

〔原著〕 血痕からの HLA タイピングに関する基礎的研究

佐藤 彌生* 木内 政寛*

(平成1年12月18日受付, 平成2年1月19日受理)

要 旨

血痕からの HLA 型の型別を行なう基礎的研究として, HLA-A2, A9, B5 の3抗原を検査対象とし, リンパ球細胞毒抑制試験の検査条件を検討した。細胞毒抑制試験による型は対応する抗体の細胞毒性を50%以上抑制した血痕を抗原陽性と判定したが, 細胞毒抑制試験は一定量の血痕の生食水抽出液を使用する Two-Stage 法と予め一定量の血痕で吸収した抗体を使用する One-Stage 法により実施した。被検血痕は38例, 使用抗血清は17種, 判定の指示血球であるリンパ球は常に同じ4名から採血, 分離して使用した。

リンパ球細胞毒抑制試験としてこれまで報告されてきた Two-Stage 法, One-Stage 法により血痕の HLA 抗原を検出することは可能であったが, 抗血清によっては偽陽性反応が出現するので, 予め使用する抗血清の吟味が必要である。検査可能な限界は血粉量は250mg/ml, 血痕ガーゼは1cm²であったが, 実際の検査試料の血痕の付着量は不明であるから, 検査可能な限界を血痕浸出液のヘモグロビン量に求めたところ, 約3mg以上のヘモグロビンがあれば検査可能であった。偽陽性反応発現の原因として cross-reactive antigen の存在が考えられたが, 明らかに他の抗原との反応が否定されている抗血清でも偽陽性反応が出現しており, また力価の低い抗血清で発現しやすく, 血痕, 血清の使用量が増加すると発現する傾向が見られたので, その原因は抗血清自体並びに血痕中の抗補体作用によるものと推察された。抗原抗体反応終了後, 補体添加前に洗浄を行う試験法(洗浄法)を用いたところ cross-reaction 以外の偽陽性反応は消失した。HLA 抗原の耐時性を HLA-A9 抗原について検討したところ42日後でも HLA 抗原の検出が可能であった。

Key words: 血痕, HLA 型判定, リンパ球細胞毒抑制試験, HLA 抗原, 可溶性 HLA 抗原

略語一覧: HLA: Human Leukocyte Antigen, Two-Stage 法: Two-Stage Extraction and Absorption Method, One-Stage 法: One-Stage Extraction and Absorption Method, Hb: Hemoglobin, CYNAP: Cytotoxicity Negative Absorption Positive

I. 緒 言

HLA 抗原の研究は1950年代に Dausset ら¹⁾がこの抗原を発見したことに始まり, つづいて1960年代に入って Terasaki^{2,3)} がリンパ球細胞毒試験による HLA 抗原検査法を確立してから著しい発展を遂げてきた。この抗原

の所在に関しては白血球のみならず有核細胞膜上⁴⁾にも, 血清⁴⁻¹²⁾, 尿¹³⁾, 精漿¹⁴⁾, 乳汁中¹⁵⁾にも分布していることが明らかにされ, さらにまたこの抗原は他の血液型とは異なりきわめて多型性であることから法医学の分野においては親子鑑別に利用¹⁷⁻²⁷⁾され, その有効性は高く評価されている。現在, HLA 抗原はA座, B座,

* 千葉大学医学部法医学講座

Yayoi SATO, Masahiro KIUCHI: Basic Studies of HLA Typing in Bloodstains.
Department of Legal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280
Received December 18, 1989. Accepted January 19, 1990.

C座, D遺伝子領域 (DR, DQ, DP) に約120の抗原¹⁶⁾が確認されており, 個々の抗原には人種による偏りがみられること, 遺伝に際しては各座の間に結合し易い形のあることなどが明らかにされて, 益々実際面においてその有効性が高められてきている。

さて, 血痕中の HLA 抗原検査は血清中に可溶性の HLA 抗原が存在するという Van Rood⁵⁾ の1970年の研究報告を契機として進められてきたが, 1974年の Rittner & Waiyawuth²⁸⁾ による血痕中の可溶性の HLA 抗原検査が始まりである。これまで血痕中の特定の抗原についての検査方法が幾つか報告²⁸⁻³⁷⁾されてきたが, 血痕からも HLA 抗原を検出し得るという試みに止まり, 実務への応用は殆ど行われていない。そこで日常の実務にも応用出来る検査方法を確立するため, リンパ球細胞毒抑制試験を検査方法の主体として, 血痕からの抗原抽出方法, 抗原の至適濃度, 抗体の至適力価など種々の点について検討を加え, 事前に血痕の状態を吟味するという条件付きではあるが, 血痕検査の実際への応用が可能な結果を得たのでここに報告する。

II. 実験材料および実験方法

1. 実験材料

(1) 血粉ならびに血痕ガーゼ

血粉は HLA 型既知の健康人血液をシャーレ上で室温4日間風乾した後, 乳鉢で磨り潰して粉末とし, これを血粉とした。血痕ガーゼは HLA 型既知の健康人血液 0.2ml をガーゼに塗布し室温4日間風乾して作製した。

実験の中で, 抗原の量など反応条件を吟味する基礎実験では A 2 抗原を使用した, これは A 2 抗原が血清学的にいわゆる split がない単一な特異性を有する抗原であり, かつ日本人においては40%以上の高い出現頻度を有する抗原であること, さらには A 2 抗原に対する抗血清は比較的入手しやすいことなど実験対象として都合の良い点が備わっているからである。

(2) 標準リンパ球

リンホブレップ (d.1.077) 比重遠心法を用いてヘパリン血から分離したリンパ球であるが, トロンビン処理を行った後, 2000~2500cells/ μ l に調整して使用した。標準リンパ球としては HLA-A 2, A24/Bw52, HLA-A 2, A24/Bw54, Bw61, HLA-A 2, A24/B51, B35, HLA-A24/B51, の4型を使用した。

(3) 抗 HLA 血清

使用した抗体は HLA-A 2 抗体, HLA-A 9 抗体, HLA-A24抗体, HLA-B 5 抗体, HLA-B51抗体で力価は1~8倍である。各抗体の Lot No., 製造元, 本文中の記号は以下の通りである。

中の記号は以下の通りである。

Lot No.	本文中の記号	製造元
(HLA-A 2)		
GJA02	S-1	ヘキストシライマツ
810204	S-2	望星サイエンス
810208	S-3	"
810207	S-4	"
HMA02	S-5	ヘキストシライマツ
HMA03a	S-6	"
FPB03a	S-7	"
JFB02	S-8	"
JFB01	S-9	"
(HLA-A 9) : (A23, A24)		
GNB01a	S-I	ヘキストシライマツ
HNC02	S-II	"
JKA01	S-IV	"
FPA04	S-V	"
(HLA-A24)		
HMA05a	S-III	ヘキストシライマツ
(HLA-B 5) : (B51, B52)		
JFB05	S-①	ヘキストシライマツ
(HLA-B51)		
HKC04	S-②	ヘキストシライマツ
JKB03b	S-③	"

なお, これら抗体は対照のリンパ球が80%以上死滅する最終希釈度に希釈して使用した。

(4) ウサギ補体

凍結乾燥補体 (ヘキスト) の補体価を測定して95%以上の Lysis を示し, さらに Cytotoxicity のないものを使用した。

(5) ヘモグロビン定量キット

ヘモグロビンーテストワコー (和光純薬) を使用した。

2. 実験方法

(1) リンパ球の分離

HLA 型既知の健康人からヘパリン採血 (ヘパリン50 u/血液10ml) し, Ficoll-Conray (比重1.077, 免疫生物研究所) を用いた比重遠心沈澱法でリンパ球を分離したが, さらに血小板, 顆粒球などを除いて純度の高いリンパ球を得るためにトロンビン処理を行い, 次いでリンパ球を5% FCS (Fetal Calf Serum, GIBCO) 加 McCoy's 5a Medium 液 (以下 McCoy's 5a とする) に浮遊し, 2000~2500cells/ μ l に調整して使用した。

(2) 血痕からの HLA 抗原検査法

血痕からの HLA 抗原検査法としては血痕抽出液を

使用する Two-Stage Extraction and Absorption Method (以下 Two-Stage 法と記載する) と血痕と抗血清を直接反応させる One-Stage Extraction and Absorption Method (以下 One-Stage 法と記載する) があるが、さらにこの二つの方法に洗浄操作を加えた方法 (以下洗浄法と記載する) を考案し、これら 3 法の諸条件を吟味した。

1) Two-Stage 法

① 抗原の抽出

実験には抗原として血粉と血痕ガーゼを使用した。血粉の場合は 250mg に生食水 1 ml を加えて室温で 30 分間浸出し、次いで 7 分間超音波処理し、遠心沈澱 (15000 r.p.m. 30 分間) の後、上清 1 μ l を被検液とした。

血痕ガーゼの場合は血液 0.2ml に相当する血痕ガーゼ (直径 4 ~ 5 cm) を細切して、生食水 2 ml を加えて血粉と同様に浸出する。遠心沈澱後、上清を 1/10 量に濃縮し、その 1 μ l を被検液とした。

② リンパ球細胞毒抑制試験

倍数希釈した抗血清を 1 μ l 宛分注してある HLA タイピング用トレイに被検液を 1 μ l 加えて室温 1 時間反応させ、次いで対応するリンパ球浮遊液 1 μ l (細胞数 2000 ~ 2500) を加えて室温 30 分間反応の後、さらにウサギ補体 5 μ l を加えて室温に静置、1 時間の後 5 % エオジン Y 水溶液 2 μ l を加えて 5 分間染色し、中性ホルマリン (pH 7.2 ~ 7.4) 5 μ l を加えて固定後、位相差顕微鏡で死細胞数の割合を判定した。結果は死細胞数を 10 % 間隔で 10 段階に分けて記録した。対照 (生食水) のリンパ球が 80 % 以上死滅する最終希釈の抗血清活性が 50 % 以上抑制される場合を抗原陽性とした。抑制率は次式で求めた。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{抑制試験の死細胞率}}{\text{対照の死細胞率}} \right) \times 100$$

2) One-Stage 法

1 cm² の血痕ガーゼをベックマンチューブに入れ、希釈した抗血清 30 μ l を加えて 4 °C に 16 時間静置後、30 分間遠心沈澱 (15000 r.p.m.) して上清 1 μ l 宛を予めミネラルオイル 6 μ l 宛を分注してある HLA タイピング用トレイに分注する。さらに対応するリンパ球浮遊液 1 μ l (細胞数 2000 ~ 2500) を加えて Two-Stage 法のリンパ球細胞毒抑制試験と同様の操作を行った。

3) 洗浄法

Two-Stage 法, One-Stage 法 (以下従来法という) の操作の過程に洗浄操作を加えて、これを洗浄法とした。洗浄は抗原-抗体反応終了の段階で McCoy's 5a 液 5 μ l を加えて遠心沈澱 1 分間 (1000 r.p.m.) して行い、上

清を吸引除去して沈澱物を McCoy's 5a 液 5 μ l に再浮遊させ、次いでウサギ補体 5 μ l を加えて検査した。

4) ヘモグロビン定量法

1 cm² の血痕ガーゼを 2 枚用意し、1 枚を細胞毒抑制試験に、他の 1 枚をヘモグロビン定量に用い、シアンメトヘモグロビン法に準じた。1 cm² の血痕ガーゼを 1 ml の生食水で 30 分間浸出し、次いで 30 分間遠心沈澱 (15000 r.p.m.) してその上清 0.5 ml に発色試薬 5 ml を加えて 5 分間反応させ、ヘモグロビンをメトヘモグロビンに変化させて、蒸留水を対照として 540 nm の吸光度を測定した。ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン標準線から計算した。

III. 実験成績

1. Two-Stage 法による HLA 抗原の検出

1) 血粉量の吟味

Two-Stage 法では血粉や血痕ガーゼから可溶性の HLA 抗原を予め生食水で抽出して、これを被検液として検査するが、血粉の場合はその量が多量であると生食水による浸出が困難である。1 ml の血液を乾燥すると 250 mg の血粉が得られるので、250 mg/ml の抽出液を原液として 125 mg/ml, 62.5 mg/ml の濃度の抽出液を作製してリンパ球細胞毒抑制試験を行い、検査に使用する抽出液を作製する血粉の至適量についてを吟味した (表 1)。

血粉は HLA-A 2 型の血粉 5 例、2 種類の抗血清、2 種類の標準リンパ球を使用して検討したが、抑制率が 55 % 以上を抗原陽性 (positive, +) とすると 62.5 mg/ml の濃度では全く抗原が検出されず、また 125 mg/ml の濃度でもほとんどの血粉で抗原が検出されなかったが、250 mg/ml の濃度では全ての血粉から抗原が検出された。したがって抗原抽出液を作製する血粉量は生食水 1 ml に対して 250 mg が至適と考えられ、以後の実験に使用する血粉量を 250 mg/ml とした。

2) 血粉, 血痕ガーゼの HLA 抗原検出

HLA-A 2 の血粉 35 例, 血痕ガーゼ 35 例について Two-Stage 法による検査を行い、被検液の抑制率が 55 % 以上を抗原陽性 (positive, +), 45 % 以下を陰性 (negative, -), 45 % ~ 55 % を判定不能 (indeterminate, $\pm$) として HLA 抗原検出の可能性を検討した。血粉の場合は 3 種類の抗血清を、血痕ガーゼの場合は 4 種類の抗血清を使用し、HLA-A 2 (+) 群, HLA-A 2 (-) 群のそれぞれの血粉, 血痕ガーゼの検査を行ったところ血粉の場合は 3 種類の中 2 種類の抗血清が、血痕ガーゼの場合は 4 種類の中 3 種類の抗血清が HLA-A 2 (-)

表 1. 細胞毒抑制反応 —血粉量の検討— (HLA-A 2 について)

血粉	血 粉 濃 度 mg/ml											
	250				125				62.5			
	S-1		S-2		S-1		S-2		S-1		S-2	
	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2	L 1	L 2
1	+	+	+	+	-	-	-	±	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	±
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	+	-	±	-	-	-	-
5	+	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-

S-1: 抗 HLA-A 2 血清 (1:8)

L 1: リンパ球 1 (A2, A24, Bw54, Bw61)

血粉 1 (A2, A24, Bw54, Bw61)

血粉 3 (A2, A26, Bw48)

血粉 5 (A2, A24, B7)

S-2: 抗 HLA-A 2 血清 (1:2)

L 2: リンパ球 2 (A2, A24, Bw52)

血粉 2 (A2, A24, Bw54, Bw62)

血清 4 (A2, Aw19, B5, B16)

の血粉, 血痕ガーゼとも陽性の反応を示し, 前者においては61%, 59%, 後者においては67%, 24%, 22%の多数が偽陽性 (false-positive) であった。血粉, 血痕ガーゼとも偽陽性を呈しなかった抗血清は僅か1種類だけであった。一方, HLA-A 2 (+) 群の血粉, 血痕ガーゼとの反応はいずれも陽性率が100%あるいはそれに近い高率であった(表2)。したがって Two-Stage 法で HLA 抗原を検出するには使用する抗血清の吟味が必要ということになる。

2. One-Stage 法による HLA 抗原の検出

1) 抗血清量の検討

One-Stage 法は血痕に直接抗血清を加えて反応せしめる方法であるから, 抗血清の使用量は血痕を完全に浸して抗原抗体反応が充分に行える量でなければならない。そこで HLA-A 2 型血痕 2 種 (BS-1: A 2, A24, B 7, BS-2: A 2, A24, Bw52,) と HLA-A 2 抗血清 (S-1), リンパ球 (HLA-A 2, A24, Bw52) を使用して抗血清の適量を検討した (図1)。1:8 に希釈した抗血清の量を20 μ l から5 μ l 宛増量して細胞毒抑制試験を行ったところ, 血痕BS-1, BS-2 に対して55%以上の抑制率を示した抗血清の量は20 μ l から30 μ l までであり, 40 μ l, 50 μ l では抗体過剰となり抑制率は低下した。したがって充分な抗原抗体反応を起こし得る量は20 μ l ~30 μ l であるから血痕を完全に浸し得る充分な量として最大量の30 μ l を適量とし, 以上の One-Stage 法に使用する抗血清の量は30 μ l とした。

2) 血痕ガーゼの HLA 抗原検出

血粉の必要量 (250mg) に直接抗血清を加えると泥状になるため, 遠心沈澱後に抗原が吸着した抗血清の必要

量を得るには, 1 ml もの抗血清を必要とするので, One-Stage 法による血粉からの抗原検出は実際上不可能である。したがって One-Stage 法による HLA 抗原の検出は血痕ガーゼから実施するしかない。One-Stage 法による HLA の抗原検出は HLA-A 2 型のみならず, HLA-A 9 型, HLA-B 5 型についても検討した (表3-1, 3-2, 3-3)。

HLA-A 2 (+) 群の血痕は14例であるが, S-1 血清との反応をみると14例中13例が陽性で陽性率は93%, 残りの1例も判定不能 (indeterminate) であって陰性ではない。この抗血清と HLA-A 2 (-) 群の血痕との反応をみると15例中14例が陰性, 残りの1例は判定不能であり, 偽陽性の現れない優れた抗血清であった。ところが S-3 血清との反応をみると HLA-A 2 (+) 群は全例陽性であったが, HLA-A 2 (-) 群でも14例中12例が陽性を呈して偽陽性発現の強い抗血清であった。この傾向は Two-Stage 法の成績とも同じであるから One-Stage 法でも使用する抗血清の吟味が必要ということになる。また S-5 血清, S-6 血清は使用し得る血清と判断し得たが, S-7 血清は偽陽性発現の強い抗血清で, とても使用し得るものではなかった。

3. 洗浄法

さてこれまでの検討の結果から検体の種類が血粉であっても血痕ガーゼであっても, One-Stage 法で偽陽性反応の発現しない抗血清は Two-Stage 法でも発現しないし, 偽陽性反応の発現する抗血清は One-Stage 法でも Two-Stage 法でも発現して使用に耐えないことが明らかになり, 検査法として何れの検査法を選ぼうとも抗血清の吟味が必要であることを痛感したが, このことは偽

表 2. Two-Stage 法による血粉, 血痕抽出液の反応結果 (A 2)

血痕 No.	HLA 型				抗 血 清							
					S-1 (1:8)		S-2 (1:2)		S-3 (1:2)		S-4 (1:2)	
					血粉	血痕	血粉	血痕	血粉	血痕	血粉	血痕
1	A 2	A24	B _w 54	B _w 61	+	+	+	+	+		+	+
2	A 2	A24	B _w 54	B _w 62	+	+	+	+	+		+	+
3	A 2	A26	B _w 48		+	+	+	+	+		+	+
4	A 2	A _w 19	B 5	B 16	+	+	+	+	+		+	+
5	A 2	A24	B 7		+	+	+	+	+		+	+
6	A 2	A24	B _w 52		+	+	+	+	+		+	+
7	A 2	A11	B _w 60		+	+	+	+	+		±	+
8	A 2	A26	B _w 61		+	+	+	+	+		±	+
9	A 2	A _w 19	B 15	B 44	+	+	+	+	+		+	+
11	A 2	A _w 33	B _w 52	B 17	+	+	+	+	+		+	+
12	A 2	A24	B 17	B _w 61	+	-	+	+	+		+	+
13	A 2	A28	B 15	B 39	+	+	+	+	+		+	+
14	A 2	A _w 19	B 44	B _w 61	+	±	+	+	+		+	+
15	A 2	A28	B 35		+	+	+	+	+		+	+
16	A 2	A11	B 15	B _w 48	+	+	+	+	+		+	+
17	A 2	A11	B 7	B 15	+	+	+	-	+		+	+
18	A 2	A _w 19	B _w 61	B 13	+	+	+	+	+		+	+
A 2 (+) 群 陽性率 (%)					100	88	100	94	100		88	100
51	A 3	A11	B 16		-	-	+	-	+		-	+
52	A24	A26	B 51		-	-	+	-	-		±	-
53	A24	A26	B 35	B 15	-	-	+	±	+		+	-
54	A25	A _w 19	B 51	B 40	-	-	+	-	+		+	-
55	A26		B 35	B _w 48	-	-	-	-	±		+	±
56	A24		B 15	B 17	-	-	+	+	-		-	-
57	A24		B 7	B _w 54	-	-	-	-	±		-	-
58	A24		B 51		-	-	-	-	+		-	-
59	A24	A26	B 51		-	-	+	+	+		+	+
60	A 3	A11	B 44	B _w 54	-	-	+	-	+			
61	A26	A11	B _w 61	B _w 52	-	-	-	±	+		+	-
62	A10		B 12		-	-	+	-	+		+	-
63	A 9	A _w 19	B 5	B 40	-	-	+	-	±		+	-
64	A24		B 51		-	-	-	-	+		+	-
65	A26	A11	B 51		-	-	-	-	-		-	-
66	A24	A26	B 39	B _w 54	-	-	-	-	+		-	-
67	A24	A26	B _w 52	B _w 62	-	-	+	+	+		+	+
68	A24	A11	B 51		-	-	+	+	+		+	+
A 2 (-) 群 陽性率 (%)					0	0	61	22	67		59	24

陽性反応発現の原因は検体である血粉や血痕ガーゼにあるのではなく、それぞれの抗血清の性質によるものであることを示している。ところで、このリンパ球細胞毒抑制試験は抗原抗体結合後に補体を加えて抗原抗体反応を

起こさせる補体結合反応であるから、抗血清中に抗補体作用を呈する物質が存在すれば当然反応は進行せず、その結果として抗体の作用が抑制されたかのような現象(反応陽性)が現れるのではないかと推察される。そこ

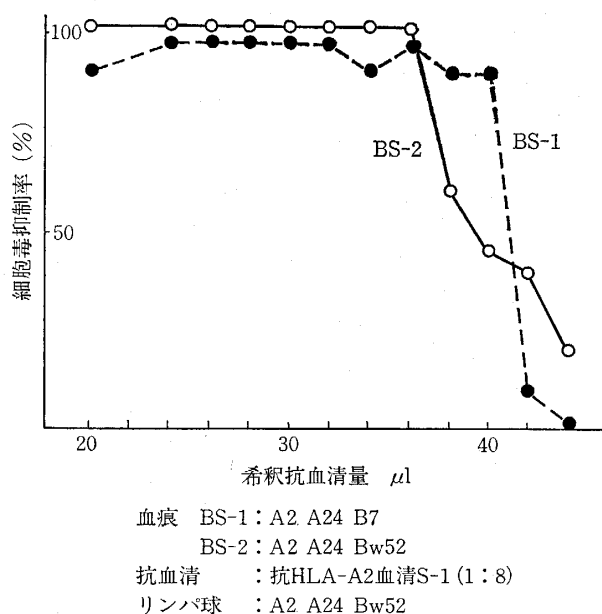


図 1. 細胞毒抑制 (A 2) (抗血清量の検討)

で One-Stage 法を検査法として抗原抗体結合後の余剰の抗血清を除去する目的で洗浄操作を加えて、偽陽性反応が消えるかどうか検討した。

1) 洗浄回数について

リンパ球と抗血清を反応させた後、洗浄操作を 3 回まで行い、回数による洗浄効果の相違を比較検討した。なお偽陽性の原因が検体である血痕に含まれている cross-reactive antigen による可能性も考えられるので、cross-reactive antigen を多く持つ HLA-B51 型について、HLA-B51 (+) 血痕 3 例、HLA-B51 (-) 血痕 6 例の計 9 例の血痕、抗体は抗 HLA-B51 血清、リンパ球は (A 2, A24, B51, B35) を使用して検討した (表 4)。

血痕番号 (52, 64, 65) は HLA-B51 抗原を有する血痕、血痕番号 (6, 17, 56, 61) は B51 との cross-reactive antigen を有する HLA-B15 (Bw62 + Bw63), Bw52 の抗原のある血痕である。血痕番号 (5, 66) は HLA-B51 抗体とは cross-react しない HLA-B 抗原 (B 7, Bw54, B39) を有する血痕である。さて、表 4 に示したように洗浄前は 66 番血痕以外はすべて陽性の反応を呈したが、この中で 52, 64, 65 番以外の血痕の反応は偽陽性反応である。ところが 1 回の洗浄によって 6 番血痕の Bw52 以外の偽陽性反応はすべて消失し、しかも 2 回、3 回の洗浄を行ってもその効果は同じであった。したがって偽陽性反応に対する洗浄効果は著明であり、偽陽性反応の殆んどが 1 回の洗浄によって消失したので以後の洗浄操作は 1 回とした。しかし HLA-Bw52 抗原のように洗浄操作によっても偽陽性反応が消失しない

cross-reactive antigen が存在したことは血痕からの HLA 型抗原検出を実施する上で注意すべきことである。

2) Two-Stage 法で洗浄した場合

Two-Stage 法は血粉、血痕ガーゼともに利用可能な HLA 型抗原検出法であるが、洗浄操作を加えた Two-Stage 法は HLA-A 2 型と HLA-A 9 型について血痕ガーゼを使用して検討した (表 5-1, 5-2)。血痕番号 (1, 6, 17) は HLA-A 2 (+) 型血痕ガーゼ、血痕番号 (52, 61, 64) は HLA-A 2 (-) 型血痕ガーゼ、また HLA-A 9 (+) 型血痕ガーゼは血痕番号 (1, 6, 52, 56, 64, 66)、HLA-A 9 (-) 型血痕ガーゼは血痕番号 (17, 61, 65, 75) であり、HLA-A 2 抗体は S-6 血清、HLA-A9 抗体は S-I 血清である。

S-6 血清は偽陽性発現の少ない比較的良好な抗血清であり、表 5-1, 表 5-2 に示したように従来法 (N) で実施しても HLA-A 2 型 (-) 群には陽性反応の発現はなかったが、S-I 抗血清は偽陽性発現のある抗血清であり、HLA-A 9 型 (-) 群でも陽性反応が発現している。ところが洗浄操作 (W) を加えた場合は全く消失しており HLA-A 9 型 (+) 群の陽性反応には洗浄後でも変化はないので、抗血清とリンパ球を反応せしめた後補体を加える前に洗浄を実施することは Two-Stage 法においても効果のあることを示している。

3) One-Stage 法で洗浄した場合

One-Stage 法に洗浄操作を加えた場合については、洗浄回数の検討の項ですでに洗浄効果のあることが明らかにされているが、この項では HLA-A 2 抗体として (S-2, S-6, S-8) 血清、HLA-A 9 抗体として (S-I, S-IV, S-V) 血清を使用して吟味した (表 6, 7)。血痕番号 (1, 6) は HLA-A 2 (+) 群血痕ガーゼ、血痕番号 (51, 52, 56, 59, 61, 64) は HLA-A 2 (-) 群血痕ガーゼ、また血痕番号 (1, 6, 56, 64) は HLA-A 9 (+) 群血痕ガーゼ、血痕番号 (17, 51, 55, 61, 65, 75) は HLA-A 9 (-) 群の血痕ガーゼである。

従来法 (N) では HLA-A 2 抗体の中 (S-2, S-8) 血清は偽陽性の発現する抗体であり、(S-6) 血清は偽陽性発現のない良好な抗体であったが、洗浄 (W) を実施した後は HLA-A 2 (-) 群での陽性反応は消失し、且つ HLA-A 2 (+) 群の陽性反応発現には変化がなかった。このことは HLA-A 9 型についての検査でも全く同じであり、洗浄操作によって偽陽性反応を消失せしめる効果は明らかであった。

4. リンパ球、血清、血痕の抗原検出の比較

血液の液性成分である血清中にも HLA 抗原が存在

表 3-1. One-Stage法による血痕の反応結果 (A 2)

	血痕 No.	HLA 型				抗 血 清				
						S-1 (1:8)	S-3 (1:2)	S-5 (1:4)	S-6 (1:2)	S-7 (1:2)
A 2 (+) 群	1	A 2	A 24	B _w 54	B _w 61	+	+	+	+	+
	2	A 2	A 24	B _w 54	B _w 62	+	+	+	+	+
	3	A 2	A 26	B _w 48		+	+	+	+	+
	4	A 2	A _w 19	B 5	B 16	+	+	+	+	+
	5	A 2	A 24	B 7		+	+	+	+	+
	6	A 2	A 24	B _w 52		+	+	±	+	+
	11	A 2	A _w 33	B _w 52	B 17	+	+	-	+	+
	12	A 2	A 24	B 17	B _w 61	±	+	-	+	+
	13	A 2	A 28	B 15	B 39	+	+	+	+	+
	14	A 2	A _w 19	B 44	B _w 61	+	+	+	+	+
	15	A 2	A 28	B 35		+	+	±	+	+
	16	A 2	A 11	B 15	B _w 48	+	+	+	-	+
	17	A 2	A 11	B 7	B 15	+	+	+	+	+
	18	A 2	A _w 19	B _w 61	B 13	+	+	+	+	+
A 2 (-) 群	51	A 3	A 11	B 16		-	+	+	+	+
	52	A 24	A 26	B 51		-	+	+	-	+
	53	A 24	A 26	B 35	B 15	-	±	-	-	+
	54	A 25	A _w 19	B 51	B 40	-	+	-	-	+
	55	A 26		B 35	B _w 48	-	+	+	-	+
	56	A 24		B 15	B 17	-	-	-	-	+
	57	A 24		B 7	B _w 54	-	+	+	-	+
	58	A 24		B 51		-	+	-	+	-
	59	A 24	A 26	B 51		-	+	-	-	-
	60	A 3	A 11	B 44	B _w 54	-	+			
	61	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62	-	+	-	-	+
	63	A 9	A _w 19	B 5	B 40	-	+	-	-	±
	64	A 24		B 51		-	+	-	-	+
	66	A 24	A 26	B 39	B _w 54	-	+	-	-	-
	67	A 24	A 26	B _w 52	B _w 62	±	+	+	+	+

することはよく知られており、血痕からの HLA 抗原の検出も血清中の可溶性の HLA 抗原を目標としたものに外ならない。本論文においてはすでに血痕からの検出が可能であることを明らかにし得たが、同一人についてのリンパ球、血清、血痕からの HLA 抗原検出を14例に試み、表 8 の成績を得た。リンパ球、血清、血痕は HLA-A 2 型 (+) 群 6 例、HLA-A 2 型 (-) 群 8 例からそれぞれ採取し、HLA 抗体は偽陽性反応の強い S-3 血清を使用し、Two-Stage 法、洗浄を加えた Two-Stage 法により抗原の検出を行った。No. 1, 2, 4, 5, 6, 17 は HLA-A 2 型 (+) 群、No. 51, 53, 54, 56, 61, 62, 63, 64 は HLA-A 2 型 (-) 群である。表 8 に

示したように偽陽性の強い抗体 S-3 血清もリンパ球では HLA-A 2 型 (-) 群とは全く反応せず、したがって偽陽性反応は発現しなかったが、血清ならびに血痕では偽陽性反応が発現し、特に血痕では HLA-A 2 型 (-) 群の全てに発現していた。血清では 8 例中 2 例が陽性反応、3 例が判定不能 (indeterminate)、3 例は陰性であった。このことは偽陽性反応の発現は血痕よりも血清の方が頻度が少なく、かつ反応そのものも弱いことを示しており、偽陽性反応は血清成分でも血球成分でも発現するが、資料が血清成分と血球成分が混在する血痕の場合に強く発現することを示唆した成績であった。しかしこの偽陽性反応も洗浄操作後は完全に消失したので、洗浄

表 3-2. One-Stage 法による血痕の反応結果 (A 9)

	血痕 No.	HLA 型				抗 血 清		
						S—I (1:4)	S—II (1:4)	S—III (1:1)
A24(+)群	1	A2	A24	B _w 54	B _w 61	+	+	+
	6	A2	A24	B _w 52		+	+	+
	56	A24		B15	B17	+	+	+
	58	A24		B51		+	+	+
	64	A24		B51		+	+	+
A24(-)群	16	A2	A11	B15	B _w 48	+	+	-
	17	A2	A11	B7	B15	±	+	+
	20	A2	B44	B13		+	-	+
	51	A3	A11	B16		-	+	+
	54	A25	A _w 19	B51	B40	-	-	±
	55	A26		B35	B _w 48	-	±	+
	60	A3	A11	B44	B _w 54	-		
	61	A26	A11	B _w 61	B _w 62	-	+	-
	65	A26	A11	B51		-	+	+
	75	A11	A26	B15	B35	+	-	
	84	A31		B44	B _w 61	-	-	

表 3-3. One-Stage 法における血痕の反応結果 (B 5)

	血痕 No.	HLA 型				抗 血 清		
						S—① (1:2)	S—② (1:1)	S—③ (1:2)
B5(+)群	6	A2	A24	B _w 52		+	+	+
	52	A24	A26	B51		+	+	+
	58	A24		B51		+	+	+
	64	A24		B51		+	+	+
	65	A26	A11	B51		+	+	+
	67	A24	A26	B _w 52	B _w 62	+	+	+
	83	A24		B _w 52		+	+	+
B5(-)群	5	A2	A24	B7		+	+	+
	15	A2	A28	B35		±	+	+
	17	A2	A11	B7	B15	+	-	+
	56	A24		B15	B17	+	-	+
	57	A24		B7	B _w 54	-		+
	61	A26	A11	B _w 61	B _w 62	-	+	+
	66	A24	A26	B39	B _w 54	-	±	-

法を実施すれば被検体がリンパ球, 血清, 血痕の何れであつても本来の型別が可能であることを示していた。

5. 血痕ガーゼのヘモグロビンの定量

さて, 本実験においては0.2ml の血液を直径4~5

cm の範囲に塗布したガーゼ片を血痕ガーゼとして, One-Stage 法ではその1cm² をまた Two-Stage 法では血痕全量 (直径4~5cm: 血液0.2ml) の抽出液を使用した, 実地応用に際しての血痕検査においては血液

表 4. One-Stage 法による細胞毒抑制反応 (B51) (洗浄回数比較)

	血痕 No.	HLA 型				洗 浄 回 数			
						0	1	2	3
B 51(+)群	52	A 24	A 26	B 51		+	+	+	+
	64	A 24		B 51		+	+	+	+
	65	A 26	A 11	B 51		+	+	+	+
B 51(-)群	6	A 2	A 24	B _w 52		+	±	+	+
	17	A 2	A 11	B 7	B 15	+	-	-	-
	56	A 24		B 15	B 17	+	-	-	-
	61	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62	+	-	-	-
	5	A 2	A 24	B 7		+	-	-	-
	66	A 24	A 26	B 39	B _w 54	-	-	-	-

抗 HLA-B51 血清 S-③(1:2)

リンパ球 (A2, A24, B51, B35)

表 5-1. Two-Stage 法における従来法と洗浄法の比較 (A 2)

	血痕 No.	HLA 型				抗血清	
						S-6	
						(1:3)	
A 2 (+) 群	1	A 2	A 24	B _w 54	B _w 61	+	+
	6	A 2	A 24	B _w 52		+	+
	17	A 2	A 11	B 7	B 15	+	±
A 2 (-) 群	52	A 24	A 26	B 51		-	-
	61	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62	-	-
	64	A 24		B 51		-	-

N: 従来法 W: 洗浄法

の付着量が不明であるから、検査に使用する血痕量を肉眼的に決定することはきわめて困難である。そこで血痕のヘモグロビン量を測定して抗原検出の可能な限界を検討した。血液0.2ml を塗布した直径4~5cm の HLA-A 2 型, HLA-B 5 型の血痕ガーゼから0.5cm 四方~1.4cm 四方の血痕ガーゼを切り取り, HLA 抗原の検出とヘモグロビン量の測定を行ったところ図2に示したように抗原検出可能なヘモグロビン量にはかなり個人差がみられたが, 2~3mg 以上では殆どの例で HLA 抗原の検出が可能であった。

図の中で●は抑制反応陽性で検出可能であったもの, ○は抑制反応陰性で検出不可能であったものである。しかしながら血痕量の指標としたヘモグロビン濃度が高くなると従来法では当然偽陽性が発現すると推測されたので, HLA-A 2 の (-) 型血痕である52, 64についてヘモグロビン量と偽陽性発現の状態を検討し, その成績を

表 5-2. Two-Stage 法における従来法と洗浄法の比較 (A 9)

	血痕 No.	HLA 型				抗血清	
						S-I	
						(1:4)	
A 9 (+) 群	1	A 2	A 24	B _w 54	B _w 61	+	+
	6	A 2	A 24	B _w 52		+	+
	52	A 24	A 26	B 51		+	+
	56	A 24		B 15	B 17	+	+
	64	A 24		B 51		+	+
	66	A 24	A 26	B 39	B _w 54	+	+
A 9 (-) 群	17	A 2	A 11	B 7	B 15	+	-
	61	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62	-	-
	65	A 26	A 11	B 51		-	-
	75	A 11	A 26	B 15	B 35	+	-

N: 従来法 W: 洗浄法

表9に示した。抗原検出は Two-Stage 法ならびにその洗浄法を, HLA 抗体は従来法で全く偽陽性の発現しなかった良好な血清である S-1 血清を使用したところ, 52血痕ガーゼではヘモグロビン濃度 3.41mg と 3.58mg で判定不能 (indeterminate) ではあるが, わずかに偽陽性反応の傾向が現れた。しかしながら洗浄法ではこの反応も完全に消失し, 正確な判定が可能であった。

6. 血痕中の HLA 抗原の耐時性について

日常の鑑定業務の中で扱う血痕は血液付着後の経過時間の不明なものが多い。したがってこの実験で行った HLA 抗原の検出も実地応用に際しては HLA 抗原の耐時性を検討しなければならない。そこで HLA-A 9 型の

表 6. Onc-Stage 法における従来法と洗浄法の比較 (A 2)

	血痕 No.	HLA 型				抗 血 清					
						S-2		S-6		S-8	
						(1:2)		(1:3)		(1:3)	
						N	W	N	W	N	W
A 2 (+) 群	1	A 2	A 24	B _w 54	B _w 61	+	+	+	+	+	+
	6	A 2	A 24	B _w 52		+	+	+	+	+	+
A 2 (-) 群	51	A 3	A 11	B 16		-	-	-	-	-	-
	52	A 24	A 26	B 51		-	-	-	-	+	-
	56	A 24		B 15	B 17	+	-	-	-	-	-
	59	A 24	A 26	B 51		+	-	-	-	+	-
	61	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62			-	-	-	-
	64	A 24		B 51		+	-	-	-	+	-

N : 従来法 W : 洗浄法

表 7. One-Stage 法における従来法と洗浄法の比較 (A 9)

	血痕 No.	HLA 型				抗 血 清					
						S-I		S-IV		S-V	
						(1:4)		(1:3)		(1:4)	
						N	W	N	W	N	W
A 9 (+) 群	1	A 2	A 24	B _w 54	B _w 61	+	+	+	+	+	+
	6	A 2	A 24	B _w 52		+	+	+	+	+	+
	56	A 24		B 15	B 17	+	+	+	+	+	+
	64	A 24		B 51		+	+	+	+	+	+
A 9 (-) 群	17	A 2	A 11	B 7	B 15	-	-	+	-	-	-
	51	A 3	A 11	B 16		+	-	+	-	-	-
	55	A 26		B 35	B _w 48	-	-	-	-	-	-
	61	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62	-	-	+	-	-	-
	65	A 26	A 11	B _w 61	B _w 62	-	-	+	-	-	-
	75	A 11	A 26	B 15	B 35	-	-	-	-	-	-

N : 従来法 W : 洗浄法

血痕ガーゼ2種を使用して、室温で4, 7, 14, 21, 28, 35, 42日間放置した後 Two-Stage 洗浄法で HLA-A 9 抗原の検出を実施した。その結果は図3に示したが ○は HLA-A24, A26, B51, 型血痕, ●は HLA-A24, B51, 型血痕, 抗血清は S-I, リンパ球の型は HLA-A 2, A24, Bw54, Bw61である。血液付着後 35 日までは両血痕とも抑制率は100%であったが, 42 日になると●血痕の抑制率は80%に低下した。しかしながら抑制率55%を陽性としているので両血痕とも血液付着後 42日までは HLA 抗原の検出が可能であった。したがって HLA 抗原は室温放置の状態で約1か月は完全な耐

時性があるということになる。

IV. 考 察

本論文は血痕からの HLA 型検査のためにリンパ球細胞毒抑制試験を用いて, 検査法の鋭敏度, 特異性, 各検査法の比較, 欠点の改良などを検討した論文である。

HLA 抗原検出の鋭敏度については, 血粉を使用した Two-Stage法についてこれまで Rittner & Waiyawuth²⁸⁾ や藤政³⁵⁾ の報告がある。Rittner & Waiyawuth は抽出液を作製する血粉の濃度を 1974 年には 1 mg/100 μ l (10mg/ml) としたが, 1975年には100mg/ml と増量して

表 8. リンパ球, 血清, 血痕の反応性 (A 2)

	血痕 No.	HLA 型				リンパ球	血清		血痕	
						N	N	W	N	W
A 2 (+) 群	1	A2	A24	B _w 54	B _w 61	+	+	+	+	+
	2	A2	A24	B _w 54	B _w 62	+	+	+	+	+
	4	A2	A _w 19	B5	B16	+	+	+	+	+
	5	A2	A24	B7		+	+	+	+	+
	6	A2	A24	B _w 52		+	+	+	+	+
	17	A2	A11	B7	B15	+	+	+	+	+
A 2 (-) 群	51	A3	A11	B16		-	-	-	+	-
	53	A24	A26	B35	B15	-	+	-	+	-
	54	A25	A _w 19	B40	B51	-	±	-	+	-
	56	A24		B15	B17	-	-	-	+	-
	61	A26	A11	B _w 61	B _w 62	-	-	-	+	-
	62	A10		B12		-	±	-	+	-
	63	A9	A _w 19	B5	B40	-	±	-	±	-
	64	A24		B51		-	+	-	+	-

N : 従来法 W : 洗浄法

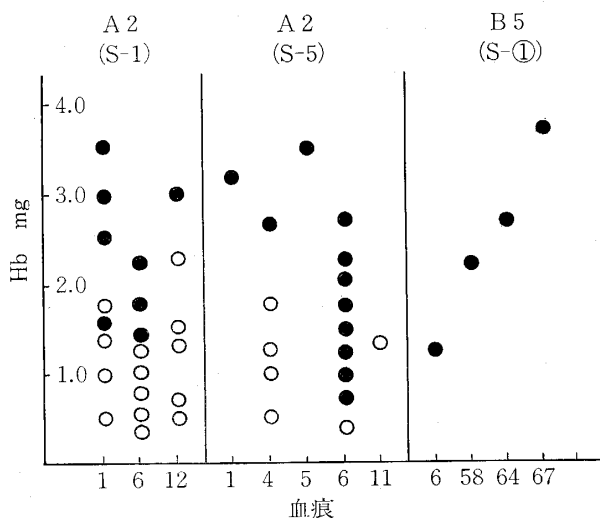
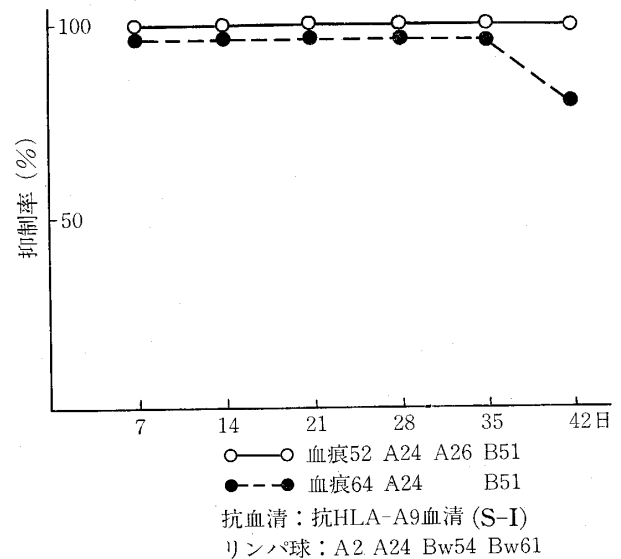


図 2. ヘモグロビン濃度と反応性 (One-Stage 法)

表 9. Hb 濃度と細胞毒抑制反応 (A 2)

血痕64			血痕52		
Hb(mg)	N	W	Hb(mg)	N	W
2.59	-	-	1.54	-	-
3.85	-	-	3.41	±	-
6.27	-	-	3.58	±	-

N : 従来法 W : 洗浄法
 血痕64 : A24 B51
 血痕52 : A24 A26 B51
 抗血清 : S-1 (1:8)

図 3. 抗原の耐時性 (A 9)
洗浄法 (Two-Stage 法)

いる。藤政 (1983年) は $10 \pm 5 \text{ mg}/100 \mu\text{l}$ ($100 \pm 50 \text{ mg}/\text{ml}$) を使用しているが、本実験では $250 \text{ mg}/\text{ml}$ の濃度が必要であった。この抽出液作製に要する血粉量の違いは Rittner & Waiyawuth や藤政と本実験とでは抽出液作製時の遠心速度が異なることから、遠心条件の差に原因するものではないかと考えられる。Rittner & Waiyawuth は 300 r.p.m. , 15分, 藤政は 3000 r.p.m. , 5分であり、本実験では 15000 r.p.m. , 30分である。遠心速度が低速だと血粉抽出液中に夾雑物が残っているため、鏡検

表 10. One-Stage 法の条件

Author	血痕	抗血清 (μ l)
Newall (1979)	布直径 0.2 mm	7
Hodge (1980)	綿糸 4 cm	5
Lötterle (1981)	綿糸 3 cm (血痕 0.5 mg)	5
Nelson et. al. (1983)	布 2 mm 四方	10

時に死細胞の一部が夾雑物に覆われて実際の死細胞数より少なく判定され、その結果抑制率が高く計算されて陽性と判定されることがあるからである。その他の研究者は血痕付着糸あるいは血痕付着布、血痕付着ろ紙などを使用しているが、Two-Stage 法で抗原検出を行った井上ら³²⁾ (1981) は木綿糸 2.0cm (2.10~3.70mg/0.2ml)、ろ紙片 0.5cm×0.5cm (1.20~3.80mg/0.2ml) を使用量としている。本実験では血痕ガーゼ片 1 cm×1 cm 大のものを使用したが、井上らは遠心沈澱の操作を実施していないので、この使用血痕量の違いも血痕浸出液の上清の夾雑物の有無によるものと考えられる。

血痕と抗血清を直接反応させる One-Stage 法は Newall³⁰⁾ (1979) が報告して以来ほとんどの研究者がこの方法を使用している。各研究者が One-Stage 法で HLA 抗原を検出した条件は表 10 に示した通りであるが、使用する血痕の大きさを示したものが多く、血痕中に含まれている抗原量は明らかでない。実際に、血清中の可溶性の HLA 抗原をも含めた乾燥血痕中の抗原量を測定することは不可能に近い。そこで本実験では HLA 抗原量の目安とする血痕量の指標として、検査に使用する血痕ガーゼのヘモグロビン量を測定し、約 3 mg 以上のヘモグロビンが存在する血痕ガーゼからは HLA 抗原の検出が可能であることを明らかにした。

HLA 型検査に使用する抗血清はすべて同種免疫抗体であり、その由来は経産婦血清や分娩時出血血液である。そのせいか偽陽性反応を呈する抗血清が多く、また良好な抗血清でも同一 Lot Number の抗血清を常に用意することは困難である。本実験においても使用した抗血清の反応態様は偽陽性を呈するものが、One-Stage 法でも Two-Stage 法でも多数を占めていた。この抗血清の偽陽性反応については Nelson ら³⁷⁾ (1983) を除いたほとんどの研究者が認めているが、その原因を HLA 抗原の特徴である抗原間の cross-reaction によるものとしている報告^{28,30,31,33)}が多い。しかしながら本実験では B 51 との cross-reaction が認められている Bw52, Bw53, B35, B15, B17, B18, B21, B38, B 8, B14⁴⁸⁾ な

どの他にも B 7 との反応が陽性 (表 4) であり、また A 9 抗原に対して cross-reactive である A 1, A 2 抗原の他にも A 3, A11 や A26 との反応が陽性 (表 7) であり A 2 抗原においても cross-reaction が知られている A28, A 9 (A23+A24) 型⁴⁸⁾ 以外の型の血痕とも陽性の反応 (表 6) を呈していた。したがって偽陽性 (false-positive) 反応の全てを cross-reaction の結果として容認することは出来ない。これまでの研究者の偽陽性反応に対する対策としては、偽陽性反応の出現する抗血清は使用しないで、判定が矛盾なく行える抗血清のみを使用するという消極的な態度をとってきた。しかし市販の HLA 抗血清の中には従来の One-Stage 法や Two-Stage 法では判定出来ないものがかなりあり、使用可能な抗血清はきわめて少数であった。そこでリンパ球細胞毒抑制試験が補体の関与した補体結合反応であること、偽陽性反応の出現する抗血清は検査法を変えても必ず偽陽性反応が出現すること、また偽陽性反応の出現しない抗血清は高力価で実際の検査には希釈して使用していることの三点から、cross-reaction でない偽陽性反応は抗血清自体の抗補体作用によるものではあるまいかと考え、抗原抗体結合後に余剰の抗血清を除去する目的で MrCoy's 5 a Medium 液を加えて遠心沈澱して洗浄し、洗浄液を吸引除去後に補体を添加する洗浄法を試みた。結果は従来法で発現していた偽陽性反応の中 cross-reaction 以外の偽陽性反応はすべて消失し、市販のほとんどの抗血清が Two-Stage 法、One-Stage 法に使用可能となった。なお偽陽性反応出現の原因としては血清を検体とした時も発現していること、血痕量が増加すると本来反応が陰性であったものが陽性の反応に転ずる傾向がみられたことなどから抗血清自体に含まれていると推察される抗補体作用を呈する物質の他に、血痕中に含まれている乾燥した血清成分にも抗補体作用を呈する物質の存在が窺われた。ところで HLA 抗原には CYNAP 現象^{38,39)} (Cytotoxicity Negative Absorption Positive) のあることが知られているが、これは抗血清と対応しない白血球にもなんらかの不明の原因で抗体が結合するが、補体は結合しないので Cytotoxicity は起さないという現象のことであるから、本実験でみられた偽陽性反応と一見類似しているが、本実験で見られた偽陽性反応は cross-reaction を除いては、そのほとんどが洗浄操作によって消失したので CYNAP 現象とは異なるものであろう。また洗浄の方法と余剰液の除去についてであるが、Nelson ら³⁷⁾ (1983) は洗浄液や余剰液を除去するために補体を加える前と補体添加後の反応終了時、さらに染色後の 3 回にわたり静置した後、マイクロタイタープレートを逆

さにして上清をすばやく振り落として (flick off) 10 分間静置し、リンパ球を沈澱させているが、この方法では残存量や残存リンパ球の数が一定しないので、洗浄の場合は遠心沈澱機でリンパ球を沈澱させ、上清を吸引除去したところ吸引により上清はほとんど除去されたので洗浄の回数も 1 回で十分であった。

洗浄操作を加えた Two-Stage 法と One-Stage 法を比較すると鋭敏度は後者が優れていたが、One-Stage 法は抗血清を多量使用し、また使用する血痕量も多量で 1 特異性の検査に約 1 cm^2 の血痕を必要とする点が欠点である。Two-Stage 法の鋭敏度は One-Stage 法と比べて多少劣るが、 1 cm^2 の血痕から複数の特異性の検査が可能であるから少ない資料からの HLA 型検査には適している。

HLA 抗原の耐時性については A 9 抗原について検討したが、室温放置 42 日後でも抗原活性が認められた。これまでの報告では 20 日²⁸⁾から 230 日³³⁾まで報告者によってかなりの差があるが、HLA 抗原の抗原量が少ないことを考えれば ABO 式血液型抗原のような長時日にわたる耐時性は期待出来ないであろう。

V. 結 論

リンパ球細胞毒抑制試験による血痕からの HLA 抗原検出を HLA-A 2, A 9, B 5 型について検討したところ次のような結論を得た。

1. リンパ球細胞毒抑制試験としてこれまで報告されてきた Two-Stage 法, One-Stage 法により血痕の HLA 抗原を検出することは可能であったが、抗血清によっては偽陽性反応が出現するので、予め使用する抗血清の吟味が必要である。

2. 検査可能な限界は血粉量は 250 mg/ml 、血痕ガーゼは 1 cm^2 であったが実際の検査資料の血痕の付着量は不明であるから、検査可能な限界を血痕浸出液のヘモグロビン量に求めたところ、約 3 mg 以上のヘモグロビンがあれば検査可能であった。

3. 偽陽性反応発現の原因を検討してその原因を抗血清や血痕中の抗補体作用を呈する物質と推察して抗原抗体反応終了後、補体添加前に洗浄操作を行うことによって cross-reaction 以外の偽陽性反応を消失せしめ得た。したがってこの方法を洗浄法として従来法と区別した。

4. HLA 抗原の耐時性を HLA-A 9 抗原について検討したところ 42 日後でも HLA 抗原の検出が可能であった。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました、千葉大学医学部法医学教室、木村 康教授に深く感謝いたします。また、御協力いただきました千葉大学附属病院輸血部、伊藤道博氏はじめ、千葉大学医学部法医学教室各位、さらに血液を御提供くださいました方々に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文は審査学位論文である。

SUMMARY

The testing procedure was studied for HLA antigen in bloodstains, using HLA-A 2, A 9, and B 5 antigens and lymphocytotoxic inhibition test. Three testing methods were compared. The first was Two-Stage Extraction and Absorption method (Two-Stage method) in which the test sample consisted of $1\text{ }\mu\text{l}$ of the fluid extracted and concentrated ten times from a bloodstain ($4\sim 5\text{ cm}$ diameter) with 2 ml of isotonic saline. The second was One-Stage Extraction and Absorption method (One-Stage method) in which $30\text{ }\mu\text{l}$ of antiserum was directly absorbed from a 1 cm^2 bloodstains. The third consisted of a washing procedure added to the first two methods. For the One- and Two-Stage methods, 17 different antisera, 38 bloodstains and four types of lymphocytes were used. Numerous nonspecific reactions were observed, and the false-positive rate ranged from 21% to 87%, indicating that only a limited number of antisera can be used. Further, false-positives occurred even among antigens that are not cross-reactive. However, the problem of false-positives was essentially eliminated by use of the third method, in which one washing preceded the addition of complement at the time of the antigen-antibody reaction.

Hemoglobin measurement provided an index of bloodstain volume. Detection of antigen was possible in bloodstains containing 3 mg or more of hemoglobin per 1 cm^2 of bloodstains. False-positives were more frequent in antisera with lower tiers ($\times 1\sim \times 3$), i.e., the rate increased as the bloodstain volume increased. Testing of serum yielded similar results, which strongly suggests the existence of anticomplement activity due to a specific substance in serum.

The improved lymphocytotoxic inhibition test, in which a washing procedure is added, improves the accuracy of HLA testing in bloodstains. Antigen was detectable even in bloodstains (A 9 type) kept for 42 days at room temperature.

文 献

1) Dausset J: Iso-leuco-anticorps. Acta Haem-

- atol 20 : 156-166, 1958.
- 2) Terasaki PI and McClelland JD : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204 : 998-1000, 1964.
- 3) Terasaki PI, Mandell M, Van de Water J and Edgington TS : Human blood lymphocyte cytotoxicity reactions with allogenic antisera. *Ann NY Acad Sci* 120 : 322-334, 1964.
- 4) Berah M, Hors J and Dausset J : A study of HL-A antigens in human organs. *Transplantation* 9 : 185-192, 1970.
- 5) Van Rood JJ, Van Leeuwen A, Van Santen MCT : Anti HL-A2 inhibitor in normal human serum. *Nature* 226 : 366-367, 1970.
- 6) Charlton RK, Zmijewski CM : Soluble HL-A7 antigen : Localization in the β -lipoprotein fraction of human serum. *Science* 170 : 636-637, 1970.
- 7) Pellegrino MA, Ferrone S, Pellegrino AG, Oh SK and Reisfeld RA : Evaluation of two sources of soluble HL-A antigens : platelets and serum. *Eur J Immunol* 4 : 250-255, 1974.
- 8) Oh SK, Pellegrino MA, Ferron S, Sevier ED and Reisfeld RA : Soluble HL-A antigens in serum I. Isolation and purification. *Eur J Immunol* 5 : 161-166, 1975.
- 9) Billing RJ, Safani M and Peterson P : Soluble HLA antigens present in normal human serum. *Tissue Antigens*, 10 : 75-82, 1977.
- 10) 吉村公一 : 可溶性 HLA 抗原に関する研究, 第 I 編 リンパ球細胞毒阻止試験による血清中可溶性 HLA 抗原の同定, *日法医誌* 36 : 710-720, 1982.
- 11) 吉村公一 : 可溶性 HLA 抗原に関する研究, 第 II 編 細胞毒阻止試験を用いた血清中 HLA-B 抗原相互関係の分析, *日法医誌* 36 : 721-724, 1982.
- 12) 吉村公一 : 可溶性 HLA 抗原に関する研究, 第 III 編 死体血清からの HLA 型判定 および 親子鑑定への応用, *日法医誌* 36 : 725-729, 1982.
- 13) Vincent C, Revillard JP and Betuel H : Purification of HLA antigens from urine. *Transplantation* 22 : 500-507, 1976.
- 14) Singal DP and Berry R : Soluble HL-A antigens. Localization in the human seminal plasma fraction. *Transplantation* 13 : 441-442, 1972.
- 15) Dauson JR, Shasby SS and Amos DB : The serologic detection of HL-A antigens in human milk. *Tissue Antigens* 4 : 76-82, 1974.
- 16) Nomenclature for Factors of the HLA System, 1987 : WHO-HLA Nomenclature Committee, *Vox Sang* 55 : 119-126, 1988.
- 17) Brautbar C, Cohen T and Nelken D : Disputed parentage due to exchanged babies solved by HLA. *Vox Sang* 39 : 322-326, 1980.
- 18) Terasaki PI : Resolution by HLA testing of 1000 paternity cases not excluded by ABO testing. *J. Fam Law* 16 : 543-557, 1977-78.
- 19) 木内政寛, 佐藤弥生, 木村 康 : HLA 系の親子鑑定への応用について, *法医学の実際と研究* 31 : 19-25, 1988.
- 20) 中嶋八良, 石本剛一, 浅野 稔, 十字猛夫 : 父として疑われている男が死亡している場合の父子鑑定の 3 例. *日法医誌* 30 : 351-355, 1976.
- 21) 中嶋八良 : 死亡した男の同胞の血液型検査結果にもとづいて父子鑑定を行なった 1 例. *日法医誌* 32 : 85-87, 1978.
- 22) 村岡 茂, 田畑典子, 真屋篤代, 塩野 寛, 森田匡彦, 八十島信之助, 黒田 誠, 楠本孝子 : HLA によってのみ父子関係を否定できた親子鑑定例, *法医学の実際と研究* 22 : 77-82, 1979.
- 23) 支倉逸人, 柳田純一, 吉村公一, 中村 博, 原正昭 : 白血球 HLA 型の法医学的応用, *日法医誌* 33 : 573, 1979.
- 24) 塩野 寛, 真屋篤代, 田畑典子, 村岡 茂, 安積順一, 森田匡彦, 八十島信之助, 黒田 誠, 楠本孝子 : HLA の親子鑑定, 卵性診断への応用. *日本医事新報* No. 2947, 43-45, 1980.
- 25) 塩野 寛, 田畑典子, 真屋篤代, 村岡 茂, 安積順一, 森田匡彦, 千葉真彰, 黒田 誠 : HLA の親子鑑定への応用—HLA によってのみ父子関係を否定できた 2 鑑定例. *日法医誌* 34 : 658-660, 1980.
- 26) 井上徳治, 木下良順, 藤政篤志 : HLA 型検査による父権否定 1 例. *久留米医会誌* 44 : 231-237, 1981.
- 27) 中屋敷徳, 佐藤元昭, 熊谷礼子, 新津ひさえ, 常盤和雄, 桂 秀策 : HLA 型式で父子関係を否定できた 1 鑑定例. *法医学の実際と研究* 25 : 61-66, 1982.
- 28) Rittner CH and Waiyawuth V : HL-A typing in dried blood stains. I. Specificity and reliability of the inhibition test. *J Immunogenet* 1 : 99-111, 1974.
- 29) Rittner CH and Waiyawuth V : HL-A typing in dried blood stains. II. Comparative studies on microcytotoxicity and microcomplement fixation tests. *J Immunogenet* 2 : 211-222, 1975.
- 30) Newall PJ : The identification of HLA-A2 and HLA-B5 antigens in dried bloodstains. *Can Soc Forens Sci J* 12 : 1-16, 1979.
- 31) Lötterle J : HLA-Typisierung von Blutspuren. Untersuchungen mit einem Absorptionstest. *Z Rechtsmed* 87 : 217-224, 1981.
- 32) 井上徳治, 藤政篤志, 原 三郎 : HLA-A2 及び A9 を指標とするヒト血痕の HLA 型検査

- 法に関する研究. 久留米医学会誌 44: 39-46, 昭和56年.
- 33) Hodge DG, Wolf E, Lincoln PJ, Festenstein H, Dodd BE: The detection of the HLA-A1 antigen in bloodstains. *Med Sci Law* 20: 213-220, 1980.
- 34) Lötterle J: HLA-Typisierung von Blutspuren. Ein Methodenvergleich (Absorptionsmethode, Absorptions-elutionsmethoden), *Acta Med. Leg Soc* 32: 581-584, 1982.
- 35) 藤政篤志: 血痕, 体液斑からの HLA 型判定に関する研究. *医学研究* 53: 179-195, 1983.
- 36) Newall PJ: The identification of HLA-A 9 in dried stains of blood and body secretions. *Can Soc Forens Sci J* 14: 104-112, 1981.
- 37) Nelson MS, Turner LL and Reisner EG: A feasibility study of human leukocyte antigen (HLA) typing for dried bloodstains. *J Forensic Sci* 28: 608-614, 1983.
- 38) Yunnis EJ, Ward FE and Amos DB: Observation of the CNAP phenomenon, In: *Histocompatibility Testing*, 1970, Terasaki PI ed., pp. 351-356, Munksgaard, Copenhagen, 1970.
- 39) Lublin DM and Grumet FC: Mechanisms of the CYNAP phenomenon. Evidence in the Bw49/Bw50 model for epitopes with different spatial orientation of antibody, *Human Immunol* 4: 137-145, 1982.
- 40) Milgrom F and Zabriskie JB: Workshop on Cross-reacting antigens. *Transplantation Proceedings Vol IX, No. 1*, 1281-1285, 1977.
- 41) Mittal KK, Terasaki PI, Springer GF, Desai PR, McIntire FC and Hirata AA: Inhibition of anti-HLA alloantisera by glycoproteins, polysaccharides, and lipopolysaccharides from diverse sources. *Transplantation Proceedings Vol V, No. 1*, 499-506, 1973.
- 42) Kristensen T, Malissen B, Charnot D, Mawas C and Kissmeyer-Nielsen F: Histocompatibility typing by cytotoxic lymphocytes. The HLA-A 2-A28, B 5-w35 serologically cross-reactive groups reviewed by cytotoxic lymphocytes. *Tissue Antigens* 17: 464-472, 1981.
- 43) Bourel D, Fauchet R, Chevrinais AM, Dejour G, Merdignac G and Genetet B: Anti-HLA-A 2 and -A28 monoclonal antibody: production and study of the cross-reaction. *Tissue Antigens* 23: 274-279, 1984.
- 44) Darke C: A serological study of the HLA-B17 cross-reactive group, *Tissue Antigens* 23: 141-150, 1984.
- 45) Belvedere M, Richiardi P, Trabace S, Cascino I and Olivetti E: Crossreactions among HLA-A antigens particularly focused on HLA-A28. In: *Histocompatibility Testing*, 1980, Terasaki PI ed., pp. 751-752, Los Angeles, California, 1980.
- 46) Mittal KK, and Terasaki PI: Cross-reactivity in the HL-A system. *Tissue Antigens* 2: 94-104, 1972.
- 47) Mittal KK and Terasaki PI: Serological cross-reactivity in the HL-A system. *Tissue Antigens* 4: 146-156, 1974.
- 48) Kostyu DD, Bernard NF and Amos DB: Cross-Reactions of HLA antibodies: VII Rate of sensitization and serological specificity. *Tissue Antigens* 13: 298-306, 1979.
- 49) Newall P: Determination of the antigens of the HLA system in bloodstains. In: *Advances in Forensic Science* Lee HC and Gaensslen RE ed., pp. 205-234, 1985. Biomedical Publ., California, 1985.
- 50) 田島康敬, 脇坂明美: HLA 単クローン抗体, HLA ハンドブック, 辻 公美編. pp. 39-46, サイエンスフォーラム, 昭和62年.
- 51) 永野耐造: 血痕, 体液, 体液斑, 組織片の血液型検査. 現代の法医学, 四方一郎, 永野耐造編. 290, 金原出版, 昭和58年.
- 52) Terasaki PI and Park MS: Microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. In: *Manual of Tissue Typing Techniques*. Ray JG and Hare DB, ed., pp. 69-80, DHEW Publ. No (NIH) 77-545, 1976.