

HLAと抗体

臨床と検査の架け橋をめざして...

2007.12
5号

Contents

●既存抗体の脱感作療法.....	1	●虎ノ門ニュース.....	8
●HLAと抗体など.....	6	●数独.....	8
●HLA抗体検査よろず相談室.....	7		

既存抗体の脱感作療法

九州大学 腎疾患治療部、臨床・腫瘍外科 杉谷 篤

既存抗体陽性例とは、輸血、妊娠、移植歴などによって抗HLA抗体あるいは抗ドナー抗体が産生され、ドナーとのクロスマッチテストを行うと陽性になっているようなレシピエントのことを言います。術前検査としては、LCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test)、FCXM (Flowcyte crossmatch)、Flow PRA (Flowcyte Panel Reactive Antibody) によって、抗体の種類と量を推察することができます。LCTはドナーリンパ球を抗原として用い、反応条件によってTcell warm (TW)、Bcell warm (BW)、Bcell cold (BC) に分けていますが、補体結合性反応を利用しているため、補体非結合性抗体や微量の抗体は検出できません。FCXMもドナーのTcellとBcellを抗原として用いますが、微量の抗体も検出でき感度が向上しています。FlowPRAはドナーリンパ球ではなく、HLA抗原を付けたビーズを用いて患者血清と反応させるため、ドナー特異的抗体：DSA (Donor Specific Antibody) のみならず、ドナー非特異的抗体：NDSA (Non-Donor Specific Antibody) も検出することができます。One LambdaのFlowPRAキットにはScreening Test、Specific Test、Single Antigen Testがありますが、我々はScreening Testを用いてHLA Class I抗

体とClass II抗体を区分し、Single Antigen Testを用いてどのHLA抗原に対する抗体を保有しているかを調べています。

既存抗体陽性例の腎移植について国内外の文献報告を調べてみると、Terasakiら¹⁾の報告が大きな影響をもたらしました。1969年にLCTの重要性が紹介され、LCTクロスマッチ陽性の場合には超急性拒絶、急性拒絶の起こる可能性が高く、移植を断念するか何らかの脱感作療法が必要となります。献腎移植の場合、日本臓器移植ネットワークはTcellに対するLCTクロスマッチが陽性のレシピエントには腎臓の斡旋を行っていません。Terasakiら²⁾はUNOSや各国施設が参加したWorkshopの多数例の解析をもとに、①免疫抑制剤の進歩によって、腎移植後の急性拒絶発生率は40%から20%に減少し移植成績は飛躍的に向上したが、依然として年間5%の割合で移植腎機能が廃絶していること、②移植前にHLA抗体が判明した場合や移植後に新規にHLA抗体を産生した場合は、そうでない場合と比較して長期生着率が悪いこと、③DSAに加え、NDSAも抗体量が多くなるとDSAと同様に生着率を悪化させていること、④Single Antigen TestでDSAが検出されなくても、

CREG (cross reactive antigen group) があって反応しうること、⑤HLA抗体のみならず、Major Histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) に対する抗体のようなnon-HLA抗体も生着率を低下させること³⁾、などを報告しています。また、移植腎機能廃絶の要因として移植腎病理の所見から提唱された慢性移植腎症CAN (Chronic Allograft Nephropathy) は、CNI (Calcineurin Inhibitor) の副作用、糖尿病、高血圧、高脂血症などの非免疫学的因子が重要でCNIの減量が推奨されましたが、近年は、このようなFlowcyteを用いた抗体検査の普及によって低力価、低用量の抗体の持続的な反応による慢性拒絶が重要であると認識されるようになり、CANの概念は再考を強いられました。

海外を中心に、このような既存抗体陽性例に対する脱感作療法が報告されています。Mayo ClinicのStegallは⁴⁾ DSA陽性例に対し、①血漿交換、低用量IVIG、抗CD20抗体投与群と②高用量IVIG群とに分けて、術前脱感作療法を行い移植した59例を報告しています。AHG-CDC法で8倍陽性なら、血漿交換、低用量IVIGを繰り返すことで、クロスマッチテストが陰性化することが可能と述べていますが、血漿

交換を移植前に平均10回、移植後に9回行っており、抗体関連拒絶AMR発生率が37%でした。高用量IVIG群にいたっては、移植後に平均9回の血漿交換を行い、AMR発生率が80%で、50%が機能廃絶になっています。UCLAのJordanは⁵⁾4ヶ月前から2g/kgの高用量IVIGを投与し、クロスマッチ陽性77例のうち67例が陰性化して移植したところ、AMRが28%に発生し、3年生着率が87%だったと述べています。これだけの血漿交換、IVIGに費やしたコストと結果を鑑みれば、私は妥当な治療法とは思いません。

本邦においては、東京女子医大から⁶⁾87症例について移植前と移植後6ヶ月以降のFlowPRAによる抗HLA抗体と腎生検所見の関連が報告されています。術後に抗HLA抗体を産生したde novo症例はCAN/CRの発症が高率で機能廃絶に至っているものもあるし、術前にFlowPRAが陽性であった症例も移植後6ヶ月以降でCAN/CRが41%にみられ、そのうち11%は非特異的抗体でnon-HLA抗体が慢性拒絶を引き起こしたと

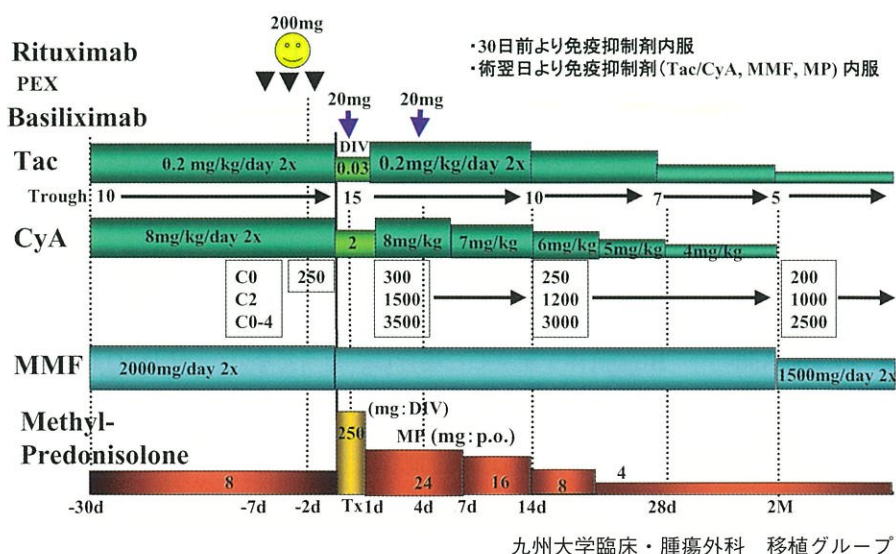
記載されています。名古屋第二赤十字病院からは⁷⁾、移植前のLCT陰性、FCXM陽性の8例に対して血漿交換4回、Cyclophosphamide投与による脱感作療法を行い、3例にAMRが発生し、2例が移植後5、6年目に透析再導入となったと報告されています。また、同施設における222例を対象として、FlowPRAによってHLA抗体の存在が判明した27例(12.2%)のうち15例は移植前から陽性、12例は移植後新規に陽性となっており、考察と併せて予後が良いことが記されています。市立札幌病院からは⁸⁾、LCT-Tcell陰性でFCXM-Tcell陽性であった12例について報告があります。脱感作療法のプロトコルとしてはFCXM陰性を目標として、血漿交換4-5回、低用量IVIG、Rituximab 2回投与、2週間前からTacrolimus 0.05mg/kg/day、MMF 15-20mg/kg/day、Methylprednisolone 4-8mg/day経口投与が基本的なようです。移植後の経過をみると2例にAMRが発生、抗体価の変動はあるものの9例で抗HLA抗体が陽性化しており、腎

生検でCRあるいはg因子陽性が6例に見られています。これらは移植後3年までの短期、中期成績ですが、長期成績はまだわかりません。2007年9月、Terasakiが日本組織適合性学会の基調講演のなかで⁹⁾、免疫学的にハイリスクと考えられる症例の平均的な経過を推定すると、腎移植後12ヶ月で新規抗HLA抗体を産生、その29ヶ月後に血清Crが2mg/dlに上昇、その後44ヶ月で機能廃絶にいたると述べています。つまり、ハイリスク症例は現時点では、術前、術後の脱感作療法、免疫抑制療法を行っても7年ぐらいの生着率しか望めないということで、これに治療のコスト、患者のリスクを考え、担当医の移植観によって治療方針が決まるものと思います。

私は、慢性腎不全に対する透析療法と腎移植の現状を考えたとき、死亡例はもちろん1例たりとも不測な拒絶反応で早期廃絶をさせたくないこと、10年生着が見込める移植をしたいこと、コストやリスクも考慮してメリットがなければならないと思っているので、

図1 免疫抑制剤Protocol (既存抗体陽性例)

2007-9-1修正



既存抗体陽性例に対する具体的な脱感作療法は以下のように考えています。生体腎移植の場合、LCT、FCXMは全例に行い、①LCT陽性、FCXM陽性の場合には移植をすすめない、②LCT陰性、FCXM陽性の場合にはFlowPRA Screening、FlowPRA Single Antigen Testを行い、Class I、II抗体の有無、DSA、NDSAの有無、CREGの可能性を調べておき、ABO不適合移植と同様な術前脱感作療法を行いFCXM陰性を確認して行う、③移植後抗体陽性例は血漿交換、Rituximab投与でFCXM、FlowPRAでモニタリングする、を原則としています。当科の脱感作プロトコルを図1に示しますが、成人の場合ではできるだけ単純・簡略な投与法に心がけています。1ヶ月前からTacolimus 0.2mg/kg/dayあるいはCyclosporine A 8mg/kg/day内服、MMF 2g/day内服、メドロール8mg/day内服を開始、約1週間前から血漿交換3回、2回目終了後にRituximab 200mg 1回点滴静注、移植時と4日目にBasiliximab 20mg点滴静注しています。手術中からTacoli-

mus 0.03mg/kg/day点滴静注、翌日から0.2mg/kg/day経口再開して目標troughに応じて調整、Cyclosporine Aの場合は2mg/kg/day点滴静注、翌日から8mg/kg/day経口再開し、1週間ごとに1mg/kg/dayずつ減量し、1週間に1回C0-4を測定しています。目標値から大きくはずれれば調整はしますが、1ヶ月後には4mg/kg/dayまで減量する固定用量です。代謝拮抗剤のMMFは術後2ヶ月まで2g/dayを出来るだけ継続するようにしますが、CMV antigenemiaが陽性になったり副作用があれば減量します。ステロイドは再灌流直前に250mg静注しますが、翌日はメドロール24mg/dayの経口に変えて、1ヶ月には4mgに減量しています。ステロイドは減量しますが早期中止は原則として行わず、経過をみながら数ヶ月後に考慮しています。移植後7日目ごろに腎生検を行い、治療方針決定の一助とします。

献腎移植の場合にも、病歴や検査結果からハイリスクと考えられる症例には、移植直前に血漿交換、Rituximab

投与を1回でもすることがあります。症例は51歳女性、17歳時に透析導入、21歳時に母親をドナーとする生体腎移植を受けて、37歳時に透析再導入となり献腎移植を待機していました。前回移植腎は右腸骨窩に残存しており、輸血、妊娠の既往、C型慢性肝炎があります。2004年のFlowPRA ScreeningでHLA Class I抗体27%、Class II抗体0%でした。2006年12月17日、58歳の心停止ドナーから第2候補として選択され、LCTはTcell陰性、Bcell陽性(8倍)、HLAは2 Ag matchでした。術前に血漿交換1回、Rituximab 200mgを投与し、左腸骨窩に移植しました。免疫抑制はBasiliximab、Cyclosporine A、MMF、steroidの4剤で行いました。臨床経過を図2に呈示します。移植後数日間、血小板は10万/mlが5万/mlに減少、LDHは1500IU/Lまで上昇しました。17日目から血漿交換4回、ステロイドパルス、IVIG5g/dayを7回行いましたが、血小板減少、貧血は改善せず、洗滌赤血球、血小板輸血を断続的に行いました。27日目まで14回の透析をしてい

図2 臨床経過

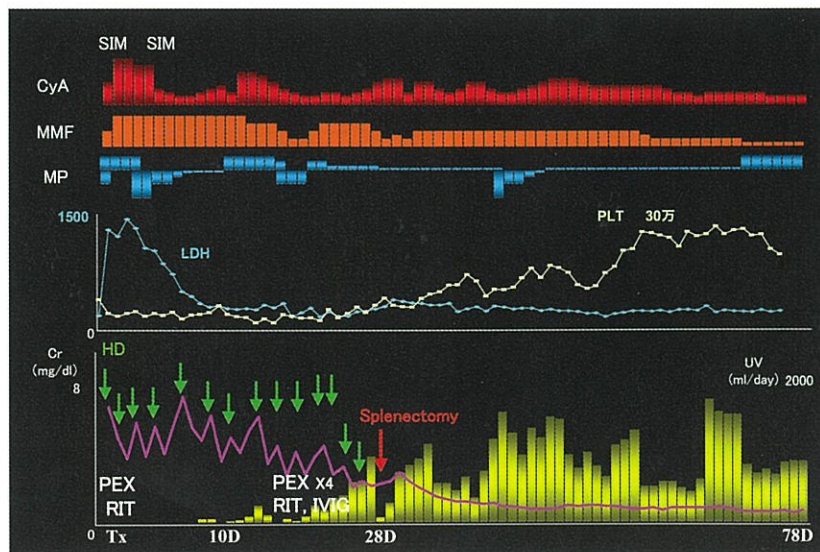
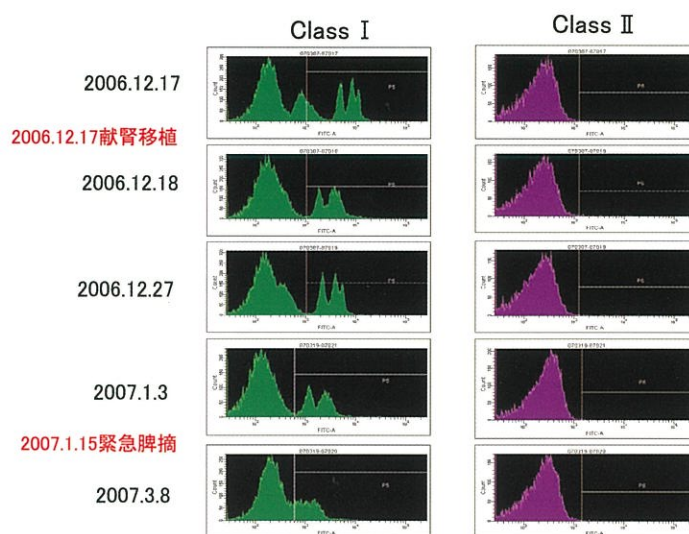


図3 FlowPRA Screening



ます。入院時の腹部CTで脾腫を認めていたため、Thrombocytopenic microangiopathyと考慮して29日目に緊急脾摘術を施行しました。その翌日から血小板は増加し始め、尿量も増加して30日目に透析離脱し、75日目に血清Cr 1.75mg/dlで退院しました。腹水、腎周囲液貯留があったために腎生検は施行していません。図3にFlowPRA Screeningの結果を経時的に供覧します。Class I抗体は多峰性に陽性で、移植後はピークが減少しますが依然として陽性です。緊急脾摘術後も陽性ですが、ピークはかなり減っています。Class II抗体はどの時点でも陰性です。FlowPRA Single Antigen Testを1月3日と脾摘後の3月8日に行っていますが、HLA-A、-B抗体(NDSA)が複数陽性です(図4)。現在、血清Cr0.8mg/dlで良好に経過しています。今回は、幸運にも脱感作療法と緊急脾摘が奏功していますが、治療に要したコストと患者に与えたりスクは相当のものです。残存腎が抗体吸着をした可能性もある

し、NDSAはあるのですから今後の経過、腎生検所見、抗HLA抗体の変動は注意深く観察する必要があります。

参考文献

1. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation *N. Engl. J. Med.* 1969; 280: 735-739.
2. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial *Am J Transplant* 2004; 4: 438-443.
3. Terasaki PI, Ozawa M, et al. Four-year follow up of a prospective trial of HLA and MICA antibodies on kidney graft survival *Am J Transplant* 2007; 7: 408-415.
4. Stegall MD, Gloor J, et al. A comparison of plasmapheresis versus high-dose IVIG desensitization in renal allograft recipients with high levels of donor specific alloantibody *Am. J. Transplant* 2006; 6: 346-351.

5. Jordan SC, Vo AA, et al. Intravenous gammaglobulin (IVIg): A novel approach to improve transplant rates and outcomes in highly HLA-sensitized patients *Am. J. Transplant* 2006; 6: 459-466.
6. 古澤美由紀、石田英樹他 抗HLA抗体の変化と慢性移植腎症発症についての検討 *移植* 2006; 41: 356-361.
7. 片山昭男 HLA抗体陽性腎移植症例をどう扱うか—術前HLA抗体陽性症例の脱感作と術后感作症例に対する長期生着を目指した治療戦略 *移植* 2006; 41: 544-550.
8. 三浦正義、下田直彦他 既存抗体陽性腎移植の臨床的検討 *移植* 2006; 41: 551-558.
9. Terasaki PI. New evidence that de novo antibodies produced after transplantation causes chronic graft failure 基調講演 第16回日本組織適合性学会 2007年9月10日 京都

図4 (1) FlowPRA Single Antigen Class I

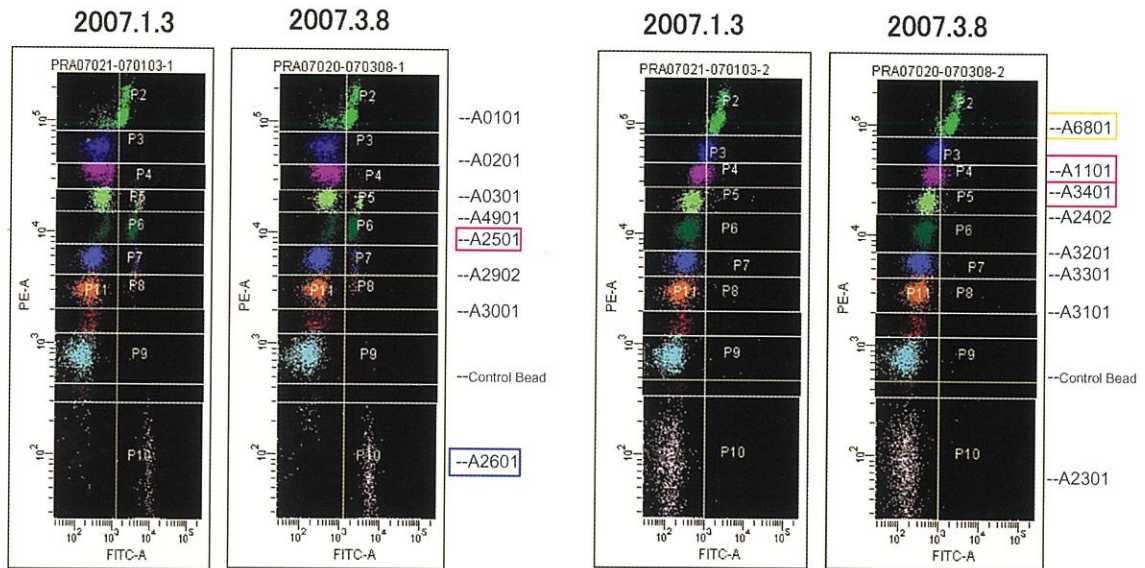
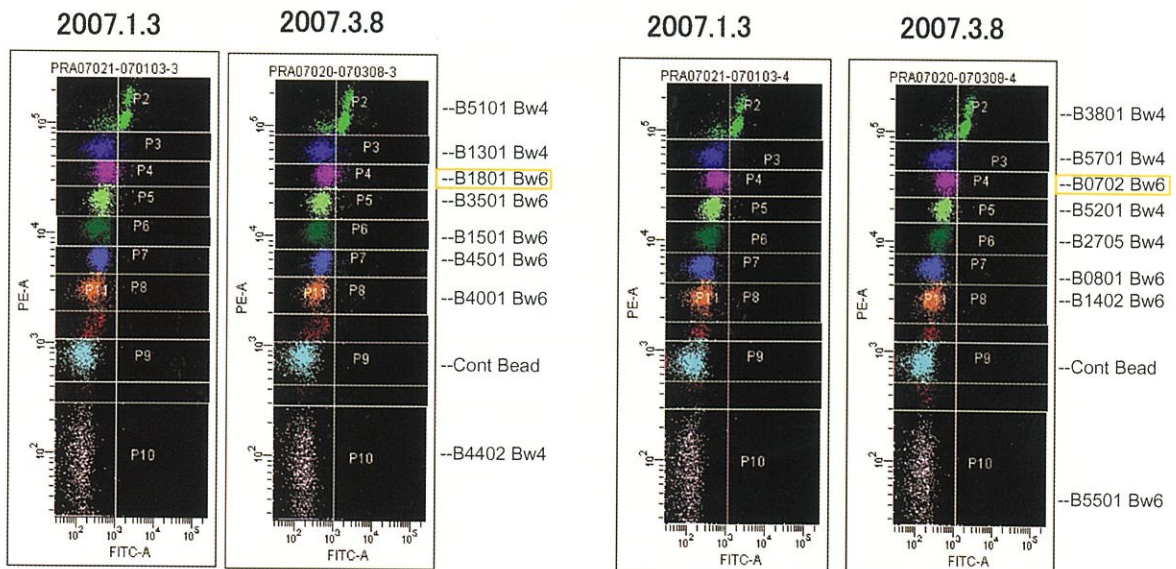


図4 (2) FlowPRA Single Antigen Class I



HLA-A25, 26, 11, 34, 68, B18, 7に対する抗体 (NDSA) が残存している

4号ではHLA抗原について解説しましたので、その裏返しであるHLA抗体について解説を致します。

HLA抗体の特異性

4号で解説したHLA抗原は、HLA-D、HLA-DPを除きLCT法 (lymphocyte cytotoxicity test; リンパ球細胞障害性試験) で検出される抗原です。

もともと私たちのHLA抗体を探す目的は、HLAタイピングに使用できるHLA抗体を見出す事で、そのために膨大な妊婦出産血のスクリーニングを行っていました。

HLAタイピングに使用する事が目的ですから、如何にシャープな特異性を有している抗体を探せるかに興味があり、ブロードに反応する血清は、HLAタイピングでは扱い難いため、興味は低かったのを思い出します。

しかし、移植希望者の血清中に存在するHLA抗体を調べる場合は、ブロードな反応の中に含まれるHLA抗原に対する特異性を漏れなく拾い出す必要があります。

しかし、この漏れなく拾い出す事は

非常に難しい問題です。例えば、日本人でA33を持っている人は、強い連鎖不平衡から殆どの場合B44を同時に保有しているため、A33に対する特異性なのかB44に対する特異性なのかまったく識別が出来ない事になります。

漏れなく特異性を拾い出すためには、HLA抗原が重ならないように工夫して組まれた数十種類のパネルリンパ球が必要になります。パネルリンパ球の種類は、そのまま検査精度に影響するため重要な要素になります。

HLA抗体検査で精度が重要となる背景は、移植希望者の血清中に含まれるHLA抗体の特異性に合致するHLA抗原を持っているドナーの場合は、ダイレクトクロスマッチが陽性となる事が予想され、移植の禁忌に直結しているからです。

CREG (Cross - reactivity - Group)

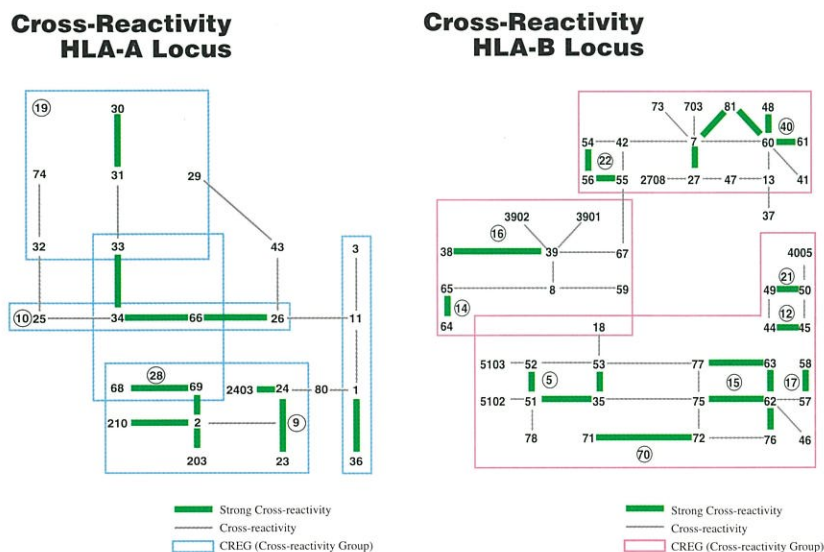
上述のような観点から、ブロードなHLA抗体の特異性を調べていくとその反応に、複数のHLA抗原に対するクロスリアクションが幾つかのグループに分けられる事が分かりCREG (Cross

- reactivity - Group) と呼ばれるようになりました。このような現象は、「本誌3号」で赤座先生に解説頂いた様に共通するエピトープを有している可能性も存在しますが、複数の抗体を含んでいる場合も存在していると考えられます。表1は、HLAタイピングを目的とし、HLA抗体のスクリーニングを世界で最も多く実施してきたワンラムダ社のLCT法での経験を基に作られたCREGの表です。「本誌4号」で解説したようにブロード抗原内に属するスプリット抗原は概ねStrong Cross - reactivityとして太線で結ばれていますが、ブロード抗原同士もCross - reactivityとして結ばれています。その外側をCREGとして囲まれています。このCREGの概念は、HLA抗体の特異性を解析するうえで、重要な情報となります。

HLA抗体検査の高感度化

ダイレクトクロスマッチは、移植直後に発症する超急性拒絶を未然に防ぐためLCT法で実施されていますが、移植後しばらくしてから発症する拒絶な

表1



どは十分には予測できませんでした。

そこでダイレクトクロスマッチの高感度化を目的にFCM（フローサイトメトリー）を使用する事により急性拒絶などの予測精度も向上しました。現在ではFCMクロスマッチが主流となってきました。

HLA抗体検査は、ドナーの保有するHLA抗原からダイレクトクロスマッチが陽性になるか陰性になるかを予想す

る事が重要な意義になります。そのため、ダイレクトクロスマッチが高感度化されるに従い、HLA抗体検査もそれと同レベルの感度である事が求められるようになりました。HLA抗体検査も、LCT法からFCMやルミネックスを用いた高感度な方法が主流となってきました。

高感度化に伴い、複数のCREGにまたがる特異性も見出されています。ま

た、極めて稀な抗原にシャープな特異性を示すHLA抗体も見出されるようになりました。これは、高感度になる事により非常に弱い反応を判定できるようになったことから、これまで気付く事の無かった、CREGのまたがりや、非常にシャープな特異性が認識できるようになったのだと思います。

QA

HLA抗体検査よろず相談室

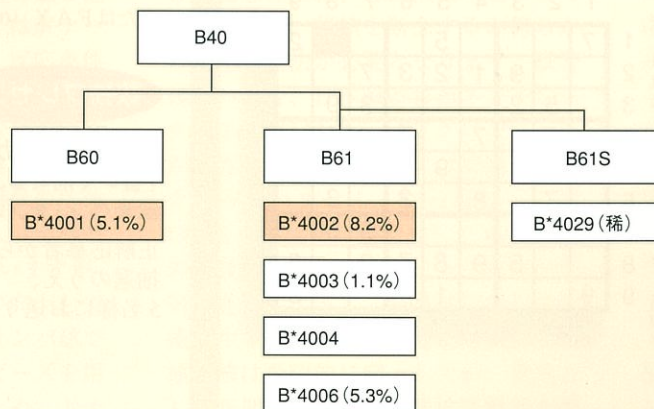
Q : LABScreen Single Antigen で B*4002 が陽性だった場合、B61 と報告することは適切でしょうか？

A : B*4002 の HLA 型は B61 ですので適切です。

腎移植前の検査で、ドナーのタイピングを2桁でしか行っていないことから、ドクターへの報告も2桁で、という意図から来るご質問かと想像されます。

1970年代にHLA-B40がHLA-B60(40)とHLA-B61(40)という2つのスプリット抗原からなることが解りました。日赤ワークショップで、血清学とアレルとの検討の結果HLA-B61といわれている日本人に存在するB*4002、B*4003、B*4006は、下記の図表（JSHIのホームページ*から引用）の様に血清学的には同一の血清タイプとして認識されます。

* http://square.umin.ac.jp/JSHI/QC_WORKSHOP/HLA-B_LOCUS/slide07.jpg



LABScreen Single Antigen Combi キットでのピーズの有無

上記の図表はJSHIのホームページ参照*

B61に属するアレルの構造はお互い非常によく似ているので、B*4002に反応したということは、B*4003、B*4006にも反応する可能性が十分高いと考えられます。

しかし厳密には、抗体検査では「当てていないものは見ていない」ということは常に心に留めておかななくては行けませんので、B*4003やB*4006を保有するドナーからの移植にはダイレクトクロスマッチで確認することが重要です。

虎の門 ニュース

お知らせ

・リンフォBクイック、Tクイック販売中止のお知らせ

平素は弊社販売製品をお引き立て頂き誠にありがとうございます。
 という固い挨拶はここまでで、ワンラムダ社製品 リンフォBクイック、Tクイックが販売中止になりました。
 そこで、その代りの製品として既にお使いの方々も多数いらっしゃいますが、ステムセル社細胞分離製品の1つであります EasySep をご紹介します。
 原理は細胞表面の抗原に対する抗体と磁気ビーズ表面に対する抗体を結合させた製品で、磁石で素早く高純度にTセル、Bセルの分離が可能です。
 また、この製品で分離した細胞はビーズが微小な粒子の為フローサイトの分析も可能でフローサイトクロスマッチや各種研究にも最適です。是非一度お試しください。
 商品構成など製品に対するお問い合わせ等は(株)ベリタス 営業販売部 小林俊太 までご一報下さい。
 お待ちしております!!!!

ベリタスのホームページが新しくなりました!!

平素は弊社販売製品をお引き立て頂き誠にありがとうございます。

<http://www.veritastk.co.jp>

会員特典満載!! 会員用メールニュースも充実!! 簡単登録!!
 是非ご登録ください!!

ベリタスへのお問合せは下記までお願いします。

TEL: 03-3593-3211 FAX: 03-3593-3216
 営業販売部 小林
 e-mail: veritas@veritastk.co.jp

数独のススメ

HLAに携わっている方、興味のある方、あまりにもたくさんあるHLA型の数字に悩まされていることはありませんか。数字に強くなるために、数独に挑戦してみましょう!

遊び方

表の空いているところに1から9までの数字を入れるだけです。ルールは縦列、横列と、太枠で区切られた3×3マスに、1から9までの数字を重ならないように入れるだけです。入れる数字は確定したものだけにしましょう。2つ以上の可能性がある場合は鉛筆で薄く書いたりして、やり直しができるようにしましょう。

ヒント

- 縦列、横列、3×3マスで、空白の少ないものに目をつけてみましょう。
- 空白には残っている数字の中から、他の条件を参照して入れていけばよいのです。
- 全体の中で一番よく使われている数字に目をつけてみましょう。
 入る場所が限られていて、その位置の縦横の関係をみるとわかるはず。縦列、横列、3×3マスの数字を組み合わせて、どんな数字が使われているのか、いないのかを見ると、入れる数字が決まるはず。

【前回の解答】

1	2	3	4	1	5	8	6	9
2	5	1	6	4	8	9	2	3
3	7	8	9	2	3	6	1	4
4	9	4	1	7	2	3	6	5
5	6	5	7	8	1	4	3	9
6	3	2	8	9	6	5	4	7
7	4	6	2	5	7	1	9	8
8	8	7	3	6	9	2	5	1
9	1	9	5	3	4	8	7	2

- 前回の問題は解けたでしょうか。
- 今回も易しい部類に入る問題です。
- 豪華ではありませんが実用的な賞品を正解応募者全員に差し上げます。
- 是非、回答をお寄せください。

1	7			5				2
2			9	1	2	3	7	
3		5	2				3	9
4		9		7		4		1
5	4	8			9			2
6		7		8		2		3
7		2	7				9	5
8			5	9	8	7	2	6
9	9				1			3

赤く塗られたマスに入る数字は何でしょう?

氏名、住所、所属病院・企業、電話、e-mailアドレスを明記のうえ、「数独プレゼント係」までご回答をお送りください。

送り先

ベリタス (e-mail:veritas@veritastk.co.jp)
 またはFAX (03-3593-3216)

数独プレゼント

数独解答に威力を発揮する「書いて消せる、ボールペン・蛍光ペン」をプレゼント!

正解応募者から抽選のうえ、5名様にお送りします。



正解応募者全員に下記の品をお送りします。



応募期限は3月末とさせていただきます。

編集委員

編集顧問 木村 彰方
 編集委員長 小川 公明
 編集委員 佐田 正晴 佐治 博夫 赤座 達也
 編集スタッフ 松本 佳子 小林 俊太
 発行者 飯田 真作

発行

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
 TEL.03-3593-3211(代) FAX.03-3593-3216
 E-mail: veritas@veritastk.co.jp

<http://www.veritastk.co.jp/>