

第 15 回 近畿 HLA 研究会

会 期 : 1998 年 2 月 7 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 : 村田 紀和
 国立大阪南病院整形外科

一般演題

1. 慢性関節リウマチ患者に対する HLA-DRB1 遺伝子型から予測される手術療法

¹⁾ 戸田整形外科リウマチ科クリニック, ²⁾ 関西医科大学整形外科

戸田 佳孝¹⁾, 竹村 清介²⁾

要約

【目的】慢性関節リウマチ (以下、RA) 患者が膝関節の滑膜切除術, および人工関節置換術 (以下、TKA) を必要とする可能性の高い罹患年数を HLA-DRB1 遺伝子型から予測する。

【対象および方法】対象は RA 因子陽性の RA 患者 264 名である。平均罹患年数は 9.2 年であった。HLA-DRB1 遺伝子分類は、PCR-SSO 法で行った。その結果、ホモ接合体である症例を S/S 群, ヘテロ接合体を S/N 群, 感受性遺伝子を有しない症例を N/N 群と分類した。評価項目は、既往歴に膝関節滑膜切除術および TKA を受けた症例について、手術施行時の罹患年数を調査し、各遺伝子群別に比較した。

【結果】S/S 群の中で滑膜切除術を受けた患者は open synovectomy 4 例, 鏡視下 4 例の計 8 例 (15.1%) であった。S/N 群では open synovectomy 6 例, 鏡視下 4 例の計 10 例 (9.8%), N/N 群では open synovectomy 5 例, 鏡視下 5 例の計 10 例 (9.1%) が滑膜切除術を受けていた。TKA についても、S/S 群の 9 例 (17.0%), S/N 群の 17 例 (16.7%), N/N 群の 22 例 (20%) がこの手術を受けていた。滑膜切除群でも TKA 群でも手術を受けた患者の割合は 3 群間で有意差はなかった。滑膜切除術施行時の平均罹患年数は、S/S 群で 5.8 年, S/N 群で 6.3 年, N/N 群で 8.4 年と、3 群間で有意差はなかった。しかし、TKA を施行した平均罹患年数は、S/S 群で 5.2 年, S/N 群で 9.4 年, N/N 群では 12.6 年と、S/S 群では他の群に比べて、有意差が観察された。

【結論】本研究の結果から、我々は S/S 群の症例に臨床上 TKA を施行する適応が生じた場合には、時期を逃さず、TKA に踏み切るべきではないかと、結論した。

はじめに

過去に我々は、今回、慢性関節リウマチ (以下、RA) の中で両方の対立遺伝子に susceptible allele を有する患者では、それを一方の対立遺伝子のみ有す

る患者やそれを全く有しない患者に比べて骨破壊進行度が急速であると報告した(1)。

今回はこの遺伝子診断法が外科的な治療法の選択に応用可能であるか否かを検証する目的で、RA 患

者の膝関節の滑膜切除術および人工関節全置換術(以下, TKA)を必要とする可能性の高い罹患年数を HLA-DRB1 遺伝子型から予測する試みを retrospective に行った。

対象および方法

対象は, RA 因子陽性で 1987 年のアメリカリウマチ学会の診断基準を満たした RA 患者 264 名である(2)。HLA-DRB1 遺伝子検査は, 1995 年以前はシオノギバイオメディカル社に依頼し PCR-SSO 法を用いて, 1996 年以降は自己の研究室内で PCR-RFLP 法で行った(3)。

その結果, 脇谷らが RA 群で健常人より有意に高率である事を報告している HLA-DRB1*0405 および 0101 を susceptible alleles とし, それらの遺伝子のホモ接合体である症例を S/S 群 (0405 / 0405, 0405 / 0101, 0101 / 0101), ヘテロ接合体で

ある症例を S/N 群, susceptible alleles を有しない症例を N/N 群と分類した(4)。

264 例の膝関節の単純 X 線写真を Larsen の stage 分類を用いて, 6 段階に分類し, 各 stage に至る平均の罹患年数を S/S, S/N, N/N 群で比較した(5)。また, 3 群間で TKA や滑膜切除術を行った症例の割合やその平均罹患年数を比較した。

統計学的有意差検定には Mann-Whitney の U test を用いた(6)。

結果

264 例中, S/S 群は 52 例, S/N 群は 134 例, N/N 群は 78 例であった。中央値を用いた差の検定では 3 群間で性の分布, 年齢, 罹患年数, リウマチ因子ならびに CRP 値に有意差はなかった (P> 0.05), (Table 1)。

各 stage に至る罹患年数の中央値は, 例えば stage

Table 1. Patients characteristics and activities of inflammatory in each genotype

	Sex		Age		RA duration		CRP (mg/dl)		RAF (ID/dl)		Joint count *	
	male	female	mean	median	mean	median	mean	median	mean	median	mean	median
Total (n = 264)	47	216	55.9	56	9.2	9.0	3.6	1.5	217.8	56.2	39.6	28
S/S (n = 52)	11	41	56.3	56	8.7	8.0	4.7	3.8	256.2	62.4	56.7	40
S/n (n = 134)	25	109	56.4	56	9.8	9.0	3.3	1.9	219.5	57.3	37.2	27
N/N (n = 78)	12	66	54.9	57	8.4	8.5	2.2	0.6	189.4	52.4	32.3	18

Table 2. The distribution of the stage in each genotype

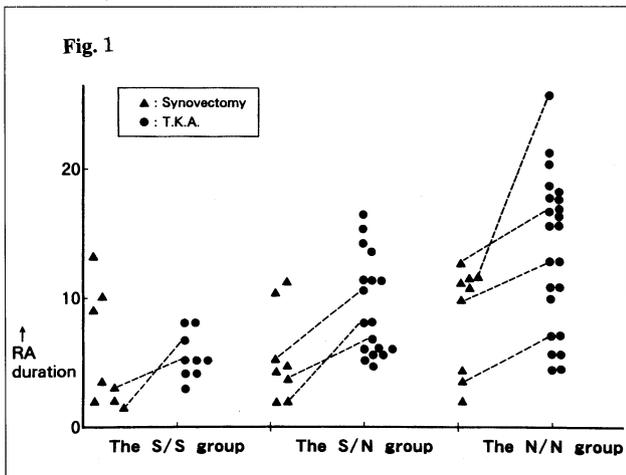
	n	stage 0			stage I			stage II			stage III			stage IV			stage V		
		(cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)	n (cases)	median (years)	mean (years)
all (n = 264)	27	1.0	1.7	94	3.0	6.0	52	5.0	7.9	23	12.0	12.6	57	16.0	14.6	10	24.5	26.0	
The S/S group (n = 52)	3	1.0	1.0	7	1.0	2.4	14	3.0	3.9	6	6.0	6.6	16	8.5	11.4	6	22.0	26.2	
The S/N group (n = 134)	9	1.0	1.2	52	3.0	6.1	28	5.5	8.9	10	10.0	17.0	30	17.5	15.5	4	24.0	22.3	
The N/N group (n = 78)	15	1.0	2.1	35	6.0	6.5	10	10.0	10.5	6	12.0	10.6	11	20.0	16.8	0	-	-	

IIはS/S群では3年であるのに対して、S/N群では5.5年、N/N群では10年と、S/S群ではS/N群やN/N群に比べて有意に短期であった(P<0.05)。同様の有意差はstage I, III, IVでも観察されたが、stage Vの場合、N/N群に属する症例が皆無であったため、有意な検定が行えなかった(Table 2)。

TKAを過去に受けた症例の割合はS/S群で15.7%、S/N群で18.8%、N/N群で10.2%であり、Mann-WhitneyのU-testでは3群間で有意差は観察されなかった。同じく、滑膜切除術(Synovectomy)を受けた患者の割合にも有意差はなかった。

滑膜切除術が施行された時の患者の平均罹患年数についてもS/S群では8.1年、S/N群では5.4年、N/N群では6.2年と3群間で有意差はなかった。

しかし、TKAを施行した平均罹患年数は、S/S群で5.2年、S/N群で9.4年、N/N群では12.6年と、S/S群では他の群に比べて、有意にTKA施行時罹患年数が短期であった(Fig. 1)。



考察

近年、人工関節の材質の発達によって、その耐久年数が伸びている。

Scuderiらによるとセメントを用いたTKAを施行した患者では術後12年以上経過しても優秀な治療成績を維持していたと、報告している(7)。

しかし、TKAは、患者にとってもそれを施行する医師にとってもRAの骨破壊進行の最終段階に行

うべき手術である事には、現在も変わりがなく、この手術を予防的に行う事は少ない。このため、今回の結果でも急速にRAの骨破壊が最終段階に達すると考えられるS/S群では、他の群に比べてTKAを施行した罹患年数が短期であった。

一方、RAに対する膝関節滑膜切除術の意義については、疼痛を抑制する効果が主であり、RA骨破壊進行に対する影響は明白ではないという意見が多数である(8~11)。従って、今回対象とした症例でも如何なるRAの骨破壊時期に滑膜切除術を行ったかは、各症例の経過およびそれを施行した施設により異なっていたと、予測される。そのため、TKAとは異なり、滑膜切除術を施行した症例数およびその時期とHLA-DRB1遺伝子型との関連性が明白とならなかったのではないかと、我々は考察した。

TKAを施行するべきタイミングを見きわめる事は非常に重要であり、その時期を逃すと、隣接関節の骨破壊が重症化しやすい。

Fig. 2



本研究の結果から、我々は S/S 群の症例に臨床
上 TKA を施行する適応が生じた場合には、時期を
逃さず、TKA に踏み切るべきであるとの、結論を
出した。

職人的要素の強い骨関節の外科治療の分野では、
遺伝子検査は一般に理解できない、また理解する気
もない存在として敬遠する医師が多い。しかし、今
後更に研究を進める事によって、遺伝子検査が適切
な時期に適切な手術を行う診断法の一つとして確立
される事を著者は(密かに)期待している (Fig. 2)。

参考文献

1. Toda Y, Minamikawa Y, Akagi S, *et al.* : Rheumatoid-susceptible alleles of HLA-DRB1 are genetically recessive to non-susceptible alleles in the progression of bone destruction in the wrist and fingers of patients with RA. *Ann. Rheum. Dis.* **53** : 587 - 592, 1994.
2. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, *et al.* : The American Rheumatism Association 1987. Revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **31** : 315 - 324, 1988.
3. Kaneshige H, Murayama T, Hirasawa M, Sada H, Amemiya H, Uchida K : Rapid and practical HLA class II genotyping by reverse dot blotting. *Transplant. Proc.* **25** : 194 - 198, 1993.
4. Wakitani S, Murata N, Toda Y, *et al.* : The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *Br. J. of Rheumatol.* **630** - 636, 1997.
5. Larsen A, Dale K, Eek M : Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference film. *Acta. Radiol. Dian.* **18** : 481 - 491, 1977.
6. Peto R, Pike MC, Armitage NE : Design analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis and examples. *Br. J. Cancer.* **35** : 1 - 39, 1977.
7. Scuderi GR, Insall JN, Windsor RE, Moran MC : Survivorship of cemented knee replacement. *J. Bone Joint Surg. [Br.]* **71** : 793 - 803, 1989.
8. Arthritis and Rheumatism Council and British Orthopaedic Association : Controlled trial of synovectomy of knee and metacarpophalangeal joint in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **35** : 437 - 442, 1976.
9. Arthritis Foundation Committee on Evaluation of synovectomy : Multicenter evaluation of synovectomy in treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **20** : 765 - 771, 1977.
10. Ochi T, Iwase R, Kimura T : Effect of early synovectomy on course of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **18** : 1794 - 98, 1991.
11. Tillmann K : Recent advances in the surgical treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Orthop.* **258** : 62 - 72, 1990.

Relationship between the disease duration performing knee joint surgery and HLA-DRB1 genotypes in patients with rheumatoid arthritis Yoshitaka Toda¹⁾

Seisuke Takemura²⁾

1) Toda Orthopedic Rheumatology Clinic

2) Dept of Orthopedic Surgery, Kansai Medical University

Key words :

Rheumatoid arthritis, Immunogenetics, Orthopedic Surgery

一般演題

4. 抗リン脂質抗体と HLA class II Ag の疾患感受性に附いての検討

¹⁾ 関西医大・第1内科, ²⁾ 同・輸血部

尾崎 吉郎¹⁾, 松崎 龍典²⁾, 香川 英生¹⁾, 野村 昌作^{1,2)}, 福原 資郎¹⁾

LAC 陽性患者 35 例, β_2 GP-I 非依存性 IgG-aCL Ab 陽性患者 21 例, β_2 GP-I 依存性 IgG-aCL Ab 陽性患者 14 例に対して, PCR-RFLP 法により HLA-DRB1・DQB1 の genotyping を実施した。

HLA-DRB1 との関連では LAC と *0901・*0803, β_2 GP-I 非依存性及び依存性 IgG-aCL Ab と *0803 との間に有意な相関関係を認めた。DQB1 との関連では LAC と *0303・*0601 との間に有意な相関関係が観察された。また DRB1 *0901・*0803 の allele を保有する患者がそれぞれ “TRAE LDT” を含む DQB1 *0303・*0601 を同時に保有する率は各々の haplotype の出現率と比較しても高い傾向があった。

Arnett 等は, HLA DQB1 の 71 ~ 77 番目のシークエンスに “TRAE LDT” というアミノ酸配列を持つ allele 群が, LAC との間に疾患感受性を持つと報告しているが, 日本人集団でもこれが当てはまると考えられ, “TRAE LDT” を含む allele 群の中でも DQB1 *0601・*0303 に強い関連があると考えられた。

日本人集団では, DRB1 *0803 / DQB1 *0601・DRB1 *0901 / DQB1 *0303 はともに強い連鎖不平衡を持つが, 抗リン脂質抗体は同時にこれらの allele を持つ個人に出現頻度が高く, あるいはこのハプロタイプに疾患感受性があるとも考えられた。

一般演題

6. サルコイドーシスの病体と HLA DQB1 DPB1

大阪簡易保険総合健診センター, 大阪府赤十字血液センター

立花 暉夫, 石井 博之, 松山 宣樹, 大谷 智司, 永尾 暢夫

目的、対象、方法

立花が長期経過追求中のサルコイドーシス（以下サ）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、得られた成績とサの病態との関連を、前回に続いて検討した。

(1) サの臨床経過との関連について。経過不良（初診後、5年以上サ病変長期持続）病例と経過良好（初診後、2年以内サ病変著明改善）症例について、HLA DRB1*0803-DQB1*0601 haplotype 頻度を比較検討した。なお、HLA DRB1*0803 および

HLA DQB1*0601 が経過不良例で経過良好例に比して高頻度な事は、立花が既に本研究会で報告した。

(2) サ経過不良と関連する ACE 遺伝子型（大阪大学老年病医学、檜垣他、Rigar 法で測定）DD, DI 陽性かつ上記 haplotype 陽性の頻度を上記 2 群で比較検討した。

(3) サの全身性病変の中で最も重要な心病変を有するサ症例（心サ症例）について HLA DQB1*0601 頻度を第 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。

(4) 英国サ症例で高頻度な、HLA DPB1 のアミノ酸 sequence 69 番目に Glutamine を有する (DP Glu 69) alleles の陽性頻度を、上記サ経過不良、良好 2 群で比較検討した。

結果

1. HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 haplotype 頻度および、同 haplotype 陽性かつ ACE 遺伝子型 DD, DI 陽性の頻度は、サ経過不良群で高頻度であった。
2. HLA DQB1* 0601 は、心サ症例では、健康人対照に比して高頻度であった。
3. HLA DPB1 Glu 69 alleles 頻度は、サ経過不良、良好 2 群間で著差を認めなかった。

表 1. HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 haplotype とサルコイドーシスの臨床経過

HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 haplotype 頻度	
経過良好例 (N=21)	7.1 %
経過不良例 (N=25)	22.0 %

表 2. HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 および ACE 遺伝子型 DD, DI 陽性とサルコイドーシスの臨床経過

HLA DRB1* 0803 -DQB1* 0601 & ACE 遺伝子型 DD, DI 陽性頻度	
経過良好症例 (N=30)	0 %
経過不良症例 (N=38)	26.3 %

表 3. HLA DQB1* 0601 とサルコイドーシス全身性病変

心サルコイドーシス症例 HLA DQB1* 0601	
(N=11)	63.6 %
健康人対照 (N=1216)	33.0 %
P=0.03	

表 4. HLA DPB1 Glu 69 とサルコイドーシスの臨床経過

HLA DPB1 Glu 69	
経過良好例 (N=23)	30.4 %
経過不良例 (N=27)	35.2 %

一般演題

8. MPHA 法のクロロキン処理による血小板上の MHC クラス I 抗原の不失活症例について

兵庫県赤十字血液センター¹⁾, 大阪府赤十字血液センター²⁾,
神戸市立中央市民病院免疫血液内科³⁾, 東京大学医学部附属病院輸血部⁴⁾

荒木 延夫¹⁾, 藤原 宝子¹⁾, 秋田 真哉¹⁾, 今栄 幸輝¹⁾, 合志 博司¹⁾,
能勢 義介¹⁾, 神前 昌敏¹⁾, 三戸 壽¹⁾, 谷上 純子²⁾, 永尾 暢夫²⁾,
平田 久美子³⁾, 石川 隆之³⁾, 柴田 洋一⁴⁾

目的

MPHA 法を用いて抗血小板特異抗体を検出する場合、血小板上の MHC クラス I 抗原を失活する目的としてクロロキン処理が一般的に使用されている。今回、我々はクロロキン処理後もクラス I 抗原が失活されずに残ったために抗血小板特異抗体と紛らわしい反応を示す症例に遭遇したので報告す

る。

症例

患者 OH は 39 才、MDS の男性で 50 単位以上の濃厚赤血球と血小板輸血により PTR に陥り、血清中に LCT 抗体価 256 ~ 4096 倍の抗 HLA 抗体 (multispecific) が検出された。また、MPHA 法を用

いてクロロキン処理パネル血小板で抗血小板特異抗体の存在を確認したところ、HPA-1~8, Nak^aそして, Va^a 抗原のいずれにも該当しない反応パターンを検出した(抗体価512倍)。また、患者血清を20種のプールリンパ球で吸収したところ、抗体価に変化は見られず未吸収の反応パターンと一致した。また、その患者血清の抗体価の推移は脾摘出前から摘出後49日までのLCT抗体価がほぼフラットなのに対し、MPHA法の抗体価は16倍に低下したことが観察された。以上のことから新たな特異性の抗血小板特異抗体と考えられたが、この抗体に反応する抗原頻度が40.1%にかかわらず、8名のHLA適合血小板ドナー〔LCT(-), AHG-LCT(-)〕と患者血清の反応がMPHA法ですべて陰性を示したことより、以下の精査を実施した。MPHA法で反応するパネルのリンパ球で患者血清(100倍希

釈済)を吸収したところ、MPHA法の反応性は消失した。また、MPHA法を用いて既知HLA抗原クロロキン処理血小板パネルで反応性を確認したところHLA-A11の特異性を示し、既知HLA抗原クロロキン処理血小板抽出抗原パネルでの結果はHLA-A11+A31の特異性を示した。

考察

本症例のように抗HLA抗体が抗血小板特異抗体と紛らわしい反応を示すことがあるので、抗血小板特異抗体スクリーニング用クロロキン処理パネルやpopulation studyパネルは既知HLA抗原パネルを用いることは必須であると考えられる。また、血小板上のHLA-A11抗原はクロロキンで失活されにくいと考えられるが更に検討が必要である。

一般演題

9. 血小板上のHLA-A11抗原のクロロキン処理による失活性について

兵庫県赤十字血液センター¹⁾, 京都大学医学部附属病院輸血部²⁾

荒木 延夫^{1,2)}, 秋田 真哉¹⁾, 藤原 宝子¹⁾, 今榮 幸輝¹⁾, 合志 博司¹⁾,
神前 昌敏¹⁾, 三戸 壽¹⁾, 伊藤 和彦²⁾

目的

MPHA法において抗HLA抗体と抗血小板特異抗体を鑑別する場合、血小板上のMHCクラスI抗原を失活する目的としてクロロキン処理が一般的に使用されている。既に、我々はクロロキン処理後もクラスI抗原が失活されずに残ったために抗血小板特異抗体と紛らわしい反応を示す症例を先の演題にて報告したが、その原因抗体は抗HLA-A11であった。そこで、同様のHLA特異性抗体例について検討したので報告する。

方法

MPHA法に用いるクロロキン処理血小板固相プレートは各穴に 5×10^6 コずつ血小板を固相後、

0.8Mのクロロキン溶液で22℃、一晚処理して作製した。MPHA法による抗体の検出方法は、血小板と抗血清の反応を22℃2時間行い、指示血球との反応は22℃、一晚で行った。抗血清は頻回血小板輸血患者の上記症例のOH(multispecific)そして、KT(A11+A26+A31+A33), AY(A11+A26+A33), US(A11+A31+A33)の4種、経産婦由来血清が37-308(A3+A11), 37-274(A1+A11+A26)の2種の計6種を用いた。

結果

抗 HLA-A 11 関連抗体の 5 法による抗体価測定

血清No.	LCT	抗体価 (倍)		MPHA 処理	
		AHG-LCT		未処理	処理
		κ	λ		
OH *	512	2048	2048	65536 ↑	陰性
OH**	4096	16384	16384	65536 ↑	512
KT**	陰性	64	32	not tested	1024
AY**	2	64	32	not tested	128
US**	4	8	16	8	陰性
37-308**	64	128	128	陰性	陰性
37-274**	4	16	16	8	陰性

血小板, リンパ球は同一ドナーを使用

(*: HLA-A 2, 24, B 35, B 59, Cw 1, Cw 9 ;

** : HLA-A 11, 24, B 62, B-, Cw 4, Cw 9 のパネル抗原を使用)

考察

HLA-A 11 関連抗体 6 種中 3 種がクロロキン処理 A 11 陽性血小板パネルに陽性を示し, 特に KT は LCT 陰性, AHG-LCT 64 倍の低力価抗体にかかわらず, MPFA 法で高力価を観察した. 血小板

上の A 11 抗原のエピトープはクロロキン処理で失活するものとされにくいものが存在し, また血小板上に発現していないものもあり, 今後の検討が必要であると考え.

一般演題

10. 羊水中の可溶性 HLA-G 抗原の検出

奈良県立医科大学法医学教室, Fred Hutchinson Cancer Research Center*

下嶋 典子, 石谷 昭子, 川崎 明彦, 安藤 稔, 増田 知恵子,
Daniel E. Geraghty*, 羽竹 勝彦

はじめに

HLA-G は, 蛋白としての発現が母体と胎児の接点である胎盤トロホプラストのみに発現され, 膜結合性抗原と可溶性抗原の 2 種が存在するという事は, これまでに報告してきた. HLA-G は胎児を母体の alloreaction から保護する役割を保っているものと推測され, HLA-G と妊娠中毒症 (preeclampsia) や習慣性流産との関連が注目されている. 最近, Fujii ら (Am J Reprod Immunol, 1996) は, 妊娠中毒症患者の extravillous trophoblast (cytotrophoblastic shell cells) において, 膜結合性 HLA-G 抗原の発現が低下しているという報告している. 我々は, 可溶性 HLA-G 抗原の発現と疾患の関連の検討を目的として, これら HLA-G に対する抗体, すなわち, 可溶性抗原のみと反応する抗体 (16 G 1), および膜

結合性抗原と可溶性抗原の両者に反応する抗体 (87 G) を作製し, これらを用いた sandwich ELISA により, 可溶性抗原を検出する方法を検討してきた. 今回, これを用いて羊水中に可溶性抗原を検出し得たので報告する.

方法

抗体の作製: 87 G 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 57 transgenic mice を免疫し, 16 G 1 については, 可溶性抗原蛋白の 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, 以下は定法に従って Hybridoma を作製し, 抗体を得た.

蛋白濃度の測定：Bio-Rad protein assay kit により測定した。

sandwich ELISA：可溶性抗原を認識する抗体 16 G1 あるいは 87 G をプレートと結合させた後、サンプルを反応させ、これをビオチン化した W6/32 (抗class I 抗体)、Streptavidin- β -Galactosidase Conjugate (GIBCO BRL)、4-methylumbelliferyl- β -D-galactoside (Sigma) の検出系を用い、この蛍光を CytoFluorTM 2300 Fluorescence Measurement System で Ex/Em=360/460 により測定した。可溶性抗原の検量線は affinity 精製した可溶性抗原を用いて作製した。

サンプル：羊水は、19～38週の羊水を3000g、10分遠心し、その上清を用いた。サンプルは測定時まで、-80℃で凍結保存した。

結果

我々は、これまでに、可溶性 HLA-G 抗原の測定法の検討を重ね、妊婦血清中の可溶性抗原の測定を試みてきたが、いまだ成功し得ていない。これは、一つに血清中の何らかの反応阻害物質が存在するためか、あるいは妊婦血清中の可溶性抗原量が測定感度以下であるためか、明らかではない。今回、血清よりも蛋白量の少ない、羊水中の可溶性 HLA-G 抗原の測定を行った結果、羊水中に、可溶性抗原の存在は認められたが、全ての羊水サンプルから可溶性抗原が検出されたわけではなかった。今後さらに可溶性抗原の測定法の改良を重ねていくと共に、疾患と HLA-G の関連を検討していく予定である。

一般演題

11. HLA-G の多型性について

奈良県立医科大学法医学教室, 鹿児島大学医学部ウィルス学教室*

岸田 学, 石谷 昭子, 下嶋 典子, 増田 知恵子, 園田 俊郎*, 羽竹 勝彦

はじめに

HLA-G は HLA class Ib 遺伝子の一つであり、多型性が極めて乏しいことが知られている。HLA-G は蛋白質レベルの発現は人体組織中、胎児と母体の接点である胎盤トロホブラストにのみ見られることから、その機能は妊娠中の免疫機構に関連していると考えられ、注目されてきた。胎盤トロホブラストには、多型性に富む HLA-A,-B,-C (class I a) や DP,-DQ,-DR (class II) は発現しておらず、多型性の乏しい HLA-G のみが発現していると考えられている。母体の T 細胞, NK 細胞に接する胎児細胞のトロホブラストには多型性のほとんどない HLA-G のみが発現していることにより、母体免疫細胞はこれらの胎児細胞を“他”とは認識せず拒絶反応を起こさないと考えられている。山下らは日本人における HLA-G の多型を調べ、110 番目のアミノ酸 1ヶ所において Leu が Ile に変化した allele が約 40% 存

在するのみであると報告しており、上記の HLA-G の機能に関する推論を裏付けている。ところが近年、van der Ven と Ober は、African American においては、exon 3 において、24 種もの nonsynonymous な変異が存在すると報告した。もし、事実このように多型に富んでいるならば、どうして母体 T 細胞は、allo 反応を引き起こさないのだろうか。そこで我々は、この疑問を解くべく、彼らと同様に African American およびアフリカ人 (ガーナ) そして日本人について、HLA-G の多型性を再検討した。

方法および材料

日本人 34 名, アフリカ人 (ガーナ) 32 名, African American 38 名より得た genomic DNA について、HLA-G 遺伝子の exon 3 部分を PCR 増幅した。この時 primer は山下らおよび Ober らの用いたものと同じものを使用した。その PCR 産物を ABI

PRISM 310 Genetic Analyzer によって dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を使用し、Direct sequence を行った。

結果

結果は表に示すとおりである。日本人のサンプル

に関して、山下らの報告とほぼ同様の結果を得ることができた。アフリカ人と African American には 130 番目の codon に Cytosine 欠失があるが、日本人にはこの多型は見られない。African American はアフリカ人より多型の頻度は高いものの、Ober らの報告したような多型は検出されなかった。

Polymorphism				Frequency(%)		
allele	codon	nucleotide change	amino acid change	Japanese	African American	Ghana
*01011	—	—	—	39.7	69.8	84.3
*01012	93	CAC⇒CAT	—	16.2	6.6	1.6
*01013	107	GGA⇒GGT	—	5.9	2.6	0
*0104	110	CTC⇒ATC	Leu→Ile	38.2	11.8	7.8
*0105N	93	CAC⇒CAT	—	0	9.2	6.3
	130	CTG⇒__TG	frameshift			

Total number of samples is 34 for Japanese, 38 for African American and 32 for Ghana population.

一般演題

12. 近畿臍帯血バンクの現状

兵庫医科大学輸血部¹⁾、奈良県立医科大学輸血部²⁾、関西医科大学小児科³⁾、京都府赤十字血液センター⁴⁾、京都府立医科大学衛生学教室⁵⁾、大阪府立母子保健医療センター⁶⁾、大阪市立総合医療センター⁷⁾

谷脇 清助¹⁾、前田 和宏¹⁾、藤林 由佳¹⁾、甲斐 俊朗¹⁾、原 弘¹⁾、下山 丈人²⁾、藤村 吉博²⁾、緒方 肇³⁾、沖 学⁴⁾、仁田 浩⁴⁾、横山 繁樹⁴⁾、園田 精昭⁵⁾、河 敬世⁶⁾、迫 正廣⁷⁾

目的

近年、小児を中心とした臍帯血中の造血幹細胞を用いた同胞間幹細胞移植が日本においても平成9年10月末現在、同胞間17例、非血縁者間9例の臍

帯血幹細胞移植が行われている。また近畿臍帯血バンクが平成7年11月に設立され、臍帯血中の幹細胞の保存が開始されたのでその現状と利用状況について報告する。

方法

近畿臍帯血バンクで採取，凍結保存が行われている施設は奈良県立医科大学輸血部，関西医科大学小児科，京都府赤十字血液センター，京都府立医科大学衛生学教室，兵庫医科大学輸血部の5施設と，その関連病院である。

結果

平成10年1月20日までに5施設で保存され近畿臍帯血バンクに登録されている臍帯血標本は272標本である。臍帯血標本のバンク登録には分娩情報，臍帯血情報，母体情報，新生児情報などが記録された臍帯血登録票，家族歴調査票，新生児の6か月調査票，同意書などが揃っており，正常な臍帯血標本に限られている。

凍結保存されている272標本の内容量は，採取量で74.5 ml（最少50～最大164 ml），有核細胞数は 7.25×10^8 （最小 $1.1 \sim$ 最大 26.4×10^8 ），また 10×10^8 以上の細胞数がある臍帯血標本は14%（39標本）にみられた。CFU-GMは 6.3×10^5 （最小 $0.5 \sim$ 最大 38.9×10^5 ），CD34陽性細胞は 33.4×10^5 （最小 $1.1 \sim$ 最大 306.5×10^5 ）であった。

平成9年6月より近畿臍帯血バンクにおいても患者登録を開始した。患者登録の手続きは近畿臍帯血バンク事務局に臍帯血検査依頼書で申し込み，評価委員会の審査を得たのちHLA typeの検索を行っている。登録患者36例と臍帯血272標本のHLA type

との一致率は完全一致3症例（8.3%），1 locus mismatchまで範囲を広げると10症例（27.8%）あり，少ない臍帯血標本でも一致率は高くなっている。近畿臍帯血バンクでは1例目（完全一致）が平成9年9月に行われ，平成10年2月に2例目（1 locus mismatch），更に3月にもう1例予定されている。

考察

現在，臍帯血標本のHLA-A,B,C locus検査は血清学的，DRの結果はDNA allele typeで登録しているが検索はDR locusで行っている。HLA検査時の問題としてA,B,C locusは各施設毎に独自のトレーで細胞毒試験により検査が行われており若干検査データに差が出ているので，今後は統一トレーによる検査システムが必要である。また採取されてから検査までに時間のかかる場合も多く，判定に困難な臍帯血標本もみられる。

臍帯血バンクは，まだ始まったばかりであり経済的な問題，保険適応など多くの問題を抱えている。今後，早急に骨髄移植と同じく保険適応による検査，採取，凍結保存費用の負担軽減が必要である。

現在，各施設の倫理委員会で承認され，近畿臍帯血バンクで認められている移植可能な施設は，大阪府立母子総合医療センター小児科，大阪府立総合医療センター小児科の2施設で，今後保険適応となれば多くの施設で移植が行われる可能性がある。