

# 第9回日本組織適合性学会近畿地方会 抄 録 集

会 期：2011年2月5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：永尾 暢夫  
神戸常盤大学 保健科学部医療検査学科  
〒653-0838 神戸市長田区大谷町2丁目6-2  
TEL：078-611-1821 FAX：078-643-4361  
E-mail：n.1121nagao@kobe-tokiwa.ac.jp

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

## 【参加費】

1. 正会員：2000円
2. 学 生：1000円(学生証提示)
3. 世話人：3000円

全て懇親会費も含まれます。

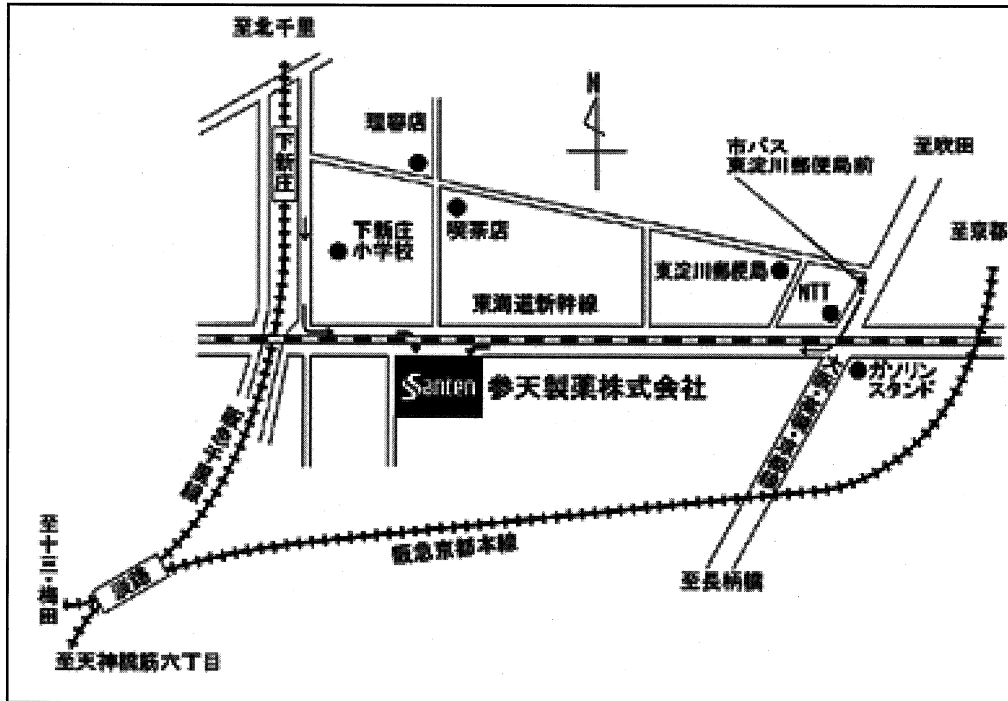
## 【会議等】

1. 世話人会：12時00分～13時00分
2. 総 会：13時00分～13時20分
3. 意見交換会：17時00分～

【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時30分

受付開始

10時00分～10時30分

オープニングセミナー

座長 谷 慶彦 (大阪府赤十字血液センター)

「新しいHLA適合血小板関連検査法の紹介」

高陽淑 (大阪府赤十字血液センター 検査三課)

10時40分～11時20分

一般演題 (1)

座長: 佐藤 壯 (札幌北榆病院)

1. 蛍光ビーズ法 (Luminex 法) における dithiothreitol 処理 (DTT) の影響について  
○大沼 豪<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 吉原 哲<sup>2)</sup>, 谷口 享子<sup>2)</sup>, 小川 啓恭<sup>2)</sup>  
特定非営利活動法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, 兵庫医科大学附属病院<sup>2)</sup>
2. LABScreen Single Antigen におけるプロゾーン現象への補体の関与  
○黒田 ゆかり<sup>1)</sup>, 小田 秀隆<sup>1)</sup>, 浅尾 洋次<sup>1)</sup>, 中山 みゆき<sup>1)</sup>, 平田 康司<sup>2)</sup>, 井上 純子<sup>1)</sup>,  
永吉 裕二<sup>1)</sup>, 大熊 重則<sup>2)</sup>, 迫田 岩根<sup>1)</sup>, 友成 洋子<sup>1)</sup>, 佐藤 博行<sup>1)</sup>, 清川 博之<sup>1)</sup>  
日本赤十字社九州血液センター 技術部<sup>1)</sup>,  
岡山県赤十字血液センター 検査課<sup>2)</sup>
3. HLA 抗体検査に使用する血漿と血清の測定値の違いについて  
○藤井 直樹<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 吉原 哲<sup>2)</sup>, 谷口 享子<sup>2)</sup>, 小川 啓恭<sup>2)</sup>  
特定非営利活動法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, 兵庫医科大学附属病院<sup>2)</sup>
4. DSA 陽性 HLA ミスマッチ造血幹細胞移植における IgG 型及び IgM 型抗体について  
○林 晃司<sup>1)</sup>, 藤井 直樹<sup>1)</sup>, 大沼 豪<sup>1)</sup>, 吉原 哲<sup>2)</sup>, 谷口 享子<sup>2)</sup>, 吉田 喬<sup>3)</sup>, 丸山 裕之<sup>3)</sup>,  
石山 賢一<sup>4)</sup>, 萬納寺 聖仁<sup>5)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 小川 啓恭<sup>2)</sup>  
特定非営利活動法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, 兵庫医科大学附属病院<sup>2)</sup>,  
富山県立中央病院<sup>3)</sup>, 高槻赤十字病院<sup>4)</sup>, 川崎医科大学附属病院<sup>5)</sup>

11時20分～12時00分

### 一般演題(2)

座長: 荒木 延夫(兵庫県赤十字血液センター)

5. 患者がHLA抗体を保有した生体肝移植症例

○山岡 学<sup>1)</sup>, 大西 修司<sup>1)</sup>, 山本 菜美<sup>1)</sup>, 井上 まどか<sup>1)</sup>, 寺島 由香利<sup>1)</sup>, 大西 哲司<sup>1)</sup>, 阿部 操<sup>2)</sup>,  
森 眞一郎<sup>1)</sup>, 野村 昌作<sup>1)</sup>  
関西医科大学附属枚方病院 輸血部<sup>1)</sup>, 関西医科大学香里病院 臨床検査部<sup>2)</sup>

6. 血小板輸血における患者抗HLA抗体と非溶血性輸血副作用の関係

○荒木 延夫, 坊池 義浩, 馬淵 理  
兵庫県赤十字血液センター

7. 口腔内粘膜細胞検体の保存方法の検討

○末上 伸二, 大沼 豪, 二神 貴臣, 小島 裕仁, 辻野 貴史, 林 晃司, 吉田 喬, 藤井 直樹,  
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

8. 造血幹細胞移植後に体細胞の一部がドナータイプに置き換わった一例

—検査に与える影響も含めて—

○小島 裕人<sup>1)</sup>, 浜之上 聡<sup>2)</sup>, 二神 貴臣<sup>1)</sup>, 辻野 貴史<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 楠木 靖史<sup>1)</sup>, 吉田 喬<sup>1)</sup>,  
藤井 直樹<sup>1)</sup>, 末上 伸二<sup>1)</sup>, 西川 美年子<sup>1)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 赤座 達也<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>  
特定非営利活動法人HLA研究所<sup>1)</sup>, 神奈川県立こども医療センター<sup>2)</sup>

12時00分～13時00分

### 昼食・世話人会

13時00分～13時20分

### 総会

13時30分～15時30分

## シンポジウム

### 「臓器移植の最近の話題」

座長 一戸 辰夫 (京都大学医学部附属病院)  
岡 芳弘 (大阪大学大学院医学系研究科)

- 1) 造血幹細胞移植における KIR 適合性  
一戸辰夫 (京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科)
- 2) HLA 半合致造血幹細胞移植について  
池亀和博 (兵庫医科大学血液内科)
- 3) iPS 細胞による再生医療の現状と展望 —iPS 細胞バンクについて—  
木村貴文 (京都大学 iPS 細胞研究所・規制科学部門)
- 4) 腎移植と HLA  
橋本光男 (県立西宮病院・腎疾患総合医療センター)
- 5) がん免疫応答解析における HLA 型解析の重要性  
西川博嘉 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

15時30分～15時40分

## 休憩

15時40分～16時40分

## 特別講演

座長 永尾 暢夫 (神戸常盤大学保健科学部)

### 「次世代シーケンサーを用いた HLA 領域のリシーケンシングによる多型解析」

猪子 英俊 (東海大学医学部基礎医学系分子生命科学)

17時～

## 懇親会

(10:00~10:30)

## オープニングセミナー

座長 谷 慶彦 (大阪府赤十字血液センター)

### 「新しい HLA 適合血小板関連検査法の紹介」

高 陽淑

大阪府赤十字血液センター 検査三課

# 新しいHLA 適合血小板関連検査法の紹介

高 陽淑

大阪府赤十字血液センター 検査三課

## 【背景】

患者の血小板数をコントロールすることは、血小板減少を伴う血液疾患や悪性腫瘍の化学療法等において非常に重要な要素である。しかし、輸血や母児不適合等でHLA抗体を産生した輸血患者においては血小板輸血の効果がなくなるケースも散見されてきた。

一方、1986年から全国の赤十字血液センターにおいて成分献血が新しい献血方法の一つとして導入され、一人の献血者から高単位の血小板製剤を得る事が出来るようになった。これを契機に大阪府赤十字血液センターでは対象患者13名(特定医療機関)、HLAタイピング済の血小板登録ドナー2,363名での試行的なHLA適合血小板供給を開始した。

1990年に濃厚血小板HLA「日赤」(PC-HLA)として薬価に収載され正式な製品となってからは、対象患者は年々増加し24年後の2010年11月までに累計約1400名となった。また、その患者群に対応するHLAタイピング済み成分献血登録ドナーは累計約31,000名(いずれも検査部門統合後の管内センター分を含む)となりPC-HLAの安定供給に貢献する事ができた。

## 【新たな問題点】

開始当初より血小板登録ドナーのHLAタイピング、患者のHLA抗体スクリーニング、およびPC-HLA供給時の交差適合試験法においてはLCT、AHG-LCT法を標準法として用いてきた。しかし、抗体の検出感度が低いためにHLA抗体を産生初期の

段階では見逃す可能性があり、結果としてPC-HLAを輸血しても効果が得られない事例があること、また、この方法に必要な試薬等の特殊性からその確保が困難な状況になってきたことなどが新たな問題点として浮上してきた。

## 【方法変更への過程】

そこで平成19年から日赤内の白血球ワークショップ等において次世代の標準法として患者のHLA抗体検査には精製HLA抗原蛍光ビーズ法、交差適合試験にはImmunocomplex Capture Fluorescence Analysis (ICFA法)の導入について検討してきた。これらの方法は抗体の検出感度も非常に高く、さらに測定は蛍光ビーズ測定装置(Luminex200)、使用試薬は市販キットを用いるために測定データの客観性や試薬管理の容易さにおいても有用で、これまで以上に安全で有効なPC-HLA輸血が期待できる検討結果が得られた。また、成分献血登録ドナーのHLAタイピングも2010年4月よりDNAタイピング(Luminex法)に変更しており、2010年12月15日で全てが新検査法に移行している。

## 【結語】

本学会では、HLA適合血小板供給試行的開始から四半世紀を経た現在の血液センターにおけるHLA適合血小板関連検査の流れをあらためて紹介するとともに、新検査法のなかでも特に交差適合試験として導入されたICFA法についてその特徴やAHG-LCT法との比較、実施後の状況などを報告する。

(10:40~11:20)

## 一般演題 (1)

座長：佐藤 壯 (札幌北榆病院)

演題番号 1~4



# 1. 蛍光 beads 法 (Luminex 法) における dithiothreitol (DTT) 処理の影響について

○大沼 豪<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 吉原 哲<sup>2)</sup>, 谷口 享子<sup>2)</sup> 小川 啓恭<sup>2)</sup>

NPO 法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, 兵庫医科大学附属病院<sup>2)</sup>

## 【はじめに】

我々は HLA 抗体検査を蛍光 beads 法 (Luminex 法) で実施している。検査結果で Negative control beads (NC) の MFI (Median Fluorescent Intensity) が 3 桁以上, Positive control beads (PC) が 4 桁以下を示し, 検体 (血清 / 血漿) 中に非特異反応や阻害反応を起こす不純物質を含む場合がある。このような結果を示した検体については, 不純物質を除く目的で AdsorbOut (AO) 処理後, 検査を実施している。

Zachary [Human Immunology 71 (2010) 45–49] らは, 阻害物質を除くため dithiothreitol (DTT) を行うと PC/NC の値は高くなり, 各 beads の反応性も良くなると報告している。今回我々は, この DTT 処理の影響について検討した。

## 【材料・方法】

DSA 陽性の患者検体 (血清 / 血漿) で, 抗体検査の結果, AO 処理を必要としなかった 11 検体と処理を必要とした 5 検体を用い, 3 種の処理 (NT [未処理]・AO・DTT) を実施し, Single Antigen beads

(SA) で検査した。処理を必要としなかった検体の MFI を基準として, 日本人に特異的な抗原の SA に対する反応性を比較した。

## 【結果・考察】

- NC の MFI で 100 以下のものは AO 処理で 81%, DTT 処理で 6% であり, PC の MFI で 10000 以上のものは, AO 処理と DTT 処理では共に 100% であった。
- 陰性を示す SA の MFI は, AO 処理も DTT 処理もほとんど変化はみられなかった。
- 陽性を示す SA の MFI が向上した beads は, AO 処理で 82, DTT 処理で 54 であり, MFI が減弱した beads は, AO 処理で 0, DTT 処理で 28 (例: NT: 15,150 → DTT: 2,842)。

日本人検体では, Zachary らの報告と同様な結果と, 各 beads の反応性が悪くなる結果が得られた。DTT 処理後の検査結果の判断には注意を要する場合がある。

## 2. LABScreen Single Antigen における プロゾーン現象への補体の関与

○黒田 ゆかり<sup>1)</sup>, 小田 秀隆<sup>1)</sup>, 浅尾 洋次<sup>1)</sup>, 中山 みゆき<sup>1)</sup>, 平田 康司<sup>2)</sup>, 井上 純子<sup>1)</sup>,  
永吉 裕二<sup>1)</sup>, 大熊 重則<sup>2)</sup>, 迫田 岩根<sup>1)</sup>, 友成 洋子<sup>1)</sup>, 佐藤 博行<sup>1)</sup>, 清川 博之<sup>1)</sup>

日本赤十字社九州血液センター 技術部<sup>1)</sup>, 岡山県赤十字血液センター 検査課<sup>2)</sup>

### 【はじめに】

LABScreen Single Antigen (以降 LAB SA) におけるプロゾーン現象を検討していく中で, その原因に補体が関与し非働化によりプロゾーン現象を回避可能であることが判明したので報告する。

### 【対象】

高力価の HLA 抗体保有が推測された 4 症例を対象とした。2 症例は NAIT 確認検査依頼があった母親検体, 残り 2 症例は HLA 適合血小板適応患者検体。

### 【方法】

LAB SA 用 NC 血清で希釈した検体においてプロゾーン現象を確認し, その後 2 症例では新鮮血清において, 非処理通常血清, 凍結解凍血清および 56°C 30 分間非働化血清を用いて反応性を比較した。

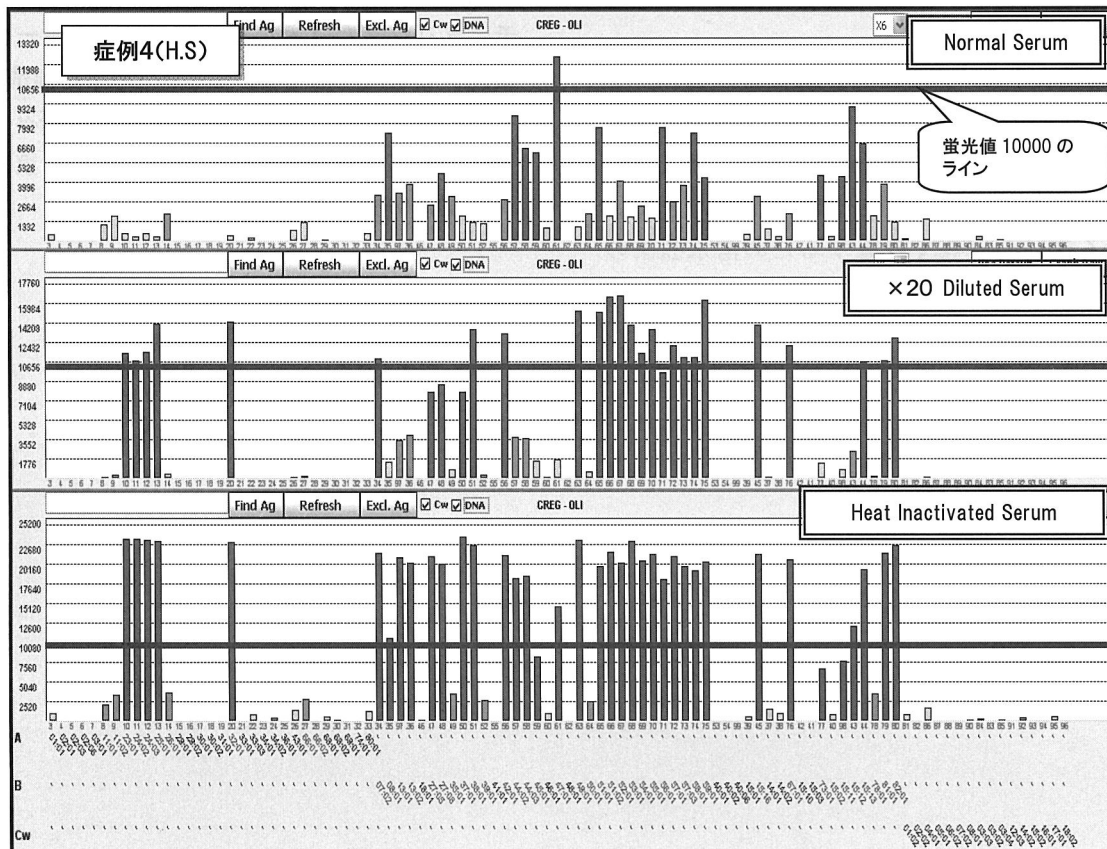
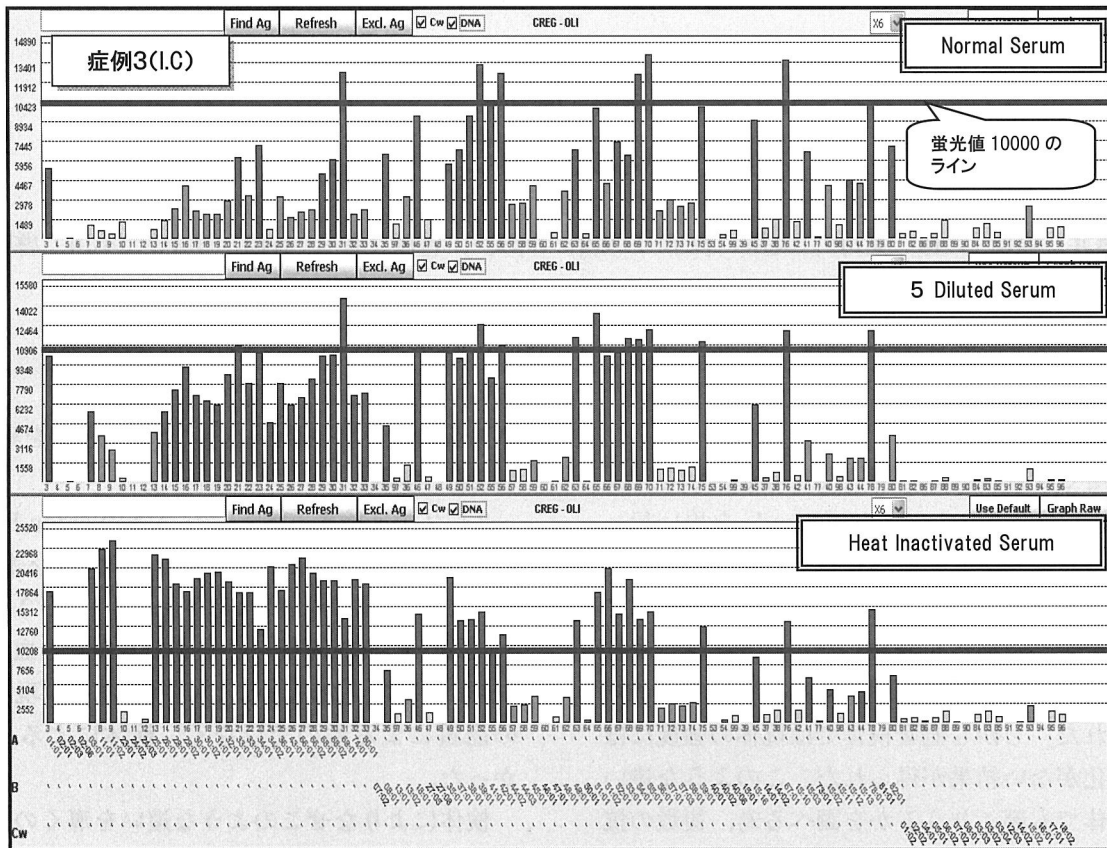
### 【結果】

4 症例いずれにもプロゾーン現象が確認された。同一検体では保管後に LAB SA の反応がより強くなっていた。新鮮血清が得られた 2 症例では保管血清よりも有意にプロゾーン現象を呈していた。凍結後に

解凍した血清では大きな変化は見られなかったが非働化により明らかに高い蛍光値を示すものが現れ, 通常血清で蛍光値 414 が非働化後で 23200, 通常血清 336 が非働化後で 22746 などを示した。非働化で高い蛍光値を示した抗体は, 希釈により高い蛍光値を示した抗体と相関していた。

### 【考察】

LAB SA ではプロゾーン現象を起こしていることがあり, 非働化によって現象が改善されることから補体の関与が示唆された。密に存在する抗原に多くの抗体が反応し, 補体成分 C1q が抗体 2 分子の CH2 に結合することで二次 (標識) 抗体が結合しにくい状態になっていると考えられた。このように 1 種類のピーズに同一抗原のみが存在している場合にプロゾーン現象が起きやすいと考えられ, 添付文書には “Test serum or plasma should not be heat inactivated, because it may give a high background in the test.” とあるが, 非働化した検体を用いることで臨床的に意義がある補体結合性の強い抗体の検出を可能にすると考えられる。



### 3. HLA 抗体検査に使用する血漿と血清の測定値の違いについて

○藤井 直樹<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 吉原 哲<sup>2)</sup>, 谷口 享子<sup>2)</sup> 小川 啓恭<sup>2)</sup>

NPO HLA 研究所<sup>1)</sup>, 兵庫医科大学附属病院<sup>2)</sup>

#### 【目的】

当研究所ではHLA抗体検査をLuminex法: LAB-Screen PRA 及び Single Antigen beads を用いている。我々が検査した抗体モニタリングの症例で同一採血日でありながら、血漿と血清で検査結果に大きな差を示した検体を経験した。血清検体では抗体強度が減弱し、抗体産生細胞の減少を示唆する結果が得られた。しかし血漿検体では抗体の強度にほとんど変化がない結果が得られた。このような違いが他の検体でも起こりうるかを調べる為、複数の抗体陽性血漿及び血清を用い比較実験を実施した。

#### 【材料・方法】

患者移植前とドナーの中から抗体陽性の8検体を選び、同一採血日の血漿と血清(当方にて血漿を血清処理した検体)を用いてLuminex法によるLAB-Screen Single Antigenでの検査を実施した。使用KITによる違いの有無を検証するため湧永製薬の

WAKPRAを用い同一検体について検査を実施した。

#### 【結果・考察】

8検体中2検体(25%)で、LABScreen PRAおよびSingle Antigen beadsで測定値に大きな差(血漿のMFIが常に高値を示す)があった。この2検体についてWAKPRAを用いた検査でも血漿と血清で同様の傾向が認められた。このことよりこの現象はKITの品質によるものではなく、検体によることがわかった。

検体によりなぜこのような違いを導くのか今のところ不明であるが、抗体検査を行うにあたり、抗体モニタリングだけでなく、移植前やドナーの抗体を検査する場合、用いる検査検体(血漿か血清)を統一する必要がある。またこのような現象がみられる検体についてどちらの結果がより臨床的に重要であるかを検討する必要がある。

## 4. DSA 陽性 HLA ミスマッチ造血幹細胞移植における IgG 型及び IgM 型抗体について

○林 晃司<sup>1)</sup>, 丸屋 悦子<sup>1)</sup>, 藤井 直樹<sup>1)</sup>, 大沼 豪<sup>1)</sup>, 吉原 哲<sup>2)</sup>, 谷口 享子<sup>2)</sup>, 吉田 喬<sup>3)</sup>,  
丸山 裕之<sup>3)</sup>, 石山 賢一<sup>4)</sup>, 萬納寺 聖仁<sup>5)</sup>, 佐治 博夫<sup>1)</sup>, 小川 啓恭<sup>2)</sup>

NPO 法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, 兵庫医科大学附属病院<sup>2)</sup>, 富山県立中央病院<sup>3)</sup>,  
高槻赤十字病院<sup>4)</sup>, 川崎医科大学附属病院<sup>5)</sup>

### 【はじめに】

造血幹細胞移植における HLA 抗体の重要性は臍帯血移植や非血縁間骨髄移植 (NMDP の報告) により明らかにされつつある。今回、我々はドナーミスマッチ HLA に対する抗体を保有する患者が該当ドナーから移植を受けた 20 例の HLA 不適合移植について、移植直前の DSA の強度 (MFI) と生着との関連を調べた。

### 【材料・方法】

- HLA 不適合造血幹細胞移植症例 (計 20 症例):  
疾患: Leukemia, ♂; 3, ♀; 17, HLA 適合度; one haplo identical
- 抗体検査:  
移植直前の血漿または血清を用い, LAB Screen Single Antigen Class I / Class II で, IgG 型・IgM 型抗体検査を実施
- 移植後生着確認検査:  
17 種のマイクロサテライト (MS) から各ペアの

informative な MS を 2 種以上選択, 移植後の患者検体 (PB/BM) で生着の有無を判定 (検出限界 5%)。但し症例によって移植施設より生着を確認した。

### 【結果・考察】

DSA と拒絶の関係を HLA 抗体のクラス別に評価した。HLA-class I で 25%, class II で 18% であり, さらに HLA-class II のみ陽性の 4 例 (最大 MFI 値: 血漿で 22427) に拒絶はなかった。今回は HLA-class I 抗体と拒絶の関連に注目し MFI との関連を調べた。拒絶を起こした抗体の MFI の最低値 (血清検体: 5670) を cut off とし全症例の HLA class I-DSA を分類し, 拒絶率を比較した。MFI  $\geq$  5670 群で拒絶率 50%, MFI < 5670 群で 0% であった (この群の最大 MFI 値は血漿検体で 2939, 血清検体で 2133)。今後, 症例数を増やし, この現象を検証し, 臨床応用可能な MFI 値を追求したい。

(11:20~12:00)

## 一般演題 (2)

座長：荒木 延夫 (兵庫県赤十字血液センター)

演題番号 5~8

## 5. 患者がHLA抗体を保有した生体肝移植症例

○山岡 学<sup>1)</sup>, 大西 修司<sup>1)</sup>, 山本 茉美<sup>1)</sup>, 井上 まどか<sup>1)</sup>, 寺嶋 由香利<sup>1)</sup>, 大谷 哲司<sup>1)</sup>,  
阿部 操<sup>2)</sup>, 森 眞一郎<sup>1)</sup>, 野村 昌作<sup>1)</sup>

関西医科大学附属枚方病院 輸血部<sup>1)</sup>, 関西医科大学香里病院 臨床検査部<sup>2)</sup>

### 【はじめに】

肝移植においても他の臓器移植と同様に患者がHLA抗体を保有する場合、移植片の液性拒絶の原因となる。今回HLA抗体保有患者の肝移植で、実施後に移植片の拒絶もなく予後良好であった2症例を経験したので報告する。

### 【症例 1】

69歳、女性。2002年に近医にて肝硬変を指摘され、外来経過観察となっていた。2007年11月頃より呼吸苦、嘔気を認めたため11月8日当院消化器内科に入院。肝不全と診断され、2008年1月消化器外科に転科し1月10日甥をドナーとした生体肝移植が実施された。

### 【結果 1】

患者、ドナーの血液型はともにB+、不規則抗体は陰性であった。HLA抗体検査はMPHA法、FCM法ともに患者が陽性、ドナーは陰性であり、直接リンパ球クロスマッチ(DCT)はLCT、AHG-LCTともに陰性であった。移植当日はPC-HLA: 35, RCC: 34, FFP: 39単位が、移植後にはそれぞれ45, 8, 0単位の輸血が実施された。移植後の経過は順調で拒絶反応も認められず2月29日軽快退院となった。

### 【症例 2】

71歳、女性。2006年9月腹部造影CTにて肝臓の腫瘍が指摘された。その後12月に再度CTにて腫瘍の増大が認められたため、18日にPET等含めた精査目的にて当院消化器外科に入院。2007年1月16

日、息子をドナーとした生体肝移植が実施された。

### 【結果 2】

患者、ドナーの血液型はともにB+、不規則抗体は患者が抗Mを保有し、ドナーは陰性であった。HLA抗体はMPHA法、FCM法ともに患者が陽性、ドナーは陰性であった。患者が保有するHLA抗体はドナータイプ(A2)と反応する特異性(DSA: Donor specific antibody) (A2+α)が認められたが、DCTはLCT、AHG-LCTともに陰性であった。移植当日はPC-HLA: 50, RCC: 26, FFP: 30単位が、移植後にはそれぞれ15, 10, 10単位の輸血が実施された。経過は順調で拒絶反応も認められず3月9日軽快退院となった。

### 【考案およびまとめ】

HLA抗体を保有した患者の生体肝移植を経験した。いずれの症例においても、移植後の経過はよく、移植片の拒絶反応は認められなかった。HLA抗体保有患者の移植では移植後の臓器や患者の予後に影響した症例を経験し、特にDSAの場合移植成績への関与が示唆される。しかし、症例2ではDSAと思われる抗体を保有したにも関わらず、経過は順調で拒絶反応も認められなかった。2症例とも抗体検査はLCT、AHG-LCTで陰性、MPHA、FCM法で陽性となり、DCTはLCT、AHG-LCTとも陰性であった。このことから、DCTについてもFCM法など高感度の検査法で実施し、今後も臓器移植における患者のHLA抗体については十分に注意し検討を重ねる必要があると思われる。

## 6. 血小板輸血における患者抗 HLA 抗体と非溶血性輸血副作用の関係

○荒木 延夫<sup>1)</sup>, 坊池 義浩<sup>1)</sup>, 馬淵 理<sup>1)</sup>

兵庫県赤十字血液センター<sup>1)</sup>

### 【目的】

非溶血性輸血副作用及び抗白血球抗体産生の低減などを目的として 2004 年 10 月 25 日採血分からの血小板製剤に対して、保存前白血球除去が行われ、残存白血球数が  $1 \times 10^6/\text{bag}$  以下となった。今回、PC-HLA を供給した抗 HLA 抗体陽性患者の輸血前後の非溶血性副作用の発生の有無とその種類について分析したので報告する。

### 【方法】

2004 年 11 月以降に PC-HLA を供給した患者 160 名を対象とし、PC-HLA 輸血前 (ランダム PC 輸血後)、輸血後の非溶血性副作用データを分析した。副作用の分類は、アレルギー、発熱、アナフィラキシー (様)、TRALI (様)、呼吸困難、その他の 6 種に分類した。

### 【結果】

PC-HLA 輸血前は、アレルギーが 32 名、発熱が 12 名、アナフィラキシー (様) が 6 名、アレルギー・発熱が 5 名、呼吸困難が 3 名、呼吸困難・発熱が 1 名、TRALI (様) が 1 名、その他が 1 名、副作用なしが 83 名、コメントなしが 16 名あった。次に、輸

血後の非溶血性副作用について臨床データが得られた PC-HLA 輸血前に副作用があった 48 名及び副作用のなかった 54 名の計 102 名を対象として分析した。輸血後の副作用の消失は、アレルギーが 26 名中 18 名、発熱が 7 名中 4 名、アナフィラキシー様が 5 名中 4 名、アレルギー・発熱が 5 名中 3 名、呼吸困難が 3 名中 2 名、呼吸困難・発熱が 1 名中 1 名、TRALI (様) が 1 名中 1 名であった。また、副作用なし 54 名中 4 名に副作用が出現した (図 1)。

### 【考察】

アレルギー、アナフィラキシーの原因としては抗血漿蛋白質抗体などが考えられ、抗 HLA 抗体の関与はほとんどないと言われている。また、残存白血球数  $1 \times 10^6/\text{bag}$  以下では抗 HLA 抗体による発熱などの副作用は起こりにくいと考えられる。しかし、今回検討した症例では PC-HLA 輸血後に非溶血性副作用の消失が患者 48 名中 33 名 (68.8%) に認められ (図 2, 図 3)、副作用の発生に抗 HLA 抗体の関与による血小板サイトカイン (例えば、RANTES,  $\beta$ -TG, PF-4, TGF- $\beta$  などか?) の影響が示唆された。



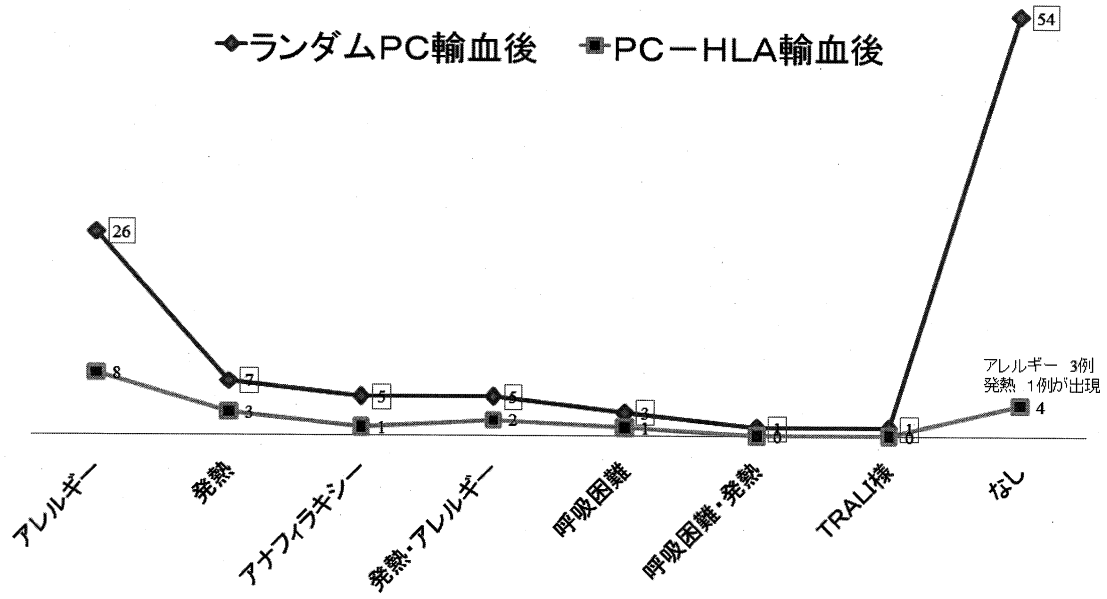
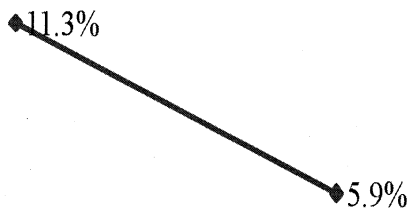
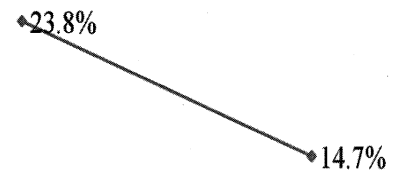


図1 ランダム PC 輸血後, PC-HLA 輸血後の非溶血性副作用発生数



ランダムPC輸血後 PC-HLA輸血後  
図2 輸血後 PC の発熱発症率



ランダムPC輸血後 PC-HLA輸血後  
図3 輸血後 PC のアレルギー, アナフィ

## 7. 口腔内粘膜細胞検体の保存方法の検討

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

DNAを用いた検査において、検査が血液検体で行われることは慣例である。血液を採取するには医療施設へ行く必要があり、採血時に痛みを伴うのに対し、口腔内粘膜 (Buccal) の採取は患者やその家族が自宅で簡単に採取することが可能である。また、体細胞由来であるため血液腫瘍細胞の LOH (Loss of heterozygosity) 疑いの場合、判断材料の一つとなる。NMDP では 2006 年より血液検体から Buccal 検体に変えて検査を行っている。

当研究所でも年々 Buccal 検体を用いた検査が増加しており、その中で検査が困難であった経験があり、比較的高温多湿の時期に集中していた。2010 年 6, 7, 8 月が 7 検体: 0.86% (総検体数: 814 検体) に対し, 1, 11, 12 月は 1 検体: 0.13% (総検体数: 742 検体) であった。検体の保存環境により DNA の劣化, 或いは DNA 純度に影響を与えている可能性がある。そのため, Buccal 採取後の検体の保存方法について検討した。

### 【材料と方法】

- 口腔内粘膜細胞採取キット: Sterile Foam Tipped

Applicator (Whatman 社)

- 精製方法: QuickGene (FujiFilm 社)
- 検査方法: Luminex 法 (WAK Flow)
- 検討条件: I. 湿度 (乾燥, 湿潤)  
II. 温度 (4°C, 室温, 30°C, 37°C)  
III. 保存期間 (2, 4 日間)

### 【結果と考察】

Buccal 細胞採取後, 室温で 1 時間以上乾燥させ, 4~37°C の温度条件下で 4 日間保存した検体であれば, 検査結果に影響はみられなかった。また, 湿潤した検体であっても 4°C 保存で 4 日間, 室温保存でも 2 日間であれば検査結果に影響はみられなかった。しかしながら湿潤した検体を室温で 4 日間以上, 37°C で 2 日間以上の保存で検査不能であった。原因として, 高温多湿によるカビの発生, 或いは細菌からの DNase による DNA の切断などの可能性が考えられる。

Buccal 検体は採取法が簡便であるため, 医療施設や被験者へ推奨したいが, 一方で採取後の検体の管理には注意を促したい。

## 8. 造血幹細胞移植後に体細胞の一部がドナータイプに置き換わった一例 —検査に与える影響も含めて—

○小島 裕人, 浜之上 聡<sup>1)</sup>, 二神 貴臣, 大沼 豪, 辻野 貴史, 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, 神奈川県立こども医療センター<sup>1)</sup>

### 【はじめに】

レシピエントとドナーのマイクロサテライト多型性を利用した移植後キメリズム検査において、移植前レシピエント検体が保管されていない場合、移植後 Buccal や爪由来 DNA が代用される。近年ではこのような体細胞にドナータイプがみられる報告が多くなされている。今回、これらの体細胞が、造血幹細胞移植後早期 (day 31) にドナータイプにほぼ置き換わった興味深い症例を経験したので、検査に与える影響も含めて紹介したい。

### 【材料・方法】

レシピエント：女児，AML，臍帯血移植。移植前検体，ドナー検体なし。

レシピエント検体：移植後 day 31 の口腔内粘膜，移植後 day 41 の爪，移植後 day 28 の骨髓液。

レシピエントの両親の末梢血。

移植後キメリズム検査はマイクロサテライト多型性を 14 種において PCR 増幅し，電気泳動後，分子量多型性の差から，そのキメリズムを観察した。

HLA タイピング検査は Luminex 法 (WAKFlow) を用いた。

### 【結果・考察】

結果 1. 移植後 day 28 の骨髓液は，移植後 day 31 の口腔内粘膜細胞，移植後 day 41 の爪と 14 種類のマイクロサテライトの多型性がほぼ同一であった。

結果 2. ミスマッチのあった HLA-B 座はすべての

検体において，ドナー由来タイプである HLA-B\*35:01, B\*58:01 が検出された。

結果 3. さらに，このレシピエントの両親のタイプから，マイクロサテライトの多型性を確認したところ，すべての検体において，両親に由来しない多型性が検出された。

以上から，移植後の口腔内粘膜細胞，爪，骨髓液の細胞はそれぞれ約 87%，約 90%，約 100% がドナータイプに置き換わっていることが判明した。

今回の例では，当初，結果 1. において生着不全 (No Chimerism) と誤判断をしていた。検査の際にドナー検体がない場合，爪細胞，口腔内粘膜細胞のような体細胞検体との比較においてドナータイプを推定して生着の確認をおこなうが，今回の例では重大な判断ミスをおこす可能性があり，ドナー検体または，移植前検体のいずれかとの照合が重要である。また，臨床症状や他の検査との比較も非常に重要である。

移植後の口腔内粘膜細胞，爪においては，移植ソースに含まれていた多機能幹細胞が分化したことを示唆する結果となったが，爪においては，生え変わりの期間や移植ソースが臍帯血であることを考慮にいと，ドナー由来に置き換わることの考察は非常に難しい。今回の症例は，移植されたドナー細胞がどのようにして，どのような時期に分化・生着するのかわかるうえで，興味深い。また，幼児の爪は 40 日程度で生え変わり得ることが示唆された。

(13:30~15:30)

## シンポジウム

座長 一戸 辰夫 (京都大学医学部附属病院)  
岡 芳弘 (大阪大学大学院医学系研究科)

### 「臓器移植の最近の話題」

- 1) 造血幹細胞移植における KIR 適合性  
一戸 辰夫 (京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科)
- 2) HLA 半合致造血幹細胞移植について  
池亀 和博 (兵庫医科大学血液内科)
- 3) iPS 細胞による再生医療の現状と展望 —iPS 細胞バンクについて—  
木村 貴文 (京都大学 iPS 細胞研究所・規制科学部門)
- 4) 腎移植と HLA  
橋本 光男 (県立西宮病院・腎疾患総合医療センター)
- 5) がん免疫応答解析における HLA 型解析の重要性  
西川 博嘉 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

# 1. 造血幹細胞移植における KIR 適合性

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

1999年イタリアのRuggeriらは、HLA不適合血縁者間移植におけるKIRリガンド不適合(KIRリガンドとしてのHLAクラスIの不適合)が、急性骨髄性白血病の再発を抑制する効果を有するとともにGVHDの発症も抑止するというセンセーショナルな報告を行った。それ以来、造血幹細胞移植におけるKIRリガンド不適合の臨床的意義について数多くの研究が行われてきたが、その移植成績への影響については、いまだに一致した見解が得られるに至っていない。

KIRリガンド不適合による白血病の再発抑制効果は、主に純化CD34陽性細胞移植や、ATGを用いた非血縁者間骨髄移植を対象とする研究において確認されていたが、2009年Eurocord-Netcordの共同研究によって、非血縁者間さい帯血移植においても同様の効果が見られることが報告された。しかし、その後に行われたミネソタグループの研究では、さい帯血移植において、KIRリガンドの不適合は再発率の低下には寄与せず、むしろGVHD発症リスクの増加に関与するという全く相反する結果が得られている。また、わが国の骨髄バンクを介する非血縁者間骨髄移植を対象とする解析においても、KIR2DLリガンドとしてのHLA-Cの不適合は拒絶やGVHDのリスクを増加させ、移植成績の向上には寄与しないという結果が得られている。

このような矛盾の解釈については、移植片に含ま

れるT細胞の多寡との関連からも議論されているが、最近、ドイツのグループは、個体毎のNK受容体の発現様式がKIR遺伝子のハプロタイプに従って異なっている可能性を報告している。この研究の結果によれば、KIR遺伝子のハプロタイプがグループAのホモ接合(A/A)となっている個体では、その個体が発現するHLA-CをリガンドとするKIR(HLA-C1グループに対するKIR2DL3, HLA-C2グループに対するKIR2DL1)を発現するNK細胞が優位に存在しているが、グループBのハプロタイプを有する個体では、より多様なKIRの発現が認められるとともに、HLA-Cに対する拘束性も明瞭ではなかったとされている。興味深いことに、米国骨髄バンク(NMDP)を介して実施された非血縁者間移植を対象とする解析の結果、ドナーがgroup BのKIRハプロタイプ、特にそのセントロメア側のモチーフを有する場合には、それ以外のKIRハプロタイプを保有する場合と比較して、急性骨髄性白血病の再発が抑制されることが報告されている。これらの結果は、グループBのKIRハプロタイプを有する個体では、骨髄系腫瘍に対するNK alloreactivityが発揮されやすいことを示唆しているのかもしれない。わが国の非血縁者間骨髄移植においても同様の効果を確認可能なのか、さい帯血のKIRハプロタイプについても同様の傾向が見られるのか等、今後の研究の進展に大いに関心が持たれるところである。

## 2. HLA 半合致造血幹細胞移植について

池亀 和博

兵庫医科大学血液内科

造血器腫瘍に対する造血幹細胞移植において、血縁者をドナーとした HLA 半合致移植は、理論上、GVHD, GVL の標的抗原として HLA をターゲットにするはずである。しかし、そもそも HLA は白血病細胞のみならず、正常組織にもあまねく発現されているのであるから、これをもって腫瘍特異的ないし造血細胞特異的な免疫反応を説明することは理屈に合わない。にもかかわらず、近年の HLA 半合致移植後における非共有 HLA ハプロタイプの LOH の報告をみると、確かに不適合 HLA を標的とした腫瘍細胞に対する immunological pressure が働いていることを実感させる。

我々のグループでは過去 10 余年に渡り、血縁 HLA 不適合移植を約 300 例（骨髄破壊的 HLA 不適合移植 (haplo-full) 約 100 例, RIST による HLA 不適合移植 (haplo-mini) 約 200 例) 施行してきた。主に非寛解症例や移植後再発を対象として、30-40% の 5 年生存率であり、GVHD の発症率、重症度は HLA 一致の移植と変わらない。日々の移植臨床の現

場で血縁 HLA 不適合移植を行ってみると、確かに移植後 1 か月間の抗腫瘍効果には、HLA 一致移植では味わえない醍醐味をしばしば経験するが、その後の再発やウイルス感染症に難渋する例が存在することも確かである。さらに血縁 HLA 不適合移植後何年経ってからも、免疫抑制剤の減量により急性 GVHD 様の皮疹が出現することも常である。あるいはまた、同じ HLA 不適合移植でも臍帯血移植とは全く手ごたえが異なり、幹細胞ソースによって頭を切り替えることに苦勞する。

共有 HLA ハプロタイプに提示されたマイナー抗原、非共有 HLA に対する直接認識、非共有 HLA に提示されたマイナー抗原、そしてまだ教科書には載っていない抗原認識があるかもしれない、そのそれぞれを個々の移植でつまびらかにすることはいまだ困難であるが、その総和としての血縁 HLA 不適合移植というものについて、その現状と現在の試み、次世代への挑戦について紹介させていただき、MHC の専門家である諸先生方のご意見をいただきたい。

### 3. iPS 細胞による再生医療の現状と展望 —iPS 細胞バンクについて—

木村 貴文

京都大学 iPS 細胞研究所・規制科学部門

2006年にマウス iPS 細胞が産声をあげ、翌 2007年にはもうヒト iPS 細胞の作製が可能となり、日米の複数の研究室から報告されました。生物学的にヒト胚性幹細胞 (hES 細胞) に酷似した多能性幹細胞である iPS 細胞には、hES 細胞の樹立や臨床応用に際しての倫理的問題を解決できる最強の治療用細胞ツールとして産学問わず大きな期待が寄せられています。

米国では 2010年に hES 細胞から分化誘導したオリゴデンドロサイトを用いた脊髄損傷患者への他家移植臨床試験 (GERON 社) がスタートしました。また、2011年1月3日には Advanced Cell Technology 社が計画していたスターガルト病に対する hES 細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞を使った移植治療も承認されました。

いっぽう、日本国内では 2010年11月1日のヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の改訂によって hES 細胞 / iPS 細胞を用いる細胞治療がようやく認められました。この改訂をうけて、hES 細胞で口火を切った米国と異なり、iPS 細胞から分化誘導した組織細胞を用いて再生医療が計画されています。

我が国の臨床試験の進め方には二つのトラックがあります。薬事法下の「治験」と医師法による「臨床研究」です。いずれのトラックにもそれぞれハードルがありますが、その高さを規定する規制枠の速

やかな検討が喫緊の課題となっています。ロット化された細胞製剤の品質を規定する枠組みも存在しませんでしたし、iPS 細胞のような長期間の培養が必要な細胞製剤の製造工程についての基準づくりも現在進行形という状況です。

個々の医療機関とくに細胞調製施設 (セル・プロセッシングセンター) は、これら規制当局との協議や調整を通じて、もっとも安全かつ高品質な iPS 細胞あるいは iPS 細胞由来組織細胞を作製し品質評価するための文書体系や組織の構築を急がねばなりません。

医療現場からの新たなシーズの創出も、iPS 細胞の臨床応用には不可欠です。また、それらを実現するための基礎実験や非臨床試験をささえる財源の確保も必要でしょう。さらには、iPS 細胞に対する「関心」から「理解」へと多くの国民に参加してもらうための施策も忘れてはなりません。その中には、ホモ HLA ドナー由来 iPS 細胞バンク構想も含まれません。

これらの諸状況の進展によって、はじめて神戸先端医療センターで計画されている加齢黄斑変性症 (AMD) に対する自家 iPS 細胞由来網膜色素上皮 (RPE) 細胞移植や慶応義塾大学病院で予定されている亜急性期脊髄損傷患者へのホモ HLA ドナー iPS 細胞由来同種 (他家) 神経細胞移植が実現すると考えられます。

## 4. 腎移植とHLA

橋本 光男

兵庫県立西宮病院・腎疾患総合医療センター

2010年7月17日に「臓器の移植に関する法律の一部を改正する法律」が施行され、本人の臓器提供の意思が明確でない場合でも、家族の承認により脳死下臓器提供が可能となった。その結果、法改正後29例の脳死下臓器提供が行われ、今後さらに臓器提供件数が増加することが期待される(2010年12月31日現在、日本臓器移植NWホームページ参照)。我が国の献腎及び脳死下臓器移植(肝臓、小腸移植を除く)のレシピエント選択の適応条件は、クロスマッチ(XM)検査が陰性であることが定められている(平成13年10月10日、健発第984号改訂)。近年、脱感作療法を含めた免疫抑制治療の進歩とHLA抗体を特異的且つ高感度に検出するHLA固相化法が開発され、ドナー特異的HLA抗体(DSA)を検出することが可能となった。そしてXM陽性を全て移植禁忌とすることが疑問視されるようになり、XM検査の意義を再検討することが求められている(S. K. Takemoto, AMJT 4; 1033: 2004)。今回、著しく変貌を遂げている臓器移植に関わる分野において、日本臓器移植NW移植検査センターの現状をUNOS (United Network for Organ Sharing)の移植選択基準の変遷と比較し、現況のXM及びHLA抗体検査の臨床との関連性について検証してみたい。

### 1. 日本臓器移植NWの移植検査体制と選択基準に関わるXM検査の現状

現在、日本臓器移植NWのレシピエント選択基準は前述したように「リンパ球直接交叉試験(全リンパ球又はTリンパ球)が陰性」と規定され、日本臓器移植NW移植検査センターの殆どの施設はLCT法を採用している。H. M. Gebel等はリンパ球XM方法を直接法と間接法に分類し、前者にNIH基準法、Extend CDC法、Amos法、後者に2次抗体を使っ

て検出するAHG法、FCXM法を挙げている(H. M. Gebel, AMJT 3; 2488: 2003)。彼等の分類に従うと献腎、脳死下移植のXM検査はLCT法に限定されることになる。UNOSは「ASHI Standards 1994」に従い、non-HLA抗体による偽陽性反応を移植禁忌の条件から除外することを明記し、XM検査として抗体検出感度の高いFCXM法を推奨している(OPTN / UNOS board as Appendix D to Policy 3, 2004)。従って、我が国の選択基準の見直しが責務と考える。

### 2. XM及びHLA抗体検査の臨床との関連性

早期腎移植予後の危険因子の一つとしてDSAが注目されている。しかし、P. Amico等はDSAの臨床的意義について、DSA陽性症例の45%はAMR (Antibody Mediated Rejection)を発症しないで予後良好であることを報告している(P. Amico, AMJT 87; 1681: 2009)。DSA検査は移植前の危険因子の評価及び脱感作療法を含む免疫抑制治療の指標とされているが、必ずしもDSAの有無と臨床予後との関連性を認めず、細胞とビーズの抗原量の差による抗体反応性の相違による可能性が指摘されている(S. Vaidya, Transplantation 2008; 85: 1046)。

近年、XM検査としてcell-based assayとbead-based assayの両方の特徴を併せ持つICFA法 (Immunocomplex Capture Fluorescence Assay)が開発された(K. Fujiwara, Vox Sang 96; 244: 2009)。我々は腎移植におけるXM検査への導入を目的に検討し、ICFA法は従来のFCXM法に比べHLA抗体を特異的に検出し、さらにDSA陽性症例のAMR発症と統計的関連性を認めた(第44回日本臨床腎移植学会, 2011年)。我々はこの方法を第3世代のXM検査と捉え、臓器移植のレシピエント選択のためのXM検査に用いることを推奨する。



## 5. がん免疫応答解析における HLA 型解析の重要性

西川 博嘉

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 実験免疫学

現在、がんに対する免疫療法の臨床試験が多数行われている。1991年ヒト悪性黒色腫に特異的に発現している腫瘍抗原遺伝子の存在が報告されて以来、これらの腫瘍特異抗原を標的とした免疫療法が注目を集めている。なかでも、腫瘍抗原内に存在する CD8+T 細胞認識エペトープペプチドを用いたがんワクチン療法への期待は大きい。しかし、これらのがん抗原ペプチドを用いて CD8+T 細胞を活性化することを試みた当初の臨床試験は、現在まで期待された効果をあげていない。その原因の一つとして、がん抗原特異的 CD8+T 細胞を活性化する際に、CD4+ヘルパー T 細胞の活性化が不十分なために、適切な CD8+T 細胞の活性化が誘導されないことがあげられる。これらの問題点を克服するために、抗原タンパクもしくは 20 アミノ酸程度のロングペプチドを用いた次世代のがんワクチン療法の臨床試験が新たに実施されている。これらの次世代のがんワクチン

療法の効果を検討する上で、特異的免疫応答をモニタリングすることは必須である。しかし、タンパクワクチン療法では HLA の制限がないため HLA 型情報に基づいた広範なアッセイが必要となる。

我々は、がん抗原のなかでもとりわけ免疫原性が高いことが明らかとなっている NY-ESO-1 抗原に着目し、食道癌患者を対象に NY-ESO-1 タンパクワクチン療法を施行した。ワクチン療法を実施された患者末梢血を用いて特異的 CD4+, CD8+T 細胞応答を検討した。本講演では、直接がん細胞を攻撃する特異的 CD8+T 細胞応答の検討に焦点を当てて議論したい。とりわけ、従来検討が進められてきた HLA-A\*0201 もしくは HLA-A\*2402 患者に加えて、2名の HLA-B\*3501 を持った患者で NY-ESO-1 特異的 CD8+T 細胞応答に関して、極めて興味深い知見を得たため、これらに焦点を絞って議論したい。

(15:40~16:40)

## 特別講演

座長 永尾 暢夫 (神戸常盤大学保健科学部)

「次世代シーケンサーを用いた HLA 領域の  
リシーケンシングによる多型解析」

猪子 英俊

(東海大学医学部基礎医学系分子生命科学)

## 次世代シーケンサーを用いた HLA 領域のリシーケンシングによる多型解析

猪子 英俊

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

個人のヒト全ゲノム配列として、最初に J. Craig Venter のゲノムが 2003 年に決定されたゲノム配列 (10 人のゲノムのモザイク) を参照して、2007 年に決定された (これをリシーケンシングと言う)。その後、2008 年には James D. Watson, ついで中国人, アフリカ人, 韓国人と次々に個人のゲノムの決定がなされ、最近では 2,300 人にもものぼる全ゲノム配列が決定されている。これらは、いまや 1,000 ドル/人のいわゆるパーソナルゲノム時代の到来を告げるとともに、近い将来のテーラーメイド医療の本格的な実用化を予想させる。この背景には、言うまでもなくシーケンシング技術の革新、すなわち 1 日に 2 Gb のアウトプットを可能にする次世代シーケンサーの登場によるものである。HLA 領域はヒトゲノムの中で最も個人差 (多型性) に富み、移植や疾患発症との密接な関連性があることから、パーソナルゲノム解析の対象として最適かつ、最重要ゲノム領域と言える。

次世代シーケンサーは、DNA ビーズ法に代わるまさに次世代の HLA-DNA タイピング技術を提供する。次世代シーケンサーは 1 分子の DNA を増幅し、その増幅産物について塩基配列を決定することから、従来の HLA-DNA タイピング方法で問題となる phase ambiguity, すなわち二つの多型が染色体上のシスカ、トランスのどちらの位置関係にあるのかが不明なため、アリルを決定できないヘテロの組み合わせ、例えば (DRB1\*15:01, DRB1\*0405) か、(DRB1\*15:02, DRB1\*0410) の ambiguity 問題が解消される。また、膨大な塩基配列を決定しうることから、HLA 遺伝子のプロモーター領域、エクソン、イントロンなど周辺領域を含む遺伝子全塩基配

列の決定できることから、以前の表記法でいう 8 桁レベルのタイピングが可能であり、かつ null アリルも判定しうる、究極の DNA タイピング法といえる。

3.8 Mb からなる HLA ゲノム領域は多型に富むと同時にハプロタイプの多様性を有し、疾患感受性や移植に関係することから、HLA テーラーメイド医療の確立には、まず個々のハプロタイプの HLA ゲノム全領域を決定していく必要がある。このような解析にもまた、次世代シーケンサーは大きな威力を発揮する。我々は、HLA 領域より 447 の PCR プライマーセットを独自に設定、これを用いた HLA 領域全体 3.8 Mb のロング PCR 増幅を確立し、これらの PCR 増幅産物を次世代シーケンサーにより、日本人集団で頻度の高い複数の HLA ハプロタイプのリシーケンシングを進めている。ロング PCR 法は次世代シーケンサーのみならずサンガー法による塩基配列の確認が可能であり、数 kb までの挿入欠失も検出可能であることに加え、シーケンスによる HLA 領域の疾患関連解析の研究デザインを自由に設計できるという利点も有している。また、このロング PCR 法に、NimbleGen Sequence Capture による HLA 領域の DNA 濃縮法を組み合わせ、ハイスループットな実験系へと発展させている。次世代シーケンサーは連続して読める長さは短い (イルミナ社 Genome Analyzer IIx では 150 bp 程度しか読めない) ので、HLA 領域のような繰り返し配列の多い複雑な遺伝子領域のリシーケンシングには不正確な領域もあるが、片鎖 300 bp のペアエンドシーケンシングやサンガー法による確認を行うことで塩基配列決定の精度を高めることが可能である。これまでに日本人に頻度の高い 5 種類の HLA ハプロタイプの

ホモ接合である7種類の細胞株, AKB, TOK, T182 (A24-B52-DR15, 8.2%), HOR (A33-B44-DR13, 5.2%), SA (A24-B7-DR1, 3.6%), LKT3 (A24-B54-DR4, 2.3%), TAB089 (A2-B46-DR8, 2.2%) の塩基配列を決定し, さらに白人の HLA ホモ接合細胞株および胞状奇胎 DNA (1 倍体のみのゲノムを有するので, 直ちにハプロタイプを決定できる) のリシーケンシングを行った。塩基配列の決定より SNP データベースに登録されていない新規の多型または変異を 1 ハプロタイプあたり数百カ所検出

しており, ハプロタイプごとの多型情報として分析を進めている。特に AKB, TOK, T182 間の比較から同一 HLA ハプロタイプ間において 20 kb~40 kb に 1 カ所の SNP が存在することが確認され, HLA ハプロタイプのさらなる細分化が可能であることが示唆された。我々はこの HLA ハプロタイプの細分化への可能性をさらに追究するとともに, 多型情報をデータベースとして蓄積し, 将来的に移植や HLA 関連疾患の診断および治療のための指針へと発展させることを目指している