

# 日本組織適合性学会誌

第 24 卷第 1 号 平成 29 年 4 月 20 日発行

## 目 次

### 日本組織適合性学会からのお知らせ

日本組織適合性学会・理事長就任のご挨拶	1
事務局移転のお知らせ	2
日本組織適合性学会における各種委員会の設置	3
第 26 回 日本組織適合性学会大会のご案内	5
平成 29 年度学術奨励賞候補者の公募について	7
組織適合性検査技術者認定制度 平成 29 年度 認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ	9
初心者講習会の開催及び参加希望者募集について	10
平成 28 年度 認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果	11
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2017)	14

### 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート

—全体経過及び QCWS 試料の総合結果—	中島 文明	15
—試料説明 DNA-QC—	田中 秀則	19
—総合解析 DNA-QC—	黒田ゆかり	20
—検査法別解析 DNA タイピング SSP 法—	高山 智美	22
—検査法別解析 DNA タイピング SSO (LABType) 法—	石塚 敏	23
—検査法別解析 DNA タイピング SSO (WAKFlow, Genosearch) 法—	奥平 裕子	24
—検査法別解析 DNA タイピング SBT (Sanger, NGS) 法—	小島 裕人	25
—試料説明 抗体 QC—	中島 文明	27
—総合解析 抗体 QC—	高 陽淑	28
—検査法別解析 抗体検査 FCM (FlowPRA) 法—	金本 人美	30
—検査法別解析 抗体検査 ルミネックス (LABScreen) 法—	蟹井はるか, 前島理恵子, 藤原 孝記	31
—検査法別解析 抗体検査 ルミネックス (WAKFlow) 法—	小林 洋紀	33
—検査法別解析 その他検査法及びクロスマッチ—	中島 文明	35
—日本移植学会連携 全血クロスマッチ—	橋口 裕樹	37

### 総説

HLA の基礎知識 3	小川 公明	38
免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM) と HLA 多型		
大貫 優子・鈴木 重明・重成 敦子・鈴木 進悟・鈴木 則宏・西野 一三・椎名 隆		46
パニック症のゲノムワイド関連解析の HLA アレルによる層別解析	杉本 (嶋多) 美穂子・徳永 勝士	54

第 15 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集		65
--------------------------	--	----

日本組織適合性学会 MHC 投稿・執筆規定 (平成 28 年 2 月 1 日改訂)		93
編集後記		96

## 日本組織適合性学会・理事長就任のご挨拶

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野  
徳永 勝士

この度、2016年10月22日の理事会の議を経て、日本組織適合性学会・理事長を拝命いたしました。理事長就任に際しまして、本学会の現状と今後の課題について日頃考えていることを述べます。

日本組織適合性学会の会員の皆様は、いうまでもなく、組織適合性に関わる HLA および nonHLA 分子、免疫担当細胞や各種臓器をさまざまな切り口から研究し、その成果を移植および輸血医療の現場に役立てるための最前線に立たれており、その活動は今後も極めて重要です。そのために、ゲノム解析、タンパク構造解析、免疫療法、再建・再生医療などの領域に見られる急速な進歩に参加・貢献し、その成果を取り入れて活用することが求められます。もちろん、HLA 多型のタイピング法や抗 HLA 抗体検査法などの開発や比較検討は本学会の果たすべき中心的な役割であり、そのために QC ワークショップを実施するとともに、HLA 検査技術者・組織適合性指導者・組織適合性検査施設の認定制度を推進しています。

これらに加えて、主要組織適合性複合体 (MHC) の基礎研究と臨床応用への注目度が新たな高まりを見せています。多くの疾患への感受性・抵抗性、また各種薬物への過敏症などに関連する HLA と nonHLA 遺伝子の同定および発症機序の解明が、個人に適した医療の実現を目指すうえで大変重要な研究領域になっています。さらに近年は、がんの免疫・ゲノム医療における HLA および組織適合性の重要性が従来に増して認識されており、その臨床応用に大きな期待が寄せられています。また、組織適合性をはじめ免疫反応に関わる MHC および nonMHC 遺伝子群の多様性や進化の研究も重要な分野です。

日本組織適合性学会の目指すところは、学会員の皆様と共に、このような基礎および臨床研究の推進の核となり、学術集会や学会ホームページなどを通してその成果を社会に発信することにあります。若手および中堅の学会員の育成や支援によって、学会活動の継承と発展を実現することも特に重要な課題であると考えます。さらに、海外への成果の発信や海外関連学会との交流の促進も目指したいと思えます。

学会員の皆様には本学会の活動に御理解と御支援を賜りたく、どうかよろしくごお願い申し上げます。皆様の御意見や御提案をお待ちしております。

## 事務局移転のお知らせ

平成 28 年 10 月 22 日に開催されました、日本組織適合性学会の理事会，評議員会および 23 日の総会において，学会の新たな執行部体制が議決，承認されました。それに伴い，学会事務局を熊本大学大学院 生命科学部 免疫識別学分野内から，下記に移転いたしましたのでお知らせいたします。なお，入退会手続等の会員管理については，引き続き中西印刷株式会社を学会事務支局として外部委託しております。詳しくは日本組織適合性学会のホームページ (<http://jshi.umin.ac.jp/>) を御参照ください。

日本組織適合性学会事務局

〒 113-0033

東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野内

電話：03-5802-2907

FAX：03-5802-8619

電子メール：hlajimu@m.u-tokyo.ac.jp

## 日本組織適合性学会における各種委員会の設置

日本組織適合性学会では、理事ならびに理事長の改選に伴う新しい学会運営体制の構築と連携して、学会運営に必要な下記の委員会を設置し、委員長ならびに委員を決定いたしましたので、お知らせいたします。

日本組織適合性学会  
理事長 徳永勝士

### 組織適合性技術者認定制度委員会（12名）

委員長：田中 秀則，副委員長：中島 文明  
委員：石塚 敏，一戸 辰夫，太田 正穂，木村 彰方，黒田ゆかり，高 陽淑，徳永 勝士，  
成瀬 妙子，西村 泰治，湯沢 賢治

### HLA 標準化委員会（13名）

委員長：田中 秀則  
委員：一戸 辰夫，太田 正穂，木村 彰方，高 陽淑，佐藤 壯，椎名 隆，中島 文明，  
成瀬 妙子，橋口 裕樹，藤原 孝記，湯沢 賢治，吉川 枝里

### 編集委員会（5名）

委員長：木村 彰方  
委員：高原 史郎，田中 秀則，成瀬 妙子，湯沢 賢治

### 将来構想委員会（13名）

委員長：小林 孝彰  
委員：一戸 辰夫，大戸 齊，笠原 正典，木村 彰方，高 陽淑，椎名 隆，田中 秀則，  
成瀬 妙子，西村 泰治，橋口 裕樹，平山 謙二，湯沢 賢治

### 教育委員会（16名）

委員長：太田 正穂，副委員長：笠原 正典  
委員：石塚 敏，一戸 辰夫，木村 彰方，高 陽淑，椎名 隆，津田 とみ，土屋 尚之，  
徳永 勝士，中島 文明，成瀬 妙子，西村 泰治，平山 謙二，宮寺 浩子，湯沢 賢治

### 学会賞選考委員会（7名）（任期：\*H28.9～31.9，\*\*H26.9～30.9）

委員長：徳永 勝士\*\*  
委員：猪子 英俊\*，木村 彰方\*，西村 泰治\*，間 陽子\*\*，一戸 辰夫\*\*，小林 孝彰\*\*



学術奨励賞選考委員会 (11名) (任期：H28.9～\*30.9, ～\*\*H29.9)

委員長：西村 泰治\*

委員：間 陽子\*, 一戸 辰夫\*, 猪子 英俊\*, 木村 彰方\*, 小林 孝彰\*, 徳永 勝士\*,  
田中 秀則\*\*, 土屋 尚之\*\*, 中島 文明\*\*, 湯沢 賢治\*\*

倫理問題検討委員会 (8名)

委員長：一戸 辰夫

委員：掛江 直子, 木村 彰方, 栗山真理子, 椎名 隆, 辰井 聡子, 徳永 勝士, 森島 聡子

選挙管理委員会 (6名)

委員長：間 陽子

委員：石塚 敏, 竹嶋伸之輔, 宮川 卓, 宮寺 浩子, 安尾美奈子

国際交流委員会 (新設) (6名)

委員長：笠原 正典

委員：間 陽子, 小林 孝彰, 細道 一善, 平山 謙二, 八幡 真人

## 第 26 回日本組織適合性学会大会のご案内

第 26 回日本組織適合性学会大会

大会長 一戸 辰夫

(広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野)

副大会長 大段 秀樹

(広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門 消化器移植外科学)

このたび、歴史ある本学会の第 26 回大会を広島市で開催させていただくこととなりました。中国四国地方での本学会開催は初めてであり、充実した学術交流の場とすることは言うまでもなく、ぜひ会員の皆様はこの地域の歴史や風土に触れていただく機会とし、秋の広島を楽しんでいただける大会にしたいと考えています。今後、precision medicine, personalized medicine の基本情報として、HLA や MHC そして組織適合性の概念が広く医療現場や社会全体で利用されていくことを期待して、大会のテーマは「組織適合性学の医療と社会への新展開」といたしました。会場は平和記念公園のすぐ南側にあり、広島を中心街や世界遺産の原爆ドームへの散策にも徒歩 10 分の圏内にあります。学術企画は基礎研究者・検査技術者・医学研究者から成るプログラム委員会を構成し、すべての皆様にとって有意義な情報の提供が可能となるように鋭意立案してまいります。ぜひ、多くの演題の応募と多数の皆様の参加をお待ちしております。

会 期：平成 29 年 10 月 27 日（金）～ 10 月 29 日（日）

会 場：JMS アステールプラザ

〒 730-0812 広島市中区加古町 4-17 TEL: 082-244-8000

### 大会プログラム（予定）

特別講演 I：本庶 佑（京都大学）

特別講演 II：Megan Sykes（Columbia University）

特別講演 III：小林孝彰（愛知医科大学）

市民公開シンポジウム：「激甚災害におけるアカデミアの連携と地域復興」

Young Investigator Cutting Edge Lecture：杉本直志（京都大学 iPS 研究所）

学会賞受賞講演，シンポジウム（基礎・検査技術・臓器移植・造血細胞移植）など

### 演題応募期間：

平成 29 年 5 月 16 日（火）～ 6 月 30 日（金）

学術奨励賞の申請受付も同じ期間中に行いますので、奮ってご応募ください。

### 大会事務局・運営事務局

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

第 26 回日本組織適合性学会大会事務局 担当・川瀬孝和

〒 734-8553 広島市南区霞一丁目 2-3

TEL: 082-257-5861 E-mail: jshi2017@hiroshima-u.ac.jp

**大会ホームページ**

<http://jshi2017.org/>

現在、事前参加登録 [申込締切日 9 月 22 日 (金)]・宿泊予約 [申込締切日 10 月 1 日 (日)] を開始しておりますので、ぜひお早めにお申し込みください。

## 平成 29 年度の学術奨励賞候補者の公募について

### 会員の皆様方へ

日本組織適合性学会では、平成 26 年度より高い権威をもつ「学会賞」と、若手学会員の学術研究を奨励する「学術奨励賞」を設けております。学術奨励賞は「組織適合性ならびに免疫遺伝学の分野における、秀でた学術的研究を若い学会員に奨励するために優れた若手研究者を表彰し、もって当該分野の発展に寄与すること」を目的としております。

本規定に則り、平成 29 年度の日本組織適合性学会の学術奨励賞候補者を、以下の要領で公募いたしますので、奮ってご応募ください。

### 1. 助成内容

平成 29 年度・学術集会大会（第 26 回大会：広島）に応募された一般演題で、さらに学術奨励賞にも応募された演題の中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者（応募者、原則として平成 29 年 4 月 1 日時点で満 45 才以下）に、学術奨励賞を授与いたします。授与件数は若干名で、賞金 5 万円あるいはそれ以下の副賞の授与を予定しております。

### 2. 応募資格

本学会の正会員（当該年度大会までに正会員となる者を含む）であり、以下の条件のすべてを満たす者とする。

- 1) 組織適合性ならびに免疫遺伝学の分野に関する学術研究において、その内容が優れていること。
- 2) 当該年度の会費を納入済みであること、または当該年度の学術集会大会までに正会員として会費を納入すること。
- 3) 学術奨励賞を受賞した者は、原則として次年度以降も正会員を継続すること。
- 4) 当該年度の学術集会大会に、筆頭演者として演題を応募すること。
- 5) 応募しようとする演題の内容において、応募者が中心的な役割を果たしていること。
- 6) 応募しようとする演題の内容が、本学会に未発表であること。
- 7) 受賞後に MHC へ原著論文あるいは総説を執筆できること。
- 8) 過去 3 年間に学術奨励賞を受賞していないこと。
- 9) 学術奨励賞の応募者は当該年度の 4 月 1 日において、原則として 45 才以下であること。

### 3. 応募方法

学術奨励賞に応募しようとする会員は、大会（学術集会）の一般演題申込み締切り日までに、一般演題登録用の大会 Web サイト上で 1) 演題抄録を登録する際に、下記の 2) 学術奨励賞・登録用紙をダウンロードして必要事項を記載し、同 Web サイト上に抄録と共にアップロードしてください。この操作により、学術奨励賞への応募が完了します。あるいは登録用紙を学術集会大会事務局（e-mail: [jshi2017@hiroshima-u.ac.jp](mailto:jshi2017@hiroshima-u.ac.jp)）あてに、メールで送信して頂いても結構です。なお大会 Web サイトの学術奨励賞応募画面にも、応募手続きに関する案内が掲載されていますので、そちらも御参照ください。

#### 1) 演題抄録

一般演題に応募した抄録

## 2) 登録用紙

1 頁目に、演題名、演者（全員）、所属（全員）、および応募者（筆頭演者）の氏名、生年月日、年齢、連絡先住所、電話番号、FAX 番号、e-mail アドレスを記入する。2 頁目以降に、応募した (1) 研究の背景、(2) 研究の意義、(3) 日本組織適合性学会との関わり（これまでの関わりと、今後の方針・計画など）を、項目ごとにそれぞれ 300 ～ 400 字程度にまとめる。

## 4. 選考および結果通知について

受賞候補者は学会会場で、「学術奨励賞応募演題」として口頭発表を行う。なお応募者が多い場合には、事前に書類選考を実施する。事前選考で選ばれた演題のみが最終選考の対象となり、事前の書類選考で選ばれなかった演題は、一般演題として発表される。

理事長、学術賞担当理事、学会賞選考委員、ならびに学術賞担当理事が選考した若干名の評議員によって構成される、学術奨励賞選考委員会が登録書類と学術奨励賞応募演題の発表の内容を評価する。奨励賞選考委員会は、学術奨励賞応募演題の演者の中から、若干名を受賞候補者として選考した後に、これを理事長に推薦して承認を得る。なお、委員が受賞候補者と緊密な利害関係にある場合は、当該候補者の審査には加わらないものとする。当該年の学術集会大会中に選考結果を公表し、表彰式を実施する。

## 5. 受賞者にかかる義務について

- 1) 学術奨励賞受賞者は、助成が行われた研究課題に関する報告書（様式は別途通知します）を、日本組織適合性学会事務局 ([hlajimu@m.u-tokyo.ac.jp](mailto:hlajimu@m.u-tokyo.ac.jp)) へてに提出する。
- 2) 受賞後原則として 3 ヶ月以内に、受賞課題に関する原著論文あるいは総説を MHC へ投稿する。

## 6. 助成金の使途

使途について特に制限はないが、学術奨励賞であることの趣旨を理解のうえ、適切に使用するものとする。なお受賞者は使途と、その内訳を前述の報告書に記載する。

## 7. 問い合わせ先

本件に関する問い合わせは、学術集会大会事務局（e-mail: [jshi2017@hiroshima-u.ac.jp](mailto:jshi2017@hiroshima-u.ac.jp)）または学術賞担当理事・西村泰治（e-mail: [mxnishim@kumamoto-u.ac.jp](mailto:mxnishim@kumamoto-u.ac.jp)）へてに、お願いいたします。

**組織適合性検査技術者認定制度  
平成 29 年度 認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ**

組織適合性検査技術者認定制度委員会

委員長 田中 秀則

組織適合性教育委員会

委員長 太田 正穂

**日 時**：平成 29 年 10 月 29 日（日曜日） 時刻：10 時 30 分～12 時 30 分の予定

**会 場**：第 26 回・日本組織適合性学会 大会会場

JMS アステールプラザ

〒730-0812 広島市中区加古町 4-17（TEL 082-244-8000）

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

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

**内 容**：各講習とも質疑応答を含めて、40 分を予定しています。

**(1) HLA に関する基礎医学的な講演**

八幡 真人 先生（シンガポール国立大学小児科）

（HLA と KIR システムー基礎と臨床応用）

**(2) 認定制度試験問題解説を中心とした HLA に関する講演**

木村 彰方 先生（東京医科歯科大学 難治疾患研究所分子病態分野）

（演題未定）

**(3) 臓器移植・再生医療に関する講演**

吉澤 淳 先生（京都大学消化器外科）

（演題未定）

この講習会は、今後 HLA 検査技術者認定を取得、あるいは更新しようとする者を対象に実施されますが、それ以外の大会参加者であっても自由に参加することができます。事前に受講希望届けを提出し、事前登録していただく必要はございません。

## 初心者講習会の開催及び参加希望者募集について

組織適合性学会教育委員会  
委員長 太田正穂  
組織適合性学会初心者教育部会  
部会長 高 陽淑

日本組織適合性学会では、学会大会プログラムにおいてQCワークショップや技術者講習会を開催し、学会員の組織適合性検査に関わる知識や技術の向上を目指しております。

しかし一方では、組織適合性検査に関する基礎的な知識の習得や日常業務に役立つポイントなどの情報交換ができる時間を十分に確保することは難しい状況があります。

そこで、今年度も下記の通り、HLA および HLA 検査に関する基礎的な内容の教育訓練を目的とした「初心者講習会」（複数企画を予定）を大会期間中に開催する事と致しました。

### 記

- 1, 対 象：学会員および大会参加者  
(組織適合検査の初心者で、HLA の基礎的な内容の教育訓練を希望する方)
- 2, 日 時：日本組織適合性学会第 26 回大会期間中
- 3, 会 場：JMS アステールプラザ
- 4, 定 員：各企画につき 20 名程度  
(定員数を超える場合は、当委員会で選考を行う場合があります。)
- 5, 参加費：無料
- 6, その他：申し込みに関する詳細は 7 月中旬に日本組織適合性学会のホームページ (<http://jshi.umin.ac.jp/>) に掲載致します (応募締め切りは 8 月末を予定しています)。

以上

## 平成 28 年度 認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果

開催日時：平成 28 年 10 月 22 日（土）10：00～12：00

会 場：第 25 回・日本組織適合性学会 大会会場  
北海道大学 学術交流会館

回答者総数：68 名

### 1) 旅費・滞在費の財源について 回答者

①	私費	10 名 (14.7%)
②	職場からの支援	48 名 (70.6%)
③	その他	10 名 (14.7%)

③その他の内訳：経費不要，科研費，個人の出張旅費，県からの補助，メーカー展示

### 2) 職場・職務について

職場 回答者

①	病院	34 名 (50.0%)
②	血液センター	4 名 (5.9%)
③	検査センター	4 名 (5.9%)
④	大学（国公立，私立）	14 名 (20.6%)
⑤	民間企業	7 名 (10.3%)
⑥	その他	5 名 (7.3%)

輸血部：15 名，検査部：11 名

製薬会社：4 名

職務 回答者

①	臨床医	2 名 (2.9%)
②	臨床検査業務	39 名 (57.4%)
③	検査受託業務	5 名 (7.3%)
④	製造業関連業務	1 名 (1.5%)
⑤	製品開発業務	3 名 (4.4%)
⑥	教育業務	0 名 (0.0%)
⑦	研究業務	8 名 (11.8%)
⑧	その他	10 名 (14.7%)

臓器：15 名，輸血：15 名，造血幹細胞：8 名

### 3) 参加者の認定制度への関わりについて

認定資格の取得状況および取得への希望 回答者 63 名

- ① 資格取得済み：18 名 (28.6%)
- ② 資格取得希望：36 名 (57.1%)
- ③ 資格取得希望しない：9 名 (14.3%)



取得済みまたは取得を希望する資格

① 取得を希望する認定技術者：33 名

(希望する年；2016 年：1 名，2017 年：7 名，2018 年：6 名，未定：19 名)

取得済み；13 名

② 取得を希望する認定指導者：4 名

(希望する年；2018 年：1 名，2020 年 1 名，未定：2 名)

取得済み；4 名

4) 学会ホームページに掲載された，講習会テキストの事前確認の有無 回答者 66 名  
あり 50 名 (75.8%) なし 16 名 (24.2%)

5) 講習科目の種類は適切であったか？ (数値は 5 点満点の平均点)

平均点 4.7

評価の基準：5：すべての科目において適切であった。	: 41 名
4：一部の科目に問題があったが，ほぼ適切であった。	: 7 名
3：約半数の科目は適切であった。	: 4 名
2：多くの科目について不適切であった。	
1：すべての科目について不適切であった。	

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

	講演評価	テキスト評価
平均点	3.9	4.0

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

7) 講習時間は量的に適切であったか？ (数値は 5 点満点の平均点)

時間評価平均点	その他 要望
4.4	無し

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

## 8) 講習会の開催通知は適切であったか？（数値は 5 点満点の平均点）

平均点 4.8

評価の基準：5：適切であった。	: 48 名
4：あやうく見落とすところであった。	: 9 名
3：他の人から情報を得るまで気が付かなかった。	: 3 名
2：その他	

情報の入手経路	回答数
学会ホームページ	19 名 (31.7%)
メール	2 名 (3.3%)
会社	1 名 (1.7%)
その他 記入無し	38 名 (63.3%)

## 9) その他の意見

- テキストを抄録に入れて欲しい
- NGS タイピングの講演を聞きたい
- 旅費等の問題から大阪・東京等の都市で開催を希望

## 組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2017)

### 組織適合性技術者認定制度委員会

委員長：田中 秀則

副委員長：中島 文明

委員：石塚 敏，一戸 辰夫，太田 正穂，木村 彰方，黒田 ゆかり，高 陽淑，徳永 勝士，  
成瀬 妙子，西村 泰治，湯沢 賢治

### 資格審査部会

部長：成瀬 妙子

部員：安藤 麻子，中島 文明，清水 まり恵

### 試験問題検討部会

部長：木村 彰方

副部長：平山 謙二

部員：一戸 辰夫，太田 正穂，田中 秀則，徳永 勝士，成瀬 妙子，西村 泰治，湯沢 賢治

### QCワークショップ部会

部長：中島 文明

副部長：黒田 ゆかり，高 陽淑，橋口 裕樹

部員：石塚 敏，一戸 辰夫，川井 信太郎，吉川 枝里，木村 彰方，小林 孝彰，田中 秀則，  
成瀬 妙子，宮崎 孔，藤原 孝記，湯沢 賢治

### 参考マニュアル作成WG

HLA タイピング WG：成瀬 妙子，黒田 ゆかり，吉川 枝里，小川 公明

抗HLA抗体WG：高 陽淑，川井 信太郎，藤原 孝記，横沢 佑弥

クロスマッチWG：橋口 裕樹，石塚 敏，黒木 聖久，高山 智美，藤井 明美，金本 人美

表記法WG：黒田 ゆかり，石塚 敏，木村 彰方，田中 秀則

## 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過及び QCWS 試料の総合結果—

中島 文明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

日本組織適合性学会 組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会<sup>#</sup>

### 1. ワークショップの経過

平成 28 年 1 月に第 20 回 HLA-QCWS の開催及び参加案内を、学会誌及び学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載し、平成 28 年 2 月までに 76 施設からの参加申し込みがあった（表 1）。参加内容の詳細は DNA-QC : 71 施設、抗体 QC : 58 施設、クロスマッチ（日本移植学会連携クロスマッチ含む）: 53 施設である。また、QCWS 参加希望施設からの連絡及びデータ収集等については、電子メール主体に実施した。

DNA-QC 及び抗体 QC に用いる試料の選択は、第 24 回大会会期中に開催した QCWS 部会で協議した基本的な方針に従って行った。また、各施設から提出された結果の解析は、検査法別と臨床部門別に解析を行うこととし、臨床部門（以下 4 部門、輸血、臓器移植、造血幹細胞移植、その他（研究等））については、参加申込書の記載に従った。

4 月 11 日に試料を発送し、4 月 19 日に QCWS 結果入力用のシートファイルを参加施設にメール配信した。結果提出の締切りを 5 月 28 日に設定し、6 月 2 日までに全施設から結果が提出された。6～7 月中に提出データの確認と生データの集約作業を終了し、7 月 19 日に各解析担当者に解析用データを配布した。

8 月中に各検査法別の解析を一旦締め切り、解析結果の公表内容を統一化する目的で総合解析担当と各検査法解析担当者間で解析結果の取り纏めについてメールでのディスカッションを行った。平成 28 年 9 月中旬までに、最終報告データを作成し、解析結果をホームページで公開し、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。同時にデータ集を CD-R で配布した。また、解析結果は QCWS 集会での報告及び本学会誌（MHC）への掲載を行った。

### 2. QCWS のテーマ及び試料選択について

DNA-QC のテーマは、①正確な DNA タイピングが出来ること、② DNA タイピング結果の表記を正しく記述できること、③学会の表記法に従って正確に表記すること、④ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型に正確に読替えること、⑤日本人集団における ambiguity となるアレルの解説の 5 点とした。試料は、前年度の QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であること」、「日本人由来で稀な HLA アレルであること」の要件に合う細胞を 4 種類購入し、抽出した DNA の配布を行った。これとは別に、データ収集の目的で、各施設で陰性コントロールのデータ取得について任意参加を呼びかけた。

<sup>#</sup> 日本組織適合性学会 組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会員

田中秀則<sup>1)</sup>、中島文明<sup>2)</sup>、成瀬妙子<sup>3)</sup>、高陽淑<sup>4)</sup>、橋口裕樹<sup>5)</sup>、一戸辰夫<sup>6)</sup>、石塚敏<sup>7)</sup>、太田正穂<sup>8)</sup>、川井信太郎<sup>9)</sup>、吉川枝里<sup>10)</sup>、木村彰方<sup>3)</sup>、黒田ゆかり<sup>11)</sup>、小林孝彰<sup>12)</sup>、藤原孝記<sup>13)</sup>、宮崎孔<sup>14)</sup>、湯沢賢治<sup>15)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 HLA 研究所、<sup>2)</sup> 日本赤十字社 中央血液研究所、<sup>3)</sup> 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野、<sup>4)</sup> 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター、<sup>5)</sup> 福岡赤十字病院、<sup>6)</sup> 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、<sup>7)</sup> 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室、<sup>8)</sup> 信州大学 医学部 法医学教室、<sup>9)</sup> 湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部、<sup>10)</sup> 東海大学 医学部 血液腫瘍内科、<sup>11)</sup> 日本赤十字社 九州ブロック血液センター、<sup>12)</sup> 愛知医科大学 医学部 外科学講座、<sup>13)</sup> 帝京大学 医学部 附属病院 輸血部、<sup>14)</sup> 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター、<sup>15)</sup> 国立病院機構水戸医療センター 臨床研究部移植医療研究室

表 1 第 20 回 HLA-QCWS 参加施設

		(受付日付順)	
1	沖縄県立中部病院	検査科 HLA検査	
2	北里大学病院	輸血部	
3	日本赤十字社 九州ブロック血液センター	検査二課	
4	香川大学医学部附属病院	輸血部	
5	岡山大学病院	輸血部	
6	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	
7	日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所	研究開発部	
8	JCHO 中京病院	検査部	
9	東京女子医科大学	中央検査部移植関連検査室	
10	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	
11	公益財団法人 鹿嶋郷腎研究所	HLA検査室	
12	熊本大学医学部附属病院	中央検査部	
13	東海大学医学部附属病院	臨床検査技術科 輸血室	
14	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	
15	INPO 腎泌尿器疾患研究所		
16	日本赤十字社 近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	
17	公益財団法人 HLA 研究所		
18	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科	
19	日本赤十字社 中四国ブロック血液センター	検査一課	
20	佐賀大学医学部附属病院	輸血部	
21	医薬基盤・健康・栄養研究所	難病資源研究室	
22	松江赤十字病院	検査部 輸血管理室	
23	ジェノタイプファーマ株式会社	ゲノム解析部門HLA検査課	
24	福協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室	
25	株式会社 LSIメディアエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査G	
26	日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター	品質部 検査三課	
27	香川県立中央病院	中央検査部	
28	大阪府立急性期・総合医療センター	移植支援検査センター	
29	札幌医科大学附属病院	検査部	
30	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部	
31	福岡赤十字病院	検査部 移植検査課	
32	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科	
33	北海道ブロック血液センター	品質部検査一課二係	
34	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室	
35	熊本赤十字病院	検体検査課	
36	大分県立病院	輸血部	
37	京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞医療部	
38	山形県立中央病院	輸血部	
39	鹿児島大学医学部・歯学部附属病院	輸血・細胞治療部	
40	宮崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部	
41	株式会社 リプロセル	技術部	
42	社会医療法人北楯会 札幌北楯病院	臨床検査科	
43	株式会社 医学微生物学研究所	品質管理部	
44	虎の門病院	輸血部	
45	徳島大学病院	輸血・細胞治療部	
46	筑波大学	消化器外科研究室	
47	独立行政法人国立病院機構千葉東病院	臨床検査科	
48	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	
49	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科 輸血管理室	
50	静岡県立総合病院	検査部輸血細胞治療科	
51	JCHO 仙台病院	統括診療部臨床検査科診療部	
52	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部	
53	広島大学病院	診療支援部 遺伝子細胞療法部門	
54	秋田大学医学部附属病院	腎疾患先端医療センター	
55	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞治療科	
56	株式会社エスアールエル	総合品質保証グループ	
57	NHO 米子医療センター	臨床検査科	
58	株式会社 保健科学研究所	QAU	
59	長崎大学病院	細胞療法部	
60	三重大学医学部附属病院	輸血部	
61	日本赤十字社東北ブロック血液センター	検査一課	
62	北海道大学病院	検査・輸血部 輸血検査室	
63	株式会社 ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課	
64	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部	
65	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課	
66	名古屋第二赤十字病院	医療技術部	
67	関東甲信越ブロック血液センター 埼玉製造所	品質部 検査三課	
68	国立循環器病研究センター	臨床検査部	
69	株式会社 ベリタス	技術グループ	
70	県立広島病院	臨床研究検査科	
71	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	
72	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部	
73	岐阜大学医学部附属病院	検査部	
74	富山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部	
75	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	
76	愛知医科大学	腎疾患・移植免疫学寄附講座	

抗体 QC のテーマは、①抗体検出が正確に行えること、②エピトープと許容抗原により正確な抗体特異性解析が行えること、③検査結果から導かれる総合判定結果を正しく報告できることの3点とし、テーマに沿った4検体を選択し、配布することとした。また、配布する検体は、「日本人に通常検出される抗 HLA 抗体であること」とした。

交差適合試験については、本年も参加希望施設からの募集参加として以下の2通り実施することを参加申込み時に受け付けた。

- ①配布した抗体 QC の検体と各施設で準備した細胞でのダイレクトクロスマッチ
- ②抗体 QC 試料と DNA-QC 試料の測定結果による仮想クロスマッチ

また、日本移植学会連携クロスマッチでは、抗体 QC で使用する試料を一部共用して実施した。

### 3. 解析方法

冒頭に参考マニュアルの趣旨説明をした後、DNA タイピング結果解析 (DNA-QC) と抗体検査結果解析 (抗体 QC) に分け、それぞれ試料説明、総合解析、検査方法別解析の順に報告した。総合解析では部門別解析と評

価結果に加え、DNA-QC では表記法、抗体 QC では不一致原因など問題点を提起しディスカッションした後、検査方法別解析で説明する形とした。

各解析分担項目と解析担当者 (所属) は、以下のとおりである。近年、ルミネックス法の参加数が増加しデータ量が膨大になるため、DNA-QC では① LABType と② WAKFlow・Genosearch、抗体 QC では① LABScreen と② WAKFlow に担当を分割して解析した。

- 1) DNA タイピング結果解析
  - ・試料説明 HLA 研究所 田中 秀則
  - ・総合解析 (部門別含む) 九州ブロック血液センター 黒田ゆかり
  - ・SSP 法 大阪府立急性期・総合医療センター 高山 智美
  - ・SSO (ルミネックス) 法① 東京女子医大 石塚 敏
  - ・SSO (ルミネックス) 法② ジェノタイプファーマ 奥平 裕子
  - ・SBT (Sanger, NGS) 法 HLA 研究所 小島 裕人

2) 抗体検査結果解析

・ 試料説明

中央血液研究所 中島 文明

・ 総合解析 (部門別含む)

近畿ブロック血液センター 高 陽淑

・ FCM (FlowPRA) 法

福岡赤十字病院 金本 人美

・ ルミネックス法①

帝京大学医学部附属病院 蟹井はるか  
前島理恵子  
藤原 孝紀

・ ルミネックス法②

関東甲信越ブロック血液センター 小林 洋紀

・ その他抗体検査法, クロスマッチ

中央血液研究所 中島 文明

・ 移植学会連携全血クロス

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

DNA 試料は、主に参加各施設の結果から総合的にリ  
アサインし、Ambiguity を可能な限り回避するため、  
HLA-A, B, C, DRB1, DPB1 (一部) アリルについて日本  
赤十字社中央血液研究所で1本鎖DNAに分離後、  
IMGT/HLA 3.24.0 (2016-04) を参照ライブラリーとして  
塩基配列を再確認した。表記は本学会 HLA 標準化委員  
会のアリル表記法と結果報告の原則(2010年版 改訂1.1  
版)に従い記載した(表2)。

抗体試料は、参加各施設の総合判定結果を集計し、  
HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原に対する反応と 0.1%  
未満の抗原に対する反応に分けて記載した。スコア「8」  
は3分の2以上の参加施設が陽性判定した抗原、スコア  
「1」は3分の2以上の参加施設が陰性判定した抗原、ス  
コア「4」はどちらも3分の2に達しない抗原として表  
示した。HLA 遺伝子頻度は日本赤十字社で公開されて  
いる造血幹細胞移植情報サービスの統計資料を参照した  
(<http://www.bmdc.jrc.or.jp/generalpublic/statistics.html#an1>)  
(表3)。

各施設の提出結果の再確認、精度管理及び技術向上に、  
これらの結果と残余試料を活用していただきたい。

4. QCWS 試料の総合結果

配布したDNA及び抗体試料について、本ワークショップ  
で解析された総合結果を示す。

表2 第20回 HLA-QC ワークショップレポート : DNA 試料の総合結果

HLA-Class I	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
<b>H2801</b>	A*02:03:01 <b>A2</b>	A*24:02:01:01 <b>A24</b>	B*38:02:01 <b>B38</b>	B*54:01:01 <b>B54</b>	C*01:02:01 <b>Cw1</b>	C*07:02:01 <b>Cw7</b>
<b>H2802</b>	A*01:01:01:01 <b>A1</b>	A*02:07:01 <b>A2</b>	B*37:01:01 <b>B37</b>	B*48:01:01 <b>B48</b>	C*06:02:01 <b>Cw6</b>	C*08:01:01 <b>Cw8</b>
<b>H2803</b>	A*03:01:01:01 <b>A3</b>	A*11:01:01:01 <b>A11</b>	B*44:02:01 <b>B44</b>	B*51:01:01 <b>B51</b>	C*03:04:01 <b>Cw10</b>	C*05:01:01 <b>Cw5</b>
<b>H2804</b>	A*24:02:01:01 <b>A24</b>	A*33:03:01 <b>A33</b>	B*15:18:01 <b>B71</b>	B*40:03 <b>B61</b>	C*03:04:01 <b>Cw10</b>	C*07:04:01 <b>Cw7</b>

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
<b>H2801</b>	DRB1*04:03:01 DRB4*01:03 <b>DR4</b> <b>DR53</b>	DRB1*08:03:02 - <b>DR8</b> -	DQA1*01:03 DQB1*03:02 <b>DQ8</b>	DQA1*03:01 DQB1*06:01 <b>DQ6</b>	DPA1*02:01 DPB1*13:01 <b>DPw13</b> ※	DPA1*02:02 DPB1*19:01 <b>DPw19</b> ※
<b>H2802</b>	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03 <b>DR9</b> <b>DR53</b>	DRB1*10:01:01 - <b>DR10</b> -	DQA1*01:05 DQB1*03:03 <b>DQ9</b>	DQA1*03:02 DQB1*05:01 <b>DQ5</b>	DPA1*01:03 DPB1*04:02:01 <b>DPw4</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 <b>DPw5</b>
<b>H2803</b>	DRB1*04:05:01 DRB4*01:03 <b>DR4</b> <b>DR53</b>	DRB1*15:01:01 DRB5*01:01 <b>DR15</b> <b>DR51</b>	DQA1*01:02 DQB1*04:01 <b>DQ4</b>	DQA1*03:03 DQB1*06:02 <b>DQ6</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 <b>DPw5</b>	- - -
<b>H2804</b>	DRB1*04:01:01 DRB4*01:02 <b>DR4</b> <b>DR53</b> ※	DRB1*14:05:01 DRB3*02:02 <b>DR14</b> <b>DR52</b>	DQA1*01:04 DQB1*03:01 <b>DQ7</b>	DQA1*03:03 DQB1*05:03 <b>DQ5</b>	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 <b>DPw2</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01:01 <b>DPw5</b>

上段 (斜体): HLA 遺伝子型  
下段 (太字): HLA 型

※このアリルに対応するHLA型が判明していないためアリル名の第1区域などで表記





# 第20回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 DNA-QC—

田中 秀則<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 HLA 研究所

### 1. はじめに

DNA-QC の試料として使用される細胞は、市販品ないしバンクなどに寄託され連結不可能匿名化された細胞を日本組織適合性学会が入手したものをを用いている。また、使用する細胞の選択は、バンクから提供された HLA タイピングを基に QCWS 集会でのアンケート調査結果を参考として選択を行っている。14～19thQCWS 集会でのアンケート調査結果を、表1に示す。(図・表については学会ホームページ参照) 希望が多い「①日本人で一般的なタイプ」として、日本人由来の細胞バンクからの使用細胞の選択を行った。また、日本人で稀な HLA タイプの試料として、2010年までは HLA-A, B, DRB1 座でのアレル頻度が 0.05% 以下の細胞を選択して来たが、2011年以降は 0.5% 以下のアレル頻度の細胞を選択してきている。

### 2. HLA アレルについて

表2に細胞入手時の HLA タイプを、表3に今回の QCWS の結果として得られた HLA アレルを示した。HLA-B 座の全 DNA 試料、HLA-A, C, DRB1 座の一部で、日本人において 0.5% 以下の稀なアレルの DNA 試料であった。また、他の HLA 座での頻度は稀なアレルはなく、HLA-DPB1 座のアレルが DPB1\*13:01/107:01 と NGS を用いたタイピングでも Ambiguity として判定された。また、HLA-DPA1 座で 02:02:01V と判定されており、新たなアレルとして判定された。

### 3. HLA ハプロタイプについて

使用細胞の HLA ハプロタイプについて、HLA-A, B, C, DRB1 座の HLA タイプから「ハプロタイプ推定ツール」(URL: [http://hla.or.jp/med/haplo\\_tools/](http://hla.or.jp/med/haplo_tools/)) を使用して推定を行ったので、その結果を図1-1及び2に示す。

3種類の細胞 (H2801, H2802, H2803) において、4種類の稀なハプロタイプ (日本人でのハプロタイプ頻度が 0.001% 以下と推定される) が推定された。また、これら4種類の稀なハプロタイプと類似するハプロタイプの検索を行った (図1-1及び1-2に示す)。類似のハプロタイプから、稀な4種類のハプロタイプは、2種類で HLA-A 座と B 座間 (H2802, H2803)、他の2種類で HLA-B 座と DRB1 座間 (H2801, H2803) のリコンビネーションにより形成されたハプロタイプである可能性が推定された。

また、稀な HLA ハプロタイプの組み合わせの HLA タイプでの HLA 適合者数について、造血幹細胞適合検索サービスで検証を行った。稀な HLA ハプロタイプを組み合わせとなった H2803 の HLA タイプの場合、HLA-A, B, C, DR での適合者は 0 人であった。一方、H2804 稀でない組み合わせの HLA タイプの場合で 6 人となった。今回の使用細胞の HLA ハプロタイプにおいても非常に稀なタイプであった。



## 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 DNA-QC—

黒田ゆかり<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

### I. 部門別総合解析 (表記含む)

#### 1. 概要

DNA-QC 参加施設は、昨年より 2 施設増加し 71 施設であり、部門別の参加施設数は、輸血部門 39 施設 (54.9%)、臓器部門 42 施設 (59.1%)、造血部門 27 施設 (38.0%) 及びその他 8 施設 (11.3%) であった。評価対象は例年通り HLA-A, B, C 及び DRB1 とし、DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1 及び DPA1 は対象外とした。ローカス別の参加施設数は、HLA-A 及び HLA-B が 71 施設 (100%)、HLA-C が 59 施設 (83.1%)、DRB1 が 69 施設 (97.2%) であった。

使用方法は、Luminex (SSO) 法を使用した施設 (他方法との重複含む) が全体の 71.8% と一番多かった。二番目に多いのは SSP で 28.2% であった。Luminex (SSO) 法による参加が増加傾向にある一方、SSP は 2013 年をピークにやや減少傾向にある。

今回の方法別解析では、参加施設が 1 施設であった INNO-LiPA を解析対象外とした。また、新たな試みとして Luminex (SSO) 法の参加施設には任意で陰性コントロールのデータを提出いただいたが、データを提出した施設は 51 施設中の 30 施設 (58.8%) であった。

詳細は、学会ホームページの第 20 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

#### 2. 判定結果の評価

①各タイピング法での判定が正しいこと、②各タイピング法の結果が総合判定と祖語がないことの 2 つを評価項目とし、60 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、59.56 点と概ね良好な結果を示した。各方法別解析を参考にさせていただきたい。

#### 3. 結果表記の評価

HLA タイピング結果は、日本組織適合性学会で規定されている「HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)」\*1 に基づき、①アンビギュイティ (ambiguity) の表記、② HLA 型への読替え、③ その他 DNA タイピング結果表記について 40 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、39.36 点と良好な結果を示した。

\*1 : [http://jshi.umin.ac.jp/standarization/JSHI-hyouki-2010\\_1.1.pdf](http://jshi.umin.ac.jp/standarization/JSHI-hyouki-2010_1.1.pdf)

表記に関して、減少している表記ミスと減少していない表記ミスがあり、特に減少していなかった以下の 3 点は、ホームページを参照し確認をお願いしたい。

- ①アソシエート抗原の読替え (A203, A2403 など)
- ②第 1 区域と HLA 型が異なる場合の読替え (B\*15:XX, B\*40:XX, C\*03:XX など)
- ③「アリル //+」と「アリル /アリル /+」との区別

#### 4. タイピング結果の評価 (総合評価)

総合評価点は、判定結果の評価 (60 点満点) と結果表記の評価 (40 点満点) の合計点であり、全施設の平均点は 99.0 点と良好であった。総合評価点 60 点未満の施設は無く、60 点以上 100 点未満が 25 施設、満点は 46 施設であった。

#### 5. 試験結果の評価

試験結果の評価は、使用試薬での結果の妥当性を評価項目とし、反応データについて A (不備無し)、B (一部の不備)、C (全体的な不備) の 3 段階で評価を行った。C 評価はなかったが、B 評価が Luminex (SSO) で 3 施設、SSP で 2 施設の計 5 施設あり、データの確認をお願いしたい。

## II. まとめ

---

DNA-QCにおいては、全体的に良好な結果が得られていた。正しく結果を報告するためには、「正確なタイピング」と「正しい報告」が必要である。

「正確なタイピング」には技術のみならず適した環境も必要である。陰性コントロールのデータは環境の指標

となるため、確認することには意義がある。

また、「正しい報告」には、自施設の使用試薬の原理や解像度及びそれらから導かれる結果や Ambiguity についても十分に理解しておく必要がある。今年度は、解析ソフトを用いていない施設のミスアサインや、カタログファイルの未更新による Ambiguity の差が見られ、“解析ソフトの適切な使用”が結果から見えた課題である。

# 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SSP 法—

高山 智美<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 大阪急性期・総合医療センター

## 1. 概要

### 1) 参加状況

SSP 法の参加施設は 22 施設で昨年と同数であった。このうち 16 施設は臓器移植関連の施設であり、SSP 法において臓器移植部門の参加が多い傾向は続いている。

### 2) 使用試薬

MicroSSP の使用が多く、その中でも MicroSSP JPN が 17 施設で使用され最も多かった。中～高解像度の試薬の使用は 2 施設あり、すべて他法の補助試薬としての SSP の使用であった。また、4 種類の試薬で使用施設が 1 施設のため相対的評価ができなかった。

## 2. 解析方法

解析は以下の 4 項目について行った。

- 1) 反応データ
- 2) アリル判定
- 3) 結果の表記法
- 4) SSP 法の結果と総合判定の祖語の有無

詳細な結果データについては、学会ホームページの第 20 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

## 3. 結果と考察

- 1) 反応の不備 (false negative) による判定ミスが 1 施設あった。検査手技や判定方法などを見直し、原因の究

明が必要であると考えられる。反応データの記載ミスが疑われる施設が 2 施設あり、結果シートへの入力の際には注意が必要である。また、陰性はスコア 1 とすべきところを判定不能 (無反応) のスコア 0 と報告した施設が 3 施設あった。

- 2) アリル判定では、ワークシートによる判定が原因と考えられる判定ミスが 2 施設あった。ワークシートだけの判定で全ての ambiguity を網羅することは難しく、解析ソフトの使用が推奨される。また、解析ソフトを用いる場合でも、カタログファイルのバージョンが古い施設があり最新のバージョンで使用する必要があると考えられる。
- 3) 欠番や Null アリルの表記について確認が必要な施設が 2 施設あった。
- 4) SSP 法単独の参加施設で総合判定と祖語のある施設が 3 施設あった。記載ミスを含めて注意が必要である。

## 4. まとめ

本年度の SSP 法の結果は概ね良好であった。明らかな反応の不備が 1 施設、アリル判定のミスが 2 施設あり、検査方法や判定方法の見直しの必要があると考えられる。また、記載ミスが疑われる施設が散見されたので、記載ミスを防ぐ方法 (エクセルのコピー機能の利用等) を検討していただきたい。

# 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SSO (LABType) 法—

石塚 敏<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

### 1. 参加状況

PCR—reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-rS-SO) である LABType の参加施設は、本年度 11 施設であり部門別内訳は、臓器移植分野 6 施設、造血幹移植分野 6 施設、輸血関連分野 7 施設、その他分野で 1 施設の参加があった。(部門重複含む)

### 2. 検査状況

試薬キットは、LABType SSO 6 施設、LABType HD 7 施設、LABType XR 2 施設であった。HLA-A, B, DRB1 Locus は全施設で参加されていたが、HLA-C Locus 8 施設、HLA-DQ Locus 5 施設、HLA-DP Locus 3 施設の参加であった。また、今回新たな試みとした陰性 Control の確認には 2 施設の参加があった。

### 3. 表記法

日本人に限定した推定 4 桁アリルで ambiguity の記載がない報告結果を提出されている施設があった。学会に基づく表記法で確認すると A locus でアスタリスクがない、B locus でスラッシュがなかったり、Null 表記がされている施設もあった。C・DR・DQ・DP locus に関しては問題なかった。

Ambiguity に関しては、同一試薬・同一ロットでも異なる結果報告の施設があった。推定 4 桁アリルにおける結果として確認すると全ローカス・全施設において共通した推定 4 桁アリルの記載があり一致率 100% であった。詳細な報告結果については、学会ホームページに掲載されている「第 20 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

### 4. Control Beads 反応性

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析し Control Beads 反応性を確認した結果、全ての locus において特に問題はなかった。また、今回新たな試みとした Control における Beads の確認においても問題はなかった。

### 5. cut-off 値の変更状況

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析し cut-off 値の変更状況を確認した。A・B・C・DR locus で解析に最大 2 箇所まで cut-off 値の変更を要する施設データがあった。DQ・DP locus では最大で 1 箇所であった。

### 6. ambiguity

同一試薬・同一ロットの DPB1 locus において 3 施設中 1 施設だけ ambiguity の記載があった。各施設から提出して頂いた CSV ファイルを比較すると Beads 73 が偽陽性を示した結果を生じた ambiguity であることが確認出来た。しかし、再解析結果を確認する限り Control 等の反応性は特に問題がなく原因不明であった。

### 7. まとめ

日本人に限定した推定 4 桁アリルで ambiguity の記載がない報告結果を提出されている施設があった。学会 DNA-QC では、日常 DNA タイピングで使用している試薬の解析結果を公認されたアリル全てに対して可能性のある組合せで表記することになっている。また、現在 DNA-QC では ambiguity まで評価対象ではないが、臨床現場において ambiguity まで臨床報告している施設は最新のカタログファイルのバージョンと nomenclature の database を確認して頂きたい。

# 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SSO (WAKFlow, Genosearch) 法—

奥平 裕子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> ジェノダイブファーマ (株)

## 1. 概要

### 1) 参加状況

全参加施設 71 施設中、Luminex 法での参加施設は 51 施設 (71.8%) であった。このうち、キットについては、WAKFlow を使用していた施設が 37 施設 (Luminex 法参加施設の 72.5%)、GenoSearch を使用していた施設が 5 施設 (Luminex 法参加施設の 9.8%) であった。また陰性コントロールのデータは 30 施設において提出された (Luminex 法参加施設の 58.8%)。

### 2) 対象ロークラス

HLA-A、-B 遺伝子座については全施設で実施されており、次いで HLA-DRB1 座は 49 施設、HLA-C 座は 43 施設となっていた。

## 2. 解析方法

ミスアサインもなく結果は概ね良好であったが、明らかに反応不良な施設や、陰性コントロールでの不良データが複数あった。

そこで、Luminex 法の作業工程を以下の 5 工程に分け、各工程の注意点について事例を挙げて示した。

- 1) PCR
- 2) ハイブリダイゼーション
- 3) 洗浄
- 4) 測定及び判定
- 5) 報告

## 3. 解析結果及び考察

- 1) PCR の工程では、以下の 2 点について示した。
  - ・ 目的の遺伝子が増幅されているか?
  - ・ 陰性コントロール (NC) 判定が行えているかどうか?

目的の遺伝子が増幅されているかについては、陽性コントロールピーズの蛍光値の平均値とばらつきのグラフで、他施設よりも平均値が低かった施設やばらつきが大きかった施設は、PCR の増幅が悪いことが原因でプローブの反応性が悪くなっていた。陰性コントロール判定が行えているかについては、陰性コントロールの全プローブの蛍光値の平均値とばらつきのグラフで高値であった施設では、多くのプローブが反応してしまっており、コンタミが疑われた。

2) ハイブリダイゼーションの工程では、Pmin/Nmax の比率が低値であった施設では、プローブの陽性、陰性の差が曖昧でプローブの反応性が悪く、ハイブリダイゼーション効率に問題があることが示唆された。

3) 洗浄の工程では、バックグラウンド値が高く洗浄操作に問題のある施設があった。この施設では、プローブの反応性が曖昧でその蛍光値は全体的に高値を示していた。

4) 測定及び判定の工程では、カットオフ値をアリル頻度によって意図的に変更していると思われる施設があった。また、多数のプローブのカットオフ値変更によって、判定している施設も複数あった。

5) 報告の工程では表記法に従った表記が出来ていない施設が多数見受けられた。

## 4. まとめ

本年度における Luminex 法 (WAKFlow, GenoSearch) の結果は、概ね良好であった。しかし、陰性コントロールでプローブが反応している施設や、多くのプローブのカットオフ値を変更している施設、表記法に従った表記が出来ていない施設があった。もう一度、各工程に操作の見直しを行い、タイピングの精度の向上に努めることが望まれる。

## 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SBT (Sanger, NGS) 法—

小島 裕人<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 HLA 研究所

### 1. はじめに

SBT 法には、Sanger 法と NGS (Next Generation Sequencing) 法がある。2005 年の NGS 法の登場までは Sanger 法のみが利用可能であったが、NGS を用いた HLA タイピング試薬や読み取り機器の普及に伴って、特に諸外国では NGS が中心になってきている。我が国では、これまでに実施されているシーケンシングデータのほとんどが Sanger 法であり、NGS は諸外国ほど普及していない。

### 2. 参加施設・使用キット

SBT 法の QC 参加施設は、NGS 法が 3 施設、Sanger 法が 5 施設であった。

NGS 法は、3 施設とも使用キットが異なり、それぞれ TruSight HLA, ScisGo HLA, NXType NGS HLA であった。これらのうち、TruSight HLA, NXType NGS HLA は Long Range PCR を、ScisGo HLA は Short Range PCR を原理としている。測定機器に関しては、TruSight HLA, ScisGo HLA を使用した施設では MiSeq, NXType NGS HLA を使用した施設では IonPGM であった。

Sanger 法は、使用キットとして SeCore を用いた施設が 3 施設であり、他の 2 施設は AlleleSEQR であった。判定ソフトは、SeCore を用いた 3 施設が uTYPE, Allele SEQR を用いた 2 施設はそれぞれ、Assign, SBTengine であった。

### 3. 結果及び考察

#### 1) NGS 法

各施設で使用キットが異なるため、施設間評価はできなかったが、以下の点は確認可能であり、すべての施設

で問題はなかった。

- ①キットが対象とする領域と、表記すべき区域の整合性
- ②他法でコンセンサスの得られている第 2 区域までの検査結果

#### 2) Sanger 法

施設間でキットの違いがあり、対象領域について、Class I は exon 2 ~ 4 と揃っていたが、DRB1 座は 2 施設が exon 2 のみ、3 施設が exon 2, 3 と相違があった。そのため、DRB1 座に対する評価は、対象領域を加味して実施した。施設間で結果に相違のあった部分を以下に挙げる。

##### ① Ambiguity

##### ● Ambiguity 候補の見落とし

H2804 の A 座は、A\*24:02/03/13/+, \*33:03/10/11/+ がコンセンサスであるが、28D45 の結果は A\*24:02/34/67, \*33:03/11/53 であった。A\*24:02, \*33:03 と A\*24:03, \*33:10 の組み合わせでは、codon 166, codon 167 での Ambiguity が確認され、28D45 の施設は結果を表記する際に見落とししている可能性が高かった。

##### ●最近追加されたアレルとの Ambiguity

H2802 の C 座は、C\*08:01, \*06:02 と C\*08:118, \*06:04:02 の組み合わせが Ambiguity の対象となる。しかし、第 2 区域が同じである C\*08:118, \*06:04:01 は対象から外れ、候補から除外される。また、C\*06:04:02 は 2016 年 1 月に新規登録されたアレルで、参照とした塩基配列が古い可能性があり 28D45 と 28D63 の施設では C\*08:118, \*06:04 が候補に含まれていなかった。同様に H2803 の B 座、H2804 の B 座でも、それぞれ B\*51:192 (2015 年 10 月新規登録)、B\*15:197:02 (2016 年 1 月新規登録) が対象となっていた。



### ● DRB1 座 codon 86 の Ambiguity

H2801 の DRB1 座 は DRB1\*04:03, \*08:03 と DRB1\*04:07, \*08:10 の組み合わせが Ambiguity となり, codon 86 の組み合わせがそれぞれ GTG, GGT と, GGT, GTG であることに起因する。H2803, H2804 の DRB1 座 も同様に codon 86 に関連する Ambiguity となり, これらはキット付属のプライマーを用いることで解消できるが, 判定ソフトに Assign SBT を用いる場合は, 解析前に設定を行う必要がある。

28D45 の施設は付属プライマーを使用しているにもかかわらず, codon 86 に関連する Ambiguity が解消できておらず, 判定ソフトの設定をし忘れた可能性がある。

### ● プライマー設計部位または設計付近の Ambiguity

H2801 の DRB1 座においては, DRB1\*08:03, \*08:14 及び DRB1\*08:03, \*08:71 の組み合わせが, codon 12, codon 94 の塩基配列が異なることから候補から除外される。28D40, 28D63 の施設では絞り込みが行なわれていなかったが, 差異のある箇所がプライマー設計部位であることから, 逆方向の読み取りで不十分であった, または施設での判定基準で判別していないことが理由として挙げられた。同様に, H2802, H2803, H2804 の DRB1 座でも, Ambiguity の絞り込みに施設により差がみられた。

### ② 判定ソフトの違い

H2804 の C 座は, 判定ソフトに uTYPE を用いた施設では C\*03:46 が Ambiguity の候補に含まれていたが, Assign, SBT engine を用いた施設では候補に含まれていなかった。C\*03:46 は C\*03:04 を基本配列として, codon 54 が欠失したアレルであり, データからは否定されるアレルとなり, 結果の齟齬は判定ソフトの問題によるも

のと考えられる。

### ③ 表記

H2801 の DRB1 座は, 28D63 の施設で片方のアレルが DRB1\*04:03 と表記されていた。DRB1\*04:03 は検査対象領域に exon 2 が含まれる場合, codon 57 及び codon 58 の違いによって DRB1\*04:03:01 と \*04:03:02 を区別することが可能であるが, 第 3 区域の表記に関しては, 表記法の項目 III.1.2) には「第 3 区域でのアレルの細分化が知られている場合, アレルが特定できた場合にのみ第 3 区域までアレルを表記する。」とされており, 区別できる場合は表記することが望ましい。

H2802 の DRB1\*10:01, H2803 の DRB1\*04:05, H2804 の DRB1\*14:05 も同様に, これらのアレルはそれぞれ, codon 72, codon 39, codon 58 の違いによって, 第 3 区域を判定することができる。

## 4. まとめ

NGS 法は, 各施設における使用キットが異なるため, 施設間差を評価できなかった。対象領域に対する結果表記の区域及び, 第 2 区域までの他法との整合性は取れていた。

Sanger 法では Ambiguity の相違がみられたが, 検査反応性によるものではなく, 結果書き込み時の候補見落とし, 参照配列が古い, Codon 86 を解析時に設定していないなどの判定に関する事項であった。Ambiguity 候補の見落としなどの人為的ミスに関しては, ダブルチェックなどが必要であり, 目視での判定や判断を伴わない, 参照配列や codon 86 による Ambiguity に関しては, それぞれキットのロットを最新にする, 判定前の設定を忘れないことが必要である。

## 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 抗体 QC—

中島 文明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

昨年度から、QCWS に使用した試料について選定理由を説明し、各施設の結果や評価に役立つ情報提供を目指している。

抗体試料は、日本赤十字社に保管されている在庫量が十分な約 300 種類の HLA 抗血清について、学会から譲渡依頼の手続きを済ませ QCWS 用に確保してある。これらから、解析上の利点、施設認定、アンケートでの要望を考慮し、4 種類を 1 mL ずつ配布すること、日本人に通常検出される HLA 抗体であること、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の非特異反応が含まれる場合があるといった要件で選定している。さらに、①抗体保有者の HLA 型が調べられていること、②過去に採用した特異性を極力避けること、③ HLA-Class I 及び Class II 特異性が含まれること、④検査法により特異性に差が生じる血清を選ぶことを努力目標としている。①～④の追加要件が意図するところは、通常では遭遇しづらい試料を実際に扱うことにより、日常使用している検査法の手技、解析、判定に問題点を見出し、知識、

技術の向上が図れる機会を提供することにある。また、日本移植学会で実施する全血クロスマッチの抗体試料を共通配布している関係で、全血検体の HLA 型との一致も考慮している。

今回採用した抗体試料は、HLA-DR1, DR10 の特異性を有する抗血清を中心に選んだ。このような抗体特異性は、エピトープの共通性から DR4, DR9 或いは DR51, DR53 の特異性を併せ持つことが多く、検出感度や利便性が高い水準で維持されている現在の抗体検査試薬でどのように判定されるか興味がある。さらに、仮想クロスマッチを行った場合、抗体検査試薬のみならず、HLA タイピング試薬でどのローカスを検査すべきかなど、さまざまな問題提起が期待できる。試料説明の詳細スライドは学会ホームページを参照していただきたい。また、今回の抗体試料を用いた各検査法の解析結果も本誌と学会ホームページに掲載されているので、併せて参照していただきたい。



## 第20回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 抗体 QC—

高 陽淑<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

### I. 総合解析 (部門含む)

#### 1. 参加施設の構成

今年度の抗体検査への参加は、輸血部門 36 施設、臓器移植部門 34 施設、造血細胞移植部門 24 施設 (重複あり) の 58 施設 (初参加は 3 施設) であった。施設別 (病院・大学に属する施設、試薬メーカー・検査施設、血液センターなど) の参加割合もこれまでとおり病院・大学に属する施設が最も多く 70% 以上を占めていた。また部門別の参加構成を調査したところ、全部門への参加は 14 施設、単独部門への参加は 30 施設 (輸血 13、臓器 17) で、例年通り造血部門には単独参加は無かった。

#### 2. 抗体検出及び抗体特異性同定結果

全部門での抗体検出 (抗体有無) 結果の一致率は全検体 (抗体試料 4 種類のクラス I & クラス II) において 100% の一致であり、抗体 QC において初の快挙となった。参加部門に関わらず HLA 抗体の有無については継続的に全施設一致となることが望まれる。

また、抗体特異性同定検査を実施した 42 施設中、40 施設は LABScreen や WAKFlow など Luminex で測定する蛍光ビーズ法を用いて結果判定を行っていた。使用試薬とその判定基準が同程度である施設の割合が高いことから特異性同定における一致率も例年以上に高かった (詳細は結果評価の項でも述べる)。

### II. 結果評価

#### 1. 抗体 QC 結果比較について

各施設から提出された総合判定結果について一致状況を調査した。具体的には各試料の判定スコアを集計して、完全一致を “1” としたときの割合を算出し試料間の一致率を比較した。その結果、クラス I 抗体では SH2802、

SH2803 が、クラス II 抗体では SH2801、SH2804 が比較的低かった。

次に、抗原ごとの判定スコア一致率を比較すると、抗体試料 4 種類の全抗原 (クラス I 316 抗原、クラス II 96 抗原) のうち、一致率 0.9 未満となった抗原の割合は、クラス I が 16.1%、クラス II が 21.9%、一致率 0.9 以上ではクラス I が 35.1%、クラス II が 20.8% であった。これらの結果比較から、完全一致が得られないまでもクラス I 抗体特異性の同定結果は、より一致率が高い状況であることがわかる。また、クラス II 抗体特異性については、SH2801 を例とするように DR よりも DQ 抗体における判定の施設間差が大きい傾向にあった。詳細について学会の HP に掲載されている QCWS 解析結果を参照されたい。

#### 2. 総合判定結果不一致の原因

不一致の原因を調査したところ、一致率が 0.9 以上かそれ未満かで原因が異なる傾向があった。以下にそれらを示す。

- ① LABScreen single antigen (LSSA) で測定した際に得られる nMFI が 1,000 ~ 3,000 の領域に含まれる場合。
- ② 用いる試薬 (LABScreen, WAKFlow HLA 抗体クラス I (HR) など) に含まれる抗原の差に依存する場合。
- ③ 一部の施設の反応性や陽性判定基準 (カットオフ) の差による場合。
- ④ 特定の施設の反応性が他施設と大きく異なる場合。
- ⑤ 入力ミス、判定ミスなどケアレスミスと考えられる場合。

これらのうち、一致率 0.9 未満では①~③が、0.9 以上では④、⑤が主な原因であると判断された。

#### 3. 抗体 QC 部門別評価について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原 (結果

シートに太字で記載) について、基準値 (0.67) 以上の構成比率を示す抗原のみを対象として評価点を算出した (評価点の計算方法は学会 HP に掲載)。

その結果、参加施設 58 施設のうち抗体検出については前述のとおり全施設 A 評価であった。

抗体特異性同定については、検査を実施した 42 施設中、評価 A が 40 施設 (95.2%)、評価 B、評価 C がともに 1 施設 (2.4%) であった。評価 B 以上の施設は、昨年 (19th) の 95.5% をさらに上回る結果 (97.6%) となった。

### III. 結語

今回の抗体 QC における総合評価は、全体的にこれまでで最も良好な結果であった。この要因としては、昨年までの傾向と同様に特異性同定検査に用いた試薬が集約

化されてきたこと、またそれに伴う検査手技の精度向上や判定基準の大きな一致などが考えられる。しかし、その一方で継続参加している施設にもケアレスミスが散見されることから、年に一度のタイミングで実施される精度管理の機会を十分に生かして頂きたい。

今回の抗体 QC の結果を踏まえて、来年度以降は、アレルレベルの反応性差を有する抗体について抗原レベル判定で報告する際の考え方や、これまで比較対象外であった DP 抗原に対する抗体の判定結果比較などができるといった内容を取り入れる事を計画している。結果判定の比較検討と施設間差の原因調査に重点をおいていた抗体 QC から、HLA 抗体検査の目的を改めて整理し、その目的に適った検査項目での達成度を確認できるような抗体 QC へと変化していくことで、より臨床に即した (抗体検査の) 精度管理の一助となることを期待している。

# 第 20 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 FCM (FlowPRA) 法—

金本 人美<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

### 1. 参加状況

今回の QCWS で OneLambda 社 FlowPRA 法を使用した施設は、スクリーニングで Class I が 24 施設、Class II が 23 施設であった。シングルアンチゲンは昨年に続き参加施設はなかった。参加施設の内訳は例年と変わらず臓器移植部門での参加が多かった。

### 2. 測定機器と試薬ロット

測定機器、及び試薬ロットの詳細はホームページの解析資料を参照して頂きたい。

### 3. 解析方法

今回、配布試料 (SH2801) を用いて、同一条件下で FACS Calibur, FACS Canto II, Navios の 3 機種で測定し、%PRA に大きな差がないことを確認した。各施設からは RAW データも併せて提出頂き、解析ソフト Flow Jo, Kaluza で再解析を行い、%PRA、取り込みビーズ数等を確認した。

### 4. 解析結果

判定スコアの一致率はクラス I, II ともに 100% と良好だった。しかし、数施設においてビーズのゲート位置のズレ、取り込み数の設定により、十分なカウントに達していなかった。%PRA においてはマーカー設定が各施設により異なり、その結果、%PRA の値は、施設により大きく異なっていた。

### 5. まとめ

FlowPRA 試薬を用いた検査の判定スコアの一致率は前年度同様に 100% で、良好な結果であり問題は認めなかった。しかし、未だ %PRA は各施設において差を認めており、各施設でゲートの位置やコンベンションが適正か否か、マーカーの位置確認、各ビーズの取り込み数を改めて確認することが必要であると考えます。また、判定基準においては、%PRA のみで判定を行っている施設が数施設見受けられ、試薬メーカーが推奨しているヒストグラムでの判定への見直しをお願いしたいと思う。以上の事を注意し、再度機器設定の見直しを行い、次回の QCWS に望んで頂きたい。

## 第20回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 ルミネックス (LABScreen) 法—

蟹井はるか<sup>1)</sup>, 前島理恵子<sup>1)</sup>, 藤原 孝記<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

### 1. はじめに

抗体 QC 参加施設は 58 施設で LABScreen を使用した施設は 39 施設 (67.2%) あった。

部門別参加状況は輸血関連 24 施設, 臓器移植 25 施設, 造血幹細胞 20 施設, その他 (メーカー, 検査会社) 2 施設あり, 複数の部門参加している施設は 21 施設 (53.8%) だった。

LABScreen の方法別実施状況は, スクリーニング検査に Mixd を用いた施設は 8 施設, Multi は 1 施設, PRA (Class I : 6 施設, Class II : 7 施設) があった。Mixd のみ参加施設が 1 施設, LABScreen Single Antigen のみ参加施設が 7 施設あった。Supplement beads を使用している施設は 12 施設あった。

### 2. 結果解析

#### 1) 抗体の有無

配布された検体 SH2801, SH2802, SH2803 及び SH2804 の抗体の有無については, Class I, Class II 共に参加全施設において抗体ありと判定された。

#### 2) 検体前処理

測定時の検体前処理方法は, 未処理, 非特異反応吸着処理, EDTA 添加, 凍結遠心, 複数組み合わせや, 検体毎に前処理が異なるなど, 施設により様々であった。

#### 3) コントロールビーズの施設間差

各検体の Class I, Class II の Negative Control Beads の蛍光値を施設ごとに比較すると, Class I の SH2801 や SH2802 で 500 を越える施設があった。同様に各検体 Class I, Class II の Positive Control Beads の蛍光値を比較すると, S43 の施設は SH2801 Class I, Class II, SH2802 Class II で 1000 以下と低値を認めた。

#### 4) PC/NC の比較

各施設の Raw data より得られた PC/NC 比は各検体 Class I, Class II 共に前処理による違いは認められなかった。

#### 5) 測定値 (nMFI) 比較

S40 の施設で SH2801 Class I Supplement beads のデータの送付間違いがあった。

S43 の施設はすべてのデータにおいて nMFI が低いため, 他施設と比較すると検出できない抗体特異性が認められた。PC ビーズを含む, すべてのビーズの蛍光値が低いことから, 使用した二次抗体に問題があったと考えられた。

S35 の施設は NC ビーズの蛍光値が SH2801 : 1434, SH2802 : 723 と高いため, nMFI が低値傾向になったと考えられた。

S37 の施設はすべてのデータで nMFI が高値傾向であったが, 原因は分からなかった。

#### 6) Consensus

各施設の総合判定結果記入表の抗原別抗体反応値 (判定スコア) において LS-SA 実施施設の結果 70% 以上の一致を得られた抗体特異性を Consensus とした。

全ての検体で Consensus が得られていない抗体特異性が複数存在した。

SH2801 の DQ2, DQ7 抗体判定は判定スコア (8) が 22 施設, 判定スコア (1) が 10 施設, 判定スコア (4) が 2 施設, と Consensus が得られていなかった。LABScreen Single Antigen Class II の DQ2 及び DQ7 のビーズはそれぞれ 5 種類ずつあるが, DQA1 に対する抗体が存在する場合は一部のビーズで陽性になる可能性があることから, この様に異なるローカスに対する抗体が存在する場合の判定は注意が必要である。

## 7) カットオフ値

カットオフ値の設定はそれぞれ nMFI>1000, nMFI>1500, nMFI>3000, Mean>1000, Rxn, さらに各カットオフに加えエピトープを考慮した判定などであった。

## 3. まとめ

LABScreen 参加施設の抗体有無の一致率は Class I, Class II 共に 100% だったが、Consensus が得られていない抗体特異性 (SH2801 Class I : 3, Class II : 2, SH2802 Class I : 10, Class II : 2, SH2803 Class I : 7, SH2804 Class I : 3) が存在した。

Consensus が得られていない要因として、以下のことが考えられた。

- ①各施設の判定基準：カットオフ値は各施設によって異なるが nMFI>1000 で設定する施設が最も多かった。一致率の低い抗体特異性についてはエピトープを考慮した判定の必要性が示唆された。
- ②再検基準：一部の施設において、NC ビーズ、PC ビーズいずれもバラつきが認められ、メーカー推奨再検基準レベルのデータが存在した。
- ③入力ミスやデータの間違い：アレルにより反応が異なる場合の判定結果にバラつきが認められた。第 15 回の QC ワークショップにて同一抗原の複数アレルで結

果が異なる場合、1 つでもビーズが陽性になった場合は陽性と判定、あるいは判定保留として陽性扱いするべきとしている。

### ④検査手技

判定基準は検査目的により異なるが、QC ワークショップにおける一致率を上げるためには、学会推奨の判定基準を設けることが必要であると思われる。

### 4. エピトープ解析

LABScreen Single Antigen を実施した施設を対象にエピトープ解析を行った。判定スコア (8) の一致率と全施設の nMFI の平均を基に解析した。

一致率が高く、Consensus の得られた抗体特異性が認識するエピトープは、単独のアミノ酸を認識するものや、複数のエピトープを認識しているもの、 $\alpha$ ヘリックスに存在するものがあった。Consensus の得られていない抗体特異性が認識するエピトープは、複数の離れたアミノ酸を認識するものが多かった。アレルによりエピトープに反応しない抗体特異性があり、Consensus の得られない要因となっていたと考えられる。各施設のカットオフ値による判定に加え、エピトープを考慮した判定を行うことで、検出感度を落さずに判定することが可能であると考えられた。

# 第20回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 ルミネックス (WAKFlow) 法—

小林 洋紀<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター

### 1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検査試薬は、抗体検出用試薬の WAKFlow MR (クラス I・II) と抗体特異性検出用試薬の WAKFlow HR (クラス I) に分けられる。WAKFlow MR (以下 MR) の参加施設はクラス I が 16 施設、クラス II が 9 施設であり、WAKFlow HR (以下 HR) の参加施設は 11 施設であった。なお、解析結果の詳細は学会ホームページを参照されたい。

### 2. WAKFlow MR (クラス I・クラス II)

データ解析は、検体 SH2801～SH2804 の各試料において、各施設間の蛍光ビーズの Median 値及び Index 値の比較、Median 値の全施設平均の 2SD との比較を行った。クラス I の試薬ロットは全施設同一 (S0B) であったが、クラス II では 2 種類の試薬ロット (S0A, S0B) が使用されていた。血清処理方法は施設によって違いがみられた。

#### 1) MR クラス I

- ① コントロールビーズの比較では、SH2801 において、吸収処理試薬の使用状況に施設間差が認められ、吸収の有無でバックグラウンドビーズ (以下 BB) の Median 値に差が認められた。
- ② S56 の施設は、試薬に添付されている二次抗体と異なる二次抗体を使用していたため、全体的に Median 値が他施設と比較して高値を示し、2SD から外れていた。
- ③ S31 の施設は、SH2802 において、全体的に Median 値が他施設と比較して低値を示し、2SD から外れていた。原因としては、二次抗体の分注不良や洗浄不良などが疑われる。

- ④ Median 値が 2SD を超えるものが散見されたが、Index 値では施設間に大きな差は無く、抗体検出結果は全施設一致していた。

#### 2) MR クラス II

- ① コントロールビーズの比較では、クラス I と同様に、SH2801 において吸収の有無で BB の Median 値に差が認められた。
- ② S56 の施設はクラス I 同様に、全体的に Median 値が他施設と比較して高値を示し、2SD から外れていた。
- ③ 2 種類の試薬ロットが使用されていたが、特にロット間差は認められなかった。また、Median 値が 2SD を超えるものが散見されたが、Index 値では施設間に大きな差は無く、抗体検出結果は全施設一致していた。

### 3. WAKFlow HR (クラス I)

HR は、日本人遺伝子頻度 0.1% 以上のクラス I のアリルを網羅しており、抗体特異性検出用の試薬として、LABScreen Single Antigen と同様の特性を持つ試薬である。データ解析は、各施設間のビーズの Median 値及び 2SD の比較、Calmed 値で判定された抗体特異性の比較、MR と HR の反応性の比較について行った。

- ① SH2801 において、吸収処理の有無で BB の Median 値に差が認められ、2SD を外れる施設があった。吸収処理の有無は、判定結果に影響する可能性も考えられるため、吸収処理後の再検査をメーカーは推奨している。また、一部のビーズで Median 値が 2SD を外れる施設を認め、試薬のロット間差 (S0A, S0B, S0C) による影響と考えられた。
- ② Calmed 値が 5000 以上を示すビーズでの検出状況はほぼ一致しているが、5000 以下では検出状況にバラツキがみられた。また、吸収処理後の Calmed 値での



判定結果に乖離が生じる場合があり、弱陽性シグナルについては、手技や血清処理等に影響される可能性がある。

- ③ MR のカットオフ（初期設定）判定は、概ね HR の特異性と一致していると思われたが、HR の Calmed 値が 3000 以下の反応は、MR での検出は難しい場合があった。

#### 4. まとめ

---

MR（クラス I・II）において、一部の施設で Median

値に乖離がみられたが、Index 値の施設間に大きな差は無く、抗体の有無の判定結果は全施設一致していた。HR でも MR と同様に一部の施設で Median 値に乖離がみられたが、Calmed 値での判定結果に影響は少ないと考えられた。また、Calmed 値が 5000 以下では検出状況にバラツキがみられるので判定の際には注意が必要である。なお、試薬の改良によって、ビーズの種類などの情報が変更されている場合があるため、旧ロットを使用される際においても注意が必要である。

# 第20回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 その他検査法及びクロスマッチ—

中島 文明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

### 1. 参加状況の定義

その他検査法とダイレクトクロスマッチは、扱う抗体試料が異なるだけで検査法はほぼ共通であるため、次のように定義して参加状況を整理した。

① その他検査法：FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の HLA 抗体検査において、SH2801～SH2804 の 4 種類を対象としていること。

② ダイレクトクロスマッチ：LCT, FCM, ICFA などクロスマッチ可能な検査方法において、SH2801/HLA Class I を対象とし、クロスマッチ入力シートに記入されていること。

### 2. その他検査法

その他に分類される検査法は、LCT 法 (1 施設)、AHG-LCT 法 (1 施設)、MPHA 法 (3 施設)、ELISA 法 (1 施設)、ICFA 法 (1 施設) であり、もはや施設間の比較が困難な状況であった。学会ホームページ掲載資料にダイレクトクロスマッチと併せて詳細を掲載しているので、そちらを参照していただきたい。

### 3. クロスマッチ

クロスマッチは、27 施設の参加があり、4 施設がダイレクトクロスマッチのみでそれ以外の 23 施設が双方に参加した。

#### 1) ダイレクトクロスマッチ

ダイレクトクロスマッチは、LCT 法 (4 施設)、AHG-LCT 法 (2 施設)、FCM 法 (7 施設)、ICFA 法 (12 施設) の参加であり、昨年より若干の増加であった。

LCT (CDC) 法は、確実な操作が保証されれば、補体活性を含む生体内反応をより忠実に再現可能な方法とい

える。AHG-LCT (AHG-CDC) 法は、LCT 法と FCM 法の中間に位置する検出感度を示すが、補体依存性と補体非依存性の抗体を両方とも検出するため、結果の解釈には注意が必要である。実際には、細胞の状態、ウサギ補体の細胞毒性、反応時間・温度、判定規準など不確定要素が多く、統一できているとはいいがたい。しかしながら、各結果は試料選定時の特異性とほぼ一致しており、一部で不明な反応が見られるものの必ずしも悲観的な結果にはなっていない。したがって、先に述べた不確定要素の一つ一つの統一が図れば、結果の正確性と整合性が期待されるであろう。

MPHA 法は、以前の QCWS 結果から感作粒子の反応時間の違いが結果に影響したと思われたが、今回、感作時間は統一されているにもかかわらず、結果の不一致が認められる。クロロキンの処理と未処理においても参加 2 施設が逆の傾向であり、血小板特異抗体検出を主目的とする本法において、HLA 特異性を検出するには、もはや無理があると言わざるを得ない。

FCM 法も統一した抗原細胞を使用していないため、一概に結果の比較評価はできないが、各ヒストグラムの形状や S/N 比に基づく判定結果を見る限り大きな問題点はないといえる。注意すべきは、測定細胞数が少ない施設は、ヒストグラムの乱れが認められる点と、判定規準が完全に統一されていない点で、これらはグレーゾーン近辺の反応において判定結果に影響する可能性があると思われる。

ICFA 法は、操作手順及び判定規準が統一されているため、結果の整合性はもっとも高いといえる。その中で、使用する血液細胞によってはバックグラウンド・シグナルが上昇し、計算上でインデックス値の低下を招くことがあるため注意すべきである。Cw7 特異性において、



ICFA 法低値と FCM 法高値という差が認められ、抗体をルミネックス・ビーズ上で濃縮する ICFA 法が高値になると予測されるが、逆の結果になった理由は不明である。

ダイレクトクロスマッチ各法は、本稿で定義する「その他検査法」とはほぼ同一であり、移植・輸血免疫において、生体内反応をダイレクトに観察できる有力な手段といえる。これら Cell Base Assay は、移植・輸血医療の貢献度が高く、今後もその技術水準の維持・向上に努めていくべきと思われる。

## 2) 仮想クロスマッチ

仮想クロスマッチは、抗体試料 (SH2804) と 2 本の DNA 試料 (H2803, H2804) を指定し、今回から HLA クラス II も対象とした。

SH2804 のクラス II 抗体特異性は、DR1, DR10 に加え DR51, DR53 を高力価で保有するが、DR51, DR53 と連鎖の強い DR15, DR4 は反応しない。H2803 は DR15-DR51, DR4-DR53 の HLA 型であるため、ダイレクトクロスマッチを行った場合は DR51, DR53 との反応で陽性になる。一方、この組み合わせで仮想クロスマッチを行っ

た場合、DNA 試料の DRB1 アリルしか検査していない施設は陰性判定、DRB3/4/5 までタイピングした施設は陽性判定となる。しかしながら、DRB3/4/5 をタイピングしていない幾つかの施設が二つの理由で陽性判定とした。一つは DR4 の蛍光値が若干 1000 を超え DR4 を「反応が予測される抗体特異性」とした施設、もう一つは抗体特異性と DR15-DR51, DR4-DR53 連鎖から反応を予測した施設である。後者は非常に重要であり、検査だけで判らない結果を HLA システムの知識で予測し、追加検査のきっかけを持たせたことにある。今回の例は、DR51, DR53 の高力価抗体が実際の移植医療でどの程度影響するか不明ではあるが、知識不足が患者の不利益になりうる良い例と言えないだろうか。

仮想クロスマッチは、確実な HLA タイピングと抗体検査に加え、HLA の知識が重要な要素といえる。毎回、フルローカスの HLA タイピングと Single supplement まで使用する抗体検査は必ずしも実施できないので、仮想クロスマッチは、それを補う知識と注意力を鍛えるには格好の場といえる。

# 第20回 HLA-QC ワークショップレポート —日本移植学会連携 全血クロスマッチャー—

橋口 裕樹<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 福岡赤十字病院 検査部移植検査課 / 輸血細胞治療部 / 事務部医療連系課

<sup>2)</sup> 日本移植学会 移植関連検査委員会 委員

### 1. 概要

平成25年4月より日本組織適合性学会と日本移植学会が連携し、全血試料由来のリンパ球を用いたクロスマッチの精度管理を試行的に実施する事となり、今回で4回目の実施となった。

### 2. 経過

昨年より、参加申し込みがQCWSと共通になり学会ホームページより申し込み可能となった。これを機に、参加数は徐々に増え、今年度は43施設の参加があり過去最多であった。

参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が25施設、移植関連病院が10施設、検査センター3施設、血液センター3施設、試薬メーカー1施設、研究所1施設であった。日本移植学会移植関連検査委員会で採血した全血の発送は、日本組織適合性学会が平成28年4月にQCWS試料を配布するのに合わせ、血清配布の翌々週に全血を参加施設に配布した。ACD-A液入全血の発送には、東京より宅配便（常温）で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着し、細胞の生存率も概ね良好であった。9月に集計結果を各施設にメールで送信、9月に開催された第52回日本移植学会総会（東京都）、10月に開催された第20回QCWS（札幌市）にて報告を行った。尚、29年2月に開催される第50回日本臨床腎移植学会（神戸市）でも報告予定である。

### 3. 試料選択及び検査方法

ドナー全血は、日本移植学会移植関連検査委員会で採血したACD採血7.5mlを準備した。ドナーHLAタイプは、日本人に高頻度に発現しているものを選択した。血清は、QCWS部会で準備されたSH2803、SH2804を

選択した。SH2803はHLA-Cw抗体（C\*07:02, C\*12:02）-DP抗体（DPB1\*05:01）、SH2804はDR51抗体（DRB5\*01:02）がドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody; DSA となる想定で選択した。

検査方法は各施設で日常的に行っている方法を選択可とした。今回、初の試みとしてクロスマッチプロトコル（案）を作成し、任意参加で27施設から測定データを送って頂いた。方法別にみると、フローサイトクロスマッチ Flow Cytometry Cross match; FCXM法が参加施設の72%と最も多く、次いでリンパ球細胞傷害試験 Complement dependent cytotoxicity; CDC法が42%、Immunocomplex capture fluorescence analysis; ICFA法が33%であった。

### 4. 結果

各方法でSH2803、SH2804ともに高い一致率であったが、一部の施設においては結果の誤入力と思われるものも認められた。FCXMにおいて乖離した施設もあり、カットオフに起因するもの、機器設定に起因するものを認めた。CDCにおいては、Bリンパ球を用いた方法で施設間差が大きかった。詳細な各方法の一致率は、学会ホームページを参照して頂きたい。

### 5. まとめ

今回も高い一致率の結果であったが、一部に施設においては問題となる判定も散見した。初の試みであった今回のクロスマッチプロトコル（案）は、主に反応させる細胞数を指定したまでにとどまり、詳細な反応条件には踏み入って内容ではなく、プロトコル（案）を使用することで大幅な施設間差の是正にはつながってはいなかった。今後は、プロトコルに修正を加え、全血を用いたクロスマッチの精度管理を推進していきたいと考える。

## HLA の基礎知識 3

小川 公明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会

HLA 検査には、患者が保有する HLA アリルを確定する HLA (抗原または DNA) タイピングと、妊娠、輸血、移植により非自己 HLA 抗原に感作された場合に産生される抗体を検出する抗 HLA 抗体検査があります。それぞれ複数の検査方法が考案され、現在は一部を除いてキット商品が存在します。今回は、各検査方法の概要と、キットを用いた場合のロット変更時等の精度管理について簡潔に述べることにします。

**キーワード：**HLA-DNA タイピング, PCR, アンビギュイティ, 抗 HLA 抗体検査, 精度管理

### はじめに

今回は HLA 検査の導入を考える場合を想定し、各検査方法の特徴を理解し、導入後に検討すべき事項等について、キット使用を前提に解説します。数ある臨床検査のなかでも、HLA 検査は特に専門知識が要求される検査です。しかし、HLA 検査の結果が臨床の場と与える影響を鑑みると、たとえ初心者であっても、結果の正確性、つまり高精度な結果を出すことに妥協は許されません。これまで解説してきた HLA の特徴を理解し、使用するキットの説明書を誦んじる位に熟読し実施することが特に大切です。一検体、一検体を丁寧にかつ正確に処理することが検査を担当する私たちの責務であると思えます。

### 1. HLA-DNA タイピング

HLA アリルの特異的塩基配列多型の大半は、エクソン内の幾つかの超可変領域に集中しています<sup>1)</sup> (図 1)。HLA-DNA タイピングは、主に超可変領域の塩基配列の違いを識別することで、多くのアリルを識別しています。

ほとんどの検査キットが超可変領域含む領域を増幅するために、PCR プライマーをその両外側に設定しています。しかし、実際には超可変領域以外にも多型が存在します。従って、キットの種類、またキットに含まれる試薬のバージョンによりタイピングできないアリルや多型が存在することがあります。

これまで、様々な HLA-DNA タイピング方法が考案されてきましたが、日々増加する公認アリルに厳密に対応するには、度重なる改良、更新が必要であり、市販のキットとして、その品質と簡便さを保ちつつ頻繁な更新を行うのは不可能にも近いと言えます。こうした事情から現在までに定着して来たのは、ほぼ下記の 3 法となりました (表 1)。何れもキット化された商品が販売されていますが、キット導入に際しては、杓子定規と思うくらいキット説明書に従うことが必要です。例えば、サーマルサイクラーの機種や、ヒートブロックの材質、PCR チューブ、反応時間、増幅試薬等は、キット設計者の意図・経験 (検討結果) が十分に反映されており、説明書に従うことで最良の結果が期待できます。キットを使いこなせることが習熟への第一歩です。

受付日：2017 年 2 月 16 日、受理日：2017 年 3 月 17 日

代表者連絡先：小川 公明 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5 階 特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会

TEL: 03-5776-0048 FAX: 03-5776-0046 E-mail: kimiakiogawa@flrf.gr.jp

AA Codon	10	15	20	25	30	35	40	45																																												
DRB1*01:01	CA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA TGT CAT TTC TTC AAT GGG ACG GAG CGG G.TG CCG TTG CTG GAA	TGC ATC TAT AAC CAA GAG GAG TCC GTG CGC TTC GAC AGC GAC GTG GGG GAG TAC CGG	DRB1*03:01	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*04:01	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*04:03	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*04:04	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*04:05	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*04:06	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*04:07	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*04:10	GA T-C TC- -A CA -G- -	DRB1*07:01	GG- -A- A-G- -	DRB1*08:02	GA T-C TC- -C- GG- -G- T- -	DRB1*08:03	GA T-C TC- -C- GG- -G- T- -	DRB1*09:01	AA- -G- -G- -G- -	DRB1*10:01	GA G- G- -G- -G- -	DRB1*11:01	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*12:01	GA T-C TC- -C- GG- -G- T- -	DRB1*12:02	GA T-C TC- -C- GG- -G- T- -	DRB1*13:01	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*13:02	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*14:03	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*14:05	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*14:06	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*14:54	GA T-C TC- -C- -C- -G- -	DRB1*15:01	C- -G- -G- -G- -G- -	DRB1*15:02	C- -G- -G- -G- -G- -	DRB1*16:02	C- -G- -G- -G- -G- -

第1超可変領域

第2超可変領域

図 1 HLA-DRB1 アリルのエクソン 2 塩基配列の一部 (文献 1, 2 より作成)

「-」は HLA-DRB1\*01:01 と同じ塩基を表す。記載したアリルは日本人集団で 0.1% 以上の頻度である。

表 1 HLA (DNA) タイピングの種類

方法による分類	解像能	DNA 量	処理能力	設備投資	ランニングコスト
PCR-SSP	低 / 高	多量	数件 / 日	数百万円	安価
PCR-SSO/rSSO	低 / 高	少量	百件 / 日	一千万円	超安価
PCR-SBT	高	少量	数件 / 日	数千万円	高価

PCR-SSP: Polymerase chain reaction-sequence specific primers  
 PCR-SSO (rSSO): Polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide  
 PCR-SBT: Polymerase chain reaction-sequencing based typing  
 現時点で、全ての方法で市販キットが存在する。

以下では DNA を用いた HLA タイピングについて、市販キット使用に共通する基本的な事項について説明します。

1) DNA 抽出

DNA は細胞核の中に核タンパク質とともに折りたたまれて存在しています。細胞は外部と細胞膜で仕切られ、細胞核は核膜によって細胞質と仕切られています。細胞膜と核膜は、リン脂質二重層で構成されています。この 2 つの膜の内側に、HLA 検査に必要な DNA が存在します。DNA 抽出には、各種のキットが存在しますが、何れの方法も、細胞膜、核膜を破壊し、高分子タンパク質と DNA が混在するなかから DNA (あるいは核酸) だけを析出あるいは吸着することにより回収しています。DNA 抽出に用いるサンプルとしては、抽出のしやすさ、DNA の収量、純度において、抗凝固剤として EDTA を

添加した末梢血が最も適しています。それ以外の抗凝固剤については、ヘパリンは PCR 増幅を阻害することが知られているため避けるべきです。DNA 抽出の操作は無菌状態の環境が理想であり、ピペット、チップ、チューブ等、DNA に触れる器具は全て滅菌状態のものを使用し DNase (DNA 分解酵素) 等のコンタミネーションを避けることが重要です。また、PCR 増幅産物のコンタミネーションを徹底して排除する必要があるため、器具機材は DNA 抽出専用のものを準備する事が必須です。DNA 抽出を行う実験室は、出来れば空調 (陽圧) も含め、PCR を行う部屋とは独立した環境が望ましいと言えます。

通常、一つの細胞には 6.6 pg の DNA が含まれています。また、末梢血中の細胞数は、健常者でも 2 倍以上の開きがありますが、患者となると細胞数にはさらに大き

な差が存在します。このため、日常検査での DNA 収量は、サンプルや抽出法によって異なります。しかし、各タイピングキットは至適 DNA 濃度・純度等の条件が設定されていますので、至適条件に合わせた調整が必要です。そのためには DNA の濃度、純度を分光光度計で測定し、キット指定の濃度、純度に調整します。十分な調整なしに DNA を使用した場合、キットの性能を十分に発揮できず無駄な再検査に繋がる可能性が拡大しますので留意してください。

DNA 濃度は分光光度計 (OD260/280 nm の測定可能なもの) で測定しますが、260 nm での吸光度 1.0 の場合は DNA 濃度 50 µg/ml に相当します。また、DNA 純度は 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比が 1.8 程度となるのが最も良いとされています<sup>3)</sup> (図 2)。抽出した DNA の凍結融解は、DNA 鎖の切断が生じるため好ましくありませんが、一般には冷蔵で長期間の保存が可能です。一旦希釈した DNA を再度濃縮するのは操作が煩雑であるため、できれば希釈前の原液で保存し、要時調整することを勧めます。もちろん保存原液には DNase 等が混入しないように十分な注意を払うことが必要ですが、保存した DNA は、再検査に用いる以外にも、キットのロット変更時などには HLA アリル既知 DNA として、検定に使用することも可能です。

## 2) PCR; Polymerase chain reaction

DNA はデオキシリボースにリン酸と塩基が結合して構成されています。塩基には A (アデニン), G (グアニン), C (シトシン), T (チミン) の 4 種が存在します。A は T とだけ、G は C とだけ水素結合で繋がる相補的關係にあり、二本鎖 DNA (二重螺旋) を形成します。DNA は高温になると二本鎖結合が解かれて一本鎖にな

**260nmの吸光度=DNAの最大吸収波長**

**280nmの吸光度=タンパク質の最大吸収波長**

260nmでの吸光度1.0がDNA50µg/mlに相当

**吸光度 × 50µg/ml × 希釈率 = DNA濃度**

**$\frac{260\text{nmの吸光度}}{280\text{nmの吸光度}} = 1.8 \sim 2.0$** がDNA純度が良い

図 2 DNA 濃度と純度

分光光度計で得られたデータからの DNA 濃度・純度の算出法を示す。

ります。PCR 反応では、濃度、純度を調整した DNA 溶液にプライマー (20 ~ 30 塩基程度の塩基配列特異的一本鎖合成 DNA)、4 種の塩基、Taq ポリメラーゼ (DNA 合成酵素) を添加します。まず高温 (通常 90 度以上) で DNA を一本鎖にしてから 60 度前後まで一気に温度を下げると、一本鎖 DNA 塩基配列の相補的な部分にプライマーが結合します。するとプライマーの 3' 端から、Taq ポリメラーゼの作用により DNA の塩基配列に相補的な塩基が 5'→3' 方向に次々と付加、結合されることで相補鎖が伸長合成され二本鎖を形成します。この温度の上下を 30 回程度繰り返すことにより、プライマーで挟まれた領域の DNA を数十万倍に増幅することが出来ます。本工程については、器具、機材、反応時間等、全てにおいてキットの説明書に忠実であることが重要です。

## 3) PCR-SSP; Polymerase chain reaction-sequence specific primers

各アリル (アリル群) に特徴的な塩基配列特異的プライマーセットが分注された PCR プレートを用いて PCR を行います。PCR 増幅産物の有無を電気泳動によるバンドの有無で判定します。バンドが確認されればサンプル DNA にそのプライマーセットと相補的塩基配列が存在していることとなります。バンドが確認されない場合は PCR 増幅が起きていない、つまりプライマーセットの両方と相補的な塩基配列が存在しないこととなります。ここで、片方のプライマーのみと相補的な塩基配列があっても PCR 増幅は行われなことに留意が必要です。

PCR 増幅産物のサイズはプライマー毎に異なるため、必ずキット指定のサイズマーカーを同時に泳動して、目的の分子量の PCR 増幅産物であることを確認します。プライマーセットごとに陽性・陰性を判断し、原則として専用解析ソフトウェアにより、アリルを判定します。ワークシートでの判定も不可能ではありませんが、複雑化し続けるアンビギュイティ (不確実性。例えば、アリルの組み合わせが区別できないヘテロ接合など) まで判読するのは困難です。本法は、HLA タイピングのなかでは最も設備投資が少なく簡便な方法で、豊富なキットが商品化されています。一検体毎にパッケージされているキットも多く存在し、処理検体数が比較的少ない検査室で採用されています。また、Low resolution (血



清学レベル) キットにより第一区域が確定すれば、第二区域を精査出来る High resolution (高精度) キットも存在しますので、他検査方法でのアンビギュイティを絞り込むための再検査としても有用です。本法は簡便である一方、検査に用いる DNA 必要量が他の方法に比べて多いことが欠点です<sup>3)</sup>。

#### 4) PCR-SSO (rSSO); Polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide

HLA-DNA タイピングとして最初に考案された方法です。

PCR 増幅産物の DNA をアルカリ変性等で一本鎖にし、メンブランフィルターやマイクロプレートに固相化後、各アレル (アレル群) に特異的な塩基配列に相補的なプローブ (20 ~ 30 塩基程度の一本鎖合成 DNA) を反応させ、サンプル DNA と二本鎖を形成するか否かを判定する方法です。開発当初は、公認されていたアレル数が限られていたことから、多数検体のサンプル DNA を一枚のメンブランフィルターに固相化し、プローブ数に応じた枚数を用意して検査していました。しかし現在では、アレル数が著しく増加したため、マイクロプレートにサンプル DNA を固相化するのではなく、プローブを固相化するように逆向きに改良されました。このため、現在一般によく行われている検査方法は reverse SSO (rSSO) と呼ばれています。また、現在では、固相化担体にポリスチレンビーズを用いたものが主流となっています。特に、ポリスチレンビーズに蛍光色素を組み込んだルミネックスビーズは、100 色の蛍光色調を識別できるフロー分析機器 (ルミネックス, Luminex) と併用することで、100 種類のプローブ反応を一度に測定することが可能となり、専用の解析ソフトウェアを用いて反応パターンから HLA アレルを判定する系が開発され、キットとして商品化されています。これらの rSSO キット、とりわけ Luminex キットの登場で、タイピング検査の効率は 100 件程度 / 日も可能なほど飛躍的に向上しました。また、専用の解析ソフトウェアで判定するため、想定されるアンビギュイティの全てを確認することが出来ます。処理数が多く、一検体当りのキット試薬単価も比較的安価であり、DNA 必要量が少ないという利点を持ちますが、その一方で、分析機器の購入など高額な初期設備投資が必要となります。しかし、分析機器は抗 HLA 抗体検査にも利用可能ですので、抗 HLA 抗体検査

の導入を合わせて考えている検査室には有力な選択肢になるでしょう<sup>3)</sup>。

#### 5) PCR-SBT; Polymerase chain reaction-sequencing based typing

PCR 増幅産物にシークエンスプライマーを加えてシークエンス反応を行い、シークエンサーにより塩基配列を判読する方法です。判読された塩基配列情報を、専用の解析ソフトウェアを用いて、公表されている HLA アレルの塩基配列データと照合してアレルを判定します。前述の PCR-SSP 法や PCR-SSO 法がプライマーやプローブとの相補性を利用した断片的な塩基配列の識別によってタイピング判定を行うのとは異なり、SBT 法は幅広い領域の塩基配列情報からタイピング判定を行うので高精度な結果が得られます。現在もっとも普及している SBT 法 (サンガー法) では、両親由来の HLA 遺伝子の 2 本を一度に増幅して判定するため、塩基配列の組み合わせが確定できない若干のフェーズアンビギュイティ (phase ambiguity) が存在します。一方、次世代シークエンサー (Next Generation Sequencer: NGS) を用いた SBT 法では、2 本の HLA 遺伝子の塩基配列情報を 1 本ずつ別々に読み取ることが可能であり、いかなる組み合わせでも各アレルを確定することができます。SBT 法は DNA 必要量が少く、第三区域 (解析領域を広げれば第四区域まで) を確定できる利点がありますが、アレル判定までにある程度の時間を要します。また、シークエンサーや判定ソフトの購入など、設備投資も高額になります<sup>4,5)</sup> し、キットや試薬類も比較的高価なものが多いのが欠点です。

#### 6) アンビギュイティと表記法

HLA-DNA タイピングでは、ほとんどの場合第一区域は確定できますが、公認アレル数が増加した現在では、第二区域において複数のアレルの組合せが識別不能な状態が存在します。これをアンビギュイティと呼びます。原因は幾つかつあります。一つは、検査対象 (PCR 増幅) 領域外に識別すべき塩基配列多型が存在する場合です。また、とくに低頻度アレルでは、特異的な塩基配列に対応するプローブや SSP プライマーがキットとして供給されていないことに起因するアンビギュイティもあります。さらに、これらの問題が解決されても、ヘテロ接合の場合、塩基の由来がどちら側か分からないことによるアンビギュイティ (フェーズアンビギュイティ) が

存在します (図3)。一般に、保有するアレルの組み合わせによりアンビギュイティは変化しますので、HLA 家系図を作ることにによりアンビギュイティを解消できることがあります。あるいは、複数の検査方法を組み合わせることによってアンビギュイティを減らすことも可能です。ただし、公認アレルがいまだに増え続ける現状では、NGS を用いたタイピングを用いない限り、アンビギュイティを皆無にすることは困難です。

こうした検査結果を報告する際におけるタイピング結果の表記法について、日本組織適合性学会ではホームページに詳細を公表しています。そこでは、第二区域の候補アレルが4種類以上ある場合は+としてまとめています<sup>6)</sup> (表2)。また、第三区域、第四区域のアンビギュイティは、臨床的な意義が小さいため、第二区域までを表記することになっています<sup>6)</sup> (表3)。また、前号で解

説したように B15, B40, Cw3, DQ3 では、第一区域からは HLA 型を想定し難いアレルが存在しますので、スプリット抗原名と合わせて報告することにより臨床現場での誤解を避けるなどの配慮が推奨されます<sup>7)</sup>。

## 2. 抗 HLA 抗体

移植前に実施する抗体検査は、標的にドナー由来リンパ球を使用するリンパ球交差試験と、標的に HLA 抗原分子を固相化したルミネックスビーズまたはラテックスビーズを擬似リンパ球とした抗 HLA 抗体検査に大別されます。ともに超急性を含む拒絶反応を惹起するドナー HLA 抗原に対する抗体の検出を目的にしています。これらは、移植後の抗ドナー特異的抗体 (Donor Specific Antibodies: DSA) の検出にも威力を発揮します。

一般に移植後はドナー由来リンパ球の入手が難しいた

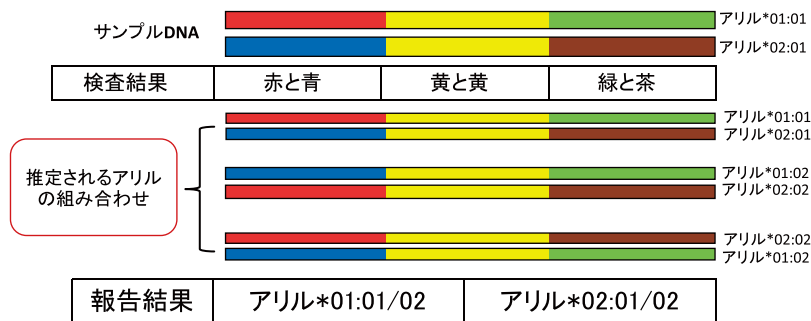


図3 フェーズアンビギュイティの模式図

超可変領域を赤、青、緑、茶で示す。この図にある例では、3通りの組み合わせから一つに絞り込むことは出来ない。

表2 HLA (DNA) タイピング結果の表記法 (文献6 改変)

DNA タイピング結果	HLA 型	JSHI 表記 (2017.2 現在)	NMDP 表記
11:01/11:02/11:03/11:05/11:07/11:09/11:12/11:13/11:15/11:16/ 11:21N/11:22/11:23/11:24	A11	A*11 : 01/02/03/+	A*11CECV
11:01/11:03/11:04/11:05/11:06/11:07/11:09/11:12/11:13/11:15/ 11:21N/11:22/11:23/11:24	A11	A*11 : 01/03/04/+	A*11CEFP
11:01/11:04/11:05/11:07/11:09/11:12/11:13/11:15/11:21N	A11	A*11 : 01/04/05/+	A*11CEFF

多くの場合、検査結果にはここで示すように多くのアンビギュイティが存在している。NMDP 表記とは、全米骨髄バンク等で採用されている表記法であり、アンビギュイティ毎にアルファベットでコード化しているが、コンピュータによるマッチングソフトの使用を前提とする。

表3 日本組織適合性学会でのアンビギュイティ表記法の原則 (文献6 引用)

アンビギュイティが存在する区域	アレル数 (判別出来ない)		
	2種類	3種類	4種類以上
第2区域	HLA-A*02 : 02/04	HLA-A*02 : 02/04/07	HLA-A*02 : 02/04/07/+
第3区域	HLA-A*02 : 01	HLA-A*02 : 01	HLA-A*02 : 01
第4区域	HLA-A*02 : 01 : 01	HLA-A*02 : 01 : 01	HLA-A*02 : 01 : 01



め、ルミネックスビーズまたはラテックスビーズを用いた抗 HLA 抗体検査が実施されます。移植を受けた患者は、移植後長期にわたってドナー由来の HLA 抗原による感作が継続するため、DSA が産生される可能性が高くなります。DSA は移植後初期においては移植臓器に吸収されるため、ドナー特異的抗原以外に対する抗体である NDSA (Non DSA) が主に検出され、このため DSA が紛れてしまうことがあります。そのため、検出力と特異性が高い抗 HLA 抗体検査を行うことで、移植後の拒絶兆候を見逃さないようにすることが重要視されています<sup>8)</sup> (表 4)。

### 1) リンパ球交差試験

- **CDC**; Complement Dependent Cytotoxicity=LCT; Lymphocyte Cytotoxicity Test

1960 年代に考案され、それ以降臓器移植時の必須検査となりました。これまでに膨大な記録・知見が蓄積されています。しかし、検査キットは存在せず、ラボ毎に細かな手順が多少異なっているため、データの再現性を担保し、データ比較や検証を行うために、今後日本組織適合性学会によって標準化されることが期待されます。

- **FCXM**; Flow Cytometry Cross Match

1980 年代に測定に flow cytometry を用いることで高感度化したリンパ球交差試験として考案されました。CDC に次ぐ歴史があり、十分な知見が蓄積されています。この方法も検査キットは存在せず、今後の標準化が期待されます。

- **ICFA**; Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis

2010 年代に日本で考案されたルミネックスを用いた高感度リンパ球交差試験であり、測定キットが存在します。新しい方法のため移植成績との関連等の知見の蓄積が今後の課題と言えます。

### 2) SBA; Solid Beads Assay

- **PRA**; Panel Reactive Antibody

米国において、移植幹旋事業の迅速化を期待して考案されました。臓器移植を待つ患者が、いざドナーが出現した際にどのくらいの確率でクロスマッチが陽性になるかを予め把握するためのものです。事前に数十名のパネルのリンパ球とのクロスマッチ検査を実施するもので、全て陰性だった場合には、突然出現するドナー候補に対してもクロスマッチ陰性である場合が高いことが予想されます。HLA タイプが判明しているパネルリンパ球を常時準備しておくことが困難であることから、現在では、数十種類の培養細胞から収集した HLA 抗原分子をビーズに固相化したものを擬似リンパ球として用いる方法が行われています。測定にルミネックスを使用する系と FCM を使用する系とがそれぞれキット化されており、抗 HLA 抗体の有無が判定できます。大まかな HLA 特異性の推定が可能であり、抗 HLA 抗体のスクリーニング (Screening) 検査に位置づけられます。

- **抗体同定検査** (Single Antigen)

上記の方法を詳細化したもので、ルミネックスを使用する系と FCM を使用する系がキット化されていますが、解析ソフトウェアが充実しているルミネックス系が主流になってきました。各ルミネックスビーズに一種類の HLA 抗原分子が固相化されているため、どのビーズが陽性反応を示すかを測定することで抗 HLA 抗体の特異性が判定でき、DSA か否かを把握できます。現在では、日本人集団に認められる殆どの HLA アリルを網羅するキットも市販されています<sup>9)</sup>。

通常、自身が保有する HLA 抗原に対する抗体は産生されませんので、抗 HLA 抗体の産生は非自己 HLA による感作の結果であると考えられます。一般に、感作の

表 4 抗 HLA 抗体検査の種類と特異性

検査方法	対象とする特異性		
	DSA	NDSA	NHLA (MICA)
リンパ球交差試験	CDC	○	
	FCXM	◎	×
	ICFA	◎	
抗 HLA 抗体検査	PRA 同定検査	◎	◎ <sup>*1</sup>

検出可能○ 高感度◎ 検出不可能×

\*1 LABScreen Mixed Class I & II, LABScreen MICA Single Antigen において検出可能。

機会は妊娠・輸血・移植に限られています。しかし例外的ですが、全く感作歴のない場合でも抗 HLA 抗体が検出されることがあります。これは、食物由来のペプチドや予防接種など何らかの抗原に対して産生された抗体が、本法が高感度であるために HLA 抗原に対する交差反応抗体として検出されたものと考えられ、HLA 自然抗体と呼ばれています。A\*11:02, B\*82:01, C\*17:01 等が HLA 自然抗体によって認識される場合が知られています。その他にも種々の可能性があります。HLA 抗原で感作された抗体との識別は困難ですので、被験者の感作に関する正確な既往歴の把握が特に重要です<sup>9,10)</sup>。

### 3. 精度管理 Lot 検定

キットメーカーではキットのバージョン更新や試薬ロット変更時に、増え続ける公認アリルを考慮したプライマー、プローブ、HLA アリル分子の追加、データベースの更新によるアンビギュイティの見直し等が行われています。したがって、ロット変更時には、各ラボでも変更箇所を把握することが必要です。特に解析ソフト内のデータベースの更新は非常に重要です。そのうえで、HLA タイピングでは HLA アリルが既知の DNA (分注して冷蔵保存) を、抗 HLA 抗体検査では特異性既知の血清や血漿 (バックマンチューブ等に小分けして凍結保存: 凍結融解の繰り返しは避ける) を用いて正しく判定されるかどうかの検証を行い、記録に残す事が推奨されます。この考え方は、検査法の変更においても有用です。HLA タイピングにおいては、検体毎の DNA 濃度、純度の記録を保管し、検査に及ぼす影響を基にキットの許容幅を把握することで、再検査の基準を明確にすることが出来ます。また、家族での検査を受託する場合、血縁関係を正しく把握することも、精度維持に必要です<sup>7)</sup>。一方で、抗 HLA 抗体検査においては、患者の保有する HLA 抗原、感作歴、前回の検査結果等の把握が重要です。

HLA タイピング、抗 HLA 抗体検査を実施するラボは、日本組織適合性学会が主催する QC ワークショップに参加し、ブラインド検体を正しく判定していることを検証することが推奨されます。また、検査担当者は、日本組織適合性学会の認定 HLA 検査技術者資格を取得することにより、HLA 検査精度に対する社会的信用が担保されると思われれます。

### 4. まとめ

今回紹介した各種検査キットの販売メーカーは、いずれもが日本組織適合性学会の賛助会員になっており、学会ホームページにリンクが貼られています。検査法導入時には、当該ラボにおける検査目的、検査業務規模、従事可能な人数等を熟慮することが必要です。HLA 検査結果は、移植実施の有無、移植の成否、移植後の治療方針など、臨床に与える影響が大きいため、これまで解説してきた HLA の特徴を十分考慮して、検査業務を安全に進捗させることが期待されます。

- 訂正: HLA の基礎知識 1 (MHC23-2) の図 6 で組み換え率 1.2% と記載していましたが、これを約 3.6% に訂正します。

### 文献

- 1) IPD-IMGT/HLA: Sequence Alignment Tool HLA-DRB1 Exon2  
<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>
- 2) 造血幹細胞移植情報サービス 統計資料.  
<http://www.bmdc.jrc.or.jp/medicalpersonnel/statistics.html>
- 3) 成瀬妙子: HLA 遺伝子検査. 移植・輸血検査学 (猪子英俊, 笹月健彦, 十字猛夫 監修, 大谷文雄, 木村彰方, 小林賢, 鈴木洋司, 徳永勝士 編), 講談社, p. 99-107, 2004.
- 4) 大田正穂: HLA 遺伝子検査. 移植・輸血検査学 (猪子英俊, 笹月健彦, 十字猛夫 監修, 大谷文雄, 木村彰方, 小林賢, 鈴木洋司, 徳永勝士 編), 講談社, p. 107-109, 2004.
- 5) 椎名 隆: 次世代シーケンサーに基づく HLA ゲノム・遺伝子解析. MHC 22(2): 84-94, 2015.
- 6) 日本組織適合性学会標準化委員会: アリル表記法と結果報告の原則.  
[http://square.umin.ac.jp/JSHI/standardization/JSHI-hyouki-2010\\_1.1.pdf](http://square.umin.ac.jp/JSHI/standardization/JSHI-hyouki-2010_1.1.pdf)
- 7) 小川公明: HLA の基礎知識 2. MHC 23(3): 185-192, 2016.
- 8) 日本移植学会 (JST): 組織適合性検査プロトコル集 (標準方法) (案).  
[http://www.asas.or.jp/jst/pdf/info\\_20130115.pdf](http://www.asas.or.jp/jst/pdf/info_20130115.pdf)
- 9) 小川公明: LABScreen Single Antigen Supplement による抗 HLA 抗体 (DSA) 測定精度の向上. 細胞 45(11): 25-27, 2013.
- 10) 佐治博夫: 移植における液性免疫制御の重要性と HLA 血清学—直接クロスマッチから HLA タイプ & スクリーンへ. MHC 18(3): 31-46, 2011.

## Basic knowledge<sup>3</sup> of HLA

Kimiaki Ogawa<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Friends of Leukemia Research Fund (NPO)

There are two laboratory testing methods for HLA. One is so-called HLA typing that had been previously done by serological detection of HLA antigens expressed on the cell surface of lymphocytes by using anti-sera produced against non-self HLA antigen, and has now been done as so-called HLA-DNA typing. The other HLA testing method is to detect the anti-HLA-antisera generated against non-self HLA antigens found in sensitized subjects. There are several different laboratory procedures for HLA-DNA typing and detection of anti-HLA-antisera, for which commercially available kits have been developed. In this review, principle and management of procedures for HLA testing including requirement of check-points at the timing of lot change for commercial kits.

**Key Words:** HLA-DNA typing, PCR, ambiguity, anti-HLA-antisera, quality control

## 免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM) と HLA 多型

大貫 優子<sup>1)</sup>・鈴木 重明<sup>2)</sup>・重成 敦子<sup>1)</sup>・鈴木 進悟<sup>1)</sup>・鈴木 則宏<sup>2)</sup>・西野 一三<sup>3)</sup>・椎名 隆<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

<sup>2)</sup> 慶應義塾大学医学部神経内科

<sup>3)</sup> 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第一部

最近、炎症性筋疾患（筋炎）に免疫介在性壊死性ミオパチー（IMNM）という新たな概念が提唱された。本疾患は、多発筋炎（PM）と類似した臨床経過を辿るが、他の筋炎とは異なり炎症細胞の浸潤が殆ど認められない特徴を持つ。筆者らによる日本人における HLA 多型との関連解析から、特定の HLA 多型（*A\*02:07* や *DRB1\*08:03* など）と IMNM との関連が示唆された。将来的には、HLA 多型を切り口とした本疾患発症機序の解明や診断法の開発が期待される。

**キーワード：**免疫介在性壊死性ミオパチー；IMNM，ヒト白血球抗原；HLA，スタチン，抗 signal recognition particle 抗体；抗 SRP 抗体，抗 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase 抗体；HMGCR 抗体

### 1. はじめに

炎症性筋疾患とは、骨格筋の炎症とそれに伴う筋組織の変性が起きる病態の総称を指し、筋炎と呼ばれることも多い。主に体幹や四肢近位筋などの筋力低下を来す。筋炎の内、自己免疫機序により筋線維が障害されると考えられる一群を特発性炎症性筋疾患と呼び、代表的な病型には、多発筋炎（polymyositis; PM）、皮膚筋炎（dermatomyositis; DM）および封入体筋炎（inclusion body myositis; IBM）がある<sup>1)</sup>。PM と DM は、厚生労働省が認定する特定疾患である。国内におけるそれら 2 疾患の推定患者総数は約 17,000 人であり、長期に渡り副腎皮質ステロイドなどの服用を余儀なくされる。それら以外にも膠原病に起因する筋炎や傍腫瘍性筋炎、薬剤性筋炎など様々な病態機序を背景に持つ病型がある<sup>1)</sup>。最近、筋炎の中でも壊死再生線維の多発を主体とし、炎症性リンパ球浸潤の乏しい病理像を特徴とする病型（免疫介在性壊死性ミオパチー；Immune-Mediated Necrotizing Myopathy; IMNM）が神経内科領域から相次いで報告されている。

本稿では、新たに提唱された IMNM を含めた炎症性筋疾患の特徴、筆者らが進めている HLA 関連解析の紹介および今後の展望について概説したい。

### 2. 炎症性筋疾患の臨床的特徴

炎症性筋疾患の主な症状は、筋症状である。典型例は、数週から数か月の亜急性の経過で左右対称性の近位筋優位の筋力低下を呈し、起立困難や歩行障害、上肢挙上困難などの症状が出現する<sup>1)</sup>。重症例では嚥下困難が生じるほか、呼吸筋も障害される。筋痛も 1/3 程度の症例で観察される。重篤な筋力低下や筋萎縮を伴う場合もある。

筋症状以外としては、皮膚所見が最も重要な所見の一つである。両側または片側の眼瞼部の浮腫性紅斑はヘリオトロープ疹と呼ばれ、手関節を中心とした関節背面にある紅斑や角化性局面を Gottron 徴候と呼ぶ。これらの所見を呈する炎症性筋疾患は DM と診断される。皮膚所見以外では、発熱、関節痛などを呈する場合があり、特に間質性肺炎は治療方針や生命予後を左右する。

受付日：2016 年 12 月 14 日，受理日：2017 年 2 月 22 日

代表者連絡先：大貫 優子 〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143

TEL: 0463-93-1121（内線 2582, PHS 5261） FAX: 0463-94-8884 E-mail: yukom@is.icc.u-tokai.ac.jp



### 3. 炎症性筋疾患の分類

炎症性筋疾患の診断基準として、国際的には1975年に発表された Bohan & Peter の診断基準が最も一般的に使用されている (表1)<sup>1)</sup>。この分類では、炎症性筋疾患は皮疹のある DM と皮疹のない PM に大別される。比較的単純明快であり、臨床的に使用しやすい。しかし、この分類では、IBM や筋ジストロフィーなどのほかの筋疾患と鑑別ができず、また、のちに生まれた IMNM の概念も含まれていない。

神経内科領域では筋病理所見を重視した分類が採用されており、2004年に Muscle Study Group/European Neuromuscular Center (MSG/ENMC) のワークショップで提唱された、DM, PM, IBM, IMNM およびいずれにも当てはまらない非特異的筋炎の5つの亜型に分類されたものが広く用いられている (表2および表3)<sup>2,3)</sup>。2014年の ENMC ワークショップでは、抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (aminoacyl transfer RNA synthetase; ARS) 抗体陽性で、筋炎、間質性肺炎、関節炎を高率に合併する抗合成酵素症候群 (antisynthetase syndrome: ASS) をも独立した病型とする分類も提唱されている<sup>4)</sup>。この分類は筋病理所見を重視しており、極めて具体的に遺漏ないが、一方で筋病理を施行していない症例には適応しづらい面がある。ゆえに汎用されているとは言い難い。炎症性筋疾患は膠原病・リウマチ科、皮膚科、神経内科、小児科など様々な科により診療される疾患であり、それぞれが異なる視点から異なる分類を用いているため、各病型の定義は一樣ではないと言える<sup>3)</sup>。たとえば、Bohan & Peter の診断基準を用いた場合、IMNM や ASS は PM に含まれるが、病理学的には、炎症細胞浸潤が特徴的な PM と炎症細胞浸潤をほぼ認めない IMNM は全く別の病型と言え、ENMC の分類を用いた場合、これらは別の病型

ということになる。特に PM という病名を聞いた場合、どの診断基準に基づいて診断されたか注意する必要がある。また、これまで PM といわれていた症例の中に、IMNM が多数含まれており、病理学的に診断された PM と IMNM の病態や発症機序にどのような違いがあるのか、筋病理のみならず多角的に検討する必要がある。

### 4. 免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM) の臨床的特徴

IMNM は、2004年に MSG/ENMC の診断基準 (表3) に記載され、固有の病型として初めて確立された歴史の浅い疾患である<sup>2)</sup>。本疾患は、18歳以上で一般的に発症し、亜急性、潜行性に近位筋優位の筋力低下が起きる。また、血清学的にはクレアチンキナーゼ (CK) 値の上昇を認め、筋電図では筋原性変化を認める。さらには、悪性腫瘍や膠原病が IMNM に合併する傾向がみられる<sup>5)</sup>。ところが、これらの所見は前述のように他の炎症性筋疾患でも一般的に観察されるものであり、筋生検をしないと IMNM とは診断できない。2004年以前は、IMNM は PM に包括されていたと考えられる。実際、PM と診断された患者のうち約5%のみが、筋生検を施行したうえで診断されていたという研究結果もあることから、PM と臨床診断された症例に IMNM が相当数含まれていることが容易に推測される<sup>6)</sup>。これに関して Watanabe らは、「筋炎の統合的診断研究」に登録された日本人炎症性筋疾患460例における病型の内訳を報告している<sup>7)</sup>。本研究では全例筋病理検査を行っている。この結果、19例の PM, 56例の DM, 177例の IMNM, 73例の IBM, 51例の ASS および84例の非特異的筋炎に分類されたとしている。興味深いことに PM, DM ならびに ASS を合わせた症例数 (126例) よりも IMNM (177

表1 Bohan & Peter の診断基準 (1975年)

1. 四肢近位筋、頸部屈筋の対称性筋力低下	
2. 筋原性酵素上昇 (CK, アルドラーゼ, AST, ALT, LDH)	
3. 定型的筋電図所見	
i) polyphasic, short, small, motor unit potentials	
ii) fibrillation, positive sharp waves, increased insertional irritability	
iii) bizarre high frequency, repetitive discharge	
4. 定型的筋病理組織所見 (筋線維の変性、壊死、貪食像、萎縮、再生、炎症性細胞浸潤)	
5. 定型的皮膚症状 (ヘリオトロフ疹, Gottron 徴候, 膝・肘・内踝・顔面・上胸などの鱗屑性紅斑)	
確実例	4項目以上 (皮膚筋炎は5を含む)
疑い例	3項目以上 (皮膚筋炎は5を含む)
可能性のある例	2項目以上 (皮膚筋炎は5を含む)

厚労省 難病情報ホームページより

表2 ヨーロッパ神経筋センター (ENMC) による炎症性筋疾患の診断基準抜粋 (2004年)

1. 臨床基準
対象基準
a) 18歳以上 (DM および非特異的筋炎では幼児期でもよい)
b) 亜急性または潜行性発症
c) 筋力低下パターン (対称性近位 > 遠位, 頸部屈筋 > 頸部伸筋)
d) DM 典型的発疹
除外基準
a) IBM の臨床的特徴
b) 眼輪筋筋力低下, 孤立性構音障害, 頸部伸筋 > 頸部屈筋の筋力低下
c) 中毒性ミオパチー, 活動的内分泌性疾患, アミロイドーシス, 筋ジストロフィーまたは近位運動神経障害の家族歴
2. クレアチンキナーゼ値高値
3. その他の検査基準
a) 筋電図
対象基準
i) 線維自発電位, 陽性鋭波, 複合反復電位のような刺入時, 安静時の自発電位増加
ii) 形態計測分析で, 短期間, 振幅低下, 多相性運動単位電位の存在
除外基準
i) 筋緊張性ジストロフィーまたは他の channelopathy を示唆するミオトニー放電
ii) 形態計測分析で主に長期間, 大振幅の運動単位電位
iii) 運動単位電位の動員減少
b) MRI : STIR 画像で筋組織内のび漫性または斑状の増強信号 (浮腫)
c) 血管筋炎特異的抗体 (MSA) の検出
4. 筋生検および除外基準
a) 筋内膜炎症性細胞 (T 細胞) の非壊死筋線維周囲への浸潤
b) 筋内膜へ CD8+ T 細胞の浸潤があるが非壊死筋線維への浸潤は明らかでない, またはび漫性 MHC-1 発現
c) 筋束周辺萎縮
d) 小血管における膜侵襲複合体 (MAC) 沈着, または毛細血管密度減少, または電子顕微鏡での内皮細胞における管状細網封入体, または筋束周辺筋での MHC-1 発現
e) 血管周囲, 筋周囲の炎症細胞浸潤
f) 筋線維周囲への明らかな侵入のない散在する筋内膜 CD8+ T 細胞浸潤
g) 多くの壊死性筋線維, 炎症細胞は血管周囲にないかわずか, 筋周囲浸潤は不明確, 電子顕微鏡での小血管又は pipestem 毛細管の MAC 沈着の可能性, 内皮細胞の管状細網封入体は珍しいか不明確
h) 縁取り空胞 rimmed vacuoles, 赤色ぼろ線維 ragged red fibres, シトクロムオキシダーゼ陰性線維は IBM の可能性
i) 非壊死筋線維の筋細胞膜上の MAC 沈着. 免疫病理学的な筋ジストロフィーの所見

表3 ENMC による診断基準に基づく炎症性筋疾患の分類基準

多発筋炎確実例	1. 皮疹を除くすべての臨床基準, 2. 血清 CK 上昇, 3. 筋生検基準として a を含み, そして, c, d, h, i を除外
多発筋炎疑い例	1. 皮疹を除くすべての臨床基準, 2. 血清 CK 上昇, 3. その他の検査条件 (3項目中1項目), 4. 筋生検基準は b を含み, かつ c, d, g, h, i を除外
皮膚筋炎確実例	1. すべての臨床基準, 2. 筋生検基準として c を含む
皮膚筋炎疑い例	1. すべての臨床基準, 2. 筋生検基準は d または e 含む, または血清 CK 上昇, またはその他の検査条件を満たす (3項目中1項目)
非特異的筋炎	1. 皮疹を除くすべての臨床基準, 2. 血清 CK 上昇, 3. その他の検査条件 (3項目中1項目), 4. 筋生検基準は e または f を含み, 他のすべてを除外
免疫介在性壊死性ミオパチー	1. 皮疹を除くすべての臨床基準, 2. 血清 CK 上昇, 3. その他の検査条件 (3項目中1項目), 4. 筋生検基準は g を含み, 他のすべてを除外

表2, 表3は文献2を一部省略し邦訳

例)の方が圧倒的に多いことが判明した。一般診療による診断が困難であり, 筋病理検査が必要であった患者を対象としていることからバイアスを生じていると考えられるが, 日本人にて炎症性筋疾患における IMNM の占める割合が従来考えられていたよりも多いことは確かであろう。ところが, 筋生検は侵襲が強い検査である上, 施行できる施設, 病理所見を正確に判定できる施設が少ない。最近では IMNM 特有に検出される自己抗体の存

在が明らかとなっており, IMNM の診断に重要な役割を担っている。

### 5. IMNM に検出される自己抗体

IMNM に検出される自己抗体として, 抗 signal recognition particle (SRP) 抗体と抗 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) 抗体が挙げられる。SRP は 7SL-RNA と 6 種類のポリペプチドから構成され

る細胞質 RNA 結合タンパク質であり、リボソームとの結合により膜タンパク質や分泌タンパク質の N 末シグナル配列を認識し、小胞体におけるタンパク質の移動を調節すると考えられている<sup>8)</sup>。一方、HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) はメバロン酸経路の律速酵素の一つであり、コレステロール合成に重要な役割を担っている<sup>9)</sup>。脂質異常症の治療薬であるスタチンは、この HMGCR の機能を阻害し、コレステロール値を下げる働きがある。スタチンの大規模臨床研究では、スタチン内服者のうち 10-25% の患者に筋痛や CK 値の上昇が観察される。殆ど場合はスタチン内服の中止で改善するが、内服中止にもかかわらず進行性の筋力低下を呈する症例が存在する。この一群が筋病理における IMNM である<sup>1)</sup>。その発症頻度は、スタチン内服者 10 万人に 2-3 人程度であるが<sup>10)</sup>、抗 HMGCR 抗体陽性の IMNM 症例にてスタチン誘発性の頻度は 30-50% であることから、本抗体はスタチン内服により産生されるとともに、それ以外の機序でも産生されると考えられている<sup>1)</sup>。また、HMGCR の発現レベルは種々の組織で低く維持されているが、スタチン内服者では筋組織での発現レベルが上昇することが知られている<sup>10)</sup>。よって、未知の遺伝要因を有する患者がスタチンに誘発されて HMGCR を過剰発現することが自己抗体を産生する原因の一つと考えられている<sup>10)</sup>。また、スタチンが HMGCR に結合すると、タンパク質の立体構造に変化が生じて通常は隠れている抗原決定基が現れ、これが自己抗体を産生する可能性もある<sup>10)</sup>。

国内における抗 SRP 抗体や抗 HMGCR 抗体の陽性率は、IBM を除く炎症性筋疾患の 18% および 12% をそれぞれ占める<sup>7)</sup>。IMNM 単独では、抗 SRP 抗体や抗 HMGCR 抗体の陽性率はそれぞれ 39% および 26% を占める<sup>7)</sup>。抗 SRP 抗体陽性の IMNM 症例は、抗 HMGCR 抗体陽性症例よりも筋力低下、筋萎縮などの臨床症状がより重篤となり、免疫抑制剤などによる治療効果が得られにくい傾向がある<sup>7)</sup>。

## 6. 炎症性筋疾患の遺伝要因

2016 年までに千人規模の Caucasian を対象とした炎症性筋疾患と HLA 多型との関連解析を行った 2 つの研究結果が報告されている<sup>11,12)</sup>。すなわち、DM は *HLA-DRB1\*03:01* や *HLA-B\*08:01* と、また PM は *HLA-DRB1\*03:01* とそれぞれ関連する。一方、日本人 120 名では、

炎症性筋疾患全体、PM および ASS が *HLA-DRB1\*08:03* とそれぞれ関連することが報告されている<sup>13)</sup>。HLA 以外の感受性遺伝子としては、末梢の総リンパ球数の恒常性の調節に主要な役割を果たす *PTPN22* やがん原遺伝子の *BLK* が PM および DM とそれぞれ関連することが報告されている<sup>12)</sup>。日本人 283 名の PM ならびに 194 名の DM を対象とした関連解析から、*BLK* が PM や DM と関連し、さらに細胞増殖、分化および生存などの過程を制御する *STAT4* が加わることにより発症リスクがさらに高まることが示唆されている<sup>14)</sup>。

一方、抗 HMGCR 抗体陽性の IMNM では、Caucasian と African American にて *HLA-DR11* と強く関連し、それらの 95% が *HLA-DRB1\*11:01* であったと報告されている<sup>15,16)</sup>。しかし IMNM 全体と HLA 多型との関連性や、悪性腫瘍合併、膠原病合併およびスタチン内服の有無、自己抗体などに分けたサブグループごとの HLA 多型との関連性についての最終結論は得られていない。IMNM は既知の炎症性筋疾患と比較して炎症細胞浸潤を欠くという特異な病態を呈しており、その概念は未だ十分に定まっていない。よって、本疾患の病態を解明するためには、これまでの病理学的、あるいは免疫学的なアプローチに加え、遺伝学的なアプローチを実施することが急務であろう。

## 7. IMNM と HLA 多型との関連性

筆者らは、IMNM の遺伝要因を探索し、その病態解明の一助にすべく、その始発点として HLA 多型との関連解析を進めているので、その概略を紹介する。

国立精神・神経医療研究センターに収集された筋検体の内、病理学的検査で IMNM と診断された 162 例を対象とした (図 1)。全ての症例の各種抗体測定は、慶應義塾大学にて施行している。また悪性腫瘍合併、膠原病合併およびスタチン内服の有無を含む詳細な臨床情報が主治医から付与されている。

*HLA-DRB1* の DNA タイピングは、PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide probe, Luminex<sup>®</sup>) 法により、また *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* の DNA タイピングは、sequence based typing (SBT) 法により施行した。有意差検定は、東海大学医学部にて収集された日本人健常者 460 検体の HLA データを対照群としたアレル数による比較を Fisher's exact test により行った。また、臨床情報から悪



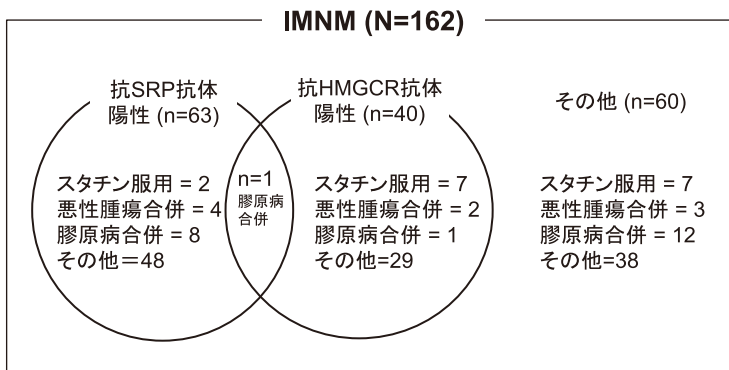


図1 HLA 多型との関連解析に用いた 162 検体の内訳

表4 IMNM と関連する HLA アレル

HLA genotype	アレル数 (%)		IMNM と日本人健常者との比較		
	IMNM (n=324)	日本人健常者 (n=920)	P	Pc	オッズ比
A*02:07	19/324 (6.2)	23/920 (2.5)	6.6×10 <sup>-3</sup>	9.8×10 <sup>-2</sup>	2.4
B*46:01	27/324 (8.3)	46/920 (5)	3.8×10 <sup>-2</sup>	1	1.7
C*01:02	74/324 (22.8)	141/920 (15.3)	2.7×10 <sup>-3</sup>	4.9×10 <sup>-2</sup>	1.6
DRB1*08:03	53/324 (16.4)	71/920 (7.7)	2.1×10 <sup>-5</sup>	4.8×10 <sup>-4</sup>	2.3
DRB1*11:01	16/324 (4.9)	23/920 (2.5)	4.0×10 <sup>-2</sup>	9.2×10 <sup>-1</sup>	2

性腫瘍合併群, 膠原病合併群, スタチン内服群, 抗 SRP 抗体陽性群および抗 HMGCR 抗体陽性群に分類し, それぞれアレル数を用いてサブグループを有する群と有さない群の比較解析を行った。その結果, IMNM 全体 (allele n.=324) では, A\*02:07 (allele n.=19, p=6.6×10<sup>-3</sup> OR=2.4), B\*46:01 (allele n.=27, p=3.8×10<sup>-2</sup> OR=1.7), C\*01:02 (allele n.=74, p=2.7×10<sup>-3</sup> OR=1.6), DRB1\*08:03 (allele n.=53, p=2.1×10<sup>-5</sup> OR=2.3) および DRB1\*11:01 (allele n.=16, p=4.0×10<sup>-2</sup> OR=2.0) が関連することが示唆された。このうち Bonferroni 法による補正を行ったところ, C\*01:02 (Pc=4.9×10<sup>-2</sup>) と DRB1\*08:03 (Pc=4.8×10<sup>-4</sup>) が関連することが示唆された (表4)。また, IMNM (allele n.=324) をサブグループに分類し, それぞれ有する群を有さない群を比較したところ, スタチン内服群 (allele n.=32) では DRB1\*08:03 (allele n.=10, p=2.3×10<sup>-2</sup> OR=2.6), 膠原病合併群 (allele n.=44) では C\*03:04 (allele n.=13, p=4.9×10<sup>-3</sup> OR=3) と C\*08:03 (allele n.=4, p=5.9×10<sup>-2</sup> OR=13.7), 抗 SRP 抗体陽性群 (allele n.=126) では B\*52:01 (allele n.=23, p=2.5×10<sup>-2</sup> OR=2.2) と C\*12:02 (allele n.=24, p=1.8×10<sup>-2</sup> OR=2.2) と DRB1\*15:02 (allele n.=22, p=2.2×10<sup>-2</sup>, OR=2.2) において, それぞれ関連する可能性が示唆された。また悪性腫瘍合併群では関連を示すアレルは

なかった。Bonferroni 法による補正を行ったところ, サブ解析においてはいずれも有意差を認めなかった (表5)。

また, IMNM 関連アレルから健常者群では 3.3%, 患者群では 8.6% の頻度を有する A\*02:07-B\*46:01-C\*01:02-DRB1\*08:03 が推定され, 両者間の陽性者数を用いた有意差検定から, このハプロタイプは IMNM と関連することが示唆された (sample n.=14, p=8.7×10<sup>-3</sup> OR=2.8)。筆者らは, 日本人にて DRB1\*08:03 が IMNM と関連することを報告したが<sup>17)</sup>, HLA-A, HLA-B, HLA-C を含めた場合, それら HLA 座を巻き込む関連性を示すことが明らかとなった。

これまでの日本人患者を対象とした研究から, 炎症性筋疾患及び PM, ASS と DRB1\*08:03 との関連が示唆されていたが, これらの中に相当数の IMNM が含まれている可能性があると思定される。なお, 我々の研究では, ASS と HLA-DRB1 との関連は認めなかった (未報告)。DRB1\*08:03 は, 炎症性筋疾患のうち, IMNM に独立した危険アレルである可能性が示唆される。

### 8. 今後の展望

IMNM は, 未だ十分に認知されているとは言い難いが,

表 5 IMNM サブグループと HLA アレル

HLA genotype	IMNM (n=324) サブタイプ アレル数 (%)		P 値	Pc 値	オッズ比
	スタチン内服 (n=32)	スタチン非内服 (n=292)			
<i>DRB1*08:03</i>	10/32 (31.3)	43/292 (14.7)	<b>2.3×10<sup>-2</sup></b>	5.6×10 <sup>-1</sup>	2.6
	膠原病合併 (n=44)	膠原病合併無し (n=280)			
<i>C*03:04</i>	13/44 (29.5)	34/280 (12.1)	<b>4.9×10<sup>-3</sup></b>	7.8×10 <sup>-2</sup>	3
<i>C*08:03</i>	4/44 (9.1)	2/280 (0.7)	<b>3.7×10<sup>-3</sup></b>	5.9×10 <sup>-2</sup>	13.7
	抗 SRP 抗体陽性 (n=126)	抗 SRP 抗体陰性 (n=198)			
<i>B*52:01</i>	23/126 (18.3)	18/198 (9.1)	<b>2.5×10<sup>-2</sup></b>	8.7×10 <sup>-1</sup>	2.2
<i>C*12:02</i>	24/126 (19.0)	19/198 (9.6)	<b>1.8×10<sup>-2</sup></b>	2.9×10 <sup>-1</sup>	2.2
<i>DRB1*15:02</i>	22/126 (17.5)	17/198 (8.6)	<b>2.2×10<sup>-2</sup></b>	5.3×10 <sup>-1</sup>	2.2
	抗 HMGR 抗体陽性 (n=80)	抗 HMGR 抗体陰性 (n=244)			
<i>DRB1*13:02</i>	8/80 (10.0)	5/244 (2.0)	<b>4.4×10<sup>-3</sup></b>	1.0×10 <sup>-1</sup>	5.3

前述のように日本では病理学的に診断された PM や DM より患者数が多いことが判明している<sup>7)</sup>。また本疾患の患者が、PM や筋ジストロフィーと診断されている可能性も十分に考えられ、適切な治療が行われていないことが懸念される。筆者らのこれまでの HLA 多型解析では、特定の HLA アレルが発症リスクを高めることから、IMNM を含む炎症性筋疾患の、より使いやすい診断基準を早急に再構築・周知させ、医療機関における診断精度を上げる必要がある。さらに、スタチン内服により IMNM が発症に至る分子機序の解明は喫緊の課題である。筆者らの解析では、スタチン内服などのリスク群で IMNM を分類した場合、サンプル数が少ないことから有意な結果が得られなかったが、IMNM の誘因ごとの病態が違ふことが予想されることから、さらにサンプル数を増やして、それぞれの遺伝学的背景を解明する必要がある。また殆どの場合、IMNM は筋症状のみを呈する疾患であることから、筋組織における HLA 解析などを通じて本疾患発症機序の解明や遺伝子診断法の開発が今後望まれる。

#### 引用文献

- 1) 鈴木重明：炎症性筋疾患. 医学のあゆみ 255(5): 467-471, 2015.
- 2) Hoogendijk JE, Amato AA, Lecky BR, *et al.*: 119<sup>th</sup> ENMC international workshop: trial design in adult idiopathic inflammatory myopathies, with the exception of inclusion body myositis. *Neuromuscul Disord* England: 337-345, 2004.
- 3) 井上道雄, 西野一三：特発性炎症性筋疾患の診断 筋病理

から何が読み取れるか, 68: 1431-1441, 2016.

- 4) De Bleecker JL, De Paepe B, Aronica E, *et al.*: 205<sup>th</sup> ENMC International Workshop: Pathology diagnosis of idiopathic inflammatory myopathies part II 28-30 March 2014, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 25: 268-272, 2015.
- 5) Basharat P, Christopher-Stine L: Immune-Mediated Necrotizing Myopathy: Update on Diagnosis and Management. *Curr Rheumatol Rep* 17: 72, 2015.
- 6) van der Meulen MF, Bronner IM, Hoogendijk JE, *et al.*: Polymyositis: an overdiagnosed entity. *Neurology* 61: 316-321, 2003.
- 7) Watanabe Y, Uruha A, Suzuki S, *et al.*: Clinical features and prognosis in anti-SRP and anti-HMGR necrotizing myopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87: 1038-1044, 2016.
- 8) 鈴木重明：抗 SRP 抗体陽性ミオパチー (anti-SRP myopathy)：筋炎との相違点. *臨床神経* 52: 1148-1150, 2012.
- 9) Musset L, Allenbach Y, Mahler M, *et al.*: Anti-HMGR antibodies as a biomarker for immune-mediated necrotizing myopathies: A history of statins and experience from a large international multi-center study. *Autoimmun Rev* 15: 983-993, 2016.
- 10) Mammen AL: Statin-Associated Autoimmune Myopathy. *N Engl J Med* 374: 664-669, 2016.
- 11) Miller FW, Chen W, O'Hanlon TP, *et al.*: Genome-wide association study identifies HLA 8.1 ancestral haplotype alleles as major genetic risk factors for myositis phenotypes. *Genes Immun* 16: 470-480, 2015.
- 12) Rothwell S, Cooper RG, Lundberg IE, *et al.*: Dense genotyping of immune-related loci in idiopathic inflammatory myopathies confirms HLA alleles as the strongest genetic risk factor and suggests different genetic background for major clinical subgroups. *Ann Rheum Dis* 75: 1558-1566, 2016.
- 13) Furuya T, Hakoda M, Kamatani N, *et al.*: Immunogenetic Features in 120 Japanese Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathy. *J Rheumatol* 31: 1768-1774, 2004.

- 14) Sugiura T, Kawaguchi Y, Yamanaka H: Association between a C8orf-BLK polymorphism and polymyositis/dermatomyositis in the Japanese population: An additive effect with STAT4 on disease susceptibility. PLOS ONE 9: e90019, 2014.
- 15) Limaye V, Bundell C, Hollingsworth P, *et al.*: Clinical and genetic associations of autoantibodies to 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase in patients with immune-mediated myositis and necrotizing myopathy. Muscle Nerve 52: 196–203, 2015.
- 16) Mammen AL, Gaudet D, Brisson D, *et al.*: Increased frequency of DRB1\*11:01 in anti-HMG-CoA reductase-associated autoimmune myopathy. Arthritis Care Res 64: 1233–1237, 2012.
- 17) Ohnuki Y, Suzuki S, Shiina T, *et al.*: HLA-DRB1 alleles in immune-mediated necrotizing myopathy. Neurology 87: 1954–1955, 2016.

## Immune-mediated Necrotizing Myopathy (IMNM) and HLA Polymorphisms

Yuko Ohnuki<sup>1)</sup>, Shigeaki Suzuki<sup>2)</sup>, Atsuko Shigenari<sup>1)</sup>, Shingo Suzuki<sup>1)</sup>, Norihiro Suzuki<sup>2)</sup>, Ichizo Nishino<sup>3)</sup>,  
Takashi Shiina<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Molecular Life Science, Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine

<sup>2)</sup>Department of Neurology, Keio University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Neuromuscular Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry

Immune-mediated necrotizing myopathy (IMNM) is a relatively newly recognized subgroup of idiopathic inflammatory myopathies. Although it has similar symptoms to polymyositis clinically, IMNM is distinguished from the other inflammatory myopathies by the absence of prominent inflammatory infiltrates histologically. IMNM has been known to be associated with myositis-specific autoantibodies such as anti-SRP and anti-HMGCR antibodies. It also may be associated with statin, malignancy and connective tissue diseases. This review provides an overview of IMNM and describes our study analyzed alleles of *HLA-A, B, C, DRB1* in IMNM patients.

**Key Words:** Immune-Mediated Necrotizing Myopathy; IMNM, Human Leukocyte Antigen; HLA, statin, Anti-signal recognition particle antibody; Anti-SRP antibody, Anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; Anti-HMGCR antibody

パニック症のゲノムワイド関連解析の *HLA* アリルによる層別解析杉本（嶋多）美穂子<sup>1)</sup>・徳永 勝士<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻人類遺伝学分野

我々は、パニック症の新規遺伝要因を探索するために、日本人のパニック症についてのゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果を用いたパスウェイ解析を実施した。その結果、免疫系、特に *HLA* の疾患への関連が見出されたため、特に *HLA-B*, *-DRB1* に着目し解析を実施した。*HLA* 解析の結果、*HLA-DRB1\*13:02* が疾患と関連することが明らかとなったため、さらに、当該アリルの有無によって他の関連遺伝要因が異なる可能性について検討した。GWAS のデータを、当該アリルを持つ群と持たない群に分けて関連解析を実施したところ、当該アリルを持たない群の解析において、*MCPHI* 内の SNP が多重検定の補正後も有意な関連を示し、またヨーロッパ系集団の GWAS で疾患への関連が報告されている *TMEM132D* 内の複数の SNP も関連する傾向を示した (rs1397504;  $P=3.88 \times 10^{-6}$ )。

**キーワード：**パニック症, *HLA*, GWAS, パスウェイ解析, 層別解析

## 1. はじめに

パニック症は、代表的な精神疾患である不安障害の一つである。強い不安の発作であるパニック発作や予期不安といった症状を主とし、一部の患者は、パニック発作を起こす可能性のある場所を避けるようになる広場恐怖という症状を合併する。そのため、一旦発症してしまうと患者は生活圏の縮小を余儀なくされ、社会生活上大きな支障となる。不安障害患者の直接治療費全体は、うつ病のそれとほぼ同額であり、生産性の低下によっても同規模の費用の損失があると試算されていることから<sup>1)</sup>、その病態の解明、治療法の進展が急務である。パニック症の年間罹患率は約 1%、生涯罹患率は 2-2.5% (パニック発作は 7-9%) と高率であり、女性の発症率は男性の約 2 倍と報告されている。双生児研究や家族例の研究から、一卵性双生児一致率は 20.7-73.0%<sup>2)</sup>、第一度近親の発症リスクは 6-17 倍<sup>3,4)</sup> と報告されている。またパニック症の遺伝率は 0.43 と推定されており<sup>2)</sup>、本疾患は遺伝要因と環境要因が共に作用して発症に至る多因子疾患で

あると考えられている。

パニック症については、連鎖解析、候補遺伝子アプローチを用いた関連解析を中心にこれまで多数の分子遺伝研究が実施されてきた。また、近年はゲノム全体にわたって単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を網羅的に探索するゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) が複数の集団で実施され、それらのメタ解析も実施されている。これらの研究からいくつかの関連遺伝要因が報告されているが、これら複数の研究間で一致した関連を示す遺伝要因は非常に少なく、現在のところ *TMEM132D* (transmembrane protein 132D) ならびに *COMT* (catechol-O-methyltransferase) 遺伝子のみである<sup>5)</sup>。また、*TMEM132D* 遺伝子内の多型の関連は、ヨーロッパ系集団を対象とした GWAS の結果では同定されたが、我々が実施した日本人の GWAS においては関連が再現されなかった<sup>5,6)</sup>。

我々はこれまでに日本人を対象としたパニック症の GWAS (パニック症: N=541, 健常者: N=1,539) を実施している。その結果、*NPY5R* (neuropeptide Y receptor

受付日: 2016 年 12 月 15 日, 受理日: 2017 年 1 月 16 日

代表者連絡先: 杉本 (嶋多) 美穂子

TEL: 03-5841-3692 FAX: 03-5841-8619 E-mail: pgmihoko@yahoo.co.jp

Y5) や *BDKRB2* (bradykinin receptor B2) といった遺伝子内の多型が日本人においてパニック症に関連する傾向を示すという結果を得ていたが、パニック症の遺伝率を説明するのに十分な遺伝要因の同定には至っていない<sup>6)</sup>。これは疾患に関連する個々の SNP のオッズが小さいことが一因と考えられる。そこで本研究ではこれらの SNP に対して個々のオッズは小さくとも、それらの機能的な組み合わせが疾患の発症リスクになっている可能性について検討するために、GWAS データを用いたパスウェイ解析を実施した。

## 2. GWAS データを用いたパスウェイ解析

GWAS の結果を用いたパスウェイ解析には、これまでに多数の方法が提案されているが、具体的にどの手法が最も優れているかを大規模データで比較検討した研究は乏しい。そこで手法の違いによらず検出され、疾患に確実に関連する可能性が高いパスウェイを検出するために、ICSNPathway, i-GSEA4GWAS, DAVID の 3 通りの方法でパスウェイ解析を実施した。これらの解析は、SNP の関連を遺伝子の関連に紐づける過程が異なっており、i-GSEA4GWAS が遺伝子領域内 (遺伝子から ±20 kb) の最も有意な SNP を直接的に遺伝子の関連として扱うのに対し、ICSNPathway は領域内 (遺伝子から ±20 kb) の機能的に重要な SNP の疾患との関連性に重点を置き解析を実施する。また、VEGAS は遺伝子領域 (遺伝子から ±50 kb) に存在する全ての SNP の関連を考慮するように統計量を計算する。いずれの手法においても、

計算された個々の遺伝子の関連に基づき疾患に関連するパスウェイが検出される。

パスウェイ解析の結果、ICSNPathway を用いた解析では、全身性エリテマトーデスに関わる遺伝子群 (FDR<0.0010) や抗原プロセッシング・抗原提示に関するパスウェイ (FDR=0.0010) などが有意なパスウェイとして検出され (表 1a)、これらのパスウェイの関連には、*HLA-DRA* 領域の SNP が最も大きく寄与しているとの結果が得られた (表 1b)<sup>7)</sup>。さらに、i-GSEA4GWAS を用いた解析では、抗原プロセッシング・抗原提示に関するパスウェイが最も強い関連を示し ( $P<0.001$ , FDR=0.0010) (表 2)、DAVID を用いた解析でも全身性エリテマトーデスに関わる遺伝子群の関連が最も強い ( $P=2.08\times 10^{-6}$ ,  $P_{corrected}=1.85\times 10^{-4}$ ) との結果が得られた (表 3)<sup>7)</sup>。以上のように 3 通りの方法で実施した全てのパスウェイ解析において、免疫系に関わるパスウェイの関連が見出され、それらの関連に *HLA* 領域に存在する SNP が寄与していることが示唆された。

## 3. HLA の解析

上記のパスウェイ解析の結果を踏まえて、GWAS の *HLA* 領域の結果を再検討した。その結果、特に *HLA-DRA* 並びに *HLA-B* 領域に、多重検定を考慮した際には有意ではないものの、関連が示唆される ( $P<1.0\times 10^{-3}$ ) 複数の SNP が存在していることが確認された (図 1)。*HLA-DRA* には多型性がないことから、この領域の SNP の関連は *HLA-DRB1* に由来するものではないかと考え、

表 1a ICSNPathway を用いた解析の結果

Index	データベース	パスウェイ	P 値	FDR
1	KEGG	Systemic lupus erythematosus	<0.001	<0.001
2	KEGG	Antigen processing and presentation	<0.001	0.001
3	KEGG	Type I diabetes mellitus	<0.001	0.007
4	KEGG	Graft-versus-host disease	0.003	0.01
5	KEGG	Allograft rejection	0.004	0.011
6	the Gene Ontology	Catalysis of the cleavage of a carbon-oxygen bond by elimination of water	0.006	0.026

(FDR: false discovery rate)

表 1b ICSNPathway で検出されたパスウェイの関連に寄与する SNP

候補 SNP	SNP の機能	遺伝子	パスウェイ (表 1a の Index)	連鎖不平衡にある SNP	r2	D'	-LOG10(P)
rs8084	essential_splice_site&intronic	HLA-DRA	1 2 3 4 5	rs7194	1	1	4.02
rs7192	non_synonymous_coding	HLA-DRA	1 2 3 4 5	rs7194	1	1	4.02
rs3765966	non_synonymous_coding	CA6	6	rs1409147	1	1	5.191



表 2 i-GSEA4GWAS を用いた解析の結果

データベース	パスウェイ	P 値	FDR	(有意な遺伝子) / (パスウェイ上の遺伝子)
KEGG	ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION	<0.001	0.0010	24/83
KEGG	CALCIUM SIGNALING PATHWAY	<0.001	0.0140	74/174
WIKIPATHWAYS	TRANSLATION FACTORS	<0.001	0.0155	10/53
BIO CARTA	NO1PATHWAY	<0.001	0.0178	17/31
KEGG	TASTE TRANSDUCTION	<0.001	0.0205	17/53
KEGG	TYPE I DIABETES MELLITUS	<0.001	0.0227	21/45
KEGG	BUTANOATE METABOLISM	0.002	0.0276	17/45
KEGG	GLYCEROLIPID METABOLISM	0.002	0.0493	17/45
KEGG	GAMMA HEXACHLOROCYCLOHEXANE DEGRADATION	<0.001	0.0496	9/32

(FDR: false discovery rate)

表 3 DAVID を用いた解析の結果

データベース	パスウェイ	P 値	$P_{corrected}$	関連する遺伝子
KEGG	Systemic lupus erythematosus	$2.08 \times 10^{-6}$	$1.85 \times 10^{-4}$	<i>HIST1H2BK, HIST1H2AG, FCGR2C, SNRPD3, HIST1H2BJ, HIST1H2AH, HIST1H4I, FCGR3B, HLA-DQA2, HLA-DOB, IL10, HLA-DRA</i>
KEGG	Intestinal immune network for IgA production	$6.44 \times 10^{-3}$	0.44	<i>MADCAM1, HLA-DQA2, HLA-DOB, IL10, HLA-DRA</i>
KEGG	Asthma	$9.52 \times 10^{-3}$	0.57	<i>HLA-DQA2, HLA-DOB, IL10, HLA-DRA</i>
KEGG	Allograft rejection	0.017	0.79	<i>HLA-DQA2, HLA-DOB, IL10, HLA-DRA</i>
KEGG	Calcium signaling pathway	0.018	0.79	<i>CYSLTR2, ATP2A3, PHKG1, TACR1, RYR1, BDKRB2, ITPR3, HTR2B</i>
KEGG	Autoimmune thyroid disease	0.043	0.98	<i>HLA-DQA2, HLA-DOB, IL10, HLA-DRA</i>

$P_{corrected}$  は多重検定を補正した P 値

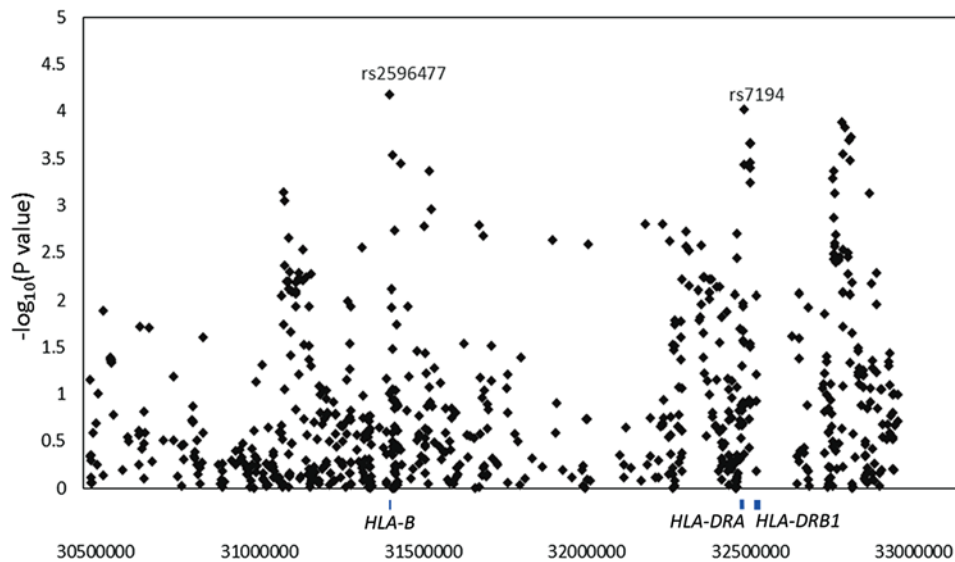


図 1 GWAS の HLA 領域の結果  
Nucleotide position: NCBI36/hg18



以降の解析では特に *HLA-DRB1*, *HLA-B* に着目して遺伝子型の決定を行い、患者・健常者間でアリル頻度の比較を実施した。遺伝子型の決定にあたっては、DNA を利用可能であったサンプル (パニック症: N=434, 健常者: N=1,418) については、WAKFlow HLA Typing kit (Wakunaga, Osaka, Japan) 並びに LABType SSO HLA kits (One Lambda, Inc., Canoga Park, CA) を用いてタイピングを実施した。さらに、GWAS ではタイピングが実施されたが、今回 DNA が利用できなかったサンプル (パニック症: N=310) については、GWAS の遺伝子型データを用いた *HLA* アリルの推定を実施した。*HLA* の推定には、我々の研究室で開発された日本人のみで構成される独自のリファレンスを用いた解析手法を用いた<sup>8)</sup>。なお、本手法の推定精度は、*HLA-B* で 94.8%, *HLA-DRB1* で 97.1% と非常に高いことが報告されている<sup>8)</sup>。今回も、GWAS 解析に用いたサンプルでかつ *HLA* タイピングを実施した

サンプル (N=231) のデータを用いて、独立にその推定精度を検証したところ、*HLA-B* で 95.7%, *HLA-DRB1* で 95.8% となり、先行研究の高い精度が再現された。

*HLA* のタイピングと推定により、*HLA-DRB1* 領域については、パニック症患者 736 例、健常者 1,418 例の *HLA* アリル型の決定に成功し、29 種類のアリルが検出された。そのうちの 7 アリルは患者群、健常者群両群において頻度が 1% 未満であったため、解析の際は「その他」とした (表 4)。*HLA-B* 領域の解析では、患者 726 例、健常者 1,418 例のアリル型が決定され、41 種類のアリルが検出された。そのうちの 16 はアリル頻度が 1% 未満であったため「その他」とした。以上から本研究では、計 47 アリルを患者・健常者間で比較したため、ボンフェローニ法による多重検定の補正を考慮した有意水準は  $\alpha=0.00106$  と設定した。

決定したアリル頻度を、患者・健常者間で比較したと

表 4 *HLA-DRB1* の解析結果

アリル	<i>HLA-DRB1</i>							
	Allelic モデル				Dominant モデル			
	パニック症 (N=736)	健常者 (N=1,418)	<i>P</i> 値	OR	パニック症 (N=736)	健常者 (N=1,418)	<i>P</i> 値	OR
N (%)	N (%)			N (%)	N (%)			
<i>DRB1*01:01</i>	80 (5.43)	176 (6.21)	0.31	0.87	76 (10.33)	170 (11.99)	0.25	0.85
<i>DRB1*04:01</i>	12 (0.82)	32 (1.13)	0.332	0.72	12 (1.63)	30 (2.12)	0.44	0.77
<i>DRB1*04:03</i>	35 (2.38)	74 (2.61)	0.646	0.91	34 (4.62)	72 (5.08)	0.641	0.91
<i>DRB1*04:05</i>	198 (13.45)	378 (13.33)	0.911	1.01	177 (24.05)	344 (24.26)	0.914	0.99
<i>DRB1*04:06</i>	57 (3.87)	94 (3.31)	0.345	1.18	54 (7.34)	92 (6.49)	0.457	1.14
<i>DRB1*04:07</i>	3 (0.20)	16 (0.56)	0.09	0.36	3 (0.41)	16 (1.13)	0.09	0.36
<i>DRB1*04:10</i>	28 (1.90)	57 (2.01)	0.81	0.95	28 (3.80)	57 (4.02)	0.808	0.94
<i>DRB1*08:02</i>	70 (4.76)	124 (4.37)	0.565	1.09	69 (9.38)	121 (8.53)	0.513	1.11
<i>DRB1*08:03</i>	106 (7.20)	231 (8.15)	0.274	0.88	104 (14.13)	218 (15.37)	0.443	0.91
<i>DRB1*09:01</i>	204 (13.86)	424 (14.95)	0.335	0.92	194 (26.36)	387 (27.29)	0.643	0.95
<i>DRB1*11:01</i>	38 (2.58)	86 (3.03)	0.401	0.85	38 (5.16)	85 (5.99)	0.43	0.85
<i>DRB1*12:01</i>	50 (3.40)	105 (3.70)	0.609	0.91	50 (6.79)	104 (7.33)	0.644	0.92
<i>DRB1*12:02</i>	32 (2.17)	57 (2.01)	0.72	1.08	30 (4.08)	56 (3.95)	0.887	1.03
<i>DRB1*13:01</i>	9 (0.61)	16 (0.56)	0.846	1.08	9 (1.22)	16 (1.13)	0.846	1.08
<i>DRB1*13:02</i>	135 (9.17)	174 (6.14)	$2.50 \times 10^{-4}$	1.54	133 (18.07)	163 (11.50)	$2.62 \times 10^{-5}$	1.7
<i>DRB1*14:03</i>	20 (1.36)	36 (1.27)	0.806	1.07	20 (2.72)	36 (2.54)	0.805	1.07
<i>DRB1*14:05</i>	29 (1.97)	58 (2.05)	0.868	0.96	29 (3.94)	56 (3.95)	0.992	1
<i>DRB1*14:06</i>	24 (1.63)	39 (1.38)	0.508	1.19	24 (3.26)	39 (2.75)	0.505	1.19
<i>DRB1*14:54</i>	35 (2.38)	92 (3.24)	0.111	0.73	35 (4.76)	92 (6.49)	0.105	0.72
<i>DRB1*15:01</i>	88 (5.98)	227 (8.00)	0.015	0.73	82 (11.14)	214 (15.09)	0.012	0.71
<i>DRB1*15:02</i>	195 (13.25)	287 (10.12)	$2.01 \times 10^{-3}$	1.36	179 (24.32)	272 (19.18)	$5.43 \times 10^{-3}$	1.35
<i>DRB1*16:02</i>	15 (1.02)	15 (0.53)	0.067	1.94	15 (2.04)	15 (1.06)	0.066	1.95
その他	9 (0.61)	38 (1.34)			9 (1.22)	38 (2.68)		

患者・健常者両群において頻度が 1% 未満だったアリルは「その他」に分類した (OR: odds ratio)

ころ、*HLA-DRB1* 領域では、*HLA-DRB1\*13:02* の頻度が多重検定の補正後も患者群で有意に高くなっているという結果が得られた ( $P=2.50 \times 10^{-4}$ , オッズ比 (OR) =1.54) (表 4)<sup>7)</sup>。また、*HLA-DRB1\*15:02* も多重検定の補正を考慮すると有意ではないものの、関連する傾向を示した ( $P=2.01 \times 10^{-3}$ , OR=1.36)。一方、*HLA-B* 領域の解析では、多重検定の補正後も有意な関連を示すアリルは検出されなかったが、*HLA-B\*44:03* 並びに *-B\*52:01* がそれぞれパニック症へ関連する傾向を示した (*B\*44:03*:  $P=2.23 \times 10^{-3}$ , OR=1.43; *B\*52:01*:  $P=5.97 \times 10^{-3}$ , OR=1.30) (表 5)<sup>7)</sup>。

#### 4. *HLA-DRB1\*13:02* の有無による GWAS データの層別解析

先行研究より *HLA* のアリルが関連する疾患では、その関連するアリルの有無によって、病態や関連する遺伝要因が異なるという報告がある。例えばナルコレプシーは *HLA-DQB1\*06:02* との強い関連が知られているが、特にカタプレキシーを伴わないナルコレプシーにおいては、その重症度が *HLA-DQB1\*06:02* を持つ患者において高いことが報告されている<sup>9)</sup>。また、*HLA-B\*51* はパーチェット病に対する強いリスク要因であるが、*ERAP1* 遺伝子領域の SNP の強い関連は *HLA-B\*51* を持つ患者でのみ確認されている<sup>10)</sup>。そこで、今回パニック症への関連が認められた *HLA-DRB1\*13:02* を持つ患者と持たな

表 5 *HLA-B* の解析結果

アリル	<i>HLA-B</i>							
	Allelic モデル				Dominant モデル			
	パニック症 (N=726)	健常者 (N=1,418)	<i>P</i> 値	OR	パニック症 (N=726)	健常者 (N=1,418)	<i>P</i> 値	OR
N (%)	N (%)			N (%)	N (%)			
<i>B*07:02</i>	78 (5.37)	173 (6.10)	0.336	0.87	74 (10.19)	165 (11.64)	0.315	0.86
<i>B*13:01</i>	23 (1.58)	41 (1.45)	0.724	1.1	22 (3.03)	41 (2.89)	0.857	1.05
<i>B*15:01</i>	130 (8.95)	226 (7.97)	0.269	1.14	128 (17.63)	216 (15.23)	0.152	1.19
<i>B*15:07</i>	3 (0.21)	15 (0.53)	0.122	0.39	3 (0.41)	15 (1.06)	0.122	0.39
<i>B*15:11</i>	9 (0.62)	18 (0.63)	0.954	0.98	9 (1.24)	18 (1.27)	0.953	0.98
<i>B*15:18</i>	17 (1.17)	52 (1.83)	0.103	0.63	17 (2.34)	50 (3.53)	0.136	0.66
<i>B*35:01</i>	103 (7.09)	231 (8.15)	0.224	0.86	101 (13.91)	224 (15.80)	0.249	0.86
<i>B*37:01</i>	6 (0.41)	17 (0.60)	0.43	0.69	6 (0.83)	17 (1.20)	0.428	0.69
<i>B*39:01</i>	49 (3.37)	92 (3.24)	0.82	1.04	48 (6.61)	91 (6.42)	0.863	1.03
<i>B*40:01</i>	87 (5.99)	157 (5.54)	0.542	1.09	84 (11.57)	150 (10.58)	0.486	1.11
<i>B*40:02</i>	96 (6.61)	206 (7.26)	0.43	0.9	94 (12.95)	199 (14.03)	0.488	0.91
<i>B*40:03</i>	4 (0.28)	15 (0.53)	0.237	0.52	4 (0.55)	15 (1.06)	0.236	0.52
<i>B*40:06</i>	71 (4.89)	136 (4.80)	0.892	1.02	70 (9.64)	133 (9.38)	0.844	1.03
<i>B*44:02</i>	9 (0.62)	11 (0.39)	0.291	1.6	9 (1.24)	11 (0.78)	0.29	1.61
<i>B*44:03</i>	137 (9.44)	193 (6.81)	$2.23 \times 10^{-3}$	1.43	134 (18.46)	185 (13.05)	$8.64 \times 10^{-4}$	1.51
<i>B*46:01</i>	64 (4.41)	145 (5.11)	0.31	0.86	63 (8.68)	140 (9.87)	0.371	0.87
<i>B*48:01</i>	33 (2.27)	85 (3.00)	0.17	0.75	32 (4.41)	85 (5.99)	0.126	0.72
<i>B*51:01</i>	114 (7.85)	242 (8.53)	0.444	0.91	111 (15.29)	233 (16.43)	0.495	0.92
<i>B*52:01</i>	201 (13.84)	311 (10.97)	$5.97 \times 10^{-3}$	1.3	188 (25.90)	295 (20.80)	$7.57 \times 10^{-3}$	1.33
<i>B*54:01</i>	101 (6.96)	212 (7.48)	0.536	0.93	95 (13.09)	198 (13.96)	0.575	0.93
<i>B*55:02</i>	28 (1.93)	78 (2.75)	0.101	0.7	28 (3.86)	77 (5.43)	0.11	0.7
<i>B*56:01</i>	11 (0.76)	19 (0.67)	0.745	1.13	11 (1.52)	19 (1.34)	0.744	1.13
<i>B*58:01</i>	10 (0.69)	20 (0.71)	0.951	0.98	10 (1.38)	19 (1.34)	0.943	1.03
<i>B*59:01</i>	25 (1.72)	56 (1.97)	0.565	0.87	25 (3.44)	56 (3.95)	0.561	0.87
<i>B*67:01</i>	24 (1.65)	30 (1.06)	0.098	1.57	24 (3.31)	30 (2.12)	0.096	1.58
その他	19 (1.31)	55 (1.94)			19 (2.62)	53 (3.74)		

患者・健常者両群において頻度が 1% 未満だったアリルは「その他」に分類した (OR: odds ratio)

い患者において、他の関連する遺伝要因が異なっている可能性を検討するために、GWAS のデータを *HLA-DRB1\*13:02* の有無によって分けた層別解析を実施した。

*HLA-DRB1\*13:02* を持つ群 (パニック症: N=103, 健常者: N=198) と持たない群 (パニック症: N=438, 健常者: N=1,341) のデータそれぞれに対して関連解析を実施した。その結果, *HLA-DRB1\*13:02* を持たない群では, *MCPHI* (microcephalin 1) 領域内の 1 つの SNP が多重検定の補正後も有意な関連を示した ( $P=4.23 \times 10^{-8}$ , OR=1.61)。さらに, ヨーロッパ系集団においてパニック症への関連が再現されている遺伝子である *TMEM132D* 領域内の 2 つの SNP もゲノムワイド有意な関連ではないものの, 関連する傾向を示し, 上位の SNP として検出された (rs1397504;  $P=3.88 \times 10^{-6}$ ; OR=1.51, rs7962650;  $P=7.32 \times 10^{-6}$ ; OR=1.49)<sup>11)</sup>。一方, *HLA-DRB1\*13:02* を持つ群の解析においては, ゲノムワイド有意な関連を示す SNP は検出されなかったが, *SLC30A8* (solute carrier family 30, member 8) 遺伝子領域内に存在する SNP rs6981381 が最も強い関連を示した ( $P=5.30 \times 10^{-7}$ , OR=0.19)<sup>11)</sup>。

### 5. *MCPHI* 並びに *TMEM132D* 領域の詳細な検討

*HLA-DRB1\*13:02* アリルを持つ群のサブグループ解析のサンプルサイズが小さいことを考慮し, 特に *HLA-DRB1\*13:02* アリルを持たない群の解析において, 関連

を示した *MCPHI* (chr8: 6,264,113–6,501,140, hg19) 並びに *TMEM132D* (chr12: 129,556,271–130,388,212, hg19) 領域についてさらに詳細に検討を実施することとした。これら 2 領域については, GWAS でタイピングされている SNP 以外に, 第一義的な関連を示す SNP がないかを検証するために, SNP imputation 解析を実施した。SNP imputation 解析には IMPUTE2 ソフトウェアを用い, 1000 人ゲノムプロジェクトの Phase 3 のデータをリファレンスとして用いた。なお, 推定精度が低い SNP については, SNP のコール率, ハーディー・ワインベルグ平衡検定の結果, imputation の確からしさの指標を考慮し除外した。

*HLA-DRB1\*13:02* を持たない群の *MCPHI* 領域の解析では, GWAS で実タイピングされていた SNP が imputation 後も最も強い関連 ( $P=4.23 \times 10^{-8}$ , OR=1.61) を示すという結果が得られた (図 2)。一方, *MCPHI* 領域のこれらの SNP は *HLA-DRB1\*13:02* を持つ群の解析においては全く関連を示さなかった (図 2)。*TMEM132D* 領域の解析では, GWAS ではタイピングされておらず, imputation によって遺伝子型を推定された SNP rs4759997 が *HLA-DRB1\*13:02* を持たないパニック症に最も強く関連するという結果が得られた ( $P=5.02 \times 10^{-6}$ , OR=1.50) (図 3)<sup>11)</sup>。他方で, *HLA-DRB1\*13:02* を持つ群の解析では, *TMEM132D* 領域の SNP の関連は見られなかった (図 3)<sup>11)</sup>。

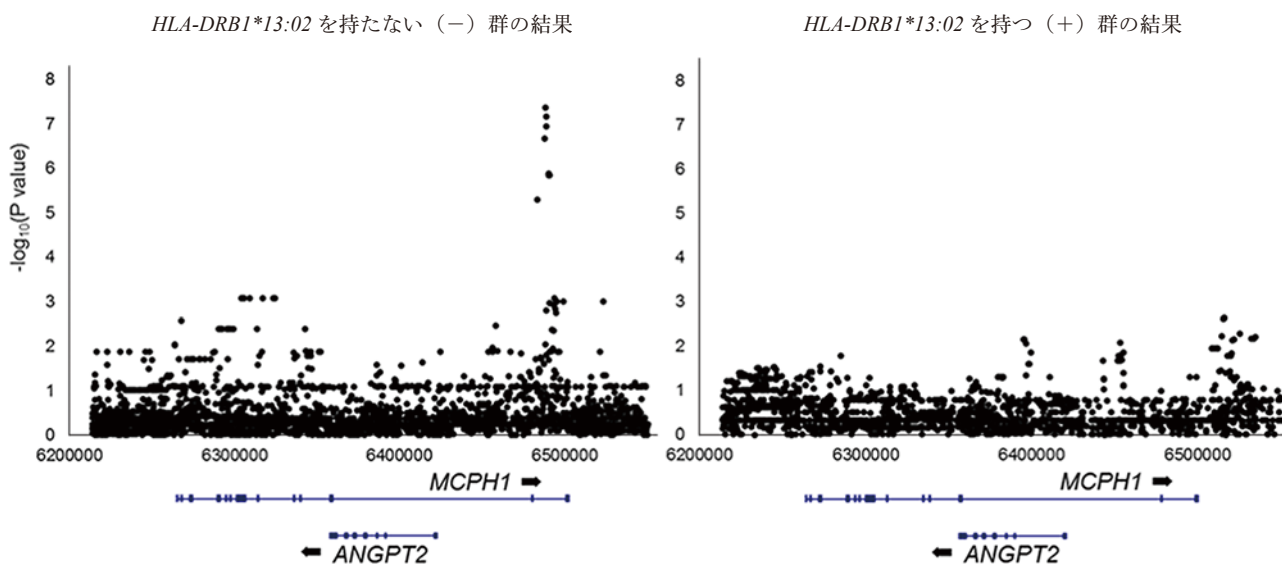


図 2 *MCPHI* 領域の imputation 解析の結果  
Nucleotide position: GRCh37/hg19

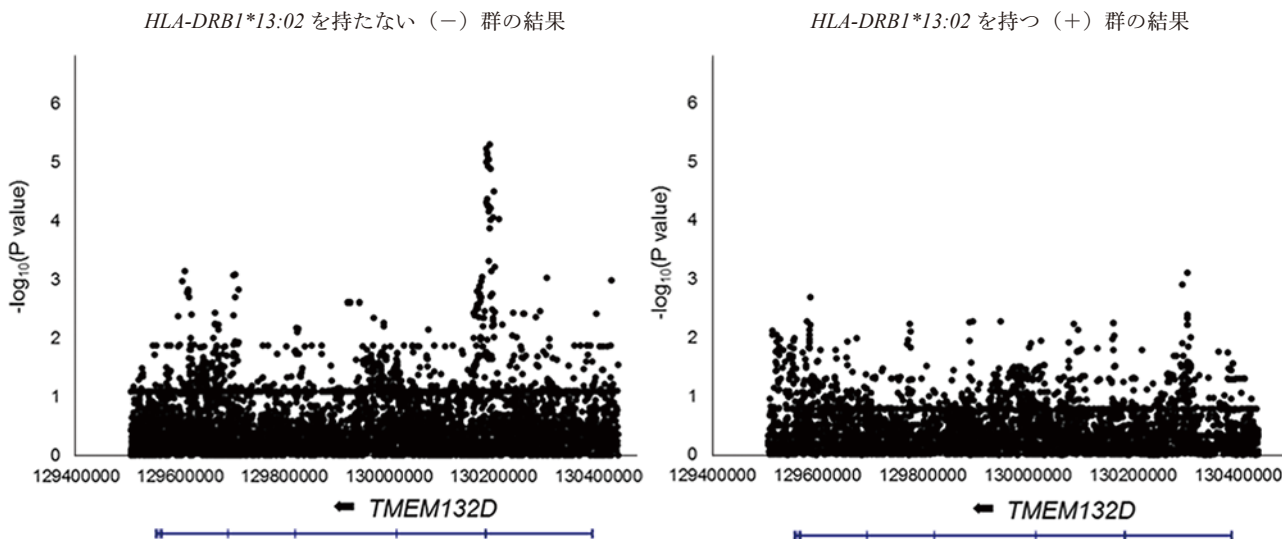


図3 *TMEM132D* 領域の imputation 解析の結果  
Nucleotide position: GRCh37/hg19

次いで、さらにこれらの領域で最も強い関連を示す SNP の影響を補正した際に、関連を示す SNP が存在するかを探索した。MCPHI 領域については、GWAS の層別解析の結果最も有意な関連を示した SNP、*TMEM132D* 領域については SNP rs4759997 の影響を補正したロジスティック回帰分析を実施した。それぞれの領域内の個々の SNP と層別解析の結果有意であった SNP を説明変数とし、疾患の有無を目的変数としたモデルにより、調整後の関連を評価した。その結果、有意な関連を示す SNP は検出されず、これらの領域に存在する SNP の関連はこれら 2 領域それぞれで最も強い関連を示す SNP の関連に由来するものであることが確認された。

## 6. パニック症と *TMEM132D*

*TMEM132D* 遺伝子とパニック症の関連は、はじめにヨーロッパ系集団を対象とした GWAS の結果見出された<sup>12)</sup>。*TMEM132D* の第 3 イントロンに存在する 2 つの SNP rs7309727 と rs11060369 の疾患への関連が認められ、同じくヨーロッパ系集団を対象とした再現性研究でその関連が確認された<sup>5)</sup>。これら 2 つの SNP は、不安の増大や扁桃体の大きさと関連することも報告されている<sup>13)</sup>。さらに、SNP rs11060369 のリスクアレルは脳内で *TMEM132D* のメッセンジャー RNA の発現の増大に関わるとの報告もある<sup>12)</sup>。一方で、これまでの日本人を対象とした GWAS では、*TMEM132D* の関連が見いだされて

いなかったが、今回 GWAS データをパニック症への関連が認められた *HLA-DRB1\*13:02* の有無によって層別解析することにより、本遺伝子内の SNP が日本人においても、*HLA-DRB1\*13:02* を持たないパニック症に関連することを見出した<sup>11)</sup>。パニック症に伴う症状は多彩であり、疾患に関与する遺伝要因の違いによるサブタイプが存在する可能性がある。本研究では、*HLA* による層別解析により、*TMEM132D* の関連が見出されたことから、*HLA-DRB1\*13:02* の有無によりパニック症の遺伝的背景が異なる可能性が示唆された。ヨーロッパ系集団においては、*HLA-DRB1\*13:02* の頻度は 5% 未満 (The Allele Frequency Net Database) と日本人よりも低いことから、ヨーロッパ系集団の GWAS においては *HLA-DRB1\*13:02* を持たない患者の割合が多く、層別解析を実施しなくても *TMEM132D* の関連が検出されたと考えられる。

本研究で日本人において関連が認められた SNP rs4759997 は、*TMEM132D* の第 1 イントロンに位置しており、Hapmap の日本人の遺伝子型データによると、ヨーロッパ系集団で報告されている 2 つの SNP とは連鎖不平衡にはなく (rs7309727,  $r^2=0.001$ ; rs11060369,  $r^2=0.003$ )、そのマイナーアレルの頻度はヨーロッパ系集団においては非常に低い (Hapmap CEU マイナーアレル頻度 = 0.009)。さらに imputation 解析の結果から、ヨーロッパ系集団においてパニック症に関連する 2 つの SNP は、日本人においては *HLA-DRB1\*13:02* を持たない集団



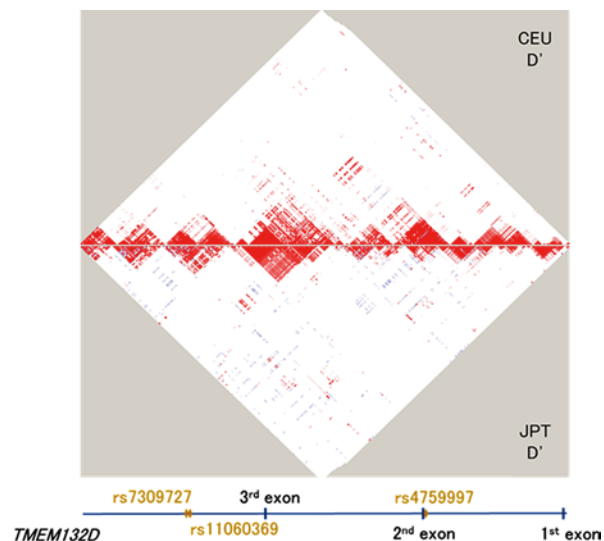


図4 *TMEM132D* 領域の集団間の連鎖不平衡構造の違い  
ヨーロッパ系集団 (CEU) と日本人集団 (JPT) における *TMEM132D* の第1～3イントロン領域 (chr12:129,864,100–130,400,300 (GRCh37/hg19)) の連鎖不平衡構造。SNP の遺伝子型データは HapMap database (HapMap Data Rel 27 Phase II+III, Feb09) のデータを使用した。

においても関連しないという結果が得られた (rs7309727:  $P=0.124$ , rs11060369:  $P=0.826$ )。このような集団による関連 SNP の違いは、図4に見られるような集団間の連鎖不平衡構造の違いによる可能性も考えられるが、今後今回関連が認められた SNP が日本人の *HLA-DRB1\*13:02* を持たないパニック症の真の一義的な関連 SNP と言えるのかについて、さらに詳細な検討が必要であると考えている。

## 7. パニック症と免疫

以上のように、GWAS のデータを用いたパスウェイ解析の結果から、パニック症への免疫系パスウェイの関連が示唆されたが、これらの関連は特に *HLA* や *IL-10*, ヒストンをコードする遺伝子領域に存在する SNP が疾患に対して比較的強い関連を示したことによると考えられる (表 1b, 3)。パニック症と免疫については、臨床の現場では、パニック症と他の免疫関連疾患の関係を示唆する所見が認められたことなどにより、これまでにも複数の研究の報告がある。喘息とパニック症の併発率が有意に高くなることは、多く先行研究で報告されている<sup>14)</sup>。また、ヨーロッパ系集団の全身性エリテマトーデスの女性を対象とした研究では、患者の 16% がパニック

症を発症しており、この発症率は一般集団に比べて有意に高いという結果が得られている<sup>15)</sup>。さらに末梢血の細胞を用いた先行研究によると、*HLA-DR* を提示する細胞がパニック症で健常者に比べて多く、*CD4+* 細胞が少なくなっていた<sup>16,17)</sup>。しかし *CD19+* 細胞については、その増減に関して複数の研究間で一致しない結果が得られており<sup>17,18)</sup>、さらに regulatory T 細胞以外の白血球細胞の数は患者と健常者の間で差がないとする報告もある<sup>19)</sup>。このように先行研究では、免疫とパニック症の関係についての結果が一致しておらず、これらの結果から免疫系の異常がパニック症の原因となっているのか、あるいは疾患に罹患したことによって引き起こされる二次的な現象なのかを特定することは困難である。そのため、現状では今回の研究で認められた免疫系パスウェイに関連する遺伝的要因が直接的に先行研究で報告されているような免疫系の表現型に関与しているかは不明であるが、今後さらに免疫系に着目した解析を実施し、免疫系とパニック症がどのように関連しているのかを明らかにする必要があると考える。

## 8. 精神疾患と HLA

管見によると我々はパニック症と *HLA* の関連をはじめ報告したが、統合失調症や自閉症、双極性障害などの他の精神疾患ではこれまでに *HLA* と疾患の関連が複数報告されている。ヨーロッパ系集団とアフリカ系集団を対象とした複数の統合失調症の GWAS では、いずれの研究においても *HLA* 領域の複数の SNP がゲノムワイド有意な関連を示した<sup>20-23)</sup>。自閉症を対象とした研究では、*HLA-DRB1\*04* がヨーロッパ系集団において疾患に関連する可能性があることが示唆された<sup>24,25)</sup>。さらに、双極性障害でも、*HLA-G* 領域のインサクションなど *HLA* 領域の関連が示唆されている<sup>26)</sup>。*HLA* がどのように精神疾患に関わっているのかという機序は明らかになっていないが、中枢神経系では脳内の免疫担当細胞であるマクログリアが主に *HLA* クラス I, II 分子を発現していることが知られており、脳内の免疫系の異常が疾患と関連している可能性がある。さらに近年、*HLA* は発達過程や成人の神経系にも発現しており、神経系の発達や可塑性に関わるとの報告もある<sup>27,28)</sup>。また、2016年には Sekar らによってこれまで統合失調症において検出されていた *HLA* の関連は実は補体成分である C4 の

関連であったとする報告もなされた<sup>29)</sup>。HLA 領域は多型性に富み、その構造が非常に複雑であることから、今後 HLA 以外の HLA 領域に存在する遺伝子のパニック症への関連についても検討していく必要があると考えている。

## 9. おわりに

本研究では GWAS のデータをもとに解析を実施し、パニック症と免疫、HLA-DRB1\*13:02 の関連を見出した。HLA-DRB1\*13:02 の有無で層別解析を実施することで、ヨーロッパ系集団でパニック症への関連が再現されていた遺伝要因である TMEM132D が日本人においても特に HLA-DRB1\*13:02 を持たないパニック症に関連するという知見を得た。しかしながら TMEM132D の詳細な機能は不明であり、HLA と機能的にどのように関わるのかについても明らかでない。さらに HLA-DRB1\*13:02 を持たないパニック症において、有意な関連が認められた MCPHI は、小頭症に関係することが報告されており<sup>30)</sup>、免疫系のみならず多様な機序が疾患の発症に関わっている可能性を示唆している。我々はすでに今回の結果の再現性研究に着手しているが、100 例規模の独立のサンプルでは、未だ TMEM132D 内の SNP の関連などを再現できていない。今後は、さらにサンプルを増やした再現性研究を実施すると共に、他集団においても HLA の関連が確認されるかについても検討していく必要がある。今後研究をさらに進め、パニック症の早期診断や治療につながる発症メカニズムの解明を目指したい。

## 参考文献

- Miyagawa T, Kawashima M, Nishida N, *et al.*: Variant between CPT1B and CHKB associated with susceptibility to narcolepsy. *Nat Genet* 40: 1324–1328, 2008.
- Hettema JM, Neale MC, Kendler KS: A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 158: 1568–1578, 2001.
- Crowe RR, Noyes R, Pauls DL, *et al.*: A family study of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 40: 1065–1069, 1983.
- Goldstein RB, Wickramaratne PJ, Horwath E, *et al.*: Familial aggregation and phenomenology of ‘early’-onset (at or before age 20 years) panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 54: 271–278, 1997.
- Howe AS, Buttenschön HN, Bani-Fatemi A, *et al.*: Candidate genes in panic disorder: meta-analyses of 23 common variants in major anxiogenic pathways. *Molecular Psychiatry* 21: 665–679, 2016. doi:10.1038/mp.2015.138.
- Otowa T, Kawamura Y, Nishida N, *et al.*: Meta-analysis of genome-wide association studies for panic disorder in the Japanese population. *Transl Psychiatry* 2: e186, 2012.
- Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, *et al.*: Immune-related pathways including HLA-DRB1(\*)13:02 are associated with panic disorder. *Brain Behav Immun* 46: 96–103, 2015.
- Khor SS, Yang W, Kawashima M, *et al.*: High-accuracy imputation for HLA class I and II genes based on high-resolution SNP data of population-specific references. *Pharmacogenomics J* 15: 530–537, 2015.
- Sasai T, Inoue Y, Komada Y, *et al.*: Comparison of clinical characteristics among narcolepsy with and without cataplexy and idiopathic hypersomnia without long sleep time, focusing on HLA-DRB1(\*)1501/DQB1(\*)0602 finding. *Sleep Med* 10: 961–966, 2009.
- Kirino Y, Bertsias G, Ishigatsubo Y, *et al.*: Genome-wide association analysis identifies new susceptibility loci for Behçet’s disease and epistasis between HLA-B\*51 and ERAP1. *Nat Genet* 45: 202–207, 2013.
- Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, *et al.*: Polymorphisms in the TMEM132D region are associated with panic disorder in HLA-DRB1\*13:02-negative individuals of a Japanese population. *Hum Genome Var* 3: 16001, 2016.
- Erhardt A, Czibere L, Roeske D, *et al.*: TMEM132D, a new candidate for anxiety phenotypes: evidence from human and mouse studies. *Mol Psychiatry* 16: 647–663, 2011.
- Haaker J, Lonsdorf TB, Raczka KA, *et al.*: Higher anxiety and larger amygdala volumes in carriers of a TMEM132D risk variant for panic disorder. *Transl Psychiatry* 4: e357, 2014.
- Favreau H, Bacon SL, Labrecque M, *et al.*: Prospective impact of panic disorder and panic-anxiety on asthma control, health service use, and quality of life in adult patients with asthma over a 4-year follow-up. *Psychosom Med* 76: 147–155, 2014.
- Bachen EA, Chesney MA, Criswell LA: Prevalence of mood and anxiety disorders in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 61: 822–829, 2009.
- Perini GI, Zara M, Carraro C, *et al.*: Psychoimmunoendocrine Aspects of Panic Disorder. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*: John Wiley & Sons, Ltd., 461–465, 1995.
- Rapaport MH: Circulating lymphocyte phenotypic surface markers in anxiety disorder patients and normal volunteers. *Biol Psychiatry* 43: 458–463, 1998.
- Schleifer SJ, Keller SE, Bartlett JA: Panic disorder and immunity: few effects on circulating lymphocytes, mitogen response, and NK cell activity. *Brain Behav Immun* 16: 698–705, 2002.
- Park JE, Kim SW, Park Q, *et al.*: Lymphocyte subsets and mood states in panic disorder patients. *J Korean Med Sci* 20: 215–219, 2005.

- 20) International Schizophrenia Consortium, S.M. Purcell, N.R. Wray, *et al.*: Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* 460: 748–752, 2009.
- 21) Shi J, Levinson DF, Duan J, *et al.*: Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia. *Nature* 460: 753–757, 2009.
- 22) Stefansson H, Ophoff RA, Steinberg S, *et al.*: Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460: 744–747, 2009.
- 23) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium: Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511: 421–427, 2014.
- 24) Torres AR, Maciulis A, Stubbs EG, *et al.*: The transmission disequilibrium test suggests that HLA-DR4 and DR13 are linked to autism spectrum disorder. *Hum Immunol* 63: 311–316, 2002.
- 25) Johnson WG, Buyske S, Mars AE, *et al.*: HLA-DR4 as a risk allele for autism acting in mothers of probands possibly during pregnancy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 163: 542–546, 2009.
- 26) Debnath M, Busson M, Jamain S, *et al.*: The HLA-G low expression genotype is associated with protection against bipolar disorder. *Hum Immunol* 74: 593–597, 2013.
- 27) Shatz CJ: MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron* 64: 40–45, 2009.
- 28) Boulanger LM: Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron* 64: 93–109, 2009.
- 29) Sekar A, Bialas AR, de Rivera H, *et al.*: Schizophrenia risk from complex variation of complement component 4. *Nature* 530: 177–183, 2016.
- 30) Rimol LM, Agartz I, Djurovic S, *et al.*: Sex-dependent association of common variants of microcephaly genes with brain structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 384–388, 2010.



## A Subgroup Analysis of Genome-wide Association Study for Panic Disorder

Mihoko Shimada-Sugimoto<sup>1)</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

Panic disorder (PD) is an anxiety disorder characterized by panic attacks and anticipatory anxiety. To date, few genetic and environmental factors were found to be involved in PD and pathogenesis of PD is remained to be elucidated. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *TMEM132D* and *COMT*, are only a few genetic factors of PD that were replicated in several studies in European population, but not in Japanese population. We previously performed a genome-wide association study (GWAS), however, there seemed to be polymorphisms which did not reach genome-wide significance threshold due to their low allele frequencies and odds ratios, although they were truly associated with PD. We then performed pathway analyses to overcome the limitations of a conventional single-marker analysis. The pathway analyses identified the associations of immune pathways with PD. Based on the results of pathway analyses, we especially focused on and investigated *HLA-B* and *HLA-DRB1*. As a result, a frequency of *HLA-DRB1\*13:02* was significantly higher in PD patients than in control ( $P=2.62 \times 10^{-5}$ , odds ratio=1.70). We further examined sub-group analyses of GWAS, taking effects of *HLA* alleles into account. The SNP genotype data were subdivided into two datasets: those of *HLA-DRB1\*13:02*-positive subjects (cases: N=103; controls: N=198) and those of *HLA-DRB1\*13:02*-negative subjects (cases: N=438; controls: N=1,341). As a result, one SNP in *MCPHI* showed a genome-wide significant association with PD and several SNPs in *TMEM132D* showed suggestive associations with PD in subjects without *HLA-DRB1\*13:02*.

**Key Words:** panic disorder, HLA, GWAS, pathway analysis, subgroup analysis

## 第 15 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集

会 期：2017 年 2 月 4 日（土）

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  
TEL 06-6962-7001

世話人：野村 昌作

〒 573-1191 大阪府枚方市新町 2-3-1  
関西医科大学附属病院 血液腫瘍内科  
TEL 072-804-0101

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

【参加費】

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

【会議等】

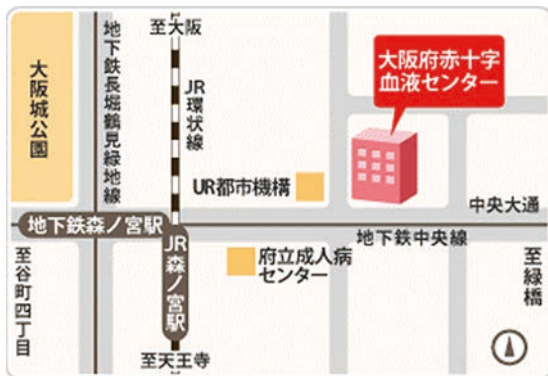
1. 総 会：2月4日（土）13:30～13:40
2. 世話人会：2月4日（土）12:30～13:30
3. 意見交換会：2月4日（土）17:00～

【会場地図】

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  
TEL 06-6962-7001



♥ 施設の詳しい地図



JR 環状線・地下鉄中央線・地下鉄長堀鶴見緑地線，森ノ宮駅下車東へ 350 m

## プログラム

9 時 30 分～10 時 30 分 HLA 基礎講習会（事前登録者対象）

### 【午前の部】

10 時 45 分～10 時 50 分

#### 開会の挨拶

10 時 50 分～11 時 20 分

#### オープニングセミナー

座長：谷 慶彦

（大阪府赤十字血液センター）

1) ASHI レポート：小島裕人（HLA 研究所）

#### 一般演題（1）

11 時 20 分～11 時 50 分

座長：石井博之

（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

1) *WAKFlow*<sup>®</sup> HLA 抗体 クラス I & II (ICFA) の改良検討

○白水隆喜<sup>1)</sup>, 尾串雄次<sup>1)</sup>, 小川貴裕<sup>1)</sup>, 川井信太郎<sup>1)</sup>, 中島文明<sup>2)</sup>, 井手健太郎<sup>3)</sup>, 大段秀樹<sup>3)</sup>

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部<sup>1)</sup>, 日本赤十字社 血液事業本部 中央研究所<sup>2)</sup>, 広島大学病院 消化器・移植外科<sup>3)</sup>

2) Common Well Documented を用いた DNA タイピングの有用性

○横沢佑弥<sup>1)</sup>, 益尾清恵<sup>1)</sup>, 小林貴弘<sup>1)</sup>, 奥平裕子<sup>2)</sup>, 榊屋安里<sup>2)</sup>, 朝治桜子<sup>2)</sup>, 猪子英俊<sup>4)</sup>

株式会社ベリタス<sup>1)</sup>, ジェノダイブファーマ株式会社<sup>2)</sup>

3) PCR を用いない新しい KIR の DNA タイピングの開発—NGS キャプチャー法—

○猪子英俊<sup>1)</sup>, 奥平裕子<sup>1)</sup>, 榊屋安里<sup>1)</sup>, 朝治桜子<sup>1)</sup>, 田嶋 敦<sup>2)</sup>, 細道一善<sup>2)</sup>

ジェノダイブファーマ（株）<sup>1)</sup>, 金沢大学医薬保健研究域医学系<sup>2)</sup>

#### 一般演題（2）

11 時 50 分～12 時 30 分

座長：木村貴文

（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

4) 新鮮凍結血漿を輸血後に移行した HPA-5b 抗体が約 1 か月間検出された一例

○山田麻里江<sup>1)2)4)</sup>, 山田尚友<sup>1)2)</sup>, 中尾真実<sup>1)2)</sup>, 東谷孝徳<sup>1)</sup>, 久保田寧<sup>2)3)</sup>, 木村晋也<sup>3)</sup>, 末岡榮三朗<sup>1)2)</sup>

佐賀大学医学部附属病院検査部<sup>1)</sup>, 佐賀大学医学部附属病院輸血部<sup>2)</sup>, 佐賀大学医学部附属病院血液・呼吸器・腫瘍内科<sup>3)</sup>, 佐賀大学大学院医学系研究科博士課程医科学専攻<sup>4)</sup>

5) 慢性骨髄性白血病におけるチロシンキナーゼ阻害剤の効果は KIR アリルと相関する

○嬉野博志<sup>1)</sup>, 進藤岳郎<sup>1)2)</sup>, 楠木靖史<sup>3)</sup>, 宮崎有紀<sup>3)</sup>, 小島裕人<sup>3)</sup>, 田中秀則<sup>3)</sup>, 佐治博夫<sup>3)</sup>, 川口 淳<sup>4)</sup>, 木村晋也<sup>1)</sup>

佐賀大学医学部血液・呼吸器・腫瘍内科<sup>1)</sup>, 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科<sup>2)</sup>, 公益財団法人 HLA 研究所<sup>3)</sup>, 佐賀大学医学部地域医療科学教育センター<sup>4)</sup>

## 6) 移植グラフト肝類洞内皮における HLA-DR 発現の変化

○上田大輔<sup>1)</sup>, 吉澤 淳<sup>1)</sup>, 金城昌克<sup>1)</sup>, 八木真太郎<sup>1)</sup>, 秦浩一郎<sup>1)</sup>, 岡島英明<sup>1)</sup>, 海道利実<sup>1)</sup>, 鶴山竜昭<sup>2)</sup>, 上本伸二<sup>1)</sup>

京都大学大学院医学研究科外科学講座<sup>1)</sup>, 京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター<sup>2)</sup>

## 7) 関東甲信越さい帯血バンクが提供した臍帯血移植における HLA-DPA1 適合度について

○高田慎之介<sup>1)</sup>, 東 史啓<sup>1)</sup>, 屋部登志雄<sup>1)</sup>, 大村和代<sup>1)</sup>, 峯元睦子<sup>1)</sup>, 鈴木雅治<sup>1)</sup>, 中島一格<sup>1)</sup>  
日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター<sup>1)</sup>

12 時 30 分～13 時 30 分

**昼食・世話人会**

13 時 30 分～13 時 40 分

**総会**

**【午後の部】**

**一般演題 (3)**

13 時 40 分～14 時 30 分

座長：佐藤 壯

(札幌北楡病院)

## 8) HLA 抗体保有患者の HLA 半合致同種末梢血幹細胞移植

○山岡 学<sup>1)</sup>, 阿部 操<sup>1)</sup>, 佐能もも香<sup>1)</sup>, 榎本梨沙<sup>1)</sup>, 大澤真輝<sup>1)</sup>, 井上まどか<sup>1)</sup>, 寺嶋由香利<sup>1)</sup>, 大西修司<sup>1)</sup>, 伊藤量基<sup>1)</sup>, 野村昌作<sup>1)</sup>

関西医科大学附属病院 輸血・細胞療法部<sup>1)</sup>

## 9) アログラフト生検材料からの移植腎組織内吸着 DSA 検出の試み

○渡部清子<sup>1)</sup>, 今西 唯<sup>1)</sup>, 中村緑佐<sup>2)</sup>, 原田俊平<sup>2)</sup>, 増田康史<sup>2)</sup>, 堀池重夫<sup>1)</sup>, 吉村了勇<sup>2)</sup>

京都府立医科大学 輸血・細胞医療部<sup>1)</sup>, 京都府立医科大学大学院 移植再生外科学<sup>2)</sup>

## 10) DQA1 タイピング結果を用いた DSA の解析

○高山智美<sup>1)</sup>, 蔦原宏一<sup>2)</sup>, 平瀬裕美<sup>1)</sup>, 小林 茜<sup>1)</sup>, 三好由真<sup>1)</sup>, 岩田和友子<sup>1)</sup>

大阪府立急性期・総合医療センター移植支援検査センター<sup>1)</sup>, 大阪府立急性期・総合医療センター泌尿器科<sup>2)</sup>

## 11) 抗体関連型拒絶反応発症例における classII de novo DSA と C3d との関連性の検討

○西村憲二<sup>1)</sup>, 木下朋子<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>, 田中 亮<sup>1)</sup>, 富山栄輔<sup>1)</sup>, 米本佐代子<sup>1)</sup>, 山中和明<sup>1)</sup>, 中川勝弘<sup>1)</sup>, 岸川英史<sup>1)</sup>

兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター<sup>1)</sup>

## 12) 肝移植患者の抗ドナー特異的 HLA 抗体が肝臓に及ぼす影響と HLA 抗原の関係

○金城昌克<sup>1)</sup>, 吉澤 淳<sup>1)</sup>, 上田大輔<sup>1)</sup>, 八木真太郎<sup>1)</sup>, 秦浩一郎<sup>1)</sup>, 岡島英明<sup>1)</sup>, 海道利実<sup>1)</sup>, 鶴山竜昭<sup>2)</sup>, 上本伸二<sup>1)</sup>

京都大学大学院医学研究科外科学講座<sup>1)</sup>, 京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター<sup>2)</sup>

14 時 30 分～ 15 時

休 憩

15 時～ 17 時

シンポジウム

「GVHD」

座長：野村昌作（関西医科大学附属病院 血液・腫瘍内科）

椿 和央（日本赤十字社中四国ブロック血液センター）

1) 制御性 T 細胞から考える GVHD 制御

佐竹敦志

（関西医科大学附属病院 血液・腫瘍内科）

2) 間葉系幹細胞（MSC；テムセル HS 注）による造血細胞移植後 GVHD 治療

安井昌博

（大阪府立母子総合医療センター 血液・腫瘍科）

3) 移植後シクロホスファミドを用いた HLA 半合致移植

杉田純一

（北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野）

17 時～ 意見交換会



(10:50 ~ 11:20)

---

**オープニングセミナー**

座長：谷 慶彦  
(大阪府赤十字血液センター)

- 1) ASHI レポート：小島裕人 (HLA 研究所)

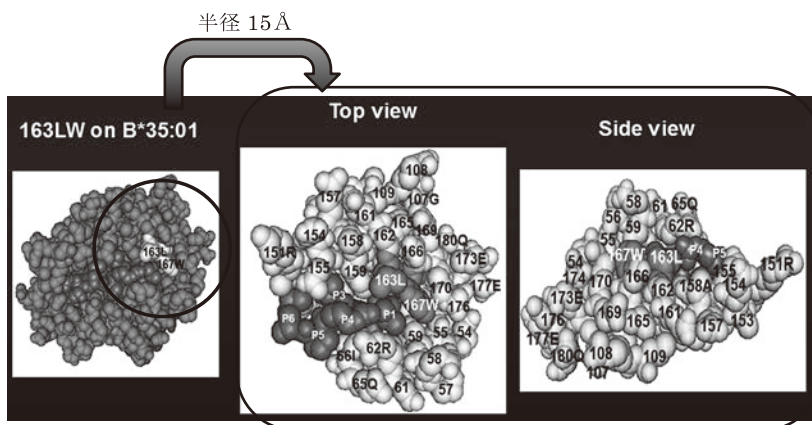
## アメリカ組織適合性学会 (ASHI) レポート

小島裕人<sup>1)</sup>

公益財団法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>

2016年9月にミズーリ州・セントルイスで開催されたアメリカ組織適合性学会に参加したので報告する。内容として、エピトープによるHLA抗体検査結果の解釈、臓器移植ドナー選定基準の変遷、NGSに焦点をあてる。今回の参加で最も状況の変化を感じたのはHLA抗体

に対する考え方であり、第16回の国際ワークショップで加速したエピトープデータベースの蓄積に伴って、MFI (Median Fluorescence Intensity) 値からエピトープへの視点変更の傾向が強まっている。エピトープとは、HLA分子上に存在する抗体認識部分のことで、構成因



	OK6H12	Eplet:	163LW		Polymorphic surface residues within 15 Å of 163LW										
			163	167	62	65	66	107	109	151	173	177	180		
	Sequence position		L	W	R	Q	I	G	L	R	E	E	Q		
MFI=高い	IMM	B*15:03	L	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	OLMFI	PANEL	L	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	8125	B*15:01	L	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	8972	B*15:02	L	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
7638	B*15:03	L	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
~~~~~															
MFI=中間	3087	B*57:03	L	W	G	R	N	-	-	-	-	-	-		
	3554	B*58:01	L	W	G	R	N	-	-	-	-	-	-		
	2055	B*15:16	L	W	-	-	N	-	-	-	-	-	-		
MFI=低い	111	B*46:01	L	W	-	-	K	-	-	-	-	-	-		
	796	C*03:02	L	W	-	-	K	-	-	-	K	-	-		
	438	C*03:03	L	W	-	-	K	-	-	-	K	-	-		
	554	C*03:04	L	W	-	-	K	-	-	-	K	-	-		

(自己より高い)

- 結果の解釈
- MFI=高い：免疫原となる抗原との構造差異が、抗体認識に重要ではない。
  - MFI=中間：免疫原となる抗原と eplet の異なる部分 (アミノ酸番号：62, 65, 66) は存在するが、抗体反応にあまり影響しない。
  - MFI=低い (自己より高い)：免疫原となる抗原と eplet の異なる部分 (アミノ酸番号：66, 173) に対する反応が弱い。
  - MFI=低い (自己と同程度か低い)：免疫原となる抗原と eplet を共有しない。

図. エピトープ (抗原性) の考え方

エピトープワークショップ講義 @Hong Kong Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Aug 2015 (<http://www.epitopes.net/education.html>) より、一部抜粋, 改変。

子として eplet と呼ばれる並列なアミノ酸構造が定義されている。抗体の特異性としては 15 Å (オームストロング) 内の eplet が対象となり (図), 自身の保持する eplet に対応する特異性の抗体は産生しないことがわかっている。つまり, エピトープを有するかどうか (抗原性) と, エピトープがミスマッチになるかどうか (免疫原性) が抗体産生の要因となる。

抗体特異性の議論は, 米国では臓器移植分野において活発である。例えば, 2014 年 12 月より全米臓器配分ネットワーク (UNOS, United Network for Organ Sharing) が移植臓器調達システム (KAS, Kidney Allocation System) を設立当初以来, 約 20 年ぶりに改正を実施しているが, 患者年齢や移植の地域性に加えて, PRA (Panel Reactive Antibody) (%) が考慮されている。ただし, MFI を特定の閾値で陽性と陰性の判定を行うと, 非特異反応が陽性と判定される場合が多くなる可能性があるため, 基準

値としては cPRA (calculated PRA) を用いる。cPRA は, PRA 算出の際に検出感度 (%PRA) に依存せず, 2007 年 1 月から 2008 年 12 月までのドナー情報から HLA 抗原頻度から, 許容できない HLA 抗原の割合を算出した数値である。

遺伝子型検査の面では, NGS (Next Generation Sequencing) での検査が普及している状況において, HLA 領域の網羅的解析が進みつつある。例えば, DP 座の 3'-UTR 内の特定 SNP (rs9277534) は, HLA 分子発現との相関が報告されている。このような従来法で検出されていない領域の SNPs が, HLA の機能的側面のみならず, 疾患との関連や人類遺伝学での応用も期待されている。また, NGS を用いた造血細胞移植後のキメラ状態の確認や, がん領域で注目されている neoantigen (癌特異的抗原) の検索など, シーケンサーによる HLA 遺伝子型検査以外の使用も幅広くなってきている状況である。

(10:40 ~ 11:10)

---

**一般演題 (1)**

座長：石井博之

(日本赤十字社近畿ブロック血液センター)

**演題番号 1～3**

## 1) WAKFlow<sup>®</sup> HLA 抗体 クラス I & II (ICFA) の改良検討

○白水隆喜<sup>1)</sup>, 尾串雄次<sup>1)</sup>, 小川貴裕<sup>1)</sup>, 川井信太郎<sup>1)</sup>, 中島文明<sup>2)</sup>, 井手健太郎<sup>3)</sup>, 大段秀樹<sup>3)</sup>

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部<sup>1)</sup>, 日本赤十字社 血液事業本部 中央研究所<sup>2)</sup>,  
広島大学病院 消化器・移植外科<sup>3)</sup>

### 【背景】

WAKFlow HLA 抗体 クラス I & II (ICFA) [以下, ICFA (I & II)] は, Luminex ビーズに固定した抗 HLA モノクローナル抗体により, HLA 分子とアロ抗体の複合体を特異的に検出することができる試薬である。第 24 回日本組織適合性学会において, 検出抗体ビーズを追加することによる ICFA (I & II) の検出感度向上について報告を行った。今回, 下記 1). 及び 2). について検討を実施したため, その結果について報告する。

#### 1). DR 及び DP 特異的検出抗体ビーズ追加検討

第 24 回日本組織適合性学会で報告したクラス II 追加ビーズ (class II-2 ビーズ及び class II-3 ビーズ) は DQ 抗体の検出感度向上を目的としたビーズである。今回, DR 及び DP 特異的検出抗体ビーズの追加を検討した。

#### 2). DR53 抗体の検出検討

これまで ICFA (I & II) による DR 抗体の検出において, DR51, DR52 及び DR53 といった DRB1 以外の抗原に対する抗体の検出例は少ない。今回, DR53 抗体陽性, DR4, DR7 及び DR9 抗体陰性の血清を入手したため, ICFA (I & II) による DR53 抗体の検出が可能であるか評価した。また, 1). で検討した DR 特異的検出抗体ビー

ズによる DR53 抗体の検出についても評価した。

### 【結果】

#### 1). DR 及び DP 特異的検出抗体ビーズ追加検討

新たに DR 検出抗体ビーズの追加と DP 検出抗体ビーズの追加を検討した結果, それぞれの検出抗体ビーズが DR 抗体と DP 抗体を特異的に検出可能であることが示唆された。今回の検討結果から, DR 及び DP 特異的検出抗体ビーズを製品に搭載することによって, ICFA (I & II) によるクラス II DSA の検出において, DR, DQ 及び DP 抗体それぞれの特異的検出が可能となることが示唆された。今後, 該当ビーズの製品への追加を目指し検討を進めていく予定である。

#### 2). DR53 抗体の検出検討

DRB1\*04:05 をもつ血液検体と DR53 抗体陽性, DR4 抗体陰性の血清の組み合わせによる ICFA (I & II) を実施した結果, DR53 抗体を検出可能であることを確認した。さらに, 1). で検討した DR 特異的検出抗体ビーズによる検出では, 従来 class II ビーズより高感度で検出が可能であることが示唆された。

## 2) Common Well Documented を用いた DNA タイピングの有用性

○横沢佑弥<sup>1)</sup>, 益尾清恵<sup>1)</sup>, 小林貴弘<sup>1)</sup>, 奥平裕子<sup>2)</sup>, 榊屋安里<sup>2)</sup>, 朝治桜子<sup>2)</sup>, 猪子英俊<sup>4)</sup>

株式会社ベリタス<sup>1)</sup>, ジェノダイブファーマ株式会社<sup>2)</sup>

### 【はじめに】

1990年代の遺伝子タイピングの開始に始まり、昨今ではNGS (Next Generation Sequencing) タイピングが導入される中でHLA New Alleleの数は増加を続けている。実際に2016年10月にリリースされたIPD-IMGT/HLA 3.26.0のデータベースでは既に15,000を超えるHLA Alleleが登録されている。

そのように増加を続けるHLAを正確にタイピングするにはNGS法が最も適した方法ではあるが、コストや検査時間、装置導入費用などの面で未だにハードルが高いのが現状である。そこで今回はCommon Well Documented データベース (バージョン 2.0.0) を用いる事でRSSO 試薬であるLABType (One Lambda 社 /Thermo Fisher Scientific グループ) によりどの精度までの解析が可能なのかを検証すると共にその有用性を検証した。

### 【方法】

One Lambda 社の複数のLABType 試薬を用いて、実際

に候補アリルがどの程度絞り込むことが出来るかを検証した。更に比較対象としてSBT法 (試薬: SeCore/One Lambda 社) 及びNGS法 (試薬: NXType/One Lambda 社) の結果も併せて評価した。

### 【結論】

今回の少数検体の検討においてCommon Well Documented (CWD) 2.0.0 データベースを用いる事で候補アリルの中からの確な回答を導き出すことが出来た。ただしCWD 2.0.0には日本人に比較的頻度の高い幾つかのAlleleが含まれていない事が判明したため、その使用に関しては注意する部分もあると考えられた。

CWD データベースを的確に使用することで、コスト及び確認検査などの時間短縮が想定される。しかしながらNGS法も一般化される事でコストが下がってきており、更に自動化へのアプローチが進んでいる事などから使用される現場において適切な試薬選択が必要になってくると思われる。



### 3) PCR を用いない新しい KIR の DNA タイピングの開発 —NGS キャプチャー法—

○猪子英俊<sup>1)</sup>, 奥平裕子<sup>1)</sup>, 榊屋安里<sup>1)</sup>, 朝治桜子<sup>1)</sup>, 田嶋 敦<sup>2)</sup>, 細道一善<sup>2)</sup>

ジェノダイブファーマ (株)<sup>1)</sup>, 金沢大学医薬保健研究域医学系<sup>2)</sup>

【はじめに】現在, KIR-DNA タイピングとして用いられているルミネックス法, SBT 法, 次世代シーケンサー法などは, いずれも PCR で増幅した産物について SSO-ハイブリダイゼーション, シーケンシングなどを行い, 多型を見出してアリル決定を行っている。しかしながら, PCR は増幅の際の間違った塩基の取り込み, PCR 酵素の染色体間や遺伝子間の乗り換えによるキメラ増幅産物の産生, PCR プライマー領域の多型による増幅の失敗 (allele drop) などのタイピングエラーが避けられない。また, 自動化に不向きな欠点もある。そこで, 本研究では, 全ゲノム断片よりハイブリダイゼーションにより KIR 遺伝子ゲノム領域を分離し, 次世代シーケンサーによりタイピングを行う, PCR 用いないキャプチャー法を開発した。

【方法】IPD-KIR データベースに多型が登録されている全ての 18 KIR 遺伝子, すなわち *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B*, *KIR3DS1*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR3DX1*, *KIR2DP1*, *KIR3DP1* のそれぞれの遺伝子に対応する 340 のゲノム領域を標的として, 総計 181 kb 塩基配列に対応するピ

オチン標識 DNA を人工合成した。これらの人工合成 DNA をプローブとして, 全ゲノム断片とハイブリダイゼーションを行い, ストレプトアビジン磁気ビーズにより, これらの KIR 遺伝子のゲノム領域を選択的に, 分離・捕捉 (capture) した。このようにして捕捉された KIR ゲノム断片について, 次世代シーケンサーによりシーケンシングを行った。KIR 型既知の 48 検体について 1 ランで解析し, それぞれ KIR ハプロタイプ並びに遺伝子型を決定した。

【結果】KIR ハプロタイプ並びに遺伝子型が問題なく, 判定された。日本人については, 数多くの非同義置換やスプライシングに関する新しい多型が見出された。また, HLA 遺伝子のキャプチャープローブを共存させることにより, 1 本のチューブで KIR 遺伝子型と HLA 遺伝子型を 1 ランで 48 検体を一度に決定可能であった。

【結語】キャプチャー法により, KIR 遺伝子と HLA 遺伝子を同時に, 多検体について, 正確, かつ安価で HLA タイピングが可能であった。自動化も容易であることから, 将来有望なタイピング法である, と考えられる。

(12:00 ~ 12:30)

---

**一般演題 (2)**

座長：木村貴文

(日本赤十字社近畿ブロック血液センター)

**演題番号 4～7**

#### 4) 新鮮凍結血漿を輸血後に移行した HPA-5b 抗体が約 1 か月間検出された一例

○山田麻里江<sup>1)2)4)</sup>, 山田尚友<sup>1)2)</sup>, 中尾真実<sup>1)2)</sup>, 東谷孝徳<sup>1)</sup>, 久保田寧<sup>2)3)</sup>, 木村晋也<sup>3)</sup>, 末岡榮三朗<sup>1)2)</sup>

佐賀大学医学部附属病院検査部<sup>1)</sup>, 佐賀大学医学部附属病院輸血部<sup>2)</sup>,  
佐賀大学医学部附属病院血液・呼吸器・腫瘍内科<sup>3)</sup>, 佐賀大学大学院医学系研究科博士課程医科学専攻<sup>4)</sup>

【はじめに】輸血用血液製剤は、感染症検査、赤血球抗原と赤血球抗原に対する不規則抗体検査を実施し、基準値内の場合に製品化される。その一方、HLA 抗体や HPA 抗体は検査されていないのが現状である。今回、新鮮凍結血漿 -LR480（以下 FFP）を輸血した患者で非溶血性輸血副作用が起り、副作用報告を行ったところ、FFP 製剤中に HLA class I 抗体と HPA-5b 抗体が検出され、製品由来の抗体が患者血清中に輸血後約 1 か月間検出された症例を経験したので報告する。

【症例】60 歳代の女性。A 型 RhD 陽性。急性リンパ性白血病の加療のため当院入院中であり、適宜輸血を行っていた。Fib 97 mg/dL と低値であったため、前投薬なしに FFP 1 バックの輸血を行ったところ、1 時間後に悪寒戦慄が出現したため FFP は投与中止された。一旦体温も 38.4°C まで上昇したが、ソル・コーテフ 100 mg 投与後に症状緩和とともに解熱した。患者は感染徴候もなく、FFP 投与に伴う輸血副作用が最も疑わしいとの判断により、血液センターへ副作用報告を行った。

【副作用報告及び検査結果】副作用関連検査では①

HLA 抗体：蛍光ビーズ法により輸血前、輸血後の患者血清及び FFP より class I 抗体が検出された。FFP から検出された抗体は、患者 HLA class I と反応する抗体ではなかった。② HPA 抗体：MPHA 法により輸血前の患者血清は陰性であったが、輸血後の患者血清と FFP から HPA-5b 抗体が検出された。③血漿タンパク質に関する検査：血漿タンパク質抗体及び欠損について異常を示す結果はみられなかった。また、自施設で行った患者の HPA 抗原は HPA-5 a/a であり、九州ブロック血液センターの追加報告から、患者血清中の移行した HPA-5b 抗体は輸血後約 1 か月間検出された。

【まとめ】輸血後非溶血性輸血副作用を起こした患者で、FFP に含まれていた HLA class I 抗体、HPA-5b 抗体が輸血により患者へ移行した症例を経験した。また HPA 抗体は輸血副作用の原因とはならない抗体であるが、輸血後約 1 か月間患者体内に残存していたことから、製品由来の抗体は次回以降の輸血不応に関与する可能性が示唆された。

## 5) 慢性骨髄性白血病におけるチロシンキナーゼ阻害剤の効果は KIR アリルと関連する

○嬉野博志<sup>1)</sup>, 進藤岳郎<sup>1)2)</sup>, 楠木靖史<sup>3)</sup>, 宮崎有紀<sup>3)</sup>, 小島裕人<sup>3)</sup>, 田中秀則<sup>3)</sup>, 佐治博夫<sup>3)</sup>, 川口 淳<sup>4)</sup>, 木村晋也<sup>1)</sup>

佐賀大学医学部血液・呼吸器・腫瘍内科<sup>1)</sup>, 京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科<sup>2)</sup>, 公益財団法人 HLA 研究所<sup>3)</sup>, 佐賀大学医学部地域医療科学教育センター<sup>4)</sup>

【緒言】チロシンキナーゼ阻害剤 (Tyrosine Kinase Inhibitor: TKI) の登場により, 慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia: CML) の長期予後は劇的に改善した。TKI 投与中に natural killer (NK) 細胞が増加する症例の予後は良好であることから, CML に対する NK 細胞免疫の関与が考えられるが, 治療反応性は症例毎に異なり, その差異を決定する因子には不明な部分が多い。今回我々は KIR 遺伝子アリルの多型が CML の治療反応性と関連する可能性につき, 検証した。

【方法】慢性期 CML (CML-CP) 患者 76 名の末梢血由来 DNA を用いて, 次世代シーケンサーで KIR アリルのタイピングを行い, 治療効果との関連性を検証した。治療効果は international scale (IS) 法または transcription mediated amplification (TMA) 法で判定し, major molecular response (MMR) は BCR-ABL mRNA の 3-log 減少 (IS) もしくは 50 copy/0.5 µgRNA 未満までの減少 (TMA), また MR<sup>4.0</sup> は 4-log 減少 (IS) もしくは BCR-ABL 検出感度未満までの減少 (TMA) と定義した。各 MR を達成するまでの時間を評価項目として, Cox の比例ハザード回帰分析により因子との関連性を評価し, 有意水準は 5% とした。

【結果】まず, 第 2 世代 TKI (ダサチニブ・ニロチニブ) による初期治療が MMR (HR 5.807, P<0.001) および MR<sup>4.0</sup> (HR 8.340, P<0.001) と, また性別 (女性) が MR<sup>4.0</sup> (HR 2.296, P=0.002) と有意に関連する因子として抽出された。次にこれらで調整した多変量解析では, 下記 KIR アリルが予後因子として抽出された。

### 1) MMR と関連

KIR2DS4\*00301 g, \*007/010 もしくは \*015 (HR 1.773, P=0.04)

### 2) MR<sup>4.0</sup> と関連

KIR2DL4\*008 g もしくは \*011/00501 (HR 1.797, P=0.032)

KIR2DS4\*00301 g, \*007/010 もしくは \*015 (HR 2.737, P=0.001)

KIR3DL1\*00501 g (HR 2.746, P=0.003)

【考案】今回 MR<sup>4.0</sup> と関連した上記の KIR2DL4/KIR2DS4/KIR3DL1 アリルは, KIR ハプロタイプを形成することで連鎖している可能性が高いと考えられる。すなわち特定の KIR ハプロタイプが CML の予後と関連し, ひいては抗腫瘍免疫の強弱を決定している可能性が示された。

## 6) 移植グラフト肝類洞内皮における HLA-DR 発現の変化

○上田大輔<sup>1)</sup>, 吉澤 淳<sup>1)</sup>, 金城昌克<sup>1)</sup>, 八木真太郎<sup>1)</sup>, 秦浩一郎<sup>1)</sup>, 岡島英明<sup>1)</sup>, 海道利実<sup>1)</sup>, 鶴山竜昭<sup>2)</sup>, 上本伸二<sup>1)</sup>

京都大学大学院医学研究科外科学講座<sup>1)</sup>, 京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター<sup>2)</sup>

【目的】肝移植患者は、術後、血清中に抗ドナー特異的 HLA 抗体 (Donor Specific Antibodies, DSA) を有することがあり、主に HLA class II に対する抗体が出現する。一方、通常肝類洞内皮には HLA-DR の発現は認めないとされている。

今回、我々は再移植を要するグラフト肝不全症例のグラフト肝における HLA-DR の発現の有無とその意義について、DSA の有無、臨床経過を合わせて検討を行った。

【方法】肝移植を 2 回以上行った患者における、初回移植時のグラフト肝生検と、再移植摘出時における HLA-DR の発現を検討した。また、DR 陽性部位の解析のため、硬変肝において類洞内皮細胞に発現が認められる CD31 (PECAM) との二重染色を行った。この染色結果と臨床経過についての関係を検討する。

【結果】当院にて 2009 年 1 月から 2012 年 12 月にかけて再移植を行った患者のうち、DSA を測定した 12 人において検討した。初回移植時年齢は 13.5 歳 (中央値、

0.8–68.0)、再移植時年齢は 21.0 歳 (中央値、3.3–68.1 歳)。初回、再移植間隔は 9.7 年 (中央値、0.2–13.4 年) であった。脱落肝に対する DSA は 12 例中 4 例で陽性、non-DSA anti-HLA antibody は 4 例で陽性、陰性は 4 例であった。

移植時グラフト肝においては DR の発現は類洞内の一部に限局していたが、移植後肝不全脱落肝においては、移植時に存在しなかった HLA-DR の発現が類洞内皮の他、新生血管や嚢胞、線維化部位などに認められた。HLA-DR の発現は DSA 陽性例で有意に多かった ( $p=0.030$ )。また、HLA-DR と CD31 の二重陽性部分が移植後脱落肝類洞内皮細胞に認められた。

【結論】脱落肝類洞内皮細胞において移植時に元来存在しなかった HLA-DR の発現が認められた。DSA の存在と関連を認め、予後に影響を与えた可能性が示唆された。また、CD31 との 2 重染色により、類洞内皮細胞に HLA-DR の発現が疑われた。

## 7) 関東甲信越さい帯血バンクが提供した臍帯血移植における HLA-DPA1 適合度について

○高田慎之介<sup>1)</sup>, 東 史啓<sup>1)</sup>, 屋部登志雄<sup>1)</sup>, 大村和代<sup>1)</sup>, 峯元睦子<sup>1)</sup>, 鈴木雅治<sup>1)</sup>, 中島一格<sup>1)</sup>

日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター<sup>1)</sup>

### 【目的】

臍帯血移植をはじめとする非血縁造血幹細胞移植では、HLA-A, B, C, DRB1 の 4 座に加えて DPB1, DQB1 座の適合度も成績に影響を及ぼすことが示唆されている。特に DPB1 においては不適合症例で GVL 効果が適合症例より有意に高く、再発抑制効果があるという報告がされている。また、感染症の分野では、DPA1 の多型が HBV 等のウイルスの感染成立や慢性化に関連しているとの報告が多数されている。今回、DPA1 の適合度の移植成績への影響を確認するため、過去に関東甲信越さい帯血バンクが提供した臍帯血移植症例の患者および臍帯血の DPA1 タイピングを実施したので報告する。

### 【方法】

2001 年～2010 年の間に関東甲信越さい帯血バンクから提供した臍帯血を使用した移植症例のうち、206 症例の患者および臍帯血、合計 412 検体について PCR-rSSO 法 (ジェノサーチ HLA-DPA1/B1: 医学生物学研究所) を用いて、DPA1 および DPB1 の DNA タイピングを実施した。

### 【結果】

206 症例中、DPA1 アリルレベル適合の移植症例は 52

症例 (25.2%) であった。DPB1 アリルレベル適合症例は 29 症例 (14.1%) で、DPA1 および DPB1 のどちらも適合した症例は 26 症例 (12.6%) であった。今回検出された DPA1 は 3 種類であり、DPB1 の 15 種類に比べて多型性は低く、またハプロタイプの影響で DPB1 適合症例の約 90% で DPA1 も適合していた。一方で DPA1 適合症例中では、DPB1 の適合症例は 50% であった。検出された DPA1 の遺伝子頻度は \*02:02 が 45.8%, \*01:03 が 39.6%, \*02:01 が 14.7% だった (直接カウント法)。

### 【考察】

今回検出された DPA1 の遺伝子頻度はこれまでの国内報告とほぼ同様であった。欧米では \*01:03 が優占しており多型性に乏しいのに対して、日本では \*02:02 がメジャー型で、3 アリルの頻度比率がおおよそ 5:4:1 であり移植で不適合が生じやすいという人種間差が見られた。また、DPA1 適合症例中での DPB1 不適合症例は約半数あり、両遺伝子の適合度の違いが移植成績に影響している可能性がある。DPB1 の適合度は GVL 効果による再発抑制に影響する事から、白血病症例における DPA1 の適合と成績との関連解析を進めている。



(12:30 ~ 13:30)

---

昼食・世話人会

(13:30 ~ 13:40)

---

総会

(13:40 ~ 14:30)

---

**一般演題 (3)**

座長：佐藤 壯  
(札幌北楡病院)

**演題番号 8 ~ 12**

## 8) HLA 抗体保有患者の HLA 半合致同種末梢血幹細胞移植

○山岡 学<sup>1)</sup>, 阿部 操<sup>1)</sup>, 佐能もも香<sup>1)</sup>, 樫本梨沙<sup>1)</sup>, 大澤眞輝<sup>1)</sup>, 井上まどか<sup>1)</sup>, 寺嶋由香利<sup>1)</sup>,  
大西修司<sup>1)</sup>, 伊藤量基<sup>1)</sup>, 野村昌作<sup>1)</sup>

関西医科大学附属病院 輸血・細胞療法部<sup>1)</sup>

【はじめに】造血幹細胞移植におけるドナー特異的抗体 (DSA) は、拒絶の原因となる重要な因子のひとつである。しかし、DSA が低力価の場合、移植する細胞数を多くする事で拒絶の回避が可能とされている。今回、DSA 保有患者の HLA 半合致移植を経験したので報告する。

【症例】50 歳代, 女性。近医から当院に紹介受診となり、精査の結果、顆粒球肉腫と診断され化学療法後寛解導入となった。しかし、同年、右上腕骨近位端に圧痛を認め、精査により再発と診断された。今回、同種末梢血幹細胞移植目的で入院となり、息子をドナーとした HLA 半合致移植が実施された。

【結果】患者は、A 型 RhD 陽性で、DSA を含む広範囲に及ぶ特異性を認める HLA 抗体 (class I) を保有したが、DSA の蛍光値 (MFI) は 1700 と低値であった。ドナーは、AB 型 RhD 陽性で、ABO 主不適合であり、HLA タイプの適合度は 4/8 であった。移植後 14 日目には好中球生着が認められ、移植後 11, 19 日目のキメリズム検査でも完全キメラであった。移植後 56 日目で DSA は FCM 法にて陰性となった。なお、移植前後とも輸血は全て、PC-HLA で実施されている。

【経過】好中球生着は認められたが、背部左膝窩部腫瘍の縮小は見られるも残存していた。移植後 3, 4 日目に GVHD 予防を目的として大量のシクロホスファミドが投与された。その結果、GVHD および感染症も認められない事から移植後 39 日目で退院となり、外来観察となった。移植後 95 日目に左膝顆粒球肉腫による左下肢疼痛を認めたため、緊急入院となり治療が実施されたが、移植後 105 日目に原病が原因で永眠された【考案およびまとめ】DSA 保有患者の HLA 半合致移植を経験した。拒絶されることなく生着が認められたのは、移植前から DSA の MFI が低値であった事や、移植細胞数が  $6.1 \times 10^6/\text{kg}$  と多かった事によると考えられた。患者は移植前から PC-HLA の輸血が実施されていたが、DSA を保有していたため移植後も継続して PC-HLA の輸血が実施された。HLA 抗体保有患者が生着後に PC-HLA からランダム PC に変更するには、HLA 抗体検査により抗体の消失を確認する事が重要であり、定期的に検査を実施する事が必要と思われた。親子による HLA 半合致移植の場合、レシピエントが DSA を保有することも多く、移植前後の抗体検査は重要である。

## 9) アログラフト生検材料からの移植腎組織内吸着 DSA 検出の試み

○渡部清子<sup>1)</sup>, 今西 唯<sup>1)</sup>, 中村緑佐<sup>2)</sup>, 原田俊平<sup>2)</sup>, 増田康史<sup>2)</sup>, 堀池重夫<sup>1)</sup>, 吉村了勇<sup>2)</sup>

京都府立医科大学 輸血・細胞医療部<sup>1)</sup>, 京都府立医科大学大学院 移植再生外科学<sup>2)</sup>

### 【はじめに】

免疫抑制剤の発展により細胞性拒絶の制御は比較的良好になったが、ドナー特異的抗 HLA 抗体 (DSA) による抗体関連拒絶 (AMR) の制御は未だ不十分である。AMR の診断には血清中の DSA (s-DSA) の同定とグラフト生検による病理学的診断が主に用いられるものの、DSA 産生が少量である場合はアログラフトへの吸着により s-DSA が検出されず、また軽微な組織損傷や多病変の混在によって病理診断が困難となる問題点が潜在する。フランスのバチュレらは生検組織から解離した抗体を Single Antigen beads で特異性を同定しアログラフトに吸着された DSA (g-DSA) を検出することで g-DSA の意義評価を試みている。今回我々は、生検材料から抗原抗体複合体を可溶化し Immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA) 法でアログラフト組織に吸着した g-DSA の検出を試みた。(京都府立医科大学医学倫理審査委員会承認 ERB-C-664 UMIN000023787 号)

### 【方法】

2016 年 6 月～11 月に診断目的に実施した移植腎生検組織のうち、s-DSA も同時に解析した 31 検体を対象とした。g-DSA は、16 ゲージ針による経皮的生検により

得られた組織 (3.2±0.8 mm) の一部を粉碎し得られた細胞を ICFA キット (湧永製薬) 添付の Lysis 液で可溶化した後、手順に従い Luminex を用いて HLA 抗原抗体複合体を検出した。「HLA ビーズの蛍光強度/ブランクビーズの蛍光強度」が 1.0 を超える場合に g-DSA 陽性と判定した。s-DSA は FlowPRA Screening を行い、陽性判定となった血清は LABScreen Class I, II Single Antigen (ONE LAMBDA, INC.) で抗体特異性を同定してドナー特異性を確認した。

### 【結果・考察】

31 検体中 15 例で g-DSA 陽性と判定され (Class I: 6 例, Class II: 7 例, Class I および II: 2 例), うち 10 例で s-DSA も同時に検出された。g-DSA 陰性の 16 例は全て s-DSA も陰性であった。g-陽性 s-陰性の 5 例は、クロスマッチ陽性移植後の残存抗体と考えられる 2 例と怠薬など免疫抑制剤血中濃度の不安定による抗体産生が推測できる 3 例であり、組織内のみを検出される微量の DSA を高感度にとらえたものと考えられた。ICFA 法を利用した g-DSA の検出は、非特異抗体による偽陽性反応を排除でき、AMR の組織学的診断を補完する有用な方法と考える。

## 10) DQA1 タイピング結果を用いた DSA の解析

○高山智美<sup>1)</sup>, 蔦原宏一<sup>2)</sup>, 平瀬裕美<sup>1)</sup>, 小林 茜<sup>1)</sup>, 三好由真<sup>1)</sup>, 岩田和友子<sup>1)</sup>

大阪府立急性期・総合医療センター移植支援検査センター<sup>1)</sup>, 大阪府立急性期・総合医療センター泌尿器科<sup>2)</sup>

### 【目的】

HLA Class II は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のヘテロダイマーであり、DR 抗原とは異なり DQ 抗原は  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖共に多型を認める。これまで当検査室では DQ 抗体の DSA (donor specific antibody) の判定は DQB1 のタイピング結果を用いて行っていた。今回、移植後の DQ 抗体陽性症例について DQA1 のタイピングを実施し、DSA を再解析したので報告する。

### 【方法】

2008 年 9 月から 2015 年 6 月に当院で腎移植を実施し、移植後に DQ 抗体が検出された 19 例のうち、DNA 検体が保存されていた 17 例を対象とした。DQA1 のタイピングは WAKFlow<sup>®</sup> タイピング試薬を用いて実施した。また、HLA 抗体特異性同定試薬には LABScreen Single Antigen<sup>®</sup> を用い、解析は Fusion<sup>®</sup> で実施した。

### 【結果】

17 例中 14 例は HLA 抗体特異性同定検査で陽性となっ

たパネルがミスマッチの DQA1 と DQB1 の組合せと一致し DSA であった。2 例は陽性のパネルがミスマッチとは一致せず Non-DSA であった。残りの 1 例は陽性のパネルとミスマッチの DQA1 だけが一致し DSA であった。

### 【考察】

陽性のパネルとミスマッチの DQA1 と DQB1 組合せが一致した 14 例は、DQB1 のタイピング結果で DSA を判定できた。しかし、ミスマッチの DQA1 だけが一致した 1 例では、ミスマッチの組合せと同じパネルがなく、DQA1 のタイピング結果がなければ DSA は判定できなかった。DRB1, DQA1, DQB1 のハプロタイプ頻度から、ドナーとレシピエントの DRB1, DQB1 のタイピング結果を用いて DQA1 を推定することが可能であるが、特に HLA 抗体特異性同定試薬にミスマッチの組合せが含まれていないことが推定される症例では、DQA1 のタイピングが必要であると考えられる。

## 11) 抗体関連型拒絶反応発症例における classII de novo DSA と C3d との関連性の検討

○西村憲二<sup>1)</sup>, 木下朋子<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>, 田中 亮<sup>1)</sup>, 富山栄輔<sup>1)</sup>, 米本佐代子<sup>1)</sup>, 山中和明<sup>1)</sup>, 中川勝弘<sup>1)</sup>, 岸川英史<sup>1)</sup>

兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター<sup>1)</sup>

### 【目的】

腎移植後に発症する抗体関連型拒絶反応 (Antibody-mediated rejection; AMR) は予後不良因子である。その原因の一つとして de novo DSA (dnDSA) の出現が考えられているが、既存の DSA に比べて dnDSA としては classII の出現が多く、臨床的に重要視されている。一方で補体の活性化も AMR 発症に関連していると考えられているが、dnDSA がすべて補体結合性を有するわけではなく予後への影響に関してもはっきり判明していない。今回我々は、AMR 発症例における dnDSA と補体の一つである C3d との関連性を検討した。

### 【対象と方法】

対象は当院で施行された腎移植症例のうち、病理組織学的に AMR と診断され、その原因として dnDSA が考えられた 15 例。このうち classII 陽性症例に関して Lifecodes C3d detection kit を用いて C3d の測定を Luminex にて行い、dnDSA の種類における C3d の有無や予後への影響に関して検討した。

### 【成績】

DnDSA は DRB1:7/20 (35%), DRB3-5:10/15 (67%),

DQA/B:15/20 (75%) の陽性率で DRB1 に比べ、DRB3-5, DQA/B で陽性率が高かった。DnDSA が陽性で C3d も陽性である比率は DRB1:3/7 (42.9%), DRB3-5:9/10 (90%), DQA/B:13/15 (86.7%) で DRB3-5 と DQA/B で優位に C3d も陽性であった ( $p=0.176, 0.038, <0.001$ )。C3d の MFI 値を dnDSA の有無で検討すると、DRB1 (dnDSA 陽性:7924, dnDSA 陰性:4549), DRB3-5 (陽性:21057, 陰性:6754), DQA/B (陽性:19144, 陰性:1056) であり、C3d の MFI 値は DRB3-5 と DQA/B 陽性で優位に高かった ( $p=0.222, 0.027, 0.001$ )。予後に関しては、DRB3-5 または DQA/B で dnDSA と C3d の MFI 値が共に 5000 以上の症例 9 例中 4 例は AMR 治療後に移植腎機能悪化または廃絶しており、5000 未満の症例 (6 例中 1 例) より予後が悪い傾向にあった。

### 【結論】

AMR 発症の原因と考えられる classII dnDSA のうち、DRB3-5 と DQA/B は DRB1 に比べ陽性率が高く、C3d の結合や活性化に関連し、予後に影響している可能性が示唆された。



## 12) 肝移植患者の抗ドナー特異的 HLA 抗体が肝臓に及ぼす影響と HLA 抗原の関係

○金城昌克<sup>1)</sup>, 吉澤 淳<sup>1)</sup>, 上田大輔<sup>1)</sup>, 八木真太郎<sup>1)</sup>, 秦浩一郎<sup>1)</sup>, 岡島英明<sup>1)</sup>, 海道利実<sup>1)</sup>, 鶴山竜昭<sup>2)</sup>, 上本伸二<sup>1)</sup>

京都大学大学院医学研究科外科学講座<sup>1)</sup>, 京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター<sup>2)</sup>

【目的】我々は、肝移植患者において移植後に出現する抗ドナー特異的 HLA 抗体 (de novo DSA) は、主に HLA class II 抗原に対する抗体であり、肝線維化との関連があることを報告した。一方、主に免疫担当細胞に発現する HLA class II 抗原の DSA に対する役割は不明であり、そこで今回我々は、肝組織における HLA class II 抗原の発現状況を調べ、DSA や線維化との関係について検討を行った。

【方法】原疾患が胆道閉鎖症で明らかな手術的血管胆管合併症を認めない症例 21 例を対象とし、線維化の有無、DSA の有無で 4 群に群別化した。肝生検標本を用いて抗 HLA-DR 抗体による免疫染色を行い、組織中の HLA-DR 抗原の発現を門脈域、静脈域、類洞に分けて評価、スコアリングした。HLA-DR 抗原発現スコアを群別化した 4 群等で比較した。

【結果】患者の肝生検標本採取時の年齢は平均 12.3 歳であった。肝移植手術時の年齢は平均 2.4 歳で、肝移植手術日からの期間は平均 9.9 年であった。血液型不適合移植は 3 例含まれていた。DSA、線維化ともに陽性の群では、DSA は陽性だが線維化は陰性の群と比較し門脈域の HLA-DR 抗原が高発現していた ( $p=0.042$ )。また、HLA-DR 抗原が高発現している症例では多くで DSA が存在しており ( $p=0.0085$ )、線維化も進行していた ( $p=0.019$ )。静脈域の HLA-DR 抗原の発現量と ALT 値にも相関が見られた ( $p=0.041$ )。

【結論】DSA が存在する症例では HLA-DR 抗原が高発現となり、線維化との関係を認めた。また、DSA が存在するが線維化を認めない症例では、門脈域の HLA-DR 抗原の発現が少なかった。

(15:00 ~ 17:00)

---

## シンポジウム

「GVHD」

座長：野村昌作（関西医科大学附属病院 血液・腫瘍内科）  
椿 和央（日本赤十字社中四国ブロック血液センター）

1) 制御性 T 細胞から考える GVHD 制御

佐竹敦志

（関西医科大学附属病院 血液・腫瘍内科）

2) 間葉系幹細胞（MSC；テムセル HS 注）による造血細胞移植後 GVHD 治療

安井昌博

（大阪府立母子総合医療センター 血液・腫瘍科）

3) 移植後シクロホスファミドを用いた HLA 半合致移植

杉田純一

（北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野）

## 1) 制御性 T 細胞から考える GVHD 制御

佐竹敦志<sup>1)</sup>

関西医科大学附属病院 血液・腫瘍内科<sup>1)</sup>

造血器悪性疾患に対する根治を目的とした治療法である同種造血幹細胞移植は、近年、移植細胞ソースの多様化や支持療法の進歩により、その件数が増加している。HLA 不一致移植の増加や高齢者の移植が増加し、GVHD ハイリスクの移植件数も増加してきている。GVHD は宿主抗原により感作されたドナー由来免疫細胞によって引き起こされる臓器障害であり、重症化するとしばしば致命的となるほか、長期生存者の QOL を低下させる。GVHD の治療としては急性、慢性ともにステロイドが第一選択となるが、ステロイド治療に抵抗性の GVHD も一定の割合で生じる。また、治療に反応する場合でもステロイドの中止や減量が困難であることもしばしばあり、長期にわたるステロイド投与による副作用や易感染性が問題となる。同種造血幹細胞移植においては GVHD を首尾よくコントロール出来るか否かは、移植の成否を左右する重要な因子である。

制御性 T 細胞 (Treg) は生体内で過剰な T 細胞の活性化を抑制し、免疫寛容を維持するために必要な T 細胞サブセットである。これまでの基礎及び臨床研究の結果から、Treg による免疫抑制作用は自己免疫反応だけでなく、非自己抗原を標的とした同種免疫反応に対しても発揮される事がわかっており、Treg は GVHD に対しても抑制的に働く。Treg を利用した GVHD 制御は、従来の免疫抑制剤による免疫抑制機序と異なるため、治療抵抗性の GVHD にも効果が期待できる有望な治療法である。

Treg の維持・増幅のためには、主として Treg 以外の通常 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (Tconv) から産生される IL-2 と、樹

状細胞 (DC) に代表される抗原提示細胞からの抗原刺激や共刺激が必要である。Treg は Tconv に比べて IL-2 に対する感受性が高いため、IL-2 を投与すると生体内で Treg の増殖を導くことができ、この性質を利用して様々な免疫疾患に対する IL-2 療法の臨床試験が行われている。GVHD に関しては、米国における第一相臨床試験でステロイド抵抗性慢性 GVHD に対する低用量 IL-2 療法の有効性が 2011 年に発表され、この結果を受けて現在日本でも臨床試験が進行中である。米国からの報告では、これまでのところ IL-2 の有効性は HLA 一致、不一致の移植で差異は認めておらず、奏功率はおよそ 60% であった。ステロイド抵抗性の慢性 GVHD に対しては、未だ有効性の高い 2 次治療が確立されていないことから、今後は国内での臨床試験の結果が期待される。しかし、治療抵抗例が存在することや副作用により治療を中止している症例が存在することに加え、ATL のように IL-2 投与が適さないと考えられる疾患もあり、IL-2 とは別のアプローチによる Treg の増幅方法を開発できれば、治療の選択肢を広げられる可能性がある。

我々は DC の中でもとりわけ Treg の増殖促進作用が強い CD8<sup>+</sup>DC に注目し、この CD8<sup>+</sup>DC の増幅を介した Treg の増幅が GVHD 抑制効果を示すかについて検討を行った。MHC 一致慢性 GVHD マウスモデルを用いて、CD8<sup>+</sup>DC 増幅作用を有する GM-CSF を投与して、GVHD に及ぼす影響を検討した。本講演では、Treg の維持・増幅メカニズム、GVHD との関わりについて基礎的・臨床的な話題や我々の研究データを紹介しながら、Treg からみた GVHD 制御について議論したい。

## 2) 間葉系幹細胞 (MSC ; テムセル HS 注) による造血細胞移植後 GVHD 治療

○安井昌博<sup>1)2)</sup>, 樋口紘平<sup>1)</sup>, 清水真理子<sup>1)</sup>, 五百井彩<sup>1)</sup>, 中西達郎<sup>1)</sup>, 佐藤真穂<sup>1)</sup>, 澤田明久<sup>1)</sup>, 井上雅美<sup>1)</sup>

大阪府立母子保健総合医療センター 血液・腫瘍科<sup>1)</sup>, 同 輸血・細胞管理室<sup>2)</sup>

【はじめに】近年、難治性血液・腫瘍性疾患に対して行われてきた造血細胞移植の成績は飛躍的に向上してきたが、移植の方法や移植片の多様性のため移植片対宿主病 (GVHD) の治療も従来の治療方法とは異なるアプローチが必要になってきている。

2016 年 2 月にヒト骨髄より作製した間葉系幹細胞テムセル HS 注が JCR ファーマ株式会社より本邦で初めて販売された。現在は、治験担当施設での使用にとどまっているが、2017 年 4 月より一般の移植施設でも使用拡大可能となる見込みである。演者らは、これまでステロイド抵抗性 GVHD の 7 症例にテムセル HS 注を使用した。その使用経験について報告する。

【対象・方法】悪性腫瘍 3 例 (神経芽腫 1 例, 急性リンパ性白血病 2 例), 血液疾患 2 例 (先天性赤芽球癆 1 例,

再生不良性貧血 1 例), 慢性活動性 EB ウイルス感染症 2 例の計 7 例であった。男女比は 3 対 4, 年齢は 2 歳から 29 歳 (中央値 8 歳) であった。全例ステロイド抵抗性の重症 GVHD (grade III-IV) に対して使用した。投与量は体重 1kg あたり  $2 \times 10^6$  個を週 2 回で 4 週間にわたって投与した。

【結果】7 例中 4 例で完全寛解, 2 例で部分寛解となり 1 例に効果を認めなかった。有害事象としては高ビリルビン血症を 1 例に認め、投与の中断を余儀なくされたが、その他は安全に投与可能であった。

【考察】テムセル HS 注は重症 GVHD に対する治療として有効な手段の一つである。しかしながら高価な指定再生医療等製品でもあるのでその使用に際しては従来の治療法を優先し慎重になるべきであると考えられる。

### 3) 移植後シクロホスファミドを用いた HLA 半合致移植

杉田純一<sup>1)</sup>

北海道大学大学院医学研究科内科学講座血液内科学分野<sup>1)</sup>

移植後シクロホスファミド (posttransplant cyclophosphamide, PTCy) による免疫寛容の歴史は古く、1963 年に Major histocompatibility complex (MHC) 不適合の皮膚移植のマウスモデルにおいて移植後 1-4 日後に CY を投与した場合に、皮膚移植片に対する拒絶抑制効果が最も高いことが報告されたのが最初である。その後、本邦の Mayumi らが 1980 ~ 90 年台に多くの基礎的検討を行い、移植後早期に同種抗原に反応して活性化したアロ応答性 T 細胞が選択的に傷害されることが PTCy の作用機序であることが報告された。近年は制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) が PTCy 後も比較的温存されることが報告されており、さらにマウスモデルにおいては Treg を除去した場合に PTCy の効果が打ち消されることから、PTCy の作用機序として Treg の温存も重要である可能性が示唆されている。

これらの基礎的背景をもとに Johns Hopkins グループは移植前処置として Fludarabine 150 mg/m<sup>2</sup>+CY 29 mg/kg+TBI 2 Gy を、GVHD 予防として day3, day4 に PTCy (50 mg/kg/day), day5 より Tacrolimus, mycophenolate mofetil (MMF) を用いて HLA 半合致骨髄移植の報告を行った。好中球生着 87%, II-IV 度の急性 GVHD は 27%, III-IV 度の急性 GVHD は 5%, 慢性 GVHD は 14%, 非再発死亡率は 18% と高い安全性が報告された。一方で再発率が 55% と高い点が問題であるが、Johns Hopkins の原法では前処置強度は非常に弱く、移植ソースも骨髄を使用していることから、BU または TBI を用いた骨髄破壊的

前処置を用いる試みや、末梢血幹細胞を用いる試みなど多くの試みがなされている。

我々は 2013 年より Johns Hopkins の原法に Busulfan (6.4 mg/kg) を加えた強度減弱前処置と末梢血幹細胞を用いた全国多施設共同第 II 相試験 (JSCT Haplo13) を実施し、本邦においても PTCy を用いた HLA 半合致移植は GVHD の抑制効果に優れ、非再発死亡も許容可能であることを報告した。さらに対象を初回移植症例に絞り Busulfan (12.8 mg/kg) または全身放射線照射 (12 Gy) からなる骨髄破壊的前処置を用いた Haplo14 MAC, Haplo13 に引き続き Busulfan (6.4 mg/kg) からなる強度減弱前処置を用いた Haplo14 RIC を実施し、計 134 例の症例登録を終了し現在は観察期間中である。さらに 2016 年 4 月より開始した Haplo16 では MMF の早期中止を試みるとともに、Haplo16 RIC においては PTCy の投与量を減量する新たな試みを行っている。

PTCy を用いた血縁者間 HLA 半合致移植は、HLA 半合致ドナーであればほぼすべての患者にドナーが得られる可能性があり、血縁ドナーであることから迅速な移植調整が可能であることが大きな利点である。さらに CY は入手が容易かつ安価な薬剤であるため、骨髄バンクや臍帯血バンクなどのインフラ整備や T 細胞除去を行う機器のない発展途上国も含めた世界中で実施可能な方法となりうる。PTCy はまだ臨床試験として多くの課題を解決しながら実施すべき段階ではあるが、今後の更なる発展が期待される。

## 【日本組織適合性学会 MHC 投稿・執筆規定】 (平成 28 年 2 月 1 日改訂)

### I. 概要

**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（もしくは掲載予定）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、ヘルシンキ宣言（「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」、1964 年第 18 回世界医師会ヘルシンキ総会採択、2013 年フォルタレザ総会修正）に基づき、文部科学省が定める関連倫理指針（「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」、「ヒト ES 細胞の分配及び使用に関する指針」、「ヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針」等）に従うと共に、当該施設の倫理委員会の審査を経て、施設長による承認を得たものでなければならない。また、遺伝子組換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（いわゆるカルタヘナ法）」、動物を用いた研究については動物愛護管理法に基づく「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（2006 年環境省告示）などを遵守し、それぞれ所属施設における関連委員会等にて所定の手続きによる審査・承認のもとに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、加筆などを求める場合がある。

**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。とくに、原著、総説については、原則として科学技術振興機構（JST）

が運営する電子ジャーナル配信サイト（J-STAGE）にて配信される。

**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、投稿原稿にその旨を明記すること）。

**別 刷**：別刷（抜き刷り）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を明記すること）。

### 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 点につき原稿用紙 1 枚分に該当するものとし、それぞれに表題を記載し、挿入箇所を本文に明記する。また、図説は別紙で作成し、本文の最後に添付する。本文は Microsoft Word で作成し、表は Microsoft Word もしくは Microsoft PowerPoint、図、写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は記憶媒体（CDR 等）に保存もしくは Email 添付で投稿レターを添えて編集長に送付する（送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照）。

#### 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に加えて、連絡責任者の住所、氏名、電話番号、FAX 番号、E-mail アドレスを記載する。なお、タイトル、著者名、所属の記載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<sup>1</sup>, Akira Tsujimura<sup>1</sup>, Masaharu Sada<sup>2</sup>, Reiko Goto<sup>2</sup>, Minoru Koga<sup>3</sup>, Yasushi Miyagawa<sup>1</sup>, Ki-yomi Matsumiya<sup>1</sup>, Kazuhiko Yamada<sup>2</sup>, Shiro Takahara<sup>1</sup>



- 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<sup>1)</sup>, 佐藤 清<sup>1)</sup>, 佐田 正晴<sup>2)</sup>, 永谷 憲歳<sup>2)</sup>, 中谷 武嗣<sup>3)</sup>

- 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. 本文一：日本語での投稿

・2 頁目から、和文要旨 (400 字以内) および 250 words 以内の英文要旨、キーワード (日本語および英語、それぞれ 5 語以内) を記載する。なお、英文要旨について、著者グループのみでは作成が難しい場合には、編集委員会による対応も可能であるので、投稿ライターにその旨を明記すること。

・ページ替えて、「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。
- ⑤遺伝子名 (シンボル) はイタリックで表記する。例えば、*HLA-DRB1* (タンパク名として用いる場合はイタリックにしない)

### 4. 本文二：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。
- ③遺伝子名 (シンボル) はイタリックで表記する。例えば、*HLA-DRB1* (タンパク名として用いる場合はイタリックにしない)

### 5. 本文三：略語一覧の作成【作成要項】

- ①略語はアルファベット順に並べる。
- ②略語の後に「:」を入れ、フルスペル (小文字) を記載する。  
例) LCT : Lymphocyte cytotoxicity test
- ③商品名は略語一覧に入れない

### 6. 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、引用順に一括して、以下の例に従って、著者名、論文名、雑誌 (もしくは書) 名 (英文の場合はイタリック表記)、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年を記載する。著者名、編集者名は筆頭者から 3 名まで列記し、4 名以上は他または *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(1-3): 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(1): 36-40, 2005.

4. 佐田正晴, 高原史郎: 腎移植一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 監修), 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点につき原稿用紙1枚分に該当するものとし, それぞれに表題を記載し, 挿入箇所を本文に明記する。また, 図説は別紙で作成し, 本文の最後に添付する。本文はMicrosoft Wordで作成し, 表はMicrosoft WordもしくはMicrosoft PowerPoint, 図, 写真はMicrosoft PowerPointを使用する。原稿は記憶媒体(CDR等)に保存もしくはEmail添付で投稿レターを添えて編集長に送付する(送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照)。

### 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内  
 日本組織適合性学会誌 MHC  
 編集長 木村 彰方  
 担当 谷本 佳澄 <E-mail: tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp>  
 Tel: 06-6879-3746 Fax: 06-6879-3749

#### 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, 連絡責任者の住所, 氏名, 電話番号, FAX番号, E-mailアドレスを記載する。タイトル, 著者名, 所属等の記載は「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, 英語のいずれも可とする。総原稿枚数は編集委員会で指定し, 原著執筆書式に準じるが, 本文構成の一部(「材料と方法」, 「結果」, 「考察」等)については, 適宜変更することも可能である。

	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

4月に入り、道々の桜の花がようやくちらほら咲き始めた。職場では大学、大学院の入学式が行われる今日、私は新年度の編集委員初仕事で、この原稿を綴っている。

実は東京の桜の開花宣言は先々週だった。早く見たくて翌日靖国神社に出かけたが、今年は寒かったせいかどの樹もまだまだ蕾。能舞台の前にある標準木だけが10輪余りの花を咲かせ、参拝者は皆必死でスマホに収めていた。そうそう、と、私は大好きな俳優さんの言葉を思い出す。「花は咲くときにしか咲かない」。何年か前のこの季節、私事ながらある事態が進展せず、私は自身の決断を誤ったかと故郷神戸の桜を見ながら落ち込んでいた。その時、なにげに開いた彼のブログに、咲き始めの桜の写真を添えたこの言葉がアップされていた。救われた思いがして、余分な力が抜けたことを覚えている。今年はその後も春の寒さに見舞われ蕾が固かったが、入学式にぴったり合わせるかのように花開いた。今日、私の目に映る桜花は、本当に強く優しく美しい。

さて、JSHIも新年度を迎え、徳永勝士新理事長の就任、それに伴う事務局移転で新しい春となった。そしていよいよ、施設認定制度が始まろうとしている。佳き花がきっと咲くだろう。

末筆ではありますが、前理事長の西村泰治先生、並びに旧事務局の皆様には、大変お世話になりました。昨年には熊本地震の被害に遭われた中であっても、学会事務局事業に多大なご尽力を頂きましたことを深く感謝申し上げます。

成瀬妙子

## 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

年会費請求手続

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](mailto: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（新）

〒113-0033 文京区本郷7-3-1

東京大学大学院 医学系研究所

人類遺伝学分野内

Tel & Fax : 03-5802-2907

E-mail : [hlajimu@m.u-tokyo.ac.jp](mailto:hlajimu@m.u-tokyo.ac.jp)

## 学会事務局（旧）【平成28年度末まで併任】

〒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](mailto: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局

電話 : 075-415-3662

FAX : 075-415-3661

Email : [jshi@nacos.com](mailto:jshi@nacos.com)