

特集：腎移植

腎移植における HLA 抗体の検出

Detection of HLA antibody in renal transplantation

小林 孝彰

Takaaki KOBAYASHI

はじめに

腎移植は、効果的な薬剤の開発と therapeutic drug monitoring 導入など、免疫抑制療法の進歩、拒絶反応、感染症対策を含めたきめ細かな患者管理により、移植成績は飛躍的に向上した。わが国の統計では、生体腎移植の5年生着率は90%を大きく超えている。さらに、組織適合性検査(HLA タイピング、クロスマッチ、抗体検査)の技術的な発展(革新)により、移植前にドナー特異的抗体(donor specific antibody : DSA)を正確に判定できるようになったことも大きく貢献している。最近では、T細胞性拒絶反応はほぼ克服され、予後に大きく影響する抗体関連型拒絶反応が注目されるようになった。DSA陽性のハイリスク患者に対して、脱感作療法(B細胞、形質細胞をターゲットにした治療と抗体除去)を用いて移植が行われている。また、移植維持期には不可逆性に腎機能障害が進行する慢性拒絶反応と DSA との関連が明らかにされている。

本稿では、HLA 抗体の検出方法を解説し、現在の検査の流れ、そして結果の解釈など臨床応用について記述したい。普段、移植医療に接していない腎臓内科医の皆様にも腎移植の現状を理解していただき、わが国での移植医療の普及につながることを期待したい。

抗体の検出方法

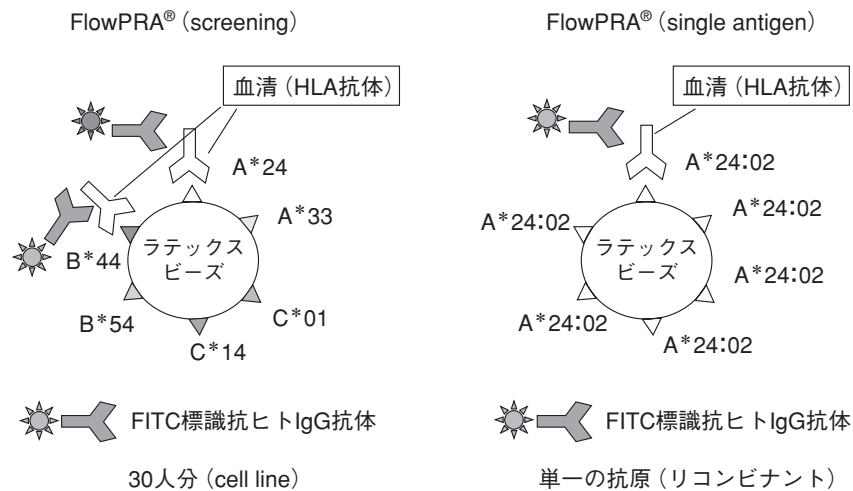
HLA 抗体は、過去の輸血、妊娠、移植により、非自己の HLA に感作されて産生される¹⁾。腎移植では、ドナー HLA に対する抗体(DSA)が存在すれば、移植後グラフトの血管内皮細胞に発現する HLA と抗原抗体反応を起こし、

補体、凝固系が活性化し、血小板凝集による血流障害を引き起こす(抗体関連型拒絶反応)。そして、最終的にはグラフト機能廃絶に陥る。そのため、移植前の抗体検査は、腎移植医療において不可欠の検査として広く実施されている。抗体検出方法として、細胞を用いたクロスマッチ、パネル反応性抗体(panel reactive antibody : PRA)検査とマイクロビーズを用いた検査がある²⁾。表1に、クロスマッチ検査、抗体検査で一般的に使用される略語をまとめた。

クロスマッチ(XM)とは、レシピエント血清中にドナーリンパ球に反応する抗体の有無をチェックする検査である。検出する方法として、従来から CDC(補体依存性細胞傷害試験)[LCT(リンパ球細胞傷害試験)とも表現される]が用いられてきた。血清とリンパ球を反応させた後に、ウサギ補体による細胞傷害の程度をエオジンなどの色素を用い判定する(色素排除試験)。検査は一般的に Tリンパ球、Bリンパ球に分離後行うが、分離せずにリンパ球全体で検査する方法もある。Tリンパ球は HLA Class I を発現し、Bリンパ球は Class I, II を発現する。この方法は感度が低いという欠点があり、感度を高める目的で抗ヒトグロブリン(anti-human globulin : AHG)抗体が用いられている。現在では、フローサイトメトリーを用いたさらに高感度の検出法(FCXM)が併用されることが多い。CDCXM では抗体接着および補体活性化の両方を加味した判定が可能であるが、FCXM では抗体の接着のみを判定することになる。HLA 抗体には、IgG, IgM が存在するが、臨床的には IgG が強く予後に関連すると考えられている。CDCXM では、ジチオスレイトール(dithiothreitol : DTT)で IgM を処理することにより IgG 抗体と IgM 抗体を判別していたが、FCXM では、二次抗体として蛍光標識された抗ヒト IgG 抗体または IgM 抗体を用いることで容易に判別可能となった。B細胞に対する HLA 以外の非特異的な結合(Fc レセプ

表 1 組織適合性検査に関する略語

- CDC (complement dependent cytotoxicity : 補体依存性細胞傷害試験)
- LCT (lymphocytotoxicity test, lymphocyte cytotoxicity test : リンパ球(細胞)傷害試験)
- AHG (anti-human globulin : 抗ヒトグロブリンによる反応増強)
- PRA (panel reactive antibody : パネル反応性抗体)
- XM (crossmatch : クロスマッチ)
- CDCXM (CDC クロスマッチ), LCTXM (LCT クロスマッチ)
- FCXM (flow cytometry crossmatch : フローサイトメトリークロスマッチ)
- ICFA (immunocomplex capture fluorescence analysis)
- LATTM, QuickScreen[®], B-Screen[®] (ELISA による HLA 抗体検査)
- FlowPRA[®] (フローサイトメトリーによる HLA 抗体検査)
- LABScreen[®], WAKFlow[®], Life Screen Deluxe[®] (Luminex による HLA 抗体検査)
- DSA (donor specific antibody : ドナー特異的抗体)
- NDSA (non-donor specific antibody : ドナー非特異的抗体)
- SAB (single antigen beads : HLA 抗体の特異性判定のために単一抗原を固定したビーズ)

図 1 マイクロビーズを用いた抗体検出 (FlowPRA[®])

ターなどが false positive 判定を引き起こすことがあるため、プロナーゼ (pronase) による Fc レセプターの前処理が行われる。最近では immunocomplex capture fluorescence analysis (ICFA) により、抗 HLA Class I または Class II モノクローナル抗体を固定した Luminex 用マイクロビーズ (下記) を用いて、細胞膜に接着した抗体が HLA 抗体 (Class I または Class II) であるかどうか直接判定できるキットも開発されている。

PRA は、ランダムに選んだ不特定のリンパ球のうち何%に反応するかを示す検査法である。血清中の HLA 抗体が反応する抗原の種類が多くなるとこの値が高くなり、移植には要注意とされ、適合するドナーが限定される。XM と PRA は、細胞をターゲットにした方法として Cell (membrane) based assay に分類される。この方法では、抗体が細胞に接着していることは検出できるが、細胞膜に発現するどの

抗原に反応しているか判定できない。最近では、Solid phase assay として、細胞由来のさまざまな型の HLA をコーティングしたプレート (ELISA)、マイクロビーズ (フローサイトメトリー、Luminex) を用いる検査方法が開発され、HLA 抗体の詳細な検査が可能となった。従来の細胞を用いた抗体検査では、血小板 (Class I のみ発現) 吸着の有無により Class I 抗体と Class II 抗体を区別していたが、Class I 用および Class II 用のプレートまたはマイクロビーズを用いることで HLA 抗体の有無を判定 (スクリーニング) できるようになった (図 1)。さらに、単一の型のリコンビナント HLA をコーティングしたマイクロビーズ (single antigen beads : SAB) も開発され、HLA 抗体の特異性 (例えば HLA-A*24:02) に対する抗体を詳細かつ正確に判定可能となった。そして、蛍光色素で区別可能な 100 種類のマイクロビーズを用いる Luminex システム (xMAP Technology)

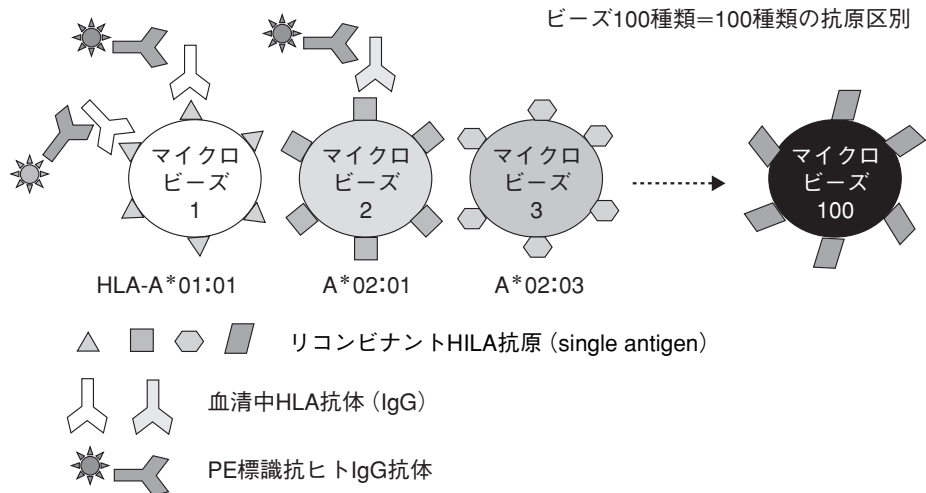


図 2 Luminex システムによる HLA 抗体の特異性解析

を応用することで、迅速かつ効率的な HLA 抗体検査が可能となった(図 2)。わが国で利用できる市販の抗体検査には、FlowPRA[®]、LABScreen[®] (One Lambda, ベリタス)、WAKFlow[®] (湧永製薬)、QuickScreen[®]、B-Screen[®]、Life Screen Deluxe[®] (Gen-Probe GTI DIAGNOSTICS) などがある。

各検査方法の詳細については、組織適合性検査プロトコル集(標準方法)として日本移植学会の暫定案が Web (日本移植学会ホームページ)に掲載されている³⁾。HLA(種類, 表記方法など)については、日本組織適合性学会のホームページ⁴⁾、HLA nomenclature のホームページ⁵⁾を参照していただきたい。

腎移植における抗体検査の意義

クロスマッチ検査の歴史を繙くと、クロスマッチが腎臓移植では不可欠な検査であることを最初に報告したのは、1969 年 Terasaki ら⁶⁾による。クロスマッチ陽性 30 例中 24 例(80.0%)が腎移植直後にグラフト廃絶に陥ったのに対して、陰性 195 例のうち 8 例(4.1%)しかグラフトは廃絶しなかった。腎移植においてクロスマッチは術前に必ず行うべきであり、陽性例は移植すべきでないことを強く主張した。当時は、十分な HLA のタイピングができなかった時代であり、(超)急性抗体関連型拒絶反応による移植直後のグラフト喪失の減少に大きく貢献した。その後、HLA 適合度は移植の予後に影響を与えると考えられたため、正確な HLA タイピングに精力が注がれた。1990 年代には、HLA タイピングは血清による細胞傷害テスト(CDC, LCT)から、

表 2 腎移植における抗体検査の意義

<p>■移植前：Preformed Ab(既存抗体)の検出 急性抗体関連型拒絶反応リスク診断 →断念 or 決行(脱感作療法 desensitization) (課題)判定基準? 長期予後?</p>
<p>■移植後：Preformed Ab(既存抗体)の変化 De novo Ab(新規産生抗体)の検出 慢性抗体関連型拒絶反応対策 →早期診断, 治療 (課題)モニタリングの意義(cost-effectiveness)</p>

DNA タイピングに移行し、正確かつ詳細な分類が可能となった。2000 年代になり、新しい薬剤の開発など免疫抑制療法の進歩に伴い、40%近くにみられた T 細胞性拒絶反応は 10%程度まで激減し、移植成績は向上した(生体腎移植, 3 年生着率 95.2%)⁷⁾。

現在は、HLA 適合度が移植成績に及ぼす影響はかなり少なくなり、HLA 適合度では不利な条件となる夫婦間移植も良好な成績が得られるようになっている。移植腎機能廃絶時にはドナー HLA に対する抗体が産生されていることが多く、二次移植の場合にはドナーが限定されることになり、移植後の拒絶反応のリスクも高い。二次移植、三次移植と治療の長期的展望に立てば、HLA のミスマッチはできるだけ少ないほうがよいと考えられている。また、マイクロビーズを用いることで微量の HLA 抗体を、(どの HLA に反応するか)特異性まで正確に判定できるようになったことは、HLA 抗体と慢性拒絶反応との関連性をより明確にした⁸⁾。このように、抗体関連型拒絶反応の対応が患者の予後を左右する時代となっている。表 2 に、腎移植における抗体検

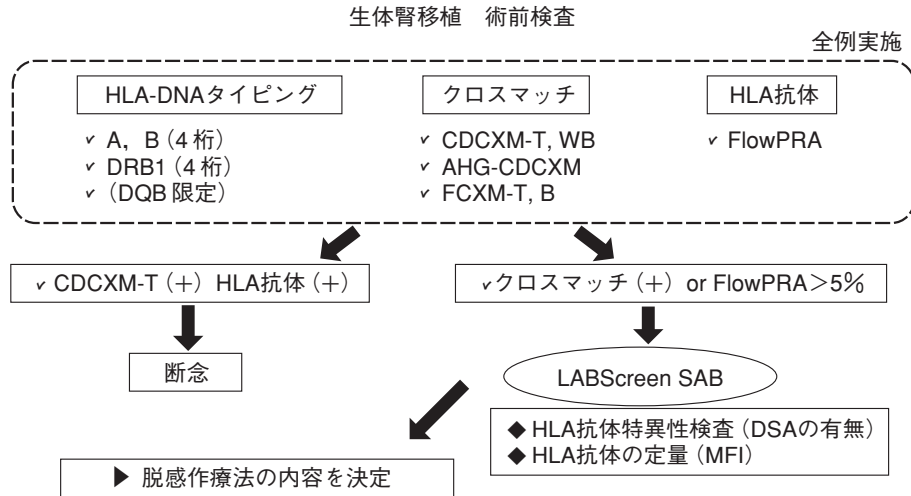


図 3 生体腎移植の組織適合性検査の流れ

査の意義を記載した。移植前にはドナーと反応する HLA 抗体(DSA)の有無をチェックして、DSA 陽性(急性抗体関連型拒絶反応ハイリスク)症例の場合には、移植を断念するか、脱感作療法を用いて決行するか判定を行う。CDCXM を移植適応判定に用いる施設が多い。しかし、CDCXM 陰性でも DSA 陽性であれば、脱感作療法を考慮しなければならない。移植後に HLA 抗体産生をモニタリングすることは、(慢性)抗体関連型拒絶反応の早期診断に役立つ重要な検査と考えられている。ただし、モニタリングの臨床的意義については、後述するように十分なコンセンサスは得られていない。

生体腎移植における組織適合性検査の現状

生体腎移植前には抗体検査を確実にを行い、正確な評価を行うことが重要である。献腎移植のような緊急の移植ではないので、十分な時間をかけて検査を行う余裕がある。中日本腎移植グループの名古屋第二赤十字病院の例を示す(図 3)。全例に対して、HLA-DNA タイピング(A, B, DRB1 は全例, DQB は限定)、クロスマッチ(CDCXM-T, WB, AHG-CDCXM, FCXM-T, B)、HLA 抗体の有無を調べるスクリーニング(FlowPRA)を実施している。CDCXM-T が陽性であり、HLA 抗体陽性であれば、移植は断念する。CDCXM-T 以外のクロスマッチ陽性または FlowPRA > 5% であるならば、さらに HLA 抗体特異性検査を LABScreen SAB を用いて行い、DSA の有無を評価して移植を決行する。このとき、クロスマッチ陽性レベル(FCXM-T, B)、DSA の量(MFI レベル)に基づき脱感作療法の内容を決定して

いる。

DSA 陽性移植、ABO 血液型不適合移植で用いられる脱感作療法は、通常の移植での免疫抑制療法に追加して、CD20 陽性 B 細胞をターゲットとしたリツキシマブ(100~200 mg, 1~2 回)、抗体除去のための(二重濾過)血漿交換(2~4 回)、ミコフェノール酸モフェチルの前投与がある。ウイルスキャリアなど B 型肝炎の増悪の危険性がありリツキシマブを使用できない場合には、脾臓摘出を行う。われわれは、移植前のクロスマッチの結果、DSA 量に基づいて、それらの投与量、回数を変えて脱感作療法の強さを決めている。さらに、Fcγ レセプターを介してマクロファージ、樹状細胞、B 細胞を抑制する IVIG(免疫グロブリン静注療法)、形質細胞のアポトーシスを誘導するボルテゾミブ、補体抑制のためのエクリズマブ(補体成分 C5 に対するモノクローナル抗体)投与を考慮する施設もある。

移植前の抗体検査の手順は施設により異なり、全例に最初から SAB による解析を行う場合もある。最高の感度で抗体を測定するため、FCXM 陰性レベルの微量の DSA をすべて検出可能であり、このような症例に処置が必要な場合には有効な検出方法である。しかし、抗体検査が保険適用となっていない現状では、全例の SAB による解析には高額な費用(Class I, II それぞれ 2~5 万円)が問題となる。2012 年には造血幹細胞移植の抗体検査が保険収載されるようになり、臓器移植領域でも積極的に厚生労働省に働きかける必要がある。

表 3 クロスマッチ結果による DSA 陽性移植の分類

抗体レベル		CDCXM	FCXM	DSA	課題
高い	①	(+)	(+)	(+)	移植適応?
↑	②	(-)	(+)	(+)	長期予後?
↓	③	(-)	(-)	(+)	脱感作療法?
低い					

抗体検査結果の解釈

クロスマッチ検査, 抗体検査のポイントを記す。

- 1) クロスマッチ検査(ドナーリンパ球とレシピエント血清の反応)では, レシピエント血中にドナーリンパ球に反応する抗体の有無をチェックする。
- 2) T 細胞には HLA Class I (HLA-A, B, C), B 細胞には Class I と Class II (DR, DQ, DP)が発現している。
- 3) Class I 発現量は B 細胞>T 細胞であり, 微量の Class I 抗体では T 細胞陰性でも B 細胞陽性となる。Class II 抗体のみの場合も, T 細胞陰性, B 細胞陽性となる。
- 4) CDCXM は, IgG, IgM 両方を検出する。自己抗体(主として IgM)の反応により陽性となる場合があるが, DTT により IgM 処理後陰性となる。
- 5) FCXM は IgG 抗体のみを検出できる。臨床的には IgG 抗体が重要であると考えられている。
- 6) 感度は FCXM>CDCXM であり, FCXM は微量の抗体を検出できるが, 補体の活性化は考慮されない。
- 7) B 細胞には, Fc レセプターがあるため抗体(Fc 部分)との非特異的の反応があり, FCXM-B 細胞は偽陽性となりやすい。リツキシマブ投与後には, 血中に存在する CD20 抗体がドナー B 細胞と反応して偽陽性となるため要注意である。これらの反応は, プロナーゼ(Fc レセプター, CD20 を分解)処理にてある程度軽減できる。
- 8) クロスマッチ検査では, リンパ球に発現する HLA 以外の抗原に対する nonHLA 抗体の検出も可能(HLA 抗体に比べ, 臨床的意義は低い)。内皮細胞をターゲットにするクロスマッチも考案されている。
- 9) 抗体の検出には, HLA 抗原を細胞膜から分離してプレートまたはマイクロビーズに結合させて ELISA, フローサイトメトリー, Luminex にて解析する Solid phase assay が用いられる。
- 10) さまざまな HLA 抗原を結合させたプレート, マイクロビーズを用い HLA 抗体の有無をチェックするスクリーニング(1 検体 2 千~1 万円)から, 特定の HLA 抗原のみを結合させた SAB を用い HLA 抗体の特異性

判定を行う検査(1 検体 2~5 万円)がある。

- 11) DSA 量は高いほうから, ①CDCXM 陽性レベル, ② CDCXM 陰性, FCXM 陽性レベル, ③FCXM 陰性, DSA 陽性レベル, の 3 つに分類される(表 3)。米国では 5 年生着率が①67%, ②77%, ③91%⁹⁾, 英国では, ①46%, ②と③は 89%と報告されている¹⁰⁾。
- 12) ①CDCXM-T 細胞陽性レベルの DSA が存在すれば, 移植は行わない。
②CDCXM 陰性, FCXM 陽性レベルの DSA であれば, 脱感作療法を行い実施する場合がある。短期成績は良好であるが, 中・長期成績については不良である可能性も示唆されている。
③CDCXM も FCXM も陰性であり, SAB を用いた抗体検査により微量の DSA を検出する。脱感作療法を行わずに移植を実施しても, 多くの場合良好な成績が得られている。しかし, 予後不良例も存在し, リツキシマブを含めて脱感作療法の必要性については結論がでていない。

表 4 に実際の移植前の組織適合性検査結果を示す。

LD969 は, FCXM-T, B 細胞ともに陽性であり, FlowPRA スクリーニングで Class I が 50%であったため, SAB 解析を行った。HLA-B*40:01 に対する DSA が検出され, MFI (mean fluorescence intensity)が 11,337 と高値であった。LD1101 は FCXM では T 細胞は陰性, B 細胞は陽性であり, FlowPRA Class I 48%であったため, SAB 解析を行った。HLA*02:06 に対する DSA が検出され, MFI は 6,018 であった。LD1000 は CDCXM, FCXM ともに, B 細胞は陽性であり, FlowPRA Class II 陽性であった。SAB 解析では, DRB4*01:03, DQB1*04:01 に対する DSA で MFI が 11,445, 8,341 であった。LD1031 は, FCXM は T 細胞, B 細胞ともに陰性であったが, FlowPRA Class I が 49%であったため, SAB 解析を行ったところ, B*07:02 に対する DSA が検出されたが, MFI は 2,331 と低値(カットオフ値 1,000)であった。

これらを含む自験例では, 2008~2011 年に実施した 26 例の CDCXM 陰性, DSA 陽性(FCXM 陽性 18 例, 陰性 8 例)腎移植は 100%生着しているが, その約 4 割が 1 年以

表 4 移植前の組織適合性検査(HLA タイピング, クロスマッチ, HLA 抗体検査)

	HLA	A	B	DRB1		DQB1		T	B	DSA	MFI
LD969	レシピエント	26 : 01	35 : 01	08 : 02		04 : 02	CDCXM	(-)	(-)	B*40 : 01	11,337
		31 : 01	15 : 02	09 : 01		03 : 03	FCXM	(+)	(+)		
	ドナー(夫)	26 : 01	40 : 01	04 : 03		03 : 02		Class I	Class II		
		24 : 02	39 : 01	08 : 03		06 : 01	FlowPRA	50 %	1 %		
感作歴：輸血, 妊娠											
LD1101	レシピエント	11 : 01	39 : 01	12 : 01		03 : 01	CDCXM	(-)	(-)	A*02 : 06	6,018
		26 : 01	44 : 03	15 : 01		06 : 02	FCXM	(-)	(+)	A*02 : 01	3,517
	ドナー(夫)	02 : 01	35 : 01	09 : 01		03 : 03		Class I	Class II		
		02 : 06	15 : 01	14 : 54		05 : 03	FlowPRA	48 %	0 %		
感作歴：輸血, 妊娠											
LD1000	レシピエント	02 : 01	40 : 02	14 : 54		05 : 03	CDCXM	(-)	(+)	DRB4*01 : 03	11,445
		33 : 01	—	14 : 05		05 : 03	FCXM	(-)	(+)	DQB1*04 : 01	8,341
	ドナー(母)	24 : 02	55 : 02	04 : 05	01 : 03	04 : 01		Class I	Class II		
		33 : 01	40 : 02	14 : 05		05 : 03	FlowPRA	2 %	89 %		
感作歴：移植											
LD1031	レシピエント	31 : 01	51 : 01	08 : 02		04 : 02	CDCXM	(-)	(-)	B*07 : 02	2,331
		02 : 01	15 : 01	09 : 01		03 : 03	FCXM	(-)	(-)		
	ドナー(母)	24 : 02	07 : 02	01 : 01		05 : 01		Class I	Class II		
		31 : 01	51 : 01	08 : 02		04 : 02	FlowPRA	49 %	0 %		
感作歴：妊娠											

内にプロトコール腎生検にて慢性抗体関連型拒絶反応の所見を示した。Class II 抗体, 特に DR+/- DQ DSA で高頻度に認められ, 長期のフォローアップが必要と考えられた。Mayo Clinic でも, Class II 抗体は高率に chronic glomerulopathy の所見を呈し, 5 年生着率が不良 (Class II DSA 62.6 % vs Class I DSA 85.3 %) と報告している。高レベルの Class I 抗体は, 最初の 1 年の graft loss を引き起こす可能性があるが, その後の予後は良好であった。

腎臓内科医が臨床現場でクロスマッチを解釈するうえで, 「Understanding crossmatch testing in organ transplantation : A case-based guide for the general nephrologist」¹¹⁾ が非常に参考になるので興味のある方は読んでいただきたい。最近, HLA および nonHLA 抗体に関連した検査および臨床管理に関するコンセンサスガイドラインが発表された¹²⁾。2012 年のローマでの会議で, 検査方法(テクニカル), 移植前の抗体検査と解釈, 移植後の抗体モニタリングについて, 3 つのグループに分かれて討論した合意事項である。移植前には, 抗体およびクロスマッチ検査に基づいてリス

ク判定が行われるべきであり, CDCXM 陽性, DSA 陽性移植は避けるべきであるとしている。そのほかに, SAB を用いた抗体検査で Class I (HLA-A, B, C), Class II (HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA, DQB, DPA, DPB) とともに陰性ならば, 移植前のクロスマッチ検査を省略できる(バーチャルクロスマッチ)こと, CDCXM 陰性, DSA 陽性移植は必ずしも禁忌ではないが, 免疫学的にリスクは高く脱感作療法により移植が可能であること, 高度に感作された患者に対しては, kidney paired donation (ドナー交換腎移植), acceptable mismatch program (EuroTransplant で採用されているプログラムで, PRA 85 %以上の移植登録患者の HLA 抗体の特異性から, HLA Matchmaker (コンピュータ解析) を用いて移植可能な HLA タイプを同定し, ドナー発生時には優先的に配分される), 脱感作療法を考慮すべきであること, ABO 以外の nonHLA 抗体については, 移植前のルーチン検査を推奨する根拠はないことなどが記載されている。

高感度検出方法の課題

SAB を用いた HLA 抗体の高感度検出方法には注意すべき点がある。第一に、広く流通しているキットは海外メーカーにより製造されており、コーティングしてある抗原 (single antigen) 型のなかには、日本人に比較的多い HLA-A*02:07, A*26:03, B*55:02, DRB1*08:03, DRB1*13:02, DRB1*08:02, DRB1*04:06 などが含まれていないことがある。しかし、2 桁レベルでも判定可能であるので、現状では大きな問題はない。第二に、定量性の問題が指摘されている。HLA 抗体の量は臨床的には重要であるが、機器による差、測定者による差、ビーズに固定した HLA 抗原密度のロット間差は存在し、検査値が標準化されていない現状では、精度の高い定量性は望めない^{12,13)}。さらに、抗体量が多い場合には、MFI 値は頭打ちとなるので過小評価される可能性がある。標準化の一つの方法として、MESF (molecules of equivalent soluble fluorochrome)¹⁴⁾が提案されているが、有効な解決策とはならず、現状では MFI (mean fluorescence intensity) で表示する例が多い。最近では、positive control を考慮した normalized MFI の報告もある。第三に、マイクロビーズに結合した変性した (denatured) HLA 分子に対する反応が認められることである。このような抗体は、マイクロビーズには反応しても、リンパ球に発現する抗原には反応しない。その一部は自然抗体であるとも考えられている。SAB と FCXM 結果との乖離がみられる場合にはこの可能性がある。第四に、IgM 抗体および補体 (C1) による HLA IgG 抗体の阻害がある。通常、臨床的に意義のある IgG 抗体を測定しているが、IgM 抗体が多く存在する場合に、IgG 抗体の接着を阻害して本来の値よりも低めに測定されることが稀にある¹⁵⁾。同じように、C1 が二次抗体の接着を阻害して、正確な抗体量を検出できない Prozone effect が報告されている¹⁶⁾。本来の値よりもかなり低い値として測定されるので要注意であるが、FCXM ではそのような阻害効果はみられないので判別は可能である。対策として、検体の DTT 処理、EDTA 処理、熱処理 (補体不活化) が提唱されている。

また、DSA がすべて同じように予後に影響するのではないことから、HLA 抗体の臨床的意義を明確にするための課題が報告されている。IgG のサブクラス (IgG 1, 3 は補体活性化する能力が高く、逆に IgG 2 は低く、IgG 4 は補体をほとんど活性化しない) 解析¹⁷⁾、C1q 解析であり¹⁸⁾、拒絶反応と関連性が検討されている。また、ターゲットとなる抗原、すなわち Class I である A, B, C, Class II である

DR, DQ, DP において、抗体接着後の細胞傷害を起しやすさに違いがあるかどうか^{19~21)}、accommodation (臨床の ABO 不適合移植で観察されるように、血漿交換などで移植前に抗ドナー抗体量を減少させて移植すれば、その後抗体価が上昇してもグラフトは拒絶されない状態) をグラフト内皮細胞が獲得している可能性^{22,23)} など、同じ DSA でも傷害性のある抗体と傷害性のない抗体の鑑別は、治療の必要性を考慮するうえで重要である。さらに、移植後には DSA はグラフト (内皮細胞) に吸着されるため、NDSA のみが先に検出される。内皮細胞には、通常、多量の HLA Class I 抗原と少量の HLA-DR 抗原が発現し、DQ 抗原は発現していない。グラフト吸着レベルは抗原の発現レベルに比例すると考えられ、Class I DSA は吸着されやすく、DQ DSA は吸着されにくい。そのため、血中の DQ DSA が検出されやすい事実と符合する。早期に DSA 産生を検出できるアッセイの確立が課題である。HLA 以外の抗体として、抗内皮細胞抗体、MICA, angiotensin type 1 receptor などに対する抗体も拒絶反応との関連が指摘されており²⁴⁾、内皮細胞を用いたクロスマッチ検査の有用性が報告されている^{25,26)}。

コンセンサスガイドライン¹²⁾では、Solid phase assay は、移植前の HLA 抗体検査に不可欠であるが、Cell based assay で補足されるべきであること、上述の技術的な問題を把握し、特にロット間でビーズに固定される HLA 抗原密度の違い、変性 HLA 抗原の割合の差が検査値のバラツキの原因となりうることを理解すること、と記載されている。検査マニュアルを最適化し、抗体価の標準化に向けて、国内・国際レベルで精度管理が必要である。各検査施設は、地域、国家の規則 (認定制度) に基づいて、検定試験 (認定試験) に参加しなければならない。

移植後のモニタリング

DSA と抗体関連型拒絶反応の関連が証明されてきた⁸⁾。しかし、移植後の定期的なモニタリングの意義については明確にされていない。移植 1 年後までの解析では、*de novo* HLA 抗体の検出は急性拒絶反応発現と同時にその後であり、HLA 抗体スクリーニング検査の有用性は認められなかった²⁷⁾。慢性抗体関連型拒絶反応では、腎機能悪化 (Cr 上昇、蛋白尿) が見られる前に診断し、治療することが望まれる。定期的な HLA 抗体モニタリングが慢性拒絶反応の早期診断に有効であるか検討する必要がある。つまり、どれくらいの頻度で、どの患者に対して (または全例に) 検査を行い、結果をどのように判定し、治療に結びつけるかを

明らかにし、cost effectiveness 解析に基づく有用性の評価を行わなければならない。

現在われわれは、移植後フォローアップ患者全例に年1回の抗体スクリーニング検査(モニタリング)を実施し、陽性例には SAB による特異性検査を行っている。DSA が検出されれば腎生検を実施し、慢性抗体関連型拒絶反応の所見が得られたら、血中濃度再検査と免疫抑制の強化、血漿交換、リツキシマブ投与を行う臨床研究を実施中である。今のところ、DSA 検出後に慢性抗体関連型拒絶反応の所見がみられたのは約4割であり、DR+/- DQ DSA が危険因子と考えられた。Class I DSA 単独、DQ DSA 単独では慢性拒絶反応を認めない例が多かったが、綿密な経過観察は必要と考えている。

2012年のコンセンサスガイドライン¹²⁾では移植後抗体モニタリングについて、1) DSA 陽性移植(脱感作療法実施)など高リスク患者では、移植後最初の3カ月に DSA 測定とプロトコル腎生検を行い、2) 過去に DSA 陽性、移植時には陰性であった中等度のリスク患者では、移植後1カ月以内に DSA モニタリングを行い、陽性であれば腎生検を行う、3) 低リスク患者(感作歴のない初回移植)では、移植後3~12カ月に1回 DSA スクリーニングを実施し、陽性ならば腎生検を実施することが望ましい、としている。治療は腎生検の結果に基づいて行い、腎機能正常であることと DSA の減少を効果判定とする。高リスク患者で DSA の急激な上昇があれば、腎生検で所見が認められなくても DSA を減少させる治療を開始する。DSA 陽性であれば引き続き DSA モニタリングを行う。低リスク患者ではそのほかに、①免疫抑制療法を変化させたとき、②non-adherence が疑われたとき、③腎機能障害が認められたとき、④フォローアップを移植センターから地方の病院に移すとき、に DSA モニタリングを行うことが推奨されている。このとき DSA 陽性であれば腎生検を実施する。移植後1年以上経過すれば、高・中・低リスク患者すべてに対して少なくとも年1回の血清保存を行い、①~④のときに DSA モニタリングを行う。DSA の検出、または前値より増加(DSA 陽性例)が認められれば腎生検を行う。1年以降は高額な検査費用のため全患者に対するモニタリングの実施は困難としている。一方少数意見であるが、患者管理の適正化、DSA 早期検出を目的として年1回の抗体モニタリングは必要との報告もある。ただ、このような慢性抗体関連型拒絶反応に対して有効な治療法が確立されていないことも、移植後抗体モニタリングの意義を明確にできない理由となっている。

日本の課題

海外と比較して、わが国が立ち後れているのは献腎移植システムである。わが国には、臓器移植を数多く実施している欧米のシステムと比較して改善すべき課題が2つある。1つは、事前 PRA 検査であり、もう1つはドナー発生時のフローサイトメトリッククロスマッチである。これらは、抗体関連型拒絶反応のハイリスクを除外し、予後の良好なレシピエントの選択には必須事項として欧米では実施されている。しかしわが国では、レシピエント選択基準の見直し(2011年3月より改正)でもこれらは盛り込まれず、実施は都道府県(地域)の HLA 検査センターにより判断され、地域による格差が生じている。移植前の抗体検査レベルが生体腎と献腎移植では大きく異なっているのが現状である。現在の献腎移植検査システムでは、中・低力価の DSA の検出を見逃し、抗体関連型拒絶反応を引き起こす危険性の高いレシピエントを除外できない可能性があり、早急な対策が望まれる。2011年のレシピエント選択基準の改正における付帯事項として、「新ルール実施後1年を目途に運用状況について検討し、PRA 検査についても適宜検討し、必要があれば基準の見直しを行う」と記載されている。海外の移植システムで常識となっている登録患者全員に対する PRA 検査、およびドナー発生時の高感度クロスマッチ検査を、わが国の献腎移植システムに導入する是非について早急に検討すべきである。さらに、海外ではこのような HLA 抗体陽性(高 PRA)患者はクロスマッチ陽性となり、移植を受けられないまま待機期間が長くなる傾向にあり、適合ドナー出現時には優先的に配分されるルールが確立されている。このとき、事前に HLA 抗体特異性検査を実施し、ドナーとして禁忌である HLA 型を同定している(バーチャルクロスマッチ)ため、効率的な臓器配分が行われている。ハイリスク患者の除外から、救済という考えである。

わが国の組織適合性検査の課題として、移植の適否、レシピエント選択、治療方法の決定に不可欠であるクロスマッチ検査の精度管理が十分に行われているか、総合的な評価が必要なのは言うまでもない。全国レベルでの QC (quality control) 調査が望ましいが、わが国では欧米ほど充実していない。アメリカでは、病院の検査データに大きな施設間差があることが判明したため、1988年に臨床検査室改善法(Clinical Laboratory Improvement Amendments: CLIA)が制定され、検査手技マニュアル、精度管理が徹底された。すべての臨床検査室は CLIA certificate を取得しなければならないため、毎年 Proficiency Test(検定試験)を受

けるのが一般的である。組織適合性検査に関して CAP (College of American Pathologists), AFDT (American Foundation for Donation & Transplantation), ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: アメリカ組織適合性学会) などの非営利団体が検定試験を年 2~4 回実施している。ドイツを中心として組織されている Euro-Transplant においても検定試験が義務づけられており、年 4 回の HLA タイピング、クロスマッチ、年 2 回の抗体スクリーニングが含まれる。

わが国では、日本組織適合性学会が年 1 回 HLA-QC ワークショップを実施している。HLA-DNA タイピングと抗体検査である (<http://jshi.umin.ac.jp/qcws/index.html>)。今まで全血を用いたクロスマッチ QC が行われていなかったもので、2013 年から日本移植学会主導(日本組織適合性学会との共同)により実施が予定されている。ようやくクロスマッチ検査の全国 QC による精度管理を実施できるようになるが、QC への参加施設の割合が低いという問題もあり、両学会による認定制度の充実と厚生労働省の承認が望まれる。

おわりに

最近の医療の進歩により、末期腎不全患者に対する透析医療は格段に改善されたが、腎移植医療も飛躍的に向上した。死体からの提供が少ないわが国では、生体移植に頼らなければならず、腎移植のチャンスは少ない。しかし患者の QOL, 医療経済を考慮すれば、腎移植は第一に選択されるべき治療法と考えられる。腎臓内科医の皆さんには、治療選択肢の一つとして移植医療に積極的にかかわっていただきたい。移植先進国である欧米では、移植外科医主導型から移植内科医主導型となっている。成熟した移植チームには内科医の力が必要である。もちろん、医師、看護師以外にコーディネーター、MSW、薬剤師、検査技師、栄養士など総合的なチーム力が不可欠である。そのなかで、リーダーシップをとることができるのは、患者を移植前から知り、移植後も長期にわたりかかわることができる腎臓内科医である。移植内科医としての活躍が期待されている。

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

文献

1. Scornik JC, Meier-Kriesche HU. Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implica-

- tions for prevention. *Am J Transplant* 2011; 11: 1785-1791.
2. Bray RA, Tarsitani C, Gebel HM, Lee JH. Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection. *Methods Cell Biol* 2011; 103: 285-310.
3. 組織適合性検査プロトコル集(標準方法)(案). 日本移植学会ホームページ. <http://www.asas.or.jp/jst/news_top.html>
4. 日本組織適合性学会ホームページ<<http://jshi.umin.ac.jp/index.html>>
5. HLA nomenclature. HLA Informatics Group. <<http://hla.alleles.org/>>
6. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735-739.
7. 臓器移植ファクトブック 2011. <<http://www.asas.or.jp/jst/pdf/factbook/factbook2011.pdf>>
8. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: From association to causation. *Transplantation* 2008; 86: 377-383.
9. Segev D, Wang JG, Gloor J, Stegall M, Kapur S, Dunn T, Pelletier R, Singh P, Posner M, Shapiro R, El-Amm JM, Light J, Marsh C, Melancon JK, Lipkowitz G, Wellen J, Oberholzer J, Montgomery RA. Risks of HLA incompatible kidney transplants by antibody strength: initial results from a national study of 603 patients. *Am J Transplant* 2011; 11(Suppl s2): 136.
10. Higgins R, Lowe D, Hathaway M, Williams C, Lam FT, Kashi H, Tan LC, Imray C, Fletcher S, Chen K, Krishnan N, Hamer R, Daga S, Edey M, Zehnder D, Briggs D. Human leukocyte antigen antibody-incompatible renal transplantation: excellent medium-term outcomes with negative cytotoxic crossmatch. *Transplantation* 2011; 92: 900-906.
11. Mulley WR, Kanellis J. Understanding crossmatch testing in organ transplantation: A case-based guide for the general nephrologist. *Nephrology* 2011; 16: 125-133.
12. Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FH, Reed EF, Bray RA, Campbell P, Chapman JR, Coates PT, Colvin RB, Cozzi E, Doxiadis II, Fuggle SV, Gill J, Glotz D, Lachmann N, Mohanakumar T, Suci-Foca N, Sumitran-Holgersson S, Tanabe K, Taylor CJ, Tyan DB, Webster A, Zeevi A, Opelz G. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 19-47.
13. Archdeacon P, Chan M, Neuland C, Velidedeoglu E, Meyer J, Tracy L, Cavaille-Coll M, Bala S, Hernandez A, Albrecht R. Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* 2011; 11: 896-906.
14. Schwartz A, Gaigalas AK, Wang L, Marti GE, Vogt RF, Fernandez-Repollet E. Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity. *Cytometry B Clin Cytometry* 2004; 57: 1-6.

15. Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, Leffell MS. Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies : characteristics and resolution. *Hum Immunol* 2009 ; 70 : 496-501.
16. Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, Schmid-Horch B, Ender A, Wernet D. HLA antibody specification using single-antigen beads--a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011 ; 92 : 510-515.
17. Lobashevsky A, Rosner K, Goggins W, Higgins N. Subtypes of immunoglobulin (Ig)-G antibodies against donor class II HLA and cross-match results in three kidney transplant candidates. *Transpl Immunol* 2010 ; 23 : 81-85.
18. Yabu JM, Higgins JP, Chen G, Sequeira F, Busque S, Tyan DB. C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation* 2011 ; 91 : 342-347.
19. Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, Saji H, Kohara S, Katayama A, Takeda A, Watarai Y, Uchida K. Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation. *Hum Immunol* 2011 ; 72 : 11-17.
20. DeVos JM, Gaber AO, Knight RJ, Land GA, Suki WN, Gaber LW, Patel SJ. Donor-specific HLA-DQ antibodies may contribute to poor graft outcome after renal transplantation. *Kidney Int* 2012 ; 82 : 598-604.
21. Bentall A, Cornell LD, Gloor JM, Park WD, Gandhi MJ, Winters JL, Chedid MF, Dean PG, Stegall MD. Five-year outcomes in living donor kidney transplants with a positive crossmatch. *Am J Transplant* 2013 ; 13 : 76-85.
22. Dehoux JP, Gianello P. Accommodation and antibodies. *Transpl Immunol* 2009 ; 21 : 106-110.
23. Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, Yazaki S, Iwamoto M, Furusawa T, Onishi A, Kuzuya T, Haneda M, Watarai Y, Uchida K, Kobayashi T. Comparative study on signal transduction in endothelial cells after anti-a/b and human leukocyte antigen antibody reaction : implication of accommodation. *Transplantation* 2012 ; 93 : 390-397.
24. Zhang Q, Reed EF. Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol* 2010 ; 22 : 682-688.
25. Breimer ME, Rydberg L, Jackson AM, Lucas DP, Zachary AA, Melancon JK, Von Visger J, Pelletier R, Saidman SL, Williams WW Jr, Holgersson J, Tydén G, Klintmalm GK, Coultrup S, Sumitran-Holgersson S, Grufman P. Multicenter evaluation of a novel endothelial cell crossmatch test in kidney transplantation. *Transplantation* 2009 ; 87 : 549-556.
26. Canet E, Devallière J, Gérard N, Karam G, Giral M, Charreau B, Coupel S. Profiling posttransplant circulating antibodies in kidney transplantation using donor endothelial cells. *Transplantation* 2012 ; 93 : 257-264.
27. Gill JS, Landsberg D, Johnston O, Shapiro RJ, Magil AB, Wu V, Tinckam K, Keown P. Screening for *de novo* anti-human leukocyte antigen antibodies in nonsensitized kidney transplant recipients does not predict acute rejection. *Transplantation* 2010 ; 89 : 178-184.