

日本組織適合性学会誌

第25巻第1号 平成30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27回 日本組織適合性学会大会の御案内	1
平成30年度の学術奨励賞候補者の公募について	2
組織適合性検査技術者認定制度 平成30年度 認定HLA検査技術者講習会のお知らせ	4
初心者講習会の開催及び参加希望者募集について	5
平成29年度 認定HLA検査技術者講習会アンケート集計結果	6
組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿(2018)	9

第21回 HLA-QC ワークショップレポート

—全体経過およびQCWS試料の総合結果—	中島 文明	10
—試料説明 DNA-QC—	黒田ゆかり	14
—総合解析(表記含む) DNA-QC—	黒田ゆかり	15
—検査法別解析 DNAタイピング SSP法—	高山 智美	17
—検査法別解析 DNAタイピング SSO法(LABType)—	石塚 敏	18
—検査法別解析 DNAタイピング SSO法(WAKFlow, GenoSearch)—	奥平 裕子	20
—検査法別解析 DNAタイピング SBT法—	小島 裕人	22
—試料説明 抗体QC—	高 陽淑	24
—総合解析 抗体QC—	高 陽淑	25
—検査法別解析 抗体検査 FCM(FlowPRA)法—	金本 人美	27
—検査方法別解析 抗体検査 ルミネックス(WAKFlow)法—	小林 洋紀	28
—検査方法別解析 抗体検査 ルミネックス(LABScreen)法—	前島理恵子, 蟹井はるか, 藤原 孝記	29
—検査方法別解析 抗体検査 その他検査法およびクロスマッチ—	藤原 孝記	31
—日本移植学会連携 全血クロスマッチ—	橋口 裕樹	33

原著

HLA半合致造血細胞移植後に再発した急性白血病小児患者における白血病細胞からの不適合HLAアレル喪失の検討	小野 智, 皆川 敬治, 川畑 絹代, 安田 広康, 池田 和彦, 高橋 信久, 大原 喜裕, 小林 正悟, 望月 一弘, 伊藤 正樹, 佐野 秀樹, 菊田 敦, 大戸 齊	34
---	---	----

総説

がん免疫療法におけるがん抗原ワクチン療法の現状と将来展望	鶴田 未季, 西村 泰治	40
内皮細胞HLA-class II DRとAロ応答するCD4 T細胞は, anti-A/B抗体接着により抑制される	岩崎 研太, 三輪 祐子, 打田 和治, 堀見 孔星, 松岡 裕, 村口 篤, 岸 裕幸, 浜名 洋, 小林 孝彰	50

第16回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集	56
------------------------	----

日本組織適合性学会誌 MHC 投稿・執筆規定(平成28年2月1日改訂)	83
編集後記	86

第 27 回日本組織適合性学会大会の御案内

第 27 回日本組織適合性学会大会
大会長 太田 正穂
(信州大学医学部内科学第Ⅱ教室 特任教授)
副大会長 田中 榮司
(信州大学医学部内科学第Ⅱ教室 教授)

このたび、第 27 回日本組織適合性学会大会を松本市で開催させていただくことになりました。松本では、本学会の前身である日本組織適合性研究会を、1977 年に開催して以来 41 年ぶりの開催であり、このような歴史と伝統のある本大会を開催させていただくことは誠に光栄でございます。本大会は、高度な多型性と機能を有する MHC 研究の最新の進歩・進捗状況、臨床応用を見据えて「MHC 多様性の科学—基礎から“Precision Medicine”の実現へ—」をテーマとしました。HLA の臨床現場への有用性は、個別化医療 (personalized medicine) と言うよりもまさしく適確医療 (precision medicine) の実現と思われます。学術企画はプログラム委員によりこの様なテーマに沿ったプログラムを構成したいと考えております。会場となるまつもと市民・芸術館は、松本駅から徒歩 10 分程で、国宝松本城、美術館、松本の中心街にも気軽に出向くことが可能であります。気候に恵まれたこの時期、城下町松本にぜひ多くの皆様方の御参加を心からお待ちしております。

会期：平成 30 年 9 月 21 日（金）～9 月 23 日（日）

会場：まつもと市民・芸術館

〒 390-0815 長野県松本市深志 3-10-1

TEL: 0263-33-3800

大会プログラム（予定）

特別講演 I：Prof. Seiamak Bahram (Strasbourg School of Medicine)

特別講演 II：Prof. Marco Colonna (Washington University School of Medicine)

学会賞受賞講演，シンポジウム（疾患感受性，腫瘍免疫，臓器移植・造血細胞移植）など

QCWS 集会，教育講演は 9 月 23 日（日）に開催

演題応募期間：平成 30 年 4 月 16 日（月）～6 月 1 日（金）

大会事務局・運営事務局

信州大学医学部内科学第Ⅱ教室

第 27 回日本組織適合性学会大会事務局 担当・城下 智

〒 390-8621 松本市旭 3-1-1

TEL: 0263-37-2634 E-mail: jshi2018@shinshu-u.ac.jp

集会運営担当・株式会社プロコムインターナショナル

〒 135-0063 東京都江東区有明 3-6-11 TFT ビル東館 9 階

TEL: 03-5520-8821 FAX: 03-5520-8820 E-MAIL: jshi27@procomu.jp

大会ホームページ

<http://procomu.jp/jshi2018/>

事前登録・宿泊予約は大会ホームページよりお早めにお申し込みください。

平成 30 年度の学術奨励賞候補者の公募について

会員の皆様方へ

日本組織適合性学会では、平成 17 年度より若手学会員の学術研究を奨励する「学術奨励賞」を設けております。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、もって当該分野の発展に寄与すること」を目的としております。

上記の趣旨に則り、平成 30 年度の日本組織適合性学会の学術奨励賞候補者を、以下の要領で公募いたしますので、奮ってご応募ください。なお応募の方法等につきましては、第 27 回 日本組織適合性学会大会(大会長：太田正穂、開催地：松本市)の HP 内に開設されている、「学術奨励賞応募」サイトにも詳細に記載されておりますので、そちらも御参照ください。

1. 助成内容

平成 30 年度・学術集会大会（第 27 回大会：松本市）に応募された一般演題で、さらに学術奨励賞にも応募された演題の中から、特に優秀と認められた演題の筆頭演者（応募者、原則として平成 30 年 4 月 1 日時点で満 45 才以下）に、学術奨励賞を授与いたします。授与件数は若干名で、賞金 5 万円あるいはそれ以下の副賞の授与を予定しております。

2. 応募資格

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、以下の条件のすべてを満たす者といたします。

- 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、または当該年度の学術集会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) 当該年度の学術集会大会に、筆頭演者として演題を応募すること。
- 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ていること。
- 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できること。
- 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. 応募方法

学術奨励賞に応募しようとする会員は、大会（学術集会）の一般演題申込み締切り日（5 月末ごろの予定）までに、大会 Web サイト上で 1) 演題抄録を登録する際に、下記の 2) 学術奨励賞・登録用紙をダウンロードして必要事項を記載し、同 Web サイト上に抄録と共にアップロードしてください。この操作により、学術奨励賞への応募が完了します。あるいは登録用紙を学術集会運営担当・プロコムインターナショナル社（e-mail: jshi27@procomu.jp）あてに、メールで送信して頂いても結構です。

1) 演題抄録

一般演題に応募した抄録

2) 学術奨励賞への「登録用紙」

登録用紙の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）の氏名、生年月日、年齢、連絡先住所、電話番号、FAX 番号、e-mail アドレスを記入してください。2頁目以降に、(1) 応募した研究の背景、(2) 研究の意義、(3) 日本組織適合性学会との関わり（これまでの関わりと、今後の方針・計画など）を、項目ごとにそれぞれ300～400字程度にまとめてください。

4. 選考および結果通知について

受賞候補者には学会会場で、「学術奨励賞応募演題」として口頭発表を行っていただきます。なお応募者が多い場合には、事前に書類選考を実施します。事前選考で選ばれた演題のみが最終選考の対象となり、事前の書類選考で選ばれなかった演題は、一般演題として発表されます。

理事長、学術賞担当理事、学会賞選考委員、なら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登録書類と学術奨励賞応募演題の発表の内容を評価します。奨励賞選考委員会は、学術奨励賞応募演題の演者の中から、若干名を受賞候補者として選考した後に、これを理事長に推薦して承認を得ます。なお、委員が受賞候補者と緊密な利害関係にある場合は、当該候補者の審査には加わらないものとします。当該年の学術集会大会中に選考結果を公表し、表彰式を実施します。

5. 受賞者にかかる義務について

- 1) 学術奨励賞受賞者は、助成が行われた研究課題に関する報告書（様式は別途通知します）を、日本組織適合性学会事務局 (hlajimu@m.u-tokyo.ac.jp) あてに提出してください。
- 2) 受賞後原則として3ヶ月以内に、受賞課題に関する原著論文あるいは総説をMHCへ投稿してください。

6. 助成金の使途

使途について特に制限はありませんが、学術奨励賞であることの趣旨を理解のうえ、適切に使用するものとします。なお受賞者は使途と、その内訳を前述の報告書に記載してください。

7. 問い合わせ先

本件に関する問い合わせは、応募方法等については学術集会運営担当・プロコムインターナショナル社 (e-mail: jshi27@procomu.jp) あてに、また学術奨励賞の規則等については学術賞担当理事・西村泰治 (e-mail: mxnishim@kumamoto-u.ac.jp) あてに、お願いいたします。

**組織適合性検査技術者認定制度
平成 30 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

組織適合性教育委員会

委員長 太田 正穂

日 時：平成 30 年 9 月 23 日（日曜日）
時刻：9 時 00 分～11 時 00 分の予定

会 場：第 27 回・日本組織適合性学会 大会会場
まつもと市民・芸術館
〒390-0815 長野県松本市深志 3-10-1（TEL 0263-33-3800）

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、40 分を予定しています。

- (1) HLA に関する基礎医学的な講演
木村 彰方 先生（東京医科歯科大学 難治疾患研究所分子病態分野）
「認定制度試験問題を中心とした HLA に関する基礎」
- (2) HLA タイピングあるいは抗 HLA 抗体検査に関する講演
大橋 順 先生（東京大学・理学系研究科）
「データ解析の基礎」
- (3) 臓器移植の臨床医学に関する講演
諫田 淳也 先生（京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学）
「造血細胞移植における HLA 適合度と移植成績の基礎」

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 高 陽淑

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おります。

しかし一方では、組織適合性検査に関する基礎的な知識の習得や日常業務に役立つポイントなどの情報交換ができる時間を十分に確保することは難しい状況があります。

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」（複数企画を予定）を大会期間中に開催する事と致しました。

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 27 回大会期間中
2018 年 9 月 21 日（金）19:00～21:00（予定）
- 3, 会 場：まつもと市民・芸術館
- 4, 定 員：各企画につき 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 29 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 29 年 10 月 29 日（日）8：30～10：30

会 場：第 26 回・日本組織適合性学会 大会会場

（JMS アステールプラザ第 1 会場）

・回答者総数：118 名

1) 旅費・滞在費の財源について 回答者 118 名

①	私費	26 名 (22%)
②	職場からの支援	87 名 (74%)
③	その他	5 名 (4%)

③その他の内訳：研究費，教育研究経費

2) 職場・職務について

職場 回答者 118 名

①	病院	62 名 (53%)
②	血液センター	17 名 (14%)
③	検査センター	8 名 (7%)
④	大学（国公立，私立）	7 名 (6%)
⑤	民間企業	17 名 (14%)
⑥	その他	7 名 (6%)

国立・公立：33，私立：29

国立・公立：5，私立：2

⑥その他の内訳：研究所

職務 回答者 118 名

①	臨床医	3 名 (3%)
②	臨床検査業務	71 名 (60%)
③	検査受託業務	13 名 (11%)
④	製造業関連業務	3 名 (3%)
⑤	製品開発業務	6 名 (5%)
⑥	教育業務	3 名 (3%)
⑦	研究業務	11 名 (9%)
⑧	その他	8 名 (7%)

兼務内訳（臓器：29，輸血：38，造血幹：23）

⑧その他の内訳：薬剤師，学生，生化学・血液等一般検査業務，技術サポート，学術・品質情報課

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 110 名

① 取得済み 46 名 (42%) ② 希望 51 名 (46%) ③ 希望しない 13 名 (12%)

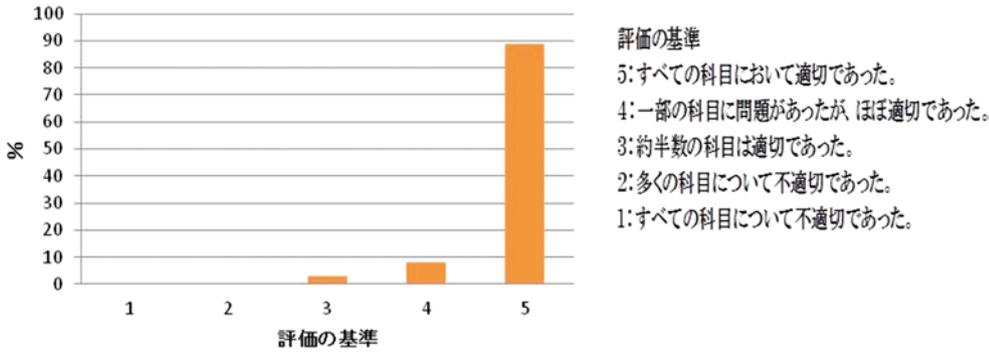
取得済みまたは取得を希望する資格 回答者 57 名

① 認定技術者 51 名 (89%) ② 認定指導者 6 名 (11%)

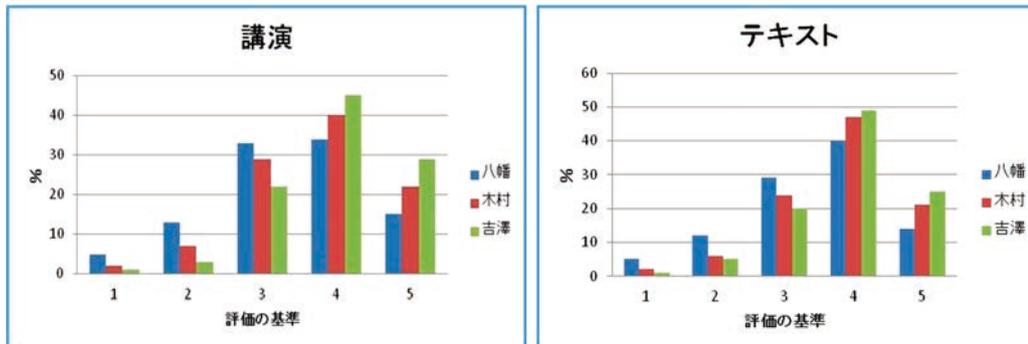
4) 学会ホームページに掲載された、講習会テキストの事前確認の有無 回答者 118 名
あり 93 名 (79%) なし 25 名 (21%)

5) 講習科目の種類は適切であったか？

講習科目の適切性

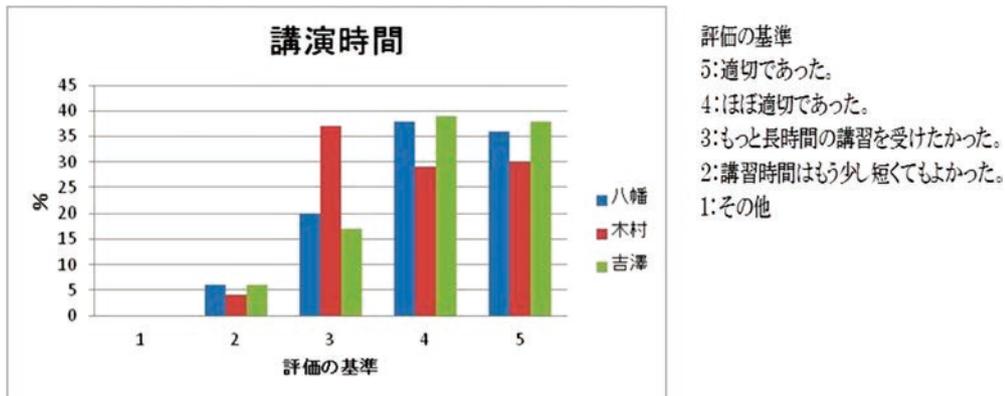


6) 講習内容のレベルならびに講習テキストは適切であったか？

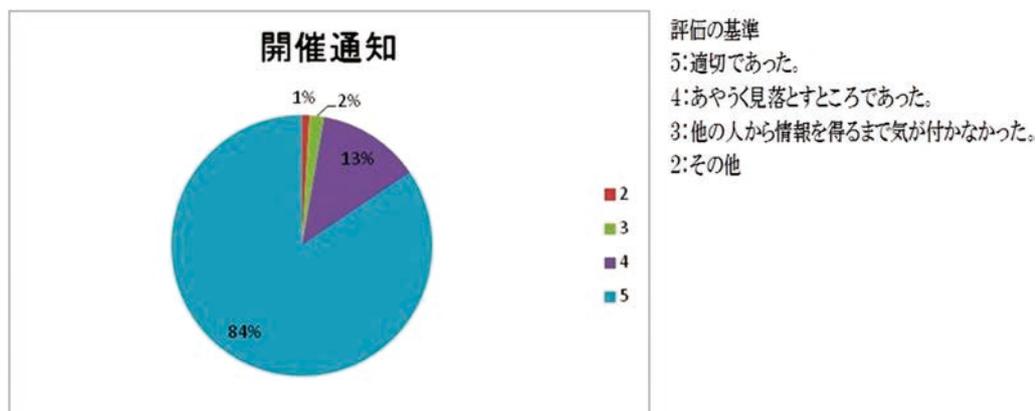


評価の基準
 5:すべて理解できた。
 4:一部は難解であったが ほぼ理解できた。
 3:約半分は理解できた。
 2:多くの内容について難解であった。
 1:すべての内容が難解であった。

7) 講習時間は量的に適切であったか？



8) 講習会の開催通知は適切であったか？



9) 意見

- 歴史等について勉強しにくいので、技術者講習あるいは試験の基礎に関するテキストを作成して欲しい。
- 統計の計算方法や種類に関する講習を開いて欲しい。
- 木村先生の内容をテープ起こしして会誌に載せて欲しい。
- とても解り易い講演でした。
- 講演会のスライドを HP に載せて欲しい。造血フォーラムでは HP に 1 週間以内に up して頂いている。
- 試験問題の解説は今後も継続して欲しい。臨床の先生方から症例検討や検査結果をどのように判断しているか報告して欲しい。
- 移植施設・移植基準に関する法体系について講習して欲しい。
- 認定試験問題のための適切な内容をまとめたものを作成して欲しい。
- テキストを抄録に入れて欲しい。
- プロジェクターが原因なのかスライドが見にくかった。
- 講習会の開始 30 分前には入室させて欲しい。
- 余裕をもって会場に来たのに入室ができなく忙しい感じがした。
- テキストの場所および抄録のパスワードが解らなかった。

組織適合性技術者認定制度委員会・部会名簿（2018）

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：石塚 敏，一戸 辰夫，太田 正穂，木村 彰方，黒田 ゆかり，高 陽淑，徳永 勝士，
成瀬 妙子，西村 泰治，橋口 裕樹，藤井 明美，湯沢 賢治

資格審査部会（※：施設認定担当）

部会長：成瀬 妙子

副部会長：田中 秀則

部員：石塚 敏，中島 文明，橋口 裕樹※，藤井 明美※

試験問題検討部会

部会長：木村 彰方

副部会長：平山 謙二

部員：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

部会長：中島 文明

副部会長：黒田 ゆかり，高 陽淑，橋口 裕樹

部員：石塚 敏，一戸 辰夫，奥平 裕子，川井 信太郎，吉川 枝里，木村 彰方，小島 裕人，
小林 孝彰，田中 秀則，成瀬 妙子，宮崎 孔，藤井 明美，藤原 孝記，湯沢 賢治

参考マニュアル作成 WG

HLA タイピング WG：成瀬 妙子，黒田 ゆかり，吉川 枝里，小川 公明

抗 HLA 抗体 WG：高 陽淑，川井 信太郎，藤原 孝記，横沢 佑弥

クロスマッチ WG：橋口 裕樹，石塚 敏，黒木 聖久，高山 智美，藤井 明美，金本 人美

表記法 WG：黒田 ゆかり，石塚 敏，木村 彰方，田中 秀則

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —全体経過および QCWS 試料の総合結果—

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

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. ワークショップの経過

平成 29 年 1 月に第 21 回 HLA-QCWS の開催および参加案内を、学会誌および学会公式サイトに掲載し、平成 29 年 2 月までに 81 施設からの参加申し込みがあった(表 1)。参加内容の詳細は DNA-QC : 74 施設、抗体 QC : 57 施設、クロスマッチ (日本移植学会連携クロスマッチ含む) : 54 施設である。また、QCWS 参加希望施設からの連絡およびデータ収集等については、電子メールで対応した。

DNA-QC および抗体 QC に用いる試料の選択は、第 25 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い行った。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 10 日付で参加施設宛てに試料の発送、QCWS 結果入力用のシートファイルをメール配信した。同時に DNA タイピングと抗体検査の参考プロトコル集を学会公式サイトに掲載した。結果提出の締切りを 5 月 27 日に設定し、6~7 月中に提出データの確認と生データの集約作業を終了、7 月 5 日に各解析担当者に解析用データを配布した。

8 月中に各検査法別の解析を一旦締め切り、解析結果の公表内容を統一化する目的で総合解析担当と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った。平成 29 年 9 月下旬までに、最終報告データを作成し、解析結果を学会公式サイトに公開し、参加者が必要に応じてダウンロード出来るようにした。同時にデータ集を CD-R で配布した。また、解析結果は QCWS 集会での報告および本学会誌 (MHC) への掲載を行った。

この期間中、DNA タイピング結果の表記法ワーキンググループを 4 名の部会員で立上げた。次年度からの導入を目指し、アレル表記法改定について入念に協議を重ね、改定案を QCWS 集会で報告した。

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、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。DNA 試料は、細胞バンクから購入済の細胞について、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

[#] 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

中島文明¹⁾、黒田ゆかり²⁾、高陽淑³⁾、橋口裕樹⁴⁾、湯沢賢治⁵⁾、一戸辰夫⁶⁾、宮崎孔⁷⁾、成瀬妙子⁸⁾、石塚敏⁹⁾、川井信太郎¹⁰⁾、吉川枝里¹¹⁾、木村彰方⁸⁾、小林孝彰¹²⁾、田中秀則¹³⁾、藤原孝記¹⁴⁾

¹⁾ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所、²⁾ 日本赤十字社 九州ブロック血液センター、³⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター、⁴⁾ 日本赤十字社 福岡赤十字病院、⁵⁾ 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、⁶⁾ 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、⁷⁾ 日本赤十字社 北海道ブロック血液センター、⁸⁾ 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野、⁹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室、¹⁰⁾ 湧永製薬株式会社 試薬・診断薬事業部、¹¹⁾ 東海大学 医学部 血液腫瘍内科、¹²⁾ 愛知医科大学 医学部 外科学講座、¹³⁾ 公益財団法人 HLA 研究所、¹⁴⁾ 帝京大学 医学部付属病院 輸血部

表 1 第 21 回 HLA-QCWS 参加施設

1	株式会社 ベリタス	バイオサイエンス本部 技術グループ
2	NPO法人腎泌尿器疾患研究所	
3	福島県立医科大学附属病院	輸血・移植免疫部
4	株式会社 ビー・エム・エル	第三検査部 ゲノム検査課
5	富山大学附属病院	検査・輸血細胞治療部
6	日本赤十字社東北ブロック血液センター	検査一課
7	日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所	研究開発部
8	株式会社 医学微生物学研究所	品質管理部
9	日本赤十字社 九州ブロック血液センター	検査二課
10	北海道大学病院	検査・輸血部
11	株式会社 エスアールエル	品質保証部
12	北里大学病院	輸血部
13	社会医療法人 北輪会 札幌北輪病院	臨床検査科
14	鹿児島大学病院	輸血・細胞治療部
15	JCHO 中京病院	検査部
16	九州大学病院	遺伝子・細胞療法部
17	三重大学医学部附属病院	輸血部
18	大阪市立大学医学部附属病院	輸血部
19	帝京大学医学部附属病院	輸血・細胞治療センター
20	名古屋第二赤十字病院	医療技術部
21	日本赤十字社東海北陸ブロック血液センター	品質部 検査三課
22	札幌医科大学附属病院	検査部 輸血係
23	東邦大学医療センター大森病院	輸血部
24	山形大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
25	佐賀大学医学部附属病院	輸血部
26	公益財団法人 鹿嶋郷賢研究所弘前病院	HLA検査室
27	JCHO仙台病院	統括診療部臨床検査科診療部
28	岐阜大学医学部附属病院	検査部
29	富山県立富山病院	臨床検査科
30	香川県立中央病院	中央検査部
31	医療法人 鉄蕉会 魚田総合病院	腎移植科
32	公立大学法人 横浜国立大学附属病院	輸血・細胞治療部
33	岩手医科大学附属病院	中央臨床検査部 輸血検査室
34	がん 感染症センター 都立駒込病院	輸血・細胞治療科
35	湧永製薬株式会社	試薬・診断事業部
36	日本赤十字社近畿ブロック血液センター	検査部 検査三課
37	愛知医科大学	腎移植外科・腎疾患・移植免疫学講座
38	熊本大学医学部附属病院	中央検査部
39	大分県立病院	輸血部
40	東京女子医科大学	中央検査部 移植関連検査室

(受付日付順)

41	独立行政法人国立病院機構千葉東病院	臨床検査科
42	松江赤十字病院	検査部
43	関西医科大学付属病院	輸血・細胞療法部
44	長崎大学病院	細胞療法部
45	NHO米子医療センター	臨床検査科
46	自治医科大学附属病院	輸血・細胞移植部
47	熊本赤十字病院	検査部 輸血係
48	岡山大学病院	輸血部
49	株式会社リプロセル	メディカル部
50	秋田大学医学部附属病院	腎疾患先端医療センター
51	愛媛県立衛生環境研究所	疫学情報科
52	山形県立中央病院	輸血部
53	株式会社 LSIメディアエンス	遺伝子解析部 遺伝子検査G
54	株式会社 保健科学研究所	GAU
55	静岡県立総合病院	検査部検査技術室
56	徳島大学病院	輸血・細胞治療部
57	県立広島病院	臨床研究検査科
58	日本赤十字社中四国ブロック血液センター	検査一課
59	沖縄県立中部病院	検査科 HLA検査
60	市立札幌病院	検査部
61	国立研究開発法人 国立循環器病研究センター	臨床検査部 輸血管理室
62	ジェノタイプファーマ株式会社	ゲノム解析部門
63	東海大学医学部付属病院	臨床検査技術科 輸血室
64	福岡赤十字病院	検査部 移植検査課
65	京都府立医科大学附属病院	輸血・細胞治療部
66	筑波大学	消化器外科研究室
67	宮崎大学医学部附属病院	輸血・細胞治療部
68	徳協医科大学病院	臨床検査センター
69	公益財団法人HLA研究所	研究検査課
70	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
71	岡山医療センター	臨床検査科
72	金沢医科大学病院	北陸腎移植HLA検査センター
73	東京大学医学部附属病院	輸血部
74	関東甲信越ブロック血液センター	検査部検査三課
75	旭川医科大学病院	臨床検査・輸血部
76	広島大学病院	診療支援部 遺伝子細胞療法部門
77	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所	難病資源研究室
78	日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター 埼玉製造所	品質部 検査三課
79	北海道ブロック血液センター	品質部検査一課
80	信州大学医学部附属病院	輸血部
81	京都大学医学部附属病院	輸血細胞治療部

あること」の要件に合う4種類を選定した。これらを培養した後、抽出したDNAを約100 ng/μLの濃度で100 μL (SSP実施施設は倍量) ずつ配布した。これとは別に、SSOルミネックス法の陰性コントロール (DNase free water 50 μL) を配布し、各施設で陰性コントロールデータの取得を必須とした。

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点とした。抗体試料は、本学会から提供依頼した日本赤十字社に保管してある献血者由来の抗血清について、「日本人に通常検出される抗HLA抗体であること」、「一部の試料では、HLA-C座抗原に対する抗体、IgM性抗体、HLA以外の非特異反応が含まれる場合がある」ことを要件とし、ダイレクトクロスマッチ、仮想クロスマッチおよび移植学会連携クロスマッチを考慮し4種類を選定した。これらを血清処理した後、各施設に1 mL ずつ配布した。

クロスマッチについては、本年も参加希望施設からの募集参加として以下の2通りで実施することを提示し、それぞれ参加申込み時に受け付けた。

①配布検体の一部を使用しクロスマッチを正確に行える

ことをテーマとして、指定した抗体試料と各施設で準備した細胞でHLAクラスIを対象としたダイレクトクロスマッチ

②抗体とDNAの結果から正しく適合判定が行えることをテーマとして、指定した抗体試料とDNA試料の測定結果によるHLAクラスIとクラスIIを対象とした仮想クロスマッチ

また、日本移植学会連携クロスマッチでは、抗体QCで使用する試料を一部共用して実施した。

3. 解析報告と担当者

解析担当者は前年度と同一の担当者に早期に再依頼した。解析結果の公表は、QCWS集会以外の報告、学会公式サイトへの掲載、データ集 (CD-R) の配布、学会誌への掲載の4通りとした。

QCWS集会では、DNAタイピング結果解析と抗体検査結果解析に分け、それぞれ試料説明、検査方法別解析、総合解析の順に報告し、最後に総合討論と質疑応答の時間を設けた。報告内容の効率化を図るため、あらかじめ担当者別に解析ポイントをとりまとめ、討論・質疑の時間が多く取れるように努めた。DNA-QCでは、表記法と評価点の解説後、カットオフ変更を討論・質疑のテー

マとした。抗体QCでは、部門別の動向分析と評価点の解説後、抗体特異性の試薬間差、Igサブクラスの判定意義などを討論・質疑のテーマとした。

前島理恵子

各解析分担当項目と解析担当者および所属は、以下のとおりである。

1) DNA タイピング結果解析

- ・ 試料説明, 総合解析
 - 九州ブロック血液センター 黒田ゆかり
- ・ SSP 法 大阪急性期・総合医療センター 高山 智美
- ・ SSO ルミネックス法①[※] 東京女子医大 石塚 敏
- ・ SSO ルミネックス法②[※]
 - ジェノダイブファーマ 奥平 裕子
- ・ SBT (Sanger, NGS) 法 HLA 研究所 小島 裕人

2) 抗体検査結果解析

- ・ 試料説明, 総合解析
 - 近畿ブロック血液センター 高 陽淑
- ・ FCM (FlowPRA) 法 福岡赤十字病院 金本 人美
- ・ 抗体ルミネックス法①[#]
 - 関東甲信越ブロック血液センター 小林 洋紀
- ・ 抗体ルミネックス法②[#]
 - 帝京大学医学部附属病院 蟹井はるか

- ・ その他, クロスマッチ
 - 帝京大学医学部附属病院 藤原 孝記
- ・ 移植学会連携全血クロス
 - 福岡赤十字病院 橋口 裕樹

[※]SSO ルミネックス法 ① LABType, ② WAKFlow/GenoSearch

[#]抗体ルミネックス法 ① WAKFlow, ② LABScreen

4. QCWS 試料の総合結果

配布したDNAおよび抗体試料について、本ワークショップで解析された総合結果を示す。DNA試料は、Ambiguityの回避とNGSのphasing結果を検証する理由で、HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 (H2902未実施), DPB1アレルについて日本赤十字社中央血液研究所で1本鎖DNAに分離後、IMGT/HLA 3.2.8.0 (2017-04)を参照ライブラリーとして塩基配列をダイレクト・シーケンズした。これらの結果と参加各施設の結果を合わせて総合的にリアサインした。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)。

表2 第21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	
H2901	A*11:01:01:01	A*24:02:01:01	B*15:02:01	B*52:01:01:02	C*08:01:01	C*12:02:02:01
	A11	A24	B75	B52	Cw8	Cw12 [*]
H2902	A*31:01:02:01	A*33:03:01	B*39:02:01	B*44:03:01:01	C*07:02:01:01	C*14:03
	A31	A33	B3902	B44	Cw7	Cw14 [*]
H2903	A*01:01:01:01	A*02:01:01:01	B*37:01:01	B*40:02:01	C*03:04:01:02	C*06:02:01:01
	A1	A2	B37	B61	Cw10	Cw6
H2904	A*02:07:01	A*33:03:01	B*40:03	B*46:01:01	C*01:02:01	C*03:04:01:02
	A2	A33	B61	B46	Cw1	Cw10

HLA-Class II	HLA-DR		HLA-DQ		HLA-DP	
H2901	DRB1*12:02:01	DRB1*15:02/140	DQA1*01:03:01	DQA1*06:01:01	DPA1*01:03:01	DPA1*02:01:01
	DRB3*03:01:03	DRB5*01:02	DQB1*03:01:01	DQB1*06:01	DPB1*09:01:01	DPB1*21:01
	DR12	DR15	DQ7	DQ6	DPw9 [*]	DPw21 [*]
	DR52	DR51				
H2902	DRB1*09:01:21	DRB1*13:02:01	DQA1*01:02:01	DQA1*03:02	DPA1*01:03:01	-
	DRB3*03:01:01	DRB4*01:03:02	DQB1*03:03:02	DQB1*06:04:01	DPB1*02:01:02	DPB1*04:01:01:01
	DR9	DR13	DQ9	DQ6	DPw2	DPw4
	DR52	DR53				
H2903	DRB1*08:02:01	DRB1*10:01:01:01	DQA1*01:05:01	DQA1*03:01:01	DPA1*01:03:01	-
	-	-	DQB1*03:02:01	DQB1*05:01:01	DPB1*02:01:02	-
	DR8	DR10	DQ8	DQ5	DPw2	-
	-	-				
H2904	DRB1*08:03:02	DRB1*14:05:01	DQA1*01:04:01	DQA1*01:03:01	DPA1*01:03:01	DPA1*02:02:02
	DRB3*02:02:01	-	DQB1*05:03:01	DQB1*06:01:01New #	DPB1*02:02	DPB1*04:02:01:01
	DR8	DR14	DQ5	DQ6	DPw2	DPw4
	DR52	-				

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
C to T substitution at 493 (R to W at codon 133) in DQB1*06:01:01 exon 3

第21回 HLA-QC ワークショップレポート — 試料説明 DNA-QC —

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. 使用する試料について

日本組織適合性学会では、DNA-QCの試料として使用する細胞を市販品あるいはバンクに寄託された匿名化した細胞から入手しストックしている。また、その年に使用する細胞は、HLA-A, B, C, DRB1のタイピングデータを基にQCWS集会でのアンケート調査結果を参考にして選択している。

2. 21stDNA-QC 細胞選定時のポイント

今回使用した細胞は、以下に示す3つのポイントから選択した。

①低頻度アレル：QCWSのアンケートでは稀なタイプを希望するとの回答が増加傾向にあり、「稀なタイプを判定できること」を課題とした。

②ハプロタイプ：日本人集団において典型的なハプロタイプを有するものを選択し、「ハプロタイプの確認」や「ハプロタイプの認識」を課題とした。

H2901のA*24:02-C*12:02-B*52:01-DRB1*15:02は、日本人集団においてハプロタイプ第1位、H2902のA*33:03-C*14:03-B*44:03-DRB1*13:02は第2位、H2904

のA*02:07-C*01:02-B*46:01-DRB1*08:03は第5位である。H2903のA*01:01-C*06:02-B*37:01-DRB1*10:01は稀なアレルA*01:01およびDRB1*10:01を含むが高い連鎖不平衡が見られるものである。

③HLA型への読替え：遺伝子型の第1区域とHLA型が異なるタイプを有するものを選択し「HLA型の知識」を課題とした。

3. 配布サンプル

今回はDNA (100 ng/μL) 4サンプルに加え、陰性コントロールとしてDNase free waterを配布した。陰性コントロールはSSO法で用いるものであるが、20thQCWSでは配布せずにデータ提出も任意としていたが、今回は陰性コントロールを配布し必須とした。なお、陰性コントロールのデータは、解析には使用するが評価の対象外である。

4. 新規アレル

前回はDPA1で新規アレルが判定されたが、今回のサンプルからもNGSにおいてDQB1で新規アレルDQB1*06:01:01V(codon 133 CGG → TGG)が検出された。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析（表記含む） DNA-QC—

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

DNA-QC 参加施設は、毎年少しずつであるが増加している。今年は、昨年より 3 施設増加し 74 施設の参加があり、部門別の参加施設数は、輸血部門 46 施設 (52.7%)、臓器部門 46 施設 (62.2%)、造血部門 27 施設 (41.9%) およびその他 6 施設 (8.1%) であった。評価対象は例年通り HLA-A, B, C および DRB1 とし、DRB3/4/5, DQB1, DPB1, DQA1 および DPA1 は対象外とした。

Luminex (SSO) 法の参加施設には陰性コントロールを必須としたが、データを提出した施設は 52 施設中の 49 施設 (94.2%) であった。

詳細は、学会公式サイトの第 21 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

2. 評価

1) 判定結果の評価

①各タイピング法での判定が正しいこと、②各タイピング法の結果が総合判定と齟齬がないことの 2 つを評価項目とし、60 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、58.48 点と概ね良好な結果を示した。各方法別解析を参考にしていきたい。

2) 結果表記の評価

HLA タイピング結果は、日本組織適合性学会で規定されている「HLA タイピング結果のアレル表記法と結果報告の原則 (2010 年度版)」に基づき、①アンビギュイティ (ambiguity) の表記、② HLA 型への読替え、③ その他 DNA タイピング結果表記について 40 点満点で評価した。全施設の評価平均点は、39.78 点と良好な結果を示した。

3) タイピング結果の評価点 (総合評価)

総合評価点は、判定結果の評価 (60 点満点) と結果表記の評価 (40 点満点) の合計点であり、全施設の平均点は 98.3 点と良好であった。総合評価点 60 点未満の施設が 1 施設あったが、結果の転記ミスであったため報告前の最終確認を行うことで改善可能である。

4) 試験結果の評価

試験結果の評価は、使用試薬での結果の妥当性を評価項目とし、反応データについて A (不備無し)、B (一部の不備)、C (全体的な不備) の 3 段階で評価を行った。C 評価はなかったが、B 評価が Luminex (SSO) で 5 施設、SSP で 7 施設の計 12 施設あり昨年より増加していた。

3. 新規アレルについて

前回に続き今回も新規アレルが検出されていたが、検査をしていく上で新規アレルに遭遇する機会は決して稀ではなく誰でも遭遇する可能性がある。

SSP や SSO は既知アレルに対応するように製造された試薬であり、今回の新規アレルは検出されなかった。今回は検出されなかったが、試薬のプライマーやプローブ部分にバリエーションがあるアレルの場合は、既知の反応パターンと異なることや弱い反応となることなどもあるため注意が必要である。

Sanger 法では、class I の Exon4、class II の Exon3 未登録問題が浮き彫りになった。自動判定でミスマッチ 0 (Exon3 未登録) のアレルの組合せが 1 組あったが、この問題を考慮し総合的に新規アレルの存在を示唆した施設の HLA に関する意識の高さが見られたことは大変注目した部分であった。

4. まとめ

1) サンプル選定から見た結果

サンプル選定時のポイント①の稀なアレルについては、特に問題なく判定されていた。ポイント②のハプロタイプについては、転記ミスをしている施設が複数あり、それらの施設ではハプロタイプを意識しながら最終結果の確認をすることで対応できたと思われた。ポイント③の HLA 型への読替えでは、第 1 区域と異なるスプリット抗原やアソシエート抗原が正しく読替えられていない施設が多く、改善が見られなかった。

2) 報告結果から見えた課題

これまでも、正しく結果を報告するためには、「安定した技術」と「HLA に関する知識」が必要であることを示してきた。「HLA に関する知識」にも「HLA そのものに関する知識」と「使用試薬や解析ソフトに関する知識」があり、今回の Sanger 法と新規アレルの結果からは知識の重要性を十分に感じる回となった。

新規アレルは、いずれの方法いずれの施設でも遭遇する可能性がある。その時に専門の技術者としてどのように考えて対応できるかを意識する機会になったと思われる。また、ambiguity には新規アレルの可能性も含むことを念頭に置くことも重要であると考え。

第21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—

高山 智美¹⁾

¹⁾ 大阪急性期・総合医療センター

1. 概要

1) 参加状況

SSP法の参加施設は25施設で、昨年と比べ3施設増加していた。このうち19施設は臓器移植関連の施設であり、SSP法において臓器移植部門の参加が多い傾向は続いている。また、25施設中22施設はSSP法単独の参加であった。

2) 使用試薬

低解像度試薬を使用していた施設は23施設で、Micro SSP JPNの使用が最も多く20施設であった。中～高解像度試薬を使用していた施設は2施設で、すべて他法との併用であった。

2. 解析方法

解析は以下の4項目について行った。

- 1) 反応データ
- 2) アレル判定
- 3) 結果の表記法
- 4) SSP法の結果と総合判定の齟齬の有無

詳細な結果データについては、学会公式サイトの第21回QCワークショップ報告集をご参照いただきたい。

3. 結果と考察

1) 反応の不備 (false negative) による判定ミスが3施設あった。このうち2施設で false negative が報告されたウェルは昨年度のQCワークショップでも false negative が報告されたウェルであり、陽性バンドの判読が難しいウェルであることが示唆された。SSP法は泳動像を目視で確認するため、各ウェルの陽性バンドの位置や特徴を知ることは正しい判読のために重要と考えられる。また、判読が難しい場合には他のSSP検査キットや他法によ

る再検査も選択肢として重要であると考えられる。

インターナルコントロールバンドが出現しない反応が検出されたまま判定を行った施設が1施設あった。このような場合には誤判定や新規アレルの見逃しにつながるため再検査を実施する必要がある。また、反応データの記載ミスが疑われる施設が3施設あった。

2) アレル判定では解析ソフトで Ambiguity として挙がっていたアレルを見逃していた施設が2施設あった。解析ソフトでの判定方法の見直しが必要であると考えられる。

3) 欠番や Null アレルの表記について確認が必要な施設が2施設あった。

4) SSP法単独の参加施設で総合判定と齟齬のある施設が3施設あった。記載ミスが原因と考えられる。

4. 新規アレルの検出について

H2904 検体で報告された DQB1 の新規アレルは、今回報告のあった SSP法の検査キットでは検出されなかった。検査キットは既知アレルに対応した試薬であり、既存のプライマー設定では今回の新規アレルを区別できなかったためである。プライマーの設定部位に変異があり、既知の反応パターンとは異なる結果が得られるような場合には「判定不能」となり新規アレルが疑われると考えられる。

5. まとめ

明らかな反応の不備が3施設、アレル判定のミスが2施設あり、検査手技や判定方法の見直しの必要があると考えられる。また、判定の難しい反応があった場合には他のSSP検査キットや他法を利用することも重要であると考えられる。

第 21 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 (LABType) —

石塚 敏¹⁾

¹⁾ 東京女子医科大学 中央検査部 移植関連検査室

1. 概要

1) 参加状況

PCR-reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-rSSO) である LABType の参加施設は、10 施設であり部門別内訳は、臓器移植分野 7 施設、造血幹細胞移植分野 4 施設、輸血関連分野 5 施設、その他分野で 1 施設であった。(部門重複含む)

2) 対象ローカス

試薬キットは、LABType SSO 6 施設、LABType HD 4 施設、LABType XR 4 施設であった。HLA-A, B, DRB1 Locus は全施設で参加されていたが、HLA-DRB3, 4, 5 Locus 1 施設、HLA-C Locus 7 施設、HLA-DQ Locus 5 施設、HLA-DP Locus 4 施設の参加であった。また、H29C は 8 施設の参加があった。

2. 解析および結果

1) 表記法

ambiguity の記載がない施設もあったが、今年度の新たな試みとして使用された試薬のカタログファイルを報告して頂き、日本人に限定した推定 4 桁アレルだけではなく ambiguity も正確な解析が可能になった。

2) 精度管理

各施設から提出して頂いた csv ファイルから分析機器の精度管理について確認した結果、Calibration・Verification の有効期限が過ぎている施設を認めた。

3) カウント数および Control Beads

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析しカウント数および Control Beads を確認した結果、H29C (陰性コントロール) において反応性を示す施設を認めしたが、この施設では分析機器に取り込むビーズ数を 100

から 50 カウントに設定変更していることを確認した。

4) cut-off 値の変更状況

各施設から提出して頂いた CSV ファイルを再解析し cut-off 値の変更状況を確認した結果、全ての locus で最大 2 箇所まで解析に cut-off 値の変更を要していた。

3. 新規アレルについて

基本的に LABType は、既知のアレルをタイピングするために設計された試薬である。そのため、新規アレルには対応していないが変異ポジションによっては False negative や False positive のプローブが存在し判定不能の場合にのみ新規アレルを疑うケースが存在する。今回の HLA-DQ Locus は、変異箇所にはプローブ設定がない新規アレルのケースであった。

4. まとめ

DNA-QC では ambiguity まで評価対象ではないが、臨床現場において ambiguity まで結果報告している施設もあることから今年度の新たな試みは正確な ambiguity 解析まで可能な有用な報告が出来たと考える。日頃から最新のカタログファイルのバージョンと Nomenclature の database を確認して頂きたい。

今年度の詳細な報告結果については、学会公式サイトに掲載されている「第 21 回 QC ワークショップ報告集」を参照して頂きたい。

※ LABType SSO HLA DRB3, 4, 5 の訂正

LABType SSO HLA DRB3, 4, 5 は、Exon2 の DRB3, 4, 5 遺伝子にのみ反応を示す Positive Control であることが判明しました。H2903 の DRB3, 4, 5 は、-/- であることから Positive Control ビーズへの反応が無いことが正し

く、QCWS 集会で「増幅不良」と報告したことを訂正
させていただきます。LABType SSO HLA DRB3, 4, 5 におけ

る増幅不良との鑑別には、DRB1 Locus の結果を必ず併
用確認して頂く必要があります。

第21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 (WAKFlow, GenoSearch) —

奥平 裕子¹⁾

¹⁾ ジェノダイブファーマ株式会社

1. 概要

1) 参加状況

全参加施設 77 施設中、Luminex 法での参加施設は 53 施設 (68.8%) であった。このうち、キットについては、WAKFlow を使用していた施設が 38 施設 (Luminex 法参加施設の 71.7%)、GenoSearch を使用していた施設が 6 施設 (Luminex 法参加施設の 11.3%) であった。そのうち 1 施設は WAKFlow と GenoSearch の両方を実施していた。また WAKFlow、GenoSearch を使用していた 43 施設のうち、陰性コントロールのデータは 42 施設において提出されていた (参加施設の 97.7%)。陰性コントロールのデータ提出が任意であった昨年の 58.8% に比べ 38.9% 増加した。

2) 対象ロカス

WAKFlow、GenoSearch で参加していた 43 施設のうち、HLA-A、-B 遺伝子座の解析は全施設で実施されており、次いで HLA-DRB1 座は 40 施設、HLA-C 座は 39 施設で解析されていた。

2. 解析方法

実験操作、解析、報告の 3 項目について以下の様に細分化し、事例を挙げて注意点を示した。

1) 実験操作

- 陰性コントロールの蛍光値
- 陽性コントロールビーズの反応性
- 各プローブの陽性、陰性の比

2) 解析

- ミスアサイン
- 判定に迷うケース
- クロスプローブ

3) 報告

- 表記について
- 4) 新規アレルについて

3. 解析結果および考察

1) 実験操作

- 陰性コントロールの蛍光値については、多くのプローブが誤反応していた施設があり、コンタミが疑われた。原因究明と、汚染防止のためフィルターチップを使用し、増幅 DNA を扱うエリアを物理的に分ける等、対策を行うことが望まれる。
- 陽性コントロールビーズの反応性については、施設間の反応性を比較出来るよう、各陽性コントロールビーズの蛍光値の平均とばらつきをグラフ化した。陽性コントロールビーズの蛍光値が低いという事は PCR の増幅不良、ハイブリ効率の低下を意味しており、陽性コントロール以外のプローブの蛍光値も低下する。その結果、多くのプローブのカットオフ値変更が必要となり、ミスアサインを招きやすことから、PCR 操作、ハイブリ操作の見直しが必要であることが示唆された。
- 各プローブの陽性、陰性の比については、プローブの P_{min}/N_{max} (陽性の最小値と陰性の最高値の比) が 50 以上、10 以上 50 未満、3 以上 10 未満、3 以下に分けてグラフで示した。DRB1 で P_{min}/N_{max} の比が 3 以下であるプローブが他施設より多い施設では、陽性、陰性の反応が明瞭でないため、ミスアサインがみられた。このような事例では、ハイブリ、洗浄操作の見直しが必要であると考えられる。

2) 解析

- ミスアサインについては、クロスプローブが高く反

応したことによりミスアサインしていた施設があり、意図的なカットオフ値変更は誤判定に繋がる事が示された。無理にアサインせず、再検査や他法での判定を行うことが望まれる。

- 判定に迷うケースについては、1プローブの陽性、陰性でタイプが変わる例を挙げ、ミスアサインのケースと同様、無理な判定はしないという判断の重要性を示した。
- クロスプローブについては、DRB1のD#37TG（クロスプローブ）はH2902検体で35施設中、14施設でカットオフ値の変更（FP）をおこなっており、判定の難しさが示唆された。しかし、21施設については変更せずにタイプ出来ていたことから、施設間差も原因の一つではないかという事が見出された。細部までプロトコルに添った実験操作を行うことで、施設間差が埋められる可能性が考えられる。

3) 報告

- 表記については、転記ミスをしていた施設があった。反応データに問題はなくても、誤判定と同様に誤った結果となってしまうため、ダブルチェックを行う

などの対策が望まれる。

4) 新規アレル（2904検体DQB1*06:01:01の新規）については、Luminex法（WAKFlow）では、検出されていなかった。検出されなかった理由として、置換部位と、プローブ設定位置の関係が考えられる。置換部位にプローブが設定されていなかったため、検出できていなかった。しかし、プローブ設定位置に置換がある新規アレルの場合には、既知の反応パターンと一致せず「判定不能」となることがあると考えられる。（GenoSearchは、DQB1のキット販売はない。）

4. まとめ

今年度から配布された陰性コントロールで、プローブの誤反応が見られた施設があった。これは、実験そのものの信憑性に関わる重大な事態である。また、プローブの陽性、陰性の差が明瞭でないと、ミスアサインに繋がる。実験環境や操作の見直しを行い、タイピングの精度の向上に努めることが望まれる。さらに、解析で迷った際は無理にアサインせず、再検査や他法による検査を考える必要がある。

第 21 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—

小島 裕人¹⁾

¹⁾公益財団法人 HLA 研究所

1. 概要

1) NGS 法

参加施設は、2 施設であった。使用キットは 2 施設で異なり、それぞれ ScisGo HLA, NXType NGS HLA であった。NXType NGS HLA は Long Range PCR を、ScisGo HLA は Short Range PCR を原理としている。測定機器に関しては、ScisGo HLA を使用した施設では MiSeq, NXType NGS HLA を使用した施設では IonPGM であった。

2) Sanger 法

参加施設は、6 施設であった。使用キットは SeCore を用いた施設が 4 施設であり、他の 2 施設は Allele SEQR であった。判定ソフトは、SeCore を用いた 4 施設が uTYPE, AlleleSEQR を用いた 2 施設はそれぞれ、Assign, SBTengine であった。

対象領域については、Class I は 1 施設のみ A, B 座が exon 2～4, C 座が exon 2～6 であり、その他の 5 施設は A 座, B 座, C 座ともに exon 2～4 であった。Class II のうち、DRB1 座は 2 施設が exon 2 のみ, 4 施設が exon 2, 3 と相違があった。

2. 結果および考察

1) NGS 法

2 施設で使用キットが異なり、伴って対象領域が異なるために結果の評価はできなかった。

2) Sanger 法

① 要改善項目

- Ambiguity の見落とし

H2901 の A 座, H2903 の C 座でそれぞれ 2 施設, 1 施設が Ambiguity となる候補アレルが抜けていた。ダブ

ルチェックなどの方法によって、判定結果を確認することが必要である。

- 塩基配列の挿入 / 欠失多型の判定

2 施設について、塩基配列の挿入 / 欠失多型が Ambiguity となる候補から除外されていなかった。両施設が共に使用していた判定ソフトである uTYPE では、塩基配列の挿入 / 欠失多型が結果の MM 欄に「0*」が表示され、ダブルクリックで除外の操作をすることができる。

- DRB1 座 codon 86 の Ambiguity

2 施設について、付属プライマーを使用しているにもかかわらず、codon 86 に関連する Ambiguity が解消できていなかった。両施設が共に使用していた判定ソフトである uTYPE では、Sample 欄の「Filter」ボタンを押すことで結果に反映することができる。

② 要確認項目

- 最新アレル抜け

H2901 の DRB1 座で、Ambiguity となる候補アレルに DRB1*15:140 を含んでいない施設があった。DRB1*15:140 は、2017/1/20 に IMGT に登録されたアレルであり、参照配列を古いバージョンで使用している施設では、近々で登録されたアレルが Ambiguity に含まれていなかった。

3. 新規アレルについて

H2904 の DQB1 座は、NGS 法で検査を実施した 2 施設で新規アレルと判定され、DQB1*06:01 の codon 133 (exon 3) が CGG から TGG に置き換わっていた。Sanger 法では、反応パターンから DQB1*05:09, *06:56 の組み合わせが判定され、新規アレルを見逃す可能性がある。

今回、Sanger 法を実施した 5 施設のうち 3 施設は、DQB1*06:01 もしくは新規アレルの可能性を判定してお

り、DQB1*05:09 および DQB1*06:56 が日本人にまれなアレルであることを加味していた。判定された結果がまれなアレルである場合は、再検査や他法での確認が必要である。

4. まとめ

NGS 法は、各施設における使用キットが異なるため、施設間差を評価できなかった。

Sanger 法は、各施設において検査結果を得るまでの技術的な問題点は無く、施設間の結果の違いは、判定時のミスがほとんどであった。新規アレル判定の例にみられるように、判定者の HLA に対する知識レベルの向上は、ミスタイプを減らす一つの方法である。また、塩基配列の挿入/欠失多型や DRB1 座の codon 86 の判定については、ソフトウェアの使用法とともに、HLA の特徴を知っておくとよい。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —試料説明 抗体 QC—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

サンプルは、学会から日本赤十字社への譲渡依頼に基づいて保管している抗血清の中から、目的に応じた4種類を複数名で検討し選択した。選んだ抗血清は、トロンビン処理、防腐剤（チツ化ソーダ）および着色料の添加、フィルターによる清浄化を実施し参加施設に配布している。ちなみに、従来からの抗体 QC のサンプルの要件としては、①日本人に通常検出される抗体であること、②一部の試料では、HLA-C 座抗原に対する抗体、IgM 性抗体、HLA 以外の非特異反応が含まれる場合など、があげられる。今年度は、クラス I 抗体で IgG と IgM で異なる特異性を保有するもの（SH2901）、DQ1 および DPA1 の特異性を保有するもの（SH2902）、DQ234 の明確な特異性を保有するもの（SH2903）、C、DR ローカスの明確な特異性を保有するもの（SH2904）を選定した。

一方、クロスマッチについては、ダイレクトクロスマッ

チ対象のサンプル（SH2901）は、特異性が限局されていること、各施設でのパネルの準備が比較的容易であること、抗体検査結果とクロスマッチの測定結果の違いに興味深い点があることが選定理由であった。また、仮想クロスマッチ対象のサンプル（SH2904）は、クラス I 抗体について、C ローカス抗体の検出がクロスマッチの結果に影響すること、クラス II では DRB345 に対する考え方、などが再確認できる組合せを選定した。

このように抗体 QC のサンプルは、限られた選択肢の中から、参加施設の精度管理や抗体検査の基礎知識の復習、さらには現状に応じた問題提起の材料となることを期待して選定している。参加施設はそのことを意識して検査に取り組み、学会公式サイト掲載の方法別解析結果および、事務局から送付される全解析データ（CD）に目を通して、日常検査の水準維持に役立てて頂きたい。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —総合解析 抗体 QC—

高 陽淑¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 近畿ブロック血液センター

1. 総合解析 (部門含む)

1) 参加施設の構成

今年度の抗体検査への参加は、輸血部門 31 施設、臓器移植部門 36 施設、造血細胞移植部門 24 施設 (重複あり) の 57 施設 (初参加は 2 施設) であった。施設別では、病院・大学に属する施設が 70% 以上を占めていて、検査・血液センターおよびそれ以外の施設の参加率を大きく上回っていた。また部門別の参加構成を調査したところ、複数部門への参加は 25 施設 (全部門 11, いずれか 2 部門 14) 単独部門への参加は 29 施設 (輸血 10, 臓器 19, 造血部門 0) と、割合としては同程度であった。

2) 抗体検出および抗体特異性同定結果

全部門での抗体検出 (抗体有無) 結果の一致率は全検体 (4 サンプルのクラス I & クラス II) において 98.2% の一致率であった。今回は 4 サンプル中の 1 本 (SH2904) が高バックグラウンドを示すサンプルであり、その処理が功を奏さず判定保留となった施設が 1 箇所あった。このサンプルの検体処理の効果には施設間差を認めたが、その原因を究明するには至らなかった。今後の QCWS でも高バックグラウンド検体への対処法については継続的に調査する予定である。

抗体特異性同定検査については、検査を実施した 43 施設中、42 施設が LABScreen や WAKFlow など Luminex で測定する蛍光ビーズ法を用いて結果判定を行っており、スクリーニングと特異性同定を段階的に実施する施設は 33 施設 (76.7%) と例年同様に検査の目的を意識した進め方を実践する施設が大半を占めていた。

2. 結果評価

1) 評価結果の比較について

日本人 HLA 遺伝子頻度 0.1% 以上の HLA 抗原について、基準値 (0.67) 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 (評価点の計算方法は学会公式サイトに掲載)。その結果、参加施設 57 施設のうち抗体検出については A 評価が 98.2% で、抗体特異性同定については、検査を実施した 42 施設中、評価 A が 36 施設 (83.7%), 評価 B が 7 施設 (16.3%) であり評価 C は無かった。

今年度は全体的に昨年を下回る結果であったが、総合判定の結果報告シートを大幅に改訂したことによる理解不足も一因であると考えられるため、次年度に向けて改良する予定である。

2) 総合判定結果比較について

各施設が提出した総合判定結果を集計し、サンプル毎にその一致度を確認した。その結果、SH2901 のクラス I 抗体は IgG と IgM で特異性が異なっていた為、Ig クラス別に検査を実施した施設としなかった施設での判定結果に齟齬があった。IgM 性抗体検出の必要性は、検査目的に依存すると思うが、43 施設中、4 施設 (9.3%) の参加では比較検討することも難しく、データ収集をすすめるに留まるのが現状である。また、SH2902 および SH2903 については、特徴的な点は認めなかったが、反応性が比較的弱い特異性が含まれていた SH2904 の一致率が低い傾向にあった。

次に、判定結果の施設別一致率を比較すると、4 サンプルの平均値が 70% 以下となる施設はクラス I 抗体では 4 施設、クラス II 抗体では 6 施設であった。このうち 3 施設はクラス I と II で重なっており、その原因は特

異性同定検査には適さない試薬の使用や、判定の考え方に他施設との乖離があるためと推測された。

3) 総合判定結果不一致の原因について

Score の一致率がクラス I 抗体では 90% 以下、クラス II 抗体では 85% 以下の場合について、各施設が提出した検査方法ごとの測定結果と総合判定結果（アレル別判定含む）から不一致となる要因について推測すると、以下の 4 点に纏められた。

- ① LABScreen single antigen (LSSA) で測定した際に得られる nMFI が 1,000 ~ 3,000 の領域に含まれる場合。
- ② 用いる試薬に含まれる抗原（アレル）ピーズの種類に依存する場合。
- ③ 特定の施設の反応性が他施設と大きく異なる場合。

- ④ 抗原ピーズのアレルによって反応が異なる場合。

3. まとめ

今回のサンプルでは、明確な HLA 特異性は全施設で概ね検出できていたが、試薬の性能に影響される特異性（HLA-C, HLA-DQ, HLA-DP）や、LSSA Supplement などの抗原ピーズ追加に起因する最終判定の施設間差を認めた。これらの現象は、抗体 QC の最近の特徴である。参加する施設が使用する試薬の種類（解像度）や陽性カットオフ値が概ね同等の反応帯に入っていることを前提に考えると、蛍光シグナルのみに依存する判定ではなく、抗体のエピトープを意識した判定方法やその考え方を参加施設に対して啓蒙して行く必要があると考える。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —検査法別解析 抗体検査 FCM (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. 参加状況

今回の QCWS で OneLambda 社 FlowPRA を使用した施設は、スクリーニングで Class I が 18 施設、Class II が 17 施設であった。シングルアンチゲンの参加施設はなかった。参加施設数は、年々減少傾向である。

2. 測定機器と試薬ロット

測定機器、および試薬ロットの詳細は学会公式サイト
の解析資料を参照して頂きたい。

3. 解析方法

各施設からヒストグラム、および RAW データを提出
頂き、解析ソフト Flow Jo, Kaluza を用いて再解析を行い、
取り込みビーズ数、%PRA などを確認した。

4. 解析結果

判定スコアの一致率は Class I, II とともに 100% と良好

だった。しかし、数施設においてはビーズの取り込み数
が少なく、十分なカウント数に達しておらず、昨年度と
の連結比較を行っても改善が認められない点も見受けら
れた。

%PRA に関しては、マーカー設定が依然各施設により
異なっているため、数値は取束していない。取り込み数
も同様に、昨年度との連結比較を行ってみたが、改善が
認められない施設も見受けられた。詳細は、学会公式サ
イトを参照して頂きたい。

5. まとめ

FlowPRA 試薬を用いた検査の判定スコアの一致率は、
100% と良好な結果であり、問題は認めなかった。今回、
取り込みビーズ数や %PRA を昨年度のデータとの連結
比較を行うことで、改善ができていないか否かを確認した。
メーカーが推奨している取り込みビーズ数や、マーカー
の設定を再度学会公式サイトで確認し、参考にしていた
だきたい。

第 21 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 ルミネックス（WAKFlow）法—

小林 洋紀¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社 関東甲信越ブロック血液センター

1. はじめに

QCWS 抗体部門参加の 57 施設において WAKFlow MR（以下 MR）の参加施設は Class I が 15 施設（26.3%）、Class II が 8 施設（14.0%）であり、どちらも昨年より 1 施設減少していた。WAKFlow HR（以下 HR）の参加施設は 12 施設（21.1%）であり、昨年より 1 施設増加していた。なお、解析結果の詳細は学会公式サイトの第 21 回 QC ワークショップ報告集をご参照いただきたい。

2. 解析項目、試薬ロット

1) MR（Class I・Class II）

解析項目は、①バックグラウンドビーズ（BB）および陽性コントロールビーズ（PB）の施設間差、②各施設間の Median 値の比較、③各施設間の Median 値および Index 値の 2SD における比較について行った。試薬ロットは、Class I では全施設同一（T0B）であり、Class II では 2 種類の試薬ロット（T0A、T0B）が使用されていた。

2) HR（Class I）

解析項目は、①バックグラウンドビーズ（BB）および陽性コントロールビーズ（PB）の施設間差、② Median 値および Calmed 値の施設間差、③サンプルごとの反応性の比較について行った。試薬ロットは、全施設同一（T0A）であった。

3. 解析結果

1) MR（Class I・Class II）

SH2901 のバックグラウンドビーズ（BB）において、非特異反応吸着処理の有無で Median 値に施設間差が見られた。各施設間の Median 値および Index 値の比較では、2SD から外れるデータも散見されたが、Index 値ではほぼ問題なく、抗体有無の判定結果に影響することは無

かった。Class II では、1 施設のみ試薬ロットが異なっていたがロット間差は見られず、Median 値のばらつきが少なく良好な結果であった。血清処理方法や洗浄操作、装置の状態などによって施設間差はある程度見られるが、日常的に MR を使用されている施設が多いと思われる、洗浄や手技的な操作に問題はないと考えられた。

2) HR（Class I）

Median 値および Calmed 値共に高い傾向が認められた施設（29S44、29S56）があり、明らかに他施設と乖離する反応性が認められた。SH2901 の IgM 抗体の特異性とほぼ一致することから、使用した二次抗体はキット添付品ではなく MR の二次抗体と推測された。精度管理を目的としている QCWS では、キット添付品での実施を推奨する。また、HR と LABScreen Single Antigen（以下 LS-SA）の反応性において、サンプルによる違いもあるが、弱い反応（nMFI:3000 以下、Calmed:2000 以下）での乖離は生じることが多かった。

4. まとめ

問題点として、MR で血清処理試薬を使用した場合に、陰性コントロールを適正に使用していない施設があった。QCWS 参考プロトコルや試薬メーカーの使用方法を確認いただくことを推奨する。また、抗体特異性判定において 2 法の検査を実施した場合、どちらかの結果を優先する施設と、2 法合わせた結果で総合判定している施設があった（HR を実施した 12 施設中の 8 施設が LS-SA も実施していた）。入力方法やアレル特異性抗体の判定などは今後の課題と考えられる。また、MR・HR 共通の問題点として、測定データが Sample Empty（ビーズカウント不足）となっていた施設があった。判定結果に影響する可能性があるため、装置や試薬の状態を確認し、再検査基準など自主的な管理の実施を推奨する。

第 21 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 ルミネックス (LABScreen) 法—

前島理恵子¹⁾、蟹井はるか¹⁾、藤原 孝記¹⁾

¹⁾ 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

1. はじめに

抗体 QC 参加 57 施設のうち LABScreen を実施した施設は 40 施設 (70%) であった。LABScreen 実施施設のうち、スクリーニングのみ行っている施設は 2 施設であった。Single Antigen (LS-SA) を行っている施設のスクリーニング法の内訳は、Mixed が 9 施設、PRA が 7 施設、Multi が 1 施設、LABScreen 以外が 13 施設であり、そのほとんどが WAK Flow MR を実施していた。LS-SA を実施しているが、スクリーニング法の記載のない施設が 8 施設あった。supplement beads を使用している施設は 24 施設あった。部門別による検査方法に偏りは見られなかった。

2. 結果解析

LS-SA 実施施設が 38 施設と多数であったため、LS-SA のデータについて解析を行った。

1) 抗体の有無

Class I, II 共にすべての検体で陽性と判定しているが、非特異反応が改善しなかった S31 は SH2904 を判定保留としていた。

2) 検体の処理方法

QCWS プロトコルで必須とされている凍結融解および遠心を行っている施設は 10 施設であったが、データシートへの記載漏れが考えられた。NC ビーズ値が高い場合に行う非特異反応吸着処理は 16 施設で行っており、PC ビーズ値が低い場合に行う DTT 処理は 5 施設で行っていた。

3) コントロールビーズの施設間差

再検基準となる NC ビーズ値 500 以上の施設は、SH2903 および SH2904 で多数存在したが、PC ビーズ値

3000 以下の施設は存在しなかった。再検基準を超える施設は多数存在するが、ほとんどの施設で再検に関するコメントがなく、再検基準を超えているのに再検していないのか、非特異反応吸着などの処理を行っているが NC ビーズ値が高いのかが不明であり、データシートへ再検の有無を記載する必要があると感じた。

4) 検体前処理法による PC/NC の比較

SH2903 および SH2904 において、PC/NC 値 10 未満の施設が存在したが、検体前処理法による差は認められなかった。

5) カットオフ値

ほとんどの施設が nMFI ≥ 1000 をカットオフ値としており、これに CREG やエピトープを考慮した判定を行っている施設が多数存在した。S09,41 はカットオフ値の記載がなく、S06,20,33,38,45 はカットオフ値と記載していた。自動判定の Rxn >6 を陽性としていると考えられるが、データシートへの記載は明確にしてもらいたい。

6) nMFI : 1000 を中心とした各ビーズの反応

① Class I

他施設と比較して nMFI が高い施設、低い施設があったが特定の施設に限定されているわけではなかった。SH2901–2904 全ての検体において、nMFI が Average から大きく外れる施設が存在した。SH2903 では nMFI が低値集団と高値集団に分かれるビーズが存在した。SH2904 は全ビーズの 1/3 にバラつきがあり、nMFI が 0-7814 と大きく離れるビーズも存在した。

② Class II

SH2901–2903 では nMFI が大きく離れているビーズは存在しなかったが、SH2904 では Average より低いビーズが複数存在した。

SH2904 は Class I, II ともにピーズの値にバラつきが見られたが、NC ピーズの値が高いことによる非特異反応が考えられた。

3. エピトープ解析

Single Antigen を実施した施設を対象に抗体特異性のエピトープ解析を行った。個別ピーズに対する反応が $nMFI > 1000$ を示す施設の割合が 2/3 以上を Consensus として評価し、 $nMFI$ の平均値と比較し、解析した。エピトープの存在する場所 (α ヘリックス, β シート), 認識する

アミノ酸の数と位置 (単一のアミノ酸, 離れた数か所のアミノ酸) などにより, 反応に差が認められた。SH2903 や SH2904 のようにバックグラウンドが高いことにより, $nMFI$ に影響が出る場合, 抗体特異性の判定が難しくなるが, エピトープを考慮すると抗体特異性を見逃さずに判定ができる。Class II では同じピーズに DQA1 と DQB1, DPA1 と DPB1 のアレルが存在するため, エピトープを考慮することでどちらの反応であるか, 推測することができる。

第 21 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 その他検査法およびクロスマッチ—

藤原 孝記¹⁾²⁾

¹⁾ 帝京大学医療技術学部臨床検査学科 免疫検査学

²⁾ 帝京大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

1. はじめに

その他検査法とダイレクトクロスマッチは、扱う抗体試料が異なるだけで検査法はほぼ共通であるため、昨年と同様に定義し、参加状況を分類した。

その他検査法は、FlowPRA, LABScreen, WAKFlow 以外の抗 HLA 抗体検査において、SH2901～SH2904 の 4 種類を対象としている施設で、LCT 法 (0 施設)、AHG-LCT 法 (1 施設)、MPHA 法 (3 施設)、FCM 法 (0 施設)、ICFA 法 (1 施設) の参加であった。

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、SH2901/HLA Class I を対象とし、クロスマッチ入力シートに記入されている施設で、LCT 法 (6 施設)、AHG-LCT 法 (1 施設)、FCM 法 (7 施設)、ICFA 法 (13 施設) の参加であった。

仮想クロスマッチは、Class I のみ (2 施設)、Class I+Class II (22 施設) の参加であり、昨年より若干の増加であった。

2. 結果解析

1) その他検査法・ダイレクトクロスマッチ

その他検査法を単独で解析することは検査件数が少ないため困難であり、ダイレクトクロスマッチと共に解析した。解析方法は測定値、スコア、判定基準にて解析を行い、LCT・AHG-LCT は総合判定の特異性を基にスコアを解析、MPHA は同一パネルをまとめてスコアを解析、FCM は FCS ファイルを再解析、ICFA は Class I-1 ビーズ、Class I-2 ビーズをそれぞれ解析した。

①抗体の有無：Class I は、31 施設中 30 施設が、Class II は、全 28 施設において抗体ありと判定した。Class I

を実施した 1 施設が判定保留としていた。

- ② LCT・AHG-LCT：AHG-LCT では反応しているが、LCT では期待通りの反応を示さない例があり、検出感度の違いによるものか、手技的な問題によるものかは不明であった。また、凍結細胞を用いた AHG-LCT で期待通りの反応を示さない例があった。細胞の状態や、ウサギ補体、反応時間・温度などの点が統一されていないものの、今回の結果は想定していた範囲内であった。
- ③ MPHA：SH2904 では予測されていた Cw7 に対する反応が陰性であった。また、SH2903 および SH2904 において施設間差が認められたが、使用したロットの違いによるものか、手技的な問題によるものかは不明であった。本来、血小板特異抗原に対する抗体を検出する方法であり、HLA 特異抗体の検出や同定に用いることは難しい。
- ④ FCM：統一した抗原細胞を使用していないため、一概に結果の比較評価はできないが、各ヒストグラムの形状や S/N 比に基づく判定結果を見る限り大きな問題点はなかった。測定細胞数が不十分な例があったが、今回の結果としては問題なかった。測定細胞数が不足するとサンプルに偏りが生じやすく、特にカットオフに近いヒストグラムにおいて測定結果が不正確になる可能性があることから 10,000 個以上、測定することを推奨する。
- ⑤ ICFA：バックグラウンドの高いケースもなく、概ね期待通りの結果が得られていた。操作手順および判定基準が統一されているため、結果の整合性は高いといえるが、SH2904 では予測されていた Cw7 に対する反応が弱いものも認められた。原因として、抗原側の検体

に血小板が含まれている影響が示唆された。

- ⑥まとめ：LABSceen Single Antigen（以下、LS-SA）の結果から反応が予想される抗体特異性と、各検査方法の結果との乖離をどの様に解釈すべきかが問題点としてあげられる。LS-SA の nMFI が比較的高い場合でもインタクト細胞との反応が認められない場合があり、単に検出感度が低いために反応しなかったのか、インタクト細胞との反応が認められない臨床的意義の低い抗体なのかを判断することは難しい。

2) 仮想クロスマッチ

仮想クロスマッチは、抗体試料（SH2904：移植患者）と DNA 試料（H2902：ドナー）を指定した。抗体試料および DNA 試料の詳細な検査データは、学会公式サイトを参照していただきたい。

- ①仮想クロスマッチ結果：24 施設すべてが仮想クロスマッチ陽性と判定した。
- ②反応が予想される特異性：DNA 試料の HLA タイプ、抗体検査部門の総合判定および LS-SA の平均 nMFI からクロスマッチ陽性となる抗体特異性を解析した。C*07:02（平均 nMFI：18,399）、DRB1*13:02（平均 nMFI：14,379）、DRB3*03:01（平均 nMFI：14,620）

との反応が予想された。Class I+Class II を実施した 22 施設中 9 施設において反応が予想される特異性を Cw7, DR13, (DR52) と報告していた。また、B*39:02 との反応は、平均 nMFI が 1,644 で B3902, Cw7, DR13, (DR52) と報告した施設が 4 施設、B39, Cw7, DR13, (DR52) と報告した施設は 1 施設であった。抗体検査部門の総合判定において、B39 の陽性判定一致率は 81.3% であったが、B3902 に対する反応は、LS-SA で nMFI が 1,000 以下も多く、極めて弱い反応であった。B3902 は、DSA になりうる抗原ではあるが、仮想クロスマッチでは判定保留とし、インタクトセルを用いた方法で確認することが望ましいと考える。

ドナーの DRB3/4/5 タイピングが未実施の場合、DRB 遺伝子領域の構造を考慮しないと、ドナーの DRB1 に対する抗体が陰性であっても、DRB3/4/5 に対する抗体が陽性になることがあり、仮想クロスマッチで見逃す恐れがある。昨年の解析結果を踏まえ、ドナーの DRB3/4/5 タイピングが未実施で DR52 に対する反応を予測した施設が 8 施設あった。

第 21 回 HLA-QC ワークショップレポート —日本移植学会連携 全血クロスマッチ—

橋口 裕樹¹⁾²⁾

¹⁾ 福岡赤十字病院 検査部移植検査課／輸血細胞治療部／事務部医療連携課

²⁾ 日本移植学会 移植関連検査委員会 委員

1. 概要

平成 25 年 4 月より日本組織適合性学会と日本移植学会が連携し、全血サンプル由来のリンパ球を用いたクロスマッチの精度管理を実施する事となり、今回で 5 回目の実施となった。

2. 経過

今年度は 43 施設の参加があり、参加施設内訳は、臓器移植ネットワークの検査施設が 27 施設、移植関連病院が 9 施設、検査センター 2 施設、血液センター 3 施設、試薬メーカー 1 施設、研究所 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ドナー用の全血の発送は、4 月の QCWS 試料配布の翌週に、参加施設に配布した。ACD-A 液入全血の発送には、東京より宅配便(常温)で発送、全国の参加施設には翌日、翌々日には到着し、細胞の生存率も概ね良好であった。8 月末に集計結果を各施設にメールで送信、9 月に開催された第 53 回日本移植学会総会(旭川市)、10 月に開催された第 21 回 QCWS(広島市)にて報告を行った。尚、30 年 2 月に開催される第 51 回日本臨床腎移植学会(神戸市)でも報告予定である。

3. 試料選択および検査方法

ドナー全血は、日本移植学会移植関連検査委員会で採血した ACD 採血 7.5 ml を準備した。ドナー HLA タイプは、日本人に高頻度に発現しているものを選択した。血清は、QCWS 部会で準備された SH2904 を選択した。SH2904 の DR12 抗体(DRB1*12:01)MFI=18,078 がドナー特異的抗体 Donor Specific Antibody; DSA となる想定で選

択した。

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。方法別にみると、フローサイトクロスマッチ Flow Cytometry Cross match; FCXM 法が参加施設の 34 施設(79%)と最も多く、次いでリンパ球細胞傷害試験 Complement dependent cytotoxicity; CDC 法が 18 施設(47%)、Immunocomplex capture fluorescence analysis; ICFA 法が 14 施設(35%)であった。

4. 結果

DR ローカスが DSA になるため、B 細胞を材料とした方法の結果は陽性、T 細胞は陰性となった。結果については各方法で高い一致率であったが、FCXM において乖離した施設が目立ち、カットオフに起因するもの、機器設定に起因するものを認めた。CDC においては、陽性細胞を顕微鏡下で目視し、カウントする % 死細胞に差を認め、弱陽性サンプルの判定に不安が残る。詳細な各方法の一致率は、学会公式サイトを参照して頂きたい。

5. まとめ

これまでの 5 回の開催は、各施設が日常使用しているプロトコルでの参加であり、ある程度の結果の一致率は達成しているものの、一部の施設においては問題となる判定も散見した。これらを解決する一つのツールとして、クロスマッチの参考プロトコルの準備が整い、学会のホームページに公開することとなった。来年度は、この参考プロトコルでの参加を呼びかけて、どの程度収束するか確認する予定である。

原 著

HLA 半合致造血細胞移植後に再発した急性白血病小児患者における白血病細胞からの不適合 HLA アレル喪失の検討

小野 智¹⁾・皆川 敬治¹⁾・川畑 絹代¹⁾・安田 広康¹⁾・池田 和彦¹⁾・高橋 信久²⁾・大原 喜裕²⁾・小林 正悟²⁾・望月 一弘²⁾・伊藤 正樹²⁾・佐野 秀樹²⁾・菊田 敦²⁾・大戸 齊¹⁾

¹⁾ 福島県立医科大学附属病院 輸血・移植免疫部

²⁾ 福島県立医科大学附属病院 小児腫瘍内科

HLA 半合致造血細胞移植 (haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: Haplo-HSCT) は再発や治療抵抗性, 予後不良因子を認める造血器腫瘍症例を対象に, 強力な抗腫瘍効果を期待し実施されている。Haplo-HSCT 後再発した症例の一部では白血病細胞の不適合 HLA 喪失が報告されている。Haplo-HSCT 後再発した 6 症例について, 白血病細胞を含む末梢血, 骨髓血由来 DNA を用いて HLA DNA typing を実施し, 患者特異的 HLA ハプロタイプの有無から不適合 HLA 喪失の可能性について評価した。6 症例中 2 症例で不適合 HLA が検出できない水準までの喪失 (低下) を認めた。Haplo-HSCT 後の再発症例では以後の治療方針決定のため, 不適合 HLA 喪失の有無の評価が重要である。

キーワード: HLA 半合致造血細胞移植, HLA 喪失, 移植片対腫瘍効果, 急性白血病, 再発

はじめに

患者とドナーとの間で, 双方の HLA ハプロタイプのうち 1 組を一致させた半合致造血細胞移植 (haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: Haplo-HSCT) は, 本邦を含め, 世界的に同種造血細胞移植に適する HLA 適合ドナーが得られない場合に, 代替ドナーからの移植法として広まりつつある¹⁾。また, Haplo-HSCT はドナーと共有しない患者特異的 HLA を標的とした強力な抗白血病 (graft versus leukemia: GVL) 効果を期待し, 移植前処置の工夫などにより再発や治療抵抗性, 予後不良因子を認める造血器腫瘍症例を対象に実施される機会が増加してきている^{2,3)}。Haplo-HSCT 後の患者には, 患者特異的 HLA ハプロタイプ, ドナーと共有する HLA ハプロタイプ, ドナー特異的 HLA ハプロタイプの 3 つの HLA ハプロタイプが存在することになる。

一方, Haplo-HSCT 後や, HLA 不一致ドナーからの移

植後に再発した白血病症例では, 白血病細胞の患者のみが特異的に保有する不適合 HLA (GVL の標的) アレルの loss of heterozygosity (LOH) が生じた例が報告されている^{4,5)}。また, Haplo-HSCT 後再発症例における患者特異的 HLA 喪失は再発時の患者末梢血や骨髓血を用いた HLA DNA typing や flow cytometry によって検出されている⁶⁾。

Luminex を用いた PCR-reverse sequence specific oligonucleotide (PCR-rSSO) 法による HLA DNA typing は, 蛍光強度の異なるピーズに特異的オリゴ DNA プローブが結合されている。今回, Haplo-HSCT 後再発時に患者特異的 HLA とのみ反応する蛍光ピーズを特定し, その反応性の有無から簡易的に患者特異的 HLA 喪失の可能性を評価する方法および臨床サンプルから白血病細胞の患者特異的 HLA 喪失の可能性について検討した。

受付日: 2017 年 3 月 2 日, 受理日: 2017 年 12 月 12 日

代表者連絡先: 小野 智 〒960-1295 福島県福島市光が丘 1 番地 福島県立医科大学附属病院 輸血・移植免疫部
TEL: 024-547-1536 FAX: 024-549-3126 E-mail: sa-ono@fmu.ac.jp

対象と方法

A. 対象症例と検査材料 (表1)

2005年9月から2011年6月に当院小児腫瘍内科にて Haplo-HSCT を実施し, その後再発した6症例を対象とした。疾患の内訳は急性骨髄性白血病3例, 急性リンパ性白血病3例であった。患者特異的 HLA 喪失の検査には, Haplo-HSCT 後再発診断時の患者末梢血および骨髓血を用いた。

B. 方法

1. DNA 抽出と HLA DNA typing

ゲノム DNA は, QuickGene DNA whole blood kit (和光純薬, 大阪) を用いて抽出した。抽出したゲノム DNA を用いて, Luminex (Luminex 100/200: Luminex Corporation, Austin, Texas) による PCR-rSSO 法 (ジェノ

サーチ HLA ver.2: 医学生物学研究所, 名古屋) で検査した⁷⁾。HLA 解析は福島県立医科大学倫理委員会の承認を得て行った (番号: 101)。また, HLA DNA typing は患者とドナーの全員からインフォームド・コンセントを得て実施した。

2. 患者特異的 HLA 喪失の推定

得られた typing データは, 解析ソフトウェア (Un-iMAG: 医学生物学研究所) に入力後, 患者特異的 HLA とのみ反応する蛍光ビーズの反応性を特定し, 患者特異的 HLA ハプロタイプの有無から不適合 HLA アレルの LOH の可能性を評価した。表 2-A に例示した移植症例の場合, 患者特異的 HLA ハプロタイプは *HLA-A*11:01*, *HLA-B*54:01*, *HLA-C*01:02*, *HLA-DRB1*04:05* となる。表 2-B は HLA-A を例に Luminex 蛍光ビーズと陽性パターンを示す。患者特異的な *HLA-A*11:01* は, オリゴプロー

表 1 Haplo-HSCT 後再発白血病症例

症例番号	診断	ドナー	細胞源	検体採取日 (移植後日数)	検査材料	芽球 (%)	患者特異的 HLA 喪失の可能性
1	AML	母	BM	1,384	BM	85	なし
2	ALL	母	BM	881	BM	89	あり
3	ALL	父	PBSC	49	PB	70	なし
4	ALL	父	PBSC	642	BM	90	なし
5	AML	同胞	PBSC	824	BM	90	あり
6	AML	父	PBSC	1,379	BM	81	なし

AML: acute myelogenous leukemia, ALL: acute lymphoblastic leukemia, BM: 骨髄, PBSC: 末梢血幹細胞, PB: 末梢血

表 2-A Haplo-HSCT 後再発時における患者特異的 HLA 喪失の評価方法

例	HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1		
患者 (移植前)	phenotype	<i>A11</i>	<i>A33</i>	<i>B44</i>	<i>B54</i>	<i>Cw1</i>	<i>Cw14</i>	<i>DR4</i>	<i>DR13</i>
	genotype	<i>A*11:01</i>	<i>A*33:03</i>	<i>B*44:03</i>	<i>B*54:01</i>	<i>C*01:02</i>	<i>C*14:03</i>	<i>DRB1*04:05</i>	<i>DRB1*13:02</i>
ドナー	phenotype	<i>A24</i>	<i>A33</i>	<i>B7</i>	<i>B44</i>	<i>Cw7</i>	<i>Cw14</i>	<i>DR1</i>	<i>DR13</i>
	genotype	<i>A*24:02</i>	<i>A*33:03</i>	<i>B*07:02</i>	<i>B*44:03</i>	<i>C*07:02</i>	<i>C*14:03</i>	<i>DRB1*01:01</i>	<i>DRB1*13:02</i>

表 2-B Haplo-HSCT 後再発時における患者特異的 HLA 喪失の評価方法

例) HLA-A		Beads No./Positive pattern									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
共有 HLA	<i>A*33:03</i>										
患者特異的 HLA	<i>A*11:01</i>										
ドナー特異的 HLA	<i>A*24:02</i>										

Beads No. 8 & 9
□: 陰性 患者特異的 HLA 喪失の可能性あり
■: 陽性 患者特異的 HLA 喪失の可能性なし
(例) 患者特異的 HLA-A*11:01 の発現評価方法
Luminex ビーズに固相されたオリゴプローブのうち, 共有 HLA-A*33:03 およびドナー特異的 HLA-A*24:02 とは反応せず, 患者特異的 HLA-A*11:01 とのみ特異的に反応する 8 と 9 のビーズとの反応が陰性的場合は患者特異的 HLA-A*11:01 喪失の可能性あり, 陽性的場合は患者特異的 HLA-A*11:01 喪失の可能性なしと判断した。

ブがコートされた No.8 と No.9 の蛍光ビーズと特異的に反応するため、両方の特異的蛍光ビーズが陽性を呈した場合は“患者特異的 HLA 喪失の可能性なし”と判定し、陰性を呈した場合は“患者特異的 HLA 喪失の可能性あり”と判定した。

結 果

患者特異的 HLA 喪失の推定 (表 3)

Haplo-HSCT 後再発を認めた 6 症例から得られた末梢血または骨髄血由来 DNA による HLA DNA typing を施行し、6 症例中 2 症例 (33.3%) の白血病細胞に患者特異的 HLA が検出できず、不適合 HLA アレルの LOH の可能性が推定された。

症例番号 2

本症例は急性リンパ性白血病であった。患者 HLA は *HLA-A*26:01*, -, *HLA-B*40:02*, *46:01*, *HLA-C*01:02*, *03:04*, *HLA-DRB1*08:03*, *09:01*, ドナー HLA は *HLA-A*24:02*, *26:01*, *HLA-B*40:02*, *52:01*, *HLA-C*03:04*, *12:02*, *HLA-DRB1*09:01*, *15:02* であり、患者特異的 HLA ハプロタイプ は *HLA-A*26:01*, *HLA-B*46:01*, *HLA-C*01:02*, *HLA-*

*DRB1*08:03* であった。移植後 2 年 4 ヶ月に骨髄再発を認め、骨髄血由来 DNA による HLA typing を実施した。その結果、ドナーと共有する HLA 由来の特異的蛍光ビーズはすべて cutoff 値以上の蛍光反応が認められたが (表 3), 患者特異的 HLA 由来の蛍光ビーズの反応はすべて cutoff 値以下であった。(表 3) 骨髄血は 89% が芽球で占められ、再発時の腫瘍細胞はドナーから見て不適合かつ GVL の標的抗原となる患者特異的 HLA 喪失の可能性が示唆された。その後患者と HLA ハプロタイプを 1 組共有し、再発腫瘍細胞に残存している HLA を標的として攻撃し得る新たな血縁ドナー (*HLA-A*02:01*, *26:01*, *HLA-B*46:01*, *51:01*, *HLA-C*01:02*, *14:02*, *HLA-DRB1*08:02*, *08:03*) からの再 Haplo-HSCT を実施し、生着、完全寛解が得られた。移植片対宿主病 (graft versus host disease: GVHD) は認めなかった。

症例番号 5

本症例は急性骨髄性白血病であった。患者 HLA は *HLA-A*02:01*, *02:07*, *HLA-B*40:02*, *46:01*, *HLA-C*01:02*, *03:03*, *HLA-DRB1*08:03*, *15:01*, ドナー HLA は *HLA-A*02:01*, -, *HLA-B*40:02*, *48:01*, *HLA-C*03:03*, *08:03*, *HLA-*

表 3 Haplo-HSCT 後再発白血病症例における患者特異的 HLA 喪失が示唆された症例の HLA 発現 (症例番号 2)

症例番号 2		HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1	
患者 (移植前)	phenotype	A26	—	B61	B46	Cw1	Cw10	DR8	DR9
	genotype	A*26:01	—	B*40:02	B*46:01	C*01:02	C*03:04	DRB1*08:03	DRB1*09:01
ドナー	phenotype	A24	A26	B61	B52	Cw10	Cw12	DR9	DR15
	genotype	A*24:02	A*26:01	B*40:02	B*52:01	C*03:04	C*12:02	DRB1*09:01	DRB1*15:02

再発時の骨髄液 (芽球 : 89%) 由来 DNA による HLA genomic typing 結果

共有 HLA		患者特異的 HLA		ドナー特異的 HLA	
Beads No.	Score/Cutoff	Beads No.	Score/Cutoff	Beads No.	Score/Cutoff
A*26:01*				A*24:02	
A_28	3328/500			A_13	3964/1000
A_37	6790/1000			A_38	3540/1000
B*40:02		B*46:01		B*52:01	
B_06	2936/400	B_38	27/500	B_09	975/500
B_33	4911/500	B_43	22/500	B_28	2018/1000
C*03:04		C*01:02		C*12:02	
C_02	2295/500	C_01	19/1000	C_19	446/500
C_30	3336/500	C_23	59/1000	C_24	266/400
DRB1*09:01		DRB1*08:03		DRB1*15:02	
D_05	1373/500	D_04	148/500	D_23	1168/1000
D_18	2784/500	D_20	153/500	D_34	893/500

*患者の *HLA-A*26:01* がホモ接合体のため評価対象外 (参考値)

表4 Haplo-HSCT 後再発白血病症例における患者特異的 HLA 喪失が示唆された症例の HLA 発現 (症例番号 5)

症例番号 5		HLA-A		HLA-B		HLA-C		HLA-DRB1	
患者 (移植前)	phenotype	<i>A2</i>	<i>A2</i>	<i>B61</i>	<i>B46</i>	<i>Cw1</i>	<i>Cw9</i>	<i>DR8</i>	<i>DR15</i>
	genotype	<i>A*02:01</i>	<i>A*02:07</i>	<i>B40:02</i>	<i>B*46:01</i>	<i>C*01:02</i>	<i>C*03:03</i>	<i>DRB1*08:03</i>	<i>DRB1*15:01</i>
ドナー	phenotype	<i>A2</i>	—	<i>B61</i>	<i>B48</i>	<i>Cw9</i>	<i>Cw8</i>	<i>DR15</i>	—
	genotype	<i>A*02:01</i>	—	<i>B*40:02</i>	<i>B*48:01</i>	<i>C*03:03</i>	<i>C*08:03</i>	<i>DRB1*15:01</i>	—

再発時の骨髄液 (芽球 : 90%) 由来 DNA による HLA genomic typing 結果

共有 HLA		患者特異的 HLA		ドナー特異的 HLA	
Beads No.	Score/Cutoff	Beads No.	Score/Cutoff	Beads No.	Score/Cutoff
<i>A*02:01</i> *		<i>A*02:07</i>			
A_23	1576/600	A_22	12/800		
<i>B*40:02</i>		<i>B*46:01</i>		<i>B*48:01</i>	
B_02	1996/500	B_38	7/500	B_49	1011/500
B_57	2167/500	B_43	30/500	B_54	657/500
<i>C*03:03</i>		<i>C*01:02</i>		<i>C*08:03</i>	
C_13	2859/500	C_01	27/800	C_15	773/500
C_30	3414/500	C_23	86/1000	C_32	974/1000
<i>DRB1*15:01</i> *		<i>DRB1*08:03</i>			
D_08	1557/500	D_04	34/500		
D_14	1447/500	D_20	6/500		

*ドナーの *HLA-A*02:01* と *HLA-DRB1*15:01* がホモ接合体のため評価対象外 (参考値)

*DRB1*15:01*, - であり, 患者特異的 HLA ハプロタイプは *HLA-A*02:07*, *HLA-B*46:01*, *HLA-C*01:02*, *HLA-DRB1*08:03* であった。移植後 2 年 3 ヶ月に骨髄再発を認め, 骨髄血由来 DNA による HLA typing を実施した。その結果, ドナーと共有する HLA は特異的な陽性反応が認められたが (表 4), 患者特異的 HLA との反応はすべて陰性であった (表 4)。骨髄血は 90% が芽球で占められ, 再発時の腫瘍細胞はドナーから見て不適合かつ GVL の標的抗原となる患者特異的 HLA 喪失の可能性が示唆された。その後患者と HLA ハプロタイプを 1 組共有し, 再発腫瘍細胞に残存している HLA を認識して攻撃し得る新たな血縁ドナー (*HLA-A*02:01*, *02:07*, *HLA-B*46:01*, *48:01*, *HLA-C*01:02*, *08:03*, *HLA-DRB1*08:03*, *15:01*) からの二度目の Haplo-HSCT を実施し, 生着, 完全寛解が得られた。GVHD は grade III (皮膚 : 1, 肝 : 1, 消化管 : 3) を認めた。

考 察

Haplo-HSCT は, HLA ハプロタイプのうち 1 つを共有するドナーからの移植である。理論上, 親子では 100%, 同胞では 50% の確率で HLA 半合致となり, ほとんどの

患者にドナー候補者が得られる可能性が高い。そのため, HLA 適合ドナーが得られない症例では, 代替ドナーとして臍帯血移植と共に Haplo-HSCT が選択されている⁸⁾。一方, Haplo-HSCT は難治性の造血器腫瘍患者に対し不適合 HLA ハプロタイプを標的とした強力な GVL 効果を期待し実施する場合もある^{2,3)}。

不均質な癌細胞から成る担癌状態において癌細胞抗原に対する免疫圧力が加わると, 癌細胞は損傷を受ける。しかし, 標的抗原を有さない癌細胞は免疫圧力を逃れ派生し, 結果として生存するのに適した変節癌細胞が増殖することが知られ, 癌細胞の自然淘汰として知られる^{9,10)}。免疫治療を行うと更にそのような派生逃避が増加する。

Vago らは Haplo-HSCT 後に再発した 17 症例中 5 症例 (29%) で患者特異的 HLA の喪失を認めたと報告している⁴⁾。この HLA 喪失は白血病細胞が Haplo-HSCT 後にドナー由来細胞傷害性 T 細胞による免疫攻撃から逃避した 6 番染色体短腕の後天性片親性ダイソミーを有するクローンが増殖したと考えられている⁴⁾。しかし, ナチュラルキラー細胞による HLA 抗原低発現白血病細胞を検出して排除する機序は充分には機能せず, むしろ細胞傷

害性 T 細胞を含む同種反応性 T 細胞からの免疫攻撃から逃れた HLA 喪失細胞クローンが増殖すると考えられている^{4,5)}。一方で、移植前の造血器腫瘍患者においても HLA ハプロタイプ喪失が観察されることがあり、病態が急性期の時期に HLA typing を実施すると、HLA ミスタイプの要因となる恐れもある¹¹⁾。

Crucitti らは HLA 不一致造血細胞移植を行った 233 症例のうち再発造血器腫瘍 84 例中 23 例 (27.4%) で不適合 HLA 喪失を認めたと報告している。この研究では、不適合 HLA 喪失を認めた症例はすべて HLA の不適合の割合が高い血縁ドナーからの移植であり、不適合 HLA 喪失は非寛解での移植患者で有意に多く発生し、高齢患者ほど有意に少ないことが示されている¹²⁾。

本検討に用いた再発時の検査材料（末梢血および骨髄血）における芽球の割合はいずれも 70% 以上であった。そのため、腫瘍細胞を分離することなく、未処理の状態ですべて DNA を抽出し HLA DNA typing を実施した。芽球割合がより少ない時期における評価方法については、同時に移植後キメリズム解析を実施しキメリズム状態を確認するなど総合的に判定することで再発白血病細胞の不適合 HLA アレルの LOH の有無を判定可能か今後検討する必要がある。また、この研究では再発と診断された腫瘍細胞がドナー由来であったことによって、患者のみが保有する HLA が検出できなくなったことは否定できない。だが、検討した 6 症例中 5 例で、腫瘍細胞の増加と並行してドナーキメリズムの低下や初発時の染色体異常、表面マーカーが認められていることから、その可能性は低いと考えられる。

同種造血細胞移植後の再発症例では、再寛解導入療法やドナーリンパ球輸注 (donor lymphocyte infusion: DLI) などの追加治療が実施される。しかし、Haplo-HSCT 後における患者特異的 HLA 喪失を伴う再発症例では、DLI による治療を選択した場合、白血病細胞は患者特異的 HLA を喪失しているため、ドナー免疫細胞は白血病細胞を標的として攻撃することができない。また、DLI による GVL 効果を認めないのみならず、GVHD による重篤な障害を引き起こす可能性もあるため、Haplo-HSCT 後の再発症例では、以後の治療方針の決定のため患者特異的 HLA 喪失の可能性を正確に評価する必要がある。DLI は腫瘍細胞が少ないほど有効であるため、より芽球が少ない状態で不適合 HLA アレルの LOH の有

無を判断できる方法の開発が必要である。

引用文献

- 1) Luznik L, O'Donnell PV, Symons HJ, *et al.*: HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 641–650, 2008.
- 2) Kobayashi S, Ito M, Sano H, *et al.*: T-cell-replete Haploidentical stem cell transplantation is highly efficacious for relapsed and refractory childhood acute leukaemia. *Transfus Med* 24(5): 305–310, 2014.
- 3) Sano H, Mochizuki K, Akaiata M, *et al.*: T-cell-rich HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation for relapsed/refractory pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia without posttransplant tyrosine kinase inhibitor therapy. *Pediatr Blood Cancer* 64(3): DOI: 10.1002/pbc.26242, 2017.
- 4) Vago L, Perma SK, Zanussi M, *et al.*: Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 361(5): 478–488, 2009.
- 5) Kato T, Terakura S, Murata M, *et al.*: Escape of leukemia blasts from HLA-specific CTL pressure in a recipient of HLA one locus-mismatched bone marrow transplantation. *Cellular Immunology* 27: 75–82, 2012.
- 6) Villabobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, *et al.*: Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115(15): 3158–3161, 2010.
- 7) 菊地正美, 小野 智, 菅原亜紀子 他: 二方法 (PCR-Luminex 法と PCR-SBT 法) 間でのタイピング結果の不一致を契機に発見された HLA-B ローカスの新アレル. *日本輸血細胞治療学会誌* 56(1): 43–47, 2010.
- 8) 杉田純一: HLA 半合致移植の現状と課題. *日本造血細胞移植学会誌* 5(3): 64–73, 2016.
- 9) Khong HT, Restifo NP: Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 3(11): 999–1005, 2002.
- 10) Kmiecik M, Payne KK, Idowu MO, *et al.*: Tumor escape and progression of HER-2/neu negative breast cancer under immune pressure. *J Transl Med* 9: 35, 2011.
- 11) Dubois V, Sloan-Béna F, Cesbron A, *et al.*: Pretransplant HLA mistyping in diagnostic samples of acute myeloid leukemia patients due to acquired uniparental disomy. *Leukemia* 26(9): 2079–2085, 2012.
- 12) Crucitti L, Crotolo R, Toffalori C, *et al.*: Incidence, risk factors and clinical outcome of leukemia relapses with loss of the mismatched HLA after partially incompatible hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 29(5): 1143–1152, 2015.

Loss of Mismatched HLA in Acute Leukemia Pediatric Patients after a Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Satoshi Ono¹⁾, Keiji Minakawa¹⁾, Kinuyo Kawabata¹⁾, Hiroyasu Yasuda¹⁾, Kazuhiko Ikeda¹⁾, Nobuhisa Takahashi²⁾, Yoshihiro Ohara²⁾, Shogo Kobayashi²⁾, Kazuhiro Mochizuki²⁾, Masaki Ito²⁾, Hideki Sano²⁾, Atsushi Kikuta²⁾, Hitoshi Ohto¹⁾

¹⁾Department of Blood Transfusion and Transplantation Immunology, Fukushima Medical University Hospital

²⁾Department of Pediatric Oncology, Fukushima Medical University Hospital

Recently, haploidentical hematopoietic stem cell transplantation (Haplo-HSCT) is expected to provide a graft-versus-leukemia (GVL) effect that targets a mismatched HLA haplotype of hematological malignancies with relapse or poor prognosis. It is reported some leukemia patients who relapsed after Haplo-HSCT, lost a mismatched HLA haplotype of leukemic cells. We evaluated a loss of mismatched HLA haplotype by HLA DNA typing using blood samples obtained during relapse for 6 patients who relapsed after Haplo-HSCT. Two of 6 patients showed a loss of mismatched HLA haplotype. It is important to estimate whether the mismatched HLA haplotype derived from leukemic cells exist or not for the decision of therapeutic strategy in recurrent cases after Haplo-HSCT.

Key Words: haploidentical hematopoietic stem cell transplantation, loss of HLA, graft versus leukemia effect, acute leukemia, relapse

がん免疫療法におけるがん抗原ワクチン療法の現状と将来展望

鶴田 未季^{1),2)}, 西村 泰治^{1),3)}

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 大学院医学教育部 歯科口腔外科学分野

³⁾ 熊本大学 生命資源研究・支援センター 西村プロジェクト研究室

がん抗原ワクチン療法は、腫瘍関連抗原 (TAA) 由来のペプチド、蛋白質、DNA/RNA などの種々の形状の TAA をがん患者に投与して、がん細胞に特異的な細胞傷害性 T 細胞やヘルパー T 細胞などの免疫細胞の誘導と活性化を促し、腫瘍縮小効果や延命効果を期待する治療法である。現在、様々な悪性腫瘍に対して TAA ワクチン療法の臨床試験が進行中である。最近、がん細胞に生じた遺伝子変異に由来するネオ抗原を標的とするワクチン療法や、免疫チェックポイント阻害療法との併用などのより個別化され、かつ複合的ながん抗原ワクチン療法に注目が集まっている。

キーワード：腫瘍関連抗原，がん抗原ワクチン，がん抗原ペプチド，ネオ抗原，腫瘍免疫

略語：CTL; cytotoxic T lymphocyte, CTLA-4; cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, DC; dendritic cell, LP; long peptide, PD-1; programmed cell death-1, PD-L1; programmed death-ligand 1, SP; short peptide, TCR; T cell receptor, Th; helper T, Th1; T-helper type 1, TAA; tumor-associated antigen

はじめに

近年がん免疫療法が目覚ましい発展を遂げており、2013 年にはがん免疫療法が Science 誌の “Breakthrough of the Year” に選ばれた¹⁾。がん免疫療法は、当初はサイトカイン療法など非特異的に免疫系を活性化することにより抗腫瘍効果を期待するものが主流であったが、近年は基礎腫瘍免疫学の発展により、腫瘍に対する特異的な免疫応答をいかに誘導し増強するのが焦点となっている。その中でも、がんワクチン療法は、がん細胞においてのみ高頻度に高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 (tumor associated antigen; TAA) 由来のペプチドや蛋白質、あるいは TAA 由来の mRNA や遺伝子を直接がん患者に接種する方法や、これらを負荷あるいは導入した樹状細胞 (dendritic cell; DC) を接種する方法などにより、内在性の腫瘍特異的 T 細胞の

誘導や活性化を促し、がん細胞特異的な抗腫瘍効果の発揮を期待する治療法である。本稿では、TAA ペプチド/RNA や DC を用いたがんワクチン療法の現状と、最近のトピックスであるがん細胞の体細胞突然変異により発生するネオ抗原を標的とするがん免疫療法、さらに併用免疫療法などの今後の展望について概説する。

1. T 細胞による抗腫瘍免疫応答の概要

腫瘍特異的ながん免疫応答をがん免疫療法に応用するにあたっては、まず標的となる TAA を同定することが重要である。現在まで、がん組織と正常組織の網羅的な cDNA マイクロアレイ解析などにより、がん精巣抗原やがん胎児性抗原などの様々な TAA が同定され、がん免疫療法に応用されてきた²⁾。

これらの TAA は、がん細胞の一部がアポトーシスなどで死ぬと組織液中に放出され、DC のエンドソームに

受付日：2017 年 12 月 27 日，受理日：2018 年 2 月 22 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 E-mail: mxnshim@gpo.kumamoto-u.ac.jp

取り込まれて分解されて出来た 10 数個～ 20 数個のアミノ酸よりなる長鎖ペプチド (long peptide; LP) は、HLA クラス II 分子 (HLA-II) に結合して細胞表面に発現し、これを CD4⁺ ヘルパー T (helper T; Th) 細胞の T 細胞レセプター (T cell receptor; TCR) が認識して Th 細胞は活性化される。DC は同時に TAA を細胞質に輸送してプロテアソームにより分解されて出来た、9 ～ 11 個のアミノ酸よりなる短鎖ペプチド (short peptide; SP) を HLA クラス I 分子 (HLA-I) に結合して細胞表面に発現し、これを CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) の TCR が認識して (クロスプレゼンテーション経路)、CTL は活性化される。

DC は副刺激分子である CD80/86 を発現し、これがナイーブ T 細胞の CD28 と結合することにより、T 細胞は強く活性化されエフェクター T 細胞へと分化する。エフェクター T 細胞は、副刺激分子を必要とせず、がん細胞表面に発現する HLA-TAA ペプチド複合体を認識して、がん細胞に対して免疫応答を示す。CD4⁺ 1 型ヘルパー T (T-helper type 1; Th1) 細胞は Th1 サイトカインを産生し、これが CTL の誘導と活性化を促進する (図 1)。

このような TAA に対する T 細胞免疫応答を誘導する目的で、外部から TAA をがん患者に能動免疫して、抗腫瘍免疫を誘導・増強する治療法が、がん抗原ワクチン療法である。

2. TAA 由来の短鎖ペプチド (SP) ワクチン療法

CTL はがん細胞を殺す非常に重要なエフェクター細胞である。TAA 由来の SP をがん患者に投与すると、DC 上の HLA-I に結合して細胞表面に提示され、ペプチド特異的 CTL が誘導・活性化され、この CTL が認識したものと同一 TAA-SP を発現するがん細胞を攻撃することにより、がん特異的な抗腫瘍効果の発現が期待される。新規 TAA を同定する方法としては、Serex 法や cDNA マイクロアレイ解析などが用いられ、さらに同定した新規 TAA のアミノ酸配列から、アルゴリズム解析や HLA を発現するトランスジェニックマウスなどを用いて、HLA-I 拘束性 CTL を誘導する SP が数多く同定され、実際にはがんワクチン療法に 응용されてきた (図 2)³⁾。

さらに、質量分析法などのプロテオーム解析技術を用いて、がん細胞表面や抗原提示細胞表面の HLA 分子に

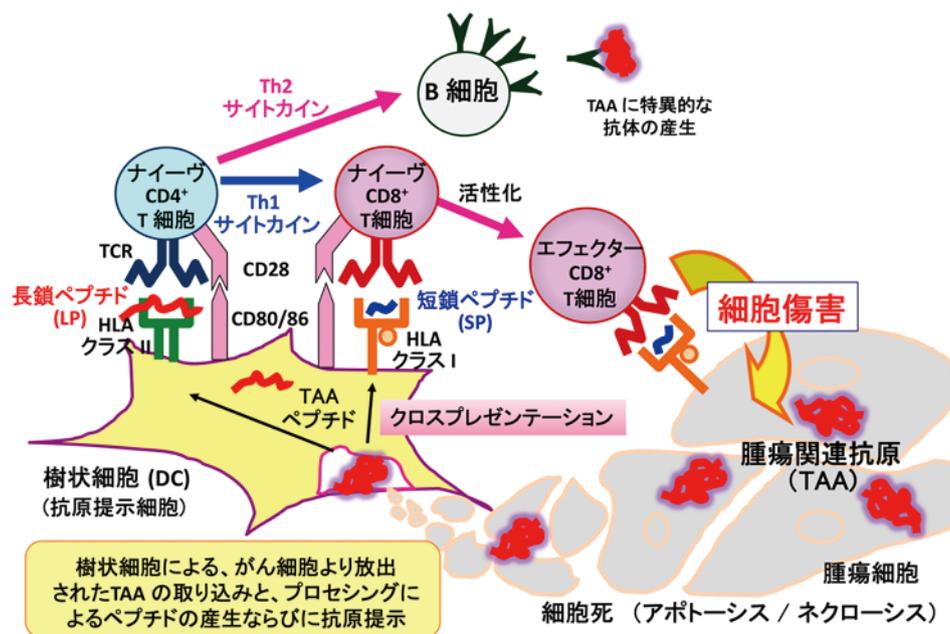


図 1 TAA に対する T 細胞免疫応答

樹状細胞 (DC) は腫瘍関連抗原 (TAA) を取り込み分解してできた抗原ペプチドを、HLA-I 分子ならびに HLA-II 分子に結合して細胞表面に提示する。これを、それぞれナイーブ CD8⁺T 細胞および CD4⁺T 細胞の T 細胞レセプター (TCR) が認識すると共に、T 細胞表面の CD28 が DC 表面の CD80/86 に結合して副刺激が提供されると、ナイーブ T 細胞は細胞傷害性 T 細胞 (CTL) およびヘルパー T (Th) 細胞に分化してエフェクター T 細胞になる。エフェクター T 細胞は副刺激を必要とすることなく、腫瘍細胞表面の HLA-TAA ペプチド複合体を認識して抗腫瘍免疫応答を示す。

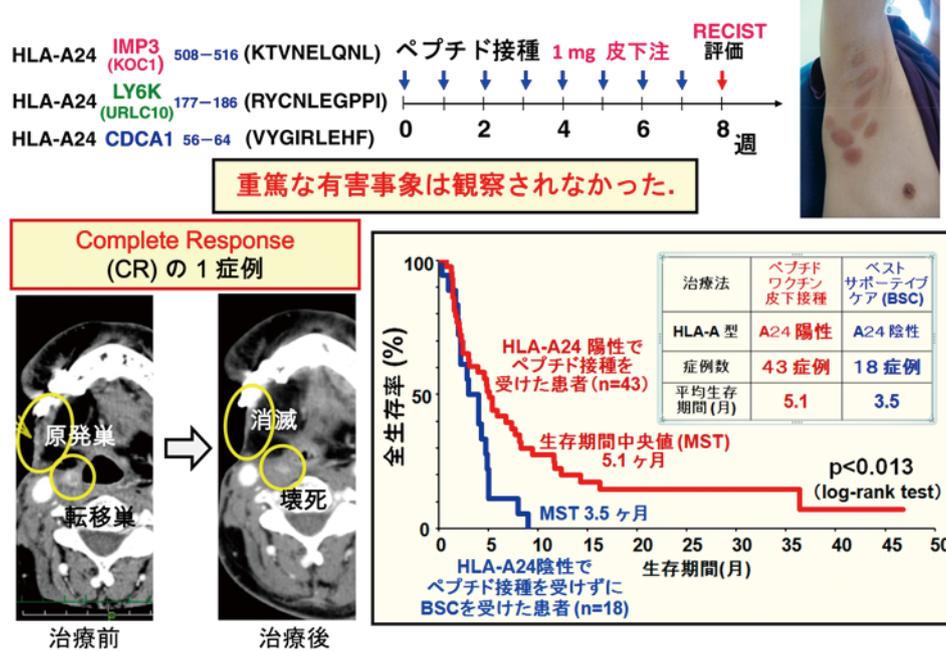


図 2 3 種類の TAA-SP 混合ワクチンを接種した進行性口腔扁平上皮癌患者における全生存率 (OS) の延長

公開されているアルゴリズムを用いて、多くの日本人が保有する HLA-A2 または A24 分子に結合親和性が高いと推定される TAA 由来の 9 個～10 個のアミノ酸により構成される SP を数十種類合成し、HLA-A2 または A24 Tgm に免疫して、ペプチド特異的のマウス CTL を誘導できるものをスクリーニングした。Tgm において CTL を誘導することができたペプチドについて健康人あるいはがん患者の末梢血単核細胞 (PBMC) を用いて免疫学的解析を行い、TAA 由来のヒト CTL エピトープを同定した。このようなヒト CTL エピトープをペプチドワクチンとして、がん患者に不完全フロイントアジュバント (IFA; モンタナイド) 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 が誘導された。誘導された CTL は、がん細胞表面の HLA-I 分子に提示された腫瘍抗原ペプチドを認識し、腫瘍細胞のみを特異的に傷害すると考えられる。

実際に頭頸部癌患者では臨床効果が観察された。HLA-A24 を保有する、他の治療法の適応がない進行性口腔扁平上皮癌患者に、3 種類の TAA に由来する SP 混合ワクチンを IFA と共に接種したところ、HLA-A24 陰性のワクチン非接種患者群と比較して、全生存率 (OS) の有意な延長が観察され、さらに 1 症例では腫瘍が完全に消滅する Complete response (CR) が観察された⁷⁾。

結合したペプチドのアミノ酸配列を決定して、TAA および TAA 由来の T 細胞エピトープを同定する試みが以前よりなされてきた⁴⁾。このようなプロテオーム解析技術を用いた TAA および T 細胞エピトープの同定法の利点は、直接がん細胞やがん組織の表面に発現する HLA により提示される TAA ペプチドを同定できる点にある。近年、Walter らは、質量分析などのプロテオーム解析や遺伝子解析などの手法を用いて、腎細胞がんが発現する HLA-I に結合した TAA-SP を複数同定し、がんペプチドワクチン療法に応用して奏功を報告している⁵⁾。SP を用いた TAA ペプチドワクチン療法の臨床研究は食道癌、頭頸部癌、肺癌、膀胱癌などの多様ながん腫を対象に実施されており、いずれにおいても重篤な有害事象は観察されず、一部の進行がん患者では腫瘍縮小効果や延命効果が認められている⁶⁻⁸⁾。

著者らはゲノムワイド cDNA マイクロアレイ法により同定された、食道癌、口腔癌および肺癌に高頻度に高

発現する、新規のがん精巢抗原である LY6K、CDCA1 および IMP3 について、HLA-A24 拘束性 CTL が認識する SP を 3 種類同定し、これらを混合して、他の治療法の適応がない進行性口腔扁平上皮がん患者に、がん抗原ワクチンとして投与する医師主導臨床研究を実施した⁷⁾。その結果、図 2 に示すように HLA-A24 陰性で免疫療法の適応外となった患者群と比較して、ワクチン投与群では全生存率が有意に延長し、1 症例で腫瘍の消滅 (Complete response) が観察された。さらにワクチン接種患者では、CTL が反応を示したがん抗原ペプチドの数に正比例して、全生存期間の延長が観察された。しかし、進行がん患者に対するがん抗原 SP ペプチドワクチンの単独療法では、奏功率は多くは 5% 未満と低く満足の行く有効性は、まだ示されていない。

3. TAA 由来の長鎖ペプチドワクチン療法

より強力な抗腫瘍免疫応答を誘導するためには、CTL

だけでなく TAA 特異的な Th1 細胞の存在が重要であることが知られている。さらに、上述した TAA-SP は、CD80/86 などの共刺激分子が発現していない、抗原提示細胞以外の体細胞の HLA-I に結合することにより、CTL に不応答性を誘導することが報告されている⁹⁾。また TAA-SP と不完全フロイントアジュバント (IFA) の免疫では、免疫局所に CTL が長期間集結し、腫瘍局所には移動しないとの指摘がなされている¹⁰⁾。一方、LP は HLA-I に直接結合することができず、抗原提示細胞に一度取り込まれて細胞内でプロセッシングされた後に、HLA-II により提示されて Th 細胞を誘導するのみならず、クロスプレゼンテーション経路を介して SP が産生され、これが HLA-I により提示されて TAA 特異的な CTL を誘導できる (図 3)。したがって LP は、より強力な抗腫瘍効果を誘導するのみならず、上記の不応答性の誘導を防ぐという点でも有用であると考えられる。LP を用いた臨床試験は現在も多様ながん腫を対象に行われており、一部では延命効果も報告されている^{9,11)}。

著者らは、単一の 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と考えられる LP を多数同定した¹²⁻¹⁵⁾ (図 3, 4)。さら

にがん患者の末梢血中に、同定した LP に特異的な Th 細胞が実際に存在することを確認した。また、膀胱がんを高頻度/high 発現しているがん抗原である、DEPDC1 と MPHOSPH1 において、LP に特異的な Th 細胞クローンが発現する TCR 遺伝子の cDNA を解析したところ、LP により誘導したバルク Th 細胞株およびクローンともに、単一の TCR α , β 鎖遺伝子を発現しており、この特定の TCR α , β 鎖のペアが、がん抗原特異性と HLA 拘束性を担っていることを証明した¹⁵⁾。このような LP をワクチンとしてがん患者に投与することにより、より抗腫瘍効果の強力な TAA ペプチドワクチン療法が開発されることが期待される。さらに上記の同定された TCR 遺伝子は、LP ワクチン療法により誘導された Th 細胞のモニタリングや、当該 TCR 遺伝子を強制発現させた末梢血 T 細胞を用いた、がんの養子免疫療法に活用できる可能性がある。

このような、ペプチドワクチン療法を臨床に応用するにあたり、LP が内包する SP を提示する HLA-I については、考慮すべき注意点がある。それは、腫瘍細胞における、HLA-I 遺伝子の欠損 (loss of heterozygosity; LOH) である。ペプチドワクチンの投与により誘導された

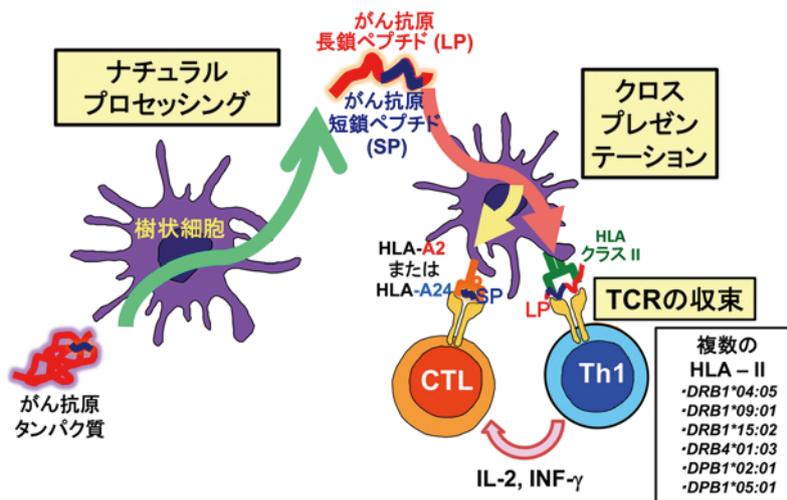


図 3 CTL エピトープを自然配列として内包する Th 細胞エピトープを用いた、TAA 由来長鎖ペプチド (TAA-LP) ワクチン療法の開発
最近著者らは、膀胱がんを高頻度/high 発現している TAA である、DEPDC1 と MPHOSPH1 由来のヘルパー T (Th) 細胞エピトープと、細胞傷害性 T 細胞 (CTL; cytotoxic T lymphocyte) エピトープを自然配列として含み、Th 細胞と CTL の誘導活性を併せ持つがん抗原長鎖ペプチド (LP) を同定した¹⁵⁾。

これらの LP は、樹状細胞 (DC) によりがん抗原蛋白質の Natural Processing によって産生され、Th1 細胞を誘導することを確認した。誘導した Th 細胞は、非常に限定された TCR- α 鎖と β 鎖を発現していた。また、CTL エピトープを内包した LP については、HLA-A2 トランスジェニックマウス (Tgm) および HLA-A24 Tgm の *in vivo* 免疫によりクロスプレゼンテーションが誘導され、内包された CTL エピトープに特異的な CTL が誘導されることを確認した。LP に特異的な Th 細胞が発現する TCR 遺伝子の cDNA を解析したところ、LP により誘導したバルク Th 細胞株およびクローンともに、単一の TCR α , β 鎖遺伝子を発現しており、この特定の TCR α , β 鎖のペアが、がん抗原特異性と HLA 拘束性を担っていることを証明した¹⁵⁾。

TAA中の Th 細胞 エピトープ	アミノ酸 の数	内包するSPを 認識するCTLの HLAクラスI 拘束性	LPを認識する Th細胞の HLAクラスII 拘束性	サイトカイン 産生パターン	CTLへの クロスプレゼン テーション	がん患者で のペプチド 特異的な Th細胞検出
KIF20A (60-84) LP	25	A24	DRB1*15:02, DPB1*02:01	Th1 型	あり	あり
KIF20A (809-833) LP	25	A2	DRB1*15:02, DRB4*01:03 (DR53)	Th1 型	あり	あり
DEPDC1 (292-313) LP	22	A2 / A24	DRB1*04:05	Th1 型	あり	なし
DEPDC1 (613-634) LP	22	なし	DRB1* 15:02, DPB1* 05:01	Th1 型	-	あり
MPHOSPH1 (272-298) LP	27	A2 / A24	DRB1* 04:05 / 09:01, DPB1*05:01	Th1 型	あり	あり
MPHOSPH1 (326-351) LP	26	なし	DRB1* 04:05, DPB1* 02:01	Th1 型	-	あり

図4 我々の研究室で同定したがん精巣抗原由来の Th 細胞エピトープペプチドのリスト

著者らはこれまでのがん精巣抗原やがん胎児性抗原に由来する、CTL エピトープを含む HLA-II 拘束性 Th1 細胞エピトープを多数同定した¹²⁻¹⁵⁾。これらのペプチドの一部について、その特徴を表に示す。TAA-LP を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 が共に活性化され、より強力な抗腫瘍効果が誘導されると期待される。

CTL により HLA-I と TAA を発現する腫瘍細胞は排除されるが、LOH を来した腫瘍細胞は CTL による攻撃を免れて増殖・転移することが良く知られている¹⁶⁾。この現象を回避するために、たとえば次のような方法が考えられる。まず NK 細胞の抑制性受容体である KIR のリガンドである¹⁷⁾、Bw4 を有する HLA-A24 などの HLA に拘束性を示す CTL を誘導できる SP を内包する LP を選ぶことである。こうすれば LOH により HLA-A24 が欠失しても、NK 細胞により腫瘍細胞は排除される。また、このような機序により腫瘍細胞における、HLA-A24 の LOH は発生しにくいと推測される。同様の考え方により、HLA-A24 ホモ接合体またはその対立ハプロタイプが Bw4 陰性、あるいは HLA-A2 ホモ接合体の患者さんを対象とし、B*40:02 をもつ患者さんは対象外とすることなども考えられる。さらに、LOH による腫瘍の CTL からの逃避を防止するために、複数の HLA 拘束性 CTL エピトープ SP を内包する LP を活用することも考えられる。

4. DC を用いたがん抗原ワクチン療法

DC ワクチン療法は、DC の強力な抗原提示能を利用した治療法である。TAA ペプチドやがん細胞の融解物を DC に負荷する方法や、TAA をコードする mRNA や

DNA を DC に導入して用いる方法などがあり、これらの DC をワクチンとしてがん患者に接種することにより、がん細胞特異的な T 細胞が誘導ならびに活性化される。DC は末梢血より採取した単球を、GM-CSF および IL-4 存在下で培養して未熟 DC を誘導し、この未熟 DC に TAA 由来ペプチドの負荷や TAA をコードする mRNA や DNA を導入して、さらに刺激を加えて成熟活性化させ強力な抗原提示能を有する DC を誘導して、ワクチンとして用いるのが一般的な方法である。

現在まで種々のがん腫に対して数多くの臨床試験が行われている。その代表例としては去勢ホルモン療法抵抗性の転移性前立腺がんに対する DC ワクチン療法（シプロイセル T）が挙げられる。この臨床試験ではその安全性と有効性が示され¹⁸⁾、2010 年 4 月より FDA により認可されたが、残念ながらその臨床効果は再現できなかった。我々はヒト iPS 細胞より DC を分化・誘導して、免疫療法に応用するための前臨床研究を完了している。iPS 細胞を用いることにより、機能的な DC の量産が可能となり、さらに治療費の負担を軽減できる可能性があり、実用化へ向けた研究を継続している¹⁹⁾。

5. ネオ抗原を利用したがん抗原ワクチン療法

がんは多段階な遺伝子変異の蓄積により発生するた

め、非常に多数の体細胞突然変異を有している。その結果として、アミノ酸変異を含むペプチドが HLA-I により提示されると、「非自己抗原」として認識されると予想される。がん細胞に生じた体細胞ミスセンス突然変異遺伝子がコードする抗原（ネオ抗原）に由来する、変異ペプチドを用いたがん抗原ワクチン療法が近年注目を集めている。ネオ抗原をがんワクチン療法に応用する利点としては、TAA に高親和性を示す T 細胞の一部は胸腺での負の選択により体内から排除されている可能性があるが、ネオ抗原特異的な T 細胞は胸腺での選択を経ないため免疫寛容を受けにくく、特異的 T 細胞が効率よく誘導されやすい可能性がある点である²⁰⁾。悪性黒色腫を中心としたがん細胞の網羅的な遺伝子解析により、がん細胞の遺伝子に生じた体細胞突然変異に起因する変異ペプチドが、腫瘍内の CTL や Th1 細胞に免疫応答を惹起し、その免疫応答が抗腫瘍免疫に重要な役割を果たすことが示唆されている (図 5)^{21,22)}。

ネオ抗原を生み出す変異は、ドライバー変異とパッセンジャー変異に区別される。ドライバー変異は、悪性腫瘍細胞の形質転換を促す遺伝子変異であり、パッセンジャー変異は、がん化には直接関与しない行きずりの変異である。ネオ抗原を供給する遺伝子変異の大多数は、ドライバー変異ではなくパッセンジャー変異に由来する

ことが明らかにされている²³⁾。また、ドライバー変異により発生するネオ抗原は腫瘍発生の初期より発現し、T 細胞は長期間のネオ抗原への暴露によりエピジェネティックな変化を起こして、不応答性になっている可能性が推測されている^{24,25)}。パッセンジャー変異は、たとえ同じ臓器から発生した腫瘍でも個々の患者で異なり、数も多く免疫原性が高いため、ネオ抗原ペプチドを用いたがんワクチン療法の標的とするに相応しいと考えられている。

ドライバー変異を標的とするがん治療としては、分子標的療法が最適と考えられ、実際に奏功が認められている。さらに最近の研究により、HLA 多型とネオ抗原との関係について重要な発見がなされている。McGranahan らは比較的早期の肺癌組織の網羅的なエクソームならびに RNA の塩基配列解析により、ネオ抗原ペプチドが多い患者では LOH が頻繁に検出され、免疫逃避が発生しやすいことを報告している¹⁶⁾。また、Marty らは、がん患者の HLA-I 対立遺伝子が、がん細胞の発生や進展において直接的に重要な役割を担っている、ドライバー遺伝子の変異の種類を制約することを観察している²⁶⁾。このような解析結果より、これらのドライバー変異により発生するネオ抗原ペプチドが、特定の HLA 対立遺伝子を有する患者では、当該 HLA により T 細胞に

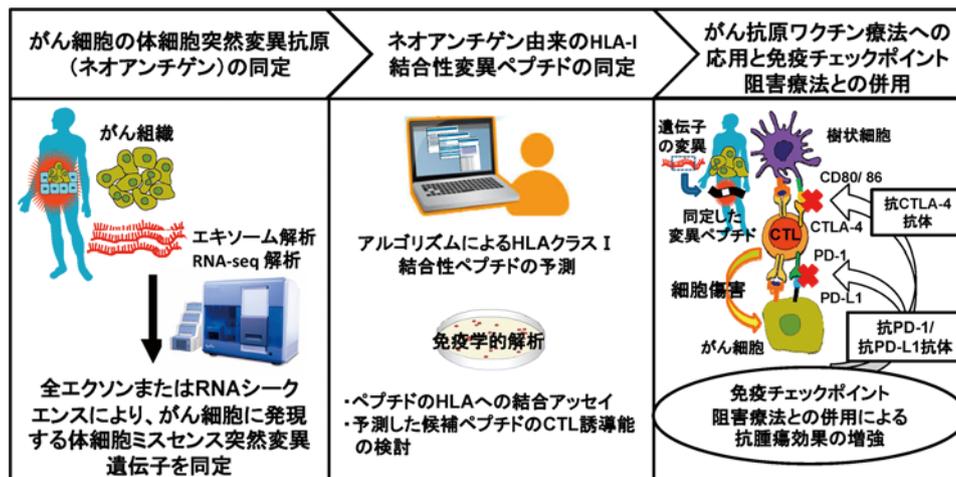


図 5 がん細胞の体細胞ミスセンス突然変異遺伝子によりコードされる、ネオ抗原・ペプチドの同定とがん免疫療法への応用

次世代シーケンサーを用いて、がん細胞の遺伝子に生じた体細胞ミスセンス突然変異を含む抗原（ネオ抗原）を、エクソームおよび RNA シークエンシングにより同定し、アルゴリズムを用いてネオ抗原由来のアミノ酸変異を伴い、患者の HLA-I 結合性ペプチドを予測する。さらに *in vitro* 実験により、その HLA-I/II 結合能や抗原性を確認し、CTL や Th 細胞を誘導できるネオ抗原由来の変異ペプチドを同定する。同定した多数の変異ペプチドをがん抗原ワクチン療法に応用することにより、個々のがん患者に応じた個別化がん免疫療法が可能となる。さらに、抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1/PD-L1 抗体などの、免疫チェックポイント阻害療法と併用することにより、強力な抗腫瘍効果が得られると期待される。

表1 海外（主に米国）で最近開始された、ネオ抗原を用いたがんワクチン療法の臨床試験

臨床試験番号	フェーズ	ワクチンの形状	悪性腫瘍	併用療法	開始日	被験者募集状況
NCT03 300843	II	ペプチド* 負荷樹状細胞療法	悪性黒色腫 胃・大腸がん 乳がん 卵巣がん 膵臓がん		2017年 11月	患者エントリー準備中
NCT03 205930	II	ペプチド* 負荷樹状細胞療法	非小細胞肺癌		2017年 8月	患者エントリー準備中
NCT01 970358	I	ペプチド* ワクチン + Poly-ICLC	悪性黒色腫		2014年 1月	募集中
NCT02 950766	I	ペプチド* ワクチン + Poly-ICLC	腎臓がん	免疫チェックポイント阻害剤 (イピリムマブ)	2016年 11月	患者エントリー準備中
NCT03 068832	I	LP ワクチン + Poly-ICLC	小児脳腫瘍		2017年 12月	患者エントリー準備中
NCT03 122106	I	DNA ワクチン	膵臓がん		2017年 12月	患者エントリー準備中
NCT03 166254	I	LP ワクチン + Poly-ICLC	非小細胞肺癌	免疫チェックポイント阻害剤 (ペンプロリズマブ)	2017年 11月	患者エントリー準備中
NCT03 199040	I	DNA ワクチン	乳がん	免疫チェックポイント阻害剤 (デュルバルマブ)	2017年 12月	患者エントリー準備中
NCT03 219450	I	ペプチド* ワクチン + Poly-ICLC	慢性リンパ性白血病	化学療法 (シクロホスファミド)	2017年 9月	患者エントリー準備中
NCT03 359239	I	LP ワクチン + Poly-ICLC	尿路上皮がん	免疫チェックポイント阻害剤 (アテゾリズマブ)	2017年 12月	患者エントリー準備中
NCT03 361852	I	ペプチド* ワクチン + Poly-ICLC	濾胞性リンパ腫	化学療法 (リツキシマブ)	2017年 12月	患者エントリー準備中

LP; long peptide, 長鎖ペプチド. * これらのペプチドについては, SP あるいは LP の区別は公開されていない。(source: <https://clinicaltrials.gov/>)

提示され腫瘍免疫を誘導することにより, 腫瘍細胞が排除されている可能性が示された。

現在, 様々ながん腫を対象に, ネオ抗原由来の変異ペプチドを利用したがんワクチン療法の臨床試験が進行中である(表1)。Carrenoらは, 悪性黒色腫患者を対象として, 変異ペプチドを負荷したDCワクチン療法の第1相臨床試験の中間結果を報告しており, その安全性と忍容性, およびペプチド特異的なCTLの免疫応答の誘導と増強を報告している²⁷⁾。Sahinらは, 5名の悪性黒色腫患者を対象に, 総計150種類のネオ抗原長鎖ペプチドをコードするRNAワクチン療法の第I相臨床試験の結果を報告しており, その安全性と忍容性が確認され, 2名の患者で臨床効果が観察されたことを報告している²⁸⁾。さらに, Ottらは, 6名の悪性黒色腫患者を対象に, 20種類のネオ抗原長鎖ペプチドを使用した, ワクチン療法の第I相臨床試験の結果を報告し, 4名の患者で

25ヶ月の無再発が観察され2名は再発を認めるも, 抗PD-1抗体との併用により完全奏功が認められたことを報告した²⁹⁾。

6. がん抗原ワクチン療法と免疫チェックポイント阻害療法の併用

近年, 抗CTLA-4 (CTL antigen 4) 抗体や抗PD-1 (programmed cell death-1) /PD-L1 (programmed death-ligand 1) 抗体などの免疫チェックポイント分子を阻害して, がん患者に特有のT細胞の免疫抑制状態を解除する抗体療法が目覚ましい効果をあげている。Gubinらは, 治療前の腫瘍組織内にネオ抗原特異的なT細胞が既に存在しており, これらのT細胞が抗CTLA-4抗体療法や抗PD-1抗体療法によって再活性化され, 抗腫瘍効果に重要な役割を担っていることを明らかにした³⁰⁾。また免疫チェックポイント阻害療法に対して良好な治療反応を示

す患者群では、アミノ酸置換を伴う非同義置換突然変異遺伝子がより多く観察されることや²³⁾、ネオ抗原特異的なT細胞が治療前の腫瘍組織内に検出されることが報告されている³¹⁾。これらの結果より、ネオ抗原に対する免疫応答の増強が、免疫チェックポイント阻害療法が有効性を発揮する機序である可能性が示唆され、ネオ抗原を含むがん抗原ワクチンと免疫チェックポイント阻害療法の併用により、強力な抗腫瘍効果が得られることが期待されている³²⁾。

さらに最近、Chowellら³³⁾は、抗PD-1抗体または抗CTLA-4抗体で治療を受けた1,535症例の進行性がん患者の解析により、HLA-B44スーパータイプ*³⁴⁾陽性患者およびHLAヘテロ接合患者は奏功と、HLA-B62スーパータイプ陽性患者、HLAホモ接合患者ならびにHLAのLOH患者は低応答を示すことを報告している。このように免疫チェックポイント阻害剤療法の効果と、HLA対立遺伝子の種類と数との間に相関関係があることが明らかになった。この現象もHLAにより提示されたネオ抗原ペプチドを認識するT細胞が、腫瘍細胞を破壊する免疫応答を担っていることに起因する可能性がある。また免疫チェックポイント阻害療法は依然として高価なため、事前に患者のHLAとKIRのタイピングや、HLAのLOHなどを解析して、本治療法の適応を検討することも重要な課題である。

* スーパータイプ；HLAのペプチド収容溝のポケットの属性の共通性から、結合ペプチドのアミノ酸配列のモチーフに共通性があるHLA抗原（対立遺伝子産物）のグループのこと

おわりに

がん抗原ワクチン療法は、臨床試験が進むにつれて、従来のがん治療法と比較して副作用が少なく、患者のQOLを維持しつつ延命効果があることが明らかになってきている。しかし、がん抗原ワクチン療法単独での進行がんへの臨床効果は依然として弱いが、多数のネオ抗原を標的とするワクチン療法には大きな期待が寄せられている。さらに、より強力ながん抗原ワクチン療法の開発には、免疫チェックポイント阻害剤のように、腫瘍微小環境中の免疫抑制メカニズムを制御する治療法を併用した、より複合的ながん免疫療法を積極的に開発してい

く必要がある。また遺伝子解析技術の進歩に伴い、がん患者個々のがんおよび免疫状態を、バイオマーカーなどで評価することが可能になってきている。これらの情報に基づいた個別化がん免疫療法の開発にも、今後力を注ぐ必要がある。

参考文献

- 1) Couzin-Frankel J: Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science* 342: 1432–1433, 2013.
- 2) Melief CJ, Van Hall T, Arens R, *et al.*: Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* 125: 3401–3412, 2015.
- 3) Pol J, Bloy N, Buqué A, *et al.*: Trial Watch: Peptide-based anti-cancer vaccines. *Oncology* 4: e974411, 2015.
- 4) Rohn TA, Reitz A, Paschen A, *et al.*: A novel strategy for the discovery of MHC class II-restricted tumor antigens: identification of a melanotransferrin helper T-cell epitope. *Cancer Res* 65: 10068–10078, 2005.
- 5) 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. *Nat Med* 18: 1254–1261, 2012.
- 6) Kono K, Linuma 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. *J Transl Med* 10: 141, 2012.
- 7) 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.
- 8) Obara W, Eto M, Mimata H, *et al.*: A phase I/II study of cancer peptide vaccine S-288310 in patients with advanced urothelial carcinoma of the bladder. *Ann Oncol* 28: 798–803, 2017.
- 9) Melief CJ, van der Burg SH: Immunotherapy of established (pre) malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8: 351–360, 2008.
- 10) Hailemichael Y, Dai Z, Jaffarzar N, *et al.*: Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺ T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat Med* 19: 465–472, 2013.
- 11) van Poelgeest MI, Welters MJ, van Esch EM, *et al.*: HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *J Transl Med* 11: 88, 2013.
- 12) Tomita Y, Yuno A, Tsukamoto H, *et al.*: Identification of promiscuous KIF20A long peptides bearing both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell epitopes: KIF20A-specific CD4⁺ T-cell immunity in patients with malignant tumor. *Clin Cancer Res* 19: 4508–4520, 2013.
- 13) Sayem MA, Tomita Y, Yuno A, *et al.*: Identification of glypican-3-derived long peptides activating both CD8⁺ and CD4⁺ T cells;

- prolonged overall survival in cancer patients with Th cell response. *OncoImmunology* 5: e1062209, 2016.
- 14) Hirayama M, Tomita Y, Yuno A, *et al.*: An oncofetal antigen, IMP-3-derived long peptides induce immune responses of both helper T cells and CTLs. *OncoImmunology* 5: e1123368, 2016.
 - 15) Tsuruta M, Shohei U, Yew PY, *et al.*: Bladder cancer-associated cancer-testis antigen-derived long peptides encompassing both CTL and promiscuous HLA class II-restricted Th cell epitopes induced CD4⁺ T cells expressing converged T-cell receptor genes *in vitro*. *OncoImmunology* 7: e1415687, 2018.
 - 16) McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, *et al.*: Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* 171: 1259–1271, 2017.
 - 17) Stern M, Ruggeri L, Capanni M, *et al.*: Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 112: 708–710, 2008.
 - 18) Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, *et al.*: Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 363: 411–422, 2010.
 - 19) Senju S, Koba C, Haruta M, *et al.*: [Author's view] Application of iPS cell-derived macrophages to cancer therapy. *OncoImmunology* 3: e27927-1-3, 2014.
 - 20) Stone JD, Harris DT, Kranz DM: TCR affinity for p/MHC formed by tumor antigens that are self-proteins: impact on efficacy and toxicity. *Curr Opin Immunol* 33: 16–22, 2015.
 - 21) Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, *et al.*: Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 19: 747–752, 2013.
 - 22) Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, *et al.*: High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4⁺ T cells in human melanoma. *Nat Med* 21: 81–85, 2015.
 - 23) Schumacher TN, Schreiber RD: Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 348: 69–74, 2015.
 - 24) Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, *et al.*: Tumor-specific T cell dynamic antigen-driven differentiation program initiated early during tumorigenesis. *Immunity* 45: 389–401, 2016.
 - 25) Philip M, Fairchild L, Sun L, *et al.*: Chromatin states define tumour-specific T cell dysfunction and reprogramming. *Nature* 545: 452–456, 2017.
 - 26) Marty R, Kaabinejadian S, Rossell D, *et al.*: MHC-I Genotype Restricts the Oncogenic Mutational Landscape. *Cell* 171: 1272–1283, 2017.
 - 27) Carreno BM, Magrini V, Becker-Hapak M, *et al.*: Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science* 348: 803–808, 2015.
 - 28) Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, *et al.*: Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 547: 222–226, 2017.
 - 29) Ott PA, Hu Z, Keskin DB, *et al.*: An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 547: 217–221, 2017.
 - 30) Gubin MM, Zhang X, Schuster H, *et al.*: Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature* 515: 577–581, 2014.
 - 31) Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, *et al.*: Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348: 124–128, 2015.
 - 32) Sharma P, Allison JP: The future of immune checkpoint therapy. *Science* 348: 56–61, 2015.
 - 33) Chowell D, Morris LGT, Grigg CM, *et al.*: Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science* 359: 582–587, 2018.
 - 34) Sidney J, Peters B, Frahm N, *et al.*: HLA class I super types: a revised and updated classification. *BMC Immunol* 9: 1, 2008.

The Present Status and Future Prospects of Cancer Immunotherapy Using Active Immunization of Tumor-Associated Antigens

Miki Tsuruta^{1),2)}, Yasuharu Nishimura^{1),3)}

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

²⁾Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

³⁾Nishimura Project Laboratory, Center for Resource Development and Analysis, Kumamoto University

Tumor cells commonly express several immunogenic antigens, such as tumor-associated antigens (TAAs) that can be recognized as foreign antigens by the immune system and elicit anti-tumor immune responses in cancer patients. Recently it was reported by many researchers that mutated peptides derived from cancer-associated non-synonymous single nucleotide variants (SNVs), so called “Neo antigenic peptides”, can induce strong anti-tumor immune responses in both CTLs and Th cells in tumor-bearing mice and cancer patients. These TAAs or neoantigens expressed in cancer cells have been identified and utilized as targets for cancer immunotherapy. One approach to elicit tumor-specific immune responses is termed peptide-based cancer vaccination; it involves administration of TAAs or neoantigen-derived peptide for treatment of cancers. There have been several forms of peptide-based cancer vaccines depending on which effector cells, such as CTLs or CD4⁺ T-helper cells, are targeted to be activated. Many phase I and II clinical trials of peptide-based cancer vaccines using TAA-derived CTL epitopes (short peptides), T-helper cell epitopes (long peptides) or dendritic cells (DCs) loaded with TAA-derived short or long peptides for various malignant tumors have been conducted and provide clinical benefits in a small fraction of patients. Although peptide-based cancer vaccines have sometimes shown survival advantages with few adverse effects compared with the conventional therapy, this immunotherapy as a monotherapy is considered to be insufficient to elicit durable control of cancers and cures.

Nowadays, to improve the efficiency of peptide-based cancer vaccines, combination immunotherapy of peptide-based cancer vaccines together with the immune-checkpoint blockade therapies using mAbs specific for CTLA-4, programmed cell death 1 (PD-1), or PD-1 ligand 1 (PD-L1) have been developed for clinical application. Combination immunotherapy with peptide-based cancer vaccines and immune-checkpoint blockade therapies that are designed concurrently to activate tumor-specific immune responses and inactivate the immunosuppression in the tumor microenvironment may overcome this ineffectiveness, and lead to the induction of stronger anti-tumor responses. Furthermore, the recent technical progress of genetic analysis enables us to evaluate the immunogenicity of tumor cells and the immune status of the tumor microenvironment in individual cancer patients. This information is expected to lead to the discovery of the predictive biomarkers to select patients for treatment with cancer immunotherapy and the development of the personalized peptide-based cancer vaccines that may improve the efficacy of this immunotherapy. In this review, we will outline the current state of cancer vaccine therapy, recent topics, and future prospects, focusing on cancer vaccine therapy using TAAs- and neoantigen-derived peptide and DC.

Key Words: tumor-associated antigen, tumor antigenic vaccine, tumor antigenic peptide, neoantigen, tumor immunity, active immunization

内皮細胞 HLA-class II DR とアロ応答する CD4 T 細胞は、 anti-A/B 抗体接着により抑制される

岩崎 研太¹⁾・三輪 祐子¹⁾・打田 和治¹⁾・堀見 孔星²⁾・松岡 裕²⁾・村口 篤³⁾・
岸 裕幸³⁾・浜名 洋³⁾・小林 孝彰²⁾

¹⁾ 愛知医科大学医学部腎疾患・移植免疫学寄附講座

²⁾ 愛知医科大学医学部腎移植外科

³⁾ 富山大学医学部免疫学講座

移植臓器の内皮細胞に発現する HLA を直接認識する、レシピエント T 細胞のアロ応答について近年注目が集まっている。これまで、アロ抗体の種類によって、移植成績が異なることから、免疫順応（移植臓器に対する抗体が存在するにもかかわらず、その機能が保たれている状態）という概念が提唱されている。この免疫順応と内皮細胞とのアロ応答の関連性については、いまだ不明な点が多い。最近我々の研究室では、異なるアロ抗体存在下では内皮細胞 HLA-DR に対する CD4 T-細胞応答が異なることを明らかとした。HLA-DR 応答性 CD4 T 細胞はメモリー型であり、特に Th17 と Tfh は強く反応した。シングル細胞解析より、HLA-DR に強く反応する最も高い頻度を示した TCR α/β を所持する T 細胞クローンは、細胞増殖が最も亢進した画分で多く存在していた。その CD4 T 細胞増殖は、anti-A/B 抗体存在下で減弱した。IFN γ の存在に関わらず anti-A 抗体接着時に、CD275 (PD-L1) が上昇しており、anti-A/B 抗体接着で内皮細胞での発現上昇がみられ、ABO 不適合腎組織において高値であった。本総説では、この研究に加え、最近の内皮細胞 HLA- 応答性 CD4 T 細胞に関する研究について述べる。

キーワード：アロ応答，免疫順応，PD-L1，TCR レパトア，内皮細胞 HLA-class II DR

はじめに

臓器移植におけるドナー特異的抗体は、抗体関連型拒絶反応を引き起こす。移植臓器に対する抗体は大きく分けて 2 つある。1 つは Donor HLA Specific Antibody (DSA) であり、もう一つは血液型抗体 (ABO 抗体) である。現在の臓器移植では、移植前にドナー特異的抗体の存在が認められる場合は、rituximab (anti-CD20 抗体) や、bortezomib (プロテオソーム阻害剤) 使用による B 細胞除去療法や、血漿交換による抗体除去療法により、移植を安全に施行できる場合が多い。しかしながら残存抗体や、特に移植後に産生される *de novo* DSA は、抗体関連

型の拒絶反応を引き起こす。一方で、その傷害の程度は抗体の種類によっても異なることが分かっている。HLA class I より class II, class II でも DQ より DR に対する抗体産生は、拒絶反応と大きく連動することが多く¹⁾、特に移植後にその産生を認めた場合、効果的な治療は少ない²⁾。これら DSA に比べて血液型抗体は、補体の活性化は認めるものの、組織傷害・腎機能不全を引き起こすことは稀であることが報告されている。近年、補体の活性化マーカーである C4d 陰性の拒絶反応、もしくは、ABO 不適合移植のように C4d 陽性であっても機能良好の所見が頻繁にみられることから、抗体接着時における補体非依存性の組織傷害の重要性が示唆されていた³⁾。

受付日：2017 年 12 月 22 日，受理日：2018 年 2 月 16 日

代表者連絡先：岩崎 研太 〒480-1195 愛知県長久手市岩作雁又 1-1 愛知医科大学医学部腎疾患・移植免疫学寄附講座

TEL: 0561-63-1410 E-mail: kentaiwasaki@aichi-med-u.ac.jp

補体非依存的に組織傷害をおこすメカニズムに注目が集まっている。

CD4 T 細胞のアロ応答

移植におけるドナー HLA class II と直接反応する CD4 T 細胞のアロ応答 (direct allo-recognition) は、非常に強い免疫反応であり、拒絶反応の大きな原因の一つである⁴⁾。このアロ応答はドナー細胞 HLA class II と反応することになるが、そのソースとしてはドナー抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell; APC) であると考えられている。移植後早期はドナー APC がレシピエント体内を循環し、二次リンパ節などでこのアロ応答がおこる為、移植直後の T 細胞を標的とした免疫抑制は非常に重要となる。一方で、移植後しばらくすると、このドナー細胞はレシピエント免疫担当細胞で処理されることから、慢性期におけるこのアロ応答のターゲットとなるドナー HLA のソースは、グラフト内皮細胞となる⁵⁾。これまでマウスを用いた基礎研究では、内皮細胞 HLA に対しては CD4 T 細胞は起こりにくいことが報告されてきたが⁵⁾、ヒト内皮細胞による CD4 T 細胞応答が確認され、グラフト内皮細胞に抗原提示機能があることが示唆されており、近年注目されている⁶⁾。しかし、内皮細胞では通常 APC が持つような、ICOS や CD40 といった T 細胞活性化分子は低発現であるため⁷⁾、その機能に関しては不明な点が多く残されている。

免疫順応

アロ抗体の接着は、その抗体の種類によって異なる内皮細胞応答を引き起こすことが報告されている。Anti-HLA class I 抗体接着は、内皮細胞で ICAM1 や FcR の発現を上昇させ、好中球やマクロファージを浸潤させる⁸⁾。Anti-HLA class II DR の内皮細胞接着が IL-6 を誘導し、内皮細胞 HLA-class II DR 応答性 CD4 T 細胞が Th17 優位となる環境を作り出すことも報告された⁹⁾。我々も低用量であれば anti-HLA class I は細胞保護を達成しうること⁹⁾、Anti-A/B 抗体接着では、補体制御因子や IFN γ 誘導性 HLA class I/II の発現を低下させる可能性を提示してきた^{10,11)}。この血液型抗体が接着しているにもかかわらず、組織傷害や移植臓器の機能不全とならない現象から、免疫順応という概念が提唱され、臨床においても散見されており、抗体の質・量による違いによるグラフトへの影響についての研究は近年盛んになっている。

内皮細胞 HLA class II DR 応答性 CD4 T 細胞の種類と、アロ抗体存在下での増殖変化

内皮細胞は通常では HLA-DR を発現していない為、IFN γ で刺激誘導する。12 Gy で X 線照射したものを留意し、ヒト末梢血より得られる CD4 T 細胞を CFSE 染色後に、内皮細胞と混合し 6 日間培養した。FCM でその増殖を測定し、CFSE の分配より Mitotic Index を計算すると (実験の全体像は図 1A に示し、様々な細胞表面

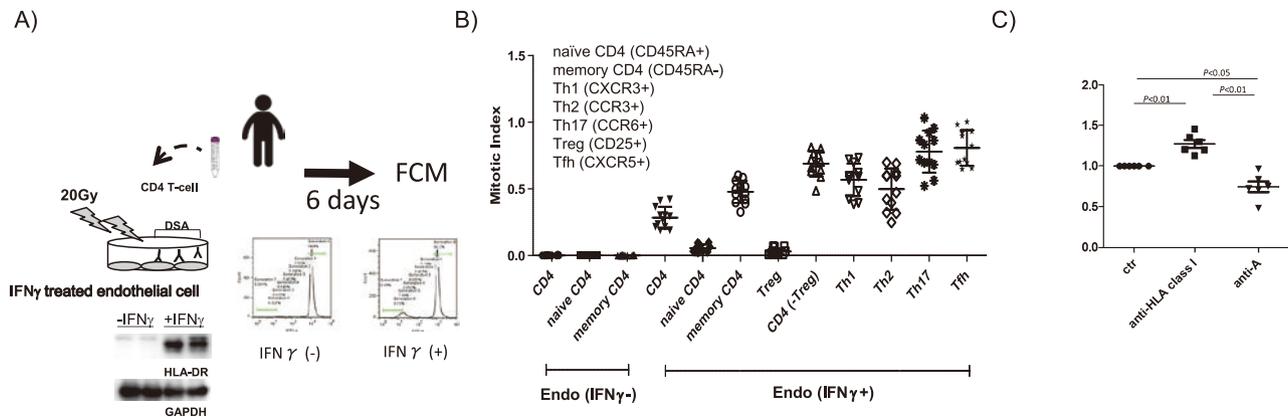


図 1 A) この研究における実験の全体像。内皮細胞を IFN γ で 48 時間刺激し、次いで 15 Gy で照射した。CD4 T 細胞を健康人から negative selection で精製し、CFSE で染色し、照射した内皮細胞と混合し、次いで 6 日間培養した。CD4 T 細胞増殖の代表的なフローサイトメトリーの図が示されている。B) 各ヘルパー CD4 T 細胞を、10 人の健康なボランティアからの指示された表面分子で選別し、CFSE で染色し、照射された内皮細胞と混合し、次いで 6 日間培養した。得られた分裂細胞数から Mitotic index を算出した。C) 抗 HLA クラス I および抗 A 抗体の存在下で CD4 T 細胞増殖アッセイを行った。*p<0.05, **p<0.01

マーカーで CD4 をサブセットに分けて増殖能を評価した結果を図 1B に示す), 内皮細胞 HLA-DR 応答性 CD4 T 細胞はメモリータイプのものが主であり, naïve CD4 T 細胞は殆ど応答していないことがわかる。特に Th17 と Tfh の反応性は強く, Treg を除くことでもその反応は増強していた。通常ドナー APC に対するレシピエントの CD4 T 細胞のアロ認識は主にメモリーであることが報告されてきたが, 内皮細胞に発現する HLA-DR に対するアロ応答もメモリータイプのものが主であることが確認できた。この実験を anti-HLA class I と anti-A 抗体存在下で行うと, CD4 T 細胞増殖は anti-HLA class I 存在下では亢進し, anti-A 抗体存在下では減弱した (図 1C)。

内皮細胞 HLA class II DR 応答 CD4 T 細胞クローンの同定と、その挙動

次にアロ応答 T 細胞がどのようなクローンで占められているのかを, シングル細胞解析で検討した。活性化 CD4 T 細胞は OX40 を指標に, 内皮細胞と 48 時間混合培養したものを, セルソーターで 96 well plate にシングルセルで回収する。TCR α/β を 3 step PCR で増幅させ,

PCR 産物のシーケンスを確認した (図 2A)。解析されたクローンにおいて TCR β の頻度を計算すると, 2% 以上の頻度で出現したクローンが 10 個確認され, そのうち一つのクローンは 11% と高い頻度であった (図 2B)。細胞増殖実験において, 増殖細胞を 8 つの分画に分け, セルソーターで細胞を回収し, 同定した TCR β 遺伝子を PCR で測定したところ, 最も細胞増殖が亢進した画分において高値で存在していた (図 2C)。この TCR β の mRNA は, anti-HLA class I 存在下では上昇し, anti-A 抗体存在下では低下した (図 2C)。

anti-A 抗体接着時の遺伝子変動

Anti-A 抗体接着で細胞増殖を抑制したそのメカニズムの一端を解明するために, 内皮細胞を anti-A・anti-HLA class I 抗体で 48 時間反応させたものから RNA を抽出し, マイクロアレイ解析を行った。IFN γ の存在に関わらず, anti-A 抗体接着時のみ変動のあった遺伝子が 5 つ同定された。その中に CD274 (PD-L1) があることがわかった。つまり, anti-A 抗体接着時に PD-L1 が上昇することで CD4 T 細胞のアロ応答が抑制されること

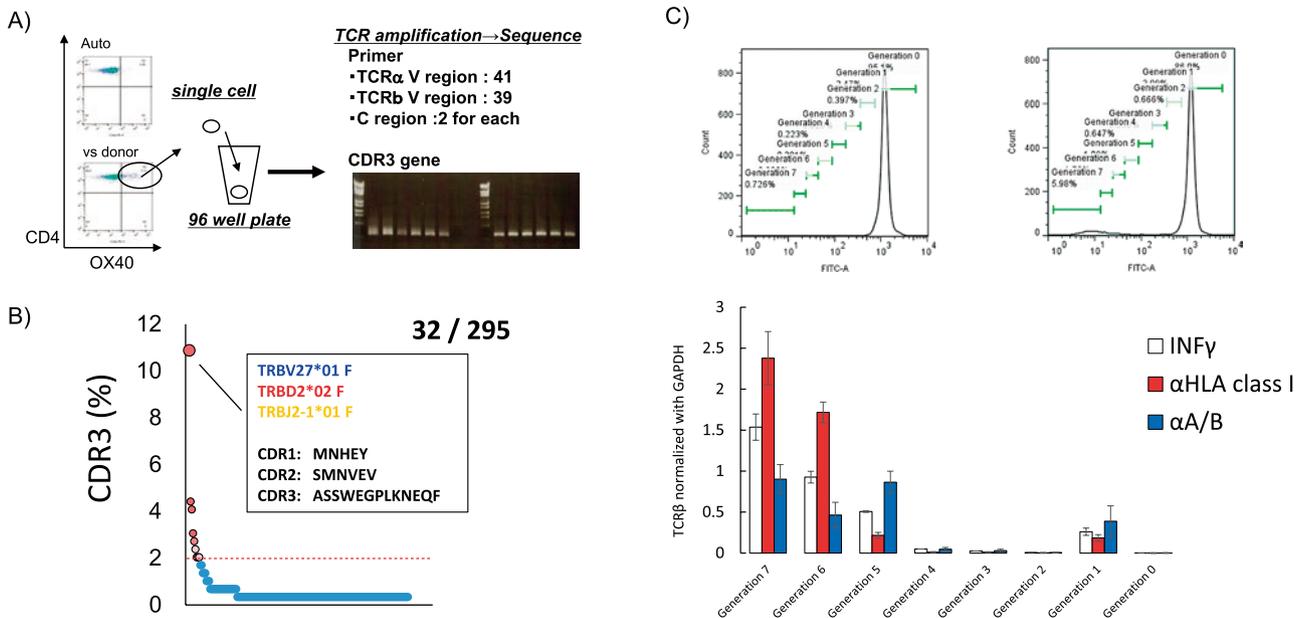


図 2 A) この研究における実験の全体像。内皮細胞を IFN γ で 48 時間刺激し, 次いで 15 Gy で照射した。CD4 T 細胞を健康人から negative selection で精製後, 照射した内皮細胞と混合し 48 時間培養した。OX40 陽性細胞を回収し, 単一細胞レベルで CDR3 α/β 領域を 3 段階 PCR で決定した。代表的なフローサイトメトリーおよび PCR 産物の図を示す。B) 2% を超える頻度で出現した 10 クローンが同定された。11% の高反応性クローン TCR β 鎖の CDR1/2/3 配列を示す。計 295 クローンを分析し, 高頻度クローンはそのうち 32 クローンであった。C) anti-HLA class I/A 抗体存在下における増殖 CD4 T 細胞を 8 領域に分け, 同定された CDR3 β mRNA を測定した。補正は GAPDH で行った。

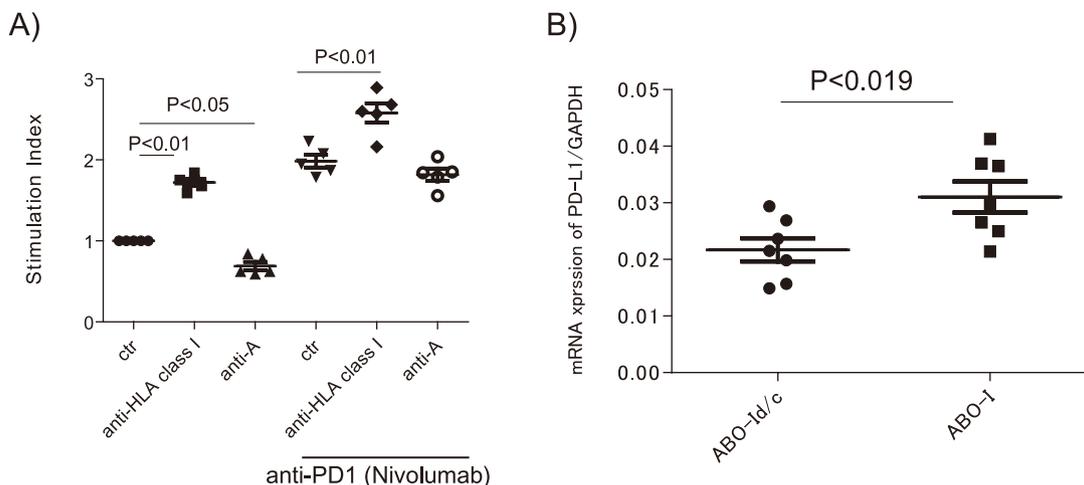


図3 A) 抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) の存在下で CD4 T 細胞増殖アッセイを行った。Stimulation index は抗体非存在下での CD4 T 細胞増殖の Mitotic index を 1.0 としたときの相対値を表す。B) ABO 腎臓不適合移植における腎組織から抽出した RNA を用いて PD-L1 の mRNA 測定を行った。補正は GAPDH で行った。

が考えられた。そこで、CD4 T 細胞増殖実験に anti-PD-1 抗体 (Nivolumab) を入れたところ、anti-A 抗体による増殖抑制効果がみられなくなった (図 3A)。実際の ABO 不適合移植の C4d 陽性の腎組織においても、PD-L1 の mRNA が高値であった (図 3B)。

内皮細胞 HLA 応答性 CD4 T 細胞と免疫順応

近年グラフト内皮細胞に発現する HLA class II を、CD4 T 細胞が直接認識する direct recognition の機能解析を目的とした研究は盛んになっている。非免疫担当細胞の場合、HLA class II の発現量は低値であり、炎症条件下でのみ発現する。そのため内皮細胞を IFN γ で処理したもので実験を行う必要がある。図 1B に示すように通常の direct recognition と同様に、内皮細胞 HLA に応答する CD4 T 細胞もメモリータイプのものであったが、そのサブセットは、Th17 や Tfh に偏っていた。これまで内皮細胞 HLA に応答するサブセットは Th17 が報告されておいたが⁶⁾、Tfh が反応することの報告は少ない。Tfh は通常 Germinal Center で B 細胞の分化・成熟に関与し、抗体産生を促す機能をもっている¹²⁾。現在 Tfh がなぜ内皮細胞 HLA に強く反応する理由は明らかではない。拒絶反応の組織において、T 細胞だけでなく B 細胞が集積していることも報告されていることから¹³⁾、Tfh-B の相互作用がグラフト上で起きている可能性も考えられるが、この部分についてはさらなる研究が求められる。

CD4 T 細胞のアロ応答が anti-HLA class I と anti-A 抗体存在下では、その応答性が異なるという結果を得たことから、さらに研究を進めた。この応答を詳細に検討するために、TCR のシングルセル解析によるレパトア解析を試みた。その結果、内皮細胞 HLA-DR 応答性 CD4 T 細胞は、特定のクローンに偏る傾向を見せた。この結果は予想外であった。当初 direct recognition を担う CD4 T 細胞はかなり多いクローンがあると考えていた。しかし、ドナー HLA 応答性 T 細胞レパトアに偏りが存在するという事は、将来的にはこれらのクローンのみを標的とした治療への可能性を含んでおり、術前のアロ応答 T 細胞クローンの同定により、術前に拒絶反応を引き起こす T 細胞クローンの同定が可能になるかもしれない¹⁴⁾。今回の結果は感作歴のない健常人からの細胞での実験であり、移植後は異なるクローンが反応することも十分考えられる。そのため、TCR を標的とした治療を考える場合、移植後 T 細胞性の拒絶反応を発症したレシピエントより得られたリンパ球を用いた研究を進める必要がある。このクローン同定の研究においては、短時間で活性化した細胞サンプルより解析したため、実際に増殖が亢進した画分で同様のクローンが存在するかは不明であったため、図 2C に示すような研究を行った。その結果、実際に細胞増殖が最も更新したところで、そのクローンが確認された。このことは、ドナー HLA に速やかに応答したクローンは、その増殖能が強固であることを示している。そのクローンの存在量が anti-HLA

class I 抗体接着では上昇し、anti-A 抗体接着では減少した。これらアロ抗体は実験に用いた CD4 T 細胞には結合していないため、これは内皮細胞内遺伝子変動に起因するものと推測できる。最後にそのメカニズムの一端を解明するために、マイクロアレイ解析を行い、IFN γ に関わらず anti-A 抗体接着時に変動を認める遺伝子の同定を試みた。その結果、anti-A 抗体接着時に発現変動する遺伝子の中に、PD-L1 が同定された。PD-L1 は抑制性のシグナルを、PD-1 発現細胞へと伝える分子で、近年がん免疫においてブレークスルーとなったチェックポイント阻害剤の標的分子の一つである¹⁵⁾。移植においては、肝臓を構築する類洞内皮細胞で PD-L1 が高発現であり、このことが肝移植でたびたび見られる免疫寛容誘導に重要であるという報告もある¹⁶⁾。今回 ABO 不適合移植患者の腎組織において PD-L1 が高発現であり、anti-PD-1 抗体で、anti-A/B 抗体接着による CD4 T 細胞のアロ応答減弱がキャンセルされたことから、ABO 不適合腎移植においては、この PD-1-PD-L1 の重要性を示唆する結果となった。抗体接着による内皮細胞内シグナル伝達は、その抗体の種類によって異なることが報告されている。Anti-HLA class I 抗体はその量により PI3K/AKT を介した細胞保護や⁹⁾、ERK を介した細胞活性化を引き起こす。またマウスモデルにおいて ICAM-1 や P-selectin を誘導することで好中球浸潤などが確認されている⁸⁾。Anti-HLA class II 抗体の研究は、定常状態で内皮細胞に発現していないこともあり、その報告は多くないが、抗体接着により内皮細胞を活性化する報告が多い。その際 IL-6 や IL-11 などのサイトカインを産生することで、内皮細胞 HLA-DR 応答性 CD4 T 細胞は Th17 有意となる⁶⁾。我々のこれまでの検討では anti-A/B 抗体接着は、内皮細胞活性化を抑制する方向へと誘導する。PD-L1 自身は組織においては炎症状態で容易に誘導される。炎症状態の内皮細胞は活性化状態にあるため、anti-A/B 抗体接着による PD-L1 の発現制御は、細胞内 ERK と mTOR の活性低下が起因であると推察される。一般的に T 細胞における PD-1 の発現は、定常状態ではそれほど高くはなく、活性化すると誘導し、PD-1 と PD-L1 との相互作用により T 細胞の活性化は抑制される。また、PD-L1 は CD80 と相互作用することが可能であり、その結果、T 細胞の活性化が抑制されることも報告されている¹⁷⁾。また Treg にも発現が確認されており、Treg による免疫抑制メカ

ニズムの一つとされている。これらのことから、anti-A/B 抗体接着により内皮細胞内シグナル伝達が制御されることで、PD-L1 が誘導され、その結果内皮細胞 HLA-DR 応答性 CD4 T 細胞のうち、PD-1 陽性細胞の活性化が抑制されることが考えられる。今後さらなる知見を得るためには、実際の移植臓器でのメカニズム解明が必要となる。特に実際の腎組織に浸潤している T 細胞の機能解析、つまり、ABO 不適合 / 適合腎移植において、腎組織での PD-L1 の高発現がどの程度の患者で確認できるのか、またその際に浸潤 T 細胞のサブセットに偏りが生じているのか。またそれらクローンは移植前に同定可能なのかどうかの研究を進めることで、免疫順応のメカニズム解明から治療法へとつながるはずである。本総説で取り扱ったこれまでの研究、さらに今回我々が得た知見が、ABO 不適合移植に頻繁に見られる免疫順応の理解、さらには移植医療の究極的な目標である免疫寛容の研究に役立つことが出来れば幸いである。

参考文献

- 1) Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, *et al.*: Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation. *Hum Immunol* 72(1): 11–17, 2011.
- 2) Yamamoto T, Watarai Y, Takeda A, *et al.*: De Novo Anti-HLA DSA Characteristics and Subclinical Antibody-Mediated Kidney Allograft Injury. *Transplantation* 100(10): 2194–2202, 2016.
- 3) Haas M, Sis B, Racusen LC, *et al.*: Banff 2013 Meeting Report: Inclusion of C4d-Negative Antibody-Mediated Rejection and Antibody-Associated Arterial Lesions. *Am J Transplant* 14(2): 272–283, 2014.
- 4) DeWolf S, Sykes M: Alloimmune T cells in transplantation. *J Clin Invest* 127(7): 2473–2481, 2017.
- 5) Ali JM, Negus MC, Conlon TM, *et al.*: Diversity of the CD4 T Cell Alloresponse: The Short and the Long of It. *Cell Rep* 14(5): 1232–1245, 2016.
- 6) Lion J, Taflin C, Cross AR, *et al.*: HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion. *Am J Transplant* 16(5): 1408–1420, 2016.
- 7) Lozanoska-Ochser B, Klein NJ, Huang GC, *et al.*: Expression of CD86 on Human Islet Endothelial Cells Facilitates T Cell Adhesion and Migration. *J Immunol* 181(9): 6109–6116, 2008.
- 8) Valenzuela NM, Trinh KR, Mulder A, *et al.*: Monocyte Recruitment by HLA IgG-Activated Endothelium: The Relationship Between IgG Subclass and Fc gamma RIIa Polymorphisms. *Am J Transplant* 15(6): 1502–1518, 2015.

- 9) Iwasaki K, Miwa Y, Haneda M, *et al.*: Significance of HLA class I antibody-induced antioxidant gene expression for endothelial cell protection against complement attack. *Biochem Biophys Res Commun* 391(2): 1210–1215, 2010.
- 10) Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, *et al.*: Comparative Study on Signal Transduction in Endothelial Cells After Anti-A/B and Human Leukocyte Antigen Antibody Reaction: Implication of Accommodation. *Transplantation* 93(4): 2012.
- 11) Iwasaki K, Miwa Y, Uchida K, *et al.*: Negative regulation of HLA-DR expression on endothelial cells by anti-blood group A/B antibody ligation and mTOR inhibition. *Transplant Immunol.* 40: 22–30, 2017.
- 12) Walters GD, Vinuesa CG: T Follicular Helper Cells in Transplantation. *Transplantation* 100(8): 1650–1655, 2016.
- 13) Xu XG, Han Y, Wang Q, *et al.*: Characterisation of Tertiary Lymphoid Organs in Explanted Rejected Donor Kidneys. *Immunol Invest* 45(1): 38–51, 2016.
- 14) Morris H, DeWolf S, Robins H, *et al.*: Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients. *Sci Transl Med* 7(272): 2015.
- 15) Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, *et al.*: PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 515(7528): 568–+, 2014.
- 16) Banshodani M, Onoe T, Shishida M, *et al.*: Adoptive Transfer of Allogeneic Liver Sinusoidal Endothelial Cells Specifically Inhibits T-Cell Responses to Cognate Stimuli. *Cell Transplant* 22(9): 1695–1708, 2013.
- 17) Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, *et al.*: PD-L1 interacts specifically with B7-1 to inhibit T cell proliferation. *Immunity* 27: 111–122, 2007.

第 16 回日本組織適合性学会近畿地方会 抄録集

会 期：2018 年 3 月 3 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：安井 昌博

〒 594-1101 大阪府和泉市室堂町 840

大阪母子医療センター 血液・腫瘍科，輸血・細胞管理室

TEL 0725-56-1220

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：3月3日（土）13:00～13:10
2. 世話人会：3月3日（土）12:00～13:00
3. 意見交換会：3月3日（土）17:20～

【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

8 時 30 分～10 時 00 分 HLA 基礎講習会（事前登録者対象）

10 時 25 分～10 時 30 分

開会の挨拶

10 時 30 分～11 時 00 分

オープニングセミナー

座長：谷 慶彦

（大阪府赤十字血液センター）

第 17 回国際 HLA ワークショップ，第 43 回アメリカ組織適合性学会レポート

小島裕人（HLA 研究所）

11 時 00 分～12 時 00 分

一般演題（1）

座長：荒木延夫

（兵庫県赤十字血液センター）

1) 腎移植後のドナー特異的 HLA 抗体と抗体関連型拒絶反応についての検討

○ 葛原宏一¹⁾，高山智美²⁾，奥田洋平¹⁾，伊藤拓也¹⁾，竹澤健太郎¹⁾，川村憲彦¹⁾，谷川 剛¹⁾，高尾徹也¹⁾，山口誓司¹⁾

大阪急性期・総合医療センター 泌尿器科¹⁾

大阪急性期・総合医療センター 移植支援検査センター²⁾

2) C3d 補体結合性 de novo HLA class II ドナー特異的抗体（dnDSA）の epitope 解析

○ 橋本光男，木下朋子，藤田友梨，深江彰太，谷口 歩，山中和明，中川勝弘，岸川英史，西村憲二

兵庫県立西宮病院 腎疾患総合医療センター

3) 乳幼児肝臓移植における HLA 抗体陽性症例の検討

○ 万木紀美子¹⁾，吉澤 淳²⁾，菱田理恵¹⁾，三浦康生¹⁾，平位秀世¹⁾，上本伸二²⁾，前川 平¹⁾

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部¹⁾

京都大学医学部附属病院 肝胆脾移植外科²⁾

4) 脳死肺移植術後 denovoDSA と HLAeplet ミスマッチの検討

○ 合地史明¹⁾，陳 豊史¹⁾，上田聡司¹⁾，栢分秀直¹⁾，徳野純子¹⁾，岡部 亮¹⁾，山岸弘哉¹⁾，高萩亮宏¹⁾，齋藤正男¹⁾，

大角明宏¹⁾，中島大輔¹⁾，濱路政嗣¹⁾，本山秀樹¹⁾，伊達洋至¹⁾，万木紀美子²⁾

京都大学 呼吸器外科¹⁾，輸血細胞治療部²⁾

12 時 00 分～13 時 00 分

昼食・世話人会

13 時 00 分～13 時 10 分

総 会

13 時 10 分～14 時 10 分

一般演題 (2)

座長：田中秀則

(公益財団法人 HLA 研究所)

5) 当検査室で行った日本人以外の HLA タイピングについての検討

○三好由真¹⁾, 高山智美¹⁾, 仲 裕美¹⁾, 小林 茜¹⁾, 薦原宏一²⁾, 岩田和友子¹⁾

大阪急性期・総合医療センター移植支援検査センター¹⁾

大阪急性期・総合医療センター泌尿器科²⁾

6) 次世代シーケンサー (NGS) による HLA タイピングで確認された新規アレルについて

○田中秀則, 宮崎有紀, 小島裕人, 北嶋友人, 西川美年子, 佐治博夫

公益財団法人 HLA 研究所

7) SSOP 法 HLA タイピング検査において, 肝臓移植後にドナーの HLA が検出された一症例

○万木紀美子¹⁾, 吉澤 淳²⁾, 菱田理恵¹⁾, 三浦康生¹⁾, 平位秀世¹⁾, 上本伸二²⁾, 前川 平¹⁾,

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部¹⁾

京都大学医学部附属病院 肝胆膵移植外科²⁾

8) 脳死片肺移植後の GVHD

○野口未紗¹⁾, 本山秀樹¹⁾, 進藤岳郎²⁾, 宮原 聡¹⁾, 中ノ坊亮¹⁾, 尾田博美¹⁾, 中島大輔¹⁾, 濱路正嗣¹⁾, 青山晃博¹⁾, 陳 豊史¹⁾, 伊達洋至¹⁾

京都大学医学部附属病院 呼吸器外科¹⁾, 血液内科²⁾

14 時 10 分～15 時 40 分

シンポジウム (1)

「HLA 不一致移植 (ハプロ移植) について」

座長：安井昌博 (大阪母子医療センター 血液・腫瘍科)

芦田隆司 (近畿大学医学部血液・膠原病内科)

1) 小児の血液・腫瘍性疾患における HLA 不一致移植

坂田尚己

(近畿大学医学部 小児科)

2) 小児固形腫瘍に対する HLA 不一致移植 (ハプロ移植) : HLA 一致移植との比較から

橋井佳子

(大阪大学大学院医学系研究科 小児科)

3) 非血縁者間骨髄移植における HLA 不適合の影響とその克服

諫田淳也

(京都大学医学部附属病院 血液内科)

15 時 40 分～15 時 50 分

休 憩

15時50分～17時20分

シンポジウム (2)

「臓器移植におけるクロスマッチ検査の進歩」

座長：高原史郎（大阪大学医学系研究科・先端移植基盤医療学寄附講座）

吉澤 淳（京都大学 肝胆膵・移植外科）

- 1) 腎移植におけるクロスマッチ検査の最新知見
—膜型抗体の段階での検知法と治療への応用—
今村亮一
（大阪大学泌尿器科）
- 2) 肝移植における抗ドナー HLA 抗体の最新の知見
吉澤 淳
（京都大学 肝胆膵・移植外科）
- 3) 肺移植におけるクロスマッチ検査の現状と今後の課題
陳 豊史
（京都大学大学院医学研究科 呼吸器外科）

17時20分～

意見交換会

講演時間のご案内

一般演題：質疑応答含め 15分 シンポジウム：質疑応答含め 30分

(10:30 ~ 11:00)

オープニングセミナー

座長：谷 慶彦
(大阪府赤十字血液センター)

第 17 回国際 HLA ワークショップ, 第 43 回アメリカ組織適合性学会レポート
小島裕人 (HLA 研究所)

第 17 回国際 HLA ワークショップ, 第 43 回アメリカ組織適合性学会レポート

小島裕人

公益財団法人 HLA 研究所

2017年9月にカリフォルニア州・サンフランシスコで開催された第17回国際HLAワークショップ (IHIW, International HLA and Immunogenetics Workshop) および, 第43回アメリカ組織適合性学会 (ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) に参加したので, その概要を報告する。

1. はじめに

両会ともに, 初日のセッションで報じられたことは, 2017年7月に逝去されたJon van Rood先生の訃報であった。Jon van Rood先生は, Rose Payne先生らと共に輸血患者や妊婦の血清中に白血球凝集素が存在することを見出し, HLA抗原に対する研究を推進させたことに加え, NIMA (Non Inherited Maternal Antigen) の移植は寛容になりやすいといった仮説を提唱し, 現在のハプロ半合致移植での基礎となる考えを構築した功績が大きい。

2. NGS (Next Generation Sequencing)

IHIWで, 29施設に24種類のDNAを配布してNGSで検査した比較結果の報告が以下の表のとおりであった。

クラスIで1~2%程度, クラスIIは2~5%程度の不一致率がみられ, 不一致の理由としては, PCRの方法やシーケンス精度の違いが挙げられていた。

また, 技術的観点以外では, 各施設で使用したNGSのキットや機器が異なることから, 結果ファイルがXMLやHTML形式で混在し, データ収集を困難にしていることが挙げられていた。この点を改善するためのひとつに, 表記法の変更がすすめられている。

3. HLA 表記法

NGSの進歩に伴い, これまでに検査されていなかった遺伝子領域の多型が急速に発見されており, これまでの命名法では表現が困難になってきている。例えば, A*24:02:01:01とA*24:02:01:02Lのような, 表記法ではどの遺伝子領域に違いがあるか, 判断することができない。

そこで, どの領域に違いがあるかを明確に表記する方法として, A*01:01:01:01の場合, HLA-Aw1-1と表記し, ハイフン(-)でつながれた数字で, HLAの5' UTR, exon1, intron1...と各遺伝子領域の多型を表記することが提案された。ただし, この表記法は, 現状では実用的でないため, 命名委員会からは, 5~7年後を目途に現在の表記方法と今回提案された表記の2種類を併用していくことを実現したいとの見解があった。

4. HLA 抗体

IHIWでは各国のデータを集めて, 移植医療におけるカットオフラインを決定するプロジェクトがあったが, 参加施設によって抗体の陽性/陰性を解釈する方法が異なり, 結論は次回へと持越した。具体的には, ブラジル: epletの違い, Leiden大学: アミノ酸の違い, スタンフォード: tripletの違い, ケンブリッジ大学: 抗原-抗体の静電力の違い, ユトレヒト大学: PIRCHE II (CD4+T細胞を活性化能力の分類)の違いによって解析していた。

ASHIではAmerican Society of Transplantation (AST)との共同で, STAR (Sensitization in Transplantation: Assessment of Risk) と呼称されるワーキンググループが結成

	A	B	C	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	DPA1	DPB1
一致率	99.3%	98.2%	99.2%	96.8%	97.6%	95.6%	96.7%	99.4%	97.6%	98.4%	96.8%
不一致率	0.7%	1.8%	0.8%	3.2%	2.4%	5.4%	3.3%	0.6%	2.4%	1.6%	3.2%

され、移植において検出された抗体の解釈を決定していく動きがある。臓器ごとに抗体に対する考え方が異なっていた。

5. 造血幹細胞移植とHLA

IHIWでは、1996年より開始されている移植とHLAのマッチングについての解析経過が報告された。これまでに19か国、46,216ペアのHLAおよび移植成績が登録され、30,212ペアの解析が実施された。

マッチ度の比較では、ミスマッチの数が増えるほど不

利に働く傾向があった。

また、移植全体を1ミスマッチの座位別で見ると、クラスIをミスマッチさせた場合より、クラスII、特にDQB1座をミスマッチさせるほうが、移植成績は若干良好であった。

今後の方向性として、国際的には症例数の増加しているハプロ半合致移植における解析を実施予定であり、プレリミナリーなデータとして、シアトルのデータではC座ミスマッチではGVHDを低下させる傾向があることが報告された。

(11:00 ~ 12:00)

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 ~ 4

1) 腎移植後のドナー特異的 HLA 抗体と抗体関連型拒絶反応についての検討

○ 葛原宏一¹⁾, 高山智美²⁾, 奥田洋平¹⁾, 伊藤拓也¹⁾, 竹澤健太郎¹⁾, 川村憲彦¹⁾, 谷川 剛¹⁾, 高尾徹也¹⁾, 山口誓司¹⁾

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

目的：移植腎の長期生着において抗体関連型拒絶反応 (Antibody mediated rejection : AMR) への対策は重要な課題である。ドナー特異的 HLA 抗体 (donor specific HLA antibody: DSA) が AMR を引き起こす重要な因子であることは報告されている。当科では 2014 年より術後に HLA 抗体検査を行い de novo DSA (dnDSA) の検出および AMR の早期診断を行ってきたので、その結果について検討する。

対象と方法：当科で腎移植を施行した患者のうち、2014 年 1 月以降当科通院中の HLA identical および既存抗体陽性例を除く 120 例を対象とした。移植後 1, 3, 5 年にスクリーニングで、また血清 Cr 上昇あるいは尿蛋白の増加時に HLA 抗体検査を行った。dnDSA が検出された症例に関しては移植腎生検を行い、AMR の有無について確認した。

結果：101 名 (84.2%) で HLA 抗体検査が行われた。16/101 (15.8%) に dnDSA の発生を認めた。dnDSA の発生率は 1 年 2.6%, 3 年で 8.0%, 5 年で 14.2% であった。dnDSA 陽性症例の血清 Cr は 1.47 (0.93–2.74) mg/dl, 尿蛋白 395 (62–2998) mg/gCr であり、class I 3 例, class II (DR/DQ) 3/10 例であった。13 例で移植腎生検が行われ、6 例 (46.2%) で chronic active AMR (CAAMR) と診断された。CAAMR と診断後、免疫抑制療法の強化など治療介入を行い、廃絶した症例は 1 例のみであった。

結論：当科通院中の腎移植患者における dn DSA の発生率は 15.8% であり、短期間の観察ではあるが AMR と診断された症例においても腎機能は良好に経過している。今後は長期的な腎予後についても検討する必要があると考えられた。

2) C3d 補体結合性 de novo HLA class II ドナー特異的抗体 (dnDSA) の epitope 解析

○橋本光男, 木下朋子, 藤田友梨, 深江彰太, 谷口 歩, 山中和明, 中川勝弘, 岸川英史, 西村憲二

兵庫県立西宮病院 腎疾患総合医療センター

【背景】近年, 腎移植生着率は新しい免疫抑制剤と抗体検査が開発導入されたことにより飛躍的に向上しているが, 移植後に陽性化する HLA class II dnDSA 症例の 10 年生着率は陰性症例に比べて約 40% 低下するといわれている。Luminex single antigen beads (SAB) は高感度で抗体の特異性を同定することができる DSA 検出系であるが, DSA 陽性レシピエントが全て拒絶反応を発症するとは限らず, また移植後に DSA が陽性化するまでに平均 5 年の長期間を要するといわれている。

我々は AMR 発症に関連する DSA の抗原性と免疫原性について, epitope の抗体結合様式を Continuous epitope (連続性), Discontinuous epitope (非連続性) に分けて検討し, 今までに得られた知見を合わせて報告する。

【対象と方法】2000 年 2 月から 2017 年 3 月までに当施設で施行した術前 HLA class II DSA 陰性 115 例のうち術後陽性化した 26 例を対象とし, AMR 陽性例 (N=14) と陰性例 (N=12) で比較検討した。HLA 抗体, 補体結合能は Luminex SAB (Immucore) を用いた。抗体特異性は HLA Epitope Registry, 拒絶反応は腎生検の病理診断に従った。

【結果】dnDSA 陽性 26 例の内訳は, DR 陽性 10 例, DQ 陽性 6 例, DR+DQ 陽性 10 例で, 今までに得た知見を合わせて報告する。

(1) AMR 陽性 14 症例で検出された DSA は全例 C3d 結合性 DSA を含み, 陰性症例は全例 C3d 非結合性 DSA であった。

(2) DSA の抗体量と C3d 結合量の相関は $R^2=0.588$ であったが, epitope を連続性と非連続性 epitope で検討すると, それぞれ $R^2=0.546$, $R^2=0.808$ となり, 非連続性 epitope に対する DSA は抗体量と C3d 結合量は高い相関を示した。

(3) HLA-DRB1, -DRB3/4/5, -DQA1/B1 特異的 DSA の抗体量と C3d 結合量の関連性をそれぞれの連続性, 非連続性 epitope で検討すると, HLA-DQA1/B1 非連続性 epitope に対する DSA のみが抗体量, C3d 結合量の両方で連続性 epitope に比べて有意に高い結合量を認めた ($P=0.0390$, $P=0.0005$)。

(4) 連続性, 非連続性 epitope と AMR 発症の関連性は HLA-DQA1/B1 DSA で No AMR 症例の 4 種類の DSA は全て連続性 epitope であるのに対し, AMR 症例 16 種類の DSA のうち 14 種は非連続性 epitope で有意差を認めた ($P=0.0093$)。

【考察】HLA-class II dnDSA の HLA-DQA1/B1 非連続性 epitope に対する DSA は抗原性, 補体結合性の強い AMR に関連する抗体であることが強く示唆された。

3) 乳幼児肝臓移植における HLA 抗体陽性症例の検討

○万木紀美子¹⁾, 吉澤 淳²⁾, 菱田理恵¹⁾, 三浦康生¹⁾, 平位秀世¹⁾, 上本伸二²⁾, 前川 平¹⁾

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部¹⁾, 京都大学医学部附属病院 肝胆膵移植外科²⁾

【はじめに】当院では肝・肺・腎の臓器移植の全症例を対象に、HLA タイピング、HLA 抗体検査およびリンパ球クロスマッチを実施している。HLA 抗体産生は妊娠・出産により高率に誘導される。当院での臓器移植例においても HLA 抗体陽性率が成人女性では 32.1% (34/106 例) と小児や男性患者 7.2% (16/222 例) に比べて高い。しかし、頻度は低いものの、輸血歴のない乳幼児患者においても HLA 抗体陽性症例が認められ、これらは、母親の HLA に対する抗体と考えられた (2015 年総会にて発表)。今回、DSA 陽性で肝臓移植が実施された乳幼児症例について、移植前後の HLA 抗体 (IgG 型) の推移を検討したので報告する。

【方法】2009 年 1 月～2017 年 5 月に実施された生体肝臓移植のうち、2 歳未満の症例で DSA 陽性であった 3 症例について検討した。

【結果】2 歳未満の DSA 陽性症例は 3 症例 / 85 例 (3.5%) であった。

症例①、生後 9 カ月の女児。ドナーは母親。血液型は B to A。抗 B は IgM 2 倍、IgG 1 倍以下。DSA は抗 HLA-A24 (MFI=3,996), B44 (MFI=7,523), DR8 (MFI=16,274), DQ6 (MFI=22,737)。術前に Rituximab を投与し移植を行った。移植後 4 日に肝生検で抗体関連拒絶反応の所見があり、大量 IVIG とステロイドパルス療法で治療し軽快した。抗 B はピーク値が IgM 16 倍、IgG 1 倍以下と

経過を通して低値であった。HLA 抗体は、移植後 3 日に一旦陰性化した。11 日には再び術前と同レベルの HLA 抗体を検出した。1 カ月後には Class I 抗体が消失して 6 カ月後には HLA 抗体自体も陰性化した。その後は抗 HLA-DQ6 のみ検出や消失を繰り返している。

症例②、10 カ月の女児。ドナーは父親。DSA は抗 HLA-DR4 (MFI=11,745) で母親は父親と同じ HLA-DR4 陽性であった。移植後 3 日に急激な肝酵素上昇、肝生検では広範な肝細胞の脱落壊死像あり。治療として交換輸血、大量 IVIG を行った。HLA 抗体は移植後 3 日に一旦消失したが、38 日には術前と同レベルの抗 HLA-DR4 (MFI=11,425) に加え HLA-A11 (MFI=2,528), B54 (MFI=3,608) を検出した。3 カ月後には DSA 陰性化し、6 カ月後には HLA 抗体も陰性化した。

症例③、1 歳 10 カ月女児。ドナーは父方祖母。DSA は抗 HLA-DR8 (MFI=3,014), DQ6 (MFI=1,829) であった (母親の HLA は検討予定)。移植後 7 日に全ての DSA の上昇を認め、その後新規 DSA として DQ4 (MFI=1,440) を検出した。移植後 50 日に DSA は一旦陰性化した。その後 DQ6 (MFI=17,896), DQ4 (MFI=20,050) と高値が持続している。

【考察】乳幼児においても術前に DSA を検出し抗体関連拒絶反応が認められる症例があり、既存抗体の検索および対策が重要であると思われた。

4) 脳死肺移植術後 denovoDSA と HLAeplet ミスマッチの検討

○合地史明¹⁾, 陳 豊史¹⁾, 上田聡司¹⁾, 栢分秀直¹⁾, 徳野純子¹⁾, 岡部 亮¹⁾, 山岸弘哉¹⁾, 高萩亮宏¹⁾, 齋藤正男¹⁾, 大角明宏¹⁾, 中島大輔¹⁾, 濱路政嗣¹⁾, 本山秀樹¹⁾, 伊達洋至¹⁾, 万木紀美子²⁾

京都大学 呼吸器外科¹⁾, 輸血細胞治療部²⁾

【はじめに】近年, 他の固形臓器同様に肺移植領域でも抗体関連拒絶 (AMR) の認識が広がりドナー特異的 HLA 抗体 (DSA) が予後不良因子として注目を集めている。組織適合性の評価として, 遺伝子座の HLA の 3 次元構造から抗ドナー抗体が結合する部位である eplet の同定が可能となり, DSA および AMR との関連性が注目されているが, 本邦よりの報告は乏しい。脳死肺移植術後 denovoDSA と HLAeplet ミスマッチの検討を行ったので報告する。

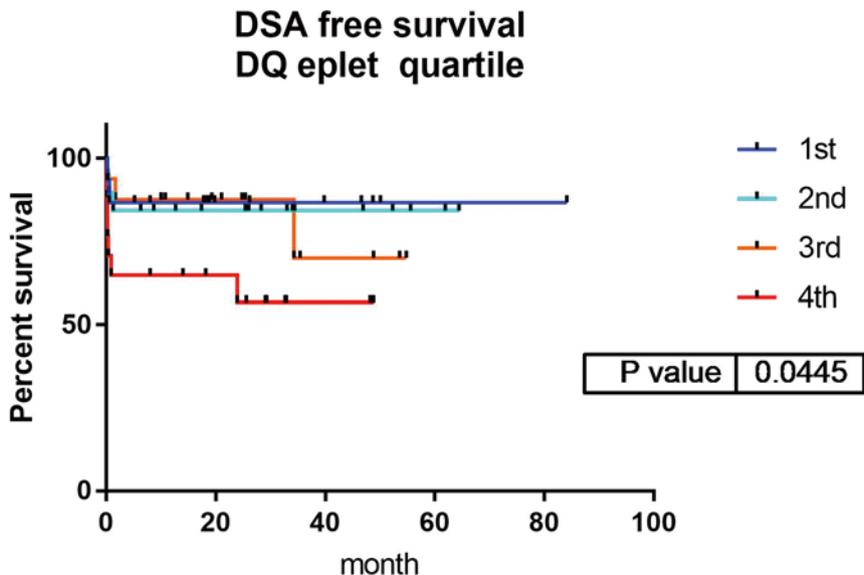
【方法】京都大学医学部附属病院で脳死肺移植を施行した症例のうち, 術前後の抗 HLA 抗体の測定がなされ, ドナーおよびレシピエントの HLA-A, B, DR, DQ の 8locus が判明している症例 67 例 (移植時平均年齢 44.6 歳, 男性 41 例) (再移植症例, 術前 DSA 陽性例を除く) について, denovoDSA とミスマッチ (MM) eplet 数との関連を eplet 解析ソフトである HLA Matchmaker を用い

て比較した。

【結果】denovo DSA は 15 例で認め, うち 4 例で CLAD を認めた。

DSA 陽性群と陰性群の比較では, 両群間で ABDR の 6locus の MM HLA 数 (DSA 陽性群 4.40 vs 陰性群 4.14, $p=0.46$), ABDR MM eplet 数 (29.13 vs 24.65, $p=0.15$) 共に有意差を認めなかった。DQ においては MM HLA 数 (1.40 vs 0.98, $p=0.045$) で有意差を認め, MM eplet 数 (12.20 vs 8.93, $p=0.075$) でも DSA 陽性群に多い傾向を認めた。DQ EpletMM 数で 4 分位にした 48 ヶ月 DSA 陰性生存率は 86.7% : 84.2% : 70.0% : 56.6% であった。(logrank, $p=0.0445$)

【結語】脳死肺移植術後 denovo DSA と HLAeplet ミスマッチの検討を行った。DQ locus のミスマッチが denovoDSA の出現に関連する可能性がある。



(12:00 ~ 13:00)

昼食・世話人会

(13:30 ~ 13:40)

総会

(13:10 ~ 14:10)

一般演題 (2)

座長：田中秀則
(公益財団法人 HLA 研究所)

演題番号 5 ~ 8

5) 当検査室で行った日本人以外の HLA タイピングについての検討

○三好由真¹⁾, 高山智美¹⁾, 仲 裕美¹⁾, 小林 茜¹⁾, 蔦原宏一²⁾, 岩田和友子¹⁾

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

【目的】

当検査室では日本人以外の検査数は増加傾向にある。今回、当検査室での日本人以外の HLA タイピング結果を集計するとともに、その型が抗体スクリーニング検査及び抗体特異性同定検査のパネルに含まれているかどうか解析を行ったので報告する。

【方法】

2011 年 1 月から 2017 年 12 月まで当検査室で実施した日本人以外のタイピング 61 症例を解析対象とした。HLA タイピングは WAKFlow[®] と MicroSSP[®] を用いて HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 について実施し、「HLA タイピング結果のアレル表記と結果報告の原則 (2017 年度版)」に従って判定した。抗体スクリーニング検査は FlowPRA Screening[®], 抗体特異性同定検査は LAB-Screen Single Antigen[®] を用い、判定された型と各検査試薬のパネルの型を比較した。

【結果】

判定された DNA 型 (推定アレル) 576 件のうち、「HLA

推定アレル一覧表」で頻度が 0.01% 以下であったのは 30 件 (5.2%) であった。当検査室でこれまで判定したことがなかった HLA 型は A34, A68, A74, B18, B41, B53, B63, B77 で、B77 は FlowPRA Screening[®] のパネルに含まれていなかった。また DNA 型の A*24:07, A*24:10, B*07:05, B*15:25, B*15:35, B*35:05, C*12:05, DRB1*14:07, DRB1*15:04 は LABScreen Single Antigen[®] のパネルに含まれていなかった。

【考察】

日本人以外のタイピングでは頻度の低い型が判定されていた。頻度が低い型の場合、WAKFlow[®] だけではなく MicroSSP[®] も併用し、総合判定を結果としている。また抗体検査において、ドナーと同じ型がパネルに含まれているかどうかは重要な情報である。今後も日本人以外の検査数は増加していくと考えられ、検査室としてこれらの検査が正確にできるように体制を整えていくことが必要であると考えられる。

6) 次世代シーケンサー (NGS) による HLA タイピングで確認された新規アレルについて

○田中秀則, 宮崎有紀, 小島裕人, 北嶋友人, 西川美年子, 佐治博夫

公益財団法人 HLA 研究所

【目的】 現状の HLA タイピングは, 蛍光ビーズによる Luminex 法が主流で, 第 2 区域までをみなし判定していることからあいまいさが残る。また, DQ 座や DP 座は検査が実施されていないことがほとんどである。そこで今回, 次世代シーケンサー (NGS) を用いた HLA タイピングによって, あいまいさを解消するとともに, DQ 座, DP 座の検査を実施したところ, 新規アレルが検出されたので報告する。

【材料・方法】 当研究所に NGS による HLA タイピング依頼のあった 2,909 検体について, Scisco Genetics 社製キット (Short Range) を用いてタイピングを行った。NGS による解析対象領域は, HLA Class I は exon1-7, HLA Class II は exon1-4 (ただし, HLA DPA1 は exon2-4) であり, 測定機器として Miseq (Illumina 社) を用いた。

【結果】 HLA 新規アレルとして 26 アレルが検出され, その内 5 アレルは家系内で同一の多型が確認された。また, 各座の内訳は, A 座で 3 アレル, B 座で 1 アレル, C 座で 3 アレル, DRB1 座で 1 アレル, DRB3 座で 2 アレル, DRB4 座で 1 アレル, DRB5 座で 1 アレル, DQB1 座で 5 アレル, DQA1 座で 1 アレル, DPB1 座で 4 アレル, DPA1 座で 3 アレルであった。

これまで骨髄バンク等で HLA-A, B, C, DRB1 座のタイピングが実施されており, 新規アレルも検出されているが, NGS による HLA タイピングでは, DQA1 座, DQB1 座, DPA1 座, DPB1 座でも新規アレルが検出された。また, 検出された新規アレルについては, その由来および変異部位での細胞性免疫等への影響の可能性について検証を行う予定である。

7) SSOP 法 HLA タイピング検査において、肝臓移植後にドナーの HLA が 検出された一症例

○万木紀美子¹⁾, 吉澤 淳²⁾, 菱田理恵¹⁾, 三浦康生¹⁾, 平位秀世¹⁾, 上本伸二²⁾, 前川 平¹⁾

京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部¹⁾, 京都大学医学部附属病院 肝胆膵移植外科²⁾

【はじめに】肝臓移植においては、HLA タイプが homo to hetero の組み合わせの場合、移植後 GVHD の発症率が高いことから禁忌とされている。当院での移植前検査では、ドナーの HLA タイピングが最優先で実施されている。今回、1 歳 2 カ月男児に対して、ドナーの母親は homo 接合でなかったにもかかわらず、移植後 GVHD 症状をきたして HLA タイピング SSOP 法にてキメラ状態となった症例を経験したので報告する。

【方法】肝臓移植前のドナーとレシピエントの DNA および移植後 GVHD 症状を来した時点のレシピエントの DNA について SSOP 法にて HLA タイピング (WAKUFlow タイピング試薬) を実施した。また、対照としてドナーとレシピエントに HLA 不一致があり且つ移植後 GVHD 症状のないレシピエントについて移植後 1 日, 3 日, 4 日, 26 日, 37 日目の HLA タイピングを実施してタイピング試薬の各プローブに対する反応性に変化がないか検討した。

【結果】患者は 1 歳 2 カ月男児。

HLA-A(2,24), -B(7,48), -Cw(7,8), -DR(1,4), -DQ(5,8)。ドナーである母親は HLA-A(24,26), -B(7,51), -Cw(7,14), -DR(1,14), -DQ(5,5)。血液型は B to O で不適合。術後から MMF 使用。ステロイド抵抗性拒絶のため移植後 15 日,

19 日に basiliximab (抗ヒト IL2R α 鎖抗体) が使用された。移植後 24 日より全身発赤が出現して 28 日生検にて皮膚 GVHD と診断。98 日に下痢・嘔吐出現して消化管 GVHD と診断。100 日より汎血球減少が出現した。移植後 35 日の患者検体において HLA タイピングを実施した結果、患児が陰性でドナーが陽性であったプローブに対して陽性となり、キメラ状態になったと考えられた。プローブに対する反応は MFI で移植前の患児 53, ドナー 5,252 に対して移植後の患児は 629 と高値であった。対照で実施した他の肝臓移植ペアでは、移植後 1 日においてはドナーの陽性プローブに若干の反応が認められるものの、移植後 3 日以降で検討した症例ではドナーの影響はなかった。

【考察】移植術中に RCC-LR 2 単位 1 バッグおよび FFP-LR240 が 1 バッグ使用された。赤血球製剤については院内で 25 Gy の放射線照射を実施しており、またドナーの HLA が検出されたことから輸血後 GVHD の可能性は否定された。homo to hetero の組み合わせでない場合においても GVHD を発症し、キメラ状態となることが判明した。非常に稀な症例であるが、今後注意が必要と考えられた。

8) 脳死片肺移植後の GVHD

○野口未紗¹⁾, 本山秀樹¹⁾, 進藤岳郎²⁾, 宮原 聡¹⁾, 中ノ坊亮¹⁾, 尾田博美¹⁾, 中島大輔¹⁾, 濱路正嗣¹⁾, 青山晃博¹⁾, 陳 豊史¹⁾, 伊達洋至¹⁾

京都大学医学部附属病院 呼吸器外科¹⁾, 血液内科²⁾

症例は 59 歳女性。少量ステロイドの維持投与を要する皮膚筋炎に合併した間質性肺炎に対し、10 代男性をドナーとする脳死右片肺移植を施行した。術後 13 日目に発熱を来し、その後皮疹と肝機能障害を伴う汎血球減少を呈した。異性間 FISH 法で骨髓液有核細胞の 14.3%、また皮疹組織浸潤細胞の 17.8% が正常男性核型を呈したことから、肺移植後の移植片対宿主病 (Graft-versus-Host Disease: GVHD) と診断した。

ステロイドパルス療法および G-CSF の投与により皮疹と白血球減少は改善したが、貧血・血小板減少と下痢、血痰が遷延し、骨髓・腸管および自己肺における GVHD と考えた。血栓性微小血管障害 (Thrombotic Microangiopathy: TMA) も発症したため、カルシニューリン阻害剤の減量・中止を要した。末梢血を用いた異性間 FISH 法では男性核型の比率が 5% (POD37) → 35% (POD57) → 62% (POD74) と増加し、特に POD62 の顆粒球分画はレシピエントタイプ (>95%) であったが、T 細胞分画はドナータイプ (90-95%) であった。その後肝障害が進行してステロイドパルス療法にも不応となったた

め、抗胸腺グロブリン (Anti-Thymocyte Globulin: ATG) を投与した。AST/ALT は低下したが、黄疸は改善せず、自己肺 GVHD が進行し、POD117 に死亡した。

本症例におけるドナーとレシピエントの HLA アリルは、下記の通りである。

Locus	A	B	C	DR
Donor	02:06/31:01	39:01/46:01	01:02/07:02	08:03/15:01
Recipient	02:01/24:02	40:01/51:01	03:04/15:02	14:54/15:01

HLA の部分一致を有する固形臓器移植後に GVHD を来すことがしばしば報告されるが、本例のように広範な HLA ミスマッチを有する移植でも GVHD を生じ得ることは重要である。また本例におけるキメリズムは顆粒球と T 細胞とで乖離をみたことから、同様の症例は潜在的に多く存在する可能性がある。本症例の臨床所見は非特異的であったが、その予後は不良であり、固形臓器移植後にも GVHD を生じることに改めて留意すべきである。

(14:10 ~ 15:40)

シンポジウム (1)

「HLA 不一致移植 (ハプロ移植) について」

座長 : 安井昌博 (大阪母子医療センター 血液・腫瘍科)

芦田隆司 (近畿大学医学部血液・膠原病内科)

1) 小児の血液・腫瘍性疾患における HLA 不一致移植

坂田尚己

(近畿大学医学部 小児科)

2) 小児固形腫瘍に対する HLA 不一致移植 (ハプロ移植)

HLA 一致移植との比較から

橋井佳子

(大阪大学大学院医学系研究科 小児科)

3) 非血縁者間骨髄移植における HLA 不適合の影響とその克服

諫田淳也

(京都大学医学部附属病院 血液内科)

1) 小児の血液・腫瘍性疾患における HLA 不一致移植

坂田尚己

近畿大学医学部小児科

同種造血幹細胞移植 (aHSCT) は小児領域の血液・腫瘍性疾患に治癒をもたらす治療法として確立されている。aHSCT に最も適したドナーは、HLA (human leukocyte antigen) 適合した血縁ドナー (HLA-matched related donor, MRD) である。HLA はヒトの主要組織適合性複合体で自己と非自己を認識する最も重要な抗原である。しかし、近年の少子化の影響もあり HLA 一致同胞からの aHSCT の頻度は減少している。第 2 選択としては、骨髄バンクからの HLA 適合非血縁ドナー (HLA-matched unrelated donor, MUD) が候補となるが、バンクに適合ドナーが見つからない、あるいは患児の状態よりコーディネート時間が待てない場合は、さい帯血バンクや HLA 不一致血縁ドナーからの aHSCT が適応となる。HLA 不一致移植では、一致移植と比較して、生着不全や重症 GVHD (graft-versus-host disease) の両方のリスクが高いことが問題点であった。しかし、近年、様々の方法により HLA 不一致の障壁を乗り越えられるようになってきている。本シンポジウムでは、小児の血液・腫瘍性疾患における HLA 不一致移植について、自施設の経験も含めて、現状と課題について報告する。

HLA 不一致移植においてエポックメイキングなのが、Science (2002 年) に報告されたペルージャの Ruggeri らの結果であった。彼らの提唱した KIR (Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor) リガンド不一致モデルにおいて、GVH 方向に不一致を認めた急性骨髄性白血病 20 例では移植後の再発率が 0% であった。その後、世界中で様々な aHSCT のセッティングにおいて、このモデルが検証されようとしたが、相反する結果が得られている。移植後の ATG や MMF の使用等が NK 細胞の抗腫瘍効果の発揮に影響を与えていることが考えられている。今後は、移植後 NK 細胞輸注も視野に検討が必要である。

NIMA (noninherited maternal antigens) 移植は、妊娠中に胎盤を通して児のリンパ球が母の体内に入っている場合があり、母児間で免疫寛容が成立していることを利

用した HLA 不一致移植法である。通常の GVHD 予防法により grade II-IV の急性 GVHD は 30% 程度と報告された。しかし、一部の症例では重症 GVHD が発症することも報告されており、今後の検討が待たれる。

HLA 不一致移植を克服する方法として、移植前に採取した骨髄血や末梢血より T 細胞除去や CD34 陽性細胞選択を施行した後に移植を行う方法が行われた (ex vivo purging)。しかし、近年は、T 細胞を含んだ移植片を投与し、前処置に引き続いて抗ヒト T 細胞グロブリン (anti-T cell globulin, ATG) を投与したり、移植後シクロフォスファミド (posttransplant cyclophosphamide, PTCy) による in vivo purging が主体となってきている。

米国 (ジョンズ・ホプキンス) より、移植前処置後の day 3-4 に、比較的高用量の CY を投与することで、選択的にアロ応答性 T 細胞を排除し、ドナーの制御性 T 細胞が温存することができ、生着と GVHD 発症予防が可能であることが示された。HLA 半合致移植の GVHD 予防法として定着しつつある。再発率が高いことが問題であるが、種々の対策が試みられている。小児領域では PTCy を用いた HLA 不一致移植の報告は少ない。また、PTCy では GVHD のコントロールが良好であることから、非腫瘍性血液疾患への試みも行われている。

ATG を移植前処置時に投与することで、HLA 不一致があった場合も重症 GVHD 発症を抑制し、再発や重症感染症の発症に影響を与えないことが、多くの臨床試験から明らかになってきている。重症 GVHD の発症を抑えつつ、GVL (graft-versus-leukemia) 効果を保持するためには、ATG の投与量や投与のタイミングが非常に重要となる。私たちは HLA 不一致移植において比較的少量 (2.5 mg/kg) の ATG を用いることにより、重症 GVHD の発症を抑制しつつ、HLA 一致の移植成績と同等の成績が得られることを経験している。今後、ATG の体内でのカイネティクスや血中濃度に影響を与える要因についての研究も必要と考えられる。

2) 小児固形腫瘍に対する HLA 不一致移植 (ハプロ移植) : HLA 一致移植との比較から

○橋井佳子, 宮村能子, 吉田寿雄, 大藪恵一

大阪大学大学院医学系研究科 小児科

[緒言] 小児固形腫瘍は化学療法に感受性が高く, 疾患によっては自家造血細胞救援大量化学療法がおこなわれ通常化学療法より有効性が示されている。しかしながら大量化学療法では救命できない症例が存在する。こうした症例に対し, 当科では 2000 年から同種造血細胞移植を用いた免疫学的効果による抗腫瘍効果 (GVT: graft versus tumor) を期待して大量化学療法後同種造血細胞移植を開始した。その後, 一部の症例では免疫学的効果に期待し晩期合併症の軽減のために骨髄非破壊前処置後に同種造血細胞移植をおこなっている。本シンポジウムでは当院においておこなった HLA 不一致移植 (ハプロ移植) と HLA 一致移植 (一致移植) を TRUMP データを用いて解析, 比較し小児固形腫瘍に対するハプロ移植の可能性を考察した。

[症例] 対象はハプロ移植例 7 例, 一致移植例 18 例, 19 回である。造血細胞移植後の拒絶ために救援例は解析から除いた。年齢および性別はハプロ移植例 4 ~ 12 歳, 中央値 6 歳 (女児 4, 男児 3), 一致移植 1 ~ 16 歳, 中央値 7 歳 (女児 7, 男児 11) である。疾患はハプロ移植では神経芽腫 4, 横紋筋肉腫 2, ユーイング肉腫 1 例, 一致移植例は神経芽腫 10 例, 横紋筋肉腫 5 例, ユーイング肉腫 2 例, ウイルムス腫瘍 1 例, 髓芽腫 1 例である。診断時病期は全例 stage4, もしくは M3 例である。また移植時病期はハプロ移植は第一寛解期が 1 例, 第二寛解期が 3 例, 第三もしくは部分寛解例が 3 例, 一致移植例は第一寛解期が 6 例, 第二, 三寛解期もしくは部分寛解例が 11 例, 不応性が 2 例であった。ハプロ移植のうち 2 人, 一致移植のうち 3 人は計画的複数回移植である。

初期は主に Thiotepa/Melphalan もしくは Busulfan に Fludarabine を追加した。その後は Cyclophosphamide/Melphalan に Fludarabine を用いたが頻回再発例が多いため前処置は症例により工夫せざるを得なかった。2 例を除き GVHD 予防は Tacrolims+short MTX である。

[移植成績] ハプロ移植では全例が生着し一致移植では 2 例が生着前に VOD, ARDS で死亡した。急性 GVHD はハプロ移植では II-IV は 3 回, 一致移植では 5 回にみられた。慢性 GVHD はハプロ移植の 3 例は治療に反応し回復した。一致移植では評価可能な 17 回のうち 6 回で全身型であり, うち 1 例は肺障害のため肺移植をうけた。移植時の重篤な有害事象はハプロ移植では膀胱炎 2 回, 敗血症 1 回, 一致移植では敗血症 3 回, 骨髄炎 1 回, 膀胱炎 2 回であった最終転帰はハプロ移植で 1 例再発, 1 例が二次がんで死亡したが, 5 例が寛解生存している。一致移植例では 10 例が再発し死亡した。症例数は少ないが 5 年生存率はハプロ移植では 85%, 一致移植では 38% であった。

[考察] 症例数は少ないがハプロ移植は一致移植と比較して急性, 慢性 GVHD や移植時合併症, 拒絶の発生頻度は多いとは言えなかった。一方, 有効性は期待できる結果であった。

小児固形腫瘍に対する同種造血細胞移植時の移植ソースとして, より免疫学的効果が強いと考えられるハプロ移植もひとつの手段である。今後は前処置を軽減した骨髄非破壊の前処置後ハプロ移植も晩期合併症の軽減が期待できる移植方法であると考えられる。

3) 非血縁者間骨髄移植における HLA 不適合の影響とその克服

諫田淳也

京都大学医学部附属病院 血液内科

造血幹細胞移植において HLA 不適合数が増加するにつれ、移植片対宿主病 (Graft-versus-host disease, GVHD) の発症頻度が上昇し、全生存率が低下することが知られており、HLA 適合ドナーからの移植が第一選択肢と考えられている。HLA-A, -B, -C, -DRB1 座 1 アリル不適合非血縁者間骨髄移植においては、本邦では HLA-A, HLA-B 座不適合が GVHD 発症頻度と強い相関を持つことが示されていた。日本造血細胞移植学会 HLA WG にて、骨髄破壊的前処置を用いた HLA1 アリル不適合移植の解析が行われたが、1993 年から 1999 年の移植においては、特に HLA-B 座不適合移植において死亡リスクは上昇していた。しかし 2000 年から 2009 年の移植においては、各座不適合の全生存率に対する影響はほとんど差がないことが明らかとなっている。このことは時代に伴う GVHD 予防法等の変化により HLA 不適合座の移植成績に及ぼす影響が変化してきていることを示している。また、重症 GVHD のリスクが高いドナー・患者の HLA の組み合わせが報告されているが、2002 年以降の移植においては 1 アリル不適合移植に限定すると、その差は有意ではなくなっている。

しかし時代とともに GVHD 予防法が変化しているものの、8 アリル適合移植と比較し、1 アリル不適合移植は GVHD 発症頻度の増加に伴い、生存率は 5-10% 程度低下するため、その克服が急務である。日本造血細胞移植学会 HLA WG において非血縁者間骨髄移植に対して抗胸腺細胞免疫グロブリン (anti-thymocyte globulin, ATG) 使用の有無が移植成績に及ぼす影響の後方視解析が行われた。用いられた ATG (thymoglobulin) の中央値は 2.5 mg/kg と低用量であった。ATG 投与群においては重症 GVHD リスク低下や致死率の低下が認められ、ATG 投与により HLA 不適合の負の影響が改善する可能性が示された。非血縁者間移植における ATG 投与の無作為割付試験は海外では複数行われているが、ATG 投与による GVHD 発症頻度の低下は示されているものの、全生存率に対する影響は一貫していない。またこれらの試験は主に HLA 適合非血縁者間末梢血幹細胞移植が対象である。そのため、現在、日本造血細胞移植学会主導の臨床研究として、HLA1 座不適合非血縁者間骨髄移植における低用量 ATG (thymoglobulin 2.5 mg/kg) の無作為割付試験を実施している。

(15:40 ~ 15:50)

休 憩

(15:50 ~ 17:20)

シンポジウム (2)

「臓器移植におけるクロスマッチ検査の進歩」

座長：高原史郎（大阪大学医学系研究科・先端移植基盤医療学寄附講座）

吉澤 淳（京都大学 肝胆膵・移植外科）

- 1) 腎移植におけるクロスマッチ検査の最新知見
—膜型抗体の段階での検知法と治療への応用—

今村亮一

（大阪大学泌尿器科）

- 2) 肝移植における抗ドナー HLA 抗体の最新の知見

吉澤 淳

（京都大学 肝胆膵・移植外科）

- 3) 肺移植におけるクロスマッチ検査の現状と今後の課題

陳 豊史

（京都大学大学院医学研究科 呼吸器外科）

1) 腎移植におけるクロスマッチ検査の最新知見 —膜型抗体の段階での検知法と治療への応用—

○今村亮一¹⁾, 松田佳子²⁾, 高原史郎²⁾

大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学講座 (泌尿器科学)¹⁾,
大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療学寄付講座²⁾

【はじめに】近年わが国においても, 末期腎不全に対する腎代替療法として, 腎移植術はすでに認知されている。ただし, 医療技術や免疫抑制剤の改良により移植後の短期生着率は著明に改善している一方, 長期生着率は十分満足できる成績とは言いがたい。この移植腎機能廃絶の一因として, 抗体関連型拒絶反応 (Antibody Mediated Rejection, 以下 AMR) が同定され, その主な原因が抗ドナー HLA 抗体 (Donor Specific Antibody, 以下 DSA) であることが認識されている。しかしながら侵襲性の低い早期診断法やその治療法は十分確立されていない。現在のところ最も有効な早期診断法は腎生検であるが, 侵襲性が低いとはいえ頻回に施行することは困難である。近年 Single Antigen Beads を用いた高感度の HLA 抗体測定法が開発され, 末梢血にて AMR を診断しうることになった。ただし初期段階では DSA は移植腎に吸着されてしまい, DSA が多量に産生され移植腎から overflow した状態でなければ末梢血から検出されにくい。この時点では腎機能が既に悪化していることが多く, 有効

な治療を行うことは困難である。AMR 早期診断のための簡便で再現性の高い, 新しいモニタリング法が求められている。【方法】AMR と診断された腎移植後レシピエント 16 例 (男性 8 名, 女性 8 名, 平均年齢 46.3 ± 17.0 歳) の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, 以下 PBMCs) を採取し, その上清を用いて Single Antigen Beads 法を施行, 抗体産生の有無を評価した。【結果】IgG 型 DSA が検出された症例は 1 例のみであったが, IgM 型 DSA は全例で検出された。これまでは検出法として IgG 型 DSA に着目されてきたが, 検出には 20 ml 以上の末梢血を必要とされている。一方 IgM 型 DSA の測定は 8 ml の末梢血で検出可能であった。【結語】これまで検出法として PBMCs での IgG 型 DSA に着目されてきたが, 得られる情報は血清と比較し限定的であるため臨床応用には至っていない。IgM 型 DSA は少量のサンプルで, 早期かつ高率に検出可能であり, 次世代の画期的診断法となりうることが示唆された。

2) 肝移植における抗ドナー HLA 抗体の最新の知見

○吉澤 淳¹⁾, 上田大輔¹⁾, 平田義弘¹⁾, 菱田理恵²⁾, 万木紀美子²⁾, 岡島英明¹⁾, 海道利実¹⁾, 前川 平²⁾, 羽賀博典³⁾, 上本伸二¹⁾

京都大学大学院医学研究科 外科学講座¹⁾, 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部²⁾,
京都大学医学部附属病院 病理診断科³⁾

【はじめに】臓器移植においてクロスマッチテスト陽性は成績不良因子とされているが、肝臓は比較的影響が少ないとされている。一方、近年、抗ドナー HLA 抗体 (Donor Specific Antibodies: DSA) の肝臓移植における抗体関連型拒絶反応 (AMR) の診断基準が提唱されている。我々は、以前に既存 DSA 陽性症例は有意に予後不良であり (1 年生存率 60%), さらに、グラフト肝不全に至る急性 AMR の報告を行った。そこで、既存 DSA 陽性症例に対しては、ドナー変更や周術期の脱感作療法を行い、AMR の回避および早期治療を行っていることでその成績を報告する。

肝移植長期経過における抗ドナー HLA 抗体 (DSA) の臨床的意義についても、いまだ明らかになっていない。肝移植における慢性抗体関連型拒絶反応の組織像は炎症細胞浸潤と肝線維化が特徴的であるが、これまで当施設において、小児症例および成人症例において DSA 陽性と肝線維化に有意な相関があることを報告してきた。今回、肝移植後長期経過における線維化に加え、肝障害の原因である移植後特発性肝炎 (IPTH) について考察する。

【方法】2009 年 10 月から 2016 年 12 月までに行なった生体部分肝移植 329 例を対象とした。術前に CDC に加え、FCXM, HLA Single Antigen Beads を用いた Luminex 法を行い、DSA の検出を行った。生体肝移植では DSA 強陽性症例については、ドナー変更または Rituximab による術前脱感作療法を行った。AMR は血中 DSA 陽性と肝生検病理所見および組織免疫化学染色による C4d 陽性所見によって診断を行った。当院で 2009 年 12 月から 2016 年 12 月までに肝移植後 1 年以上経過した症例で DSA の測定を行った症例は小児症例 (移植時 20 歳未満) 355 例, 成人症例 (移植時 20 歳以上) 242 例であった。

さらに DSA を測定した症例のうち、IPTH の診断をした症例は 34 例であった。DSA は Single Antigen Beads を用いて Luminex で測定した。

【結果】CDC 陽性症例は 8 例, FCXM 陽性症例 14 例, Luminex 法による DSA 陽性は 33 例であった。4 症例でドナー変更を行った。CDC 陽性症例に対して術前リツキシマブ投与を行った。AMR 症例に対しては、大量免疫グロブリン投与 (IVIg), ステロイドパルス療法を行い、3 例は血漿交換を行った。1 年生存率は DSA 陽性症例では 83.9%, DSA 陰性症例では 82.9% であった。(p=0.54)

De novo DSA 陽性率は成人症例 17%, 小児症例 38% であった。成人症例において DSA 陽性症例の中心静脈領域に架橋形成を認める進行した線維化が 50% に認められる一方、DSA 陰性症例では 3% と有意に DSA 陽性症例に線維化を認めた。(p=0.001) 小児症例においても DSA 陽性症例の架橋形成をとまなう線維化は 41.4% に認められたが、DSA 陰性症例では 22.4% と有意差を認めた。(p=0.04) IPTH を発症した症例の DSA 陽性率は 12% であった。

【考察】術前 DSA 陽性症例に対してはドナー変更、周術期脱感作療法により、致命的な AMR を回避しえた。AMR を認めた症例は、早期の診断と治療が有効であった。長期経過における DSA 陽性症例は、小児症例および成人症例において肝線維化との相関が強かった。その移植肝の予後に与える影響の評価には長期間の観察が必要である。慢性 AMR は治療困難であるため、その予防が重要である。晚期移植肝障害の原因となる IPTH では DSA との相関は認めなかったが、液性免疫の関与が示唆された。

3) 肺移植におけるクロスマッチ検査の現状と今後の課題

○陳 豊史¹⁾, 中島大輔¹⁾, 濱路政嗣¹⁾, 本山秀樹¹⁾, 青山晃博¹⁾, 万木紀美子²⁾, 菱田理恵²⁾, 前川 平²⁾, 伊達洋至¹⁾

京都大学大学院医学研究科 呼吸器外科¹⁾, 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部²⁾

【はじめに】腎臓や肝臓移植と異なり、肺移植においては、本邦のみならず、世界的にも、血液型不適合やクロスマッチ陽性移植は、基本的に行われていない。また、現在の脳死肺移植のアロケーションの際には、CDC クロスマッチ (T-cell) が陰性であることが条件となっている。一方、近年、MFI が高値の HLA 抗体を持っているレシピエントにおいては、フローサイトメトリー (FCM) を用いた、より高感度のクロスマッチ検査の有用性が肺移植実施施設において認識されている。

【目的と方法】京都大学における術前クロスマッチ検査の現状と今後の課題について検討する。

【結果】現状として、生体、脳死を問わず、肺移植ドナー・レシピエントにおいては、HLA タイピング (A, B, C, DR, DQ, DP) を全例で行っている。レシピエントにおいては、HLA 抗体を肺移植評価時に LABScreen Mixed でスクリーニング後に、Single Antigen を用いて同定している。また、クロスマッチは、CDC と FCM の両者を全例で行っている。なお、脳死ドナーについては、臓器移植ネットワークからの情報で移植を判断するが、ドナー臓器摘出の際に、ドナーの血液を持ち帰り、京都大

学でも HLA タイピングとクロスマッチを検査している (結果は移植術後に判明)。なお、HLA 抗体を用いたバーチャルクロスマッチを行っており、MFI<5000 を一つの基準としている。

上記システムの下で、生体肺移植においては、71 例中 2 例で、DSA 陽性であった。しかし、MFI は低く、全例 CDC, FCM ともにクロスマッチ陰性の症例で肺移植が行われており、大きな問題はなかった。脳死肺移植においては、80 例中 2 例で DSA 陽性 (DQ) であった。1 例では、FCM のみ陽性であったが、術後 DSA は消失しグラフト機能にも影響はない。一方、CDC, FCM 陰性であった別の 1 例では、術後繰り返す抗体関連拒絶により、術後 1 年で死亡した。

【結論】肺移植におけるクロスマッチ検査については、HLA 抗体のスクリーニングが有用であったが、現行のシステムでは、ドナーの HLA タイピングは A, B, DR のみであり、バーチャルクロスマッチは完全には機能していない。FCM 検査の有用性を評価するためには、全国規模での症例の検討が必要であると考えられた。

【日本組織適合性学会 MHC 投稿・執筆規定】 (平成 28 年 2 月 1 日改訂)

I. 概要

内 容：MHC に関する基礎研究から臨床研究まで全てを対象にし、未発表の論文、他誌に投稿中（もしくは掲載予定）でないものに限る。

資 格：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、ヘルシンキ宣言（「ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則」、1964 年第 18 回世界医師会ヘルシンキ総会採択、2013 年フォルタレザ総会修正）に基づき、文部科学省が定める関連倫理指針（「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」、「ヒト ES 細胞の分配及び使用に関する指針」、「ヒト iPS 細胞又はヒト組織幹細胞からの生殖細胞の作成を行う研究に関する指針」等）に従うと共に、当該施設の倫理委員会の審査を経て、施設長による承認を得たものでなければならない。また、遺伝子組換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（いわゆるカルタヘナ法）」、動物を用いた研究については動物愛護管理法に基づく「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（2006 年環境省告示）などを遵守し、それぞれ所属施設における関連委員会等にて所定の手続きによる審査・承認のもとに行われた研究でなければならない。

種 類：原著、総説、シリーズ、短報（研究速報、技術速報などを含む）、症例報告などとし、日本語、英語を問わない。

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、加筆などを求める場合がある。

著作権：本誌に掲載された論文などの著作権は日本組織適合性学会が有し、インターネットを通じて電子配信されることがある。とくに、原著、総説については、原則として科学技術振興機構（JST）

が運営する電子ジャーナル配信サイト（J-STAGE）にて配信される。

掲載料：掲載は無料であるが、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、投稿原稿にその旨を明記すること）。

別 刷：別刷（抜き刷り）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を明記すること）。

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 点につき原稿用紙 1 枚分に該当するものとし、それぞれに表題を記載し、挿入箇所を本文に明記する。また、図説は別紙で作成し、本文の最後に添付する。本文は Microsoft Word で作成し、表は Microsoft Word もしくは Microsoft PowerPoint、図、写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は記憶媒体（CDR 等）に保存もしくは Email 添付で投稿レターを添えて編集長に送付する（送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照）。

2. 第 1 頁目

表紙とし「原著」を明記し、日本語と英語でタイトル、著者全員の氏名と所属に加えて、連絡責任者の住所、氏名、電話番号、FAX 番号、E-mail アドレスを記載する。なお、タイトル、著者名、所属の記載は下記の形式に従う。

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

Tetsuya Takao¹, Akira Tsujimura¹, Masaharu Sada², Reiko Goto², Minoru Koga³, Yasushi Miyagawa¹, Ki-yomi 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 頁目から、和文要旨 (400 字以内) および 250 words 以内の英文要旨、キーワード (日本語および英語、それぞれ 5 語以内) を記載する。なお、英文要旨について、著者グループのみでは作成が難しい場合には、編集委員会による対応も可能であるので、投稿ライターにその旨を明記すること。

・ページ替えて、「はじめに」、「材料と方法」、「結果」、「考察」、「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。
- ⑤遺伝子名 (シンボル) はイタリックで表記する。例えば、*HLA-DRB1* (タンパク名として用いる場合はイタリックにしない)

4. 本文二：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。
- ③遺伝子名 (シンボル) はイタリックで表記する。例えば、*HLA-DRB1* (タンパク名として用いる場合はイタリックにしない)

5. 本文三：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、引用順に一括して、以下の例に従って、著者名、論文名、雑誌 (もしくは書) 名 (英文の場合はイタリック表記)、巻 (号)、最初と最後のページ、発表年を記載する。著者名、編集者名は筆頭者から 3 名まで列記し、4 名以上は他または *et al.* とする。

1. Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, *et al.*: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* 127(1-3): 233-238, 2005.
2. Tongio M, Abbal M, Bignon JD, *et al.*: ASH#18: HLA-DPB1. *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication* (ed. Charron D), Medical and Scientific International Publisher, p. 134-136, 1997.
3. 難波行臣, 今尾哲也, 石黒 伸 他: 既存抗体陽性生体腎移植後に生じた抗体関連型拒絶反応に対して血漿交換および免疫グロブリン大量療法 (IVIG) が奏効した 1 例. *血管外科* 17(1): 36-40, 2005.

4. 佐田正晴, 高原史郎: 腎移植一組織適合と拒絶反応. 新図説泌尿器科学講座 6「腎疾患, 神経泌尿器科, 老年泌尿器科」(吉田修 監修), Medical View 社, p.120-125, 2000.

III. 短報 (研究速報, 技術速報などを含む), 症例報告執筆書式

1. 執筆要項

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点につき原稿用紙1枚分に該当するものとし, それぞれに表題を記載し, 挿入箇所を本文に明記する。また, 図説は別紙で作成し, 本文の最後に添付する。本文はMicrosoft Wordで作成し, 表はMicrosoft WordもしくはMicrosoft PowerPoint, 図, 写真はMicrosoft PowerPointを使用する。原稿は記憶媒体(CDR等)に保存もしくはEmail添付で投稿レターを添えて編集長に送付する(送付先は投稿・執筆規定の末尾を参照)。

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内
 日本組織適合性学会誌 MHC
 編集長 木村 彰方
 担当 谷本 佳澄 <E-mail: tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp>
 Tel: 06-6879-3746 Fax: 06-6879-3749

2. 第1頁目

表紙とし「短報」「症例報告」を明記し, 日本語と英語でタイトル, 著者全員の氏名と所属, 連絡責任者の住所, 氏名, 電話番号, FAX番号, E-mailアドレスを記載する。タイトル, 著者名, 所属等の記載は「原著」の形式に従う。

3. 本文 (日本語および英語での投稿)

- 2頁目に, 英文要旨 (200 words 以内), キーワード (3語以内) を記載。
- 3頁目以降は, 原著執筆書式 3. の3頁目以降に準じる。

IV. 総説, シリーズその他

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, 英語のいずれも可とする。総原稿枚数は編集委員会で指定し, 原著執筆書式に準じるが, 本文構成の一部(「材料と方法」, 「結果」, 「考察」等)については, 適宜変更することも可能である。

	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

今回も中島文明先生に第21回HLA-QCワークショップレポートの監修をお願いした。HLA-QCも21回をむかえ、血液疾患や臓器移植などの様々な検体を扱う検査ラボがQCによって毎年高レベルで安定した検査を実施できるようになった。HLA-QCは日本組織適合性学会が今後も基礎・臨床面で高い評価を維持するために必須の活動となっている。

また総説として、第26回日本組織適合性学会大会の学術奨励賞「最優秀賞」を受賞された鶴田未季先生と、西村泰治先生の共著で「がん免疫療法におけるがん抗原ワクチン療法の現状と将来展望」を寄稿していただいた。今後世界中で広まるがん抗原ワクチン療法の実際と課題を解りやすく解説された。

さらに今回は第16回日本組織適合性学会・近畿地方会の抄録集を掲載している。近畿地方会は日本組織適合性学会の分科会としては最も活発な活動を継続しており、今後の他の地区の地方会の指針となる内容である。

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](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

〒113-0033 文京区本郷7-3-1

東京大学大学院 医学系研究科

人類遺伝学分野内

Tel & Fax：03-5802-2907

E-mail：hlajimu@m.u-tokyo.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：075-415-3661

FAX：075-415-3662

Email：jshi@nacos.com