

第 6 回日本組織適合性学会・近畿地方会 抄録

会 期： 2008 年 2 月 2 日(土)
 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： 石谷 昭子
 奈良県立医科大学 法医学教室
 共 催： 財団法人 大阪腎臓バンク

● オープニングセミナー ●

「HNA (顆粒球抗原)の種類と検査方法, その臨床的意義について」

荒木 延夫

兵庫県赤十字血液センター

顆粒球膜表面には、顆粒球抗原(好中球のみに発現している抗原または、好中球と他の細胞にも発現している抗原)、HLAclassI 抗原、血液型 I 式、P 式抗原が存在している。なお、好中球には血液型 ABH 抗原、Lewis 式抗原の存在は証明されていない。顆粒球抗原は 1960 年、Lalezari らによって同種免疫新生児好中球減少症 (alloimmune neonatal neutropenia; ANN) から発見された NA1(現在の HNA-1a)以来、表に示す抗原系が ANN、自己免疫性好中球減少症 (autoimmune neutropenia; AIN)、輸血副作用 (非溶血性発熱性輸血反応や輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury; TRALI) などの症例の研究によって発見されてきた。表中に抗原

系(抗原名)、オリジナル名の 2 通りの名称があるのは、たとえば、1995 年に Bux らは、NA2 と NC1 は同じ特異性であることを証明し、このような名称の混乱を避けるため、1998 年、国際輸血学会の The Granulocyte Antigen Working Party のメンバーによって HNA (human neutrophil antigen) という新しい命名法が採用された。

表中にそれぞれの顆粒球抗原の白人、日本人、韓国人、中国人、アフリカ黒人の抗原頻度および、抗原部位である糖タンパクを示した。

これらの抗原の種類と検査方法、その臨床的意義について解説したい。

顆粒球抗原の分類

HNA抗原系	HNA抗原	抗原部位	オリジナル名	抗原頻度(%)			アليل
				白人	日本人	アフリカ黒人	
HNA-1	HNA-1a	CD16b(FcRⅢb)	NA1	58	86.9	68	<i>FCGR3B*1</i>
HNA-1	HNA-1b	CD16b(FcRⅢb)	NA2, NC1	88	68.3	78	<i>FCGR3B*2</i>
HNA-1	HNA-1c	CD16b(FcRⅢb)	SH	5	0	38	<i>FCGR3B*3</i>
HNA-2	HNA-2a	CD177	NB1	97	98.1	95	<i>CD177*1</i>
HNA-3	HNA-3a	gp70-95kD	5b	97	87.2		不明
HNA-4	HNA-4a	CD11b	Mart ^a	99	70.6		<i>CD11B*1</i>
HNA-5	HNA-5a	CD11a	Ond ^a	96			<i>CD11A*1</i>
		gp45-56kD	NB2	32	20.3		
		CD16b(FcRⅢb)	ND1	98.5			
		CD16b(FcRⅢb)	Lan	>99			
		CD16b(FcRⅢb)	Sar ^a	>99			
		gp70-95kD	5 ^a	33			
			9 ^a	58			
			9 ^b	81			
			SL ^a	66			

HNA: human neutrophil antigen(s)

● 教育講演 ●

「HLA はおもしろい」

佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

● 免疫以外

HLA は免疫の他に、生殖や神経伝達にも関わっているらしい。哺乳類のメスは非自己 MHC をもつオスを選んでメーティングをし、結果として heterozygote (進化的に super dominant) の子孫を得ている。非自己 MHC は主として鋤鼻器官によって感知されるフェロモン様物質で見分けられ、その物質は「運び屋」HLA がもつ抗原ペプチドとされる。抗原ペプチド・モチーフは HLA 多様性に規定されるから、結果として自己/非自己 MHC を峻別することができる。メーティング後の sperm selection にも MHC が関わっていて、メスの非自己 MHC をもつ haploid の精子が選択的に卵子に到達しやすいという。

古い HLA 学を学んだわれわれは、中枢神経には HLA は分布しないか希薄であると考えてきた。しかしながら、脳の海馬錐体領域には HLA が dynamic に検出され、HLA の発現が中枢シナプスどうしの伝

達や神経/神経膠間伝達に必須かもしれないことがわかってきた。神経伝達に HLA 多様性がどう関わるか興味あるところである。

● 免疫

獲得免疫の発動と各免疫担当細胞の連携仲介に必須の役割を果たしていることは良く知られていて、NK 免疫の KIR リガンドとして働く。免疫は「Danger signal」によって発動され、自然免疫系を介して獲得免疫や NK 免疫が活性化される。Danger signal の候補は HLA の前身とされる Heat Shock Protein (HSP)-Peptide 複合体が有名である。ストレスを受けた感染細胞や腫瘍細胞から分泌され、TLR や HSP レセプターを介して抗原提示機構が活性化される。HSP と HLA の構造の類似から HLA-peptide 複合体が Danger signal にもなりうるのではないかと考えている。

●組織適合性

移植医療におけるアロ免疫の制御は最重要点の一つである。二つの方法論がある。ひとつは組織適合性のバリアを超えることであり、もうひとつは組織適合性をフィットさせる努力である。臓器移植では細胞性免疫に関する限り前者の方法論が趨勢を占めた。残るは液性免疫の制御である。造血幹細胞移植は後者の方法論を重視する。超バリアの方法論を一部に導入可能ではあるが、移植片がその後の免疫を担当するので、Recipient 体細胞と移植免疫担当細胞間の効果的な免疫を維持するには、最低限の組織適

合性を図ることが絶対条件になる。最低限の組織適合性は「haploidentical」であると考えている。臓器移植でもその後の移植片の免疫監視(感染と腫瘍化)を考えると、haploidentical が理想である。

●HLA マッチング

非血縁間の HLA マッチング戦略には、ハプロタイプ、HLA の遺伝子構造 (DR 領域には構造的多様性)、allele の個性、座位間連鎖、Taboo Mismatch か Permissible Mismatch か、Ethnicity などが Key であり、性別・年齢・病態・腫瘍/非腫瘍などが考慮される。

●シンポジウム●

シンポジウム「造血幹細胞移植における組織適合性を見直す」

1. HLA アリル型適合性の立場から

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

ヒトゲノムの解読、国際 HapMap プロジェクトの進展などを背景として、HLA 領域以外に存在する免疫応答制御関連遺伝子の多型が、同種造血幹細胞移植後の移植片対宿主病 (GVHD) や感染性合併症の発症リスクに強く関連している可能性を示唆する報告が続々と行なわれるに至っている。それにもかかわらず、造血幹細胞移植の一般の臨床現場においては、依然として、HLA ができる限り適合していることがドナー選択時の“*sine qua non* (必要条件)”と看做されており、HLA 以外の遺伝子多型が HLA 適合性を差し置いて優先的に考慮されることはまれである。実際、最近では、HLA-C や HLA-DP の移植抗原としての重要性も知られるようになり、非血縁者間で実施される造血幹細胞移植においても、これらを含めて、より多くの HLA 遺伝子座がアリル型のレベルで適合したドナーを選択することにより、

GVHD の発症率や生存率の比較において、HLA 一致同胞間移植にほぼ匹敵する成績を得られることが明らかにされつつある。

一方、HLA 適合基準の厳密化はドナー選択可能性の狭小化と常に裏腹の関係にあることから、造血幹細胞移植の黎明期から今日に至るまで、「許容可能な HLA の不適合」を同定するためのさまざまな試みがなされてきている。また、最近ではさらに積極的な立場から、再発率の低下などを指標として、「移植成績の向上に関与する不適合」を見出そうとする研究成果も報告されている。このように HLA アリル型適合性は、造血幹細胞移植のドナー選択における“golden standard”であり続けており、これまでに得られている研究成果に基づき、その臨床的意義を再検討したい。

2. KIR 適合性の立場から

○屋部 登志雄¹⁾, 平安 恒幸¹⁾, 三好 佳名子¹⁾, 柏瀬 貢一¹⁾, 松尾 恵太郎²⁾, 森島 泰雄²⁾

1) 東京都赤十字血液センター

2) 愛知県がんセンター

造血幹細胞移植における組織適合性については主として HLA 抗原と認識アロ抗体, アロ反応性 T 細胞および HLA 一致ペア移植におけるマイナー抗原と認識 T 細胞の反応性が解析されてきた。以前よりナチュラルキラー (NK) 細胞のアロ反応性が知られていたが, 最近 NK 受容体の大部分が HLA クラス I およびクラス I 関連分子を認識することが明らかとなり, NK 受容体リガンドの観点から組織適合抗原系が見直されており, 造血幹細胞移植における HLA 適合性もアロ NK との反応性の視点から再考してみることは重要であろう。NK 受容体には NK や T 細胞で発現する Killer Ig-like Receptor (KIR) ファミリーと NKG2 ファミリー, 抗原提示細胞群にも発現する Leukocyte Ig-like Receptor (LILR) ファミリーなどがある。リガンドとして KIR が主に HLA-C, -B, -A を LILR が HLA-G, -F, -A, -B を, NKG2A/C が HLA-E を, NKG2D が MICA/B, ULBP (RAET) を認識する。KIR によるクラス I 認識の特徴はアリルを個々に識別するのではなく, アロ抗体の CREG (Cross-reactive Group) のように複数のアリルに共通する抗原エピトープ特異性を認識することである。これまでに HLA-C 抗原では $\alpha 1$ ドメイン 80 番目のアミノ酸残基の差異により C1 と C2 の特異性(それぞれ KIR2DL2 と 2DL3, 2DL1 のリガンド), Bw4 特異性 (KIR3DL1 のリガンド), HLA-A3, -A11, -B27 特異性 (KIR3DL2 のリガンド)が報告されているが, 特異性不明の KIR が数種類あり, さらに各 KIR 遺伝子座には複数のアリルが存在するので上記以外の HLA 抗原がそれらのリガ

ンドである可能性が考えられる。さらに KIR のクラス I 認識の強弱が結合ペプチドの違いで大きく変化することや LILR や NKG2A 認識もペプチド依存性であることも報告されている。こうした NK 受容体の認識機構は自己の生体恒常性維持のために発達してきたと考えられる。感染, 腫瘍化やストレスを受けた細胞では古典的クラス I の表面発現低下や結合ペプチドの変化, あるいは正常細胞では未発現のクラス I 関連分子の発現誘導を起こすが, これらは細胞の出す危険信号の一種と考えられる。こうした標的細胞の状況変化を NK の活性化型と抑制型の受容体がモニターし, それぞれの出す正負のシグナルのバランスにより, 正常な細胞とは反応せずに生体にとって危険な細胞をうまく排除するのであろう。この認識機構は一方ではアロ細胞にも向けられ, クラス I リガンド特異性の相違や特定のペプチドの存在を受容体が認識して NK のアロ反応性が引き起こされることが考えられる。造血幹細胞移植の場合, 患者・ドナー間でクラス I の KIR リガンド特異性が異なるために抑制型 KIR が機能しない場合 (Missing Self) や活性化型 KIR が刺激を受け NK が反応し, GVHD, 拒絶, 再発 (GVL 効果), 移植後感染症罹患などに影響を及ぼすと思われる。我々は非血縁者間骨髄移植において従来の HLA 適合性解析に加えて, クラス I の KIR リガンド特異性と NK 受容体レパートリーの患者・ドナー間組み合わせの各種移植成績への効果について統計学的な解析を行っている。本シンポジウムでは得られた結果をもとに組織適合性と NK 認識の関連について議論したい。

3. ABO 血液型適合性の立場から

○諫田 淳也, 一戸 辰夫

京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科

固形臓器移植において、ABO 血液型は移植片の拒絶に関与する重要な移植抗原として機能することが知られている。一方、同種造血幹細胞移植においては、必ずしも血液型を一致させることがドナー選択の重要な条件とはされておらず、実際、ABO 血液型不適合ドナーからの移植が全体の約 3-4 割を占めるに至っている。しかし、血液型主不適合あるいは主/副不適合造血幹細胞移植においては、一定の頻度で、移植後赤芽球瘍や溶血性貧血などの合併症が出現することが知られており、これらが重篤化した場合には予後にも影響が及び得る。前者は、ABO 血液型の主不適合が存在する移植において、前処置後もレシピエントの形質細胞が一定期間残存し、ドナーの不適合 A 抗原あるいは B 抗原に対する抗体を産生するために、赤芽球系の回復が起こらず長期間の赤血球輸血が必要となる合併症であり、後者は ABO 血液型副不適合が存在する移植において、移植されたドナー由来の B 細胞が、移植後早期より抗 A 抗体あるいは抗 B 抗体を産生することにより発症する合併症であり、移植後急性期に出現するものは“passenger lymphocyte syndrome”としても知られている。

ABO 血液型の適合性は、上記のように移植後合併症の発症リスクを増加させると考えられるが、その移植片対宿主病 (GVHD) の発症頻度あるいは再発率・生存率に及ぼす影響に関しては一貫した結論は得られていない。そのため近年では多施設が登録し

ているデータベースを利用して、後方視的研究による ABO 血液型適合性の意義の再検討が試みられている。CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) における HLA 一致同胞からの骨髓移植を受けた急性あるいは慢性白血病 3103 例の後方視的研究では、主/副不適合移植は適合移植と比較し重症の急性 GVHD の発症頻度が高いものの、生存には影響を及ぼさず、HLA 一致同胞間移植におけるドナー選択において ABO 血液型不適合は問題とならないことが示唆された (Seebach et al, Biol Blood Marrow Transplant. 2005; 11(12): 1006-13)。しかし JMDP (Japan Marrow Donor Program) における 4970 例の後方視的解析では、主不適合群、副不適合群において 5 年生存率が有意に低かったことが報告されている (2006 年米国血液学会)。また、緩和的前処置を用いた移植においては赤芽球瘍等の合併症が増加する可能性が懸念されており、臍帯血移植なども含め比較的新しい移植方法に限ってみた場合、ABO 血液型不適合が生存率に及ぼす影響に関しては、今後検討されるべき重要な課題と考えられる。本シンポジウムでは、今まで行われた報告をもとに、造血幹細胞移植における ABO 血液型適合の意義を振り返るとともに、1990 年 11 月から 2007 年 3 月まで京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科において造血器腫瘍に対して行われた初回の造血幹細胞移植 242 例を対象とする解析結果を提示し、ABO 血液型適合性の意義を再検討したい。

追加発言, 「ABO 血液型主不適合ミニ移植に みられた赤芽球癆」

○谷口 享子・島崎 千尋

京都府立医科大学 血液・腫瘍内科

赤芽球癆 (pure red cell aplasia: PRCA) とは、種々の原因によっておこる選択的赤血球生成障害の総称である。血液型主不適合や主/副不適合の同種造血幹細胞移植では、レシピエントの形質細胞が残存するとドナー不適合抗原 (A 抗原や B 抗原) に対する抗体が長期にわたって産生され赤芽球の産生低下をひき起こすと考えられている。骨髓非破壊的前処置による移植は、その前処置の軽さから形質細胞が残存しこれらの合併症の増加が懸念されている。

症例は 60 歳男性。原疾患は、MDS/RA。輸血依存による肝ヘモクロマトーシスと糖尿病を合併していたため、骨髓バンクドナーより同種骨髓移植を施行した。高齢者であることより前処置は Flu/iv BU/TBI 4Gy, GVHD 予防は FK + short term MTX とし、2007 年 6 月 8 日に骨髓バンクドナーより同種骨髓移植を実施。血液型が主不適合 (ドナー A 型 レシピエント O 型) であったため輸注前に赤血球除去を行い、処理後の輸注細胞数は ANC $0.6 \times 10^8/\text{kg}$ であった (処理前 ANC $2.7 \times 10^8/\text{kg}$)。生着は好中球 $\geq$

500 day17, 血小板 ≥ 2 万 day19 であり速やかであったが、移植後赤血球の回復は遅延し day30, day60, day90 いずれの骨髓穿刺においても赤血球系の回復は認めず移植後 PRCA と判断した。day60 の血清では抗 A 抗体 IgG 1024 倍と高値。rituximab など含めた治療なども検討したが、day110 には抗 A 抗体 IgG 128 倍と抗体の低下を認めたため経過観察とした。day121 には抗 A 抗体 IgG 2 倍未満まで低下し末梢血中も A 型血球 82% と増加を認め、day 119 には reticulocyte の回復も認めた。

移植後 PRCA の治療法は、残存した形質細胞を駆逐するために、ドナー T 細胞による graft-versus-plasma cell 効果を期待した移植片対宿主病の誘発やドナーリンパ球輸注, rituximab の投与などが行われるが、移植後のレシピエントに対してはどれも侵襲が高くその生命予後に影響を与える可能性がある。今後、ミニ移植における、ABO 不適合移植においては抗形質細胞効果のある前処置を加える必要性についても検討していきたい。

4. 臍帯血移植の立場から

甲斐 俊朗

兵庫医科大学輸血部

臍帯血中の T 細胞の未熟性の故、臍帯血移植ではその多くが HLA 不一致ドナーからの移植であるに

もかわらず、GVHD の発症頻度、重症度とも低く、GVHD の制御も容易であるといわれている。し

かし、臍帯血移植における HLA 適合度とその成績に関しては十分解析されてはいないのが現状である。今回、日本さい帯血バンクネットワークに集積されたデータをもとに臍帯血移植における HLA 適合度の意義について解析したので報告する。

〈対象〉 対象は 2713 例(成人/小児: 1905/808, 悪性疾患/非悪性疾患: 2489/224, 初回移植/再移植例: 2091/622), 骨髄破壊の移植が 1475 例, RIST 1113 例, ミニ移植 87 例, 前処置なしの移植が 27 例あった。HLA 不一致数と好中球, 血小板生着, 2 度以上 AGVHD 発症率, TRM, EFS の関連を単変量および多変量解析で解析した。

〈結果〉 1) HLA-A, B, DR 血清学的タイピングおよび HLA-AB; 血清学的, DRB1; DNA タイピングとも, HVG, GVH 両方向不一致数が少ない程 EFS, TRM は良好で AGVHD II = < の発症頻度は低かった(単変量解析)。しかし, 多変量解析では GVHD 方向の不一致が AGVHD II = < 発症に有意な影響を及ぼすものの, EFS, TRM には有意な影響を及ぼしてはいない。2) 生着に関しては, 単変量解析で A, B, DR 血清学的 (GVH 方向), AB; 血清学的, DRB1; DNA high (両方向)不一致と好中球, 血小板生着との間に有意な関連を認めたが, 多変量解析では有意な影響を及ぼしてはいなかった。3) 小児急性白血病 (n = 373) においては, HLA-HVG 方向の不一致と好中球や血小板生着, TRM の間に有意な関連が認められ(単変量解析), TRM に関しては多変量解析においても HLA 不一致数が少ない程好影響を与え

ていた。4) 成人 AML 初回移植フル移植症例 (n = 284) では, HLA2 抗原不一致例の EFS が良好 (p = 0.0105) であり, 不一致数が少ない程再発率が高い傾向にあった。また, AGVHD II 合併例の EFS が AGVHD 0-I 合併例に比べ EFS が良好かつ再発率が低い傾向にあり臍帯血移植における GVL 効果を示唆する結果が得られた。5) 成人 ALL 初回移植フル移植症例 (n = 199) では AML にみられたような成績は得られなかった。6) 小児非腫瘍性疾患では HLA HVG 方向不一致数が少ない程 EFS が有意に良好であった。

〈考察〉 HLA 不一致が移植成績, 特に生存率に及ぼすインパクトに関しては患者年齢や, 疾患, 移植病期, 移植細胞数等他の因子の影響も考慮する必要がある。Eurocord の 1000 例以上の解析では HLA-A, B, DR 血清学的および HLA-AB; 血清学的, DRB1; DNA タイピングとも, HLA 不一致数が増す程生存率は低くなるが 1 不一致と 2 不一致では有意差がないと報告されている。今回, わが国の多数例の解析から全体では Eurocord と同様の結果が得られているが, 年齢, 疾患により HLA 適合度の生存率に及ぼす影響は異なっており, 臍帯血の選択に際しては患者背景と HLA 適合度を考慮した臍帯血の選択をする必要性がある。

(この報告は, 日本さい帯血バンクネットワークデータ管理委員会において解析された成績をもとに発表した。)

● 特別講演 ●

「KIR gene Typing」

Daniel E. Geraghty

Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle WA

Towards identifying causal genetic variants in complex disease: application of state of the art resequencing methods to the human KIR locus.

Our current work addresses two central challenges in genomics, one biological and the other technical. The biological challenge is to identify “causal sequence variants” within a candidate region that has been implicated in disease susceptibility by linkage or association. The technical challenge is to find a path forward from current practice (*i.e.*, PCR amplification of the recognizable functional elements in the candidate region, from cases and controls, followed by sequencing of the PCR products on conventional sequencing instruments). This technical challenge includes the development of high throughput methods for fosmid isolation and sequencing. As an initial application of these tools to a biologically important locus, we examined the human-killer-cell-inhibitory receptors (KIRs), a group of highly homologous genes with 8–14 KIR genes on any one haplotype. Each gene is ~17 kbp in length and the sets of genes are arranged in nearly precise tandem arrays over a region of 140–200 kbp. The emergence of KIR as a potentially important locus relevant to the genetics of transplantation and infectious disease has made resequencing of this region, in sufficient numbers of individuals to capture the overall popula-

tion diversity at KIR, an important goal. Towards that end, we resequenced 23 KIR haplotypes to completion using fosmid libraries and shotgun sequencing to obtain complete, phased, high quality sequence data. Two noteworthy features are emerging from the KIR data set. First, it appears that, in previous work, the number of common haplotypes in the population was overestimated on the basis of apparent differences in gene content. In the current study, based on STS content and sequence data, we were expecting the 23 chromosomes sampled to contain 12 distinct patterns of gene content. Instead, upon complete resequencing we found 7, one of which had not been predicted previously. In addition to addressing basic evolutionary and functional issues about KIR, these data are amenable to the development of typing methods that will facilitate the acquisition of accurate, and far more complete, KIR genotypes for disease-association studies. Derivative methods for resequencing KIR at the gene content haplotype level and allelic content levels in conjunction with the development of advanced software for data acquisition, storage, and analysis will be described.

● 特別講演 ●

「造血幹細胞移植における免疫寛容」

豊嶋 崇徳

九州大学病院 遺伝子・細胞療法部

同種造血幹細胞移植は、免疫系そのものも移植されるにもかかわらず、やがて免疫抑制を中止できる症例がまれではなく、臓器移植ではみられない大きな特徴である。このような例では免疫寛容が成立していると考えられ、この免疫寛容は若年者、HLA 適合同胞間移植、末梢血幹細胞以外の移植などで成立しやすいことが知られている。免疫寛容が成立しない症例は慢性 GVHD を発症する。かつて慢性 GVHD は急性 GVHD が経時的に移行したものと考えられていたが、最近、異なる病態であると考えられるようになった。慢性 GVHD は膠原病に類似し、自己抗体も検出される例があることから、自

己免疫疾患の側面をもった同種免疫疾患であるとする仮説も提唱されている。最近の研究によって、急性 GVHD の発症がきっかけとなってドナー由来自己応答性 T 細胞が出現する可能性が示されている。このように考えると、ドナー個体の発生・成長の過程で、いったんは中枢性、末梢性に抑制されていた自己応答性 T 細胞が、造血幹細胞移植後にレシピエントの体内で再構築されてくる過程で出現してくることになる。このような現象を基礎的、臨床的観察から考察し、造血幹細胞移植における免疫寛容について考えてみたい。

● 一般演題 (1) ●

1. 可溶性 HLA-G 測定法の問題点と
体外受精分野への影響

○下嶋 典子¹⁾, 中西 真理²⁾, 大村 素子²⁾, 川井 信太郎³⁾, 永田 のぞみ³⁾,
喜多 英二¹⁾, Daniel E Geraghty⁴⁾, 羽竹 勝彦²⁾, 石谷 昭子²⁾

1) 奈良県立医科大学細菌学

2) 奈良県立医科大学法医学

3) 湧永製薬バイオ事業開発部

4) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】

非古典的 HLA クラス I 分子の一つである HLA-G は、その発現が胎盤特異的であり、また NK, T, 樹状細胞などに発現する抑制性レセプターの

LILRB1 や LILRB2 のリガンドであることから、母児免疫寛容に重要な分子であると考えられている。特に alternative splicing により産生される可溶性 HLA-G 抗原 (sHLA-G) は、2002 年 Fuzzi らが、

体外受精卵培養上清中に sHLA-G を検出できなかった体外受精卵の着床率が 0% であったのに対し、sHLA-G が検出された体外受精卵の着床率が 24% であったと報告した。このことから、体外受精の分野において、確実に着床・妊娠する良好胚の選別に sHLA-G の検出が非常に有用であると注目された。そこで我々も同様に体外受精卵培養上清 109 例中の sHLA-G の有無を検討したが、体外受精卵培養上清中に sHLA-G は検出されず、またその着床率との関連も見出せなかった。我々と、Fuzzi らの結果の違いは測定方法の違い、またその問題点にあると考え、体外受精卵培養上清中に存在すると推測される可溶性 HLA class Ia 抗原 (sHLA-Ia) と、トロホプラストが産生するホルモンの一つである hCG (ヒト絨毛性ゴナドトロピン) が、sHLA-G 測定に与える影響について検討した。

【方法】

sHLA-Ia は IHW の HLA homozygous cell line 09075, 09044, 09031, 09084 から、sHLA-G は 221-Gs からアフィニティー精製したものを使用した。また ELISA には抗 HLA-G 抗体 MEMG/9, 抗 HLA クラス I 抗体 W6/32, 抗 β_2m 抗体のそれぞれを用

いた。

【結果】

sHLA-Ia が、sHLA-G 検出に与える影響をみたところ、sHLA-Ia 添加により、サンプル中の sHLA-G 検出が擬陽性となることがわかった。しかし、この結果は ELISA を行う際のブロッキングの条件により異なっていた。hCG が sHLA-G 検出系に与える影響は認められなかった。

【考察】

sHLA-G の存在は、胎盤・体外受精卵培養上清中のみならず、健常人男子血清、移植免疫成立患者血清中などにも検出されているが、いまだその存在は疑問視されている。我々はこのことが、一つには sHLA-G の ELISA 測定法にあると考えている。今回の結果から、サンプル中の sHLA-Ia の存在が、サンプル中の sHLA-G を擬陽性とする可能性の一つとして考えられたが、今後さらに詳細な検討を重ね、サンプル中の生体成分に影響をうけず sHLA-G を検出する系を確立し、体外受精卵培養上清中の sHLA-G の存在をはじめ、sHLA-G を検出したとする多くの報告を検証していく予定である。

2. 妊娠後期における HLA・HPA 抗体スクリーニングの有用性

○井手 大輔¹⁾, 山田 枝里佳¹⁾, 菅野 知恵美¹⁾, 伊藤 志保¹⁾, 峯 佳子¹⁾, 藤田 往子¹⁾,
金光 靖¹⁾, 芦田 隆司^{1) 2)}, 金丸 昭久^{1) 2)}, 椿 和央³⁾, 釣谷 充弘⁴⁾, 塩田 充⁴⁾

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

3) 近畿大学医学部奈良病院 血液内科

4) 近畿大学医学部 産科婦人科

【はじめに】

妊婦の保有する HLA・HPA 抗体は新生児血小板減少症 (NAIT) の原因になる事が知られている。こ

れらの抗体のスクリーニングは臨床的に重要であり、当院においても妊娠 28 週前後の妊婦に対して抗体スクリーニングを行っている。今回は、抗体の検出頻

度および経験した NAIT 症例について報告する。

【対象・方法】

1991 年 8 月～2007 年 8 月の間に近畿大学附属病院輸血部にて検査を実施した 4580 例を対象とした。HLA 抗体および HPA 抗体の検査は MPHA 法を用いた。

【結果】

HLA 抗体は 4580 例中 596 例 (13.0%) で陽性であった。HPA 抗体は 4580 例中 26 例 (0.6%) で陽性であった。また、3 例では HLA 抗体と HPA 抗体の両方を認めた。陽性症例中、HLA 抗体によると思われる NAIT を 6 例認めた。また、HPA-4b による NAIT 発症例を 2 例認めた。NAIT 発症例は同じ母親からの出産例であった。第 1 子妊娠時のスクリーニング検査において HPA-4b 抗体 (抗体価 2000～

3000 倍)を検出した。出生後の検査で児の血小板数は 1.8 万/ μ l と著明に減少していた。紫斑・出血斑は認めず、頭部エコーによる異常も認めなかった。児には HPA-4 (a+b+), HPA-4b 抗体 (+) を認め、NAIT と診断した。HPA 適合血小板を準備したが使用せず、 γ グロブリンの投与で血小板は増加した。第 2 子は出生直後の血小板数が 10.6 万/ μ l と軽度の減少であったが、HPA-4 (a+b+) を認め、NAIT と診断した。治療は行なわず経過観察したところ、血小板は徐々に増加した。

【考察】

妊婦の HLA・HPA 抗体スクリーニングは、NAIT の危険性を予知し、発症後の迅速な対応が可能となり、臨床上有用であると考えられた。

3. 分娩後長期経過を追及したサルコイドーシス症例の HLA Class I

○立花 暉夫¹⁾, 石井 博之²⁾, 福森 泰雄²⁾, 谷 慶彦²⁾

1) 愛染橋病院 内科

2) 大阪府赤十字血液センター

【研究目的, 方法】

分娩後悪化はサルコイドーシスの経過不良要因として重要課題であるが、分娩後 10 年以上の長期経過を追及し得たサルコイドーシス症例の報告は稀であり、免疫遺伝学的に検討した報告はない。

今回分娩後 10-34 年間の長期経過を追及したサルコイドーシス 13 症例の HLA Class I DNA typing を実施し分娩後長期経過と HLA Class I との関連性を検討した。

【研究対象と分娩後の長期臨床経過】

A 群: 分娩後長期経過中悪化なく、経過良好 11 例 (その内 1 例は妊娠中、胸部画像で両側性肺門リンパ節腫脹 (BHL) + 肺野病変が改善し、分娩直

後一時悪化のみで、その後の長期経過は良好、病変著明改善し悪化なく、肺門リンパ節も石灰化し、分娩後 29 年後も胸部画像正常化を維持している)

B 群: 分娩後悪化を繰り返す、経過不良 2 例、

a) 発見時 BHL のみ、最初の分娩後、病変悪化、肺野病変、皮膚病変が新出現し、2,3 回目分娩後も同様悪化、分娩後 34 年経過中も悪化改善を繰り返し、病変が長期持続中。

b) 発見時 BHL のみ、経過中、肺野病変、皮膚病変新出現、分娩後両病変悪化、分娩後 29 年経過中も悪化改善を繰り返し、病変が長期持続中。

【成績】

1. A 群 11 例では、前回、サルコイドーシス症例で高頻度と報告した HLA-B*1301, 5502, 6701 が同様高頻度で、HLA-A*0201, HLA-B*5101, HLA-C*0304 も高頻度傾向であった。しかし、既に報告してきたサルコイドーシスの経過不良と相関を示す HLADRB1*0803, HLADQB1*0601 は何れも陰性であった。
2. B 群 2 例ではそれぞれ HLA-B*1301, 6701 が陽性で、その内 1 例は経過不良と相関を示す

HLADRB1*0803-DQB1*0601 が陽性であった。

【結論】

分娩後の長期経過中悪化なし 11 例では、前回報告の HLA Class I 検討成績とほぼ同様の傾向を示し、HLA-A*0201, HLA-B*5101, HLA-C*0304 も高頻度傾向であった。今後、さらに両群症例数を追加して、分娩後長期経過と HLA Class I との関連性を検討する必要がある。

4. 献血者における HLA 抗体陽性者の頻度分布

○福森 泰雄, 小野 明子, 池田 通代, 高陽淑, 石井 博之, 谷上 純子, 谷 慶彦, 柴田 弘俊

大阪府赤十字血液センター

【はじめに】

血液センターでは 2002 年度まで、HLA タイピング用抗血清の収集を目的として献血者の約 5% に対して HLA 抗体スクリーニングを実施していた。抗血清収集を目的とした場合、25 歳以上の女性献血者を対象にスクリーニングした方が検出効率が高いが、大阪センターにおいては性別や年齢を特に限定せず、献血者の約 5% に対し、ランダムにスクリーニングを実施した。そこで、HLA 抗体スクリーニング陽性献血者から、同時期の年齢・性別献血者数を基に頻度分布を求め、またその抗体特異性について解析した。

【材料・方法】

1998 年 4 月から 2002 年 3 月までの間で実施した献血者の HLA 抗体スクリーニング(一次抗体スクリーニング)を対象とした。一次抗体スクリーニングはランダムに選んだ 5-6 パネルリンパ球に対し LCT 法で陽性となるドナーを選択した。うち血漿 Bag が得られた検体に対し、さらに二次抗体スクリーニングを実施した。二次抗体スクリーニングは、HLA 型

既知の約 200 パネルリンパ球を用いてセログラムを作成し、HLA 抗血清として有効性の可否、さらに詳細な解析の必要性の有無等を総合的に判定した。さらに今回、その抗体スクリーニング対象者の性別、年齢を調査し、解析結果との照合を行った。

【結果】

上記の 4 年間の総ドナー数は 1,831,317 人で、うち計 97,476 人のドナー (5.3%) のスクリーニングを実施した。一次スクリーニング陽性者は 2,038 人で、2.1% の抗体陽性率であった。そのうち血漿 Bag が得られた 703 人 (34.5%) の年齢・性別分布を基に 4 年間の総ドナーの年齢・性別分布から抗体陽性率を推定した。その内訳を表 1 に示す。二次抗体スクリーニング陽性者は女性 124 人 (0.84%)、男性 36 人 (0.19%) であり、その内訳を表 2 に示す。二次抗体スクリーニング陽性者の抗体特異性解析結果から、抗体特異性には男女差が見られ、男性では A ローカスで、A3, A11, A26, A19, B ローカスでは B8, B13, B17, B27, B44 等の特異性を保有していた。

表1 一次スクリーニング陽性率

年齢	16-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	平均
女性 (%)	0.32	1.57	4.8	3.64	2.28	3.26	2.57
男性 (%)	0.82	1.76	1.85	1.67	2.19	2.57	1.81

表2 二次スクリーニング陽性率

年齢	16-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	平均
女性 (%)	0.06	0.35	2.11	1.11	0.66	0.54	0.84
男性 (%)	0.08	0.18	0.21	0.13	0.29	0.24	0.19

【まとめ】

女性の陽性率は一次スクリーニング、二次スクリーニング陽性率において、30代に急激な上昇があり、その後序々に低下した。男性は10代を除いて、一次で約2%、二次でほぼ0.2%の陽性率で大きな変

化は見られなかった。また陽性者中、女性の割合は一次スクリーニングで52.8%、二次スクリーニングで77.5%であった。さらに、HLA抗体特異性は男女差が見られ、男性の持つ抗体に特徴のあるエピトープが推測された。

5. マルチプレックス PCR を利用した 生着確認検査法について

○二神 貴臣, 林 晃司, Ju Ruiqing¹⁾, 小島 裕人, 辻野 貴史,
大沼 豪, 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

1) Chonchun Blood Center

【はじめに】

我々はマイクロサテライト (MS) の多型性を利用し、造血幹細胞移植後の生着確認検査をおこなっている。今回検査の精度と効率の向上をめざしマルチプレックス PCR を用い、14 種の MS を 4 本のチューブで増幅させポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) による検出方法を検討したので報告する。

【材料・方法】

- 造血幹細胞移植ペア (同胞・親子・非血縁) 100 例の DNA.
- Multiplex PCR Assay Kit (タカラバイオ), 14 種の MS 増幅用プライマー

14 種の MS について多型分子量に重複のない最適なグループ化をおこなった。全 MS を包含する 4 本の MultiplexPCR をドナーとレシピエントにつきおこない、MS allele を PAGE, サイバーゴールド染色後分子量を測定し決定した。

【結果・考察】

- マルチプレックス PCR で MS 多型の分子量に重複のない最大の組み合わせ数は 4 種であり、プライマーの組み合わせおよびプライマー量の調整により PCR の最適化が可能であった。
- 14 種の MS について、移植ドナーの種類により Chimerism に informative である頻度を調べた結

果を以下の表に示す。

	informative%	informativeなMSの数				
		80%以上	70%以上	60%以上	50%以上	50%以下
ドナー の種類	同胞	0	1	2	4	7
	親子	3	4	3	1	3
	非血縁	10	1	1	0	2

- 14種のMSのうち7種のMSにおいて, Cauca-

sian には検出されない MS 多型が 11 種検出された。

- 従来 42 本必要とされた PCR チューブがマルチプレックス PCR により 12 本にまとめられ, PCR 及び電気泳動の所要時間が大幅に短縮された。
- マルチプレックス PCR は同一検体で複数の増幅産物を用いる検査の省力化に有用な方法である。

6. Whole Genome Amplification の検討

○辻野 貴史, 大沼 豪, 二神 貴臣, 林 晃司, 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】

Whole Genome Amplification (WGA) は貴重な DNA sample を半永久的に利用できる。さらに DNA の抽出が困難な試料から得られる極微量な DNA 検体も WGA を使用することで種々の検査・研究に使用可能となる。DNA が研究・検査の基盤となっている分野では夢の方法(試薬)である。WGA のキットとして QIAGEN 社から REPLI-gKit が発売されている。我々はこの Kit を使用し, 効率の良い WGA の条件設定および WGA 後の増幅 DNA が正しく復元されているかの検証を目的とし検討したので報告する。

【検討目的】

- キットプロトコールでの到達収量を達成するための効率的な増幅条件
- WGA に使用する template DNA 量と genome 復元の精度の検証

【材料・方法】

DNA 増幅キット: REPLI-g Mini Kit (QIAGEN)

DNA sample: 血液・口腔内粘膜細胞・爪由来 DNA

Genome 復元の精度の検証法として, HLA-class I,

II, 各遺伝子座に存在する 14 種のマイクロサテライト, マイナー抗原遺伝子群, 免疫応答遺伝子群に存在する多型性のマッピング法を用いた。

【結論・考察】

- REPLI-g Kit で変性時間, アニール温度について検討した結果, キットプロトコール通りの条件が最適であった。
- 増幅収量について, 使用する template 量で増幅倍率を比較すると, 少ない template 量 (1 ng) の増幅倍率が高く, 収量はほぼ同一であった (2 µg)。
- Template の濃度別, 由来別で WGA 後の検体を使用し HLA Typing をおこなった結果, 血液や口腔内粘膜, Dried blood 由来の DNA については DNA 濃度に関わらず, HLA-Class I・II の復元が安定的に得ることが確認された。しかし, 爪由来の DNA については DNA 濃度の影響を受け, HLA typing では特に B 座, C 座で復元が不安定であった。Template DNA の質が WGA 後の genome の良い復元性を得るためのキーポイントであることが確認された。

7. Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding molecules with immune functions - possible clinical relevance and ethnic difference.

○Milena Ivanova^{1) 3)}, Ju Ruiqing^{2) 3)}, Masaki Matsushita⁴⁾, Shintaro Kawai⁴⁾,
Naoya Ochiai³⁾, Etsuko Maruya³⁾, Hiroh Saji³⁾

1) Central Laboratory of Clinical Immunology University Hospital "Alexandrovskaya", Sofia, Bulgaria

2) Chonchun Blood Center

3) HLA Laboratory NPO

4) Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.

The level of immune response is associated with genes regulating immune functions and diversity of these genes modulates an individual's response to life-threatening disorders. **The aim** of this study was to analyze functional polymorphisms of immune response (IR) genes in different ethnic groups and to develop a rapid, cost-effective, and high-throughput method for genotyping using multiplexed microsphere-based suspension array platform — Luminex^R xMAPTM. Polymorphic SNPs, previously shown to determine the level of gene expression were analyzed in immunoregulatory IL-6, associated with different diseases and transplant outcome and MBL-2, involved in innate immunity and associated with severe infections and transplant-related complications. Two SNPs in the promoter region of IL-6 gene — 174 (G/C) and -572 (G/C) and 6 SNPs in MBL2 gene — three of them in the promoter region -619 (C/G); -290 (G/C); -66 (C/T) and 3 coding SNPs in the exon 1 — cdn 52 (C/T); cdn 54 (G/A); cdn 57 (A/G) were selected. PCR-SSOP method using Luminex^R xMAPTM technology that we developed for IL-6 genotyping included amplification of two fragments containing SNPs of interest by multiplex

PCR, direct hybridization with capture probes, specific for the each allele of -174 and -572 SNPs, followed by analysis on Luminex 100. SNPs in the promoter region of MBL-2 were assessed by amplification of 690bp region, containing 3 SNPs of interest, followed by direct hybridization with allele-specific capture probe and analysis on Luminex 100. Haplotypes determined by the 3 coding SNPs in the exon 1 were analyzed by Preferential Homoduplex Formation Assay (PHFA) adapted for Luminex^R xMAPTM platform. The methods developed were applied on a DNA panel of healthy Japanese and Caucasians controls. We detected no C allele for -174 IL-6 SNP in the Japanese, and this position seems to be monomorphics with only G allele present. Significant polymorphism with prevalence C allele (frequency 0.69), possibly associated with high IL-6 level, over G allele (frequency 0.31) was observed in the Japanese population. In contrast, for Caucasians -572 SNP was characterized by limited polymorphism compared to highly variable -174 SNP. Analysis of MBL2 showed limited degree of polymorphism in the exon1 in Japanese compared to Caucasians. The highest degree of variability was observed for cdn 54, while for cdns

52 and 57 minor alleles were not detected in Japanese in contrast to Caucasians. While genotype frequencies of -619 SNPs were similar in both of ethnic groups studied, -290 and -66 SNPs were characterized with increased frequency of wild type genotypes (GG and CC respectively) in Japanese compared to Caucasians. Haplotype analysis including all 6 SNPs was also performed in both groups in order to estimate variants associated with different MBL level.

In conclusion we have developed a rapid and sensitive method for simultaneous detection of functionally important SNPs in two IR genes IL-6 and MBL2. Considering the important role of these genes in the acquired and innate immune response respectively, knowledge of their polymorphism in different ethnic groups is important for future medical genetic studies.

8. 当院における献腎移植希望登録者 HLA 型 10 年の変遷

○大西 民子, 岡村 康子, 飯田 好江, 酒巻 建夫, 剣持 敬¹⁾, 倉山 英昭²⁾

1) 国立病院機構千葉東病院研究検査科 HLA 検査室 臨床研究センター

2) 小児科

【目的】

献腎移植希望登録患者の HLA 型は以前から健常人 HLA 型とは異なることが知られている。一方、学校検尿、職場検診、住民検診などが導入され早期発見、治療追跡などが進んでいるが、これにより登録患者の HLA 型が変化してきているかどうかを解析した。

【方法】

当 HLA 検査室で検査を実施した献腎希望者 751 名と現在も移植希望を更新している 361 名を対象とした。対照としては病院職員および実習生 619 名である。また日本組織適合性学会 WS データも参照した。末梢血リンパ球による抗血清法タイピング、及び末梢白血球由来 DNA によるタイピングを実施した。DNA 法は 11 回国際 HLAW-SSO セットと自家製 SSP キット, Dynal-Reli キット, ペルフリーズキット, 自家製 SSP キットを使用した。対象および対照全例で DNA 法による DRB1 タイピングを実施している。また希望登録者の群を 1997 年までの

317 名と 1998 年からの 434 名の 2 群に分けて HLA 頻度を比較した。

【結果】

HLA-DR 抗原は患者群では DR4 が健常人頻度よりも 10% 程度多く、DR15, DR12, DR9 が数 % ずつ少ない傾向が認められた(カイ二乗検定で 5% 以下)。B 座では B35, B62 と B71 抗原が多い傾向が認められた。1997 年までの登録希望者と 1998 年以降の登録希望では共通して DR4 が多く、DR15 などが少ないという傾向が続き、2 群間では有意な差(変化)が認められなかった。

【考察】

10 年程度の短期間では HLA 抗原変化が認められなかったことは、生活環境や食生活、腎疾患に対する治療の進歩以上に HLA 関連の影響が続いていることを示している。登録患者の原疾患についても漠然と慢性糸球体腎炎という記載が多い。11 年前の腎生検による確定診断例の小児 IgA 腎症研究では今回の登録患者と同様の DR 頻度傾向を示していた。登

録患者の原疾患の中に IgA 腎症が占める割合は高いものと考えられる。一方、日本人の中で地域的に HLA 抗原頻度が微妙に異なることから地域ごとに登

録患者 HLA 頻度を調べることで、同じアジア地域での比較検討することの意義は大きいと思われる。

9. 心移植における既存抗体陽性症例に対する FlowPRA を用いた HLA 抗体のモニタリングの有用性について

○大久保 美里¹⁾, 山本 賢¹⁾, 古田 賢二¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 東 晴彦²⁾,
加藤 倫子³⁾, 佐田 正晴⁴⁾, 永谷 憲歳⁴⁾, 中谷 武嗣³⁾

1) 国立循環器病センター 臨床検査部

2) 同 心臓血管内科

3) 同 臓器移植部

4) 同 再生医療部

【目的】

心移植前に HLA 抗体を保有し %PRA が高値を示す症例は、移植後に抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection; AMR) の発症ハイリスク群である。心移植待機中の患者の多くが左室補助人工心臓 (left ventricular assist system; LVAS) を装着しているため、HLA 抗体を保有するリスクが高いとされている。しかしながら、移植前の脱感作療法はドナー発生時期の予測が困難であり不可能である。そのため既存抗体の推移や特異性を把握することは必須と考えられる。今回、ダイレクトクロスマッチが陰性のため心移植を施行した HLA 抗体陽性 2 症例において、FlowPRA により HLA 抗体のモニタリングを行い液性免疫能の評価を行ったので報告する。

【症例と方法】

症例 1 は DCM の 38 歳女性、14 ヶ月間の LVAS 装着。妊娠歴と輸血歴あり。移植時の %PRA classI は 13% (DSA 陰性) で陽性を示した。症例 2 は DCM の 43 歳女性、23 ヶ月間の LVAS 装着。出産歴と輸血歴あり。移植時の %PRA classI は 42% (DSA 陽性) で陽性を示した。免疫抑制療法はタクロリムス (Tac), ミコフェノール酸モフェチル (MMF), プレ

ドニゾロンの 3 剤併用で開始した。HLA 抗体の有無および特異性の解析はそれぞれ FlowPRA Screening Test と FlowPRA Single Antigen で行った。心筋生検により細胞性拒絶反応は国際心肺移植学会 (International Society for Heart&Lung Transplantation; ISHLT) に従った。また AMR については免疫組織学的染色 (IgG, IgM, IgA, C3d, C4d, C1q) にて行った。

【結果】

症例 1 は移植後 3 日目から、%PRA classI が徐々に上昇し IVIG を開始したが %PRA classI は低下せず、7 日目に 82% となった。6 日目の HLA 抗体特異性でも DSA(-) であったが 7 日目の心筋生検の免疫組織学的染色で IgM, C3d, C4d の沈着が認められた。このため AMR 発生を懸念し血漿交換 (plasma exchange; PE) を併用した結果、%PRA classI は低下し免疫組織学的染色も陰性化し治療効果を得た。症例 2 は移植前に DSA が認められたため、二重膜濾過血漿分離交換法 (filtration plasma pheresis; DFPP) を実施した。さらにバシリキシマブの induction therapy を併用したが DSA は 5 日目に陰性化し細胞性拒絶反応及び AMR も認めず経過も良好で

ある。

【考察】

HLA 抗体保有患者の移植において AMR を回避し抑制することは重要であり、このような症例への対応策を確立しておくことが必要と考えられる。こ

のため Flow PRA により既存抗体の存在や特異性を把握することは、AMR の早期診断を行うための心筋生検実施の決定や脱感作療法 (PE, IVIG, DFPP など) の治療効果を判定するうえで重要な情報を提供しえる。

10. ドナー HLA 抗原に対する抗体の減弱を試みた 児母間末梢血幹細胞移植における抗体価の推移 —Luminex 法と AHG-LCT 法の相関について—

○峯 佳子¹⁾, 山田 枝里佳¹⁾, 井手 大輔¹⁾, 菅野 智恵美¹⁾, 伊藤 志保¹⁾, 藤田 往子¹⁾,
金光 靖¹⁾, 山口 晃史²⁾, 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】

造血幹細胞移植において患者がドナー HLA 抗原に対する抗体を保有している場合、急性の拒絶反応を引き起こすと考えられており、移植を困難にしている。しかし近年、rituximab の投与やドナー由来の血小板輸血により、抗体価を減弱、吸収し生着したという報告がされている。今回、我々は HLA 抗体陽性の児母間末梢血幹細胞移植 (PBSCT) において HLA 抗体価の推移を Luminex 法と AHG-LCT 法にて測定した。また Luminex 法と AHG-LCT 法の相関について検討をおこなったので報告する。

【症例】

65 歳女性、急性骨髄性白血病。他院にて頻回輸血が行われ、血小板輸血不応のため HLA-PC 適応患者であった。移植目的で当院に転院した。HLA 抗体の検査で、広範囲に特異性の強い HLA クラス I 抗体が検出された。HLA 抗原型は Recipient A11, A24, B46, B62, DR4, DR8, Donor (次女) A24, —, B7, B62, DR4, DR1 であり、GVHD 方向 3 座ミスマッチ、HVG 方向 2 座ミスマッチであった。HLA-B7 に対する HLA 抗体価は AHG-LCT 法で 16 倍、

Luminex 法 Single antigen の蛍光強度で 15353 であった。拒絶予防として day-10 に rituximab 375mg/m², day-3 に HLA-7 を有する長女より PC35u, day-2 に移植 Donor から PC30u が輸血された。また day-2, -1, 0 にそれぞれ血漿交換 2700 ml が行われた。輸注 CD34 + 細胞数は 2.2×10^6 /kg, 前処置は Flu/L-PAM, GVHD 予防は FK506 + shortMTX であった。AHG-LCT 法, Luminex 法で経時的に抗体価の測定をおこなった。

【結果】

HLA 抗体は rituximab の投与、血漿交換、PC 輸血により AHG-LCT 法 1 倍、Luminex 法で 10037 まで減少した。また、PBSCT 施行後の AHG-LCT 法は陰性、Luminex 法 8640 であった。しかし生着不全のため、day27 に HGV 方向マッチドナーよりの臍帯血移植がおこなわれ生着した。また両方法の相関について、AHG-LCT 法の抗体価を Y 軸、Luminex 法の蛍光強度を X 軸にとりプロットすると、その近似曲線は指数関数で表すことができた。AHG-LCT 抗体価 2ⁿ の指数 n と Luminex 法の蛍光強度は正比例し、相関係数は 0.991, P < 0.01 であり

強い相関が認められた。

【考察】

Luminex 法は AHG-LCT の検出限度以下の抗体

を検出でき、また抗体の詳細な特異性やドナーリンパ球がなくても抗体価の推移を測定できる点で優れた方法であると考えられた。

11. ドナー非特異的 HLA 抗体陽性腎移植患者における Rituximab の効果について

○佐藤 壯¹⁾, 玉置 透²⁾, 山田 理大²⁾, 安部 美寛²⁾, 小林 直樹³⁾,
笠井 正晴³⁾, 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

3) 同 血液内科

【はじめに】

Rituximab は抗 CD20 ヒト・マウスキメラ抗体で、本来 CD20 抗原陽性悪性リンパ腫に対する治療薬として保険適応を受けている。しかし、近年臓器移植においても ABO 不適合腎移植やクロスマッチ陽性患者に対する脱感作療法的手段として使用されている。その効果についてはすでに多くの報告がなされ広く認められているところであるが、その用量や併用する治療法の組み合わせについては明確な基準やエビデンスがないのが現状である。当院で三次腎移植を受けたドナー非特異的 HLA 抗体陽性患者が悪性リンパ腫を発症し、Rituximab を含む化学療法を受けた。この患者の治療前後における HLA 抗体を測定し、Rituximab 単剤の HLA 抗体産生抑制効果について検討したので報告する。

【症例と方法】

患者は、脾摘をした上で母親をドナーとする ABO 不適合腎移植を受けたが約 2 年で拒絶された。次いで妻をドナーとする ABO 適合腎移植を受けたがこれも拒絶され、移植腎に対する class I, II 両方の HLA 抗体を保有している。3 年前に長男をドナーとして三次移植を受け、腎機能は安定し順調に経過していたが、昨年 6 月 diffuse large B cell lymphoma を発症した。これに対して CHOP 療法を 1 回行い、その

後 R-CHOP 療法を 5 回施行した。この治療前後の HLA 抗体の推移を FlowPRA screening test にて検討した。

【結果】

この患者における Rituximab 使用量は標準量の 375 mg/m² で一回に 650 mg、合計 3,250 mg 投与された。5 回の治療の前後で血清中の HLA 抗体を FlowPRA 法で測定したが、class I, II 両方の HLA 抗体の明らかな減弱化は認められなかった。

【考察】

HLA 抗体が減少しない理由については、過去に産生された抗体の残存も考えられるが 5 ヶ月にもわたって残存しているとは考えづらい。休止期の memory B cell がどこに存在しているのかは未だ明確とはなっていないが、今回の症例は Rituximab 単剤では HLA 抗体産生に関わる memory B cell の排除が難しい可能性を示唆している。Rituximab を有効に作用させるためには、血漿交換などによって抗体を減少させ休止期の memory B cell を幼若化、分裂期に導き出し、これに代謝拮抗剤を併用するなどの操作が必要なのかもしれない。今後、さらに経過を観察していくとともに、同様の症例を増やして検討していきたい。

12. SLE における IgG 型 HLA クラス I 抗体産生に関する解析

Analysis of IgG type HLA class I antibody production in patient with SLE

○周 博¹⁾, 斉藤 敏²⁾

1) 信州大学医学部小児医学研究科

2) 信州大学医学部法医学教室

【はじめに】

SLE は自己抗体などの出現に基づく多臓器障害を主徴とする疾患である。圧倒的に女性、特に 20~30 歳代の女性に好発し、血球減少がよくみられ、近年習慣流産との関連についても注目されている。今回、SLE 患者が、HLA に対する自己抗体を保有するか

調べるため、SLE 患者の HLA クラス I 抗体スクリーニング、特異性解析を行った。また、対照として、健常男性の HLA クラス I 抗体スクリーニング、特異性についても解析を行った。

【方法】

輸血、移植歴がない SLE 患者 38 名及び健常者

HLA type of patients with SLE and healthy males carried HLA class I antibodies

No.	Gender	HLA								Specificity Antibodies
		A*		B*		Cw*		DRB1*		
Pt.1	M	0201	1101	1501	4801	0401	0803	0802	1501	B8, B45
Pt.2	M	0201	0206	1301	4006	0304	0801	0405	0901	A3
Pt.3	M	0207	2402	4601	5502	0102	—	0803	0901	B8
Pt.4	M	0206	2601	4002	5101	0304	1402	0802	1201	B45
Pt.5	M	1101	—	1501	4001	0401	0702	0406	0803	B45, B18, B35, B51
Pt.6	F	2402	—	5201	—	1202	—	1502		B45, B13, B60, B44, B49
1	M	2402	3303	5101	4403	1402	1403			B8, B7
2	M	2402	3101	5901	0702	0102	0702			A68, A34, A25, A26
3	M	0101	0210	5504	4006	0801	0303			B45, B35, B44, B51, B52
4	M	2602	3303	4002	4006	0801	0304			B8, B35
5	M	0201	2402	4601	5201	0102	1202			B44, A68, A34, A3, A31
6	M	0207	—	4601	—	0102	—			B45, B35
7	M	2402	3101	5201	4001	0304	1201			B35
8	M	2402	1101	4801	1501	0401	0803			B45
9	M	2402	—	5201	—	1202	—			B8
10	M	0206	2601	3501	4002	0303	0304			A68
11	M	2402	3101	5401	4002	0102	0304			B8
12	M	2402	2601	5101	1501	0303	1402			B8
13	M	0207	—	4601	4801	0101	0801			B45, A23, A24
14	M	2402	3303	5201	1502	0801	1202			B18, A2, B7, B55, B57
15	M	0207	3101	3501	4601	0102	0401			B45, B44
16	M	0201	0206	4801	4006	0801	0803			B8, B45, A1, A3, A11, A23, A24, A25, A26, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A68, B7, B13, B14, B18, B27, B35, B38, B44, B49, B51, B52, B55, B57, B60, B62

149 名を対象に、HLA クラス I タイピングを PCR-SSOP (Luminex LABScreening), HLA クラス I 抗体スクリーニングを FlowPRA 法, HLA クラス I 抗体の同定を FlowPRA® Single 法により実施した。

【結果】

男性患者の HLA クラス I 抗体保有率は 45.5%, 男性健常者より高頻度に存在していることがわかった ($P=0.01$)。患者群と健常者群両群から検出した HLA クラス I 抗体に自己抗体は確認されなかった。妊娠歴も輸血歴もない患者及び健常者に多く見られた HLA クラス I 抗体の特異性は、日本人にはほとんど存在しない B8, B45 抗原に対する抗体であった。B8 抗体保有者では 80% の人が A24 を持っていたが、A2 を持つ人は一人もいなかった。逆に B45 抗

体保有者では 80% が A2 抗原を持っており、A24 を持つ人は一人であった。患者群では例数が少ないが、健常群で見られた傾向は認めてられていない。また、患者抗体非保有者では A2 抗原を持つ人が少なく、A11 と Cw7 を持つ人が多く、逆に健常抗体保有者では A11 と Cw7 を持つ人が少ない傾向を示した。

【考察】

これまでに HLA-B8 に対する IgM 型自然抗体の報告例がある。今回、HLA-B8IgG 型自然抗体も存在することが示唆された。また抗体の特異性と抗体保有者の HLA タイプには相関がある可能性がある。一方、抗体特異性及び抗体頻度については、SLE 患者群と健常者群の差が認められなかった。