

第2回 関東HLA研究会記録

会 期：2018年6月9日（土曜日）

会 場：東京大学 本郷キャンパス

世話人：藤原 孝記

帝京大学医療技術学部

HLA の基礎講習 -1 日本組織適合性学会初心者講習会—概要と展望—

高 陽淑

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

日本組織適合性学会 (JSHI) では、会期中に HLA 関連業務歴が浅い担当者に向けた講習会を開催している。本講習会は、自施設の精度管理や検査レベルの維持向上を目的とした学会主催の QCWS への理解を促進するために、2014 年に開催された QCWS ミニ集會に端を発し、2015 年からは JSHI 教育委員会内の初心者教育部会が企画・運営し、講師陣のほとんどが QCWS 部会のデータ解析担当も兼ねている。

そのため、時間に制約のある QCW 集會では困難な素朴な疑問の解消を可能にする環境作りが重要と考え、応募条件は業務歴 3 年以内、募集人数も企画毎に 20 名程度としているが、毎年、応募者は多数で、業務歴が 3 年以上でも基礎知識を系統立てて学ぶ機会が無かった等の

理由で応募するケースもある。

また、講習会の対象は検査担当者を想定していたが、特に移植関連の複数の臨床医から検査データへの理解を深めることなどを目的に応募があるのも特徴的と言える。

講習会終了後には参加者に対してアンケート調査への協力を依頼し、次回の企画立案への参考としているが、毎年好評を博し、継続的な参加の意思や企画への具体的な要望などが多く寄せられていることから、こういった類の学び場が他になく、貴重な機会であることが伺える。本講演では、2017 年度の開催概要と受講後のアンケート結果を中心に、講習会の現状について紹介したい。

HLA の基礎講習 -2 QCWS DNA 検査部門の解析方法について： PCR-rSSOP (WAKFlow, Genosearch)

奥平 裕子

ジェノダイブファーマ株式会社

【目的】QCWS の目的として、日本組織適合性学会のホームページには「認定委員会の主催で、会員を対象にして、HLA 検査技術の向上をめざして行っています。」と記載されている。解析を担当するにあたり、技術の向上を促すにはどのようなデータを示せば良いのかを考慮した時、まず施設間差を示し、次にその原因を探り、解決方法を考察し、共有することが重要であると考えられた。

【解析方法】各施設の CSV ファイルから、解析ソフトを用いて解析を行うという基本的な方法を取ったが、特に陰性コントロールの反応状況、陽性コントロールビーズ

の反応状況、ミスアサインをしていないか、カットオフ値の変更が必要か、クロスプローブ (WAKFlow) の反応状況の 5 点に着目して解析を行った。陰性コントロールと陽性コントロールビーズの反応状況については、蛍光値の平均とばらつきを計算し、グラフ化して施設間差を見た。ミスアサインについては、他施設の反応と比較し誤反応しているプローブを示した。カットオフ値の変更については、どのプローブの変更が必要か、いくつのプローブを変更しているかを見ることで、誤反応しやすいプローブはないか、手技に問題はないかを探った。最

後にクロスプローブの蛍光値を施設間で比較することによって、実験の手技によりプローブの反応性に差が見られることを示した。

【評価】評価は、判定結果の評価（評価点：60点）、結果表記の評価（評価点：40点）あわせての点数（100点満点）と、試験検査状況の評価（評価ランク：A, B, C）で行われる。これらのうち解析担当者が担うのは、判定結果の評価と試験検査状況の評価である。判定結果の評価は各タイピング法での判定が正しいことと、各タイピング法の結果が、総合判定と齟齬が無いこととしており、ミスアサインが無い事が基準となる。また、試験検査状

況の評価は使用試薬での結果の妥当性を見るもので、データに不備がないかが基準となり、PCR-rSSOPの場合はプローブの反応性をみることとなる。

【まとめ】QCWSの解析を担当し、自施設の検査状況を見つめ直した時、検査法や精度管理において注意すべき点が一層明確になった。他施設でのミスアサインを、自施設のトラブルシューティングに置き換え、また施設間差を実験間差と置き換えることで、検査技術の向上に繋がると感じる事が出来た。QCWSや本講習を聴講された皆様も、各解析結果をご参考頂き、技術の向上にお役立て頂ければと願う。

HLAの基礎講習-3 QCWS 血清学検査部門の解析方法について：Luminex（LABScreen）

前島理恵子

帝京大学医学部附属病院

現在、抗HLA抗体検査はこれまで用いられていたLCTから精製抗原を結合した蛍光ビーズによる間接蛍光抗体法が用いられるようになってきている。フローサイトメーター技術を応用したビーズアレイシステムであるLuminexをプラットフォームにした蛍光ビーズ法が複数のメーカーより販売されており、1つの蛍光ビーズに複数の精製抗原を結合した抗体スクリーニングから、単一の精製抗原を結合させた高感度かつ高解像度な抗体同定を目的とした方法がある。

LABScreen SingleAntigen（LS-SA）は、単一の精製抗原を1つの蛍光ビーズに結合させた方法であり、高感度

に抗体を検出することができる一方、非特異反応も認められていることから、抗体特異性の判定が困難になる場合がある。

日本組織適合性学会QCWS血清学検査部門では、参加施設の提出した結果を基に客観的に抗HLA抗体の有無、抗体特異性について解析を行い、参加施設のHLA検査技術の向上をめざしている。

今回、LABScreen特にLS-SAを解析する際のポイントや抗体特異性を判定する際に抗体が認識するエピトープを考慮した解析方法、注意点を概説し、今後のQCWS抗体検査解析の参考にしていただきたい。

シンポジウム1：HLAと臨床 心臓移植とHLA

布田 伸一

東京女子医科大学大学院 重症心不全制御学分野

ヒトにおける心臓移植は1967年に初めて行われ、50

年が経過した。今日の心臓移植にまで興隆させたのは、

拒絶反応診断法としての心内膜心筋生検法と病理組織学的診断基準の確立、そして拒絶に対する免疫抑制療法の開発であろう。ここで非自己の移植組織を自己の生体内で機能させる移植医療では、組織適合性の一致度によって移植後免疫抑制療法とその予後が規定されるため、HLAに代表される組織適合性検査は重要である。

今日では移植後の拒絶反応における細胞性拒絶はある程度制御可能な時代になったが、最近のHLA抗体検査の進歩により、液性免疫が関与する超急性拒絶、抗体関連型拒絶（AMR）、そして慢性拒絶（移植心冠動脈病変：CAV）への関与が注目されてきている。

ここで、心臓移植後拒絶反応の10～20%を占めるAMRは、その予後不良および慢性期におけるCAVの発

症進展リスクのため早期診断および早期治療が大切である。そして、わが国の心臓移植では、90%以上の症例が補助人工心臓を装着して待機し、その待機期間は1000日以上に及ぶため、その長い待機期間中に輸血や感染を複数回生じるのが実情である。その結果、抗HLA抗体を産生する可能性は高くなり、それによって引き起こされる移植後AMR、その後のCAVへの進展には注意が必要になってくる。

本シンポジウムでは、心臓移植についての概説と、近年注目されてきている心臓移植におけるAMRについても触れ、わが国における組織適合性検査の今後の発展に繋げたい。

シンポジウム2：HLA多型に基づいた個別化医療 薬の副作用とHLA—重症薬疹を例に一

中村 亮介

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

医薬品の副作用には、用量依存的で薬理効果から推定可能なものと、一般に用量非依存的で薬理効果には基づかないものがある。特に重篤な副作用には後者のタイプが多く、発症頻度は一般にまれであることから、「特異体質性」とも言われる。特異体質性の副作用は通常患者の遺伝的素因に依存するが、近年の研究から、ある種の医薬品の副作用に特定のHLAが関連していることが明らかになってきた。

よく知られた例は、カルバマゼピン（CBZ）によるStevens-Johnson症候群（SJS）や中毒性表皮壊死症（TEN）等の重症薬疹の発症と関連するHLA-B*15:02である。これは台湾の漢民族における研究により発見され、発症オッズ比は1357に達した。SJS/TENの発症にはT細胞が関係しているが、CBZはHLA-B*15:02に直接結合し、感作T細胞によって認識されるというメカニズムが想定されている。一方、アバカビル（ABC）過敏症にはHLA-B*57:01が有意に関連するが、ABCは同HLAのFポケットに結合し、提示ペプチドのレパトアを変化させることが知られている。このように、副作用と関連する

HLAは、医薬品ごと、民族ごとに異なっており、発症機序も様々である。

本講演では、薬の副作用に関連するHLAをどのように探索するか、また、その作用機序解析や臨床応用への道筋等について、我々の結果を交えつつ紹介したい。

ワークショップ-1 蛍光ビーズ法 HLA 抗体検査試薬の半量法に関するワークショップについて

中島 文明

日本赤十字社 中央血液研究所研究開発部

昨年、公表された論文では、LABScreen Single Antigen (LS-SA) 試薬について操作全体の効率化を検討し約70%の時間短縮を達成したとされる。その中で、ビーズも標準量と半量で扱っているが、なぜか双方の明確な比較はされていない (Hum Immunol 78, 2017)。本研究会では、ビーズ量の違いが試薬性能に影響するか複数施設で検証することにした。

参加11施設に対し、4種類のHLA抗血清を共通配布し、各施設ではビーズを標準量と半量でそれぞれ測定した。LS-SA試薬は、クラスIが全てLot.010、クラスIIがLot.011と012半々であった。可能な限り施設間のバイアスを排除したいため、抗血清は未処理のまま使用し、

操作はメーカーのinstruction manualに従うように指示した。

様々な組み合わせで、ビーズ標準量と半量の測定結果を比較すると、ピアソンの積率相関係数や線形回帰直線等の数値データは、どの施設も良好に見えた。しかしながら、Raw dataで比較するとバックグラウンド・シグナルのバラツキなど操作環境の影響は十分に排除できていない。バックグラウンドの制御が相関に影響することも認められた。集会では、このような様々な観点の解析結果を提示するが、半量法の可否に関しては、その使用目的を踏まえた上で各施設の判断に委ねたい。

ワークショップ-2 NGS-SBT法に関するワークショップ

佐伯 幸枝¹⁾、竹下 昌孝²⁾、椎名 隆³⁾

¹⁾株式会社イミュノ・ジェネックス

²⁾東京北医療センター 血液内科

³⁾東海大学医学部

臍帯血移植の多くはHLA不一致移植であり、次世代シーケンサーを活用したHLA遺伝子のDNAタイピング法(NGS-SBT法)は、PCR-SSOP法やSBT法などの現行の高解像度DNAタイピング法では不可能なphase ambiguity問題の多くを解消する新しいHLA検査技術として臨床現場への導入が期待されている。ところが、NGS-SBTを実際に経験された方々は少なく、また経験して頂く機会も国内ではこれまでにない。そこで本研究会では、NGS-SBTを経験して頂くための実習を13施設、16名の参加者と共に3日間の日程(2018年3月9-11日)で開催した。具体的には、4つのパートに分け

た実習項目(ライブラリーの調製、テンプレートの調製、シーケンスランおよびアレル判定)と6つのパートに分けた講義(NGSの原理、DNAの品質チェック法とAmpliconの準備、NGS-SBT法の開発史、NGS-SBT法の将来展望、アレル判定ソフトウェアの紹介など)を実施した。さらに本実習では、NGS-SBT法に対する理解度を深めて頂くため、参加者らが自らの手を動かして体験出来るような工夫を施した。

本ワークショップでは、本実習の概要を説明した後、参加者の佐伯幸枝先生と竹下昌孝先生からNGS-SBT法の印象、現行のHLA DNAタイピング法との違い、

NGS-SBT法導入の際に考慮すべきこと等についての率直な意見をいただく。さらには、参加者全員を対象にしたアンケート結果についても報告する。回答者全員が

NGS-SBTに関する実習や勉強会の場は今後も必要である、と回答されたことから今回と同様な実習やワークショップの継続的な実施が必要であろう。

一般口演発表 -1

免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM) と HLA-DRB1 多型との関連解析

大貫 優子, 重成 敦子, 椎名 隆

東海大学医学部

【目的】免疫介在性壊死性ミオパチー (IMNM) は炎症性筋疾患の中で高頻度を占めており、リンパ球細胞浸潤が乏しく、筋線維の壊死・再生を特徴とする。近年、抗SRP抗体やスタチン誘発性ミオパチーと関連する抗HMGR抗体がIMNMの疾患標識マーカーになること、悪性腫瘍や膠原病がIMNMの危険因子であることが報告されている。演者らはIMNMの遺伝要因を特定すべく、患者166例のDNAを用いてHLA関連解析を行い、第26回日本組織適合性学会大会においてHLA6座 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1) の結果を報告した。本研究では、更に症例数を増やし、計247例の患者におけるHLA-DRB1解析を行うことにより、IMNM全体、さらに抗体や危険因子との関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】臨床像、筋病理所見、自己抗体からIMNMと診

断した日本人247例の末梢血由来DNAを対象とした。HLA DNA タイピングはPCR-SSOP法またはSBT法にて行い、Fisher's exact testにより有意差検定を行った。

【結果・考察】日本人健常者460例に比して、IMNM患者群においてDRB1*08:03 (OR 2.4, $p=3.9 \times 10^{-7}$), DRB1*11:01 (OR 2.3, $p=6.0 \times 10^{-3}$) が有意に多かった。抗SRP抗体陽性IMNM 78例では、抗SRP抗体陰性IMNM 169例に比して、DRB1*12:01 (OR 6.7, $p=1.4 \times 10^{-2}$) が有意に多かった一方、抗HMGR抗体陽性65例を抗HMGR抗体陰性182例と比べたところ有意に多いアレルは認めなかった。これらのことから、IMNMは特定のHLA多型と関連することが強く示唆された。また、抗SRP抗体陽性群と抗HMGR抗体陽性群では病態機序に何らかの相違があると考えられた。

一般口演発表 -2

High accuracy KIR Genotype Imputation with Attribute Bagging (KIBAG) from GWAS datasets

Seik-Soon Khor¹⁾, Xiuwen Zheng²⁾, Akiko Ishitani³⁾, Fumihiro Azuma⁴⁾, Chul-Woo Pyo⁵⁾, Yosuke Omae¹⁾, Toshio Yabe⁴⁾, Dan Geraghty⁵⁾, Katsushi Tokunaga¹⁾

¹⁾ Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Japan

²⁾ Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, WA, USA

³⁾ Nara Medical University, Kashihara, Nara 634, Japan

⁴⁾ Japanese Red Cross Kanto-Koshinetsu Block Blood Center, Tokyo, Japan

⁵⁾ Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA

Natural killer (NK) cells are essential in innate immunity and determine the outcome of antigen-specific responses. NK cell function based on the complex interactions mediated by membrane-bound and soluble gene products. NK cell activity is genetically modulated by differential expression of inhibitory and activating killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) that recognize HLA class I molecules. The high level of polymorphism of KIR genes together with their functional relation with HLA class I molecules suggest selection pressure driven by exposure to a wide variety of diseases. Indeed, long established KIR-HLA association has been revealed with HIV infection, hepatitis C infection, human papilloma virus (HPV) induced cervical cancer, psoriatic arthritis and type 1 diabetes. With the recent advancement of next generation sequencing (NGS) technology, KIR can now be characterized to high resolution including KIR copy number (CP), KIR A&B haplotypes and KIR allele. NGS based KIR typing remains a costly and laborious method to determine KIR types from a large cohort of individuals. Thus, we developed a new methodology

named KIBAG (KIR Genotype Imputation with Attribute Bagging) which enable a rapid and inexpensive way to determine KIR typing from GWAS dataset. KIR typing of 726 Japanese individuals were performed using Scisco Genetics KIR typing kit and Miseq sequencing system. SNP information of these samples were determined using Affymetrix Axiom Japonica V1 and Japonica V2. Internal validation and external validation of KIR CP imputation were performed and an average accuracy of 97.9% and 95.7% were obtained respectively across 16 KIR genes. KIR with >3 copies remains the most difficulties to impute due to the insufficiency of 3 copies carrying individual in the reference. Re-examination of GWAS with HLA class I associations or GWAS with SNP peaks in KIR region may reveal novel HLA-KIR associations. This work is part of the project of HKIMP.net (HLA & KIR Imputation Network) with the aim of providing population specific HLA & KIR imputation system to research community. KIR imputation system for a wide range of populations is currently undergoing.

一般口演発表 -3

抗原発現が抑制される HLA-C*03:23 と C*07:02:01:17N の解析

清水まり恵¹⁾, 黒田ゆかり²⁾, 鎌田 裕美¹⁾, 内田みゆき¹⁾, 高田慎之介¹⁾, 高橋 大輔¹⁾, 中島 文明¹⁾, 柴 雅之¹⁾, 永井 正¹⁾, 佐竹 正博¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部中央血液研究所

²⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

我々は骨髄ドナー登録者の HLA タイピングに NGS 法を検討している。今回、特異的な抗血清に反応しない HLA-C*03:23 と C*07:02:01:17N について報告する。塩基配列はクローニングと SBT 法で決定し、また、次世代シーケンサー (MiSeq, イルミナ社) でシーケンスし HLA Analysis Pipeline (ビッツ社) で解析した。C*03:23 は Luminex 法 (SSO) で判定し LCT 法で抗 Cw10 抗血清と反応を認めなかった。C*03:04:01:02 と比較した塩基配列はエキソン 3 の 406 番塩基が G から A へ置換し、新たなスプライス部位によりストップコドン形成した可能性がある。また、69/259,466 人のドナー

より A*26:01-B*40:02 を推定した。

C*07:02:01:17N は Luminex 法で C*07:02:01:01 を検出するプローブの 1 つが陰性で、LCT 法では抗 Cw7 血清と反応性を認めなかった。C*07:02:01:01 と比較しイントロン 3 の 2 番塩基が T から A へ置換し、スプライスサイトを破壊した可能性がある。14/259,466 人より A*11:01-B*67:01 を推定した。

NGS 法は発現に影響する因子も確認可能であり、今後、抗原発現が抑制されるアレルを精査することは重要であると考えられる。

一般口演発表-4 FCXMによるDSAモニタリングの有用性

小山 暁史¹⁾, 杉本 達哉¹⁾, 豊崎 誠子^{1,2)}

¹⁾ 東海大学医学部附属病院 臨床検査技術科輸血室

²⁾ 東海大学医学部附属病院 血液腫瘍内科

【はじめに】当院で実施されたDSA陽性ハプロ半合致alloPBSCT症例において、FCXMによるDSAモニタリングの有用を検証したので報告する。

【症例】47歳、女性。CML急性転化のため当初SCTを計画したが、妊娠、出産、輸血歴有のため広範囲かつ高力価のHLA抗体を保有しており、国内にドナーが見つからないため、SCTを断念していた。しかしながら、再発したため、DSA陽性ながらも息子からの移植を行った。当初より複数回移植を計画しており、初回移植前には脱感作療法は行っていなかった。生着(DAY+51)に至るまでに計4回(合計NC: $10.29 \times 10^8/\text{kg}$, CD34+

$10.42 \times 10^6/\text{kg}$)の輸注を行い、4回目の移植前にPE3回、ドナーPC10Uを輸血し脱感作を行った。DSAは移植前の検査でB*54:01(nMFI:22,665)に対して最も強く、生着の直前まで消失することはなかった。移植前後で計5回LABScreen Single Antigen Beads(SAB)による特異性確認が行われており、生着後、保管してあった患者血漿、ドナーPBを解凍し、FCXMを実施した。FCXM(Median)とSAB(nMFI)で抗体価推移を比較したところ、ほぼ同様の経時的変化を認めることが確認できた。

【結語】DSAモニタリングとしてFCXMは有用な方法であることが示唆された。

一般口演発表-5 当センターにおけるPC-HLA交差適合試験陽性例の原因調査

宮城 徹, 礪波 薫, 瀬戸 勝也, 岡崎 晃士, 小野あいこ, 安藤 萌, 山際 裕子, 植木 純一,
松橋 美佳, 東 史啓, 津野 寛和, 中島 一格

日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター

【背景】PC-HLA(HLA適合血小板)は、患者のHLA型およびHLA抗体検査の結果に基づいて適合ドナーを選択し、交差適合試験を実施したうえで供給している。ドナーのHLAタイピングについては2010年に血清学的タイピング法から高精度なDNAタイピング法に切り替えた。また、交差適合試験についても2010年にAHG-LCT法から高感度なICFA法に変更し、さらに、2015年にはICFAの改良試薬を導入してより広範囲なHLA抗体を検出できるようになった。

【目的】PC-HLA交差適合試験における陽性数を低減するため、陽性原因を調査する。

【方法】2015年4月から2018年3月までの当センター

における交差適合試験の実施状況を集計した。

【結果】実施数21,149件のうち陽性例は68件(HLA抗体による例が49件、非特異反応と考えられる例が19件)であった。HLA抗体による陽性例のうち、適合ドナーが少ないために陽性となるドナーを選んだ例が23件、過去の血清学的タイピング法の精度に起因する例が18件、その他が8件であった。

【考察】HLA抗体による陽性数については、新規ドナーおよび血清学でタイピングされたドナーを対象としたDNAタイピングの推進により、今後低減できると考えられる。非特異反応については、原因究明に取り組む必要がある。