日本組織適合性学会誌

第 20 巻第 2 号　平成 25 年 8 月 10 日発行

目　　次

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 12 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内 …… 97

認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる） …… 98

認定制度指導者講習会…… 99

平成 25 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

さい帯血移植における HLA 適合性 …… 一戸辰夫　101

アロ HLA 抗原に対する拒絶反応の基礎免疫学 …… 入江　厚，西村泰治　109

臓器移植における HLA 抗体検査について …… 石塚　敏　121

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定 …… 131

編集後記…… 134

Major Histocompatibility Complex
Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics
JSHI

第 12 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内

会　期：2014 年 2 月 1 日（土）9:30 〜 17:00
会　場：未定
世話人：木村　貴文（京都大学　iPS 細胞研究所　規制科学部門）
t.kimura@cira.kyoto-u.ac.jp
会　費：正会員　2,000 円　学生　1,000 円
共　催：財団法人　大阪腎臓バンク
抄　録：2013 年 12 月 21 日　締め切り
送付先：〒 589–8511　大阪府大阪狭山市大野東 377–2
近畿大学医学部附属病院　輸血・細胞治療センター
日本組織適合性学会近畿支部事務局
金光　靖　宛
yuketsu@med.kindai.ac.jp

本会参加は、JSHI 認定技術者・指導者の新規および更新時の単位となります

認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる）

本講習会は，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。大会参加者は自由に参加することができます。受講に関しましては，事前登録をしていただく必要はございません。

日　　時：平成 25 年 9 月 14 日（土曜日）10:00 〜 12:00

会　　場：第 22 回・日本組織適合性学会　大会会場
コラッセふくしま　多目的センター A・B（4F）
（福島県産業振興センター）
（〒 960–8053　福島県福島市三河町 1 番 20 号）

テキスト：会場でのテキストの販売は，いたしません。本誌に掲載されたテキストを必要に応じて印刷し，ご持参下さい。

受講証明書：認定制度に関わる受講証明書は，会場入口の受付にて受講者 1 につき 1 枚を発行いたします。各自で所属，氏名を記入していただき，講習会終了時に回収致します。途中退出，中途入場の場合は受講証明書を発行できませんので，ご留意ください。

内　　容：

（1）さい帯血移植における HLA 適合性
一戸辰夫（広島大学原爆放射線医科学研究所　血液・腫瘍内科部門）

（2）アロ HLA 抗原に対する拒絶反応の基礎免疫学
入江　厚（熊本大学大学院・生命科学研究部・免疫識別学分野）

（3）臓器移植における HLA 抗体検査について
石塚　敏（東京女子医科大学　中央検査部　移植関連検査室）

認定制度指導者講習会

第 22 回日本組織適合性学会大会中の下記の特別講演 I および II を含め，合計 6 企画から，4 企画以上の受講をもって，指導者新規申請および更新申請に必要な講習を受講したものと認めます。会場入口に用意されている，受講者記帳名簿へのサインをもって受講証明といたします。

1. 特別講演 I：9 月 15 日（日）11:00 〜 12:00
   「iPS 細胞技術が拓く新しい医療」
2. 特別講演 II：9 月 16 日（月）12:00 〜 13:00
   「未処理 HLA 半合致（ハプロ）移植の現状と課題」
3. シンポジウム I：9 月 15 日（日）14:40 〜 16:40
   「免疫寛容を誘導する養子免疫療法：その基礎と臨床応用」
4. シンポジウム II：9 月 16 日（月）14:00 〜 16:00
   「造血細胞移植における組織適合性研究の新展開」
5. セミナー：9 月 15 日（日）12:00 〜 13:00
   「Genome 研究と新しい倫理指針」
6. 教育講演（認定 HLA 検査技術者講習会を兼ねる）
   9 月 14 日（土）10:00 〜 12:00

Major Histocompatibility Complex　2013; 20 (2): 101–107

さい帯血移植における HLA 適合性

一戸　辰夫[1)]

[1)] 広島大学原爆放射線医科学研究所　血液・腫瘍内科研究分野

現在，わが国において実施されている同種造血幹細胞移植の約 30% 程度は，非血縁者間さい帯血移植（unrelated cord blood transplantation, UCBT）である。従来より, UCBT においては HLA 適合性と移植成績との関連が明確ではなかったが，最近では十分な移植経験の蓄積に伴い，さい帯血ユニットの選択指針を提示し得るような信頼性の高い研究が行われるようになってきた。本講演では，UCBT を対象とする HLA 適合性と移植成績に関してのわが国における最新の研究成果を紹介するとともに，その中で得られた知見に基づいたさい帯ユニット選択指針の試案を提示する。

キーワード：さい帯血移植，HLA 適合性，生着不全，HLA 抗体

1. はじめに

健康な HLA 一致同胞が得られる機会の減少等を背景として，現在，わが国で行われている同種造血幹細胞移植のほぼ 7 割は非血縁者に由来する移植片を使用している。特に最近の移植技術の進歩に伴い，非血縁者間さい帯血移植（unrelated cord blood transplantation, UCBT）の実施機会が急速に増加しており，日本造血細胞移植学会の平成 24 年度全国調査報告書によれば，2010 年以降は国内で行われている同種移植の 30% 以上にさい帯血が用いられている（図 1）。非血縁者間骨髄移植（unrelated bone marrow transplantation, UBMT）においては，これまで実施されてきた多くの研究によって，ドナーとレシピエント間における各 HLA 座のアリルレベルでの不適合が移植成績に与える影響が詳細に知られるようになっているが，UCBT においては，従来，HLA 適合性と移植成績との関連が十分に明らかにされていなかった。しかし，最近，移植件数の十分な蓄積を背景として，国内外より UCBT における HLA 適合性の新たなエビデンスとなり得る研究成果が続々と報告され始めている。本講習においては，主に日本さい帯血バンクネットワークを介して実施された UCBT 例を対象とする HLA 適合性と移植成績についての最新の研究成果を紹介するとともに，その中で得られた知見に基づいた今後のさい帯血ユニットの選択指針を提示したい。

2. さい帯血移植における HLA 適合度と細胞数の影響

従来から，UCBT においては，移植さい帯血ユニットに含まれる有核細胞数や CD34 陽性細胞数が多いほど生着や生存に正の影響がもたらされるという研究報告が多く，HLA の適合性と移植細胞数のいずれを優先的な選択基準とするかが非常に重要な問題とされてきた。この課題にひとつの解答を与える研究結果として，最近，熱田らは, UCBT の移植成績に HLA 適合性が与える影響は，小児例と成人例では異なっていることを報告している。

この研究では，2000 年 1 月から 2009 年 12 月までの 10 年間に白血病と骨髄異形成症候群に対して実施された 2378 例（15 歳以下 498 例）の UCBT を対象として，*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DRB1* 座の不適合が生着，急性移植片対宿主病（graft-versus-host disease, GVHD），慢性 GVHD，移植

受付日：2013 年 6 月 27 日，受理日：2013 年 6 月 27 日
代表者連絡先：一戸　辰夫　〒 734–8553　広島市南区霞 1 丁目 2–3　広島大学原爆放射線医科学研究所放射線災害医療センター血液・腫瘍内科研究分野
TEL: 082–257–5861　FAX: 082–256–7108　E-mail: nohe@hiroshima-u.ac.jp

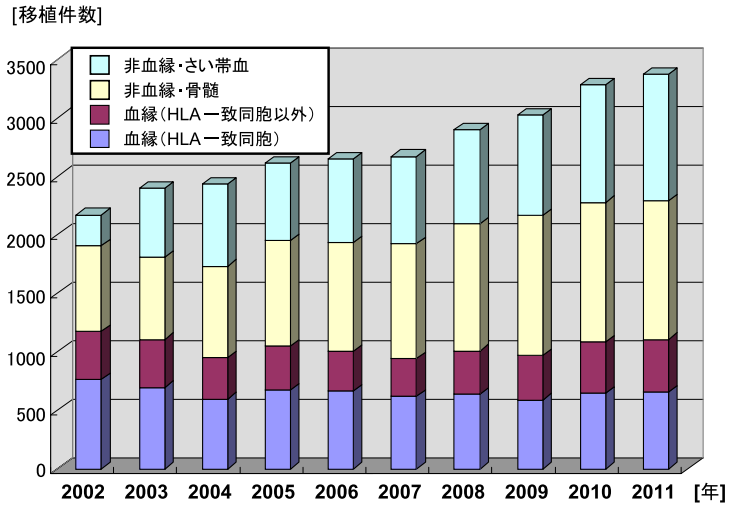


図 1　わが国の同種造血幹細胞移植における幹細胞ソースの年次別推移
（日本造血細胞移植学会　平成 24 年度全国調査報告書より）

表 1　HLA-A, -B, -DRB1 の適合性がさい帯血移植の成績に与える影響（文献 2 より）

（A）レシピエントが 15 歳以下のグループにおける影響

	小児（年齢 15 歳以下）							
	死亡		再発		TRM		2–4 度急性 GVHD	
	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P
6/6 適合	1.00		1.00		1.00		1.00	
5/6 適合	1.07（0.68–1.69）	0.765	1.06（0.68–1.65）	0.794	1.29（0.52–3.23）	0.58	2.13（1.28–3.58）	0.004
4/6 適合	1.61（1.02–2.56）	0.042	0.77（0.48–1.24）	0.282	3.55（1.47–8.58）	0.005	2.65（1.55–4.52）	<0.001
3/6 適合	1.25（0.65–2.42）	0.498	0.91（0.45–1.86）	0.802	1.56（0.43–5.63）	0.497	2.39（1.18–4.84）	0.015

（B）レシピエントが 16 歳以上のグループにおける影響

	成人（年齢 16 歳以上）							
	死亡		再発		TRM		2-4 度急性 GVHD	
	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P
6/6 適合	1.00		1.00		1.00		1.00	
5/6 適合	0.99（0.71–1.38）	0.944	0.70（0.47–1.04）	0.075	1.41（0.83–2.41）	0.205	1.03（0.64–1.65）	0.916
4/6 適合	0.88（0.65–1.21）	0.436	0.67（0.46–0.97）	0.034	1.24（0.75–2.04）	0.408	1.27（0.82–1.97）	0.276
3/6 適合	0.95（0.69–1.31）	0.751	0.70（0.48–1.03）	0.07	1.29（0.77–2.16）	0.339	1.72（1.10–2.70）	0.017

RR=relative risk, CI=confidence interval, P=P value, TRM=transplant-related mortality

関連死亡（transplant-related mortality, TRM），生存に与える影響が検討された。欧米での先行研究と同様に，*HLA-A*, *HLA-B* 座の不適合は抗原型レベル，*HLA-DRB1* 座の不適合はアリルレベルで定義された。まず，レシピエントが 15 歳以下の場合には，*HLA-A*, *-B*, *-DRB1* の不適合数の増加は，急性 GVHD および慢性 GVHD の発症リスクおよび TRM の増加に関与しており，生存に不利な影響を与えていた。一方，16 歳以上のグループでは，HLA 不適合の存在は，再発リスクの低下に関連していたが，GVHD・生存・TRM のリスクには有意な影響を与えていなかった（表 1）。また，移植に使用されたさい帯血ユニットの有核細胞数の影響については，小児・成人とも細胞数が少ないほど生着率が低下するが，TRM や生存には関連していないという結果であった（表 2）。

表 2　移植さい帯血ユニットの凍結時細胞数が移植成績に与える影響（文献 2 より）

（A）レシピエントが 15 歳以下のグループにおける影響

小児（年齢 15 歳以下）								
細胞数［× 10^7/kg］	死亡		再発		TRM		好中球数の回復	
	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P
10.0 以上	1.00		1.00		1.00		1.00	
5.0–9.9	1.14（0.72–1.79）	0.579	1.10（0.69–1.75）	0.684	0.82（0.40–1.68）	0.592	0.66（0.49–0.89）	0.007
2.5–4.9	0.92（0.58–1.45）	0.707	0.90（0.56–1.44）	0.651	0.90（0.45–1.80）	0.77	0.50（0.37–0.67）	<0.001
2.5 未満	0.88（0.47–1.67）	0.701	0.98（0.53–1.83）	0.961	0.67（0.24–1.88）	0.443	0.54（0.38–0.77）	0.001

（B）レシピエントが 16 歳以上のグループにおける影響

成人（年齢 16 歳以上）								
細胞数［× 10^7/kg］	死亡		再発		TRM		好中球数の回復	
	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P	RR（95%CI）	P
3.0 以上	1.00		1.00		1.00		1.00	
2.5–2.9	0.99（0.83–1.17）	0.876	0.86（0.70–1.06）	0.167	1.10（0.86–1.42）	0.445	0.84（0.72–0.97）	0.021
2.0–2.4	0.86（0.72–1.01）	0.06	0.79（0.65–0.97）	0.021	1.05（0.83–1.33）	0.694	0.79（0.68–0.90）	0.001
2.0 未満	0.93（0.73–1.18）	0.562	0.79（0.59–1.07）	0.126	1.00（0.70–1.45）	0.983	0.78（0.64–0.94）	0.009

RR=relative risk, CI=confidence interval, P=P value, TRM=transplant-related mortality

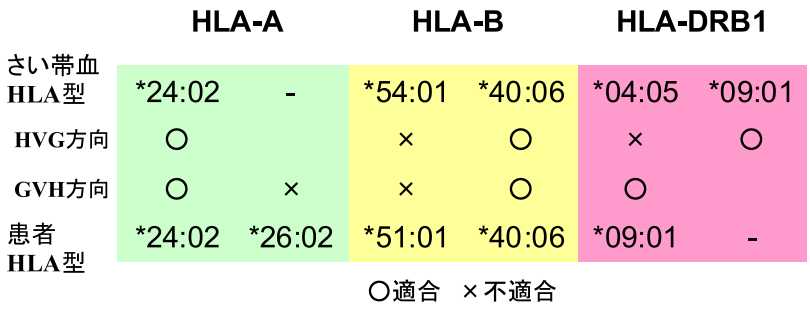


図 2　GVH 方向の不適合と HVG 方向の不適合

患者が有している HLA 型のうち，さい帯血が有していないものを「GVH 方向の不適合」と呼び，さい帯血が有している HLA 型のうち，患者が有していないものを「HVG 方向の不適合」と呼ぶ。上記の例では，HLA-A 座には GVH 方向のみの不適合（A*26:02），HLA-B 座には GVH/HVG 双方向の不適合（B*54:01 ⇔ B*51:01），HLA-DRB1 座には HVG 方向のみの不適合（DRB1*04:05）が存在する。

なお，この研究では，最も実施される頻度の高い，成人に対する 2/6 不適合ユニットを用いた移植例のみを対象として不適合 HLA 座の組み合わせが移植成績に与える影響も検討されており，不適合座に *HLA-DRB1* 座が含まれている場合（A+DRB1, B+DRB1, DRB1+DRB1）には再発のリスクが低く，*HLA-DRB1* 座が 2 組とも適合していない場合には，TRM のリスクが高かったとされている。

3. GVH 方向不適合と HVG 方向不適合の影響

UCBT では，複数の HLA 座に不適合が存在するユニットを選択する機会が多いため，GVH 方向と HVG 方向のいずれの適合性を重視すべきかも，臨床上の重要な問題となる。なおここで，「GVH 方向の不適合」とはレシピエントの発現する HLA 型のうち，さい帯血ユニットには発現されていないものを指し，「HVG 方向の不適合」とはさい帯血に発現されている HLA 型のうち，レシピエントが有していないものを指す（図 2）。松野らは，

単一施設において治療強度を減弱した前処置（reduced-intensity conditioning, RIC）を用いて実施された 152 例の UCBT の成績を解析し，*HLA-A, -B, -DRB1* の血清型レベルあるいはアリルレベルでの GVH 方向の不適合数の増加が生着不全の発症リスクを増加させるという報告を行った（Matsuno N, et al. Blood 114: 1689–1695, 2009）。一方，New York Blood Center の Stevens らは，1202 例の単一ユニットを用いた UCBT の解析を行い，GVH 方向単独の不適合は HVG 方向の不適合よりもむしろ移植成績に有利な影響を与えるという結果を報告した（Stevens CE, et al. Blood 118: 2969–3978, 2011）。すなわち，GVH 方向・HVG 方向のいずれにも 1 座ずつ HLA 不適合が存在する場合を基準とすると，GVH 方向単独の不適合例では生着が早く，TRM や全死亡率が低い傾向が認められたのに対し，HVG 方向単独の不適合例では，生着不全や再発のリスクが高いという結果であった。なお，この報告で解析対象となった例の 75% は 15 歳以下であり，移植細胞数の中央値が 4.5 × 10^7/kg と比較的多かったことには留意が必要である。

諫田らは，わが国で 1998 年から 2009 年までの間に白血病あるいは骨髄異形成症候群を対象に実施された 2977 例の UCBT を対象として，レシピエントの年齢が 15 歳以下の小児グループ（677 例）と 16 歳以上の成人グループ（2300 例）に分けて Stevens らと同様の解析を行った。その結果，全例を対象とした解析では，*HLA-A, -B, -DRB1* 座の抗原型レベルでの不適合が存在しない「6/6 適合」の成績が有意に優れており，また，小児グループでは GVH 方向単独の不適合例において TRM が低下する傾向が見られたものの，成人グループでは，GVH 方向・HVG 方向いずれの不適合も TRM や生存には有意な影響は観察されなかった（表 3）。なお，GVH 方向単独の不適合は，成人グループにおいて生着に有利な影響を与える傾向が認められ，移植細胞数が 2.0 ～ 2.4 × 10^7/kg と比較的少なかった成人グループに限定して解析を行うと，GVH 方向単独の不適合は TRM の低下に関連していた。このように，さい帯血ユニットを選択する

表 3　HLA-A, -B, -DRB1 の GVH 方向・HVG 方向別の不適合数がさい帯血移植後の死亡リスクに与える影響（文献 3 より）

（A）全症例を対象とした解析結果

	全症例		
	症例数	HR（95%CI）	P
0 抗原不適合	273	0.79（0.64–0.97）	0.025
1-2 抗原：GVH 方向のみ	150	0.88（0.69–1.13）	0.317
1-2 抗原不適合：HVG 方向のみ	136	0.95（0.74–1.22）	0.670
1 抗原不適合：双方向	716	1.00	
2 抗原不適合：双方向	1170	0.90（0.79–1.03）	0.122
2 抗原不適合：双方向＋ GVH 方向	231	0.97（0.79–1.18）	0.737
2 抗原不適合：双方向＋ HVG 方向	264	0.93（0.77–1.13）	0.481
2 抗原不適合：GVH 方向＋ HVG 方向	37	0.55（0.35–0.87）	0.012

（B）小児例（15 歳以下）・成人例（16 歳以上）別の解析結果

	小児（年齢 15 歳以下）			成人（年齢 16 歳以上）		
	症例数	HR（95%CI）	P	症例数	HR（95%CI）	P
0 抗原不適合	144	0.74（0.53–1.04）	0.079	129	0.82（0.63–1.06）	0.134
1-2 抗原：GVH 方向のみ	45	0.73（0.44–1.20）	0.208	105	0.92（0.69–1.22）	0.560
1-2 抗原不適合：HVG 方向のみ	39	0.85（0.49–1.46）	0.557	97	0.96（0.72–1.29）	0.796
1 抗原不適合：双方向	314	1.00		402	1.00	
2 抗原不適合：双方向	98	0.88（0.61–1.26）	0.480	1072	0.89（0.76–1.03）	0.118
2 抗原不適合：双方向＋ GVH 方向	16	1.10（0.55–2.20）	0.785	215	0.94（0.76–1.17）	0.594
2 抗原不適合：双方向＋ HVG 方向	19	2.08（1.19–3.63）	0.011	245	0.87（0.71–1.08）	0.208
2 抗原不適合：GVH 方向＋ HVG 方向	2	NE		35	0.54（0.33–0.87）	0.012

HR=hazard ratio, CI=confidence interval, P=P value.

際に，GVH 方向・HVG 方向のいずれを重視すべきかについては，現在までに行われた研究においては一定の結論が得られていない。

4. さい帯血移植における HLA-C 座の影響

UBMT においては，*HLA-C* 座のアリルレベルでの不適合が GVHD の発症リスクや移植後の生存率に影響を与えることが知られている。これまで UCBT における *HLA-C* 座不適合の影響は十分に明らかにされていなかったが，最近，主にヨーロッパと北米において実施された 803 例の単一ユニットを用いた UCBT を対象として *HLA-C* 座の移植成績に与える影響が検討された（Eapen M, et al. Lancet Oncol 12: 1214–1221, 2011）。解析対象の原疾患は白血病または骨髄異形成症候群，年齢中央値は 10 歳，69% が 16 歳以下であった。この研究の結果によると，*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* 座がすべて適合している群と比較し，*HLA-C* 座にアリルファミリー（従来の 2 桁レベルでのタイピング結果）のレベルで不適合が存在する群においては TRM が有意に高かった。また，*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1* 座の不適合数が増加するほど，TRM のリスクも増加する傾向が見られた。わが国においてはまだ同様の研究は行われていないが，現在，厚生労働科学研究として UCBT におけるアリルレベルでの HLA 適合性と移植成績についての解析が行われることが計画されており，今後 *HLA-C* 座など *HLA-A*, *-B*, *-DRB1* 座以外の HLA 座不適合の影響が明らかにされることが期待される。

5. KIR リガンド不適合の意義

T 細胞除去を用いた HLA 不適合造血幹細胞移植において，NK 細胞の killer immunoglobulin-like receptors（KIRs）のリガンドとしての HLA クラス I 分子の不適合が（HLA-C1/C2, HLA-Bw4/Bw6, HLA-A3/A11），生着・GVHD・再発に関与する可能性が報告されており，UCBT においても KIR リガンド不適合が移植成績に与える影響を検討した研究結果が報告されている。

ヨーロッパの研究グループは，急性白血病を対象に実施された 218 例の UCBT を対象とする解析を行い，GVH 方向に NK 細胞の同種免疫応答が起こり得る KIR リガンド不適合が存在する場合には，GVH 方向への KIR リガンド不適合が見られない例と比較して移植後の再発リスクが有意に低いことを報告した。一方，KIR リガンドの不適合は，生着や GVHD・TRM には有意な影響を及ぼしていなかった（Willemze R, et al. Leukemia 23: 492–500, 2009）。

この研究とは対照的に，米国の Brunstein らは 257 例の UCBT を対象として，同様に KIR リガンド不適合の影響を検討し，骨髄破壊的な前処置を用いた移植群では不適合の影響が見られなかったのに対し，RIC を用いた移植群では，KIR リガンド不適合が急性 GVHD の発症リスクの増加に関与しており，生存にも不利な影響を及ぼしていることを報告した（Brunstein CG, et al. Blood 113: 5628–5634, 2009）。

このように UCBT における KIR リガンド不適合の影響を検討したこれまでの 2 つの研究では矛盾した結果が得られているが，これらの研究の間では，対象症例の背景因子にも大きな相違が存在している。すなわち，ヨーロッパの研究では 81% が抗胸腺細胞グロブリン（anti-thymocyte globulin, ATG）などによる in vivo T 細胞除去を用いて移植が行われていたのに対し，米国の研究における ATG 等の使用例は 32% であった。また，米国の研究では 60% 以上が複数さい帯血移植例であったのに対し，ヨーロッパの研究ではすべて単一ユニットを用いた移植例が対象とされている。すなわち，いずれの研究も，わが国で行われている UCBT とは大きく相違した背景の症例群を対象としている点に留意が必要である。

6. HLA 抗体の影響

UCBT 後の生着不全の原因のひとつとしてレシピエントが移植前に保有する HLA 抗体が関与することが報告されている。高梨らは，東京都赤十字血液センターを介して実施された 386 例の UCBT の移植成績の解析を通して，レシピエントが移植前に HLA 抗体を保有している場合，移植さい帯血ユニットの好中球生着率が有意に低下し，特にレシピエントの HLA 抗体がユニットに発現される不適合 HLA を認識する場合（ドナー反応性抗体）には，生着不全に至るリスクが特に高いことを報告した（表 4）。その後，フランスのグループからも RIC を用いた UCBT 例 294 例を対象とした解析を通じて同様の報告がなされており，ドナー反応性 HLA 抗体が検出されない場合の生着率は 81% であったのに対し，ドナー反応性抗体が検出された場合の生着率は 44% であったとされている（Ruggeri A, et al. Haematologica, in

表 4　レシピエントが保有する HLA 抗体がさい帯血の生着に与える影響（文献 4 より）

	好中球数の回復		血小板数の回復	
	HR（95%CI）	P	HR（95%CI）	P
HLA 抗体なし	1.00		1.00	
HLA 抗体あり	0.69（0.49–0.96）	0.027	0.73（0.49–1.07）	0.11
さい帯血に反応する HLA 抗体あり	0.23（0.09–0.56）	0.001	0.31（0.12–0.81）	0.017

press）。これらの結果に基づき，移植前のレシピエントが HLA 抗体を保有している場合には，その抗体によって認識される HLA を含まないさい帯血ユニットを選択することが望ましいと考えられる。

7. まとめ

以上のような解析結果より，現時点では，造血器腫瘍に対して UCBT の実施を計画する場合には，以下の基準に従ってさい帯血ユニットを選択する方針が妥当と考えられる。

（1）レシピエントの HLA 抗体のスクリーニングを行い，抗体の保有が判明した場合には，その標的となる HLA を発現しないさい帯血ユニットを優先的に選択する。

（2）15 歳以下の症例に対しては，一定の有核細胞数が確保されていれば HLA 適合度の高いさい帯血を優先的に選択する。

（3）16 歳以上の症例に対しては，HLA 適合度にかかわらず有核細胞数の多いさい帯血を優先的に選択する。

今後は，UCBT においても，UBMT と同様に，*HLA-C* や *HLA-DQB1*, *HLA-DPB1* 等すべての HLA 座のタイピング結果を含む移植データセットが集積され，アリルレベルでの HLA 適合性の影響が詳細に明らかにされることが望まれる。

参考文献

1) 一戸辰夫：造血幹細胞移植における HLA 適合性．検査と技術 40: 294–299, 2012.
2) Atsuta Y, Kanda J, Takanashi M, *et al.*: Different effects of HLA disparity on transplant outcomes after single-unit cord blood transplantation between pediatric and adult patients with leukemia. Haematologica (98): 814–822, 2013.
3) Kanda J, Atsuta Y, Wake A, *et al.*: Impact of the direction of HLA mismatch on transplantation outcomes in single unrelated cord blood transplantation. Biol Blood Marrow Transplant (19): 247–254, 2013.
4) Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, *et al.*: The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. Blood (116): 2839–2846, 2010.
5) 佐治博夫：移植と HLA 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: 494–504, 2012.

Role of HLA compatibility in unrelated cord blood transplantation

Tatsuo Ichinohe[1)]

[1)] Department of Hematology and Oncology, Research Institute for radiation Biology and Medicine, Hiroshima University

Unrelated cord blood transplantation (UCBT) is increasingly performed as an alternative treatment for patients who need hematopoietic cell transplantation (HCT) but lack an immediate access to an HLA compatible bone marrow or peripheral blood donor, thus currently comprising approximately 30% of the total allogeneic HCT in our country. Although the clinical significance of HLA matching in UCBT has been so far controversial, the increasing size of UCBT datasets now allows us more reliable analysis on the impact of HLA compatibility on the clinical outcomes of UCBT. In this short review, we summarize the results of most recent studies addressing the role of HLA matching in UCBT and propose an algorithm for selecting an appropriate cord blood unit for HCT.

Key Words: unrelated cord blood transplantation, HLA compatibility, graft failure, HLA antibody

©2013 日本組織適合性学会

Major Histocompatibility Complex　2013; 20 (2): 109–120

平成 25 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

アロ HLA 抗原に対する拒絶反応の基礎免疫学

入江　　厚[1)]・西村　泰治[1)]

[1)] 熊本大学大学院生命科学研究部・免疫識別学分野

移植片に対する拒絶反応の重要な原因である，同種異系（アロ）HLA/ペプチド複合体（アロ pHLA）に対する T 細胞の強い免疫応答は，T 細胞レセプター（TCR）がアロ pHLA を直接認識して，活性化されることに起因する。本来，自己の HLA に結合した非自己抗原ペプチドの複合体（cognate pHLA）を認識するはずの TCR が，どのようにしてアロ pHLA を認識するのか，その根底にあるメカニズムを解明できれば，移植前にドナーとレシピエントの HLA 型の違いを解析することにより，起こり得るアロ反応の強弱を予測できるかも知れない。これが可能となれば，移植医療に携わる者にとって福音となるはずである。これまでに，いくつかの TCR/アロ pHLA（MHC）の複合体の立体構造が明らかにされ，TCR が本来認識する cognate pHLA（MHC）との複合体の構造と比較検討されている。その結果 TCR の直接アロ pHLA（MHC）反応性のメカニズムとして，少なくとも以下の 3 つの様式があることが明らかとなっている。: 1）アロ pHLA（MHC）の立体構造が cognate pHLA（MHC）のものと酷似するために，TCR が交差反応により認識する場合（分子擬態 ; molecular mimicry と呼ぶ），2）アロ pHLA（MHC）の立体構造が cognate pHLA（MHC）と異なっていても，TCR のみならずペプチドと HLA（MHC）のいずれもが，柔軟に立体構造を変化させて会合する場合（induced fit と呼ぶ），および，3）同一の TCR が cognate pHLA（MHC）の場合とは全く異なるドッキング様式により，アロ pHLA（MHC）と会合する場合（disparate docking と呼ぶ）である。このように，TCR とアロ pHLA（MHC）の会合様式は多様であり，T 細胞の直接アロ pHLA（MHC）認識を一元的に説明することは出来ない。いっぽう，移植後の慢性拒絶反応において，抗ドナー HLA-IgG 抗体が産生されるメカニズムとして，レシピエントの B 細胞上の自己 HLA クラス II 分子と，これにより提示されたアロ HLA 抗原由来のペプチドを認識する，レシピエントの CD4 陽性ろ胞ヘルパー T 細胞（follicular Th-cell）による，間接アロ pHLA（MHC）認識反応が必須であることが，最近のマウスの実験系により明らかにされている。

キーワード：アロ反応性，直接アロ認識，間接アロ認識，抗ドナー HLA 抗体

1. はじめに

末梢の成熟した T 細胞は，その前駆細胞である胸腺細胞が胸腺の中で正負の選択に合格し，生き残り末梢に供給されたものである。正の選択では，胸腺皮質上皮細胞に発現する自己の pMHC に，弱い親和性を示す T 細胞レセプター（TCR）を発現する胸腺細胞のみが，生存シグナルを受け取り生き残り，それ以外の胸腺細胞は死滅する（図 1）。したがって正の選択を経た末梢の成熟 T 細胞は，いずれも自己の HLA を認識する TCR を発現しており，その多くは非自己 HLA を認識することができないため，T 細胞の抗原ペプチドに対する反応性は自己の HLA に「拘束」されることになる。しかし実際には，移植片に対してレシピエントの T 細胞が示す拒絶反応や，造血幹細胞移植に際して混入したドナーの成熟 T 細胞が，レシピエントのアロ抗原に対して免疫応答を示

受付日：2013 年 7 月 15 日，受理日：2013 年 7 月 15 日
代表者連絡先：入江　　厚　〒 860–8556　熊本市中央区本荘 1–1–1　熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野
TEL: 096–373–5313　E-mail: airie@gpo.kumamoto-u.ac.jp

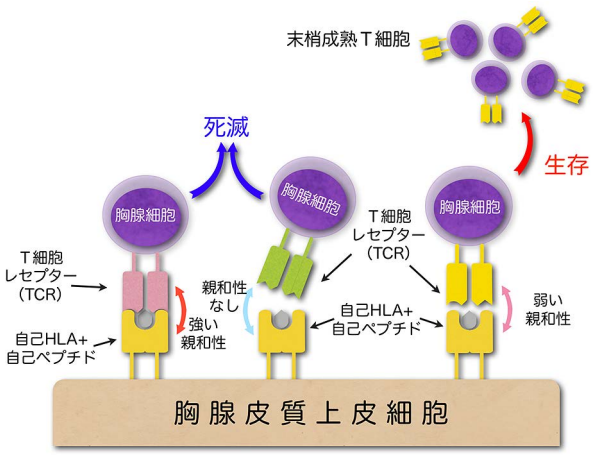


図 1　胸腺における正の選択により，自己の MHC に拘束される成熟 T 細胞が選択される

胸腺皮質上皮細胞に発現する自己の pMHC に，弱い親和性を示す T 細胞レセプター（TCR）（黄色）を発現する胸腺細胞のみが，生存シグナルを受け取り成熟 T 細胞として末梢に供給される。自己の MHC に親和性を示さない TCR（緑）や，強すぎる親和性を示す TCR（ピンク）を発現する胸腺細胞は排除される。

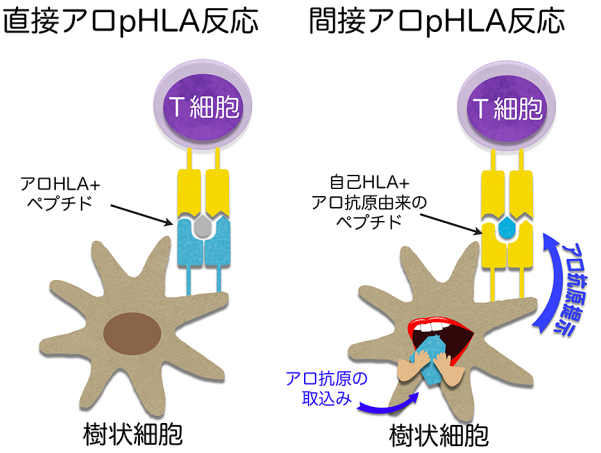


図 2　T 細胞の間接アロ pHLA 認識と直接アロ pMHC 認識

T 細胞の間接アロ pHLA 認識は，自己 HLA とこれに提示されたアロ抗原由来の非自己ペプチドの複合体を TCR が認識するものであり，非自己ペプチド／自己 HLA 複合体の認識と本質的に同じである。これに対して T 細胞の直接アロ pHLA 認識は，TCR が交差反応によりアロ pHLA を直接認識するものである。

すことにより発生する，移植片対宿主病（GVHD；Graft-versus-host disease）に見られるように，我々の末梢成熟 T 細胞の中にはアロ pHLA 対して交差反応性を示す，アロ反応性 T 細胞が相当な数存在する。TCR が自己の HLA（MHC）への拘束性と高い抗原ペプチド特異性を有するにも関わらず，高頻度にアロ pHLA（MHC）反応性を示すのはなぜであろうか？　本総説では，この問題の解明に重要な手掛かりを与える，最新の研究成果について紹介する。

2. T 細胞の直接アロ pHLA（MHC）認識と間接アロ HLA（MHC）認識の違い

T 細胞のアロ pHLA（MHC）への反応には，直接認識と間接認識の 2 種類がある。前者は，自己の HLA（MHC）に拘束されている TCR が，アロ HLA（MHC）– ペプチド複合体（アロ pHLA（MHC））と交差反応するために生じる T 細胞応答である（図 2）。この直接認識による T 細胞のアロ pMHC の認識様式がどのようなものであるのかについては，その立体構造の特徴を以下の 3，4 で概説する。

いっぽう T 細胞の間接アロ認識は，アロ HLA（MHC）分子やその他のマイナー組織適合性抗原などが抗原提示細胞に取り込まれて，分解されて生じるペプチドと自己 HLA（MHC）の複合体を，T 細胞が認識して反応するものである。この場合，アロ分子の多型により，提示されるペプチドのアミノ酸配列が自己のものと異なるため，自己 HLA（MHC）（拘束分子）に非自己抗原由来のペプチドが提示された複合体を認識するという点で，T 細胞の間接アロ認識は通常の非自己抗原ペプチドと HLA（MHC）複合体に対する T 細胞応答と本質的に同じである。最近，CD4 陽性ヘルパー T（Th）細胞による間接アロ pMHC 認識が，移植後の慢性拒絶反応の誘導において重要な役割を担っている，抗ドナー MHC-IgG 抗体の産生に重要な役割を果たしていることを示唆する，マウスの実験結果が報告されているので 5 で紹介する。さらにアロ pHLA（MHC）反応性 Th 細胞が活性化されないと，抗アロ抗原 IgG 抗体は産生されないことについて説明する。

3. TCR が pHLA（MHC）を認識する際の一般的なルール

1）一般的な TCR と自己 HLA（MHC）／非自己ペプチド複合体のドッキング様式

T 細胞はα鎖とβ鎖の 2 量体から成る TCR を介して，pHLA（MHC）を認識する。pHLA（MHC）の TCR と接触する部位を，パンにソーセージが挟まったホットドックに例えれば，パンの部分が HLA の 2 つのα ヘリッ

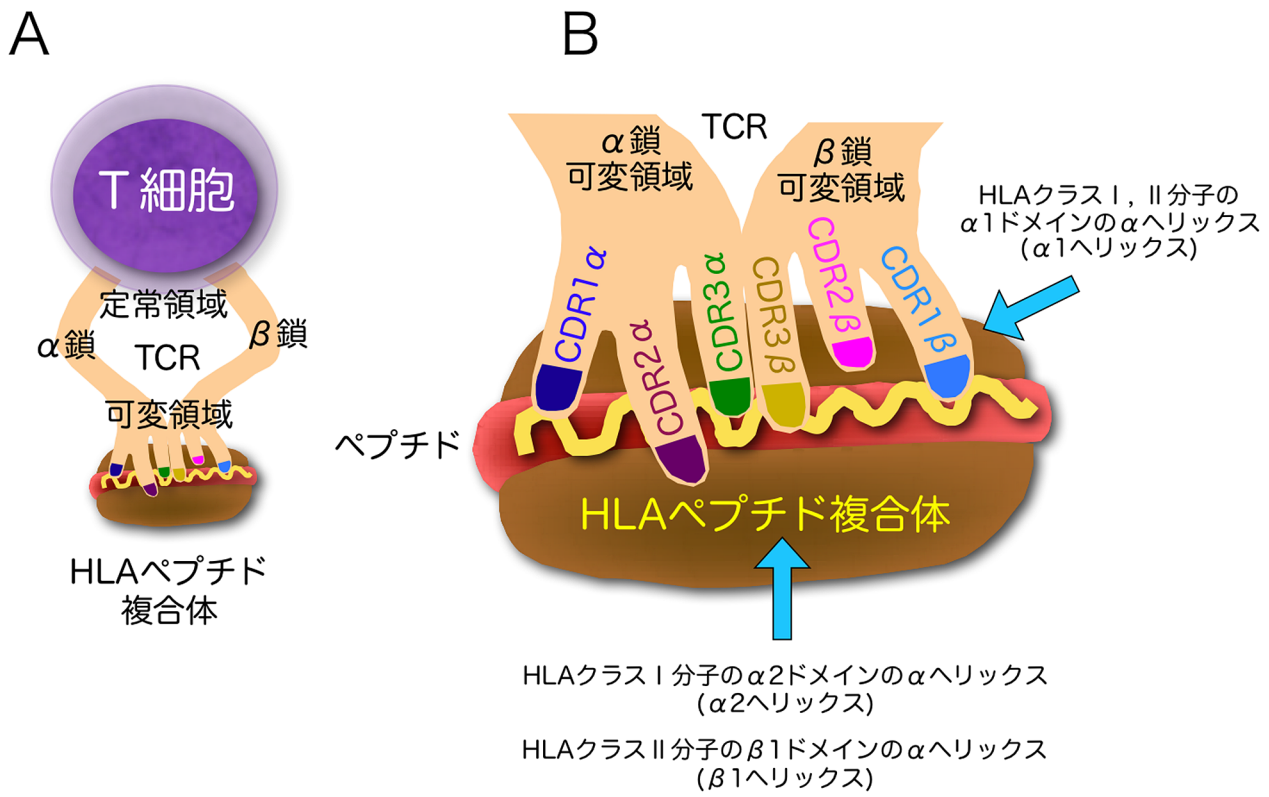


図 3　TCR の可変領域の相補性決定領域（CDR）による pHLA の識別

TCR の α および β 鎖の可変領域のうち，pHLA と接触する部分は相補性決定領域（CDR）と呼ばれ，TCRα 鎖と β 鎖にそれぞれ 3 つずつ存在する（A）。CDRα1 ～ 3 は主に pHLA（ホットドック）の右半分を，CDRβ1 ～ 3 は主に pHLA の左半分を認識する（B）。

クス構造とペプチド収容溝に，またソーセージがペプチドに相当する。これを T 細胞は TCRαβ 鎖の可変領域を手にたとえると，その 3 本の指を用いて識別する（図 3A）。これらの指は CDR（相補性決定領域；complementarity determining region）1，2，および 3 と呼ばれており，TCR の α 鎖と β 鎖の可変領域のそれぞれに存在する（CDR1α，CDR2α，CDR3α と CDR1β，CDR2β，CDR3β。図 3B）。

これまでに明らかにされた TCR/pHLA（MHC）複合体の立体構造解析結果から，この識別法は HLA クラス I とクラス II 分子の両方に当てはまる，次のような原則があることがわかっている。

1）TCR の α 鎖は，抗原ペプチドの左（N 末端側の）半分と HLA（MHC）の下側を認識する。
2）TCR の β 鎖は，抗原ペプチドの右（C 末端側の）半分と HLA（MHC）の上側を認識する。

典型的な pHLA（MHC）複合体を真上から，すなわち T 細胞の TCR 側から見た模式図を図 4 に示す。ここでは HLA（MHC）の 2 つの α ヘリックス構造を青で，ペプチドを赤で示している。TCR の各 CDR と接触する pHLA（MHC）を色分けして示すと，CDR1α（青），CDR2α（紫），CDR3α（緑）は pHLA（MHC）の主にクラス I 分子の α2 ドメインの α ヘリックス，またはクラス II 分子の β1 ドメインの α ヘリックスとペプチドの N 末端側に結合し，CDR1β（黄），CDR2β（ピンク），CDR3β（水色）はクラス I およびクラス II 分子ともに，pHLA（MHC）の主に α1 ドメインの α ヘリックスとペプチドの C 末端側に結合することがわかる。すなわち pHLA（MHC）を紙面に示す向きに配置した場合，上述の原則は「TCR は pHLA（MHC）の中心に配位し，TCRα 鎖は pHLA（MHC）の左半分を，β 鎖は右半分を認識する」ということになる。

TCR と cognate pHLA（MHC）との会合は，熱力学的に安定な典型的な構造をとると考えられるので，多くの場合図 4 に示すような立体配置で TCR と pHLA が会合すると想定されている。それでは，TCR とアロ pHLA

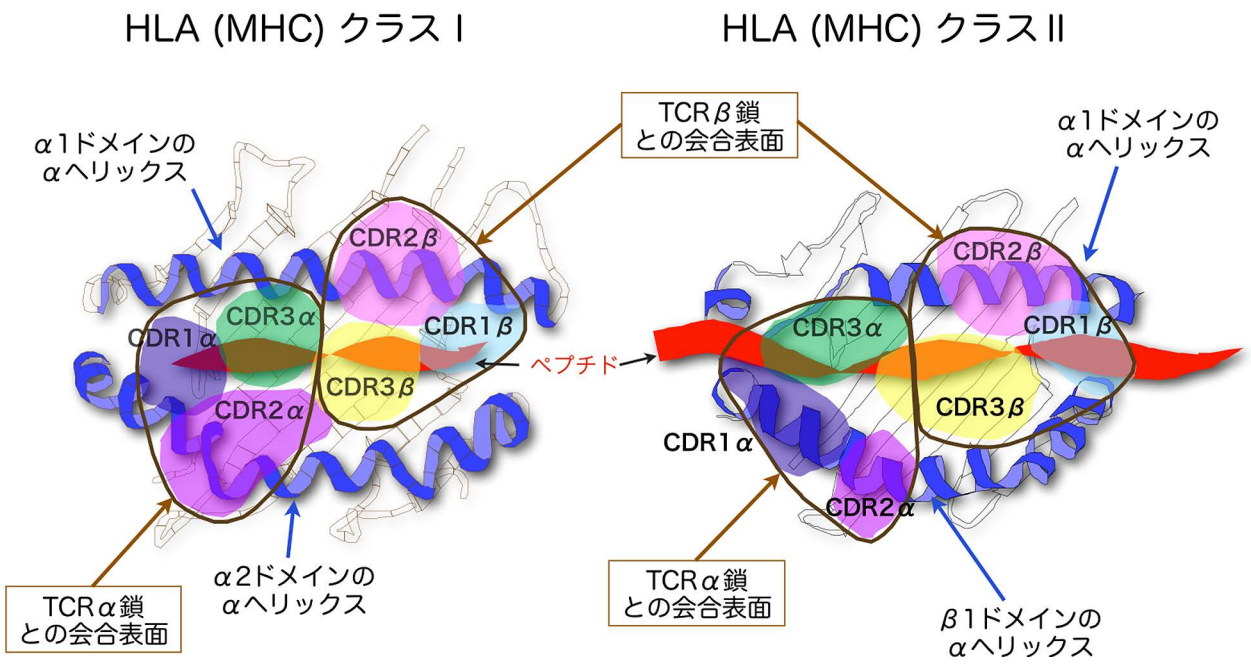


図 4　HLA ペプチド複合体上における TCR の CDR1 ～ 3 の結合部位

HLA（MHC）の 2 つの α ヘリックス構造を青で，ペプチドを赤で示す。TCRα 鎖の CDR1α（青），CDR2α（紫），CDR3α（緑）は，pHLA（pMHC）の主にクラス I 分子の α2 ドメインの α ヘリックス（α2 ヘリックス），またはクラス II 分子の β1 ドメインの α ヘリックス（β1 ヘリックス）とペプチドの N 末端側を認識し，CDR1β（黄），CDR2β（ピンク），CDR3β（水色）は pHLA（pMHC）の主にクラス I および II の α1 ドメインの α ヘリックス（α1 ヘリックス）とペプチドの C 末端側を認識する。

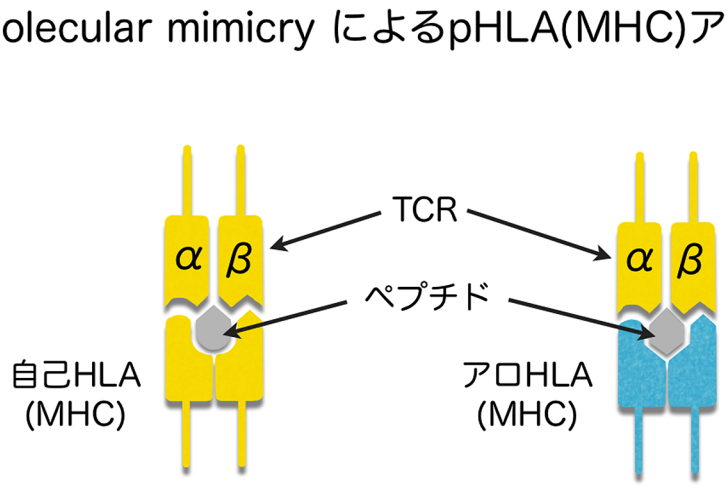
（MHC）の複合体のドッキング様式も，この原則に当てはまるのであろうか。

4. TCR とアロ pHLA（MHC）との会合

1）アロ pHLA（MHC）の形状が cognate pHLA（MHC）と酷似する場合（molecular mimicry，図 5）

このケースは TCR がアロ pHLA（MHC）を認識する，最も考えやすい機序である。それぞれの pHLA（MHC）の立体構造がそっくりなので，TCR が交差反応を示すものである。例として HLA-DR1 拘束性で HA ペプチド（PKYVKQNTLKLAT）に特異的な HA1.7 TCR が，同じペプチドを結合したアロの HLA-DR4 と交差反応する場合[1]や，マウスの MHC クラス I 分子である H2-K^{b} 拘束性で dEV8 ペプチド（EQYKFYSV）に特異的な 2C TCR が，同じペプチドを結合したアロの H2-K^{bm3} と交差反応する場合[2]が報告されている。これらの例では，自己とアロの HLA（MHC）に結合するペプチドが同じものである上に，HLA-DR1 と DR4，および H2-K^{b} と H2-K^{bm3} が比較的に構造が似ているため，pHLA（MHC）の構造に大きな差異がないことが容易に想像できるため，TCR が交差反応によりアロ pHLA（MHC）を認識できることが，十分に想定される。

しかし，HLA-B8（*B*08:01*）拘束性で EB ウイルス由来の FLR ペプチド（FLRGRAYGR）に特異的な LC13 TCR が，アロの HLA-B44（*B*44:05*）を認識するケースは，これらとは異なる。Macdonald らは，巧妙な方法で LC13 TCR が認識する HLA-B44（*B*44:05*）上のペプチドを同定し（EEY ペプチド：EEYLQAFTY），LC13 TCR/HLA-B*4405/EEY ペプチドの立体構造を決定した[3]。その結果，HLA-B8（*B*08:01*）と HLA-B44（*B*44:05*）は 25 個のアミノ酸残基が異なり，FLR ペプチドと EEY ペプチドの間の類似性もほとんどないにも関わらず，同定された構造は cognate pHLA（MHC）のものと極めて似た構造であった。この例は，アロ pHLA（MHC）と cognate pHLA（MHC）の間のアミノ酸配列の類似性ではなく，立体構造上の相同性による TCR のアロ pHLA（MHC）認識が，実際に存在することを示したものである。molecular mimicry による TCR のアロ認識は，上記 2 の原則に従った TCR と pHLA の会合様式をとる。



TCR	自己HLA(MHC)/ペプチド		アロHLA(MHC)/ペプチド	文献
HA1.7 TCR →	HLA-DR1/HAペプチド	vs	HLA-DR4/HAペプチド	1
2C TCR →	H2-K^{b}/dEV8ペプチド	vs	H2-K^{bm8}/dEV8ペプチド	2
LC13 TCR →	HLA-B8/FLRペプチド	vs	HLA-B44/EEYペプチド	3

図 5　アロ pMHC（HLA）の立体構造が cognate pMHC（HLA）と酷似する場合（分子擬態；moleucular mimicry）
自己 HLA を黄色，アロ HLA を青で示す。自己 HLA と非自己ペプチドの複合体（cognate pHLA）とアロ HLA とペプチドの複合体（アロ pHLA）の構造が酷似するため，TCR が交差反応によりアロ pHLA を認識する。

2）アロ pHLA（MHC）の形状が cognate pHLA（MHC）の形状と異なっていても，TCR のみならずペプチドと HLA（MHC）のいずれもが，柔軟に構造を変化させて会合する場合（induced fit）

BM3.3 は CBA マウス（H-2^{k}）から得られた CD8^{+}T 細胞が発現する TCR であるが，マウス MHC クラス I 分子である H2-K^{b} に結合した pBM1 ペプチド（INFDFNTI），VSV8 ペプチド（RGYVYQGL）の複合体，および H2-K^{bm8} に結合した pBM8 ペプチド（SQYYYNSL）の複合体にアロ反応性を示す。BM3.3 TCR の cognate pHLA（MHC）リガンドは不明であるため，これと構造を比較することはできないが，BM3.3 TCR がこれら 3 つのアロ pMHC とどのように会合するのか，報告された立体構造を考察することは可能である。Reiser[4] や Auphan-Anezin[5] らの構造解析により，BM3.3 TCR はその α 鎖の CDR3 の形状を変化させて，これらのアロ pHLA（MHC）を認識することが示された。このケースは TCR 側の構造を変化させることにより，アロ pHLA（MHC）の構造にフィットして認識する例と考えられる（図 6）。

A6 は，HLA-A2（*A*02:01*）と TAX ペプチド（LLFGYPVYV）の複合体を認識し，これと会合する TCR であるが，HLA-A2（*A*02:01*）と Tel1p ペプチド（MLWGYLQYV）の複合体とも交差反応する。Tel1p ペプチドはデータベース検索により，TAX ペプチドの類似体として同定されたものであり，これら 2 つの pHLA 複合体に対する A6 TCR の交差反応は molecular mimicry によるものと考えられた。しかし結晶構造解析から，A6 TCR と会合するために，Tel1p ペプチドと HLA-A2（*A*02:01*）の α2 ドメインの α ヘリックスの構造が大きく変化し，A6 TCR についても TCRβ 鎖の CDR3 の形状が変化することが示された[6]。この例は TCR によるアロ pHLA（MHC）の認識ではないが，TCR が異なる pHLA 複合体と交差反応する際には，TCR，ペプチドおよび HLA の 3 者がその立体構造を柔軟に変化させて，互いの形状に適合させて会合するケース（induced fit）と考えられる（図 7）。

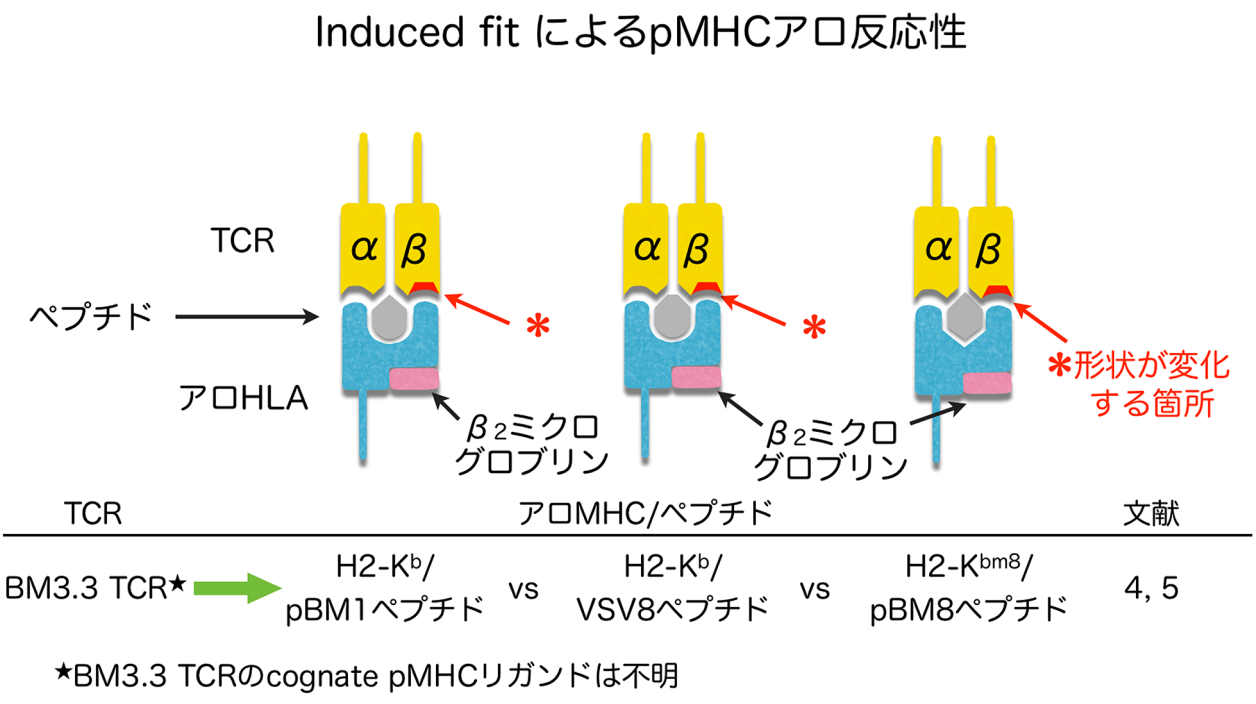


図 6　TCR が形状を柔軟に変化させてアロ pHLA を認識する場合（induced fit）
アロ HLA を青で示す。TCR の一部（赤色で示す）の形状が変化することにより，形状が異なるアロ pHLA にフィットして，これを認識する例を示す。

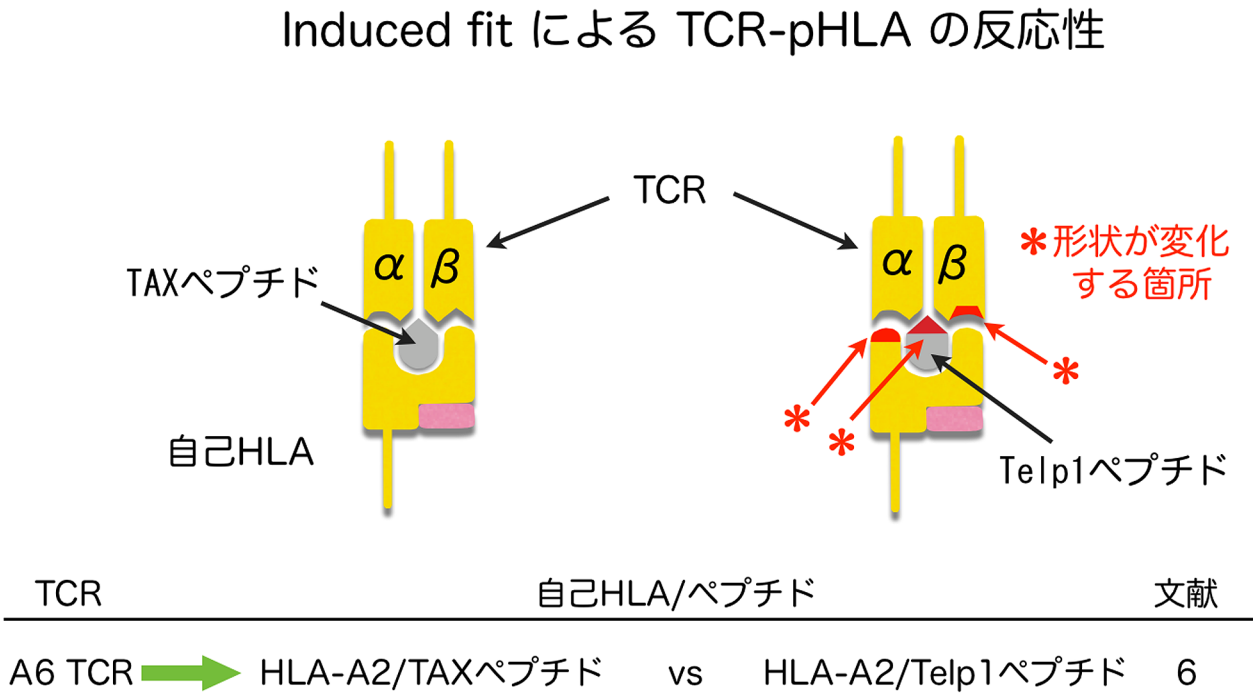


図 7　TCR，ペプチドおよび HLA のそれぞれが形状を変化させて，TCR が多様な pHLA を認識する場合（induced fit）
TCR がアロ pHLA に交差反応する際に，TCR，ペプチドおよび HLA のそれぞれが一部分（赤色で示す）の形状を変化させて，互いに結合する例を示す。この例では 2 つの pHLA について HLA が同一であり，TCR がアロ反応性を示す例ではないことに注意されたい。

3）同一の TCR が cognate pHLA（MHC）リガンドとの会合とは全く異なるドッキング様式により，アロ pHLA（MHC）リガンドと会合する場合（disparate docking）

2C はマウス MHC クラス I 分子である，H2-K^b 拘束性で dEV8 ペプチド（EQYKFYSV）に特異的な TCR（上述）であるが，アロ pMHC である H2-L^d と QL9 ペプチド（QLSPFPFDL）の複合体とも会合する。H2-K^b と H2-L^d は，34 個のアミノ酸残基が異なり，dEV8 ペプチドと QL9 ペプチドのアミノ酸配列の類似性も乏しい。2C TCR がアロ pMHC（QL9/H2-L^d）と会合する場合は，cognate pMHC（dEV8/H2-K^b）と会合する場合と比べて，2C TCR の α 鎖は反時計回りに約 30 度，β 鎖は時計回りに約 15 度ずれた状態で配位し，pMHC 上の各 CDR の接触部位は両者で大きく異なる[7]。この例のように，TCR は異なる pMHC に対して，異なるドッキング様式をとる場合（disparate docking）もある（図 8）。

5. TCR がアロ pHLA（MHC）を直接認識するメカニズムに関するまとめ

このように TCR とアロ pHLA（MHC）の会合様式には，いろいろなパターンがあり，T 細胞の直接アロ認識反応を一元的に説明するメカニズムはない。アロ pHLA（MHC）の中に，cognate pHLA（MHC）とよく似た形状を呈するものが存在することは十分考えられるので，molecular mimicry は TCR が特異性を維持しつつも，交差反応としてアロリガンドを認識し得ることをよく説明できる[8]。TCR に複数の pHLA（MHC）に対する特異性がある（polyspecificity）という考え方も，負の選択により胸腺で排除されないアロ pHLA（pMHC）に対する特異性は無傷で温存されるので，アロ反応性 T 細胞が高い頻度で存在することも理解できる[9]。

いっぽう，TCR や pHLA（MHC）の形状には柔軟性があり，多少の形状の不適合に対応できることは，既知の立体構造の多くが示すところであり，TCR の交差反応を説明する機序としてはわかりやすい。しかし，TCR には自己 HLA への拘束性があり，pHLA に対する特異性を有することと相容れない。さらに 2C TCR のように，リガンドに対して複数のドッキング様式を持つものもある。このように，TCR のアロ pMHC の認識様式は多様であるので，T 細胞のアロ反応を予測可能なルールがあるのかどうか，あるとすればどのようなルールであるの

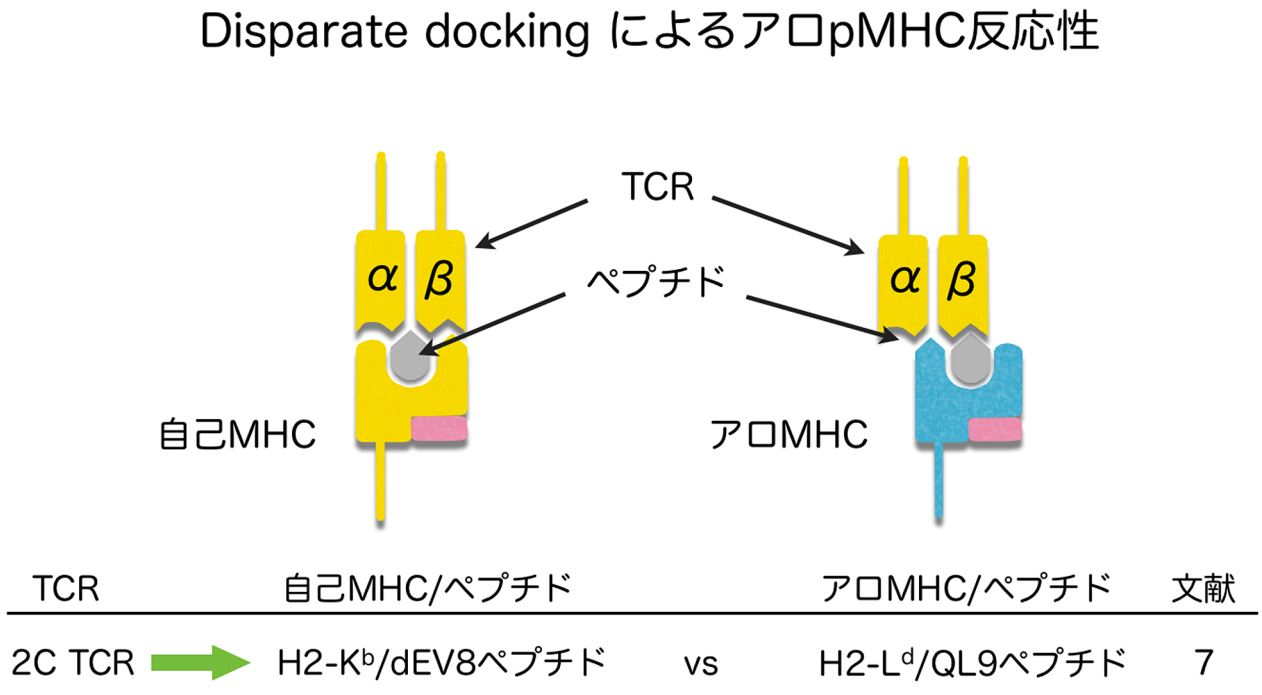


図 8　Cognate pHLA とアロ pHLA で，異なるドッキング様式を TCR がとる場合（disparate docking）
自己 HLA を黄色，アロ HLA を青で示す。TCR が cognate pHLA とアロ pHLA を認識する際に，異なるドッキング様式をとる例を示した。

か，この結論を出すためにはさらに多くの構造解析により，同一の TCR が会合するアロ pHLA（MHC）と cognate pHLA（MHC）の複合体の立体構造についての知見を集積して，それらを比較検討する必要がある。

6. Th 細胞の間接アロ pMHC 認識は，移植後の抗ドナー MHC IgG 抗体の産生に必須である

最後に T 細胞の間接アロ pMHC 認識が拒絶反応に重要な役割を担っていることに関する，最近の話題を 1 つ提供する。移植後の特に慢性拒絶反応において予後を悪化させる抗ドナー HLA IgG 抗体の産生には，ドナー HLA 抗原に特異的な $CD4^+$Th 細胞による B 細胞の形質細胞（抗体分泌細胞）への分化誘導が不可欠である。このアロ反応性 T 細胞のドナー HLA の認識機構が直接認識によるものか，間接認識によるものなのかは不明であった（図 9）。

Conlon らはマウスの体内で $CD4^+$T 細胞が間接アロ認識，あるいは直接アロ認識しかできない実験系を構築して，どちらの場合に抗ドナー MHC 抗体が産生されるのかを検討した[10]。まず，H-2^b ハプロタイプのマウスにアロ H-2^d ハプロタイプの心臓を移植すると，抗マウス MHC クラス I（H2-K^b）抗体が産生された（図 10A）。T 細胞を欠くマウスでは，T 細胞による B 細胞へのヘルプがないので，抗 H2-K^b 抗体の産生は認められなかった（図 10B）。B 細胞上の MHC クラス II（MHC-II）の発現を欠くマウス（H-2^b）では，H-2^d ハプロタイプの心臓を移

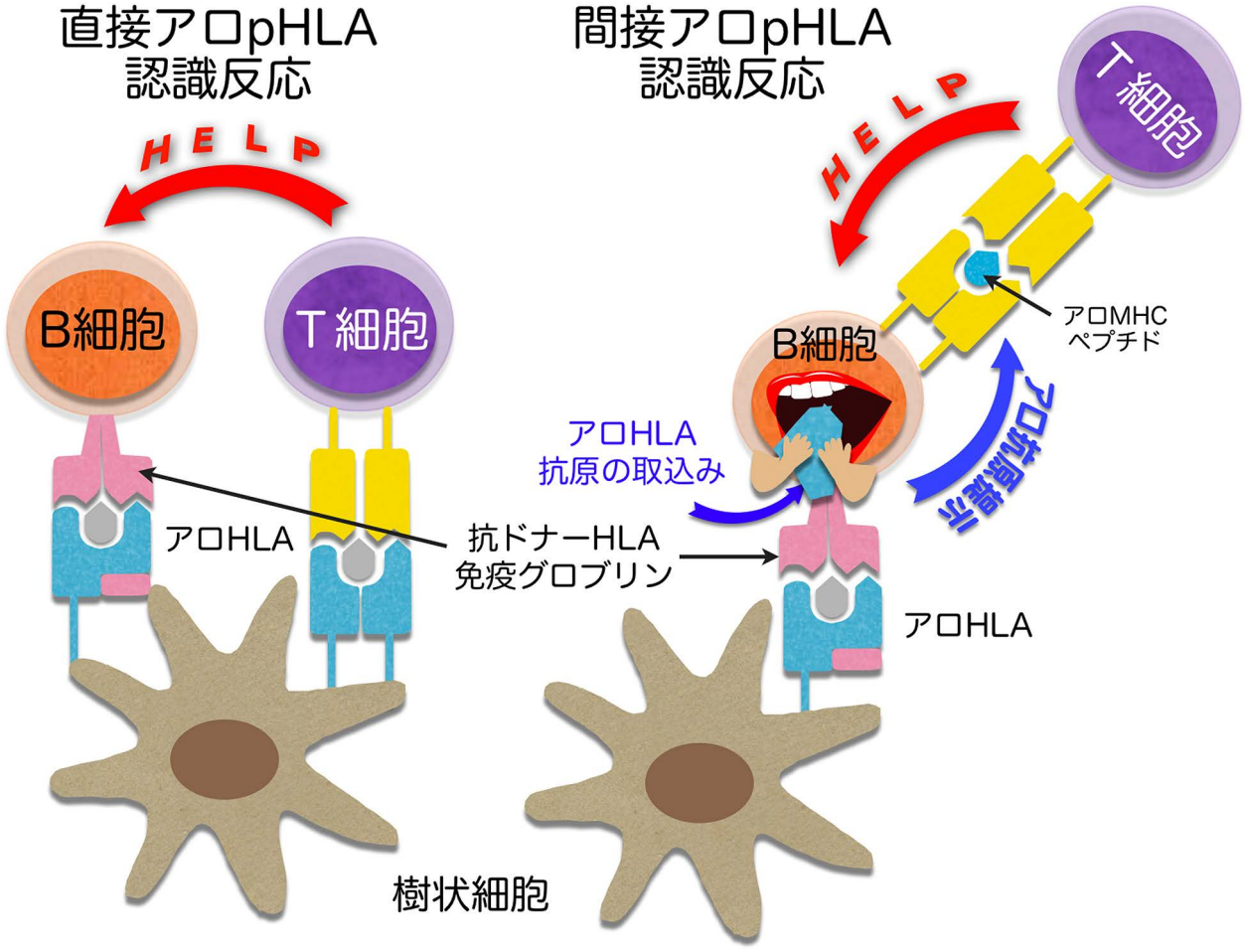


図 9　アロ pHLA に特異的な B 細胞に対する，CD4+Th 細胞の間接アロ pHLA 認識によるヘルプと直接アロ HLA 認識によるヘルプ
アロ pHLA に特異的な免疫グロブリン（抗体）を発現する B 細胞は，アロ pHLA を認識して活性化されると共に，アロ抗原により活性化された Th 細胞によるヘルプを受けて，抗アロ pHLA 抗体を分泌する形質細胞に分化する。図では自己 HLA を黄色，アロ HLA を青で示す。この Th 細胞がアロ抗原により活性化される際に，TCR が直接アロ pHLA を認識する直接アロ認識と，TCR が自己 HLA とこれに提示されたアロ HLA 由来のペプチド（青色）を認識する間接アロ pHLA 認識の，どちらの関与が大きいかと言う疑問が生じる。

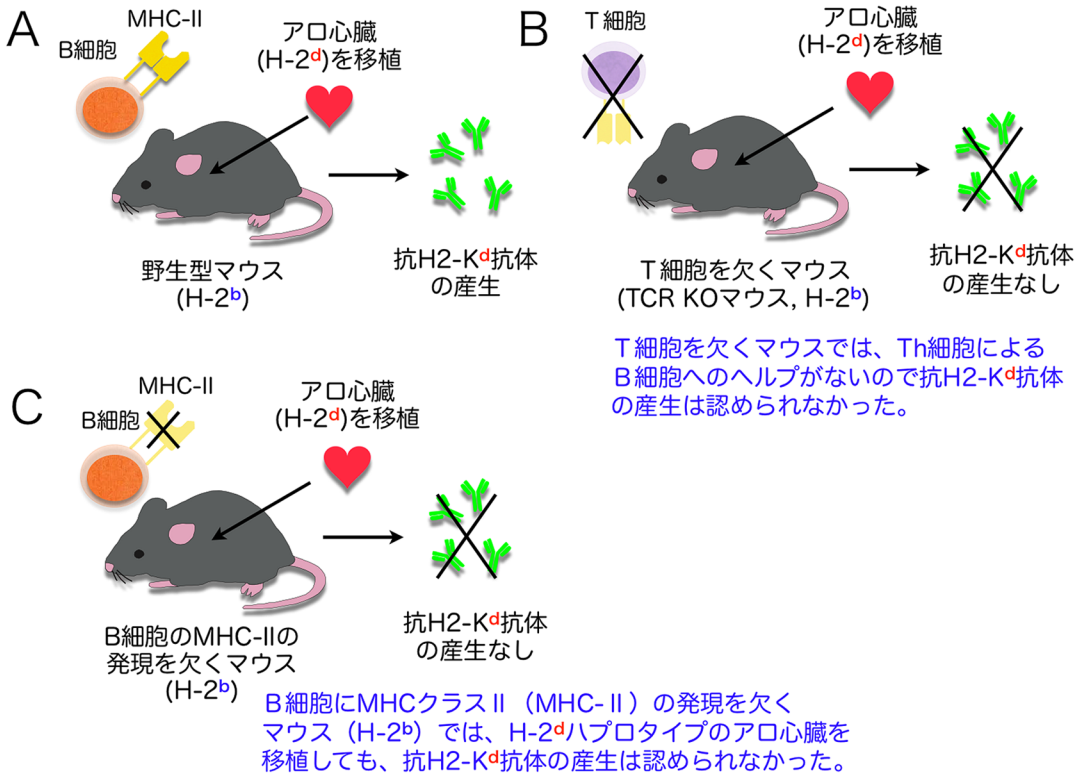


図 10　抗ドナー MHC 抗体の産生には，B 細胞上の MHC-II 分子と T 細胞が必要である

（A）野生型マウス（H-2^b）にアロ心臓（H-2^d）を移植すると抗 H2-K^b 抗体が産生されるが，（B）T 細胞を欠損するマウスでは，抗 H2-K^b 抗体は産生されない。（C）さらに B 細胞上の MHC-II の発現を欠損するマウス（H-2^b）でも，抗 H2-K^b 抗体は産生されない。

植しても，抗 H2-K^b 抗体の産生は認められなかった（図 10C）。つまり B 細胞上の MHC クラス II 分子によるドナー由来のアロ抗原ペプチドの提示は，Th 細胞の間接アロ MHC 抗原認識による抗体産生のヘルプに不可欠であることが示され，Th 細胞の間接アロ pMHC 認識が抗アロ MHC 抗体の産生に重要であることが示唆された。

次に，T 細胞としてマウスのクラス II 分子である I-A^b により提示された，H2-K^d 由来のペプチドに反応する T 細胞のみを体内に有する H-2^b ハプロタイプのマウスに，アロ H-2^d ハプロタイプの心臓を移植したところ，抗 H2-K^b 抗体が産生された（図 11A）。いっぽう，T 細胞としてアロ・マウスクラス II 分子である I-A^{bm12} を直接認識するもののみを，体内に有する H-2^b ハプロタイプのマウスに，アロ H-$2^{d/bm12}$ ハプロタイプの心臓を移植したところ，抗 H2-K^b 抗体の産生は認められなかった（図 11B）。

これらの結果から Th 細胞による直接アロ pMHC 認識ではなく，レシピエント B 細胞の MHC クラス II 分子により提示された，アロ MHC 抗原ペプチドを間接アロ認識した Th 細胞によるアロ MHC 反応性 B 細胞へのヘルプが，移植後の抗ドナー MHC IgG 抗体の産生に重要であることがマウスの実験系で示された。

以上の結果と既知の知識とを照らし合わせると，アロ pMHC に対する IgG 抗体が産生される機序は，図 12 のようにまとめられる。まず，1）アロ MHC 反応性 B 細胞の表面のアロ MHC 抗原に特異的な免疫グロブリンに，アロ MHC 抗原が結合して B 細胞が活性化され，2）その表面に Th2 細胞が産生するサイトカインのレセプターが発現する。3）$CD4^+$ ヘルパー（Th2）細胞は，B 細胞上に発現する，MHC クラス II 分子とアロ MHC 抗原ペプチドの複合体を間接アロ認識して活性化され，4）一定の期間 Th2 サイトカインを分泌する。5）Th2 サイトカインは B 細胞表面の Th2 サイトカインレセプターに結合して，B 細胞の増殖と形質細胞への分化を誘導する。さらに，6）アロ抗原刺激で活性化された TH2 細胞の表面には，CD40 リガンド（CD40L）分子が一定の期

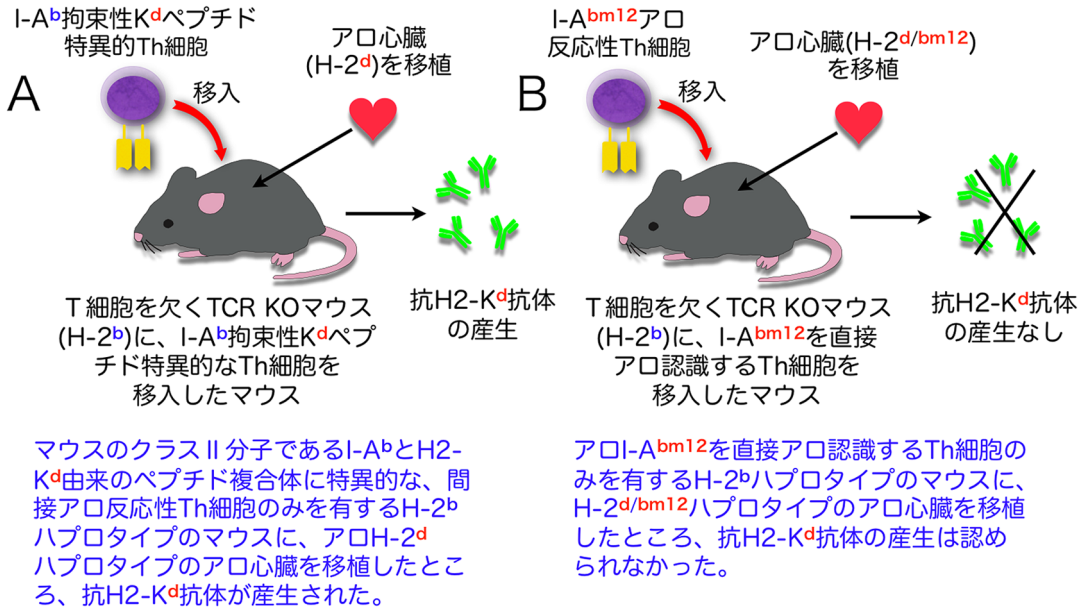


図 11　抗ドナー MHC 抗体の産生には，直接アロ pMHC 認識ではなく，間接アロ pMHC 認識する Th 細胞のヘルプが重要である
（A）I-A^b/K^d ペプチド複合体に特異的な間接アロ反応性 T 細胞のみを有するマウス（H-2^b）に，アロ心臓（H-2^d）を移植すると抗 H2-K^b 抗体が産生されるが，（B）T 細胞として I-A^{bm12} を直接アロ認識する T 細胞のみを有するマウス（H-2^b）では，心臓（H-$2^{d/bm12}$）を移植しても抗 H2-K^b 抗体は産生されない。

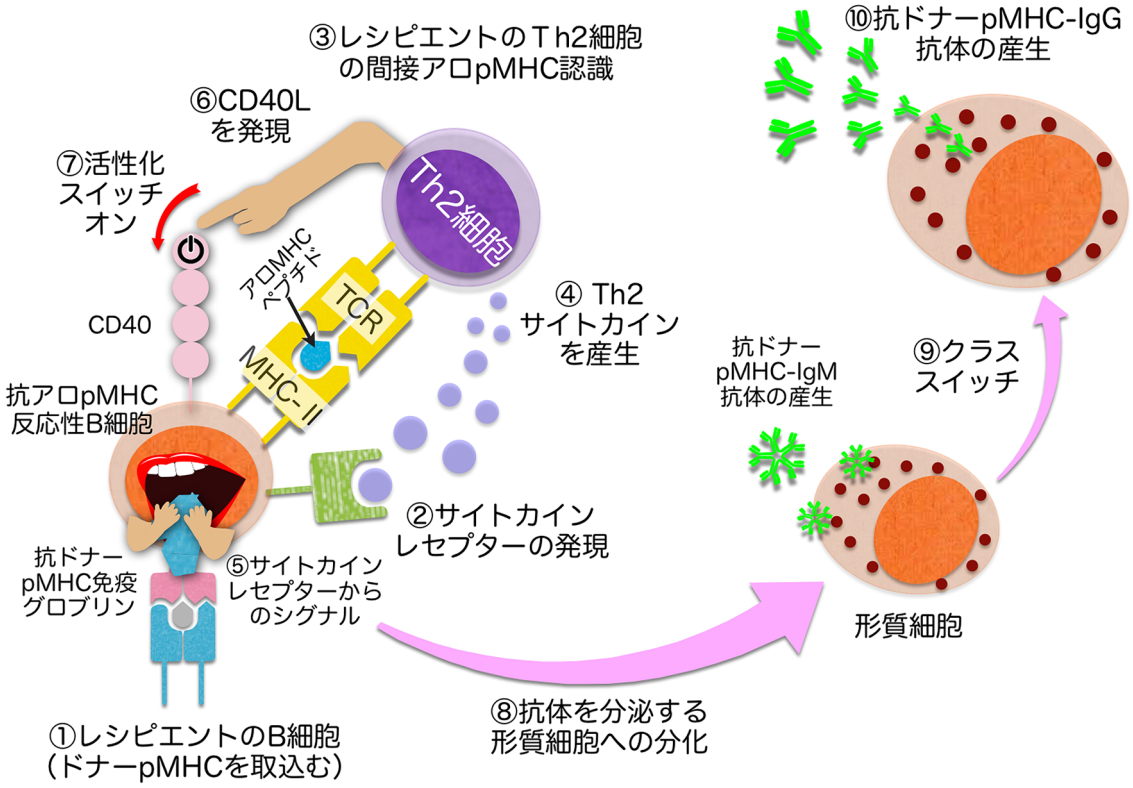


図 12　ヘルパー（Th2）細胞による，B 細胞上に発現する MHC クラス II 分子とアロ MHC 抗原ペプチドの複合体の間接アロ認識により，抗ドナー MHC-IgG 抗体が産生されるしくみ。詳細については，テキスト本文を参照のこと。

間限定で発現し，7）これが B 細胞表面に恒常的に発現している CD40 分子に結合することにより，8）B 細胞の形質細胞（抗体分泌細胞）への分化と，9）免疫グロブリン遺伝子のクラススイッチが誘導される。このようにして，10）アロ抗原に特異的な IgM 抗体が，IgG 抗体ほかのアイソタイプの抗体にクラススイッチし，形質細胞より分泌されるようになる。

今後は，アロ反応性 B 細胞のみならず，Th 細胞による間接アロ認識を阻害することを標的とした，抗ドナー HLA IgG 抗体の産生を抑制する免疫療法の開発が期待される。

参考文献

1) Hennecke J, Wiley DC: Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity. J Exp Med (195): 571–581, 2002.
2) Luz JG, Huang M, Garcia KC, *et al.*: Structural comparison of allogeneic and syngeneic T cell receptor-peptide-major histocompatibility complex complexes: a buried alloreactive mutation subtly alters peptide presentation substantially increasing V(beta) Interactions. J Exp Med (195): 1175–1186, 2002.
3) Macdonald WA, Chen Z, Gras S, *et al.*: T cell allorecognition via molecular mimicry. Immunity (31): 897–908, 2009.
4) Reiser JB, Darnault C, Gregoire C, *et al.*: CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. Nat Immunol (4): 241–247, 2003.
5) Auphan-Anezin N, Mazza C, Guimezanes A, *et al.*: Distinct orientation of the alloreactive monoclonal CD8 T cell activation program by three different peptide/MHC complexes. Eur J Immunol (36): 1856–1866, 2006.
6) Borbulevych OY, Piepenbrink KH, Gloor BE, *et al.*: T cell receptor cross-reactivity directed by antigen-dependent tuning of peptide-MHC molecular flexibility. Immunity (31): 885–896, 2009.
7) Colf LA, Bankovich AJ, Hanick NA, *et al.*: How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC. Cell (129): 135–146, 2007.
8) Gras S, Kjer-Nielsen L, Chen Z, *et al.*: The structural bases of direct T-cell allorecognition: implications for T-cell-mediated transplant rejection. Immunol Cell Biol (89): 388–395, 2011.
9) Felix NJ, Donermeyer DL, Horvath S, *et al.*: Alloreactive T cells respond specifically to multiple distinct peptide-MHC complexes. Nat Immunol (8): 388–397, 2007.
10) Conlon TM, Saeb-Parsy K, Cole JL, *et al.*: Germinal center alloantibody responses are mediated exclusively by indirect-pathway CD4 T follicular helper cells. J Immunol (188): 2643–2652, 2012.

Basic immunology of immune response to allogeneic HLA

Atsushi Irie[1)] and Yasuharu Nishimura[1)]

[1)] Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Alloreactivity of T cells is a main cause of rejection of allografts, and it depends on direct T-cell recognition of and reaction to the allogenic HLA (allo-HLA) molecules. If the mechanisms underlying this great paradox in immunology, in which T cells must stringently discriminate 'non-self peptide' from 'self peptide' in a self-HLA-restricted manner, while a large number of T cells show allo-HLA reactivity, were solved, it would be tremendously beneficial for patients receiving transplantation medicine. Accumulating knowledge for the crystal structures of TCR/peptide/allo-HLA (MHC) complexes has enabled us to compare them to the structures of TCR/cognate ligand, that is, TCR/non-self peptide/self-HLA (MHC) complexes. It has been shown that there are at least three patterns of T-cell allo-recognition; 1) molecular mimicry, 2) induced fit and 3) disparate docking. Since not only TCRs but also peptides and HLAs (MHCs) are so flexible to form the three-member complexes, there is no uniform mechanism of T-cell allo-recognition so far and it is yet difficult to predict the magnitude of T cell reactivity to the certain combination of allo-HLAs before transplantation. So, the basic mechanisms underlying the T-cell allo-recognition are awaited to be determined by accumulation of more crystal structures of the same TCRs interacting with their cognate ligands and with allo-ligands (peptide/allo-HLAs (MHCs)). Finally, it was recently reported that, in murine experiments, the production of anti-donor-HLA-specific IgG antibodies in the recipients after transplantation is exclusively mediated by the recipient helper T (Th) cells indirectly recognized allogenic donor MHC-derived peptides presented by the MHC class II molecules expressed on the surface of recipient B cells. The importance of Th cells activated by indirect allo-recognition for the differentiation of B cells into plasma cells producing long-lasting anti-donor-HLA-specific IgG antibody that mediates chronic allograft rejection has been elucidated.

Key Words: alloreactivity, direct allorecognition, indirect allorecognition, anti-donor HLA antibody

©2013 日本組織適合性学

Major Histocompatibility Complex　2013; 20 (2): 121–129

平成 25 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

臓器移植における HLA 抗体検査について

石塚　　敏[1)]

[1)] 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室

臓器移植における HLA 抗体検査には，ドナーリンパ球を用いたクロスマッチ検査，抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子をコーティングした合成ビーズによる PRA（Panel reactive antibody）法などさまざまな検査法が考案されている。しかし，検査法によって検出感度の相違，検出されたドナー特異的抗体 DSA（Donor specific alloantibody）の免疫グロブリン（class・subclass）の相違，自然抗体または自己抗体など non-HLA 抗体が反応する場合もあり結果判定が難しいのが現状である。本講演では，HLA 抗体検査について当施設で日常実施している検査法および解析法を紹介する。

キーワード：Human leucocyte antigen (HLA)，Donor specific alloantibody (DSA)，Panel reactive antibody (PRA)

1. はじめに

臓器移植では，臓器提供者をドナー（Donor），移植を受ける患者をレシピエント（Recipient），そして，移植される臓器を移植片（Graft）といい，現時点で臓器移植は末期臓器不全に対する唯一の根治療法である。

HLA 抗原は，自己と非自己を識別する細胞表面抗原であり，移植片の拒絶に関与する移植抗原でもある。HLA 抗原に対する抗体は，移植だけではなく輸血・妊娠によっても産生されるため，レシピエントによっては移植前から HLA 抗体（既存抗体・前感作抗体）を保有していることもある。また，稀に自然抗体が HLA 抗原と交差反応する場合もある。

そして，移植前よりレシピエント血液中にドナーミスマッチの HLA-Class1 抗原に対する DSA が存在すると移植後短時間で超急性拒絶反応を発症したり，移植前に DSA が陰性であっても移植後，長期的なドナーミスマッチの HLA 抗原の刺激により産生された DSA によって抗体関連型拒絶反応が惹起されることもある。そのため，臓器移植における HLA 抗体検査は，移植臓器の液性拒絶反応による機能廃絶を回避する最も重要な検査である。

2. HLA 抗体検査に使用する HLA 抗原の種類について

臓器移植における HLA 抗体検査には，1）ドナーリンパ球（T 細胞・B 細胞），2）抽出 HLA 抗原，3）精製 HLA 分子が用いられている。

1）ドナーリンパ球（T 細胞・B 細胞）（図 1）

リンパ球（細胞直径 6 ～ 15 mm）のうち T 細胞は，HLA Class I 抗原の発現があり HLA Class II 抗原は通常発現していないが，活性化 T 細胞では HLA Class II 抗原の発現がある。また，B 細胞には HLA Class I・Class II 抗原の両方を発現しているが，T 細胞と比べると同じ HLA Class I 抗原であってもその発現量が多い。

2）抽出 HLA 抗原

培養細胞株から抽出した HLA 抗原を精製したもので，HLA Class I 抗原と Class II 抗原に分かれている（Flow-PRA Screening・Flow-PRA Specific・LABScreen Mixed など）。

3）精製 HLA 分子

単一の HLA 遺伝子を培養細胞株に導入して，発現させた HLA 抗原を精製した単一の HLA 抗原である（Flow-PRA Single Antigen・LABScreen Single Antigen など）。

受付日：2013 年 7 月 11 日，受理日：2013 年 7 月 11 日
代表者連絡先：石塚　敏　〒 162–8666　東京都新宿区河田町 8–1　東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室
TEL: 03–3353–8111　FAX: 03–5269–7534　E-mail: ishizuka.tsutomu@twmu.ac.jp

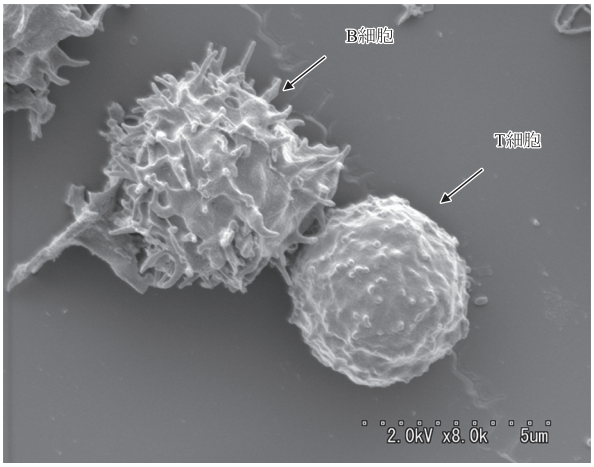


図 1　走査型電子顕微鏡によるヒトリンパ球細胞膜表面構造
B 細胞は，細胞膜上の表面突起（微絨毛）が特徴である。

3. HLA 抗体検査に使用するドナーリンパ球（T 細胞・B 細胞）の分離法について

T 細胞・B 細胞の分離法として以前は，比重遠心法で分離したリンパ球を用いたナイロンウールカラム法が主流であったが，現在はモノクローナル抗体を用いた比重遠心法や磁気ビーズ法（ビーズ直径 150 nm）の開発により純度の高い細胞の分取が可能となっている（図 2）。

リンパ球の分離操作では，物理的刺激により HLA 抗原が細胞膜から遊離することがあるため，細胞使用時には 37°C インキュベーターで 30 分間程度静置することが望ましい。

4. ドナーリンパ球を用いたクロスマッチ検査について

ドナーリンパ球を移植臓器と仮定し，レシピエント血清中のドナーリンパ球に対する HLA 抗体の有無を確認する in vitro 検査である。

ドナーリンパ球を用いたクロスマッチ検査には，1）リンパ球細胞傷害試験 LCT-XM（Lymphocyte cytotoxicity-crossmatch test）=CDC（Complement-dependent cytotoxicity）-XM，2）AHG-LCT-XM（Anti-human immunoglobulin LCT-XM），3）フローサイトメーターを使用したリンパ球クロスマッチ検査 FCXM-IgG（Flow cytometry lymphocyte crossmatch-IgG test）などがある。

1）LCT-XM

本来，血清学的な HLA タイピングを行うために考案された，補体結合性抗体のみ検出できる唯一の検査法である（図 3）。

国内での LCT-XM は，組織適合性委員会・HLA 実務作業部会において，1994 年腎移植 -HLA タイパー会議で作成された組織適合性検査マニュアル第 1 版に準じた方法であり，ドナー T 細胞・B 細胞（およそ 2,000 個 / 1 μl）と被検血清 1 μl を 1 次反応 37°C 60 分間，ウサギ補体血清を加え 2 次反応 25°C 120 分間反応させ染色後，顕微鏡にて陰性コントロールを基準に死細胞割合（%）として判定する。

（ASHI Laboratory Manual，4th Edition では，1 次反応 20 ～ 25°C 30 分間，2 次反応 20 ～ 25°C 60 分間である。）

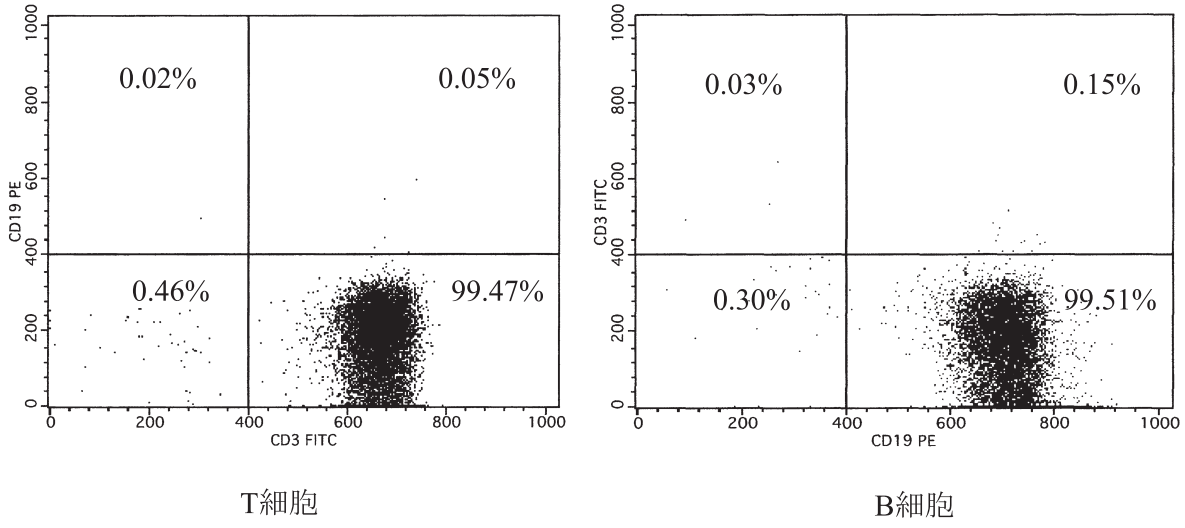


図 2　モノクローナル抗体を用いた磁気ビーズ法による目的細胞分取
フローサイトメーターにより確認したリンパ球の分取純度は，T 細胞 99.47%，B 細胞 99.51% であった。

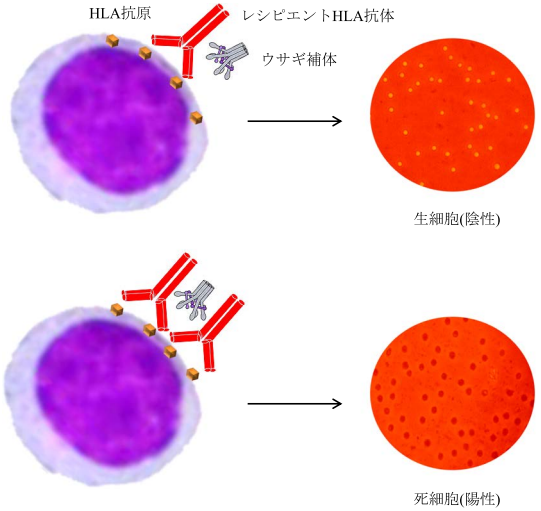


図 3　LCT-XM の模式図およびエオジン染色法の倒立位相差顕微鏡による細胞所見

リンパ球の細胞表面抗原に結合した補体結合性抗体が細胞膜傷害を惹起するためには，ウサギ補体が結合し，活性化するために近接する HLA 抗体の Fc 領域が 2 つ必要である。

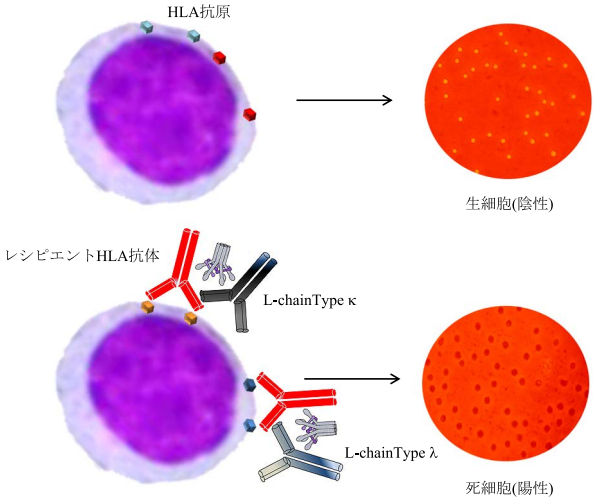


図 4　AHG LCT-XM の模式図およびエオジン染色法の倒立位相差顕微鏡による細胞所見

AHG（anti-human immunoglobulin）は，レシピエント HLA 抗体の L-chain に結合することで補体活性化を惹起できる。

臓器移植では，特に IgG 抗体が液性拒絶反応を惹起する allotype 抗体として重要視されている。そのため，被検血清中の IgM 抗体不活化法として DTT（dithiothreitol），2ME（2-mercaptoethanol）で処理することにより IgM 抗体の影響を受けない結果が確認できる。

健常者の末梢血液中の IgG subclass は，IgG1 は 65% 程度，IgG2 は 25% 程度，IgG3 は 7% 程度，IgG4 は 3% 程度を占める割合である。そして，補体活性化能は，IgG1 と IgG3 が最も効率がよく，IgG2 はそれより劣り，IgG4 は機能を持たないと報告がある。しかし，疾患によっては高 IgG4 血症など補体非結合性抗体を多く発現した関連腎臓病なども報告されている。

細胞固定液には，通常ホルムアルデヒドが使われているが，現在ではそれに代わるエオジン染色用の細胞染色固定液が市販されている。

リンパ球の細胞表面抗原に結合した補体結合性抗体が細胞膜傷害を惹起するには，ウサギ補体が結合し，活性化するためには近接する HLA 抗体の Fc 領域が 2 つ必要である。そのため，IgG は 2 分子（結合部位が 2 個），IgM は 1 分子（結合部位が 10 個）で補体活性化が起こる。

2）AHG-LCT-XM

LCT-XM を改良したものでウサギ補体を加える前に被検血清と反応させたリンパ球を洗浄し，AHG（anti-human immunoglobulin）であるウサギ L-chain Type κ・L-chain Type λをそれぞれ加えることにより，補体結合性抗体・補体非結合性抗体の両方を検出できる検査法である（図 4）。

（AHG LCT-XM は，1970 年代に考案された方法であるが，ASHI Laboratory Manual，4th Edition では，L-chain Type λの測定マニュアルはなく 1 次反応 4°C，20 ～ 25°C，37°C 30 ～ 60 分間，2 次反応 20 ～ 25°C 60 ～ 90 分間である。）

健常者の末梢血液中 IgG 抗体は，L-chain Type κが Type λのおよそ 2 倍産生されていると報告がある。

リンパ球には，Fcγレセプター FcγRII（CD32）・FcγRIII（CD16）が存在する。そのため，ウサギ L-chain Type κ・Type λが細胞に直接結合してしまうこともあり結果判定には注意が必要な場合がある。

リンパ球の細胞表面抗原に結合した 2 分子の IgG 抗体が近接していない場合，補体活性化は起こらない。そのため，AHG は IgG 抗体の L-chain に結合することで補体活性化を惹起できる。

3）FCXM-IgG

プロテアーゼ処理ドナーリンパ球（200,000 個 /100 µl）と被検血清 100 µl を 25°C 30 分間反応，洗浄後 Goat $F(ab')_2$ anti-human IgG-FITC（fluorescein isothiocyanate）・CD19-PE（Phycoerythrin）・CD3-PerCP（Peridinin Chlorophyll Protein Complex）を加え，4°C 遮光 30 分間反応，洗浄後フローサイトメーターによる 3 カラー測定すること

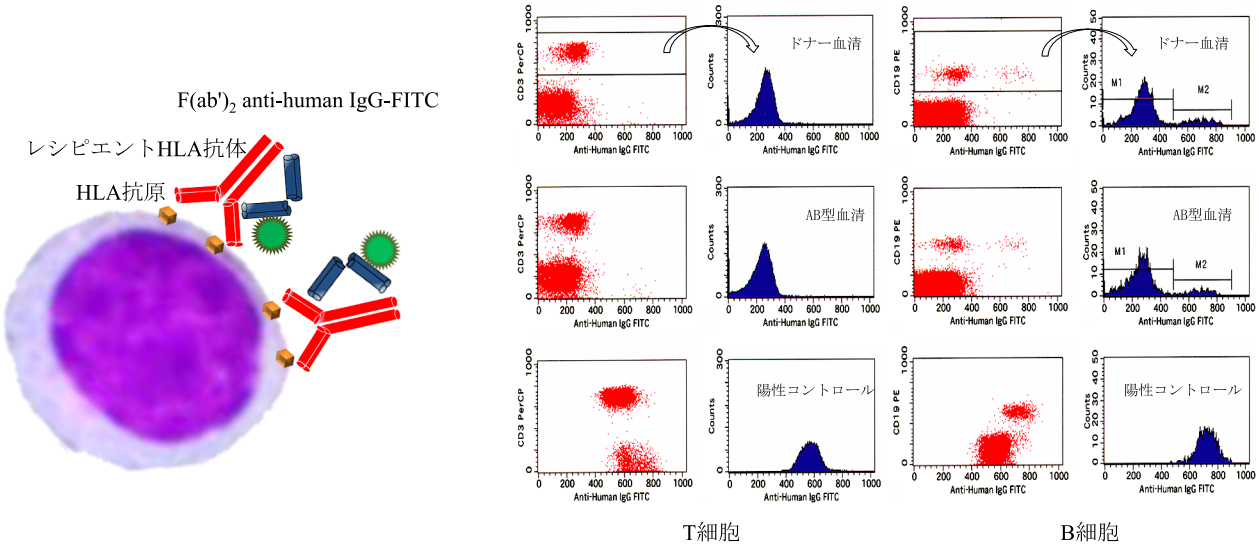


図 5　FCXM-IgG の模式図および解析結果
ドナーリンパ球をプロテアーゼ処理した 3 カラー解析結果である。

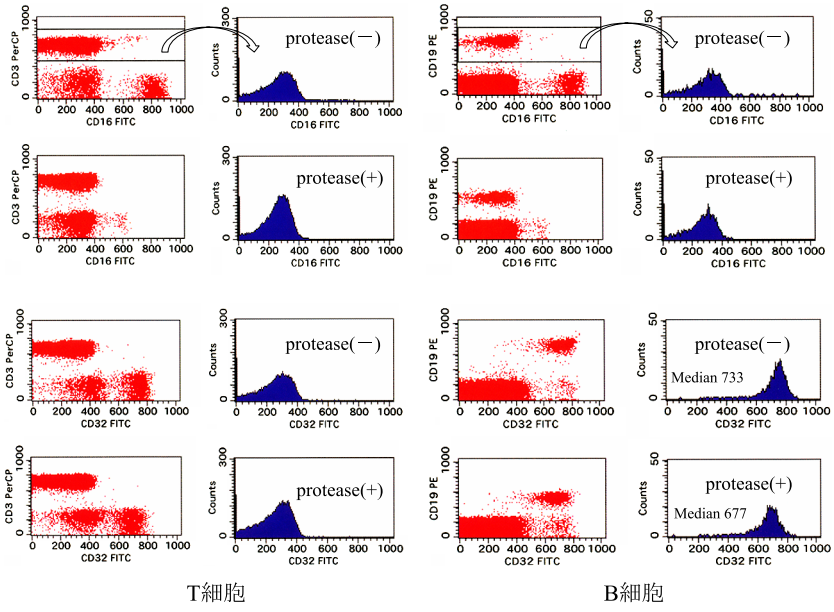


図 6　protease 処理による Fcγ レセプター FcγRII（CD32）・FcγRIII（CD16）発現量の比較
B 細胞の Fcγ レセプター FcγRII（CD32）については発現を抑制することは難しいが IgG に対しては低親和性レセプターである。

により補体結合性・補体非結合性 IgG 抗体の両方を検出できる検査法である（図 5）。

（ASHI Laboratory Manual，4th Edition では，ドナーリンパ球（500,000 個 /30 μl）と被検血清 30 μl を使用するマニュアルである。しかし，LCT-XM で使用するドナーリンパ球と被検血清の割合とはかけ離れている。）

ドナーリンパ球をプロテアーゼ protease type XIV 処理することにより非特異的反応をある程度抑制することが可能である。しかし，B 細胞の Fcγ レセプター FcγRII（CD32）については発現を抑制することは難しいが IgG に対しては低親和性レセプターである（図 6）。

B 細胞の FCXM-IgG 陰性コントロールは，anti-human IgG に対して通常 2 つの母集団として反応性を示すが，この 2 つの母集団は主に B 細胞の分化によりナイーブ

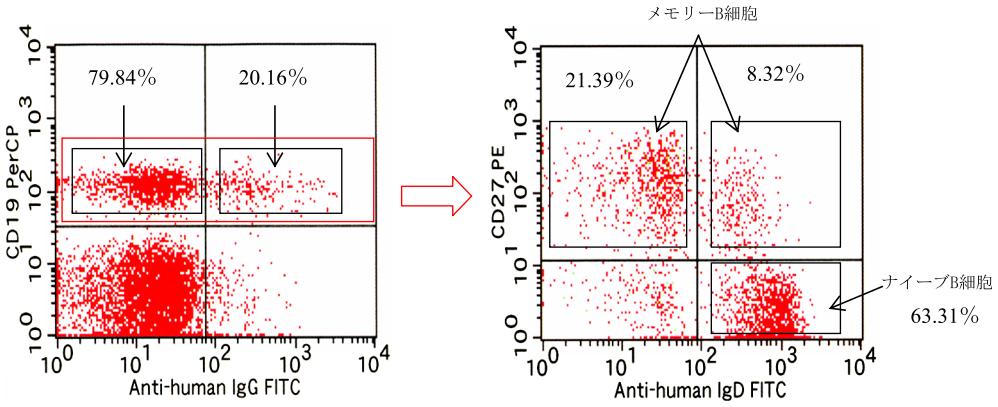


図 7　末梢血ナイーブ B 細胞とメモリー B 細胞の発現量の比較

左が末梢血 B 細胞のマーカーである CD19 と anti-human IgG を解析した図である。右が末梢血 B 細胞 CD19 をゲートし，メモリー B 細胞のマーカーである CD27 と anti-human IgD を解析した図である。

B 細胞とメモリー B 細胞であると報告されている。

ナイーブ B 細胞は，細胞表面に IgM・IgD を発現しており，メモリー B 細胞は，細胞表面に IgG・IgA・IgE のいずれかを発現しているが IgM のみ発現している B 細胞群もある。

図 7 は，左が末梢血 B 細胞のマーカーである CD19 と anti-human IgG を解析した図である。右が末梢血 B 細胞 CD19 をゲートし，メモリー B 細胞のマーカーである CD27 と anti-human IgD を解析した図である。解析した図から anti-human IgG^+CD19^+ が 20.16% 程度，anti-human IgD^-CD27^+ が 21.39% 程度であり anti-human IgG に反応性を示した B 細胞は一部のメモリー B 細胞の細胞表面上に発現している IgG に結合したものと考えられる。

健常者の末梢血 B 細胞には，ナイーブ B 細胞の IgD^+CD27^- が 60% 程度，メモリー B 細胞の IgD^+CD27^+ が 10% 程度（クラススイッチなし），IgD^-CD27^+ が 30% 程度であると報告がある。そして，HLA Class Ⅰはナイーブ B 細胞よりもメモリー B 細胞に発現量が多く，HLA Class Ⅱはメモリー B 細胞とナイーブ B 細胞では同等の発現量であると言われている。

ナイーブ B 細胞・メモリー B 細胞は共に DSA と反応性を示すが，ナイーブ B 細胞群を主体として解析することで非特異的反応をある程度回避した判定結果が得られる。

通常 2 次抗体に使用されている $F(ab')_2$ anti-human IgG は，抗体分子から Fc 領域を除いた構造である。Fc 領域は，マクロファージ，NK 細胞，B 細胞など血球細胞表面上の Fc レセプターと結合するため，2 次抗体が目的細胞に非特異的結合するのを避けることができる。しかし，同一の L-chain を持つ IgM・IgA 抗体にも結合するため結果判定には注意が必要な場合がある。

現在，フローサイトメーターの機械間差を最小限にすることができる可溶性蛍光色素分子等量 MESF（Molecules of equivalent soluble fluorochrome）による検査解析法の標準化が進められている（図 8）。

5. リンパ球クロスマッチ検査に影響を与える薬剤について

臓器移植では，患者の状態に応じて 1）Rituximab，2）Thymoglobulin などの薬剤が投与される。しかし，これらの薬剤は末梢血液中の薬剤濃度によって，リンパ球クロスマッチ検査で偽陽性反応を生じる場合がある。そのため，被検血清中から抗体を用いた磁気ビーズ法などで検査に影響しない程度まで薬剤を除去する必要がある。Rituximab については FCXM-IgG でドナーリンパ球のプロテアーゼ処理が有効である。

1）Rituximab（抗ヒト CD20 ヒト・マウスキメラ抗体）

CD20 は，Pro-B 細胞，形質細胞を除くほとんど全ての正常及び腫瘍化した B リンパ球に発現している分化抗原（リンタンパク質）であり，B リンパ球以外の細胞には発現していない。

2）Thymoglobulin（抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン）

Thymoglobulin は，T 細胞性表面抗原（CD2，CD3，

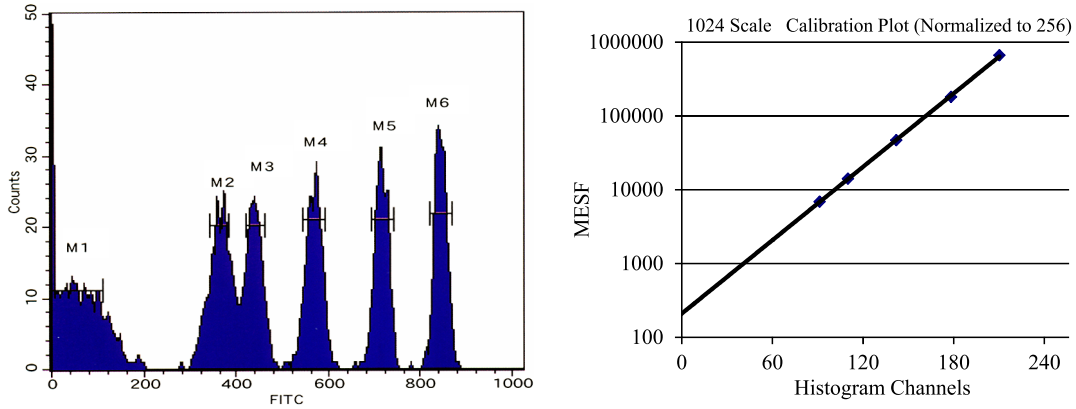


図 8　可溶性蛍光色素分子等量 MESF（Molecules of equivalent soluble fluorochrome）
フローサイトメーターの機械間差を最小限にすることが可能であり，検査解析法の標準化に向けた試みの一つである。

CD4，CD5，CD7，CD8，CD25，TCRαβ）並びに白血球表面抗原（CD11a）に対し高い親和性を示すポリクローナル抗体である。

6. 抽出 HLA 抗原・精製 HLA 分子を用いた HLA 抗体検査について

抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子を用いた HLA 抗体検査には，1）Flow-PRA（Flow cytometry panel reactive antibody），2）Luminex，3）ELISA（Enzyme-linked immunosorbent assay），4）Cell tray などがある。

1）Flow-PRA

Flow-PRA は，抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子をラテックスビーズにコーティングする違いにより① Screening，② Specific，③ Single Antigen の 3 種類に分けられる。

抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子をコーティングしたラテックスビーズ（ビーズ直径 2 ～ 4 μm）と被検血清を 25°C 30 分間反応，洗浄後 Goat $F(ab')_2$ anti-human IgG-FITC を加え，25°C 遮光 30 分間反応，洗浄後フローサイトメーターにより測定する。補体結合性・補体非結合性 IgG 抗体の両方を検出できる検査法である。

解析には，anti-human IgG-FITC の蛍光強度を用い，抗体の有無や抗体特異性を定量的に分析することが可能である。

①　Flow-PRA Screening

HLA Class I・Class II 用キットがあり，それぞれ 30 種類のパネル細胞から抽出•精製した HLA 抗原をコーティングしたビーズを使用する。

Class I ビーズ -unlabeled，Class II ビーズ -PE であるため，結合した抗体に対する 2 次抗体である anti-human IgG-FITC の蛍光強度を同時測定することが可能である。

陰性コントロールのマーカー設定は，陽性コントロールを対照として陽性領域において理論値 3.3% 以下にすることが望ましい。しかし，フローサイトメーターのバックグランドノイズにより 1 ～ 7% まで陽性領域に反応性を示すこともある。

結果判定は，目視判定において 2 峰性・多峰性のヒストグラムは HLA 抗体陽性である。

陰性領域において被検血清が 2 峰性・多峰性のヒストグラムを示す場合，陰性コントロールのピークの位置とほぼ同じ形状ならば陰性領域内でマーカーの再設定を行う。また，陰性コントロールとほぼ同形のヒストグラムで右方移動した場合であってもコントロールビーズに非特異的反応がなければ HLA 抗体特異性の確認検査をすることが望ましい（図 9）。

②　Flow-PRA Specific

HLA Class I・Class II 用キットがあり，1 種類のビーズに 1 種類のパネル細胞から抽出・精製した HLA 抗原がコーティングされている 8 パネル抗原を同時測定できる。

③　FlowPRA Single Antigen

HLA Class I・Class II 用キットがあり，1 種類のビーズに精製された単一のリコンビナント HLA 抗原がコーティングされている 8 抗原を同時測定できる。

2）Luminex 法

Luminex 法は，抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子をポリスチレンビーズにコーティングする違いにより①Mixed，② PRA，③ Single Antigen の 3 種類に分けられる。

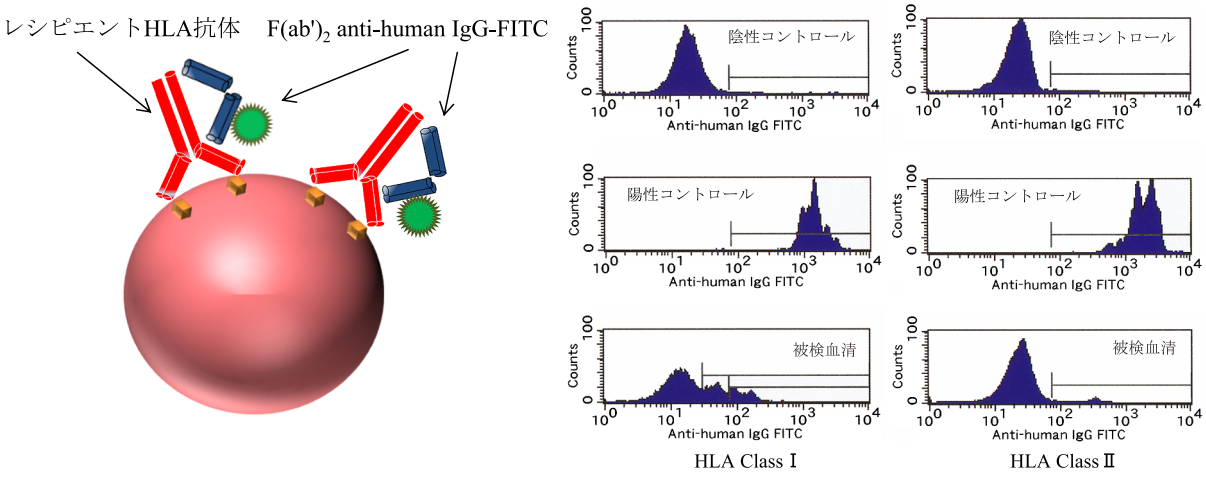


図 9　Flow-PRA の模式図および解析結果

目視判定において 2 峰性・多峰性のヒストグラムは HLA 抗体陽性である。陰性領域において被検血清が 2 峰性・多峰性のヒストグラムを示す場合，陰性コントロールのピークの位置とほぼ同じ形状ならば陰性領域内でマーカーの再設定を行う。

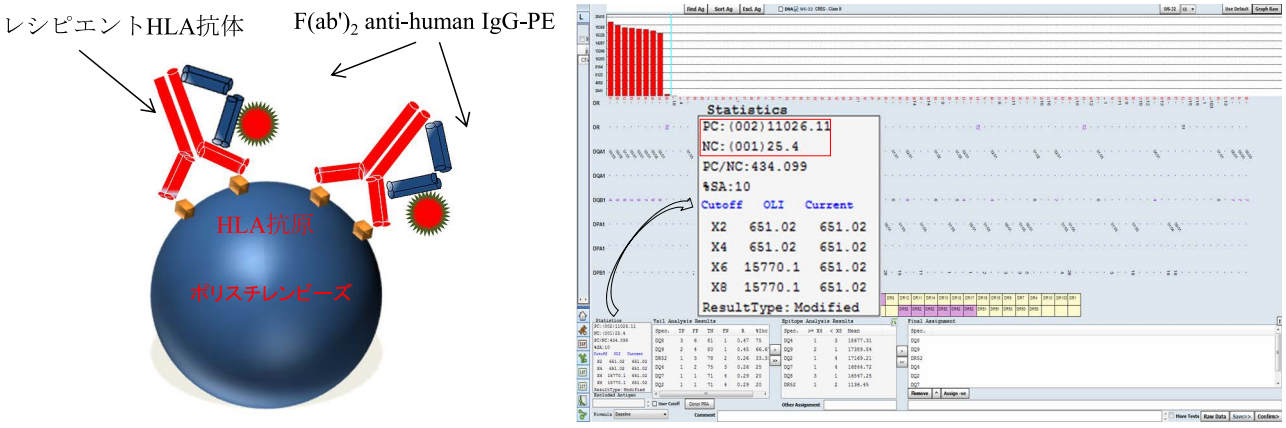


図 10　Luminex の模式図および解析結果

被検血清中の NC beads（1 番目）は，Trimmed Mean 100 以下，PC beads（2 番目）は Trimmed Mean 10,000 以上になることが望ましい。

Luminex は，赤色レーザと APD センサでビーズの直径と色を測定し，緑色レーザと光電子増倍管でビーズ表面の蛍光量を測定する。

Luminex ビーズは，ポリスチレンビーズ（ビーズ直径 5.6 μm）でビーズの蛍光強度（最大 100 種類の番号化されたビーズが使用可能）の違いにより suspension array technology 法が可能である。

抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子をコーティングしたポリスチレンビーズと被検血清を 25°C 30 分間反応，洗浄後 Goat F(ab')$_2$ anti-human IgG-PE を加え，25°C 遮光 30 分間反応，洗浄後 Luminex により補体結合性・補体非結合性 IgG 抗体の両方を検出できる検査法である（図 10）。

解析には，anti-human IgG-PE の蛍光強度を用い，抗体の有無や抗体特異性を定量的に分析することが可能である。

被検血清中の NC beads（1 番目）は，Trimmed Mean 100 以下，PC beads（2 番目）は Trimmed Mean 10,000 以上になることが望ましい。

PC beads は，IgG 抗体がコーティングされているため 2 次抗体 anti-human IgG の反応性を確認することができる。そして，anti-human IgG の Trimmed Mean が低い場合には，被検血清中に反応を阻害する因子が考えられるため被検血清を前処理して再度検査することが望ましい。

① LABScreen Mixed

HLA Class I・Class II 用キットがあり，1 種類のビーズには 3 ～ 5 種類のパネル細胞から抽出・精製した HLA 抗原がコーティングされている。

② LABScreen PRA

HLA Class I・Class II 用キットがあり，1 種類のビーズには 1 種類のパネル細胞から抽出・精製した HLA 抗原がコーティングされている。

③ LABScreen Single Antigen

HLA Class I・Class II 用キットがあり，1 種類のビーズには精製された単一のリコンビナント HLA 抗原がコーティングされている。

3）ELISA

抽出 HLA 抗原や精製 HLA 分子を固相化した Terasaki tray の各ウェルと被検血清を 25°C 30 分間反応，洗浄後 Alkaline phosphatase 標識 anti-human IgG を加え，25°C 遮光 30 分間反応，洗浄後各ウェルの発色により補体結合性・補体非結合性 IgG 抗体の両方を検出できる検査法である。

結果判定には，発色の程度を目視判定もしくは ELISA tray reader で吸光度 OD（Optical density）を測定し，抗体の有無や抗体特異性を定量的に分析することができる。

被検血清に 100 μg/mL 以上の ATG が含まれる場合，非特異的反応が生じるため Alkaline phosphatase 標識 anti-human IgG を Antibody Diluent（10% ウサギ血清）で希釈すると非特異的反応を抑えることができる。

LCT-XM と感度を相関させるためには，被検血清を 1:3 に希釈して使用する。

4）Cell tray

Cell tray は，LCT-XM と同じ反応原理である。

Class I 用が T 細胞・Class II 用が B 細胞を分注して凍結保存されている Terasaki tray を室温に戻し，これに被検血清を 25°C 30 分間反応，ウサギ補体を加え 25°C 60 分間反応後エオジン染色により補体結合性抗体を検出できる検査法である。

7. ドナー細胞上の HLA 抗原と合成ビーズを用いた HLA 抗体検査について

ICFA（Immunocomplex capture fluorescence analysis）は，Luminex ビーズアレイに antigen capture を応用した方法である。

被検血清と反応させたドナー白血球や血小板を可溶化し，細胞膜から遊離した HLA 抗原・HLA 抗体複合体と抗ヒト HLA Class I・Class II 抗体をコーティングした多色のポリスチレンビーズを反応させ，Goat anti-human IgG-PE を加え，Luminex により補体結合性・補体非結合性 IgG 抗体の両方を検出できる検査法である。

8. HLA 抗体検査に影響を及ぼす被検血清中の非特異的反応処理方法について

被検血清中には，ヒトリンパ球・抽出 HLA 抗原結合ビーズ・精製 HLA 分子結合ビーズに対して HLA 抗体以外にも反応性を示す非特異成分が多く含まれている。そのため，非特異反応を最小限に抑える被検血清の前処理が必要な場合がある。

被検血清の前処理法としては，液体窒素で凍結解凍，超高速冷却遠心処理（100,000G），熱処理（不活性化），DTT（Dithiothreitol；最終濃度 5 mM）処理，ウシ胎児血清 FBS（Fetal Bovine Serum）添加，EDTA（最終濃度 50 mM）添加，Adsorb Out，血清希釈などを組み合わせる前処理法が報告されている。

参考文献

1) 日本組織適合性学会認定 HLA 検査技術者講習会テキスト 2004, 2007, 2008, 2011. http://jshi.umin.ac.jp/certification/ktext_list.html
2) 日本移植学会　組織適合性検査プロトコール集（標準方法）（案）. http://www.asas.or.jp/jst/pdf/info_20130115.pdf
3) 荒木千枝子，十字猛夫：抗白血球抗体検査法．日本臨床巻春季増刊 42: 1499–1504, 1984.
4) 石塚敏，安尾美年子，石田悠梨：Complement-Dependent Cytotoxic Crossmatch および Flow cytometric crossmatch の結果の乖離についての検討―補体結合性 HLA 抗体の検出―. 移植 48: 33–41, 2013.
5) ASHI Laboratory Manual, 4th Edition.

HLA Antibody Detection in Organ Transplantation

Tsutomu Ishizuka[1)]

[1)] Division of Transplant Immunology, Central Clinical Laboratories, Tokyo Women's Medical University

Various methods have been proposed for the testing of HLA antibodies in organ transplantation. These methods include cross-matching using donor lymphocytes, and panel reactive antibody (PRA) tests using synthetic beads coated with purified HLA molecules or extracted HLA antigens. However, currently, depending on the testing method, the results can be difficult to determine due to differences in detection sensitivity, differences in the classes/subclasses of immunoglobulin composing the donor-specific alloantibodies (DSA), and instances where non-HLA antibodies such as natural antibodies or autoantibodies react. In this lecture, I will introduce the testing and analysis methods that are routinely used for HLA antibody testing at our institution.

Key Words: Human leucocyte antigen (HLA), Donor specific alloantibody (DSA), Panel reactive antibody (PRA)

©2013 日本組織適合性学会

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 Takao[1)], Akira Tsujimura[1)], Masaharu Sada[2)], Reiko Goto[2)], Minoru Koga[3)], Yasushi Miyagawa[1)], Kiyomi Matsumiya[1)], Kazuhiko Yamada[2)], Shiro Takahara[1)]

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 aiterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimune 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

このところ日本は熱帯になったと思うくらいの異常気象が続いている。暑さはともかくとして、集中豪雨が及ぼす被害は甚大であり、被災地では大変な思いをされている方々も多い。この異常気象の原因の一つは CO_2 による温室効果だと言われて久しいが、京都議定書で合意された CO_2 の排出削減目標は一向に達成できず、ことに日本では原発事故以来の火力発電のフル稼働にともなう化石燃料の消費とともにむしろ CO_2 の排出が増えてしまっている。このため、排出削減目標の数値を取り下げ、達成時期を先送にする有様である。そもそも事業目標や事業計画は、綿密な調査と周到な準備の基に策定されるべきものであるが、一時しのぎの思いつきや短絡思考によって作られた夢物語では国民は振り回されるばかりである。

福島の原発事故はいつ終息するかさえ見えない状態が続いている今、政策を立案される方々には襟を正して資源政策を再構築していただきたいし、国民の一人一人が自分の出来ることは何かを自問自答することで、少しでもよい世界を作りたいと思う。

さて、今号の MHC（Vol.20, No.2）は Web 化して 2 号目であるが、その使い勝手はいかがであろうか？　会員の皆様からの要望やご意見をいただき、より良い方向に持って行きたいというのが編集委員一同の思いである。

木村　彰方

「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。

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

学会事務局からのお知らせ

平成 23 年度総会で承認されました通り，平成 24 年度より，学会事務の一部を外部委託することとなりました。

委託業務は以下の通りです。

入退会手続
届け出事項の変更手続き
年会費請求手続き
学会誌等の発送

平成 24 年 5 月より，ご自身で会員情報にアクセスするオンラインシステムの利用が可能となりました。各種申請については，日本組織適合性学会ホームページ　URL：http://jshi.umin.ac.jp/ より行えます。

詳しくは，学会ホームページ　URL：http://jshi.umin.ac.jp/ にアクセスの上，「学会事務局からのお知らせ」をご覧ください。

また，これらに関するお問い合わせ，届け出については，学会事務支局 Email:jshi@nacos.com にて取り扱います。

その他の学会業務に関するお問い合わせは，従来通り学会事務局にて受け付けます。

学会事務局
〒 860–8556
熊本市中央区本荘 1–1–1
熊本大学大学院生命科学研究部　免疫識別学分野内
電話：096–373–5313
FAX：096–373–5314
E-mail：jshijimu@kumamoto-u.ac.jp

事務支局
〒 602–8048
京都市上京区下立売通東入ル
中西印刷株式会社　学会部内
日本組織適合性学会事務支局
電話：075–415–3662
FAX：075–415–3661
Email：jshi@nacos.com

MHC

Major Histocompatibility Complex
Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics
2013 年 8 月 10 日発行　　20 巻 2 号，2013
定価　2,000 円
発行　日本組織適合性学会（会長　西村　泰治）
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　西村　泰治）
〒 860–8556　熊本市中央区本荘 1–1–1
熊本大学大学院生命科学研究部　免疫識別学分野内
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