

第4回日本組織適合性学会近畿地方会抄録

◆組織適合性への新たな挑戦◆

会 期: 2006年2月4日(土)
 10:00~18:00
 会 場: 参天製薬株式会社本社
 (大阪市東淀川区下新庄3-9-19)
 世話人: 谷 慶彦(大阪府赤十字血液センター)
 共 催: 財団法人 大阪腎臓バンク

● オープニングセミナー ●

Lessons from HLA-DNA Typing 骨髄バンクドナー HLA 型検査の DNA タイピング化

小野 明子

大阪府赤十字血液センター 検査二課

平成17年2月末まで、骨髄バンクドナー登録者のHLA検査(タイピング)は、HLA-A,B,Cが全国約40箇所の血液センターにおいて、LCT法による血清学的検査で、HLA-DRB1はPCR-MPH法を用いて全国7箇所の基幹センターで行われ、血清学相当(2桁レベル)の結果を得ていた。HLA-A,B,Cに対して行っている血清学的検査法では、ドナー血液からリンパ球を生細胞の状態で調整し、血液センター製のタイピングトレイ(日赤共通トレイ)を用い、その多くは手作業でHLA型を調べていた。そのため、精度も効率も悪く、また、全国的にも検査法等に違いがあり、検査法に統一性が無かった。さらに骨髄移植後の生着率全国集計の結果からも、アリルレベルの不一致が予後に影響することが明らかになり、DNAタイピングへの移行とタイピング精度の向上が求められていた。

それらの要請を受けて、平成17年3月1日より、骨髄バンクドナー登録時のHLA-A,BおよびDRB1のHLA型検査は、蛍光ビーズを用いたLuminex法によるDNAタイピングへの移行が行われた。Luminex法は、プローブを固相に付けたPCR-rSSO法のひとつであり、1本のチューブ内で多くのプローブとの反応が可能のため、簡便、正確かつ短時間で多検体処理が可能で新しい遺伝子多型判別法である。特徴は2種類の蛍光物質により各10段階に着色された100種類の色調となるポリスチレンビーズで、それぞれのビーズ表面に異なるプローブを吸着させ、蛍光ラベルしたPCR産物とのハイブリダイゼーションの有無を判定する。測定装置は2種類の検出用レーザーを有し、2種類のうち1種類のレーザーでビーズ表面の蛍光物質の色調によりビーズを特定し、もう1種類のレーザーで、ビーズ表面のプ

ローブにハイブリダイズした蛍光ラベルしたPCR産物(標識されたフィコエリスリン)の蛍光強度を数値データとして得ることができる。使用キットは、日本人集団において遺伝子頻度が0.1%以上でみられる対立遺伝子について判別が可能であること、最小陽性反応値と最大陰性反応値の比が3以上(交差反応があれば2以上)であることという条件等を基に、今年度はHLA-A,Bは湧永製薬のWAKFLow HLA-A,BをHLA-DRB1はワンラムダのLABTypeSSOを使用した。

また効率化のため、検体をバーコード管理し、DNA抽出についても、自動化を進め、ベックマンと富士フィルムが共同開発した96検体を一度に処理できる自動機器を導入した。PCRはABI9700を用い、タイピングは前述のLuminex法を実施し、これらのシステムを用いることにより、血液センターでの骨髓バンク事業の効率化も図ることが可能となり、これまで約40箇所で行っていた検査を東京都赤十字血液センターが関東以北16センター分および大阪府赤十字血液センターが中部以南31センター分を検査集約した。実際の検査工程では1週間に1回、各受入センターより検体が送付され、それらをシステムにより受け付け、1プレート96検体を1バッチとして検査を行った。1バッチ当たりの所要時間は、バーコードの読み取りからDNA抽出に約1.5時間、PCRに約1.5時間、蛍光ビーズ法の反応操作に約1時間、Luminex法での測定および判定に約1時間、計約5時間であった。3月から11月末までに、当センターでは、中部以南の31府県を対象とし、14,091本の検査を実施した。

まず、タイピング法をLuminex法に変更することにより、日本人集団において遺伝子頻度が0.1%以上でみられる対立遺伝子についての判別が可能となり、識別不能(Ambiguity)となる組み合わせを除き、

4桁レベルのタイピングがヘテロの組み合わせも含め、判別可能となった。4桁レベルの判定結果が得られるようになり、これまで日本人において、多型があまり無いと考えられていた型が存在したり、極めて稀だとされていた型の遺伝子頻度が解明され、また、検査された対立遺伝子頻度に東日本と西日本で有意差が認められた型もあった。

またDNAタイピングの精度を上げることで新たな問題も発生している。Luminex法は、多くのHLA型を一度に判定できるよう、PCRの段階で、複数のプライマーを含むマルチプレックスPCR反応となっている。PCR増幅の出来(すべてのPCR産物の均一な増幅)が非常に重要であり、その後の判定に多大な影響を及ぼすことを我々は経験した。しかしPCR反応の増幅効率は、DNAの純度やヘテロの組み合わせが影響すること、また使用するサーマルサイクラーやその微妙な環境が増幅効率の違いをもたらすことが確認されている。特に、HLA-A遺伝子のexon2において特定の型のPCR増幅に不安定さを感じられた。また、96検体分を一度に増幅しているが、well間での増幅効率の違いも経験している。以上の経験より、精度の高いタイピングには安定したPCR反応を得ることが不可欠であり、大きな課題であると考えられる。

骨髓バンクドナーのHLA型検査が、Luminex法によりDNAタイピング化され、これまで行っていた血清学的検査法では不可能であった大量検体を効率的にタイピングすることが可能となり、また、これまでに得られていた2桁レベルの判定結果と比べ、高解像度のHLA型検査結果を得ることが可能になった。しかも、現在3万検体を越えるタイピングの結果から、頻度や稀なアリル、新しいアリルについて、新たな事象がわかってきた。

● 特別講演 ●

HLA の将来展望 (HLA, innate immunity, 骨髄移植)

十字 猛夫

日本赤十字社中央血液研究所所長

講演を依頼されたときに、なんの配慮もなく決めていただいた演題名の大きさに現在当惑いたしているところでもあります。そこで上記のような副題をつけさせていただきました。HLA 抗原は、現在も new alleles が日本人でも十数個発見されていて、それらを含めて、正しく検査できる検査体制を確立することは、大変困難な状況であります。骨髄バンクのドナー数も二十万人を超えた状況で、検査を行うと今まで日本人にはないと考えられていた HLA 抗原も百人レベルで保有者がいることも、明らかとなり、このような患者にも、適合ドナーを探すことも、バンクの新しい課題となっております。また現在のプローブを用いた検査法の宿命として、保有する抗原の組み合わせによっては、いわゆる ambiguity が生じて、確定できないことも、明らかとなり、革新的な技術の開発が待たれるところでもあります。DNA 検査が exon 2, exon 3, exon 4 の全域をカバーでき、骨髄移植の成績と付き合わせれば、どの領域が適合を無視しているか明らかとなる可能性もありうると思います。それにより、適合ドナー選択の幅も広がるでしょう。

約二十年前、白血病患者およびその家族、血液内科医、HLA typers の大きな夢であった骨髄バンクが

設立され十五年近くが過ぎました。ドナー登録も、昨年十月には、月間 7,000 近い数に上り、うれしい悲鳴をあげ、またバンクを介した骨髄移植数も、900 を超えると予測されています。しかしながら、HLA アリル適合の組み合わせでの白血病患者への骨髄移植も、長期無病生存率はなかなか 6 割を超えない、ことについて、NK 細胞と HLA-C 抗原の適合性、マイナー抗原の関与などが、想定され、それぞれについての研究が進められているところである。

近年 innate immunity についての研究がすすみ、おぼろげながら、徐々にその実像が伺える様になってきております。Collectin, ficolin, MBL, TLR, anti-microbial peptides, cathelicidin, defensin, NK receptor などを御紹介する。そのなかで、MBL (mannose binding lectin) の変異型が、MBL の血中濃度と関連し、低値型の個体は、好中球減少状態では、細菌感染に抵抗性がないことが、知られている。最近九大原田先生のグループは、骨髄移植症例において、MBL 低値変異型の患者に、不成功率が高いことを報告している。

今後、骨髄移植において、innate immunity の関与に配慮することも重要であると思われる。

●テクニカルセミナー&臨床に即応した抗体検査ワークショップ●

Luminex 法 (LABScreen Single Antigen) によって 検出された CREG に対する HLA 抗体と その PC-HLA 輸血効果の解析

河村久美子

兵庫県赤十字血液センター

【目的】

HLA 抗体による PTR に陥った患者に PC-HLA を供給する際、患者 HLA 抗体が広範囲特異性の場合、患者 HLA タイプの CREG (交差反応性抗原グループ) を考慮し、ドナー選択している。今回、CREG に基づき、ドナー選択し、PC-HLA 適合性試験である LCT 法、AHG-LCT (κ 法)、AHG-LCT (λ 法) の 3 法が陰性であったにもかかわらず PTR を引き起こした症例等を経験した。それらの症例について高感度で HLA 抗体特異性同定可能な Luminex 法 (LABScreen Single Antigen) を用いて解析したので報告する。

【方法, 結果】

症例 1. MDS, 男性, HLA-A24, A26, B51, B-, Cw1, Cw10。HLA 抗体特異性は Luminex 法 (LABScreen PRA Class I) の解析では 55 ビーズ(セル)中 55 ビーズ陽性の広範囲特異性。患者の B51 と交差反応性の B52 を持つドナーを許容抗原に選択し、LCT 法、AHG-LCT (κ 法)、AHG-LCT (λ 法) の 3 法が陰性の PC-HLA を 3 回供給した。CCI ($\times 10^4$; 24 時間値) はそれぞれ、0.48 (無効)、0.95 (有効)、-0.63 (悪化) を示したため、LABScreen Single Antigen にて抗体を解析したところ、B52 を含む広範囲特異性 (B52 + B39 + B49 + B62 + B72 + B18 + B27 + B7 + B50 + B75 + B55 + B78 + B54 + B61 + B42 + B60 + B41 + B45 + B47 + B64 + B4005 + B48 + B35 + B71 + B76 + B81 + A11 + B13 + B8 + B44 + B67 + A3 + B56 + B57 + B73 + A66) を確認した。B51, B- の PC-HLA 輸血 (2 回) により、CCI (24 時間値) 2.06

(著効)、1.99 (著効) を得た。

症例 2. AML, 男性, HLA-A2, A24, B60, B75, Cw4, Cw9。HLA 抗体特異性は LABScreen PRA Class I の解析では 55 ビーズ中 55 ビーズ陽性の広範囲特異性。患者の B75 と交差反応性の B35 を持つドナーを許容抗原に選択。LCT 法、AHG-LCT (κ 法) の 2 法が陰性、AHG-LCT (λ 法) がスコア 8 の強陽性で反応したため、PC-HLA ではなく、一般 PC の扱いで供給したところ、CCI (1 時間値) 2.63 (著効) を示した。LABScreen Single Antigen を用いた抗体の解析において、B75 の交差反応性抗原である B35, B62 そして、B60 の交差反応性抗原である B48, B61 を含む広範囲特異性 (B48 + B61 + B35 + B62 + B18 + B38 + B51 + B72 + B52 + B39 + B78 + B53 + B56 + B81 + B8 + B63 + B57 + B8201 + B58 + B50 + A11 + B49 + B73 + A30 + A31 + B4005 + B37 + B71 + B59 + B41 + A32 + A68 + B7 + A33 + A3 + B45 + B77 + B67 + A74 + B44 + B47 + A36 + B27) を確認した。B62 を含む 3 セルには、1 セル目 (B*4002, B*1507) が LCT 法、AHG-LCT (κ 法) の 2 法が陰性、AHG-LCT (λ 法) がスコア 8 の強陽性、2 セル目 (B*1501, B*1507) が LCT 法陰性、AHG-LCT (κ 法)、(λ 法) の 2 法がスコア 8 の強陽性、3 セル目 (B*1501, B60) が LCT 法、AHG-LCT (κ 法)、(λ 法) の 3 法が陰性を示した。また、B61 (B*4002, B*4006) の 3 セル、B48 (B*4801, —) の 1 セルには、LCT 法、AHG-LCT (κ 法)、(λ 法) の 3 法がすべて陰性を示した。

症例 3. 肺がん, 女性, HLA-A2, A24, B46, B61

(B*4002), Cw1, Cw10. HLA 抗体特異性は LAT1240 の解析では 28 ウェル中 11 ウェル陽性。患者の B61 と交差反応性の B60 を持つドナーを許容抗原に選択。B60 を含む 4 セルが LCT 法, AHG-LCT (κ 法) の 2 法が陰性, AHG-LCT (λ 法) がスコア 4~8 の陽性で反応した。LABScreen Single Antigen を用いた抗体の解析において, B61 の交差反応性抗原である B60 を含む特異性 (B60 + B7 + A31 + B55 + B42) を確認した。PC-HLA 適合性試験において陽性を示し, 該当製品の供給を行わなかったため, 輸血臨床効果は不明である。

症例 4. AML, 女性, HLA-A24, A—, B7, B46, Cw—, Cw—。HLA 抗体特異性は LABScreen PRA Class I の解析では 55 ビーズ中 50 ビーズ陽性の広範囲特異性。患者の B46 と交差反応性の B62 を持つドナーを許容抗原に選択。B62 を含む 4 セル (B62, B7) のうち, 3 セルについては LCT 法, AHG-LCT (κ 法), (λ 法) の 3 法で陰性を示した。また, 1 セルが LCT 法, AHG-LCT (κ 法) の 2 法が陰性, AHG-LCT (λ 法) がスコア 6 の陽性を示した。LABScreen Single Antigen を用いた抗体の解析において, B75 の交差反応性抗原である B35, B62 そして, B60 の交差反応性抗原である B48, B61 を含む広範囲特異性 (B62 + B39 + B60 + B50 + B61 + B4005 + B18 + B72 + B49 + B13 + B52 + B37 + B47 + B44 + A31 + B51 + B78 + B53 + B48 + B75 + A30

+ B41 + B38 + B45 + B76 + B54 + B71 + B64 + B77 + B35) を確認。確認した。PC-HLA 適合性試験において陽性を示し, 該当製品の供給を行わなかったため, 輸血臨床効果は不明である。

症例 5. MDS, 女性, HLA-A26, A33, B51, B58, Cw10, Cw—。HLA 抗体特異性は LABScreen PRA Class I の解析では 55 ビーズ中 55 ビーズ陽性の広範囲特異性。患者の A33 と交差反応性の A31 を持つドナーを許容抗原に選択。A31 を含む 4 セル (A31, A—) のうち, 3 セルについては LCT 法, AHG-LCT (λ 法) の 2 法が陰性, AHG-LCT (κ 法) がスコア 4~6 の陽性を示した。また, 1 セルは陰性を示した。LABScreen Single Antigen を用いた抗体の解析において, A33 の交差反応性抗原である A31 を含む広範囲特異性 (A31 + B60 + B55 + B62 + B61 + A24 + A2 + B49 + B7 + A31 + B50 + A30 + A2 + B27 + B4005 + B39 + B42 + B72 + B75 + B76 + A68 + A23 + B54 + B48 + B13 + A69 + B18 + B52 + B47 + B44 + B81 + B41 + B77 + B8201) を確認した。PC-HLA 適合性試験において陽性を示し, 該当製品の供給を行わなかったため, 輸血臨床効果は不明である。

【まとめ】

PC-HLA 適合性試験が陰性にもかかわらず PTR を引き起こした症例の原因究明に LABScreen Single Antigen は有用であると考えられる。

Luminex 法 (LABScreen) で HLA 抗体同定を行った PC-HLA 適応患者に対する、全血を用いた LIFT 法による交差試験の検討

小島 芳隆

大阪府赤十字血液センター

【はじめに】

我々は昨年の本学会にて蛍光ビーズを使用する LABScreen を HLA 抗体スクリーニングに使用した経験の報告をした。現在、われわれのセンターでは PC-HLA 対応患者の HLA 抗体スクリーニングを LABScreen を用いて行い、HLA 抗体を同定し、その結果を基にドナーを選択している。今回、PC-HLA 交差適合試験である AHG-LCT に代わりうる、全血を用いた LIFT 法(ここでは全血 LIFT 法と呼ぶ)による交差試験を考案し、AHG-LCT に対して、並行して全血 LIFT 法で交差試験を行い、両者の交差試験法の比較検討を行った。そこで、全血 LIFT 法の詳細と、全血 LIFT 法と現行法の比較結果等について報告する。

【対象と方法】

PC-HLA 交差適合試験 (AHG-LCT 法) 行った患者血清とドナー血液に対し、並行して、同じ検体で全血 LIFT 法を実施した。患者については事前に LABScreen を用いて、HLA 抗体スクリーニングを行い、HLA 抗体の同定を行っている。全血 LIFT 法は、ドナー EDTA 加血液 50 μ L と患者血清 25 μ L を混合、37 $^{\circ}$ C15 分反応させ、BSA-EDTA-PBS700 μ L で 3000rpm2min 遠心により 4 回洗浄後、FITC 標識 Goat Anti Human IgG (Jackson 社) 2000 倍希釈を 200 μ L と PE 標識 Donkey Anti Human IgM (Jackson 社) 2000 倍希釈を 200 μ L と PerCP 標識 CD3 (ベクトンデッキンソン社) を 1 μ L で 4 $^{\circ}$ C15 分反応させ、Lysing Solution (ベクトンデッキンソン社) 10

倍希釈を 500 μ L で室温 5min 溶血、遠心後、BSA-EDTA-PBS で 2 回遠心洗浄し、同液 200 μ L で浮遊させ、フローサイトメトリー (FACSCaliber, ベクトンデッキンソン社) で解析を行った。なお、解析データの Median 値(中央値)を基準として、患者血清を加えた場合の Median 値と陰性コントロール血清の Median 値の比が 2.0 以上を示したものを陽性とし、2.0 未満を陰性とした。

【結果】

結果を得るまでの検査時間は AHG-LCT 法の 3-4 時間に対し、全血 LIFT 法では 1-2 時間であった。948 例の両者の交差適合試験の結果、AHG-LCT 法陰性で、全血 LIFT 法陽性である症例が 27 例あった。それらの症例のうち 3 例(同一症例)において、LABScreen での HLA 抗体スクリーニングではバックグラウンドが高いため HLA 抗体として同定できなかった HLA 抗原に対する抗体が明らかとなった。つまり、全血 LIFT 法では陽性になり、その結果を基に許容抗原から削除し、ドナーを選択した。

【考察】

今回の全血 LIFT 法はクロスマッチにおいて、AHG-LCT に比べ、約 2 時間短縮可能で、また感度の点でも、高感度であり、有用性を確認できた。これらの症例のように LABScreen でバックグラウンドが高く、抗体同定が困難な場合、全血 LIFT 法での抗体同定検査を併用すればドナー選択にも有用ではないか考えた。

M-MPHA 法を用いた HLA クラス I 抗体スクリーニング —M-MPHA 法の血小板輸血における 交差適合試験法としての有用性—

斉藤 敏

長野県赤十字血液センター 検査課

磁性粒子を用いた MPHA 法 (M-MPHA 法) では、抗ヒト IgG 標識もしくは抗ヒト IgM 標識粒子に磁性粒子を用いること、低イオン強度食塩液 (Liss) を検体希釈液に用いることにより、判定までに 7 時間を要した従来法に比べ、1 時間以内に、より高感度に HLA クラス I 抗体を検出することが可能になった。血小板輸血不応状態 (PTR) 患者の IgG 型 HLA クラス I 抗体検出率において、M-MPHA 法を用いた場合は 26.4% で、LIFT 法を用いた場合と同じであった。一方 AHG-LCT 法では 19.4%、PIFT 法では 22.2%、FlowPRA 法では 30.1% であった。

血小板輸血における IgM 型 HLA クラス I 抗体 (IgM-HLA 抗体) の臨床的意義については、赤血球抗体同様に、低温反応性の HLA 抗体は臨床的に意味がないとの報告もあるが、当施設において輸血効果が検討できた 7 症例全例において輸血効果が得られなかったことから、IgM-HLA 抗体も多くの症例において PTR の原因となる可能性が高い。PTR 患者の IgM-HLA 抗体検出率において、M-MPHA 法を用いた場合は 39.7% で、高感度抗体検出法と考えられている FlowPRA 法の 28.9% より高かった。一方、ほとんどの IgM-HLA 抗体の検出が可能と考え

られていた AHG-LCT 法では、わずか 16.5% しか検出できなかった。

これまで、異型血小板輸血の交差適合試験に M-MPHA 法を用いた場合に、血小板上の A, B 抗原と患者の ABH 抗体により、しばしば陽性反応が起こると報告されていた。しかし、これら陽性反応を示す症例の交差適合試験結果と血小板輸血効果を検討したところ、交差適合試験が陽性の異型血小板輸血においては輸血効果が得られず、交差適合試験が陰性の異型血小板輸血において輸血効果が得ることが判明した。さらに、アフエレーシス由来の血小板上の A, B 抗原量は、保存日数の経過とともに増加することから、異型血小板輸血時には M-MPHA 法による交差適合試験を行うことが望ましい。

一方、M-MPHA 法を HLA 抗体スクリーニングとして用いる際には、ABH 抗体による上記陽性反応が起こる可能性もあることから、ABH 抗体の影響を受けないパネルを選択する必要がある。

以上より、M-MPHA 法を HLA 抗体スクリーニング、血小板輸血の際の交差適合試験に用いることで、PTR の原因解析と輸血効果の向上に貢献できる可能性がある。

JSHIKB “臨床に即応した抗体検査ワークショップ” サンプルについて

丸屋 悦子¹⁾, 斎藤 敏²⁾

- 1) NPO 法人 HLA 研究所
2) 長野県赤十字血液センター 検査課

前提: すべて患者検体です。血清量は 100 μ l です。
この量でできる限りの検査をお願いします(方法の選
択なども考慮頂けると幸甚です)。
各血清の背景と質問を以下に示します。

JSHIK001

再生不良性貧血, 34 歳, 女性, 妊娠歴輸血歴有り。
血小板輸血効果ない。将来の治療方針: 骨髄移植の
予定。

患者 HLA: A2 A26 B48 B61 Cw3 Cw8

質 問

1. HLA 抗体の有無
2. 抗体陽性の場合: 血小板輸血で許容されると考えられる抗原について (A 座・B 座・C 座)
3. ミスマッチ骨髄移植を余儀なくされた場合, 避けなければいけない HLA 抗原について

JSHIK002

81 歳, 男性, 疾患名: 不明

貧血と出血傾向あり。血小板輸血の必要性あり。

患者 HLA タイプ: A2 A33 B61 B44

質 問

1. 抗体の有無
2. 効果的な血小板輸血をおこなうためのアドバイス

JSHIK003

ミスマッチ骨髄移植を希望する患者の血清です。

患者 HLA タイプは A1101, 2402 B6701, 0702
Cw0702 DRB1*1501, 0101 で, ドナー候補 (A 型
+): HLA-A1101, 2402 B6701, 3501 Cw0702, 0303
DRB1*1501 である。

質 問

1. 患者血清中の HLA 抗体の有無
2. 患者はこの候補者をドナーとすることが可能か否かについてコメント

JSHIK004

43 歳女性 AML, O 型+, HLA タイプ: A26 A11
B13 B61

血小板輸血を必要とするが, 現在ランダム血小板輸
血で効果なし。

質 問

1. HLA 抗体の有無
2. 抗体陽性の場合: 血小板輸血で許容されると考えられる抗原について (A 座・B 座・C 座)
3. ミスマッチ骨髄移植を余儀なくされた場合, 避けなければいけない HLA 抗原について

● シンポジウム ●

「血縁 HLA 半合致移植において」

池亀 和博

大阪大学大学院医学系研究科 血液腫瘍内科学講座

造血細胞移植におけるトピックスの1つは、血縁者内、骨髄バンクともに HLA 適合ドナーがない、あるいは骨髄バンクにあっても間に合わないときにするか、すなわち alternative donor からの移植である。現在可能な手段としては、臍帯血移植と血縁者からの HLA 不適合移植がある。臍帯血移植においては、免疫能の未熟性を反映するためか、感染症や再発、拒絶が問題となる。一方 HLA 不適合移植では、重篤な GVHD が最大の障害となる。組織適合性と免疫抑制剤という観点からは、従来の HLA 適合移植における免疫抑制療法はかなり確立してきたと考えられ、今後 HLA 不適合の壁をいかに乗り越えるかに興味もたれる。

近年様々な免疫抑制剤が開発され、移植の現場でもチャレンジングな試みが展開されているが、現在の進歩をもってしても両方の HLA ハプロタイプが異なる場合の造血細胞移植は不可能である。そこで2本の HLA ハプロタイプのうち、一方を共有し、もう一方が異なる血縁者ドナーからの移植(血縁 HLA 半合致移植)が行われつつある。血縁 HLA 半合致移植が可能となれば、親子間では 100%、兄弟間では

75%で、移植ドナーが確保できることになる。本講演では、最初に血縁 HLA 半合致移植にまつわるいくつかの概念を確認し、議論の基盤を共有するようにしたい。その上で、血縁 HLA 半合致移植での従来型の移植(血縁 HLA 半合致フル移植)の話題と、ミニ移植への応用(血縁 HLA 半合致ミニ移植)について紹介する。ミニ移植は近年盛んに行われるようになった造血細胞移植の方法であり、「キメリズム」がキーワードになると考えられているので、それを中心に解説を加える。次に血縁 HLA 半合致フル移植と血縁 HLA 半合致ミニ移植を合わせた治療成績の解析を紹介する。最後に HLA 半合致移植における免疫制御について、現時点での我々の考えを提示する。

HLA 不適合、ミニ移植といった概念は、免疫の力を鮮明化し、その効果を如実に知らしめる結果となった。それにより、化学療法の延長としての移植から、免疫療法としての移植にパラダイムシフトをもたらした。今後ますます免疫学的な考察が臨床の場で必要となるであろう。そしてその鍵となるのが、やはり組織適合性ということになる。

腎移植の免疫抑制療法

岸川 英史

兵庫県西宮病院泌尿器科

I. 生着率の向上: 腎移植の生着率は、過去 30 年間の免疫抑制療法の進歩によって飛躍的に向上した。日本移植学会の集計では、1983 年から 98 年までに施行された生体腎移植の 1 年生着率 92.5%, 5 年生着率 77.3%, 10 年生着率 58.35, 献腎移植では 1 年生着率 81.5%, 5 年生着率 62.8%, 10 年生着率 46.6% である。米国の UNOS (United network of Organ Sharing) 集計による最新の生着率は、生体腎移植の 1 年生着率 94.4%, 5 年生着率 78.7%, 献腎移植では 1 年生着率 88.4%, 5 年生着率 65.5%, である。

II. 最近の免疫抑制療法: 現在の免疫抑制療法は、① カルシニユリン阻害薬(シクロスポリン・ネオール), ② 代謝拮抗剤(ミコフェノール酸モフェチル, ミゾリピン, アザチオプリン), ③ ステロイド剤, の 3 剤併用療法である。さらに移植直後と 4 日目に IL2 レセプター (CD25) に対するモノクロナル抗体 (Basiliximab) を投与するが多い。ABO 血液型不適合移植の場合はさらに、移植前後の血漿交換と脾臓摘出手術が追加される。

III. 新しい免疫抑制剤: TOR 阻害剤 (IL2 レセプター刺激の下流の阻害剤) である、ラパマイシンおよ

びエベロリムスは欧米では既に腎移植の臨床で用いられている。また拒絶反応を起こすリンパ球の移植臓器への遊走を阻害する FTY720 が欧米と日本で臨床治験中である。Co-Stimulatory Signal を阻害するモノクロナル抗体も欧米では臨床治験中である。

IV. HLA 適合度と生着率: 免疫抑制療法が進歩しても依然として HLA 適合度は重要である。UNOS 集計による最新の献腎移植の生着率は、HLA 0 ミスマッチの 5 年生着率 77.0%, HLA 6 ミスマッチの 5 年生着率 63.6% である。また最近特に重要視されているのは PRA である。やはり UNOS 集計による最新の献腎移植の生着率は、PRA 0-9% の 5 年生着率 70.7%, PRA 80% 以上の 5 年生着率 58.7% である。

V. 適応拡大: 免疫抑制療法の進歩によって術前にクロスマッチ陽性であっても、血漿交換+免疫グロブリン大量投与, あるいは抗 CD20 抗体(リツキシマブ)の投与によって腎移植が可能な場合もある。また術後の液性拒絶反応に対しても同様の治療法によって拒絶反応を克服できる場合もある。

VI. 新たな問題: 術後の C4d 抗体陽性症例は明らかに生着率が悪い。しかし診断はできて治療法は確立していない。

肝移植

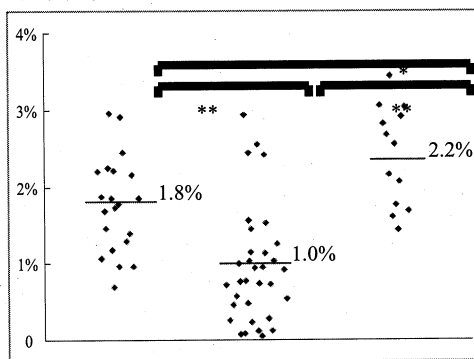
小柴 貴明

京都大学大学院医学系研究科・移植外科

これまで京都大学で施行された小児生体肝移植の患者 568 名のうち 55 名 (9.7%) の患者において、免疫抑制剤が完全に中止されたにもかかわらず拒絶が起きず安定した状態すなわち免疫寛容が維持されている。これらの免疫寛容患者の末梢血単核球の特徴をフローサイトメータにて網羅的に検討したところ、現在免疫抑制剤を使用中の患者、同年代の健常人に比較して、制御性 T 細胞とされる細胞分画 (CD4 + CD25^{high} 細胞) の割合、 $\gamma\delta$ 細胞のサブセット比 (V δ 1/V δ 2 比) が有意に増加していた。また、機能的解析により、CD4 + CD25^{high} 細胞はドナー抗原に対するリンパ球の増殖を抗原特異的に抑制した。一方、V δ 1/V δ 2 比はこれまで臓器移植の領域ではあまり着目されていなかったが、妊娠が正常に維持される場合には、子宮脱落膜中に V δ 1 細胞が増加する

こと、逆に、流産症例では V δ 1 細胞の増加が認められないことが報告されている。妊娠を胎児という異物の移植、妊娠の維持を胎児に対する免疫寛容との立場に立てば、われわれの見出した生体肝移植後の免疫寛容患者における V δ 1/V δ 2 比の上昇の意義が捉えやすい。生体肝移植後の免疫寛容患者の V δ 1 細胞の受容体 δ 鎖をコードする遺伝子の塩基配列を検討したところ、特定の配列を有するものが増加しており、ある特定の対応抗原を認識して V δ 1 細胞が増加していると考えられる。また、これらの V δ 1 細胞は細胞内に IL-10, パーフォリンを含有しており Th2 immune deviation, あるいは, Veto 機構を介して免疫寛容の維持に貢献している可能性が考えられる。

免疫寛容における CD4⁺CD25^{high} 細胞の増加

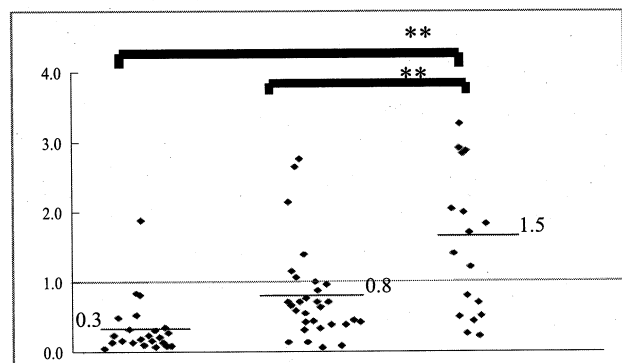


健常人 免疫抑制剤使用 免疫寛容

*p<0.05

**p<0.01

免疫寛容における V δ 1/V δ 2 比の上昇



健常人 免疫抑制剤使用 免疫寛容

**p<0.01

移植医療をめざした HLA 分子の発現制御

宮川 周士

大阪大学大学院医学系研究科・分子治療学講座・臓器移植分野

我々は、臨床での深刻な donor 不足を解消するために、異種(ブタ)からの臓器・細胞移植を研究している。異種移植は超急性拒絶反応のため、その原因究明がなされないまま殆ど放置されていた。我々はこれに 85 年より取り組み、この反応が宿主の補体と移植片の補体制御因子の種差による現象であることを明らかにした (Transplantation 1988; 46: 825)。この報告をヒントに世界でブタの臓器開発が始まった。我々も補体制御因子 (DAF) や糖転位酵素 (GnT-III) のトランスジェニック (TG) ブタを作成した (J.B.C. 2001, 276: 39310)。

さらに、TG ブタとは別に、異種移植での最大の障害である糖鎖抗原 α -Gal の knock out (KO) が争われ、米国で 2002 年 7 月にホモが生まれている。これに対して我々は、TG ブタ (DAF+GnT-III) 由来の線維芽細胞を使って α 1, 3-GT の KO に成功し、2004 年春ヘテロの仔ブタが産まれた (M.R.D. 2005; 71: 331)。

このように、DAF の TG ブタや糖鎖抗原の KO ブタの出現により、異種間での超急性拒絶反応に対する一定の制御方法が確立されつつあるが、次に、細胞性免疫による急性拒絶反応の制御が緊急の課題となっている。

これまでに我々は graft に HLA-G1 および HLA-E を発現させる事がヒト NK 細胞の抑制に有効であることを報告してきたが、HLA-G1 がブタ細胞に高発現するのに対し HLA-E の発現は 1/20 と非常に低く両者の間で発現に影響する分子的差違の存在が示唆される。そこで HLA-G1 と E との間で種々のアミノ酸配列置換分子を作製し発現性変化を検討した。方法は、各構築遺伝子を CHO- β あるいは PEC- β (それぞれ CHO cell あるいはブタ血管内皮にヒト β 2m 遺伝子導入した株) に導入し、選択培地にて培養後、細胞表面での発現を FACS で解析した。さらに、末梢血から磁気ビーズ法で精製したヒト NK 細胞を使い細胞傷害抑制性を ^{51}Cr により検討した。まず HLA-G1 と E の各ドメインの置換体を作製したところ高発現を得るには α 2 ドメインが重要であることが判明した。さらに HLA-E の α 2 ドメイン内に点変異を導入した。HLA-E 分子の 147 番目のアミノ酸をセリンからシステインに変換すると発現が大きく増加し、遺伝子導入株はヒト NK 細胞依存性細胞傷害を効果的に抑制した。改良遺伝子 HLA-Ev (147) は異種移植に有効な遺伝子であることが判明した。

● 一般演題 ●

日本人に希な allele のハプロタイプ解析—その 1—

二神 貴臣, 大沼 豪, 丸屋かおり, 宮崎 豊人, 小島 裕人, 丸屋 悦子, 赤座 達也, 佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

はじめに

HLA 遺伝子型タイピングは造血幹細胞移植で、最も重要な検査のひとつである。最近 DNA タイピング方法およびタイピングキットの解像度の向上に伴い、4 桁レベルのタイピングが日常検査業務で実施可能となっている。当研究所で昨年 1 年間に実施した 651 家系の HLL タイピングデータより haplotype 解析を行い、日本人に希な allele として報告されている allele の haplotype について報告する。

材料・方法

造血幹細胞移植のためのドナー検索を目的とし HLA タイピング家系, 651。

HLA タイピング方法: Luminex 法 (WAKFlow,

LABtype)

統計的処理: 直接カウント法で HLA-A, B, DR の allele のうち日本人に希とされている allele について解析した。

結果・考察

日本人に希とされている HLA-A allele について haplotype を表に示す。A*2420 は希な allele とされているが、日本人の中で見つけられた A*2404, 2408 より検出頻度が高く、連鎖不平衡を示す haplotype は検出されなかった。A*2420 は進化的には A*2402 の祖先型である可能性がある。今後もタイピングデータを蓄積したい。

日本人に希な HLA-A allele の haplotype

No	A	C	B	DR	N	No	A	C	B	DR	N
1	A*2420	CW*0801	B*1518	DRB1*0901	1	1	A*0301		B*4402	DRB1*1301	6
2	A*2420		B*3501	DRB1*1101	2	2	A*0301		B*0702	DRB1*1501	1
3	A*2420		B*3501	DRB1*1501	1	1	A*0302		B*1302	DRB1*0701	1
4	A*2420	Cw*0303	B*3501	DRB1*0405	1	1	A*1102		B*2704	DRB1*1401	1
5	A*2420		B*3901	DRB1*1501	1	2	A*1102		B*5401	DRB1*0405	1
6	A*2420		B*4001	DRB1*0405	1	3	A*1102		B*5502	DRB1*1501	1
7	A*2420		B*4001	DRB1*0803	1	1	A*2901	Cw*1505	B*0705	DRB1*0803	1
8	A*2420		B*4002	DRB1*0802	1	1	A*3001		B*1302	DRB1*0403	1
9	A*2420		B*5401	DRB1*0405	1	2	A*3001		B*1302	DRB1*1406	1
10	A*2420		B*5502	DRB1*0901	2	3	A*3001		B*1302	DRB1*0405	1
11	A*2420		B*5502	DRB1*0405	3	4	A*3001		B*1302	DRB1*0701	1
12	A*2420		B*5502	DRB1*1406	1	1	A*2605	Cw*0803	B*4801	DRB1*1501	1
1	A*0218		B*4601	DRB1*0803	1	2	A*2605		B*5101	DRB1*0405	1

Luminex システムを用いたタイ人の HLA-A, B, C 座の DNA タイピング

福森 泰雄, Oytip NaThalang¹⁾, 石井 博之, 小野 明子, 松下 正毅²⁾, 吉村 敬次, 柴田 弘俊

大阪府赤十字血液センター

1) Department of Pathology, Phramongkutklao College of Medicine

2) 湧永製薬株式会社

【はじめに】

タイ人 114 名の HLA-A, B, C 抗原のタイピングを PCR-reverse SSOP 法の原理による Luminex システムを用いた蛍光マイクロビーズアレイシステム (WAKFLow HLA-A, B, C: 湧永製薬) を用いて行ったので, その結果を日本人との比較を含め報告する。

【材 料】

タイ人の DNA サンプルについては, バンコク近辺在住人の医療機関からの検査用血液を採取し, 通常法でゲノミック DNA を抽出した。

【方 法】

PCR は, WAKFLow HLA-A, B, C のマニュアルに従い, HLA-A, B, C 遺伝子ともに第 2, 第 3 エクソン領域をそれぞれビオチン標識した特異的プライマーを用いて増幅した。これらの増幅産物を, 特異的オリゴ DNA プローブを固相した蛍光ビーズに加えてハイブリダイズさせ, 次にビーズ表面にハイブリダイズされた増幅産物と, ストレプトアビジン標識フィコエリスリンとを反応させた。測定は Luminex100 を用いて行い, 専用の判定ソフトウェアにより HLA 遺伝子型の判定を行った。

【結 果】

タイ人 114 名の HLA タイピングにより得られた遺伝子型は, HLA-A 遺伝子が 25 種類, HLA-B 遺伝子が 45 種類, HLA-C 遺伝子が 20 種類であった。タイ人に優位な (5% 以上) HLA-A の遺伝子型とその頻度は, A*1101 (25.9%), A*2402 (13.2%), A*3301/A*3303 (13.2%), A*0203 (7.9%), A*0207 (7.5%) であった。また HLA-B 遺伝子型では, B*1502 (13.2%), B*4601 (11.4%), B*4001 (9.6%), HLA-C 遺伝子型では, Cw*0801 (15.4%), Cw*0102 (14.9%), Cw*0702 (14.9%), Cw*0304 (10.0%), Cw*0701 (6.6%), Cw*0302 (5.3%) が高い頻度で検出された。

【考 察】

タイ人と日本人の頻度を比較すると, タイで優位な HLA-A の遺伝子型が日本人では, A*1101 (9.0%), A*2402 (36.7%), A*3301/A*3303 (7.7%), A*0203 (0.04%), A*0207 (3.2%) であり, 同様に HLA-B 遺伝子型では, B*1502 (0.03%), B*4601 (4.5%), B*4001 (5.5%), HLA-C 遺伝子型では, Cw*0801 (10.9%), Cw*0102 (17.0%), Cw*0702 (11.3%), Cw*0304 (11.3%), Cw*0701 (0%), Cw*0302 (rare) と大きな差がみられた。

Luminex 法用 HLA-A, B タイピングキット (ジェノサーチ new version プロトタイプ)の検討

荒木 延夫¹⁾, 河村久美子¹⁾, 稲葉 洋行¹⁾, 能勢 義介¹⁾,
井本しおん¹⁾, 三戸 壽¹⁾, 甲斐 俊朗²⁾, 原 宏³⁾

1) 兵庫県赤十字血液センター

2) 兵庫医科大学輸血部

3) 樹徳会上ヶ原病院

【目的】

兵庫さい帯血バンクでは、DNA を凍結された ACD-A 液採取サンプル血液(血漿部分はウイルス検査用のため、除去されている)からチオシアン酸グアニジン法によって抽出し、Luminex 法用 HLA タイピングキット (G & G サイエンス社ジェノサーチ) を用いて、HLA-A, B, C, DRB1 遺伝子型の登録を実施している。このキットにおいて、特筆すべきことは、HLA-C タイピングキットは PCR 時に DNA サンプル中の PCR 阻害物質が存在してもその影響を受けにくく 100% 判定が可能(当センター 893 例実施)であるという点である。

しかし、A, B, DRB1 タイピングキットにおいては、DNA サンプル中に PCR 阻害物質がある場合、増幅不良を起こすサンプルがあり、判定不能となるため、DNA 再抽出を行う必要性があった。

今回、G & G サイエンス社において HLA-C タイピングキットと同様な DNA サンプル中の PCR 阻害物質の影響をほとんど受けにくいというジェノサーチ new version が開発された。そのプロトタイプの Luminex 法用 HLA-A, B タイピングキットを検討する機会を得たので報告する。

【方法】

従来法で増幅不良のため、判定不能であった DNA サンプル 11 種並びに、判定可能であった 5 種を用いて new version プロトタイプの検討を行った。また、サンプル DNA 濃度と PCR 増幅効率の検討を 8 種のサンプルについて実施した(従来法においては、上

記サンプル血液 150 μ L から抽出した DNA を 300 μ L の純水に溶解した DNA 溶解液を更に純水で 8 倍希釈したものを PCR 用の検体として用い、ほぼ安定した判定結果が得られている: 図の a レーンに従来法ジェノサーチ HLA-A, b レーンに従来法ジェノサーチ HLA-B の PCR 陽性バンドを示した)。

【結果】

増幅不良のため、判定不能であった DNA サンプル 11 種を含む 16 種すべてに new version プロトタイプで判定可能であった。

次に、DNA 溶解液を原液、5 倍希釈して PCR を行った結果、従来法では、原液、5 倍希釈で従来法ジェノサーチ HLA-A がそれぞれ、8 種中 1 種、8 種中 2 種が陽性バンドを示し(図: c, d レーン)、従来法ジェノサーチ HLA-B がそれぞれ、8 種中 0 種、8 種中 3 種が陽性バンドを示した(図: e, f レーン)。それと比較して new version のジェノサーチ HLA-A, B, そして、従来法ジェノサーチ HLA-C は原液、5 倍希釈の 8 種すべてに陽性バンドを示した(図: g, h, i, j, k, l レーン)。

【考察】

本法は、従来法の HLA-C タイピングキット同様、DNA サンプル中の PCR 阻害物質の影響を受けにくいため、100% の判定可能性が期待できることから、試薬のロスも無くなり、経済的にも有用である。また、DNA サンプル濃度が濃い状態 (PCR 阻害物質が濃い状態と推察) であっても PCR が増幅されるので、PCR 前にサンプルの DNA 濃度を測定する手

間が入らず、比較的幅広い濃度のサンプルを用いて検査を行うことが可能というメリットがある。同様の

の DRB1 キットの開発が望まれる。

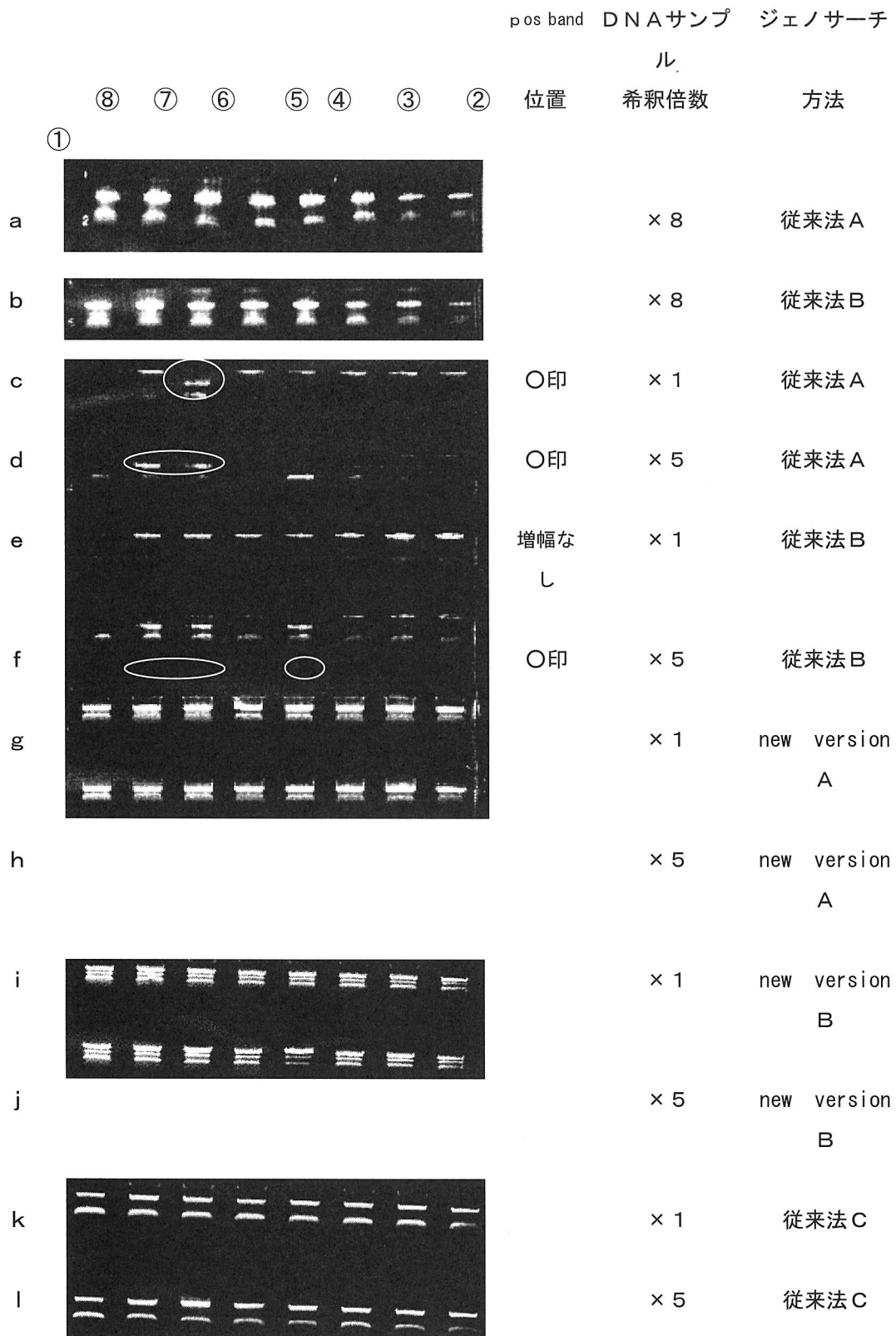


図. サンプル DNA 濃度と PCR 増幅効率の検討 (n = 8)

KIR リガンド HLA-C の日本人遺伝子頻度と そのタイピングの重要性

荒木 延夫¹⁾, 河村久美子¹⁾, 稲葉 洋行¹⁾, 能勢 義介¹⁾,
井本しおん¹⁾, 三戸 壽¹⁾, 甲斐 俊朗²⁾, 原 宏³⁾

- 1) 兵庫県赤十字血液センター
2) 兵庫医科大学輸血部
3) 樹徳会上ヶ原病院

HLA-Cは血清学的タイピングではその多くがブランクとされてきたが、最近の遺伝子タイピングの導入により、判定が可能となった。HLA-CはNK細胞免疫グロブリン様受容体(KIR; killer cell immunoglobulin-like receptor)のリガンドであり、NK活性を抑制することが示され、KIR2DL2/3のリガンドは、グループ1(Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, Cw9, Cw10, Cw12, Cw14, Cw16), KIR2DL1のリガンドはグループ2(Cw2, Cw4, Cw5, Cw6, Cw15, Cw17, Cw18)に分類されている。JMDPの解析では、非血縁者間骨髄移植において、GVH方向にKIRリガンドとしてHLA-Cの不一致が存在する場合には、急性GVHDの発症率が増加し、生存率も低下するという結果が得られており、HLA-C適合の重要性が明らかにされつつある。そこで、兵庫さい帯血バンクでは、昨年開発されたLuminex法用HLA-Cタイピングキット(G&Gサイエンス社ジェノサーチHLA-C)を用い、HLA-C遺伝子型の登録を実施している。登録臍帯血893例中、グループ1はCw*0102が320例、Cw*0103が9例、Cw*0302が13例、Cw*0303が232例、Cw*0304が213例、Cw*0702が243例、Cw*0704が14例、Cw*0801が108例、Cw*0803が16例、Cw*1202が219例、Cw*1203が3例、Cw*1402が143例そして、Cw*1403が98例の計1631例(遺伝子頻度91.3%)を示した。また、グループ2はCw*0202が1例、

Cw*0401が76例、Cw*0501が8例、Cw*0602が16例そして、Cw*1502が48例の計149例(遺伝子頻度8.3%)を示し、日本人のほとんどは、グループ1に属する結果を得た。しかし、グループ2も抗原頻度で考えると14.7%存在するため、タイピングの重要性が示唆された。

登録臍帯血(N=893)のKIRリガンドHLA-C遺伝子頻度						
グループ1遺伝子(n=1631)			グループ2遺伝子(n=149)			
抗原名	アリル	n	抗原名	アリル	n	
Cw1	Cw*0102	320	Cw2	Cw*0202	1	
	Cw*0103	9				
Cw3	Cw10	Cw*0302	13	Cw4	Cw*0401	76
	Cw9	Cw*0303	232			
	Cw10	Cw*0304	213			
Cw7	Cw*0702	243	Cw5	Cw*0501	8	
	Cw*0704	14				
Cw8	Cw*0801	108	Cw6	Cw*0602	16	
	Cw*0803	16				
Cw12	Cw*1202	219	Cw15	Cw*1502	48	
	Cw*1203	3				
Cw14	Cw*1402	143	Cw17		0	
	Cw*1403	98				
Cw16		0	Cw18		0	
グループ1遺伝子頻度 91.3%			グループ2遺伝子頻度 8.3%			
グループ1抗原頻度 99.2%			グループ2抗原頻度 14.7%			
HLA-Cグループ1 ホモ			762例(85.3%)			
HLA-Cグループ1、グループ2 ヘテロ			124例(13.9%)			
HLA-Cグループ2 ホモ			7例(0.8%)			

白血球除去血液製剤使用患者に認められた HLA 抗体

峯 佳子¹⁾, 井手 大輔¹⁾, 菅野知恵美¹⁾, 伊藤 志保¹⁾, 麻田真由美¹⁾,
藤田 往子¹⁾, 金光 靖¹⁾, 芦田 隆司¹⁾²⁾, 金丸 昭久¹⁾²⁾

1) 近畿大学医学部附属病院輸血部

2) 近畿大学医学部血液内科

【はじめに】

当院では、副作用の軽減、同種免疫の防止などを目的として、頻回輸血患者に対して白血球除去血液製剤を用いている。また、2004年10月26日から日本赤十字血液センターは保存前白血球除去の成分採血由来血小板製剤の供給を開始している。今回、白血球除去血液製剤のみを使用した患者において、HLA抗体が認められた症例を経験したので報告する。

【症 例】

42歳，男性。診断は急性骨髄性白血病。輸血歴なし。2005年7月26日から寛解導入療法を開始した。8月5日から濃厚血小板10件（100単位），赤血球MAP（白血球除去フィルター使用）5件（10単位）の輸血が行われた。10月31日に使用した濃厚血小板により全身蕁麻疹，呼吸苦の副作用が出現し，血液センターに副作用報告を行った。精査の結果，LABScreenにてHLAクラスI抗体，特異性HLA-B17（57,58）が同定された。輸血前後の検体にて追加検査をおこなったところ，輸血前は陰性，9月20日の時点ではHLA-B17抗体が認められた。また

MPHA,M-MPHAでも同様の反応が認められた。9月20日までに輸血した濃厚血小板のうちHLA Typeの判明しているものの中にはB-17は存在しなかったが，HLA Type不明の製剤が3件含まれていた。

【考 察】

白血球除去は1Bagあたり残存白血球数 1×10^6 個以下で同種免疫が予防できると考えられている。しかし，保存前白血球除去血小板製剤において1Bagあたり 1×10^6 個以下の製剤は約95%であり，今回の抗体産生の原因ではないかと考えられた。血液内科においてHLA抗体産生率は1990年32.7%であったが白血球除去フィルター導入により2004年には5.2%と減少してきた。特に1996年の第三世代白血球除去フィルター（残存白血球数 1×10^5 個以下）導入によりHLA抗体産生は，感作歴のない患者では防止することができていた。しかし今後も本例のような症例が出現する可能性が示唆された。2006年12月より赤血球製剤についても保存前白血球除去製剤の導入が予定されている。今後も頻回輸血患者におけるHLA抗体産生について検討したいと考えている。

血小板抗体 (HLA 抗体) 陽性患者における抗体の推移

佐藤 壯, 山本 紗代, 南坂 雅美, 千野 瞳, 禿 蘭子

特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科

【はじめに】

当院では、白血病などの血液疾患患者に対して化学療法や造血幹細胞移植を積極的に行っており、治療や移植によって血小板が減少した患者に対する血小板輸血は年間 3,800bag (2004 年) を超えている。このうち輸血によっても血小板数が上昇しない輸血不応患者も多く、その都度北海道赤十字血液センターに抗血小板抗体検査を依頼し、陽性患者に対しては HLA-PC の供給体制を取ってもらい、その数は年間 200bag 以上にのぼっている。今回、それら血小板抗体 (HLA 抗体) 陽性患者を対象に、治療や移植後の抗体の推移について検討したので報告する。

【対象と方法】

対象は、2003 年から 2005 年の間に、北海道赤十字血液センターにて血小板抗体陽性と判定された患者 31 人中、その後の経過を追跡可能な 15 人。疾患別の内訳では、AML 7 人・MM 2 人・Lymphoma 2 人・その他 4 人。経過としては治療中 4 人・自家移植 3 人・同種移植 5 人・経過観察中 3 人であった。方法は、HLA 抗体の有無については FlowPRA Screening Test (One Lambda) を用い、抗体特異性の同定には Class I および Class II Single Antigen Test (One Lambda) を使用した。また、Flowcytometry には FACScan (BECTON DICKINSON) を用い、解析には Cell Quest (BECTON DICKINSON)

を使用した。

【結果】

治療中の 4 人については抗体の大きな変動は見られず、経過観察中の 3 人も同様であった。自家移植の 3 人のうち 1 人は抗体が減弱化する傾向がみられたが、残り 2 人に変化はなかった。同種移植を受けた 5 人の内 2 人は抗体が徐々に減少し、移植 1 年後には抗体がほぼ消失した。また、1 人は化学療法後抗体が陰性化したのが、移植後ドナー由来と推測される Class II 抗体が陽性化した。

【考察】

血小板抗体 (HLA 抗体) 産生の原因は、①輸血、②出産、③移植の三つしかあり得ない。しかし、様々な要因によって血小板抗体 (HLA 抗体) 保有者は決して稀ではなくなっている。当院の経験でも、自家移植患者で移植後の血球減少時の血小板輸血で輸血不応性となり、初めて抗体陽性が判明した患者もおり、今後、自家・同種を問わず、造血幹細胞移植予定患者に対しては、血小板抗体 (HLA 抗体) の有無を事前に検索しておく必要があると考えられる。また、症例数が少ないので断定はできないが、同種移植によって血小板抗体 (HLA 抗体) が消失する可能性とドナー由来の血小板抗体が患者に持ち込まれる可能性が示唆された。

移植腎拒絶患者における HLA 抗体の特異性と交差反応性

佐藤 壯¹⁾, 千野 瞳¹⁾, 禿 蘭子¹⁾, 玉置 透²⁾, 久木田和丘²⁾,
目黒 順一²⁾, 米川 元樹²⁾, 川村 明夫²⁾

1) 特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科
2) 同 外 科

【はじめに】

HLA 抗体は腎移植患者における慢性拒絶にも関与していると言われており、それらに関する報告もある。ただ、移植腎が機能している間は、donor specific antibody (DSA) はあまり同定されないことが多く、これは抗体が移植腎に吸着されているためだと推測されている。しかし、拒絶末期になると DSA が同定されるようになり、拒絶後や廃絶した移植腎を摘出した後にはよりはっきりと同定される。そこで、HLA 抗体の交差反応性を検討するために、移植腎拒絶患者における HLA 抗体の特異性を測定したので報告する。

【対象と方法】

対象は当院あるいは他院で腎移植を受け、その後拒絶された患者 8 人。このうち 2 人はその後再移植されている。移植時年齢は 19 歳から 52 歳。方法は、HLA 抗体の特異性の同定に Class I および Class II Single Antigen Test (One Lambda) を使用した。Flowcytometry には FACScan (BECTON DICKINSON) を用い、解析には Cell Quest (BECTON

DICKINSON) を使用した。

【結果】

Class I および Class II のいずれにおいても、ミスマッチ抗原やいわゆる CREG のみならず、その他の抗原にも広汎に交差反応していることが分かった。一方で、患者が DQ*0301 を保有し、ドナーとのミスマッチ抗原が DQ*0302 の場合、DQ*0302 と DQ*0303 に対する抗体はあるものの DQ*0301 に対する抗体はなく、きわめて特異性が高い場合も認められた。

【考察】

非自己に対する抗原抗体反応には、まだまだ不明な点が多い。ただ、今回の検討から出産によって産生される抗体の交差反応性と移植臓器に対して産生される抗体の交差反応性にはその機序に違いがある可能性が示唆された。また、Class II 抗原の交差反応性についてはこれまで十分な検討がなされていないのが現状である。今後は、検査方法の感度も含めて、さらに症例数を増やして検討していきたい。

ABO 不適合腎移植における脾臓摘出の 抗 HLA 抗体産生に対する影響の検討

難波 行臣¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 史 屹¹⁾, 石黒 伸一¹⁾, 今村 亮一¹⁾, 市丸 直嗣¹⁾, 猪阪 善隆³⁾, 永谷 憲歳²⁾, 丸屋 悦子⁴⁾, 赤座 達也⁴⁾, 佐治 博夫⁴⁾, 高原 史郎³⁾, 奥山 明彦¹⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学(泌尿器科)

2) 国立循環器病センター 臓器移植部

3) 大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学

4) NPO 法人 京都 HLA 研究所

【目的】

脾臓は B 細胞の分化, 成熟に重要な場所と考えられている。

そのため, ABO 不適合腎移植においては経験的に脾臓摘出が移植前に行われているが, 脾臓摘出の意義は未だに証明されていない。

近年, 抗 CD20 抗体と血漿交換を組み合わせることにより脾臓摘出を行わずとも良好な成績を得たとの報告がなされている。

今回我々は, 脾臓摘出の抗 HLA 抗体産生に対する影響を検討した。

【対象】

対象は 1999 年から 2004 年の間に大阪大学医学部附属病院にて施行した 18 症例である。

【方法】

保存血清を用いて LABScreen・Mixed を用いた Luminex 法により HLA class I/II 抗体の有無を測定

した。

【検討項目】

脾臓摘出施行及び免疫抑制剤投与状態である移植後の抗 HLA 抗体の変化(術前と術後 1 ヶ月)を検討した。

【結果】

術前に抗 HLA 抗体が認められたものは 3 例, 認められなかったものは 15 例であった。脾臓摘出された症例における抗 HLA 抗体産生に関して, 移植前の抗 HLA 抗体有無と移植後の抗体の変化には関連が認められなかった。(p=0.59)

【考察】

ABO 不適合腎移植における脾臓摘出の抗 HLA 抗体産生に対する抑制効果は認められなかった。ただし, 今回の結果は観察期間が短期であり, 症例数も少ないため, 今後さらなる検討が必要と思われる。

心臓移植における Flow PRA 法を用いた 抗 HLA 抗体検出の意義

山本 賢¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 永谷 憲歳²⁾, 中谷 武嗣³⁾

1) 国立循環器病センター臨床検査部

2) 同 再生医療部

3) 同 臓器移植部

【目的】

心臓移植待機患者は心臓移植ドナー発生までに、延命のための補助人工心臓装着を余儀なくされ、装着時に大量の輸血を必要とする場合も多く、そのため抗 HLA 抗体が産生される可能性が高い。また心臓移植後 1 年以内の主な死亡原因は急性拒絶と感染症となっており、移植後の拒絶反応に関連する抗 HLA 抗体のモニタリングが非常に重要となってくる。当センターでは心臓移植後、Flow PRA (以下 PRA) を用いたレシピエント血清中の抗 HLA 抗体の推移を治療の指標のひとつにしているため、心臓移植前後の PRA 陽性率の推移について検討したので報告する。

【対象および方法】

当センターにおいて心臓移植を施行した 15 例(男性: 13 例, 女性: 2 例)を対象とした。PRA 測定はフローサイトメータによる Flow PRA I & II Screening

Test (Flow PRA: One Lambda) を用い、分析機器は FACS Calibur, 測定解析ソフトは Cell Quest を使用した。

【結果】

心臓移植前に PRA 陽性が 3 例, 移植後 PRA の陽転化がそれぞれ 5 例, 残りの 7 例は陰性のまま推移した。移植前の Direct Crossmatch は全て陰性であった。

【考察・結語】

心臓移植前に前感作抗体を保有すること, また移植後同種抗体を産生することは臓器生着に大きく関与してくる。このため移植前後に PRA による抗 HLA 抗体スクリーニングを実施することで各患者の液性免疫能を評価することができ, 心筋バイオプシー検査やその他の検査を評価する上でも重要な指標となり, 適正な免疫療法をすすめる上で有用と考えられる。

HLA Class II とサルコイドーシスの臨床

立花 暉夫¹⁾, 石井 博之²⁾, 福森 泰雄²⁾, 谷 慶彦²⁾

1) 大阪簡易保険総合健診センター

2) 大阪府赤十字血液センター

【研究目的, 方法】

1. サルコイドーシス症例の HLA Class II DNA typing を実施し,
 - a) サルコイドーシス 146 症例を経過良好例, 経過不良例にわけて, サルコイドーシスの臨床経過と HLA Class II allele との関連性を検討した。
 - b) サルコイドーシスの肺, 肺門リンパ節, 眼, 皮膚, 心, 脳, 肝, などの全身性病変の中で最も重要な心病変と HLA Class II allele との関連性を検討した。
2. 2005 年国際サルコイドーシス会議で報告, 討論されたヨーロッパ各国, 米国のサルコイドーシスの臨床と HLA Class II allele との関連性の成績を検討した。
なお, ゲノム全域遺伝子解析の結果 BTNL2 遺伝子がサルコイドーシスに強い関連を認めたドイツ報告および英米の自験例解析に基づく討論も紹介する。

【成績】

1. a) HLA-DRB1*0803, HLA-DQB1*0601 は, サルコイドーシス経過不良例で経過良好例に比して高頻度, 重症例ではより高頻度に認め, HLA-DQB1*0601 はサルコイドーシス心病変あり症例, 重症例で特に高頻度に認めた。b) HLA-DRB1*0803-DQB1*0601-DPB1*0501 ハプロタイプは, 経過不良例で経過良好例に比して高頻度である。
2. 2005 年国際サルコイドーシス会議報告から,
 - a) HLA-DR17 は経過極めて良好な Sweden サルコイドーシス症例で, 対象群, 経過不良

例に比して高頻度に認め, 英国, オランダ症例では認めず。b) HLA-DQB1*0201 は経過良好の Sweden, 英国, オランダ症例で高頻度に認め, African American で認めず。c) HLA-DQB1*0602 は経過不良 African American, Sweden 症例で, 経過良好例に比し, また英国, ポーランド症例で対象群に比し高頻度。d) 英国症例で HLA-DR 12,14 が, チェコ症例で HLA-DR 14 が, ポーランド症例で HLA-DR15 が対象群に比し高頻度, HLA-DR 1,4,7 が低頻度は国別で相違あり。e) ドイツ報告, 第 6 染色体短腕上 BTNL2 遺伝子と本症との関連は, 米国では white で有意, African American で有意でなく, 英国でも有意でない。

【結論】

1. 我々の検討で, HLA-DRB1*0803, HLA-DQB1*0601 及び HLA-DRB1*0803-DQB1*0601-DPB1*0501 ハプロタイプが, サルコイドーシス経過不良例では, 良好例に比して高頻度, 重症例でより高頻度である。HLA-DQB1*0601 が, 心病変あり例で, 特に高頻度である。
2. 2005 年国際サルコイドーシス会議報告等から, サルコイドーシスの経過と関連して高頻度な特定の HLA-DR,DQ allele は人種差が明瞭である。サルコイドーシスで高頻度な特定の HLA-DR allele, サルコイドーシスの特定の病変に高頻度な HLA-DQB1*allele も人種差が明瞭である。欧米での本症関連の BTNL2SNP 遺伝子解析成績も人種差がある。