

疾患感受性を規定するHLA-D領域遺伝子と 遺伝子産物の検出法の開発

(課題番号 60870017)

昭和61年度科学研究費補助金（試験研究(2)）研究成果報告書

昭和 62 年 3 月

研究代表者 片 桐 一

(旭川医科大学・医学部・教授)

は し が き

昭和60年度から文部省科学研究費補助金（試験研究(2)）の助成のもとに行なわれた「疾患感受性を規定する HLA-D 領域遺伝子と遺伝子産物の検出法の開発」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果報告書をまとめることになった。研究計画の全てが達成されたわけでないが、いくつかの新しい検出法が開発されたと考えられる。報告書をまとめるにあたって、各分野の専門家の方々から率直な御批判を願うものである。

研究組織

研究代表者：片 桐 一
(旭川医科大学医学部・教授)

研究分担者：矢 倉 英 隆
(旭川医科大学医学部・助教授)

研究分担者：比 嘉 敏 夫
(旭川医科大学医学部・助手)

研究分担者：池 田 久 実
(北海道赤十字血液センター研究部・部長)

研究経費

昭和60年度	5,200千円
昭和61年度	2,000千円
計	7,200千円

研究発表

1. 学会誌等

- 1) 三代川齊之、池田久実、片桐一：9 C 4 抗体により検出されるヒトクラス II 抗原の免疫化学的解析－F A 抗原との免疫化学的比較－、移植、20(2)、1985
- 2) 山下幸紀、中村隆文、清水哲也、池田久実、片桐一：培養絨毛癌細胞における HLA－class I および class II 抗原の発現に関する研究、日本産婦人科学会雑誌、38(1)、1986
- 3) 高橋光明、熊井恵美、奥田稔、池田久実、新保雅之、関口定美、片桐一：実験動物マウスにより惹起される職業エネルギーの解析、アレルギー、35(6)、1986
- 4) 楯玄秀、片桐一：T リンパ芽球の HLA－class II 抗原 mRNA の解析、北海道医学雑誌、61(2)、1986
- 5) Murakami, M., Miyokawa, N., Yakura, H., Ikeda, H. and Katagiri, M. : A non－DR and－DQ class II molecule detected by monoclonal antibody AS－9C4, in HLA in Asia－Oceania 1986, ed. M. Aizawa, pp 439－447, Hokkaido University Press, Sapporo, Japan, 1986
- 6) 千葉清司、新保雅之、池田久実、関口定美、片桐一：酵素抗体法による細胞表面の HLA－class II 抗原の検出、投稿中

2. 口頭発表

- 1) 比嘉敏夫、坂田博美、片山耕、片桐一：HLA－DQ 抗原と HTLV－1 構造蛋白の共通抗原性の解析、第15回日本免疫学会、1985年12月7日
- 2) 新保雅之、池田久実、関口定美、千葉清司、片桐一：EIA 法による HLA クラス II 抗原の解析、第22回日本移植学会、1986年9月26日
- 3) 池田久実：RIA による Class II タイピング血清の解析、第28回日本組織適合性研究会、1987年3月25日

研究成果

或る種の自己免疫疾患の発症には、HLA-D領域の遺伝子産物が重要な影響を与えており、そしてその疾患発症の内因（素因）の一つをなしている。HLA-D領域の遺伝子産物としては、DR、DRw52・53、DQおよびDPの4種類の抗原系が明らかにされている。これらの抗原系のうちDR、DRw52・53およびDQ抗原系では、互いに類似した抗原特異法（強い連鎖不平衡の状態）を示すため、これらの抗原分子の識別にはラジオ・イムノアッセイが用いられている。遺伝子レベルの解析では、現在明らかにされているHLAクラスⅡ抗原よりはるかに多くのクラスⅡ遺伝子が明らかにされている。従って未だ検出されていないクラスⅡ抗原分子が存在し、それらを明らかにしていくためにもっぱらラジオ・イムノアッセイが用いられている。又、われわれの作製した抗HLA単クローン抗体のうちには、HLAタイピング法として一般に使用されている細胞障害性試験では反応しなく、ラジオ・イムノアッセイにより抗原を検出し得る抗体が多数存在する。これらの放射性同位元素を用いた検出法の利用には、法的規制を含めた諸種の制限があるため、各研究室、検査室で広く利用することは困難である。われわれが用いているD領域の遺伝子産物の分子レベルでの解析を広く臨床病理へ応用させるために、ラジオ・イムノアッセイにかわるHLA抗原の検出法の開発が望まれている。われわれは、細胞および可溶化抗原材料を標的抗原として用いた酵素免疫測定法の開発をすすめ、以下のHLAクラスⅡ抗原検出法を確立した。

1. HLAクラスⅡ抗原を検出する3種類の酵素免疫測定法

細胞を標的抗原として用いた2種類の酵素免疫測定法（EIA法）と可溶化抗原材料を標的抗原とした1種類のEIA法を確立した。

(1) 細胞を標的抗原とした Cellular-EIA法

ミリタイターSVプレートを用いる方法（ミリタイター法）と平底プレートを用いる方法（平底プレート法）を開発した(図1)。ミリタイター法に用いたミリタイターSVプレートは底面がフィルター状になっており、これと吸引ホルダー、真空ポンプを組合わせて（ミリポア社）、プレートの洗浄をホルダー側から吸引によって行なう

特徴を有し、ウェル中の細胞が洗浄により剥離することはない。あらかじめ 0.1% BSA で coating したプレートに細胞 ($1 \sim 10 \times 10^5$ /well) と抗体 $50 \mu\text{l}$ を加え、室温 60 分反応させた後、PBS を加えて吸引による洗浄を 5 ～ 6 回行う。適当量酵素 (ペルオキシダーゼ) 標識抗体を添加し、さらに室温 60 分反応させ、再び吸引による洗浄を行った。3.7mM o-phenyl diamine を基質として加え発色させ、反応停止後、反応液を他の EIA プレートに移し、2 波長マイクロプレート光度計 (コロナ) (主波長 492 nm、副波長 655 又は 630 nm) で吸光度を測定した。

平底プレート法では先ず細胞をプレート底面に接着固定させる操作を必要とした (図 1)。96 穴平板プレート (イミュロン 600、グライナー社) のウェルに 200 倍に稀釈した PHA-P (デイフコ社) $600 \mu\text{l}$ を入れ、 37°C 、60 分放置した後数回洗浄した。次いで細胞 (2×10^5) を加え、2,000 回転 5 分で細胞を遠沈させた後 37°C 、15 分放置した。次いで 0.25% グルタルアルデヒドで各ウェルを満たして室温に 5 分放置後各ウェルを洗浄した。次いでニワトリ卵より分離した卵白溶液 ($\text{OD } 280 \text{ nm} = 12/\text{ml}$) でウェルを満たし 37°C 、60 分放置して、ウェル内の糖蛋白結合部位をブロックした。この細胞固定プレートを 4°C で保存し (3 ケ月間迄保存可能であることを確めた)、随時抗体との反応に使用した。抗体との反応後の操作は、ビオチン化抗体とアビチン化ペルオキシダーゼを用いた以外は殆んどミリタイター法と同様である。

(2) 可溶化抗原材料を標的抗原とした Solid Phase - EIA 法 (固相法)

可溶化抗原材料を 96 穴平底プレートのウェルに固相化させる操作を必要とした。培養 B 細胞の 10% 浮游液と 0.2% デオキシコール酸 (DOC) を等量に混じ、室温に 2 時間放置後、超遠心により可溶化抗原材料を得た。この可溶化抗原材料をトリス塩酸バッファー (0.05M、pH 8.0) で透析後、1% BSA を含むトリス塩酸バッファーで適当に稀釈し、各ウェル当たり $100 \mu\text{l}$ 注入した。室温に一晩放置後洗浄し、次いで 1% BSA を含む PBS $100 \mu\text{l}$ を注入し、室温に 2 時間放置して、固相化したプレートを得た。この固相化プレートは、 -40°C で少くとも 3 ケ月間保存可能である。固相化プレート使用時に各ウェルを洗浄し、次いで抗体を加え 37°C 、90 分反応させ、その後の操作はミリタイター法とほぼ同様の操作によった (図 1)。界面活性剤として、DOC のほかに Nonidet P-40、Renex 30、Brij 58 等を用いて抗原を可溶化し、そしてこれらの可溶化抗原材料を固相化し、EIA を試みた。DOC 可溶化抗原材料を用いた場合にのみ再現性ある結果

が得られた。D O C可溶化抗原材料を固相化する際、炭酸バッファーを用いてみたが、トリス塩酸バッファーを使用した場合の方が有意に高い吸光度値が得られたので、上述のようにトリス塩酸バッファーを用いた。

図 1 Procedure of EIA

<Flat-bottom>

96 wells flat plate
↓ coating PHA-P
↓ 60 min, 37 °C
↓ wash
↓ + cultured B cells
↓ 2,000 rpm, 5 min.
↓ 15 min, 37 °C
↓ fixed by glutaraldehyde
↓ 5 min, RT
↓ wash
↓ blocking with egg white buffer
↓ 60 min, 37 °C
↓ wash
↓ + antibody
↓ 30 min, 37 °C
↓ wash
↓ + biotinylated anti-Ig
↓ 30 min, RT (or 10 min, 37 °C)
↓ wash
↓ + avidin-peroxidase
↓ 30 min, RT (or 10 min, 37 °C)
↓ wash
substrate

<Millititer>

Millititer SV
↓ + cultured B cells
↓ + antibody
↓ 60 min, RT
↓ wash by suction
↓ + enzyme conjugated anti-Ig
↓ 60 min, RT
↓ wash by suction
substrate

<Solid Phase>

96 wells flat plate
↓ coating DOC-antigen
↓ wash
↓ + antibody
↓ 90 min, 37 °C
↓ wash
↓ + enzyme conjugated anti-Ig
↓ 60 min, 37 °C
↓ wash
substrate

2. 各種酵素免疫測定法による単クローン抗体の反応性の検討

われわれが作製した単クローン抗体(表1)とHLA-Dホモ接合体培養B細胞(表2)との反応性を3種類のEIA法で検討した。ミリタイター法を用いて単クローン抗体Sh2及びDI4と各種培養細胞との反応性を検討した(図2)。DR抗原に共通の抗原決定基を検出するDI4抗体は、HLAクラスII抗原を発現していない培養T細胞TALL-1以外の培養B細胞と抗体の濃度依存性に反応した。Sh2抗体はDQ抗原に特異性を有し、多型性エピトープを検出することが確かめられている抗体である。この抗体はDQw3陽性細胞であるL-KT2、ER、JMeおよびEBV-Isk細胞と濃度依存性に反応した。従ってミリタイター法は、抗体の特異性を充分検出し得る方法とみなされる。

平底プレート法を用いて同様に検討した(図3)。DQ抗原に共通の抗原決定基を検出する単クローン抗体DW7は、クラスII抗原を発現していない培養T細胞Molt4以外の培養B細胞と反応した。DQ抗原の多型性エピトープを検出するSh2抗体を用いると、ミリタイター法と同様にDQw3を有する培養B細胞ER及びEBV-Kyとのみ濃度依存性に反応した(図4)。Sh2抗体と培養B細胞ERとの反応性を、この平底プレート法と図2で示したミリタイター法で比較すると、最高A₄₉₂値の50%を得るための抗体量は、平底プレート法ではミリタイター法の約1/20量であった。従って平底プレート法は、ミリタイター法の約20倍の高感度で単クローン抗体を検出し得るとみなされ、そしてこの方法はわれわれが用いて来たラジオ・イムノアッセイに優る方法である。

固相法を用いて同様の検討を行った。DR抗原に共通の抗原決定基を検出するDI4抗体と固相化したER及びEBV-Sa抗原との反応を検討した(図5)。これらの抗原は、ともにDI4抗体と抗体の濃度依存性に反応した。この固相法の反応性は、図2でしめしたミリタイター法の約2倍の感度を有していた。

表 1 MONOCLONAL ANTIBODY

Antibody	Specificity
DI4	common determinant of DR
KOP	common determinant of DR
Sh2	molymorphic determinant of DQ
D□1	polymorphic determinant of DQ
DW7	common determinant of DQ

表 2 HLA CLASS II PHENOTYPE
OF CELL LINES

Cell line	DR	DQ
EBV-Sa	1/1	w1/w1
EB-CMG	2/2	w1/w1
PGF	2/2	w1/w1
MAT	3/3	w2/w2
WT49	3/3	w2/w2
ER	4/4	w3/w3
EBV-WA	4/4	wa/wa
L-KT2	4/4	w3/w3
LEIF-T	4/4	w3/w3
JMe	5/5	w3/w3
WT46	w6/w6	w1/w1
HOR	w6/w6	w1/w1
L-PITOTT	7/7	w2/w2
MANN	7/7	w2/w2
EBV-Ky	w9/w9	w3/w3
EBV-Isk	w9/w9	w3/w3

Titration by Millititer EIA

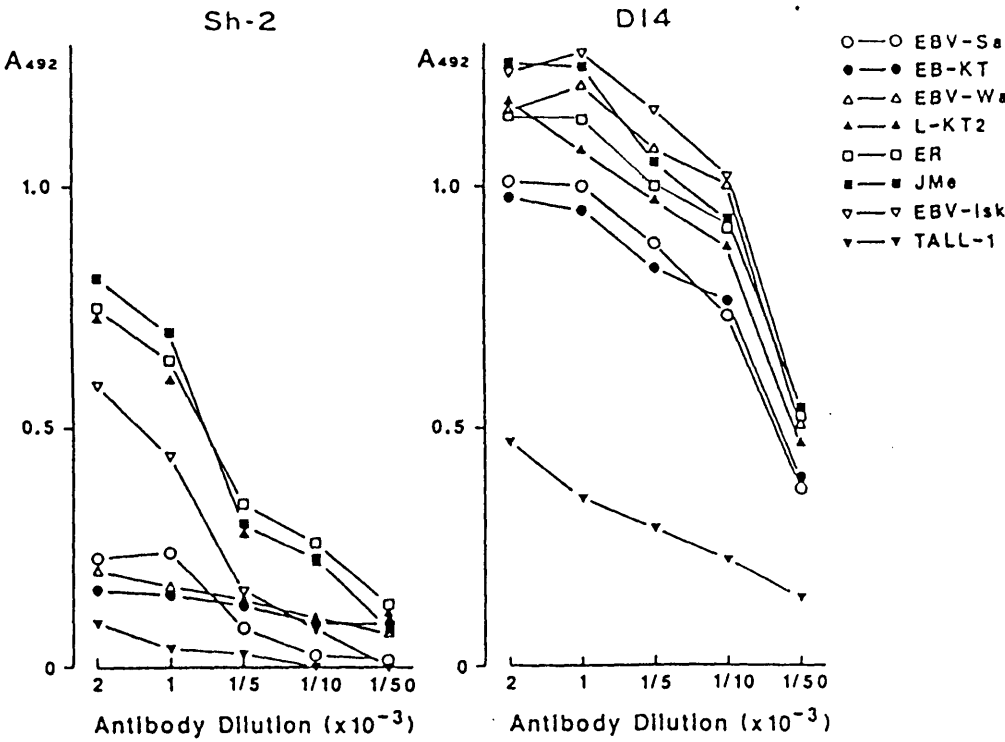


図3. Titration by Flat-bottom EIA
Antibody : DW7

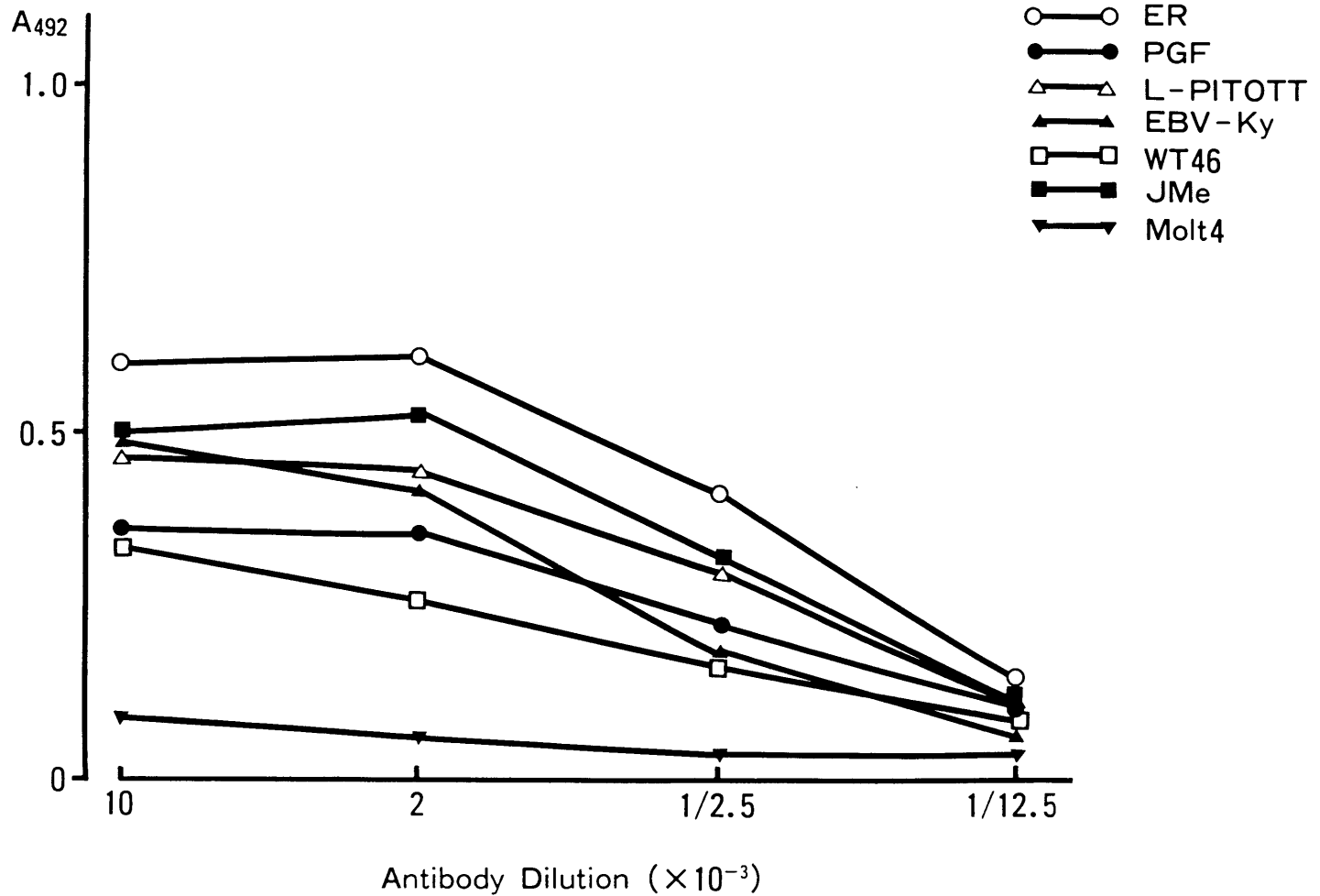


图 4. Titration by Flat-bottom EIA
Antibody: Sh 2

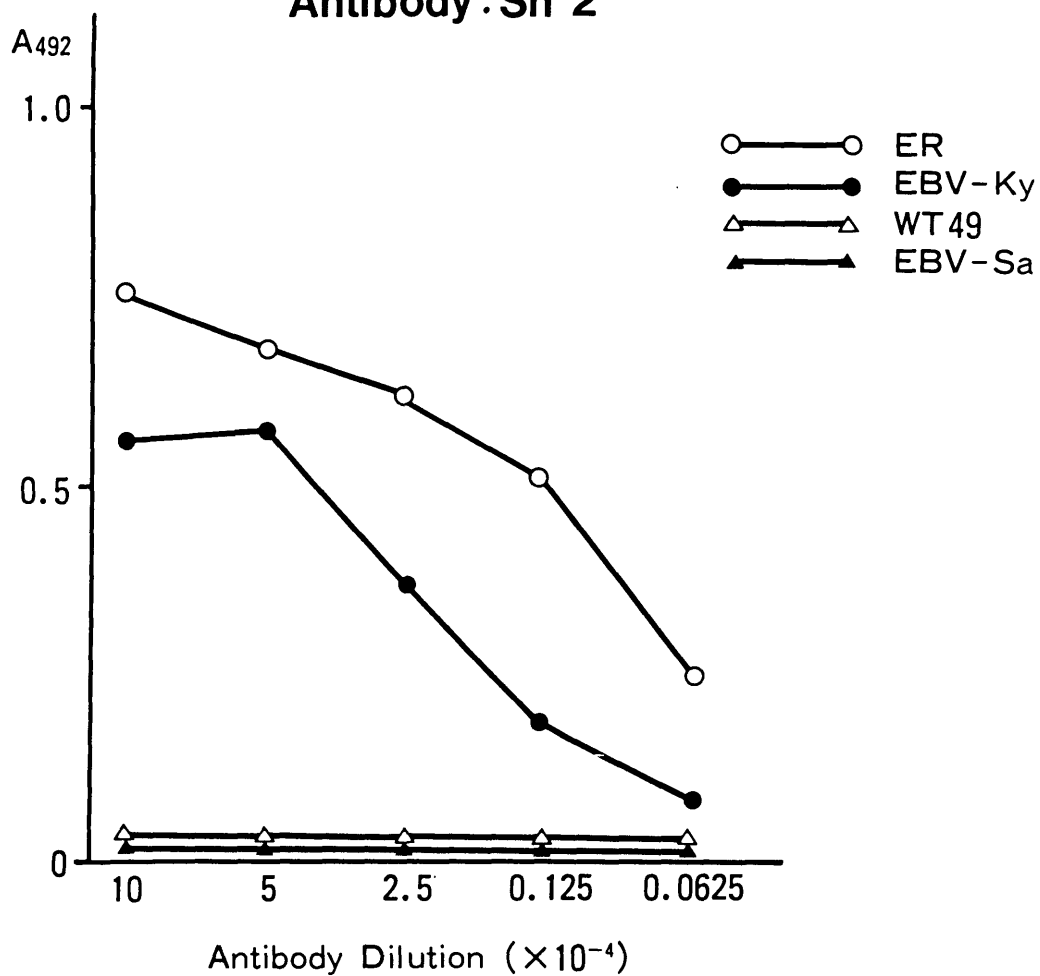
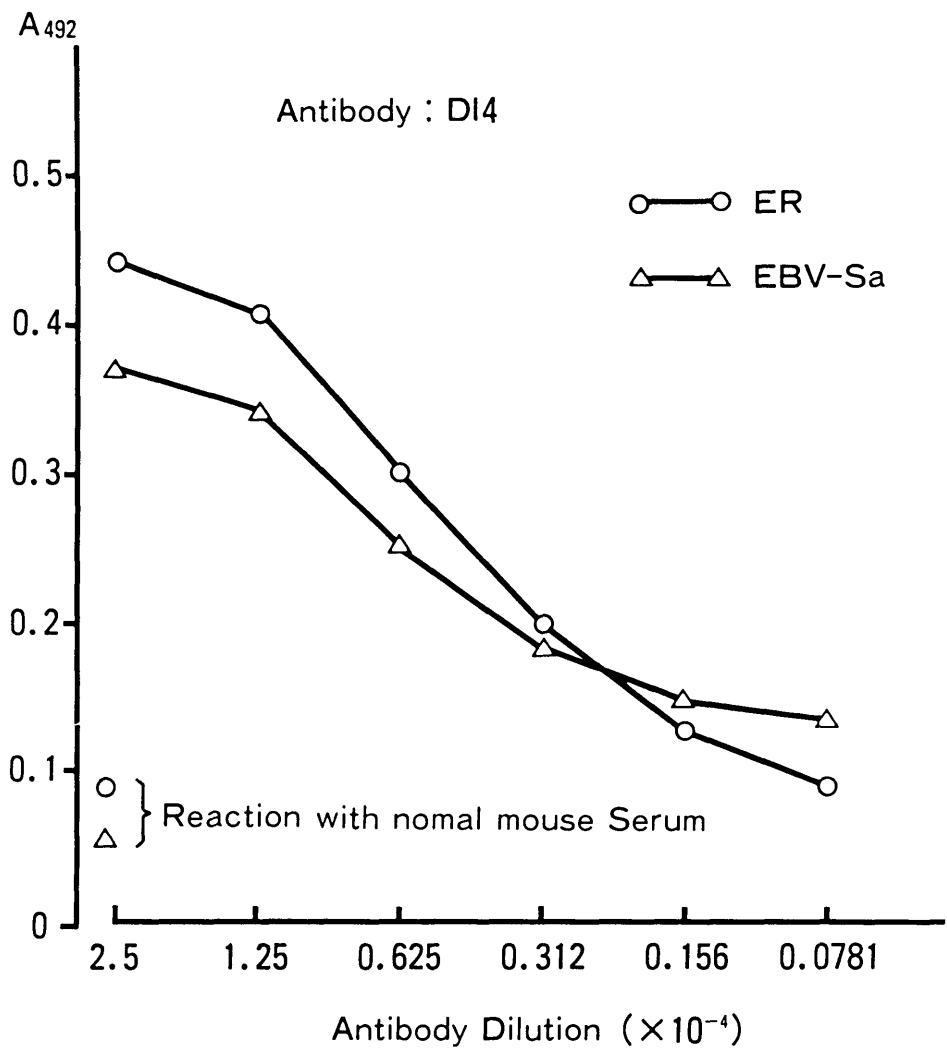


図5. Titration by Solid Phase EIA



3. 酵素免疫測定法の阻止反応によるHLAクラスII抗原特異性の検討

これ迄示した抗原と抗体との反応を直接検出する酵素免疫測定法（直接結合反応）はクラスII抗原の多型性エピトープを検出し得る。さらにこれらの測定法の阻止反応によりクラスII抗原特異性（多型性エピトープ）を検出し得るか否かを検討した。阻止反応は（図6）、抗体50 μ lを各種の培養細胞（ $1 \sim 4 \times 10^5$ ）や末梢リンパ球（ $1.3 \sim 5 \times 10^6$ ）と室温で90分反応させた後、遠心し、上清中に残った抗体活性を酵素免疫測定法で検出し、次式により% inhibition 値を求めた。

$$\left(1 - \frac{B-C}{A-C}\right) \times 100 = \% \text{ inhibition}$$

ただし

A：吸収操作を行っていない抗体を用いての吸光度値

B：吸収操作を行なった抗体を用いての吸光度値

C：同希釈率のNMSの吸光度値

ミリタイター法を用いて、阻止反応を行ない、直接結合反応と比較した。DR抗原に共通の抗原決定基を検出する単クローン抗体KOPは、使用したすべての培養B細胞と有意な反応を示した（図7A）。ER細胞を標的細胞とした阻止反応では、吸収に使用した細胞のクラスII抗原特異性と関係なく抗体活性が吸収された（図7B）。又、各細胞の直接反応と阻止反応の程度は相関した。

DQ抗原の多型性エピトープを検出するSh2抗体は、直接結合反応では、DQw3陽性の細胞とのみ反応した（図8A）。ER細胞を標的細胞とした阻止反応では、DQw3陽性細胞であるLEIF-T、EBV-KyおよびERで抗体吸収がみられ、DQw3陰性であるEB-CMGでは反応の阻止はみられなかった（図8B）。

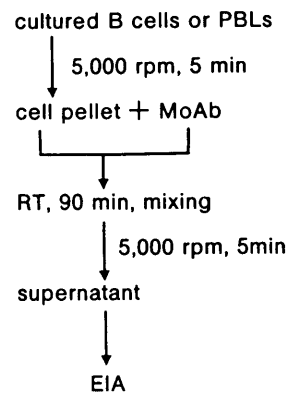
同様に、DQ抗原の多型性エピトープを検出するDII1を用いた場合でも、直接結合反応ではDQw2陽性細胞とのみ反応し（図9A）、MANN細胞を標的細胞とした阻止反応ではDQw2陽性細胞であるL-PITOTT、MANN、MATおよびWT-49細胞で反応の阻止がみられ、DQw2陰性であるEBV-Kyでは阻止がみられなかった（図9B）。以上のミリタイター法の阻止反応の成績から、この阻止反応を用いてHLA

クラスⅡ抗原の特異性を検出し得ることが明らかになった。

平底プレート法の阻止反応についても同様の検討を行った。DQ抗原の多型性エピトープを検出するSh2抗体とER細胞との反応は、DQw3陽性細胞であるEBV-KyおよびERによって阻止され、DQw3陰性細胞であるEBV-SaおよびWT49では阻止されなかった(図10)。ミリタイター法と全く同様の成績であった。

固相法の阻止反応について検討した。ER細胞から得た可溶性抗原材料を固相化したプレートを用い、DQ抗原の多型性エピトープを検出するSh2抗体との反応の阻止反応を検討した。DQw3陽性細胞のERでのみ阻止がみられ、DQw3陰性のEBV-Wa細胞および培養T細胞TALL-1では阻止されなかった(図11)。DR抗原に共通の抗原決定基を検出するDI4を用いた場合には、クラスⅡ抗原を発現しているERおよびEBV-Wa細胞により阻止がみられ、培養T細胞TALL-1では阻止されなかった。以上の成績から固相法を用いた場合も、ミリタイター法の場合と同様に阻止反応によりクラスⅡ抗原の特異性が検出され得ることが明らかになった。

图6 Procedure of Inhibition Test



7 INHIBITION TEST BY MILLITITER EIA

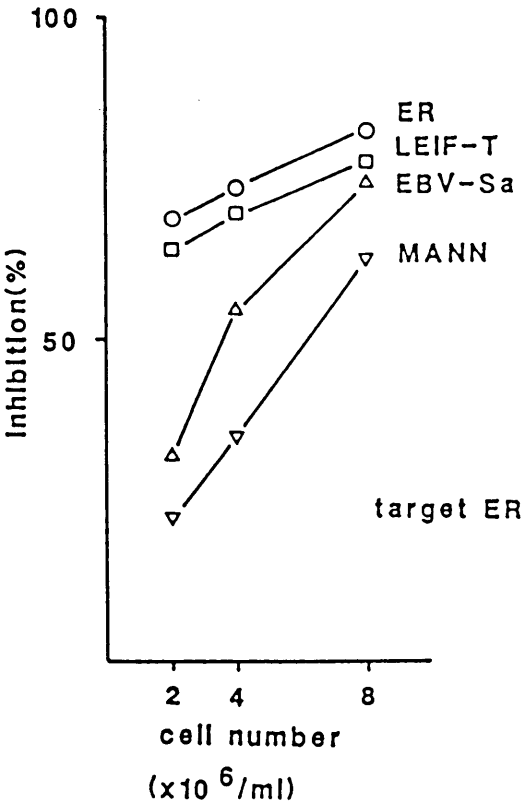
A. DIRECT

KOP (x1000)

cell lines	DR	DQ	A ₄₉₂
EBV-Sa	1	w1	0.262
EB-CMG	2	w1	0.415
MAT	3	w2	0.485
ER	4	w3	0.480
LEIF-T	4	w3	0.456
HOR	w6	w1	0.306
MANN	7	w2	0.120
EBV-Ky	w9	w3	0.231

B. INHIBITION

x2000



8 INHIBITION TEST BY MILLITITER EIA

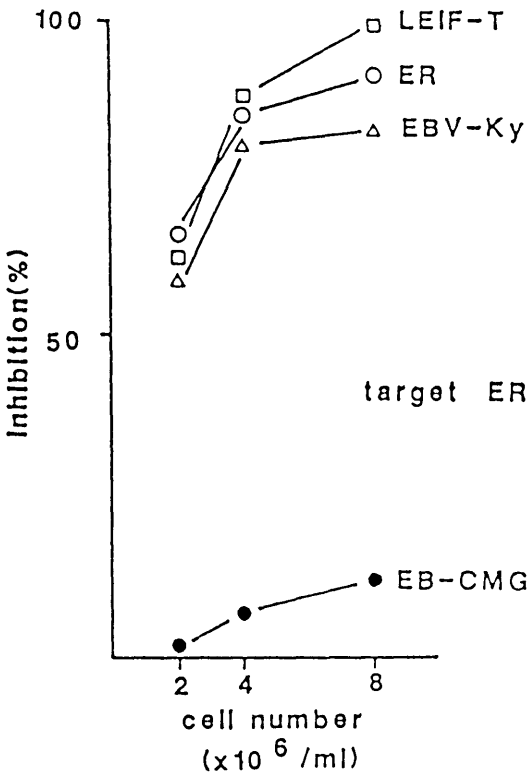
A. DIRECT.

Sh2 (x1000)

cell lines	DR	DQ	A ₄₉₂
EBV-Sa	1	w1	0.033
EB-CMG	2	w1	0.048
MAT	3	w2	0.076
ER	4	w3	0.463
LEIF-T	4	w3	0.373
HOR	w6	w1	0.054
MANN	7	w2	0.089
EBV-Ky	w9	w3	0.492

B. INHIBITION

x2000



9

INHIBITION TEST BY MILLITITER EIA

A. DIRECT

D111 (x1000)

cell lines	DR	DQ	A ₄₉₂
EBV-Sa	1	w1	0.052
EB-CMG	2	w1	0.071
MAT	3	w2	0.388
WT-49	3	w2	0.414
ER	4	w3	0.056
L-PITOTT	7	w2	0.229
MANN	7	w2	0.278
EBV-Ky	w9	w3	0.064

B. INHIBITION

x3000

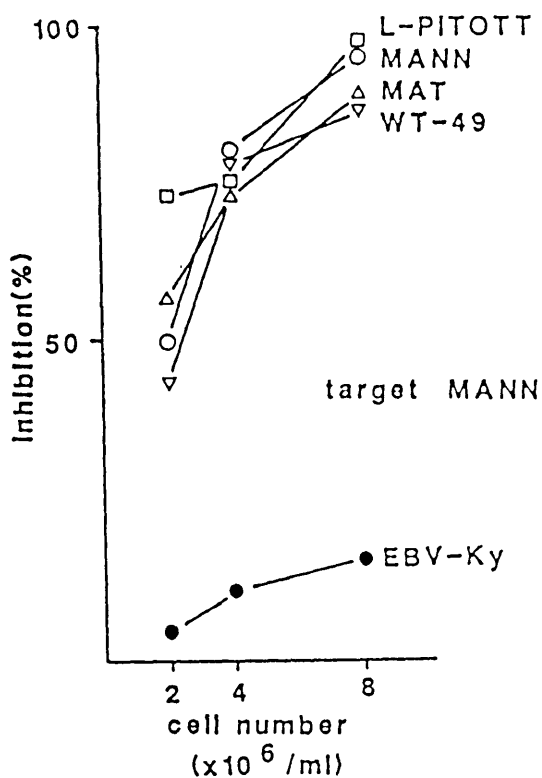
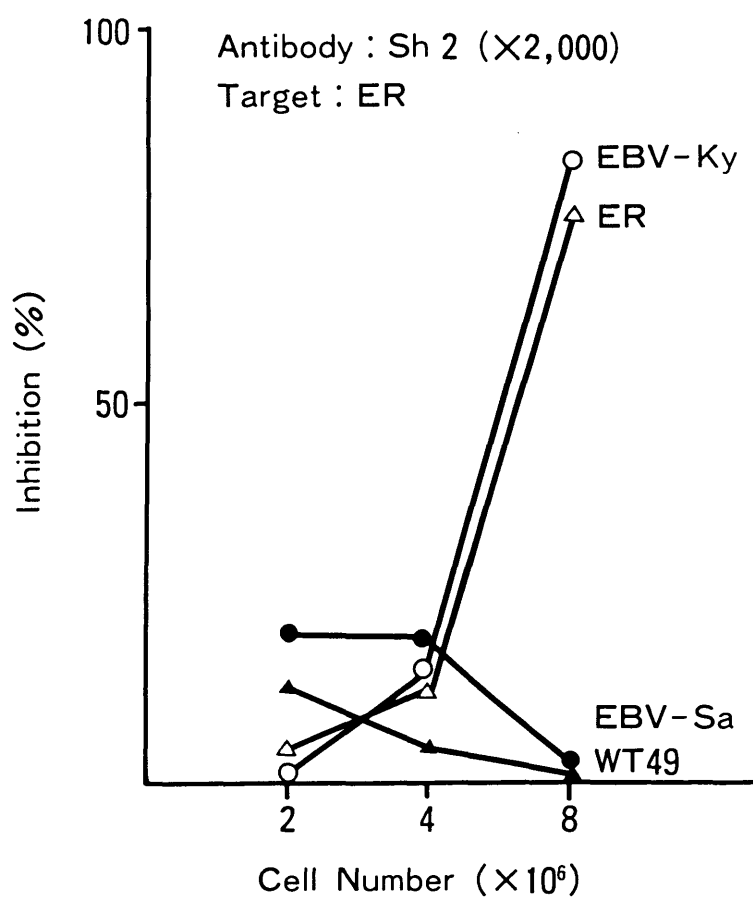
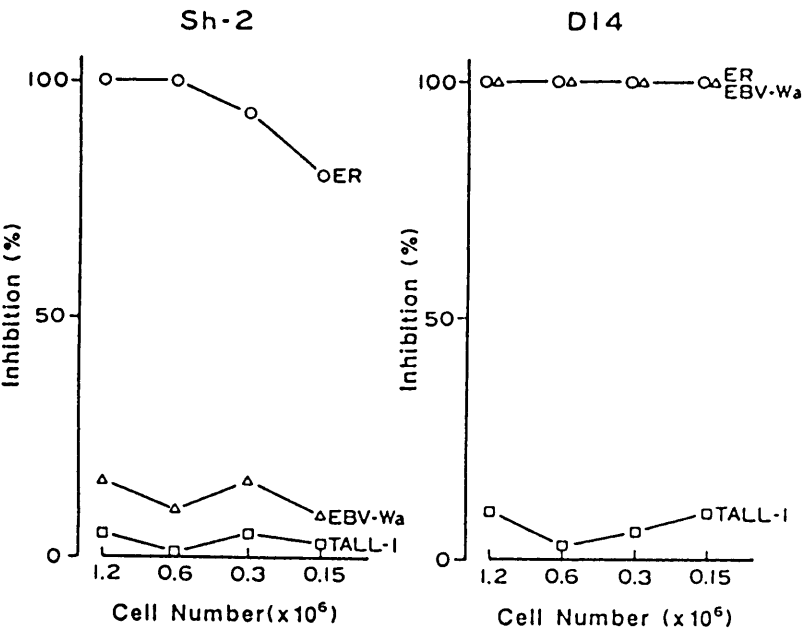


図10 . Inhibition Test by Flat-bottom EIA



Inhibition Test by Solid Phase EIA



4. 酵素免疫測定法による末梢リンパ球および可溶化抗原材料のクラスⅡ抗原検出の検討

先に示した成績から、培養B細胞のクラスⅡ抗原の解析に酵素免疫測定が有用であることが明らかにされた。次いで、末梢リンパ球および可溶化抗原材料のクラスⅡ抗原の解析が可能か否かを検討した。

末梢リンパ球のS h 2抗体に対する反応性について検討した(図12)。32名のパネルのうちD Q w 3陽性者(N I H標準法であるマイクロ細胞障害性試験:L C Tにより決められた)は24名であった。これらのヒトの末梢リンパ球とS h 2抗体との反応性をL C Tにより検討するとD Q w 3陽性者24名中17名が陽性であった。同じリンパ球を用いて、ミリタイター法および固相法の阻止反応により検討すると、D Q w 3陽性者24名のうちミリタイター法では4名が、又固相法では3名が阻止反応陰性であった。ミリタイター法および固定法の結果はほぼ一致し、両方法おける% inhibitionの値はよく相関しており、相関係数は $r=0.91$ であった。

次に培養B細胞EBV-Saから可溶化クラスⅡ抗原材料を精製する過程で、クラスⅡ抗原活性を酵素免疫測定法で検出し得るか否かを検討した(図13)。EBV-Sa細胞の膜性成分を非イオン系界面活性剤Renex 30で可溶化し、可溶化分画をBio-gel A1.5Mカラムでゲル濾過を行った。各分画について、D O C可溶化E R抗原とD I 4抗体との固相法による反応の阻止率(EIA)とわれわれがこれ迄用いて来た¹²⁵I標識Brij58可溶化Ky抗原とD I 4抗体とのラジオ・イムノアッセイ(RIA)の阻止率を比較検討した。その結果、固相法で検出される抗原活性のピークはラジオ・イムノアッセイで検出されるピークとほぼ一致しており、そして固相法の阻止反応の検出感度も良好であった。

5 ま と め

これ迄われわれが用いてきたラジオ・イムノアッセイにかわるH L A抗原系を検出する方法として、3種類の酵素免疫測定法を確立した。これらの方法は、多型性エピートープの解析、可溶化抗原材料の免疫化学的解析等に有用であることを明らかにした。

Fig 1 2

Reactivity of Sh-2 with PBLs

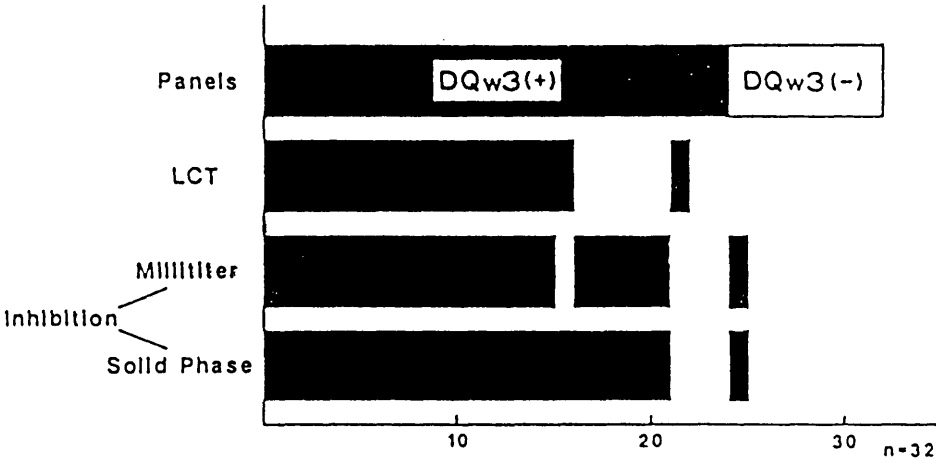


Fig 1 3

**Class II Antigen Activity of Renex-Sa
Bio Gel Fractions Assayed with
Solid Phase EIA**

