

# 日本組織適合性学会誌

第 26 巻第 2 号 2019 年 8 月 20 日発行

## 目 次

日本組織適合性学会からのお知らせ

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 第 28 回 日本組織適合性学会大会のご案内 .....    | 79 |
| 認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる） ..... | 81 |
| 認定制度指導者講習会 .....                | 82 |
| 第 18 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内 ..... | 83 |

### 2019 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

|                               |       |     |
|-------------------------------|-------|-----|
| HLA の基礎知識—認定試験問題から— .....     | 木村 彰方 | 84  |
| HLA 抗体検査の判定基準と結果の解釈について ..... | 中島 文明 | 95  |
| 臍帯血バンク事業の現状と将来展望 .....        | 木村 貴文 | 105 |

### 総説

|                                                          |                     |     |
|----------------------------------------------------------|---------------------|-----|
| ヒト以外の動物種を対象とした NGS による MHC タイピング法 .....                  | 谷本 幸介, 成瀬 妙子, 木村 彰方 | 115 |
| 第 3 回 関東 HLA 研究会 抄録集 .....                               |                     | 124 |
| 第 3 回 東海北陸 HLA 研究会 抄録集 .....                             |                     | 132 |
| 日本組織適合性学会誌 MHC 投稿・執筆規定（2019 年 2 月 12 日改訂） .....          |                     | 142 |
| Instructions to Authors (updated on Feb. 19, 2019) ..... |                     | 146 |
| 編集後記 .....                                               |                     | 150 |

## 第 28 回日本組織適合性学会大会のご案内

第 28 回日本組織適合性学会大会

大会長 小林 孝彰

(愛知医科大学 外科学講座 (腎移植外科))

副大会長 高見 昭良

(愛知医科大学 内科学講座 (血液内科))

日本組織適合性学会・会員の皆様におかれましては益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

名古屋での第 28 回日本適合性学会大会に向けて、スタッフ一同準備を進めているところでございます。

2019 年 9 月 21 日 (土) から 23 日 (月: 祝) まで下記の要領で開催いたします。

詳細は、ホームページをご参照ください。(今回は事前参加登録がございません)

**【テーマ】『多様性と個性、連携と創出：組織適合性学会の役割と未来』**

### 【特別講演】

移植領域で話題となっております EPITOPE (B cell EPITOPE, T cell EPITOPE) の最新情報をお届けします。

SL-1 Frans Claas 先生 (ライデン大学, オランダ) 「The highly sensitized patient: prevention and transplantation」

SL-2 仲野徹先生 (大阪大学医学系研究科病理学) 「エピジェネティクスと医学」

SL-3 Eric Spierings 先生 (ユトレヒト大学, オランダ) 「T-cell epitopes in transplantation」

### 【シンポジウム】

2 日目には QCWS の内容を踏みこんで、検査技師と臨床医が DISCUSSION します。3 日目には、キャリア支援ワーキング発足後の初回のシンポジウムがあります。事前のアンケート調査結果をもとに、スマホを利用した会場参加型のパネルディスカッションがあります。その他に、動物 MHC 研究をどのように臨床応用するか、今まで実現しなかった造血幹細胞移植と臓器移植の合同シンポジウムもございます。

S I 臨床の中の HLA 検査～第 23 回ワークショップレポートとそこから広がる臨床応用～

S II キャリア支援キックオフシンポジウム～ニーズを探る～

S III 動物 MHC 研究 臨床へのチャレンジ

S IV 新たな移植医療の創出に向けて ～造血幹細胞移植と臓器移植の合同シンポジウム～

### 【ポスターセッション with WINE】

ワインを飲みながら、楽しく、活発な討論を行い、直後の懇親会に弾みをつけてください。

### 【初心者講習会】

移植医向けを含む、3 部門に分かれて行います。終了後には、交流会もあります。

### 【託児所】

初日は初心者講習会の時間帯 (夜) もお預かりします。お申し込みはお早めをお願いします。

### 【市民公開講座】

病気が見える！ 組織適合性抗原（HLA）って何？（初日，於愛知医大）

会場は，名古屋駅の近く，徒歩 5 分です。今回，初めての企画が多くございます。参加者の皆様が「楽しんで，学び，語り合い，元気がでる」学会になることを目指して，準備に取りかかっております。多くの方々のお越しを心よりお待ちしております。どうぞよろしくお願い致します。

会 期：2019 年 9 月 21 日（土）～9 月 23 日（月：祝）

会 場：ウイנקあいち

〒450-0002 愛知県名古屋市中村区名駅 4 丁目 4-38

TEL: 052-571-6131

### 大会プログラム（詳細は，ホームページでご確認ください）

特別講演（3），学会賞受賞講演，シンポジウム（4），学術奨励賞候補口演，一般演題（口演・ポスター），QCWS 集会，教育講演（認定 HLA 技術者講習会），初心者講習会，ランチョンセミナー（4）など

### 大会事務局

本大会に関するお問い合わせは，下記の事務局にお願いいたします。

愛知医科大学 外科学講座（腎移植外科）

第 28 回日本組織適合性学会大会事務局

〒480-1195 愛知県長久手市岩作雁又 1-1

TEL: 0561-62-3311 E-mail: jshi2019@aichi-med-u.ac.jp

### 大会ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/jshi2019>

## 認定 HLA 技術者講習会（大会教育講演を兼ねる）

本講習会は、今後 HLA 検査技術者認定を取得あるいは更新しようとする方々を対象に実施されます。大会参加者は自由に参加することができます。受講に関しましては、事前登録をしていただく必要はありません。

**日 時：**令和元年 9 月 21 日（土曜日）

**時 刻：**10 時 30 分～12 時 30 分

**会 場：**第 28 回・日本組織適合性学会 大会会場

ウインクあいち

〒450-0002 愛知県名古屋市中村区名駅 4 丁目 4-38（TEL 052-571-6131）

＊メモするためにクリップボード等の持参をお勧めします。

**テキスト：**会場でのテキストの販売は、いたしません。学会ホームページに掲載されたテキストを必要に応じて印刷し、ご持参下さい。

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

### 内 容：

- (1) 木村 彰方 先生（東京医科歯科大学難治疾患研究所）  
「HLA の基礎知識—認定試験問題から—」
- (2) 中島 文明 先生（日本赤十字社中央血液研究所）  
「HLA 抗体検査の判定基準と結果の解釈について」
- (3) 木村 貴文 先生（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）  
「臍帯血バンク事業の現状と将来展望」



## 認定制度指導者講習会

第 28 回日本組織適合性学会大会中の下記の教育講演（認定 HLA 検査技術者講習会）、特別講演 3 企画、シンポジウム 2 企画、合計 6 企画から、4 企画以上の受講をもって、指導者新規申請および更新申請に必要な講習を受講したものと認めます。会場入口に用意されている、受講者記帳名簿へのサインをもって受講証明といたします。

内 容：

1) 教育講演（認定 HLA 技術者講習会を兼ねる）

9 月 21 日（土）10:30 ～ 12:30

① 木村 彰方 先生（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

「HLA の基礎知識—認定試験問題から—」

② 中島 文明 先生（日本赤十字社中央血液研究所）

「HLA 抗体検査の判定基準と結果の解釈について」

③ 木村 貴文 先生（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

「臍帯血バンク事業の現状と将来展望」

2) 特別講演 I：9 月 22 日（日）11:15 ～ 12:15

Dr. Fans Claas（Leiden University Medical Center）

3) 特別講演 II：9 月 22 日（日）15:10 ～ 16:10

仲野 徹 先生（大阪大学）

4) シンポジウム III：9 月 23 日（月）10:30 ～ 12:00

「動物 MHC 研究 臨床へのチャレンジ」

5) 特別講演 III：9 月 23 日（月）13:15 ～ 14:15

Dr. Eric Spierings（University Medical Center Utrecht）

6) シンポジウム IV：9 月 23 日（月）14:15 ～ 16:15

「新たな移植医療の創出に向けて～造血幹細胞移植と臓器移植の合同シンポジウム～」

## 第 18 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内

会 期：2020 年 3 月 14 日（土）10:30 ～ 17:00（予定）

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

世話人：進藤 岳郎 京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

会 費：正会員 2,000 円 学生 1,000 円

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

抄 録：2019 年 12 月 26 日 締め切り

送付先：〒 589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

近畿大学病院 輸血・細胞治療センター

日本組織適合性学会近畿支部事務局

yuketsu@med.kindai.ac.jp

本会参加は、JSHI 認定技術者・指導者の新規および更新時の単位となります。

## 2019 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

### HLA の基礎知識—認定試験問題から—

木村 彰方<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学・統合研究機構・リサーチコアセンター

#### I. はじめに

本学会の認定制度は組織適合性検査に関わる技術者と指導者を学会が認定することによって、その知識水準および技術水準を担保することを目的としている。毎年の大会期間中に実施されている教育講演（組織適合性技術者講習会）と QCWS は、上記の目的を達成するために企画・実施されているものであり、認定制度と切り離せない関係にあることは言うまでもない。本講演では、認定制度における審査要件となっている認定制度試験の問題について、とくに難問（模擬試験において正答率が概ね 40% 未満）を中心に、その内容や応用範囲について解説する。

2017 年度以前の難問については昨年の教育講演で取り上げたので、本年は 2018 年度の難問について解説する。難問は 17 問であったが、そのうち 2 問（問題 6 および問題 34）は正答率が 20% 未満となっており、5 択問題でのランダムな選択率よりも低かったため、誤った知識が一般的になっていると思われる。

#### II. 難問の正解、正答率、代表的な誤答および問題解説

問題 1. MHC クラス II 分子の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が会合する細胞内小器官として、最も適切なものを a～e のうちから一つ選べ。

- a. エンドソーム
- b. リボソーム
- c. 滑面小胞体
- d. 粗面小胞体
- e. プロテアゾーム

正解：d（正答率：38.8%，代表的な誤答：a, b）

【解説】MHC クラス II 分子は粗面小胞体内で  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖が会合する。エンドソームでは MHC クラス II 分子にペプチド分子が結合する。リボソームはタンパク質の翻訳を行うが、リボソームが結合している小胞体を粗面小胞体と呼ぶ。プロテアゾームは細胞質内でユビキチン化されたタンパク質を分解する。（図 1）

問題 2. MHC クラス II 分子の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖との会合に関与しない化学結合を a～e のうちから一つ選べ。

- a. ジスルフィド結合
- b. イオン結合
- c. 疎水結合
- d. 水素結合
- e. ファンデルワールス力

正解：a（正答率：25.9%，代表的な誤答：e）

【解説】ジスルフィド結合は、SS 結合とも呼ばれるが、タンパク質間あるいはタンパク質内の結合に関わり、立体構造を維持する機能がある。クラス II 分子では、 $\alpha 1$  ドメイン、 $\alpha 2$  ドメイン、 $\beta 1$  ドメイン、 $\beta 2$  ドメインそれぞれのドメイン中に各 1 箇所の SS 結合が認められる。（図 2）

問題 5. 同じ染色体上に存在する 3 つの遺伝子座 a, b, c がセントロメア側からこの順序で並んでおり、a と b の距離は 8 cM（センチモルガン）、b と c の距離は 2

受付日：2019 年 6 月 19 日，受理日：2019 年 6 月 19 日

代表者連絡先：木村 彰方 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学・統合研究機構・リサーチコアセンター  
TEL: 03-5803-5972 E-mail: akitis@mri.tmd.ac.jp

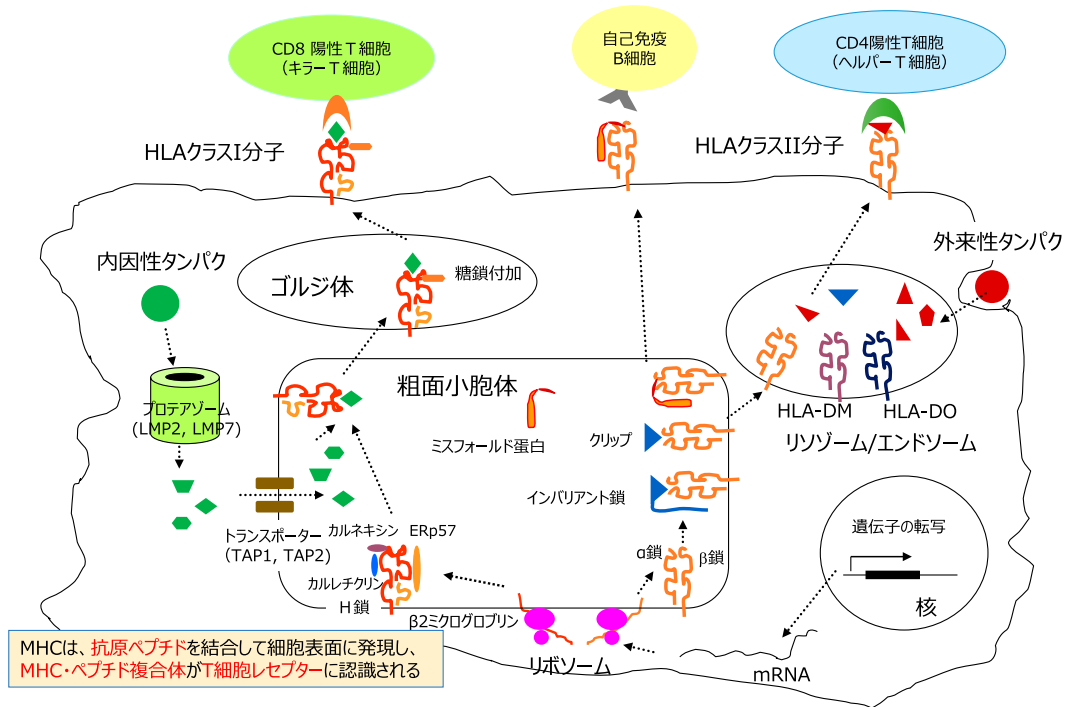


図1 HLA分子による抗原提示機序

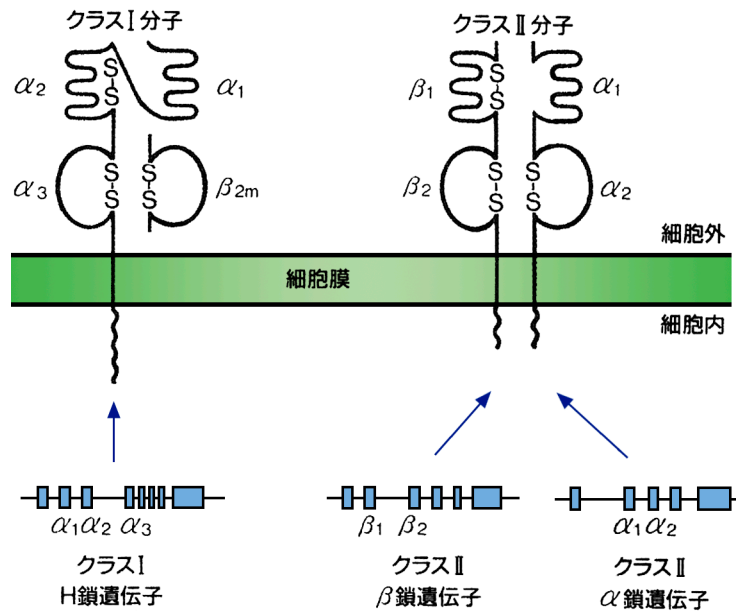


図2 HLA遺伝子とHLA分子の構造模式図

cMであった時、aとcの組換え頻度はbとcの組換え頻度の約何倍になるか。最も適切な値をa～eのうちから一つ選べ。

- a. 0.2  
b. 0.8

- c. 1  
d. 4  
e. 5

正解：e（正答率：38.8%，代表的な誤答：a）

【解説】 a-b-c の順に並んでおり、a-b 間が 8 cM、b-c 間が 2 cM であるので、a-c 間は 10 cM と推定され（この場合、一般に組換え頻度は 10% より小さくなる）、b-c 間の距離（2 cM）の約 5 倍である。

問題 6. MHC の系統発生に関して、正しい記述を a～e のうちから一つ選べ。

- MHC クラス I, II 遺伝子は、最も原始的な脊椎動物である無顎類（円口類）にも存在する。
- 硬骨魚類では、MHC クラス I 遺伝子と MHC クラス II 遺伝子が異なる染色体上に存在する。
- 免疫プロテアソームのサブユニットをコードする遺伝子は、ウニやヒトなどの棘皮動物にも存在する。
- 非古典的なクラス II 分子である DM 分子は、昆虫にも存在する。
- MHC クラス I 様分子は、ヒトや類人猿にのみ存在する。

正解：b（正答率：14.3%，a, c を選択した誤答が正答より多かった）

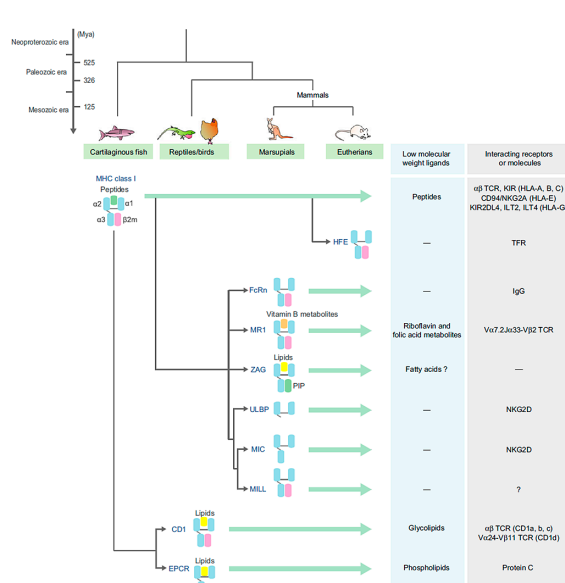
【解説】 進化的に、MHC は有顎類になってから出現する。免疫プロテアソームの出現は MHC クラス I 分子と同時である。DM 分子の出現時期は正確には分かっていないが、無顎類や無脊椎動物には DM 分子が存在しない。MHC クラス I 様分子は霊長類のみに存在する訳ではなく、多くの哺乳類に存在する。また、CD1 のように鳥類、爬虫類にも存在するものもある。（図 3）

問題 12. リガンドと受容体の関係について、誤っている組合せを a～e のうちから一つ選べ。

- CD1 — Vα24-Vβ8 TCR
- MICA — NKG2D
- FcγR — IgG
- HLA-E — αβTCR
- HLA-A — LILR

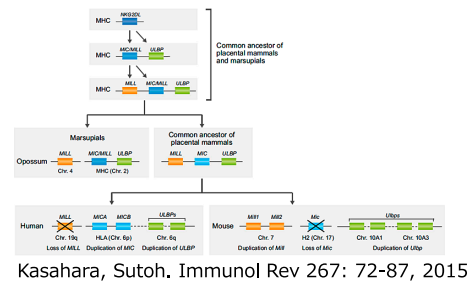
正解：d（正答率：23.5%，代表的な誤答：b, c, e）

【解説】 HLA-E は NK 細胞レセプター（CD94/NKG2A, CD94/NKG2C）のリガンドである。その他の組合せは正しい。（図 4）

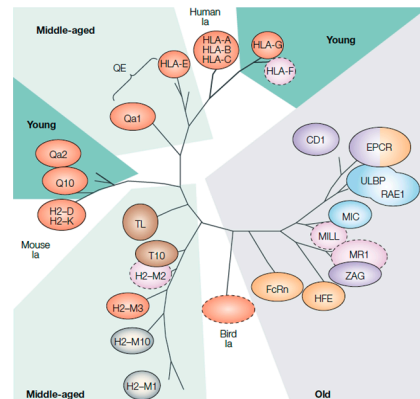


Kasahara, Sutoh. Immunol Rev 267: 72-87, 2015

- MHCは有顎類（サメなどの軟骨魚類）で出現
- MHC様分子で最古はCD1, EPCR
- MIC, ULBPは遺伝子重複で生じ、独自に進化

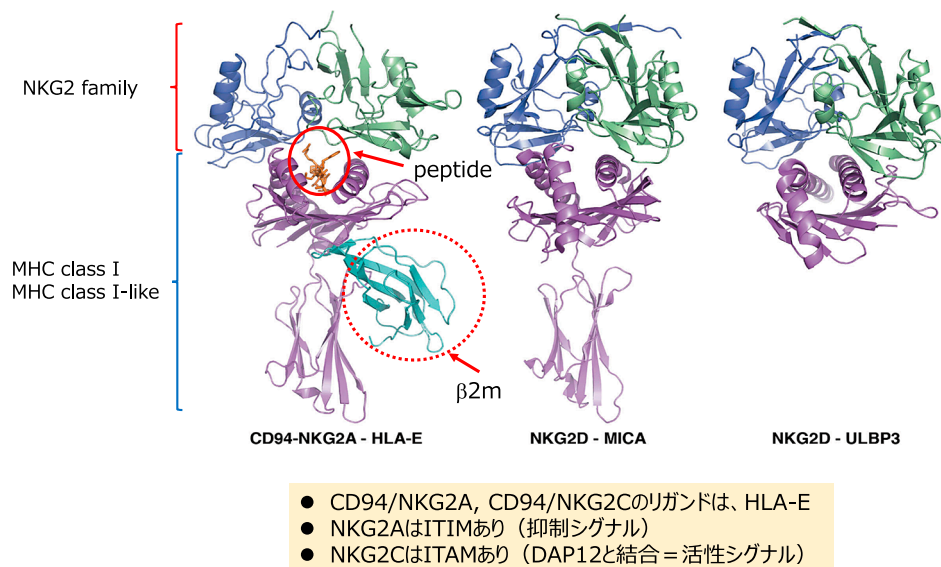


Kasahara, Sutoh. Immunol Rev 267: 72-87, 2015



Rodgers, Cook. Nat Immunol 5: 459-471, 2005

図 3 MHC の系統発生



Petrie, et al. J Exp Med 205(3): 725-735, 2008

図4 NKG2ファミリーとMHCクラスIおよびMHCクラスI様分子

問題 13. 以下の遺伝子のうち、HLA 遺伝子と同じ領域に存在しているものを a～e のうちから一つ選べ。

- HFE
- CD1
- MR1
- AZGP1
- FCGRT

正解：a (正答率：37.6%，代表的な誤答：b, c)

【解説】HFE は HLA 領域と同じ染色体 6p23 に位置する。また、CD1 は 1q22-q23, MR1 は 1q25.3, AZGP1 は 7q22.1, FCGRT は 19q13.33 にそれぞれマップされる。

問題 14. 次の遺伝子のうち、MHC クラス I 分子による抗原ペプチドの提示に関連する遺伝子として、最も適切な組合せを a～e のうちから一つ選べ。

- TNF
- PSMB8
- C2
- NOTCH4
- TAP1

a 1, 3    b 1, 5    c 2, 4    d 2, 5    e 3, 4

正解：d (正答率：29.4%，代表的な誤答：b)

【解説】細胞内タンパクがプロテアゾームで分解されて出来たペプチドは、トランスポーター (TAP; Transporter associated with Antigen Processing) の働きで滑面小胞体内に輸送され、そのうちの一部分が MHC クラス I 分子に結合する。PSMB8 (Proteasome subunit beta type-8 遺伝子) は、プロテアゾームのサブユニット (20S proteasome subunit beta-5i) の遺伝子である。なお、プロテアゾームのサブユニットには恒常的に発現するもの (beta-1, -2, -5) と、炎症時に誘導 (インターフェロン  $\gamma$  で誘導) されるもの (beta-1i, -2i, -5i) があり、炎症時には恒常性サブユニットが誘導性サブユニットに置き換わる。また、TAP1 はトランスポーターを構成する二量体分子の一つであり、ATP をエネルギー源としてペプチドの輸送を担う。なお、TNF はサイトカインであり、MHC クラス I 分子の発現を増強するが、抗原ペプチドを提示する機能を直接制御するものではない。C2 は補体 C2 の遺伝子であり、NOTCH4 は細胞内シグナル伝達分子をコードする。

問題 17. 抗原提示における HLA 分子の機能に関して、正しい記述を a～e のうちから一つ選べ。

a. HLA-C 分子は T 細胞の活性化に抗原ペプチドを必要



としない。

- b. TAP 遺伝子の転写産物は MHC クラス II コンパートメントへのペプチドの輸送を行う。
- c. HLA-DO および DM 分子は HLA クラス I 分子を介した抗原提示を制御する。
- d. MICA/MICB 分子は  $\gamma\delta$ T 細胞を活性化する事ができるが、ペプチドは提示しない。
- e. HLA-C 分子は NK 細胞レセプター (NKG2A/CD94) のリガンドである。

正解 : d (正答率 : 25.9%, 代表的な誤答 : b, c, e)

【解説】HLA-C 分子による T 細胞活性化は抗原ペプチドを必要とする。TAP1 は MHC クラス I 分子に結合するペプチドの輸送に関わる。HLA-DO および DM 分子はクラス II 分子に結合する高親和性ペプチドの選択を制御する。HLA-C 分子は NK 細胞レセプター (KIR) のリガンドであり、NK 細胞レセプター (NKG2A/CD94) のリガンドは HLA-E である。(図 5)

問題 18. HLA はどのような分子によって識別されるか。

正しい記述の組合せを a ~ e のうちから一つ選べ。

1. 抗体によって識別される。

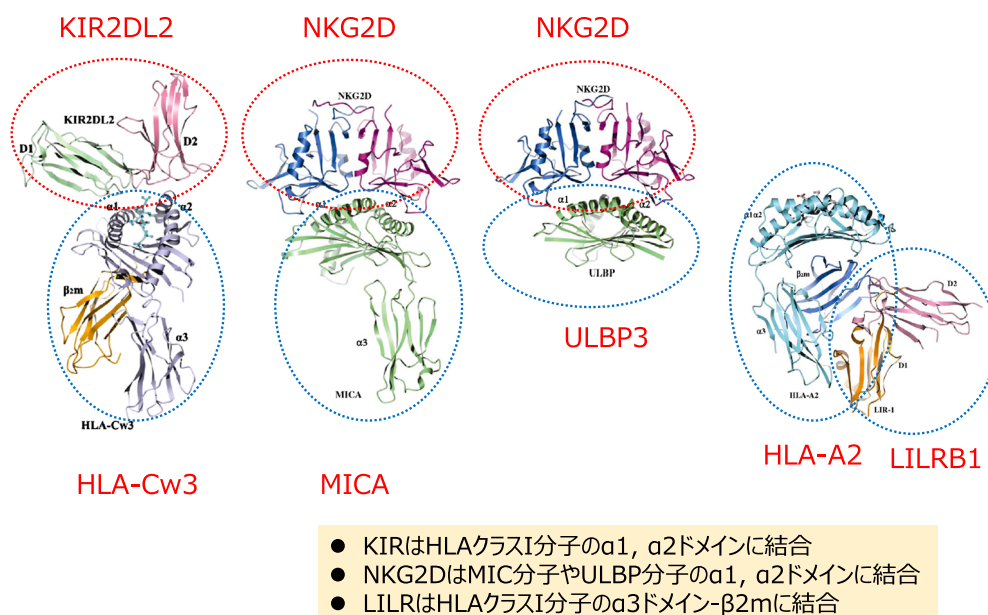
2. KIR 受容体群によって識別される。
3. MICA, MICB 分子によって識別される。
4. TLR 受容体群によって識別される。
5. LILR (または ILT) 受容体群によって識別される。
- a 1, 2, 3    b 1, 2, 5    c 1, 4, 5    d 2, 3, 4  
e 3, 4, 5

正解 : b (正答率 : 35.3%, 代表的な誤答 : a, d)

【解説】MICA, MICB 分子は NK 細胞レセプター (NKG2D) によって認識される。TLR 受容体群は自然免疫を担う細胞表面受容体ファミリーであり、TLR-1 ~ TLR-11 が知られている。TLR (toll-like receptor) 受容体はそれぞれ特異的にリポ多糖 (LPS), リポタンパク質, フラジェリン, 一本鎖 RNA, 二本鎖 RNA, 非メチル CpG DNA などの外来微生物 (細菌, ウイルス) 由来の物質を認識する。その他の分子はいずれも HLA を識別 (認識) する。(図 6)

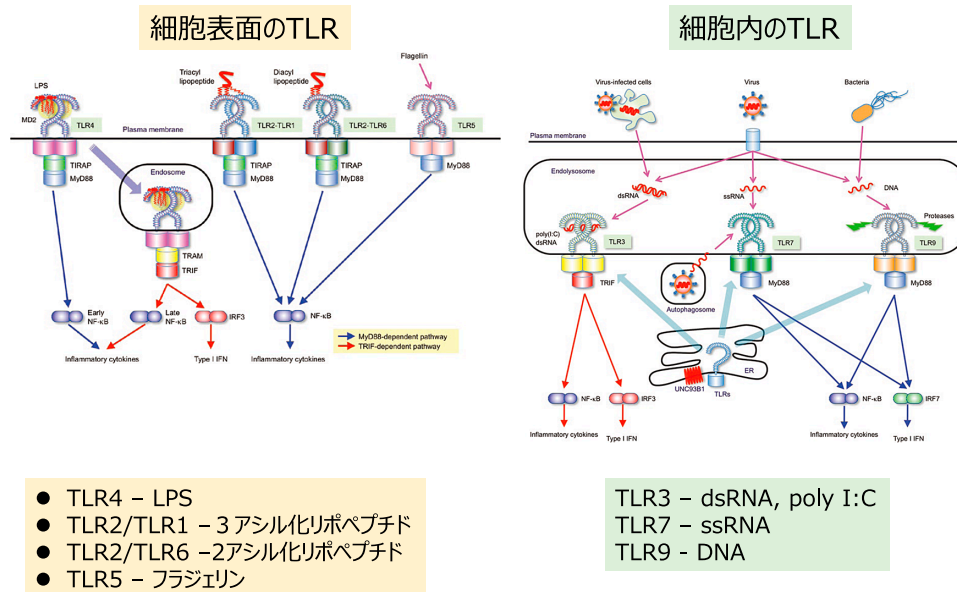
問題 20. 自然免疫に関連する語句として、最も適切なものを a ~ e のうちから一つ選べ。

- a. 抗体産生  
b. 免疫記憶



Deng et al. Sem Immunol 18: 159-166, 2006

図 5 NK 細胞レセプターとリガンドとの対応関係と結合位置



Kawai, Akira. Nat Immunol 11: 373-384, 2010

図 6 Toll-like receptor (TLR) の多様性

- c. HLA  
d. パターン認識受容体  
e. T リンパ球

正解 : d (正答率 : 36.5%, 代表的な誤答 : a, b, c)

【解説】パターン認識受容体とは、微生物にしか存在しない物質 PAMP (pathogen-associated molecular pattern) を認識する受容体の総称であり、その代表が TLR であるが、自然免疫を担う。その他の選択肢はいずれも獲得免疫に関連する。

問題 23. T 細胞レセプターに関して、正しい記述を a ~ e のうちから一つ選べ。

- MHC 分子に結合したペプチドを認識するが、MHC の抗原性の認識には関与しない。
- 胸腺内において、まず  $\alpha$  鎖遺伝子の再編成が起こる。
- 個々の T 細胞の多くでは、単一の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖のペア、あるいは  $\gamma$  鎖と  $\delta$  鎖のペアからなるヘテロ二量体として細胞表面に発現している。
- T 細胞の成熟に伴って、 $\gamma\delta$  型から  $\alpha\beta$  型へのクラススイッチを生ずる。
- 出生時期前後に、胎児型の  $\gamma\delta$  型から成人型  $\alpha\beta$  型へ

と変化する。

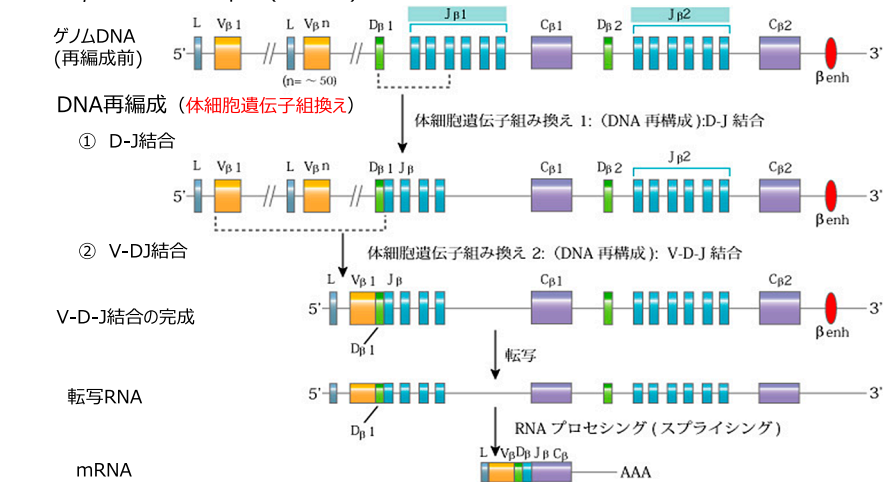
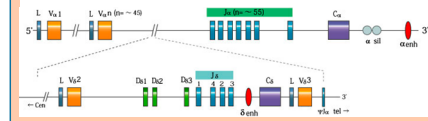
正解 : c (正答率 : 36.5%, 代表的な誤答 : a, b, d)

【解説】T 細胞レセプターは、MHC-抗原ペプチド複合体を認識するが、MHC の抗原性 (アロ MHC) も認識する。胸腺内では、 $\beta$  鎖遺伝子の再構成が先行する。クラススイッチは B 細胞レセプター (免疫グロブリン) で生じる現象であり、T 細胞レセプターでは生じない。T 細胞レセプター ( $\gamma\delta$  型と  $\alpha\beta$  型) には、胎児型、成人型の区別はない。(図 7)

問題 34. HLA 領域内における遺伝子の配置に関して、正しい記述を a ~ e のうちから一つ選べ。

- 先天性副腎過形成症候群の原因遺伝子は HLA-DRB1 と HLA-DQA1 の間に位置する。
- 遺伝性ヘモクロマトーシスの原因遺伝子は HLA-A と HLA-C の間に位置する。
- 補体 C4 遺伝子は CYP21 遺伝子と対をなして存在する。
- TAP 遺伝子は HLA-DPB1 遺伝子と対をなして存在する。
- TNF 遺伝子は HLA-B 遺伝子と MICA 遺伝子の間に



ヒトTCR $\beta$ 鎖遺伝子座 7q34 (620 kb)ヒトTCR $\gamma$ 鎖遺伝子座 7p14 (200 kb)ヒトTCR $\alpha$ , $\delta$ 鎖遺伝子座 14q11.2 (1000 kb)

WikiPathologicaより改変引用 : <http://www.ft-patho.net/index.php?T-cell%20receptor%28TCR%29%20gene>

図7 T細胞レセプター遺伝子の再編成

位置する。

e. a～eのいずれでも父子鑑定が可能である

正解 : c (正答率 : 19.0%, 代表的な誤答 : a, b, e)

正解 : d (正答率 : 38.8%, 代表的な誤答 : b, c, e)

【解説】先天性副腎過形成症候群の原因遺伝子はCYP21Bであり、C4B遺伝子に隣接して存在する。なお、CYP21Aは偽遺伝子であり、C4A遺伝子に隣接している。つまり、C4とCYP21は対をなして存在する。遺伝性ヘモクロマトーシスの原因はHFE遺伝子の変異であるが、HFE遺伝子はHLA-AやHLA-Fよりもさらにテロメア側にマップされる。TAP遺伝子にはTAP1、TAP2があるが、DPB1と対をなすものではない。TNF遺伝子はMICA遺伝子よりもセントロメア側(HLA-B遺伝子と反対側)に存在する。(図8)

【解説】ミトコンドリアは卵子の成熟過程で増加する。また、精子にもミトコンドリアがある(中片)が、受精の際には精子の頭部のみが卵子に入る(中片は卵子内に入らない)ため、受精卵のミトコンドリアは卵子由来である。すなわち、ミトコンドリア遺伝子は母親由来であるため、父子鑑定には使えない。(図9)

問題35. 父子鑑定を行うための遺伝マーカーとして不適切なものをa～eのうちから一つ選べ。

- 第1染色体上の多型遺伝子
- X染色体上の多型遺伝子
- Y染色体上の多型遺伝子
- ミトコンドリア上の多型遺伝子

問題36. 胎児成長に関わる胎盤の機能維持には、母体のNK細胞から分泌される種々のサイトカインが重要であるが、これはどのHLA分子の認識によるものか。もっとも適切なものをa～eのうちから一つ選べ。

- 胎盤トロホブラスト上のHLA-G
- 胎盤トロホブラスト上のHLA-E
- 母体樹状細胞上のHLA-E
- 母体樹状細胞上のHLA-G
- a～dのいずれでもない

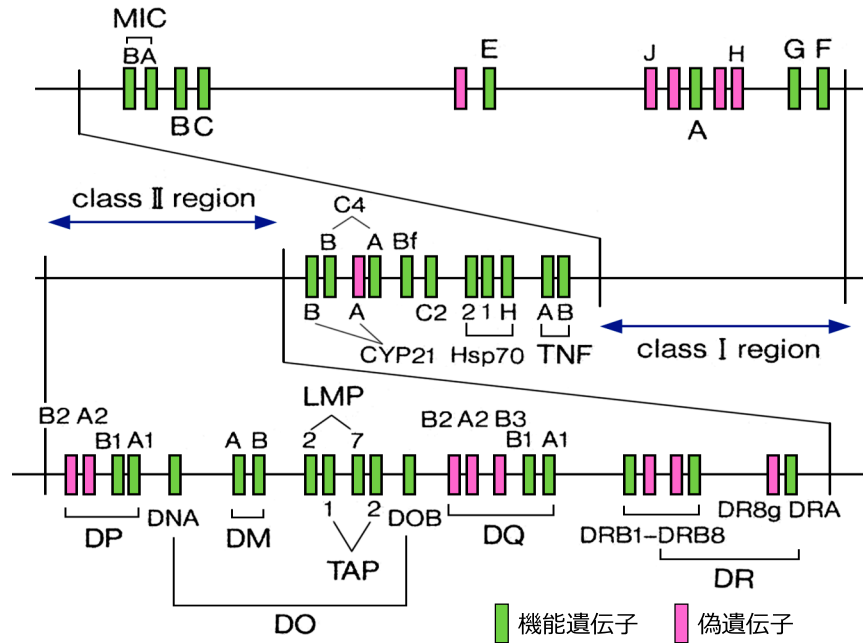


図8 HLA 領域の遺伝子構成の概要

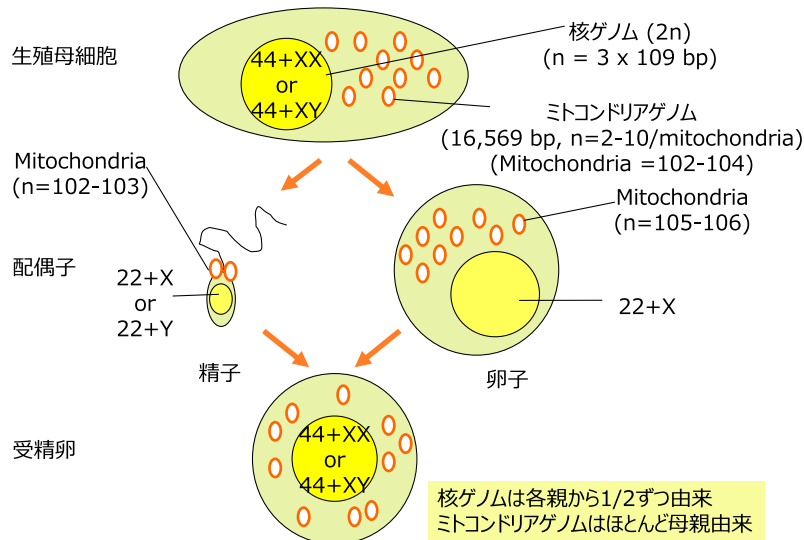


図9 生殖細胞における核とミトコンドリアの遺伝情報

正解 : b (正答率 : 26.2%, 代表的な誤答 : a)

【解説】HLA-G は、古典的 HLA クラス I 分子と同様に、細胞内に存在するタンパクの分解産物であるペプチドを結合している。一方、HLA-E は、HLA クラス I 分子のシグナルペプチドを結合している。胎盤トロホブラストには HLA-G および HLA-E が発現しているが、この際 HLA-G はトロホブラスト由来ペプチドを結合し、HLA-E はトロホブラストに強発現する HLA-G のシグナ

ルペプチドを結合している。HLA-E は NK 細胞レセプター（抑制型 CD94/NKG2A および活性型 CD94/NKG2C）のリガンドであるが、これは CD94/NKG2A よりも CD94/NKG2C の方に強く結合する。母体 NK 細胞は CD94/NKG2C を発現しており、このため HLA-E を認識すると活性化する。HLA-G は抑制型 NK 細胞レセプターである LILR-B1/B2 のリガンドである。なお、HLA-G が活性型 NK 細胞レセプターである KIR2DL4 のリガンドであるとする報告もあるが、今のところコンセ

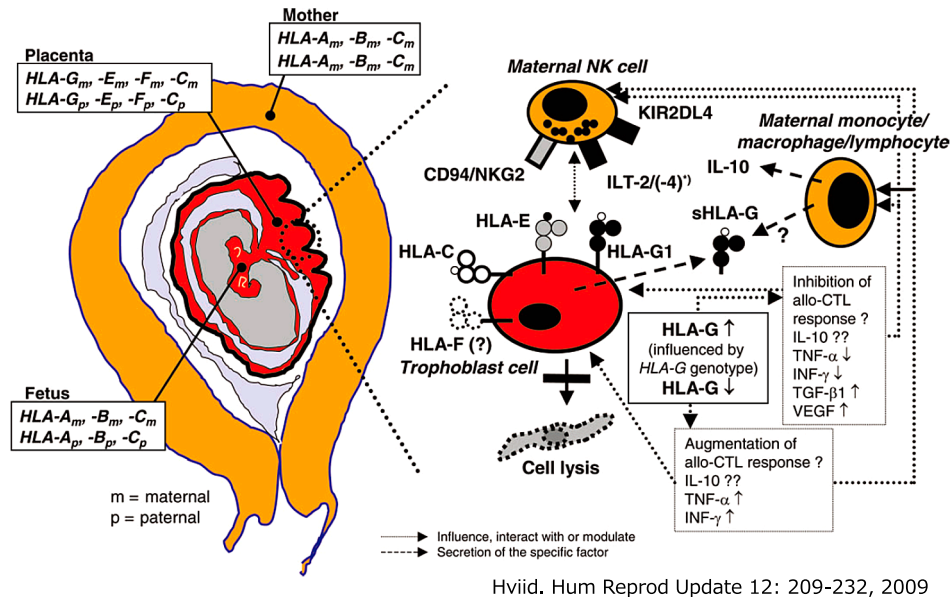


図 10 胎盤における HLA-G および HLA-E の機能

ンサスを得られていない。このように、胎児成長に関わる胎盤の機能維持に重要な種々のサイトカインは、胎盤トロホブラスト上の HLA-E の認識により活性化された母体 NK 細胞から分泌される。(図 10)

問題 40. リンパ球分離法に使われるものとして最も適切な組合せを a～e のうちから一つ選べ。

1. ラテックスビーズ
2. 磁性体粒子
3. リンパ球分離用の比重液
4. ナイロンウールカラム
5. 蛍光ビーズ

a 1, 2    b 1, 3    c 2, 3    d 3, 4    e 4, 5

正解 : d (正答率 : 29.4%, 代表的な誤答 : c)

【解説】ラテックスビーズはポリスチレン等の担体であり、これに抗体あるいは抗原を結合させて用いる医療応用(ラテックス凝集試験等)がある。磁性体粒子は磁気を帯びた粒子であるが、特にナノ粒子磁性体については、その磁性特性を利用した医療応用への研究開発が進められている。蛍光ビーズに抗体や DNA を結合したものが HLA タイピングや抗 HLA 抗体検査に用いられている。しかし、これらの方法は、現在のところ、リンパ球分離

には用いられていない。

問題 42. 血清学的 HLA 検査方法に関して、正しい記述の組み合わせを a～e のうちから一つ選べ。

1. LCT 法は、Leukocyte Cytotoxicity Test の略である。
2. HLA-ABC のタイピングには B 細胞が、HLA-DR の場合には T 細胞が用いられる。
3. ナイロンウールカラム法は、B 細胞がナイロンウールによく付着することを利用した B 細胞分離法である。
4. HLA 抗原の判定では、2 種類以上の抗血清による反応性を考慮することが望ましい。
5. HLA 抗原頻度は集団・民族によって異なるため、日本人のタイピングを目的とする場合は、日本人由来の抗血清を収集することが効率的である。

a. 1, 2, 3    b. 1, 2, 5    c. 1, 4, 5    d. 2, 3, 4  
e. 3, 4, 5

正解 : e (正答率 : 34.1%, 代表的な誤答 : c)

【解説】LCT 法は、Lymphocyte Cytotoxicity Test の略語である。血清学的タイピングにおいて、HLA クラス I のタイピングには T 細胞、クラス II のタイピングには B 細胞が用いられる。

| 血清学的分類（国際ワークショップで討議→WHO命名委員会）                                                                                                                       |                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1) 抗血清などで区別ができた順に座位を命名<br><b>座位名は歴史的産物である</b><br>HL-A<br>→ HLA-A, HLA-B, HLA-C, (HLA-Dw→DR, DQ, DP),<br>HLA-E, HLA-F, HLA-G...                      | 国際ワークショップで決めた群にwをつける<br>→本体分子が明らかにされるとwを除くが、<br>wを除くと混乱が生じる場合は残す |
| 2) 特異性が決まった順に抗原を命名<br><b>抗原名（番号）には生物学的な意味はない</b><br>HL-A1, -A2, -A3, -A4, -A5, -A6, -A7, -A8...<br>→ HLA-A1, -A2, -A3, -Bw4, -B5, -Bw6, -B7, -B8... |                                                                  |
| 3) 同じ特異性が細分化されて命名（スプリット抗原）<br><b>区別する抗血清がみつかったと細分化される</b><br>HLA-A10→A25, A26, A66<br>HLA-B5→B51, B52, B5102, B5103<br>など                           |                                                                  |

図 11 HLA 分子の多様性の命名は歴史的産物である -1

|                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4) <b>混合リンパ球反応(MLR)</b> で決まった座位に対応する血清型を命名<br>HLA-D座 (Dw) の発見<br>→対応するHLA-DR抗原 (Dw1とDR1の対応など) を命名                          |
| 5) <b>刺激混合リンパ球反応(PLT)</b> で決まる座位の抗原型を命名<br>HLA-DP座の発見<br>→HLA-DP抗原 (DPw1など) を命名                                            |
| 6) 異なるHLA型のグループが <b>抗原性 (エピトープ)</b> を共有することがある<br>HLA-Bw4, -Bw6 (Bパブリックエピトープ)<br>など                                        |
| 7) <b>連鎖した座位の抗原</b> が発現する<br>HLA-DR15, -DR16 と DR51<br>HLA-DR3, -DR5, -DR6 と DR52<br>HLA-DR4, -DR7, -DR9 と DR53<br>はそれぞれ連鎖 |

図 12 HLA 分子の多様性の命名は歴史的産物である -2

問題 43. HLA の歴史に関して、正しい記述を a ~ e のうちから一つ選べ。

- HLA-MICA の多型は経産婦の子に対する抗血清から明らかになった。
- HLA-A, B, C の多型は、当初 MLR 反応で解析された。
- HLA-DR, DQ の多型は PCR を用いた DNA 解析で見された。
- HLA-DP の多型は、感作リンパ球試験 (primed lymphocyte test) により明らかとなった。
- マイナー組織適合性抗原はゲノム解析により発見された。

正解 : d (正答率 : 25.0%, 代表的な誤答 : a, c, e)

【解説】MICA の多型は遺伝子レベルの解析から明らかになったものである。MLR 反応で多型が解析されていたのは HLA-D であり、これは HLA クラス II 分子（主に HLA-DR）の多型を反映したものである。なお、HLA-DR の名称は、HLA-D related antigen に由来する。つまり、HLA-DR, DQ の多型は、PCR を用いた DNA 解析が行われる以前から、抗血清への反応性の違いとして知られていた。また、マイナー組織適合性抗原には HA-1, HA-2 など約 20 種類が知られているが、特定の HLA クラス I 分子が提示する抗原ペプチドに多型がある場合に、これを T 細胞が識別する。つまり、HLA 一致ペア間の造血幹細胞移植における GVHD はマイナー組織適合性抗原の違いに起因するものである。(図 11, 12)

## Comments on difficult questions in the JSHI certification paper test 2018

Akinori Kimura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Research Core, Institute of Research, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI) has a certification system for HLA technologist and Director for Histocompatibility testing, in which ability and knowledge about the Histocompatibility and Immunogenetics is required. To evaluate the ability and knowledge, a paper examination is obliged. Here I will comment on several questions of which percentage of correct answer was below 40% in the last year 2018.

**Key Words:** JSHI certification system, paper examination, HLA technologist, difficult questions

## 2019 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

## HLA 抗体検査の判定基準と結果の解釈について

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

近年の HLA 抗体検査は蛍光ビーズ法が主流となり、多くの移植・輸血医療関連施設で採用されている。蛍光ビーズ法を用いた HLA 抗体の測定は、抗ヒト IgG の補正蛍光値 (nMFI) を指標に判定評価されるため、利便性の高さから臨床側に受け入れられてきた。しかしながら、蛍光ビーズ試薬の特性の理解や臨床評価の検証が進み、この手法が患者の病態を適確に反映しているか疑問視する報告も増えてきた。HLA 抗体は、複数のエピトープに対して複雑な特異性を示し、IgG, IgM, 補体結合性など様々な性状が混在する。判定基準を正しく設定しその結果を適切に解釈するには、(1) 試薬の特性を正しく理解し、(2) 患者が受ける医療に適した評価を導き、(3) 検査精度を適正に管理することが重要と考える。本稿では、蛍光ビーズ試薬の判定基準 (カットオフ) 設定方法を例示し、その妥当性を検証した。混合パネル型のスクリーニング試薬では妥当性が認められた。一方、単一抗原型の試薬を用いた確認試験では、エピトープ解析との関係から特定の nMFI 値でカットオフを設定することに困難な面があることが認められた。結果の解釈では、交差反応性グループとエピトープ解析の対比、HLA 抗体の多様性、HLA 抗体の性状から見た臨床上の重要性について解説する。HLA 抗体検査の判定基準と結果を解釈する上での考え方を示して、今後の取り組みのヒントになることを期待したい。

**キーワード：**蛍光ビーズ法, エピトープ, 補体結合性

## 1. はじめに

図 1 に各 HLA 抗体検査法の検出感度と処理性能の分布を図式化した。当初は、1964 年に P.I. テラサキ (米国カリフォルニア大学) らが発表した LCT, あるいは CDC (complement dependent cytotoxicity) 法と呼ばれる検査法で、移植医療に貢献するとともに HLA システムそのものの発展にも寄与してきた。1972 年に A.H. ジョンソン (米国テキサス医療センター) らが発表した AHG-LCT は、LCT に抗ヒトグロブリンを応用した検査法で検出感度の増強を図った。日本では HLA 適合血小板輸血の有効率を LCT の 70% から 90% まで高めることができた。1990 年代には、フローサイトメトリを利用する検査法が普及してきた。リンパ球を使用するため LIFT-FCM (lymphocyte immunofluorescence test-

FCM) ともよばれている。ここまでは、どちらかという抗体検出感度の強化に視点を置いており、どの検査法もリンパ球生細胞を使用するため交差適合試験 (クロスマッチ) としても応用可能である。2000 年代前後には生細胞に替わって、培養細胞などから精製した HLA 抗原をマイクロビーズに固相した試薬が登場し、究極の検出感度を達成した。先にフローサイトメーターに応用され、直後に Luminex システムが開発され、処理性能も単純計算で 100 倍に達した。マイクロビーズを使用する検査法ではクロスマッチができないデメリットがあったが、日本赤十字社 (日赤) が開発した ICFA は生細胞とマイクロビーズを併用してそれを可能とした。

日本組織適合性学会 (JSHI) が運営する QC ワークショップでは、2004 年以降、HLA 抗体検査の精度管理プログラムを提供している。図 2 には、各施設が使用し

受付日：2019 年 6 月 21 日, 受理日：2019 年 6 月 21 日

代表者連絡先：中島 文明 〒135-8521 東京都江東区辰巳二丁目 1 番 67 号 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所  
TEL: 03-5534-7510 E-mail: h-nakajima@jrc.or.jp



た HLA 抗体検査法を年度別に示している。初期の頃は、LCT, AHG-LCT, FCM など生細胞を使用する検査法が主体であったが、近年では、ほぼマイクロビーズを使用する検査法に移行し、2018 年では、Luminex が全施設の 8 割以上で使用されている。この間、FlowPRA は 20

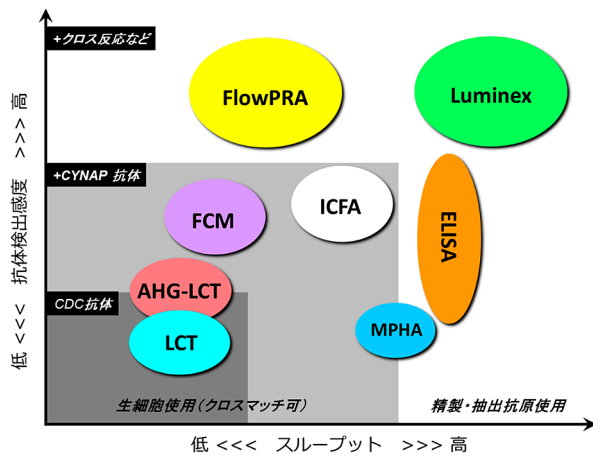


図1 HLA 抗体検査法の検出感度と処理性能の関係

（日本骨髄バンク「造血細胞移植のための HLA ガイドブック」より一部改変）

CDC 抗体（Complement-Dependent Cytotoxicity）補体依存性細胞傷害活性

CYNAP 抗体（Cytotoxic-Negative, Absorption-Positive）補体非依存細胞結合性

LCT（Lymphocyte Cytotoxicity Test）リンパ球細胞毒性試験

AHG-LCT（Anti Human Globulin-LCT）抗ヒトグロブリンリンパ球細胞毒性試験

FCM（Flow Cytometry）免疫蛍光抗体法

MPHA（Mixed Passive Hemmagglutination Test）混合受身凝集法

ICFA（Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis）免疫複合体キャプチャー法

ELISA（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay）酵素結合免疫吸着法

施設前後で推移しているが、初期ではスクリーニング試薬と特異性同定試薬の併用であったものが、近年ではスクリーニング試薬のみで使用し、特異性同定は Luminex で実施するスタイルが定着している。

このことから、現状はマイクロビーズを使用するいわゆる蛍光ビーズ法が HLA 抗体検査の主流であるといえる。本学会の公式サイトに HLA 標準化委員会から「造血幹細胞移植における抗 HLA 抗体検査に関する指針」が掲載されている。また、日本骨髄バンクの医師向けのサイトに掲載される「造血細胞移植のための HLA ガイドブック」の中に「HLA 抗体の測定原理と検査結果の解釈」という項目がある。どちらも、造血幹細胞移植に関する指針や資料集であるが、蛍光ビーズ試薬の取り扱いや結果の解釈について、どの分野にも通用するよう詳細に記載されている。本稿はこれらに沿って解説する。

## 2. 判定基準

### 1) 判定基準の設定

判定基準（カットオフ）の設定には、対象が特定の患者か、不特定多数の患者かによって考え方が異なる。前者は、患者の病態監視が主な目的で、同一の医療・病態に基づいて個別の判定基準が求められる。病期に応じてモニタリングすることが目的となるため、臨床医と綿密な情報交換をしながら対応を図ることが望ましい。後者は、移植・輸血のドナー選択が主な目的と考えられる。この場合ドナーが潤沢であるかないかによって設定の考え方も異なってくる。ドナーが潤沢であれば、厳しい条

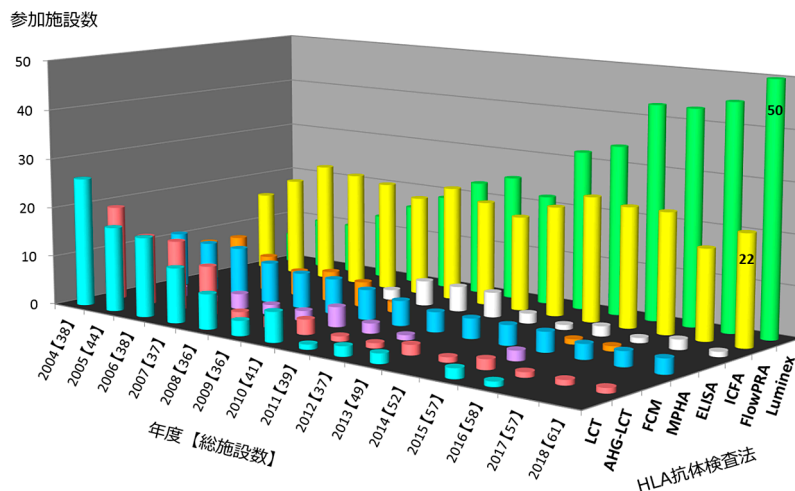


図2 JSHI-QC ワークショップの HLA 抗体検査法参加数の年度別推移



件でカットオフを設定して患者へのリスクをより軽減できる。一方、ドナーを得る機会が厳しいケースでは、ギリギリのところの設定しないと、患者が移植・輸血の機会を失うことになり、より大きな不利益を被ってしまう。判定基準の設定には以下の方法が考えられ、それぞれの問題点を(→)で示す。

① HLA 抗体陰性のサンプルが多数ある場合(健常男性集団など)、測定値の平均+3SD 値など統計的手法でカットオフが設定可能。

→ ある程度の規模のサンプル数を必要とする

→ 対象サンプルが真に HLA 抗体陰性とする根拠が不明

→ 健常男性にも HLA 抗体保有者は存在する

② 対象検体の HLA 抗体検査結果(陽性か陰性)が別の検査方法で確定していれば、ROC 曲線(Receiver Operatorating Characteristic curve)でカットオフを設定可能。

→ HLA 抗体が陽性であるか陰性であるかを決定する別の方法とは何か

→ その方法で決定した判定結果が正しいという確証はあるか

③ 臨床成績を反映したカットオフの設定。本来はこの方法で設定することが望ましい。

→ 対象とする医療(臓器別、造血幹細胞、輸血など)や病態(治療方針、病期など)によって設定値が異なる

→ 有効なデータの蓄積に時間がかかる

→ 既に暫定カットオフで運用している場合、後方視的なデータの蓄積が困難

## 2) HLA 抗体スクリーニング試薬のカットオフ設定例

日本赤十字社では、全国 6 ヶ所の臍帯血バンクのうち、4 ヶ所で HLA 抗体検査を実施している。造血幹細胞移植の対象患者は、臍帯血バンクを利用すると HLA ミスマッチになるケースが頻繁にある。この場合、患者保有の HLA 抗体が DSA (donor-specific HLA antibodies) となって生着不全のリスクを追う可能性があるため HLA 抗体検査は必須となる。日赤では、臍帯血移植予定患者を対象とする HLA 抗体検査について、使用試薬、操作手順、判定基準、報告方法の統一を図った。使用試薬は、「造血幹細胞移植における抗 HLA 抗体検査に関する指針」に沿って、スクリーニングと確認試験の二段階検査とし

た。スクリーニング試薬は混合パネル型の LABScreen Mixed (ワンラムダ社)を使用して抗体の陽性・陰性を決定する。確認試験では単一抗原型の LABScreen single antigen (ワンラムダ社)を使用してスクリーニング陽性者のみ特異性(=DSA の確認)を検査することとした。ここで最も重要なのは、スクリーニング試薬のカットオフの設定である。不特定多数の患者を対象とする検査であるが、上述した①~③の方法では適正なカットオフ設定が困難と判断し、視点を変えて次のような方法とした。

対象集団(臍帯血移植患者)に対して、使用する試薬の性能が最も効果的に発揮されるポイントをカットオフとすることが妥当と考えた。各臍帯血バンクに保存してある患者検体(600 検体)を対象に統一したスクリーニング試薬で再度データを測定する。測定値(NBG ratio 後述)を段階的に解析し感度(Sensitivity)と特異度(Specificity)が最適な点を求め、スクリーニング試薬のカットオフとする。この場合、過去に調べた結果は反映させず、あくまでも、今回測定したデータで解析した。

図 3 にその結果を示す。対象集団に対して本スクリーニング試薬が最も性能を発揮する点は、HLA クラス I, II とも NBG ratio=6 付近であったことからこの値をカットオフに設定した。この時の抗体陽性率はそれぞれ 19.9%, 9.8% で、高梨らの報告(19.2%, 7.5%)とほぼ同等であった(表 1)。

## 3) 確認試薬(Single beads 試薬)の判定基準

Sullivan らは、Single beads 試薬の導入が MFI で量化可能な値であるという信念をもたらし、HLA 抗体報告、モニター、および治療に影響を及ぼしてきた現状に疑念を抱いた。臨床と検査の現在の習慣における MFI の使用の有効性やこの数値が抗体の病原性の影響に関して何を明らかにしているのかなど、臨床決定をする MFI 値の信頼性について調査した。結論として、Single beads 試薬のような技術進展は新たな疑問が必然的に生じ、古い問題もほぼ確実に残るため HLA 抗体検出とその評価の道程は未だ道半ばであると結んでいる。他にも、プロブゾン回避のための抗体希釈系列による検討、イムノグロブリン・サブクラスによる検討、HLA 抗原発現量の差異、補体結合性抗体による DSA 回避の検討など臨床成績との整合を確認する様々な検証がされている。nMFI で臨床側に報告する利便性だけで考えて良いものが慎重な判断が要求される。

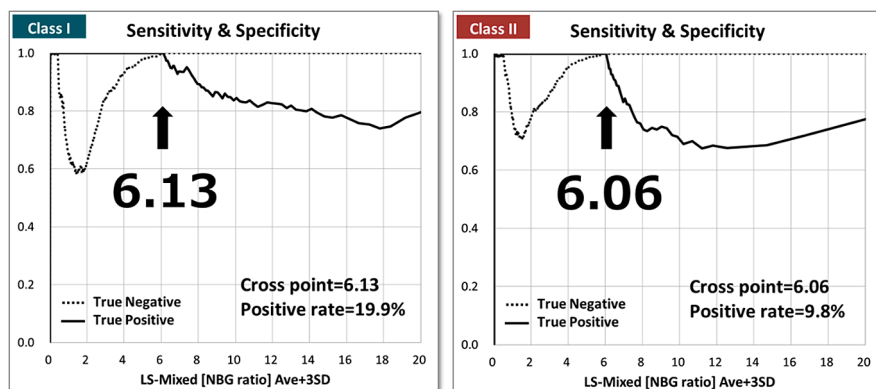


図3 臍帯血移植予定患者を対象としたHLA抗体スクリーニング試薬の性能評価

(中島文明ら「第27回日本組織適合性学会大会」一般演題スライドより)

サンプルごとに測定したNBG ratio順に平均+3SD値を算出し、その時の真の陽性率(True Positive)と真の陰性率(True Negative)をプロットした。それぞれが最も高くなる点(Cross point)をカットオフとして、その時の抗体陽性率(Positive rate)を示した。

表1 臍帯血移植患者を対象としたHLA抗体陽性率の比較

|              | 高梨ら論文                                     |    |       | 本検討                         |     |       |
|--------------|-------------------------------------------|----|-------|-----------------------------|-----|-------|
| 検体数          | 386                                       |    |       | Class I: 588, II: 592       |     |       |
| スクリーニング試験    | FlowPRA Screening Test *1                 |    |       | LABScreen Mixed *2          |     |       |
| 確認試験         | LABScreen PRA<br>LABScreen Single Antigen |    |       | LABScreen Single Antigen *3 |     |       |
| HLA クラス I    | 60                                        | 74 | 19.2% | 84                          | 117 | 19.9% |
| HLA クラス I+II | 14                                        | 29 | 7.5%  | 33                          | 58  | 9.8%  |
| HLA クラス II   | 15                                        |    |       | 25                          |     |       |
| 合計           | 89                                        |    | 23.1% | 142                         |     | 24.0% |

(中島文明ら「第27回日本組織適合性学会大会」一般演題スライドより)

\*1 HLA Class I=30, Class II=30 パネルのミックス抗原ビーズ, FCM 測定

\*2 HLA Class I=36, Class II=25 パネルのミックス抗原ビーズ, Luminex 測定

\*3 抗体特異性検出に特化=抗体陽性率に影響しない

実際にデータで確認しただけでも次のようなことが判ってきた。図4は、LABScreen single antigen を用いて、HLA 抗体の反応を見たものである。このソフトウェアでは4種類の式(formula)で測定結果を出力することができる。

- ① Raw data : 測定した蛍光値そのもの
- ② Baseline : コントロール血清とコントロールビーズの測定値で補正したMFI値(=nMFI)
- ③ NBG Ratio: コントロール血清とコントロールビーズの測定値で計算したS/N比
- ④ Rxn : 前後のシグナル強度とエピトープ情報からソフトウェアが判定したスコア値

現状でよく使われるnMFI=1,000をカットオフとした場合、Bw4エピトープの途中で切ってしまうことが判る。Rxnはエピトープ情報を反映するためそのようにはならない。ここには示さないが、Single beads 試薬の

NBG ratioは陰性コントロールの蛍光値が大きく影響するため、施設間差や再現性の精度維持面で不利と考えた。

よって、日赤の基準としては、確認試薬(Single beads 試薬)はHLA抗体の特異性を検査するためだけに使用し、ソフトウェアの規定判定でRxn=4以上を抗体特異性とした。ただし、医療機関はDSAがどの特異性でその影響力の程度が情報として得たいことになる。また、医療機関側の判断も尊重できるように、ソフトウェアから出力される数値データ(Baseline, Rxn, NBG ratioなど)も添付して報告する運用とした。

### 3. 結果の解釈

#### 1) 交差反応性グループとエピトープ

交差反応性グループ(CREG; cross reactive group)はHLA抗血清やモノクローナル抗体の反応性から各抗原の類似性をグループ化した概念で、抗原と抗体の実際の

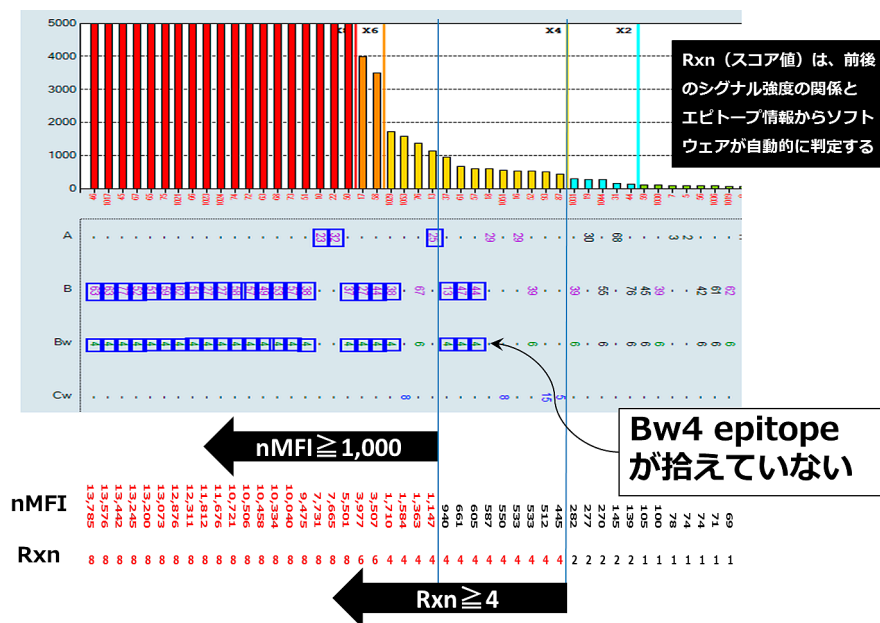


図4 Single beads 測定結果の評価方法の比較

(中島文明ら「第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会」一般演題スライドより)  
LABScreen Single Antigen HLA Class I-Combi+Supplement (ワンラムダ社) 使用

### 交差反応性グループ

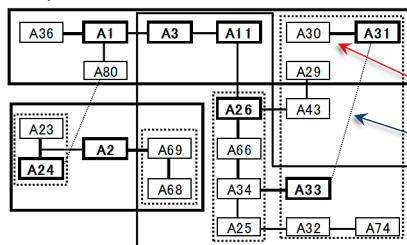
抗体特異性に基づく抗原の分類で、抗原をグループ化して類似性を図式化したもの

### エピトープ解析

抗原のアミノ酸配列に基づく抗体認識部位の分類で、アミノ酸の位置と種類で示す

抗体の反応性に基づく分類 ↔ 抗原の設計図に基づく分類  
 旧来からの経験則 ↔ HLA遺伝子解析で明確化  
 実際の反応 ↔ 反応の予測  
 説明のつかない反応もある ↔ 予測どおりに反応しない場合もある

#### Aローカス



| HLA allele  | $\alpha 1$ -domain                                                            |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Position    | 11123333333444455566666777777788889<br>37917940123456134824623567034678901230 |
| Consensus   | HYFSREADTQVRFQRRIGQERNVHTDVLGTLRGA                                            |
| HLA-A*01:01 | -----K-----M-----AN-----D                                                     |
| HLA-A*02:01 | -----G-----K-----H-----D                                                      |
| HLA-A*11:01 | -----Y-----Q-----D                                                            |
| HLA-A*24:02 | -----S-----E-GK-----EN-RIALR-----D                                            |
| HLA-A*26:01 | -----Y-----RN-----AN-----D                                                    |
| HLA-A*30:01 | -----S-----S-----R-----D                                                      |
| HLA-A*31:01 | -----T-----RN-----I-----D                                                     |
| HLA-A*33:03 | -----T-----RN-----I-----D                                                     |

56R 73I

図5 交差反応性グループとエピトープ解析の比較

(中島文明 MHC Vol. 13, No 2: 2006 より一部改変)

反応に基づいている。図5の左に示すように、各抗原間を結ぶ線や抗原グループを囲む線の太さでその類似性の強さを表した。一方、エピトープ (epitope) は、抗体が結合する抗原の構造単位のことである。HLA の場合、各抗原のアミノ酸変異の共通性をアミノ酸の位置と種類

で示す。図5の右に示す“56R”はA30とA31が56番目でアルギニン (arginine)、“73I”はA31とA33が73番目でイソロイシン (isoleucine) を共有することを表している。ここに示したエピトープは、隣り合う数個のアミノ酸変異をターゲットとしているが、分子構造上離

れたアミノ酸配列でエピトープとなりうる場合は、エプレット (eplet) と呼んでいる。ちなみに、抗原と結合する抗体側の立体構造はパラトープ (paratope) という。

R.J. Duquesnoy (米国ピッツバーグ大学医療センター) らは、HLA Matchmaker というアルゴリズムでエピトープ解析をサポートするソフトウェアを展開している。これで解析すると、可能性のあるエピトープが機械的にすべてリストアップされてくるため、どれが求めるエピトープか判りづらい面がある。N. El-Awar (米国ワンラムダ社) らは、モノクローナル抗体や一部 HLA 抗血清を用いて、Single beads の反応性とエピトープで整合が担保できるものにエピトープ名を付して整理した。“56R” “73I” はそれぞれ “31E” “5007C” と命名されているが、国際的な共通認識にはなっていない。このように、生体反応として有効と考えられるエピトープに名称を付けて分類したものを、Cross-reactive epitope groups (CREGs) と称している。

まとめると、交差反応性グループとエピトープは同じ目的に向かっているものの根本概念は異なる。相互に検証し生体内で影響を与える可能性のある反応に分類する努力をしているのが CREGs ではないだろうか。いずれにしても、抗体特異性が広範囲になると HLA Matchmaker の機械的な解析や El-Awar の分類を活用しても、もはやエピトープ解析は不可能といえる。

## 2) HLA 抗体の多様性

サンプル中には様々な性状の HLA 抗体が含まれている。通常、Single beads で検出しているのは抗ヒト IgG に対する抗体であるが、二次抗体を IgM, IgG1 ~ IgG4 の抗ヒトグロブリン抗体に変更することで Ig サブクラスの反応を観察することができる。さらに、補体依存性細胞傷害活性を見るには C1q や C3d の結合を観察できる試薬キットもある。これらは、HLA 精製抗原をマイクロビーズに固相したフロービーズアッセイをベースとしており、それぞれの反応を重ね合わせると HLA 抗体の性状により異なった特異性で存在することが判る。ここに旧来のセルベースアッセイ (FCM, LCT) の結果を加えたものが図 6 である。

22 種類の特異性のうち、nMFI=10,000 以上の IgG と C1q 結合性を示している B5102 ~ B38 の 6 種類は重要度が高いと考えられる。特に LCT との反応が見られる B5102, B52, B51 の 3 種類に関しては最重要といえる。次に、B37 ~ A24 の 5 種類は IgG 結合性があり FCM で生細胞との反応も認められることから軽視できない。A24 (nMFI=6.866) と B35 (nMFI=2,599) には蛍光値でギャップがあり、丁度ここが生細胞との反応の境となっている。今注目した B5102 ~ A24 の 11 抗原は Bw4 エピトープ (82L-83R) を共通に有している。B35 ~ Cw6 の 11 種類は、IgG/IgM と nMFI 低値で生細胞との反

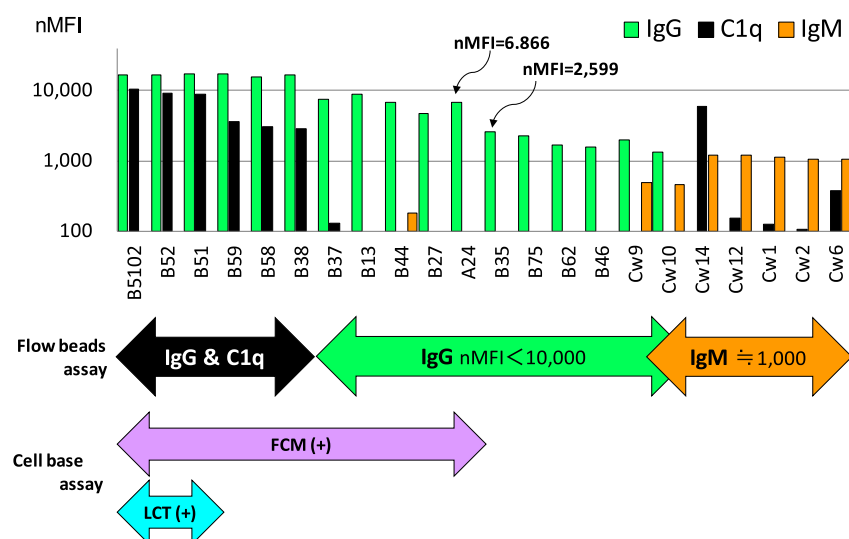


図 6 一つのサンプルに含まれる HLA 抗体の多様性

(日本骨髄バンク「造血細胞移植のための HLA ガイドブック」より一部改変)

LABScreen Single Antigen HLA Class I-Combi+C1qScreen (ワンラムダ社) を使用してデータを抽出



応も認められず重要度は低いと判断される。この中で Cw14 のみは C1q 結合がある程度高いため注意を要する。この感作は、B51 抗原と強く連鎖する Cw14 抗原の影響が高いことが推測される。

このように、一つのサンプルに対して様々なアプローチで取り組みば HLA 抗体の性状を正確に把握でき、患者が受ける医療に適した評価を導くことが可能となる。しかしながら、通常の検査においてここまで費用、時間、人員を費やすことはほぼ不可能である。この例では Single beads 抗ヒト IgG の結果のみであっても、シグナル強度の差とエピトープ解析を補助手段として、強い連鎖不平衡に関係する他ローカスの感作などを考えることで、様々な方法で検査した時に近い評価も不可能ではないことを示した。

### 3) HLA 抗体の性状と解釈

補体結合性と臨床成績については数多くの報告があり、いくつか紹介する。Lan らは、**腎臓移植患者** 106 症例の 5 年経過観察中に循環機能不全時の 81 例 (76.4%) が C3d+DSA であり、C3d+DSA 群は、腎生検で 73% が C4d+ であった。一方、C3d-C4d- 群は 76% が Single DSA であったと報告している。Ciurea らは、122 症例の**造血幹細胞ハプロ移植**において、22 例が DSA を保有しており、その中で MFI>5,000 かつ C1q 陽性の 4 例は、すべて生着不全となり、高い MFI 値と C1q 拘束力がある補体結合 DSA は、著しく生着率の低下を招くことを示した。Fontaine らは、高度に感作された**血小板輸血不応患者** 13 名の HLA 抗体と輸血された血小板製剤との HLA 適合を調べ CCI で評価し、ABO 型適合・IgG 不適合グループのうち C1q 不適合が有意に CCI 低値であっ

たと報告している。このように、移植・輸血医療どの分野においても補体結合性 HLA 抗体の検出が患者の病態を適確に反映していることを示していることから、最も重要度が高いといえる。

マイクロビーズに固相されている精製 HLA 抗原は必ずしも完全な状態ではない。メーカーの見解では、ペプチドや  $\beta 2$ -ミクログロブリンが脱落して不完全な状態であるものが 10% ほど存在する (図 7)。本来の HLA とは関係ない何らかの抗体がこれらの不完全 HLA 抗原とクロスリンクして、あたかも HLA 特異性が有るように見えることがある。このような抗体は、生細胞のインタクト HLA には反応しない。蛍光ビーズ試薬は高感度であるがゆえにこのような反応をしばしば捉えてしまう。Morales-Buenrostro らは、Single beads の使用で 424 人の男性健常者の 6 割から HLA 様自然抗体を検出したと報告している。蛍光ビーズを pH 2.8 酸処理バッファー (インビトロジェン社) で処理するとビーズ上の精製 HLA 抗原は変性するため、本来の HLA 抗体は反応せず、自然抗体の非特異反応と考えられる反応だけが残る。Cai らは、酸処理で  $\beta 2m$ -free ビーズと Intact HLA に対する DSA を比較して、後者は移植臓器 (腎臓) の生存率が有意に低かったことを報告している。よって、蛍光ビーズ法陽性であっても生細胞に反応しない抗体は臨床問題にならない可能性が高い。

以上のことから、蛍光ビーズ法の陽性結果には以下の 3 種類の要素が含まれ、移植・輸血医療における臨床上の重要性は図 8 のように整理される。

- ① 最重要：補体結合性 (+)，細胞結合性 (+)
- ② 重要：補体結合性 (-)，細胞結合性 (-)

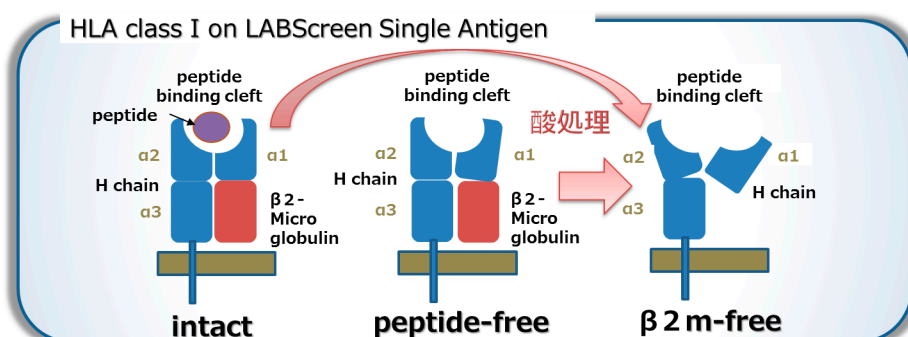


図7 蛍光ビーズ上の HLA class I 抗原構造のイメージ

(中村淳子ら「第 24 回日本組織適合性学会大会」一般演題スライドより一部改変)

## ③ 注 意：補体結合性 (－)，細胞結合性 (－)

これらは、あくまでも総合的な見解であって対象となる医療によって取り扱い異なる。

**臓器移植**では、移植片に対する DSA を重視する。すでに妊娠や輸血、あるいは以前の移植で前感作された抗体 (preformed DSA) は、超急性拒絶反応に関与する。移植片に対する de novo DSA は慢性拒絶反応の要因とされる。検査はダイレクトクロスマッチと蛍光ビーズ法などの HLA 抗体検査が併用される。産生された抗体が移植臓器に吸着して、検査上検出困難になっているケースもある。DSA の確認と定期的なモニタリングにより免疫抑制剤投与や脱感作療法などの判断情報となる。これらの対応は、移植される臓器によって異なり、同じ臓器であっても患者個々の治療経過によって異なる。日本移植学会臓器移植抗体陽性診療ガイドライン策定委員会編集「臓器移植抗体陽性診療ガイドライン 2018 年版」には、すべての臓器移植における抗体陽性の診療ガイドラインが記述されている。この分野は、ドナーに対して患者を選択する運用であり、抗体検査とダイレクトクロスマッチを併用して総合的に判断されるため検査の適確性は高い。死体腎移植の場合、ドナー HLA 型が不明のケースが多く、エピトープ解析には不利な条件となる。移植後の病態監視も続く個別対応が必至であり、HLA 抗体検査の判定基準を一律に設定することは困難といえる。

**造血幹細胞移植**では、特に臍帯血移植で問題となる。臍帯血バンクは当初、小児患者に対して設立されたが、近年では成人患者の利用が多い。理由のひとつに、骨髄バンクではドナーコーディネート期間が長いこと、移植のタイミングの関係で臍帯血を選択するケースが増加したと

考えられる。その結果、患者体重と保存細胞数との関係で、ほとんどが HLA ミスマッチ移植になり、DSA を回避する必要がある。本稿の判定基準の項目は、これに対する日赤の対応を例示したものである。また、骨髄移植は多くの場合、HLA 一致で移植されるが、患者 HLA 型がレアタイプであるかプライベートハプロタイプの場合は HLA ミスマッチ移植となるケースがあり同様の対応が必要である。近年では、いわゆるハプロ移植が盛んに実施されるようになり、この場合も DSA の回避は必要と考えられる。この分野は、臓器移植と逆に患者がドナーを選択する運用となる。不特定多数の患者を対象とするため判定基準の統一は必須といえる。図 8 ③のケースは可能であれば許容したい。

**血小板輸血**では、患者が HLA 抗体を保有していると血小板輸血不応状態 (PTR; platelet transfusion refractoriness) に陥るため、HLA 適合血小板輸血の適応となる。献血ドナーの選択は、HLA クラス I のみを対象として許容抗原検索で確保する。許容抗原検索は、患者 HLA 型と保有する HLA 抗体特異性から交差反応性およびエピトープを考慮しつつ、新たな抗原感作リスクを抑えて選択するため、結果的に DSA を回避している。血小板輸血は複数回実施されるため、ドナープールの規模との関係ですべてのドナーを HLA 型完全一致にできない事情がある。なお、造血幹細胞移植患者と HLA 適合血小板輸血適応患者の多くは、オーバーラップしていると思われる。この分野も造血幹細胞移植と同じく、患者がドナーを選択する運用である。使用試薬の判定基準の統一はもちろん必須であり、複数回の輸血で様々な免疫感作を受けるため、図 8 ③のケースも可能であれば避けたい。許容抗原を選択する基準の統一は候補ドナー数、輸血回

|               |     |           |          |          |               |
|---------------|-----|-----------|----------|----------|---------------|
| ビーズ結合性        |     | (+) (黒)   |          | (-) (白)  | 蛍光ビーズ法        |
| 細胞結合性         |     | (+) (黒)   |          | (-) (白)  |               |
| 補体依存性細胞傷害活性   |     | (+) (黒)   |          | (-) (白)  | LCT, 補体結合補助試薬 |
| イムノグロブリンサブクラス | IgG | ① 最重要 (赤) | ② 重要 (赤) | ③ 注意 (緑) | －             |
|               | IgM | 重要 (赤)    | －        | －        | －             |

図 8 HLA 抗体性状と検査法別の重要度

(日本骨髄バンク「造血細胞移植のための HLA ガイドブック」より一部改変)



数など不確定要素が存在するため困難を極める。

#### 4. まとめ

HLA 抗体検査の判定基準の設定は、様々な要素が絡み合い非常に難しい。市販される HLA 抗体検査試薬に明確な判定基準が記述されていないことがそれを裏付けている。本稿で示した結果の解釈における考え方を含めて施行錯誤が今しばらく続くものと思われる。本文で取り上げていないもう一つ大事な要素は検査精度の維持である。特に施設間差は患者の不利益に直結する。本学会の QC ワークショップでは全国 80 施設以上が参加しており（2019 年は 86 施設が参加）、同一検体、同一試薬における施設間で結果の比較が可能である。HLA 抗体検査に関わる技術者は、このようなプログラムに積極的に参加して、関連する医療の水準を維持・向上する義務があると考ええる。

#### 参考文献

- 1) 造血幹細胞移植における抗 HLA 抗体検査に関する指針 日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会 2015, <http://square.umin.ac.jp/JSHI/standardization/file/2015zouketsu-shishin.pdf>
- 2) 造血細胞移植のための HLA ガイドブック 日本骨髄バンク 2019, [https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04\\_medical/hla\\_guidebook20190510.pdf](https://www.jmdp.or.jp/documents/file/04_medical/hla_guidebook20190510.pdf)
- 3) 臓器移植抗体陽性診療ガイドライン 2018 年版 日本移植学会臓器移植抗体陽性診療ガイドライン策定委員会編集, メディカルレビュー社, 2018.
- 4) 中島文明: HLA 抗体の解析手法. 日本組織適合性学会誌 13: 131–137, 2007.
- 5) 中島文明: HLA 抗体検出テクニックについて. 日本組織適合性学会認定 HLA 検査技術者講習会テキスト 2008, [http://jshi.umin.ac.jp/certification/file/lecture\\_text2008.pdf](http://jshi.umin.ac.jp/certification/file/lecture_text2008.pdf)
- 6) Hanley JA, McNeil BJ: The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 143: 29–36, 1982.
- 7) Ruggeri A, Rocha V, Masson E, *et al.*: Impact of donor-specific anti-HLA antibodies on graft failure and survival after reduced intensity conditioning-unrelated cord blood transplantation: a Eurocord, Société Francophone d’Histocompatibilité et d’Immunogénétique (SFHI) and Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) analysis. *Haematologica* 98: 1154–1160, 2013.
- 8) Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, *et al.*: The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood* 116: 2839–2846, 2010.
- 9) Sullivan HC, Liwski RS, Bray RA, *et al.*: The road to HLA antibody evaluation: do not rely on MFI. *Am J Transplant* 17: 1455–1461, 2017.
- 10) El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, *et al.*: Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Hum Immunol* 70: 844–853, 2009.
- 11) Lan JH, Gjertson D, Zheng Y, *et al.*: Clinical utility of complement-dependent C3d assay in kidney recipients presenting with late allograft dysfunction. *Am J Transplant* 18: 2934–2944, 2018.
- 12) Fontaine MJ, Kuo J, Chen G, *et al.*: Complement (C1q) fixing solid-phase screening for HLA antibodies increases the availability of compatible platelet components for refractory patients. *TRANSFUSION* 51: 2611–2618, 2011.
- 13) Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, *et al.*: Complement-binding donor-specific anti-HLA antibodies and risk of primary graft failure in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 1392–1398, 2015.
- 14) Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Va’zquez LA, *et al.*: “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 86: 1111–1115, 2008.
- 15) Cai J, Terasaki PI, Anderson N, *et al.*: Intact HLA not beta2m-free heavy chain specific HLA class I antibodies are predictive of graft failure. *Transplantation* 88: 226–230, 2009.

## HLA antibody testing criteria and interpretation of the results

Fumiaki Nakajima<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Research and Development Department, Japanese Red Cross Society Central Blood Institute

Fluorescent bead-based methods have been the main techniques in HLA antibody testing in recent years, and are used in many transplantation and transfusion medical facilities. When measuring HLA antibodies using fluorescent bead-based methods, assessments are made with the normalized mean fluorescence intensity (nMFI) values of anti-human immunoglobulin G (IgG) as an indicator. Thus, these methods have been adopted due to their great convenience for clinicians. However, as progress is being made in the characteristics of fluorescent bead reagents and verification of clinical assessments, an increasing number of reports are questioning whether these methods accurately reflect patients' conditions. HLA antibodies exhibit complex specificity with multiple epitopes and there is intermingling of various properties, such as IgG, immunoglobulin M, and complement binding. To establish proper criteria for judgments and to interpret the results appropriately, it is important to: (1) properly understand the characteristics of the reagent, (2) arrive at an evaluation suited to the treatment the patient is receiving, and (3) properly control the test accuracy. In this article, we present examples of methods to establish judgment criteria (cutoff values) and examine their validity. Validity was seen with the screening reagents. In contrast, confirmation tests using single beads revealed difficulties in terms of establishing specific nMFI values for the cutoff because of the relationship with epitope analysis. In interpreting the results, we explain the clinical importance from the perspectives of comparison between the cross-reactivity group and epitope analysis, HLA antibody diversity, and HLA antibody properties. We discuss HLA antibody testing with regard to the judgment criteria and interpretation of the results, and hope this will provide insight for future efforts.

**Key Words:** fluorescent bead-based methods, epitope analysis, complement binding

## 2019 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

### 臍帯血バンク事業の現状と将来展望

木村 貴文<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

骨髄移植法の確立から 20 年を待たずして幕を開けた臍帯血移植は、旺盛な造血幹細胞の増殖能と 2 座までの患者／ドナー間 HLA 不一致を許容できること、さらには供給に時間を要さないことなどから新たな造血幹細胞移植（HSCT）法としてひろく受容されてきた。HSCT にとどまらず、欧米では早くからさまざまな疾患に対する細胞治療への応用を視野に入れた研究や臨床試験が積み重ねられ、その有効性はわが国においても衆目の的となりつつある。

**キーワード：**臍帯血バンク、造血幹細胞移植、再生医療

#### 1. はじめに：造血幹細胞移植の歴史

世界初のヒトからヒトへの骨髄移植は、60 年余を遡る 1957 年に Columbia 大学大学病院において Edward Donnall Thomas 博士らの手で行われた。第一例目の一卵性双生児間の移植では患者の白血病は再発の転帰をとるが、それ以後の移植では重度の graft-versus-host disease (GVHD) によって 100 名以上の白血病患者を失うことになる。それでも不撓不屈の注力によって彼らは最も効率の良い生着と GVHD 予防が期待できる骨髄移植法を 1970 年代に確立する。ポイントは①ドナーとレシピエントの HLA を一致させて確実な生着を得ることと、②適切な免疫抑制剤使用による重度の GVHD の抑制である。この近代移植法はそれ以後の血液疾患治療に革命をもたらした、多くの患者への福音となった。

次には白血球増殖因子 G-CSF による血球回復の促進によって化学療法の間隔を短縮することが可能となった。加えて、G-CSF 投与が健常者末梢血中に CD34 陽性造血幹細胞（以下「CD34<sup>+</sup> HSC」）をリクルートさせることができることを利して、骨髄移植に替わる新たな造血幹細胞移植法として末梢血幹細胞移植法が確立される。骨髄移植と同等の治療成績を期待して本邦でも

2000 年には保険適用となり、骨髄バンクを介した非血縁者間移植として導入されている。

これらの造血幹細胞移植の拡がりとは並行して、1982 年には第 3 の造血幹細胞として臍帯血造血幹細胞の存在が報告された<sup>1)</sup>。骨髄や末梢血の造血幹細胞に比べて顕著な増殖能を有し、HLA-A、-B、-DRB1 の 6 座のうち 2 座までの不一致が許容されるという大きな特徴から、その後わずか 6 年で第一例目の同種（この時は同胞間）臍帯血移植が Gluckman 博士らによって Fanconi 貧血の 5 歳の男児に対して行われている<sup>2)</sup>。1992 年には New York Blood Center 内に臍帯血バンクが設立され、本邦においても 1995 年に臍帯血バンクがスタートし（表 1）、小児患者への新たな造血幹移植細胞ソースとして導入された。臍帯血造血幹細胞の特徴は、骨髄や末梢血中に含まれる造血幹細胞に比べて顕著な増殖能を有することである。このため、比較的体格の小さな日本人では、少数の造血幹細胞でも移植後の造血が支持可能であるため、成人患者への移植幹細胞ソースとして積極的に利用された。その結果、海外では類を見ない勢いで臍帯血移植が行われ、1996 年の供給開始以来、2019 年 5 月末までに 17,000 例以上の移植数に達している<sup>3)</sup>。

受付日：2019 年 6 月 21 日，受理日：2019 年 6 月 21 日

代表者連絡先：木村 貴文 ☎ 567-0085 大阪府茨木市彩都ささぎ 7-5-17 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

E-mail: t-kimura@kk.bbc.jrc.or.jp

## 2. 臍帯血バンクの設立と基盤整備

前述のように、臍帯血の移植幹細胞ソースとしてのメリットは、本邦初の公的臍帯血バンクが設立されたことを契機とする臍帯血移植の拡がりにおける大きな原動力となった。公的臍帯血バンクは非血縁者間臍帯血移植に不可欠であるため、当初はさまざまな支援の下に全国に複数の臍帯血バンクが設立されて移植医療を支えていた。やがてこれらのバンクに保管された臍帯血の有効利用を目的として臍帯血バンクネットワークが設立され（表1）、ドナーが見つかる確立も格段に改善された。

しかしながら、ドナーの安全性確保や採取した臍帯血の調製・保存および供給業務全般の安定的な運営を規定する法的根拠が存在しない状況でのバンク運営となっていた。そこで、移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の

推進を図り、造血幹細胞移植の円滑かつ適正な実施に資する基盤整備がなされた<sup>4)</sup>。この法律において、骨髄・末梢血幹細胞あっせん事業者とともに、臍帯血供給事業についての定義および要件が明記され、臍帯血供給事業が国の許可事業となった。同時に、造血幹細胞移植の安全性と有効性に資する研究利用についても明記されている（表2）。さらに、骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業及び臍帯血供給事業と移植医療現場との円滑な連携を図ることを目的として、厚生労働大臣の指定により造血幹細胞提供支援機関が設置されており、日本赤十字社血液事業本部が唯一の指定機関としてその役割を担っている。

本法の制定以来、本邦における臍帯血供給事業者（以下「臍帯血バンク」）は全国で6事業あり、すべて国の許可制となっている。日本赤十字社は北海道、関東甲信越、近畿、九州の各さい帯血バンクを運営し、中部さい帯血バンクは一般社団法人として、兵庫さい帯血バンクは特定非営利活動法人としてそれぞれ運営されている。

表1 臍帯血バンクの歴史

|       |                            |
|-------|----------------------------|
| 1982年 | 中畑博士が臍帯血造血幹細胞を発見           |
| 1994年 | 国内初の臍帯血移植（血縁者間）            |
| 1995年 | 国内初の臍帯血バンク設立               |
| 1997年 | 臍帯血バンクを介し国内初の非血縁者間臍帯血移植を実施 |
| 1999年 | 日本さい帯血バンクネットワーク発足          |
| 2001年 | 非血縁者間臍帯血移植が500例を記録         |
| 2003年 | 非血縁者間臍帯血移植が1,000例を記録       |
| 2008年 | 非血縁者間臍帯血移植が5,000例を記録       |
| 2013年 | 非血縁者間臍帯血移植が10,000例を記録      |
| 2014年 | 日本さい帯血バンクネットワークの業務終了       |

## 3. 臍帯血バンク事業の現状

国内の6つの臍帯血バンクでは、それぞれの事業所の近隣地域の産科施設（医院または病院内の産科部門）で採取された臍帯血のうち、凝集塊のないものを受け入れて無菌的に調製し、液体室素タンクに保管する。児の産後数ヶ月まで健康調査を行い、9ヶ月の検疫期間を経て臍帯血の安全性を十分に確保したのちに有核細胞数、

表2 移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律（抜粋）<sup>4)</sup>

|                                                                           |                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 第四条<br>(国の責務)                                                             | 移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する施策を策定し、及び実施する責務を有する                                                                                         |
| 第十三条<br>(財政措置)                                                            | 国は、移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に資するよう、造血幹細胞提供関係事業者の安定的な事業の運営を確保するため、財政上の措置その他必要な施策を講ずるものとする                                                 |
| 第五章<br>(臍帯血供給事業)<br>第三十条<br>(許可)                                          | 臍帯血供給事業を行おうとする者は、厚生労働省令で定めるところにより、厚生労働大臣の許可を受けなければならない                                                                              |
| その他<br>第三十二条：品質の確保に関する基準の遵守<br>第三十三条：採取に当たっての説明及び同意<br>第三十五条：研究目的での利用及び提供 |                                                                                                                                     |
| 第六章<br>(造血幹細胞提供支援機関)<br>第四十四条<br>(支援機関の指定)                                | 厚生労働大臣は、営利を目的としない法人であって、支援業務を適正かつ確実に行うことができると認められるものを、その申請により、全国を通じて一個に限り、造血幹細胞提供支援機関として指定することができる                                  |
| 第四十五条<br>(支援機関の業務)                                                        | 一 骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業及び臍帯血供給事業に必要な協力<br>二 骨髄・末梢血幹細胞提供あっせん事業及び臍帯血供給事業について、必要な連絡調整<br>三 情報の一元管理と移植医への情報提供<br>四 移植に用いる造血幹細胞の提供に関する普及啓発活動 |

平成二十四年法律第九十号 平成三十年十二月十四日公布（平成三十年法律第九十八号）改正

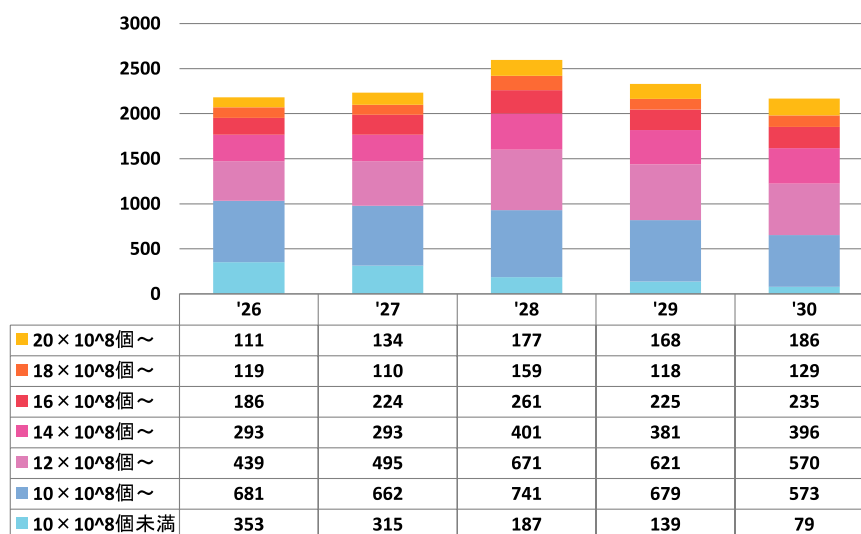


図1 臍帯血の新規公開数

CD34 陽性細胞数, HLA などの情報が臍帯血情報公開システムに公開される。この製造管理・品質管理過程を経て公開される臍帯血は年間 2,100 本を超える (図 1)。

成人患者における良好な移植成績を得るために有核細胞数では  $12 \times 10^8$  個以上の臍帯血が全提供数の半数以上を占め (図 2a), CD34 陽性細胞数も  $3 \times 10^6$  個以上のものが 80% を占めている (図 2b)。

一方で、保管後 10 年を経過して公開取り消しとなる臍帯血も年間 1,000 本を超えており、1,300 本超/年の臍帯血を移植用に提供する結果、経年漸減となり、平成 30 年度には年間公開臍帯血数が 9,516 本にとどまった (図 3)。

各臍帯血バンクでは、日本人のほぼ全ての患者が HLA1 座不一致または完全一致のドナーを見出せる Off-the-Shelf スケール (10,000 本) を回復するために採取施設と連携した強化策がとられている。

移植後の生着日数が骨髄や末梢血に比べて有意に長くなるものの、HLA2 座までの不一致を許容できるためにほぼ全ての患者に適合ドナーを見いだすことができ、十分な品質管理のもとに迅速な提供が可能であるという利点から、非血縁者間臍帯血移植は今や骨髄・末梢血幹細胞移植を超える勢いで行われており、この傾向は今後もしばらく続くものと予想される (図 4)。

#### 4. 臍帯血を用いた新たな細胞治療 (国外)

1989 年の第一例目の同胞間臍帯血移植が行われて 30

年を経過し、わが国では今や骨髄・末梢血幹細胞移植をしのぐ 1,300 例余りの非血縁者間臍帯血移植が毎年実施されている (図 4)。いっぽう、多民族地域である欧米ではわが国と事情が異なり、臍帯血移植に代わって移植後シクロフォスファミドを併用した HLA ハプロタイプ半合致ドナーからの骨髄または末梢血幹細胞移植が主流となりつつある。

造血幹細胞移植としての臍帯血移植は減りつつある欧米ではあるが、臍帯血細胞のもつ旺盛な増殖能などを利して、さまざまな再生医療や免疫調節治療に用いられていることは意外と知られていない。臍帯血幹細胞が発揮する組織再生効果には 2 つの要因考えられる。一つは、臍帯血幹細胞が脳神経や脳血管内皮細胞に分化するという機序である。しかしながら、現時点ではこの可能性を積極的に支持する科学的根拠に乏しく、注目すべきはもう一つの機序である。つまり、VEGF (血管内皮増殖因子) による血管新生・再生、プロスタグランジンなどによる血管障害部位の炎症反応抑制効果、造血幹細胞由来の液性因子による間接的 (二次的) 脳神経細胞増殖促進作用によるところが大きいと考えられる。これらの新しい細胞治療への応用をめざした臨床試験は枚挙にいとまがなく、臓器及び対象疾患も多岐にわたる (表 3)。

残念ながら対照群を置いた試験で有効性が認められたものは一部にとどまる (表 4)。また、虚血性心筋疾患<sup>37-39)</sup>と視神経形成不全<sup>52,53)</sup>に対する明らかな効果は認められていない。



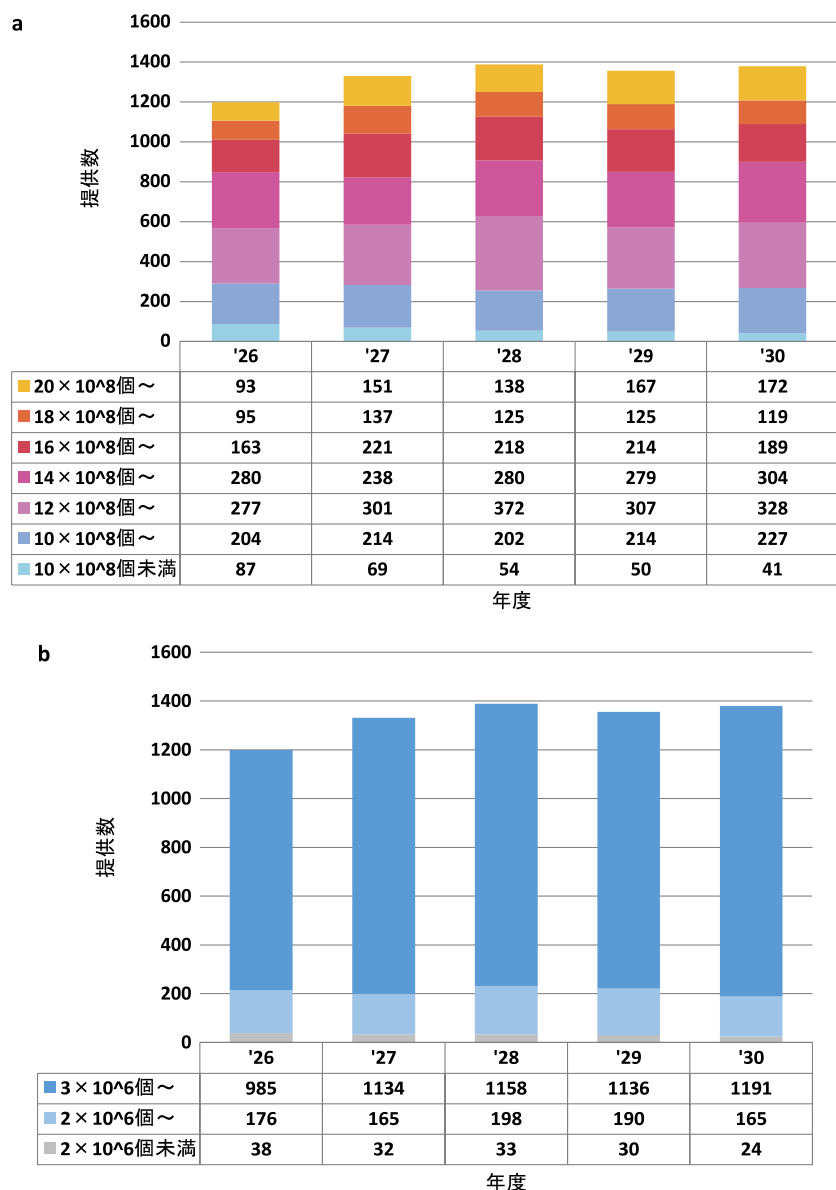


図2 臍帯血提供数. a: 有核細胞数別. b: CD34 陽性細胞数別

## 5. 本邦における臍帯血を用いた再生医療

本邦でも諸外国と同様に臍帯血の旺盛な増殖能と低い免疫原性を利した再生医療や免疫治療への応用が進められようとしている。

再生医療の分野では、出産時に低酸素虚血性脳症（HIE）となった児に対して自家臍帯血移植による脳機能の再生が試みられている<sup>57)</sup>。このような症例の国内での発症頻度は1,000人に2～3人と言われる。平成26年度より大阪市立大学が中心となり、埼玉医科大学、東京大学医科学研究所、東京女子医科大学、国立成育医療

研究センター、名古屋大学、国立循環器病研究センター、神戸先端医療センター、大阪市立総合医療センター、淀川キリスト教病院、倉敷中央病院との共同研究として実施されている本臨床試験は、生後1～3日目に自己臍帯血を数度に分けて移植するという内容で、従来の低体温療法では重症仮死児の約半数に残る重篤な麻痺の予防を目的としている。平成27年に移植医を受けた第1例目の症例では、有害事象なく1歳児の検診で正常の発達を確認している。その後、2017年度には目標とする6例全例の安全性評価を終了し、問題となる有害事象を認めなかった。



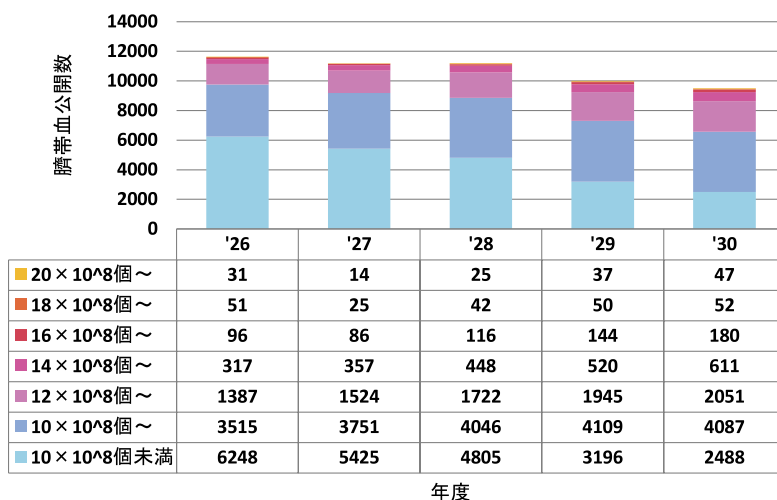


図3 臍帯血公開数の推移（有核細胞数別）

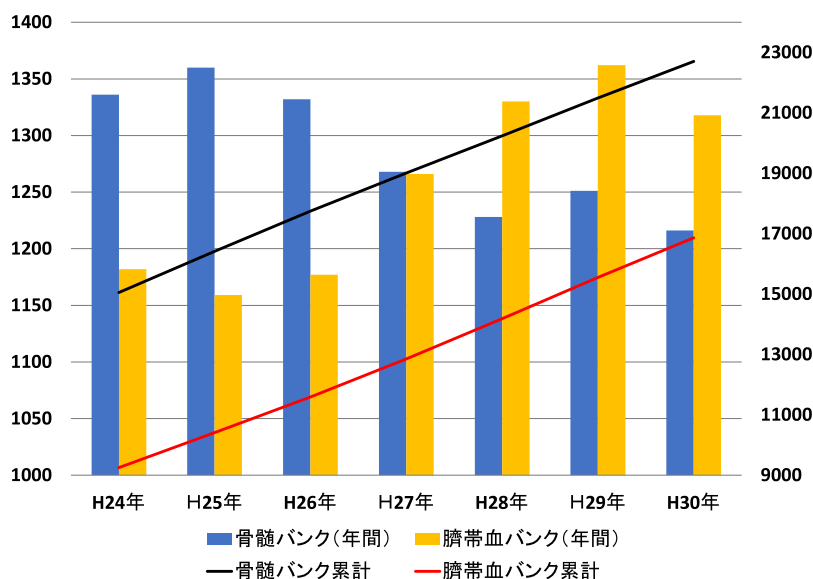


図4 骨髄バンクおよび臍帯血バンクを通じた移植の実績（年次・累積）

高知大学らのグループも、2017年から7歳以下の①脳性麻痺の診断を受けている、②中等度以上の低酸素性虚血性脳症、③画像で脳室周囲白質軟化症を認め脳性麻痺への移行が確実視されている、のいずれかに該当する患者に対し自己臍帯血の単回投与による安全性および有効性の評価を目的とする臨床試験に着手しており、予定症例数（6例）のエントリーまで終了している<sup>58)</sup>。これら2件の臨床研究は第Ⅱ相試験（探索的臨床試験）に進むための調整段階に進むと考えられるが、症例の確保が課題と考えられる。

これら組織や器官の機能再生を目指す医療への応用と

は異なる方向性として、臍帯血中に少数ながら含まれる間葉系幹細胞（MSC）の持つ免疫調節能を活用しようという試みも始まっている。東京大学医科学研究所附属病院では2014年までの東京臍帯血バンク運営のノウハウを生かし、セルプロセッシング・輸血部において非血縁健常者、自家、同胞、および気象疾患患者から得た臍帯血および臍帯からMSCを単離・増幅培養し、さまざまな疾患に対する治療用として用いる臍帯血・臍帯バンク（IMSUT-CORD）を設立した。IMSUT-CORDが担う役割としては、①MSCの免疫抑制効果を利した造血幹細胞移植後の重症急性GVHD、クローン病や潰瘍性大腸炎

表3 臍帯血移植を用いた臨床試験

| 疾患                                                             | 論文数 (患者数) | コントロール試験 (患者数) | 効果の可能性に関する論文 (患者数) |
|----------------------------------------------------------------|-----------|----------------|--------------------|
| 神経疾患 <sup>5-28)</sup><br>脳性麻痺<br>変性疾患<br>外傷性脳障害<br>脳卒中<br>脊髄損傷 | 24 (476)  | 6 (171)        | 16 (270)           |
| 糖尿病 <sup>29-36)</sup><br>I 型<br>II 型                           | 8 (149)   | 4 (53)         | 6 (108)            |
| 心血管系障害 <sup>37-43)</sup><br>心筋梗塞                               | 7 (24)    | 1 (12)         | 7 (24)             |
| 肝／消化器系疾患 <sup>44-46)</sup><br>肝硬変<br>B 型肝炎                     | 3 (106)   | 3 (106)        | 2 (55)             |
| 筋／軟骨系疾患 <sup>47-50)</sup><br>筋萎縮性疾患                            | 4 (21)    | 1 (11)         | 2 (12)             |
| その他 <sup>51-54)</sup><br>SLE                                   | 4 (38)    | —              | 4 (38)             |
| 合計                                                             | 50 (814)  | 15 (353)       | 35 (56)            |

表4 臍帯血を用いた前向き対照試験

| 試験     | ドナー | 投与細胞など             | 試験群 (n) | 対照群 (n) | 対照治療     |
|--------|-----|--------------------|---------|---------|----------|
| 脳性麻痺   |     |                    |         |         |          |
| 55)    | 自家  | TNC*               |         |         | Placebo  |
| 56)    | 同種  | TNC                | 17      | 17      | Placebo  |
| 32)    | 同種  | MSC**+ マウス NGF***  | 30      | 30      | mNGF+ リハ |
|        |     |                    |         | 30      | Placebo  |
| 34)    | 同種  | TNC                | 31      | 32      | Epo      |
|        |     |                    |         | 35      | Placebo  |
| 肝硬変    |     |                    |         |         |          |
| 31)    | 同種  | MSC                | 30      | 15      | Placebo  |
| 27)    | 同種  | MSC                | 38      | 16      | Placebo  |
| 8)     | 同種  | MSC+BM stem cells  | 13      | 19      | リハ       |
| I 型糖尿病 |     |                    |         |         |          |
| 30)    | 同種  | 自家リンパ球 + TNC       | 12      | 3       | 自家リンパ球   |
| 35)    | 自家  | TNC (+DHA/VTD****) | 10      | 5       | Placebo  |
| 17)    | 自家  | TNC                | 7       | 10      | 無治療      |

\* 有核細胞, \*\* 間葉系幹細胞, \*\*\*Nerve Growth Factor, \*\*\*\*Vitamin D

などの炎症性疾患に対する治療への応用<sup>59)</sup>, ②脳性麻痺などの出生時疾患の治療, ③良性疾患に対する造血幹細胞移植ソースとして, ④その他新たな細胞治療や検査法などの開発に必要な研究用資材の提供などが想定されている (図5)。なかでも難治性重症急性 GVHD に対する治療薬としての応用は, 2018 年 7 月から医師主導型試験として第一相安全性試験<sup>60)</sup> がスタートしており, 安全性と一定の有効性が確認されれば, 以後は企業治験として進められる予定である。

## 6. まとめ

日本は今や世界で有数の臍帯血移植大国である。成人の体格が欧米に比べて小さいことから kg 体重当たりの移植 CD34<sup>+</sup> HSC 数が相対的に多くなること, 島嶼国としての地理的特性から HLA ハプロタイプが良好に保存されていること, 国民皆保険制度による移植費用の抑制などが臍帯血移植を後押しする要因になったと考えられる。諸外国では造血幹細胞移植用細胞ソースよりはむしろ造血幹細胞の持つさまざまな生物活性を生かした再

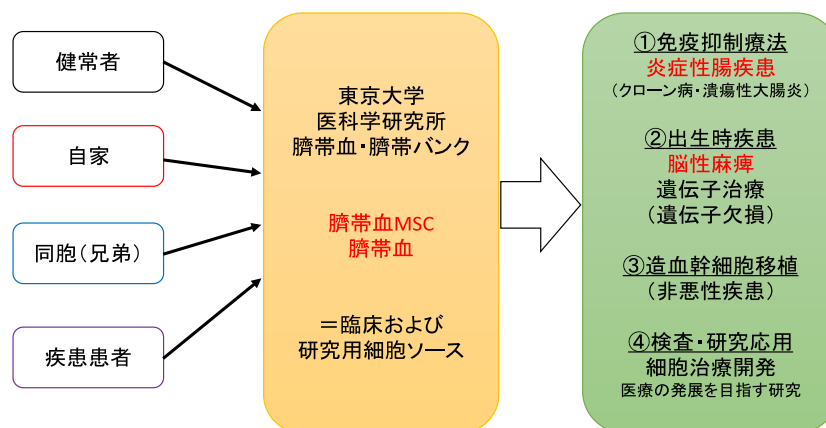


図5 東京大学医科学研究所臍帯血・臍帯バンク<sup>61)</sup>

生・細胞治療や免疫療法への応用に活路を見出し始めている。とくに小児，成人を問わず血管や神経の再生を促進する by-stander としては内外を問わず有望視されている。しかしながら，公的臍帯血バンクはそれら再生医療をまだ支援できない<sup>4)</sup>。基礎研究段階において概念実証が重ねられることと並行して，公的臍帯血バンクが臍帯血を用いた再生・細胞治療を推進するための法的な基盤整備も不可欠と考えられる。また，造血幹細胞移植に用いられる臍帯血は年間 1,300 本余にとどまる（図4）が，適用範囲の拡大は臍帯血バンクの規模の拡大を要求し，HLA タイピングや無菌試験などの品質管理分野でも処理能力の向上が求められるであろう。

#### 参考文献

- 1) Nakahata T, Ogawa M: Hemopoietic colony-forming cells in umbilical cord blood with extensive capacity to generate mono- and multipotential hemopoietic progenitors. *J Clin Invest* 70: 1324–1328, 1982.
- 2) Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, *et al.*: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from HLA identical sibling. *N Engl J Med* 321(7): 1174–1178, 1989.
- 3) 造血幹細胞移植情報サービス. <http://www.bmdc.jrc.or.jp/generalpublic/statistics.html#an2>
- 4) 移植に用いる造血幹細胞の適切な提供の推進に関する法律（平成二十四年法律第九十号，平成三十年十二月十四日公布（平成三十年法律第九十八号）改正）
- 5) Sun J, Mikati M, Troy JD, *et al.*: Adequately dosed autologous cord blood infusion is associated with motor improvement in children with cerebral palsy. *Biol Blood Marrow Transplant* 22: S61–62, 2016.
- 6) Zhang C, Huang L, Gu J, *et al.*: Therapy for cerebral palsy by

human umbilical cord blood mesenchymal stem cells transplantation combined with basic rehabilitation treatment: a case report. *Glob Pediatr Health* 2: 2333794X 15574091, 2015.

- 7) Kang M, Min K, Jang J, *et al.*: Improvement of immune responses in the efficacy of cord blood cell therapy for cerebral palsy. *Stem Cells Dev* 24: 2259–2268, 2015.
- 8) Feng M, Lu A, Gao H, *et al.*: Safety of allogeneic umbilical cord blood stem cells therapy in patients with severe cerebral palsy: a retrospective study. *Stem Cells Int* 2015: 325552, 2015.
- 9) Cotton CM, Murtha AP, Goldberg RN, *et al.*: Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr* 164: 973–979.e1, 2014.
- 10) Lee YH, Choi KV, Moon JH, *et al.*: Safety and feasibility of countering neurological impairment by intravenous administration of autologous cord blood in cerebral palsy. *J Transl Med* 10: 58, 2012.
- 11) Xing LH, Zhang LX, Zhang LL, *et al.*: Umbilical cord blood stem cell transplantation combined with mouse neural growth factor application and physical rehabilitation therapy for infantile cerebral palsy. *Clin J Tissue Eng Res* 16: 7777, 2012.
- 12) Choi JU, Kim MY: Umbilical cord blood and erythropoietin combination therapy trial for children with cerebral palsy. *Childs Nerv Syst* 28: 1589, 2012.
- 13) Papadopoulos KI, Low SS, Aw TC, *et al.*: Safety and feasibility of autologous umbilical cord blood transfusion in 2 toddlers with cerebral palsy and the role of low dose granulocyte-colony stimulating factor injections. *Restor Neurol Neurosci* 29: 17–22, 2011.
- 14) Wu F, Fang JY, Zhang M, *et al.*: Effect of umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation on nervous system function in 20n cerebral palsy children. *J Clin Rehab Tissue Eng Res* 12: 3198–3200, 2008.
- 15) Smith A, Sun J, Allison J, *et al.*: Use of privately banked autologous umbilical cord blood to treat brain injuries in pediatric patients. *Bone Marrow Transplant* 51: S568, 2008.

- 16) Wang S, Cheng H, Dai G, *et al.*: Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation significantly improves neurological function in patients with sequelae of traumatic brain injury. *Brain Res* 1532: 76–84, 2013.
- 17) Yang WZ, Zhang Y, Wu F, *et al.*: Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear cell therapy for degenerative conditions. *J Transl Med* 8: 75, 2010.
- 18) Min K, Song J, Lee JH, *et al.*: Allogeneic umbilical cord blood therapy combined with erythropoietin for patients severe traumatic brain injury: three case reports. *Restor Neurol Neurosci* 31: 397–410, 2013.
- 19) Fufaeva E, Semenova J, Semenova N, *et al.*: Dynamics of high mental function recovery in children after severe traumatic brain injury having umbilical cord blood cells therapy. *Brain Inj* 26: 688–689, 2012.
- 20) Kurtzberg J, Durham R, Laskowitz D, *et al.*: Allogeneic umbilical cord blood infusion for adults with ischemic stroke. *Bil Blood Marrow Transplant* 22: 141–142, 2016.
- 21) Jiang Y, Zhu W, Zhu J, *et al.*: Feasibility of delivering mesenchymal cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery. *Cell Transplant* 22: 2291–2298, 2013.
- 22) Hua R, Li P, Wang X, *et al.*: Evaluation of somatosensory evoked potential and pain rating index in a patient with spinal cord injury accepted cell therapy. *Pain Physician* 19: E659–666, 2016.
- 23) Cheng H, Liu X, Hua R, *et al.*: Clinical observation of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in treatment for sequelae of thoracolumbar spinal cord injury. *J Transl Med* 12: 253, 2014.
- 24) Ichim TE, Solano F, Lara F, *et al.*: Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report. *Int Arch Med* 3: 30, 2010.
- 25) Kang KS, Kim SW, Oh YH, *et al.*: A 37-year-old spinal cord-injured female patient transplanted of multipotent stem cells from human UC blood with improved sensory perception and mobility both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy* 7: 368–373, 2005.
- 26) Zhu H, Poon W, Liu Y, *et al.*: Phase I-II clinical trial assessing safety and efficacy of umbilical cord blood mononuclear cell transplant therapy of chronic complete spinal cord injury. *Cell Transplant* 25: 1925–1943, 2016.
- 27) Cordes AL, Jahn K, Hass R, *et al.*: Intramedullary spinal cord implantation of human CD34<sup>+</sup> umbilical cord-derived cells in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* 12: 325–330, 2011.
- 28) Hou ZL, Liu Y, Mao XH, *et al.*: Transplantation of umbilical cord and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cell Adh Migr* 7: 404–407, 2015.
- 29) Delgado E, Perez-Basterrechea M, Suarez-Alvarez B, *et al.*: Modulation of autoimmune T-cell memory by stem cell aducator therapy: phase 1/2 clinical trial. *EBioMedicine* 2: 2024–2036, 2015.
- 30) Giannopoulou EZ, Puff R, Beyerlein A, *et al.*: Effect of a single autologous cord blood infusion on beta-cell and immune function in children with new-onset type 1 diabetes: a non-randomized controlled trial. *Pediatr Diabetes* 15: 100–109, 2014.
- 31) Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, *et al.*: Reversal of type 1 diabetes via a islet  $\beta$  cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Med* 10: 3, 2012.
- 32) Haller MJ, Wasserfall CH, Mcgrail K, *et al.*: Pilot study of autologous umbilical cord blood (UCB) transfusion followed by docosahexanoic acid (DHA) and vitamin D (VTD) supplementation in children with type 1 diabetes (T1D). *Diabetes* 61: A321, 2012.
- 33) Haller MJ, Wasserfall CH, Hulme MA, *et al.*: Autologous umbilical cord blood transfusion in young children with type 1 diabetes fails to preserve C-peptide. *Diabetes Care* 34: 2567–2569, 2015.
- 34) Kong D, Zhang X, Wang D, *et al.*: Umbilical cord mesenchymal stem cell transfusion ameliorated hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab* 60: 1969–1976, 2014.
- 35) Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, *et al.*: Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial. *BMC Med* 11: 160, 2013.
- 36) Tong Q, Duan L, Xu Z, *et al.*: Improved insulin secretion following intrapancreatic UCB transplantation in patients with T2DM. *J Clin Endocrinol Metab* 98: E1501–1504, 2013.
- 37) Yu L, Zhang M: Transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells for treatment of myocardial infarction with heart failure. *Clin J Tissue Eng Res* 18: 8103, 2014.
- 38) Zhang M, Yu L: Human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation for extensive anterior-wall acute myocardial infarction with cardiogenic shock and severe heart failure in one case. *Clin J Tissue Eng Res* 16: 99, 2012.
- 39) Burkhardt HM, Qureshi MY, Peral SC, *et al.*: Regenerative therapy for hypoplastic left heart syndrome: first report of intraoperative intramyocardial injection of autologous umbilical-cord blood-derived cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 149: e35–37, 2015.
- 40) Ichim TE, Solano F, Brenes R, *et al.*: Placental mesenchymal and cord blood stem cell therapy for dilated cardiomyopathy. *Reprod Biomed Online* 16: 898–905, 2008.
- 41) Bahk JY, Jung JH, Han H, *et al.*: Treatment of diabetic impotence with umbilical cord blood stem cell intracavernosal transplant: preliminary report of 7 cases. *Exp Clin Transplant* 8: 150–160, 2010.
- 42) Protti C, Arici V, Cervio M, *et al.*: Allogenic lethally irradiated cord blood mononuclear cells in no-option critical limb ischemia: a ‘box-of rain’. *Stem Cells Dev* 22: 2805–2812, 2013.

- 43) Han H, Chang SK, Chang J, *et al.*: Intrathecal injection of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells for the treatment of basilar artery dissection: a case report. *J Med Case Rep* 5: 562, 2011.
- 44) Zhang Z, Lin H, Shi M, *et al.*: Human umbilical cord mesenchymal stem cell improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 27(suppl 2): 112–120, 2012.
- 45) Zeng ZY, Li DL, Fang J, *et al.*: Umbilical cord mesenchymal stem cells with bone marrow stem cells in the treatment of decompensated cirrhosis: a 1-year follow-up study. *Clin J Tissue Eng Res* 19: 1533, 2015.
- 46) Chen LM, Tang XP, Gong HY, *et al.*: Umbilical cord and blood plasma infusion for treating hepatitis: grouping control and 1-year follow-up. *J Clin Rehab Tissue Eng Res* 14: 1874, 2010.
- 47) Rajput BS, Chakrabarti SK, Dongare VS, *et al.*: Human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: safety and feasibility study in India. *J Stem Cells* 10: 141–156, 2015.
- 48) Li P, Cui K, Zhang B, *et al.*: Treatment of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for the treatment of Becker muscular dystrophy in affected pedigree members. *Int J Mol Med* 35: 1051–1057, 2013.
- 49) Allewelt HB, Patel S, Prasad VK, *et al.*: Umbilical cord blood transplantation for cartilage hair hypoplasia: a single center experience demonstrates excellent outcomes using myeloablative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant* 22: S235, 2016.
- 50) Ha CW: Human articular repair using umbilical cord blood-derived allogeneic mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 6(suppl 1): 409, 2012.
- 51) Sun L, Wang D, Liang J, *et al.*: Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62: 2467–2475, 2010.
- 52) Fink C, Garcia-Filion P, Borchert M: Failure of stem cell therapy to improve visual acuity in children with optic nerve hypoplasia. *J AAPOS* 17: 490–493, 2013.
- 53) Abukhalil F, Lam BL, Guy J, *et al.*: Visual observations of an American patient with Leber hereditary optic neuropathy after purported injections of stem cells in China. *Arch Ophthalmol* 130: 532–534, 2012.
- 54) Valbonesi M, Gianniti G, Migliori F, *et al.*: Cord blood (CB) stem cells for wound repair: Preliminary report of 2 cases. *Transfus Apher Sci* 30: 153–156, 2004.
- 55) Mukhopadhyay S, Sen S, Data H: Comparative role of 20% cord blood serum and 20% autologous serum in dry eye associated with Hansen's disease: a tear proteomic study. *Br J Ophthalmol* 99: 108–112, 2015.
- 56) Nassar WF, El-Ansary M, Shehab T, *et al.*: Effect of cell-free mesenchymal stem cells microvesicles (MVS) and exosomes therapy beta-cell mass in type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Diabetes* 64: A282, 2015.
- 57) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構平成 26 年度「再生医療等実用化研究事業—低酸素性虚血性脳症に対する自己臍帯血幹細胞治療に関する研究」
- 58) 小児脳性麻痺など脳障害に対する自家臍帯血単核球細胞輸血. [https://rctportal.niph.go.jp/s/detail/um?trial\\_id=UMIN000024852](https://rctportal.niph.go.jp/s/detail/um?trial_id=UMIN000024852)
- 59) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構平成 28 年度「再生医療等実用化研究事業—臍帯血・臍帯由来間葉系細胞製剤を用いた新規免疫療法・再生医療の開発」
- 60) 国立研究開発法人日本医療研究開発機構平成 30 年度「再生医療等実用化研究事業—同種臍帯由来間葉系細胞を用いた重症急性移植片対宿主病に対する医師主導治験を目指した研究」
- 61) <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcpt/bank.html>

## Current status and future prospects of cord blood bank

Takafumi Kimura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Preparation Department, Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

Umbilical cord blood (UCB) transplantation, launched without waiting for 20 years after the establishment of current method for allogeneic bone marrow transplantation (allo-BMT), has been increasingly and widely accepted as a new strategy for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) on the grounds that HSC in UCB have extensive proliferation capacity, that a donor UCB can be used even if it has 2-loci HLA incompatibility to the recipient, and that cryopreserved and readily qualified UCB can be shipped immediately after order. On the other hand, clinical utility of UCB has been verified, not only for HSCT, but also in the field of cell therapy against various diseases in many countries including recent Japan.

**Key Words:** umbilical cord blood, transplantation, cell therapy

---

©2019 日本組織適合性学会



## ヒト以外の動物種を対象とした NGS による MHC タイピング法

谷本 幸介<sup>1)</sup>, 成瀬 妙子<sup>2)</sup>, 木村 彰方<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム解析室<sup>2)</sup> 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野

次世代シーケンサー (NGS) によるヒト以外の動物種の MHC タイピングでは、動物種によってはハプロタイプごとに MHC 遺伝子の数が異なり、さらにヒトほどリファレンス情報が充実していないことから、HLA タイピング法とは異なる独自の手法が必要であり、これまでに様々な手法が報告されている。本稿では、代表的なヒト以外の動物種の MHC タイピング法について、シーケンスデータの解析方法を中心にその概略を紹介することにより技術の変遷をたどり、最後に今後の展望について触れたい。

**キーワード:** 次世代シーケンサー (NGS), MHC タイピング, バイオインフォマティクス

## 1. はじめに

次世代シーケンサー (NGS) の普及は遺伝子解析の手法に大きな変化をもたらした。NGS を利用した解析の中でも、全エクソンシーケンスや RNA-seq, ChIP-seq はすでに一般的な解析手法として様々な研究分野に広く普及しており、その解析方法も標準的なものが存在している。一方、NGS による MHC タイピングの手法はまだ発展途上であり、現在も更なる効率化、高精度化を目指して様々な手法の開発が続いている。MHC 遺伝子はアレル間の配列類似性が高いため、タイピングには高精度なシーケンスが必要となる。それに加えて phase ambiguity の問題も存在する。しかし、NGS で得られる個々の配列は、キャピラリーシーケンスに比べ短いものが多く、精度も高くない。これらの特徴が NGS による MHC タイピングを困難にしていると考えられる。さらにヒト以外の MHC タイピングでは、ヒトほどリファレンス情報が充実していないことに加え、動物種によってはハプロタイプごとに MHC 遺伝子の数が異なるため<sup>1)</sup>、HLA タイピング法として開発された手法をそのま

ま適用できない場合がある。そのため、HLA とは異なるタイピング法の開発が必要であり、NGS の登場以来様々な手法が報告されてきた。本稿では、ヒト以外の動物種の NGS による MHC タイピング法について紹介するが、いずれの手法も多様性の高い領域の PCR 産物をシーケンスする点は共通しているため、得られたシーケンスデータからいかに精度よくシーケンスエラーを除いて真の配列を得るかにタイピング法開発の主力が注がれている。そのため、本稿では代表的な手法のデータ解析に焦点をあててその概略を紹介することで、NGS を用いた MHC タイピング技術の変遷をたどり、最後に今後の展望について触れたい。

## 2. 用語の説明

ヒト以外の MHC タイピング法にはスタンダードとになっているものが存在していないこともあり、用語が統一されておらず、同じ用語でも文献ごとに異なる意味で使用されているものが散見される。そのため、本稿で用いる用語の定義を図 1 にまとめた。リードは NGS により産出される個々の配列、バリエーションは産出されたリー

受付日: 2019 年 3 月 27 日, 受理日: 2019 年 7 月 2 日

代表者連絡先: 谷本 幸介 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム解析室  
TEL: 03-5803-4960 E-mail: ktani.nri@mri.tmd.ac.jp

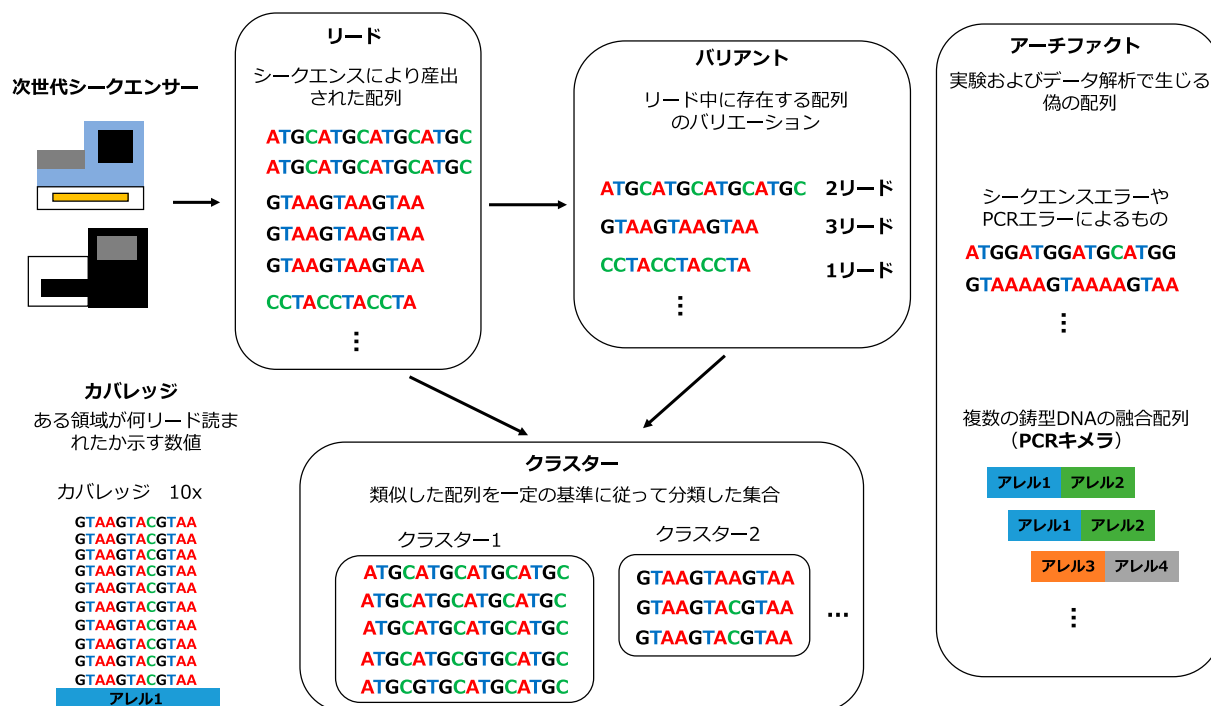


図1 本稿で用いる用語の定義

本稿では引用文献において主流と考えられる定義を採用しているため、一部文献では異なる意味で使用されているので注意されたい。

ドに存在する配列のバリエーションを意味する。本稿で紹介する多くの手法では、まず得られたリードをもとにバリエントを特定し、各バリエントのリード数をカウントしている。バリエントを取得するためによく使用されるソフトウェアとして、jMHC<sup>2)</sup>やMUSCLE<sup>3)</sup>がある。クラスターとは、類似した配列を一定の基準に従って分類した集合を指す。カバレッジは同じ領域が何回読まれたか（何リード存在するか）を表す指標である。例えばある領域の配列が10リード読まれた場合、その領域のカバレッジは10xと表現する。アーチファクトはシーケンスや解析時のエラーによって生じる偽の配列のことを指す。PCRキメラは、PCR反応時の鋳型乗り換えにより生じる、複数の鋳型DNAの融合配列を持つPCR産物である。本稿で使用する用語は、引用文献中では異なる意味で使われている場合があるため、引用文献に当たる際は注意されたい。

### 3. 各MHCタイピング法の解析方法

#### (1) ヒト以外の動物種のMHCタイピング法の特徴

ヒト以外の動物種のNGSによるMHCタイピングの報告例を表1に記載した。これらのMHCタイピング法

に特徴的な点として、多くの場合で、解析する領域が多型の集中する200–300塩基程度に局限されることが挙げられる。これは各動物種のリファレンスゲノムがヒトほど充実していないことが関係していると思われる。また、ハプロタイプごとにMHC遺伝子の数が異なる動物種が確認されているため、いずれの手法も遺伝子数の多様性に対応した検出法となっていることも特徴である。NGSプラットフォームに付属するマッピングソフトウェアを使用して精度良くタイピングすることも可能<sup>4)</sup>であるが、本稿ではヒト以外のMHCタイピングのために開発された特徴的な6手法を選び、その解析アルゴリズムの概略を紹介する(図2)。各手法ともNGSで産出されるデータにはシーケンスエラーを含んだリードが一定数含まれていることを前提としており、データ解析によっていかにしてアーチファクトを排除するかに注力している。

#### (2) Allele validation threshold method (AVT)

本法は、Galanらの手法<sup>5)</sup>をベースにZagalska-Neubauerらが改良した手法<sup>6)</sup>である。NGSのシーケンスエラーは低頻度でランダムに生じるという考え方に基づき、独立した2回のPCR産物をシーケンスし、

表 1 ヒト以外の動物種についての NGS を用いた MHC タイピングの報告例

| 著者                       | 発表年  | 生物種                                                                                                           | 手法                                                                                                                                                | 材料         | シーケンシングプラットフォーム    | サンプル数    | ターゲット領域                              | ターゲットサイズ         | 文献 |
|--------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------|----------|--------------------------------------|------------------|----|
| Zagalska-Neubauer et al. | 2010 | シロエリヒタキ<br>colared flycatcher<br>( <i>Ficedula albicollis</i> )                                               | Allele validation threshold method (AVT)                                                                                                          | DNA        | 454                | 237      | MHC class IIβ                        | 188 bp           | 6  |
| Sepil et al.             | 2012 | シジュウカラ<br>great tit<br>( <i>Parus major</i> )                                                                 | Allele validation threshold method (AVT)                                                                                                          | DNA        | 454                | 1532     | MHC class I                          | 212–221 bp       | 7  |
| Huchard et al.           | 2012 | ハライロネズミキツネザル<br>grey mouse lemur<br>( <i>Microcebus murinus</i> )                                             | Allele validation threshold method (AVT)                                                                                                          | DNA        | 454                | 665      | MHC class II DRB<br>MHC class II DQB | 276 bp           | 8  |
| Sommer et al.            | 2013 | バリドアトランティエ<br>Pallid Atlantic Forest Rat<br>( <i>Delomys sublineatus</i> )                                    | Replicated amplicon method (RA)                                                                                                                   | DNA        | 454                | 40       | MHC class II DRB                     | 228 bp           | 10 |
| Pavey et al.             | 2013 | レイクホワイトフィッシュ<br>lake whitefish<br>( <i>Coregonus clupeaformis</i> )                                           | Hierarchical clustering method (HC)                                                                                                               | DNA        | 454                | 151      | MHC class IIβ                        | 252 bp           | 12 |
| Lighten et al.           | 2014 | グッピー<br>guppy<br>( <i>Poecilia reticulata</i> )                                                               | Degree of change method (DOC)                                                                                                                     | DNA        | illumina           | 159      | MHC class IIβ                        | 209 bp           | 13 |
| Shiina et al.            | 2015 | カニクイザル<br>cynomolgus macaque<br>( <i>Macaca fascicularis</i> )                                                | 既知アレルの検出 GS Reference Mapper<br>新規アレルの検出 Sequencher                                                                                               | RNA        | 454                | 127      | MHC class I                          | 514 or 517 bp    | 4  |
| Grogan et al.            | 2016 | ワオキツネザル<br>ring-tailed lemurs<br>( <i>Lemur catta</i> )                                                       | Replicated amplicon method (RA) を改良                                                                                                               | DNA        | 454<br>Ion Torrent | 319      | MHC class II DRB                     | 171 bp           | 11 |
| Sebastian et al.         | 2016 | イトヨ *<br>Stickeback<br>( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )<br>グッピー *<br>Guppy<br>( <i>Poecilia reticulata</i> ) | Adjustable clustering method (AC)                                                                                                                 | DNA<br>RNA | 454<br>Ion Torrent | 92<br>13 | MHC class IIβ<br>MHC class II        | 213 bp<br>131 bp | 16 |
| Demasius et al.          | 2016 | ウシ<br>cow<br>( <i>Bos taurus</i> )                                                                            | RNA-seq                                                                                                                                           | RNA        | illumina           | 12       |                                      |                  | 17 |
| Biedrzycka et al.        | 2017 | スゲヨシキリ<br>sedge warbler<br>( <i>Acrocephalus schoenobaenus</i> )                                              | Allele validation threshold method (AVT)<br>Replicated amplicon method (RA)<br>Degree of change method (DOC)<br>Adjustable clustering method (AC) | DNA        | illumina           | 24       | MHC class I                          | 235–254 bp       | 18 |

\* 既報論文のデータを使用

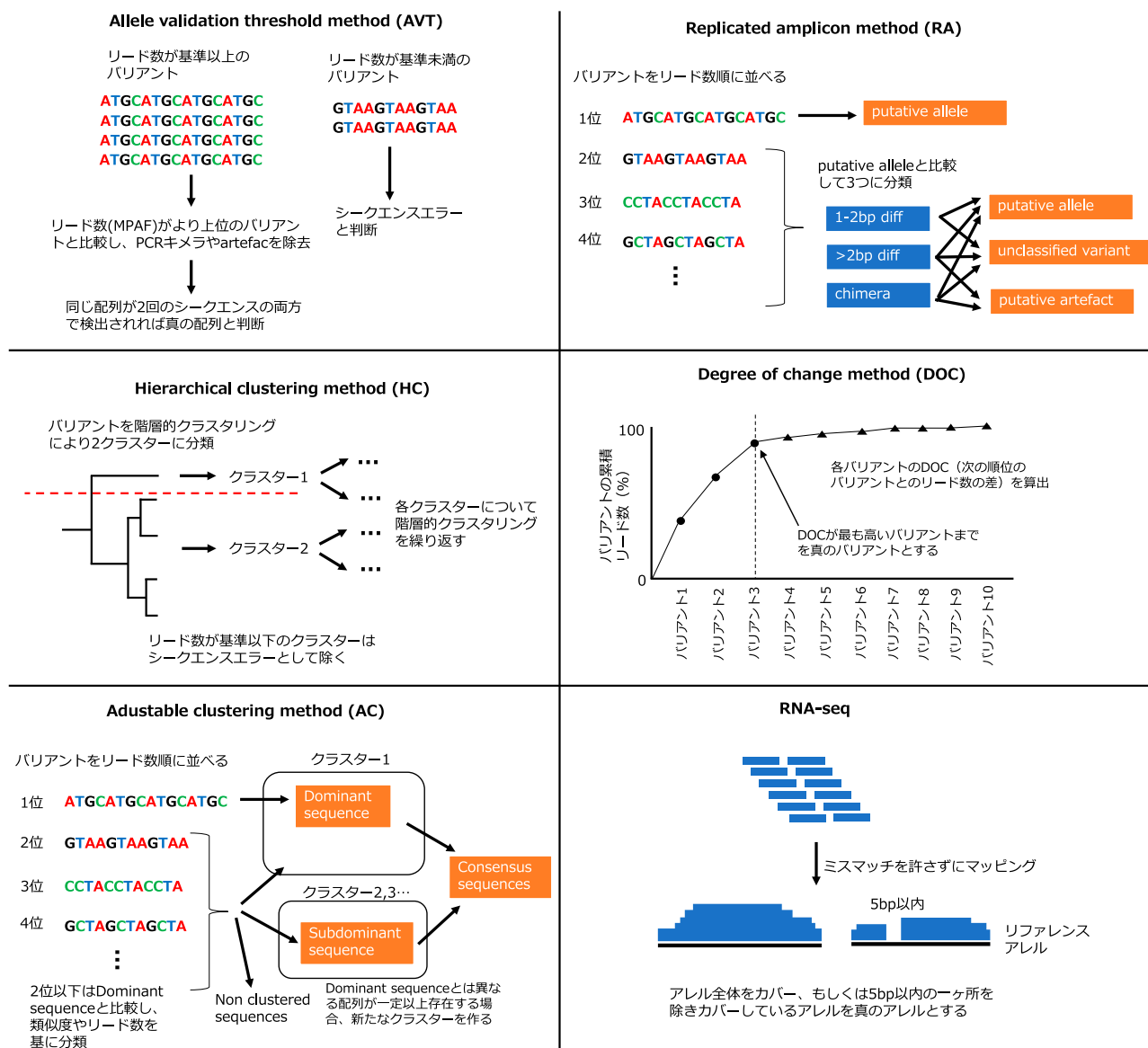


図2 ヒト以外の MHC タイピング用に開発された手法の解析アルゴリズムの概略

ヒト以外の MHC タイピングを目的として開発された手法のうち、代表的な6手法の解析アルゴリズムの概略を示す。いずれの手法も既存の NGS 用ソフトウェアを活用しながら、そこに独自の処理を追加することでアーチファクトを除いている。

両方で一定数以上のリード数が得られたバリエーションを真の配列であると判断する。Galan らが提唱した確率モデルでは、得られたバリエーションの確からしさは、(1) バリエーションの特定に必要な最低リード数、(2) 産出された全リード数、(3) 検出されたバリエーション数、の3つの因子により決定されるが、1つのバリエーションについて3リード得られればアーチファクトである確率は非常に低い ( $p < 10^{-8}$ ) と主張している (2-PCRs-3-copies-in-each criterion)。そのため、Zagalska-Neubauer らも同様に2回のシー

クエンスで3リード以上得られたバリエーションを候補としている。本手法を利用した他の報告でも、この確率モデルを元に必要なリード数を決定している (例えば、Sepil らは2リード<sup>7)</sup>、Huchard らは18リード<sup>8)</sup>)。上記基準を満たすバリエーションを取得した後、各バリエーションのリード数 maximum per amplicon frequency (MPAF) を算出する。各バリエーションはそれ自体より MPAF の大きいバリエーションと比較し、より頻度の高いバリエーション由来のアーチファクトや PCR キメラと考えられるものを除き、残っ

たものを検出されたバリエーションとする。この手法に対して Lighten らは、NGS のシーケンスエラーは実際にはランダムでなくエラーを生じやすい配列が存在する点、研究者ごとにバリエーションの確からしさの基準となる p 値を恣意的に変更して用いている点を批判している<sup>9)</sup>。

### (3) Replicated amplicon method (RA)

本法は 2013 年に Sommer らによって報告された手法<sup>10)</sup>で、2 回の独立した PCR 産物をシーケンスし、3 ステップの処理により候補アレルである “putative allele”, アーチファクトと考えられる “putative artefact”, 候補アレルともアーチファクトとも断定できない “unclassifiable variant” の 3 つに分類する。最初のステップでは、得られたリードからバリエーションを特定し、1 リードしか得られなかったバリエーションをアーチファクトとして除く。各バリエーションをリード数の順にならべ、最もリード数の多いバリエーションを putative allele とする。残りのバリエーションについては、他の複数のバリエーションの配列を含むものは PCR キメラとして chimera に分類する。chimera に分類されないものは、それよりリード数の多いバリエーションと比較し、最も類似度の高いバリエーションとの違いが 1-2 塩基であれば 1-2 bp diff, それ以上異なっていれば >2 bp diff に分類する。次のステップでは、2 回のシーケンス結果を比較し、両方に存在しないバリエーションは putative artefact と判断する。最後のステップでは、1-2 bp diff は他の putative artefact よりもリード数が多ければ putative allele として扱い、そうでなければ unclassified variant に分類する。>2 bp diff と chimera は、他の putative artefact よりもリード数が多いかどうか、または他の個体で putative allele として検出されているかを基準にして、putative allele, unclassified variant, putative artefact のいずれかに分類する。最終的に putative allele と unclassified variant を得られたバリエーションとして使用する。本手法も AVT 法と同様、アーチファクトは真の配列に比べ頻度が低いという考えに基づいてリードを処理している。また、アーチファクトを精度よく除くためにバリエーションを各分類に振り分ける条件を変更した改良法も報告されている<sup>11)</sup>。

### (4) Hierarchical clustering method (HC)

本法は、機械学習の手法を用いて配列を処理する方法<sup>12)</sup>であり、2013 年に Pavey らが報告している。統計ソフト R を使用してシーケンスから得られたバリア

ントの階層的クラスタリングを行い、得られた樹形図の最も深い node で 2 分割する。この時、得られたクラスターに含まれるリード数が基準以下であればアーチファクトとして除く。残った各クラスターは、得られる樹形図の最も深い枝の長さが基準値を超えるまで同様の処理を繰り返し、最終的に残った配列を検出されたアレルとする。各個体で検出されたアレルを統合したものをリファレンスとして、シーケンスで得られたリードを BLAST 解析し、各アレルのリード数をカウントする。

### (5) Degree of change method (DOC)

本法は 2014 年に Lighten らが報告した手法<sup>13)</sup>である。本手法では CNV モデルと DOC (Degree of change) 基準という 2 つの独自の手法を用いてタイピングを行う。本報告では両手法とも、リード数が上位 10 位までのバリエーションを解析に使用している。ここで 10 位までを使用したのは、解析対象であるグッピーの MHC class IIb の座位数が最大 3 であるとの報告<sup>14,15)</sup>を踏まえ、幅を持たせて 5 座位 (10 アレル) 決定すればよいと考えたためである。CNV モデルは式 (1) により定義され、アレル数や遺伝子座の数、CNV パターンを推定するために使用する。

$$E_{ij} = \left( \frac{D_i}{E(A_i)} \right) \times E(N_{ij}) \quad \text{式 (1)}$$

$E_{ij}$  は個体 i におけるアレル j のカバレッジの期待値、 $D_i$  は個体 i の上位 10 バリエーションのカバレッジの実測値、 $E(A_i)$  は個体 i の全アレルのコピー数の期待値、 $E(N_{ij})$  は個体 i におけるアレル j のコピー数の期待値である。例えば上位 10 バリエーションのカバレッジが 1000× で、二つ目の座位にホモ接合のアレル 1 ( $j_1$ )、二つ目の座位にヘミ接合のアレル 2 ( $j_2$ ) が存在するモデルを想定した場合、それぞれのアレルのカバレッジの期待値は  $E_{i1}=(1000/3) \times 2$ ,  $E_{i2}=(1000/3) \times 1$  となる。モデルの適合度は各アレルのカバレッジの期待値と実測値の差の二乗の総和で表し、上位 2 モデルの F 検定を行う。有意差があれば最も適合度の高いモデルを、なければより単純なモデルを採用する。

真のバリエーションとアーチファクトの境界を決定するために使用するのが DOC 基準である。順位 n 番目のバリエーションのリード数を  $C_n$  としたとき、n 番目の DOC は式 (2) により定義される。



$$DOC_n = \frac{c_n}{\sum c} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

この定義では次の順位のバリエーションとのリード数の差が大きいくほど、DOC は大きな値を取るようになる。全てのバリエーションの DOC を計算し、最も高い DOC 値を持つバリエーション（群）を検出されたアレルとし、それ以下のバリエーションをアーチファクトと判断する。この手法は真のアレルとアーチファクトの間にはリード数に大きな違いがあるという考え方を基に開発されており、DOC という独自に定義した基準を用いることにより、リード数が大きく変化する境目となるバリエーションを見つけている。また、本手法が他の手法と大きく異なる点として、解析に必要なパラメーターを事前に一切決める必要が無いことが挙げられる。これは、NGS のシーケンサーエラーの頻度や特徴は、シーケンサーの種類だけでなくサンプルや実験手法にも依存すると考えられることから、異なるサンプルで統一したパラメーターを設定することはふさわしくないとの考えによるものである。

#### (6) Adjustable clustering method (AC)

本法は2016年にSebastianらが報告した手法<sup>16)</sup>である。この手法ではNGSのシーケンサーには偏りがあり、同じエラーを有するリードが複数生じうるという前提に基づき処理を行っている。まず得られた各バリエーションのリード数をカウントする。リード数が最も多いバリエーションについて、予想されるPCR産物と塩基数およびopen reading frameが一致していれば、これをこの個体のメジャーアレルである“dominant sequence”とする。以降はリード数が多い順に各バリエーションを dominant sequence と比較し、その差異が dominant sequence のシーケンサーエラーに起因するものと考えられる場合（イルミナシーケンサー用のデフォルト条件はミスマッチ1%以内、挿入・欠失は0.001%以内）は dominant sequence のクラスターに加える。dominant sequence との差異がシーケンサーエラーによるものではないと考えられるリードについては、それが dominant sequence に対して一定の割合以上検出された場合、それを新たなメジャーアレルである“subdominant sequence”として新規クラスターを形成させる。以上の処理を全てのリードについて行った後、各クラスターに割り当てられたリードから最も頻度の高い配列を決定し、それを検出されたアレルとする。この手法はAMPLISASというウェブ上

の解析パイプラインが作られており、利用者は dominant sequence と比較する際のシーケンサーエラー率等の諸条件を変更することが可能である。

#### (7) RNA-seq

これまでのPCRベースの手法とは大きく異なり、RNA-seq から得られたデータを使用したMHCタイピング法をDemasiusらが2016年に報告している<sup>17)</sup>。まず、RNA-seqにより得られたリードをNGS用マッピングソフトウェアBowtieでマッピングする。この報告で対象としている動物種はウシであるが、そのリファレンスには塩基配列データベースであるIPD MHC (Immuno polymorphism Database MHC) から取得した古典的および非古典的 class I アレルの配列を使用している。この手法ではBowtieでミスマッチ無くマッピングされるリードのみ使用する。マッピングされたリードでアレルの全塩基がカバーされた場合のみ検出されたとみなし、カバーされていない塩基が存在するアレルは候補から除外される。ただし、ヒトと比べデータベースが充実していない動物種を対象としているため、新規アレルの存在を想定する必要がある。そのため、次に3塩基ミスマッチを許した緩い条件でマッピングを行い、各リードは最もマッピングクオリティが高いアレルに対してマッピングされたとみなして集計する。マッピングされたリードで全塩基がカバーされたアレル、もしくは5 bp 以内の一ヶ所を除きカバーされたアレルを新規アレルとみなし、Integrated Genome Viewer で可視化して、目視でその新規配列を決定する。PCRベースの解析では、使用したプライマーで増幅できないアレルは検出できないという重要な問題が存在するが、RNA-seqでは発現さえしていれば原理的にはすべてのアレルが検出可能である。一方で、RNA-seqはPCRベースの解析に比べリード数が必要となるためコストパフォーマンスは低下する。さらに、他の発現量の大きい遺伝子に埋もれてしまい検出感度が低下する可能性も否定できない。とはいえ、RNA-seqは広く普及しているアプリケーションであるため、主たる目的が発現量解析の場合に、同時にMHCタイピングも実施するのであれば利便性は高い。

#### (8) 手法の比較

ヒト以外を対象とした代表的なMHCタイピング法を紹介したが、いずれも解析対象となる動物種が異なるため、文献だけから各手法の優劣を判断するのは難しい。



そのような中, Biedrzycka らが AVT, RA, DOC, AC の 4 手法を同じデータセットを用いて解析した結果を報告<sup>18)</sup>しているため, それを紹介したい。彼らは, リード数が結果に与える影響も合わせて評価するために, 各サンプルのリード数を 500–20,000 の間の 7 種類にダウンサンプリングし, 各リード数について解析を行っている。その結果, 2000 リードまでは AVT, TA, AC の結果は 90% 以上一致したが, DOC は他の手法との一致率が著しく低かった。一方, リード数を増やすと DOC と他の手法との一致率は上昇し, 20000 リード時には RA と 88%, AC とは 91% 一致した。この報告は, 信頼性のある結果を得るためにはリード数が重要であることを示しているが, それ以上に重要なのは, 異なる手法によるタイピング結果が一致するのは 90% 程度という点であろう。この一致率は解析する動物種や遺伝子領域により変化するものと思われるが, 現状は “No MHC typing technique is perfect”<sup>19)</sup> であり, 単一の手法だけに頼るのではなく, 様々な手法を組み合わせる必要があることを示唆している。

#### 4. 今後の展望

ヒト以外の MHC タイピング法について代表的なものを紹介したが, いまだに完璧なものは存在しない。NGS による MHC タイピングが困難な理由として, NGS のシークエンス精度が高くないことと, リード長が短いことの 2 点が挙げられる。しかし近年, Pac Bio や MinION シークエンサーの登場により, リード長に関しては著しい進展がみられる。Phase ambiguity が課題である MHC タイピングにおいて, 長いリードが得られることは非常に重要である。NGS による MHC タイピングの歴史を振り返ってみても, 現在は市場から撤退した Roche 社の 454 シークエンサーが当初は主流であったのは, その当時 454 が他のプラットフォームに比べ圧倒的にロングリードであったためであろう。現時点では, ロングリードタイプの NGS はショートリードタイプに比べると精度が低いため, ロングリードタイプを用いる場合でもショートリードタイプと組み合わせて MHC タイピングを行っている報告<sup>20)</sup>も見られる。しかし, いずれロングリードを第一選択として使用することがスタンダードになると思われる。我々は, NGS の更なる技術的進展を待ちながらも, 現在の技術で最大限の精度を引き出せ

るような動物 MHC タイピング手法の開発に取り組みたい。

利益相反：申告すべき事項なし

#### 参考文献

- 1) Bontrop RE: Comparative genetics of MHC polymorphisms in different primate species: duplications and deletions. *Hum Immunol* 67, 388–397, doi:10.1016/j.humimm.2006.03.007 (2006).
- 2) Stuglik MT, Radwan J, Babik W: jMHC: software assistant for multilocus genotyping of gene families using next-generation amplicon sequencing. *Mol Ecol Resour* 11, 739–742, doi:10.1111/j.1755-0998.2011.02997.x (2011).
- 3) Edgar RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797, doi:10.1093/nar/gkh340 (2004).
- 4) Shiina T, Yamada Y, Aarnink A, *et al.*: Discovery of novel MHC-class I alleles and haplotypes in Filipino cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) by pyrosequencing and Sanger sequencing: Mafa-class I polymorphism. *Immunogenetics* 67, 563–578, doi:10.1007/s00251-015-0867-9 (2015).
- 5) Galan M, Guivier E, Caraux G, *et al.*: A 454 multiplex sequencing method for rapid and reliable genotyping of highly polymorphic genes in large-scale studies. *BMC Genomics* 11, 296, doi:10.1186/1471-2164-11-296 (2010).
- 6) Zagalska-Neubauer M, Babik W, Stuglik M, *et al.*: 454 sequencing reveals extreme complexity of the class II Major Histocompatibility Complex in the collared flycatcher. *BMC Evol Biol* 10, 395, doi:10.1186/1471-2148-10-395 (2010).
- 7) Sepil I, Moghadam HK, Huchard E, *et al.*: Characterization and 454 pyrosequencing of major histocompatibility complex class I genes in the great tit reveal complexity in a passerine system. *BMC Evol Biol* 12, 68, doi:10.1186/1471-2148-12-68 (2012).
- 8) Huchard E, Albrecht C, Schliehe-Diecks S, *et al.*: Large-scale MHC class II genotyping of a wild lemur population by next generation sequencing. *Immunogenetics* 64, 895–913, doi:10.1007/s00251-012-0649-6 (2012).
- 9) Lighten J, van Oosterhout C, Bentzen P: Critical review of NGS analyses for de novo genotyping multigene families. *Mol Ecol* 23, 3957–3972, doi:10.1111/mec.12843 (2014).
- 10) Sommer S, Courtiol A, Mazzoni CJ: MHC genotyping of non-model organisms using next-generation sequencing: a new methodology to deal with artefacts and allelic dropout. *BMC Genomics* 14, 542, doi:10.1186/1471-2164-14-542 (2013).
- 11) Grogan KE, McGinnis GJ, Sauter ML, *et al.*: Next-generation genotyping of hypervariable loci in many individuals of a non-model species: technical and theoretical implications. *BMC Genomics* 17, 204, doi:10.1186/s12864-016-2503-y (2016).
- 12) Pavay SA, Sevellec M, Adam W, *et al.*: Nonparallelism in

- MHCII $\beta$  diversity accompanies nonparallelism in pathogen infection of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) species pairs as revealed by next-generation sequencing. *Mol Ecol* 22, 3833–3849, doi:10.1111/mec.12358 (2013).
- 13) Lighten J, van Oosterhout C, Paterson IG, *et al.*: Ultra-deep Illumina sequencing accurately identifies MHC class IIB alleles and provides evidence for copy number variation in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Mol Ecol Resour* 14, 753–767, doi:10.1111/1755-0998.12225 (2014).
  - 14) van Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM: Evolution of MHC class IIB in the genome of wild and ornamental guppies, *Poecilia reticulata*. *Heredity* (Edinb) 97, 111–118, doi:10.1038/sj.hdy.6800843 (2006).
  - 15) Van Oosterhout C, Joyce DA, Cummings SM, *et al.*: Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution* 60, 2562–2574 (2006).
  - 16) Sebastian A, Herdegen M, Migalska M, *et al.*: AMPLISAS: a web server for multilocus genotyping using next-generation amplicon sequencing data. *Mol Ecol Resour* 16, 498–510, doi:10.1111/1755-0998.12453 (2016).
  - 17) Demasius W, Weikard R, Hadlich F, *et al.*: A novel RNAseq-assisted method for MHC class I genotyping in a non-model species applied to a lethal vaccination-induced alloimmune disease. *BMC Genomics* 17, 365, doi:10.1186/s12864-016-2688-0 (2016).
  - 18) Biedrzycka A, Sebastian A, Migalska M, *et al.*: Testing genotyping strategies for ultra-deep sequencing of a co-amplifying gene family: MHC class I in a passerine bird. *Mol Ecol Resour* 17, 642–655, doi:10.1111/1755-0998.12612 (2017).
  - 19) Knapp LA: Denaturing gradient gel electrophoresis and its use in the detection of major histocompatibility complex polymorphism. *Tissue Antigens* 65, 211–219, doi:10.1111/j.1399-0039.2005.00368.x (2005).
  - 20) Fuselli S, Baptista RP, Panziera A, *et al.*: A new hybrid approach for MHC genotyping: high-throughput NGS and long read MinION nanopore sequencing, with application to the non-model vertebrate Alpine chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Heredity* (Edinb) 121, 293–303, doi:10.1038/s41437-018-0070-5 (2018).

## Non-human MHC genotyping methods using next generation sequencing

Kousuke Tanimoto<sup>1)</sup>, Taeko K Naruse<sup>2)</sup>, Akinori Kimura<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Genome Laboratory, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

<sup>2)</sup>Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

Genotyping methods for non-human MHC by using next generation sequencing (NGS) require different approaches from the HLA genotyping, because the structure of non-human MHC genes is quite different from the human MHC and lack of sufficient reference information. In this review, we will introduce representative NGS-based MHC genotyping methods for non-human species, focusing on data analyses of sequence data obtained for non-human MHC.

**Key Words:** next generation sequencing (NGS), MHC genotyping, bioinformatics

### 第3回 関東HLA研究会記録

会 期：2019年5月18日（土曜日）

会 場：東海大学高輪キャンパス

世話人：中島 文明

日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

## HLAの基礎講習-1 HLA検査の日常

小山 暁史, 杉本 達哉

東海大学医学部付属病院 臨床検査技術科輸血室

近年、ハプロ半合致移植の増加や臓器移植後のHLA抗体検査の保険適応によりHLA検査の需要が高まっている。HLAタイピング検査は血清学手法からDNAタイピングへ移行し、判別できるアレルが飛躍的に増加した。HLAタイピング検査では目的に合った正確な結果を臨床側に報告しなければならないが、そのためには使用する方法の特徴や限界を理解することだけではなく、HLA分子の遺伝様式の理解なども重要となる。また、検査工程における過誤の防止や精度管理等もHLAタイピング精度を向上させるためには重要である。HLA抗体検査は、複数の会社から試薬が販売されており抽出HLA抗原や精製HLA抗原をマイクロビーズに固定し、フロー

サイトやLuminexにより測定する方法が一般的である。しかし試薬や方法によりカットオフ値や判定基準が異なり、用いる試薬により結果が異なることがある。そのためHLAタイピング検査と同様に方法の特徴を良く理解することが重要となる。また、輸血領域や移植領域といった検査目的によっても結果の解釈に差が生じる。このようにHLA検査ではまず目的を良く認識し、結果の解釈に際してはHLAの特徴を理解することが重要となる。今回は当院で行っているHLA検査の流れから結果を理解するうえで必要と思われる基礎知識のポイントを踏まえて講演を行う。

## HLAの基礎講習-2 HLA抗体のIgGサブクラスとエピトープ解析

高橋 大輔

日本赤十字社中央血液研究所

HLA抗体検査は蛍光ビーズ法の普及により検出感度が向上し、Single beads (SAB) 試薬により誰でも容易に抗体特異性の同定が可能となった。しかし、一方で検査結果が正しく評価・解析され、臨床現場に誤解なく伝わっているかはいまだ疑問が残る。この理由として、HLA抗体検査には他のイムノアッセイとは異なる独特なシステムがあるためと考えられる。

通常のイムノアッセイは抗原と抗体の関係が1対1であり、検査結果は明瞭なことが多い。しかし、HLAは異なるHLA抗原間で抗原決定基(エピトープ)を共有しているため、一つの抗体が複数のHLA抗原型と反応する場合が通常である。しかも、一つのHLA抗原型に

は複数のエピトープが存在している。我々が扱う検体は多種の抗原刺激を受けていることが多く、多数のエピトープに対する抗体が混在している場合がほとんどである。さらに厄介なことに、SAB試薬はアロ特異性を持たないHLA様抗体をも検出するため、HLA抗体検査の解釈はさらに複雑でわかりにくくなる。このような特徴からHLA抗体の解析には、エピトープ単位の抗体特異性を考慮した手法が有用な手段の一つとなる。また、近年では臓器移植分野において、IgGサブクラスや補体結合能といった抗体の機能も注目されており、今後はエピトープだけでなく抗体の機能といった広い視点で結果の解釈が要求されると考えられる。

本講演では HLA 抗体の多様性とエピトープ解析手法 介する。  
について概説し、HLA 抗体検出の基本的な考え方を紹

## HLA の基礎講習 -3 HLA タイピングに関する情報検索

中條 聖子

株式会社エスアールエル マーケティング部 マーケティング企画課

HLA DNA タイピングは、遺伝子関連検査のひとつで、HLA 型を分類する遺伝子検査技術であり、造血幹細胞移植、臓器移植、血小板輸血、疾患感受性の確認などに汎用されている。HLA 遺伝子の対立遺伝子(アレル)は、IPD-IMGT/HLA データベースに登録されており、これまでに 21,000 以上のアレルが登録・公開されている。新規に登録される HLA アレルは未だに増加の傾向にある。

現在、HLA DNA タイピング法には、PCR-rSSO 法、SSP 法、SBT 法などが用いられ、それぞれ利点と欠点がある。HLA アレルを最終的に判定するためには、複数の検査方法を組み合わせて報告結果を導き出す必要があ

る。年々増加する登録 HLA アレルの判定に対応するためには、より精度、解像度の高い NGS-SBT 法による HLA DNA タイピングが国際的に広がっていくものと予想される。変動の激しいゲノム医療において、常に新しい情報を入手、確認しておくことは、重要である。

本講習会では、遺伝子関連検査、HLA DNA タイピングに関する情報検索について日本組織適合性学会等の学会、関連団体の情報・データベースサイトをご紹介します。

HLA DNA タイピングの精度を維持、向上するために、検査担当者や指導者は、本講習会でご紹介する情報を含め、常に新しい情報を入手、活用して、次世代遺伝医療に貢献できる人材育成に繋げて頂きたい。

## シンポジウム -1: HLA と臨床 免疫ゲノム学の進歩と造血細胞移植における組織適合性

一戸 辰夫

広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野  
広島大学病院 血液内科

20 世紀の後半に人類史上初めての「再生医療」として誕生した同種造血細胞移植の治療成績の向上には、免疫ゲノム学の発展が大きな役割を果たしてきた。その代表とも呼べる HLA 遺伝子の DNA タイピングは多型ゲノム領域の「高精度な分類法」であったが、現在では、NGS や第 3 世代シークエンスの登場により、非翻訳領域を含めた HLA 遺伝子全領域の配列を決定可能な技術

に進化を遂げている。海外の造血幹細胞バンクでは、すでにこれらの新しいシークエンス技術による HLA 遺伝子や KIR 遺伝子のタイピングが日常的に用いられており、日本骨髄バンクにおいても本年から患者確認検査とドナーオプショントップ検査への NGS-SBT 法の導入が予定されている。また、今後の造血細胞移植の発展に重要な新規のテクノロジーとして、T 細胞受容体 (TCR) と B 細胞



胞受容体 (BCR) の網羅的免疫シーケンス法を紹介しておきたい。免疫シーケンスは、ゲノム DNA あるいは RNA 由来の cDNA をテンプレートとして、V-(D)-J 再構成領域の PCR 増幅を行い、アムプリコンシーケンスにより検体中に含まれる TCR/BCR のクロノタイプを網羅

的かつ定量的に同定する技術である。本法を用いれば、移植前後の TCR/BCR レパトアの「フィンガープリント」を経時的に取得することが可能であり、今後、GVHD やウイルス感染症等の先制的なモニタリングに活用されていくことが期待される。

## シンポジウム -2: HLA と臨床 腎移植臨床における HLA 検査の重要性

小林 孝彰

愛知医科大学 医学部 外科学講座 (腎移植外科)

組織適合性検査や免疫抑制療法の進歩、患者管理技術の向上などにより、移植成績はかなり向上した。生体腎移植では5年生着率が95%近くになっており、現在の課題は長期成績である。長期成績のさらなる改善には、ドナー特異的 HLA 抗体 (DSA: donor specific HLA antibody) による慢性抗体関連型拒絶反応 (antibody-mediated rejection: ABMR) の制御が不可欠となっている。すなわち、移植前では過去の輸血、妊娠、移植などにより感作され、ドナーに反応する既存 HLA 抗体 (Pre-existing (preformed) DSA) を、移植後は新規に産生される HLA 抗体 (de novo DSA) をいかに高感度で効率的に検出するかが重要なポイントである。さらに、移植前の検査費

用は移植手術費用に含まれるが、移植を実施しない場合には保険請求できないため患者負担となる。一方、移植後の HLA 抗体検査は、平成 30 年度 (昨年度) から保険収載され、基本的に年 1 回のスクリーニング (陽性の場合には特異性検査により DSA 有無の判定) が可能となっている。このようなことを踏まえて、日本の腎移植医療の現状と、臨床現場で移植前と後にどのような検査が必要とされ、実施されているかを紹介し、精度の高い組織適合性検査がますます重要となっていることを示したい。最近、EPITOPE ミスマッチと新規 HLA 抗体産生との関連が話題となっており、臨床的意義と将来の課題についても言及する。

## ワークショップ -1 蛍光ビーズ法を用いた補体結合性抗体の検出ワークショップ

中島 文明

日本赤十字社 中央血液研究所

蛍光ビーズ法を用いた HLA 抗体の測定では、抗ヒト IgG の蛍光値 (nMFI) を指標に判定評価され、臨床医にとって数値で示すことは利便性が高いと受け入れられてきた。移植・輸血医療における臨床評価との比較検討を重ねてきた結果、どの分野においても適正なカットオ

フがなかなか定まらず混迷している。このような状況で、nMFI 値のみで評価する手法に留まらず、プロゾーン回避のための抗体希釈系列による検討、イムノグロブリン・サブクラスによる検討、HLA 抗原発現量の差異、補体結合性抗体による検討など臨床成績に近づけるための

様々な検証がされている。特に、補体結合性 DSA の回避は、移植・輸血医療において有効性が高いという論文が数多く公表されている。しかしながら、日本組織適合性学会が主催する QC ワークショップでは、補体結合性抗体の検査結果は皆無という状況で、日本国内ではこの手法が浸透していないと考えられる。

今後、この検査が潮流となる可能性もあることから、補体結合性抗体の検出ワークショップを企画し実施した。まずは、抗ヒト IgG との結果の違いを体験してもらい、同時に複数施設の参加で施設間差を確認した。この手法を取り入れてデータを蓄積していくことが今後の臨床評価につながると期待する。

## ワークショップ-2 ナノポアシーケンサー MinION に関するワークショップ

細道 一善<sup>1)</sup>, 奥平 裕子<sup>2)</sup>, 岩内 陽子<sup>1)</sup>, 榊屋 安里<sup>2)</sup>, 猪子 英俊<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 金沢大学 医薬保健研究域医学系 革新ゲノム情報学分野

<sup>2)</sup> ジェノダイブファーマ (株)

Oxford Nanopore 社から販売されたナノポアシーケンサー MinION は手のひらにのるほどコンパクトな筐体、という見た目のインパクトだけでなく、長いリード長が得られること、ランまでの作業が簡便であること、リアルタイムで産出されるデータを速やかに取得できること、など多くの技術革新が詰まった新たな原理に基づくシーケンサーである。特に、長い読み取り長は HLA アレルの塩基配列の組み合わせによるアンビグイティの解消には大きなアドバンテージがある。一方で、塩基配列の読み取り精度はその他の NGS に比べて劣るとされており、クリニカルグレードの精度を担保するための

評価が必要といえる。そこで、MinION を使った HLA タイピングを実際に体験することを通して、その操作性やデータの質を議論する実習を 14 施設 21 名の参加者で開催した。本ワークショップでは実習での作業の流れ、それぞれの工程での所要時間、MinION の操作、得られたリードデータ、さらにはそれを用いた HLA タイピング結果を紹介する。全体を通しての所要時間は 5 時間程度であり、1 フローセルで 11 遺伝子、7 サンプルを解析したところ、2 時間のラン時間で得られたデータ量で HLA タイピング解析は可能であり、課題は残るものの、将来的に迅速診断の実現が期待できる結果であった。

## 一般口演発表-1 PCR-rSSO 法における PCR 産物の保存安定性の確認

宮城 徹, 植木 純一, 岡崎 晃士, 山際 裕子, 安藤 萌, 松橋 美佳, 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】PCR-rSSO 法は多くの検査施設で HLA タイピングに採用されている。検査業務効率化の観点から、PCR の翌日以降にハイブリダイゼーションを実施することが望ましい場合もあるため、PCR 産物の保存可能期間に

ついて確認した。

【目的】PCR-rSSO 法における PCR 産物の保存安定性を確認する。

【方法】WAKFlow HLA タイピング試薬 (クラス I, 湧永

製薬)を使用した。献血者8人分の検査残余DNAを検討に用いた。各検体のPCR産物4ウェル分を混合して5°Cで保存し、PCR当日、1日後、2日後、3日後、5日後に各検体3ウェルずつハイブリダイゼーションを実施した。経時変化の評価には3ウェルの中央値を使用した。蛍光値100未満のデータはばらつきが大きいため解析対象外とした。

【結果】5日後とPCR当日の比は、平均0.97、最大1.2、最小0.7であった。5日後とPCR当日の解離が大きかつ

たプローブについて、蛍光値の経時的な変化を確認したが、連続的な上昇や下降は認められなかったため、5日後まで安定だと考えられた。

【考察】今回の結果から、金曜日の午後に受理した検体を当日中にPCRで増幅し、ハイブリダイゼーションは翌週に実施するといった運用が可能と考えられる。また、ハイブリダイゼーションで操作ミスなどが発生した場合に、PCR後5日までであればPCR産物を用いた再検査が可能であると考えられた。

## 一般口演発表-2

### TRALI症例におけるFFPEを用いた患者HLAタイピングについて

高田慎之介<sup>1)</sup>, 鎌田 裕美<sup>1)</sup>, 内田みゆき<sup>1)</sup>, 清水まり恵<sup>1)</sup>, 高橋 大輔<sup>1)</sup>, 榎本 克彦<sup>2)</sup>, 斎藤 宏文<sup>2)</sup>,  
中島 文明<sup>1)</sup>, 宮田 茂樹<sup>1)</sup>, 五十嵐 滋<sup>1)</sup>, 面川 進<sup>3)</sup>, 佐竹 正博<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

<sup>2)</sup> 日本赤十字社 秋田赤十字病院

<sup>3)</sup> 日本赤十字社 秋田県赤十字血液センター

【背景】我々は輸血関連急性肺障害 (TRALI) などの副作用症例について精査試験を実施している。今回、特殊な検体を用いて TRALI 症例の HLA 遺伝子型検査を経験したので報告する。まず原因製剤は男性献血者由来 Ir-PC-LR10 で、HLA 抗体を調べたところ、補体結合性 A26 に対する抗体が検出された。この男性献血者が保有する HLA 抗体は性状解析がなされ、既に報告している (26th JSHI O-10 : 鎌田)。しかし、患者 HLA 型の確認がされていなかったことから、補体結合性 A26 抗体の影響について明確な結論がなされていない。

【目的】本実験ではホルマリン固定パラフィン包埋組織切片 (FFPE) を用いて HLA 遺伝子型検査を実施し、補体結合性 A26 抗体の関連を確認する。

【方法】FFPE より抽出したゲノム DNA に含まれる ssDNA よりライブラリーを作製し NGS キャプチャー法を用いて精査を行った。

【結果及び結論】患者 HLA 型は A26, A31 であると認められた。原因製剤に含まれる補体結合性 A26 抗体により TRALI が発症した可能性が極めて濃厚であると確認された。

【考察】患者検体が入手困難である場合、遺伝子検査で FFPE を用いることは有効な手段であることが確認された。しかし、FFPE より抽出されるゲノム DNA はサンプルごとに性状が異なると想定される為、適応性に富む実験方法が必要であると考えられた。

## 一般口演発表 -3

## Updates on HLA &amp; KIR imputation network (HKimpnet)

Seik-Soon Khor<sup>1)2)</sup>, Xiuwen Zheng<sup>3)</sup>, Mei-Hsuan Lee<sup>4)</sup>, Mary Carrington<sup>5)6)</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>1)2)</sup>, HLA & KIR imputation network (HKimpnet)<sup>1)6)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Japan.

<sup>2)</sup> Genome Medical Science Project (Toyama), National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan.

<sup>3)</sup> Department of Biostatistics, University of Washington, Seattle, WA, USA.

<sup>4)</sup> Institute of Clinical Medicine, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan.

<sup>5)</sup> Basic Science Program, Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, MD, United States.

<sup>6)</sup> Ragon Institute of the Massachusetts General Hospital, Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Boston, MA, United States.

Statistical imputation of HLA alleles has become a routine in fine-mapping of GWAS studies. HLA & KIR imputation network (HKimpnet) is a non-profit consortium with the aim of consolidating population specific references from the world populations. We and other research groups have emphasized the importance of having population specific references in order to achieve high accuracy HLA & KIR imputation. Currently, only HLA references of major populations are available to the community and more coordinated efforts are needed to accelerate research in the HLA & KIR field. There are several software packages available for HLA imputation and HIBAG is consistently reported to deliver high accuracy HLA imputation. Moreover, HIBAG generates the reference consisting only of SNP information needed for imputing a wide range of HLA alleles. Recently, we have developed a new algorithm

named KIBAG (KIR Genotype Imputation with Attribute Bagging) for the high accuracy imputation of KIR copy number from GWAS dataset. Both internal validation and external validation of KIR copy number imputation were performed and average accuracies of 97.9% and 95.7% were obtained respectively across 16 KIR genes. Currently, there are data of > 10,000 individuals for HLA reference building and of > 3,800 individuals for KIR reference building deposited into HKimpnet. The primary aim of HKimpnet is to generate accurate and reliable population specific imputation references from GWAS data for identifying novel associations of HLA/KIR polymorphisms with a wide range of diseases. Re-examination of GWAS with HLA class I associations or GWAS with SNP peaks in the KIR region may reveal novel HLA-KIR associations.

## 一般口演発表 -4

## 抗ドナー抗体陽性患者に対する腎移植

石田 英樹, 海上 耕平, 古澤美由紀, 石塚 敏

東京女子医大 移植管理科 泌尿器科

われわれは抗ドナー抗体が強陽性の腎臓移植において、2011年より通常の免疫抑制法に加えガンマグロブリンの大量投与をおこなっている。免疫抑制治療は通常

の3剤の免疫抑制剤、抗CD25抗体（シムレクト）、抗CD20抗体（リツキシマブ）、血漿交換に加え高用量（2g～4g/kg）のガンマグロブリンを移植前に投与してい

る。経過中、免疫抑制剤の投与とともに抗ドナー抗体の抗体価は着実に低下し、全例において初尿が認められ、透析を離脱している。同プロトコール開始後5年以上が経過したが、患者生存率および移植腎生着率ともに抗ド

ナー抗体陰性の腎移植患者と比較しても遜色はない。しかしながらプロトコール生検において抗体関連型拒絶反応の発生率は有意に高かった。当科で施行した抗ドナー抗体陽性患者に対する腎移植成績について発表したい。

## 一般口演発表 -5 リンパ球クロスマッチ検査の基礎的検討

石塚 敏<sup>1)</sup>, 藤田 龍司<sup>1)</sup>, 小林 悠梨<sup>1)</sup>, 安尾美年子<sup>1)</sup>, 石田 英樹<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学, 中央検査部, 移植関連検査室

<sup>2)</sup> 東京女子医科大学, 移植管理科 泌尿器科

【はじめに】リンパ球クロスマッチ検査は、ドナー由来の移植臓器と共に移入される抗原に対してレシピエント自身が特異的に反応する抗体を有しているか否かを *in vitro* で確認する検出法である。この検出法は、1960年代 complement-dependent cytotoxic crossmatch (CDC-XM), 1980年代 flow cytometry crossmatch (FCXM), 1990年代には精製 HLA 抗原を用いた enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA), 2000年代には Solid-phase assay と変貌を遂げてきた。その中で、日本臓器移植ネットワークは、現在 CDC-XM を重要視されている。昨年の日本移植学会・日本組織適合性学会の全血クロスマッチ QCWS において CDC-XM 補体反応時間が 14 施設で 120

分、9 施設で 60 分と施設によって反応時間に相違があることが確認された。そこで、我々は CDC-XM 補体反応時間について基礎的検討を行ったので報告する。

【対象および方法】対象は、抗 HLA 抗体陽性血清を用い CDC-XM, FCXM-C1q および C1qScreen について測定を行った。

【結果および考察】CDC-XM の補体反応時間 60 分では 120 分よりも陽性率が低いことが確認された。ドナー特異的な補体結合性のある抗体は、低力価であっても液性拒絶に強く関与する可能性があるため統一した測定手順が必要であると考ええる。

抄録集

### 第3回 東海北陸 HLA 研究会抄録集

日 時：2019 年 7 月 14 日（日）（午後 2 時～）

会 場：名古屋第一赤十字病院 内ヶ島講堂

〒453-8511 名古屋市中村区道下町 3 丁目 35 番地

（TEL: 052-481-5111（代表））

当番世話人：宮村 耕一（名古屋第一赤十字病院 造血細胞移植センター センター長）

研究会事務局：愛知医科大学医学部 腎移植外科 内



## 当番世話人基調講演

## 臓器移植，造血細胞移植，逆の視点，共通の視点から

宮村 耕一

名古屋第一赤十字病院 造血細胞移植センター

臓器移植と造血幹細胞移植が本邦に導入されてからおよそ半世紀の歴史がある。臓器移植は患者側の同種免疫による反応による移植臓器の拒絶が，造血幹細胞移植では移植されたドナー免疫細胞の同種免疫による移植片対宿主病（GVHD）が最大の問題となり，それをいかにコントロールするかが最も大きなテーマとして進歩してきた。ここには共に Calcineurin Inhibitor の導入による大きな進展があった。一方腎移植で起こる拒絶のミラー現象である腎臓の GVHD がほとんど起こらないのは不思議である。このような免疫抑制状態の中で行われる両移植は共に感染症の克服が次の大きな問題であった。アデノウイルス 11 型による腎移植後の出血性膀胱炎の報告後，当院においても造血幹細胞移植後に起こることの証明に繋がった。さらに免疫抑制剤を始めとする治療関連毒性への対応も共通した課題である。ドナー選択においては，造血幹細胞移植においては健康なドナーからのみ行われるが，臓器移植は欧米に比較するとはるかに少ないが，死体臓器から移植を行えるところに特徴がある。また HLA のバリアも臓器移植と，造血幹細胞移植では異なる。

限られたドナーという制限のある臓器移植では HLA 不適合でも積極的な移植を行ってきたが，造血幹細胞移植では当初より遺伝学的に完全に一致した同胞ドナーから行われたように，できる限り HLA を合わせていくように努力した。その延長上にあるのが骨髄バンクであり，現在 50 万人のドナーが登録され，多くの場合 HLA 適合ドナーを得ることができる。近年造血幹細胞移植では HLA のバリアを超えた試み，DSA への対応については臓器移植から学ぶことが多い。両移植に必要な MMF の保険適応は臓器移植で早くに認められ本邦へ導入され，これを臨床研究で使うことにより造血幹細胞移植の発展を陰で支えてきたが，最近になって造血幹細胞移植でも正式に使えるようになった。遺伝子増幅検査により診断とフォローが必要な感染性疾患は多々あるが，これらに対しては両学会が協力して保険承認を得るべきであろう。このように，臓器移植を中心とした学会である日本移植学会と造血幹細胞移植の学会である日本造血細胞移植学会が協働して解決する問題は多く，本研究会の役割も大きい。

## 特別講演

## 移植免疫と HLA

森島 聡子

琉球大学大学院 医学研究科 内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座（第二内科）

同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）では，HLA の不適合は重症 GVHD の発症リスクとなり，移植成績に多大な影響を及ぼす。GVHD の原因となる HLA のバリアを克服するために，大規模な患者とドナーの臨床情報及び HLA のータが整備されている非血縁者間造血細胞移植

（UR-HSCT）を中心に解析が行われてきた。日本骨髄バンクの解析では，HLA class I アリルの不適合及び HLA-DRB1 と DQB1 が同時に不適合の場合に重症急性 GVHD と死亡のリスクになる。HLA-DPB1 不適合は，生存には影響しないが白血病再発が減少する（Blood. 2015;

125: 1189–1197)。

最近、イギリスからは UR-HSCT を施行された患者とドナーの HLA 遺伝子の全領域の解析をレトロスペクティブに行い、従来の HLA タイピングでは判明しなかった不適合が移植後の生存に影響する可能性が報告された (Biol Blood Marrow Transplant. 2019; 25: 443–450)。我々は、HLA-DPB1 遺伝子のエキソン 3 から 3'UTR の高度に保存された領域が急性 GVHD と関係することを報告した (Blood. 2018; 131: 808–817)。今後日本人間の UR-

HSCT においても、非コード領域も含めた HLA class I, class II 遺伝子の多型情報の意義を検証する必要がある。

さい帯血移植では HLA2 抗原不適合移植まで許容され、近年 GVHD 予防法を工夫することで HLA 半合致移植も安全に実施可能であることが示されている。臓器移植においては、拒絶方向の免疫制御が重要であるが、allo-HSCT と比べて HLA のバリアは低い。本講演では移植免疫における HLA の意義について、発表者の研究成果や最近の知見も含めて紹介したい。

## 一般演題 O-1

### 肝移植症例における HLA eplet ミスマッチの影響 既存抗ドナー抗体陽性症例からの検討

○吉澤 淳<sup>1,2)</sup>, 菱田 理恵<sup>3)</sup>, 万木紀美子<sup>3)</sup>, 小倉 靖弘<sup>1)</sup>, 上本 伸二<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 名古屋大学医学部附属病院 移植外科

<sup>2)</sup> 京都大学医学部附属病院 肝胆脾・移植外科／小児外科

<sup>3)</sup> 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部

【目的】HLA に対する抗体の認識するエピトープに注目して、eplet のミスマッチ数 (MM) と腎移植の成績についての報告がされている。今回、我々は、術前 DSA 陽性肝移植症例について、epilet MM と術前 DSA および、拒絶反応への影響を検討した。

【方法】2010 年から 2015 年に京都大学で施行した肝移植症例のうち、Luminex 法で既存 DSA 陽性 29 例を対象とした。HLA matchmaker を用いて eplet MM を算定した。HLA Class I DSA 陽性症例は 12 例、HLA-DR DSA 陽性症例は 8 例、HLA-DQ DSA 陽性症例は 3 例、HLA Class I と DR に DSA 陽性症例は 3 例、HLA Class I, DR, DQ に DSA 陽性症例は 3 例であった。

【結果】eplet MM と既存 DSA : HLA Class I eplet MM と HLA Class I DSA ( $p=0.57$ )、および HLA-DQ eplet MM と HLA-DQ DSA について有意な相関は認めなかった。 $(p=0.82)$  HLA-DR eplet MM と HLA-DR DSA に相関あり。

$(p=0.467)$  epilet MM と拒絶反応：急性細胞性拒絶反応 (ACR) 症例は 10 例。HLA Class I eplet MM と有意な相関があり ( $p=0.0071$ )、HLA-DR+DQ の eplet MM と有意な相関を認めた。 $(p=0.0428)$  一方、HLA-DR eplet MM および HLA-DQ eplet MM には相関を認めなかった。 $(p=0.446, p=0.062)$  また、抗体関連型拒絶反応 (AMR) は 6 例。Epilet MM と AMR に有意な相関は認めなかった。HLA-Class I, DR, DQ に対する DSA と ACR 及び AMR に相関は認めなかった。

【考察】既存 DSA 陽性症例において、DSA と eplet MM に相関があった。De novo DSA と eplet MM との相関についても今後検討が必要である。今回検討した、前感作があり、拒絶を起こしやすいと考えられる症例で、eplet MM と拒絶反応に相関があった。肝移植においても eplet MM と拒絶反応の発生および予後の検討が必要である可能性が示唆された。

## 一般演題 O-2

## さい帯血移植における HLA ホモ接合ハプロタイプを有するさい帯血の生着と急性 GVHD へのリスク：同種 iPSC 移植・バンキングへの示唆

森島 泰雄<sup>1)2)</sup>, 森島 聡子<sup>3)</sup>, 村田 誠<sup>4)</sup>, 有馬 靖佳<sup>5)</sup>, 内田 直之<sup>6)</sup>, 杉尾 康浩<sup>7)</sup>, 高橋 聡<sup>8)</sup>,  
松橋 佳子<sup>9)</sup>, 鬼塚 真仁<sup>10)</sup>, 衛藤 徹也<sup>11)</sup>, 熱田 由子<sup>12)</sup>, 福田 隆浩<sup>13)</sup>, 一戸 辰夫<sup>14)</sup>,  
加藤 俊一<sup>10)</sup>, 諫田 淳也<sup>15)</sup>

<sup>1)</sup> 中部さい帯血バンク

<sup>2)</sup> 愛知医科大学

<sup>3)</sup> 琉球大学医学部

<sup>4)</sup> 名古屋大学医学部

<sup>5)</sup> 神戸神鋼病院

<sup>6)</sup> 虎ノ門病

<sup>7)</sup> 北九州市立医療センター

<sup>8)</sup> 東京大学医科学研究所

<sup>9)</sup> 川崎医科大学

<sup>10)</sup> 東海大学医学部

<sup>11)</sup> 浜の町病院

<sup>12)</sup> 日本造血細胞移植データセンター

<sup>13)</sup> 国立がん研究センター

<sup>14)</sup> 広島大学原爆放射線医科学研究所

<sup>15)</sup> 京都大学医学：日本造血細胞移植学会 HLA ワーキンググループ

【背景と目的】HLA ホモ接合体のハプロタイプ（ホモ HP）を有する iPSC 細胞からの移植が試みられている。さい帯血移植はこの iPSC 細胞移植の生着度を検証する良いモデルになる可能性がある。そこで、わが国のさい帯血バンクを介した単一さい帯血移植 5017 症例で、HLA-A ~ DRB1 ホモ HP ドナーの末梢血好中球の生着ならびに急性 GVHD の発症を解析した。

【方法】Competing risk regression 法を用い臨床変数で調整した。

【結果】1. ドナーホモ・患者ヘテロの組み合わせが 38 組見出された。HLA アレルの不適合数は HVG 方向は全例で 0 で、GVH 方向は 1 アレル不適合が 14 症例、2 不適合が 5、3 不適合が 19、4 不適合 1 であった。全例が好中球 500/cmm 以上に到達し、II 度以上と III 度以上の GVHD は 38 例中それぞれ 17 例と 3 例に発症した。

HLA 適合ドナーヘテロ・患者ヘテロの組み合わせ（n=236）に比べ生着は HR 1.18 p=0.2585 とほぼ同じで、II 度以上 GVHD の HR は 1.69 p=0.065 と高い傾向にあった。2. ドナーホモ・患者ヘテロの HLA HP を見ると、ドナー HP は 39 例中 37 例が conserved extended haplotype (CEH) として HLA 領域が高度に保存されている日本人特異的な HP（HP-1 n=18, HP-2 n=8, HP-3 n=7, HP-4 n=3, HP-5 n=1）であり、患者のヘテロ HP の一つはドナーのホモ HP を共有していた。また、この 39 ペアーは KIR ligand 適合の組み合わせであった。

【まとめ】ドナー HLA ホモ・患者 HLA ヘテロは全例生着していることから、HLA ハプロタイプホモ iPSC 移植で生着不全のリスクは高くならないと推測された。また、CEH を有する患者がホモ HP iPSC 細胞を得られやすいことが判明した。

## 一般演題 O-3

腎移植後 de novo DSA 産生を予測し得る、ドナー HLA 由来ペプチドと  
レシピエント HLA class II の複合体の検討

友杉 俊英<sup>1)</sup>, 岩崎 研太<sup>2)</sup>, 坂本慎太郎<sup>3)</sup>, 神田亜希子<sup>1)</sup>, 二村 健太<sup>1)</sup>, 岡田 学<sup>1)</sup>, 平光 高久<sup>1)</sup>,  
後藤 憲彦<sup>1)</sup>, 鳴海 俊治<sup>1)</sup>, 渡井 至彦<sup>1)</sup>, 小林 孝彰<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 名古屋第二赤十字病院 移植内科・移植外科・内分泌外科

<sup>2)</sup> 愛知医科大学 腎疾患・移植免疫学寄附講座

<sup>3)</sup> 名古屋第二赤十字病院 医療技術部臨床検査科

<sup>4)</sup> 愛知医科大学 腎移植外科

抗原提示細胞による、ドナー HLA 由来抗原ペプチドの提示は、de novo DSA (dnDSA) 産生の最初のプロセスである。近年ある特定の HLA class II とペプチドから成る複合体が、それを認識する CD4 陽性 T 細胞を活性化、もしくは制御性 T 細胞を介して抑制することで、その後の抗体産生に影響を及ぼすことが示された。本研究では、de novo DSA 産生に影響を及ぼし得る donor-HLA-derived peptide and recipient HLA class II complexes (pHLAs) が存在すると仮定し、統計学的手法で検証した。当院および愛知医科大学にて実施した生体腎移植症例 536 例に対して、PIRCHE-II アルゴリズムを用いて pHLAs を各ドナー、レシピエントのペアでシミュレーションし、統計学的手法から dnDSA 産生に影響を及ぼし得る pHLAs を探索した。dnDSA 陽性群 (n=115) では、dnDSA 陰性群 (n=421) と比較して多くの pHLAs がシミュ

レーションされた。(PIRCHE-II score  $256.9 \pm 142$  vs  $206.0 \pm 140$ ,  $p < 0.05$ )。pHLAs のうち DRB1\*12:01/SFT-VQRRVQPKVTVY (recipient HLA class II/donor-HLA-derived peptide) は dnDSA 陽性群で多く ( $p=0.002$ )、de novo DSA 産生に影響を及ぼしている可能性が示唆された。一方で DRB1\*13:02/VVNITWLSNGHAVTE は dsDSA 陰性群で多く ( $p=0.011$ )、de novo DSA 産生抑制に関与している可能性が示唆された。〈考察〉Goodpasture 症候群の知見にて、特定の HLA class II と自己抗原ペプチドから成る複合体が、制御性 T 細胞を優位に活性化し、抗体産生を抑制することが示された。腎移植においてもこのような現象が確認できれば、新たな治療法の開発へとつながる。今後は症例数を更に重ね、in vitro においても pHLAs がレシピエント CD4 陽性 T 細胞の活性に影響を及ぼし得るか検証していく。

## 一般演題 O-4

## 当院における腎移植術前フローサイトメトリクロスマッチの精度管理の試み

丸山美津子<sup>1)</sup>, 西川 晃平<sup>2)</sup>, 橋口 裕樹<sup>3)</sup>, 松本 剛史<sup>1)</sup>, 大石 晃嗣<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 三重大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

<sup>2)</sup> 三重大学医学部附属病院 腎泌尿器外科

<sup>3)</sup> 福岡赤十字病院 移植センター

【緒言】当院は生体腎移植術前の組織適合性検査として、2015 年 11 月までは HLA Typing のみ実施していた。しかし、抗体陽性例などの症例に迅速に対応するため、院

内でのフローサイトメトリクロスマッチ (FCXM) および HLA 抗体検査を実施できる体制を確立してほしいとの要望があり検査を開始した。FCXM には標準方法

が存在せず、精度管理の方法や Cut off 値も施設によって様々であった。そこで、FCXM の院内で実施するとともに、外注検査が可能な福岡赤十字病院（以下、福岡と省略）にも検査依頼し、精度管理を行うこととした。【方法】2016年2月から2018年11月までに術前検査目的に施行した43回のFCXMを対象とした。前期21回、後期22回に分け、福岡の結果を基準として感度・特異度を解析した。【結果】当院陰性で福岡陽性であったのは、前期4回・後期0回であり、感度は前期42.9%・後期100.0%であった。また、当院陽性で福岡陰性は、前期

0回・後期3回であり、特異度は前期100.0%・後期77.3%であった。【考察】感度は前期より後期が高くなっているが、逆に特異度は低下していた。手技の向上および、二次抗体の保存方法や試薬の変更などが原因として考えられた。FCXMの結果は、手技や試薬の変化で変化しやすく、制度管理が重要であると考えられた。更に、FCXMの判定にはHLA TypingやHLA抗体検査の結果、それらの組織適合検査の特性や限界を踏まえ総合的に評価することが重要である。

## 一般演題 O-5

### 再生不良性貧血に対する非血縁者間同種骨髄移植後に EBV 関連リンパ増殖疾患を発症した一例

宮尾康太郎<sup>1)</sup>、加藤 智則<sup>1,2)</sup>、小原 史也<sup>1)</sup>、茂木 健太<sup>1)</sup>、若林 浩也<sup>1)</sup>、横田 裕史<sup>1)</sup>、桑野史穂美<sup>1)</sup>、  
竹内 裕貴<sup>1)</sup>、澤 ひとみ<sup>1)</sup>、稲垣裕一郎<sup>1)</sup>、澤 正史<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 愛知県厚生連安城更生病院 血液・腫瘍内科

<sup>2)</sup> トヨタ記念病院 血液内科

やや重症以上の成人再生不良性貧血（AA）で抗ヒト胸腺グロブリン（ATG）などの免疫抑制療法が奏功しない場合、同種造血幹細胞移植が考慮される。この場合、生着を向上し移植片対宿主病（GVHD）発症を抑制するためATGを用いた強力な免疫抑制を伴う移植前処置が選択されうる。一方ATGを用いた前処置は移植後リンパ増殖性疾患（PTLD: post-transplant lymphoproliferative disorders）発症リスクである。PTLDはEpstein-Barr virus（EBV）が再活性化し、感染したB細胞が腫瘍性増殖を来し致死的な移植後合併症である。本症例は41歳女性、ATGおよびシクロスポリンによる免疫抑制療法が無効で、HLA8/8座遺伝子型一致の非血縁者ドナーより同種骨髄移植を実施した。移植前処置はフルダラビン、シクロフォスファミドおよびATG（15 mg/kg）にて行い、移植後20日目に好中球生着、末梢血キメリズム100%ド

ナータイプを確認した。しかし移植後56日目にEBV-DNAが $3.0 \times 10^3$  copy/mlに増加した。同時期に抗菌薬不応性の発熱および増悪する肝脾腫、CD20陽性のクローナルな末梢血異型リンパ球増加を認めておりPTLDと診断した。プレドニゾロンに加え移植後62日目にリツキシマブを投与したが病勢改善なく、69日目に2回目のリツキシマブと化学療法（THP-COP療法）を行った。同日のEBV-DNAは $2.0 \times 10^5$  copy/mlに増加していた。その後病勢はさらに増悪し移植後76日目に死亡した。一般にPTLDの腫瘍細胞はドナー由来との報告が多いが、本症例にてPTLD発症後異型リンパ球出現時のキメリズムはレシピエント優位でありレシピエント由来と考える。本症例の経過から、移植前処置としてのATG至適投与量やリツキシマブ治療開始時期など検討が必要である。



## 一般演題 O-6

## ヒト化マウスを用いたドナー特異的抗体 (DSA) 産生モデルの構築

野田 貴幸<sup>1)2)</sup>, 岩崎 研太<sup>3)</sup>, 三輪 祐子<sup>3)</sup>, 小林 孝彰<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 愛知医科大学病院 薬剤部<sup>2)</sup> 愛知医科大学 医学部 腎移植外科<sup>3)</sup> 愛知医科大学 医学部 腎疾患・移植免疫学寄附講座

【目的】 Donor Specific HLA Antibody (DSA) は、抗体関連型拒絶反応の主たる原因であり、特に de novo DSA が引き金となるグラフト傷害は難治性である。早期診断・早期検出はもちろん、その治療法は現在の課題である。今回我々はヒト化マウスを用いた DSA 産生モデル構築を試みた。

【方法】 重症免疫不全である NSG マウスに、健常人由来末梢血 (PBMC)  $5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  cells を尾静脈より移入しヒト化マウスを作製した。ヒト細胞の生着は FCM で、マウスの生存は体重減少と脱毛を判定指標とした。HLA の異なる健常人 PBMC で複数回の感作後、IgM, IgG 量を ELISA 法で、抗 HLA 抗体を Luminex 法で測定した。

【結果】 マウス PBMC 中のヒト CD3 陽性細胞は、35 日目頃から著明に増え、GVHD 発症との関連を認めた。ヒト IgM, IgG 量は、感作 2 回以上で大幅に増加した。抗 HLA 抗体は、感作 5 回施行例で検出されたがその抗体価は血清中全 IgG 抗体量との相関はなかった。DSA は低値ながらも検出されたが、non-DSA も多く検出された。

【考察】 本実験で構築されたヒト化マウスを用いた感作実験により、DSA を検出することができた。しかし、ヒト細胞の生着・DSA 量など解決すべき課題も明らかとなった。安定した de novo DSA 産生の可能性を探る有用なモデルとするために、更なる検討が必要である。

## 一般演題 O-7

## Unc93B1 遺伝子多型と非血縁者間造血細胞移植後転帰

内野かおり<sup>1)</sup>, 水野 昌平<sup>1)</sup>, 堀尾 知弘<sup>1)</sup>, 水谷 元紀<sup>1)</sup>, 中村 文乃<sup>1)</sup>, 高杉 壮一<sup>1)</sup>, 花村 一朗<sup>1)</sup>,  
Lam Vu Quang<sup>1)</sup>, 小寺 良尚<sup>1)</sup>, J. Luis Espinoza<sup>2)</sup>, 鬼塚 真仁<sup>3)</sup>, 柏瀬 貢一<sup>4)</sup>, 森島 泰雄<sup>5)</sup>,  
福田 隆浩<sup>6)</sup>, 土岐 典子<sup>7)</sup>, 宮村 耕一<sup>8)</sup>, 森 毅彦<sup>9)</sup>, 森下英理子<sup>10)</sup>, 中尾 眞二<sup>10)</sup>, 高見 昭良<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 愛知医科大学病院 血液内科<sup>2)</sup> 近畿大学 血液膠原病内科<sup>3)</sup> 東海大学 血液腫瘍内科<sup>4)</sup> 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター<sup>5)</sup> 愛知県がんセンター 血液細胞療法部<sup>6)</sup> 国立がん研究センター中央病院 造血幹細胞移植科<sup>7)</sup> がん・感染症センター都立駒込病院 血液内科<sup>8)</sup> 名古屋第一赤十字病院 血液内科<sup>9)</sup> 慶応大学病院 血液内科<sup>10)</sup> 金沢大学附属病院 血液・呼吸器内科



造血細胞移植において、もっとも重要なのは HLA 適合性である。しかし、HLA 一致同胞間移植においてすら、移植後合併症は一定の確率で発症するため、非 HLA 遺伝子多型の影響も大きいと考えられている。Unc 93 homolog B1 (Unc93B1) は Toll-like receptor (TLR) 7 と TLR9 の核酸認識に関連する。さらに Unc93B1 は TLR7 と TLR9 の免疫応答バランスをもコントロールしており、自然免疫応答に重要な役割を果たしている。Unc93B1 rs308328 遺伝子多型は Unc93B1 の発現に関連することから、我々は、日本骨髄バンク協力の下、血液がん患者・ドナー 237 組を対象に、Unc93B1 rs308328 遺

伝子多型と非血縁者間骨髄移植後転帰の関連を後方視的に解析した。その結果、ドナーの Unc93B1 遺伝子多型が 3 年生存率を有意に改善させることがわかった。したがって、移植前にドナーの Unc93B1 遺伝子多型を決定すれば、最適ドナーの選択や、移植後の予後予測・早期治療介入に役立つ可能性がある。また、Unc93B1 自体が同種移植の成否に重要な役割を担っている可能性も考えられる。今後、Unc93B1 遺伝子多型の機能や同種移植後免疫構築・臓器機能における Unc93B1 の役割が解明できれば、ゲノム・分子標的治療法開発への発展も期待される。

## 一般演題 O-8

### HLA-DQ 抗体産生後に ClassI 抗ドナー抗体の産生と尿路感染により慢性活動性抗体関連拒絶を発症した女児例

田中 一樹<sup>1)</sup>, 日比野 聡<sup>1)</sup>, 藤田 直也<sup>1)</sup>, 小林 孝彰<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> あいち小児保健医療総合センター 腎臓科

<sup>2)</sup> 愛知医科大学 腎移植外科

症例は 16 歳女児。鰓弓耳腎症候群の腎尿路奇形として左単腎症、低形成腎を合併し 9 歳で末期腎不全により腹膜透析導入した。

11 歳 6 か月時に母親をドナーとした血液型不一致 R : B (+), D: O (+), HLA 3 mismatch, CMV (R-, D-) の生体腎移植を施行し、免疫抑制療法はプレドニゾロン (PSL), タクロリムス (FK), ミコフェノール酸モフェチル (MMF), バシリキシマブで導入した。

移植後 2 年 6 ヶ月時に Cre 上昇を認めたため移植腎生検施行し、急性 T 細胞関連拒絶を認めた。ステロイドパルス治療した後、HLA 検査を施行し HLA-DQB1 に対する抗ドナー抗体 (DSA) を MFI 24234 で認めた。抗体関連拒絶も合併していると考え血漿交換、大量  $\gamma$  グロブリン療法、リツキシマブで治療した。

移植後 3 年 8 ヶ月時に DQB1 に対する DSA の MFI は 22573 と高値のままであったが移植腎生検で拒絶を示唆

する所見は認めなかった。

移植後 4 年 1 ヶ月時に HLA-B59 に対する新規の DSA を MFI 7133 で認め、DQB1 に対する DSA の MFI は 22573 で高値であったが移植腎機能低下は認めなかった。

移植後 4 年 2 ヶ月、6 ヶ月時に尿路感染症を発症し、移植後 4 年 9 ヶ月時に腎機能低下を認め、HLA 検査を施行したところ、HLA-B59 に対する DSA は MFI 6706, DQB1 に対する DSA の MFI は 4992 と低下していた。移植腎生検で慢性活動性抗体関連拒絶 (CAAMR) を認めた。

本症例は DSA である DQ 抗体を移植後早期から認めており、経過で ClassI 抗体も加わり、感染症を契機に CAAMR 発症、DQ 抗体が移植腎に接着し MFI が低下したと考える。

この一連の経過を報告する。

## 一般演題 O-9

## ハプロ半合致移植について

尾崎 正英, 武田健一郎, 土門 洋祐, 石際 康平, 一木 朝絵, 岡部 基人, 川口 裕佳, 大引真理恵,  
松本 玲奈, 後藤 辰徳, 森下 喬允, 小澤 幸泰, 宮村 耕一

名古屋第一赤十字病院 血液内科

造血幹細胞移植は臓器移植と比較して HLA 不適合の壁が高く, HLA 不適合の移植については骨髓 (末梢血幹細胞) 移植では 1 座不適合まで, 臍帯血移植においては 2 座不適合までが, 一般臨床として行われている。一方, 血縁者間では同じハプロタイプを共有する HLA 半合致移植の試みが古くから行われてきたが, HLA が複数座異なることより, 重症の GVHD を発症するため T 細胞除去が行われてきた。近年になり, 移植後数日後に大量のエンドキサンを投与し, 同種反応性のリンパ球を患者体内から除去する post-CY という方法が行われている。

症例 1 15 歳男性, 右腎腫瘍と多発肺転移を認め, 腎臓摘出を行い, 病理で clear-renal-cell carcinoma と診断された。インターフェロン治療を受けるも, 進行したため,

東北大学倫理委員会の承認後, CY, フルダラビン, ATG, 少量全身照射の前処置後, 3 座不適合の弟より造血幹細胞移植を行った。しかし, 移植後も腫瘍は増大傾向があり, IL2 を投与したところ, 腫瘍は縮小し, その後数か月にわたり stable な状態となった。症例 2 52 歳女性。前医で汎血球減少を認め, 骨髓検査で急性骨髄性白血病と診断された。化学療法で完全寛解に至ったものの, 治療終了から 1 年で再発をきたし, 非寛解で同種移植を行なった。フルダラビン, プスルファン, 少量全身照射の前処置後, 3 座不適合の息子より骨髓移植を行った。GVHD 予防は, 移植後 day3, 4 に大量エンドキサン, タクロリムス, ミコフェノール酸モフェチルを使用した。移植後, 完全寛解に至った。その後 2 年に渡り寛解を維持している。

## 一般演題 O-10

## 術前クロスマッチ検査の再検を要した DSA 陽性生体腎移植の 1 例

斉藤 尚二<sup>1)</sup>, 丸山 彰一<sup>1)</sup>, 藤田 高史<sup>2)</sup>, 加藤 真史<sup>2)</sup>, 栃木 宏介<sup>2)</sup>, 石田 昇平<sup>2)</sup>, 舟橋 康人<sup>2)</sup>,  
松川 宜久<sup>2)</sup>, 後藤 百万<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋大学 医学部 腎臓内科

<sup>2)</sup>名古屋大学 医学部 泌尿器科

症例は 64 歳女性。原疾患不明の腎不全に対して, 夫をドナーとした生体腎移植を希望して当院を受診した。3 歳時に弁膜症といわれた以外, 特記すべき既往歴はなかったが, 3 回の妊娠歴を有していた。血液型は B 適合で, HLA-A, B, DR は 5 ミスマッチであった。CDC クロスマッチは T 細胞, B 細胞ともに陰性であったが, FCXM は T 細胞陽性, B 細胞陰性であった。しかしながら, HLA 抗体同定検査では A26, B52 に対するクラ

ス I 抗体 (いずれも DSA, MFI はそれぞれ 1562 と 2254) と, DR4, DR16, DR18, DQ5, DP2, DP11 に対する複数のクラス II 抗体 (いずれも non-DSA, 一番高い MFI は DR4 で 1328) が検出されたため, High volume センターの他施設へ再度クロスマッチ検査を依頼した。結果, FCXM は T 細胞陰性, B 細胞陽性, HLA 抗体同定検査で B52 に対するクラス I 抗体 (DSA, MFI4221) と複数のクラス II 抗体 (non-DSA) を検出した。

移植術4週前からグラセプター 0.1 mg/Kg, セルセプト 500 mg, プレドニン 10 mg を開始し, 手術3週前にリツキサン 300 mg 投与, 手術2週前にグラセプターを 0.15 mg/Kg, セルセプト 1500 mg, プレドニン 20 mg に増量した。手術11日, 9日, 7日前にDFPPを施行し, 手術5日前から連日4日間IVIGを行い, 手術前日に全血漿交換およびリツキサン 200 mg を追加投与して手術に臨んだ。

術後1日目の夕方から尿量が減少し, 利尿剤で尿量を確保する状態となった。術後2日目にHb 7 g/dl の貧血と血小板 7 万 / $\mu$ l への低下を認め, 臨床的に抗体関連型の拒絶反応を疑い, 血漿交換療法, IVIG およびステロイドパルスを開始した。血漿交換は連日二日間, IVIG

は連日5日間 (一回 20 g), ステロイドパルスはm PSL 500 mg を3日間投与した。術後6日目ごろから血小板の増加, 血清クレアチニン値の低下を認めた。この間, 術後より発症した心房細動や, ドレン脇からの出血に対して並行して処置を要した。

腎移植後1時間での移植腎生検所見では異常を認めず, 術後18日目に行った移植腎生検ではABMR 疑い, 術後3ヶ月と1年で行った移植腎生検でもABMR 疑いであった。

現在術後から1年9か月経過したが, 血清クレアチニン値は0.98 mg/dl, eGFR は44 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, 尿たんぱくは0.07 g/日と安定しているため, 抗体スクリーニング検査を行い慎重に経過観察中である。

## 【日本組織適合性学会 MHC 投稿・執筆規定】 (2019 年 2 月 12 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：**筆頭著者および責任著者は本学会会員であり、その他の共著者も、原則として、本学会会員に限る。ただし、MHC 編集委員会が非会員に執筆を依頼した総説については、その限りでない。

**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、所属施設等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。

**利益相反の開示：**MHC に原著論文もしくは総説を掲載する場合には、利益相反事項について開示しなければならない。

**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）。

※論文の構成や形式等について疑問や不安等がある場合には、MHC 編集委員会がアドバイス等に対処可能であるため、投稿規定の末尾にある連絡先まで連絡されたい。

### II. 原著執筆書式

#### 1. 執筆要項

12,000 字（刷り上がり 12 頁程度）以内とする。ただし、図、表、写真は、1 点につき概ね 400 字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、図説は本文の最後に記載する。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、責任著者（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>, Kiyomi 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—1：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, 投稿レ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」, 「謝辞」, 「利益相反事項の開示」, 「引用文献」, 「図説」の順に記載する。

- ①専門用語以外は常用漢字, 新かな遣いに従い記述する。
- 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,  $\mu$ l, %, °C など) を, 数字はアラビア文字を用いる。単位と数字の間には半角スペースを入れる。
- 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—2：英語での投稿

- ・2 頁目に 250 words 以内の要旨, キーワード (5 語以内) を記載する。
- ・3 頁目より, 「Introduction」, 「Materials and Methods」, 「Results」, 「Discussion」, 「Acknowledgements」, 「Disclosures」, 「References」, 「Legend to Figures」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,  $\mu$ l, %, °C など) を, 数字はアラビア文字を用いる。単位と数字の間には半角スペースを入れる。
- 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—3：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 (先頭のみ大文字とし, 他は小文字とする) 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. 利益相反事項の開示 (日本語, 英語いずれの場合とも)

学会 HP にある取り扱い (<http://jshi.umin.ac.jp/coi/index.html>) に掲載されている「COI があるとして申告する範囲に関する規則 (JSHI\_COI 規則)」を必ず参照し, 申告すべき利益相反事項がある場合には, COI 申告\_様式 2 を用いて申告すること。また, 論文等では本文の末尾で引用文献の前に, 以下を明記すること。



＊申告すべき利益相反事項がない場合  
(和文) 利益相反：申告すべき事項なし  
(英文) Disclosures: none to declare

＊申告すべき利益相反事項がある場合（事項に応じて記載する。以下は例示）

(和文) 利益相反：以下の利益相反事項があります。

本論文の内容に関連して、著者〇〇が△△社より受けた講演料（□円）

本論文に記載した研究は、〇〇社から受けた研究費（□円）による。

(英文) Disclosures:

〇〇(著者名) received a reward for lecture from (営利企業名)

This study was conducted by a research fund from (営利企業名)

## 7. 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。なお、引用論文の（号）については、原則として記載するものとするが、存在しないあるいは不明な場合には不記載を可とする。

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

6,000字（刷り上がり6頁程度）以内とする。ただし、図, 表, 写真は, 1点につき概ね400字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、図説は本文の最後に記載する。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「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

日本語、英語のいずれも可とする。概ね 6,000 ~ 12,000字（刷り上がり6 ~ 8頁）程度とし、利益相反事項の開示を含めて、上記の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とする。



## V. 原稿送付先

〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2  
 大阪大学大学院医学系研究科 J8  
 先端移植基盤医療学気付  
 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

|          | 総原稿枚数<br>(図表, 文献含む) | 図表数         | 文献数         | 要旨                                           | 原稿タイトル<br>所属, 著者 | キーワード<br>数 | 査読 | 著者<br>校正 |
|----------|---------------------|-------------|-------------|----------------------------------------------|------------------|------------|----|----------|
| 原著       | 30 枚以内              | 5~10個<br>以内 | 20 個以内      | 英文原著 英文 250 words 以内<br>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      |

## **Instructions to Authors** (updated on Feb. 19, 2019)

### **Submission**

MHC is the official journal of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI). The aim of this journal is to serve as a forum for the scientific information in the form of original and high quality papers in the field of major histocompatibility complex (MHC) and immunogenetics. Manuscripts, from basic to clinical research relating to MHC or immunogenetics, are accepted with the understanding that they are original unpublished work and are not being submitted elsewhere. Manuscripts should be written in Japanese or English. First author and corresponding author must be members of JSHI, while it is preferable for the other co-authors also to be JSHI members.

Ethics: Clinical and basic studies using human subjects and specimens obtained from humans must adhere to the 1980 Helsinki Declaration (adapted by the 18<sup>th</sup> World Medical Assembly) and must be approved by the ethics review board of each participating institution. Furthermore, animal studies must adhere to such guidelines.

Conflict of interest: All the authors must clearly declare any conflicts of interest according to the guideline of JSHI (<http://jshi.umin.ac.jp/coi/index.html>). Further information is available upon request.

Types of papers published: Original articles, reviews, series, short communications (including research and technical bulletins) and case reports are acceptable.

Review: The editorial board is responsible for the acceptance of all submitted papers based on a review by multiple referees. Based on the outcome of the review, the board may request corrections, omissions, or additions for publication in MHC.

Copyright: Papers that are accepted for publication become copyright of JSHI and will be made available electronically via the J-Stage platform (<https://www.jstage.jst.go.jp/>).

Fees: There is no fee for publication. However, authors will be responsible for the costs incurred for color photographs and special prints (please specify at submission if color printing is required).

Reprints: Costs incurred for reprints will be charged based on the number of copies and pages (please specify the number of reprints at the time of proofing).

**Manuscript (in English)****1. Original articles**Summary

Articles are limited to 4,000 words. Each figure, table, and photograph must be included on separate manuscript pages and must include a title. The location of tables and figures in the manuscript must be clearly stated in the main text. The main text must be submitted as a Microsoft Word file, tables as a Microsoft Word, Excel, or PowerPoint files, and figures and photographs as PowerPoint files. All files must be electronically sent as attached files via email to the editor-in-chief. If the authors would like to submit large size files (over 30 MB), the files should be saved on a CD-ROM, which is to be submitted by mail to the editor-in-chief with one printed copies of the manuscript. Alternatively, the large size files may be submitted via a high volume file transfer service. In that case, the authors must contact the editorial office (indicated on the last page of this instruction) before submission.

First page

The first page is the title page, which must clearly state that the submitted article is an "Original article" and include titles, and the name and affiliation of each author. Include the address, name, telephone number, fax number, and email address of corresponding author at the bottom of the title page. Follow the example shown below for the title, author names, and affiliations:

**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>, Kiyomi 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

Main text

- The second page must contain an "Abstract" no more than 250 words in length, followed by key words (no more than five).

- Starting on the third page, the main text begins with the "Introduction" and is followed by the "Materials and Methods", "Results", "Discussion", "Acknowledgments", "Conflict of Interest", and "References" sections, in this order.
- Geographic, human, and scientific names are listed in their original languages. Use generic names for drugs with commercial names in parentheses.
- Indicate units and quantities using Arabic numbers followed by international units (cm, ml, g, kg, pg, l, %, °C, etc.).

### References

References should include names of authors (last names first); title of article; title of journal (abbreviate according to the style of *Index Medicus*) or book; volume number; location and name of publishing company (book only); first page, year of publication. For references with more than three authors, list the first three, followed by "et al.". See the examples below:

#### *Journal.*

Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, et al.: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* 127: 233-238, 2005.

#### *Book.*

Katz DH: *Lymphocyte Differentiation, Recognition, and Regulation*. New York, Academic Press, 1997

#### *Chapter in a book.*

Tongio M, Abbal M, Bignon JD, et al. ASH#18 : HLA-DPB1.

Charron D (ed): *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication*. Paris, EDK, 1997

## **2. Short communications (including research and technical bulletins) and Case reports**

### Summary

Short communications are limited to 1,500 words. For other information, please see "Summary" section of "Original articles" described before.

First page

The first page is the title page, which must clearly state that the submitted article is a "Short Communication" or "Case report" and include titles and the name and affiliation of each author. Include the address, name, telephone number, fax number, and e-mail address of the corresponding author at the bottom of the title page. Follow the example shown below for the title, author names, and affiliations:

Main text

- Short communications and case reports do not require an abstract.
- After the second page, follow the same guidelines for the third and subsequent pages of original articles as described.

**3. Reviews, Series, and Others**

As a general rule, reviews and series are written by invitation from the editorial board; however, submission by JSHI members is strongly encouraged. The editorial board determines the total number of pages, but in general a manuscript of no more than 3,000 words is preferable. As a general rule, reviews and series follow the format for original articles.

**Editorial Office and Mailing Address**

Manuscripts should be submitted to the Editor-in-Chief at the Editorial office:

Editor-in-Chief: Prof. Akinori Kimura

Editorial office:

The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics Journal, MHC

c/o Department of Advanced Technology for Transplantation

J8, Faculty of Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University

2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

E-mail: [tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp](mailto:tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp)

Tel: +81-6-6879-3746

Fax: +81-6-6879-3749

## 編集後記

今年も猛暑かつ台風到来のシーズンを迎えておりますが、会員の皆様方にはお元気で、お仕事に従事されておられることと存じます。

MHC 第 26 巻 2 号では、大会の教育講演を兼ねる認定 HLA 技術者講習会のテキストを、木村彰方先生、中島文明先生ならびに木村貴文先生の 3 名の講師の先生方に御執筆を頂きました。技術者講習会に関しましては、この数年間に整備され好評を博しております初心者講習会と相まって、その内容を認定 HLA 技術者をめざす若手の会員の皆様方にとって、従来にもまして有意義なものとする方針で、優れた講演のプログラムが組まれております。また谷本先生には、「ヒト以外の動物種の MHC タイピング法」に関します、優れた総説を御執筆いただきました。

日本組織適合性学会の地方会の最古参である、近畿地方会は来年の 3 月の集会で 18 回を迎え、さらに新設されました関東 HLA 研究会ならびに東海北陸 HLA 研究会は、ともに今年度に第 3 回目の学術集会を終え、各地区において組織適合性に関します活発な学術活動が行われていることは、学会の今後の発展にとって力強い推進力となるものと期待いたしております。

最近、組織適合性の研究に大きな貢献をされました、John A Hansen 先生と辻公美先生が相次いで、ご逝去されましたことは誠に残念でございます。お二人の御冥福を心より、お祈り申し上げたいと存じます。それでは、最後に 9 月に小林孝彰大会長が名古屋で御主催になられます、素晴らしいプログラムを擁する第 28 回日本組織適合性学会大会での活発な学会活動を祈念して、編集後記とさせていただきます。

西村泰治

## 日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報や HLA 遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

<http://square.umin.ac.jp/JSHI/index.html>

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

## 学会事務局からのお知らせ

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

委託業務は以下の通りです。

入退会手続

届け出事項の変更手続き

年会費請求手続き

学会誌等の発送

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

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

また、これらに関するお問い合わせ、届け出については、学会事務支局 Email:[jshi@nacos.com](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

〒113-0033 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

Tel & Fax : 03-5802-2907

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

## 事務支局

〒602-8048

京都市上京区下立売通東入ル  
中西印刷株式会社 学会部内  
日本組織適合性学会事務支局

電話 : 075-415-3661

FAX : 075-415-3662

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