\text{kg}$ 。

【結果】

全例速やかに生着し急性GVHDは評価可能11例中0度1例、I度5例、II度4例、III度1例に認め、特に児母間、NIMA不一致同胞間では7例中5例がI度以下であった。慢性GVHDは評価可能10例中

6例に認めた。100日以内の死亡は評価可能11例中1例のみであり、2年生存率60.6%であった。合併症としては1例にFK脳症、10例にTMA、8例にサイトメガロウイルス抗原血症を認めた。

【考察】

本移植法はHLAが2-3座不一致であるにもかかわらず生着は速やかで急性GVHDのコントロールも比較的容易であった。また4例で免疫抑制剤の投与中止が可能であった。T細胞除去やCD34陽性細胞移植と比較し再発や感染症のリスクも少ないと考えられHLA一致ドナーが得られない症例においても移植を可能とする有用な方法と考えられた。