

日本組織適合性学会誌

第31巻第2号 2024年8月7日発行

目次

2024年度認定HLA検査技術者講習会テキスト

基礎知識：認定制度筆記試験の解説とポイント整理 —初心に還って基礎の基礎から—	成瀬 妙子	53
NGS法によるHLAタイピング～その基礎から最新の知見まで～	尾崎 有紀	62
我が国の臍帯血バンクと臍帯血移植	森島 泰雄	69
第23回 日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集		78
第7回 関東HLA研究会記録		92
第7回 東海北陸HLA研究会		100
日本組織適合性学会誌MHC投稿・執筆規定		108
Instructions to Authors		114
編集後記		118

2024 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

基礎知識：認定制度筆記試験の解説とポイント整理 —初心に還って基礎の基礎から—

成瀬 妙子¹⁾

¹⁾ 長崎大学熱帯医学研究所 原虫学分野

1. はじめに

日本組織適合性学会が主催する HLA 検査技術者・組織適合性指導者認定制度は、組織適合性検査の技術、知識の向上、維持を目的とし、毎年大会時に認定のための筆記試験を実施している。併せて教育講演として開催される技術者講習会では、大会参加者の任意参加による模擬試験での「難問」とされる低正答率問題を取り上げ解説してきた。ここ数年は新型コロナウイルス (COVID-19) 感染拡大の影響により模擬試験は中止を余儀なくされたが、2023 年度は 3 年ぶりの模擬試験を開催した。そこで第 32 回大会での本講習会では、従来型に戻って模擬試験での低正答率問題について解説したい。

2. 2023 年度認定制度模擬試験 低正答率問題の傾向

さて、2023 年度の全試験問題と正解は、学会ホームページ¹⁾に、また難問とされた 19 題については、本誌に試験報告として解説を掲載している²⁾。模擬試験の受験者は従来より減少傾向であったものの、得点分布や平均点については前述の試験報告に掲載の通り、大差のない結果となっている。ただし、低正答率問題の傾向はこれまでと大きく異なり、従来は免疫学や統計学、倫理学系の問題が多かったが、今回は「HLA 学」の基礎事項で多くを占めていたことである。その原因の一つには、将来認定取得を志す、比較の実務経験の浅い会員が多いことも考えられたが、今回は従来よりも有資格者の受験が多かったことから、コロナ禍における「HLA 学」の

学習の機会喪失や集会参加などの情報収集の機会の減少にあるように思われた。さらに、最近では、移植における抗体検査のみに従事し、遺伝子型や抗原型タイピングを経験していない実務者が増加傾向にある。そこで本稿では、基礎の基礎に立ち戻り、19 題の難問の中から HLA に関する基礎問題 7 問を取り上げ、出題の意図や正解を導くためのポイントについて解説する。

3. 2023 年度模擬試験 低正答率問題解説

1) HLA 研究の歴史 (2 題)

問題 50. HLA に関連する以下の出来事のうち、誤っているものを a～e のうちから一つ選べ。

- リンパ球細胞傷害性試験 (LCT) 法の発明
- 第 6 回国際 HLA ワークショップでの HLA-D 特異性同定
- マウス H2 領域の発見
- G. D. Snell, D.B. Amos らがノーベル医学生理学賞を受賞
- PCR を用いた DNA タイピング法の普及

正解：d 正答率 25.5% (代表的な誤答：b)

【解説】 毎年問題をチェックしている会員には本問は記憶にあるかもしれない。なぜなら本問はここ数年に出題した過去問題を改変したものである。各選択肢は、MHC の発見から DNA タイピング法の普及までという、

受付日：2024 年 6 月 6 日、受理日：2024 年 6 月 6 日

代表者連絡先：成瀬 妙子 〒852-8523 長崎市坂本 1-12-4 長崎大学熱帯医学研究所 原虫学分野
TEL: 095-819-7838 E-mail: t-naruse@nagasaki-u.ac.jp

HLAの発見と発展

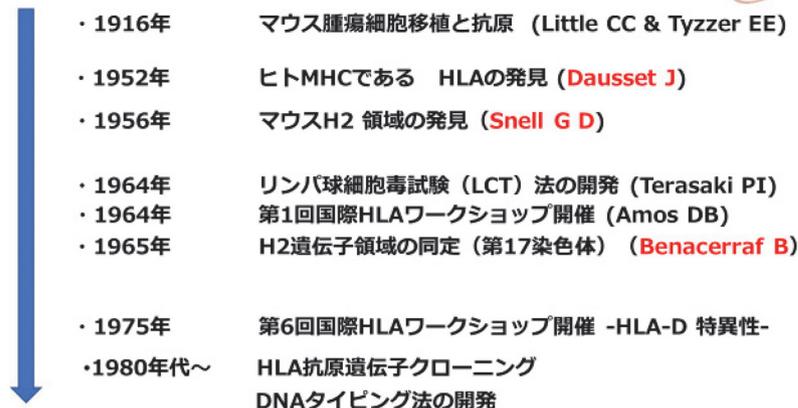


図1 HLA 研究の歴史と過程

HLA 研究の発展における重要なキーポイントを列挙している (図1)。

この様に、ヒトの MHC である HLA 発見の歴史は、マウスの MHC である H2 の研究とも深く結びついている。

図中に赤字で示した、マウス H2 領域の発見に関わった G. D. Snell, B. Benacerraf, そして HLA を発見した J. Dausset の 3 博士は、「免疫反応を調節する細胞表面の遺伝的構造に関する研究」の功績により、1980 年にノーベル医学・生理学賞を受賞したが、この中に D.B. Amos 博士は含まれていない。よって選択肢 d は誤りである。D.B. Amos 博士は図示の通り、1964 年に世界で初めて開かれた国際組織適合性ワークショップを主催し、このワークショップでは Hu-1, LA, Four と呼ばれる 3 つの特異性が同定された。これが HLA 多様性同定の始まりである。国際 HLA ワークショップはその後数年おきに開催され、1975 年にはデンマークで第 6 回ワークショップが開催され、D 特異性が主なテーマとして扱われた。なお、国際 HLA ワークショップの概要等については過去の解説 (参考文献 3) の表 2 を参照されたい。

問題 1. HLA の発見について、もっとも適切な記述を a～e のうちから一つ選べ。

- 腎臓移植を受けた患者血清と他人の白血球の凝集反応により HLA が発見された。
- 最初に命名された HLA 抗原は HLA-A24 である。

- 皮膚移植の適合、不適合の解析によって HLA が発見された。
- HLA を発見したのは Jean Dausset 博士である。
- 細胞学的 HLA 検査方法を確立したのは Paul Ichiro Terasaki 博士である。

正解：d 正答率 29.8% (代表的な誤答：e)

【解説】 先の問題 50 で示した、スイスの免疫学者である Jean Dausset 博士 (図 2) は、輸血歴のある患者血清中に白血球を凝集させる抗体の存在を見出し、1952 年に発表したことから、この論文を以て HLA 研究の始まりとされている。Dausset 博士が「HLA の父」と呼ばれる所以である。よって選択肢 d が正しい。代表的な誤答である選択肢 e の Paul Ichiro Terasaki 博士の偉業は、図 1 にも示されている通り、血清学的検査法であるリンパ球細胞傷害試験 (Lymphocyte cytotoxicity test: LCT) (最近では補体依存性細胞傷害検査 (complement dependent cytotoxicity: CDC) ともいわれる) を発明したことであり、本法は通称「テラサキ法」とも呼ばれている。本法の登場により、わずか 1～2ul の HLA 抗血清を使用して被検者リンパ球の抗原特異性を同定することが可能になり、HLA 多様性研究が発展した。しかし選択肢 e で示されているのは細胞学的検査法であり、両者は全く異なる検査法である。本問は各選択肢の語句の使われ方に注目すると間違いに気づくが、HLA 発見

の背景を知っていれば容易に正解を導くことができる、いわばボーナス問題である。



図2 J. Dausset 博士（文献4より抜粋）

2) HLA 検査法 (1 題)

問題 38. Primed lymphocyte test (PLT) について、誤っている記述を a ~ e のうちから一つ選べ。

- a. PLT 検査により検出できるのは HLA-DP 抗原の相違である。
- b. PLT 検査は刺激細胞，反応細胞ともにリンパ球を使用する。

- c. PLT 検査は，MLR により増殖した被検者由来 B 細胞の反応で識別される。
- d. HLA-DP 抗原特異性を検出するアロ抗血清は存在しない。
- e. PLT 検査は手技が煩雑であるため，現在では DNA タイピングが主流である。

正解：c 正答率 14.9%（代表的な誤答：d）

【解説】本問は今回の模擬試験で最も正答率が低かったので詳述しておきたい。HLA 検査法は，その原理に基づいて図3のように大別される。このうち1. 血清学的検査法と，2. 遺伝子検査法がよく知られているが，PLT は3. 細胞学的検査法に分類される。PLT は，この細胞学的検査法の一つであり，HLA-DP 抗原のタイピングに用いられていた検査法である。

細胞学的検査法には，図4に示すように，混合リンパ球培養反応（mixed lymphocyte culture testing: MLC）と Primed lymphocyte test (PLT) があり，両者とも

- 1. 刺激細胞と反応細胞を用いる
 - 2. 細胞幼若化の際の増殖の有無によって判定を行う
- という共通点があるが，MLC は HLA-D 特異性の同定，

主なHLAタイピング法

- 1. 血清学的検査法（古典的HLA クラスI, クラスII抗原の同定）**
 - リンパ球細胞傷害試験（lymphocyte cytotoxicity test: LCT）
- 2. DNA（遺伝子型）検査法（HLA クラスI, クラスII遺伝子の同定）**
 - SSO (sequence specific oligonucleotide) 法
 - SSP (sequence specific primer) 法
 - RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法
 - SSCP (single strand conformation polymorphism) 法
 - SBT (sequencing based typing) 法
 - NGS (next generation sequencing typing) 法
- 3. 細胞学的検査法 (HLA D特異性、DP抗原特異性の同定)**
 - MLC (mixed lymphocyte culture testing)
 - PLT (primed lymphocytes typing)

図3 主な HLA 検査法の分類と対象

PLT は HLA-DP 抗原特異性の同定に用いられる。PLT の原理を理解するには MLC の理解が必須であるので、ここではまず MLC について解説したい。

MLC 検査 (図 4 左) は、異なる 2 種類のリンパ球を混合して培養すると、非自己 HLA 抗原を認識したリンパ球が培養から 6 ~ 8 日目をピークに幼若化して増殖する性質を利用したものである。検査には既知 HLA-D ホモ接合体細胞 (HLA-D homozygous typing cells ; HLA-DTHC) が必要で、放射線やマイトマイシン処理で増殖抑制した後に、刺激細胞として用いる。この刺激細胞に反応細胞である被検リンパ球を加えて混合培養し、その際に放射性同位元素で標識されたチミジンを加えることで、反応細胞の増殖 (DNA 合成) の有無を確認する。反応細胞 (被検リンパ球) の HLA-D 特異性が刺激細胞と同一の場合には増殖は起こらず、異なる HLA-D 特異性であれば増殖する。

これに対して PLT 検査 (図 4 右) は、HLA-D 特異性が一致し、かつ HLA-DP 特異性が異なるアロリンパ球の混合リンパ球培養反応 (mix lymphocyte reaction: MLR) により生じた、アロ HLA-DP 感作 T 細胞 (抗 DP-PLT 細胞と呼ばれる) に、増殖抑制処理した被検細胞を加えて二次刺激を与えることにより発生する T 細胞

胞応答の有無で HLA-DP 抗原の多型を検出できる。すなわち、抗 DP-PLT 細胞は被検リンパ球の DP 抗原が一次 MLC での刺激抗原と同一の時のみ急速に増殖するため、混合培養時のチミジンの取り込みを測定して判定する。

HLA-D 特異性は、WHO 命名委員会により現在までに 26 種が公認されているが、これらはすべて MLC により同定され、かつてはクラス II 抗原多型のタイピング法として活用されていた。しかし、最初 HLA-D 抗原と呼んでいたその特異性が、後に主に HLA-DR と HLA-DQ 分子を中心とする複数のクラス II 分子による総合的な細胞反応性であり、D という単独抗原座は存在しないことが明らかとなり、さらには HLA 遺伝子検査法の普及により、多型検出、同定検査としての MLC は現在ほとんど行われていない。

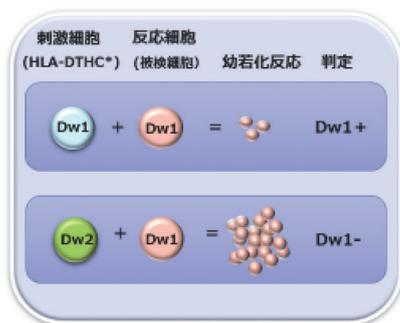
PLT についても、HLA-DP 抗原を認識する特異的アロ抗血清が存在しなかったことから、以前は DP タイピングには本法が用いられていたが、手技が煩雑であるため現在は DNA タイピングがほとんどを占める。

細胞学的HLA検査法の原理

- 刺激細胞と反応細胞を用いる
- 細胞幼若化 (増殖) の有無によって判定する

■ 混合リンパ球培養検査 (MLC: mixed lymphocyte culture testing)

HLA-D特異性を同定
被検細胞の幼若化反応を測定



*HLA-DTHC:HLA-D抗原ホモ接合体細胞

■ PLT検査 (PLT: primed lymphocyte typing)

HLA-DP抗原特異性を同定
被検細胞は幼若化しない



図 4 細胞学的検査法

3) HLA 遺伝子・分子の構造 (3 題)

問題 5. HLA 領域上の次の遺伝子のうち、古典的 HLA クラス I 分子による抗原提示と直接関係しない遺伝子を a～e のうちから一つ選べ。

- a. *TAP1*
- b. *TNXB*
- c. *PSMB9*
- d. *TAP2*
- e. *TAPBP*

正解 b 正答率 21.3% (代表的な誤答：c)

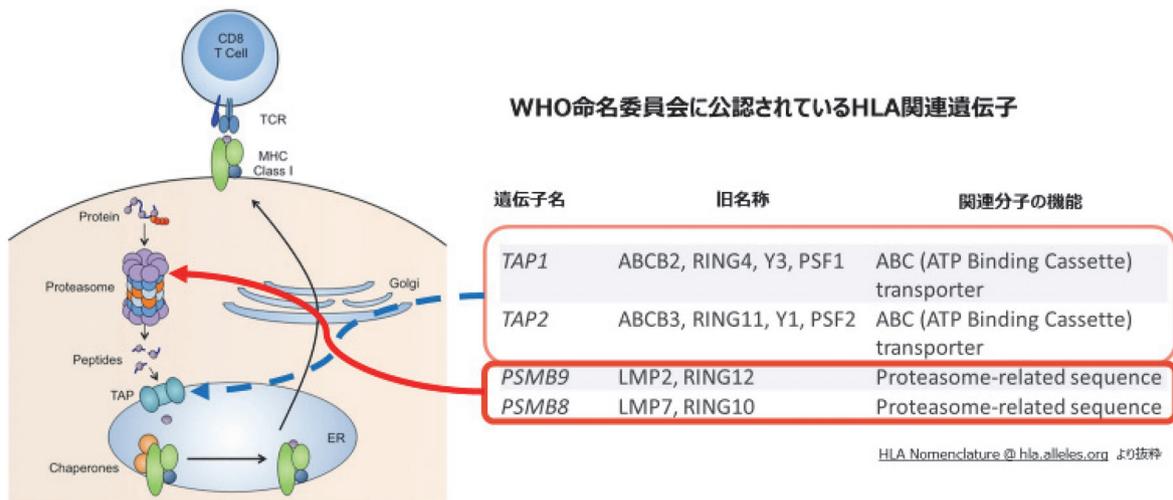
【解説】*TNXB* は HLA クラス III 遺伝子領域にマップされる遺伝子で、テネイシンファミリーメンバータンパクの一つである Tenascin XB をコードしているが、この分子は細胞外マトリックス糖タンパクであり、HLA 分子の抗原提示には関与していない。HLA 遺伝子領域では進化の過程で遺伝子重複が起こり、*TNXB* はそのような遺伝子クラスター内の 4 つのコピーの一つである。この様に、特に HLA クラス III 遺伝子領域内には、HLA の機能には無関係な遺伝子も多く存在している。

一方、代表的な誤答である選択肢 c の *PSMB9* は、以前は *LMP2* と呼ばれていたプロテアソーム関連遺伝子

で、20S サブユニットタンパクをコードしている。本遺伝子は HLA クラス II 遺伝子領域にマップされるが、当該分子は細胞内プロテアソームにおける内因性タンパクのプロセッシングを担い、TAP 分子と共に HLA クラス I 分子による抗原提示に関わっている (図 5)。

問題 14. 古典的 HLA 分子による抗原提示に関して誤っている記述の組合せを a～e のうちから一つ選べ。

1. 細胞質内のウイルスやある種の細菌などの非自己タンパク質に由来するペプチドは、主にエンドソームに運ばれて HLA クラス II 分子により細胞表面に提示される。
2. 樹状細胞は非自己タンパク質を取り込んで、これに由来するペプチドを、クラス I、クラス II のいずれの HLA 分子にも提示することができる。
3. 細胞外のタンパク質を取り込み、これがプロセスされて生じたペプチドを HLA クラス I に結合して、細胞傷害性 T 細胞に提示することを交差抗原提示という。
4. 自己のタンパク質よりプロセスされて生じるペプチドは、HLA クラス I、クラス II のいずれにも結合しない。
5. 細胞質内のタンパク質の一部は、プロテアソームで分解され、生じたペプチドは TAP により小胞体内に輸送される。



McCarthy MK, Weinberg JB - *Frontiers in microbiology* (2015)

図 5 古典的 HLA クラス I 分子の抗原提示と TAP, LMP 分子の役割

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

正解：b 正答率 17.0% (代表的な誤答：d)

【解説】 前述の問題5とも関連するので取り上げるが、図5を参照されたい。細胞内に存在する自己のタンパク質や、細胞質内で増殖するウイルスや細胞内寄生するある種の細菌由来のタンパク質はプロテアソームで分解され(内在性ペプチド)、TAPトランスポーター分子により粗面小胞体に運ばれてHLAクラスI分子と結合して細胞表面に提示される(図6)。従って、選択肢1と4は誤りである。その他の選択肢は正しい。代表的な誤答であるdに含まれている選択肢3の交差抗原提示は、cross-presentationともよばれ、主に樹状細胞が有する抗原提示能力である。抗血清などの交差反応とは語句は似ているが意味は全く異なるので留意されたい。

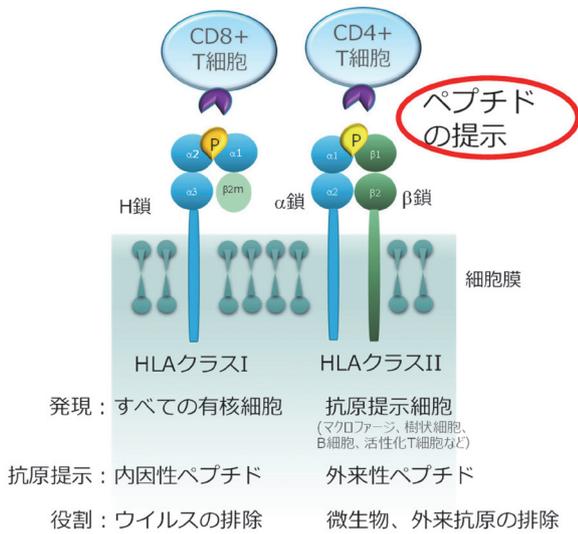


図6 HLAクラスI、クラスII抗原(分子)の役割。P: 提示されるペプチド

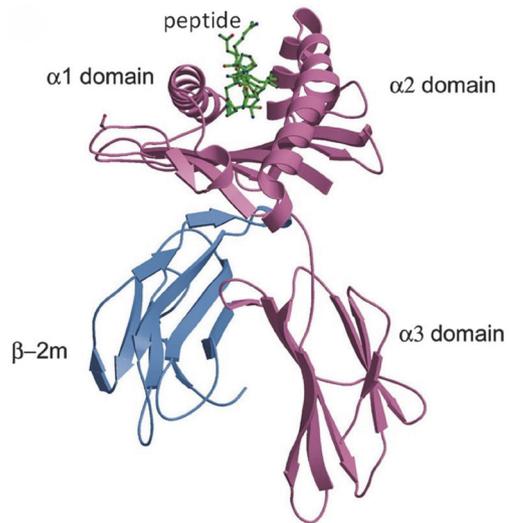
問題10. HLA-Gの機能に関して、誤っている記述をa～eのうちから一つ選べ。

- a. ホモダイマーを形成する。
- b. 自己ペプチドを提示する。
- c. $\beta 2$ マイクロglobulinと会合している。
- d. 可溶性 HLA-G 分子は、TCR を介して CD8 陽性 T 細胞を抑制する。
- e. 膜結合性 HLA-G 分子は LILR-B2 を介して NK 細胞

基礎知識：認定制度筆記試験の解説とポイント整理を抑制する。

正解：d 正答率 23.4% (代表的な誤答：c)

【解説】 非古典的 HLA クラス I 分子である HLA-G には、膜結合型以外に可溶型が存在する。可溶型 HLA-G 分子は、妊娠初期～中期の胎盤に発現し、CD8 陽性 T 細胞のアポトーシスや CD4 陽性 T 細胞の増殖抑制を誘導することで、母児免疫寛容維持の役割を担っている。しかしこれらの反応が TCR を介したものであるという報告は現時点では見られない。よって選択肢 d は誤り(正解)である。HLA-G 分子をはじめとする非古典的クラス I 分子も古典的クラス I 分子と同様にホモダイマーを形成し、クラス I 遺伝子由来の α 鎖と $\beta 2$ ミクロglobulin (問題文では発音上の問題でマイクログロブリンと記載しているが、日本ではミクロglobulin の表記が一般的である) が会合しており(図7)、ペプチド収容溝に内在性ペプチドを結合できる。



Craig S. Clements, et al: 2005⁵⁾

図7 HLA-G分子の立体構造。青で示された部分が $\beta 2$ -ミクロglobulin分子。

4) HLAの多様性, 統計解析 (1題)

問題42. 下の表は日本人集団に多く観察される HLA-A-B-DRB1 ハプロタイプである。高頻度の1～5位のハプロタイプのうち、誤っているものをa～eの

日本人集団に多く観察される HLA-A-B-DRB1 ハプロタイプと頻度

順位	ハプロタイプ			ハプロタイプ頻度 (%)	陽性者頻度 (%)
1	A*24:02	B*52:01	DRB1*15:02	8.5	16.2
2	A*33:03	B*44:03	DRB1*13:02	4.7	9.3
3	A*24:02	B*07:02	DRB1*01:01	3.7	7.3
4	A*11:01	B*54:01	DRB1*04:05	2.6	5.1
5	A*02:07	B*46:01	DRB1*08:03	1.8	3.5

うちから一つ選べ。

- a. 1 位
- b. 2 位
- c. 3 位
- d. 4 位
- e. 5 位

正解：d 正答率 23.4% (代表的な誤答：c)

【解説】本問は HLA の基本的な特徴についての出題である。HLA が示す遺伝子多様性の主な特徴として、人種、民族に特徴的な HLA タイプの存在が挙げられる。HLA 各遺伝子座における多型 (遺伝子型 = アレル) は、遺伝子座が近傍にあるアレルは連鎖不平衡によりハプロタイプ (ブロック) を形成し、遺伝を繰り返すことで人種や民族に特徴的なハプロタイプが観察される。問題中に示したハプロタイプはいずれも日本人集団に多く観察される HLA ハプロタイプとして知られているが、4 位に示されている頻度は、正しくは A*24:02

HLAの遺伝様式

⇒メンデルの法則にしたがう
⇒ 2×2の4通り

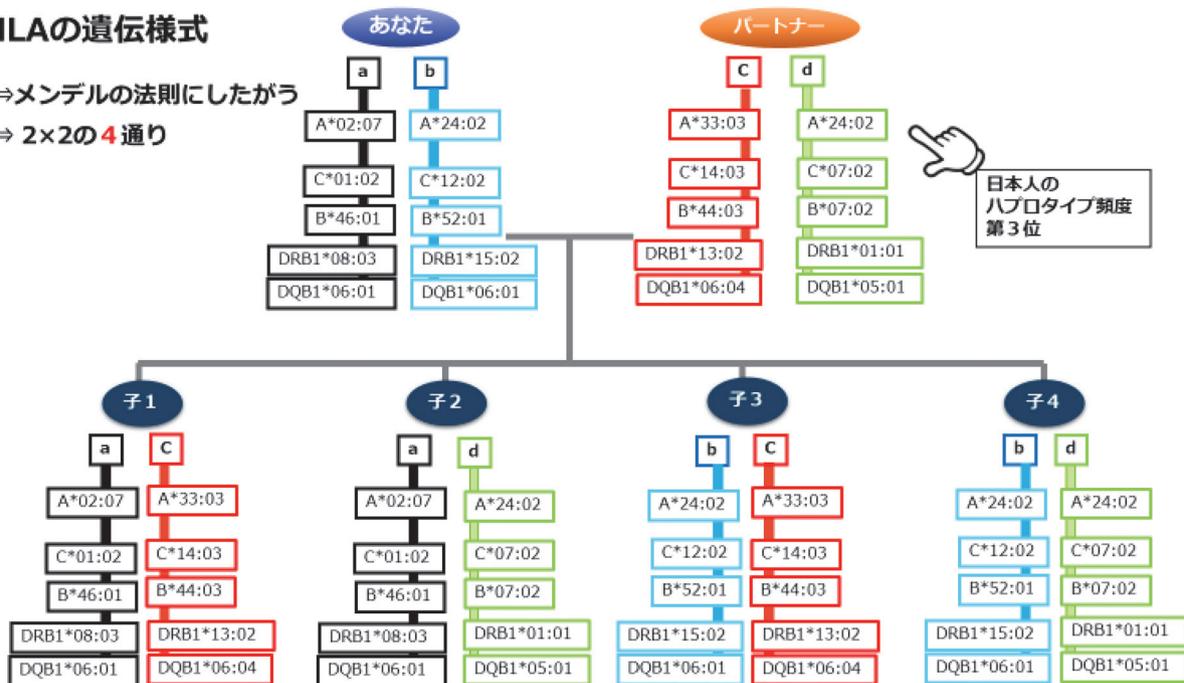


図8 HLA ハプロタイプの遺伝様式

*B*54:01-DRB1*04:05* ハプロタイプのものである。*HLA-B*54:01* と *-DRB1*04:05* アレルは強い連鎖不平衡の関係にあるが、これに *HLA-A* を加えた *HLA-A-B-DRB1* の3遺伝子座間のハプロタイプ構成をみると、*HLA-A*24:02* の他に *-A*11:01* においても連鎖不平衡が存在する。ちなみに 選択肢 d に示した *A*11:01-B*54:01-DRB1*04:05* ハプロタイプは正しくは9位であり、ハプロタイプ頻度は0.8~0.9%である。代表的な誤答である選択肢 c は日本人集団の代表的なハプロタイプとしてよく知られており、3位に相当する。このような統計データは国内の数機関から公式に報告されているが、頻度、順位とも概ね同様である。代表的なハプロタイプ頻度についての知識があれば、遺伝子型タイピングを行う際の一助となる場合がある。参考として *HLA-C*、および *HLA-DQB1* を加えた5座ハプロタイプ (図8) を挙げておくので参照されたい。

4. 終わりに

以上、2023年度はタイトル通り基礎の基礎について解説を行った。普段 *HLA* 関連業務に携わっておられる方々には少々物足りなく感じられたかもしれないが、今回の模擬試験でも、やはり「なんとなく知っている事柄」の読み間違いや、あいまいな部分の解釈が誤答につ

ながっていると考えられることから、ポイント整理で一層深く理解して頂けると幸いである。これまで解説してきた免疫学や統計学、倫理学の基礎については専門書も多く、独学も可能であるが、「*HLA* 学」を学びたい皆様には、ぜひ *MHC* 誌に掲載されている過去の解説や総説をご一読頂きたい。また、専門用語についての用語集⁶⁾ も是非ご活用頂きたい。

参考文献

- 1) 2023年度認定制度試験問題 (解答付き) <https://jshi.smooisy.atlas.jp/ja/ninteikakomon>)
- 2) 成瀬妙子, 一戸辰夫, 王寺典子, 大橋 順, 木村彰方, 椎名 隆, 土屋尚之, 西村泰治, 村田 誠, 湯沢賢治: 令和5年度 認定 *HLA* 検査技術者認定制度試験問題に関する報告. *MHC* 30: 133-139, 2023.
- 3) 成瀬妙子: 基礎知識：認定制度試験問題—解説とポイント整理—. *MHC* 28: 77-82, 2021.
- 4) Carosella, E. Jean Dausset 1916-2009. *Nat Immunol* 10, 797, 2009.
- 5) Craig S. Clements, et al: Crystal structure of *HLA-G*: A nonclassical *MHC* class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *PNAS* 102, 3360-3365, 2005
- 6) 高山智美, 金本人美, 黒田ゆかり, 木村彰方. *HLA* 用語集 (入門編) Ver.1.4. *MHC* 30: 78-91, 2023.

Commentary on the JSHI Certification Paper Test 2023

Taeko K Naruse¹⁾

¹⁾ Dept. of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI) has implemented a certification system for HLA technologists and histocompatibility directors to enhance and maintain their skills and knowledge in histocompatibility testing. The society holds an annual written examination for certification during its conference. Although practice examinations were cancelled in recent years due to the COVID-19 pandemic, they were held again in 2023, we returned to its approach of explaining low correct-response rate questions from the practice examination, and the society plans to continue this important opportunity.

The distribution of average scores has not significantly changed; however, this year's trend of low-correct-response-rate questions differs from previous years, as they were dominated by basic HLA studies rather than conventional immunology, statistics, and ethics-fields questions. One reason for this is the increase in members with relatively little practical experience aspiring to obtain certification in the future. Another reason is the missed opportunities to learn about HLA studies and gather information by attending meetings during the Corona disaster. In the present time, I focus on the basics and describe seven typical HLA questions among the 19 difficult questions, explaining the intention of the questions and the key points to derive the correct answers.

2024 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

NGS 法による HLA タイピング ～その基礎から最新の知見まで～

尾崎 有紀¹⁾

¹⁾ 大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室

膨大な数の HLA 遺伝子型を判定する DNA タイピング (HLA-DNA タイピング) は、移植時の組織適合性の一致や自己免疫疾患などとの関連解析に欠かせない検査技術法である。現在、主流である PCR-SSO 法や PCR-SBT 法に比べ、次世代シーケンサーを用いた HLA DNA タイピング法 (NGS-HLA 法) はより正確なアレル情報が得られ、HLA 遺伝子全領域の新規多型や変異を効率よくかつ染色体ごとに分けて検出できるなどの利点を有する。本講習会では、次世代シーケンシングの基本的な仕組みから、次世代シーケンサーを用いた DNA-HLA タイピングの具体的な方法、さらに新しい知見についてなどを概説する。

キーワード：ヒト白血球抗原 (HLA)、次世代シーケンス (NGS)、DNA タイピング

1. はじめに

ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) アレルを判定する HLA DNA タイピング法は、移植の際にドナーとレシピエントの組織適合性の一致、自己免疫疾患との関連、造血幹細胞移植に伴う移植片対宿主病 (GVHD)、感染症の防御と重症化などとの関連解析に不可欠な検査技術法である。

1980 年代より HLA 遺伝子の多型性を指標とした種々のより正確で簡便な HLA DNA タイピング方法がその当時の最新技術を駆使しながら開発され、検査現場で実用化されてきた。特にポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法に基づく PCR sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSO) 法、PCR sequence specific primer (PCR-SSP) 法および PCR Sequence based typing (PCR-SBT) 法などの HLA DNA タイピング法は、それ以前の検査技術よりもタイピング結果の精度が飛躍的に向上したことから、現在も臨床検査現場で主に使用されている。これらよ

り更に高解像度のタイピング法として、2010 年代より次世代シーケンシング (Next Generation Sequencing: NGS) 法を用いた HLA-DNA タイピング法 (NGS-HLA 法) が開発され、徐々に臨床検査現場でも導入されつつある。

本講習会では、次世代シーケンシングの基礎的な解説から HLA-DNA タイピングへの応用、さらに今後の新たな展開について詳しく解説する。

2. 次世代シーケンスとは？

次世代シーケンシング (NGS) 法は、2005 年頃より出てきた比較的新しい技術であり、サンガー法 (ジデオキシ法) の「次の」世代という意味で「次世代」シーケンシング法と呼ばれている。

次世代シーケンシング法の解説の前に、サンガー法 (ジデオキシ法) について簡単に解説する。サンガー法は、1977 年にフレデリック・サンガーによって開発された革命的な DNA シーケンシングの技術であり、特

受付日：2024 年 6 月 11 日、受理日：2024 年 6 月 11 日

代表者連絡先：尾崎 有紀 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1 大阪大学微生物病研究所ゲノム解析室
TEL: 06-6879-8323 E-mail: yozaki@gen-info.osaka-u.ac.jp

定の DNA 領域の塩基配列を決定するために広く使用されている。具体的には、次のような3ステップで解析する。1. 特定の DNA 領域を PCR 法により増幅させる。2. シーケンス反応により途中で伸長反応を停止し、3' 末端が各塩基を識別する蛍光で標識された、1 塩基違いの断片を合成する。3. シーケンサーでのキャピラリー電気泳動で、1 塩基違いの断片を分離し、流れてきた順に3' 末端の蛍光を検出することで、塩基配列を決定する。つまり、サンガー法では特定の DNA 領域を1回のシーケンスで1通りしか塩基決定できない。また、塩基決定長は最長で1,000bp程度まで可能である。サンガー法で使用する機器は、ThermoFisher Scientific 社の Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer をはじめとする Applied Biosystems シリーズが主流である。

次に、次世代シーケンシング法で使用する機器、次世代シーケンサーは原理によっていくつかのグループに分けられ「第2世代」「第3世代」「第4世代」と呼ばれている。第2世代の主流機器は、illumina 社の NovaseqX シリーズ、Miseq, iSeq などや MGI 社の DNBSEQ-G400, DNBSEQ-T7 などである。この世代のシーケンサーは「ショートリードシーケンサー」と呼ばれ、100～400塩基程度のリード長のシーケンスを行うものである。この世代のシーケンサーは、大変種類が

多く、現在多くの研究現場や臨床検査現場で使用されている。続いて、第3世代の主流機器は、PacBio 社の Sequel SystemII などであり、第4世代の主流機器としては Nanopore 社の MinION などのシーケンサーが当てはまる。この第3世代、第4世代のシーケンサーは「ロングリードシーケンサー」と呼ばれ、1kb以上の領域を一度にシーケンスできるものである。

次世代シーケンシング法は、テンプレート DNA より、「ライブラリ」と呼ばれる次世代シーケンシング用のサンプル調製を行う。その後、それぞれの機器により調製したライブラリを並列的にシーケンスを行い、塩基配列を決定する。つまり、次世代シーケンシング法では、1回で複数の配列を一度に決定できることが特徴である。まずは、次世代シーケンス技術の解説に、よく出てくる用語を説明する。

1) ライブラリ (Library)

シーケンスを行うターゲット領域の両側にアダプター配列やインデックス配列などをライゲーションにより付加し、次世代シーケンサーでランできる状態の配列のこと。アダプター配列やインデックス配列は約100bpあり、完成したライブラリのサイズはシーケンスしたい（ターゲット）領域のサイズより100～130bpほど大きくなる（図1・A）。

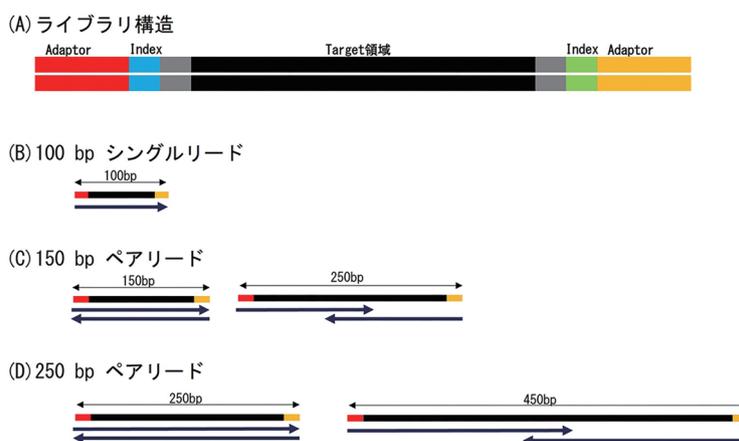


図1 次世代シーケンシング法の (A) ライブラリ構造および (B,C,D) リード長
 (A) Target 領域（シーケンスを行いたい領域）の両端に、index 配列（青・緑）と adaptor 配列（赤・黄）を付加させる。両端に付加する index 配列 6～10 塩基で構成されており、組み合わせによって区別ができる。(B) シングルリードとは片側からのみシーケンスすること。シーケンス可能な領域はアダプター配列を含めるので、実際のターゲット領域はそれよりも短くなる。(C,D) ペアリードとは両側からシーケンスすること。Read1 と Read2 が完全に重なるようにも、一部重なるようにも実験計画を立てることが可能である。

2) アダプター (adaptor) 配列

シーケンス配列の両端に付加された次世代シーケンサー特異的な配列のこと。

3) インデックス (index) 配列

複数サンプル由来の DNA 配列を同時に次世代シーケンサーでランした場合にサンプル同士を識別するために付加された 6 ~ 10bp 程度の配列のこと。バーコード配列, タグ配列とも呼ばれる。

4) リード長

シーケンスで何 bp を解読するか, ということ。100bp シングルリード, 100bp ペアエンドリード, 150bp ペアエンドリード, 250bp ペアエンドリード, 300bp ペアエンドリード, などがある。シーケンスの目的により, 長さやシングルリードかペアリードかを決める事が多い。例えば, 150bp ペアエンドリードであるとアダプター配列込で約 250bp の領域をシーケンスすることが可能であり, 約 150bp のターゲット領域のシーケンスが可能になる (図 1・B,C,D)。

5) シングルリード

配列の片側だけからシーケンスすること。

6) ペアエンドリード

配列の両端からシーケンスすること。

7) リード数

1 回のシーケンスで, 複数ライブラリの配列を同時に読むことができ, その数のこと。シーケンサーや使用する試薬キットによって数は変わるが, 100 万 ~ 260 億リードと幅がある。

8) デプス (depth)

カバレッジともいう。Read depth of coverage の意味で使用されることが多い。各塩基が読まれた回数。例えば, HLA 領域 6Gb を 60Gb シーケンスしたとすると平均カバレッジは x10 となる。

3. 現行の高解像度 DNA タイピング法の問題点

欧州バイオインフォマティクス研究所 (European Bioinformatics Institute : EBI) に設置されている IPD-IMGT/HLA データベースには世界中で収集された HLA アレル情報が掲載されている。1998 年 12 月に公開された Release1.0 ではわずか 964 種類の HLA アレルが公開されていたが, 年々増加しており, 最新の Release3.56 (2024 年 4 月公開) では 38,975 種類 (HLA クラス I アレル : 27,301 種類, HLA クラス II アレル : 11,674 種類) ものアレルが公開されている。

現行法の高解像度 HLA タイピング法は, PCR-SSO 法 (主として Luminex 法) や PCR-SBT 法であるが, これらの方法の問題点として, 遺伝子全領域ではなく特定のエクソン周辺の多型のみでタイピングしていること, 2 個の多型部位が同一の染色体上 (cis) か異なる染色体上 (trans) に位置するのかの位置情報が得られないいわゆる phase ambiguity が生じること, また Luminex 法などの PCR-SSO 法では年々増加している新規 HLA アレルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足していることが挙げられる。よってこれらの方法による HLA-DNA タイピングの多くはいくつか

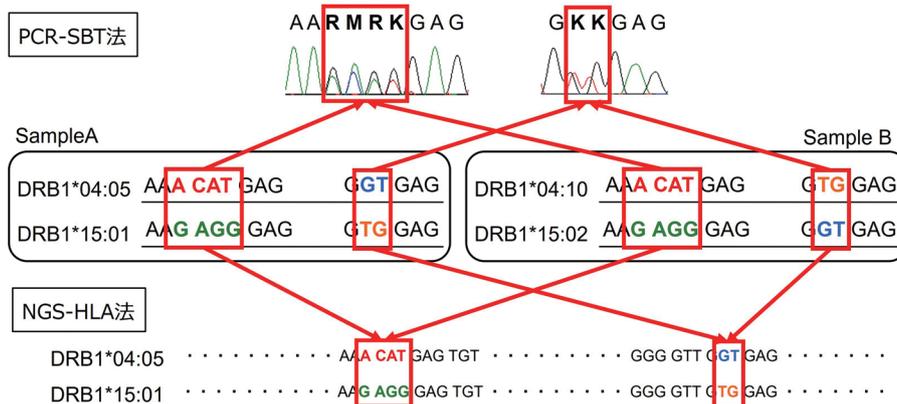


図 2 DRB1 遺伝子における phase ambiguity の例
上部が PCR-SBT 法でのシーケンス波形, 下部が NGS-HLA 法でのタイピング結果を示す。

の候補アリルが存在し、単一の HLA アリルに絞り込むことができないため、日本人における HLA 遺伝子頻度を参照して頻度の高いアリルを最も可能性の高いアリルと判定する推定（みなし）タイピングをおこなっているのが現状である。しかし、次世代シーケンシング法を用いた NGS-HLA 法であるとこれらの問題については解消する。

1) phase ambiguity 問題

現行法では、2 個の多型部位が同一の染色体上（cis）か異なる染色体上（trans）に位置するのかを明確にすることが不可能である。例えば、PCR-SBT 法により HLA 遺伝子由来の PCR 産物をサンガー法により塩基配列を決定する場合、両アレル間の塩基配列の違いはヘテロピークとして確認できる。例として、HLA-DRB1 遺伝子における phase ambiguity を示す（図 2）。このサンガーシーケンス結果の一部を見ると連続した 4 塩基対とその約 90 塩基下流の 2 塩基対にヘテロピークが確認できる。これをアレル判定ソフトウェアにより解析すると、DRB1*04:05 と DRB1*15:01、もしくは DRB1*04:10 と DRB1*15:02 の組み合わせが候補に上がり、どちらか確定することは難しい。これに対して、次世代シーケンシング法を用いた NGS-HLA 法ではそれぞれの染色体上の塩基配列を大量並列的に解読する特徴から、どちらの染色体上にある変異かの確定が可能になる。先の例では、

リード 1 では DRB1*04:05 と一致する塩基配列、リード 2 では DRB1*15:01 に一致する塩基配列と確認できるので、この場合は DRB1*04:05 と DRB1*15:01 の遺伝子型である、と導くことが可能である。

ショートリードシーケンサーでは、最大でも 400 塩基程度のリード長しかないため、エクソンを跨ぐ多型の検出は困難を示すことが多かった。例として、HLA-DPB1 遺伝子における phase ambiguity を示す（図 3）。エクソン 2 の配列は DPB1*05:01:01 と DPB1*135:01:01 が、DPB1*09:01:01 と DPB1*1149:01 が同一、エクソン 3 の配列はすべて同一、エクソン 4 の配列は DPB1*05:01:01 と DPB1*1149:01 が、DPB1*09:01:01 と DPB1*135:01:01 が同一である。ショートリードシーケンサーでは 6,000 塩基以上離れているエクソン 2 とエクソン 4 の組み合わせは確定することが難しく、DPB1*05:01:01 と DPB1*09:01:01 もしくは DPB1*135:01:01 と DPB1*1149:01 のどちらか、というアレル判定になる。しかし、ロングリードシーケンサーはエクソン領域をまたいで一本のライブラリをシーケンスすることが可能であるので、例の場合は DPB1*05:01:01 と DPB1*09:01:01 と確定できる。

2) 特定のエクソン周辺の多型のみでのタイピング

現行法では、抗原提示領域をコードするエクソン、具体的には HLA クラス I 遺伝子（HLA-A, -B, -C）ではエクソン 2 とエクソン 3、HLA クラス II 遺伝子座

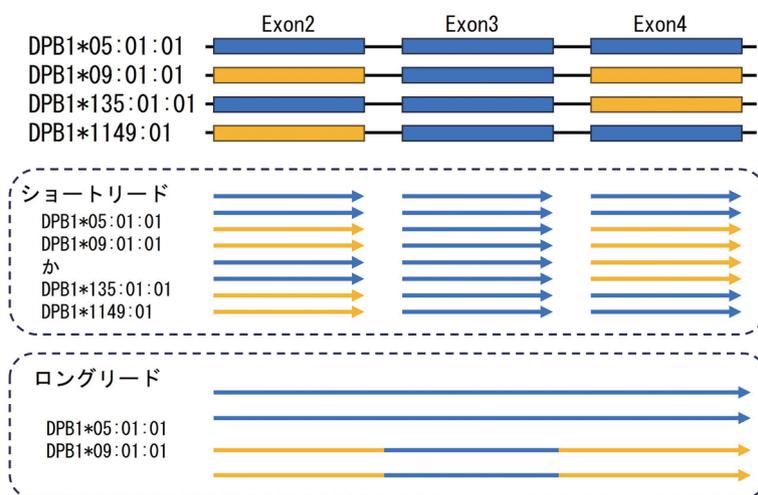


図 3 DPB1 遺伝子における phase ambiguity の例

同色が同じ配列を示す。ショートリードの場合は、短いリードのため、エクソンをまたいで 1 本のリードでつながることはない。ロングリードの場合はエクソンをまたいでリードがつながる。

(HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1) ではエクソン 2 を中心にタイピングが行われてきた (図 4)。よって、現行法では遺伝子全領域 (プロモーター/エンハンサー領域から 3'UTR 領域) の HLA 多型が検出できないことにより HLA 分子構造や発現に直接関与する異常な多型や変異を見逃している可能性があるという問題点がある。特にプロモーターやエンハンサー領域、スプライシング部位などの変異は遺伝子発現に影響を及ぼす可能性がある。これらを HLA-NGS 法で行うと、遺伝子全領域についての変異を確認することができ、上記の問題で解決することができる。

4. 具体的な NGS-DNA タイピング

HLA-NGS 法の DNA タイピングには、特定の HLA 遺伝子を PCR 法で増幅し次世代シーケンサーでシーケンスをするもの、ターゲットキャプチャー法によって HLA 領域の主要遺伝子を回収し次世代シーケンサーでシーケンスするもの、などがある。その中で、現在主流となっているのは、各社から試薬キットとして発売されている PCR 法を用いた DNA タイピング方法である。市販の試薬キットとして発売されているものを表 1 および表 2 にまとめた。それぞれの試薬キットについては差はあるものの、イントロン領域を含めた遺伝子のほぼ全域

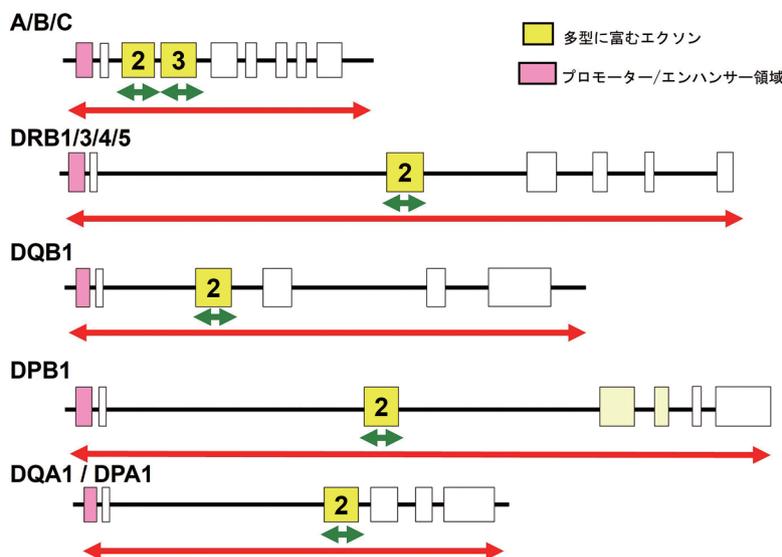


図 4 HLA 遺伝子の HLA タイピング領域

各遺伝子のエクソンを四角で、ピンクがプロモーター/エンハンサー領域、黄色が多型に富むエクソンを示す。緑矢印が PCR-SSO 法や PCR-SBT 法での解析対象領域、赤矢印が HLA-NGS 法での解析対象領域を示す。

表 1 各社から発売されている試薬キットの解析領域

	AllType FASTplex NGSv2 (OneLambda社)	ScisGoHLA v6 (SCISCO GENETICS社)	NGSgo®-MX11-3 (GenDX社)
A	5'UTR – 3'UTR	exon1 – exon7	exon1 – exon8
B	5'UTR – 3'UTR	exon1 – exon7	exon1 – exon7
C	5'UTR – 3'UTR	exon1 – exon7	exon1 – exon8
DRB1	exon1 + exon2 – 3'UTR	exons 1-4	exon1 + exon2 – exon6
DRB3/4/5	exon2 - 3'UTR	exons 1-4	DRB3/5; exon1 + exon2 – exon6 DRB4; exon2-exon4
DQB1	exon1 + exon2 – 3'UTR	exons 1-4	exon1 – exon6
DPB1	exon1 + exon2 – 3'UTR	exons 1-4	exon1 + exon2 – exon5
DQA1	5'UTR – 3'UTR	exons 1-4	exon1 – exon4
DPA1	5'UTR – 3'UTR	exons 1-4	exon1 – exon4

表 2 各社から発売されている試薬キットの実験方法

	AllType FASTplex NGSv2 (OneLambda社)	ScisGoHLA v6 (SCISCO GENETICS社)	NGSgo®-MX11-3 (GenDX社)
PCR実験方法	Multiplex	Multiplex	Multiplex
使用できる次世代シーケンサー	Miseq, MiniSeq, iSeq, IonGeneStuio S5	MiSeq	MiSeq, IonGeneStuio S5, Sequel II
データ解析用ソフト	TypeStream	Sciscloud	NGSengen

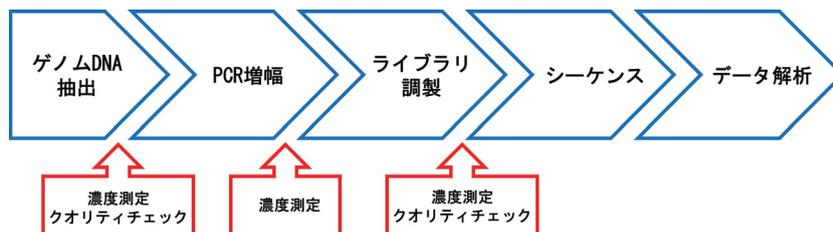


図 5 次世代シーケンシング法の流れ

が解析対象となっており、さらに、HLA 遺伝子 11 座を同時に DNA タイピングすることができるようになっていいる。これらに次世代シーケンサーを用いて行う一般的な実験の流れは図 5 のような流れである。使用する試薬キットによって少しずつ異なるが、一般的な流れについて具体的に説明する。

1) ゲノム DNA 抽出

NGS-HLA 法に使用する検体は、血液やスワブからゲノム DNA 抽出を行うことをお勧めする。抽出方法は DNA 抽出用の試薬キットを使用した方法が簡便であるが特に指定はなく、純度の高い DNA が抽出できればよい。純度は吸光度によって測ることが多く、よく使われているのは Thermo Fisher Scientific 社の NanoDrop である。吸光度 A260/A280 の値が 1.8 ～ 2.0 にあると純度の高い DNA であると言える。また、DNA 濃度は蛍光定量装置で測ることが推奨されており、よく使われているのは Thermo Fisher Scientific 社 Qubit フルオロメーターである。NanoDrop でも DNA 濃度を測定することもできるが、2 本鎖のゲノム DNA 以外の不純物も一緒に測定してしまう。正確に 2 本鎖 DNA のみを測定するためには、蛍光定量装置を推奨する。

2) HLA 遺伝子特異的な PCR 反応

抽出されたゲノム DNA から HLA 遺伝子に特異的なプライマーを使用して PCR 法で増幅させる。各社の試薬キットは少しずつ異なるが、基本的に PCR は 1 ～ 2 本のチューブで実験可能なように設計されている。つま

り、1 ～ 2 本のチューブ内で、HLA 遺伝子 11 座 (HLA-A, -B, -C, HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1) のほぼ全領域を増幅させることが可能である。使用するゲノム DNA は 25ng 程度であることが多く、ハンドリング時間は約 15 ～ 30 分程度、PCR 時間は約 2 ～ 3 時間であることが多い。

3) ライブラリ作製

ライブラリ作製は、①酵素での断片化、②アダプター / インデックス付加、③サイズセレクション、④ PCR 増幅という 4 ステップである。

①酵素での断片化

37℃ 10 分の後、72℃ 2 分をサーマルサイクラーで反応させる。これにより様々なサイズの DNA 断片ができる。

②アダプター / インデックス付加

シーケンサー特有の配列(アダプター配列)とインデックス配列を付加させる。インデックス配列は 2 ヶ所に付加することができ、この組み合わせによって 384 種類の区別が可能である。このインデックス配列を付加させたあとは、複数のサンプルを混合しても区別可能になる。

③サイズセレクション

ここまでの操作では様々なサイズ(長さ)の DNA 断片があるため、サンプルの精製と同時にサイズセレクションを行う。磁性ビーズ(多くの試薬キットで採用されているのはベックマン・コールター社の Ampure XP ビーズである)で行う。

④ PCR 増幅

両端に2種類のアダプターが付加されているものが正しいライブラリである。そのライブラリのみをPCR法で8～15cyclesほど増幅させ、ライブラリが完成する。

この時点で、ライブラリのクオリティチェック（濃度測定と電気泳動）を行う。ライブラリの濃度測定には、1) ゲノム DNA 抽出でも使用した Qubit フルオロメーターの使用が推奨される。電気泳動は自動電気泳動装置での測定が推奨され、Agilent 社の TapeStation や Bioanalyzer を使われることが多い。

4) シーケンシング

シーケンスを行う前に、同じシーケンスに入れるライブラリを均等に混合する。そのライブラリ混合物をリアルタイム PCR にて定量する。その後は各機器のプロトコルに準じてシーケンスを行う。

5) データ解析

シーケンサーからは fastq と呼ばれる配列ファイルが取得できる。これをそれぞれの試薬キットに対応する解析ソフトウェアにアップロードすると HLA タイピング結果の候補リストが上がってくる。

4. 今後の課題

次世代シーケンサーによる HLA-NGS 法は万能であるように思えるが、問題点も多く残っている。一番大きな問題は、配列データベースの不足である。IPD-IMGT/HLA データベースは、主要エクソン（エクソン2やエクソン3）のみ登録のアリルが多数ある。HLA-NGS 法の利点を活かすためには、少なくとも全エクソンの登録をされないと確実なアリル判定が難しい。現在、イントロン領域を含む遺伝子全領域の登録が進んでいるが、まだ時間がかかるといえるだろう。

また、現在主流の方法はPCR法であるので、最初の HLA 領域特異的 PCR の際、増幅できないアレルがある可能性がある。PCR の原理上 PCR 増幅時のエラーが入る可能性もある。これらの課題を解決するために、PCR 法を使用せずキャプチャー法で HLA タイピングを行う

方法も順次開発されており、試薬キット化されていくと予想される。

さらに、試薬キットのランニングコストも高価であるため、ある一定の検体数が収集できるまで解析を開始しづらいという点もある。特に移植関連検査などで検査結果を迅速に提供する必要がある場合に対応が難しい可能性もある。この問題を解決するには少数検体でも HLA-NGS タイピングを開始できる体制を整える必要があると考えられる。

5. おわりに

本講習会では、次世代シーケンスの概要、NGS-HLA 法の原理、現行法との相違、今後の課題について解説した。HLA-NGS 法はPCR-SSO 法やPCR-SBT 法などの現行法より、より高精度にタイピングできるため、今後徐々に臨床検査現場に広がっていくだろう。また、次世代シーケンス技術もまだ発展途上の技術であるため、さらに新しい HLA タイピング方法が開発されていくかもしれない。

今後、さらなる次世代シーケンス技術の発展に伴い、より安価でより高精度な HLA タイピング方法が開発され、検査現場に導入されていくことを期待したい。

引用文献

- 1) IPD-IMGT/HLA データベース: <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/>
- 2) 豊田敦, 藤山秋佐夫: 次世代シーケンサーのシーケンシング原理. 次世代シーケンサー目的別アドバンストメソッド (細胞工学別冊), 学研メディカル秀潤社, 2012.
- 3) 椎名隆: 次世代シーケンサーに基づく HLA ゲノム・遺伝子解析. MHC 22 (2): 84-94, 2015.
- 4) 椎名隆, 鈴木進悟, 尾崎有紀, 光永滋樹, 猪子英俊: 次世代シーケンサーは HLA ジェノタイピング法を変えるのか?, 分子リウマチ治療, vol.8 (no.3), 131-135, 2015
- 5) 椎名隆: 次世代シーケンシングに基づく HLA DNA タイピング法の特徴と移植医療への応用. 日本造血・免疫細胞療法学会雑誌, 第12巻 (第3号), 133-140, 2023.

2024 年度認定 HLA 検査技術者講習会テキスト

我が国の臍帯血バンクと臍帯血移植

森島 泰雄¹⁾

¹⁾ 中部さい帯血バンク

我が国の臍帯血移植成績は著しく向上している。同種移植のあゆみと臍帯血移植の位置づけ、臍帯血バンクを介して臍帯血ユニットがどのように作成され患者さんに届けられるのか、また患者にとって最適な移植ユニットをどのように選択したらよいかにつき具体的に記したい。

キーワード：臍帯血バンク、臍帯血移植、CD34 陽性細胞数、HLA アレル適合度

1. 我が国における同種移植とバンクのあゆみ

我が国における近代的な同種造血細胞移植は 1974 年に HLA 適合同胞間移植が開始されてからほぼ 50 年となる。1991 年には日本骨髄移植推進財団（現在の日本骨髄バンク）が設立され非血縁者間骨髄移植が全国展開され、引き続いて 1999 年から日本さい帯血バンクネットワークが組織され、非血縁者間臍帯血移植が開始された。また、1990 年代には血縁者間末梢血幹細胞移植が実施されるようになり、様々な移植治療法が確立され、移植適応のある患者にとって移植ができる可能性が高まり、より適切な治療法を選択できるようになった。最近では HLA ハプロタイプが不適合な血縁者からの移植法も開発されて臨床応用されるようになってきた。これらの移植方法の我が国における推移を図 1 に示すが、現在では血縁者間移植、骨髄バンクを介した非血縁者間移植、臍帯血バンクを介した臍帯血移植がほぼ 3 分の 1 ずつの割合となっている。

2012 年に成立し、2014 年に施行された「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」により移植病院への供給が認可された公的臍帯血バンクとして、日本赤十字社に属する 4 バンク（北海道さい帯血バンク、関東甲信越さい帯血バンク、近畿さい帯血バンク、

九州さい帯血バンク）と一般社団法人中部さい帯血バンク、特定非営利活動法人兵庫さい帯血バンクの 6 バンクが稼働している。臍帯血移植数は年々増加しており、近年は年間約 1400 症例実施されている。

2. 臍帯血移植の特徴

臍帯血移植の大きな特徴は移植適応時にドナーのコーディネートが必要なく、臍帯血バンクから凍結保存された臍帯血ユニットを迅速に提供することが可能で、他の移植法のドナーコーディネートと採取でのドナーの精神的、身体的な負担がないことである。また、臍帯血移植は患者と臍帯血ユニットの HLA 不適合度が大きくなっても移植合併症の頻度は増加せず、HLA 不適合が許容され、移植後の GVHD の頻度・重症度が低く、良好な白血病の再発抑制効果があり、長期生存例の QOL も良いことである。臍帯血移植で最も課題とされた生着不全は最近では適切に臍帯血ユニットを選択すれば 90% 以上の良好な生着率が得られている^{1,3,4)}。

近年、移植後 cyclophosphamide 投与による免疫抑制法 (PT-CY) をもちいた HLA ハプロタイプ不適合血縁者間移植 (PT-CY ハプロ移植) が開発され、欧米では臍帯血移植を凌駕しようとしている。わが国では臍帯血

受付日：2024 年 6 月 7 日、受理日：2024 年 6 月 7 日

代表者連絡先：森島 泰雄 〒489-8555 愛知県瀬戸市南山口町 539-3 愛知県赤十字血液センター 4 階 中部さい帯血バンク
TEL: 0561-85-5222 E-mail: morishimayasuo5050@gmail.com

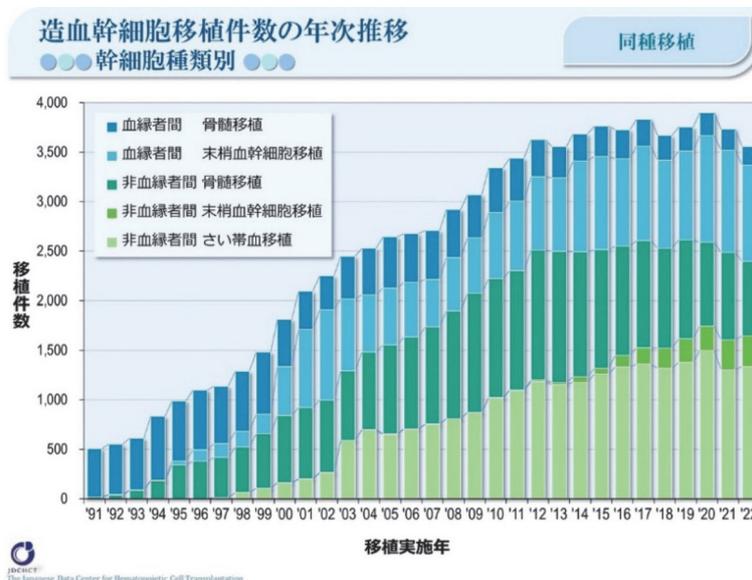


図1 日本造血細胞移植データセンター ホームページから引用

移植で良好な移植成績が得られており、両移植法ともに積極的に実施されている。

3. 臍帯血ユニットはどのように採取・調製され、患者さんに届けられるのか

1) 採取病院での採取

採取病院では、あらかじめ妊婦さんに臍帯血採取につき説明・同意を得ている。分娩後の胎盤から臍帯血を採取する手技と安全性、さらに採取された臍帯血は臍帯血バンクに輸送され、後述するように臍帯血ユニットが調製・凍結保存され、希望した移植病院の患者さんに届けられ、移植されることなどである。中部さい帯血バンクでは愛知県、岐阜県、三重県、石川県の17病院で採取が実施され、臍帯血量（60ml以上）や凝固が認められないなど臍帯血の品質基準を満たした臍帯血が愛知県瀬戸市にある中部さい帯血バンクに運搬される。

2) 臍帯血バンクでの調製と保存

① 到着した臍帯血パックは受け入れ検査を実施する。2023年度には臍帯血の液量（60mL以上）・外観試験・書類審査（問診票等）を通過した3357本の臍帯血につき、最初に有核細胞数（TNC）を測定し、 11.4×10^8 個以上ある場合にCD34陽性細胞数をフローサイトメトリーで測定して、 3.0×10^6 個以上あれば調製に進む。

② 調製はクリーンルーム内で、開放作業は安全キャビネット内で行う。調製の手順を示すと、臍帯血バッグ

に赤血球沈降促進剤（HES）を加え、赤血球を沈降させた後、上清を回収する。この上清を遠心分離にかけ、細胞層を回収（濃縮）し、ここに凍害保護液（DMSO）を添加し、フローズバッグへ移し替える。フローズバッグを保護カセットに入れ、プログラムフリーザーを用いて -90°C まで凍結した後、液体窒素タンク内にて -196°C で保存する。2023年度に仮保存できた臍帯血ユニットは920本であった。保存期間は10年間としている。

③ 保存前の臍帯血の一部を用いて品質検査を行っている。検査項目は総有核細胞数、細菌・真菌培養検査、CD34陽性細胞数、コロニー形成細胞数、細菌・真菌培養検査、感染症検査等である。

④ 臍帯血ユニットのHLA検査を行う。2024年1月から中部さい帯血バンクではNGS（next generation sequence）HLAタイピング法（long range法）²⁾でHLA-A, B, C, DRB1, DRB3,4,5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1の11座を第3-4領域までタイピングしている（外注）。2023年以前のHLAタイピングはluminex法でHLA-A, B, C, DRB1の高頻度アレル（第2領域まで）を同定している。

⑤ 保存4カ月以降に、母児のアンケート調査を実施し、臍帯血の安全性が確認されたら、生後9ヶ月を待って保存した臍帯血ユニットを公開し、造血幹細胞提供支援機関（日本赤十字社）の臍帯血情報公開システムに登録する。

3) 主治医により選択された臍帯血ユニットの出庫

主治医は造血幹細胞適合検索サービスにより臍帯血ユニットを検索し、患者に適した臍帯血ユニットでの移植実施の方針を決定したら、当該臍帯血ユニットがある臍帯血バンクに選択臍帯血ユニットを申し込む。臍帯血バンクにおけるこの患者のための保管期間は最長3か月である。

中部さい帯血バンクでは臍帯血バンクに送付された患者の血液を用いて患者のNGS-HLAタイピングを実施するとともに、臍帯血ユニットの確認検査を臍帯血ユニットがすでにNGS-HLAタイピング済の場合には、luminex法でHLA-A, B, C, DRB1の高頻度アレル（第2領域まで）を同定し、同一臍帯血であることを確認する。さらに患者のHLA抗体検査を行い、患者にドナー特異的HLA抗体がないことを確認する。

4) 移植病院での保存

臍帯血ユニットは液体窒素を充填した容器で搬送業者により移植病院に運搬される。移植病院では厚労省ガイドラインに従い液体窒素タンクまたは超低温フリーザー

(-140°C) 内で移植まで保管される。移植病院での保管手順書の作成とその遵守による安全な保管が重要である。

5) 臍帯血ユニットの移植と移植関連有害事象の報告

移植時は移植病院の手順書に従い、解凍し経静脈的に輸注するが、輸注時間とアナフィラキシーショックなどの副作用に注意する。小児への臍帯血液の投与速度は $1\sim 2\text{mL/kg}$ (体重) /hが目安とされており、成人の場合は、最初の10～15分間は 1mL/min での投与が推奨されている。米国の臍帯血バンクでは低速度（成人 100mL/h 、小児 1mL/kg/h ）からの投与開始を勧めているところもある。臍帯血輸注の間は患者さんの状態変化に注意する。有害事象が認められたら、Webにて有害事象を臍帯血バンクに報告する。重篤な有害事象は直ちに厚労省に報告される。

4. 最新の移植成績

全国臍帯血バンクを介して届けられた臍帯血ユニットを用いた臍帯血移植の最新の解析結果につき以下に記載

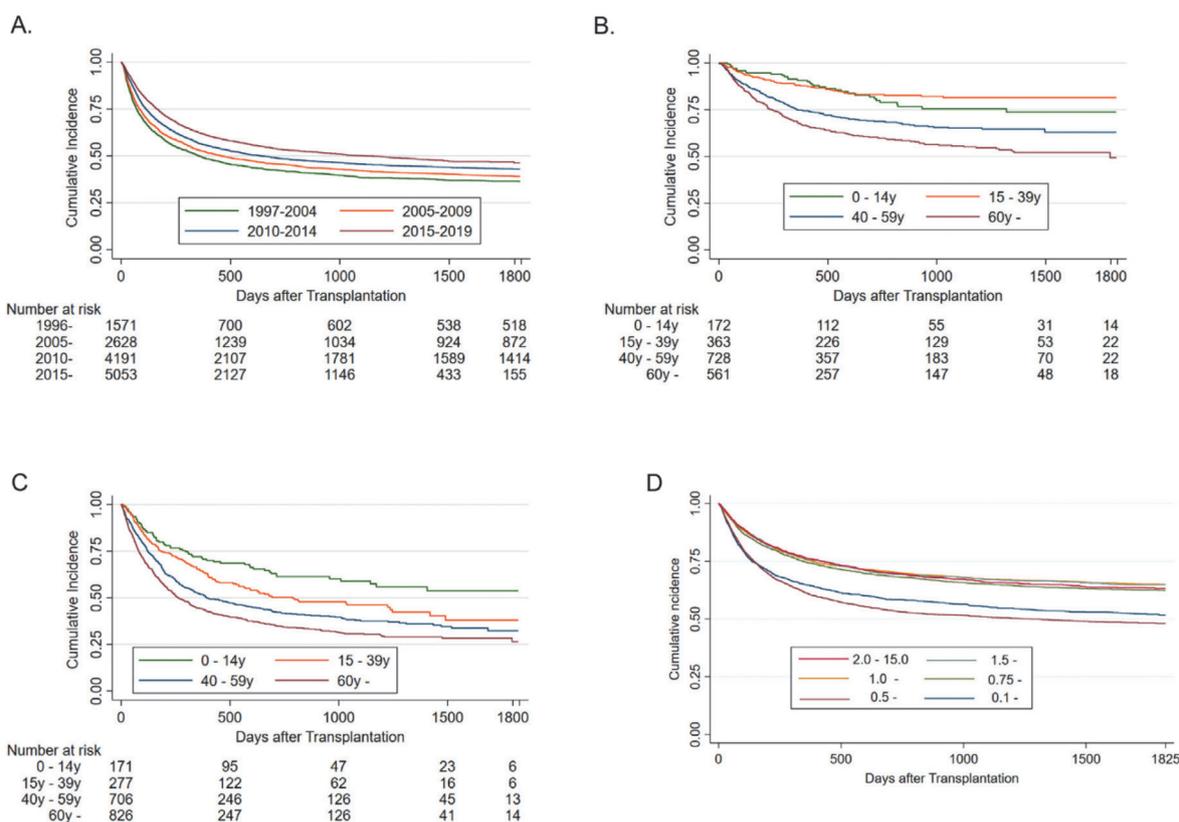


図2 A: 年代別移植後生存曲線。B: スタンダードリスク急性骨髄性白血病年齢別生存曲線 (2015-2019)。C: ハイリスク急性骨髄性白血病年齢別生存曲線 (2015-2019)。D: CD34 陽性細胞 ($\times 10^3$) / 体重 (kg) 別生存曲線 (参考文献 1 を引用)

する¹⁾。

症例は1996年～2019年に全国の臍帯血バンクを介して初回単一臍帯血移植が実施された13,502症例で、移植登録一元管理プログラムデータベース (TRUMP) を用いた解析である。移植後の全症例の生存率は年度毎に向上している (図1A)。近年 (2015年～2019年) の急性骨髄性白血病の年齢別累積5年生存率は、第1, 2完全寛解時15-39才で78%, 40-59才で64%, 60才以上でも49%と良好な成績であった (図2B)。疾患別・リスク別の移植後1年, 3年, 5年の生存率を表1に示す。これら成績は骨髄バンクからのHLA適合非血縁者間移植の成績と比べ遜色ないものと考えられる。

5. 臍帯血移植成績に関する因子

1) 移植後生存, 生着, 白血病再発, 急性GVHD (Ⅲ-Ⅳ度) 及び慢性GVHD発症に関する因子。

表2に示した。基準とする群に比べ有意 ($P < 0.01$) な因子を◎とした。生存では有意な因子として患者年齢, 前移植の有無, 白血病病期, HCTC index score, GDHD 予防法とともに臍帯血ユニットのCD34細胞数/kgが認められた。好中球生着, 白血病再発, 重症GVHD発症, 慢性GVHD発症率についても各々のリスクが有意に高い又は低い因子についても◎で記載した。

2) 好中球生着に及ぼす有核細胞数 (TNC) /kg, CD34陽性細胞数 (CD34⁺) /kg, CFU-GM数 (CFU-GM) /kgの効果

生着曲線と生着のリスクを各々6群の細胞数に分けて解析した。どの細胞成分も細胞数が増すにつれて良好な生着が得られたが, TNC/kgに比べCD34⁺/kgとCFU-GM/kgはより6群の生着率の幅が広く, とくに高い生着群を検索するのに有用であった。TNC/kg, CD34⁺/kg, CFU-GM/kgの関連を明らかにするためinteraction (交互作用) 解析を実施した。TNC/kgとCD34⁺/kgとの間ならびにTNC/kgとCFU-GM/kgとの間のinteractionのp値はそれぞれ0.013と0.019と交互作用が認められた。CD34⁺/kgとCFU-GM/kgとの間は $P = 0.314$ と独立した変数であった。これら結果から, 良好な生着を得るための選択にはTNC/kgよりもCD34⁺/kgとCFU-GM/kgを用いることが良いと考えられた。

最近の症例を用いた解析ではCD34⁺/kgが 1.0×10^5 以上では90%以上の生着率が得られている。0.5から $1.0 \times$

表1 疾患・病期別生存率 (2015-2019)
(参考文献1を引用)

疾患	年齢	N	生存割合 (x100)		
			1年	3年	5年
AML/1CR 2CR					
	0 -	82	0.95	0.68	0.68
	15-	216	0.86	0.78	0.78
	40-	460	0.75	0.66	0.64
	60-	365	0.68	0.57	0.49
AML/より進行期					
	0 -	52	0.56	0.33	0.10
	15-	153	0.64	0.42	0.37
	40-	435	0.48	0.34	0.28
	60-	536	0.40	0.26	0.24
ALL /1CR					
	0 -	81	0.87	0.84	0.80
	15-	130	0.91	0.88	0.88
	40-	189	0.77	0.66	0.63
	60-	91	0.76	0.62	0.59
ALL /より進行期					
	0 -	105	0.78	0.68	0.68
	15-	84	0.61	0.45	0.31
	40-	87	0.50	0.31	
	60-	52	0.44	0.25	
MDS/RA RAS					
	0 -	6	0.83	0.83	
	15-	16	0.93	0.84	0.84
	40-	65	0.69	0.62	0.62
	60-	98	0.59	0.44	0.41
MDS/more advanced stage					
	0 -	10	0.78	0.78	0.78
	15-	21	0.70	0.57	
	40-	135	0.67	0.52	0.52
	60-	216	0.55	0.43	0.32

表2 生存, 生着, GVHD, 白血病再発にかかわる因子 (多変量解析) (参考文献1を改変)

Clinical factor	Bases	Grouping	Mortality	Engraftment Neutro.>500/ μ l	Leukemia relapse	Acute GVHD (III-IV degree)	Chronic GVHD
移植年	2005-2009	4 group	◎↓	—~◎↑	—	—	—
患者年齢	0-14 y.o.	5 group	◎↑	○↑~◎↑	—	—	◎↑
疾患	AML	ALL	—	◎↑	◎↓	—	—
白血病病期	Standard	Advanced	◎↑	◎↓	◎↑	—	—
HCTC score	Low	3 group	◎↑	◎↓	◎↓	—	—
GVHD 予防法	CSP	TAC	○↓	◎↑	—	◎↓	◎↑
移植前治療	MAC	RIC	—	—	—	—	◎↓
	TBI	non-TBI	◎↓	—	—	○↓	—
臍帯血・患者の性	Male to Male	4 group	—~◎↓	—/◎↑/◎↓	—	○↓~◎↓	—
ABO 血液型適合度	minor	major	—	—~◎↑	—	—	—
CD34/kg no.	0.1 -0.5 ($\times 10^5$)	6 group	◎↓	◎↑	—	—	—
CFU-GM/kg no.		6 group	—	◎↑	—	—	—
HLA mismatch no.	0 mismatch	9 group	—*	◎↑**	○↓~◎↓***	—~◎↑***	—~◎↑***

◎ P<0.01 ○ P<0.05 — n. s. ↑ higher hazard ratio than bases ↓ lower hazard ratio than bases

10⁵では85%の生着率であるが、この群をCFU-GM/kgで見るとCFU-GM/kgが20から50×10³(この群の66.5%を占めている)ではおよそ90%の生着率が得られている(図3)。血小板の生着ではこのようなCFU-GM/kgの効果は認められていない。また、CD34⁺/kgの増加は生存率の向上に寄与している(図1D)。CD34⁺/kgの効果は海外も含め数多く報告されているが、CFU-GM/kgの報告はない。

6. HLAの適合性

1) 患者と臍帯血間のHLA不適合数(HLA-A, B, C, DRB1アレルレベル)と生存(死亡)および移植免疫反応との関連解析

現在までHLA-A,B,DRの2抗原不適合までの臍帯血ユニットの選択が認められている。この条件でHLA不適合数(HLA-A, B, C, DRB1アレルレベル)を解析した(表3)。

不適合数を5群に層別化した場合、0-1不適合数の症例は、より不適合数が多い症例に比べ良好な生着(HVG方向)、白血病の再発(GVH方向)が高率、急性GVHDが低率、慢性GVHDが低率であり、生存(死亡)リスクは5群間に有意差はなかった。

不適合数が2以上の症例では生着、白血病再発、急性GVHD、慢性GVHDともに不適合数が増えても悪化することはなかった。

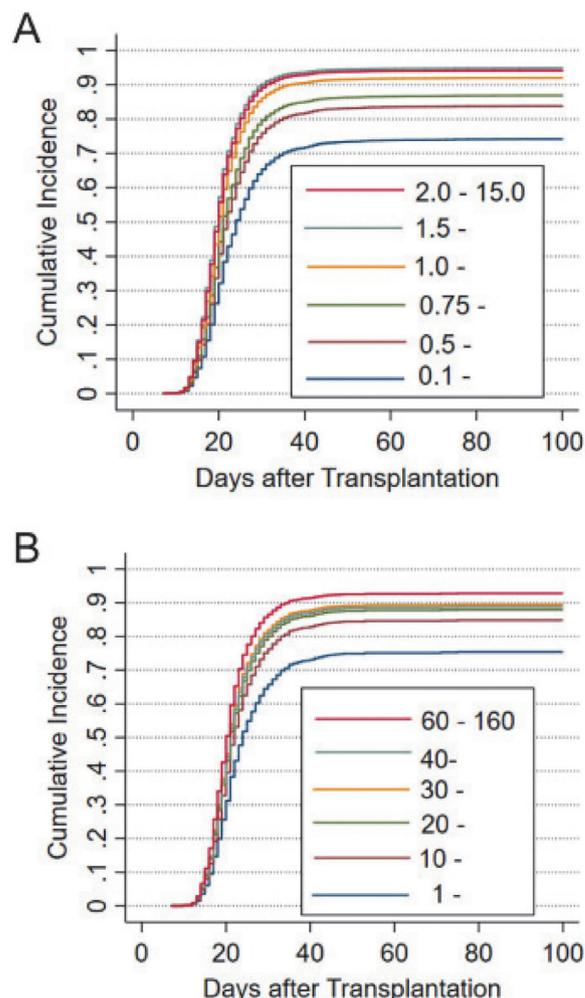


図3 A CD34⁺/kg ($\times 10^5$) と生着曲線 B CD34⁺/kgが0.5~1.0でのCFU-GM/kg ($\times 10^3$) 別生着曲線 (参考文献1を引用)

表 4 HLA アレル不適合数別の生存（死亡），好中球生着，白血病再発，GVHD 発症リスク（参考文献 1 を改変）

mm no.	Mortality				Engraftment				A-GVHD (II - IV)				A-GVHD (III - IV)				C-GVHD				Relapse (AML, ALL, MDS)			
	N	HR	%	p	N	HR	%	p	N	HR	%	p	HR	%	p	N	HR	%	p	N	HR	%	p	
HLA-A																								
0	3,654	1.00			4,086	1.00			4,009	1.00			1.00			3,031	1.00			2,908	1.00			
1	4,305	0.97	##	0.393	3,872	0.96		0.097	3,923	1.07	#	0.062	1.17	#	0.016	2,883	1.10	#	0.081	2,860	0.92	#	0.104	
2	664	0.94	##	0.329	583	1.03		0.534	583	1.08	#	0.280	1.19	#	0.176	431	1.05	#	0.597	440	0.78	#	0.016	
HLA-B																								
0	2,658	1.00			2,914	1.00			2,882	1.00			1.00			2,211	1.00			2,047	1.00			
1	5,316	1.07	##	0.088	5,017	0.92		0.004	5,018	1.11	#	0.025	1.53	#	0.000	3,687	0.99	#	0.842	3,694	0.95	#	0.391	
2	649	1.14	##	0.048	610	0.81		0.000	615	1.10	#	0.243	1.34	#	0.044	447	1.03	#	0.759	467	0.92	#	0.407	
HLA-C																								
0	1,993	1.00			2,436	1.00			2,393	1.00			1.00			1,819	1.00			1,711	1.00			
1	4,944	0.98	##	0.618	4,606	0.98		0.581	4,634	0.97	#	0.487	0.93	#	0.382	3,448	0.98	#	0.776	3,368	0.95	#	0.363	
2	1,686	0.95	##	0.411	1,499	1.02		0.681	1,488	1.02	#	0.732	0.98	#	0.841	1,078	1.08	#	0.393	1,129	0.95	#	0.534	
HLA-DRB1																								
0	2,033	1.00			2,345	1.00			2,302	1.00			1.00			1,743	1.00			1,611	1.00			
1	5,054	0.98	##	0.663	4,764	0.90		0.000	4,789	1.23	#	0.000	1.19	#	0.030	3,545	1.15	#	0.038	3,505	0.83	#	0.001	
2	1,536	0.97	##	0.516	1,432	0.86		0.000	1,424	1.35	#	0.000	1.28	#	0.018	1,057	1.42	#	0.000	1,092	0.79	#	0.002	

表 5 小児と成人別生存（死亡）リスク（参考文献 1 を引用）

	N	HR	95% C.I.		p		N	HR	95% C.I.		p
小児 (0 - 14才)						成人 (15 - 88才)					
0 - 1	396	1.14	0.85	1.53	0.398	0 - 1	598	0.97	0.86	1.09	0.598
2	294	1.28	0.94	1.74	0.122	2	972	0.94	0.84	1.04	0.225
3	271	1.00				3	2,359	1.00			
4	111	1.37	0.93	2.01	0.111	4	1,832	0.93	0.85	1.01	0.076
5 - 7	71	1.66	1.08	2.55	0.022	5 - 7	1,602	0.92	0.84	1.00	0.051

HLA-A,B,C,DRB1 のアレル適合度の重要性の報告している。さらに、2023 年の論文¹⁾ により HLA 適合度は移植免疫反応に様々な程度に影響を与えており、骨髄バンクの非血縁者間造血細胞移植とは異なる形で機能していることが確認された。海外では Eapen ら⁶⁾ は HLA アレル適合度の重要性を報告している。

Yabe ら⁷⁾ は HLA-A,B,C,DRB1,DQB1,DPB1 のアレルタイピングを後方視的に実施し、HLA-DPB1 アレル不適合が GVL 効果を生じさせることを報告している。

臍帯血移植における HLA 抗体の検討では Takanashi ら⁸⁾ の donor specific antibody (DSA) の影響や Jo ら⁹⁾ の HLA-DP/-DQ に対する抗体の影響が報告されている。

7. 患者にとって最適な移植ユニットをどのように選択したらよいか。

上記解析結果に基づき HLA-A, -B, -C, -DRB1 アレルに基づく臍帯血ユニット選択アルゴリズムを以下のように構築した。

- ドナー特異的 HLA 抗体に対する抗原を有する臍帯血ユニットは選択の対象にならない。
 - 体重あたりの有核細胞数 (TNC/kg) よりも CD34⁺/kg と GM-CFU/kg を優先して選択する。まず CD34⁺/kg の多いユニットを選択した中で、CFU-GM/kg が多いユニットがあれば選択する。
- 0.5×10⁵ 以上の CD34⁺/kg のユニットが選択可能である。
 CD34⁺/kg が 0.5 ~ 1.0×10⁵ の場合は CFU-GM/kg が 30×10³ 以上であれば 90% 前後の好中球生着率が予測される。1.0×10⁵ CD34⁺/kg 以上のユニットでは 90% 以上の好中球生着率が予測される。

1.0から1.5, 1.5から2.0, 2.0から15.0 ($\times 10^5$) CD34⁺/kgのユニットでは同様な好中球生着率が得られるが、血小板の生着率は 1.5×10^5 CD34⁺/kg以上で高い生着率が得られる。

3. 上記の選択基準で適切なユニットが得られたら、HLA アレル適合度に基づき選択する。
 - 1) 良好な好中球生着を得るためにはHLA アレル0-1 ミスマッチ (HVG 方向) ユニットをHLA アレル2 ミスマッチ以上ユニットに優先して選択する。
 - 2) 白血病の再発予防など個々の症例の病状を優先する場合には2-6 アレルミスマッチユニットの選択が可能である。
 - 3) 15才以上の成人では2-6 アレルミスマッチのユニットの選択が可能である。(7 アレルミスマッチ症例はほとんどないため除外した)
 - 4) 14才以下の小児では2-4 アレルミスマッチのユニットの選択が可能である。
 - 5) HLA-DRB1 または HLA-B アレルミスマッチのユニットの選択順位は低い可能性がある。

上記手順により選択された臍帯血ユニットの臍帯血移植の成績を予測し、他の移植源の成績の予測、各移植法の適応、ドナーが得られる可能性、移植可能な時期などを考慮して最適な移植法を選択する。

8. おわりに

我が国における単一の臍帯血移植はHLA 適合非血縁者間移植と少なくとも同等の成績が示されており、移植適応のアルゴリズムは改訂が必要である。臍帯血バンクの一部ではNGS-HLA typingの導入が始められており、より品質の高い(CD34陽性細胞数の多い)臍帯血ユニットの提供と合わせて、今後のさらなる移植成績の向上が期待される。また、日本で得られている臍帯血移植の知見は人種を超えた普遍的なものと考えられるが、欧米でのdouble臍帯血移植も含めた成績との違いを今後検証

する必要がある。さらに、臍帯血を用いた再生医療として造血幹細胞移植だけでなく数多くの臨床的な試み(例えば脳性麻痺)がなされており、近い将来に実臨床に導入されることが期待される。

参考文献

- 1) Y. Morishima, N. Watanabe-Okochi, S. Kai et al. Selection of Cord Blood Unit by CD34⁺ Cell and GM-CFU Numbers and Allele-Level HLA Matching in Single Cord Blood Transplantation. *Transplant Cell Ther.* 29(10): 622-631. 2023.
- 2) 椎名 隆 次世代シーケンシングに基づくHLA DNA タイピング法の特徴と移植医療への応用. *日本造血・免疫細胞療法学会雑誌* 12(3) 133-140 2023.
- 3) 内田 直之 臍帯血移植の合併症の現状と未来. *日本造血・免疫細胞療法学会雑誌* 11(2): 81-89, 2022.
- 4) 小沼貴晶 本法における成人に対する単一ユニットを用いた臍帯血移植. *日本造血・免疫細胞療法学会雑誌* 12(2):83-93, 2023
- 5) T Yabe, F Azuma, K K Kashiwase, et al. Japanese Cord Blood Transplantation Histocompatibility Research Group. HLA-DPB1 mismatch induces a graft-versus-leukemia effect without severe acute GVHD after single-unit umbilical cord blood transplantation. *Leukemia* 32 168-175. 2018.
- 6) M Eapen, JP Klein, A Ruggeri, et al. Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Netcord, Eurocord, and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. *Blood*, 123, 133-140. 2014.
- 7) H Yokoyama, Y Morishima, S Fuji, et al. HLA Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Impact of HLA allele mismatch at HLA-A, -B, -C, and -DRB1 in single cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 26, 519-528. 2020.
- 8) M Takanashi, Y Atsuta, K Fujiwara, et al. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*, 116, 2839-2846. 2010.
- 9) T Jo, Y Arai, K Hatanaka, et al. Adverse effect of donor-specific anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies directed at HLA-DP/-DQ on engraftment in cord blood transplantation. *Cytotherapy*, 25, 407-414. 2023.

Cord blood bank and cord blood transplantation

Yasuo Morishima¹⁾

¹⁾ Central Japan Cord Blood Bank

Recent progress of single cord blood transplantation in Japan is remarkable. More than 90% of engraftment, low incidence of severe acute GVHD, chronic GVHD and intensive graft versus leukemia effect were observed. CBT is considered one of choice, when HLA identical sibling donor is not available. This paper reports that how to cord blood units are collected and processed in 6 public cord blood banks in Japan, how to select suitable cord blood unit by CD34 positive cell number/kg, CFU-GM colony cell number/kg and HLA compatibility.

Key Words: cord blood transplantation, cord blood bank, CD34 positive cell, HLA compatibility.

第 23 回日本組織適合性学会近畿地方会抄録集

会 期：2024 年 7 月 6 日（土）
会 場：大阪府赤十字血液センター 7 階会議室
大阪市城東区森之宮 2 丁目 4 番 43 号
TEL 06-6962-7001

当番世話人：王寺 典子
奈良県立医科大学免疫学講座
〒 634-8521 奈良県橿原市四条町 840
TEL：0744-22-3051(2016) / FAX：0744-29-7503

事 務 局：日本赤十字社近畿ブロック血液センター
代表世話人 木村 貴文
事務局担当 高 陽淑
〒 567-0085 茨木市彩都あさぎ 7-5-17

【開催方法】

ハイブリッド開催（現地開催と Zoom によるオンライン配信）

【参加費】

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

プログラム

HLA 基礎講習会（事前登録者対象）	8 時 50 分～10 時 20 分
1) HLA の基礎知識 HLA 抗原（Serogram）から HLA エピトープ (Epigram) へ」 講師：橋本 光男（兵庫県立西宮病院腎移植センター）	
2) HLA 検査にかかるワークショップ DNA タイピングについて 講師：東 史啓（日本赤十字社血液事業本部 技術部 造血幹細胞事業管理課） 抗 HLA 抗体検査について 講師：栗田 絵美（広島大学病院 診療支援部臨床検査部門）	
開会の挨拶	
オープニングセミナー	10 時 30 分～11 時 30 分
座長 木村 貴文（日本赤十字社近畿ブロック血液センター） 演者 徳永 勝士（国立国際医療研究センター ゲノム医科学プロジェクト戸山プロジェクト長） 「HLA のこれから」	
一般演題	11 時 30 分～12 時 00 分
座長 石谷 昭子（奈良県立医科大学 未来基礎医学教室）	
1) FCXM 測定中にリンパ球の減少を認めた一例 ○高山智美 ¹⁾ ， 葛原宏一 ²⁾ ， 川村正隆 ²⁾ ， 山田直美 ¹⁾ ， 三好由真 ¹⁾ ， 小野原健一 ¹⁾ ， 野田智恵子 ¹⁾ ， 高尾徹也 ²⁾ （大阪急性期・総合医療センター移植支援検査センター ¹⁾ ， 大阪急性期・総合医療センター泌尿器科 ²⁾ ）	
2) 肝移植における DSA の意義 ○奥村晋也， 伊藤孝司， 波多野悦朗（京都大学 肝胆膵・移植外科 / 小児外科）	
3) 脊髄性筋萎縮症の修飾遺伝子である SMN2 遺伝子のスクリーニング法開発と日本人における SMN2 遺伝子欠失の推定頻度について ○崎間 誠 ¹⁾ ， 西尾久英 ²⁾ ， 坊池義浩 ³⁾ （神戸学院大学大学院栄養学研究科 ¹⁾ ， 神戸学院大学総合リハビリテーション学部 ²⁾ ， 神戸学大学栄養学部臨床検査学専攻 ³⁾ ）	
ランチョンセミナー	12 時 00 分～13 時 00 分
座長 谷 慶彦（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所） 「免疫原性血栓性血小板減少性紫斑病の病態解明における免疫学的アプローチ」 酒井 和哉（奈良県立医科大学 輸血部）	
近畿地方会世話人会	13 時 00 分～13 時 20 分
総会	13 時 20 分～13 時 30 分

- Topic discussion 13 時 30 分～ 14 時 00 分
 「脳血管病変の治療に用いる X 線照射済み臍帯血の品質試験とは？」
 木村 貴文（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）
- 特別講演 I 14 時 00 分～ 15 時 00 分
 座長 王寺 典子（奈良県立医科大学 免疫学講座）
 「動く細胞からみる生体防御システム」
 戸村 道夫（大阪大谷大学薬学部・免疫学講座）
- ワークショップ 15 時 00 分～ 16 時 00 分
 テーマ：検査技術と報告方法のスキルアップ
 座長 進藤 岳郎（広島大学病院 血液内科）
 高 陽淑（日本赤十字社近畿ブロック血液センター 検査三課）
 1) 「医師とのコミュニケーションで心がけていること～臨床検査技師の立場から～」
 今西 唯（京都府立医科大学附属病院 輸血・細胞医療部）
 2) 「兵庫さい帯血バンクにおける DSA の取り組み」
 川岸 万佑子（兵庫さい帯血バンク）
 3) 「当研究所の検査結果報告書と適合性評価の実態と課題」
 木野 佑亮（公益財団法人 HLA 研究所 技術部検査課）
- 特別講演 II 16 時 00 分～ 17 時 00 分
 座長 池亀 和博（愛知医科大学造血細胞移植センター）
 「新型コロナウイルス感染症（COVID-19）研究—単科医科大学からの発信—」
 伊藤 利洋（奈良県立医科大学 免疫学講座 /MBT 研究所）
- 閉会の挨拶

オープニングセミナー
HLA のこれから

徳永勝士

国立国際医療研究センター ゲノム医科学プロジェクト戸山プロジェクト長

移植、輸血などの臨床分野における HLA の重要性は言うまでもないが、自己免疫疾患、アレルギー、がん、感染症などの多様な疾患との関連や、薬剤やワクチンへの応答性との関わりにおいても HLA は重要な要因となっている。また、HLA 遺伝子群はヒトゲノムの中で最高度の多様性を示すことから進化学などの基礎分野においても注目されている。

これらについて近年私達が行ってきた研究の中から、感染症と HLA の関連について対照的な姿を示す B 型肝炎ウイルスと新型コロナウイルスを紹介する。また、19 番染色体上で KIR 遺伝子群の隣に位置する LILR 遺伝子群の遺伝子コピー数の多型について、ショートリードシーケンサによる全ゲノム解析およびロングリードシーケンサ解析に基づく興味深い結果を紹介する。

次に、世界各国の先導的な臨床および基礎研究者が集う第 19 回国際 HLA・免疫遺伝学ワークショップ (2026

年 5 月, 沼津市) について紹介する。提案されたプロジェクトの中から参加したいプロジェクトを選んで、自分達が収集した検体について行った解析結果を持ち寄って発表し、活発な議論を行う、合宿のような楽しい催しである。造血幹細胞移植などの重要なプロジェクトは引き続き実施されるとともに、日本チームからも上述の LILR 遺伝子群の構造と多型に関する新しいプロジェクトを提案している。

この国際ワークショップで行われる 20 余りのプロジェクトを概観すると、HLA 関連研究の最近の潮流を知ることができる。私が参加してきた ASHI や EFI から受けた印象なども交えて、eplet 解析・登録、新しい血清学解析、HLA 11 座の NGS 解析や KIR 解析の移植における意義、造血幹細胞移植後の HLA 欠失による再発などの話題にも触れたい。

一般演題

FCXM 測定中にリンパ球の減少を認めた一例

○高山智美¹⁾, 葛原宏一²⁾, 川村正隆²⁾, 山田直美¹⁾, 三好由真¹⁾, 小野原健一¹⁾, 野田智恵子¹⁾, 高尾徹也²⁾

大阪急性期・総合医療センター移植支援検査センター¹⁾, 大阪急性期・総合医療センター泌尿器科²⁾

【はじめに】リンパ球クロスマッチはドナーに特異的な抗体を検出することを目的とした検査であり、当検査室ではLCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test), FCXM (Flowcytometry Crossmatch) の2法を行っている。これまでFCXMが強陽性の場合にレシピエント血清中の補体の働きにより細胞傷害が起こり目的のリンパ球が減少することはあったが、今回FCXMが陰性にも関わらずリンパ球が減少した症例を経験したので報告する。

【方法】

①血清処理方法

レシピエント血清は凍結保存後に解凍し、15,000rpmで10分遠心したものを用いた。また、EDTA処理、非働化処理は以下のように行った。

- ・EDTA処理: EDTAの終濃度が約10mMとなるように血清にEDTAを添加した。
- ・非働化処理: 血清を56℃で30分インキュベートした。

②FCXM

プロテアーゼ処理したドナーリンパ球にレシピエン

ト血清、陰性コントロール血清、陽性コントロール血清をそれぞれ混和し室温で30分反応させた。洗浄後にFITC-Anti-Human IgG, PC5-CD3, PE-CD19を添加し、4℃で30分反応させた。洗浄後にフローサイトメーターにて測定し、Ratioを算出して判定した。

③抗HLA抗体検査

LABScreen Single AntigenTMを用いて測定を行った。

【結果と考察】通常のプロトコールで測定したFCXMではBリンパ球の減少を認めた。EDTA処理、非働化処理をした血清を用いたFCXMではBリンパ球の減少は認めず、Ratioは陰性であった。また、抗HLA抗体検査は陰性であった。

補体を不活化するEDTA処理、非働化処理によりリンパ球の減少が解消したことから、リンパ球の減少には補体の関与が考えられる。FCXM、抗HLA抗体検査は二次抗体にAnti-Human IgGを用いており、IgG以外の抗体は検出できない。このため、リンパ球の減少を引き起こしたのはIgG以外の抗体であることが示唆された。

肝移植における DSA の意義

○奥村晋也, 伊藤孝司, 波多野悦朗

京都大学 肝胆膵・移植外科 / 小児外科

【はじめに】肝移植における preformed DSA と de novo DSA の意義について検討する。

【方法】

- 1) Preformed DSA 陽性症例について, 患者背景・拒絶反応および患者生存への影響を検討した。
- 2) 移植後 de novo DSA 発生率と, 肝線維化・拒絶反応および患者生存への影響について検討した。

【結果】

- 1) Preformed DSA High titer (MFI > 10000) 症例では, ABO 血液型不適合に準じて, 術前に Rituximab 投与・血漿交換・免疫抑制剤投与を行っている。Preformed DSA 陽性例は女性に多く, 特に多産婦に多い傾向にあった。抗体関連型拒絶反応のリスク

因子は, MFI 高値, 複数の DSA 陽性などであった。一方, 抗体関連型拒絶反応の有無は, 患者生存には影響を与えなかった。

- 2) de novo DSA は移植後経時的に発生し, 特に小児に多い傾向を認めた。de novo DSA の有無は患者生存・グラフト生存に影響を認めなかったが, 晩期 T 細胞性拒絶およびグラフト肝線維化に相関を認めた。

【結語】Preformed DSA については, High-titer 症例について現行の Rituximab プロトコルを継続する。また de novo DSA は患者生存には影響を与えないものの, 長期的にグラフト肝の線維化に影響を及ぼすため, 特に若年者において, 術後の定期的な DSA の測定と, 定期肝生検でのフォローアップを行っていく方針である。

脊髄性筋萎縮症の修飾遺伝子である *SMN2* 遺伝子のスクリーニング法開発と日本人における *SMN2* 遺伝子欠失の推定頻度について

○崎間 誠¹⁾, 西尾久英²⁾, 坊池義浩³⁾

神戸学院大学大学院栄養学研究科¹⁾, 神戸学院大学総合リハビリテーション学部²⁾,
神戸学院大学栄養学部臨床検査学専攻³⁾

【目的】脊髄性筋萎縮症 (spinal muscular atrophy: SMA) は、常染色体劣性遺伝形式をとる下位運動ニューロン疾患である。原因遺伝子である *SMN1* 遺伝子の近傍には相同遺伝子である *SMN2* 遺伝子が存在する。*SMN2* 遺伝子のコピー数は多いほど SMA が軽症化する傾向にある。一方、*SMN2* 遺伝子欠失が他の筋疾患の発症について関連するとの報告もあり、*SMN2* 遺伝子の役割はいまだ十分に解明されていない。そこで、我々は *SMN2* 遺伝子のスクリーニング法を開発し、日本人における *SMN2* 遺伝子の欠失頻度を推定することで、今後の研究に寄与したいと考える。

【方法】検体は、*SMN1* 遺伝子を保有した日本人新生児の乾燥濾紙血 (Dried blood spots: DBS) 500 検体を使用した。*SMN2* 遺伝子欠失を検出するスクリーニング法はリアルタイム PCR で検討を行い、確認検査として PCR-RFLP を行った。さらに、*SMN2* 遺伝子欠失の確定については、サンガー法を用いてシーケンス解析を行った。

【結果】リアルタイム PCR の解析結果は、Ct 値が平均 +1SD 未満の検体 (グループ A) は 444 検体、1SD 以

上かつ 2SD 未満の検体 (グループ B) は 27 検体、2SD 以上の検体 (グループ C) は 29 検体であった。グループ B と C を対象に行った PCR-RFLP での確認検査では、56 検体中 28 検体に *SMN2* 遺伝子欠失が認められた。*SMN2* 遺伝子の欠失頻度は合計 500 検体中 28 検体で 5.6% であった。グループ B と C の残り 28 検体については、PCR-RFLP とシーケンス解析の結果で *SMN2* 遺伝子を保有していた。

【考察】今回の研究では、増幅効率の高い DNA ポリメラーゼを使用し、最適な PCR 条件を設定することで、リアルタイム PCR での *SMN2* 遺伝子スクリーニング法を開発することができた。*SMN2* 遺伝子は SMA 患者に必ず存在するが、*SMN1* 遺伝子を保有した日本人における *SMN2* 遺伝子欠失頻度は報告されていない。我々は簡便かつ大量検体の解析を可能とするリアルタイム PCR を用いた *SMN2* 遺伝子スクリーニング法により、今回はじめて日本人の *SMN2* 遺伝子欠失が 5.6% であることを推定した。今後、他の筋疾患における、*SMN2* 遺伝子欠失の集団解析を行うことで、*SMN2* 遺伝子の役割の解明につながることを期待できると考えられた。

ランチョンセミナー

免疫原性血栓性血小板減少性紫斑病の病態解明における免疫学的アプローチ

酒井和哉

奈良県立医科大学 輸血部

血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura: TTP) は血小板減少, 溶血性貧血, 虚血性臓器障害で特徴づけられる致死性血栓症である。TTP の病態は血中の止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) の機能亢進による病的な血小板血栓の形成と理解されている。VWF が生体内で適切な止血能を維持するためには, ADAMTS13 による切断を受けた, 適切な重合度の重合体として血中に存在する必要がある。しかしながら, TTP の大部分を占める免疫原性 TTP 患者においては ADAMTS13 酵素活性が抗 ADAMTS13 自己抗体によって後天的に著減している。免疫原性 TTP は抗体産生伴う自己免疫性疾患であり, 血漿交換療法による抗 ADAMTS13 自己抗体の除去および免疫抑制剤による加療が標準治療として実施される。近年, 急性期の血栓イベント抑制のため VWF A1 ドメイン抗体薬であるカプラシズマブが上市され, 免疫原性 TTP の治療は新たなフェーズに入った。しかしながら, 免疫原性 TTP においては治療後の再発率が 3 割程度と報告され, また明確な抗体産生のメカニズムが解明されていない。

自己免疫性疾患における発症の背景リスクとして疾患感受性 HLA が認知されている。免疫原性 TTP においてもヨーロッパ系白人集団を対象とした解析から, *DRB1*11* (*DRB1*11:01* および *DRB1*11:04*) が疾患感受性 HLA として同定されている。我々は日本人免疫原性 TTP を対象とした HLA タイピング研究を行い, 東アジアに局在する *DRB1*08:03* が日本人にお

ける疾患感受性 HLA であることを示した。ヨーロッパ系白人における基礎解析結果より, *DRB1*11* 分子は ADAMTS13 の CUB ドメイン内に存在するペプチドと結合し, 自己反応性 CD4 陽性 T 細胞の刺激を行うことが報告されている。我々は抗原提示細胞における HLA 分子と抗原提示ペプチドの親和性が細胞表面の HLA-ペプチド複合体の発現量と相関する原理を利用した MHC density assay を筑波大学遺伝医学と共同で実施し, *DRB1*11:01* 分子および *DRB1*08:03* 分子は 6 つの共通する ADAMTS13 由来ペプチドについて強い親和性を示した。この結果はヨーロッパ系白人と日本人において異なる疾患感受性 HLA を有しながら, 同様に抗原提示を行うことを示唆する。一方, 免疫原性 TTP 患者において自己反応性 B 細胞から分化した形質細胞は ADAMTS13 に対する自己抗体を産生・血中に分泌を行う。この自己抗体が認識する ADAMTS13 エピトープについてもヨーロッパ系白人においては積極的に解析がなされており, Cysteine-rich および Spacer (CS) ドメインに対する抗体の保有頻度が高いと報告されている。我々はベルギー KU Leuven と共同研究として, 日本人急性期免疫原性 TTP における自己抗体のエピトープマッピングを行った。ヨーロッパ系白人および日本人は CS ドメインに対する抗体保有率が 7 割であり, また約 3 割の患者が CS ドメインのみに対する抗体を保有することが示されたこのように, 異なる人種・異なる遺伝的背景にもかかわらず, 免疫原性 TTP 患者は類似した免疫プロファイルを有する。

Topic discussion

脳血管病変の治療に用いる X 線照射済み臍帯血の品質試験とは？

木村貴文

日本赤十字社近畿ブロック血液センター

国内で実施される同種造血幹細胞移植の約 1/3 は臍帯血移植ですが、これは日本に特有の状況で、欧米では骨髄・末梢血幹細胞移植が主流です。海外でも臍帯血バンク事業は盛んですが、供給目的は造血器疾患や代謝疾患ではなく、神経疾患や血管病変が大半です。虚血性脳障害の新生児あるいは脳卒中など虚血性神経疾患の成人患者を対象とする同種臍帯血輸注療法に関する初期臨床試験が実施され、その安全性だけでなく有効性の可能性を示唆する報告もされています。新生児や高齢者は免疫・代謝系に問題を抱えている可能性が高く、同種臍帯血輸注療法の症例が今後累積されるにしたがって移植片対宿主反応 (GVHD) への配慮が求められると予想されます。

私たちは、海外での虚血性神経疾患を対象とする臨床試験が、臍帯血の治療メカニズムが明らかにされないまま実施されていることに疑問を持ち、それを解明する研究に着手しました。2004 年に田口らが脳梗塞モデルマウスでの臍帯血 CD34 陽性 (CD34⁺) 細胞の血管新生を介する治療効果を証明したことを基盤として、CD34⁺ 細胞が虚血性障害を受けた部位の血管内皮細胞に gap junction を介して直接グルコースなどの小分子エネルギー源を供給することで血管新生を促進することを見出しました。しかも、その受け渡しは臍帯血投与後極めて短時間 (約 10 分) で起こることも発見しました (Stroke,

2020)。

そこで私たちは、臍帯血の CD34⁺ 細胞が極短時間で血管修復効果を発揮するには、従来の増殖・分化能力がまったく不要ではないかという仮説をたてました。15 Gy という高線量の X 線を照射して幹細胞の増殖・分化能を完全に奪った臍帯血から精製した単核球分画を脳梗塞モデルマウスに動脈内投与すると、未照射臍帯血由来細胞と同様に顕著な神経学的改善が得られました。また、照射済み臍帯血細胞は凍結融解後も同じ治療効果を示しました。さらに、これらの効果が梗塞巣での血管新生促進によるものだけでなく、投与臍帯血細胞が血液脳関門のバリアを超えて星状細胞など血管周辺の神経細胞にも小物質を供与することで神経再生を直接促進することによる可能性も発見できました。これら一連の研究を通して、虚血性脳疾患に対する同種臍帯血輸注療法の治療メカニズムの主要な部分が明らかになったと考えられます (Sci Rep, 2004)。

しかし、これらの Proof of Concept をベッドサイドに展開するには、practical use に必要な品質の確保が不可欠です。X 線照射で GVHD への対応は「ほぼ」問題ないと考えられますが、この領域の専門家のみなさんには、どのように品質管理のシステムを構築すべきかご議論いただければ幸いです。

特別講演 I

動く細胞からみる生体防御システム

戸村道夫

大阪大谷大学薬学部

私達は、テキストのイラストに描かれた細胞同士の相互作用を見ながら勉強し、生体内で起こっている生理現象をイメージしてきた。しかし、現実の生体内では、沢山の種類の免疫細胞が、組織内、臓器間を移動して働いている。組織内では免疫応答の場を形成する間質系の細胞、あるいは神経系とも相互作用している。そして、これらを健常時から病態時において変化させることで生体恒常性を維持している。

Seeing is Believing, 「百聞は一見にしかず」, 蛍光タンパク質そして生体内 2 光子レーザー顕微鏡観察技術の発達により、生体内での細胞の動態、相互作用に加え機能発現の可視化が実現している。生体内 2 光子レーザー顕微鏡観察は一般的に数 100 μm 立方の中で起こる生命現象を直接観察し、生きている体の中で起こっている生

物現象を目で見て理解できる。それに対し、近年開発が進んだ組織透明化法は、固定化された組織ではあるが数 mm 単位を超え、ヒト検体やマウスなどの個体レベルでの蛍光イメージングによる単細胞レベルの 3D 可視化観察を可能にした。また、我々は、紫色の照射で緑から赤色に変色する光蛍光タンパク質 Kaede/KikGR を発現するマウスを用い、生きたマウスでの in situ 光ラベリング系を確立し、全身レベルで定常時および病態時における臓器間の免疫細胞動態の解明を可能にした。

本講演では、免疫応答の開始から病態まで、上記の可視化技術によって得られた映像をお見せしながら、生体防御機構を担っている個々の細胞のダイナミックな働きを紹介します。

ワークショップ「検査技術と報告方法のスキルアップ」
1) 医師とのコミュニケーションで心がけていること
～臨床検査技師の立場から～

今西 唯

京都府立医科大学附属病院 輸血・細胞医療部

臨床検査技師は、検査結果に関して医師とのコミュニケーションを取る際にすれ違いが起こることを経験する。原因として、1) 臨床検査技師と医師が各々で電子カルテ上のデータや短いコメントを確認するのみで、直接対話をする機会が少ないこと、2) 医師が多忙であり連絡のタイミングが難しいこと、3) 臨床検査技師と医師で有する知識が異なること、3) 臨床検査技師と医師でデータ解釈についてギャップがあること、などが挙げられる。

私が組織適合性検査に携わり7年が経過したが、その間に医師とのコミュニケーションについて試行錯誤することを2回経験した。1回目がベテランの前任技師が退職するにあたり初心者の方に検査が引き継がれた時、2回目が院内の腎移植体制を再構築するにあたり、今まで移植医療に携わっていなかった腎臓内科医に対して検査結果報告を行うようになった時である。1回目は、ベテラン技師から急に初心者の方に担当者が交代になったことで、当時の移植外科医が不安や不信感を抱いていることが分かり、「自らの検査技術・知識の向上」「医師やチームからの信頼獲得」が課題となった。そこで、日本組織適合性学会の初心者向け講習会に繰り返し参加すること、学会で他施設・他病院の先生や先輩方に検査法や

解釈について教えていただくこと、各試薬メーカーの学術担当者から情報を得ることなどを積み重ねて少しずつ知識・技術を磨くとともに、院内では移植一般外科主催のカンファレンスに参加し検査結果について対面で話することを心掛けた。コミュニケーションの機会が増えるに従い、徐々に医師から信頼を得ることができるようになり、検査に関する質問や相談を受けることも多くなった。2回目は、初めてHLA検査データを目にする腎臓内科医と仕事をする機会が増え、「医師との知識共有」について考えることとなった。検査結果について医師へ個別に補足説明を実施するほかに、新体制で移植医療に参加した腎臓内科医に対し各メーカー主催のオンライン講演会について案内したり、他施設の先生にお力添えをいただいで講演会を開催したりすることで、多忙な医師が効率的に知識を得やすいように工夫した。腎臓内科医に電話や対面でなるべく直接結果説明をする機会を設けるようにした。現在では医師と検査データの解釈について有意義なディスカッションができるようになってきた。当院で実施してきたコミュニケーション向上への取り組みが、各施設での医師とのコミュニケーションについて参考になれば幸いである。

2) 「兵庫さい帯血バンクにおける DSA の取り組み」

川岸万佑子

兵庫さい帯血バンク

臍帯血移植は 2 座までの HLA 不適合移植が可能のため、患者が臍帯血の有する HLA 抗原に対する抗 HLA 抗体 (DSA) を持つと生着不全の頻度が高いことを移植医は認識している。しかし、抗体特異性同定試薬の Single Antigen 製造・販売元の One Lambda 社は、陽性カットオフ値を明確に規定しておらず、nMFI 値 (Test Details の Normal 値) が抗 HLA 抗体価を示す目安の数値であり、5,000 以上を強陽性、1,000-3,000 を弱陽性の程度を目安としている。一般的な認識では、試薬の cut off 値が 1,000 であるが、日赤では、独自の陽性基準 (Rxn を指標とし 4 以上を陽性) を決めており、nMFI 値 100 位の低値であっても陽性と判定される。移植医はそれに基づき DSA 陽性と判定し、当該臍帯血を移植しない決定をされることがある。当バンクでは、Single antigen のデータについての相談があった移植

医療機関には説明を行い、DSA 判断の対応を実施している。

次に、患者が抗 DP, 抗 DQ 抗体を有する場合は、現在では、臍帯血の DP, DQ タイプが未実施のため、移植医療機関より DP, DQ タイピング実施に必要な当該臍帯血の DNA の依頼があれば提供し、移植医療機関で臍帯血の DP, DQ タイピングを実施し、DSA の判断をしてもらっている。そこで、当バンクでは、本年 1 月分から臍帯血登録時 HLA 検査を NGS 法 (AllType NGS 11-Loci Amplification Kit) に切り替え、ジェノタイプファーマに委託している。このことは、見なし HLA タイプではない HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 での登録となり、本件は、抗 DP, DQ 抗体の DSA の判定のみならず、移植成績の向上にも有効となるものと考えている。

3) 当研究所の検査結果報告書と適合性評価の実態と課題

木野佑亮

公益財団法人 HLA 研究所 技術部検査課

当研究所の公益業務のひとつとしてコンサルティングがあり、その一環として検査結果報告書に適合性に関するコメントを記載している。HLA 遺伝子型タイピングの検査結果報告書には、血縁者での適合性や重症急性 GVHD ハイリスクと相関する HLA 型の組み合わせ情報を提供している。また、抗 HLA 抗体検査結果報告書ではドナー HLA タイプによるバーチャルクロスマッチ結果や、DSA 陰性となるドナー選択の情報を提供している。

また、当研究所のホームページには、「問い合わせ窓口（コンサルティング）」を設けており、各種移植検査に関連する相談を受け付けている。2021 年 9 月～2024 年 5 月の間のコンサルティング内容について集計を行ったところ、臨床分野では造血幹細胞移植関連が 82% と多く、一方、臓器移植関連は 8% と少なかったが、近年、増加傾向にある。相談内容では、レアアレルや新規アレルでの適合性の解釈が最も多く 26%、次いで抗体検査における DSA の解釈が 19%、各バンクでの適合ドナー

の選定に関する相談が 19%であった。

現状のコンサルティング業務の課題としては、報告書上の適合性コメントが、主に造血幹細胞移植を対象としており、事例によっては臓器移植に対応したコメントへの対応が必要である。また、これまでのコンサルティング事例をホームページで公開し共有することで、迅速な適合性評価に対応することが出来る体制の構築が望まれる。

HLA 検査結果は、各臨床分野でのバックグラウンドが異なること、その解釈が難しい事例が多いことから、知識や情報を積極的に広めていくことが必要不可欠である。本ワークショップでは、各種報告書でのコメントの内容について示すともに、現状、問い合わせ窓口から寄せられたコンサルティング内容について紹介する。これからの移植関連医療に関し、より有益な情報を提供できるように努め、効率的かつ、効果的な手法について議論できることを期待したい。

特別講演 II

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 研究 — 単科医科大学からの発信 —

伊藤利洋

奈良県立医科大学 免疫学講座 / MBT 研究所 教授

2020 年からの新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の蔓延は、我が国が経験したことのない医療崩壊を引き起こし、社会経済活動にも大きな弊害を与えた。今後 COVID-19 をはじめとする新興感染症対策は日本をはじめ世界共通の喫緊な課題である。奈良県立医科大学では国内で新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に感染した日本人の 1 例目を本学附属病院にて確定診断したこと、研究施設としても SARS-CoV-2 を取り扱うことのできる BSL (Biosafety level) 3 対応施設を有していることから、本学では COVID-19 研究を積極的に進めてきた。

本講演では、特に COVID-19 パンデミック当初から取り組んできた COVID-19 研究の成果ならびに今後の発展性につき、紹介したい。

(1) 新型コロナワクチン接種による免疫記憶機構の解明

COVID-19 のパンデミックを契機に 2021 年春より新しいタイプのワクチンである mRNA ワクチンの接種が始まった。mRNA ワクチンはほぼ同時期に人類が初めて接種するワクチンであり、人における免疫記憶のメカニズムを解明する絶好の機会ともなった。なかでも獲得免疫の中核を担う T 細胞は、抗原を認識する受容体分子である T 細胞受容体 (TCR) を有しており、TCR は多様な抗原と反応できるように、遺伝子再構成や体

細胞超突然変異の機構によって、多様な TCR が創出される。そこで我々は個々に異なる特異性を持った TCR によって特徴づけられた T 細胞のコレクションである TCR レパトア解析をワクチン接種前から経時的に行った。TCR レパトアならびに HLA の解析から新型コロナワクチン接種による免疫記憶機構の解明に迫った。

(2) 身近に存在する抗 SARS-CoV-2 物質の探索—産学連携への取り組み

特に日本で初めての緊急事態宣言が発令された 2020 年は、COVID-19 に対する明らかな予防法がなく、非常に不安な時代であった。COVID-19 の主な感染経路は飛沫・エアロゾル感染であり、無症状・軽症の感染者にも感染性があること、また、会食・発声などによって飛散する感染者の唾液中にも多くのウイルスが存在することが、SARS-CoV-2 の強い感染性の一因と考えられている。そこで我々は早期に安全かつ簡便な予防法を探索し、唾液における SARS-CoV-2 不活化研究に取り組んだ。そしてその研究成果は産学連携を推進する本学独自の MBT (Medicine-Based Town) コンソーシアムの参画により、商品化にまで至った。このような本学独自の MBT 構想で挑戦する新たな産学連携の取り組みについても紹介していく。

第7回 関東HLA研究会記録

会 期：2024年5月18日（土曜日）

会 場：東京大学医科学研究所1号館・講堂

開催方法：ハイブリッド形式

担当幹事：椎名 隆

東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学領域

特別講演

造血細胞移植 ～臍帯血移植の成績向上，および適応拡大に向けた研究～

高橋 聡

東京大学医科学研究所 臨床精密研究基盤社会連携研究部門

分子標的薬や遺伝子・免疫療法の臨床開発に伴い、多くの造血器悪性疾患は現在、治療可能な疾患となっているが、そのためには最終的に造血幹細胞移植が必要となる患者がいまだに多いのも現状である。一方で移植可能な患者年齢の上限が徐々に高くなるとともに、移植ドナー・細胞ソースの多様化により、近年は移植が必要な患者のほとんどが移植を受けることが可能となっている。依然として、HLA一致同胞が最善ドナーということになっているが、それ以外のいわゆる代替ドナーからの移植成績の向上が著しく、全体の生存率向上の大きな要因の一つとなっている。その中で臍帯血は現在わが国ではHLA一致・不一致血縁ドナーを含めても最も多く使用されているドナーソースとなっており、その移植成績の向上も著しい。

臍帯血移植は、ドナーへの負担がほぼ皆無であり、慢性GvHDのリスクが低いことによる移植後QOLが良好である点、GvL反応がより強化されることに起因されると思われる移植後再発のリスクが低いなどの利点があり、すぐに入手できることにより最適な時期での移植が可能であることと相まって良好な移植成績の要因となっている。一方で、他の移植法に比べて造血・免疫系の移植後回復の遅延が以前から問題になっており、その改善がなされれば全ての中で最善な移植法となりえる。本講演では造血幹細胞の増幅、抗原特異的免疫細胞による細胞療法などの臨床開発に加え、機械学習法を用いた大規模コホートの解析による移植後好中球の回復に関与する因子の解析など、最近取り組んできた研究成果も含めた概説を予定する。

教育講演

子宮移植は新しい医療技術となり得るか？

木須伊織

慶応義塾大学医学部 産婦人科学教室

近年、生殖補助医療技術の発展により多くの不妊夫婦に福音がもたらされているが、先天性もしくは後天性の子宮性不妊女性の挙児は困難である。最近、これらの子宮性不妊女性が児を得るための1つの選択肢として「子宮移植」という新たな生殖補助ならびに移植医療技術が考えられている。海外では既に臨床応用がなされ、これまでに100例以上の子宮移植が実施され、60名以上の児が誕生し、急速に臨床展開されてきている。

子宮移植には医学的、倫理的、社会的課題が内包される。医学的課題は、生体ドナー手術の侵襲性をはじめとして、周術期合併症や拒絶反応の回避、免疫抑制薬による感染症対策、ハイリスク妊娠管理、新生児のフォローなど多岐にわたる課題も存在する。倫理的課題は、生ま

れた子の福祉の尊重、ドナー・レシピエント・児のリスク、生命に関わらない臓器の移植の許容、養子制度や代理懐胎などの他の代替手段との対比、臓器売買やその斡旋などが主な論点として挙げられる。社会的課題は、子宮性不妊患者が児を得るための手段として、子宮移植が社会のニーズとして真に求められているか、社会的価値を検証せねばならない。

子宮移植にはこれまでの医療技術にはない新たな臨床倫理的課題が多く存在するが、その実施を望む子宮性不妊女性からの声も多く、国内での臨床展開が大いに期待されている。本講演では子宮移植の現状や課題に触れながら、本技術の将来の可能性について議論したい。

ワークショップ「ケーススタディ」

造血移植・輸血分野から 前島理恵子（帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター）
臓器移植分野から 祖父江晃基（東邦大学医療センター大森病院 輸血部）

本ワークショップでは、造血幹細胞移植、輸血、臓器移植の各分野において、日常の検査現場でしばしば遭遇しうるであろう「取りこぼしてはいけない」あるいは「判断に悩む」症例を選択肢形式の設問とともに提示します。その設問に対してご参加の皆様とともに対応を考え、パネリストが解説するというケーススタディ方式で進めま

す。各パネリストから提示される設問に、ご参加の皆様はPCまたはスマートフォンから回答入力フォームにアクセスいただき、回答を入力してください。皆様の回答の集計結果をリアルタイムで公表し、座長・パネリストとディスカッションします。

シンポジウム「NGS-HLA タイピングの新たな展開」

1. ハイブリッドキャプチャー法による HLA タイピングとその応用

細道一善

東京薬科大学生命科学部 ゲノム情報医学研究室

ハイブリッドキャプチャー法はゲノム上のターゲット領域に特異的なビオチン化プローブとサンプル DNA とのハイブリダイゼーションにより、ゲノム関心領域を捕捉し、磁気プルダウンにより分離する手法である。HLA 遺伝子群をターゲットとして本手法を適用することで遺伝子網羅的に HLA タイピングすることが可能となる。本手法における NGS を用いた一般的な HLA タイピング手法との違いは HLA 遺伝子の特異的増幅ステップを用いないことであり、PCR 増幅が困難であったサンプルの解析が可能であること、構造多型を有する遺伝子についてコピー数を反映したタイピング結果が得

られること、多検体検査の実施のために自動分注機に適用することが容易であることなど、多くの優位性を有する。本講演ではハイブリッドキャプチャー法による HLA タイピング手法を実際の解析データとともに紹介する。さらに、その応用例として、セルフフリー DNA、FFPE 由来 DNA、古代人骨 DNA、1 細胞 RNA などの質的または量的に特殊なサンプルへの適用と研究における解析例についても紹介したい。また、ハイブリッドキャプチャー法の精度管理のための取り組みとしてすすめている機械学習による精度評価方法についても議論したい。

2. NGS-HLA タイピング法の有用性評価プロジェクト
～その背景と研究計画～

椎名 隆

東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学領域

NGS に基づく HLA DNA タイピング法 (NGS-HLA 法) は、HLA II 座のアレルを遺伝子全長レベルで高精度に判定する検査技術であり、従来の PCR-SBT 法や PCR-rSSO 法などの短所を補うことから、移植成績の向上が期待される標準 HLA タイピング法として国際的に普及しつつある。わが国においても、2016 年 11 月 15 日以降、NGS-HLA 法検査結果をもって JMDP に登録された患者は、登録後の PCR-SBT 法による患者確認検査が不要になった。その後、2020 年 3 月 3 日より JMDP を介した骨髄・末梢血幹細胞移植における患者 HLA 確認検査やドナー HLA オプション検査が PCR-SBT 法から NGS-HLA 法に変更された。ところが、NGS-HLA 法の導入により、従来法と比して、①どの程度の新規アレ

ルが同定されるか、②どの程度の移植後のリスクになりうる新規アレルが含まれるか、③それらが移植成績にどのような影響を与えるか、等についてはその基礎となる解析結果が未だ存在しない。そこで演者らグループでは、NGS-HLA 法の有用性を評価し、移植成績と直結する有益な情報を見出す計画を、日本骨髄バンクを介する非血縁者間造血細胞移植症例を用いて進めており、その情報をドナー選択アルゴリズムの提案や移植成績の向上にフィードバックすることに重要な意義を有するものと考えている。本シンポジウムでは、この有用性評価プロジェクトの計画に至った経緯からその計画について、海外からの最新情報を含めて紹介したい。

一般演題1

HLA 適合血小板献血者における SSO 法と NGS 法の判定結果の比較検討

内田みゆき¹, 清水まり恵¹, 鎌田裕美¹, 阿部和真¹, 中野 学², 鈴木友菜³, 小原琢巳⁴, 小林洋紀⁵, 竹内奈由美⁶, 高 陽淑⁷, 谷川桃子⁸, 首藤笑里⁹, 高橋大輔¹, 宮田茂樹¹, 谷 慶彦¹, 佐竹正博¹

¹ 日本赤十字社 血液事業本部中央血液研究所, ² 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター,

³ 日本赤十字社 東北ブロック血液センター, ⁴ 日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター埼玉製造所,

⁵ 日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター, ⁶ 日本赤十字社 東海北陸ブロック血液センター,

⁷ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター, ⁸ 日本赤十字社 中四国ブロック血液センター,

⁹ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

【目的】SSO 法は、簡便で処理能力が高い検査法であるが、判定結果にはアンビギュイティが数多く存在する。今回、SSO 法で判定困難であった検体について、解像度の高い NGS 法との比較を行ったので報告する。

【方法】SSO 法は WAKFlow HLA タイピング (湧永製薬) を用い、専用のソフトウェアによる自動判定結果を使用した。NGS 法は AllType NGS (One Lambda) を用い、判定には TSV (TypeStream Visual Software) を使用した。HLA 適合血小板献血者 83,451 検体について SSO 法を実施し、No Pattern や低頻度アレルを理由として判定保留となった 420 検体 (0.5%) を対象とし、その中で NGS 法と不一致を認めた検体について詳細に解析を行った。対象はクラス I とし、第 2 区域までを比較した。

【結果】420 検体中 79 (18.8%) で不一致を認めた。アレル毎の集計では 83 アレル (A:18, B:28, C:37) に不一致を認めた。SSO 法における保留理由の内訳は、低頻度アレルが 51 アレル、No Pattern が 32 アレルであった。NGS 法との不一致理由は、2 法で異なる低頻度アレルの検出例 (22) が最も多く、次いで新規アレル (20)、プローブの反応不良による誤判定 (12)、イントロン変異による増幅不良 (10)、その他 (19) の順であった。

【考察】SSO 法による自動判定では、正しい HLA 型を同定することは難しい場合がある。特に SSO 法で低頻度アレルあるいは No Pattern と判定された場合は、NGS 法など他法での確認が望ましいと考える。

一般演題2

PC-HLA 供給検査の依頼状況とHLA抗体の関連性

續橋雅子, 田原綾乃, 増田英敏, 石本裕子, 安藤 萌, 山口陽平, 吉田芳生, 新国 駿, 礪波 薫,
小林洋紀, 津野寛和, 室井一男

日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター

【背景・目的】HLA 適合血小板 (PC-HLA) は血小板輸血不応 (PTR) の患者に HLA 抗体が検出された際に適応となる血液製剤である。当施設では、医療機関から免疫学的機序による PTR が疑われた患者の HLA 抗体検査依頼を受ける際、検体と共に検査依頼書の提出を要請している。今回、検査依頼書における患者情報の記載項目を集計し HLA 抗体の関連性を調査した。

【方法】2021 年 4 月から 2023 年 3 月の期間に当施設が依頼を受けた 1043 件 (135 施設) を対象に、妊娠歴や臨床症状等の患者情報と HLA 抗体陽性率を集計した。

【結果】対象の 1043 件中 432 件 (41%) が HLA 抗体陽性で、陽性率は男性より女性に有意に高く、妊娠歴がある女性

では 66.7% と高値を示した。HLA 抗体陽性率は、女性は 30 代から 90 代までが 60% 程度と高く、男性は 90 代 (50%) に次いで 20 代 (35%) が高かった。10 代以下は 7% と低かった。疾患別では血液疾患が 85.4% を占め、リンパ系の血液悪性疾患群の陽性率は 22% と低かった。その他の記載項目は HLA 抗体陽性群と陰性群で差がなかった。輸血効果については記入率が 6 割程度だったが、実際に CCI 値を算出できる症例は 2 割程度だった。

【考察】今回の結果から、女性の HLA 抗体陽性率と妊娠歴の関連性は強く、リンパ系の血液悪性疾患では男女ともに HLA 抗体陽性率が低い特徴があることが示唆された。

一般演題3

抗 HLA 抗体に関する血清凍結融解の影響について

細羽恵美子¹, 石塚 敏¹, 笹野まゆ¹, 小林悠梨¹, 安尾美年子¹, 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

【背景】臓器移植において術前のリンパ球細胞傷害試験 (CDC-XM) は、術後早期の液性拒絶を回避する有用な検出法の一つである。公益社団法人 日本臓器移植ネットワークでは、CDC-XM Tcell が陰性であればレシピエント候補に成り得る選定基準である。しかし、待機患者によっては複数回レシピエント候補に選定され、マイナス 80℃ 保存血清はその都度凍結融解を繰り返すことになる。今回われわれは、レシピエント血清の凍結融解が抗 HLA 抗体の力価にどの程度影響を及ぼすか基礎的検討を行ったので報告する。

【対象】東京女子医科大学 移植管理科に腎移植目的で来

院された患者のうち、抗 HLA 抗体陽性の 2 症例を対象とした。

【方法】LABScreen single antigen および C1qScreen を測定し、HLA Class I 抗体について蛍光強度 (normalized MFI) を確認した。そして、被検血清を 10 回まで凍結融解を繰り返し、それぞれ 2 倍連続希釈系列を作成した。CDC-XM は、C1qScreen 陽性の HLA 特異性が一致する第三者リンパ球 (Tcell) を用いた。

【結果】本研究の結果より、LABScreen single antigen, C1qScreen および CDC-XM の 3 法において凍結融解による影響が少ないことを確認した。

一般演題4

フローサイトクロスマッチと抗HLA抗体検査の比較分析

大菅貴寛¹, 祖父江晃基¹, 石橋瑞樹¹, 齋藤光平¹, 佐瀬千佳¹, 奥田 誠¹, 村松真樹²,
酒井 謙², 高橋 浩之¹

¹ 東邦大学医療センター大森病院 輸血部, ² 東邦大学医学部 腎臓学講座

【はじめに】腎移植前の組織適合性検査として実施されるフローサイトクロスマッチ (FCXM) および Single Antigen Beads (SAB) を用いた抗HLA抗体特異性同定検査は、検査の特性上の違いから結果に乖離が見られることがある。今回、FCXMとSABの結果を後方視的に比較分析したので報告する。

【対象および方法】2022年6月～2023年12月にFCXMとSABを実施した55例を対象とした。SABはnMFI \geq 1000, FCXMは患者血清と陰性コントロールの中央値の比がT cell \geq 1.4, B cell \geq 1.7を陽性とした。SABの結果を基準としてFCXMの結果を、陰性・陽性・偽陰性・偽陽性に分類した。さらに結果が乖離した症例のうち偽陰性群について分析した。

【結果】55例のうち陰性25例, 陽性9例, 偽陰性6例, 偽陽性15例であった。偽陰性群のうち4例はDSAのnMFI $>$ 2000であった。2例はDSAのnMFI:3741 (Cw14)の腎移植歴がある症例と, nMFI:5048 (A2)の妊娠歴のある症例であった。

【考察】偽陽性群の原因としてSABで検出できないnonHLA抗体や非特異反応が考えられた。また偽陰性群の原因としてFCXMとSABの検出感度差が考えられた。

【結語】FCXMとSABの一致率は約60%であった。それぞれの検査特性を十分に理解し、複数の検査結果を総合的に考慮して判断することが重要である。

一般演題5

HLA エピトープ不一致が臍帯血移植の治療成績に与える影響の解析

岩田紫乃¹, 吉川枝里¹, 重成敦子², 白岩佐和子¹, 豊崎誠子¹, 町田真一郎¹, 椎名 隆², 鬼塚真仁¹

¹ 東海大学医学部 内科学系血液腫瘍内科, ² 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学領域

【目的】実臨床では造血幹細胞移植におけるドナー検索でHLA-A, B, C, DRB1の8抗原を利用する。HLA mismatchesが許容される臍帯血移植では mismatches HLA由来のエピトープの存在が治療成績に影響する可能性が高い。すでに、一般臨床で測定する8抗原HLAの mismatchesに由来するエピトープ数が臍帯血移植成績に影響を与えることが報告されている。そこで、我々は一般臨床では測定しないHLA-DPA1, DPB1, DQA1, DQB1をタイプニングし、合計18抗原のHLA mismatches由来のエピトープ数が臍帯血移植成績に与える影響を解析した。

【方法】対象は当院で行われた血液悪性疾患に対する臍帯血移植110症例とし、各HLA mismatches由来のエピ

トープ数をHLA matchmakerにより解析した。

【結果および考察】HLA Class IではHVG方向のエピトープ数が多い群で慢性GVHDの発症率が有意に高率であった。またClass IIの解析ではDPA1, DRB1でHVG方向のエピトープ数が多い群で再発率が有意に低率であった。さらにDPA1のエピトープ数が多い群では慢性GVHDの発症率が有意に高率であった。これらに対して、生存、急性GVHDとエピトープ数の関連は認めなかった。今回の解析から、実臨床ではタイプニングを行わないDPA1の mismatches由来のエピトープ数が臍帯血移植の成績に関連すること、また予後予測因子としてエピトープ数が有用である可能性が示唆された。

一般演題6

同種移植におけるドナー選定と免疫学的背景についての考察 —症例からみた適合性指標の有用性—

竹下昌孝^{1,2}, 小玉信之^{1,2}, 比島智子^{1,2}, 鈴木大志¹, 阿部尚美¹, 平井理泉¹, 谷村 聡¹,
工藤大輔¹, 三輪哲義^{1,2}

¹東京北医療センター 血液内科, ²国際骨髓腫先端治療研究センター

【背景と目的】 血液悪性疾患に対する同種造血幹細胞移植は再発リスクの高い疾患に対する根治的治療として選択されるが、予後を左右する移植後GVHDの抑制が課題である。我々はHLA適合性に基づき最適と思われるドナーを選択してきたもののGVHDを発症する症例は少なくない。そこで、造血幹細胞移植後GVHDに対し臓器移植を行うことでレスキューした一例について治療経過と移植時の免疫学的背景を後方視的に解析することを目的とした。

【症例】 18歳男性。Ph陽性急性リンパ性白血病に対し、HLA8/8座一致の非血縁バンクドナーより造血幹細胞移植を施行。白血病は分子生物学的寛解を得るも慢性GVHDとして閉塞性細気管支炎を発症。血縁者より生体間肺移植を施行した。

【方法と結果】 ドナー・レシピエントの免疫学的背景としてHLA, KIRについてタイピングを行った。造血幹

細胞ドナーとレシピエントはHLA (A,B,C,DRB1) が完全一致であったが、ドナーのKIRは2DS1を含むtB01ハプロを有していた。一方、2名の臓器ドナーはHLAミスマッチ (2/8, 6/8一致) を認めたが、HLA-Cの他に抑制性KIRのリガンドとしてHLA-B*46を両者とも有していた。

【考察】 本症例における2度の移植において以下の可能性が考察された。

- ・幹細胞移植時KIRステータス変化によりNK活性化を誘導しやすい状態へ遷移し、GVLのみならずGVHDも惹起された。
- ・臓器移植時偶然有したHLA-B*46により抑制性KIRに対するシグナルが増強され移植の拒絶から逃れた。

【結語】 幹細胞移植ドナー選択時、HLAだけでなくKIRステータスを加味することが有用となる可能性がある。

国際HLAワークショップ (IHIWS19) の概要

IHIWS19の進捗状況徳永勝士¹, 椎名 隆²¹ 国立国際医療研究センター研究所, ゲノム医科学プロジェクト, ² 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学領域

第19回国際HLA・免疫遺伝学ワークショップ (The 19th International HLA and Immunogenetics Workshop: IHIWS) を日本において徳永と椎名がCo-Chairsとして開催することになった。場所や時期を検討した結果、静岡県沼津市のJR沼津駅に隣接するPlaza Verdeで2026年5月19日から24日までと決定した。なお、一日おいて5月26日から28日までアジア・パシフィック組織適合性・免疫遺伝学連合会議 (The 2026 Asia-Pacific Histocompatibility and Immunogenetics Association Conference) も開催され

る。IHIWSは世界の熱心な臨床および基礎研究者が各プロジェクトでの解析結果を持ち寄って発表し、活発な議論を行う、いわば「合宿」のような心踊る催しである。今回もおよそ20のプロジェクトが実施されることになっており (<https://ihiw19.org/>), その中には日本から提案された新しいプロジェクト「LRC structure and polymorphism」も含まれている。日本の方々が積極的に参加し、HLA・免疫遺伝学の先端に触れ、海外のHLA関係者と親しく交流するまたとない機会を活かしていただきたいと強く願っている。

第7回 東海北陸 HLA 研究会

日 時：2024年7月6日（土）12：55～17：15

会 場：日本赤十字社愛知医療センター名古屋第一病院 内ヶ島講堂

当番世話人／研究会会長：西田 徹也（日本赤十字社愛知医療センター 名古屋第一病院
（血液内科／造血細胞移植センター）

特別講演 1

同種造血幹細胞移植における HLA エピトープ適合度の臨床的意義

諫田淳也

京都大学大学院 医学研究科 血液内科学

同種造血幹細胞移植は、白血病やリンパ腫などの難治性の造血器腫瘍に対する根治的治療となり得る免疫療法である。しかしながら、移植後の移植片対宿主病 (GVHD) など免疫学的合併症を中心とした合併症のため移植関連死亡率は 2 割前後と高率であり、その克服が課題である。免疫学的合併症のリスクを軽減するため、HLA-A, -B, -C, -DRB1 座を適合させたドナーが第一選択となる。しかしながら、近年、移植前の抗胸腺細胞免疫グロブリン投与や移植後のエンドキサン投与などの GVHD 予防法により GVHD 発症リスクは軽減され、HLA 不適合ドナーを用いた移植数が増加している。しかしながら、HLA 不適合ドナーの選択に関して主に HLA 不適合数や HLA 不適合座による選択が行われているが、どのような HLA 不適合であれば許容されるかなどに関しては議論の余地があるところである。

HLA 抗原の中で、T 細胞受容体や免疫グロブリン抗体が認識する部位は HLA エピトープと呼ばれている。この抗原決定基である HLA エピトープを推定する様々な手法が開発されてきている。Duquesnoy らが *in silico* で推定されたエピトープ部位を *in vitro* での抗原抗体反応で検証したデータを基に、HLAMatchmaker アルゴリズムを開発している。また、T 細胞が認識するエピトープを推定するプログラムとしては、Spierings らが開発した Predicted Indirectly ReCognizable HLA-Epitopes (PIRCHE) がある。これらのアルゴリズムによる HLA 不適合ドナー選択の有用性を明らかとするため、我々は、京都造血幹細胞移植グループや日本造血細胞移植データセンターの移植登録一元管理プログラム (TRUMP) に登録されている移植症例を対象に、その臨床的意義に関する検討を行っている。

本講演では、HLA 不適合非血縁者間骨髄移植および臍帯血移植を対象にした HLAMatchmaker アルゴリズムの意義および抗胸腺細胞免疫グロブリンあるいは移植後エンドキサンによる GVHD 予防法を受けた HLA 不適合血縁者間末梢造血幹細胞移植を対象した PIRCHE の意義に関して我々の研究結果を示すとともに、HLA エピトープ適合度を含む HLA 適合度の臨床的意義に関して議論したい。

特別講演 2
腫瘍免疫と HLA

赤塚美樹

名古屋大学 医学系研究科・分子細胞免疫学

折しも最初の免疫チェックポイント阻害剤（Immune Checkpoint Blocker, ICB）であるニボルマブが切除不能の悪性黒色腫に対して国内で承認されてから 2024 年 7 月でちょうど 10 年が経過する。この間、複数の ICB が承認され、対象となるがん種も拡大し、さらにネオアジュバント療法への展開も進みつつある。しかしながら ICB が著効を示す患者の割合は 2 - 3 割にとどまっており、効果を阻む機序の解明と、バイオマーカーの開発は重要な課題である。

がん細胞は腫瘍免疫微小環境（Tumor Immune Microenvironment, TiME）の中で宿主免疫細胞からの攻撃を受けると同時に、がん免疫編集を経て攻撃から回避する新たな機能を次々と獲得している。T 細胞による HLA に提示されたがん抗原の認識は抗腫瘍免疫の中心であり、進行がんはしばしば HLA の発現を喪失させている。全ての HLA コーディング領域が欠損することになれば、抗原性の強いエピトープを提示する HLA アリルのみ欠損する場合も報告されている。HLA リガンド欠失を探知する NK 細胞に対しては HLA-G 等の異所性発現で対応している。他方、TiME の構成細胞の中には HLA クラス II 分子を介して腫瘍抗原を提示し、腫瘍の排除に関わっていることも報告されており、HLA は腫瘍免疫のキープレイヤーでと言える。

細胞性免疫だけでなく、抗体を中心とした液性免疫も重要である。TiME には形質細胞が存在し、また慢性炎症巣や移植後臓器において認められる三次リンパ組織（Tertiary Lymphoid Structures : TLS）はがんにおいては局所免疫や抗体の産生を介して腫瘍免疫に関わっているとされる。抗体は HLA を介さずに細胞表面の抗原を認識出来ることから、キメラ抗原受容体遺伝子改変 T / NK 細胞への開発が進み、CAR-T 細胞療法として新たなパラダイムシフトをもたらした。

本講演では、腫瘍免疫微小環境の解説、腫瘍免疫における HLA の関わり、HLA を介さない CAR-T 細胞療法などの最前線について情報提供したい。

教育講演

移植医療における NGS-HLA タイピングとその展望

中島文明

ジェノダイブファーマ株式会社

移植医療に欠かせない HLA タイピングは、近年、Luminex 法によって HLA-A, B, C, DRB1 の 4 座の情報を得て HLA 適合の指標としてきた。このような DNA タイピングの普及が、旧来の抗原型マッチングからアレル型マッチングへの進展をもたらした。一方、最近では、エピトープ・マッチングで移植成績のさらなる向上を目指す動きや、HLA 抗体の特異性解析において、エピトープ・レベルによる正確な DSA 判定を求めるようになってきた。さらに、造血幹細胞移植では HLA-B Leader mismatch や DPB1 遺伝子の tag SNP に GVHD リスクが見出され、Luminex 法で情報を得られない HLA 領域の重要性が注目されている。あるいは、HLA 抗体検査において単一抗原試薬の普及により、DRB345, DQ, DP に対する抗体の検出も可能となり、これらの DSA 監視のために従来より広範囲の HLA タイピング結果も求められている。

NGS (next-generation sequencing) は、このような新たな要求に対応可能な HLA タイピング法である。その利点は、複数の HLA 座 (HLA-A, B, C, DRB1, DRB345, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) のほぼ全領域を同時に測定できることに加え、第 3, 第 4 区域までの高解像度タイピングが可能である。これまで問題となっていた、いわゆる ambiguity も完全とはいえないが概ね解消される。Luminex 法では、新規 HLA アレルの登録数増加とともにプローブを追加、改良する必要があるが、NGS 法は DNA 塩基配列を直接測定するため、登録アレルの増加にともなう試薬の改良は必要ない。これら塩基配列情報の取得が、正確なエピトープ・レベルのマッチングや解析も可能としている。さらに、Luminex と同様に大量検体処理も可能である。敢えてデメリットを述べるなら、少数検体ではコスト高になること、測定に数日を要することにある。

移植や輸血などの人為的な行為は、自然界とは異なる免疫応答のイベントを扱う分野と考えられ、同じ同種免疫であっても妊娠と輸血と移植では異なるであろう。NGS 法で精度の高い HLA データを蓄積しながら臨床データとの解析を積み重ねることで、各分野の臨床上における重要なエピトープや SNP だけを検査する未来があるかもしれない。その先には、HLA を起点として KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) など自然免疫系との相互作用の解明に繋がっていくことも期待が持てる。本講演ではそのようなトピックを紹介しつつ進めていく。

一般演題 1-1

空間解析を用いたびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (DLBCL) の新たな免疫バイオマーカー同定の試み

鐘 心¹⁾, 河野 奨²⁾, 岡本昌隆³⁾, 島田和之⁴⁾, 尾関和貴⁵⁾, 河野彰夫⁵⁾, 富田章裕⁶⁾, 赤塚美樹¹⁾

名古屋大学大学院 医学系研究科 分子細胞免疫学分野¹⁾,

JA 愛知厚生連江南厚生病院 病理診断科²⁾,

藤田医科大学岡崎医療センター 血液・腫瘍内科³⁾,

名古屋大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科学⁴⁾,

JA 愛知厚生連江南厚生病院 血液・腫瘍内科⁵⁾,

藤田医科大学 血液内科⁶⁾

【背景】DLBCL は臨床的, 生物学的に不均一な疾患であり, 様々な遺伝学的異常が発症に関わっている。予後予測モデルとしては IPI や NCCN-IPI が用いられる他, 遺伝子異常プロファイルによる新たな病型分類も試みられている。最近では, 腫瘍免疫微小環境のシングルセル解析や空間分析が行われつつある。今回我々は空間分析による層別化の可能性について検討したので報告する。

【方法】2007 年から 2021 までの間に初発 DLBCL に対して R-CHOP 療法を行った 106 名の患者につき, 臨床データとパラフィン包埋ブロックないしは薄切標本を収集した。薄切標本は CD4, CD8, CD20, CD163, HLA-DR, PDGFR, FOXP3, CTLA4, α SMA, FAP 等に対する抗体で 6 抗原同時染色を行い, 撮像を Halo ソフトによって最近傍分析を行い, 予後との相関を解析した。

【結果・考察】十分な標本サイズと良好な染色が得れた 57 名について「トレーニングコホート」と「バリデーションコホート」に二分し, 解析した。前者にてある T 細胞サブセットとある非血液細胞の距離が近い場合に全生存期間, 無増悪生存期間とも有意に良好であった。残りのバリデーションコホートでも同様な結果が得られた。免疫細胞との距離によって DLBCL 微小環境の抗腫瘍免疫状態が異なり, 予後に影響を与えている可能性が示された。今後各細胞をレーザーマイクロダイセクションで採取し遺伝子発現解析を元にサブセットの特定と機序の解明を行う予定である。

一般演題 1-2

至適細胞数の臍帯血移植と非血縁者間骨髄移植の比較検討

石際康平^{1,2)}, 森下喬允³⁾, 宇野友梨¹⁾, 久保篤史⁴⁾, 中谷記衣¹⁾, 内藤知希¹⁾, 土門洋祐^{2,5)}, 福岡 翔¹⁾, 加賀谷裕介¹⁾, 後藤辰徳¹⁾, 西田徹也¹⁾

日本赤十字社愛知医療センター 名古屋第一病院 血液内科¹⁾,

名古屋大学大学院 医学系研究科 血液腫瘍内科学²⁾,

藤田医科大学病院 医学部医学科 造血細胞移植・細胞療法学³⁾,

豊橋市民病院 血液・腫瘍内科⁴⁾,

岐阜県立多治見病院 血液内科⁵⁾

背景・目的：臍帯血移植 (CBT) においてはその他のドナーソースと比較して HLA のミスマッチが許容され代替ドナーとして貴重なドナーソースとなっている。有核細胞数を多く含む臍帯血を用いて同種造血幹細胞移植を行った場合に転帰が改善する可能性が考えられる。

対象・方法：当院で 2013 年 1 月 1 日から 2023 年 5 月 31 日の期間に CBT または非血縁者間骨髄移植 (UR-BMT) を行った患者を対象に後方視的に解析した。臍帯血に含まれる有核細胞数が中央値より大きい例を hCBT 群として UR-BMT と比較した。

結果：CBT139 例, UR-BMT177 例を含む 316 例が対象となった。臍帯血中の有核細胞数中央値は 2.71 (range, 0.027-6.42) $\times 10^7$ /kg であり, hCBT 群 69 例について解析を行った。hCBT 群の 2 年 OS は UR-BMT と同等であり (hCBT : 53.6%, UR-BMT : 58.9%, $p=0.56$), 2 年 NRM も有意差は認めなかった (hCBT : 24.9%, UR-BMT : 25.4%, $p=0.87$)。急性 GVHD の累積発生率は hCBT 群で低い傾向にあり (hCBT : 18.2%, UR-BMT : 33.6% at 100 days, $p=0.067$), 慢性 GVHD の累積発生率は hCBT 群で有意に低かった (hCBT : 4.7%, UR-BMT : 48.3%, $p<0.001$)。続いて背景因子の影響を低減するため傾向スコアマッチングを行った。2 年 NRM は hCBT 群で低い傾向にあるものの有意差は認めなかった (hCBT : 19.1%, UR-BMT : 30.1%, $p=0.21$)。2 年 OS, GVHD の累積発生率に関しては同様の結果だった。

考察：本研究の結果から, 細胞数が十分に含まれる臍帯血が確保できる場合は同種造血幹細胞移植のドナーソースとしてより優先的に使用できる可能性が示唆された。

一般演題 1-3

妊娠歴を利用した Eplet の
免疫原性の評価

西川晃平¹⁾, 西川武友¹⁾, 加藤桃子¹⁾, 東 真一郎¹⁾,
佐々木 豪¹⁾, 舛井 覚¹⁾, 丸山美津子²⁾,
金本人美³⁾, 橋口裕樹³⁾, 井上貴博¹⁾

三重大学大学院 医学系研究科 腎泌尿器外科学¹⁾,
三重大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部²⁾,
福岡赤十字病院 移植センター 移植細胞研究課³⁾

【目的】 Eplet 解析の手法を用い、妊娠において免疫原となり得る HLA-Class I Eplet の探索を行うこと。

【方法】 対象は 2010 年 3 月から 2022 年 10 月に、夫からの腎提供による生体腎移植を希望し当科を受診した患者のうち、移植歴や輸血歴がなく、夫との間のみ妊娠歴を有する患者 25 例。患者及びその夫の WAKFlow HLA Typing (A・B-Locus) を行い、ミスマッチとなっている antibody-verified Eplet (Abv-Eplet) を抽出した。さらに、患者に対し抗 HLA 抗体 Screening 検査を行い、陽性であった場合には、Labscreen Single Antigen 検査 (LSSA) を施行した。LSSA の data を元に Eplet 解析を行うことで免疫原となり得る Abv-Eplet を抽出し、Abv-Eplet 毎の抗体産生率 (抗体産生症例 / ミスマッチ症例 x100%) を算出した。

【結果・考察】 nMFI>1000 を陽性 Cutoff とした場合、6 例 (24.0%) で夫の HLA に対する抗体が陽性であった。Eplet 解析時の陽性 Cutoff を nMFI>100 としたところ、抗体産生率が高かった Abv-Eplet は、80K (1/2: 50%), 82LR (3/8: 37.5%), 62EE (2/6: 33.3%), 65GK (2/6: 33.3%), 80I (2/7: 28.6%), 163LS/G (2/7: 28.6%) であった。特に 82LR は抽出された全 3 例において、LSSA のほぼ全ての陽性 Beads の反応を説明可能であった。妊娠によってもこれらの Eplet は腎移植後の抗体産生に関わる免疫原ともなり得るため、今後腎移植後レシピエントにおいても、これらの Eplet に対する抗体の出現に注目していきたい。

一般演題 1-4

小児期移植患者における HLA
エピトープミスマッチとドナー
特異的抗体と拒絶反応の検討

田中一樹¹⁾, 川向永記¹⁾, 寺野千香子¹⁾,
藤田直也¹⁾, 小林孝彰²⁾

あいち小児保健医療総合センター 腎臓科¹⁾,
愛知医科大学医学部 腎移植外科²⁾

【緒言】 成人において HLA エピトープ解析は de novo ドナー特異的抗体 (dnDSA) の産生や抗体関連拒絶反応の予測に有用であるとされているが小児腎移植患者においては症例数も少ないため解析は困難である。今回小児期に腎移植を施行し移植後の経過を当科でフォローした 23 症例 (男児 13 例) を対象とし解析を行った。

【方法】 HLA エピトープミスマッチ (eplet MM) 数は HLA matchmaker (ver. 3.1) により、dnDSA は LABScreen Single Antigen Beads (MFI \geq 1000 を陽性) で判定した。

【結果】 移植時年齢の中央値は 8.77 歳、観察期間の中央値は 5.44 年であった。原疾患は低形成・異形成腎が最多で 13 例であった。先行的腎移植は 8 例、血液型不適合は 4 例、ドナーは父または母が 20 例、祖母が 3 例であった。

dnDSA を認めた症例は 5 例 (21.7%) で class I, class II ともに認めた症例は 1 例、class I, II のみが各々 2 例であった。dnDSA 陰性例の eplet MM 数の中央値は Class I が 8, Class II が 4.5 であったのに対して dnDSA 陽性例ではそれぞれ Class I (11,13,2), Class II (9,5,6) であった。

拒絶反応は 4 例で 2 例は慢性抗体関連拒 (CAAMR), 1 例は急性抗体関連拒絶, 1 例は T 細胞性急性拒絶を認めたのちに CAAMR を認めた。拒絶反応を認めなかった症例の eplet MM 数は中央値が Class I で 11, Class II で 5 であったのに対して拒絶反応を認めた症例の eplet MM 数は Class I (4,8,5,10), Class II (0,5,6,9) であった。

【まとめ】 小児においてもエピトープ解析は dnDSA の産生や抗体関連拒絶反応の予測に有用な可能性がある。

一般演題 2-1

Ligandome 解析による
immunogenic peptide の同定

河田 賢¹⁾, 岩崎研太²⁾, 伴野 勤³⁾, 雫 真人¹⁾,
三輪祐子²⁾, 安次嶺聡¹⁾, 石山宏平¹⁾,
高村祥子³⁾, 小林孝彰¹⁾

愛知医科大学医学部 腎移植外科¹⁾,
同 腎疾患・移植免疫学寄附講座²⁾,
同 免疫³⁾

【背景 / 目的】長期生着の課題の一つとして、移植後のドナー特異的 HLA 抗体 (de novo DSA) による抗体関連型拒絶反応が上げられる。Predicted Indirectly ReCognizable HLA Epitopes (PIRCHE) を用いて HLA 情報からレシピエント HLA に提示されるドナー HLA 由来 peptide を推定可能であるが、実際に抗原提示細胞が提示している peptide は定かではない。本研究では、DSA 陽性の腎移植患者に提示されたドナー HLA 由来ペプチドの同定と、in silico での推定異種抗原同定との比較検討を行った。

【方法】レシピエント末梢血から CD14+monocyte を精製し、放射線照射したドナーの PBMC 存在下で IL-4/GM-CSF/IL-1 β /TNF α を加え樹状細胞へと分化させた。anti-HLA-DR 抗体で免疫沈降を行い Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) により提示された peptide を測定した (ligandome 解析)。

【結果】いくつかの抗原とともに、HLA 由来の peptide が同定された。それらの配列は PIRCHE Matching Service において提示された中にも認められた。

【考察】High PIRCHE score と de novo DSA の産出には相関があるとされている。本研究で検出されたドナー HLA 由来 peptide 候補の情報をもとに合成ペプチドを作成し、T 細胞の反応性を解析する。そして、実際に T-B communication を通して DSA 産生に関与しているか検討する。DSA 産出にかかわる抗原特異的 T 細胞の検出と制御方法の開発が最終目標である。

一般演題 2-2

膵腎同時移植における epitope
mismatch と de novo DSA 産生

長谷川雄基¹⁾, 鳴海俊治¹⁾, 姫野智紀¹⁾, 島本侑樹²⁾,
児玉卓也²⁾, 西川涼馬¹⁾, 青木太郎²⁾, 二村健太²⁾,
岡田 学¹⁾, 平光高久¹⁾, 中島萌夏³⁾,
坂本慎太郎³⁾, 小林孝彰⁴⁾, 渡井至彦¹⁾

日本赤十字社愛知医療センター 名古屋第二病院 移植外科¹⁾,
同 移植内科²⁾,
同 医療技術部臨床検査科³⁾,
愛知医科大学 腎移植外科⁴⁾

【目的】本邦の膵臓移植は 550 件を超えた。その中でも膵腎同時移植 (SPK) の 5 年生着率は 83.2% と非常に良好である。一方で移植臓器の長期生着のためには抗ドナー特異的抗体 (de novo DSA) 産生の制御が非常に重要である。レシピエント選択基準の 1 つに DR の一致が優先条件とされており、多くの症例で DR アレル 2 桁での一致を認める。しかしエピトープレベルでのミスマッチについては世界的に見ても報告が少なく、膵移植におけるエピトープミスマッチと de novo DSA との関連については一定の見解を得ていない。

【方法】2010 年から 2023 年に当院で行われた SPK 症例の内、ドナーとレシピエント双方の A, B, DR の HLA アレル 4 桁が判明している症例 16 例を後方視的に調査した。DQB1, DRB3/4/5, DQA1 は日本人に多く見られるアレルパターンから推定した。エピトープミスマッチは HLAMatchmaker を使用して算出した。

【結果】16 例のうち de novo DSA が発生した症例 (DSA 群) は 16 例中 2 例 (12.5%) で 2 例共に Class I に対する DSA であった。エピトープミスマッチ数は DSA 群と非 DSA 群で 12.0 ± 9.9 と 7.6 ± 6.4 , $p=0.397$ で差を認めなかった。Class2 のエピトープミスマッチは 2.5 ± 0.7 vs 11.4 ± 5.2 , $p=0.035$ だった。生存群と死亡群にはエピトープミスマッチ数や術前患者背景などリスク因子は認めなかった。

【考察】今回 Class1 の DSA 産生に関しては SPK 患者においてエピトープミスマッチ数に差を認めなかったが、今後症例を増やしてさらなる研究が必要だと考えている。

一般演題 2-3

**臍帯血移植における FluMelTBI
レジメンと FluCyTBI レジメンの比較**

堺 寿保, 野々山海斗

安城更生病院 血液・腫瘍内科

目的:臍帯血移植における FluMelTBI レジメン (FMT) と FluCyTBI レジメン (FCT) は強度減弱型前処置として使用されているが, 治療成績を直接比較した報告は少ない。二つのレジメンの治療成績の差異を明らかにすることを目的とする。

対象・方法:2009年5月から2022年10月までの間に安城更生病院, 血液・腫瘍内科において FMT または FCT を移植前処置として選択し AML, ALL, MDS いずれかの疾患に対し初回の同種臍帯血移植を行った患者を後方視的に解析した。

結果:対象となった患者は FMT 群 32 症例, FCT 群 35 症例であった。移植時年齢, 性別, 原疾患, 移植時疾患状態, PS は両群に有意差は認めなかった。移植年代は FMT 群が有意に近年の移植が多かった。3年 OS は FMT 群 39.8%, FCT 群 38.9% と有意な差を認めず, PFS, 累積再発率, 非再発死亡率いずれも有意差を認めなかった。移植前病期が非寛解の症例のみでサブグループ解析を行った場合, 1年累積再発率は FMT 群 44%, FCT 群 100% であり, 有意に FMT 群で良好であった (P=0.02)。

考察:両レジメンの全生存, 非再発生存, 累積再発, 非再発死亡いずれも差は認めず, 大きな優劣は認めなかった。移植前の疾患状態が不良な患者群では FCT の再発率が有意に高く, FMT を選択すべきと考える。

一般演題 2-4

**NGS-HLA タイピングによる臍帯血
HLA 型判定不能検体の検討**大矢健一, 畑 佐鎮代, 吉村美千子, 鈴木艶枝,
松本加代子, 加藤剛二, 森島泰雄

中部さい帯血バンク

【目的】当バンクにおける臍帯血の HLA 型検査は, PCR-SSO 法にて実施しているが, HLA の ambiguity 等による判定不能検体が発生し, 調製保存後の臍帯血で公開できないものがある。このため, これらの判定不能の検体を用いた NGS 法による HLA タイピング結果と PCR-SSO 法の結果を比較し, さい帯血バンクにおける NGS-HLA タイピングの有用性を検証する。

【方法】2019年1月~2022年12月の4年間で HLA 検査 (HLA-A, B, C, DRB1 第2領域まで PCR-SSO 法) が 2,537 件実施され, HLA 型判定不能とされた臍帯血が 24 件発生した。これらのうち, HLA 型の確定で公開可能な臍帯血 19 件につき NGS-HLA タイピング (HLA11 座, 第4領域までロングレンジ法 外注) を実施し, アレルタイピング結果を比較した。

【結果】19 件の臍帯血については, PCR-SSO 法にて A ローカス 7, B ローカス 10, C ローカス 5, DR ローカス 3 の延べ 50 アレルの判定不能が含まれるが, NGS-HLA タイピングにて全て結果を得ることができた。50 アレル中 26 アレルで, 0.004% 以下の稀なアレルタイプを含んでいた。また, この中で二つの New アレルがタイプされた。

すでに PCR-SSO 法で判定できている HLA タイプは NGS 法のタイピング結果と全て一致した。

【結論】今回の結果より, NGS-HLA タイピングは, PCR-SSO 法判定不能の低頻度の検体もタイプすることができた。また, DRB3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1 の結果も得ることができると, 移植時の臍帯血選択肢に加えることや, 患者の DSA の有無が迅速に確認できるメリットもあり, さい帯血バンクの HLA タイピングに有用な方法であることが確認できた。

【投稿・執筆規定】(2022年11月29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、編集広報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、文部科学省等が定める関連倫理指針（「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」、「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、本学会が指定する様式を用いて、利益相反事項について開示しなければならない。下記、「6. 利益相反事項の開示」参照のこと。

審査 : 投稿論文掲載の採否は編集広報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、特殊な加工を必要とする図等を掲載する場合に

は、著者の実費負担とする(特殊加工を希望の場合には、投稿原稿にその旨を明記すること)。

別刷：別刷は作成しない。

※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、編集広報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Email添付で、投稿レターを添えて広報編集委員会委員長に送付する(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 Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

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¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 永谷 憲歳²⁾, 中谷 武嗣³⁾

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, 編集広報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, μ 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, μ 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 (<https://jshi.smoozy.atlas.jp/ja/coi>) 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（2022. 3. 20 制定）」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とし，原稿とともに編集広報委員会委員長に送付すること（送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照）。

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-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 Email 添付で投稿レターを

添えて編集広報委員会委員長に送付する（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

日本組織適合性学会 編集広報委員会
委員長 黒田 ゆかり

E-mail: mhc.edit.office@soubun.org

Instructions to Authors (updated on November 29, 2022)

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 18th 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 (<https://jshi.smoosy.atlas.jp/ja/coi>). 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 special processing (please specify at submission if special processing is required).

Reprints: Reprints are not prepared, but pdf files could be obtained via the J-Stage platform (<https://www.jstage.jst.go.jp/>).

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 at the editorial office. If the authors would like to submit large size files (over 100 MB), 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 Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

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: Yukari Kuroda

Editorial office:

E-mail: mhc.edit.office@soubun.org

編集後記

「のぼせもん」…博多弁で、何かに夢中になる人やすぐに熱くなる人を指す言葉。

この記事の起稿をおこなっている7月は、福岡（博多）の夏の風物詩である博多祇園山笠が7月1日から15日間かけて開催され、300万以上の観光客が訪れる祭りとして、1年で最も町が賑やかで活気付く時期である。そんな祭りの中、学会の“お祭り”である学術大会を、1995年第4回日本組織適合性学会大会（福岡大学 内藤説也大会長）は13日（集団山笠見せ）から15日（追い山笠）のフィナーレに照準を合わせた企画で開催され、地域文化とアカデミアが融合し参加者を魅了する大会であったであろう。勿論、当時運営に携われた大会事務局はご苦労も多かったと思うが、ここ数年のパンデミックによる制約の中での大会運営に比べると、それは楽しい苦労であった事だと推察する。さて昨日のニュースを見ると、新たな変異株「KP.3」が全国に先駆けて福岡では猛威を振っている。実は福岡での感染拡大はある程度予想されており、山笠「のぼせもん」が原因のひとつであることは、ほぼ間違いない。地元民は誰も口には出さないが…。

今回の第31巻2号MHCは、我々の“お祭り”である近畿地方会抄録、関東HLA研究会抄録、東海北陸HLA研究会抄録、認定HLA検査技術者講習会テキスト等が掲載されています。お祭りに参加出来なかった皆様、是非ご一読頂き「のぼせもん」になって頂ければ幸いに存じます。

橋口 裕樹

日本組織適合性学会ホームページが新しくなりました。

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。

<https://jshi.smoosy.atlas.jp/ja>

学会事務局からのお知らせ

本会では会員管理システムを変更いたしました。入退会手続等の会員管理、登録情報の変更および会費納入については、会員管理システム（SMOOSY）を用いて行っております。

その他の学会運営事項については、ホームページにQ&Aページを設けていますので、ご参照ください。

<https://jshi.smoosy.atlas.jp/ja/FAQ2022>

事務所：

一般社団法人 日本組織適合性学会

〒601-8323 京都市南区吉祥院春日町 21-11