

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 19 No. 1, 2012

Contents

日本組織適合性学会からのお知らせ	
第 21 回日本組織適合性学会大会のご案内.....	1
2012 年度学術賞ならびに学術奨励賞の募集について.....	5
平成 24 年度認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ.....	7
平成 23 年度・認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果.....	8
日本組織適合性学会 技術者認定制度委員会 QCWS 部会名簿 (2012 年).....	11
第 15 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	13
—検査法別解析: DNA タイピング: Luminex 法—..... 石井博之	16
—検査法別解析: DNA タイピング: SBT 法—..... 吉川枝里	18
—検査法別解析: DNA タイピング: SSO, SSP 法—..... 安尾美年子	19
—検査法別解析: DNA タイピング: 結果の表記法—..... 橋口裕樹	20
—検査法別解析: DNA タイピング: FlowPRA 法—..... 石塚 敏	22
—検査法別解析: 抗体検査: LABScreen—..... 宮崎 孔	23
—検査法別解析: 抗体検査 (追加発言) —	
抗体検査におけるプロゾーン様現象について.....	24
—検査法別解析: 抗体検査: WAKFlow & ICFA 法—..... 平田康司	26
—検査法別解析: 抗体検査: その他検査法およびクロスマッチ—..... 中島文明	28
—部門別解析: DNA-QC および結果評価—..... 田中秀則	29
—部門別解析および結果評価 (抗体部門) —..... 高 陽淑	30
〔原著論文〕	
蛍光ビーズ抗体検査法におけるプロゾーン様現象への補体の関与—非働化による検証—黒田ゆかり, 平田康司, 永吉裕二, 田原大志, 浅尾 洋次, 中山みゆき, 井上 純子, 大熊 重則, 迫田 岩根, 佐藤 博行, 清川 博之, 木村 彰方	33
次世代シーケンサーを用いた HLA クラス I 遺伝子の超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発鈴木進悟, 尾崎有紀, 吉川枝里, 重成敦子, 岡 晃, 光永滋樹, 椎名 隆, 猪子英俊	43
第 10 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集.....	55
日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定.....	79
編集後記.....	82

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

日本組織適合性学会誌 第19巻第1号 平成24年4月30日発行

日本組織適合性学会からのお知らせ

第21回日本組織適合性学会大会のご案内.....	1
2012年度学術賞ならびに学術奨励賞の募集について.....	5
平成24年度認定HLA検査技術者講習会のお知らせ.....	7
平成23年度・認定HLA検査技術者講習会アンケート集計結果.....	8
日本組織適合性学会 技術者認定制度委員会 QCWS部会名簿(2012年).....	11

第15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	13
—検査法別解析: DNAタイピング: Luminex法—..... 石井博之	16
—検査法別解析: DNAタイピング: SBT法—..... 吉川枝里	18
—検査法別解析: DNAタイピング: SSO, SSP法—..... 安尾美年子	19
—検査法別解析: DNAタイピング: 結果の表記法—..... 橋口裕樹	20
—検査法別解析: DNAタイピング: FlowPRA法—..... 石塚 敏	22
—検査法別解析: 抗体検査: LABScreen—..... 宮崎 孔	23
—検査法別解析: 抗体検査(追加発言)— 抗体検査におけるプロゾーン様現象について.....	24
—検査法別解析: 抗体検査: WAKFlow & ICFA法—..... 平田康司	26
—検査法別解析: 抗体検査: その他検査法およびクロスマッチ—..... 中島文明	28
—部門別解析: DNA-QCおよび結果評価—..... 田中秀則	29
—部門別解析および結果評価(抗体部門)—..... 高 陽淑	30

[原著論文]

蛍光ビーズ抗体検査法におけるプロゾーン様現象への補体の関与—非働化による検証— 黒田ゆかり, 平田康司, 永吉裕二, 田原大志, 浅尾 洋次, 中山みゆき, 井上 純子, 大熊 重則, 迫田 岩根, 佐藤 博行, 清川 博之, 木村 彰方	33
次世代シーケンサーを用いたHLAクラスI遺伝子の超高解像度DNAタイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT)法の開発 鈴木進悟, 尾崎有紀, 吉川枝里, 重成敦子, 岡 晃, 光永滋樹, 椎名 隆, 猪子英俊	43

第10回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集.....	55
-----------------------------	----

日本組織適合性学会誌 MHC投稿規定.....	79
-------------------------	----

編集後記.....	82
-----------	----

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 東京女子医科大学消化器病センター外科
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 桜橋医誠会クリニック

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 21 回日本組織適合性学会大会のご案内

第 21 回日本組織適合性学会大会

大会長 間 陽子

(独立行政法人理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット)

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 21 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、「異分野研究が拓く MHC 研究の新しい展開」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。会場は東京の明治大学（駿河台キャンパス）ですので、利便性に優れた会場と思います。多数の会員のご参加をお待ちいたしております。

会 期：2012 年 9 月 15 日（土）～ 17 日（月・敬老の日）

会 場：明治大学（駿河台キャンパス）アカデミーコモン・リバティータワー

〒 101-8301 東京都千代田区神田駿河台 1-1

http://www.meiji.ac.jp/koho/campus_guide/suruga/access.html

[大会ホームページ]

<http://www.hla2012.com/>

[大会内容（予定）]

◆ 9 月 15 日（土）

1. シンポジウム 1 「HLA とウイルス —新しい臨床展開—
2. ランチョンセミナー
3. 一般口演および学術賞・学術奨励賞候補口頭発表
4. ポスターセッション

◆ 9 月 16 日（日）

1. 一般口演
2. ランチョンセミナー
3. シンポジウム 2 「新しいパラダイムが拓く MHC 研究の新展開」
4. ポスターセッション
5. 懇親会

◆ 9 月 17 日（月・敬老の日）

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

[海外招待講演者 (予定)]

- Daniel E Geraghty (Fred Hutchinson Cancer Research Center)
- Derek Middleton (University of Liverpool)

[事前参加登録]

事前参加登録は大会ホームページ (<http://www.hla2012.com/>) にて申込み可能です。

事前参加登録をされる方は、2012年8月8日(水)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 (2012年8月8日(水)まで)		●当日参加費	
◆理事・評議委員・非会員	¥10,000	◆理事・評議委員・非会員	¥12,000
◆会員	¥8,000	◆会員	¥10,000
◆学生	¥5,000	◆学生	¥6,000

[一般演題募集要項]

1. 発表形式

口頭およびポスター、またはポスターのみによる発表です。(口頭発表を行う方にはポスターの掲示もお願い致します。)

発表形式(口頭およびポスター発表、またはポスターのみの発表)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「21JSHI 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、21jshi@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21回日本組織適合性学会大会ホームページ (<http://www.hla2012.com/>) 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 間陽子演題申込書.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
ください。(例 間陽子抄録 .doc)
- 下記の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.hla2012.com/>) 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

2012 年 5 月 31 日 (木) 必着

5. 採択通知

演題をお申しいただいた後、確認のメールをお送りいただきます。もし、演題お申込確認メールが届かない
場合は、運営事務局 (21jshi@aeplan.co.jp) まで、御連絡下さい。採択に関しましては、2012 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 : 2012 年 9 月 16 日 (日) 18:15 ~ (予定)

会 場 : リバティータワー (岸本辰雄ホール・宮城浩蔵ホール)

参加費 : 一般 ¥3,000 学生 ¥2,000

[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。

[2012 年度学術賞・学術奨励賞]

第 21 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賞・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本号に掲載されている「2012 年度学術賞ならびに学術奨励賞の募集について」をご参照ください。

[2012 年度大会長賞]

第 21 回日本組織適合性学会大会では、上記の学術賞・学術奨励賞とは別に、一般演題に応募された中から、ユニークで優れた発表をされた団体または個人に対して授与される大会長賞を設けます。大会長賞の選考結果については、懇親会会場にて発表します。

[大会事務局]

〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1
独立行政法人理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
第 21 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 21 回日本組織適合性学会大会運営事務局
運営事務局 担当：衛藤 匡
Tel: 03-3230-2744 Fax: 03-3230-2479
E-mail: 21jshi@aeplan.co.jp

2012 年度学術賞ならびに学術奨励賞の募集について

会員の皆様

研究助成を目的とした日本組織適合性学術賞並びに学術奨励賞を以下の要領で募集します。年齢制限の無い学術賞も授与いたしますのでふるってご応募ください。

1. 助成内容

2012 年度学術集会大会（第 21 回大会）に応募された一般演題の中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者（応募者）に学術賞（年齢制限無し）と学術奨励賞（2012 年 9 月 17 日時点で満 45 才未満）を授与します。授与件数は学術賞 1～2 件、学術奨励賞 1～2 件（両賞併せて原則として 3 件までとする）で、助成金授与を予定しております。

2. 募集分野

- (1) 基礎研究系（主に基礎医学系の研究。理学，生物学的な研究を含む）
- (2) 臨床研究系（臨床関連研究。基礎医学的な疾患研究などを含む）
- (3) 技術応用系（実務関連研究。実務を通じた発見，技術応用などを含む）

3. 応募資格

助成金応募にあたっては、以下の条件のすべてを満たしていることが必要です。

- 1) 応募者は本学会の正会員であり 2012 年度の会費を納入済みであること、または今後正会員となる予定であり学会までに 2012 年度の会費を納入予定であること（今後正会員となられた方で、学会にて受賞された方は、原則として次年度以降も正会員を継続することを条件とする）
- 2) 応募者は応募しようとする演題の筆頭演者であること
- 3) 応募しようとする演題の内容において、応募者が中心的な役割を果たしたこと
- 4) 応募しようとする演題の内容が、本学会にふさわしく、かつ未発表であること
- 5) 学術奨励賞の応募者は 2012 年 9 月 17 日時点で満 45 才未満であること。ただし、技術応用系については年齢制限はありません。

4. 応募方法

大会の演題抄録募集とは別途の手続きで行いますので、以下の書類を次のアドレス宛にメール添付で送って下さい。（HLA 学会事務局，E-mail: jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp）

必要書類

1) 抄録

一般演題に応募した抄録

（Word 形式で保存し、ファイル名を応募者名抄録.doc {例；猪子英俊抄録.doc} とする。ただし、Word が使えない場合はテキスト形式で保存しファイル名を応募者名抄録.txt とする）

2) 応募ファイル

1 頁目に、演題名、演者（全員）、所属（全員）、応募助成対象（学術賞か学術奨励賞のいずれかひとつ）、応募分野（基礎研究系、臨床研究系、技術応用系のいずれかひとつ）、および応募者（筆頭演者）の連絡先住所、電話番号、FAX、e-mail アドレス、生年月日、年令を記入する。

2 頁目以降に、応募した (1) 研究の背景, (2) 研究の意義, (3) 日本組織適合性学会との関わり (これまでと今後の方針・希望など) を、各項目ごとに 300–400 字程度でまとめる。

(Word 形式で保存し、ファイル名を応募者名申込 .doc {例; 猪子英俊申込 .doc} とする。ただし、Word が使えない場合はテキスト形式で保存しファイル名を応募者名申込 .txt とする)

5. 応募締め切り

2012 年 7 月 6 日 (金) (必着)

6. 選考および結果通知について

21 回大会期間中に実施される「学術賞ならびに学術奨励賞応募演題セッション」において発表を行っていただきます。数名の評価委員が発表内容の評価を行います。その評価結果を参考にして学術賞・学術奨励賞選考委員会にて選考を行います。第 21 回大会期間中に選考結果を公表し、表彰式を実施します。

7. 助成金の使途

使途について特に制限はありませんが、学術賞・学術奨励賞であることの趣旨をご理解の上、適切に使用ください。なお、使途とその内訳を後述の報告書に記載するものとします。

8. 受賞者にかかる義務について

受賞者は、助成が行われた研究課題についての報告書(様式は別途通知します)を学会宛に提出して頂きます。

9. 助成が行われた研究課題の成果発表について

研究課題の研究成果については、原著論文もしくは総説等の形式にて、学会誌 MHC への積極的な発表をお願いします。

10. 問い合わせ先

本件に関しての問い合わせは学会事務局 (Tel: 03-5803-4906, Fax: 03-5803-4907, E-mail: jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp) または、学術賞・学術奨励賞担当理事猪子英俊 (TEL: 0463-93-1121 内線 2312, FAX: 0463-94-8884, E-mail: hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp) をお願いします。

組織適合性検査技術者認定制度
平成 24 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 24 年 9 月 17 日（月曜日・祭日）9:00～11:00

会 場：第 21 回・日本組織適合性学会大会会場

明治大学駿河台キャンパス リバティホール

（東京都千代田区神田駿河台 1-1）

テキスト：テキストは講習会の約 1 ヶ月前に、学会ホームページ上に掲載しますので各自、御参照ください。
従来のような会場でのテキストの販売は、いたしません。

受講証明書：認定制度に関わる受講証明の受領を希望される方には、会場入口の受付にて、1 人につき 1 枚を発行いたします。

内 容：各講習とも質疑応答を含めて、35 分を予定しています。講演の抄録につきましては、MHC Vol. 19, No. 2 大会案内号（2012 年 8 月発刊予定）に掲載いたします。

(1) 熱帯感染症と HLA

平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野 教授）

(2) QC ワークショップの結果から見た HLA 抗体検査の現状

高 陽淑（日本赤十字社・近畿ブロック血液センター 検査三課 係長）

(3) 肝臓移植と HLA

江川 裕人（東京女子医科大学・消化器外科 教授）

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方々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。

従来のように、事前に受講希望届けを提出し、事前登録していただく必要はございません。

平成 23 年度・認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果

開催日時：平成 23 年 8 月 28 日（日曜日）10:00～12:00

会 場：第 20 回・日本組織適合性学会大会会場

三島市民文化会館（ゆうゆうホール：静岡県三島市）

・回答者総数：95 名

1) 旅費・滞在費の財源について 回答者 94 名

①	私費	24 名 (26%)
②	職場からの支援	66 名 (70%)
③	その他	4 名 (4%)

③その他の内訳：研究費から 2 名，①と②を半額ずつ 2 名

2) 職場・職務について

職場 回答者 95 名

①	病院	46 名 (48%)
②	血液センター	17 名 (18%)
③	検査センター	5 名 (5%)
④	大学（国公立，私立）	13 名 (14%)
⑤	民間企業	6 名 (6%)
⑥	その他	8 名 (8%)

職務 回答者 90 名

①	臨床医	4 名 (4%)
②	臨床検査業務	60 名 (67%)
③	検査受託業務	13 名 (14%)
④	製造業関連業務	2 名 (2%)
⑤	製品開発業務	1 名 (1%)
⑥	教育業務	4 名 (4%)
⑦	研究業務	5 名 (6%)
⑧	その他	1 名 (1%)

3) 参加者の認定制度への関わりについて

認定資格の取得状況および取得への希望 回答者 91 名

①資格取得済み 50 名 (55%) ②資格取得希望 30 名 (33%) ③資格取得希望しない 11 名 (12%)

取得済みまたは取得を希望する資格 回答者 55 名

①認定技術者 52 名 (95%) ②認定指導者 3 名 (5%)

4) 学会ホームページに掲載された，講習会テキストの事前確認の有無 回答者 95 名

あり 89 名 (94%) なし 6 名 (6%)

5) 講習科目の種類は適切であったか？ (数値は5点満点の平均点)

平均点 4.7 回答者 71 名

dz	評価の基準：5：すべての科目において適切であった。	dz
—	4：一部の科目に問題があったが、ほぼ適切であった。	—
—	3：約半数の科目は適切であった。	—
—	2：多くの科目について不適切であった。	—
—	1：すべての科目について不適切であった。	—
tf		ts

6) 講習内容のレベルならびに講習テキストは適切であったか？ (数値は5点満点の平均点)

	講演評価	テキスト評価	
平均点	4.1	4.1	回答者 90 名

dz	評価の基準：5：すべて理解できた。	dz
—	4：一部は難解であったがほぼ理解できた。	—
—	3：約半分は理解できた。	—
—	2：多くの内容について難解であった。	—
—	1：すべての内容が難解であった。	—
tf		ts

7) 講習時間は量的に適切であったか？ (数値は5点満点の平均点)

時間評価平均点	コメント 回答者 89 名
4.2	<ul style="list-style-type: none"> ・ 声が聞き取れなかった ・ スライドのプリントも欲しかった ・ 映像が興味深い ・ ポインター動かし過ぎ ・ 3 講師ともスライドが面白かったのでホームページで閲覧希望 ・ 現状がよく分かった

dz	評価の基準：5：適切であった。	dz
—	4：ほぼ適切であった。	—
—	3：もっと長時間の講習を受けたかった。	—
—	2：講習時間はもう少し短くてもよかった。	—
—	1：その他	—
tf		ts

8) 講習会の開催通知は適切であったか？ (数値は5点満点の平均点)

平均点 4.9 回答者 90 名

dz	評価の基準：5：適切であった。	dz
—	4：あやうく見落とすところであった。	—
—	3：他の人から情報を得るまで気が付かなかった。	—
—	2：その他	—
tf		ts

講習会開催情報の入手経路	回答者数 (27名中)
学会誌	7名 (7%)
ホームページ	15名 (16%)
知人より	1名 (1%)
メール	4名 (4%)

9) その他の意見

①講習の内容について

- ・講習科目として、臨床の現状（造血、臓器移植等）、最新の一年間の内容が総括・理解できる科目を希望。
- ・臨床を多くしてもらいたい。
- ・基礎はもっと内容を絞ってもらいたい。

②テキストのホームページ掲載について

- ・ホームページ掲載で問題ないと思う。
- ・テキストはホームページからの印刷のみで良いと思う。誰がダウンロードしたかを確認すべき。
- ・テキストをホームページに掲載する際は、修正版が出ないようにしていただきたい（ギリギリでも構わないので）
- ・テキストを先に見られてよかった。
- ・ホームページが分かりにくい。
- ・講習会の大会ホームページのリンクが、無効になっており問題だと思う。

③会場及び開催時期について

- ・マイクの音質が悪く、音がこもって聞き取りにくかった。
- ・会場の冷房が強すぎる。
- ・会場スクリーンが小さく見えなかった。スライドとテキストが一致しているわけではないことが分かった。
- ・例年通り、9月開催を希望する。
- ・8月は皆が夏休みを取るので学会参加が難しい。8月末は一般人が帰省から戻ったりするので、旅券も取りにくいし高価なので、9月末～10月の開催を希望する。地方よりも、やはり東京・大阪が便利。
- ・開催日を土・日・月など休日にしていただきたい。
- ・土曜日の夕方、日曜日11時頃を希望。
- ・次年の開催予定を県名だけでもいいので公表してほしい。

④その他（認定制度更新について）

- ・新規認定取得希望だが、認定単位など非常に難解で系統立っていない印象がある。
- ・QCWSに参加しているが、証明書の発行に追加で費用を徴収されるのには疑問を感じる。
- ・勝手ですが、認定の更新時に個人宛にハガキをいただければ幸いです。忘れる可能性があるため。

日本組織適合性学会 技術者認定制度委員会 QCWS 部会名簿 (2012 年)

担 当	氏 名	所 属
部 会 長 :	田中秀則	日本赤十字社 中央血液研究所 中央骨髄データセンター
副 部 会 長 :	中島文明	日本赤十字社 中央血液研究所 研究開発部
副 部 会 長 :	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
・ 企画解析部門		
臓器移植分野 :	石塚 敏	東京女子医科大学 腎センター移植免疫研究室 (新任)
造血幹移植分野 :	森島泰雄	愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部
輸 血 分 野 :	高 陽淑	大阪府赤十字血液センター
・ 試料管理部門		
DNA-QC 担 当 :	安波道郎	長崎大学 熱帯医学研究所
抗 体 -QC 担 当 :	中島文明	日本赤十字社 中央血液研究所 研究開発部
・ 部 会 員 :		
	太田正穂	信州大学 医学部
	吉川枝里	東海大学 医学部基礎医学系分子生命科学 (新任)
	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
	小林孝彰	名古屋大学 免疫機能制御学寄附講座 (新任)
	佐田正晴	国立循環器病センター 再生医療部
	宮崎 孔	北海道血液センター 検査三課
	橋口裕樹	福岡赤十字病院
	山本 賢	国立循環器病センター 臨床検査部

事 務 局 : 日本赤十字社 血液事業本部内

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 15 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 部会員 : 田中秀則¹⁾, 石塚 敏²⁾, 太田正穂³⁾, 木村 彰⁴⁾, 高 陽淑⁵⁾, 小林孝彰⁶⁾, 佐田正晴⁷⁾, 中島文明¹⁾, 成瀬妙子⁴⁾, 橋口裕樹⁸⁾, 宮崎 孔⁹⁾, 森島泰雄¹⁰⁾, 安波道 郎¹¹⁾, 山本 賢¹²⁾

(所属 : ¹⁾日本赤十字社中央血液研究所, ²⁾東京女子医科大学腎センター移植免疫研究室, ³⁾信州大学医学部, ⁴⁾東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, ⁵⁾大阪府赤十字血液センター, ⁶⁾名古屋大学免疫機能制御学寄附講座, ⁷⁾国立循環器病センター再生医療部, ⁸⁾福岡赤十字病院, ⁹⁾北海道赤十字血液センター, ¹⁰⁾愛知県がんセンター中央病院・血液細胞療法部, ¹¹⁾長崎大学熱帯医学研究所, ¹²⁾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

平成 23 年 1 月から QCWS 開催及び参加申込みについて、学会誌及び学会ホームページ (以下、HP に) 掲載することで案内した。今回から QCWS への参加を、会員個人参加から施設参加とし、平成 23 年 2 月 18 日までに 67 施設 (DNA-QC : 59 施設, 抗体 QC : 39 施設) から参加申し込みがあった。

平成 23 年 2 月から、今回の方針について QCWS 部会で討議を行い、DNA-QC 及び抗体 QC に用いる試料の選択を行った。また、臨床部門別での解析については、今年度も実施することとし、参加申込の際に①輸血, ②臓器移植, ③造血幹細胞移植, ④その他 (研究等) の 4 部門における QCWS の結果解析を行った。また、参加者との連絡及びデータ収集は、各施設の連絡者を通じ、電子メールで行った。

4 月 5 日に試料を発送し、4 月 15 日に QCWS 結果入力用のシートファイルをメールの添付ファイルとして参加施設に配布し、結果提出の締切りを 4 月 30 日とした。震災の影響及び一部試薬の供給停止の影響により、最終的には 56 施設 (DNA-QC : 51 施設, 抗体 QC : 38 施設) から結果が提出された。

5 月中に生データの取りまとめ、6 月中に各解析担当者による解析が行われ、7 月上旬に各検査法別結果を学会ホームページ (以下、学会 HP) に順次掲載し、各検査法での解析結果に基づき、部門別解析を行い、その結果を 8 月 10 日に学会 HP に掲載することで、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。

2. QCWS のテーマ及び試料選択について

DNA-QC のテーマは、①正確な DNA タイピングが出来ること, ② DNA タイピング結果が正しく表記されていること, ③ DNA 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の 3 点とした。また、試料については、前年度の QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で、ある程度高頻度で見られる HLA アリルであること」、「日本人由来で稀な HLA アリルであること」の要件に合う細胞を 2 種類購入し、過去使用した細胞を含め 4 細胞から抽出した DNA の配布を行った。

抗体 QC のテーマは、昨年同様、通常検査で検出される抗体で①エピトープと許容抗原により正確な

抗体特異性解析が行えること, 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とし, テーマに沿った4検体を選択し, 配布することとした。また, ①IgGとIgMのHLA抗体が含まれること, ②HLA以外にMIC抗体の特異性を含むことも試料選択の要件とした。交差適合試験については, アンケート調査で細胞も準備して欲しいとの希望もあったが, 対応が困難なため, 配布検体の一部を使った任意参加によるデータ収集を行い, クロスマッチ試験の現状把握を行った。

3. 参加者数及び参加施設

参加者数は209名(事前参加:181名, QCWS集会当日参加:28名), 参加施設数は69施設(集会のみ参加を含む)であった(表1)。

4. 解析方法

検査法別解析は, DNA-QCでは①SSO法(Luminex), ②SSP法及びSSO法(Luminexを除く), ③SBT法及び④結果の表記法について, 抗体QCでは, ①FlowPRA法, ②Lab Screen, ③プロゾン様現象に関する追加発言, ④WAK FlowおよびICFA法, ⑤その他検査法およびクロスマッチの5法について解析を行った。部門別解析は, 各検査法別の解析結果から, 各参加部門(輸血・臓器移植・造血幹細胞)での検査実施状況の解析及び「HLA-QCワークショップ結果評価の基準」に従った提出結果の評価を行い, その状況について解析した。各解析分担項目と解析担当者(所属)は, 以下のとおりである。

1) タイピング結果解析

- ①Luminex(SSO)法について: 石井博之(大阪府血液センター)
- ②SBT法について: 吉川枝里(東海大学医学部)

表1. 第15回QCWS参加施設

1	山田赤十字病院	輸血検査室
2	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部
3	大阪府赤十字血液センター	検査部 検査三課
4	広島県赤十字血液センター	技術部 検査課
5	東京都立小児総合医療センター	検査科 輸血検査室
6	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
7	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
8	獨協医科大学病院	臨床検査部
9	香川県立中央病院	中央検査部
10	NPO 法人腎泌尿器疾患研究所	
11	東海大学医学部付属病院	臨床検査技術科 移植免疫検査室
12	東京都赤十字血液センター	検査一部 検査二課
13	岡山県赤十字血液センター	検査課
14	日本赤十字社 九州血液センター	検査二課
15	高知医療センター	MCM 検査室
16	関西医科大学附属病院	輸血部
17	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部
18	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部
19	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部
20	近畿大学医学部附属病院	輸血部
21	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部
22	兵庫医科大学病院	輸血部
23	株式会社 ベリタス	技術営業部
24	鷹揚郷腎研究所 弘前病院	HLA 検査室
25	広島大学病院	輸血部
26	三重県赤十字血液センター	学術品質情報課
27	静岡県立総合病院	輸血・細胞治療室
28	北海道赤十字血液センター	検査部 検査三課
29	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
30	北海道大学病院	検査・輸血部
31	徳島大学病院	輸血部
32	仙台社会保険病院	検査部
33	福岡赤十字病院	検査部 HLA 検査室
34	愛知県赤十字血液センター	検査一課
35	大分県立病院	輸血部
36	東京女子医科大学	腎センターE4 移植免疫研究室
37	特定非営利活動法人 HLA 研究所	
38	株式会社 リプロセル	技術部
39	東海大学	医学部基礎医学系分子生命科学
40	松江赤十字病院	検査部
41	株式会社エスアールエル	信頼性保証部門品質保証部 品質保証企画グループ
42	株式会社 医学生物学研究所	営業推進部
43	虎の門病院	輸血部
44	株式会社 保健科学研究所	特殊分析センター 染色体遺伝子関連・細胞検査グループ
45	株式会社ビー・エム・エル	特殊分析部 ゲノム検査課
46	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部
47	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
48	札幌北楡病院	臨床検査科
49	宮城県赤十字血液センター	技術部検査一課
50	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科 HLA 検査室
51	名古屋第二赤十字病院	医療技術部 組織適合検査室
52	県立広島病院	臨床研究検査科
53	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
54	大阪府立急性期・総合医療センター	臨床検査科 組織適合性検査室
55	三菱化学メディエンス株式会社	遺伝子分析研究部 細胞性免疫グループ
56	社会保険中京病院	検査部

- ③ DNA 検査法解析 (Luminex, SBT 以外): 安尾美年子 (東京女子医大)
- ④ 結果の表記法: 橋口裕樹 (福岡赤十字病院)
- 2) 抗体検査結果解析
- ① FlowPRA 法の検査状況の解析: 石塚 敏 (東京女子医大)
- ② Lab Screen による抗体検査: 宮崎 孔 (北海道血液センター)
- ③ (追加発言) 抗体検査におけるプロゾーン様現象: 藤井直樹 (HLA 研究所)
- ④ (追加発言) LABScreen Single Antigen とプロゾーン様現象: 黒田ゆかり (九州血液センター)
- ⑤ (追加発言) QCWS 試料について: 中島文明 (中央血液研究所)
- ⑥ WAK Flow および ICFA 法による抗体検査: 平田康司 (岡山県血液センター)
- ⑦ その他検査法およびクロスマッチ: 中島文明 (中央血液研究所)
- 3) 部門別解析及び結果評価
参加部門での現状と結果評価 (施設別)

- ① DNA タイピング: 田中秀則 (中央血液研究所)
- ② 抗体検査: 高 陽淑 (大阪府血液センター)

5. QCWS サンプルの総合結果

各施設の精度管理, 技術訓練に役立てることを目的に, DNA 及び抗体サンプルの総合結果を示す。DNA サンプルは, 本ワークショップで解析したデータに中央血液研究所で精査した結果を追加し, 総合的にリアサインした。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 領域は, 1 本鎖 DNA に調製して塩基配列を確定し Ambiguity を回避した結果を示す。解析データベースは IMGT/HLA Database Sequence Alignments based on Release 3.4 (Apr-2011), 表記は本学会 HLA 標準化委員会のアレル表記法と結果報告の原則 (2010 年版 改訂 1.1 版) に則り記載した (表 2)。また, 抗体サンプルは, 抗体 QC 参加施設の総合判定結果を集計して, 3 分の 2 以上の参加施設が陽性あるいは陰性判定した抗原をスコアで示した (表 3)。

表 2. 第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート: DNA サンプルの総合結果

HLA-Class I	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
H2301	A*24:02:01:01 A24	A*26:02 A26	B*15:01:01:01 B62	B*52:01:01:01 B52	C*03:03:01 Cw9	C*12:02:02 Cw12 ※
H2302	A*26:02 A26	A*31:01:02 A31	B*15:01:01:01 B62	B*39:02:02 B39	C*03:03:01 Cw9	C*07:02:01:01 Cw7
H2303	A*03:02 A3	A*24:02:01:01 A24	B*07:02:01 B7	B*13:02:01 B13	C*06:02:01:01 Cw6	C*07:02:01:01 Cw7
H2304	A*26:03:01 A26	- -	B*35:01:01:01 B35	B*51:01:01 B51	C*03:03:01 Cw9	C*14:02:01 Cw14 ※
HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2301	DRB1*14:12:01 DRB3*01:01:02:01 DR14 DR52	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02 DR15 DR51	DQA1*01:03 DQB1*03:01:01 DQ7	DQA1*05:03/07 DQB1*06:01:01 DQ6	DPA1*02:02 DPB1*05:01 DPw5	DPA1*02:01 DPB1*09:01 DPw9 ※
H2302	DRB1*14:06:01 DRB3*02:02:01 DR14 DR52	DRB1*14:54 - DR14 -	DQA1*01:01/04/05 DQB1*03:01:01 DQ7	DQA1*05:03/07 DQB1*05:03:01 DQ5	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 DPw5	- - -
H2303	DRB1*01:01:01 DRB4*01:01:01:01 DR1 DR53	DRB1*07:01:01:01 - DR7 -	DQA1*01:01/04/05 DQB1*02:02 DQ2	DQA1*02:01 DQB1*05:01:01 DQ5	DPA1*02:02 DPB1*05:01 DPw5	DPA1*02:01 DPB1*09:01 DPw9 ※
H2304	DRB1*13:07:01 DRB3*01:01:02:01 DR13 DR52	DRB1*14:03:01 DRB3*02:02:01 DR1403 DR52	DQA1*05:03/07 DQB1*03:01:01 DQ7	DQA1*05:05/09 - -	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 DPw2	- - -

上段(斜体): HLA 遺伝子型
下段(太字): HLA 型

※このアレルに対応する HLA 型が判明していないためアレル名の第 1 区域で表記

- 各プローブの Pmin/Nmax 値 (P/N 値) の比較
- 各施設のカットオフ値の変更状況
- アサインミスとその原因

なお、詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「15 回 QC ワークショップ報告集」を参照されたい。

3. 結果と考察

各参加施設のデータ比較では、概ね良好であったが、一部の施設で反応データの不備やアサインミスが見られた。反応データの不備については、HLA-DRB1 の陽性コントロールピーズ蛍光値の平均値が低く、ばらつき (%CV) が 67.2% と大きい施設が 1 施設あった。当該施設の 4 検体 (H2301 ~ H2304) の蛍光値は、1847, 725, 5332, 2254 と H2303 以外は蛍光値が低く、他施設の値と比較すると半分以下で PCR の増幅不良が疑われた。増幅不良の場合、当然ながら P/N 値も全体的に低くなり、アサインミスの原因ともなりうる。当該施設の判定結果自体には問題が見られなかったが、HLA-B, C についても HLA-DRB1 と同様の傾向が見られ、PCR の工程 (DNA の濃度や純度、増幅試薬の調整、サーマルサイクラーの温度等) に問題がないかチェックする必要があると考えられた。

各施設のカットオフ値の変更状況では、複数の施設が同じプローブのカットオフ値を変更しているものがいくつか見られた。原因としては、非特異反応や特定のアリルに対するクロス反応が高い場合、特

定アリルとの反応が弱い場合等のある程度試薬の性能に起因すると考えられる。カットオフ値については、各メーカー内の試験結果より設定されており、同一のプローブであってもロットにより異なることがある。大部分は設定どおりの性能がでているが、一部その設定値が高い場合、あるいは低い場合もあり、個々のプローブの特性を把握することは、判定を行う上で大変重要である。

アサインミスについては、昨年同様 5 件 (HLA-A: 1 件, HLA-B: 2 件, HLA-C: 1 件, HLA-DQA1: 1 件) あり、原因としては、プローブとの反応が偽陽性によるものが 2 件 (No. 1, 5), 偽陰性によるものが 3 件 (No. 2, 3, 4: 同一施設) であった。No. 4 については、本来陽性となるべき 3 つのプローブとの反応が弱く、非特異反応の強い陰性プローブも散見され、判定するには苦慮するデータであり、再検査し確認する必要があると考ええる。他の 4 件 (No. 1, 2, 3, 5) については、反応データに大きな問題はなく、判定用ソフトの出す警告 (偽陽性や偽陰性の可能性のあるピーズ No. の表示等) や判定結果のタイプ、各プローブとの反応を慎重に判断すれば防げた判定ミスであると思われた。

Luminex 法は、プローブの種類が多く、数個のプローブの判定をミスしても何らかのタイプがアサインされてしまうことがある。この様なミスを防ぐためには、使用する試薬の特性を良く理解すると共にアリルに対する知識 (頻度やハプロタイプ等) も必要である。

15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. はじめに (HP 掲載結果: 表 2)

SBT 法の参加施設は 6 施設で, HLA-A, B, DR は全施設, C は 5 施設, DQB1, DPB1 は 2 施設がタイピングを行った。使用されたキットは AlleleSEQR (abbott) のみであった。昨年シークエンスプライマーが改良された AlleleSEQR DRB1 キット (abbott) を使用するには, 解析ソフト上の設定変更が必要であるが, その事実を知らない施設および販売企業があった。その為, 施設によって DRB1 の結果に違いが生じたが, どちらの結果も正解とした。

2. 解析結果と考察 (HP 掲載結果: 図 1-4)

今回 3 種類の表記ミスが認められた。表 3 に示すように, ほとんどが①の第 1 区域アンビグニティーにおける表記ミスであった。

1) 第 1 区域アンビグニティー表記法における不正解

HLA-B の H2301 と DPB1 の H2301 および H2303 において, 第 1 区域で区別出来ないアンビグニティーとなった。HLA-B では, Allele1 の群が全て B*15 に対し, Allele2 の群は B*52 と B*78 が混在している (図 1)。この場合の表記は, 「HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則」の II.1 (2) に相当するため, B*15:01/24/38/+, B*52:01/78:05/+ が正解となる (図 2)。しかし, 6 施設の結果を集計すると 4 パターンの回答が得られた (①~④)。同様に, HLA-DPB1 においても Allele1 の群で DPB1*05 と DPB1*22, Allele2 群では DPB1*09 と DPB1*35 が混在している (図 1)。HLA-B の場合とは異なり, 両方のアリル群での第

一区域アンビグニティーとなる。この場合は, 「アリル表記法の原則」の II.3 に相当するため, DPB1*05:01//+, DPB1*09:01//+ が正解となる (図 3)。やはり, 回答した 2 施設で表記が異なった (①, ②)。

このように, 第 1 区域アンビグニティーの表記方法を理解していない施設があり, このことは「アリル表記法の原則」の説明文が初心者には分かりづらいことが一因かもしれない。

2) Null アリルの表記法における不正解

Null アリルの表記は毎年ミスが認められ, 今年も表記内に「N」を記載した施設があった。複数の候補アリルの中に Null アリルが存在する場合は, 「アリル表記法の原則」の II.2 に記載されている通り, 「第 2 区域の数字」を記載するため, HLA-C の H2301 においては, C*03:03/20N/69 ではなく, C*03:03/20/69 が正解となる (図 4)。

3. まとめ

今年の不正解の主な原因は表記ミスであった。例え正確で精度の高い解析が出来たとしても, 表記ミスをすることで意味合いの全く違い, 間違った結果報告をしていることになる。誰が見ても判定結果を正しく把握させるためには, 決められた表記法を守り, 正しく報告することが肝要である。

また, 改良キットを使用するに当たり, 解析ソフトの設定を変更する必要があることを知らない施設およびソフト販売会社があった。アンビグニティー解消のため, 以前よりも広い塩基配列領域の解析が出来るように DRB1 のキットが改良されたが, 解析ソフトの設定変更をしていなかった施設は,

改良キットを使用しているも、改良前と変わらないタイピング結果となった。施設内だけでの評価では気づきにくく、今回のように複数施設のデータを比

較することで発見できたことから、このようなQCワークショップに積極的に参加することで施設のタイピング精度を担保できると思われる。

第15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, SSP 法—

安尾美年子

東京女子医科大学腎センター移植免疫研究室

1. はじめに

今回の DNA-QCWS は例年と異なり、これまで参加施設の3割近くが使用していた SSO 法の RELI キットが製造停止となったため、試薬が不足している施設やこれに代わるキットが決まっていない施設はデータの提出を見合わせた。また、残り少ない RELI では再検査の余裕がなかった施設や、使い慣れないキットを使用した施設もあったようである。また、東日本大震災の影響もあり、RELI での参加は6施設のみとなった。このデータについては残りの試薬がある間だけの使用となるため、詳細な検討は省略させていただいた。

尚、2種類以上のキットを使用した施設において、方法別のアレル判定シートへの結果記入が方法別ではなく総合判定となっている施設があり、今後データの提出要領を徹底したい。

2. SSO 法 (DynaL RELI)

6施設中1施設(23D24)のみ HLA-C および DQB1 を実施されているが、SSP との併用であり、1部結果が記載されていない個所があった。また同施設の H2301 の C ローカスで発色が弱いプローブがスコア:1であったため、ミスアサインとなり、DRB1 は H2302・H2304 が誤判定であった。その他の施設についてはとくに問題ない結果であったが、

一部に別キットによる判定と思われる結果を記載した施設があった。また、ambiguity が少し異なるのはロット No. が全施設で異なるためと考えられた。

3. SSP 法

今回 SSP の結果を提出した施設は20施設であったが、そのうち5施設は SSP を補助として使用していた。使用キットの種類は6種類であり、そのうち13施設が Micro ssp JPN (OneLambda 社)、3施設が Micro ssp を使用していた。その他は Micro ssp 1L/2L、補助として Micro SSP Specific, SSP Unitray, All Set Gold SSP である。

SSP を補助として使用した施設の目的は、別方法による判定結果の確認のためであると思われるが、1アレルごとにアレル特異的なキットを使用するのは日常的ではないため、今後の DNA-QC については提出方法を検討した方が良いと思われた。

使用頻度が一番高かった Micro SSP JPN は日本人に限られたタイピングでは判定が容易と考えられるが、1ウエルのみで決定される抗原型が、今回のサンプルだけでも9種類(A24・A31・A3・DR1・DR7・DR15・DQ3・DQ5・DQ6)あるため、1ウエルの反応不良でも1抗原を見落とす可能性があり、注意しなければならない。

これによる誤判定は23D27のA24およびDQ5、

また Micro SSP ABDR でも 23D02 の DR7 が見落とされた。一方、false negative が 1～4 箇所認められた施設は他に 6 施設あったが、判定に影響がなかったようである。これについてはスコアの記載ミスによるものか、別の方法で確認された結果であったのかは不明である。

また、SSP は本来 low resolution の検査が目的で作製されたキットであったため、2 桁の判定でも良いとされてきたが、4 桁で誤判定になる場合を考えると、今後どちらかに統一するべきかもしれない。

4. 結果報告と表記

SSP のアレル判定に抗原型を記載している施設があった (23D57)。今回が初めての参加であるかは不明であるが、抗原型としては間違いではないのに、抗原型と遺伝子型を混同しているような記載も含まれていた。また、23D59 の施設はアレル表記に

アステリスク (*) が記載されていなかった。その他は C ローカスのアレル表記が Cw となっているもの、第 2 区域の 2 桁に L・N 付記されているものがあった。

また、方法別のアレル判定シートに、別方法の判定を含めた総合判定と思われる結果を記入した施設もあり、同一キット同一ロットであるのに、あるべき ambiguity が無いなどの差異が見られた。

5. おわりに

日常業務に追われる中での HLA-QC であるので、QC 担当者からのメールなど、見落とすこともあると思われる。日本人由来のサンプルであるなど、見落としていけば簡単には結果が出せないの、注意事項など見落とされないような工夫が必要であるかもしれない。

第 15 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 結果の表記法—

橋口 裕樹

福岡赤十字病院

1. 概要

今回、第 15 回 QCWS の参加施設は 51 施設であり結果の表記は A, B, C, DRB1 を評価対象とし DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1, DPA1 は評価対象外とした。ローカス別の参加数は A, B, DRB1 が全 51 施設 (100%) C は 39 施設 (76.4%) であった。今回の解析は“HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)”をもとに評価を行った。表記法の主な改箇所を下記に示す。

1) 改訂箇所 (1)

「II. アンビギュイティ (ambiguity) の結果表記

について」の「2. 第 2～4 区域で判別できないアレルが複数存在する場合の表記」について、以下の改訂を行う。

第 2 区域で判別できないアレルが複数存在する場合、最も数字の小さいアレルを最初に記し、その後に「/ (スラッシュ)」を入れ、判別できない他のアレルの第 2 区域の数字を小さい順に記す。「/(スラッシュ)」で表記するアレルは、最大 3 種類までとし、4 種類以上の場合、最後に「/+ (スラッシュ、プラス)」を付記する。

2) 改訂箇所 (2)

「IV. 血清学的 HLA 型の結果表記について」、複数の HLA 型表記について、以下の内容を追加する。

DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合、最も数字の小さい HLA 型から順番に記し、各 HLA 型は「/ (スラッシュ)」区切る。

例：HLA-DRB1*04:03/05/06/+ と判定された場合は、「HLA-DR4」と表記し、HLA-A*02:06/10/21/+ と判定された場合は、「HLA-A2/210」と表記する。

3) 改訂箇所 (3)

「IV. 血清学的 HLA 型の結果表記について」、HLA-C 座の HLA 型表記について、以下の内容を追加する。

WHO 命名委員会と日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会の何れでも HLA 型が不明な場合は、第 1 区域で分類される HLA 型で表記する。また、HLA-C 座のアリル HLA-C*12 から C*18 に対応する HLA 型は公認されていないが、第 1 区域を用いて HLA 型とする。これらの場合、備考欄に「このアリルに対応する HLA 型が判明していないため、アリル名で表記している」等の説明を付記してもよい。

2. 結果

DNA 表記は、全て 90% 以上の正解率であった。HLA 型表記は正解率が 90% 以下の箇所が 8 ヶ所あり、表記に不備が目立った。

表 1. 主な DNA 型表記での減点対象例

ambiguity の表記が不正確 (-15)	A*24
“L” を付記 (-15)	A*24:02/02L/03/+
“N” を付記 (-15)	A*24:02/09N/10/+
“.” コロンなし (-5)	A*2602
ローカス名の表記なし (-5)	24:02/03/04/+
“*” の表記なし (-5)	24:02/03/04/+
“*” が全角 (-5)	DRB1 * 15
判定不能表記が “undefined” でない (-5)	判定不能
Blank の表記 (-5)	A*—
小さい順に表記されていない (-10)	DRB1*14:54/01/02/+

表 2. 主な HLA 型での減点対象例

表記が不正確 (-10)	B15
小さい順に表記されていない、/ の後のローカス名が不要 (-10)	B62/B15
小さい順に表記されていない、 () の表記 (-10)	B62 (B15)
第 1 区域を用いて表記していない (-10)	Cw12 を blank や - を記載
判定不能表記が undefined でない (-5)	判定不能
“DRB” と表記している (-10)	DRB1
“*” を表記している	Cw14*

3. 考察

今回は、特に HLA 型表記の間違えが目立つ形となった。ローカス別では、C ローカスは前述した改訂箇所 (3)、B ローカスは改訂箇所 (2) の表記方法での誤りが多かった。再度、“HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)” を熟読されて、正しい表記での報告をお願いしたい。

第 15 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 FlowPRA 法—

石塚 敏

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

1. 概要

今回、FlowPRA 法では、全施設から Negative Control と Sample の FCS ファイルの提出をお願いし、統一した条件設定による解析が可能になった。

FlowPRA 法の検査状況の解析について詳細な集計データ等は、MHC 誌紙面の都合上、学会ホームページに記載されている概要資料を参考にして頂きたい。

2. FlowPRA 法の検査状況

FlowPRA Screening IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体：21 施設、HLA Class II 抗体：20 施設（内訳は、輸血関連 13、臓器関連 14、造血関連 7: 重複施設を含む）であった。

FlowPRA Screening IgM test の実施施設は、HLA Class I 抗体：3 施設（内訳は、輸血関連 3、臓器関連 2、造血関連 3: 重複施設を含む）、HLA Class II 抗体：1 施設（内訳は、輸血関連 1、臓器関連 1、造血関連 1: 重複施設を含む）であった。

FlowPRA Single Antigen IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体：3 施設、HLA Class II 抗体：3 施設（内訳は、輸血関連 3、臓器関連 4、造血関連 2: 重複施設を含む）であった。

使用機器は、ベクトン・ディッキンソン 11 施設、バックマン・コールター 10 施設であった。

3. FlowPRA Screening IgG test 解析結果

今回、配布された 4 種類の Sample は、すべて HLA Class I & II 抗体共に陽性であった。参加施設から報告して頂いた判定スコアは、一致率 100% で結果の乖離を示した施設はなかった。

陽性率 % は、1 施設において HLA Class I & II 抗体共に極端に陽性反応が鈍い施設があった。データ提出用ファイルに添付されているヒストグラム、また FCS ファイルから Control Besds 等を参照すると問題が無いと考えられることから、Positive Control または Anti-Human IgG-FITC の力価の確認が必要である。

4. FlowPRA Screening IgM test 解析結果

配布された 4 種類の Sample は、HLA Class I 抗体がすべて陰性であると推測されるが、1 施設で陽性判定があり、そのため一致率 66.7% となり結果の乖離を生じた。

結果の乖離した施設のデータ提出用ファイルのヒストグラム、また FCS ファイルから Control Besds 等を確認したところ問題が無いと考えられたため、解析法による相違であることが推察された。

5. FlowPRA Single Antigen IgG test 解析結果

データ提出用ファイルの図を確認すると、Negative Control の初期設定が各施設で若干異なっていた。また、施設によってはメーカー純正の Negative Control serum ではなく、自家製 Negative Control serum を使用しており、明らかにデータの相違が認められた。今後、使用機器に対して Calibration Beads などによる初期設定の確認と Cut-off の設定基準が必要であると考えられる。

6. まとめ

今回、FlowPRA 法の解析では、全施設の FCS ファイルを統一した条件設定にて再解析を実施すること

が出来た。

再解析することにより非特異的反応を見極める Control Beads や解析に使用したビーズ数を確認する

ことがより可能になった。

来年度は、Positive Control についてもデータ提出用ファイルに添付出来るようにしたい。

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 LABScreen—

宮崎 孔

北海道赤十字血液センター

1. はじめに

LABScreen は Mixed, PRA, single antigen (LS-SA) の 3 種類の試薬があるが、今回のワークショップでは Mixed が 5 施設、PRA は class-I, -II 共に 3 施設、LS-SA class-I は 20 施設、class-II では 17 施設の参加となった。全 22 施設中 20 施設で同一 Lot の LS-SA (class-I) が使用されていたため、LS-SA 中心にデータの解析を行った。解析のポイントは次のとおりである。

- 1) LS-SA での個別の HLA 抗原に対する判定結果は、全施設の結果の 2/3 以上一致を consensus として評価し、consensus が得られない抗原は判定保留とした。
- 2) 施設間の不一致が多かった HLA 抗原については蛍光値 (Baseline Normalized Value: BNV) の分布について解析を行った。
- 3) 各施設の BNV 平均値のバラツキ (シフト) について解析を行った。

なお、結果の詳細は学会ホームページの「第 15 回 QCWS 解析報告集」を参照いただきたい。

2. 結果の解析および考察

SH2301 ~ SH2304 の HLA 抗体の有無 (総合結果) は全ての施設が正解であった。LS-SA での HLA 抗原別の判定では、consensus が得られた抗原では全 20 施設でほぼ一致した結果が得られた。一方、

class-I では 11%、class-II では 14% の抗原で施設間の乖離が認められた。

2.1 cutoff の設定について

施設間の乖離が多い HLA 抗原での全施設の BNV の分布に注目すると、LS-SA の cutoff 付近と考えられる 500 ~ 1000 付近に分布していた。例えば BNV=800 を示す弱い反応の場合は cutoff を 500 としている施設では陽性、cutoff を 1000 としている施設は陰性と判定するため、施設間の乖離が多くなるものと考えられる。Cutoff の設定は本来その施設でのデータを元に検査目的に合わせて設定するものであるが、最近では LABScreen で陽性と判定しても移植や輸血の成績に影響しない例も報告されているため、十分な注意が必要である。自施設での臨床データを元に高い cutoff を設定した場合、本 QCWS で設定した consensus との乖離が多くなり施設評価が低くなる可能性がある。しかし、その施設での抗体検査結果と臨床データの相関が高いのであれば、むしろそちらの方が検査目的に合った実際的な正解であるとも考えられる。

2.2 各施設での平均蛍光強度の差異

各施設の全データの中から明かな陽性反応 (BNV>2000) を示したビーズだけの BNV 平均値を施設毎に求めて比較すると、全施設の BNV 平均値

±2SD を外れる施設がいくつか見られた。これらの施設は LS-SA に含まれる positive control beads の BNV で比較しても、同様に全施設の BNV 平均値 ±2SD を外れる傾向にある。平均蛍光値が高くシフトしている施設 (Luminex) で cutoff を低く設定すると、結果の乖離 (偽陽性) がより増える結果となってしまう。Luminex の蛍光値が全国平均から外れている施設においては、再度キャリブレーションを実施することを勧める。なお、それでも改善が見られない場合は検査プロトコルの再確認、あるいは QCWS のデータを元に cutoff を再設定する必要もある。

2.3 その他の判定不一致

その他の判定結果の乖離の原因として、特定のビーズだけの実測値の異常、実測値と判定が明らかに異なる判定 (転記) ミスがいくつか認められた。LS-SA ではデータ数が膨大になるため、データ解析は慎重に行い、適切なデータ確認操作も必要になる。

さらに判定不一致の原因として、アレルによって反応性が異なる場合がある。SH2302 は DRB1*01:01, *01:02 陰性, DRB1*01:03 陽性となる検体であるため、DR103 陽性と明記しない場合は DR1 に対する判定は陽性とするべきである。しかし、全施設で同じ反応性を示したにも関わらず、「DR1 陰性, DR103 コメント無し」とした施設が見られた。このようにアレルによって反応が異なる場合は、少なくとも判定保留として陽性扱いするべき

である。

3. まとめ

LABScreen による HLA 抗体スクリーニングの結果は全施設正解であった。抗体特異性に関しては施設間の乖離がいくつか認められ、その原因の多くは各施設での cutoff 設定による弱陽性反応の判定の違いによるものであった。弱陽性反応や突発的な異常反応については、複数のアレル、CREG の反応などエピトープを考慮して抗体特異性の判断を行うと判定の精度は向上すると考える。また、施設 (検査目的) によって cutoff が異なる可能性があるため、LS-SA にとっての本 QCWS の活用法は、各抗原に対する判定の一致よりも自施設の BNV が他の施設と比べて大きく外れていないことを確認することが重要となるかも知れない。

HLA 抗体検査は LABScreen と FlowPRA が主流となっているが、年々 LABScreen (特に LS-SA) が増えており、今回の LABScreen に参加した全 22 施設のうち LS-SA を実施していないのは 2 施設だけである。このように LS-SA は現在の HLA 抗体特異性同定のスタンダードとなっているが、臨床成績との乖離、自然抗体様の反応 (偽陽性?), 血清検体による偽陰性などの問題もある。従って正しい結果を導き出すためには FCXM 等のダイレクトクロスマッチとの組み合わせが理想的である。

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 (追加発言)— 抗体検査におけるプロゾン様現象について

1. LABScreen Single Antigen とプロゾン様現象 黒田ゆかり (日本赤十字社九州血液センター)

2010 年 9 月日本血液事業学会において、岡山県赤十字血液センターの平田氏らによって他方法との

結果の乖離から、LABScreen Single Antigen においてプロゾン様現象が起きることが報告された。その後、我々はこのプロゾン様現象について検討した結果、プロゾン様現象が非働化によって抑制さ

れることを見出し、プロゾーン様現象への補体の関与について2011年2月日本組織適合性学会近畿地方会で報告した。

今回、QCWSの検体(class I)においてこの現象の有無を確認したところ、蛍光値に差が見られた検体が存在した。SH2301では56°C 30分の熱非働化後にいくつかの抗原ビーズで蛍光値が10,000程度高くなったが、このSH2301を含む全ての検体においてプロゾーン様現象の影響による陰性陽性判定の乖離は無く、QCWSへの影響は無かった。

新鮮血清を用いた場合、LABScreen Single Antigenではプロゾーン様現象によって蛍光値が大きく変動する可能性があることから、統一した対応策が望まれる。

2. 抗体検査におけるプロゾーン様現象

藤井直樹, 小島裕人, 佐治博夫 (特定非営利活動法人 HLA 研究所)

1) はじめに

抗原抗体反応において、抗体過剰のために反応が抑制されることをプロゾーン現象という。Luminex法におけるHLA抗体検査で類似の現象が見られ、EDTA処理により改善されることが報告されている^{1,2,3)}。そこで、今回QC検体でEDTA処理をすることによりこの現象に関する検討をおこなった。

2) 検査方法

Luminex 法

- LABScreen Single Antigen (One Lambda) (SA)
- LABScreen PRA (One Lambda)
- WAKFlow HLA 抗体クラス I/クラス II (MR) (湧永製薬)

3) 結果

EDTA処理の有無により、MFI (Median Fluorescence intensity) 値に大きな差がみられた検体はPRAではSH2301, SAではSH2301, SH2302, SH2303である。Class IIではPRAでSH2302, SH2303で、SAではSH2302, SH2304である。例えば、SH2301のClass I (SA) ではB*49:01のMFI値は血清で10,158, EDTA処理後で23,051, SH2304のClass II (SA) ではDQB1*03:01のMFI値は血清で19,996, EDTA処理後で28,252であり、EDTA処理後のMFI値が高

い抗体ほど大きな差がみられた (ホームページ掲載図1, 図2)。

WAKFlow HLA 抗体クラス I/クラス II (MR) の検査では、MFI値に大きな差はみられなかった。

4) 考察

今回の結果はMFI値の高い抗体ほどEDTA処理前のMFI値が低値であり、プロゾーン様現象といえる。陽性判定が陰性化する検体はなかったが、抗体過剰の検体ではプロゾーン様現象がおきることにより、DSA (Donor Specific Antibody) を見落とす可能性がある。そのため、検査には血漿検体を用いるのが望ましいが、血清検体を用いる場合はEDTAを加えて検査したほうが良い。とくに経時的な抗体価の推移を見るときに留意が必要である。

WAKFlow HLA 抗体クラス I/クラス II (MR) においては、プロゾーン様現象は確認されなかったが、当研究所ではLS同様にこの現象が確認された検体もあり、キットの特性によるものではないと考えられる。

参考文献

1. Lowe D, Hathaway M, Briggs D. The high-dose hook effect in the detection and monitoring of HLA specific antibody by Luminex assay. *Int J Immunogenetics* 2007; 34: 288.
2. Kosmoliaptsis V, Bradley JA, Peacock S, et al. Detection of immunoglobulin G human leukocyte antigen-specific alloantibodies in renal transplant patients using single-antigen-beads is compromised by the presence of immunoglobulin M human leukocyte antigen-specific alloantibodies. *Transplantation* 2009; 87: 813.
3. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation*. 2011 Sep 15; 92(5): 510–515.

3. 抗体QCサンプルに関するコメント

中島文明 (日本赤十字社中央血液研究所)

抗体サンプルの選定にあたっては、テーマに基づ

いて通常検出する特異性かつ明確な反応を示す血清を採用している。具体的には、① LCT 特異性から選択する、②各 HLA 抗体検査法で確認する、③高バックグラウンド、非特異反応の有無を確認する、④ Ig isotype の確認をして配布している。非働化によるシグナルの変化も確認しており、特異性として問題ないレベルであることも把握している。

これらは、蛍光値自体は大きく改善されているよ

うに見えるが、コントロールと比較した比率では大きな差はない。日常の検体で観察されるプロゾーン様現象は、特に補体結合性抗体で認められるため、その重要度は無視できない。しかしながら、QCWS サンプルはそのような影響を受けない血清を配布しており、今回のデータで、測定期間中にシグナルが変化した形跡も認めなかった。

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 WAKFlow & ICFA 法—

平田 康司

岡山県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

WAKFlow HLA 抗体検出試薬（以下 WAKFlow-MR）は 12 施設が使用し、その内 8 施設はクラス I と II 両方、4 施設はクラス I のみの使用であり、前年度に比べ使用施設数が少し増加した。試薬ロットはクラス I：4 種、クラス II：3 種の使用であった。非特異反応吸着処理として WAKFlow-MR 専用の血清処理試薬は、クラス I：8 施設、クラス II：6 施設で全サンプルにおいて使用されていた。（HP 掲載：表 1）

1.2. 結果と考察

1) 各ビーズの反応性の比較

WAKFlow-MR は、陰性対照血清および被検血清において精製 HLA を結合した各 HLA ビーズおよびバックグラウンドビーズの蛍光 Median 値より Index 値が算出され、その Median 値および Index 値によってカットオフ値が設定され、各 HLA ビーズにおける抗体反応性が判断される。

クラス I では、SH2301 および SH2303 のように

陰性・陽性反応ビーズが比較的明確に区別できるサンプルでは僅かな施設間差（血清前処理の影響を含む）および試薬ロット間差は抗体反応性の判断にはほとんど影響がなかった（HP 掲載：図 1 および図 3）。しかしながら、SH2302 および SH2304 では抗体有無（HP 掲載：表 2）および Index 値が高値を示す HLA ビーズの抗体反応性：陽性の判断には問題はないが、Index 値が低値を示し明確に陰性・陽性判定できない HLA ビーズにおいては僅かな施設間差および試薬ロット間差が抗体反応性の判断に影響しているようであった（HP 掲載：図 2、図 4 および図 9）。一方、クラス II ではパネルの抗原性解釈（DP 抗原等）より判定に相違がみられるが、施設間差および試薬ロット間差がほとんどみられず、抗体反応性の判断に施設間で乖離はほとんどなかった（HP 掲載：図 5～図 8 および図 10）。

2) 各サンプルの抗体特異性について

WAKFlow-MR は、抗体と反応を示さない「許容抗原」を決定する検査法として HLA ビーズパネルは構築されているため、各施設からの WAKFlow-MR の抗原別抗体判定よりコンセンサスを導き

WAKFlow-MR で判別可能な許容抗原を示した (HP 掲載: 表 3)。また, 抗体特異性が同定できたものについては合わせて示した (HP 掲載: 表 3)。

クラス I-SH2301 は, HLA-A24, Bw4 および B15 関連と反応を示すサンプルであり, WAKFlow-MR でも HLA-A24, Bw4 をもつ HLA ビーズとは反応を示していた。一方, B15 関連である B75 をもつ HLA ビーズとは反応がみられなかった。クラス I-SH2302 は, HLA-A24 以外の A ローカスと反応を示すサンプルであり, WAKFlow-MR でも HLA-A24 には反応がみられなかった。しかしながら, HLA-A1, A2 および A3 の反応性については施設間で乖離がみられた。クラス I-SH2303 は, WAKFlow-MR において 2 種 (ないしは 1 種) の HLA ビーズ以外に対して強い反応性を示すサンプルであり, 抗体特異性を明確にすることは困難であった。クラス I-SH2304 は Cw および B ローカスに対する抗体を複合して有するサンプルで, 前述 1) の項で示したように WAKFlow-MR では陰性・陽性判定が容易でないサンプルではあるが HLA-Cw4, Cw6 および B62 を有する HLA ビーズには反応を示しているようであった。一方, HLA-Cw15 および B75 を有する HLA ビーズとは反応がみられなかった。クラス II-SH2301 は, HLA-DR1, DR7, DR9, DR10, DR16 および DQ6 を有する HLA ビーズと反応することが確認されたが, DQ5 を有する HLA ビーズとは反応がみられなかった。クラス II-SH2302 は, HLA-DR8, DR11, DR12, DR13, DR14, DR15, DR16 および DR17 を有する HLA ビーズと反応することが確認された。クラス II-SH2303 は, DR1, DR4, DR9, DR11 および DR14 を有する HLA ビーズと反応することが確認された。一方, HLA-DR7, DR15 および DR17 等その他の抗原については他の検査方法と反応性に乖離がみられるものがあった。クラス II-SH2304 は, HLA-DR4, DQ7, DQ8 および DQ9 を有する HLA ビーズと反応することが確認された。

以上より, WAKFlow-MR は本 QC サンプルにおいて HLA 抗体の有無を正しく判定することができた。また, WAKFlow-MR は「許容抗原」を決定する検査法として有用であり, ある程度抗体特異性を

同定あるいは推定することもできる。クラス I においては, LABScreen Single Antigen において検出される HLA-A および B ローカスに対する抗体で蛍光値 BNV4,000 ~ 5,000 以上の反応性を示すものを概ね検出することができるのではないかと推察される。

2. ICFA 法

2.1. はじめに

ICFA 法は 5 施設が使用し, その内 3 施設がクラス I のみで 2 施設はクラス I と II 両方の使用であった。前年度の 8 施設より 3 施設減少した。各施設における使用パネル数から, パネルスクリーニングおよび (他法で得られた抗体特異性の) 反応性の確認目的で使用されているようであった (HP 掲載: 表 4)。

2.2. 結果と考察

実施施設からの Raw data が十分でなかったため, 各サンプル血清に対する細胞反応性について各施設でデータシートに入力された測定値 (スコア) をもとにセログラフを作成し, ICFA 法の評価・解析を行った (HP 掲載: 表 5)。なお, class II については, データ数が少なかったため参考データとする。

クラス I-SH2301 は, HLA-A24, Bw4 および B15 関連との反応がみられたが, B15 関連である B71, B75 および B35 との反応は弱かった (HP 掲載: 図 11)。クラス I-SH2302 は HLA-A24 以外の A ローカスと反応性を示すサンプルであるが, ICFA 法では A1, A2 および A3 との反応は弱いもしくは陰性であった (HP 掲載: 図 12)。クラス I-SH2303 は 1 パネルを除きほとんどのパネルと強い反応がみられ, パネルスクリーニングである ICFA 法で抗体特異性を同定することは困難であった (HP 掲載: 図 13)。クラス I-SH2304 は HLA-Cw4, Cw5, Cw6 および Cw15 に加え, B15 関連等の B ローカスにも反応性を示すサンプルで, ICFA 法においてもこれらの抗原と反応がみられた (HP 掲載: 図 14)。一方, クラス II-SH2301 では DR1, DR15 および DQ5 (HP 掲載: 図 15), クラス II-SH2302 では DR3, DR11, DR12, DR13, DR14 および DR8 (HP 掲載: 図 16), クラス II-SH2303 では DR4 (weak) (HP 掲載: 図 17), クラス II-SH2304 では DR4 (HP 掲載: 図

18) と反応することが ICFA 法で確認された。

以上より、ICFA 法は WAKFlow-MR と同等以上の HLA 抗体の検出感度を有しており、また LABScreen Single Antigen において検出される HLA-A および B ローカスに対する抗体で蛍光値

BNV 4,000 ~ 5,000 以上の反応性を示す抗体を概ね検出することができた。生体試料である血液を用いる ICFA 法はクロスマッチの検査法として適しており、検出された抗体の生体反応性および臨床的意義を評価する上においても有用である。

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 その他検査法およびクロスマッチ—

中島 文明

日本赤十字社 中央血液研究所

1. その他検査法

その他検査法は、LCT(AHG-LCT)1 施設、MPHA5 施設、LIFT2 施設の参加であった。総合判定の抗体検出状況は、どの方法も問題ない。ただし、多くの施設は FlowPRA や LABScreen などを併用している。抗体特異性について、LCT 及び LIFT は抗原種類の充実度に依存した結果であった。一方、MPHA キットでの HLA 抗体特異性決定はほぼ不可能であった。

これらの検査法に共通する問題は抗原種類の確保と維持であり、抗体検査法としては近年の精製抗原試薬の方が遥かに優れている。しかし、クロスマッチにこれらの手法は必要不可欠であり、その技術水準の維持を期待したい。

2. クロスマッチ

クロスマッチは昨年から試行導入し、ダイレクトクロスマッチに加え仮想クロスマッチも実施した。

ダイレクトクロスマッチは、抗体サンプル (SH2301) を指定し、抗原細胞は各施設が準備し、LCT1 施設、LIFT3 施設、ICFA8 施設の参加であった。判定結果のグレーゾーン部分を解析すると、LCT

は検出感度に応じて幾つかの抗体反応が不十分であった。抗体検査結果とクロスマッチ結果の比較では、B55、Cw1 などでクロスマッチの偽陰性化が認められ、抗体検査とクロスマッチの検出感度の不整合が原因と考えられる。

仮想クロスマッチは、一つの抗体サンプル (SH2301) に対して、二つの HLA 型 (H2301, H2302) を指定した。抗体特異性が明確であり結果に問題は生じなかった。今回の QC ワークショップの参加状況では、仮想クロスマッチ参加の 6 施設以外に、18 施設が DNA-QC と抗体 QC に参加しているので、次年度以降の参加を望みたい。今後は、タイピング結果に抗原グループの Ambiguity が存在する場合、抗体特異性が不明瞭な場合にどのように判定すべきか検証できる組合せも考慮したい。

ダイレクトクロスマッチは手技を含めた判定解析、仮想クロスマッチは DNA と抗体 QC 結果の正確性から派生する判定解析が検証点であるが、部門の方向性に応じた解釈も要求されるであろう。最終的には施設認定の重要な要素となることを目指すべきと考える。

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析 DNA-QC および結果評価—

田中 秀則

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

DNA-QC には、51 施設の参加があり、震災の影響及び一部の試薬が供給停止になったことで、参加施設数は昨年より減少した。輸血部門 27 施設、臓器移植部門 32 施設、造血幹移植部門 17 施設、その他 5 施設であり、うち 21 施設で重複がみられた (図 1)。

以下に部門別解析および各施設の結果評価について概説する。本文中の図表については、誌面の都合により、学会ホームページに掲載しているのので、そちらをご参考にして頂きたい。

1. 使用タイピング法について

何れの部門でも Luminex 法 (蛍光ビーズ法) が一番多く使用されていたが、使用比率で見れば、SSP 法または RELI は、臓器移植部門での使用比率が高かった (表 1)。また、各タイピング法の参加部門別の占有率は、RELI が臓器移植部門で 100% を占めていた (表 2)。

各タイピング法で、タイピング対象となった HLA 座を表 3 に示した。何れのタイピング法においても、HLA-A, B, DRB1 座は 100% 実施されていたが、HLA-C 座については、RELI 使用施設 (6 施設) での実施率は 17% と低く、SBT 法では 100% であった (表 3)。

2. 結果評価

2.1. 概要

これまで QCWS 結果報告は、結果の状況を報告するだけであったが、昨年より、HLA-DNA タイピングの QCWS (以下、DNA-QC) 結果を、①判定結果、②結果表記、③試験・検査状況の 3 項目の評価を試行的に行った。今回から「HLA-QC ワークシ

ョップ結果評価の基準」に従い結果の評価を行った。

2.2. 判定結果の評価

判定結果の評価は、基準にもあるように①「各 HLA タイピング法での判定結果が妥当であること」、②「各 HLA タイピング法の判定結果と総合判定結果に祖語がないこと」について、各タイピング法別、検体別、タイピング実施座別に、両方の基準が適合している場合を 60 点、何れか片方が適合しない場合は 0 点と採点し、最終的には各評価点の平均点をその施設の評価点とした。

今回の QCWS の「判定結果」の評価点は、平均で 54.8 点 (図 2 参照) であり、昨年の 56.7 点より低くなった。タイピング法別では、SSO/SSP 法での評価点が、14thQCWS では 57.3 点であったのに対し、15thQCWS では 53.4 点であった。この点については、SSO/SSP 法を使用した低解像度のタイピングでの結果表記に問題があり、結果的に評価点が下がるケースが見受けられた。今後、低解像度での HLA 抗原型をタイピングした際の、結果表記の在り方を明確にする必要がある。

2.3. 結果表記の評価

2010 年 4 月から HLA アリルの命名規則が変更となり、当学会では「HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)」(以下、表記法) により新表記法に対応を行った。昨年より表記法の問題点について指摘があり、3 ヶ所 (①第 2 区域で判別できないアリルが複数存在する場合の表記する順番について、② DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合の結果表記法

について、③ HLA-C 座の HLA 型が不明な場合 (HLA-C*12 ~ C*18) の HLA 型表記について) について改訂を行った。

結果表記の評価基準は、「表記法に従って記載されている」ことを評価基準としており、参加全施設の評価点の平均点は、今回の QCWS で 38.5 点 (図 3 参照) であった。前回の QCWS の平均点は 37.3 点であり、今回の QCWS の方が高くなり、徐々に表記法に従った記載が増えて来ている。また、表記法の問題点等については、本稿の「検査法別解析—DNA タイピング—結果の表記法」で紹介されているが、「ローカス名記載」、「*」の表記、「HLA-C 座の HLA 型の表記」等に間違いが多く見られた。

2.3. 総合評価

「判定結果の評価点」と「結果表記の評価点」の合計点の分布を図 4 に示した。平均点は 92.8 点であり、昨年 の平均点 94.0 点より低かった。総合的

な判定区分として、判定結果と結果表記の評価点の合計から、100 点を“A:良好”, 60~100 点未満を“B:要確認”, 0~60 点未満を“C:要改善”と区分して評価し、A 評価が 13 施設、B 評価が 36 施設、C 評価が 2 施設であった (図 4)。

試験・検査状況の評価については、「HLA タイピング実施時に得られた試験結果 (データ) が適切であること、また判定が適切に行われていること」を評価しており、①試験結果が全て妥当である場合を“A”, ②反応データの一部に不備がある場合を“B”, ③反応データのほとんどが不備である場合を“C”と判定している。各方法別の評価結果の分布を表 4 に示した。SSP 法で“B”として評価された割合が高くなった。

以上、施設別の結果の評価が各施設での検査法の改善に繋がれば結果の評価も意味があると考えているが、まだまだ改善の余地が必要である。

第 15 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析および結果評価 (抗体部門)—

高 陽淑

大阪府赤十字血液センター

1. 部門別解析

1.1. 概要

抗体検査の参加は、輸血部門 24 施設、臓器移植部門 22 施設、造血幹細胞移植部門 15 施設 (全て重複あり) で昨年より 3 施設少ない 38 施設であったが、部門別参加の割合および参加施設の構成比率については大きな変動はなかった。

また、抗体検査実施状況については、38 施設中 36 施設 (94.7%) が蛍光ビーズ法を応用した方法を実施し、使用試薬の目的調査から、抗体検出には

FlowPRA が 21 施設 (58.3%), LABScreen が 8 施設 (22.2%), WAKFlow が 7 施設 (19.4%) で用いられたことが判明した。一方、抗体特異性同定 (28 施設が実施) には 20 施設 (71.4%) が LABScreen single antigen を採用しておりこの試薬が広く用いられていることが伺えた。また、昨年同様に試薬の使用状況が特定の部門に偏らない「均一化傾向」も認められた。

1.2. 部門別解析

部門別に、抗体特異性同定の実施率を比較すると、Class I 抗体では造血幹細胞移植部門 86.7%、輸血部門 83.3%、臓器移植部門 68.2% であり、Class II 抗体では造血幹細胞移植部門 73.3%、臓器移植部門 59.1%、輸血部門 50.0% となった。殆どの施設は複数部門に参加しているため厳密には言えないが、各部門における抗体特異性の重要度を反映している結果と考える。

2. 結果評価

2.1. 抗体 QC 結果評価に対する考え方

正解が決定できない抗体検査において、公平に評価するための基本理念は以下の①～③で、評価の対象は各施設の「総合判定結果」とし、一定の評価基準に基づく三段階評価 (A.B.C) とする。

- ①参加施設の結果をデータベースとすること
- ②一定の水準を満たしている事
- ③サンプルの内容 (性状) に左右されないこと

また、各サンプルの結果に対する評価は、参加施設から提出された結果が共通となる割合を表した「基準値＝現段階では 0.67 (2/3)」を基に、それ以上の構成比率を示す抗原 (サンプル) を対象として実施した。よってそれ以下の構成比率を示す抗原 (判定結果が施設間でとまらない抗原) は対象外となる。

また、検査の実施環境や目的が異なるすべての参加施設が検出可能な抗原を対象にするべきという観点から、現段階では日本人遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原を評価の対象としている (詳細な評価点基準設定の根拠および算出法については HP 掲載の解析結果を参照)。

2.2. 評価内容

- 1) 抗体検出については 37 施設 (97.4%) の結果が A 評価 (80 点以上) となり全体的に良好な成績ではあったが、今回は抗体有無の判定が比較的容易なサンプルであったことを考えると、参加施設の完全一致が望ましい。
- 2) 抗体特異性同定検査においては評価 A が 19 施設 (67.9%) であるのに対し、評価 B が 7 施設 (25.0%) 評価 C が 2 施設 (7.1%) となった。こ

れを部門別に解析すると、3 部門間の平均評価点には大差を認めないが、輸血部門においては部門内施設間の評価点にバラツキを認めた。また、サンプル別に部門ごとの平均点を比較してみたが、サンプルに偏りはなく全体的に輸血部門の平均点が低いことが判明した。

- 3) 各抗原における未検査および陰性が判定できない保留 (評価 0) が全く存在しない施設は Class I においては 20 施設 (71.4%)、Class II においては 17 施設 (77.2%) と大半を占めている一方で、対象抗原の 50% 以上が未検査あるいは保留 (評価 0) としている 3 施設はすべて輸血部門であった。
- 4) また、輸血部門では抗体特異性同定を判定する際にも、MPHA 法や LCT, AHG-LCT 法など 40 種類 (Class I) 前後の HLA 抗体を判別することは困難な検査法を採用している施設があった。以上を総合的に考えると、輸血部門では「抗体特異性同定の必要性」に施設間差があるのかもしれない。
- 5) 抗原毎の共通となる結果を対照として、各施設の結果の一致状況を検討した。

結果が不一致となるパターンから推測できる要因としては、判定の Cut off 値が他施設と比較して高い (あるいは低い) 設定になっている場合と判定基準そのものが不安定である場合などが考えられるため、不一致率の高かった施設においては再確認を願いたい (詳細は HP 掲載の解析結果を参照)。

2.3. 14QCWS に関するアンケートについて

14QCWS でのアンケートにおいて、特に現在の「評価基準が不適切」と判断された施設のご意見に対して回答した内容を HP に掲載したので参照されたい。これらのご意見については、全体的な水準を考慮しながら評価の方法などに反映していくものと思われる。

3. 結語

15QCWS の結果からは、14QCWS の結果と比較して全般的には評価点の上昇および施設間差の減少

が伺える。このことは参加施設の努力によって全体的な水準が上昇したこともあるが、採用する検査法が高感度な方法に集約されてきた事も反映していると考えられた。

これまでのように、各施設が用いる抗体検査の原理も検出感度も様々であるような状況、あるいは輸血では Luminex 法、臓器移植ではフローサイトメトリというように部門で採用する方法に偏りがある状況では、検査の目的を同一にする部門毎に解析・評価することが妥当であると考えられた。しかし、今後はますます採用する検査法が参加施設全体で集

約・均一化されていくことを考慮すると、むしろ病院などの医療機関、血液センター、研究施設や試薬メーカーなど、施設別に整理し評価することも検討する必要があると考える。

QCWS の本来の目的は自施設での検査結果の精度および判定基準等について再確認し、参加目的とその到達度を自己評価することにある。最終的には「施設認定」の評価に繋がっていくことから参加目標が単に「評価点をあげること」にならないよう認識することが重要である。

●原著論文●

蛍光ビーズ抗体検査法におけるプロゾン様現象への 補体の関与—非働化による検証—

黒田ゆかり¹⁾, 平田 康司²⁾, 永吉 裕二¹⁾, 田原 大志¹⁾, 浅尾 洋次¹⁾, 中山みゆき¹⁾,
井上 純子¹⁾, 大熊 重則²⁾, 迫田 岩根¹⁾, 佐藤 博行¹⁾, 清川 博之¹⁾, 木村 彰方³⁾

- 1) 日本赤十字社九州血液センター
2) 岡山県赤十字血液センター
3) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野

(平成 23 年 10 月 4 日受付)

要旨：近年、臓器移植や造血幹細胞移植において、レシピエントの保有する HLA 抗体が重要視されるようになった。特にドナー特異抗体は移植成績への影響が大きいため、精製抗原結合蛍光ビーズを用いた高感度の HLA 抗体同定検査が広く用いられるようになってきた。我々は、蛍光ビーズを用いた抗体検査の結果と交差適合試験の結果との乖離を 3 例経験したが、いずれも被検血清を希釈して検討した結果、この乖離はプロゾン様現象によると考えられた。また、保管血清を再度検査した際に、蛍光ビーズを用いた抗体検査での蛍光値が保管前より明らかに高くなる検体が存在した。さらに、血清を 56°C 30 分で非働化するとプロゾン様現象が抑制されたこと、およびウサギ補体やヒト新鮮血清を用いた実験から、この現象には熱処理で失活する補体の関与が示唆された。一方、HLA 抗体陽性と判定された 20 検体について検討したところ、10 検体でプロゾン様現象が確認された。この 10 検体中 3 検体については、新鮮検体を用いた抗体検査では HLA 抗体陰性と誤判定する可能性があった。以上のことは、HLA 抗体検査においてプロゾン様現象が生じている可能性を考慮することの重要性を示す。

キーワード：プロゾン様現象, HLA 抗体, 非働化, 補体, 蛍光ビーズ法

はじめに

近年、臓器移植や造血幹細胞移植を中心とする移植医療において、患者の移植前検査や移植後のモニタリング検査等の手法として、HLA 抗体検査が重要視されるようになった¹⁻⁴⁾。また、米国 Luminex 社⁵⁾が開発した測定技術 xMAP[®] (multiple analyte profiling) の開発など、近年蛍光ビーズを用いた多

くの検査試薬が普及したが、なかでも高感度 HLA 抗体同定試薬である LABScreen Single Antigen (One Lambda 社) は多くの検査施設で用いられている。とくに、血清中のドナー特異抗体 (Donor Specific Antibody, DSA) の存在は移植成績に影響を与える重要な要素であり、DSA の主体は HLA 抗体であることから、特異的 HLA 抗体を高感度に同定可能な

代表者連絡先 〒 839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣 3-4-12
日本赤十字社九州血液センター 技術部
黒田ゆかり

電話 0942-31-8957
F A X 0942-31-8959
E-mail y-kuroda@fukuoka.bc.jrc.or.jp

試薬は大変有用である。

我々は、蛍光ビーズを使用した高感度 HLA 抗体同定試薬を用いた検査において、プロゾーン様現象を経験し、その原因について実験的に検討した。

試薬と測定原理

Luminex システムとは、米国 Luminex 社が開発した xMAP[®] (multiple analyte profiling) と呼ばれる測定技術である。Luminex ビーズは、直径 5.6 μm のポリスチレン製マイクロビーズであり、ビーズ表面には赤とオレンジの 2 種類の蛍光色素がそれぞれ 10 段階に濃度を変えコーティングされていることから、この組み合わせによって 100 種類のビーズを区別することが可能である。

LABScreen Single Antigen は、1 種類の Luminex ビーズに既知の精製 HLA 抗原 1 種類がコーティングされ、現在 class I では 97 抗原、陰性および陽性反応ビーズの計 99 種類の抗原ビーズ混合試薬となっている。抗原ビーズ 5 μL に被検検体 20 μL を加えて抗原抗体反応させ、洗浄後に PE 標識抗ヒト IgG 抗体 (100 倍希釈) を 100 μL 加えて反応させる。抗原と反応した HLA 抗体が存在する場合には、二次抗体の PE 標識抗ヒト IgG 抗体が結合する。

Luminex 装置により赤色ダイオードレーザーで Luminex ビーズの蛍光を区別し、緑色ダイオードレーザーで二次抗体の標識を測定することにより、それぞれの抗原ビーズに反応した抗体が蛍光値 (Mean Fluorescence Intensity, MFI) として表される。LABScreen Single Antigen は、試薬メーカーによる cut off 等の明確な判定基準は設定されていない。

プロゾーン様現象を初めて確認した症例

血小板輸血不応 (platelet transfusion refractoriness, PTR) のため抗体検査を実施した患者血清を対象として、蛍光ビーズ法である WAKFlow MR (湧永製薬株式会社) 検査を実施し、高力価広範囲特異性 HLA 抗体の存在を示すデータを得た。患者の HLA タイプから適合ドナー検索が困難であることが予想されたため、抗体同定試薬 LABScreen Single Antigen class I test を用いた検査結果から陰性であると考えられた抗原を許容抗原としてドナー検索を実

施した。しかし、許容抗原を含む適合ドナー候補との交差適合試験 (immunocomplex capture fluorescence analysis, ICFA, 湧永製薬株式会社) で強陽性の結果を得た。このため LABScreen Single Antigen class I test でのプロゾーン様現象による偽陰性判定の可能性を考え、PBS で希釈した血清検体を用いて再度検査を実施した。その結果、許容抗原としていた抗原ビーズにも強く反応していたことから、当初の検査ではプロゾーン様現象による偽陰性のため、許容抗原を誤判定していたと考えられた。許容抗原 (HLA-B67) の原液血清を用いた際のビーズ蛍光値 MFI は 171 であったが、PBS で 100 倍希釈した血清では MFI 値が 17,083 と高値を示した⁶⁾。そこで、プロゾーン様現象の原因追究および発生頻度確認のために以下の検討を行った。

材料と方法

1. 原因追究のための検討

HLA 抗体陽性血清 3 検体を対象とした。3 検体とも複数の HLA 抗体検査法を実施し、高力価 HLA 抗体保有が確認されていた。検体 1 は新生児同種免疫性血小板減少症 (neonatal alloimmune thrombocytopenia, NAIT) の確認として検査を実施した検体であった。また、検体 2 は血液疾患、検体 3 は肝細胞癌で HLA 適合血小板を供給するための HLA 抗体検査を実施した検体であった。いずれも 2 週間から 1 カ月程度の間は約 4°C で、その後は約 -80°C で保管していた。

それぞれの検体について、以下の検討を行った。なお、①は検体 1～3 について、②～⑤は検体 2 と 3 についてのみ実施した。

- ① 検査依頼当初と -80°C 保管後の反応した抗原ビーズの蛍光値 (Mean Fluorescence Intensity, MFI) の比較
- ② 非処理血清と処理 (56°C 30 分非働化) 後血清との MFI 値の比較
- ③ 非処理血清と LABScreen negative control serum で希釈した血清との MFI 値の比較
- ④ 抗原ビーズと血清との反応後に、ウサギ補体または非働化 (56°C 30 分処理) ウサギ補体を 20

μL 加えて MFI 値を比較した。ただし、非処理血清と非働化後血清の反応で差があった検体では非働化後血清を、差が無かった検体では非処理血清を用いた。

- ⑤ 抗原ビーズと血清との反応後に、ヒト新鮮血清 (HLA 抗体陰性) または非働化したヒト新鮮血清を 20 μL 加えた。ただし、非処理血清と非働化後血清の反応で差があった検体では非働化後血清を、差が無かった検体では非処理血清を用いた。

II. プロゾーン様現象発生頻度の確認

FlowPRA Screening Test Class I (One Lambda 社) で陽性であると判定され、かつ検査当日あるいは前日採血された新鮮血清であるとの条件を満たした血清 20 検体について、新鮮血清と 56°C 30 分非働化後血清による反応を比較した。抗体価によって現象の発生頻度が変動する可能性があることから、上記

条件を満たした検体のうち連続した 20 検体を検討対象とした。

なお、I および II で用いたヒト由来試料は、いずれも関連検査に用いることに関する包括同意が得られた匿名化試料である。

結果

I. 原因追究のための検体処理による検討

検体 1 ~ 3 についての採血直後と保管後での抗原ビーズ反応性を図 1 に示す。

① 検査当初と保管後の蛍光値 MFI の比較

検体 1 および 2 では保管後の検査で MFI 値が明らかな高値を示した抗原ビーズが存在した。一方、検体 3 では保管前後の MFI 値にほとんど差が見られなかった。NAIT 疑いがあった検体 1 では、免疫原と推測される夫の保有する HLA 抗原型に対する反応性に特に大きな差が見られた。

検体 2 および 3 についての②~⑤までの抗原ビー

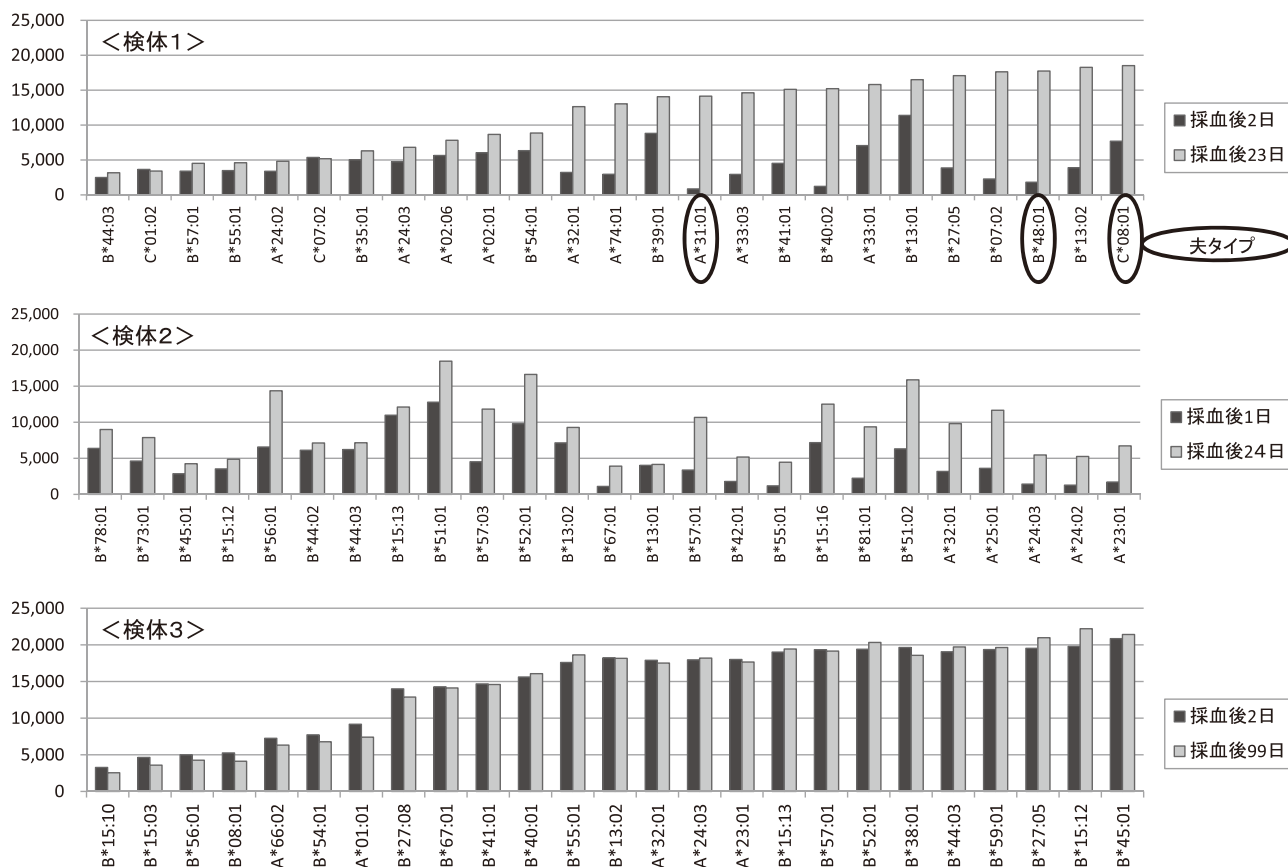


図 1 採血直後と保管後における MFI 値

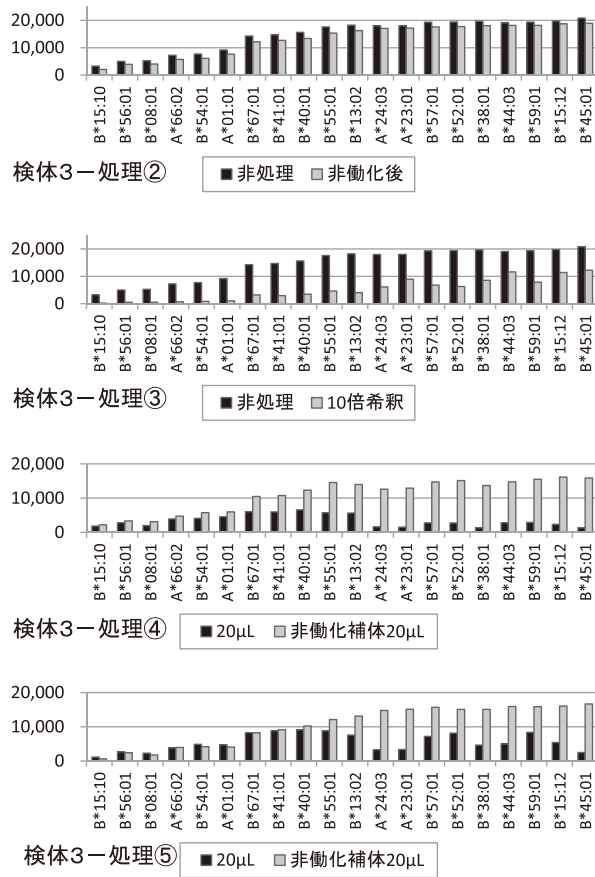
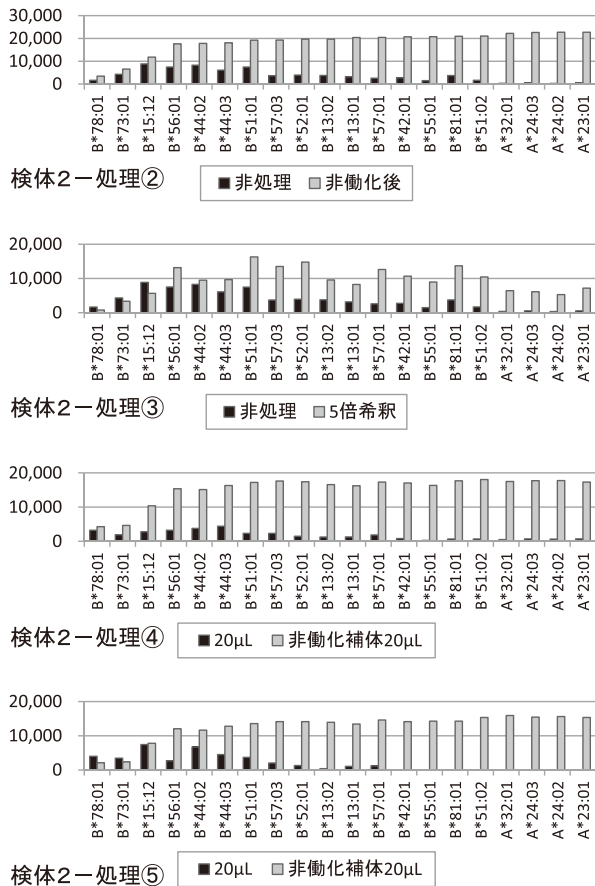


図2 種々の処理前後のMFI値(検体2および3)

ズ反応性を図2に示す。

② 非処理血清と非働化後血清の蛍光値 MFI の比較

検体2では非働化後に高いMFI値を示す抗原ピーズが存在したが、検体3では大きな差はなかった。

③ 非処理血清と希釈血清の蛍光値 MFI の比較

検体2では希釈後に高いMFI値を示す抗原ピーズが存在した。これらの抗原ピーズは、②による検討で高いMFI値を示したものと同一の特異性であった。一方、検体3では希釈による効果として期待される通りにMFI値が減少した。

④ 抗原ピーズ反応性へのウサギ補体の効果

非働化によって抗原ピーズのMFI値に変化があった検体2では非働化後血清を、変化が無かった検体3では非処理血清を用いた。どちらの検体の場合も、ウサギ補体を加えるとMFI値が低くなる抗原ピーズが存在したが、非働化したウサギ補体の添加ではMFI値の低下が抑制された。

⑤ 抗原ピーズ反応性へのヒト新鮮血清 (HLA抗体陰性) の効果

非働化によって抗原ピーズのMFI値に変化があった検体2では非働化後血清を、変化が無かった検体3では非処理血清を用いた。どちらの検体の場合も、ヒト新鮮血清を加えるとMFI値が低くなる抗原ピーズが存在したが、非働化したヒト新鮮血清の添加ではMFI値の低下が抑制された。

II. プロゾーン様現象発生頻度の確認

抗体価に関係なく FlowPRA Screening Test Class I (One Lambda 社) で陽性と判定された新鮮検体連続20件中に、新鮮血清よりも非働化血清の蛍光値MFIが15,000以上高くなった抗原ピーズが少なくとも1種類存在した検体が10検体存在した。MFIで15,000以上の差があった抗原ピーズについてみると、新鮮血清のMFIの内訳は表1の通りであった。また、非働化後に20,000以上のMFI値を示したピーズ

表 1 連続 20 検体における 56°C 30 分非働化前後の MFI 値の変化

No.	年齢 性別	検査例 疾患名	採血から 検査まで の日数	新鮮血清の MFI とビーズ数 () は非働化後に 15,000 以上 MFI 値が高くなったビーズ数						非働化後 血清の最高 MFI 値
				≤1,000	1,001 ~ 5,000	5,001 ~ 10,000	10,001 ~ 15,000	15,001 ~ 20,000	20,001 ~ 25,000	
* 1	74F	急性白血病	1	45	15 (2)	11	10	16	0	21,902
* 2	61F	急性骨髄性白血病	1	53(7)	18(16)	21(8)	4	1	0	25,149
* 3	71M	急性骨髄性白血病	1	37	15	15(4)	27	3	0	25,219
4	74F	骨髄異型成症候群	1	71	13	5	6	2	0	19,709
* 5	68F	骨髄異型成症候群	1	39	35 (7)	20	3	0	0	22,317
6	70F	急性リンパ性白血病	0	90	1	6	0	0	0	7,289
7	54M	骨髄異型成症候群	1	90	7	0	0	0	0	4,642
8	61F	急性骨髄性白血病	1	92	4	1	0	0	0	5,975
9	54F	形質細胞白血病	1	83	10	4	0	0	0	6,858
10	33M	急性骨髄性白血病	1	86	8	0	3	0	0	18,681
* 11	29F	新生児血小板減少症 (母)	1	35(7)	38(26)	19(1)	5	0	0	26,934
12	77F	再生不良性貧血	0	50	35	9	3	0	0	13,706
13	51F	不明	1	89	4	4	0	0	0	10,270
* 14	65M	急性骨髄性白血病	1	72	14(8)	9(2)	2	0	0	23,457
* 15	80F	骨髄異型成症候群	1	27	21(1)	33(2)	16	0	0	24,124
* 16	53F	再生不良性貧血	1	76	10(6)	11(2)	0	0	0	23,521
17	48M	急性骨髄性白血病	1	96	1	0	0	0	0	1,442
* 18	75F	急性骨髄性白血病	0	75	15	7(1)	0	0	0	21,732
* 19	71F	急性リンパ性白血病	1	72(3)	19(7)	2	4	0	0	22,385
20	36M	急性リンパ性白血病	1	95	2	0	0	0	0	2,236

* プロゾーン様現象が見られた検査例

ズが少なくとも 1 種あった 10 検体では、そのすべてでプロゾーン様現象が見られた。これら 10 検体中には、cut off 値を 1,000 とした場合、新鮮血清では HLA 抗体の一部を陰性と誤判定する検体が 3 検体 (検査例 No. 2, 11 および 19) あった。それらについて、非働化後に MFI 値が 15,000 以上高くなった抗原ビーズの蛍光パターン変化を図 3 に示した。

図 4a には 20 検体の非働化前後の全抗原ビーズについての MFI 値を示したが、プロゾーン様現象は非働化後の MFI 値が 10,000 を超えた域から認められ、非働化後の MFI 値が高くなるほど非働化前後の MFI 値の相関が低くなっていた。また、cut off 値 1,000 とした場合に誤判定となった領域を図 4b に、誤判定となった抗原ビーズの非働化前後の MFI 値を図 4c に示した。

考 察

今回の検討で、長期保存や希釈によって特定の抗原ビーズで高い MFI 値を示すようになる検体は、検査当初においてプロゾーン様現象が起きていたと考えられる。また、希釈後に高い MFI 値を示した蛍光ビーズと、56°C 30 分非働化した血清で高い MFI 値を示した蛍光ビーズとの間には相関が認められ、プロゾーン様現象が非働化により抑制されたことから、補体の関与が示唆された。

補体成分の C1q は、IgG 抗体と結合する場合には、補体結合性のある抗体 2 分子間の CH2 に架橋するように結合する。このため、プロゾーン様現象が生じていた機序は、補体成分 C1q が IgG 抗体の CH2 に結合し、分子量の大きい補体 C1 が抗体の Fc 部分を認識する二次抗体である PE 標識抗ヒト IgG の結合を阻害していたことによると推測される。

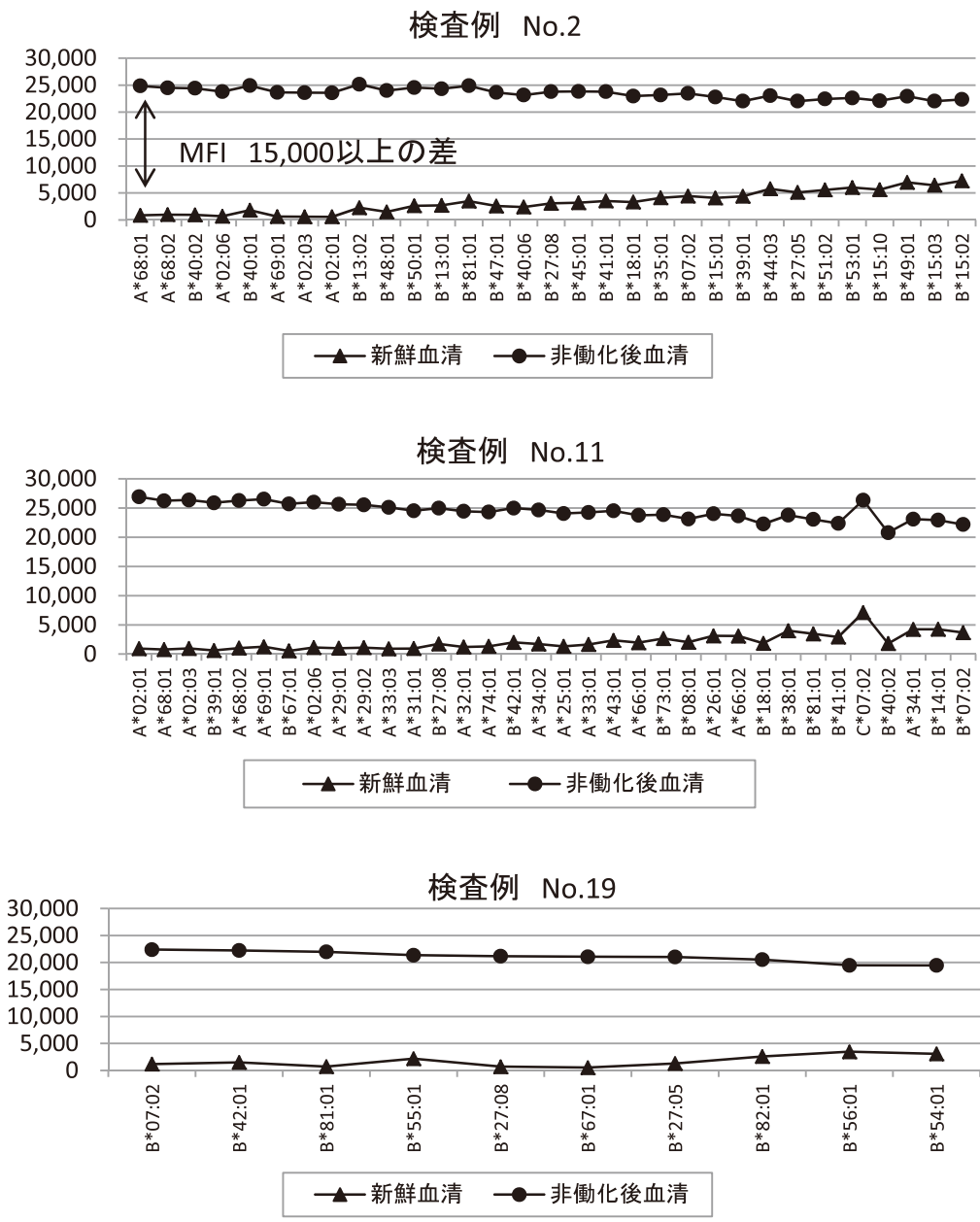


図3 誤判定3検体における56°C 30分非働化前後のMFI値の変化

保管血清において新鮮血清より反応が強くなったことは、新鮮血清中にあった補体が経時的に失活したためと考えられる。また、希釈血清では、阻害している補体あるいは抗原ビーズへ反応している抗体の濃度減少によって、補体とIgG抗体とが結合し難い状態となり、標識抗体がIgG抗体に結合可能となるためにMFI値が高くなったと考えられる。

LABScreen Single Antigenは1つのビーズに1種類のHLA抗原が結合していることから、密に存在す

る抗原に多量のHLA抗体が反応することで、このHLA抗体間が補体の結合しやすい距離となると推測される。すなわち、HLA抗体が過剰になっている場合には補体成分C1qが結合しやすいが、ビーズ上の抗原が過剰となっている場合には抗原抗体反応した抗体間の平均距離が大きくなり、結果として補体成分C1qの影響が少なくなるために、MFI値にあまり変化が見られなかったものと思われる。

プロゾン様現象は高力価抗体保有血清で起きや

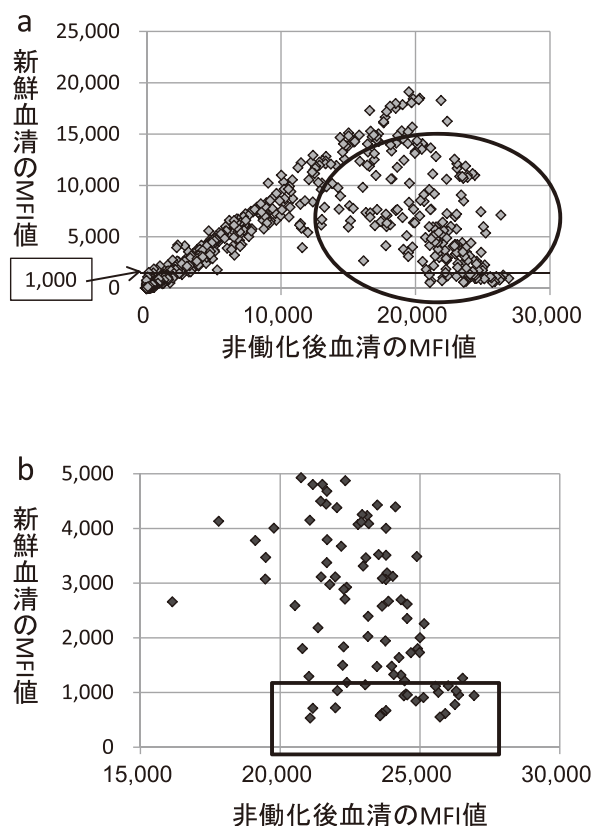


図4 新鮮血清と非働化後血清の MFI 値相関図

- a. MFI 値相関図 (○はプロゾーン様現象発生領域)
 b. MFI 値相関図 (□は cut off 1,000 の場合の誤判定領域)
 c. cut off 1,000 の場合の誤判定抗原と MFI 値

	新鮮血清	非働化後
B*67:01	534	21,070
B*67:01	551	25,715
A*02:01	575	23,575
A*02:03	590	23,594
B*39:01	616	25,901
A*69:01	623	23,652
A*02:06	671	23,784
B*27:08	712	21,165
B*81:01	720	21,974
A*68:01	781	26,248
A*68:01	846	24,853
A*33:03	908	25,123
B*40:02	941	24,425
A*02:01	944	26,934
A*31:01	957	24,549
A*02:03	958	26,382
A*68:02	974	24,493

すいと考えられるが、検体3は肝細胞癌患者であったことから、肝臓で産生される補体の血清レベルが低かったために、高力価抗体保有者であったにも関わらずプロゾーン様現象が起きていなかった可能性がある。また、ウサギ補体やヒト新鮮血清を加えた検討において、非処理ではプロゾーン様現象が起きなかった検体3でもプロゾーン様現象が認められたため、HLA抗体量ではなく、補体活性がプロゾーン様現象をもたらす因子であると考えられた。

今回プロゾーン様現象を経験し文献を検索したところ、赤血球検査においては30年以上前から補体の影響によるプロゾーン様現象が報告されていることがわかった⁷⁻⁹⁾。しかし、これまで報告されている他の検査領域のプロゾーン現象の頻度は比較的低いものであったのに対し、蛍光抗原ビーズ試薬を用いた場合にプロゾーン様現象が観察される頻度は稀

ではない可能性がある。特に、高力価抗体保有血清を対象を絞った場合には、かなりの高確率でプロゾーン様現象が観察されることが予想される。

移植医療において、HLA抗体検出の有無は特に重要な情報である。検査試薬の添付文書には“Test serum or plasma should not be heat inactivated, because it may give a high background in the test.”と記載されているが、新鮮血清を用いた検査では、補体結合性のある高力価 DSA を陰性と誤判定する可能性がある。これまでに誤判定を回避するための検討報告¹⁰⁻¹⁴⁾はあるが、プロトコルの統一には至っていない。よって、早急なプロトコルの統一が望まれる。また、今回の報告は特定の試薬で観察された現象であるが、他の HLA 関連抗体検査試薬においても、抗原ビーズなどとの反応性の確認が必要であると思われる。

参考文献

- 1) 市丸直嗣, 矢澤浩治, 高原史郎: 腎移植と HLA の最前線. 医学のあゆみ 233(13): 1211–1215, 2010.
- 2) 宮崎 孔, 池田久寛: 臓器移植の検査. 臨床検査 51(7): 779–787, 2007.
- 3) 杉谷 篤, 北田秀久, 岡部安博 他: 献腎移植の現場での HLA 検査とクロスマッチ. MHC 15(1): 27–38, 2008.
- 4) 佐治博夫: 移植と抗体 HLA タイプ & スクリーンと移植後抗体モニタリング. 移植 45(5): 494–504, 2010.
- 5) Luminex Corportion: <http://www.luminexcorp.com/>
- 6) 平田康司, 田邊奈美子, 渡邊麻莉子 他: LABScreen Single Antigen 法において「プロゾーン現象」がみられ HLA 許容抗原選択に苦慮した血小板輸血不応症例. 血液事業 33(2): 174, 2010.
- 7) Voak D: Observation on the rare phenomenon of anti-a prozone and the non-specific blocking of haemagglutination due to C1 complement fixation by IgG anti-A antibodies. Vox Sang 22: 408–419, 1972.
- 8) Sundqvist KG, Svehag SE, Thorstensson RT: Dynamic aspects of the interaction between antibodies and complement at the cell surface. Scandinavian Journal of Immunology 3(3): 237–250, 1974.
- 9) Judd WJ, Steiner EA, O'Donnell DB, et al.: Discrepancies in reverse ABO typing due to prozone. How safe is the immediate-spin crossmatch? Transfusion 28(4): 334–338, 1988.
- 10) 黒田ゆかり, 小田秀隆, 浅尾洋次 他: LABScreen Single Antigen におけるプロゾーン現象への補体の関与. 日本組織適合性学会 18(1): 56–57, 2011.
- 11) 黒田ゆかり, 田原大志, 浅尾洋次 他: 蛍光ビーズ抗体検査法におけるプロゾーン様現象への補体の影響と非働化による現象の抑制効果—第2報—. 日本組織適合性学会 18(2): 158, 2011.
- 12) 小島裕人, 藤井直樹, 二神貴臣 他: Luminex 法におけるプロゾーン様現象. 日本組織適合性学会 18(2): 157, 2011.
- 13) 内田みゆき, 宮城 徹, 寺木佳子 他: LABScreen Single Antigen にみられる抑制反応の解析. 日本組織適合性学会 18(2): 148, 2011.
- 14) Martina Schnaidt, Christof Weinstock, Martina Jurisic, et al.: HLA antibody specification using single-antigen beads—A technical solution for the prozone effect. Transplantation 92(5): 510–515, 2011.

Possible involvement of compliment C1q in the prozone-like phenomena found in the detection system of anti-HLA antibodies by HLA antigen-conjugated fluorescence beads

Yukari Kuroda¹⁾, Yasushi Hirata²⁾, Yuji Nagayoshi¹⁾, Hiroshi Tahara¹⁾, Yoji Asao¹⁾, Miyuki Nakayama¹⁾, Junko Inoue¹⁾, Shigenori Okuma²⁾, Iwane Sakoda¹⁾, Hiroyuki Satou¹⁾, Hiroyuki Kiyokawa¹⁾, Akinori Kimura³⁾

¹⁾ Japanese Red Cross Kyusyu Blood Center, Fukuoka, Japan, ²⁾ Japanese Red Cross Okayama Blood Center, Okayama, Japan, ³⁾ Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Summary: It is well recognized that the anti-HLA antibodies in recipients are associated with prognosis of graft rejection in transplantation including both solid organ transplantation and bone marrow stem cell transplantation. Recently, a detection system for anti-HLA antibodies using the HLA-antigen-conjugated fluorescence beads has been widely used in the laboratory testing. We have experienced three cases in which a discrepancy of results between the cross-match tests and bead-based detection system for anti-HLA-antibodies. Dilution of serum with the discrepant results showed that the bead-based detection system failed to detect several specific anti-HLA-antibodies, suggesting that the discrepancy was representing the prozone-like phenomenon. Treatment of the serum with discrepant results by freeze-thaw or heat inactivation for 30 min at 56°C suggested the involvement of complement C1q in the prozone-like phenomena. Further experiments using rabbit complement or human serum also supported the involvement of C1q in the phenomena. In addition, analysis of sequential 20 cases with anti-HLA-antibodies revealed that 10 of them showed discrepancy results and anti-HLA-antibodies were failed to be detected by using the bead-based detection system in three of them. These observations indicated the importance of considering a possibility for the prozone-like phenomena in detection of anti-HLA-antibodies.

Key Words: Prozone-like phenomenon, anti-HLA-antibody, heat inactivation, compliment, fluorescence beads method

●原著論文●

次世代シーケンサーを用いた HLA クラス I 遺伝子の 超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発

鈴木 進悟*, 尾崎 有紀*, 吉川 枝里, 重成 敦子,
岡 晃, 光永 滋樹, 椎名 隆, 猪子 英俊

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

(平成 23 年 10 月 24 日受付)

要旨: HLA 遺伝子の DNA タイピング法は, SSP 法, SSO 法, SBT 法が主流であるが, 多くの場合単一のアレルに絞り込むことが困難な, いわゆるあいまいさ (ambiguity) により明確な判定結果を得るのが困難である。本研究では, 次世代シーケンサーを用いて ambiguity を排除した 8 桁レベルの超高解像度 DNA タイピング (SS-SBT) 法の開発を試みた。その結果, HLA-A, -B および -C 遺伝子についてエンハンサーやプロモーター領域を含む遺伝子全領域 (約 5 kb) をそれぞれ特異的に PCR 増幅させ, かつ両染色体由来の HLA アレルをほぼ 1:1 で増幅させる PCR 条件を設定した。この条件にて従来法では単一のアレル判定ができない 10 検体を用いた DNA タイピングにより, いずれの検体とも 8 桁レベルの HLA アレルが判定された。したがって, 本法は ambiguity の認められない 8 桁レベルの HLA タイピングに有効であるとともに, 新規 HLA アレルや null アレルを効率よく検出するための精度の高い, 究極の HLA-DNA タイピング法であることが示唆された。また, 本法は各遺伝子の PCR プライマーを混合して, 一本の試験管内でのマルチプレックス PCR 法とその後のシーケンシングが可能であることから, 従来法に比して費用の点でも優れた方法になりうると考えられる。

キーワード: HLA, 次世代シーケンシング, PCR, DNA タイピング, Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing (SS-SBT)

はじめに

HLA アレルを判定する DNA タイピングは, 移植の際のドナーとレシピエントの組織適合性の一致や疾患関連解析に必要不可欠である。現在, 高精度タイピング法として, SSOP (主として, Luminex 法)

法と SBT 法が主に利用されている¹⁻³⁾。ところが, Luminex 法を含む SSOP 法や SBT 法では, 2つの多型部位が同一の染色体上 (*cis*) か, 異なる染色体上 (*trans*) に位置するのかわかり位置情報が得られない, いわゆる phase ambiguity が生じること⁴⁾, また

代表者連絡先 〒 259-1143 神奈川県伊勢原市下糟屋 143
東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
猪子 英俊

電話 0463-93-1121 (内線 2582)
F A X 0463-94-8884
E-mail hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp

Luminex 法を含む SSOP 法では年々増加している新規 HLA アリルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足していることから、これら従来法では多くの場合はいくつかのアリル候補が存在し、単一のアリルに絞り込むことができない。よって、日本人における HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上のアリルを参照して頻度の高いアリルを最も可能性の高いアリルと判定する推定 (みなし) タイピングを行っているのが現状である (表 1, 表 2 参照)。また、

それらの方法では、遺伝子発現が抑制される null アリルの原因となるエンハンサー・プロモーター領域やイントロンにおける多型や変異の検出が不可能である。例えば、HLA-A*01:01:01:01 と HLA-A*01:01:01:02N の違いはイントロン 2 における 4 塩基の欠失のみであり、翻訳領域の塩基配列は一致していることから、エクソンのみの DNA タイピングでは、HLA-A*01:01:01:02N は HLA-A*01:01:01:01 と判定される危険性がある。これまでに 7600 を超える HLA ア

表 1 HLA-A, B および -C における PCR-Luminex 法による DNA タイピングの結果

Locus	Sample ID	Allele 1	Allele 2	Number of ambiguity (候補アリル数)	
				Allele 1	Allele 2
HLA-A	TU1	A*02:06/10/21/+	A*11:01/02/03/+	12	22
	TU2	A*02:01/07/09/+	A*31:01/09/11/+	68	13
	TU3	A*24:02/09/11/+	A*31:01/09/12/+	40	14
	TU4	A*02:01/04/07/+	A*02:06/10/21/+	102	20
	TU5	A*26:01/10/15/+	A*31:01/06/09/+	14	13
	TU6	A*26:03/21/30	A*33:01/03/04/+	3	17
	TU7	A*02:03/92:48	A*24:02/09/11/+	2	45
	TU8	A*24:02/31:08/+	A*33:01/03/04/+	41	16
	TU9	A*02:01/04/07/+	A*02:06/10/21/+	102	20
	TU10	A*11:01/02/03/+	A*31:01/02/09/+	20	13
HLA-B	TU1	B*40:02/35/39/+	B*55:02/12/19/+	13	4
	TU2	B*51:02/70	B*56:01/20/24/+	2	5
	TU3	B*07:02/09/10/+	B*35:01/05/07/+	42	21
	TU4	B*40:02/35/56/+	B*44:02/03/13/+	12	17
	TU5	B*15:01/05/20/+	B*35:01/07/14/+	49	24
	TU6	B*15:11	B*44:03/13/26/+	1	11
	TU7	B*38:02/08/15/+	B*54:01/07/08/+	4	5
	TU8	B*44:02/03/13/+	B*48:01/09/11	15	3
	TU9	B*40:06/70	B*48:01/09/11	2	3
	TU10	B*40:01/22/38/+	B*51:01/03/11/+	11	25
HLA-C	TU1	C*01:02/07/11/+	C*03:03/11/12/+	18	17
	TU2	C*01:02/07/11/+	C*03:04/06/09/+	18	23
	TU3	C*03:03/04/06/+	C*07:02/10/13/+	40	29
	TU4	C*03:03/04/06/+	C*14:03/10	41	2
	TU5	C*03:02/04/05/+	C*07:02/10/13/+	40	29
	TU6	C*03:03/04/06/+	C*14:03/10	41	2
	TU7	C*01:02/07/11/+	C*07:02/32/38/+	17	25
	TU8	C*08:03/06/14	C*14:03	3	1
	TU9	C*08:01/08/20/+	C*15:02/03/10/+	7	5
	TU10	C*07:02/10/19/+	C*15:02/03/07/+	27	7

リルが IMGT-HLA データベースから公開されているが、遺伝子全領域が決定されている HLA アリルは約 6% にすぎず、未知の null アリルや新規 HLA アリルの存在が十分に考えられる⁵⁾。したがって、ambiguity を排除するとともに、null アリルの検出や新規 HLA アリルの検出を目指した 8 桁レベルにおける DNA タイピング法は将来の目指すべき理想的なタイピング法と考えられる。

近年、次世代シーケンサーを用いた HLA 遺伝

子の DNA タイピング法が注目を浴びている。すなわち、決定できる塩基配列数に関しては、例えば次世代シーケンサーの一つである 454 FLX Genome Sequencer とその姉妹版である GS Junior ベンチトップシステム (Roche 社) は、1 リード当たり 400 ~ 500 bp の塩基配列、約 10 万リード (GS Junior ベンチトップシステム)、あるいは ~ 100 万リード (454 FLX Genome Sequencer) を一度に決定できるハイスループット性に優れ、HLA 遺伝子の全領域 (エク

表 2 HLA-A, B および -C における PCR-SBT 法による DNA タイピングの結果

Locus	Sample ID	Allele 1	Allele 2	Number of ambiguity (候補アリル数)	
				Allele 1	Allele 2
HLA-A	TU1	A*02:06/79/142	A*11:01/24/73	3	3
	TU2	A*02:01/20/40/+	A*31:01/02/21/+	6	4
	TU3	A*24:02/03/57/+	A*31:01/02/05/+	8	5
	TU4	A*02:07	A*02:06:01	1	1
	TU5	A*26:01/43/52	A*31:01/30/40	3	3
	TU6	A*26:03/66:15	A*33:03/24	2	2
	TU7	A*02:03/148/280	A*24:02/06/53	3	6
	TU8	A*24:02/03/34	A*33:03/10/11	4	3
	TU9	A*02:01:01	A*02:06:01	3	1
	TU10	A*11:01:01	A*31:01:02	1	1
HLA-B	TU1	B*40:02/39/40	B*55:02/16	4	4
	TU2	B*51:02:01	B*56:01:01	1	1
	TU3	B*07:02/09/12/+	B*35:01/05/08/+	11	13
	TU4	B*40:02/11/37/+	B*44:03/45/46/+	5	5
	TU5	B*15:01/05/08/+	B*35:01/10/14/+	11	13
	TU6	B*15:11:01	B*44:03:01	1	1
	TU7	B*38:02:01	B*54:01:01	1	1
	TU8	B*44:03/100	B*48:01/03	2	2
	TU9	B*40:06:01	B*48:01:01	2	1
	TU10	B*40:01/07/25/+	B*51:01/52:01/+	13	12
HLA-C	TU1	C*01:02/22/51	C*03:03/04/20/+	6	7
	TU2	C*01:02/22/31/+	C*03:04/28/64/+	6	6
	TU3	C*03:03/04/13/+	C*07:02/10/50/+	12	12
	TU4	C*03:03/04/20	C*14:03/10	4	2
	TU5	C*03:04/32/35/+	C*07:02/10/29/+	9	11
	TU6	C*03:03/04/20	C*14:03/10	4	2
	TU7	C*01:02/17/22	C*07:02/37/39/+	4	6
	TU8	C*08:03:01	C*14:03	1	1
	TU9	C*08:01/10/22	C*15:02/17	3	2
	TU10	C*07:02/19/39/+	C*15:02/03/07/+	8	6

ソン、イントロンを含めて)のシーケンシングが多検体について可能である。また、その次世代シーケンシングの原理から、1分子のDNAからの塩基配列決定 (clonal amplification) が可能なため、*cis-trans* 情報が得られ、その結果、phase ambiguityの問題は解決される (詳細は材料と方法の項目に記載)。さらに検体それぞれに異なるタグ配列 (multiplex identifier; MID) 配列を付加させることにより、同時に多サンプルの塩基配列を解析するマルチプレックス解析も可能である⁶⁾。すなわち、この方法は、各 HLA 遺伝子における PCR 産物の塩基配列を次世代シーケンサーにて決定し、得られたデータを既知配列にマッピングして、比較・検討することにより、単一 HLA アリルの 8 桁レベル判定や新規塩基配列の検出を可能とする^{6,7)}。ところが、この方法による HLA 遺伝子の DNA タイピングは特定エクソンのみについて報告されており⁸⁻¹⁰⁾、エンハンサー・プロモーター領域からすべてのエクソンおよびイントロン領域を網羅する DNA タイピング法に関する報告はない。

本研究では、ambiguity が観察される 10 検体を用いて、HLA-A、-B および -C の遺伝子全領域をそれぞれ特異的に増幅させる PCR 条件の設定から、Roche GS Junior を用いた次世代シーケンシング、塩基配列の編集およびアリル判定までの一連の過程の超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発を試みた。

材料と方法

(1) 供試検体

日本人由来の 10 検体 (TU1 ~ TU10) のゲノム DNA を本研究に供試した。ゲノム DNA は末梢白血球より QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出した。

(2) PCR-SBT 法と PCR-Luminex 法による DNA タイピング法

TU1 ~ TU10 のゲノム DNA を用いて、SBT 法と Luminex 法により HLA-A、-B および -C のにおける DNA タイピングをおこなった (表 1, 表 2)。SBT

法には、AlleleSEQR HLA タイピング試薬 (Abott 社)、Luminex 法には、LABType SSO キット (One Lambda 社) を用いた。

(3) PCR プライマーの設計法

IMGT-HLA データベースに登録されている塩基配列より、HLA-A、-B および -C における遺伝子全領域 (エンハンサー・プロモーター領域、すべてのエクソンおよびイントロン領域) について、それぞれの遺伝子の特異的にかつ登録されている全ての HLA アリルについて増幅を可能とする PCR プライマーの設計を試みた。PCR プライマーの設計には、Primer Express (Applied Biosystems 社) を用いた。

(4) PCR 法

ゲノム DNA を鋳型として、HLA クラス I 遺伝子それぞれについて PCR 増幅をおこなった。PCR 増幅には、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa 社) を用いた。PCR 反応液の組成は、50 ng のゲノム DNA、4 μ L の 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer (5 mM Mg²⁺)、1.6 μ L の dNTPs (各 2.5 mM)、4 μ L (1 pmol/ μ L) ずつの PCR プライマー、1 unit の PrimeSTAR GXL Polymerase (1.25 U/ μ L) とし、最終的に 20 μ L に調整した。PCR 条件は、94°C、2 分間の熱変性後、98°C、10 秒間、60°C、20 秒間、68°C、5 分間の 3 工程を 1 サイクルとし、これを 30 回繰り返した。PCR 増幅には、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) を用いた。アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の有無を確認した後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) のプロトコールにしたがって PCR 産物の精製をおこなった。

(5) サンガー法による直接塩基配列決定 (ダイレクトシーケンシング) 法

前述の PCR 条件にて両染色体由来の HLA アリルが 1:1 で増幅しているか否かを確認するために、HLA-A、-B および -C 遺伝子のエクソン 3 に新たに設計したシーケンシングプライマーを用いて、サンガー法により PCR 産物の塩基配列を決定した。塩基配列は、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver3.1 (Applied Biosystems 社) な

らびにキャピラリー電気泳動装置 ABI Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems 社) を用いて決定した。得られた塩基配列は Sequencer ver.4.10 (Gene Codes Corporation 社) により解析した。

(6) 次世代シーケンシング法

次世代シーケンサー Roche GS Junior ベンチトップシステムを用いた主な工程を図 1 に示した。すなわち、(1) シーケンシング用のライブラリー調製、(2) エマルジョン PCR (emPCR)、(3) ゲノムシーケンサー Roche GS Junior を用いたパイロシーケンシングおよび (4) コンピューター上における塩基配列決定の 4 工程を PCR 増幅後に実施した。

具体的には、得られた PCR 産物を窒素ガス噴射により約 500 塩基ほどに断片化し、その断片化された DNA 断片の末端にライブラリー専用 DNA アダ

プターを付加させた。その DNA 断片をアルカリ変性させることにより一本鎖にした後、アダプターを介してエンリッチメントビーズに結合させた。得られたビーズを油中水型エマルジョンに包み込み、1 ビーズに 1 分子の DNA 断片が結合したマイクロリアクター環境を形成させた。その後、エマルジョン PCR 反応を実施し、各ビーズ上に各 DNA 断片のコピーを形成させた。この際、各 DNA 断片は各々のマイクロリアクター内でクローナルに増幅されるので、他の配列との競合もなく、多数の断片の増幅が同時に並列的に実施される。さらに、エマルジョンを破壊して増幅された DNA 断片を有するビーズを回収し、ピコタイタープレートに 1 ウェルに 1 個のビーズが入るように、最大 50 万個のビーズをローディングした。最終的に各々のビーズについて、4 種類の核酸 (A, G, C, T) を一定の順序で加え、ビーズ上の DNA 断片とのポリメラーゼ反応の際に生じ

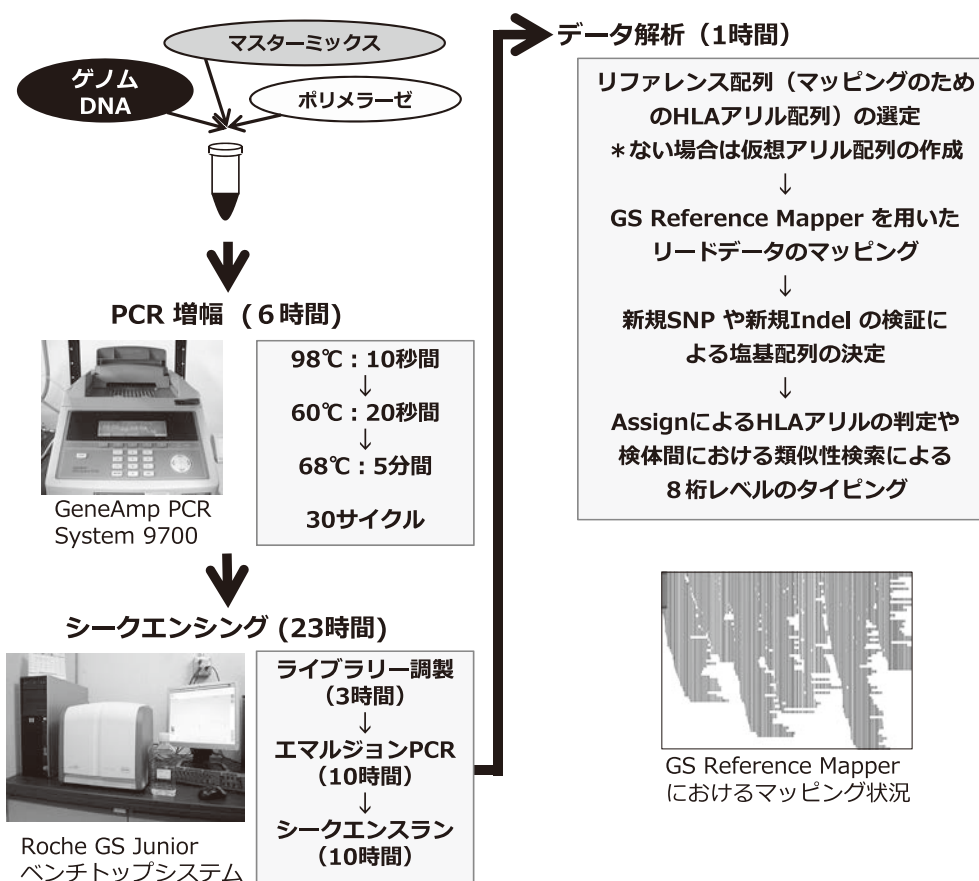


図 1 SS-SBT 法の概略

括弧に必要とするおおよその時間をしめした。

るピロリン酸をルシフェラーゼによる蛍光反応で検出し、添加した核酸に応じた化学発光パターンを記録し、そのシグナル強度と位置情報との組み合わせにより塩基配列を決定した。なお、ライブラリーの調製、emPCRならびにパイロシークエンシングは、GS Titanium Rapid Library MID Adaptor Kit, GS Junior emPCR Bead Recovery Reagents, GS Junior Titanium Pico Titer Plate Kit (Roche 社) などのプロトコールに従った。なお、シークエンシング用のライブラリーは、PCR産物それぞれに10 bpからなる10種類のMID配列を付加させたアダプターをライゲーションさせることにより調製した。また、emPCRはそれぞれ別に調製したライブラリーを混合してからおこなった。

各塩基配列データ(リードデータ)から塩基配列の正確さを示すクオリティ値(Quality Value; QV値)がリード全長に渡って20以上の高品質リードデータをMIDごとに分類した後、IMGT-HLAデータベースにて公開されている全HLAアレル配列とリードデータとの類似性検索をBLATプログラム(<http://genome.ucsc.edu/>)を用いておこない、各検体が有するHLAアレル配列を選定した。次いで、そのHLAアレル配列をリファレンス配列として用いて、その配列とリードデータとを結合させる作業(マッピング)をおこなうことにより、遺伝子全領域の塩基配列を決定した。この際のマッピングには、GS Reference Mapper (Roche 社)を用い、100塩基が100%一致する条件にておこなった。PCR全域におけるリファレンス配列が存在しない場合は、仮想アレル配列をSequencher ver.4.10 (Gene Codes 社)により作成したものをを用いた。また、新たに塩基置換が検出された場合は新たに設計したシークエンシングプライマーを用いて、PCR産物のダイレクトシークエンシングにより確認した。最終的に、決定された塩基配列データを用いて、Assign-ATFシークエンス解析ソフトウェア (Conexio Genomics 社)によるエクソンごとのHLAアレル判定や各検体にて検出された塩基配列との詳細な類似性検索により、8桁レベルのDNAタイピングをおこなった。

結果

(1) PCR条件の設定

HLA-A, -B および -C において、ATG 開始コドンの上流側 844 bp と下流側 1,720 bp を含む 5,466 bp を増幅させる HLA-A プライマー、ATG 開始コドンの上流側 885 bp と下流側 1,048 bp を含む 4,609 bp を増幅させる HLA-B プライマーおよび ATG 開始コドンの上流側 1,044 bp と下流側 855 bp を含む 4,802 bp を増幅させる HLA-C プライマーを設計した(図 2A, 表 3)。これら PCR プライマーセットを用いて PCR 条件の検討をおこなった結果、いずれのプライマーセットともアニーリング温度を 60°C、伸長反応を 68°C で 5 分間に設定した場合、10 検体ともに目的サイズ付近に単一の PCR 産物を確認した(図 2B)。その後、これら PCR 産物の塩基配列をサンガー法による直接塩基配列決定法(ダイレクトシークエンシング)によりエクソン 2 領域の一部を決定した結果、いずれの検体でも特定部位に 2 種類の塩基がほぼ 1:1 で混在する波形が観察された(図 2C)。したがって、本研究にて設定した PCR 条件は両染色体由来の HLA アレルを 1:1 で増幅することを確認したことから、これら PCR 産物を次世代シークエンシングに供試した。

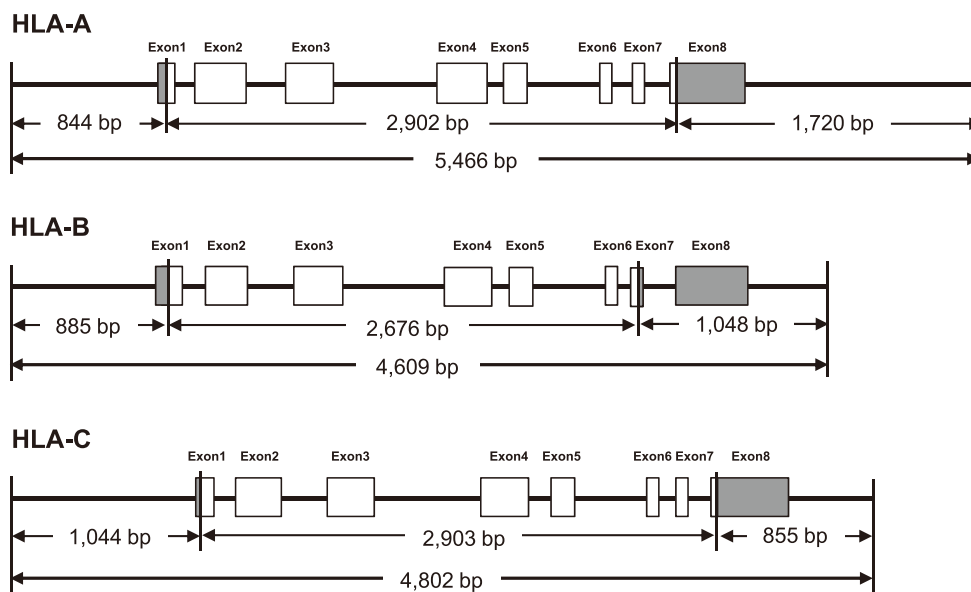
(2) 次世代シークエンシングにより得られた基本情報

HLA-A, -B および -C における 10 検体の PCR 産物(計 30 PCR 産物)からそれぞれ MID を含むシークエンシング用ライブラリー(計 30 ライブラリー)を調製し、emPCR の過程で HLA-A の 10 PCR 産物、HLA-B の 10 PCR 産物および HLA-C の 10 PCR 産物を混合して、計 3 回のシークエンシングランをおこなった。その結果、HLA-A, -B および -C にて、127,263 リード、114,306 リードおよび 125,514 リードがそれぞれ得られた。各リードデータにおける QV 値の平均である平均 QV 値はそれぞれ 30.8, 31.1, 30.4 であり、それらリードの平均長はそれぞれ 432.9 bp (425.7 bp ~ 440.7 bp), 438.0 bp (430.6 bp ~ 445.0 bp) および 416.2 bp (405.2 bp ~ 422.5 bp) であった(表 4A)。これらリードデータを検体ごとに分類した場合、HLA-A では 9,473 リード(DNA sample ID: TU3) ~ 18,101 リード(TU2)、HLA-B

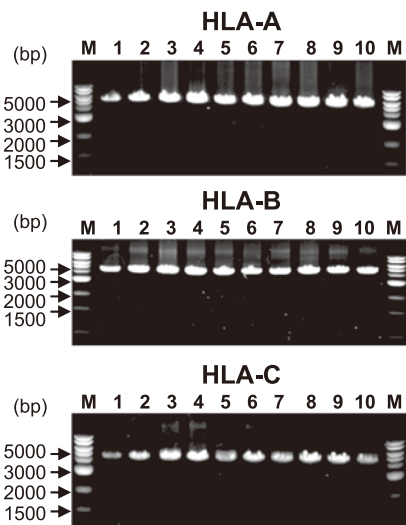
では6,727リード (TU8) ~ 14,442リード (TU2), HLA-Cでは7,873リード (TU1) ~ 18,617リード (TU4) がそれぞれ得られた (表4)。また、1つの塩基を決定するために使用したリード数 (重複度; depth) のPCR全領域における平均値 (平均 depth) は、

HLA-A, -B および -C にて、それぞれ平均 139.8 ~ 525.2 depth, 平均 149.2 ~ 383.7 depth, 平均 134.9 ~ 445.9 depth であり、いずれの検体も Roche GS Junior ベンチトップシステム使用時に推奨される 30 depth を超えていた (表5)。したがって、本解析に

(A)



(B)



(C)

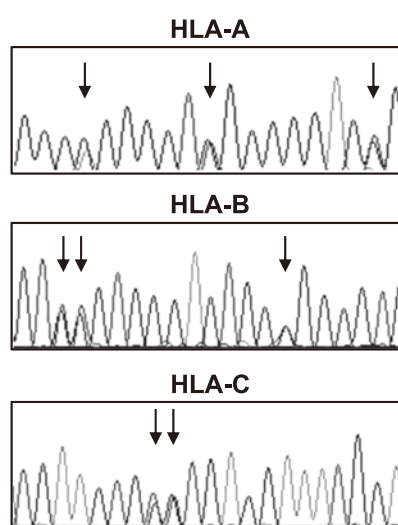


図2 HLA-A, -B, -CにおけるPCR条件の検討

(A ~ C) は HLA-A, -B, -C における遺伝子構造と PCR 増幅領域, 10 検体を用いた PCR 増幅の確認および直接塩基配列決定 (ダイレクトシーケンシング) による PCR 増幅の確認をそれぞれ示す。(A) の白色と灰色のボックスは翻訳領域と非翻訳領域をそれぞれ示す。また、(B) の 1 ~ 10 は検体番号 TU1 ~ TU10 をそれぞれ示す。M は 500 bp DNA Ladder を示す。さらに、(C) の矢印は 2 種類の塩基が混在する部位を示す。

表3 HLA-A, B および -C 遺伝子座をそれぞれ特異的に PCR 増幅させるためのプライマー配列と PCR 条件

HLA class I locus	Amplified Length (bp)	Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Primer Length (mer)	Tm (°C)
HLA-A	5,466	HLA-A_F1	AACTCAGAGCTAAGGAATGATGGCAAAT	28	59.1
		HLA-A_F2	AACTCAGAGCTATGGAATGATGGTAAAT	28	57.6
		HLA-A_R1	ATATAACCATCATCGTGTCCCAAGGTTC	28	60.5
HLA-B	4,609	HLA-B_F1	CCCGGTTGCAATAGACAGTAACAAA	25	58.8
		HLA-B_R1	GGGTCCAATTTACAGACAAAATGT	24	57.1
HLA-C	4,802	HLA-C_F1	TGCTTAGATGTGCATAGTTCACGAA	25	57.2
		HLA-C_F2	TGCTTAGATGTGCATAGTTCACGAA	25	58.8
		HLA-C_R1	TGGACCCAATTTTACAAACAAATA	24	51.9

表4 Roche GS Junior ベンチトップシステムにより得られた塩基配列情報

(A) Average read length (bp)

DNA sample ID	MID type	HLA-A	HLA-B	HLA-C
TU1	MID1	430.1	432.2	408.2
TU2	MID2	435.0	436.2	416.8
TU3	MID3	427.9	436.9	405.2
TU4	MID4	440.7	442.6	422.5
TU5	MID5	435.0	442.2	417.1
TU6	MID6	433.5	445.0	418.3
TU7	MID7	432.5	430.6	413.1
TU8	MID8	425.7	439.7	416.5
TU9	MID9	432.3	432.4	413.4
TU10	MID10	430.7	438.3	419.6
Average		432.9	438.0	416.2

(B) Read number

DNA sample ID	MID type	HLA-A	HLA-B	HLA-C
TU1	MID1	11,069	9,349	7,873
TU2	MID2	18,101	14,442	17,926
TU3	MID3	9,473	10,157	8,211
TU4	MID4	16,657	14,268	18,617
TU5	MID5	12,672	12,941	12,432
TU6	MID6	14,767	13,804	8,292
TU7	MID7	10,193	9,437	10,900
TU8	MID8	12,019	6,727	11,507
TU9	MID9	10,126	11,438	12,082
TU10	MID10	12,186	11,743	17,674
Total		127,263	114,306	125,514

より得られたリードデータは HLA アリルの塩基配列決定に十分に資するものであったことから、これらリードデータを用いて以降の解析を進めた。

(3) SS-SBT 法による HLA アリルの判定

得られたリードデータと HLA クラス I 遺伝子のリファレンス配列とのマッピングにより、いずれの検体においても、両染色体由来の HLA アリルの塩基配列が決定された (表 6)。なお、新規アリルと思われるものについては、WHO の HLA 命名委員会から正式な命名の承認を得ていないため、8 桁アリル表記の区域のなかで新規と思われる該当区域について便宜的に括弧にて示した (すなわち、HLA-B*55:02:01:(02), B*56:01:01:(02), C*07:02:01:(04) および C*07:02:01:(05))。また、平均 depth の比 (average depth of allele 1/average depth of allele 2) を PCR 産物ごとに算出した結果、すべての PCR 産物は 0.8 ~ 1.4 の間に含まれたことから、両 HLA アリルにおける塩基配列はおおむね同等のリード数でマッピングされていることが明らかとなった (表 5)。これら塩基配列のうち、HLA-A については 10 検体全てが IMGT-HLA データベース上のアリル配列と一致したが、HLA-B および -C ではデータベース上には認められない、イントロン領域に新規 SNP あるいは新規欠失 (deletion) を含む新規 HLA アリルと思われる配列がそれぞれ 2 種類ずつ見出された (表 7)。すなわち、HLA-B*55:02:01:(02) は、HLA-B*55:02:01 と比較して、イントロン 7 に 1 塩基の欠失と 1 個の SNP を、HLA-B*56:01:01:(02) は、HLA-B*56:01:01

表5 HLA-A, -B および -C におけるアレル 1 とアレル 2 の平均 depth の比

DNA Sample ID	HLA-A			HLA-B			HLA-C		
	Average Depth of Allele 1*	Average Depth of Allele 2*	Ratio**	Average Depth of Allele 1	Average Depth of Allele 2	Ratio**	Average Depth of Allele 1	Average Depth of Allele 2	Ratio**
TU1	173.5	166.4	1.0	197.6	155.6	1.3	134.9	176.1	0.8
TU2	297.9	294.7	1.0	383.7	366.3	1.0	388.2	427.8	0.9
TU3	139.8	151.0	0.9	250.7	203.1	1.2	165.1	146.8	1.1
TU4	525.2	523.4	1.0	329.5	382.1	0.9	445.9	381.1	1.2
TU5	226.6	235.0	1.0	280.0	279.8	1.0	257.1	257.3	1.0
TU6	229.1	237.8	1.0	293.2	323.7	0.9	212.5	193.4	1.1
TU7	156.3	157.4	1.0	158.9	205.3	0.8	211.7	206.5	1.0
TU8	175.0	184.2	1.0	149.2	163.2	0.9	237.6	228.0	1.0
TU9	320.1	319.0	1.0	218.1	271.6	0.8	293.0	232.0	1.3
TU10	172.5	179.4	1.0	276.3	233.6	1.2	418.1	309.4	1.4

*アレル 1 とアレル 2 における正式なアレル名を表 5 に示した。 **Ratio はアレル 1 の平均 depth/アレル 2 の平均 depth を示す。

表6 HLA-A, -B および -C における SS-SBT 法による DNA タイピングの結果

DNA Sample ID	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
	Allele1	Allele2	Allele1	Allele2	Allele1	Allele2
TU1	A*02:06:01	A*11:01:01	B*40:02:01	B*55:02:01:(02) AB679915	C*01:02:01	C*03:03:01
TU2	A*02:01:01:01	A*31:01:02	B*51:02:01	B*56:01:01:(02) AB679916	C*01:02:01	C*03:04:01:02
TU3	A*24:02:01:01	A*31:01:02	B*07:02:01	B*35:01:01:02	C*03:03:01	C*07:02:01:03
TU4	A*02:07	A*02:06:01	B*40:02:01	B*44:03:01	C*03:03:01	C*14:03
TU5	A*26:01:01	A*31:01:02	B*15:01:01:01	B*35:01:01:02	C*03:04:01:02	C*07:02:01:(04) AB679917
TU6	A*26:03:01	A*33:03:01	B*15:11:01	B*44:03:01	C*03:03:01	C*14:03
TU7	A*02:03:01	A*24:02:01:01	B*38:02:01	B*54:01:01	C*01:02:01	C*07:02:01:(05) AB679918
TU8	A*24:02:01:01	A*33:03:01	B*44:03:01	B*48:01:01	C*08:03:01	C*14:03
TU9	A*02:01:01:01	A*02:06:01	B*40:06:01:01	B*48:01:01	C*08:01:01	C*15:02:01
TU10	A*11:01:01	A*31:01:02	B*40:01:02	B*51:01:01	C*07:02:01:01	C*15:02:01

灰色の背景は新規に検出されたアレル (上段) とその DDBJ accession number (下段) を示す。

と比較して、イントロン 5 に 1 個の SNP を、HLA-C*07:02:01:(04) は、HLA-C*07:02:01:01 と比較して、イントロン 1 に 1 個の SNP およびイントロン 5 に 1 塩基の欠失を、HLA-C*07:02:01:(05) は、HLA-C*07:02:01:01 と比較して、イントロン 2 に 1 個の SNP がそれぞれ検出された。そこで、前述のように便宜的に HLA-B*55:02:01:(02), B*56:01:01:(02), C*07:02:01:(04) および C*07:02:01:(05) と表記し

た (表 6)。これらの 4 個の新規アレルは、新たに設計したシークエンシングプライマーを用いたサンガー法によるダイレクトシークエンシングにより検証したところ、いずれも新規 HLA アレル配列であることが確認された (HLA-B*55:02:01:(02): DDBJ accession number AB679915, HLA-B*56:01:01:(02): AB679916, HLA-C*07:02:01:(04): AB679917, HLA-C*07:02:01:(05): AB679918)。

表 7 新規に検出された HLA アリルの特徴

Locus	DNA Sample ID	Reference				Newly identified alleles		Position
		Allele name	IMGT HLA No.	Position (bp)	Nucleotide	Allele name	Nucleotide	
HLA-B	TU1	B*55:02:01	HLA00369	3,037	G	B*55:02:01:(02)	Deletion	Intron 7
				3,076	T		A	Intron 7
	TU2	B*56:01:01	HLA00376	2,478	C	B*56:01:01:(02)	G	Intron 5
HLA-C	TU5	C*07:02:01:01	HLA00434	397	C	C*07:02:01:(04)	G	Intron 1
				2,583	G		Deletion	Intron 5
	TU7	C*07:02:01:01	HLA00434	822	C	C*07:02:01:(04)	T	Intron 2

考 察

次世代シーケンサーを用いた DNA タイピング法は既に報告されているが、一部のエクソンのみ (クラス I 遺伝子についてはエクソン 2, エクソン 3, エクソン 4) をシーケンシングする方法であり、その他のエクソン, インtron, インtron ならびにエンハンサー・プロモーター領域から 3' 非翻訳領域はシーケンシングの対象としていないので, 8 桁レベルの DNA タイピング法ではない¹¹⁾。一方, 本研究では, Roche GS Junior ベンチトップシステムを用いて HLA-A, -B および -C 遺伝子全領域における 8 桁レベルの DNA タイピングを試みたものであり, 10 検体のみの少数を対象としたことからエクソンにおける新規多型や null アリルは検出されなかったものの, インtron に新規多型を検出したこと, ambiguity の認められない HLA アリルを判定したことから, 多型検出の精度が優れている手法であると考えられた。したがって, 設計したプライマー, 開発した PCR 系ならびに次世代シーケンシング法は, 遺伝子全領域における ambiguity の認められない 8 桁レベルの DNA タイピングに有効であるとともに, 新規 HLA アリルや null アリルの検出, 疾患関連解析および分子進化的研究のための優れた手法であることが示唆された。また, 本研究にて計 30 種類の PCR 産物から 4 種類の新規 HLA アリルが検出されたが, IMGT-HLA データベースに登録されている HLA-A, -B および -C アリルのうち, 遺伝子全領域が完全に決定されているアリルは全体の 6.5% 程度であることから, 今後も数多くの新規 HLA クラス I アリルが検出されると考えられた。

臨床現場にて日常的に SS-SBT 法を利用するためには, 解析時間, コストならびに解決すべき技術が課題となる。時間面では, PCR 増幅から HLA アリル判定までの計 4 日間で現時点で必要であるが, 最近シーケンシング用ライブラリーを短時間で作製するキットも販売されており, このキットを使用すれば 3 日間の解析も可能である。コスト面では, 1 検体 1 遺伝子あたり 2 万数千円と現時点では極めて高価である。この対処法として, 平均 depth が最低でも 134.9 (HLA-C の TU1, 表 4) と極めて厚かったことから, 1 シーケンシングランあたりの検体数を増やすこと, さらには HLA-A, -B および -C の PCR 産物を混合した DNA タイピングによりランニングコストが次世代シーケンサーに比して 1/10 以下である第 3 世代のシーケンサーを用いることにより, 従来の HLA-DNA タイピングに比して, より低価格に引き下げることが十分に可能であると考えられた。技術面では, 8 桁レベルにおけるアリル配列を収集し, これらをリファレンス配列とした HLA アリル判定ソフトウェアを開発する必要があると考えられた。その際, プライマー領域に多型が存在することにより PCR 効率が下がる可能性が想定されることから, 平均 depth の比を常にモニタリングし, その比が極端に変化した場合, 新規プライマーの設計により対処する必要がある。また, 平均 depth は検体によって 3 ~ 4 倍の差異が認められたが (表 5 の TU3: 139.8 depth, TU4: 525.2 depth), これは Picogreen を用いた PCR 産物の定量の際のハンドリングの問題であると考えられ, 多検体を解析するためには, 平均 depth の均一化も課題の一つであ

る。今後、これらの問題点を解決することにより、より本 DNA タイピング法が普及していくものと考えられる。また、HLA クラス II 遺伝子についても同様の次世代シーケンサーを用いた HLA-DNA タイピングを開発中である。

謝 辞

次世代シーケンサーのデータ解析をおこなっていただいた東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター情報科学部門の林英樹氏ならびに田中政之氏に感謝します。

引用文献

- 1) Bettinotti M, Mitsuishi Y, Bibee K, *et al.*: Comprehensive method for the typing of HLA-A, B and C Alleles by direct sequencing of PCR products obtained from genomic DNA. *Journal of Immunotherapy* (20): 425–430, 1997.
- 2) 吉川枝里, 宮原詞子, 成瀬妙子 他: PCR-Luminex 法を用いた, HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本人対応 4 桁 DNA タイピング方法の検討. *MHC* 10: 21–31.
- 3) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, *et al.*: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* (57): 717–729, 2005.
- 4) Rozemuller E. Collection and analysis of SBT results data. 13th IHWS Technology Joint Report. *Immunobiology of Human MHC Vol. 1* (ed. Hansen JA), p. 413–416, 2006.
- 5) IMGT-HLA database (Release 3.6.0, 10 October 2011). <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>
- 6) Curt L, Deborah F, Divitri M: Next Generation Sequencing: Entering a New Era in HLA Sequence-Based Typing. *Scientific Communications* 8–14, 2010.
- 7) Wiseman RW, Karl JA, Bimber BN, *et al.*: Major histocompatibility complex genotyping with massively parallel pyrosequencing. *Nature medicine* (15): 1322–1327, 2009.
- 8) Gabriel C, Danzer M, Hackl C, *et al.*: Rapid high-throughput human leukocyte antigen typing by massively parallel pyrosequencing for high-resolution allele identification. *Human Immunology* (70): 960–964, 2009.
- 9) Bentley G, Higuchi R, Höglund B, *et al.*: High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens* (74): 393–403, 2009.
- 10) Holcomb CL, Höglund B, Anderson MW, *et al.*: A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens* (77): 206–217, 2011.
- 11) Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, *et al.*: Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Human Immunology* (71): 1033–1042, 2010.

Development of the Super high resolution Single molecule - Sequence Based Typing (SS-SBT) method for HLA class I genes

Shingo Suzuki*, Yuki Ozaki*, Eri Kikkawa, Atsuko Shigenari, Akira Oka, Shigeki Mitunaga, Takashi Shiina, Hidetoshi Inoko

Department of Molecular Life Science, Division of Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1143, Japan

Summary: Current HLA-DNA typing methods are mainly PCR-SBT and PCR-Luminex used as routine testing. However, these methods generally yield ambiguous typing results because of lacking of oligonucleotide probes and phase ambiguity for HLA allele determination. In this paper we described the development and first application of 8-digit level super high resolution single molecule - sequence based typing (SS-SBT) method for HLA-A, -B and -C loci using next generation sequencer, Roche GS Junior Bench Top System aimed at elimination of ambiguities. HLA-A, -B and -C specific PCR primers were designed to amplify the entire gene regions from the enhancer-promoter to the 3' untranslated region. The PCR condition was set to amplify both of the HLA alleles of the HLA-A, -B and -C gene with 1:1 ratio. By this SS-SBT HLA-DNA typing of the HLA class I loci using DNA samples that were observed with ambiguities for HLA alleles when defined by conventional HLA-DNA typing method, all of them were unequivocally defined to single HLA alleles at the 8-digit level without ambiguity by next generation sequencing. Therefore, our SS-SBT method is a superior, complete and ultimate HLA-DNA typing method to efficiently detect new HLA alleles and null alleles along with effective 8-digit level DNA typing for the HLA class I genes without ambiguity.

Key Words: HLA, next generation sequencer, PCR, DNA typing, super high resolution single molecule - sequence based typing (SS-SBT)

第 10 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄 録 集

会 期：2012 年 2 月 11 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：池亀 和博
兵庫医科大学血液内科
〒 663-8501 西宮市武庫川町 1 番 1 号
TEL: 0798-45-6111（代表）
E-mail: kame@hyo-med.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

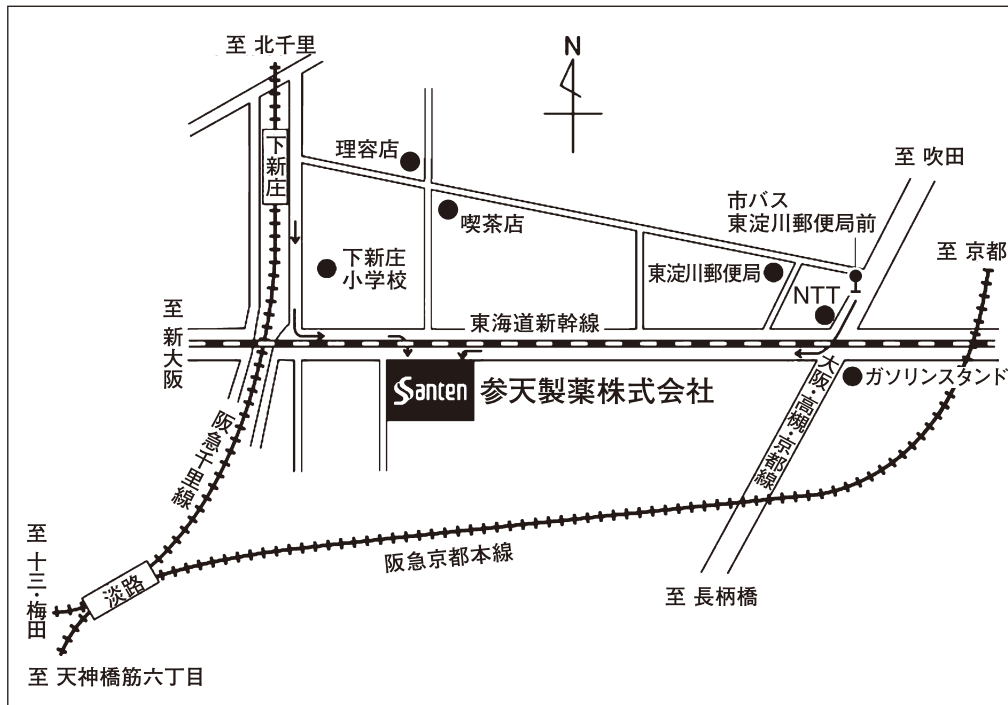
【会議等】

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

【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

【午前の部】

10時～11時

オープニングセミナー

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院血液内科）

- 1) 顆粒球抗原（HNA）遺伝子導入細胞株による GIFT 確認試験
保井一太（大阪府赤十字血液センター研究部研究二課）
- 2) HPA 関連
林 智也（大阪府赤十字血液センター研究部研究三課）

11時～12時

一般演題

座長：高 陽淑（大阪府赤十字血液センター検査三課）

1. Luminex 法による HLA LOH/6p-UPD の検出

○末上伸二¹⁾，二神貴臣¹⁾，小島裕人¹⁾，辻野貴史¹⁾，林 晃司¹⁾，楠木靖史¹⁾，藤井直樹¹⁾，西川美年子¹⁾，
小川公明²⁾，赤座達也¹⁾，佐治博夫¹⁾
NPO HLA 研究所¹⁾，NPO 白血病研究基金を育てる会²⁾

2. HLA ハプロ半合致移植後の上皮細胞に HLA LOH/6p-UPD がみられた症例（予報）

○小島裕人¹⁾，小沼正栄²⁾，二神貴臣¹⁾，辻野貴史¹⁾，林 晃司¹⁾，楠木靖史¹⁾，藤井直樹¹⁾，末上伸二¹⁾，
西川美年子¹⁾，小川公明³⁾，赤座達也¹⁾，佐治博夫¹⁾
NPO HLA 研究所¹⁾，東北大学医学部附属病院 小児科²⁾，NPO 白血病研究基金を育てる会³⁾

3. GVHD 予防をステロイドで強化した HLA 半合致移植における，CMVpp65 抗原特異的 T 細胞の検討

○加藤るり
兵庫医科大学 血液内科

4. HLA 不適合ハプロ半合致移植症例における HLA 抗体の検出率

○林 晃司¹⁾，小島裕人¹⁾，藤井直樹¹⁾，二神貴臣¹⁾，辻野貴史¹⁾，楠木靖史¹⁾，末上伸二¹⁾，西川美年子¹⁾，
吉原 哲²⁾，谷口享子²⁾，小川啓恭²⁾，赤座達也¹⁾，佐治博夫¹⁾
NPO HLA 研究所¹⁾，兵庫医科大学病院 血液内科²⁾

5. 造血幹細胞移植後に頬粘膜細胞がドナータイプに置き換わった2例

○辻野貴史¹⁾, 道下吉広²⁾, 浜之上聡³⁾, 小島裕人¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾,
末上伸二¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明⁴⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾
NPO HLA 研究所¹⁾, 秋田大学医学部附属病院²⁾, 神奈川県立こども医療センター³⁾,
NPO 白血病研究基金を育てる会⁴⁾

12時～13時

昼食・世話人会

13時00分～13時20分

総 会

【午後の部】

13時30分～15時30分

シンポジウム

移植医療の最新知見

座長：芦田隆司（近畿大学 血液内科）
池亀和博（兵庫医科大学 血液内科）

- 1) KIR 適合性と造血細胞移植成績：最近の知見から
屋部登志雄（東京都赤十字血液センター）
- 2) 造血幹細胞移植領域における HLA 抗体の役割
吉原 哲（兵庫医科大学 血液内科）
- 3) graft versus GVHD
石井慎一（兵庫医科大学 血液内科）
- 4) 腎移植と MICA・MICB について
水谷一夫（名古屋大学医学部 泌尿器科）

15時30分～15時40分

休憩

15時40分～16時40分

特別講演

座長：岡 芳弘（大阪大学 呼吸器・免疫アレルギー内科学）

悪性腫瘍のペプチド免疫療法 一なりたちと展望—
宇高恵子（高知大学 免疫学講座）

17時～

懇親会

(10:00 ~ 11:00)

オープニングセミナー

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院血液内科）

- 1) 顆粒球抗原（HNA）遺伝子導入細胞株による GIFT 確認試験
保井一太（大阪府赤十字血液センター研究部研究二課）
- 2) HPA 関連
林 智也（大阪府赤十字血液センター研究部研究三課）

1. 顆粒球抗原 (HNA) 遺伝子導入細胞株による GIFT 確認試験

保井一太

大阪府赤十字血液センター研究部研究二課

輸血によってひきおこされる副作用の報告は年間約 2,000 例に及び、その約 90% は非溶血性輸血反応 (NHTR) である。輸血関連急性肺障害 (TRALI) は NHTR のうち最も重篤な症状を示す一つで、輸血医療にとって解決しなければならない重要課題の一つとなっている。ヒト白血球抗原 (HLA) やヒト好中球抗原 (HNA) などに対する抗体は、時に血液製剤中に存在し TRALI 発症に関与する。このうち HLA 抗体に関しては確立された検査法が存在し、その同定には大きな障害はない。一方、HNA 抗体検査には標準法がなく、また国際的に認知された HNA-1 ~ HNA-5 以外にも TRALI に関与する好中球抗原の存在も示唆されており、まだ多くの問題が存在する。大阪センターではヒト好中球抗体を GIFT 法の変法である 5 cell-lineage IFT 法でスクリーニングし、特異性同定は遺伝子導入により HNA-1a,

-1b, -1c, -2a, -4a, -4b, -5a, -5b 抗原のみをそれぞれ恒常的に発現する細胞株を用い、日々の検査を行っている。また、非溶血性輸血副作用が報告された血液製剤 (副作用検体) 中における白血球抗体を上記方法で検査したところ、顆粒球表面上の抗原とは結合するが、既知の HLA, HNA には特異性を示さない抗体が多数存在した。さらに、これら抗体が結合する分子の一つとして、われわれは Siglec-14 を同定した。Siglec-14 分子はシアル酸含有糖鎖を認識するレクチン分子群に属し、その発現は顆粒球および単球表面上に限られ、健常人でのタンパク質レベルの欠損が報告されている。今回のセミナーでは、HNA 抗原発現細胞株の特性と同細胞株を用いた HNA 抗体検査法を中心にわれわれが得たこれら HNA 抗体検査に関する知見について報告したい。

2. HPA 関連

林 智也

大阪府赤十字血液センター研究部研究三課

ヒトの血小板膜上には ABO 血液型抗原, HLA, HPA, Naka 抗原等, 様々な分子が存在する。輸血・妊娠・自己免疫疾患・骨髄移植等をきっかけとして, これらの分子に対する抗体が産生されると, 血小板減少の症状が現われる。輸血後紫斑, 血小板輸血不応や新生児血小板減少症等, これらの症状を引き起こす原因として, 患者の産生する HLA 抗体が主な物であるが, 一部 HPA 抗体の関与が報告されている。これらの病態の理解や予防のために抗体の特異性を決定する必要がある。HLA 抗体のスクリーニング及び特異性の解析は, 検査キットが市販されており, 簡易に検討することが出来る。一方, HPA 抗体の検出方法については, フローサイトメーターを用いた方法や MPHA 法をはじめ, MAIPA 法などが開発され, 検出感度, 特異性の向上が図られてきた。これらの方法は血小板を使用することから, 低頻度 HPA 発現血小板の準備が困難なこと等, 実施する際に種々の問題がある。我々は HPA に対する抗体検査における諸々の問題点を解決する方法を模索しており, それらを紹介したい。

【HPA について】

HPA はヒト血小板抗原 (Human Platelet Antigen) の略であり, 赤血球の血液型に対応するものとして, 血小板型ともよばれている。それらはわずか 6 種類の血小板膜タンパク質に局在しており, 多くは一塩基置換による一アミノ酸変異による多様性である。 α IIb β 3 上に存在する HPA が最も多く 15 種類存在し, α 2 β 1 に 3 種類, GPIbIXV に 2 種類, CD109 に 1 種類存在している。これらの頻度は, 人種や型により大きく異なり, 非常に稀な型も存在する。現在, 国際ワークショップでは 21 種類の体系が血小板抗原

として認められているが, 新規抗原候補が毎年報告されており, 今後, 増えていくと思われる。

【新規 HPA 抗体検査について】

HPA に対する抗体検査の問題点を解決する方法として, 我々は血小板を用いない検査法の確立を目指してきた。まず, 特異的な血小板抗原を長期間・安定的に発現する細胞を分子生物学的手法により作製する方法を考案した。次に, 樹立した細胞を血小板抗体検査法に応用することを試みた。その結果, 一部の血小板抗体を除いて, 細胞株パネルが様々な血小板抗体検査に応用可能であることが示された。現在, 14 種類の細胞を樹立しており, それぞれの細胞の特徴と血小板抗体検査への応用について言及したい。

【HPA の DNA タイピングについて】

患者さんの HPA の型を知ることは, 抗体産生のリスクや血小板抗体による血小板減少の予防に役に立つ。また, 血小板抗体検査に用いる血小板は, 特異的な HPA を発現している必要がある。HPA の型を調べる方法として, 遺伝子検査が有効である。HPA の DNA タイピングは, PCR-SSP 法等で行なわれてきたが, PCR-SSO を応用して Luminex beads を用いる方法が確立された。この方法では, 一度に複数種類の HPA を決定できる。しかし, 新しく追加された HPA に適応するには, プローブの配列やその他の条件検討が必要となる。我々はこの問題を解決できる可能性のある方法を試みている。

【HPA 抗体の将来展望】

輸血や妊娠において, HPA の不適合が認められ

る場合でも HPA 抗体の産生が起りやすい場合と、起りにくい場合がある。これらは、HLA の型が関与しているとの報告がある。従って、血小板抗体による血小板減少症の予防には、HPA の型に加えて、HLA の型を調べ、これらの組み合わせを調査していく事が今後重要になってくる。

抗体医薬品やリコンビナント医薬品において、糖

鎖構造が活性に重要である事は周知の事実である。実際に HPA 抗体においてもシアル酸付加による抗体活性への影響が報告されている。しかしながら、糖鎖構造解析は抗体活性に係る因子の 1 つにすぎない。今後、糖鎖構造の違いを含め、実際の患者体内での HPA 抗体の動態を定量的に解析できる方法が望まれる。

(10:40 ~ 11:15)

一般演題

座長：高 陽淑（大阪府赤十字血液センター検査三課）

演題番号 1～5

1. Luminex 法による HLA LOH/6p-UPD の検出

○末上伸二¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 小島裕人¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾,
藤井直樹¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾

NPO HLA 研究所¹⁾, NPO 白血病研究基金を育てる会²⁾

【はじめに】

造血幹細胞移植において HLA 領域での LOH/6p-UPD は、移植後のみならず移植前の腫瘍細胞や再生不良性貧血などの自己免疫疾患にみられ、ドナー選択や治療方針の決定の際に考慮されるようになり、近年、LOH/6p-UPD の検出を受託する機会が増えてきた。また、Luminex 法による HLA タイピング検査において LOH/6p-UPD がミスタイプを誘導する可能性がある。当研究所での経験例から注意すべき点を紹介したい。

【材料と方法】

Luminex 法 (WAKFlow) を用いて、LOH/6p-UPD を検出した血液検体。

【結果】

Luminex 法で LOH/6p-UPD を検出した検査の結果は、次の 3 パターンに分けられた。パターン①片方のアレルの Signal 強度が低値だが、heterozygote と判定される。

パターン②片方のアレルの一部の Signal 強度が低値で、タイピングの判定が不可能。

パターン③片方のアレルの Signal 強度が極めて低値で、homozygote と判定される。

【考察】

3 パターンの Signal の強弱は検体に含まれる LOH/6p-UPD 細胞数の割合に相関するものと考えられ、LOH/6p-UPD 検出目的の場合はパターン①のように heterozygote で判定されることがあり、腫瘍細胞をセレクション (CD34+ など) した検体を用いるのがよい。HLA タイピング目的の場合は、パターン③のように homozygote として判定されることがあるため、腫瘍細胞の割合が高い検体を用いることは望ましくない。体細胞 DNA 検体を用いるか、両親などの HLA タイピング検査を行い確認をするほうがよい。さらに、患者の HLA ハプロタイプが homozygote、特に稀なタイプの homozygote の場合は LOH/6p-UPD を考慮すべきである。

また、タイピングの判定が難しいときはパターン②のように片方のアレルの一部の Signal 強度が低値の場合があり、その場合も LOH/6p-UPD を考慮すべきである。

2. HLA ハプロ半合致移植後の上皮細胞に HLA LOH/6p-UPD がみられた症例（予報）

○小島裕人¹⁾, 小沼正栄²⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾,
藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明³⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾

NPO HLA 研究所¹⁾, 東北大学医学部附属病院 小児科²⁾, NPO 白血病研究基金を育てる会³⁾

【背景】

近年, HLA ハプロ半合致造血幹細胞移植後の血液腫瘍細胞において HLA 領域での LOH/6p-UPD が確認され, 予後が悪いことから新たな話題となっている。今回, 血液腫瘍細胞のみならず, 体細胞にも LOH/6p-UPD がみられた一例を紹介する。

【臨床経過】

14歳の男児。AML (M2) と診断され, 2007年2月に臍帯血移植するも, 2008年5月に再発。治療抵抗性, non CR で2008年12月に2回目の臍帯血移植。2010年7月に再発し, non CR で父をドナーとした HLA ハプロ半合致 PBSCT を実施。2011年7月に末梢血に blast がみられたため DLI を考慮し, LOH/6p-UPD の確認をおこなった。

Recipient : A*24:02/*02:06, C*01:02/*08:01,
B*54:01/*40:06, DRB1*14:03/*15:01

3rd Donor (父) : A*24:02/-, C*01:02/*08:03,
B*54:01/*48:01, DRB1*14:03/*15:01

【材料・方法】

3rd 移植後 day 289 の腫瘍細胞, Buccal, Nail, Hair の HLA 領域は Luminex 法 (WAK Flow) を,

それ以外はマイクロサテライト多型性検査を行った。

【結果】

マイクロサテライト多型性検査ではアンバランスはみられず, Luminex 法ではミスマッチの HLA-A, B, C 座の Signal 強度が, 移植前と比較して Nail はほぼ同等, 腫瘍細胞, Buccal, Hair はそれぞれ 1%, 1%, 10% 程度であった。DR 座は全検体, 同等の強度。

【考察】

3rd 移植後 day 289 の腫瘍細胞, Buccal, Hair の HLA-A, B, C 座の領域において LOH/6p-UPD がみられた。Nail にみられなかったことも考慮にいと, 程度に差はあるが, Buccal や Hair が Donor の強烈的な GVH 攻撃を受け, (上皮) 幹細胞クローンとして存在していた LOH/6p-UPD 細胞が生き残り, 進化的に選択されて増殖したと考えられる。結果としてドナー免疫から回避することになり, このことは臓器を含めた移植全般において, 患者がドナーの免疫を寛容するメカニズムを解明するブレイクスルーとなりうる。

3. GVHD 予防をステロイドで強化した HLA 半合致移植における, CMVpp65 抗原特異的 T 細胞の検討

○加藤るり

兵庫医科大学 血液内科

【目的】

免疫抑制が強化された HLA 半合致移植は, サイトメガロウイルス (CMV) 再活性化の危険性が高い。CMV への免疫機能の回復を, フローサイトメトリーによる CMVpp65 抗原特異的 T 細胞を測定し検討した。

【対照】

2009 年 7 月から 2011 年 5 月施行した HLA 半合致移植のうちレシピエントかドナーの HLA-A が 0201, 0206 の骨髄破壊的移植 9 例, 骨髄非破壊的移植 24 例 (7 例は再移植) を対照。HLA-A02 (0201, 0206) は 20 症例が共有 (RD 群), 13 症例はドナーのみ (D 群), 観察期間の中央値は 190 日 (40 ~ 665) であった。

【方法】

CMV の再活性化は週 1 回の CMVpp65 抗原の測定により評価。pp65 抗原が 4 週連続での陰性を再燃の鎮静化とした。移植後, 2, 3 週目から週に 1 回, フローサイトメトリーを施行。CD3 陽性かつ CD8 陽性かつ デキストラマー 試薬 HLA-A0201

(NLVPMVATV) 陽性の細胞集団を CMVpp65 抗原特異的 T 細胞とした。

【結果】

pp65 抗原血症は 31/33 症例 (93.9%) で発症, 1 例のみ (RD 群) はサイトメガロウイルス肺炎で死亡。2 症例 (RD 群 2 例) は抗原血症なし。pp65 抗原陽転から CMVpp65 抗原特異的 T 細胞の出現までの日数の中央値は, RD 群, D 群で 14 日 (-13 ~ 31), 23 日 (0 ~ 60) であった。CMVpp65 抗原特異的 T 細胞数の観察期間中の最高値は中央値で RD 群, D 群で, 14.07 (1.3 ~ 153.7) 個/μL, 9.657 (1.09-12) 個/μL。pp65 抗原陽転から CMVpp65 抗原特異的 T 細胞数が最大となるまでの日数は中央値で RD 群 62.5 (22-247) 日, D 群 68 (35-389) 日であった。

【結語】

免疫抑制が強化された HLA 半合致移植であっても CMVpp65 抗原血症に反応して CMVpp65 特異的 T 細胞が出現, CMV 再活性化のコントロールに関与している可能性が示唆された。

4. HLA 不適合ハプロ半合致移植症例における HLA 抗体の検出率

○林 晃司¹⁾, 小島裕人¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 末上伸二¹⁾,
西川美年子¹⁾, 吉原 哲²⁾, 谷口享子²⁾, 小川啓恭²⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾

NPO HLA 研究所¹⁾, 兵庫医科大学病院 血液内科²⁾

【目的】

近年、造血幹細胞移植における HLA 抗体に対する認識は普及し、移植前患者で DSA (Donor Specific Antibody) の有無を確認する為の HLA 抗体検査は生着不全のリスクを予測する上で必須の検査になった。検出される抗体特異性や頻度、そしてドナーの保有する HLA 抗体に関しての臨床的意義についてまだ不明な点が多い。今回、我々は HLA 不適合ハプロ半合致移植を目的とした患者及びそのドナーの HLA 抗体検査結果から、検出される抗体陽性率と抗体特異性についてまとめたので報告する。

【方法】

対象：HLA 不適合ハプロ半合致移植症例（患者：200 例，ドナー：171 例）の血漿又は血清，疾患：主に Leukemia，患者：男 105・女 95，ドナー：男 83・女 88，HLA 適合度；one haplo identical，方法：LABScreen PRA, LABScreen Single Antigen を使用，解析方法：上記 IgG 型抗体検査の結果を抗体の特異性と MFI (Median fluorescence intensity) で分類した。

【結果】

MFI $\geq 3,000$ で検出された HLA 抗体陽性率は患者:22.5% (n=45), ドナー:11.1% (n=19) であった。加えて患者:3.0% (n=6), ドナー:6.4% (n=11) はいわゆる自然抗体と推定される陽性反応のみが検出された。抗体陽性ドナーから移植された患者からドナー抗体産生細胞由来と思われる抗体が検出された症例は 7 例あったが、全て HLA-class I の MFI ≥ 3000 であった。

【考察】

自然抗体と推察される抗体陽性検出例があるが、それらの臨床的意義はないと推察される。また、HLA 抗体が検出されたドナーから移植された患者から近似した HLA 抗体が検出される症例に関してはドナー由来の抗体産生細胞の一部が移植後の患者体内において刺激を受けている結果と推察されるが、その臨床的意義を含めて今後症例数を増やし、更に検討したいと考える。

5. 造血幹細胞移植後に頬粘膜細胞がドナータイプに置き換わった2例

辻野貴史¹⁾, 道下吉広²⁾, 浜之上聡³⁾, 小島裕人¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 林 晃司¹⁾, 楠木靖史¹⁾,
藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明⁴⁾, 赤座達也¹⁾, 佐治博夫¹⁾

NPO HLA 研究所¹⁾, 秋田大学医学部附属病院²⁾, 神奈川県立こども医療センター³⁾, NPO 白血病研究基金を育てる会⁴⁾

【目的】

我々は、臍帯血移植後に口腔内粘膜細胞がドナータイプに置き換わる症例を2例経験した。移植ソースの挙動を知る手掛かりとするため、2例を比較・検討したので報告する。

【方法】

1. 移植後キメリズム検査は14種のマイクロサテライトを用い、レシピエントの移植後の末梢血・口腔内粘膜細胞・爪・毛髪（2例目のみ）の多型性を確認した。
2. HLA タイピングには、Luminex 法（WAKFlow）を用いた。

【結果・考察】

1. 第1例においては、口腔内粘膜細胞のみならず爪においてもドナータイプが100%近くを占め

た。しかし、第2例では爪・毛髪は患者タイプのままであり、体細胞がドナータイプに置き換わるのは人や組織・部位によって異なるといえる。2例とも graft は臍帯血であったことから、このような現象が臍帯血移植に特異的に起こるかを今後確認していく。

2. 第2例のマイクロサテライト多型性は口腔内粘膜細胞と爪・毛髪とで異なった。移植ソースに間葉系幹細胞が含まれ、口腔内粘膜細胞がドナータイプに置き換わったとき、爪に関しては患者タイプのままである場合がある。GVHD の標的となる口腔内粘膜細胞はドナータイプ細胞がGVH 反応を逃れて選択されることで局所的な免疫寛容が成立していると考えられる。移植後免疫寛容の成立機作として注目すべき現象といえる。

(13:30 ~ 15:30)

シンポジウム

移植医療との最新知見

座長：芦田隆司（近畿大学 血液内科）

池亀和博（兵庫医科大学 血液内科）

- 1) KIR 適合性と造血細胞移植成績：最近の知見から
屋部登志雄（東京都赤十字血液センター）
- 2) 造血幹細胞移植領域における HLA 抗体の役割
吉原 哲（兵庫医科大学 血液内科）
- 3) graft versus GVHD
石井慎一（兵庫医科大学 血液内科）
- 4) 腎移植と MICA・MICB について
水谷一夫（名古屋大学医学部 泌尿器科）

1. KIR 適合性と造血細胞移植成績：最近の知見から

屋部登志雄

東京都赤十字血液センター製剤部製剤三課製剤一係長

造血幹細胞移植成績に HLA 適合性が大きく影響している。HLA クラス I は抗体、T 細胞受容体に加え、NK 細胞受容体の KIR (Killer Ig-like Receptor) にも認識される。KIR 遺伝子多型およびその HLA リガンド特異性の造血細胞移植成績への影響についてはこれまで多くの報告がされており、海外では急性白血病、特に AML における再発抑制効果の有効性が示される一方で、成績が悪化する報告例もあり、いまだにその効果がはっきりとは定まっていないのが現状である。その理由としては移植の多様性（疾

患、移植源、移植手技など）に加えて KIR 遺伝子およびそのリガンドである HLA クラス I 遺伝子型の集団差も影響していることが挙げられる。そのため各人種集団ごとにおける移植成績と KIR 遺伝子型、HLA リガンド特異性の関連解析が必要となっている。今回は海外での造血細胞移植における KIR 適合性解析の最近の知見を紹介するとともに国内の JMDP を介した非血縁者間骨髄移植症例および臍帯血移植症例における KIR 適合性の解析結果の現状についても報告する。

2. 造血幹細胞移植領域における HLA 抗体の役割

吉原 哲

兵庫医科大学 血液内科

造血幹細胞移植領域における昨年のトピックの1つは、HLA ハプロ一致血縁ドナーからの移植（ハプロ移植）が現実的な選択肢であることが示されたことであろう。BMT-CTN（米国の臨床試験ネットワーク）の第II相試験として行われた臍帯血移植とハプロ移植の比較検討結果が報告され、引き続き第III相試験を行うことが発表された（Brunstein & Fuchs, Blood 2011）。臍帯血移植、ハプロ移植、そして非血縁者間移植（バンク移植）の多くには、HLA 不適合移植であるという共通点があり、これらの移植法の普及に伴って HLA 抗体の役割も急速にクローズアップされるようになってきた。レシピエントが保有する HLA 抗体がドナー幹細胞の生着不全を増加させることは、単一ユニットの臍帯血移植（Takanashi, Blood 2009）、複数臍帯血移植（Cutler, Blood 2011）、非血縁者間移植（Spellman, Blood 2010; Ciurea, Blood 2011）、ハプロ移植（Ciurea, Transplantation 2009; Yoshihara, Bone Marrow Transplant 2011）のそれぞれの移植法において相次いで報告された。移植前に抗体レベルを低下させる

ためのインターベンションに関する知見も増えつつある。一方、これに比べると臨床的なインパクトは小さいが、ドナーが保有する HLA 抗体の意義も明らかとなってきた。我々の検討では、HLA 抗体陽性のドナーから移植を受けた患者7例中4例において移植後早期（1週間以内）に HLA 抗体が出現し、抗体レベルは10日から2週間でピークとなりその後低下した（Taniguchi & Yoshihara, in submission）。この抗体によって血小板輸血不応も起こり得る。以上と全く異なる話題であるが、HLA class II は抗原提示細胞、活性化 T 細胞といった移植後の移植片対宿主病（GVHD）を引き起こす細胞群に比較的選択的に出現している。これを利用して、HLA-DR に対する抗体を GVHD の予防・治療に用いる基礎的検討も行われつつある（Chen, Bone Marrow Transplantation 2011）。

造血幹細胞領域における HLA 抗体検査の必要性（需要）は今後も増大していくことが予想され、検査法の標準化や保険適応の取得など環境整備も望まれるところである。

3. graft versus GVHD

石井慎一

兵庫医科大学 血液内科

同種移植後の GVHD (graft versus host disease) に対する治療法としては、様々な報告がなされてきたが、ステロイド・TNF 阻害薬・ATG (antithymocyte globulin) 等に抵抗性を示す症例がある。我々が主に行っている血縁者間 HLA 不適合移植においても、約 10% で治療に難渋する GVHD に遭遇する。このような場合に、別のドナーから同種移植を施行し、80% の確率で GVHD の寛解を得ており、かつ、PS (performance-status) を保ちながら、原疾患の寛解も得てきた。自己免疫疾患においても、自己を攻撃する宿主リンパ球の排除を目的として試みられており、これを、GVA (graft-versus-Autoimmunity) と呼ぶのに対し、ドナー由来の免疫細胞の排除を目的とした同種移植を、GvGVHD (graft-versus-GVHD) と名付けた。前処置としては、TBI を含めて、フル

ダラビンや ATG の lymphoablative な薬剤を使用し、GVHD 予防としては、タクロリムスとステロイドを使用する。第 2 ドナーの生着が得られれば、約 90% の症例で、GVHD は、速やかに寛解となった。一方、生着が得られない症例においても、約 50% の症例で GVHD の寛解が得られた。これは、前処置により、GVHD が抑制されたのではないかと考えられる。GVHD の grade が高く、PS の低下がみられる場合には、臓器障害も強く、前処置の治療毒性に耐えられない症例も存在するが、難治性 GVHD に対する治療としては、比較的毒性が低く、また、GVHD の寛解とともに、GVL (graft versus leukemia) 効果も期待でき、今後、症例数を増やしていくことで、GVHD の一つの治療戦略として、有効な手段となりうると考えている。

4. 腎移植と MICA・MICB について

水谷一夫

名古屋大学医学部泌尿器科

近年、HLA を含む各種検査や免疫抑制剤の進歩と共に臓器移植における急性拒絶反応は低下し、移植の成績は向上してきている。しかし、長期の臓器移植の成績の改善は急性期における成績の改善ほど大きくなく、慢性期における拒絶反応は臓器移植において以前より重要な問題となってきている。以前にテラサキらは臓器移植において HLA の適合性の問題を指摘、HLA の適合性を向上させることで移植の成績が向上することを示したが、近年は臓器移植した患者の約 20-30% の患者に HLA 抗体が出現すること、抗体陽性の患者では移植の成績が低下することなどを示した。特に近年の報告をみると長期における移植成績の向上のためには抗体による拒絶反応の解明と治療はさけては通れない問題となってきており、臓器移植前後または長期のフォローアップで移植関連抗体を検査・モニターすることは移植成績の向上のためには必須の検査方法のひとつであると考えられる。

更に、科学の進歩と共に今まで検査されてきた HLAA, B, DR という抗体のみでなく、他の HLA-DP/DQ という他の HLA 抗体も測定できるようにな

り HLA 抗体の数も増加してきている。同時に HLA 抗原以外を抗原とする様々な抗体の存在も報告されている。それらは一般に non-HLA 抗体と呼ばれ、今までに多くの抗体が報告されてきている。具体的には MICA/MICB (Major-histocompatibility-complex class I-related chain A/B) 抗体や抗血管内皮抗体などが報告されているが、その多様性から MICA, MICB は HLA につぐ抗原として近年注目されてきている。MICA/MICB は Non-HLA 抗体とされているが、遺伝子は HLA の近傍にあり、HLA と同様に多様性がある。現在 MICA は遺伝子として現在 80 種類、MICB は 33 種類が、蛋白としてはそれぞれ 63 種類、22 種類が報告されてきている。この MICA/B は NKG2D を介した免疫反応の一部に携わるのみならず、その多様性から HLA 抗体と同様、その抗体により移植臓器に拒絶反応を引き起こし、移植の成績を低下させると報告されている。また MICA/B 抗体は腎のみならず他の移植にも関係するという報告もあり、今後臓器移植における注目すべき抗体のひとつとして扱われている。

(15:40 ~ 16:40)

特別講演

座長：岡 芳弘（大阪大学 呼吸器・免疫アレルギー内科学）

悪性腫瘍のペプチド免疫療法 ーなりたちと展望ー

宇高恵子（高知大学 免疫学講座）

悪性腫瘍のペプチド免疫療法 —なりたちと展望—

宇高恵子

高知大学 免疫学講座

悪性腫瘍の免疫療法は、丸山ワクチンに代表される自然免疫系の細胞傷害活性を利用するものから始まった。自然免疫系のエフェクターのひとつである Natural Killer (NK) 細胞はいくつかの NK レセプターを使って腫瘍細胞を正常の細胞から見分ける。活性化型 NK レセプターのひとつである NKG2D は、非古典的 MHC 分子である MICA/MICB や ULBP ファミリー分子等を標的として認識する。これらは、悪性腫瘍に限らず、ウイルス感染や老朽化により弱った細胞が発現するストレス分子である。このため、標的細胞の種類や、標的が弱った原因によらず殺すことができる点は有利であるが、殺すか殺さないかが殺される標的細胞側の要因によって決まるため、元気な腫瘍細胞は標的となりにくい点が問題である。

一方、脊椎動物以降、遺伝子組み換えによりリンパ球がクローン特異的な抗原受容体遺伝子 (T 細胞レセプター: TCR) を発現するようになると、腫瘍細胞が作るタンパク質の質的、量的変化を鋭敏に感知する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) をエフェクターとする抗腫瘍免疫が可能になった。CTL は、標的細胞内で合成されるタンパク質の分解産物であるペプチドを MHC class I 分子が細胞内で結合し細胞表面で提示したものを認識して腫瘍細胞を見分ける。CTL が認識する抗原ペプチドが同定できれば、腫瘍細胞やウイルス感染細胞を特異的に認識する CTL を選択的に数百倍以上にも増やすことができる。こうしたペプチド免疫療法を開発する上でやっかいな問題は MHC の遺伝的多型性である。MHC 分子は、進化の過程で結合ペプチドが変わるようなアミノ酸変異をもつ対立遺伝子型 (allele: アリル)

が多数、集団に残され、異なるアリルを有する人は、より多様な抗原に対応できて子孫を残し易かったことがうかがわれる。古くに分かれたアリル間では、結合するペプチドのレパートリーが大きく異なる。

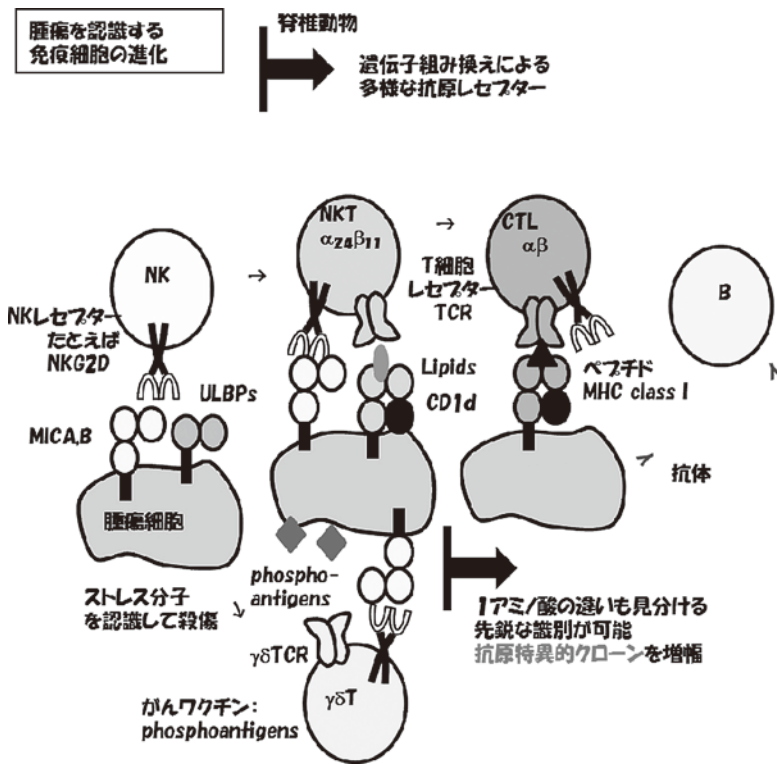
MHC class I 分子に結合するペプチドは、ランダムなアミノ酸配列の 9 アミノ酸長のペプチドの百数十個に 1 個程度存在する。標的抗原蛋白質のアミノ酸配列の中に MHC に結合するペプチドを見つけるには工夫が必要である。我々は、NEC と共同で、隠れマルコフモデルを基盤アルゴリズムとする質問学習法を使ってペプチド結合実験をデザインし、アリルごとに MHC のペプチド結合特性を調べて、任意のペプチドについて結合能を予測するプログラムを作製した。その結果、HLA-A*24:02 については 93% の的中率、60% の回収率で予想ができる。この的中率なら、まれに存在する複数のアリルに共通に結合するペプチドを見つけることもでき、日本人の大半に共通に免疫源として使える有用なペプチドをデザインすることが可能である。

このようにデザインした WT1 腫瘍抗原ペプチドを使って、抗腫瘍活性を調べている。国内外のペプチド免疫療法は、CTL 誘導ペプチドを免疫源とする第 1 世代の免疫療法が多いが、我々は第 3 者抗原である百日咳全菌体ワクチンを加えて Th1 細胞を誘導し、CTL の細胞傷害活性を高める第 2 世代ワクチンを工夫して抗腫瘍効果の向上をみた。

しかし、それでも抗腫瘍効果は限られる。その原因を探ったところ、腫瘍特異的 CTL は増えても、固形腫瘍の組織へはあまり侵入していないことがわかった。そこで、T 細胞が固形腫瘍に侵入するメカニズムを調べたところ、腫瘍組織においては血管内

皮細胞が死んだ腫瘍細胞を貪食してペプチドを MHC class II 分子に提示し、血管内を流れる腫瘍特異的 Th 細胞の腫瘍内浸潤を誘導することが明らかになった。また、Th が侵入することにより、腫瘍

特異的 CTL が大量に腫瘍内に侵入して固形腫瘍が縮小することがわかった。この原理を利用した第 3 世代の免疫療法の開発を進めている。



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 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「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, µl, %, °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, µl, %, °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 adrenomedullin 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で指定し, 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 250 words 以内 和文原著 英文 400 words 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

2012年 はや桜の季節となり、各地で開花の報道がされている。

昨年は我が国にとっては試練の年であり、3/11の震災、津波はいわゆる想定外として扱われることが多いが、防災の観点からはこれらのレベルの対応が求められている。

MHCの分野ではHLAアليل表記法が変更され、8桁の表示が行われ、シークエンサーも対応されるようになった。われわれにとっては想定外であるが、臨床においてそれらに対応できるのは、いつになるのであろうか。

私はシリーズ：各臓器移植についての拒絶反応の開設・移植の新しい治療法の紹介を楽しみにしている。前回18巻3号のNKレセプターとHLAの最前線はとくに読み応えがあった。造血幹細胞に従事する人にとってGVLやGVHDを考えるために非常に参考になったと思われる。本号も含め、今後の展開に期待したい。

最後に原著論文の応募よろしく申し上げます。

椿 和央

「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/index.html>

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

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2012年4月20日発行 19巻1号, 2012

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・中西印刷株式会社

〒602-8048 京都市上京区下立売通小川東入ル西大路町146