

NMDP、台湾 以外の海外バンクサーチ経過報告

報告日：99年2月1日

観察期間：98年4月～99年1月末

報告作成：名古屋第一赤十字病院 前NMDP-TC 中村 真貴子

この報告は、99年1月末現在でのNMDP、台湾以外の海外バンクへのサーチ実施と結果状況をまとめたものである。BMDWへの直接サーチのためのID入手が、98年8月である。それまでは、個別に各海外バンクへサーチを実施していたが、7月以降はBMDWリストにより一致ドナーの登録している機関へ確認のための初期サーチ、その後にCT希望があればサンプル送付依頼を行なった。その結果によっては、BMDWに加入していないシンガポールバンクの検索も実施した。シンガポールは、HLA-A、B、DRのタイピング済みドナーが少ないため、サーチ結果はAとDRの一致者数を記載した。BMDWとシンガポールの両方で一致の見つからない患者については、記載していない。

PT. 1		4月		カナダ、フランス、ドイツ、シンガポール他サーチ ABブロード一致ドナーのみ
PT. 2	98年	5月	13日	ドイツ初期サーチ
			15日	サーチ結果 CT依頼
		6月	2日	サンプル着
			18日	タイピング結果
			19日	Work-up依頼
		8月	28日	BMT
PT. 3		5月		フランス初期サーチ ABブロード一致
		6月		ベルギー初期サーチ HLA-AB一致 ABともブロードのため不可 オーストラリアサーチ CT依頼
		9月		オーストラリアドナーWork-up依頼
	99年	1月		旅程調整中
PT. 4		5月		ドイツサーチ HLA-AB一致ドナー DRタイピング依頼→不一致
PT. 5	98年	5月		フィンランド初期サーチ HLA-ABDR一致 CT依頼
		6月		ドナーがイギリスへ転居のためフィンランドとの調整終了
		7月		イギリスへサーチ、該当者なし。
PT. 6		5月		BMDWドナー0、シンガポール初期サーチ
		6月		再サーチ HLA-A、DRB1一致ドナー Bタイピング依頼

PT. 7	6月		カナダ初期サーチ HLA-ABDR 一致1名 CT依頼 ドナーの事情により採血不可
	99年	1月	7日 カナダに再サーチ 上記ドナー採血可能により 7日 サンプル依頼 26日 ドナー健康診断 採血 28日 サンプル到着 7月 ドナー事情により調整終了
PT. 8	7月		ドイツ初期サーチ HLA-AB 一致2名 考慮中
PT. 9	7月		BMDW ABDR 一致ドイツ、オーストラリア各1名 ドイツ初期サーチ DRB1 不一致 シンガポール A、B、DR ブロード一致1名
PT. 10	8月		BMDW サーチオーストラリア、ドイツ各1名 オーストラリア料金表送付
PT. 11	9月		BMDW HLA-A、B 一致3名 シンガポール HLA-B1 座ミスマッチ1名
PT. 12	9月		BMDW ABDR 一致4名 イギリス、イタリア、カナダ初期サーチ イギリス2名、カナダ1名、イタリア0 料金、サーチ結果送付
PT. 13	98年	10月	ドイツ HLA 一致ドナー1名 NMDP にドナーがあり調整進行
PT. 14	10月		BMDW 一致なし シンガポール HLA-A、DR 一致35名
PT. 15	10月		BMDW サーチ カナダ、ドイツ、スペイン、シンガポールサーチ カナダ DR1 座ミスマッチ1名 DR タイピング4名依頼 患者よりキャンセル希望
PT. 16	10月		BMDW サーチ ABDR ブロード3名 イギリス ドイツ初期サーチ イギリス、ドイツ確認 JMDP ドナーと調整進行
	99年	1月	
PT. 17	11月		BMDW サーチ ABDR1名 シンガポール A、DR 一致8名 NMDP ドナーと調整進行
	99年	1月	
PT. 18	11月		シンガポール A、DR 一致9名

PT. 19	10月 12月	BMDW HLA-ABDR ドイツ一致1名 NMDP ドナーと調整進行中
PT. 20	11月 12月	BMDW HLA 一致1名 ギリシア初期サーチ依頼
PT. 21	99年 1月	BMDW サーチ 英国に HLA - A、B、DR 一致ドナー イギリス初期サーチ サーチ結果と料金表送付

分担研究課題 HLAのDNAタイピングの普及に関する研究
分担研究者 九大・生医研 笹月 健彦

骨髄移植は、造血系の悪性疾患および遺伝性疾患の有効な治療法である。しかしながら、骨髄移植においては、移植片の宿主に対する強い免疫応答がしばしば致死性GvH病をもたらすことから、GvH病を中心とした予後に対するHLAの寄与を正確に把握することが最重要となる。そこで、公的骨髄バンクを利用した非血縁者間骨髄移植行われたHLA-A、B、DRが血清学的検索でマッチした移植例のうちこれまでにHLAのDNAレベルでの解析が終了した440組につき詳細なデータ解析を行い、1) 急性GVHDを指標にした場合HLA-A、Cの一致が予後に良好な結果をもたらすこと、2) 生存を指標にした場合HLA-Aの一致が予後に良好な結果をもたらすこと、3) 白血病の再発を指標にした場合HLA-Cの不一致が予後に良好な結果をもたらすこと、4) HLA-Bの一致は、急性GVHD、生存いずれを指標にした場合にも予後に良好な影響を与える可能性が高いこと、5) HLA-DPA1、DPB1の不一致は、急性GVHD、生存いずれを指標にした場合にも予後に影響を与えないことが明らかになった。これに対し、HLA-DRB1、DQB1の不一致は、多変量解析において有意に予後に影響を与える因子として選択されなかったが、生存を指標とした場合、一致群と不一致群の間に若干の差が認められた。

これらの結果を踏まえて、今後、1) HLA-C遺伝子の不一致によるGvL効果の意義の確認とそのメカニズムの解明のために、GvL効果のない非白血病の移植例についてHLA-C遺伝子の不一致の予後に与える影響の検討、2) 予後に与える影響が若干認められたHLA-DRB1、DQB1に関し、その意義の確認のために、HLA-A、Bが一致している移植例においてさらに例数を増やした検討が必要がある。

非血縁者間の造血幹細胞移植の課題

1. CML 第1慢性期移植の生存率の向上

表1. 疾患/病期別生存率：3年生存率% (症例数)

	<16才	>15	<16	>15		
AML 1CR	84(19)	71(47)	ALL 1CR	77(18)	65(73)	CML 1CP 51(195)
AML 2CR	89(18)	50(47)	ALL 2CR	58(44)	30(36)	CML ACC 49(39)
AML REL	31(13)	26(45)	ALL REL	40(27)	13(45)	CML BC 12(23)

2. 40才以上移植の生存率の向上

表2. 年齢別生存率：3年% (症例数)

	-10	11-20	21-30	31-40	41-51才
Standard Risk Leukemia	66(36)	65(64)	61(102)	58(87)	49(65)
High Risk Leukemia	47(75)	45(118)	33(122)	36(92)	13(65)

3. 重症急性GVHDの抑制/GVHDとGVL効果との関連

表3. 急性GVHD重症度別生存率：3年% (症例数)

重症度	0	1	2	3	4
Standard Risk Leukemia	66(84)	67(113)	64(89)	29(29)	4(35)
High Risk Leukemia	33(131)	46(129)	48(101)	32(53)	0(40)

表4. High Risk Leukemiaの再発率(2年)とHLA-A, B, C disparity

	Match	Mismatch	
A/ B	41 (118)	41 (78)	n.s
C	42 (105)	26 (47)	0.30

4. 生着不全/拒絶とHLA disparity (Rejection Vector)との関連

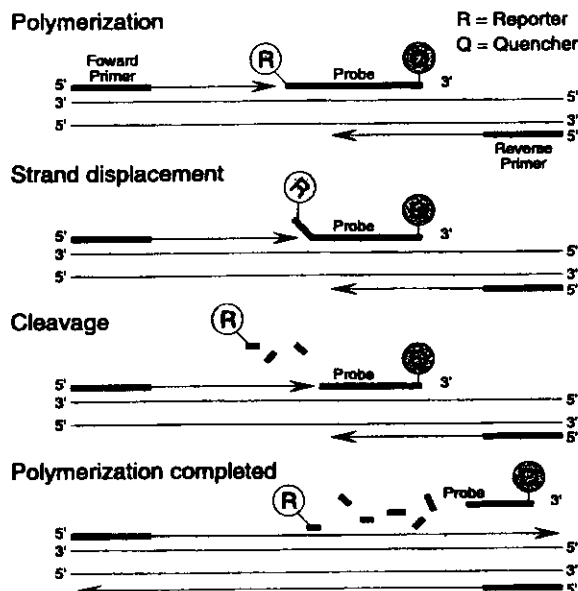
	Match	Mismatch	
A	3.7 (252)	3.4 (91)	n.s.
B	3.2 (292)	6.1 (51)	n.s.
C	3.2 (198)	6.5 (79)	n.s.
DRB1	2.7 (198)	6.3 (65)	n.s.
DQB1	2.9 (281)	6.8 (68)	n.s.
DPB1	3.0 (108)	3.7 (166)	n.s.

リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた新しいHLA クラスI DNA タイピング法の開発

東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
猪子英俊

PCR-SSP (sequence specific primer) 法は多数の対立遺伝子特異的なプライマーを用いてPCR反応を行い、標的の領域が増幅されたか否かを電気泳動にて確認するのみの、非常に簡便な方法として、骨髄移植や死体腎移植の適合のためのHLA-DNAタイピングを中心に広く応用されている。しかしながらこの方法で高精度タイピングを行うには多数のプライマーセットが必要とされ、尚且つすべてのプライマーセットに対して電気泳動を行う必要があることから、多数検体を一度にこなすことは実技レベルでは困難であり、血清学レベルでの解像度にとどまっているのが現状である。

本研究で我々が開発したリアルタイムPCR-SSP法は、PCR産物自動検出機(ABI PRISM 7700)を用いて、多数のプライマーセットを用いた反応を同時に、しかもリアルタイムでモニタリングする方法である。すなわち、鋳型に結合した蛍光オリゴヌクレオチドプローブが、PCR反応中にTaqポリメラーゼの伸長に伴って加水分解され、その結果生じる蛍光シグナル強度をモニターすることによって、PCR反応の有無を確認する方法であり、シグナルを直接検出可能であることから、高い再現性が期待できる。DRB1遺伝子タイピングでは、12組のプライマーセットを用いて血清学的 - 中精度のタイピングが可能で、測定後の増幅産物は、RFLP法に使用することが可能である。HLA-C遺伝子タイピングについては、22組のプライマーセットを用いて中 - 高精度のタイピングが1時間40分で検出可能となり、更に現在HLA-A遺伝子についても検討を行っている。本法は電気泳動を必要とせず、PCR反応後の操作も不要であることから、迅速な結果判定が行え、従来法に比べ大幅な時間短縮が可能となる。また、HLA-B遺伝子についても検討を行う予定であり、確立されれば迅速なHLA DNAタイピング法として、移植医療に貢献できると考える。



蛍光プローブによる検出の原理

平成10年度 厚生科学研究 第一回研究班報告

京都府赤十字血液センター・研究部長
佐治博夫

1998年7月18日 東京

Table 5. Status of the HA-1 Antigen and GVHD in 115 Donor-Recipient Pairs.*

Variable	Children		Adults		All Patients	
	No GVHD	No GVHD	No GVHD	No GVHD	No GVHD	No GVHD
HA-1 status (no. of pairs)						
Mismatched	1	2	10	0	11	2
Matched	9	22	43	28	52	50
Total	10	24	53	28	63	52
Odds ratio	1.2		∞		5.4	
95% confidence interval	0.02-26		1.3-∞		1.0-56	
P value	1.00		0.02		0.06	

*Data on HA-1 status were missing for two pairs. The P value for heterogeneity between children and adults was 0.41.

N Engl J Med 1996; 334: 281-285

Table 6. Status of the HA-1, 2, 4, and 5 Antigens and GVHD in 98 Donor-Recipient Pairs.*

Variable	Children		Adults		All Patients	
	No GVHD	No GVHD	No GVHD	No GVHD	No GVHD	No GVHD
HA-1, 2, 4, 5 status (no. of pairs)						
Mismatched	2	3	12	0	14	3
Matched	5	15	35	26	40	41
Total	7	18	47	26	54	44
Odds ratio	1.9		∞		6.4	
95% confidence interval	0.1-22		1.8-∞		1.4-43	
P value	0.07		0.006		0.01	

*Data were missing for 19 pairs. The P value for heterogeneity between children and adults was 0.21.

N Engl J Med 1996; 334: 281-285

表1. Molecularly defined minor histocompatibility antigens

mHa	Source protein	Restriction molecules	Known alleles*
Human			
HA-1	KIAA0223 protein	HLA-A*0201	2 (2)
HA-2	Class I myosin	HLA-A*0201	2 (1)
H-Y	SMCY protein	HLA-B7, -B60, -A1, -A*0201	1 (1)
Mouse			
AAPDNRETF	Unknown	H-2D ^b	2 (1)
COI	Cytochrome oxidase	H-2M3	2 (2)
H-Y	SMCY protein	H-2K ^k	1 (1)
H-Y	UTY protein	H-2D ^b	1 (1)
NDI	NADH dehydrogenase	H-2M3	4 (4)

*: The number in parentheses indicates how many alleles have been molecularly defined.

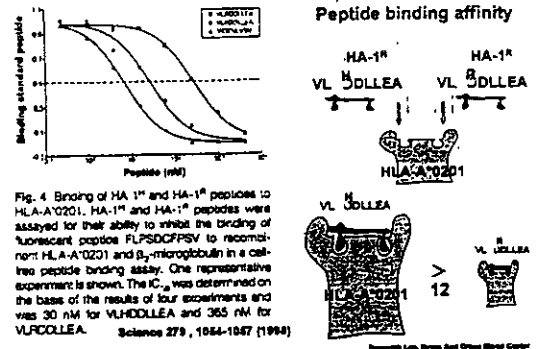


Fig. 4. Binding of HA-1^H and HA-1^R peptides to HLA-A*0201. HA-1^H and HA-1^R peptides were assayed for their ability to inhibit the binding of fluorescent peptide FLPSDFPSPV to recombinant HLA-A*0201 and β_2 -microglobulin in a cell-free peptide binding assay. One representative experiment is shown. The IC₅₀ was determined on the basis of the results of four experiments and was 30 nM for VL3DLLEA and 365 nM for VLFCOLLEA. Science 279, 1954-1957 (1994)

Gene Frequencies of HA-1 allele (Dutch and Japanese)

Race	number	HA-1 ^H	HA-1 ^R
Dutch*	100	0.44	0.56
Japanese	52	0.40	0.60

* Van Els et al, Immunogenetics 35: 161-165, 1992

Table 1. Gene frequencies and amino acid variations of adhesion molecules in Japanese subjects

Adhesion molecule	Chr. no*	Codon	Amino acid substitution	Gene Frequency [†]
CD2 (LFA-2)	1	266	CAC (His) → CAA (Gln)	H: 0.68 Q: 0.32
CD28 (T44)	2		not detected	
CD31 (PECAM-1)	17	80	GTG (Val) → ATG (Met)	V: 0.99 M: 0.01
		125	GTG (Val) → CTG (Leu)	V: 0.55 L: 0.45
		563	AGC (Ser) → AAC (Asn)	S: 0.52 N: 0.48
		670	AGA (Arg) → GGA (Gly)	R: 0.52 G: 0.48
CD34	1		not detected	
CD36 (GPIV)	7		not detected	
CD42 (GPIb)	17	161	ACG (Thr) → ATG (Met)	T: 0.89 M: 0.11
CD44 (Pgp-1)	11		not detected	
CD48 (Blast-1)	1		not detected	
C D49b (VLA-2, GPIa)	5	505	GAG (Glu) → AAG (Lys)	E: 0.97 K: 0.03
CD54 (ICAM-1)	19	489	AAG (Lys) → GAG (Glu)	K: 0.61 E: 0.39
CD62L (LECAM-1)	1	213	CCT (Pro) → TCT (Ser)	P: 0.8 S: 0.2
CD86 (B70)			not detected	
CD102 (ICAM-2)	17	256	CGG (Arg) → CAG (Gln)	R: 0.995 Q: 0.005
CD106 (VCAM-1)	1		not detected	

* Chromosome number

[†] Calculated from random Japanese population, number of DNA samples; 209

表2. Association between compatibility of adhesion molecules and acute GVHD in BMT of HLA-identical siblings and their restriction to HLA superfamilies

HLA restriction	Pt. No.*	Genotypes matched for adhesion molecules	Acute GVHD grade ≥ 1	No GVHD	%	X ²	P value	P _c value	Odds Ratio	
A3-like SF	47	CD62L	IC	7	0	100	7.24	0.01	0.03	18.2
			C	18	22	45				
		CD62L + CD49b	IC	8	0	100	8.48	0.004	0.07	21.8
			C	17	22	44				
B44-like SF	57	CD31(codon 563/670)	IC	14	2	88	8.88	0.003	0.018	3.9
			C	18	23	44				
		CD31(codon 125)	IC	9	2	82	3.65	0.09		4.5
			C	23	23	50				
		CD31 ^{**} + CD62L	IC	19	4	83	10.97	0.001	0.018	7.7
			C	13	21	38				

HLA Superfamilies (SF) based on similarities of their peptide-binding motifs.

HLA-A3-like SF: A3, A11, A31, A33, A*6801

HLA-B44-like SF: B37, B41, B44, B46, B47, B49, B50, B60, B61

* Total number of patients=116, CD31^{**}=CD31(codon 563/670)

P_c: If the P values reached values of less than 0.05, than they were corrected for the total number of tests performed by using the formula: P_{corrected}=1-(1-P)ⁿ, where P is the original P value and n is the number of tests performed. CD62L, n=3;

CD31(codon 563/670), n=6; CD49B+CD62L and CD31^{**}+CD62L, n=18

神奈川臍帯血バンクにおける HLA 1 抗原ミスマッチ検索について

中島文明 神奈川県赤十字血液センター

西平浩一 神奈川県立こども医療センター

はじめに： 神奈川臍帯血バンクにおいて臍帯血ドナーの HLA 型検索は血清学的 A, B, DR 各 6 抗原で 5 抗原以上の一致をみた場合をドナー候補としている。平成 10 年 6 月までに 147 件の検索依頼に対して報告し、また、ドナー候補を得た 16 例の患者に対して臍帯血を提供してきた。提供する直前には患者と候補臍帯血の HLA 型を遺伝子型で調べ、取り違え、タイピングミス等の過誤がないことを確認している。これらのデータは移植成績との関連を調べるための蓄積ともなる。

概 説： このような 1 抗原がミスマッチであるドナーの選択は、これまでに我々が経験したことがない方法であり、このことによって生じる以下のふたつの問題点について述べる。

1. HLA 抗原名はその発見過程から、ブロードタイプと呼ばれるおおもとの抗原名から、これを出発点としたより詳細なスプリットタイプと呼ばれる抗原名まで複数の抗原表記ができる。例えば、HLA-DR6 という抗原は DR13, DR14, DR1403 と WHO 公認抗原名でも 3 種類のスプリット抗原をもち、アミノ酸配列で相違のある遺伝子型まで調べると日本人に存在する対立遺伝子だけでも 9 種類に分類される。全国から依頼される、患者 HLA データの表記方法も千差万別で、このことが適合ドナー検索においてある種の不公平を生じている。つまり、患者の HLA 型をどの段階の表記にするかによって、得られるドナー数に相違が生じるからである。ブロードな表記であると得られるドナー数が多くなり移植の機会は増えるが、その反面かけ離れた HLA 型によって移植成績に悪影響をおよぼす可能性がある。細分化された表記であると、得られるドナー数は少ないが、より患者に適合したドナーで移植できる。したがって、患者の HLA データは遺伝子タイピングを含めたより詳細な結果が望ましいと考えられる。

2. 最終確認で A, B, DR 以外の HLA 領域も調べているが、ミスマッチとなる 1 抗原に何が選ばれたかによって HLA 領域全体の相同性に大きな相違が生じていることが確認された。例えば患者の DR4 抗原に対してミスマッチとなるドナーの抗原に DR9 が選択された場合は、その他の HLA 領域もほぼ同じとなるが、DR6 が選択された場合では A, B, DR 以外のところで全く異なった HLA 型になってしまう。これらの領域が移植成績にどれほどの影響があるかは不明であるが、少なくとも同じ土台で比較するデータとは言い難いと考える。

結 語： 国内では現在 30 例弱の非血縁者臍帯血幹細胞移植が行われたが、それぞれの病態や移植時の病状はさまざまであり、これらのデータで HLA 一致度と移植成績に関して述べるには無理がある。しかしながら、完全一致を原則としている非血縁者間骨髄移植と異なり、何でもよい 1 抗原のミスマッチが許される臍帯血移植においては、より信頼性の高い評価に裏打ちされた移植を目標にしていかなければならないであろうし、そのためのデータの蓄積と検討が今後もさらに必要であると考える。

日本人の MICA 遺伝子の多型と HLA-B との関連

日赤中央血液センター・石川善英・十字猛夫

【目的】HLA 同様多型を示すことが知られている MICA 産物がマイナー抗原として移植に影響を及ぼす可能性を調べるため、日本人の MICA 遺伝子の多型解析と HLA-B との関連を調べた。

【方法】健常な HLA アリル既知の日本人 114 人のゲノム DNA を用いて MICA の多型解析を行った。MICA の exon 2、3、4 をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを設定し、これらを用いて増幅された PCR 産物を SSCP 法で段階的にパターン解析し、exon 2、3、4 の組み合わせによりアリルを推定した。統計学的解析には maximum likelihood method (Imanishi et al. 1992) を用いて MICA の対立遺伝子頻度および MICA と HLA-B との間の連鎖不平衡を検討した。

【結果】健常日本人集団において exon 2 で 5 種、exon 3 で 6 種、exon 4 で 4 種の SSCP パターンが得られた。それらの組み合わせにより 8 種のアリルの存在が確認され、うち 1 種は既報の MICA アリルと異なり、新しい対立遺伝子であると推定された。MICA と HLA-B との関連を検討したところ、強い連鎖不平衡の存在が示唆された。また、特定の HLA-B アリルと連鎖不平衡の強い null アリルの存在が推定された。

Association between MICA and HLA-B

(N=114)

MICA	associated HLA-B allele	Serology	HF (%)
002	B*3501	B35	7.9
	B*3901	B39 (16)	2.6
	B*3902	B39 (16)	0.9
	B*6701	B67	1.3
004	B*4403	B44 (12)	11.8
007	B*1301	B13	0.9
008	B*0702	B7	5.3
	B*3701	B37	1.3
	B*3901	B39 (16)	0.9
	B*4001	B60 (40)	6.1
	B*4002	B61 (40)	6.6
009	B*4006	B61 (40)	4.8
	B*5101	B51 (5)	7.0
	B*5201	B52 (5)	11.4
010	B*1501	B62 (15)	5.7
	B*4601	B46	5.7
012	B*5401	B54 (22)	7.0
	B*5502	B55 (22)	1.8
	B*5601	B56 (22)	1.3
	B*5901	B59	0.9
017 (New)	B*1518	B71	1.8
null	B*4801	B48	3.8

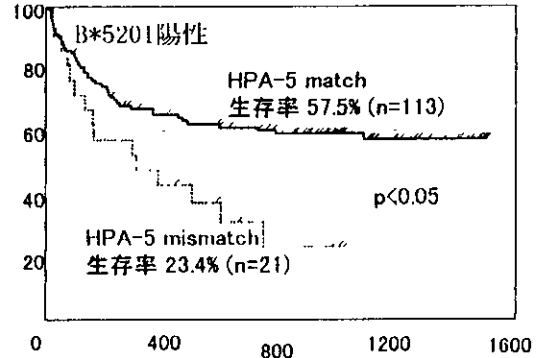
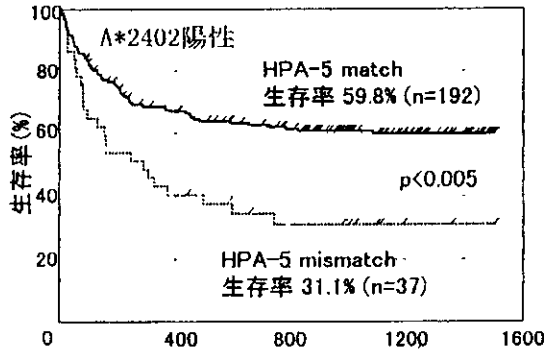
マイナー抗原の移植成績への影響

1999. 2. 6

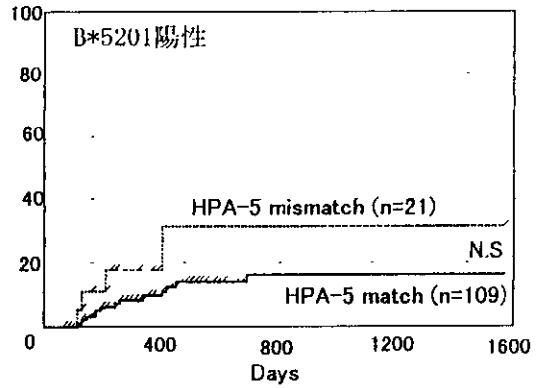
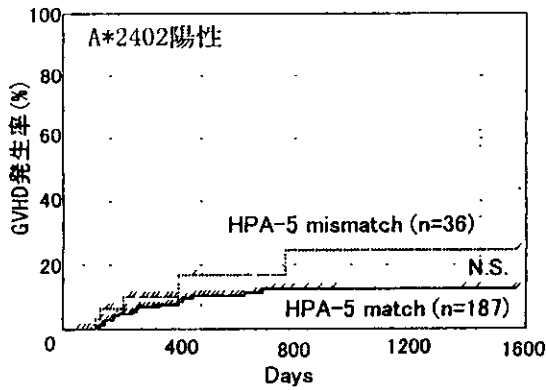
日赤中央血液センター・十字猛夫

解析対象:HLA-A,B,C,DR適合移植

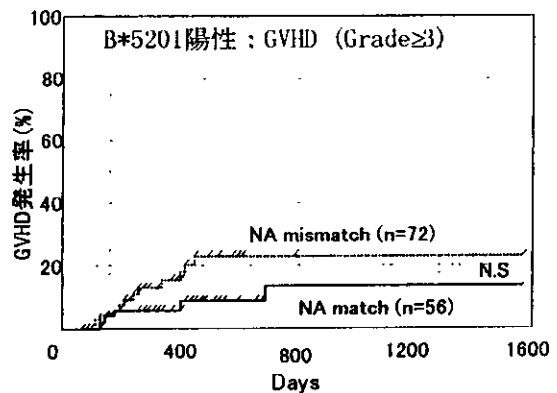
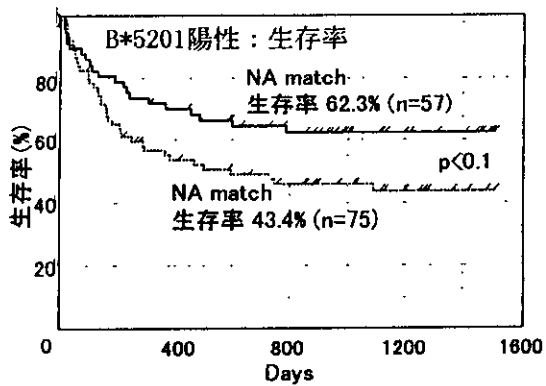
1-1. HPA-5 : 生存率



1-2. HPA-5 : GVHD (Grade \geq 3)



2-1. 顆粒球抗原 (NA) の影響



アリルによるHPA-5不適合の影響

解析対象：HLA-A, B, C, DR適合移植

allele	HPA-5	n	4年生存率(%)	p
A*0201	match	25	61.8	N.S.
	mismatch	4	50.0	
A*0206	match	23	52.2	N.S.
	mismatch	8	25.0	
A*1101	match	41	54.8	N.S.
	mismatch	8	50.0	
A*2402	match	192	59.8	p<0.005
	mismatch	37	31.1	
A*3101	match	46	41.0	N.S.
	mismatch	3	0.0	
A*3303	match	63	53.3	N.S.
	mismatch	10	40.0	
B*0702	match	51	64.2	p<0.1
	mismatch	12	41.7	
B*4403	match	60	52.9	N.S.
	mismatch	10	40.0	
B*4601	match	24	64.9	p<0.1
	mismatch	8	12.5	
B*5201	match	113	57.5	p<0.05
	mismatch	21	23.4	
A*2402(+)	match	79	64.9	p<0.05
B*5201(-)	mismatch	14	35.7	
DRB1*0405	match	60	55.5	N.S.
	mismatch	11	60.6	
DRB1*0901	match	66	65.0	N.S.
	mismatch	8	37.5	
DRB1*1502	match	110	56.3	0.1
	mismatch	21	23.4	

「HLA-DNAタイピングと移植成績」

●GVHD

急性GVHDとHLA不適合抗原数
HLA-A B C DR DNA型

重症GVHDの頻度	
不適合抗原数	% (n)
0	9.5 (325)
1	20.3 (189)
2	32.4 (103)
3	53.4 (25)

p<0.0001

急性GVHDとHLA1抗原不適合
抗原別重症GVHDの頻度

DNA型不適合抗原	% (n)	p
なし	9.6 (323)	-
A	20.2 (51)	0.017
B	37.5 (6)	0.029
C	20.2 (99)	0.006
DR	16.1 (45)	0.18

急性GVHDとHLA2抗原不適合
重症GVHDの頻度

不適合HLA-DNA型	% (n)	p
なし	9.6 (323)	-
A と B	37.5 (6)	0.02
A と C	39.5 (27)	<0.001
A と DR	25.0 (8)	0.100
B と C	25.2 (25)	0.010
B と DR	20.0 (5)	0.384
C と DR	34.8 (32)	<0.001

GVHD予防法と急性GVHD

HLA適合度	HLA適合度別重症GVHDの頻度		p
	GVHD予防法		
	CSP+MTX	FK+MTX	
A B DR適合	12.7% (597*)	7.8% (52)	0.304
A B DR不適合	31.1% (279)	11.8% (34)	0.026

*症例数

●生着不全

生着日:移植後3日間以上好中球数が500/cmmを超えた最初の日
1次的生着不全:移植後好中球数が持続して3日間500/cmm以上にならない(移植後21日以上生存症例)
2次的生着不全:生着後、重度の骨髄低形成を来し、好中球数が500/cmm以下になる

疾患別生着不全

	症例数	%	1次的	2次的
急性リンパ性白血病	(162)	4.9	3.7	1.3
急性骨髄性白血病	(129)	4.7	2.3	2.3
慢性骨髄性白血病	(217)	8.8	4.6	4.3
骨髄異形成症候群	(46)	4.3	4.3	0
再生不良性貧血	(88)	12.5	9.1	3.9
遺伝性疾患	(19)	15.8	10.5	5.9

HLA-A B C DR DQ判明症例

HLA適合度別生着不全

HLA-DNA型	適合% (n)	不適合% (n)	p
A	6.9 (551)	9.6 (125)	0.30
B	6.8 (559)	12.2 (74)	0.10
C	5.8 (451)	10.6 (226)	0.02
DR	6.8 (557)	10.3 (117)	0.20
DQ	6.7 (549)	10.2 (127)	0.17

HLA適合度別生着不全

全症例			
HLA-DNA型	適合% (N)	不適合% (N)	p
A B C DR DQ	3.9 (307)	10.6 (359)	0.001

再生不良性貧血			
HLA-DNA型	適合% (N)	不適合% (N)	p
A B C DR DQ	9.1 (33)	14.8 (54)	0.43

生着不全
TBI(全身放射線照射)

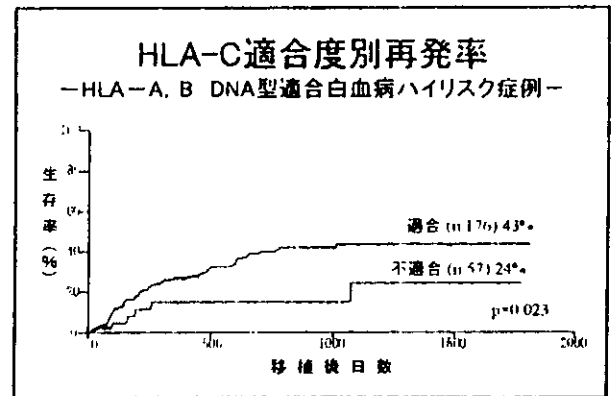
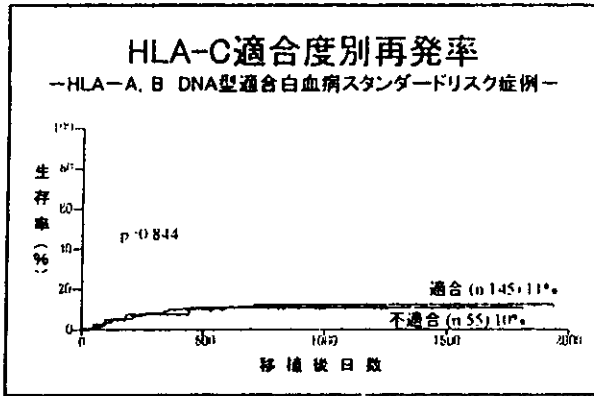
HLA-A B C DR DQ適合症例

TBI 有 (231)	3.5%	p=0.81
無 (74)	4.1%	

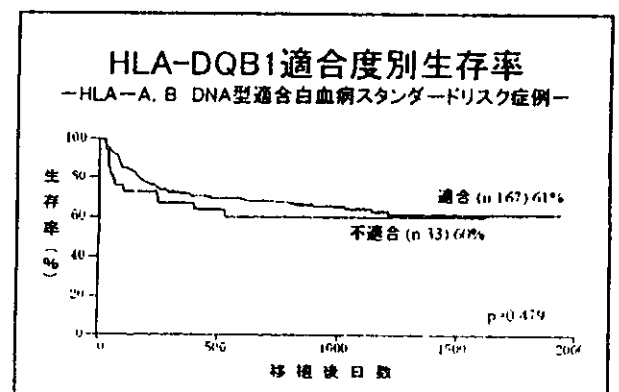
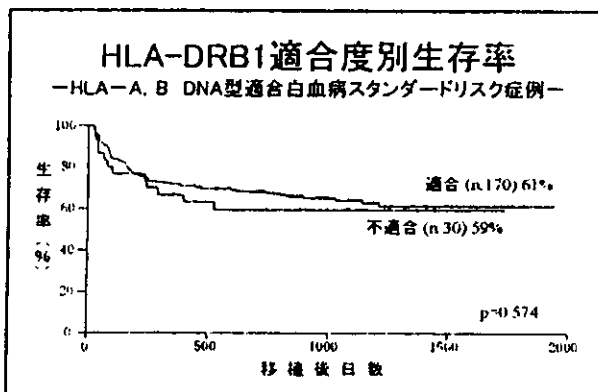
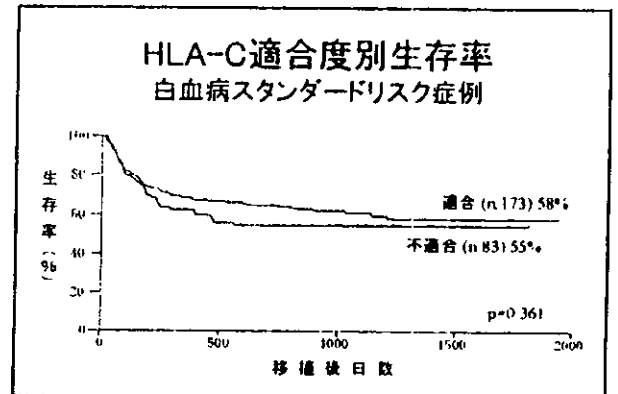
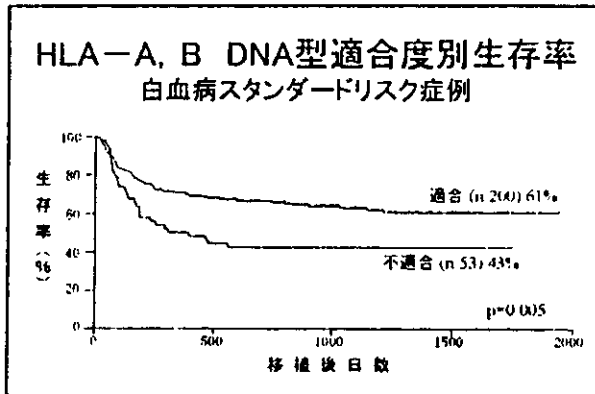
HLA-A B C DR DQ不適合症例

TBI 有 (263)	6.5%	p<0.0001
無 (92)	22.8%	

●GVL効果)



●生存率



HLA-DO 遺伝子の多型性解析とその臨床的意義

分担研究者

東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

猪子 英俊

[目的] HLA-DO 遺伝子は、DNA 遺伝子と DOB 遺伝子より構成され、ともに 1985 年に発見されて以来、機能不明のクラス II 様遺伝子とされてきたが、最近 DOB 遺伝子とその近傍に位置する DNA 遺伝子がヘテロダイマーを形成し (図 1)、クラス II 抗原提示機構において、HLA-DM-DO 複合体として DM 分子の抗原ペプチド選択能を制御している可能性が報告された。そこで本研究では骨髄移植への DO 遺伝子多型の影響を明らかにするため、HLA-DNA、-DOB の両遺伝子について多型性解析を行い、その意義について考察を行った。

[材料と方法] 材料は、第 10 回国際組織適合性会議で公認された HLA-D 抗原ホモ接合体細胞と、我々が樹立した日本人由来 D 抗原ホモ接合体細胞計 35 種より抽出した高分子 DNA を用いた。方法は、HLA-DNA 遺伝子の第 2～第 5 エキソン並びに -DOB 遺伝子の第 2～第 4 エキソンを増幅するプライマーセット計 8 組をイントロン部に設定し、PCR にて増幅後の産物を精製して、蛍光自動シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した。

[結果] DNA 遺伝子では、8 種の多型性が存在し (表 1)、このうち 6 種が新たな塩基配列を含んでいることが明かとなったが、これら 8 種の多型はいずれもアミノ酸の変化を伴わない同義置換であった。DOB 遺伝子では現在までに 3 種の対立遺伝子が発見されたが、これらもやはりアミノ酸の置換は認められなかった。

[考察] HLA-DNA 遺伝子は、DOB 遺伝子とヘテロダイマーを形成していること明かとなり、WHO の命名委員会において新たに DOA と改名された (表 1)。それに伴い、今回我々が検出した新対立遺伝子は、

DOA*01011、DOA*0101201、DOA*0101202、
DOA*0101203、DOA*01013、DOA*0101401、
DOA*0101402、DOA*01015 として公認された。

最近、HLA-DO 分子はクラス II 抗原提示機構において、DM 分子と共にシャペロン様物質として機能し、DM 分子を補助してクラス II 抗原分子からの II 鎖由来ペプチドの解離を促進し、外来抗原由来ペプチドの選択性を高めているとの報告がなされた。我々はすでに DM 遺伝子についても多型性の解析を行ってきたが、高度な多型は見いだされていない。今回の解析においても、DO 遺伝子においては DOA、DOB 共にアミノ酸の変化を伴う多型は認められなかった。しかしながら DO 遺伝子はマウス、ラットをはじめとしてウサギ、ヒツジ、ウシ、クジラなどにも存在することが報告されており、ヒトとの塩基配列レベルでの相同性は 80% 以上であることから種を超えてこの遺伝子がよく保存されていることが推測される。以上の結果より、HLA-DO 遺伝子はその機能上、非多型性を保つ淘汰が働いていたと想像される。HLA クラス II の抗原提示機構を解明することは、骨髄移植を中心とする移植時のドナー選択や治療方針を決定する上で重要であり、HLA-DO 遺伝子の臨床的意義を明らかにするため、今後さらに解析を進めて行く予定である。

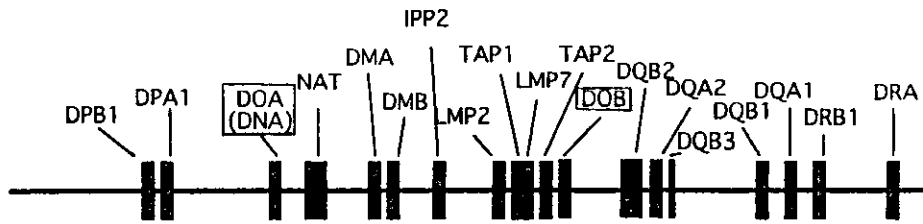


図 1. HLA-DOB 遺伝子地図

Table 1. HLA-DOA alleles defined by direct DNA sequencing in HTC

Cell Name	Nucleotide Positions							DOA allele
	Exon2 152	Exon2 170	Exon3 113	Exon4 59	Exon4 68	Exon5 114	Exon5 202	
WT100	T	C	G	C	C	C	G	0101202
SA	T	C	G	C	C	C	G	0101202
BGE	T	C	G	C	C	C	G	0101202
WJR	T	C	G	C	C	C	G	0101202
KT2	T	C	G	C	C	C	G	0101202
PEA	T	C	G	C	C	C	G	0101202
HY870	T	C	G	C	C	C	G	0101202
HOR	T	C	G	C	C	C	G	0101202
AKIBA	T	C	G	C	A	C	G	0101201
TOK	T	C	G	C	A	C	G	0101201
KT3B	T	C	G	C	A	C	G	0101201
AL10	T	C	G	C	A	C	G	0101201
KT3	T	C	G	C	A	C	G	0101201
RML	T	C	G	C	C	A	G	0101203
SP0010	T	C	G	C	C	A	G	0101203
DEU	T	T	A	T	C	A	G	01011
DBB	T	T	A	T	C	A	G	01011
DKB	T	T	A	C	C	A	G	01013
COX	C	C	G	C	C	C	A	01015
SR117	T	C	G	C	A/C	C	G	0101202/0101201
KAS011	T	C	G	C	A/C	C	G	0101202/0101201
JTED	T	C	G	C	A/C	C	G	0101202/0101201
WDV	T	C	G	C	A/C	C	G	0101202/0101201
BM21	T	C	A/G	C	C	A	G	0101203/0101401
U-937	T	C	A	C	C	A/C	G	0101401/0101402
GECL	T	C	A/G	C	C	C	G	0101202/0101402
E-1370	T	C/T	A/G	T/C	C	A/C	G	01011/0101202*
HY605	T	C/T	A/G	T/C	C	A/C	G	01011/0101202*
SUD	T	C/T	A/G	T/C	C	A/C	G	01011/0101202*
BAE	T	C/T	A/G	T/C	C	A/C	G	01011/0101202*
LS40	T	C/T	A/G	T/C	A/C	A/C	G	01011/0101201*
HY595	T	C/T	A/G	T/C	A/C	A/C	G	01011/0101201*
HY628	T	C/T	A/G	T/C	A/C	A/C	G	01011/0101201*
HY1092	T	C/T	A/G	T/C	A/C	A/C	G	01011/0101201*
BOR	T	C/T	A/G	C	A/C	A/C	G	0101201/01013*
JAH	T	T	A	C/T	C	A	G	01011/01013*
WK-1	T	C/T	A	T/C	C	A	G	01011/0101401*

* DOA allele was predicted on the basis of the additive sequence patterns of two alleles, among DOA*01011 - 0101401 and so this assignment has not been firmly established. See text.

「ABO minor mismatch の移植後、抗 Transferase を産生した症例の検討」
 - cGVHD との関係および予後の与える影響は？ -

【ABO minor mismatch における Transferase 活性消失の報告例】

			抗Tf産生	患者←ドナ	抗Tf観察	GVHD	
1988	Barbollaら	肝移植	1例	O←B	16ヶ月後	?	A-Tf,B-Tfともに抑制
		BMT	2例/4例	A←O	52ヶ月後 18ヶ月後	有り	A-Tf,B-Tfともに抑制 GVHDなしの2例は抗Tfなし
1989	松江ら (金沢大)	BMT	1例/3例	B←O	移植前~day140 day35~Tf減弱	有り	A,B-Tfを抑制, IgG
1990	小湊、滝沢ら (富山医薬大)	BMT	1例	B←O	?	?	EBVトランスフォームによる抗体産生 A-Tf,B-Tfともに抑制
1997	菅野ら (自治医大)	BMT	1例/5例	AB←O	2ヶ月~48ヶ月	なし	A-Tfを抑制

表1 ABO血液型不適合造血幹細胞移植における
 血液型および型転移酵素活性の観察症例 (98.11.16現在)

patient	donor	BMT	CBT	PBSC	計
A	B	5			5
	O	7(1)	1	3(1)	11(2)
B	A	2			2
	O	5	2(1)	1(1)	8(2)
AB	A				
	O				
O	A	2		1	3
	B	2	1		3
	AB	2			2
計		25	6	5	36
minor mismatch 計		12(1)	5(1)	4(2)	21(4)

□ : minor mismatch 21例 () : 抗Tf産生例

表2 症例

症例	1 (U.T.)	2 (M.S.)	3 (K.Y.)	4 (S.O.)
年齢	2歳2ヶ月	34歳	1歳10ヶ月	45歳
性別	男	女	男	男
移植	Allo-PBCT	Allo-PBCT DLT	CBT	BMT
移植前処置	TT/L-PAM TBI	BCNU/VP16/CY	BU/CY/VP16	BU/CY TBI
donor	姉	妹	非血縁幹細胞	非血縁
HLA	一致	一致	1座不一致	一致
ABO血液型 (patient-donor)	A←O	B←O	B←O	A←O
生着: WBC (>1000)	day12	day17	day15	day24
PLT (>5×10 ⁹)	day32		day33	
GVHD	肝(持続) 皮膚	肝 口腔,皮膚,涙腺	なし	なし
合併症		閉塞性黄疸		副腎性肺炎, 出血性膀胱炎
抗Tfの産生開始時期	(1Y3M)	day28~46	day97~104	day80~181

検体送付先: 大阪府赤十字血液センター 研究部 谷 慶彦
 〒536-8505 大阪市城東区森之宮 2-4-43
 Tel: 06-6962-7660 Fax: 06-6962-7652
 検体: ACD入り採血管使用

平成10年度 厚生科学研究「造血細胞移植と免疫応答に関する研究班」報告要旨

臍帯血バンクの整備ならびに

非血縁者間臍帯血移植に関する研究

西平浩一, 大沼 圭, 豊田恭徳(神奈川県立こども医療センター), 生田孝一郎(横浜市大), 磯山恵一(昭和大学藤が丘病院), 中島文明(神奈川血液センター)

平成11年2月6日

1. 臍帯血バンクの整備についての検討

国内での臍帯血バンクは北海道, 日赤中央血液センター, 東京, 神奈川, 東海大学, 静岡, 東海, 近畿, 福岡赤十字センターなどに研究グループ, または任意団体として設立されている。さらに東北, 中国・四国にも設立準備会がある。国内の臍帯血バンクはいずれも研究段階の小規模な組織であり, さらに各バンクの採取, 処理保存方法もさまざまである。

現在, 厚生省 臍帯血移植検討会等で臍帯血採取から移植に至るすべての過程に関する基準書の作成作業が進行している。これを利用して既存の臍帯血バンクを利用した臍帯血移植に関するネットワークを作る方法, 臍帯血移植を希望する患者のHLA検索, 患者と臍帯血の適合性, HLA検索依頼から移植に至までの臍帯血バンクと移植施設との連携と移植を迅速に進める方法等につき検討した。現在, 同胞, 血縁者に骨髄ドナーが得られない場合, 骨髄バンクに登録し, 適合ドナーを検索することが優先されることになっている。しかし, 骨髄バンクは移植実施までに少なくとも6カ月を要しており, 急性白血病などではその期間待機できない患者もいる。臍帯血バンクが整備されたら, 患者の病状によってはHLA検索は骨髄バンクと臍帯血バンクは同時進行でも可能となるような体制が必要である。

2. 神奈川臍帯血バンクにおける臍帯血移植実施症例

[神奈川臍帯血バンクの組織と非血縁者間臍帯血移植の方法] 神奈川臍帯血バンク参加施設: 神奈川県立こども医療センター, 横浜市立大学, 横浜市立愛児センター, 昭和大藤が丘病院, 神奈川赤十字血液センターなどを中心とした任意団体で, 非血縁者間でも臍帯血移植が可能になっている。現在, 神奈川臍帯血バンク参加施設その他から決められた手順で移植に係わる書類を提出し, HLA検索で適合臍帯血があれば移植審議委員会で検討して, 患者および臍帯血が適合していたら, 臍帯血を提供している。移植前には患者と臍帯血のHLAの再検査(genotypeを含む)を実施し, HLAの再確認を行ってから臍帯血は提供することになっている。HLAの検査および臍帯血ドナー検索は神奈川県赤十字血液センターが担当している。

[結果]平成10年11月現在, HLAの移植適合は原則として完全一致または1座不一致までとした。患者の病状あるいは患者またはその保護者が希望する場合は2座

不一致も提供することとした。平成10年12月現在、HLA検索依頼のあった患者数は260例である。平成9年2月から神奈川臍帯血バンクを利用した移植を開始し、1998年11月までに22例に実施された。移植実施症例は神奈川臍帯血バンク参加施設のみでなく、その他の関東や広島、福岡などの遠隔地へも臍帯血を搬送し、移植が実施された。臍帯血の搬送は液体窒素(-196℃)の容器を使用した。

移植症例の疾患名、年齢、体重、移植前の状態は下記の通りである。疾患、例数は急性白血病 13例、CML 2例、骨髄異形成症候群 (MDS) 1例、先天性免疫不全症 (PNP) 1例、先天代謝異常症 3例、再生不良性貧血 1例、先天性赤芽球癆 1例。年齢は7カ月から28歳、体重は7kgから55kg (中央値16kg)、寛解導入不能例、非血縁者間骨髄移植後の再発、第2-4寛解期間など条件の悪い症例が大部分であった。患者と移植臍帯血のHLAの適合度は血清型で完全一致は1例のみで、その他の症例は1座不一致15例、2座不一致7例であった。HLA遺伝子型では完全一致は1例、1座不一致 10例、2座不一致 5例、3座不一致 3例、4座不一致2例であった。急性GVHDの出現は3度以上は2例で、2度は3例、その他17例は0度または1度であった。すなわち、HLA適合度は1例を除いて、不一致例であったにも拘わらず重度のGVHDは2例のみであった。移植有核細胞数は $1.5\sim 10.0\times 10^7/\text{kg}$ 、中央値 $2.8\times 10^7/\text{kg}$ であった。移植CFU-GM数は $1\sim 11.5\times 10^4/\text{kg}$ 、中央値 $4.0\times 10^4/\text{kg}$ であった。生着日(好中球 $500/\mu$ 以上)は15-49日、中央値34日であった。3例は生着不全で再生不良性貧血、先天性赤芽球癆、副腎ロイコジストロフィーであった。生存16例、死亡6例でKaplan Meier法での生存確率は58%、無病生存率は57%であった。死因は原病再発 2、VOD 1、CMV感染 1、多臓器不全 2例であった。

[考察] 神奈川臍帯血バンクでは1997年年2月、第1例目の臍帯血移植を実施し、その後全国13施設で1998年11月までに22例に実施された。疾患の種類は急性白血病が大部分でその他、MDS、先天性免疫不全および先天代謝異常症であった。HLAは1例を除いて不一致であったが、GVHDは極めて少なく発症例でも軽度であった。1座不一致と2座不一致で重症GVHD、生存率に有意差は認められてない。今後はHLA2座不一致の臍帯血移植も積極的に推進して行くことを予定している。移植された有核細胞数は $2\times 10^7/\text{kg}$ で22例中19例に生着が得られた。これらの成績は非血縁者間臍帯血移植は造血幹細胞移植の有力な手段の一つであることを示すものである。

平成10年度

厚生科学研究『造血細胞移植と免疫応答に関する研究』班 (主任研究員 小寺良尚)
班会議 平成11年2月6日(東京)

班員 兵庫医科大学輸血部 原 宏

IV. 臍帯血移植;HLA 適合度と GVHD 並びに生存率の関係

1. 目的

我が国において施行された非血縁者間臍帯血移植症例を対象として HLA 適合度と GVHD の発症並びに生存率に及ぼす影響について検討した。

2. 対象

1997年2月から1998年11月末までに施行された57例(59回)で、悪性疾患35例(AML 9, ALL 22, CML 4;予後良好群<CR1 or 2, CP1期移植>;16例、予後不良群;17例、不明2例)、非悪性疾患22例(24回)である。年齢の中央値は5歳(7カ月~28歳)、体重は20kg(6~55kg)、輸注細胞数は 3.0×10^7 /kg($0.6 \sim 10.4 \times 10^7$ /kg)であった。HLA 一致度(HLA-A, B 血清学的検査, DR 血清学的 or DNA low resolution typing;<>は DRB1 high resolution typing)は6/6一致が6<3>例、5/6一致44<26>例、4/6一致8<13>例、3/6一致<5>例、不明1<12>例であった。前処置に放射線照射およびATGを併用した症例がそれぞれ33, 21例あった。

3. 成績

1) 急性GVHDの発症頻度

評価可能症例は48例で1度が14例(29.2%), 2度11例(22.9%), 3度3例(6.2%), 4度2例(4.2%)であり、2度以上のGVHDが33.3%, 3度以上の重症GVHDが10.4%にみられた。

HLA 適合度と2度以上のAGVHDの発症頻度みると6/6および5/6一致移植例と4/6一致移植例を比較(HLA-A, B 血清学的検査, DR 血清学的 or DNA low resolution typing)すると2抗原不一致移植例の方が有意にGVHDの発症頻度が高く($p > 0.05$, $\chi^2 = 3.533$) (表1)、また、class I抗原不一致移植例($n=33$)とclass I一致移植例($n=15$)を比較すると前者では33例中14例(42%)に2度以上AGVHDの発症がみられ後者では13%でありclass I不一致移植の方が有意にAGVHDの発症頻度が高かった(表2)。

2) 慢性GVHD

慢性GVHDの発症頻度は評価可能症例24例中2例(8.3%)であった。

3) 生着不全および拒絶

悪性疾患35例中2例、非悪性疾患24例中7例に生着不全・拒絶がみられた。今回輸注細胞数との検討はしていないが、生着不全および拒絶9例中8例はclass I抗原不一致を含む移植例であり血清学的にclass I抗原一致している症例での拒絶は1例(class II 1抗原不一致)のみであった(表3)。