

## 造血幹細胞移植における抗 HLA 抗体検査に関する指針

### 1. 概要

造血幹細胞移植では、HLA ミスマッチ移植が多く実施されるようになり、提供者（以下、ドナーという）の HLA 抗原に対して、移植対象患者（以下、レシピエントという）が保有する抗体が反応する組合せの場合、移植成績に影響を及ぼすことが判明している。

特に臍帯血移植においては、HLA 型が不適合でも GVHD 発症リスクが低いことが知られており、また、近年では成人を対象とした移植の増加により、保存細胞数の関係から HLA ミスマッチ移植が多く実施されている。また、骨髄移植においても HLA 一致ドナーが見つからない場合は HLA ミスマッチ移植が実施される。このような背景から、事前にレシピエントが保有する抗 HLA 抗体を調べておくことが、ドナー選択の適正度を高め、移植成績の向上をもたらすと考えられる。

一方、近年の抗 HLA 抗体検査試薬は、培養細胞や遺伝子導入発現細胞から HLA 分子を精製し、蛍光識別可能なマイクロビーズなどに固相化し、検出感度と再現性を高い水準で実現している。しかしながら、この形状の試薬は、必ずしも生体内反応を忠実に反映していない特性も合わせ持っている。とくに、マイクロビーズ上の HLA 抗原の一部が変性し、細胞表面の HLA 抗原とは反応しない抗体を過剰に検出する傾向があること、あるいは、レシピエント血清中の補体成分が試薬の二次抗体の結合を阻害し、偽陰性の結果をもたらすことなどが知られている。

リンパ球などの細胞を用いた検査は、より生体内反応に近い状態を再現できることが期待できるが、パネル細胞の安定的な供給や維持が困難であることなどから実現性は低い。同様に、クロスマッチは必ずしも十分な数のドナー細胞を確保できないことより、必須検査とすることは困難である。

以上のことより、精製 HLA 抗原試薬の特性を十分に理解しながら、施設間における差が発生しにくい方法で標準化を目指すことが妥当であり、移植成績を反映した判定基準の適正化を目指すことが望ましい。

### 2. 使用試薬の選定要件

- 市販の精製 HLA 抗原試薬を使用する。
- 安定的に入手可能な市販試薬であり、メーカーで品質が保証されている。
- HLA クラス I (HLA-A,B,C)、HLA クラス II (HLA-DR,DQ,DP) に対する抗体

を検出できる。

- 日本人集団における HLA 対立遺伝子頻度が 0.1%以上の HLA 型抗原に対する抗体を概ね検出できる。
- 試薬の判定用ソフトウェアが準備され、使用可能である。
- スクリーニング試験で抗体の有無を決定し、抗体陽性の場合は確認試験で抗体特異性を決定する 2 段階での試験を推奨する。
- 測定条件の設定及び精度管理に有利な Luminex 装置を使用する試薬が望ましい。

## ※補足説明

### 精製 HLA 抗原試薬の概要

#### (ア) 種類

精製 HLA 抗原試薬には、用途により次の 3 種類のタイプがある。また、ここでは、試薬に使用する HLA 抗原の由来により、培養細胞 (EBV transformed human B lymphoblastoid cell lines) 由来の精製 HLA 抗原を使用した試薬を「パネル細胞型」、HLA 遺伝子導入細胞 (HLA-deficient human lymphoid cell lines transfected with a particular HLA gene) 由来の精製 HLA 抗原を使用した試薬を「単一抗原型」という。

#### ① スクリーニング用 (パネル細胞型)

培養細胞から精製した HLA 抗原を、複数パネル分まとめて同一の識別範囲で測定可能なマイクロビーズに固相化し、1 回の反応で HLA クラス I 及びクラス II に対する抗体を検出するスクリーニング試薬である。マイクロビーズ上の多様な HLA 抗原の割合は生細胞と同等であるが、抗原量は生細胞より高い密度で固相化されている。スクリーニングに特化された試薬であり、特異性は同定できない。

#### ② 確認試験用 (パネル細胞型)

パネルとなる培養細胞から精製した HLA 抗原をマイクロビーズに固相化し、1 回の反応で HLA クラス I およびクラス II に対する抗体特異性を同定する試薬である。各パネルの HLA 抗原は、それぞれ異なる識別範囲で測定できるマイクロビーズに固相化されている。マイクロビーズ上の多様な HLA 抗原の分布は生細胞と同等であるが、抗原量は生細胞より高い密度で固相化されている。明確に特異性が決定できない場合もあるが、陽性率の評価には向

いている。

③ 確認試験用（単一抗原型）

HLA 遺伝子導入細胞から精製した HLA 抗原を、それぞれ異なる識別範囲で測定可能なマイクロビーズに固相化されており、1回の反応で HLA クラス I あるいはクラス II に対する抗体特異性を決定する試薬である。それぞれのマイクロビーズ上には 1 種類の HLA 抗原のみが固相化されているので、抗体の特異性を明確に決定することが可能である。

(イ) 判定要素

HLA 抗原固相化マイクロビーズとバックグラウンドとなるノイズ測定用マイクロビーズに対し、サンプル血清と陰性コントロール血清（メーカー規定値で代用することもある）それぞれの測定値（「シグナル」及び「ノイズ」）を判定要素とする。原則として、パネル細胞型の場合は S/N 比（signal-noise ratio）で、単一抗原型の場合はシグナルからノイズを差し引いた蛍光値で評価する。導かれる計算式はメーカーにより工夫が施されている。

3. 判定基準と適合判定

選定した試薬について、判定基準の設定と適合判定のアルゴリズムについては、次に示す手順を参考とされたい。

※（参考）判定基準の設定

一般に、試薬メーカーは判定基準を明示していない。一方、一部の試薬では、判定用ソフトウェアで暫定的な規定値を設定している。抗体検出限界は、方法論や検出感度に依存し、その限界点は流動的であるため、陽性と陰性を明確に定義することが困難である。また、検出限界と移植成績に影響する境界は必ずしも一致しない。したがって、次に示す手順で複数の施設における測定値を蓄積して、判定基準（=カットオフ）を設定することを推奨する。

(ア) スクリーニング用試薬

① 第一段階：判定ソフトウェアの規定値

まず、出発点として判定用ソフトウェアの規定値をカットオフとする。

② 第二段階：暫定的カットオフの設定

次に、第一段階で設定したカットオフで、健常者サンプル数百例の測定データを取得する。陰性測定値の統計値、例えば、平均値+3SD（標準偏差の3倍値）を暫定カットオフとする。この作業は複数施設で短期間のうちに実施することが望ましい。

③ 第三段階：移植成績を反映したカットオフの適正化

第二段階で設定した暫定カットオフで、実際の移植症例の測定データを蓄積する。これらのデータが蓄積された段階では、抗体の検出限界点をターゲットとするのではなく、移植成績に影響があった点を境界に真陽性と真陰性が評価できるため、ROC（Receiver Operating Characteristic）曲線を描きカットオフを適正化する。有効なデータの蓄積に時間がかかるため、期間を定め定期的に評価してカットオフの適正化を進めていく。

(イ) 確認試験用試薬

ここで用いる試薬は単一抗原型であることが望ましい。パネル細胞型の試薬は明確に特異性が決定できない場合があり推奨しない。しかしながら、単一抗原型の試薬は高価なため、スクリーニング用試薬の手法でカットオフを設定することは現実的ではない。また、スクリーニング陽性サンプルを対象とするため、ほとんどの場合は何らかの抗体特異性を認めるが、スクリーニング段階の非特異反応などの場合は確認試験で陰性化することも想定される。したがって、確認試験用試薬もカットオフを設定しておく必要がある。

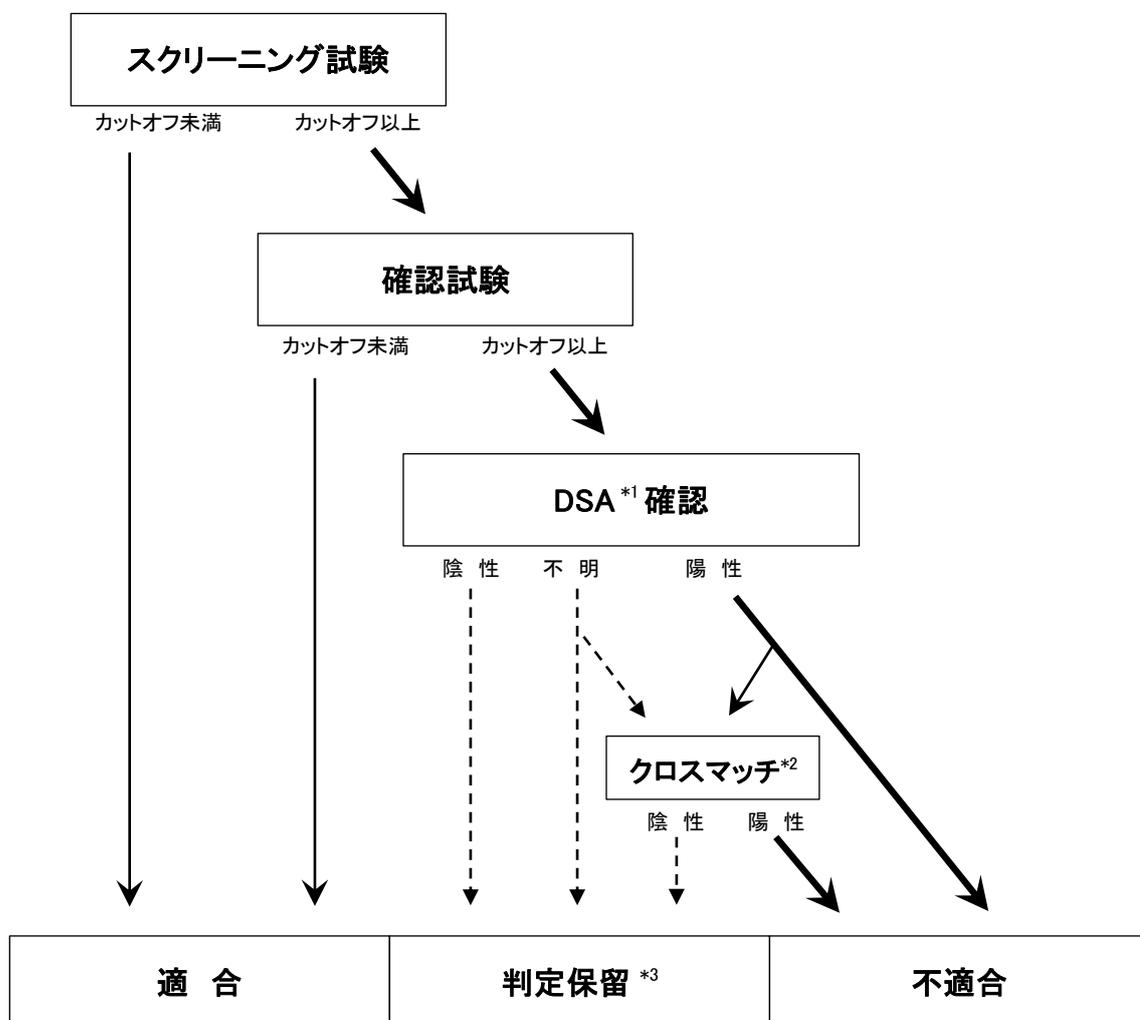
1. 第一段階：暫定カットオフの設定

確認試験用試薬は、判定ソフトウェアで規定値が設定されていないことが多く、エピトープを考慮した判定も要求される。判定要素は蛍光値（パラメータはメーカー指定）であるため、暫定カットオフとして、蛍光値が1,000から3,000の範囲内で設定することを推奨する。この数値の範囲は、日本組織適合性学会QCワークショップの解析結果から、細胞ベースで反応が認められる限界点で、臨床的に影響を与える境界点より低いレベルの設定と考えられる。

2. 第二段階：移植成績を反映したカットオフの適正化

第一段階で設定した暫定カットオフで、実際の移植症例の測定データを蓄積し、スクリーニング用試薬と同一の手法で適正化する。

※ (参考) 適合判定アルゴリズム



\*1 DSA (donor specific antibody ; ドナー特異的抗体)

レシピエント血清中にドナーHLA型と反応する抗体が存在する場合を DSA 陽性、存在しない場合を DSA 陰性とする。DSA 不明は、例えば未検査のドナーHLA-DP型に対する抗体がレシピエントから検出された場合、あるいは、ドナーHLA型に対応した抗体が確認試験試薬で検出できない場合のことで、クロスマッチの実施またはドナーのリタイピングで対応する。

\*2 クロスマッチ

造血幹細胞移植ではドナー細胞が確保できない場合があるため、オプション検査とする。方法論はフローサイトメトリーによる間接蛍光抗体法や Luminex 装置を使用す

る ICFA (Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis) 法などの高感度法を推奨する。ただし、市販キット以外の方法でクロスマッチを実施する場合は、日本組織適合性学会 QCWS 部会のワーキンググループで作成されたプロトコールに従って、検査を実施することを推奨する。判定基準等はそれぞれの試験方法に準じ、必要であれば適正化する。これらの結果は、抗体検査試薬のカットオフの適正化にフィードバックすることが望ましい。

### \*3 判定保留

抗体検査とクロスマッチ判定基準においてカットオフ近辺の反応をどのように判断するかは、レシピエントの状態や適合ドナー候補数の関係で一律に規定できない。抗体陽性で DSA 陰性、DSA 不明あるいはクロスマッチ陰性の場合の適合判定は、別途取決める必要がある。

## 4. 検査用検体の処理

検査に用いるレシピエント検体は血清あるいは血漿のいずれでもよいが、検査実施前に必ず 8,000~10,000g で 5 分以上の遠心分離により検体の不純物を沈降させ、その中間層からサンプリングする。ただし新鮮血清を用いる場合は、レシピエント血清中の補体成分による反応阻害を阻止するために、適正な血清処理を実施することが望ましい。

## 5. 検査精度管理

### (ア) 試薬管理

試薬の納入時に受入試験を実施し、規定の様式に記録を残す。

試薬ロットの更新毎に、陽性コントロール血清および陰性コントロール血清で再検証し、前ロットと同等の試薬の性能・品質及び設定したカットオフの妥当性が確保されている事を確認する。各コントロール血清は、常時、同一の血清を使用する。すなわち、コントロール血清の量的な確保も必要である。これらの結果は規定の様式に記録を残す。

### (イ) 機器管理

定期保守、定期点検、始業時点検、定期キャリブレーション、設置環境（温度、湿度）の確認などを実施し、規定の様式に記録を残す。

### (ウ) 外部精度管理

日本組織適合性学会 QC ワークショップに参加し、客観的評価を受ける。

(エ) 検査担当者

組織適合性検査に係る知識・技術を高く維持することが必要であり、組織適合性検査に関して、日本組織適合性学会等の外部組織・機関により認定を受けた指導者または検査者が所属していることが望ましい。また、現在、日本組織適合性学会で検討中の施設認定制度等に基づいて、総合的に管理・運営することが望まれる。

※上述した精度管理を高度に実現するための検査管理体制として、管理者及びバリデーション、自己点検、教育訓練、文書管理、試験責任者などの人員配備体制の構築が望ましい。また、人員体制、試験基準、試薬管理、機器管理、標準作業手順などを記述した文書体系の整備が望ましい。