

第5回 関東HLA研究会記録

会 期 : 2022年6月4日(土曜日)

開催方法 : Zoom Webinar で実施

世 話 人 : 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

HLA 関連基調講演-1

組織適合性検査を知ろう～HLA タイピング、抗HLA抗体検査、クロスマッチの基礎～

吉田 雅弥（熊本赤十字病院検査部）

組織適合性検査は移植医療、人類遺伝学、疾患感受性など多くの領域で実施されている。臓器移植においては、移植後の抗HLA抗体検査が保険収載されて以降、組織適合性検査を実施する施設が増加しているが、組織適合性検査は検査者のスキルと専門的な知識が必要となる。HLA タイピングはDNAを利用した検査が主流となり、手技の習得と併せて検査環境の整備が正しい結果を出すために重要である。抗HLA抗体検査は結果の解釈がポイントとなり、ドナー特異的抗体(Donor Specific Antibody; DSA)の有無は移植成績に影響するため、慎重な判断が求められる。クロスマッチは顕微鏡以外に高額機器を必

要としないリンパ球細胞障害試験(Lymphocyte cytotoxicity test; LCT)やフローサイトクロスマッチ(Flow Cytometry Crossmatch; FCXM)などがある。LCTは補体結合性抗体を検出することが可能であるが、検出感度に劣り、IgM抗体の影響を受ける。また、FCXMは検出感度に優れるが、非特異反応による偽陽性やリツキサンなど薬剤の影響を受ける。検査者はHLAタイピング、抗HLA抗体検査、クロスマッチの特徴を理解し、総合的に判断する能力が求められる。今回、組織適合性検査の基礎を中心に講演するとともに、腎移植施設である当院で経験した症例も紹介する。

HLA 関連基調講演-2

HLAの概要

高橋 大輔（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

HLAはヒトゲノムの中で最も多型に富み、免疫応答を制御する重要な要素の一つである。HLAタイピング技術は蛍光ビーズ法の登場により飛躍的に進歩し、さらにNGS法の普及により新規アレルも指数関数的に増加した。新規アレルの増大は、ambiguityの増加や異なるHLAタイピング法の間で生じる報告結果の違いを生じさせ、結果を受け取る臨床医を混乱させている。また、HLA抗体検査においても、蛍光ビーズ試薬の普及により、簡便かつ高精度な検査を可能となった。特に、シングル試薬は、これまで不明瞭であった抗体特異性を高感度に同定することを可能とし、輸血や移植医療に有益な情報をもたらした。しかしながら、蛍光ビーズ試薬には自然抗体の影響や蛍光強度の考え方など、今なおいくつかの

課題が存在しているのが現状である。このように、HLA関連検査は大きく進歩しているものの、正しい検査を行い、検査結果を臨床現場に適切に伝えるためには、頻度情報やハプロタイプ、適切な表記法といったHLAの基礎知識だけでなく検査法の特性的理解や外部および内部精度管理などを行うことが求められる。また、近年ではHLA抗体判定における対立遺伝子レベルのタイピングの有用性やエピトープレベルでの解析やHLA発現レベルの違いといった従来とは異なる適合性評価のアプローチも広がりつつある。

本講演では、HLAの基礎から検査に必要な知識に加え、エピトープマッチングや抗体の性状を測定する意義について概説する。

ワークショップ-1

HLA 関連検査精度管理の実際

小山 暁史 (東海大学医学部附属八王子病院 臨床検査技術科)

HLA 関連検査とは抗HLA抗体検査やHLAタイピング検査など多岐にわたる。検査の結果は輸血細胞治療や移植医療など臨床上重要な指標となる。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、Luminexやフローサイト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。HLAタイピング検査は血清学的手法からDNAタイピング(遺伝子検査)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が重要となる。2018年に施行された『医療法等の一部を改正する法律』により遺伝子関連検査には責任者の配置や内部精度管理(義務)や外部精度管理(努力義務)など適切な精度管理を求められている。しかしHLA関連検査の特殊性や実施施設の少なさから、精度管理項目や方法に関する情報は少ないため苦慮するところである。本講演では東海大学医学部附属病院の事例や構想を紹介しながら、精度管理の実際について解説を行う。

ワークショップ-2

HLA 関連検査精度管理の課題

黒田 ゆかり (日本赤十字社九州ブロック血液センター)

平成30年12月1日施行の改正医療法では、検体検査を実施する場合における精度の確保のために設けるべき基準が明確化され、内部・外部精度管理が重要視されている。また、日本組織適合性学会が年に1回開催するQCワークショップは昨年で第25回と長い歴史があり、その位置付けは認定資格取得から外部精度管理へと変化し重要なプログラムとなっている。

HLA関連検査は、生化学検査等とは異なり検査工程の多くが手技によるものであるため個人差や施設間差が出やすく、精度管理の意義は大きい。QCワークショップでは、解析担当者が検査結果だけでなく各施設から提出された測定データを詳細に解析し技術的な側面についても解析

報告しており、参加施設は参加する(Do)だけではなく評価(Check)からどのような改善(Action)を行っているかが重要である。DNAタイピングで主流のSSOにおいては、誤判定に繋がる要因となるコンタミネーションや反応不良などのデータが毎年見られ、改善(Action)方法を見いだせない施設があることを示唆していると考えられる。毎年、誤判定施設はゼロにならないが、誤判定は移植医療において重大な問題である。正確な結果の報告には、方法原理、試薬の特性、HLAに関する知識を持ちながら安定した技術を必要とするが、QCワークショップから見える現状と課題について報告する。

教育セミナー：臨床とHLA-1

臓器移植とHLA

湯沢 賢治（国立病院機構水戸医療センター 臓器移植外科）

1964年に日系アメリカ人 Paul Terasaki が考案した「テラサキプレート」により確立したリンパ球細胞傷害試験 LCT (lymphocyte cytotoxicity test) により HLA の同定が可能となった。HLA の一致が臓器移植成績を良くすることが明らかになり、成績向上のために正確な HLA 検査と HLA を合わせての臓器移植が行われるようになった。1980年代になり、有効な免疫抑制薬が開発され、HLA が一致しなくとも移植が可能となり、本来 HLA が一致しない夫婦間でも生体臓器移植が行われるようになり、臓器移植における HLA の意義が低下した様にも思えた。

しかし、近年、抗 HLA 抗体の高精度・高感度の測定が可能となり、臓器移植後の抗 HLA 抗体が移植臓器の短期、長期生着に関わっていることが明らかになった。

そして、抗 HLA 抗体の除去、産生抑制により移植臓器の長期成績が改善されることが報告された。日本移植学会では「臓器移植抗体陽性診療ガイドライン 2018」を刊行し、これらの知見の普及に努めた。この結果、2018年4月から、抗 HLA 抗体（スクリーニング検査）および抗 HLA 抗体（抗体特異性同定検査）の測定が臓器移植後について保険収載になり、2020年4月からは移植前についても抗 HLA 抗体検査が保険収載された。臓器移植成績の向上のためには、正確な HLA 検査、抗 HLA 抗体検査が必要で、これらの進歩について詳説する。

臓器移植において HLA 検査に始まる組織適合性検査はきわめて重要である。

教育セミナー：臨床とHLA-2

造血幹細胞移植とHLA

鬼塚 真仁（東海大学医学部血液腫瘍内科）

同種造血幹細胞移植は移植されたドナーからレシピエントへの同種免疫反応が発生する点で臓器移植と大きく異なる。ドナーからの同種免疫反応は GVHD (graft-versus-host disease) として移植の成否を左右する重大な合併症と関連する一方で、自家造血幹細胞移植と比較して現病の再発率が低いことから GVL (graft-versus-leukemia) 効果にもなり得る。GVHD と GVL 効果、このバランスをいかに保つかは造血幹細胞移植医療の重要なテーマである。さらに、HLA タイピングの進歩によりこれまでの-A, -B, -C, -DR に加えて、-DQ や-DP 座の適合度も GVHD 発症と関連することが明らかとなりつつある。GVHD を完全に避けるためには HLA の一

致度を高めるべきだが、一方で GVL 効果も低下してしまう。さらに実臨床では、ドナー選定に難渋する症例は多く、よりベストな HLA 条件のドナーに選定しなおす余裕のない症例がほとんどである。移植を行うべきタイミングでベストなドナーが得られない患者の割合が高い現状において、詳細な HLA 情報は GVHD のリスクを正確に見積もる上で極めて重要な情報であり、GVL 効果を損なわない必要十分な移植前処置や GVHD 予防法を選択するのに不可欠といえる。詳細な HLA 情報をもとにどのように同種造血幹細胞移植が組み立てられるかを、エビデンスに基づいて示す。

一般演題-1

An Association Study of HLA with the Kinetics of SARS-CoV-2 Spike Specific IgG Antibody Responses to BNT162b2 mRNA Vaccine

Seik-Soon Khor¹, Yosuke Omae¹, Junko S. Takeuchi², Ami Fukunaga³, Shohei Yamamoto³, Akihito Tanaka⁴, Kouki Matsuda⁵, Moto Kimura², Kenji Maeda⁵, Gohzoh Ueda⁶, Tetsuya Mizoue³, Mugen Ujiie⁷, Hiroaki Mitsuya⁵, Norio Ohmagari⁷, Wataru Sugiura⁸, and Katsushi Tokunaga¹ (¹Genome Medical Science Project, NCGM, ²Department of Academic-Industrial Partnerships Promotion, Center for Clinical Sciences, NCGM, ³Department of Epidemiology and Prevention, Center for Clinical Sciences, NCGM, ⁴Department of Laboratory Testing, Center Hospital of the NCGM, ⁵Department of Refractory Viral Infection, Research Institute, NCGM, ⁶Division of Core Diagnostics, Abbott Japan LLC., ⁷Disease Control and Prevention Center, NCGM, ⁸Center for Clinical Sciences, NCGM)

BNT162b2, an mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine (Pfizer-BioNTech, New York, United States), is one of the most effective COVID-19 vaccines and has been approved by more than 130 countries worldwide. However, several studies have reported that the COVID-19 vaccine shows high interpersonal variability in terms of humoral and cellular responses, such as those with respect to SARS-CoV-2 spike protein immunoglobulin (Ig)G, IgA, IgM, neutralizing antibodies, and CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The objective of this study is to investigate the kinetic changes in anti-SARS-CoV-2 spike IgG (IgG-S) profiles and adverse reactions and their associations with HLA profiles (*HLA-A*, *-C*, *-B*, *-DRB1*, *-DQA1*, *-DQB1*, *-DPA1* and *-DPB1*) among 100 hospital workers from the Center Hospital of the National Center for Global Health and Medicine (NCGM), Tokyo, Japan. *DQA1*03:03:01* ($p = 0.017$; Odd ratio

(OR) 2.80, 95%confidence interval (CI) 1.05–7.25) was significantly associated with higher IgG-S production after two doses of BNT162b2, while *DQB1*06:01:01:01* ($p = 0.028$, OR 0.27, 95%CI 0.05–0.94) was significantly associated with IgG-S declines after two doses of BNT162b2. No HLA alleles were significantly associated with either local symptoms or fever. However, *C*12:02:02* ($p = 0.058$; OR 0.42, 95%CI 0.15–1.16), *B*52:01:01* ($p = 0.031$; OR 0.38, 95%CI 0.14–1.03), *DQA1*03:02:01* ($p = 0.028$; OR 0.39, 95%CI 0.15–1.00) and *DPB1*02:01:02* ($p = 0.024$; OR 0.45, 95%CI 0.21–0.97) appeared significantly associated with protection against systemic symptoms after two doses of BNT162b2 vaccination. Further studies with larger sample sizes are clearly warranted to determine HLA allele associations with the production and long-term sustainability of IgG-S after COVID-19 vaccination.

一般演題-2

腎移植患者後 SARS-CoV2 感染患者に対する抗体価の探索

海上 耕平^{1,3}, 大木 里花子^{2,3}, 古澤 美由紀³, 尾本 和也^{2,3}, 石田 英樹¹

(¹東京女子医科大学病院移植管理科, ²東京女子医科大学泌尿器科, ³ときわ会余丁町クリニック)

SARS-CoV2 による新型コロナウイルス感染症は全国的に流行しており重篤な転帰をたどる。特に移植患者は免疫抑制下のため感染の重症化が懸念されており、感染制御のためワクチン接種が行われているが、抗体獲得性低下が判明してきている。一方で、移植患者が感染した場合抗体獲得性は分かっていないことが多く、特に抗体価の推移は今後の加療の面で非常に重要である。

今回、東京女子医科大学病院に通院する腎移植後の感染患者 18 名において、網羅的かつ経時的に SARS-CoV-2 抗体価の測定 (LABScreen™ COVID Plus, One Lambda Inc) を行い、感染による抗体獲得性を調べ、さらに経時的な抗体測定を行うことにより、抗体価の減衰有無を調べたので報告する。

一般演題-3

検体の前処理が LABScreen Single Antigen の測定結果に与える影響

禿 蘭子¹, 山本 希², 藤原 千恵², 益尾 清恵², 横沢 佑弥², 木田 秀幸¹(¹札幌北楡病院臨床検査技術科, ²株式会社ベリタス)

抗 HLA 抗体検査において、検体中の阻害物質を除去するための前処理操作は重要である。発表者らは昨年、抗体スクリーニング検査試薬 LABScreen Mixed において前処理が測定結果に与える影響を評価した。一方、抗体同定検査試薬 LABScreen Single Antigen は LABScreen Mixed と同様の原理であるが、前処理が与える影響は確認されていない。今回は LABScreen Mixed で評価済の検体の一部を用い、検証を行った。

検体は匿名化した血清 14 検体を用い、前処理 3 種 (Adsorb Out (One Lambda)、FBS、3 種混合 (EDTA + DTT + FBS)) を実施した。試薬は LABScreen Single Antigen Class I および Class

II (One Lambda) を使用し、LABScan3D (Luminex) で測定した。測定データは HLA Fusion で解析し、結果の比較を行った。

未処理でメーカーの再検査基準に該当した検体は、全ての前処理によって NC ビーズ値が低下した。未処理で NC ビーズ値が 500 以上の場合、FBS・3 種混合処理で値が低下しない検体があった。陽性抗体ビーズの nMFI 値が高い場合、前処理の種類が nMFI 値及び判定に与える影響は少ないと考えられたが、nMFI 値が低い場合、前処理により蛍光値の低下率に差が見られ、抗 HLA 抗体パターンが変化する可能性が示された。

一般演題-4

HLA 抗体の臨床的意義について解釈に苦慮した 1 症例

今泉 満明¹, 安藤 理絵¹, 小山 暁史², 杉本 達哉¹, 豊崎 誠子¹(¹東海大学医学部附属病院輸血室, ²東海大学医学部附属八王子病院臨床検査技術科)

【はじめに】臓器及び造血幹細胞移植において、HLA 適合性や抗体特異性により治療選択やドナー選定がなされることから、これら検査の正確な判定とその解釈は重要である。今回、患者背景と検査結果から臨床的意義についての解釈に苦慮した症例を経験したので報告する。

【症例】患者は CKD のため妻をドナーとした先行的腎移植を希望し術前検査を実施した。結果は LCT (-), FCXM (-), HLA Typing と HLA 抗体検査の結果から preformed DSA [A*31:01 nMFI 10,433] の存在が示唆された。患者背景を調査したが同種免疫感作となる輸血や移植などのイベントはなかった。ドナーに出産歴があったため検体の取り違えを考慮し再検査を実施したが初回と同

様の結果であった。

【考察】preformed DSA と考えられるが、nMFI 10000 程度の HLA 抗体にも関わらず LCT や FCXM で陰性であること、特異性が狭いこと、免疫感作歴のない健常人に検出された HLA 抗体特異性の報告と一致することからも自然抗体の可能性も考えられた。またマイクロビーズ上の変性抗原による反応である可能性も考慮する必要がある。

【まとめ】今回、患者背景と術前検査の結果からその解釈に苦慮する症例を経験した。HLA 自然抗体については臨床的意義が低いとされているが、データの蓄積がないことから慎重に判断すべきである。また臨床検査サイドから臨床医への情報提供も重要である。

一般演題-5

腎移植前 DSA 陽性症例に併存する non-DSA のエプレット解析の 1 例

尾本 和也^{1,2}, 海上 耕平³, 神澤 太一², 古澤 美由紀¹, 田邊 一成², 高木 敏男², 石田 英樹^{2,3}
 (1医療法人社団ときわ会 余丁町クリニック, 2東京女子医科大学泌尿器科,
 3東京女子医科大学移植管理科)

【背景・目的】 DSA と同時に検出される Non-DSA (nDSA) の臨床的意義は不明な点が多い。今回その意義を明らかにできないか移植前 DSA ならびに nDSA を有する一症例に対してエプレット解析を行った。

【症例】 症例は 50 歳男性、ドナーは 46 歳妹。感作歴なく、CDC、FCXM 陰性で DR53 のみが DSA として検出 (nMFI: 1354)、その他、nDSA として: DQ7 (nMFI 5927), DQ2 (nMFI 3090), DQ4 (nMFI 2288) が検出されていた。DSA あるも nMFI が高値でないことからリツキシマブと DFPP による脱感作療法を行って移植手術を行った。

【経過】 術後 7 か月で AAMR を認め、同時期 dnDSA (DQ9, DR9) の出現を認めた。DSG による加療を

4 コース施行したが、術後 2 年において nMFI 20000 以上の既存 DSA、dnDSA、nDSA を認めてしまっている。nDSA (DQ8, 7, 4, 2) のエプレット解析を行ったところ 84QL といったエプレットがミスマッチエプレットであり、nDSA と思われた抗体は DSA として扱うべき抗体であった可能性が高い。

【結語】 症例を重ねる必要があるが、既存 DSA に併存する nDSA はエプレット解析を行い、認識するエプレットが存在する場合は DSA として判断し、術前脱感作を行うべきである。本症例の場合は脱感作に IVIG を併用すべきであったかもしれない。

一般演題-6

6. ABO 血液型不適合腎移植後に抗体関連型拒絶反応を呈した 1 例

小林 悠梨¹, 石塚 敏¹, 笹野 まゆ¹, 安尾 美年子¹, 三浦 ひとみ¹, 海上 耕平², 石田 英樹²
 (1東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室, 2東京女子医科大学移植管理科)

腎移植は、腎代替療法として広く普及し免疫学的ハイリスク症例も安全に施行されるようになってきた。しかし、稀に抗体関連型拒絶反応 acute ABMR により移植腎摘出せざるを得ない症例を経験する。本研究では、抗血液型 IgG 抗体を中心に flow cytometry 法による Total-IgG と 4 種類のサブクラス (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4) およびヒト補体 C1q に反応する IgG (Total C1q(IgG)) を検出し acute ABMR を引き起こした原因について検討を行ったので報告する。症例は、51 歳女性で母をドナーとした ABO 血液型不適合腎移植 (A+→0+) である。HLA 抗原は、1

haplo identical 以上で抗 HLA 抗体は術前陰性であった。術前 Rituximab と 4 回 DFPP を施行し、抗血液型抗体は術直前 IAT 法で抗 A-IgG×32 であった。術後 acute ABMR を引き起こし Eculizumab と IVIG を投与、腎機能の改善が見られず移植腎摘出せざるを得なかった症例である。抗血液型 IgG 抗体の経過推移をみると 0POD に比べ 9POD では MFI-ratio がすべてのパラメーターにおいて低下していた。そして、Total IgG が再度上昇した 11POD 付近では、特に IgG4 の上昇と Total C1q(IgG) の急激な上昇を認め 14POD において移植腎摘出となった。