

第14回 近畿 HLA 研究会

会期 : 1997年2月8日(土)
 会場 : 三和化学研究所 大阪メディカルホール 5F会議場
 世話人 : 吉田 克法
 奈良県立医科大学泌尿器科学教室

シンポジウム

「12th International HLA Workshop, St. Malo, 1996」

- | | | |
|---------------------------|------------------------|-------|
| 1. AHS# 2 (A2/A9) | 京都府赤十字血液センター, 研究課 | 丸屋 悦子 |
| 2. AHS# 16 (DR7/DR9/DR53) | 東海大学医学部, 分子生命科学 | 猪子 英俊 |
| 3. SBT | 東海大学医学部, 分子生命科学 | 成瀬 妙子 |
| 4. AHS# 8 (B15) | 日本赤十字社中央血液センター, 検査課 | 田中 秀則 |
| 5. AHS# 18 (DPA1/DPB1) | 国立循環器病センター研究所, 実験治療開発部 | 佐田 正晴 |
| 6. AHS# 5 (B7/B22) | 防衛医科大学校, 検査部 | 小林 賢 |

特別講演

「人類遺伝学からみた HLA」

東京大学医学系研究科, 人類遺伝学教室 徳永 勝士

遺伝学的見地からみた場合, HLA の最大の特徴は複数の類似した遺伝子が染色体上で近接して遺伝子複合体を形成すること, しかもそれぞれの HLA 遺伝子が機能を持つ遺伝子として最高度の多型性を示し, これらの間に強い連鎖不平衡が存在することにある。

PCR 法の登場によって HLA 遺伝子群の DNA タイピングには飛躍的な進歩がみられた。特にクラス II 遺伝子群についてはすでにいくつかの方法が確立され, 日常検査の場に普及しつつある。一方, クラス I 遺伝子群については, 変異が集中する部位が二つのエクソンに及ぶこと, 互いの配列の相同性が高く特異的な増幅が困難であること, 塩基配列未決定の対立遺伝子が多く残っていることなどの理由から, 高精度の DNA 検査法の開発が遅れていた。最近我々は, 典型的クラス I に分類される HLA-A, B, C 座と非典型的クラス I に属する HLA-G 座について, 日本人に存在する主な対立遺伝子の塩基配列の決定をほぼ終了した。他の研究グループからの報告もあわせると, これまでにそれぞれの座位で 24, 40, 16, 4 種類の対立遺伝子が確認された(1~4)。

さらに我々は, 日本人集団試料における典型的クラス I 遺伝子群の高精度 DNA タイピングを終了し, すでに解析済みのクラス II 遺伝子群の結果と合わせていくつかの興味深い知見を得た(1)。遺伝子頻度が 10% 以上の対立遺伝子は A, B, C 座それぞれ 4, 2, 6 種類みられた。注目されるのは, A2, A26, B61 グループにおいて血清学的には区別できないが頻度の高いサブタイプ(対立遺伝子)が存在した点である(5~7)。また, 従来の血清学的検査から見いだされていた高頻度の A-C-B-DR-DQ ハプロタイプのそれぞれが, 実際に一定の対立遺伝子セットからなることが今回の配列レベルの解析で実証された。これは, 我々が以前より主張してきた HLA ハプロタイプの進化的保存性を支持する結果のひとつであり, また骨髄移植のマッチングや疾患感受性遺伝子の特定にあたって考慮すべき特性でもある。

厚生省骨髄移植研究班による日本人非血縁者間骨髄移植例に関する HLA 遺伝子群の DNA 多型解析の結果によれば, クラス II よりむしろクラス I の HLA-A, B 遺伝子の配列レベルのマッチングが, 急

性 GVHD の発症率や長期生存率に有意に関連していた。上述のように、日本人では主として A 2, A 26, B 61 グループにおいて頻度の高い対立遺伝子が複数存在していたことから、最近我々は、PCR-MPH (microtiter plate hybridization) 法を応用してこれらのグループの DNA タイピングプレートを作成し、日常検査に導入している。

移植に関してもうひとつ注意したい点は、非発現型対立遺伝子 (null allele) の存在である。我々はクラス I の A 座において初めて null allele の存在を報告したが(8)、その後国内外でいくつかの null allele が認められている。いずれも頻度は低いがそれぞれ異なるものであったことから、当然これら以外にも我々がまだ見出していない null allele が何種も存在すると推測される。これらは通常の DNA 検査ではごく普通の発現型の対立遺伝子と混同される可能性が高い。その結果だけをもとに移植を行うと拒絶あるいは GVHD (移植片対宿主病) の原因となりうる。血清学的検査によって HLA 分子の発現を確認することの意義がここにある。

また、自己免疫疾患における感受性遺伝子の研究においても、従来の血清学的検査では区別できなかったクラス I 対立遺伝子を解析し、クラス II の解析結果と考え合わせることで新たな展開が期待される。一例として最近我々は、若年性関節リウマチの解析を行っているが、興味深いことに 3 種の疾患サブタイプにおいて関連する HLA 対立遺伝子が異なっており、しかもクラス I 遺伝子とクラス II 遺伝子が互いに独立な危険因子であると推定された。また、以前より知られてきた B 27 と強直性脊椎炎の強い関連についても、B 27 に多数の対立遺伝子が存在し、それら全てが感受性を示すわけではないことが明らかとなっている(9)。

一方、HLA 遺伝子群の著しい多型性やそのユニークな進化の特徴は、人類集団の起源と形成の研究にも大きく貢献している。第 11 回および第 12 回国際組織適合性ワークショップでは、多くの民族集団について HLA 型の頻度分布が調査された。その結果の一部を紹介するとともに、これらの知見から日本人やその近隣集団の形成について何がいえるのか議論したい。

文献

- 1) Tokunaga K, Ishikawa Y, Ogawa A, *et al.* Sequence-based association analysis of HLA class I and II alleles in Japanese supports conservation of common haplotypes. *Immunogenetics* (in press).
- 2) Bannai M, Tokunaga K, Tanaka H, *et al.* Five HLA-B 22 group alleles in Japanese. *Tissue Antigens* (in press).
- 3) Wang H, Tokunaga K, Akaza T, *et al.* : Identification of HLA-C alleles using PCR-single-strand-conformation-polymorphism and direct sequencing. *Tissue Antigens* (in press).
- 4) Yamashita T, Fujii T, Watanabe Y, *et al.* : Polymorphism of the HLA-G Gene in Japanese. *Immunogenetics* **44** : 186-191, 1996.
- 5) Ishikawa Y, Tokunaga K, Kashiwase K, *et al.* : Sequence-based typing for HLA-A 2 alleles using a primer with an extra base mismatch. *Hum. Immunol.* **42** : 315-318, 1995.
- 6) Ishikawa Y, Tokunaga K, Lin L, Imanishi T, *et al.* Sequences of four splits of HLA-A 10 group : Implications for serological cross-reactivities and their evolution. *Hum. Immunol.* **39** : 220-224, 1994.
- 7) Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.* : HLA-B 40, B 18, B 27, and B 37 allele discrimination using group-specific amplification and SSCP method. *Hum. Immunol.* **46** : 107-113, 1996.
- 8) Ishikawa Y, Tokunaga K, Tanaka H, *et al.* : HLA-A null allele with a stop codon. HLA-A *0215 N, identified in homozygous state in a healthy adult. *Immunogenetics* **43** : 1-5, 1996.
- 9) Yamaguchi A, Ogawa A, Tsuchiya N, *et al.* : HLA-B 27 subtypes in Japanese with seronegative spondyloarthropathies and healthy controls. *J. Rheumatol.* **23** : 1189-93, 1996.
- 10) Tokunaga K, Imanishi T, Takahashi K, *et al.* : On the origin and dispersal of East Asian populations as viewed from HLA haplotypes. *Prehistoric Mongoloid Dispersals*, (eds. Akazawa T, Szathmary EJ) Oxford University Press Oxford, 1996, p.187-197.

一般演題

1. 慢性リウマチの重症度と HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度

国立大阪南病院, 整形外科 真塚 健夫, 脇谷 滋之, 井本 一彦, 村田 紀和

目的

慢性関節リウマチ (RA) の重傷度と HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度との関係を明らかにすること。

方法

我々は、関西地区在住の 852 人の RA 患者の HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度を調べた。発症年齢により、高齢発症 RA (発症年齢 60 歳以上) および成人発症 RA (発症年齢 16 歳以上 59 歳以下) に分類した。さらに、成人発症 RA を X 線上での関節破壊数 (Steinbrocker 分類で Stage II 以上のレ線変化が見られる関節数) に基づく越智らの RA 病型分類により、小関節の破壊に留まる軽症病型 (least erosive subset ; LES), 大関節も破壊される重症病型 (more erosive subset ; MES), および、発症早期から全身の関節が破壊される最も重症病型であるムチランス型 (most erosive subset with mutilating disease ; MUD) に分類し、各病型別に HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度を検討した。HLA-DRB1 遺伝子の正常コントロールとして兵庫県立西宮病院腎移植センター、橋本光男先生より頂いた 652 例の DRB1 遺伝子表現型頻度を使用した。

結果

RA 全体では、DRB1*0101 および*0405 が有意に高頻度であり DRB1*0701, *0802, *1302 および*0405 の 4 つが有意に低頻度であった。成人発症 RA の軽症病型である LES と DRB1*0101 が相関した。DRB1*0405 はすべての病型で高頻度であったが、重症病型である MES および MUD とより強く相関した。また、高齢発症 RA では、DRB1*0405 よりも*0101 がより強く相関した。

考察

DRB1*0405 を持つ人は RA を発症しやすいのみならず越智らの RA 病型分類における重症 RA になる危険が高いことが明らかになった。HLA と RA の相関をこのように明らかにしてきたが、実際には DRB1*0405 を持つ人のほとんどは RA を発症しないし、RA 患者の半数は DRB1*0405 を持っておらず DRB1*0405 のみでは RA の発症は説明できない。しかしながら、RA との関連が明らかにされている遺伝子は HLA のみであり、RA の原因を探る有力な手がかりである。

表 1. 日本人 RA 患者およびその 4 つの病型における HLA-DRB1 遺伝子の表現型頻度および相対危険率

[表現型頻度% (相対危険度)]

HLA-DRB1*	control (N=652)	total RA (N=852)	LES (N=345)	MES (N=218)	MUD (N=80)	EORA (N=120)
0101	8.4%	14.4%(1.8)**	15.1%(1.9)**	12.4%(1.5)	10.0%(1.2)	20.0%(2.7)**
0405	29.0	49.9 (2.4)**	42.3 (1.8)**	61.9 (4.0)**	63.8 (4.3)**	44.2 (1.9)**
0701	2.2	0.2 (.11)**	0.6 (.27)	0.0 (.00)	0.0 (.00)	0.0 (.00)
0802	10.0	2.7 (.25)**	3.2 (.30)**	1.8 (.17)	2.5 (.23)*	4.2 (.39)*
1302	11.7	5.6 (.45)**	6.4 (.52)*	6.0 (.48)*	0.0 (.00)**	5.0 (.40)*
1405	5.4	2.0 (.36)**	1.4 (.26)*	1.8 (.33)*	5.0 (.93)	1.7 (.30)

*コントロールと比較して、uncorrected P 値のみ統計学的有意差を示す。

**コントロールと比較して、corrected P 値が統計学的有意差を示す。

一般演題

2. サルコイドーシスと HLA-DQB1, -DPB1

大阪簡易保険総合検診センター 立花 暉夫

大阪府赤十字血液センター 石井 博之, 松山 宣樹, 大谷 智司, 永尾 暢夫

目的, 対象, 方法

立花他は, 本学会第1回から13回迄主として大阪地区のサルコイドーシス症例と HLA の関連性についての検討成績, 外国のサルコイドーシス症例で検討された成績との比較検討も発表してきた。

今回は, 立花が初診および経過追求中のサルコイドーシス 90 症例について, 大阪府赤十字血液センターで, PCR-RFLP 法により, HLA-DPB1, DQB1 DNA typing を実施し, 得られた成績を第11回日本 HLA Workshop で集計された健康人の成績と比較検討した。更に, サルコイドーシス経過不良(初診後, 5年経過後もサルコイドーシス病変持続) 27 症例と経過良好(初診後5年以内, 著明改善) 23 症例について DNA Typing を実施した DPB1, DQB1 各 alleles について出現頻度を比較検討した。

HLA-DPB1 DNA Typing 成績については, 1995 年国際サルコイドーシス会議で, ロンドン大学 Brompton 病院グループが, サルコイドーシス症例と健康人の間で, 各 alleles について比較検討し,

前者に高頻度な allele はないが, HLA-DPB1 のアミノ酸 sequence で69番目に Glutamine を有する alleles について比較検討すると, 前者が高頻度であったとの報告があったので, その点も検討した。

結果

1. HLA-DQB1 DNA Typing の結果, 表1に示す各 alleles で, サルコイドーシス, 健康人の間で, 0301 が前者に高頻度であった。臨床経過, 臨床像との関連では, 0601 は経過不良例では経過良好例に比して高頻度であり, 発見時年齢40才以上症例では40才以下症例に比して高頻度であった。

2. HLA-DPB1 DNA Typing の結果, 表4に示す各 alleles で, サルコイドーシス, 健康人の間で前者に高頻度な allele を認めなかった。また HLA-DPB1 のアミノ酸 sequence で69番目に glutamine を有する alleles で比較検討しても, 英国サルコイドーシス症例で認めた成績は得られなかった。

表1 サルコイドーシスと HLADQB1

	Phenotypic Frequency	
	サルコイドーシス N= 90	健康人 N= 1216
0301	31.1 %	21.9 % *
0302	8.9 %	20.0 %
0303	27.8 %	27.6 %
0401	25.6 %	27.3 %
0402	5.6 %	7.6 %
0501	6.7 %	12.6 %
0502	7.8 %	4.9 %
0503	10.0 %	7.9 %
0601	36.7 %	33.0 %
0602	18.4 %	10.0 %
0603	1.1 %	1.6 %
0604	11.1 %	13.3 %

表2 サルコイドーシスと HLADQB1 症例の内訳

	HLADQB1 0601
経過良好例 (N= 23)	26.1 % *
経過不良例 (N= 27)	55.6 % *
全症例 (N= 50)	42.0 %
	*P= 0.03

表3 サルコイドーシスと HLA DQB1

発見時年齢	HLA DQB1 0601
40才以下 (N=31)	16.1% *
40才以上 (N=19)	84.2% *
全症例 (N=50)	42.0%
	*P=0.003

表5 サルコイドーシスと HLA DPB1

Glu 69を有するAlleles*のAllele frequency

サルコイドーシス (N=90)	32.6%
健康人 (N=679)	37.0%

* : HLA DPB1 0201, 0202, 0601, 0901,
1301, 1701, 1901

表4 サルコイドーシスと HLA DPB1

	Phenotypic Frequency	
	サルコイドーシス N=90	健康人 N=649
0201	30.0%	37.6%
0202	11.1%	7.3%
0301	11.1%	7.3%
0401	10.0%	7.5%
0402	8.9%	19.7%
0501	72.2%	60.4%
0601	2.2%	1.2%
0901	11.1%	17.4%
1301	4.4%	4.4%
1401	5.6%	3.1%
1701	1.1%	0.5%
1901	2.2%	0.5%

一般演題

3. 無精子症とHLA

国立循環器病センター研究所
大阪大学医学部, 泌尿器科
東海大学医学部, 分子生命科学

佐田 正晴, 式田 有里, 辻 隆之
高原 史郎, 辻村 晃, 奥山 明彦
成瀬 妙子, 猪子 英俊

無精子症とは精液検査で精子を全く認めない場合の総称で, その原因は多種に及んでいるが一般に精子形成障害によるものと精子輸送通過障害によるものに大別される。両者は精巣生検と精管造影検査で容易に鑑別可能で, 更に精子形成障害において無精子症と高度乏精子症との区分は精巣生検により容易に鑑別できる。今回我々は不妊外来を受診した無精子症患者を対象に HLA 疾患感受性について検討し

たので報告する。

対象および方法

大阪警察病院, 大阪中央病院および大阪大学病院を受診した無精子症患者のうち, 精巣生検を施行し Johnsen score count で score 7 以上を示し精子輸送路通過障害による無精子症および高度乏精子症患者を確実に除外した65症例を今回の対象とした。対象

症例の HLA-A, -B 抗原は LCT 法および PCR-SSP 法により同定した. HLA-DR 抗原, DRB1 allele の決定は PCR-LiPA 法および PCR-SSP 法を用いた.

結果

健常日本人と無精子症との抗原頻度, allele 頻度

Frequency of HLA.A Antigens between Azoospermia and Healthy Japanese Control

A antigens	Control (n=1216)			Azoospermia (n=45)			p value
	N	PF	GF	N	PF	GF	
A1	15	1.2	0.6	0	0.0	0.0	
A11	215	17.7	9.3	6	13.3	6.9	
A2	507	41.7	23.7	17	37.8	21.1	
A24	745	61.3	37.8	28	62.2	38.5	
A28	252	20.7	10.5	4	8.9	4.6	
A3	15	1.2	0.6	1	2.2	1.1	
A30	5	0.4	0.2	1	2.2	1.1	
A31	206	16.9	8.9	8	17.8	9.3	
A33	175	14.4	7.5	18	40.0	22.5 †	<0.0001
BL	15	1.2	0.6	5	11.1	5.7	

Frequency of HLA.B Antigens between Azoospermia and Healthy Japanese Control

B antigens	Control (n=1216)			Azoospermia (n=24)			p value
	N	PF	GF	N	PF	GF	
B13	35	2.9	1.48	3	12.5	6.5 †	0.007
B14	0	0.0	0.04	0	0	0	
B17	15	1.2	0.58	0	0	0	
B27	10	0.8	0.41	0	0	0	
B35	169	13.9	7.22	3	12.5	6.5	
B37	17	1.4	0.70	0	0	0	
B38	7	0.6	0.29	0	0	0	
B39	100	8.2	4.20	1	4.2	2.1	
B44	174	14.3	7.43	14	58.3	35.4 †	<0.0001
B46	100	8.2	4.18	2	8.3	4.2	
B48	58	4.8	2.43	0	0	0	
B49	0	0.0	0.04	0	0	0	
B51	227	18.7	9.81	3	12.5	6.5	
B52	259	21.3	11.31	3	12.5	6.5	
B54	193	15.9	8.27	2	8.3	4.2	
B55	63	5.2	2.63	1	4.2	2.1	
B56	19	1.6	0.78	0	0	0	
B59	46	3.8	1.93	1	4.2	2.1	
B60	135*	11.1	5.72	0	0	0	
B61	291	23.9	12.75	5	20.8	11.0	
B62	165	13.6	7.06	1	4.2	2.1	
B67	28	2.3	1.17	0	0	0	
B7	131	10.8	5.56	1	4.2	2.1	
B70	24	2.0	0.99	1	4.2	2.1	
B75	19	1.6	0.80	1	4.2	2.1	
B58				1	4.2	2.1	
B76				1	4.2	2.1	
BL	45	3.7	1.89	4	16.7	8.7	

の比較検討から, class I 抗原では HLA-A 33 ($p < 0.0001$, $RR = 4.0$), HLA-B 44 ($p < 0.0001$, $RR = 8.4$), B 13 ($p < 0.007$, $RR = 4.8$) で有意に高い相関を, class II 抗原では DR13 ($p < 0.0001$, $RR = 5.9$) また allele 頻度では DRB1*1302 ($p < 0.0001$, $RR = 8.2$) で有意に高い相関を認めた.

Frequency of HLA.DR Antigens between Azoospermia and Healthy Japanese Control

DR antigens	Control (n=898)		Azoospermia (n=50)			p value
	N	GF	N	PF	GF	
1	96	5.5	5	10.0	5.1	
15	363	17.4	14	28.0	15.1	
16	14	0.8	0	0	0.0	
17	4	0.2	0	0	0.0	
18	0	0.0	0	0	0.0	
4	409	22.8	23	46.0	26.5	
11	47	2.6	0	0	0.0	
12	126	7.0	4	8.0	4.1	
13	140	7.8	26	52.0	30.7 †	<0.0001
14	99	5.5	12	24.0	12.8	
7	7	0.4	0	0	0.0	
8	239	13.3	8	16.0	6.3	
9	233	13.0	8	16.0	8.3	
10	11	0.6	0	0	0.0	
bk	2	0.1	0	0	0.0	

Frequency of HLA.DRB1 Alleles between Azoospermia and Healthy Japanese Control

DRB1 allele	Control (n=1216)		Azoospermia (n=23)		p value
	N	AF	N	AF	
0101	141	5.81	4	9.1	
1501	173	7.11	0	0.0	
1502	246	10.13	7	16.5	
1802	25	1.04	0	0.0	
0405	322	13.26	7	16.6	
0410	44	1.79	0	0.0	
0403	51	2.08	0	0.0	
0406	74	3.03	0	0.0	
1101	63	2.59	0	0.0	
1201	89	3.65	1	2.2	
1202	43	1.75	0	0.0	
1301	14	0.59	1	2.2	
1302	166	6.83	13	34.0 †	<0.0001
1401	82	3.37	1	2.2	
1405	54	2.22	0	0.0	
1403	47	1.91	1	2.2	
1406	42	1.71	0	0.0	
0803	202	8.29	3	6.7	
0802	102	4.18	2	4.4	
0901	342	14.08	3	6.7	
1001	17	0.70	0	0.0	
bk	21	0.86	0	0.0	

一般演題

4. 生体肝移植後の GVHD について

京都府赤十字血液センター，研究部¹，京都大学医学部，移植外科²
 丸屋 悦子¹，山岡 正暢¹，池田 忠明¹，佐治 博夫¹，横山 繁樹¹，木内 哲也²，田中 紘一²

はじめに

近年，胆道閉鎖症の患者の救命法として生体部分肝移植が行われている。この移植では通常ドナーとして one haplotype identical な親が選ばれている。肝移植において HLA の適合性と graft survival の間にあまり相関がみられないことは死体肝移植のデータからも明らかである。したがって肝移植において HLA 型検査は費用がかさむだけで、恩恵はほとんどないように考えられがちである。我々は親から生体部分肝移植を受けた患者で、重篤な GVHD を起こし死亡した症例より親をドナーとする場合の肝移植における HLA 検査の重要性と必要性を経験したので報告する。

対象・方法

患者：9ヶ月の女兒，先天性胆道閉鎖症のため母から生体部分肝移植を受け，移植後20日頃より水疱・表皮剥離を伴う発疹，水様下痢と高熱および汎血球減少が出現した。その後 GVHD 重症化3週で敗血症となり，術後43日目に死亡した。

HLA typing：両親の血液および移植後30，33，34，37，43日目の各患者血液よりリンパ球を分離し，LCT法により HLA-class I を検査した。患者の爪由来および両親の有核細胞由来の DNA を用い PCR-LIS-MPH と PCR-LIS-SSCP により HLA-DRB1，DQB1 を type した。

マイクロサテライトの検査：移植後各採血日の患者血液および爪由来の DNA と両親の血液由来の DNA を用い，human beta-actin related pseudogene および human growth hormone のマイクロサテライトを PCR-LIS-SSCP で検出した。

結果・考察

図1.に患者家族の HLA type を示す。母は日本人の common ハプロタイプである HLA-A 24/B 52/

氏名	A locus		C locus		B locus		DRB1*		DQB1*	
父	2	31	10	-	61	51	0802	1403	0302	0301
母	24	-	-	-	52	-	1502	-	0601	-
患者	2	24	10	-	61	52	0802	1502	0302	0601

PROBABLE HAPLOTYPE

	A	C	B	DRB1	DQB1
HAPLOTYPE a:	2	10	61	0802	0302
HAPLOTYPE b:	31	-	51	1403	0301
HAPLOTYPE c:	24	-	52	1502	0601
HAPLOTYPE d:	-	-	-	-	-

FAMILY TREE

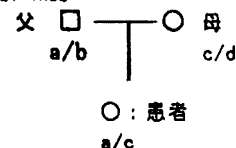


図1. 患者家族の HLA Type

表1. 患者リンパ球の HLA 抗血清に対する細胞障害スコア

患者 HLA type : A 24, A 2, B 52, B 61, CW 10-

Serum Specificity	抗血清との反応スコア				
	採血日				
	11/08	11/11	11/12	11/15	11/21
A 2	6	8	8	8	8
A 2 + A 28	6	6	6	8	8
A 24 + A 23	8	8	8	8	8
A 24	8	8	8	8	8
B 61 + B 60 + B 48	6	6	6	8	8
B 61 + B 60 + B 13 + B 47	6	6	6	8	8
B 59 + B 51 + B 52 + B 5102 + B 5103	8	8	8	8	8
B 52	8	8	8	8	8
B 52	8	8	8	8	8
B 51 + B 5102 + B 52 + B 35 + B 75 + B 63 + B 77	8	8	8	8	8
BW 4	8	8	8	8	8
BW 4	8	8	8	8	8
BW 6	6	8	8	8	8
BW 6	6	6	6	8	8
CW 9 + CW 10	6	6	6	8	8
CW 9 + CW 10	4	6	6	8	8

(スコアの説明) 8. ほぼすべてのリンパ球が死細胞である。
 6. 50%~70%のリンパ球が死細胞である。
 4. 30%以上で50%以下の死細胞数である。

DRB1*1502/DQB1*0601 のホモザイゴートと考えられる。表 1 に患者保有 HLA 抗原に対する抗血清と患者リンパ球の細胞傷害スコアの経時変化を示す。図 2 に両親と患者（経時変化を含め）のマイクロサテライト泳動パターンを示す。これらの結果から、GVHD と診断時の患者末梢血には母の細胞の存在が証明された。また死亡後の剖検報告で皮膚病変の真皮、基底層および腸管粘膜下層に CD

8 陽性 T リンパ球の浸潤がみられた。親子間生体肝移植の重篤な GVHD を起こした事に起因する患者の死亡例に遭遇し、親子間生体肝移植の場合、HLA 検査（ホモザイゴートのドナーを除外するため）の重要性が確認された。現在、移植後 30 日目の患者末梢血に含まれる母の細胞の割合およびその細胞特性を検討している。

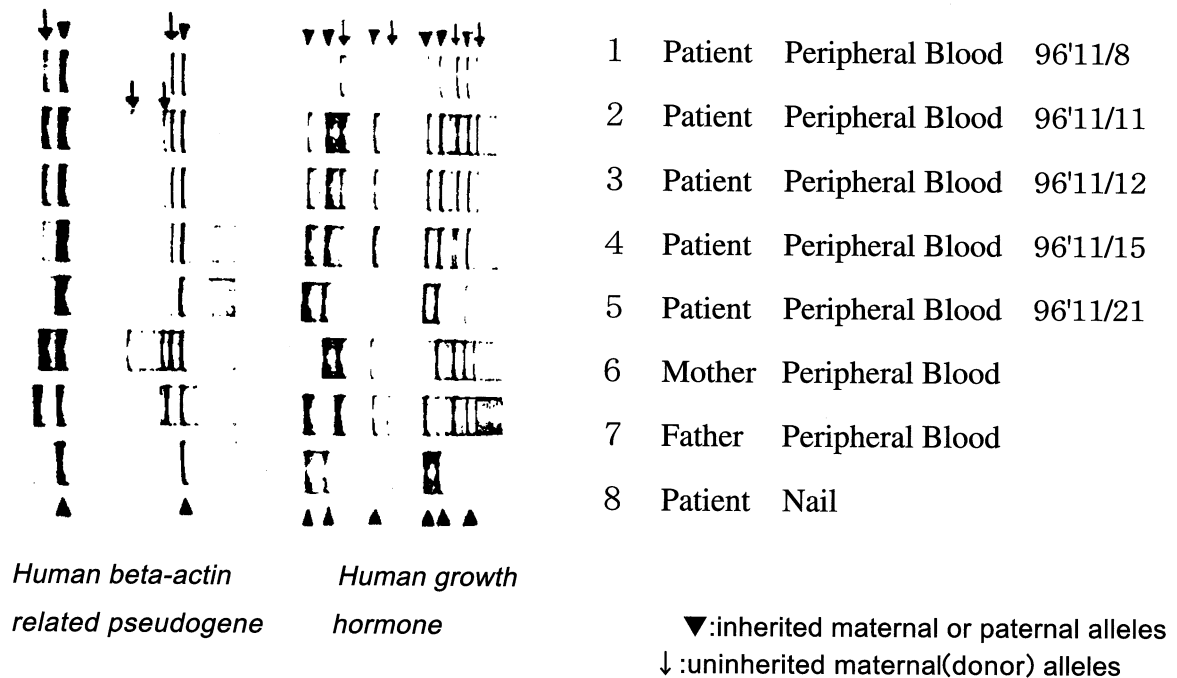


図 2. 患者家族のマイクロサテライト泳動パターン

一般演題

5. 3 種の抗 HLA-G および 2 種の抗 HLA-E モノクローナル抗体の特異性について

奈良県立医科大学, 法医学教室

下嶋 典子、石谷 昭子、長池 知恵子、Daniel E. Geraghty、羽竹 勝彦

はじめに

HLA-G および HLA-E は HLA クラス Ib 遺伝子のひとつであって、その構造はクラス Ia の conservative sequece と 70 ~ 80 % のホモロジーをもっているが、その多型性は著しく乏しいことが特徴である。

蛋白レベルでの発現については、HLA-G は母児間の接点である胎盤トロホブラストのみに発現していることが知られているが、HLA-E については報告はない。

我々はこれまでに、2 種の抗 HLA-G 抗体につい

て報告してきたが、今回新たに、1種の抗 HLA-G 抗体および2種の抗 HLA-E 抗体の生産に成功した。これにより HLA-G については、膜結合性抗原 (Gm) のみ、可溶性抗原 (Gs) のみ、および両者 (Gm+Gs) のそれぞれに反応する抗体を得たことになり、これらは HLA-G の発現や機能の解析に非常に有用な手段となると考えられる。また抗 HLA-E 抗体により、これまで膜上への発現が疑問視されていたこの抗原の発現と機能の解析を可能にするものと考えられる。これらの抗体の特性について詳しい解析を行った。

方法

抗体の作製：87G と oIG については $\beta 2$ -m と HLA-G 遺伝子を導入したマウス細胞で HLA-B 27 transgenic mice を免疫し、16G1 については Gs 蛋白の C 末端に位置する 20 アミノ酸 (第4イントロン) の配列をもつペプチドを合成し、これに KLH を結合したもので BALB/c マウスを免疫し、3D12 および 7G3 については HLA-A と HLA-G のハイブリッド細胞から得られた HLA-E 蛋白を W6/32 affinity column で精製したもので HLA-B 27 transgenic mice を免疫し、以下は定法に従って Hybridoma を作製し、抗体を得た。

特異性の検定：各抗体について、FACS, immunoprecipitation, sandwich ELISA, 免疫染色,

Western blot 等により特異性を調べた。ELISA には、抗 HLA class I 抗体 W6/32 と各抗体との組み合わせで、plate に第1抗体を結合させ、これに結合した抗原をビオチンラベルした第2抗体で検出した。この時、抗原としては affinity 精製した Gm および Gs 蛋白を用いた。免疫組織染色は Histofine SAB・PO キット (ニチレイ) を用いて行った。

結果

今回検討した5種の抗体の特性を表に示した。特異性の検定の結果、これら5種の抗体はすべて、他の HLA との cross reactivity はみられなかった。87G および oIG については、10th International workshop より得られた60種の cell line に対する microcytotoxicity test をも行き、いかなる HLA とも cross react しないことを確認した。また3種の抗 HLA-G 抗体については、ELISA および免疫組織染色により、oIG は Gm に、16G1 は Gs に、87G は Gm と Gs の両者と反応することが明らかとなった。

これらの抗体を用いて胎盤組織の免疫染色を行ったところ、Gm は母体脱落膜組織に侵入しつつある extravillous trophoblast にのみ発現し、Gs はあらゆる trophoblast に発現し、HLA-E の発現は、HLA-G よりは、一般に弱い。villous cytotrophoblast および syncytiotrophoblast に弱く、extravillous trophoblast に比較的強く発現していた。

Monoclonal antibodies

Monoclonal Antibodies	Specificity	Isotype	FACS	precip	ELISA	histology	western
87G	G (Gm+Gs), nc	IgG 2a	+	weak	Gs+Gm+	+	+
oIG	G (Gm), nc	IgG 2a	+	weak	Gm+	+	nt
16G1	G (Gs), nc	IgG1	nt	+	Gs+	+	+
3D12	E, nc	IgG1	+	+	nt	+	+
7G3	E, nc	IgG 2b	+	+	nt	+	+

nt, indicates not tested

nt, indicates no crossreactivity with tested HLA-A, -B and -C specificities

一般演題

6. 臍帯血バンクにおける組織適合性検査法について

京都府赤十字血液センター，研究部
丸屋 悦子，池田 忠明，仁田 浩，佐治 博夫，横山 繁樹

目的

近年白血病の治療法として非血縁間骨髄移植が普及し，日本においても骨髄バンクを介した非血縁間骨髄移植が1,000例に達しようとしている．移植成績も欧米の成績とほぼ同等の結果が得られている．非血縁間骨髄移植の場合，ドナーに与える負担は大きい．最近，幹細胞のソースとして臍帯血や末梢血幹細胞も使用可能であることが確認されている．これらの移植法はドナーに与える負担を多大に軽減し得る．臍帯血の場合さらに移植時期の制限からも開放され，患者の移植最適時期に移植できる利点がある．ただし採取量の確保が難しい場合や採取時期が不規則である欠点もある．臍帯血バンキングに不可欠な HLA 検査のための血液量（非血縁間骨髄移植の場合 10 ml の血液）を確保すれば，移植用の臍帯血量がバンクの基準量に満たなくなる場合や HLA 検査センターの営業時間に間に合わず検査不能となり，採取した臍帯血が登録できないことなどがある．このような短所を補う組織適合性検査法について検討した．

方法

—臍帯血（1 ml）からのリンパ球の分離法—

1. 臍帯血 1 ml に生理食塩水 1.5 ml 加える．
2. フィッシャーチューブに 0.5 ml のフィコールパックを入れ，1液を 0.5 ml 重層し，10,000 g，5 min 遠心する．
3. リンパ球層を新しいフィッシャーチューブに入れ，生理食塩水を入れ混合し，3,000 g，1min 遠心する．
4. 上清を除き，沈渣を 0.7 ml のパーコール 40 で一本のフィッシャーチューブにまとめる．
5. 0.2 ml の生理食塩水を重層し，3,000 g，1min 遠心する．
6. 上清をすべて除き，RPMI 溶液を 1 ml 入れ，や

さしく混和後 2,000 g，1min 遠心する．

7. 上清を除き，RPMI 1 ml に浮遊させ，細胞数を数え， $2 \sim 3 \times 10^6 / ml$ に調整する．

—臍帯からの DNA 分離法—

1. 臍帯血採取後，臍帯の一部（約 2～3 cm）を切除し，滅菌チューブに入れ採取場所より持ち帰り 4℃または -20℃に保存する．
2. シャーレに滅菌生理食塩水を満たし，臍帯（約 0.5 ml³に切る）を洗う．これを 3 回繰り返す．
3. エッペンドルフチューブ（2 ml）に臍帯を入れ DNA 抽出液（1×PCR buffer，0.5% Tween 20，protease K 0.05%）をチューブに満たし，56℃の恒温槽で一夜放置する．
4. フェノール・クロロフォルム抽出を 3 回行う．
5. エタノール沈殿により DNA を回収し，洗浄後乾燥し TE buffer（0.5 ml）で溶解する．

結果・考察

臍帯血 1 ml より約 3×10^6 個のリンパ球が得られる．現在まで 15 例の臍帯血を分離しているがリンパ球の収量はほぼ一定であり，HLA-class I typing には十分量であった．残りのリンパ球より DNA を抽出し，HLA-DRB1 allele typing を行うに十分量の DNA が得られた．小児の血液と同様に臍帯血中のリンパ球数は成人より多く，検査に必要とする血液量は 0.5～1 ml で十分であることが解った．臍帯からの DNA 分離は簡便で，約 5 ml³の臍帯からおよそ 30 μg の DNA が得られた．今後 HLA-class I の DNA typing が可能になれば臍帯の DNA で HLA 検査ができる．したがって検査用臍帯血の確保の必要もなくなり，検査時期も制限されず便利な臍帯血バンク組織適合性検査法となり得る．今後この方法で DNA の分離例数を増やし，各条件の最適性を確認する予定である．

一般演題

7. 血液直接 PCR 法による PCR-RFLP タイピングの検討

東海大学医学部, 分子生命科学系遺伝情報部門
島津製作所, 基盤技術研究所

成瀬 妙子, 猪子 英俊
西村 直行

PCR (polymerase chain reaction) 増幅に鋳型として用いる高分子 DNA は, 従来より, フェノール抽出法が一般的であったが, 抽出までに時間を要するため死体腎移植ドナー検索などには実用的ではない. 短時間で DNA を調製する方法として, salting-out 法や煮沸法などがあるがこれらは変性タンパクの混入が多いため, PCR 阻害物質の影響を受け, 増幅が困難な場合がある. そこで今回, 末梢血より DNA 抽出を行わず, 直接血液を添加して PCR 反応を行うことが可能な Ampdirect™ を用いて, PCR-RFLP 法による DNA タイピングを試みた.

10名の健常者より採取した ACD-A 加血液 1 μ l に, Ampdirect™ 5 μ l を添加し, dNTP, プライマー, Taq DNA ポリメラーゼを加えて, 全量を 50 μ l として 40 ~ 50 サイクルで PCR 反応を行ったところ, 全例に明瞭な増幅バンドが確認できた. 次にこの検体を用いて PCR-RFLP 法による DQA1, DQB1 遺伝子の DNA タイピングを行ったところ, 全例の対立遺伝子の特定が可能で, 他法にて精製を行った DNA を用いた場合と結果が一致した.

このことより, Ampdirect™ による血液直接 PCR 法は, 迅速, 簡便な DNA 精製法として期待できると思われた.