

第18回 近畿HLA研究会

会期：2001年1月27日（土）
会場：京大会館
世話人：丸屋悦子
京都大学医学部

エクソン2, エクソン3の間で塩基配列の置換を生じたと考えられるB*3531抗原について

皆森久美子¹⁾, 秋田真哉¹⁾, 荒木延夫¹⁾, 能勢義介¹⁾, 井本しおん¹⁾, 三戸 壽¹⁾
清水まり恵²⁾, 田中昌子²⁾, 田中秀則²⁾, 十字猛夫²⁾, 樋口香織³⁾

¹⁾ 兵庫県赤十字血液センター, ²⁾ 日本赤十字社中央血液センター, ³⁾ 長崎県赤十字血液センター

【目的】

今回我々は日本人のHLAクラスIタイピングにおいて一部のB35とB40関連抗血清に反応する稀なB35 variant (以下B*3531) を検出したので報告する。

【方法】

血清学的検査は日赤共通トレイを使用し、LCT法で行った。DNAタイピングはワンラムダマイクロSSP-1L, ダイナルSSP-B40を用いた。また、塩基配列をダイレクトシーケンスにて解析した。

【結果】

日赤共通トレイによるHLAタイプはA11.1, A31, B59, ?, Cw1, Cw10と判定された。共通トレイでの反応は血清No.131222 (B61+B60+B48+BFu+BFuv), 血清No.01M021 (B35+B51+B5102+B52+ B37+B18+B78+B53) にはスコア8で反応し, 血清No.161288 (B61+B60+B13+B13N+B41+B47), 血清No.7097310(B35+B5102)には反応を示さなかった。また、SSP法の結果は、B40のnewアリルの存

在を示唆したが、ダイレクトシーケンスの結果、B*3531であることが判明した。

【考察】

B*3531はB40関連抗原であるBFu(B*4007)と若干の反応性が異なるBFuv (Fu Variant)と名付けられた抗原で、塩基配列はエクソン2がB*3501(B35), エクソン3以降がB*4002 (B61)と同様な塩基配列を持っている。そのため、B35関連抗原にかかわらず、B40関連抗血清と反応する可能性が高く、我々もB40関連のDNAタイピングを行うなど困惑する抗原であった。本症例と同様にエクソン2, エクソン3の間で塩基配列の置換が生じたと考えられるB*8101, B*5603, B*5301, B*4406などの数例の報告があることから、この位置での塩基配列の置換が生じやすいのではと考えられた。なお、B*3531はこれまでに韓国人から数例、日本人から1例検出され、いずれもA2-B*3531-Cw10のハプロタイプであったが、今回検出したタイプはA2と連鎖していなかった。

羊水を用いた血小板型遺伝子タイピングにより 抗HPA-3aによるNAITPを予測した症例

荒木延夫¹⁾, 秋田真哉¹⁾, 皆森久美子¹⁾, 能勢義介¹⁾, 井本しおん¹⁾, 三戸 壽¹⁾
谷上純子²⁾, 福森泰雄²⁾, 永尾暢夫²⁾

¹⁾ 兵庫県赤十字血液センター, ²⁾ 大阪府赤十字血液センター

【目的】

抗HPA-3aによるNAITP（新生児血小板減少性紫斑病）は本邦で8症例確認され、そのうち4症例に脳内出血を認めるなど、HPA-3aによるNAITPは極めて重症度が高いと言われている。今回、前出産で抗HPA-3aによるNAITPを起こした妊婦の羊水を用いた血小板型遺伝子タイピングによりNAITPを起こすことを予測し、出産対策を講じたので報告する。

【方法】

妊娠27週の羊水をHPA genotype ELMA（Enzyme Linked Minisequencing Assay）法にて血小板型遺伝子タイピングを実施した。また、妊娠27, 28, 29, 30, 31, 32週の抗HPA-3a抗体価をMPHA法で測定した。

【成績】

羊水の血小板型はHPA-3a+, 3b+を示し、NAITPを起こすことが予測された。抗体価は27～32週すべて512倍（パネルはHPA-3a+, 3b+の血

小板を使用）を示した。なお、HLA抗体は陰性であった。そこで、妊娠33週第1日に帝王切開分娩したところ、児体重は1894g, Apgar score 6/8, そして、臍帯血血小板数16,000/_L, 紫斑が認められ、NAITPと診断された。そこで、あらかじめ用意されたHPA-3a陰性の血小板を10単位輸血したところ、翌日の血小板数は280,000/_L, 翌々日は250,000/_Lと大幅に上昇し、NAITPは治療された。また、脳内出血も認められなかった。

【結論】

NAITPの既往歴のある妊婦の羊水の血小板型遺伝子タイピングを実施することによって、NAITPを予測することが可能となった。また、抗体価の定期的測定により、帝王切開の時期などが決定されることにより、あらかじめ、HPA適合血小板の準備ができるなど、羊水の血小板型遺伝子タイピングの有用性が示唆された。

慢性関節リウマチ（RA）の関節病変とHLA-DRB1*0405

村田紀和¹⁾, 脇谷滋之²⁾, 井本一彦²⁾

¹⁾ 国立大阪病院 リウマチ科, ²⁾ 国立大阪病院 整形外科

慢性関節リウマチ（RA）とHLA-DRB1*04との関連は世界的に認められているが、日本ではそのなかでも特に*0405との相関が強い。RA患者中で

*0405が高頻度に認められるが、それがRAの発症に関連するのかわ、関節病変の進展に関連するのかわはまだ結論が得られていない。

われわれの現在までの結果では、

- ① RAの重症度で LES, MES, MUD の3群に分けた場合, *0405の頻度が継承群のLESではコントロール群と差が見られないが, MES, MUDでは有意に高頻度になっている。
- ② 発症早期RAを登録し, その後の関節病変の進展を見ると, 関節病変が軽い群ではDR4.1がコントロール群と同率であるが, 病変進行の

高度な群ではDR4.1が高頻度である。

- ③ 関節の最重症病型で, 関節周辺骨が融解し, 関節が動揺するムチランス変形群で DRB1*0405が有意に増加している。

このことから, DRB1*0405はRAの発症よりむしろ関節病変の進行, 病気の遷延化に関わっていると考えている。

胎盤トロホプラストにおけるHLA-E, -F, -Gの発現について

下嶋典子¹⁾, 石谷昭子¹⁾, 大村素子^{1), 2)}, 中西真理¹⁾, Daniel E. Geraghty³⁾, 羽竹勝彦¹⁾

¹⁾ 奈良医大・法医学, ²⁾ 県立西宮病院, ³⁾ Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】

我々はこれまでHLA-EおよびGに対するモノクロナル抗体を作製し, その発現と機能を調べてきた。HLA-Gは妊娠時の母体と胎児の接点で胎盤トロホプラストに強く発現しており, HLA-Eについては広範な組織に弱く発現していることを明らかにしてきた。しかし, HLA-Fについてはまだ報告がわずかしかない。今回我々は, このHLA-Fに対するモノクロナル抗体の作製に成功したので, これらHLA-E, -F, -Gの抗体を用いて, HLA class Ib蛋白の検出を行い, これら遺伝子の発現について総合的に検討した。

【方法】

抗HLA-F抗体の作製: E.Coliに産生させたHLA-F蛋白をマウスに免疫し, 定法に従いモノクロナル抗体を作製した。抗HLA-F抗体の特異性の検定: FACSおよびWestern blotにより各種HLA抗原との反応を調べた。免疫組織染色: 初期, 中期, termの

胎盤について3種の抗体とシンプルステイン・マックス (ニチレイ) キットを用いて行った。

【結果と考察】

抗HLA-F抗体の特異性: FACSではHLA-A2, -B27, -B7, -Cw4, -Cw15, -E, -Gの.221transfectantと反応はみられず, western blotではHLA-A2, -B7, -E, -G蛋白とは反応せず, HLA-F蛋白とのみ反応した。発現: FACSでは各種HLA型のB-LCLとの反応は見られなかった。すなわちこれらの細胞表面にはHLA-Fは発現していなかった。初期, 中期, term胎盤において, 絨毛間腔に増殖しつつあるextravillous trophoblastには弱く (HLA-Gは強く) 発現し, 母体組織の脱落膜に侵入しているtrophoblastには強く発現していた。さらに, これまでHLA class I分子が発現していないのではないかと考えられていたsyncytiotrophoblastにもHLA-Fが発現していた。この結果は, HLA-Fが母体の拒絶反応を抑える何らかの重要な機能を持っていることを示唆している。

血小板輸血におけるHLA-C座抗原適合の必要性について

斉藤 敏, 大田 智, 瀬下秀幸, 野村節夫

長野県赤十字血液センター

【はじめに】

血小板輸血に際し、フィルターによる白血球の除去、紫外線の照射、単ドナーからの輸血等、HLA抗体産生を防ぐために様々な工夫がされているものの、HLA抗体を産生し血小板不応状態に陥ってしまうケースがある。こういった場合、クエン酸処理を施した血小板の輸血や免疫グロブリンの大量投与が有効という報告もされているが、第一の選択枝はHLAタイプの適合するドナー、またはクロスマッチ陰性のドナーからの血小板を輸血することである。

血小板輸血におけるHLA-C座の関与については、これまでDuquesnoyらにより輸血効果にはほとんど影響を与えないと報告されていたが、第24回国際輸血学会において我々によりHLA-C座不一致が原因で血小板不応答を引き起こしたと思われる3症例が報告された。

今回これらの症例に新たな2症例を加えた5症例につきC座のDNAタイピング、フローサイトメトリー(FCM)による検査データを加え検討を行ったので報告する。

【材料と方法】

HLAの血清学タイピングはLCT法にて行い、HLA-C座及びB*40についてはPCR-SSPにてアレルタイピングを行った。抗HLA抗体の検出にはリンパ球を使用しAHG-LCTを行い、血小板を使用してクロロキン未処理MPHA(NT-MPHA)及び酸未処理FCM(NT-FCM)を実施した。血小板抗体の検出にはクロロキン処理MPHA(T-MPHA)と酸処理FCM(T-FCM)を実施した。血小板表面上のHLA抗原量はFCMにてその特異性が再確認された通常のクラス。タイピングに用いているヒト経産婦由来

の抗HLA抗体を使用しFACSCalibur (ベクトンディッキンソン)にて測定した。輸血効果はCCI_{24h}により評価しt-testを用い統計処理を行った。

【結果】

いずれの患者もPRA (Percentage of panel-reactive activity) 33%以上の強い抗HLA抗体を保有しており、更にHLA-A,B適合リンパ球によるスクリーニングの結果、それぞれの症例において抗Cw3, 抗Cw7もしくは抗Cw8抗体が新たに検出された (B*4002-Cw8, B*4006-Cw3のパネルリンパ球が同定のために使用されていないのでS.F.とT.S.がそれぞれ抗Cw8, 抗Cw3抗体の他にB61のサブタイプB*4002, もしくはB*4006由来抗原に対する抗体を同時に保有している可能性もある)。全ての症例においてHLA-A,B適合C不適合ではAHG-LCT,NT-MPHAによるクロスマッチが陽性となり(LCT陰性)血小板輸血効果がなく、C座も適合させることによりクロスマッチが陰性となり輸血効果が認められた。

【結語・考察】

血小板上にはHLA-C座抗原が個人差はあるものの発現されておりHLA-PC供給に当たってはHLA-C座抗原を適合させなければならない場合もある。B60(B*4001)-Cw8及びB61(B*4006)-Cw8のHLAタイプの患者において抗Cw3抗体が認められ、B60(B*4001)-Cw3及びB61(B*4002)-Cw3の患者において抗Cw8抗体が認められたことから、HLA-B座抗原が複数のC座抗原と連鎖不平衡がある場合には特に注意する必要があると思われる。

HLA適合血小板の供給依頼検査において経験した数症例

尼岸悦子, 高陽淑, 斉藤順, 松山宣樹, 谷上純子, 福森泰雄, 吉村敬次, 山野孟

大阪府赤十字血液センター 技術部

HLA適合血小板製剤は、HLA抗体を保有しかつ血小板製剤の輸血を必要としている患者にとって不可欠である。全国で供給の始まった平成2年から現在まで、HLA抗体確認の検査法としてLCT法およびAHG-LCT (AHG)法が主に用いられているが、この方法は現在まで変わっていない。この間で我々が経験したLCT法やAHG法の結果と輸血効果が一致しない、いくつかの症例を報告する

症例1, 患者は精巣腫瘍のため抗がん剤による化学療法中であった。ランダムな血小板製剤の輸血では、血小板値の上昇は認められず、当センターにHLA適合血小板検査依頼があった。原因究明のためHLA抗体の検査を実施したところ、LCT, AHG法ともに陰性であった。しかし約1ヵ月後に化学療法が終了し、再度検査を実施したところ、LCT, AHG法で高力価、かつ、広範囲のHLA抗体を保有することが分かった。HLAの検査を行う上で化学療法の有無、治療期間などは大切な情報であると思う。

症例2, 患者は先天性赤血球産生異常であり、治療のため、ATG (Anti-T-cell-Globulin) を使用していた。この患者のLCT法およびAHG法は、陽性で

あったが、患者自身のリンパ球に対しても陽性を示し、使用中の薬剤による偽陽性と考えられた。薬剤がクロスマッチの結果に与える影響について知る必要がある。

症例3, HLA適合血小板供給中の患者のクロスマッチにおいて、HLAマッチのドナーにもかかわらず、検査結果がLCT法陽性、AHG法陰性を示した例がある。輸血効果は「著効」と認められたことからこのLCT法陽性という結果は、薬剤、その他何らかの原因による非特異的な反応と思われる。

症例4, 患者はMDSで、HLA適合血小板を継続して輸血していた。しかしLCT法、AHG法共に陰性の血小板製剤を輸血していたにも関わらず、血小板製剤の無効例があり、血小板抗体が新たに出現してきていることが判明した。臨床成績を追って見ていくことと同時に常に新しい検体での検査が大切であると思われる。

以上の症例により、HLA抗体の有無や特異性(許容抗原)の決定には患者の臨床症状や使用している薬剤等の把握が必要であり、従来のLCT法やAHG法に加えて新たなHLA抗体や、HPA抗体の検査法の導入が必要であると考えられる。

移植業務における輸血部の役割

金光 靖¹⁾, 菅野知恵美¹⁾, 川本佳代¹⁾, 伊藤志保¹⁾, 麻田真由美¹⁾, 峯 佳子¹⁾
藤田往子¹⁾, 芦田隆司²⁾, 金丸昭久²⁾, 椿 和央³⁾

¹⁾ 近畿大学医学部附属病院輸血部, ²⁾ 同医学部第三内科, ³⁾ 同奈良病院血液内科

【はじめに】

当施設では、造血幹細胞移植と腎移植が実施されている。特に造血幹細胞移植の供給源は多様化しており、医療機関もそれに対応して業務の広がりを見せている。それに伴い、輸血部でも安全な移植が実施できるように、臨床と協力して移植関連業務の一部を実施しているその現状について報告する。

【業務内容と現状】

輸血部で実施している移植関連業務として以下のものがある。検査業務としては、HLA-ABC・DRタイピング、ダイレクトクロスマッチ、CD34陽性細胞の測定、コロニーアッセイ、ABOミスマッチ造血幹細胞移植後のABO抗原・抗体の測定。造血幹細胞採取と保存に関しては、当施設では1991年から末梢血幹細胞採取を実施しており、当初は成分採血装置の準備と操作のみ行っていたが、現在は採取時期決定のため、輸血部で末梢血CD34+細胞数の測定や、採取細胞の評価、凍結保存・解凍も実施している。

また、ABOミスマッチ骨髄液の移植前処理を実施している。HLA検査人数は、1998年87名、1999年66名であったが、2000年1月から12月までのHLA検査人数は98名で、HLA-ABCが96件、HLA-DRが56件であった。検査目的は、78%が造血幹細胞移植で、患者数23名、その兄弟40名、両

親14名であった。その内、HLA一致の弟が見つかった患者さんは6名(26%)であった。生体腎移植関連では患者3名、その兄弟4名、両親4名であった。HLA一致の提供者はなかったが、2例に移植が実施された。死体腎移植は1例実施されているが、死体腎移植関連の検査等は院内では実施していない。その他、疾患関連等が11名であった。骨髄移植数は14例で、その内8例が骨髄バンクからの提供であった。また、ABOマイナーミスマッチは2例で、血漿除去を実施し、ABOメジャーミスマッチの6例に骨髄細胞濃縮(赤血球除去)を実施した。auto-PBSC採取は、4名に15回実施したが、移植は1例であった。また、allo-PBSC移植は、3例実施された。臍帯血移植は1例で、臍帯血バンクからの提供で移植までの保管と移植時の解凍を実施した。

【まとめ】

当施設におけるHLA typingの約80%が造血幹細胞移植関連で、今後HLA typingと造血幹細胞移植件数は増加すると考えられる。骨髄移植の57%が骨髄バンクの提供で、ABO血液型不適合移植例も57%であった。造血幹細胞供給源の多様化、移植件数の増加、複数化での移植の実施などに対応して、安全で効率的な移植を実施するために、輸血部の役割は重要と思われる。

京都大学医学部附属病院におけるHLA検査

辻博 昭, 佐原敏之, 柏井三郎, 万木紀美子, 前田清子, 丸屋悦子, 伊藤和彦

京都大学医学部附属病院輸血部

【はじめに】

京都大学医学部附属病院では平成11年12月まで移植医療に伴うHLA検査を全て外注検査（年間約400件）で行っていた。平成12年1月までの移植件数は生体肝移植が532件（過去10年間）、造血幹細胞移植（SCT）、86件（内科56件<過去10年>、小児科30件<過去5年>）、腎移植33件（過去10年間）あった。移植医療の需要の増加に伴い京都大学医学部附属病院に移植医療部が設立され、院内でHLA検査ができる体制を整える必要性が増した。平成12年1月よりHLA検査を輸血部で行える体制を整備した。HLA検査を始めおよそ1年が経過しつつある。今回京都大学医学部附属病院におけるHLA検査の現状を報告する。

【方法】

検査項目はHLAタイピングとリンパ球クロスマッチ検査であり、週2回（月・水）予約制で受け付けている。HLAクラスI（A,B,C）抗原は血清学的タイピング法で、HLAクラスII（DR,DQ）抗原は遺伝子タイピング法（PCR-MPH法、PCR-SSP法）を行っている。結果はすべて血清学レベル（2桁）で報告している。DRについては希望により遺伝子レベル（4桁）の検査を行っている。リンパ球クロスマッチはwholeリンパ球を用いた、LCT（Lymphocyte cytotoxicity test）、AHG-LCT（anti human globulin-LCT）を行っている。

【現状・結果】

約1年間のHLAタイピング需要総数は432件（392件;院内実施）であった。輸血部で院内需要の91%を受託できた。各診療科の内訳は移植外科277件<209>、内科162件<155>、小児科36件<23>、泌尿器科9件<5>であった（括弧内の数字は院内実施数）。院内受託検査の各診療科が占める割合は移植外科：53%、内科：40%、小児科：6%、泌尿器科：1%であった。当院では生体肝移植が週2回、SCTが約週1回行われ、平成12年移植実施件数は生体肝移植114件、SCTは29件（うち9件はミニ移植）であった。SCTでは、HLA検査により最適なドナーの選択を行うため移植実施数に比べ検査件数が増加する傾向がある。一方、肝移植はGVH方向のミスマッチドナーを回避するためHLA検査を行っている。

【展望・考察】

現在の院内受託可能件数は1ヶ月、約30件である。今後、内科ではミニ移植の増加が見込まれ、HLA検査需要が益々増大することが予測される。泌尿器科からは腎移植時のwarm T、cold Bのリンパ球クロスマッチ導入を強く要望されている。このような要望を満たすため、HLA検査の精度を保ちつつ効率化を図る必要がある。今後、HLAクラスIIの血清学的タイピング法からDNAタイピング法への移行を行い、検査体制をより充実したものにしていこうと予定である。

MHCに関する新しいテクノロジーの方向性 —マーケティング・リサーチャーの立場から

飯田 真作

株式会社 ベリタス

1987年の第10回国際組織適合性ワークショップに始まったDNAを利用したHLA検査の流れは、今や血清学的検査を押さえてその本流になろうとしている。1991年横浜で開催された第11回国際組織適合性会議から10年を経て、DNAアリの扱いに関する考え方も落ち着き、検査法も取捨選択が行われた。

今日のHLA検査を言う場合に、特長的なことはその多型性が膨大であるがゆえに、一つの検査方法が全ての目的に対して最も好ましいとは言えない事にある。従って、MHCに関するテクノロジーは、遺伝子検査の方法の進歩と共にいつもその目的に対する妥当性が問い直されながら、採用・不採用が検討されるだろう。

そのような状況の中で、フローSSOなるテクノロジーが最近開発されたので、まだ、詳細については不明な点が多いながら、理論的には多型性の多いHLAに適した方法であるので、ここにご紹介したい。

フローSSO法は、卓上型のフローサイトメーターと100種類の蛍光ビーズを利用する事に特徴がある。2色の10段階に濃度の違った蛍光ビーズを用いる事により、100種類の測定を同一チューブで行う事が可能であり、HLAに利用する場合には、同時に100種類のプローブを使用して検査を行う事が可能になる。また、チューブ以外にプレートの使用も可能で、少量検体から大量検体まで、同一の方法で短時間に検査が出来る事が従来のHLA-DNA検査法にない特徴と言える。

ヘテロデュプレックス多型のHLAタイピングへの応用

菊池 修一

株式会社メディカルアクセス

ハイレゾリューションHLAタイピングを効率的に、低価格でタイピングすることは、HLA検査技術者が長い間待ち望んでいる技術でした。その新しい技術は、RSCA (Reference Strand Mediated Conformational Analysis) です。RSCAは、英国のアンソニー ノーラン リサーチ インスティテ

ュートで開発されたヘテロデュプレックスを利用した技術です。ペル・フリーズ クリニカル システムズ社では、この新しい技術がHLAタイピング検査室で利用できるように、この技術を取り入れました。この技術を確立するために、既知のアリル移動値データベースの構築とアマシャム ファルマシア

バイオテック社のALF expressに使用するための試薬キットを開発しました。ペル・フリーズ クリニカル システムズ社は、世界で唯一RSCA技術のライセンスを所有しています。

RSCAは、ヘテロデュプレックスを用いた技術で、まずDNAの抽出からはじまります。Aローカスタイピングでは250 ngのDNAで行うことができます。次にアニールステップを開始します。Cy5標識のリファレンスストランドを増幅産物に加えます。Aローカスキットには2つのリファレンスストランドが、Bローカスキットには3つのリファレンスストランドがあります。サンプルDNAとリファレンスストランドを96℃で熱すると、DNAは変性します。次に55℃まで冷やすとアニール反応が起こります。この操作で、リファレンスストランドの5'の末端だけが標識されるので、ホモデュプレックスであるそのものにアニールしたリファレンスストランドとヘテロデュプレックスである2つのサンプルのみが検出されます。次にローディングバッファーを加えて、ALF express DNA解析システム

で検出します。検出器はレーザーを使用します。検出されたデータは、フラグメントアナライザーにて処理され、最後にRSCAタイパーソフトウェアにより自動的にHLAタイピングを識別します。前処理工程で約3時間、検出工程で約7時間です。

このRSCAでは、Aローカスで18サンプル、Bローカスで12サンプルのハイレゾリューションHLAタイピングが可能です。Aローカス18サンプルを解析するのに要する時間は20分です。また、新しいアレルが発見された時には、キット内容の変更ではなくソフトウェアに新しいデータを追加することだけで対処することができます。再現性にも優れ、判定困難なヘテロ接合の組合せも解決できることが証明されました。

今後、造血幹細胞移植などクラスI DNAタイピングの需要は益々高くなると予測され、このRSCAは、HLAタイピング検査室において大きな威力を発揮すると確信します。

マイクロアレイとその関連new technology

川井信太郎

湧永製薬

DNAマイクロアレイ、あるいはDNAチップと呼ばれる技術は、平面担体上に高密度にDNAプローブを固相化したもので、従来に比べ飛躍的に大量の情報を一度に扱うことを可能にするものである。この技術は、ゲノムプロジェクトの成果を飛躍的に発展させるものとして開発され、創薬研究、疾病の診断や予防を初めとする医学、薬学、生物学の分野で役立つものと期待されている。

まず、このDNAマイクロアレイは、1989年に

SBH (Sequencing by hybridization) として報告された。その後、米国のAffymetrix社やStanford大学がその方法は異なるものの高密度でDNAプローブを固定する高密度アレイ作製技術を開発し、遺伝子の発現、変異或いは多型 (いわゆるSNPs) を効率よく調べるHTS (High Throuput Screening) が可能となった。

DNAマイクロアレイとは、DNAを通常顕微鏡で使用されているスライドガラスやシリコンなどの基

板に固定（固相化）したもので、一般的なチップの大きさは約1.8cm x 5 cmで、その領域に数千から数万種類のDNAが固定されている。これに調べたいサンプルをハイブリダイズさせそのシグナルを画像として自動検出器で取り込んでデータを解析する。最近では、このDNAマイクロアレイのための機器が国内外の企業から発売されるようになっており、研究分野では有力な手法となっている。しかし、現在市販されているものは、主に研究用途を目的としたものであり、臨床検査での使用に耐えうるような高品質・高精度な製品はまだない。

そこで、我々は実際の臨床現場で使用できる信頼

性の高いDNAマイクロアレイ技術の確立を目指し、新規HLA遺伝子タイピングシステムを開発中である。このシステムでは、プローブの数を増やすことが容易なために、全人種に対応した詳細な解析が可能となり、さらに短時間で大量検体処理に適した系となることが期待される。

本研究会では、我々の研究も含めたDNAマイクロアレイの現状と将来の展望について紹介する。さらに、遺伝子変異やSNPsを検出するために最近報告されたDNAマイクロアレイ以外の方法についても紹介したい。

臓器移植（腎移植）におけるMHCの効用

橋本 光男

兵庫県立西宮病院・腎移植センター

我が国の腎移植は1964年に始まり1994年までの統計では9,801例の移植が実施され、そのうちの28%弱に当たる2,724例が献腎移植である(1)。特に献腎移植は提供者の善意に報いるためにも、拒絶反応ができるだけ少なく良好な移植予後が期待できる受者を選択しなければならない。HLA適合検査はこの受者選択の最も重要な要因の一つと考えられる。

Opeltz等はHLA-A, BとDR適合症例(HLA-A+B+DR: 0 mismatch)の5年生着率は74%で、不適合症例群のそれよりも有意に良好であると報告し、長期の移植予後におけるHLA適合度の重要性を指摘している。しかし、これらの適合症例と免疫学的に拒絶反応がより少ないと考えられるHLA一致同胞間移植の成績を比較すると、移植経過が長期になるとともに生着率の差が広がる傾向にあり、適合症例の5年での生着率74%に対し、HLA一致同胞間のそれは85%である(2)。我々も1983年から1995年

にかけて行われた552症例についてHLA適合度と5年生着率を検討したが、HLA一致同胞間では94%であるのに対し、DR適合症例は79%、DR不適合症例は72%であった。DR適合群とDR不適合群の間には有意差が認められたが、HLA一致同胞間の成績には遥かに及ばない結果であった(3)。移植医療の成否を考えるうえでHLA一致同胞間移植の生着率を一つの基準とすると、HLA-A, B, DRの6抗原適合症例でも期待されるほどの移植成績が得られていない。何故、これら両者の間に生着率の相違が生じるのであろうか？

幾つかの要因が考えられるが、本研究会では我々が検討してきたHLA-DRB1遺伝子型適合度と長期の移植予後との関連について述べ、さらに1995年に発足した日本臓器移植ネットワークのもとで実施された近畿ブロックの献腎移植症例のHLA-DRB1遺伝子型適合度と移植成績について検証してみたい。

- (1) 日本移植学会 腎移植臨床登録集計報告 (1994, 中間報告) 移植 vol. 30, No.4, 428-449, 1995
 (2) G. Opelz et al. HLA compatibility and organ transplant survival Rev Immunogenetics 1999 : 1,

334-342

- (3) Ichikawa Y. The significant effect of HLA-DRB1 matching on longterm kidney graft outcome. Transplantation 56 : 1368-1371, 1993

造血幹細胞移植におけるマイナー組織適合性抗原の応用

佐治 博夫

HLA研究所

マイナー組織適合性抗原 (mHA) は歴史的には Snellによって命名された主要組織適合性抗原 (MHC) に対する対語である。Snellのマウス皮膚移植の解析からすでに半世紀を経て、研究の進歩は「MHCの一人勝ち」の観を呈している。彼の発見したH-2のみが詳細に解析され、H-1, H-3, H-4, , , などmHAははるか後方に捨て置かれた。MHCのひとり勝ち；マイナー抗原はマイナーリーグか？

MHCであるH-2やHLAは血清学的に型を決めることができ、座位もある領域に限定して存在したため、ゲノム科学でも容易に解析された。一方、mHAはMHCクラスI分子に提示されるペプチドのアロ多型性であり、ゲノム科学でいうSNPsであり、そのうちアロ免疫を誘導するものをいう。抗血清にあたるCTLクローンの樹立、ペプチドの抽出と精製、アミノ酸シーケンス、ゲノム上のホモロジー検索、DNAタイピング、臨床データとの相関解析による確認などのステップを踏んでひとつずつ明らかにされてきた。この手順で明らかにされたmHAは5指に満たない。HLAクラスIアレルはすでに600以上が同定され、クラスIIも600に近くなるようとしているから格差は明らかである。

実地医学でのmHAはHLA一致同胞間移植後におこるGVHDやGVLのターゲット分子のアロ多型性である。造血幹細胞移植 (SCT) 症例の蓄積と骨髄バンクによる非血縁間移植のデータ解析は、組織適合性

が最大の予後要因であることを明らかにし、移植後GVHD発症に影響するマグニチュードはmHAが必ずしも「マイナーリーグ」でないことを示した。すなわち、HLA不適合がGVHD発症に与える影響力を10とすると、mHAはその1.5~2倍のマグニチュードを持つことがわかってきた。組織適合性においてMHCとmHAはJ-1対J-2リーグの関係ではなく、J-1とアジアリーグの関係に近い。

アロSCTにおける腫瘍免疫の主役は？

造血幹細胞移植は致死的な腫瘍細胞の根絶戦術のキュアとしての補充療法から、アロ腫瘍免疫療法としての位置付けが明瞭になってきた。前処置による腫瘍細胞の縮小をアロ免疫による腫瘍細胞の根絶でフォローするものである。近年のもうひとつの戦略；ミニ・トランスプラント (non-myeloablative transplantation) はさらにアロ免疫による腫瘍療法としての性格を強調したものとなっている。その効果をGVLとよぶが、そのターゲット分子はmHAである。ミニ・トランスプラントは固形腫瘍の治療への展開も示唆されており、唯一実施可能で有効な腫瘍免疫療法として脚光を浴びることは明らかになりつつある。

アロ腫瘍免疫療法のキーワードはmHAであり、その鉞脈をより多く掘り出す戦術の考案が待たれている。マイクロサテライト多型性やSNPsとSCT臨床データの相関解析がキーになりそうである。

造血幹細胞移植における新しい戦略： 母児間キメラ；"long-term feto-maternal microchimerism" の臨床応用

一戸 辰夫

京都大学大学院医学研究科・血液病態学

ヒトの同種造血幹細胞移植は1950年代に基礎研究が開始されたが、実際の治療方法として確立するためにはHLAの認識が必要であった。HLA適合者間同種造血幹細胞移植は、GVHDの制御をはじめいまだに未解決の課題を内包しつつも、多くの難治性造血器疾患に長期生存をもたらしている。その一方でdonor availabilityによる治療結果の違いが現実的に無視できないレベルまで顕在化しつつあり、HLA適合ドナーを見出せない症例に対する造血幹細胞移植技術の確立が急務となっている。この間、欧米においてはCD34陽性細胞の純化あるいはex vivo・in vivoでのT細胞機能の抑制などによってalloreactive barrierを超えようとの様々な試みが行われてきたが、移植後の重篤な免疫不全や高い原病の再発率などの問題に加え、実施経費や手技的煩雑さからまだ一般的な移植法となるには至っていない。

最近HLA特異的な高感度PCR法により、健常な免疫能を有した成人の末梢血球から母由来の非遺伝HLAが検出されるという驚くべき報告がなされた。一方、妊娠を経験した母末梢血からは出産後数十年以上を経過しても児由来の配偶者型HLAを検出することが可能であることも判明し、母子間においては妊娠後相当な長期間にわたってお互いの造血細胞のマイクロキメリズムが維持されているものと考えられる。本来<非自己>であるはずの造血細胞がきわめて長期間マイクロキメリズムを成立させているという現象は、これまでの免疫学に大きな問いを投げかけるものであり、その生物学的意義を明らかにしていくことはきわめて重要な課題と考えられる。われわれはこの現象をlong-term feto-maternal microchimerism (LT-FMC)と名付け、哺乳動物の妊

娠成立に関連する非遺伝MHCに対する普遍的トランス機構の一部と考えている。実際、LT-FMCはマウスにおいても成立しているようであり、われわれはH-2の異なったstrainを親にもつF1の骨髄から母と同一のH-2を発現する細胞が増幅可能であることを確認している。これまでLT-FMCはむしろ一種の免疫異常として理解されてきた感があり、SeattleのNelsonらはPSSなどの自己免疫疾患との関連を指摘している。しかし、われわれの行った自己免疫疾患を有さない25家系の調査では、母子間の約70%、同胞間の64%において、LT-FMCが確認可能であったことから、検出感度の問題も含めて考慮する時、むしろLT-FMCはかなり普遍的に認められる現象である可能性が高い（丸屋悦子，一戸辰夫他，投稿準備中）。

また、われわれは三世代の母子間を対象としたLT-FMCの検討も行ったが、母由来造血細胞は各世代間で伝達されることが確認されている。もしLT-FMCが非遺伝MHCに対する寛容のindicatorであることが明らかとなれば、妊娠を経験した女性は最大で3つのHLAハプロタイプ（母由来のもの1種類と配偶者のもの2種類）に対する潜在的な寛容誘導機構を秘めていることとなり、移植医療に与えるインパクトはきわめて大きなものになることが推測される。

すでにClaasやBurlinghamらによる腎移植例の解析などを通じ、非遺伝母HLA (NIMA) に対する獲得寛容効果の存在が示唆されているが、われわれはLT-FMCを指標として、そのような母子間の長期免疫寛容をヒト造血幹細胞移植に応用していくことを検

討している。例えば母子間に限らなくても、父由来のHLAハプロタイプを共有し、不適合ハプロタイプが母由来であるような同胞間（NIMA不一致同胞）では、非遺伝母HLAに対する相互のトレランスの存在が生着不全やGVHD発症リスクの低下に有利に働く可能性がある。昨年日本造血細胞移植学会ワーキンググループにおいて行われた両親からの造血細胞移植の治療成績に関する解析結果は、このようなわれわれの予想を支持するものであり、retrospectiveな解析ではあるが、母から移植を受けた群の生存率が父から移植を受けた群より有意に優れていることが判明した。またIBMTRでのHLA部分不適合血縁者間の造血細胞移植の解析でも、

NIMA不一致同胞間における急性GVHDの発症はNIPA不一致同胞間よりも有意に低率であることが報告されている。これらの知見に基づき、われわれはNIMA不一致血縁者をドナーとする造血細胞移植に関する臨床試験を開始しているが、これまで登録された症例ではHLA-A, B, DRに二座以上の不適合座が存在する例が含まれているにもかかわらず重症GVHDの出現は見られていない。今後の重要な研究課題は、母子間での相互の造血細胞のtrafficの過程における双方向性トレランスの誘導機構を明らかにすることであり、この領域へのさらなる基礎研究者の参画を強く期待している。

自己免疫疾患とMHC

尾林 博

社団法人京都微生物研究所学術調査研究企画室

自己免疫疾患は、遺伝的に疾患感受性をもつ個体（遺伝素因）に何らかの環境因子が加わり発症する。ヒトMHC領域であるHLAクラスI, クラスII分子は抗原ペプチドを結合してT細胞に提示することや、T-T細胞間やT-B細胞間の（自己）免疫応答機構に深く関与しており、自己免疫疾患発症、進展における最も重要な遺伝因子である。実際、多くの自己免疫性疾患では主としてHLAクラスII (DR, DQ)あるいはクラスI (A,B,C)遺伝子との有意な相関が報告されている。しかしながら、臨床的観点からは臓器特異的自己免疫疾患（1型糖尿病、多発性硬化症など）においても発症年齢、病状・障害程度・予後および自己抗体の産生の有無などのheterogeneityが認められ、特定のHLAクラスII, I領域遺伝子型のみでは疾患に対する相関関係の低下や、あるいは疾患との関連性を否定的する報告が見られる。

本シンポジウムでは1型糖尿病（インスリン依存

型；IDDM）を例に取り上げ、上記のclinical heterogeneityとHLAクラスII(-DR, -DQ)およびクラスIIIからクラスI領域に存在するマイクロサテライト遺伝子多型 (TNF α , BAT2, D6S273, MICA) に関する我々の成績を示し、これらのマイクロサテライト遺伝子多型解析の意義、臨床的有用性について考察する。

[1型糖尿病のclinical heterogeneity]

1型糖尿病では、①発症年齢（若年発症：成人発症）②発症様態（急激又は緩除発症）③自己抗体（ICA, 抗GAD抗体）の産生とそのheterogeneityがあり、成人発症緩除進行型（①, ②）はLADA(latent autoimmune diabetes in adult), SP-IDDM(slowly progressive IDDM)とも呼ばれる。ICAや抗GAD抗体はIDDM発症前から検出され、有用な予知マーカーとして知られているが、NIDDM(インスリン非依存

性糖尿病)患者の一部やstiff-man症候群などでも検出される同抗体と若年発症IDDM患者で検出される抗体とは質的(認識エピトープ)に異なる。

[検討成績結果の要約]

- ①若年発症IDDM患者ではクラスII遺伝子と強い関連性(感受性: DRB1*0405, *0901, *0802, 抵抗性: DRB1*1501, *1502)を認めるが, 発症年齢の上昇につれて, その関連性(遺伝的リスクファクター)は低下する。
- ②TNFaおよびMICAマイクロサテライト遺伝子多型

は発症年齢に関係する。

- ③DRB1*1502-DQB1*0602を有する抗GAD抗体陽性成人NIDDM様発症患者において, TNFaマイクロサテライト遺伝子多型は, IDDMへの進展および抗GAD抗体の産生, 質的差違の決定に影響(関連)する。

TNFaを中心とするマイクロサテライト遺伝子多型の解析はIDDMの病因論のみならず, 予知および予防的治療方針の選択に有益な情報を与えるものと思われる。