

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 17 No. 1, 2010

Contents

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 19 回日本組織適合性学会大会のご案内.....	1
平成 22 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ.....	5
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2010).....	6

第 13 回 HLA-QC ワークショップレポート

—全体経過およびサンプルの総合結果—.....田中秀則, 中島文明, QCWS 部会	7
—部門別解析: 輸血部門—.....高陽淑, 黒田ゆかり, 平田康司, 山岡学, 中島文明	11
—部門別解析: 臓器移植部門—.....中山みゆき, 石塚毅, 佐藤壯, 山本賢	14
—部門別解析: 造血部門—.....加藤道, 杉本達哉	20
—DNA 結果表記について (新表記も含む)—.....太田正穂	23
—検査法別解析: FCM による抗体検査法の解析: FlowPRA 法の検査状況の解析—.....佐藤壯	24
—検査法別解析: FCM による抗体検査法の解析: LIFT 法および FCXM の検査状況の解析—宮崎孔	26
—検査法別解析: Luminex による抗体検査: LABScreen による抗体検査—.....高陽淑	27
—検査法別解析: Luminex による抗体検査: WAKFlowHLA 抗体および ICFA 法による抗体検査—関根みゆき	29
—検査法別解析: DNA タイピング: SSO 法, SSP 法—.....橋口裕樹	31
—検査法別解析: DNA タイピング: Luminex (SSO) 法—.....大沼豪	34
—検査法別解析: DNA タイピング: SBT 法—.....吉川枝里	35

〔原著論文〕

非血縁者間臍帯血移植におけるレシピエント HLA 抗体と生着の関連性について; HLA ミスマッチ移植における ICFA 法を用いた交差適合試験の有用性 ... 藤原孝記, 高梨美乃子, 田中秀則, 柏瀬貢一, 佐竹正博, 中島一格	39
--	----

第 8 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集.....	47
日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定.....	75
編集後記.....	78

● Contents ●

日本組織適合性学会誌 第 17 巻第 1 号 平成 22 年 4 月 30 日発行

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 19 回日本組織適合性学会大会のご案内.....	1
平成 22 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ.....	5
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2010).....	6

第 13 回 HLA-QC ワークショップレポート

—全体経過およびサンプルの総合結果—.....	田中秀則, 中島文明, QCWS 部会	7
—部門別解析: 輸血部門—.....	高 陽淑, 黒田ゆかり, 平田康司, 山岡 学, 中島文明	11
—部門別解析: 臓器移植部門—.....	中山みゆき, 石塚 毅, 佐藤 壯, 山本 賢	14
—部門別解析: 造血部門—.....	加藤 道, 杉本達哉	20
—DNA 結果表記について (新表記も含む)—.....	太田正穂	23
—検査法別解析: FCM による抗体検査法の解析: FlowPRA 法の検査状況の解析—.....	佐藤 壯	24
—検査法別解析: FCM による抗体検査法の解析: LIFT 法および FCXM の検査状況の解析—	宮崎 孔	26
—検査法別解析: Luminex による抗体検査: LABScreen による抗体検査—.....	高 陽淑	27
—検査法別解析: Luminex による抗体検査: WAKFlowHLA 抗体および ICFA 法による抗体検査—	関根みゆき	29
—検査法別解析: DNA タイピング: SSO 法, SSP 法—.....	橋口裕樹	31
—検査法別解析: DNA タイピング: Luminex (SSO) 法—.....	大沼 豪	34
—検査法別解析: DNA タイピング: SBT 法—.....	吉川枝里	35

〔原著論文〕

非血縁者間臍帯血移植におけるレシピエント HLA 抗体と生着の関連性について;

HLA ミスマッチ移植における ICFA 法を用いた交差適合試験の有用性.....	藤原孝記, 高梨美乃子, 田中秀則, 柏瀬貢一, 佐竹正博, 中島一格	39
---	--	----

第 8 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集.....	47
日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定.....	75
編集後記.....	78

日本組織適合性学会誌 MHC 編集委員会

編集委員長

高原 史郎 大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学

編集委員

赤座 達也 特定非営利活動法人 HLA 研究所
一戸 辰夫 京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科
江川 裕人 朝日大学村上記念病院外科
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
佐治 博夫 特定非営利活動法人 HLA 研究所
佐田 正晴 国立循環器病センター研究所再生医療部移植外科
下嶋 典子 奈良県立医科大学細菌学教室
椿 和央 近畿大学医学部奈良病院血液免疫内科
成瀬 妙子 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野
難波 行臣 医誠会病院腎臓内科

編集協力者

安藤 麻子 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
石川 善英 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所研究開発部
石谷 昭子 奈良県立医科大学法医学教室
猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
太田 正穂 信州大学医学部法医学教室
大谷 文雄 北里大学医学部免疫学講座
小河原 悟 福岡大学病院腎臓・膠原病内科
小幡 文弥 北里大学医療衛生学部免疫学
柏瀬 貢一 東京都赤十字血液センター検査部
小林 賢 日本薬科大学 生物学研究室
酒巻 建夫 国立病院機構千葉東病院 HLA 検査室
杉谷 篤 藤田保健衛生大学医学部臓器移植再生医学講座
千住 覚 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野
田中 秀則 東京都赤十字血液センター検査部
田邊 一成 東京女子医科大学泌尿器科
徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野
中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所研究開発部
永尾 暢夫 神戸常盤短期大学衛生技術科
西村 泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学講座
平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門疾病生態分野
森島 泰雄 愛知県がんセンター中央病院
安波 道郎 長崎大学熱帯医学研究所国際連携研究戦略本部
屋部登志雄 東京都赤十字血液センター製剤部

第 19 回日本組織適合性学会大会のご案内

第 19 回日本組織適合性学会大会
大会長 徳永 勝士
(東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野)

皆様におかれましては、益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第 19 回日本組織適合性学会大会を下記要領にて開催いたします。本大会は、「多様性の医科学」をテーマとして、MHC 研究の基礎から臨床まで多様な視点から最新の成果を取り上げたいと考えています。組織適合性の基礎・臨床に関わる多数の方々の演題のご応募とご参加をお待ちいたしております。

会 期: 2010 年 9 月 17 日 (金)～19 日 (日)

会 場: 東京大学 (本郷キャンパス) 医学部教育研究棟 13 階・14 階
〒113-0033 文京区本郷 7-3-1
http://www.u-tokyo.ac.jp/campusmap/map01_02_j.html (本郷キャンパス)
http://www.u-tokyo.ac.jp/campusmap/cam01_02_09_j.html (医学部教育研究棟)

[大会ホームページ]

<http://www.aeplan.co.jp/hla/>

[大会内容 (予定)]

◆ 9 月 17 日 (金)

1. 招待講演
2. シンポジウム I 多能性幹細胞を利用した医学研究のブレイク・スルー
3. シンポジウム II NK および HLA クラス I 認識受容体研究の最前線

◆ 9 月 18 日 (土)

1. シンポジウム III MHC と疾患
2. シンポジウム IV 臓器移植における術前・術後クロスマッチの現状と課題
3. 学術奨励賞候補および一般口演
4. ポスターセッション
5. 懇親会

◆ 9 月 19 日 (日)

1. 教育講演 (認定制度講習会)
2. QC ワークショップ集会
3. 認定技術者試験

[海外招待講演者 (予定)]

- Professor Steven G. E. Marsh
Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital, UK
- Professor Peter Parham
Department of Structural Biology and Department of Microbiology and Immunology,
School of Medicine, Stanford University, USA
- Professor Emmanuel Mignot
Center for Narcolepsy, School of Medicine, Stanford University, USA

[事前参加登録]

事前参加登録は大会ホームページ (<http://www.aeplan.co.jp/hla/>) にて申込み可能です。
事前参加登録をされる方は、2010年8月12日(木)までに事前参加登録をお願いいたします。

[参加費]

●事前参加費 (2010年8月12日まで)

◆理事・評議委員・非会員	¥10,000
◆会員	¥8,000
◆学生	¥5,000

●当日参加費

◆理事・評議委員・非会員	¥12,000
◆会員	¥10,000
◆学生	¥6,000

[一般演題募集要項]

1. 発表形式

口頭またはポスターでの発表です。

発表形式(口頭またはポスター)の決定に関しましては、プログラム委員会に一任下さい。

2. 応募資格

筆頭演者は本学会員である事が必要です。

非学会員の方は、日本組織適合性学会ホームページ (<http://square.umin.ac.jp/JSHI/index.html>) から入会手続きを行って下さい。

3. 申込方法

1) 演題のお申込みの前に事前参加登録をお願いいたします。

・事前参加登録を完了されますと、事前参加登録の確認メールが届きます。その確認メールに事前参加受理番号が記載されます。この番号が演題申込みの際に必要となります。

2) 演題の申込は、E-Mailのみでお受けいたします。

・E-Mailの件名は「19JSHI一般演題」として下さい。

・① 演題申込書、② 要旨の2つのファイルを添付して、19jshi@aeplan.co.jp宛にお送り下さい。

3) 演題申込書ファイルの作成

・第19回日本組織適合性学会大会ホームページ (<http://www.aeplan.co.jp/hla/>) から「演題申込書」をダウンロードし、必須項目(事前参加受理番号、演題カテゴリ番号、演題名、演者、所属、代表者の連絡先住所、電話番号、Fax、E-mail)をご記載下さい。

・ファイル名は「応募者演題申込書.xls」として下さい。(例 徳永勝士演題申込書.xls)

・演題カテゴリは、下記のカテゴリよりお選び下さい。(それぞれ基礎および臨床を含みます)

演題カテゴリー

- | | |
|------------|------------|
| 1. 臓器移植 | 6. 免疫 |
| 2. 造血幹細胞移植 | 7. 技術・方法 |
| 3. 細胞・組織移植 | 8. 疫学・統計解析 |
| 4. 再生医療 | 9. 動物 MHC |
| 5. 疾患 | 10. その他 |

4) 要旨形式

- ・要旨は、Microsoft Office の Word 形式の 2003 以上で保存し、ファイル名は、「応募者抄録 .doc」としてしてください。(例 徳永勝士抄録 .doc)
- ・「要旨記載例」をご参照の上、「演題名、演者、所属、本文」の順に記載してください。
 - 演者は、発表者に○印を付けてください。また、各演者名の後に上付き文字で所属番号を入れてください。
 - 所属の正式名称が長い場合は、省略所属名で記載してください。
 - 本文は、MS 明朝 11 ポイントで作成してください。
 - 800 文字以内を厳守し、【目的】・【方法】・【結果】・【考察】などに分類してください。
 - 英数字は半角文字を使用し、2 文字で 1 字としてカウントしてください。

※要旨記載例

大会ホームページ (<http://www.aeplan.co.jp/hla/>) の「演題申込」のページの「要旨記載例」を参考に作成をお願いします。

(ご注意)

申込者ご本人が入力したデータをそのまま抄録集に使用しますので、タイプミス等があっても、そのまま印刷されます。ご注意下さい。

また、要旨の修正は、締切日以降に受付することも出来ませんので、ご注意下さい。

4. 演題申込締切

2010 年 6 月 10 日 (木) 必着

5. 採択通知

演題をお申込いただいた後、確認のメールをお送り致します。演題お申込確認メールが届かない場合は、運営事務局 (19jshi@aeplan.co.jp) まで、御連絡下さい。

採択に関しましては、2010 年 8 月上旬に演題発表形式 (口演 / ポスター) および発表日時を記載しました採択通知を E-Mail にて連絡代表者へ通知いたします。

[懇親会]

日 時：2010 年 9 月 18 日 (土) 19:00～ (予定)

会 場：東京大学 (本郷キャンパス) 医学部教育研究棟 13 階「カポ・ペリカーノ」

参加費：一般 ¥5,000 学生 ¥3,000

[宿泊・交通のご案内]

本大会の宿泊・交通に関しましては、各自でご手配をお願いします。

[2010 年度学術奨励賞]

第 19 回日本組織適合性学会大会の一般演題に応募された中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者に学術奨励賞が授与されます。応募希望者は別途の手続きが必要です。詳細は日本組織適合性学会ホームページおよびMHC誌 Vol. 16 No. 3 に掲載されている「2010 年度学術奨励賞の募集について」をご参照いただくか、http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc/mhc_Vol16-20/MHC16-3-190.pdf をご参照ください。

[大会事務局]

〒 113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1
東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野
第 19 回日本組織適合性学会大会 事務局

[運営事務局]

〒 101-0051 東京都千代田区神田神保町 3-2-8
昭文館ビル 3F (株式会社エー・イー企画内)
第 19 回日本組織適合性学会大会
運営事務局 担当 衛藤 匡
Tel. 03-3230-2744 Fax. 03-3230-2479
E-Mail: 19jshi@aeplan.co.jp

組織適合性検査技術者認定制度
平成 22 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ

組織適合性検査技術者認定制度委員会
 委員長 田中 秀則
 組織適合性検査技術者認定制度委員会教育部会
 部会長 西村 泰治

日 時：平成 22 年 9 月 19 日（日曜日）9 時～11 時

場 所：東京大学医学部教育研究棟 13 階・14 階（東京都文京区本郷 7-3-1）

テキスト代金：1,000 円（認定申請の際に必要な受講証明と領収書をテキストに綴じ込みますので、認定技術者の申請あるいは更新を希望される方は、会場で代金を支払って、テキストを購入してください。）

内 容：各講習とも質疑応答を含めて、40 分を予定しています。

- (1) HIV/AIDS 感受性、抵抗性とゲノム多様性
 中島 敏晶（東京医科歯科大学・疾患生命科学研究部 ゲノム多様性）
- (2) HLA 抗原エピトープを考慮した HLA 抗体の解析
 宮崎 孔（北海道赤十字血液センター 検査部）
- (3) 同種造血幹細胞移植
 村田 誠（名古屋大学医学部附属病院 血液内科）

この講習会は、今後 HLA 検査技術者認定を取得、あるいは更新しようとする者を対象に実施されますが、それ以外の大会参加者であっても自由に参加することができます。受講希望者は、平成 22 年 7 月 31 日（土）までに、件名を「HLA 講習会」とし、以下の申込書の必要事項を書き込んだ E-mail を熊本大学大学院生命科学研究部・免疫識別学分野宛（miohta@kumamoto-u.ac.jp）に送付してください。E-mail を使用できない場合は、下記申込書を FAX（096-373-5314）にて、上記締め切り日までに送信してください。認定申請の際に必要な受講証明と領収書を綴じこんだテキストを、事前受講申込者数に応じて印刷し、事前申込者に優先して当日配布します。そのため当日の申込者が非常に多数になった場合については、受講証明書と領収書は差し上げますが、テキストの配布を受けられない場合がありますことを、あらかじめ御了承ください。テキスト代金は当日受付にて、お支払い下さい。なおテキストは講習会終了後の 10 月中旬には、学会ホームページに掲載する予定です。

平成 22 年度・認定 HLA 検査技術者講習会 受講申込書
 （学会ホームページからダウンロードできますので、そちらも御利用ください。）

FAX 送信先：096-373-5314, Eメール送信先：miohta@kumamoto-u.ac.jp

氏 名：

所 属：

住 所：〒

電話番号：

FAX 番号：

Eメールアドレス：

HLA 検査技術者認定取得予定 なし あり →平成 ____ 年度を予定

組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2010)

組織適合性技術者認定制度委員会

委員長： 田中 秀則

副委員長： 中島 文明

委員： 石川 善英, 猪子 英俊, 太田 正穂, 大谷 文雄, 木村 彰方, 酒巻 建夫, 佐治 博夫,
小林 賢, 徳永 勝士, 成瀬 妙子, 西村 泰治

資格審査部会

部会長： 小林 賢

副部会長： 成瀬 妙子

部員： 柏瀬 貢一, 中島 文明

教育部会

部会長： 西村 泰治

副部会長： 成瀬 妙子

部員： 太田 正穂, 小河原 悟, 木村 彰方, 小林 賢, 酒巻 建夫, 佐治 博夫, 佐田 正晴,
徳永 勝士, 中島 文明, 平山 謙二, 丸屋 悦子

試験問題検討部会

部会長： 太田 正穂

副部会長： 石川 善英

部員： 石谷 昭子, 大橋 順, 小河原 悟, 柏瀬 貢一, 木村 彰方, 小林 賢, 高原 史郎,
田中 秀則, 徳永 勝士, 中島 文明, 西村 泰治, 平山 謙二, 丸屋 悦子, 屋部 登志雄

QCワークショップ部会

部会長： 田中 秀則

副部会長： 成瀬 妙子, 中島 文明

抗体-QC 試料担当： 中島 文明

DNA-QC 試料担当： 安波 道郎

造血幹細胞移植： 森島 泰雄

臓器移植： 佐藤 壯

輸血： 高 陽淑

部員： 太田 正穂, 木村 彰方, 佐田 正晴, 橋口 裕樹, 宮崎 孔, 山本 賢

第13回 HLA-QC ワークショップレポート

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過およびサンプルの総合結果—

田中秀則, 中島文明 (日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所)
日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会[#]

[#]: 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会構成員: 田中秀則¹⁾, 太田正穂²⁾, 木村彰方³⁾, 高陽淑⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾, 佐藤 壯⁶⁾, 中島文明¹⁾, 成瀬妙子³⁾, 橋口裕樹⁷⁾, 森島泰雄⁸⁾, 安波道郎⁹⁾, 山本 賢¹⁰⁾ (所属: ¹⁾日本赤十字社中央血液研究所, ²⁾信州大学医学部, ³⁾東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, ⁴⁾大阪府赤十字血液センター, ⁵⁾国立循環器病センター再生医療部, ⁶⁾札幌北楡病院臨床検査課, ⁷⁾福岡赤十字病院, ⁸⁾愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部, ⁹⁾長崎大学熱帯医学研究所, ¹⁰⁾国立循環器病センター臨床検査部)

1. ワークショップの経過

認定制度委員会が主催する本年度のHLA-QCワークショップ(QCWS)は, 大会長主催を含めると通算13回目のQCWSとなった。平成19年11月からQCWS部会において今年度の方針について討議し, 昨年同様HLA-DNAタイピングのQC(DNA-QC)とHLA抗体検査のQC(抗体QC)を実施することとした。また, 参加施設を輸血, 臓器移植, 造血幹細胞移植, その他に分類し, 各部門におけるQCWSの結果解析を行うこととし, 部会員の中から輸血, 臓器移植, 造血幹細胞移植の担当を決定した。

開催の案内・参加の申し込みは, MHC誌上及び学会ホームページ上に「第13回QCWSの案内」として平成21年1月に掲載した。平成21年3月6日の締め切りまでに, 68施設, 172名の参加申し込みがあった。参加者との連絡およびデータ収集は, 原則として電子メールにより連絡することとで運営した。また, 平成20年2月よりQCWS部会員による電子メールによる討議で得られたテーマに基づいて具体的なサンプルの選定を行った。

ついで, 4月上旬から中旬にかけて, 同意書・誓約書を得た後に施設を単位としてサンプルを発送し

た。5月上旬にデータ入力フォーマットを送付し, 6月上旬のデータ送付締め切りまでに63施設からデータが回収された。生データおよび取りまとめた結果を各解析担当者に送付し, 8月下旬まで解析が行われた。前回と同様に, 解析結果を参加者に直接配布するのではなく, 学会のホームページ(以下, HP)解析結果を順次掲載し, 参加者が必要に応じてダウンロード出来る形式とした。

2. QCWSのテーマ

組織適合性技術者認定制度の主旨にそったQCWSのテーマをQCWS部会で検討した結果, DNA-QC部門では, ①正確なDNAタイピング出来ること(4桁アレルが判定されること), ②DNAタイピング結果の表記を正しく表記すること(学会の表記法に従い正確に表記すること), ③DNAタイピング結果に対応したHLA抗原型を正確に読替えること(DNA結果からHLA抗原型が正確によりみ表記すること), 抗体QC部門では, ①エピトープと許容抗原により正確な抗体特異性解析を目指す, ②非特異成分(反応)の排除が適切に行なえること, ③HLA-C座抗原に対する抗体特異性が検出可能であること, ④Igサブ

クラスの抗体がそれぞれ検出可能であること、⑤ HLA 以外に MIC に対する抗体が検出可能であることをテーマとした。用いた検体の詳細は以下のサンプルの総合結果で概説する。また、抗体-QC ではクロスマッチ検査方法について検討を行うこととし、① 配布検体の一部を使用しクロスマッチ試験の現状を把握する、② 今回は予備調査という位置づけで、任意参加とすることとした。

なお、今年度のデータ解析においては、QCWS 部会メンバー以外に広く参加を求めることとした。

3. 参加者数および参加施設

参加者は総数 203 名、78 施設(当日参加 34 名、10 施設)となった。また、DNA-QC 試料配布は 58 施設、抗体-QC 試料配布施設は 36 施設であった。

参加施設名: 北里大学病院・臨床検査部, 富山大学附属病院輸血・細胞治療部, 広島県赤十字血液センター・技術部検査課, 宮城県赤十字血液センター・検査一課, 東海大学医学部附属病院・細胞移植再生医療科, 日本赤十字社中央血液研究所・研究開発部, 岐阜大学病院・検査部, 福岡赤十字病院・検査部, 日本赤十字社九州血液センター・検査二課, 岡山県赤十字血液センター・検査課, 自治医科大学附属病院輸血・細胞移植部, NPO 法人腎泌尿器疾患研究所, 東京都赤十字血液センター・検査部, 株式会社リプロセル FCM・臨床検査グループ, 大阪府赤十字血液センター・検査部, 長野赤十字病院・検査部, 湧永製薬株式会社・バイオ事業開発部, 香川県立中央病院・中央検査部, 医療法人立川メディカルセンター, 立川総合病院・臨床検査科, 山形県立中央病院・輸血部, 九州大学病院遺伝子・細胞療法部, 山形県立救命救急センター・山形県移植検査センター, 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター・移植免疫研究室, 高知医療センター・MCM 検査室, 大阪市立大学医学部附属病院・輸血部, 株式会社ビー・エム・エル・特殊分析部, 関西医科大学病院・輸血部, 金沢医科大学病院・北陸腎移植 HLA 検査センター, 株式会社エスアールエル・臨床検査事業品質保証部, 札幌北楡病院・臨床検査科, 広島県赤十字血液センター・製剤課, 公立大学法人横浜市立大学附属病院・輸血細胞治療部, 三重県赤十字血液セン

ター・安全管理担当, 株式会社ベリタス技術営業部, 徳島大学病院・輸血部, 名古屋第二赤十字病院・医療技術部, 北海道大学病院・検査輸血部, 株式会社医学生物学研究所・応用技術部, 近畿大学医学部附属病院・輸血部, 岐阜赤十字病院・検査課, 財団法人鷹揚郷腎研究所・化学実験室, 広島大学病院・輸血部, 松江赤十字病院・検査部, 仙台社会保険病院・研究部, 金沢医科大学・代替基礎医学, 岩手医科大学附属病院・中央臨床検査部, 愛知県赤十字血液センター・検査二課, 福島県立医科大学附属病院・輸血・移植免疫部, 姫路赤十字病院・検査部, 国立病院機構千葉東病院・研究検査科, 静岡県立総合病院・総合診療部, 京都大学医学部附属病院・検査部, 株式会社保健科学研究所・特殊分析センター, 特定非営利活動法人 HLA 研究所, 信州大学医学部・法医学教室, 虎の門病院・輸血部, 東京大学医学部附属病院・輸血部, 熊本大学医学部附属病院・輸血細胞治療部, 東海大学・医学部基礎医学系分子生命科学, 国立循環器病センター・臨床検査部, 熊本県赤十字血液センター・総務課, 北海道赤十字血液センター・検査部, 大分県立病院・臨床検査技術部, 東海大学・医学部教育研究支援センター, 新潟市民病院・臨床検査科, 佐賀県立病院好生館・検査科, 三菱化学メディエンス株式会社・遺伝子検査部, 京都大学医学部附属病院・輸血細胞治療部(以上のべ 68 施設)

4. 解析担当者

今年度のデータ解析担当者(所属)と分担項目は以下の通りである。

4.1. 部門別解析

1) 輸血部門

- ① 概要と解析の考え方について: 高陽淑(大阪府赤十字血液センター)
- ② DNA タイピング: 黒田ゆかり(日本赤十字社九州血液センター)
- ③ 抗体検査(血液センター): 平田康司(岡山県赤十字血液センター)
- ④ 抗体検査(医療機関): 山岡学(関西医科大学附属病院大滝井病院)

- ⑤ クロスマッチ：中島文明（日本赤十字社中央血液研究所）
- 2) 臓器移植部門
 - ① DNA タイピング：中山みゆき（九州血液センター）
 - ② 抗体部門（Flow PRA）：石塚 敏（東京女子医科大学腎臓病総合医療センター）
 - ③ 抗体部門（AbScreen LAT）：佐藤 壮（札幌北楡病院）
 - ④ クロスマッチ：山本 賢（国立循環器病センター）
- 3) 造血幹移植部門
 - ① DNA タイピング：加藤 道（愛知県赤十字血液センター）
 - ② 抗体解析：杉本達哉（東海大学医学部付属病院）
- 4.2. DNA 結果表記について：太田正穂（信州大学医学部法医学）
- 4.3. 検査法別解析
 - 1) FCM による抗体検査法の解析
 - ① FlowPRA 法の検査状況の解析：佐藤 壮（札幌北楡病院）
 - ② LIFT 法および FCXM の検査状況の解析：宮崎 孔（北海道赤十字血液センター）
 - 2) Luminex による抗体検査
 - ① Lab Screen による抗体検査：高 陽淑（大阪府赤十字血液センター）

- ② WAK Flow および ICFA による抗体検査：関根みゆき（東京都赤十字血液センター）
 - 3) DNA タイピング
 - ① DNA 検査法の概要（Luminex, SBT 以外）：橋口裕樹（福岡赤十字病院）
 - ② Luminex (SSO) 法について：大沼 豪（HLA 研究所）
 - ③ SBT 法について：吉川枝里（東海大医学部）
- 各解析担当からの結果は終了後順次学会 HP に掲載し、QCWS に参加していない方も QCWS の解析結果を閲覧出来る様にした。また、参加者自身が QCWS 集会までに結果を検討できるように、試料の構成および生データ資料を CDR で各施設に配布し、参加者が自施設の結果を再検討出来る様にした。

5. サンプルの総合結果

本ワークショップで解析されたデータに基づき、DNA および抗体サンプルの総合結果を示す。DNA サンプルは、SBT データを基準に SSO など他法を参照し Ambiguity 状態を回避する方向で総合的にリアサインした。解析解像度は IMGT/HLA Database Sequence Alignments based on Release 2.26.0 (July-2009), 表記は本学会 HLA 標準化委員会の表記ルール(2003年度版)に則り記載した。なお、HLA-DRB3,4,5 および DQA データは中央血液研究所による参考データである。(表1) また、抗体サンプルは、検査方法別に各抗原に対する反応状態を簡略化して示した。(表2) それぞれ、各施設の精度管理、技術訓練に役立てば幸いである。

表 1. 13th. QCWS HLA-DNA typing: consensus results

ID	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DR	
H2101	A*2603	-	B*3501/04/24/+	B*5101/02/04/+	Cw*030301	Cw*140201	DRB1*130701	DRB1*140301
	A26	-	B35	B51	Cw9	Cw7	DR13	DR1403
H2102	A*2602	A*310102	B*1501/70	B*390202	Cw*0303/43	Cw*0702/29/50	DRB1*1401/54	DRB1*1406
	A26	A31	B62 *	B3902	Cw9	Cw7	DR14	DR14
H2103	A*020101	A*020601	B*270401	B*670102	Cw*0702/50	Cw*150201	DRB1*0405	DRB1*090102
	A2	A2	B27	B67	Cw7	-	DR4	DR9
H2104	A*0302	A*240201	B*0702/26/61	B*1302/18	Cw*060201	Cw*0702/50	DRB1*010101	DRB1*070101
	A3	A24	B7	B13	Cw6	Cw7	DR1	DR7

ID	HLA-DRB345		HLA-DQA		HLA-DQB		HLA-DP	
H2101	DRB3*0101	DRB3*0202	DQA1*0501/05/09	DQA1*0503/07	DQB1*030101	-	DPB1*020102	-
	DR52	DR52	nd	nd	DQ7	-	DPw2	-
H2102	DRB3*0202	-	DQA1*0101/04/05	DQA1*0503/07	DQB1*030101	DQB1*050301	DPB1*0501	-
	DR52	-	nd	nd	DQ7	DQ5	DPw5	-
H2103	DRB4*0101/03/06	-	DQA1*0302/03	-	DQB1*030302	DQB1*0401	DPB1*0301//+	DPB1*0901//+
	DR53	-	nd	nd	DQ9	DQ4	nd	nd
H2104	DRB4*0101/03/06	-	DQA1*0101/04	DQA1*0201	DQB1*0201/02/04	DQB1*050101	DPB1*0501//+	DPB1*0901//+
	DR53	-	nd	nd	DQ2	DQ5	nd	nd

Upper : Allele type
Lower : HLA type

※ タイピング結果にB*15010102Nが含まれるので、抗原名表記は暫定的なもの

表 2. 13th. QCWS HLA-antibody specificities: consensus results

	SH2101		SH2102		SH2103		SH2104		Cw7 IgM	MICA IgG	MICA IgM
	A24	A23	B60	B61	Cw1	Cw14	B44	B44			
LS-SA	8	8	8	8	8	8	8	8	4	8	8
FP-SA	8	8	8	8	8	8	8	8			
WAKFlow	8	8	8	8	8	8	8	8			
ICFA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LIFT	8	8	8	8	8	8	8	8			
AHG-LCT	8	8	8	8	8	8	8	8			
LCT	8	4	8	8	8	8	8	8			
MPHA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LS-SA	8	8	8	8	8	8	8	8		2	1
FP-SA	8	8	8	8	8	8	8	8			
WAKFlow	8	8	8	8	8	8	8	8			
ICFA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LIFT	8	8	8	8	8	8	8	8			
AHG-LCT	8	8	8	8	8	8	8	8			
LCT	8	4	8	8	8	8	8	8			
MPHA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LS-SA	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
FP-SA	8	8	8	8	8	8	8	8			
WAKFlow	8	8	8	8	8	8	8	8			
ICFA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LIFT	8	8	8	8	8	8	8	8			
AHG-LCT	8	8	8	8	8	8	8	8			
LCT	8	4	8	8	8	8	8	8			
MPHA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LS-SA	8	8	8	8	8	8	8	8		4	8
FP-SA	8	8	8	8	8	8	8	8			
WAKFlow	8	8	8	8	8	8	8	8			
ICFA	8	8	8	8	8	8	8	8			
LIFT	8	8	8	8	8	8	8	8			
AHG-LCT	8	8	8	8	8	8	8	8			
LCT	8	4	8	8	8	8	8	8			
MPHA	8	8	8	8	8	8	8	8			

8 Strong positive
4 Weak or several positive
1 Negative
- No data

LS-SA : LABScreen Single Antigen
FP-SA : FlowPRA Single Antigen
MICA : using LABScreen Mixed

第13回 HLA-QC ワークショップレポート

—部門別解析：輸血部門—

高 陽淑¹⁾, 黒田ゆかり²⁾, 平田康司³⁾, 山岡 学⁴⁾, 中島文明⁵⁾

¹⁾大阪府赤十字血液センター, ²⁾日本赤十字社九州血液センター, ³⁾岡山県赤十字血液センター, ⁴⁾関西医科大学付属病院大滝井病院, ⁵⁾日本赤十字社中央血液研究所

1. 輸血部門解析の主旨 (高 陽淑: 大阪府赤十字血液センター)

輸血部門に参加した25施設を検査の目的が同じであるグループとして、医療機関、血液センター、検査施設、メーカーに分類し、グループ内の現状と問題点について解析・整理した。ただし、方法別解析を別に設定していることから技術面での解析には重点を置いていない。参加施設の構成と検査目的および、他部門との関わりについては、学会HP「13回QCワークショップ報告集」の「輸血関連 概要」に示す。また、各解析担当からの解析結果を以下に報告する。

2. 輸血部門 DNA タイピング (黒田ゆかり: 日本赤十字社九州血液センター)

2.1. はじめに

輸血部門において、結果報告数の多かったHLA-A, B, CおよびDRB1について総合判定データを解析した。各施設より提出された総合判定にコンセンサスアリアルと同様の表記が含まれるものを正解とし、施設別、方法別の2方向から正解率を中心に解析した。

2.2. 結果 (学会HP「13回QCワークショップ報告集」の「輸血関連 DNA タイピング」参照)

1) 方法別、施設別 検査結果報告数

HLA-A, B, C, DRB1において、1法のみで判定している施設は30施設中24施設、2法を用いた施設は6施設であった。実施検査項目は、HLA-A, B, C, DRB1が30施設中13施設と最も多く、Cローカス

は4施設が未実施であるのに対し、DRB1については全施設で実施していた。

2) 施設別の正解率

輸血部門全体の総合正解率は96.0%であった。施設別の総合正解率は、いずれも90%を超えていたが、検体別では医療機関においてH2104の正解率が低く、A*0302で64.3%、B*1302で78.6%、Cw*0602で72.7%、Cw*0702で63.6%であった。また、輸血で必要となるクラスI(2桁)について正解率を算出した結果、血液センターで100%、医療機関では約97%と、正解率は全体的に高くなっていたが、一般的なHLA型であるA24, A26, B51等を検出できていない施設があった。

3) 方法別の正解率

データの偏りを考慮し、使用していた施設が多かったSBT法、Luminex(SSO)法、SSP法に絞ってローカス別に比較すると、SSP法におけるH2104のA*0302の正解率は28.6%と最も低く、7施設中正解は2施設のみであった。また、クラスI(2桁)の正解率を算出し比較すると、Luminex法では100%、SSP法では約96%であった。

4) アサインミス

アサインミスは4種類に分類でき、判定ミス(正しく反応していないことから誤判定となっている)、判定不能(明らかな反応不良がある)、表記ミス(正しく反応しているが誤判断から正解アリアルを記載していない)、転記ミス(各検査方法からの単純な転記間違い)とした。アサインミス(4桁)は全回答の4.0%に見られ、内訳は判定ミス1.7%、判定不能0.7%、表記ミス1.5%、転記ミス0.1%であり表記ミスが意外

と多かった。判定ミス 16 件のうち 14 件は SSP 法に見られたが、原因として推奨濃度以下であった DNA 検体の影響も考えられた。

2.3. まとめ

全体的に正解率は高かったが、本来 100% 正解可能な HLA タイプであることから、判定ミスがあったことへの危機感を持って欲しい。また、転記および表記ミスも誤報告となる重大なミスであることから、日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会の「検査結果 (ワークシート) 記載法と結果報告書表記法およびアンビギュイティ (ambiguity) の取扱いの原則 (2003 年度改訂版)」を再度熟読し、さらに新表記についても確認していただきたい。

近年の DNA タイピング試薬および技術の向上により検査精度は向上したが、検査結果表記の複雑化が見られ、輸血部門においては正しい DNA 検査結果表記だけでなく、正確な HLA 型への読み替えや適切な運用上の HLA 型の判断も求められる。

自施設の試薬の特性を熟知した上で使用し、様々な条件を考慮したタイピング方法の選択、適切な結果報告が可能である体制がとれていることが望ましいと考える。

3. 輸血部門抗体解析 (平田康司: 岡山県赤十字血液センター, 山岡 学: 関西医大滝井病院)

以下に示す表は、学会ホームページ「13 回 QC ワークショップ報告集」の「輸血関連 抗体検査」に掲載しているのでご参照下さい。

3.1. はじめに

今回は「輸血」という観点から、血液センターと医療機関のグループを対象に HLA クラス I 抗体解析を実施した。参加施設および方法を表 1-1 および表 1-2 に示す。各グループにおける抗体検査の主な目的が、医療機関は抗体の検出であることから「抗体の有無」について、血液センターは HLA 適合血小板輸血適応の可否判断および許容抗原検索であることから「抗原別判定」について、参加施設間の一致率を重点的に解析した。

3.2. 結果

SH2101~2104 の「抗体の有無」についての一致率を表 2-1 および 2-2 に示す。中でも、SH2104 の一致率は医療機関で 36.4%、血液センターで 70% と低く、さらに生体試料を用いた検査との総合判定から HLA 抗体以外の反応 (non-HLA) も疑われた (表 4)。また、血液センターグループ内で比較した抗原別判定結果では日本人集団での出現頻度 0.1% の 43 抗原において 4 サンプル共に施設間差がみられた (表 3)。

3.3. 問題点

医療機関では、原理の異なる複数の方法や健常者由来の多数の生細胞を日常検査として準備する事は経済的、人間的な問題からハードルが高く、現状では低力価の抗体検出が困難であると考えられた。一方、血液センターでは、殆どの施設で抗体検出における高感度化は進んでいるものの判定基準は標準化されておらず、HLA 適合血小板供給のための許容抗原検索にも施設間差が反映されること等が問題点として挙げられる。

3.4. まとめ

輸血部門での最優先事項は輸血不応答症例に対してより有効な輸血を行う事である。その為には医療機関と血液センターがそれぞれの役割を果たし、相互連携する事が重要であろう。

具体的には、医療機関では、低力価抗体を保有する患者への対応として高感度法実施施設との連携体制の構築、血液センターでは精製抗原を用いた方法における判定基準の設定と、結果判定が困難なケース (non-HLA 抗体との判別など) をフォローするためにも臨床的意義のあるクロスマッチの確立が今後の課題である。

4. 輸血部門クロスマッチ (中島文明: 日本赤十字社中央血液研究所)

4.1. はじめに

本年度から QCWS では、輸血や移植など部門別解析を導入した。これまでの抗体部門の結果解釈が、輸血や移植などで異なることが見えてきたからである。

第13回 HLA-QC ワークショップレポート

—部門別解析：臓器移植部門—

中山みゆき¹⁾、石塚 敏²⁾、佐藤 壯³⁾、山本 賢⁴⁾

¹⁾日本赤十字社九州血液センター、²⁾東京女子医科大学腎臓病総合医療センター、³⁾札幌北榆病院、⁴⁾国立循環器病センター

1. 臓器移植関連部門 DNA タイピング (中山みゆき：日本赤十字社九州血液センター)

1.1. はじめに

臓器移植関連部門の DNA タイピングにおける総合判定データ解析を A, B, C および DRB1 の正解率を中心として検討を行った。

各施設より提出された総合判定にコンセンサスアリアル (2 桁レベルおよび 4 桁レベル) と同様の表記が含まれるものを正解とし、正解率を算出した。不正解については、判定ミス・判定不能 (主に試薬キットの問題)・表記ミス・転記ミス (主に判定者の問題) の 4 区分で解析した (区分詳細内容は輸血部門と同様)。

解析結果の詳細は、学会ホームページ「13 回 QC ワークショップ報告集」の「臓器移植関連 DNA タイピング」(HP 掲載結果) を参照されたい。

1.2. 参加施設

臓器移植関連部門参加：40 施設

内訳は、血液センター：3 施設、試薬メーカー：3 施設、検査センター：6 施設、医療機関：28 施設、日常業務は臓器のみ：17 施設、臓器と造血：8 施設、臓器と輸血：2 施設、全て：13 施設であった。上記の中で、臓器移植ネットワーク検査施設が 24 施設あった。

1.3. 結果

1) 検査方法・方法数とローカス別施設内訳別の検査結果報告施設数 (HP 掲載結果, 表 1)

データを提出した 40 施設の内、SSO 法 (Luminex,

RELI) を使用している施設が最も多く、次いで SSP 法が多く使用されていた。また、ローカス別では A, B, DR ローカス：40 施設、C ローカス：20 施設の報告であった。近年、臨床的に重要と言われている C ローカスの報告施設は他部門 (造血・輸血部門) と比較して少なかった。

2) 検査方法・方法数・施設内訳と検査内容別の検査結果報告施設数 (HP 掲載結果, 表 2)

1 方法のみで検査結果を報告した施設が 30 と最も多く、中でも SSO 法の RELI を使用している施設が 14 施設あった。(RELI に関してはすべて臓器移植ネットワークの検査施設で使用されていた。)

2 方法を用いた施設では、SSO 法と SSP 法もしくは SSO 法と SBT 法の組合せで検査を行った施設が大半を占め、この傾向は例年同様であった。SSO 法と RFLP 法の組み合わせが 1 施設あった。

検査ローカス別にみると、A, B, DRB1, DRB3/4/5 の組み合わせが 14 施設と多く臓器移植部門として必要なローカスのみを選択していると考えられる。

3) 各ローカス毎 (対立遺伝子型毎) の検査方法・参加施設別正解率 (HP 掲載結果, 表 3, 表 4)

検査方法別において総合ではすべてのローカスにおいてほぼ 90% 以上の正解率を示したが個別では単独で SSP 法, SSO 法 (RELI) を使用した場合正解率が低い傾向にあった。これについては他部門も同様な結果であった。特に正解率の低かったものについては後述する。参加施設別においてもすべてのローカスにおいてほぼ 90% 以上の正解率を示した。検査センター、試薬メーカーの各 1 例を除き不正解となったものは医療機関でありその中でも一部の施設にア

サインミスが多く認められ、技術や判定に習熟する必要性が感じられた。

4) 不正解施設のアサインミス原因調査 (HP 掲載結果, 表 5)

アサインミスのあった全 38 例の内訳は SSO-LABType 2 例と SSO-ジェノサーチの 1 例以外は SSP 法と SSO 法 (RELI) であった。

SSO-LABType の 2 例中 1 例は表記ミス。もう 1 例は H2101 の Cw*1402 の判定ミスであった。原因としてこの施設の No76 のビーズの Positive Value が 19.36% (No76 の Cut off Value は 20%) であり弱陽性と誤判定したためと推測された。同一試薬・Lot を使用していた他 2 施設と比較すると全体的に値が高めにでており、DNA 濃度が高いか洗浄操作や反応時間の不備等が考えられる。SSO-ジェノサーチは表記ミス。(同一試薬・Lot を使用した他 2 施設は問題なし)

SSO (RELI) の約 60% が判定ミス, 40% が表記ミスであった。SSO 法では偽反応が多くみられた。昨年の解析で DRB キット #30 のプローブの DRB1*0405 での反応は、本来陽性だが反応が弱くスコアがばらつくと指摘されており、今年も同じく H2103 の DRB1*0405 において #30 プローブが施設間でスコア 2~8 とばらつきを認めた。引き続き DR4 の判定の際には注意が必要である。

プローブの反応は PCR 産物量・時間・温度管理・試薬調整・洗浄操作・振とうの有無等に問題なければ発色に差はでないと思われるが、判定する側の基準の差によりプローブの発色反応を陽性とするか陰性とするかが問題となってくる。

SSP 法での 35% が判定ミス, 10% が判定不能, 55% が表記ミスであった。アガロースゲル電気泳動による SSP 法は Luminex のような高価な設備を必要としないため採用されることが多い。しかし DNA 濃度不足により陽性バンドが得られない場合や、再検査するためのサンプル量が十分量ではなく誤判定の要因になっている。特に H2104 の A*0302 のアサインミスが多かったが (正解は 1/6 施設, 正解率 16.7%) 6 例中 2 例が偽陰性による判定ミス, 3 例は表記ミス (反応は問題なく A*0302 検出している) であった。また H2101 の A ローカスの場合 SSP-JPN

を使用すると, A*2601/02/03+, -の他に A*2601/02/03+ と A*2501/2607/4301/+ のヘテロの組み合わせの可能性があるためそのような記載もしくはコメントを結果に記入する必要がある。(今回はコンセンサスアリアルが含まれていることで正解としたが, このような記載をしている施設はなかった。)

1.4. 考察とまとめ

正確なタイピングのためには方法論の異なる 2 種類以上の検査法を用いることが望ましいとされるが, 実際には単独使用を余議なくされる場合が多い。施設の規模により設備・人員・予算等に限界があり, 必ずしも最善の検査体制を確立できないのが現状である。臓器移植部門は, 造血・輸血部門と異なり慢性的なドナー不足のため現実的には HLA の適合度があまり重要視されないこともあり, 生体移植では参考程度となっている。一方, 献腎・臍移植では HLA 型のミスマッチ数の少なさが移植候補者選択のポイントのひとつとなっており。臓器移植ネットワーク検査施設には検査の正確性だけではなく迅速性も要求される。

ただ依然として試薬の反応性には問題ないのに, データの転記ミス, 反応パターンの読み取り間違い, 表記ミスなどの人為的過誤が見受けられる。

今回は「正確な DNA タイピング技術と学会が規定した結果表記で記載すること」がテーマとなっているが, 検査結果 (ワークシート) 記載法と結果報告書表記法の原則 (2003 年度改訂版) がまだ理解されていない。通常我々がタイピングを行う際には人種や家族背景 (ハプロタイプ頻度), 疾患名, 移植の有無等の情報が得られるため参考にできるが QCWS ではそのような情報が示されていないので, すべての可能性を考慮する必要がある。

今後臨床側に正確なタイピング結果を報告するためにも, 新表記法の導入に伴う結果表記を正しく理解, 解釈できるよう技術・知識をさらに深めることが重要課題であると思われた。

2. 臓器移植関連 抗体部門 (FlowPRA) (石塚 敏: 東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター)

臓器移植関連の抗体部門 (Flow PRA) では,

FlowPRA と LABScreen を中心に解析を行った。

各施設から報告して頂いたすべての判定スコアについては概要資料に集計を掲載した。今回、配布されたサンプルには正確な回答がないため、解析を行うにあたり判定保留または判定不可の抗体については解析から除外した。

データの解析方法は、各施設の判定スコアから陽性一致率、陰性一致率、判定保留率を求め、抗体の有無について統計学的に解析を行った。

2.1. FlowPRA Screening

HLA Class I IgG では、SH2104 で判定保留の報告が 5 施設あり、判定スコアの一致率は、SH2101, SH2101, SH2103 が 100%, SH2104 は 73% であった。

陽性率 (最小値, 最大値) は、SH2101 (48.3%, 90.84%), SH2102 (50.20%, 92.53%), SH2103 (7.40%, 48.60%), SH2104 (0.40%, 9.70%) と施設間において陽性率のバラツキがみられた。

HLA Class II IgG では、SH2102 で判定保留の報告が 1 施設あり、判定スコアの一致率はすべて 100% であった。

陽性率 (最小値, 最大値) は、SH2101 (41.10%, 86.60%), SH2102 (0.30%, 71.63%), SH2103 (6.60%, 74.70%), SH2104 (0.20%, 2.80%) と HLA Class I IgG 同様に施設間において陽性率のバラツキがみられた。SH2102 では、陽性率が 71.63% でありながら判定スコアを判定保留とした施設があったが原因調査までには至らなかった。

2.2. FlowPRA single

HLA Class I & II IgG の判定スコアでは、一部の抗体で 3 施設に判定保留の報告があった。全体の一致率から HLA 抗体の有無を解析した結果、4 つのサンプルで合計 15 抗体の判定不可があった。

2.3. LABScreen

HLA Class I IgG では、SH2104 のサンプルで判定保留が 3 施設あり、判定スコアの一致率は、すべて 100% であった。HLA Class II IgG では、SH2104 で判定保留が 2 施設あり、これらの 2 施設では、HLA

Class I IgG についても判定保留で報告されていた。判定スコアの一致率は、SH2104 で 91.7%, SH2101, SH2102, SH2103 で 100% であった。

2.4. LABScreenPRA

QCWS では、PRA% の報告はなかったが、csv ファイルから解析を行った。参加施設が少数ではあったが、HLA Class I IgG の SH2104 で一致率 75% であり、その他はすべて HLA Class II も含め一致率 100% であった。陽性率は、各施設で大きな差はなく、FlowPRA screening より安定した結果であった。

2.5. LABScreen single

HLA Class I & II IgG の判定スコアでは、一部の抗体で 7 施設に判定保留の報告があった。判定保留抗体では、各施設によってカットオフの基準値が異なっている傾向があった。全体の一致率から HLA 抗体の有無を解析した結果、4 つのサンプルで合計 2 抗体の判定不可があった。

2.6. FlowPRA と LABScreen single IgG の比較 (表 1-4)

一致率の解析から得られた 2 法による結果は、SH2101 で 6 抗体が不一致であった。recombinant 抗原の 4 ケタのアリルでもみて全く同じ抗原であるため、乖離した原因は把握出来なかった。FlowPRA では、判定保留が 2 抗体あり、解析可能であった 101 抗体中 6 抗体が不一致で、一致率は 94.1% であった。

SH2102 では、6 抗体が不一致であった。4 ケタのアリルで見ると 5 抗体については全く同じ抗原であり、乖離した原因は把握出来なかった。しかし、A66 に関しては FlowPRA で A*6601, LABScreen で A*6601 と A*6602 の 2 抗原あり、LABScreen の蛍光値で見ると A*6601 よりも明らかに A*6602 は蛍光値が高く、不一致の原因であることが示唆された。FlowPRA では、判定保留が 3 抗体あり、解析可能であった 76 抗体中 6 抗体が不一致で、一致率は 92.1% であった。

SH2103 では、3 抗体が不一致であった。4 ケタのアリルでもみて全く同じ抗原であるため乖離した原

因は把握出来なかった。FlowPRA では、判定保留が 9 抗体、LABScreen では 2 抗体あり、解析可能であった 92 抗体中 3 抗体が不一致で、一致率は 96.7% であった。

SH2104 では、1 抗体が不一致であった。B75 は FlowPRA で B*1502、LABScreen で B*1502 と B*1511 の 2 抗原があった。LABScreen の蛍光値で

みると B*1502 では施設によって蛍光値が 20 から 1803 と大きな差があり、B*1511 よりは蛍光値が全体に高めだった。各測定法の一致率も悪いことから、判定が困難であったことが推測された。FlowPRA では、判定保留が 1 抗体あり、解析可能であった 78 抗体中 1 抗体が不一致で一致率は 98.7% であった。

表 1 FlowPRA と LABScreen single IgG の比較 (SH2101)

FlowPRA		LABScreen	
A*0301	陽性(62.5%)	A*0301	陰性(78.6%)
A*3001	陰性(100%)	A*3001	陽性(85.7%)
A*6901	陰性(100%)	A*6901	陽性(73.3%)
A*8001	陰性(100%)	A*8001	陽性(100%)
B*4501	陽性(100%)	B*4501	陰性(100%)
B*8201	陰性(100%)	B*8201	陽性(100%)

表 2 FlowPRA と LABScreen single IgG の比較 (SH2102)

FlowPRA		LABScreen		LABScreen			
				施設番号	A*6601	A*6602	スコア
A*2601	陽性(75.0%)	A*2601	陰性(100%)	21S02	437	9643	8
A*3101	陽性(85.7%)	A*3101	陰性(92.9%)	21S03	284	11021	8
A*6601	陰性(100%)	A*6601, A*6602	陽性(100%)	21S07	122	13308	8
B*3801	陰性(62.5%)	B*3801	陽性(80.0%)	21S08	246	15573	8
B*3901	陰性(100%)	B*3901	陽性(85.7%)	21S09	10	4442	8
B*6701	陰性(100%)	B*6701	陽性(100%)	21S10	108	11999	8
				21S11	214	16386	8
				21S12	179	16162	8
				21S15	144	14917	8
				21S24	172	12042	8
				21S28	222	15497	8
				21S32	142	15019	8
				21S34	289	12707	8
				21S35	175	17511	8
				21S36	152	12388	8
				Trimmed Mean			

表 3 FlowPRA と LABScreen single IgG の比較 (SH2103)

FlowPRA		LABScreen	
Cw*1802	陰性(100%)	Cw*1802	陽性(78.6%)
B*4201	陰性(75.0%)	B*4201	陽性(64.3%)
DRB1*1501, DRB1*1502	陽性(60.0%)	DRB1*1501, DRB1*1502	陰性(83.3%)

表4 FlowPRA と LABScreen single IgG の比較 (SH2104)

FlowPRA		LABScreen	
B*1502	陽性(66.7%)	B*1502, B*1511	陰性(71.4%)

施設番号	LABScreen		スコア
	B*1502	B*1511	
21S02	1045		8
21S03	1803		8
21S07	727	107	1
21S08	1348	212	4
21S09	20	23	1
21S10	284	110	1
21S11	678	147	8
21S15	438	78	1
21S24	1026	109	8
21S28	398	104	1
21S32	787	134	1
21S34	688		1
21S35	976	126	1
21S36	622	104	1

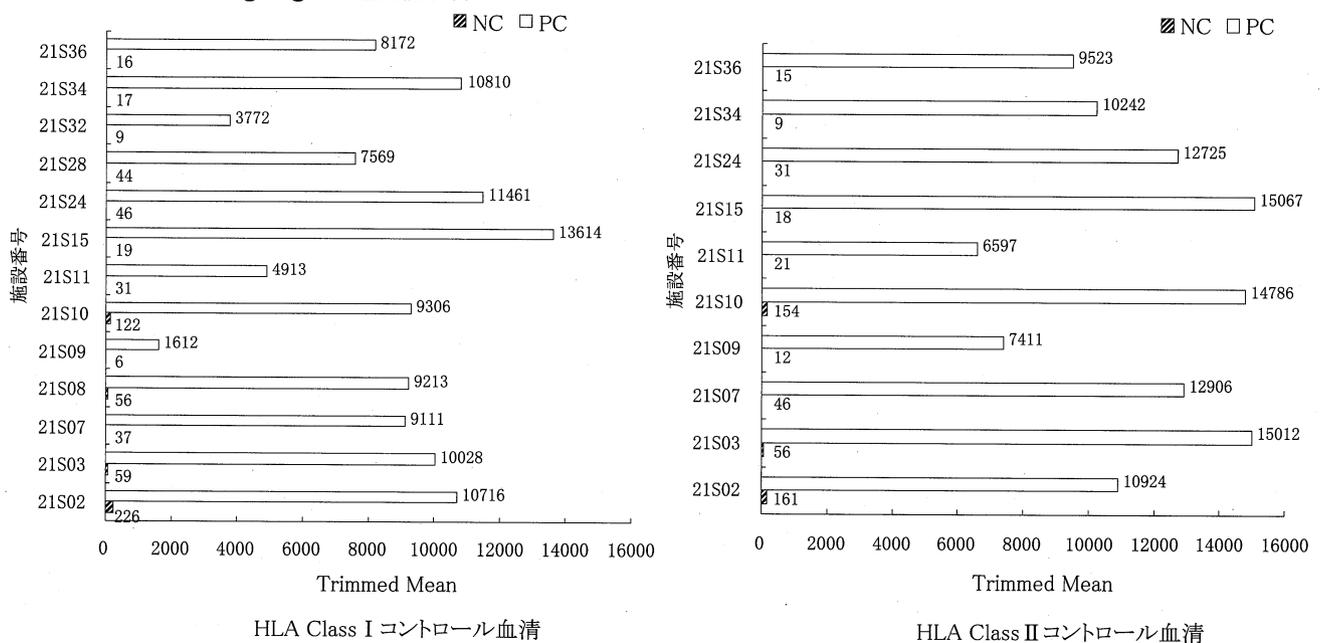
Trimmed Mean

2.7. LABScreen single IgG の蛍光値解析

LABScreen の自動解析ソフトでは Baseline 法や Ratio Scoring 法などが主流である。今回は、参加された全施設の蛍光値 (Trimmed Mean) について解析を行った。Luminex ビーズの 1 番はヌルビーズで negative control (NC) である。Luminex ビーズの 2

番は HLA 抗原ではなく 1 次抗体として IgG が結合してあり、必ず 2 次抗体 IgG が反応する positive control (PC) である。図 1 に示すように各施設のコントロール血清の NC では、ほぼ全施設許容範囲内の蛍光値を示していたが、PC では施設間において反応性にバラツキがみられた。

図 1 LABScreen single IgG の蛍光値解析



2.8. まとめ

FlowPRA では、陽性率 (%) を改善することが重要であると思われた。

FlowPRA と LABScreen の single は、特異性を確認する検査であるため、判定保留という報告では正確な統計解析が困難である。今後結果報告の改善をお願いしたい。

3. 臓器移植関連 抗体部門 (AbScreen, LAT) (佐藤 壯: 札幌北楡病院)

ELISA 法はマイクロプレート上に固相化された HLA 抗原と被験血清を反応させて形成される抗原抗

体複合体に標識抗体を結合させて発色させ、目視あるいはプレートリーダーで判定する方法である。

今回の参加施設は 3 施設で、LAT 法 (One Lambda) が 2 施設、AbScreen 法 (Biotest) が 1 施設であった。分野別の分類では LAT 法が臓器関連と臓器・輸血・造血関連各 1 施設 (いずれも医療機関)、AbScreen 法が臓器・造血関連 (検査センター) であった。

結果は表 5 の通りで、いずれも Class I 抗体では SH2101, SH2102 は陽性判定となったが、SH2103, SH2104 は陰性であった。また、Class II 抗体を測定した AbScreen 法において SH2101 は陽性であった

表 5 LAT および AbScreen 法での結果

LAT法(21S22)

陽性判定: 目視

クラス I&II									
位置	A	B	C	D	No.	E	F	G	H
Control	1	1	1	1	1	1	8	8	8
Control	1	1	8	8	2	8	1	1	1
2101	8	8	4	4	3				
2102	8	8	1	1	4				
2103	1	1	1	1	5				
2104	1	1	1	1	6				

LAT法(21S30)

陽性判定: 目視

クラス I									
位置	A	B	C	D	No.	E	F	G	H
Control	1	1	1	1	1	1	8	8	8
Control	1	1	8	8	2	8	1	1	1
2101	8	8	1	1	3				
2102	8	8	1	1	4				
2103	1	1	1	1	5				
2104	1	1	1	1	6				

AbScreen法(21S31)

陽性判定: 吸光光度計で測定しN.C.のOD値の平均×2以上

		N.C	P.C	2101	2102	2103	2104
HLA Class I	OD値	0.12	2.45	1.83	2.19	0.11	0.13
	判定			8	8	1	1
HLA Class II	OD値	0.17	1.8	0.95	0.1	0.09	0.08
	判定			8	1	1	1

がSH2103は陰性であった。

したがって Class I 抗体に関しては LCT 法や AHG-LCT 法よりも、Class II 抗体においては Flow-PRA 法や LABScreen 法よりも感度が低い可能性が示唆された。

4. 臓器関連 クロスマッチ (山本 賢: 国立循環器病センター)

4.1. 概要

今回、QCWS において部門別解析の充実を踏まえ、クロスマッチを実施し各施設における検査の現状を把握し、今後 QCWS に導入するための準備・模索の位置づけとして、任意参加として実施することになった。参加施設は臓器関連部門として3施設(医療機関、血液センター、試薬メーカー各1施設)が参加し、測定方法については AHG-LCT, LIFT, ICFA の3法であった。また、臓器関連部門の3施設以外で、輸血部門(+造血部門)として参加した6施設(医療機関: 1施設, 血液センター: 5施設)を追加し測定方法別に解析を行った。

4.2. 結果および考察

クロスマッチ Sample SH2101 に含まれる抗体特異性をもとに、各施設で使用した生細胞が保有する抗原 (A1, A2, A24, B44) についてクロスマッチ方法別に解析を行った。各施設におけるクロスマッチ結果については解析結果の詳細は、学会ホームページ「13回 QC ワークショップ報告集」の「②臓器関連・クロスマッチ」を参照されたい。

A1 および A24 において、FlowPRA, LABScreen における蛍光強度より高力価の抗体であるため、AHG-LCT, ICFA, FCXM いずれの方法でも良好な結果が得られた。また、A2, B44 については FCXM, LIFT (83%) に比べ LCT, AHG-LCT, ICFA では陽性率が 50% 以下と低く、低力価の抗体においては、方法により検出感度の差が認められた。

以上の結果より、クロスマッチはいずれの方法にせよ、FlowPRA, LABScreen などの FCM を用いた蛍光ビーズ法よりも明らかに HLA 抗体の検出率が低いこと、さらには施設ごとに用いている標識抗体、反応温度についても含め、今後十分に検討を行っていく必要があると思われる。

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析: 造血部門—

加藤 道¹⁾, 杉本達哉²⁾

¹⁾愛知県赤十字血液センター, ²⁾東海大学医学部付属病院

1. 造血部門 DNA タイピング (加藤 道: 愛知県赤十字血液センター)

1.1. はじめに

造血部門の DNA タイピングについては、参加 23 施設(医療機関 13 施設, 血液センター 3 施設, 検査センター 4 施設, 試薬メーカー 3 施設)のデータについて、検査報告数の多い HLA-A, B, C および DRB1 の正解率を中心に検討を行った。また、正解率につ

いては、総合判定にコンセンサスアレル (2桁レベルおよび4桁レベル) と同等の表記を含むものを正解とし算出した。更に造血部門については、「4桁でのアレル判定ができること」がもう一つのテーマであることから、総合判定とコンセンサスアレルとの4桁アレルの正解率を算出し検討を加えた。なお、不正解の詳細については、重複することから他部門を参照したい。

1.2. 解析内容

1) コンセンサスアレルとの正解率

施設及びローカス別正解率(施設別正解率, 施設別不正解内訳)

検査法及びローカス別正解率(検査法別正解率, 検査法別不正解内訳)

2) 4桁アレル正解率

現行の造血幹細胞移植は, 造血幹細胞のソースによって, C-locusを照合する場合としない場合があるため, 4桁アレルの正解率についてはHLA-A, B, DRとHLA-A, B, C, DRに分け算出した。なおHLA-A, B, C, DRの正解率はC-locus未実施を不正解として算出した。

施設別のHLA-A, B, DR及びHLA-A, B, C, DRの正解率

検査法別のHLA-A, B, DR及びHLA-A, B, C, DRの正解率

1.3. 結果及び考察

解析結果の詳細は, 学会ホームページ「13回QCワークショップ報告集」の「造血部門 DNAタイピング」を参照されたい。

1) コンセンサスアレルとの正解率

施設別の正解率については, 全施設90%以上の正解率であり良好な結果が得られた。また, 特に検査センター, 血液センターでは100%の正解率であった。

検査法別正解率については, SBT+Luminexが100%, Luminex単独使用が99.6%とLuminexをベースとした検査法の正解率が高く, SSP単独使用の正解率が84.1%と唯一90%を切っていた。SSPを実施している施設は全て医療機関であったため, 医療機関の正解率が他施設と比較し若干低めであったが, 今回のSSP実施施設の不正解は単純なミスが目立つことから, SSPの単独使用であっても, 精度を上げることによって十分正解率を改善させることができると考えられた。

2) 4桁アレルの正解率

施設別の正解率については, 血液センターがA, B, DR及びA, B, C, DRともに100%であった。また, 検査センターでは, 1施設がLuminex単独使用での

表記を2桁にしており, 100%の正解率にはならなかった。医療機関でA, B, DRとA, B, C, DRの正解率に差があるのは, 医療機関のうち5施設がC-locusのタイピングを行っていないためであった。

検査法別の正解率については, SBT+LuminexがA, B, DR及びA, B, C, DRともに100%であった。Luminex単独使用では, 2桁表記やCの未実施が正解率を下げており, 不正解は表記ミスの1例のみであった。SSP+RELI及びSSP単独使用の正解率は0%であった。

今回の結果より, 造血幹細胞移植における検査法としてLuminexがスタンダードになりうると思われた。また, 造血部門のテーマである「4桁でのアレル判定ができること」の観点から, SSPの単独使用は, 造血幹細胞移植の検査法として問題があると考えられた。今回もC-locus未実施が数施設あったが, 造血幹細胞移植におけるC-locusの影響が明らかになりつつあることから, 造血部門では今後C-locusのタイピングが必要になると思われる。

2. 造血部門抗体解析(杉本達哉: 東海大学医学部付属病院)

2.1. はじめに

第13回QCWSでは, 臓器移植, 造血細胞及び輸血関連の3部門に区分けされQCの解析が実施された。今回, HLA抗体QCWSの提出サンプル(2101, 2102, 2103, 2104)について, 造血細胞部門の抗体検査解析報告を行った。また, 臍帯血移植時のHLA抗体検査の必要性を鑑みて, 東海大学さい帯血バンクにおけるHLA抗体検査の利用を紹介したので報告する。解析結果等の報告内容の詳細は, 学会ホームページ「13回QCワークショップ報告集」の「造血部門 抗体解析」を参照されたい。

2.2. 造血細胞部門におけるHLA抗体検査の解析

造血細胞部門として抗体検査に参加した施設は19施設であった。参加19施設の内訳は, 病院群が9施設, 検査センター群は10施設であった。HLA抗体検査の内容別参加数は, HLA-Class I参加が19施設, HLA-Class II参加は16施設であった。HLA抗体検査の検査方法は多岐(10検査方法)に渡っていた

が、FlowPRA (21%), LABScreen (33%), WAK-Flow (15%) が多くを占めていた。また、検査方法は病院群では1種類であったが、検査センター群では複数の検査方法を持っている施設 (70%) が多く認められた。

QCWS の4種類のサンプルについて HLA-Class I 抗体有無の回答率は 2101, 2102 が 100%, 2103 と 2104 はそれぞれ 94.4%, 66.7% であった。HLA-Class I 抗体結果が一致しなかった内容は、陽性サンプルを陰性と報告 (6 施設) したものであった。

HLA-Class II 抗体の有無の回答率は 2101, 2102 が 100%, 2103 と 2104 はそれぞれ 87.5%, 93.8% であった。HLA-Class II 抗体結果が一致しなかった内容は、2103 において陽性サンプルと陰性と報告した施設及び判定保留を1施設ずつ認めた。2104 では判定保留を1施設認めた。各サンプルの HLA 抗体の特異性の同定は施設間で若干のばらつきが認められた。

2.3. 造血細胞部門における HLA 抗体検査のまとめ

HLA 抗体検査有無の回答率は 100%~66.7% であった。HLA 抗体の有無は造血幹細胞移植を実施するためには、非常に重要なファクターとなる。特に今回の QC では 2104 の high background サンプルで陽性サンプルを陰性とした施設が散見された。抗体の存在の有無を的確に検査することは重要である。high background を呈するサンプルでは、適切なサンプル処理を行い、検査を実施する必要がある。今回抗体の存在を検出できなかった施設は、今一度検査手順を見直し再考すれば、今後の改善につながると思われる。また、HLA 抗体の特異性の同定は各施設で若干のばらつきを認めた。HLA 抗体の交差反応性、HLA 抗体検査におけるカットオフの設定や低力価抗体の存在などが特異性の同定にばらつきを発生させうる要因と考えられる。施設間別の特異性同定の精度向上も今後の課題と考えられた。

2.4. 東海大学さい帯血バンクにおける HLA 抗体検査の利用紹介

東海大学さい帯血バンクに臍帯血移植のコーディネートを依頼された場合、臍帯血のセグメントを利

用して解凍検査が実施される。解凍検査では凍結臍帯血の品質確認のため、細胞数、細胞生存率、CD34 陽性細胞数測定、colony assay 及び臍帯血の HLA 再確認検査が実施される。

患者検体からは、HLA 確認検査及び HLA 抗体検査が実施される。臍帯血及び患者検体からの検査情報は、毎週実施しているさい帯血バンクミーティングでスタッフにより確認される。確認内容は、臍帯血解凍後の生細胞数、CD34 陽性細胞数、CFU-GM 数を患者体重当たりの細胞数に換算して、選択臍帯血の適正確認を行っている。また、患者検体 HLA 抗体検査より HLA 抗体の有無を確認し、HLA 抗体の存在を認めた場合は、該当臍帯血との HLA 反応性を確認している。

高梨らは臍帯血移植を受けた患者が HLA 抗体を保有しているとき、その HLA 抗体が臍帯血の HLA 特異性と一致するか否かでの移植成績について報告している。患者が HLA 抗体を有しているが移植臍帯血の HLA と一致しない時の移植成績は HLA 抗体を保有しない臍帯血移植患者と同等の移植成績である。しかしながら、患者保有 HLA 抗体が移植臍帯血の HLA と反応する組み合わせでは、移植成績が有意差をもって低下する。¹⁾

我々の施設もこの報告に準じて臍帯血出庫の対応がなされている。患者保有 HLA 抗体が該当臍帯血に反応しない場合は、患者に HLA 抗体が存在するが該当臍帯血との反応性を認めない旨を移植施設の担当医に伝達して臍帯血を出庫している。

患者保有 HLA 抗体が該当臍帯血に反応する場合は、患者保有 HLA 抗体が該当臍帯血と反応する旨を移植施設の担当医に伝達し、臍帯血の利用判断を委ねている。多くの場合は臍帯血の出庫を見合すことが多い。なお、当バンクで患者が HLA 抗体を保有しており該当臍帯血との反応性を認める場合にバンク側の判断のみで出庫を停止することは行っていない。患者の中には HLA 抗体を保有しており該当臍帯血との反応が考えられる場合もやむを得ず移植を選択するケースも存在する可能性が考えられる。現段階ではその可能性を無くすことがようにとの配慮のためである。

今後の課題として、HLA 抗体検査報告の力価の報

告が挙げられる。現状ではHLA抗体の力価報告が困難なため、統一された報告がなされていない。この点に関しては、今後検討が必要と考える。また、低力価と考えられるHLA抗体が存在した場合、該当臍帯血のHLAと反応が考えられるケースがある。この場合の臍帯血移植コーディネートをどのように進めていくかについても今後の課題として挙げられる。

参考文献

1. Minoko Takanashi, Koki Fujiwara, Hidenori Tanaka, et al: The impact of HLA antibodies on engraftment of unrelated cord blood transplants: TRANSFUSION, 48 791-792, 2008.

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —DNA 結果表記について(新表記も含む)—

太田正穂

信州大学医学部法医学教室

日本組織適合性学会における認定制度委員会が主催するHLA-QCワークショップは13回となった。これまでの12回のワークショップでは、各施設から提出された検査表記について、検査結果の表記法についての問題点や疑問点などを検討し、報告してきた。HLA表記法は、HLAを利用する何れの人達にも、明確かつ正確に理解されるものでなければならない。そのため、日本組織適合性学会では標準化委員会を中心に、アレル表記法または血清対応型の表記法についての指針を示し、HLA検査結果の正確なアレル表記法を「検査結果(ワークシート)記載法と結果報告書表記法およびアンビギュイティ(ambiguity)の取扱い原則(2003年度版)」で提唱している(MHC vol 10(3), 160-162)。

これはWHO命名委員会報告(Nomenclature Committee for Factors of the HLA System)および1987年に最初に紹介された4桁でアレルを表記する方法に基づいて作成されており(Marsh SGE, et al; Tissue Antigens, 65: 301-369, 2005, Human Immunology, 66: 571-636, 2005, Immunogenetics, 32: 107-159, 2005), 我が国に適応したHLA表記法である。しかし、最近では世界各国からの新アレルの登録によ

り、アミノ酸の違いを示す3~4桁の数字が99を超えるallele family (HLA型)が幾つも生じ(A*02, A*24, B*07, B*15, B*35), アレル表記法が複雑になってきた。この状況を解消するために、WHOのNomenclature Committee for Factors of the HLA Systemは2010年4月より新たな記述法を採用することを示した。我が国でも、日本組織適合性学会のHLA標準化委員会が、4月からの命名規則の変更に準じた表記法の改正を検討している。従って第13回QCワークショップは、従来の表記法を用いた最後の解析となった。

第13回QCワークショップでのDNAタイピング結果報告は、これまでとは様式が異なり、各先生方からそれぞれの部門(輸血部門、臓器移植部門および造血幹移植部門)における解析結果(正解率、表記法等)の報告がなされている。更に、各種DNA検査法(Luminex, SBT, SSO等)別の解析結果も報告されている。これらの詳細な内容は日本組織適合性学会ホームページ(<http://square.umin.ac.jp/JSHI/>)のQCWS欄に掲載されている。今回のQCワークショップにおけるDNAタイピング結果表記およびHLA型表記では、これまでのワークショップで報告されたもの

と同等の間違が見られた。特に、データの転記ミス、反応パターンの読み違い、表記ミスなどの人為的な過誤については、表記法の知識以前の問題で、最新の注意と十分な確認が必要である。

本学会の認定制度委員会は、4月から導入される新

表記法について学会ホームページに、ブリーフレポート(HLA アリルの命名規則の変更について)を掲載しているので参照して頂きたい。また、新旧アリルの変換はウエブサイト http://hla.alleles.org/data/txt/Nomenclature_2009.txt で容易に確認できる。

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析: FCM による抗体検査法の解析: FlowPRA 法の検査状況の解析—

佐藤 壯

札幌北楡病院

1. はじめに

昨年に続いて FlowPRA 解析を担当させていただいた。今回から結果報告のエクセルファイルの他に FCS ファイル (LABScreen 法における CSV ファイルと同様のファイル) の提出をお願いした。昨年はデータ提出後にあらためて FCS ファイルの提供をお願いし、ベックマン・コールター社 (以下 BC) を使用している施設の FCS ファイルについてはベクトン・ディッキンソン社 (以下 BD) の file converter で変換して解析した。ただ、file converter が FCS2.0 にまでしか対応していないため FCS3.0 モードでデータファイルを作成する FC500 (BC) については別途解析せざるをえなかったため統一的な解析とは言えなかった。

今年は FC500 と同様に FCS3.0 モードの FACS-Canto (BD) で測定する施設も参加したため、すべての FCS ファイルを解析できるソフトウェア FlowJo (Tree Star, USA) を用いて解析を行った。

解析結果については、学会ホームページに掲載されている「13回 QC ワークショップ報告集」の「FCM 抗体検査法の解析 FlowPRA 法の検査状況の解析」(以下、HP 掲載結果)を参照されたい。

2. 参加施設と測定項目・機器

参加施設を医療機関、血液センター、検査センターに大別して測定項目毎に表示したのが、HP 掲載結果の2ページである。合計20施設で、医療機関が11施設、血液センター7施設、検査センター2施設であった。

Screening Test (以下 SC) は全施設が測定し、このうち IgM 抗体を測定したのは6施設、Single Antigen (以下 SA) を測定したのは8施設であった。

測定機器は BD が12施設、BC が8施設だった。

3. 測定結果

3.1. SC

今回の配布検体は4種類で、IgG class I 抗体はすべての検体、IgG class II 抗体は SH2101, SH2103 で陽性だった。陽性検体を8と判定、陰性検体を1と判定したものを一致と見なして集計したのがHP掲載結果5, 6ページである (histogram は4, 11, 15-19ページ)。結果が一致していなかったのは IgG class I 抗体の SH2104 のみで他はすべて一致し (21S08 施設が SC の class II 抗体を IgG+IgM で測定し、SH2102 を陽性率 71.63% ・判定4としているが解析からは除外している)、昨年と比較しても良好な結果であっ

た。また取り込み event 数も多く施設が class 別に 10,000 近い数を取り込んでいた。ただ、陽性率に関しては施設によりかなりばらつきが見られた。IgM 抗体に関しては、結果のみを掲載した (HP 掲載結果 7 ページと histogram 9 ページ)。

3.2. SA

測定した 9 施設中、5 施設が G1~4 までで G5 以降も測定したのは 4 施設であった (HP 掲載結果, 21~24 ページ, plot は 26, 28~31 ページ)。PE 蛍光の強いビーズが右に非特異的にシフトしたり、PE 蛍光の最も弱いビーズが陽性となった際に上にずれたり下にずれて plot 上から消失する場合があるなど、Compensation 不良のプロットが数多く認められ、残念ながら昨年と比較して改善は認められなかった。

4. 考察

SH2104 検体の IgG class I 抗体に関して、4 と判定したのが 5 施設、1 と判定したのが 4 施設であった。このうちはっきりとしたセカンドピークを認めなかったのが 3 施設あり、これらの施設に再検を依頼したところ 2 施設が再検を行った (HP 掲載結果 12 ページ)。結果は明らかなセカンドピークが認められ、さらに SH2103 も再検した 1 施設の結果では histogram に大きな違いが認められた。2 施設に確認したところ最初に測定した際に使用した試薬は解凍後かなり時間が経過していることが判明した。One Lambda が添付している取扱説明書には試薬の有効期限は解凍後 3 ヶ月と明記されている。

また、同一検体での陽性率に大きな差が認められている (HP 掲載結果, 13 ページ) し、histogram にも大きな違いが認められている。あるいはこれらの現象にも試薬の劣化が関係している可能性がある。次回以降の QCWS においては試薬のロット番号の他に、試薬を解凍してからどれくらい経過しているかの記載も必要であると考えられる。

次に、今回の解析で気づいたのは、class II ビーズの histogram のばらつきである。これはロット変更により class II ビーズの PE 蛍光強度がおそらく弱く

なり、これが FITC への洩れ込みにも影響したのか左側 (蛍光強度が弱い方向) にシフトしている施設がいくつか認められた (HP 掲載結果, 20 ページ)。蛍光強度が弱いとどうしても陰性ピークと陽性ピークの差が小さくなり判定しづらくなるので、各施設で適宜 Comp file の更新を行っていただきたい。

さらに、これは今回に限ったことではないが、スコアに 4=判定保留という選択肢がある。判定する側にとっては便利な選択肢であるかもしれないが、結果を受け取る立場で考えてみれば、これほど困惑する報告はない。ましてや SA で特異性の有無を検討してもらった結果が「判定保留」では臨床サイドはお手上げである。来年からはこの選択肢は廃止する方向で考えていただきたい。

最後になるが、今年も SH2102 検体の A66 抗体に関して FlowPRA と LABScreen で結果が解離する現象が認められた。これは FlowPRA には A*6601 抗原だけが、LABScreen には A*6601 と A*6602 の 2 抗原が含まれていることによる相違である。昨年の A24 に関して同様の現象が認められており、抗原をアサインするレベルも 4 桁レベルに移行しつつあることを考慮すると抗体レベルでも 4 桁レベルで議論する方向で進める必要があるものと考えられる。

5. まとめ

今回の結果は、昨年と比較しても High Background の検体が全く問題にならなかったように、全体的に見て大きなレベルの向上が認められた。

昨年 One Lambda 主催の Histocompatibility Workshop に参加したが、アメリカにおいても各施設で非特異反応をどう抑えるかメーカーに頼らずに各々模索しているのが印象的であった (Absorb Out を使用しているという施設はまったくなかった)。臨床に関わる各施設が参加する QCWS の役割は今後ともますます重要であると改めて再認識した。

また、試薬の劣化に関しては、今回参加された一部の施設の協力を得て QCWS 配布検体を使用した試薬劣化試験を行っている。結果については何らかの形で報告させていただければと考えている。

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析：FCMによる抗体検査法の解析： LIFT法およびFCXMの検査状況の解析—

宮崎 孔

北海道赤十字血液センター

1. はじめに

LIFT法の参加施設は計5施設、抗体検査は2施設(21S08, 21S32)、FCXMは4施設(21S02, 21S20, 21S26, 21S32)の参加となった。

5施設のうち、IgM抗体を単独で測定している施設が1カ所、HLA class-II抗体を測定している施設も1カ所しか無かったため、ここではclass-IのIgG抗体のみを解析対象とした。

各施設から提出されたLIFT法の結果(score)について、本ワークショップでLABScreen Single Antigen (LABSA)を実施した15施設のrawdataの平均値を基準として解析した。また、解析結果については、学会ホームページ「13回QCワークショップ報告集」の「FCM抗体検査法の解析 LIFT法およびFCXMの検査状況の解析」(HP掲載結果)を参照されたい。

2. HLA抗体検査

2施設でのHLA抗体検査の結果について解析した(HP掲載結果：図1~4)。2施設ともAHG-LCTで検出でき、LABSAのrawdataが10,000以上の反応性の強いHLA-A、-Bに対する抗体、SH2101：抗A24、SH2102：抗B7+B13+B27+B48+B60+B61は全て検出できていた。しかし、SH2103の抗Cw1はAHG-LCTでも検出でき、LABSAのrawdataも10,000以上であったが、LIFT法では1施設のみしか検出できていなかった。LABSAのrawdataが3,000~5,000程度のHLA抗体の反応はLIFT法では多くが特異性が検出できていたが、一部検出できないものもあった。LABSAのrawdataが1,000

以下のものはLIFT法では概ね陰性を示した。SH2104はLABSAでrawdataが3,000前後のHLA抗体の反応性が検出されたが、LIFTではHLA抗体は検出されなかった。

LIFTのHLA抗体の検出感度はLABScreenやFlowPRAよりも低いと考えられるが、これらの高感度な検査法でのみ検出されるHLA抗体の臨床的な意義を検証することは今後の重要な課題であると言える。LIFTとLABScreen・FlowPRAの結果が乖離する原因として、検出感度の他に抗体の検出に用いるHLA抗原の性状の違いも考えられる。LIFTが生体由来の試料(リンパ球)のHLA抗原を用いているのに対し、LABScreen・FlowPRAでは精製HLA抗原を使用しており、この両者の抗原に対する反応性の違いも乖離の一因になっている可能性が考えられる。本ワークショップから配布された検体SH2104もLABSAではHLA抗体の特異性が検出されたが、LIFTなどの生体由来の試料を用いた方法では検出できなかった。このような検体ではLABSAを用いたリンパ球・血小板によるHLA抗体の吸収試験も有効な確認方法の1つであると考えられる。

また、LIFTのHLA抗体検出能は使用するリンパ球のHLA抗原にも影響を受けるため、1つのHLA抗原につき複数のパネルリンパ球を使用するのが望ましい。本ワークショップの結果でも1つのパネルのみで抗体の特異性を決めてしまったために誤判定となった例があり、このような場合は複数のパネルで特異性を確認することにより正しく判定できた可能性がある。

3. FCXM

4施設での検体 SH2101 を用いたクロスマッチの結果は、LABSA での HLA 抗体の特異性から予測される結果 (抗 A24+A2+A1+B44) とほぼ一致した。しかし、一部は判定保留、あるいは偽陰性と考えられる結果となっていた (HP 掲載結果: 図5)。この原因の一つとして各施設での LIFT の cutoff の設定が異なっており (HP 掲載結果: 図6)、判定基準の設定が適切でない可能性も考えられる。我々の施設ではサンプルの平均蛍光強度を陰性コントロールの平均蛍光強度で割った値 (S/N) が 2.0 以上を陽性と判定しており、仮にこの条件で全施設の結果を判定すると判定保留・偽陰性のほとんどが陽性と判定された。この cutoff を適用するためにはそれぞれの LIFT のプロトコルでの十分な特異性の検証が必要となるが、cutoff を適切に設定することは非常に重要であ

り、正しい判定を行うためには必要不可欠である。LIFT の普及には標準プロトコルを作成し、それに準じた検査を行うことによって検査法を標準化する必要があるかも知れない。

また、FCXM では検出感度が高くなる分、非特異反応も増加する。クロスマッチ検査法としては特異性が重要となるため、偽陽性を極力少なくするプロトコルが望ましい。偽陽性を少なくすると検出感度が犠牲になるが、これは事前の HLA 抗体スクリーニングで補うことも可能である。

今回の QCWS では LIFT の参加施設が少なかったが、LIFT (FCXM) は移植検査で必要となる直接クロスマッチ法の中でも最も簡便で感度の高い方法と考えられるため、今後はより多くの施設の参加が期待される。

第 13 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析: Luminex による抗体検査: LABScreen による抗体検査—

高 陽 淑

大阪府赤十字血液センター

1. 解析の内容

LABScreen に参加した 17 施設から提出された CSV データを基に、サンプルの蛍光値 (Trimmed mean) のバラツキについて試薬の特徴をふまえて比較検討した。本稿では解析のポイントについて述べるので詳細なデータに関しては、学会ホームページ「13 回 QC ワークショップ報告集」の「Luminex 抗体検査 LABScreen による抗体検査」(以下、HP 掲載結果) を参照されたい。

2. LABScreen Mixed について

2.1. 使用目的と判定方法:

Mixed は、17 施設中 7 施設が実施。Mixed は HLA class I, II 抗体の有無を決定するものであり、殆どの施設では HLA Visual 等の解析ソフトから得る NBG Ratio が cut off 以上であれば陽性と判定している。

2.2. 検討結果

全ビーズが高い蛍光値を示した 1 施設を除いて、ほぼ同じ反応パターンを示していた (HP 掲載結果, スライド No. 4~11)。但し、高い蛍光値となった原因は特定できなかった。

2.3. まとめ

NBG Ratio は陰性コントロールビーズおよび陰性対象血清の蛍光値に左右されることから cut off Ratio の設定は慎重に行うべきである。また場合によっては判定の際に任意のビーズの蛍光値も確認する必要がある (HP 掲載結果, スライド No. 12)。

3. LABScreen PRA について

3.1. 使用目的と判定方法

PRA は, 17 施設中 3 施設が実施。使用目的は Mixed に準ずると思われるが, 結果によっては一部の特異性の同定も可能である。判定には採用する解析ソフトと実施者の判断が反映される。

3.2. 検討結果

3 施設が測定した PRA I の反応パターンは 4 件検体ともに一致していたが, 蛍光値の差を Max 値に対する割合に変換して各ビーズ間で比較したところ一定の幅が存在した。その幅は SH2101 が 50% 前後と最も大きく, SH2102, 2103 は 25% 以下であった (HP 掲載結果, スライド No. 17~23)。しかし PRA II では 1 施設の反応パターンが他と違いさらに, ビーズ毎の蛍光値幅にもバラツキを認めた。これは, この施設のみが Lot. 12 を用いておりさらに全検体について Adsorb out 処理を実施していた事に起因しているかどうかは究明できなかった (HP 掲載結果, スライド No. 24~28)。

3.3. まとめ

第 11 回 QCWS では PRA 実施施設は参加 11 施設中 7 施設と, 多数であったが回を重ねる毎に減少している。その原因としては, Mixed の改良が進んで, 日常業務に採用する施設が増加してきた事, 特異性の同定が可能である single antigen の使用頻度が全般的に増加している事が挙げられる。しかし反応性のバラツキも少なく, 何よりも生体細胞での抗原の状態に最も近い PRA の測定意義を再考するべきであると考え。

4. LABScreen single antigen について

4.1. 使用目的と判定方法

single antigen は, 17 施設中 15 施設が実施。使用

目的は抗体特異性の同定であり, 判定には採用する解析ソフトと実施者の判断が反映される。

4.2. 検討結果

反応性が極端に低かった 1 施設を除く 14 施設の結果を解析した。

使用 Lot が施設によって 1~5 と違っていたが, 陰性対象血清における各ビーズの反応パターンは 1 施設で 1 ビーズが突出した事を除けば概ね同様であった (HP 掲載結果, スライド No. 32~36)。SH2101~2104 の 4 検体において, ビーズ毎の蛍光値を Lot 毎に色分けし, 14 施設での中央値を加えて比較したもの, さらにそれをワークショップの基準でスコアに換算して比較したものをグラフに表した (HP 掲載結果, スライド No. 37~45, No. 48~51)。その結果中央値が 4,000 以上となるような高い値の領域ではスコアもその後の判定も一致するが, 1,000 以下となるような低い領域ではスコアでのバラツキも顕著になり, 最終的には抗原別判定の不一致に繋がると考えられる。

次に Adsorb out 処理の効果について述べる。SH2104 について single antigen を実施した 13 施設中, 6 施設が Adsorb out 処理を実施していた。このうち Mixed, PRA など他の試薬でバックグラウンドが高い事を確認したのは 3 施設, 全検体について無条件に処理をしていたのは 2 施設であり, single antigen でバックグラウンドが高い事を確認していたのは 1 施設のみであった (HP 掲載結果, スライド No. 47)。

また, Adsorb out 処理を実施した 6 施設と未実施の 7 施設の蛍光値に大差は認めず, 判定結果も全施設一致していた (HP 掲載結果, スライド No. 46)。このことから LABScreen において single antigen はそれ以外の試薬とは異なりバックグラウンドの影響を受けにくい可能性が示唆された。また, SH2104 はその反応性から保有する抗体が HLA か non-HLA であるか判別する必要がある (HP スライド No. 46)。

4.3. まとめ

HLA 抗体特異性同定法として有用であり, 多数の施設が使用する single antigen ではあるが, その測定結果には大きなバラツキがあった。これは試薬側 (使

用 Lot など)と施設側(手技や測定環境・機器など)の両面に起因すると考えられる。また、コントロールおよび任意のビーズから算出されるスコアは、蛍光値の強さによってはバラツキの影響を大きく受けることから、判定に際しては解析ソフトで求められるスコアだけに頼らず、蛍光値の確認、さらには抗体特異性のクレッグなども考慮した判断が求められる。

る。

5. 今後の課題

Adsorb out の必要性や、non-HLA との判別法についての検討、さらには、バラツキを含んだデータを正確に判断するための新たな解析方法を模索することなどが挙げられる。

第 13 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析: Luminex による抗体検査: WAKFlow HLA 抗体および ICFA 法による抗体検査—

関根みゆき

東京都赤十字血液センター

1. WAKFlow HLA 抗体クラス I & II (MR)

1.1. はじめに

今回のワークショップにおいて WAKFlow HLA 抗体の参加施設は、クラス I が 9 施設、クラス II が 8 施設であった。そのうち市販化された試薬 (Lot J0A) を使用していたのは 6 施設であり、その他の 3 施設では市販前の試薬を使用していた。非特異的な反応を除去する WAKFlow HLA 抗体専用の血清処理試薬は、5 施設がすべてのサンプル、3 施設が一部のサンプルについて使用し、1 施設は未使用であった。

1.2. 結果と考察

解析結果の詳細については、学会ホームページ「13 回 QC ワークショップ報告集」の「Luminex 抗体検査 WAKFlow HLA 抗体・ICFA 法による抗体検査」を参照されたい。

1) 各ビーズの反応性の比較

陰性対照血清においては、血清処理試薬の使用の有無に関わらず、陽性コントロールビーズの測定値は一定していた。血清処理試薬の使用で、血清のバックグラウンドが抑えられ、バックグラウンドビーズ

および各 HLA ビーズの測定値が明瞭になった。

SH2102 を例に、各ビーズの反応性の比較検討を行った。各 HLA ビーズの Median 値について、血清処理試薬を使用した 8 施設のデータを用いて箱髭図で比較を行った。施設 26 と施設 32 では、いくつかのビーズにばらつきが確認された。操作性の問題および使用していた試薬が製品化前の試薬であったことが原因と考えられた。

2) 各施設間の判定で相違が生じた場合およびビーズの反応性に問題が生じていた場合の原因追求について

① WAKFlow HLA 抗体クラス I (MR)

SH2101: すべての施設で A24 抗原に対する抗体特異性が検出されていた。A2 抗原に対する特異性判定は各施設で相違が認められた。A2 抗原を保有するビーズ測定値の解析では、施設間差およびアリアルによる反応の違いは確認できなかった。

カットオフ値に着目すると、解析ソフトによるデフォルト値、各施設設定値いずれも、A2 抗原を保有するビーズ測定値は、陰性、陽性双方の領域に存在していた。このことが A2 抗原に対する特異性判定

に相違を生じさせた原因であると考えられた。各パネルの反応パターン、Median 値、Index 値から最適なカットオフ値を設定し、弱陽性反応を示すパネルや判定に矛盾が生じたパネルを考慮した上で、許容抗原を決めることが重要である。

SH2102: 血清処理試薬が有効なサンプルであった。血清処理試薬の使用については、測定前にすべてのサンプルについて使用するか、測定結果から必要なサンプルについて使用するかは検討する必要がある。また、血清処理試薬を必要とするサンプルを選択する場合、バックグラウンドビーズ測定値の基準について検討する必要がある。

SH2103: Cw1 に対する弱い反応が確認されたが、Cw1 の抗体特異性と決定できる反応ではなかった。他の検査法では Cw1 に対する抗体特異性が検出されていることから、C ローカスに対する抗体の検出能力は不十分であった。

SH2104: Lot.J0A を使用した施設で Pc118 (A11/B52/55 Cw1/12) のビーズのみ反応が確認された。添付の二次抗体 (IgG+IgM), IgG, IgM の3種類の二次抗体を用いて検討を実施したところ、IgM の反応であることが明らかになった。他の検査法で IgM クラスの抗体特異性は検出されていないことより、Lot.J0A における IgM クラスの非特異的な反応であることが推測された。

② WAKFlow HLA 抗体クラス II (MR)

SH2101: 広範囲の抗体特異性を保有するサンプルであり、特異性を同定することはできなかった。WAKFlow HLA 抗体 (MR) は、許容抗原の決定を目的とした試薬であるため、広範囲の抗体を保有する検体では、特異性同定ができないことがある。

SH2103: Pd12 (DR12, DQ7/9 DPB1*0501/-) のビーズにのみ反応が確認された。他の検査法で検出された DR12 および DQ7 を保有するビーズの反応性を再確認したが、Pd12 以外のビーズに反応は認められなかった。Pd12 が DR12 のホモであることから、Pd12 のビーズだけ感度良く反応したと推測された。

2. ICFA 法

2.1. はじめに

ICFA 法の抗体検査としての参加施設は 2 施設であった。2 施設においても、他の検査法の確認検査を目的として選択したパネルを用いたデータ提出であった。参加施設が少なく、対象データが少ないことから、SH2101 については交差試験として提出されたデータも解析に使用し、他の検査法の結果と比較検討を実施した。

2.2. 結果と考察

解析結果の詳細については、学会ホームページ「13 回 QC ワークショップ報告集」の「Luminex 抗体検査 WAKFlow HLA 抗体・ICFA 法による抗体検査」を参照されたい。

SH2101: 他の検査法と同様、A24 抗原に対する抗体特異性を検出していた。他の生体材料を使用した検査法 (AHG-LCT 法の κ 鎖, LIFT 法) で検出されていた A2 抗原に対する反応は、ICFA 法では確認されなかった。AHG-LCT 法および LIFT 法が細胞上に存在する抗原に対しての反応を検出する方法であるのに対して、ICFA 法は HLA 分子に特異的に結合するモノクローナル抗体を用いた検出系であることが、相違を生じさせた原因と推測された。B44 抗原においては、他の生体材料を使用した検査法では陰性と判定され、ICFA 法では一部に反応が認められた。前述の検出系の違いや、操作技術上に要因があると考えられた。今後、多数施設が参加し、施設間差の検討および Raw data による詳細な解析が行えることが期待される。

SH2102: 他の検査法と同様に B7 および B40 に対する抗体を検出していた。

SH2103: Cw1 および Cw14 に対する抗体を検出していた。ICFA 法で C ローカスの抗体は、A ローカスおよび B ローカスの抗体と同じように検出が可能であった。

SH2104: 精製抗原を使用した検査法で検出する、いくつかの抗原に対する反応は、ICFA 法では確認されなかった。ICFA 法は生体材料を使用した検査法であり、精製抗原試薬で検出した反応と比較すると生体内により近い反応を示すと考えられる。

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析：DNA タイピング：SSO 法，SSP 法—

橋口裕樹

福岡赤十字病院 検査部 HLA

1. SSO 法

1.1. 参加施設

タイピング部門参加 58 施設中，22 施設 (38%) が SSO 法を使用していた。内訳は表 1 の通りである。その殆どが Dynal RELI であり，湧永製薬 MPH，INNOGENETICS INNO-LiPA が各 1 施設ずつであった。使用キット数では RELI の単独使用が 14 施設と一番多く，SSO+SSP との併用が 5 施設，SSO+SSP+RFLP の 3 法を使用した施設は 1 施設であった。

今回，Dynal RELI を中心として解析を行い，参加施設が少なかった MPH，INNO-LiPA の生データの解析は省略し，HLA 型判定のみ解析対象とした (表 2)。参加施設の内訳は臓器移植 18 施設，造血細胞 6 施設，輸血関連 5 施設，その他 1 施設であった。(重複あり)

1.2. キット構成

Dynal RELI HLA-A では 48probe kit の使用が 18 施設，43probe kit の使用が 2 施設であった。Lot 数は合わせて 9 種類であった。HLA-B については全施設が 61probe kit を使用し Lot 数は，11 種類であった。HLA-Cw については全 5 施設が 37probe kit を使用し Lot 数は，4 種類であった。HLA-DR については 54probe kit の使用が 19 施設，60probe kit の使用が 1 施設であった。Lot 数は，13 種類であった。また H2101，H2102 の検体については DR3/11/13/14 プライマーを追加的に使用した施設もあった。HLA-DQ については全 2 施設が 41probe kit を使用し Lot 数は，2 種類であった。各施設の多くは Lot の異なるキットを使用している状況であった。比較的，短期間で Lot 変更が行われる RELI は，各施設において解析ソフトのバージョンアップ，Lot 変

表 1 使用キット及び方法数

メーカー名	キット名	施設数			
		1 法	2 法	3 法	Total
Dynal	RELI	14	5	1	20
湧永製薬	MPH	1	0	0	1
INNOGENETICS	INNO-LiPA	1	0	0	1
Total		16	5	1	22

表 2 参加数

HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1	HLA-DRB345	HLA-DQB1
22/22	22/22	7/22	22/22	15/22	2/22

更など管理を確実に行って頂きたい。また、キット添付書類に False positive, False negative が発生しやすい probe 情報等が掲載されてあるので使用しているキットの特徴を確認しておく必要があると思われる。また、施設によっては期限切れの試薬を使用している施設も見受けられた。

1.3. 生データ

入力ミスと思われるもの、発色の弱い“2”, False positive, False negative が考えられるものについては、セル背景を黄色にして表示した。各施設にて再度、確認をお願いしたい。またバンドがみられない probe に“1”を入力せず、空欄のまま報告した施設があった。

各座を確認すると HLA-A は reference probe #21 で 2~8 と発色にばらつきが認められた。HLA-B は reference probe #29, #61 で 2~6 と発色にばらつきが認め、発色が弱い傾向にあった。HLA-Cw は H2104 検体のみで probe #21, #30 の発色が弱く False negative となり、ミスアサインの原因となった。HLA-DRB1 は、H2103 の検体では 12thQCWS でも指摘があった probe #30 の発色が弱い傾向が認め、改善していないと思われる。DR4 を判定する場合 (probe #4, #42 が陽性) には probe #30 の判定には引き続き注意が必要である。

2. SSP 法

2.1. 参加施設

HLA タイピング部門参加 58 施設中、18 施設 (31%) が SSP 法を使用していた。(表 3) その殆どが One Lambda 社 Micro SSP であり、invitrogen UniTray

を使用した施設が 1 施設であった。ジェノサーチサポート SSP については追加確認での使用だった。SSP 法の使用目的及びキット種類は表 4, 5 に記す。今回、One Lambda Micro SSP JPN, ABDR, SSP1L, SSP2L を中心に生データの解析を行った。他については、HLA 型判定のみ解析対象とした。参加施設の内訳は臓器移植 14 施設、造血細胞 5 施設、輸血関連 9 施設、その他 1 施設であった。(重複あり)

2.2. 生データ

参加数の多い JPN, ABDR, 1L2L のみ生データの解析を行った。試薬 Lot は異なるが、生データを比較すると、False positive, False negative と思われる反応が散見している。これが原因で正解アリルを含まないアリル表記、HLA 型の判定ミス、判定保留になった施設があった。また、生データは問題ないのに、解析レポートからの転記ミスも多く見受けられた。各施設にて、今一度確認して頂きたい。個別にみると H2101 B*5101, H2104 A*0302, H2104 B*1302 の正解アリル表記が出来ていない施設が多く見受けられた。H2101 B*5101 の原因は SSP-ABDR キットでは 4G の False negative が、SSP-1B では 1F の False negative が原因と考えられる。H2104 A*0302 ABDR キットは 1D の False negative と解析レポートからの表記ミスが考えられた。H2104 B*1302 (JPN) も解析レポートからの表記ミスが考えられた。また SSP では、H2101 A*2603 のように解析レポートを確認すると、A*25 等も否定できない事が判明する。この点も結果に反映させるか、コメント欄に書く必要があると考えられる。

表 3 使用キット及び方法数

試薬 Kit	施設数
Micro SSP	10
Micro SSP + SSO (Dynal RELI)	5
Micro SSP + SSO (LAB Type)	1
Micro SSP + SSO(Dynal RELI) + RFLP(自家製)	1
Micro SSP + UniTray SSP+ SSO(LAB Type)	1

表4 使用目的

目的	施設数
SSP 法を主なタイピング法としてアレル判定に使用	10
SSP 法、SSO 法の両方をアレル判定に使用	4
SSO 法を主なタイピング法として、SSP 法を補助としてアレル判定に使用	4

表5 One Lambda Micro SSP キット (重複使用あり)

製品名	商品コード	Lot No,	施設数
マイクロ SSP ABC/DRDQ	SSP JPN	#003, #004	5
マイクロ SSP AB/DR	SSP ABDR	#006, #007	4
マイクロ SSP クラス I Generic Typing Kit	SSP 1L	#006, #007	4
マイクロ SSP クラス II Generic Typing Kit	SSP 2L	#006	4
マイクロ SSP Allele Specific xxxxx	SSP1-xx, SSP2-xx		4
マイクロ SSP HLA x Typing Kit	SSP xxx		2
マイクロ SSP Seramates-B15	SSPSB15	#1	1

3. 報告書記入

以前より指摘のあったアレル表記等の不備は今回も見受けられた。未だ記載ルールが浸透していないと思われる。正解アレルの表記が無いもの、記載不備、解析ソフトからの転記ミスと思われるものが散見された。

4. まとめ

今回、解析を行い、結果を誤る3つの要因があると考えられた。

1. 試薬自体の問題や、誤った設定、操作方法により false positive, false negative が起こる。

2. 試薬の反応には問題は無いが、検査結果記載法、結果表記法、アンビギュイテイに問題。

3. 試薬の反応には問題は無いが、解析ソフトからの結果解釈に問題があり判定ミスをしている。

ミスアサインをした施設については、各施設において何処に問題があったかを再度、見直し解決して頂きたいと考える。

第13回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析: DNA タイピング: Luminex (SSO) 法—

大沼 豪

NPO 法人 HLA 研究所

1. はじめに

今回のレポートは過去3年間の比較を中心にまとめた。ワークショップ参加者(施設)が技術の向上と、その持続を評価するための参考資料と、タイピングキットの継続的な品質の評価の参考資料になることを目的とした。

- ・QC用検体数: 4: 昨年と検体は異なるが、コンセプトは同様。
- ・評価方法: 昨年と同様(PN値比較/PCR精度比較)。
- ・評価対象: HLA-A, B, C, DRB1の4ローカス。DQB1, DPB1はデータ提出数が少なかったため除外した。

なお、今回の施設別・キット別の評価結果は、学会ホームページ「13回QCワークショップ報告集」の「DNAタイピング Luminex (SSO) 法について」を参照されたい。

2. 参加施設と使用タイピングキットについて

- ・QCWS参加58施設中24施設からデータの提出があった。
- ・使用されたタイピングキットメーカーは3社(●▲■)。
- ・過去3年間におけるキットの使用施設数に偏りはなし。

3. 施設別評価

表1-1にHLA class I, 表1-2にHLA class II, 表1-3にHLA class I & IIの総合評価を示す。今年度の最優秀検査施設はD050であった。

4. キット別評価

表1-4にキットの総合評価を示す。今年度の最優秀キットは▲であった。以下キットごとにP/N値, PCR精度について記す。なお、各図の縦軸は得点(5点満点)、横軸は年度を示す。

4.1. キット●について

1) P/N値比較: 図1-1に推移を示す。

今年度、成績が向上したlocusはA, DRB1であるが、Bは昨年より悪化し、C座は横ばいの結果であった。各locus間においてばらつき(精度の差異)が顕著にみられた。

2) PCR精度比較: 図1-2に推移を示す。

PN値と同様、locus間にばらつきがみられた。

4.2. キット▲について

1) P/N値比較: 図2-1に推移を示す。

各locusの得点は中程度であるが、各locus間の精度にばらつきはみられず、バランスのとれたキットであった。A, B, Cは昨年より向上したが、DRB1は悪化した。キットの特性と推察される。

2) PCR精度比較: 図2-2に推移を示す。

P/N値と同様、locus間のばらつきはなく、バランスのよいキットであった。全体的に昨年度よりも得点が上昇していたが、P/N値と同様、4locus中DRB1が低い成績であった。

4.3. キット■について

1) P/N値比較: 図3-1に推移を示す。

HLA-A, B, Cは昨年度よりも悪化した。HLA-DRB1は上昇した。遺伝子座の中でDRB1が一番良

い成績であった。各 locus 間でのばらつき (精度の差異) が顕著にみられた。

2) PCR 精度比較: 図 3-2 に推移を示す。

DRB1 が一番良く、3 年連続で上昇。3 キット中で最高の成績を収めた。B は昨年より向上したが、他の 2 locus は悪化した。

5. 過去 3 年間における全施設得点推移

2007 年、2008 年、2009 年における全施設の成績を比較した (図 4 参照)。平均点が毎年 5 点ずつ上昇していることから、各施設の検査精度は着実に向上していることがわかる。

6. 過去 3 年間におけるキット精度比較

2007 年 (上段)、2008 年 (中段)、2009 年 (下段)

におけるキット精度を比較した (図 5 参照)。

左側は class-I、右側は class-II、横軸は P/N 比、縦軸は PCR 精度の得点を示す。両項目ともに得点が良い場合、A エリアにプロットされるが、class I ではキット▲に、class II ではキット■に年々精度の向上がみられた。

7. まとめ

- 全施設は年度ごとに着実な typing 精度の向上がみられ、今後もその継続が望まれる。
- タイピングキットはローカス別に精度差がみられ、かつメーカーの格差も認められた。均一な精度を示すキットへの改良が望まれる。

第 13 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析: DNA タイピング: SBT 法—

吉川枝里

東海大学医学部

1. 概況

SBT 法の参加施設は全 9 施設で、昨年より 1 施設減少した (表 2)。SBT のみの施設が 2 施設で、他 7 施設は SBT の他に SSO や SSP も行い 2 法以上を併用していた (表 1)。使用されたキットは、8 施設が AlleleSEQR (abbott)、1 施設が SBTexcellerator (QIAGEN) で、自家製は 1 施設であった (表 3)。

2. 解析結果と考察 (表 4)

HLA-C, DQB1, DPB1 では正解率が 100% であったが、A では 97.2%、B では 86.1% で、DRB1 では 78.1% であった (表 5)。

今回、検体 H2101 の HLA-A で 1 施設が増幅不良のため検査不能となっていた。セルライン由来の

DNA は増幅不良を起こす場合があるため、それが原因ではないかと考えられる。同一検体の HLA-B は、Abbott および QIAGEN の両キットともに、2 桁さえ決まらないアンビグイティーとなるが (B*3501//+, B*5101//+), 9 施設中 5 施設が表記ミスにより不正解となった。原因を調査した結果、2 桁レベルで区別出来ない場合の表記法が分からなかった施設、2 桁で区別出来ないことに気付かなかった施設などがあった。また、1 施設で検体 H2102, H2103, H2104 の HLA-DRB1 で表記ミスが認められた。H2102 では、DRB1*1401/54 が DRB1*140101/54 と誤表記された。おそらく DRB1*140101 と DRB1*1454 のアンビグイティーを示していると考えられるが、4 桁と 6 桁が混在する場合は、全て 4 桁に合わせて表

表1 参加施設および方法 (9施設)

施設コード	ClassI			ClassII		
	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
21D01	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT+SSO			
21D02	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT+SSO		
21D08	SBT+SSO	SBT+SSO		SBT+SSO		
21D09	SBT+SSO	SBT+SSO		SBT+SSO		
21D18	SBT	SBT	SBT	SBT		
21D25	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT	SBT+SSO	SBT	SBT
21D48	SBT	SBT		SBT		
21D53	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT+SSO	SBT+SSO+RFLP	
21D57	SBT+SSO	SBT+SSO+SSP	SBT+SSO+SSP	SBT+SSO	SBT	SBT

表2 過去の参加施設数および方法

	第9回	第10回	第11回	第12回	第13回
	H17	H18	H19	H20	H21
総施設数	10	10	10	10	9
SBT	5	3	3	4	2
SBT+SSO	1	4	5	4	6
SBT+SSP		1	1		
SBT+SSO+SSP	2	1		1	1
SBT+SSO+RFLP	1	1	1	1	
SBT+SSO+RFLP+SSCP	1				

表3 SBT法の使用キット (単位: 施設)

キット名	ClassI			ClassII		
	A	B	C	DRB1	DQB1	DPB1
AlleleSEQR	8	8	5	8	2	2
SBTexcellerator	1	1	1	1		
自家製					1	

記しなければならない。H2103では、DRB1*0405がDRB1*040501/0503と表記されていた。DRB1*040501とDRB1*040503のアンビグイティーを示していると考えられるが、6桁以上の表記はアリルが1つに特定出来た場合のみであるため、この場合は4桁で表記しなければならない。H2104も同様の表記ミスであった。またアリル番号の前に記載するローカス名はDRB1*と表記するべきだが、DR*と記載した施設があった。

以上のように、タイピング不正解の原因のほとん

どが表記ミスであった。他検体のタイピング結果は問題なく、おおむね一致していた。

3. まとめ

タイピング不正解の主な原因であったアンビグイティーにおける表記ミスは、6桁以上のタイピングが可能な高精度タイピング法であるSBT法ならではのミスと言える。SBT法を用いる上では、このような表記法に注意しなければならない。年々登録アリル数が増加しているため、SBT法におけるアンビ

表4 ミスタイプが認められた各施設のタイピング結果（記入は添付データのまま）

施設	A		B	
	H2101		H2101	
21D01	A*2603	-	B*3501/37/42	B*5101/04
21D02	A*2603	-	B*3501//+	B*5101//+
21D08	A*2603	-	B*3501//+	B*5101//+
21D09	A*2603	-	B*3501/42	B*510101
21D18	A*2603	-	B*3501/04/11/+	B*5101/02/04/+
21D25	A*2603	-	B*350101	B*510101
21D48	ND	ND	B*35/53	B*51/78
21D53	A*2603	-	B*3501//+	B*5101//+
21D57	A*2603	-	B*350101	B*510101

ND：増幅不良

DRB1

施設	H2101		H2102		H2103		H2104	
	21D02	DRB1*130701	DRB1*140301	DRB1*1401/06/39/+	-	DRB1*0405	DRB1*090102	DRB1*0101/07
21D08	DR*130701	DR*140301	DR*1401/06	DR*1406/39/54	DR*0405	DR*090102	DR*0101/07	DR*0701
21D09	DRB1*130701	DRB1*140301	DRB1*1401/54	DRB1*1406	DRB1*0405	DRB1*0901	DRB1*0101/21	DRB1*0701/11
21D18	DRB1*130701	DRB1*140301	DRB1*1401/06	DRB1*1406/39/54	DRB1*0405	DRB1*090102	DRB1*0101/07/21	DRB1*0701/11
21D25	DRB1*130701	DRB1*140301	DRB1*1401/54	DRB1*1406	DRB1*0405	DRB1*090102	DRB1*010101	DRB1*0701
21D48	DRB1*130701	DRB1*140301	DRB1*1401/06	DRB1*1406/39/54	DRB1*0405	DRB1*090102	DRB1*0101/07	DRB1*0701
21D53	DRB1*1307	DRB1*1403	DRB1*1401/06	DRB1*1406/39/54	DRB1*0405	DRB1*0901	DRB1*0101/07	DRB1*0701
21D57	DRB1*130701	DRB1*140301	DRB1*140101/54	DRB1*1406	DRB1*040501/0503	DRB1*090102	DRB1*010101	DRB1*070101/0102

表5 SBT法におけるタイピング結果の正解率

Aローカス・正解率

		報告数	正解数	正解率%
		A	H2101	9
	H2102	9	9	100.0
	H2103	9	9	100.0
	H2104	9	9	100.0
合計および平均		36	35	97.2%

DRB1ローカス・正解率

		報告数	正解数	正解率
		DRB1	H2101	8
	H2102	8	6	75.0
	H2103	8	6	75.0
	H2104	8	6	75.0
合計および平均		32	25	78.1%

Bローカス・正解率

		報告数	正解数	正解率
		B	H2101	9
	H2102	9	9	100.0
	H2103	9	9	100.0
	H2104	9	9	100.0
合計および平均		36	31	86.1%

DQB1ローカス・正解率

		報告数	正解数	正解率
		DQB1	H2101	3
	H2102	3	3	100.0
	H2103	3	3	100.0
	H2104	3	3	100.0
合計および平均		12	12	100.0%

Cwローカス・正解率

		報告数	正解数	正解率
		Cw	H2101	6
	H2102	6	6	100.0
	H2103	6	6	100.0
	H2104	6	6	100.0
合計および平均		24	24	100.0%

DPB1ローカス・正解率

		報告数	正解数	正解率
		DPB1	H2101	2
	H2102	2	2	100.0
	H2103	2	2	100.0
	H2104	2	2	100.0
合計および平均		8	8	100.0%

ギユイティーの問題は更に深刻化する可能性がある
この問題に対処する為に、他タイピングの併用など
様々な対策法を用いる工夫をし、可能性を否定で

きないアリの存在を明確にすることが大切であると
考える。

●原著論文●

非血縁者間臍帯血移植におけるレシピエント HLA 抗体と生着の関連性について；HLA ミスマッチ移植における ICFA 法を用いた交差適合試験の有用性

藤原 孝記¹⁾，高梨美乃子¹⁾，田中 秀則²⁾，柏瀬 貢一¹⁾，佐竹 正博^{2),3)}，中島 一格¹⁾

1) 東京都赤十字血液センター

2) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

3) 東京都西赤十字血液センター

要約：2006年12月までに東京都赤十字血液センター臍帯血バンクを介して移植が行われた患者391例についてHLAクラスI，クラスII抗体の検査を行い，臍帯血移植における患者（レシピエント）HLA抗体と生着の関連性について解析した。

患者HLA抗体の特異性が臍帯血HLA抗原に反応しない場合，抗体の有無による生着率の差は認められなかったが，患者HLA抗体の特異性が臍帯血のHLA不一致抗原に反応する場合，生着を認めたのは8例中4例で，生着不全が多いことが確認された。この8例についてimmunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA)法にて確認検査を行ったところ，4例で陽性となり生着不全の結果と一致した。

HLA不一致抗原を有する臍帯血移植前には患者のHLA抗体を高感度抗体検査法で検査し，臍帯血のHLA不一致抗原が抗体と反応しないように選択することにより生着不全の危険性を回避することが期待できる。また，ICFA法はHLA不一致抗原を有する臍帯血移植における確認検査法として有用と考えられた。

キーワード：臍帯血移植，レシピエント HLA 抗体，HLA 交差適合試験法，immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA)

はじめに

わが国では，骨髄由来の造血幹細胞と比較してすぐに入手できることやドナーに対する負担や危険性が少ないことから非血縁者間臍帯血移植の症例数が増加しており，臍帯血移植は，さまざまな疾患や年齢の患者（レシピエント）に適応されている。

腎移植などでは，移植前の患者にすでに産生されていた抗体，すなわち preformed antibody の存在は，移植の成否に大きくかかわっていることが知られている¹⁾。それが HLA 抗体でドナーの HLA 型に反応

性を持っている場合には，超急性拒絶反応（または vascular rejection）が起こり，移植片は直ちに拒絶される²⁾。一方，臍帯血移植ではその大多数が HLA 不一致移植であり，生着不全の危険性が骨髄移植と比較すると高いとされており，国内外の施設より患者に HLA 抗体がある場合，生着不全を起こす可能性が高いのではないかとの問題提起がなされている。しかしながら，患者が保有する HLA 抗体と移植片生着不全に関する詳細な報告はされていない。

近年，精製した HLA 抗原を用いた高感度 HLA 抗

代表者連絡先 〒173-8606 東京都板橋区加賀 2-11-1
 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター
 藤原 孝記

電話 03-3964-3912
 F A X 03-5375-0725
 E-mail ko-fuji@med.teikyo-u.ac.jp

体検査法の開発³⁻⁵⁾により、低力価 HLA 抗体が検出可能となり血小板輸血不応との相関が確認されている⁶⁾。また、腎移植などでは超急性拒絶反応の回避や移植後の治療効果判定を目的としてドナー HLA 型に特異的な抗体の検出に用いられており、低力価 HLA 抗体検出の重要性が認められている。腎移植や HLA 適合血小板製剤 (濃厚血小板 HLA 「日赤」) の供給を行なう場合、交差適合試験による確認検査を行っているが、anti-human immunoglobulin lymphocyte cytotoxicity test (AHG-LCT: 以下、AHG-LCT 法)⁷⁾ を標準法としているため、高感度 HLA 抗体検査法と比較すると最終的な確認検査として十分な検出感度が得られていない状況である。また、精製抗原を用いた HLA 抗体検査法は高感度であるため、非特異的な反応が検出される可能性があることから⁸⁾、白血球を用いた高感度 HLA 抗体検出法が必要とされている。最近、我々は Luminex ビーズアレイに antigen capture 法を応用した高感度 HLA 交差適合試験法 immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA: 以下、ICFA 法) を開発し、その有用性について報告した⁹⁾。

我々は、東京都赤十字血液センター臍帯血バンクを介して臍帯血移植が行われた患者について調査を行い、患者が保有する HLA 抗体の特異性が臍帯血 HLA 抗原に反応しない場合、抗体の有無による生着率の差は認められないが、患者が保有する HLA 抗体の特異性が臍帯血の HLA 不一致抗原に反応する場合、生着不全が多いことを報告している¹⁰⁾。本研究では、患者が保有する HLA 抗体の特異性を精査し、その抗体が移植された臍帯血の HLA 不一致抗原に反応する特異性を含む場合、臍帯血と同じ HLA 型の白血球に対する反応を確認するために ICFA 法を実施して、臍帯血移植における HLA 抗体と生着 (ドナー型好中球の回復) の関連性について解析すると共に、ミスマッチ移植における ICFA 法を用いた交差適合試験の有用性について検討した。

対象および方法

1. 対象

2001 年以降に東京都赤十字血液センター臍帯血バンクに登録し、2006 年 12 月までに移植が行われた

造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植患者 391 例を対象とした。臍帯血バンク登録時の HLA タイピング用患者検体より分離・保存した患者血漿を血清化し、HLA 抗体検査を実施した¹⁰⁾。

2. HLA 抗体検査

FlowPRA Class I & Class II Screening (One Lambda, CA, USA, 以下、FlowPRA) にて HLA クラス I, クラス II 抗体の精査を行った。Flow PRA のヒストグラム解析で陰性と判定できなかった症例について、LABScreen PRA Class I & Class II, LABScreen Class I Single Antigen, LABScreen Class II Single Antigen (One Lambda, CA, USA, 以下、LABScreen) にて特異性解析を実施した。

3. ICFA 法による確認検査

1) 蛍光ビーズ作製: Fig. 1 に ICFA 法の原理を示す⁹⁾。3 種類の Luminex 蛍光ビーズ (Luminex, TX, USA: 使用ビーズ Lot No. 137, 138, 139) に HLA クラス I 分子に特異的なモノクローナル抗体: W6/32, ヒト IgG (ZYMED, CA, USA, 2 次抗体陽性コントロールビーズ用), BSA (FrV Serologicals Proteins, IL, USA, バックグラウンドビーズ用) を Luminex の添付マニュアルにしたがって、それぞれ結合させた。3 種類の Luminex 蛍光ビーズは、各ビーズが約 4×10^5 個/ml になる様に等量混合して調整した。

2) ICFA: LABScreen による特異性解析の結果、臍帯血と同じ HLA 型の白血球に対する反応を確認するために ICFA 法を実施した。96 ウェルマイクロプレート (Greiner, Frickenhausen, Germany: 96 Well Polystyrene Microplates 300 μ l U-bottom) に Tris-NH₄Cl を 200 μ l 分注し、臍帯血と同じ HLA 型の EDTA 加全血 20 μ l を加え、混和後、37°C にて 10 分間溶血させた。0.5% EDTA-PBS (pH 6.0), 200 μ l にて 2000 g, 2 分遠心による洗浄を 2 回行い、被検患者血清・陰性コントロール血清を 20 μ l ずつ加え、37°C で 30 分間反応させた。0.05% Tween20-PBS (以下 PBS-T), 200 μ l にて 2000 g, 2 分遠心による洗浄を 2 回行い、lysis buffer (0.005 M Tris, 0.25% TritonX-100, 0.9% NaCl, pH 7.4) を 50 μ l 加え、室

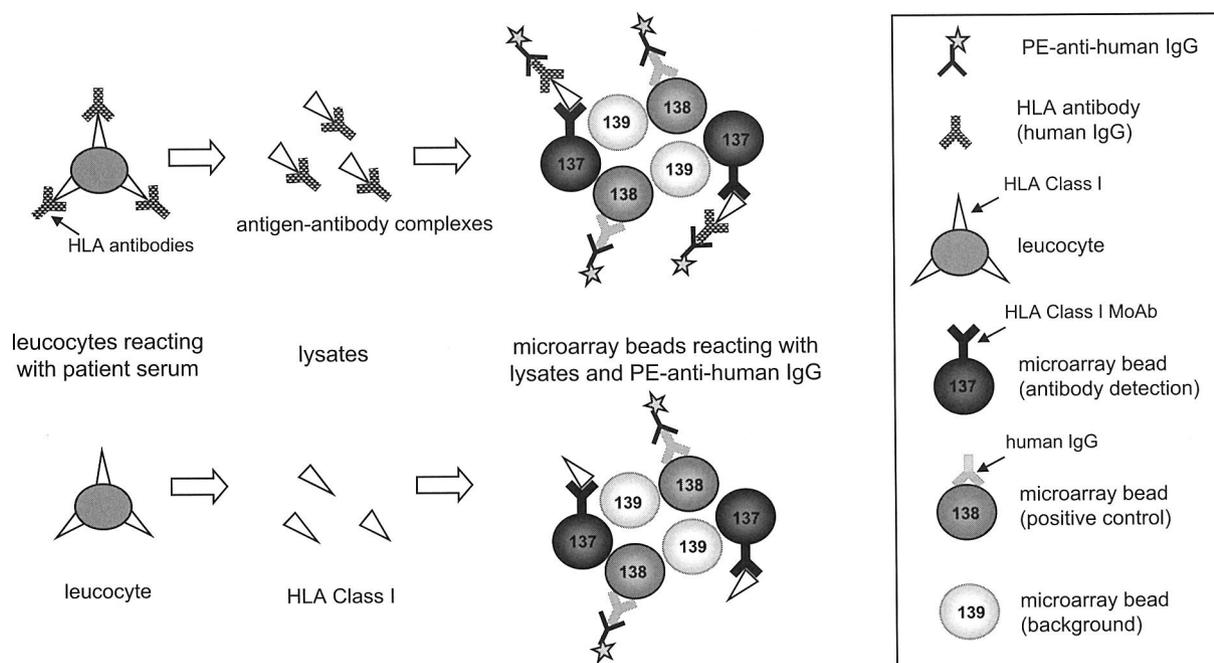


Fig. 1. Overview of immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA). Three types of bead (Luminex bead Lot Nos. 137, 138, and 139) were coupled with monoclonal antibodies specific for HLA class I, human IgG (positive control beads), and BSA (background beads), respectively. The bead mixture were incubated with lysate and subjected to flow cytometric analysis. HLA Class I molecules, or antigen-antibody complexes were obtained by solubilization of leucocytes that had been reacted with a patient's serum.

温で10分間振盪しながら可溶化した後、2000 gで5分遠心した。3種類のLuminex 蛍光ビーズミックスを5 ul 加えた96ウェルマイクロプレート(Whatman, NJ, USA: UNIPLATE V-bottom, 96 wells, 250 ul)に可溶化した検体の遠心上清25 ulを加え、室温で20分間振盪しながら反応させた。PBS-T, 200 ulにて2000 g, 2分遠心による洗浄を行い、あらかじめPBS-Tにて100倍希釈したPE標識抗ヒトIgG抗体(Jackson Immuno Research Laboratories, PA, USA)を50 ul加え、室温で10分間振盪しながら反応させた。PBS-T, 200 ulにて2000 g, 2分遠心による洗浄を2回を行い、PBS-Tを50 ul加えて蛍光ビーズを再浮遊させ、Luminex¹⁰⁰ (Luminex, TX, USA)にて各蛍光ビーズを測定した。

3) 判定: Cut-off Indexは各ビーズの蛍光強度median値を用い、検体と陰性コントロール血清における実測値とバックグラウンドの比率からIndex(以下の計算式)を算出し、2.0以上の場合を陽性とした。

$$\frac{(\text{検体実測値} \div \text{陰性コントロール血清実測値})}{(\text{検体バックグラウンド} \div \text{陰性コントロール血清バックグラウンド})}$$

4. 血小板によるHLAクラスI抗体の吸収試験

ICFA法の結果を検証するため、約50人分の洗浄プール血小板を用いてHLAクラスI抗体の吸収試験を実施し、患者が保有するHLA抗体の特異性を解析した。洗浄プール血小板ペレット100 ulに対して患者血清100 ulを加え、ローテータで攪拌しながら4°C overnightでHLAクラスI抗体を吸収した。10000 g, 5分遠心した後、LABScreenにて遠心上清の特異性解析を実施した。

結果

臍帯血移植患者391例についてHLAクラスI, クラスII抗体検査を行った結果をTable 1に示した。患者がHLA抗体を保有する症例のうち、臍帯血のHLA不一致抗原に反応する特異性を持つ症例は、

Table 1. Detection of HLA antibodies in recipients on the engraftment of CB transplants

CB transplants	: 391
HLA Class I antibodies (IgG)	: 42 (10.7%)
reactive to CB	: 8 (2.0%)
HLA Class I antibodies (IgM)	: 26 (6.6%)
reactive to CB	: 0
HLA Class II antibodies (IgG)	: 21 (5.4%)
reactive to CB	: 0
HLA Class II antibodies (IgM)	: 4 (1.0%)
reactive to CB	: 0

Table 2. Clinical summaries for recipients of CB transplants whose HLA antibody corresponded to an HLA in the donor's CB

Cases	Diagnosis	Age	CB HLA mismatch	Cell/kg, (x10 ⁷)	CD34/kg, (x10 ⁵)	Preparative regimen	GVHD prophylaxis	Engraftment	Days to neutrophil recovery
1	MDS-leukemia	59	1	2.95	0.56	RIST	CYA	rejection	
2	AML, M2, refractory	45	2	2.61	1.04	RIST	CYA+FK	donor type	46
3	ALL, 1CR	33	1	2.3	0.61	Full	CYA+MTX	auto-recovery	
4	ALL, 1CR	0.9	1	13.9	3.63	Full	FK+MTX	donor type	14
5	MDS, RA	66	2	2.33	0.61	RIST	FK	rejection	
6	AML, M2, 1relapse	56	1	1.91	0.85	RIST	FK	donor type	17
7	MDS, RAEB-T	56	2	2.41	0.54	Full	CYA+MTX	auto-recovery	
8	AML, 1CR	28	2	2.43	0.83	Full	CYA+MTX	donor type	25

AML = acute myelogenous leukemia; ALL = acute lymphocyte leukemia; MDS = myelodysplastic syndrome;

RA = refractory anemia; RAEB-T = refractory anemia with excess blasts in transformation;

RIST = reduced intensity stem cell transplantation; CYA = cyclosporin A; MTX = methotrexate; FK = FK506 (tacrolimus)

HLAクラスI抗体 (IgG抗体) が8例 (2.0%) であった。391例中、造血器悪性腫瘍に対する初回単一臍帯血移植患者285例を対象として解析を行なった。285例のHLA適合度は、HLA一致 (6/6マッチ) が26例 (9.1%)、HLA1抗原不一致 (5/6マッチ) が123例 (43.2%)、HLA2抗原不一致 (4/6マッチ) が135例 (47.4%)、HLA3抗原不一致 (3/6マッチ) が1例 (0.3%) であった。HLA抗体解析結果と患者好中球

の生着について解析した結果、患者がHLA抗体を保有していない症例群 (92.7%; 95%CI, 87.2%–98.1%) と患者が臍帯血HLA抗原に反応しないHLA抗体を保有している症例群 (93.6%; 95%CI, 82.6%–100%) を比較すると、患者HLA抗体の有無による有意差は認められなかった。しかし、患者が保有するHLA抗体の特異性が臍帯血のHLA不一致抗原に反応する場合、生着を認めたのは8例中4例

Table 3. Confirmation of HLA Class I antibodies using ICFA

Cases	CB mismatch antigens	Specificity of recipients HLA Class I antibodies by LABScreen	ICFA	Neutrophil recovery
1	B62	B7, 22, 35, <u>62</u> , 70, 75, 48, 60, 61	Positive	No
2	B52 B70	A2, 68, 69, B35, 62, 75, 51, <u>52</u>	Negative	Yes
3	B7	B35, 62, 70, 75, <u>7</u> , 54, 55, 56	Positive	No
4	A2	B51, 52, A1, 36, <u>2</u> , 68	Negative	Yes
5	A2 B48	B54, 55, 56, 7, 27, 39, 38, <u>48</u> , A30, 31, <u>2</u> , 68, 69	Positive	No
6	B54	B7, 67, <u>54</u> , 55, 56	Negative	Yes
7	B44 B61	A2, 23, 24, 68, 69, 30, 31, 11, <u>B44</u> , 45, 49, 50, 7, 13, 27, 39, 54, 55, 56, 67, 62, 70, 75, 48, 60, <u>61</u>	Positive	No
8	A26 B62	A11, <u>26</u> , 66, 23, 24, 2	Negative	Yes

To confirm the reactivity of antibodies to transplanted CB, recipient samples, which containing HLA Class I antibodies and a corresponding HLA in the transplanted CB, were analysed using immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA). Only four of these eight CBTs were transplanted successfully and those four recipient samples were not reacted with HLA identical leucocytes to transplanted CB by ICFA.

Table 4. Specificity characterization of platelet absorbable HLA Class I antibodies

Cases	CB mismatch antigens	Specificity of recipients HLA Class I antibodies	
		Not absorbed serum	Absorbed serum
1	B62	B7, 22, 35, <u>62</u> , 70, 75, 48, 60, 61	Negative
2	B52 B70	A2, 68, 69, B35, 62, 75, 51, <u>52</u>	A2, 68, 69, B51, <u>52</u>
3	B7	B35, 62, 70, 75, <u>7</u> , 54, 55, 56	Negative
4	A2	B51, 52, A1, 36, <u>2</u> , 68	A <u>2</u> , 68
5	A2 B48	B54, 55, 56, 7, 27, 39, 38, <u>48</u> , A30, 31, <u>2</u> , 68, 69	Negative
6	B54	B7, 67, <u>54</u> , 55, 56	B7, 67, <u>54</u> , 55, 56
7	B44 B61	A2, 23, 24, 68, 69, 30, 31, 11, <u>B44</u> , 45, 49, 50, 7, 13, 27, 39, 54, 55, 56, 67, 62, 70, 75, 48, 60, <u>61</u>	Negative
8	A26 B62	A11, <u>26</u> , 66, 23, 24, 2	A11, <u>26</u> , 66, 23, 24, 2

で生着不全が多く (Table 2), 有意差が認められた (58.3%; 95%CI, 16.6%-89.7%; P=0.017)。以上の結果は, 我々が以前報告した結果と相違が認められなかった¹⁰⁾。

Table 3 に臍帯血の HLA 不一致抗原に反応する特異性を持つ 8 例について ICFA 法による確認検査を行った結果を示した。臍帯血と同じ HLA 型の血液検体を用いて確認検査を実施した結果, 4 例で陽性とな

り生着不全の結果と一致した。ICFA 法が陰性となった4例では生着が認められた。

Table 4 に臍帯血の HLA 不一致抗原に対する特異性を持つ8例について、血小板を用いた HLA クラス I 抗体吸収試験による特異性解析結果を示した。ICFA 法が陽性を示した4例は、全ての特異性について HLA クラス I 抗体が陰性化し、血小板による吸収が認められた。一方、ICFA 法が陰性であった4例は、臍帯血の HLA 不一致抗原に対する特異性を含む反応が残り、血小板による吸収が認められなかった。

考 察

臍帯血移植は、骨髄移植と比較すると疾患や年齢などの患者に対する適応範囲が広く、HLA 不一致抗原も2抗原まで認められていることや、移植適応の決定から移植までの期間が短いなどのメリットがある。その反面、臍帯血移植は症例の多くが HLA 型不一致移植であり、患者が臍帯血の HLA 不一致抗原に反応する抗体を保有している可能性がある。本研究において、ICFA 法による確認検査の結果、患者が保有する HLA 抗体が臍帯血の HLA 不一致抗原に反応した全ての症例で生着不全が認められたことから、移植前に患者の HLA 抗体検査を行い、HLA 抗体を保有している症例では臍帯血を選択する際に、HLA が完全に一致している臍帯血あるいは患者が保有する HLA 抗体と反応しない HLA 型の臍帯血を選択して移植を施行することにより、生着不全の危険性を回避することが期待できる。

腎移植では、腎移植希望登録患者の HLA 抗体検査を実施し、ドナー発生時にドナーの HLA タイピングおよび交差適合試験を実施している。HLA 適合血小板は、患者が保有する HLA クラス I 抗体に起因した血小板輸血不応症例に適応となる血液製剤であり、あらかじめ患者の HLA 抗体検査を実施し、供給時に交差適合試験による確認検査を行なっている。一方、臍帯血移植では、移植希望登録患者の HLA タイピングを実施し、登録・保存されている臍帯血から HLA 型の適合した臍帯血を選択して移植を実施している。より安全な臍帯血移植を行なうためには、移植前に高感度 HLA 抗体検査法により患者の HLA 抗体検査を実施し、患者が HLA 抗体を保有している場合、抗体

と反応しない HLA 型の臍帯血を選択する必要がある。また、HLA 抗体の保有により選択可能な臍帯血に限られる場合には交差適合試験による確認検査を実施する必要性が示唆された。

現在、腎移植や HLA 適合血小板製剤の供給を行なう場合の HLA 交差適合試験は、AHG-LCT 法を標準法としているが、高感度 HLA 抗体検査法と比較すると検出感度が低く、最終的な確認検査として十分な検出感度が得られていない。また、検査の工程が煩雑で3時間以上要するため、高感度かつハイスループットな交差適合試験法の開発が望まれていた。我々が開発した ICFA 法は、AHG-LCT 法と比較すると約8倍検出感度が高く、検査所要時間が1時間以上短いなどの利点がある⁹⁾。本法は、1次反応において白血球、血小板、セルラインなどを抗原パネルとして用いることが可能であるため、被検血清中の抗体検出や交差適合試験に用いることが可能である。1次反応後、抗原パネルを可溶化し、2次反応において蛍光ビーズを用いて抗原抗体複合物を特異的に捕捉・濃縮して抗体を検出する原理から検出感度が高く、従来の間接蛍光抗体法で認められる非特異的な反応の影響が少ない方法である。また、パネル細胞の生存率による影響を受けにくい特徴があることもメリットとして極めて大きい。間接蛍光抗体法は、使用した細胞またはビーズに結合した抗体を蛍光ラベルした2次抗体で検出する方法であるが、細胞またはビーズに結合した抗体が目的とする抗原に特異的な抗体で無い場合にも反応が認められる。これは、いわゆる非特異的な抗体の結合、HLA 抗体検出を目的とした際に認められる HLA 以外の白血球抗体の存在による細胞との反応、一部のビーズが高い血清バックグラウンド値を示すことにより生じる偽陽性反応などである⁸⁾。また、精製抗原を用いた HLA 抗体検査法は高感度であるが、インタクト白血球上に発現している HLA 抗原と立体構造が異なるため、HLA 様の抗原に対する抗体との反応や、実際に抗体が反応を示すエピトープと部分的にアミノ酸配列が共通である抗原との過剰反応(インタクト白血球との反応が認められない臨床的意義の低い抗体)を示す可能性がある^{8) 9)}。ICFA 法は、インタクト白血球を用い、可溶化して抗原抗体複合物を特異的に捕捉・濃縮して抗

体を検出する原理から、高感度かつ特異性の高い方法であり、本研究において、ICFA法による確認検査の結果、患者が保有するHLA抗体が臍帯血のHLA不一致抗原に反応した全ての症例で生着不全が認められたことから、臨床的意義の高いHLA抗体を検出する方法であることが示唆された。

ICFA法は応用範囲が広く、既に血小板抗体、顆粒球抗体、HLAクラスII抗体の検出などに応用されており、検出感度、検査所要時間、検体処理能力、全ての工程をマイクロプレートで行う操作性、Cut-off Indexを用いて客観的に判定を行うなどの点から、移植・輸血検査においてAHG-LCT法に代わるHLA交差適合試験法として有用である。

引用文献

- 1 Patel R, Terasaki PI: Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med*, 280: 735–739, 1969.
- 2 Iwaki Y, Terasaki PI: Primary non-function in human cadaver kidney transplantation: evidence of hidden hyperacute rejection. *Clin Transplant*, 1: 125 1986
- 3 Pei R, Wang G, Tarsitani C, et al: Simultaneous HLA Class I and Class II antibodies screening with flow cytometry. *Hum Immunol*, 59: 313–322, 1998.
- 4 Pei R, Lee J, Chen T, et al: Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol*, 60: 1293–1302, 1999.
- 5 El-Awar N, Lee JH, Tarsitani C, et al: HLA Class I epitopes: recognition of binding sites by mAbs or eluted alloantibody confirmed with single recombinant antigens. *Hum Immunol*, 68: 170–180, 2007.
- 6 Sato S, Sakurai T, Yamamoto Y, et al: Earlier detection of HLA alloimmunization in platelet transfusion refractoriness by flow cytometric analysis. *Transfusion*, 45: 1399–1401, 2005.
- 7 Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204: 998–1000, 1964.
- 8 Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, et al: “Natural” Human Leukocyte Antigen Antibodies Found in Nonalloimmunized Healthy Males. *Transplantation*, 86: 1111–1115, 2008
- 9 Fujiwara K, Shimano K, Tanaka H, et al: Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang*, 96: 244–251, 2009.
- 10 Takanashi M, Fujiwara K, Tanaka H, et al: The impact of HLA antibodies in on engraftment of unrelated cord blood transplants. *Transfusion*, 48: 791–792, 2008

Effects of HLA antibodies in recipients on engraftment of unrelated cord blood transplants; HLA cross-matching using immunocomplex capture fluorescence analysis in HLA-mismatched cord blood transplants

Koki Fujiwara¹⁾, Minoko Takanashi¹⁾, Hidenori Tanaka²⁾, Koichi Kashiwase¹⁾, Masahiro Satake^{2, 3)}, Kazunori Nakajima¹⁾

- 1) Japanese Red Cross Tokyo Blood Center, Tokyo, Japan
- 2) Japanese Red Cross Blood Service Headquarters Central Blood Institute, Tokyo, Japan
- 3) Japanese Red Cross Tokyo West Blood Center, Tokyo, Japan

Summary: Many cases of unrelated cord blood transplants (CBTs) are HLA mismatched. Also CBTs are pointed out to have a higher risk of engraftment failure than bone marrow transplants.

To evaluate the effect of existing HLA antibodies in recipients on the engraftment in CBTs, we analyzed the stored recipients' plasma sample of CBT by December 2006, for which the Metro Tokyo Red Cross Cord Blood Bank supplied the cord blood (CB) units. Detection of HLA class I and class II antibodies was performed in 391 recipients using FlowPRA (One Lambda, CA, USA), and a total of 121 samples were further analyzed using LABScreen (One Lambda, CA, USA). To confirm the reactivity of antibodies to the transplanted CB, the recipient samples, which contains HLA Class I antibodies, were analyzed using immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA) for the corresponding HLA in the transplanted CB.

Compared to the recipients without HLA antibody, the recipients with HLA antibody without the corresponding HLA in the transplanted CB showed no significant differences in the probability of CB engraftment. There were eight CBTs in which the specificity of the HLA antibody was directed against an HLA which was present on the transplanted CB. Only four of these eight CBTs were transplanted successfully and those four recipient samples were not positive in the ICFA to the leucocytes that have the same HLA with the transplanted CB.

In conclusion, we interpret these findings to indicate that the presence of an existing HLA antibody is not a reason to avoid CBT, unless the corresponding HLA is present in the proposed CB unit. Moreover, ICFA can be used for confirmatory method of HLA antibodies in CBTs.

Key Words: cord blood transplants, HLA antibodies in recipients, HLA cross-matching, immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA)

第8回日本組織適合性学会近畿地方会 抄 録 集

会 期：2010年2月6日(土)

会 場：参天製薬株式会社
大阪市東淀川区下新庄 3-9-19
TEL: 06-6321-7000

世話人：芦田 隆司
近畿大学 血液内科
〒589-8511 大阪狭山市大野東 377-2
TEL: 072-366-0221 FAX: 072-368-3732
E-mail: ashida@med.kindai.ac.jp

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

【参加費】

1. 正会員：2,000円
2. 学 生：1,000円
3. 世話人：3,000円

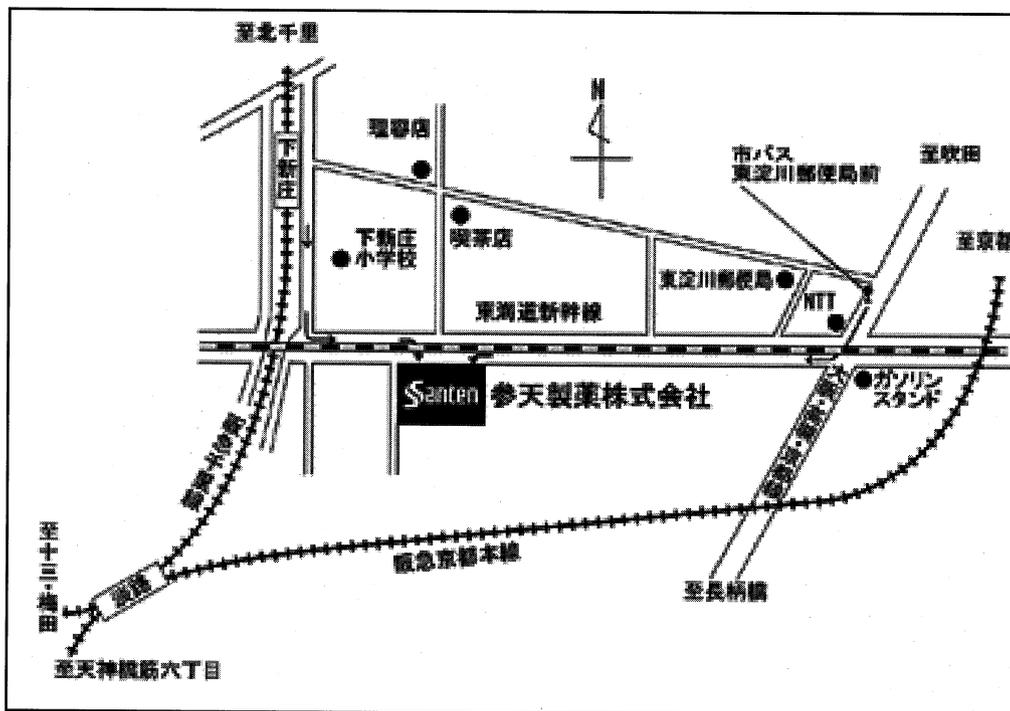
【会議等】

1. 総 会：2月6日(土) 13:20~13:40
2. 世話人会：2月6日(土) 12:20~13:20
3. 意見交換会：2月6日(土) 17:10~

【会場地図】

参天製薬株式会社 本社案内図

大阪市東淀川区下新庄 3-9-19 TEL 06-6321-7000



新大阪駅より (所要時間: 約 30 分)

地下鉄御堂筋線・新大阪駅よりなかもず行きに乗車し、一駅目の西中島南方駅で下車。阪急千里線に乗換え、南方駅より北千里行きに乗車、下新庄駅下車。下新庄駅から徒歩 5 分。

地下鉄堺筋線日本橋、北浜方面より (地下鉄と阪急が相互乗り入れ)

北千里行きに乗車し、下新庄駅下車。下新庄駅から徒歩 5 分。

JR 大阪駅、阪神・地下鉄・阪急 梅田方面より

阪急電車・梅田駅から北千里行きに乗車し、下新庄駅下車。下新庄駅から徒歩 5 分。

プログラム

9:30

受付開始

【午前の部】

10:00~10:40

オープニングセミナー

座長：椿 和央
(近畿大学医学部附属奈良病院)

ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) に参加して —世界の現況—

丸屋 悦子 (特定非営利活動法人 HLA 研究所)

10:50~11:40

一般演題 (1)

座長：荒木 延夫
(兵庫県赤十字血液センター)

1. 日本人既タイプ HLA-DRB1*140101 の再検討

○福森 泰雄¹⁾, 齋藤 順¹⁾, 小野 明子¹⁾, 西澤 果苗¹⁾, 石井 博之¹⁾, 東 史啓²⁾, 鮫島 千裕²⁾,
松本 加代子³⁾, 吉村 敬次¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田 弘俊³⁾, 中埜 肅¹⁾
大阪府赤十字血液センター¹⁾, 医学生物学研究所²⁾, 京阪さい帯血バンク³⁾

2. MICA の日本人におけるアレル頻度と HLA-B 座との連鎖不均衡について

○辻野 貴史, 大沼 豪, 二神 貴臣, 小島 裕人, 林 晃司, 楠木 靖史, 吉田 喬, 藤井 直樹,
末上 伸二, 西川 美年子, 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

3. 口腔癌患者における可溶性 MICA, MICB 濃度と病期進行との関連

○玉置 盛浩¹⁾²⁾³⁾, 中西 真理³⁾, 山中 康嗣¹⁾, 川島 渉³⁾, 工藤 利彩³⁾, 森村 佳史³⁾, 桐田 忠昭²⁾,
羽竹 勝彦³⁾, 石谷 昭子³⁾
高清会高井病院口腔外科¹⁾, 奈良県立医科大学口腔外科学講座²⁾, 奈良県立医科大学法医学教室³⁾

4. 卵胞液中の HLA-G 抗原について (血清中の HLA-G 抗原測定法の検証)

○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⁾
奈良県立医科大学細菌学¹⁾, 奈良県立医科大学法医学²⁾, 湧永製薬バイオ事業開発部³⁾,
Fred Hutchinson Cancer Research Center⁴⁾

11:40~12:20

一般演題 (2)

座長: 川西 一信
(近畿大学)

5. LABScreen Single Antigen の反応性 —妊娠免疫 HLA 抗体から見た解析—

○黒田 ゆかり, 小田 秀隆, 浅尾 洋次, 中山 みゆき, 中野 稔, 永吉 裕二, 迫田 岩根,
友成 洋子, 佐藤 博行, 清川 博之
日本赤十字社九州血液センター 技術部

6. BMT 後, ドナー由来 HLA 抗体により血小板輸血不応となった一例

○万木 紀美子¹⁾, 芦原 英司¹⁾, 菱澤 方勝²⁾, 菱田 理恵¹⁾, 丹羽 紀実¹⁾, 竹川 良子¹⁾,
西澤 正俊²⁾, 近藤 忠一²⁾, 平位 秀世¹⁾, 石川 隆之²⁾, 前川 平¹⁾
京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部¹⁾, 京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科²⁾

7. 同種造血幹細胞移植後, ドナー由来および輸血由来の HLA 抗体が検出された一例

○小田原 聡一¹⁾, 谷口 享子¹⁾, 吉原 哲¹⁾, 池亀 和博¹⁾, 海田 勝仁¹⁾, 岡田 昌也¹⁾, 小川 啓恭¹⁾,
丸屋 悦子²⁾, 佐治 博夫²⁾
兵庫医科大学血液内科¹⁾, HLA 研究所²⁾

12:20~13:20

昼食・世話人会

13:20~13:40

総会

【午後の部】

13:50~16:00

シンポジウム

『臓器移植の将来の展望 —HLA の医療への関与—』

座長: 谷 慶彦 (大阪府赤十字血液センター)
芦田 隆司 (近畿大学)

- 1) 最近の腎移植における HLA の意義
大阪中央病院 泌尿器科 市丸直嗣
- 2) 肝臓移植
朝日大学歯学部附属村上記念病院 外科 江川裕人
- 3) 心臓移植と HLA
大阪大学医学部附属病院 移植医療部 福寫教偉
- 4) 造血幹細胞移植
京都大学医学部附属病院 血液腫瘍内科 一戸辰夫
- 5) ペプチドワクチン—WTI ペプチド癌ワクチンをモデルとして—
大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 岡 芳弘

休憩

16:10~17:10

特別講演

座長：永尾 暢夫
(神戸常盤大学)

『疾患と HLA: ゲノム全域探索の視点から』

徳永 勝士 (東京大学医学系研究科人類遺伝学分野)

17:10~

懇親会

(10:00~10:40)

オープニングセミナー

座長：椿 和央
(近畿大学医学部附属奈良病院)

ASHI (American Society for Histocompatibility and
Immunogenetics) に参加して ー世界の現況ー

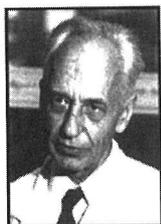
丸屋 悦子
特定非営利活動法人 HLA 研究所

ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) に参加して ー世界の現況ー

丸屋 悦子

特定非営利活動法人 HLA 研究所

第35回ASHIが昨年(2009年)の11月2日から6日、サンフランシスコのHyatt Regencyで開催された。この学会に出席し、私が感じた「組織適合性についての世界の現況(主にアメリカ)」について報告する。



This Year's Meeting is Dedicated to the Memory of Jean Dausset

Jean Dausset, MD, a pioneer in the genetics of the MHC, passed away on June 6, 2009 in Mallorca, Spain. With Baruj Benacerraf and George Davis Snell, he received the Nobel Prize in Physiology in 1980 for the discovery and characterization of the genes comprising the Major Histocompatibility Complex. In 1984 he created the Human Polymorphism Center (CEPH). We will remember him as a visionary in immunogenetics as well as a dedicated humanist.

It is truly fitting that we dedicate our 35th Annual Meeting to the memory of Dr. Dausset.

大会長(Deborah O. Crowe)の第一声、本年度のASHI meeting参加者が過去最大の1,000人を越えたと発表された。大変盛大な学会である。スポンサーとなった企業数が30を超え、これらの企業の協力のお陰で、この盛大な学会活動ができた感謝の意を

述べられた(アメリカらしいと感じた)。

今年のASHIは亡くなられたJean Dausset先生に捧げる学会として開催され、Dr.TerasakiによりJean Dausset, MDについての追悼講演がなされた。

Keynote AddressはMichael D. Cahalanによりなされ、テーマは「Imaging the Immune System」,

細胞は活性化されるとイオンチャンネルが働き、カルシウムイオン濃度の上昇がみられる。これを利用して、T cellやB cell, dendritic cellによる免疫反応を3次元でみることのできるシステムが構築された。T cellは $67\mu\text{m}^2/\text{min}$ で、B cellは $12\mu\text{m}^2/\text{min}$ で動き、T cellの動きが非常に早いことが分かり、T cellが抗原提示細胞との反応性を時間ごとに追ってみる(0-1h, 1-2h, 10h, 16h)と時間が経つにつれてT cellの凝集が見られる。そのコンタクトの様子は音楽でたとえるとマーチのように軽やかでテンポが速い。一方T cellとB cellの反応の場合はワルツを踊るようなゆっくりとT cellとB cellが美しいコンビネーションを示しながら次の細胞へと伝達の相手を変えていく様子が窺えた。今後このImaging systemを利用し、移植医療に応用できる日がくることが期待されると話された。講演終了後のロビーは細胞性免疫と液性免疫現象がビジュアル化されたことに参加者の囁きがどよめきとなっていた。

ポスター発表, 281題, 口演, 49題, ワークショップ35題, 特別講演, シンポジウムにplenary lecture 4種などなど, 多種・多様であった。当学会では、私の興味の主体であるHLA抗体について主に報告する予定である。

(10:50~11:40)

一般演題 (1)

座長：荒木 延夫
(兵庫県赤十字血液センター)

演題番号 1~4

1. 日本人既タイプ HLA-DRB1*140101 の再検討

○福森 泰雄¹⁾, 齋藤 順¹⁾, 小野 明子¹⁾, 西澤 果苗¹⁾, 石井 博之¹⁾, 東 史啓²⁾, 鮫島 千裕²⁾,
松本 加代子³⁾, 吉村 敬次¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田 弘俊³⁾, 中埜 肅¹⁾

近大阪府赤十字血液センター¹⁾, 医学生物学研究所²⁾, 京阪さい帯血バンク³⁾

【はじめに】

2009年 Yang.KL ら, や Xiao.Y らによりいまま で DRB1*140101 と名づけられていたタイプの中に 新たな変異を持つ New type (exon 3 の codon 112 に おける His>Tyr 置換を持つ) が存在することがわか り, DRB1*1454 と命名された。その連鎖としては DRB1*140101-DRB3*0201, DRB1*1454-DRB3* 020201 であると推測されている。Xiao.Y らは, 米 国在住人を調査し, ヒスパニック系で 15%, ヨー ロッパ系で 9% が DRB1*140101 であり, アジア系 はすべて DRB1*1454 であったことを報告している。 その後の他の報告者も, 韓国人や中国人(漢民族)で は 100%, DRB1*1454 であったと報告しており, ア ジア系の DRB1*140101 であったタイプは DRB1* 1454 である可能性の高いことが予想される。日本に おいて DRB1*140101 は約 3% の頻度で存在するこ とがわかっているが, その調査報告はまだない。そ こで, われわれは現在所有している DRB1*140101 とタイプされた検体に対して, DRB1*1454 の存在 について再検討を行った。

【材料・方法】

検体は, 京阪さい帯血バンクに登録している 279

人の DRB1*140101 とタイプされた DNA サンプル を用いた。

DNA 抽出試薬は, QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社) あるいは QuickGene DNA whole blood Kit (FUJIFILM 社), タイピング試薬は, ジェ ノサーチ HLA-A, B, C, DRB1 (医学生物学研究所) を用いた。さらに DRB1*1454 の確認のため PCR-SSP 法のプライマーを設計し, 検査を実施した。

【結果】

ジェノサーチ HLA-DRB1 (Ver. 2, 2本タイプ) タ イピングキットの中には, DRB3*020201 特異的プ ロープが含まれており, これまでに DRB1*140101 と判定した 279 検体について, 再度このプローブと の反応性を確認したがすべて陽性であり, DRB1* 1454-DRB3*020201 の連鎖が予想された。さらに 279 例の検体について, PCR-SSP法を用いて DRB1* 140101 と DRB1*1454 との判別を行ったが, すべ て, DRB1*1454 という結果であった。よって, 日 本人集団でこれまでに DRB1*140101 とタイプされ ていた検体はすべては DRB1*1454 である可能性の 高いことが予想された。

2. MICA の日本人におけるアリル頻度と HLA-B 座との連鎖不平衡について

○辻野 貴史, 大沼 豪, 二神 貴臣, 小島 裕人, 林 晃司, 楠木 靖史, 吉田 喬,
藤井 直樹, 末上 伸二, 西川 美年子, 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】

MICA 抗体は HLA 抗体と同様に臓器移植時の生着率に關与する重要な non-HLA 抗体のひとつとして考えられている。テラサキらによると、移植患者のうち約 10% が MICA/B 抗体を有しており、HLA 抗体を保有した患者と同様、生着率が悪くなることが報告されている。

そこで我々は、MICA のタイピングを行い、日本人におけるアリル頻度と HLA-B 座との連鎖不平衡の確認をした。今回使用したキットでは検査結果から ambiguity が多く出ることから、家族検体を用いて検査を行い、ambiguity の絞り込みを行った。

【材料・方法】

- ・造血幹細胞移植のドナー検索を目的とした HLA タイピング家系, 81 家系, 324 検体
- ・HLA タイピング方法: Luminex 法 (Lab Type)

【結論・考察】

日本人の MICA アリル頻度として多いものは、MICA*00901/049/(045) (18.5%), MICA*010/054/(016/019/033/056) (18.2%), MICA*01201/(02/03/1801) (15.1%), MICA*00801/04 (13.3%), MICA*00201/020/055 (11.1%) 等があった。

今回の検討で HLA-B 座との連鎖不平衡で報告されてきた MICA アリル型以外のタイプが多数検出されたこと、ときには従来と異なる連鎖が検出されたことから MICA アリル型をタイピング検査無しに推定するのは困難であることがわかった。

また、HLA-B48 には MIC 欠損遺伝子が連鎖すると報告されていたが、今回欠損遺伝子以外に、MICA*00801/04 (0.6%), MICA*010/054 (0.3%) が検出された。

今後更に ambiguity を絞り込む為、SSCP 法によってアリル型を確定できるよう検討をしたい。

MICA アリル頻度

MICA	アリル 個数	アリル 頻度	これまでに報告されている アリル頻度
MICA*00901/049/(045)	60	18.5%	18.4~19.7
MICA*010/054/(016/019/033/056)	59	18.2%	12.5~16.1
MICA*01201/(02/03/1801)	49	15.1%	10.9~14.5
MICA*00801/04	43	13.3%	13.8~14.5
MICA*00201/020/055	36	11.1%	9.9~12.5
MICA*027	32	9.9%	
MICA*004	21	6.5%	8.2~11.1
MICA*016/019/056/(033)	8	1.2%	1.8~3.0
MICA*045	7	2.2%	
deficiency	7	2.2%	1.0~3.8
MICA*00701/026/(045)	2	0.6%	0.9~1.3
総計	324	100.0%	

HLA-B 座との連鎖不平衡

B 座		MICA	Haplotype 個数	Haplotype 頻度	これまでに報告され ているアレル頻度
抗原 型	アレル 型				
B7	*0702	MICA*00801/04	16	4.9%	MIC-A*008
B13	*1301	MICA*045	7	2.2%	MIC-A*007
		MICA*00701/026/045	1	0.3%	
		MICA*00901/049/045	1	0.3%	
	*1302	MICA*00801/04	5	1.5%	
B62	*1501	MICA*010/054/(016/019/033/056)	24	7.4%	MIC-A*010
	*1507	MICA*010/054	2	0.6%	
B75	*1511	MICA*010/054	5	1.5%	
B71	*1518	MICA*016/019/056/(033)	7	2.2%	
B62	*1527	MICA*010/054	1	0.3%	MIC-A*010
B27	*2704	MICA*010/054	1	0.3%	
	*2705	MICA*00701/026	1	0.3%	
B35	*3501	MICA*00201/020/055	21	6.5%	MIC-A*002
		MICA*00801/04	1	0.3%	
B37	*3701	MICA*00801/04	1	0.3%	
B39	*3901	MICA*00801/04	7	2.2%	MIC-A*002
		MICA*00201/020/055	5	1.5%	
		MICA*010/054	1	0.3%	
	*3904	MICA*00201/020/055	1	0.3%	
B60	*4001	MICA*00801/04	10	3.1%	MIC-A*008
		MICA*027	1	0.3%	
B61	*4002	MICA*027	18	5.6%	MIC-A*048
	*4003		1	0.3%	
	*4006		12	3.7%	
B44	*4402	MICA*00801/04	1	0.3%	MIC-A*004
	*4403	MICA*004	21	6.5%	
B46	*4601	MICA*010/054/(016/019/033/056)	23	7.1%	MIC-A*010
	*4602	MICA*010/054	1	0.3%	
B48	*4801	deficiency	7	2.2%	deficiency

		MICA*00801/04	2	0.6%	
		MICA*010/054	1	0.3%	
B51	*5101	MICA*00901/049	18	5.6%	MIC-A*009
B52	*5201		41	12.7%	
B54	*5401	MICA*01201/(02/03/1801)	23	7.1%	MIC-A*012
B55	*5502	MICA*01201/(02/03/1801)	11	3.4%	
		MICA*00201/020/055	3	0.9%	
	*5504	MICA*016/019/056	1	0.3%	
B56	*5601	MICA*01201/(02/03)	2	0.6%	
B58	*5801	MICA*00201/020/055	4	1.2%	
B59	*5901	MICA*01201/(02/03)	13	4.0%	MIC-A*012
B67	*6701	MICA*00201/020/055	2	0.6%	

3. 口腔癌患者における可溶性 MICA, MICB 濃度と病期進行との関連

○玉置 盛浩¹⁾²⁾³⁾, 中西 真理³⁾, 山中 康嗣¹⁾, 川島 渉³⁾, 工藤 利彩³⁾,
森村 佳史³⁾, 桐田 忠昭²⁾, 羽竹 勝彦³⁾, 石谷 昭子³⁾

高清会高井病院口腔外科¹⁾, 奈良県立医科大学口腔外科学講座²⁾, 奈良県立医科大学法医学教室³⁾

【はじめに】 MHC class I chain-related gene A, B (MICA, B) は, NK 細胞などの活性化受容体である NKG2D のリガンドとして, 癌排除免疫の役割を果たしているとされている。しかし, 何らかの癌免疫回避機能により癌細胞上の MICA, B タンパクが血清中に遊離し, その可溶性 MICA, B が NKG2D レセプターをブロックすることで癌の病期進行を促進していると示唆されている。今回我々は, 口腔癌患者について可溶性 MICA, MICB 濃度と病期進行との関連を検討したので報告した。

【対象および方法】 口腔扁平上皮癌と診断した 60 名および健常者 60 名よりインホームドコンセント得て血液を採取し, その血清を用いて ELSA 法により可

溶性 MICA および MICB 濃度の測定を行った。

【結果】 口腔癌患者において可溶性 MICA, B 濃度は, 健常者と比較して有意な上昇を認めなかった。しかし, 癌の病期進行に伴い可溶性 MICA, B 濃度は上昇傾向を認め, 累積生存率は濃度の上昇に伴い低下していた。また可溶性 MICA, B 濃度の上昇に軽度の相関を認めた。

【考察】 本検討では口腔癌患者において可溶性 MICA, B 濃度は必ずしも上昇していなかったが, 病期進行に伴い上昇し, 累積生存率は低下していた。今後は病期進行の予測マーカーとして有用であるかどうか, 症例数を増加させるとともに, 臨床的検討を行い慎重な判断が必要であると思われる。

4. 卵胞液中の HLA-G 抗原について (血清中の HLA-G 抗原測定法の検証)

○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⁾

奈良県立医科大学細菌学¹⁾, 奈良県立医科大学法医学²⁾, 湧永製薬バイオ事業開発部³⁾,
Fred Hutchinson Cancer Research Center⁴⁾

【目的】 HLA-Gは本来、胎盤特異的に発現し、母体免疫を抑制することにより母児免疫寛容に機能すると考えられている。しかし近年、各臓器移植において、移植片の生着とHLA-Gの発現が相関するという報告が多くみられる。これ以外にもHLA-Gが胎盤以外で検出されたとする報告は多い。その中で、我々は、体外受精卵の培養上清中のHLA-Gの発現が着床と相関するという報告について詳細に検討した結果、これらのデータを否定せざるを得なかった。今回は、卵胞液中のHLA-G発現の有無が、良好胚選定に有用であるとする報告を検討するため、卵胞液中のHLA-GおよびHLA-I発現について検討を行ったので報告する。

【方法】 卵胞液199例(内訳:患者6名から27例,患者172名から172例)につき可溶性HLA class I抗原(S・HLA-I)および可溶性HLA-G抗原(S・HLA-G)の濃度をsandwich ELISA法により測定した。さらに、ELISAにより検出された抗原を確認する目的で、Westernblottingを行った。標準物質として、S・HLA-IをIHWのHLA homozygous cell line 09075, 09044, 09031, 09084から、S・HLA-Gを.221-Gsからアフィニティー精製し、作製した。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。Westernblottingにおいては、W6/32あるいは抗HLA-G抗体87GでimmunoprecipitationしたサンプルをWesternblottingし、抗HLA-G抗体4H84あるいは、抗HLA class I抗体B-D11を用いて、S・HLA-GあるいはS・HLA-Iを検出した。

【結果】 患者6名からの卵胞液27例中のS・HLA-G濃度を比較したところ、1患者の各卵胞間卵胞液中のS・HLA-G濃度はほぼ同じであった。患者172名からの卵胞液172例中のS・HLA-GおよびS・HLA-I抗原量を測定した結果、S・HLA-Gは172例中55例に検出され、最も高いもので、1072 ng/mlあった。S・HLA-Iは全ての卵胞液に検出され、平均414±279 ng/mlであった。しかし、卵胞液中のHLA抗原量は、S・HLA-G, S・HLA-Iいずれも妊娠着床の有無で有意な差を認めなかった。次に卵胞液中のS・HLA-GあるいはS・HLA-Iの存在を確認するため、Westernblottingを行ったところ、ELISAの結果と異なっており、S・HLA-Gは全く検出されなかった。一方、S・HLA-IはELISAの結果と一致して、検出された。

【考察】 1患者の各卵胞間卵胞液中のS・HLA-G濃度はほぼ同じであったこと、卵胞液中のHLA抗原量は、S・HLA-G, S・HLA-Iいずれも妊娠着床の有無で有意な差を認めなかったことから、卵胞液中のS・HLA-GあるいはS・HLA-I濃度の比較が、将来、良好胚となりうる卵の選定には不適であると考えられた。

また、ELISAとWesternblottingの結果が、S・HLA-I濃度で一致し、S・HLA-G濃度で一致しなかったことから、今回用いたELISA検出法では、高濃度のタンパク等を含む生体成分中のHLA-Gタンパクは、正確に検出できないということが示された。本法は、血清中にS・HLA-G抗原を検出したとする多くの報告よりも高感度な測定法を使用して

おり、以上の結果は、多くの臓器移植生着と HLA-G (特に血清中の HLA-G 抗原) との相関について再検討する必要性を示している。今後は、血清中の S・

HLA-G 抗原を検出し得る検出系の確立、ならびに、移植生着と S・HLA-G および S・HLA-I について解析を進めていく予定である。

(11:40~12:20)

一般演題 (2)

座長：川西 一信
(近畿大学)

演題番号 5~7

5. LABScreen Single Antigen の反応性 —妊娠免疫 HLA 抗体から見た解析—

○黒田 ゆかり, 小田 秀隆, 浅尾 洋次, 中山 みゆき, 中野 稔,
永吉 裕二, 迫田 岩根, 友成 洋子, 佐藤 博行, 清川 博之

日本赤十字社九州血液センター 技術部

【はじめに】 近年, 蛍光ビーズを用いた HLA 検査法が主流となっている。その中でも単一精製抗原を用いた高感度抗体検査試薬 LABScreen single Antigen (以後 LAB SA) は, 反応した抗体が蛍光値として表される有用な方法であるが, 結果の解釈や Cut Off 値等が問題となる場合がある。今回, 妊娠免疫 HLA 抗体保有血清を用いて LAB SA の反応性を解析した結果, 有用なデータが得られたので報告する。

【対象】 本人 HLA 型が, A24/33, B44/52, Cw12/14 であり, 2 名の子供の HLA 型はいずれも A26/33, B44/62, Cw9/14 の妊娠免疫により産生した HLA 抗体を保有している輸血歴のない健常人血清 1 検体を対象とした。

【方法】 対象血清の LAB SA を実施し, 反応を示した抗原のうち, A11.1, A26, B13, B35, B62, B75 のリンパ球を用いて吸収操作を行い, 各上清における LAB SA の反応性を吸収前の血清の反応性と比較した。なお, 吸収操作に用いた血清は同量にし, リンパ球は同程度のカウント数とした。

【結果】 対象血清の LAB SA においては, A26, B62 およびその交差反応抗原に反応を認めた。A26/- B62/- Cw9/- のリンパ球による吸収後の血清では, ほぼ全ての反応抗原において吸収が認められ, A26 単独では A Locus の反応抗原全体が, B62 単独および B75 単独では B Locus の反応抗原全体が吸収され, それ以外のリンパ球による吸収後の反応性は, A11.1 では A Locus の一部が, B13 では B Locus の一部が, B35 では B13 と異なる B Locus の一部が吸収された。

【考察】 LAB SA の反応には, 抗体の交差反応が関与していることから, LAB SA の対応抗原の蛍光値と抗原抗体反応の強さとは, 相関しない場合があることが示唆された。それぞれの反応性は抗体の持つエピトープに起因し, 対応抗原の蛍光値が低い抗体であっても広範囲に交差反応性を認める場合には, 強い抗原抗体反応を示す可能性が高く, 安易な Cut Off 値の設定は危険であると考えられる。

6. BMT 後, ドナー由来 HLA 抗体により 血小板輸血不応となった一例

○万木 紀美子¹⁾, 芦原 英司¹⁾, 菱澤 方勝²⁾, 菱田 理恵¹⁾, 丹羽 紀実¹⁾, 竹川 良子¹⁾,
西澤 正俊²⁾, 近藤 忠一²⁾, 平位 秀世¹⁾, 石川 隆之²⁾, 前川 平¹⁾

京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部¹⁾, 京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科²⁾

【はじめに】 同種造血幹細胞移植や固形臓器移植後, ドナー由来の B 細胞により産生された赤血球抗体により溶血性貧血を発症することが報告されている。今回我々は BMT 後にドナー由来の B 抗体により溶血性貧血を発症し, 同時期に血小板輸血不応状態をきたした患者よりドナー由来の HLA 抗体を検出したので報告する。

【症例】 61 歳, 男性 (B 型 Rho 陽性)。2007 年 12 月に MDS (RAEB-1) と診断。2009 年 8 月 7 日 HLA-DR アリルレベル 1 座不一致の骨髓バンクドナー (O 型 Rho 陽性) より BMT を施行。Day+12 より溶血性貧血を発症し, 時期を同じくして血小板輸血不応状態となった。

【方法】 Day+4 および血小板輸血不応状態となった day+12, day+41 の患者血清において Luminex 法にて HLA 抗体の測定を行った。また, 溶血の原因となった B 抗体と, 溶血には関与しないが A 抗体の力価の推移を BMT Day-4~+50 の間測定した。

【結果】 Day+4 では HLA 抗体陰性であったが, day+12 には高力価の HLA 抗体を検出し, day+41 には高力価かつ新規の HLA 抗体が確認された。B 抗

体は Day+12 に検出され Day+30 にはほぼ消失した。A 抗体は患者本来の力価に比べ Day+10 より上昇が認められ Day+20 にピークとなり Day+50 においても力価の低下は殆ど認められなかった。

【考察】 患者は輸血歴が無く, day+4 での HLA 抗体は陰性で血小板輸血効果があり, day+12 に検出した HLA 抗体はドナー由来の抗体と思われる。また, 患者 B 型赤血球の溶血を引き起こしたドナー由来の B 抗体は day+41 には検出限界にまで低下した。しかし HLA 抗体は day+41 にさらに広範囲に反応するようになっていた。B 抗体は患者血球や組織に発現する B 抗原により消費され減少したと思われるが, HLA 抗体は長期にわたり残存するものと考えられた。本症例ではドナー B リンパ球の活性化により生着前の血小板補充療法が必要な時期に HLA 抗体が産生されランダム血小板の輸血効果が得られなくなった。移植後にドナー由来の赤血球抗体や血小板抗体が産生された報告は認めるが, HLA 抗体が産生された報告はなく, ドナー由来の HLA 抗体が出現する可能性についても注意を払うことが必要と思われる。

7. 同種造血幹細胞移植後，ドナー由来および輸血由来の HLA 抗体が検出された一例

○小田原 聡一¹⁾，谷口 享子¹⁾，吉原 哲¹⁾，池亀 和博¹⁾，海田 勝仁¹⁾，
岡田 昌也¹⁾，小川 啓恭¹⁾，丸屋 悦子²⁾，佐治 博夫²⁾

兵庫医科大学血液内科¹⁾，HLA 研究所²⁾

【症例】 34歳女性。2008年12月24日に急性リンパ性白血病を発症（MLL-AF4融合遺伝子），化学療法抵抗性であったため，HLA半合致移植目的で兵庫医科大学血液内科紹介入院となった。2009年5月22日にHLA2座不一致の娘より同種末梢血幹細胞移植を施行。移植前検査でレシピエントにClassI，ClassIIに対するHLA抗体が検出され，ClassIIはDSAであったため，抗体の除去目的で移植前day-18よりBortezomibを投与した。これによる，抗体強度の低下は軽度にとどまった。移植後好中球は速やかに生着（day12）し，急性GVHDはgradeI（皮疹と下痢）と軽度であったが，day60の骨髄検査でMLL-AF4の融合遺伝子が検出され，白血病細胞の残存が確認されたため，2009年8月3日にHLA1座不一致の同胞より同種末梢血幹細胞移植を施行。好中球は速やかに生着（day12）したが，GVHDとしての重度の角膜上皮細胞障害と口腔粘膜障害が出現し治療に難

渋した。移植後の患者血清中のHLA抗体を確認したところ，移植前より患者自身が有していたHLA抗体に加えて，second donorがもつHLA抗体が移植後2週目より強く検出され，またこれらは長期にわたり残存した。ドナー由来のHLA抗体はその後緩やかに減少していったが，それに伴い角膜上皮細胞の炎症や口腔粘膜障害の炎症は沈静化した。さらに，輸血由来と考えられるHLA抗体の一時的な出現を観察した。

【考察】 造血幹細胞移植後のドナー由来HLA抗体の動態については現在まであまり報告されておらず，またこれらがレシピエントの生体内において免疫系にどのように関与するのかあまり知られていない。本症例ではドナー由来のHLA抗体がGVH反応に寄与している可能性が示唆され，今後ドナー由来HLA抗体に注目していく必要があると考えられ，文献的考察を加えて報告する。

(13:50~16:00)

シンポジウム

『臓器移植の将来の展望 —HLA の医療への関与—』

座長：谷 慶彦 (大阪府赤十字血液センター)
芦田 隆司 (近畿大学)

- 1) 最近の腎移植における HLA の意義
大阪中央病院 泌尿器科 市丸直嗣
- 2) 肝臓移植
朝日大学歯学部附属村上記念病院 外科 江川裕人
- 3) 心臓移植と HLA
大阪大学医学部附属病院 移植医療部 福寫教偉
- 4) 造血幹細胞移植
京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科 一戸辰夫
- 5) ペプチドワクチン —WT1 ペプチド癌ワクチンをモデルとして—
大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学 岡 芳弘

1. 最近の腎移植における HLA の意義

市丸 直嗣¹⁾³⁾, 高原 史郎²⁾

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 (泌尿器科)¹⁾,
大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学²⁾, 大阪中央病院泌尿器科³⁾

臓器移植において臓器不足の問題は年々世界中で顕在化してきており, ドナーの掘り起こしや適応拡大が試みられている。本邦では 1989 年から本格的にスタートした ABO 不適合腎移植領域においては, ABO 血液型と腎移植後拒絶反応のメカニズムの解明やその対策が精力的に行われた結果, 現在では ABO 不適合腎移植における拒絶反応はほぼ克服され, ABO 適合腎移植と移植腎生着率は遜色ない。そして本邦では生体腎移植のうち約 2 割が ABO 不適合腎移植となるほど急速に普及し, 日本は世界最多の ABO 不適合腎移植実施国となった。

ABO 不適合腎移植の場合とは異なり, 抗 HLA 抗体による抗体関連型拒絶反応は現在でも移植腎生着率に大きく影響する重要な課題である。臓器移植後の拒絶反応における HLA の重要性は移植臓器により異なるが, 腎移植領域では従来から HLA の拒絶反応における役割は非常に重要であることが知られていた。近年の抗 HLA 抗体検査の進歩により従来では検出できなかった微量な抗体の有無が検出できるようになり, また single antigen まで抗体検査が詳細にできるようになってきた。その結果, 従来は原因不明

の拒絶反応あるいは移植腎機能低下とされた症例の中で, 抗 HLA 抗体による拒絶反応の症例が多く含まれていることがわかってきた。

本邦の通常の腎移植においては, 超急性拒絶反応の回避を目的として腎移植前に抗 HLA 抗体を一度調べるのみである。腎移植後の抗 HLA 抗体検査には保険適応がないため, 移植後に産生される抗 HLA 抗体については十分な検討がなされていない。当科において腎移植後に新規に産生される抗 HLA 抗体 (*de novo anti-HLA antibody*) の頻度を検討した結果, 腎移植後 1 年の時点で 10% 強の患者に *de novo anti-HLA antibody* が産生されていた。また腎生検で慢性拒絶反応が証明された患者の多くで, 抗 HLA 抗体の関与が示された。

今後の腎移植において, 腎移植前だけでなく腎移植後の抗 HLA 抗体の制御はますます重要になってくると思われる。従来の血漿交換や IVIG に加えて, リツキシマブやボルテゾミブなど新規薬剤の使用経験も徐々に報告されるようになってきた。腎移植における近年の抗 HLA 抗体対策についてもその概略を述べる予定である。

2. 肝臓移植

江川 裕人

朝日大学村上記念病院 外科

肝臓移植における HLA の意義は生体肝移植において一層重要となる。血縁特に親子間の臓器提供においては、ドナーの HLA がホモである場合に GVHD が合併する危険がある。拒絶反応は生じないので術後早期は肝機能は安定するがその後免疫抑制が減量される時期に発症する。救命はきわめて困難であり、予防が最善の策である。原則禁忌としている。脳死移植ではまず起こりえないことで日本の脳死移植においてもドナーの HLA 検査は必須ではない。しかし、今回の脳死移植法改正において親族への優先提供が行われることになり、GVHD 予防のために HLA をしらべてホモの場合は提供しないことになっている。次に問題となるのがドナーに対する抗 HLA 抗体である。欧米ではいわゆるクロスマッチ陽性が肝移植に及ぼす意義について一定した見解がなかった。生体肝移植では胆道閉鎖症症例が主な対象であった時代は明らかな影響を認めなかったが、成人症例が増え且つ手術手技が安定し外科的な合併症がほぼ克服されるようになると抗 HLA 抗体の影響が浮き上

がってくるようになった。これまでに京都大学から術前クロスマッチ陽性が術後生存率あるいは在院死亡率に有意に影響することが報告された。シングルビーズ法により HLA 抗体の質と量を定量的に評価することが可能になり、今後、脳死移植のシステムにも組み込んでいく必要があると考える。ただ、生体肝移植では夫に妻が臓器提供する場合、妊娠により感作されていることが多く、さらに疾患が原発性胆汁性肝硬変のように自己免疫疾患の場合その危険は一層高まる。この場合子供も当然父親の HLA を半分受け継ぐので注意が必要である。さらに術後も抗ドナー抗体が陽性になることがある。小児における術後クロスマッチ陽性症例の肝生検標本の組織免疫学的検討から特有の組織所見と予後との因果関係が明らかとなり術前検査のみならず術後のフォローも重要と考えられた。さらに、長期成績向上のためには、術前・術直後だけでなく、長期経過例における抗 HLA 抗体の研究が重要となる。

3. 心臓移植と HLA

福寫 教偉

大阪大学移植医療部

一般に急性拒絶反応といえば細胞性拒絶反応をさすが、心移植の場合、液性因子である抗体が移植心を障害する抗体媒介拒絶反応 (antibody mediated

rejection; AMR) も稀ではない (約 3-15%)。

AMR はドナー抗原 (多くは組織適合性抗原: HLA) に対する抗体、マクロファージや細胞障害性

Tリンパ球が移植心の毛細血管を傷害することにより発症し、わが国で心臓移植を受けた69例中5例に発症している。わが国の心臓移植の場合には、待機期間が長く、左心補助人工心臓(LVAS)装着歴、開心術歴、輸血歴がある患者が多い。そのため移植前に、自己以外のHLAを初めとする様々な抗原に接触し、抗HLA抗体などを持っている症例が多い。そのため待機中に、他人のリンパ球と患者血清を反応させ、何%の人のリンパ球に対して殺傷性を持つか(Panel reactive antibody (PRA) 検査)を行っている施設が多い。移植前にPRAの高い症例は、たとえドナーとの交差試験が陰性でも、AMRを発症しやすいといわれているので、AMRを念頭に置いた移植後管理が重要である。AMRは移植心冠動脈硬化症(Tx-CAD)の頻度を増加させるという報告も多く、遠隔期まで注意深い観察が必要である。

細胞性拒絶反応の診断基準は、国際心肺移植学会(ISHLT)が推奨する組織学的診断基準を用いているが、AMRは診断が難しく、施設によって違っている。一般的には虚血の影響が取れた以降に血行動態が破綻するような心不全をきたした場合に、ISHLTの示すような組織学的所見が認められた場合にAMRと診断される。

組織学的には、心筋生検のHE染色で血管内皮細胞の膨化、血管周囲の浮腫、細胞浸潤を認めるが、HE染色のみで判定することは困難である。免疫組織学的に、ヒトIgG, IgM, C3, C4などの補体を染色

すると、血管・心筋細胞が染色されることもあるが、必ずしも染色されるとは限らない。近年他の臓器の移植と同様、C4d, C3d, C1qの染色や、CD68陽性マクロファージが有用であると報告され、HE所見と免疫染色を用いたAMRの診断基準が提案された。ドナーリンパ球をドナー心摘出時に採取した場合には、ドナーリンパ球を用いてflowcytometryを行うことにより、患者血清にドナー特異的抗体があるか否かを同定可能である。ドナーリンパ球がない場合には、移植後にPRA検査を行い、PRA値が高値になっている場合が多いので、その値を参考にしながら診断・治療を行う。

AMRを発症した場合には、細胞性拒絶反応の場合とは異なり、ステロイドパルスや抗胸腺細胞抗体製剤が無効である場合が多い。従って移植後急性期に心機能低下・心嚢液貯留があり、心筋生検で細胞性拒絶反応を疑わせる所見が見られない場合には、液性拒絶反応を考えて、血漿交換を行うべきと考える。一般的にはアルブミン製剤で血漿を置換するが、止血機能などが不良な場合には新鮮凍結血漿を用いる。これと同時に抗体産生を抑制するために、ステロイドパルスや抗胸腺細胞抗体製剤を併用することが多い。これでも無効な場合には、抗CD20抗体製剤¹²⁾やシクロフォスファミド(CP)を使用する場合もある。

シンポジウムにおいては、事例を交えてAMRについて説明する予定である。

4. 造血幹細胞移植

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

造血幹細胞移植におけるHLA適合性の臨床的意義に関しては、これまで多くのことが語られてきた。しかし、HLAはT細胞による自己・非自己の識別目印として機能するのみならず、液性免疫応答の標的

種抗原でもあり、同時にNK細胞の機能調節にも関与していることを想起すると、造血細胞移植におけるHLAのまだ十分に解明されていない一面が浮かび上がってくる。

最近となって、さい帯血移植・HLA 半合致移植などの HLA 不適合幹細胞ソースの利用機会の増加に伴い、造血細胞移植領域においても、HLA その他の同種抗原に対する液性免疫応答の臨床的意義への関心が高まりつつある。また蛍光ビーズ法などのハイスループット解析技術の普及に伴い、HLA 抗体陽性のレシピエントに対しても事前に HLA 抗体の特異性を検索しておけば、virtual crossmatch によって HLA 抗体との反応性を有しないと推測される幹細胞ソースを選択することが可能になっている。一方、移植後には、ドナー免疫担当細胞に由来する HLA 抗体の産生が見られることが知られているが、その臨床的意義についてはほとんど明らかにされていない。

NK 細胞受容体としての HLA の役割に関しては、近年、特に HLA-C に焦点を当てた多くの研究が行われている。これまでに得られている知見に基づくと、十分なコンセンサスの形成には至っていないものの、KIR2DL リガンドとしての HLA-C の不適合

は、T 細胞が稀少な環境では GVL 効果に寄与する可能性があるものの、T 細胞除去を用いない一般的な骨髄移植においては、むしろ急性 GVHD の増悪因子になることが知られるようになりつつある。一方、KIR2DL と並ぶ主要な NK 細胞抑制性受容体である CD94/NKG2A は、非古典的 HLA クラス I 分子である HLA-E をそのリガンドとする。HLA-E は古典的 HLA クラス I 分子と異なり、 $\alpha 2$ 領域に存在する 107 番目のアミノ酸置換 (Arg・Gly) 以外の多型には著しく乏しく、最近、レシピエントの HLA-E 遺伝子型が HLA-E*0103 (Gly107) の homo 接合である場合、急性 GVHD の発症リスク並びに治療関連死亡のリスクが低下するという興味深い報告が複数のグループから行われている。

これらの新知見を通じて、造血幹細胞移植のドナー選択における HLA 領域遺伝子の適合性への配慮はますます重要性を増しており、さらなる臨床データの蓄積と解析が求められている。

5. ペプチドワクチン —WT1 ペプチド癌ワクチンをモデルとして—

岡 芳弘

大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学

癌細胞内に存在する癌抗原はプロセッシングと呼ばれるメカニズムによりペプチドに断片化され、HLA class I 分子と結合し「ペプチド/HLA class I 分子」複合体として癌細胞表面に提示される。その「ペプチド/HLA class I 分子」複合体は、その複合体を特異的に認識する T 細胞レセプター (TCR) を持つ CD8 陽性細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) に認識され攻撃され得る。これが腫瘍免疫による腫瘍攻撃の原理であり、また、癌ワクチンとは、腫瘍抗原由来ペプチドを投与することによりこの抗腫瘍免疫反応を誘起するものである。し

たがって、ペプチド癌ワクチンのデザイン・創薬には、それぞれの HLA class I 分子に結合し細胞表面に提示される癌抗原ペプチドを同定することが必須となる。

一方、我々は、WT1 遺伝子 (Wilms' tumor gene) 産物である WT1 タンパクを標的とした抗腫瘍免疫療法、つまり WT1 ペプチド癌ワクチン療法の開発を、世界に先駆けてすすめてきた。WT1 遺伝子は、①癌遺伝子としての機能を持ち癌の形成や癌細胞の機能維持に重要な働きを果たすこと、および、②多くの種類の悪性腫瘍で発現がみられること、により、す

ぐれた癌抗原と考えられる。現在までに、我々を含めたいくつかの研究室により、HLA-A*2402 (日本人に最多の HLA class I タイプ) や HLA-A*0201 (白人に最多の HLA class I タイプ) などに結合する WT1 ペプチドが同定されている。そして、実際に臨床試験として WT1 ワクチンが種々の癌患者に投与され、腫瘍縮小や長期生存などの臨床効果が示されて

いる。

今回機会をいただいた発表では、WT1 ワクチンをモデルとしたペプチド癌ワクチンの考案やその作用メカニズムを述べ、さらに、実際に WT1 ワクチンにより治療された癌患者の臨床効果やそれのもとになる WT1 特異的免疫応答の誘起についても自験例を中心に提示したい。

(16:10~17:10)

特別講演

座長：永尾 暢夫
(神戸常盤大学)

『疾患と HLA: ゲノム全域探索の視点から』

徳永 勝士
東京大学医学系研究科人類遺伝学分野

疾患とHLA: ゲノム全域探索の視点から

徳永 勝士

東京大学医学系研究科人類遺伝学分野

近年、ゲノム全域に分布する数十万種ものSNPsを並列解析する技術の出現などにより、さまざまな多因子病の発症や重症化に関わる遺伝子、あるいは薬剤・治療応答性に関わる遺伝子の解明が加速化されている。代表的な過眠症であるナルコレプシーについて、我々はゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施し、まず6番染色体上のHLA領域、特にHLA-DQB1遺伝子近傍SNPsの極めて強い関連($p < 10^{-45}$)を確認し、また新規感受性領域CPT1B/CHKBを同定した(Miyagawa *et al.* Nat Genet 2008)。さらにMignotらの国際共同グループによるGWASに参加し、新規感受性遺伝子T cell receptor α (TCRA)を報告した(Hallmayer *et al.* 2009)。類縁疾患である真性過眠症(essential hypersomnia)においても、HLAとCPT1B/CHKBがともに関連することや(Miyagawa *et al.* PLoS ONE 2009)、HLAとTCRAの相互作用(Miyagawa *et al.* J Hum Genet 2009)を見出した。これらの結果は、自己免疫など少なくとも2つの経路が発症に関与することを示唆する。

我々はまた、日本糖尿病学会1型糖尿病部会においてGWASを実施しており、HLA領域との強い関

連($p < 10^{-10}$)を認めた。現在HLA以外の感受性遺伝子の同定を目指して2次スクリーニングを実施中である。急性型、緩徐進行型、劇症型の3つの臨床亜型に分け、HLA遺伝子群およびHLA領域のnon-HLA遺伝子群について関連解析した結果も紹介したい(Kawabata *et al.* Diabetologia 2009)。昨年、東大医科研グループがB型慢性肝炎とHLA-DPA1/-DPB1の関連を報告した(Kamatani *et al.* Nat Genet 2009)。我々も肝炎の多施設共同研究班においてGWASを担当しており、同様の結果を得てさらに詳細な解析を続けている。

我々も参加したPan Asian SNP Consortiumがアジアの73集団、約1,900人について5万種余りのSNPsを解析した結果、これらの集団の遺伝学的関係が民族学・言語学的分類および地理学的分布とよく対応することや、東南アジアから東アジアへ向かう遺伝的多様性の勾配が明らかとなった(Science 2009)。これまでに報告してきたアジア諸集団におけるHLA遺伝子群の多型解析結果とも比較してみた。

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

I. 投稿について

内容: MHCに関する基礎研究から臨床研究まで全てを対象にし、未発表の論文、他誌に投稿中でないものに限る。

資格: 著者(共著者を含む)は原則として本学会会員に限る。

倫理: ヒトおよびヒトの試料を用いた臨床研究・基礎研究の場合、1980年ヘルシンキ宣言(第18回 World Medical Assemblyにて採択)に基づくと共に、当該施設の倫理委員会の承諾を得たものでなければならない。また動物を用いた研究については「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」(1980年日本学術会議決議)などを遵守し行われた研究でなければならない。

種類: 原著、総説、シリーズ、短報(研究速報、技術速報などを含む)、症例報告などとし、日本語、英語を問わない。

審査: 投稿論文掲載の採否は当誌編集委員会において決定し、審査は複数の査読制で行う。審査の結果を踏まえ修正、削除、加筆などをお願いする場合がある。

著作権: 本誌に掲載された論文などの著作権は日本組織適合性学会が有し、インターネットを通じて電子配信されることがある。

掲載料: 掲載は無料であるが、カラー写真など特別印刷に関わる経費は著者の実費負担とする(カラー印刷を希望の場合にはその旨明記)。

別冊: 別冊は有料とし、その経費は別冊部数やページ数による(別冊希望の場合は著者校正の際にその旨明記)。

II. 原著執筆書式

1. 執筆要項

400字詰め原稿用紙換算で30枚(刷り上がり12頁程度)以内とする。図、表、写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文はMicrosoft Wordで作成し、

図、表、写真はMicrosoft PowerPointを使用する。原稿は全てCD-ROMに保存し、CD-ROMにA4サイズでプリントアウトした原稿3部を添えて編集長宛に送付する。

2. 第1頁目

表紙とし「原著」を明記し、日本語と英語でタイトル、著者全員の氏名と所属を記し、脚注として連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、E-mailアドレスを記載する。タイトル、著者名、所属は下記の形式に従う。

Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia in the HLA class II region: correlations with Y chromosome microdeletion and spermatogenesis. Tetsuya Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

- 1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan
- 2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan
- 3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

心移植におけるFlowPRA法を用いた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) 国立循環器病センター再生医療部
- 3) 国立循環器病センター臓器移植部

3. 本文—1: 日本語での投稿

• 2頁目に400 words以内の英文要旨(和文要旨必要なし)、日本語および英語のキーワード(5語以内)を記載する。尚、英文要旨作成については編集委員会

による対応も可能(希望の場合, 400字以内の日本語要旨を記載しその旨明記)。

• 3頁目より, 「はじめに」, 「材料と方法」, 「結果」, 「考察」, 「引用文献」の順に記載する。

- ① 専門用語以外は常用漢字, 新かなづかいに従い記述する。
- ② 本文中の英単語は固有名詞を除き全て小文字で統一する。
- ③ 地名, 人名, 学名は原語のまま用い, 薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ④ 単位, 数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, $^{\circ}$ C など) を, 数字はアラビア文字を用いる。

4. 本文-2: 英語での投稿

• 2頁目に 250 words 以内の要旨, キーワード(5語以内)を記載する。

• 3頁目より, 「Introduction」, 「Materials and Methods」, 「Results」, 「Discussion」, 「References」の順に記載する。

- ① 地名, 人名, 学名は原語のまま用い, 薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ② 単位, 数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, $^{\circ}$ C など) を, 数字はアラビア文字を用いる。

5. 引用文献

引用文献は本文中の引用箇所の右肩に片カッコ付きで番号を付し, 引用順に一括し記載する。著者名, 編集者名は筆頭者から3名まで列記し, 他または et al. とする。

1. Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, *et al.*: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adreno-medullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* (127): 233-238, 2005.
2. Tongio M, Abbal M, Bignon JD, *et al.*: ASH#18: HLA-DPB1. *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication* (ed. Charron D), Medical and Scientific International Publisher, p. 134-

136, 1997.

3. 難波行臣, 今尾哲也, 石黒 伸 他: 既存抗体陽性生体腎移植後に生じた抗体関連型拒絶反応に対して血漿交換および免疫グロブリン大量療法 (IVIG) が奏効した1例. *血管外科* 17: 36-40, 2005
4. 佐田正晴, 高原史郎: 腎移植—組織適合と拒絶反応. 新図説泌尿器科学講座 6 「腎疾患, 神経泌尿器科, 老年泌尿器科」(吉田 修 監), Medical View 社, p. 120-125, 2000.

III. 短報(研究速報, 技術速報などを含む), 症例報告執筆書式

1. 執筆要項

400字詰め原稿用紙換算で15枚(刷り上がり6頁程度)以内とする。図, 表, 写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文は Microsoft Word で作成し, 図, 表, 写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は全て CD ロムに保存し, CD ロムに A4 サイズでプリントアウトした原稿3部を添えて編集長宛に送付する。

2. 第1頁目

表紙とし「短報」「症例報告」を明記し, 日本語と英語でタイトル, 著者全員の氏名と所属を記し, 脚注として連絡責任者の住所, 氏名, 電話, FAX, E-mail アドレスを記載する。タイトル, 著者名, 所属は「原著」の形式に従う。

3. 本文(日本語および英語での投稿)

- 2頁目に, 英文要旨(200 words 以内), キーワード(3語以内)を記載。
- 3頁目以降は, 原著執筆書式3.の3頁目以降に準じる。

IV. 総説, シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが, 会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。総原稿枚数は編集委員会指定し, 原則的に原著執筆書式に準じる。

V. 原稿送付先

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

大阪大学大学院医学系研究科 J8

先端移植基盤医療学

日本組織適合性学会誌 MHC

編集長 高原 史郎

担当 谷本 佳澄 <E-mail: tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp>

Tel: 06-6879-3746 Fax: 06-6879-3749

	総原稿枚数 (図表, 文献含む)	図表数	文献数	要旨	原稿タイトル 所属, 著者	キーワード 数	査読	著者 校正
原著	30 枚以内	5~10 個 以内	20 個以内	英文原著 英文 250words 以内 和文原著 英文 400words 以内	和英併記	5 個	有り	1 回
短報, 症例報告	15 枚以内	5 個以内	10 個以内	和文, 英文とも英文 200 words 以内	和英併記	3 個以内	有り	1 回
総説, その他	その都度指定	適宜	20~30 個前後	和文 400 字以内	和英併記	5 個	なし	1 回

編集後記

2010年度第1号のMHCをお届けいたします。

今回は基礎と臨床の相互理解を深めるためのMHC誌総説シリーズをお休みさせて頂いております。そして、以前佐治先生がこの編集後記に原著の少なさを残念に思われている旨を書かれておられましたが、今回は久しぶりに原著を掲載しております。

ところで、学会ホームページに学会事務センター破産の経緯についての「報告書」が掲載されており、興味深く読ませていただきました。一部専務理事や専務常務のやりたい放題、これに対するチェック機能が無いことが問題の根源でした。また、刑事事件としての立件には時効の壁があり、困難であることが報告されておりました。

現在の学会支援機構には堅実な活動を期待しています。

第19回日本組織適合性学会が徳永勝士先生を大会長として東京で開催されます。「多様性の医科学」をテーマにMHC研究の基礎から臨床まで多様な視点からの最新の成果が発表されるとお聞きしております。

基礎研究、技術、臨床それぞれに携わる人たちの熱意が感じられ、楽しみにしております。

難波 行臣

「MHC」バックナンバー

一冊 ¥2,000にて購入できます。学会事務局までお問い合わせ下さい。なお在庫僅少の号もありますので、万一品切れの際にはご容赦ください。

入・退会、所属・住所・連絡メールアドレス変更

各種の申請は、学会事務局で受け付けます。

日本組織適合性学会事務局

〒113-8510

東京都文京区湯島 1-5-45

医歯学総合研究棟 (II) 22F

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

分子病態分野 内

電話 03(5803)4906

FAX 03(5803)4907

電子メール jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報やHLA遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>

<http://jshi.umin.ac.jp/mhc.html>

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2010年4月30日発行 17巻1号, 2010

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会(会長 木村 彰方)

編集 日本組織適合性学会編集委員会(編集担当理事 高原 史郎)

平成8年7月24日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会(事務局担当理事 木村 彰方)

〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 医歯学総合研究棟 (II) 22F

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内

印刷・研究社印刷株式会社

〒352-0011 埼玉県新座市野火止 7-14-8