

417例のうち216例(51.8%)が高血圧を有していた。高血圧のない201例に比べて長期移植腎生着は有意に高血圧群で不良であった。(p=0.0048)。また、死体腎移植例で同様な症例290例のうち204例(70.3%)が高血圧を有していたが、非高血圧群86例と比べ長期移植腎生着は有意に不良であった(p=0.0020)。

3-3) 糖尿病

生体腎移植後1年以上経過観察が可能で糖尿病の有無が評価できた387例のうち、28例(7.2%)が1年で糖尿病を有し18例が3年でも糖尿病を合併していた。これらと、糖尿病のない群との間で長期移植腎生着を比較したが、有意な差はなかった。しかし、死体腎移植後では、1年経過時の糖尿病の有無が評価できたのは280例であり、このうち33例(11.8%)が糖尿病を有し、うち25例は3年でも合併をみた。非糖尿病群に比べ移植腎生着率が有意に不良であった(p=0.0047)。

4) 移植腎長期生着の免疫学的要因の解明

1973年から1997年までに移植をうけた生体腎移植例85例と死体腎移植74例の末梢血中のCD28の発現のないヘルパーT細胞の割合は、健常人(N=15)、透析患者(N=15)のそれに比較し有意に高く(p<0.05)、また、移植腎生着期間が長くなるにしたがい、有意に高値を示した(p<0.001 p<0.01)。また、CD28⁻CD4⁺T細胞の割合は慢性拒絶反応発生例で低値を示す傾向がみられた(図1、2)。CD28⁻CD4⁺細胞の増加例では、MLRでdonorに対する反応が特異的に抑制され

ており、更にT細胞レセプターのVβレパートリアの解析では偏りがみられドナー抗原などの特異的抗原により影響を受けている可能性が示唆された。また、IFN γ 、IL-4、TGF- β 、RNAの発現が亢進していた。

以上の結果より、長期的移植腎患者ではヘルパーT細胞のCD28の発現が抑制されドナー抗原に対する反応性が低下していることが示唆され、この特異的な細胞はドナーに対する免疫寛容状態に関連し、移植腎の長期生着を可能にする免疫状態を示す指標となるかも知れないことが示唆された。

血管内皮細胞に対する抗体は腎移植例22例の移植前を含む216検体について検索し、特に急性拒絶反応合併例(16例)に有意に抗体価が高く、急性拒絶反応の発症と関係が示唆された。本年度の研究により以下の結果が得られ、今後の課題が明らかにされた。

① 長期移植腎生着阻止因子として急性拒絶反応、高血圧症、糖尿病の合併が明らかになった。急性拒絶反応については発生時期、程度及び拒絶反応の治療の効果と長期移植腎生着との関係について更に検討する必要があると示唆された。

② subclinicalな組織学的急性拒絶反応については長期移植腎生着への影響は明らかにならなかったが、移植腎機能の低下の原因になる可能性が示唆されており、この種の組織学的急性拒絶反応について更に症例を増し、より長期の移植腎生着との関係を検討する必要がある。また、sub clinicalな拒絶反応例に対する治療の有無と移植腎

生着との関係を検討する必要がある。

③ 長期移植腎生着を可能にする免疫状態として costimulatory pathway の障害の関与が示唆されたが、更に臨床例の経過、特に慢性拒絶反応発症との関連の検討が必要である。

④ 血管内皮細胞に対する抗体については慢性拒絶反応との関係の検討が必要である。

⑤ 免疫抑制剤シクロスポリンやタクロリムスは拒絶反応の抑制力は強いものの、これらの薬剤のみで移植腎の完全生着が困難であることが知られている。一方、代謝拮抗作用により免疫抑制を示すいくつかの新しい免疫抑制剤も報告されている。それらの薬剤を組み合わせることで急性拒絶反応による移植腎の損傷を最小にする新しい免疫抑制療法を開発する必要がある。

2.

1) 2000年1月より2001年2月まで、21例の成人生体肝移植を施行した。このうち、5例に後区域グラフトを移植した。ドナーは、いずれも右葉の比率が70%を超えており、右葉切除が困難と考えられた(表1)。左葉では、レシピエントの標準肝容積の24-38%であり、不十分と考えられた(表2)。後区域は、いずれの症例でも左葉より容積が大きくレシピエントの標準肝容積の41-47%であり、有利と判断した。いずれの症例も合併症なく、順調に経過した。

この術式は、生体部分肝移植においてのみならず、脳死グラフトの分割肝移植にも応用可能であるので、ドナープールの増大に大きく貢献しうる、有用な方法であると

考えられる。生体部分肝移植においては、左葉では十分なグラフトサイズが確保できないことがある。近年右葉グラフトを用いる試みが為されているが、ドナーの左葉：右葉の比率によっては、ドナーの安全性が十分に確保できない可能性がある。この問題を克服するために、後区域グラフトを考案し、良好な成績を得た。1996年1月より2000年8月まで、39例の成人生体肝移植を施行した。このうち、3例に後区域グラフトを移植した。ドナーは、いずれも右葉の比率が70%を超えており、右葉切除が困難と考えられた。左葉では、レシピエントの標準肝容積の27-33%であり、不十分と考えられた。後区域は、いずれの症例でも左葉より容積が大きくレシピエントの標準肝容積の34-47%であり、有利と判断した。いずれの症例も合併症なく、順調に経過した

2) 患者長期経過のデータ整備を行い、京都大学、熊本大学で経過観察中の生体肝移植患者の長期経過をデータベースとして整備中である。すでに完全に免疫抑制剤を中止している児童や、移植後8年経過し20歳となり、二児の父となった国内初例を確認している。このような良好な長期経過の確認が、学校や社会への患者受け入れ向上を促進することが期待される。

なお、予防接種を含めた術後経過管理に関して患者に配布するパンフレットの原案を作成する段階まで到達し、細部の修正の上実際に臨床で使用する予定である。

3) 東京女子医科大学腎臓病総合医療センタ

一において腎移植施行例（生体腎移植患者5例、死体腎移植患者5例）および血液透析患者5例でそれぞれ入院時（腎移植患者は移植時、透析患者は透析導入時）、移植後1年経過した患者（透析患者は透析導入後1年経過時）、移植後5年経過した患者（透析患者は透析導入後1年経過時）で医療費を算出し比較検討した。

結果、生体腎移植患者における移植時における医療費は合計で平均4,500,000円/入院であった。（内訳は、手術費：748,000円、麻酔関連：158,000円、検査等：350,000円、薬剤等：1,000,000円、透析関連：78,000円、その他：333,000円、ドナー療養費用：1,085,000円）対して献腎移植における医療費（移植時（1ヶ月入院））は、合計で平均3,100,000円/入院であった。（内訳は、手術費：1,448,000円、麻酔関連：158,000円、検査等：180,000円、薬剤等：1,000,000円、透析関連：78,000円、その他：236,000円）。また血液透析における医療費（透析導入時（入院））は、合計で平均2,023,560円/入院であった。（内訳は透析：593,820円、手術（シャント術）：134,760円、検査等：173,190円、薬剤等：82,420円、その他（入院料等）：1,039,370円）

移植後1年の患者の生体腎、献腎移植における医療費は、生体腎、献腎による差はなく合計で平均347,920円/月であった。（内訳は、検査等：6,000円/月、薬剤等：340,000円/月、その他（診察料等）：1,920円/月）、さらに移植後5年の患者の腎移植における医療費は、合計で平均303,600円/月であっ

た。（内訳は、検査等：1,890円/月、薬剤等：300,000円/月、その他（診察料等）：1,710円/月）。

一方、透析導入後1年経過した血液透析患者における医療費は、合計で平均489,160円/月であった。（内訳は、指導料：.400円/月、透析関連：419,880円/月、薬剤：30,000円/月、その他：2,880円/月）。透析導入後5年経過した血液透析患者における医療費は、合計で平均381,850円/月であった。（内訳は、再診指導料：.37,000円/月、透析関連：.316,970円/月、薬剤：.25,000円/月、その他：.2,880円/月）。さらに透析導入後10年経過した血液透析患者における医療費は、合計で平均439,740円/月であった。（内訳は、再診指導料：.36,570円/月、透析関連：.371,140円/月、薬剤：.30,000円/月、その他：.2,030円/月）。

標準的免疫抑制剤の1剤あたりの費用は、それぞれプログラフ（1mg）1T：.1097.7円、プログラフ（0.5mg）1T：.624.0円、ネオーラル（50mg）1C：.698.5円、ネオーラル（25mg）1C：.398.9円、セルセプト（250mg）1T：.377.9円、アザニン（50mg）1T：.91.7円、ブレディニン（50mg）1T：.407.5円、メドロール（4mg）1T：.23.6円であった（保険点数を値段に換算）。たとえばプログラフ（1mg）4T+ブレディニン（50mg）4T+メドロール（4mg）1Tの場合、131,724円/月+48,900円/月+708円/月で合計181,332円/月かかることとなる。ネオーラル（50mg）4T+セルセプト（250mg）8T+メドロール（4mg）1Tの場合、65,844円/月+

90.696円/月+708円/月で合計157.248円/月かかることとなる。

主な検査における費用は、血液生化学検査：.1.750円/1回、腹部エコー：.5.500円、腹部CT：.30.000円、CMVアンチゲネミア：.6.000円などである。

3

1) 本邦における肝移植の登録制度を充実させるため、日本肝移植研究会と協力して同研究会の登録フォーマットの改訂(詳細化)に取り組んできた。既に同研究会のワーキングでの検討及び役員会での議を経て登録フォーマットの場合は完成しているが、近々決定される ILTS の登録フォーマットと整合させる必要があり待機中である。なお、一連の作業は、日本移植学会の登録委員会とも連携して進めている。

2) 2000年の1年間にわが国で実施された腎移植の総数は744件であり、生体腎は598件、献腎は146件で7件の脳死体からの提供を含んでいる。

一方、これをブロック単位で見ると関東甲信越が278件と最も多く、中国・四国125、近畿113、東海・北陸98、北海道47、東北43、九州・沖縄40と続く。一方、献腎移植の件数は脳死体からの提供を含め、関東甲信越49(17.6%)、東海・北陸41(41.8%)、中国・四国20(16.0%)、九州・沖縄13(32.5%)、近畿13(11.5%)、北海道6(12.8%)、東北4(9.3%)、の順となるが全腎移植に対する、比率から見ると東海・北陸が一番高くなっている。

一方、都道府県別では東京都が175件で

最も多く、以下愛媛56、愛知53、大阪49、北海道47、神奈川34、京都28、兵庫、広島がともに26、新潟22、宮城21などとなる。施設別では東京女子医大が116件と最も多く、以下宇和島病院36、市立札幌、および東邦大26、名古屋日赤24、京都府立22、仙台社保20などとなる。

4) 大阪大学病院で施行された臓器移植症例・移植待機症例を検討し、レシピエントコーディネーターの役割を検討した。レシピエントコーディネーターはいわゆる病棟・外来での看護に留まらず、a) 移植適応患者の管理として、評価・データ整理、身体的・精神的ケア、b) 移植登録(待機)患者の管理として、評価・データ整理、身体的・精神的ケア、紹介主治医・患者との定期的連絡、ソーシャルワーカー的な役割(待機中の住居・経済的サポート)、c) 移植患者の管理として、評価・データ整理、身体的・精神的ケア、移植後外来、ソーシャルワーカー的な役割(経済的サポート)等の役割があると考えられた。

次年度は、本研究費を用いて、研究室としてレシピエントコーディネーターを雇用し、その役割を検討する予定である。

D. 考察

計画的減量症例から21例中2例の急性拒絶反応の発生をみた。計画的減量中に難治性・不可逆性の拒絶があつてはならないが、幸い2例ともタクロリムスの投与量を元に戻すことで容易に治療できた。特に小児の

慢性期の急性拒絶は成人のそれと違いステロイドパルスなどの治療によく反応し、難治性や慢性拒絶に移行することはまれであるとの報告もあるが、嚴重に経過を観察する必要がある。これらの症例を再度減量するかは慎重に検討すべきと思われるが、一定期間拒絶のない状態が続けば、再減量は可能と思われる。今後は症例選択、また、減量開始後のモニタリングのための科学的な指標が必要であり、臨床における免疫寛容の機構が解明されれば、さらに遺伝子導入などによる免疫寛容導入の臨床応用への道が開けることになると予測される。

近年、シクロスポリンやタクロリムスなどの強力な免疫抑制剤の出現によりほとんど拒絶反応は治療が可能になり、1～2年の短期の移植腎生着は大幅に向上した。しかし、5年を越える長期の移植腎予後は依然として生体腎で85%、死体腎で70%である。急性拒絶反応は40～50%に合併するが、合併例の5年生着率は生体腎で82%、死体腎で65%であり、非合併例のそれぞれ88%、78%と比較すると劣る。今後計画する① risk factor の解析及び④開発する急性拒絶反応合併後の免疫抑制療法によりその半数の長期予後が非合併例並になれば5年生着率は全体で5%向上すると推測される。また、②で計画しているborder line change型の急性拒絶反応の長期移植腎生着に対する影響はまだ不明な点が多く、前述の急性拒絶反応と同じように予測することは困難であるが治療が有効であれば5年ではかわりないものの10年生着率が数%の向上が

予測される。研究④に関しては既に3年前より長期移植腎生着例でCD28陰性ヘルパーT細胞の存在を確認し、腎移植例での検索を開始しており臨床経過との予測的研究が可能となり、今後1～2年でその意義が解明されると予測される。⑤で計画している免疫抑制療法の開発にも利用可能と考えられる。

臓器移植の長期成績をさらに向上させ、本邦で一般医療として定着させるためには、各臓器移植後患者の追跡調査が必須である。現在は各臓器ごとに移植数や追跡調査期間がまちまちであるので、登録システムを統一的に確立し、QOLを含めていつでも開かれた形で分析・評価できる体制が必要である。本年は本研究班によりその第一歩を踏み出したといえる。また、今回慢性腎不全における医療費の実際について調査できたことは意義深い。長期成績及びQOLを考慮する上でも医療経済性は重要である。

わが国においてレシピエントコーディネーターの役割と必要性について社会の理解は極めて低い。この役割について調査し、国に働きかけ、システムを構築することは臓器移植成績の向上に必須である。次年度からの研究成果が期待される。

研究課題 臓器移植長期予後に及ぼす組織適合性の意義に関する研究

分担研究者	柏原英彦	国立佐倉病院副院長
研究協力者	木村彰方	東京医科歯科大学教授
	打田和治	名古屋第二赤十字病院外科医長
	福嶋教偉	大阪大学医学部第一外科講師
	酒巻建夫	国立佐倉病院臨床検査科長
	寺岡 慧	東京女子医科大学腎臓病総合医療センター教授

研究要旨 今年度は HLA 抗原の適合性と移植予後研究に欠かせないより高精度タイピング法の 1 つとして HLA クラス I 遺伝子配列を直接読む sequence based typing (SBT) 法、及び reference strand mediated conformational analysis (RSCA) 法によるタイピングを実施し他法との比較検討を行った。また移植予後に影響する既存抗体検査法や交差試験法の検討を開始した。HLA 抗原結合トレイによる既存抗体検査、フローサイトメトリー法による、リンパ球クロスマッチ (FCXM) および HLA クラス I・II 結合ビーズをもちいた既存抗体検査 (Flow-PRA) の免疫学的リスク評価法としての有用性の検討を行った。さらに日本臓器移植ネットワークにおいても HLA クラス I 抗原のタイピングに抗血清法から DNA 法に移行するに予定であるが、本研究班として蓄積してきた DNA タイピングに関する知識をマニュアルとして作成する予定である。本マニュアルを全国の HLA 検査センター、移植施設、ネットワークの担当者に配布し、導入や判定の参考に役立つものとした。

A. 研究目的

HLA タイピングにおいては、検査精度、手技の簡便性、再現性、迅速性、試薬供給等の観点から、最近では血清学的手法から DNA 手法を用いたタイピング法に移行しつつある。移植医療においてはドナーとレシピエントの HLA 型を一致させることが予後の向上に有効であることが知られているが、特に非血縁間骨髄移植においては血清学レベル (2 桁レベル) の一致のみならず、DNA 型レベル (4 桁レベル) での一致の重要性が解明されている。これに対して、臓器移植、特に腎移植においては、2 桁レベルの HLA 型一致の重要性は以前より知られているが、4 桁レベル一致の効果と意義については、不明な点が多く今後の

検討が必要である。

一方、DNA タイピング手法としては表 1 に示すような方法があり、その多くで市販キットが開発されている。種々のタイピングキットの精度は、対象とする遺伝子座ごと、アレルごと、キットごとに多少異なっているが、SSP 法、SSOP 法、RFLP 法が 2 桁?4 桁レベル、SSCP 法、SBT 法、RSCA 法が主に 4 桁ないしそれ以上の精度に対応するものとなっている。

臓器移植における HLA 型一致を詳細に検討する方法論を考察し、高精度タイピング法とされる SBT 法と RSCA 法によるタイピングを行い、血清学的タイピング (低精度タイピング) や SSOP 法によるタイピング (中精度タイピング) との有用性の比較

検討は成績向上と将来のレシピエント選択基準にとって重要である。

一方、急性や慢性拒絶反応にはドナー側のアロ抗原に対する抗体産生や細胞傷害性のキラー細胞などが関与するが、術前の検査としてはレシピエント予定者の既存抗体検査および交差試験を実施してリスクを予見する必要がある。広く PRA 検査、クロスマッチ検査にはリンパ球を用いているが HLA 抗原以外との反応に対しても検出されることが少なくない。リンパ球を用いた細胞傷害性試験による既存抗体検査と精製 HLA 抗原を標的とした E L I S A 法を用いた検査法との比較検討が必要である。

既存抗体、クロスマッチと腎移植成績は、抗ドナー抗体の種類と液性拒絶反応発症リスクの関連性について評価するために定性および定量測定の点で感度の高い方法が求められる(表2)。

また HLA の D N A 法の精度管理にはキット間の精度、操作性、特性などを表わした検査マニュアルが求められている。

B. 研究方法

SBT 法及び RSCA 法によるタイピング:

血清学的タイピング及び SSOP 法によるタイピングによって HLA 型が既に決定されているパネル 56 件を対象として、HLA-A 及び HLA-B について、SBT 法による 4 桁タイピングを行った。また、このうち 20 件については、RSCA 法による 4 桁タイピングを行った。

PRA 法の検討:

国立佐倉病院に腎移植希望登録を行っている患者に対してリンパ球細胞傷害性試験(LCT)法により T リンパ球に対する抗体の有無を調べた。血清の希釈は 1 x とし、パネル T リンパ球数はとした。1 時間室温で反応させ、そのまま補体を加えて 2 時間で判定した。陽性検体については全例

を、陰性検体については 50 例を市販の H L A 抗原結合 L A T トレイ 1 2 4 0 (One Lambda, Inc. 製) を使用し I g G クラスの H L A 抗体の有無を調べた。方法はキット添付の手順書にしたがった。クラス I の抗原は 28 パネル、クラス II の抗原は 12 パネル使用している。このキットでは大多数のパネル抗原が日本人・東洋人以外で占められている。

心移植患者 4 名及び待機患者 7 名の血清検体は大阪大学より協力を得て L A T トレイによる検査を実施した。

フローサイトメトリーによる既存抗体、クロスマッチの検査と腎移植成績についての検討は名古屋第二赤十字病院の生体腎移植症例について検討した。1993 年以降、生体腎移植症例 188 例に対して、術前リンパ球クロスマッチに従来の LCT 法・AHG-LCT 法・FCXM 法を同時施行した。FCXM 法は、患者血清 20ul とドナーリンパ球 20ul (1X10⁷/ml) を混和し、FITC-ヤギ抗ヒト IgG 抗体・PE-CD3 抗体標識を行った。また、Flow-PRA 法は患者血清 20ul を、Lambda 社製 FlowPRA I・II ビーズと混和して、FITC-ヤギ抗ヒト I g G 抗体で標識した。いずれも解析には、BECTON DICKINSON 社製 flow cytometer を用いた。従来法陰性・FCXM 法のみ陽性症例に対して腎移植を施行し、FCXM 法と Flow-PRA 法を同時に施行して、移植成績からみた FCXM 法・Flow-PRA 法の意義と、抗ドナー抗体の種類と急性拒絶反応の有無をはじめとした治療経過との関連について検討した。

C. 研究結果および考察

1. SBT 法による高精度タイピング

今回検討したほぼ全例で、血清学及び SSOP タイピング結果と矛盾しない HLA-A および B タイピング結果が、4 桁レベル

以上で得られた。SSOP 法によるタイピングでは、一部のアレル群（例 A*0206 と *0210 など）が区別困難なことがあるが、SBT 法ではそれらのアレル群も容易に区別可能であった。

SBT 法は PCR 産物をダイレクトシーケンスする方法であるため（図 1）、アレルの組み合わせによっては区別出来ない（例えば、A*0201 と *2601 のヘテロ接合性は、A*0204 と *2610 のヘテロ接合と区別不可能）ことがあるが、そのような組み合わせの多くはアレル頻度を考慮すればタイピング可能と言える。例えば前記の例のヘテロ接合で言えば、A*0224、*2610 のいずれとも日本人には事実上存在しないため、前者の組み合わせであると推定され得ることになる。

一方、SBT 法では、4 例で片側のアレルしかタイピング出来ないことがあった。これらはいずれも HLA-B*4403 を有する例であるため、B*4403 がうまく PCR 増幅されていないことが考えられた。しかしながら、B*4403 を有する例の大半では十分に PCR 増幅され正確なタイピング結果が得られていたため、初期 PCR 条件を変更することで、このようなミスタイピングを防ぐことが可能であると考え、現在検討中である。

これとは別に、56 例中 1 例の HLA-B で new アレルと考えられるシーケンスパターンが得られた。現在当該対象試料より HLA-B 遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定中である。SBT 法は直接アレルのシーケンスを決定する方法であるため、このような new アレルの発見が容易に行えると考えられる。

2. RSCA 法による高精度タイピング

RSCA 法は特定のアレル間のヘテロデュプレックスがポリアクリルアミドゲル電気泳動上で異なる移動度を示すことを利用し

たタイピング法である。HLA-A では 2 種、HLA-B では 3 種のリファレンスアレルを用い、それらとのヘテロデュプレックスの移動度からアレルを決定する。従って、原理上、個々のアレルを区別してタイピングしていることになる。このため、SBT 法の原理的な欠点としての、一部のアレル間の組み合わせが区別不可能となるような現象は、RSCA 法にはないと言える。

実際に 20 例で RSCA 法によるタイピングを行ったが、ほとんどは SBT によるタイピング対象と一致していた。一部の例での SBT 結果との不一致は、RSCA 法では A*0201 と *0207 のヘテロ接合が A*0201 のホモ接合と区別不可能であったことなど、HLA-A2 のサブタイプ（A*0201、*0206、*0207 など）間のヘテロ接合が、各々のホモ接合と酷似した泳動パターンを示したことにあつた。但し、A2 以外のアレルとのヘテロ接合の場合には A*0201、*0206、*0207 それぞれの A2 サブタイプが明瞭に区別可能であった。この RSCA 法における HLA-A タイピングにおける不都合な点はリファレンスを変更すれば解決可能であると考えられるため、今後 A2 サブタイピングを目指したリファレンス選択を行う予定である。

一方、RSCA 法の最大の特徴として、イントロン内の多型をも区別していることがあげられる。すなわち、エクソン配列が同じでもイントロン配列が違えば別アレル（5 桁アレルでの区別）とされることになる。また一般にイントロン配列はこれまで決定されていないため、5 桁アレルの存在はそれほど多くは知られていない。従って、RSCA 法を使うことによって、多数の new アレルが見出される可能性が高い。事実、我々の検討でも、タイピング不能例とされた 2 例のいずれもが SBT 法では B*4006 とタイプされていた（図 2）。つまり、日本人の B*4006 は、RSCA キット開発において

テストされた B*4006 とはイントロン配列が違っていることが示唆される。現在これらの検体から B 遺伝子をクローニングして、イントロン配列を含めてシーケンスを決定中である。

3. 既存抗体検査

腎移植希望登録患者ではリンパ球を標的とした細胞傷害性試験 (LCT) 法による既存抗体 (panel reactive antibody, PRA) 検査で 50 名のパネル T リンパ球に当てたところ 348 名中 26 名、7.5% にパネル陽性が認められ、その内訳は 10% 未満のパネルと反応したものが 6 名、23.1%、10-20% が 7 名、26.9%、30-50% が 8 名、30.8%、80% 以上が 5 名、19.2% であった (表 3)。次に LCT 法で陽性だった 26 名に加え、陰性だった 322 名からランダムサンプリングした 56 名について精製 HLA 抗原を結合した LAT トレイを使用して、IgG クラスの抗 HLA 抗体の有無を調べた。LCT 陽性群では IgG クラスが陽性だったものは 16 名 (62%)、IgG クラス陰性だったものが 10 名 (38%) であった。一方 LCT 法陰性であった群の 56 名中 3 名 (5%) に IgG クラスの抗 HLA 抗体が検出された (χ^2 乗値は 31.482) (表 4)。LCT 法で陽性で LAT 法で陰性の検体は IgG クラス以外の HLA 抗体 (IgM クラス) の場合とリンパ球に対する抗体の場合が考えられる。LCT 法では陰性であった検体で LAT 法で陽性に出た検体は補体結合性がない IgG クラスの抗体があったためではないかと考えられる。このことから LCT 法で検出される既存抗体は多くは IgG クラスであるが、IgM クラスの可能性もあることを示している。LCT 法陽性でも LAT 法陰性の検体はやや特異性が明瞭でない傾向がある。LAT 法による特異性の検出はパネルが数も少なく、日本人・東洋人以外の欧米人が多数を占めるために明

らかな特異性としては再現されなかった。なお現在では IgM クラスの既存抗体の場合には移植予後に悪い影響はないと考えられている。

心臓移植患者関係では 4 名の既移植患者では何れも LAT 法では陰性であった。7 名の待機患者では 2 名が陽性を示した。そのうち 1 名は多くのパネルと反応していきわめてリスクが高いと考えられた。1 名は 2 パネル (7%) と反応したのみで採血した時点では強い既存抗体が存在しているとは考えられない。この検体は 1 年 6 ヶ月前に PRA 検査を実施しているが、この時点では 61% の陽性率を示していたので、低下したことを示している。この患者は血清を検査時点から報告書を作成する間に心移植が行われた。移植後移植心機能が低下し始めた。過去の PRA 値が高かったことから早期に拒絶反応と診断され血漿交換を施行した。現在では治療が奏効し回復している。

4. フロウサイトメトリー法による検査と移植予後

生体腎移植全 188 例が従来の LCT 法では直接交差試験は陰性であったが、3 例が AHG-LCT 法陽性であった。この 3 例を含む FCXM 法持続陽性例を 188 例中 5 例に認めた (表 5)。われわれの生体腎移植免疫抑制療法はプレドニゾロン (PSL) とシクロスポリン (CsA) あるいはタクロリムスによる 2 剤併用療法を原則としているが、これら 5 症例に対しては、術前 DFPP 4 回と CsA・PSL・シクロフォスファミド (CP) 3 剤併用療法を導入療法として選択した (表 6)。

Flow-PRA 解析の結果、クラス I 抗体のみ陽性 1 例、クラス II 抗体のみ陽性 2 例、クラス I および II 抗体陽性 1 例、non HLA 抗体陽性 1 例であった (表 7)。このように HLA クラス I・II 結合ビーズを用いた Flow-PRA

法は、従来の細胞毒性試験と比較して、きわめて感度の高い抗 HLA 抗体の検出法であり、HLA クラス I と II に対する抗体を区別するとともに、抗体価の定量が可能である。

Acute humoral rejection を発症した症例は 2 例で、病理組織学的所見では、間質の出血・血栓形成と、糸球体基底膜および毛細血管内皮への C3・IgG・IgM 抗体の結合を認めた。また 2 例において、Acute cellular rejection を発症した。拒絶反応の種類・程度により、全血漿交換 + OKT 3、DFPP + OKT 3、ステロイド増量 + DSG による治療を施行し、いずれも奏効した (表 8)。拒絶反応を発症した症例はいずれも抗 HLA 抗体陽性症例であり、non HLA 抗体陽性の 1 例のみが拒絶反応を発症しなかった。一方、FCXM 法陰性 183 症例の急性拒絶反応発現症例は、50 例 (27.3%) であった。FCM 法により、従来法で感知されない Humoral rejection のリスクを拾い上げることが可能で、持続陽性例では抗体対策を考慮した免疫抑制療法を選択すべきである。また抗ドナー抗体陽性であっても、non HLA 抗体であれば、拒絶反応のリスクは低いことが示唆され、より正確な術前評価のためには術前 FCXM 法持続陽性症例においては、Flow-PRA を施行して、抗 HLA・抗 non HLA 抗体の識別をすることが、必要と考えられる。

E. 結論

高精度タイピング法である SBT 法、RSCA 法はいずれも 4 桁以上のタイピングを可能とする方法であり、正確なタイピングを行う上で有用な手法であった。また、いずれの手法とも new allele の検出が容易であるため、今後の臓器移植予後調査を行う上でデータベースを作成する際の HLA タイピング法として極めて有用と言える。

心移植例で示されたように既存抗体検査は移植後の患者のリスクを予見する上でも重要な検査であることが示された。検査法では単純 LCT 法が多数の検体を処理する上では簡便で効率もよいが、必ずしも IgG クラスの抗体ばかりではなく IgM クラスの抗体や非 HLA 抗体も検出するので、積極的に LAT 法や Flow-PRA 法の導入を図る必要がある。価格的には後者は割高になるので、輸血歴、移植歴、LCT 法の結果などを参考に対象を選ぶのが合理的と言えるだろう。生体腎症例に限らず脳死ドナーとのクラスマッチにおいても高精度のクロスマッチ法が必要で、フローサイトメトリーを用いた方法は優れた方法と言えるだろう。そのためには高額な機械を整備することがまず必要なので、その方策などを講ずる必要がある。

F. 研究発表

1. 学会発表

酒巻建夫、柏原英彦、木村彰方、他：日本臓器移植ネットワークによる献腎移植の HLA 精度。第 36 回日本移植学会総会、岐阜、2000 年 10 月。

小原節子、加村ひろみ、打田和治、他：腎移植における HLA-class I, II 結合ビーズ、フローサイトメトリー (FCM) による抗 HLA 抗体モニタリングの有用性。第 36 回日本移植学会総会、岐阜、2000 年 10 月。

表 1 各種HLA-DNAタイピング法の特徴比較

	SSP	SSO	RFLP	SSCP	RSCA	SBT
多型検出原理	プライマーの特異性	プローブの特異性	制限酵素の特異性	一本鎖構造の特異性	ヘテロデュプレックス形成	塩基配列自体の決定
検出多型部位	2 箇所の組み合わせ	1 箇所	複数箇所の組み合わせ	複数箇所の組み合わせ	全箇所	全箇所
多型検出の制限	多少あり	ほとんどない	多少あり	あり	ほとんどない	ほとんどない
タイピング精度	中～高精度 プライマー数に依存	中～高精度 プローブ数に依存	中～高精度 制限酵素数に依存	高精度 単塩基置換の見逃しあり	高精度 構造多型に依存	高精度
処理検体数	少数	少数～多数	主に少数	多数	少数	少数
PCR 後の処理	アガロース電気泳動	ハイブリダイゼーションと標識検出	酵素処理とアクリルアミド電気泳動	アクリルアミド電気泳動と銀染色	ヘテロデュプレックス形成とアクリルアミド電気泳動	シークエンス反応とアクリルアミド電気泳動
市販キット	DynaI OneLambda PeI freeze	ImmoGene DynaI Biotest 漢永 塩野義 ゲノムサイエンス CanType (DR)	スマイテスト (DR)	なし	PeI Freeze	ABI V6I

図 1 HLA Sequence-Based Typing (SBT) の概略

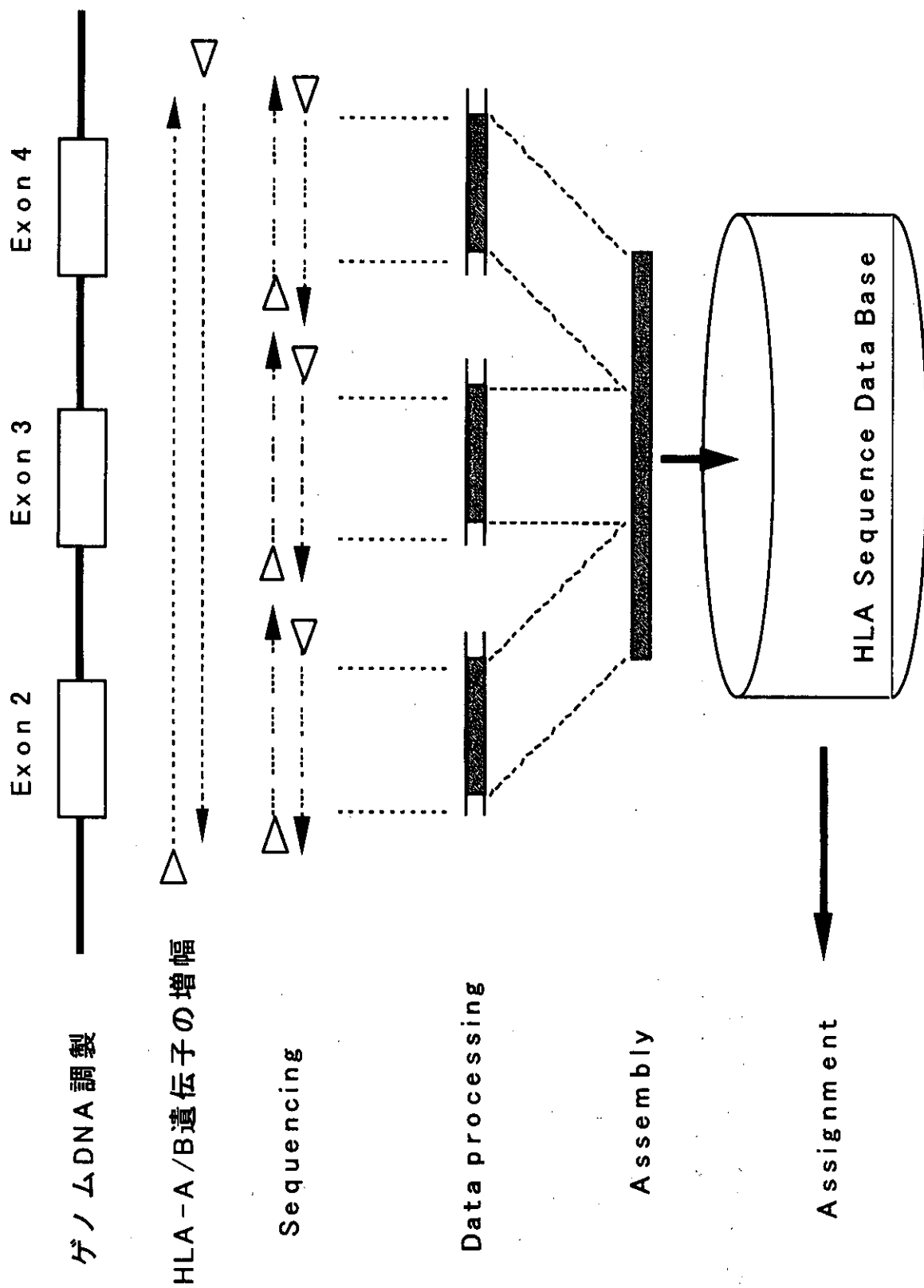


図2 RSCA法によるnewアレル (B*4006 variant) の検出例

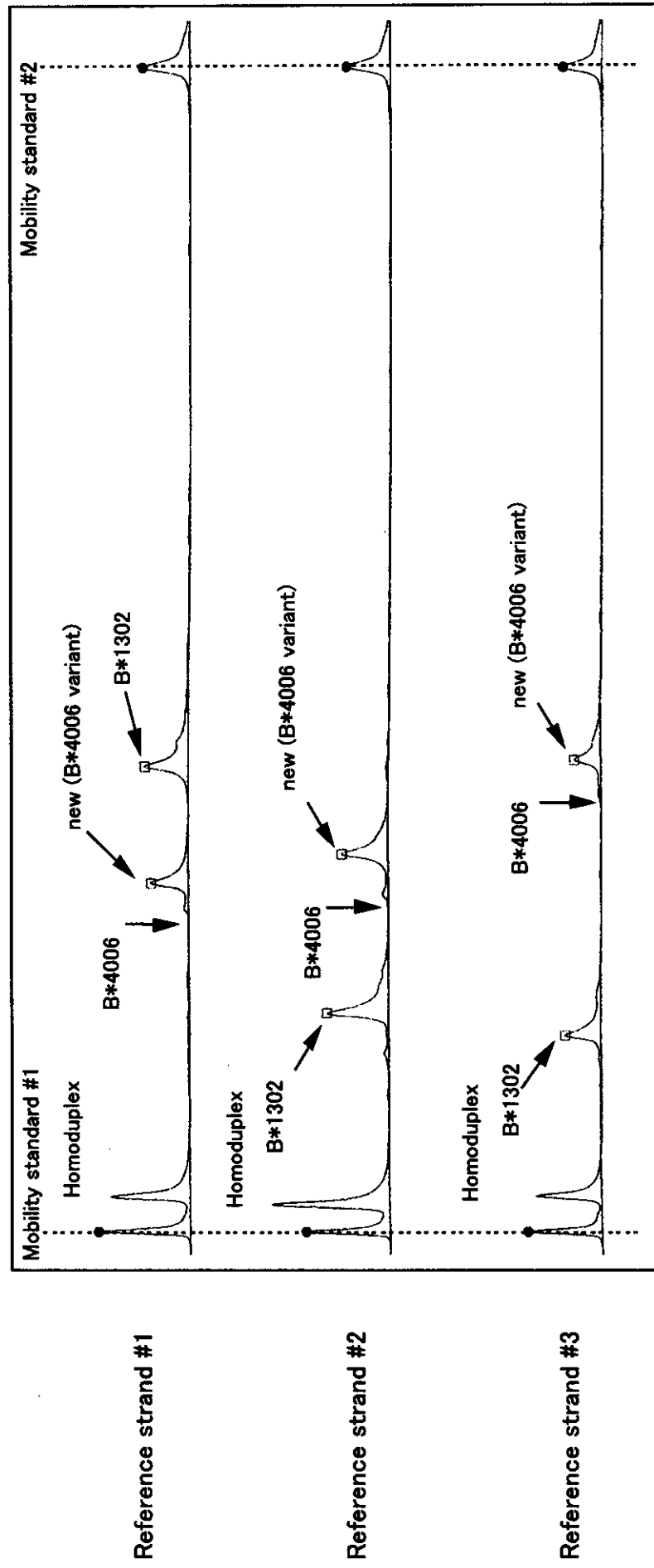


表2 リンパ球クロスマッチの方法と検出抗体

LCT	:	T, WB Ab (IgG + IgM)
AHG - LCT	:	IgG型 T Ab
FCXM	:	IgG型 T Ab
感度	:	FXCM > AHG - LCT > LCT

表3 献腎移植登録患者の既存抗体陽性率と特異性

検体番号	LCT-PRA%	特異性	LAT-PRA
1	4	A11	+
2	4	B7w	+
3	4	B44w	+
4	6	B58,A26w	-
5	6	B70,B56w,A11w	-
6	6	B54	+
7	10	B52w	-
8	14	A31w,B52w	-
9	14	B75Vw,B52w,B70	+
10	16	B44w,A24w	-
11	16	B7,Cw1	-
12	16	B44w,B52w	-
13	18	B70W,A11w,B35w,B51w	-
14	30	A31,A11	+
15	34	A2	+
16	36	A?w,B54w,B58,B52w	-
17	38	A2,B58	+
18	38	A2	+
19	42	A24	+
20	42	B60,B61,B48w	+
21	46	A26,A11,B7w,B59	+
22	82	Bw6,B51	+
23	83	Cw?,B?w	-
24	92	Bw4,A?,A31,B70,B56	+
25	92	Cw?,A24,B60,B61	+
26	94	???	+

表4 既存抗体検査の比較

	LCT-negative	LCT-positive	N
LAT(IgG)-negative	53	10	63
LAT(IgG)-positive	3	16	19
n	56	26	82

X二乗=31.48(p<0.01)

**表5 生体腎移植症例術前ダイレクトクロスマッチ
(LCT, AHG - LCT, FCM法を同時施行 n=188)**

Auto reactive	2 / 188
B - cell Ab	1 / 188
FCM (+)	5 / 188
うち AHG - LCT (+)	3 / 188

表6 ダイレクトクロスマッチ陽性症例に対する
免疫抑制療法プロトコール

- 1) 術前 DFPP 4回 (-6, -4, -2, -1 POD)
- 2) 代謝拮抗剤として、CP を -10 PODより開始
- 3) CsA (-3 POD ~), PSL (-10 POD~) より開始
- 4) 術後、抗凝固療法併用
- 5) 脾臓摘出

表7 直接交差試験陽性移植症例

<i>LD</i>	<i>Direct Crossmatch</i>				<i>PRA</i>		<i>Flow PRA</i>	
	<i>T</i>	<i>WB</i>	<i>AHG</i>	<i>FCM (CD3)</i>	<i>T</i>	<i>WB</i>	<i>class I</i>	<i>class II</i>
438	1	1	4	1.9	0/36	0/35	—	3.2
447	2	4	6	2.9	1/50	5/35	5.4	—
449	1	1	6	5.7	0/50	1/35	3.7	4.6
452	2	1	1	1.9	0/50	0/35	—	—
488	1	8	2	2.3	0/36	5/35	--	4.5

表8 術後経過と治療

LD No.	導入療法	急性拒絶反応	治療	予後
438	CsA, PSL, CP, DFPP	humoral	DFPP, DSG	recovery
447	CsA, PSL, CP, DFPP	cellular	Bolus, DSG	recovery
449	CsA, PSL, CP, DFPP	humoral	PE, OKT-3,	recovery
452	CsA, PSL, CP, DFPP	none		functioning
488	CsA, PSL, CP, DFPP Splenectomy	cellular	Bolus, DSG	recovery

分担研究課題 臓器移植新領域開発に関する研究

- 1) 成人肝移植の適応と成績向上に関する研究
- 2) 小腸移植の問題点に関する研究

分担研究者 藤堂 省 北海道大学大学院医学研究科外科治療学講座教授
研究協力者 林 衆治 名古屋大学医学部外科学第二講座助手
安波 洋一 福岡大学医学部外科学第一講座助教授

研究要旨：B型・C型肝炎硬変合併肝癌症例に対し初回治療が内科的（520例）又は外科的（337例）に行われた症例の予後を clinical stage と tumor stage により分析した。その結果、内科的治療例では、clinical stage 3 の症例の 80% が1年以内に死亡し、肝切除後1年以上経って再発した症例で、その後多発再発したもの及び肝切除後数年経って肝不全を生じた症例は8ヶ月前後で死亡することが明らかとなった。肝切除及び肝移植症例で、術前 AFP mRNA をプライマーとした定量的 RT-PCR を用いた micrometastasis で肝癌の進展と相関が見られた。定量的 RT-PCR は、肝癌症例で診断時ないし治療の経過中に肝移植を考慮すべき症例選択において有用であることが示唆された。

A. 研究目的

我が国の肝不全死は年間 4～5 万人発生するが、そのうち急性肝不全は 1,000～5,000 例、B型・C型肝炎硬変による慢性肝不全には 17,000 例、肝癌を伴う慢性肝不全ないし肝癌死が 30,000 例を占める。これら症例の大部分は成人であり、従ってこれら成人症例に対し安全で効率的な肝移植法を確立することは急務である。そのためには以下の点について検討が必要となる。

- 1) 急性・慢性肝不全における移植のタイミングの客観的評価法
- 2) 再発性肝疾患（B型肝炎硬変、C型肝炎硬変及び肝癌等）の予防法の確立
- 3) small-for-size グラフト肝移植における術後病態の解明とその制御法の開発

我が国で発生する肝不全死の中でも B型・C型肝炎硬変に合併する肝癌症例がその大部分を占めている。近年の医療技術の進歩に伴い、これらに対し外科手術を含め侵襲的、非侵襲的治療が広く行われている。これらの治療成績は格段に向上したが、overall で見ても 5 年生存率は 45%、無再発生存率はわずか 15% に過ぎない。これら症例が癌の発生母地である B型・C型肝炎硬変を有しているためである。他方、欧米における肝癌に対する肝移植は、厳しい適応基準を満足する症例のみに限られている。肝移植は肝癌に対する最も理論的な方法論として 1980 年代まで多くの症例に行われてきたが、移植後肝癌再発が高頻度に見られた為である。適応基準は、1) リンパ節転移及び肝外転移がないこと、2) 血管浸潤が無いこと、3) 腫瘍径が 5cm 以下（1 個まで）ないし 3cm 以下（3 個まで）となっている。しかし、

1) 症例は非適応であるものの、2) 及び 3) 以上の症例でも移植後無再発長期生存する症例もあり、移植後の肝癌再発について骨髄中の肝癌細胞の検出がその予後を規定するとの報告もある。

従って、以上を背景に今年度は、1) B型・C型肝炎硬変合併肝癌症例に対する従来の内科的・外科的治療法の限界を明らかにし、移植のタイミングの客観的評価法と、2) 肝切除及び肝移植症例において micrometastasis の検出法を確立することを目指した。

B. 研究方法

1) B型・C型肝炎硬変合併肝癌症例に対する従来の内科的・外科的治療法の限界に対する研究

1990 年から 1999 年までの 10 年間に札幌厚生病院内科と北大医学部附属病院第一外科で初回治療を行った肝癌症例各々 520 例と 337 例の予後を clinical stage と tumor stage により分析した。特に追跡調査が明らかな北大第一外科症例ではこれまでに死亡した 117 例の死因も併せ検討した。

2) 肝癌症例における micrometastasis の検出法の確立

lightcycler system (Roche molecular biochemicals 社) を用いて血中、骨髄中の肝癌細胞の定量的 PCR による検出を試みた。

1) 基礎的条件の設定

HuH7 細胞をヒト正常末梢血液と 1ml あたり 1～10⁶ 個希釈混和した。その一部から RNA を抽出し、cDNA を作製し、αフェトプロテイン (AFP) をプライマートして定量的 RT-PCR を行った。また一部は buffy coat から smear を作成し、AFP の免疫組織染色を行った。

2) 臨床的條件の設定

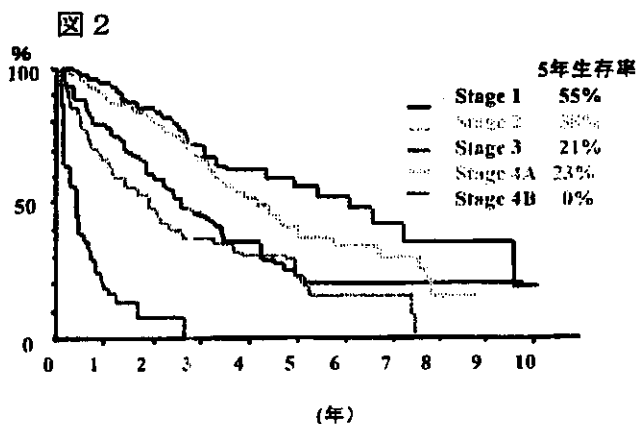
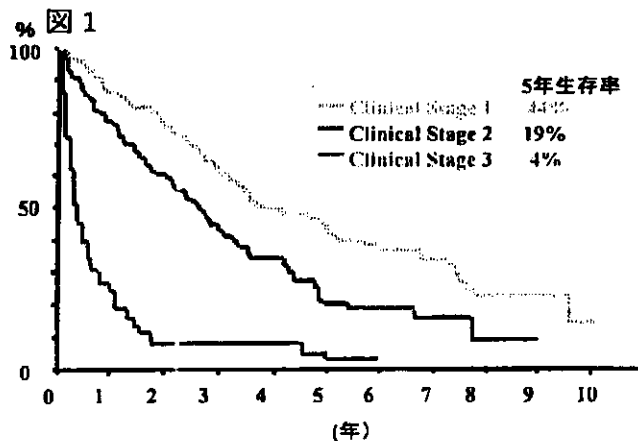
健康者の末梢血を4℃と室温で各々1時間、3時間、6時間、12時間、24時間、36時間、48時間保存し、保存時間と温度がRNAに与える影響を検討した。次いで2例の肝癌肝切除症例と5例の肝癌肝移植症例を用い、術前術中ないし術後に末梢血、肝静脈血、門脈血、骨髓を採取し、AFDをターゲットとした定量的RT-PCRを行った。尚、RT-PCRを行った micrometastasis 症例に関しては本学倫理委員会の承認と患者からのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

1) B型・C型肝炎合併肝癌に対する従来の内科的・外科的治療法の評価

(1) 内科的治療による成績

PEIT, TAE, TAI, MCT 等により治療を行った術後予後を検討した。clinical stage 1, 2, 3, の5年生存率は各々44%, 19%, 4%と肝硬変が進行するに従い、有意に生存率が低下した。特に clinical stage 3 の症例は治療後半年以内に70%が、1年以内に80%が死亡している(図1)。他方、tumor stage による予後の検討では tumor stage 1, 2, 3, 4A, 4B, の5年生存率は各々55%, 38%, 21%, 23%, 0%で4B症例は3年以内に全員死亡した(図2)。



(2) 外科的治療による成績

初回治療として肝切除を行った肝癌症例の clinical stage 1, 2 の5年生存率は各々54.3%と36.2%であった(図3)。また、tumor stage 1, 2, 3, 4A, 4B の5年生存率は各々51.1%, 68.4%, 42.4%, 30.7%, 41.7%であった(図4)。追跡期間中に117例の死因を検討した結果、早期多発再発が33.3%、晩期肝内再発30.4%、遠隔転移再発18.8%、肝不全7.2%、他病死10.1%であった。早期多発再発と遠隔転移による死亡は腫瘍径、門脈浸潤、硬変の程度と有意に相関していたが、clinical stage や tumor stage 及び手術の根治度とは有意の相関はなかった。

図3

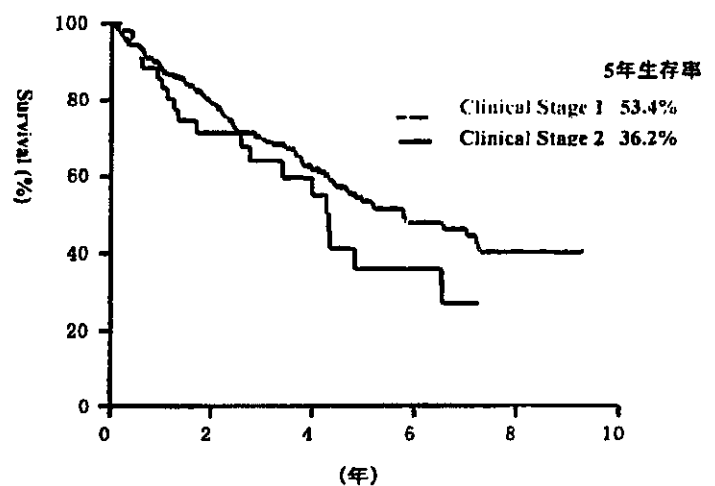
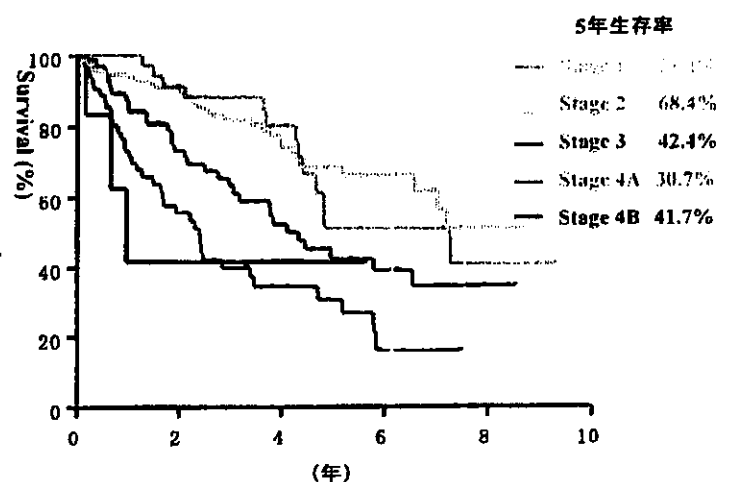


図4



平均無再発期間及び平均生存期間との関係を分析した結果では、早期肝内多発再発、晩期肝再発、遠隔転移、肝不全死の平均無再発期間は各々102日、541日、498日、487日、又、平均生存期間は216日、1204日、842日、1045日であり、早期肝内多発症例は3ヶ月前後に肝癌が再発し、術後平均7ヶ月で死亡している。他方、晩期肝内再発症例は術後