

# HLAと抗体

臨床と検査の架け橋をめざして...

2010.12  
9号

## Contents

●血液型適合肝移植における抗ドナー特異抗体の意義—シングルビーズ法の有用性— 1

## 血液型適合肝移植における抗ドナー特異抗体の意義 ——シングルビーズ法の有用性——

朝日大学 村上記念病院 外科 江川裕人

京都大学附属病院輸血部 万木紀美子、菱田理恵子、辻弘明、前川平

京都大学肝胆膵外科 上本伸二

血液型不適合肝移植は、様々な工夫がなされ、特にリツキサンの登場によりほぼ満足いく成績が、施設間格差なく達成されるようになりました。一方で、血液型適合肝移植における抗ドナー特異抗体の臨床的意義についてはいまだ定まった見解がありません。

Takayaらは、1992年術前クロスマッチ陽性症例では、生存率と生着率が劣りvascular complicationが多いと報告しました<sup>(1)</sup>。続いて1999年術前クロスマッチ陽性症例では慢性拒絶反応と胆管合併症がおおいことを報告しました<sup>(2)</sup>。その肝病理所見は、早期は強い急性拒絶反応や肝壊死、3ヶ月以降になると胆管炎や慢性拒絶反応にまとめられます。しかし、当時その因果関係に迫る証拠は頻度の差のみでした。

わが国の生体肝移植においては、Kasaharaらが主に小児症例においてクロスマッチが急性細胞性拒絶反応(ACR)には関連するがグラフト生着には関係ないと報告しました<sup>(3)</sup>。しかし、最近になってAshizawaらが、成人女性症例における術前クロスマッチ陽性症例において生着率が有意に低下することを報告しました<sup>(4)</sup>。

### 抗ドナー抗体検出法

抗ドナー特異抗体の対象抗原は、HLAであるが非HLA抗原も存在します。HLAクラスI分子は、ほとんどすべての有核細胞と血小板の細胞表面に存在する糖タンパクで、細胞により発現の程度には差異があり、甲状腺、副甲状腺、下垂体の内分泌細胞や膵ランゲルハンス島、胃粘膜、心筋、骨格筋、肝細胞では発現が弱く、中枢神経、末梢神

経には発現がないとされます。一方、HLAクラスII分子は、マクロファージや樹状細胞、活性化T細胞、B細胞などの抗原提示細胞を含め、限られた細胞にのみ発現しています。

従来の細胞傷害性リンパ球クロスマッチ検査(LCT)では、小さなプラスチックトレイを使って標的のドナーのT、Bリンパ球とレシピエント予定の血清と反応させ、さらにウサギ血清補体を添加し、リンパ球の傷害の有無を肉眼で調べるもので、検査手技の熟練度の影響が大きい検



表1 ドナー特異抗体検出法の比較

	LCT	FCM	ビーズ法
検出抗原	ドナー抗原(HLA以外も)	ドナー抗原(HLA以外も)	既知のHLA抗原のみ
標的	ドナーリンパ球	ドナーリンパ球	標識抗原
検出法	傷害されたリンパ球数	抗体が結合したリンパ球数	標識抗原に結合した抗体量
判定法	肉眼	FCM	Luminex
感度	低い	高い	高い
定量化	希釈法	Count	蛍光強度 (未確立)
経費	許容範囲	高価	とても高価
手技	熟練を要す	容易	容易

査法です。感度を高めるために、抗ヒト免疫グロブリンを添加する (AHG-LCT法)。感度は後述のフローサイトメトリ法より低くなるが細胞傷害という現象を捕らえるために臨床的には重要です。また対象となる抗原系はHLAにとどまらない点が特徴です。一般的にB細胞を標的としたLCTはクラスII分子に対する抗体を検出すると考えているが一对一对応ではありません。また抗体がIgMかIgGかの区別は、温度やDTT (dithiothreitol) 処理によって行われるがこれも完全ではありません。

フローサイトメトリー法 (FCM) はこの問題を解決します。感度がよく、補体を結合しない性質の抗体も検出可能です。LCTと同じく標的にリンパ球を用いるため、対象となる抗原系はHLAにとどまりません。FCMでは標的リンパ球に結合した抗体を検出するのであって、細胞傷害度を測定するも

のではありません。

近年、急速に普及しつつある方法にシングルビーズ法があります。あらかじめビーズに既知の抗原がクラスI、クラスII別に標識してあり被験者の血清を反応させ抗原に結合したIgGをLuminexという機器を用いて検出する方法です。クラスI、クラスII別にスクリーニングする事が可能です。さらに対象抗原を特定するだけでなく定量評価もある程度可能です。

表1 (文献5.「移植」45巻473-480; 2010年表2より引用) に3種類の検出法の比較したものを示します。定量的評価には、LCTは希釈法、FCMはカウント、シングルビーズ法は蛍光強度 (fluorescence intensity [FI]) が用いられるが、三者の相関に関する報告はありません。

京都大学生体肝移植におけるクロスマッチの臨床的意義

1994年7月から1997年6月にかけて生体肝移植178症例中131例でLCTを測定しました。成人1例を含む25例の血液型適合症例で術後CDCを測定しました。術後陽性となったのは7例でした。術後陰性であった18例との2群間で、背景因子は、レシピエント・ドナーの年齢、性別、ドナー続柄、HLA一致数、術前クロスマッチに差がなく、sex mismatchのみが術後陽性群で有意に多かった。術後経過は、術後在院日数が $123 \pm 22$ 日対 $58 \pm 14$ 日 (術後陽性群対術後陰性群;  $p < 0.05$ )、在院死亡は43%対6% ( $p < 0.01$ )、Graft lossは86%対17% ( $p < 0.005$ )、生存率は14%対89% ( $p < 0.001$ ) と、術後陽性群で有意に不良な予後が示されました。術後陽性群では1例のみ経過良好で10年以上経過した現在も健常ですが、残る7例は全例死亡しています。

表2 術前クロスマッチ症例におけるシングルビーズ法蛍光強度と臨床経過

LCT	AHG-LCT	シングルビーズ法 蛍光強度	症例数	1年生存
陽性	陽性	> 10000	5	20%
陰性	陽性	> 10000	6	33%
		< 10000	3	100%
		陰性	4	75%
陽性	陰性	陰性	4	100%

肝生検所見はACRから慢性拒絶への移行が3例、胆管炎が4例で、2例が再移植を受けたましたが、一例は同じ経過を辿り肝不全死、もう一例は再移植後早期に感染死しました。再移植を受けなかった5例も、術後55日から265日で肝不全死または感染死している。しかし、当時因果関係を証明する方法がありませんでした。当時凍結切片でのみ検出可能であったC4d検出を試みようとしたましたが、小児症例で凍結切片とホルマリン固定用に2検体採取することに躊躇したため証明するにいたらずこのデータは10年間たなざらしになりました。その後血液型不適合症例でHagaらがホルマリン固定標本でのC4d検出の臨床的意義<sup>(6)</sup>、続いてSakashitaらが血液型適合症例の術前クロスマッチ陽性症例におけるC4d検出の臨床的意義を報告しました<sup>(7)</sup>。そこで、術後クロスマッチ陽性7例のホルマリン固定肝生検標本において

C4dを検討したところ、全例が陽性で、7例中6例に強陽性でした。またこのうち2例は術前クロスマッチは陰性でした。MMFや抗CD20などの抗体関連拒絶に有効な免疫抑制剤が利用可能な現在では術後クロスマッチを検討することは重要とかがえられました。

#### ビーズ法の検討

まず、2000年から2008年に肝移植を受けた肝移植870症例中、LCT and/or AHG-LCTが陽性であった症例が26例のうち、血清が保存されていた22例を対象としました。LCTの結果とビーズ法の結果と移植成績及び肝生検標本でのC4dを検討しました。表2(「移植」45巻473-480;2010年表3より引用)にLCT, AHG-LCT, 蛍光強度と移植成績を示します。LCTとAHG-LCT両者陽性5症例は全例蛍光強度が10000以上、AHG-LCTのみ陽性13例は、蛍光

強度10000以上(6例)、陽性だが10000未満(3例)、陰性(4例)の3群にわかれ、LCTのみ陽性4例はシングルビーズ法では陰性でした。生存率は蛍光強度10000以上で最も低く、蛍光強度が低下するにつれて良好となりました。

そこで、輸血部の尽力により2008年秋から術前クロスマッチにシングルビーズ法が導入された、100例に術前評価を行いました。うち16例において、クラスIかIIに対する抗HLA抗体が検出され、9例においてに抗ドナーHLA抗体でした。さらに1例で蛍光強度が10000以上でした。この1例を含む2例においてレシピエントが感作されていないドナーを選択することができました。



クロスマッチ陽性症例における臨床経過と組織所見

術後クロスマッチ陽性症例

**症例1** (図1:「移植」45巻473-480; 2010年図1より引用)。1歳女児胆道閉鎖症、ドナーは母親。LCT/AHG-LCT; 術前未施行, 1月後+/, 2月後+/, 3月後+/. 第61病日の肝生

検はChronic cholangitis。C4d染色はstromal depositionであった。第255病日に肝不全死。

**症例2** (図2:「移植」45巻473-480; 2010年図2より引用)。1歳男児胆道閉鎖症、ドナーは母親。LCT/AHG-LCT 術前-/- 1月後+/- 2月後

+/. 第35病日の肝生検はresolving ACRでしたがその後ductpenic rejectionに進行し第89病日に肝不全死。35病日の肝生検標本のC4d染色はstromal depositionでした。

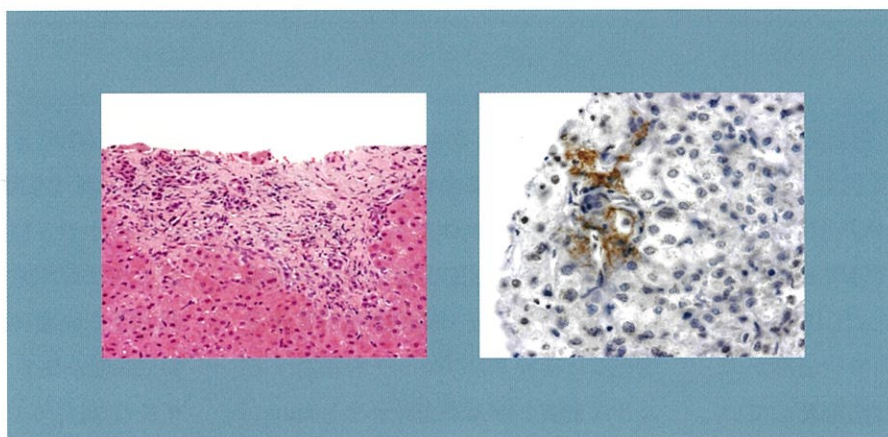


図1 症例1の肝生検。左: cholangitis (HE染色)、右: stromal deposition (C4d染色)。

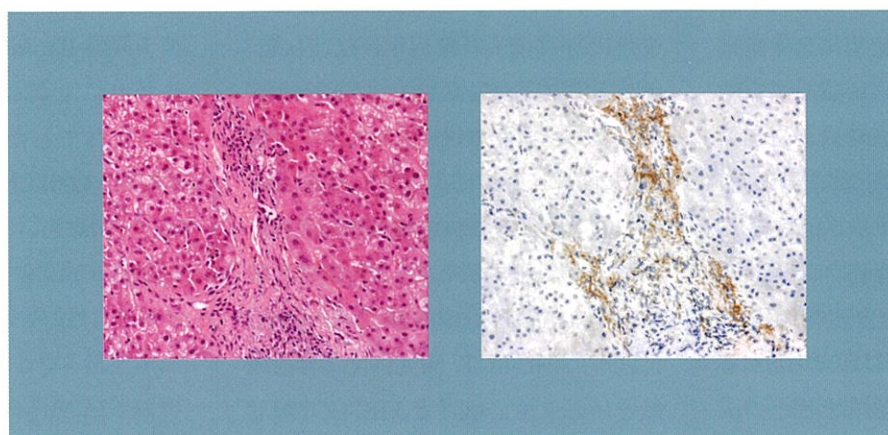


図2 症例2の肝生検。左: resolving acute cellular rejection (HE染色)、右: stromal deposition (C4d染色)。

## 術前クロスマッチ陽性症例

**症例3** (図3:「移植」45巻473-480;2010年図3より引用)。50歳女性 PBC。ドナーは娘。術前LCT/AHG-LCT:-/+。第183病日の肝生検はcholangitis、C4d染色はstromal depositionでした。免疫抑制強化にて生存中。

## 急激な転機をたどった術前クロスマッチ強陽性症例

**症例4** (図4、図5:「移植」45巻473-480;2010年図4、5より引用)。

術前LCTは、ドナー(夫)リンパ球100%が死亡する強陽性でしたが、臨床的判断から術前脱感作療法無しで肝移植。第3病日に血小板減少し、

TMAの診断にて血漿交換するも肝不全進行し第10病日で死亡。1週目の肝生検でzone 2からzone 3の壊死。C4dはわずかにendothelialに染まるのみ。死後、保存血栓でDSAを検証しました。シングルビーズで術前抗ドナー抗体を確認し、蛍光強度も10000以上でした。FCMにて血清中の抗体の

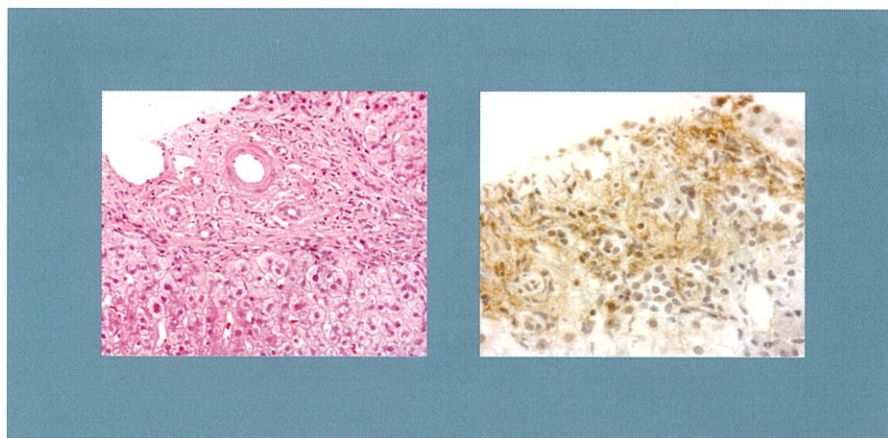


図3 症例3の肝生検。左: cholangitis (HE 染色)、右: stromal deposition (C4d 染色)。

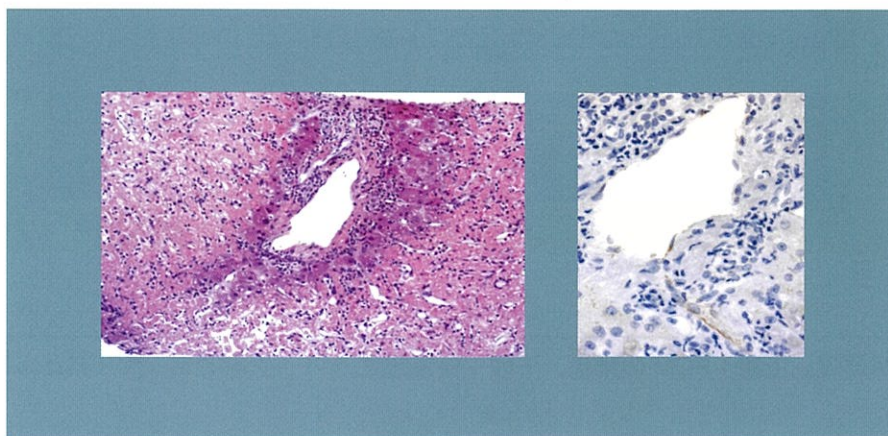


図4 症例4の肝生検。左: hepatic necrosis (HE 染色)、右: indeterminate endothelial deposition (C4d 染色)。



推移を検証したところ、第2病日に陰性化したクロスマッチが、第6病日に陽性となり以後増強することが確認されました。肝臓が移植され、抗体が肝臓に吸着されいったん検出できなくなった抗体が末梢血中に増加してくることが示唆されました。

### 今後の抗ドナー抗体対策

DSAの評価は、シングルビーズのみで評価することも可能ですが、HLA以外を標的とするDSAの意義も腎臓では論議されているので当面LCTとFCMも平行して測定しています。ク

ロスマッチ陽性 (LCT, AHG-LCT) はシングルビーズ法で再評価します。シングルビーズ蛍光強度10000以上の場合は原則禁忌とし他のドナー候補を選択します。シングルビーズ蛍光強度10000未満の症例は、可能であれば回避して、回避できない場合は血液型不

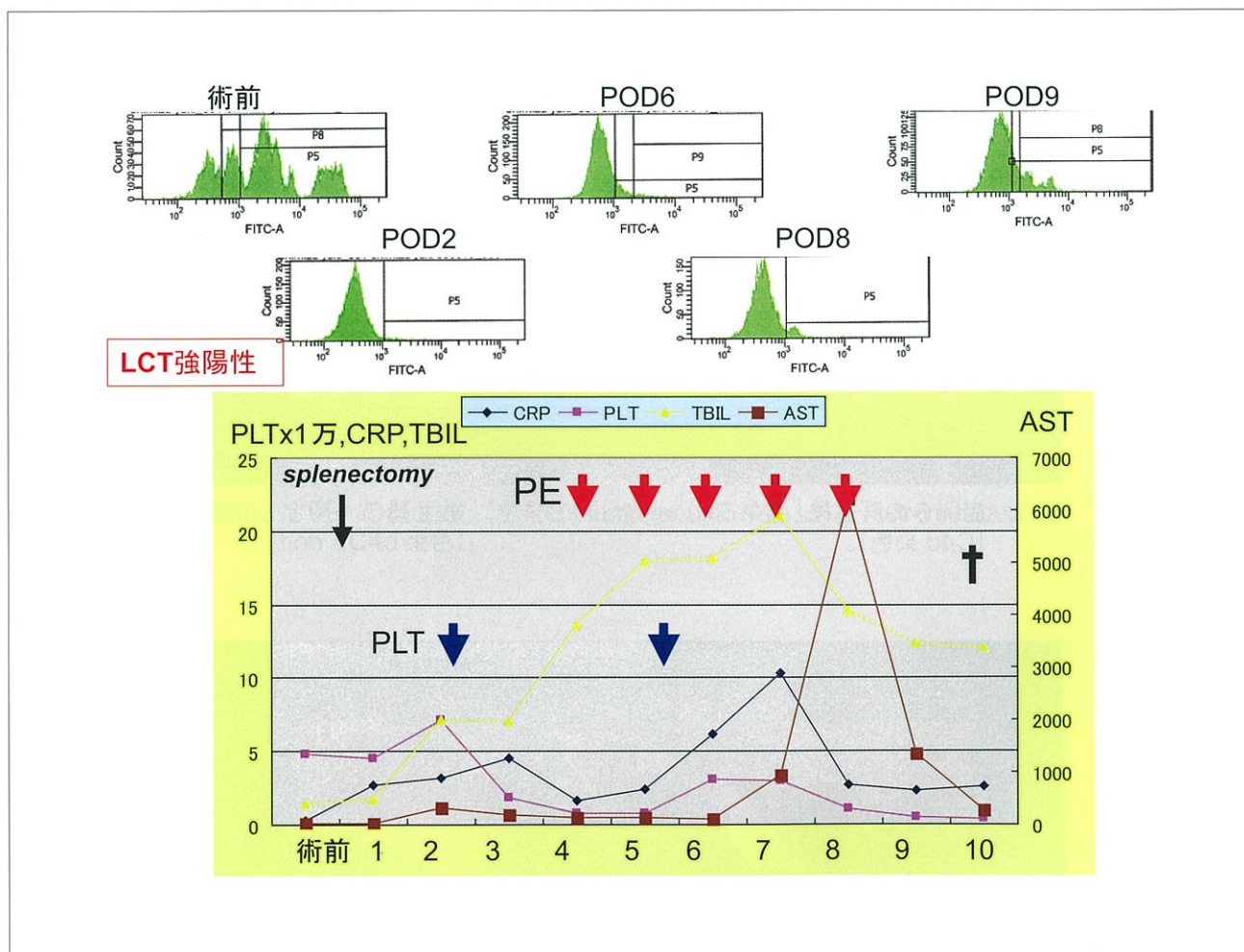


図5 症例4の臨床経過。上段：FCMの推移、下段：検査所見。

適合移植に準じた術前脱感作療法を試みています。シングルビーズ陰性でFCMのみ陽性は他にドナー候補がない場合はリスクを十分に説明して移植を行い注意深く経過を見ています。図6に術前抗ドナー抗体検査アルゴリズムを示します。術後に難治性の拒絶反

応や狭窄が同定し得ない胆管炎を認めたらDSAの有無を検討すべきとかがえます。

術前脱感作療法については、血液型不適合肝移植に準じた方法をとっています。リツキサシとMMFとカルシニユリン阻害薬の術前投与と血漿交換の

組み合わせです。術中脾摘も有効と考えられず。術後脱感作療法は、MMF、リツキサシ、血漿交換、IVIgが基本となります。

術後は、全例DSAをルーチンに測定する必要はないが、術前弱陽性例、夫や子供から妻・母親への移植、中心

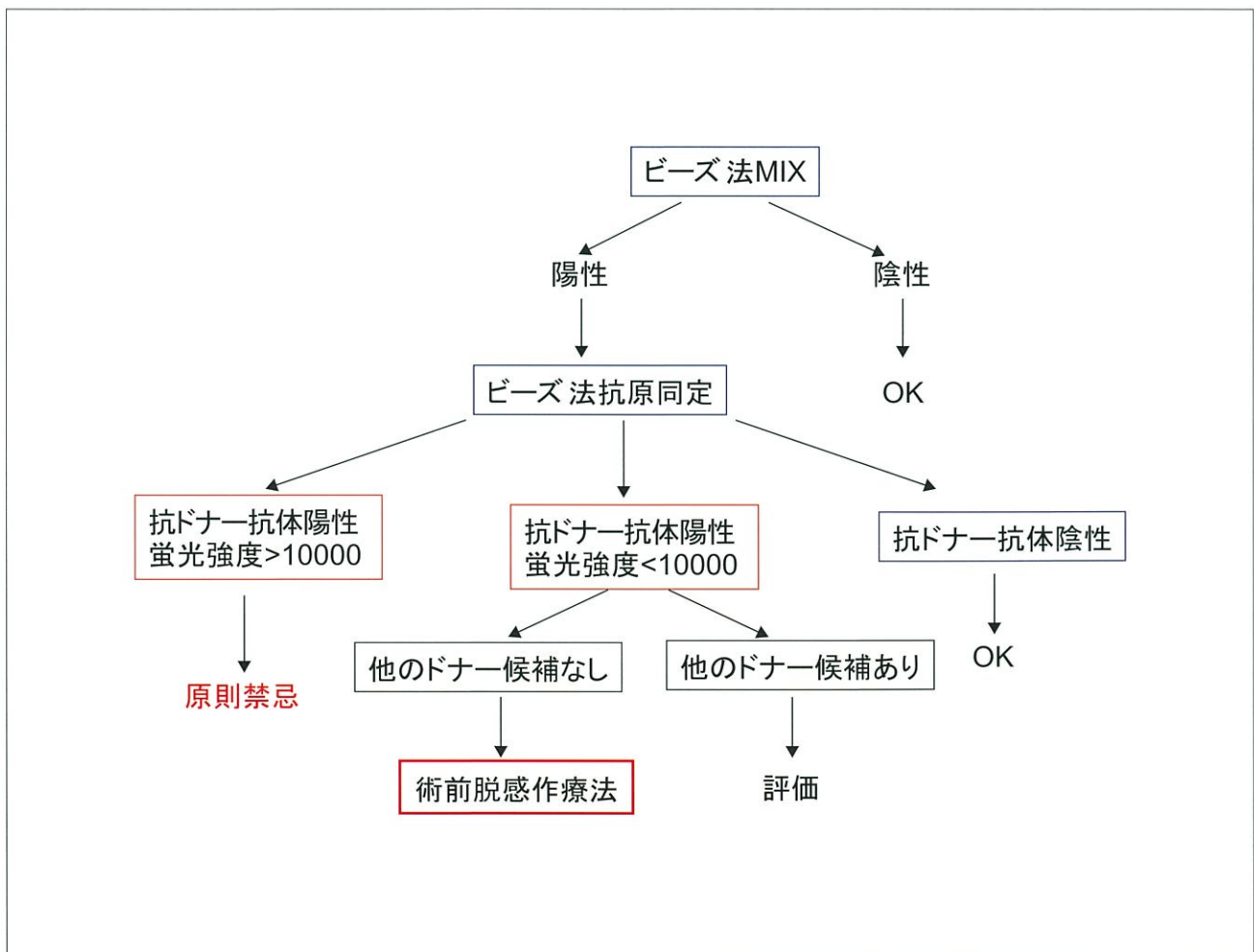


図6 ビーズ法による抗ドナー抗体検査とドナー選択

静脈周囲の反応が強いACR、肝生検での術後早期の胆管炎所見の症例ではDSAとC4dをチェックして、迅速かつ適切な対応が求められるでありません。

生体肝移植では、家族であるがゆえに“感作”という落とし穴が存在します。脳死移植では頻度は低いと予想されますが、わが国では頻度が高いHLAもあるので油断できません。シングルピース法で肝移植希望者の術前抗HLA抗体陽性は23%でした。脳死肝移植においても他の臓器と同じくDSAをチェックするシステムが必要ではないでしょうか？特に親族優先提供において危惧されます。今後検討していくべき課題です。

#### 参考文献

- 1) Takaya S, Bronsther O, Iwaki Y, Nakamura K, Abu-Elmagd K, Yagihashi A, Demetris AJ, Kobayashi M, Todo S, Tzakis AG, et al. The adverse impact on liver transplantation of using positive cytotoxic crossmatch donors. *Transplantation* 1992;53:400-6.
- 2) Takaya S et al. Increased bile duct complications and/or chronic rejection in crossmatch positive human liver allografts. *Transplantation Proceedings* 1999;31:2028-2031.
- 3) Kasahara et al. Antidonor antibody in patients receiving ABO-identical and HLA-mismatched living donor liver transplants: effect on survival. *Transplantation* 1999;67:568-575
- 4) Ashihara E, et al. In-hospital mortality in adult recipients of living donor liver transplantation: experience of 576 consecutive cases at a single center. *Transplantation*. 2007;83:506-9.
- 5) 江川裕人、宮川文、羽賀博典、前川平、吉澤淳、上本伸二。血液型適合移植における抗ドナー特異抗体の意義。移植 2010；45:473-480.
- 6) Haga H, Egawa H, Fujimoto Y, et al. Acute humoral rejection and C4D immunostaining in ABO blood type incompatible liver transplantation. *Liver Transpl* 2006;12:457-64.
- 7) Sakashita H, Haga H, Ashihara E, et al. Significance of C4d staining in ABO-identical/compatible liver transplantation. *Modern Pathology*. 2007;20:676-84.

#### 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 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/>