

### 3 臓器移植における 組織適合性検査の意義

ゆざわ けんじ  
■ 湯沢 賢治

国立病院機構水戸医療センター 臓器移植外科



湯沢 賢治

1982年 筑波大学医学専門学群 卒業

1988年 筑波大学大学院 修了  
(医学博士)

1991 - 2006年 筑波大学外科 講師

1997 - 1999年

テキサス大学ヒューストン校  
外科臓器移植部門

2006年より国立病院機構水戸医療  
センター 臓器移植外科(現職)

2007年よりテキサス大学外科臓器  
移植部門 客員教授(兼任)

2013年より筑波大学 臓器移植学  
臨床教授(兼任)

日本移植学会副理事長, アジア移植学  
会理事, 日本組織適合性学会理事

Key words : 組織適合性検査, 臓器移植, 拒絶反応

#### Abstract

臓器移植において拒絶反応を回避するための組織適合性検査は、かつてドナー選択にのみ使われていた。近年の免疫抑制薬や周辺技術の進歩により、ABO血液型不適合や既存抗体陽性でも移植が可能となったことで、組織適合性検査の意義が低下したかという点、その逆で一層大きくなっている。高感度で高精度の抗HLA抗体検査が可能となったため、移植後に出現する *de novo* 抗HLA抗体の検出が可能となり、これが移植臓器の短期、長期予後に関わっていることや、その除去、抑制で予後が改善されることが明らかになったからである。臓器移植において組織適合性検査はきわめて重要である。

#### はじめに

他人からの臓器提供を受けて行う臓器移植においての大きな課題は、移植臓器を異物と認識して惹起される免疫反応による拒絶反応の克服である。1956年に初めてヒトで行われた臓器移植は遺伝的に全く同一の一卵性双生児間の腎移植であり、これを回避したものであった。臓器移植において拒絶反応を惹起する引き金になる

のが組織適合性であり、組織適合性検査として、  
1. ABO血液型検査, 2. HLA検査, 3. リンパ球クロスマッチ検査が行われてきた。最近では、3.に代わり、より高感度で特異性の定まった4. 抗HLA抗体検査が導入されている。これらの原理と長所や短所、意義について詳説する。

#### 1. ABO血液型検査

1901年にLandsteinerが発見したABO血液型の基本となる抗原は赤血球の表面のみならず、血管内皮細胞などにも存在しており、抗A抗B抗体は自己にないABO血液型抗原に対する自然抗体として血清中にIgG, IgMとして存在する。この抗体により輸血できる組み合わせが限定され、臓器移植においても同様に血管内皮細胞に発現しているABO血液型抗原と反応して補体を活性化し、抗体関連型拒絶反応をおこし、血管内凝固や微小血栓を作り、移植臓器は廃絶してしまう。このため、ABO血液型不適合での臓器移植は禁忌とされていたが、現在では移植前の抗A抗B抗体の除去と産生抑制により、臓器移植が可能となった。この治療効果判定のために、抗A抗B抗体の抗体価測定が必須である。

*Importance of histocompatibility testing in organ transplantation*

Kenji Yuzawa, Transplantation Surgery, National Hospital Organization Mito Medical Center

通常、赤血球と患者血清を倍々希釈していき凝集反応が起こる希釈倍数をもって定量的に抗体価を判定する。

## 2. HLA 検査

免疫反応に関わる重要な分子として主要組織適合性複合体 (Major Histocompatibility Complex, MHC) があり、ヒトでは HLA (ヒト白血球抗原, Human Leukocyte Antigen) として知られている。HLA はほぼ全ての細胞表面に存在し、分子構造から class I (A, B, C など) と class II (DR, DQ, DP など) に分かれ、その各々が数十種類の型をもつ。臨床的には、この全てを検査することは不可能なので、class Iとして A と B, class IIとして DR が検査される。この HLA の遺伝子は 6 番染色体の短腕にあり、各々の DNA が近くに存在しているため、HLA は 1 つの組み合わせとして遺伝する。この組み合わせをハプロタイプと呼ぶ。1 人の人間には、父親からと母親からの 2 つのハプロタイプがある。臨床的には、A, B, DR が検査されるので、一人の人間には、HLA について 6 つ型がある。親子間では 2 つのハプロタイプのうち 1 つが一致している。子供のハプロタイプの組み合わせは 4 通りとなり、子供同士で HLA が一致する確率は 4 分の 1 となる。HLA の各々が数十種類の型をもつので、非血縁者で偶然に一致する確率は低い。次に HLA の検査法を詳説する。

### ① LCT 法

1964 年に日系アメリカ人 Paul Terasaki が確立した検査方法で、リンパ球細胞傷害試験 LCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test) 法、あるいは、補体依存性細胞傷害試験 CDC (Complement-Dependent Cytotoxicity test) 法と呼ばれている。「テ

ラサキ プレート」を用いてお産の際に胎盤とともに出血した血液から、血清を分離、特異性をスクリーニングした抗血清をもちいたが、後には単クローン抗体が用いられた。1 $\mu$ l (1,000 分の 1ml) の抗血清と被検者のリンパ球を混合し、補体を加え、細胞の生死を顕微鏡で判定する。本法は、生きたリンパ球を用い、最終的にリンパ球の生死を判定するため、その手技、判定には熟練を要した。現在、この手技は、HLA 検査で使われることはなく、リンパ球直接交差試験 (リンパ球ダイレクトクロスマッチ) にのみ使われている。

### ② DNA タイピング法

細胞膜に発現する膜糖タンパクである HLA の多型は、それをコードする DNA の多型に依存しているので、この DNA 多型を解析することにより、HLA を同定することが可能である。この DNA 多型の検出には多くの方法がある。この詳細については、日本組織適合性学会の HP 上の「認定 HLA 検査技術者講習会テキスト」<sup>1)</sup> から参照できる。

現在、臓器移植ネットワークの献腎移植希望登録での HLA 登録は低解像度 (low resolution) のタイピングであり旧来の血清学的な HLA 抗原レベル、いわゆる 2 桁表記のものである。多くの施設では、DNA タイピング法による中または高解像度レベル (high resolution) の 4 桁レベルのタイピングが行われているが、ドナー発生時のレシピエントの検索では日本臓器移植ネットワークのシステムで 2 桁レベルデータである。しかし、2 桁レベルの血清学的タイピングより 4 桁レベルの DNA タイピングの方が、より移植成績に関係するの報告があり、その導入が待たれる。

また、臓器移植の臨床では、前記の通り、HLA-A, B, DR のみが検査され、登録されてい

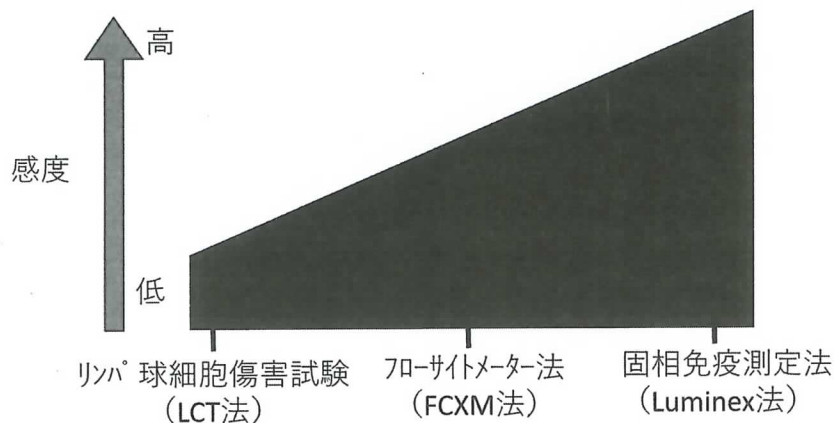


図 リンパ球クロスマッチ・抗体検査の感度

るが、後述の *de novo* 抗 HLA 抗体として抗 DP, DQ 抗体の関与が報告されてきており、これらの抗原系についての検査も求められる。

### 3. リンパ球クロスマッチ検査

レシピエントがドナーリンパ球に対する抗体を持っていると超急性拒絶反応を発症するため、移植は禁忌とされ、この検査として、リンパ球クロスマッチが行われてきた。

#### ① LCT 法

前述の HLA 検査と同様に、レシピエントのリンパ球とドナー血清を用いた LCT 法により、リンパ球の生死を直接判定するため、直接リンパ球クロスマッチ法と呼ばれている。この検査の感度は非常に低く、HLA 検査同様、顕微鏡を使ってリンパ球の生死を判定するため、判定には曖昧さがあった。また、非特異的反応があるため、結果に影響があった。

#### ② フローサイトクロスマッチ法 (Flow Cytometry crossmatch, FCXM)

レシピエントのリンパ球とドナー血清に蛍光

標識抗体抗ヒト IgFITC を加え、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定する。高感度であるが、HLA 抗体に特異性はなく、IgG 抗体を検出している。非補体依存性抗体も検出可能であるが、非特異反応もあり、陽性判定の閾値決定には経験を要する。

### 4. 抗 HLA 抗体検査

歴史的には抗体検査として、凍結保存パネル細胞を用いた LCT 法で Panel Reactive Antibody (PRA) 検査が行われていたが、最近では、フローサイトメーターや Luminex を用いた高感度測定に変わった。この方法は HLA 分子をコーティングしたマイクロビーズを用いることから固相免疫測定法とも呼ばれる。高感度で少量の抗体も同定できる。ドナーリンパ球を必要とせず、レシピエント血清のみで可能である。リンパ球クロスマッチ検査から抗 HLA 抗体検査までの感度の違いを図に示す。

本法に用いられるマイクロビーズは、精製抗原ビーズの組み合わせにより、スクリーニングから抗体特異性同定までキットとして市販されており、一般に用いられている。

なお、抗HLA抗体以外の抗体、抗non-HLA抗体の中で、MICA (Major histocompatibility complex class I-related Chain A) に対する抗体の予後に対する影響が報告されている。これはリンパ球には発現せず血管内皮細胞に発現しているため、リンパ球クロスマッチでは検出出来なかったが、市販されている試薬で検出出来るようになった<sup>2,3)</sup>。

### ①フローサイトメーターを用いた方法

HLA抗原がコーティングされたマイクロビーズとレシピエント血清を反応させ、ビーズに結合したHLA抗体を蛍光二次抗体で標識し、フローサイトメーターで測定する。HLA抗体とHLA抗原との反応はヒストグラムとして表され、判定する。結果は必ずしも抗体量とは相関せず、定量性はない。陽性判定の閾値設定、施設間格差などの問題がある。

### ②Luminexを用いた方法

HLA抗原がコーティングされたLuminexビーズには各ビーズを識別する赤レーザー色素が含まれており、これにレシピエント血清を加え、phycoerythrin標識抗ヒトIgを加えることにより、緑レーザーとして識別される。Luminexによる蛍光検出により、赤レーザーでビーズを認識し、緑レーザーで抗体の反応を見ることが出来る。この値は、Mean Fluorescence Intensity (MFI) として示され、蛍光強度なので厳密な定量性はないが、抗体量の目安としては使える。Luminexを用いた抗体試薬は数社から市販されているが、試薬によりHLA抗原の構成、特性、判定が異なるので、判定には注意を要する。

## 5. 抗HLA抗体検査の意義と保険収載

歴史的に既存抗体陽性では移植成績が不良で

あることは知られていたが、近年、高感度の抗HLA抗体検査法が可能となった。移植後にレシピエントに発現した*de novo*抗体が抗体関連型拒絶反応の原因となること、移植臓器の短期、長期予後に悪影響があることがわかり、抗体除去療法により予後が改善することが明らかになってきた。この事実から、日本移植学会臓器移植抗体陽性診療ガイドライン策定委員会では「臓器移植抗体陽性診療ガイドライン2018年版」<sup>4)</sup>を刊行し、これらの知見の普及に努めた。また、この努力の結果、2018年4月から、抗HLA抗体(スクリーニング検査)および抗HLA抗体(抗体特異性同定検査)の測定が臓器移植後について保険収載になった。

スクリーニング検査(1,000点)は各臓器移植後の患者に年1回は可能となり、抗体関連型拒絶反応を強く疑う場合は1年に1回は追加検査が可能となった。また、抗体特異性同定検査(5,000点)はスクリーニング検査によって陽性が確認された症例について可能となり、抗体関連型拒絶反応と診断された患者の経過観察では1年に2回の追加検査が可能になった。ただし、これらの検査は無闇に行われぬ様にするため、施設が限定された。①移植後患者指導管理料に関する施設基準の届け出を行っていること、②関係学会による指針を遵守し検査を実施していること(外部委託の場合には、関係学会による指針を遵守し検査を実施していること)となっている。関係学会とは日本組織適合性学会であり、その指針は学会認定制度委員会の定めるプロトコル集であり<sup>1)</sup>、学会が開催する精度管理(QCワークショップ)に参加することが求められる。

ただし、臓器移植後の患者で前記①の施設基準を満たしていない施設、たとえば診療所などでは、年1回は①を満たす施設での抗体検査を

勧めることとなった。これは抗体検査で陽性となった場合、抗体除去療法など高度な治療が必要となるため、治療後の経過観察も必要であるからである。

### おわりに

1980年代前半までは、現在のように有効な免疫抑制薬がなかったため、移植成績向上のためにはHLAを一致させることしかなく、亡くなった方から提供される腎臓を受けるレシピエントにはHLAの適合する者を選択してきた。このため非常に大きな労力を使い血清学的にHLA検査を行っていた。1980年代後半に優れた免疫抑制剤の出現により、移植成績が向上すると共に、HLA検査の重要性は低下し、HLAが一致しない夫婦間での臓器移植も可能になった。

このような現状では、臓器移植においてHLA検査は不要かと言うとそうではない。近年、臓器移植後の抗HLA抗体が移植臓器の短期、長

期生着に関わっていることや、この除去、抑制により移植臓器の長期成績が改善されることも明らかとなった。これらは、抗HLA抗体の高感度の測定が可能となったため、明らかになってきたものである。従って、正確なドナーのHLAが分からなければ移植後の抗HLA抗体の判断ができないため、やはりHLA検査なしには臓器移植はあり得ないのである。

臓器移植においてHLA検査に始まる組織適合性検査はきわめて重要である。

### 文 献

- 1) 日本組織適合性学会 . QCWS プロトコール集 . <http://jshi.umin.ac.jp/qcws/index.html>
- 2) Ogawa K. Basic Knowledge 1 of HLA. MHC. 2016; 23: 115-122.
- 3) Yuzawa K. Renal transplantation and the role of histocompatibility testing in it. MHC. 2014; 21: 105-118.
- 4) 日本移植学会臓器移植抗体陽性診療ガイドライン策定委員会編 : 臓器移植抗体陽性診療ガイドライン 2018年版 . メディカルレビュー社 . 2018

## TOPICS

### ◇ 第53回日本臨床腎移植学会

開催年月日：2020年2月19日（水） - 21日（金）

代表者：八木澤 隆

（自治医科大学 腎泌尿器外科学 教授）

開催地：東京都港区

会 場：浜松町コンベンションホール

事務局連絡先：株式会社コンベンションリンクージ内

TEL：03-3263-8688

開催案内 URL：<https://www.c-linkage.co.jp/53jsct/>

テーマ：腎移植 2020

- Transforming Kidney Transplantation Together -

◇理事長講演

司 会：吉村 了勇（京都府立医科大学 移植・一般外科）

演 者：剣持 敬（藤田医科大学医学部 移植・再生医学）

◇会長講演

司 会：剣持 敬（藤田医科大学医学部 移植・再生医学）

演 者：八木澤 隆（自治医科大学 腎泌尿器外科）

◇腎移植臨床統計報告

司 会：湯沢 賢治（水戸医療センター 臓器移植外科）

◇腎移植連絡協議会（日本腎臓学会ジョイントシンポジウム）

司 会：剣持 敬（藤田医科大学医学部 移植・再生医学）

：柏原 直樹（川崎医科大学 腎臓・高血圧内科学）

◇特別企画シンポジウム 在日・来日外国人対応の医療チーム

司 会：田村 純人（東京大学医学部附属病院）

：池田 成江（北里大学病院泌尿器科）

他、多数