

## 2020年 One Lambda Asia Workshop レポート

株式会社ベリタス 技術グループ  
藤原 千恵、山本 希、栗原 優太、益尾 清恵、横沢 佑弥



### 背景

One Lambda Asia Workshop は上海、東京、シンガポール、台北、香港、大阪と続き、昨年 2019 年は再びシンガポールでの開催でした。しかし、2020 年は世界を巻き込んだコロナ禍によりオンライン開催となりました。例年、各国から 30-50 名が参加するワークショップですが、今年はオンラインということもあり 300 名以上が参加登録し、最新情報を共有できました。弊社からも例年より多くのメンバーが参加してきました。

本稿では 5 日間にわたる One Lambda Asia Workshop の内容を共有いたします。(Day 1 は LinkSeq (qPCR 試薬) のソフトウェア解説のため省略)

### Day 2 : TSV 2.0

2 日目は次世代シーケンシング (NGS) による HLA タイピングアッセイ「AllType™ NGS」の解析ソフトウェア「TypeStream™ Visual (TSV) 2.0」についての講演でした。本セッションでは、今年 4 月にリリースされた TSV 2.0 の機能紹介と幾つかのケーススタディーが紹介されました。TSV 2.0 は「ユーザーフレンドリー」、さらに「高精度のタイピングアルゴリズム」をコンセプトに改良が加えられました。

#### TSV 2.0 の主な特長や機能

- 解析結果トップ画面の変更：読み込んだすべての検体の 11 ローカスの結果が一度に表示され、それぞれの状況が

カラーなどでわかりやすく表示 (Fig. 1)

- データベースのマージ・アップグレード：解析用の SQL データベースをマージ、TSV 1.3 で使っていたデータベースを TSV 2.0 用にアップグレード可能
- 高精度のタイピング：解析アルゴリズム改良により、ミスタイピングを低減
- Health Metric のカスタマイズ：ユーザー自身が結果の判定基準を Level 設定可能で、Level に応じて Warning としてコメント表示 (Fig. 2)
- Assignment のカスタマイズ：タイピング結果の最終的な結果報告形式を設定可能 (2 桁～8 桁、P group など)
- Comparison tool によるデータ比較機能：解析結果を簡単に比較できる機能の追加。ソフトウェアのバージョンや IMGT バージョン、Analysis Parameters の設定による結果の違いをエクセルで出力
- HLA Fusion™ との互換性：TSV 2.0 での正確なタイピングデータは Patient record として HLA Fusion へ容易にトランスファーが可能。LABScreen Single Antigen との組み合わせでドナー特異的抗体 (DSA) 解析に有用
- 解析したセッションの圧縮：zip ファイルにすることで 80% のサイズダウン
- Blast 検索：マッピングされたリードの Blast 検索が可能 (インターネット接続時)

TSV 2.0 ではユーザーの施設基準に合わせ、NGS アッセイでのタイピングをより効率的におこなえます。現在も改良を続けているとのことで、今後さらに使いやすいソフトウェアになっていくことが期待されます。

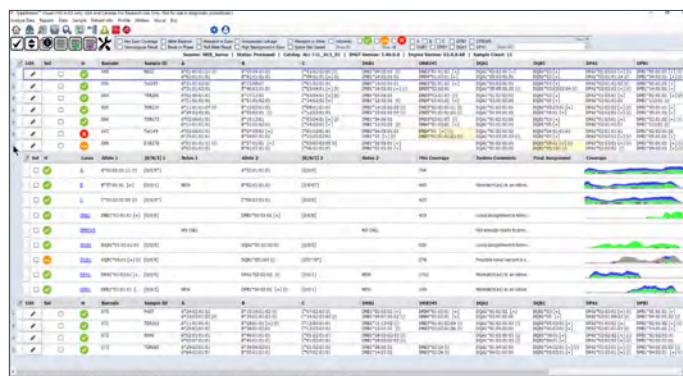


Fig. 1. TSV 2.0 の解析トップ画面

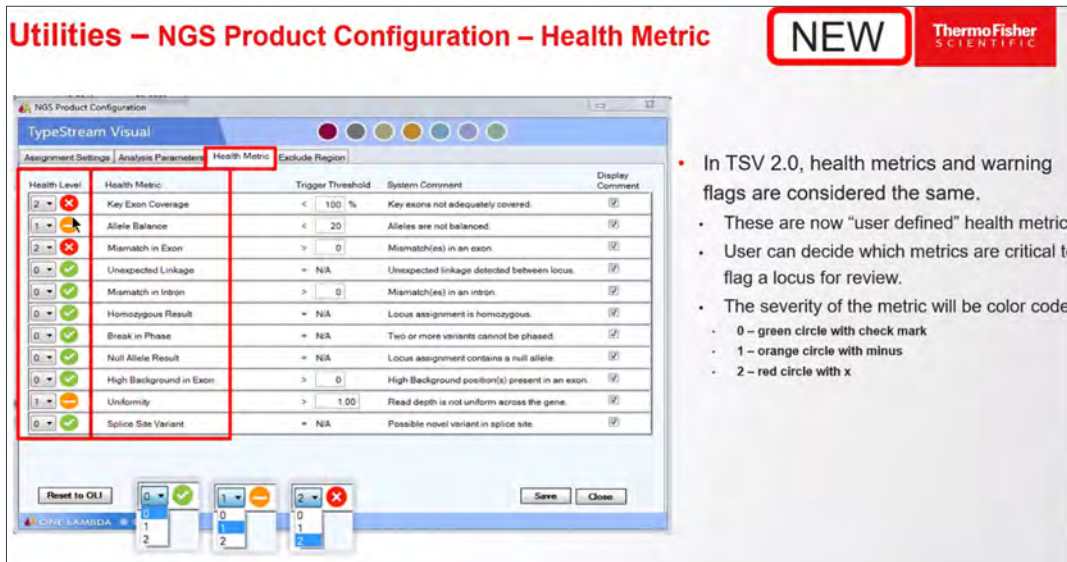


Fig. 2. Health Metric のカスタマイズ画面

- In TSV 2.0, health metrics and warning flags are considered the same.
- These are now "user defined" health metrics
- User can decide which metrics are critical to flag a locus for review.
- The severity of the metric will be color coded
  - 0 – green circle with check mark
  - 1 – orange circle with minus
  - 2 – red circle with x

### ケーススタディーまとめ

AllType NGS アッセイと他のアッセイ (LABType/ マイクロ SSP/NXType) で結果が異なったケーススタディーが紹介された中で、本稿では 2 つを紹介します。

1 つは他の手法で検出できなかったアレルが、NGS でタイピングできた例が示されました。この検体では LABType (SSO 法) で使用しているプローブ領域に変異があり、正しくタイピングができませんでした。しかし、AllType NGS + TSV 2.0 にて複数のミスマッチの組み合わせ出現率を表示させる機能を使うことで、新規アレルを確認できました (Fig. 3)。

Technical Analysis					
ALLTYPE 11-Loci Result					
However when we look at the reads including positions 142 and 144 (downstream positions) you can see that phasing is as follows:					
	Pos 97	Pos 103	Pos 106	Pos 142	Pos 144
Consensus	C & T	T & G	G & A	T & A	A & C
B*15 :210	C	G	A	T	A
B*15 :03:01	T	G	A	T	A
B*44:03:01	T	G	A	A	C
B*44:103	C	T	G	A	C
Novel	C	T	G	T	A

Fig. 3. NGS タイピングによる新規アレルの確認

2 つ目は NGS 法で使われたプライマー領域にミスマッチがあることが原因で、PCR 増幅がうまくいかずタイピング結果が他の手法と異なった例が示されました。これら検体は最新のバージョンである AllType NGS 法でのアレルドロップが報告されました。従来の NXType NGS ではうまく結果がでていたものが、バージョンアップした AllType NGS ではプライマー領域が拡張されており (Fig. 4)、正確なタイピングが実現できなくなりました。

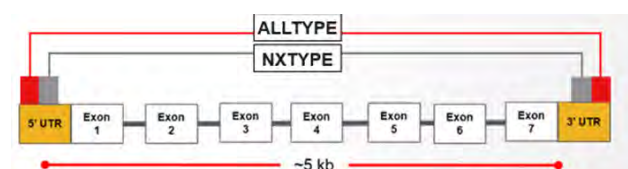


Fig. 4. NXType と AllType のプライマー領域の違い

HLA アレルは近年ますます登録数が増加しています。とくにイントロン領域の多型はデータが不十分で、イントロン領域が不確実なアレルも多く登録されています。製品開発やバリデーションで用いた QC パネルとは異なる部分に変異がある検体では、同じアレルとされていても正しくタイピングできないことがあります。One Lambda 社ではこのようなケースが発覚した場合には、Fig. 5 のような報告がウェブで表示されます。

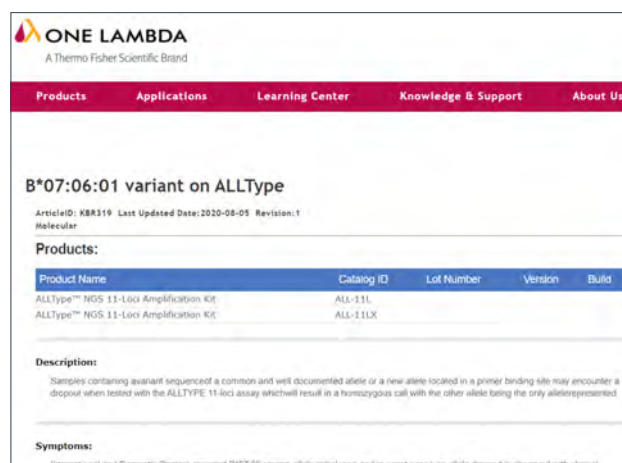


Fig. 5. QC パネルと異なる部分に変異がある検体の表示例

幾つかのケーススタディーから一般的に NGS アッセイのデータ解析の注意点を下記にまとめました。

- Total read が十分か：デフォルトは 30 万リード / サンプル
- 各ローカスのリード数にばらつきがないか
- Coverage が低くないか
- Health metrics で Warning が出ているか
- ミスマッチが複数ある場合、位置およびミスマッチの組み合わせと割合

### ベリタスからのコメント

膨大な HLA アレルの多型および多型内の変異すべてに対応できる手法は現在ありません。アッセイの異なる複数の手法で確認検査をすることも必要と思われます。NGS によるタイ



ピングの精度もまだ完全ではありません。ただし、今回紹介されたケーススタディーのように、NGSは新規のHLAアレルやイントロン領域の変異を発見する強力な手法です。One Lambda社では今後も精度の良いNGSタイピングのため、ケーススタディーのようなデータを元にプライマー等を改良するとのことでした。また、TSVの次のアップデートではBローカスとCローカスの関連性を示すB/C Linkage機能の追加を予定しているとのことでした。

このようにユーザーからのフィードバックも重要な情報となります。アッセイ手法やNGSタイピング解析で気になる点がありましたら是非お知らせください。

## Day 3 : HLA Fusion 4.4

3日目はHLA Fusion 4.4の新機能の紹介とLABScreenの解析方法の解説でした。本稿では新機能のみ紹介いたします。

### CREG マップ

HLA Fusionの解析画面、上部赤枠の「2D CREG map」をクリックすると、「Sero」と「DNA」が選択できるようになり、「Sero」は2桁、「DNA」は4桁でCREGマップが表示されます(Fig. 6)。また次頁に紹介する方法でCREGマップをベースにアレルを選択し、解析画面へ反映することもできます。

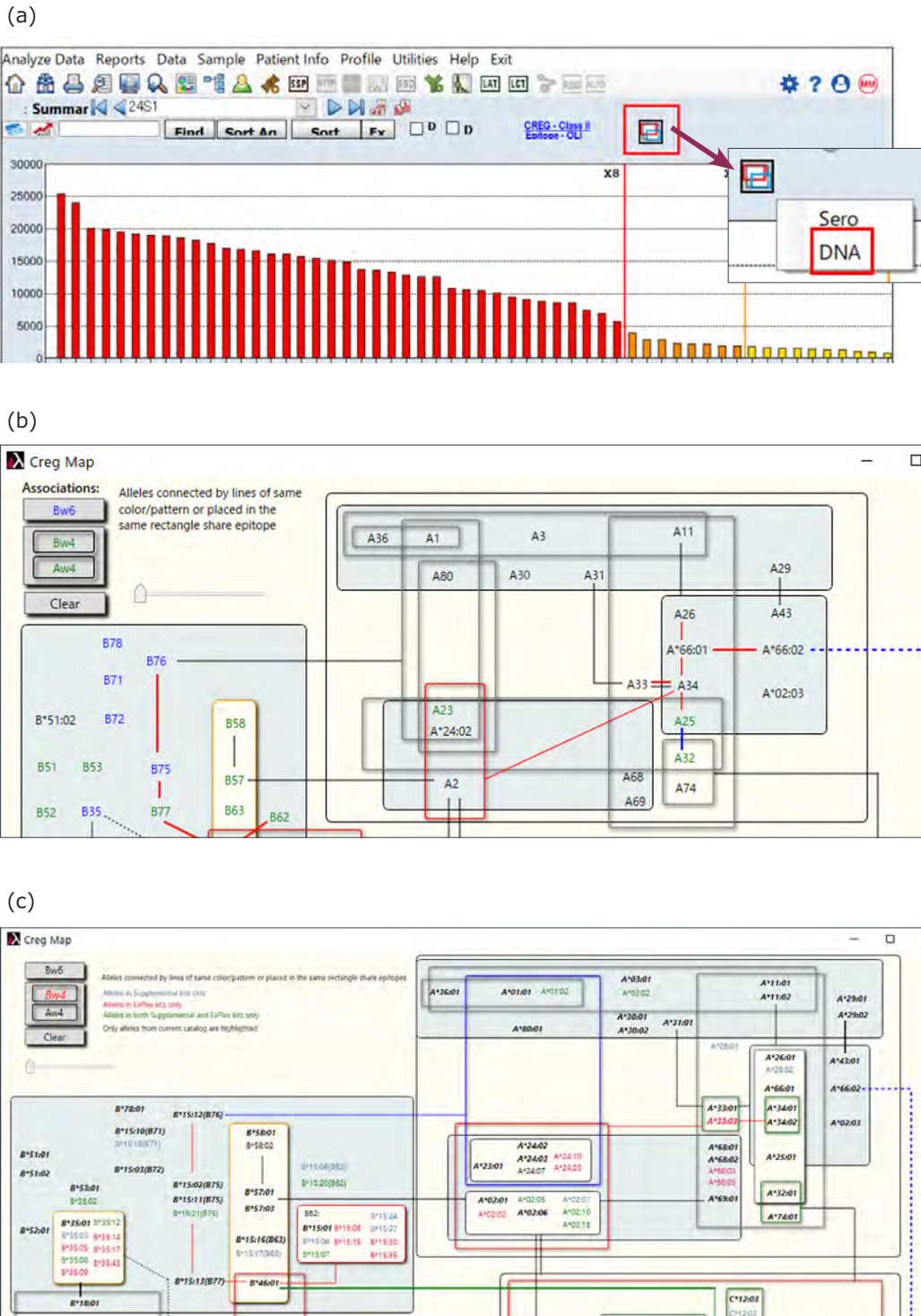
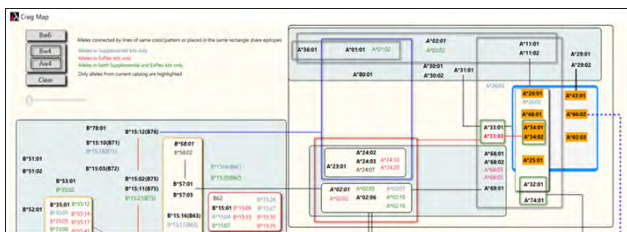


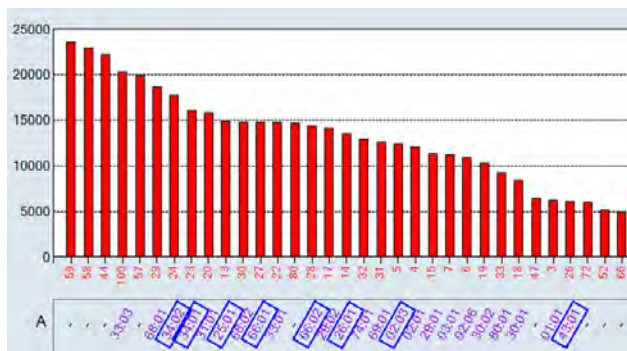
Fig. 6. CREG マップ。(a) HLA Fusion の解析画面から CREG マップを表示例、(b) 「Sero」 での表示例、(c) 「DNA」 での表示例

## CREG マップでアレルを選択し、解析画面に反映する方法

1. CREG マップを開き、確認するアレルを選択（アレルはグループでの選択もできます。今回の例はグループを選択）
2. 選択したグループが青枠、試薬に含まれるアレルはオレンジで表示（Fig. 7）
3. CREG マップで選択したアレルは、HLA Fusion 解析画面中の青ボックスで表示（Fig. 8）



**Fig. 7.** CREG マップでグループを選択した例。A\*26、A\*34、A\*66 などの CREG グループが選択されています。A\*26:02 は使用した LABScreen Single Antigen には含まれないため、グレーで表示されます。

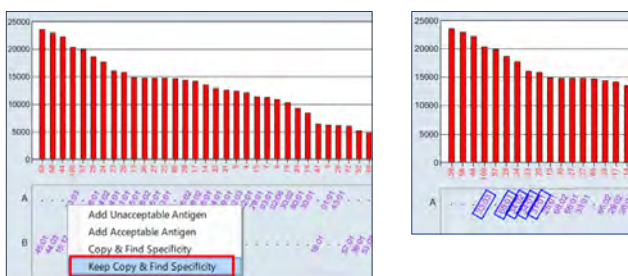


**Fig. 8.** HLA Fusion での解析画面例。Fig. 6 のように CREG マップでグループをアサインすると解析画面上ではそれに対応するピーズ（アレル）が青ボックスで示されます。

## 「Keep Copy & Find Specificity」機能

LABScreen PRA では 1 ピーズに複数のアレルがあり、また 1 種類のアレルが複数のピーズに含まれることもあります。そこで「Keep Copy & Find Specificity」の機能を使うことで、LABScreen PRA を用いたおおよその特異性 (Specificity) の推測が容易になります。

1. チェックしたいアレルにカーソルを合わせて右クリックし、「Keep Copy & Find Specificity」を選択
2. 「1」の操作を繰り返します
3. チェックしたアレルは青ボックス表示に切り替わります

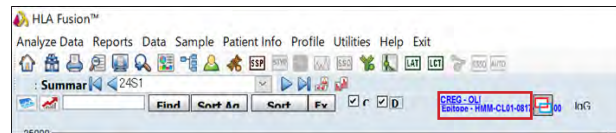


**Fig. 9.** Keep Copy & Find Specificity の方法 (左) と表示例 (右)

## エピトープのアサイン

エピトープ解析が今後重要になっていくと考えられる中で、従来は血清型やアレルのみのアサインでしたが、エピトープのアサインもできるようになりました。

1. 赤枠内の「Epitope」をクリックします



2. Epitopes ウィンドウが新たに開き、一覧で表示されます

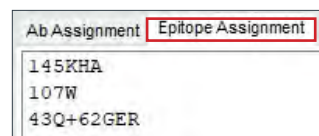
- ピンクのセル：解析画面で Final Assignment したアレル
- オレンジのセル：Final Assignment した中で試薬に含まれないが 2 桁レベルでは一致しているアレル
- 赤のセル：患者のアレル
- 黄色のセル：ドナーのアレル
- 青字：試薬に含まれるアレル
- 緑字：試薬に含まれないアレル

「Group Name」の列では、横軸のすべてがピンクまたはオレンジのセルになっているエピトープに関してピンクのセルになります。つまり論理的にはエピトープとしてアサインしても良いエピトープです。

3. アサインするエピトープを「Group Name」でダブルクリックすると「AA Position」の列が水色セルになりアサインが完了します。

Group Name	AA Position	Polymorphic Residues	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06
44TKH	42-143-144-145	142T143T144K145H	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06
45KHA	144-145-146	144K145H146A	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06
47W	44-95	94T95V	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06
47W	87	107W	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06
43Q+62GER	43 + 62-63-65	43Q + 62G63E65R	A*02:01	A*02:03	A*02:06	A*02:05	A*02:04	A*02:02
42GLS	65-163-167	162G163L167S	B*44:01	B*44:02	B*44:03	B*44:04	B*44:05	B*44:06
22GKZ	62-68-69-66	62G63E68P66K	A*02:01	A*02:03	A*02:06	A*02:05	A*02:04	A*02:02
59V	99	139V	B*44:01	B*44:02	B*44:03	B*44:04	B*44:05	B*44:06
46VA	245-246	245V246A	A*68:01	A*68:02	A*68:03	A*68:04	A*68:05	A*68:06
46SH	144-145-149	144K145H149T	A*02:03	A*02:01	A*02:02	A*02:04	A*02:05	A*02:06
11SM	11-12	11S12M	A*02:01	A*02:02	A*02:03	A*02:04	A*02:05	A*02:06
65RK	65-66-67	65R66K67V	A*34:01	A*02:01	A*02:03	A*02:05	A*02:06	A*02:04
166ES	163-166-167	163L166E167S	B*44:01	B*44:02	B*44:03	B*44:04	B*44:05	B*44:06
151AHV	150-151-152	150A151H152V	A*68:01	A*68:02	A*68:03	A*68:04	A*68:05	A*68:06
63NV	63-66	63N66V	A*33:03	A*68:01	A*33:01	A*34:02	A*02:01	A*68:02
127K	127	127K	A*68:01	A*68:02	A*68:03	A*68:04	A*68:05	A*68:06
62RNV	62-68-65	62R63N65R	A*33:03	A*68:01	A*33:01	A*34:01	A*34:02	A*68:02

4. 解析画面にて「Epitope Assignment」中に選択したエピトープがアサインされたことを確認します。



## ベリタスからのコメント

HLA Fusion 4.4 は今回紹介した幾つかの追加機能以外にも抗 HLA 抗体検査試薬の LABScreen のデータを解析するにあたり、便利な機能が各種盛り込まれております。そのような情報を定期的に共有するために、弊社では、ワークショップやメールニュースまたは技術刊行物を通じて今後も継続して発信してまいります。



## Day 4 : MatchMaker

4日目はケーススタディーを交えながら、エピトープ解析ソフトウェア HLA Fusion MatchMaker の紹介がありました。本稿では紹介された内容の中からポイントを抜粋してお届けします。

### HLA Fusion MatchMaker とは

- Dr. Duquesnoy が作成したフリーソフトの HLA Matchmaker と同じアルゴリズム
- LABScreen のデータを用いた解析を簡便にするために HLA Fusion 4.2 より追加
- LABScreen Single Antigen の結果を用いたエピトープ解析 (Epitope Analysis) と、ドナーとレシピエントのタイピング結果をもとにエピトープミスマッチ数の確認 (Epitope Matching) をする 2つの機能がある
- HLA Fusion への追加により簡便化された内容
  - カタログファイル等をデータベースにインポートする手間が省略 (従来の MatchMaker ではロットごとにマニュアルで実施)
  - 自己抗原やドナー抗原に由来したエピトープがわかりやすい
  - 容易にカットオフ値を変更可能
  - 陽性抗体だけでなく、陽性エピトープを判定可能

### エピトープ (Epitope) とは

抗体は抗原分子の全体と結合するのではなく、抗原上の数個のアミノ酸を認識して結合します。エピトープはその抗体が結合する抗原の一部のアミノ酸を指します。HLA は異なる抗原であっても共通するアミノ酸を保有するため、生体内において産生された抗体が共通エピトープを保有する複数の HLA 抗原と反応することがあります。

エピトープには機能的エピトープ (Functional Epitope) と構造エピトープ (Structural Epitope) があり、機能的エピトープをエプレットといいます。エプレットは 3Å (オームストロング) 程度のサイズといわれています (Fig. 10)。

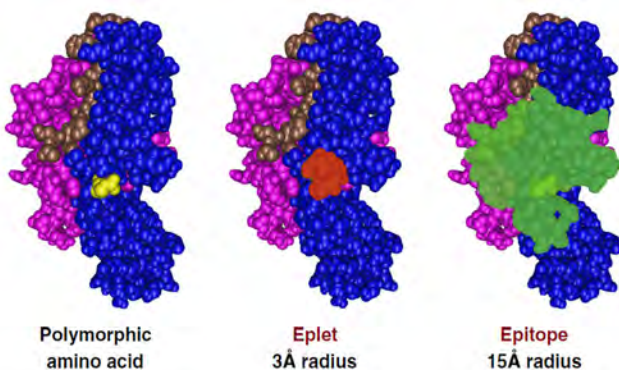


Fig. 10. アミノ酸 (左)、エプレット (機能的エピトープ: 中央)、エピトープ (構造エピトープ: 右) の模式図。(Am J Transplant. 2019; 19: 1708-1719. の図を一部改変)

## エピトープと CREG (Cross-Reactive Group)

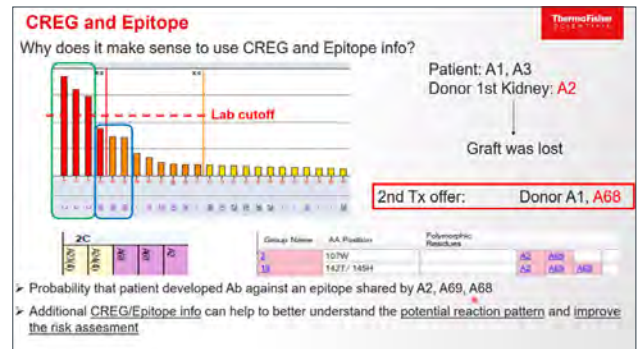


Fig. 11. CREG とエピトープの関連性

CREG は血清学による経験的なデータの蓄積により構築されたものであるのに対して、エピトープは DNA 構造から推定したアミノ酸配列に基づいて構築されたものですが、類似した反応を示すことが分かっています。上記の例 (Fig. 11) の場合、A2, A69, A68 は CREG では同じ 2C グループとなっており、エピトープで見ると 107W や 142T/145H といった同じエピトープをシェアしています。

1 度目の移植で A2 を保有するドナーの臓器を移植したことにより、A2 に対する抗 HLA 抗体が産生されています (Fig. 11 の緑ボックス)。LABScreen Single Antigen のデータでは A68 や A69 に対するビーズも A2 より低い nMFI で且つ Lab カットオフ値以下ではあるが反応を示しており (Fig. 11 の青ボックス)、これは上記の CREG/Epitope の考え方からすれば妥当であり、A68 をもつ 2nd ドナー候補は選択から外すべきと判断されました。このように CREG/Epitope の情報は LABScreen Single Antigen の結果の更なる理解と臨床へのフィードバックとして有用であるといえます。

### MatchMaker の機能紹介

#### ① Epitope Analysis

LABScreen の解析画面上的 MM ボタンをクリックして MatchMaker を起動すると、自動的にエピトープ解析の結果が表示されます。



ドナーと患者のタイピング結果を入力することで、より有意義な解析結果が得られます。

ある 1つのエプレットを「陽性」と判定する場合は、すべてのエプレットが陽性であることを Reaction Table で確認することが必要です (Fig. 12 - 13)。

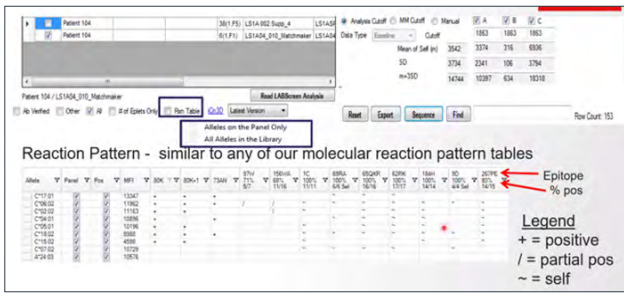


Fig. 12. Reaction Table の展開方法および Reaction Table の表示の見方

- + : すべてのアレルで陽性
- / : 一部のアレルで陽性
- ~ : 患者の HLA アレルに含まれるエピトープ

Allele	Panel	Pos	MFI	62RNQ	45EE	94TW	69AA	69AA+	9H	113YN
B*39:01			1628	+						
C*08:01			1605							
B*67:01			1568	+	+		+			
B*14:01			1527							
B*27:08			1434							
B*40:02			1367							
B*27:05			1366							
B*41:01			1365							
B*38:01			1329	+	+					
B*08:01			1302	+						
B*44:03			1244							
B*54:01			1218	+		+		+		
B*55:01			1207							
B*46:01			1160							
D*14:01			1162							

Fig. 13. Reaction Table 表示例。患者の HLA タイプは赤、ドナーは黄色で示されます。

## ② Epitope Matching

複数のドナー候補が存在する場合には、従来はアレルミスマッチ数をもとに判断されてきました。しかし Epitope Matching を利用することで、エピトープのミスマッチ数をもとにドナー選択をすることができます。



Fig. 14. Epitope Matching 解析例

Fig. 14 の場合、アレルミスマッチ数だけでは同じなのでドナー選択が困難でした。Epitope Matching の結果では母親のミスマッチ数が計 8 個、父親のミスマッチ数が 5 個であるため、エピトープミスマッチ数の観点では抗 HLA 抗体を産生する確率が低い父親の方がドナーとして適していると判断されます。

## ベリタスからのコメント

MatchMaker は移植前後における抗 HLA 抗体検査の解析補助ツールにすぎず、すべての抗 HLA 抗体検査の結果を説明できるわけではないことに注意が必要です。しかし、拒絶が起きた場合にドナーのタイプとエピトープをシェアしている HLA アレルに対して抗体が産生されることは事実であるため、予

期せぬ抗体が陽性となった場合の原因解明には有用なツールです。

今後、よりエピトープに関する研究が進み知見が集まるにつれ、Acceptable Epitope、Unacceptable Epitope などデータ解析する上で考慮することになるかもしれません。

## Day 5 : Cathi Murphey 講演

Asia Workshop の 5 日目（最終日）は、ゲストスピーカーとして University of Texas at San Antonio の HLA ラボの Director である Cathi Murphey PhD の講演がおこなわれました。本講演は臓器移植と造血幹細胞移植における抗 HLA 抗体検査のポイントなどがケーススタディーとともに紹介されました。

本稿に記載した幾つかは Cathi のコメントであり、すべてがガイドラインに基づいたものではありません。表現などの細かい部分は One Lambda 社のウェブサイトにある動画をご覧ください。

## イントロダクション

移植における臨床的意義のある抗体とは何なのでしょう？造血幹細胞移植と臓器移植において抗 HLA 抗体、IgG と IgM、補体依存性や IgG サブクラス、Class I と Class II などに対して解釈の仕方は変わってきます。また、Non-HLA 抗体 (autoantibody) に関してもアンジオテンシン II タイプ 1 受容体 (AT1R)、ビメンチン (Vimentin)、MICA などに関連していると報告されています。

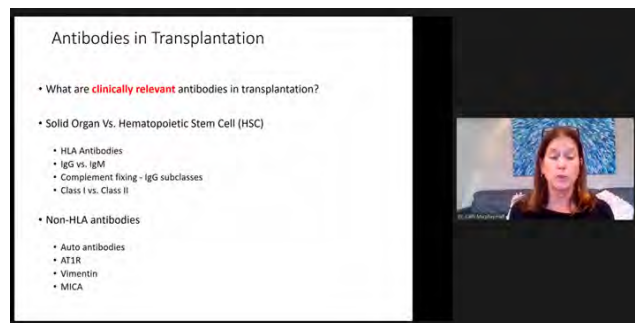


Fig. 15. Cathi Murphey によるオンライン講演

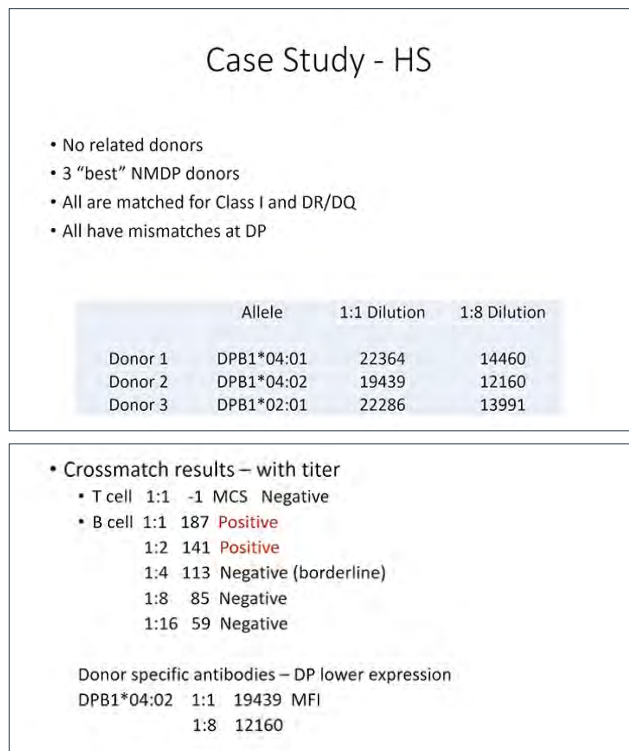
## 造血幹細胞移植

造血幹細胞移植には血縁関連のドナー、非血縁関連のドナーのケースがあります。非血縁関連ドナーの場合、DP アレルのミスマッチまでケアできていないことが多いので、生着不全に対して DP のミスマッチに注意が必要です (ケーススタディー: 造血幹細胞移植における抗 HLA-DP 抗体の項参照)。抗 HLA 抗体は nMFI が 5,000 以上はハイリスクとなりますが、それが DSA である場合には nMFI が 5,000 以下でも生着不全が起こりえます。また補体結合性 DSA と高い相関関係があるため、nMFI が 5,000 以上あるような患者は C1q についても



測定する必要があります。なお、ヨーロッパのガイドラインでは C1q のモニタリングを実施することを勧めています。移植前に DSA のある患者は脱感作をすべきで、適したドナーがない場合は移植を控えます。脱感作の目安は nMFI が 1,000 ~ 2,000 と考えています。脱感作後に抗 HLA 抗体を測定するタイミングは、血漿交換の場合はすぐに実施、化学療法の場合は 4-5 日後に実施するのが一般的ですが、それでも抗 HLA 抗体検査に影響を与える場合があるので注意が必要です。

### ケーススタディー：造血幹細胞移植における抗 HLA-DP 抗体



**Fig. 16.** ケーススタディー：造血幹細胞移植における抗 HLA-DP 抗体

本症例では非常に高い nMFI が DP ビーズで検出されましたが、B リンパ球のフローサイトクロスマッチの MCS (Mean Channel Shift) はそれほど高くありません。

DP は発現量が他のアレルに比べて少ないため、クロスマッチでは反応が弱いことがわかります。非血縁の場合は A/B/DR が同じ HLA タイプでも DP アレルが連鎖していないケースがあるので注意が必要です。ここでフローサイトクロスマッチの際に検体を希釈して測定しているのはプロゾーン現象を考えているためです。

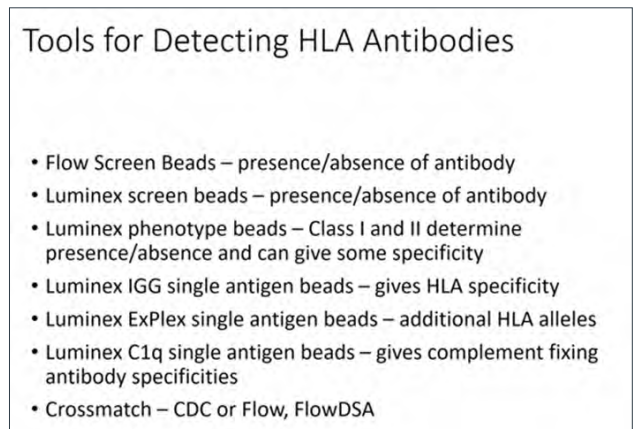
造血幹細胞移植患者に対しての抗 HLA 抗体検査のポイントは、下記の通りです。

1. 抗 HLA 抗体検査は必須
2. DSA がある患者は脱感作が必須
3. ドナー選択のためのガイドラインを見ること
4. 移植後もクロスマッチ、抗 HLA 抗体検査でモニターすること
5. DP ミスマッチによる抗体産生に注意すること

### 臓器移植

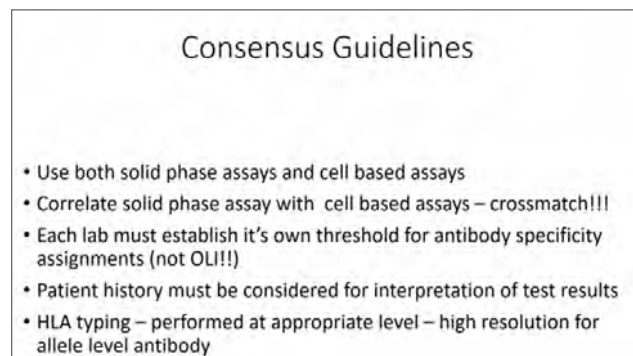
抗 HLA 抗体検査をするということは、どのようなことを考える必要があります。

抗 HLA 抗体検査には様々な方法があり、目的に応じた手法を選択します (Fig. 17)。例えば、心臓移植患者には高感度なクロスマッチが要求されますし、臓器移植全般におけるバーチャルクロスマッチに最適な特異性同定試薬の選択、さらには抗 HLA 抗体が陰性と想定される患者に最適なスクリーニング方法の選択など、目的に応じて使用する試薬や検査方法を選択する必要があります。大事なことは使用している検査試薬の特長や限界を知ることです。さらに得られたデータの解釈には、輸血歴や脱感作等の患者背景も非常に重要になります。



**Fig. 17.** 抗 HLA 抗体測定の方法と目的

コンセンサスガイドラインには重要な点が示されています (Fig. 18)。抗 HLA 抗体の特異性同定の際には各施設での基準を設ける必要があります。One Lambda 社は基準を提示しておりません。患者背景も非常に重要な要素です。またアレルレベルで抗体の特異性をアサインするために、HLA タイピングもそれに適した解像度で実施する必要があります。施設の検査法の違い、検査技術の違い、医療スタッフ、医療設備、患者の状態や情報などによって状況は異なります。したがって、その結果を解釈する基準は施設によって異なり、施設ごとに決めると考えられています。



**Fig. 18.** コンセンサスガイドラインからのポイント

## Consensus Guidelines

- Identify Interfering factors - solid phase assays
  - Antigen density
  - Reactivity of control sera, control beads
  - Reduce interfering factors (absorption, DTT, EDTA etc)
  - Saturation of target antigens
  - Antibodies to Denatured Antigen (not Native)
- Must develop protocols for identifying/mitigating limitations of the assay

**Fig. 19.** 抗 HLA 抗体検査における影響を与える要素 (コンセンサスガイドラインより)

コンセンサスガイドラインでは、下記の 1 ~ 5 を踏まえてプロトコルを組み立てる必要があります (Fig. 19)。

1. 抗体密度
2. コントロール血清やコントロールビーズの反応性
3. 抗体検査試薬との反応を妨げるファクターの存在
4. ターゲット抗原の飽和
5. Denatured 抗原に対する反応

"3" に対する対策として、我々 (Cathi) の施設ではすべての検体に Adsorb Out™、DTT、EDTA 処理を実施しています。

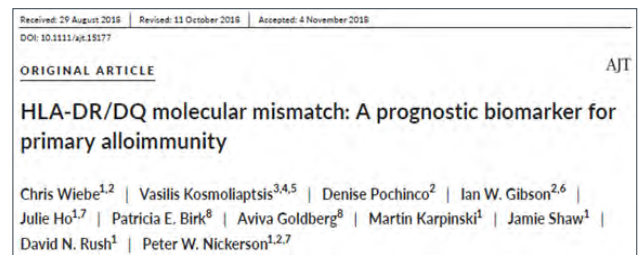
"4" に対しては、DP 抗原や C ローカス抗原は発現が低いので、DP 抗原では nMFI が 9,000、C ローカス抗原では nMFI が 7,000 を Lab カットオフとしています。

"5" に関連して、抗 HLA 抗体が存在するがクロスマッチで陰性の場合は Denatured 抗原が疑われます。その時には、セルトレーに使う生細胞などを使用して抗 HLA 抗体の有無を確認します。

## 抗 HLA 抗体とエピートープ

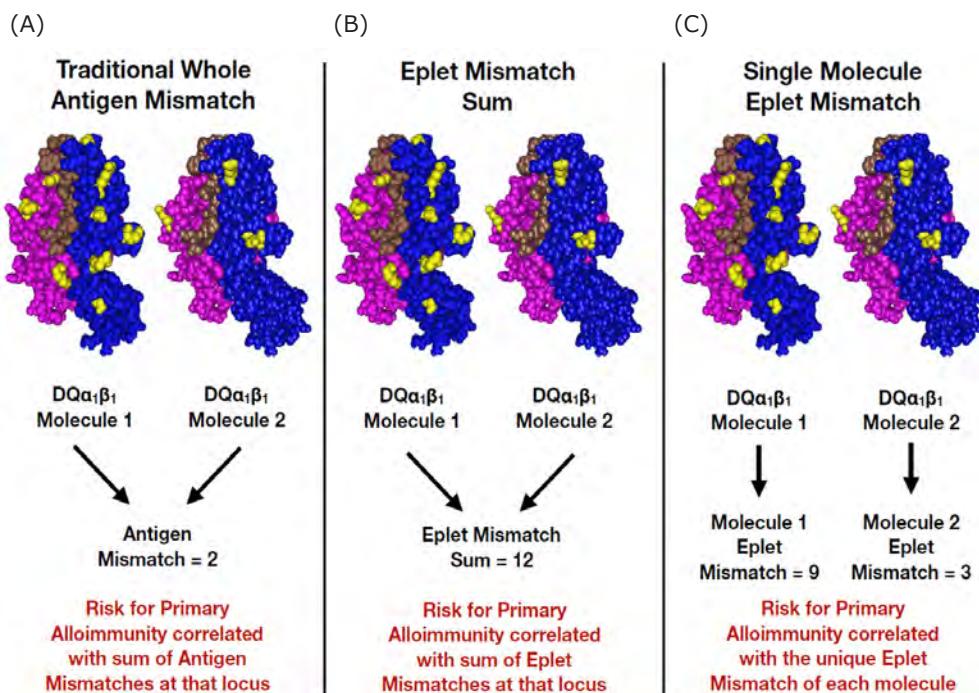
移植前に患者が保有する抗 HLA 抗体を検出するのは、適切なドナーそして移植前治療の選択のためです。つまり抗 HLA 抗体を必要以上に陽性と判定すると移植候補患者がいなくなり、その反対ですと適切な処置がされず拒絶から生着不全につながります。また移植後においては *de novo* DSA (dnDSA) を的確に捉えることで、適切な治療がおこなえます。そこで適切に抗 HLA 抗体をアサインするためにエピートープの考え方が主流になっています。

エピートープに関しての有名な論文の一つ (Wiebe, *et al.* HLA - DR/DQ molecular mismatch: A prognostic biomarker for primary alloimmunity. *Am J Transplant.* 2019; **19**: 1708-1719.) を紹介します。



**Fig. 20.** *Am J Transplant.* 2019; **19**: 1708-1719. の表題

1999 年 1 月から 2016 年の 664 名 (成人 606 名、小児 58 名) の患者を対象としています。フォローアップの平均が 7.58 年間です。HLA MatchMaker を使用してクラス II を対象に Fig. 21 に示す 3 種類の考え方でミスマッチ数を算出しました。Fig. 22 には、3 種類の方法で算出したそれぞれのミスマッチ数と dnDNA の産生を調査した結果を示しました。



**Fig. 21.** 抗原レベル、Eplet の数の考え方。(A) 従来の抗原レベルでのミスマッチ数の考え方。(B) Eplet ミスマッチ数を抗原全体で捉える考え方。(C) Eplet ミスマッチ数をα鎖、β鎖の単独で捉える考え方。  
 \**Am J Transplant.* 2019; **19**: 1708-1719. の図を一部改変



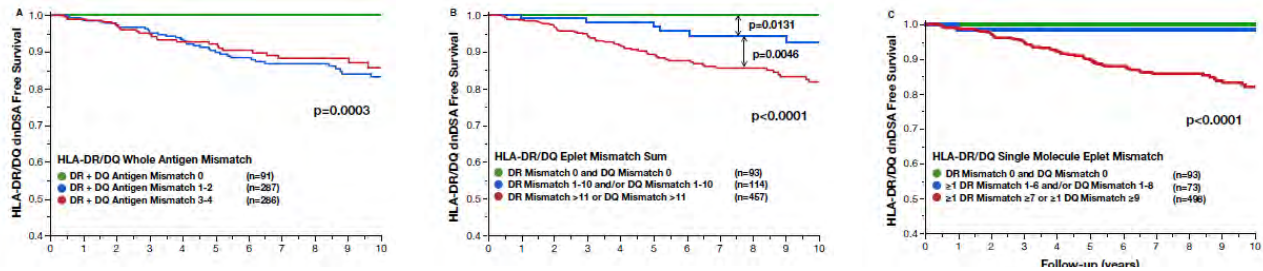


Fig. 22. DR/DQ ミスマッチ数による DSA 産生の関係。(A) 抗原レベルのミスマッチ数の場合、(B) Fig. 21 - (B) の数え方の場合、(C) Fig. 21 - (C) の数え方の場合 \*Am J Transplant. 2019; 19: 1708-1719. の図を一部改変

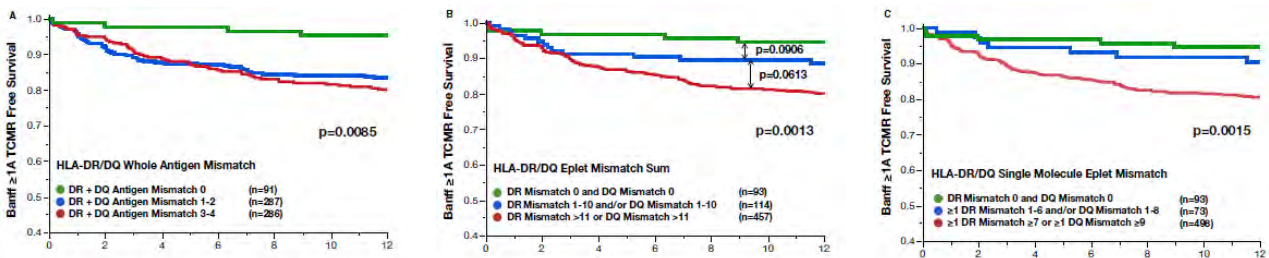


Fig. 23. Eplet ミスマッチ数でのリスク分類と (A) TCMR、(B) dsDNA 産生、(C) ABMR の関係。Low Risk=0DR 0DQ or DR  $\geq$  1-6 and/or DQ 1-8, Intermediate (DR  $\geq$  7 and DQ  $\leq$  14, or DR 0 - 6 and DQ 9 - 14), High (DR 0 - 22 and DQ 15 - 31)

Fig. 22 からわかるように Single Molecules Epilet Mismatch 数で評価したものが最も明確にその数と dnDSA の関連性を示しています。

さらに DR/DQ の Eplet ミスマッチ数で Low、Intermediate、High の 3 カテゴリーに分類し、TCMR (T-Cell Mediated Rejection)、dnDSA 産生、ABMR (Antibody Mediated Rejection) との関連性を調査しました (Fig. 23)。

本論文で示すように Eplet 解析を応用することがさらなる診断そして治療につながると考えられます。

### バーチャルクロスマッチ

バーチャルクロスマッチの定義はドナーの HLA タイプと患者の抗 HLA 抗体プロファイルを基に適合性を予測することです (Fig. 24)。米国においては、抗体検査は Solid Phase Testing (ビーズ法) によって実施するように定義されています。ドナーが遠方においてクロスマッチができないとき、バーチャルクロスマッチで患者を選定します。

**Virtual Crossmatch – Deceased Donor**

- Deceased donor kidney transplantation
  - Type patients for HLA A,B,C,DR,DQB,DQA,DPA,DPB – preferably at high resolution
  - Type donors for HLA A,B,C,DR,DQB,DQA,DPA,DPB – at appropriate level – prefer high resolution
  - Establish HLA Antibody profile of patient for all loci
- Assign acceptable or unacceptable mismatches
- Predict compatibility against deceased donor HLA type

Fig. 24 バーチャルクロスマッチ。米国ではほとんどのローカスのタイピングが実施され、特に患者においては高解像度で実施されています。

バーチャルクロスマッチをおこなう際には①ホモ接合型 (homozygous) の抗原、②複数の抗体、③低レベルの DSA、④C ローカスや DP 抗原のような低発現の抗体、⑤個々のドナーの HLA 発現量の違いなどによる限界を知っておく必要があります。

### Non-HLA 抗体

アンジオテンシン II のリガンドに結合するアンジオテンシンタイプ I 受容体 (AT1R) は、動脈血圧や水分バランスなどの生理学的作用を仲介します。

抗 AT1R 抗体と予後の関係について、Reinsmoen らの論文 (Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients. *Transplantation*. 2010; 90: 1473-7.) の報告を紹介します。移植前にドナーに対する抗 HLA 抗体および抗 MIC 抗体が検出されなかった 63 名のうち、移植後に 16 名が拒絶が起きました。16 名のうち 7 名が AMR (抗体関連型拒絶)、9 名が CMR (細胞関連型拒絶) でした。AMR と診断された 7 名のうち 6 名に抗 AT1R 抗体が検出され、拒絶との関連が示唆されました。なお CMR の 9 名からは抗 AT1R 抗体は検出されませんでした。

また Dragun らは、ドナーに対する抗 HLA 抗体 (DSA) を持っていない患者の中で抗 AT1R 抗体による急性拒絶が起こる患者は 2 - 4% いると報告しています。心臓の患者では DSA と同じくらい抗 AT1R 抗体の存在は悪影響を与えるといわれています。

ニュージーランドでは、すべての小児で抗 AT1R 抗体を測定するほど抗 AT1R 抗体を重要視しています。



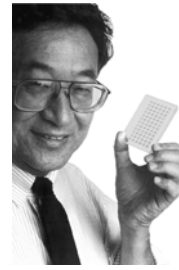
## ベリタスからのコメント

造血幹細胞移植における移植後の抗 HLA 抗体のモニタリング、バーチャルクロスマッチ、エピトープ解析など想像以上に Cathi の施設では既に臨床応用が進んでいる印象を受けました。複雑な HLA であるが故に様々な課題もありますが、医師、検査現場の皆様が新しい知見を得ながらより少しでも臨床成績を良くしようとしていると感じることができたセッションでした。弊社としても少しでも日本の移植医療に貢献できるように情報提供を続けていきます。

## 編集後記

HLA はヒト遺伝子の中で最も多様性に富んだ分子です。よって抗 HLA 抗体の解釈はさらに複雑なものになります。1936 年に Gorer、Snell らによりマウスの MHC (H-2) 抗原が発見され、1952 年に Dausset によるヒトの MHC (HLA) 抗原の発見から 68 年、Dr. Terasaki の有名な論文から 56 年、LABScreen が発売されてから 20 年が経過しましたが、今でもまだわからないことばかりです。移植における抗 HLA 抗体の重要性は周知の事実ではありますが、それだけで生着または拒絶のすべてを語ることはできません。しかし、患者様や社会にとってより最適な診断と治療が届けられるよう、我々は努力し続ける必要があると思います。

本報告が少しでも社会に貢献できることを願いつつ、編集後記といたします。



NATURE December 5, 1964 Vol. 204  
PAUL I. TERASAKI  
JOHN D. MCCLELLAND  
University of California, Los Angeles,  
School of Medicine, Department of Surgery,  
Los Angeles.

**Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins**

ATTEMPTS to define leucocyte groups in man serologically have been hampered by the scarcity of immune human antisera and the capriciousness of the leuco-agglutination reaction'. The method recorded here for assaying lymphocyte cytotoxins in a microscale was developed to circumvent these difficulties. Its extreme sensitivity permits performance of 1,000 or more tests with 1 ml. of antiserum. Furthermore, lymphocytes obtained from one finger-prick sample of blood are sufficient for 100 separate tests. The basic innovation in handling these small quantities of serum and cells and in gaining a greater than ten-fold increase in sensitivity over present-day methods is the performance of the reaction in microdroplets submerged under oil. This permits

Dr. Paul I. Terasaki (1929 - 2016) らは、1964 年に 1  $\mu$ L の血清からリンパ球細胞毒試験 (LCT) おこなう手法を発表しました。(Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; **204**: 998-1000.)。Terasaki プレートは一般的な用語として利用されています。



ベリタス社内から Asia Workshop に参加する様子

## LABScreen COVID Plus の発売について

HLA Fusion の新機能に加えて新製品の紹介がありました。LABScreen COVID Plus です。

既存の測定機器で高感度に COVID-19 を測定できる製品となっております。

詳細な製品情報については、改めてお知らせいたします。

**LABScreen COVID Plus**

**A Powerful Solution for More Accurate COVID-19 Antibody Detection**

Detect COVID-19 Antibodies for a More Complete Antibody Profile

Research has found that pathogen infections similar to COVID-19 can lead to the development of HLA antibodies. With multiple distinct antigens and fragments, the LABScreen™ COVID Plus assay is more specific than current assays and, in combination with HLA antibody detection, can help provide a more complete picture of the patient's antibody profile.

日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14  
住友東新橋ビル3号館5階  
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076  
E-mail: veritas@veritastk.co.jp  
<https://www.veritastk.co.jp/>