

HLAと抗体

臨床と検査の架け橋をめざして...

2008.12
7号

Contents

● 臍帯血移植における抗HLA抗体の影響.....	1	● 虎ノ門ニュース.....	8
● HLAと抗体など.....	6	● 数独.....	8

臍帯血移植における抗HLA抗体の影響

東京都赤十字血液センター 高梨美乃子

はじめに

非血縁者間造血細胞移植の源として、2003年以降臍帯血の頻度が増加してきています。2007年の非血縁者間造血細胞移植のうち44%が臍帯血移植でした(図1)。臍帯血移植においてはHLA不適合を2抗原まで許容しています。本邦の臍帯血移植の約8割は成人に対して行われており、その殆どがHLA不適合移植です。一方、移植の際には臍帯血の凍結細胞数、CD34陽性細胞数を指標に臍帯血を選択する重要性が臍

帯血移植の初期より認められておりますが^{1) 2)}、成人の体重から推測される必要細胞数(2x10⁷/kg)を満たす臍帯血のバンクサイズは数千にすぎません(図2)。日本さい帯血バンクネットワークとしての検索可能臍帯血数は現在約3万件ありますが、小児領域においても体重によっては、細胞数を指標とすればHLA抗原不適合移植とならざるを得ません。

血液疾患は殆どの場合において輸血医療を必要としますが、それに伴って

患者は非自己の抗原にさらされ、結果として抗HLA抗体を産生する可能性があります。患者にHLA抗体がある場合、特に血小板輸血不応状態で、HLA適合献血者からの血小板(PC-HLA)を必要とするような場合においては、移植に至っても移植片が拒絶される危険性が指摘されてきました。HLA適合移植が殆どである骨髓移植ではあまり問題とならなかったと思います。

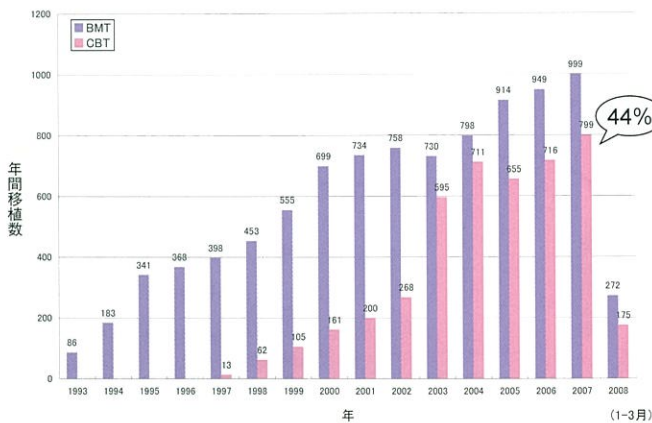


図1 日本の非血縁者間造血細胞移植

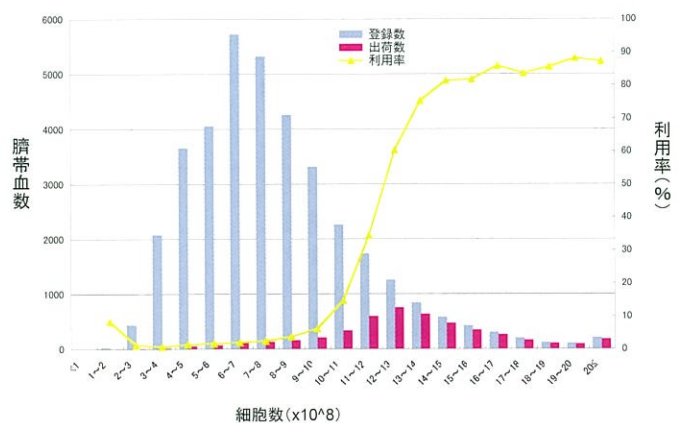


図2 保存臍帯血、移植臍帯血の細胞数分布と利用率

2008年7月までにネットワークにて公開、移植に提供された臍帯血について

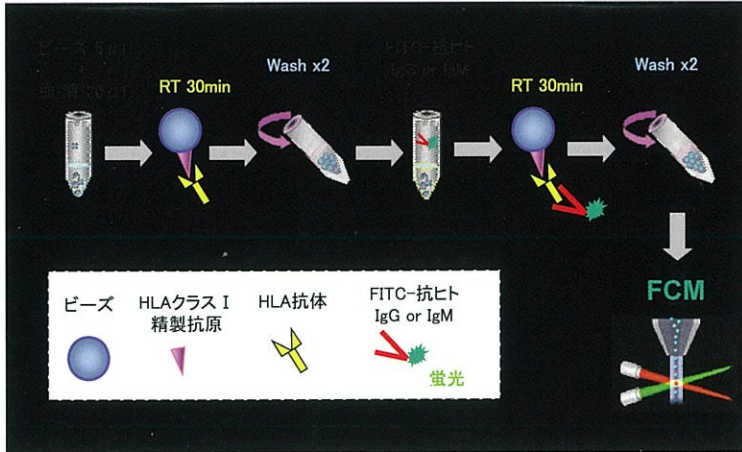


図3 FlowPRAによるHLA抗体の検出原理

HLA抗体検査

抗体検出法はまずスクリーニングとしてFlowPRA (One Lambda社製)を用い、class I, class IIともにIgG抗体を検出しました。検出原理を図3に示しますが、精製抗原を用い、フローサイトメーターにより判定します。実際にフローサイトメーターをお使いの方にはおなじみと思いますが、非特異反応に注意が必要です。閾値10%以上、2峰性の場合に陽性としませんが、閾値が10%以下でも多峰性の分布を示すようであれば、確認検査に進みます。特異性の判定にはLuminexによるLAB-Screen PRAおよびLABScreen Single Antigen (One Lambda社製)を用いています。非特異反応を念頭におき、抗体特異性に患者自身のHLA型も考慮して判定します。また臍帯血移植例についてはIgG抗体のみを判定、解析しています。東京都赤十字血液センター臍帯血バンクでの血液腫瘍性疾患、初回移植例の抗体陽性率は成人(16歳以上)では287例中47例、16.4%、小児(16歳未満)では50例中5例、10.0%、全体では15.4%でした。抗体特異性が移植された臍帯血HLA抗原に対応していたのは337例中11例、全体の3.3

%でした。

2007年前半には他臍帯血バンクより既に他の検査室で陽性と判定された検体も多数頂きましたので、検査結果判定についての検査室比較検討にもなりました(表1)。抗体検査系の検査室間の判定統一は難しいのですが、FlowPRAのスクリーニング結果のみでは疑陽性判定となる可能性がある、ということには留意すべきです。

表1 検査室によるHLA抗体判定結果の相違

	Class I and/or II		計
	陰性	陽性	
Lab A	0	52	52
Lab C	37	15	
Lab B	6	80	86
Lab C	36	50	

検討対象

臍帯血移植の際には各臍帯血バンクにて、臍帯血と共に患者HLA型の確認検査をします。この際の患者血漿(または血清)がバンクに保存されていれば、患者HLA抗体の有無と臍帯血移植の結果とあわせて、後方視的検討ができます。東京都赤十字血液センターでは、2001年からの初回移植の患者検体を検討してきました。それに加えて、厚生労働科学研究補助金「臍帯血を用いる造血細胞移植の高度化と安全性確

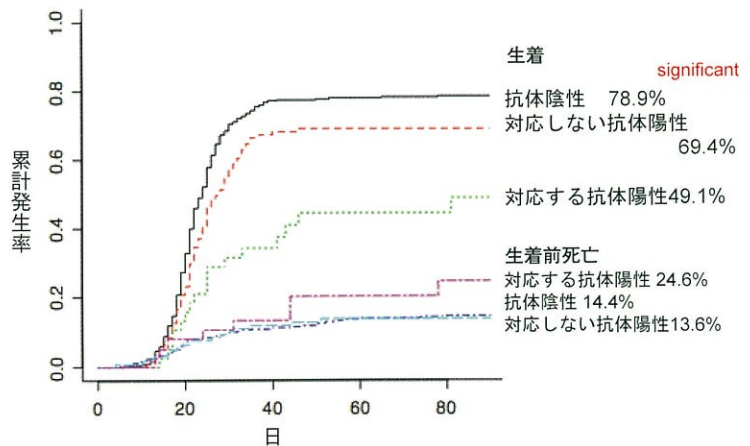


図4 好中球の生着における抗HLA抗体の影響

保に関する研究」(加藤俊一班長)を通し、他の臍帯血バンクにも協力を頂き、初回移植の患者検体を東京都赤十字血液センターに送付頂きました。最終的には663例の造血器悪性腫瘍、初回移植を対象とする検討となりました。

臍帯血移植における生着とHLA抗体

臍帯血の品質を考えると、感染症などの「安全性」と移植の成功をもたらす「効能効果」とに整理することができます。そして移植後の生存に最も影響する因子はgraftの生着です。この解析ではまず生着に注目し、解析ツールはRを用いました。生着の競合リスクは生着前死亡です。

663例中160例において抗HLA抗体が陽性、うち39例で抗体特異性が移植臍帯血のHLA型に対応していました。好中球の生着は抗体陰性群(累積発生率78.9%)に比して、移植臍帯血HLA型に対応しない抗体陽性群(69.4%)、対応する抗体陽性群(49.1%)ともに有意に低い事が示されました(図4)。小児と成人とでの生着の差は認めませんでしたが、小児群ではHLA抗体の影響を認めず($p=0.943$)、成人群ではHLA抗体は有意な影響を示しました($p<0.001$) (図5)。

生着に重要な因子として、輸注造血細胞数があります。コロニー形成細胞数がより正確に造血細胞数を反映するものなのでしょうが、日本さい帯血バンクネットワークで共有する情報のうちCFU-GM数は検査室間の差が大きく、多施設検討の際には有意な因子として残らないこともあります。検査室間の差が小さいのは細胞数なのですが、一般に造血細胞数の指標とされるのは患者体重あたりのCD34陽性細胞数です。これらの指標となる細胞数は、特に成人群では狭い範囲に集積されてしまいますが、今回の検討例を体重あたりCD34数の中央値($0.8 \times 10^5/\text{kg}$)で2群に分けました。HLA抗体が臍帯血に対

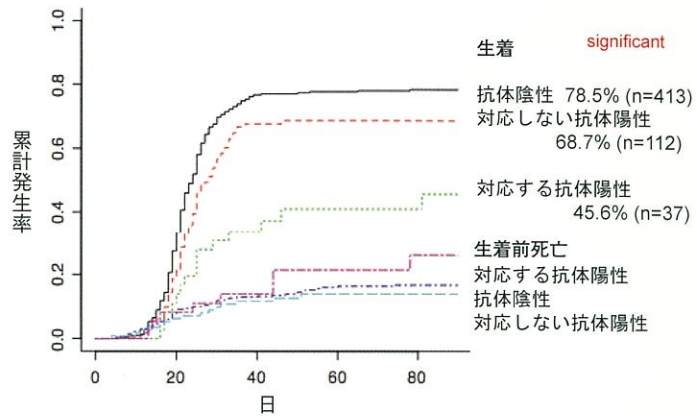


図5 好中球の生着における抗HLA抗体の影響、成人

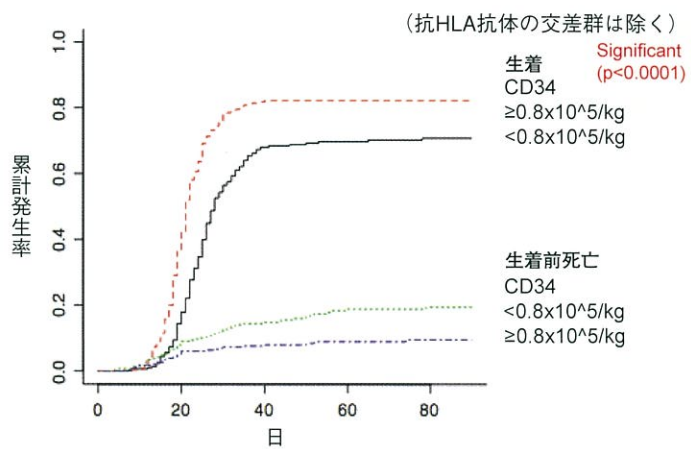


図6 好中球の生着におけるCD34陽性細胞数の影響

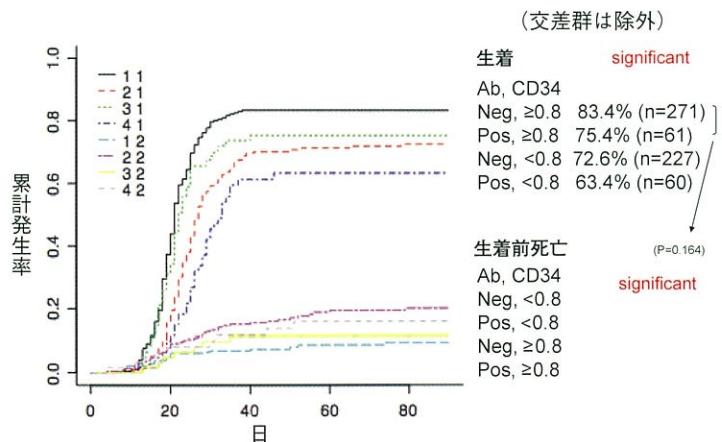


図7 好中球の生着におけるCD34輸注量と抗HLA抗体の影響

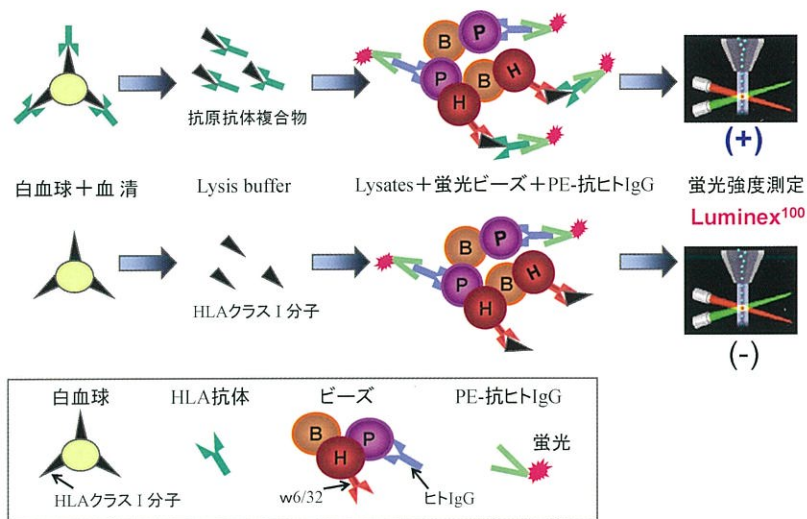


図8 ICFA (Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis)

応する群は除き、CD34 数の影響をみますと生着に対して有意な影響を認めます ($p < 0.001$) (図6)。

CD34 数の影響と HLA 抗体の影響はどちらが強いのでしょうか。HLA 抗体陽性の症例に対して移植を計画する場合にどのような方針を立てればいいのか、という問題になります。HLA 抗体が臍帯血に対応する群は除き、CD34

数中央値からの多少と HLA 抗体の有無で4群に分けました。生着の累積発生率からは、まずCD34 数が多いことが重要であると考えられます (図7)。CD34 数が $0.8 \times 10^5/\text{kg}$ より多い群の中で HLA 抗体陰性群と陽性群を比較しても HLA 抗体の影響は有意ではありません ($p = 0.164$)。HLA 抗体が臍帯血に対応する群も含めると、CD34 数が

$0.8 \times 10^5/\text{kg}$ より多い群では HLA 抗体は生着に対して有意な影響を与えませんが、CD34 数が $0.8 \times 10^5/\text{kg}$ より少ない群では HLA 抗体は生着に対して有意な影響を与えます ($p = 0.001$)。

HLA抗体の確認検査

東京都赤十字血液センター検査部にて HLA 抗体の確認検査法を開発し応

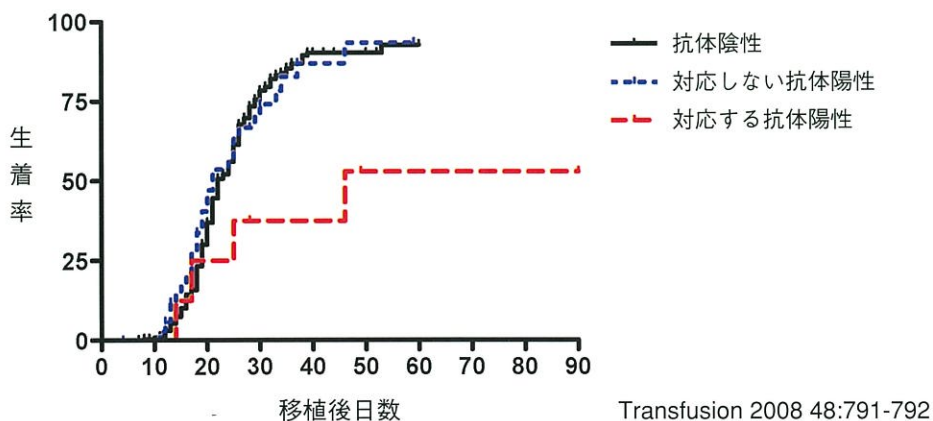


図9 東京都赤十字血液センター臍帯血バンクからの移植例 (腫瘍性疾患、初回移植) における HLA 抗体の影響

表2 臍帯血のHLA不適合抗原に反応するHLA抗体を保有する症例

診断	年齢	体重	HLA ミスマッチ	cell/kg, x10 ⁷	CD34/kg, x10 ⁵	移植前処置	GVHD予防	生着	好中球 500 回復日数
AML, 1CR	28	92	2	2.43	0.83	Full	CYA+MTX	donor type	25
ALL, 1CR	0.9	8	1	13.9	3.63	Full	FK+MTX	donor type	14
AML, M2, 1relapse	56	65	1	1.91	0.85	RIST	FK	donor type	17
AML, M2, refractory	45	51	2	2.61	1.04	RIST	CYA+FK	donor type	46
MDS, RAEB-T	56	69	2	2.41	0.54	Full	CYA+MTX	auto-recovery	
ALL, 1CR	33	49	1	2.3	0.61	Full	CYA+MTX	auto-recovery	
MDS, RA	66	56	2	2.33	0.61	RIST	FK	rejection	
MDS-leukemia	59	58	1	2.95	0.56	RIST	CYA	rejection	

用しています。抗体検出系では精製抗原を使用しますが、この Immunocomplex Capture Fluorescence Analysis (ICFA) 法では白血球に発現されている HLA 抗原と患者血清中 HLA 抗体との反応を検出します (図 8)。

東京都赤十字血液センター臍帯血バンクでの 285 例について HLA 抗体の影響を解析した際、recipient の HLA 抗体特異性が臍帯血抗原に対応していた症例が 8 例、うち臍帯血の生着を認めたのが 4 例ありました (図 9、表 2) 3)。この 8 例について ICFA 法による確認検査を行ったところ、陽性であった 4 例と移植後の生着を認めなかった 4 例が一致していました (表 3)。HLA クラス I、IgG 抗体については有用な確認検査法であると考えています。

まとめ

HLA 抗体が陽性である場合には、その特異性が臍帯血抗原に対応しないように臍帯血を選択することが望ましいと考えられます。また HLA 抗体があるということだけでは臍帯血移植を避ける理由にならないでしょう。患者体重あたりの輸注 CD34 数の多い臍帯血を選択することにより、HLA 抗体陽性であっても生着不全の危険性を増すことにはならないと考えられます。

これまでの解析では、実際に移植が

行われた後の recipient 抗体価の動きが不明です。また血小板輸血抵抗性であったかの情報もありません。臨床現場の貢献により、将来さらに解析が進み、移植の安全性が高まることと信じています。

参考文献

1) Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998; 339 (22): 1565-77.

2) Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Barker KS, Blazar BR, Eide C et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood* 2002; 100: 1611-1618.

3) Takanashi M, Fujiwara K, Tanaka H, Satake M, Nakajima K. The impact of HLA antibodies on engraftment of unrelated cord blood transplants. *Transfusion* 2008; 48: 791-792

表3 HLA抗体の再検査およびICFA法による交差適合試験

症例	CBT mismatch Ag	FlowPRA (histogram)	LABscreen Single Antigen (rawdata)	Cross match by ICFA	好中球生着
1	B62	+	B62 : 25160	+	なし
2	B52 B70	+	B52 : 8375	-	あり
3	B7	+	B7 : 70700	+	なし
4	A2	+ (one peak)	A2 : 2120	-	あり
5	A2 B48	+	B48 : 65440	+	なし
6	B54	+ (spike)	B54 : 29880	-	あり
7	B44 B61	+	B61 : 2776.0	+	なし
8	A26	+ (spike)	A26 : 353.0	-	あり

HLA抗体検査が難しいとの話を聞く頻度が多いことに気がきました。

今回は、なぜ難しいのか考えてみる事にしました。

二つの時代

HLA検査は、二つの時代に分けられます。一つはHLAタイピング（抗原検査）にリンパ球を用いたLCT法（Lymphocyte cytotoxicity test: リンパ球細胞障害性試験）の時代、もう一つは、現在であり、DNAを用いたDNAタイピングの時代です。その中で患者のHLA抗体を検査する意義や、方法も変わってきました。

LCT法の時代

この時代は、1960年代から2000年代初頭まで続きました。この技術は患者血清とドナーリンパ球を用いて行うダイレクトクロスマッチ検査として、現在に伝承されています。

この時代、HLAタイピングは被検者のリンパ球と抗血清（HLA抗体）と家兎補体を用いたLCT法で行っていました。

正確なHLAタイピングを行うためには、非特異反応が無く、各種のHLA抗原に正しく反応する良好な抗血清が必要です。その良好な抗血清を得るた

めには、正確な各種HLA抗原が必要です。このように、正確な各種HLA抗原と良好な抗血清は相互補完の関係にあり、長い時間を経る事により、互いに発展してきました。つまり、HLAタイピングの発展が、良好な抗血清を見つける事の発展であり、その逆もまた真でありました。

この良好な抗血清を見つける技術が、HLA抗体検査となります（図1）。

この時代は長く続きましたので、技術や知識の蓄積も十分にありました。検査担当者は、抗体の反応を理解する事が、抗原を理解する事に直結し、抗原を理解する事で、抗体が解釈できるスキルを向上する事が出来ました。

この時代に、複数のHLA抗原に対する反応の解析からCREG（Cross reactivity Group）が明確になってきており、次のDNAタイピングの時代でも判定の基礎を成す概念として重要視されています（図2）。

DNAタイピングの時代

HLAタイピングが、被検者のリンパ球や抗血清を使用せず、DNAを用いたタイピングに変化して、HLA抗原はさらに詳細・正確に分類出来るようになってきました。HLA抗体検査方法も、LCT法よりも遥かに高感度のFCMや

ルミネックスを用いる方法に進化してきました（図3）。

HLAタイピングはLCT法の時代より正確・精密な結果が得られるようになりました。

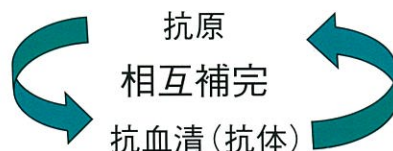
つまり、正確な各種HLA抗原が用意できる事になりました。

しかし、HLA抗体検査が高感度になった事で判定をいっそう難しいものになりました。

以前より弱い抗体も検出できる事になり、LCT法の時代に認識されていたCREG（Cross reactivity Group）の概念を超える反応も時々見受けられるようになりました。さらに新しい概念としてエピトープの概念を持ちこむ事により解釈の幅は広がりましたが、それでも全ての反応を解釈出来るまでには至っていません。どうもHLAに直接関係の無い自然抗体もクロスリアクションとして検出されている可能性があります。このように解釈の難しい場合がありますので何処までの反応が真の陽性なのか、それは臨床的意義があるのか？等の疑問・不安が出てきます。この疑問・不安の最大の原因は、DNAタイピングの時代になり情報量が著しく多くなったが解釈の為の経験の蓄積が追いついていない事です。LCT法が50年の歴史を経てきた事か

図1 LCT法の時代

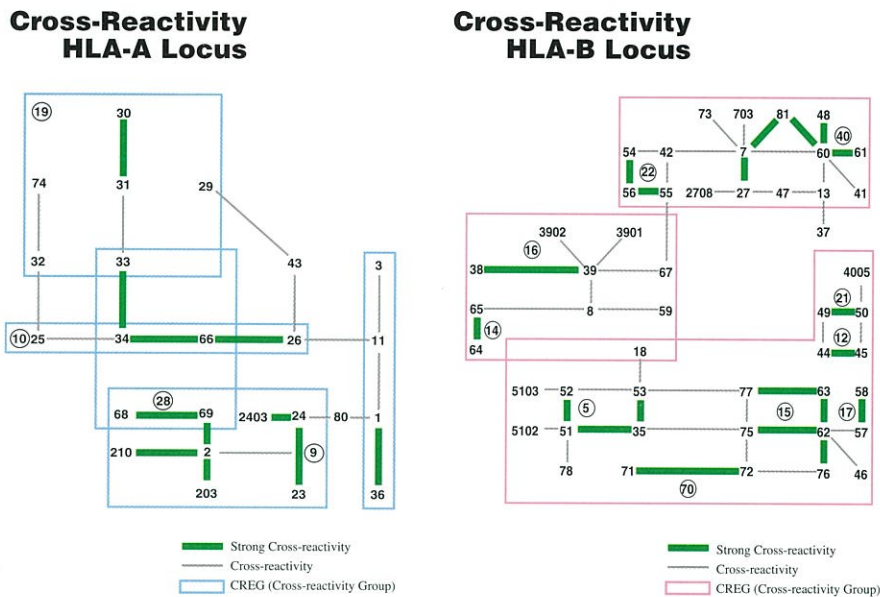
正確な各種HLA抗原が存在しなくては、良好な抗血清は得られない



良好な抗血清が存在しなくては、正確な各種HLA抗原は得られない

50年近い歴史（蓄積）があり判断材料は確立している

図2 クロスリアクション



ら見ればまだまだ歴史が浅いということに他なりません。

HLA抗体検査の新鮮な認識の蓄積を少しでも読者の皆様と共有化していきたいとの想いでこの「HLAと抗体」は編集しています。「HLAと抗体」バックナンバー等に目を通される事で蓄積された経験の共有化と、現実の臨床場面での活用状況の理解が深まるものと思います。

る方が結果の信頼度が高いのは言うまでもありません。たとえばFlowPRA等のスクリーニング検査で判定に悩む弱い反応の場合、妊娠歴・輸血歴・移植歴が全て「無し」と把握できていれば非特異的反応と考える事が出来ますが、もし、妊娠歴が有りと把握されている場合は、弱い反応（非特異反応）

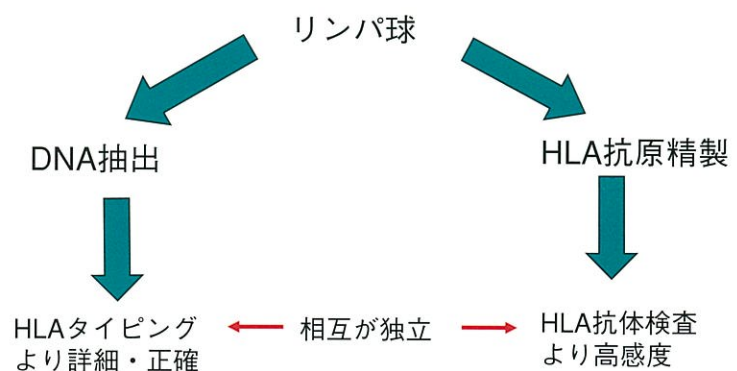
にHLA抗体が隠れている可能性も考えられるのでドナーHLAに対するSingle Antigenでの精査を考慮することも可能です。

HLA抗体検査ご依頼の際は、患者さんの臨床情報を検査員にお伝えくださることを臨床医の先生方へお願い申し上げます。

HLA抗体検査を依頼する先生方へ のお願い

HLA抗体検査は、臨床上有用な検査である事はすでに明らかになっていますが、HLA抗体検査は臨床検査の中でも最も難しい部類に入ります。信頼性の高い検査結果を得る為には、患者さんの臨床情報の把握が重要です。特に、妊娠歴・輸血歴・移植歴・ドナーHLAを把握して検査を行うのと、情報がまったく把握できないのでは、得られる検査結果の信頼度が異なってしまいます。もちろん臨床情報を把握してい

図3 DNAタイピングの時代



情報量が非常に多く10年程度の歴史(蓄積)しかないため発展段階である

虎の門 ニュース

お知らせ

・今デモ引っぱりだこ!!! 百聞は一見にしかず!!!

プロメガ社の Maxwell 16は、血液、スワブ、から前処理なしに完全自動でDNA抽出が可能です。

専用カセットを使用し全くの手間いらずでDNA抽出が可能となりました。

たとえば末梢血の場合、末梢血をDNA抽出専用カセットに分注しカセットをセット後スイッチON! 約40分後には必要十分量のDNAが回収できます。

純度もバッチリ! パフィーコートならさらにDNA収量UP!! その他材料からのDNA抽出も専用のプロトコルで十分可能です!!!!

デモの申し出はお早めに!!!



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

営業本部 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よう!

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

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

今回も非常に易しい問題です。初めての
が独力で15分間で解くことが出来ました。
皆さんふるってご参加ください!

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

USBメモリー内蔵ボールペンをプレゼント!

正解応募者から厳正なる抽選のうえ、
2名様にお送りいたします。



応募期限は4月末とさせていただきます。

編集委員

編集顧問 木村 彰夫

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 甲田 純也 児玉 千恵

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/>