

● 総 説 ●

[シリーズ：各臓器移植についての拒絶反応の解説・移植
の新しい治療法の紹介]

第 4 回

移植における液性免疫制御の重要性と HLA 血清学
—直接クロスマッチから HLA タイプ & スクリーンへ—

佐治 博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所,

はじめに：HLA の発見とその後の進展は血清学に負うところが大きい。抗血清とデータの交換と国際ワークショップによるデータ解析により、HLA の全容が明らかにされた歴史がある。そのころの HLA 血清学は HLA 抗原決定が主目的であり、そのために抗体（抗血清）の収集と特異性の解析が行われた。HLA が遺伝子タイピングで行われるようになると、わが国の HLA 血清学は衰退の危機に瀕した。臓器移植の直接クロスマッチなどに継承されたが、移植の症例数は諸外国の 10～100 分の一であり、まさに細々と受け継がれた感がある。当時の造血幹細胞移植は HLA 一致が前提であったため、血清学的クロスマッチは行われなかった。抗血清収集で得られた HLA 血清学の経験値（HLA アロ抗体の特性）は貴重で、それを次世代へ伝える努力がいま求められている。

近年になって HLA 血清学のルネッサンスがはじまった。Terasaki¹⁾によって臓器移植の超急性拒絶から急性拒絶と慢性拒絶に至るすべてに HLA 抗体が関わることが明らかされた。それがきっかけで HLA 血清学の重要性が浮上した。HLA 液性免疫の制御が重視されるようになり、HLA 抗体の検出が臨床に欠くべからざる手段となったのである。加えて造血幹細胞移植の領域で、臍帯血バンクからの HLA ミスマッチ移植や、血縁間ハプロ半合致移植などが行われるようになり、この領域でもクロスマッチが必要になった。輸血の領域では血小板輸血不応や非溶血性副作用への対応に HLA 血清学が必要である。さらに HLA 抗体検出法の技術的な革新が HLA 血清学の再興に寄与した。

直接クロスマッチは技術的問題や標準化の問題はさておいても、ドナーリンパ球の確保と搬送というロジスティック（兵站学）問題がその実施の障害となっている。HLA 抗体検出法はすでに第 4 世代法に突入していて、ロジスティックな問題解決が可能になったのでそれを提案したい。「HLA タイプ & スクリーン (HLA T & S)」またはバーチャル・クロスマッチである。

キーワード：HLA 抗体，移植後モニタリング，抗体減弱法

代表者連絡先 〒606-8396 京都市左京区川端通丸太町下下提
町 82 恵美須ビル 3-4F 特定非営利活動法人 HLA 研究所
佐治 博夫

電 話 075-762-5201
F A X 075-762-5202
E-mail saji@hla.or.jp

1. 検査法

1. HLA 抗体検出法

1-1. 第1世代

Terasaki の「リンパ球細胞障害試験 (LCT)」と「抗ヒトグロブリン付加リンパ球細胞障害試験 (AHG-LCT)」はいまでも Golden Standard とされている。生きたリンパ球が必要で、その入手と準備に手間とコストがかかり、高い技術力 (経験) が必要とされる。

1-2. 第2世代

「ELISA 法」である。マイクロプレートまたはテラサキトレーに固相化した抽出 HLA 抗原に、検体血清を反応させ、洗浄後に結合した HLA 抗体を酵素標識抗-ヒトグロブリンで検出するものである。ドナーの HLA 抗原を用いるべき直接クロスマッチには適さないで普及しなかった。

1-3. 第3世代

「フローサイトメトリー (FCM) 法」は臓器移植領域では直接クロスマッチの標準法になっている。感度が高いこと、臨床成績との相関が高いことから多くの国で採用されている。また、FCM に適したビーズに HLA 抗原を固相化した試薬も市販されている (FlowPRA Screening, FlowPRA Single Antigen, OneLambda 社)。機器の設定や判定にコツが要り、客観的判定が意外に難しい。

1-4. 第4世代

「ルミネックス法」は Luminex[®] beads (ルミネックス・ビーズ) をプラットフォームとする方法である。100 色の蛍光色調を認識するビーズ上に精製 HLA 抗原 (クラス I またはクラス II) が固相化してある。このビーズ群に検体血清を反応させ、洗浄後 PE 標識抗-ヒトグロブリンで蛍光標識して、フロー系 (LAB-Scan 100[®]) に流し、ビーズの 100 色を片方のレーザーで識別し、PE 蛍光をもう片方のレーザーで検出測定する。HLA 抗原ごとに PE 蛍光値 (IFI) が得られるので適切なカット・オフ値を設定して判定する。

HLA 抗体スクリーニング用キットが 2 社から市販されている (LABScreenPRA[®], OneLambda 社。WAKFlow[®], 湧永製薬)。培養細胞から免疫化学的に HLA クラス I またはクラス II 抗体を抽出精製して、ルミネックス・ビーズに固相化したものである。直接クロスマッチ法として藤原らにより immunocom-

plex capture fluorescence analysis (ICFA) 法が提案され²⁾ キットが市販されている (WAKFlow[®] HLA 抗体クラス I & II (ICFA), 湧永製薬)。生きたリンパ球が必要であるが、精製 HLA 抗原の問題点 (後述) をカバーする方法として注目される。

HLA 抗体の特異性同定には Single Antigen Beads 法が開発されている。遺伝子工学的手法で、単一の HLA 抗原のみを発現する培養細胞を作成し、有意の頻度である HLA 抗原をライン・アップする。培養細胞を溶解し、アフィニティー・クロマトグラフィーなどの手法で、単一の HLA 抗原を抽出・精製する (リコンビナント・HLA 抗原)。ルミネックス・ビーズへ固相化して、一つの蛍光スペクトラムをもつビーズ毎に、固相化する HLA 抗原を選択する。100 種の蛍光スペクトラムのビーズが用意できる。いまは OneLambda 社の独占的市場である (LAB-Screen Single Antigen[®])。

2. 精製 HLA 抗原固相化法の留意点

精製された HLA 抗原は、細胞上にある膜貫通蛋白としての HLA 抗原と異なる抗原性 (エピトープ) をもっている。HLA Class I 分子は HLA 長鎖と $\beta 2$ ミクログロブリンのヘテロ・ダイマーで、抗原ペプチドが載っている。Class II 分子は HLA α 鎖と β 鎖のヘテロ・ダイマーである。そうした HLA 完全分子以外の長鎖蛋白や、 α 鎖または β 鎖分子も抗原として固相化されている。HLA 完全分子とは異なるエピトープが固相化されていることになる。

2-1. 「HLA 自然抗体」非 HLA 抗体

発見者 (Nadim EL-Awa) が「HLA Natural Antibody」と記載したので日本語訳の「HLA 自然抗体」が慣用語になっている。正確には非 HLA 非 allo 抗体と呼ぶべきものである。精製 HLA 抗原が固相化されたルミネックス法は非常に高感度を与えるゆえに、HLA 以外のウイルスや食物に対する抗体との交差反応をも検出する。以下は主として経験値から述べる。

2-1-1. 低力価の非 HLA 抗体

Single Antigen Beads 法では非常に高頻度 (70%) で、低力価の非 HLA 抗体が検出される。通常は蛍光値にして、1,000~2,500 程度であり、臨床的意義はほとんどない。細胞膜上の HLA 抗原との反応性につ

表 1 「HLA 自然抗体」の特異性 (%=検出割合)

A locus			B locus			C locus			DR locus		DQ locus		DP locus	
spec	%		spec	%		spec	%		spec	%	spec	%	spec	%
	MEX	JPN		MEX	JPN		MEX	JPN		MEX		MEX		MEX
A*1102	4.4	10.6	B*8201	10.6	15.9	Cw*1701	10.4	24.2	DRB1*0404	5.1	DQA1*0503,DQB1*0301	10.6	DPA1*0201,DPB1*0101	20.6
A*8001	8.6	8.3	B*4501	5.8	9.8	Cw*0403	NT	14.4	DRB1*1202	1.9	DQA1*0601,DQB1*0301	10.2	DPA1*0201,DPB1*2301	2.8
A*0101	5.6	7.6	B*1402	0.9	9.8	Cw*0702	1.2	8.3	DRB1*1601	1.9	DQA1*0303,DQB1*0301	9.3	DPA1*0401,DPB1*1301	2.3
A*6602	6.7	6.8	B*1512	10.6	8.3	Cw*0202	4.9	6.8	DRB5*0101	1.9	DQA1*0505,DQB1*0301	8.3	DPA1*0201,DPB1*1801	2.1
A*2501	5.8	6.1	B*4402	6.3	6.8	Cw*0602	3.7	6.8	DRB1*0302	1.4	DQA1*0301,DQB1*0301	6.0	DPA1*0201,DPB1*0202	1.9
A*3601	2.1	5.3	B*1516	10.0	4.5	Cw*0102	3.7	5.3	DRB1*0403	1.2	DQA1*0501,DQB1*0201	3.5	DPA1*0103,DPB1*0401	1.6
A*3101	11.3	4.5	B*5801	2.5	4.5	Cw*1802	3.0	5.3	DRB1*1001	1.2	DQA1*0102,DQB1*0502	3.2	DPA1*0103,DPB1*0402	1.6
A*4301	6.0	4.5	B*8101	4.9	3.8	Cw*0303	3.9	3.8	DRB3*0202	0.9	DQA1*0102,DQB1*0609	2.8	DPA1*0201,DPB1*0901	1.2
A*6601	6.0	4.5	B*6701	3.5	3.8	Cw*0302	4.4	3.0	DRB1*1201	0.9	DQA1*0301,DQB1*0302	2.8	DPA1*0103,DPB1*0201	0.9
A*3401	6.9	3.8	B*0702	3.5	3.8	Cw*0501	3.9	3.0	DRB4*0103	0.9	DQA1*0101,DQB1*0501	2.5	DPA1*0201,DPB1*1401	0.9
A*0203	4.4	3.8	B*3701	7.4	3.0	Cw*1402	2.8	3.0	DRB1*1502	0.7	DQA1*0401,DQB1*0402	2.3	DPA1*0201,DPB1*1901	0.9
A*2601	3.7	3.8	B*5601	3.9	3.0	Cw*0304	1.4	3.0	DRB1*0301	0.7	DQA1*0302,DQB1*0303	2.3	DPA1*0201,DQB1*1501	0.9
A*2902	2.8	3.8	B*5703	3.0	3.0	Cw*1502	3.5	1.5	DRB1*0401	0.7	DQA1*0103,DQB1*0603	2.1	DPA1*0201,DPB1*0501	0.7
A*2403	3.5	3.0	B*0801	4.2	2.3	Cw*1203	2.5	0.8	DRB1*1501	0.7	DQA1*0201,DQB1*0303	1.9	DPA1*0201,DPB1*1101	0.7
A*2301	2.5	3.0	B*4403	2.3	2.3	Cw*0801	2.1	0.8	DRB3*0101	0.7	DQA1*0301,DQB1*0304	1.9	DPA1*0201,DPB1*1701	0.7
A*3402	2.3	3.0	B*5701	2.1	2.3	Cw*1601	1.4	0.8	DRB1*0901	0.5	DQA1*0303,DQB1*0401	1.6	DPA1*0103,DPB1*0301	0.2
A*2901	2.1	3.0	B*5001	1.2	2.3				DRB5*0202	0.5	DQA1*0201,DQB1*0402	1.2	DPA1*0201,DPB1*1001	0.2
A*6901	0.9	3.0	B*4001	0.7	2.3				DRB1*0101	0.5	DQA1*0103,DQB1*0601	1.2		
A*3002	18.3	2.3	B*1401	0.0	2.3				DRB1*0801	0.5	DQA1*0102,DQB1*0602	0.5		
その他			その他						その他					
A*2402	A*3303		B*5401	B*4601					DRB1*1602		DQA1*0102,DQB1*0604			
A*0201	A*7401		B*4201	B*5501		Normal males			DRB1*0102		DQA1*0201,DQB1*0401			
A*1101	A*3201		B*4801	B*4101		JPN=Japanese # =132			DRB1*0402		DQA1*0301,DQB1*0201			
A*3301	A*6801		B*2705	B*5901		MXN=Mexican # =424			DRB1*0405		DQA1*0101,DQB1*0602			

いては不明である。健常男性の血清中に「HLA 自然抗体」として高頻度に検出される HLA 特異性を表 1 に示す。

2-1-2. 中～高力価の HLA 自然抗体

古典的な LCT 法でも健常男性血清中に HLA 自然抗体が検出されていた。有名なものに抗-B8, 抗-A11.2 (A*1102) や抗-B37 などがある。日本人男性に検出される抗-B8 は免疫原が HLA-B8 抗原とは考えられないので、自然抗体とされている。抗-A11.2 は多くが IgM 抗体で、IgG 抗体が共存する。抗-B37 を含め非常に狭い特異性を示す。臨床的意義は不明であるが、日本列島人からドナーを得る場合はほとんど問題にならない(クロスマッチが不適合になることはあまりない)。

2-1-3. 精製抗原特異的に反応する抗体

古典的な LCT 法や細胞膜上の HLA 分子を抗原とする方法 (LIFT, ICFA) では検出されないが、精製 HLA 抗原とのみ反応する抗体である。有名なものに抗-B45 (B44, ときに B49, B50 や B59 または B37 と交差反応する), 抗-B76 (B*1512) (ときに B46 と交差反応) などが知られている。しばしば高力価 (IFI 5,000~20,000) を呈する。免疫化学的手法のみで精製された抗原 (PRA 法) には反応しにくい、遺伝子工学的に精製された抗原 (Single Antigen Beads 法) では強く反応する傾向がある。おそらく、不完全 HLA 抗原; HLA 長鎖抗原などへの反応と考えられ

る。臨床的意義はないが、検査結果の判断に影響するので無視できない。

3. Single Antigen Beads 法の留意点

前述のとおり、高感度であるがゆえに検出される「いわゆる HLA 自然抗体」が高頻度に検出され、遺伝子工学で得られた精製抗原独特のエピトープへ反応する抗体がある。よってそれらを臨床的に有意な HLA アロ抗体と区別することが大事になる。それ以外に次の 2 点を留意したい。

3-1. プロゾーン現象: 血清不活化の必要性

抗原抗体反応 (血清学) の宿命である。古典的には抗原過剰域で抗体力価が低下または偽陰性になることを意味するが、抗体過剰域での現象を含めてプロゾーンと呼んでいる。ルミネックス法では極微量の精製抗原によって抗体を検出するので、抗体過剰域でプロゾーンが起こることを予想していた。最近になっていくつかの例が発見された (未発表および学会発表のみ)。意外にも補体が関与するプロゾーン現象であった。すなわち、EDTA 血漿を検体とすると IFI 値が 20,000 を超える高力価抗体であるのに、血清化すると IFI 値が 5,000 以下に下がるという現象である。もう一度 EDTA を加えて Ca^{++} をキレートしたり、加熱して不活化すると、IFI 値が復活する。補体 C1q (巨大分子) による抗体グロブリンの結合障害が推察される。

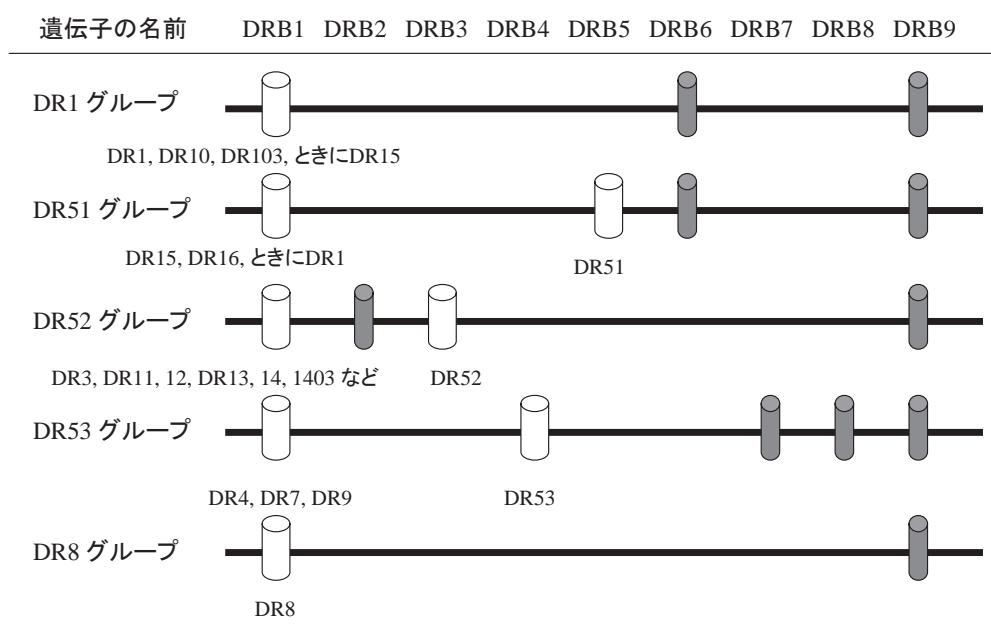


図1 HLA-DRB 領域の構造

DR1 グループやDR8 グループは発現遺伝子としてDRB1のみをもつが、DR51, 52, 53, グループは発現遺伝子として、それぞれDRB5, DRB3, DRB4をもっている。偽遺伝子の種類と数もグループによって異なっている。● 発現遺伝子 ■ 偽遺伝子

血清を検体とするときは56°C 30分加熱して不活化する前処置が必要であり、EDTA血漿を用いる方が無難といえる。とくに臨床症例の抗体価の推移を見るときは注意を要する。

3-2. 連鎖の考慮とくにHLAクラスII抗体特異性の判断

他のドナー抗原や免疫化学的に得られたPRA抗原と異なり、遺伝子工学により人工的に得られた単一HLA抗原であることを念頭に置く。すなわち、遺伝子が近接して連鎖する抗原が、別々に精製されてビーズに固相化されているので「連鎖」の概念なしに結果を判断してはならない。最も留意しなければならないのは、HLA Class IIのパネルである。とくにDR抗原(DRB1産物)とDR51(DRB5産物)、DR52(DRB3産物)、DR53(DRB4産物)の関係性である。これらはDRB領域に近接して存在し、非常に強い連鎖不平衡が成立している。培養パネル細胞からHLAクラスII分子を抽出精製すると、連鎖するDR抗原がすべて抽出される。これらを固相化した「抗体スクリーニング」用のビーズには「連鎖する抗原」の全てが含まれる。これに対してSingle Antigen Beads

は単一の抗原が固相化されている。例えば、DR15(DRB1*1502)と連鎖するDR51(DRB5*0102)は、抗体スクリーニング用のビーズでは同じビーズに固相化されるが、Single Antigen Beadsでは、DR15ビーズとDR51ビーズが別々に作成されている。ドナー候補の有するミスマッチ抗原がDR15であるときは、レシピエントに抗-DR15が検出されないことを確認すると同時に、抗-DR51の存在をも否定しなければ、バーチャル・クロスマッチ適合とはいえない。逆にいえば、抗-DR51が検出されるときは、連鎖するDR15, DR16も(抗-DR15, -DR16が検出されなくても)バーチャル・クロスマッチ(次項)不適合とみなす必要がある。DRB領域の遺伝子構造を図1に示す。

臨床的にはHLA-A, B, DR座しかタイプされていないドナーが多い。レシピエントに抗-HLA-Cがあるとき、HLA-C座の連鎖を予測してドナー特異的HLA抗体(DSA(donor specific antibody))を推測することが求められる。同様に抗-DQや抗-DPが検出されたときは、DR座との連鎖でDQ座を推測してDSAかどうかを判断したり、ときにはDPB1タ

表2 移植 Graft や輸血血球における HLA 分子の座位別抗原の表現

Graft	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP	文献
腎・末梢血管内皮	+	+	+	+	0	+	Muczynski etal (2003)(3) (2001)(4)
造血幹細胞	+	+	?	+	0	+	Ottmann etal(1988) (5) Piacibello etal (1987) (6)
血液腫瘍細胞	+	+	+~0	+	+	+	Aglietta etal (1986) (8) Falkenburg etal (1986) (9)
血小板	+	+	+	0	0	0	省略
顆粒球	+	+	?	+	?	?	
T細胞	+	+	+	0	0	0	
活性T細胞	+	+	+	+	?	+	
B細胞	+	+	+	+	+	+	
単球	+	+	+	+	0	+	

イピングが必要になる。

II. 移植臨床

HLA 抗体の臨床的意義を知るには、その標的となる HLA 抗原が移植臓器・組織・細胞に存在するかどうかが第一義的問題である。HLA 座位別の抗原の有無を表2に示す。ついで抗体の力価(カットオフ値)が議論になる。HLA 抗体の存否を決めるカットオフ値と、臨床的意義を決めるカットオフ値は乖離してよい。

1. 臓器移植

クロスマッチの高感度への転換と、移植後の高感度 HLA 抗体モニタリングの実施が肝要である。

1-1. 移植後 HLA 抗体モニタリングの重要性

アメリカにおける 1960 年代から 70 年前半、献腎移植後 1 年生着率は 40% に過ぎなかったが¹⁰⁾、いまや 90% を超えるようになった。免疫抑制剤の進歩のほかに、HLA 抗体の検出や直接クロスマッチ技術の改善によって、超急性拒絶や急性拒絶(100 日まで)を防ぐことができるようになったことが要因である。しかしながら、生着腎の half-life は、1966-1975 年で 7.5 年¹⁰⁾、1987-1995 年で 7.5 年¹¹⁾と変化なく、1996-2006 年でも 8.1 年¹¹⁾と大きな改善は見られない。すなわち、HLA 抗体検出技術の進歩は、長期生着にはほとんど貢献していないといえる。細胞性免疫抑制剤(cyclosporine, tacrolimus (FK-506), sirolimus, mycophenolate mofetil (MMF) その他)の使

用も長期生着に関する限り有意の相関は得られていない。さらに Bortezomib 投与による Clonal deletion プロトコールによる腎生着が、免疫抑制剤なしで得られているので(後述)、移植免疫において液性免疫が細胞性免疫を凌駕する主役であるとするコンセプトは確かなものになりつつある。

肝臓を含め(Ashihara ら)¹²⁾多くの移植臓器の慢性拒絶の原因が、移植後に産生される HLA 抗体であることは、膨大なデータによって証明された¹³⁾。つまり、長期生着率を高め、臓器の half-life を延長させるには、原因である HLA 抗体をモニタリングし、液性免疫を制御することが求められる。移植後 1 年以内に de novo の DSA が検出されると、拒絶が早く起こり、それ以後に検出されるときは、拒絶が遅延する。移植後 1 年以内は 3 ヶ月ごと(3, 6, 9, 12 ヶ月の 4 回)、以後、6 ヶ月~1 年ごとの HLA 抗体モニタリングが推奨される。モニタリングは HLA クラス I とクラス II 抗体スクリーニングで行う。HLA 抗体が検出されたときは、特異性を同定し、DSA かどうかを判断し抗体価の推移を見る。心臓移植ではクラス I 抗体が重視されるように、臓器によって異なる戦略があっても良い。移植後の DSA はグラフトによって、吸収されるので血清中には極わずかしか残らない。高感度な抗体スクリーニング法が必要である。IgG サブクラスのうち、IgG3 抗体が重要であるという知見が出始めている(Terasaki 私信)。

DSA が検出されたときは HLA 抗体の除去または産生を制御することが求められる。その方法につい

ては、III章で詳述する。

臨床的意義のある抗体力価については、臓器の種類、移植前か移植後かによって異なるカットオフ値が設定されるべきで、現在は議論中である。

1-2. HLA抗体保有者へのロジスティックス(兵站学)

臓器移植の待機者リストは増加の一途をたどっている。とくにHLA抗体保有者への、臓器ロジスティック問題(後述)は国際的に議論が多い。待機者のHLA抗体の有無、そのHLA抗体の特異性がわかっているならば、HLAタイプ&スクリーン(後述)など打つ手はありそうである。HLA抗体を保有する待機者の抗体同定検査を定期的に行うことを提案する。費用が問題になるが、希望者へのオプション検査(有料)であれば実施可能と考える。

2. 造血幹細胞移植

免疫系がドナー細胞によって再構築されるので、臓器移植とは異なる視点が求められる。造血幹細胞移植はもともとHLA一致のドナーからの移植が主流であり、HLA抗体の影響はほとんどなかった。かねてより血縁間HaploidenticalでHLA1座ミスマッチ移植は標準選択とされ、その後、臍帯血バンクの成立によって非血縁間臍帯血ミスマッチ移植が普及し、さらにケモリフラクトリー患者へのハプロ半合致(HLA2座以上ミスマッチ)の適用がコンセンサスを得るなど、HLAミスマッチ造血幹細胞移植が日常的に行われるようになった。

2-1. 臍帯血・HLAミスマッチ移植

当初は慣習からクロスマッチは行われず、「HLAミスマッチ移植は、とくに臍帯血移植は拒絶率が高い」ことがクローズアップされた。その中にはHLA抗体による拒絶が含まれていることは容易に推測されたが、ときまさにEBMかまびすしい時期であり、データの蓄積が要望されるままに過ぎた時期でもあった。それに先立ち、東京大学医科学研究所の臍帯血移植グループは、HLA抗体保有者への臍帯血移植を自粛する方針を出した。東京都赤十字血液センター臍帯血バンクの高梨や、兵庫臍帯血バンクの荒木らは臍帯血移植におけるHLA抗体の関与についてデータを収集し始め、ようやく2008年Takanashiら¹⁴⁾は、臍帯血移植における拒絶の主因はHLA抗体で

あり、DSAがあるときは、50%の確率で拒絶が起こることを明らかにした。その後、同じCohortで藤原ら¹⁵⁾はICSF法でDSAを検出する(4/8)とき、全例(4例)に拒絶が起こることを報告した。

一方でハプロ半合致移植におけるHLA抗体の影響については兵庫医科大学でデータが蓄積され、Yoshiharaらは移植前にDSAがあるとき、25~40%に生着不全が招来されることを明らかにした(投稿中)。2010年にはNMDP(全米骨髄バンク)のデータが明らかにされ、DSAがあるとき、拒絶のOdds ratioは22倍になんなんとすると報告された¹⁶⁾。われわれは多施設共同研究により、DSA陽性のハプロ半合致移植20例を解析し、DSAがClass I抗体であるとき25%、Class II抗体であるとき18%に拒絶を認めた。またIFIが3,800を超えるDSAは拒絶率50%、それ以下では拒絶を認めなかった。興味あることにClass II抗体のみが検出された4例にIFIの高値を含め拒絶はなかった(自家データ・学会発表のみ)。臨床的なカットオフ値を3,500にすべきかもしれない。

移植前に直接クロスマッチやHLAタイプ&スクリーン(後述)が陽性(不適合)になり、そのドナーを選択せざるを得ないときは、移植直前に血小板(ドナー候補の血小板が最適)輸血によってHLA抗体を吸収し、残存または新たに分化する抗体産生細胞をBortezomibによって除去することが薦められる(後に詳述)。血漿交換のHLA抗体の除去効果は意外に得られない。

2-2. 移植後モニタリング

移植前にHLA抗体が検出されるレシピエントは、移植後のHLA抗体モニタリングが推奨される。早期に抗体が減弱・消失すれば予後は良好なことが多い。抗体が長期に持続するときは、免疫抑制剤の減量によるGVH効果を図ることが薦められる。抗体の持続はレシピエントの免疫細胞が(ひいては腫瘍細胞)が残存している証拠と考えられるからである。実際レシピエント由来抗体が持続する症例の予後は例外なく悪い(自家データ)。

2-3. HLA抗体陽性ドナー

ドナーがHLA抗体を持っているとき、移植後にドナー由来のHLA抗体が検出されることがある(自家データ4例と学会発表データ)。ドナーの形質細胞が

レシピエント内で抗体を産生した結果と推定される。血小板輸血不応からその現象が発見された例もある(万木ら, 学会発表)。以上のことから, 移植後にドナーの免疫担当細胞がHLA抗体を産生することは普通と考えてよい。HLAミスマッチや血縁間ハプロ半合致移植のときは, ドナー由来のHLA抗体が, レシピエントのミスマッチHLA抗原と反応するとき, GVH反応を起こす可能性を否定できない。HLA不適合移植後は, 臓器移植と同様にHLA抗体モニタリングが必要な時代が来るかもしれない。ドナー由来のHLA抗体がどの程度持続するか, 臨床への影響などは今のところ不明である。

3. 輸血臨床

血小板輸血と顆粒球輸血のみ述べる。白血球除去輸血が日常的に行われるようになって, HLA適合血小板輸血の適応は依然としてあるし, 顆粒球輸血が重症再生不良性疾患(SAA)や造血幹細胞移植後などの重症感染の救命に適用される。顆粒球機能に異常がある慢性肉芽腫性疾患(CGD)への適応もある。

3-1. HLA適合血小板輸血

受血者のHLA抗体をDSAとしない血小板ドナーを選択することになる。その際, Single Antigen Beads法を用いると, 速やかにドナーの選択が可能である。Single Antigen Beads法は高感度であるゆえに, どの程度のIFIをカットオフ値とすべきか議論のあるところである。暫定的であるが3,000~5,000をカットオフ値にすることが提唱されている(高ら, 私信)。通常は血液センターに保管されたドナーリンパ球と直接クロスマッチをして出庫されるが, リンパ球の保存にはロジスティックな問題が付きまとう。クロスマッチを繰り返すうちに凍結リンパ球を費消してしまうこともある。その際は後述する「HLA T & S」を採用することがよい。いずれその方向を目指すべきかも知れない。

3-2. 顆粒球輸血¹⁷⁾

HLA抗体を有する受血者への顆粒球輸血についてコンセンサスは得られていない。出血予防のための血小板輸血と異なり, 目的の多くが感染の治療であり, 血球数を維持することではないからである。32名のSAA患者に顆粒球輸血が行われた経験が報告さ

れている(2009)¹²⁾。多くはATGとCyAの投与を受けており, 1/4はHLA抗体を持っていた。半数は細菌, 残りは真菌感染で, 平均9(2-43)回の顆粒球輸血を受け, 生存率は58%であった。輸血後の顆粒球数は予後およびHLA抗体の有無で差はなかった。過去の多くの報告もHLA抗体の影響はないとするものが多いが, HLA適合をすすめるものもある¹⁹⁾。

CGDへの顆粒球輸血は正常顆粒球によるNADPH酸化酵素の補充であり, 活性酸素による殺菌効果を得るためである。よって輸血顆粒球のrecoveryは重要である。Heimら(2010)²⁰⁾によれば, CGDにおける輸血顆粒球のrecoveryはHLA抗体があるとき $19.7 \pm 17.4\%$ (n=15), ないとき $0.95 \pm 1.59\%$ (n=16)であり有意差(p<0.01)があった。HLA抗体の有無により呼吸困難などの輸血副作用頻度にも有意差があり, HLA抗体があつて, 効果のない顆粒球輸血は避けるべきとしている。顆粒球recoveryはNADPH酸化酵素のマーカーであるdihydrorhodamine 123を用いたサイトメトリーで測定している点がおもしろい。CGDへの顆粒球輸血は造血幹細胞移植後の重症感染にも奏功している²¹⁾。

4. クロスマッチからHLA T & Sへ

脳死ドナーからの臓器移植, 臍帯血バンクからの造血幹細胞移植, HLA適合血小板輸血などにおける直接クロスマッチには, ドナーリンパ球の入手が困難なことが多い。いわゆるドナーリンパ球のロジスティック問題がある。移植におけるロジスティクス(兵站学)は, もともと高度にアロ免疫を受け広範囲HLA抗体を保有する登録レシピエントへ, 献腎臓器などが提供できない状況に発した用語であり, 臍帯血移植や, 血小板輸血にも同様の問題がある。レシピエントは主治医・移植医の保護下にあり容易に検体を入手できるし, 必要な検体は血清または血漿であり保存や運搬も容易にできる。しかしながらドナーのリンパ球検体は, 血縁や家族を除き, 採取が困難なことが多いし, 運搬や保存に手間を要し, 時には入手が不可能なこともある(臍帯血移植など)。さらには脳死臓器移植ではドナーリンパ球がグラフトと同時に搬送され, 時間的制約が厳しいことも多い。移植施設のHLAラボは24時間体制をとるのが

世界の趨勢であり、専門スタッフの確保も課題であった（わが国では症例数の関係でそれほどの問題にはなっていない）。すなわち、直接クロスマッチ実施にはドナー検体の採取と、入手までの時空間的問題があり、これをドナーリンパ球のロジスティック（兵站学）問題とよび、移植領域の直接クロスマッチ実施に大きな障害となっている。つまるところ、入手しやすいレシピエントの血清だけでクロスマッチに代替できる方法論が待望されてきた。

輸血の分野では待機手術などのためのクロスマッチは、直接クロスマッチを省略して、「タイプ & スクリーン (T & S)」をするシステムが導入されて久

しい。レシピエントとドナーの ABO と Rho をタイプし、レシピエントの血清中の不規則抗体をスクリーニングしておく。不規則抗体が陰性のときはクロスマッチを省略できる。不規則抗体が陽性のときは抗体の特異性を同定して、その抗体が反応する抗原が陰性の血液を用意する。

この思想を移植の世界に導入しようというのが「HLA タイプ & スクリーン (T & S)」で、手順の概要は次のとおりである（図 2）。

- ① レシピエントとドナー候補の HLA をタイプして（または臍帯血バンクの HLA リストと照合して）、拒絶方向のミスマッチ抗原を同定する。

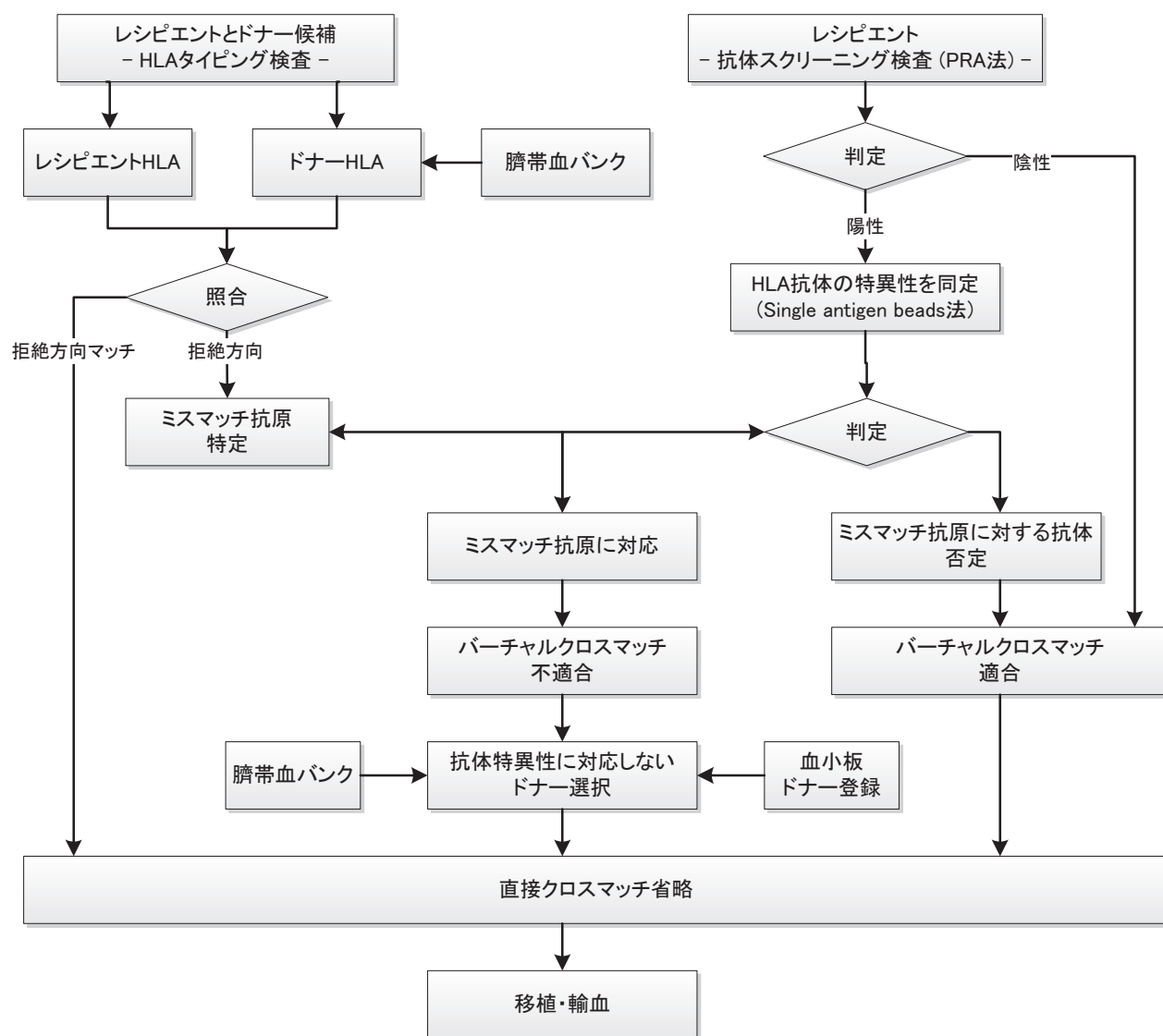


図 2 HLA タイプ & スクリーン (バーチャル・クロスマッチ)

- ② レシピエント血清中のHLA抗体スクリーニング検査を行う。
- ③ HLA抗体が陰性のときは、クロスマッチ適合と判断してこれを省略する。
- ④ HLA抗体が陽性の時は、その抗体の特異性をSingle Antigen Beads法で同定する。
- ⑤ 抗体の特異性を、同定された拒絶方向ミスマッチ抗原と比較対照する。または臍帯血バンクやHLA適合血小板ドナープールのHLAリストから適合者を検索する。
- ⑥ ドナー候補の有するミスマッチ抗原に反応する抗体が否定される時は、クロスマッチ適合と判断して直接クロスマッチを省略する。
- ⑦ 抗体の特異性がミスマッチ抗原に対応するときは、クロスマッチ不適合と判定する。
- ⑧ 抗体の特異性に対応しないミスマッチ抗原を持つドナーを選択する。

HLAタイプ&スクリーンは筆者の造語で、最近ではアメリカなどで「Virtual Crossmatch」と称して、一部の分野(屍体臓器と臍帯血移植など)に導入されつつある²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾。わが国でもハプロ半合致移植や臍帯血移植で一部採用され始めた。輸血分野で20年前に採用されたシステムが、移植の世界で採用できなかったのはテクノロジーのせいであり、HLA遺伝子タイピングとルミネックス法による抗体検査の迅速化と高精度・高感度が実現されて導入可能になった。

III. HLA液性免疫制御

Medawarが細胞性免疫を解明し定義して以来、移植免疫は細胞性免疫と同義であった。免疫抑制剤も細胞性免疫の制御を目的として開発された。Medawarの弟子であるTerasaki Ichiroは液性免疫の臨床的重要性に早くから注目し、精力的に臨床データを蓄積し、HLA抗体すなわち、HLA液性免疫が移植の成否、生着期間に第一義的に重要であることを明らかにした。HLA抗体検査の開発と革命にも関与してきたことは周知のことであり、彼こそがHLA血清学のルネッサンスをもたらしたとあってよい。

しかるに市販の免疫抑制剤では液性免疫の制御は困難である。免疫抑制剤のカクテル(FK506と

MMF)や、MMFの大量投与や²⁶⁾、Rituximab(リツキサン[®])によるB細胞から形質細胞への転換を抑制²⁷⁾、などが試みられている。物理的な抗体除去(血漿交換や抗体除去フィルター)が行われているが、一時的な臨床効果しか得られない。多発性骨髄腫の治療薬として市販されているBortezomib(ベルケード[®] ヤンセンファーマ、武田薬品)はプロテアソーム阻害剤であり、活性化された形質細胞や活性化T細胞など細胞周期の短い細胞に働いてアポトーシスを誘導することが知られている(Everyら)²⁸⁾。HLAアロ抗体の除去効果²⁹⁾³⁰⁾の他、マウスの実験でGVLを阻害せずGVHDを予防する効果があることも注目されている(2004)³¹⁾。Korethら(2009)³²⁾は23例の非血縁間HLAミスマッチ移植にGVHD予防剤として、Bortezomib, FK-506, Methotrexateを適用した。Bortezomib関連毒性はほとんどなく、II-IV急性GVHDを3例に認め、day 180における累積頻度は13%であった。慢性GVHDは9例に認め1年累積頻度は41%であった。非再発TRMはなく、再発率は29%、全・非再発・event free生存率はそれぞれ75%、64%、59%であった。慢性GVHD治療効果もありそうである³³⁾³⁴⁾。本章ではBortezomibを中心に述べる。

1. Bortezomibの作用機序と移植への応用

プロテアソーム阻害剤で、骨髄腫治療薬として販売されている。プロテアソームは細胞内の異常構造の蛋白質や、不要蛋白質を分解する酵素を有する細胞内構造で、細胞周期に重要な役割を担っている。細胞内にある不要な蛋白質はユビキチンで標識され、ユビキチン・蛋白質は、プロテアソームに運ばれ酵素分解される(ユビキチン・プロテアソーム経路)。骨髄腫細胞をはじめ腫瘍細胞は、細胞周期に関連したこのプロテアソームに何らかの異常があり、正常細胞よりもプロテアソーム阻害に対する感受性が高いと考えられている。腫瘍は正常細胞に比べて細胞増殖が非常に早い(細胞周期が短い)ので、蛋白質の合成も正常細胞より盛んに行われ、構造異常蛋白質が過量になる。プロテアソーム阻害により、この構造異常蛋白質が分解されないと、細胞機能は低下し、アポトーシスへと誘導される。

B細胞が活性化し、抗体産生細胞：形質細胞へ分化すると細胞周期が短く増殖速度が速くなるので、Bortezomibによってアポトーシスが誘導される。抗原刺激を与えてB細胞クローンを可及的に形質細胞へ分化させた後にBortezomibを投与すると、その抗原に対するB細胞クローンが激減し、Clonal deletionに近い状態を招来させることが可能である。同様の機序がT細胞においても起こりえるので、造血幹細胞移植におけるGVHD予防への適用が示唆される。動物実験ではあるが、GVL効果を阻害しないGVHD予防法として注目されている³¹⁾。ひとつにはBortezomib自身が抗腫瘍効果(腫瘍細胞のアポトーシス)を発揮するからであろう。

2. 抗体除去(減弱)法としてのBortezomib投与

移植前にHLA抗体を保有する症例のDSA除去(クロスマッチ陰性化の狙い)や、移植後HLA抗体モニタリングで、DSAが検出されたときは、抗体除去か減弱が求められる。

Bortezomibは1回1.3 mg/m², Day 1, 4, 8, 11に投与を1クールとし、10日間の休薬後に2クール目を開始することが推奨されている。中力価抗体の減弱には1クールで効果があるが、高力価抗体には2~3クールが必要とされている。HLA抗体(IgG)の半減期は、ほぼ1ヶ月ありBortezomibの投与のみでは即効性を期待できない。造血幹細胞移植のレシピエントの場合は、血小板輸血によるHLA抗体の吸収後にBortezomibを投与することが良いと考える。血小板はドナー候補の血小板が最適で、ランダム血小板でもよい。免疫刺激により活性化する形質細胞をBortezomibで制御すれば、DSA産生クローンの除去につながるかもしれない。臓器移植では血小板輸血の代わりに血漿交換でHLA抗体を減弱させることが推奨されている。

3. Bortezomib単独による腎移植

Terasakiら³⁵⁾(私信)はすでにBortezomib投与による「Clonal Deletion」プロトコルを開発し、血縁者間腎移植に適用し、無投薬(2例)かステロイド以外の免疫抑制剤を使用しない17症例に2年以上の生着、約100症例(うち2例は無投薬)に1年以上

の生着を得ている。ときにサイクロスポリンやMMFを要する症例もあるが、多くはステロイドのみで経過している。このインドにおける臨床治験の結果を得て、アメリカでもサンフランシスコとニューヨークで治験が始まるという(Terasaki私信)。今後の発展が期待される。

4. 形質細胞除去は抗ウイルスを抑制しない

EveryとTerasakiら(2010)³⁶⁾は、移植後にDSAが検出された13例の生体腎移植のレシピエントにBortezomibを式どおり投与し、HLA抗体をSingle Antigen Beads法で1週ごとにモニターし、同時に麻疹と破傷風抗体を定量した。全員に50%以上のDSA減量を認め、10/13例に完全なDSAの消失を見た。1年後も減量効果は持続していた。しかるに抗麻疹IgGと破傷風トキソイドは1年後も変化なく、効果域にとどまったと報告している。細胞質内のreticulumへの蛋白質の蓄積が多いときは(活性化形質細胞)、プロテアソーム阻害によって細胞のアポトーシスが起るが、蛋白質の蓄積が少ないとき(ウイルスワクチンで感作されたメモリーB細胞や形質細胞)ではアポトーシスが起らず生きつづけると仮説している。

IV. HLA抗原エピトープ

HLA抗体の最も特徴的な性質は「多様な交差反応」である。HLAはアレル間のgene conversion(遺伝子交換)様の変異で進化してきた。ただし、DPB1は例外的にpoint mutationが主たる進化要因である。よって、DP座以外のHLA抗原はアミノ酸配列を共有する抗原群があり、これがエピトープとなり得るものを「交差反応抗原群」cross reactive group(CREG)として分類してきた(図3)。それを詳細に解析し発展させたのがエピトープ解析である。初期にはHLAのアミノ酸配列から共通項を見出して、仮想エピトープとして交差反応を説明していた。われわれは免疫原となる抗原が特定できる妊婦血清を得て、Single Antigen Beads法を用いてエピトープ解析を行った。輸血歴のない妊婦にHLA抗体が検出される時、その免疫原はハプロ共有の児に存在する父由来HLA抗原(inherited paternal antigens)に限

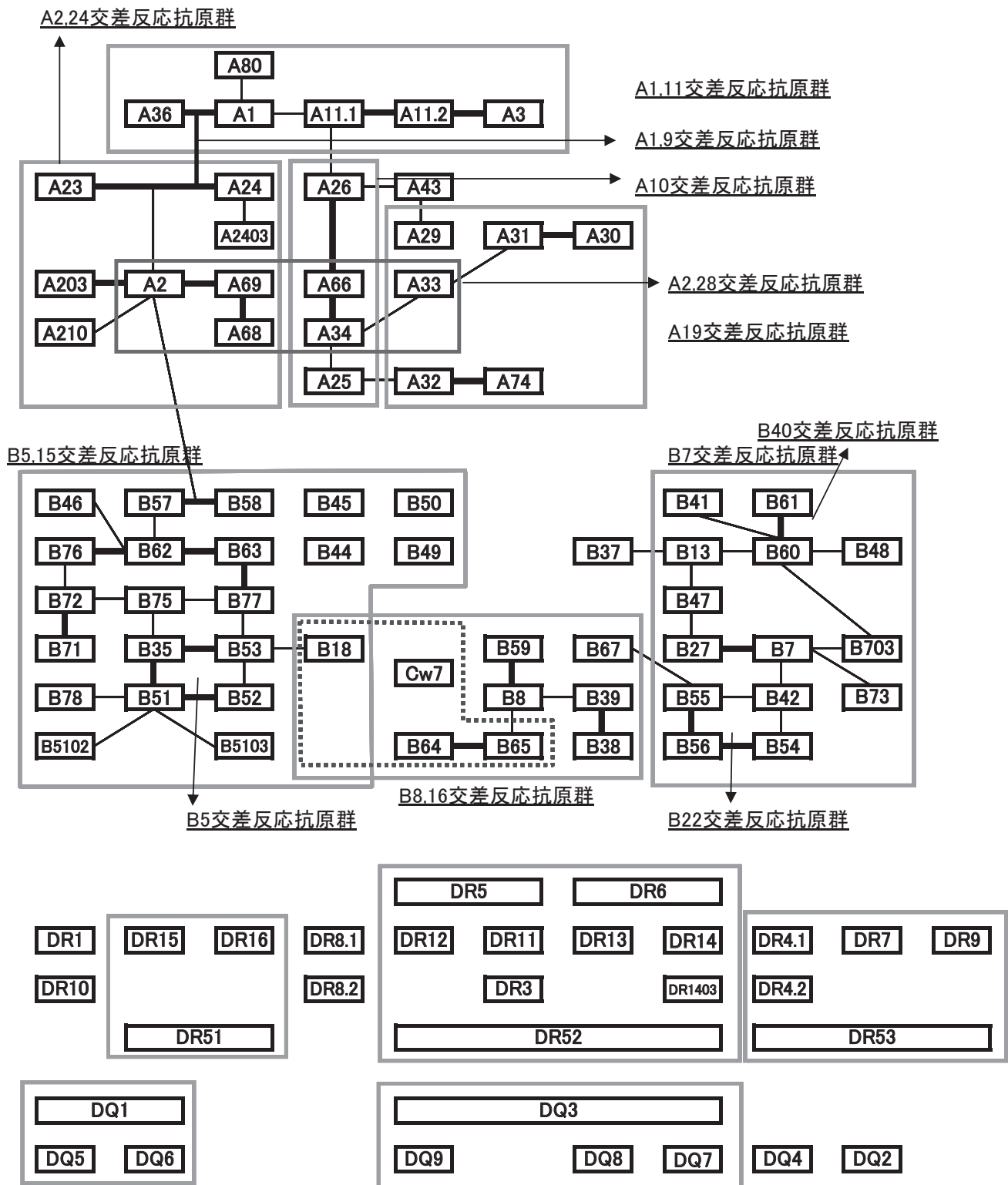


図3 交差反応抗原群の相関図, Cross Reactive Map

表3 HLAクラスI抗体が認識するエピトープ図4を参照

仮の 名称	アミノ酸の位置					アミノ酸	エピトープをもつHLA allele									
	1	2	3	4	5		6	7	8	+α						
I-0101	35	45	46			RMA	B*1301	B*1501	B*1502	B*1512	B*1513	B*1516	B*4601	B*5701	+1	
I-0201	41	46	65			AAQ	B*1501	B*1502	B*1512	B*1513	B*4601					
I-0301	43	62				QR	A*2501	A*2601	A*3301	A*3303	A*3401	A*6601	A*6602	A*6801	+2	
I-0302	43	69				PA	B*0702	B*1516	B*2705	B*2708	B*4201	B*5401	B*5501	B*5601	+7	
I-0303	43	69	76			PAE	B*0702	B*1516	B*2705	B*2708	B*4201	B*5401	B*5501	B*5601	+6	
I-0401	45	62	65	66	69	71	TRQITT	B*1801	B*3501	B*3701	B*5101	B*5102	B*5201	B*5301	B*7801	
I-0501	62	63				GE	A*0201	A*0203	A*0206	A*0207	B*5701	B*5703	B*5801			
I-0502	43	62	66	76	79		QGKVG	A*0201	A*0203	A*0206						
I-0601	65	66	69			QIA	B*0702	B*2705	B*2708	B*4201	B*5401	B*5501	B*5601	B*6701	+3	
I-0602	65	66	69	70		RKAH	A*0201	A*0203	A*0206							
I-0603	65	66	69	70		QIAQ	B*0702	B*4201	B*5401	B*5501	B*5502	B*5601	B*6701	B*8101	+1	
I-0604	65	66	70			GKH	A*2301	A*2402	A*2403							
I-0605	65	66	70			RNH	A*0101	A*2501	A*2601	A*3101	A*3201	A*3301	A*3303	A*3601	+3	
I-0606	65	69	70	73		QRQT	B*4601	C*0102	C*0202	C*0302	C*0303	C*0304	C*0501	C*0801	+3	
I-0607	66	69	70			KAH	A*0201	A*0203	A*0206	A*2301	A*2402	A*2403				
I-0608	65	69	80			QTI	B*1513	B*3801	B*4901	B*5101	B*5102	B*5201	B*5301	B*5901		
I-0701	67	163				FT	B*5901	B*0801								
I-0801	69	80	82	83		TNRG	B*0801	B*1401	B*1402	B*1501	B*1502	B*1503	B*1510	B*1512	+13	
I-0901	73	76	77			TEN	A*2301	A*2402	A*2403	B*1301	B*1513	B*1516	B*3801	B*4402	+10	
I-0902	73	76	77			TVS	B*4601	C*0102	C*0302	C*0303	C*0304	C*0801	C*1402	C*1601		
I-0903	73	76	77			TAN	A*0101	A*1101	A*1102	A*2501	A*2601	A*2901	A*2902	A*3401	+9	
I-0904	73	76	77			IVD	A*3101	A*3301	A*3303							
I-0905	76	77	80			ENI	A*2301	A*2402	A*2403	B*1513	B*1516	B*3801	B*4901	B*5101	+7	
I-0906	76	77	80			ANT	A*0101	A*2601	A*2901	A*2902	A*3601	A*4301	A*8001			
I-0907	79	80				RI	A*2301	A*2402	A*2403	A*2501	A*3201	B*1513	B*1516	B*3801	+9	
I-1001	76	163				EE	B*0702	B*1301	B*2705	B*2708	B*4001	B*4002	B*4701	B*4801	+1	
I-1101	80	90				IA	A*2301	A*2402	A*2403	A*3201	B*1513	B*1516	B*3801	B*4901	+8	
I-1102	82	83				LR	A*2301	A*2402	A*2403	A*2501	A*3201	B*1301	B*1513	B*1516	+15	
I-1103	90					D	A*0101	A*1101	A*1102	A*2501	A*2601	A*3401	A*3601	A*4301	+7	
I-1201	109	163				LT	B*0801	B*1401	B*1402	B*1801	B*3701	B*3801	B*3901	B*3905	+16	
I-1301	127					K	A*0201	A*0203	A*0206	A*2301	A*2402	A*2403	A*6801	A*6802	+1	
I-1401	138	142	144	145	149	MTKHA	A*0201	A*0203	A*0206	A*6801	A*6802	A*6901				
I-1402	142	143	144			ISQ	B*4001	B*4801	B*8101	C*1701						
I-1403	144	145	149			QRT	A*2501	A*2601	A*3401	A*4301	A*6601	A*6602				
I-1501	149	150	151			AAH	A*0201	A*0203	A*0206	A*0301	A*1101	A*1102	A*2402	A*2403	+3	
I-1502	150	151	152			AHA	A*1101	A*1102								
I-1503	150	151	152			AHV	A*0201	A*0206	A*2402	A*2403	A*6801	A*6802	A*6901			
I-1504	150	151	152			ARE	B*0702	B*1401	B*1402	B*1501	B*1502	B*1503	B*1510	B*1512	+25	
I-1601	163	166	167			EEW	A*6602	B*0702	B*1301	B*2705	B*2708	B*4001	B*4002	B*4701	+5	
I-1602	163	166	167			LEW	B*1501	B*1502	B*1503	B*1510	B*1513	B*1516	B*3501	B*4005	+15	
I-1603	163	166	167			REW	A*1101	A*1102	A*2501	A*2601	A*4301	A*6601				
I-1604	166	167				DG	A*0101	A*2301	A*2402	A*8001	B*1512					
I-1605	163					R	A*0101	A*1101	A*1102	A*2501	A*2601	A*4301	A*6601			
I-1701	177	178				DK	B*0702	B*4001	B*4801	B*8101						
I-1801	184	207				AS	A*0201	A*0203	A*0206	A*2501	A*2601	A*2901	A*2902	A*3101	+12	
I-1901	267	268				PE	C*0102	C*0202	C*0302	C*0303	C*0304	C*0401	C*0501	C*0602	+6	
I-1902	267	268				QE	B*7301	C*0702	C*1701							

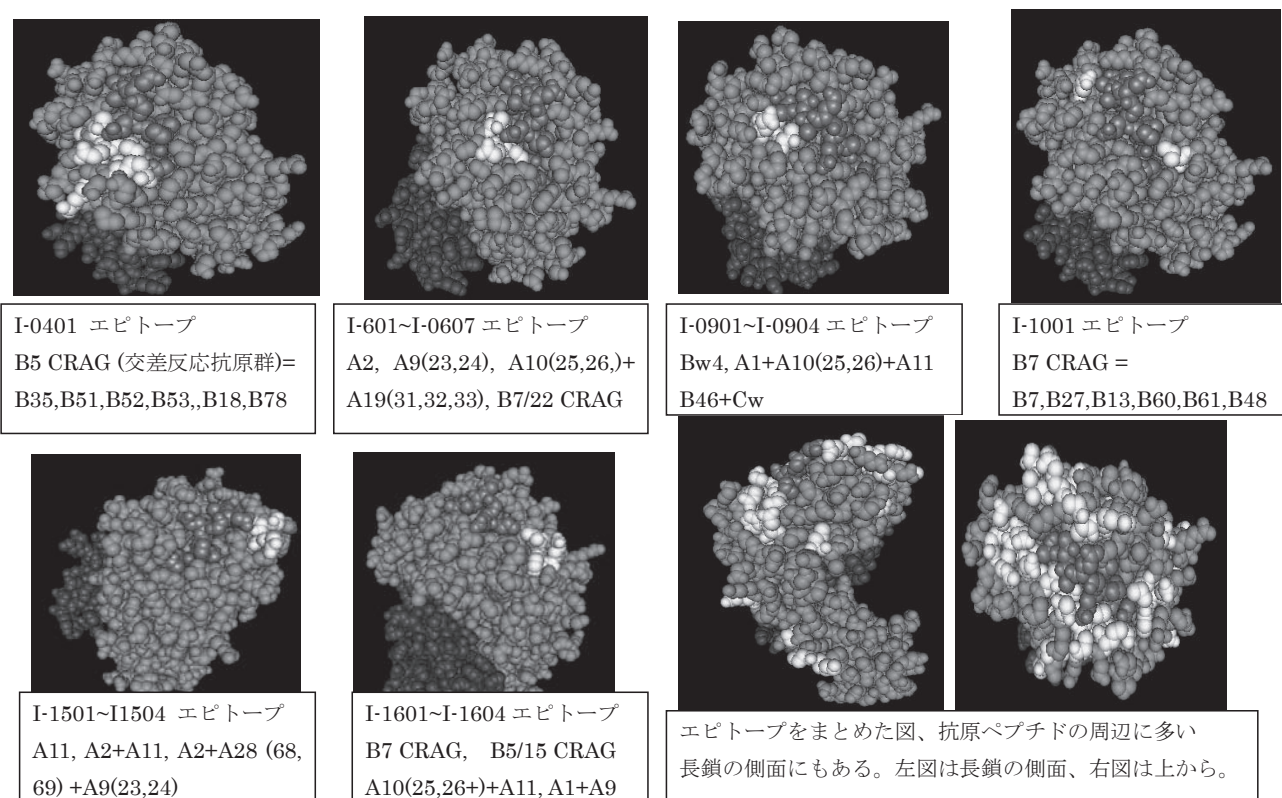


図4 HLA クラス I 抗原のエピトープ。アミノ酸と特異性は表4参照、同位置で複数のエピトープ特異性が表現される

定され、座位あたり最大1抗原である。反応陽性となる allele/ 抗原群と免疫原 HLA との共通エピトープを「赤座 Epigraph ソフトウエア (エクセル・マクロ)」(赤座達也の好意による)で解析した。その結果を表3にまとめその一部を図4に図示する³⁷⁾。抗原エピトープはペプチドを受容する位置の α -Helix 周辺に集中して存在することがわかる。また、分子の同じ位置に複数以上のエピトープが表現されることも理解でき、交差反応の概念も整理できる。多クローンである高度免疫アロ抗体を単一 HLA 抗原で吸収後に、解離抗体 (おそらく単クローン抗体) を得て、Single Antigen Beads 法でその特異性を判定し、エピトープを推定するという解析も行われている³⁸⁾。

われわれは HLA エピトープ解析をすすめ、抗体産生につながりやすい免疫優性エピトープ (Immunodominant Epitope) を解明し、HLA の組み合わせによって液性免疫が刺激されやすいものと、抗体レスポンスが起こりにくい組み合わせを予知できるようにしたいと考えている。これにより、移植の予後推

測が期待されるからである³⁷⁾。

参考文献

1. Terasaki PI, Cai J. Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* 2008; 86: 377-83.
2. Fujiwara K, Shimano K, Tanaka H, et al: Application of bead array technology to simultaneous detection of human leucocyte antigen and human platelet antigen antibodies. *Vox Sang*, 2009. **96**: 244-251,
3. Muczynski KA, Cotner T, Anderson SK.: Unusual expression of human lymphocyte antigen class II in normal renal microvascular endothelium. *Kidney Int.* 2001 Feb; 59(2): 488-97.
4. Muczynski KA, Ekle DM, Coder DM, Anderson SK: Normal human kidney HLA-DR-expressing renal microvascular endothelial

- cells: characterization, isolation, and regulation of MHC class II expression. *J Am Soc Nephrol*. 2003 May; 14(5): 1336–48.
5. Ottmann OG, Nocka KH, Moore MA, Pelus LM.: Differential expression of class II MHC antigens in subpopulations of human hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*. 1988 Oct; 2(10): 677–86.
 6. Busch FW, Langer M, Pawelec G, Ziegler A, Wernet P, Bühring HJ, Meyer P, Müller C.: A-class II antigens on human hematopoietic progenitors. *Blut*. 1987 Mar; 54(3): 179–88.
 7. Piacibello W, Aglietta M, Stacchini A, Spinelli P, Salvetti L, Kerim S, Malavasi F, Infelise V, Resegotti L, Gavosto F.: Expression of HLA class II determinants by normal and chronic myeloid leukemia progenitors. *Leuk Res*. 1987; 11(3): 285–90.
 8. Aglietta M, Piacibello W, Stacchini A, Dezza L, Sanavio F, Malavasi F, Infelise V, Resegotti L, Gavosto F.: Expression of HLA class II (DR, DQ) determinants by normal and chronic myeloid leukemia granulocyte/monocyte progenitors. *Cancer Res*. 1986 Apr; 46(4 Pt 1): 1783–7.
 9. Falkenburg JH, Fibbe WE, Veenhof WF, Koning F, van Eeden G, Voogt PJ, Jansen J.: Selective removal of clonogenic neoplastic B cells from human bone marrow using anti-HLA-DQ antibodies and complement. *Exp Hematol*. 1986 Feb; 14(2): 101–7.
 10. Fifteen years of HL-A: what is the importance of HL-A compatibility for clinical outcome of renal transplantations? *Vox Sang* 1978. 34: 171–88.
 11. Kaneku HK, Terasaki PI. Thirty year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl* 2006: 1–27.
 12. Ashihara E, Tsuji H, Sakashita H, Haga H, Yurugi K, Kimura S, Egawa H, Manabe T, Uemoto S, Maekawa T.: Antidonator antibody in patients receiving ABO-identical and HLA mismatched living donor liver transplants: effect on survival. *Transplantation*. 2007; 83(4): 506–9.
 13. Everly MJ, Terasaki PI: Monitoring and treating posttransplant human leukocyte antigen antibodies. *Human Immunology* 2009. 70: 655–659.
 14. Takanashi M, Fujiwara K, Tanaka H, Satake M, Nakajima K.: The impact of HLA antibodies on engraftment of unrelated cord blood transplants. *Transfusion*. 2008 Apr; 48(4): 791–3.
 15. 藤原孝記, 高梨美乃子, 田中秀則, 柏瀬貢一, 佐竹正博, 中島一格: 非血縁者間臍帯血移植におけるレシピエントHLA抗体と生着の関連性について; HLA mismatch移植におけるICFA法を用いた交差試験の有用性. *MHC* 2010 17(1). 39–46.
 16. Spellman S, Bray R, Rosen-Bronson S, Haagen-son M, Klein J, Flesch S, Vierra-Green C, Anasetti C. The detection of donor-directed, HLA-specific alloantibodies in recipients of unrelated hematopoietic cell transplantation is predictive of graft failure. *Blood*. 2010 Apr 1; 115(13): 2704–8.
 17. Massey E, Paulus U, Doree C, Stanworth S. Granulocyte transfusions for preventing infections in patients with neutropenia or neutrophil dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jan 21; (1): CD005341.
 18. Quillen K, Wong E, Scheinberg P, Young NS, Walsh TJ, Wu CO, Leitman SF. Granulocyte transfusions in severe aplastic anemia: an eleven-year experience. *Haematologica*. 2009 Dec; 94(12): 1661–8.
 19. Atallah E, Schiffer CA. Granulocyte transfusion. *Curr Opin Hematol*. 2006 Jan; 13(1): 45–9.
 20. Heim KF, Fleisher TA, Stroncek DF, Holland SM, Gallin JI, Malech HL, Leitman SF. The relationship between alloimmunization and post-transfusion granulocyte survival: experience in

- a chronic granulomatous disease cohort. *Transfusion*. 2010 Dec 22. doi: 10.1111/j.1537-2995.
21. Bielorai B, Toren A, Wolach B, Mandel M, Golan H, Neumann Y, Kaplinisky C, Weintraub M, Keller N, Amariglio N, Paswell J, Rechavi G. Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by granulocyte transfusions followed by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Nov; 26(9): 1025–8.
 22. Tambur AR, Ramon DS, Kaufman DB, et al: Perception versus reality?: Virtual crossmatch — how to overcome some of the technical and logistic limitations. *Am J Transplant*. 2009. 9: 1886–93.
 23. Gutman JA, McKinney SK, Pereira S, et al: Prospective monitoring for alloimmunization in cord blood transplantation: “virtual crossmatch” can be used to demonstrate donor-directed antibodies. *Transplantation*. 2009. 287(3): 415–8.
 24. Zachary AA, Sholander JT, Houp JA, Leffell MS.: Using real data for a virtual crossmatch. *Hum Immunol*. 2009. 70: 574–9.
 25. Bingaman AW, Murphey CL, Palma-Vargas J, Wright F.: A virtual crossmatch protocol significantly increases access of highly sensitized patients to deceased donor kidney transplantation. *Transplantation*. 2008. 86: 1864–8.
 26. Rebellato LM, Zadeh S, Ozawa M, et al. Mycophenolic acid may reduce donor specific HLA antibody strength in kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009; 9: (Suppl 2): 641 (Abstract).
 27. Becker YT, Becker BN, Pirsch JD, Sollinger HW. Rituximab as treatment for refractory kidney transplant rejection. *Am J Transplant* 2004; 4: 996–1001.
 28. Everly MJ, Everly JJ, Susskind B, Brailey P, Arend LJ, Alloway RR, Roy-Chaudhury P, Govil A, Mogilishetty G, Rike AH, Cardi M, Wadih G, Tevar A, Woodle ES. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation*. 2008 Dec 27; 86(12): 1754–61.
 29. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS, Amiot BP, Gloor JM, Gores GJ, Stegall MD. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant*. 2009 Jan; 9(1): 201–9.
 30. Diwan TS, Raghavaiah S, Burns JM, Kremers WK, Gloor JM, Stegall MD. The impact of proteasome inhibition on alloantibody-producing plasma cells in vivo. *Transplantation*. 2011 Mar 15; 91(5): 536–41.
 31. Sun K, Welniak LA, Panoskaltis-Mortari A, O’Shaughnessy MJ, Liu H, Barao I, Riordan W, Sitcheran R, Wysocki C, Serody JS, Blazar BR, Sayers TJ, Murphy WJ. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 25; 101(21): 8120–5.
 32. Koreth J, Stevenson KE, Kim HT, Garcia M, Ho VT, Armand P, Cutler C, Ritz J, Antin JH, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd. Bortezomib, tacrolimus, and methotrexate for prophylaxis of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched unrelated donors. *Blood*. 2009 Oct 29; 114(18): 3956–9.
 33. Mateos-Mazon J, Pérez-Simón JA, Lopez O, Hernández E, Etxebarria J, San Miguel JF. Use of bortezomib in the management of chronic graft-versus-host disease among multiple myeloma patients relapsing after allogeneic transplantation. *Haematologica*. 2007 Sep; 92(9): 1295–6.
 34. Koreth J, Alyea EP, Murphy WJ, Welniak LA. Proteasome inhibition and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a review. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Dec; 15(12): 1502–12.

35. Trivedi HL, Kaneku H, Terasaki PI et al: Clonal Deletion Using Total Lymphoid Irradiation with No Maintenance Immunosuppression in Renal Allograft Recipients. *Clinical Transplants* 2009, 265–280.
36. Everly MJ, Terasaki PI, Hopfield J, Trivedi HL, Kaneku H. Protective immunity remains intact after antibody removal by means of proteasome inhibition. *Transplantation*. 2010 Dec 27; 90(12): 1493–8.
37. Maruya E, Sasaki N, El-Awar N, Akaza T, Kitawaki J, Saji H, and Paul. Terasaki PI: Immunogenic HLA Class I Epitopes Identified by Humoral Response to Pregnancies. *Clinical Transplants* 2008, 215–227
38. Nadim El-Awar N, Terasaki PI, Nguyen A, Sasaki N, Morales-Buenrostro, LE, Saji H, Maruya E, Poli F: Epitopes of human leukocyte antigen class I antibodies found in sera of normal healthy males and cord blood. *Human Immunol*. 2009. 70: 844–853.