

感染から **recover** する症例より **HCV** 特異的な **T**細胞が少ないことが分かった。
CD4を除いた末梢血のレベルで **HCV** 特異的な **CD8**の反応は慢性的な **HCV** 感染において増加していた。

D. 考察

免疫寛容の成立と慢性拒絶の防止が、臓器移植後の長期成績向上には必要である。このことを実現するには免疫学的、あるいは疫学的研究から何が免疫寛容を可能にしているか、何が慢性拒絶の危険因子であるかを知ることが極めて重要である。またこれらの医学的研究にとどまらず、コーディネーターの育成や患者の登録業務の充実など社会的要因の果たす役割も大きいと考えられる。

E. 結論

臓器移植後の長期成績向上にむけて、我々は社会的、医学的双方の見地からアプローチを行うためのシステムを確立しつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

B の課題について雑誌<移植>に報告予定

2. 学会発表

A の課題について平成15年度日本外科学会総会にて発表した

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

分担研究課題 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	国立佐倉病院長
研究協力者	木村彰方	東京医科歯科大学難治疾患研究所教授
	打田和治	名古屋第二赤十字病院外科部長
	福嶋教偉	大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科助手
	寺岡 慧	東京女子医科大学腎臓病総合医療センター教授
	酒巻建夫	国立佐倉病院臨床検査科長

研究要旨 臓器移植ネットワークの新規登録およびドナーのHLA検査法が全面的に抗血清法からDNA法に移行した。DNAレベルで新抗原が見つかるようになったので、検索のためには血清学タイプに読み替えやルールの追加制定が必要となった。腎移植生着とHLA-DR抗原特異性の解析を行うと、DR15のレシピエントでは有意に生着が悪く、DR4のレシピエントでは逆に有意に良好な成績を示した。ドナーおよびレシピエントの年齢、性別、HLA適合性、移植後の透析期間などの多変量解析しても、有意であることが判明した。希望登録者中のDR4抗原の増加を考えると、移植成績を押し上げている要因の1つと考えられる。既存抗体検査やクロスマッチにはリンパ球細胞傷害性試験法が利用されているが、IgGクラスの抗HLA抗体を正確に捉えるためには精製HLA抗原結合トレイやビーズの使用やFlowサイトメトリー法でのクロスマッチの採用が急務である。高額機器整備の必要性や試薬コストを考慮すると、全例を対象とするのではなく移植希望者の背景に即した対応法の検討が必要である。心臓移植待機患者では補助型の人工心臓などの装着のために血液製剤、血小板等の頻回投与が既存抗体産生を惹起することが知られている。このために心臓移植における液性拒絶反応のリスク解消には事前の既存抗体検査が不可欠である。さらに既存抗体陽性者を短期間に減感作し、いかにして安全に移植に結びつけるか臨床上重要な課題である。

A. 研究目的

本研究班では組織適合性抗原のDNA法開発や新HLA抗原の確認と対応、マッチングや特定抗原と移植生着の検討、既存抗体の検出法から実際の腎移植や心臓移植での減感作法の取り組みを研究目的としている。さらにHLA抗原と反応するNKレセプター多型の同定法の開発にも取り組んだ。

(社)日本臓器移植ネットワークのHLA抗原タイピング法が昨年4月からクラスIおよびクラスIIにおいて全面的にDNA法に移行した。この一年腎移植患者関係でも新抗原の症例が出た。まず

これらの日本人集団に認められた稀なHLA-Bアレル及び新HLA-Aアレルを高精度HLAタイピング法を用いて詳細に検討し、血清型への読み替えるルールが必要である。そこで(1)高精度HLAタイピングによる稀抗原アレル及び新抗原アレルの解析をサブテーマの1つとした。

昨年の移植腎生着と組織適合性の検討では、心臓死のドナーからの提供と移植後も大多数の症例で利尿が開始するまで透析が必要であったにも関わらず腎生着成績が、移植後6年でも70%を越えて良好であったこと、ドナーおよびレシ

ピエントの年齢や性別が大きく影響していたこと、HLAの適合性との関連ではきわめて適合性の悪い群では移植成績が悪いが、HLA適合度のよい順番に移植成績がよいかというと必ずしもそうではないことが判明した。今年度は登録者にHLA-DR抗原頻度の偏りあることが知られているので、サブテーマ(2)としてDRの特異性が移植成績に影響するかどうかを検討した。

輸血・妊娠・移植歴などの感作にもとづき、レシピエント血清中に特に抗ドナー HLA 抗体が形成された場合には、超急性拒絶反応を始めとした制御不可能な antibody mediated rejection の発症リスクが極めて高く、一般的に移植の適応外とされてきた。antibody mediated rejection を回避するためには、術前にレシピエント血清中の抗ドナー抗体の有無を評価することが必要であり、血清学的手法による lymphocytotoxic crossmatch test (以下 LCT 法) が広く行われ、この結果に基づいて移植の適応が決定されてきた。この点についてサブテーマ(3)として腎移植希望患者の既存抗体 (PRA) の経年変化について継続調査を行った。

しかしながら近年、Flow cytometric crossmatch (以下 FCXM) の開発により、補体非依存性の抗体検出と、より高感度な抗体検出が可能となり、既存抗体検出法に関しても、Flow-PRA の導入により、通常の PRA では検出されない HLA 抗体の検出が可能となった。我が国においては、FCXM 自体の導入が一部の施設に限られているが、欧米ではすでに prospective study も報告されている。これらの報告の多くが、移植後早期の液性拒絶反応リスクが高まる点では共通しているが、短期生着率や長期予後に及ぼす影響に関しては見解が様々である。打田らは、術前に LCT 法と FCXM 法を同時に施行して FCXM 法のみが持続的に陽性となった症例に対して、ABO 血液型不適合腎移植に準じた抗体対策を用いて移植を施行してきた。今回、FCXM 陽性腎移植症例での経験をもとに、サブテーマ(4)として FCXM の意義と

FCXM 陽性症例の液性免疫学的リスクについて検討を行った。

1999年2月に脳死臓器移植が再開され、2003年2月末までに17例の心臓移植が施行され、全例外来通院中である。17例中、5例に拒絶反応(5例で細胞性拒絶反応、1例で液性拒絶反応)を認め、全例ステロイドパルス療法などで効果的に治療され、冠動脈造影・超音波検査などで有意の移植後冠動脈硬化症は認められていないが、心臓移植後の成績を向上させるためには、すこしでも拒絶反応の頻度並びに重症度を軽減させることは重要である。欧米の経験から、HLA のミスマッチ、移植前後の panel reactive antibody (PRA) 値が移植後の拒絶反応や生存率に関与するという報告があるが、我が国での報告はまだない。今回、研究のサブテーマ(5)として心臓移植における panel reactive antibody 測定の意義に関する臨床的検討とし、大阪大学付属病院で待機中又は心臓移植を施行した症例で PRA を測定し、その予後を検討した。

免疫応答の個体差は HLA によって遺伝的に制御されているが、HLA 分子は CD4 あるいは CD8 T 細胞に認識されると同時に、NK 細胞によっても認識される。ことに NK 細胞レセプターである KIR 分子は HLA-A、Bw4、C、G などのクラス I 分子を認識して抑制性シグナルを入れる。一方、KIR 分子の遺伝子は多型遺伝子族を構成しており、構造の類似した活性化レセプターと制御性レセプターの遺伝子が混在する。NK 受容体の多型は NK-HLA 相互作用を介して移植免疫応答にも関与すると考えられるため、サブテーマとして(6) NK 受容体 KIR 遺伝子複合体タイピング法の開発を試みた。

B. 研究方法

(1) 新抗原の精度管理については血清学的に HLA-B62 抗原を有し、SSOP 法によって B*1527 であると推定されたパネル 1 及び

HLA-A3 抗原を有するが SSOP 法では New とタイプされたパネル 2 について、SBT 法及び RSCA 法を用いて構造を解析した。

(2) HLA-DR 特異性と移植生着成績については、昨年の(社)日本臓器移植ネットワークより腎移植患者を対象にして、まず DR 抗原特異性と移植生着への影響をKaplan-Meyer法にて単変量分析した。次に HLA-DR 適合数、ABDR 適合数、レシピエントおよびドナーの性別、年齢、術後の透析日数、特定 DR 特異性の有無について、Cox 回帰分析を行った。

(3) 既存抗体(PRA)の経年変化については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と特異性を調べた。さらにHLA抗原結合LATトレイによりIgGクラス抗体の有無を調べた。

(4) フローサイトメトリー法によるダイレクトクロスマッチ(FCXM)および既存抗体検査(Flow-PRA)の有用性と、術前FCXM陽性症例に対する腎移植の適応拡大について、1)FCXM導入以前に施行した名古屋第二赤十字病院腎移植症例のうち、腎生検により液性拒絶反応が考えられた20症例を対象として、移植前と拒絶反応時の保存血清を用いて、Flow-PRAを施行した。HLA classI、classII抗体検出の有無を移植前と拒絶反応時の検体で比較して、拒絶反応に対するHLA抗体の関与の可能性を検討した。

2) 1993年以降、すべての生体腎移植予定患者に対する術前ダイレクトクロスマッチに、従来のLCT法に加えてFCXM法を同時に施行した。このうち、LCT法が陰性でFCXM法が持続的に陽性であった6例を対象として、腎移植を施行した。なお、移植に際しては、欧米での報告に基づく免疫学的リスク、当科におけるABO血液型不適合症例での成績、実際

の抗体対策の方法と合併症などに関してあらかじめ説明を行ない、同意を得たうえで適応を決定した。

FCXM法は、患者血清20 μ lとドナーリンパ球20 μ l(1X10⁷/ml)を混合し、室温で30分インキュベート後に2%FCS加PBSにて2回洗浄。これに40倍希釈FITC標識ヤギ抗ヒトIgG抗体20 μ lを加えて4℃で30分インキュベート後2回洗浄。次いで、PE標識抗ヒトCD3抗体20 μ lを加え、4℃で30分インキュベートし、2%FCS加PBSにて2回洗浄後、fixing solution 0.5mlを加えて、フローサイトメトリー解析を行った。被検値/ネガティブコントロールで計算したratio2.0以上を陽性とした。

Flow-PRA法は、患者血清20 μ lをOne Lambda社製Flow PRA I・IIビーズ5 μ lと混和して、20-25℃で30分インキュベート後に、wash bufferにて2回洗浄。これにFITC標識ヤギ抗ヒトIgG抗体100 μ lを加え、20-25℃で30分インキュベートした後に、wash bufferにて2回洗浄。これにfixing solution 0.5mlを加えてフローサイトメトリー解析を行った。%positive値20%以上を陽性とした。いずれも解析には、BECTON DICKINSON社製flow cytometerを用いた。

移植前後の免疫抑制療法は、シクロスポリン、プレドニゾロン、シクロフォスファミドの3剤併用療法で行った。術前の抗体除去には二重濾過血漿交換(以下DFPP)を用いた。ABO血液型不適合症例に準じて、1回あたりの血漿処理量は4000mlとし、移植手術の6、4、2、1日目の計4回施行した。また抗体産制を抑制する目的で、シクロフォスファミド100mg/日をDFPPに先立って手術の10日前より経口投与し、術後は可及的に200mg/日に増量して投与を継続し、総投与量7g/bodyあるいはシクロフォスファミドが副作用で継続困難となった時点で、ミゾリビン6mg/kg/日投与に変更した。なお、二次移植症例で特に拒絶反応のリスクが高いと判断された2例に対し

ては、脾臓摘出を行った。

これらの症例に対して FCXM と Flow-PRA の併用により、抗ドナー抗体を HLA class I、class II、non HLA 抗体に識別し、抗体の種類による拒絶反応発症リスクを検討した。また、DFPP 施行時の FCXM の変化と術後の FCXM の推移について、拒絶反応発症例と未発症例間で比較検討するとともに、拒絶反応発現率、生着率について、ABO 血液型不適合症例と比較し、FCXM 陽性症例のリスクを評価した。

(5) 心臓移植における panel reactive antibody 測定の意味に関する臨床的検討のサブテーマの対象は、1997 年 10 月から 2003 年 2 月までに大阪大学付属病院で心臓移植希望患者として登録し、panel reactive antibody (PRA) 測定を最低 1 回以上施行し得た 32 例。男性 29 例、女性 3 例 (内、複数分娩歴 1 例)。原疾患は、拡張型心筋症 19 例、拡張相肥大型心筋症 5 例、拘束型心筋症 1 例、虚血性心疾患 1 例、弁膜症後心筋症 1 例、先天性心疾患 2 例、心筋炎後心筋症 2 例、薬剤性心筋症 1 例。補助人工心臓 (LVAS) 装着症例 14 例 (国循環型 2 例、Novacor 型 4 例、TCI-IP 型 6 例、TCI-VE 型 2 例：1 例国循環型から TCI-IP に移行) とした。輸血歴は LVAS 例全例と 3 例 (拡張型心筋症 Batista 手術時、弁膜症後心筋症大動脈弁置換術時、先天性心疾患の姑息手術時に輸血既往あり) で、血小板輸血例 13 例であった。待機中 PRA は、6 ～ 12 カ月毎に再検した。現行のルールでは、レシピエント・ドナーの適合条件として class I の crossmatch 陽性例は心臓移植を施行していない。7 例 (LVAS 症例 5 例) に心臓移植を施行した。

(6) NK 受容体 KIR 遺伝子複合体タイピング法の開発では、KIR 多重遺伝子族間で相同性が保たれている D2 ドメインに対応するエクソンを特異的に増幅するイントロンプライマーをデザインした。これを用いて KIR 複合

体遺伝子群を PCR 増幅し、標識した D2 ドメイン産物をレファレンスとして RSCA 解析を行った。解析対象は非血縁日本人集団及び CEPH 家系サンプルである。

倫理的な側面として HLA タイピングではキットの供給や精度の問題から全面的に日常業務として抗血清法から DNA 法に移行している。HLA 適合性の解析では過去に行われたタイピング結果を利用していること、データを処理する上でリストには実名ではなく検体番号で解析をしている。症例報告でも実名がなく番号のみを使用しているため、個人情報を守られている。臨床の減感作療法については患者に十分な説明を行い、合意を得た上で行っている。

C. 研究結果および考察

(1) SBT 法によってパネル 1 は B*1527 であることが確認された。また RSCA 法では図 1 に示すように New パターンであった。一方、パネル 2 は SBT 法によって図 2 に示すように A * 0301 アリルのいずれ (A*03011 ～ A*03013) と異なる New アリルであったが、RSCA 法では A*0301 または A*0304 と区別できなかった。以上より、日本人集団において B*1527 が存在すること、及びその血清学的反応性が B62 であることが確認された。一方、HLA-A3 の新アリルを見出したが、このパネルは A3-B44-DRB1*1301 のホモ結合であった。

(2) 個々の DR 特異性の有無と移植生着を Kaplan-Meyer 法にて分析すると、単変量解析では DR15、DR11 のレシピエントおよびドナーで有意に移植生着が悪いことが判明した (図 3、図 4)。有意差はないが、DR4、DR8 のレシピエントでは生着成績がよい傾向を示した (図 5、図 6)。次に HLA-DR マッチング数、DRAB マッチング数、ドナーおよびレシピエントの年齢と性別、移植後から利尿までの透

析期間を入れて多因子による Cox 回帰分析法にて解析すると、ドナー年齢 ($p=0.006$) やレシピエントの年齢 ($p=0.037$)、レシピエントの性別 ($p=0.025$) に有意差が認められた。DR の特異性ではレシピエントが DR 4 の場合に p 値が 0.033 (ドナーが DR4 の場合には $p=0.060$)、レシピエントおよびドナーが DR15 の場合に p 値はそれぞれ 0.001、0.011 と有意差が認められた。多変量解析では DR11 と DR8 では有意差は認められなかった。

(3) 既存抗体検査

前年度に引き続き腎移植希望登録患者375名の既存抗体 (panel reactive antibody, PRA) 検査を実施すると、リンパ球細胞傷害性試験 (LCT) 法では21名 (5.6%) が PRAが陽性であった。パネルとの陽性率では2%から92%までバラツキがあり70%を越えるものは2名であった。既存抗体の特異性が解析されたものと特定できない例が認められた。この21名に対してLAT法でIgGクラスの抗HLA既存抗体の有無を調べる検査を実施した。クラスIで陽性だったのは14名 (67%)、クラスIIで陽性であったものが11名 (52%) であった。いずれも陰性であったものが5名 (24%) であった。移植経験者はLAT法でも陽性を示していた。前年度にLCT法陰性で今年度陽性に転じた5名のうち、3名がLAT法では陰性であった (表1)。

(4) フローサイトメトリー法による研究では、まず FCXM 導入以前の液性拒絶反応発症症例における Flow-PRA 解析の結果は次の通りである。

術前検体にて、20 例中 6 例に HLA 抗体が検出された。検出された抗体は、class I 2 例、class II 1 例 class I および II 3 例で、4 例において抗体は、拒絶反応時に増加していた。また、術前には抗体が検出されなかった 1 例において、拒絶反応時に class I 抗体が検出され、術前に class I 抗体のみが検出された 1 例におい

て、拒絶反応時に class II 抗体も陽性となった。これらの症例では、拒絶反応に対する HLA 抗体の関与が示唆された。

次に FCXM 陽性生体腎移植症例における、FCXM および Flow-PRA 解析の結果では各症例における FCXM と LCT 法の結果を比較すると、LCT-WT はいずれも陰性ないしは擬陽性で、FCXM により検出された抗ドナー T cell 抗体は、LCT 法では検出不可能であった。また、通常の PRA では抗体が検出されない症例においても Flow-PRA では検出され、抗ドナー抗体の種類を HLA class I/class II/non HLA 抗体に識別した結果、class I 抗体 2 例、class II 抗体 2 例、class I および II 抗体陽性 1 例で、残る 1 例では Flow-PRA は陰性であり、FCXM に関与する抗体は non HLA 抗体と考えられた (表2)。

DFPP による FCXM の変化と液性拒絶反応の有無に関しては、初回の DFPP により FCXM が陰性化した 3 例 (症例 2、4 および 6) では液性拒絶反応の発症を認めなかったが (表3)、FCXM の陰性化に複数回の DFPP を要した症例 (症例 1 および 5) と、FCXM が陰性化しなかった症例 (症例 3) においては、移植直後から FCXM は陽性のまま継続あるいは経時的に上昇傾向を認め、結果的に液性拒絶反応を発症した (図7)。この症例における抗体量の推移に関する検討では、DFPP により陰性化した抗 HLA 抗体は移植後も陰性のまま経過したが、液性拒絶反応の発症時には陽性化した。%PRA は、class I、class II 抗体ともに移植直後の 0%から 80%以上まで上昇し、治療により再び陰性化した。また、術後 1 年以上経過して腎機能が安定している時期における Flow-PRA は陰性であった。

すべての症例において、DFPP とシクロフォスファミドの内服など抗体対策としての術前処置は、予定通り施行可能であった。拒絶反応の頻度は、液性急性拒絶反応 3 例 (50.0%)、細胞性急性拒絶反応 1 例 (16.7%)、拒

絶反応なし 1 例 (16.7 %) であった。抗 HLA 抗体が検出された 5 例のうち 3 例に液性拒絶反応を発症し、non HLA 抗体の 1 例と脾臓摘出を行った 1 例には拒絶反応を認めなかった。液性拒絶反応の治療として、1 例では腎生検後の皮膜下血腫を合併していたため、DFPP による凝固因子の喪失は危険であると判断して、全血漿交換 + OKT3 を施行し、他の 2 例においては拒絶反応の程度に応じて、DFPP + デオキシスパーガリン (DSG) およびステロイド + DSG を施行して、3 例とも液性拒絶反応は制御された。また、細胞性急性拒絶反応を発症した 1 例に対しては、ステロイド + DSG を施行して制御可能であった。拒絶反応を発症した症例はいずれも抗ドナー 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。また、脾臓摘出を行った 2 症例に関しては、1 例に軽度の液性拒絶反応を認めたのみであり、術前の感作状態から検討しても、拒絶反応の抑制に対する脾臓摘出の意義が示唆された。2003 年 2 月現在、全例生着、生存中である。

液性拒絶反応に対する確実な治療法が確立されていない現状では、レシピエント血清中に存在するドナー特異的抗体を、術前に精度良く検出することが極めて重要である。特に、移植予後に影響を与える重要なリンパ球抗体である、T cell 抗体を精度良く検出することが必要となる。従来から LCT 法が術前ダイレクトクロスマッチとして施行されてきたが、感度が低く、細胞の状態が悪いと正確な判定が困難であり、Autoreactive な IgM 抗体にも反応するといった難点が存在する。

また、LCT 法を用いた既存抗体検査では、多種類のリンパ球を必要とする。これに対して FCXM は細胞の状態に影響されることなく、T, B cell 抗体を感度良く検出することが可能である。また、Flow-PRA はドナーの細胞を必要とせず、HLA class I, class II 結合ビーズを用いて、HLA 抗体と non HLA 抗体の区別が可

能となる。FCXM と Flow-PRA を併用することは、抗ドナー抗体の中でも、特に移植腎予後に影響すると考えられる IgG 型 T cell 抗体を検出するとともに、HLA 抗体と non HLA 抗体を識別することができ、液性免疫学的リスクを高い精度で詳細に検討するために極めて有用な手段と考えられる。液性免疫学的ハイリスク群を術前に高い精度で選別して、移植の適否を決定することや、適切な術前処置と免疫抑制療法を用いて超急性あるいは促進型急性拒絶反応を避け、移植腎機能廃絶を予防することは、生体腎移植の適応拡大、予後改善につながる。一方、従来から施行されてきた LCT 法では検出されず、FCXM や Flow-PRA のみで検出される抗体が、はたして臨床的にどの程度の液性免疫学的リスクを持つかが問題となる。当科では、1992 年に LCT 法に追加して試行的に FCXM を行い、FCXM のみが持続的に陽性であった 1 症例を認め、約 6 か月間代謝拮抗剤の投与を行った後に移植を施行したが、液性拒絶反応にて移植腎機能廃絶に陥った。また、FCXM 導入以前の症例において液性拒絶反応と考えられた 20 例に対して Flow-PRA 解析を行い、術前検体にて陽性所見を呈するとともに、拒絶反応時に %PRA が上昇している症例があり、このような症例では、LCT 法で検出されない抗ドナー HLA 抗体の関与が示唆された。これらの経験および検討をもとにすれば、FCXM 法のみで検出される抗体量であっても、液性拒絶反応のリスクは高く、術前評価としての FCXM の重要性と、通常の免疫抑制療法では拒絶反応の回避が困難であることが示唆される。当科では、FCXM 持続陽性症例を回避不能な液性拒絶反応のハイリスク群として、1993 年以降は移植の適応外と位置付けた。一方、同時期より術前抗体除去に DFPP を施行するとともに、シクロフォスファミドを併用した ABO 血液型不適合生体腎移植を開始し、移植後早期の液性拒絶反応による機能廃絶例は 1 例もなく、良好な短

期移植腎生着率を獲得することができた。この経験をもとに、比較的微量の抗体量と考えられる FCXM 陽性症例に対しては、ABO 血液型不適合症例に準じた術前抗体対策と免疫抑制療法を用いることにより、抗体対策が可能であると判断して、1998 年以降は FCXM 陽性症例を移植適応に変更した。この結果、3/6 (50.0%) に病理組織所見で確認された液性拒絶反応を発症し、いずれも血漿交換療法などにより制御可能であったが、拒絶反応の頻度は ABO 血液型不適合症例 (25.9%) よりも高く、抗体除去を施行してもなお、液性免疫学的リスクは高いと考えられる。

以上の結果から、直接交差試験において感度の極めて高い FCXM 法を導入することは、細胞毒性試験による従来法では感知されない微量抗体の検出を可能とし、術前に Humoral rejection のリスクをより厳密に評価する上で有用と考えられた。さらに、FCXM 法による抗ドナー抗体陽性症例においても、non HLA 抗体であれば、HLA 抗体と比較して拒絶反応のリスクは低いことが示唆され、術前 FCXM 法持続陽性症例に対しては、より正確な液性免疫学的リスク評価のために、Flow-PRA をあわせて施行し、抗 HLA・抗 non HLA 抗体を識別することが必要と考えられた。移植後期間が比較的短く、長期生着率を検討するには至っていないが、短期生着率に関しては、他の生体あるいは献腎移植症例と遜色ない成績が得られている。

今後、FCXM と Flow-PRA を併用することは、生体腎移植における免疫抑制プロトコルの選択や、術後の液性免疫学的モニタリングに有用であるばかりでなく、献腎移植のドナー発生時に移植の適否を決定する際にも、重要な情報を与えてくれると考えられる (表 4)。すなわち、時間的余裕と状態の良いドナーリンパ球を入手することが可能である生体腎移植においては、全例に術前の FCXM を施行することが望まれる。FCXM が陽性の際

には、Flow-PRA による HLA/ non HLA 抗体の区別を行い、HLA 抗体陽性であれば、DFPP などによる抗体除去後に移植を行い、Flow-PRA によるフォローアップが有用であろう。また、non HLA 抗体の際には、抗血管内皮細胞抗体のチェックを行い、血管内皮に対する抗体であれば、抗体対策後に移植を行い、血管内皮に対する抗体でなければ、通常の免疫抑制療法による移植が可能と考えられる。この点に関しては、血管内皮細胞を用いた FCM による抗血管内皮細胞抗体の検出を検討中である。一方、時間的裕と良好なドナーリンパ球が得られない可能性がある死体腎移植の際には、移植・輸血・妊娠などの抗 HLA 抗体保有のハイリスク患者に対して、あらかじめ感度の高い Flow-PRA を行い、陰性であればドナー発生時の Direct cross match を省略できる可能性が示唆される。この点に関しても、当施設では献腎移植待機患者の抗体保有率と種類などに関して、Flow-PRA を用いて解析検討中である。

直接交差試験に代表される液性免疫学的リスクに関しては、FCXM 法などの感度の高い検査法を導入することにより、移植の適否の決定をより精度の高いレベルで検討することが可能となり、制御不能な拒絶反応に陥る症例を除外し、一方で、抗体除去をはじめとした適切な術前処置ができれば、移植の適応例の拡大につながるものと考えられる。

(5) 心移植と PRA の研究では、peak PRA class I 0% (陰性例) は 24 例、0-9% は 3 例、10% 以上 5 例 (各々 93、82、57、32、14%) で、PRA class I 陽性例は全て血小板輸血例 (7 例は LVAS 症例) であった。いずれの症例も PRA class I は自然に低下する傾向にあった。

peak PRA class II 0% (陰性例) は 19 例、0-9% は 6 例、10% 以上 7 例 (各々 97、82、81、67、42、29、12%) で、PRA class II 陽性例は、必ずしも輸血歴のない症例もあり、ガンマグロブリンや

アルブミン投与に関係するものと考えられた。いずれの症例も PRA class I は自然に低下する傾向にあった。

心臓移植施行例 7 例中 6 例は待機中を通じて class I、II 共に PRA は陰性であったが、1 例は LVAS 装着早期に class I、II 共に高値であった。表 5 に示すように、1 例が 2 ミスマッチであったのを除くと、他の 6 例は 5 以上のミスマッチ例であり、我が国が同一民族で HLA の面から有利であるという意見もあるが、決してそうではなかった。

7 例は、シクロスポリン (CsA)、アザチオプリン (AZP) 又はミコフェノール酸モフェチル (MMF)、プレドニゾロン (PRD) の 3 者併用療法を基本とした免疫抑制療法で管理し、定期的に心筋生検を行って拒絶反応を診断した。内、2 例で拒絶反応を認めた。1 例目は興味ある経過をとったので、後で詳細に報告する。2 例目は移植後 1 週目に ISHLT 分類 grade 3a の拒絶反応を認め、ステロイドパルス療法を行い、それ以後は拒絶反応を認めていない。

症例：40 歳代男性。肥大型心筋症拡張相

1994 年夏に心不全症状を発症し、精査により肥大型心筋症拡張相と診断された。内科的治療で一旦心不全症状は改善していたが、1997 年 8 月に心不全が悪化し、1998 年 2 月に当院に転院し、1998 年 3 月 2 日に Novacor 型 LVAS を装着した。以後経過良好で、全身状態が安定し他臓器不全から離脱できたので、心臓移植の適応と判断されたため、6 月 26 日に登録した。10 月 7 日に退院し、3 年近く自宅にて心臓移植の待機した後、LVAS 装着後 1087 日目にドナーが現れ、心臓移植を実施した。

血小板輸血などの影響で panel reactive antibody (PRA) が一時的に高値を示していたが、移植前には陰性化し、ドナーリンパ球との交叉試験は陰性であった。移植直後は順調で 3 日目に ICU を退室した。移植後 6 日目に全身倦怠感出現し、7 日目に心機能低下を認め、心筋

生検で細胞性拒絶反応を認めなかったため、液性拒絶反応を考え、ステロイドパルス療法、抗胸腺細胞グロブリン製剤投与に引き続いて 2 回の血漿交換を施行し、拒絶反応は治癒した。シクロスポリン、セルセプト、プレドニンの 3 剤をやや多い目に投与していたが、移植後 12 週目に grade 3a の拒絶反応を認めたので、経口のステロイドパルス療法 (100mg 3 日間) を行い、治癒した。移植後 86 日目に退院した。その後も定期的な生検で grade 3a 及び 2 の拒絶反応を認めたので、移植後 18 カ月目に CsA をタクロリムス (FK) に変更したが、以後拒絶反応を認めていない。

cross match 陽性例の心臓移植は施行されないこと、並びに前述の症例のように PRA の高い時期のあった症例は拒絶反応を引きやすいことから、PRA class I が 50% 以上の症例で、全身状態が安定している症例 (特に全身性の感染症のない症例) では Columbia 大学が行っている方法を用いて、待機中に脱感作する方針とした。そのような症例を 1 例経験下ので、報告する。

症例：30 歳代男性。単心室 (心室機能低下)、肺動脈狭窄、房室弁置換術後生下時よりチアノーゼを認め、精査により上記診断され、右室流出路再建術が他院で施行された。その後もチアノーゼ、息切れ等を認めたが、単心室、アイゼンメンジャー症候群と診断され、心肺移植しか治療できないとされ、経過を見られていた。2000 年 8 月に心不全が増強し、カテコラミン依存状態となり、多臓器不全の状態となったため、2001 年 3 月当院に転送された。肺動脈圧が低いことを確認後、同月房室弁置換術を施行した。この際、血小板輸血を施行した。術後、多臓器不全から脱したが、心機能の回復はなく、カテコラミン依存状態であるため、心臓移植希望患者として、同年 7 月登録した。現在もカテコラミン依存状態で、待機中である。

2001年9月と2002年3月の2回に渡り PRA class Iが高値であったので(表6)、2002年11月にシクロフォスファミド 325mg とベニロン 15 gを5日間点滴静注した。白血球減少、食思不振を認めたと、心機能の悪化、膀胱出血などの副作用は認めなかった。まだ PRA class I値では著効を認めていないが、12月に同じ血液型のドナーとの cross matchは陰性であった。今後もドナー出現まで定期的に治療を続ける方針である。

まだ症例数が少ないので統計的には論じられないが、待機中に PRA 値が高値なものは LVAS 装着例、特に血小板輸血例に多く、長い経過の内に自然に低下するものが認められた。心臓移植後拒絶反応の面から、待機中に PRA が高値になった症例は、有症状で反復性の拒絶反応及び液性拒絶反応を引き起こしやすいことが示唆された。この点からも、待機中に可能な限り輸血、特に血小板輸血を削減すべきであり、輸血時には白血球除去フィルターを使用することが推奨される。脱感作を1例に試みたが、まだ経過が短く、今後の検討を要するが、ドナーを得るためにはこのような治療を積極的に行っていく必要があると考えられた。

(6) NK 受容体 KIR 遺伝子複合体タイピング法の開発では、非血縁日本人集団を対象とした解析の結果、図8に示すように、個体差が明らかな多数の RSCA パターンが得られた。この RSCA パターンは決してランダムに生じたアーチファクトではなく、図9に示すように家系内での遺伝的共分離を認めることから、この方法によって KIR 多重遺伝子族を同時に増幅し、かつ多型を解析することが可能であると考えられた。今後、解像度向上、複数レファレンスの導入などのタイピング法としての改良を行うことで、ドナー・レシピエント間の KIR 座ハプロタイプ一致度と移植前後との関連が検討可能であると考えられる。

D. 結論

臓器移植ネットワークでは DNA タイピングによって HLA 型を決定し、それを血清対応型(検索型)に読み替えることとしているが、このような稀抗原ないし新抗原の確認には、高精度タイピング法を用いることが必要であると考えられた。市販のキットではアレルが確定されず、読替ができないことがある。SBT法における確定、WHO 呼称委員会への登録、リンパ球の抗血清との反応の確認、読替ルールの設定、キット反応パターンの変更など一連の作業を進める必要が生じた。

移植希望登録患者や実際の移植患者で、頻度の増加している DR4 抗原が移植生着に有利に働いていること、逆に頻度の低い DR15 抗原が生着に不利に働いていることが明らかとなったことは、全体の移植成績が上に引き上げられている可能性を示唆するものと考えられる。この DR 特異性の効果が移植後、どのくらいの期間持続するのかについては今後も追跡する必要がある。DR4 は主要な腎不全原因となる慢性腎炎の IgA 腎症で頻度が高いことが知られ、DR15 では膜性腎症に相関していることが知られている。このことは移植生着と拒絶反応と共通する何らかのメカニズムが原疾患にも働いていることを示すものと考えられる。一方、移植後利尿開始までの透析期間が移植腎生着には影響していなかったことは、急性尿細管壊死からの回復が十分に行われその後に障害が残りにくいことを示すものかも知れない。

ドナーとのクロスマッチ検査では過剰に判定すれば患者から移植の機会を奪い、逆に見逃すと拒絶反応による患者の不利益に繋がることになる。全国的にもクロスマッチや PRA 検査に従来の LCT 法に加え、IgG クラスの抗 HLA 抗体を検出する LAT 法や Flow サイトメトリー法を採用する時期に来ている。設備機器整備や試薬コストを考慮すると、事前の移植歴、輸血歴、妊娠歴、頻回大量のγグ

ロブリン製剤、アルブミン製剤の使用も含めての確実な把握が必要となる。それをもとに対象者の絞り込みや実際のドナー発生時の対応や既存抗体ピーク時の強さや特異性の記録など詳細に検討する必要がある。

HLA 抗原を認識するキラー T 細胞や NK 細胞の KIR レセプター多型による応答反応と移植成績についても検討する必要がある。個々の患者により拒絶反応起こしやすいものそうでないもの、同じような治療経過をたどっても既存抗体産生をしやすいものとし難いものがある。このことに対して HLA 適合性の違いに加え、免疫応答に関与するサイトカイン多型性との関連も検討する価値がある。将来的に移植患者の遺伝子多型を基盤にし、その患者に即した免疫抑制法を選択するテーラーメイド医療を目指すためにも重要な検討である。

E. 研究発表

(1) 学会発表

1. 酒巻建夫、木村彰方、柏原英彦、福寛教偉、打田和治、寺岡慧
組織適合性と死体腎移植生着
第 38 回日本移植学会総会、シンポジウム
18 腎移植 (献腎移植) 2002 年 10 月 東京
2. 酒巻建夫、木村彰方、山崎正明、飯田好江、野田岳
DR 抗原特異性と腎移植成績
第 11 回日本組織適合性学会 2002 年 9 月
川越
3. 片山明男、打田和治、小林孝彰、小原節子、後藤憲彦、松岡慎、佐藤哲彦、幅俊人、富永芳博、武田朝美、両角国男、長坂隆治、横山逸男、中尾昭公
Flow PRA による抗 HLA 抗体の検出：移植医療にいかに関与する？
第 38 回日本移植学会総会 2002 年 10 月
東京

4. Akio Katayama, Takaaki Kobayashi, Kazuharu Uchida et al. Beneficial effect of antibody removal and enhanced immuno suppression in FCXM-positive and ABO-incompatible renal transplantation

The 6th Congress of international Society for Organ Sharing 2001.

5. 片山昭男, 打田和治ほか
フローサイトメトリー法を用いたダイレクトクロスマッチ (FCXM) の有用性と FCXM 陽性症例に対する腎移植適応拡大の可能性
日本臓器保存生物医学学会 2002. 5. 23

6. 片山昭男, 富永芳博, 打田和治ほか
ダイレクトクロスマッチ陽性腎移植症例に対する DFPP の効果
第 22 回日本アフェレーシス学会 2002. 6. 14. -6. 16 ワークショップ

(2) 論文発表

1. 片山昭男, 打田和治ほか: フローサイトメトリー法を用いたダイレクトクロスマッチ (FCXM) の有用性と FCXM 陽性症例に対する腎移植適応拡大の可能性.
Organ Biology 2003. 4. 掲載予定
2. A. Katayama, T. Kobayashi, K. Uchida et al: Beneficial effect of antibody removal and enhanced immuno suppression in flow cytometry cross match-positive and ABO-incompatible renal transplantation.
Transplantation Proceedings in press
3. 福寛教偉, 松田 暉。我が国の心臓移植の現況：大阪大学の経験。2001;14:425-432.
4. 福寛教偉。心臓移植と HLA。日本組織適合性学会誌 2002;9:111.

図1 HLA-B*1527のRSCAパターン

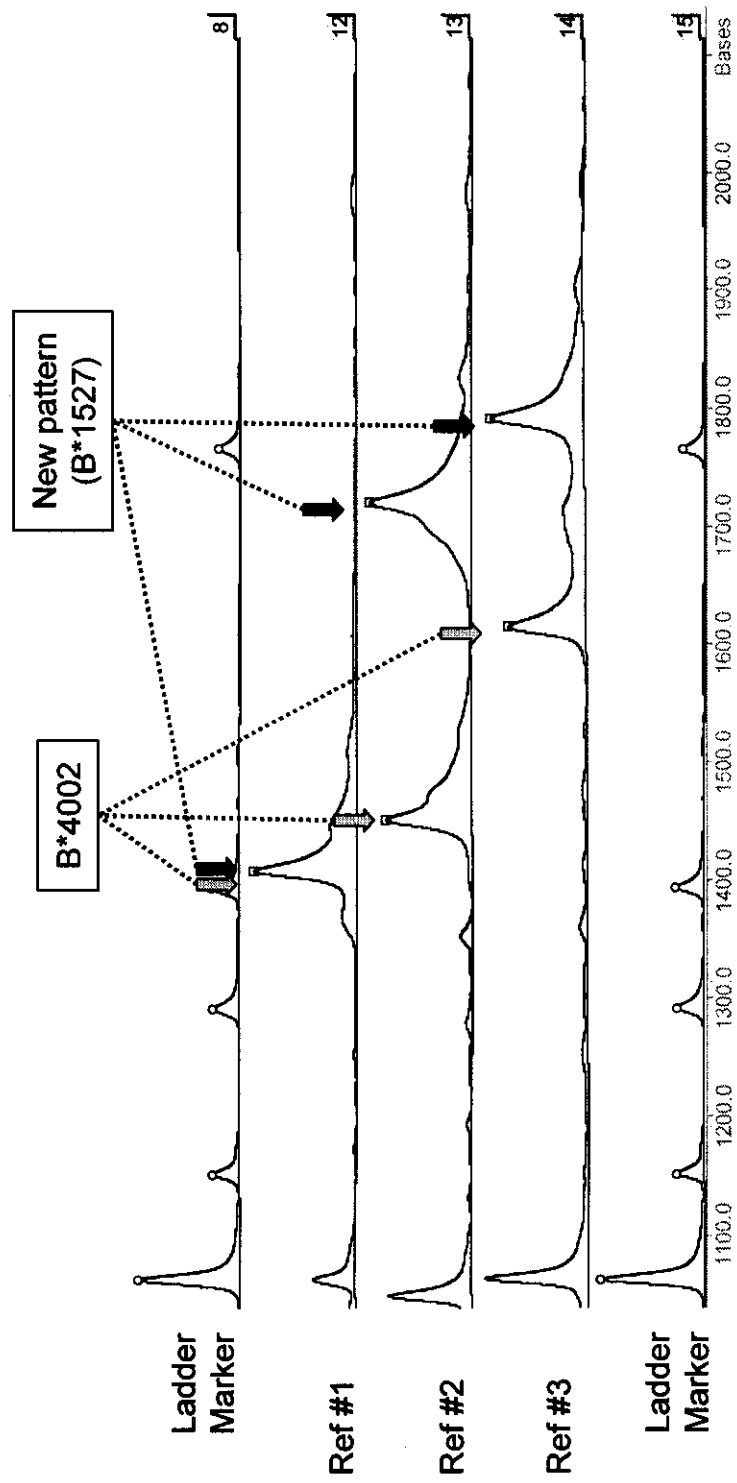


図2 新たなHLA-A3アリルと既知のHLA-A3アリルの配列比較

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
A*030101	ATGGCCGTATGGCCGCCAACCCTCTCTGCTACTCTCGGGCCCTGGCCCTGACCCAGACCTGGCGGGCTCCCACTCCATGAGTATTCTTCA	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*030103	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*0301New	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
A*030101	CATCCGTGTCCCGCCGGCCGGGAGCCCGCTTCATCCGCTGAGCGGCTACGTGGACGACACCGCAGTTCGTGCGGTTGACAGCGCAGCCCGGAGCCA	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*030103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*0301New	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A*030101	GAGGATGGAGCCCGCGGCGCGGTGATAGACGAGGGCCGGATATTGGGACCAGGACGGAAATGTGAAGCCCACTCAGACTGACCGAGTGG	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*030103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*0301New	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
A*030101	GACTGGGACCCCTGGCGGCTACTACACCAGACGAGCGCGGTTCTCACACCATCCAGATAATGATGGCTGGACGTGGGTGGGACGGCGGCTTCC	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*030103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*0301New	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
A*030101	TCCGCGGTACCGCAGGACGCCCTACGACGGCAAGGATTACATGCCCTGAACGAGGACCTGGCTCTTGGACCGCGGACATGGCGGCTCAGATCAC	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*030103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*0301New	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
A*030101	CAAGCCAAGTGGAGCGGCCCATGAGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGATGGCACCTGGCTGGAGTGGCTCCGAGATACCTGGAGAACGGGAAG	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*030103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*0301New	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
A*030101	GAGCCGTGACGGACGGACCCCCCAAGACACATATGACCCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCCTGAGGTGCTGGCCCTGGGCTTCTTACC	*	*	*	*	*	*	*	*	*
A*030102	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*030103	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A*0301New	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

図3

腎移植生着

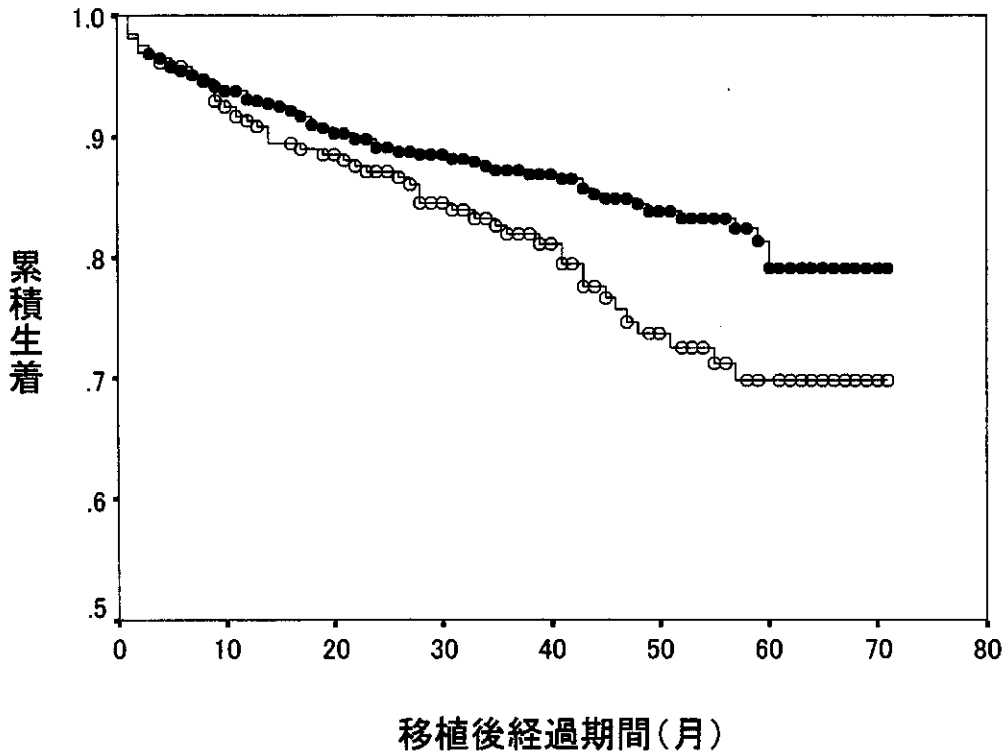


図4

腎移植生着

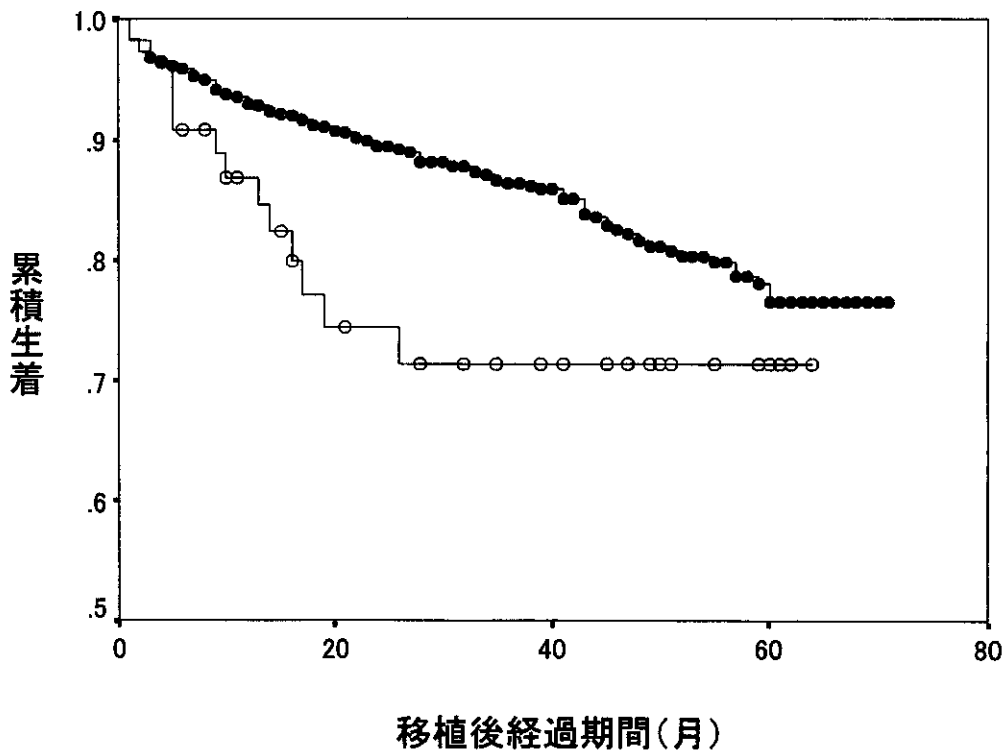


図5

腎移植生着

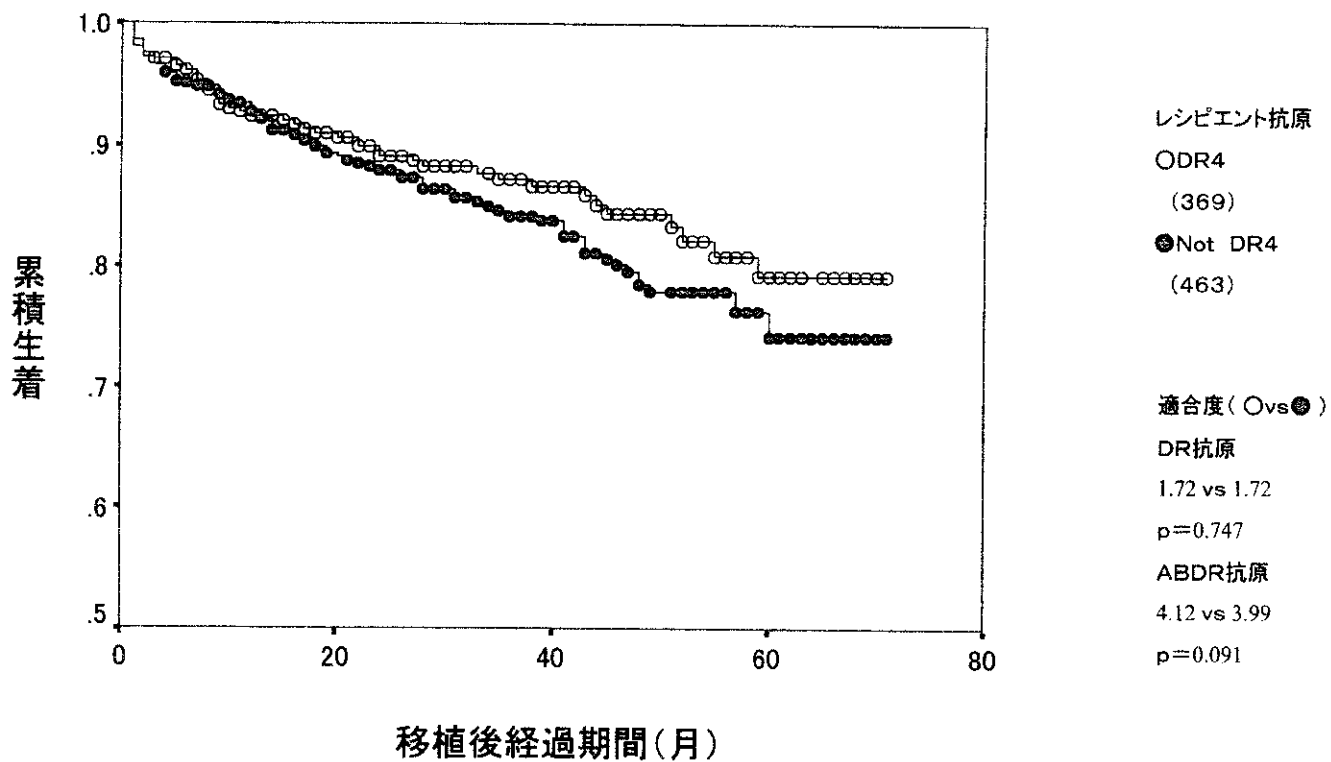


図6

腎移植生着

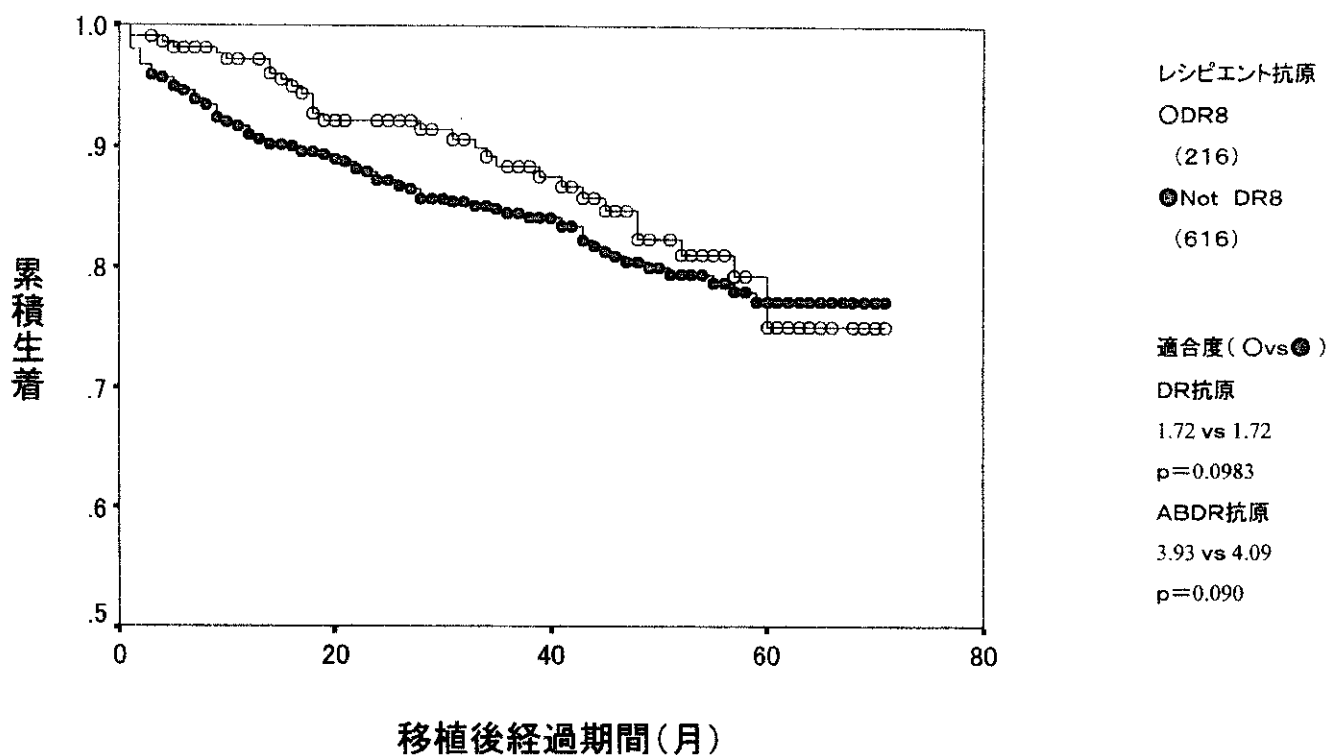


表1 死体腎移植希望患者血清中の既存抗体

検体番号	移植歴	前年LCT%	今年LCT%	LCT特異性	LAT c11 %	LAT c12 %
006		94	62	B7,B39,B46,B48,B56,Bw4	0	0
014	有	29	26	A11,B7	50	83
021		39	34	A2	39	25
024		98	92	?(特定できず)	75	25
025		81	84	A24,A33,B7,B55,B61	100	33
048		33	28	B60,B61	7	42
049		42	60	A11,A26,B44,B46	100	100
079		37	32	A2	50	42
080		0	6	B46	0	0
094		0	2	?(特定できず)	0	0
101	有	31	26	B13,B35,B60	0	42
130	有	0	2	?(特定できず)	11	8
150		85	64	A26,A28,A30,B39,Cw1,Cw6,Cw8	11	0
164		12	28	B51	14	0
175	有	12	6	A30	0	42
200		40	34	A2	18	0
202		23	10	?(特定できず)	7	0
236		0	8	B7,B39,B46,B48,B56,Bw4	0	0
275		35	22	A2	0	0
361		6	64	B61,B67,Bw4	25	0
369		0	10	Cw8	7	67

表2. FCXM陽性腎移植症例における術前抗体検出の結果(n=6)

症例	Direct Crossmatch			PRA		Flow PRA	
	LCT-T	LCT-WB	FCM	T	WB	class I	class II
1	1	1	1.9	0/36	0/35	(-)	29
2	2	4	2.9	1/50	5/35	60	(-)
3	1	1	5.7	0/50	3/35	49	74
4	2	1	1.9	0/50	0/35	(-)	(-)
5	1	8	2.3	0/36	5/35	(-)	39
6	1	6	11.2	34/49	26/35	95	(-)

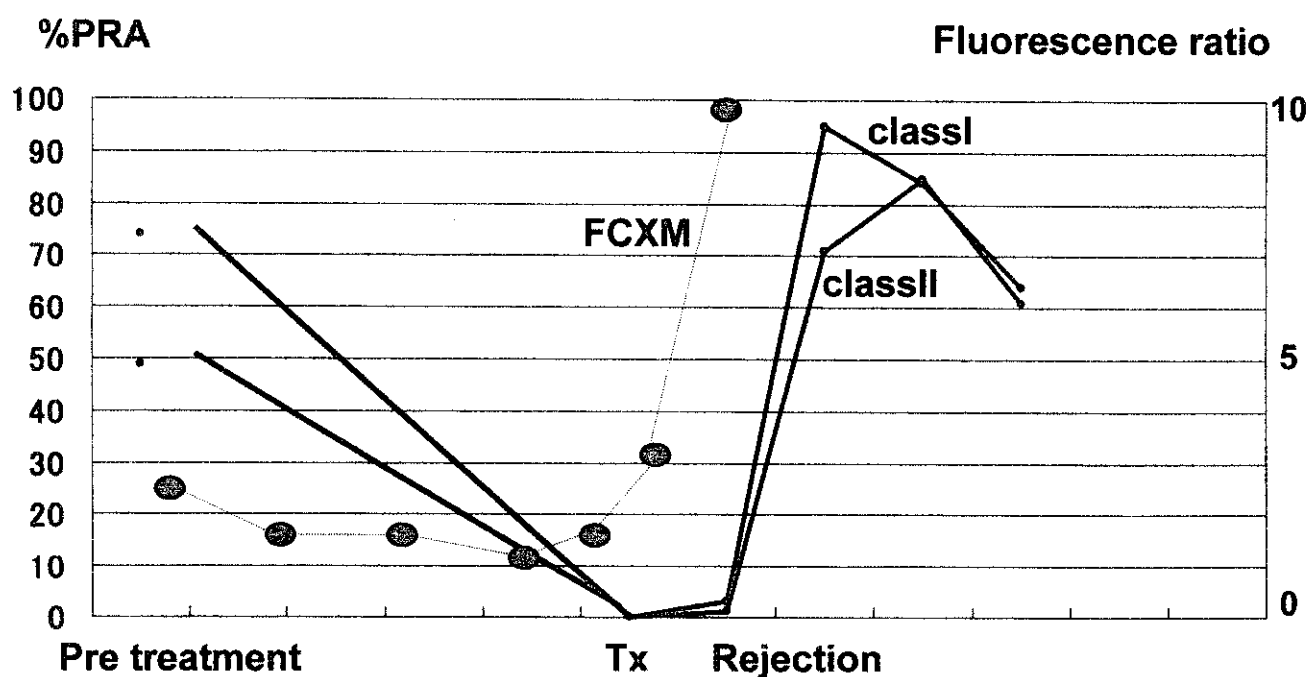


図7. 液性拒絶反応症例における移植前後のFCXM, Flow-PRAの変化(症例3)

表3. 検出抗体の種類と拒絶反応との関係

症例	FCXM DFPP前 / 移植前	検出抗体	拒絶反応
1	1.9 / 1.8(-)	HLA classII	Humoral
2	2.9 / 1.5(-)	HLA classI	Celluler
3	5.7 / 2.1(+)	HLA classI,II	Humoral
4	1.9 / 1.0(-)	non HLA	(-)
5	2.3 / 1.9(-)	HLA classII	Humoral
6	11.2 / 1.7(-)	HLA classI	(-)

表4. 今後の利用方法の可能性

生体腎移植＝時間的余裕、ドナーリンパ球入手可能

全例にFCXM施行

陽性であれば、Flow-PRAによるHLA/nonHLA抗体の区別

- ・抗HLA抗体であれば、DFPP・血漿交換による抗体除去後移植を行い、Flow-PRAでフォローアップ
 - ・nonHLA抗体であれば、抗血管内皮細胞抗体のチェック
- 陽性であれば、抗体対策後移植
陰性であれば、通常の免疫抑制療法により移植

死体腎移植＝PRAの代用. Direct crossmatch省略

移植・輸血・妊娠などの抗HLA抗体保有ハイリスク患者のみ、Flow-PRA施行

陰性であれば、ドナー発生時のDirect crossmatch省略

陽性であれば、ドナー発生時のDirect crossmatchと可及的にFCXM施行

表5 心臓移植症例7例のHLAミスマッチ数、peak PRAと拒絶反応

症例番号	ミスマッチ数			Peak PRA %	拒絶反応		経過期間 (月)
	HLA-A	HLA-B	HLA-DR		細胞性	液性	
1	0	1	1	0	0	0	48
2	1	2	2	0	0	0	35
3	2	1	2	0	0	0	34
4	2	2	2	92	3	1	24
5	2	2	2	0	0	0	14
6	1	2	2	0	1	0	6
7	1	2	2	0	0	0	4

表6 脱感作療法施行例のPRA class I 及びII値の推移

PRA抗体	日付		
	2001.9.10	2002.3.25	2002.11.1
HLA class I %	57	50	36
HLA class II %	67	8	0
			2003.1.31
			32
			0

図8 KIR遺伝子座PCR産物のRSCA解析(非血縁の日本人9名の泳動パターン)

