

日本組織適合性学会誌

第 21 巻第 2 号 平成 26 年 8 月 20 日発行

目 次

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 13 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内	83
認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる）	84
認定制度指導者講習会	85

平成 26 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

HLA 遺伝子群の多型データの活用	徳永 勝士	87
16th IHWS と 39th ASHI からみた HLA 検査の現状	小島 裕人	97
腎移植の現況と組織適合性検査のかかわり	湯沢 賢治	105

総説

ウシ MHC クラス II <i>DQA1</i> 遺伝子の多様性	竹嶋伸之輔, 間 陽子	119
---	-------------	-----

学会レポート

第 39 回アメリカ組織適合性学会（ASHI）の報告	小島 裕人, 木村 貴文	131
日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定		135
編集後記		138

第 13 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内

会 期：2015 年 2 月 7 日（土）9:30 ～ 17:00

会 場：大阪府赤十字血液センター 7 階会議室（大阪市城東区森之宮 2 丁目 4 番 43 号）

世話人：金光 靖（近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター）

yuketsu@med.kindai.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：2014 年 12 月 26 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ありません。

日 時：平成 26 年 9 月 13 日（土曜日）10:00 ～ 12:00

会 場：長崎市坂本 1-12-4：長崎大学医学部（坂本）キャンパス

テキスト：会場でのテキストの販売は、いたしません。学会ホームページ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、ご注意ください。

内 容：

1. 「HLA 遺伝子群の多型データの活用」
徳永 勝士
東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野
2. 「16th IHWS と 39th ASHI からみた HLA 検査の現状」
小島 裕人
公益財団法人 HLA 研究所
3. 「腎移植の現況と組織適合性検査のかかわり」
湯沢 賢治
国立病院機構水戸医療センター

認定制度指導者講習会

第 23 回日本組織適合性学会大会中の下記の特別講演 I ～Ⅲ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. 教育講演（認定 HLA 検査技術者講習会を兼ねる）
9 月 13 日（土）10:00 ～ 12:00
2. 特別講演 I：（タイトル未定：笹月教授）
9 月 14 日（日）11:00 ～ 12:00
3. シンポジウム I：感染症制御と MHC
9 月 14 日（日）14:00 ～ 16:00
4. 特別講演 II：T cell recognition of microbial vitamin metabolites presented by the MHC-I-related molecule MR1.
（Prof. McCluskey）
9 月 14 日（日）16:00 ～ 17:00
5. 特別講演 III：Living donor liver transplantation in patients with positive lymphocyte cross-matching. (Prof. Suh)
9 月 15 日（月）11:00 ～ 12:00
6. シンポジウム II：各臓器移植での抗体関連拒絶の現状と対策
9 月 15 日（月）13:00 ～ 15:00

平成 26 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

HLA 遺伝子群の多型データの活用

徳永 勝士¹⁾

¹⁾ 東京大学大学院医学系研究科・人類遺伝学分野

最高度の遺伝的多型性を示す HLA 遺伝子群は、輸血・移植領域にとどまらず、人類進化、親子鑑定・個人識別、疾患感受性、薬剤過敏症など幅広い分野で有効に活用されている。ここでは、日本人を含むアジア系集団の起源と形成、ナルコレプシー、B 型肝炎関連疾患などへの感受性と抵抗性、Stevens-Johnson 症候群などを例に取り上げ、我々の経験を中心に紹介する。

キーワード：HLA 遺伝子多型、東アジア集団、ナルコレプシー、B 型肝炎、スティーブンス・ジョンソン症候群

1. はじめに

HLA はいうまでもなく、(1) 移植・輸血における主要な適合性抗原として必須の検査対象となっており、これまでの講習会でも多く取り上げられている。また HLA は免疫応答の制御に重要な働きを果たし、機能を持つヒト遺伝子として最も高度な多型を示すことで知られている。この際だった多型は、(2) 親子鑑定、個人識別を目的とした遺伝標識（マーカー）として、(3) 人類集団の起源や形成過程を推定するための遺伝標識として、(4) さまざまな疾患、とりわけ各種の自己免疫疾患や感染症への感受性に関わる遺伝要因として、(5) 各種の薬剤への過敏症に関わる遺伝要因として、さかんに活用されている。ここでは上記 (3) ～ (5) の活用例を紹介したい。

2. HLA の集団遺伝学的活用

HLA 遺伝子群とくに HLA-A, HLA-B, および HLA-DRB1 遺伝子は最高度の多型を示すことから、卓越した遺伝標識となる。さらに、HLA ハプロタイプをも標識とすることにより、集団内の構造あるいは先祖集団の移住や混血の過程も推定できる。すなわち、(1) 特徴的な

HLA ハプロタイプのそれぞれがユニークなゲノム構造をもつ。(2) 各々の特徴的な HLA ハプロタイプは単一起源である。したがって異なる集団間に共通の HLA ハプロタイプが見られた場合、それらの集団は少なくとも一部、共通の先祖集団を持つ。(3) HLA アリルおよびハプロタイプの分布には明瞭な地域差・集団差がある。(4) 多数の人類集団について HLA 頻度データが蓄積されており、比較研究に適する。

HLA の際だった多型の維持には自然淘汰が働いているので、集団遺伝学的な研究には適さないという議論がある。理論的には正しいが、現実的には大きなバイアスにはならないというのが我々 HLA 研究者の経験である。図 1 はその一例で、HLA-A, -B, -DRB1 遺伝子群の多型に基づく東アジア集団の系統樹が、自然淘汰に「中立的な」24 種の多型に基づく系統樹と変わらないことがわかる。我々は最近、本土日本人、沖縄人、アイヌ人についてゲノム全域 90 万 SNP を解析して集団遺伝学的分析を行ったが、その系統樹も図 1 の 2 つの系統樹とよく一致していた (Jinam et al. J Hum Genet, 2012)。また、ゲノム全域 SNP データを日本の各地域で解析した結果から、地域差を最も顕著に示す SNP が HLA 領域にあることも報告されている (Yamaguchi-Kabata et al. Am J Hum

受付日：2014 年 7 月 5 日，受理日：2014 年 7 月 5 日

代表者連絡先：徳永 勝士 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

E-mail: tokunaga@m.u-tokyo.ac.jp

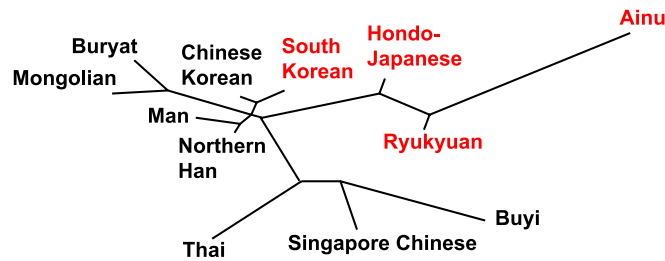
Hatta *et al.* Hum Biol (1999)

図 1-1 HLA-A, -B, -DRB1 遺伝子頻度に基づくアジア集団の系統樹

Omoto and Saitou, Am J Phys Anthropol (1997)

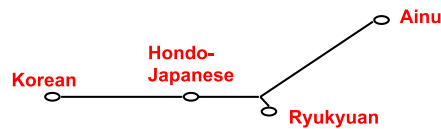


図 1-2 25 種類のタンパク多型頻度に基づく東アジア集団の系統樹

Genet, 2008)。

図 2 は、我々が長年アジア諸国の研究者と共同研究をしてきた成果に他グループからの報告も加え、世界の 48 集団における HLA 頻度データに基づき、多変量解析法を用いて遺伝的類縁関係を分析した結果である。まず、アフリカ系、ヨーロッパ系、東北アジア、東南アジア、太平洋、中南米の諸集団に分けられることがわかる。一見するとアフリカとヨーロッパの集団の近縁性が高いが、図には表示していない第三成分では、アフリカ諸集

団は他のどの集団からも離れている。

アジア系諸集団に着目すると、東北アジアで大陸に住む集団はクラスターを成すが、本土日本人はやや離れている。さらに離れて沖縄集団、サハリンに住むニブヒ族、さらにもう少し離れてアイヌ民族が位置する。その位置は、東北アジア大陸の諸集団と中南米の先住民のほぼ中間である。一方、東南アジアの諸集団が一つのグループを形成しているが、これに中国南部の少数民族や台湾人、シンガポール中国人が含まれる。すなわち、東アジア諸

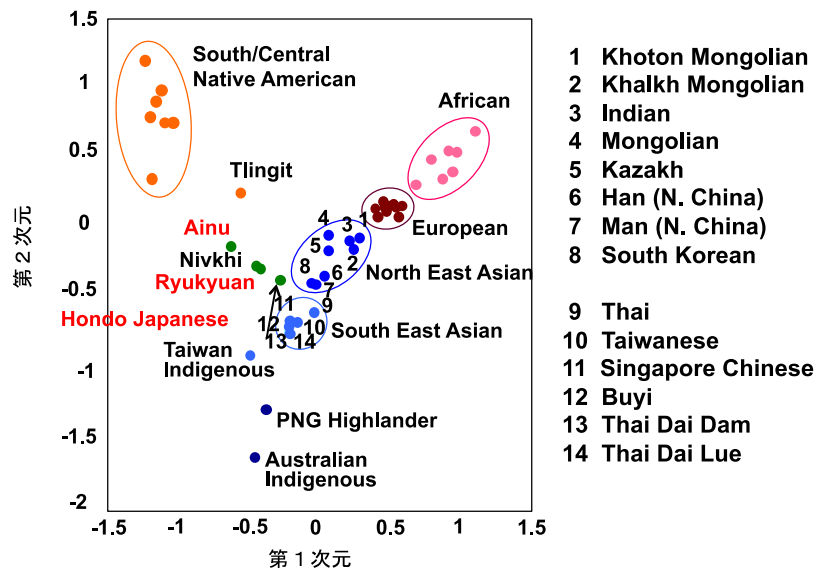
Tokunaga *et al.* Hum Immunol (2001)

図 2 HLA 多型を用いた人類集団の近縁図
(世界 48 集団, HLA-A, -B, -DRB1, 対応分析)

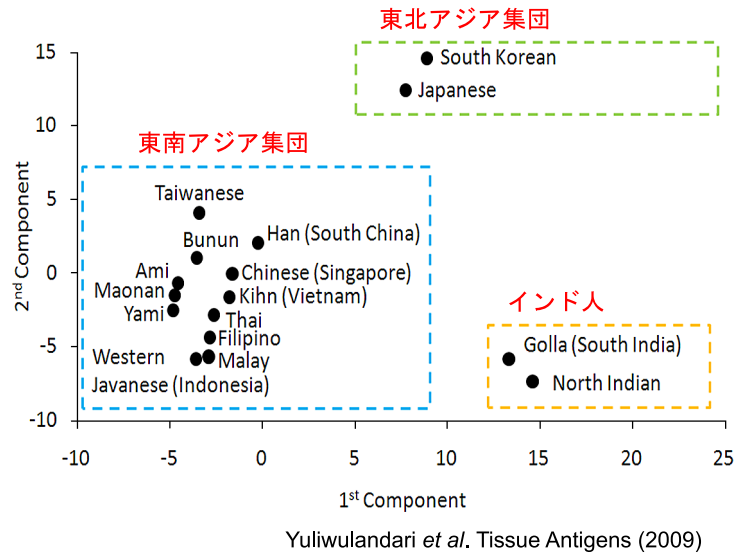


図3 HLA 遺伝子多型を用いたアジア系集団の類縁図
(HLA-A, -B, DRB1 ; 主成分分析)

集団が大きく北部グループと南部グループに分けられることがわかる。このことは、その後の中国、タイ、ベトナム、インドネシアなどの研究グループとの共同研究によっても確認された(図3)。

HLA ハプロタイプを見ることにより、集団の形成についてより詳細な考察が可能となる。我々は日本人に多い HLA ハプロタイプの分布を国内各地および近隣諸国で調べた結果から、A24-B52-DR15, A33-B44-DR13 など特徴的な HLA ハプロタイプを高頻度を持つ先祖集団が、いくつかの時期に、いろいろなルートを経て日本列島に移住・拡散したと推定した(Tokunaga *et al.* Prehis-

toric Mongoloid Dispersals, 1996)。

さらに我々は各々の HLA ハプロタイプがどのくらい以前に成立したのかを連鎖不平衡の強さから推定した(図4)。本土日本人に多いハプロタイプは特定のシンボルで表示し、いずれかひとつの集団でのみ頻度が高いハプロタイプは○で表した。本土日本人と韓国人は多くの HLA ハプロタイプを共有し、しかもそれらの年代推定値が比較的最近であることから、弥生時代前後の先祖集団の移住を反映しているものと思われる。沖縄集団では、本土日本人や韓国人と共通するハプロタイプが少数であることから、朝鮮半島を経由して日本列島に渡来した先

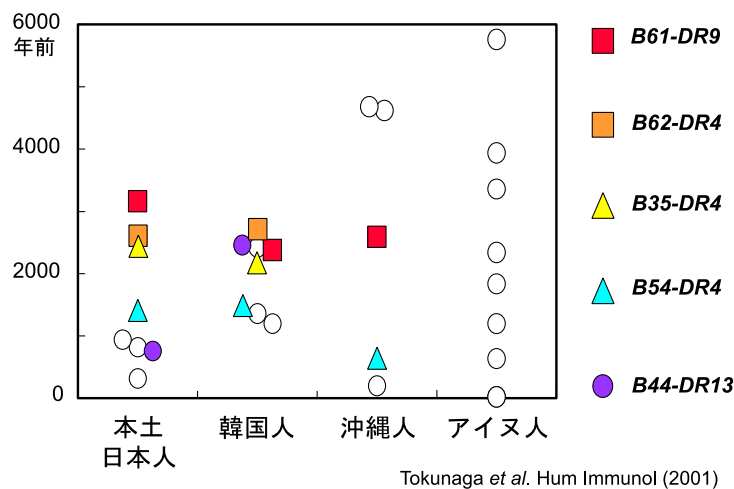


図4 主な HLA B-DRB1 ハプロタイプの年代推定
(組換え率 0.5%, 1 世代 20 年を仮定)

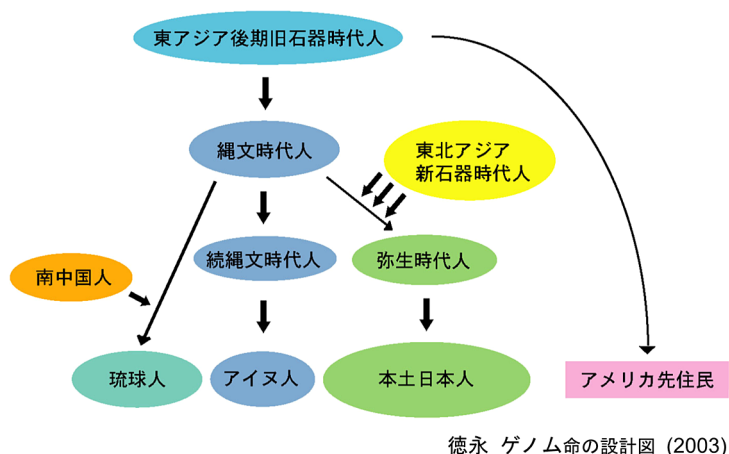


図5 日本列島の人々の成立一仮説

祖集団の影響は比較的小さいと考えられる。アイヌ民族に関しては、おもなHLAハプロタイプに他の3集団と共通するものがないことに加え、最も古いハプロタイプを持つとともに比較的最近のものも持つことから、縄文時代人の特徴を受け継ぐとともに、弥生時代以降にも本土日本人とは異なる集団との遺伝的交流があったと考えられる。

図5は、以上のようなHLAアليلおよびハプロタイプの分布調査とその結果に関する考察に基づいて推定した日本人の形成モデルである。まず、縄文時代人は東アジア後期旧石器時代人を先祖にもつと考えられる。この後期旧石器時代人の一部はアメリカ大陸に渡り、中南米の先住民の先祖となったであろう。縄文時代人の特徴はかなりの程度、続縄文時代人、そしてアイヌ民族に受け

継がれた。一方、弥生時代人は一部に縄文時代人の特徴を残しつつも、朝鮮半島などいくつかのルートを経て渡来した新石器時代人の影響を大きく受け、この特徴が現代の本土日本人にも受け継がれている。さらに、沖縄集団は縄文時代人の特徴を本土日本人より多く継ぐと同時に、弥生時代以降、南中国のいずれかの集団の影響も受けたと推定される。このように、日本列島に住む人々の成立過程においては、近隣の多様な先祖集団が異なる時代にさまざまなルートを経て移住・拡散した後、混血あるいは重層化して形成されてきた、そして現在も均質化は完了していないと考えられる。

3. 疾患感受性遺伝子としてのHLA

疾患感受性遺伝子をゲノム全体から探索する戦略とし

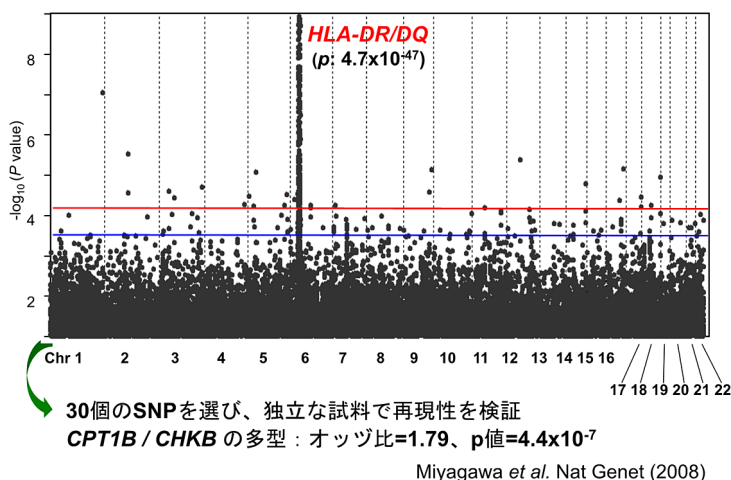


図6 ナルコレプシーのGWAS

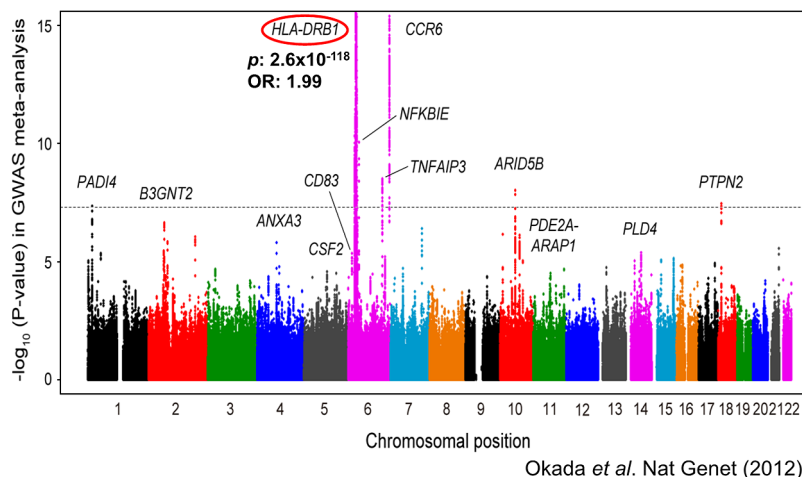


図7 関節リウマチの日本人大規模 GWAS メタ解析
(GWAS in 4,074/16,891; replication in 5,277/21,684)

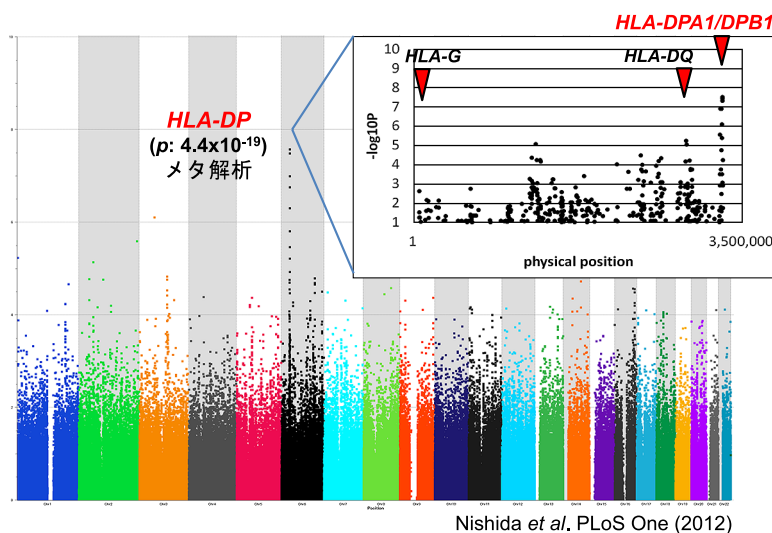


図8 慢性B型肝炎のGWAS

て現在最も多く使われているものがゲノムワイド関連解析 (GWAS) である。これまでに多数の疾患について GWAS が実施されてきたが、その中の多くについて HLA が感受性遺伝子であることが示されている。我々自身の経験でも、ナルコレプシー (図6)、関節リウマチ (図7)、慢性B型肝炎 (図8)、原発性胆汁性肝硬変 (図9)、1型糖尿病 (未発表データ)、インスリン自己免疫症候群 (未発表データ) などについて、いずれかの HLA 遺伝子座との強い関連を認めた。

ナルコレプシーについては、十字らが1984年に世界で初めて HLA-DR2 (HLA-DRB1*1501-DQB1*0602 ハプ

ロタイプ) との極めて強い関連を報告しており、我々の SNP-based GWAS によっても HLA-DR/DQ 領域に極めて強い関連が認められた (図6)。ヨーロッパ系集団やアフリカ系集団の HLA 解析結果も考え合わせると、第一義的感受性アリルは HLA-DQB1*0602 と推定される。なお、最近 HLA-DQB1*0602 とは独立な疾患関連 HLA-DQB1 アリルを複数同定している (宮川ら、投稿中)。

B型肝炎ウイルスに起因するいくつかの病態について GWAS を実施しており、慢性肝炎では HLA-DP 遺伝子群が最も強く関連することが分かった (図8)。続いて、韓国、香港、タイの研究者との国際共同研究で DPB1 遺

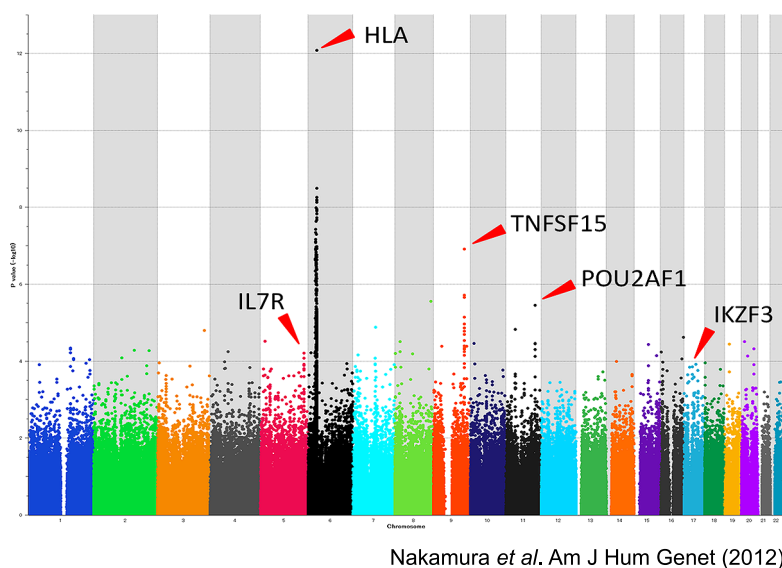


図9 原発性胆汁性肝硬変のGWAS

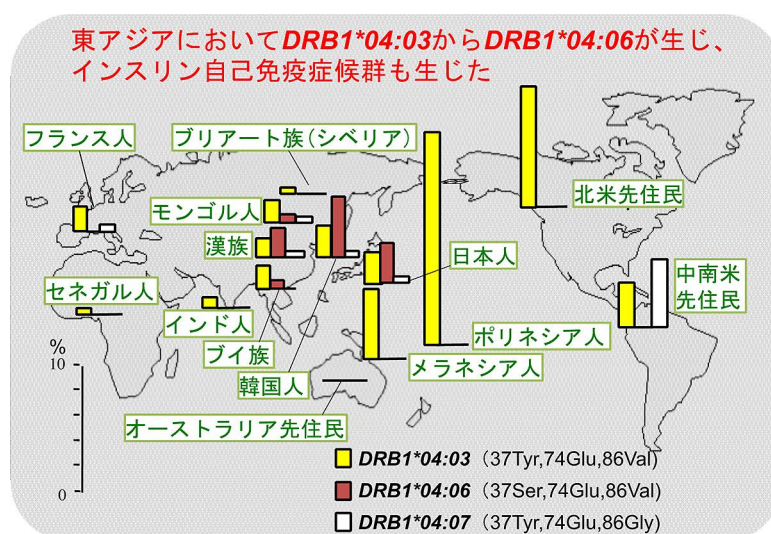


図10 世界における HLA-DR4 アリルの分布

伝子自体の多型解析を行ったところ、感受性、抵抗性それぞれに複数の DPB1 アリルが関連することがわかり、それらが集団を越えて再現された (表1)。興味深いことにアジア系集団およびヨーロッパ系集団では、感受性アリルと抵抗性アリルの頻度分布と慢性肝炎の有病率がよく対応している。さらに、DPB1*02:01 は慢性肝炎のみならず、肝硬変、肝癌への病態進展へも抵抗性であることがわかった (表2)。これらの結果は、HLA と疾患感受性の関連の分子機序の研究にも役立つ情報となる。

眼を転じて、HLA の多型進化と疾患の歴史が関連す

る例を示したい。我々はインスリン自己免疫症候群が HLA-DRB1*04:06 と強く関連することを見出したが (表3)、最近の GWAS によっても HLA-DRB1 が最も強い遺伝要因であることを確認した (内潟ら, 未発表)。この患者の大部分は日本人, 韓国人で, 欧米で報告される症例もほとんどが日系あるいは韓国系の子孫である。DRB1*04 グループの各アリルの塩基・アミノ酸配列および世界における分布を見ると, DRB1*04:03 を祖先型とし, 東北アジアの我々の先祖に生じた一つの塩基置換 (アミノ酸変異をもたらす非同義置換) によって

表 1 東アジア集団の慢性肝炎関連 *HLA-DRB1* アリル

日本	case (n=488)	control (n=464)			韓国	case (n=251)	control (n=140)		
	freq.	freq.	P-value	OR		freq.	freq.	P-value	OR
02:01	0.186	0.245	0.00213	0.71	02:01	0.191	0.239	0.1191	0.75
04:01	0.020	0.058	2.38×10⁻⁵	0.34	04:01	0.040	0.039	1	1.01
04:02	0.039	0.099	1.59×10⁻⁷	0.37	04:02	0.028	0.129	1.27×10⁻⁷	0.19
05:01	0.467	0.386	0.00036	1.40	05:01	0.538	0.368	5.13×10⁻⁶	2.00
09:01	0.157	0.087	3.70×10⁻⁶	1.94	09:01	0.040	0.018	0.136	2.28

香港	case (n=280)	control (n=156)			タイ	case (n=369)	control (n=122)		
	freq.	freq.	P-value	OR		freq.	freq.	P-value	OR
02:01	0.089	0.167	0.00092	0.49	02:01	0.084	0.107	0.3014	0.77
04:01	0.039	0.048	0.5997	0.81	04:01	0.065	0.119	0.00891	0.52
—					04:02	0.018	0.025	0.591	0.71
05:01	0.552	0.481	0.04769	1.33	05:01	0.360	0.320	0.2785	1.20
—					09:01	0.011	0.016	0.5056	0.66
13:01	0.100	0.074	0.2193	1.40	13:01	0.220	0.115	0.00025	2.17
					31:01	0.008	0.041	0.00143	0.19

(有意なアリルのみ表示)

Nishida, Sawai *et al.* PLoS One (2014)表 2 *HLA-DPB1*02:01* は肝硬変、肝癌にも抵抗性

<i>DPB1</i> allele	日本			韓国		
	LC+HCC (2n=412)	IC+CH (2n=522)	P-value	HCC (2n=286)	CH (2n=216)	p 値
02:01	0.131	0.226	0.0002	0.140	0.259	0.0009
02:02	0.131	0.023	>0.1	0.035	0.046	>0.1
03:01	0.053	0.046	>0.1	0.017	0.023	>0.1
04:01	0.027	0.017	>0.1	0.049	0.028	>0.1
04:02	0.032	0.044	>0.1	0.021	0.037	>0.1
05:01	0.495	0.448	>0.1	0.573	0.491	0.0710
09:01	0.158	0.151	>0.1	0.059	0.014	0.0103
13:01	0.027	0.015	>0.1	0.084	0.060	>0.1
14:01	0.017	0.015	>0.1	0.003	0.023	0.0891
others	0.015	0.016	>0.1	0.003	0.005	>0.1

Nishida, Sawai *et al.* PLoS One (2014)表 3 インスリン自己免疫症候群の歴史—*HLA-DRB1* との強い関連—

<i>HLA-DRB1</i> アリル	患者 (n=50)	健常者 (n=106)	オッズ比	p 値
04:06	42 (84%)	9 (8%)	56.6	<10 ⁻⁶
04:03	5 (10%)	7 (7%)	1.6	
04:07	1 (2%)	2 (2%)	1.1	
その他の型は省略				

Uchigata *et al.* Lancet (1992); Hum Immunol (2000)

*DRB1*04:06* が生まれ、インスリン症候群も生じたと推定される (図 10)。

4. 薬剤過敏症遺伝子としての *HLA*

HLA はまた薬剤過敏症とも関連することで注目されている。よく知られた例がふたつある。まず HIV の治療薬 abacavir によって引き起こされた過敏症について、

表4 スティーブンス・ジョンソン症候群と HLA の関連 (感冒薬に関連 ; 眼合併症を伴う)

	CM-SJS/TEN with SOC*	Control	Dominant Model	
	(n=151)	(n=639)	p	OR (95% CI)
A*02:06	71 (47.0%)	87 (13.6%)	2.72×10^{-20}	5.63 (3.81–8.33)
B*44:03	39 (25.8%)	95 (14.9%)	0.0013	1.99 (1.30–3.05)

* cold medicine related SJS/TEN with severe ocular surface complications

Ueta et al. Sci Rep (2014)

HLA-B*57:01 を持つ患者が 8 割近くにのぼり、オッズ比が 117 と報告された (Mallal et al. Lancet, 2002)。さらに台湾のグループが、てんかんの発作や向精神薬として用いられる carbamazepine によって引き起こされた過敏症 Stevens-Johnson syndrome (SJS) の患者 44 例全例が HLA-B*15:02 を持つことを報告した (Chung et al. Nature, 2004)。ただし、日本人においては HLA-B*57:01 は 0.1% 以下、HLA-B*15:02 に至っては極めてまれであるため、これらの先行報告と同じ関連はほぼ観察されないと予想された。

実際、薮田らは carbamazepine によって皮膚に生じた副作用と HLA-A*31:01 との関連を報告している (Ozeki et al. Hum Mol Genet 2011)。我々はこれらとは別に、眼症状を伴う Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis (SJS/TEN) について、HLA-A*02:06 などとの関連を報告した (Ueta et al. Am J Ophthalmol, 2007; Mol Vis, 2008)。また最近、一般的な感冒薬がその原因となり得ることを明らかにし、HLA-A*02:06 に加えて HLA-B*44:03 が独立なリスク遺伝要因であることを報告した (表 4)。さらに GWAS を実施した結果、HLA 以外の新たな遺伝要因を同定することができた (Ueta et al. 投稿中)。薬剤過敏症を含め薬剤応答性には遺伝要因の関与が強い傾向が見られ、今後さらなる遺伝要因の同定によって、リスク予測検査が可能になるかもしれない。

5. SNP 情報による HLA 型の imputation

最後に HLA 領域における SNP 解析の限界と HLA 遺伝子自体のタイピングの重要性を述べたい。まず、市販のゲノムワイド SNP タイピングアレイは HLA-DR 領域の SNP を解析できない。その理由として、HLA-DR 領域では DRB 遺伝子の数の多型 (copy number polymor-

phism ; DRB 遺伝子は B1 から B9 まで 9 種類あり、DRB のハプロタイプによって遺伝子構成が異なる) があるため、この領域の SNP は Hardy-Weinberg の平衡に適合しないことから市販の SNP アレイに搭載されていない。したがって、SNP-based GWAS の結果から HLA-DQ 領域が第一義的であるように見えたとしても、その隣に位置して極めて強い連鎖不平衡にある HLA-DR 領域も同様に候補であると考えなければならない。

また、HLA 遺伝子には多数のアリルが存在しており、個々のアリルと 1 対 1 に対応する SNP や SNP ハプロタイプはほとんどないことから、少数の SNP 情報から簡単に HLA アリルを推定することはできない。しかしながら最近、数十～数百という多数の SNP タイピングデータからヨーロッパ系集団では 90% 以上の精度で HLA imputation ができると報告された。我々も日本人のデータを reference にして imputation を試みたところ、90% 以上の精度で各 HLA 遺伝子の genotype を推定できること、ただし比較的間違いやすいアリルがあることや低頻度のアリルは推定し難いことがわかった (Khor et al. 投稿準備中)。したがって研究目的によっては有用な方法となるが、稀なアリルも含めた詳細な解析や検査目的には適さないと考えられる。

参考文献

- 1) 徳永勝士:ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子・薬剤応答性遺伝子の探索, フェルマシア 46(5): 421–431, 2010.
- 2) 徳永勝士 (編): HLA と疾患—最新トピックス, 医学のあゆみ 233 巻 13 号, 2010.
- 3) 徳永勝士:ゲノム全域の多様性解析からみえる人類移動, 「人類の移動誌」印東道子編, 臨川書店, 308–314, 2013.
- 4) 徳永勝士, 小池麻子:ヒトゲノムの多様性とバリエーションデータベース, 「ゲノム 医学・生命科学研究総集編」, 実験医学増刊 31(15): 173–180, 2013.

Applications of HLA gene polymorphisms

Katsushi Tokunaga¹⁾

¹⁾Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

Human MHC (major histocompatibility complex) or HLA genes exhibit the highest degrees of polymorphisms. These polymorphisms play important roles not only in transplantation and transfusion but also in various other fields including human evolution, paternity test, personal identification, disease susceptibility, and drug hypersensitivity. Our experiences in the studies on the origin and formation of East Asian populations, susceptibility and resistance genes to narcolepsy, hepatitis B virus-related diseases, and Stevens-Johnson syndrome are described.

Key Words: HLA polymorphism, East Asian, narcolepsy, hepatitis B, Stevens-Johnson syndrome

平成 26 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

16th IHWS と 39th ASHI からみた HLA 検査の現状

小島 裕人¹⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所研究検査課

HLA (Human Leukocyte Antigen) は移植に関わる検査が多く、より正確なデータをより早く提供することは検査側の責務である。検査の精度やスループットを上げるには、高価な機器や試薬、複雑な検査法が必要となるが費用、人力的な問題が発生するため、施設ごとに検体数や設備などによって最適の方法を選択しているのが現状である。

そのなかで検査精度の理想は、いつ、どこで、だれが、なにを (検体種類)、なぜ (検査目的)、どのように (検査方法) 検査しても同等の結果が得られることである。これは国内のみならず、国際的な観点からも同じことが言える。今回は、2012 年にリバプール (イギリス) で開催された第 16 回国際ワークショップ (16th IHWS) と 2013 年にシカゴで開催された第 39 回アメリカ組織適合性学会 (39th ASHI) からみた HLA 検査の現状について国内と比較して紹介していきたい。

キーワード: 次世代シーケンシング, HLA 抗体検査プロトコル標準化, エピトープ, 補体結合性 HLA 抗体

1. はじめに

HLA は主に造血幹細胞移植・輸血・臓器移植分野において検査が必要となる。造血幹細胞移植では移植前に HLA 遺伝子型検査をおこない、ミスマッチ移植であれば HLA 抗体検査を実施するのがスタンダードであり、輸血では主に血小板適合を図るため、臓器移植では移植片に対する HLA 抗体の有無を検査するために検査が実施される。輸血・臓器移植分野での HLA 抗体検査については DSA (Donor Specific Antibody) を評価する必要がある、HLA 遺伝子型検査も同時に実施する。

2. HLA 遺伝子型検査 (NGS; Next Generation Sequencing)

日本で現状の検査法は、PCR-rSSO 法 (Luminex 法, Line Probe Assay), PCR-SSP 法, PCR-SBT 法などであるが、例えば HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*15:01 の組み合わせと HLA-DRB1*04:10, HLA-DRB1*15:02 の組み合わせのように cis と trans の関係にある配列を区別するのは難しい。国際的な動きではこれらの検査法にとって代わ

る方法として、NGS を用いた検査が注目されており、cis/trans の Ambiguity を解消することができる。

16th IHWS では主に、1) タイピングする領域 (エクソン領域のみをタイピングする, short range PCR 法か、それとも遺伝子全領域をタイピングする long range PCR 法か)、2) シークエンシングのプラットフォームの違い、3) ソフトウェアを含めた解析法についての議論があったので、これらの面を紹介する。

1) Long range PCR 法と short range PCR 法

日本では、東海大学の椎名先生らが第 4 区域までの DNA タイピングの方法論を確立している。この方法はいったん long range PCR 法にて長断片を作製し、その長断片を制限酵素、超音波などで切断して、そこに次世代シーケンサー用アダプター配列と識別配列 (Barcode) を付加させて相補的なプライマーでさらに増幅させる。そして、エマルジョン PCR やブリッジ PCR など断片を個別化させて増幅させ、これをシーケンサーに読み込ませる。詳細な方法は、鈴木ら, MHC 19: 43-54, 2012 と尾崎ら, MHC 19: 211-222, 2012 を参照されたい。

受付日: 2014 年 6 月 6 日, 受理日: 2014 年 6 月 6 日

代表者連絡先: 小島 裕人 〒600-8813 京都市下京区中堂寺南町 134 京都リサーチパーク 1 号館 2F HLA 研究所研究検査課
TEL: 075-313-5201 FAX: 075-313-5202 E-mail: kojima@hla.or.jp

①	85	86	87	(アミノ酸番号)
DRB1*04:05	...	GTT GGT	GAG	
DRB1*15:01	...	GTT GTG	GAG	
②	85	86	87	(アミノ酸番号)
DRB1*04:10	...	GTT GTG	GAG	
DRB1*15:02	...	GTT GGT	GAG	

図 1 Ambiguity の例。86 番目のアミノ酸の由来が区別できないため、PCR-SSO 法のように相補配列の反応の組み合わせを基にした検査法の場合は①と②は同じ結果となる。

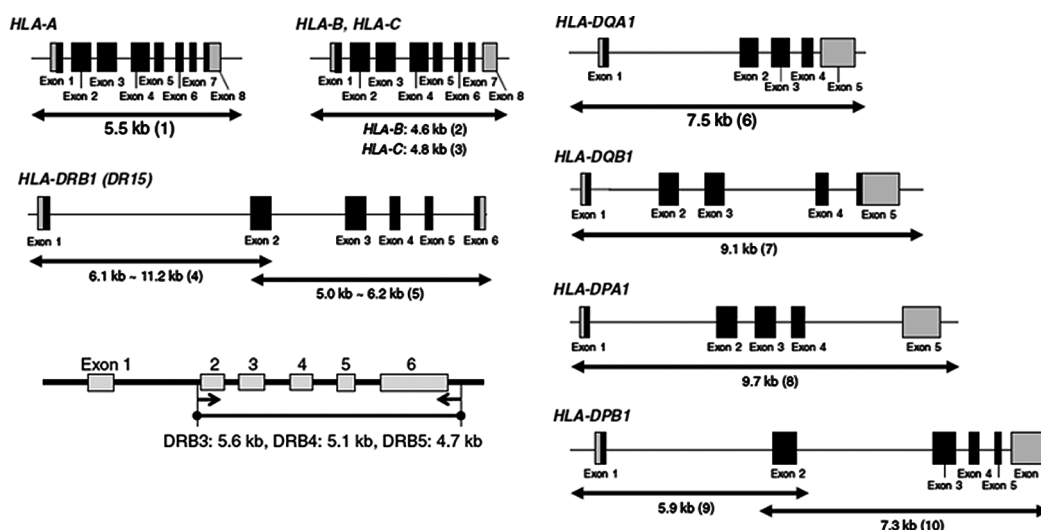


図 2 Long range PCR の Primer 設計位置

本法の欠点として、第 4 区域までの参照配列が乏しいこと、遺伝子全領域における臨床面でエビデンスデータが皆無であることから、現時点では臨床現場におけるアリル判定が困難であることが挙げられる。しかしながら本法はプロモーター領域、全てのエクソンやイントロンを含む領域における第 4 区域までの多型や変異を検出できる究極な DNA タイピング法であるため、国外での導入が既に検討されている。

一方、39th ASHI にて報告の多くはエクソーム解析である。これは HLA がペプチド断片や T 細胞などと接触する領域で、多型に富んでいる exon 2 と 3 をターゲットにして、short range PCR 法により増幅させた断片にそのままアダプター配列と識別配列を付加させて相補的なプライマーでさらに増幅させる。その後の行程は long range PCR 法の場合と同様である。技術的に long range PCR 法よりも簡便であるために臨床的に現実的な手法といえるが、煩雑な PCR 操作が要求される。

2) プラットフォームの違い

現在利用できる主なプラットフォームは 454 GS Junior (Roche), MiSeq (Illumina), IonPGM (Thermo Fisher Scientific, 旧 Life Technologies), Pacific Biosciences RS (Pacific Biosciences) である。それぞれに特徴はあるが、ここで MiSeq と IonPGM を簡単に紹介する。

① MiSeq

DNA 断片の個別化はブリッジ PCR で行う。つまり、

表 1 MiSeq と IonPGM の比較

項目\シーケンサー	MiSeq	Ion PGM
モード/チップ	通常モード	316/318 チップ
断片の個別化	ブリッジ PCR	エマルジョン PCR
原理	蛍光塩基 CCD カメラ	水素イオン検出
リード長	75 ~ 300 bp × 2	200 ~ 400 bp
リード数	4,400 ~ 5,000 万	100 ~ 500 万
出力	13 ~ 15 Gb	100 Mb, 1 Gb
シーケンシング時間	~ 24 時間 (2 × 75 bp)	数時間
	~ 65 時間 (2 × 300 bp)	

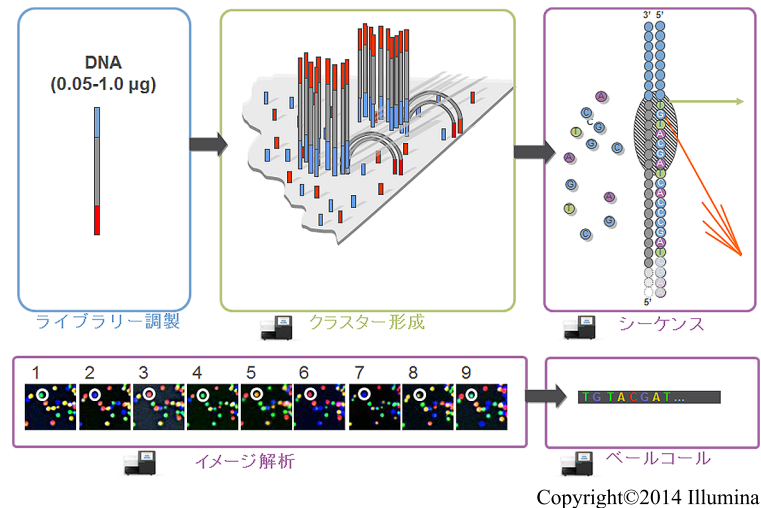


図3 MiSeq 検査原理

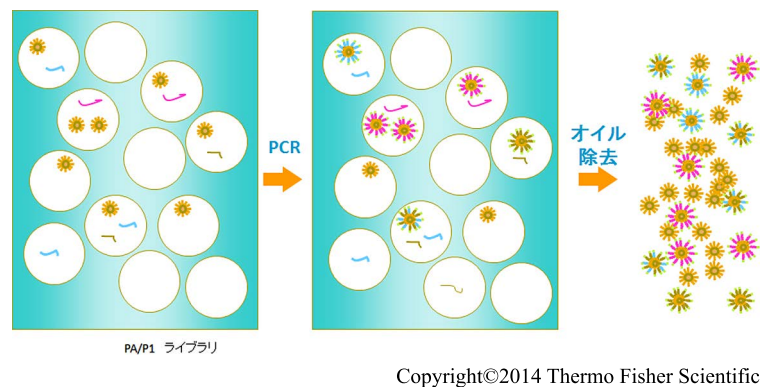


図4 エマルジョン PCR 原理

識別配列の相補反応でフローセルと DNA 断片の両端を固定し、さらに PCR で増幅させることで 1 種類の DNA 断片が～ 1,000 分子程度のクラスターを形成する。これに蛍光標識をした 4 種類の塩基を反応させ、1 反応ごとの蛍光信号を読み取る。

② IonPGM

DNA 断片の個別化はエマルジョン PCR で行う。つまり、水層と油層を混ぜ合わせてできるエマルジョンの水層にビーズと DNA 断片を 1 対 1 で反応させ、反応後に油層を除去する。検出は、塩基を 1 種類ずつ反応させて伸長反応の際に生じる水素イオン信号の有無によって決定していく。

これら機種他にも次々世代シーケンシング（1 分子リアルタイムシーケンシング）技術を搭載した PacBioRS（PacBio）を用いた DNA タイピングの開発が進められており、これまでのところ図 2 に示した領域に

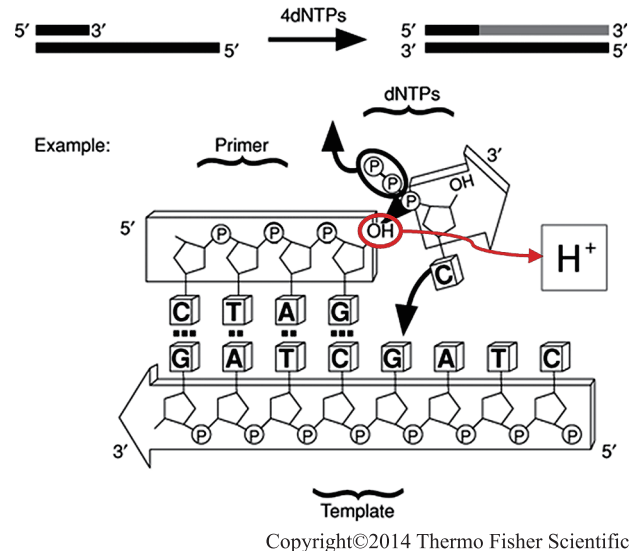


図5 IonPGM 検出原理

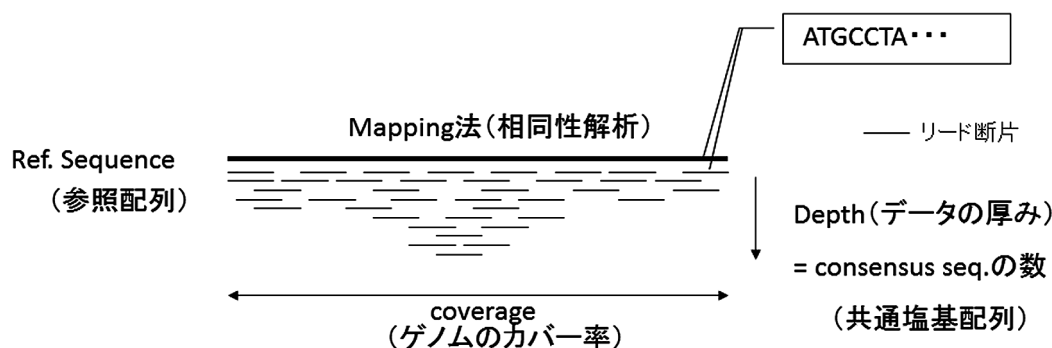


図6 Mapping 解析のイメージ

ついて良好なタイピング結果が得られている。

3) 解析面

解析方法の原理としては2種類あり、それぞれの断片ののりしろをつなぎ合わせて1本の配列を作り上げるDe novo解析と、既知の参照配列との比較で型を決定するMapping解析がある。前者は断片の向きや長さの問題、長さはのりしろの確実性に関わるが、これらの問題から技術的に難しいために現実的ではない。後者の方法に基づくアリル判定自動化ソフトウェアが多く開発されているが、タイピング結果の精度を上げることが課題となっている。

3. HLA 抗体検査 (Luminex 法)

最近10年の検査法の推移をみると、AHG-LCT法、LCT法、MPHA法などは減少傾向にあり、FlowPRA法は横ばいである。そして、近年の主流であるLuminex法の市販キットはLABScreen® (Onelambda)のシェアが圧倒的に大きく、次にICFA、WAKFlowが挙げられる。

1) 技術面

16th IHWSでもLABScreen® Single Antigen Beadsを用いたLuminex法が話題の中心となった。JSHIワークショップ同様、MFI値(Median Fluorescence Intensity)が低値になるほど施設間差が大きくなる傾向があり、21施設で方法の比較がなされた。その結果、SampleとBeadsの使用量やその比率、Washの回数、Dry Vortexの有無、2次抗体の使用量にばらつきがみられた。そして、これらの要素を考慮に入れた標準プロトコルを作成して4施設で再検査したところバラつきが抑えられる傾向にあったため、今後は施設数を増やして解析しようとしている。

日本でも同様の動きがあり、札幌北楡病院、東京女子

医科大学病院、名古屋第二赤十字病院、大阪府立急性期・総合医療センター、福岡赤十字病院の5施設で同等の結果が得られることを目的とした、共有化プロジェクトの一環としてプロトコルをメーカー推奨に統一した検討がなされている。

日差再現性と同時再現性はカットオフラインである1,000付近のnMFI(normalized Mean Fluorescence Intensity)でも10%以下のCV(%)となり、プロトコルをある程度統一すれば検査結果のバラつきを抑えられる傾向があるという国際的な考えをサポートしている。

2) 解析面

MFI値もさることながら、陽性Beadsの解釈も難しい。16th IHWSでは単独、もしくは2抗原(正確には2Beads)のみに反応している血清に特異性があることが明確となったが、これらの抗体の臨床的意義は不明のままである。

① エピトープ解析

抗体がHLA特異的かどうかを判断するひとつの手掛かりとして有用なのが、エピトープ解析である。エピトープとは抗体が認識する抗原の一部分で、抗原型が違っていても同一アミノ酸がエピトープとなり得る。同一エピトープを有する抗原型グループは交差反応を起こしやすい。

16th IHWSではエピトープを分類化し、命名法を定義する動きがある。まずは分類化であるが、これはLuminex法の判定とHLA Matchmakerによる解析から推測される。命名に関してはアミノ酸番号とその残基を用いて、表6のように示される。

これらのデータベースはインターネットで利用可能となっている。

② 臨床的に有用な検査法の選択(クロスマッチ法)

HLA抗体は諸外国のほうが圧倒的に臓器移植症例が多いため、その分野の話題が日本より多い。検査方法を

表 2 16th IHWS での 21 施設における検査条件の比較

21 Labs (US, UK, France, Germany, Italy, Australia)

	Serum Volume	Beads Volume	Serum/uL Beads	Washes	Dry Vortex	Conjugate	Vendor	comments
1	10	2.5	4.0	5	N	100	1L	
2	20	5	4.0	3	Y	100	1L	
3	10	2.5	4.0	3	Y	100	1L	
4	20	5	4.0	3	N	100	1L	5 ul Beads+5 ul water
5	20	5	4.0	3	Y	100	1L	
6	20	5	4.0	3	Y	100	1L	
7	20	5	4.0	3	N	100	1L	
8	20	5	4.0	4	N	100	1L	
9	20	5	4.0	3	Y	100	1L	
10	16	4	4.0	3	N	100	1L	
11	20	3	6.7	3	Y	100	1L	
12	16	2.5	6.4	5	N	50	1L	
13	20	3.5	5.7	3	N	100	1L	
14	12	5	2.4	4	N	100	1L/GP	
15	40	5	8.0	4	Y	100	1L	
16	50	2.5	20.0	4	Y	100	1L	
17	20	5	4.0	3	N	100	1L	
18	40	4	10.0	3	N	50	GP	
19	40	2.5	16.0	4	Y	100	1L	Biotin-IgG w/AV-PE
20	50	5	10.0	4	Y	100	1L	Biotin-IgG w/AV-PE
21	50	2.5	20.0	4	Y	100	1L	Biotin-IgG w/AV-PE

表 3 メーカープロトコール（第 2 回共有化プロジェクト）

	施設 A	施設 B	施設 C	施設 D	施設 E
凍結融解	実施				
超遠心	実施				
血清量	20 uL				
ビーズ量	5 uL				
プレート & チューブ	96 ウェルプレート			1.5 ml チューブ	
ビーズ分注	激しくボルテックスピペット後、しっかりミキシング				
反応条件	遮光しながら振とう器で 30 分間振とう				
反応時の温度	室温（約 25℃）				
洗浄	回数：3 回 or 2 回				
ドライボルテックス	行っている（2-5 秒程度）				

中心として、16th IHWS ではクロスマッチを Luminex 法を用いたバーチャルですか、CDC（complement-dependent cytotoxicity）で実施するかを pros and cons の形式で議論された。また、39th ASHI では補体結合性抗体の検査技術と、その結果の解釈のセッションが設けられた。

CDC はドナーリンパ球を用いるために、より現実に近い検査ができる。また、nonHLA 抗体も検出できるが、

ドナーリンパ球の入手が困難であること、感度が低いことが欠点となる。

Luminex 法はこの欠点を補うことができ、感度が非常に高く、ドナーリンパ球が不要で検査は簡便で高い再現性が得られる。DSA（donor specific antibody）の有無を検査するバーチャル適合試験に適しており、我が国の造血幹細胞移植領域では汎用される。しかし、リコンビナ

表 4 マーカープロトコールで同一血清を検査した 5 施設の nMFI (normalized Median Fluorescence Intensity) 値比較

施設 ピーズ	施設 A	施設 B	施設 C	施設 D	施設 E	%CV
B44	7,609	7,810	6,860	6,386	6,669	7.78
B45	7,316	7,756	6,786	6,270	6,480	7.89
B76	6,377	6,319	5,681	5,514	5,488	6.67
B44	5,440	5,479	4,998	4,833	5,126	4.83
B82	3,482	3,316	3,113	3,280	3,008	5.09
A1	1,140	1,202	1,057	1,118	946	7.94

表 5 16th IHWS にて確認された単独, もしくは 2 抗原のみに反応した血清の特異性

Mono- and Duo-specific Sera (n=1,123)				
	Alone	(%)	>1 with others	once with others
A11	17	1.51		A23, A43, B45, B54, B76
A29	8	0.71		A43, Cw8
A34	6	0.53		A66, B27, B45, B46, B67, B75
Cw5	6	0.53	B76 (2)	A2, B8, B73, B82
Cw17	10	0.89	A66 (2)	A23, A80, B37, B57, B76, B82, Cw1, Cw5, Cw7
B37	22	1.96	B47 (2)	A24, A68, A80, B27, B45, B76, Cw17
B76	17	1.51	B45 (5), B82 (2), Cw5 (2)	A1, A24, A30, A43, A80, Cw17
B45	8	0.71	Cw1 (2)	A11, A34, A80, B76
B63	6	0.53		Cw15
B67	6	0.53	A68 (5)	
B75	4	0.36		B8, B18, B46
B82	8	0.71		A1, A43, B44, B73, B76, B81, Cw5, Cw17
DR18	11	0.98	DR17 (4), DR52 (2)	DR9
DR4	21	1.87	DR52 (2), DQ7 (3), DP10 (2), DP11 (2)	DR53, DQ2, DP1, DP14
DP1	24	2.14	DP20 (7)	DR11, DR52, DQ4, DP4, DP11, DP23
DP10	9	0.80	DQ7 (2)	DR4, DR9, DQ6, DQ7
DP11	17	1.51	DR4 (2), DR13 (2), DQ4 (2), DQ8 (2)	DQ6, DQ7, DP13
DP14	6	0.53		DR4, DP3

表 6 エピトープの表記例

Locus	Epitope	Description	Epitope-Carrying Antigens
Class I	62GE	62G, 63E, 65R	A2, B57, B58
Class I	82LR	79R, 82L, 83R	All Bw4-carrying HLA-B and A23, A24, A25, A32
Class I	82LR+43Q	79R, 82L, 83R+43Q	All Bw4-carrying HLA-B
Class I	82LR+145RAA	79R, 82L, 83R+145R, 149A, 150A	All 82LR-carrying alleles except A25 and B13
DRB	12TSE	12T, 13S, 14E	DRB1*01:01/02/03, *09:01/02, *10:01
DRB	57V	57V, 58A, 60S	DRB1*07:01, *09:01, *12:01, B3*01:01, *03:01
DRB	57V+71R	57V, 58A, 60S+71R	DRB1*07:01, *09:01, *12:01
DQB	56PA	56P, 57A	DQB1*02:01, *02:02, *03:02

ント抗原をピーズにコートさせているために非特異反応を検出する可能性があるし、移植対象（造血幹細胞か、臍帯血か、腎か、肝か、心か、肺かなど）により、適切なカットオフ値を設定することが課題となっている。造

血幹細胞移植であればドナー変更が可能であるが、臓器移植では次のドナーを待たなければならなくなるので、高感度であることと非特異反応が検出されることが不利になることがある。

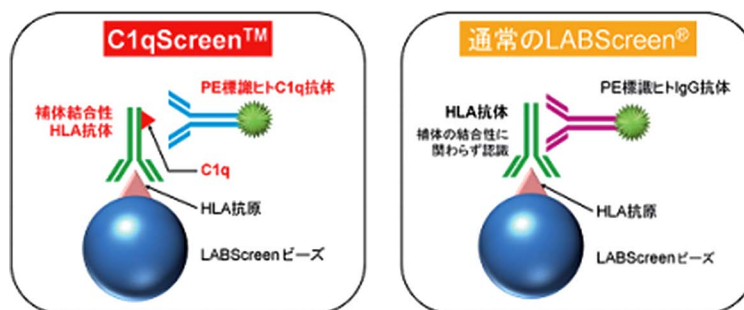


図7 C1qScreen™ の原理

臓器移植では、細胞性免疫よりも液性免疫が重要視されている。なかでも液性免疫の主たる反応は補体を介する抗体反応であり、HLA 抗体で最も重要なのは補体結合性抗体の検出と考えるのが国際的にはコンセンサスが得られている。実際には IgG のサブクラスのうち、補体結合性は IgG3>IgG1>IgG2>IgG4 の順で量的には IgG1>IgG2>IgG3>IgG4 の順である。

補体結合性抗体を検出するために C1qScreen™ (One Lambda) が注目されている。原理は C1q に対する 2 次抗体を使用する以外は、通常の LABScreen® と変わらない。MFI 値の施設間差や非特異反応の問題はあるものの、プロトコールの変更を重ねて CDC や C4d 染色、臨床との整合性は良好になりつつある。

4. おわりに

16th IHWS, 39th ASHI では、臨床と検査が手をつないでいるスライドを複数回みかけた。HLA 検査に限ったことではないが、臨床的に本当に必要な情報を発信することが検査側の責務であり、そのためには臨床で何が求められているかを知らんとすることは重要である。

HLA 遺伝子型検査では NGS によるタイピング、HLA 抗体検査ではエピトープ解析などが主役となりつつあるが、検査の正確さばかりを求めて数字だけがひとり歩きしないように臨床的意義を付加していくことがこれからの課題になるだろう。

参考文献および Web Site

- 1) 猪子英俊, 笹月健彦: 十字猛夫監修「移植・輸血検査学」, 講談社サイエンティフィク, 2004 年.
- 2) 吉原 哲, 佐治博夫: 造血幹細胞移植における HLA 抗体の臨床的意義. 臨床血液 53: 4, 2012.
- 3) Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, et al.: Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. Tissue Antigens. 2012 Oct; 80(4): 305–316.
- 4) Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, et al.: HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high-throughput sequencing. Tissue Antigens. 2014 Jan; 83: 10–16.
- 5) 鈴木ら: MHC 19: 43–54, 2012.
- 6) 尾崎ら: MHC 19: 211–222, 2012.
- 7) De Santis D, Dinanuer D, Duke J, et al.: 16(th) IHIW: review of HLA typing by NGS. International Journal of Immunogenetics. 2013 Feb; 40(1): 72–76.
- 8) Edited by Yongzhi Xi, HLA and Associated Important Disease. InTech, 2014 Mar.
- 9) Allele Frequencies <http://www.allelefrequencys.net/>
- 10) HLA epitope registry <http://epregistry.ufpi.br>
- 11) イルミナ株式会社ホームページ <http://www.illumina.co.jp/>
- 12) ライフテクノロジーズジャパン株式会社ホームページ <http://www.lifetechnologies.com/jp/ja/home.html>
- 13) 抗 HLA 抗体検査試薬 (LABScreen Single Antigen) 第 2 回 共有化プロジェクト結果報告 http://www.veritastk.co.jp/attached/5109/201400313_rinshoujin_standardization.pdf
- 14) ペリタスサイエンスライター. Vol. 1 2011.06 http://www.veritastk.co.jp/attached/2989/HLA_Transplantation_Vol1_1106.pdf

Trends of HLA allele typing and antibody testing in 16th IHWS and 39th ASHI

Hiroto Kojima¹⁾

¹⁾Department of Research and Testing, HLA Foundation Laboratory

The results of HLA allele typing and antibody testing are important especially in case of organ and hematopoietic cell transplantation. Therefore, the subjects about methodology and accuracy of result are sometimes focused on at conference. In fact, there were many subjects about HLA testing at 16th IHWS (16th International histocompatibility Workshop) and 39th ASHI (39th American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Conference). In the view of HLA allele typing, NGS (Next Generation Sequencing) was capturing the spotlight as new technology. And in the field of HLA antibody testing, the standardization of protocol in a technique, the epitope and complement fixing HLA antibody in an analysis were the major subjects. In this short review, I summarize the detail contents at 16th IHWS and 39th ASHI in HLA testing that is a little bit different from direction of Japan.

Key Words: next generation sequencing, standardization of HLA antibody test protocol, epitope, complement fixing HLA antibody

平成 26 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

腎移植の現況と組織適合性検査のかかわり

湯沢 賢治¹⁾

¹⁾ 国立病院機構水戸医療センター 臓器移植外科

腎移植の成績は、免疫抑制剤の進歩により、格段に良くなった。それまでは、拒絶反応を少しでも少なくするために組織適合性 HLA の一致が求められ、適合者が選択されてきた。しかし、免疫抑制剤の進歩により、HLA の適合度が腎移植成績に与える効果は低くなった。その後、高感度の抗 HLA 抗体検査が可能となり、組織適合性検査の重要性が見直されてきている。腎移植における組織適合性検査の重要性を認識できるよう、腎移植の現況を解説し、組織適合性検査の関わりの詳細を解説する。また、現在の組織適合性検査の問題点、今後の展望を述べた。

キーワード：組織適合性、腎移植、HLA、リンパ球クロスマッチ検査、抗 HLA 抗体

1. はじめに

臓器移植の歴史は、腎移植で始まった。今では当たり前のように行われている腎移植は、始まって 60 年にもならない。さらに、現在のような腎移植成績が得られるようになったのは 30 年前である。これは、ひとえに免疫抑制剤の進歩によるものである。1980 年代にシクロスポリンという優れた免疫抑制剤が開発されたことで、全ての臓器移植が、実験的医療から一般医療へと変わった。

この免疫抑制剤の出現以前には、拒絶反応を少しでも少なくするために組織適合性 HLA の一致が求められ、亡くなった方から提供される腎臓を受けるレシピエントには HLA の適合する者を選択してきた。また、生体腎移植では、HLA が少しでも一致する血縁者に限られていた。

しかし、免疫抑制剤の進歩により、HLA の適合度が腎移植成績に与える効果は低くなり、現在、生体腎移植では、成績が一番良いのは、HLA が半分一致している親子ではなく、本来 HLA が一致しない夫婦間での腎移植である。また、現在、日本臓器移植ネットワークで、亡くなった方からの臓器移植において、HLA の適合度でレシピエントが選択されるのは、腎臓と膵臓だけであ

る。心臓、肝臓、肺、小腸の移植では、レシピエント選択において HLA の適合度は関係ない。

それでは、臓器移植医療において、HLA、組織適合性検査は関係なくなったのかというと、そうではない。2000 年代になり、リンパ球クロスマッチ検査に代わる高感度抗体検査が可能となり、全ての臓器移植患者において、ドナーの HLA に対する特異的抗体と移植臓器機能廃絶とが関連することが明らかになった。さらに 2010 年代になり、抗体除去療法による移植予後の改善が明らかとなったことから、移植後も高感度な抗 HLA 抗体検査の必要性が明らかとなった。結局、臓器移植医療において HLA、組織適合性検査の重要性が見直されてきている。腎移植における組織適合性検査の重要性を認識していただくために、腎移植の現況を解説し、組織適合性検査の関わりの詳細を解説する。

2. 腎不全と腎移植

健康な人が病気になり、臓器の機能が低下した場合、内科では主に薬剤で治療し、外科では主に手術で治療する。しかし、どのような治療を行っても臓器の機能が低下すると臓器不全という状態になる。心臓ならば心不全、

腎臓なら腎不全となり、重症になれば命に関わる。この状態を改善し、命を救うには、臓器不全に至った臓器を取り替える「臓器置換」という方法以外にはない。この臓器置換には、人工臓器、臓器移植、再生医療がある。人工臓器は著しく進歩し、いろいろな臓器で救命できるようになったが、いまだに多くの制約がある。臓器移植は、臓器提供者が必要なこと、生涯にわたって免疫抑制剤が必要なことが大きな問題ではあるが、唯一完全な臓器機能が獲られる方法である。再生医療は、2012年に京都大学の中山教授がiPS細胞でノーベル賞を獲得して以来注目され、いずれ臓器を作ることができるとされたが、立体的で複雑な構造を持つ臓器が作ることができる目処はついていない。

ヒトが腎不全になると、老廃物や水分の排泄ができなくなり、体内の電解質バランスも崩れてしまうので、何もしなければ1週間ほどで死に至る。急性腎不全というのは、一時的な腎機能喪失で、種々の原因で発症し、一時的に血液透析などで補助することが必要なこともあるが、原因が除かれれば、必ず回復する。しかし、慢性腎不全は、一度この状態になると、腎機能が回復することはない。この慢性腎不全になる原因として現在、一番多いのは糖尿病で、43.8%もある。慢性腎不全で透析治療を受けている患者の数は、2013年12月末で、314,180人であり、このときの推計人口は1億2722万人であるから、国民405人に1人は透析療法を受けていることになる。

腎臓不全に対する臓器置換は、腎代換療法とよばれる。これには表1の方法があり、人工臓器の範疇には、血液透析と腹膜透析がある。血液透析は、通常、週3回、1回に4時間、患者の血液を体外に導き、ダイアライザーと呼ばれる透析器（人工の膜）に通し、血液中の老廃物

表1 腎不全に対する腎置換療法

人工臓器	血液透析 腹膜透析
臓器移植	腎移植 生体移植 献腎移植（死体腎移植）
再生医療	iPS細胞

や水分を取り除いて血液をきれいにし、血液を再び体内に戻す治療である。腹膜透析は、腹膜に囲まれた腹腔内に透析液を注入し、一定時間そのままにして、腹膜を介して血中の不要な老廃物や水分を透析液に移行させた後、その液を体外に取り出して血液を浄化する。いずれも、これらを持続すれば日常生活をすることも可能である。しかし、たとえば血液透析では、通常24時間、週7日（＝168時間）働く腎臓の機能を、1回4時間、週3回（＝12時間）で代行することになり、14分の1の時間で血液を浄化することになるので、体に対する負担は大きく、日常生活での制約も多い。

腎移植は、本来の腎臓が働くので、最も生理的といえる。提供者をドナー（donor）とよび、移植を受ける慢性腎不全患者をレシピエント（recipient）と呼ぶ。移植は、提供者がなければ成り立たない。かつて異種動物としてイヌやネコの腎臓をヒトに移植することが試みられたが、成功しなかった。ヒトからヒトへの移植は同種移植とよばれる。腎臓は、1人に2つあり、予備力もあるので、生きているヒトから1腎を提供することが可能であり、この生体腎移植と、死んだヒトから2つの腎臓を提供されて2人に移植する献腎移植がある。献腎移植は、かつて死体腎移植と呼ばれていたが、現在、この言葉は用いられない。献腎移植の提供者は、心臓が停止してからの提供と、循環が保たれたまま脳死での提供とがある。

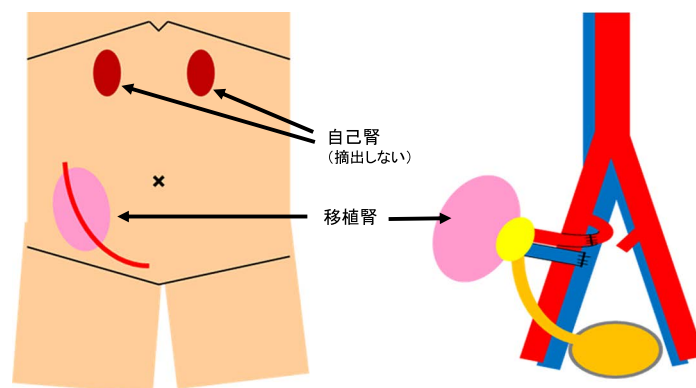


図1 腎移植手術

腎臓は、虚血状態に比較的強い臓器なので、心臓が停止してから摘出しても移植可能であるが、心臓、肝臓などは不可能で、脳死下の提供のみである。

腎移植の手術の方法を図1に示す。慢性腎不全として機能しなくなった自己の腎臓は摘出せず、そのままにしておく。移植腎は一般的には右下腹部、おへその右下に移植する。足に行く血管の脇に置いて、最初に静脈をつなぎ、次に動脈をつないで、最後に移植腎の尿管を膀胱へ直接つなぐ。

3. 腎移植の歴史

臓器移植の歴史を表2に示す。血管吻合を行う移植は1902年Ulmanが行ったイヌ腎移植が最初だが、本格的にさまざまな臓器移植実験を開始したのは細い血管の吻合法を考案したCarrellの1905年のイヌ、ネコの腎移植からであった。最初の臨床の腎移植は昇汞中毒患者に対する1936年Voronoyによる異所性死体腎移植であり、患者は36時間で死亡した。その後も各地で腎移植が試みられたが、何故か移植した腎が壊死する状態が見られた。この現象が免疫反応と解明されたのは、1940年代である。

そして、この免疫反応が起らない一卵性双生児間の腎移植が成功したのが、1954年である。このときの移植手術の術式は現在のものと全く変わらない。現在、慢性腎不全の治療として普及している血液透析は、1969年にダイアライザーの製造が開始され、1970年に開始され、一般化したもので、当時は行われていなかった。このため、「腎不全＝死」を意味し、たとえ、成功率が

限りなくゼロに近くても、腎移植に生存の一縷の望みをつないだ。

1970年代の終わりに画期的な免疫抑制剤シクロスポリンが開発され、全ての臓器移植に応用され、臓器移植成績の飛躍的な向上がはかられた。わが国でも1980年代に使えるようになった。また、1990年代になると、わが国の製薬メーカーが開発したタクロリムスが使えるようになり、より一層の成績向上が図られ、現在では、タクロリムスは世界中の全臓器移植患者の80%に使われるに至った。

ABO血液型不適合腎移植は、1982年にAlexandreが報告したが普及しなかった。献腎移植の少ない日本で1989年から東京女子医科大学高橋公太らの挑戦が始まり、ABO血液型適合移植と同等にまで成績を発展させ、生体腎移植の27%を占めるに至っている。

4. 腎移植の現況

2013年末、日本では31万人が血液透析を受けており、その中で献腎移植を希望して日本臓器移植ネットワークに登録している患者の数は、12,500人程度である。これまで、合計約3万人に腎移植が施行されてきたが、2013年には、生体腎1,431人、脳死からの献腎88人、心停止後の献腎67人であった。これまでの推移を図2に示す。

2013年の生体腎移植症例の内、夫婦間での移植は41%、ABO血液型不適合移植は27%、慢性腎不全で血液透析なしに直接腎移植になったのは30%、提供者の腎摘出術が侵襲の少ない腹腔鏡を使って行われたのが90%と

表2 臓器移植の歴史

1902年	オーストリア：Ulmann	イヌの腎臓を摘出し、首に移植
1905年	フランス：Carrel	イヌ、ネコで腎移植→拒絶反応
1906年	フランス：Jaboulay	ヒツジ、ブタ→ヒト 異種間腎移植
1910年	京都大学：山内半作	臓器移植実験を外科学会で報告
1936年	ウクライナ：Voronoy	死者の腎臓を移植→36時間後死亡
1940年代	イギリス：Medawar	移植免疫拒絶反応の解明
1954年	米国：Merrill, Murray	一卵性双生児間の腎臓移植→成功
1956年	新潟大学：楠隆光	腎臓移植→生存に寄与
1961年	英国：Calne	Azathioprine（イムラン）イヌ腎移植
1963年	米国：Murray	Azathioprine 腎移植
1967年	米国：Starzl	肝移植→成功
	南アフリカ：Barnard	心移植→18日間生存
1968年	世界で約100例の心移植→拒絶反応で死亡	
	札幌医大：和田寿郎	日本初の心移植
1972年	スイス：Borel	Cyclosporin A（シクロスポリン）発見
1978年	米国：Calne	Cyclosporin A（シクロスポリン）腎移植

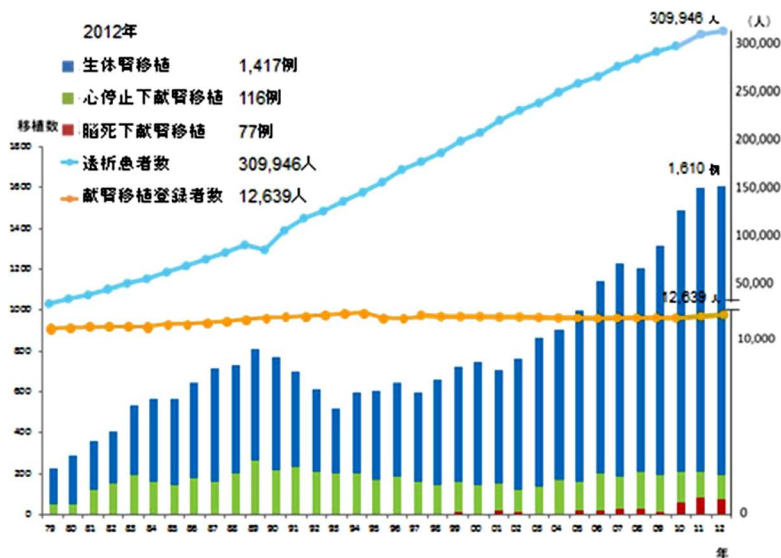


図2 透析患者数、献腎移植登録患者数と腎移植数の推移

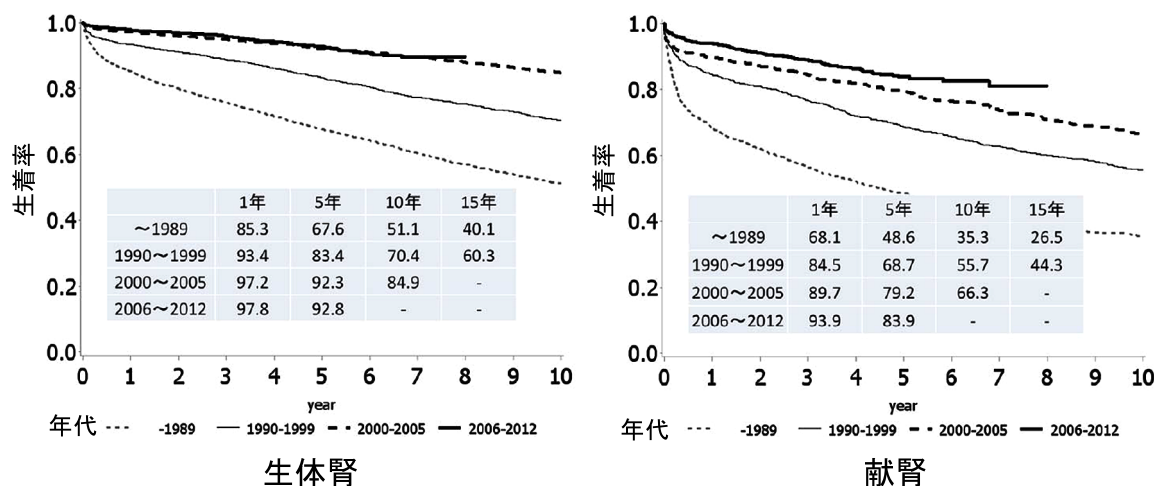


図3 腎移植 年代別生着率

集計されている。

年代別の腎移植成績を生着率として図3に示す。腎移植の成績向上は、免疫抑制剤の進歩だけではなく、移植に関わる感染症管理、合併症管理、臓器保存技術などの向上にも由来する。一般的に、腎移植では移植腎機能が廃絶しても、血液透析に戻れば死に至ることはない。最新の腎移植成績は、2006年から2012年の症例について、生体腎移植の5年生着率は92.8%で、献腎移植の5年生着率は83.9%である。

5. 腎移植の問題点

第1の問題は、提供者がいないことである。31万人の慢性腎不全患者がいるのもかわらず、毎年1600人

程しか腎移植が行われていないのは、提供者がいないからである。わが国では、腎移植の90%が生体腎移植であるが、本来、臓器移植は亡くなったヒトからの提供で行われるべきで、100%健康な人から健康な臓器を摘出することは、その人にとって何の利益にもならない。そればかりか、2013年には、生体腎ドナーが手術中および術後の合併症で2人が亡くなられた。一方、亡くなった方からの提供については、かつて脳死が人の死と認められておらず、脳死下の提供は行われてこなかったが、臓器は心停止下にも提供可能なので、1956年から行われている。臓器の移植に関する法律が1997年に施行された後、脳死下の提供は可能となったものの、全提供者数の増加はなく、2010年に改正施行されても、一向に提

供者数の増加はない。2012年まで毎年110人ほどの死後の臓器提供者があったが、驚くべきことに、2013年には84人に急減している。このため、現在、献腎移植を希望して日本臓器移植ネットワークに登録している患者の平均待機年数は17年となっている。

第2の問題は、免疫抑制剤を一生服用する必要があることである。腎移植において移植された腎臓の全ての細胞は提供者に由来するもので、移植を受けた患者の細胞に置き換わることはない。また、ヒトで免疫寛容状態の導入に成功したという報告もない。このため、免疫抑制剤は一生必要である。たまたま合併症などで、免疫抑制剤を中止しても移植腎が生着している症例が報告されることもあるが、非常に希なことであり、幸運といわざるをえない。全ての免疫抑制剤には、それ固有の副作用があり、さらに免疫抑制状態を作っているから、感染症、最近では特にウイルス感染症、悪性腫瘍の発生の問題もある。免疫抑制剤を中止しえる免疫寛容導入の試みはあるが、成功はしていない。

6. 腎移植における組織適合性検査

腎移植では組織適合性検査として、HLA（ヒト組織適合性抗原）検査とクロスマッチ検査がある。

HLAは、1952年にDaussetが輸血した患者に抗白血球抗体が存在することを見だし、1964年経産婦、妊婦にも抗白血球抗体があることから、発見された。このHLA検査法の確立には、1964年に日系アメリカ人Terasakiが考案したテラサキプレートが大きく寄与した（図4）。これは、微量の細胞と微量の血清でリンパ球障害試験を行えるもので、このトレーのおかげで、HLA検査とドナーリンパ球に対するレシピエントの抗体の有無を見るリンパ球クロスマッチ検査が普及した。HLAには、分子構造から、クラスI抗原系と、クラスII抗原系に分かれる。古典的にクラスI抗原系には、A、B、Cがあり、クラスII抗原系には、DR、DQ、DPがあり、いずれも多くの多型を持ち、免疫学的にも多様な機能を担っている。臨床的には、HLA検査として、A、B、DRを検査し、適合度の判定に用いている。

腎移植で、移植腎に血流再開の直後に抗原抗体反応で起こる超急性拒絶反応は、ドナーリンパ球に対するレシピエントの抗体によるもので、これを防ぐために、腎移植では必ずリンパ球クロスマッチ検査が行われる。これ

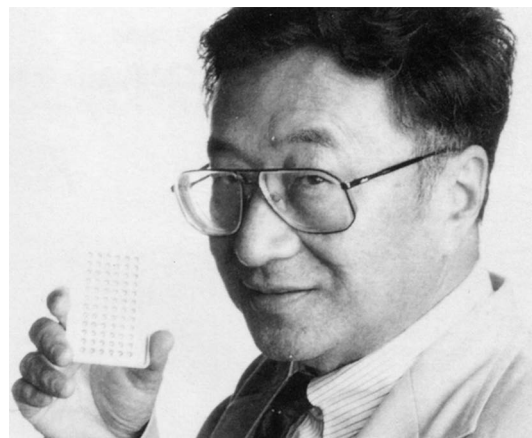


図4 Paul Teresaki とテラサキ プレート

は、結局、レシピエントにドナーのHLAに特異的な抗体があるかどうかを検査しているわけで、抗HLA抗体検査とも言える。つまり、従来、リンパ球クロスマッチ検査と呼ばれていたものが、ドナー特異的な抗HLA抗体検査であるとも言える。

これらの検査法の概要を示す。

① HLA 検査

テラサキ プレートによりにHLA検査が行われるようになり、この方法は血清学的手法で、リンパ球傷害試験（Lymphocyte Cytotoxicity Test; LCT）と呼ばれた。この検査のためには、産婦人科病院から出産時に出血した血液を集め、HLAの特異性をスクリーニングして抗血清として収集し、テラサキ プレートに分注し、配布するという手間が大変であった。私も若かりし頃、近隣の産婦人科病院を回り、出産時に出血した血液の収集、保存をお願いして歩いたことがあった。この方法は、これら的大変さから衰退し、後に、HLAに特異性を持つ単クローン抗体が分注されたテラサキ プレートが市販されるようになった。しかし、生細胞の生死を顕微鏡を用いて判定する困難さ、抗血清の交差反応性の問題などから、1990年代後半からDNAの多型性を直接検査して、HLA検査とするDNAタイピングに移行した。

1) LCT法（Lymphocyte Cytotoxicity Test）

補体依存性細胞傷害抗原抗体反応（Complement Dependent Cytotoxicity）試験で、CDC法とも呼ばれる。図5に示すテラサキ プレートの3mmの穴には蒸散防止のため流動パラフィンが満たしてあり、その底には特異性の明らかな1μlの抗血清（経産婦血清）が注入されており、ここに2000個のリンパ球を含む1μlの細胞液を加え抗

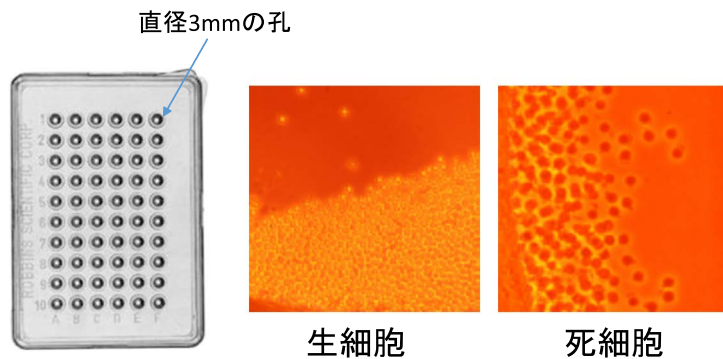


図5 テラサキ プレートと生細胞, 死細胞

原抗体反応の後, 5 μ l のウサギ補体を加え補体活性化反応により細胞傷害を起こさせる。ここに2 μ l のエオジンを加えることにより, 死細胞は染色され, 黒く膨化して見える。

死細胞の割合から, スコア化され, 強陽性から陰性まで5段階に判定されるが, 検査者の主観, 熟練度, 元の細胞の生存率に大きく左右されることがあり, さらに, 抗血清の交差反応性, スプリット抗原などの理解が必要で, 判定には習熟を要した。

2) DNA タイピング法

細胞に発現する糖タンパクである HLA の多型性は,

もともと DNA の多型性に依存しているので, HLA をコードする DNA の多型性を解析することにより, HLA を同定することが可能である。この DNA の多型性の解析方法には, 多くの方法があり, PCR-RFLP, PCR-SSP, PCR-SSO, PCR-SSCP, direct sequencing, RT-PCR がある。これらの詳細は成書を参照されるか, 日本組織適合性学会の HP からも参照できる。

一例として, 図6に PCR-SSP 法について紹介する。PCR プライマーの3'末端に HLA に特異的な配列をもったプライマー (合成オリゴヌクレオチド) を用いて, PCR 反応を行い増幅する。プライマー特異的に増幅さ

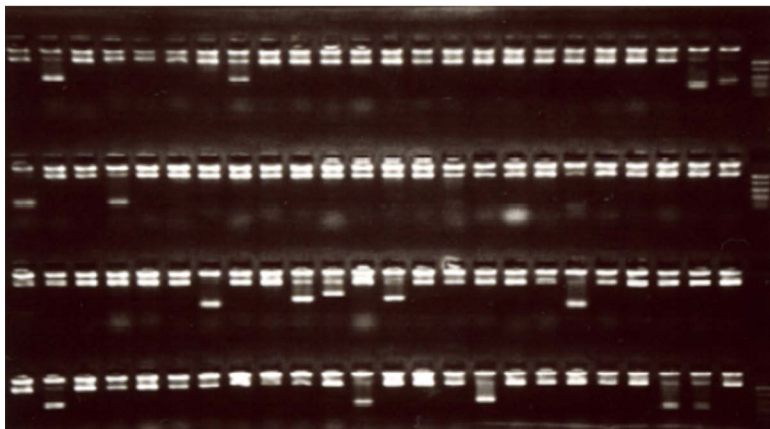
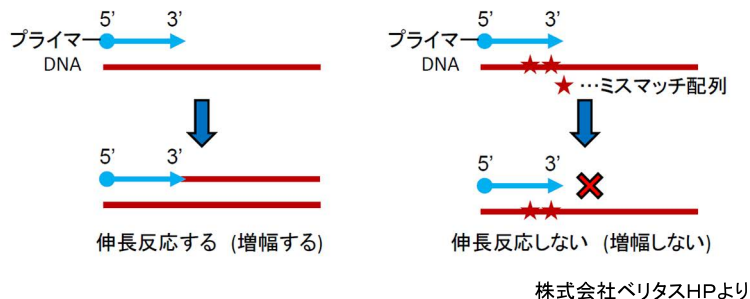


図6 PCR-SSP 法の原理とゲル電気泳動像

れたDNAバンドの有無をゲル電気泳動により解析する。PCR用の96穴プレートにHLAに特異的なプライマーが分注されたキットが市販されており、容易に用いることができる。1つの穴で1つのHLAを判定することになり、コントロールバンドが見えない場合、そのHLA型の判定は不能になってしまうという欠点がある。

日本臓器移植ネットワークに登録されている献腎移植希望登録者は全てHLAが検査され、登録されており、臓器提供候補者（ドナー）が現れた際には、ドナーのHLA検査をして適合者が選択される。この献腎移植希望登録者のHLA検査は、1990年代後半まではLCT法で行われてきた。DNAタイピングの導入にあたり、全ての登録者のHLAをDNAタイピングを用いて再検査したところ、多くのミスタイピングが発覚し、修正された。現在、全てDNAタイピングとなり、ミスタイピングは根絶されたと考えている。しかし、現行の登録データは血清学的なHLA抗原レベルの検査データで、低解像度（low resolution）で2桁レベルである。しかし、高解像度（high resolution）の4桁レベルのDNAタイピングの方が、より移植成績に関係するとされており、その導入が待たれる。

② クロスマッチ検査

腎移植での超急性拒絶反応を防ぐため、リンパ球クロスマッチ検査が行われてきた。従来はLCT法で行われて

きたが、より感度が高い方法が求められ、進歩して来た。

1) LCT法（Lymphocyte Cytotoxicity Test）

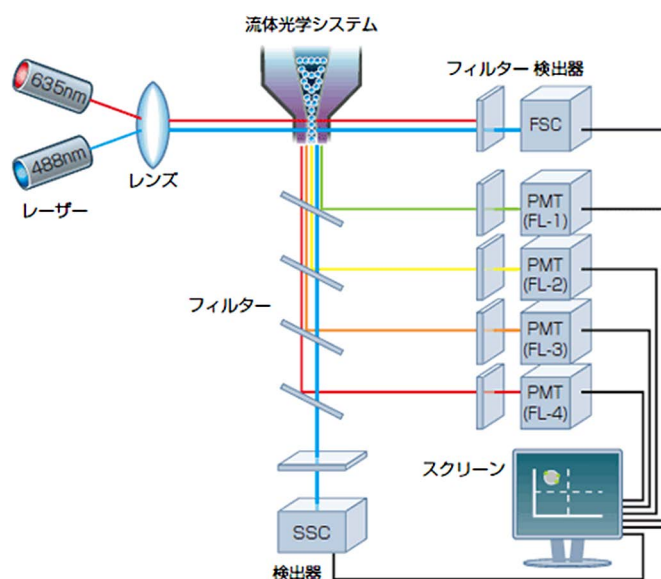
HLA検査のLCT法と全く同じ方法であり、前記の項目を参照されたい。抗血清の入らないテラサキプレートに、移植を受ける患者の血清1μlと臓器提供者のリンパ球を含む1μlの細胞液を加え、5μlのウサギ補体、2μlのエオジンを加え、死細胞を判定する。

2) AHG-LCT法

LCT法を改良し、ウサギ補体を加える前に血清と反応し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療法を検出できる方法である。リンパ球の表面抗原に結合した2分子のIgG抗体が近接していないと、補体活性化は起こらない。AHGはIgG抗体のL-chainに結合することにより補体活性化を起こすことができる。

3) DTT処理LCT法

臓器移植で抗体による拒絶反応を起こすのは、IgG抗体であるとされ、IgMである自然抗体の影響を受けないLCT法が必要である。このために、血清をDTT（dithiothreitol）で処理することにより、IgM抗体の影響を排除したLCT検査が可能となる。SLEなどで自己抗体を持つ患者では、通常のLCT法では、偽陽性となることが多く、献腎移植の機会がなくなってしまうので、本法の



コスモ・バイオ株式会社HPより

図7 フローサイトメーターの原理

導入は必須である。

AHGを用いて高感度にしようが、DTT処理で自然抗体の影響を排除しようが、これら1) 2) 3)の方法は、基本的にはLCT法であり、判定はHLA検査のLCT法と同様に、検査者の主観、熟練度、元の細胞の生存率に大きく左右され、さらに判定結果の解釈にも困難なこともあった。

4) FCXM法

移植を受ける患者の血清と臓器提供者のリンパ球を反応させ、抗ヒトIgG蛍光標識抗体を加える。さらに、Tリンパ球とBリンパ球を区別するために蛍光標識抗体(CD3, CD19)を反応させる。これをフローサイトメーター(図7)で解析し、リンパ球に結合するIgG抗体を検出する。感度は、従来のLCT法よりも高い。しかし、高価なフローサイトメーターが必要なことが欠点であり、検出感度が高いため、偽陽性もあり、患者のHLA抗体の有無、感作歴などと合わせた総合的な判断が必要である。また、操作法、判定基準、結果の解釈が施設によって異なり、統一されていないことも問題である。

③ 抗HLA抗体検査

腎移植での超急性拒絶反応予防のリンパ球クロスマッチ検査は、結局、レシピエントにドナーHLAに対する特異的抗体があるかどうかを検査していることになり、ドナー特異的抗HLA抗体検査とも言える。従来はLCT法で行われてきたが、より感度が高いFCXM法に進歩して来た。

それを更に高感度にしたものが開発され、もはや、生細胞を用いた方法(Cell-Based Assay)ではなく、純粋な抗体検査として、抽出したHLA抗原や精製HLA分子を用いた方法で、Solid-Phase Immunoassayと呼ばれている。これには、ビーズを使ったBead-based array assayの、1) Flow PRA、2) LABScreenと、トレーを使った、3) ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)とがある。これらの詳細は、昨年度の本講習会テキスト(石塚 敏, http://jshi.sakura.ne.jp/pdf/MHC20-2_ishiduka.pdf)を参照されたい。概略を示す。

1) Flow PRA

フローサイトメーターを用いて、抗HLA抗体を検出するもので、抽出HLA抗原や精製HLA分子がラテックスビーズにコーティングされたものを使う。コーティングの違いにより、screening, specific, single antigenの

3種に分けられる。screeningは、クラスI、クラスII用があり、各々30種のHLA抗原がコーティングされている。Specificは、1種類の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。single antigenは、リコンビナントHLA抗原がコーティングされている。

2) LABScreen

Luminexを用いて、抗HLA抗体を検出するもので、抽出HLA抗原や精製HLA分子がポリエチレンビーズにコーティングされたものを使う。コーティングの違いにより、mixed, PRA, single antigenの3種に分けられる。Mixedは、クラスI、クラスII用があり、1種類のビーズに3～5種類のHLA抗原がコーティングされている。PRAは、クラスIは55種類のビーズ、クラスIIは35種類のビーズに精製HLA抗原がコーティングされている。single antigenは、1種のビーズに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 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

抽出HLA抗原や精製HLA分子を固相化したトレーで血清を反応させ、ELISAトレーで発色を測定し、分析する。

7. 生体腎移植における組織適合性検査

生体腎移植では、腎不全患者が腎移植を希望したとして、腎提供者の選択に組織適合性検査が用いられる。このためには、HLA検査に加え、リンパ球クロスマッチ検査を行う。HLA検査は、クラスIとしてAとB、クラスIIとしてDRについておこなう。生体腎移植の41%を占める夫婦間での腎移植では、HLAが一致することはまれであり、HLAの一致率で生体腎移植ドナーを選ぶことはない。しかし、リンパ球クロスマッチ検査の陰性は絶対条件となる。従来、リンパ球クロスマッチ検査陽性は、腎移植の禁忌であったが、近年、血漿交換などの抗体除去療法に加え免疫抑制剤により抗体産生を強力に抑制することにより、腎移植は可能となり、良好な結果が得られている。

最近では、1人の人に2度目、3度目の腎移植をすることもあり、その際には、廃絶された移植腎により感作され抗HLA抗体が産生されていることもあり、高感度、高精度の抗HLA抗体検査が求められる。

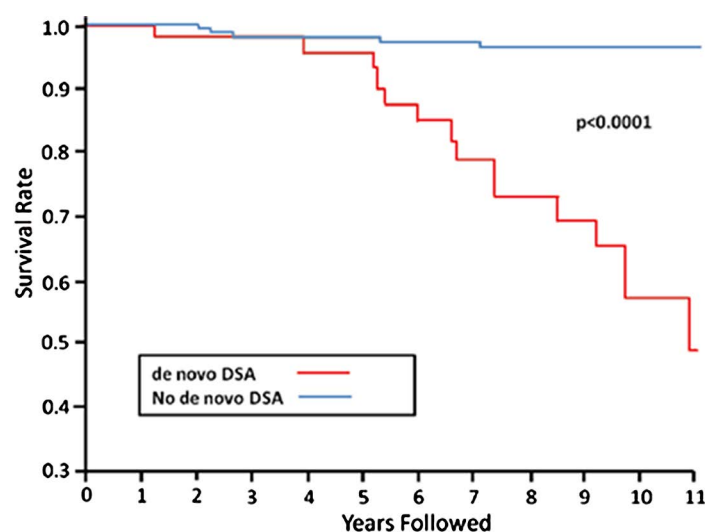
8. 献腎移植における組織適合性検査

日本臓器移植ネットワークに登録されている献腎移植希望登録者は、全てHLA検査が行われ、登録されている。このHLA検査は日本臓器移植ネットワークに登録された56のHLA検査施設に限定して行われている。臓器提供候補者（ドナー）が現れた際には、ドナーから採血した血液が、全国に18ある特定HLA検査施設に急送され、ドナーのHLA検査とリンパ球クロスマッチ検査が行われ、その結果で、登録者の中から適合者が選択される。このため、地域ごとの特定HLA検査施設に、その地域の全登録患者の血清を凍結保存しておき、リンパ球クロスマッチ検査に備えている。このための保存血清は、毎年、登録患者から郵送で収集し、各特定HLA検査センターに配分し、更新している。脳死での提供者に対応する特定HLA検査施設は、全国に7施設で、ここにはクロスマッチが必要な心臓、肺、膵臓移植希望患者の血清も保存されている。

日本臓器移植ネットワークにおけるレシピエント選択基準は、厚生労働省の「臓器の移植に関する法律の運用に関する指針（ガイドライン）」に関する作業班で決定される。献腎移植に関しては、「腎臓移植の基準等に関する作業班」で審議、決定される。2009年7月に改正公布された「臓器の移植に関する法律」が、翌2010年7月に施行される前に、指針（ガイドライン）の改訂が

必要となり、2009年10月、厚生労働省健康局長指名で、「腎臓移植の基準等に関する作業班」が7人の班員で組織され、私も班員として指名された。作業班では、親族提供の範囲、ドナー適応基準として感染症の扱い、レシピエント選択基準としてHLA適合性、クロスマッチ検査の方法、小児優先などが検討されることとなった。従来の腎臓移植希望者の選択基準では、前提条件として「リンパ球直接交差試験 陰性」とされていた。この「直接」というのは厳密にはLCT法を意味し、より高感度のAHG-LCT法やFCXM法は認められないことになる。そこで、私が「直接」の文字を消すことを主張し、2011年3月から「リンパ球交差試験 陰性」と改正された。しかし、リンパ球クロスマッチ検査が必要な他の臓器、心臓、肺、膵臓では「直接」の文字は残ったままである。

実際の運用にあたる日本臓器移植ネットワークの特定HLA検査センターでのリンパ球クロスマッチは、歴史的にLCT法が取られていた。しかし、より高感度のリンパ球クロスマッチ検査が求められ、特に西日本の施設ではAHG-LCT法やFCXM法が併用されてきたが、明確な結果判定基準や形式が統一されておらず、各検査センターの出す結果の報告形式も統一されていなかった。この結果、2012年の献腎移植においてレシピエントの選択で誤った判断がなされた。これが明らかになった2013年10月に厚生労働省から日本臓器移植ネットワークに「あっせん機関の業務の改善について」の通達が出



Clin and Transpl Research 2011, 91, 991-996

図8 DSAの有無による生存率の差

され、「検査方法や検査結果報告様式の統一化を着実に進めること」とされた。日本臓器移植ネットワークでは、移植検査委員会（委員長：湯沢賢治）で検討され、2013年11月に日本組織適合性学会に「死体臓器移植におけるリンパ球交差試験の検査方法の統一基準の検討について」の依頼が出された。これを受けて、日本組織適合性学会の標準化委員会（委員長：田中秀則）では、リンパ球交差試験について「統一の検査法としてFCXMを推奨する。」との結論で、回答した。日本臓器移植ネットワークでは、2014年4月から、腎臓と脾臓について「LCT法を実施し、かつFCXM法を実施すること」とし、結

果報告の様式も統一した。

9. 腎移植後の抗 HLA 抗体検査

腎移植での超急性拒絶反応を予防するためのリンパ球クロスマッチ検査は、ドナー特異的抗 HLA 抗体検査とも言える。このドナー特異的抗 HLA 抗体は、DSA (donor specific antibody) と呼ばれ、2000 年代から前記した抗 HLA 抗体検査法によって高感度の検出が可能となり、DSA の存在が移植臓器予後に深く関わっていることが明らかになった（図 8）。また、DSA が臨床的に明らかになる前から移植臓器に傷害を及ぼしてきていることが

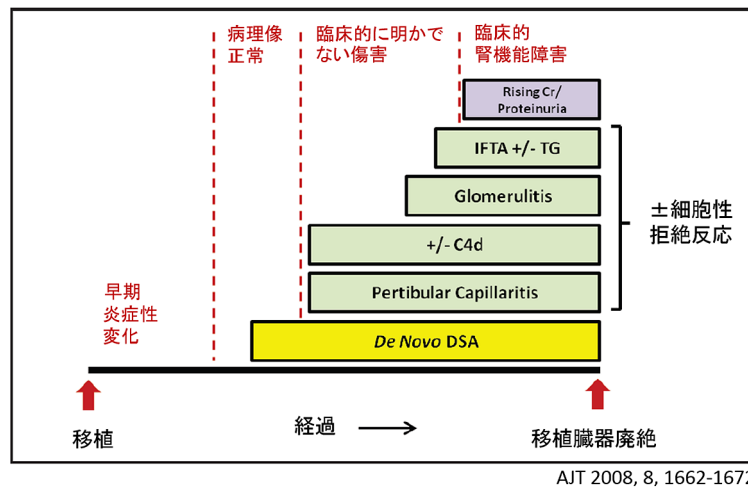


図 9 移植から廃絶までの DSA の関与

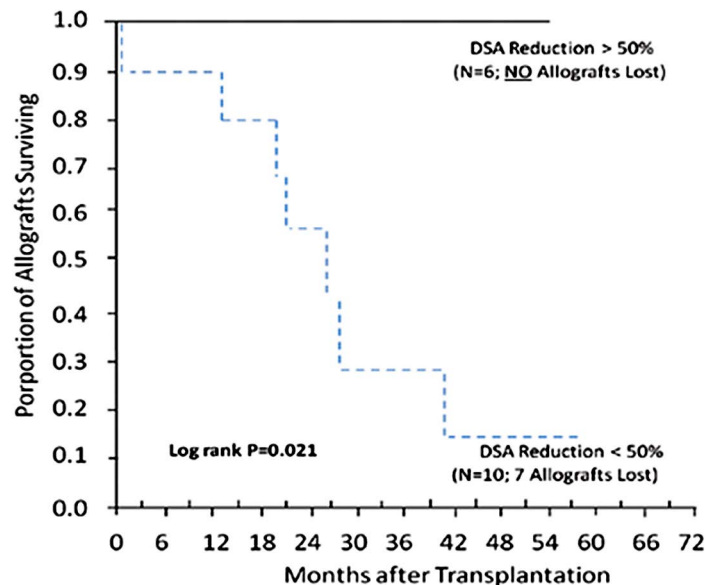


図 10 DSA 除去による生着率の差

示された(図9)。その後、このDSAを除去する治療により予後が改善することも明らかになった(図10)。今後、積極的なDSA検査としての抗HLA抗体検査をすることによって、DSAを検査し、陽性になった場合、積極的なDSA除去療法を行うことにより、移植臓器の予後改善が見込まれる。

10. 自験例

私の施設で経験した症例を表3に示す。夫婦間の生体腎移植で拒絶反応なく約5年が経過していた。約5年を経過した頃、腎機能を示す血清クレアチニン値(Cre)が軽度上昇し、尿蛋白が陽性になった。このため、移植腎生検と抗HLA抗体検査を行った。図11が移植腎組織のC4d蛍光抗体検査の結果でC4d陽性として、抗体

関連型の拒絶反応と判断した。また、抗HLA抗体スクリーニング検査(図12)により、クラスII抗体陽性との結果で、抗HLA抗体シングル同定検査により、ドナーに特異的なDR14, DR15が陽性と判断された。

その後の経過を表4に示す。DSAによる抗体関連型拒絶反応との診断で、血漿交換を1回、二重濾過血漿交換を2回、副腎皮質ホルモンのパルス療法を行った。これにより移植腎機能は改善し、尿蛋白の消失した。

ドナーに特異的な抗HLA抗体、DSAによる拒絶反応を発症したものの、正確な診断で、適切な治療を行い、移植腎機能を回復することができた症例である。

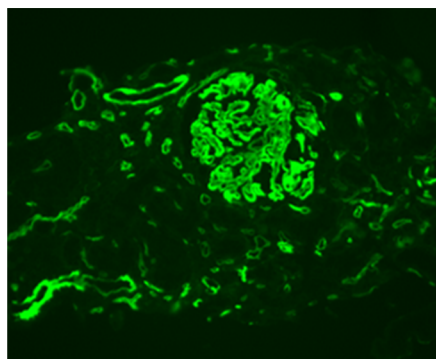
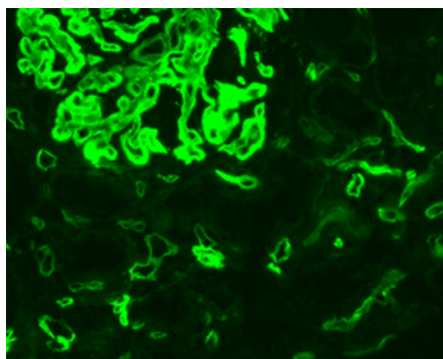
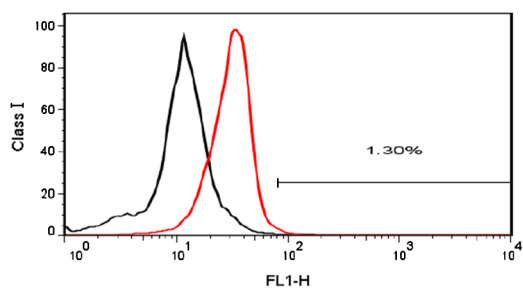


図11 移植腎組織のC4d蛍光抗体検査

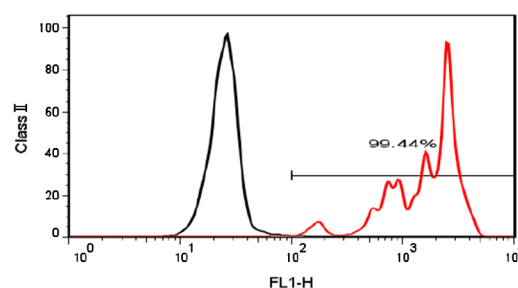
Class I



黒 : Negative Control

HLA抗体(Class I)	陰性
%PRA	1.30

Class II



黒 : Negative Control

HLA抗体(Class II)	陽性
%PRA	99.44

図12 抗HLA抗体スクリーニング検査

表3 腎移植症例の経過 1

2007年 4月	生体腎移植 レシピエント HLA :	夫婦間 A24, 26 B60, 61 DR4, 9	O → A 型
	ドナー HLA :	A2, 24 B52, 61 DR14, 15	
2012年 1月	Cre 1.8	尿蛋白 (-)	
3月	2.0	(+)	
4月	2.4	(+)	
		腎生検 抗 HLA 抗体検査	

表4 腎移植症例の経過 2

2012年 4月	抗体関連型拒絶反応 血漿交換 1 × 二重濾過血漿交換 2 × 副腎皮質ホルモン パルス療法		
経過 4月	Cre 2.4	尿蛋白 (+)	
6月	1.6	(-)	
9月	1.3	(-)	

11. 組織適合性検査の問題点

① リンパ球クロスマッチ検査の標準化

「献腎移植における組織適合性検査」に記したように、これまで日本臓器移植ネットワークの特定 HLA 検査センターでは、臓器提供者が現れたときのリンパ球クロスマッチは、LCT 法で行われていた。しかし、一部の施設で AHG-LCT 法や FCXM 法が併用され、報告様式が統一されていなかったこともあり、誤った臓器配分がされた。このため、日本組織適合性学会の協力のもと、2014 年 4 月から、腎臓と脾臓について「LCT 法を実施し、かつ FCXM 法を実施すること」とし、結果報告の様式も統一した。日本組織適合性学会では、リンパ球交差試験について「統一の検査法として FCXM を推奨する。」との結論を出しているが、移植臓器、特に心臓移植の特殊性、腎臓以外のレシピエント選択基準の「直接交差試験」との記載から、LCT 法を除くことはできず、LCT 法と FCXM 法を両方行うこととなった。この際に、2つの方法の結果に乖離があった時の解釈も未解決である。諸外国では、もはや FCXM 法のみが施行されている国が多い。

② 精度管理

HLA 検査が LCT 法で行われていた頃、その結果は、検査者の主観、熟練度、元の細胞の生存率に大きく左右されることがあり、さらに、抗血清の交差反応性、スプリッ

ト抗原などの理解が必要で、判定には習熟を要した。現在、DNA タイピングとなり、HLA 検査のミスタイピングは激減した。一方で、リンパ球クロスマッチ検査では、LCT 法では HLA 検査の LCT 法と同様の問題があり、FCXM 法でフローサイトメーターの操作方法、判定基準、報告様式が統一していない。

これらの問題を解決するために、日本組織適合性学会では、1997 年抗血清を用いた HLA ワークショップを開催し、1997 年から DNA を用いた QC ワークショップを開催してきた。そして、2005 年からは抗体部門が開催され現在に至っている。しかし、日本組織適合性学会では生細胞を郵送できないとの規定により、実際のリンパ球クロスマッチ検査の精度管理が不可能であった。このため 2013 年から日本移植学会が全血を送付するかたちで共同し、名実ともにリンパ球クロスマッチ検査の精度管理が可能となった。

しかし、いまだ抗 HLA 抗体検査の精度管理は行われていない。

日本臓器移植ネットワークでは、HLA 検査施設、特定 HLA 検査施設に対し、「日本組織適合性学会の QC ワークショップに参加することが望ましい」と述べている。

③ 検査費用

日本臓器移植ネットワークの特定 HLA 検査センターで LCT 法と FCXM 法が併施されることとなったが、今のところ、それに対する検査費用の増額は決定していない。

移植患者における抗 HLA 抗体検査は、造血幹細胞移植において 2012 年に保険収載され、保険で検査費用が賄われることとなった。しかし、臓器移植においては、2014 年に保険収載を目指したものの認められなかった。臨床的に非常に意味のある検査で、移植成績向上に必須のことであるだけに残念なことである。

12. 組織適合性検査の今後の展望

日本臓器移植ネットワークに登録されている献腎移植希望登録者は、全て HLA 検査が行われ、登録されている。臓器提供者（ドナー）が現れた際、ドナーから採血した血液が、全国に 18 ある特定 HLA 検査施設に急送され、ドナーの HLA 検査とリンパ球クロスマッチ検査が行われる。そのために、特定 HLA 検査施設には登録患者の血清が凍結保存され、毎年更新される。このシステムでは、ドナーリンパ球を用いた HLA 検査と登録患者の保存

血清とドナーリンパ球のクロスマッチ検査を緊急的に行うということになる。現在のシステムでは、特定 HLA 検査施設の負担が多く、将来的に維持していくことの困難が伴う。

現在、抗 HLA 抗体の検査は、非常に高感度で、全ての HLA の特異性に対する抗体の検出が可能となっている。現在のリンパ球クロスマッチは、登録患者がドナーに対する抗 HLA 抗体をもっているかの検査であるから、全登録患者にあらかじめ、全ての HLA の特異性に対する抗 HLA 抗体の有無の検査をしておけば、実際にドナーのリンパ球を使ったクロスマッチを行わなくとも、ドナーの HLA だけが分かれば、クロスマッチの結果は推測できる。これがヴァーチャル クロスマッチであり、ドナーの HLA 検査のみが緊急的に行われればよいことになる。このためには、全登録患者の詳細な抗 HLA 抗

体の検査が必要になり、相当な費用が必要であるが、毎年の血清収集保存、緊急的なリンパ球を用いたリンパ球クロスマッチ検査が不要になり、その意義は大きい。このバーチャル クロスマッチを用いた臓器配分がヨーロッパで試験的に行われており、良好な結果を得られていると聞く。大きな改革になるが、現行のシステム維持の困難さから、一考に値するものと考ええる。

参考文献および Web Site

- 1) 臓器移植ファクトブック 2013 <http://www.asas.or.jp/jst/pdf/factbook/factbook2013.pdf>
- 2) HLA 検査法 http://jshi.umin.ac.jp/what_hla/hla_typing.html
- 3) DNA タイピング検査 http://jshi.umin.ac.jp/what_hla/dna_typing.html
- 4) 石塚 敏：臓器移植における HLA 抗体検査について. MHC 20: 121-129, 2013. (http://jshi.sakura.ne.jp/pdf/MHC20-2_ishiduka.pdf)

Renal transplantation and the role of histocompatibility testing in it

Kenji Yuzawa¹⁾

¹⁾Department of Transplantation Surgery, National Hospital Organization Mito Medical Center

The graft survival after renal transplantation has been improved especially after the development of new immunosuppressive drugs. Before that, in the better matching of HLA we selected the donor, the better survival of the graft we could get after renal transplantation. Now, many people think the role of histocompatibility matching became less important. But it's not true. In cadaveric donor renal transplantation, no mismatch of the HLA leads excellent survival of the graft. Before and after organ transplantation, using high sensitive anti-HLA antibody testing developed recently, we can predict and prevent the antibody mediated rejections. To understand the importance of histocompatibility testing in organ transplantation, the present status of renal transplantation is reported. Moreover, the problems of the histocompatibility testing in present organ transplantation and the outlook of histocompatibility testing for the future are described.

Key Words: histocompatibility, renal transplantation, HLA, lymphocyte crossmatch, anti-HLA antibody

総 説

ウシ MHC クラス II *DQA1* 遺伝子の多様性竹嶋伸之輔¹⁾・間 陽子¹⁾¹⁾ 理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット

ウシ MHC クラス II 領域は、15 Mb 長の DNA 挿入により非古典的クラス II 遺伝子を有するクラス IIb 領域と古典的クラス II 遺伝子を有するクラス IIa 領域の 2 つに分断されている。これまで、主にクラス IIa 領域の *BoLA-DR* 遺伝子の多型性解析が行われてきたが、近年 *BoLA-DQ* 遺伝子群の高精度タイピング法が開発され、クラス IIa ハプロタイプの解析が大きく進展した。本稿では、*BoLA-DQ* 遺伝子群の中で最も多型に富む *BoLA-DQA1* 遺伝子についてウシ品種集団における多様性解析と、*BoLA-DQ* と疾患感受性の関連について概略した。

キーワード：ウシ MHC (BoLA), DQA 遺伝子, ウシ品種, 乳房炎, タイピング法

はじめに

主要組織適合抗原 (MHC) クラス I とクラス II 分子は極めて高度な遺伝的多型性を有する分子である。MHC は抗原ペプチドと T 細胞レセプターで三量体を形成し、T 細胞を活性化するが、MHC の多型性は MHC と抗原ペプチドが結合するアミノ酸残基 (peptide binding site; PBS) に集中しており、その多型性は平衡選択 (balanced selection) により維持されている事が知られている¹⁾。この MHC の高度な多型性は結合するペプチドとの親和性に強く影響することで、免疫応答の個体差を生じる原因となっている²⁾。

一方、起源を異にするヒト集団の間での遺伝的距離の推定に、しばしばヒト MHC (HLA) アレル頻度の差異が用いられている³⁾。同様に、多くの研究で、ウシ、イヌ、ヒツジなどで、品種間でアレル頻度が異なる事が報告されている⁴⁾。例えば、ウシの品種では、ジャージー種、ホルスタイン種、アルゼンチン在来種、日本短角種、ジール種、黒毛和種のウシ MHC(*BoLA*)-*DRB3* 遺伝子アレル頻度や⁵⁻⁷⁾、80 種類以上のイヌの品種のイヌ MHC (DLA)

クラス II 遺伝子のアレル頻度の比較などが行われており⁸⁾、それぞれの品種でアレル頻度が大きく異なる事が知られている。ヒトや野生動物の亜集団の比較と異なり、人為交配や改良が行われている経済動物での遺伝的距離は、その集団の進化を表すことは出来ないが、品種の近縁度から交配の歴史を表すのに有用なツールである。本稿ではウシ MHC (BoLA) クラス II *DQA1* 遺伝子頻度を用いた品種間の MHC の分布の比較および *BoLA-DQA1* 遺伝子と疾患感受性の個体差の相関について概略する。

反芻動物の MHC

ウシやヒツジ等の反芻動物の MHC クラス II 領域はヒト、ブタ、マウスなどの他の哺乳動物と異なる特徴を有する。最も大きな特徴は、クラス II 領域が DM, DO や DY 等の非古典的クラス II 分子や T-cell-activating protein (TAP) や proteasomes beta subunits (PSMB) 等のクラス I の抗原提示に関与する分子、および MHC 遺伝子以外の遺伝子がマップされる伸長クラス II 領域を含むクラス IIb 領域が古典的クラス II 領域である DQ や DR を含むクラス IIa 領域と大きく分断されていることである (図

受付日：2014 年 2 月 17 日，受理日：2014 年 6 月 18 日

代表者連絡先：竹嶋伸之輔 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1 理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット

TEL: 048-462-4420 FAX: 048-462-4399 E-mail: takesima@riken.jp

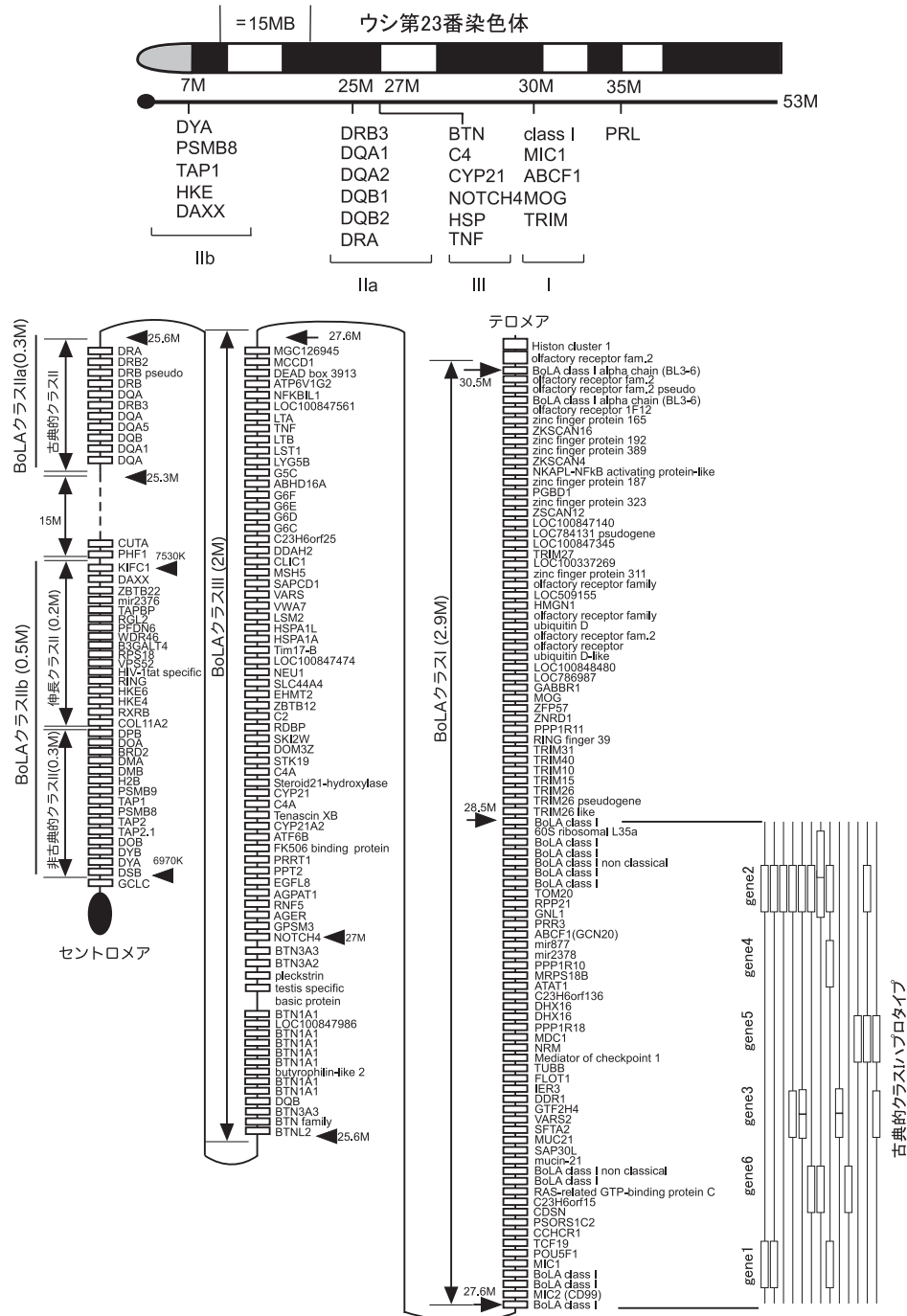


図1 ウシ MHC (BoLA) 領域の遺伝子構造

遺伝子の構成はウシゲノムアセンブリー (UMD_3.1) に基づいて作成されている。クラス I 領域の遺伝子数の推定は Codner³⁵⁾ らによって推定されているため、図中にその結果を併せて示した。

1)。このクラス IIa 領域は DR 分子をコードする *BoLA-DRA* 遺伝子と *BoLA-DRB3* 遺伝子,そして DQ 分子をコードする少なくとも 3 つの *BoLA-DQA* 遺伝子と 5 つの *BoLA-DQB* 遺伝子から構成されており, HLA-DP に相同な遺伝子は存在しない。これらの遺伝子の中で最も多型

に富み, 発現が強いものは *BoLA-DRB3* 遺伝子で, 現在 130 種類のアレルが報告されている (IPD-MHC: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola/>)。一方, *BoLA-DRA* 鎖をコードする *BoLA-DRA* 遺伝子にはアミノ酸置換を伴う多型の存在は知られていない。*BoLA-DQ* は, 上述のように

ハプロタイプあたり少なくとも3種類の *BoLA-DQA* 分子と5種類の *BoLA-DQB* 分子が発現し、理論上その組み合わせの数の分子種が存在しうる。*BoLA-DQA* 遺伝子の数は未だ明確にはなっていないが、*BoLA-DQA1* 遺伝子のアレルは大部分のハプロタイプに存在しており、報告されたアレル数は31と、*BoLA-DQA* 遺伝子群の中では最も多様性に富む⁹⁾。

DQA1 タイピングはこれまで *DQA* プローブと制限酵素を用いた制限酵素断片長多型 (RFLP) 法やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅産物の制限酵素断片長多型によりアレルを判別する PCR-RFLP¹⁰⁾、そしてマイクロアレイにより *BoLA-DQ* 遺伝子群の多型を複数箇所検出し、アレルを同定する方法¹¹⁾ などで実施されてきた。しかしながらこれらの方法では新規アレルが存在した場合、その存在を見逃してしまう恐れがあった。一方、近年我々は *BoLA-DQA1* 遺伝子の PCR-sequence based typing (SBT) 法を開発し¹²⁾、新規アレルの検出も含めて *BoLA-DQA1* 遺伝子の詳細なタイピングが可能とし、初めて塩基配列レベルでアレル頻度分布を明らかにした。この方法を用いて我々は、日本国内で飼育されているウシ品種の *BoLA-DQA1* 遺伝子の解析を行った。

国内のウシ品種の起源

我が国においては、主に国内の在来種から作出され、肉用種として用いられている和牛と乳用種として飼育されているホルスタイン種やジャージー種が飼育されている。

和牛には、黒毛和種、褐毛和種、無角和種および日本短角種の4品種があるが、全国的に分布し、最も広く飼育されているのは黒毛和種である。我が国で古来役牛として飼育されていた在来牛は、明治末期ごろシンメンタール種、ブラウンスイス種、デボン種、ショートホーン種などの外国種を交雑する品種改良が盛んに行われた。その後、在来牛の美点を維持する方針で選抜を行って作出された品種が黒毛和種である。日本短角種は、岩手県、青森県にまたがる旧南部藩の南部在来牛に外来種であるショートホーン種を交雑したものが基礎となっており、山地放牧に適している品種である。

乳用種であるホルスタイン種はオランダ原産の、家畜種としては最も古い品種で、世界中に分布している。国内のホルスタイン種は、現在主にアメリカ合衆国より輸

入した精液によって作出されている。ジャージー種はイギリス海峡のジャージー島原産の乳用種で、約600年間にわたって他品種と交雑することなく純粋繁殖によって維持されている品種である。乳量は少ないが乳脂率が極めて高く、バターの原料乳として高く評価されている。

BoLA-DQA1 遺伝子の多様性

日本国内で飼育されている品種の *BoLA-DRB3* 遺伝子多様性解析の結果、日本短角種、ジャージー種、ホルスタイン種および黒毛和種の比較では、ホルスタイン種と黒毛和種の *BoLA-DRB3* アレル頻度が最も近い頻度を有するという結果が得られていたが⁷⁾、1遺伝子座のみでの解析であったため、その後 *BoLA-DRB3* 遺伝子に加えて *BoLA-DQA1* 遺伝子のタイピングが、日本国内の黒毛和種、日本短角種、ホルスタイン種およびジャージー種、計352頭について行われた¹³⁾。全部で19の *BoLA-DQA1* アレルが検出され、品種別では、102頭の日本短角種から10種類、64頭のジャージー種からは12種類、91頭のホルスタイン種からは13種類、95頭の黒毛和種より15アレルが検出された(表1)。さらに、これらの品種の4品種のアレル頻度を比較すると(表1)、ジャージー種では最も高い頻度で検出された *BoLA-DQA*12021* (33.6%) は、他の品種では低頻度であった(ホルスタイン種4.9%; 黒毛和種2.1%; 日本短角種0.0%)。黒毛和種では *BoLA-DQA*10012* (33.2%) が最も高頻度なアレルであるが、他品種では低頻度であった(ホルスタイン種4.4%, 日本短角種およびジャージー種0%)。日本短角種で高頻度の *BoLA-DQA*0204* (23.0%) は、他の品種では中程度の頻度であった(ジャージー種2.3%, ホルスタイン種4.9%, 黒毛和種8.9%)。ホルスタイン種では *BoLA-DQA*10011* (33.5%) が最も高頻度であったが、このアレルは黒毛和種でも高い頻度であった(29.5%)。ホルスタイン種において、*BoLA-DQA*0101* (21.4%) は *BoLA-DQA*10011* に続いて高頻度アレルであったが、この2種類のアレルは他の品種でも高頻度に検出された(10.9%~15.2%)。ここで示すように、*BoLA-DQA*0101* のように品種にかかわらず高頻度に見られるアレルが存在する一方で、多くの *BoLA-DQA1* アレルは品種毎に頻度が大きく異なる事が明らかになった。

現実的に任意交配を想定できるヒト民族集団では、遺伝子頻度より算出される遺伝距離は、集団形成過程の歴

表1 ジャージー種, ホルスタイン種, 黒毛和種, 日本短角種の *BoLA-DQA1* 遺伝子頻度

	ジャージー種 ^a (N=64) (アレル数= 128)	ホルスタイン種 ^a (N=91) (アレル数= 182)	黒毛和種 ^a (N=95) (アレル数= 190)	日本短角種 ^a (N=102) (アレル数= 204)
DQA* 0101	10.9	21.4	11.1	15.2
DQA* 0103	4.7	0.5	3.7	9.8
DQA* 0202	0.0	0.0	0.0	0.5
DQA* 0203(1) ^d	10.2	4.9	3.7	9.8
DQA* 0203(2) ^d	3.9	0.5	1.1	0.0
DQA* 0204	2.3	4.9	8.9	23.0 ^b
DQA* 0301	11.7	0.5	0.5	0.0
DQA* 0801	10.9	0.0	1.1	2.9
DQA* 10011	0.8	33.5 ^b	29.5	11.8
DQA* 10012	0.0	4.4	33.2 ^b	0.0
DQA* 1002	0.0	0.0	1.6	0.0
DQA* 12011	1.6	12.6	1.1	21.1
DQA* 12012	3.9	4.9	0.0	0.0
DQA* 12021	33.6 ^b	4.9	2.1	0.0
DQA* 12022	0.0	1.6	1.6	1.5
DQA* 1203	0.0	0.0	0.5	0.0
DQA* 1204	5.5	0.0	0.0	0.0
DQA* 1301	0.0	0.0	0.5	0.0
DQA* 1401	0.0	4.9	0.0	4.4

a, N, 調査した個体数

b, 最も高頻度に検出されたアレル

史を反映しており, HLA の遺伝子頻度は民族集団間の遺伝的距離の推定にしばしば用いられている^{3,14)}。家畜においては選択交配の影響が強いと考えられるが, それでも遺伝子頻度から作出される遺伝的距離が, 歴史的, 地理的背景から説明される品種の特徴を良くあらわしていることが知られている¹⁵⁾。そこで, 得られた *BoLA-DQA1* 遺伝子頻度を用いて遺伝距離を算出し (表2), 系統樹を作製して品種の特徴の考察に用いた (図2)。系統樹の形状は, ホルスタイン種と黒毛和種は最も近くに位置し, (遺伝距離 0.313), ジャージー種は他のどの品

種とも異なっていた (遺伝距離 1.170 ~ 1.792)。この傾向は, *BoLA-DRB3* と *BoLA-DQA1* 両方の頻度を使用した系統樹でも同様で, 少なくともクラス II 遺伝子のアレル分布は黒毛和種とホルスタイン種で似通っている事が明らかとなった (図2)。歴史的に, 黒毛和種の系統造成にホルスタイン種はあまり用いられていないが, 黒毛和種の造成に用いられたシンメンタール種はホルスタイン種と遺伝子がよく似ていることや, ヨーロッパ大陸を原産とするシンメンタール種やホルスタイン種がイギリス原産のジャージー種, ヘレフォード種およびアンガス

表2 ウシ MHC(*BoLA*)*DQA1* アレル頻度および *DQA1-DRB3* アレル頻度に基づく各品種間の遺伝距離

	ジャージー種	ホルスタイン種	黒毛和種	日本短角種
DQA1				
ジャージー種	0.000	1.170	1.792	1.278
ホルスタイン種	1.170	0.000	0.313	0.353
黒毛和種	1.792	0.313	0.000	0.796
日本短角種	1.278	0.353	0.796	0.000
DRB3-DQA1				
ジャージー種	0.000	1.405	1.744	1.318
ホルスタイン種	1.405	0.000	0.318	0.408
黒毛和種	1.744	0.318	0.000	0.853
日本短角種	1.318	0.408	0.853	0.000

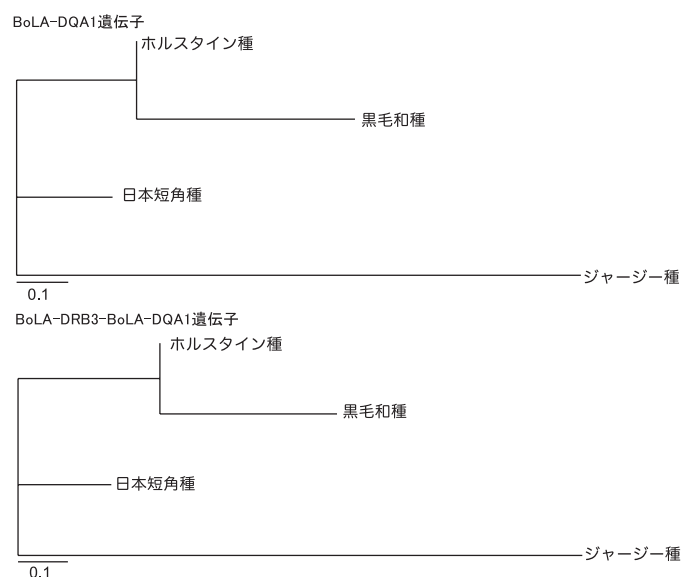


図2 ウシ MHC(*BoLA*)*DQA1* アレル頻度および *DQA1*-*DRB3* アレル頻度に基づく系統樹

種と遺伝子の特徴が異なる事などがマイクロサテライト多型を用いた解析により示されていることから¹⁶⁾, 品種改良に使用されたシンメンタール種などのヨーロッパ大陸型の品種が現在の黒毛和種の造成に強く影響しており, イギリス原産種であるジャージー種や, 同じくイギリス原産のショートホーン種の影響を強く受けた日本短角種と異なるクラスを形成する結果となったと考えられる。

BoLA-*DRB3* および *BoLA*-*DQA1* の遺伝子頻度がホルスタインと黒毛和種で似通っていることが明らかとなったが, クラス II のハプロタイプも共通するのかどうか調べるために, 507 頭の黒毛和種および 143 頭のホルスタイン種のサンプリングを行い, *BoLA*-*DRB3*, *BoLA*-*DQA1*, *BoLA*-*DQA2*, *BoLA*-*DQA3*, *BoLA*-*DQA4* および *BoLA*-*DQA5* のタイピングを行い, ハプロタイプを予測した⁹⁾。その結果, 黒毛和種で高頻度に検出される *BoLA*-*DRB3*-*BoLA*-*DQA* ハプロタイプ 1601B (42/507 頭), 0201A (28/507 頭), 0503A (27/507 頭), 1601C (14/507 頭) などのうち, ホルスタイン種でも高頻度に検出されたのは 0201A (7/143 頭) のみであり, ハプロタイプはほとんど一致しないことが明らかとなった (表 3)。このことから, 品種の近縁度の推定には, 単一の遺伝子のアレル情報だけでなく, ハプロタイプの同定が非常に重要である事が明らかとなった。

BoLA クラス II 遺伝子のアレル頻度が明らかになって

いる品種は一部の品種のみに限られている。MHC のアレル頻度は, 病気抵抗性やワクチンへの感受性など, 畜産分野での重要な形質にも大きな影響を与えていると考えられるため, より多くの品種のアレル頻度を明らかにしていく事が求められる。

BoLA-*DQA1* 遺伝子の多型と疾患感受性

BoLA 領域は, 表 4 に示すような種々の疾患との相関が報告されている¹⁷⁻³²⁾。その中には, *BoLA*-*DRB3* と良く相関する牛白血病や, 血清学的検査による MHC 多型と相関するとの報告のある糞虫寄生虫数などがある。ここでは *BoLA*-*DQA* 遺伝子との相関が報告されているウシ乳房炎について概説する。乳房炎は毎年 1,000 億円以上の被害を畜産界に与える, 発病しやすい上に極めて治療しにくい疾患であり, 世界的に共通してウシの最難治疾病の一つとされている。乳房炎は, 5 種類の原因菌 (黄色ブドウ球菌, 無乳性連鎖球菌, 表皮ブドウ球菌, 環境性連鎖球菌および大腸菌群) の感染により引き起こされる疾患で, 飼育環境等の環境要因に加えて遺伝的要因が存在することが古くから示唆されていた。乳房炎と遺伝子多型との相関性の多くは, *BoLA* 遺伝子の多型に基づいて解析されてきた^{11,33)}。例えば, クラス I 分子である *BoLA*-W16 を持つものは抗体産生能が高く乳房炎に易罹患性であること, 一方, *BoLA*-W2 を持つものは抗体産生能が低く乳房炎に相対的に抵抗性であることを示した

表3 ホルスタイン種と黒毛和種におけるクラス II ハプロタイプ頻度

BoLA クラス II ハプロタイプ		BoLA クラス II 遺伝子のアレル						黒毛和種 (N=507)	ホルスタイン種 (N=143)
RIKEN ¹	Official ²	<i>DRB3</i>	<i>DQA1</i>	<i>DQA2</i>	<i>DQA4</i>	<i>DQA5</i>	<i>DQB</i>		
0101A	DH24A	*0101	*0101				*0101	1	11
0201A	DH07A	*0201	*0203(1)				*0201	28	7
0501A	DH01A	*0501		*22021			*1301	—	2
0502A		*0502		*2901	*2703		*3101	5	—
0503A		*0503	*0101				*2702	27	—
0504A		*0504						7	—
0601A		*0601					*0302	—	1
0701A	DH28A	*0701	*0101	*22031			*0103	4	1
0801A		*0801	*0801	*22031		*2801	*0801	1	—
0801B	DH21A	*0801	*0801			*2801	*0801 *2001	—	—
0801C		*0801	*1203	*2201				1	—
0801D		*0801		*22031		*2801		3	—
0901A	DH11C	*0901	*1203	*2201			*1006 *0901	3	—
0902A	DH11A	*0902	*0204				*0301	3	—
0902B		*0902	*0204				*1803	—	7
0902C		*0902	*0204				*1807	10	—
1001A		*1001	*10012	*2101			*10021 *0901	—	2
1001B		*1001	*10012	*2206			*10021 *1402	11	—
1001C	DH03A	*1001	*10012				*1003 *0902	—	—
1101A	DH22H	*1101	*10011	*2206			*10021 *1402	10	4
1101B	DH22E	*1101	*10012	*2101			*10021 *2902	—	1
1101C		*1101	*1301				*1802	3	—
1103A		*1103	*0203(2)				*3602	—	—
1201A		*1201	*10011	*2206			*10021 *1402	8	—
1201B	DH08A	*1201	*12011	*2201			*1005 *1201	2	6
1301A		*1301			*27011			1	—
1302A		*1302			*27011			4	1
14011A		*14011	*10012	*22021			*10021 *1301	3	—
14011B	DH27A	*14011	*1401				*1401	—	5
1501A		*1501	*10011	*2101			*10021 *2903	1	—
1501B	DH16A	*1501	*10011	*22021			*0102 *1101	—	—
1501C	DH16A	*1501	*10011	*22021			*10021 *1301	13	8
1501D		*1501	*10012	*2101			*10021 *0901	—	—
1601A	DH10C	*1601	*10011	*2002				—	—
1601B		*1601	*10012	*22021			*10021 *1302	42	—
1601C		*1601	*12021	*22021			*1001 *1301	14	—
1701A		*1701			*3001			—	2
1801A	DH18A	*1801		*2201			*0601 *1702	—	1
1902A		*1902		*2206			*1402	1	—
2002A	DH15B	*2002	*0101				*0101	—	—
2703A		*2703	*0101	*22031			*0103	—	5
2703B	DH23A	*2703	*0101	*22031			*1803	—	—
2703C		*2703	*0203(1)				*0201	1	—
2703D		*2703	*0204				*1808	—	2
2703E		*2703	*12012	*2201			*1001 *0501	—	3
3401A		*3401	*0103	*22021			*2501	1	—
3401B		*3401	*0203(1)				*0201	1	—
3401C		*3401	*0301				*1501	1	—
4401A		*4401	*0103				*2701	2	—
	DH09B		*0301					—	—
	DH11B		*0301					—	—
	DH12B		*0802	*22023				—	—
	DH15A		*0103					—	—
	DH17A		*1101					—	—
	DH22A		*0401					—	—
	DH22F						*0401	—	—

¹ Miyasaka ら⁹⁾によって定義されたハプロタイプ² Lewin ら³⁶⁾, Glass ら³⁷⁾, Park ら¹¹⁾, Staska ら³⁸⁾, Norimine ら³⁹⁾によって定義されたハプロタイプ

表 4 ウシ MHC と相関する感染症

疾患	MHC アレル (BoLA-) および血清型 ¹⁾	効果 ²⁾	文献
牛白血病	W8.1	感染防御	Lewin <i>et al.</i> , (1988)
	W12.1	B 細胞数増加	
	W6, Eu28R	PL 感受性	Stear <i>et al.</i> , (1988)
	W8	PL 抵抗性	
	DA12.3	PL 感受性	Lewin and Bernoco (1986)
	DA7	PL 抵抗性	
	W8	PL 感受性	
	W12.1, W8.2	感受性	Bernoco and Lewin, 1989
	W8.1, W13	抵抗性	
	DRβ70:Glu-DRβ71:Arg	PL 抵抗性	Xu <i>et al.</i> , 1993
	<i>DRB3.2*11</i>	PL 抵抗性	Mirsky <i>et al.</i> , 1998
	<i>DRB3*0902, DRB3*1701</i>	低プロウイルス量	Juliarena <i>et al.</i> , 2008
	<i>DRB3*1501</i>	高プロウイルス量	
	0902B or C (<i>DRB3*0902-DQA1*0204</i>), 1101A (<i>DRB3*1101-DQA1*10011</i>)	低プロウイルス量	Miyasaka <i>et al.</i> , 2013
	1601B (<i>DRB3*1601-DQA1*10012</i>)	高プロウイルス量	
乳房炎	M7	抵抗性	Oddgeirsson <i>et al.</i> , 1988
	W6, W6.1	感受性	
	A2	抵抗性	Mejdell <i>et al.</i> , 1994
	<i>DRB3.2*16</i>	感受性	Dietz <i>et al.</i> , 1997
	<i>DRB3.2*23</i>	感受性	Sharif <i>et al.</i> , 1998, 2000
	DRβ74:Glu		
	<i>DRB3.2*16</i>	抵抗性	
	DH*24A (<i>DRB3*0101-DQA*0101-DQB*0101</i>)	感受性	Park <i>et al.</i> , 2004
糞虫寄生虫数	DQA1 ヘテロ接合	抵抗性	Takeshima <i>et al.</i> , 2008
	W3	感受性 (<i>O. radiatum</i>)	Stear <i>et al.</i> , 1990
	W7	抵抗性 (<i>H. placei</i>)	
	W8	感受性 (<i>H. placei</i>)	
	CA5	感受性 (<i>H. placei</i>)	
	CA36	抵抗性 (<i>H. placei</i>)	

¹⁾ A, CA, DA, M および W から始まる記号で示されている多型は血清学的検査により同定されたものであり、現在広く使用されている遺伝子タイピングによる結果との関連性は不明である。DRB3.2 から始まる 2 桁のアレルは PCR-RFLP 法の結果であり、SBT 法との関連性は IPD-MHC (http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/ipd/mhc/view_nomenclature.cgi?bola.drb3) により提供されている。

²⁾ PL: 持続性リンパ球増多症 (Persistent lymphocytosis)

が、その後クラス II *BoLA-DRB3* 遺伝子の PCR-RFLP による遺伝子タイピング法が開発されたことから、疾患感受性と *BoLA-DRB3* 遺伝子との相関性の研究が進められてきた³⁴⁾。Sharif らは、835 頭のホルスタインの *BoLA-DRB3* 遺伝子の多型を PCR-RFLP 法を用いて解析したところ、*BoLA-DRB3*16* を有する個体では乳房炎の病態進行の指標とされる乳中体細胞数 (SCS) が有意に低く抑えられていることを見いだした²⁹⁾。また、韓国のグループはマイクロアレイタイピング法を用いて *BoLA-DRB3*, *BoLA-DQA* およびクラス I 遺伝子のタイピングを行った結果、クラス IIa の DH24A ハプロタイプ (*DRB3*0101-DQA*0101-DQB*0101*) は有意に乳房炎発症牛に高頻度で見いだされることを示した¹¹⁾。我々は、乳房炎と

BoLA-DQA1 との相関性を調べるために、日本におけるホルスタイン種の *BoLA-DQA1* アレル頻度を、全国から無作為に抽出した 95 頭のサンプルを用いて、新しく開発した *BoLA-DQA1* の PCR-SBT 法によりタイピングし、算出した。続いて千葉県下の 4 地区より採取したホルスタイン種 188 頭の乳房炎発症牛の DNA を PCR-SBT 法によりタイピングした。その結果、乳房炎の中でも特に、原因菌が環境に常在し、発症にはウシの免疫応答の個体差が重要であると考えられる環境性乳房炎の発症に、*BoLA-DQA1* 遺伝子のホモ接合性が重要であるという知見を得た (図 3)³¹⁾。この研究では *BoLA-DRB3* 遺伝子のホモ接合度は発症に影響しなかったことから、*BoLA-DQA1* 遺伝子のタイピングが DQ 遺伝子群の多型性の非

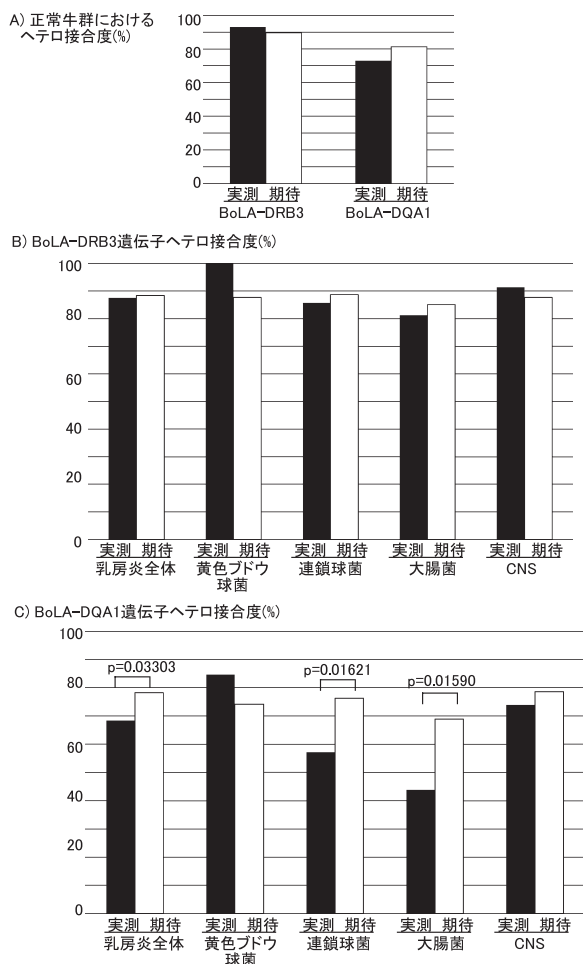


図3 乳房炎とウシ MHC (BoLA) クラス II 遺伝子のヘテロ接合度。ヘテロ接合度の実測値をアレル頻度から予測されるヘテロ接合度の期待値と比較し、有意に実測値が低下している群を検出した。A) 正常牛群 (N=85) のヘテロ接合度, B) 乳房炎発症牛 (N=120) における *BoLA-DRB3* 遺伝子のヘテロ接合度, C) 乳房炎発症牛 (N=120) における *BoLA-DQA1* 遺伝子のヘテロ接合度。B) および C) において用いた乳房炎の原因菌別の解析では、黄色ブドウ球菌 13 頭、連鎖球菌 42 頭、大腸菌 16 頭およびコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) 23 頭を使用した。

常に良いマーカーとなり、DQ 分子群の多型性が免疫応答の個体差を通して発症を制御していることを強く示唆している。

結 語

ウシをはじめとした経済動物は遺伝的背景が明らかなゲノム DNA の入手が容易である事、感染実験の実施や遺伝子異常による疾患の発現の検証が可能であること、MHC の多様性が集団内で維持されている事、など MHC の多型性に起因する疾患感受性の個体差を研究するため

の様々な利点が存在する。一方で、MHC 領域の高度な多型性のため、MHC 領域のゲノム配列の決定は進んでおらず、本領域に存在すると予測される多くの疾患関連遺伝子の同定はほとんど進んでいない。今後、ゲノム情報の充実により、更なる研究の進展が期待される分野である。

謝 辞

本稿で述べた実験結果は、多くの共同研究者との共同研究により得られたものであり、心から深謝いたします。本研究は科学研究費補助金・基盤研究 (A・B・C) および生研センター・イノベーション創出基礎研究推進事業の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) Hughes AL, Nei M: Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (86): 958–962, 1989.
- 2) Bodmer WF: Evolutionary significance of the HL-A system. *Nature* (237): 139–145, 1972. Epub 1972/05/19.
- 3) Mizuki M, Ohno S, Ando H, *et al.*: Major histocompatibility complex class II alleles in Kazak and Han populations in the Silk Route of northwestern China. *Tissue Antigens* (50): 527–534, 1997.
- 4) Konnai S, Nagaoka Y, Takeshima SN, *et al.*: Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep. *Eur J Immunogenet* (30): 275–282, 2003. Epub 2003/08/16.
- 5) Giovambattista G, Golijow CD, Dulout FN, *et al.*: Gene frequencies of DRB3.2 locus of Argentine Creole cattle. *Anim Genet* (27): 55–56, 1996.
- 6) Takeshima SN, Nakai Y, Ohta M, *et al.*: Short communication: characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese short-horn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. *J Dairy Sci* (85): 1630–1632, 2002. Epub 2002/07/31.
- 7) Takeshima SN, Saitou N, Morita M, *et al.*: The diversity of bovine MHC class II DRB3 genes in Japanese Black, Japanese Shorthorn, Jersey and Holstein cattle in Japan. *Gene* (316): 111–118, 2003. Epub 2003/10/18.
- 8) Kennedy LJ, Barnes A, Happ GM, *et al.*: Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. *Tissue Antigens* (60): 43–52, 2002.
- 9) Miyasaka T, Takeshima SN, Sentsui H, *et al.*: Identification and diversity of bovine major histocompatibility complex class II haplotypes in Japanese Black and Holstein cattle in Japan. *J Dairy Sci* (95): 420–431, 2012. Epub 2011/12/24.
- 10) Zanotti M, Poli G, Ponti W, *et al.*: Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet* (27):

- 337–341, 1996. Epub 1996/10/01.
- 11) Park YH, Joo YS, Park JY, *et al.*: Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *Journal of veterinary science* (5): 29–39, 2004.
- 12) Takeshima SN, Miki A, Kado M, *et al.*: Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DQA1 exon 2. *Tissue Antigens* (69): 189–199, 2007. Epub 2007/01/30.
- 13) Takeshima SN, Chen S, Miki M, *et al.*: Distribution and origin of bovine major histocompatibility complex class II DQA1 genes in Japan. *Tissue Antigens* (72): 195–205, 2008. Epub 2008/08/22.
- 14) Zhang L, Cheng D, Tao N, *et al.*: Distribution of HLA-A, -B and -DRB1 genes and haplotypes in the Tujia population living in the Wufeng Region of Hubei Province, China. *PloS one* (7): e38774, 2012. Epub 2012/06/22.
- 15) Kantanen J, Olsaker I, Holm LE, *et al.*: Genetic diversity and population structure of 20 North European cattle breeds. *The Journal of heredity* (91): 446–457, 2000. Epub 2001/02/24.
- 16) MacHugh DE, Loftus RT, Cunningham P, *et al.*: Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 micro-satellite markers. *Anim Genet* (29): 333–340, 1998. Epub 1998/11/04.
- 17) Lewin HA, Wu MC, Stewart JA, *et al.*: Association between BoLA and subclinical bovine leukemia virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. *Immunogenetics* (27): 338–344, 1988.
- 18) Stear MJ, Dimmock CK, Newman MJ, *et al.*: BoLA antigens are associated with increased frequency of persistent lymphocytosis in bovine leukaemia virus infected cattle and with increased incidence of antibodies to bovine leukaemia virus. *Anim Genet* (19): 151–158, 1988. Epub 1988/01/01.
- 19) Lewin HA, Bernoco D: Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. *Anim Genet* (17): 197–207, 1986. Epub 1986/01/01.
- 20) Bernoco D, Lewin HA: Genetic aspects of bovine leukaemia virus infection and disease progression. *Anim Genet* (20): 337–339, 1989. Epub 1989/01/01.
- 21) Xu A, van Eijk MJ, Park C, *et al.*: Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J Immunol* (151): 6977–6985, 1993. Epub 1993/12/15.
- 22) Mirsky ML, Olmstead C, Da Y, *et al.*: Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. *Anim Genet* (29): 245–252, 1998. Epub 1998/09/24.
- 23) Juliarena MA, Poli M, Sala L, *et al.*: Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. *Anim Genet* (39): 432–438, 2008. Epub 2008/06/25.
- 24) Miyasaka T, Takeshima SN, Jimba M, *et al.*: Identification of bovine leukocyte antigen class II haplotypes associated with variations in bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black cattle. *Tissue Antigens* (81): 72–82, 2013. Epub 2012/12/12.
- 25) Oddgeirsson O, Simpson SP, Morgan AL, *et al.*: Relationship between the bovine major histocompatibility complex (BoLA), erythrocyte markers and susceptibility to mastitis in Icelandic cattle. *Anim Genet* (19): 11–16, 1988. Epub 1988/01/01.
- 26) Mejdell CM, Lie O, Solbu H, *et al.*: Association of major histocompatibility complex antigens (BoLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, ketosis and fertility in Norwegian cattle. *Anim Genet* (25): 99–104, 1994. Epub 1994/04/01.
- 27) Dietz AB, Cohen ND, Timms L, *et al.*: Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* (80): 406–412, 1997. Epub 1997/02/01.
- 28) Sharif S, Mallard BA, Sargeant JM: Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vet Immunol Immunopathol* (76): 231–238, 2000. Epub 2000/10/25.
- 29) Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, *et al.*: Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim Genet* (29): 185–193, 1998. Epub 1998/08/28.
- 30) Park CA, Hines HC, Monke DR, *et al.*: Association between the bovine major histocompatibility complex and chronic posterior spinal paresis—a form of ankylosing spondylitis—in Holstein bulls. *Anim Genet* (24): 53–58, 1993. Epub 1993/02/01.
- 31) Takeshima SN, Matsumoto Y, Chen J, *et al.*: Evidence for cattle major histocompatibility complex (BoLA) class II DQA1 gene heterozygote advantage against clinical mastitis caused by *Streptococci* and *Escherichia* species. *Tissue Antigens* (72): 525–531, 2008. Epub 2008/11/13.
- 32) Stear MJ, Hetzel DJ, Brown SC, *et al.*: The relationships among ecto- and endoparasite levels, class I antigens of the bovine major histocompatibility system, immunoglobulin E levels and weight gain. *Vet Parasitol* (34): 303–321, 1990. Epub 1990/01/01.
- 33) Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN: Characterization of naturally processed and presented peptides associated with bovine major histocompatibility complex (BoLA) class II DR molecules. *Anim Genet* (34): 116–123, 2003.
- 34) Takeshima SN, Aida Y: Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Animal Science Journal* (77): 138–150, 2006.
- 35) Codner GF, Stear MJ, Reeve R, *et al.*: Selective forces shaping diversity in the class I region of the major histocompatibility complex in dairy cattle. *Anim Genet* (43): 239–249, 2012. Epub 2012/04/11.

- 36) Lewin HA, Russell GC, Glass EJ: Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunol Rev* (167): 145–158, 1999. Epub 1999/05/13.
- 37) Glass EJ, Oliver RA, Russell GC: Duplicated DQ haplotypes increase the complexity of restriction element usage in cattle. *J Immunol* (165): 134–138, 2000. Epub 2000/06/22.
- 38) Staska LM, Davies CJ, Brown WC, *et al.*: Identification of vaccine candidate peptides in the NcSRS2 surface protein of *Neospora caninum* by using CD4+ cytotoxic T lymphocytes and gamma interferon-secreting T lymphocytes of infected holstein cattle. *Infect Immun* (73): 1321–1329, 2005. Epub 2005/02/26.
- 39) Norimine J, Brown WC: Intrahaplotype and interhaplotype pairing of bovine leukocyte antigen DQA and DQB molecules generate functional DQ molecules important for priming CD4(+) T-lymphocyte responses. *Immunogenetics* (57): 750–762, 2005. Epub 2005/10/13.

Diversity of Bovine MHC Class II *DQA1* Gene

Shin-nosuke Takeshima¹⁾, Yoko Aida¹⁾

¹⁾Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN

The cattle MHC class II region is divided into two subregions, named class IIb and class IIa. Class IIb contains non classical class II genes, and class IIa region contains classical class II genes. Previously, the *BoLA-DRB3* had been mainly analyzed for class IIa polymorphism, but recently we developed PCR-SBT method for high-resolution genotyping of the *BoLA-DQA1* gene, which enable to analyze class IIa haplotype including the *BoLA-DQ* loci. In this review, we focused on the *BoLA-DQA1* polymorphism among various cattle breeds and the association between *DQA* gene and disease susceptibility.

Key Words: bovine leukocyte antigen (BoLA), DQA gene, cattle breed, mastitis, typing method

学会レポート

第 39 回アメリカ組織適合性学会 (ASHI) の報告

小島 裕人¹⁾・木村 貴文²⁾

¹⁾ 公益財団法人 HLA 研究所

²⁾ 京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門

キーワード：国際組織適合性ワークショップ, KIR 遺伝子多型, 補体結合性抗 HLA 抗体

はじめに

2013 年 11 月 17 日から同 21 日まで米国のシカゴで開催された 39th ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics Conference) に出席した。シカゴは函館と同緯度に位置し、ミシガン湖から吹き付ける冷風で体が凍るほどの寒さと聞いていたが、おもちゃのように整然と建ち並んだビル街が風をさえぎるせいか、意外と寒さは感じなかった (写真 1)。

内容については iPS 細胞の医療への応用のオープニングセミナーをはじめとして、遺伝多型や新技術に至るまで、「組織適合性」にかかわる領域を広げつつ、移植適合性のレビューまで盛り込んだプログラム構成は内外から多くの参加者を集めるのに十分で、初日のウェルカムパーティーは身動きがとれないくらいの盛況ぶりだった (写真 2)。

一般演題では、医療技術者が注目している次世代シーケンサーを用いたタイピング (Next Generation Sequencing, NGS) と抗 HLA 抗体に関する演題が全体の 3 分の 2 程度を占めていた印象である。ただし技術が組織適合性を理解するひとつのツールであるという位置づけであるためであろうか、これらが教育講演で話題にされることはなかった。本稿では、教育講演を中心に今後の移植の方向性を占う話題に焦点をあてて紹介する。



写真 1 スカイデッキ (地上 442 m) からのシカゴの様子



写真 2 ウェルカムパーティーの様子

1. KIR 遺伝子多型

NK 細胞は初期免疫のみならず獲得免疫にも関与しており、その機能は多岐に広がる。そのレセプターのひとつである KIR (killer cell immunoglobulin like receptor) のクローナリティーは一卵性双生児では全く同じで、環境によって個々の NK 細胞表面上の組み合わせが変化していき、多様なレパートリーを形成する^{1,2)}。遺伝子座の組み合わせによって A ハプロタイプと B ハプロタイプに大別でき (表 1)、前者はチンパンジーのそれと類似性が高く、後者は人類特有で、リガンドである HLA との親和性が弱くなったものが蓄積された結果と考えられる。さまざまな自然選択圧の影響を受けながら、B ハプロタイプはアフリカ大陸を起源としてヨーロッパ方向に、A ハプロタイプはアジア方向にそれぞれ拡散していった。

いっぽう、NK リガンドである HLA クラス I の方はどうか。例えば、古典的 HLA クラス I のなかでも HLA-A、-B は主に T 細胞性免疫に関与するが、HLA-C は妊娠時の胎盤絨毛上皮 (トロホブラスト) にも発現がみられるなど、NK 細胞への関与が大きい。レセプターの多型及びリガンドの特性から生じる多様な組み合わせは、進化の過程で外敵や環境の変化に対応してきた結果といえる。

これまで KIR の遺伝子型は、参照データが少ないために型を決定することが難しかったが、NGS の登場によって容易になりつつある。今後の移植医療においては、従前の HLA に加えて KIR 及びそのリガンドの適合性も考慮されるであろう。まさに、将来パーソナル医療の一翼を担う技術革新といえる。

KIR で注目されているような遺伝子多型解析は機能的な差異を知るだけでなく、人類遺伝学にも応用されてい

る。例えば単一塩基多型 (SNPs) 解析のデータからは次のことが明らかにされている。すなわち、人類がその起源においてアフリカからヨーロッパへと移動したポイントで遺伝学的な分岐点があり、そこを基点に SNPs が広がっていったことである。特に rare SNPs の解析からはヨーロッパの中でも地域性があることがわかっている。

2. 造血幹細胞移植における組織適合性

NMDP/CIBMTR のデータを用いて、1988 年から 2009 年までの期間に T 細胞除去しない骨髄 (BM) または末梢血 (PB) のフル移植を行った ALL, AML, CML, MDS 患者とドナーのマッチング解析の結果が紹介された。HLA 遺伝子型で 8/8 マッチ (n=1,126)、7/8 マッチ HVG 方向 1 ミスマッチ (n=121)、7/8 マッチ GVH 方向 1 ミスマッチ (n=125)、7/8 マッチ HVG/GVH 双方向 1 ミスマッチ (n=1,497) の 4 カテゴリ間の比較を実施した結果、7/8 マッチ移植では GVH 方向と双方向のどちらでも重症 GVHD の発症率、生存率に影響ないが、HVG 方向では生存率は他の 1 ミスマッチと同等であるものの、GVHD の危険性が下がるようである。

さらに興味深いことに、HLA-C 座 1 ミスマッチの中で 68.7% と最も多い組み合わせである C*03:03 と C*03:04 のミスマッチが他の組み合わせよりも生存率改善に寄与することが示唆された³⁾。

他に悪性腫瘍 (n=6,349) に対する造血細胞移植データから、若いドナーのほうが良い、ABO 型も予後因子である、抗原レベルよりもアليلレベルマッチのほうが予後は良く性別は関係ない、さらには意外なことにドナーのサイトメガロウイルス (CMV) 感染歴は予後に影響しないなどの解析結果も紹介された。

続いてさい帯血移植 (CBT) に関する報告があった。single unit のフル移植にカルシニューリン阻害剤を用いた

表 1 KIR における A ハプロタイプと B ハプロタイプの遺伝子構成

	Centromeric part									RS	Telomeric part							
	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5B	2DS3/5	2DP1	2DL1	3DP1		2DL4	3DL1	3DS1	2DL5A	2DS3/5	2DS1	2DS4	3DL2
A ハプロタイプ																		
B ハプロタイプ																		

(灰色) ... 抑制型受容体
 (黄色) ... 活性型受容体
 (無色) ... 偽遺伝子

B ハプロタイプの方が多様性に富み、活性型レセプターを多く保持している。最近では組み換えポイント (Recombination Site, RS) を起点にセントロメア側とテロメア側に分けて解析されることが多い。

GVHD 予防を施した $n=1,568$ の AML, ALL, MDS 症例について移植後 4 年で解析すると, HLA マッチ度が高く移植有核細胞数が多い移植ほど非再発期死亡 (Non-Relapse Mortality, NRM) が低減されるという結果が紹介された。HLA の一致度で比較してみると, 8/8 マッチを 1 としたときの相対危険率 (Hazard Ratio, HR) の中央値は 7/8 マッチで 2.79, 6/8 マッチで 2.69, 5/8 マッチで 3.60, 4/8 マッチで 3.48, 3/8 マッチで 4.61 であった。7/8 マッチの移植症例を参考にした場合, 有核細胞数 $3 \times 10^6/\text{kg}$ 以上では移植後 3 年までの NRM は 20–24% 程度であるのに対し, それ以下だと 45% にまで上昇した。

さらにドイツ赤十字センターからヨーロッパにおける造血細胞移植の全般的な後方的解析結果の報告があった。EBMT のデータによると, 移植ソースは全体の 22% が BM, 72% が PB で, さい帯血 (CB) は 6% しかなく, ドナーは 39% が一致同胞, 7% が血縁, 54% が非血縁者である。当然 GVHD の危険性の高い PB は 20 歳未満ではあまり使われない。ヨーロッパのなかでも地域性があり, イタリアはハプロ半合致移植に積極的であり, フランスや特にスペインは CB もよく使うようである。

また, National Registry である ZKRD のデータを用いた移植成績の解析結果が紹介された。データは 1997 年から 2010 年に ALL, AML, CML, MDS 患者に造血細胞移植が施行された 2,646 例を対象とし, 細胞ソース別では末梢血幹細胞移植 (PBSCT) が 86.9%, 骨髄移植 (BMT) が 13.1%, 前処置別ではフル移植が 63.9%, ミニ移植が 36.1%, さらにドナーソースとしては国内ドナーが 79.0%, 国外ドナーが 21.0% の内訳であった。解析の結果, HLA ミスマッチは全生存率に影響し, 1 ミスマッチの場合に抗原とアレルのミスマッチの影響は同等である。さらに, 患者の年齢は高いほうが, 病気の進行度が進んでいるほうが, それぞれ生存に不利である。最後に 10/10 マッチにおける国内ドナーと国外ドナーの移植成績の比較があり, 国内ドナーのほうが 10% 程度高い 5 年生存率をもたらすことに驚いた。進化的に保存された民族間での, マイナー抗原をはじめとする遺伝子多様性の差異を想起させる。

3. 補体結合性抗 HLA 抗体

臓器移植では補体結合性抗 HLA 抗体が重要視されている。腎臓移植を例にとると, 移植前ではドナーの死後

硬直や脳死など, 一方移植後では虚血臓器に対する再灌流, 急性の細胞性拒絶, 抗体関連拒絶, 感染症などで補体活性は上昇し, 抗体への結合を初期反応として補体カスケードが進行していく。C1q やマンノース結合レクチン (MBL) はアポトーシスの引き金となるが, 炎症に対しては, マクロファージの IL-10 産生を誘導し抑制的に働く。促進的に働くのはカスケードの分解産物である C3, C5a などであり, 臓器の血管に対して内皮細胞障害や血栓を引き起こし, マクロファージからの IL-1, IL-6, IL-12 などの産生を促進する。

近年は, 古典的経路のみならずレクチン経路において Collectin11 が MBL の MASP2 に結合することによって活性化されることも注目されている。このように補体は移植片の拒絶に関与しており, 補体結合性抗体の検査は重要となる。

クロスマッチ検査である CDC (Complement Dependent Cytotoxicity) には, non-HLA 抗体も検出できる利点はあるものの, 感度が低いことやドナーリンパ球が必要といった欠点がある。そこで, C1qScreen (OneLambda 社) を用いた Luminex 法を主流にする動きが強い。これは補体結合性抗体をある程度特異的に検出できるが, 弱陽性付近の MFI 値は施設によって大きく異なり, 技術的な差異やプロトコルの違いが要因と考えられている。改善策として, ビーズ反応後のインキュベーション時間延長, Wash と Anti-human globulin の使用, ビオチン化 C1q の使用などが検討されている。

C1qScreen と CDC の相関性については UCLA (University of California, Los Angeles) から報告があり, CDC で陽性と判定された抗 HLA クラス I 抗体陽性 38 検体, 抗クラス II 抗体陽性 22 検体について比較解析がなされた。全検体について, C1qScreen は 315 種類の抗原に対して陽性, Single Antigen Beads では 934 種類, CDC では 149 種類が検出された。総じては, CDC 陽性の 85% である 127 種類の抗原に対して C1qScreen でも陽性であり, 逆にいうと 15% の 22 種類は不一致となった。

さらに C1qScreen と C4d 染色の相関については, 39 症例を用いた検査で一致が 14 例, C1qScreen のみ陽性が 8 例, C4d のみ陽性が 5 例, どちらも陰性が 2 例とある程度の相関はみられる。

臓器移植前のクロスマッチや移植後の抗体関連拒絶のモニタリング方法としての適性という観点から, C1qScreen

を用いた Luminex 法はバリデートされているとの印象を受けた。

4. その他の話題

今後が期待される新技術の報告にもふれておきたい。Fred Hutchinson Cancer Research Center は CB から CD34 陽性細胞をセクションして、Delta1^{ext-IgG} (human IgG 改変) を用いて増幅したものを移植する計画である。まずは CB を通常移植し、その 4 時間後に T 細胞除去をおこなった増幅培養 CB を移植する。そうすることによって、CBT の弱点である拒絶反応を回避し、移植成績の向上が期待できる。将来的には HLA を無視した CBT を目指している。

また「Tregitope」にも注目したい。大量投与された免疫グロブリン (IVIG) の構造から Treg のエпитープになりうるペプチド配列が発見された。これらは Tregitope と呼ばれ、細胞内に取り込まれて Treg を活性化し、IL-10 を介した抑制系反応を促進する。自己免疫疾患や移植医療などへの応用が期待される。

学会のもうひとつの目玉ともいえる企業展示ブースでは、OneLambda 社が蛍光ビーズ法の次世代プラットフォームである FLEXMAP 3D を紹介していた。本法では従来の Luminex 法の 100 種類のビーズに加えて、もう 400 種類の計 500 種類のビーズが利用可能である。このような未発売を含めた最新の機器や試薬の情報が得られたなかでも特筆すべきは、NGS ベースの技術紹介ブースが主流になりつつあることである。この分野に多くの

企業が興味を持っていて、多角化への道を歩んでいることが伺えた。

最後に、今回は紹介しなかったが、一般演題にも多くのユニークな切り口の報告があり、その抄録は Human Immunology 誌に別冊として掲載されている⁵⁾。

おわりに

米国と日本では組織適合性の検査や研究の方向性が異なり、国際的な動向を知るうえでは非常によい学術集会であることを実感した。次回、第 40 回 ASHI はコロラド州のデンバーで開催される予定である。わが国からも臓器移植や造血細胞移植にかかわる臨床家も含めて、多数の参加が得られることを祈念して筆をおきたい。

参考文献

- 1) 黒木喜美子, 北辻千展, 前仲勝実: NK レセプターと HLA の最前線. MHC 18: 215–233, 2011.
- 2) Sarah Cooley, Daniel J. Weisdorf, Lisbeth A. Guethlein, *et al.*: Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. Blood. 116: 2411–2419, 2010.
- 3) Marcelo A. Fernandez-Vina, Tao Wang, Stephanie J. Lee, *et al.*: Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. Blood. 123: 1270–1278, 2014.
- 4) Fürst D, Müller C, Vucinic V, *et al.*: High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. Blood. 122: 3220–3229, 2013.
- 5) 39th ASHI Meeting 2013 Chicago. Human Immunology. 74: Supplement, 2013.

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, μ l, %, $^{\circ}$ Cなど）を、数字はアラビア文字を用いる。

4. 本文—2：英語での投稿

・2頁目に250 words以内の要旨、キーワード（5語以内）を記載する。

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

①地名、人名、学名は原語のまま用い、薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。

②単位、数量は国際単位（cm, ml, g, Kg, pg, μ l, %, $^{\circ}$ Cなど）を、数字はアラビア文字を用いる。

5. 引用文献

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

1. Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, *et al.*: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal 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-ROMに保存し、CD-ROMにA4サイズでプリントアウトした原稿3部を添えて編集長宛に送付する。

2. 第1頁目

表紙とし「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

Web 版になって 5 号目の 21 巻 2 号をお届けします。本学会のホームページの管理者もしていますが、以前は「MHC」の必要なページをスキャナーで取り込んだものを整理してホームページに載せる仕事が年 3 回有り、QCWS の報告書の掲載とともに一番手間のかかる仕事でした。それよりも、原著等は著作権の問題から、要約しか載せることができなくて残念に思っていました。しかし Web 版になるとともに、原著などは J-STAGE で広く公開されるようになって、発表される方にも励みになったのではないかと考えています。できれば、「MHC」19 号までの分もすべて、ホームページに掲載できないかと考えております。逆に心配なのは、会員の皆様の中で以前より、不便になったと感じている方が見えるのではないかとことです。インターネットに繋がっているパソコンは勿論ですが、スマートフォンや、タブレットでも、「JSHI」で検索すると、本学会のサイトが簡単にでてきますので、ご活用ください。(同名の略号を持つ組織がひとつありますが)

赤座 達也

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