

第16回 近畿HLA研究会

開催日 : 1999年2月13日 土曜日

会 場 : 三和化学研究所 大阪メディカルホール

- | | | |
|--|----------------------|-------|
| 1. HLA-DNA Typing の戦略 | 京都府赤十字血液センター | 丸屋 悦子 |
| 2. HLA-DO 遺伝子の多型性解析とその意義 | 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門 | 成瀬 妙子 |
| 3. PCR-MPH法によるHLAのDNAタイピング | 湧永製薬創業研究所 | 川井信太郎 |
| 4. 日本人のSBT(Sequence-Based Typing)によるHLA-A locus allele typing
ー近畿HLA研究会ワーキンググループ活動報告ー京都府赤十字血液センター | | 丸屋 悦子 |
| 5. 臍帯を用いたMHCクラス I、クラス II のDNAタイピング | 兵庫県赤十字血液センター | 荒木 延夫 |
| 6. HLA-Gの胎盤における発現について | 奈良県立医科大学法医学教室 | 下鴨 典子 |
| 7. 日本人におけるHLA-Gの多型性について | 奈良県立医科大学法医学教室 | 川崎 明彦 |
| 8. HLA抗体によるNAIT | 大阪府赤十字血液センター | 永尾 暢夫 |
| 9. HLA-A2の肺癌患者における臨床的意義 | 関西医科大学第一内科 | 吉村 千恵 |
| 10. 小児期発症IDDM患者におけるHLA-クラス II 遺伝子の疾患感受性の検討
ー特に日本人IDDMとDPB1*0201との関連についてー | 大阪市立大学医学部小児科 | 西牧 謙吾 |
| 11. 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) に対する各種治療効果とHLA-DRB1アレルに関する検討 | 関西医科大学第一内科 | 野村 昌作 |

HLA-DNA Typingの戦略

京都府赤十字血液センター 丸屋悦子、佐治博夫

目的 ゲノムDNAを用いたHLAアレルタイピングは臨床医学（特に造血細胞移植でのマッチング）や免疫に関する研究分野では必須である。我々の研究室ではHLA-class I、IIの DNA allele typingを実施しながら、できる限り精度が高く、簡便・迅速・省力化・低コストな方法を模索している。当実験室で用いているHLA-class Iアレルタイピング法の戦略を紹介し、戦術として用いたキットの使用経験を紹介する。

方法 タイピングの技術的戦略

- ◆ 試薬の精度管理を均一化するため市販キットを使用する。
- ◆ 既存のアレルと無限に増加しうるアレルを

99%以上の精度で判定可能とするため、検出原理の使い分けを行う。

キット選択の条件：各ステップの必要条件

- ① DNA増幅：増幅がシンプルで容易である
- ② アレル検出：
 - A)操作が簡単
 - B)特殊な機械を必要としない
 - C)少数サンプルでも多数サンプルでも対応可能
 - D)検出系が単純で効率の良いもの
 - E)迅速なトラブルシューティングへの対応が可能
- ③ アレルデータ判定：操作が簡便で、人為的

ミスが軽減可能な判定システム

- ④ 最低限のトータルコスト：再現性が良く、再検・追加検査を最小限にとどめる。

検定キットと主な使用目的

1. MPH法によるHLA-A・B low resolution typing kit：既存のHLA抗原のタイピングに対応
2. SBT法によるHLA-A allele typing kit：無限に増加する未知アリのタイピングに対応

結果および考察 MPH法は主に既存アリのタイピングに、SBT法は未知アリのタイピングおよび既存アリのより精度の高い確認検査に用いることを目的とし検定した。SBT法についての結果は近畿HLA研究会ワーキンググループの活動報告で行う。

MPH法によるHLA-A・B typingについて：HLA-allele既知（おもにTerasakiのDNA exchange programに提出された）DNAを用い、HLA-AおよびB low

resolution typing kitの検定を行った。HLA-A kitについて19種のHLA-A抗原を用いタイプした。DNAの増幅および抗原の検出に問題なく良好な結果が得られた。HLA-B kitについて日本人に存在する20種の抗原について検定した。DNAの増幅について、増幅困難な場合があった。特にHLA-B61をもつヘテロ接合体の場合、相手側の抗原の種類（B7）によりB61の増幅不良が見られた。その他のHLA-B抗原については問題なく検出できた。この方法は我々のキット選択条件のほとんどを満足させる条件を整えていると考えられるが、HLA-B抗原増幅法の改良とHLA-C抗原 kitの開発が待たれる。またDNAを用いたHLAタイピングで結果がホモ接合体であった場合、DNAのアリによる増幅不良がないか考えてみる必要がある。

HLA-DO遺伝子の多型性解析とその意義

東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
小田原市立病院眼科
大阪市立大学医学部臨床検査

成瀬 妙子、河田 寿子、安西 達也、猪子英俊
鍵谷 雅彦
巽 典之

HLA-DO遺伝子は、1985年に発見されて以来、機能不明のクラスII様遺伝子とされてきたが、最近、DOBとその近傍に位置するDOA(DNAより改名)遺伝子がヘテロダイマーを形成し、クラスII抗原提示機構において、HLA-DM-DO複合体としてDM分子の抗原ペプチド結合能を制御している可能性が報告された。そこで今回はHLA-DOAと-DOB遺伝子について多型性解析を行った。材料は、第10回国際組織適合性会議での公認細胞及び独自に確立したHLA-D抗原ホモ接合体細胞37種より抽出したDNAを用いた。方法は、HLA-DOA遺伝子の第2エキソンから第5エキソンを、-DOB遺伝子の第2エキソンから第6エキソンを、それぞれイントロン部より設定したプライマーにてPCR増幅し、蛍光自動シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した。

結果、DOA遺伝子では8種の対立遺伝子の存在がみいだされ、新たに公認されたが、これからはすべて同義置変であった。DOB遺伝子においても5種の対立遺伝子が新たに見いだされたが、第4エキソンのコドン208が、LeuからPheへのアミノ酸置換を伴う多型が検出された以外は同義置換であった。今回の結果により、HLA-DO遺伝子は他のクラスII遺伝子と同様の構造をとりながら、極めて多型性に乏しいという、特徴的な結果を示した。DO遺伝子はマウス、ラット、ラビット、ウシなどをはじめとする哺乳類にその存在が認められており、相同性が高いことが報告されている。このことからDO遺伝子を構成するアミノ酸配列は、DO-DM複合体、さらには抗原提示機能に重要な役割をになっているが故に淘汰され、保存されていると推測された。

PCR-MPH法によるHLAのDNAタイピング

湧永製薬・創薬研究所
東大・医・人類遺伝
日赤中央血液センター

川井信太郎、松見達也、青池正貴、宮城徹、山根明男
徳永勝士
柏瀬貢一、赤座達也、十字猛夫

目的 一度に多検体処理が可能なHLAのDNAタイピング方法として我々はPCR-MPH法を開発し、既にクラスⅡ遺伝子のタイピングに使用している。PCR-MPH法は、ELISAを利用した方法である。ビオチン標識したプライマーで目的の遺伝子を増幅し、96穴のマイクロプレートに予め固定してあるプローブとハイブリダイズさせる。このハイブリダイズした増幅物を発色反応により検出するものである。今回、主に日本人を対象とした本方法を用いたクラスⅠ、特にA及びB抗原の血清学的タイピングレベル（low resolution）のタイピングを検討した。また、クラスⅠ抗原のなかで血清学的にタイピングが困難なアリルに分かれるB15、B16、B5、及びB40抗原のアリルタイピングキット（high resolution）についてもあわせて検討した。

方法 目的とする抗原を各抗原に特異的なプライマーを用いて、PCR増幅した。また、A抗原では16プローブ、B抗原では21プローブ、B15抗原では12プローブ、B16抗原では11プローブ、B5抗原では8プローブ、B40抗原では8プローブがそれぞれ固定されたプレートを使用した。クラスⅠに関するPCR条件は全て共通であり、MPHの条件及び操作はクラスⅡ遺伝子のタイピングのものと全く同じで

ある。

結果 PCR-MPH法後、ウエルの発色パターンをコンピュータを用いた自動判定プログラムにより判定した。得られたA及びB抗原のタイピング結果は血清学的タイピング法の結果と一致した。また、high resolutionの自動判定の結果もPCR-SSP法或いはPCR-SBT法の結果と一致した。

考察 クラスⅡ遺伝子のタイピングに加えて、PCR-MPH法によるA及びB抗原のDNAタイピングが可能になった。本方法ではPCR反応の時間を含めて約4.5時間でタイピングができる。尚、本キットは組替え可能なマイクロプレートを使用しているので大量検体だけでなく1、2検体といった少数検体にも十分対応できる。また、さらに従来の血清学的タイピング方法ではタイピングできなかったB15、B16、B5及びB40抗原のアリルタイピングも可能となった。クラスⅠとクラスⅡのタイピングの際のMPHの条件は全て共通であり、クラスⅠとクラスⅡ間で条件が異なるPCRさえ行なっていれば同時にタイピングが可能である。この様にPCR-MPH法はHLAのタイピングを行う上で有用な方法であると思われる。

日本人のSBT (Sequencing-Based Typing) による HLA-A locus allele typing

—近畿HLA研究会ワーキンググループ活動報告—

京都府赤十字血液センター
京都府立医科大学附属病院腎移植センター
近畿大学附属病院輸血部
兵庫医科大学病院輸血部
大阪府赤十字血液センター

丸屋悦子、山岡正暢、北村后代、内藤早織、佐治博夫
渡部清子
金光 靖
国分寺 晃
福森泰雄、石井博之
晒 稔雅

PEバイオシステムズジャパンKK フィールドアプリケーションDNAラボ

目的

最近の移植医療、特に非血縁間骨髄移植や臍帯血移植の分野でHLA-class I DNA typingは必須事項である。HLAのallele数はDNAを用いたタイピング法の確立以来、日々増加の一途をたどっている。このような現状を踏まえ、近畿HLA研究会ワーキンググループの活動として、原理的にすべてのアリルがタイピング可能な検査法である核酸の塩基配列を直接決定して行うtyping法 (SBT) のウェットワークショップを実施した。HLA-A locus SBT typingにおける日本人の特徴をみいだしたので報告する。

材料・方法

DNA sample: 9種のHLA型既知 DNA {分離法; フェノールクロロホルム法 (7)、チオシアン酸グアニジン法 (1)、ビーズ法 (1)} を用いた。

方法: PE バイオシステムズジャパン社の Class I HLA-A Sequencing-Based Typing System kitとABI PRISM 377 DNA Sequencerを用いシーケンスし、Match Maker ソフトウェアでアリル解析と判定を行った。

結果および考察

3施設より提供された3種のDNA (血清学での

HLA-A抗原: A2/A11、A2/A24、A24/A31) と、コントロールとしてPEバイオシステムズジャパンより提供された1種のDNA (A*0301/A*0301) を用いた。判定されたHLA-A alleleはA*0201/1101、A0206/2402、A2402/31012、0301/0301の4種であった。判定する過程でA*0201/1101以外は問題なく容易に型判定できた。A*0201/1101は418bpと559bpおよび560bpでForwardとReverseのシーケンスデータに不一致 (片方のデータは2種の塩基を保有するが、他方の塩基では単一の塩基と判定) が生じた。この現象がサンプルによるか又はalleleの組合せに起因するのかを検討するため、A*0201/1101型のDNA、5種を追加した。全6種のDNAが同一のpositionで同じ結果が得られた。SBT法でheterozygote alleleを直接タイピングする場合、組み合わされるallele (例えばA*0201とA*1101) によりこのような現象が見られ、判定を困難にする場合がある。alleleの多型性は人種により違うため、日本人に比較的高頻度に出現するalleleの組合せが示すSBTでのこのような特徴を理解しておくことにより、正確なSBT typingができる。

臍帯を用いたMHCクラス I、クラス IIのDNAタイピング

兵庫県赤十字血液センター

兵庫医科大学輸血部

荒木延夫、秋田真哉、今榮幸輝、合志博司、能勢義介

神前昌敏、三戸 壽

藤林由佳、原 宏

目的

最近、臍帯血は造血幹細胞の供給源として注目され、本邦においては9カ所の臍帯血バンクが設立されている。このような状況下において、血液センターの協力の役割の一つとしてHLAタイピングがある。我々は臍帯血バンキングに不可欠のHLAタイピング検査用臍帯血の消費量を少なくする試みとして、第20回日本造血細胞移植学会 (1997年) にTCGFによる微量臍帯血からのHLAタイピングを報告した。今回、その方法以外に臍帯よりDNAを抽出し、MHCクラス I、クラス IIのDNAタイピングを実施したので報告する。

方法

臍帯はDNAの抽出まで-20℃の冷凍庫に保存した。DNAの抽出は図1に示す方法で実施した。

- 臍帯1cmをハサミで細切
- O. 5%SDSとO. 5N-NaClの混合液で洗浄
- DDWで洗浄
- proteinaseKを含むフォローイングバッファーで56℃一晩インキュベート
- DNA抽出キット (チオシアン酸グアニジン法) で抽出 (約1時間)

図1 臍帯からのDNA抽出法

MHCクラスⅠ、クラスⅡのDNAタイピングはワンラムダ社のマイクロSSPを用いた。

結果

図2、図3に示すように臍帯血由来リンパ球、TCGF培養細胞、臍帯のMHCクラスⅠ、クラスⅡのDNAタイピング結果は100%一致した。

考察

現在、臍帯血バンクにおいては、臍帯血移植前の臍帯血のHLAタイピングの再検査（確認検査）用に有核細胞を凍結保存している。しかし、本来処分される臍帯そのものを凍結保存しておくことにより、その代用品となり得、再検査用の有核細胞がすべて移植に供されることとなる。

臍帯血リンパ球(CBL)						TCGF培養細胞					
	A	B	Cw	DR	DQ		A	B	Cw	DR	DQ
CB1	2, 31	35, 56	4, -	15, 9	6, 9		2, 31	35, 56	4, -	15, 9	6, 9
CB2	2, 24	35, 54	1, 9	4, 8	4, 6		2, 24	35, 54	1, 9	4, 8	4, 6
CB3	2, 11, 1	46, 67	1, 7	15, 8	6, -		2, 11, 1	46, 67	1, 7	15, 8	6, -
CB4	nt	nt	nt	4, -	4, 8		24, 26	51, 61	9, -	4, -	4, 8
CB5	24, 11, 1	51, 62	9, -	11, 14	7, -		24, 11, 1	51, 62	9, -	11, 14	7, -
CB6	24, -	52, -	-	15, -	6, -		24, -	52, -	-	15, -	6, -
CB7	2, 24	39, 52	7, -	15, 9	6, 9		2, 24	39, 52	7, -	15, 9	6, 9
CB8	2, 33	44, 62	1, -	11, 13	6, 7		2, 33	44, 62	1, -	11, 13	6, 7
CB9	24, 33	44, 52	-	15, 14	5, 6		24, 33	44, 52	-	15, 14	5, 6
CB10	nt	nt	nt	15, -	6, -		2, 24	61, 62	1, 10	15, -	6, -
CB11	nt	nt	nt	13, 14	5, 6		26, 33	44, 61	10, -	13, 14	5, 6

	A	B	Cw	DR		A	B	Cw	DR
CB12	24, -	52, 54	1, -	2, -		24, -	52, 54	1, -	2, -
CB13	24, 26	7, 61	7, -	1, 9		24, 26	7, 61	7, -	1, 9
CB14	24, -	7, 54	1, 7	1, 4		24, -	7, 54	1, 7	1, 4
CB15	2, 26	54, 62	1, 3	2, 2		2, 26	54, 62	1, 3	2, 2
CB16	24, -	51, 53	3, 4	3, 4		24, -	51, 53	3, 4	3, 4
CB17	3, 24	7, 59	1, 7	4, -		3, 24	7, 59	1, 7	4, -
CB18	11, -	39, 55	3, 7	4, -		11, -	39, 55	3, 7	4, -
CB19	24, -	52, 54	1, -	15, 9		24, -	52, 54	1, -	15, 9
CB20	24, 33	7, 46	1, 7	1, 8		24, 33	7, 46	1, 7	1, 8

CBL, TCGF培養細胞: HLA-ABC(LCT), DR, DQ(PCR-SSP; CB1~CB11), DR(PCR-MPH, CB12~CB20)

図2 CBLとTCGF培養細胞のHLAタイピング

臍帯血リンパ球(CBL)						臍帯					
	A	B	Cw	DR	DQ		A	B	Cw	DR	DQ
CB1	2, 31	35, 56	4, -	15, 9	6, 9		2, 31	35, 56	4, 8	15, 9	6, 9
CB2	2, 24	35, 54	1, 9	4, 8	4, 6		2, 24	35, 54	1, 9	4, 8	4, 6
CB3	2, 11, 1	46, 67	1, 7	15, 8	6, -		2, 11	46, 67	1, 7	15, 8	6, -
CB4	nt	nt	nt	4, -	4, 8		24, 26	51, 61	9, -	4, -	4, 8
CB5	24, 11, 1	51, 62	9, -	11, 14	7, -		24, 11	51, 62	9, 8	11, 14	7, -
CB6	24, -	52, -	-	15, -	6, -		24, -	52, -	12, -	15, -	6, -
CB7	2, 24	39, 52	7, -	15, 9	6, 9		2, 24	39, 52	7, 12	15, 9	6, 9
CB8	2, 33	44, 62	1, -	11, 13	6, 7		2, 33	44, 62	1, 14	11, 13	6, 7
CB9	24, 33	44, 52	-	15, 14	5, 6		24, 33	44, 52	12, 14	15, 14	5, 6
CB10	nt	nt	nt	15, -	6, -		2, 24	61, 62	1, 10	15, -	6, -
CB11	nt	nt	nt	13, 14	5, 6		26, 33	44, 61	10, 14	13, 14	5, 6

CBL: HLA-ABC(LCT), DR, DQ(PCR-SSP)
 臍帯: HLA-ABC, DR, DQ(PCR-SSP)

図3 CBLと臍帯のHLAタイピング

HLA-Gの胎盤における発現について

奈良県立医科大学, 法医学 下嶋典子, 岸田学, 川崎明彦, 石谷昭子, 羽竹勝彦
赤崎クリニック 赤崎正佳

はじめに

我々はこれまでにHLA-Gが胎盤トロホプラストのみに発現し、特に膜結合性HLA-G抗原は母体に侵入しつつあるextravillous trophoblastに、可溶性HLA-G抗原は、トロホプラスト全体に弱くではあるが発現しており、特にextravillous trophoblastに強く、また母体血に直接接しているsyncytiotrophoblastの内側に接するcytotrophoblastにも発現していることを報告してきた。今回さらにトロホプラストにおけるHLA-Gの発現を調べたところ、絨毛の間質に存在するマクロファージにも抗HLA-G抗体である87Gとの反応が認められたので報告する。

方法

抗体；マクロファージと反応する抗体としてCD14 (PHAMINGEN) を用いた。その他の抗体については、我々が作製した抗体を用いた。

免疫染色；(1) 0.3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、抗HLA-G抗体と反応させた。これをヒストファインシンプルステインPO(M)

(ニチレイ) を用いて免疫染色を行った。

(2) 0.3%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを失活させた後、細胞のFcレセプターとの反応をブロックするために同じアイソタイプの抗CD3抗体であるBC3等を反応させ、次にビオチン化した抗HLA-G抗体を反応させた。これをキットを用いて免疫染色を行った。

結果と考察

今回3種の抗HLA-G抗体、およびマクロファージと反応するCD14を用いた免疫染色を行った結果、絨毛の間質に抗HLA-G抗体と反応する細胞が存在し、これがCD14とも反応することから、この細胞がマクロファージであると推測され、HLA-Gを発現しているということが考えられた。また、Fcレセプターをブロックしても抗HLA-G抗体との反応が認められたことから、この細胞がHLA-Gを発現していると考えられ、今後さらに検討を重ねていく予定である。

HLA-EおよびGの多型性について

奈良県立医科大学・法医学 川崎明彦, 岸田学, 安藤稔, 桐山敬生, 下嶋典子, 石谷昭子, 羽竹勝彦
兵庫県赤十字血液センター 能勢義介

はじめに

HLA-EおよびGはいずれもHLA class I b遺伝子であって、きわめて多型性の乏しいことが特徴とされてきた。ところがHLA-GについてはOberらがAfrican Americanについては26種ものアミノ酸レベルでの多型が存在すると報告した。しかし我々がこれを再検したところ、そのような多型は見当たらず、African Americanは日本人よりも多型性が少ないことを明らかにした。このAfrican Americanお

よびアフリカのガーナ人の多型解析において、Exon 3、codon130のC deletionがかなりの頻度に見られたが、日本人には全く見出されなかった。このalleleはすでにHLA-G*0105Nと命名されており、我々のデータも他のデータでも、全て0105NはA30とassociateしていた。そこで、本研究ではこの*0105N alleleが日本人には全く存在しないのかどうかを調べた。

一方、我々はHLA-Eの多型について主に

caucasoidについて調べた結果をすでに報告している(1992年)が、アミノ酸レベルの多型はcodon107におけるもの1種であった。Ohyaらの報告したcodon157の多型は全く検出しなかった。ところが驚いたことに、第12回国際組織適合ワークショップの調査ではantigen frequencyがcaucasoidで15%、orientalで52%となっていた。そこで本研究では日本人についてHLA-Eのcodon157の多型の有無を再検した。

方法および材料

HLA-G*0105N alleleの検出には日本人50人のDNAを用いて allele specific PCR法により、codon130におけるC deletionの有無を調べた。プライマーは表1に示すものを用い、PCRは95℃5分の後、94℃1分、65℃2分、72℃3分を30サイクル行った。HLA-Eのcodon157の検出については日本人31人のDNAについて表2に示すプライマーを用いてcodon157を含むExon3を増幅し、これをABI PRISM 310 Genetic AnalyzerによりDirect Sequenceを行い調べた。

結果と考察

HLA-Gの多型については、日本人においては本研究では*0105N alleleは検出されなかった。このalleleはAmerican Caucasoidにも見出されなかったとの報告がある。我々のデータではガーナ人やAfrican Americanに5~8%と高く、他の報告によると、スペイン人に3%、ドイツ人、クロアチア人に2.3%、オランダ人に0.6%見出されたということから、このalleleはアフリカに起源し、それが少しずつ伝播されたと推測される。

HLA-Eについては、codon157における多型は全く見出されなかった。日本人31人、62 alleleのsequenceを行ったが、もしワークショップのデータが正しいとすれば、約半数の15名のDNAにこの多型が検出されるはずなので、ワークショップにおいて何らかの大きな過ちが犯されたと推測される。codon107における多型は、これがアルギニンであるallele (HLA-E*0101およびHLA-E*0102) が24/62で38.7%、グリシンであるE*0103が38/62で61.3%であった。

表1 HLA-G*0105N allele検出用プライマー

Primer	Primer Sequence
GE3U (5'側)	5'-GGGGCTGACCGAGGGGGT-3'
GEU-original (3'側)	5'-GCGGTCCAGGAGCGCAGG-3'
GEU-deletion (3'側)	5'-GCGGTCCAGGAGCGCAGT-3'

表2 HLA-E exon3増幅用プライマー

Primer	Primer Sequence
Eg1.1 (5'側)	5'-CGGGACTGACTAAGGGGC-3'
Eg2.2 (3'側)	5'-AGCCCTGTGGACCCTCTT-3'

HLA 抗体によるNAIT

大阪府赤十字血液センター 永尾暢夫、谷上純子、富田忠夫

はじめに

赤血球系以外の母児不適合妊娠では、近年HPA抗体によるものが知られるようになってきたが、HLA系はまだ散見する程度である。

我々は、HPA系の母児不適合妊娠の検査に併せてHLA系についても調べているのでその状況と依頼検査で経験したHLA系によると思われる新生児血小板減少症（NAIT）例についても併せて報告する。

材料および方法

妊娠30週以後の妊婦血清について、HPA系とHLA系の抗体スクリーニングを実施した。

HPAの抗原・抗体検査は、柴田らの開発した混合受身凝集反応（MPHA）、HLAの抗原・抗体検査は、NIHの標準法・リンパ球細胞毒性試験（LCT）とLCTに抗グロブリンを加えた抗グロブリン加LCT（AHG・LCT）法をそれぞれ用いて行った。

成績および考察

妊婦のHPAおよびHLA系の抗体スクリーニング結果は1,032例中172例（16.7%）が陽性で、その内訳は、HPA系の抗体が6例（3.5%）、HPA+HLA系の抗体と考えられるものが4例（2.3%）、HLA系の抗体と考えられるものが162例（94.2%）であった。

また、抗体の特異性はHPA系が4b抗体：3例、5b抗体：7例で、HLA系は解析中で、判明していない。なお、このうちNAITを起こした例は1例もなかった。

一方、他の機会に経験したHLA系の抗体が関与したと考えられたNAIT例は、19例で、それらの抗体の特異性は表に示したとおりで、児の血小板数が $1 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 台の値を示した例もあり、今後さらに症例を重ね検討をする必要があると考える。

表 HLA 系の抗体が関与したと考えられたNAIT例

No.	特異性	母血清中の抗体価		臍帯血中の血小板数 $\times 10^4 / \mu\text{L}$
		LCT	AHG・LCT	
1.	A 2	8	1 6	1 2. 2
2.	A 2	8	8	2. 9
3.	B 4 0	8	n. t.	1. 5
4.	A 2 + B 4 8	8	6 4	8. 0
5.	B 7 + 2 2 + α	8	1 2 8	2 1. 1
6.	B 7	8	3 2	1. 0
7.	A 2 + 2 4 + B 5 2	8	6 4	6. 4
8.	A 2 4 + B 5 1	1, 0 2 4	2, 0 4 8	3. 6
9.	B 7 + α + HPA-4 b	1	+	2. 6
10.	B 4 0 + α + HPA-4 b	1 6	6 4	2. 2
11.	A 2 4 + B 2 2 + HPA-4 b	2 5 6	n. t.	1. 7
12.	A 2 + 1 1 + 2 4 + B 5 4 + Cw 1 + α	n. t.	2, 0 4 8	3. 5
13.	Mu l t i	1 6	1 2 8	6. 7
14.	A 2 4	0	+	7. 1
15.	A 2 + B 3 9 + 6 7 + α	3 2	6 4	2. 7
16.	A 1 1 + 2 6	1 6	6 4	2. 4
17.	A 2 6	0	1	5. 2
18.	B 6 0 + 6 1 + 4 8	4	3 2	2. 0
19.	A 3 3 + B 4 4 + 1 3 + α	n. t.	1 6	2. 6
20.	B 5 1 + 5 2 + 3 5 + 6 2 + α	8	8	1 4. 1

HLA-A2の肺癌患者における臨床的意義について

関西医科大学・第一内科

関西医科大学・輸血部

吉村千恵, 野村昌作, 桑名みどり, 上平和孝, 大城明寛,
小柳津治樹, 松下広, 清水俊樹, 山口和之, 福原資郎
野村昌作 松崎龍典 山岡学

はじめに

肺癌は悪性腫瘍群の中でも毎年増加を続け、1993年には癌死亡数の第一位になった(1)。この背景には人口の高齢化や喫煙率などの要因もあるが、それに加えて治療法に関する問題点も指摘されている。すなわち、外科療法や放射線療法は適応症例に限界があり、また化学療法に関しても治療成績の向上につながるものが少ないという点などが挙げられる。近年の分子遺伝学の発展により、悪性腫瘍に対する治療戦略として、抗癌剤以外への治療の道を模索する試みも行われつつある。このような背景から今回我々は肺癌における免疫療法の意義を考察する目的で次の2種類の系

(1)HLA class I と癌特異的サイトトキシックT細胞(CTL)による系

(2)Fas,Fasリガンド(FasL)による系
について検討を行った。

対象及び方法

対象は、原発性肺癌の患者61例である。そのうち16例が扁平上皮癌、24例が腺癌、18例が小細胞癌、3例が大細胞癌である。また健常人30例をランダムに抽出しコントロール群とした。肺癌患者とコントロール群の末梢血よりリンパ球を分離し細胞障害試験によりHLA class I のフェノタイピングを行った。それにより得られたHLA-A2を持つ患者27例とコントロール群30例からDNAを抽出し、PCR-SSP法にてHLA-A2のアリルを決定した。また肺癌患者61例より、分離したリンパ球を用いてフローサイトメトリーによる2colorサブセット解析を行った。更に患者血清を用いてsFas及びsFasLをELISA法により測定した。

結果

①は1996年の日本骨髓移植のHLA-A2 のアリル

についての分類(2)、②は1997年のImunogeneticusの分類(3)である。どちらも0201、0206、0207がほとんどで、順に40%、40%、15%程度である。③は本院で行った分類で、左がコントロール群、右が肺癌症例である。本院で行ったコントロール群は0206が上記報告例に比べ少ないが、①、②、③のコントロール群と肺癌症例を比較して総合的に判断するとアリル分類で有意な差は認められなかった(Table1)。

大細胞癌については数が少ないためグラフ化していない。HLA-A2を持つ群の方が持たない群よりsFasは高値であり、それはどの組織型においても同様の結果だった(Fig1)。

sFasLは逆にHLA-A2を持たない非小細胞性肺癌群において高値を示した。HLA-A2を持たない小細胞性肺癌群においてはHLA-A2を持つ群との差を認めず、HLA-A2を持たない非小細胞性肺癌群だけが高値を示しているのが特徴だった(正常値sFasL0.028-0.112 sFas0.3-1.3ng/ml) (Fig2)。

NKについてはNKweakではHLA-A2を持つ群において増加しているが、NKstrongではHLA-A2を持つ群と持たない群において差は認めなかった。

(Fig3)

CD8陽性のT細胞についてのグラフにおいてはsup/cyt T細胞ではsmall cellでは差は認めなかったが他の組織型ではHLA-A2を持つ群の方が増加していた。act-sup/cyt TではHLA-A2を持つ群の方がすべての組織型において増加していた。

supTやcytTにおいてもHLA-A2を持つ群の方がすべての組織型において増加しているという結果を得た(Fig4)。

考察

これまでに、癌特異的CTLの誘導が報告されているペプチドはHLA-A2拘束性のものが多く、原発性

肺癌においても相次いでHLA-A2拘束性についてのものが報告されている(4)(5)。近年HLAは遺伝子レベルでの解析が勧められ、HLA-A2に関してもいくつかの対立遺伝子が決定されている(6)。今回我々は、原発性肺癌において特定のHLAアリルが癌特異的CTLを拘束しているのではないかと考え、HLA-A2のタイピングを行った。しかしながら結果はコントロール群と原発性肺癌群でHLA-A2のアリルに有意な差は認められなかった。最近HLA-A*0201などが悪性腫瘍の癌関連遺伝子のペプチドを拘束しているという報告がなされており(7)、肺癌症例におけるHLA-A2アリルと癌特異的CTLの関係については更に症例を追加して検討する必要があると考えられた。

一般に悪性腫瘍の癌抗原はHLA class I を介してT細胞に提示され、その後ヘルパーT細胞の助けを借りて癌特異的CTLの誘導が起こるとされている。そして、誘導されたCTLはHLA class I を介し標的癌細胞に結合しperforin等の顆粒により破壊にいたらしめる。CTLには、自己細胞の異常を認識して傷害するものと、自己細胞でないことを認識して傷害するものがあり、両者ともに主としてCD8+T細胞である。また、CD8+T細胞は基本的にHLAクラスI分子に提示された腫瘍抗原ペプチドを認識するとされている。HLA-A2を所有する肺癌群においてより多くのCD8+T細胞の動員が起こっているという今回の我々の結果は上記の考え方に一致するものであった。すなわち、一部の肺癌症例においては、HLA-

Table 1

①HLA-A allele frequencies in Japanese(n=493)

Antigen	%FRQ	Allele	%FRQ(対A)	%FRQ(対A2)
A2	24.8	0201	10.9	≒43.95
		0206	10.4	≒41.93
		0207	3.4	≒13.71
		0210	0.1	≒0.4

*Clinical Transplants 1996(1)

②HLA-A allele frequencies in Japanese(n=117)

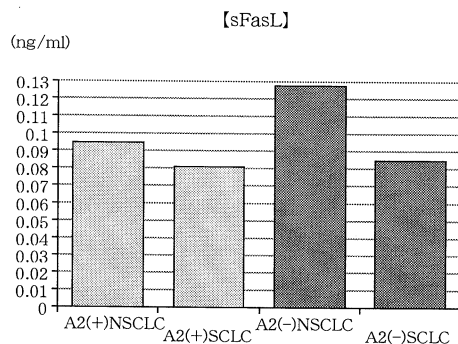
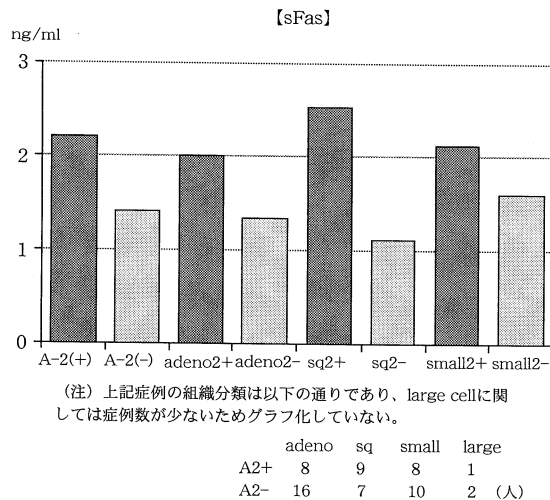
Antigen	%FRQ	Allele	%FRQ(対A)	%FRQ(対A2)
A2	23.0	0201	10.6	46.08
		0206	8.4	36.52
		0207	4.0	17.39

*Immunogenetics1997(2)

③HLA-A2 allele frequencies in KMU(control n=27,M16,F11)
(LK n=27,M20,F7)

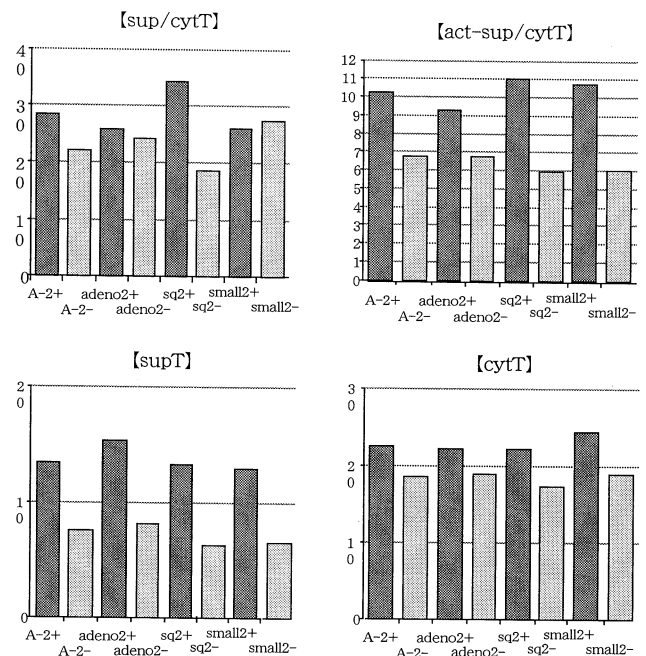
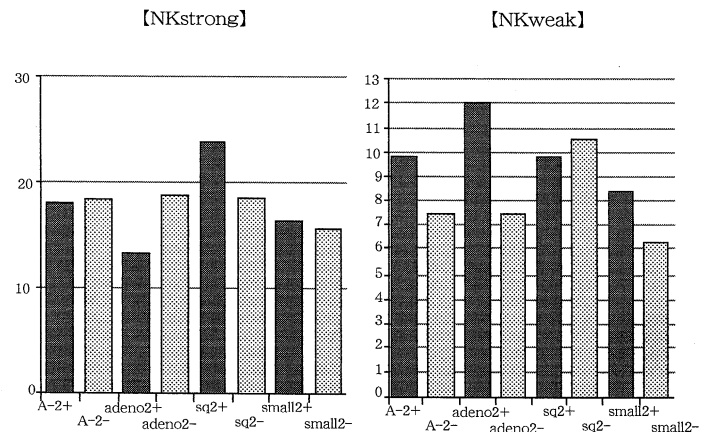
Allele	control(%FRQ)	LK(%FRQ)
0201	13 (48.1)	10 (37.0)
0205	0	1 (3.7)
0206	7 (25.9)	12 (44.4)
0207	4 (14.8)	4 (14.8)
0209	0	2 (7.4)
0211	0	1 (3.7)
0218	3 (11.1)	1 (3.7)

* controlにて3例判定不能有り、削除。



A2拘束性に癌特異的CTLが誘導されていると考えられた。

生体内において不要となった細胞は、アポトーシスの機構を経て死滅除去される(8)。このメカニズムは現在様々な分野において研究されており、その主要な経路であるFas-FasLは役割を終えたTリンパ球の除去に関与していると考えられている(9)。Fas-FasLの系を考える際には、それぞれの分子の可溶性分子について考慮する必要がある。例えば、sFasはFasを発現した細胞がFasLによるアポトーシスに対して防御するためにその細胞から生成されているという説がある(10)。この考えに基づくと、今回の結果において、HLA-A2を所有する群において、CD8+細胞の動員が活発であり、かつsFasも増加していたことから、HLA-A2に機能するCD8+細胞が何らかの原因によりsFasを生成している可能性があると考えられた。これは、FasLによるCD8+細胞へのアポトーシスを抑制するためのCD8+細胞自身の防御機構であると理解される。一方、もう一つの可



溶性分子であるsFasリガンドについては、今回の検討ではHLA-A2を所有しない非小細胞肺癌において高値の傾向を示した。残念ながらsFasLの由来について今回の検討では明確な結論は得られていない。しかし、多くの肺癌の培養細胞において、sFasLが発現していたとの報告(11)もあることから、少なくともその産生原の一つとして癌細胞の存在が考慮された。今回HLA-A2を所有しない非小細胞肺癌群においてsFasLが高値を呈し、CD8+のT細胞において増加を認めなかったことから、Fas-FasLの系によって腫瘍細胞よりは癌特異的CTLのほうがむしろアポトーシスに陥っていると考えられた。すなわち、肺癌細胞がCTLの攻撃から逃れる目的でFas-FasLの系

が作用しているものと思われた。さらに、CTL側から考えると、sFasの産生により、この系を調節している可能性があると考えられた。いずれにしても、sFasLが高値を示している肺癌群においては免疫療法の効果が不十分となる可能性があることが示唆された。

参考文献

- 1.厚生省編：喫煙と健康.健康体力づくり事業団、東京：1993
- 2.Tanaka.H, Akaza.T, Juji.T: Report of Japanese Central Bone Marrow Data Center.*Clinical Transplants* .139-144,1996.
- 3.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*.**46**:199-205,1997.
- 4.Seki.N, Hoshiro.T, Kikuchi.M,et al.:HLA-A Locus-Restricted and Tumor-Specific CTLs in Tumor-Infiltrating Lymphocytes of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Cellular Immunology* **175**:101-110,1997
- 5.Yoshino.I, GoedegebuurePS, PeoplesGE,et al.: HER2/neu-derived Peptides Are Shared Antigens among Human Non-Small Cell Lung Cancer and Ovarian Cancer. *Cancer Reseach* **54**:3387-3390,1994
- 6.Arnett KL, Parham P: HLA class I nucleotide sequence,1995. *Tissue Antigens* **46**:217-257,1995
7. Gunjatic S, Cai Z, Viguier M,et al.: Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast cartinomas and melanomas. *J Immunol* ;**160**: 328-333,1998.
- 8.Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide- ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer* **26**:239-257,1972
- 9.Nagata S,Golstein P: The Fas death factor. *Science* **267**: 1449-1456, 1995
- 10.Knipping E, Krammer P H, Onel K B, et al.: Level of Soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematus and juvenile rheumatoid arthritis. *Am Coll of Rheum.* **38**:1735-1737, 1995
- 11.Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, et al.:Human Lung Cartinomas Express Fas Ligand. *Cancer Reseach* **57**:1007-1012,1997

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)に対する各種治療効果と HLA-DRB1アレルに関する検討

関西医科大学・第一内科¹⁾、同 輸血部²⁾ 野村昌作^{1,2)}、松崎龍典²⁾、山岡 学²⁾、吉村千恵¹⁾、福原資郎^{1,2)}

はじめに

特発性血小板減少性紫斑病(ITP)は、血小板膜に反応する抗血小板抗体によって引き起こされる自己免疫疾患の一つである(1)。ITPの成因については不明のままであるが、遺伝的な要因と環境的な要因の両者が関与していると考えられる(2)。特に、ITPの遺伝的な要因に関しては、他の多くの自己免疫疾患

と同様に、組織適合抗原であるHLAとの関係が注目されている(3-5)。一方、ITP の治療に関しては、ステロイド療法と摘脾が主体であり、緊急時にはγグロブリン療法が行われることもある。今回我々は、ITP患者を対象としてHLAのタイピングを行い、ITPに対する四つの治療法(プレドニソロン、γグロブリン、セファランチン、加味帰脾湯)に対するITPの

反応性とHLAタイプとの関連性について検討した。

材料と方法

対象は、慢性ITP患者111例であり、コントロールとして健常人71名のリンパ球を使用した。HLAクラスIは、細胞障害試験によりA、B、Cの各ローカスのフェノタイプを決定し、HLAクラスIIは、PCR-RFLP法によりHLA-DRB1のアリルを決定した。これらHLAの解析結果と、ITPに対する四つの治療法(プレドニソロン、 γ グロブリン、セファランチン、加味帰脾湯)の治療効果との関係をretrospectiveに解析した。なお、各治療法の投与量は以下のとおりである。

プレドニソロン: 30~60 mg/day、 γ グロブリン: 20~25 g/day $\times$ 4~5 days、セファランチン: 40~60 mg/day、加味帰脾湯: 7.5 g/day

結果

HLAクラスIのフェノタイプの頻度に関しては、健常コントロール群とITP患者の間に有意な差を認めなかったが、表1に示すように、HLA-DRB1に関してはDRB1*0410が有意にITP患者で増加していた。一方、各種治療法に対する反応性とHLAの関連性については、表2に示すように、DRB1*0410はプレドニソロンとセファランチンに対する反応性が悪い症例で多く認められた。しかし、この傾向は、 γ グロブリンや加味帰脾湯では観察されなかった。DRB1*1302は、プレドニソロンや γ グロブリンの反応性の悪い症例において、DRB1*1401は、 γ グロブリンに反応性の悪い症例でそれぞれ有意な高値を示した。またDRB1*0901は、セファランチン有効群に、B61は加味帰脾湯有効群において有意に高値であった。

考察

ITPは、現在までのところ遺伝性の疾患とは考えられていない。しかし、時に家族内にITPをはじめとする自己免疫疾患を発症したり、ITPから全身性エリテマトーデスに移行するような症例もみられ、免疫調節機構に変調を示す遺伝的要因があつて、そこに環境因子が加わることによってITPの病型が出

現する可能性が示唆されている。これまでにITPとHLAとの関連性についてもいくつかの報告がみられるが、特定のHLAとの相関性が報告によってまちまちであり、また人種による相違も認められる。ただ、以前は血清学的な検討が中心であったが、最近DNAタイピングが導入され従来とやや異なった報告もみられる。例えば、Gaigerら(6)はITP患者のHLAクラスIIアリルについて検討し、DPB1*0402およびDPB1*1501の重要性を指摘している。我々の検討では、DRB1*0410が有意にITP患者で増加しており、一部の日本人ITPではDRB1*0410が発症要因のひとつに関与している可能性があると考えられた(5)。

ITPの治療法に関しては、副腎皮質ステロイドによる治療が第一選択であるが、ITPのなかには副腎皮質ステロイドに反応しない難治性の症例も含まれている。難治性症例については、これまでにいくつかのITP治療法が試みられている(7-12)。Fcレセプターをブロックする γ グロブリン療法は効果が一時的ではあるものの、ITPに対して確実な血小板増加

表1 ITPおよび健常人のHLA-DRB1*04, *08, *09の比較

DRB1	Controls (n=71)	ITP Patients (n=111)	Relative risk	p value
*0401	1 (1.4%)	2 (1.8%)	1.28	
*0403	2 (2.8%)	3 (2.7%)	0.96	
*0404	0 (0.0%)	2 (1.8%)	3.26	
*0405	19 (26.8%)	14 (12.6%)	0.40	
*0406	8 (11.3%)	8 (7.2%)	0.61	
*0407	2 (2.8%)	2 (1.8%)	0.63	
*0408	0 (0.0%)	2 (1.8%)	3.26	
*0410	2 (2.8%)	24 (21.6%)	9.52	p < 0.05
*0802	4 (5.6%)	3 (2.7%)	0.47	
*0803	8 (11.3%)	24 (21.6%)	2.17	
*0804	1 (1.4%)	4 (3.6%)	2.62	
*0901	17 (23.9%)	36 (32.4%)	1.52	

表2 ITPの各種治療に対する反応性とHLAの関連性

	Responder	Nonresponder	p value
<i>prednisolone</i>	n=57	n=54	
DRB1*0410	3 (5.3%)	24 (44.4%)	p<0.01
DRB1*1302	0 (0.0%)	4 (7.4%)	p<0.05
<i>γ-globulin</i>	n=38	n=19	
DRB1*1302	0 (0.0%)	3 (15.8%)	p<0.05
DRB1*1401	2 (5.3%)	5 (26.3%)	p<0.05
<i>cepharanthin</i>	n=14	n=31	
DRB1*0410	1 (7.1%)	8 (25.8%)	p<0.05
DRB1*0901	8 (57.1%)	7 (22.6%)	p<0.05
<i>Kami-kibi-to</i>	n=12	n=25	
B61	5 (41.7%)	1 (4.0%)	p<0.01

効果を示す(7,8)。セファランチンはビスコウラリン型アルカロイドであり、生体膜安定化作用などの薬理作用をもち、ITPにもよく使用されている(9,10)。また、加味帰脾湯は慢性ITPに対して約40%の有効率が報告されている(11,12)。これらの治療薬は必ずしも作用メカニズムが同一ではないが、セファランチンに関しては副腎皮質ステロイドとの併用において血小板増加効果が増強されることが報告されている(10,13)。今回の検討において、DRB1*0410は、プレドニソロンやセファランチンに対する反応性が悪いITP症例に多く認められた。この結果は、セファランチンが副腎皮質ステロイドとの併用によって血小板数増加効果を示すことが多いことを考慮すると、DRB1*0410がステロイドに対する反応性に影響を及ぼした結果と理解された。このことから、DRB1*0410はステロイドを中心とする免疫抑制剤の治療効果に影響を及ぼす遺伝的素因であることが示唆された。

難治性ITPに対して有効な治療法を選択することは、決して容易とはいえない。今回の検討より、ITPに対する治療法は作用メカニズムの違いによって、多少HLAの頻度との関連性が異なっていた。HLAのタイプによってITPに対する各種治療法の反応性が予測できれば、臨床にきわめて有意義である。ただ、より明確な結論を得るためには、さらなる症例数の追加による検討が必要であろう。

参考文献

1. Karpatkin S : Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* **56**:329-343, 1980.
2. 野村昌作、福原資郎: 特発性血小板減少性紫斑病 (ITP); 発症の機序. *血液・腫瘍科* **36**: 113-119, 1998.
3. Helmerhorst FN, Nijenhuis LE, De Lange GG, et al. : HLA antigens in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Tissue Antigens* **20**: 372-379, 1982.
4. Gratama JW, D'Amato J, De Koning J, et al. : The HLA-system in immune thrombocytopenic purpura: its relation to the outcome of therapy. *Brit J Haematol* **56**: 287-293, 1984.
5. Nomura S, Matsuzaki T, Ozaki Y, et al. : Clinical significance of HLA-DRB1*0410 in Japanese patients with idiopathic thrombo-cytopenic purpura. *Blood* **91**: 3616-3622, 1998.
6. Gaiger A, Neumeister A, Heinzl H, et al. : HLA class I - and II-antigens in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia. *Ann Hematol* **68**:299-302, 1994.
7. Imbach P, Barandun S, D'Appuzo V, et al. : High dose intravenous gamma globulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* **ii**: 1228-1231, 1981
8. Nomura S, Yasunaga K, Fujimura K, et al. : High-dose intravenous gammma globulin reduces macrophage colony stimulating factor levels in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* **63**:227-234, 1996.
9. Nomura S, Yanabu M, Miyake T, et al. : Effect of cepharanthin and cytocharasin D on platelet internalization of anti-glycoprotein IIb/IIIa antibodies. *Autoimmunity* **18**: 23-29, 1994.
10. Nomura S, Matsuzaki T, Yamaoka M, et al. : Genetic analysis of HLA- and HPA-typing in idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura patients treated with cepharanthin. *Autoimmunity* in press.
11. Sakuragawa N, Yasunaga K, Nomura T, et al. : Clinical study of TJ-137 Tsumura Kami-kihi-to in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Clin Appl Thromb/Hemostasis* **2**: 213-218, 1996.
12. Matsuzaki T, Nomura S, Yamaoka M, et al. : HLA and HPA typing in idiopathic thrombocytopenic purpura patients treated with Kami-kihi-to. *Am J Chine Med* **26**:191-198, 1998.
13. Saito N, Takemori N, Hirai R, et al. : High-dose biococlaurine alkalois together with predonisolone raise platelet counts in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* **51**:173-174, 1996.