

4. ヒト白血球抗原検査法の検討 Evaluation of HLA Typing

田口 武 佐藤 敏雄 林 英夫

Takeshi Taguchi, Toshio Sato and Hideo Hayashi

はじめに

ヒト白血球抗原 (HLA) には、種々の型が発見され赤白血球の型と並んで、輸血後の悪寒・発熱などの副作用や、臓器・組織移植を行う際の拒絶反応の原因となることから多くの研究がなされてきた¹⁾。

さらに各人の HLA 型を調べることにより、遺伝や疾病の素因、原因、予後をさぐる因子として遺伝学から医学・生物学の領域にわたり、ますますその重要性が増してきている²⁾。

現在、HLA として認められた抗原型は、その染色体の位置から A 座 20, B 座 33, C 座 6, D 座 11, DR 座 7 の合計 77 種類の数に分けられている³⁾。これらの組み合わせは個人により人種により異なり特有の型があるとされている。

そこで今回は、A 及び B 座の中で日本人に比較的高い頻度を示している数種の抗原型について型別検査を実施し、ABO・Rh 式血液型と同様のレベルで検査を行うことが可能か否かを検討したので報告する。

材料と方法

1) 測定材料：ヘパリン加試験管に採血された新鮮血液を 1～3 ml 使用した。

2) 抗血清：望星サイエンス製を A 座から -2, -9, -10, -11 の 4 種, B 座から -7, BW7+BW40+B48, BW22+BW54, BW51+BW52 の 4 種に陽性と陰性のコントロールを 2 種加えて使用した。

3) その他の試薬

イ) Ficoll-Conray 混合液：Ficoll を蒸留水で溶解し 9% の溶液とする。Conray 66.8% 液に等量の蒸留水を加えて 33.4% の溶液とし、Ficoll : Conray の両液を 2.4 : 1 の割合で混合し比重 1.077 に調製した。

ロ) Hank's 溶液 (三光純薬)

ハ) ウキギ補体 (望星サイエンス)

ニ) 5% エオジン水溶液

ホ) 中性ホルマリン液

4) HLA-A, B Typing

イ) リンパ球の分離：血液と等量の生食液で約

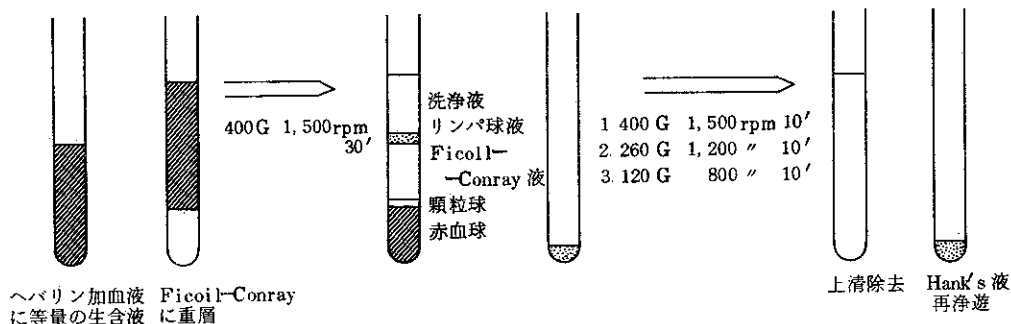


図 1

2倍に希釈混和後、Ficoll-Conray液3ml入りの試験管に静かに重層する。400G30分遠心後3層に別れた中間部の白い輪状のリンパ球層を毛細管ピペットで採取後、生食液を加えて3回遠心洗浄を繰り返し、Ficoll液の残余、血小板の除去を行い上清をできるだけ除いてHank'sで3000/mm³になるよう調製再浮遊した。

ロ) リンパ球細胞毒試験

a) 抗血清プレートの作製：マイクロプレートに陽性、陰性対照を2穴にA、B座(Locus)の各4種のHLA抗血清を8穴に1μl宛分注後(-)80℃で凍結、使用に際し取り出し、自然融解させた。

b) Hank's液に再浮遊したリンパ球を各抗血清の小穴に1μlを分注しミキシング後室温30分incubationした。

c) ウサギ補体を5μl各穴に分注し更に60分incubationした。

d) 5%エオジン水溶液を2μl各穴に分注し染色、5分間放置した。

e) 中性ホルマリンをツベルクリン用注射器を用いて半滴加え固定および反応停止を行った。

5) 判定

反応が終了したプレートを位相差顕微鏡で(×100)各々を観察した。

各検体の陽性、陰性対照を鏡検し、陽性は殆んどがエオジンに染まり黒ずんで膨化した細胞(死)であり、陰性は殆んどの細胞がエオジンに染まらず丸く光って見える(生)ことを確認したのち、A locusの4種、B locusの4種について死細胞が40%以下を陰性と判定した。

結 果

表1の反応例に示されるように縦に10穴を1検体として60穴6検体を1プレートで実施した。

154例の型別の結果、使用した抗血清と反応したのは143例であった。A locusで反応のなかったものが34件、1種のみ陽性は79件、2種が41件で3種のものはなかった。B locusでは反応のなかったものは50件、1種の陽性が68件、2種が27件

表1 反応例と表現頻度

	プレートの反応例						反応陽性数 309	当 所 N=154 (%)	*日本HLA 会議 N=430 (%)	*日本人 N=141 (%)	**日本 %
	1	2	3	4	5	6					
Positive Contorol	卅	卅	卅	卅	卅	卅	154				
Negative Contorol	--	--	--	--	--	--	0				
HLA-A 2	--	--	卅	--	--	卅	57	37.0	30.3	43.3	45
-A 9	--	--	--	--	--	卅	31	20.1	37.9	58.9	58
-A 10	--	--	--	--	--	--	37	24.0	14.6	14.2	17
-A 11	--	卅	--	--	卅	--	35	22.7	17.7	11.3	24
HLA-B 7	--	--	--	卅	--	--	25	16.2	13.4	8.5	11
-B7+Bw40+Bw48 (B 40)	--	--	--	卅	--	--	40	25.9	35.5	29.1	31
-Bw22+Bw54 (B 22)	卅	--	--	--	--	--	16	10.4	21.5	29.5	16
-Bw51+Bw52 (B 5)	--	--	卅	--	卅	卅	68	44.2	35.2	38.3	34

* 5)より引用した。

** 1)より引用した。

と3種には9件あった。

各人のHLA型は、A・B・C locus 共2つずつの組み合わせで表わされる。実施したA・B locus から「A・2, A・9, B・5 B・7」のように4種がすべて表現できたものが8件あった。

表1の表現頻度に表されたものと当所の比較で5種には大差のない結果であったが、A・9, B・22は極めて少くA・10では多くの反応を見る相違した成績が得られた。

考 察

① リンパ球の分離から反応固定、鏡検判定と操作の複雑さは、ABO式血液型とは比較にならない。

② 生着細胞と死細胞の割合で判定することから、ヘパリン処理した新鮮血(当日採血のもの)が必要である。

③ 各座に属する種類が多く、購入できない抗血清がある。また特異性についても3種以上のロットの異なる抗血清を用いることが望ましいことから1検体に60～120種類が必要となる。

④ 市販の抗血清は、少量(0.5 ml)で且つ有効期限も短い。使用する量は微量(1 μ l)であり、これに必要な特殊の器具、判定のための位相差顕微鏡がいる。

⑤ 成績を判定する鏡検には十分な精査と経験が必要である。

以上のことから検査の重要性はあるが、日常検査への導入は難かしくABO式血液型との併用も未だ将来のことと思われる。

文 献

- 1) 辻公美：組織適合抗原と臓器移植，けんさ，Vol, 6 Ⅱ 3/4 11～24 1976年
- 2) 辻公美：HLA 研究の歴史的展望。日本臨床 36巻9号 7～9 1978
- 3) 村上省三：HLA 抗原系の分類とWHO 新 nomenclature。日本臨床 36巻9号 10～14 1978
- 4) 萩野陽一郎：本邦HLA 抗原検査法の統一と標準化をめぐる。日本臨床 36巻9号 15～19 1978
- 5) 宮島哲也他：HLA 抗原系の現況，医学のあゆみ 100巻2号 267～272 1977