

症 例

成分献血者に見られた HLA-B 座モザイクと考えられる症例の解析

斉藤 敏 小松 由美 大田 智 玉木 啓子
瀬下 秀幸 山崎雄一郎 野村 節夫
長野県赤十字血液センター

(平成 17 年 3 月 31 日受付)

(平成 17 年 6 月 17 日受理)

ANALYSIS OF AN HLA-B MOSAICISM OBSERVED IN APHERESIS DONOR

Satoshi Saito, Yumi Komatsu, Satoshi Ota, Keiko Tamaki,
Hideyuki Seshimo, Yuichiro Yamazaki and Setsuo Nomura
Japanese Red Cross Nagano Blood Center

We encountered an apheresis donor with a suspected case of mosaicism. The donor, K.A., was a 46-year-old Japanese female registered as an HLA-compatible platelet concentrate (HLA-PCs) donor. In her HLA serological typing for HLA-PCs donor registration, three antigens, HLA-B55, -B61 and -B62, were assigned in the HLA-B locus. She was not a twin and had never undergone transfusion or transplantation. Flow cytometric analysis using platelets and lymphocytes indicated that HLA-B55, -B61 and -B62 antigens were simultaneously expressed on the surface of platelets and lymphocytes. HLA-B allele typing with the polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism technique using genomic DNA from peripheral blood and nails as a somatic sample was carried out to establish HLA-B mosaicism. Three alleles, HLA-B*5502, -B*4002 and -B*1501, were assigned in both exon 2 and exon 3. HLA-B mosaicism was observed in both her peripheral blood and nails. The HLA-B*4002 and -B*1501 alleles were inherited by her son, who carried three HLA-B alleles, HLA-B*4002, -B*1501 and -B*4001. No other sign of chimerism or mosaicism was observed in other HLA loci antigens or red cell antigens. These results suggest that this donor has a chimeric allele consisting of a mixture of the nucleotide sequences of HLA-B*4002 and -B*1501 alleles.

Key words : Chimerism, HLA-B, Mosaicism, PCR, Triplet

はじめに

血液型の異なる 2 種の血球が一個体内に混在する例には、血液型キメラと血液型モザイクがある。血液型キメラは、異なる表現形の血球が 2 つあるいは、それ以上の遺伝子に由来している状態であり、血液型モザイクは 1 つの遺伝子に由来している状態であると定義されている¹⁾。血液型キメラは Dunsford らにより初めて報告され²⁾、本邦では Furuhashi ら³⁾が報告して以来、数多くの報告がされている。一方、血液型モザイク例としては、

北濱⁴⁾、生田⁵⁾の報告があるが、これら報告例では、親から子への血液型モザイクの遺伝は確認されていない。また、HLA クラス I のモザイクについては、われわれが調べた範囲において、これまで報告例がない。今回、HLA 成分献血の登録を希望する、46 歳女性の血清学による HLA タイピングにおいて、HLA-B 座に 3 抗原が同定される症例に遭遇し、フローサイトメトリー (FCM) 法による細胞学的解析、HLA アリルタイピング、家系調査から、HLA-B 座においてモザイクの可能性が示

唆されたので報告する。

方 法

症例

献血者 K.A. は 46 歳女性。平成 16 年 5 月 18 日に献血のため来所。HLA 成分登録のための HLA クラス I タイピングにおいて、HLA-B 座に 3 抗原が同定された。輸血歴はなく、特記すべき疾患もない。出生に当たり、双生児または母親の妊娠中の流産はなかった。本人、母、夫、娘、息子の 5 人家族であり、精査のための家系調査および DNA 検査の実施に当たっては、家族と面談後、文書により同意を得た。

血液型

ABO オモテ検査は、市販のマウス由来パイオクローン (Ortho 社) の抗 A、抗 B 血清とレクチン由来抗 A₁ 血清 (Ortho 社) および抗 H レクチン (Ortho 社) を用い、試験管法で行った。ウラ検査は、市販の A₁ 型、A₂ 型、B 型、O 型血球 (Immucor 社) を用いて試験管法で行った。ABO 式以外の血液型については、Ortho 社の抗血清を用いて判定した。

HLA タイピング

HLA-A、B、C 座の血清学によるタイピングは、日赤共通タイピングトレイと自家製タイピングトレイの 216 種類の抗血清を用い LCT により行った⁶⁾。アリルタイピングは末梢血、爪由来の DNA を使用し、HLA-A、-B、-DRB1、-DQB1、-DPB1 座アリルは polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法により行い、PCR-RFLP 法により識別ができないアリルと HLA-C 座アリルについては polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) 法により行った⁷⁾⁻¹²⁾。Fig. 1 に HLA-B 座アリルの PCR-RFLP によるタイピングの概略を示す。HLA-B 座特異的プライマー、5BInt 1-57 と 3BInt3-37 を用い、exon2 および exon3 を含む領域を増幅し、この一次 PCR 産物を鋳型として、exon2 は 2 組のプライマーセット (BF-E21/N4, BF-E23/N4)、exon3 は 3 組のプライマーセット (BF-E31/Bga, BF-E31/Bct, BF-E31/Bac) を用いて、対立遺伝子群特異的な二次 PCR を行っ

た後、それぞれの PCR 産物を制限酵素処理後、電気泳動し、泳動パターンから HLA-B 座アリルを決定した。

FCM 解析

血小板上およびリンパ球上の HLA-B 座抗原の発現を確認するため、Platelet immunofluorescence test (PIFT)、Lymphocyte immunofluorescence test (LIFT) を FCM 法により行った¹³⁾。K.A. の 2×10^7 個の血小板または 2×10^6 個のリンパ球を 30 μ l の抗 HLA-B55 血清、抗 HLA-B40 Cross Reacting Group Antigens (CREG) 血清、抗 HLA-B62 血清と混合後、30 分間 4℃ で反応させた。細胞を 10ml の EDTA 入り PBS (PBS-E) で 2 回洗浄後、30 μ l の FITC-conjugated goat F(ab')₂ anti-human IgG (Biosource, CA) を混合後 30 分間 4℃ で反応させた。10ml の PBS-E で 2 回洗浄後、1ml の PBS-E に浮遊させ、FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., Sunnyvale, CA) により測定後解析を行った。

結 果

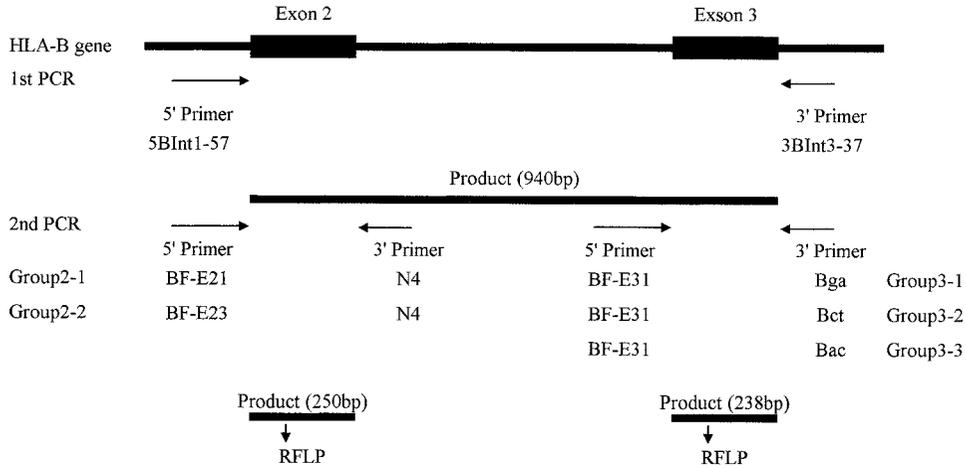
血液型検査

Table 1 に K.A. および家族の血液型を示す。家族全員の ABO 式を含めた全ての血液型判定において、凝集する部分と凝集が見られない free cell 部分とに分かれるような mixed field agglutination、その他の異常反応は認められなかった。

HLA タイピング

Table 1 に K.A. および家族の HLA 血清型を示し、Table 2 に K.A. および息子のリンパ球が反応した 32 種類の抗 HLA-B 座抗原血清との反応パターンを示す。K.A. では抗 HLA-B40CREG 血清 12 本中 7 本、抗 HLA-B15CREG 血清 10 本中 10 本、抗 HLA-B22CREG 血清 10 本中 10 本に反応し、HLA-B 座に B61、B62、B55 の 3 抗原が同定された。息子も、HLA-B 座に B61、B62、B60 の 3 抗原が同定され、K.A. から HLA-B61、-B62 抗原が遺伝していた。一方、K.A. および息子の HLA-A、-C 座抗原、夫、娘の HLA 型にトリプレットは認められなかった。

Fig. 1 に K.A. および息子の末梢血由来 DNA および爪由来 DNA を使用したアリルタイピング結



group DNA	Exon 2			Exon 3				
	2-1	2-2		3-1	3-2	3-3		
K.A. (Blood)	/	B*4002	B*5502	B*1501	/	B*4002	B*5502	B*1501
K.A. (Nail)	/	B*4002	B*5502	B*1501	/	B*4002	B*5502	B*1501
Son (Blood)	B*4001	B*4002	/	B*1501	B*4001	B*4002	/	B*1501
Son (Nail)	B*4001	B*4002	/	B*1501	B*4001	B*4002	/	B*1501

Fig. 1 Summary of the PCR-RFLP method for HLA-B allele typing and allele types of K.A. and her son using DNA of different origin. The first PCR was performed using HLA-B locus-specific primers(5BInt1-57 and 3BInt3-37) to obtain a 940 bp DNA fragment covering from exon 2 through exon 3. In the second PCRs, exon 2 fragments of HLA-B alleles were amplified from the diluted first PCR product using 2 sets of group-specific primers, and exon 3 fragments were independently amplified using 3 sets of group-specific primers. HLA-B alleles were identified by cleavage patterns obtained by digestion of each exon PCR product.

果を示す。末梢血由来および爪由来のいずれのDNAを用いた場合においても、K.A.では、HLA-B*4002、B*5502、B*1501の3アレルがexon2、exon3において同定され、息子においてはHLA-B*4001、B*4002、B*1501の3アレルがexon2、exon3において同定された。

Fig. 2にK.A.家系の推定HLAハプロタイプと家系図を示す。HLA-B*1501、-B*4002アレルがHLA-A*0207-B*1501、B*4002-Cw*0102-DRB1*0403-DQB1*0302-DPB1*0501のハプロタイプでK.A.から息子に遺伝していた。

FCM 解析

Fig. 3にK.A.の血小板、リンパ球と抗HLA-B55血清、抗HLA-B40CREG血清、抗HLA-B62血清との反応をヒストグラムに示す。いずれの血清との反応においても、陰性を示すピークは存在せず、全ての細胞が陽性を示す単一のピークが存在し、キメラ細胞の測定時に見られる陰性細胞と陽性細胞の混在による複数のピークは認められなかった。

考 察

血液型キメラは、双生児キメラと2精子受精キメラの2種類に大きく分類され、双生児キメラの

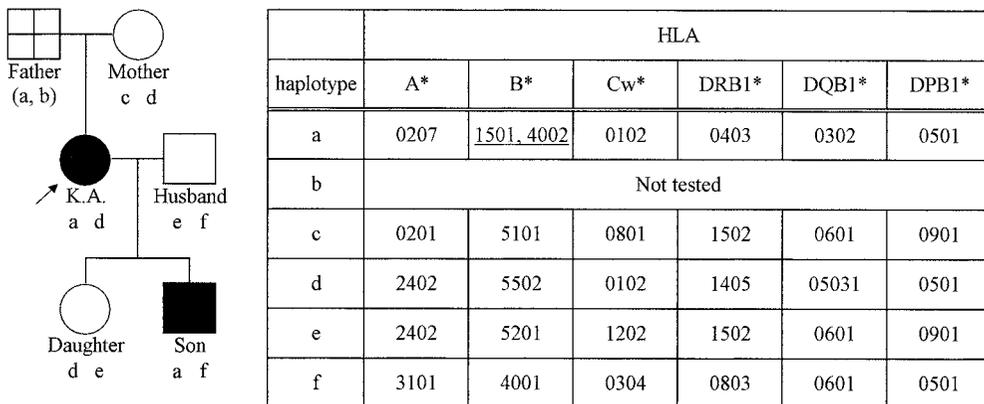


Fig. 2 Pedigree and haplotypes of K.A. family. HLA haplotypes are given as (a) and (b) for the father,(c) and (d) for the mother and (e) and (f) for the husband. Proband is indicated by an arrow, the subject with the affected haplotype is shaded and the affected alleles are underlined.

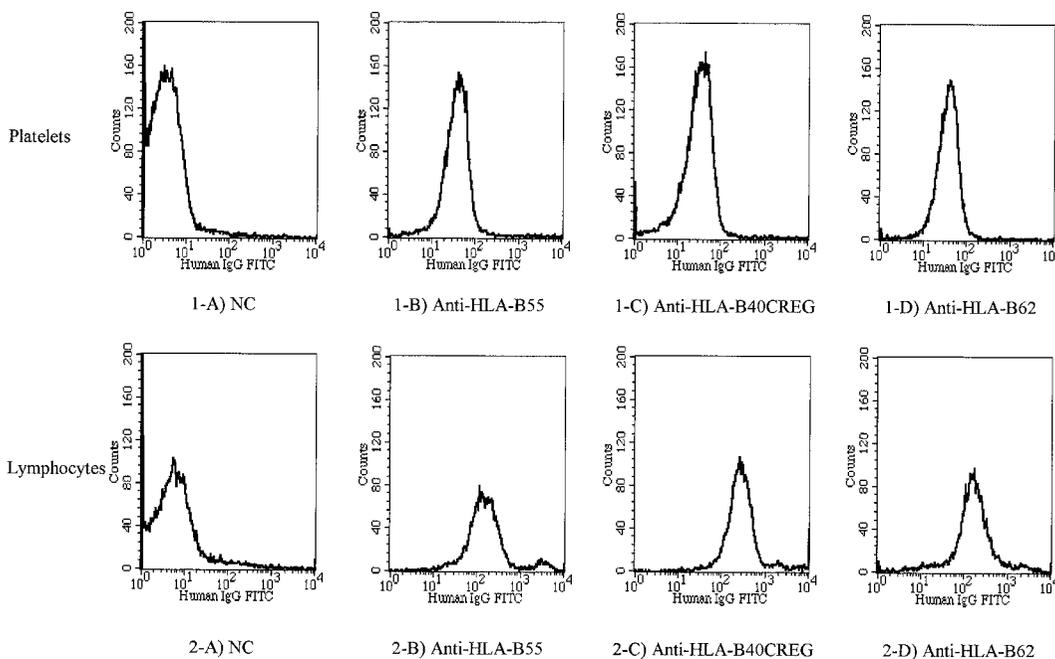


Fig. 3 Flow cytometric analysis obtained with platelets(1)and lymphocytes(2)from K.A. after incubation with negative control (A) anti-HLA-B55 (B) anti-HLA-B40 CREG (C) or anti-HLA-B62 (D) Horizontal axis = fluorescence intensity, vertical axis = number of cells.

証明は、造血細胞の混合血球を持つ、もう一方の
 双生児の存在により証明され、2精子受精キメラ

の証明は、異なった染色体遺伝子の混在、皮膚の
 色調変化、半陰陽等により証明される。これに対

しモザイクとは、双生児でないヒトに2種類の血液型が出現し、体細胞にもキメラ、モザイク様現象が見られる症例を指す。Cotterman は、この原因は体細胞の広義の突然変異に由来するとし、血液型モザイクと名づけた¹⁴⁾。

HLA モザイクの例として、血清学タイピングによる HLA-DR1 と HLA-DR2 の HLA-DR モザイクがいくつか報告されたが、これらは DR2 と強い連鎖不平衡にある DRB5*0101 の遺伝子産物 (DR51) に対する抗血清に、DR51 と非常にまれに連鎖不平衡がある DR1 を持つ細胞が反応したことによる現象で、DR モザイクではないことが遺伝子解析により解明されている¹⁵⁾⁻¹⁷⁾。

HLA 領域において、parent allele の塩基配列の一部が donor allele の塩基配列に置き換わる allelic conversion による新しいアリルの報告は数多くされている。しかし、HLA モザイクの報告は、我々が調べた限りにおいて、2003 年に Crowley らにより報告された以外ない¹⁸⁾。Crowley らは、HLA-DRB 5*01-DRB 1*1501-DQA 1*0102-DQB 1*0602 の約 100kb が第 6 染色体上に存在し HLA-A3-B60-DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501 のハプロタイプとともに母から 3 人の子供に遺伝していたと報告しているが、第 6 染色体の詳細な解析は行っていない。

本症例は、赤血球型において全くキメラ、モザイク様現象が認められず、HLA 型の血清学タイピングにおいて、HLA-B 座にのみ 3 抗原が同定された。血清学タイピングにより 1 座に 3 抗原が同定される原因のひとつとして、交差反応が考えられるが、HLA-B55、-B61、-B62 はいずれも CREG 抗原でないため、交差反応によるものではないと考えられる。

河村らは、血清学タイピングにより、HLA-B59、-B54、-B62 の 3 抗原が同定された症例において、抗 HLA-B54 血清と抗 HLA-B62 血清との反応は、exon2 が B*5401、exon3 が B*1501 の塩基配列をもつ新しいアリル由来の抗原であったことによることを報告している¹⁹⁾。河村らによると、この新しいアリル由来の抗原と抗血清との反応は、抗 B22CREG 血清の 9 種類中 2 種類、抗 B15

CREG 血清の 9 種類中 2 種類であった。このように、exon2 と exon3 がそれぞれ異なる抗原由来の塩基配列を持つ HLA-B 座アリルには、B*3531、B*5603 があり、いずれのアリル由来の抗原も、通常反応する抗血清の一部の抗血清にしか反応しない。一方、今回の症例では、抗 HLA-B40CREG 血清 12 本中 7 本、抗 HLA-B15CREG 血清 10 本中 10 本に反応し、抗原に対応する抗血清にはすべて反応した。また、PCR-RFLP による exon2、exon3 のアリルタイピングの結果、それぞれ 3 種類の HLA-B 座アリルが同定されたことから、exon2 と exon3 がそれぞれ異なる抗原由来の塩基配列を持つ新しいアリルの可能性はない。

更に、本症例では、血小板、リンパ球表面に同時に HLA-B55、B61、B62 抗原が発現していること、末梢血だけでなく体細胞にもキメラ、モザイク様現象が認められたこと、母から息子に形質が遺伝し、常染色体優性遺伝と考えられることから、HLA 型の異なる 2 種類の細胞が混在しているキメラではなく、遺伝子の突然変異によるモザイクと推定するのが自然と考える。

本症例におけるモザイク発現機序は、K.A. もしくは祖先において、受精卵から個体発生の過程で染色体不分離もしくは転座により遺伝子の中に変異がおきた可能性があり、今後「karyotype 検査」を実施するとともに、STR を含む MHC 領域全体の遺伝子解析を行うことにより、変異の起きた HLA 遺伝子の長さ、染色体上の位置等について解明したい。

謝辞：論文のご高閲、ご指導を賜りました信州大学医学部法医学教室の太田正穂先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, eds : Blood transfusion in Clinical Medicine, 10th ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997, 94.
- 2) Dunsford I, Bowley CC, Hutchinson AM, et al : A human blood group chimera. Br. Med. J, 2 : 81, 1953.
- 3) Furuhashi T, Kitahata M, Nozawa T : A family study of the so-called blood group chimera. Proc. Japan. Acad, 35 : 55-57, 1956.

- 4) 北濱睦夫：血液型モザイクの2家系について．信州医誌，12(5-6)：82-89, 1963.
 - 5) 生田貞義，小川泰子，早川善朗：血液型モザイクの1例について．日法医誌，19(2)：114-121, 1965.
 - 6) Terasaki PI, McClelland JB：Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*, 204：998-1000, 1964.
 - 7) Moribe T, Kaneshige T, Inoko H：Complete HLA-A DNA typing using the PCR-RFLP method combined with allele group- and sequence-specific amplification. *Tissue Antigens*, 50：535-545, 1997.
 - 8) Ogawa A, Mitunaga S, Tokunaga K, et al：A nested PCR-RFLP method for high-resolution genotyping of HLA-B alleles. *MHC (In Japanese)* 5：4-17, 1998.
 - 9) Inoko H, Ota M：PCR-RFLP, In：Hui KM, Biswell JL, eds, *Handbook of HLA typing techniques*, CRC Press, London, 1993, 9-70.
 - 10) Yu N, Ohashi M, Alosco S, et al：Typing of HLA-B*15 alleles using sequencing specific primers. *Tissue Antigens*, 52：260-269, 1998.
 - 11) Bunce M, Barnardo MCNM, Procter J, et al：High resolution HLA-C typing by PCR-SSP：identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens*, 48：680-691, 1996.
 - 12) Olerup O, Aldener A, Fogdell A, et al：HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 41：119-134, 1993.
 - 13) Sintnicolaas K, de Vries W, van der Linden R, et al：Simultaneous flow cytometric detection of antibodies against platelets, granulocytes and lymphocytes. *J Immunol Meth*, 142：215-222, 1991.
 - 14) Cotterman CW：Erythrocyte antigen mosaicism. *Physiol*, 52(1)：69-95, 1958.
 - 15) Bidwell JL, Bidwell EA, Dupont E, et al：Molecular characterization of a recombinant HLA-DR1/DR2 Haplotype. *Human Immunol*, 33：289-293, 1992.
 - 16) Schreuder GMT, van den Berg-Loonen PM, Verduyn W, et al：Increasing complexity of HLA-DR2 as detected by serology and oligonucleotide typing. *Human Immunol*, 32：141, 1991.
 - 17) Bontrop RE, Schreuder GM, Elferink DG, et al：Molecular, serologic and functional evidence for an apparent HLA-DR triplet. *J. Immunol*, 137：211-216, 1986.
 - 18) Crowley J, Hagan R, Clancy D, et al：Two sets of HLA class II DRB and DQB1 alleles co-segregate among family members in a single maternal haplotype. *Tissue Antigens*, 61：487-491, 2003.
 - 19) 河村久美子，秋田真哉，荒木延夫，他：日本人に検出された B54 new allele (BKAW) について．*MHC*, 11(2)：163, 2004.
-