

# 日本組織適合性学会誌

第 20 巻第 1 号 平成 25 年 3 月 20 日発行

## 目 次

### 日本組織適合性学会からのお知らせ

第 22 回日本組織適合性学会大会のご案内	1
2013 年度学会賞ならびに学術奨励賞の募集について	4
「認定 HLA 検査技術者認定制度申請要領」の訂正とお詫び	7
組織適合性検査技術者認定制度平成 25 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ	8
平成 24 年度・認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果	9
日本組織適合性学会 認定制度委員会 QCWS 部会名簿 (2013 年)	12

### 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

—全体経過およびサンプルの総合結果—	田中秀則, 中島文明	13
—検査法別解析 DNA タイピング Liminex 法—	石井博之	17
—検査法別解析 DNA タイピング SSO 法 (INNO-LiPA) —	安尾美年子	19
—検査法別解析 DNA タイピング SSP 法—	藤井明美	20
—検査法別解析 DNA タイピング SBT 法—	重成敦子	21
—DNA タイピング 表記法について—	橋口裕樹	23
—検査法別解析 抗体検査 FlowPRA 法—	石塚 敏	25
—検査法別解析 LABScreen による抗体解析—	二神貴臣	27
—検査法別解析 WAK Flow および ICFA 法による抗体検査—	高橋大輔	28
—検査法別解析 その他検査法およびクロスマッチ—	中島文明	30
—部門別解析 DNA-QC および結果評価—	田中秀則	31
—部門別解析および結果評価 (抗体部門) —	高 陽淑	33

### 総説

実験動物サルの MHC クラス I 多様性	成瀬妙子, 木村彰方	35
HLA 多型を考慮したがん免疫療法の開発	富田雄介, 千住 覚, 入江 厚, 西村泰治	45

### 学会レポート

第 16 回国際組織適合性ワークショップの報告	小島裕人, 一戸辰夫	57
第 11 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集		63
日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定		91
編集後記		94

## 第 22 回日本組織適合性学会大会のご案内

第 22 回日本組織適合性学会大会

大会長 大戸 斉

福島県立医科大学医学部 輸血・移植免疫学講座

皆様におかれましては、益々ご清祥のこととお慶び申し上げます。

第 22 回大会は「HLA バリアと臨床：葛藤から順応、そして応用へ」をテーマとして、とくに移植など MHC を基盤とした臨床での最前線の成果を取り上げたいと準備しています。会場（コラッセふくしま）は福島駅から直ぐで交通便の良いところにあります。多数のご参加をお待ち致しております。

会 期：2013 年 9 月 14 日（土）～ 16 日（月・祝）

会 場：コラッセふくしま（福島県産業振興センター）

〒 960-8053 福島市三河南町 1-20 TEL 024-525-4089

### [第 22 回学会大会ホームページ (HP)]

<http://www.hla2013.com>

完成予定日：2013 年 2 月下旬頃

なお、大会内容、事前参加登録、一般演題登録等に関する最新情報は HP 上で随時お知らせ致します。

### [大会内容 (予定)]

#### ◆ 9 月 14 日（土）

1. 教育講演（認定制度講習会）
2. QC ワークショップ集会
3. 認定制度技術者試験
4. 特別講演 I 「未処理 HLA 半合致（ハプロ）移植の現状と課題」  
菊田 敦（福島県立医科大学附属病院 臨床腫瘍センター小児腫瘍部門）

#### ◆ 9 月 15 日（日）

1. 一般口演および学会賞・学術奨励賞候補口頭発表
2. 特別講演 II（演者 交渉中）
3. ランチョンセミナー（未定）
4. シンポジウム I 「移植免疫の基礎と臨床医学」（進行中）  
モデレーター：高原史郎（大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学）  
小林孝彰（名古屋大学大学院医学系研究科 免疫機能制御学寄附講座）

5. ポスターセッション（閲覧・発表）

6. 意見交換会

#### ◆ 9 月 16 日（月・祝）

1. 一般口演
2. ランチョンセミナー（未定）

3. 特別講演 III 「Transfusion-associated and fetal-maternal microchimerism beyond MHC?」  
Tzong-Hae Lee, MD, PhD (Senior Scientist/Director of Molecular Transfusion Core, Blood Systems Research Institute, San Francisco, California, USA)
4. シンポジウム II 「造血細胞移植における組織適合性研究の新展開」  
モデレータ：森島泰雄（愛知県がんセンター研究所）  
一戸辰夫（広島大学 血液内科）
  - 1) 造血細胞移植における組織適合性 update  
一戸辰夫（広島大学 血液内科）
  - 2) 非血縁者間移植における HLA ハプロタイプ適合性  
森島聡子（藤田保健衛生大学）
  - 3) 造血細胞移植における非 HLA 遺伝子多型の臨床的意義  
高見昭良（金沢大学）
  - 4) さい帯血移植における組織適合性  
熱田由子（名古屋大学）
5. ポスターセッション（閲覧）

#### [事前参加登録]

事前参加登録は『第 22 回学会大会 HP』から申し込み下さい。  
登録期間：2013 年 4 月 16 日（火）から 8 月 7 日（水）となります。

#### [参加費]

●事前参加費（2013 年 8 月 7 日（水）まで）	●当日参加費
◆理事・評議員・非会員 ￥10,000	◆理事・評議員・非会員 ￥12,000
◆会員 ￥8,000	◆会員 ￥10,000
◆学生 ￥5,000	◆学生 ￥6,000

#### [一般演題募集要項]

演題登録をされる方は先に事前参加登録をお願いいたします。

登録期間：2013 年 4 月 16 日（火）から 5 月 31 日（金）となります。

今年度は発表スライドも事前登録（一週間前）が必要になります。なお、申込方法や発表要旨形式などの詳細については、『第 22 回学会大会 HP』で随時案内致します。

#### 1. 発表形式

- ・口演またはポスターによる発表です。
- ・発表形式（口演またはポスター）の決定に関しましては、プログラム委員会に一任下さい。

#### 2. 応募資格

- ・筆頭演者は本学会員である必要があります。
- ・非会員の方は、日本組織適合性学会 HP（<http://square.umin.ac.jp/JSHI/index.html>）から入会手続きを行って下さい。

**[意見交換会]**

日 時：2013 年 9 月 15 日（日）18:00 ～（予定）

会 場：福島ビューホテル（本館 3F 吾妻）

参加費：一般 ¥3,000 学生 ¥2,000

**[宿泊・交通のご案内]**

本大会の宿泊・交通に関しては、各自で手配をお願いします。

**[2013 年度学会賞・学術奨励賞]**

組織適合性分野において顕著な業績をあげ、組織適合性学会の発展に貢献した業績が審査により認められた正会員に「学会賞」が授与されます。

また、第 22 回日本組織適合性学会大会の一般演題に応募された中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者（正会員）に「学術奨励賞」が授与されます。

応募希望者は別途の手続きが必要です。詳細は日本組織適合性学会ホームページおよび本学会誌〔19(3): 10-12, 2012〕に掲載されている『2013 年度学会賞ならびに学術奨励賞の募集について』を参照ください。

**[大会事務局]**

本大会に関する問い合わせは、下記にお願いいたします。

〒 960-1295 福島市光が丘 1 番地

福島県立医科大学医学部 輸血・移植免疫学講座

第 22 回日本組織適合性学会大会 事務局（安田，小野）

Tel: 024-547-1536 Fax: 024-549-3126 E-mail: jshi22@fmu.ac.jp

## 2013 年度学会賞ならびに学術奨励賞の募集について

### 会員の皆様

研究助成を目的とした日本組織適合性学会賞並びに学術奨励賞を以下の要領で募集します。今年度より、学術賞に代えて新たに学会賞をもうけました。この学会賞についてはより権威のある高い賞として位置づけるため、昨年度までの学術賞とは趣旨や応募方法が異なりますのでご注意ください。学術奨励賞については、重賞を避けるため過去3年間に学術奨励賞を受賞したものは応募できない点を除き、変更はありません。学会賞並びに学術奨励賞、いずれも日本組織適合性学会の学会賞としての位置づけです。2012年度以上の応募者を期待しています。ふるってご応募ください。

### 1. 助成内容

これまでの組織適合性分野において顕著な業績をあげられた学会員に学会賞（年齢制限無し）を授与します。また、2013年度学術集会大会（第22回大会）に応募された一般演題の中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者（応募者）に学術奨励賞（2013年9月16日時点で満45才未満）を授与します。授与件数は学会賞1件（原則として助成金10万円）、学術奨励賞2～3件（原則として助成金5万円）を予定しています。

### 2. 募集分野

- (1) 基礎研究系（主に基礎医学系の研究。理学，生物学的な研究を含む）
- (2) 臨床研究系（臨床関連研究。基礎医学的な疾患研究などを含む）
- (3) 技術応用系（実務関連研究。実務を通じた発見，技術応用などを含む）

### 3. 応募資格

助成金応募にあたっては、以下の条件のすべてを満たしていることが必要です。

- (1) 学会賞
  - 1) 応募者は本学会の正会員で、原則として5年以上の会員歴があり、2013年度の会費を納入済みであること。
  - 2) 組織適合性分野において顕著な業績をあげ、組織適合性学会の発展に貢献した実績を有すること。なお、年齢制限はありません。
- (2) 学術奨励賞
  - 1) 応募者は本学会の正会員であり2013年度の会費を納入済みであること、または今後正会員となる予定であり第22回大会までに2013年度の会費を納入予定であること（今後正会員となられた方で、第22回大会にて受賞された方は、原則として次年度以降も正会員を継続することを条件とする）
  - 2) 応募者は応募しようとする演題の筆頭演者であること
  - 3) 応募しようとする演題の内容において、応募者が中心的な役割を果たしたこと
  - 4) 応募しようとする演題の内容が、本学会にふさわしく、かつ未発表であること
  - 5) 重賞をさけるために過去3年間に学術奨励賞を受賞したものは応募できない
  - 6) 学術奨励賞の応募者は2013年9月16日時点で満45才未満であること。ただし、技術応用系については年齢制限はありません。

#### 4. 応募方法

大会の演題抄録募集とは別途の手続きで行いますので、以下の書類を次のアドレス宛にメール添付で送って下さい。(HLA 学会事務局, e-mail: mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp)

#### 必要書類

##### (1) 学会賞

###### 1) 業績概要

書式は自由とし、A4 用紙にて 2～3 枚程度とする。

###### 2) 履歴書

書式は自由とし、A4 用紙にて 1 枚程度とする。

###### 3) 論文業績リスト

書式は自由とし、代表的な論文 3 編各 4 部を添付する。

###### 4) 応募ファイル

応募者の連絡先住所、電話番号、Fax、e-mail アドレス、生年月日、年齢を記入する。

(Word 形式で保存し、ファイル名を応募者名申込 .doc {例; 猪子英俊申込 .doc} とする。

##### (2) 学術奨励賞

###### 1) 抄録

一般演題に応募した抄録

(Word 形式で保存し、ファイル名を応募者名抄録 .doc {例; 猪子英俊抄録 .doc} とする)

###### 2) 応募ファイル

1 頁目に、演題名、演者 (全員)、所属 (全員)、応募分野 (基礎研究系、臨床研究系、技術応用系のいずれかひとつ)、および応募者 (筆頭演者) の連絡先住所、電話番号、Fax、e-mail アドレス、生年月日、年齢を記入する。

2 頁目以降に、応募した (1) 研究の背景、(2) 研究の意義、(3) 日本組織適合性学会との関わり (これまでと今後の方針・希望など) を、各項目ごとに 300～400 字程度でまとめる。

(Word 形式で保存し、ファイル名を応募者名申込 .doc {例; 猪子英俊申込 .doc} とする。

#### 5. 応募締め切り

2013 年 6 月 30 日 (必着)

#### 6. 選考および結果通知について

##### (1) 学会賞

4 名の学術奨励賞委員会委員が書面審査を行い、その結果をもとに学術奨励選考委員会にて選考し、大会前に選考結果を公表します。受賞者には第 22 回大会期間中に受賞講演と表彰式を実施します。

##### (2) 学術奨励賞

22 回大会期間中に実施される「学術奨励賞応募演題セッション」において発表を行っていただきます。4 名の学術奨励賞委員会委員が発表内容の評価を行います。その評価結果を参考にして学術奨励賞選考委員会にて選考を行います。第 22 回大会期間中に選考結果を公表し、表彰式を実施します。

## 7. 助成金の使途

使途について特に制限はありませんが、学会賞・学術奨励賞であることの趣旨をご理解の上、適切に使用ください。なお、使途とその内訳を後述の報告書に記載するものとします。

## 8. 学術奨励受賞者にかかる義務について

学会受賞者は、助成が行われた研究課題についての報告書（様式は別途通知します）を学会宛に提出して頂きます。

## 9. 助成が行われた研究課題の成果発表について

研究課題の研究成果については、原著論文もしくは総説等の形式にて、学会誌 MHC への積極的な発表をお願いします。

## 10. 問い合わせ先

本件に関する問い合わせは学会事務局（Tel: 096-373-5310, Fax: 096-373-5314, e-mail: mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp）または学術奨励賞担当理事 猪子英俊（Tel: 0463-93-1121 内線 2312, Fax: 0463-94-8884, e-mail: hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp）をお願いします。

## 「認定 HLA 検査技術者認定制度申請要領」の訂正とお詫び

組織適合性技術者認定制度委員会

委員長 田中 秀則

本誌 19 巻 3 号において掲載いたしました「平成 25 年度 認定 HLA 検査技術者認定試験申請要領」について、下記の誤りがありましたので訂正しお詫び致します。

### 記

誤) 実技試験：平成 25 年 9 月 17 日（月曜日）時間は未定

筆記試験：平成 25 年 9 月 17 日（月曜日）時間は未定

↓

正) 実技試験：平成 25 年 9 月 14 日（土曜日）時間は未定

筆記試験：平成 25 年 9 月 14 日（土曜日）時間は未定



**組織適合性検査技術者認定制度  
平成 25 年度・認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ**

組織適合性検査技術者認定制度委員会  
委員長 田中 秀則  
組織適合性検査技術者認定制度委員会教育部会  
部会長 太田 正穂

**日 時**：平成 25 年 9 月 14 日（土曜日）時刻：10 時～12 時の予定

**会 場**：第 22 回・日本組織適合性学会 大会会場

コラッセふくしま（福島県福島市三河町 1 番 20 号）の予定

日時と会場は確定次第，学会ホームページに掲載し，また MHC の Vol. 20, No. 1 に掲載します。

**テキスト**：テキストは講習会の約 1 ヶ月前に，学会ホームページ上に掲載しますので各自，御参照ください。  
会場でのテキストの販売は，いたしません。

**受講証明書**：認定制度に関わる受講証明の受領を希望される方には，会場入口の受付にて，1 人につき 1 枚を発行いたします。

**内 容**：各講習とも質疑応答を含めて，35 分を予定しています。なお講師と講演タイトルについては，今後決定次第，平成 25 年 3 月上旬ごろに学会ホームページに掲載すると共に，MHC Vol. 20, No. 1（平成 25 年 4 月末発刊予定）にも掲載いたします。

(1) HLA に関する基礎医学的な講演

(2) HLA タイピングあるいは抗 HLA 抗体検査に関する講演

(3) 臓器移植の臨床医学に関する講演

この講習会は，今後 HLA 検査技術者認定を取得，あるいは更新しようとする者を対象に実施されますが，それ以外の大会参加者であっても自由に参加することができます。従来のように，事前に受講希望届けを提出し，事前登録していただく必要はございません。

## 平成 24 年度・認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果

講習会開催日時：平成 24 年 9 月 17 日（月・祝）9:00～11:00

会 場：第 21 回・日本組織適合性学会 大会会場

明治大学駿河台キャンパス リバティホール（東京都千代田区神田駿河台 1-1）

・回答者総数：112 名

1) 旅費・滞在費の財源について 回答者 109 名

①	私費	33 名 (30%)
②	職場からの支援	70 名 (64%)
③	その他	6 名 (6%)

③その他の内訳：研究費から 2 名，①と②を半額ずつ 2 名

2) 職場・職務について

職場 回答者 112 名

①	病院	47 名 (42%)
②	血液センター	18 名 (16%)
③	検査センター	13 名 (12%)
④	大学（国公立，私立）	13 名 (12%)
⑤	民間企業	11 名 (10%)
⑥	その他	7 名 (6%)

職務 回答者 105 名

①	臨床医	1 名 (1%)
②	臨床検査業務	58 名 (55%)
③	検査受託業務	18 名 (17%)
④	製造業関連業務	9 名 (8%)
⑤	製品開発業務	1 名 (1%)
⑥	教育業務	0 名 (0%)
⑦	研究業務	10 名 (10%)
⑧	その他	8 名 (8%)

3) 参加者の認定制度への関わりについて

認定資格の取得状況および取得への希望 回答者 105 名

①資格取得済み 55 名 (52%) ②資格取得希望 33 名 (31%) ③資格取得希望なし 17 名 (17%)

取得済みまたは取得を希望する資格 回答者 49 名

①認定技術者 44 名 (90%) ②認定指導者 5 名 (10%)

4) 学会ホームページに掲載された，講習会テキストの事前確認の有無 回答者 110 名

あり 98 名 (89%) なし 12 名 (11%)

5) 講習科目の種類は適切であったか？ (数値は 5 点満点の平均点)

平均点 4.8

評価の基準：5：すべての科目において適切であった。  
 4：一部の科目に問題があったが、ほぼ適切であった。  
 3：約半数の科目は適切であった。  
 2：多くの科目について不適切であった。  
 1：すべての科目について不適切であった。

6) 講習内容のレベルならびに講習テキストは適切であったか？ (数値は 5 点満点の平均点)

	講演評価	テキスト評価
平均点	4.3	4.2

評価の基準：5：すべて理解できた。  
 4：一部は難解であったがほぼ理解できた。  
 3：約半分は理解できた。  
 2：多くの内容について難解であった。  
 1：すべての内容が難解であった。

7) 講習時間は量的に適切であったか？ (数値は 5 点満点の平均点)

時間評価平均点	その他 要望
4.4	マラリアの話も聞きたかった 質疑応答の時間を、もう少し長く設けてほしい LCT のやり方やフローの見方を教えてほしい 高陽淑先生のプレゼン PPT がよかった。話が分かり易かった。

評価の基準：5：適切であった。  
 4：ほぼ適切であった。  
 3：もっと長時間の講習を受けたかった。  
 2：講習時間は、もう少し短くてもよかった。  
 1：その他

8) 講習会の開催通知は適切であったか？ (数値は 5 点満点の平均点)

平均点 4.9

評価の基準：5：適切であった。  
 4：あやうく見落とすところであった。  
 3：他の人から情報を得るまで気が付かなかった。  
 2：その他

情報の入手経路	回答数
学会誌	31 名 (35%)
学会誌, ホームページ	20 名 (22%)
ホームページ	36 名 (40%)
ホームページ, 口コミ	1 名 (1%)
口コミ	1 名 (1%)
その他	1 名 (1%)

## 9) その他の意見

## ①講習の内容について

- ・ 実技研修等の開催
- ・ もう一題くらいあってもいいと思う。
- ・ 「肝移植における HLA の意義」のテーマは実施してほしい

## ②学会ホームページについて

- ・ ホームページの更新を希望する。

## ③会場及び開催時期について

- ・ 3 連休に学会大会を行うのは困る。
- ・ もうすこし涼しい季節にしてほしい。
- ・ 雑誌配布時に一枚紙で QCWS の案内をしていただければ、忙しい施設でも参加しやすくなるのではないと思う。

## ④その他（認定制度更新について）

- ・ 事前登録については、毎年変わるので見落とししたりする可能性が高い。確立してほしい。
- ・ 更新手続き等、分かりづらい部分が多い。
- ・ 更新直前 2 年のうちに一回は出席することになっているが、私費の場合、遠方が続くと経済的に大変なので次年度の開催地まで教えてほしい。

## 日本組織適合性学会 認定制度委員会 QCWS 部会名簿 (2013 年)

担 当	氏 名	所 属
部 会 長:	田中秀則	日本赤十字社 中央血液研究所 中央骨髄データセンター
副 部 会 長:	中島文明	日本赤十字社 中央血液研究所 研究開発部
副 部 会 長:	成瀬妙子	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野
• 企画解析部門		
臓器移植分野:	湯沢賢治	国立病院機構水戸医療センター 臨床研究部移植医療研究室 (新任)
造血幹移植分野:	一戸辰夫	広島大学 原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野 (新任)
輸 血 分 野:	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
• 試料管理部門		
DNA-QC 担 当:	安波道郎	長崎大学 熱帯医学研究所
抗 体 -QC 担 当:	中島文明	日本赤十字社 中央血液研究所 研究開発部
• 部 会 員:		
	石塚 敏	東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室
	太田正穂	信州大学 医学部 法医学教室
	吉川枝里	東海大学 医学部基礎医学系分子生命科学
	木村彰方	東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野
	小林孝彰	名古屋大学 移植免疫学寄附講座
	宮崎 孔	日本赤十字社 北海道ブロック血液センター 検査一課
	森島泰雄	愛知県がんセンター研究所 疫学・予防部
	橋口裕樹	福岡赤十字病院
	山本 賢	国立病院機構 大阪医療センター 臨床検査部

事 務 局 : 日本赤十字社 血液事業本部内

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過およびサンプルの総合結果—

田中秀則<sup>1)</sup>・中島文明<sup>1)</sup>

日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会QCWS 部会<sup>#</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

### 1. ワークショップの経過

平成 24 年 1 月から QCWS 開催および参加申込みについて、学会誌および学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載することで案内した。前回から QCWS への参加主体を、会員個人から施設に変更し、平成 24 年 2 月までに 57 施設（DNA-QC：53 施設、抗体 QC：38 施設）の参加申し込みがあった（表 1）。

当学会の第 20 回大会期間中に開催した QCWS 部会で検討した方針に従い、DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択を行った。また、臨床部門別での解析については、今年度も実施することとし、参加申込の際に①輸血、②臓器移植、③造血幹細胞移植、④その他（研究等）の 4 部門における QCWS の結果解析を行った。また、参加施設への連絡およびデータ収集は、電子メールで行った。

4 月 4 日に試料を発送し、4 月 16 日に QCWS 結果入力用のシートファイルをメールの添付ファイルとして参加施設に配布し、結果提出の締切りを 5 月 21 日とした。最終的には 57 施設（DNA-QC：53 施設、抗体 QC：37 施設）から結果が提出された。5 月中に生データの取りまとめ、6 月中に各解析担当者による解析が行われ、7 月中旬に各検査法別結果を学会 HP に順次掲載し、各検査法での解析結果に基づき、部門別解析を行い、その結

果を 8 月 25 日に学会 HP に掲載することで、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。

### 2. QCWS のテーマおよび試料選択について

DNA-QC のテーマは、①正確な DNA タイピングが出来ることおよび第 2 区域まで判定されること、② DNA タイピング結果の表記を正しく記述できること、③学会の表記法に従い正確に表記すること、④ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型を正確に読替えること、⑤ Ambiguity となるアリの日本人集団でのアリについて解説の 5 点とした。

また、試料については、前年度の QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型であること」、「日本人由来で稀な HLA アリルであること」の要件に合う細胞を 4 種類購入し、抽出した DNA の配布を行った。

抗体 QC のテーマは、①抗体検出が正確に行えること、②エピトープと許容抗原により正確な抗体特異性解析が行えること、③検査結果から導かれる総合判定結果を正しく報告できることの 3 点とし、テーマに沿った 4 検体を選択し、配布することとした。また、配布する検体は、「日本人に通常検出される HLA 抗体」を保有する検体で、一部の試料では、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の分子に対して非特異的な反応を示す

# 日本組織適合性学会組織適合性技術者認定制度委員会 QCWS 部会員

田中秀則<sup>1)</sup>、石塚 敏<sup>2)</sup>、太田正穂<sup>3)</sup>、吉川枝里<sup>4)</sup>、木村彰方<sup>5)</sup>、高 陽淑<sup>6)</sup>、小林孝彰<sup>7)</sup>、佐田正晴<sup>8)</sup>、中島文明<sup>1)</sup>、成瀬妙子<sup>9)</sup>、橋口裕樹<sup>9)</sup>、宮崎 孔<sup>10)</sup>、森島泰雄<sup>11)</sup>、安波道郎<sup>12)</sup>、山本 賢<sup>13)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社中央血液研究所、<sup>2)</sup> 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室、<sup>3)</sup> 信州大学医学部法医学教室、<sup>4)</sup> 東海大学医学部生命科学、<sup>5)</sup> 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野、<sup>6)</sup> 日本赤十字社近畿ブロック血液センター、<sup>7)</sup> 名古屋大学移植免疫学寄附講座、<sup>8)</sup> 国立循環器病センター再生医療部、<sup>9)</sup> 福岡赤十字病院、<sup>10)</sup> 日本赤十字社北海道ブロック血液センター、<sup>11)</sup> 愛知県がんセンター研究所疫学・予防部、<sup>12)</sup> 長崎大学熱帯医学研究所、<sup>13)</sup> 国立循環器病センター臨床検査部

場合もある。

また、交差適合試験については、クロスマッチ試験の現状把握のため、以下の 2 通りで試行することとし、参加申込みの受付を行った。

①配布した抗体 QC の検体と各施設で準備した細胞でのダイレクトクロスマッチ

②抗体 QC 試料と DNA-QC 試料の測定結果による仮想クロスマッチ

### 3. QCWS 集会参加および参加証明書発行

昨年度から、学会大会参加者は QCWS 集会に参加可能となったため、QCWS 集会への参加者数は把握出来ていないが、QCWS 参加証明書の発行依頼は、77 名からあった。

### 4. 解析方法

検査法別解析は、DNA-QC では① Luminex (SSO 法)、②イノリパ (SSO 法)、③ SSP 法、④ SBT 法および⑤結果の表記法について、抗体 QC では、① FlowPRA 法、

② Lab Screen、③ WAK Flow および ICFA 法、④その他検査法およびクロスマッチの 4 法について解析を行った。

部門別解析は、各検査法別の解析結果から、各参加部門（輸血・臓器移植・造血幹細胞移植）での検査実施状況の解析および「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」に従った提出結果の評価を行い、その状況について解析した。各解析分担項目と解析担当者（所属）は、以下のとおりである。

#### 1, タイピング結果解析

Luminex (SSO 法) について

近畿ブロック血液センター 石井 博之

イノリパ (SSO 法) について

東京女子医大 安尾美年子

SSP 法について

県立広島病院 藤井 明美

SBT 法について

東海大学 医学部 重成 敦子

HLA タイピング結果の表記について

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

表 1 第 16 回 QCWS 参加施設

(受付日付順)

1	北里大学病院	臨床検査部 DNA検査室	30	京都大学	iPS細胞研究所・規制科学部門
2	仙台社会保険病院	検査部	31	東海大学	医学部基礎医学系分子生命科学
3	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	32	東北ブロック血液センター	品質部 検査一課
4	名古屋第二赤十字病院	組織適合検査室	33	静岡県立総合病院	輸血・細胞治療科
5	株式会社 医学生物学研究所	品質管理部	34	株式会社ビー・エム・エル	特殊分析部 ゲノム検査 1 課
6	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	35	一般財団法人 HLA 研究所	
7	NPO法人腎泌尿器疾患研究所		36	札幌北楡病院	臨床検査科
8	中四国ブロック血液センター	技術部 検査課	37	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
9	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞療法部	38	県立広島病院	臨床研究検査科
10	福岡赤十字病院	検査部 HLA検査室	39	高知医療センター	
11	岡山県赤十字血液センター	検査課	40	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事ビジネス課
12	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	41	株式会社 リプロセル	技術部
13	株式会社エスアールエル	品質保証部 品質保証企画グループ	42	北海道赤十字血液センター	検査部 検査三課
14	近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	43	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室
15	近畿大学医学部附属病院	輸血細胞治療センター	44	社会保険中京病院	検査部
16	香川県立中央病院	中央検査部	45	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター
17	九州ブロック血液センター	検査二課	46	山形県立 中央病院	輸血部
18	株式会社 ベリタス	技術営業部	47	株式会社 保健科学研究所	特殊分析センター 染色体遺伝子関連・細胞検査グループ
19	東海大学医学部付属病院	診療技術部 移植免疫	48	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
20	広島大学病院	輸血部	49	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科 HLA検査室
21	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課	50	獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室
22	松江赤十字病院	検査部	51	大分県立病院	輸血部
23	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部	52	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
24	徳島大学病院	輸血部	53	三菱化学メディエンス株式会社	遺伝子分析研究部 細胞性免疫グループ
25	筑波大学	医学系技術室	54	Gen-Probe GTI ダイアグノステックス株式会社	企画開発
26	北海道大学病院	検査・輸血部	55	愛知県赤十字血液センター	検査一課
27	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	56	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部
28	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室	57	鷹揚腎研究所 弘前病院	化学実験室
29	大阪府立急性期・総合医療センター	移植支援検査センター			

2, 抗体検査結果解析

FlowPRA 法の検査状況の解析

東京女子医大 石塚 敏

Lab Screen による抗体検査

HLA 研究所 二神 貴臣

WAK Flow および ICFA 法による抗体検査

北海道ブロック血液センター 高橋 大輔

その他検査法およびクロスマッチ

中央血液研究所 中島 文明

3, 部門別解析および結果評価 (各参加部門における施設別結果評価)

DNA タイピング

中央血液研究所 田中 秀則

抗体検査

近畿ブロック血液センター 高 陽淑

5. QCWS サンプルの総合結果

参加各施設の精度管理, 技術向上に役立てることを目的に, DNA および抗体サンプルの総合結果を示す。DNA サンプルは, 本ワークショップで解析した結果に加え, 中央血液研究所で精査した結果を加味し, 総合的にリアサインした。HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 領域は, 1 本鎖 DNA に調製して塩基配列を確定し Ambiguity を回避した結果を示す。解析データベースは IMGT/HLA Database Sequence Alignments based on Release 3.7.0 (Jan-2012), 表記は本学会 HLA 標準化委員会のアレル表記法と結果報告の原則 (2010 年版 改訂 1.1 版) に従い記載した (表 2)。また, 抗体サンプルは, 抗体 QC 参加施設の総合判定結果を集計して, 3 分の 2 以上の参加施設が陽性判定した抗原をスコア「8」、陰性判定した抗原をスコア「1」、どちらも 3 分の 2 に達しない抗原をスコア「4」で示した。SH2402 は, IgM 性抗体のみの特異性で反応する抗原に「\*\*」を記した (表 3)。

表 2 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート : DNA サンプルの総合結果

HLA-Class I	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
<b>H2401</b>	A*02:03:01 <b>A203</b>	A*24:02:01:01 <b>A24</b>	B*52:01:01 <b>B52</b>	B*56:01:01 <b>B56</b>	C*01:02:01 <b>Cw1</b>	C*12:02:02 <b>Cw12</b> ※
<b>H2402</b>	A*11:01:01 <b>A11</b>	A*31:01:02 <b>A31</b>	B*46:01:01 <b>B46</b>	- <b>-</b>	C*01:02:01 <b>Cw1</b>	- <b>-</b>
<b>H2403</b>	A*02:06:01 <b>A2</b>	A*11:02:01 <b>A11</b>	B*38:02:01 <b>B38</b>	B*48:01:01 <b>B48</b>	C*07:02:01 <b>Cw7</b>	C*08:03:01 <b>Cw8</b>
<b>H2404</b>	A*02:01:01 <b>A2</b>	A*24:02:01:01 <b>A24</b>	B*15:05:01 <b>B62</b>	B*51:01:01 <b>B51</b>	C*07:02:01 <b>Cw7</b>	C*14:02:01 <b>Cw14</b> ※
HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
<b>H2401</b>	DRB1*13:12:01 DRB3*02:02:01 <b>DR13</b> <b>DR52</b>	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02:01 <b>DR15</b> <b>DR51</b>	DQA1*01:03 DQB1*03:01:01 <b>DQ7</b>	DQA1*05:03:07 DQB1*06:01:01 <b>DQ6</b>	DPA1*02:01 DPB1*05:01 <b>DPw5</b>	DPA1*02:02 DPB1*09:01 <b>DPw9</b> ※
<b>H2402</b>	DRB1*09:01:02 DRB4*01:03:01 <b>DR9</b> <b>DR53</b>	DRB1*12:01:10 DRB3*01:01:02 <b>DR12</b> <b>-</b>	DQA1*03:02:03 DQB1*03:01:01 <b>DQ7</b>	DQA1*05:05:09 DQB1*03:03:02 <b>DQ9</b>	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 <b>DPw2</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01 <b>DPw5</b>
<b>H2403</b>	DRB1*04:10:01 DRB4*01:03:01 <b>DR4</b> <b>DR53</b>	DRB1*16:02:01 DRB5*02:02 <b>DR16</b> <b>DR51</b>	DQA1*01:02:08/09 DQB1*04:02:01 <b>DQ4</b>	DQA1*03:01:02/03 DQB1*05:02:01 <b>DQ5</b>	DPA1*02:02 DPB1*03:01 <b>DPw3</b>	- DPB1*05:01 <b>DPw5</b>
<b>H2404</b>	DRB1*08:02 <b>DR8</b> <b>-</b>	DRB1*14:06 DRB3*02:02:01 <b>DR14</b> <b>DR52</b>	DQA1*04:01 DQB1*03:01:01 <b>DQ7</b>	DQA1*05:03:07 DQB1*04:02:01 <b>DQ4</b>	DPA1*01:03 DPB1*02:01:02 <b>DPw2</b>	DPA1*02:02 DPB1*05:01 <b>DPw5</b>

上段 (斜体): HLA 遺伝子型  
下段 (太字): HLA 型

※このアレルに対応するHLA型が判明していないためアレル名の第1区域で表記





## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング Liminex 法—

石井 博之<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 近畿ブロック血液センター検査三課

### 1. 概況

Luminex 法の参加施設は、解答を寄せた 53 施設中、31 施設 (58.4%) あり、昨年と同じ施設数であった。使用されたキットは、ワンラムダ社製 LABType が 10 施設 (32.3%)、LABType HD が 7 施設 (22.6%)、湧永製薬製 WAKFlow が 17 施設 (54.8%)、医学生物学研究所製ジェノサーチが 6 施設 (19.4%)、ジーンプローブ社製 LIFECODES が 1 施設 (3.2%) であった。タイピング実施ローカスは、全施設が HLA-A, B を実施しており、その他 HLA-C (26 施設, 86.7%)、DRB1 (30 施設, 96.8%)、DRB3/4/5 (3 施設, 9.7%)、DQA1 (7 施設, 25.8%)、DQB1 (15 施設, 48.3%)、DPA1 (4 施設, 12.9%)、DPB1 (8 施設, 25.8%) の報告があった。

### 2. 解析方法

解析方法については、以下の 3 項目について解答のあった HLA-A, B, C, DRB1 を対象に行った。

- 結果の表記
- 反応データ
  - ① 陽性コントロールビーズ蛍光値の平均値とばらつき (%CV)
  - ② 各プローブの Pmin/Nmax 値 (P/N 値) の比較
  - ③ 各施設のカットオフ値の変更状況
- アサインミスとその原因

なお、詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「16 回 QC ワークショップ報告集」を参照されたい。ジーンプローブ社製 LIFECODES については、1 施設のみ参加であり、解析ソフトも使用できなかったため、反応データの解析は対象外とした。

### 3. 結果と考察

#### 1) 結果の表記

Luminex 法における結果の表記については、同一キットの同一ロットであれば同じ結果表記になるはずであるが、ambiguity の記載がないもの、ambiguity の組み合わせが数字の小さいアリアル順になっていない等、例年見られる。原則に沿った結果の表記で報告することが望まれる。

#### 2) 反応データ

陽性コントロールビーズ蛍光値の平均値とばらつきでは、HLA-C のエクソン 2 において %CV が 56% と大きな施設があった。当該施設の 4 検体 (H2401 ~ H2404) の内、H2402 のエクソン 2 陽性コントロールビーズ蛍光値が、159 (他の 3 検体の蛍光値は、2543, 2270, 2304) と非常に低く、増幅不良が考えられる。結果的には、正しいタイプで判定されていたが、増幅不良が明らかなデータで結果を出すのは、信頼性という意味では低く、問題があると考えられる。各プローブの P/N 値) の比較では、各ローカスとも良好であったが、HLA-DRB1 において P/N 値 3 未満のプローブが多く見られた施設があった。原因はプローブとの反応性が悪かったわけではなく、コンタミネーションが原因と考えられた (後述)。各施設のカットオフ値の変更状況では、今年度は約 7 割 (昨年度は約 3 割) の施設がカットオフ値の変更なく正しい結果で判定されており、全体的に反応性が良好であったことが伺える。

#### 3) アサインミス

アサインミスについては、7 件 (HLA-A : 2 件, HLA-B : 2 件, HLA-C : 1 件, HLA-DRB1 : 2 件) あり、内 3 件 (No. 3, 4, 7) は反応データには問題なく転記ミ

スと考えられた。No. 1, 2 については、1つのプローブとの反応が偽陰性によるものであったが、原因となったプローブの反応性は特に問題となるようなデータではなく、慎重に判定すれば防げたアサインミスと思われた。No. 5 については、判定に苦慮するデータであり、コンタミネーションの疑いがあった。当該施設の報告された結果をもとに判定すると7個のプローブのカットオフ値を陽性から陰性に変更する必要があったが、変更したプローブの蛍光値はすべて高く、陰性とは考えられないデータであった。結果、2つのプローブの判定に誤りがあったが、基本的には判定できるデータではなく、再検査が必要であり、無理やり判定し、結果を出したこと自体に問題がある。このように特定のプローブの蛍光値が高い場合、別のアレルの存在も考えられる。これらのプローブの特異性を確認すると DRB1\*08:02 の存在

が疑われ（当該検体の正しいタイプは、DRB1\*04:10, DRB1\*16:02/17/19）、コンタミネーションが原因と考えられた。Luminex 法は、反応させるプローブ数が多く、数個のプローブの判定をミスしても何らかのタイプがアサインされてしまう。そのため、各プローブの反応性を把握することが重要であり、特に蛍光値（LABType の場合は Normal Value）がカットオフ値付近のプローブの判定には注意が必要である。

#### 4. まとめ

---

反応データについては、年々安定してきており、概ね良好であった。しかしながら、転記ミスやアサインミスの数については例年と変わらない状況であり、ミスのあった施設においては、もう一度データを見直し、ミスの原因や問題点を見つけ改善することが望まれる。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート — 検査法別解析 DNA タイピング SSO 法 (INNO-LiPA) —

安尾美年子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医大中央検査部移植関連検査室

### 1. はじめに

INNO-LiPA (SSO 法) は、昨年で最後となった RELI に代わるキットとして、同様の原理であることから使用する施設が増えているが、今回の QCWS の参加は 4 施設のみであった。解像度は低～中であり、RELI に比べて判定までの所要時間が長い。ストリップが薄いため多少扱い難く手間もかかるが、RELI に慣れた施設では導入しやすいと思われる。

### 2. 検査状況

4 施設中 1 施設 (24D18) は H2401・H2402 のみのデータ提出であり、INNO-LiPA は SSP の補助としての使用であった。また、HLA-C・DRB3/4/5・DQB1 のデータ提出は 1 施設 (24D08) のみである。

### 3. 解析結果

#### 3.1 クラス I

INNO-LiPA の判定は判定ソフトによるものと日本人を対象とした早見表によるものがある。判定ソフトではアレルの組み合わせにより ambiguity が異なるのに対して、早見表では 4 桁アレルにより ambiguity が固定されるが、同じ結果になる場合もある。

サンプル H2401・H2402・H2403 についてはどの施設も 4 桁レベルでの問題はなかったが、24D04・24D18 の

施設はとくにサンプル H2401 でバンドの発色が弱い部分が見られた。また 1 施設の表記法 (アレルが 1 つしか検出されない場合) の誤りと、判定ソフトのバージョンの違いのためか ambiguity が異なる施設があった。

H2404 については A ローカスには 3 施設とも判定に問題はなかった。しかし、B ローカスでは 3 施設とも 2 桁 (第 1 区域) レベルでは問題無いが、第 2 区域が判定ソフトの見方の違いと考えられる結果であった。

#### 3.2 クラス II

DR ローカスは 1 施設のみが Decoder の使用により、DRB3/4/5 まで判定されていた。また同施設のみ DQ ローカスも提出されており、他施設とは比較できないが問題無い結果と考えられた。

DRB1 については 1 施設のみ H2401・H2404 で第 1 区域の判別ができない結果が記載されているが、原因はこれも判定ソフトの見方の違いと考えられる。

### 4. まとめ

サンプルが日本人由来のアレルであるため、日本人アレルとしては 2 桁レベルの誤判定はなかったが、判定ソフトの見方の違いにより、第 1 区域が決定できないと判断した施設があった。どのキットでも同様かも知れないが、日本人のアレルに限定しなければ第 1 区域の判定も困難であり、日常検査には対応できないと考えられる。

## 第16回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第16回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SSP 法—

藤井 明美<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 県立広島病院

### 1. 概要

SSP法での参加施設は、27施設（全参加施設50%）であり、昨年度比較で7施設増であった。このうち、SSP法単独参加は18施設、その他の方法との併用参加は9施設であった。なお、併用参加施設中2施設は「補助試薬として使用」と明記され、1施設は報告内容から補助試薬使用と解釈されたため、SSP法での解析および評価をおこなわないこととした。なお、結果の詳細は学会ホームページに掲載されているので、そちらを参照して

### 2. 参加部門

SSP法の参加部門は、輸血関連、臓器移植または輸血関連と臓器移植両方での参加が造血幹細胞移植での参加施設に比して多かった。特に、臓器移植での参加施設ではSSP法単独参加が多い傾向にもあった。

### 3. 試薬

今回報告された使用試薬は低解像度（low resolution）試薬4種類、高解像（high resolution）試薬3種類であった。特にMicro SSP（OneLambda社）の使用施設数が多く、とりわけ日本人向けに開発された低解像度（low resolution）試薬であるMicro SSP JPNの使用施設は19施設と最も多かった。

### 4. 解析結果

解析はQCWS部会からの解答（Consensus Allele）を

基に miss assign がないかをチェック、相対的反応データの不備（偽陽性 false positive・偽陰性 false negative）の有無を確認した。

#### 1) 判定ミス（miss assign）

判定をミスの主な要因として、①反応が不備（偽陽性 false positive・偽陰性 false negative）であった場合、②表記方法が間違っていた場合があり、どちらでもない場合もあった。しかし、多くは②の表記方法の間違いによる判定ミスものであり、反応に関しては概ね良好であった。

#### 2) 相対的反応データの不備

相対的に偽陽性（false positive）や偽陰性（false negative）があると思われた施設は5施設あった。しかし、miss assign していない施設もあり、入力間違いの可能性も中にはあると思われる。

### 5. まとめ

今回は、反応データに関しては概ね良好と思われる。しかし、SSP法の参加施設の多くは低解像度（low resolution）試薬の使用であるため、第2区域表記では多くの Ambiguity が生じ、記載方法間違いでの判定ミスが多かったと思われる。本来、第1区域までの判定試薬である低解像度（low resolution）試薬を使用している報告には、かなりの困難が生じていると思われる、またこのことは結果の解析時にも同様である。SSP法での使用試薬状況を加味した報告方法等、今後対応が必要になってくるかもしれない。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 DNA タイピング SBT 法—

重成 敦子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東海大学医学部

### 1. はじめに (HP 掲載結果: 図 2)

SBT 法の参加施設数は 6 施設で, HLA-A, B, C, DRB1 座のタイピング結果は全施設から, HLA-DQB1, DPB1 座のタイピング結果は, 3 施設から提出された。使用されたキットは, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) が 6 施設で, その中の 1 施設については SeCore Sequencing Kits (invitrogen) と併用していた。データ解析は, 全ての施設が Assign 解析ソフトを使用していた。

今回, すべての施設が, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) と, Assign 解析ソフトを使用していた為, QCWS を行った時点での最新のリファレンス (IMGT/HLA3.7.0-12/04/2012) を使用し, Assign3.6+ で解析した結果を正解回答とした (図 1)。本レポートでは, 各施設で判定したタイピング結果の異なる部分に注目して解析を行った (図 3, 4)。

### 2. 解析結果と考察

Assign 解析ソフトにおけるリファレンスの更新ミスと, 第 1 区域アンビグエィティーにおける表記ミスが認められた。

#### 2.1 Assign 解析ソフトにおけるリファレンスの更新ミス (図 6)

SBT 法のタイピングでは, データベースで頻繁にアリの削除や新規登録が行われているため, 最新のリファレンスを使用してタイピングすることが必要である。

最新のリファレンスは, Conexio Genomics のホームページよりダウンロードすることが可能である。そのリファレンスデータを Assign 解析ソフトに取り込み, 解析を行う。このリファレンスの更新は, 解析ソフト購

入会社などからの通知はないため, それぞれ個人で確認し, 更新しなくてはならない。

このダウンロードしたリファレンスデータファイルには, IMGT-HLA データベースサイトのバージョン, 削除および新規登録のアリの情報が含まれている。

#### 2.2 表記ミス (図 7)

第 1 区域アンビグエィティーにおける表記では, H2404 の DRB1 のタイピングで allele1 の群が全て DR14 なのに対し, allele2 の群は, DR8 と DR13 が混在していることから, この場合の正しい表記は, 「HLA タイピング結果のアリ表記法と結果報告の原則」の III (2) に相当するため, DRB1\*08:02/13:47/+, DRB1\*14:02/06/52/+ が正解となる。

さらに, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) および, SeCore Sequencing Kits (invitrogen) の HLA-DRB1 のタイピングキットには, エクソン 2 Forward プライマー, エクソン 2 Reverse プライマー, Codon86 プライマーの 3 種類のシークエンスプライマーが添付されている (図 8)。この Codon86 プライマーは, DRB1 のコドン 86 番目の GTG モチーフのシークエンスプライマーである。

Assign 解析ソフトで解析する際に, コドン情報を設定 (図 9) することで Codon86 (GTG) プライマーで得られる配列の有無や, その配列情報により, アリを絞り込むことが可能な場合もある。今回の QCWS のサンプルでは, H2404 が Codon86 の使用により, HLA-DRB1\*08:02, -DRB1\*14:06 とさらに絞り込みが可能である。

#### 2.3 キットによる違い

今回の QCWS では, AlleleSEQR HLA typing kits (CELERA) と, SeCore Sequencing Kits (invitrogen) の 2 種類のキットでの報告があった。

2 種類のキットの解析可能ローカスは、いずれも HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 である (図 10)。対照とする解析領域は、ClassI の HLA-A, B, C はエクソン 2, 3, 4 領域で、ClassII の DRB1 はエクソン 2 領域、DQB1 はエクソン 2, 3 領域となっており、両キット共に同じ領域の配列を解析しているが、DPB1 の解析領域については両者で異なっている。

すなわち、AlleleSEQR HLA-DPB1 typing kits は、エクソン 2 領域のシークエンスプライマー (別に補足試薬を購入可能) のみなのに対し、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits は、エクソン 2, 3, 4 領域のシークエンスプライマーが含まれており、より長い領域が可能である。

そして、AlleleSEQR typing kits の補足試薬 (別購入) を使用しアンビグニティーを解消した施設があった。また、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits を使用し、アンビグニティーを減らすことに成功した施設もあった。

さらに、今回 H2402 の HLA-DPB1 座のタイピングで、SeCore Sequencing Kits を使用すると判定不能との報告があった (図 11)。H2402 の HLA-DPB1 座の得られたシークエンス配列を IMGT-HLA データベースサイトで解析したところ、新しく登録された HLA-DPB1\*135:01 と既知の HLA-DPB1\*02:01:02 のヘテロの配列と一致した。HLA-DPB1\*135:01 は、今回の解析で使用した Assign のリファレンスでは、公認未決定 (Pending) の段階で含まれていなかったが、その後、新たに IMGT データベー

スで公開されたアリルだった。

このように、新しい HLA アリルが次々と同定、登録され、順次公開が行われているので、SBT 法では最新のリファレンスを確認し使用することが必要である。

また、H2402 の DRB1 タイピングでは、SeCore DRB1 Locus Sequencing Kits を使用し、Assign のソフトで解析を行う場合、エクソン 2 領域前半部分のシークエンス配列は綺麗に読めているにもかかわらず、プライマーの位置が正しく認識されずアンビグニティーとなった施設もあった。Assign のソフトのバージョンによって、プライマー位置を変更できずアリルの絞り込みが出来なかったと考えられる。

### 3. まとめ

今回の不正解の主な理由は、表記ミスとリファレンスの更新ミスであった。正確で精度の高い解析が出来たとしても、正しく表記し報告することが必要である。また、必要に応じて補足試薬などを使用し、アンビグニティーを減らすことも考慮しなければならない。

SBT 法を行う際には、綺麗なシークエンスデータを得ることを心がけ、リファレンスとアンビグニティーの表記に注意する必要がある。さらには、QC ワークショップに積極的に参加することで、施設の精度を保持できると思われる。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート  
—DNA タイピング 表記法について—橋口 裕樹<sup>1)</sup><sup>1)</sup>福岡赤十字病院

## 1. 概要

今回、第 16 回 QCWS の参加施設は 53 施設であり結果の表記は A, B, C, DRB1 を評価対象とし DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1, DPA1 は評価対象外とした。ローカス別の参加数は A, B が全 53 施設 (100%), DRB1 は 52 施設 (98.1%), C は 41 施設 (77.4%) であり、昨年と比べ僅かに増加傾向であった。

今回の解析も学会が規定する表記法 (HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版), 改訂 1.1 版) をもとに評価を行った。表記法, 改訂 1.1 版の主な改訂箇所を下記に示す。また, 表記法の詳細は, 学会のホームページを参照して頂きたい。

## 1) 改訂箇所 (1)

「II. アンビギュイティ (ambiguity) の結果表記について」の「2. 第 2～4 区域で判別できないアリルが複数存在する場合の表記」について, 以下の改訂を行う。

第 2 区域で判別できないアリルが複数存在する場合, 最も数字の小さいアリルを最初に記し, その後に「/ (スラッシュ)」を入れ, 判別できない他のアリルの第 2 区域の数字を小さい順に記す。「/ (スラッシュ)」で表記するアリルは, 最大 3 種類までとし, 4 種類以上の場合, 最後に「+ (スラッシュ, プラス)」を付記する。

## 2) 改訂箇所 (2)

「IV. 血清学的 HLA 型の結果表記について」, 複数の HLA 型表記について, 以下の内容を追加する。

DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合, 最も数字の小さい HLA 型から順番に記し, 各 HLA 型は「/ (スラッシュ)」区切る。

例: HLA-DRB1\*04:03/05/06/+ と判定された場合は, 「HLA-DR4」と表記し, HLA-A\*02:06/10/21/+ と判定さ

れた場合は, 「HLA-A2/210」と表記する。

今回のサンプル H2401 を使った表記例は, 以下のとおり。

- A\*02:01/02/03/+ と判定した場合は A2/203 と表記する。
- A\*02:03 と判定した場合は A203 と表記する。
- A\*24:02/03/04/+ と判定した場合は A24/2403 と表記する。
- A\*24:02 と判定した場合は A24 と表記する。

## 3) 改訂箇所 (3)

「IV. 血清学的 HLA 型の結果表記について」, HLA-C 座の HLA 型表記について, 以下の内容を追加する。

WHO 命名委員会と日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会の何れでも HLA 型が不明な場合は, 第 1 区域で分類される HLA 型で表記する。また, HLA-C 座のアリル HLA-C\*12 から C\*18 に対応する HLA 型は公認されていないが, 第 1 区域を用いて HLA 型とする。これらの場合, 備考欄に「このアリルに対応する HLA 型が判明していないため, アリル名で表記している」等の説明を付記してもよい。

表 1 主な DNA 型表記での減点対象例

ambiguity の表記が不正確 (-15)	A*24
“L” を付記 (-15)	A*24:02/02L/03/+
“N” を付記 (-15)	A*24:02/09N/10/+
“:” コロンなし (-5)	A*2602
ローカス名の表記なし (-5)	24:02/03/04/+
“*” の表記なし (-5)	24:02/03/04/+
“*” が全角 (-5)	DRB1 * 15
判定不能表記が “undefined” でない (-5)	判定不能
Blank の表記 (-5)	A*—
小さい順に表記されていない (-10)	DRB1*14:54/01/02/+



表 2 主な HLA 型表記での減点対象例

表記が不正確 (-10)	B15
小さい順に表記されていない, /の後のローカス名が不要 (-10)	B62/B15
小さい順に表記されていない, ( ) の表記 (-10)	B62 (B15)
第 1 区域を用いて表記していない (-10)	Cw12 を blank や — を記載
判定不能表記が undefined でない (-5)	判定不能
“DRB” と表記している (-10)	DRB1
“*” を表記している	Cw14*

## 2. 結果

DNA 表記, HLA 表記ともに多くの施設で A (正解)

若しくは B (不備がある) であったが, 数施設においては表記に誤りがあり, 大きな減点対象となった。

## 3. 考察

今回は, DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合, 最も数字の小さい HLA 型から順番に記す表記方法での誤りが多かった (改訂箇所 (2))。この点を次回, 表記する時に特に注意して頂きたい。また減点となった施設は, 再度 “HLA タイピング結果のアリル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)” を熟読されて, 正しい表記での報告をお願いしたい。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 FlowPRA 法—

石塚 敏<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室

### 1. 概要

FlowPRA 法は、全施設から Negative Control・Positive Control およびサンプルの FCS ファイルの提出をお願いし、FCS データ解析ソフト (FlowJo : Tree Star, Inc. USA) で統一した条件設定による解析を行った。各施設から報告があったデータの解析方法は、判定保留を除外し、各施設の判定スコアから陽性率・陰性率、一致率を求めた。FlowPRA 法の検査状況の解析について詳細な集計データ等は、紙面の都合上、学会ホームページに記載されている概要資料を参考にして頂きたい。

### 2. FlowPRA 法の検査状況

FlowPRA Screening IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体 : 19 施設・HLA Class II 抗体 : 18 施設 (内訳は、輸血関連 9・臓器関連 16・造血関連 5 : 重複施設を含む) であった。

FlowPRA Screening IgM test の実施施設は、HLA Class I 抗体 : 2 施設 (内訳は、輸血関連 2・臓器関連 2・造血関連 2 : 重複施設を含む), HLA Class II 抗体 : 2 施設 (内訳は、輸血関連 2・臓器関連 2・造血関連 2 : 重複施設を含む) であった。

FlowPRA Single Antigen IgG test の実施施設は、HLA Class I 抗体 : 3 施設・HLA Class II 抗体 : 3 施設 (内訳は、輸血関連 2・臓器関連 3・造血関連 1 : 重複施設を含む) であった。

使用機器は、ベクトン・ディッキンソン : 11 施設・ベクマン・コールター : 8 施設であった。

### 3. FlowPRA Screening IgG test 解析結果

配布された 4 種類の Sample は、HLA Class I IgG 抗体

が SH2401・SH2403・SH2404 において陽性であり、SH2402 は陰性であった。

参加施設から報告して頂いた判定スコアの一致率は、SH2401 : 100%・SH2402 : 84.2% (判定保留 : 2 施設・偽陽性 : 1 施設), SH2403 : 100%・SH2404 : 84.2% (偽陰性 : 2 施設・判定保留 : 1 施設) であった。

HLA Class II IgG 抗体は、SH2401・SH2404 において陽性であり、SH2402・SH2403 は陰性であった。一致率は、4 種類の Sample すべてにおいて 100% であった。

陽性率 % は、HLA Class I & II 抗体共に最大・最小値についての施設間差が大きい結果であった。

データ提出用ファイルに添付されているヒストグラム、また FCS ファイルからの再解析結果を参照すると、各施設の Negative Control ヒストグラムの波形や設定位置に若干の相違が認められた。また、ヒストグラム等のデータから確認することが出来ない使用機器の初期設定や Anti-Human IgG-FITC の力価等を確認して頂きたい。

各施設の FCS ファイルから Control Beads を解析すると、1 施設 SH2401 と SH2403 において Gate 内に HLA Class I Beads の混入が認められた。しかし、SH2402 と SH2404 において問題がないことから Sample の前処理が均一でない可能性が考えられた。

### 4. FlowPRA Screening IgM test 解析結果

配布された 4 種類の Sample の判定スコア一致率は、HLA Class I IgM 抗体で SH2401 : 50%・SH2402 : 100%・SH2403 : 100%・SH2404 : 50% であり、HLA Class II IgM 抗体は、4 種類の Sample すべてにおいて 100% であった。

結果の乖離を示した HLA Class I IgM 抗体の SH2401・SH2404 について、データ提出用ファイルに添付されているヒストグラム等を参照すると、乖離の原因は Nega-

tive Control にある可能性が考えられた。IgM 抗体に対するメーカー純正の Negative Control serum は現在販売されていない。そのため、メーカー純正の IgG 抗体用である Negative Control serum を使用する場合は、使用 Lot. ごとに IgM 抗体の有無をチェックする必要がある。

#### 5. FlowPRA Single Antigen IgG test 解析結果

データ提出用ファイルに添付されているドットプロット、また FCS ファイルからの再解析結果を参照すると各施設のドットプロットによる図にはほぼ相違がなかった。しかし、各施設によって Cut-off の設定基準が大き

く異なっているのが現状であり、設定基準によって結果の乖離を生じていることが把握出来た。

#### 6. まとめ

今回の解析結果から FlowPRA Screening では、陽性率 % における最大・最小値について施設間差を小さくする統一化プロトコルが必要であると考えられた。

また、FlowPRA Single Antigen test においても、各施設のドットプロットによる図にはほぼ相違はないことから Cut-off の設定基準を統一化する検討が必要であると考えられる。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 LABScreen による抗体解析—

二神 貴臣<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 HLA 研究所

### 1. はじめに

LABScreen を実施した施設は 21 施設（輸血：14, 臓器：13, 造血：13, その他：1）であった。スクリーニングのみを実施した施設は 1, Mixed・Multi・PRA のいずれかを用いたスクリーニングの後に Single Antigen (SA) で同定を実施した施設は 9 施設, SA で同定のみを行った施設は 11 施設であった。スクリーニング検査に Mixed を用いた施設は 6 施設で, PRA は 4 施設, Multi を用いた施設も 1 施設あった。判定は 1 施設（自家製）を除きすべての施設で HLA Fusion が使用された。

### 2. 結果の解析および考察

#### 2.1 判定の不一致

抗体有無の判定について Class I では SH2402, Class II では SH2402 と SH2403 に乖離が見られた。SH2402 Class I では 14 施設が陰性と判定したのに対して, 陽性と判定した施設が 6 施設, 保留とした施設が 1 施設あった。SH2402 Class II では陰性：14 施設, 陽性 3 施設, 保留 2 施設であり, SH2403 Class II では陰性 16 施設, 陽性 2 施設であった。乖離の原因としては cutoff の施設間差や Baseline Normalized Value (BNV) の施設間差によるものと考えられる。

#### 2.2 cut off の設定について

ほぼ全ての施設が HLA Fusion を使用して判定をしているが, cut off の設定は施設により様々であった。BNV500～1,000 を cutoff としている施設が多いが, Threshold (しきい値) を cutoff としている施設もあるように見られる。また, cutoff 値を参考に総合的に判定している施設もあった。このような cutoff の設定の違いのため, ある施設では BNV900 を陰性とし, 別の施設では BNV600 を陽性とするケースがいくつか見られた。

#### 2.3 実測値のバラツキ

各施設の Positive Control Beads を比較すると施設毎に大きく差があることがわかる。もっとも大きな差があるところでは BNV にして 10,000 程度差があった。また, 陽性反応の beads だけを集め, その平均値を比較したところ, 大きな差が見られ, 昨年の QCWS と同様であった。施設間のバラツキは検体の前処理方法や洗浄の仕方など技術的な要因や施設の環境に影響しているものと考えられる。

#### 2.4 その他の判定不一致

その他の判定不一致には記載ミスがあった。日常検査においても QCWS 同様に手動で入力している施設は, 入力の際には細心の注意を払う必要がある。他の判定不一致の要因としてコンタミが疑われる例が 2 例あった。コンタミ防止は検査時に最も気をつけなければならない技術的問題であり, 当該施設は自施設の検査手順を見直し, 必要に応じて改訂する必要があると考える。

### 3. まとめ

LABScreen による HLA 抗体スクリーニングの結果には施設間でいくつかの乖離がみられた。乖離の原因は検体の前処理方法や検査手技に起因する実測値のバラツキと cutoff の設定の違いによるもので, 弱陽性抗体の判定に影響した。強陽性抗体についてはいずれの施設も検出していた。実測値についてはある程度のバラツキは仕方がないが, 他の施設よりも大きく差があった施設については検査手順等を見直す必要があるかもしれない。判定の際には cutoff のみに捉われず交差反応やエビトープを考慮に入れて総合的に判定するとより精度の高い判定が可能になる。また, SA はリコンビナント抗原を用いているため, 細胞には反応せず, SA にのみ反応する抗体も検出することがある。臨床的に意義のある抗体かどうかを見極めるためにも PRA などの細胞由来 HLA 抗原を用いた検査との併用が望ましいと考える。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート  
—検査法別解析 WAK Flow および ICFA 法による抗体検査—高橋 大輔<sup>1)</sup><sup>1)</sup>北海道ブロック血液センター

## 1. はじめに

WAKFlow HLA 抗体検出試薬（以下 WAKFlow MR）での参加数は、クラス I で 10 施設、クラス II で 6 施設、ICFA で 5 施設であり例年とほぼ変わらなかった。参加施設の大半は血液センターであった（Table 1）。クラス I の試薬ロットは、M0A が 1 施設のみで、それ以外の施設は L0B の使用であった。何らかの血清処理を行っている施設が 7 施設、未処理が 3 施設であった。クラス II の試薬ロットは、L0A が 3 施設、L0B が 2 施設、K0B が 1 施設であった。また、すべての施設で何らかの血清処理を行っていた（Table 2）。

解析結果の詳細は、学会ホームページ「第 16 回 QC ワークショップ報告集」の HLA 抗体「WAKFlow および ICFA 法による解析結果」を参照されたい。

## 2. WAKFlow-MR クラス I

## 2.1 ビーズ反応性の比較

同一ロット内での血清処理の有無によるバックグラウンドビーズ（BB）とポジティブビーズ（PB）の蛍光強度に差を認めなかった。しかし、ロット M0A を使用した施設では、他の施設と比較して高い蛍光強度を示しており、試薬のロット間差の可能性が考えられた（Fig. 1）。また、配布血清の BB、PB の蛍光強度を施設別にみると、PB において施設番号 S04 と S17 で高い値を、S05 では低い値を示す傾向にあり、施設間差が示唆された（Fig. 2）。

## 2.2 サンプルごとの反応性について

HLA 抗体スクリーニング（抗体の有無）の結果は、全施設で一致した。Table 3–6 に各施設の抗原毎の判定結果の一覧を示すが、メインとなる特異性の判定はいずれの施設も一致が認められた。しかしながら、一部の抗

原では施設間で陽性、陰性の判定に不一致を認めた。Fig. 3–6 に施設ごとのビーズの反応性と設定したカットオフ値の範囲、施設間で判定の異なったビーズを示す。グラフに示されるように、Index 値がカットオフ値付近にあるビーズは、陽性・陰性の判断が難しく施設間差も大きくなり、このことが施設間の判定の不一致につながっていると考えられる。

各施設が設定したカットオフ値に基づくビーズごとの Index 値をスコア化し、セログラフを作成した（Fig. 7–11）。セログラフ解析の結果から、WAKFlow-MR はメインとなる抗体の特異性、および許容抗原の判定に十分な性能を有していると考えられた。しかし、C ローカスの特異性を含む血清 SH2403、2404 において、一部の C ローカス抗原に対する抗体を検出することができなかった（Fig. 10, 11）。

## 2.3 施設間での結果の不一致例について

結果の不一致例を Fig. 12–16 に示す。不一致例の多くは、カットオフ値付近の反応性の解釈に施設間差が生じたために起こっていた（Fig. 12）。このような、カットオフ値付近の反応性の解釈が困難な場合は、抗体の交差反応性やエピトープを考慮することで精度を上げることが可能かもしれない。また、記入ミスと思われる例や、勘違いと考えられる例も散見された（Fig. 13–15）。特定のロットを用いた施設において、ビーズの異常反応による判定結果の相違がみられており、試薬のロット差による非特異的な反応が示唆された（Fig. 16）。

## 3. WAKFlow-MR クラス II

HLA 抗体スクリーニング（抗体の有無）の結果は、1 施設において不一致を認めた。また、クラス I 同様に抗原ごとの判定結果の一部にも不一致を認めた（Table

13)。これらの不一致は、いずれもカットオフ値付近のビーズの判定が施設間で異なっているためと考えられた (Fig. 17, 18)。

#### 4. ICFA 法

ICFA 法の参加施設はクラス I で 5 施設、クラス II で 1 施設の参加であった。評価可能パネルはクラス I で 4 ~ 25 パネル、クラス II で 4 パネルであった。

ICFA 法は各施設での使用パネル数や種類によって精度に大きく差が出てしまうことから抗体特異性の同定が難しく、施設間の評価は困難であった (Table 14)。

ICFA 法で提出された全結果について、Index 値をスコアリングし、セログラフによる血清の解析を行った (Fig. 22-24)。血清 SH2401 の解析結果から、ICFA 法は LABScreen Single Antigen (以下 LS-SA) で少なくとも BNV が 5,000 程度の抗体は十分検出可能であった (Fig. 22)。しかしながら、血清 SH2403 は、LS-SA で Cw9, 10, 1, 14 といった特異性を認めているのに対し、ICFA 法では Cw1, Cw14 を判定できるパネル全てに反応を認めなかった (Fig. 23)。同様に、血清 SH2404 についても LS-SA で Cw5, Cw8 の特異性を認めたが、ICFA 法では、Cw5 については確認可能なパネルすべてで陰性となり、SH2403 同様に C ローカスに対する抗体の一部が検出困難であった (Fig. 24)。

#### 5. まとめ

WAKFlow-MR による HLA 抗体スクリーニング (抗体

の有無) 結果は、クラス II で、1 施設に不一致を認めたものの、概ね良好であった。抗体特異性の判定についても、概ね良好であったが、一部の抗原では施設間の不一致を認めた。この原因として、カットオフ値付近で反応しているビーズの解釈が施設間で異なっていることが挙げられる。WAKFlow-MR では、抗体が広範囲に及んでいる場合や IgM 性の抗体を保有する場合、陽性、陰性の境界が不明瞭となり、適切なカットオフ値を設定するのが困難となるケースが多い。そのため、ビーズの反応性を総合的に判断しながら抗体特異性、あるいは許容抗原を決定することが非常に重要であろうと考えられる。WAKFlow-MR クラス I は血小板輸血不応の原因となる抗体を十分に検出しうると推察される。しかし、今回の血清でもみられたように、C ローカスに対する抗体を検出できない場合もあるため、結果の判断には注意を要すると考えられる。

ICFA 法は、参加施設、パネル数が少ないことから施設間での評価は困難であったものの、セログラフ解析の結果から、ICFA 法は LS-SA で少なくとも BNV が 5,000 程度の抗体は検出可能であり、細胞を用いたクロスマッチには有用と考えられる。しかし、WAKFlow-MR クラス I 同様に、LS-SA で BNV が 15,000 以上の C ローカスに対する抗体を検出できない例を認めており、C ローカスに対する抗体の有無の判断には注意が必要と考えられる。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 その他検査法およびクロスマッチ—

中島 文明<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 中央血液研究所

### 1. その他検査法

近年の HLA 抗体検査は圧倒的に FlowPRA や LABScreen が用いられている。必然的に本項で解析される「その他検査法」は LCT や LIFT などセル・ベースの検査法となる。LCT (AHG-LCT) 2 施設, LIFT1 施設, MPHA4 施設の参加であった。総合判定の抗体検出状況は、どの方法も問題ないように見えるが、複数方法の併用でカバーされているに過ぎない。また、抗体特異性について、LIFT 以外は厳しいといわざるを得ない。理由は明確で、抗原種類が少ないことが原因である。このような状況で HLA 抗体特異性を求めることは不可能であり、結果報告も困難である。

しかしながら、これらのセル・ベース・アッセイはクロスマッチに欠かせない技術である。さらに、高感度試薬の過剰反応を見分ける手段ともなる。今後も、高い技術水準の維持を期待する。

### 2. クロスマッチ

クロスマッチは本年から募集参加とし、ダイレクトクロスマッチと仮想クロスマッチで実施した。昨年と比較し、ダイレクトクロスマッチが 9 施設から 13 施設、仮想クロスマッチが 6 施設から 11 施設へと増加した。

ダイレクトクロスマッチは、指定する抗体サンプル (SH2401) と各施設が準備する抗原細胞で実施し、LCT4 施設, LIFT5 施設, ICFA9 施設の参加であった。

判定結果のグレーゾーン部分を解析すると、SH2401 の B35 特異性は、LABScreen Single で BNV 値 1,500 程度であり、ICFA クロスマッチでは Index 値 2.0 前後を示した。同様に、A24 特異性は LABScreen Single で BNV 値 6,000 程度の比較的強い反応を認めるが、LIFT では、ほとんど反応しない。こちらは、QC サンプル選定時に事前調査しており、A24 特異性は HLA 分子上の  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  ドメイン以外のエピトープを認識していることが判明している。どちらのケースも、異なる方法による感度差の問題というより、各検査法の適切なカットオフ設定が要求される。また、このような抗体特異性が臨床意義をもつ抗体であるか検証することが重要と考える。

仮想クロスマッチは抗体サンプル (SH2401) に対して、二つの HLA 型 (H2401, H2403) を指定した。残念ながら、当初予定したセル・ソースが培養不良のため差替えとなり興味深い組合せとならなかった。抗体特異性が明確なため、各施設とも結果に問題は生じなかった。今回の QC ワークショップの参加状況では、仮想クロスマッチ参加の 11 施設以外に、15 施設が DNA-QC と抗体 QC に参加しているので、次年度以降の参加を望みたい。仮想クロスマッチは、データ自体も仮想化して行うことは可能である。しかし、QC ワークショップとして意味合いを持たせるには、やはり、実データでのマッチングは欠かせない。このことで、マッチングの考え方の根拠となる、HLA 型と抗体測定精度向上も兼ねることが期待される。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLAQC ワークショップレポート —部門別解析 DNA-QC および結果評価—

田中 秀則<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

### 1. はじめに

DNA-QC 用の試料については、QCWS 部会で協議した「日本人由来の細胞で高頻度に検出される HLA 型（アレル）であること」、「日本人由来で稀な HLA アレルであること」の要件に合う細胞から抽出した DNA を配付した（表 1）。

DNA-QC への参加希望施設は、53 施設であり、昨年の参加希望施設（56 施設）より減少した。臓器移植部門 37 施設、輸血部門 24 施設、造血幹移植部門 19 施設、その他が 7 施設であり、うち 22 施設で重複がみられた（図 1）。

以下に部門別解析および各施設の結果評価について概説する。本文中の図表については、誌面の都合により、学会ホームページに掲載しているのので、そちらをご参考にして頂きたい。

### 2. 使用タイピング法について

SSO 法（Luminex）は、臓器移植部門以外で一番多く使用されており、また、臓器移植部門では SSP 法の使用比率が、54.1% と一番高かった（表 2）。また、各タイピング法の参加部門別の占有率は、臓器移植部門で SSO 法（INNO-LiPA）が 100% を占めていた（表 3）。

各タイピング法で、タイピング対象となった HLA ローカスを表 4 に示した。何れのタイピング法においても、HLA-A, B, DRB1 座は 100% 実施されていたが、HLA-C 座については、臓器移植部門の SSO 法（INNO-LiPA）使用施設（4 施設）での実施率は 50% と低かった。また、HLA-DRB3/4/5 座及び HLA-DQB1 座の HLA タイピングは、SSO 法（Luminex）及び SBT 法での実施率は低い傾向にあり、SSP 法及び SSO 法（INNO-LiPA）で高い傾向にあった。

### 3. 結果評価

#### 3.1 概要

DNA-QC 参加施設から提出された結果の評価については、一昨年は試行的に実施し、昨年より統一した「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」に基づき行っている。QCWS 結果は、①判定結果、②結果表記、③試験・検査状況の 3 項目について評価し、各施設に報告を行った。

#### 3.2 判定結果の評価

「HLA-QC ワークショップ結果評価の基準」の判定結果の評価として、「各 HLA タイピング法での判定結果が妥当であること」、「各 HLA タイピング法の判定結果と総合判定結果に齟齬がないこと」について、各タイピング法別、検体別、タイピング実施座別に、両方の基準に適合している場合を 60 点、何れか片方が適合しない場合は 0 点と採点し、最終的には各評価点の平均点をその施設の評価点とした。

今回の QCWS の「判定結果」の評価点は、平均で 56.5 点（図 2 参照）であり、昨年の 54.8 点より高くなった。タイピング法別では、SSO/SSP 法での評価点が、14th QCWS では 57.3 点、15th QCWS では 53.4 点であったのに対して、16th QCWS では 56.5 点であった。15th QCWS では、SSO/SSP 法のような低解像度のタイピングでの結果表記に問題があり、今回は一部改善されたものの、低解像度で表記法について、明確にすることが必要である。

#### 3.3 結果表記の評価

昨年、当学会標準化委員会では、結果の表記法について以下 3 点の改訂を行った。

①第 2 区域で判別できないアレルが複数存在する場合



の表記する順番について

- ② DNA タイピング結果から複数の HLA 型の可能性がある場合の結果表記法について
- ③ HLA-C 座の HLA 型が不明な場合 (HLA-C\*12 ~ C\*18) の HLA 型表記について

結果表記の評価基準は、「表記法に従って記載されている」ことを評価基準としており、適合している場合を 40 点とした。今回の QCWS 参加の平均点は 38.7 点 (図 3 参照) と、前回の QCWS の平均点 (38.5 点) を上回った。

### 3.4 試験・検査状況の評価

試験・検査状況の評価については、「HLA タイピング実施時に得られた試験結果 (データ) が適切であること、また判定が適切に行われていること」を評価しており、①試験結果が全て妥当である場合を “A”, ②反応データの一部に不備がある場合を “B”, ③反応データのほとんどが不備である場合を “C” と判定している。各方法別の評価結果の分布を表 5 に示した。SSO 法 (INNO-LiPA) 使用施設で “B” として評価された割合が高くなった。

## 4. 総合評価

「判定結果の評価点」と「結果表記の評価点」の合計点を総合評価とし、その評価点の分布を図 4 に示した。平均点は 95.3 点であり、昨年の平均点 92.8 点を上回った。総合的な判定区分として、判定結果と結果表記の評価点の合計から、100 点を “A:良好”, 60 ~ 100 点未満を “B:要確認”, 0 ~ 60 点未満を “C:要改善” と区分して評価した。A 評価が 26 施設, B 評価が 27 施設, C 評価が 0 施設となり, “C:要改善” と評価された施設数が、初めて 0 となった (図 4)。

14th QCWS 以降、各施設別の評価点数の変動について検討を行うため、各施設の了承を得て 45 施設の評価結果を連結し、検討を行ったが、特に施設特異的な評価点数の変動は見られなかった。

また、各 QCWS での評価点の推移を図 5 に示した。14 ~ 16th QCWS での最低点は、年々上がって来ており、QCWS 評価点数が均一化している傾向にあった。

## 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート

# 第 16 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析および結果評価（抗体部門）—

高 陽淑<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

### 1. 概要

抗体検査の参加は、輸血部門 22 施設、臓器移植部門 23 施設、造血幹細胞移植部門 15 施設（全て重複あり）で昨年（15th）より 1 施設少ない 37 施設であったが、部門別参加の割合および参加施設の構成比率については大きな変動はなかった。

また、抗体検査実施状況については、37 施設中 34 施設が蛍光ビーズ法を応用した方法を実施し、使用試薬の目的調査から、抗体検出には FlowPRA が 18 施設、LABScreen が 14 施設、WAKFlow が 9 施設で用いられたことが判明した（重複あり）。さらに使用試薬の詳細を確認すると、抗体検出の検査の際に LABScreen single antigen も使用していた 8 施設中、5 施設は他施設との結果に相違を認めた。このことから抗体有無を検出する際には試薬の選択が重要であることが窺える。

また、ここ数年の傾向と同様に試薬の使用状況が特定の部門に偏らない「均一化傾向」を認めた。

### 2. 部門別解析

全部門での総合判定から抗体検出（抗体有無）結果の一致率を見た。昨年（15th）は 4 検体すべてクラス I, II ともに一致率が 97% 以上と非常に高かったが、本年は 83.0%～100% と一致率にバラツキを認め、SH2402 については Consensus が得られなかった。但し、この原因については検体が IgM 抗体の特異性を有するものであったことが原因であり評価点の採点対象にはならなかった。

総合判定結果部門別に、抗体特異性同定の部門別実施率（実施数／部門別参加数×100）を比較すると、Class I 抗体では実施率の高い部門から順に、造血幹細胞移植部門 86.7%、輸血部門 86.4%、臓器移植部門 65.2%、

Class II 抗体では造血幹細胞移植部門 73.3%、輸血部門 63.6%、臓器移植部門 60.9% となり、輸血部門の実施率が低かった昨年（15th）の結果とは異なる傾向を認めた。

### 3. 結果評価

#### 3.1 抗体 QC 結果評価に対する考え方

今年度においても考え方は昨年（15th）と同様で参加施設から提出された結果が共通となる割合を表した「基準値＝現段階では 0.67（2/3）」を基に、それ以上の構成比率を示す抗原（あるいはサンプル）を対象として実施した。よってそれ以下の構成比率を示す抗原（判定結果が施設間でまとまらない抗原）は対象外となる（本年は SH2402 のクラス I 抗体についてはすべてが対象外）。その他、詳細な評価点基準設定の根拠および算出法については HP 掲載の解析結果を参照されたい。

#### 3.2 評価内容

1) 抗体検出について A 評価（80 点以上）が 32 施設（86.5%）、B 評価（40～80 点未満）5 施設（13.5%）となり昨年の成績と比較すると若干の低下がみられた。今回は、SH2404 が Cw8+Cw5 の特異性であり、スクリーニングに用いた抗原パネルの不足が原因で抗体検出できなかった施設、また抗体スクリーニングに LABScreen single antigen を用いたことで他法では検出されない微弱的な反応を抗体陽性として判断した施設があったことが原因であると考えられる。

2) 抗体特異性同定検査を実施した 27 施設中、評価 A が 21 施設（77.8%）、評価 B が 3 施設（11.1%）評価 C（40 点以下）が 3 施設（11.1%）となり、抗体検出とは逆に昨年より評価 A の施設が増加し、B の施設が減少するという良い結果であった。これを部門別に解析すると、部門別平均評価点は造血幹細胞移植部門（38.9 点）>臓

器移植部門 (36.8 点) > 輸血部門 (33.0 点) で、3 部門では造血幹細胞移植部門が最も良好な成績となった。同様にサンプル別に部門ごとの平均点を比較してみたが、サンプルに偏りはなく全体的に輸血部門の平均点が低いことが判明した。

3) 今回、評価の対象となる抗原は各サンプル共に Class I 42 抗原 Class II 23 抗原、そのうち Class I 42 抗原について未検査 (抗原パネル不足) が存在するのは 7 施設 (特異性同定を実施した 27 施設の 25.9%) であった。7 施設の内訳を詳細にみると、1 施設は 1 抗原限定の未検査であったが 4 施設は抗原の未検査率が 42% ~ 78.6% と高く、さらに全施設が輸血部門での参加であった。Class II での未検査は 1 施設のみで、未検査率は 65.2% と過半数を占めており、なおかつ Class I で未検査率の高かった 4 施設のうちの 1 施設であった。

4) 抗体特異性同定検査の共通となる結果 (Consensus Result) を比較対照として、各施設の結果の一致状況を検討した。結果が不一致となるパターンは、Consensus Result が Score 1 であるのに対して Score 8 である場合 (暫定的に偽陽性とする)、その逆で、Consensus Result が Score 8 であるのに対して Score 1 である場合 (暫定的に偽陰性とする) の 2 通りを比較すると、全体的に偽陽性のパターンが多い傾向にあった。抗体特異性同定まで行った 27 施設中 21 施設 (77.7%) は LABScreen あるいは FlowPRA の single antigen を用いていることから、低い MFI の領域 (1,000 以下) での判定基準が統一化されていないこと、各抗原の反応性が明らかな陰性でなければ Score 8 と判定する傾向があることなどが要因として推測された。また、判定そのものが不安定である施設も存在するので、不一致率の高かった施設においては再確認を願いたい (詳細は HP 掲載の解析結果を参照)。

#### 4. 結語

16QCWS の結果を総合的に判断すると、15QCWS から引き続き、参加施設の努力によって全体的な水準は維持されていると考えられた。ただし、C ローカス抗体の検出や未検査率の低減を目指すのであれば、採用する検査法の再検討が必要であろう。

また、改めて再認識が必要と思われた事項として、以下の 3 点が挙げられた。

① 抗体を検出した際には IgG/M に係らず、総合判定の Score は 8 (抗体は有り) とすること。

② 抗体の検出 (抗体有無) を実施する際には、その用途に応じた試薬を用いるべきであり、同定検査で用いる Single antigen は妥当ではないこと。

③ 抗体 QCWS で用いる Score は一般的に用いられるように反応性の強弱を表す数値ではない。あくまでも「陽性 = 8」, 「陰性 = 1」, 「未検査 = 0」のいずれかであり、任意の抗原との反応性が陰性ではないが、判定用パネルの抗原の重複状態から「陽性 = 8」という確証がとれないケースについてのみ「保留 = 4」という Score になること。

次年度以降の抗体 QCWS に参加する際には、時間と労力を駆使して出した結果が正当に解析されるためにも上記に挙げた事項について再認識して頂きたい。その上で、自施設での検査結果の精度および判定基準等について再確認し、その到達度を自己評価することができれば QCWS に参加したことが非常に有意義なものになると考える。

## 実験動物サルの MHC クラス I 多様性

成瀬 妙子<sup>1)</sup>・木村 彰方<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野

旧世界ザルに属するアカゲザル (*Macaca mulatta*) やカニクイザル (*Macaca fascicularis*) は、ヒトに最も近い重要な実験動物として、エイズワクチン開発や薬剤の安全性確認をはじめとする各種の医学研究に欠かせない役割を担っている。このような動物実験，なかでも免疫に関わる実験の結果を正しく評価するためには，各個体の免疫応答に関わる遺伝的背景，特に MHC 情報を把握することが重要である。筆者らの研究室では，以前よりエイズワクチン開発モデルであるサル免疫不全症候群ウイルス (simian immunodeficiency virus: SIV) に対するワクチン開発実験に用いられているアカゲザルやカニクイザルについて，RSCA (reference strand-mediated conformation analysis) 法や cDNA クローニングにより *Mhc* クラス I 遺伝子群の解析を行い，多数の新規アレルを同定する一方，家系解析などから旧世界ザルに特徴的な MHC ハプロタイプ構造を見出している。本稿では，旧世界ザル *Mhc* クラス I 解析に関する研究の現状を紹介する。

**キーワード：**実験動物，アカゲザル，カニクイザル，MHC クラス I，多様性

### はじめに

アカゲザル (*Macaca mulatta*) やカニクイザル (*Macaca fascicularis*) は旧世界ザルに属する。旧世界とはアフリカ，アジアなどの旧大陸のことであり，そこに生息する狭鼻猿類サル (アカゲザル，カニクイザル，ニホンザル，アフリカミドリザルなど) が旧世界ザルと呼ばれる。

アカゲザルの生息地はインド・パキスタンから中国南部に至る東南アジア<sup>1)</sup>であり，これに対して，カニクイザルはインドネシアやフィリピンなどの島しょ部を含む東南アジア全域に広く生息していることが知られている<sup>2)</sup>。これらアカゲザル，カニクイザルを含む旧世界ザルの祖先は，約 2,500 万年前にヒト・チンパンジーの共通祖先と分岐したと推測されており (図 1)<sup>3,4)</sup>，ヒトとは異なる多くの進化的特徴が認められる。

### 実験動物としてのアカゲザル，カニクイザル

医学研究を目的とした旧世界サルの組織的な飼育は，

1920 年代にはすでに欧米で行われており<sup>5)</sup>，以来現在まで，アカゲザル，カニクイザル，ブタオザル (*Macaca nemestrina*)，ニホンザル (*Macaca fuscata*) などが世界中で主に用いられてきた<sup>4)</sup>。中でもアカゲザルは，ポリオワクチンを始め，AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) やインフルエンザなどのワクチン開発研究に欠かせない実験動物であり，また薬剤の安全性を含めた各種の医学研究におけるモデル動物としても広く用いられている他，1960 年代には，チンパンジーより 10 年以上早く，宇宙ロケットの搭乗実験に供されている。カニクイザルもまた，ワクチン開発研究に用いられるほか，最近では SARS (severe acute respiratory syndrome)<sup>6)</sup> や各種疾患のモデル動物として，また移植医療<sup>7)</sup>，再生医療の分野でも実験動物としての重要な役割を担っている。

このように旧世界ザルが実験に用いられる理由として，体格が比較的小型で扱いやすく，成熟や繁殖の周期が短いことがあげられるが，最も大きな理由は，野生種の生息個体数が多く，捕獲が容易であったためと思われる。

受付日：2013 年 1 月 19 日，受理日：2013 年 1 月 19 日

代表者連絡先：成瀬 妙子 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 M&D タワー 22F 東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態分野  
TEL: 03-5803-4906 FAX: 03-5803-4907 E-mail: naruse.tis@mri.tmd.ac.jp

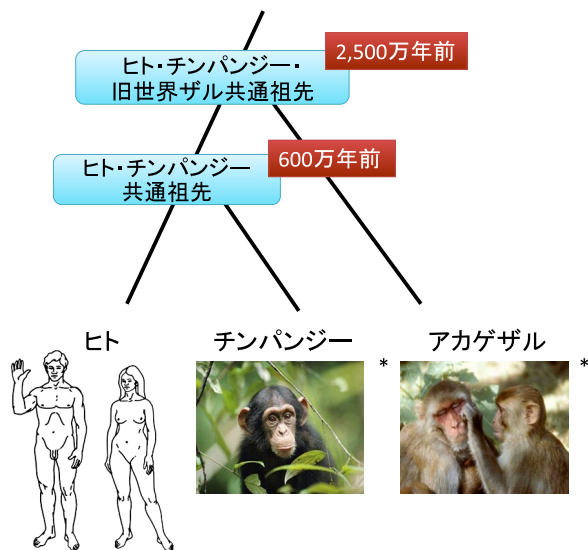


図1 霊長類の進化系統樹（文献4より改変）

\* National Geographic ([http://www.nationalgeographic.co.jp/animals/animals\\_profile.php?WALLPAPER&VignVCMId=33ff220789022110VgnVCM100000f102a8c0RCRD](http://www.nationalgeographic.co.jp/animals/animals_profile.php?WALLPAPER&VignVCMId=33ff220789022110VgnVCM100000f102a8c0RCRD)) より引用。マカク属はヒト・チンパンジーの祖先（HC 祖先）と約 2,500 万年前に分岐したと考えられる。

る。しかし、インドでは、乱獲によって野生アカゲザルが激減し、1970 年代以降は国外への持ち出しが禁止されている。また、野生ザルの飼育中に感染症が蔓延するといった問題も発生した。そこでヒトへの影響および自然保護の観点から、世界保健機構（WHO）が輸入実験動物サルの検疫体制確立と人工繁殖サル使用に関する勧告を行ったことにより、1970 年代以降は、欧米を始め日本でも、国や地域の霊長類センター等で繁殖された実験用繁殖サルを用いる研究室が多くなっている。

## 旧世界ザルの MHC

ヒト血清を用いた血清学的な同定方法から始まった霊長類の *Mhc* タイピングは、cDNA クローニングやゲノムマッピングなどの遺伝子解析の手法により多くの対立遺伝子が明らかにされてくると、ヒトには存在しない複数の遺伝子の存在や遺伝子重複の可能性が示された<sup>8,9)</sup>が、2007 年にインド産アカゲザル全ゲノムの暫定塩基配列<sup>4)</sup>が発表されることによって、このことが具体的に裏付けられた。すなわち、アカゲザルでは、*Mhc* を含む免疫関連遺伝子の 6 割強の遺伝子について、遺伝子重複が認められている。また、*Mhc* 領域における遺伝子重複は、カニクイザルや他の旧世界ザルにおいても同様の報

告がなされており<sup>10,11)</sup>、筆者らの研究室においても *Mhc* 以外の免疫関連遺伝子群の重複を確認している<sup>12)</sup> ことから、免疫関連遺伝子の重複は旧世界ザルに特徴的な進化事象であると言える。

アカゲザル全ゲノム暫定塩基配列の解析では、*Mhc* 遺伝子群は第 4 染色体短腕に位置しているが、クラス I 遺伝子は、古典的遺伝子の *Mhc-A*, *-B* 遺伝子と、非古典的遺伝子の *Mhc-E*, *-F*, *-G*, *-AG*, および *-I* 遺伝子から構成されている。*Mhc-A*, *-B* 遺伝子はそれぞれ *HLA-A*, *-B* 遺伝子に相当するが、*Mhc-A*, *-B* 共に複数の遺伝子により構成されることが特徴である。一方、*HLA-C* に相当する遺伝子は、旧世界ザルや新世界ザルでは報告されていない、存在しないと考えられる。また、*Mhc-E*, *-F*, *-G*, もそれぞれ *HLA-E*, *-F*, *-G* 遺伝子に相当するが、旧世界ザルにおける *G* 遺伝子は偽遺伝子であると推測される<sup>13,14)</sup>。*Mhc-AG* 遺伝子は、*HLA-G* と高い相同性を示す、旧世界ザルに特徴的な遺伝子である<sup>13)</sup>。妊娠初期のアカゲザル、カニクイザルで、胎盤における MHC-AG の発現が認められることから<sup>13,15)</sup>、*Mhc-AG* は *Mhc-G* の重複遺伝子であり、*HLA-G* と同様に妊娠免疫に関わる機能を担っていると考えられる。また、*Mhc-I* は *Mhc-B* から派生した、旧世界ザルに特異的に認められる重複遺伝子である<sup>16)</sup>が、構造解析や機能解析の結果、MHC-I 分子は細胞膜上での発現が低いと報告されており<sup>16)</sup>、抗原ペプチド結合溝の構造も狭いため、抗原提示能は低いと考えられている<sup>17)</sup>。また、*HLA-H* に相当する遺伝子は、旧世界ザルでは報告されていない。

クラス II 遺伝子は、古典的遺伝子の *Mhc-DR*, *-DQ*, *-DP* 遺伝子より構成され、それぞれ *HLA-DR*, *-DQ*, *-DP* 遺伝子に相当する。また、*Mhc-DR* 座は複数の遺伝子により構成されている。*Mhc-DR*, *-DQ*, *-DP* の個々の遺伝子座やサブタイプ構成については、必ずしもヒトと同一ではなく、例えば、*HLA-DQA2* や *-DQB2* に相当する遺伝子や *Mhc-DM* や *Mhc-DO* については、旧世界ザルでは報告されていない。旧世界ザルでは、遺伝子や遺伝子座の重複が顕著であることから解析が複雑であり、また、十分な解析個体数を得ることが困難なサル種もあり、*Mhc* 遺伝子領域構造の全容については未だ不明な部分も多い。

なお、それぞれのサル種における *Mhc* 遺伝子の名称は、遺伝子座の先頭に各サル種の学名の頭 2 文字から

取った頭文字計 4 文字を付加して用い、その他はヒトにおける命名法にほぼ準じている。例えば、アカゲザルの MHC-A は学名の *Macaca mulatta* より *Mamu-A* と記す。同様に、カニクイザルでは *Macaca fascicularis* より *Mafa-A*、ブタオザルでは *Macaca nemestrina* より *Mane-A* と表記する。

### アカゲザル MHC クラス I 多様性

アカゲザルは実験動物サルの中で最も汎用されている。特に AIDS 関連の研究やワクチン開発においては、開発段階の薬剤やワクチンをヒトに直接投与する研究が困難であることから、以前よりアカゲザルが用いられており、現在でもアカゲザルにおけるデータ集積は必須となっている。ウイルス感染感受性やワクチン応答性などには個体差があり、そのような事象を研究する上では、MHC 多様性を考慮することが実験結果を正しく評価することに繋がるため、特にクラス I 遺伝子については、比較的早くから実験動物サルを対象とした解析が行われてきた。

サル免疫不全症候群ウイルス (simian immunodeficiency virus, SIV) に感染したアカゲザルは、ヒトの AIDS に似た症状を呈することは以前より知られていた<sup>18-20)</sup>。その後の研究で、感染後のサルは、比較的早期に AIDS 症状を発症する個体と、そうでないものに分類でき、このような発症、病態進行過程の個体差は、ヒトにおける HIV (human immunodeficiency virus) の感染予後と同様に、MHC クラス I の多様性が関与しているとする報告が相次いでなされた<sup>21-23)</sup>。さらに、特定の *Mamu* アリルを持つ個体では、感染後のウイルス増殖の抑制が認められている<sup>24,25)</sup>。このようなアリルは“elite controller allele”と呼ばれ、インド産アカゲザルにおいては *Mamu-A\*001:01*, *-B\*008:01*, *-B\*017:04* などが知られている。実際、*Mamu-B\*017* 分子のアミノ酸配列や立体構造は、ヒ

トにおける AIDS 抵抗性アリルである *HLA-B\*57* 分子と類似しており<sup>26)</sup>、MHC クラス I 分子の多様性を介するウイルス免疫応答機構が、ウイルス増殖の効率的な抑制を遺伝的に制御していると考えられる。

上述の研究をはじめとして、欧米では主にインド産や中国産アカゲザルが用いられてきたが、筆者らの研究室ではビルマ産 (ミャンマー産やラオス産に相当) のアカゲザルで、SIV ワクチン実験に供された個体の解析を行っている。これらのアカゲザルは父個体の系統によって 7 種の血縁コロニーに分類されているが、現在までに、500 個体あまりの *Mamu* クラス I 遺伝子を RSCA 法<sup>27)</sup> や cDNA クローニング<sup>28)</sup> により解析し、それぞれの系統で父由来の *Mamu* ハプロタイプとその構成アリルを同定できている。

まず、100 個体での *Mamu* クラス I 遺伝子の cDNA クローニング解析<sup>28)</sup> では、*Mamu-A* で 73 種、*Mamu-B* で 83 種のアリルを同定したが、その約 60% はインド産や中国産個体にはみられない新規アリルであった (表 1)。また、既報アリルは、中国産個体にみられるアリルが多く、インド産個体由来のアリルはさほど多くはなかった。ここで特記すべきことは、“elite controller allele”である *Mamu-A\*001:01*, *-B\*008:01*, *-B\*017:02* または *04*, などのアリルがビルマ産個体では検出されなかったことである。これらのことは、アカゲザルにおいても、ヒトの *HLA* アリル分布と同様に、地理的要因による *Mhc* 遺伝的多様性の分布の違いがあることを示している。ついで、各個体で検出されたアリルを基に、7 系統の家系調査と合わせてハプロタイプ構成を検討したところ、表 2 に示す通り、100 個体で 23 種類のハプロタイプが特定されたが、各ハプロタイプは 1~3 種の *Mamu-A* 遺伝子および 1~5 種の *Mamu-B* 遺伝子より構成されていることが明らかになった。

*Mamu-A* および *Mamu-B* 遺伝子座の詳細な位置関係や

表 1 ビルマ産アカゲザル (ミャンマーおよびラオス産) にみいだされた Mhc クラス I アリル

遺伝子座	解析個体数	検出アリル	新規アリル (number, %)		既知アリル (number, %)	
<i>Mamu-A</i>	100	73	44	60.2%	29	39.8%
<i>Mamu-B</i>	93	83	45	54.2%	38	45.8%
<i>Mamu-I</i>	93	15	8	53.3%	7	46.7%
その他 ( <i>AG, F</i> )	93	2	0	—	2	100%
計		173	97	56.1%	74	43.9%

表 2 ビルマ産アカゲザルにおいて同定された Mamu クラス I ハプロタイプ

父ザル系統	ハプロタイプ	Major A (A1)	Minor A	Mamu-B
90-120	a	A1*043:01, A1*065:01		B*061:03, B*068:04, B*089:01
	b	A1*018:08	A2*05:31	B*036:03:01, B*037:01, B*043:01, B*162:01:01,
90-010	d	A1*032:02		B*004:01, B*102:01:01
	e	A1*066:01		B*005:02, B*040:01:01
90-030	g	A1*105:02	A2*05:11	B*066:01
	h	A1*004:01:02	A4*14:03	B*043:01, B*092:02:01
90-088	j	A1*008:01:02		B*007:02, B*039:01
	k	A1*018:08	A2*05:45	B*001:01:01, B*007:02
89-002	p	A1*018:07	A2*01:03, A4*14:03	B*001:01:01, B*007:02
	q	A1*107:01		B*016:02:01
91-010F1	s	A1*003:08		B*023:01, I*01:08:01
	w	A1*022:03	A4*01:02:02	B*001:01:02, B*007:02, B*017:03
89-075	w	A1*022:03	A4*01:02:02	B*001:01:02, B*007:02, B*017:03
	v	A1*109:01	A3*13:13	B*054:02:01, B*061:04:01, B*063:02:02, B*068:04, B*124:01:01
	other-1	A1*050:01	A2*05:11	B*066:01
	other-2	A1*028:07:01		B*056:03:01, B*066:01
	other-3	A1*049:03	A2*05:22	B*001:01:02, B*007:02, B*017:03
	other-4	A1*066:01	A2*05:14, A5*30:01:01	B*005:02
	other-5	A1*066:01		B*005:02, B*040:01:01
	other-6	A1*018:08	A2*05:31	B*026:02, B*045:07:01, B*051:06:01
	other-7	A1*032:03	A2*05:14, A5*30:01:01	B*005:02
	other-8	A1*004:01:02		B*026:02, B*043:01, B*073:01
	other-9	A1*050:01		B*063:02:01, B*066:01

遺伝子座数については、その遺伝子数の多さやゲノムマッピングでの解析個体が少数であることなどにより未だ不明な部分が多い。ことに、Mamu-B については遺伝子座の分類がなされていないが、Mamu-A については、ハプロタイプ解析により Mamu-A 1 ~ Mamu-A 7 の 7 遺伝子座に分類されている (表 2, 図 2)<sup>29,30</sup>。このうち Mamu-A1 遺伝子は最も高発現で、Mamu-A2, -A3 遺伝子についてもコードする Mamu 分子の細胞膜上での強発現が確認されている。一方、Mamu-A4 遺伝子のコードする Mamu 分子は、細胞内での発現は認められるものの、膜上での発現が弱いと報告されている<sup>17</sup>。現時点でのコンセンサスは、1 種の Mamu-A1 遺伝子 (major) と 0 から複数の Mamu-A2 ~ Mamu-A7 遺伝子 (minor) によりハプロタイプが構成され、遺伝子座数と種類は個体毎に異なり、いくつかのパターンに分類されるという説である (図 2)<sup>29,30</sup>。しかしながら、我々のミャンマー産 90-120 系統サルの解析においては、1 つのハプロタイプ上に、例外的に 2 種の Mamu-A1 遺伝子 (具体的には Mamu-A1\*043:01 と -A1\*065:01) が同定されている (表 2)。高発現である Mamu-A1 遺伝子が 2 個存在するハプロタ

イプが免疫応答にどのような違いをもたらすのか興味深いところである。このハプロタイプ (90120-a ハプロタイプ) は SIV ワクチン接種後の免疫応答効果が高いが、この 90120-a ハプロタイプを構成する Mamu-A, -B 各アレルのトランスフェクタントを作製し、SIV ウイルスペプチドに対する CTL アッセイを行なったところ、Mamu-A1\*065:01 分子によって、SIV Gag エピトープ特異的な CTL クローンの誘導が認められた<sup>31</sup> (図 3a)。また、Mamu-A1\*065:01 分子により提示される SIV 由来 Gag ペプチドの配列が HLA-B\*57 分子により提示される HIV 由来 Gag ペプチドに類似していたため、Mamu-A1\*065:01 分子と HLA-B\*57:01 分子のアミノ酸配列を比較したところ、抗原ペプチドとの結合に重要な B, F ポケット構成部位の相同性が高いことが確認された<sup>31</sup> (図 3b, c)。このように、ビルマ産アカゲザル Mhc クラス I においても、ウイルス感染においてヒトと同様の免疫応答機構が働いていることが裏付けされており、今後も SIV ワクチン実験個体の Mhc クラス I 解析は重要であると考えている。

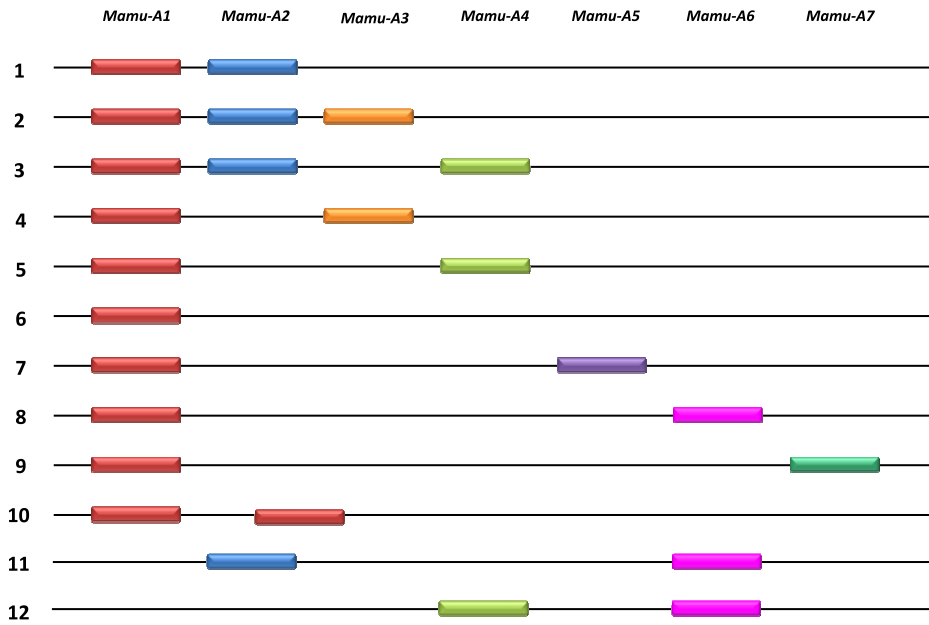


図2 インド産, 中国産, ビルマ産アカゲザルに検出された Mamu-A 遺伝子座ハプロタイプ構成パターンの模式図 (文献 30 より改変) 我々が検出した 2 種の A1 遺伝子を持つハプロタイプはいずれもハプロタイプ 10 であった。

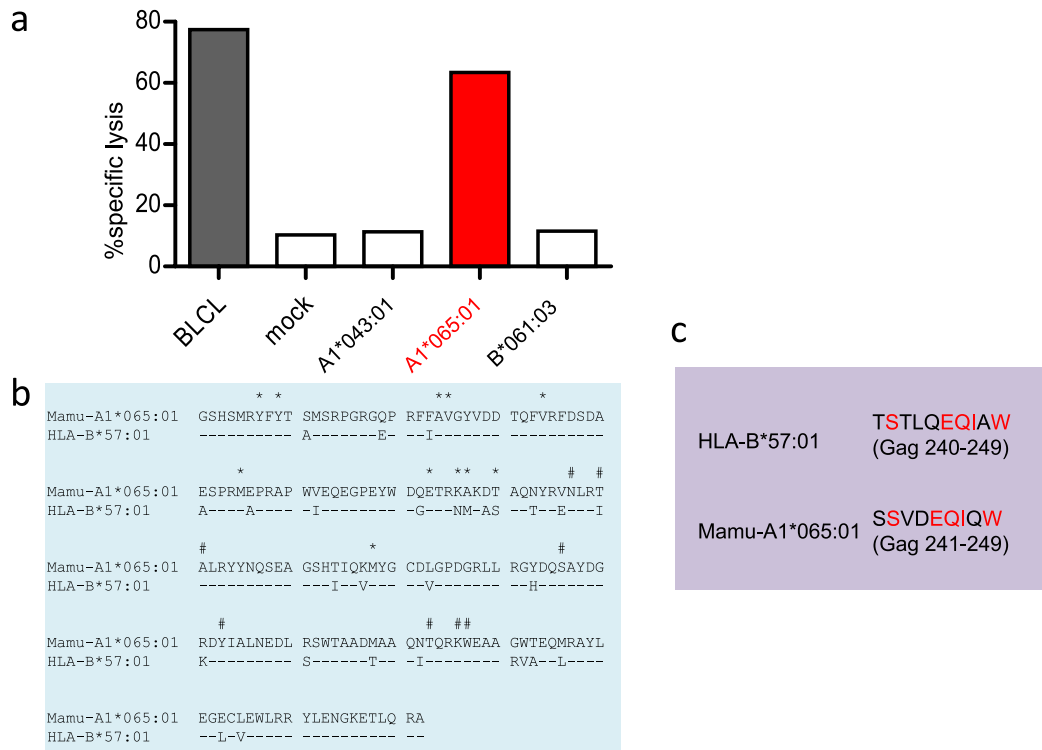


図3 90120-a ハプロタイプ構成アレルによる SIV Gag241-249 エピトープの CTL アッセイ (文献 31 より改変)

a. 90120-a ハプロタイプを構成する各アレルトランスファクターによる SIV Gag241-249 エピトープの CTL アッセイの結果を示す。b. Mamu-A1\*065:01 と HLA-B\*57:01 のアミノ酸配列の比較。B および F ポケットと結合すると推測されるアミノ酸残基をそれぞれ \* と # で示す。c. HLA-B\*57:01 によって提示される HIV ペプチドと Mamu-A\*065:01 によって提示される SIV 抗原ペプチドの類似性を示す。



### カニクイザル MHC クラス I 多様性

カニクイザルもワクチン実験をはじめとする各種の医学実験に欠かせない実験動物であるが、ゲノム解析を含めた遺伝子解析は全般にアカゲザルに後れをとっており、*Mhc* 遺伝子領域の解析もアカゲザルほどには進んでいない。しかしながら、実験結果の評価における *Mhc* クラス I の重要性は認識されている。先行研究により、カニクイザルは主に東南アジアから中央アジアへ拡散していったと推測され<sup>32)</sup>、これまでにフィリピン産を中心に、インドネシア産、ベトナム産個体などの解析が行われている。また、モーリシャス島に生息しているコロニーは、観賞用としてフィリピンから持ち込まれたものが繁殖したものである<sup>33,34)</sup>。

筆者らの研究室では、医薬基盤研究所霊長類医学センターでの飼育コロニーのうち、インドネシア産、マレーシア産、およびフィリピン産の 5 家系 26 個体について、*Mafa* クラス I 遺伝子の解析を行い、87 種のアリルを同定した<sup>35)</sup>(表 3)。そのうち 45% が新規アリルであったが、産地別に分類して比較すると、新規アリルの割合はマレーシア産個体でもっとも高く、逆にフィリピン産個体ではごく少数にとどまった。これは、マレーシア産個体の解析がこれまで行われていなかったためと考えられ、*Mafa* 遺伝子の多様性を知る上で、さらに幅広い産地における解析が必要であることを物語っている。

カニクイザルにおける *Mhc* クラス I 遺伝子座は、アカゲザルと極めて相同性が高く、検出されたアリルにもアカゲザルやブタオザルの各遺伝子座アリルと一致するものが少なくない。筆者らの同定した *Mafa* アリルのうち、*Mafa-A* で 2 種 (6.3%)、*Mafa-B* で 15 種 (32.6%)、*Mafa-I* では 5 種 (83.3%) がそれぞれ *Mamu*、*Mane* の各遺伝子と同一の塩基配列であった。アカゲザル、カニク

イザル、ブタオザル間での交配が頻繁に行われている可能性も否定できないが、これらのサルの生息地の地理的分布がかなり異なっていることや、系統樹解析で *Mamu*、*Mafa*、*Mane* が種ごとのクラスターを形成しないことから、旧世界ザルはそれぞれの種が分岐する以前に、特徴的な *Mhc* 多様性を獲得していたと考えられる。

筆者らが家系解析により特定した 23 種類の *Mafa* クラス I ハプロタイプは、そのほとんどが 1 種の major な *Mafa-A1* 遺伝子と、複数の minor な *Mafa-A* 遺伝子、および複数の *Mafa-B* 遺伝子により構成されていたが、アカゲザル同様、例外的なハプロタイプとして、2 個の *Mafa-A1* 遺伝子を持つ 2 種類の *Mafa* ハプロタイプが存在した。これらの 2 種類のハプロタイプは、それぞれマレーシア産個体由来ハプロタイプ “e” と、フィリピン産個体由来ハプロタイプ “v” で、“e” では *Mafa-A1\*001:01* と *Mafa-A1\*032:05*、ハプロタイプ “v” では *Mafa-A1\*074:02* と *Mafa-A1\*093:01* がそれぞれ同定された。そこで、同一ハプロタイプ上に存在する 2 個のアリルが両方とも強発現する major アリルであるのか、あるいはどちらか片方のみが major アリルであって他方は弱発現する minor アリルであるのかを明らかにするために、以下のような検討を行った。まず、系統樹解析であるが、その結果は図 4 に示すように、これらのハプロタイプを構成する 2 個の *Mafa-A* アリルは、いずれも *Mafa-A1* アリルのクラスターに含まれた。ついで、ハプロタイプを構成する各アリルの発現レベルを cDNA クローンの検出割合として検討したが、2 個の *Mafa-A* アリル由来のクローン数は、そのいずれもが他の minor な *Mafa-A* アリル由来のクローン数を大きく上回っていた。これらのことから、カニクイザルにおいても複数の major な *Mafa-A1* アリルを持つハプロタイプの存在が確認された。

表 3 インドネシア、マレーシア、フィリピン産アカゲザルにみいだされた *Mhc* クラス I アリル

遺伝子座	検出アリル数	新規アリル数 (%)	各地域ごとのアリル数		
			Indonesian	Malaysian	Philippino
<i>Mafa-A</i>	32	14 (43.7%)	9 (3), 33.3%	12 (8), 66.7%	11 (3), 27.3%
<i>Mafa-B</i>	46	20 (43.5%)	13 (5), 38.5%	20 (15), 75.0%	18 (1), 5.6%
<i>Mafa-I</i>	6	3 (50.0%)	2 (1), 50.0%	4 (3), 75.0%	2 (0), 0%
<i>Mafa-AG</i>	3	3 (100%)	0 (0), 0%	2 (2), 100%	1 (1), 100%
計	87	40 (45.5%)	24 (9), 37.5%	38 (28), 73.7%	32 (5), 15.6%

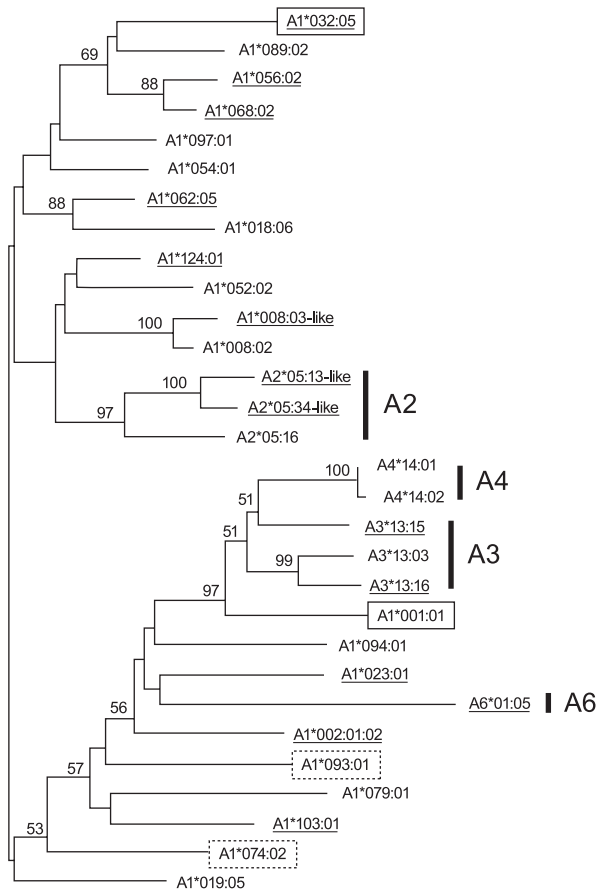


図4 カニクイザル 26 個体より検出された Mafa-A 遺伝子の系統樹  
ハプロタイプ “e” を構成する A1\*001:01, A1\*032:05 (実線□で  
囲む) とハプロタイプ “v” を構成する A1\*074:02, A1\*093:01 (点  
線□で囲む) はどちらも A1 遺伝子のクラスターに含まれる。  
下線は筆者らが新たに検出したアリル。

このような遺伝子構成は、*Mamu-B* や *Mafa-B* のハプロタイプ構成にも見られ、“double lock strategy” と呼ばれている<sup>30)</sup>。高発現アリルを複数有するハプロタイプは、CD8+ T 細胞への抗原提示のバリエーションを大きく出来ると考えられるが、その一方で、個体内での MHC の多様性を増大することは、胸腺における負の選択の範囲を拡大することになり、結果として末梢での T 細胞レセプターのレパートリーの欠損を大きくする可能性がある。一方で、カニクイザルでは *Mafa-A1* 遺伝子が欠失したハプロタイプの存在が示唆されている<sup>30)</sup> が、複数の *Mafa-A1* 遺伝子を有するハプロタイプとは逆に、抗原提示のバリエーションは小さくなるが、末梢での T 細胞レパートリーの欠損は拡大しないことになると考えられる。MHC の多様性形成は、外来微生物に対する集団としての多様性が維持されたことを反映していると考えら

れているが、ヒトやチンパンジーのように、同一ハプロタイプ上には各ローカスあたり 1 個の遺伝子しか持たないが、個々の遺伝子の多様性が大きい場合と、旧世界ザルのように、ハプロタイプ構成での多様性と個々の遺伝子の多様性を併せ持つ場合がある。このような MHC 多様性のあり方の違いは、ヒト・チンパンジーの共通祖先と旧世界ザルの祖先が分岐した以降にそれぞれの系統で独立して獲得された進化適応戦略と考えられるが、それぞれの生息環境に依存した進化選択圧があったのか、あるいはなんの選択圧もなく中立に生じたのかの区別は困難である。しかしながら、冒頭で述べたように、旧世界ザルでは MHC に限らず免疫関連遺伝子の重複が生じていることから、免疫機構に対するなんらかの進化選択圧が存在していた可能性が高いと考えられる。

今後の展開

上述のとおり、アカゲザルやカニクイザルの *Mhc* 遺伝子構成やハプロタイプ構成はヒト *HLA* 領域よりも複雑で、未だ不明な点が多い。旧世界ザルを用いた各種の研究・実験における *Mhc* の意義を明確にするためには、今後もさらなる解析を行う必要がある。具体的には、現在のところ不明な点が多い *Mhc-B* 遺伝子座のアリルの特定と分類を行うことが急務であるが、そのためには家系情報が明確な個体を用いた解析が重要である。次世代シーケンサーの普及により、最近ではカニクイザルの全ゲノム配列が明らかにされるなど<sup>36)</sup>、旧世界ザルの遺伝子解析も速度を増してきた感があるが、そもそも、「なぜ旧世界ザルには免疫関連遺伝子に特徴的な遺伝子重複が必要だったのか？」という命題について、我々はまだ研究の緒に就いたばかりである。我々に貴重な血液サンプル、組織、そして時にはその生命を提供してくれる「おさるさん達」に報いるためにも、*Mhc* の重要性を真摯に探っていきたいと考えている。

謝 辞

本稿で述べた研究成果は、国立感染症研究所エイズ研究センター 俣野哲朗教授、森一泰主任研究官、京都大学霊長類研究所 明里宏文教授、医薬基盤研究所霊長類医学研究センター 保富康宏センター長、近畿大学医学部 宮澤正顕教授と東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野との共同研究の一部であり、諸先生方にお礼申し上げます。本稿で述べた研究は、東京医科歯科大学女性研究者支援事業助成により遂行されました。ここに謝意を表します。

## 引用文献

- 1) Timmins RJ, Richardson M, Chhangani A, *et al.*: *Macaca mulatta*. In: IUCN 2009. IUCN red list of threatened species. Version 1.2009. www.iucnredlist.org.
- 2) Lang KC 2006. [http://pin.primat.wise.edu/factsheets/entry/long-tailed\\_macaque](http://pin.primat.wise.edu/factsheets/entry/long-tailed_macaque)
- 3) Stewart C-B, Disotell TR: Primate evolution—in and out of Africa. *Curr. Biol.* (8): R582–R588, 1998.
- 4) Gibbs RA, Rogers J, Katze MG, *et al.*: Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome. *Science* (316): 222–234, 2007.
- 5) 吉田高志: 世界の霊長類センターと TPRC (Tsukuba Primate Research Center). 医学研究資源としてのカンクイザル (吉田高志, 藤本浩二 編), Springer Japan, p. 1–3, 2006.
- 6) Lawler JV, Endy TP, Hensley LE, *et al.*: Cynomolgus macaque as an animal model for severe acute respiratory syndrome. *PLoS Med* (3): 677–686, 2006.
- 7) Wiseman RW, O'Connor DH: Major histocompatibility complex-defined macaques in transplantation research. *Transplant Rev* (21): 17–25, 2007.
- 8) Kulski JK, Anzai T, Shiina T, *et al.*: Rhesus macaque class I duplication structures, organization, and evolution within the alpha block of the major histocompatibility complex. *Mol Biol Evol* (21): 2079–2091, 2004.
- 9) Otting N, Otting N, de Vos-Rouweler AJM, *et al.*: MHC class I A region diversity and polymorphism in macaque species. *Immunogenetics* (59): 367–375, 2007.
- 10) <http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/nhp/nomenclature.html>
- 11) de Groot NG, Otting N, Robinson J, *et al.*: Nomenclature report on the major histocompatibility complex genes and alleles of Great Ape, Old and New World monkey species *Immunogenetics* (64): 615–631, 2012.
- 12) Naruse TK, Okuda Y, Mori K, *et al.*: ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* (63): 501–509, 2011.
- 13) Boyson JE, Iwanaga KK, Golos TG, *et al.*: Identification of a novel MHC class I gene, Mamu-AG, expressed in the placenta of a primate with an inactivated G locus. *J Immunol.* (159): 3311–3321, 1997.
- 14) Daza-Vamenta R, Glusman G, Rowen L, *et al.*: Genetic divergence of the rhesus macaque major histocompatibility complex. *Genome Res.* (14): 1501–1515, 2004.
- 15) Bondarenko GI, Dambueva SV, Grendell RL, *et al.*: Characterization of cynomolgus and vervet monkey placental MHC class I expression: diversity of the nonhuman primate AG Locus. *Immunogenetics* (61): 431–442, 2009.
- 16) Urvater JA, Otting N, Loehrke JH, *et al.*: Mamu-I: a novel primate MHC class I B-related locus with unusually low variability. *J Immunol.* (164): 1386–1398, 2000.
- 17) Rosner C, Kruse PH, Lübke T, *et al.*: Rhesus macaque MHC class I molecules show differential subcellular localizations. *Immunogenetics* (62): 149–158, 2010.
- 18) Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, *et al.* (2000) Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokineaugmented DNA vaccination. *Science* (290): 486–492, 2000.
- 19) Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, *et al.*: Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* (283): 857–860, 1999.
- 20) Yasutomi Y, Reimann K, Lord C, *et al.*: Simian immunodeficiency virus-specific CD8+ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *J Virol* (67): 1707–1711, 1993.
- 21) Mothe BR, Weinfurter J, Wang C, *et al.*: Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A\*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* (77): 2736–2740, 2003.
- 22) Yant LJ, Friedrich TC, Johnson RC, *et al.*: The high-frequency major histocompatibility complex class I allele *Mamu-B\*17* is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* (80): 5074–5077, 2006.
- 23) Loffredo JT, Bean AT, Beal DR, *et al.*: Patterns of CD8+ immunodominance may influence the ability of *Mamu-B\*08*-positive macaques to naturally control simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J Virol* (82): 1723–1738, 2008.
- 24) Loffredo JT, Maxwell J, Qi Y, *et al.*: Mamu-B\*08-positive macaques control simian immunodeficiency virus replication. *J Virol* (81): 8827–8832, 2007.
- 25) Maness NJ, Yant LJ, Chung C, *et al.*: Comprehensive immunological evolution reveals surprisingly few differences between elite controller and progressor Mamu-B\*17-positive simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Virol* (82): 5245–5254, 2008.
- 26) Wu Y, Gao F, Jun Liu J, *et al.*: Structural basis of diverse peptide accommodation by the rhesus macaque MHC class I molecule Mamu-B\*17: insights into immune protection from simian immunodeficiency virus. *J Immunol* (187): 6382–6392, 2011.
- 27) Tanaka-Takahashi Y, Yasunami M, Naruse T, *et al.*: Reference strand-mediated conformation analysis-based typing of multiple alleles in the rhesus macaque MHC class I Mamu-A and Mamu-B loci. *Electrophoresis.* (28): 918–924, 2007.
- 28) Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, *et al.*: Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaques. *Immunogenetics* (62): 601–611, 2010.
- 29) Otting N, de Vos-Rouweler AJM, Heijmans CMC, *et al.*: MHC class I A region diversity and polymorphism in macaque species. *Immunogenetics* (59): 367–375, 2007.
- 30) Doxiadis GG, de Groot N, Otting N, *et al.*: Genomic plasticity of the MHC class I A region in rhesus macaques: extensive haplotype diversity at the population level as revealed by microsatellites. *Immunogenetics* (63): 73–83, 2011.

- 31) Tsukamoto T, Dohki S, Ueno T, *et al.*: Determination of a major histocompatibility complex class I restricting simian immunodeficiency virus Gag241–249 epitope. *AIDS* (22): 993–998, 2008.
- 32) Lang KC (2006) [http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/longtailed\\_macaque](http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/longtailed_macaque)
- 33) Pendley CJ, Becker EA, Karl JA, *et al.*: MHC class I characterization of Indonesian cynomolgus macaques. *Immunogenetics* (60): 339–351, 2008.
- 34) Campbell KJ, Detmer AM, Karl JA, *et al.*: Characterization of 47 MHC class I sequences in Filipino cynomolgus macaques. *Immunogenetics* (61): 177–187, 2009.
- 35) Saito Y, Naruse TK, Akari H, *et al.*: Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* (64): 131–141, 2012.
- 36) Higashino A, Sakate R, Kameoka Y, *et al.*: Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biology* (13): R58, 2012.

## Diversity of MHC class I genes in rhesus macaques and cynomolgus macaques (crab-eating monkeys)

Taeko Naruse<sup>1)</sup>, Akinori Kimura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

Non-human primates are widely used in medical researches including development of vaccines against pathogens, because their immune system is similar to that in humans. In particular, the Old World monkeys such as rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaques (crab-eating macaques, *Macaca fascicularis*) are useful models for human infectious diseases, especially for developing a strategy for vaccination against HIV, by using simian immunodeficiency virus (SIV) infection as a model system. Because there are individual differences in immune responsiveness, which are controlled by the polymorphic nature of the major histocompatibility (MHC) locus, it is important to reveal the diversity of MHC in the model animal. We analyzed polymorphisms in *Mhc* class I loci in rhesus macaques (*Mamu* locus) from Myanmar (Burma) and Laos and cynomolgus macaques (*Mafa* locus) from Indonesia, Malaysia and Philippine to obtain genetic information about the role of *Mhc* class I diversity in the immune responsiveness. We found that each *Mhc* class I haplotype was composed of one to three *Mamu-A* or *Mafa-A* alleles and one to five *Mamu-B* or *Mafa-B* alleles. In addition, family studies revealed that there were three *Mhc* haplotypes carrying two *Mhc-A1* alleles not only in rhesus but also in cynomolgus macaques. These observations further demonstrated the complexity of *Mhc* class I loci in the Old World monkeys.

**Key Words:** animal model, rhesus macaque, cynomolgus macaque, MHC class I, diversity

## HLA 多型を考慮したがん免疫療法の開発

富田 雄介<sup>1),2)</sup>・千住 覚<sup>1)</sup>・入江 厚<sup>1)</sup>・西村 泰治<sup>1)</sup><sup>1)</sup>熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野<sup>2)</sup>熊本大学大学院生命科学研究部呼吸器病態学分野

がん細胞特異的に免疫応答を誘導するために、正常細胞には発現せず、がん細胞にのみ強く発現する腫瘍関連抗原 (TAA; Tumor-associated antigen) の遺伝子を、ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析により同定した。TAA のアミノ酸配列をもとに、日本人で頻度が高い HLA-A2 あるいは A24 に結合するペプチドを *in silico* で予測して合成し、HLA トランスジェニックマウスやヒト末梢血単核細胞を TAA ペプチドで刺激することにより、当該 HLA 分子により提示された TAA ペプチドに特異的に反応し、がん細胞を殺す細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導できるペプチドを同定した。これらを用いた、がん免疫療法の医師主導型第 I 相臨床研究により、安全性が確認され奏効例も観察された。さらに、より有効ながん免疫療法の開発を目指して、CTL とヘルパー T (Th) 細胞を同時に誘導できる TAA ペプチドや、組織不適合性を回避できる遺伝子改変 iPS 細胞由来の樹状細胞を用いた細胞ワクチン療法の開発など、著者らの最近の研究成果について紹介する。

**キーワード：**がん免疫療法、腫瘍関連抗原、がん抗原ペプチドワクチン、HLA トランスジェニックマウス、iPS- 樹状細胞

## はじめに

従来のがん免疫療法は、非特異的な免疫系の活性化による抗腫瘍効果を期待するものであった。これに対して近年のがん免疫療法では、良く確立された抗体療法のほかに、がん特異的に T 細胞を活性化して効率よく抗腫瘍免疫応答を誘導するものが開発されつつある。新しい T 細胞性がん免疫療法は、治療初期の腫瘍縮小効果は抗がん剤には及ばないが、副作用が少なく、生存期間の延長をもたらすものがあることが報告されつつある。

がん細胞に特異的な抗腫瘍免疫応答を発現する T 細胞を誘導するためには、がん細胞においてのみ強く発現し正常細胞ではほとんど発現を認めない、腫瘍関連抗原 (TAA; Tumor-associated antigen) を同定する必要がある。さらに同定した TAA を利用して効率よく抗腫瘍免疫応答を誘導するためには、1) TAA が分解されて生ずるペ

プチドで、患者の持つヒト組織適合性白血球抗原 (HLA; human histocompatibility leukocyte antigen) に結合し、がん細胞に特異的に反応する T 細胞を誘導できるものを選んでペプチドワクチンとして投与方法、あるいは 2) TAA を負荷させるか遺伝子導入により TAA を強制発現させた樹状細胞を、細胞ワクチンとして投与方法などが考えられる。

本総説においては、まず我々が世界に先駆けて行った cDNA マイクロアレイ解析を用いた TAA の探索について概説する。次いで、HLA 分子に結合するペプチドを予測するアルゴリズムと HLA トランスジェニックマウスを利用した TAA ペプチドワクチンの開発と、その臨床応用について述べる。最後に iPS 細胞から樹状細胞を分化誘導して、がん免疫療法に応用する方法、ならびにこの際に生じ得る、組織不適合性等の問題を克服する方法について、最近の著者らの成果を紹介する。

受付日：2013 年 1 月 15 日，受理日：2013 年 1 月 15 日

代表者連絡先：西村 泰治 〒860-8556 熊本市中央区本荘 1-1-1 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野  
TEL: 096-373-5310 / 5313 FAX: 096-373-5314 E-mail: mxnishim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

1. がん抗原ペプチドワクチン療法に应用可能な, T 細胞に抗腫瘍免疫応答を誘導する TAA ペプチドの同定

1. cDNA マイクロアレイ解析を用いた新規 TAA の同定

正常組織を損傷させることなく、腫瘍組織のみを排除する抗腫瘍免疫応答を誘導するためには、適切な TAA を同定して、これを T 細胞の標的抗原として利用する必要がある。著者らは理想的な TAA が備えるべき性質として、以下の3点を重視している。1) 発現の組織特異性が優れたタンパク質由来の TAA であること。すなわちがん細胞に高発現するが、正常組織にはほとんど発現しておらず、TAA に対する免疫応答が重篤な自己免疫疾患を誘導しないものでなければならない。胎児期組織と腫瘍組織のみに発現するがん胎児性抗原や、がん細胞と免疫系から隔離された精巣などの組織にのみ発現するがん精巣抗原 (Cancer-Testis 抗原; CT 抗原) などが該当する。2) 免疫系からの逃避が起こりにくい分子であること。TAA が悪性形質転換、組織浸潤や転移に不

可欠な役割を担っている分子で、その発現を失えば、がんの悪性形質も消失する分子であれば理想的である。3) がん患者の体内において、免疫応答を誘導する抗原であること。がん細胞の拒絶までには至らないとしても、がん患者の血液中に抗原特異的な抗体や T 細胞の存在が検出できるものであることが望ましい。

著者らは、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの中村祐輔博士 (現: シカゴ大学医学部教授) との共同研究により、ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析を用いて、網羅的にがん細胞と正常組織の遺伝子発現の違いを解析することにより、新規の TAA を探索した (図1)。cDNA マイクロアレイ解析を用いることにより、一度に約3万種類の遺伝子発現をスクリーニングして、正常細胞と比較してがん細胞に高発現する遺伝子を同定することが可能となった。また同定した遺伝子が成人正常臓器には、ほとんど発現しないことをチェックすることにより、誘導された抗腫瘍免疫応答により正常組織の損傷を未然に回避することができる。さらに、多

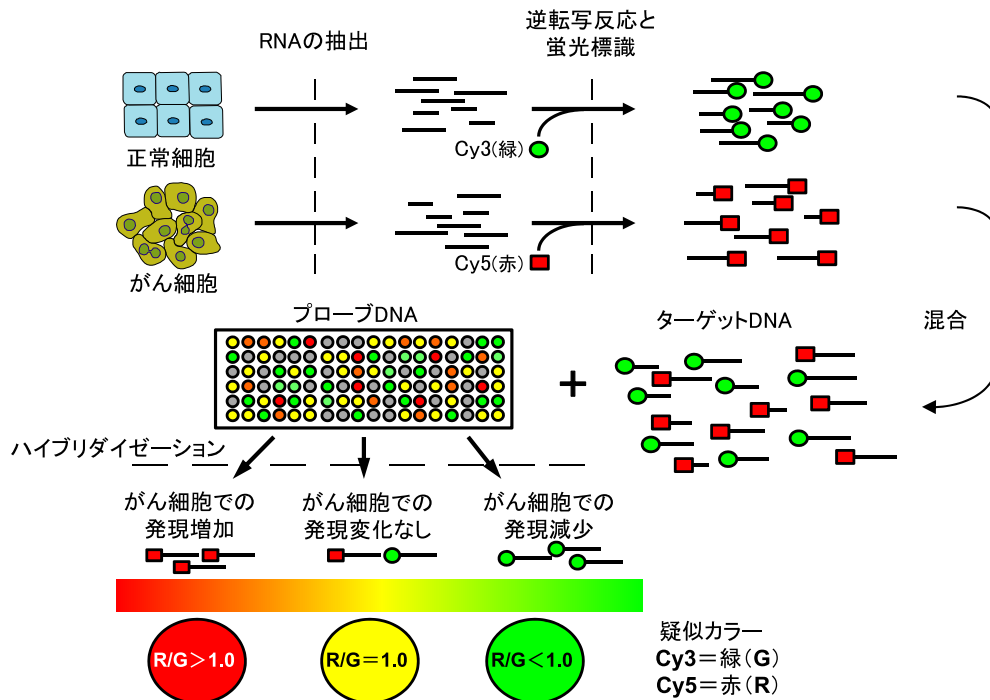


図1 cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍関連抗原 (TAA) の同定法の概要

がん組織の切片から、がん部と非がん部組織をレーザー光線により別々に切り出し、それぞれから RNA を抽出する。逆転写反応により cDNA を合成する際に、それぞれを異なる蛍光色素、すなわち非がん部 cDNA を Cy3 (緑色) で、がん部 cDNA を Cy5 (赤色) で標識する。標識した cDNA を混合し、ターゲット DNA とする。ゲノムワイドの遺伝子をカバーするプローブ DNA を配置したスライドガラス上で、ハイブリダイゼーションを行った後に、その蛍光画像を取込み疑似カラー (Cy3: 緑, Cy5: 赤) をつけて表示するとともに、それぞれの蛍光強度の比 (R/G) を計算して、遺伝子発現プロファイルとして半定量的に解析する。このようにして、がん細胞で著明に発現量が変化する遺伝子を、網羅的に同定することが出来る。

数の患者のがん組織における遺伝子発現を容易に検出することができるため、TAA 遺伝子のがん患者における発現頻度を知ることができる。

cDNA マイクロアレイ解析により、著者らは上述の条件 1) を満たす、以下のような多数の新規 TAA の遺伝子を同定した (図 2)。がん胎児性抗原として Glypican-3 (*GPC3*) と Insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 (*IMP3*) を、がん精巢抗原あるいはこれと類似した抗原として、Cell division cycle associated 1 (*CDC41*), Kinesin family member 20A (*KIF20A*), Cell division cycle 45-like (*CDC45L*) および Cadherin 3 (*CDH3*)/P-cadherin を同定した<sup>1-10</sup>。さらに、一部の正常組織にのみわずかに発現するが、がん組織では非常に高発現する TAA として、Secreted protein acidic and rich in cysteine (*SPARC*) および Forkhead box M1 transcription factor (*FOXM1*) を同定している<sup>11,12</sup>。

このような正常細胞における発現が見られないか、あるいはごくわずかである TAA をがん免疫療法の標的とすれば、強い抗原性と自己免疫反応などの副作用が起こ

りにくい、抗腫瘍免疫応答の誘導が期待できる。さらに標的とする TAA が、がんの分裂や増殖に不可欠な遺伝子産物であれば、免疫系からの逃避が起こりにくい、より有効ながん免疫療法を開発できると期待できる。

興味深いことに、これまでに著者らが cDNA マイクロアレイ解析により標的 TAA 候補として選択したものの多くが、既知の文献情報と照らし合わせた結果、細胞のがん化にも関与する遺伝子であり、がん細胞が、これらの遺伝子発現を失い免疫系から逃避することは難しいと想定される分子であった。さらに、同定した TAA 遺伝子は多臓器に由来するがん種にも高発現しており、これらの TAA を標的とすれば、多くのがん患者に应用可能な、非常に有望ながん免疫療法の開発が可能になると期待される (図 2)。

2. 細胞傷害性 T 細胞(CTL)が認識する抗原ペプチド(エピトープ)の同定

TAA を同定した後のステップとして、その TAA を発現するがん細胞を標的とし、これを傷害する CTL の免疫応答を、いかにして誘導するかが重要な課題となる。

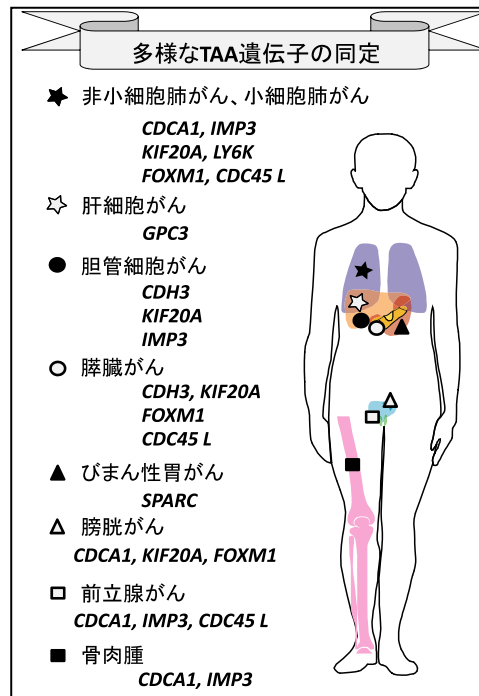
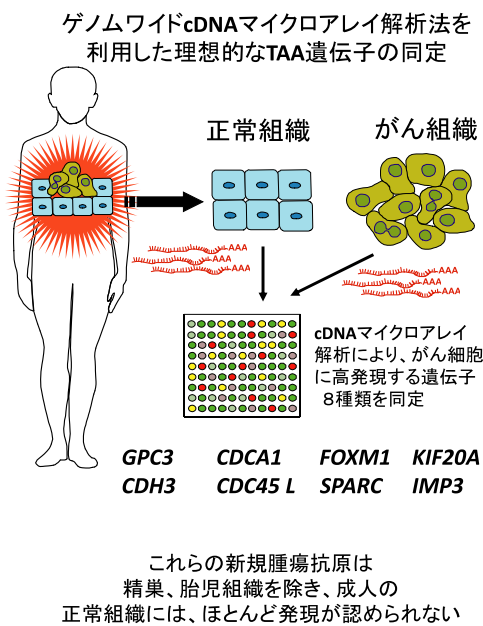


図 2 多様ながんの免疫療法の標的として理想的な TAA 遺伝子の同定

ゲノムワイド cDNA マイクロアレイ解析法を用いて、がん部と非がん部組織における遺伝子発現を網羅的に解析することにより、がん組織にのみ高発現する腫瘍関連抗原 (TAA) の遺伝子を選択した。次に、その遺伝子に関して、胎生臓器を含む正常組織における発現を解析することにより、がん細胞には強く発現するが、精巢や胎生期の臓器以外の正常臓器には発現しない遺伝子を標的 TAA の遺伝子として選択した。このようにして同定した TAA の遺伝子は、多くの場合複数のがん腫において高発現することが分かり、このような TAA を多数同定することにより、これらの多様ながん腫を標的とする、がん免疫療法の開発が可能になると期待される。



CTLはT細胞レセプター (TCR) を介して、患者のHLAクラスI分子に結合したTAA由来のペプチドを認識し、パーフォリンやグランザイムなどを放出することにより、がん細胞を破壊する。近年、CTLを効率よく誘導するTAA由来のペプチドを、アジュバントと共にがん患者に投与するがん免疫療法が注目されている<sup>13)</sup>。そこで著者らは、cDNAマイクロアレイ解析により同定したTAAのアミノ酸配列をもとに、がん細胞を傷害するCTLの免疫応答を誘導するペプチドの同定を試みた。

CTLはペプチドとHLAクラスI分子の複合体を認識するため、まずTAAペプチドを結合してCTLに提示できる、HLAクラスI分子を選択する必要がある。HLAの選択に当たっては、治療に応用する場合に、なるべく多くのがん患者に応用できることを期待して、日本人で頻度が高いHLA分子を選択した。*HLA-A24* (*HLA-A\*24:02*) 遺伝子は、日本人の約60%が所有する、最も頻度の高いHLAクラスI対立遺伝子である。また *HLA-*

*A2* (*HLA-A\*02:01*) 遺伝子は、日本人の約20%が保有する、*HLA-A24*に次ぐ2番目に頻度が高いHLAクラスI対立遺伝子であるだけでなく、日本人以外の他の多くの人種においても遺伝子頻度が高いため、*HLA-A2*分子に結合するCTLエピトープは、世界中の多くのがん患者の治療に利用が可能である。

### 3. *HLA-A2/A24* トランスジェニックマウスを利用したCTLエピトープのスクリーニング

一般的に、抗原ペプチドを用いたヒトT細胞の誘導実験は、ヒトの末梢血単核球細胞 (PBMC: peripheral blood mononuclear cells) を用いて解析されているが、多種類のペプチドの中からCTLを誘導するペプチドをスクリーニングするには、複数のドナーから血液を大量に採取する必要があり、血液を提供するドナーの負担が重くなる。また、本邦においては売血が禁止されているため、研究を進めるためには、血液の提供が可能な複数のボランティアを確保する必要がある。このような理由に

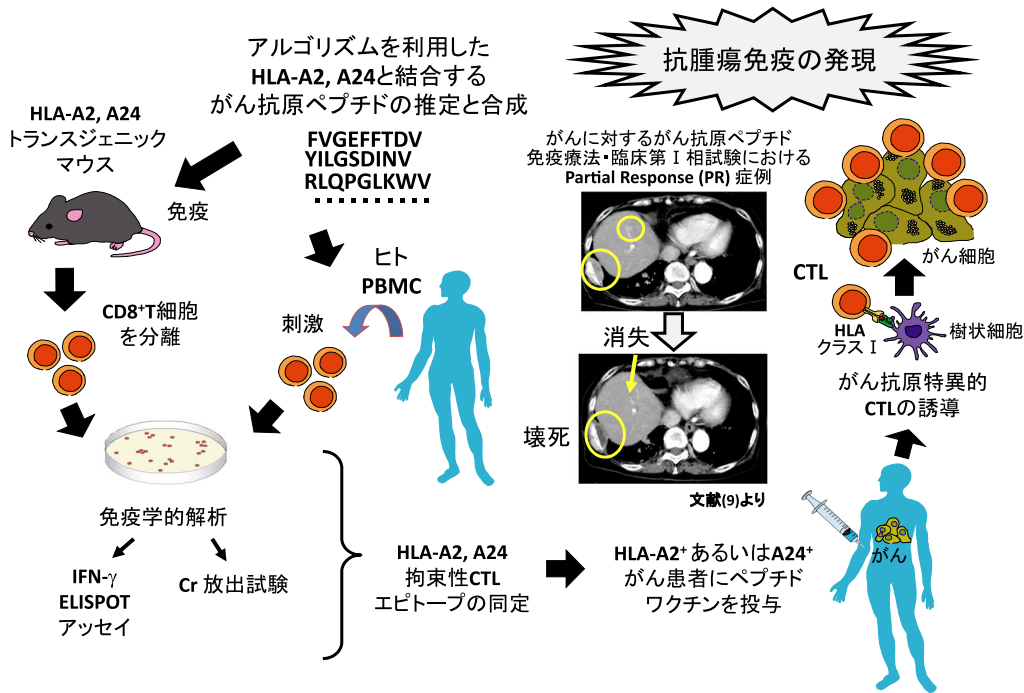


図3 *HLA-A2* および *A24* トランスジェニックマウスを用いた新規 TAA の CTL エピトープの同定と、そのがん免疫療法への臨床応用  
公開されているアルゴリズムを用いて、HLAクラスI分子に結合すると予測される、9個～10個のアミノ酸により構成されるTAA由来のペプチドを推定した後多数合成し、HLAクラスIトランスジェニックマウスに免疫して、ペプチド特異的なマウスCTLを誘導するものをスクリーニングした。さらにこれらのペプチドの中から、ヒトの腫瘍細胞を傷害するCTLを誘導できるものを選び出した。このようにして同定したヒトCTLエピトープを、ペプチドワクチンとしてがん患者にアジュバントとともに接種することにより、投与されたペプチドに特異的なCTLが誘導され、がん細胞表面のHLAクラスI分子に提示されたTAAペプチドを認識し、腫瘍細胞のみを特異的に傷害することが期待される。このようにして同定したCTLエピトープペプチドを用いた、複数のTAAペプチドワクチン療法の臨床研究が進行中である。いずれも安全性が確認され、さらに一部の標準治療に抵抗性の進行がん患者において、腫瘍縮小効果が観察されている(文献9, 15)。

より、著者らは、フランスのパスツール研究所の Lemonnier 博士より恵与された HLA-A2 あるいは HLA-A24 トランスジェニックマウス (Tgm: Transgenic mouse)<sup>14)</sup> を利用した、CTL 誘導活性を有する TAA ペプチドのスクリーニング方法を確立している。

その方法では、まずインターネット上に公開されているソフトウェアを利用して、HLA/MHC 分子に結合するペプチドを予測する。著者らは、BIMAS ソフトウェア (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, Center for Information Technology, NIH, Bethesda, USA; [http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)) を主に利用して、同定した TAA のアミノ酸配列の中から、HLA-A2 分子あるいは HLA-A24 分子に結合すると期待される 9~10 個のアミノ酸からなるペプチドを、一つの TAA について数十種類合成する。これらの TAA ペプチドをアジュバントと共に Tgm に免疫して、ペプチドに特異的に反応して増殖し、インターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を産生する CTL を誘導できるものを同定する。最後に、これらの TAA ペプチドの中から、HLA-A2 あるいは HLA-A24 を有する健常人やがん患者の PBMC を用いて、ヒトの CTL 応答を誘導できるペプチドを同定する。

著者らはこの方法を用いて、HLA-A2 あるいは HLA-A24 分子に結合する TAA ペプチドで、当該 HLA クラス I 分子と TAA を共に発現する腫瘍細胞を特異的に傷害するヒト CTL を誘導できるものを複数同定した (図 3)。すでにこれらのペプチドを用いた、がん免疫療法の医師主導型第 I 相臨床研究が、30 症例以上に実施されている。その結果、いずれにおいても重篤な副作用は観察されず安全性が確認されており、さらに一部の標準治療不応の進行がん患者では腫瘍縮小効果も観察されており、延命効果も観察されている<sup>9,15)</sup>。

#### 4. CTL 誘導活性を併せ持つ、Th 細胞エピトープの同定

HLA クラス I 分子が、ほとんどの有核細胞に発現するのに対して、HLA クラス II 分子は主に、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、単球、B 細胞などの、いわゆるプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC; antigen presenting cell) に限定して発現する。CD4 陽性 Th1 細胞は、HLA クラス II 分子に結合した、10~30 数個 (多くは 15 個前後) のアミノ酸により構成される、比較的長いロングペプチド (LP: long peptide) を認識して、IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF および GM-CSF などのサイト

カインを産生する。これにより Th1 細胞は、CTL、Th1 細胞自身あるいは抗原提示細胞を活性化することにより、抗腫瘍免疫応答を増強する働きがある。

実際に腫瘍拒絶に至るほどの抗腫瘍免疫応答を誘導するためには、CTL のみでなく、TAA 特異的な Th1 細胞の存在が重要であることが近年報告されている。特に Th1 細胞が産生する IFN- $\gamma$  や IL-2 については、TAA 特異的 CTL の増殖とメモリー細胞の形成、腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害作用、腫瘍血管の新生抑制効果や CTL の腫瘍内への浸潤を促進する効果などが報告されている<sup>16)</sup>。したがって、CTL のみならず TAA 特異的な Th1 細胞も併せて活性化することは、強力な抗腫瘍免疫を誘導するうえで重要である。このような LP を用いたメラノーマ、肺がん、大腸がん等に対する臨床試験が、すでに海外では開始されており延命効果が報告されている<sup>17,18)</sup>。

そこで著者らは、CTL と Th1 細胞のエピトープを共に含む LP の免疫により、同一 TAA に特異的な Th1 細胞と CTL を同時に誘導し、より強力な抗腫瘍免疫応答を誘導できる LP を同定することにした。HLA クラス II 分子に結合するペプチドの予測は、Immune Epitope Database (IEDB) サイト ([http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\\_II\\_binding.html](http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html))<sup>19)</sup> に公開されている Sette と Peters らが開発したソフトウェアを用いた。これを用いた解析結果と、我々が同定した CTL エピトープの情報を組み合わせて、日本人で頻度が高い複数の HLA クラス II 分子に結合し、かつがん免疫療法の臨床研究により、患者体内で CTL の誘導が確認されている CTL エピトープを自然配列として含む、20~30 個のアミノ酸により構成される LP を複数同定した。

これらの LP は、*in vitro* の実験系において腫瘍特異的なヒト Th1 細胞と CTL の誘導活性を併せ持ち、さらにはがん患者の血液中に、この LP に特異的な Th1 細胞が実際に存在することが確認された。この観察結果は、がん患者にペプチドワクチンとして LP を接種することにより、腫瘍特異的な Th1 細胞が誘導される可能性を示唆している。また、LP を HLA クラス I Tgm に免疫することにより、TAA 特異的な CTL が誘導されることが確認されており、CTL エピトープペプチド単独よりも CTL の誘導活性が高い LP も存在した。このような LP を多数同定し、ペプチドワクチンとしてがん患者に投与する

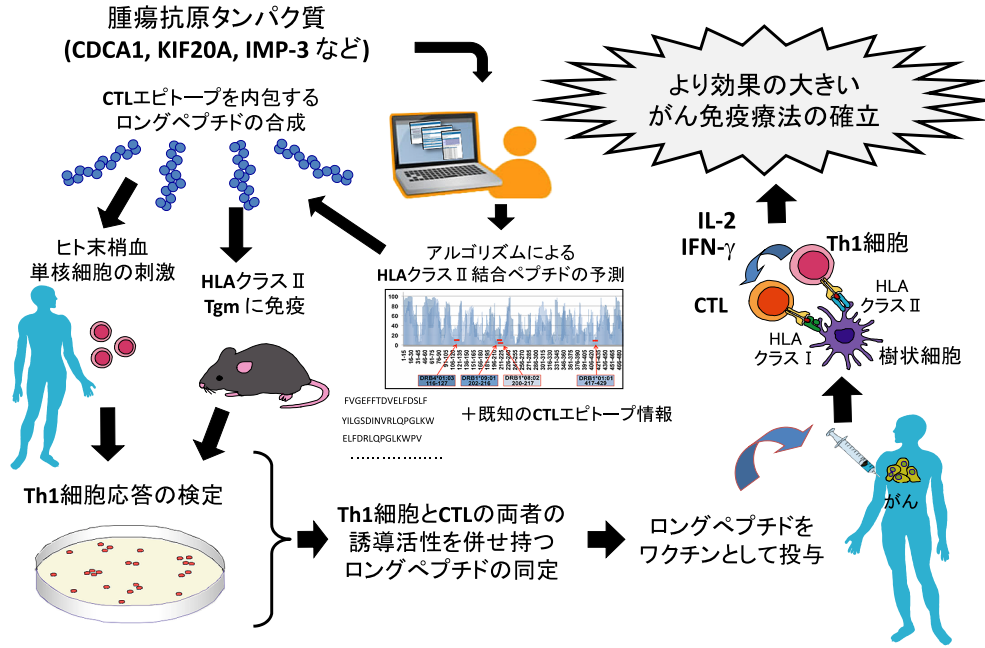


図4 CTL エピトープを自然配列として内包する Th1 細胞エピトープ（ロングペプチド；LP）を用いた、TAA ペプチドワクチン療法の開発

アルゴリズムを用いて、TAA のアミノ酸配列の中から、多くの日本人が保有する HLA クラス II 分子への結合が予測されるペプチドの情報を得る。これと既知の CTL エピトープを組み合わせることで、Th1 細胞と CTL のエピトープを含むと推定される LP を合成する。これを、健康人あるいはがん患者の血液を用いて、実際に Th1 細胞と CTL を誘導できる LP を同定する。また、HLA クラス II Tgm に、TAA 由来の LP を免疫することにより、*in vivo* における Th1 細胞と CTL 誘導の検証が可能となる。このようにして同定した LP を、ペプチドワクチンとしてがん患者に接種することにより、TAA に特異的な Th1 細胞と CTL が活性化されると期待できる。Th1 細胞は IFN- $\gamma$  や IL-2 を産生し、CTL の誘導やメモリー形成、腫瘍細胞への浸潤促進、直接的な腫瘍細胞傷害、ならびに腫瘍血管新生抑制などに寄与し、抗腫瘍免疫応答を増強する。

ことにより、腫瘍特異的な Th1 細胞と CTL を同時に、かつ効率よく誘導できる理想的な、がんペプチドワクチン療法が開発されることが期待できる (図 4)。

### 5. HLA- クラス II Tgm を利用したがん免疫療法に有用な TAA-LP の同定

HLA クラス I Tgm が CTL を誘導する TAA ペプチドを同定する際に、非常に有用であることを先に述べた。同様に、*in vivo* における Th1 細胞エピトープの同定を目的として、著者らは HLA クラス II Tgm を作成した。この Tgm は内在性のマウス MHC クラス II 遺伝子を欠損し、日本人の約 26% が保有する *HLA-DR4 (HLA-DRA/HLA-DRB1\*04:05)* 遺伝子を発現する。このマウスに、HLA-DR4 により Th 細胞に提示されることが既知の抗原ペプチドを免疫することにより、HLA-DR4 により提示された当該抗原ペプチドに特異的な Th 細胞が Tgm に誘導されることを確認できた (論文準備中)。この Tgm に TAA 分子あるいは TAA 由来の LP を免疫することにより、ヒト Th1 細胞エピトープを効率良くスクリーニ

ングすることが可能になるだけでなく、Th1 細胞と CTL を同時に活性化して、より強力な抗腫瘍効果を発揮する LP の同定にも有用なツールになると期待している。

## II. iPS 細胞から誘導した樹状細胞 (DC; dendritic cell) を利用した、がん免疫療法の開発

### 1. DC 療法の現状と問題点

同定した TAA を発現するがん細胞を標的とし、これを傷害する CTL の抗腫瘍免疫応答を効率よく誘導するもう一つ的手段として、DC 療法がある。マウスを用いた動物実験では、TAA ペプチドをそのままワクチンとして投与するよりも、体外で TAA または TAA ペプチドを負荷、あるいは TAA 遺伝子の導入により TAA を発現させた DC を投与する方法が、有効であることが示されている。またヒトの治療においても、前立腺がんに対する自己 DC を用いた細胞ワクチン療法の有効性が、大規模な臨床試験の結果をもとに報告されている<sup>20)</sup>。

DC 療法に用いられる DC は、組織適合性の問題によ

り、通常は患者末梢血中の単球（モノサイト）から分化させて作製される。しかし、単球は体外ではほとんど増殖しないため、治療に必要な数の DC を調製するためには、大量の患者末梢血が必要である。さらに末梢血中の単球数や、その DC への分化能力には、細胞ドナーにより大きな個体差があり、特にがん患者の場合、十分な数の DC を調製できない場合もある。

## 2. iPS 由来ミエロイド系細胞 (iPS-ML) からの DC の調製

著者らは、DC 療法における細胞ソースの問題を解決するために、ES 細胞に由来する DC を用いたがん免疫療法の研究を行ってきた<sup>21-23)</sup>。また iPS 細胞の作製方法が発表された後は、マウス<sup>24)</sup>あるいはヒト<sup>25)</sup>の iPS 細胞から分化誘導した DC を、疾患治療に用いることを想定して研究を進めてきた。その結果、図 5 に示す方法により、*in vitro* でヒトの iPS 細胞から DC を分化誘導する方法を確立した<sup>25)</sup>。しかし、この方法では分化誘導に 1 ヶ月以上の時間を要し、かつ治療に十分な数の DC が容易には得られなかった。

試行錯誤の結果、著者らはヒト iPS 細胞に由来する、

CD11 陽性ミエロイド系血液細胞に、レンチウイルスベクターを用いて *cMYC+BM11*, *cMYC+EZH2*, あるいは *cMYC+BM11+MDM2* 等の遺伝子を導入することにより、DC に分化する能力を保持したまま、大量に増殖させることができるミエロイド系細胞を作製し (図 6), iPS-ML (iPS cell-derived myeloid cell line) と名付けた<sup>26)</sup>。iPS-ML は、M-CSF に依存して、倍加時間 1~2 日程度で長期間 (4 ヶ月以上) 増殖するので、得られる細胞数は無限と言って良い。また、浮遊状態で増殖するので、培養液を追加して培養を継続するだけで、比較的容易に大量培養が可能である。さらに、iPS-ML 培養系に IL-4 を添加するだけで、数日で DC 様の形態を有する細胞が分化する (ML-DC) (図 6)。ML-DC は、現在、臨床で使用されている単球由来の DC よりも強力な T 細胞刺激活性と CTL 誘導能力を有しており、細胞ワクチンとして非常に有望である。

実際ががん治療に用いるためには、iPS-ML を大量に製造してストックしておき、必要に応じてこれを解凍し、IL-4 を添加して 2~3 日培養することにより ML-DC へと分化させれば良い。このシステムを実用化することが

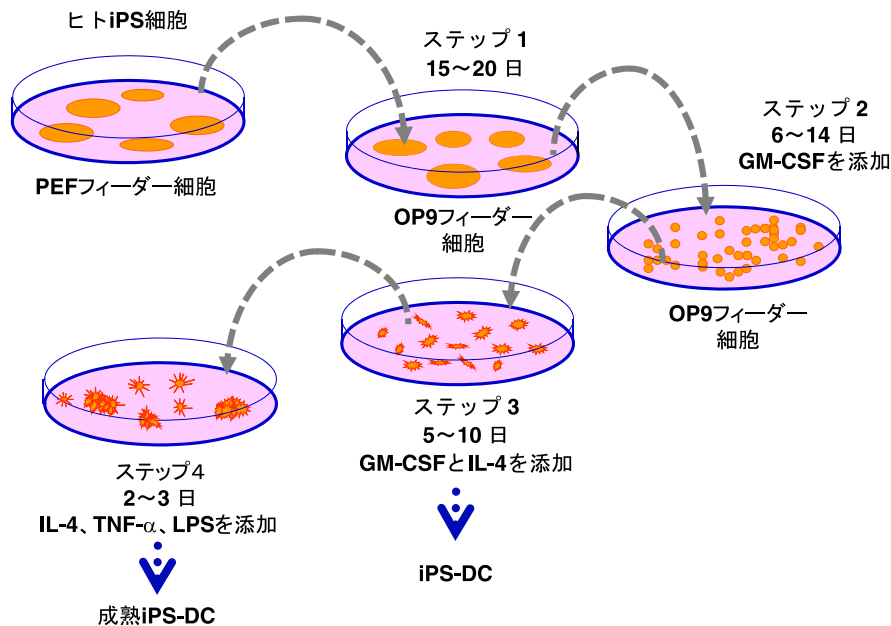


図 5 ヒト iPS 細胞からの *in vitro* における樹状細胞への分化誘導法の概要

ステップ 1; 培養中の iPS 細胞を、トリプシン/EDTA を用いて回収し、OP9 細胞フィーダー細胞上へ移し、15~20 日間培養する。この間に、ドーム状に盛り上がった形態を示す未分化な iPS 細胞のコロニーは、平坦な形態へと変化する。ステップ 2; 分化した iPS 細胞を、トリプシン/EDTA を用いて培養プレートから回収し、新たに準備した OP9 細胞上で GM-CSF 存在下で 6~14 日ほど培養する。ステップ 3; OP9 細胞上に出現する浮遊性の細胞を、細菌培養用のペトリディッシュに移し、GM-CSF と IL-4 の存在下でさらに 5~10 日培養を続けると、不規則な樹状突起を有する浮遊性の樹状細胞が出現する。ステップ 4; ステップ 3 の未成熟な樹状細胞に、IL-4, TNF- $\alpha$ , LPS を添加することにより、成熟樹状細胞が誘導される。

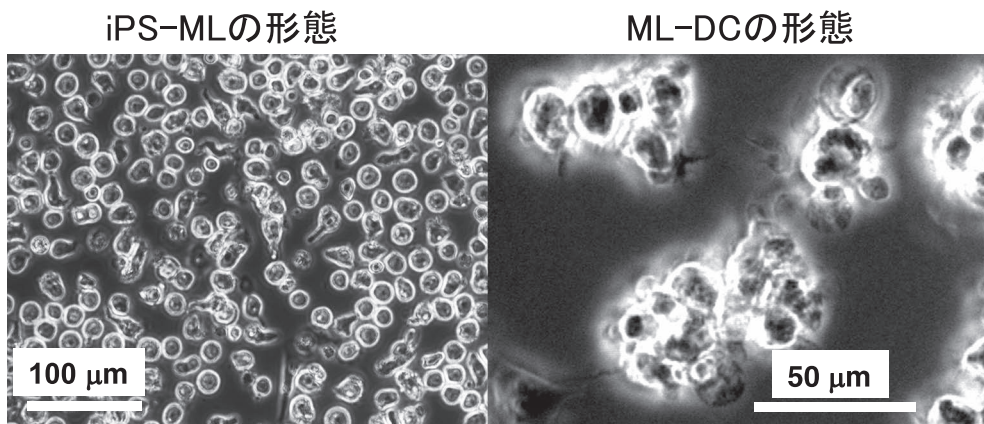


図6 iPS-ML および iPS-ML より誘導した樹状細胞様細胞 (ML-DC) の形態

iPS-ML (左) から分化誘導した ML-DC (右) には、樹状細胞様の突起が認められ、さらに CD40, 80, 86, HLA クラス I, II の発現が増加していた (文献 11 より)。

できれば、細胞ワクチンとして使用可能な DC を、簡便かつ低コストで供給することが可能になる。

### 3. 組織不適合性の問題を回避した HLA タイプ別の ML-DC 供給システムの開発

iPS-ML が作製可能となったことにより、ヒト ML-DC の大量生産が可能となった。しかしながら、患者ごとに個別に ML-DC を樹立するためには、患者の細胞から iPS 細胞を樹立し、これをミエロイド系細胞、次いで iPS-ML へと分化誘導する手順を踏む必要があり、2 ヶ月以上の期間を必要とする。さらに、HLA の不一致による組織不適合性から、特定のアロ細胞ドナーに由来する iPS 細胞から分化誘導した ML-DC を、遺伝的背景の異なる患者の治療に使用することはできない。これは、アロ個体間で細胞移入を行った場合、移入されたドナー由来の細胞が、レシピエントの免疫系により認識され、速やかに破壊されてしまうためである。特に、細胞移入後数日で発生する急性拒絶反応においては、不適合 HLA クラス I 分子を認識する CTL が、主要なエフェクター細胞となることが知られている。

そこで著者らは、ドナーの細胞表面の HLA クラス I 分子の発現に必須の、TAP (Transporter associated with Antigen Presentation) 分子を欠損する iPS 細胞を作製し、これにレシピエントに適合する HLA クラス I 分子を発現させて ML-DC に分化させることにより、組織不適合性を解決することを考えた。この TAP 分子は、細胞質内でユビキチン化されたタンパク質が、プロテアソームにより分解されて出来たペプチドを、小胞体 (ER) 内

に輸送する機能を有する。HLA クラス I 分子は ER 内でペプチドを結合して初めて構造が安定化され、細胞表面に安定して発現する。したがって TAP 欠損細胞ではペプチドを結合しない不安定な HLA クラス I 分子が、26°C の培養条件では細胞表面に発現するが、細胞を 37°C で培養すると不安定な HLA クラス I 分子は、細胞内のエンドソームに取り込まれて分解されるため、細胞表面の HLA クラス I 分子の発現量は激減する。

実際に、*TAP1* 遺伝子を欠損するマウスの ES 細胞に由来する DC (*H-2<sup>b</sup>* ハプロタイプ) を分化誘導し、これに *H-2<sup>d</sup>* ハプロタイプの MHC クラス I である *H-2K<sup>d</sup>* 遺伝子を導入して作製した DC を、BALB/c マウス (*H-2<sup>d</sup>* ハプロタイプ) に移入したところ、急性拒絶反応を軽減できた。また、*H-2K<sup>d</sup>* に結合する合成ペプチドを、この DC に添加して BALB/c マウス投与したところ、ペプチド特異的免疫応答が誘導され、さらに抗原特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導することができた。すなわち、組織不適合な抗原提示細胞を、人為的に組織適合に改変することが可能であることを示した<sup>23)</sup>。

この動物実験の結果に基づき、ヒト iPS 細胞においても *TAP* 遺伝子の発現を欠損させることにより、アロ反応性 CD8 陽性 T 細胞による認識を回避できるかどうか検討した<sup>26)</sup>。まず、*HLA-A\*24:02/11:01* 遺伝子を有するヒト iPS 細胞において *TAP2* 遺伝子の標的破壊を行い、この iPS 細胞から iPS-ML を作製した。この *TAP2* 欠損 iPS-ML に対して、*HLA-A\*02:01* 遺伝子の発現ベクターを導入し、その後この iPS-ML から ML-DC を作製した。

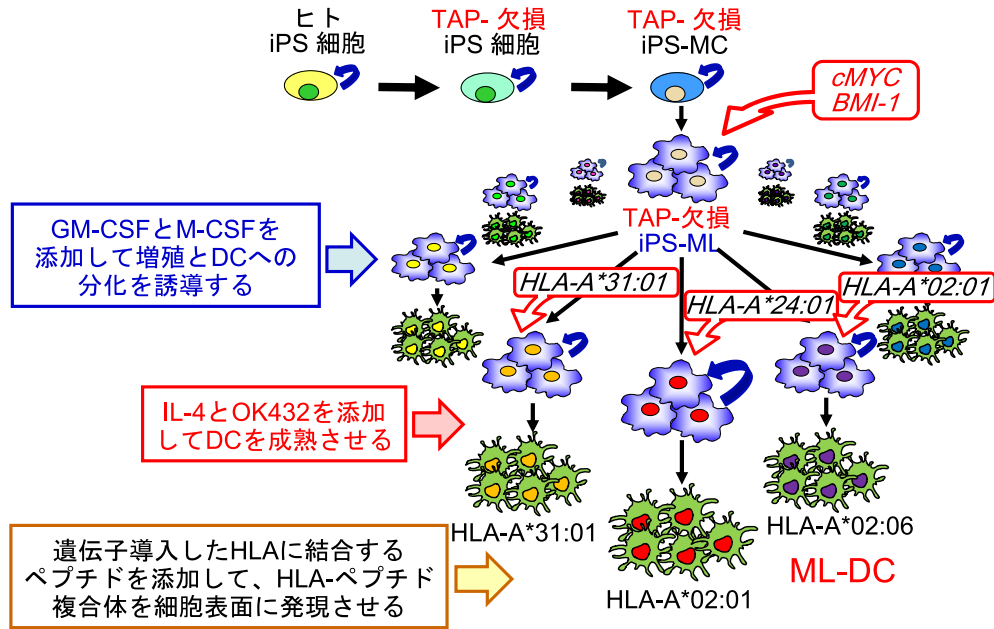


図7 TAP欠損 iPS 細胞を用いた多様な HLA 型に対応できる樹状細胞ワクチン供給システムの開発

TAP2 遺伝子を標的破壊したヒト iPS 細胞は、多くの患者への樹状細胞免疫療法の応用を可能にする。TAP2 遺伝子欠損 iPS 細胞では、HLA クラス I 分子に結合するペプチドの、細胞質から小胞体 (ER) 内腔への輸送が阻害されるため、細胞表面における HLA クラス I ペプチド複合体の発現が激減する。そこで、TAP2 遺伝子欠損 iPS 細胞を iPS-ML に分化させて、それぞれの患者が持つ HLA クラス I (たとえば *HLA-A\*31:01*, *HLA-A\*02:01*, *HLA-A\*02:06* など) 遺伝子を導入して発現させる。この細胞を大量培養し保存しておく。治療が必要な患者が現れた際には、HLA の適合する iPS-ML を解凍して培養し、ML-DC に分化させて樹状細胞療法に用いる。この際に、遺伝子導入された当該 HLA クラス I 分子とのみ結合する、TAA 由来の CTL 誘導ペプチドと、ML-DC を 26°C で培養することにより、当該 HLA クラス I 分子とペプチドの複合体のみを発現する、ML-DC を調製することが可能となる。

この ML-DC に悪性黒色腫関連抗原である MART1 に由来する HLA-A2 (*HLA-A\*02:01*) 結合性ペプチドを負荷し、これを *HLA-A\*02:01* 遺伝子を有するアロのドナーの末梢血に由来する CD8 陽性 T 細胞と共に培養した。

通常、末梢血 T 細胞を HLA 不適合のあるアロ DC と共培養すると、ミスマッチ HLA に対する強力な T 細胞反応が起こるため、このような DC に特定の抗原ペプチドを負荷して T 細胞を刺激しても、抗原ペプチドに特異的な T 細胞の免疫応答を検出することは困難である。しかしながら、この TAP 欠損 ML-DC を刺激細胞とした実験では、HLA-A2/MART1 ペプチドに特異的な CTL を誘導することができた。したがって、ヒトの場合も TAP 欠損 ML-DC を用いることにより、ミスマッチ HLA クラス I に対する T 細胞のアロ反応を回避して、さらにレシピエントと同じ型の HLA クラス I 分子により提示された抗原ペプチドに特異的な CTL を誘導できることを証明した<sup>26)</sup>。

以上より著者らは、TAP 欠損 iPS-ML に各種の HLA クラス I 遺伝子を導入することにより、多様な HLA 型

の患者に対して使用できる ML-DC を作製することが、可能であると考えている。図7に示すように、このシステムでは、TAP2 欠損 iPS 細胞から iPS-ML を作製し、これに各種の HLA クラス I 遺伝子を導入した後に、大量に増殖させて凍結保存しておく。がん患者に対する樹状細胞ワクチンとして使用する場合は、適切な HLA クラス I 遺伝子が導入された iPS-ML を解凍し、IL-4 を添加して培養し樹状細胞 (ML-DC) へと分化させる。これに当該 HLA クラス I 分子に結合する TAA ペプチドを負荷して治療に用いる。iPS-ML を大量に生産し、クオリティーチェックを行った後に凍結保存することにより、製造コストを大幅に削減することが可能となる。また細胞の解凍以降のステップは、短期間の簡単な培養操作を行うのみで、臨床応用に供することが可能である。

#### おわりに

TAA ペプチドワクチン療法は、臨床研究が進むにつれて、従来のがん治療法と比較して副作用が少なく、患者の QOL を維持しつつ、がん患者の延命効果があるこ

とが分ってきており、手術療法、化学療法および放射線療法との併用により奏功が望める、第4の治療法として期待されている。従来のがん治療法では効果を認めなかった進行がん患者の中には、ペプチドワクチン療法を受けることにより、著明な腫瘍縮小効果が観察されている症例もあり、生命予後の改善効果が期待されている。

しかし、現在でもなおTAAペプチドワクチン療法単独での進行がんの根治は、困難と考えられている。こうしたがん免疫療法を、より切れ味の良い、強力ながん治療法へと進化させることを目指して、著者らは本稿で述べたような、患者のHLAに対応するCTLとTh1細胞を共に活性化する理想的なTAA由来のロングペプチドを用いた、がん免疫療法を開発しつつある。さらに、患者のHLAに合わせた遺伝子改変iPS細胞から誘導されたDCを用いた細胞ワクチン療法などの、新しいがん免疫療法の開発に取り組んでいる。

#### 引用文献

- 1) Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, *et al.*: Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clinical Cancer Research* (10): 6612–6621, 2004.
- 2) Ikuta Y, Nakatsura T, Kageshita T, *et al.*: Highly sensitive detection of melanoma at an early stage based on the increased serum secreted protein acidic and rich in cysteine and glypican-3 levels. *Clinical Cancer Research* (11): 8079–8088, 2005.
- 3) Yoshitake Y, Nakatsura T, Monji M, *et al.*: Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immunotherapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clinical Cancer Research* (10): 6437–6448, 2004.
- 4) Tomita Y, Imai K, Senju S, *et al.*: A novel tumor-associated antigen, cell division cycle 45-like can induce cytotoxic T-lymphocytes reactive to tumor cells. *Cancer Science* (102): 697–705, 2011.
- 5) Harao M, Hirata S, Irie A, *et al.*: HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel lung cancer-associated cancer testis antigen, cell division cycle associated 1, can induce tumor-reactive CTL. *International Journal of Cancer* (123): 2616–2625, 2008.
- 6) Imai K, Hirata S, Irie A, *et al.*: Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer* (104): 300–307, 2011.
- 7) Tomita Y, Harao M, Senju S, *et al.*: Peptides derived from human insulin-like growth factor-II mRNA binding protein 3 can induce human leukocyte antigen-A2-restricted cytotoxic T lymphocytes reactive to cancer cells. *Cancer Science* (102): 71–78, 2011.
- 8) Imai K, Hirata S, Irie A, *et al.*: Identification of a novel tumor-associated antigen, cadherin 3/P-cadherin, as a possible target for immunotherapy of pancreatic, gastric, and colorectal cancers. *Clinical Cancer Research* (14): 6487–6495, 2008.
- 9) Sawada Y, Yoshikawa T, Nobuoka D, *et al.*: Phase I trial of a glypican-3-derived peptide vaccine for advanced hepatocellular carcinoma: immunologic evidence and potential for improving overall survival. *Clinical Cancer Research* (18): 3686–3696, 2012.
- 10) Komori H, Nakatsura T, Senju S, *et al.*: Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* (12): 2689–2697, 2006.
- 11) Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, *et al.*: The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *International Journal of Cancer* (126): 2153–2163, 2010.
- 12) Inoue M, Senju S, Hirata S, *et al.*: Identification of SPARC as a candidate target antigen for immunotherapy of various cancers. *International Journal of Cancer* (127): 1393–1403, 2010.
- 13) Walter S, Weinschenk T, Stenzl A, *et al.*: Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nature Medicine* (18): 1254–1261, 2012.
- 14) Jung KO, Khan AM, Tan BY, *et al.*: West Nile virus T-cell ligand sequences shared with other flaviviruses: a multitude of variant sequences as potential altered peptide ligands. *Journal of Virology* (86): 7616–7624, 2012.
- 15) Kono K, Iinuma H, Akutsu Y, *et al.*: Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with three peptides derived from novel cancer-testis antigens. *Journal of Translational Medicine* (10): 141, 2012.
- 16) Shedlock DJ, Shen H: Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* (300): 337–339, 2003.
- 17) Brunsvig PF, Kyte JA, Kersten C, *et al.*: Telomerase peptide vaccination in NSCLC: a phase II trial in stage III patients vaccinated after chemoradiotherapy and an 8-year update on a phase I/II trial. *Clinical Cancer Research* (17): 6847–6857, 2011.
- 18) Melief CJ, van der Burg SH: Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nature Review of Cancer* (8): 351–360, 2008.
- 19) Wang P, Sidney J, Dow C, *et al.*: A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Computational Biology* (4): e1000048, 2008.
- 20) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, *et al.*: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine* (363): 411–422, 2010.
- 21) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, *et al.*: Generation and genetic

- modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells. *Blood* (101): 3501–3508, 2003.
- 22) Senju S, Suemori H, Zembutsu H, *et al.*: Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* (25): 2720–2729, 2007.
- 23) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata S, *et al.*: Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by beta 2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* (181): 6635–6643, 2008.
- 24) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, *et al.*: Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* (27): 1021–1031, 2009.
- 25) Senju S, Haruta M, Matsumura K, *et al.*: Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Therapy* (18): 874–883, 2011.
- 26) Haruta M, Tomita Y, Yuno A, *et al.*: TAP-deficient human iPS cell-derived myeloid cell lines as unlimited cell source for dendritic cell-like antigen-presenting cells. *Gene Therapy* (epub ahead of print).



## Development of an Ideal and Potent Cancer Immunotherapy Designed by Consideration of HLA Polymorphism

Yusuke Tomita<sup>1),2)</sup>, Satoru Senju<sup>1)</sup>, Atsushi Irie<sup>1)</sup>, Yasuharu Nishimura<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

<sup>2)</sup>Department of Respiratory Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

To develop cancer immunotherapy, we identified the tumor-associated antigens (TAAs) that are prominently expressed only in cancer cells but not in normal tissues by using the genome-wide cDNA microarray analyses. TAA-derived peptides predicted *in silico* to be bound by frequent HLA class I molecules in the Japanese population were synthesized, and several peptides that could induce the HLA class I-restricted, TAA peptide-specific and tumor-reactive cytotoxic T lymphocyte (CTL) were identified by using HLA class I transgenic mice and human peripheral blood mononuclear cells. The phase I clinical trials of cancer immunotherapy using those TAA-derived peptides showed the safety and some effectiveness. To further improve the effectiveness of the TAA-targeted cancer immunotherapy, we identified TAA-derived peptides that can stimulate both TAA-specific CTL and helper T (Th) cells, and developed genetically modified allogeneic iPS cell-derived dendritic cell-mediated immunotherapy that can overcome the potential problems of histoincompatibility between iPS cell donors and cancer patients.

**Key Words:** cancer immunotherapy, TAA; Tumor-associated antigen, tumor antigenic peptide vaccine, *HLA* Tgm; *HLA* transgenic mice, iPS cell-derived dendritic cell

## 第16回国際組織適合性ワークショップの報告

小島 裕人<sup>1)</sup>・一戸 辰夫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 公益財団法人 HLA 研究所

<sup>2)</sup> 広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科研究分野

**キーワード：**国際組織適合性ワークショップ，次世代 DNA シークエンサー，HLA エピトープレジストリー

### はじめに

2012年5月28日から6月3日まで英国のリバプールで開催された 16th International HLA and Immunogenetics Workshop および合同開催された 26th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference & 23rd British Society of Histocompatibility and Immunogenetics Conference に出席した (写真 1, 2)。今回のワークショップでは、高速シークエンサーを用いたゲノム解析法や HLA 抗体エピトープのデータベース化など、今後の組織適合性研究に新たな方向性をもたらす技術資源についての詳細な報告が行われ、造血細胞移植や臓器移植に携わる医療技術者にとっても非常に意義深いセッションが多かつ

た。ビートルズ生誕の地として有名なリバプールは北緯 53 度に位置し、日本の北端部よりもかなり北に位置するが、暖流の影響と比較的好天に恵まれたこともあってあまり寒さは感じられなかった。しかし、イギリス西部の気候を象徴する「一日のうちに四季がある」という言葉のように天候の変化は多く、学会開催期間中にも急な雨が数回あったと記憶している。なお、著者のうち、小島は主に技術系および臓器移植領域のセッションを中心に、一戸は造血細胞移植領域のセッションを中心に情報収集を行った。

### 1. 造血細胞移植領域における報告

Effie Petersdorf がリーダーを務める造血細胞移植コン



写真 1 BT Convention Centre (会場)



写真 2 ワークショップサマリーの様子

ポーネントでは、まずこのグループならではのグローバルな研究成果として、これまでに集積した21,777例のHLAデータに基づいた非血縁者間移植の解析結果が報告された。今回の解析対象は、HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1座のアリル完全適合例(10/10適合)が約半数、9/10適合例が約3割程度含まれるものであったが、アリル不適合数が増加する毎に死亡リスクが増加し、HLA-DQB1座以外のHLA座のアリル不適合は、すべて急性GVHDの重症化と死亡率の増加に関連するという結果であった。また、従来欧米においては、HLA-DRB1の不適合が移植成績に強く影響することが指摘されていたが、今回の検討ではむしろHLAクラスIの影響が強かった。

それに引き続き、臍帯血移植における inherited paternal antigens (IPA) や non-inherited maternal HLA antigens (NIMA) のミスマッチの影響、HLA-DRB3/4/5やHLA-DQの不適合、HLA-DPB1のT細胞エピトープの相違に基づいた permissive な不適合と non-permissive な不適合の識別、HLA-Bの97番アミノ酸置換によるアリル不適合の影響、TNFをはじめとするサイトカイン遺伝子多型の影響、HY不適合とHLA-DPB1不適合の相互作用など様々な切り口から興味深い研究成果が数多く発表された。日本からは森島泰雄先生(愛知県がんセンター)が、人種間における移植成績の相違やHLA-C不適合の影響の国際間比較についての報告を行い、森島聡子先生(藤田保健衛生大学)が、HLA領域ハプロタイプのゲノムワイドなSNPs解析の結果に基づき日本列島ではHLA領域の遺伝子配列が進化的に高度に保存されていることを報告した。

近年多方面からの解析が進められているKIRの適合性についても、ドナーKIRタイプとレシピエントHLAアロタイプの影響について、Katharine Hsuよりきわめて興味深い発表が行われ、KIR2DS1陽性ドナーからの移植後の再発リスクにドナーHLA-Cアロタイプが影響を与えていることや(急性骨髄性白血病に対する造血細胞移植において、ドナーがKIR2DS1を有している場合には移植後の白血病再発率が低下することが示されているが、その効果はドナー自身がKIR2DS1のリガンドであるHLA-C<sup>K80</sup>を有している場合には観察されなくなる)<sup>1)</sup>、ドナーKIR3DL1アリルのBw4結合特異性の相違が移植後再発に影響を与えていることが報告された(KIR3DL1にはBw4に対するアフィニティに相違があ

る多くのアリルが存在しているが、ドナーKIR3DL1アリルとレシピエントのBw4アロタイプが高アフィニティの組み合わせとなっている場合には再発率が増加する)。また、近年国際的にも実施機会が増加しているHLA不適合血縁者間移植・さい帯血移植についても、同様にこのワークショップで免疫遺伝学的な立場から移植成績に関与する因子を検討していくことを目的として、検体とデータ収集を行う新たなプロジェクトの提案が行われた。

## 2. HLA抗体についての話題

ドナー特異的に反応するHLA抗体(donor-specific antibody, DSA)は、臓器移植、造血幹細胞移植のいずれにおいても移植片の拒絶に関与していることが明らかにされているが、Luminex法など高感度の検査方法では臨床的意義の乏しい抗体や非特異反応による抗体も検出される可能性がある。また、測定方法や施設の相違によって検査結果に較差が生じることが知られており、今回のワークショップでは、これらの問題にどのように対処するべきかにスポットが当てられた。

まず、臨床的意義のない抗体に関しては、各国から集められた抗体陽性者のデータに基づき、mono-specificとduo-specificの抗体に焦点を当てると、B45, B76, Cw17などアリル頻度の低いHLAに対する抗体が多く検出されるという結果が報告された。HLA研究所において2011年に行われた抗体検出頻度の検討でも、日本人に検出されない珍しい抗原に対するものが上位に来ており、それらはmono-specificやduo-specificに検出される場合があった(表1)。

検出された抗体が真のアロ抗体かどうかを見極める試みとしてエピトープ解析が進んでおり、エピトープの表記方法の統一化とともに、データベース化に向けた取り組みが開始されている。エピトープの命名法についてはアミノ酸の番号+頭文字、例えば62GEのように表記することが推奨されており、エピトープが離れたアミノ酸を認識する場合は、82LR+45Qのように“+”でつなげる表記となる。すでにHLA Epitope Registry (<http://epregistry.ufpi.br>)が利用可能であり、HLAクラスI, DRB, DQB+DQA, DPB+DPA, MICAに対するエピトープが登録されている。エピトープデータベースのセッションは、優に100人以上は入れそうな会場で開催され

表 1 HLA 研究所の 2011 年抗体検出頻度 Top 5 (各座位)

Beads	アレル頻度	陽性症例数 (%)	各陽性 Beads 数における症例数					陽性 Beads 数 ≤ 5 かつ MFI ≤ 3,000 の症例数	
			5	4	3	2	1		
A*11:02	0.226%	72 (28.6%)	3	5	1	1	4	10	
A*25:01	Not Found	72 (28.6%)	1	1	1	1	0	1	
A*68:02	0.005%	71 (28.2%)	1	2	2	1	0	4	
A*32:01	0.032%	61 (24.2%)	0	0	1	0	0	1	
A*66:02	Not Found	61 (24.2%)	1	1	0	1	0	2	
B*57:01	Not Found	98 (38.9%)	0	1	1	0	1	1	
B*45:01	Not Found	97 (38.5%)	5	1	1	2	2	6	
B*15:12	Not Found	97 (38.5%)	6	1	0	1	1	3	
B*57:03	Not Found	94 (37.3%)	0	1	1	0	0	2	
B*82:01	Not Found	84 (33.3%)	2	1	1	2	2	5	
C*17:01	0.016%	95 (37.7%)	2	4	4	8	3	17	
C*15:02	3.051%	39 (15.5%)	0	2	1	0	0	3	
C*02:02	0.039%	32 (12.7%)	1	1	1	1	0	3	
C*07:02	12.464%	29 (11.5%)	0	0	1	1	0	1	
C*06:02	0.812%	29 (11.5%)	0	2	0	1	1	4	
DRB1*04:03	2.953%	64 (43.5%)	3	2	3	1	4	13	
DRB1*09:01	14.130%	54 (36.7%)	0	2	0	1	0	3	
DRB1*04:01	0.908%	53 (36.1%)	3	1	1	0	0	5	
DRB1*04:02	0.005%	49 (33.3%)	2	0	0	0	0	2	
DRB1*04:04	0.230%	48 (32.7%)	2	2	1	0	1	5	
DQB1*03:01	DQA1*05:03	11.538%	53 (36.1%)	3	2	3	1	2	9
DQB1*03:01	DQA1*02:01	11.538%	38 (25.9%)	1	0	0	0	0	0
DQB1*03:01	DQA1*05:05	11.538%	36 (24.5%)	2	0	0	0	0	1
DQB1*03:01	DQA1*03:01	11.538%	31 (21.1%)	1	0	0	0	0	0
DQB1*03:01	DQA1*06:01	11.538%	30 (20.4%)	1	0	0	0	0	0
DPB1*19:01	DPA1*01:03	0.738%	27 (18.4%)	0	0	0	0	0	0
DPB1*02:01	DPA1*01:03	24.111%	23 (15.6%)	0	0	0	0	0	0
DPB1*10:01	DPA1*02:01	Not Found	22 (15.0%)	0	0	1	0	1	2
DPB1*14:01	DPA1*02:01	1.476%	22 (15.0%)	0	1	0	0	1	2
DPB1*28:01	DPA1*02:01	Not Found	22 (15.0%)	0	0	0	0	0	0

全検体 (Class I : 252 例, Class II : 147 例) における陽性数の各 locus の Top 5 を表に示す。各陽性 Beads 数における症例数とは、例えば陽性 Beads 数が 5 の症例について該当アレル陽性の場合に 5 の欄にカウント。※ DQ, DP のアレル頻度についてはそれぞれ DQB1, DPB1 の頻度を記載。

たが、立ち見はもちろん床に座る参加者まで出る状況で、このテーマに対する聴衆の強い関心が感じられた。

その他に興味深い企画としては、Luminex 法を用いた抗体検査の施設間較差について、測定プロトコールの標準化を目指した試みの報告があった。同一検体での検査結果を比較した場合、MFI の高い領域ではほぼ同一の結果が得られたが、低い領域では陽性・陰性を左右するほ

どの測定較差が出現した。実際、各施設毎に使用トレイ、血清とビーズの比率などに相違がある上に、洗浄方法や洗浄回数、測定機種の違いなどの影響も受けるため、Luminex 法による抗体測定方法の標準化には多くの困難があるが、21 施設において共通の測定プロトコールの使用を試みたところ、測定較差が減少する傾向が見られたことが報告されていた。

また、臓器移植における CDC の有用性を Pros & Cons の形式で考える教育的なセッションもあった。Luminex 法は CDC より簡便で感度が高いが、非特異的な抗体を検出している可能性を否定できず、周知のように、CDC ではより生体内での反応に近い情報が得られるものの感度がかかなり低いことが課題とされている。両方の検査方法を用いて検討を行うことが理想であるが、時間・費用・検体確保等の問題があり、CDC をどのように位置づけるかについては、国際的にもまだ完全にコンセンサスが得られていないと感じられた。

### 3. 次世代シーケンサーの話題

今回の学会で最も注目度の高かった話題は、やはり次世代シーケンシング技術 (next-generation sequencing, NGS) を用いた HLA タイピング法の開発であろう。NGS は、サンガー法に比べて high throughput であるばかりではなく、2 本の DNA 鎖の配列を別々に読んでいくことにより allele ambiguity をなくすることができる究極的なシーケンス技術である。HLA 領域ではすでにわが国の東海大学のグループにより NGS を用いて、プロモーター領域やイントロンの多型も検出可能な 8 桁レベルの超高解像度 DNA タイピング (SS-SBT) 法が開発されており<sup>2)</sup>、尾崎有紀先生 (東海大学) が一般演題で発表されていた。NGS のプラットフォームもこのワークショップの時点では 4 機種が使用可能となっており、それぞれの read length や run time, running cost, error rate などの比較データが紹介された。NGS では、シーケンシング技術の面もさることながら、断片化された遺伝子配列をどのように統合していくかが課題となる。イメージとしてはばらばらになったパズルを組み立てていくようなもので、解析ソフトウェアの改良も進んでいるが、現在の問題は、見本となる完成図に相当する reference sequence が十分に蓄積されていないことであり、今後 1,000 人ゲノムプロジェクトなどの進展に期待がもたれている。KIR 領域についても NGS を用いたタイピングの研究が進んでおり、数年の間には多くのデータが蓄積され、臨床研究に応用されていくことが期待される。

### 4. その他の話題

ワークショップの終了後には、湖水地方へのエク



写真 3 ウィンダミア湖

カーションをはさんで (写真 3), EFI/BSHI の大会が行われた。400 以上の一般演題に加えて、連日 plenary session が持たれ、古人類の MHC ゲノム解析に基づいた人類進化過程の考察、薬剤過敏症発症への HLA の関与、HIV 感染症における KIR の役割、など数々の学際的な話題が提供された。

しかし、何と言っても特筆すべきは、best abstract に選択された 10 題の口演演題のうち 3 題が日本からの演題であったことで、宮寺浩子先生 (東京大学) が DQ の安定性と 1 型糖尿病発症リスクの関連、西村泰治先生 (熊本大学)・千住寛先生 (熊本大学, 当日は西村先生が代演) が肝細胞癌に対するペプチドワクチンならびに TAP2 欠損 iPS 由来の樹状細胞の特性について、それぞれ会場を圧倒するようなボリュームの研究成果を発表した (宮寺先生は最優秀演題賞に当たる van Rood 賞を受賞)。

なお、ワークショップの 2 日目には HLA 研究所が参加した “Global HLA Haplotypes” のセッションがあり、著者らも日本人のハプロタイプデータ (HLA 研究所ホームページ <http://www.hla.or.jp/hapro/top.html>) を韓国, 台湾, 中国との比較という観点から発表し、HLA ハプロタイプの分布頻度から日本列島人の祖先は朝鮮半島と近縁な関係にあると推測されることを紹介した。なお、本合同会議における一般演題の抄録は Tissue Antigens 誌に別冊として掲載されている<sup>3)</sup>。

### おわりに

全開催期間中を通じて、われわれが会った日本人の参加者は高々 10 名程度であったが、その演題の質の高さ

は、学会の headquarter にも高く評価されていた。次回の第17回ワークショップは2015年カリフォルニアのスタンフォードで開催される予定である。わが国からも臓器移植や造血細胞移植にかかわる臨床家も含めて、このワークショップに多数の参加が得られることを祈念して筆をおきたい。

#### 謝 辞

今回の学会で情報収集にご協力いただいた佐藤壯（札幌北楡病院）、益尾清恵（ペリタス）、児玉千恵（ペリタス）の各氏に感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) Venstrom J, Pittari G, Gooley TA, *et al.* HLA-C-dependent prevention of leukemia relapse by donor activating KIR2DS1. *New Engl J Med* (367): 805–816, 2012.
- 2) 鈴木進悟, 尾崎有紀, 吉川枝里, 他: 次世代シーケンサーを用いたHLAクラスI遺伝子の超高解像度DNAタイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発. *MHC* 19: 43–53, 2012.
- 3) Abstracts for the Joint 16th International HLA and Immunogenetics Workshop, 26th European Federation for Immunogenetics Conference and 23rd British Society of Histocompatibility and Immunogenetics Conference. *Tissue Antigens* (79): 399–611, 2012.

## 第 11 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄 録 集

会 期：2013 年 2 月 2 日（土）

会 場：参天製薬株式会社

大阪市東淀川区下新庄 3-9-19

TEL: 06-6321-7000

世話人：椿 和央

近畿大学医学部奈良病院血液内科

〒 630-0293 生駒市乙田町 1248 番-1

TEL: 0743-77-0880（代表）

E-mail: tubaki@nara.med.kindai.ac.jp

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

## 【参加費】

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

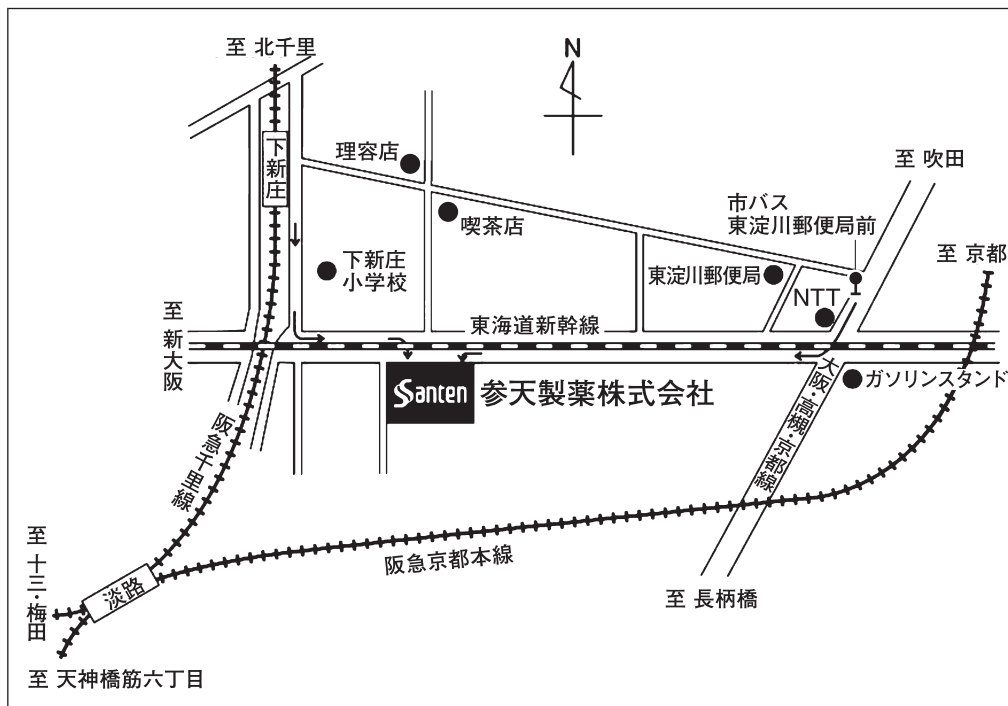
## 【会議等】

1. 総 会：2月2日（土）13:50～14:00
2. 世話人会：2月2日（土）12:30～13:50
3. 意見交換会：2月2日（土）17:00～

## 【会場地図】

## 参天製薬株式会社 本社案内図

大阪市東淀川区下新庄 3-9-19 TEL 06-6321-7000



## 新大阪駅より（所要時間：約 30 分）

地下鉄御堂筋線・新大阪駅よりなかもず行きに乗車し、一駅目の西中島南方駅で下車。阪急千里線に乗換え、南方駅より北千里行きに乗車、下新庄駅下車。下新庄駅から徒歩 5 分。

## 地下鉄堺筋線日本橋、北浜方面より（地下鉄と阪急が相互乗り入れ）

北千里行きに乗車し、下新庄駅下車。下新庄駅から徒歩 5 分。

## JR 大阪駅、阪神・地下鉄・阪急 梅田方面より

阪急電車・梅田駅から北千里行きに乗車し、下新庄駅下車。下新庄駅から徒歩 5 分。



## プログラム

9 時 30 分

受付開始

【午前の部】

10 時～ 11 時

オープニングセミナー

座長：谷 慶彦（近畿ブロック血液センター研究部）

1) 「HPA 抗原系」

高 陽淑（近畿ブロック血液センター検査三課）

2) 「新生児同種免疫性血小板減少症（NAIT）」

峯 佳子（近畿大学医学部附属病院輸血・細胞治療センター）

11 時～ 12 時 30 分

一般演題（1）

11 時～ 11 時 50 分

座長：坊地義浩（兵庫県赤十字血液センター 学術課）

1) 「血小板輸血不応（PC-HLA 依頼）患者の HLA 抗体スクリーニングの現状」

○福森泰雄，高 陽淑，西海真弓，西宮紘子，稲葉洋行，入江與利子，松山宣樹，尼岸悦子，西澤果苗，石井博之，松倉晴道，河 敬世

（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 検査部）

2) 「当施設における PC-HLA ドナーの DNA タイピング結果について」

○中村仁美，黒田ゆかり，中山みゆき，田原大志，井上純子，永吉裕二，中村 功，久田正直，入田和男，清川博之  
（日本赤十字社 九州ブロック血液センター）

3) 「Quick Step<sup>®</sup> による献血者 HLA 抗体スクリーニングの試行と男性献血者 HLA 抗体陽性者の解析」

○入江與利子<sup>1)</sup>，勝田通子<sup>1)</sup>，福森泰雄<sup>1)</sup>，高 陽淑<sup>1)</sup>，松倉晴道<sup>1)</sup>，河 敬世<sup>1)</sup>，岡崎 仁<sup>2)</sup>

（日本赤十字社近畿ブロック血液センター検査部<sup>1)</sup>，日本赤十字社中央血液研究所<sup>2)</sup>）

4) 「LABScreen による HLA Class II 抗体の特異性解析について」

○菱田理恵<sup>1)</sup>，万木紀美子<sup>1)</sup>，平位秀世<sup>1)</sup>，吉澤 淳<sup>2)</sup>，丹羽紀実<sup>1)</sup>，竹川良子<sup>1)</sup>，三浦康生<sup>1)</sup>，吉岡 聡<sup>3)</sup>，芦原英司<sup>4)</sup>，  
上本伸二<sup>2)</sup>，前川 平<sup>1)</sup>

（京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部<sup>1)</sup>，同 肝胆膵・移植外科<sup>2)</sup>，同 血液腫瘍内科<sup>3)</sup>，京都薬科大学 生命薬学系病態生理学分野<sup>4)</sup>）

5) 「Luminex 法による HLA 抗体検出反応の特性解析」

○小島裕人<sup>1)</sup>，二神貴臣<sup>1)</sup>，辻野貴史<sup>1)</sup>，林 晃司<sup>1)</sup>，楠木靖史<sup>1)</sup>，藤井直樹<sup>1)</sup>，末上伸二<sup>1)</sup>，池田奈未<sup>1)</sup>，西川美年子<sup>1)</sup>，  
小川公明<sup>2)</sup>，赤座達也<sup>1)</sup>，佐治博夫<sup>1)</sup>

（公益財団法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>，NPO 法人 白血病研究基金を育てる会<sup>2)</sup>）

一般演題 (2)

11 時 50 分～12 時 30 分

座長：芦田隆司（近畿大学医学部 血液・膠原病内科）

6) 「HLA-DPB1 抗体陽性 (DSA) 患者に対する臍帯血移植」

○佐藤 壯<sup>1)</sup>, 佐藤蘭子<sup>1)</sup>, 荒 隆英<sup>2)</sup>, 小笠原励起<sup>2)</sup>, 太田秀一<sup>2)</sup>, 小林直樹<sup>2)</sup>

(社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科<sup>1)</sup>, 同 血液内科<sup>2)</sup>)

7) 「さい帯血バンク出庫前検査としての交差適合試験と患者 HLA 抗体スクリーニング」

○福森泰雄<sup>1)</sup>, 高 陽淑<sup>1)</sup>, 稲葉洋行<sup>1)</sup>, 小島芳隆<sup>1)</sup>, 石井博之<sup>1)</sup>, 南 明美<sup>1)2)</sup>, 松本加代子<sup>1)2)</sup>, 松倉晴道<sup>1)</sup>, 河 敬世<sup>1)</sup>

(日本赤十字社 近畿ブロック血液センター<sup>1)</sup>, 日本赤十字社 近畿さい帯血バンク (旧 京阪さい帯血バンク)<sup>2)</sup>)

8) 「DSA 陽性腎移植 3 例におけるクロスマッチ検査及び抗体値推移の検討」

○西村憲二<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>, 木下朋子<sup>1)</sup>, 岸川英史<sup>1)</sup>, 秋山幸太郎<sup>1)</sup>, 吉田康幸<sup>1)</sup>, 上田倫央<sup>1)</sup>, 平井利明<sup>1)</sup>, 市川靖二<sup>1)</sup>

(兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター<sup>1)</sup>)

9) 「HLA に遺伝的選択はあるか？」

○池田奈未<sup>1)</sup>, 小島裕人<sup>1)</sup>, 二神貴臣<sup>1)</sup>, 辻野貴史<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 楠木靖史<sup>1)</sup>, 藤井直樹<sup>1)</sup>, 末上伸二<sup>1)</sup>, 西川美年子<sup>1)</sup>,  
小川公明<sup>2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 佐治博夫<sup>1)</sup>

(公益財団法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会<sup>2)</sup>)

12 時 30 分～13 時 50 分

昼食・世話人会

13 時 50 分～14 時 00 分

総会

**【午後の部】**

14 時 00 分～ 16 時 00 分

**シンポジウム**

「組織適合性の将来」

座長：石谷昭子（奈良県立医科大学 法医学教室）

池亀和博（兵庫医科大学 血液内科）

- 1) 「疾患感受性と薬剤応答性：ゲノムからのアプローチ」  
徳永勝士（東京大学 医学系研究科人類遺伝学分野）
- 2) 「がん抗原ペプチドを用いたワクチン治療の原理・現況・将来展望  
—WT1 ペプチドがんワクチンをそのモデルとして—」  
岡 芳弘（大阪大学 呼吸器・免疫アレルギー内科）
- 3) 「iPS 細胞」  
木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 規制科学部門）
- 4) 「心臓移植における抗体関連型拒絶反応」  
佐藤琢真（国立循環器病研究センター 移植部）

16 時 00 分～ 17 時 00 分

**特別講演**

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

「造血幹細胞移植と組織適合性の将来」

一戸辰夫（広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野）

17 時～

**懇親会**

(10:00 ~ 11:00)

---

### オープニングセミナー

座長：谷 慶彦（近畿ブロック血液センター研究部）

1) HPA 抗原系

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）

2) 新生児同種免疫性血小板減少症（NAIT）

峯 佳子（近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター）

## 1) HPA 抗原系

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)

【背景】ヒト血小板膜上の同種抗原 (HPA: Human platelet antigen) は, GPIa, GPIb, GPIIb, GPIIIa 等の血小板膜タンパクに局在し現在までに 27 種類が報告されている。各抗原は 2 つの対立する抗原によって成り立っており, その抗原性の違いは殆ど一塩基置換によるアミノ酸配列の違いに起因する。また, 抗原頻度は人種によって偏りがあり, たとえば白人と日本人では HPA-1a 抗原, HPA-4b 抗原, HPA-5b 抗原において特徴的な違いを認めることが知られている。

一方, これらの抗原に対する抗体 (HPA 抗体) はしばしば妊娠や輸血によって産生され, 血小板輸血不応状態 (PTR) や, 新生児血小板減少症 (NAIT) の原因になることから, HPA 抗原系についての知見を得る事は臨床的意義があると言える。

中でも NAIT についてはその重篤度は様々であり, 特に NAIT を発症した患児の出産経験がある妊婦の (次回の) 出産については, 医療機関との連携および事前の適合血小板の準備が必要になる場合もある。そのため NAIT 症例については HPA の抗体および抗原の検査を正確に行い, その抗原頻度を把握しておく事は非常に重要である。近畿ブロック血液センターでは昨年度までに NAIT 疑いの症例について 234 件の依頼について検査を実施し, 患

児の母親血清から 69 例 (29.5%) の血小板抗体を検出した。また, 国内外での NAIT 症例報告やワークショップ等での周知活動により, その認知度は高まってきたことを反映して同様の依頼は年々依頼件数が増加傾向にある。

【新しい抗原の発見と検査システムの確立】HPA 発見の歴史を振り返ると, そのほとんどが PTR や NAIT の原因となった抗体の検出が発端である。言い換えれば未知の HPA を発見するためには, Private な抗体を検出することが重要である。そこで, 我々は, HPA 抗体検出用の血小板パネルの安定確保を目的とした遺伝子導入細胞の樹立と, 従来の MPHA 法だけでは検出し得なかった新しい抗体の検出および同定をするための検査システムを構築した。そして, その効果により 2007 年には HPA-7ver 抗体を検出し, その結果 HPA-7 の新しいアリルを発見した。また, 日本人家系で初報告となる HPA-21bw 抗体を血縁関係ではない 2 家系から検出し, NAIT 症例における HPA-21bw 抗体の関与を明らかにすることができた。本学会では, 現在の近畿ブロック血液センターにおける NAIT 症例の検査システムの紹介と, それによって検出した稀な抗体の性状及び抗原頻度について報告する。

## 2) 新生児同種免疫性血小板減少症 (NAIT)

峯 佳子

(近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター)

【NAIT とは】 HPA (Human Platelet Antigen) に対する抗体は妊婦でしばしば認められ、新生児同種免疫性血小板減少症 (Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: NAIT) の原因となる临床上重要な抗体である。HPA 抗体の関与する NAIT の発症頻度は 1000 ~ 2000 分娩に 1 例とされている。血小板型不適合により産生された IgG 抗体は、胎盤を通過し、児の血小板と反応し、単球貪食系により破壊され血小板減少を引き起こす。加えて点状出血、紫斑などの臨床症状を伴う場合は新生児同種免疫性血小板減少性紫斑病 (Neonatal Alloimmune Thrombocytopenic purpura: NAITP) と診断される。必要に応じ、 $\gamma$ -グロブリンの投与や適合血小板輸血などの治療がおこなわれる。重篤な場合は、頭蓋内出血、水頭症を起こす場合もあり、妊婦におけるスクリーニング検査は重要であると考えられる。また HLA 抗体による NAIT の報告もある。母血清中より移行した HLA 抗体は胎盤や胎児組織によりそのほとんどは中和されると考えられているので頻度は少ないが、胎盤機能不全や胎児仮死がある場合には NAIT を発症する事があり注意が必要である。

【当院における NAIT 症例】 当院では 1991 年より妊娠後期 28 週前後での血小板抗体スクリーニングを導入している。抗体検出頻度、および当院で経験した症例につい

て報告する。

【対象および方法】 1991 年 8 月 ~ 2011 年 12 月に当院において妊婦検診を実施した 5892 名を対象とした。方法は日本血小板型・顆粒球型ワークショップでスタンダードにおこなわれている Mixed Passive Hemagglutination test (MPHA) を用い、HLA・HPA 抗体の鑑別のためクロロキン処理法を併用した。抗原パネルは自家製 5 ~ 7 種類と、anti-HPA・MPHA・スクリーン (ベックマン・コールター・バイオメディカル株式会社) を組み合わせて使用した。

【結果】 HPA 抗体は 41 例 (0.7%)、HLA 抗体は 774 例 (13.1%) で陽性であった。HPA 抗体陽性症例のうち HPA-4b で 3 例、HPA-5b で 1 例、HPA-15b で 1 例の NAIT が発症し、2 例で HPA-5b 抗体による NAIT が疑われた。また 11 例で HLA 抗体による NAIT が疑われた。

【考察】 NAIT は臨床症状がなければ見過されていることもある。妊婦の HLA・HPA 抗体スクリーニングをおこなうことにより、出生時の NAIT の危険性を予測することができ、発症後の迅速な対応が可能である。また NAIT を経験したことの無い産科医師も多く、臨床へ関与し貢献していくことは重要であると考えられる。

(11:00 ~ 11:50)

---

**一般演題 (1)**

座長：坊地義浩 (兵庫県赤十字血液センター 学術課)

**演題番号 1) ~ 5)**

## 1) 血小板輸血不応 (PC-HLA 依頼) 患者の HLA 抗体スクリーニングの現状

○福森泰雄, 高 陽淑, 西海真弓, 西宮紘子, 稲葉洋行, 入江與利子,  
松山宣樹, 尼岸悦子, 西澤果苗, 石井博之, 松倉晴道, 河 敬世

(日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 検査部)

【はじめに】血液センターでは 1986 年より, HLA 抗体による血小板輸血不応の患者に対し, 医療機関の依頼により HLA 適合血小板 (PC-HLA) を供給している。ここ数年の PC-HLA 依頼患者の HLA 抗体検査結果の現状についてまとめたので紹介する。

【材料・方法】2008 年度から 2011 年度までの 4 年間に PC-HLA 供給のために検査依頼のあった輸血患者について解析し, 集計を行った。HLA 抗体検査は WAKFlow-HLA (湧永製薬) を基本とし, 必要に応じ LABScreen Single Antigen I (ワンラムダ社) を使用した。

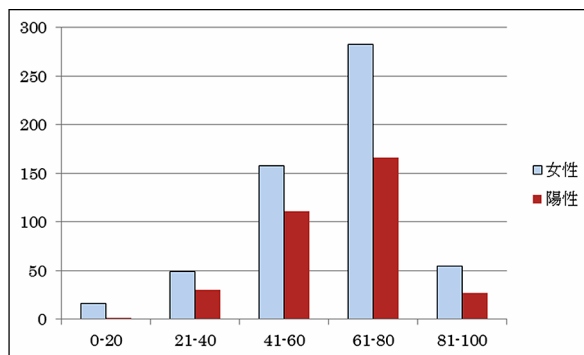
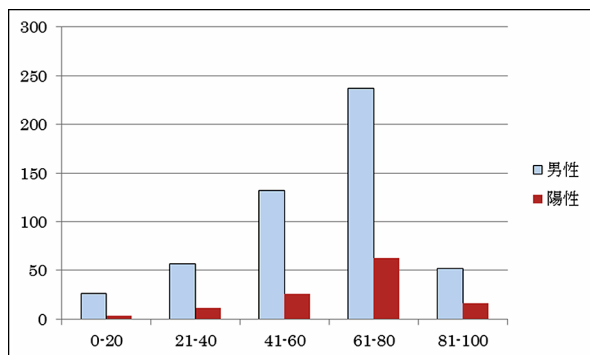
【結果・考察】4 年間の男女別, センター別依頼者数, 陽性者頻度を下表に示す。

各センターごとの集計では特に差は見られなかった。依頼患者の男女比は 1.17 であったが, HLA 抗体陽性患者比は 2.85 と女性が多かった。大阪センター分は年齢別

分布についても調査した。下図にその年齢別陽性者数のグラフを示す (左: 男性, 右: 女性)。21-80 歳までの女性は 60% 以上の抗体陽性率を示すことが分かった。年齢別陽性比は男性では 0-20 歳代の 10% から 80-100 歳代の 30% まで, 徐々に上昇したが, 女性では 41-60 歳代の 70% をピークに 81-100 歳代の 49% まで徐々に減少していた。

疾患別については約 80% が血液疾患, 残りが固形がん・その他であった。血液がんでは抗体陽性率が骨髄系のがん患者 (AML: 47%, MDS: 52%) は, リンパ系の患者 (ALL: 28%, 悪性リンパ腫: 11%) と比べより高い傾向が見られ, リンパ系の血液がんの方が輸血量が少ないか, 免疫細胞系への影響によるのか, その他の患者より抗体陽性率が低かった。

	依頼男性	依頼女性	依頼合計	陽性男性 (%)	陽性女性 (%)	陽性合計 (%)
滋賀	34	53	87	8 (24)	29 (55)	37 (43)
京都	75	89	164	15 (20)	56 (63)	71 (43)
大阪	430	483	913	99 (23)	277 (57)	376 (41)
兵庫	100	125	225	26 (26)	75 (60)	101 (45)
奈良	40	51	91	14 (35)	27 (53)	41 (45)
和歌山	26	21	47	5 (19)	12 (57)	17 (36)
合計	705	822	1527	167 (24)	476 (58)	643 (42)





## 2) 当施設における PC-HLA ドナーの DNA タイピング結果について

○中村仁美, 黒田ゆかり, 中山みゆき, 田原大志, 井上純子,  
永吉裕二, 中村功, 久田正直, 入田和男, 清川博之

(日本赤十字社 九州ブロック血液センター)

【はじめに】日本赤十字社では, PC-HLA の HLA DNA タイピングを 2010 年 4 月から PCR-SSO を原理とした Luminex 法に変更した。当施設でこれまでに確認された, 日本人集団における Rare allele (遺伝子頻度 GF 0.1% 未満) について報告する。

【方法】2010 年 4 月より 2012 年 8 月までに Luminex 法 (WAKFlow) を用いて HLA タイピングを実施した 5,598 検体を対象とした。結果は, 専用解析ソフトを用いて判定した。

【結果】Rare allele と判定された症例は, HLA-A ローカス 20 種 71 例, HLA-B ローカス 27 種 62 例および HLA-C ローカス 7 種 40 例の計 54 種 173 例(検出率 0.52%) が確認された (表 1)。また, 同一検体で複数の Rare

allele を保有する検体が 12 例 (A, B ローカス 1 例, B, C ローカス 4 例, A, B, C ローカス 7 例) 認められた (表 2)。さらに, B ローカスの両 allele が Rare allele であった検体が 1 例あった。A\*02:03 (16 例), A\*26:05 (14 例), B\*15:02 (13 例), B\*27:05 (12 例) および C\*07:01 (13 例) は, 中央骨髄データセンターにおいて Rare allele (GF 0.050%, 0.064%, 0.040%, 0.061%, 0.053%) であるが, 当施設では 0.143%, 0.125%, 0.116%, 0.107%, 0.116% と 0.1% 以上の遺伝子頻度を示した (表 3)。

【考察】Rare allele を複数のローカスで保有する検体から, 連鎖不平衡の状態にあるハプロタイプが推定された。また Rare allele の地域特異性があることが示唆された。

表 1 当施設で検出された Rare allele と遺伝子頻度 N=5,598

HLA-A			HLA-B			HLA-C		
HLA-A	n	GF(%)	HLA-B	n	GF(%)	HLA-C	n	GF(%)
A*02:03	16	0.143	B*15:02	13	0.116	C*07:01	13	0.116
A*26:05	14	0.125	B*27:05	12	0.107	C*12:03	10	0.089
A*26:06	6	0.054	B*15:28	5	0.045	C*08:02	4	0.036
A*03:02	5	0.045	B*07:05	4	0.036	C*15:05	4	0.036
A*32:01	4	0.036	B*40:07	3	0.027	C*02:02	3	0.027
A*68:01	4	0.036	B*14:01	2	0.018	C*03:23	5	0.045
A*02:18	3	0.027	B*40:50	2	0.018	C*07:02	1	0.009
A*24:08	3	0.027	B*08:01	1	0.009			
A*29:01	3	0.027	B*15:38	1	0.009			
A*30:04	2	0.018	B*39:23	1	0.009			
A*26:04	2	0.018	B*51:03	1	0.009			
A*02:15N	1	0.009	B*14:02 <sup>注2)</sup>	1	0.009			
A*02:42	1	0.009	B*14:02 <sup>注3)</sup>	1	0.009			
A*11:13	1	0.009	B*15:25	1	0.009			
A*11V <sup>注1)</sup>	1	0.009	B*15:93	1	0.009			
A*26:01	1	0.009	B*27:06	1	0.009			
A*30:02	1	0.009	B*35:03	1	0.009			
A*31:05	1	0.009	B*35:08	1	0.009			
A*31:11	1	0.009	B*35:64	1	0.009			
A*33:01	1	0.009	B*39:05	1	0.009			
			B*39:41	1	0.009			
			B*40:49	1	0.009			
			B*46:35	1	0.009			
			B*50:01	1	0.009			
			B*52:01	1	0.009			
			B*55:12	1	0.009			
			B*56:05	2	0.018			

点線より下の allele は, 中央骨髄データセンターで遺伝子頻度 0.005% 未満  
 注 1) V: variant New allele のため申請登録中 注 2) B\*14:02:01 注 3) B\*14:02:02

表2 ハプロタイプの推定

Rare alleleのローカス	ハプロタイプ	n
A, B, C	A*29:01 - C*15:05 - B*07:05	3
	A*30:04 - C*08:02 - B*14:01	2
	A*33:01 - C*08:02 - B*14:02	1
	A*30:02 - C*08:02 - B*14:02	1
A, B	A*03:02 - C*07:02 - B*08:01	1
B, C	A*26:01 - C*02:02 - B*27:05	1
	A*26:01 - C*02:02 - B*27:05	1
	A*26:02 - C*15:05 - B*07:05	1

表3 A\*02:03, A\*26:05, B\*15:02, B\*27:05およびC\*07:05の九州各県の遺伝子頻度

		福岡	佐賀	長崎	熊本	大分	宮崎	鹿児島	沖縄	九州	中央骨髄
		N									
A*02:03	n	4		1	1	3	1	6		16	
	GF	0.145		0.126	0.115	0.718	0.083	0.220		0.143	0.050
A*26:05	n	4	2	1	2		3	2		14	
	GF	0.145	0.162	0.126	0.230		0.250	0.073		0.125	0.064
B*15:02	n	1	2	1			3	6		13	
	GF	0.036	0.162	0.126			0.250	0.220		0.116	0.040
B*27:05	n	5	2	2	1		1	1		12	
	GF	0.181	0.162	0.253	0.115		0.083	0.037		0.107	0.061
C*07:01	n	4	2	1	3		1	2		13	
	GF	0.145	0.162	0.126	0.345		0.083	0.073		0.116	0.053 <sup>注1)</sup>

注1) 中央骨髄データのHLA-CのみN=88,205

### 3) Quick Step<sup>®</sup> による献血者 HLA 抗体スクリーニングの試行と 男性献血者 HLA 抗体陽性者の解析

○入江與利子<sup>1)</sup>, 勝田通子<sup>1)</sup>, 福森泰雄<sup>1)</sup>, 高 陽淑<sup>1)</sup>, 松倉晴道<sup>1)</sup>, 河 敬世<sup>1)</sup>, 岡崎 仁<sup>2)</sup>

(日本赤十字社近畿ブロック血液センター検査部<sup>1)</sup>, 日本赤十字社中央血液研究所<sup>2)</sup>)

【はじめに】輸血用製剤に含まれる HLA 抗体は、輸血関連急性肺障害 (TRALI) などの重篤な輸血副作用の原因の一つである。そこで、今回、最近の献血者の HLA 抗体保有状況を調査するため、および、HLA 抗体スクリーニングキットの候補の一つとして ELISA を使用した比較的安価な Quick Step<sup>®</sup> の使用検討するため、献血者検体に対し HLA 抗体スクリーニングを試行的に実施したので報告する。また、HLA 抗原に感作されていない男性献血者の一部も HLA 抗体を自然抗体の形で持つことが知られているが、クラス II 抗体についてはあまり報告がない。そこで、HLA 抗体陽性男性献血者の HLA 抗体特異性も解析したので、併せて報告する。

【材料・方法】近畿エリアの献血者血液を用いて、HLA 抗体スクリーニングを実施した。HLA 抗体検査キットは Quick Step<sup>®</sup> (Gene Probe 社) を使用した。また、陽性検体は可能な限り、LABScreen Single Antigen I & II (SA) を使用して抗体特異性を解析した。

【結果】Quick Step<sup>®</sup> を用いた HLA 抗体陽性者頻度 (%) は、クラス I: 女性 (8.3), 男性 (3.2), クラス II: 女性 (9.0), 男性 (4.0) であった。年齢別陽性率は下記の表に示す。男性 HLA 抗体陽性者に対し、SA を用いた抗体特異性の解析では、クラス I: A68, B67, クラス II: DR1, DR4, DR16, DQ7, DP10, DP19 が高頻度に認められた。

【考察】献血者の HLA 抗体陽性率は我々が以前 LCT 法で行っていた HLA 抗体 (2 次) スクリーニングの結果: 女性 (0.87), 男性 (0.24) と比べ 10 倍近い開きがあったが方法による感度の違いと考えられる。また、男性抗体陽性者のクラス I およびクラス II 抗体解析結果から、男性の持つクラス I 抗体は、日本人集団の持つ HLA 抗原の抗原頻度から考えてほとんど影響しないと推察された。これらの抗体は常在菌やウイルスなどの抗原刺激による自然抗体であろうと推察されたが、既報告のメキシコ人男性献血者の持つ抗体特異性と比べ、アレルレベルでみると、多少の違いが見られた。

	年齢	女性献血者					男性献血者				
		~29	30~39	40~49	50~	合計	~29	30~39	40~49	50~	合計
クラス I	検査数	166	166	166	166	664	166	166	166	166	664
	陽性数	12	19	12	12	55	8	4	5	4	21
	陽性率 (%)	7.2	11.4	7.2	7.2	8.3	4.8	2.4	3.0	2.4	3.2
クラス II	検査数	155	155	155	155	620	155	154	155	155	619
	陽性数	12	11	14	19	56	10	8	3	4	25
	陽性率 (%)	7.7	7.1	9.0	12.3	9.0	6.4	5.1	1.9	2.5	4.0

#### 4) LABScreen における HLA Class II 抗体の特異性解析

○菱田理恵<sup>1)</sup>, 万木紀美子<sup>1)</sup>, 平位秀世<sup>1)</sup>, 吉澤 淳<sup>2)</sup>, 丹羽紀実<sup>1)</sup>, 竹川良子<sup>1)</sup>,  
三浦康生<sup>1)</sup>, 吉岡 聡<sup>3)</sup>, 芦原英司<sup>4)</sup>, 上本伸二<sup>2)</sup>, 前川 平<sup>1)</sup>

(京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部<sup>1)</sup>, 肝胆膵・移植外科<sup>2)</sup>,  
血液腫瘍内科<sup>3)</sup>, 京都薬科大学 生命薬学系病態生理学分野<sup>4)</sup>)

【はじめに】京大病院では臓器移植の術前・術後に HLA 抗体検査を実施して、ドナー特異 HLA 抗体 (DSA) の検討を行っている。HLA Class II 抗体は移植後に高頻度に検出され、判定ソフト (Fusion) の解析では、自己 HLA 型に対する抗体と判定される場合がある。われわれは、このような場合に、同一 HLA 型ビーズでも陽性となるビーズと陰性のビーズが存在することを見出した。肝臓移植症例で検出した抗体の特異性と固相化されている抗原の関連について詳細に解析し、その原因について検討したので報告する。

【方法】2010.4.1 ~ 2012.11.30 に HLA 抗体検査の依頼のあった肝臓移植症例 1128 検体について LABScreen Mixed Beads で HLA 抗体のスクリーニングを行い、陽性が疑われるものは Single Antigen Beads にて抗体の有無及び特異性を決定した。

【結果】肝臓移植症例の移植前検体では Class II 抗体の陽性率が 7.1% (27/381 件) であったが、移植後では 32.3% (241/747 件) と高頻度であった。Class II 抗体陽性検体の内、DR 抗体では 268 件中 6 件 (2.2%) が自己 HLA 型に対する抗体と判定された。自己 HLA 型に対する DR 抗体が陽性と判定された検体すべてが、患者と同一アレルのビーズには反応が認められなかった。DQ 抗体は 268 件中 38 件 (14.1%) が自己 HLA 型に対する抗

体と判定された。抗体の特異性は DQ4 抗体が 11 件、DQ7 抗体が 9 件、DQ6 抗体が 18 件であった。Single Antigen Beads 法のビーズには Class II 分子が  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖ともに固相化されており、DQB1 抗原が同一であっても DQA1 抗原の異なるビーズが数種類存在する。DQ4、DQ7 抗体の合計 20 件では、同一 DQB1 抗原であっても反応性が大きく異なり、DQA1 抗原に対して特異性が高い事が判明した。DQ6 抗体については 18 件すべてで、患者と同一アレルのビーズには反応が認められなかった。

【考察】Fusion での解析では、DQB1 抗原に限って判定しているため、DQA1 抗原に対する反応であるにも関わらず、自己 HLA-DQ 型に対して抗体が陽性と判定される場合があると考えられる。DQ4、DQ7 抗体以外に DQ2、DQ8 抗体についても同様に DQA1 抗体が解析に影響を与えている場合があると考えられた。DR 抗体や DQ6 抗体については、アレルレベルで判定することが重要であることが示唆され、結果の解析には注意が必要である。肝臓移植後 HLA Class II 抗体は高頻度に検出されるが、Class II 抗体と臨床症状との関連は、抗体陽性症例の方が肝線維化のリスクが高まるとされている。DP 抗体についてはドナーおよびレシピエントのタイピングを実施していないが、今後検討する予定である。

## 5) Luminex 法による HLA 抗体検出反応の特性解析

○小島裕人<sup>1)</sup>, 二神貴臣<sup>1)</sup>, 辻野貴史<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 楠木靖史<sup>1)</sup>, 藤井直樹<sup>1)</sup>,  
末上伸二<sup>1)</sup>, 池田奈未<sup>1)</sup>, 西川美年子<sup>1)</sup>, 小川公明<sup>2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 佐治博夫<sup>1)</sup>

(公益財団法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会<sup>2)</sup>)

**【目的】** HLA 抗体検査の結果解釈をより正確に判断するために、当研究所において 2011 年に実施した抗体検査のうち、陽性と判定した例から HLA 抗体検出反応の傾向を解析した。

**【材料・方法】** 2011 年に当研究所で LABScreen Single Antigen (LS, Onelambda 社) を用いた Luminex 法の結果から、MFI  $\geq 1,000$  (MFI; Median Fluorescence Intensity) を示した症例 (HLA-Class I : 252 例, HLA-Class II : 147 例) で、造血幹細胞・臓器移植などを必要とする患者を対象とした。同一患者で複数検査した場合は初回検査を採択した。

**【結果・考察】** MFI が 10,000 以上の割合は Class I では A 座 (417/1,486, 28.0%), B 座 (1,164/3,164, 36.8%) に比べ C 座 (52/467, 11.1%) が、Class II では DR 座 (320/1,149, 27.9%), DQ 座 (169/709, 23.8%) に比べ DP 座 (74/503, 14.7%) が低く、C 座, DP 座は他の locus と比べて全体的に MFI が低値の傾向にあった。抗原性 (免疫原性)

が低い、交差反応が少ない、精製 Beads の抗原量が少ないなどの可能性が想定される。

ある集団から無作為に選択された患者に対して別の HLA にさらされる確率は、HLA の表現頻度  $x$  にドナーが患者の HLA と異なる確率  $(1-x)$  を乗じて得られる。この式からいくと、全体では集団の抗体検出頻度は HLA の表現頻度が 0.5 を最大値とした曲線を描くことになり、日本人の集団では HLA 抗体の検出頻度と HLA の表現頻度が正の相関性をもつと考えられる。ところが、解析結果では表に示すように各座位でアレル頻度との相関性がない抗原 Beads に対する反応が多く検出された。これは、免疫原性の差異の他に、① HLA 抗体の交差反応、② non HLA 抗体との交差反応 (= 自然抗体)、③ 精製抗原特有の反応が原因として挙げられる。Luminex 法による HLA 抗体検査の結果の解釈には各 Beads の特性についての十分な理解が不可欠である。

(11:50 ~ 12:30)

---

**一般演題 (2)**

座長：芦田隆司 (近畿大学医学部 血液・膠原病内科)

**演題番号 6) ~ 9)**

## 6) HLA-DPB1 抗体陽性 (DSA) 患者に対する臍帯血移植

○佐藤 壯<sup>1)</sup>, 佐藤蘭子<sup>1)</sup>, 荒 隆英<sup>2)</sup>, 小笠原励起<sup>2)</sup>, 太田秀一<sup>2)</sup>, 小林直樹<sup>2)</sup>

(社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科<sup>1)</sup>, 同 血液内科<sup>2)</sup>)

【緒言】造血幹細胞移植, 特に HLA ミスマッチ移植において患者が保有するドナー特異的 HLA-A, B, DR 抗体 (DSA) は移植源の生着に影響することがすでに報告されている。しかしそれ以外の HLA 抗原に対する抗体が生着に影響するのか詳細な検討はなされていない。今回我々は HLA-DPB1 抗体 (DSA) を保有する患者に対する臍帯血移植を経験したので報告する。

【症例】患者は 41 歳女性 (出産歴有り)。汎血球減少を主訴に来院, MDS with MF (IPSS: int-2, WPSS: high) と診断され, 治療するも症状が改善しないため造血幹細胞移植の適応と判断された。同朋と HLA が一致せず, 骨髄バンクにもドナーがいなかったため臍帯血移植を選択した。ただ, 治療後の血小板減少に対して血小板輸血不応を示し, 調べたところ HLA 抗体陽性で HLA-B, DR, DP に対する抗体が陽性であった。そのため HLA-B, DR についてはミスマッチ抗原が DSA でない CB を選択したが (有核細胞数 =  $2.16 \times 10^7/\text{kg}$ , CD34 陽性細胞数 =  $0.58 \times 10^5/\text{kg}$ ), HLA-DP については情報がなかったため検討できなかった。移植後の CB バッグから DNA を抽出し HLA タイピングを行ったところ DPB1\*05:01,- (患者) に対し DPB1\*03:01, 04:02 (ドナー) で, 患者は DSA を保有していた (MFI=22,000, 18,000)。

【臨床経過】移植前処置は G-CSF 先行の AraC+CY+TBI12Gr のフル移植。移植当日に脳出血を起こし 2 週間近く連日の HLA-PC 投与を要したが, day29 で白血球生着。その

後経過は比較的順調で明らかな GVHD 所見も認めていない。末梢血リンパ球分画において CD19 陽性細胞は 1.4% (day29), 1.0% (day36), 2.4% (day50) と B cell lineage の回復も認めている。また, 単球も末梢血中 27.3% (day29) と回復している。一方, HLA 抗体の蛍光強度は全般的に移植後急速に減少し, Class I で 22,000 から 13,000 強, Class II で 22,000 から 1,000 強まで低下している (day45)。

【考察】造血幹細胞における Class II 抗原, 特に DQ 抗原, DP 抗原の発現や DQ 抗体, DP 抗体が移植源の生着に影響するかどうかは, 現在までのところ明確ではない。そこで, 本症例の経過を検討するにあたって, 末梢血単核球における Class II 抗原の発現について flowcytometry で検討した。結果は B 細胞: DR ≒ DQ ≫ DP, 単球: DR ≒ DP > DQ, B 細胞以外のリンパ球: DR ≫ DQ ≫ DP となった。造血幹細胞に DP 抗原が発現しているかどうかは不明であるが, 移植前後で DP 抗体の蛍光強度がほとんど変化しなかったこと, day29 で生着していることから, 少なくとも本症例に関してドナー特異的 DP 抗体は生着には影響しなかったと考えられる。また, 通常臍帯血移植においては患者が保有する HLA 抗体は比較的長期に残存していることを考えると, 本症例における HLA 抗体蛍光強度の急速な低下は, 移植後ホストに対してドナー細胞による何らかの免疫反応が惹起されたことを示唆している。

## 7) さい帯血バンク出庫前検査としての交差適合試験と患者 HLA 抗体スクリーニング

○福森泰雄<sup>1)</sup>, 高 陽淑<sup>1)</sup>, 稲葉洋行<sup>1)</sup>, 小島芳隆<sup>1)</sup>, 石井博之<sup>1)</sup>,  
南 明美<sup>1)2)</sup>, 松本加代子<sup>1)2)</sup>, 松倉晴道<sup>1)</sup>, 河 敬世<sup>1)</sup>

(日本赤十字社 近畿ブロック血液センター<sup>1)</sup>, 日本赤十字社 近畿さい帯血バンク (旧 京阪さい帯血バンク)<sup>2)</sup>)

【はじめに】われわれは移植用臍帯血の出庫前検査として Luminex 法を用いた HLA タイピングの確認検査に加え、移植される患者血清の HLA 抗体スクリーニング、および同時にフローサイトメトリー (FCM) を使用して患者血清とドナー候補臍帯血白血球を用いた交差適合試験を行ってきた。それらの検査状況についてまとめたので報告する。

【材料・方法】2010 年度から 2011 年度までの 2 年間、旧京阪さい帯血バンクより出庫した臍帯血と患者の組み合わせのうち、604 例の臍帯血検体と患者検体を対象とした。HLA タイピングは HLA-A, B, C, DRB1 を Luminex 法によるキットを使用してタイピングした。HLA 抗体スクリーニングは LABScreen PRA で行い、HLA 抗体陽性であれば、さらに LABScreen Single Antigen (SA) を用いて特異性を調べた。交差試験は、FCM を用いて我々が独自に考案した 2 重染色法により、ドナー臍帯血の T, B セルに対し陽性かどうかを判定した。また、必要に応じ ICFA 法による確認を行った。

【結果】604 人の患者の内訳は、男性、352 人、女性、252 人で、年齢分布は男性のピークは 70 代で、60 代、70 代で全体の 53% を占めた。一方、女性のピークは 60

代で、60 代以上で 43% を占めた。HLA 抗体陽性率は、男性で 17%、女性で 34% と 2 倍の差があった。年齢的には男性は、30 代までは低く (10%)、40 代からほぼ 20% 弱を示した。女性は 20 代を除けば年齢とともに上昇し、25% から段階的に 50% まで上昇した。同時に実施したクロスマッチについては、クロスマッチ陽性で、HLA 抗体陽性者が 12 例 (男: 5, 女: 7) 見られた。12 例中 10 例は SA による解析でも陽性である可能性が示された。また、抗体陰性でありながら、クロスマッチ陽性が T セルで 2 例 (男: 1, 女: 1) B セルで 6 例 (男: 4, 女: 2) 見られた。HLA 抗体陰性、クロスマッチ陽性のほとんどは HLA 抗体以外の抗体であると予想された。抗体陽性者の移植取りやめ率は男女ともほぼ同じ、20% 弱であった。陰性者は約 10% であった。クロスマッチ陽性の組み合わせについては、SA の検査で対象抗原有の場合、10 例中 9 例が移植中止、対象抗原なしの例では 10 例中 3 例が移植中止であり、HLA 抗体によるクロスマッチ陽性の情報は、ドナー選択において重要な情報と言える。

現在、移植効果等についてもさらにデータを収集中である。



## 8) DSA 陽性腎移植 3 例におけるクロスマッチ検査及び抗体値推移の検討

○西村憲二<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>, 木下朋子<sup>1)</sup>, 岸川英史<sup>1)</sup>, 秋山幸太郎<sup>1)</sup>,  
吉田康幸<sup>1)</sup>, 上田倫央<sup>1)</sup>, 平井利明<sup>1)</sup>, 市川靖二<sup>1)</sup>

(兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター<sup>1)</sup>)

【はじめに】腎移植におけるクロスマッチ検査は 1969 年に Terasaki らから補体依存性細胞障害試験 (Complement dependent cytotoxicity; CDC) が報告されて以来, CDC 法が第一世代としてゴールドスタンダードの方法とされてきた。しかしながら CDC 法は抗体検出の感度と特異性に問題があり, 1990 年代に入り抗体検出感度の高い蛍光抗体標識法 (Flow cytometry crossmatch; FCXM) が開発された。FCXM 法は臨床成績との相関性が高く近年ではクロスマッチとして CDC 法と FCXM 法の両者を行っている施設も多い。一方, FCXM 法はその感度の高さゆえに疑陽性として non-HLA 抗体にも反応してしまうので Beads 法などの HLA 抗体検査結果を加味した上で移植の是非が検討されている。近年, クロスマッチ法と HLA 抗体検査法の両者の機能を兼ね備えた新しいクロスマッチ法である ICFA (Immunocomplex capture fluorescence analysis) 法が開発された。今回我々は DSA (Donor specific antibody) 陽性の 3 症例に対し生体腎移植を行ったが, この 3 症例に関しての臨床経過と ICFA 値と DSA 値 (molecules of equivalent soluble fluorochrome (MESF) 値) の推移に関して検討したので報告する。

【症例】症例 1: 58 歳女性。原疾患: 糖尿病性腎症。透析歴 1 年 6 ヶ月。ドナーは 61 歳男性, 夫婦間移植。HLA3 ミスマッチ。クロスマッチ (CDC B cell(-)/T cell(-), FCXM B cell(+)/T cell(+), Flow PRA (class I(+)/class II(+))。DSA (MESF 値; A\*24:02, 20072, B\*54:01, 10128, DRB1\*04:05, 2053), ICFA (Index; class I, 5.2(+)/class II, 1.5(-))。

症例 2: 62 歳女性。原疾患: IgA 腎症。透析歴 1 年 6 ヶ月。ドナーは 66 歳男性, 夫婦間移植。HLA3 ミスマッチ。クロスマッチ (CDC B cell(-)/T cell(-), FCXM B cell(+)/

T cell(+), Flow PRA (class I(+)/class II(-))。DSA (MESF 値; B\*15:01, 13990), ICFA (Index; class I, 3.4(+)/class II, 1.4(-))。

症例 3: 64 歳女性。原疾患: 慢性糸球体腎炎。透析歴 1 年 6 ヶ月。ドナーは 61 歳男性, 夫婦間移植。HLA3 ミスマッチ。クロスマッチ (CDC B cell(+)/T cell(+), FCXM B cell(+)/T cell(+), Flow PRA (class I(+)/class II(-))。DSA (MESF 値; B\*54:01, 31970, B\*55:01, 34495), ICFA (Index; class I, 74.2(+)/class II, 1.1(-))。全症例でタクロリムス, ミコフェノール酸モフェチル, ステロイド, 血漿交換, 大量免疫グロブリン療法による脱感作療法の末, DSA を MESF 値で 3000 以下まで低下させ移植を行った。

【結果】1. 3 症例とも DSA class I 値と ICFA class I 値はほぼ同様に推移した。

2. DSA class II に関しては, 症例 1 において, ICFA class II 値が DSA (DRB1\*04:05) 値を反映しない値を取ることがあった。一方, 移植後腎機能悪化し移植腎生検で抗体関連型拒絶反応 (Antibody-mediated rejection; AMR) が確認された際の ICFA class II 値は陽性であったが DSA class II は低値のままであった。

【考察】ICFA 法には従来の FCXM 法の非特異的反応である non-HLA 抗体に反応せず, class I 抗体検出感度は DSA の MESF 値と関連し, 移植後の AMR 発症と関連しているという特徴がある。今回の 3 症例においても class I に関しては ICFA 値と DSA 値はほぼ同様に推移した。従って DSA が class I であれば経済的な観点からも ICFA 法のみでのフォローでも良い可能性がある。一方, class II に関しては DSA 値と ICFA 値の間に不一致を認める部分があり, 今後の検討を要する。

## 9) HLA に遺伝的選択はあるか？

○池田奈未<sup>1)</sup>, 小島裕人<sup>1)</sup>, 二神貴臣<sup>1)</sup>, 辻野貴史<sup>1)</sup>, 林 晃司<sup>1)</sup>, 楠木靖史<sup>1)</sup>,  
藤井直樹<sup>1)</sup>, 末上伸二<sup>1)</sup>, 西川美年子<sup>1)</sup>, 小川公明<sup>2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 佐治博夫<sup>1)</sup>

(公益財団法人 HLA 研究所<sup>1)</sup>, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会<sup>2)</sup>)

**【目的】** 日本列島人の HLA ハプロタイプにみられる連鎖不平衡の成因として、遺伝的選択があり得るかどうかを①各ハプロタイプの遺伝確率、② homozygote は回避されるか、③母子間 KIR リガンドミスマッチ有無の観点から解析した。

**【材料・方法】** 当研究所で HLA アレル型検査を実施した家族（年齢不問）を対象とした。

①ハプロタイプの遺伝確率…HLA-A, B, DR 遺伝子型検査を実施した 4,481 家族（親子 11,011 ペア）に対し、親のハプロタイプ（1 家族 4 本）が次世代（=子）に遺伝する割合を算出。② homozygote の解析…両親が同一ハプロタイプ（HLA-A, B, DR）を共有している 284 家族（親子 702 ペア）に対し、次世代が homozygote になる確率を算出。③ KIR リガンドの解析…母子ともに HLA-A, B, C 遺伝子型検査を実施した 2,025 家族（親子 4,356 ペア）に対し、KIR リガンドミスマッチの割合を算出。

**【結果】** ①頻度上位 20 位までのハプロタイプの遺伝割合

の平均は 50.2% であった。②次世代が homozygote の実測値は 193, 理論値は 190.75 であった。③母子間での KIR リガンドミスマッチの実測値は 1,882, 理論値は 1,899 であった。KIR リガンドの種類や親子間のミスマッチ方向も実測値と理論値に有意な差はなかった。

**【考察】** すべての解析結果で HLA の遺伝的選択は見られなかった。年齢不問を考慮にいと、遺伝免疫学的に不利とされる homozygote が寿命に与える影響も少ないかも知れない。妊娠時に母体が子を異物として認識して NK が働く可能性について、古典的クラス I（HLA-A, B, C）における KIR リガンドミスマッチは次世代への遺伝頻度に影響を与えないと考えられ、NK の調節については非古典的クラス I（HLA-G, E）の役割が大きいと推察できる。

以上から、HLA ハプロタイプの連鎖不平衡には遺伝的選択の要因は低いといえる。

(14:00 ~ 16:00)

---

## シンポジウム

### 「組織適合性の将来」

座長：石谷昭子（奈良県立医科大学 法医学教室）

池亀和博（兵庫医科大学 血液内科）

- 1) 疾患感受性と薬剤応答性：ゲノムからのアプローチ  
徳永勝士（東京大学 医学系研究科人類遺伝学分野）
- 2) がん抗原ペプチドを用いたワクチン治療の原理・現況・将来展望  
—WT1 ペプチドがんワクチンをそのモデルとして—  
岡 芳弘（大阪大学 呼吸器・免疫アレルギー内科）
- 3) iPS 細胞  
木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 規制科学部門）
- 4) 心臓移植における抗体関連型拒絶反応  
佐藤琢真（国立循環器病研究センター 移植部）

## 1) 疾患感受性と薬剤応答性：ゲノムからのアプローチ

徳永勝士

(東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野)

DNA マイクロアレイによる大規模 SNP 解析および次世代シーケンサーによる全エクソーム・ゲノムシーケンス解析を活用したゲノム全域の探索により、多数の遺伝子多型・変異が疾患発症や薬剤応答性と関連することが見出されている。特に数十万種以上の SNP を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) は複合疾患 (多因子疾患) に関連する遺伝要因の同定に画期的な成果をもたらしており、我々も睡眠障害、2 型糖尿病、B 型肝炎、ネフローゼ症候群、結核などの新規感受性遺伝子、および C 型肝炎などの治療応答性遺伝子を報告してきた。本シンポジウムでは、各種疾患の感受性や薬剤応答性について、我々が見出した *HLA* 遺伝子あるいは免疫・炎症系遺伝子との関連を紹介し、その意義について考察したい。ナルコレプシーについて実施した最初の SNP based GWAS により、*HLA-DR/DQ* 領域が最も強い遺伝要因であることが確認されるとともに、新たな感受性座 *CPT1B/CHKB* を同定した (Miyagawa *et al.* Nat Genet 2008)。続いて E. Mignot ら国際共同研究グループによる GWAS により、*TCRA* および *P2RY11* といった免疫系遺伝子との関連も見出された (Hallmayer *et al.* Nat Genet 2009; Kornum *et al.* Nat Genet 2011)。さらに我々は CNV (copy number variation) 解析により、脂質代謝、免疫応答性などに関わるパスウェイ上の遺伝子群についてまれな CNV の増加を認めた (Yamasaki *et al.* submitted)。患者血清において、*TRIB2* タンパクに対する自己抗体を確認し (Toyoda *et al.* Sleep 2010)、カルニチン代謝物の異常低値を認めたことから (Miyagawa *et al.* Sleep 2011)、少なくとも 2 つの機序、すなわち自己免疫および脂肪酸の代謝異常がナルコレプシーの発症に関与すると推定さ

れる。

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の GWAS でも *HLA-DR/DQ* 領域が最も強い遺伝要因であることを確認するとともに、新規感受性遺伝子 *TNFSF15* および *POU2AF1* を同定した (Nakamura *et al.* Am J Hum Genet 2012)。また、ヨーロッパ系集団から報告された 20 種の非 *HLA* 感受性遺伝子のうち 5 種 (*IL7R*, *IKZF3*, *CD80*, *STAT4*, *NFKB1*) は日本人でも明瞭な関連を示した。これらより、PBC の発症には TNF シグナル伝達および B 細胞分化が関与すると推定される。以上のように、ゲノム全域探索によって多数の感受性遺伝子が同定されることにより疾患発症機序の理解が進み、新たな治療法開発の標的が見出される。GWAS により、C 型肝炎のインターフェロン  $\alpha$ ・リバビリン併用療法への応答性と強く関連する遺伝子として予想もしなかった *IL28* (IFN- $\lambda 3$ ) が同定された (Tanaka *et al.* Nat Genet 2009)。その SNP 検査は論文発表の翌年には先進医療として認可され、現在では臨床および臨床治験において必須の検査となりつつあり、個の医療に直結している。この成果から新たな治療法も提案され、*IL28B* と同様にインターフェロン  $\lambda$  の一員である *IL29* (IFN- $\lambda 1$ ) の治験がすでに開始されている。

このほか、眼合併症型ステーブンス・ジョンソン症候群に関与する *HLA* ほかの免疫系遺伝子について (Ueta *et al.* PLoS ONE 2012)、また関節リウマチの大規模メタ GWAS (Okada *et al.* Nat Genet 2012) および慢性 B 型肝炎の GWAS (Nishida *et al.* PLoS ONE 2012) の成果についても紹介したい。

## 2) がん抗原ペプチドを用いたワクチン治療の原理・現況・将来展望 —WT1 ペプチドがんワクチンをそのモデルとして—

岡 芳弘<sup>1)</sup>, 杉山治夫<sup>2)</sup>

(大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫アレルギー内科学<sup>1)</sup>, 機能診断科学<sup>2)</sup>)

これまでに多くのがん抗原分子が同定されている。ここでは、演者らが取り組んでいる *WT1* 遺伝子 (Wilms' tumor gene) 産物である WT1 タンパクを標的とした「WT1 ペプチドがんワクチン」をモデルとして、がん抗原に対する細胞性免疫応答をベースとしたがん免疫治療の原理、現況、将来展望を概説する。なお、2009 年の Clin. Cancer Res. 誌の Cheever らの総説において、WT1 は免疫療法の標的としてのがん抗原の優越性・有望性に関して第 1 位にランクされた。がん遺伝子としての機能を有する *WT1* は、さまざまな造血器腫瘍や固形がんに発現しており、WT1 を標的としたがん免疫療法は多くの種類の悪性腫瘍に適応できる。また、白血病幹細胞や腫瘍血管にも発現しているデータが示されており、これらもがん免疫療法の標的抗原としての優越性を示すものである。

核や細胞質に存在する WT1 タンパクから生成された WT1 ペプチド断片は HLA class I 分子との複合体としてがん細胞表面に提示され、その複合体は細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) により認識される。WT1 ペプチドワクチン (WT1 ペプチドと免疫アジュバント) を皮内または皮下注射すると、免疫アジュバントにより活性化された皮膚の樹状細胞の HLA class I 分子に WT1 ペプチドが結合し (つまり、WT1 ペプチド / HLA class I 複合体が形成され)、その活性化樹状細胞はリンパ節に移動する。そして、そこで、上記の複合体を認識する CTL を活性化し、その活性化 CTL は、細胞表面にその WT1 ペプチド / HLA class I 複合体を持つがん細胞を認識し攻撃する。

我々は、世界に先駆けて、HLA class I 拘束性のヒト WT1-CTL ペプチドの同定や WT1 を標的としたがん免疫療法のマウスモデルの構築 (それらは 2000 年に論文発表)、さらに、それらを基礎とした WT1 ペプチドワクチン療法の臨床試験を行ってきた。現在では、数百例

の症例に投与しており、我々の阪大病院を含め国内外の多くの施設より、白血病や種々の固形がんでの臨床反応例が報告されている。また、WT1 ペプチドワクチン投与による WT1 特異的免疫反応の誘導と臨床反応の出現との間に相関がみられるようであり、「WT1 ペプチドワクチン投与→WT1 特異的免疫反応誘導→臨床反応出現」という一連の反応が予想通り引き起こされていると考えられる。

WT1 ペプチドワクチンが一定の臨床反応を誘導できることは確かであると考えられる現在、そのより臨床的有用性を増強する工夫に焦点を当てることが重要である。その代表的なものが、腫瘍量の多い進行期のがんに対する化学療法併用 WT1 ペプチドワクチン投与、および、微小残存腫瘍 (minimal residual disease: MRD) にした後の WT1 ペプチドワクチン投与である。後者には、手術療法後、化学療法後、放射線療法後だけでなく、造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) 後の WT1 ワクチン投与も含まれる。また、HLA class II 拘束性の WT1-helper ペプチドの同定も我々を含むいくつかのグループから報告されており、CTL ペプチドとの併用投与による抗腫瘍活性の増強も期待される。これらの現況や将来展望について概説する。

### (参考文献)

- 1) Oka Y., et al. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Current Opinion in Immunology*, 20:211–220, 2008.
- 2) Oka Y., Sugiyama H. WT1 peptide vaccine, one of the most promising cancer vaccine: its present status and the future prospects. (Editorial) *Immunotherapy*, 2: 591–594, 2010.
- 3) 岡 芳弘. がん免疫療法の進歩と今後の展開—がんワクチン治療と補助シグナル制御を中心に—. *The Frontiers in Life Science 免疫学 Update—分子病態の解明と治療への展開—* (編集: 審良静男ら) p. 183–189, 2012.

### 3. iPS 細胞

木村貴文

(京都大学 iPS 細胞研究所)

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞 : induced pluripotent stem cell) は、胚性幹細胞 (ES 細胞 : embryonic stem cell) 特有の問題、すなわち①ヒト胚の利用を必要とする倫理上の危惧及び② HLA 不適合移植による生着不全をクリアできる細胞治療用ツールとして期待されている。

当初は患者由来の iPS 細胞を用いる自家移植に話題が集中したが、iPS 細胞の樹立から移植用分化細胞の調製までに要する時間と経費の問題が、同種移植用 iPS 細胞バンク (あるいは組織幹細胞バンク) というコンセプトをあと押ししてきた。

さまざまな臨床分野での応用が期待されている iPS 細胞ではあるが、それを用いた同種細胞移植における組織適合性の意義を説明するには、まだまだ論拠に乏しい。なるほど、造血細胞移植や臓器移植の経験あるいは遺伝学

の進歩は多くの秘鑰を与えてくれる。たとえば、移植後の拒絶反応を回避するには、患者と同じハプロタイプの HLA ホモ接合体ドナーから作製した iPS 細胞を由来とする移植が理想的で、「医療用 iPS 細胞ストック構築」の理論的背景となっている。とはいえ、HLA 一致同種移植でも拒絶反応や移植片対宿主反応は起こりうることや、移植される組織や器官によってそのような免疫応答のレベルや質に差異があることはよく知られている。

iPS 細胞を用いた細胞治療の普及には、iPS 細胞や分化細胞の有効性と安全性の担保だけでは不十分である。同種移植治療として確立させるために、どのような移植関連リスクが予想され、その低減を目指してどのようにアプローチすべきか—基礎研究から臨床医療までのシームレスな議論と試みがいよいよ必要と考えられる。

## 4. 心臓移植における抗体関連型拒絶反応

佐藤琢真<sup>1)</sup>, 宮田茂樹<sup>3)</sup>, 築瀬正伸<sup>1)</sup>, 稗田道成<sup>1)</sup>, 渡邊琢也<sup>1)</sup>, 角南春樹<sup>1)</sup>, 村田欣洋<sup>1)</sup>,  
瀬口 理<sup>1)</sup>, 和田恭一<sup>2)</sup>, 植田初江<sup>4)</sup>, 秦 広樹<sup>1)</sup>, 藤田知之<sup>1)</sup>, 中谷武嗣<sup>1)</sup>

(国立循環器病研究センター 移植部<sup>1)</sup>, 薬剤部<sup>2)</sup>, 輸血管理室<sup>3)</sup>, 病理部<sup>4)</sup>)

心臓移植における抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection: AMR) は循環動態の破綻を伴うことがあり, 適正な診断がなされない場合は重篤な予後をもたらす。本邦における心臓移植は, 900 日に及ぶ長期の移植待機を必要とし, 9 割の症例が左心補助人工心臓装着によるブリッジ例である。そのため, 心臓移植前に手術における大量輸血や, 管理中における頻回の輸血や感染症等により感作される機会が多い。我が国の心臓移植では, 全例にダイレクトクロスマッチが行われるが, 移植に際して HLA のマッチングは考慮できない。このため, AMR 発症については慎重に観察する必要がある。近年, AMR の早期診断の重要性が指摘され, 診断法と治療法が議論されている。

AMR の自然経過, 特に臓器機能の著明な悪化を伴わない AMR によって引き起こされる組織学的, 免疫組織学的及び, 血清学的な変化が長期に及ぶ経過はいまだ不明である。しかし, 移植前, 周術期, 慢性期において抗 HLA 抗体, 特にドナー特異抗体 (donor specific antibody: DSA) の有無や, 感作されやすい患者群 (high PRA 群) を把握することで, AMR 発症例においても血行動態が悪化する前に治療介入できる可能性があり, AMR の発症予防及び治療を行う上で重要である。

AMR の診断法としては, 組織病理・免疫病理及び, 血清学の面から検討が進められている。これまで診断意義があるとされる免疫蛍光抗体法による病理検査と免疫組織化学による免疫染色 (IgG, IgM, IgA, C3d, C4d, C1q, CD68 等) に加え, パネル反応性抗体 (PRA) の測定, Single Antigen beads を用いた HLA 抗体の特異性の同定及び, DSA 保有の有無とその定量化といった血清学的検査が, 早期診断においてより重要な位置を占めるようになってきている。

当センターの移植 50 症例につき検討を行ったところ,

AMR の発症は 6 例であり, 5 例が移植後急性期であった。その内, 血行動態破綻をきたした症例はなく, 6 症例全例が無症候性発症の段階で診断された。移植直前の細胞障害性ダイレクトクロスマッチは全例陰性であったが, 1 例は移植後に施行したフローサイトクロスマッチで陽性であった。なお, 術前 PRA 陽性例は 12 例, DSA 陽性例は 5 例であった。病理学的検討において, 6 例全例で免疫組織学的変化がみられ, 内 3 例では免疫組織学的変化に加え, 組織学的変化がみられた。これら 3 例に対してはステロイドパルス, 血漿交換療法及び, 免疫グロブリン療法による治療が行われ, その後の経過は良好である。

急性期に治療が行われた AMR 症例のうち 1 例が, 移植後 4 年目に左冠動脈起始部の冠動脈狭窄進行を認め, 冠動脈バイパス術が施行された。DSA は移植後 1 年目で陰性化が確認されていたが, PRA は 40% と高値が続いており, 抗 HLA 抗体を 6 種類有していた。このため, 手術に伴う輸血による AMR 発症が懸念され, オフポンプによる最小限の手術侵襲を考慮するとともに, 用いる血液製剤として洗浄赤血球及び, HLA 適合血小板を準備した上で手術を行った。術後, PRA の上昇なく経過し, 術二か月後の心筋生検においても AMR を疑う所見はなかった。

高度に感作された心臓移植後患者において, 周術期における AMR 発症の危険性や, その後の冠動脈病変との関連性は多数報告されているが, 移植後慢性期における血液製剤使用の危険性については未だ報告がない。しかし, 高度に感作された患者においては, 慢性期においても AMR 発症に対する配慮が必要で, 血液製剤を用いる場合において, AMR 発症予防への対策は, 今後も重要な課題と考える。

(16:00 ~ 17:00)

---

**特別講演**

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

「造血幹細胞移植と組織適合性の将来」

一戸辰夫（広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野）



## 造血幹細胞移植と組織適合性の将来

一戸辰夫

(広島大学原爆放射線医科学研究所 血液・腫瘍内科研究分野)

造血幹細胞移植における組織適合性の研究は、周知の通り、主要な HLA 抗原をできうるかぎり適合させることを目標理念としてその歴史を開始した。しかし、近年では、ドナーとレシピエント間における組織適合性の相違が腫瘍細胞に対する有効な免疫応答に寄与するという仮説に基づき、マイナー組織適合性抗原や HLA の不適合、KIR-KIR リガンドの不適合等を利用した新たな幹細胞ソース選択法の有用性が検討されている。また、いずれも前向きコホートで検証されたものではないが、網羅的

なゲノム解析を通じて HLA 以外の特定の遺伝子多型が移植成績に影響を与え得るという研究結果も多く得られている。近未来の造血細胞移植においては、これらの膨大な情報をどのように統合し、ドナー選択の指針として実臨床に導入し得るかが新たな課題となりつつある。本講演では昨年開催された第 16 回国際 HLA ワークショップでの話題も含め、今後の組織適合性研究がどこまで造血幹細胞移植のベッドサイドに近づくことができるのか、その可能性と方向性を展望してみたい。

## 日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

### I. 投稿について

**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、他誌に投稿中ではないものに限る。

**資 格**：著者（共著者を含む）は原則として本学会会員に限る。

**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、1980年ヘルシンキ宣言（第18回 World Medical Assembly にて採択）に基づくと共に、当該施設の倫理委員会の承諾を得たものでなければならない。また動物を用いた研究については「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（1980年日本学術会議決議）などを遵守し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。

**審 査**：投稿論文掲載の採否は当誌編集委員会において決定し、審査は複数の査読制で行う。審査の結果を踏まえ修正、削除、加筆などをお願いする場合がある。

**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。

**掲載料**：掲載は無料であるが、カラー写真など特別印刷に関わる経費は著者の実費負担とする（カラー印刷を希望の場合にはその旨明記）。

**別 冊**：別冊は有料とし、その経費は別冊部数やページ数による（別冊希望の場合は著者校正の際にその旨明記）。

### II. 原著執筆書式

#### 1. 執筆要項

400字詰め原稿用紙換算で30枚（刷り上がり12頁程度）以内とする。図、表、写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文は Microsoft Word

で作成し、図、表、写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は全て CD ロムに保存し、CD ロムに A4 サイズでプリントアウトした原稿 3 部 を添えて編集長宛に送付する。

#### 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を記し、脚注として連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、E-mail アドレスを記載する。タイトル、著者名、所属は下記の形式に従う。

Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia in the HLA class II region: correlations with Y chromosome microdeletion and spermatogenesis.

Tetsuya Takao<sup>1)</sup>, Akira Tsujimura<sup>1)</sup>, Masaharu Sada<sup>2)</sup>, Reiko Goto<sup>2)</sup>, Minoru Koga<sup>3)</sup>, Yasushi Miyagawa<sup>1)</sup>, Kiyomi Matsumiya<sup>1)</sup>, Kazuhiko Yamada<sup>2)</sup>, Shiro Takahara<sup>1)</sup>

1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan

3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

心移植における FlowPRA 法を用いた HLA 抗体検出の意義

山本 賢<sup>1)</sup>, 佐藤 清<sup>1)</sup>, 佐田 正晴<sup>2)</sup>, 永谷 憲歳<sup>2)</sup>, 中谷 武嗣<sup>3)</sup>

1) 国立循環器病センター臨床検査部

2) 国立循環器病センター再生医療部

3) 国立循環器病センター臓器移植部

#### 3. 本文一：日本語での投稿

・2頁目に400 words 以内の英文要旨（和文要旨必要なし）、日本語および英語のキーワード（5語以内）を記載する。尚、英文要旨作成については編

集委員会による対応も可能（希望の場合、400字以内の日本語要旨を記載しその旨明記）。

・3頁目より、「はじめに」、「材料と方法」、「結果」、「考察」、「引用文献」の順に記載する。

①専門用語以外は常用漢字、新かなづかいに従い記述する。

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, μl, %, °Cなど）を、数字はアラビア文字を用いる。

#### 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」、「References」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, μl, %, °Cなど）を、数字はアラビア文字を用いる。

#### 5. 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、引用順に一括し記載する。著者名、編集者名は筆頭者から3名まで列記し、他または*et al.*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): 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: 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), 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

400字詰め原稿用紙換算で15枚（刷り上がり6頁程度）以内とする。図、表、写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文はMicrosoft Wordで作成し、図、表、写真はMicrosoft PowerPointを使用する。原稿は全てCD-ROMに保存し、CD-ROMにA4サイズでプリントアウトした原稿3部を添えて編集長宛に送付する。

#### 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を記し、脚注として連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、E-mailアドレスを記載する。タイトル、著者名、所属は「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

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。総原稿枚数は編集委員会で指定し、原則的に原著執筆書式に準じる。

## V. 原稿送付先

〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2  
 大阪大学大学院医学系研究科 J8  
 先端移植基盤医療学  
 日本組織適合性学会誌 MHC  
 編集長 高原 史郎  
 担当 谷本 佳澄 <E-mail: tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp>  
 Tel: 06-6879-3746 Fax: 06-6879-3749

	総原稿枚数 (図表, 文献含む)	図表数	文献数	要旨	原稿タイトル 所属, 著者	キーワード 数	査読	著者 校正
原著	30 枚以内	5~10個 以内	20 個以内	英文原著 英文 250 words 以内 和文原著 英文 400 words 以内	和英併記	5 個	有り	1 回
短報, 症例報告	15 枚以内	5 個以内	10 個以内	和文、英文とも英文 200 words 以内	和英併記	3 個以内	有り	1 回
総説, その他	その都度指定	適宜	20 ~ 30 個前後	和文 400 字以内	和英併記	5 個	なし	1 回

## 編集後記

学会誌 (MHC) が本号から完全に電子化 (オンライン出版) します。MHC は平成 8 年 7 月 24 日に学術刊行物として認可され、今年で 18 年目となります。この間、多彩な日本組織適合性学会の活動を反映して多数の原著論文・総説が掲載されました。これらの内容は学会員のみならず関連する基礎・臨床の領域の多くの研究者の方々お役にたってきました。

今後は日本組織適合性学会の様々な活動のさらなる活性化と他領域への波及を目的とし、具体的には原著論文・総説へのアクセスの利便性と迅速化を実現するため、日本組織適合性学会は MHC の J-STAGE での公開に踏み切りました。結果的に印刷・郵送費のコストダウンにも成功しました。

今後は学会員の皆様に今まで以上にモバイル端末からも頻繁に MHC を Web 上で閲覧していただき、学会員同士や関連する領域の研究者とのコミュニケーションを増やし、MHC 研究のさらなる発展を実現させたい所存です。

高原 史郎

## 「MHC」バックナンバー

一冊 ¥2,000 にて購入できます。学会事務局までお問い合わせ下さい。なお在庫僅少の号もありますので、万一品切れの際にはご容赦ください。

## 日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報や HLA 遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

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

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

### 学会事務局からのお知らせ

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

委託業務は以下の通りです。

入退会手続

届け出事項の変更手続

年会費請求手続

学会誌等の発送

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

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

また、これらに関するお問い合わせ、届け出については、[学会事務支局 Email:jshi@nacos.com](mailto:jshi@nacos.com) にて取り扱います。

その他の学会業務に関するお問い合わせは、従来通り学会事務局にて受け付けます。

### 学会事務局

〒 860-8556

熊本市中央区本荘 1-1-1

熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野内

電話 : 096-373-5313

FAX : 096-373-5314

E-mail : [jshijimu@kumamoto-u.ac.jp](mailto:jshijimu@kumamoto-u.ac.jp)

### 事務支局

〒 602-8048

京都市上京区下立売通東入ル

中西印刷株式会社 学会部内

日本組織適合性学会事務支局

電話 : 075-415-3662

FAX : 075-415-3661

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

## MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2013 年 3 月 20 日発行 20 巻 1 号, 2013

定価 2,000 円

発行 日本組織適合性学会 (会長 西村 泰治)

編集 日本組織適合性学会編集委員会 (編集担当理事 高原 史郎)

平成 8 年 7 月 24 日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会 (事務局担当理事 西村 泰治)

〒 860-8556 熊本市中央区本荘 1-1-1

熊本大学大学院生命科学研究部 免疫識別学分野内

印刷・中西印刷株式会社

〒 602-8048 京都市上京区下立売通小川東入ル西大路町 146