

日本組織適合性学会誌

第 22 巻第 1 号 平成 27 年 4 月 20 日発行

目 次

日本組織適合性学会からのお知らせ

第 24 回日本組織適合性学会大会の御案内	1
2015 年度学術賞ならびに学術奨励賞の募集について	3
組織適合性検査技術者認定制度 平成 27 年度 認定 HLA 検査技術者講習会のお知らせ	6
初心者講習会の開催及び参加希望者募集について	7
平成 26 年度 認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果	8
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿 (2015)	11

第 18 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	12
—検査法別解析 DNA タイピング Luminex 法—	黒田ゆかり	16
—検査法別解析 DNA タイピング SSO 法 (INNO-LiPA) —	安尾美年子	18
—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	22
—検査方法別解析 抗体検査 FlowPRA 法—	金本 人美	25
—検査法別解析 抗体検査 LABScreen—	杉本 達哉, 土田 文子	26
—検査法別解析 抗体検査 WAKFlow—	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, 結果の表記法—	橋口 裕樹	31
—部門別解析および結果評価 (抗体部門) —	高 陽淑	33
【追加発言】—血液を用いた「クロスマッチ」の実施報告—日本組織適合性学会 QCWS との連携—	橋口 裕樹	35

総説

HLA 拘束性 T 細胞を誘導可能な末梢血モノサイト由来樹状細胞の大量産生法の開発	今村 悠哉, 春田 美和, 富田 雄介, 松村 桂子, 池田 徳典, 高松孝太郎, 西村 泰治, 千住 覚	37
-------------------------------------------	----------------------------------------------------------	----

第 13 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集	44
--------------------------	----

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定	67
----------------------	----

編集後記	70
------	----

第 24 回 日本組織適合性学会大会の御案内

第 24 回日本組織適合性学会大会

大会長 湯沢賢治

(国立病院機構水戸医療センター 臨床研究部長 臓器移植外科)

1973 年に開催された第 1 回日本組織適合性研究会から数えて 43 年目になります歴史と伝統のある日本組織適合性学会の第 24 回大会を担当させて頂くこととなりました。外科医になって 3 年目の 1984 年に臓器移植の道を志し、一貫して臓器移植を専門としてきた外科医です。30 年前には、現在のように有効な免疫抑制剤がなく、移植成績向上のためには、組織適合性を合わせることも出来ず、学会（当時は研究会）には多くの移植医が参加していたものです。その後、免疫抑制剤の格段の進歩により、移植成績が向上し、臓器移植における組織適合性の意義が薄れてしまった感があり、本学会から多くの移植医が去りました。しかし、現在、臓器移植の臨床の現場では、高感度クロスマッチ検査の導入、抗体陽性症例に対する処置、抗体検査の意義が明らかになり、正に移植臨床の現場への本学会の回帰が求められています。

第 24 回大会は「移植医療の壁 – 個体の多様性を解き明かす –」をテーマとして、組織適合性の原点とも言える臓器移植の臨床での組織適合性の関わりを取り上げ、さらに基礎研究から臨床までの多様なテーマで最新の成果を取り上げたいと考えています。会場は日本三大名園である「偕楽園」に近いホテルにしました。多数のご参加をお待ちいたしております。

会 期：平成 27 年 9 月 10 日（木）～ 12 日（土）

会 場：ホテルレイクビュー水戸

〒310-0015 茨城県水戸市宮町 1-6-1 TEL: 029-224-2727

演題応募：平成 27 年 4 月 1 日～ 5 月 31 日

大会内容

特別講演 2 題、シンポジウム 2 セッション、一般演題、学会賞受賞講演、
学術奨励賞候補者発表、QCWS 集会、教育講演（認定 HLA 技術者講習会）、
初心者講習会、ランチョンセミナー、その他

演題募集

種別：シンポジウム 1（公募、一部指定）「移植医療における抗体 – 現状と課題 –」

シンポジウム 2（公募、一部指定）「MHC 研究の新たな展開」

一般演題（口演およびポスター）

学術奨励賞

演題募集期間：平成 27 年 4 月 1 日（水）～ 5 月 31 日（日）

演題登録方法：大会 HP よりオンライン演題応募のみとさせていただきます。

詳細は以下大会 HP をご覧ください。 <http://itpc.co.jp/jshi24/>

大会事務局

本大会に関するお問い合わせは、下記の大会事務局にお願いいたします。

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

〒311-3193 茨城県東茨城郡茨城町桜の郷 280

第24回日本組織適合性学会大会事務局

E-mail: ishoku@mn.hosp.go.jp

大会ホームページ

<http://www.itpc.co.jp/jshi24>

※参加登録、宿泊予約、プログラムの詳細などについては、大会ホームページで、順次お知らせします。

2015 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

日本組織適合性学会においては、昨年度より、高い権威をもつ「学会賞」と若手学会員の学術研究を奨励する「学術奨励賞」を設けています。

この学会賞は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を表彰するものです。学会を代表する学会員を選ぶ慎重を要する作業であり、推薦された候補者について、公平かつ十分な審議をへて、受賞者を決定すべきものです。そこで昨年度、学術奨励賞も含めて、各賞候補の資格や選考の手続きなどを明確にした、規定を作成いたしました。本規定において、学会賞は組織適合性ならびに免疫遺伝学の分野において顕著な業績をあげ、本会の発展に特筆すべき功績を残した者を表彰し、もってその栄誉をたたえることを目的とし、一方学術奨励賞は組織適合性ならびに免疫遺伝学の分野における秀でた学術的研究を若い学会員に奨励するために優れた若手研究者を表彰し、もって組織適合性分野の発展に寄与することを目的としています。

本規定に則り、2015 年度日本組織適合性学会の学会賞並びに学術奨励賞を以下の要領で募集します。なお昨年度の規定から若干の変更がありますので、以下の要領にしたがい、ふるってご応募ください。

1. 助成内容

組織適合性ならびに免疫遺伝学の分野において顕著な業績をあげ、本会の発展に特筆すべき功績を残した学会員または名誉会員（年齢制限無し）に学会賞を授与します。また、2015 年度学術集会大会（第 24 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、原則として 2015 年 4 月 1 日時点で満 45 才以下）に学術奨励賞を授与します。授与件数は学会賞 1 名（賞金 10 万円）、学術奨励賞若干名（賞金 5 万円、あるいはそれ以下）を予定しています。

2. 応募資格

(1) 学会賞

本学会の正会員として 5 年以上の会員歴があり、以下の条件を満たす者とする。

- 1) 組織適合性ならびに免疫遺伝学の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特筆すべき功績を残した実績を有すること。
- 2) 本学会の正会員または名誉会員であること
- 3) 正会員である場合は、当該年度の会費を納入済みであること。

(2) 学術奨励賞

本学会の正会員（当該年度大会までに正会員となる者を含む）であり、以下の条件をすべて満たす者とする。

- 1) 組織適合性ならびに免疫遺伝学の分野に関する学術研究において、その内容が優れていること。
- 2) 当該年度の会費を納入済みであること、または当該年度の大会までに正会員として会費を納入すること。
- 3) 学術奨励賞を受賞した者は、原則として次年度以降も正会員を継続すること。
- 4) 当該年度の大会に、筆頭演者として演題に応募すること。
- 5) 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。
- 6) 応募しようとする演題の内容が、本学会に未発表であること。

- 7) 受賞後に MHC へ原著論文あるいは総説を執筆すること。
- 8) 過去 3 年間に学術奨励賞を受賞していないこと。
- 9) 学術奨励賞の応募者は当該年度の 4 月 1 日において、原則として 45 才以下であること。

3. 応募・推薦方法

(1) 学会賞

学会賞は自薦または他薦とし、前年度の 12 月末までに、候補者に関する以下の書類を日本組織適合性学会事務局 (e-mail: jshijimu@kumamoto-u.ac.jp) および学術奨励賞担当理事 徳永勝士 (e-mail: tokunaga@m.u-tokyo.ac.jp) にメール添付で提出する。なお、他薦の場合には、推薦者は正会員であることが必要です。

1) 履歴書

書式は自由とし、A4 用紙にて 1 枚程度とする。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) 業績概要

書式は自由とし、A4 版用紙にて 2～3 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 編について、各 1 部 (コピーも可) 添付する。

4) 応募動機 (他薦の場合は推薦書)

書式は自由とし、学会賞への応募理由 (他薦の場合は推薦理由) を A4 版用紙 1 枚に記載する。

(2) 学術奨励賞

学術奨励賞に応募しようとする会員は、演題申込み締切りまでに、以下の書類を日本組織適合性学会事務局 (e-mail: jshijimu@kumamoto-u.ac.jp) および学術奨励賞担当理事 徳永勝士 (e-mail: tokunaga@m.u-tokyo.ac.jp) にメール添付で提出する。

1) 抄録

一般演題に応募した抄録

2) 応募ファイル

1 頁目に、演題名、演者 (全員)、所属 (全員)、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、項目ごとに 300-400 字程度でまとめる。

4. 選考および結果通知について

(1) 学会賞

評議員の中から評議員による選挙で選ばれた選考委員 7 名により構成される学会賞選考委員会が選考を行う。委員会は、応募・推薦のあった学会賞受賞候補者より、1 名を受賞候補者として選考した後に、これを理事会に推薦するものとする。なお、委員は密接な利害関係者の審査に加わらない。理事会は、学会賞選考委員会から推薦された受賞候補者 1 名について審議し、受賞者を決定した後に、評議員会の承認を経て総会に報告するものとする。

(2) 学術奨励賞

理事長、学術賞担当理事、学会賞選考委員、並びに学術賞担当理事が選考した若干名の評議員によって

構成される学術奨励賞選考委員会が選考を行う。委員会は、応募のあった奨励賞受賞候補者の中から、当該年大会中の各候補者の口頭発表内容の評価等を参考にして、奨励賞選考委員会にて若干名を受賞候補者として選考した後、これを理事長に推薦し、承認を得る。なお、委員は密接な利害関係者の審査に加わらない。当該年大会中に選考結果を公表し、表彰式を実施する。

5. 受賞者にかかる義務について

(1) 学会賞

学会賞受賞者は、原則として受賞年度に開催される大会期間中に、受賞講演を行う。

(2) 学術奨励賞

学術奨励賞受賞者は、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）を学会宛に提出する。

6. 助成金の使途

使途について特に制限はないが、学会賞・学術奨励賞であることの趣旨をご理解の上、適切に使用しなければならない。なお、学術奨励賞受賞者については使途とその内訳を後述の報告書に記載する。

7. 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: jshijimu@kumamoto-u.ac.jp）または学術奨励賞担当理事 徳永勝士（e-mail: tokunaga@m.u-tokyo.ac.jp）にお願いします。

**組織適合性検査技術者認定制度
平成 27 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 27 年 9 月 12 日（土曜日）時刻：8 時 30 分～10 時 30 分

会 場：第 24 回・日本組織適合性学会 大会会場

ホテルレイクビュー水戸 2 階（飛天鳳凰）

〒310-0015 茨城県水戸市宮町 1 丁目 6-1（TEL029-224-2727）

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。

(1) HLA に関する基礎医学的な講演

土屋 尚之 先生（筑波大学医学医療系分子遺伝疫学研究室・教授）

「リウマチ・膠原病と HLA」

(2) HLA タイピングあるいは抗 HLA 抗体検査に関する講演

椎名 隆 先生（東海大学医学部分子生命科学・准教授）

「次世代シーケンサーを用いた HLA 領域のゲノム解析と HLA タイピング」

(3) 臓器移植の臨床医学に関する講演

剣持 敬先生（藤田保健衛生大学医学部臓器移植科・教授）

「わが国の臓器移植・臓器移植の現状と将来展望」

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。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。

初心者講習会の開催及び参加希望者募集について

組織適合性学会教育委員会
委員長 太田正穂
組織適合性学会初心者教育部会
部会長 成瀬妙子

日本組織適合性学会では、学会大会プログラムにおいてQCワークショップや技術者講習会を開催し、学会員の組織適合性検査に関わる知識や技術の向上を目指しているところです。しかしながら、組織適合性検査の初心者や各検査法に関する基礎的な情報を要望する会員に十分な説明を行う時間を確保できない状況です。

そこで、今年度も下記の通り、HLA および HLA 検査に関する基礎的な内容の教育訓練を目的とした「初心者講習会」を大会期間中に開催することと致しました。

記

- 1, 対 象：学会員および大会参加者
(組織適合検査の初心者で、HLA の基礎的な内容の教育訓練を希望する方)
- 2, 日 時：日本組織適合性学会第 24 回大会期間中
- 3, 会 場：ホテルレイクビュー水戸
- 4, 定 員：20 名程度
(定員数を超える場合は、当委員会で選考を行う場合があります。)
- 5, 参加費：無料
- 6, その他：申し込みに関する詳細は 6 月中旬に日本組織適合性学会のホームページ (<http://jshi.umin.ac.jp/>) に掲載致します (応募締め切りは 7 月末を予定しています)。

以上

平成 26 年度 認定 HLA 検査技術者講習会アンケート集計結果

開催日時：平成 26 年 9 月 13 日（土）10:00～12:00

会 場：第 23 回・日本組織適合性学会大会会場

長崎大学医学部キャンパス（坂本キャンパス）

（長崎市坂本 1-12-4）

1) 旅費・滞在費の財源について 回答者 73 名

①	私費	10 名 (13.7%)
②	職場からの支援	61 名 (83.6%)
③	その他	2 名 (2.7%)

③その他の内訳：県からの受託費 1 名

2) 職場・職務について

職場 回答者 71 名

①	病院	42 名 (59.2%)	輸血部：15 名，検査部：17 名
②	血液センター	6 名 (8.4%)	
③	検査センター	7 名 (9.9%)	
④	大学(国公立, 私立)	8 名 (11.3%)	
⑤	民間企業	6 名 (8.4%)	
⑥	その他	2 名 (2.8%)	公的バンク：1 名，研究：1 名

職務 回答者 70 名

①	臨床医	2 名 (2.9%)	
②	臨床検査業務	47 名 (67.1%)	臓器：14 名，輸血：23 名，造血幹：12 名
③	検査受託業務	4 名 (5.7%)	
④	製造業関連業務	3 名 (4.3%)	
⑤	製品開発業務	2 名 (2.9%)	
⑥	教育業務	1 名 (1.4%)	
⑦	研究業務	10 名 (14.3%)	
⑧	その他	1 名 (1.4%)	

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 69 名

①資格取得済み 34 名 (49.3%)

②資格取得希望 30 名 (43.5%)

③資格取得希望しない 5 名 (7.2%)

取得希望者の内訳 回答者 29 名

- ② - I : 認定技術者 19 名 (65.5%)
- ② - II : 認定指導者 4 名 (13.8%)
- ② - III : 未定 6 名 (20.7%)

- 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 70 名
あり 60 名 (85.7%) なし 10 名 (14.3%)

[意見]

場所が解らなかった。

テキストが開けなかった。

- 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)

回答者 63 名 平均 4.7 点

- 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	4.1	4.0

- 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)

評価平均点	その他 要望
4.5	海外の情報をもっと多くして欲しい。 時間的に詰め込み過ぎず、ゆとりが欲しい。 もっと詳細な話を聞きたい。 解り易かった。

- 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
ホームページ	11 名
メール	2 名

9) その他の意見

- 講習テキストの入手がわかりにくかった。HP からのダウンロードのリンク先の明記をお願いしたい。
- テキストの掲載をわかりやすくしてほしい。
- 学会の初日、朝だと、前日のうちの開催地へ入らねばならず、前日仕事だときびしい場合も、学会中日を希望します。
- いつも開催時期がわかりづらい。
- 仕事上、休日に開催して頂きたい。
- 抄録集の事前配布をしてほしい。
- 抄録は郵送して欲しい。
- 連続性のある講習会も必要かと思う。
- 大学までのアクセスがわかりづらく大変だった。

組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿（2015）

組織適合性技術者認定制度委員会

委員長：田中 秀則

副委員長：中島 文明

委員：石川 善英、太田 正穂、木村 彰方、高 陽淑、酒巻 建夫、徳永 勝士、成瀬 妙子、
西村 泰治

資格審査部会

部長：成瀬 妙子

副部長：

部員：安藤 麻子、中島 文明、清水まり恵

教育部会

部長：太田 正穂

副部長：笠原 正典

部員：一戸 辰夫、土屋 尚之、木村 彰方、高 陽淑、津田 とみ、徳永 勝士、中島 文明、
成瀬 妙子、西村 泰治、平山 謙二、湯沢 賢治

試験問題検討部会

部長：木村 彰方

副部長：平山 謙二

部員：石川 善英、一戸 辰夫、太田 正穂、田中 秀則、徳永 勝士、成瀬 妙子、西村 泰治、
湯沢 賢治

QCワークショップ部会

部長：田中 秀則

副部長：成瀬 妙子、中島 文明、高 陽淑、橋口 裕樹

部員：石塚 敏、一戸 辰夫、太田 正穂、川井信太郎、吉川 枝里、木村 彰方、黒田ゆかり、
小林 孝彰、藤原 孝記、宮崎 孔、湯沢 賢治

参考マニュアル作成 WG (新設)

HLA タイピング WG：成瀬 妙子（リーダー）、黒田ゆかり、吉川 枝里、小川 公明

抗HLA抗体 WG：高 陽淑（リーダー）、川井信太郎、藤原 孝記、新地 隆文

クロスマッチ WG：橋口 裕樹（リーダー）、石塚 敏、黒木 聖久、高山 智美、藤井 明美、
金本 人美

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 18 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¹⁾, 中島文明¹⁾

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[#]

¹⁾ 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 26 年 1 月に QCWS 開催及び参加申込みの案内を、学会誌および学会ホームページ（以下、学会 HP）に掲載し、平成 26 年 2 月までに 73 施設（DNA-QC:69 施設、抗体 QC:54 施設）からの参加申し込みがあった（表 1）。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。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択は、第 22 回大会会期中に開催した QCWS 部会で協議した基本的な方針に従って行った。また、各施設から提出された結果の解析は、検査法別と臨床部門別に解析を行うこととし、臨床部門（以下 4 部門、輸血、臓器移植、造血幹細胞移植、その他（研究等））については、参加申込書の記載に従った。

4 月 1 日に試料を発送し、4 月 10 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、結果提出の締め切りを 5 月 10 日とした。最終的には 73 施設（DNA-QC : 68 施設、抗体 QC : 52 施設）から結果が提出された。5～6 月中に生データの取りまとめ、6 月 25 日に各解析担当者にデータが配布され、解析が行われた。各検査法別の解析結果を 7 月 20 日に締め切り、8 月上旬までの間、各検査法解析担当者間で解析結果の取り纏めについてメールでのディス

カッションを行い、解析結果の公表内容を統一化した。平成 26 年 8 月中旬までに、最終報告データを作成し、解析結果をホームページで公開し、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。また、解析結果は QCWS 集会での報告及び本学会誌（MHC）への掲載を行った。

2. QCWS のテーマおよび試料選択について

DNA-QC のテーマは、昨年同様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学会の表記法に従って正確に表記すること、④ DNA タイピング結果に対応した HLA 抗原型に正確に読替えること、⑤日本人集団における ambiguity となるアレルの解説の 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 アレルであること」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

[#] 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¹⁾, 中島文明¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 一戸辰夫³⁾, 石塚 敏⁴⁾, 太田正穂⁵⁾, 吉川枝里⁶⁾, 木村彰方²⁾, 高 陽淑⁷⁾, 小林孝彰⁸⁾, 橋口裕樹⁹⁾, 宮崎 孔¹⁰⁾, 森島泰雄¹¹⁾, 安波道郎¹²⁾, 山本 賢¹³⁾, 湯沢賢治¹⁴⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液研究所, ²⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野, ³⁾ 東京女子医科大学中央検査部移植関連検査室, ⁴⁾ 広島大学原爆放射線医学研究所血液・腫瘍内科研究分野, ⁵⁾ 信州大学医学部, ⁶⁾ 東海大学医学部生命科学, ⁷⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター, ⁸⁾ 名古屋大学移植免疫学寄附講座, ⁹⁾ 福岡赤十字病院, ¹⁰⁾ 日本赤十字社北海道ブロック血液センター, ¹¹⁾ 愛知県がんセンター研究所疫学・予防部, ¹²⁾ 長崎大学熱帯医学研究所, ¹³⁾ 国立病院機構大阪医療センター臨床検査部, ¹⁴⁾ 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

表 1 第 18 回 QCWS 参加施設

(受付日付順)

1	熊本大学医学部附属病院	中央検査部	38	岐阜大学病院	検査部
2	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部	39	中四国ブロック血液センター	検査一課
3	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター	40	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
4	高知医療センター	SRL検査室	41	国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
5	がん・感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科	42	株式会社 ベリタス	技術推進部
6	関西医科大学附属枚方病院	輸血・細胞療法部	43	沖縄県立中部病院	検査科
7	日本赤十字社 中央血液研究所	研究開発部	44	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
8	九州ブロック血液センター	検査二課	45	虎の門病院	輸血部
9	獨協医科大学病院	臨床検査センター 遺伝子・HLA検査室	46	独立行政法人 国立病院機構 米子医療センター	臨床検査科
10	東海北陸ブロック血液センター	検査三課	47	社会保険中京病院	検査部
11	北里大学病院	臨床検査部 DNA検査室	48	国立病院機構千葉東病院	臨床検査科
12	静岡県立病院機構 静岡県立総合病院	検査部 輸血・細胞治療科	49	県立広島病院	臨床研究検査科
13	徳島大学病院	輸血・細胞治療部	50	東海大学	医学部基礎医学系 分子生命科学
14	株式会社ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課	51	湘南鎌倉総合病院	検査部
15	株式会社 LSIメディエンス	遺伝子検査部 遺伝子分析グループ	52	近畿大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
16	伊勢赤十字病院	臨床検査部 輸血検査室	53	株式会社 エスアールエル	遺伝子染色体解析センター 遺伝子検査課
17	富山大学附属病院	輸血・細胞治療部	54	関東甲信越ブロック血液センター	検査部 検査三課
18	鷹揚郷腎研究所 弘前病院	HLA検査室	55	名古屋第二赤十字病院	検体検査第二課組織適合検査室
19	大分県立病院	輸血部	56	広島大学病院	輸血部
20	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部	57	福岡赤十字病院	検査部 移植・輸血検査課
21	市立札幌病院	検査部	58	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
22	JCHO仙台病院	統括診療部 臨床検査科	59	札幌北極病院	臨床検査科
23	株式会社 リプロセル	技術部	60	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 免疫血清検査室
24	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科	61	秋田大学医学部附属病院	輸血部
25	国立病院機構 岡山医療センター	臨床検査科	62	京都府立医科大学附属病院	腎移植センター
26	近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課	63	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部
27	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター	64	北海道大学病院	検査・輸血部
28	NPO法人腎泌尿器疾患研究所		65	株式会社 医学生物学研究所	品質保証部
29	東海大学医学部付属病院	診療技術部 移植免疫	66	公益財団法人 HLA 研究所	
30	公立大学法人 横浜市立大学附属病院	輸血・細胞治療部	67	関東甲信越ブロック血液センター 埼玉製造所	品質部 検査三課
31	富士重工業健康保険組合 太田記念病院	臨床検査部	68	京大大学IPS細胞研究所	基盤技術研究部門
32	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室	69	筑波大学	消化器外科研究室
33	松江赤十字病院	検査部 輸血管理室	70	北海道ブロック血液センター	検査一課
34	湧永製薬株式会社	試薬・診断薬事業部	71	山形県立 中央病院	輸血部
35	東北ブロック血液センター	品質部 検査一課	72	株式会社 保健科学研究所	QAU
36	香川県立中央病院	中央検査部	73	株式会社 イムコア	マーケティング 遺伝子・移植検査
37	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部			

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抗 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場合もある。

また、交差適合試験については、本年も試行的に以下の 2 通り実施することで参加申込みの受付を行った。また、全血由来のリンパ球による交差適合試験は、日本移植学会との連携し QCWS で使用する試料（血清）を使用して行った。

- 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. 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 (次世代シーケンサーを用いた方法も含む) 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
九州ブロック血液センター 黒田ゆかり
 - ・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

表 2 第 18 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	
H2601	A*26:01:01 A26	A*31:01:02 A31	B*46:01:01 B46	B*40:02:01 B61	C*01:03 Cw1	C*03:04:01 Cw10
H2602	A*02:07:01 A2	A*24:20 A24	B*46:01:01 B46	B*59:01:01 B59	C*01:03 Cw1	C*01:02:01 Cw1
H2603	A*03:01:01 A3	A*24:20 A24	B*44:02:01 B44	B*40:01:01 B60	C*05:01:01 Cw5	C*03:04:01 Cw10
H2604	A*24:02:01:01 A24	A*26:02:01 A26	B*52:01:01 B52	B*15:01:01 B62	C*12:02:02 Cw12 ※	C*03:03:01 Cw9

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2601	DRB1*08:03 - DR8 -	DRB1*09:01:21 DRB4*01:03:01 DR9 DR53	DQA1*03:01:02/03 DQB1*06:01:01 DQ6	DQA1*01:03:10 DQB1*03:03:02 DQ9	DPA1*02:02:05 DPB1*05:01//+ DPw5	- - -
H2602	DRB1*09:01:21 DRB4*01:03:01 DR9 DR53	DRB1*04:05 - DR4 -	DQA1*03:02:03 DQB1*03:03/30 DQ9	- DQB1*04:01:05 DQ4	DPA1*02:02:05 DPB1*05:01//+ DPw5	DPA1*01:03 DPB1*02:01//+ DPw2
H2603	DRB1*13:01:01 DRB3*01:01:02 DR13 DR52	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02 DR15 DR51	DQA1*01:03:10 DQB1*06:03:01 DQ6	- DQB1*06:01:01 DQ6	DPA1*01:03 DPB1*02:01//+ DPw2	DPA1*02:01 DPB1*09:01//+ DPw9 ※
H2604	DRB1*15:02:01 DRB5*01:02/08 DR15 DR51	DRB1*14:12:01 DRB3*01:01/11 DR14 DR52	DQA1*01:03:10 DQB1*06:01:01 DQ6	DQA1*05:03:07 DQB1*03:01:01 DQ7	DPA1*02:01 DPB1*09:01//+ DPw9 ※	DPA1*02:02:05 DPB1*05:01//+ DPw5

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

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

2) 抗体検査結果解析

・ FlowPRA 法の検査状況の解析

福岡赤十字病院 金本 人美

・ Lab Screen による抗体検査

東海大学医学部附属病院 杉本 達哉

・ WAK Flow 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) 部門別解析及び結果評価

・ DNA タイピング (表記法を含む)

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

・ 抗体検査

近畿ブロック血液センター 高 陽淑

・ 追加発言 : 全血クロスマッチについて

福岡赤十字病院 橋口 裕樹

ワークショップで解析された総合結果を示す。DNA サンプルについては、日本赤十字社中央血液研究所で精査した結果を加え、総合的にリアサインした。各ローカスは、1本鎖DNAに分離してから塩基配列を確定し、可能な限り Ambiguity を回避した。参照ライブラリーは、IMGT/HLA 3.15.0 (2014 January 17) である。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)。抗体サンプルは、日本骨髄バンク統計資料に基づく HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の抗原に対する反応と 0.1% 未満の抗原に対する反応に分けて示した。スコア「8」は3分の2以上の参加施設が陽性判定した抗原、スコア「1」は3分の2以上の参加施設が陰性判定した抗原、スコア「4」はどちらも3分の2に達しない抗原で表している (表 3)。これらの結果と各施設の提出結果を再確認し、精度管理及び技術向上に活用されたい。また、サンプル残余がある場合は、それらの用途に使用可能であることを付け加えておく。

4. QCWS サンプルの総合結果

配布した DNA 及び抗体サンプルについて、本ワーク

表 3 第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート：抗体サンプルの総合結果

日本人HLA遺伝子頻度0.1%以上の抗原に対する反応

Sample	Antigen	Score	
SH2601	A2	8	
	A24	8	
	B13	8	
	B27	8	
	B37	8	
	B38	8	
	B44	8	
	B51	8	
	B52	8	
	B59	8	
	B59	8	
	A11	1	
	A1	1	
	A26	1	
	A3	1	
	A30	1	
	A33	1	
SH2602	A30	8	
	A31	8	
	SH2603	A11	8
		A11	8
A11		8	
SH2604		A30	8
		A30	8
	A30	8	

日本人HLA遺伝子頻度0.1%未満の抗原に対する反応

Sample	Antigen	Score	
SH2601	A23	8	
	SH2602	A25	8
		A25	8
A25		8	
SH2603		B73	8
		B73	8
		B73	8
	B73	8	
	SH2604	A32	8
		A32	8
		A32	8
A32		8	

抗体QC参加施設の総合判定結果を基準とした
 Score8: 陽性 = 2/3以上の参加施設が陽性判定した抗原
 Score4: 保留 = 陽性・陰性どちらも2/3に達しない抗原
 Score1: 陰性 = 2/3以上の参加施設が陰性判定した抗原

* 暫定的なHLA抗原名 (WHO未公認)

第 18 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 Luminex 法—

黒田ゆかり¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター

1. 概要

Luminex 法の参加施設は、今年 DNA-QC に参加した 69 施設中 43 施設 (62.3%) であり、年々増加している。使用キットは、OneLambda 社製 LABType が 10 施設、LABType HD が 12 施設、湧永製薬株式会社製 WAKFlow が 26 施設、医学生物学研究所製ジェノサーチが 5 施設であった。

タイピング実施ローカスは、全施設が HLA-A, B のタイピングを実施しており、その他 HLA-C (37 施設, 86.0%), HLA-DRB1 (41 施設, 95.3%), HLA-DRB3/4/5 (2 施設, 4.7%), HLA-DQA1 (8 施設, 18.6%), HLA-DQB1 (15 施設, 34.9%), HLA-DPA1 (5 施設, 11.6%), HLA-DPB1 (8 施設, 18.6%) の報告があった。

2. 解析方法

解析は、HLA-A, B, C, DRB1 座の結果を対象とし、以下の 3 項目について行った。

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

詳細なデータについては、学会ホームページに掲載の「第 18 回 QC ワークショップ報告集」を参照いただきたい。

3. 結果と考察

- 1) 表記については、年々増加するアリルにより複雑化してきたが、ambiguity として可能性のある全ア

リルを対象とし、表記法の原則に基づいた記入が必要である。

- 2) 反応データの確認には、各施設から提出された CSV ファイルを用いた。陽性コントロールピーズは、4 検体 (H2601 ~ H2604) において同等の蛍光値が期待され、ばらつきが少ないことが基本である。HLA-A Exon3 において %CV が 50.8% と大きくばらついている施設や陽性コントロールの平均蛍光値が他施設より明らかに低い施設が見られた。

Pmin/Nmax 値が小さい数値を示している場合、反応のメリハリが少ないことを示しており、いくつかの施設において適切なカットオフ値の設定が困難であったことが窺えた。

また、カットオフ値の変更については、変更が必要であった施設数が、変更が必要でない施設数を大きく上回った。カットオフ値は、カットオフ値を変更するプローブ数が多くなるほどアサインミスに繋がる可能性が高くなるため、安定した技術が求められる。昨年同様、提出された CSV ファイルを用いて全施設の再解析を実施したが、多数の偽陰性 (False Negative) や偽陽性 (False Positive) が見られ、判定が困難な施設が見られた。それらの施設の中には、はるかにデフォルトカットオフ値から外れているものを無理やり判定しているケースもあった。試薬の特性も考えられるが、明らかな施設間差が見られることから、技術的な改善のみならず解析時の判断基準の見直しも必要であると思われた。

- 3) アサインミスとして、記入ミスの 4 件とカットオフ値付近の反応でカットオフ値変更をせずに誤判定となった結果が 4 件あった。記入ミスは、入力内容の再確認を実施することで回避可能であるが、誤判定 4 検体の結果では、いずれも極めて稀な HLA

タイプに判定されており、判定結果を疑う必要があったと思われる。QCWS であるということから稀なタイプも含んでいるだろうという憶測により判定した施設もあったようで、思い込みによる HLA タイプの判定は、誤判定につながった。また、2 施設で HLA-C 座が誤判定となった H2603 の HLA-A, B, DR のタイプは A3/24, B44/60, DR13/15 であり、A3-B44-Cw5-DR13 というハプロタイプを知っているとミスを回避することが可能であったことから、HLA に関する知識を持ち総合的に判定することも重要であると考え。 (参考: A*03:01-B*44:02-C*05:01-DRB1*13:01, A*33:03-B*44:03-C*14:03-DRB1*13:02)

また、全体的に反応が弱く複数のプローブで FN となっていた 1 施設では、一部のカットオフ値のみを変更し判定が行われており、各プローブの反応性を十分に確認されていないことが示唆された。

解析する際には、①全プローブの反応性をチェックすること、②陽性コントロールプローブの蛍光値が明確に陽性反応を示していること、③陰性と陽性の反応にメリハリがあること、④カットオフ付近のデータの判定には注意が必要であること、⑤ハプロタイプ考慮し判定すること、⑥良好でない反応データで判定は避けることなどを念頭に置き適切な判断をしなければならない。

4. まとめ

タイピング結果は、移植成績に大きな影響を与える重要な要素である。正しいタイピングには、「安定した技術」と「解析における的確な判断」が必要である。QCWS は、自施設のデータを確認することができる良い機会であることから、配布されたデータを活用し是非改善に繋げていただきたい。また、不明な点などは QCWS 事務局や解析担当者へご確認いただきたい。

第 18 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¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

1. はじめに

INNO-LiPA による参加施設は昨年の QCWS より減り、今回の QCWS には補助として使用している 1 施設を含めて 4 施設の参加となった。その原因としては、昨年の QCWS でお知らせした方法別解析での学会の表記法で行うことが、特に INNO-LiPA では受け入れられないことが要因で参加しない施設があったと考えられる。その理由として、学会の表記法に従うと日常検査とはかけ離れ、非常に手間の掛かる判定・表記となるからである。

2. 解析結果

参加 4 施設のうち 1 施設は SSP の補助としての使用であり、HLA-C および DQ ローカスのデータ提出は今年も 1 施設だけであった。また、HLA-DR ローカスの DRB3/4/5 が判定できる decoder キットを使用した施設はなかった。

1) 結果判定

クラス I の HLA-A・B ローカスについては 2 桁アリの組み合わせがそれぞれ 1 つのみであったため、特に問題はなかったが、第 2 区域の ambiguity が判定された全アリル候補からではなく、日本人に多い 4 桁アリが含まれる組み合わせの中から選択されたものが多かった。また、全アリルを対象に ambiguity を選んでも第 2 区域の小さい順を全体からさがすのは困難であった。

HLA-C ローカスは 1 施設のみ提出であり、2 桁アリの組み合わせがそれぞれ複数あることから、学会の表記法に従うと抗原型も決められない第 1 区域が ambiguity となり、提出した施設は日本人アリの組み合わせを選択していた。

クラス II の HLA-DRB1 については H2601・H2604 は

日本人アリが含まれる組み合わせのみであるため、どの施設も正しく判定出来ていたが、H2602・H2603 ではいずれも抗原型がホモとなる組み合わせを見落としていた。この判定は、日本人アリを含まない組み合わせでの表記であるが、学会の表記法ではホモの組み合わせも加える必要があり、これにより抗原型での結果が ambiguity となる。

HLA-DQB1 については 1 施設のみで、特に問題はなかったが、やはり第 2 区域の ambiguity に全アリル候補からの表記の見落としがあった。

方法別解析の表記法を統一してからはじめての QCWS であり、学会の表記法がまだ十分に認識されていなかったこともあり、日本人アリを優先したための表記法の間違ひについては不正解とはしなかった。

2) 反応状態について

クラス I の陽性バンドにスコア 4 の多い施設があった。また同施設ではクラス II の HLA-DRB1 にスコア 2 の偽陽性バンドが多く見られた。陽性バンドの発色が弱いのは、おもに PCR の増幅不良が原因と考えられ、発色が弱いために発色時間を延長した結果、偽陽性バンドが増えたことが推察される。PCR の増幅効率が悪い原因として、サマルサイクラーの室温管理や機器の管理・整備などが行われていない可能性もある。

3. おわりに

昨年の QCWS において、今年度からの方法別解析では日本人に多いアリルを優先することなく、学会の表記法に従い判定結果を表記することとしたが、INNO-LiPA 使用施設には、十分に認識されていなかったようである。また、表記法を統一したことにより、その結果報告の煩雑さから、いくつかの施設が INNO-LiPA のデータ提出

を辞退したようである。

日本人に多いアレルを優先しなければ、INNO-LiPAに限らず多くのキットで抗原型も決められない判定結果になることが予測される。とくにINNO-LiPAの判定ソフトについては、可能性のあるアレルの組合せを判定していることから、全アレルから判定結果を表記することが理解し難いのではないかと思われた。

学会の表記法の目的は、日常のタイピングで使用している試薬の判定結果が、公認されたアレル全てに対して、

可能性のあるアレルの組合せを結果として表記することになっているが、日常検査の判定結果とはかけ離れている。また、学会表記をするために労力を費やすのは有意義とはいえない。とくに臓器移植の適合性検査としては抗原型を決定することが最も重要であることから、臨床に役立つQCWSの方向性としては、部門別の解析シート及び臓器移植での表記のルールと規定することも検討する必要がある。

第 18 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¹⁾

¹⁾ 県立広島病院

1. 概要

1.1 参加状況

SSP 法の参加施設は 30 施設（全参加施設の約 43%）であり、昨年より 1 施設減少した。このうち、SSP 法のみでの参加施設は 22 施設（昨年同）、その他のタイピング法を併用していた施設は 8 施設であった。

1.2 参加部門

参加 30 施設中 23 施設は臓器移植部門または臓器移植部門と輸血関連、造血幹細胞移植部門であり、臓器移植部門での参加が多かった。また、臓器移植部門のみでの参加は 18 施設あり、そのうち 14 施設は SSP 法のみでの参加であった。

1.3 使用試薬

今回使用されていた試薬は、低解像度（low resolution）試薬では、OneLambda MicroSSP 28 施設、Invitrogen AllSetGold 2 施設であった。中解像度（medium resolution）試薬では、OneLambda MicroSSP 2 施設、Invitrogen AllSetGold および UniTray 2 施設であった。MicroSSP については、中でも日本人向けに開発販売された MicroSSP JPN の使用施設数が多く、SSP 法参加施設のうち 24 施設（SSP 法参加の 80%）で使用されていた。

2. 解析結果および考察

解析は使用した試料の Consensus Allele を基に、1. 結果の評価項目である①判定が正しいこと②結果が総合判定と祖語がないこと、2. 試験結果の評価項目である①相対的反応データに不備（false positive または false negative）がないことを確認した。結果表記の不備等により結果解析が困難であった報告は「解析困難」として示した。ただし、これら「解析困難」と示した結果は、評価

時の減点対象外とした。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、そちらを参照していただきたい。

2.1 判定ミス（miss assign）

判定ミスの主な要因として以下の 3 点が考えられた。

- ①反応の不備（false positive, false negative）
- ② ambiguity が正しく判定または記載されていない
- ③記載間違い（疑い）

①の反応の不備による判定ミスは同施設で複数検体報告されており、検査方法の見直しや再確認等原因の究明が必要と思われる。②の ambiguity が正しく判定、記載されず判定ミスとなった原因の多くは解析ソフトの未使用またはバージョン違いと思われる。解析ソフトは必ず使用し、またバージョンアップ等最新のデータを採用し判定する必要がある。③の記載間違い（疑い）は判定ミスに繋がる要因が認められないものである。

2.2 相対的反応データの不備

反応データに不備が認められた施設は 7 施設（偽陽性 5 施設、偽陰性 2 施設）であり、そのうち 5 施設で判定ミスを認めた。その他、「判定不能」のスコア 0 を報告した施設が 3 施設あった。

3. まとめ

本年度の SSP 法の結果は概ね良好であり、特に HLA-DRB1 座の判定ミスは無く、表記に問題があるのみであった。反応データの不備が判定ミスに繋がった 3 施設では同じ Jewel で偽陽性が認められており、試薬の使用方法の確認を行うとともに陽性、陰性の判定方法の再確認を行う必要がある。また、反応データのスコア化に不慣れな施設もあったので、SSP 法の反応データのスコアについては、別表を参照していただきたい。

SSP 法参加施設のほとんどで低解像度試薬（第 1 区域までの判定試薬）が使用されており，第 2 区域での判定が困難となっている。また，解析ソフトのバージョンでも判定結果が異なる場合もある。結果報告や解析を円滑に行うために，報告時の記載方法や内容など，今後も随時検討が必要と思われる。

表 SSP 法における反応データのスコア

スコア	反応データ
0	判定不能
1	陰性
2	偽陰性
4	偽陽性
6	弱陽性
8	強陽性

第 18 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¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部

1. はじめに (HP 掲載の解析報告集: 図 1)

今年度参加した施設が用いた SBT 法は、標的とする解析領域や使用機器から、SBT 法、SBT-NGS 法、及び SS-SBT 法の 3 つの検査法に分類された。

まず従来の方法である SBT 法は、各 Exon (例: Class I 領域の場合 Exon 2, 3, 4) の遺伝子を PCR 増幅し、Exon ごとに F 側, R 側の両側よりサンガー法により塩基配列を決定し、解析ソフトを用いてアレルの判定を行う方法である。この方法は、高解像度を有するが 2 つの染色体に由来する PCR 増幅混合産物をタイピングするため、SNP がどちらの染色体に由来する変異なのか区別できない、いわゆる phase ambiguity の問題をかかえている。

今年度から新しく提出された SBT-NGS 法は、Class I 遺伝子の場合 Exon 2, 3, 4 の各 Exon の配列を PCR 増幅し、Exon の配列を次世代シーケンサーにより決定し解析ソフトでアレル判定をする。この方法では、次世代シーケンサーで塩基配列を決定するため各 Exon の片側の染色体に由来する塩基配列が決定出来るため、Exon 内での phase ambiguity は解消されるが、各 Exon 2, 3, 4 塩基配列を決定しアレル判定をするため、Exon の組み合わせによる phase ambiguity が発生する問題が残る。

一方、SS-SBT 法では、HLA 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域・5'UT 領域・Exon・Intron・3'側 UT 領域を含む遺伝子の全体を PCR 増幅し、次世代シーケンサーにより塩基配列を決定し解析ソフトでアレルの判定を行うため、Exon・Intron の領域を含む遺伝子全体を標的とすることで phase ambiguity の問題は解消される。

アレルの解析ソフトはそれぞれの方法により異なっており (図 2 参照)、SBT 法の解析ソフトとして、従来の Assign の他に SBTengin を使用した施設があった。これ

らの解析ソフトは、生データの管理・リファレンス更新など使用方法が異なっていた。また、SBT-NGS 法と SS-SBT 法では、次世代シーケンサーのデータが解析可能な専用の解析ソフトを使用して、アレルの判定を行っていた。

2. 参加施設・使用キットについて (図 3)

今年度の参加施設は 8 施設で、その内 1 施設からは 3 種類の結果 (SBT 法で 2 種類、SS-SBT 法 1 種類) が提出された。

SBT 法での参加は 6 施設で、全施設が AlleleSEQR HLA typing Kits (CELERA) を使用されていたが、1 施設で SeCore Sequencing Kits (invitrogen) が併用されていた。この試薬は HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 座のタイピングが可能で、全施設で使用されていた AlleleSEQR HLA typing Kits と比べ、SeCore DPB1 Locus Sequencing Kits は Exon 2, 3, 4 領域のシーケンスプライマーが含まれており、より長い領域の解析が可能である。アレル判定の解析ソフトとして、SBTengin が 4 施設、Assign が 3 施設で使用されていた。

SBT-NGS 法での参加は 1 施設で、Miseq class I+class II kits (Scisco genetics) と Miseq シーケンサーを使用し、専用の解析ソフトで解析していた。

SS-SBT 法での参加は 2 施設で、1 施設では GS Junior シーケンサーと GS Junior Titanium sequencing Kit (Roche)、他の 1 施設では Ion PGM シーケンサーと Ion PGM 400 Sequencing Kit (Life Technologies) が使用されていた。データ解析は、Omixon Target と SeaBass (Suzuki 法) を使用していた。

3. 結果及び考察

1) SBT 法での解析結果と考察

今回、QCWS を行った時点での最新のリファレンス (IMGT/HLA 3.15.0, 2014-01-17) を使用した結果で解析をした。本報告では、各施設間で判定したタイピング結果が異なるアレルに注目して解析を行った (図 4, 5, 6, 7)。

①アレルの絞り込み

HLA-DRB1 のタイピングキットには 3 種類のシークエンスプライマー (Exon 2 Forward, Exon 2 Reverse, Codon 86) が添付されている。この Codon 86 プライマーは、HLA-DRB1 のコドン 86 番目の GTG モチーフに相当する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、コドン情報を設定することで Codon 86 (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レル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、H2603 が Codon 86 の配列決定により、HLA-DRB1*13:01/105/117/+, DRB1*15:02:01 とさらに絞り込みが可能であった (図 8)。また、H2604 でも Codon 86 の配列決定により、HLA-DRB1*14:12, DRB1*15:02:01 とさらに絞り込みが可能であった (図 9)。

今回の AlleleSEQR HLA typing kits では、Exon 2 の 3' 側領域の 13 bp は解析対象外なので、HLA-DRB1*14:12:01 と HLA-DRB1*14:12:02 を区別することが出来ないが、今後の Kit の改良により解析可能となる予定である。

② SBT 法の ambiguity の結果表記

今年度の QCWS サンプルの SBT 法での結果では、片側のアレル群のみ第 1 区域に異なるアレルが複数存在する ambiguity が、4 ヶ所に認められた。

H2603 の HLA-C (Exon 2, 3, 4) タイピング, H2602 の HLA-DQB1 (Exon 2, 3) タイピング, H2601 の HLA-A (Exon 2, 3, 4) タイピング, H2604 の HLA-B (Exon 2, 3, 4) タイピングに、片側のアレル群のみ第 1 区域に異なるアレルが複数存在する ambiguity があった (図 10, 11, 12)。

これらの表記は、結果報告の原則に従い、第 2 区域で判定出来ないアレルが複数存在する場合はアレルを第 2 区域まで表記し「/ (スラッシュ)」でつないで報告しなければならない。

例えば H2602 の HLA-DQB1 (Exon 2, 3) タイピング結果では、DQB1*03:03, DQB1*04:01 または、DQB1*03:25,

DQB1*03:100 など、片側のアレル群のみに第 1 区域に異なるアレルが複数存在する ambiguity があった。この結果表記は、DQB1*03:03/25/30, DQB1*03:100/04:01/+ となる。この DQB1*03:100 は、IMGT データベースでの登録日が 2013 年 10 月 11 日と新しく登録されたアレルで、解析結果に反映されてない施設があった (図 11)。

また、H2601 の HLA-A (Exon 2, 3, 4) タイピング結果では、候補に含まれる新しく登録されたアレル A*31:79 と、A*66:15 の組み合わせが、見落とされた判定ミスがあった (図 12)。

2) 方法別による HLA-DPB1 のアレル判定の違いと結果表記 (図 13)

今年度の SBT 法による結果で、SBT 法, SBT-NGS 法, SS-SBT 法の HLA-DPB1 の方法別による結果が異なっていた。これは、HLA-DPB1 の解析領域が大きく関係していた。

SBT 法の AlleleSEQR HLA typing Kits は、Exon 2, 3 のみを標的としているので、多くの ambiguity が生じる結果であったが、SeCore DPB1 Locus Sequencing kits では Exon 2, 3, 4 の解析を行い H2601 と H2604 についてアレルの絞り込みが可能だった施設の報告があった。

SBT-NGS 法では、解析領域が Exon 2, 3 のみで判定を行うため、DPB1*05:01:01 と DPB1*135:01 の区別ができなかった。この場合の結果表記は、DPB1*05:01/135:01 となる。

さらに 2 施設が参加した SS-SBT 法では、Exon・Intron の全領域を標的とするので 1 施設ではこれらのアレルの絞り込みが可能であった。一方、他の 1 施設では DPB1*05:01:01 と DPB1*135:01 の区別できず ambiguity をしめず結果であった。この結果の相違は、次世代シーケンサーより十分な長さのデータとリード数が得られず、そのため Exon 4 領域の 1 塩基を正しく決定できなかったため、アレルの絞り込みが出来なかったことが原因と考えられる。

3) 判定ミス (図 14)

H2604 の HLA-C の結果で判定ミスがあった。SBT 法の Exon 2, 3, 4 の解析では多くの ambiguity が生じるが、SBT-NGS 法と SS-SBT 法の結果から片方のアレルに C*03:03:01 を有する場合、SBT 法の結果と併せると他方のアレルは C*12:02:02 か、C*12:112 のみの可能性しかない。しかし、SS-SBT 法の 1 施設では C*12:02:01 とのミス判定の報告

であった。これについても、次世代シーケンサーからの解析に必要な十分なデータが得られなかったことが原因と考えられる。

4) コードによる表記

今年度、初めてコードによる表記（“G”，“P”を付加する表記法）で結果を提出された施設があった。SBT-NGS法の判定結果である。QCWS タイピング結果報告のアリル表記法と結果報告の原則では、コードを付加するグループアリルは、HLA アリルの WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System（以下「nomenclature」という。）を参照することになっている。結果報告の原則として HLA アリルに“G”を付加する表記は、ペプチドを収容するドメインをコードする領域内（クラス I は、Exon 2 と 3、クラス II は、Exon 2）の塩基配列が同一となる ambiguity を示すとされ、HLA アリルに“P”を付加する表記は、ペプチドを収容するドメインをコードする領域内（クラス I は、Exon 2 と 3、クラス II は、Exon 2）のアミノ配列が同一となる ambiguity を示すとされている（図 15, 16）。

H2603 の HLA-B の結果で、SBT-NGS 法では B*40:01:01G, B*44:02:01G と報告され、一方 SS-SBT 法では B*40:01:02, B*44:02:01:01 と報告され、両者で異なった結果判定のように見えるが、nomenclature の表記中には、SS-SBT 法の結果や、SBT 法の結果の一部が含まれているので、齟齬が生じているわけではない。

H2601, H2602, H2604 の HLA-DQA1 の結果で、SBT-NGS 法では DQA1*03:02P と、DQA1*05:03P との報告があったが、このコード表記は nomenclature には掲載されていない。この表記について、SBT-NGS 法実施施設からは、DQA1 解析を Exon 2, 3 領域を標的として行うため、nomenclature のコード表記よりアリルの絞り込みが可能だったため DQA1*03:02P と、DQA1*05:03P として報告した。コード表記による結果報告は、nomenclature の原

則に従ったアリル表記にすることが必要と思われる。

4. まとめ

今年度、SBT 法、SBT-NGS 法、SS-SBT 法の 3 つの検査法での結果が報告された。

SBT 法を解析する際に注意する点はいくつかあり、最新のリファレンスを使用し解析することが必要であり、本学会の表記法に従い DNA タイピング結果の表記を正しく記述する（図 17）。

今年度の SBT 法での不正解の理由は、表記ミスであった。SBT 法を行う際には、きれいなシーケンズデータを得ることを心がけ、リファレンスと ambiguity の表記に注意する必要がある。正確で精度の高い解析が出来たとしても、正しく表記することが重要であることは論を待たない。

しかしながら、毎年アリルの登録が急速に増加しているため、ambiguity の表記のみでは分かり辛くなりつつあり、場合によってはコメントの記載の必要性もあると思われる。また、必要に応じて補足試薬などを使用し、ambiguity を減らすことも考慮しなければならない。

また、次世代シーケンサーを使用した HLA タイピング法として、SBT-NGS 法が 1 施設、SS-SBT 法による参加が 2 施設あった。この SS-SBT 法は、新規アリルの同定、ambiguity の解消、null アリルの同定などが可能であり、第 4 区域までのアリル判定が実現できる、究極の HLA タイピングと考えられる。しかしながら、上記に報告したような問題点も見つかり、今後次世代シーケンサーの改良によりこれらの点を解決しつつ、さらに 1 分子の DNA について、より長く、精度の高い塩基配列を決定し、得られた情報を正しく判定することが必要と考えられる。

最後に、QC ワークショップに参加することで、施設の検査精度の管理・維持に役立つことから、HLA タイピング実施施設においては積極的な参加をお願いしたい。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査方法別解析 抗体検査 FlowPRA 法—

金本 人美¹⁾

¹⁾福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. はじめに

第 18 回 HLA-QCWS での HLA 抗体検査で FlowPRA を実施した施設は、スクリーニング 25 施設、シングルアンチゲン 2 施設であった。前年 17 回と比較するとスクリーニングが 3 施設増加、シングルアンチゲンが 2 施設減少であった。参加内訳（重複含む）は、臓器 18 施設、輸血 10 施設、造血 6 施設と、臓器移植での参加が多い状況であった。

2. 試薬キットと測定機器

スクリーニング試薬はクラス I のロットは 25 施設中 23 施設で Lot.16 を使用し、残り 2 施設が期限切れの Lot.15 を使用していた。クラス II のロットは 24 施設中 22 施設で Lot.18 を使用。シングルアンチゲンは全て同一 Lot であった。

測定機器は、バクtonディッキンソン社 13 施設（FACS Calibur 8 施設、Canto II 5 施設）とベックマンコールター社 12 施設（NAVIOS 5 施設、FC500 4 施設、EPICS XL 3 施設）であった。

3. 解析方法

各施設からの報告データより判定スコアの一致率を求めた。スクリーニング試薬では、各サンプル、4 サンプルのトータル、陽性コントロールの %PRA についてそれぞれクラス I、II 別に集計した。シングルアンチゲン試薬では、各ビーズのスコアと LABScreen Single Antigen でのコンセンサス結果との比較を行った。詳細な集計データは、学会ホームページを参照されたい。

4. 解析結果

今回、配布された血清はクラス I 全て陽性、クラス II は SH2601 陰性、SH2602、SH2603、SH2604 は陽性を示した。スクリーニングでは、各施設からの判定スコアの一致率は、クラス I、II 共に 100% 一致であった。判定スコアは全て一致であったが、%PRA は施設によって乖離するデータも認めた。%PRA データの乖離の原因として、マーカー位置設定や、機器設定が要因としてあげられる。測定機器、コントロールが同一条件で比較しても、マーカーの位置はかなり違う施設も見受けられた。マーカーの設定方法は、学会ホームページの解析資料を参照されたい。尚、測定機器別にも集計、解析を行ったが、機器による SD、CV 等の有意な差は認めなかった。

シングルアンチゲンは、判定スコアの一致率を全体のコンセンサスアリアルと比較を行った。使用試薬の抗原ビーズの構成が違い為に、判定スコアが乖離する箇所も見受けられた。これは使用される試薬に添付されている Antigen Distribution 情報を十分に確認する必要があると思われる。また一部抗原ビーズにおいて反応性の違いも認めたことも、注意が必要である。

5. まとめ

FlowPRA の結果は一致率 100% であった。しかし、%PRA の数値は前年同様に施設により乖離した数値もあり、各施設において、測定機器調整、マーカーの設定手順を確認し、使用する試薬の特徴およびロット別の反応性について情報は把握することが重要である。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 LABScreen—

杉本 達哉¹⁾・土田 文子¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部付属病院 臨床検査技術科 輸血室

1. はじめに

抗体 QC 参加 52 施設で LABScreen を利用した参加は 32 施設 (61.5%) であり、抗体 QC 参加として最も多い方法であった。LABScreen 参加 32 施設のうち DNAQC 参加は 31 施設であり、クロスマッチ参加は 19 施設であった。部門別参加状況では輸血関連 19 施設、臓器移植 18 施設、造血幹細胞 16 施設、その他 (メーカー) 1 施設であった。参加施設毎でこれらの部門に複数関与して参加されている施設は 50.0% であった。LABScreen Single Antigen (以下, SA) 実施の際に、4 施設がスクリーニング検査の実施が不明であった。

2. 結果解析

1) 抗体の有無

H2601, H2602, H2603 および H2604 の抗体の有無について Class I 参加 32 施設の全施設で抗体ありと判定された。Class II では H2601 の抗体の有無について Class II 参加 31 施設のうち 30 施設で抗体なしと判定され、1 施設で抗体ありと判定された。Class II の H2602, H2603 および H2604 の抗体の有無では Class II 参加 31 施設の全施設で抗体ありと判定された。

2) 抗体種類の一致

各施設から提出された IgG 判定結果記入表の抗原別抗体反応値 (判定スコア) における施設毎の一致率は、Class I で 88.2 ~ 100.0% (平均 97.7%)、Class II で 87.9 ~ 100.0% (平均 97.9%) であった。

3) PC/NC およびカットオフ設定

各施設から提出された生データより再解析で得られた PC/NC 値は Class I が 11 ~ 1653, Class II は 19 ~ 1272 であった。各施設のカットオフ設定は 500 ~ 2000 であった。

4) Consensus

各施設から提出された IgG 判定結果記入表の抗原別抗体反応値 (判定スコア) において、3 分の 2 以上一致が得られた抗体特異性を Consensus とした。Class I では SH2602 で 1 抗原特異性, SH2603 で 5 抗原特異性および SH2604 で 2 抗原特異性に対する抗体の Consensus が得られなかった。Class II では SH2603 で 1 抗原特異性および SH2604 で 2 抗原特異性に対する抗体の Consensus が得られなかった。

5) その他

Class I の測定において、同一施設内で H2602 に H2601 が混入および H2603 に H2602 が混入したと考えられる事例があった。また、サンプル測定時におけるサンプルの前処理は、非特異反応吸着処理, EDTA 添加, フィルターろ過およびこれらを複数組合せ実施している施設があり、その処理方法は様々であった。

3. まとめ

LABScreen による抗体 QC 参加施設の抗体有無および抗原別の抗体特異性の一致率は、Class I 測定におけるコンタミネーション疑いおよび Class II における抗体有無の不一致を各 1 施設認めたものの、概ね良好な結果が得られたと考えられた。QC では同一サンプルを測定している。一概には言えないかもしれないが、PC/NC 値がある程度まとまった値となることが理想と考えられる。しかしながら、実際の PC/NC は施設毎でその値 (Baseline Normalized Value: 11 ~ 1272) に幅を認めている。施設間における測定機器間差等も推測されるが、サンプルの前処理が施設によって様々であることも PC/NC がバラツキとなる要因の一つと推測される。

Consensus が得られない抗体の特異性では、その測定

蛍光値が 500 ～ 2,000 前後のデータであった。今後、更に施設間の測定データで一致を得るためには、測定手技の統一を図るのみならず、カットオフ基準の統一が課題

と考えられる。カットオフ基準については、臨床的意義を踏まえた設定が重要と思われる。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 WAKFlow—

高橋 大輔¹⁾

¹⁾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）の参加施設は、クラス I が 13 施設と前年と同数であった。一方、クラス II は 7 施設と前年より 1 施設の減少であったが、第 12 回からほぼ横ばいであった。また、1 ビーズ 1 抗原が固相されている湧永製薬社製の WAKFlow HR 試薬の参加が 2 施設でみられた (Fig. 1)。試薬ロットは、WAKFlow MR クラス I では NOC が 10 施設、NOB が 3 施設で使用されており、血清の前処理は 11 施設で実施されていた。WAKFlow MR クラス II は、全施設で NOB を使用しており、6 施設において血清処理が実施されていた (Table 1)。解析結果の詳細及び当該レポートの図表については、学会ホームページ「第 18 回 QC ワークショップ報告集」の抗 HLA 抗体「WAKFlow による解析結果」を参照されたい。

2. WAKFlow MR クラス I

2-1) ビーズの反応性について

コントロールビーズの蛍光強度を Fig. 2 に示す。血清 SH2602 のバックグラウンドビーズ (BB) において、Fig. 2 の赤丸で示した施設 (施設番号 2) は他施設と比較して明らかに蛍光強度が高かったが、試薬ロットや血清処理等に施設間差は認められなかった。HLA ビーズの反応性を Fig. 3-6 に示す。施設番号 2 は、血清 SH2601, SH2602 で他施設と比較して蛍光強度が高い傾向にあったが、判定に重要である Index 値では施設間差を認めなかった (Fig. 3-4)、しかしながら、当該施設は BB でも蛍光強度が高い傾向にあることから、機器または操作等の再確認が必要と考える。血清 SH2603 において、施設番号 29 は蛍光強度ならびに Index 値が他施設と比べ低

値を示しており、抗原別判定の不一致の一因となりうると考えられた (Fig. 5)。また、血清 SH2604 は、蛍光強度の施設間差を認めなかったが、一部のビーズ (Pc116) において他施設と比較して明らかな低値を示す施設 (施設番号 29, 53, 54) を認めた (Fig. 6)。このビーズは、Index においても明らかな差を認めたが、抗原別判定に影響を与える数値ではなかった。このような傾向がみられた 3 施設は、いずれもロット NOB を使用しており試薬のロット差による反応性の違いが疑われた。

2-2) 判定結果について

クラス I 抗体のスクリーニング結果は施設間差を認めなかった (Table 2)。各施設のビーズごとの反応性、およびカットオフ値から陽性と判定したビーズの一覧を Table 3-6 に示す。血清 SH2601, SH2602, SH2604 での各施設の陽性ビーズの種類と数は、若干の施設間差が認められたものの、概ね統一された結果であった (Table 3, 4, 6)。一方、血清 SH2603 は、ビーズの Index 値には施設間差を認めなかったにもかかわらず、施設間差を認めた。特に、カットオフ値を 1.5 前後と低めに設定した施設番号 2, 38 (Table 5 青枠)、他施設の 2 倍以上に設定した施設番号 52 (Table 5 赤枠) で顕著であった。また、施設番号 29 ではビーズの反応性が全体的に低下していたことによる著しい施設間差が認められた。

2-3) 抗原別判定不一致例等について

Table 7-8 に抗原別判定スコアについてまとめた表を示す。血清 SH2601, SH2602 において、若干の差異はあったものの、ほとんどの施設でほぼ一致した結果が得られた。ただし、血清 SH2601 について施設番号 53 でカットオフ値を変更したことにより B46 の判定にスコアリングの相違が認められた (Table 7)。また、施設番号 2 の血清 SH2601, SH2602, SH2604 において、Index 値に施設

間差が認められないにもかかわらず、他施設と比較してスコア 4 とした抗原数に乖離が認められたことから、当該施設は判定方法の再確認が必要と考えられた (Table 7, 8)。血清 SH2603 では、カットオフ値の違いにより施設間差が多く認められた。特に、Index 値が他施設と比較して低かった施設番号 29 において、ほとんどの抗原で陰性と判定されており、抗原ごとの反応性に乖離が認められた (Table 7)。以上のように、一部の血清で抗原別結果の不一致がみられたが、昨年と比較すると概ね統一された結果が得られた。

3. WAKFlow MR クラス II

コントロールビーズの蛍光強度を Fig. 7 に示す。バックグラウンドビーズ (BB) の蛍光強度について、Fig. 7 の赤丸で示した施設 (施設番号 54) は他施設と比較して明らかな高値であったが、試薬ロットや血清処理等に差はみられなかった。クラス I と同様に、クラス II についても蛍光強度や Index などの反応性についても判定に影響を与えるような施設間差は認められず (Fig. 8-10)、抗体の有無は全施設で一致していた (Table 9)。また、抗原別判定結果は Table 10 に示すように、一部の抗原で不一致を認めたが、いずれもカットオフ値付近のわずかな反応性の違いによるもので、どの施設も設定したカットオフ値と得られた Index 値から正しくスコアリングできていた。

4. WAKFlow HR

WAKFlow HR は、湧永製薬社製の試薬であり、現在 One Lambda 社から販売されている LABScreen Single An-

tigen (以下 LS-SA) と同様の特性をもつ試薬である。本試薬について、蛍光強度の比較を行ったところ、施設番号 53 で、若干ではあるが蛍光強度が高い傾向を認めた (Fig. 11)。Table 12 に LS-SA と WAKFlow HR の蛍光強度についてまとめた表を示す。血清 SH2602 の B35, SH2603 の Cw5, SH2604 の B46, B56 といった一部の抗原において判定スコアの不一致を認めた。また、LS-SA との反応性の比較において、LS-SA 陽性、WAKFlow-HR 陰性が 4 抗原、逆に LS-SA 陰性、WAKFlow-HR 陽性が 2 例といった乖離例が認められた。これらのうち、ICFA 法により生細胞との反応性を再確認したところ、2 例が弱陽性、残りの 4 例で陰性であり、LS-SA, WAKFlow HR のいずれの検査法においても non-HLA 様の反応を検出している可能性が示唆された。

5. まとめ

クラス I およびクラス II において、一部の施設で蛍光値の乖離を認めたが、Index 値にはほとんど影響せず、最終判定にも影響を与える数値ではなかった。また、C ローカスの特異性を含む血清 SH2603 で施設間の乖離が認められたが、各施設とも測定値、ならびに自施設で設定したカットオフ値から適切に判定出来ていたと考えられた。以上のことから、昨年と比較して特異性評価におけるスコアリングの施設の乖離が減少していた。また、ビーズの反応性と判定スコアの不整合、抗原表に記載のない抗原に対して判定を行っている、あるいは判定可能な抗原について判定不能ケースも認められず、昨年注意喚起した「抗原表から得られる情報の解釈」を正しく行っていると考えられた。

第 18 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¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所

1. その他検査法

その他検査法は、後述のダイレクトクロスマッチとの混同を避けるため、「FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の検査法において、SH2601～SH2604 の 4 サンプルを測定した場合」と定義して解析した。その結果、AHG-LCT 法 (1 施設), MPHA 法 (4 施設) のみであった。また、LIFECODES のキットは、その取扱いメーカー 1 施設のみであったため、QCWS としての解析はここでは述べない。

AHG-LCT 法は、中央血液研究所でサンプル選定時に測定した C1qScreen と一致した反応とそうではない反応を認めた。AHG-LCT が補体結合性以外の抗体も検出する反面、C1qScreen より感度が低いという状況により、そのような差異が生じたと考えられる。

MPHA 法における結果の差異は、昨年解析では感作時間に依存していたが、今年は、そのような傾向は見られず、現状ではどこに原因があるか不明である。

以上、「その他検査法」の参加施設は年々減少し、十分な解析が困難になりつつある。

2. クロスマッチ

クロスマッチは、26 施設の参加があり、6 施設はダイレクトクロスマッチのみ、別の 6 施設は仮想クロスマッチのみで、残り 14 施設が双方に参加した。

ダイレクトクロスマッチは、「LCT, FCM, ICFA などクロスマッチ可能な検査方法において、SH2602 のみ測定し、クロスマッチ入力シートに記入されていること」と定義して解析した。LCT 法 (6 施設), AHG-LCT 法 (2 施設), FCM 法 (8 施設), ICFA 法 (12 施設) の参加で

あった。FCM 法は FCS ファイルから再解析し、測定結果をスコア化した。ICFA 法は、追加ビーズの測定値も解析した。また、各測定データの表記や表示方法を一定の条件で統一した (学会ホームページ掲載資料参照)。LCT 及び FCM 法は、判定基準に統一性がなく、パラメータと判定基準及びコントロールとの関係性が一定していない。細胞測定数に問題のある施設もあった。ICFA 法は、測定条件や判定基準が統一されており、追加ビーズの反応も明確に認められた。

仮想クロスマッチは抗体サンプル (SH2602) に対して、2 本の DNA サンプル (H2601, H2602) を指定した。SH2602 × H2601 は、抗体検査で A26 陰性となる試薬を使用した施設はクロス陰性判定とし、その他は全て陽性判定であった。その中で、B61 を「予想される抗体反応」と判定した施設は、LABScreen の蛍光値 1,000 を若干超える程度を抗体陽性としていたからと思われる。SH2602 × H2602 は、全て陽性判定で一致していた。ここ数年の結果から、DNA タイピングの結果は、表記の違いはあるものの概ね一致しており、抗体検査法の感度や判定基準がクロスマッチ判定にそのまま影響していることが判ってきた。多くの場合、HLA に対する抗体反応は複数の特異性を示すため、どのローカスと反応するかハプロタイプを考慮しながら判断する必要がある。抗原側からの視点も要求される。このように、仮想クロスマッチは、HLA の抗原抗体反応を考える絶好の機会であり、そのトレーニングにもなりうる。

現在、本学会のクロスマッチ 2 項目と移植学会のクロスマッチが実施されており、次年度以降、サンプルの取り扱いや解析において本学会主体に整理されていく予定である。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート —部門別解析 DNA-QC, 結果の表記法—

橋口 裕樹¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. はじめに

18th の DNA-QC 参加は、68 施設であり、昨年より 2 施設増加した。部門別の内訳は、臓器移植部門 (43 施設, 63.2%), 輸血部門 (29 施設, 42.6%), 造血幹細胞移植部門 (26 施設, 38.2%), その他 (7 施設, 10.3%) であった。内訳に大きな変化はないが、15th から参加施設数は徐々に増加傾向にある。また参加施設の 68 施設中、26 施設が重複部門での参加であり、さらにその内の 11 施設では 3 部門での重複であった。参加施設の業務内容が多岐に渡る事が示唆された。

2. QC テーマと配布サンプル

DNA-QC のテーマは 1) 正確な DNA タイピングが行えること, 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 となるアレルと日本人集団でのアレルの解説である。配布サンプルは、購入した細胞から抽出した DNA を 4 サンプル配布 (10 µg, 20 µg), 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 アレルであることを条件とした。

3. 使用タイピング

SSP 法, SSO 法 (Luminex, INNO-LiPA), SBT 法での参加であった。各部門で最も多く使用された方法は Luminex SSO 法であり、これ以外に、部門別で見ると臓器移植部門で SSP 法の使用が多かった。また約半数近くの施設では 2~4 法の検査方法を用いての参加であった。

4. 結果評価

結果評価は、HLA-QC ワークショップ結果評価の基準に基づき行った。評価対象は HLA-A, -B, -C, -DRB1 の 4 座で、項目は 1) 判定結果, 2) 結果表記, 3) 試験・検査状況の 3 項目であった。

4-1. 判定結果の評価 (基本評価点 60 点)

判定結果の評価点分布をみても、大幅な減点施設はなく、平均 58.8 点であり、16th (56.5 点), 17th (57.8 点) と比較し、少しずつ得点はあがってきている。

4-2. 結果表記の評価 (基本評価点 40 点)

大幅な減点施設はなく、全施設が 31-40 点に分布していた。平均 39.6 点と 17th (38.7 点) より点数はあがっているが、数施設において HLA アレルから HLA 型への読み替えて誤表記を認めた。この点は学会ホームページの表記の原則を熟読して頂きたい。(http://jshi.umin.ac.jp/standarization/index.html 参考)

4-3. 試験・検査状況の評価 (3 段階評価)

評価は A (良好: 反応データが全て妥当である), B (要確認: 反応データの一部不備がある), C (要改善: 反応データのほとんどが不備である) の 3 段階評価を行った。今回も C 評価はなかったが、B 評価は 1~2 割程認める。それらの施設では False Positive, False Negative を認め、これが誤判定に繋がる可能性もある。コメント等で指摘を受けた施設は、生データを確認頂きたい。

5. 総合評価 (判定結果 60 点 + 結果表記 40 点)

総合評価点は、判定結果の評価点 60 点 + 結果表記の評価点 40 点 = 100 点であり、A 評価 (100 点: 良好), B 評価 (60 ~ 100 点未満: 要確認), C 評価 (0 ~ 60 点未満: 要改善) とした。今回は平均 98.4 点で、分布も

B 評価 (60 ～ 100 点未満) の施設が 26 施設 (38%) と徐々に減少傾向、A 評価 (42 施設, 62%) が昨年より 10% 増加した。

6. 結語

18thQCWS DNA 部門の結果を総合的に判断すると、

過去の結果と比較しても全体水準は維持され、参加部門や検査方法別に比較しても大きな差異は認めなかった。今後、更なる精度向上に向けて参加し、結果を出すだけでなく、指摘事項を再確認し、問題点の把握、改善に取り組む事こそが、本来の QC の目的であり、自施設の精度向上に繋がると考える。

第 18 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¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

1. 部門別解析

1.1. 概要

抗体検査への参加は、輸血部門 28 施設、臓器移植部門 29 施設、造血細胞移植部門 20 施設（全て重複あり）で昨年（17thQCWS）より 2 施設多い 51 施設（このうち初参加は 1 施設）となり若干の増加傾向を認めた。例年、複数部門に参加する施設が認められるがその構成を調査したところ、全部門に参加は 8 施設、逆に単独部門参加は 28 施設（輸血 12、臓器 16）で、造血細胞移植部門への単独参加は無かった。また、複数部門に参加する施設では抗体特異性同定検査の実施率が 88% 以上と高いのに比べて、単独部門参加の施設では実施率が 60～70% と低い傾向を認めた。

施設別の参加状況については、全体の 2/3（67%）を大学・病院が占めており、残りの 1/3 は血液センターと検査センター等がほぼ同数を占めていた。このような傾向が認められる背景には、昨年同様に臓器移植学会との共同企画（クロスマッチ）をきっかけとして臓器移植関連施設の参加が増加したことがある。

また、抗体検査実施状況については、この数年間と同じく 51 施設中 49 施設（96.1%）が 1 種類以上の蛍光ビーズ法を応用した方法を実施しており、輸血・造血細胞が LABScreen または WAKFlow を、臓器が Flow PRA または LABScreen（いずれも重複あり）をよく使用していた。

1.2. 抗体検出結果

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。昨年度（17thQCWS）は抗 HLA クラス II 抗体での 1 サンプルを除くすべてが一致率 100% と非常に良好な成績であったが、今回は、抗 HLA クラス I 抗体（SH2603 の一致率 97.9%）、抗 HLA クラス II 抗体

（SH2601 の一致率 97.6%）ともに全サンプルで 100% の一致には至らなかった。

この要因は、抗 HLA クラス I、II 抗体ともに使用した検査方法の特性によるものと考えられた（検査方法別解析結果参照）。例年のコメントとなるが、抗体検出における試薬の選択は慎重にしなければならない。

1.3. 抗体特異性同定検査実施状況

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、抗 HLA クラス I 抗体では全参加施設で 72.5% であるのに対して臓器が 71.4%、抗 HLA クラス II 抗体では全参加施設で 58.8% であるのに対して輸血が 53.5% と低い実施率であった。これとは対照的に造血細胞は、抗 HLA クラス I 抗体が 85%、抗 HLA クラス II 抗体が 75% と全体的に高く、造血細胞移植部門における抗体検査の重要性が伺われた。

2. 結果評価

2.1. 抗体 QC 結果比較について

各施設から提出された総合判定結果について、部門別評価と同様の計算方法（後述）で求めた「Consensus Result」を暫定的な正解として各施設の抗原別反応値を比較し、同じスコアの場合は「一致」、異なる場合は偽陽性（1⇒8）「FP」あるいは偽陰性（8⇒1）「FN」と定義した。その比較結果について、サンプル毎および検査方法別に一致状況（評価点ではない）を調査した。

1) サンプル別：抗 HLA クラス I 抗体では SH2602 に FP を多く、SH2604 に FN を多く認めた。これらの抗原に対する反応性はいずれも LABScreen single antigen で各施設が設定した cut off 前後に位置していたことが影響しているようであった。また、C ローカス抗体を含む SH2603 については FP および

FN が同等に存在し選択した検査方法に依存していると考えられた。抗 HLA クラス II 抗体については、SH2602 について FN および判定保留が最も多かった。このサンプルに限らず、抗 HLA-DQ 抗体については単なる基準の相違ではなく判定に対する考え方について議論の余地がある。

- 2) 方法別：LABScreen では一部の施設で FP あるいは FN のどちらかに偏る傾向を認めた。これは測定手技や判定基準の違いを反映している。その一方、それ以外の検査法では用いる抗原パネルが（single antigen と比較して）不足気味であるため FN となる場合が多く、保留率ともリンクしている傾向を認めた。
- 3) 施設別：血液センターおよび検査センター等の施設はほとんど継続参加しており毎年若干の変動はあるが、全体に安定した結果であった。それに対して、大学・病院については、参加施設数も多く結果の良・不良は用いた方法や判定基準に影響されている。今回の結果で他施設との乖離が散見された施設においては、抗体特異性の同定検査が日常的に必要なのであれば、用いた検査方法（検査手技、判定方法も含む）について再考するべきである。

2.2. 抗体 QC 部門別評価について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原（結果シートに太字で記載）について、参加施設から提出された結果が共通となる割合を「基準値（現在は 0.67）」とし、それ以上の構成比率を示す抗原のみを対象として評価点を算出した（それ以下の構成比率を示す抗原は対象外）。評価点の計算方法については HP 掲載の解析結果を参照されたい。

2.3. 評価内容

- 1) 抗体検出については、A 評価（80 点以上）が 47

施設（92.2%）、B 評価（40～80 点未満）1 施設（2.0%）、C 評価（40 点未満）3 施設（5.9%）であった。ただし C 評価の 3 施設は判定シートへの記載漏れと考えられ、抗体検出の結果そのものについては全体的に良好な結果であった。

- 2) 抗体特異性同定検査を実施した 37 施設中、評価 A が 32 施設（86.5%）、評価 B が 2 施設（5.4%）、評価 C が 3 施設（8.1%）となり、昨年よりも評価 A および B の施設が増加し、評価 C の施設が減少するという結果であった。昨年見られたような明らかな理解不足による記入漏れや誤記と推測される箇所も認めず、参加施設は本来の実力を発揮した結果であると判断された。

3. 結語

18QCWS の結果を総合的に判断すると、これまで以上に判定結果において高い一致率を認めた。この判定が『QCWS での評価点を意識した特別な基準』ではなく、日常的に実施している基準であるならば、QCWS に参加する施設の抗体検査における判定基準はかなり一致してきたと言える。

その一方で、抗原別判定結果の一致度は概ね検査方法に依存するため、検査方法の選択はもとより検査手技や結果の解釈など経験に基づく差異にも影響される（方法別解析データを参照）。抗体 QC の結果解析では施設間差だけがクローズアップされてしまうことは否めないが、「差があること」を問題視しているのではなく、その原因を解明することを目的としている。その事を理解したうえで参加施設は今回の解析結果を考察し、自施設の精度管理に利用するとともに日常検査の目的に合致した方法および判定基準を設定することが重要である。

第 18 回 HLA-QC ワークショップレポート【追加発言】 —血液を用いた「クロスマッチ」の実施報告— 日本組織適合性学会 QCWS との連携

橋口 裕樹¹⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部 移植検査課 / 輸血細胞治療部

1. 概要

日本移植学会では、統一した全血サンプル由来のリンパ球を用いた交差試験（以下、「クロスマッチ」という。）の精度管理が必要だと思慮し、平成 25 年 4 月に日本組織適合性学会との連携により、試行的に実施する事なり、今回 2 回目の実施となった。

2. 経過

日本組織適合性学会が開催する 18thQCWS 参加施設の内、34 施設からのクロスマッチ参加申し込みがあった。検査施設の内訳は、臓器移植ネットワーク検査施設が 23 施設、移植関連病院が 6 施設、検査センター 4 施設、試薬メーカー 1 施設であった。

日本移植学会移植関連検査委員会で採血した全血の発送は、日本組織適合性学会が平成 26 年 4 月に QCWS 試料を配布するのに合わせ血清配布の翌週に全血を参加施設に配布した。到着後、直ちに T 細胞を分離しクロスマッチを実施した。ACD-A 液入全血の発送には、宅配便（常温）で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着し、細胞分離に関して大きな影響は無かった。集計結果は各施設にメールにて報告し、9 月に開催された第 50 回日本移植学会、日本組織適合性学会 18thQCWS で報告を行った。

3. 検査方法および試料選択について

検査方法は各施設で日常的に行っている方法を選択可とした。検査方法を見ると CDC 法（22 施設）、AHG-CDC 法（7 施設）、FCXM（24 施設）、ICFA 法（11 施設）を使用し、半数以上の施設で複数の検査方法を使用して

試料 1			
A*24:02	B*40:01	C*03:04	DRB1*09:01
A*31:01	B*40:02	-	DRB1*12:01
試料 2			
A*02:01	B*51:01	C*07:02	DRB1*14:03
A*02:06	B*52:01	C*12:02	DRB1*15:02

の結果報告であった。配布した全血の HLA は表の通りである。

日本組織適合性学会の抗体部門 QCWS（抗体 QC）で使用する抗血清 4 本の 2 本を抗体の特異性より #2602、#2604 を選択した。

4. 検査結果

今回、準備したサンプルは、クロスマッチ弱陽性の結果になるものも含まれており、検査方法の検出感度の差により、方法別にみると陰性、陽性と乖離した結果もあった。この為、全体の一致率は昨年度より低くなったが、検査方法の感度差が原因であると推測される。また、一部の HLA 抗体には、抗体検査で使用する精製抗原とは反応するが、生リンパ球と反応しないものが含まれていた事も推測された。

5. まとめ

昨年度に続き、全国規模の統一した全血サンプル由来のリンパ球を用いたクロスマッチを、日本組織適合性学会の協力のもと実施した。次年度は、参加申し込み方法を変更し、精度管理を予定、準備を進めている。

今回、各施設にアンケートを行い、CDC、FCXM の反応条件、判定基準を調査した。施設により条件が大き

く異なり，これも施設間差の原因となると考えられ，臓器移植検査に関わる検査方法の統一，マニュアル整備等

も行い事が急務であると考えられる。

HLA 拘束性 T 細胞を誘導可能な末梢血モノサイト由来樹状細胞の大量産生法の開発

今村 悠哉^{1,2)}・春田 美和¹⁾・冨田 雄介^{1,3)}・松村 桂子¹⁾・
池田 徳典^{1,4)}・高松孝太郎^{1,4)}・西村 泰治¹⁾・千住 寛¹⁾

¹⁾ 熊本大学大学院生命科学研究部免疫識別学分野

²⁾ 熊本大学大学院生命科学研究部整形外科学分野

³⁾ 熊本大学大学院生命科学研究部呼吸器内科学分野

⁴⁾ 熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野

癌免疫療法では HLA 抗原により提示された癌抗原ペプチド特異的な T 細胞を誘導することが最も重要であり、これを誘導するために樹状細胞 (DC) が有用である。そこで我々はヒトの単球を生体外で増殖させることにより、少量の末梢血から大量の DC を作成する方法を開発した。末梢血より分離した CD14⁺ 単球にレンチウイルスで *cMYC* と *BMI1* 遺伝子を導入した後、M-CSF と GM-CSF の存在下で培養すると 3–5 週後に最大 1,000 倍に増殖させることができた。我々は、この細胞を CD14-ML と命名した。健康人ドナー 12 人中 9 人から CD14-ML が樹立でき、CD14-ML に IL-4 と TNF α または OK432 を添加すると DC (CD14-ML-DC) に分化した。この CD14-ML-DC に CMV ペプチドあるいは MART1 ペプチドを負荷し、末梢血から分離した CD8⁺T 細胞と共培養することで抗原特異的な T 細胞ラインを誘導することができた。CD14-ML 誘導法は *in vitro* でヒトの末梢血単球を増殖可能とした初めての技術であり、患者負担を軽減する DC 免疫療法への応用が期待できる。

キーワード : CD14-ML, DC, *cMYC*, *BMI1*

はじめに

癌免疫療法において HLA 抗原により提示された癌抗原ペプチドに特異的な T 細胞を誘導することが最も重要であり、これを誘導するためには樹状細胞 (DC) が有用であるため、DC を用いた抗腫瘍ワクチン療法は広く行われている。近年 DC ワクチン療法は腫瘍の縮小、生存率の改善に有用であるという報告がなされている¹⁻³⁾。しかしながら、生体内の DC を回収することは難しいため^{4,5)}、DC ワクチン療法を効果的に行うためには、患者自身の単球 (約 1×10^8 個) より、DC を作製することが必要であり、大量の単球を得るためにアフエレーシス操

作による癌患者末梢血からの白血球分離が行なわれており、患者の負担が大きいという問題がある。この問題の解決法の一つとしてドナー体細胞 (繊維芽細胞あるいは血液系の細胞等) から iPS 細胞を作製し、さらにこれを DC に分化させるという手順で DC の大量産生を行う方法がある。しかしながら、個々のヒト iPS 細胞の樹立には 1 ヶ月近い時間がかかる上、ヒト iPS 細胞から DC に分化させる段階でもさらに 1 ヶ月以上の期間を要するという問題がある^{6,7)}。そこで我々は、ヒト iPS 細胞を経由せずにより簡便な方法でヒトの単球を生体外で増殖させることにより、少量の末梢血から大量の DC を作製することを試みた。

受付日 : 2015 年 3 月 2 日, 受理日 : 2015 年 3 月 17 日

代表者連絡先 : 今村 悠哉 〒860-8556 熊本市本荘 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: 096-373-5313 FAX: 096-373-5314 E-mail: 123r5109@st.kumamoto-u.ac.jp

この技術が実用化されれば DC ワクチン療法における患者負担の軽減につながり、白血球数が少ないために DC ワクチン療法を受けることができない癌患者も、DC 療法を受けることができるようになることが期待される。また、ペプチドワクチンの開発研究において、*in vitro* で抗原に対する T 細胞反応を解析するためにも DC が多数必要であるが、T 細胞と DC の HLA 型が一致していなければならないため、DC の調整のために同一の健康人や癌患者から何度も血液採取をしなくてはならず、血液ドナーの負担が大きいという問題も合わせて解決できることが期待される。以上のことから我々はヒトの単球を生体外で増殖させる技術を開発した。

研究方法と結果

1. CD14-ML の作製および CD14-ML-DC の作製

健康人末梢血から、Ficoll Paque を用いた比重遠心により末梢血単核細胞 (PBMC) を分離し、抗ヒト CD14 抗体がコートされた磁気マイクロビーズを用いて CD14⁺ 単球を分離した。分離した CD14⁺ 単球を 20% ウシ胎仔血清含有 α MEM に M-CSF (50 ng/ml) と GM-CSF (50 ng/ml) を添加した培養液中で、 5×10^5 個 / 0.5 ml/well (24-well 培養プレート) で培養を開始した。さらにポリブレン (8 ng/ml) を添加し、ヒト *cMYC* および *BMI1* 遺伝子の発現ベクターで組み換えられたレンチウイルスを感染させた。翌日に培養液を 0.5 ml 添加し、これ以降は 1, 2 日毎に 0.5 ml 培養液置換を行った。培養開始後 3-5 週に細胞増殖を認め、最大 1,000 倍程度に増殖させることが可能であった。この現象は健康人ドナー 12 人中 9 人で認められ、この増殖細胞を CD14-ML (CD14 cell-derived myeloid cell line) と命名した。増殖した CD14-ML に IL-4 (20 ng/ml) を添加し、その 3 日後に OK432 (10 α g/ml)^{8,9)} を添加することにより DC に分化させた (CD14-ML-DC)。

図 1, 2 は単球, CD14-ML, 単球に IL-4, OK432 を添加して DC に分化させた Mo-DC, CD14-ML-DC の位相差顕微鏡画像と May Giemsa 染色像を示す。CD14-ML は末梢血より分離した単球と比較すると大きく、核の形状は単球とは異なりノッチがなく丸くなっていた。一方単球, CD14-ML にそれぞれ IL-4 と OK432 を添加し DC に分化させた CD14-ML-DC は、より生理的な DC に近い Mo-DC と同様の突起を有しており、核の形状も類似していた。

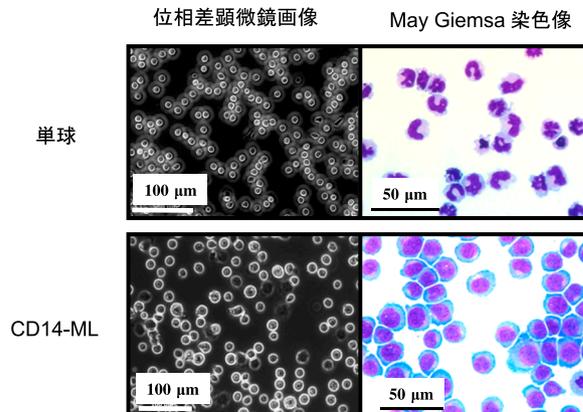


図 1 CD14-ML の形態 (文献 20 より引用)

単球および CD14-ML の位相差顕微鏡画像 (左) と May Giemsa 染色像 (右) を示す。

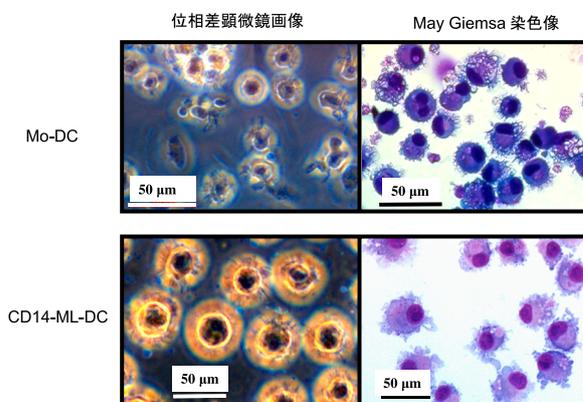


図 2 CD14-ML-DC の形態 (文献 20 より引用)

Mo-DC および CD14-ML-DC の位相差顕微鏡画像 (左) と May Giemsa 染色像 (右) を示す。

2. 細胞表面マーカーの解析

CD14-ML, CD14-ML-DC および Mo-DC について共刺激分子である CD80, CD86, DC の成熟マーカーである CD83, DC の活性化刺激分子である CD40, DC に多量に発現している HLA クラス I, HLA クラス II, ケモカインレセプターである CCR7 の発現についてフローサイトメトリーで解析した。図 3 において黒色のラインは特異的抗体による染色を、灰色塗りつぶしはアイソタイプ対照抗体による染色を示す。CD14-ML に IL-4 と OK432 を添加し、DC としての成熟を誘導した細胞ではほとんどの分子の発現が CD14-ML と比較して増加しており、Mo-DC と同等の発現を認めた。

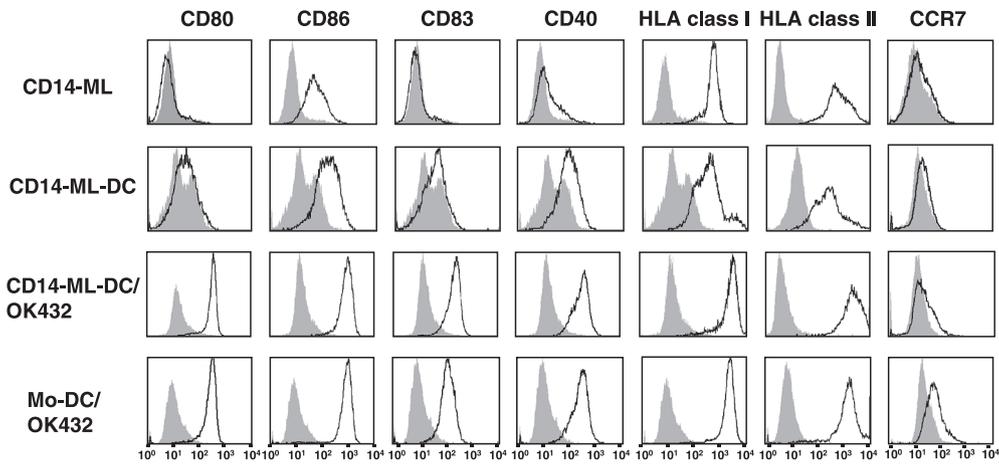


図3 CD14-ML-DC の細胞表面マーカー (文献 20 より引用)

CD14-ML, CD14-ML-DC, Mo-DC の表面マーカーを解析した。CD40, CD80, CD86, CD83, HLA クラス I, HLA クラス II, CCR7 の発現をフローサイトメトリーで解析した。黒色のラインは特異的抗体による染色を、灰色塗りつぶしはアイソタイプ対照抗体による染色を示す。

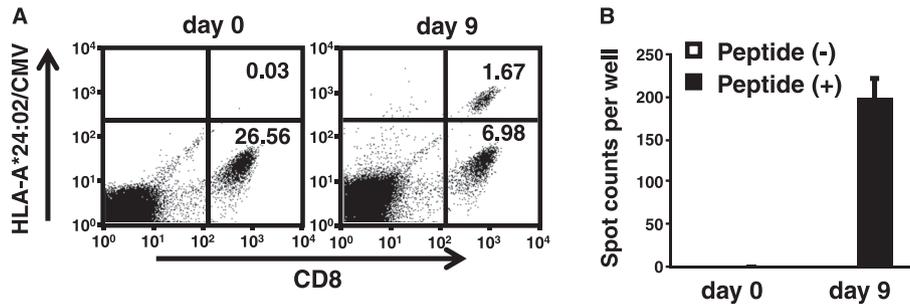


図4 CMV ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の誘導 (文献 20 より引用)

A : tetramer 染色を行った後のフローサイトメトリーの結果を示す。day 0 は CMV ペプチド刺激前の CMV ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の割合を示し、day 9 は CMV ペプチド刺激後の CMV ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の割合を示す。B : ELISPOT の結果を示す。day 0 は CMV ペプチド刺激前の CMV ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞のスポット数 (ウェルあたり 3×10^4 個の T 細胞を解析) を示し、day 9 は CMV ペプチド刺激後の CMV ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞のスポット数を示す。

3. HLA-A24 陽性ドナー由来の CD14-ML-DC を用いた CMV ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の誘導

日本人が高頻度に感染しているサイトメガロウイルス (CMV) の、HLA-A24 に結合する CMVpp65 抗原由来の CMVpp65₃₄₁₋₃₄₉ (QYDPVAALF)¹⁰⁾ ペプチドを使用した。HLA-A24 を保持する細胞ドナーの CD14-ML に IL-4 と TNF α (5 ng/ml) を添加して DC に分化させ、ペプチドを添加した。その後、CD8⁺T 細胞とペプチドを添加した CD14-ML-DC と共に培養した。培養液は AIM-V にヒト血漿 (5%) を添加したものを用い、共培養同日に IL-7 (10 ng/ml)、2 日後に IL-2 (20 u/ml) 添加し、誘導開始後 9 日目に培養プレートから T 細胞を回収し、HLA-A24 に CMVpp65 ペプチドを結合した HLA-A24 の tetramer¹¹⁾ で

染色し、フローサイトメトリーで CMVpp65 ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の検出を行った。図 4A において CD14-ML-DC で刺激する前 (day 0) は、CMVpp65 ペプチドに特異的な CD8⁺T 細胞はほとんど認めなかった (0.03%) が、誘導を行った 9 日後には回収した CD8⁺T 細胞中の 1.67% が CMVpp65 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞であることが示された。

さらに、誘導開始後 9 日目に培養プレートから回収した T 細胞を、CMVpp65₃₄₁₋₃₄₉ ペプチドおよびコントロールとして HLA-A24 に結合する HIV ペプチド (RYLRDQQLL) を負荷した HLA-A24 陽性細胞 (C1R) と培養した。16 時間後に IFN- γ を産生する T 細胞数を ELISPOT 法により計測した (図 4B)。グラフは IFN- γ 産生細胞を検出したスポット数を示す。刺激前ではどちらもスポットを認め

なかったが、刺激後 9 日目ではコントロールと比較して、CMV pp65₃₄₁₋₃₄₉ ペプチドを負荷した CIR で刺激したもので有意なスポットの増加を認めた。以上のフローサイトメトリーと ELISPOT の結果より、CMVpp65 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞が CD14-ML-DC との共培養により誘導されることが示された。

4. HLA-A2 陽性ドナー由来の CD14-ML-DC を用いた癌抗原 MART1 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の誘導

HLA-A2 に結合する癌抗原 MART1 由来の MART1₂₆₋₃₅ (EAAGIGILTV)¹²⁾ のペプチドを使用した。HLA-A2 を保持する細胞ドナーの CD14-ML に IL-4 と OK432 を添加し DC に分化させ、ペプチドを添加した。その後、CD8⁺T 細胞とペプチドを添加した CD14-ML-DC と共に培養した。培養液は AIM-V にヒト血漿 (5%) を添加したものをを用い、共培養同日に IL-7 (10 ng/ml)、2 日後に IL-2 (20 u/ml) 添加し、1 週間毎に 3 回刺激を行った。刺激開始後 21 日目に培養プレートから T 細胞を回収し、HLA-A2 に MART1 ペプチドを結合した dextramer で染色し、フローサイトメトリーで MART1 ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞を検出した。図 5A において CD14-ML-DC で刺激する前 (day 0) は、MART1 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞はほとんど認めなかった (0.01%) が、誘導を行った 27 日目には回収した CD8⁺T 細胞中 0.96% が、MART1 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞であることが示された。以上のフローサイトメトリーの結果より、MART1 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞が CD14-ML-DC との共培養により誘導されることが示された。

さらに、刺激開始後 21 日目に培養プレートから回収した T 細胞を MART1₂₆₋₃₅ ペプチドおよびコントロールとして、HLA-A2 に結合する HIV ペプチド (SLYNTYATL) を負荷した HLA-A2 陽性細胞 (T2) と培養した。16 時間後に IFN- γ を産生する T 細胞数を ELISPOT 法により計測した (図 5B)。グラフは IFN- γ 産生細胞を検出したスポット数を示す。刺激前ではどちらもスポットを認めなかったが、刺激後 21 日目ではコントロールと比較して、MART1 ペプチドを負荷した T2 で刺激したもので有意なスポットの増加を認めた。以上のフローサイトメトリーと ELISPOT の結果より、MART1 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞が CD14-ML-DC との共培養により誘導されることが示された。

考 察

DC ワクチン療法の臨床研究・試験は前立腺癌、悪性黒色腫や神経膠芽腫など様々癌で行われ^{1,13,14)}、生存率の改善に有用であると報告されている。DC ワクチン療法は有用な治療法であるが、DC 作製のために大量の単球が必要であるため、臨床研究・試験の多くはアフエレーシス操作を行っており、患者の負担が大きいという問題がある。我々は以前行った研究でヒト iPS-ML にレンチウイルスベクターで *cMYC* と *BMII* 遺伝子を導入することにより、ヒト iPS 細胞に由来するミエロイド系細胞を増殖させることができることを示した¹⁵⁾。この結果より、患者個々のヒト iPS-ML を作製すればアフエレーシス操作を行うことなく DC ワクチン療法を行うことができるが、より簡便かつ短時間で大量の単球を得ることができないかと考え、単球にレンチウイルスベクターで *cMYC* と *BMII* を

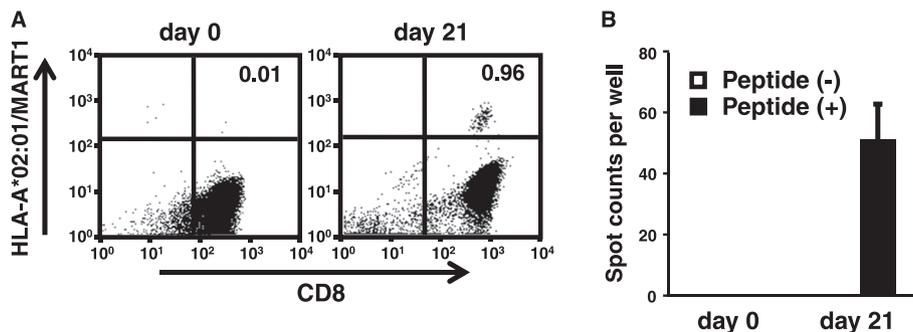


図 5 MART1 ペプチドに特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の誘導 (文献 20 より引用)

A : フローサイトメトリーの結果を示す。day 0 は MART1 ペプチド刺激前の MART1 ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の割合を示し、day 21 は MART1 ペプチド刺激後の MART1 ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の割合を示す。
B : ELISPOT の結果を示す。day 0 は MART1 ペプチド刺激前の MART1 ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞のスポット数を示し、day 21 は MART1 ペプチド刺激後の MART1 ペプチド特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞のスポット数を示す。

導入することによっても iPS-ML と同様に増殖させることができるのではないかと考え、健康人ドナー 12 人の単球にレンチウイルスベクターで *cMYC* と *BM11* 遺伝子をそれぞれ導入した。その結果、12 人中 3 人では 1,000 倍以上に増殖し、6 人は 20–1,000 倍に増殖したが、3 人ではほとんど増殖がみられなかった。一部のドナーで CD14-ML が樹立できなかった原因は不明であるが、全てのドナーから CD14-ML を樹立するためには *cMYC* と *BM11* のほかに新たな遺伝子を追加する必要があるのではないかと考え、現在新たな遺伝子の特定を行っている。

CD14-ML は単球と比較すると大きく、核の形状はノッチがなく丸くなっており、単球とは異なっていたが、DC に分化させると突起を有し、Mo-DC と比較的似ている形状を示し、細胞表面マーカーも類似していた (図 1, 2)。また、抗原特異的な TCR を発現する CD8⁺T 細胞の誘導も Mo-DC と同様に行えることが示され (図 3, 4)、今後、ペプチドワクチンの開発研究や DC 療法などの臨床応用に向けた研究が必要である。現在臨床研究・試験で行われている癌ペプチドワクチン療法の対象となっている患者のほとんどが HLA-A2 又は HLA-A24 を有する患者に限られており^{16–19)}、HLA-A2 又は HLA-A24 を有さない患者は癌ペプチドワクチン療法を受けることができない。そこで、CD14-ML が任意のドナーから作製できるようになれば、CD14-ML に癌特異的な遺伝子を直接導入することにより、CD14-ML-DC の HLA クラス I に癌特異的なペプチドを提示させ、HLA の型に関係なく CTL の誘導が可能になることが期待される。

CD14-ML の臨床応用の大きな問題点として、①全てのドナーからは CD14-ML の樹立ができないこと、②癌原遺伝子を導入しているためがん化のリスクがあるという 2 点があげられる。①については新たな遺伝子の特定のための研究を続けており、いずれ新たなファクターが明らかになることが期待される。②については CD14-ML-DC に分化させるために IL-4 を添加すると数日以内に増殖が止まるが、癌化するリスクは否定できない。そこで、CD14-ML を CD14-ML-DC に分化させ、生体内に投与する直前に細胞増殖能を不活性化する適切な量の放射線照射を行うことにより、癌化のリスクを限りなく低くすることができると考えられる。CD14-ML を臨床応用するために、これらの問題を解決することが今後の課題である。

略語一覧

CD14-ML: CD14 cell-derived myeloid cell line
 CMV: cytomegalovirus
 CTL: cytotoxic T lymphocyte
 DC: dendritic cell
 ELISPOT: Enzyme-Linked ImmunoSpot
 HIV: human immunodeficiency virus
 iPS-ML: iPS cell-derived myeloid cell line
 Mo-DC: monocyte-derived dendritic cell
 OK432: penicillin-killed *Streptococcus pyogenes*
 PBMC: peripheral blood mononuclear cells

引用文献

- 1) Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, *et al.*: Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* (115): 3670–3679, 2009.
- 2) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, *et al.*: Impact study investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* (363): 411–422, 2010.
- 3) Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Med* (10): 909–915, 2004.
- 4) Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, *et al.*: Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* (155): 1172–1187, 1982.
- 5) Freudenthal PS, Steinman RM: The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci USA* (87): 7703–7707, 1990.
- 6) 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.
- 7) Choi KD, Vodyanik M, Slukvin II: Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* (6): 296–313, 2011.
- 8) Itoh T, Ueda Y, Okugawa K, *et al.*: Streptococcal preparation OK432 promotes functional maturation of human monocytederived dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* (52): 207–214, 2003.
- 9) Nakahara S, Tsunoda T, Baba T, *et al.*: Dendritic cells stimulated with a bacterial product, OK-432, efficiently induce cytotoxic T lymphocytes specific to tumor rejection peptide. *Cancer Res* (63): 4112–4118, 2003.
- 10) Kuzushima K, Hayashi N, Kimura H, *et al.*: Efficient identification of HLA*2402-restricted cytomegalovirus-specific CD8 (+) T-cell epitopes by a computer algorithm and an enzyme-linked immunospot assay. *Blood* (98): 1872–1881, 2001.
- 11) Watanabe K, Suzuki S, Kamei M, *et al.*: CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in

- adoptive immunotherapy. *Int J Hematol* (88): 311–320, 2008.
- 12) Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, *et al.*: Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* (180): 347–352, 1994.
 - 13) Oshita C, Takikawa M, Kume A, *et al.*: Dendritic cell-based vaccination in metastatic melanoma patients: phase II clinical trial. *Oncol Rep* (28): 1131–1138, 2012.
 - 14) Phuphanich S, Wheeler CJ, Rudnick JD, *et al.*: Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* (62): 125–135, 2013.
 - 15) 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 Ther* (20): 504–513, 2013.
 - 16) Uemura H, Fujimoto K, Tanaka M, *et al.*: A Phase I Trial of Vaccination of CA9-Derived Peptides for HLA-A24-Positive Patients with Cytokine-Refractory Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* (12): 1768–1775, 2006.
 - 17) Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, *et al.*: Phase II Clinical Trial of Multiple Peptide Vaccination for Advanced Head and Neck Cancer Patients Revealed Induction of Immune Responses and Improved OS. *Clin Cancer Res* (21): 312–321, 2015.
 - 18) Schwartzentruber DJ, Lawson DH, Richards JM, Conry RM, Miller DM, Treisman J, *et al.*: gp100 peptide vaccine and interleukin-2 in patients with advanced melanoma. *N Engl J Med* (364): 2119–2127, 2011.
 - 19) Suzuki N, Hazama S, Ueno T, *et al.*: A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *J Immunother* (37): 36–42, 2014.
 - 20) Haruta M, Tomita Y, Imamura Y, *et al.*: Generation of a large number of functional dendritic cells from human monocytes expanded by forced expression of cMYC plus BMI1. *Hum Immunol* (74): 1400–1408, 2013.

Development of a Method for Generation of Immune Competent Dendritic Cells in a Large Scale by Using Human Peripheral Blood Monocytes with Gene Modifications

Yuya Imamura^{1,2)}, Miwa Haruta¹⁾, Yusuke Tomita^{1,3)}, Keiko Matsumura¹⁾,
Tokunori Ikeda^{1,4)}, Koutaro Takamatsu^{1,4)}, Yasuharu Nishimura¹⁾ and Satoru Senju¹⁾

¹⁾ Department of Immunogenetics, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

²⁾ Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

³⁾ Department of Respiratory Medicine, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

⁴⁾ Department of Neurology, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

In cancer immunotherapy, it is the most important that the cancer antigen-specific T cells are derived by the peptide presented by HLA antigen, and dendritic cells (DC) are useful to drive them. For preparation of sufficient quantity of DC, a large number of monocytes are required, and apheresis, a somehow invasive procedure, is generally conducted. As a means to facilitate the generation of DC, we herein report a method to amplify human monocytes. We found that lentivirus-mediated transduction of *cMYC* along with *BM11* induced proliferation of CD14⁺ monocytes derived from 9 out of 12 blood donors, and we named this proliferating cell CD14 cell-derived myeloid cell line (CD14-ML). The proliferation of CD14-ML began after a culture start in 3–5 weeks in the presence of M-CSF and GM-CSF, resulting in 20–1000-fold amplification. When we added IL-4 and TNF α or OK432 in the expanded CD14-ML, the cell differentiated into DC (CD14-ML-DC) having strong T cell stimulation activity. We successfully stimulated autologous CD8⁺ T cells with CD14-ML-DC pulsed with cytomegalovirus peptide or MART-1 peptide to generate antigen-specific CTL lines. This is the first report describing the method for *in vitro* expansion of human peripheral blood monocytes.

Key words: CD14-ML, DC, *cMYC*, *BM11*

第 13 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集

会 期 : 2015 年 2 月 7 日 (土)

会 場 : 大阪府赤十字血液センター 7 階会議室

大阪市城東区森之宮 2 丁目 4 番 43 号

TEL: 06-6962-7001

世話人 : 金光 靖

近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

〒 589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

TEL: 072-366-0221

E-mail: yuketsu@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7日（土）12:50～13:00
2. 世 話 人 会：2月7日（土）11:30～12:50
3. 意見交換会：2月7日（土）17:00～

【会場地図】

大阪府赤十字血液センター 7階会議室
大阪市城東区森之宮2丁目4番43号 TEL 06-6962-7001



♥ 施設の詳しい地図



JR 環状線・地下鉄中央線・地下鉄長堀鶴見緑地線，森ノ宮駅下車東へ 350 m

プログラム

9 時 30 分

受付開始

【午前の部】

10 時～10 時 30 分

モーニングセミナー

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

「幹細胞治療の現状と展望：iPS 細胞の臨床応用を中心に」

木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

10 時 30 分～11 時 30 分

一般演題 (1)

10 時 30 分～11 時

座長：荒木延夫（兵庫県赤十字血液センター）

1) WAKFlow[®] HLA 抗体 クラス I&II (ICFA) の改良報告

○白水隆喜¹⁾, 直原 寛¹⁾, 河野幸太¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 中島文明²⁾

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部¹⁾, 日本赤十字社 血液事業本部 中央研究所²⁾

2) HLA-C 抗体と血小板輸血効果について

○山本ゆかり, 高 陽淑, 西海真弓, 原 祐子, 西宮紘子, 下北希美, 石井博之, 松倉晴道, 谷 慶彦, 河 敬世

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

3) HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度について

○中村仁美¹⁾, 岸 友子²⁾, 中野 学³⁾, 黒田ゆかり¹⁾, 山口恵津子¹⁾, 田原大志¹⁾, 井上純子¹⁾, 宮本 彰¹⁾, 迫田岩根¹⁾, 入田和男¹⁾, 清川博之¹⁾

日本赤十字社九州ブロック血液センター¹⁾, 日本赤十字社東北ブロック血液センター²⁾, 日本赤十字社北海道ブロック血液センター³⁾, 佐賀県赤十字血液センター⁴⁾

一般演題 (2)

11 時～11 時 30 分

座長：石井博之（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター）

4) 次世代シーケンシング (NGS) で検出された新規アレルについて

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

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

5) MiSeq による HLA タイピング (その 2)

○末上伸二¹⁾, 小島裕人¹⁾, Wyatt Nelson²⁾³⁾, 石谷昭子³⁾⁴⁾, 林 晃司¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, Daniel E. Geraghty²⁾³⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明⁵⁾, 赤座達也¹⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, Fred Hutchinson Cancer Research Center²⁾, Scisco Genetics, Inc.³⁾, 奈良県立医科大学法医学教室⁴⁾, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会⁵⁾

6) iPS 細胞ストック構築に必要な HLA ホモ接合体について

○楠木靖史¹⁾, 赤座達也¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 小島裕人¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 木村貴文³⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, 特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会²⁾, 京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門³⁾

11 時 30 分～12 時 50 分

昼食・世話人会

12 時 50 分～13 時 00 分

総会

【午後の部】

13 時 00 分～13 時 30 分

テクニカルセミナー

座長：小島裕人（公益財団法人 HLA 研究所）

次世代シーケンシング（NGS）による HLA タイピング：SS-SBT 法の開発状況と今後の展望

尾崎有紀，鈴木進悟，重成敦子，伊藤さやか，榎屋安里，光永滋樹，猪子英俊，椎名 隆

（東海大学医学部基礎医学系分子生命科学）

13 時 30 分～15 時 30 分

シンポジウム

「HLA 抗体と移植」

座長：谷 慶彦（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

芦田隆司（近畿大学医学部 血液膠原病内科）

1) DSA 陽性症例の腎移植について

西村憲二（兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター）

2) HLA 抗体と肝臓移植

○井手健太郎，大段秀樹

（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・移植外科学）

3) HLA 抗体と造血幹細胞移植

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾, 小林良二³⁾

（社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾, 同 血液内科²⁾）

（同 小児思春期科³⁾）

15 時 40 分～16 時 40 分

特別講演

座長：木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法

岡 芳弘（大阪大学大学院医学系研究科）（癌免疫学（大塚製薬）共同研究講座 特任教授）

17 時～ **懇親会**

(10:00 ~ 10:30)

モーニングセミナー

座長：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

幹細胞治療の現状と展望：iPS 細胞の臨床応用を中心に

木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

幹細胞治療の現状と展望：iPS 細胞の臨床応用を中心に

木村貴文

京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門

人工多能性幹細胞（以下、iPS 細胞）創出に関する山中らの報告（Cell, 2006）から 9 年目を迎えている。基礎生命科学にとどまらず、医療とくに細胞移植を基軸とする再生・細胞治療領域でのパラダイムの転換に内外から至高の期待が寄せられてきた。

iPS 細胞に触発されるように、体性幹細胞や免疫担当細胞を用いたがん免疫療法の特異性と有効性はここ数年間で格段に改善しつつある。とくに構造解析やバイオイメージングなどの技術革新がもたらした分子間相互作用の再評価などによって、特異的抗原をターゲットとする免疫治療が可能ながん種と HLA ハプロタイプは急速に拡張しており、今後 HLA ハプロタイプの人工的改変などが可能になれば、高頻度 HLA ハプロタイプを持つがん特異的 T 細胞株や樹状細胞株のバンク化も有用ながん治療戦略となる可能性がある。すでに HLA 分子の発現を抑制した universal (HLA Class-I-null, β 2MG-null) 血小板の大量調製が可能となっている（参考文献 1）。

多能性幹細胞を用いた再生・細胞治療の分野においても、胚性幹細胞（以下、ES 細胞）を用いた網膜変性疾患に対する米英での臨床試験成績がすでに報告された（参考文献 2）。

加齢および先天性黄斑変性症に対する ES 細胞由来人工網膜シートの同種移植治療は、HLA 不一致移植でも

急性拒絶反応なく、安全かつ有効な治療になりうることが示されている。いっぽう、iPS 細胞を用いた再生・細胞治療として、加齢黄斑変性症の患者に対する自家 iPS 細胞由来網膜シート移植が、理化学研究所の高橋らによって 2014 年に世界で初めて実施された。移植後に憂慮すべき有害事象は報告されておらず、第 2 例目の移植に期待が寄せられている。その他にもパーキンソン病、心疾患、軟骨変性疾患、脊髄損傷、血小板輸血、がん特異的 T 細胞治療などは近い将来に実施が予想されるシーズとして iPS 細胞を用いた基礎研究が進行中であり、多様化する細胞治療の早期実現と活性化を推進するため世界に先駆けて整備されたさまざまな医療規制を身方につけ、わが国の再生・細胞治療は発展をしていくものと考えられる。

参考文献

- 1) Scalable generation of universal platelets from human induced pluripotent stem cells. Feng Q, et al. *Stem Cell Reports* 3: 817–831, 2014.
- 2) Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. Schwartz SD, et al. *Lancet*. published online October 15, 2014. doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3.

(10:30 ~ 11:00)

一般演題 (1)

座長：荒木延夫（兵庫県赤十字血液センター）

演題番号 1) ~ 3)

1) WAKFlow[®] HLA 抗体 クラス I&II (ICFA) の改良報告

○白水隆喜¹⁾, 直原 寛¹⁾, 河野幸太¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 中島文明²⁾

湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部¹⁾, 日本赤十字社 血液事業本部 中央研究所²⁾

【背景】HLA 交差適合性試験試薬である WAKFlow HLA 抗体 クラス I & II (ICFA) [以下, ICFA (I&II)] は, HLA 抗体を特異的に検出する試薬である。今回, ICFA (I&II) について, クラス II 抗体の検出感度向上及び移植後 HLA 抗体検出のモニタリングへの適応検討を行ったので, その結果について報告する。

〈クラス II 抗体感度向上検討〉

使用する血液量を増やすことで, HLA クラス II 抗体の検出感度向上が可能であるか検討した。

〈移植後のモニタリング適応検討〉

移植後に *de novo* DSA が産生されているかどうかをモニタリングすることは, 抗体関連拒絶反応を予測するために重要である。ドナー血液の保存方法の検討を行い, 移植後 HLA 抗体検出のモニタリング検査が可能であるか検討した。

【結果】〈クラス II 抗体感度向上検討〉

クラス II 感度向上のため, 使用するドナー血液量の検討を行った。その結果, 現在の使用血液量 (全血) である 100 uL から 500 uL に血液量を増加させることで感度が向上することが明らかとなった。

使用する細胞上の HLA に対する抗体陽性の検体 [WAKFlow HLA 抗体クラス II (MR) で MFI : 2000 以上の 21 検体] について, 100 uL 及び, 500 uL 使用時の

検出感度を比較したところ, 100 uL 使用時では抗体陽性率 57.1% (12 検体 / 21 検体) であったのに対し, 500 uL 使用時では 95.2% (20 検体 / 21 検体) に検出率が上昇した。また, 血液量を増加させたことによる, クラス I の検出感度への影響や陰性反応の非特異的な上昇は確認されなかった。これらの結果から, 使用血液量を 500 uL に増加する方法は, 感度向上のために有効な手段であると考えられる。

〈移植後のモニタリング適応検討〉

まず, ドナー血液から通常のアッセイ方法により得られた白血球を凍結保存し, アッセイが可能であるか検討した。しかし, バックグラウンドビーズへの非特異的な蛍光シグナルの上昇が確認されたため, 抗体検査を行うことは不可能であった。

そこで次に, 血球分離試薬を用いて, ドナー血液から単核球 (リンパ球・単球) の画分を分離し, この画分を凍結保存後にアッセイを行った。その結果, 保存 6 ヶ月後の細胞を使用しても, バックグラウンドビーズに蛍光シグナルの非特異的な上昇は見られず, 保存前の通常アッセイ時と同等の検出感度で抗体検出が可能であることが明らかとなった。

今後, より長期間 (1 年以上) 保存した細胞でもモニタリングが可能であるか, 検討を続ける予定である。

2) HLA-C 抗体と血小板輸血効果について

○山本ゆかり, 高 陽淑, 西海真弓, 原 祐子, 西宮紘子,
下北希美, 石井博之, 松倉晴道, 谷 慶彦, 河 敬世

日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

【はじめに】濃厚血小板 HLA-LR「日赤」は患者とドナーの HLA 型を適合させた血小板製剤であるが、供給する際、HLA-A, B 抗原の適合度を考慮してドナーを選択するため HLA-C 抗原不適合の製剤を供給する場合がある。HLA-C 抗体については、HLA-C 抗原の発現が弱いため考慮不要¹⁾とされているが、輸血不応例の症例報告²⁾もあり、不透明な部分が多い。今回、最近の症例を対象に HLA-C 抗体と血小板輸血効果の関連性について調査を行ったので報告する。

【対象と判定基準】平成 24 年 10 月 1 日～平成 26 年 10 月 31 日に実施した PC-HLA 交差適合試験 10,393 件中、199 件（患者 52 名）が陽性であった。そのうち LAB-Screen single antigen を用いた HLA 抗体検査により陽性の原因が HLA-C 抗体と判断できたのが 102 件（20 名）であった。これらの製剤は、HLA-C 抗体が原因で交差適合試験陽性であることを主治医が了承した場合のみ、患者指定の血小板製剤として供給しており、このうち、CCI（補正血小板増加数）を計算するための情報が得られた 8 件（6 名）について解析を行った。

輸血効果の判定基準として、CCI が 1 時間値で 7,500/ μ L 以上、または 24 時間値が 4,500/ μ L 以上を輸血効果ありとした。

【結果】対象となった 8 件（6 名）のうち 5 件（4 名）は輸血効果が認められたが、3 件（3 名）は効果が認められなかった（1 名は重複）。

この 8 件の PC-HLA 交差適合試験について、ドナーの HLA-C 抗原に反応すると考えられる抗体特異性を比較したところ、輸血効果のあった症例では、HLA-Cw1, Cw4, Cw8, Cw9、輸血効果のなかった症例の特異性は、HLA-Cw1, Cw9 であった。さらに、輸血効果があった症例の中には抗体検査時の LABScreen single antigen での BNV（補正蛍光値）が 20,000 近くと高値を示したのもあった。

【考察】今回対象とした症例の中では、患者が保有する HLA-C 抗体の特異性と輸血効果には関連性を認めなかったことや、抗体検査時に強陽性となった抗体を保有していても輸血効果が得られた例を認めたことから、HLA-C 抗体は輸血効果に影響しないことが示唆された。さらに、輸血効果のなかった 3 件は血小板減少を引き起こす非免疫性の要因もあることから、HLA-C 抗体が輸血不応の原因と断定することはできなかった。

今回の検討において、HLA-C 抗体と輸血効果の直接的な因果関係は認められなかった。しかし、症例数が少ないことや、データ不足のため CCI の 1 時間値での比較ができなかったことが影響していることも否定できないため、引き続きデータ収集を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Transplantation Proceedings, 4: 1977
- 2) 日本輸血細胞治療学会 Vol. 53 No. 2 日本血液事業学会 第 32 巻 Vol. 2

3) HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度について

○中村仁美¹⁾, 岸 友子²⁾, 中野 学³⁾, 黒田ゆかり¹⁾, 山口恵津子¹⁾, 田原大志¹⁾,
井上純子¹⁾, 宮本 彰¹⁾, 迫田岩根¹⁾, 入田和男^{1,4)}, 清川博之¹⁾

日本赤十字社九州ブロック血液センター¹⁾, 日本赤十字社東北ブロック血液センター²⁾,
日本赤十字社北海道ブロック血液センター³⁾, 佐賀県赤十字血液センター⁴⁾

【はじめに】血小板特異抗原（以下，HPA）に対する同種抗体は，血小板輸血不応や新生児血小板減少性紫斑病（NAIT）の一因となる。HPA は，人種により遺伝子頻度に差が認められ，現在までに 28 抗原系が報告されている。低頻度 HPA のすべてが，NAIT 症例における同種抗体の存在で発見され，HPA-7new および HPA-21bw は大阪で検出報告された。日本では，HPA-1 から HPA-6 の遺伝子頻度は明らかになっているが，HPA-7 以降の HPA について全国的な遺伝子頻度は明らかになっていない。今回 HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度を明らかにし，さらに遺伝子頻度に地域差が認められるかを検討した。

【対象・方法】対象は，日本赤十字社九州ブロック血液センター（以下，九州），北海道ブロック血液センター（以下，北海道）および東北ブロック血液センター（以下，東北）における PC-HLA 登録献血者とし，検査済の HPA DNA タイピングデータをもとに集計した。対象数は，HPA-7 が 17,287 名（九州 10,540 名，北海道 1,951 名，東北 4,795 名），HPA-21 が 4,473 名（九州 1,494 名，北

海道 177 名，東北 2,802 名）である。HPA-7 および HPA-21 遺伝子型の決定は，PCR-SSO 法で用い，HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度を求めた。

【結果】HPA-7new の遺伝子頻度は，全体で 0.03% であり，地域別の遺伝子頻度は，九州 0.04%，北海道 0.08%，東北 0% であった。また，HPA-21bw の遺伝子頻度は 0.48% であり，地域別では，九州 0.57%，北海道 0.28%，東北 0.45% であった。

【まとめ】HPA-7new および HPA-21bw の遺伝子頻度は，大阪での高らによる報告では 0.077%（7/4536 名），0.53%（10/944 名）とされている。今回集計した結果と併せて，HPA-7new は東北では検出されておらず，大阪及び北海道で遺伝子頻度が高いことから地域差があるのではないかと推測される。HPA-21bw は，対象数が少ない北海道の集計を除いた九州，東北および大阪を比較すると頻度に差は認められなかった。今回の結果から，HPA-21bw は日本全国での存在が推定され，その頻度からも NAIT 発症要因となる可能性が高く，検査時には稀な抗体を検出可能な交差試験が重要であると思われる。

(11:00 ~ 11:30)

一般演題 (2)

座長：石井博之（日本赤十字社 近畿ブロック血液センター）

演題番号 4) ~ 6)

4) 次世代シーケンシング (NGS) で検出された新規アレルについて

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

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

【目的】Luminex 法では検出できなかったが NGS による HLA 遺伝子型検査により見つかった 3 例の新規アレルを紹介する。

【材料・方法】造血幹細胞移植を考慮し Luminex 法 (WAKFlow HLA Typing kit) により HLA 遺伝子型検査をした 12 家族 54 人を, Scisco Genetics 社のタイピング試薬で Class I の exon 2, 3, 4, Class II の exon 2, 3 を増幅し illumina 社の Miseq で塩基配列を決定した。

【結果】3 家族に見つかった新規アレルの塩基配列の変異箇所, アミノ酸置換, およびハプロタイプを以下に示す。

1) C*04:01V

C*04:01 の 132 番目のコドン TCC が TCT に変異。同義置換でありアミノ酸置換はない。

A*11:01:01 - C*04:01V - B*15:01:01G - DRB4*01:01:01G - DRB1*04:06:01 - DQA1*03:01:01 - DQB1*03:02:01 - DPA1*02:02:02 - DPB1*03:01:01G

2) C*12:02:02V

C*12:02:02 の 136 番目のコドン GCG が GTG に変異し, アラニン (非極性) がバリン (非極性) に置換。136 番目は Class I $\alpha 2$ ドメインの α ヘリックスと β シートのルー

プアウト部分にあたる。

A*24:02:01G - C*12:02:02V - B*52:01:01G - DRB5*01:02 - DRB1*15:02:01 - DQA1*01:03:01G - DQB1*06:01:01 - DPA1*02:01:01 - DPB1*09:01:01

3) DPB1*02:01:02V

DPB1*02:01:02 の 99 番目のコドン GTT が GAT に変異し, バリン (非極性) がアスパラギン酸 (酸性) に置換。99 番目は Class II の $\beta 2$ ドメインにあたる。

A*24:02:01G - C*15:02:01G - B*40:02:01 - DRB3*02:02:01G - DRB1*14:06:01 - DQA1*05:01:01G - DQB1*03:01:01G - DPA1*02:02:02 - DPB1*02:01:02V

(G 表記は IMGT ホームページ参照。)

【考察】C*12:02:02V と DPB1*02:01:02V のアミノ酸置換は, TCR 結合部位でも CD4 や CD8 接触部位でもないことから, これらが T 細胞応答に与える影響は低いと考えられる。特に, C*12:02:02V は exon3 のループアウト部分の変異であり, 他の HLA-C アレルでは多型性が乏しい箇所であることから, プローブが設計されていなかったため Luminex 法 (WAKFlow HLA Typing kit) で検出されなかったと考えられる。

5) MiSeq による HLA タイピング (その 2)

○末上伸二¹⁾, 小島裕人¹⁾, Wyatt Nelson²⁾³⁾, 石谷昭子³⁾⁴⁾, 林 晃司¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 楠木靖史¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, Daniel E. Geraghty²⁾³⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明⁵⁾, 赤座達也¹⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, Fred Hutchinson Cancer Research Center²⁾, Scisco Genetics, Inc.³⁾, 奈良県立医科大学 法医学教室⁴⁾, NPO 法人 白血病研究基金を育てる会⁵⁾

〔目的〕 NGS (Next Generation Sequencing) による HLA 全領域の塩基配列の決定は, 従来の Luminex 法に代わる新たなタイピング法として注目されている。しかし, exon 領域を標的とした方法に比べ多くの工程を必要とするため, ルーチン検査で行うことは難しいとされている。

我々は前回の当地方会でルーチン検査を目的として Class I の exon2, 3, 4, Class II の exon2, 3 を標的としたタイピングでは, Ambiguity を完全に解消できないことを報告した。

今回は, Ambiguity を解消するために Class I (A, B, C) の exon1-7, Class II (DRB1, DRB3, 4, 5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) の exon1-4 を標的としたタイピングを試みたので報告する。

〔材料・方法〕 当研究所に依頼があり, Luminex 法で HLA-A, B, C, DRB1 遺伝子型 (WAKFlow, 湧永製薬) タ

イピング検査済みの 47 検体 (濾紙血痕 4 検体, Buccal 20 検体, 末梢血 23 検体) について Scisco Genetics 社の試薬キットを用いて PCR で増幅し, MiSeq を用い HLA 領域の塩基配列の決定を行った。

〔結果〕 47 検体 (Class I 3 座, Class II 6 座) で 4 座の genotype が決定できなかったものの 423 座の genotype 中, 419 座の genotype が決定され Luminex 法と一致した。

〔考察〕 今回の検討で標的となる遺伝子領域を拡大することで, これまで第 2 区域で決められなかった HLA-A 座 1 種, HLA-B 座 2 種, HLA-C 座 4 種, HLA-DRB1 座 2 種, HLA-DQA1 座 6 種, HLA-DPB1 座 3 種の Ambiguity が解消でき, より正確な HLA タイピングが可能となった。

今回の結果, 99% 以上 (419 座 / 423 座) で対象とした HLA 遺伝子座が決定でき, ルーチン検査で使用していく検査キットとして有用であることが分かった。

6) iPS 細胞ストック構築に必要な HLA ホモ接合体について

○楠木靖史¹⁾, 赤座達也¹⁾, 二神貴臣¹⁾, 小島裕人¹⁾, 辻野貴史¹⁾, 林 晃司¹⁾, 藤井直樹¹⁾, 末上伸二¹⁾, 池田奈未¹⁾, 宮崎有紀¹⁾, 西川美年子¹⁾, 小川公明²⁾, 木村貴文³⁾, 田中秀則¹⁾, 佐治博夫¹⁾

公益財団法人 HLA 研究所¹⁾, 特定非営利活動法人 白血病研究基金を育てる会²⁾,
京都大学 iPS 細胞研究所基盤技術研究部門³⁾

【はじめに】iPS 細胞は人工的な多能性幹細胞として今後の再生医療において非常に有効であると考えられる。しかし、患者本人から iPS 細胞を作製し、治療に用いる場合は膨大な時間やコストがかかることから、HLA ホモ接合体の iPS 細胞をバンクキングすることで、免疫的反応、作成時間、コストなどの問題を解消することが可能となる。

今回、我々は当研究所で行った HLA タイピング結果に基づき算出したハプロタイプデータにより iPS 細胞ストック構築に必要な HLA ホモ接合体の種類、適合率、および必要とするドナー母集団について算出した。

【材料・方法】2005 年から 2013 年までにタイピングを行った日本人 8,138 家系、31,410 人の HLA タイプから算出された HLA-A, B, DR, 3 座、2,796 ハプロタイプの頻度、および、日本人 4,992 家系、19,183 人の HLA タイプから算出された HLA-A, B, C, DR, 4 座、3,361 ハプロタイプの頻度を用いてそれぞれの適合率などを算出した。

【結果】HLA-A, B, DR, 3 座では HLA ホモ接合体 68 種類で日本人の 70% をカバーし、ドナー母集団として約 21 万人が必要であった。また、124 種類で日本人 80% をカバーし、ドナー母集団として約 46 万人が必要であった。

HLA-A, B, C, DR, 4 座では 79 種類で日本人の 70% をカバーし、ドナー母集団として約 30 万人が必要であった。また、154 種類で日本人の 80% をカバーし、ドナー母集団として約 95 万人が必要と推計できた。

【考察】今回の算出結果では、2013 年の中島の報告[※]と同程度の推定となった。

現在、東アジア地域における各国のハプロタイプ頻度から各国が iPS 細胞ストックを構築した際の相互の適合率検証を進めている。

※：参考文献

「iPS 細胞バンクと HLA」, 中島文明：血液フロンティア, Vol.23, No.8, 2013

(11:30 ~ 12:50)

昼食・世話人会

(12:50 ~ 13:00)

総会

(13:00 ~ 13:30)

テクニカルセミナー

座長：小島裕人（公益財団法人 HLA 研究所）

次世代シーケンシング（NGS）による HLA タイピング：SS-SBT 法の開発状況と今後の展望

尾崎有紀，鈴木進悟，重成敦子，伊藤さやか，榎屋安里，光永滋樹，猪子英俊，椎名 隆

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

次世代シーケンシング (NGS) による HLA タイピング： SS-SBT 法の開発状況と今後の展望

尾崎有紀, 鈴木進悟, 重成敦子, 伊藤さやか, 榊屋安里, 光永滋樹, 猪子英俊, 椎名 隆

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

現在の高精度 HLA タイピング法として、主に PCR-SSOP 法 (主に Luminex 法) や PCR-SBT 法が使用されている。しかし、これらの方法を用いた場合、2 つの多型部位が同一の染色体上 (*cis*) か異なる染色体上 (*trans*) に位置するのかが情報が得られない、いわゆる phase ambiguity が生じること、PCR-Luminex 法では年々増加している新規 HLA アリルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足していることから、多くの場合はいくつかのアリル候補が存在し、単一のアリルに絞り込むことができない。これらに代わる方法として、近年、次世代シーケンシング (NGS) による HLA 遺伝子の DNA タイピング法が注目を浴びている。NGS では 1 分子の DNA より塩基配列決定が可能のため、*cis-trans* 情報が得られ、その結果 phase ambiguity 無しにアリルを正確に判定できる。そこで我々は、従来の高精度 HLA タイピング法の後継法として、超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法を開発した。

SS-SBT 法は (1) PCR, (2) NGS, (3) アリル判定の 3 つの過程で成り立っている。我々はまず HLA 遺伝子 11 座 (*A, B, C, DRB1/3/4/5, DQA1, DQB1, DPA1* および *DPB1*) について、遺伝子全領域をそれぞれ特異的に増幅させる PCR プライマーの設計 (4.6 ~ 11.2 kb) および PCR 条件の設定を行った。また、特定の HLA 遺伝子座では一方のアリル由来のリード数が他方よりも少ない現象 (allelic imbalance) が観察されたため、この allelic

imbalance をプライマー配列や PCR 条件の変更により解消する工夫も施した。

これまでに解析した日本人を含む計 157 検体では、いずれも目的とする PCR 産物が得られている。また、普及しているベンチトップ型次世代シーケンサー 3 機種間における SS-SBT 法の評価を行った結果、いずれも既知アリル情報と矛盾なく良好なタイピング結果が得られている。さらに、我々独自に開発した超高精度次世代シーケンシング用アリル判定プログラム (SeaBass) や市販のアリル判定ソフト Omixon Target, GeneDX などを使用してタイピング結果の精度を比較した結果、市販のアリル判定ソフト Omixon Target では 74.1 ~ 96.3%, GeneDX では 53.7 ~ 94.4% の正解率であったのに対して、SeaBass では 99.8% 以上の高い正解率が得られた。よって、我々が開発した PCR システムは HLA 遺伝子の DNA 増幅に最適なこと、次世代シーケンサーの機種を問わずアリル判定がなされたこと、SeaBass は極めて精度の高いアリル判定を実現することが確認された。

今後の課題として、NGS がルーチンタイピングに普及するためには、操作全体の簡易化・迅速化・コストダウン化が不可欠であり、我々も従来法からの replacement model として、第 3 区域までのルーチンタイピングのための Multiplex PCR 法の開発に取り組んでいる。本講演では、海外の最新情報を含めて NGS による HLA タイピングの利点、開発現状および今後の展望について概説したい。

(13:30 ~ 15:30)

シンポジウム

「HLA抗体と移植」

座長：谷 慶彦（日本赤十字社近畿ブロック血液センター）

芦田隆司（近畿大学医学部 血液膠原病内科）

- 1) DSA陽性症例の腎移植について
西村憲二（兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター）

- 2) HLA抗体と肝臓移植
井手健太郎（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・移植外科学）

- 3) HLA抗体と造血幹細胞移植
佐藤 壯（社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科）

1) DSA 陽性症例の腎移植について

○西村憲二

兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター

【はじめに】妊娠、輸血、臓器移植などに感作されたことにより産生される HLA 抗体 (Donor specific antibody; DSA) を保有している患者に対する腎移植は陰性症例と比較してその移植腎生着率は低いとされている。しかしながら、昨今の献腎移植数の低下によるドナー不足からこのようなハイリスク腎移植が増加しているのが現状である。また移植後に出現する de novo DSA も急性抗体関連型拒絶反応 (Antibody-mediated rejection; AMR) を発症するリスクが高く、予後不良とされている。今回はこのような DSA 陽性症例の腎移植について自験例を踏まえて検討する。

【術前 DSA 陽性症例】 DSA 陽性症例は早期に AMR を起こし graft loss に陥る可能性があるので十分な脱感作療法を行う必要がある。脱感作療法のコンセプトは、1. T 細胞系の反応の抑制、2. 既存抗体の除去、3. 残存する抗体の抑制と補体活性化の抑制、4. 抗体産生細胞あるいはその前駆細胞の除去、であり、その方法には、免疫抑制剤の早期使用、血漿交換、抗 CD20 抗体 (リツキシマブ)、免疫グロブリン大量静注療法 (IVIG 療法) などがある。また AMR 発症時の治療としては血漿交換、IVIG 療法、リツキシマブ、ステロイドパルスなどがあり、患者の状況をみながら治療を行う。

【当院における術前 DSA 陽性腎移植の検討】 対象は 2008 年 5 月以降の生体腎移植症例のうち術前の DSA が陽性であった 9 症例。性別は男性 2 例、女性 7 例。平均年齢は 55.9 歳 (25-68 歳)。平均観察期間 3 年 1 ヶ月 (4 ヶ月-6 年 7 ヶ月)。原疾患は慢性糸球体腎炎 5 例、糖尿病 2 例、IgA 腎症 1 例、多発性嚢胞腎 1 例。感作歴は移植 2 例、輸血 3 例、妊娠 7 例 (女性すべて) (重複例含む)。Flowcytometry crossmatch は T のみ陽性 5 例、B のみ陽性 1 例、T, B 共に陽性 4 例。DSA は class I のみ陽性 5 例、II のみ陽性 2 例、I, II 共に陽性 2 例。脱感作療法：免疫抑制剤は全例で MMF 1000 mg (1-8 週前から：平均 3.9

週)、ステロイド 10 mg (1-8 週前から：平均 3.6 週)、7 例でタクロリムス 1-5 mg (原則 0.1 mg/kg) (2-4 週前から：平均 3.1 週) を術前より開始した。リツキシマブ投与 5 例、脾摘 4 例。血漿交換は全例で行い、IVIG 療法 (400 mg/kg) は 6 例に投与した。結果：経過観察期間で全例生着、生存している。術前最高の平均 DSA 値 (MESF) は 12,041 (351-56,532) で、脱感作療法により移植前日で 2,172 と下降し、移植後も 1 日目 952, 7 日目 547, 1 年目 273 と上昇なく推移している。腎機能に関しては平均 Cr, eGFR 値は移植後 3 ヶ月：1.01 mg/dl, 52.7 ml/min/1.73 m², 1 年 1.09, 55.6, 2 年 1.05, 59, 3 年 1.1, 53.4 と良好に経過している。拒絶反応は急性細胞性拒絶反応 3 例、AMR 1 例を発症したが、治療にて改善した。術前 DSA 陽性であっても十分な脱感作療法により、たとえ拒絶反応を起こしても短期の予後は良好である。

【de novo DSA 陽性症例】 約 20% の患者に腎移植後、de novo DSA が発症すると考えられており、そのターゲットは主に HLA class II とされている。また発症後しばらく経過してから移植腎不全へつながらとされているので、早期発見は移植腎予後にも重要である。

【当院における de novo DSA 陽性腎移植の検討】 対象は 2005 年 1 月以降に当院で施行された腎移植症例 171 例 (生体腎 129 例、献腎 42 例) のうち何らかの原因で DSA 検査を行い、de novo DSA が確認された 17 症例。DSA 出現時期は平均 2 年 10 ヶ月 (0 ヶ月-6 年 9 ヶ月)。DSA は class I のみ陽性 4 例、II のみ陽性 10 例、I, II 共に陽性 3 例。そのうち腎機能悪化の精査のために DSA 検査を行った症例は 10 例であり、episode biopsy 全例に AMR が発症していた。血漿交換、リツキシマブ投与、ステロイドパルス、IVIG 療法などを施行したが、腎機能が改善した症例は 2 例のみで、3 例は悪化しうち 2 例は graft loss となった。

2) HLA 抗体と肝臓移植

○井手健太郎, 大段秀樹

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 消化器・移植外科学

心臓移植や腎臓移植などと異なり肝臓移植における抗ドナー特異的 HLA 抗体 (DSA) の臨床的意義は確立されていない。これは本邦のみならず海外においても脳死移植のレシピエント選択基準においてリンパ球直接交差試験陰性が必要条件となっていないことが物語っている。

しかし近年の抗 HLA 抗体検査法の進歩により, DSA の解析が可能となり, 肝臓移植においても DSA の存在が予後不良の原因となる抗体関連型拒絶反応の発症に関与している可能性が示唆されている。

このような背景のもと当院では生体肝移植希望患者に対して, まず DSA 検索目的で ICFA を施行すると同時に, 抗 HLA 抗体検索目的で LABScreen Mixed を施行し, 陽性の場合には Single Antigen を追加している。ICFA が陽性

の場合は FCXM および CDC を行い, その結果に応じて減感作療法を計画する。T-cell FCXM 陽性のみ場合は, 血液型不適合移植症例に準じリツキシマブ+カルシニューリン阻害薬+ミコフェノール酸モフェチル投与後に血漿交換を施行し, クロスマッチ陰性化を確認した後に移植に臨んでいる。脳死肝移植希望患者においても登録時に LABScreen Mixed を施行, 陽性の場合には Single Antigen を追加しておき, レシピエント候補となった際にはバーチャルクロスマッチの結果をもとに, 移植適応か否かを判定している。術後も定期的に HLA 抗体検査を行い, その結果に応じた免疫抑制療法を実践している。

本シンポジウムでは当院での肝臓移植における HLA 抗体に対するマネージメントについて紹介する。

3) HLA 抗体と造血幹細胞移植

○佐藤 壯¹⁾, 佐藤蘭子¹⁾, 小林直樹²⁾, 小林良二³⁾

社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科¹⁾, 同 血液内科²⁾, 同 小児思春期科³⁾

HLA 抗体が造血幹細胞移植, 特に HLA 不一致移植において生着不全の原因となりうることは, 今ではよく知られているが, HLA 抗体が造血幹細胞移植の分野で注目を集めるようになったのは, 今世紀に入ってからである。1970 年代, 造血幹細胞移植が急性白血病に対する根治療法として臨床応用されるようになった当初は血縁 HLA 一致ドナーからの移植であり, その後非血縁者間移植がスタートしても HLA 一致ドナーからの移植が原則であった。そのため, 臓器移植と異なり造血幹細胞移植においては HLA 抗体の有無は, 血小板輸血不応の問題を除けば移植における危険因子とはみなされなかった。

それが, HLA2 抗原不一致まで可能な臍帯血移植の発展と再発難治性疾患に対するハプロ移植を始めとする HLA 不一致移植の発展によって, 造血幹細胞移植でも HLA 抗体がスポットライト浴びることとなった。高梨らは臍帯血移植を受けた患者が HLA 抗体の有無によっ

て好中球生着に有意差があり, さらにミスマッチ抗原に対する抗体を保有していた場合, より生着率が低下することを示した。そのため, 2012 年からは造血幹細胞移植時の HLA 抗体検査が保険適応となっている。

とはいえ, 造血幹細胞移植におけるドナーの第一選択は現在でもなお HLA 一致ドナーであり, 骨髄バンク, 臍帯血バンクにおけるドナー数の増加により, HLA 不一致ドナーを選択する場合でも, 事前に HLA 抗体検査を行うことにより, ドナーを得られる可能性は高い。

問題となるとすれば, HLA 不一致の対象とされる HLA-A, B, DR 以外の HLA-C, DQ, DP に対する抗体をどう評価するかであろう。

本講演では, 造血幹細胞移植におけるドナー選択の変遷も踏まえつつ, 文献学的考察や症例検討を行いながら, HLA 抗体をどう評価するか, 今後の方向性についても論議していきたい。

(15:40 ~ 16:40)

特別講演

座長：木村貴文（京都大学 iPS 細胞研究所 基盤技術研究部門）

WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法

岡 芳弘（大阪大学大学院医学系研究科，癌免疫学（大塚製薬）共同研究講座 特任教授）

WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法

岡 芳弘

大阪大学大学院医学系研究科, 癌免疫学 (大塚製薬) 共同研究講座 特任教授

Wilms' tumor gene (*WT1*) は、がん細胞のがんとしての機能維持に重要な働きを有しており、また、多くの種類の造血器腫瘍や固形がんを発現している。これらの特徴は、*WT1* の遺伝子産物である WT1 タンパクががん免疫療法のすぐれた標的抗原であることを示唆している。我々は、2000 年に、世界に先駆けて、ヒトならびにマウスの WT1 特異的 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) を誘導できる WT1-CTL ペプチドの同定を報告し、また、マウスモデルを用いて WT1 は *in vivo* でがん免疫療法の標的抗原として機能し得ることを示した。

これらの基礎研究の成果に基づき、2001 年に WT1 ペプチドを用いたがんワクチン療法の臨床試験を開始した。初期の症例において、WT1 ペプチドワクチンの投与による白血病細胞の減少や固形がんの縮小を経験でき、その治療的ポテンシャルを実感した。また、同時に、WT1 ペプチドワクチンの投与により誘導される「WT1 特異的免疫反応」と「腫瘍量の減少などの臨床反応」との間の相関が観察され、「WT1 ペプチドワクチン投与→WT1 特異的免疫反応の誘導→臨床反応の出現」という一連の流れ、つまり、WT1 ペプチドワクチンの Proof of Concept が確立されたと考えてよい。

現在では、他施設との共同研究も含めて 600 例以上の WT1 ペプチドワクチン治療の経験を蓄積した。臨床的に特筆すべきことのひとつに、WT1 ペプチドワクチン単剤投与 (他薬剤の併用なし) で、腫瘍量の減少や長期の病勢の安定化だけでなく、治癒に導けたと考えられる症例も存在することがあげられる。

臨床試験開始当初は、安全性の検証を最優先する必要から、上記のように、ワクチン単剤での治療を行っていたが、最近では、抗癌剤や分子標的薬との併用治療も行っており、promising な結果を得ている。また、ペプ

チドに関しても、WT1-CTL ペプチドだけでなく WT1-helper ペプチド (WT1 特異的 CD4⁺ ヘルパー T リンパ球を誘導できる) との併用がより有効と考えられ、その臨床試験もすでに開始している。さらに、興味深い臨床セッティングとしては、造血幹細胞移植 (HSCT) 後があげられる。HSCT 後は、通常、残存腫瘍量が少なく、つまり、minimal residual disease (MRD) の状態であり、したがって、その状況で WT1 特異的 CTL が誘導できれば effector (CTL) /target (tumor or leukemia) ratio (E/T ratio) は大きく、抗腫瘍効果が発揮されやすい。さらに、HSCT 後のリンパ系細胞の再構築期に WT1 ペプチドワクチンを投与することになり、WT1 特異的 CTL が効率よく誘導され、そしてそれが expand することが予想される。また、HSCT 後の WT1 ペプチドワクチンは、「HSCT という allo 免疫反応による免疫療法」と「WT1 ペプチドワクチンというがん抗原に対する免疫療法」との併用療法とも考えられる。これらの有利な点を期待し、HSCT 後になお再発ハイリスクの造血器腫瘍に WT1 ペプチドワクチンを投与する臨床試験を構築・実施し、それにより、HSCT 後に WT1 ペプチドワクチンを投与することは再発抑制・長期完全寛解維持 (治癒の可能性が考えられる) に寄与できることを示した。現在、さらなる症例を蓄積中である。

上記のように、我々独自の基礎研究の成果をもとに translational research として WT1 ペプチドワクチン臨床試験を開始し、種々のポジティブな結果を得、さらに症例を蓄積しつつある。また、一方では、それらの症例から得られた検体を詳細に解析 (reverse translational research) することにより、生体におけるがん抗原に対する免疫応答のより深い理解が得られることも期待される。

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 Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

- 1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan
- 2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan
- 3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

心移植における FlowPRA 法を用いた HLA 抗体検出の意義

山本 賢¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 永谷 憲歳²⁾, 中谷 武嗣³⁾

- 1) 国立循環器病センター臨床検査部
- 2) 国立循環器病センター再生医療部
- 3) 国立循環器病センター臓器移植部

3. 本文一：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. 本文—3：略語一覧の作成【作成要項】

- ①略語はアルファベット順に並べる。
- ②略語の後に「:」を入れ、フルスペル（小文字）を記載する。例）LCT: lymphocyte cytotoxicity test
- ③商品名は略語一覧に入れない。

6. 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

今号では、まず第18回HLA-QCワークショップレポートが大きな意味を持つ。日本組織適合性学会は学術団体であるが同時に学会を構成する主要組織である組織適合性検査ラボのクオリティコントロールとしてのHLA-QCワークショップを継続して行っている。近年、臓器移植におけるクロスマッチの精度管理の重要性が増しており、その意味でも行政および日本の医学・医療界から高い評価を得ているHLA-QCワークショップを日本組織適合性学会が高い学術レベルで継続していること、そして参加施設を拡大していることは大きな成果であり、今後の日本組織適合性学会の活動の展開に繋がる。

また総説の、[HLA拘束性T細胞を誘導可能な末梢血モノサイト由来樹状細胞の大量産生法の開発]は様々な領域で今後、導入・応用される末梢血モノサイト由来樹状細胞の、疾患治療を想定した実験に必要とされる大量産生の手法の開発に成功したことは、一気に多くの疾患モデル実験の展開に繋がることであり、またその先に臨床応用に直結する成果である。

高原 史郎

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き

年会費請求手続き

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

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