

HLA 検査の紹介

秦泉寺裕子¹

¹筑波大学人間総合教育研究支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

消化器外科研究室では、臓器移植に必要な組織適合性検査のひとつである HLA 検査を実施している。HLA 検査とはどのような検査なのか。検査方法やその種類、その検査精度や問題点など検討した。

また、臓器移植ネットワークに認定されている HLA 検査施設（第3類）は、茨城県に1箇所しかなく、筑波大学である。全国的に展開され注目を集めている臓器移植の一翼を担っている HLA 検査を中心に紹介する。

1. HLA とは

HLA はヒトの組織適合性抗原 (human leukocyte antigen) である。細胞膜表面に発現する膜蛋白質で、免疫系の細胞性免疫に関与している。また、この抗原をコードしている遺伝子群を HLA 遺伝子複合体という。

ヒトは、細胞内に寄生した病原体由来の蛋白質などを分解し、できた抗原ペプチドを HLA に結合させた形で細胞膜表面に提示する。この提示をうけて免疫担当細胞が免疫反応を活性化させる。これにより、感染した細胞はもとより、病原体を体内から排除する。この一連の免疫応答が移植片に向かって働くと、拒絶反応が起こる。

HLA には、形や組織分布や結合する抗原ペプチドの由来を異にする、クラス I とクラス II に分けられる。

HLA クラス I 分子は、すべての有核細胞と血小板に発現している。ウイルスや細胞内寄生性細菌に感染している細胞と腫瘍細胞など、細胞内由来の分解ペプチドを、クラス I 抗原に結合させ提示、免疫担当細胞を活性化させる。

クラス II 分子は樹状細胞、マクロファージ、リンパ球 B 細胞、モノサイトなどの抗原提示細胞に限定して発現する。抗原提示細胞は細胞外にある蛋白質や細胞表面にある蛋白質を取り込み分解し、クラス II 抗原と結合させ提示、免疫応答を活性化させる。

さらに、クラス I 分子は HLA-A,B,C と、クラス II 分子は HLA-DR,DQ,DP に細分化される。また、それを両親から1組ずつ受け取ることとなる。(図1)

また、HLA-A,B,DR では、HLA 抗原の種類が多数同定されている。(表1) これは、抗原ペプチ

ド結合部分に差異があることを意味しており、各個人で提示できる抗原ペプチドが限定されることになる。

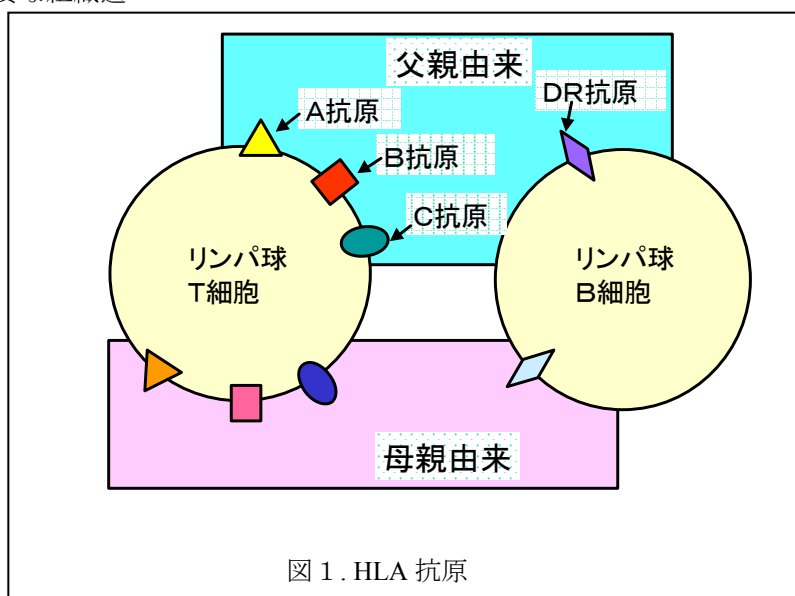


表1. 第11回国際組織適合性ワークショップで公認された HLA 特性

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	B49(21)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1
A2	B7	B50(21)	Cw2	Dw2	DR103	DQ2
A203	B702	B51(5)	Cw3	Dw3	DR2	DQ3
A210	B8	B52(5)	Cw4	Dw4	DR3	DQ4
A3	B12	B53	Cw5	Dw5	DR4	DQ5(1)
A9	B13	B54(22)	Cw6	Dw6	DR5	DQ6(1)
A10	B14	B55(22)	Cw7	Dw7	DR6	DQ7(3)
A11	B15	B56(22)	Cw8	Dw8	DR7	DQ8(3)
A19	B16	B57(17)	Cw9(3)	Dw9	DR8	DQ9(3)
A23(9)	B17	B58(17)	C10(3)	Dw10	DR9	
A24(9)	B18	B59		Dw11(w7)	DR10	
A25(10)	B21	B60(40)		Dw12	DR11(5)	
A26(10)	B22	B61(40)		Dw13	DR12(5)	
A28	B27	B62(15)		Dw14	DR13(6)	
A29(19)	B35	B63(15)		Dw15	DR14(6)	
A30(19)	B37	B64(14)		Dw16	DR15(2)	
A31(19)	B38(16)	B65(14)		Dw17(w7)	DR16(2)	
A32(19)	B39(16)	B67		Dw18(w6)	DR17(3)	
A33(19)	B3901	B70		Dw19(w6)	DR18(3)	
A34(19)	B3902	B71(70)		Dw20		
A36	B40	B72(70)		Dw21		
A43	B4005	B75(15)		Dw22		
A66(10)	B41	B76(15)		Dw23	DR51	
A68(28)	B42	B77(15)				
A69(28)	B44(12)	B7801		Dw24	DR52	
A74(19)	B45(12)			Dw25		
	B46			Dw26	DR53	
	B47	Bw4				
	B48	Bw6				

組織適合性学会ホームページより引用

¹ E-mail:mg99i150@igaku.md.sukuba.ac.jp

また、細胞膜表面の HLA 抗原に対応する DNA 型は、さらに多数となる。DNA レベルでは、膜表面では判定できない塩基配列の違いを調べることができ、それによってさらにたくさんの多型が発見、認定されている。表2は日本人に見られる HLA-DNA 型であるが、それでも表1の HLA 抗原で発見されている HLA 型とは比較にならないほどの数となり、細分化が進んでいる。

A-Allele は HLA-A を DNA 型で表している。頻度は参考までに記載した。HLA 抗原は表1の HLA 型に対応する。DNA 型の最初の2桁が、ほぼ HLA 抗原型に一致しているが、中には一致しないものや、限定できないもの、DNA 型では判定できるのに細胞膜に発現していないものも見つかっている。

表2. 日本人に見られる DNA 型と頻度

A-Allele	頻度	HLA抗原	B-allele	頻度	HLA抗原	B-allele	頻度	HLA抗原	DRB1-allele	頻度	HLA抗原
A*0101	0.2	A1	B*0702	5.2	B7	B*39011	r	B3901	DRB1*0101	4.76	DR1
A*0201	10.9	A2	B*0705	r	B7	B*39013	4.0	B3901	DRB1*1501	6.08	DR15
A*0203	r	A203	B*1301	0.9	B13	B*39021	0.2	B3902	DRB1*1502	8.74	DR15
A*0206	10.4	A2	B*1302	0.1	B13	B*39022	r	B3902	DRB1*1602	0.55	DR16
A*0207	3.4	A2	B*14	r	B14(B64orB65)	B*3904	0.2	B39	DRB1*0301	0.22	DR17
A*0210	0.1	A210	B*1501	7.2	B62	B*3923	r	(B39)	DRB1*0401	1.16	DR4
A*0215N	Vr		B*1502	r	B75	B*40012	5.1	B60	DRB1*0403	3.00	DR4
A*0218	r	A2	B*1503	r	B72	B*4002	8.2	B61	DRB1*0404	0.22	DR4
A*0242	Vr	-	B*1507	0.7	B62	B*4003	1.1	(B61)	DRB1*0405	15.51	DR4
A*0301	0.8	A3	B*1509	Vr	B70	B*4006	5.3	B61	DRB1*0406	3.22	DR4
A*0302	r	A3	B*15111	1.0	B75	B*4007	Vr	(B4007)	DRB1*0407	0.44	DR4
A*1101	8.1	A11	B*15112	Vr	B75	B*4029	Vr	(B61)	DRB1*0410	1.82	DR4
A*1102	0.2	A11	B*1518	0.9	B71	B*4402	1.0	B44	DRB1*0701	0.81	DR7
A*2402101	35.6	A24	B*1522	Vr	B35	B*44031	6.9	B44	DRB1*0802	4.99	DR8
A*2404	r	A24	B*1526N	Vr		B*4601	3.8	B46	DRB1*0803	7.55	DR8
A*2408	r	A24	B*1527	Vr	B62	B*4602	Vr	(B46)	DRB1*0809	r	DR8
A*2420	Vr	-	B*1528	r	B15	B*4801	2.7	B48	DRB1*0901	12.38	DR9
A*2601	9.8	A26	B*1538	r	(B15)	B*51011	7.9	B51	DRB1*1001	0.59	DR10
A*2602	2.2	A26	B*1546	Vr	(B70)	B*51021	0.1	B5102	DRB1*1101	2.94	DR11
A*2603	2.1	A26	B*1560	Vr	(B62)	B*5103	Vr	B5103	DRB1*1201	3.90	DR12
A*2604	Vr	A26	B*2702	Vr	B27	B*52011	13.7	B52	DRB1*1202	2.66	DR12
A*2605	r	A26	B*2704	r	B27	B*5401	6.5	B54	DRB1*1301	0.86	DR13
A*2606	Vr	A26	B*2705	r	B27	B*5402	Vr	(B54)	DRB1*1302	5.25	DR13
A*2611N	Vr		B*2711	Vr	B27	B*5502	3.2	B55	DRB1*1307	0.11	(NJ25)
A*2901	Vr	A29	B*3501	8.6	B35	B*5504	r	B55	DRB1*1401	4.45	DR14
A*3001	0.3	A30	B*3510	Vr	(B35)	B*5510	Vr	(B55)	DRB1*1405	2.56	DR14
A*31012	7.7	A31	B*3521	Vr	(B35)	B*5601	1.0	B56	DRB1*1407	0.27	DR14
A*3105	Vr	-	B*3531	Vr	(B35)	B*5603	0.2	(B56)	DRB1*1403	1.57	DR1403
A*3201	Vr	A32	B*3535	Vr	(B35)	B*5605	Vr	(B56)	DRB1*1412	r	DR1403
A*3303	7.9	A33	B*3701	0.2	B37	B*5701	0.1	B57	DRB1*1402	r	(HR5)
A*6801	r	A68	B*3802	0.3	B38	B*5801	0.6	B58	DRB1*1406	1.36	(HR5)
						B*5901	1.7	B59	DRB1*1429	r	(DR14?)
						B*6701	1.0	B67			
						B*78022	Vr	B78			
						B*8101	Vr	B81			

遺伝子頻度：Tanaka, H. et al., Clinical Transplants 1996; 139-144 による日本人 N=493 のアليل頻度
 その他、低頻度により上記の調査で検出されなかったアليلを r とし、さらに低頻度と思われるものを Vr とした
 抗原名：WHO Nomenclature Committee による定義（ただし () は標準化委員会による抗原名）

組織適合性学会ホームページより引用

2. HLA 検査方法

消化器外科研究室では、移植医療で検査することが義務付けられている HLA-A,B,DR について検査している。

また、検査方法は、膜表面にある HLA 抗原を直接、抗原抗体反応で調べる方法（血清学的検査）と、HLA 抗原をコードしている遺伝子を、PCR などを用いて解析する方法（DNA 検査）を実施している。

2.1 血清学的検査方法（細胞障害試験）

検体として被験者のリンパ球を用い、テラサキ HLA トレイ(ONE LAMBDA,INC)と交差試験を行う。トレイのウェルには各 HLA 抗原に特異的な抗体が分注されており、被験者の HLA 型に応じて細胞障害反応が起こる。これにより、HLA 型を判定できる。（図 2）（写真 1）この方法は、トレイに分注されている抗血清の抗体価の高低や、分注されている抗血清の種類で判定できない HLA 型を生じるおそれがある。また、患者さまのリンパ球の状態の良し悪しで反応が弱くなることや、リンパ球を取り出すだけで、細胞が障害されてしまうなどのことも起きうる。

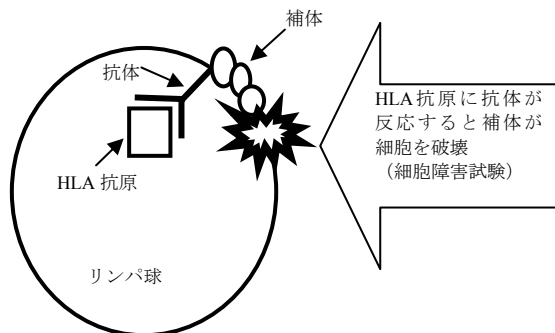


図 2. 血清学的検査方法の模式図

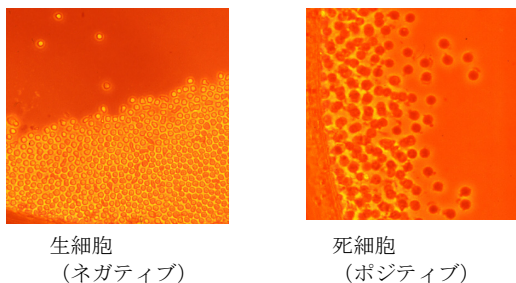


写真 1. 血清学的検査例

2.2 DNA 検査方法

消化器外科研究室では、マイクロ SSP (One Lambda, Inc) と Dynal RELI SSO (DYNAL BIOTECH, Inc) の 2 種類の検査キットを使用して HLA 検査を実施している。

マイクロ SSP は、各 HLA 抗原をコードしているプライマーと被験者の DNA を PCR 増幅することで HLA 型を判定する。（図 3）（写真 2）

各 HLA 型に対応する数のプライマーが必要となり PCR が煩雑になるが、判定にかかる時間は短縮でき 3 時間程度で結果を出すことができる。対応できる検査数は限られるので、少検体数向きである。

プライマーの種類を変えることで、もっと細かい塩基配列の違いを読み取ることも可能となっている。

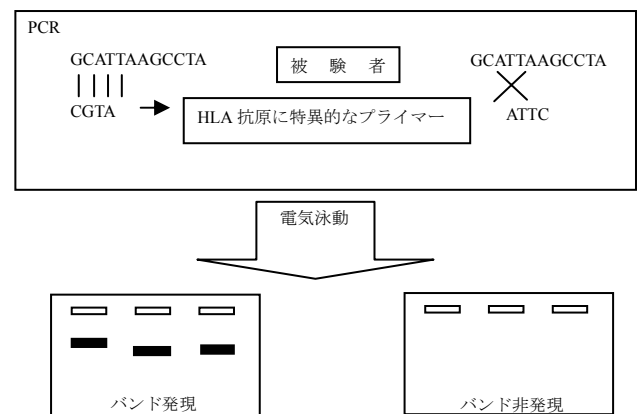


図 3. SSP 法の模式図

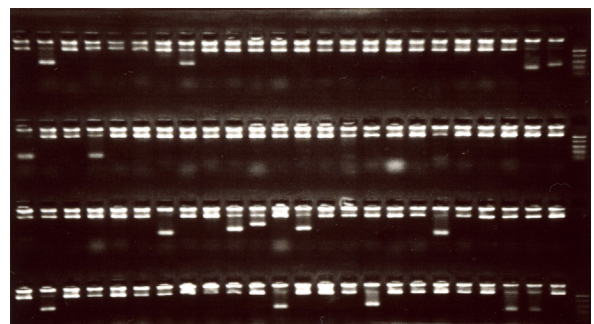
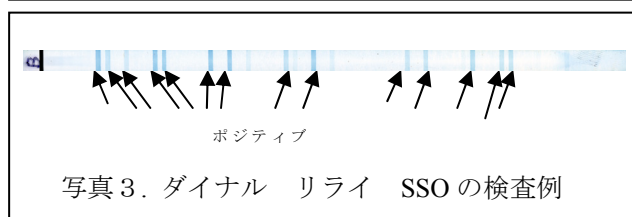
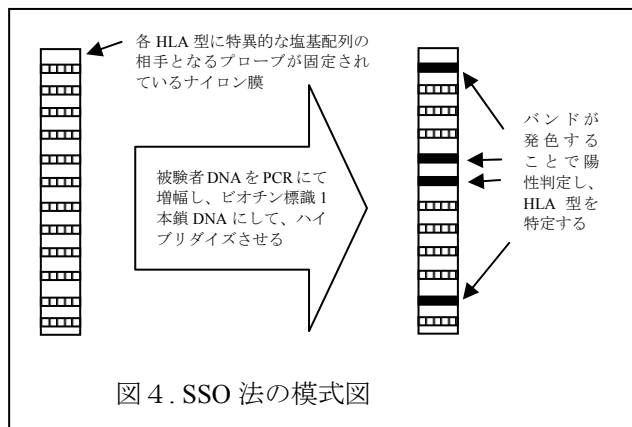


写真 2. マイクロ SSP JPN の検査例

Dynal RELI SSO は、細いナイロン膜に各 HLA 抗原に特異的なプローブが貼り付けてあるキットを使用する。これに被験者の DNA を PCR にて増幅しビオチン標識して 1 本鎖にしたものをハイブリダイズ、発色させて HLA 型を判定する。(図 4) (写真 3)

PCR は一度でよく、1 枚のナイロン膜にハイブリダイズするので間違いは起こりにくく、操作が容易である。しかし、ハイブリダイズ、発色作業に多少時間がかかり、6 時間を要する。多数の検体を一度に処理することが可能で、多検体向きである。

また、さらに細かく塩基配列を決定する作業には不向きである。



3. 検査結果の一例

HLA-A の、DNA 検査結果を比較して、検討する。

図 5 には SSP 法での HLA-A の判定結果を示した。図 6 には SSO 法での判定表と判定結果を示している。いずれも多数の組み合わせが判定でき、この中のどの DNA 型が被験者の DNA 型か区別することはできない。また、プライマー、プローブの塩基配列が異なるため、組み合わせの種類も 2 法では違う結果となった。しかし、上 2 桁ではいずれも同じ結果であり、血清学的検査と一致している。以上のことから、この被験者の HLA 型は HLA-A(11,26)であることがいえる。

血清学的検査では細胞膜表面に発現している HLA 抗原を 2 桁で判定している。しかし、DNA 検査では、4 桁になっている。しかも、検査結果はすっきりと 1 つではない。これは、HLA 遺伝子が極めて多型性が高く、相同性遺伝子が多いことが原因となっている。さらに、新しい DNA 型 (アリル) は 2002 年には HLA-ABC だけでも 900 アリルを超えている。また、問題点として遺伝子型では区別できるが、血清学的には同一のものや、細胞膜表面に HLA 抗原として提示しないアリルも見つかっており、すっきりとした判定は、非常に困難なものになっている。

しかし、日本人に見られる DNA 型や、SSP 法と SSO 法を組み合わせると考えると、かなり HLA 型を絞り込むことはできる。また、直接遺伝子をシーケンスして読み取る方法などもっと精度の高い検査方法を導入するという考え方もある。ただ、この研究室では移植医療で拒絶反応を抑え、移植臓器ができるだけ長く生着することを目的としている。現在では免疫寛容誘導するための検討を進める必要があると考えている。

```

Loc <A> with 0 false reaction(s)
***A*11/A*26>*** A*11011/A*2601 A*11011/A*2602 A*11011/A*2604 A*11011/A*2608 A*11012/A*2601 A*11012/A*2602 A*11012/A*2604 A*11012/A*2608 A*1102/A*2601 A*1102/A*2602 A*1102/A*2604 A*1102/A*2608 A*1103/A*2601 A*1103/A*2602 A*1103/A*2604 A*1103/A*2608 A*1104/A*2601 A*1104/A*2602 A*1104/A*2604 A*1104/A*2608 A*1105/A*2601 A*1105/A*2602 A*1105/A*2604 A*1105/A*2608
***A*11/A*10>*** A*11011/A*2610 A*11012/A*2610 A*1102/A*2610 A*1103/A*2610 A*1104/A*2610 A*1104/A*2610 A*1105/A*2610
***A*11/A*BLANK>*** A*11011/A*2611N A*11012/A*2611N A*1102/A*2611N A*1103/A*2611N A*1104/A*2611N A*1105/A*2611N
***A*11/A>*** A*11011/A*2612 A*11011/A*2613 A*11011/A*2614 A*11011/A*2615 A*11011/A*2616 A*11012/A*2612 A*11012/A*2613 A*11012/A*2614 A*11012/A*2615 A*11012/A*2616 A*1102/A*2612 A*1102/A*2613 A*1102/A*2614 A*1102/A*2615 A*1103/A*2612 A*1103/A*2613 A*1103/A*2614 A*1103/A*2615 A*1104/A*2612 A*1104/A*2613 A*1104/A*2614 A*1104/A*2615 A*1104/A*2616 A*1105/A*2612 A*1105/A*2613 A*1105/A*2614 A*1105/A*2615
***A*11/A*2617>*** A*11011/A*2617 A*11012/A*2617 A*1102/A*2617 A*1103/A*2617 A*1104/A*2617 A*1105/A*2617
***A*11/A*2618>*** A*11011/A*2618 A*11012/A*2618 A*1102/A*2618 A*1103/A*2618 A*1104/A*2618 A*1105/A*2618
***A*1107/A*26>*** A*1107/A*2601 A*1107/A*2602 A*1107/A*2604 A*1107/A*2608
***A*1107/A*10>*** A*1107/A*2610
***A*1107/A*BLANK>*** A*1107/A*2611N
***A*1107/A>*** A*1107/A*2612 A*1107/A*2613 A*1107/A*2614 A*1107/A*2615
***A*1107/A*2617>*** A*1107/A*2617
***A*1107/A*2618>*** A*1107/A*2618
***A*1108/A*26>*** A*1108/A*2601 A*1108/A*2602 A*1108/A*2604 A*1108/A*2608
***A*1108/A*10>*** A*1108/A*2610
***A*1108/A*BLANK>*** A*1108/A*2611N
***A*1108/A>*** A*1108/A*2612 A*1108/A*2613 A*1108/A*2614 A*1108/A*2615
***A*1108/A*2617>*** A*1108/A*2617
***A*1108/A*2618>*** A*1108/A*2618
***A*1109/A*26>*** A*1109/A*2601 A*1109/A*2602 A*1109/A*2604 A*1109/A*2608
***A*1109/A*10>*** A*1109/A*2610
***A*1109/A*BLANK>*** A*1109/A*2611N
***A*1109/A>*** A*1109/A*2612 A*1109/A*2613 A*1109/A*2614 A*1109/A*2615
***A*1109/A*2617>*** A*1109/A*2617
***A*1109/A*2618>*** A*1109/A*2618
***A*1110/A*26>*** A*1110/A*2601 A*1110/A*2602 A*1110/A*2604 A*1110/A*2608
***A*1110/A*10>*** A*1110/A*2610
***A*1110/A*BLANK>*** A*1110/A*2611N
***A*1110/A>*** A*1110/A*2612 A*1110/A*2613 A*1110/A*2614 A*1110/A*2615
***A*1110/A*2617>*** A*1110/A*2617
***A*1110/A*2618>*** A*1110/A*2618
***A*1113/A*26>*** A*1113/A*2601 A*1113/A*2602 A*1113/A*2604 A*1113/A*2608
***A*1113/A*10>*** A*1113/A*2610
***A*1113/A*BLANK>*** A*1113/A*2611N
***A*1113/A>*** A*1113/A*2612 A*1113/A*2613 A*1113/A*2614 A*1113/A*2615
***A*1113/A*2617>*** A*1113/A*2617
***A*1113/A*2618>*** A*1113/A*2618

```

図 5. SSP 法の判定例

ダイナルリライHLA-A速見表(日本人)-PN 830.01

A	Allele(S)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	*01011																																			
1	*01012																																			
2	*0301,0207,0215N,0218,0242																																			
2	*0203																																			
2	*0206,0210																																			
3	*03011,03013,0303N																																			
3	*03012																																			
3	*0302																																			
11	*1101,1102																																			
24	*2402,2420																																			
24	*2404																																			
24	*2408																																			
26	*2601,2602																																			
26	*2603,2606																																			
26	*2604																																			
26	*2605																																			
26	*2611N																																			
29	*2901																																			
30	*3001																																			
31	*31012																																			
31	*3105																																			
32	*3201																																			
33	*3303																																			
68	*68011																																			

* Faint but positive signal
? This allele contains a novel mutation under the indicated probe
Without testing this allele in the HLA-A Assay we cannot predict whether it will hybridise with the indicated probe.

東京医科歯科大学教授 木村彰方先生が日本人のハプロタイプ頻度に基づき作成されたものです。
この速見表による判定は必ずPackage InsertのHomozygous Hybridisation Patternsで確認して下さい。
またこの速見表にないパターンはHomozygous Hybridisation Patterns、ダイナルリライ判定用ソフトにより判定して下さい。

Type summary: HLA-A*11 & 26

NMDP Code: HLA-A*11XX & 26XX;

1 HLA-A*11 & 26
HLA-A*1109 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2616
HLA-A*1109 & 2616
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2604
HLA-A*1109 & 2604
HLA-A*1108 & 2604
HLA-A*1108 & 2608
HLA-A*1103 & 2616
HLA-A*1108 & 2616
HLA-A*1103 & 2604
HLA-A*1108 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*1103 & 2601,2602,2610,2615,2617
HLA-A*1109 & 2612
HLA-A*11011,11012,1102,1107 & 2612
HLA-A*1108 & 2612
HLA-A*1103 & 2612

図6. SSO法の判定表と判定例

4. 臓器移植ネットワーク

臓器移植ネットワークとは、国内唯一の臓器提供の仲介を行う組織である。仲介する臓器は、心臓、肝臓、肺、脾臓、腎臓、小腸である。また、移植医療の普及・啓発、移植希望者の登録、臓器提供者への対応、適正かつ公平な移植者の選択などの業務を遂行されている。H15年7月現在、心臓70名、肺72名、肝臓62名、腎臓12、491名もの移植を待たれる患者さまが登録されている。

筑波大学は、腎臓、脾臓の移植施設、また今回紹介するHLA検査施設(第3類)に認定されており、ネットワークと協力し移植医療の一翼を担っている。

研究室では、主に腎臓移植希望者のHLA検査、ネットワークへの登録、年1回の血清保存、また、検査精度を保つために義務化されているクオリティコントロールに参加している。

茨城県では、腎移植希望者は約250名登録されており、一日も早く移植が実現されることを願っている。

5. これからのHLA検査

HLA検査方法は常に進化し続けている。また、HLA-DNA型もどんどん増え続けている。検査技術の向上はもとより、新しい情報にも耳を研ぎ澄ませて、患者さまや、依頼者である先生方により正確な検査

結果を提供できるように、日々努力することが求められていると考える。

謝辞

今回の発表にあたり適切なご助言、ご指導を頂きました湯沢賢治先生に、この場をかりてお礼申し上げます。

参考資料

- [1] 臓器移植におけるHLA-DNAタイピングマニュアル
厚生科学研究ヒトゲノム再生医療等研究事業(H12年度)
- [2] 臓器移植ネットワークホームページ
URL: <http://www.jotnw.or.jp/>
- [3] 組織適合性学会ホームページ
URL: <http://square.umin.ac.jp/JSHI/frame.html>
- [4] 免疫学最新イラストレイテッド
- [5] 平成15年度日本組織適合性学会・認定HLA検査技術者講習会 資料
- [6] VERITAS マイクロSSP HLA DNA タイピングキット、ダイナルリライSSOタイピングキット取り扱い説明書