

抄録集

### 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について概説し、HLA抗体検出の基本的な考え方を紹介する。

## 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ナル検査への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。