

## RH および HLA 各血液型システムの 遺伝子型判定法に関する研究

太 田 正 穂

信州大学医学部法医学教室

(主任: 支倉 逸人教授)

### Studies on Genotyping Methods of the RH and the HLA Blood Group Systems

Masao OTA

*Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine*

*(Director: Prof. Hayato HASEKURA)*

In the forensic practice of paternity testing and personal identification, zygosity of the RH erythrocyte system and of the HLA leukocyte systems is of great significance but is hard to judge, because these systems have recessive genes of blank antigens together with larger numbers of dominant alleles. The possibility of genotyping was studied in these systems by using the immunofluorescence flow cytometry (FCM) method and the Southern hybridization analysis of DNA polymorphism in the HLA-D region.

1. Rh1 (Rho, D), HLA-A2, HLA-A24, HLA-Bw52 and HLA-DR2 antigen activities have been analyzed by the use of indirect FCM. Various RH blood group genotypes including rare variants expressing  $D_{el}$  and  $D^u$  (high-grade and low-grade) were successfully determined from the intensity of fluorescence detected in FCM using anti-D IgG fractionated in a Protein A Sepharose CL-4B column as the primary antibody. Also, the HLA genotypes could be successfully determined from the different degrees of fluorescence intensity detected by using FITC (fluorescein isothiocyanate) conjugated anti-human IgG goat F (ab)<sub>2</sub> serum as the secondary antibody.

2. Genomic DNAs from 12 normal individual cells expressing DR1, DR2, DR1DR2, DR2DRw8, DR1DRw8, DRw8, DR1DR9 and DR9 antigens were digested with 3 different restriction endonucleases (EcoRI, MspI and TaqI) and hybridized to a  $DQ\beta$  cDNA probe. Distribution analysis of restriction fragment length polymorphism (RFLP) was able to differentiate the zygosity of DR antigens (a DR homozygote or a DR heterozygote involving DR-gene). *Shinshu Med. J.*, 37: 605—620, 1989

(Received for publication July 14, 1989)

---

**Key words:** genotype and phenotype, human leukocyte antigen, RH blood groups, flow cytometric analysis, HLA-DNA typing

表現型と遺伝子型, 白血球 HLA 抗原, RH 血液型, フローサイトメトリー分析, HLA-DNA タイピング

---

## I 緒言

赤血球膜や白血球膜上に発現し、遺伝的多型性を示す血液型抗原は、法医学において親子鑑定や個人識別にはきわめて有用な正常遺伝形質である。特に親子鑑定では、赤血球膜上にある各種赤血球型、白血球膜上のHLA型(Human Leukocyte Antigen Systems)、血清ないし血漿中の血清蛋白型、溶血液中の赤血球酵素型など数十種類の血液型システムの検査結果から親子関係の肯定否定を判断する。親子関係が否定されない場合には父と疑われている男の父権肯定確率を算出し鑑定書を作成し裁判所に提出する。

一般に赤血球および白血球などの遊離細胞における血液型抗原は、それぞれ赤血球凝集反応、および特異抗体と補体を用いたリンパ球細胞毒試験による血清学的な検査で判定される。しかし、これらの定性的な検査法ではあるシステムにおいて1種類の抗原のみ発現している場合にその接合体判定ができない。すなわち、これらの検査法からは家族の調査をして、問題の人の接合体を推定できる型の血縁者が発見されるまでは表現型しか判定できない。ABOシステム、RHシステムなど劣性遺伝子を有する血液型や、HLAシステムのようにブランク遺伝子ないしブランク抗原を持つ血液型の遺伝子型判定が可能になれば個人識別や親子鑑定の父権否定や肯定の判定に有意義であり、肯定時の確率計算に大きな影響を与える。

細胞膜上のある種の血液型の抗原活性は、その遺伝子型と関係しホモ接合体の方がヘテロ接合体よりも強いことが報告されている<sup>1)</sup>。

RHおよびHLAシステムは、複数の遺伝子座が密接し、遺伝子の組(ハプロタイプ)を形成して親から子に遺伝する。また、1つの遺伝子座には多くの対立遺伝子が存在し遺伝的多型性に富んでいるためこれらの遺伝子型を決定することの重要性は個人識別や親子鑑定に際して特に痛感されている。

今回、細胞膜上の抗原の解析および定量が自動的かつ客観的に行えるフローサイトメトリー(FCM: Flow Cytometry)を用いて血液型抗原量を測定することにより遺伝子型決定の可能性について検討した。

白血球HLA抗原は非常に遺伝的多型性に富むため親子鑑定や個人識別に威力を発揮<sup>2-5)</sup>し、第10回組織適合性ワークショップでは、総計148種類のA抗原特異性を持つことが示された<sup>6)</sup>。これらのA抗原特異性を示すHLA抗原のうち、HLA-A、-B、-C、-DR、

-DQ各システムの抗原は、リンパ球細胞毒試験(LCT: Lymphocyte Cytotoxicity Test)で決定され<sup>7)</sup>、HLA-D抗原は、特異性の異なるA抗原を認識したT細胞が幼若化、増殖する性質を利用した一次混合リンパ球培養反応(MLC: Mixed Lymphocyte Culture)によりタイピングされ<sup>8)</sup>、またHLA-DP抗原は一次MLC活性(D抗原活性)はないが、すでに感作されたT細胞に対しては、増殖を誘導し得る抗原であり、クローン化T細胞を用いた二次混合リンパ球培養(PLT: Primed Lymphocyte Typing)<sup>9)10)</sup>により決定される。

近年、HLA-DR、-DQ、-DPの各クラスII抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖のcDNAならびに遺伝子クローンが分離、解析され、従来の血清学および細胞学的方法によって検出されてきたHLA抗原の各Aロタイプ遺伝的多型性が、DNAレベルで明らかになった<sup>11)-14)</sup>。

本研究においては、HLA-DR抗原について、被検白血球から抽出したDNAを各種制限酵素で分解後、電気泳動により断片を長さにより分画しサザンハイブリダイゼーション(Southern hybridization)を行って制限酵素切断断片長の多型性(RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism)を観察するDNAタイピングを行うことにより、血清学的手法では検出されないブランク遺伝子の検出と遺伝子型判定の可能性について検討した。

## II 材料および方法

## A FCM法による抗原解析のための材料

FCM法に用いた赤血球は、健康人から抗凝固剤入りの試験管に採血した新鮮なものおよび市販のパネルセル(Resolve Panel A: Ortho社)から必要な型のものを選んだ。

また、白血球は抗凝固剤入りの試験管に採血し、比重1.077の比重液(リンホプレップ、第一化学)で分離後実験に使用した。解析時に白血球浮遊液中に血小板があると血小板上にあるHLAクラスI抗原が反応抗体を吸収するため、トロンビンを加え血小板を完全に除去した白血球浮遊液を用いた。

## B FCM測定に使用した赤血球および白血球の血液型

赤血球は次のRH式血液型のものを用いた。表現型がRh陽性型のものでは遺伝子型がCDe/CDe, CDe/cDE, cDE/cDE, CDe/cde, cDE/cde, cDe/cde, Rh陰性型はcde/cde, Cde/cde, Rh変異型と

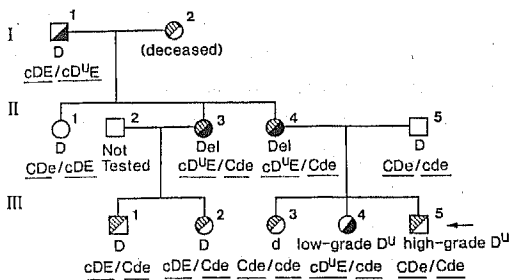


Fig. 1 Pedigree of a family demonstrating that the Del phenotype is expressed by the genotype  $cD^uE/Cde$ . Black symbol:  $cD^uE$ . Shaded symbol:  $Cde$ . The arrow indicates the propositus whose  $D^u$  phenotype led to the blood tests of the family.

しては high grade  $D^u$  の  $cDE/Cde$ ,  $CDe/Cde$ , low grade  $D^u$  の  $cD^uE/cde$ ,  $CD^ue/cde$ , および Fig. 1 に示した Del の  $cD^uE/Cde$ .

白血球は、以下の HLA 抗原既知のリンパ球を用いた。HLA-A2 抗原解析のためには A 2 遺伝子がホモ接合体の A2A2, Bw48Bw48, Cw3Cw3, DR9DR9, ヘテロ接合体の A2A24, B7B44, C-C-, DR1DRw6, A 2 抗原が陰性である A24A26, Bw61Bw62, Cw3Cw3, DR4DR9 の各型。

HLA-A24 抗原解析のために用いた型はホモ接合体の A24A24, Bw52Bw52, C-C-, DR2DR2, ヘテロ接合体の A24A26, Bw61Bw62, Cw3Cw3, DR4DR9, 陰性対照として A2Aw33, Bw61B44, C-C-, DR9DRw6 の各型。Bw52 抗原解析のためにはホモ接合体の A24A24, Bw52Bw52, C-C-, DR2DR2, ヘテロ接合体の A24A24, B7Bw52, Cw7C-, DR1DR2, Bw52 抗原陰性の A24A26, Bw61Bw62, Cw3Cw3, DR4DR9 の各型。DR2 抗原解析のためにはホモ接合体である A24A24, Bw52Bw52, C-C-, DR2DR2, ヘテロ接合体である A24A24, B7Bw52, Cw7C-, DR1DR2, DR 2 抗原陰性である A24A26, Bw61Bw62, Cw3Cw3, DR4DR9 の各型。

### C FCM 測定用の血液型抗体

RH 式血液型抗体は、抗 Rh 1(D)型判定用血清 (Ortho社) を Protein A Sepharose CL-4B (Pharmacia 社) 15 ml を充填した  $1.5 \times 10$  cm のカラムに通して IgG 分画に精製して使用した。すなわち、pH8.4 の 100 mM トリス緩衝液 (0.02%  $\text{NaN}_3$ , 8mM EDTA, 0.5M NaCl を含む) でゲルを洗浄後、10 ml の

抗 Rh 1 (D)血清をアブライシ、3M の尿素 (0.05%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0.5M NaCl を含む) で溶出させ、すばやくトリス緩衝液 (pH 7.2) で中和した。

HLA 式血液型抗体は、抗 HLA-A2, -A24, -Bw52 (長野日赤より提供および Hoechst 社) と抗 HLA-DR2 (Hoechst 社) の単一型特異抗血清を用いた。これらの抗体は、Protein A Sepharose CL-4B カラムにて IgG 分画にして使用した。標識抗体は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ヒト IgG ヒツジ F (ab)<sub>2</sub> 血清 (日本ターナー社) を用いた。

### D FCM 法による抗原解析

赤血球抗原解析のための試料作製は、採血した血液を 0.05% EDTA (Ethylene diamine-tetraacetic acid) 添加 PBS (Phosphate-buffered saline) で 3 回洗浄後、同緩衝液で 3% 赤血球浮遊液を作り、50  $\mu$ l をフィシャーチューブ (Labo-Science 社) に分注した。チューブを遠心後、上清を捨て、一次抗体として最適濃度の抗 Rh 1 (D)抗血清を 100  $\mu$ l 添加し 37°C で 1 時間反応させた。反応後 EDTA 添加 PBS で血球を 3 回洗浄し、最適濃度に調整した FITC 標識二次抗体 100  $\mu$ l を添加し 22°C で 1 時間反応させた。反応後血球を EDTA 添加 PBS で 3 回洗浄し、同緩衝液で 1 ml の浮遊液を作成し測定用の試料とした<sup>15)</sup>。

白血球 HLA 型抗原解析のための試料作製は、比重 1.077 の比重液にてリンパ球を分取し、T 細胞と B 細胞の分離はナイロンフィルター法を用いた。分離した細胞は、0.05% EDTA 添加 PBS で 3 回洗浄し、細胞数を  $3 \times 10^5$  個/ $\mu$ l になるように緩衝液を加えた。2,000 回転 1 分間遠心し、上清を取り除いた後、最適濃度の一次抗体 50  $\mu$ l を加え、37°C で 1 時間反応させた。反応後、細胞を EDTA 添加 PBS で 3 回洗浄し、最適濃度に調節した FITC 標識二次抗体 100  $\mu$ l を加え、室温で 1 時間反応させた。反応後細胞を EDTA 添加 PBS で 3 回洗浄した。上清を取り除いた後、1 ml の EDTA 添加 PBS に細胞を再浮遊し測定用の試料とした。

本研究ではエピックス V (Coulter 社) フローサイトメーターを用いた。細胞 1,000 個から得られた蛍光強度をヒストグラムに描きその中央値を平均蛍光強度として示した。本機器の検出感度は、0 から 255 チャネルを用いた。

### E RFLP 解析による HLA-DNA タイピングのための材料

HLA-D, -DR 遺伝子がホモ接合体である 5 種類の

EB トランスフォーム B リンパ芽球様細胞株 (HTC: homozygous typing cell) を使用した。これらの HLA 型は, DR2・Dw2 型か DR2・Dw12 型である。また, 一般健康人の末梢血より得たリンパ球で HLA-DR クラス II (DR2) 遺伝子がホモ接合体, ヘテロ接合体を示すものを用いた。さらに, 家系調査でブランク遺伝子を持つことが知られた 2 家系について調べた。これらの HLA 遺伝子型は DR2DR-, DR1DR2, DR2DRw8, DRw8DR-, DR1DRw8, DR1DR9, および DR9DR-型であった。

抽出した DNA は各種制限酵素 EcoRI, MspI, PstI, および TaqI (宝酒造) を用いて処理した。

ハイブリダイゼーションに用いたプローブは 1.2 kb の DQ $\beta$  鎖 cDNA (pDC $\beta$  101)<sup>16)</sup> である, これは DQ $\beta$  鎖の mRNA の全長をほぼカバーするものである。

#### F RFLP による HLA-DNA タイピング

##### 1 高分子量 DNA の抽出

6% デキストランを用いて末梢血から有核細胞を分離し, 50 mM Tris HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS と 150  $\mu$ g/ml proteinase K を含む溶液で 50°C で一晩反応させた。その後 400 mM トリスで飽和させたフェノール溶液で蛋白除去を 3 回行い, DNA を含んだ層を 2.2 ml のエッペンドルフチューブ (Eppendorf 社) にとり, 30 units/ml RNase T<sub>1</sub> (Sigma 社) と 80  $\mu$ g/ml RNase A (Sigma 社) を加え 37°C で 2 時間反応させた。高分子量の DNA は, 全体量の 1/10 量の 3M potassium acetate (酢酸カリウム) と 2 倍量の 100% 冷エタノールで沈澱させた。沈澱した DNA は, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l の濃度になるように滅菌水で溶解させた。

##### 2 プローブ DNA の <sup>32</sup>P による標識

用いた DQ $\beta$ cDNA プローブの <sup>32</sup>P 標識には, Feinberg と Vogelstein によるランダムプライム法<sup>17)</sup> を用いた。<sup>32</sup>P 標識プローブは, 1-3 $\times$ 10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g の比活性を示した。

##### 3 サザンハイブリダイゼーション

4 種類の制限酵素 (EcoRI, MspI, PstI, および TaqI) で処理した DNA (7  $\mu$ g) を 0.7% アガロースで電気泳動後, ナイロンフィルターの Hybond-N (Amersham 社) に 20 $\times$ SSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate, 1M NaOH) トランスファー緩衝液を用いて転写した<sup>18)19)</sup>。転写後, フィルターをプレハイブリ溶液 (6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's 溶液, 0.5% SDS,

100  $\mu$ g/ml Salmon Sperm DNA) で 65°C 5 時間処理した。<sup>32</sup>P でラベルした cDNA 断片を 2.5 $\times$ 10<sup>6</sup> cpm/ml の濃度になるようにハイブリダイゼーション溶液 (10% dextran sulfate, 6 $\times$ SSC, 5 $\times$ Denhardt's 溶液, 0.5% SDS, 100  $\mu$ g/ml Salmon Sperm DNA) に加え, 65°C で 16 時間フィルターと反応させた。フィルターは, 3 $\times$ SSC (0.1% SDS 含), 2 $\times$ SSC (0.1% SDS 含) 溶液でそれぞれ 5 分間室温で洗浄後, 1 $\times$ SSC (0.1% SDS 含), 0.2 $\times$ SSC (0.1% SDS 含) 溶液でそれぞれ 20 分間 65°C で洗浄した。フィルターを風乾した後, X 線フィルム XAR-5 (Kodak 社) と増感紙 Cronex Lighting Plus (Dupont 社) を用いて -70°C でオートラジオグラフィを行った。

### III 結 果

#### A FCM を用いた RH 式血液型 Rh1 (D) 抗原の解析

FCM で赤血球膜上の抗原を間接蛍光抗体法を用いて検査するときには, 一次抗体で感作した赤血球が, 蛍光物質をラベルした二次抗体で凝集をおこすと凝集した面の抗原は測定されないため, 凝集がおきないでかつ最強の蛍光強度が得られる条件を設定する必要がある。*cDE/cDE* 型赤血球に Protein A Sepharose CL-4B を通した抗 D 一次抗体 (抗グロブリン法による抗体価: 320 倍) を生理食塩水で 25 倍, 50 倍, 100 倍および 200 倍に希釈した溶液を反応後, FITC 標識抗ヒト IgG ヒツジ血清の 10 倍から 640 倍までの 2 倍連続希釈液を反応させ, 一次抗体と蛍光抗体標識二次抗体との最適比を検討したところ, 一次抗体は 50 倍, 蛍光標識二次抗体は 40 倍の希釈率が最もよい結果を示した (Table 1)。

これらの希釈率の抗体を用いて遺伝子型が, *CDe/CDe*, *cDE/cDE*, *CDe/cDE*, *cDe/cde*, *CDe/cde*, *cDE/cde*, *cde/cde* の赤血球の平均蛍光強度を求めた結果を Fig. 2 に示した。細胞 1,000 個における平均蛍光強度の値は, *z* 検定により *CDe/cde* と *cDE/cde* の差以外は有意水準 *p*=0.005 で有意差を示し, D 遺伝子の接合体の違いにより, Dd ヘテロ接合体型よりも DD ホモ接合体型の方が強い蛍光強度を示した。また, Rh 1 (D) 抗原の弱い変異型である high grade D<sup>u</sup> (*cDE/Cde*), low grade D<sup>u</sup> (*CD<sup>u</sup>e/cde*) について蛍光強度を測定したところ Fig. 3 に示すように, D 抗原の抗原量に順じ *CDe/cDE* > *cDE/Cde* (high grade D<sup>u</sup>) > *CD<sup>u</sup>e/cde* (low grade D<sup>u</sup>) > *cde/cde*

Table 1 Effect of the concentration of antibodies on the strength of mean fluorescence

P. A. S. A.	×25	×50	×100	×200
× 10	175±31*	166±25*	151±26★	131±22☆
× 20	164±28*	155±28★	132±23★	108±20
× 40	134±25☆	129±28	108±21	95±22
× 80	108±17	104±21	71±18	64±18
×160	81±18	74±21	50±15	47±15
×320	60±14	54±18	34±13	36±13
×640	31±12	29±11	27±11	28±12

Values represent mean fluorescence intensity in channel numbers and standard deviation. P. A. : anti-D primary antibody with antiglobulin titer of 320 fractionated by Protein A Sepharose CL-4B affinity column. S. A. : FITC conjugated goat anti-human IgG serum as a secondary antibody. R2R2 (ccDDEE) cells were used for the measurement of fluorescence intensity. \* very strong agglutination ★ strong agglutination ☆ weak agglutination

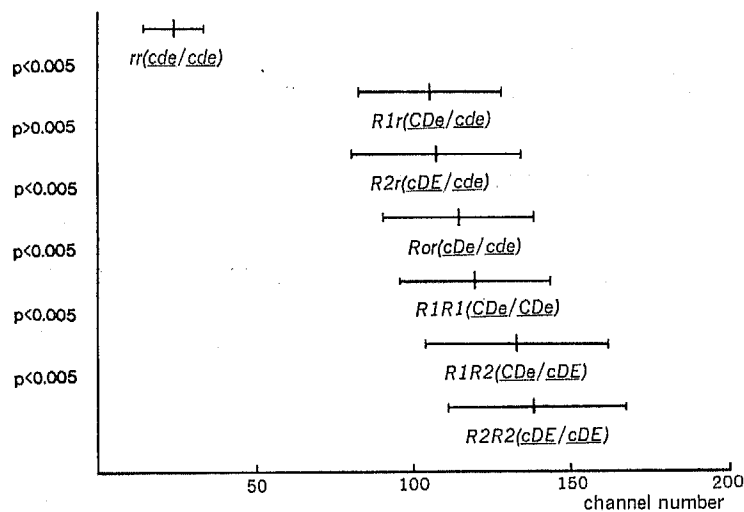


Fig. 2 Summary of the fluorescence intensity (in channel numbers) for 1,000 cells from every RBC sample within each phenotype. The bars represent the ranges of standard deviation and the middle of the bars represent the mean. The p values are shown on the left to indicate the significance in difference between the means of two consecutive samples.

の順に蛍光強度が減少した。

さらに、D<sup>u</sup>型および D<sub>e1</sub>型を含む各種 RH 式表現型を有する家系 (Fig. 1) について、各人の Rh 1 (Rho, D) 抗原の解析を FCM で行った結果を Table 2 に示した。各赤血球で得られた平均蛍光強度の有意差を z 検定法により検定すると Fig. 4 に示したよう

に同じ D<sub>e1</sub> 型の II-3 と II-4 および cDE/Cde 型の III-1 と III-2 の間に差がない以外は、何れも Fig. 4 の左側に示した有意水準で有意差があった。また、これら家族のヒストグラムを Fig. 5 と Fig. 6 に示した。測定された蛍光強度は、次の順に減少し家系調査で決定された遺伝子型と Rh 1 抗原の強さとの関係が

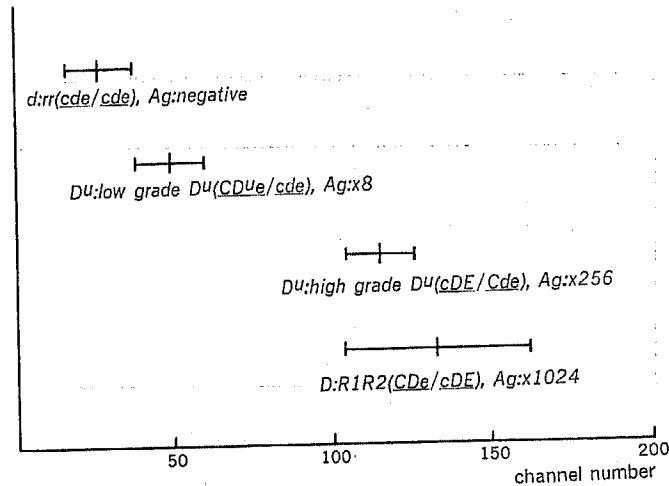


Fig. 3 Fluorescence intensity (in channel numbers) and antiglobulin titers with anti-D against erythrocytes of various Rh phenotypes. Ag: antiglobulin titer

Table 2 Rhl antigen activity on erythrocytes from a family expressed in anti-globulin (AG) agglutination titer, fluorescence intensity, and relative fluorescence.

Pedigree number	Rh phenotype and genotype	AG titer	Fluorescence intensity	Relative fluorescence(%)
I—1	D (cDE/cD <sup>u</sup> E)	400	85.7±20.8 (SD)	68.2
II—1	D (CDe/cDE)	800	92.9±20.1	76.0
II—3	D <sub>el</sub> (cD <sup>u</sup> E/Cde)	AG(-) Elution(+)	26.9±11.5	3.8
II—4	D <sub>el</sub> (cD <sup>u</sup> E/Cde)	AG(-) Elution(+)	26.0±10.3	2.8
II—5	D (CDe/cde)	800	90.4±19.1	73.3
III—1	D (cDE/Cde)	800	87.6±21.4	70.2
III—2	D (cDE/Cde)	800	88.0±19.6	70.7
III—3	d (Cde/cde)	—	23.4±12.0	0
III—4	low-grade D <sup>u</sup> (cD <sup>u</sup> E/cdE)	1	28.6±13.6	5.7
III—5	high-grade D <sup>u</sup> (CDe/Cde)	100	77.4±14.1	59.1
Positive control	D (cDE/cDE)	1,600	114.8±32.4	100
Negative control	D (cDE/cDE) No primary antibody	—	12.8±9.2	

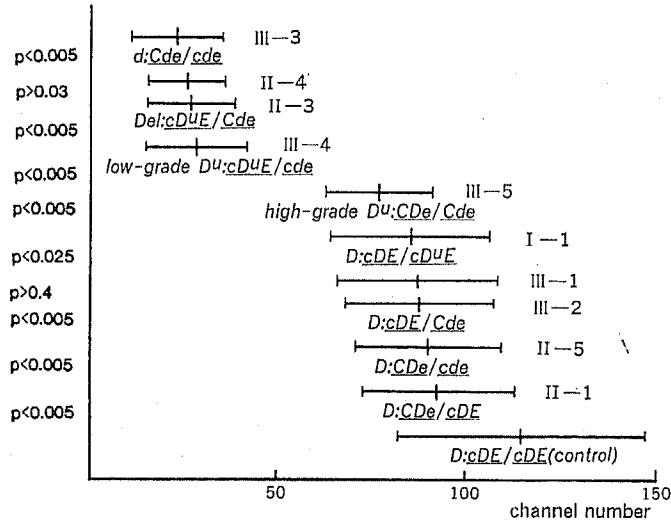


Fig. 4 Summary of the fluorescence intensity (in channel numbers) for 1,000 cells from every RBC sample within each member of the family. The bars represent the ranges of standard deviation and the middle of the bars represent the means. The p values are shown on the left to indicate the significance in difference between the means of two consecutive samples.

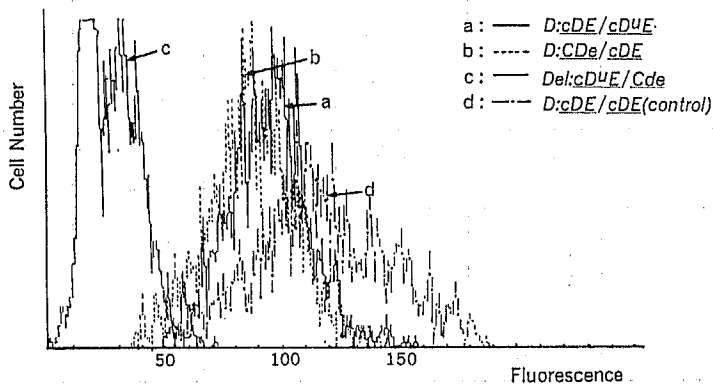


Fig. 5 Histograms of the fluorescence intensity from 4 RBC samples within a part of H.N. family and a healthy donor. a : I-1 (cDE/cD<sup>u</sup>E), b : II-1 (CDe/cDE), c : II-3 (cD<sup>u</sup>E/Cde), d : control cells (cDE/cDE)

示された。CDe/cDE>CDe/cde>cDE/Cde>cDE/cD<sup>u</sup>E>cD<sup>u</sup>E/cde>cD<sup>u</sup>E/Cde>Cde/cde

さらに、遺伝子型の違いによる相対的 Rh 1 (D)抗原活性を相対蛍光強度の比率 RF (Relative Fluorescence) を求め比較した (Table 2)。

RF は次に示す計算式を用いて求めた。

$$RF = (FI - 23.4) \div (114.8 - 23.4) \times 100$$

ここで FI (Fluorescence Intensity) は各被検血球で得られた平均蛍光強度を示す。114.8は Rh 陽性対照血球 (cDE/cDE) で得られた FI 値を示し、また 23.4は Rh 陰性対照血球 (Cde/cde) で得られた FI 値を示す。

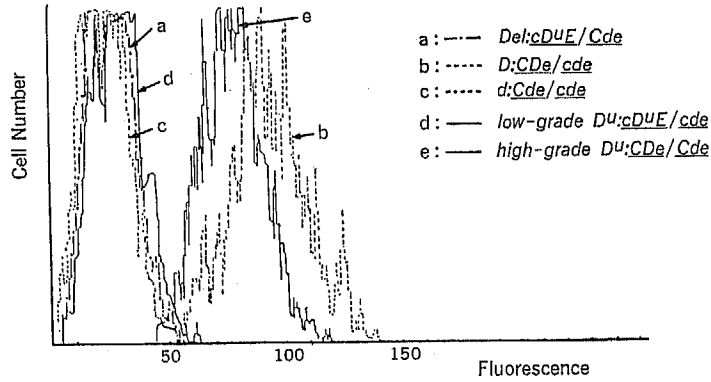


Fig. 6 Histograms of the fluorescence intensity from 5 RBC samples within a part of H.N. family. a: II-4 ( $cD^{u}E/Cde$ ), b: II-5 ( $CDe/cde$ ) c: III-3 ( $Cde/cde$ ), d: III-4 ( $cD^{u}E/cde$ ) e: III-5 ( $CDe/Cde$ )

Table 3 Different reaction patterns of two anti-HLA-A2 sera (26-674, 26-56)

Cell No	Phenotypes			Scores of LCT	
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	A2(26-674)	A2(26-56)
1	2	35,60	3	8	8
2	2	38,48	7	8	8
3	2	48	3	8	8
4	2	54,61	1,3	8	8
5	2	61	1	8	8
6	2	35,56	1,3	2	8
7	2	44,60	3	2	8
8	2,24	35,60	3	1	8
9	2,24	7,44		1	8
10	2,24	46,62	11,4	1	8
11	2,26	61	3	1	8
12	2,31	46,52	11	1	8
13	24	44,62	1	1	1
14	24,11	7,54	1,7	1	1
15	24,26	55,61	3	1	1

LCT: lymphocytotoxicity test

この結果  $Del$  型赤血球 (II-3, II-4) はそれぞれ 3.8%と2.8%の RF 値を示した。一方 low-grade  $D^u$  (III-4) は5.7%で, high-grade  $D^u$  (III-5) は59.7%であった。

#### B FCM を用いた白血球 HLA 型抗原の解析

HLA-A2 抗原解析のために用いた抗血清は, リンパ球細胞毒試験 (LCT) で A 2 遺伝子がホモ接合体であるリンパ球と特に強く反応する (Table 3: 26-674 血清)。このときのヒストグラムは Fig. 7 に見られるように A 2 ホモ接合体リンパ球では, 蛍光強度が70チャ



ンネルと 155 チャンネル付近に二峰性のピークを示した (Fig. 7a)。一方 A 2 A24 型のヘテロ接合体のリンパ球では、90 チャンネル付近に一峰性のピークを示した (Fig. 7b)。

HLA-A24 抗原ホモ接合体リンパ球は90チャンネル付近に蛍光強度を示すピークを示し (Fig. 8a)、ヘテロ接合体リンパ球では、55チャンネル付近に蛍光強度を示すピークが得られた (Fig. 8b)。

HLA-Bw 52抗原ホモ接合体リンパ球は30チャンネルと95チャンネル付近に蛍光強度を持つ二峰性のピークを示し (Fig. 9a)、ヘテロ接合体リンパ球では、30チャンネル付近に蛍光強度を示すピークが得られた (Fig. 9b)。

HLA-DR2抗原ホモ接合体リンパ球は130チャンネル付近に蛍光強度を示す一峰性のピークであり (Fig.

10a)、ヘテロ接合体は、110チャンネル付近に蛍光強度を持つヒストグラムを示した (Fig. 10b)。

### C RFLP-DNA タイピングによるクラスII抗原の遺伝子型判定

今回検査した DR 2 抗原を表現している細胞は、Dw 2, Dw 12, Dw 21, Dw 22 のいずれかを有している (Table 4)。クラスII抗原の cDNA プローブ (DR $\alpha$ , DR $\beta$ , DQ $\alpha$ , DQ $\beta$ , DN $\alpha$ , DP $\alpha$ , および DP $\beta$ ) の中で、DQ $\beta$  鎖 cDNA プローブを用いて RFLP-DNA タイピングを行うときに最も遺伝的多型性をしめし<sup>20)21)</sup>、DR, DQ, D アロ抗原タイプのおおよそを決定できる<sup>22)23)</sup>。ヒトBリンパ芽球様細胞 (B-LCL: B lymphoblastoid cell line) でDR 2 抗原が HTC 細胞について各種制限酵素 (EcoRI, PstI, MspI, TaqI) を用いて切断し、DQ $\beta$  鎖 cDNA プローブを用

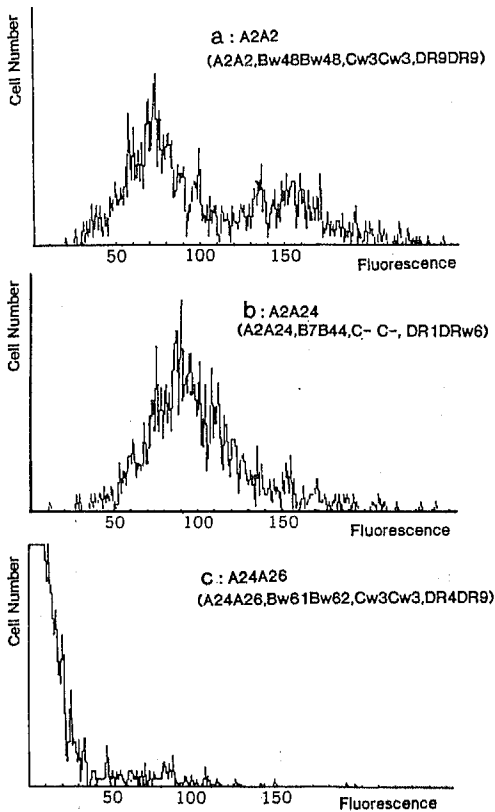


Fig. 7 Histograms of fluorescence intensity of the different lymphocyte samples within 3 different HLA genotypes. Anti-A2 (25-674) monospecific antibody was used for the primary antibody.

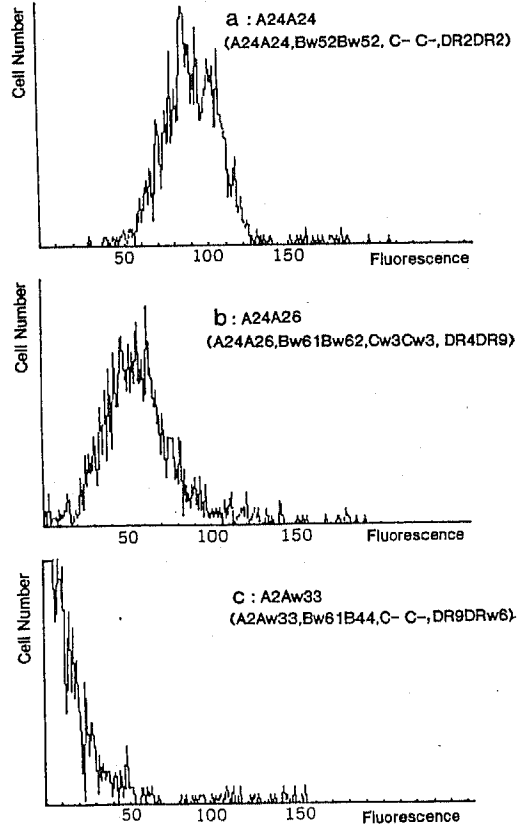


Fig. 8 Histograms of fluorescence intensity of the different lymphocyte samples within 3 different HLA genotypes. Anti-A24 monospecific antibody was used for the primary antibody.

Table 4 HLA class II (DR2, DRw8, DR9) haplotypes 6)

HLA-DR		HLA-D	HLA-DRw52/w53	HLA-DQ
DR2	DRw 15	Dw 2		DQw 6(w1)
	DRw 15	Dw 12		DQw 6(w1)
	DRw 16	Dw 21		DQw 5(w1)
	DRw 16	Dw 22		DQw 5(w1)
DRw 8		Dw 8.1		DQw 4
		Dw 8.2		DQw 4
		Dw 8.3		DQw 1
		Dw 8.3		DQw 7(w3)
DR 9		Dw 23	DRw 53	DQw 9(w3)

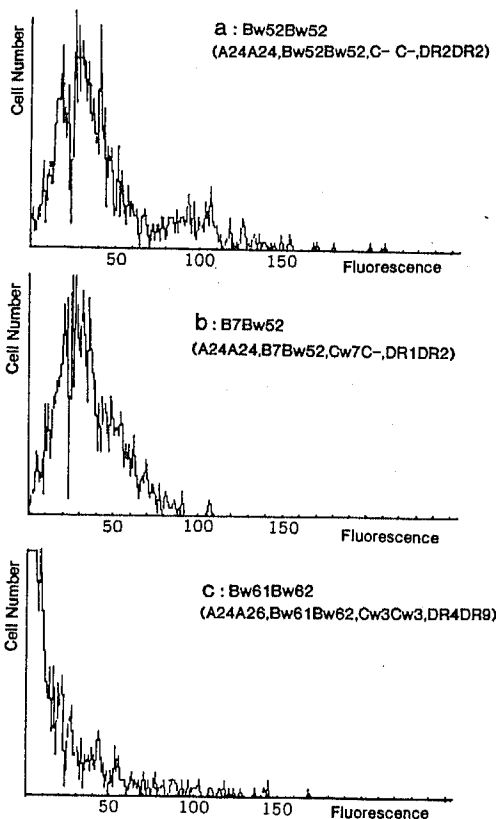


Fig. 9 Histograms of fluorescence intensity of the different lymphocyte samples within 3 different HLA genotypes. Anti-Bw52 monospecific antibody was used for the primary antibody.

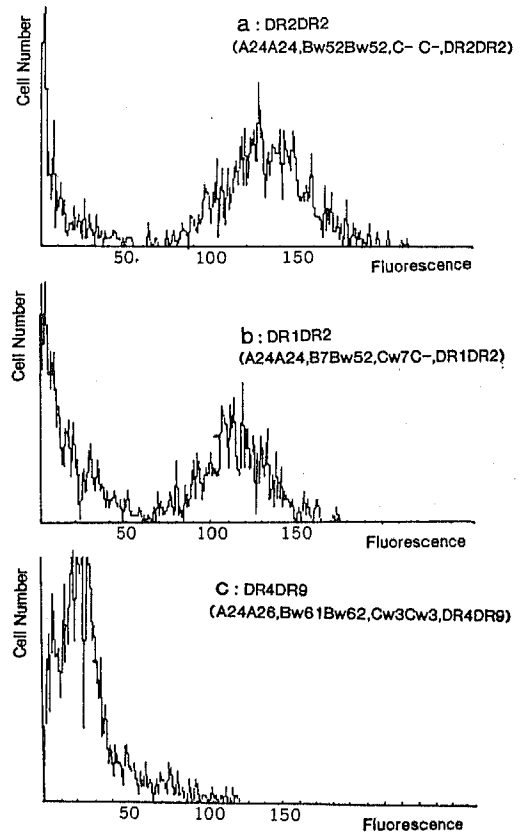


Fig. 10 Histograms of fluorescence intensity of the different lymphocyte samples within 3 different HLA genotypes. Anti-DR2 monospecific antibody was used for the primary antibody.

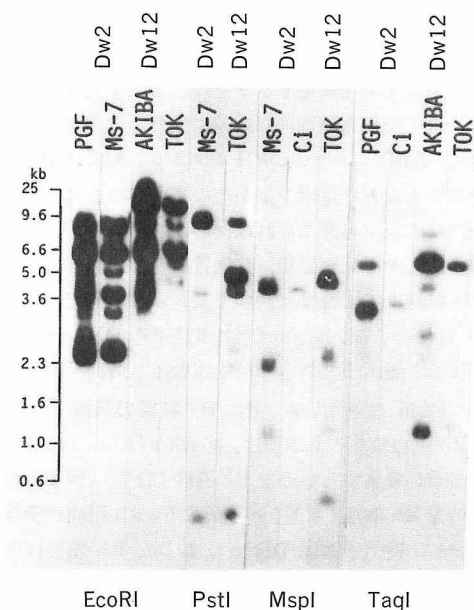


Fig. 11 Autoradiograms of Southern blot hybridization using genomic DNAs from B LCLs with the DQ $\beta$  probe after EcoRI, PstI, MspI, and TaqI digestion.

いたサザンハイブリダイゼーション後のオートラジオグラムを Fig. 11 に示した。

EcoRI で処理したときの RFLP パターンは、DR2・Dw2 抗原を有する HTC 細胞 (PGF, Ms-7) では 9.1 kb と 2.4 kb に特異的なバンドが現れ、DR2・Dw12 抗原を有する HTC 細胞 (AKIBA, TOK) では 18 kb と 10 kb に特異的なバンドが見られた。

PstI で処理したときには、DR2・Dw12 抗原を発現している HTC 細胞では、5.4 kb に特異的なバンドが生じた。

MspI で処理したときには、4.0 kb (DR2・Dw2) と 5.1 kb (DR2・Dw12) に特異的なバンドが生じた。

TaqI で処理したときには、3.2 kb (DR2・Dw2) と 6.8 kb (DR2・Dw12) に特異的なバンドが見られた。

一般健康人12人から得た DNA を DQ $\beta$  鎖 cDNA でサザンハイブリダイゼーションした結果を Fig. 12 に示した。この中には、家族内検査で細胞毒試験による DR 抗原がブランクを含むもの (レーン2: DRw8 DR-型, レーン4: DR1DR-型, レーン9: DR9DR-

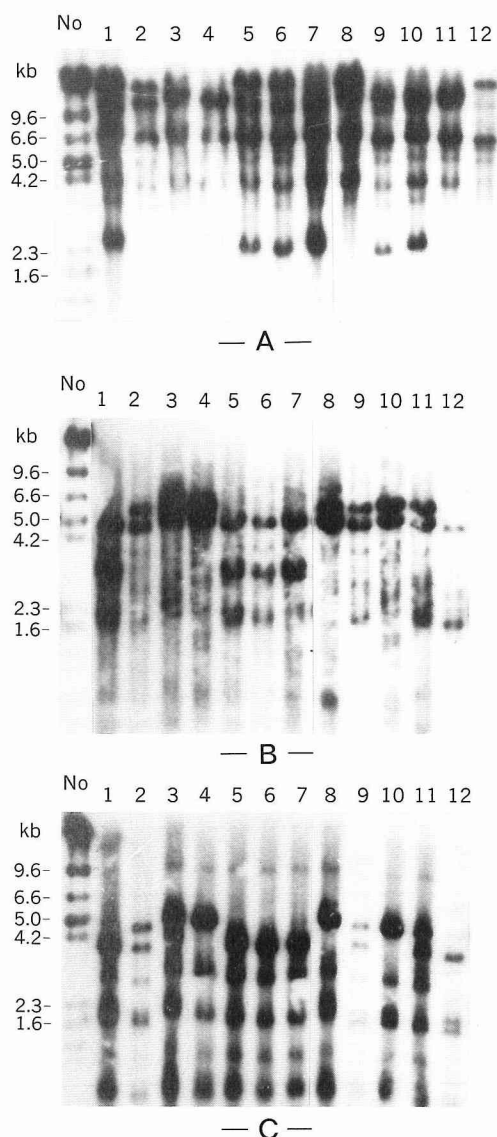


Fig. 12 Autoradiograms of Southern blot hybridization using DNAs from 12 normal individuals with the DQ $\beta$  probe after EcoRI (A), MspI (B), and TaqI (C) digestion. 1: DR2DRw8, 2: DRw8DR-, 3: DR1DRw8, 4: DR1DR-, 5: DR2, 6: DR2, 7: DR2, 8: DR1DR2, 9: DR9DR-, 10: DR1DR-, 11: DR1DR9, 12: DR9

型, レーン10: DR1DR-型)が入っている。2家族 (レーン1~4; 1:母, 2:子, 3:子, 4:父, とレーン8~11; 8:父, 9:母, 10:子, 11:子)

Table 5 RFLP patterns in HLA-D homozygous B cell-lines<sup>23)</sup>

Enzyme	kb	DR	1	2	2	8	8	9
	Dw	1	2	12	8.1	8.3	23	
EcoRI	18	—	—	+	—	+	—	
	13.5	+	—	—	+	—	+	
	10	—	—	+	+	+	+	
	9.1	—	+	—	—	—	—	
	3.8	+	+	+	+	—	+	
	3.4	—	+	+	—	+	—	
	2.4	—	+	—	—	—	—	
TaqI	6.8	—	—	+	—	—	—	
	6.0	+	—	—	—	—	—	
	3.2	—	+	—	—	—	—	
	2.2	—	—	—	—	+	+	
MspI	5.1	+	—	+	—	—	—	
	4.0	—	+	—	+	+	+	

Table 6 Irregular bands detected in autoradiogram by comparing with HTC RFLP patterns

lane	2	5	6	9	10
phenotype DR	w8	2	2	9	1
band(kb)					
enzyme					
EcoRI	3.8			3.4 2.4	10.0 3.4 2.4
TaqI	6.0	2.2	2.2	6.0	
MspI	5.1			5.1	

のうちブランク抗原を持つ人には、Table 5 で示したホモ接合体の RFLP パターンの組合せから比較すると、幾つか矛盾したバンドが現れた (Table 6)。すなわちレーン 2 では、EcoRI 処理の 3.8 kb, TaqI の 6.0 kb, および MspI の 5.1 kb, レーン 9 では EcoRI の処理の 3.4 kb と 2.4 kb, TaqI の 6.0 kb および MspI の 5.1 kb, レーン 10 では EcoRI 処理の 10.0 kb, 3.4 kb と 2.4 kb にそれぞれ HTC で見られたバンド以外のバンドが観察された。

## IV 考 察

優性形質を持つ血液型やブランク遺伝子を持つ血液型の遺伝子型を決定することは、法医学実務における親子鑑定や個人識別には非常に重要なことである<sup>24)</sup>。特に、ABO システム, RH システム, および HLA 各システムなどの遺伝子型がその当事者の血液型を調べるだけで決定可能であれば、個人識別での識別能力<sup>25)</sup>、親子鑑定での父権否定、父権肯定時における父権肯定確率に及ぼす影響はきわめて大きい。本研究で試みた FCM 法および、HLA クラス II 抗原の DNA タイピング法は、遺伝子型判定の可能性を示した。

## A FCM 法を用いた Rh1(D) 抗原の解析

Rh 式血液型の基本型は、抗 Rh 1 (Rho, D) 抗体で赤血球が凝集するものを Rh 陽性 (D 型)、凝集しないものを Rh 陰性 (d 型) と分類する。Rh 陽性は優性に遺伝し、遺伝子型は DD または Dd, Rh 陰性は劣性で遺伝子型は dd である。特に、DD か Dd の接合体 (遺伝子型) の区別は非常に困難で、そのため凝集反応<sup>26)</sup>、フェリチン<sup>27)</sup> や金<sup>28)</sup> を抗体に標識して細胞膜上の抗原を形態学的に調べる方法、およびアイソトープ<sup>29)-31)</sup> を用いた方法などが試みられている。これらの方法に比較して FCM 法は、試料作成が簡単で危険性もなく短時間に多くの細胞膜上の抗原を検査できる<sup>32)-35)</sup>。本実験で用いたように一次抗体を IgG 分画にし、FITC を標識した二次抗体との最適比を定めて抗原解析を行うと、Bockstaele ら<sup>32)</sup> の行った直接法では検出できなかった D<sup>u</sup> も検出でき、さらに DeI の検出も可能であった。本研究で行った間接法は、非常に鋭敏なうえに直接法に比べ一次抗体に蛍光物質を結合させる煩わしさを必要としないため、目的とする抗原の解析が簡単に行うことができる。

D<sup>u</sup> 表現型 (Rh 変種型, Rh variant) については、赤血球膜上の Rh 1 (D) 抗原活性の低下したものとしてその抗原活性が様々な方法を用いて研究されている<sup>31)-35)-37)</sup>。high grade D<sup>u</sup>, low grade D<sup>u</sup>, および D における蛍光強度を比較し、D 抗原の相対活性を求めると high grade D<sup>u</sup> は D の 83%, low grade D<sup>u</sup> は D の 23% であった<sup>35)</sup>。

D<sup>u</sup> 表現型の遺伝的背景は複雑である。(i) Rh 2(C) 抗原が Rh 1 (D) 抗原の活性を抑制する、すなわち一方の親から r' (Cde) 遺伝子を受けて Cde 抗原が発現するともう 1 種の Rh 陽性抗原の抗 Rh 1 (D) との反応が妨害されて弱くなる。(ii) Rh 1 (D) 抗原を構成してい

るモザイク構造のうち少なくとも4つの部分<sup>38)-41)</sup>の1つあるいはそれ以上の部分が欠如しているとき抗原活性が弱まる。(iii) Rh 1 (D)抗原活性が弱い D<sup>u</sup> 遺伝子<sup>42)</sup>を持っている。

日本人で発見された非常にまれな De<sub>1</sub> 表現型は、型判定用抗 Rh 1 (D)血清による検査では凝集反応陰性でかつ抗グロブリン法による D<sup>u</sup> 試験も陰性であるが、抗 Rh 1 (D)抗体の吸着解離試験で赤血球膜上に Rh 1 (D)抗原の存在が証明される。日本人における De<sub>1</sub> 型は Cde 遺伝子を含んでいるものがほとんどであり、この Cde 抗原が D<sup>u</sup> 型の D 抗原活性を抑制し De<sub>1</sub> 型の変異型を作ると考えられる<sup>43)</sup>。今回、FCM 法で調べた De<sub>1</sub> 表現型を持つ家系 (Fig. 1) は、非常にまれな D<sup>u</sup> 遺伝子 (cD<sup>u</sup>E) を持ち、それが3代にわたり遺伝し、この遺伝子に対立遺伝子 Cde が組み合わされた人では D<sup>u</sup> 型の Rh 1 (D) 抗原活性を減少させ De<sub>1</sub> 型を示したものである。これらの遺伝的な要因により影響を受けた家族内の Rh 1 (D) 抗原活性の相違は、抗グロブリン試験では相違がみられないものも FCM 法では、有意な違いを示すことができた (Table 2, Fig. 4)。

## B FCM を用いた HLA 抗原の解析

白血球型 HLA 各システムは非常に多くの遺伝的多型性を示すため親子鑑定における有用性についてはいくつか報告がある<sup>5)44)-46)</sup>。細胞毒試験による HLA 抗原の検査では、1 抗原だけ陽性となった場合、ホモ接合体かブランク遺伝子とのヘテロ接合体かの区別ができない。Table 3 に示した26-674抗血清の反応は特殊な例外で、A 2 遺伝子がホモ接合体と思われる細胞 (Cell No. 1~5) とは細胞毒試験が陽性であるが、A 2 ヘテロ接合体 (Cell No. 8~15) とは陰性であった。注目されるのは Cell No. 6~7 との反応で、A 2 以外の A システム抗原は検出されないのに疑陰性であった。このことからこれらの細胞は A 2 ホモ接合体ではなく、抗体で検出されないいわゆるブランク抗原を作る遺伝子とのヘテロ接合体と推定される。一方、26-56抗血清は、A 2 抗原を持つ細胞とはいずれも陽性であった。26-674抗血清を Protein-A Sepharose 4B で処理しフローサイトメトリーで解析すると、A 2 抗原がホモ接合体の細胞では、2 峰性のピーク (Fig. 7) が得られ、ヘテロ接合体で得られたピークよりも右にシフトしており、強い蛍光強度を示す細胞群が確認できた。これらの結果から、26-674抗血清の中には、補体依存性の抗体と非依存性の抗体が適当な割合で存在

していると思われる。このような細胞毒試験で、HLA システムの遺伝子型を確認できる抗血清は抗 A24 抗体<sup>47)</sup> の報告例があるが、一般には例外的なものである。細胞毒試験のみで非常に多くの HLA 抗原について遺伝子型を決定できるような抗血清を見つげ出すことは容易なことではない。本研究では一次抗体を IgG 分画にし、蛍光物質を標識した二次抗体にヒト IgG 羊 F (ab)<sub>2</sub> 血清を使用した FCM による解析を考案、試行したところ HLA 抗原プロタイプの識別および遺伝子型の判定も可能となる見通しが得られた。

## C RFLP 法を用いた DNA タイピングによる

### HLA クラス II 抗原の遺伝子型判定

HLA 抗原の遺伝的多型性に関しては血清学的ないし細胞学的な検査とともに DNA レベルの検査がクローン化された cDNA を用いたサザンハイブリダイゼーションにより可能になった<sup>14)20)23)48)</sup>。RFLP-DNA タイピングは、現在血清法で検出される程多種類の HLA 遺伝子検出率は得られていないが<sup>49)</sup>、クラス II 抗原ホモ接合体から得られた RFLP スタンダードパターンを組み合わせると血清学的および細胞学的に検出できるアロ抗原の分類と約 8 割程度一致する<sup>50)</sup>。このことから、被検細胞を RFLP-DNA タイピングで検査すると、クラス II 抗原のアロタイプが同定できるうえにその接合体の区別の推定も可能である。今回プローブとして用いた DQβ 鎖の cDNA はいままでクローニングされている cDNA のなかで最も遺伝的多型性を示すものであり、さらに密に連鎖している D, DR および DQ 抗原の推定も可能である<sup>23)49)</sup>。本実験で得た RFLP パターンからそれぞれの細胞のクラス II 抗原のハプロタイプを推定するとレーン 1 からレーン 4 の家族では、レーン 1 (母)は DR2・Dw2・DQw1, DRw8・Dw8.3・DQw3, レーン 4 (父)は, DR1・Dw1・DQw1 が考えられたが、レーン 2 (子)では、Table 5 にしめした HTC の標準パターンと比較すると DRw8・Dw8.3 とは異なるいくつか不規則なバンド (EcoRI: 3.8 kb, TaqI: 6.0 kb, MspI: 5.1 kb) が見られた。これは父 (DR1DR-) から遺伝したブランク遺伝子に相当するものがバンドとして見られたものと思われる。レーン 6 は、DR2・Dw2 のホモ接合体の細胞である。レーン 8 (父), 9 (母), 10 (子) および 11 (子) の家族で得られた RFLP パターンでは、血清学的な検査で明らかにブランク遺伝子の存在が示された母 (レーン 9) と子 (レーン 10) に DR9 と DR1 で得られた RFLP バンド以外のバンドが見られた。

すなわち EcoRI を用いたときの 10 kb, 3.4 kb および 2.4 kb, TaqI 用いたときの 6.0 kb, MspI を用いたときの 5.1 kb バンドはブランク遺伝子に相当し母から子に遺伝したものと思われる。さらにレーン 12 の RFLP パターンは、DR9 の HTC で得られたバンドパターンとまったく一致していることにより、この細胞は、DR9・Dw23・DQw9 のホモ接合体であると判定される。

このように、サザンハイブリダイゼーションによる HLA 型の RFLP-DNA タイピングは、血清学的な検査では検出されないブランク遺伝子もバンドとして明確に示すこともできる (Fig. 12)。血清学的な検査では、DR2 抗原だけが検出される DR2 細胞 (ホモ接合体) でも RFLP-DNA タイピングを行うことによりハプロタイプが DR2・Dw2 (Fig. 11, Fig. 12: レーン 7) のみ、あるいは DR2・Dw12 (Fig. 11) のみのホモ接合体の細胞であるか、これら 2 種類のハプロタイプをもつヘテロ接合体の細胞、あるいはこれらのうちの 1 種のブランク遺伝子を含むハプロタイプとのヘテロ接合体 (Fig. 12: レーン 5 と 6) であるかの証明が可能である。

## V 結 語

各種の血液型のうち、劣性遺伝子ないしブランク抗原の存在が親子鑑定や個人識別に特に影響が大きい赤血球型 RH システムおよび白血球型システムについて、その接合体同定の可能性を検討した。

1 赤血球を間接蛍光抗体法で染色する FCM 法を用いて細胞膜上の抗原定量を行うことにより、RH 式血液型の遺伝子型による Rh 1 (D) 抗原の蛍光強度に有為な差が認められることが分かった。また、Rh 1 (D) 抗原の変異型である high grade D<sup>u</sup>, low grade

D<sup>u</sup>, DeI 型の D 抗原量の定量化も可能であり Rh 1 (D) 抗原の接合体の推定が可能であった。

FCM 法を用いた白血球 HLA 型抗原の解析は、一次抗体を IgG 分画にし、蛍光抗体を標識した二次抗体に抗ヒト IgG ヒツジ F (ab)'<sub>2</sub> 血清を用いることにより接合体の相違による蛍光強度の違いがみられ型判定が可能であった。

2 HLA クラス II 抗原についてサザンブロッティングを用いた RFLP-DNA タイピングを行うことにより、ホモ接合体か、ブランク抗原を作る遺伝子とのヘテロ接合体かの判定ができた。プローブに DQβ 鎖 cDNA を使い、制限酵素に EcoRI, PstI, TaqI および MspI を用いて DNA の RFLP を調べて、ホモ接合体の培養 B cell line から得られた RFLP と比較し異なったバンドを証明することにより血清学的検査では検出できないブランク抗原の検出も可能であり、クラス II 抗原の遺伝子型判定には有力な検査法であることがわかった。

## VI 謝 辞

本論文の要旨は、第 71 次日本法医学会総会 (1987 年 4 月、東京)、第 72 次日本法医学会総会 (1988 年 5 月、秋田)、第 73 次日本法医学会総会 (1989 年 5 月、岡山) で発表した。稿を終えるにあたり、ご指導ならびにご鞭撻を賜りました支倉逸人教授に深く感謝致します。また、本研究にご協力下さいました東海大学医学部第 II 移植学教室 猪子英俊助教授、佐藤忠之技官：当大学輸血部緒方洪之講師、長谷川康久技官、伊藤進技官：長野市赤血液センター 斎藤敏氏：ならびに法医学教室 福島弘文助教授、宮嶋親子技官に深く感謝致します。本研究は文部省科学研究費一般 A (No 61440040) の助成を受けた。

## 文 献

- 1) Mollison, P.L., Engelfriet, C.P. and Contreras, M. : Blood transfusion in clinical medicine. 8th ed., pp. 201-203, Blackwell Scientific Publications, London, 1987
- 2) Jeannet, M., Hässig, A. and Bernheim, J. : Use of the HLA antigen in disputed paternity cases. Vox Sang, 23 : 197-200, 1972
- 3) Page-Bright, B. : Proving paternity-human leukocyte antigen test. J Forensic Sci, 27 : 135-153, 1982
- 4) Terasaki, P.I., Bernoco, D., Gjertson, B.O., Mickey, M.R. and Perdue, S. : Ninety-five percent probability of paternity with HLA, ABO and Haptoglobins. Forensic Sci Int, 12 : 227-232, 1978
- 5) Ota, M., Okajima, H., Yonemura, I., Hasekura, H. and Ishimoto, G. : Usefulness of the leukocyte HLA groups in paternity confirmation and exclusion. Jpn J Legal Med, 38 : 773-

777, 1984

- 6) Nomenclature Committee on Leukocyte Antigens. : Nomenclature for factors of the HLA system. *Immunogenetics*, 28 : 391-398, 1988
- 7) Terasaki, P.I., Bernoco, D., Park, M.S., Ozturk, G. and Iwaki, Y. : Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *Am J Clin Pathol*, 69 : 103-120, 1978
- 8) Bach, F.H. and Voynow, N.K. : Oneway stimulation in mixed leukocyte cultures. *Science*, 153 : 545-547, 1966
- 9) Bach, F.H., Inouye, H., Hank, J.A. and Alter, B.J. : Human T lymphocyte clones reactive in primed lymphocyte typing and cytotoxicity. *Nature*, 281 : 307-309, 1979
- 10) Shaw, S., Johnson, A.H. and Shearer, G.M. : Evidence for a new segregant series of B cell antigens that are encoded in the HLA-D region and that stimulate secondary allogeneic proliferative and cytotoxic responses. *J Exp Med*, 152 : 565-580, 1980
- 11) Wake, C., Long, E.O. and Mach, B. : Allelic polymorphism and complexity of the genes for HLA-DR $\beta$ -chains-direct analysis by DNA-DNA hybridization. *Nature*, 300 : 372-374, 1982
- 12) Andersson, M., Böhme, J., Andersson, G., Möller, E., Thorsby, E., Rask, L. and Peterson, P.A. : Genomic hybridization with class II transplantation antigen cDNA probes as a complementary technique in tissue typing. *Hum Immunol*, 11 : 57-67, 1984
- 13) Böhme, J., Andersson, M., Andersson, G., Möller, E., Peterson, P.A. and Rask, L. : HLA DR- $\beta$  genes vary in number between different DR specificities, whereas the number of the DQ  $\beta$  genes is constant. *J Immunol*, 135 : 2149-2155, 1985
- 14) Owerbach, D., Lernmark, Å., Rask, L., Peterson, P.A., Platz, P. and Sveigaard, A. : Detection of HLA-D/DR-related DNA polymorphism in HLA-D homozygous typing cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 : 3758-3761, 1983
- 15) 太田正穂, 福島弘文, 支倉逸人 : フローサイトメトリーによる Rh 式血液型 Rh2 (c), Rh3(E), Rh4(c) および Rh5(e) 抗原の解析. *法医学の実際と研究*, 31 : 31-35, 1988
- 16) Inoko, H., Ando, A., Kimura, M. and Tsuji, K. : Isolation and characterization of the cDNA clones and genomic clones of the HLA class II antigens. In : Tsuji, K. (ed.), *Present and further development of transplantaion*, pp.188-220, Tokai University Press, Japan, 1985
- 17) Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*, 132 : 6-13, 1983
- 18) Southern, E.M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 98 : 503-517, 1975
- 19) Thomas, P.S. : Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitro cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77 : 5201-5205, 1980
- 20) Inoko, H., Ando, A., Ito, M. and Tsuji, K. : Southern hybridization analysis of DNA polymorphism in the HLA-D region. *Hum Immunol*, 16 : 304-313, 1986
- 21) 猪子英俊, 辻 公美 : 骨髄移植と HLA. *代謝*, 25 : 21-36, 1988
- 22) Otani, F., Okuda, M. and Kashiwagi, N. : Southern blot analysis of HLA class II beta genes in relation to HLA-D, DR specificities. *Transplant Proc*, 19 : 817-821, 1987
- 23) Maeda, M., Inoko, H., Ando, A., Uryu, N. and Tsuji, K. : HLA-D typing of heterozygotes using restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the HLA-DQ gene region on the basis of standard band patterns derived from HLA homozygotes. *Hum Immunol*, 25 : 195-205, 1989
- 24) 支倉逸人, 太田正穂, 福島弘文 : セルソーターを利用した遊離細胞における各種血液型の遺伝子型判定. *病態生理*, 7 : 557-563, 1988
- 25) 支倉逸人 : 白血球 HLA 型の法医学における応用. *信州医誌*, 30 : 443-453, 1982
- 26) Hasekura, H., Ota, M., Fukushima, H., Yonemura, I. and Ishimori, T. : Gene dosage effect on Rh blood group antigens observed in erythrocyte heterozygous for Rh-29 ( $\bar{r}$ , ---) gene. *Proc Jpn Acad*, 62 : 75-78, 1986
- 27) Masouredis, S.P., Sudora, E., Mahan, L. and Victoria, E.J. : Antigen densities and ultrastructural patterns of red cell Rh antigens. *Transfusion*, 16 : 94-106, 1976
- 28) Romano, E.L., Stolinski, C. and Hughes-Jones, N.C. : Distribution and mobility of the A,D

- and c antigens on human red cell membranes: Studies with a gold-labelled antiglobulin reagent. *Br J Haematol*, 30: 507-516, 1975
- 29) Masouredis, S.P., Chi, C-A. and Ferguson, E.: Relationship between Rho (D) genotype and quantity of  $^{131}\text{I}$  anti-Rho (D) bound to red cells. *J Clin Invest*, 39: 1450-1462, 1965
  - 30) Rochna, R. and Hughes-Jones, N.C.: The use of purified  $^{125}\text{I}$ -labelled anti- $\gamma$  globulin in the determination of the number of D antigen sites on red cells of different phenotypes. *Vox Sang*, 10: 675-686, 1965
  - 31) Fukushima, H., Matsuba, K., Ota, M., Segawa, M., Yonemura, I. and Hasekura, H.: Quantitative comparison of Rh 1(Rho, D) antigen on D, D<sup>u</sup> and d red cells by radioimmunoassay using  $^{125}\text{I}$ -protein A. *Int J Biochem*, 18: 1147-1149, 1986
  - 32) Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., Muylle, L., Cole-Dergent, J. and Peetermans, M.E.: Flow cytometric analysis of erythrocytic D antigen density profile. *Vox Sang*, 51: 40-46, 1986
  - 33) 田中光信, 瀬尾たい子, 山口英夫, 大久保康人: フローサイトメトリーによる赤血球抗原の解析 [1] 間接フローサイトメトリー法導入の基礎的研究, 日本輸血学会誌, 33: 695-701, 1987
  - 34) 田中光信, 瀬尾たい子, 宮本千弥子, 山本和子, 山口英夫, 大久保安人, 御手洗安興, 内山英一, 宮田義久: フローサイトメトリー法による Rh 系抗原の遺伝学的背景, 日本輸血学会誌, 33: 702-709, 1987
  - 35) Ota, M., Hasekura, H., Fukushima, H. and Yonemura, I.: Flow cytometric analysis on the Rh 1 (Rho, D) antigen activity on red cells: Various Rh blood group phenotypes including D<sup>u</sup> variants. *Jpn J Legal Med*, 43: 122-127, 1989
  - 36) Race, R. R., Sanger, R. and Lawler, S.: Rh genes allelomorph to D. *Nature*, 162: 292, 1948
  - 37) Masouredis, S.P. and Sturgeon, P.: Quantitative serologic and isotopic studies on the Rho variant-D<sup>u</sup>. *Blood*, 25: 954-975, 1965
  - 38) Wiener, A.S., Geiger, J. and Gordon, E.B.: Mosaic nature of Rho factor of human blood. *Exper Med Sur*, 15: 75-82, 1957
  - 39) Unger, L. J. and Wiener, A.S.: Observations on blood factors Rh<sup>A</sup>, Rh<sup>a</sup>, Rh<sup>B</sup> and Rh<sup>C</sup>. *Am J Clin Pathol*, 31: 95-103, 1959
  - 40) Unger, L. J., Wiener, A.S. and Weiner, L.: New antibody (anti-Rh<sup>B</sup>) resulting from blood transfusion in Rh positive patient. *J Am Med Assoc*, 170: 1380-1383, 1959
  - 41) Sacks, M.S., Wiener, A.S., John, E.F., Spurling, C.L. and Unger, L. J.: Iso-sensitization to the new blood factor RhD with special reference to its clinical importance. *Ann Intern Med*, 51: 740-747, 1959
  - 42) Konugres, A.A., Polesky, H.F. and Walker, R.H.: Rh immune globulin and the Rh-positive, D<sup>u</sup> variant, mother. *Transfusion*, 22: 76-77, 1982
  - 43) Okubo, Y., Yamaguchi, H., Tomita, N. and Nagano, N.: A D variant, Del? *Transfusion*, 24: 542, 1984
  - 44) Terasaki, P.: Resolution by HLA testing of 1,000 paternity cases not excluded by ABO testing. *J Family Law*, 16: 543-557, 1978
  - 45) Brautbar, C., Cohen, T. and Nelken, D.: Disputed parentage due to exchanged babies solved by HLA. *Vox Sang*, 39: 322-326, 1980
  - 46) Houtz, T.D., Brook, M.A., Mickey, R.E. and Dawson, R.B.: Utility of HLA and six erythrocyte antigen systems in excluding paternity among 500 disputed cases. *Forensic Sci Int*, 17: 211-218, 1981
  - 47) 田中敦子, 中村典子, 前川孝子, 村田 愿, 児崎宣夫, 松木一雅, 十字猛夫: HLA-A24 に特異的に反応する抗血清について, 日本輸血学会誌, 31: 589-590, 1985
  - 48) Maeda, M., Inoko, H., Ando, A., Uryu, N., Nagata, Y. and Tsuji, K.: HLA-DP typing by analysis of DNA restriction fragment length polymorphisms in the HLA-DP $\beta$  subregion. *Hum Immunol*, 21: 239-248, 1988
  - 49) 猪子英俊: HLA 抗原の DNA タイピング. *日本臨牀*, 47: 550-576, 1989
  - 50) 大谷文雄: RFLP 解析による HLA-DNA タイピング. *Medical Immunol*, 16: 939-947, 1988

(1. 7. 14 受稿)