

角膜移植におけるクラスII主要組織適合性抗原 (HLA)のDNA タイピング

島崎 潤¹⁾, 坪田 一男¹⁾, 土田 文子²⁾, 佐藤 忠之²⁾, 萩原 政夫²⁾³⁾, 辻 公美²⁾³⁾

¹⁾東京歯科大学眼科, ²⁾東海大学病院細胞移植医療センター

³⁾東海大学医学部移植免疫学教室

要 約

角膜移植でのDNA解析による主要組織適合性抗原(human leukocyte antigen: 以下, HLA)クラスII抗原タイピングの有用性について検討を行った。始めにアイバンク眼球の各組織からDNAの抽出, polymerase chain reaction (PCR)法によるDRB1, DQB1, DPB1抗原の増幅, およびrestriction fragment length polymorphism (RFLP)法による各抗原のタイピングを行った。その結果, 水晶体を除くすべての組織からDNAの抽出, 増幅, タイピングが可能であったが, 虹彩, 脈絡膜では反応液を希釈する必要があった。次に, 角膜移植に使用されたドナー, レシピエント角膜7組でのタイピング

を行った。全例でタイピングが可能で, 角膜を材料としたDNA-HLAタイピングは, リンパ球からのタイピングの結果と完全に一致した。以上から, 眼組織においてDNA-HLAタイピングが可能であることが示された。本方法は, ドナーからの採血を要せず, 溶血に影響されにくく, かつ精度が高いことから, 角膜移植におけるHLAマッチングを検討する上で有用と思われた。(日眼会誌 99: 1248—1253, 1995)

キーワード: 角膜移植, 主要組織適合性抗原 (HLA), DNA, PCR-RFLP 法

Usefulness of the DNA-HLA Class II Typing in Corneal Transplantation

Jun Shimazaki¹⁾, Kazuo Tsubota¹⁾, Fumiko Tsuchida²⁾
Tadayuki Sato²⁾, Masao Hagihara²⁾³⁾ and Kimiyoshi Tsuji²⁾³⁾

¹⁾Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College

²⁾Department of Cell Transplantation Center, Tokai University Hospital

³⁾Department of Transplantation Immunology, Tokai University School of Medicine

Abstract

DNA-HLA (human leukocyte antigen) typing was performed for ocular tissues in order to determine the usefulness of the method in corneal transplantation. Each type of ocular tissue was dissected from eye bank eyes (n=3). DNA was extracted, and HLA-DRB1, DQB1, and DPB1 genes were amplified using PCR (polymerase chain reaction) method. DNA can be extracted and amplified from each ocular tissue except for the crystalline lens, but DNA from iris and choroid can be amplified only after diluting the samples 10 to 100 times. HLA class II antigens were successfully determined in these ocular tissues by the RFLP (restriction fragment length polymorphism) method. The method was applied to the corneal tissues of donor and recipient

used for the corneal transplantation (n=7). HLA class II antigens can be determined in both the donor and recipient corneal samples, and the results of recipients' HLA typing were the same as those determined using the blood samples. These results indicate that the DNA-HLA typing can be used for ocular tissues. Since DNA-HLA typing is more accurate than the conventional serological typing, the method is promising for the study of HLA class II typing in corneal transplantation. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1248—1253, 1995)

Key words: Corneal transplantation, HLA, DNA, PCR-RFLP analysis

別刷請求先: 272 千葉県市川市菅野5-11-13 東京歯科大学眼科 島崎 潤
(平成6年9月22日受付, 平成7年7月17日改訂受理)

Reprint Requests to: Jun Shimazaki, M.D. Department of Ophthalmology, Tokyo Dental College, 5-11-13 Sugano, Ichikawa-shi, Chiba-ken 272, Japan

(Received September 22, 1994 and accepted in revised form July 17, 1995)

I 緒 言

角膜移植後の移植片混濁の最大の原因は拒絶反応であり、現在までのところ、その予防はステロイド剤点眼を中心とした免疫抑制剤により行われている。他臓器移植では、免疫抑制療法と並んで主要組織適合抗原 (human leukocyte antigen, HLA) のマッチングが有用であることが報告¹⁾²⁾されている。角膜移植においても HLA のマッチングの有用性についての検討がなされているが、その効果については相反する結果が報告されている。すなわち、HLA クラス I, クラス II 抗原のマッチングにより拒絶片の透明性維持が促進されたという報告^{3)~8)}がある反面、これを否定する報告^{9)~11)}もある。

これまでの角膜移植における HLA タイピングは、すべて血清学的方法によって行われてきた。この方法は技術的にはかなり完成されているものの、角膜移植に応用するにはいくつかの欠点がある。すなわち、① 20~30 cc の採血を必要とする。レシピエントの採血は容易であるが、ドナーからの採血は技術的にも難しく、また、現在アメリカでウイルス感染の検索のために行われている心臓や大腿部からの採血は遺族の了承を得る上でも支障がある¹²⁾。② 血清学的なタイピングは、溶血によって精度が低下する。角膜移植の場合には、死亡してから眼球摘出まで 12 時間以上となることも珍しくなく、かなりの頻度で溶血を起こす。③ 溶血がなくとも、血清学的なタイピングでは判定できない抗原がある。特に、D related HLA locus in human (DR) 抗原などのタイプ II 抗原の判定は精度が落ちる。

近年、組織の DNA から直接 HLA 抗原を判定する方法が開発された¹³⁾¹⁴⁾。この方法は、わずかな材料からタイピングが可能で、血液に限らずあらゆる組織に応用可能である。また、その精度は血清学的方法より優れており、腎移植における報告では、その差は 25% にも及ぶとされている¹⁵⁾。我々は、角膜移植における HLA マッチングの意義が明らかにならない原因の一つが、上記の血清学的タイピングの欠点に起因するのではないかと仮説を立てた。今回は第一段階として、眼組織を材料とした HLA-DNA タイピングの有効性について検討を行った。

II 実験方法

1. 材 料

1) アイバンク眼球を用いての検討

3 例 5 眼のアイバンク眼球を用いて、どの眼組織が DNA-HLA タイピングを行う上で適しているかを検討した。アイバンク眼球は、米国アイバンクから内皮細胞の不良などのために移植に適さないと判定され、モイストチェンバーで 4°C で保存、搬送されたものを用いた。ドナーの年齢、性別は 71 歳男性、87 歳女性、55 歳男性で、保存時間は各々 156, 109, 173 時間であった。これらの眼球を無菌条件下で結膜、角膜上皮、角膜実質 (内皮細胞を含む)、強膜、外眼筋、虹彩、水晶体、硝子体、脈絡膜、網膜、視神経の各部分に分け、それぞれをマイクロチューブに入れて -80°C で保存した。

2) ドナー、レシピエントの HLA タイピング

実際に角膜移植に使用されたドナー、レシピエントの角膜およびその周辺部組織から HLA-DNA タイピングが行えるかを検討した。ドナーは、角膜移植に使用する目的で強角膜保存で米国アイバンクから輸送された 7 眼で、レシピエントはそのドナー角膜を移植されたものである。各々の年齢、性別、その他の所見を表 1 に示す。今回検討したレシピエントで術後に拒絶反応を発症したのは症例 1 のみであった。

ドナー強角膜片の中央部を移植に使用した後、周辺部組織をマイクロチューブに入れ、-80°C で保存した。レシピエントに関しては、角膜移植の際に打ち抜かれた中央部角膜を 1/4 に分割したものを同様に冷凍保存した。これらの組織から、DNA の抽出と増幅、および HLA タイピングを行った。また、レシピエントの採血を行い、末梢血中のリンパ球を材料に DNA タイピングと血清学的タイピングの双方を行い、結果を比較した。

2. HLA-DNA タイピング

1) DNA の抽出と増幅

各々の組織の重量を測定した後、常温下で細切し、プロテイナーゼ K で除タンパクした。その後、クロロホルム/エタノールで DNA の抽出を行い、得られた DNA 量を測定し、各組織ごとの重量あたりの DNA 量を求めた。解

表 1 ドナー、レシピエントの臨床所見

症例	ド ナ ー				レシピエント			
	年齢	性別	保存液	保存時間(時間)	年齢	性別	原疾患	拒絶反応
1	70	女	Optisol	103	75	女	角膜潰瘍	あり
2	71	男	Optisol	75	59	男	円錐角膜	なし
3	69	女	Optisol	73	78	女	水疱性角膜症	なし
4	71	男	Optisol	115	76	女	角膜白斑	なし
5	66	男	Optisol	157	36	男	円錐角膜	なし
6	83	男	Optisol	58	76	女	水疱性角膜症	なし
7	73	男	Optisol	105	57	男	角膜白斑	なし

析に十分な DNA 量が得られた場合には,HLA クラス II 遺伝子である DRB 1, DQB 1, DPB 1 の各遺伝子領域を polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した. PCR の条件は, 96°C, 1 分, 56°C, 1 分, 72°C, 2 分を 30 サイクル繰り返した. 得られた PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動を行って, 目的とする領域の増幅が行われているかを検討した.

2) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法

HLA タイピングは, RFLP 法により行った. この方法は, 各遺伝子領域に対する PCR 産物に対して行うタイピングで, allele 特異的な塩基配列を認識, 切断する制限酵素を用いて, 切断されるパターンを電気泳動によって検出してタイプを決定する方法である¹³⁾¹⁴⁾. 今回用いた制限酵素を以下に示す.

DRB 1 : Hae II, SfaNI, Ava II, Sac II, Fok I, Pst I, KpN I, Bsp 1286 I, Hph I, Cfr 13 I, Hinf I, Mnl I

DQB 1 : Hae III, BssH II, Apa I, Acy I, Hae II, Hpa II, Rsa I, Bsp 1286 I, SfaN I

DPB 1 : Bsp 1286 I, BssH II, Cfr 13 I, Dde I, EcoN I,

Fok I, Rsa I

III 結 果

1. アイバンク眼球を用いた検討

表 2 に各組織ごとおよび組織重量あたりの抽出 DNA 量を示す. 水晶体では十分な DNA が得られなかったが, その他の組織では十分な量の DNA が得られた. 重量あ

表 2 各眼組織からの抽出 DNA 量

組織	平均組織重量 (g)	平均 DNA 量 (μg)	DNA 量/組織重量 (μg/g)
結膜	0.06	6.5	108.3
角膜上皮	0.02	1.8	90.0
角膜実質	0.09	9.2	102.2
外眼筋	0.05	5.0	100.0
強膜	0.18	26.6	147.8
虹彩	0.08	16.2	202.5
水晶体	0.22	<0.001	<0.005
硝子体	0.60	1.5	2.5
脈絡膜	0.22	182.0	827.3
網膜	0.12	252.0	2,100.0
視神経	0.10	14.0	140.0

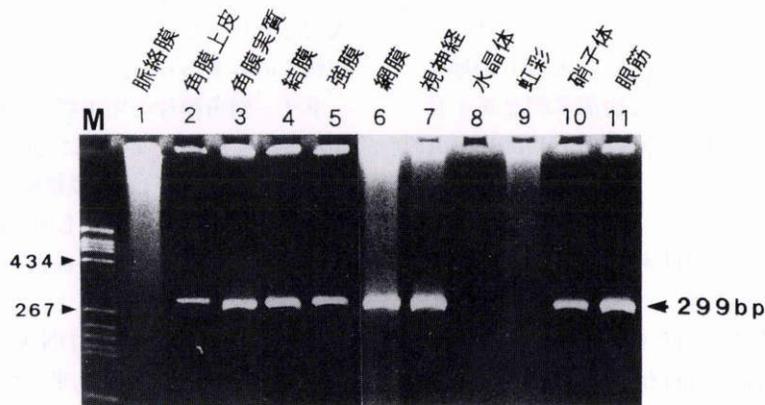


図 1 各眼組織での DPB 1 遺伝子の増幅.

ほとんどの組織では polymerase chain reaction (PCR) で遺伝子増幅が可能であったが, 水晶体および虹彩と脈絡膜においては増幅できなかった.

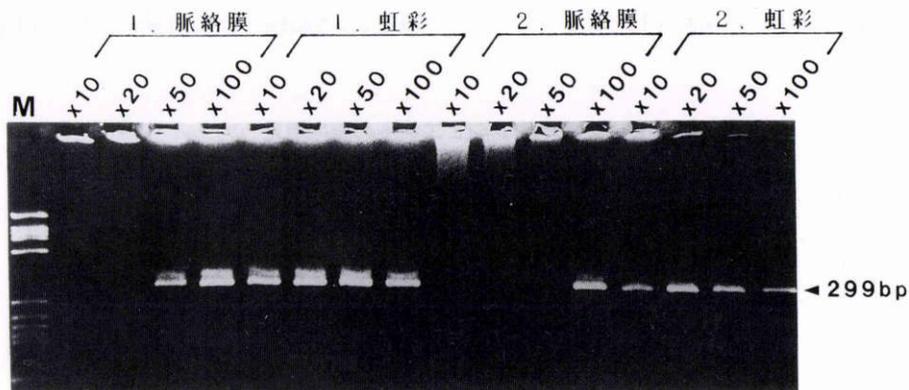


図 2 ぶどう膜組織からの DNA 抽出液の希釈と DPB 1 遺伝子の増幅.

虹彩では 10 倍以上, 脈絡膜では 50~100 倍に希釈することで遺伝子の増幅が可能となった.

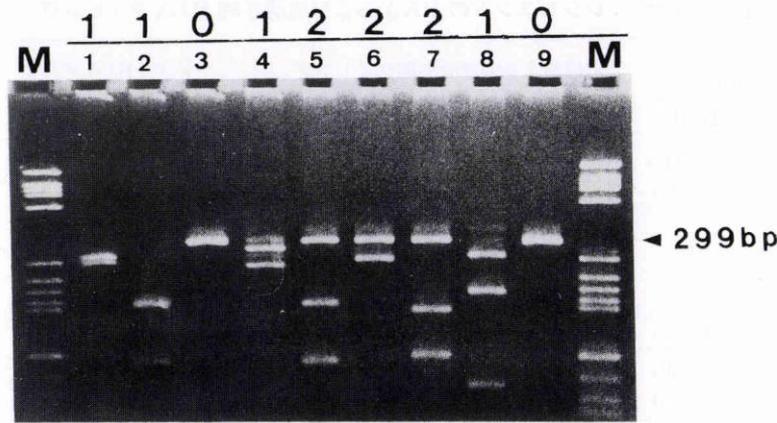


図3 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)法による HLA クラス II タイピング。角膜実質組織を材料として DPB 1 遺伝子のタイピングの 1 例を示す。制限酵素による反応から、この例では 0401/0901 のタイプであることが示された。

表3 アイバンク眼球からの HLA クラス II DNA タイピング

サンプル	DRB 1	DQB 1	DPB 1
1	1304/1304	0301/0301	0401/0402
2	1501/1501	0602/0603	0401/0901
3	0407/0408	0301/0302	0401/0402

たりの DNA 量では、網膜が最も多く(2,100 μg/g)、次いで脈絡膜、虹彩の順であった。

DNA が採取された各組織について、PCR により DPB 1 遺伝子の増幅を行ったところ、虹彩と脈絡膜では増幅が行えなかった(図 1)。しかし、材料を希釈して再度 PCR を行ったところ、虹彩では約 10 倍、脈絡膜では 50~100 倍に希釈することで増幅が可能となった(図 2)。角膜実質を材料として RFLP 法によるタイピングを行ったところ、いずれの眼球からもタイピングが可能であった(図 3, 表 3)。

2. ドナー、レシピエントの HLA タイピング

表 4 に検討したドナー、レシピエント角膜からの HLA タイピングの結果を示す。いずれの材料からも HLA タイピングが可能であった。レシピエント角膜を材料とした HLA-DNA タイピングの結果は、末血リンパ球を材料とした DNA タイピングの結果と全く同じであった。末血リンパ球を材料とした 7 例での DR, DQ 全 14 抗原の血清学的タイピングの結果を DNA タイピングの結果と比較すると、血清学的方法でのミスタイピングが 3 抗原(DR 1, DQ 2)あり、血清学的タイピングで決定できなかった抗原が 1 抗原(DQ)あった。

ドナーとレシピエントの DNA タイピングによる HLA マッチングの結果を比較すると、対立遺伝子のうち、2 つが一致していたものが DR 抗原で 1 例、1 つが一致していたものが DR, DQ, DP 抗原で、それぞれ 1, 1, 3 例であった。拒絶反応を発症した症例 1 を含め、全くマッチングのないものが 3 例、DR 抗原が完全一致していたものが 1 例、DR, DQ, DP 抗原が 1 つずつ一致して

いたものが 1 例であった。

IV 考 按

今回、眼組織を材料とする HLA の DNA タイピングを行い、角膜を始めとする各組織からタイピングが可能であることが示された。今回用いた DNA タイピングは、遺伝的多型性を塩基配列レベルで直接調べるために、従来のエピトープを認識する方法に比べてより鋭敏で正確な方法である。本方法では、ドナーからの生前または死後の採血が不要であり、眼球摘出の際に通常の業務と変わらない手間で材料の採取が可能となる。本方法は、2 日以内で解析が可能であり、強角膜保存と併用すれば、実際の角膜移植に応用するための時間的制限は十分にクリアできる。費用の面では、今回行った方法では 1 つの抗原タイピングあたり 1 万円程度を要した。当然ながら、1 例ずつ解析するよりも多数例を一度に解析する方が経済的であることから、将来実用化される際には各アイバンクで解析するよりも 1 か所に材料を集めて行う方が効率的であると思われる。

DNA-HLA タイピングの材料としては、細胞成分の少ない水晶体を除いてすべての組織が使用可能であった。ただし、虹彩、脈絡膜には比較的多量の DNA が含まれていたにもかかわらず、PCR による増幅には材料を希釈する必要があった。これは組織に含まれているメラニン色素が PCR に対して阻害的に働いたためと推測された。メラニンが PCR 反応を阻害するという報告は、眼科領域では著者の渉猟した限りこれまでないが、法医学で毛髪からの HLA タイピングについて検討した論文で同様の報告¹⁰⁾がある。実際にアイバンクの業務として本方法を行うにあたっては、結膜を含む眼周囲の結合組織を用いるか、手術用セルローススポンジに血液を吸着させて材料とするのが実際的ではないかと思われる。

今回、HLA-DNA タイピングでは血清学的タイピングに比べ、クラス II 抗原を全例で解析可能であり、かつ、各

表4 ドナー、レシピエントのDNAおよび血清学的HLAタイピング

症例	DNAタイピング (上:末梢血,下:角膜)			末梢血よりの血清学的タイピング						ドナーHLAタイピング			マッチング		
	DRB	DQB	DPB	A	B	C	DR	DRw	DQw	DRB	DQB	DPB	DR	DQ	DP
1	1405/1502 1405/1502	05031/0601 05031/0601	05031/0901 0501/0901	24,26	52,61	3,-	2,-*	-, -	1,-	1301/0101	0501/0603	0201/1401	0	0	0
2	1502/0901 1502/0901	0601/0303 0601/0303	N/T	2,24	52,61	3,-	2,9	-,53	1,3	1103/07 or 1104/07	0201/0301	0401/1701	0	0	?
3	1502/0901 1502/0901	0601/0303 0601/0303	0501/0901 0501/0901	11,24	52,61	-, -	2,9	-,53	1-3	0301/07	0201/0201	040/0401	0	0	0
4	0407/1501 0407/1501	0602/0302 0602/0302	0501/0501 0501/0501	2,11	35,62	3,4	2,4	-,53	1,3	1501/BL	0602/0603	0201/0501	1	1	1
5	1302/0802 1302/0802	0604/0402 0604/0402	0402/0201 0402/0201	24,31	51,52	-, -	5,8	52,-	1-4	1301/1501	0602/0603	0402/1001	0	0	1
6	0901/BL 0901/BL	0303/0303 0303/0303	0201/0402 0201/0402	2,24	51,46	1,-	6**,9	52,53	1,3**	1101/1001	05031/0301	0201/1701	0	0	1
7	0406/BL 0406/BL	0302/0302 0302/0302	0201/0501 0201/0501	2,26	39,48	3,7	4,-	52,53	1**,3	0406/BL	0201/0201	0101/0301	2	0	0

N/T: not tested, BL: blank

*: DNAタイピングで検出されたのに対し、血清学的には検出されなかったタイプ

**: DNAタイピングの結果と異なる血清学的タイピングの結果を得たもの

抗原のサブタイプの決定を行うことができた。腎移植などにおいては、このサブタイプの差が移植成績に影響を与えることが明らかとなっており¹⁷⁾、角膜移植においてもDNA-HLAタイピングによる精密な解析により、従来明らかとならなかったHLAマッチングの有用性が明らかとなる可能性がある。角膜移植においては、HLAのマッチングによる移植片生着の効果がはっきりせず、かつ、クラスI抗原とクラスII抗原のうち、どの抗原をマッチングさせることが有用なのかについても定説がない。一般に移植免疫では、HLAクラスII抗原がTリンパ球(CD4+)に認識されることが拒絶反応の発症に重要であるとされており、クラスII抗原をマッチングさせることが理論的に有効と考えられる。角膜移植においては、これまでクラスIマッチングの効果について検討した報告が多く、クラスII抗原はDR抗原での検討が行われているに過ぎない¹⁸⁾。これは、従来の血清学的なタイピングがクラスII抗原のタイピングについては十分な精度をもって行えないことに起因している。先頃発表されたHLAマッチングの効果を否定するアメリカでのプロスペクティブスタディーにおいても、クラスII抗原はDR抗原のみしか調べられておらず、しかもその一部は溶血のために判定が困難であったと報告¹¹⁾されている。そのため、本当にHLAクラスII抗原のマッチングが角膜移植において有用性がないかどうかの判定には、本研究で用いたDNA-HLAタイピングの結果を待たなければならないと思われる。

今回は、実際の検体については少数例で解析したのみであり、HLAクラスIIマッチングと拒絶反応発症との関連については、今後の多数例での結果を待たなければ

ならない。現在当施設において、これまでに角膜移植を施行した症例のサンプルを基に検討中である。

この論文の要旨は、第98回日本眼科学会総会において発表した。本論文は、平成5年度厚生省厚生科学研究「DNA解析を用いたアイバンクにおける組織適合性抗原の有用性」(班長: 島崎 潤)、および日本眼球銀行協会「角膜移植についてのシステム作り」(班長: 木下 茂)の研究補助を受けた。

文 献

- 1) **Opelz G**: Influence of HLA matching on survival of second kidney transplants in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation* 47: 823-831, 1989.
- 2) **日本移植学会**: 腎移植臨床登録集計報告. 移植 6: 494-517, 1991.
- 3) **Stark WJ, Taylor HR, Bias WB, Maumenee AE**: Histocompatibility (HLA) antigens and keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 86: 595-604, 1978.
- 4) **Boisjoly HM, Roy R, Dubé I, Laughrea PA, Michaud R, Douville P, et al**: HLA-A, B, and DR matching in corneal transplantation. *Ophthalmology* 93: 1290-1297, 1986.
- 5) **Batchelor JR, Casey TA, Werd A, Gibbs DC, Prasad SS, Lloyd DF, et al**: HLA matching and corneal grafting. *Lancet* 1: 551-554, 1976.
- 6) **Ehlers N, Ahrons S**: Corneal transplantation and histocompatibility. *Acta Ophthalmol* 49: 513-527, 1971.
- 7) **Völker-Dieben HJ, Kok-van Alphen CC, Lansbergen Q, Persijn GG**: The effect of prospective HLA-A and -B matching on corneal graft survival. *Acta Ophthalmol* 60: 203-212, 1982.

- 8) **Sanfilippo F, MacQueen JM, Vaughn WK, Foulks GN**: Reduced graft rejection with good HLA-A and -B matching in high-risk corneal transplantation. *N Engl J Med* 315: 29-35, 1986.
- 9) **Allansmith MR, Fine M, Payne R**: Histocompatibility typing and corneal transplantation. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 78: 445-460, 1974.
- 10) **Stark WJ**: Transplantation immunology of penetrating keratoplasty. *Trans Am Ophthalmol Soc* 78: 1079-1117, 1980.
- 11) **The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS)**: Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. *Arch Ophthalmol* 110: 1392-1403, 1992.
- 12) **Shimazaki J, Tsubota K, Sawa M, Kinoshita S, Ohkura T, Honda M**: Detection of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus in donor eyes using polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 78: 859-862, 1994.
- 13) **Inoko H**: PCR-RFLP method holds great promise for complete HLA class II genotyping. *Tissue Antigens* 36: 88-92, 1990.
- 14) **Ota M, Seki Y, Fukushima H, Tsuji K, Inoko H**: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* 39: 187-202, 1992.
- 15) **Mytilineos J, Scherer S, Opelz G**: Comparison of RFLP-DR beta and serological HLA-DR typing in 1500 individuals. *Transplantation* 50: 870-873, 1990.
- 16) **Uchihi R, Tamaki K, Kojima T, Yamamoto T, Katsumata Y**: Deoxyribonucleic acid (DNA) typing of human leukocyte antigen (HLA)-DQAL from single hairs in Japanese. *J Forensic Sciences* 37: 853-859, 1992.
- 17) **Opelz G, Mytilineos J, Wujciak T, Schwarz V, Back D**: Current status of HLA matching in renal transplantation. *Clin Investig* 70: 762-772, 1992.
- 18) **Hoffmann F, von Keyserlingk H-J, Wiederholt M**: Importance of HLA DR matching for corneal transplantation in high-risk cases. *Cornea* 5: 139-143, 1986.