

第12回近畿HLA研究会

抄録

会 期：1995年6月17日(土)
 会 場：三和化学研究所 大阪メディカルホール 4 F会議場
 〒532 大阪市淀川区宮原4-3-5
 T E L 06-394-3831
 世話人：大阪大学医学部バイオ臓器移植学
 〒565 大阪府吹田市山田丘2-2
 T E L 06-879-3062
 F A X 06-879-3069

1. 日本人に特異的なDR13ハプロタイプの解析(2)

木下 朋子, 橋本 光男, 山崎 美保, 市川 靖二, 福西 孝信

兵庫県立西宮病院, 腎移植センター

日本人には3種類の特徴的なDR13ハプロタイプが存在することをこれまでに検討してきた。クラスIのDNAタイピングを行うことにより、アレルレベルでのハプロタイプの解析が可能となった。【対象と方法】1959人の日本人非血縁者のDNAタイピングをPCR-SSOP, PCR-SSP法で行った。【結果】以下のハプロタイプが特徴的であることがわかった。

- (1) A*3302-Cw*14-B*4403-DRB3*0301-DRB1*1302-DQA1*0102-DQB1*0604
- (2) A*0301-Cw*05-B*4402-DRB3*0101-DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603
- (3) A*3302-Cw10-B58-DRB3*0301-DRB1*1302-DQA1*0102-DQB1*0609

2. HLA-Cw4 抗原系の血清学的解析

川崎 盛彦¹⁾, 岩本 通子¹⁾, 中島 克子¹⁾, 嶋 裕子¹⁾, 狩野 好彦²⁾, 武井 浩充³⁾

¹⁾奈良県赤十字血液センター, ²⁾群馬県赤十字血液センター, ³⁾茨城県赤十字血液センター

Cw4 抗原サブタイプと抗血清の評価のために, 9本の抗 Cw4 単一特異性血清, 及び3本の抗 Cw4+Cw6 血清と50パネルの Cw4 陽性セルとの反応を解析した. 抗 Cw4 単一特異性血清に反応するが, 抗 Cw4+Cw6 血清に反応しないか弱い反応のセルが各種ハプロタイプに存在した. これらのミス反応は抗原量, 抗体力価の問題ではないことが力価測定と吸収試験で確認できた. つまり, Cw4 と Cw6 に共通するエピトープの有無を反映しているものと考えら

れる. また, 反応が親子で一致しないことが3家系で認められ, HLA 蛋白の高次構造が反映しているものと考えられた. (データは研究会の抄録集を参照). 既報のアミノ酸配列より, α 1 ドメイン69番から96番目アミノ酸が Cw4 と Cw6 に特異的に共通であり, 79R と90D 及び80K と89E がイオン結合による架橋を形成し, エピトープ中心となっている可能性が高い. この架橋が切れる構造を仮定すれば上記の反応成績を説明できる.

3. 15歳未満発症のインスリン依存型糖尿病における GAD 抗体と HLA クラス II 抗原

西牧 謙吾¹⁾, 新平 鎮博²⁾, 和東 栄美²⁾, 今井 龍也¹⁾, 川村 智行¹⁾, 稲田 浩¹⁾, 一色 玄¹⁾, 鍋谷 登³⁾, 能勢 義介⁴⁾

¹⁾大阪市大医学部, 小児科, ²⁾同 発達保健, ³⁾ナベヤクリニック, ⁴⁾兵庫県赤十字血液センター, 検査課

【目的】インスリン依存型糖尿病(IDDM)は自己免疫疾患であり, 膵 β 細胞の成分に対する種々の自己抗体を持つ. 最近 GAD 抗体測定が容易になり, IDDM 患者の診断・予知マーカーとして注目されている. 今回, 血清学的に解析した疾患感受性 HLA 抗原, 罹患年数と GAD 抗体陽性率を比較した結果, 興味あるデータを得たので報告する. **【対象・方法】**対象は15歳未満発症の IDDM 患者32名. DR, DQ は血清学的タイピングを行った. GAD 抗体は, GAD 研究会(ヘキストジャパン社製のキットを使用)の測定結果を用いた. **【結果】**GAD 抗体陽性者は, 罹患年数10年未満で6/12 (50%), 10年以上では, 5/20

(25%) の陽性率であった. HLA との関連から見ると, 罹患年数10年未満の場合, DR4.1 保有者は2/10 (20%) であるのに対し, 非保有者は4/4 (100%) と陽性率が高く, 10年以上では, DR4.1 保有者は1/11 (9.1%) であるのに対し, 非保有者は4/7 (57%) と陽性率が高い傾向を示した. この傾向は, DQ4 でも見られたが, DR9, DQ3 では見られなかった. **【結語】**GAD 抗体は, ある特定の HLA クラス II 抗原(DR4.1, DQ4)保有者に比べ, 非保有者の方が高い陽性率を示す傾向がある. その意義については, 今後検討を要する.

4. ブロッキング法を用いた抗体解析について

斎藤 隆夫¹⁾, 高橋 順子¹⁾, 吉村 敬次¹⁾, 富田 忠夫¹⁾, 福森 泰雄¹⁾, 大軒 子郎¹⁾, 柴田 弘俊¹⁾, 大久保 康人¹⁾, 高橋 英夫¹⁾, 小河 英人¹⁾, 山野 孟¹⁾, 矢橋 弘嗣²⁾, 平井 博美³⁾, 兼重 俊彦³⁾

¹⁾大阪府赤十字血液センター, ²⁾大阪府南大阪赤十字血液センター, ³⁾シオノギ製薬, 診断医学部

今回、患者血清中より Cx4451 及び Cw1 の一部とのみ反応すると思われる抗体を得た。

本血清の持つ抗体が C 座抗原特異的であることを確認するために特異性既知の抗血清を用いて抗原をブロックし、調べようとする抗体の特異性を検査するブロッキング法を考案した。その結果、B 座抗原をブロックする抗血清を用いた場合抗体は吸収され陰性となった。また、C 座抗原をブロックする抗血清を用いた場合抗体は吸収されずに陽性を示し、本

血清が C 座抗原特異的であることを示唆する結果を得た。

家系調査により本血清と反応する抗原が矛盾なく遺伝していることを確認し、その HLA-C 遺伝子の塩基配列解析の結果、エクソン2において Cx4451 は B51 と連鎖する Cw*1401 と B44 に連鎖する Cw*1403 であった。Cw1 については引き続き検討中である。

5. PCR-RFLP 法による HLA-C の generic タイピングの試み

福森 泰雄¹⁾, 大軒 子郎¹⁾, 柴田 弘俊¹⁾, 斎藤 隆夫¹⁾, 高橋 順子¹⁾, 吉村 敬次¹⁾, 大久保 康人¹⁾, 富田 忠夫²⁾, 矢橋 弘嗣²⁾, 平井 博美³⁾, 兼重 俊彦³⁾

¹⁾大阪府赤十字血液センター, ²⁾大阪府南大阪赤十字血液センター, ³⁾シオノギ製薬, 診断医学部

【はじめに】PCR-RFLP 法を用いて HLA-C の generic なタイピングを試みた。【材料, 方法】PCR プライマーは HLA-C 遺伝子のエクソン2 部分に設定し、増幅を行った。この PCR 産物に対し、DdeI, EagI, NlaIV で処理した。その後、必要に応じて、AciI, BstNI, SmaI, NcoI などの酵素処理を行った。【結果】HLA-C のエクソン2 の増幅産物の酵素処理で、各対立遺伝子は6つのグループ (group1: Cw1, group2: Cw2, group3: Cw0301 (欠番),

group4: Cw14, Cw4, Cw3 (0301 を除く), group5: Cw6, Cw7, group6: その他の型) に分類できた。また、Cw4, Cw3, Cw14 は BstNI と AciI 処理で、Cw6, Cw7 は SmaI 処理で、group6 に属する Cw5, Cw8, Cw12, Cw15, Cw16 などは AciI 処理の結果より、さらに細かく分類可能で、PCR-RFLP の結果と血清学の結果に矛盾はなかった。血清学の結果と合わせて、HLA-C 型判定の一助となりうる。

6. PCR-LIS-MPH 法による HLA-DR low resolution typing について

原 祐子, 丸屋 悦子, 佐治 博夫, 横山 繁樹

京都府赤十字血液センター

【はじめに】PCR-MPH 法は DNA を用いた HLA-class II の血清学レベルのタイピングを大量かつ簡便迅速に行える方法である。低イオン強度の溶液 (Low Ionic Strength: LIS) 中で熱変性させる条件で一本鎖 DNA の形成効率を高め、その効果を検討した。【材料と方法】当センターにおける control DNA 7種およびパネル DNA 1種を用いた、LIS-熱変性：増幅した DNA を滅菌蒸留水で4倍希釈した後熱変性する。各プローブに添加する DNA 量は従

来の半量(4倍希釈 DNA としては倍量の10 μ l)とする。【結果とまとめ】増幅 DNA を希釈した後熱変性すると反応を増強することができた。結果的に用いる DNA 量が減り、一度の PCR で再検用 DNA も確保できた。さらにプローブの種類が増加しても対応が可能である。PCR-LIS-MPH 法をスクリーニングとして用い、PCR-RFLP, -SSCP 法等を組み合わせることで high resolution typing の精度を高めることにつながった。

7. PCR-LIS-SSCP (low ionic strength single strand conformation polymorphism) 法による HLA-DRB1, DQB1, DPB1 allele typing (予報)

丸屋 悦子, 原 祐子, 佐治 博夫, 横山 繁樹

京都府赤十字血液センター

【はじめに】SSCP は塩基配列の変異を検出する鋭敏で経済的な方法である。一本鎖 DNA 形成の効率良い方法：LIS-熱変性法を開発し、PCR-LIS-SSCP による HLA-DRB1, DQB1, DPB1 allele typing を行った。【材料と方法】Japanese, Hispanic, Black, Caucasian DNA 200例と reference として Terasaki DNA exchange DNA を用いた。LIS-熱変性は増幅 DNA を低イオン強度溶液に浮遊させ加熱処理する。【結果とまとめ】LIS-熱変

性の効率は formamide よりまさり、形成される SSCP パターンも鮮明である。試薬と冷却操作を省けるので、簡便で安価である。PCR-LIS-SSCP を用いた HLA-class II allele typing は十分な解像力を持ち high resolution typing として有用、変異検出能力の高さから「適合性」を目的とした typing に有利、SSOP, RFLP, SSP など他の typing 法の確認法としても有用であることがわかった。

8. HLA-A26 の New allele, HLA-A26KY について(予報)

丸屋 悦子¹⁾, 林 玲²⁾, 石川 善英²⁾, 徳永 勝士²⁾, 木村 彰方³⁾, 仁田 浩¹⁾, 佐治 博夫¹⁾

¹⁾京都府赤十字血液センター, ²⁾中央赤十字血液センター, ³⁾九州大学医学部生体防御研究所

【はじめに】木村らが開発した PCR-SSOP による HLA-A locus allele typing を行ない, 既存の HLA-A26 alleles (A2601, 2602, 2603, 2604) と異なった SSOP 反応パターンを示す DNA (仮称: HLA-A26KY) を検出し, この DNA について検討した。【材料と方法】DNA: 89人の健康な日本人由来 DNA を用いた。HLA-A locus SSOP typing は木村らの方法に準じた。exon 2および exon 3 の部分塩基配列の決定は direct sequencing 法を用いた。

【結果および考察】HLA-A26 関連 probes と HLA-A26KY の反応は A26 specific probes すべてに陽性, A26 allele を分類する probes で amino acid positions 70~79 と反応する probes と new reaction pattern を示した。この部位の sequencing により, A26KY は Glu-76 (A*2601=2=4: Ala, A*2603: Val) であった。現在, 全 exon の塩基配列を決定している。

9. Alternative splicing により産生される多様な HLA-G mRNA, およびそれらの蛋白に対するモノクローナル抗体について

石谷 昭子¹⁾, 藤井 知行²⁾, Daniel E. Geraghty³⁾

¹⁾奈良県立医科大学, 法医学, ²⁾東京大学医学部, 産婦人科, ³⁾Fred Hutchinson Cancer Research Center

HLA-G mRNA は, alternative splicing により, 3種の膜結合性抗原の mRNA (G1, G2, G3), および2種の可溶性抗原の mRNA (G1 sol., G2 sol.) が合成されることを明らかにした。G1は, full length, G2は $\alpha 2$ が欠損, G3は $\alpha 2$, $\alpha 3$ が欠損していた。これらの抗原に対する抗体については, HLA-G 全遺伝子に対するものと, 可溶性抗原 G1 sol. に対するものの2種のモノクローナル抗体の作製に成功した。これら抗体の特異性については, cytotoxicity test, FACS, ELISA および免疫組織化学により検定を行った。

10. 抗 HLA-G モノクローナル抗体を使用したヒト各種組織および各妊娠周期胎盤における HLA-G 抗原の検索

長池 知恵子¹⁾, 石谷 昭子¹⁾, 平野 佳成¹⁾, 伊藤 信彰¹⁾, 羽竹 勝彦¹⁾, Daniel E. Geraghty²⁾

¹⁾奈良県立医科大学, 法医学, ²⁾Fred Hutchinson Cancer Research Center

ヒト各種組織・各妊娠周期の胎盤における HLA-G 抗原の局在を我々が作成した抗 HLA-G 抗体および抗可溶性 HLA-G 抗体を用いて, 新鮮凍結切片および固定凍結切片の免疫組織染色により検索した。抗 HLA-G 抗体による検索では胎盤の Extravillous Trophoblast にのみ HLA-G 抗原の発現を認めた。抗可溶性 HLA-G 抗体による検索においてもほぼ同部位に発現を認めた。現在, 絨毛間腔等の母体血についても検索を行っている。