

MHC

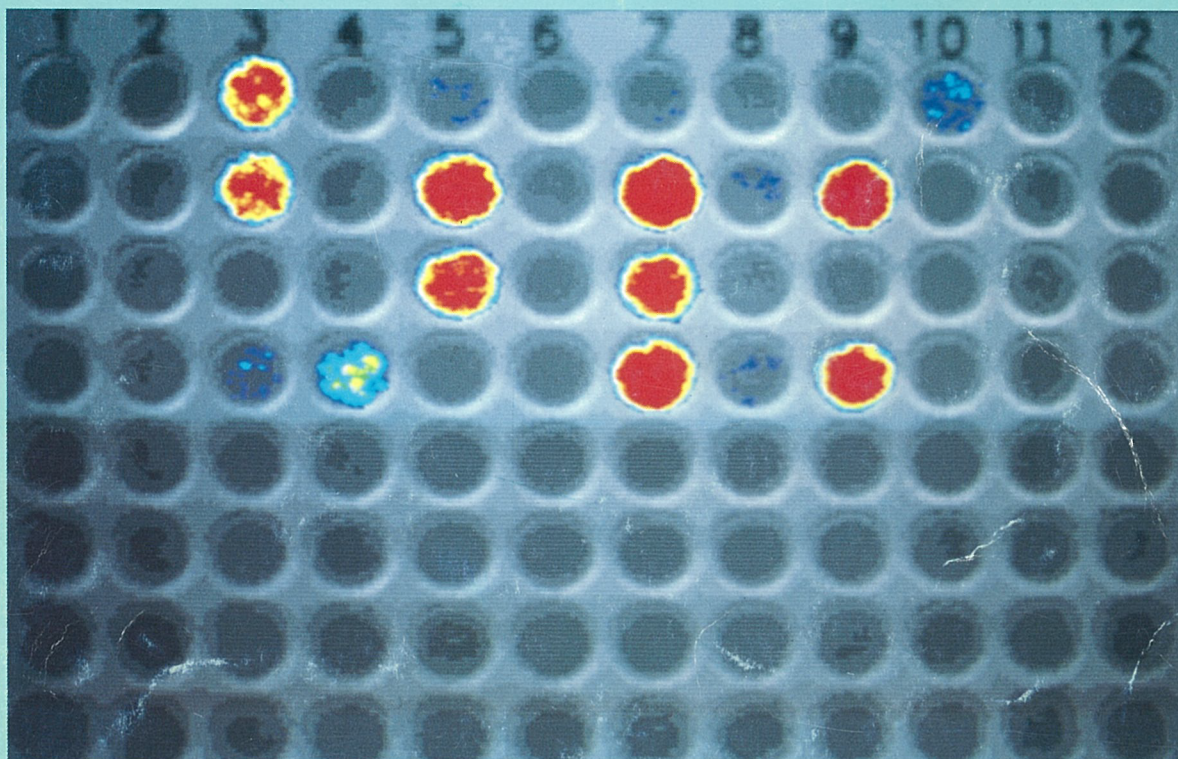
Major Histocompatibility Gene Complex

Vol.1 No.1
1994

Immune Response System

& IRS

日本組織適合性学会誌 第1巻第1号 平成6年7月7日発行



Major Histocompatibility Gene Complex and Immune Response System
Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI

Contents

日本組織適合性学会誌 第1巻第1号 平成6年7月7日発行

HLA 研究の歴史

- | | | | |
|--|----|-------|----------|
| 1. 日本におけるHLA研究の歴史 | 7 | 相沢 幹 | 学会会長 |
| 2. 第1回日本組織適合性学会大会とその開催までを回顧して ... | 11 | 柏木 登 | 北里大免疫 |
| 3. 第2回日本組織適合性学会大会のまとめ | 13 | 片桐 一 | 旭川医大第2病理 |
| 4. 第3回日本組織適合性学会大会にあたって
—本誌MHC & IRSの創刊号を祝う— | 14 | 吉田 孝人 | 浜松医大微生物 |
| 5. 第11回日本HLAワークショップ報告 | 15 | 園田 俊郎 | 鹿児島大ウイルス |

MINI REVIEW

- | | | |
|--|----|-------------------|
| 1. HLA AND MARROW Transplants from unreleated
donors | 19 | John. A. Hansen. |
| 2. Signaling via HLA class II molecules : Cell activation
and death | 21 | Dominique Charron |
| 3. 白血病と骨髄移植 | 23 | 大野 竜三 浜松医大三内 |
| 4. 血液疾患に対する遺伝子治療の基礎的研究 | 25 | 谷憲 三朗 東大医科研 |
| 5. HLA クラスII抗原のインターフェロン- γ による
発現調節機構 | 27 | 小出 幸夫 浜松医大微生物 |
| 6. Proteasomeのインターフェロン γ による調節 | 29 | 田中 啓二 徳島大酵素研究セ |
| 7. 絨毛癌由来細胞株からの核蛋白と非古典的クラスI
遺伝子上流域との特異的結合 | 31 | 古山 将康 大阪大産婦人科 |

ORIGINAL PAPER • Shot communication

1. クラスI関係

- | | | | |
|--|----|-------|-----------|
| 1. HLA-A2サブタイプの血清学的反応性 | 35 | 柏瀬 貢一 | 日赤中央血液セ |
| 2. 日本人におけるB75の血清学的検討について | 37 | 大田 智 | 長野県赤十字血液セ |
| 3. HLA 新抗原 B5103における当血液センターの
血清学的検索の足跡 | 39 | 林 律子 | 浜松赤十字血液セ |
| 4. HLA-Cw1のサブタイプ "Cw1N" を認識する
アロ抗血清について | 41 | 中島 文明 | 神奈川県赤十字血液 |
| 5. PCR-RFLP 法による HLA クラスI アロ抗原の
サブアリルタイピング | 43 | 大西 浩史 | 住友金属診断薬室 |
| 6. 肝細胞における内因性胆汁酸の主要組織適合
抗原(MHC) class I 遺伝子発現調節機構 | 45 | 平野 史倫 | 旭川医大二内 |

MHC & IRS

7. 1976年から93年までのHLA-B, DR抗原の推移	47	小河原 悟 福岡大病院腎セ
8. Modified regular dot-blot hybridization for HLA-A SSOP	49	奏 美暢 防衛医大検査部
2. クラスIIと新しい遺伝子		
1. 日本人のDR-NJ25, DR14特異性の 遺伝学的多型性とハプロタイプの解析	53	橋本 光男 県立西宮病院腎移植
2. HLA-DNA タイピングの導入と血清学的 タイピング結果との相違	55	西垣 文敬 市立札幌病院中央検
3. PCR-MPH 法による簡便な HLAclassII遺伝子のタイピング	57	前川尻真司 湧永製薬バイオ研
4. HLA 検査における血清学的タイピングと DNAタイピングの比較	59	村山 敦浩 シオノギバイオラボ
5. 日本人を対象にしたPCR-SSP 法による DQB1タイピングの試み	61	酒巻 建夫 国立佐倉病院臨床研
6. 16プローブを用いたPCR-MPH 法による簡便な DRB1 generic typing	63	宮本 正樹 日赤中央血液セ
7. Reverse dot blot 法を利用した, ヘテロ接合体からの 新たなDPB1アレル(DPB1*JYO)の直接塩基配列決定	65	兼重 俊彦 シオノギ診断医学部
8. PCR-RFLP法によるTAP遺伝子多型の解析	67	桑田 昇治 東大輸血部
3. 人類学・移植・疾患感受性・免疫応答		
〔人類学〕		
1. ブリヤット族におけるMHCハプロタイプの分布	71	田中 秀則 日赤中央血液セ
〔移植〕		
2. B細胞ラインを用いた腎移植希望登録患者の panel reactive antibody(PRA)検出法の検討	73	前島基志 国立佐倉病院臨床研
3. 非血縁間骨髄移植のためのDNAクロスマッチ “PCR-LIS-DCP”	75	丸屋 悦子 京都府赤十字血液セ
〔疾患感受性〕		
4. 成人型多発性嚢胞腎家系における HLA-DRB1, PKD-1遺伝子の解析	77	李 丹 国立循環器病セ
5. HLA-DRB1とサルコイドーシス	79	安波 礼子 大阪府立病院臨床検
〔免疫応答〕		
6. 同一DRでDRB1遺伝子が異なるMLC反応	81	能勢 義介 兵庫県赤十字血液セ
7. 細菌性スーパー抗原によって誘導されるT細胞アナジー —サイトカイン遺伝子発現に対するアナジー・スペクトラム—	83	小出 幸夫 浜松医科大学微生物

第 3 回日本組織適合性学会大会 抄録

◦ 特別講演

1. John A. Hanson: "HLA and marrow transplants from unrelated donors"87
2. Dominique Charraon: "Signaling via HLA class II molecules : Cell activation and death"87

◦ シンポジウム

1. "日本人における HLA の DNA タイピングと骨髄移植"88
 2. "HLA 抗原の発現調節機構"91
- 第11回ワークショップ報告93
- 一般演題94
- ポスターセッション110

目次の詳細は第3回学会大会プログラムをご参照ください。

ニュースレター120

日本組織適合性学会会則123

日本組織適合性学会評議員一覧126

編集後記128

HLA 研究の歴史

日本における HLA 研究の歴史

相 沢 幹*

*日本組織適合性学会長

本文は第1回日本組織適合性学会の教育講演の内容を要約し、補完したものである。

HLA (human MHC) の研究は、免疫学と遺伝学の学際領域すなわち免疫遺伝学の中に包含される。その研究は、① 各個的先導的研究と、② 国際的共同研究 (ワークショップ) による新知見の確認、の2本の柱から成り立っている。

そのような研究上の特殊性を考慮して、日本における HLA 研究の歴史を要約すると、つぎの3期を区別することが出来る。

- ① “模索の時代”(1957~74) : 日本人研究者が留学先で研究し、日本国内の研究体制の確立に努力した時代
- ② “追いつけ、追い越せ”の時代(1975~87) : 日本人研究者による、日本人の HLA 研究成果を国際ワークショップに提供して、その真価が評価されるに至った時代
- ③ “新時代、国際化社会の日本の時代”(1988~94) : 国際ワークショップを主催し、国際的レベルでの HLA 研究に貢献しつつある時代

HLA は、ヒト第6染色体短腕にマップされている遺伝子領域記号 (region designation) で、HL-A 遺伝子座名 (locus name) の発展的改称である。HLA 遺伝子複合体の構成と産物、それらの機能に関する研究は、マウスの H-2 複合体のそれと同様、移植片拒絶の生物学 (組織適合性) との関連で進展してきた。それが、「HLA は、ヒト主要組織適合性遺伝子複合体 human MHC」といわれる所以である。

HLA 研究はつぎの特徴を持つ (図1)

- ① 対立遺伝子と抗原特異性は同一記号 (番号) を使用し、整理、体系化されている。(図1)

図1 HLA と HLA 抗原

○ HLA : ヒト第6染色体短腕の遺伝子領域記号 (= 遺伝子複合体) DNA		
領域	座	対立遺伝子番号
HLA-A	24	
		抗原特異性番号
○ HLA 抗原 : HLA 遺伝子産物、細胞膜に発現された糖蛋白		

表1 日本における HLA 研究の“模索の時代” (1957~74)

1957 (S32)	Mac 抗原 (Dausset)
1964	LA (Payne)
1963	4a/4b (van Rood)
	MLR (Bain)
1964 (S39)	1 st IHWS (Amos ; Wash.)
	日本移植学会発足
1965	2 nd IHWS (van Rood ; Leiden)
1967	3 rd IHWS (Ceppellini ; Torino)
	“HL-A” (locus name)
1970 (S45)	4 th IHWS (Terasaki ; L.A.)
	汎太平洋会議 (Amos-石橋)
	日本免疫学会発足 (山村会長)
1972	5 th IHWS (Dausset ; Paris)
	1*US-JAP.Coop.Seminar
	(Amos-稲生) Santa Barbara
	日本組織適合性研究会 (村上会長)
1973	第1回研究会 (札幌 ; 相沢)
	(文) 特定研究「免疫の基礎」(相沢班)
1974	第1回日本 HLA ワークショップ (辻・森)

- ② 遺伝学的解析は、国際的共同研究 (ワークショップ) による集団遺伝学的方法を用いる。
- ③ 研究方法などを標準化し、成果は共同研究者の合意により確認され、WHO 委員会が集約、統一する。

表2 国際ワークショップの歩みと HLA 遺伝子

HLA 領 域							
クラス I 領域				クラス II 領域			
座	A (LA)	B (FOUR)	C (AJ)	D (LD)	DR (WIA)	DQ (DC, MB)	DP (SB)
HL-A 第3回 IHWS (1967)	3	3	—	—	—	—	—
第4回 IHWS (1970)	7	13	—	—	—	—	—
第5回 IHWS (1972)	16	15	—	—	—	—	—
HLA 第6回 IHWS (1975)	20	20	5	6	—	—	—
第7回 IHWS (1977)	20	31+2	6	11	7	—	—
第8回 IHWS (1980)	20	40+2	8	12	10	—	—
第9回 IHWS (1984)	23	47+2	8	19	14+2	3	6
第10回 IHWS (1987)	24	50+2	11	26	18+2	9	6

表3 日本における HLA 研究の“追いつけ、追い越せ”の時代 (1975~87)

1975 (S50)	6 th IHWC (Kis smeyer-Nielsen ; Århus)
	“HLA” (region design.)
1977	2 nd US-JAP. Seminar (Honolulu)
	7 th IHWC (Bodmer ; Oxford)
1978	日本 HLA 協会発足
1979	1 st AOHWC (Tsuji ; Hakone)
1980 (S55)	8 th IHWC (Terasaki ; L.A.)
1981	II nd AOHWC (Simond ; Melbourne)
1983	Vth ICI (Yamamura ; Kyoto)
1984	9 th IHWC (Albert-Meyer ; München-Wien)
1985 (S60)	第9回 JHWS (内藤 ; 福岡)
1986	IIIrd AOHWC (Aizawa ; Sapporo)
1987	10th IHWC (Dupont ; N.Y.)

以上のような HLA 研究の特殊性を考慮しつつ、日本における研究の歩みを、要約すると、前述の通り 3 期に区別される。その内容を簡潔に記すことにする。

摸索の時代 (1957~74) (表1)

Mac 抗原 (HLA-A2 抗原) の発見 (Dausset, 1957) にはじまる HLA 系の研究は、第1回 国際組織適合性ワークショップ IHWS (Amos 会長, 1964) 以降、組織化され今日に至っている。

日本における組織化された研究は、汎太平洋組織適合性会議 (Amos-石橋, 1970) にはじまり、ついで第1回日米科学会議 (HL-A 協力セミナー) (稻生

表4 日本における HLA ワークショップ

第1回	1974	大阪	辻 公美・森 隆
第2回	1975	福岡	大河内一雄・野本亀久雄
第3回	1976	千葉	宮島哲也
第4回	1976	大阪	森 隆・松山正経
第5回	1977	千葉	宮島哲也
第6回	1978	東京	関口 進
第7回	1980	大阪	宮島哲也
第8回	1982	東京	十字猛夫
第9回	1985	福岡	内藤説也
第10回	1990	浜松	吉田孝人・赤座達也

表5 相沢研究室で発見した新抗原

研究室記号	同類/WS番号	公認番号
Sa-1 (1974)	J-1, SN-1, SAP 1, Bw22J	Bw54 (1977)
LD-Wa (1976)	DYT	Dw15 (1984)
LD-Su (1976)	DHO	Dw12 (1980)
LD-Sh (1976)	DSh	
Hon-7 (1978)	WIA4×7, MT3	DRw53 (1984)
DR7J (1978)	8W12	DRw9 (1980)
Hok-1 (1979)	8W69	Bw59 (1980)
DQWa (1984)	DQWa	DQw4 (1987)

-Amos, サンタ・バーバラ, 1972) の開催となったが、日本の後進性に呆然とした。その折、日本人グループ (稻生, 相沢, 板倉, 松倉, 野本, 折田, 辻, 吉田) は、「今に見ておれ僕たちは、必ずや追いつき、追い越すぞ!!」と奮起を誓って解散した……と

表6 日本人、白人に特徴的なハプロタイプ

A	B	DR	DQ	日本人		白人	
				頻度*	△*	頻度	△
A24	B7	DR1	DQw1	336	146	0	-3
A24	Bw52	DR2	DQw1	781	320	0	-7
A24	Bw54	DR4	DQw4	286	82	0	0
Aw33	B44	DRw13	DQw1	101	66	2	2
A3	B35	DR1	DQw1	0	0	68	33
A3	B7	DR2	DQw1	0	0	179	92
A1	B8	DR3	DQw2	0	0	407	253
A29	B44	DR7	DQw2	0	0	154	104
A1	B57	DR7	DQw2	0	0	99	58

*1万人当り

表7 HLAの生物学的意義

A. 応用的側面

1. 移植抗原 型合わせ
2. 多型性 個人鑑別
3. 人種的特徴 人類学への応用
4. 病気との相関 病因論への貢献

B. 真の存在意義

1. 免疫応答回路における自己識別 ... 生体防御
 - I) クラスI抗原: キラーT細胞拘束分子
 - II) クラスII抗原: 免疫調節拘束分子
2. 多型性 長命、種の保存

表8 HLA研究における新時代、国際化社会の日本 (1988~)

1988 (S63)	JOC発足
1989	
1990 (H02)	第10回 JHWS (浜松; 吉田・赤座)
1991 (H03)	第36回「日組適」研究会 (京都; 佐治) 「進化と拡散」研究会から学会へ 11th IHWC (Tsuji; Yokohama)
1992 (H04)	第1回日本組織適合性学会大会 (東京; 柏木)

伝えられている (「サンタ・バーバラの誓い」)。

翌年、日本組織適合性研究会 (村上会長) が結成され、その第1回研究会 (相沢世話人) では J-1抗原 (Bw54) の報告があった (十字)。

追いつけ、追い越せの時代(1975~87)(表2, 3)

第6回 IHWS International Histocompatibility Workshop (Kissmeyer-Nielsen 会長, 1975) は、日本人研究者が、日本人の成績を提出した最初の国際ワークショップであるとともに、このWSによって、“HL-A から HLA へ”の大きな進展があったという歴史的な意義を持っている。

国内では、1973年以降、原則として年2回の研究会をもち、1974年以降、随時、日本 HLA ワークショップが開催された (表4)。MLCに関する技術的ワークショップ (笹月健彦) の開催も行われた。

さらにアジア・オセアニア圏の HLA ワークショップ(AOHWC) (実際は国際ワークショップのミニ版といえるであろう) も開催された。

この時期 (表2, 3) における日本人研究者の業績は、世界の HLA 研究者から注目されるようになった。たとえば、北大病理学 (相沢) 研究室で発見され、国際ワークショップで公認された新抗原は表5の通りであるが、同様の研究成果は、日本国内の多くの研究室で記録されている。

この時期の HLA 研究の特徴は、国際的にも、国内的にもクラスII領域の解析が進み、人種的特徴が明らかにされるとともに、各種の疾患とHLAの関連が注目を集め、さらに、HLAの生物学的意義が、組織

適合性から免疫応答の根幹に及ぶものであることが明らかにされたことであろう。(表6, 7)

第10回 IHWS (Dupont 会長, 1987, New York) の理事会は, 第11回 IHWC の日本開催を決定した。(相沢, 辻, 笹月の3世話人が選出された)。

新時代, 国際化社会の日本の時代(1988~)(表8)

日本組織適合性研究会は, 第11回国際ワークショップを成功させるために準備委員会を設置するとともに, 第10回日本 HLA ワークショップ(吉田孝人, 赤座達也世話人, 浜松, 1990) を開催, 血清学的タイピングに新たに生化学的タイピングと DNA タイピングを加えて実施し, 日本人のクラス I に14の新しい抗原を確認した。同研究会は通算36回の研究会を最後に, “日本組織適合性学会”へと脱皮した。

第11回 IHWC (辻 公美会長, 1991) は, 従来からの多くの研究課題に加え, DNA タイピング等の

新時代突入にふさわしい大きな成果をあげることが出来た。

また, 新時代にふさわしい日本組織適合性学会の学術集会は, 第1回(柏木会長), 第2回(片桐会長)を経て, 第3回(吉田会長)へと受け継がれた。また, この間, 第11回日本 HLA ワークショップ(園田俊郎世話人, 鹿児島, 1993)が, DNA タイピングをテーマとして開催された。

日本における HLA 研究の歴史を回顧するとき, 「サンタ・バーバラの誓」(1972)を果たし得た喜びをともにする多くの同僚, 友人を誇りに思う。また, 新時代を切り拓く友人, 後輩に多くを期待している。

注: 本文に関係のある文献の一部は, “HLA 研究の変遷”(HLA ハンドブック, 辻公美・編, サイエンスフォーラム社, 1987) “日本人の HLA” (吉田孝人, 赤座達也・編, 今日の移植 4 巻・別冊特集 2, 1991), および“HLA 1991” (eds Tsuji, K., Aizawa, M. & Sasazuki, T.), Oxford University Press, 1992.

第1回日本組織適合性学会大会と その開催までを回顧して

柏木 登*

*北里大学医学部免疫学

1987年に Princeton と New York で行われた10th International Histocompatibility Workshopは、HLA研究にとり大きな曲がり角であった。第1に、HLAが免疫応答の制御において中枢的な位置を占めていることが明瞭となったこと、第2に、HLAの分子生物学的研究が進展して、リガントであると同時にレセプターとしても働く2面性が解明されたこと、第3に、HLAの解析にDNAレベルの方法論が導入可能となったことなどの当時の状況がその理由である。

その Workshop を準備していた1986年頃より、日本組織適合性研究会の討議の一部に、こうしたHLA研究の多様化への変化に応じて、研究会の今後の姿を抜本的に見直すべきではないかという意見がでていた。そして、1987年春の研究会幹事会において”将来像ワークショップ”を設けることが合意され、幹事の赤座達也、秋山暢夫、柏木登、関口進、辻公美、吉田孝人の6名にその問題についての検討が委託された。

10th Workshop の Councillor Meeting は次回の Workshop を日本で開催することを決定し、その受け皿としても、日本組織適合性研究会はもう一回り大きな組織となるべき必要性が再認識された。研究会の発展的改組のモデルはアメリカにあった。アメリカでは、HLA Tray User's Meeting が American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) という学会組織に改まってから、当時すでに12年の歴史を経緯していた。この学会

は、研究の発表機関であると同時に、HLA技術者の育成活動にも力を注いでおり、International Workshopとは別の機能をもって HLA-ologyの発展に貢献していた。

1988年春の日本組織適合性研究会において、1973年の研究会発足以来15年間会長職を務めてこられた村上省三会長が引退され、相沢幹幹事が新会長に推挙された。このとき、学会組織への改組を念頭に置いた研究会再編委員会を設けることが議決され、委員に秋山暢夫、柏木登、笹月健彦、十字猛夫、関口進、辻公美、吉田孝人の各幹事が選ばれた。再編委員会は、再編後の組織のあるべき構成、運営、財政、学術集会、ワークショップ、学会誌、教育、対社会活動などについて討議を重ねるいっぽう、研究会幹事にアンケート調査を行って、これらの問題についての意見を収拾した。

1990年、11th Workshop の準備で多忙を極めていたさなか、秋の研究会における討議を通して、日本組織適合性研究会は1991年をめどに日本組織適合性学会に衣替えすべきだとの合意がなされた。そして、研究会再編委員会は名称を学会設立準備委員会に変更し、学会の会則作成の準備に入った。

1991年春に行われた研究会は日本組織適合性研究会の学術集合としては最後の集合となった。そして同時に、日本組織適合性学会が研究会総会の総意のもとで正式に発足したのである。このとき、学会の初代会長に相沢幹研究会会長が推挙され、学会事務局長には十字猛夫研究会事務局長が就任した。

学会の評議員を研究会幹事の全員で務めることが合意され、総会と学術集会をかねた日本組織適合性学会大会を年一回開くことが決められた。その第1回大会の会長には柏木登研究会幹事が指名された。

1991年は11th Workshopの年である。11月に横浜で行われたこのWorkshopは、HLA研究の時代性を反映して、討議のテーマが前回に比べますます多彩な様相を呈した。新しく発足した学会の会員全員の努力が質の高い成果をWorkshopから生み出すことに成功し、世界のHLA研究者より多くの賛辞が寄せられた。

第1回日本組織適合性学会大会は、こうした高揚したHLA研究の雰囲気のもとで、1992年の7月27日と28日の両日、東京市ヶ谷の私学会館で開催された。参加者は延べ300名を越え、活発な討論のために予定時間がしばしば引き延ばされて主催者をはらはらさせた。

11th Workshopに参加できなかった若い研究者や技術者のために、「11th IHWSのまとめ」と銘打つ報告講演が設けられた。報告は、(1) Serology, 赤座達也(2) DNA typing, 木村彰方(3) Anthropology, 脇坂明美(4) Disease, 西村泰治(5) Transplantation, 雨宮浩(6) Epitope Analysis, 徳永勝士からなり、Workshopの主要テーマがすべてカバーされてその再現の役割を果たした。

学会の活力は学会員の裾野の広がりから生まれる。その考えに基づいて、新しい知見を伝えるための教育講演が用意された。(1) 日本におけるHLA研究の歴史、相沢幹(2) HLAの構造および遺伝子、猪子英俊(3) HLAタイピングの新技法・血清タイピング、内藤説也(4) HLAタイピングの新技法・DNAタイピング、小幡文弥(5) HLAと臓器移

植、P. I. Terasaki(6) HLAと疾患、片桐一(7) 骨髄バンク設立の現況、十字猛夫(8) HLA研究の将来、笹月健彦 からの講演の編成によって、主催者はその意図を伝えようとした。

一般演題は49題が口演され、そこにみられた特徴的なことは発表者にHLA技術者がおおく算えられたことであった。クラスI関連が8題、クラスII関連が20題、人類学関連が5題、疾患関連が7題、移植関連が9題という内容構成であったが、クラスII関連の演題数が物語る通り、諸種のDNAタイピングの手法の試みが披露されて、会員の興味はその難易度、再現性、適用範囲の比較に向けられた。

総会議事としては、4月に新評議員の互選によって選ばれていた学会理事9名と監事2名が承認されることがある。理事は相沢幹、柏木登、片桐一、笹月健彦、十字猛夫、関口進、辻公美、内藤説也、吉田孝人の9名の評議員、また監事は秋山暢夫、野本亀久雄の各評議員である。また、第2回と第3回の大会会長に片桐一理事、吉田孝人理事がそれぞれ指名された。

かくして、日本組織適合性学会は第1回大会をほぼ成功裏に終了し、まずまずの滑り出しであった。しかしながら、その時点において、いくつかの事項が将来決められるべき課題として残されたままであった。第1は財政的基盤の安定化であり、第2はそれに基づく機関紙の整備である。第3回大会を迎えた現在、編集担当理事でもある吉田孝人大会長のご尽力により、この学会プロシーデングスがわが学会誌として刊行されることとなった。第1回大会とそれまでの経緯をまとめたこの拙稿が記録として残るのも、本プロシーデングスが発行されるに至ったお陰である。

第2回日本組織適合性学会大会のまとめ

片桐 一*

*旭川医科大学第2病理学

第2回日本組織適合性学会大会は、平成5年7月21日から23日の3日間、旭川市のニュー北海ホテルで開催されました。

一般演題49題の発表とともに、特別講演、シンポジウム、教育講演、イブニングレクチャーが行われ、HLAの医学、生物学における最近の進歩が発表、討議された。

特別講演は九州大学生体防御医学研究所の笹月健彦先生が「HLAによる免疫制御」という題で講演された。ここではHLA-DR、DQトランスジェニックマウスを用いた解析によりT細胞レパトリーの決定いわゆる胸腺内でのT細胞の正負の選択の様子が最新のデータと共に発表された。

教育講演として、北海道大学医学部第2生化学笹原正典先生より「主要組織的合遺伝子複合体の分子進化」、東海大学医学部分子生命科学猪子英俊先生より「HLA遺伝子領域のクローニングとその機能」という発表がそれぞれなされた。笹原先生は御自分がなされた軟骨魚類のMHC遺伝子の分離の知見を基にどの様にしてMHCが分子進化してきたのかを明快に示された。猪子先生はYACベクターを用いたクローニングの手法を用いHLA遺伝子座付近に存在すると思われる疾患感受性遺伝子の単離について将来の展望を混じえながら興味深い知見を発表された。

シンポジウムは、「抗原提示細胞のMHC結合ペプチド」というテーマで行われ、「HLA-B35抗原によるヒトマイナー組織適合抗原ペプチドの提示」東大医科研癌体質学滝口雅文先

生、「成人T細胞白血病細胞のCTL認識抗原発現」熊本大学医学部感染防御神奈木真理先生、「白樺花粉の抗原性ペプチド」旭川医大第2病理種市麻衣子先生、「HLAクラスII分子と外来ペプチドとの結合」九州大学生体防御医学研究所上川路信博先生、「ペプチドワクチン作製のための新しい方法」北大免疫科学研究所病理部門小笠原一誠先生がシンポジストとして発表した。現在MHC、HLA研究で最も注目されている分野だけに内容もフレッシュでかつ力作ぞろいで活発な質疑応答がなされた。

学会初日のイブニングレクチャーでは、「HLAタイピングの現状と将来」というテーマで京都府赤十字血液センターの佐治博夫先生が「血清学的タイピング」、九州大学生体防御医学研究所の木村彰方先生が「HLA抗原のDNAタイピング」、日赤中央血液センターの徳永勝士先生が「血清学的タイピングとDNAタイピングの比較応用」という題で最近の臓器移植の問題とからめながら最新の知見を講演した。

一般演題は、HLAクラスI、II分子とそのタイピングに関して20題、新しいHLAタイピング法、遺伝子に関して4題、単球抗原、動物のMHCに関して3題、免疫制御5題、移植関係8題、疾患感受性遺伝子9題と多岐多彩にわたりしかも充実した内容の発表であった。

ラベンダーの咲き乱れる短い道北の夏に、アカディズムとロマンティズムを満喫された3日間であった。

第 3 回日本組織適合性学会大会にあたって

——MHC & IRS の創刊を祝う——

吉 田 孝 人*

* 第 3 回日本組織適合性学会大会長
浜松医科大学微生物学

20年余の歴史ある研究会のあとに発足した日本組織適合性学会の第 3 回を日本の中心の地遠州浜松でお世話し、学会誌(MHC & IRS)第 1 巻第 1 号, JSHI ニュースレター VOL.1, NO. 1 を編集する機会が与えられましたことは大変に光栄であります(相沢 幹: 刊行によせて, JSHI ニュースレター 1 (1), 1994)。

会員のみなさまのオリジナリティと成果を大切にする意味で、理事会、編集委員会では、まず毎年集録する公的な刊行物をつくり、個人と学会としての活動を記録したいと願ってきました。今回は最初でもあり、資金の都合もありまして、学会に発表する内容を原著形式 2 頁にまとめたものを original paper (sheet communication: 短報) といたしました。特別講演、シンポジウムの原稿は内容的に総説でありますので、不完全かもしれませんが、mini review として集録させていただきました。

過去の日本における HLA 研究の活動状況は、“HLA 研究の歴史”として相沢 幹会長、柏木 登第 1 回大会長、片桐 一第 2 回大会長にまとめていただき、第 11 回日本 HLA ワークショップを園田俊郎世話人代表に追加していただいた次第でございます。従来であれば、この内容は編集後記に当るものかもしれませんが、歴史の 1 頁に付け加えさせていただくことにします。

この創刊号は学会誌としての体裁を整えています

んが、いままでの抄録集(非公式)と今後続刊されていく整った学会誌(公式)の過渡期のものとしてお認めいただけましたら幸甚でございます。

生命現象の中で一つの要として重要な遺伝子群 MHC, そしてその産物の重要性は免疫応答機構の関連はもとより生物学, 医学, 医療の中で日増に増大してきております。骨髄移植のドナーの数が激増していることは、一般の人々の意識が向上したことを意味する一方、その必要性、有用性を求める人々が増えていることを証明していると考えます。

末ながくこの学会が発展し、国内ネットワークとともに国際的ネットワークが広がることを願い、Prof.D.Charron (12th IHWC 世話人代表)と Prof. J.Hansen (骨髄移植のメッカ Univ. of Washington)に特別講演をしていただきます。同時に、二つのシンポジウム“日本人における HLA の DNA タイピングと骨髄移植”“HLA 抗原の発現調節機構”を企画しました。また本学会誌の表紙を MHC & IRS としてみなさまの研究内容が研究室から医療へ、日本から世界へ、またその逆と直結することを願っています。

MHC 研究の環を広く各分野へ広げ、この雑誌を国際的に育てていきたいと思ひます。

編集に当り 相沢会長をはじめ編集委員の先生がた、日本医学館菊澤俊明氏、小出大会幹事、および協力者の皆さまに心から深謝します。

第11回日本HLAワークショップ報告

園田俊郎*

*鹿児島大学医学部ウイルス学

第11回日本HLAワークショップは血清学的タイピングとDNAタイピングとの統合をめざし、既存の日本人パネルセルを用いてHLA-クラスI, II DNAタイピング法の実用性を以下の項目で検討した。本ワークショップには40施設から260名が参加し、日本人のパネルセル1764を用いて、クラスI, II DNAタイピング法の特異性、操作性、迅速性、経済性ならびにアリル特異的抗血清の有無を検討した。その結果、クラスI DNAタイピングではHLA-Bアリルに加えて、HLA-Aアリルの同定が可能となった。クラスII タイピングでは1216パネルのHLA-DR, DQ, DPのアリルが同定された。抗血清との対応ではアリル特異的血清は見いだせなかった。以上のDNAタイピングでアリルまで確定されたパネルセルによって、日本人のHLA遺伝子頻度と5座位のハプロタイプを解析し、DPとの連鎖の多様性を明らかにした。これによって、腎臓、骨髓移植のドナー選択にあたってのDNAタイピングの重要性が確認された。

HLAワークショップ検討項目

I. クラスII DNAタイピングの実用性と問題点

- ①PCR-RFLP法 ②PCR-SSCP法 ③TMA-HPA法
- ④PCR-MPH法 ⑤PCR-SSO法 ⑥PCR-SSOP法
- ⑦PCR-SSP法 ⑧PCR-SSPA法

II. クラスI DNAタイピングの実用性と問題点

PCR-SSOP法によるHLA-A遺伝子のDNAタイピングの検討

III. HLA-DNAシーケンスの解析

1. クラスI DNAシーケンスの解析

A2, A11, A26, A31, A33, B60, B61, B62,
B5CREG, B39, B44

2. 血清学的タイピング抗原とクラスIIアリルとの対応

DR4. 1, DR4. 2
DR8. 1, DR8. 2
DR13, NJ25
DR14 関連抗原

IV. 日本人のHLA遺伝子頻度とハプロタイプ頻度の解析

MINI REVIEW

HLA and marrow transplants from unrelated donors

John A. Hansen, Effie Petersdorf, Paul J. Martin, and Claudio Anasetti*

*Immunogenetics Program, Division of Clinical Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA

HLA plays a critical role in marrow allografting impacting significantly on the risk of graft rejection, the incidence and severity of acute graft-versus-host disease (GVHD), the prevalence of chronic GVHD and the probability of finding adequately matched unrelated donors. In Seattle alternate donor transplants are currently considered according to diagnosis, age of the patient and the degree of HLA mismatching.

MARROW TRANSPLANTATION, UNRELATED DONOR, HLA MATCHING

GVHD is increased in unrelated donor (URD) transplants despite matching for HLA by standard methods. The risk of GVHD, and also graft failure, varies with conditioning regimen and method of GVHD prophylaxis, however there is no proven superior approach for preventing these complications. Nevertheless, it can be shown that matching for HLA is an essential requirement for optimizing disease-free survival. Unfortunately, the need for HLA matching significantly limits access to this potentially life saving therapy. Less than 30% of patients have an HLA identical sibling and only a few will find a sufficiently matched alternate donor within their family. The requirements for selecting URDs are not precisely defined. We have attempted to standardize matching for URD transplants by requiring identity for HLA-A, B & DRB1 for patients ≤ 55 , however patients <36 years old are also eligible for a one locus A, B or DR *minor mismatched* transplant.

The chance of finding an HLA matched URD has dramatically improved with the advent of large registries containing HLA phenotypes of volunteers willing to donate bone marrow. The U.S. National Marrow Donor Program (NMDP) consists of a National Coordinating Center located in Minneapolis, Minnesota and a network of 105 donor centers and 76 transplant centers, including 3 donor centers and 13 transplant centers located in countries other than the U.S. The NMDP registries contain HLA-A and B phenotypes for more than 1.2 million

donors, and HLA-A, B and DR phenotypes for more than 280,000 donors.

Currently 55% of new patients requesting an unrelated donor transplant through our center will identify at least one HLA-A,B,DR identical match during their initial search of the National Marrow Donor Program (NMDP) registry, 30% will identify at least one donor matched for DR, but incompatible for an A or B *minor mismatch*, and 15% will identify at least one A,B match. Patients in the latter group have requested DR serotyping from an average of 35.5 A,B matched donors within 9 to 12 months, yielding a 2.2% probability of DR matching per donor typed. Subsequent DNA typing of A,B,DR matched donors results in identity for DRB1 alleles in 40% of patients if one donor is typed, 65% if 2 donors, and 95% if 5 donors are typed. Overall, marrow transplants are scheduled for 36% of patients within 9 to 12 months from initiating a search.

Our standard URD transplant protocol for patients with a hematological malignancy includes fractionated total body irradiation (1200 cGy in 6 daily doses, or 1320 to 1440 cGy over 4 days), unmodified marrow (non-T cell-depleted) and methotrexate plus cyclosporine for GVHD prophylaxis. Graft failure or rejection has occurred in 1.6% of HLA-A, B, DRB1 identical (n=187) and 2.5% of one antigen *minor mismatched* transplants (n=80). We have retrospectively completed DRB

and DQB allele typing in 370 URD transplants, and risk of GVHD was analyzed for HLA-A, B, DRB1, DQB1 identical and one locus *minor mismatched* transplants. Matching characteristics were: HLA-A, B, DRB1, DQB1 identical, N= 266; minor mismatched for HLA-A, N= 24; minor mismatched for HLA-B, N= 18; alleles mismatched for DRB1, N= 33; allele mismatch for DQB1, N= 31; allele mismatch for DRB1+DQB1, N= 25. Probability of clinically significant grades II-IV acute GVHD was 81% for HLA matched, 91% for A-locus minor mismatches, 82% for B-locus minor mismatches, 94% for DRB1 mismatches and 100% for DQB1 mismatches. Probability of clinically severe grades III-IV acute GVHD were 40% for HLA-matched, 62% for A-locus minor mismatches, 51% for B-locus minor mismatches, 62% for DRB1 mismatches, 52% for DQB1 mismatches, and 69% for DRB1+DQB1 mismatches.

We have analyzed the utility of MLC testing in donor selection in both haploidentical HLA partially matched transplants and in URD transplants. MLC responses of the donor to the patient (the "GVHD vector") did not correlate with risk or severity of GVHD. Given the precision of allele matching for DRB and DQ currently available, we have abandoned the use of the MLC for donor selection: IEF testing for HLA-A and B variants has been performed in 173 patients and 337 URD matched for HLA-A, B and DR. Forty-one IEF-defined variants were detected among 36 of the 337 (11%) patient-URD pairs studied. IEF variants were found more frequently for certain antigens: A29 (33%), A33 (30%), B27 (18%), B44 (16%), B18 (14%), A30 (17%) and A2 (5%). The number of IEF mismatched transplants identified is too low to

determine risk of GVHD. Little information about matching for HLA-C is available, and standard methods for C-locus typing have been limited by the relatively high frequency of apparent "blanks." We have retrospectively analyzed HLA-C alleles by PCR-based direct sequencing in 112 individuals representing 56 HLA-A, B, DRB1 and DQB1 identical patient-URD pairs. Twelve C-locus alleles were identified, and 16% of the samples were homozygous for the same C-locus allele. The number of patient-URD pairs mismatched for HLA-C was 12%, a relatively low number presumably reflecting the high degree of positive linkage disequilibrium that occurs between the HLA-A, B, C, DR and DQ loci of relatively common haplotypes.

Probability of survival for 179 patients with CML in chronic phase transplanted from 1985 through October 1993 was 55% (follow-up, 0.5 to 5.5, median 2.5 years), and the probability of sustained cytogenetic relapse was 7%. Probability of survival was 45% for 17 CML patients transplanted in 2nd chronic phase, 42% for 71 patients transplanted in accelerated phase, and 6% for 35 patients transplanted in blast phase. Although these are encouraging results, the timeliness and success of the URD search process especially for racial minorities and prevention of GVHD continue to be major issues.

Signaling via HLA class II molecules : Cell activation and death

Dominique Charron*

*Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Institut Biomedical des Cordeliers,
Paris, France. Université Paris VI/INSERM U396

In addition to their antigen presenting function HLA molecules have been shown to transduce signals in resting and activated B cells. Two different signalling pathways which lead to opposite effector functions were observed. Both cell activation /differentiation and cell death can be induced through HLA class II. The rôle of HLA class II engagement in normal and auto immune response is discussed.

HLA - Signaling - PKC - Cell Death.

HLA class II molecules are constitutively expressed on B lymphocytes and on monocytes and T lymphocytes after activation. In addition to their central role as restricting elements in antigen presentation HLA class II molecules have been shown to transduce signals particularly in resting B cells. A number of second messengers have been identified including calcium, phospholipase C, tyrosine kinase and PKC. Interestingly treatment of human B cells and B cells lines with anti HLA class II monoclonal antibody provokes an increase in cytosolic PKC activity as a result of transcriptional regulation of the PKC similarly to anti μ , SAC and TSST1 treatment. However while anti class

II stimulation results in increased transcription of 3 PKC isoforms (α , β and δ) anti μ and SAC down regulate the β and δ isoforms. PKC isoforms can thus be differentially regulated in B cell activation. One of the dramatic consequences of HLA class II signaling is rapid homotypic aggregation of the cells. This phenomenon is dose and time dependent as well as temperature and energy dependent. However mRNA and protein synthesis are not required. A TPK pathway precedes PKC activation and an LFA-1/ICAM-1 interaction is implicated. IL4 failed to support HLA class II mediated B cell proliferation in the presence of anti LFA-1 or in LFA-1 deficient B cells suggesting that

HLA class II mediated aggregation is a relevant step in subsequent B lymphocyte activation and proliferation. In contrast to resting B cells, in activated cells HLA class II signaling is able to induce cell death as determined by morphology, DNA fragmentation and inhibition by ATA (aurintricarboxylic acid) an endonuclease inhibitor.

Rapid cell death of activated lymphocytes induced by either monoclonal antibodies or by cross-linked bacterial superantigens, was detected by propidium iodide uptake. Cytoskeletal integrity, serine/threonine phosphatase activity were required for optimal

cell death. However, tyrosine kinases, PKC and a calcium flux were not necessary for HLA class II mediated cell death. Electron microscopy studies reveal nucleolar swelling and nuclear shrinkage but not chromatin condensation characteristic of apoptosis.

On the basis of these data, we propose that HLA class II mediated death may be a mechanism to prevent autoimmune disease, and may undermine the immune response in bacterial superantigen pathologies.

Therefore HLA class II signaling can lead to opposite effects which take place in the development or the termination of the immune response.

白血病と骨髄移植

大 野 竜 三*

*浜松医科大学第三内科

要旨：近年の化学療法と骨髄移植療法の進歩により、白血病は治癒可能な疾患となってきた。骨髄移植療法は現時点での最強の抗白血病療法であるが、graft-versus-host disease (GVHD)のコントロールが最大の課題である一方、GVHDには明らかにgraft-versus-leukemia 効果を示している。

再発した白血病の予後は絶対不良であり、骨髄移植療法が絶対適応となる。慢性骨髄性白血病も骨髄移植が絶対適応と見なされているが、最近、インターフェロンでPh¹ 染色体が消失する症例長期生存率は骨髄移植例より良好であると報告されており、このような症例での選択が問題になりつつある。

小児・45歳未満成人急性骨髄性白血病や成人急性リンパ性白血病では、強力な化学療法で治療される患者については、再発までは化学療法を施行し、再発したら骨髄移植を施行するというのがコンセンサスとなりつつある。ただし、化学療法の予後因子不良例では骨髄移植の方がよいと思われる。

key words : bone marrow transplantation, leukemia, chemotherapy

はじめに

近年の化学療法と骨髄移植療法の進歩により、白血病は治癒可能な疾患となってきた。治癒を得るためには、Skipper らの実験白血病におけるtotal cell killの治療理念、すなわち、マウス白血病では白血病細胞を1個残らず殺してゼロにしない限り治癒が得られないという実験結果に基づいて、白血病細胞をゼロにするまで徹底的に治療する必要がある。事実、これまでの白血病治療の歴史は、この治療理念が正しいことを教えている。

白血病の化学療法は完全寛解導入療法と寛解後療法の二相に分けて行う。急性白血病では完全寛解を得ない限り治癒は得られない。完全寛解になっても患者体内には 10^{10} 程度の白血病細胞が存在しているので、治癒を得るためには、強力な寛解後療法が必須であるが、骨髄移植療法は最強の寛解後療法である。骨髄移植療法は現時点での最強の抗白血病療法であるものの、患者体内に多量の白血病が残存する場合の長期生存率はせいぜい10～15%であることより、通常骨髄移植療法は化学療法により完全寛解となった時点で実行されている。

再生不良性貧血における骨髄移植療法

重症再生不良性貧血における同種骨髄移植療法の長期生存率は70%以上に達しており、同種骨髄移植そのものは安全かつ高い有効性をもって施行できるようになった。好成績の最大の理由は、cyclosporine Aを始めとする免

疫抑制療法によりgraft-versus-host disease (GVHD)のコントロールが可能となったことによる。

一方、白血病における同種骨髄移植療法においては、①残存白血病細胞を殺すために全身放射線照射に代表される致死量の前治療が必要であること、②にもかかわらず白血病再発が必発する、③白血病再発は免疫抑制療法の強度と正比例することにより、免疫抑制療法の進歩は必ずしも治療成績の向上につながらないこと等により、再生不良性貧血におけるように、全ての白血病に絶対適応となる治療法とは言えない現状にある。

同種骨髄移植とgraft-versus-leukemia (GVL) 効果

白血病においては、骨髄移植療法としては理想的と考えられる一卵性双生児間の同系移植の成績は、同種移植の成績よりも有意に悪く、GVHDをおこす同じ機序でGVL効果がおこっていることが示されている。

GVHDは骨髄移植に特有な医原病であり、通常4段階に分けられる。Ⅲ～Ⅳ度は重症で、これを発症した患者のほとんどは早晩GVHD関連死する。しかし、Ⅰ～Ⅱ度は免疫抑制療法によりコントロール可能であり、軽症GVHDを持つ患者の予後は、GVHDを発症しない患者の予後よりも良好であり、GVL 効果によることが確実である。ただし、上記③で述べたように、免疫抑制療法が効き過ぎると再発の危険性が増大する。しかし、興味あることに、再発初期に免疫抑制剤を切って、GVHDを発症させる

と白血病の進展を抑えることができる。

白血病における化学療法か骨髄移植療法かの選択

1) 化学療法の治療成績が不良な白血病

再発した白血病の予後は絶対不良であり、骨髄移植療法が絶対適応となる。再発早期か第二回寛解期に施行すれば、30~40%の長期生存が期待できる。

慢性骨髄性白血病の化学療法の成績もここ20年来ほとんど進歩が見られず、骨髄移植が絶対適応と見なされている。しかし、最近、インターフェロンの有効性が報告され、約75%に血液学的完全寛解が得られ、60~70%にPh⁺染色体の減少が認められる。この内、Ph⁺染色体が消失する症例の8年生存率は約80%、65~95%減少例は約60%であると報告されている。インターフェロン療法の後に関しては、さらに観察が必要であるが、インターフェロンないしは化学療法との併用療法を先行させ、Ph⁺染色体の減少が見られない時には、骨髄移植を施行するというような治療順序となる可能性も出てこよう。

2) 化学療法の治療成績が良好な白血病

最近の化学療法の進歩により、小児急性リンパ性白血病(ALL)では95%以上が完全寛解となり、その70%以上が長期生存するため、初回寛解期には骨髄移植は行われない。一方、小児急性骨髄性白血病(AML)や40歳以下成人AML・ALLでは80%以上が完全寛解となり、その約40%が長期生存しているので、これら症例で初回寛解期から骨髄移植を行うべきか否かは、現在もっとも議論のある所である。数百例におよぶ国際骨髄移植登録症例の成績は、AMLの初回寛解期の同種骨髄移植療法の長期生存率は約50%、成人ALLの初回寛解期の同種骨髄移植療法の長期生存率は約40%である。

初回寛解期で化学療法か骨髄移植のどちらかを選択するかを正しく評価するためには、大規模なprospective無作為比較試験が必要である。AMLでは米国のEastern Cooperative Oncology Group (40歳未満成人)、米国のChildrens Cancer Study Group、英国のMedical Research Council (~55歳)において多数例によるランダム化試験が行われたが、骨髄移植施行群と化学療法施行群を単純比較すると、前者の成績が優れているが、早期再発等で移植が出来なかった症例を除外することなしに、HLA一致ドナーの有無で比較すると、その成績にはほとんど差がないことが報告されている。統計学的には、後者のような比較がより客観的な評価法である。40歳未満成人ALLではフランスのグループが同様な成績を報告して

いるが、染色体、年齢、初診時白血球等の予後因子不良群では、骨髄移植群が優れている。

一方、国際骨髄移植登録例とドイツの化学療法成績とのmatched-pair比較成績は、成人AMLでは骨髄移植療法の成績が優れ、成人ALLでは同じである。

したがって、小児AML、45歳未満成人AML、ALLでは、現時点では、再発までは強力な化学療法を施行し、再発したら骨髄移植を施行するというのがコンセンサスとなりつつある。ただし、最初から化学療法のみでは予後不良が予測される症例については、骨髄移植療法を初回寛解期より施行するのがよからう。しかし、多数例での解析では、化学療法の予後因子と骨髄移植療法の予後因子は一致しており、そのような症例の予後は骨髄移植例においても結局は不良であることを知っておくべきである。

年齢別の骨髄移植療法の成績

骨髄移植療法の成績は年齢が若いほど良好であり、少数例の報告を解釈する時に注意を要する。化学療法の成績も全く同様で、小児ALLと成人ALLとの成績の違いは年齢が最大の要因である。

非血縁者ドナーからの同種骨髄移植療法

骨髄移植推進財団のドナー登録数が4万人を越えたことは大変喜ばしい。日本人の場合7万人のドナープールがあれば、少なくとも一人のドナーが見つかる計算なので、今一步という所である。欧米では15万人が必要とされるので、日本人がよりhomogeneousな国民であることが判る。事実、日本人での同胞間同種骨髄移植でのGVHD発症の頻度と重症度は欧米のそれらよりも低い。非血縁者間骨髄移植の最大の問題はGVHDであり、欧米での発症頻度と重症度は予想どおりに高率であり、GVHD関連死も高いが、我が国では欧米よりは低いことが期待される。

重症再生不良性貧血や化学療法不応性白血病には絶対適応となろうが、インターフェロン反応性の慢性骨髄性白血病での適応は今後もっとも議論のある所となろう。

おわりに

我が国における骨髄移植施行症例も3000例を越えたがどのような症例に骨髄移植を優先すべきか決める科学的臨床研究は皆無に近い。非血縁者間移植のGVHDは欧米でのそれよりも頻度も重症度も低い可能性が十分あるので非血縁者間移植も含め、大規模なprospective無作為比較試験において、これらを明らかにする必要がある。

血液疾患に対する遺伝子治療の基礎的研究

谷 憲三郎・日比野 仁・中崎有恒・林 焯唐・高橋圭介
長山人三・高橋 聡・齋藤 泉・浅野茂隆*

東京大学医科学研究所内科

要旨：血液細胞への効率良い遺伝子導入法としては、レトロウイルスベクターならびにアデノウイルスベクターが挙げられる。われわれは先ずレトロウイルスベクターを用い、FACSソーターにて濃縮したマウス骨髓幹細胞への比較的長期的な遺伝子導入を行うことができた。つぎにアデノウイルスベクターを用い、各種白血病細胞やマーマセット骨髓細胞に対して短期的に高い効率での遺伝子導入が可能であることも明らかにした。従ってこれら2つのベクター系を用途に応じて使いわけることで血液疾患への遺伝子治療法開発も可能となると考えられた。さらに、われわれはヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子導入線維芽細胞を用いたサイトカイン補充遺伝子治療法の開発基礎研究も行っており、臨床応用への可能性を検討中である。

Key words: Retroviral vector, Adenoviral vector, Hematopoietic cells

(はじめに)

哺乳動物細胞に対する遺伝子導入技術の進歩に伴い、遺伝子治療法の臨床的展開が具体化してきている。現在の治療対象疾患としては固形癌、エイズや致死的な先天性疾患などに限られているが、病因遺伝子の解析がすすむにつれ、今後対象疾患の種類は増加していくものと考えられる。われわれは従来より骨髓移植療法を中心とした治療法により、血液疾患患者に対する治療を行ってきたが、現行のアプローチでは克服し難い疾患群も多く新しい治療手技の導入が望まれている。われわれはこのような観点から、血液疾患治療に対して遺伝子治療技術を用いたアプローチを将来的に行っていく方向性で、いくつかの基礎的検討をこれ迄行ってきたので以下報告する。

(材 料)

血液細胞への遺伝子導入は、レトロウイルスベクター(MIT.Mulligan教授より供与)、ならびにアデノウイルスベクターを用いた、従来の遺伝子導入プロトコルに従った。導入する遺伝子としてはヒトピルビン酸キナーゼ(PK)cDNA、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子(LacZ)を用い、対象細胞としてはマウス骨髓細胞、マウスならびにヒト白血病細胞、カモンマーマセットモンキー骨髓細胞

を用いた。

(方 法)

(1)マウス骨髓細胞への遺伝子導入は、マウス骨髓細胞からFACSソーターにて幹細胞分画を分離、濃縮後(筑波大学・中内教授との共同研究)ヒト型PKレトロウイルスベクターを用いIL-3, IL-6存在下で行い、予め放射線照射をしたマウス尾静脈中へ移植した。骨髓移植後、造血臓器中のヒト型PKの発現検討を経時的に行った。

(2)カモンマーマセットモンキー(実験中央動物研究所との共同研究)より骨髓細胞を採取し、レトロウイルスならびにアデノウイルスベクターを用い、種々のサイトカインの存在下、LacZ遺伝子の導入を行った。導入遺伝子の発現はX-galを基質として、ガラススライド標本上で青色化した細胞数を計数することで観察を行った。

(3)遺伝子導入線維芽細胞を用いたサイトカイン補充療法の検討の為に、BMG-Neoプラスミドベクター(烏山博士より供与)中にヒトG-CSFもしくはヒトIFN- α cDNAを挿入し、NIH/3T3細胞中へ遺伝子導入を行った。加えてG-CSF遺伝子導入細胞にはヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)遺伝子をプラスミド又はレトロウイルスベクターを介して導入し、ガンシクロビル(GCV)のin vitro処理による

G-CSF発現制御を試みた。これらの細胞をマウスへ皮下へ移植し、in vivoでの検討をGCVを用いて行った。

(結 果)

(1)FACSにて精製を行った濃縮骨髓幹細胞分画へのPK遺伝子導入により、マウス造血細胞中で少なくとも135日間は導入遺伝子の発現をRT-PCR法の検出レベルでみとめた。

(2)マーモセット骨髓細胞へのレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入は、CFU-GMレベルで産生細胞との共培養感染系にて4~26%、ウイルス上清液による感染系では5%以下であった。しかし後者においてストローマ細胞存在下の感染で導入効率の上昇をみた。尚、現在リポソーム系を用いて、ヒトならびにマーモセットCD34⁺細胞への導入効率を併せて検討中である。

(3)線維芽細胞中への遺伝子導入によりサイトカインの生体内への補充が可能であり、同種マウスにおいても拡散チャンバー系を用いて同様の方法の利用が可能であることが示された。また、ある程度の発現の制御がガンシクロビル投与でin vitroならびにin vivoで可能であることが判明した。

(考 察)

血液幹細胞への遺伝子導入は、長期的に多系統細胞での発現が必要な物質を対象とした場合にとくに重要となってくる。今回は導入遺伝子としては、ヒトPK遺伝子ならびにLacZ遺伝子を対象として検討を行った。われわれの系ではPK遺伝子導入に関して用いたレトロウイルスベクターは内在性SV40初期プロモーターを用いていた為、細胞分裂後に発現の抑制がおり、より長期的な発現が得られなかったものと考えられた。さらに、PK異常症では今後赤芽球系細胞での特異的発現方法の開発が必要となるものと考えられる。一般的に現在のところ世界的レベルを含め、まだ骨髓細胞中での導入遺伝子の長期間にわたる発現維持に関して十分な結果は得られていないが、今後の各種サイトカ

インや接着分子の応用、さらには幹細胞分画の高効率での濃縮技術の向上により次第に成績は向上してくるものと期待される。次に遺伝子治療に用いるベクター系開発に用いる前臨床試験モデルとしてのマーモセットモンキーの有用性については、今後in vivoでの結果をさらに検討していく必要があるが、その扱いやすさから期待がもたれている。最後に線維芽細胞を用いたサイトカイン補充療法の開発は、簡便性のみならず医療費削減という経済的要求性から考える場合に特に重要であると考えられ、われわれは発現コントロール法の開発を中心とした実用化にむけての検討を今後も行っていく予定である。

(文 献)

- 1)Tani, K., et al.: Implantation of fibroblasts trnsfected with human granulocyte colony-stimulating factor cDNA into as a model of cytokine-supplement gene therapy. Blood 74: 1274, 1989.
- 2)Ogura, H. et al.: Implantation of gene genetically manipulated fibroblasts into mice as antitumor alpha-interferon therapy. Cancer Res 50: 5102, 1990.
- 3)Tani, K., et al.: Bone marrow recostitution using FACS-sorted mouse hematopoietic stem cells retrovirally transfected with human pyruvate kinase cDNA. Blood 83: 2305, 1994.
- 4)Lin, T., et al.: Transduction of bacterial beta-galactosidase gene into hematopoietic cells using adenovirus and retrovirus vectors. (in press)
- 5)Aoki, Y., et al.: Regulation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor production using herpes simplex virus 1 thymidine gne. Biochem Biophys Res Commun (in press)

HLA クラスII抗原の インターフェロン- γ による発現調節機構

小出幸夫・龍 慶子・根津延和・吉田孝人*

*浜松医科大学微生物学

要旨：我々はインターフェロン(IFN)- γ によるHLA-DR抗原の発現が転写レベルで制御されており、これには新たな蛋白合成が必要でないことを認めた。そこで、このDR抗原の発現に関与するシグナル伝達機構を研究した。IFN- γ はそのレセプターに結合するとこれに会合しているチロシンキナーゼ、恐らくJAK1、2、を活性化し、その後IP₃の産生とCキナーゼの活性化を惹起することが判明した。IP₃による細胞内Ca²⁺濃度の上昇とCキナーゼの活性化がIFN- γ によるHLA-DR抗原の発現に必須であると考えられる。

key words : HLA-DR, signal transduction, IFN- γ

はじめに

HLAクラスII抗原はそのペプチド結合溝に免疫原性ペプチドを結合し、CD4陽性T細胞に抗原の提示を行なうことが知られている。このようなT細胞-HLAクラスII抗原の相互作用は胸腺中においては分化段階にあるT細胞のpositive selection及びnegative selectionに関与し、末梢では成熟ヘルパーT細胞の活性化に関与する。T細胞によるこのような抗原認識はクラスII抗原の多型性のみならず、クラスII抗原の細胞表面への発現量によっても影響を受ける。自己免疫疾患に認められる異所性のクラスII抗原の発現はその良い例である。そこで我々は、IFN- γ によるクラスII抗原の発現に関与するシグナル伝達機構をグリオーマ細胞株T98Gを用いて検討した。

材料と方法

細胞：ヒト・グリオーマ細胞株T98Gを用いた。

免疫蛍光法：DR抗原の発現はこれに対する単クローン抗体HU-20（北大・脇坂博士より供与）を用いEPICS Profileで行なった。

Cキナーゼ活性の測定：AmershamのCキナーゼ活性測定キットを用い、100,000xgにて分離した膜分画、細胞質分画の活性を測定した。

免疫プロテイング：抗ホスホチロシン抗体を用いて、常法どうり行なった。

細胞内Ca²⁺濃度の測定：Fura-2を用いて、Arugus-100/CA（浜松ホトニクス）で測定した。

RNAプロテイング：HLA-DRA、-DRB、-DPA、-DPBプローブ（東海大・猪子博士より供与）を用いて、常法どうり行なった。

IP₃の測定：Amershamのキットを用いた。

結果と考察

1) IFN- γ によるHLA-DR遺伝子発現に対するcycloheximide(CHX)及びactinomycin D(Act D)の影響：T98G細胞をCHX(5 μ g/ml)で1時間前処置し、その後IFN- γ (10³U/ml)で16時間刺激し、RNAプロットを行なったところ、DRA、DRB、DPA、DPBmRNA発現に影響を与えず、この系に新たな蛋白合成は必要でないことが分かった。また、RNAポリメラーゼIIの阻害剤Act D(5 μ g/ml)をIFN- γ 刺激16時間後に添加、そのまま8時間培養したところ、DRA、DRB、DPA、DPBmRNA量は抑制され16時間刺激のものと同等であった。このことは、IFN- γ によるクラスII遺伝子発現は転写レベルで調節されていることを示唆する。

2) Cキナーゼの関与：IFN- γ によるHLA-DR抗原の発現はH7によって阻害される。このことより、Cキナーゼの関与が示唆される。そこで、PMA(100 μ g/ml)でT98Gを37°C、96時間処理し、Cキナーゼを枯渇させてから、IFN- γ によるHLA-DR抗原の発現を検討したところ、未処置群に比し低下していた。更に、Cキナーゼの局在を検討したところ、IFN- γ 刺激2分後に細胞質から膜分画へ移行していることが判明した。このこ

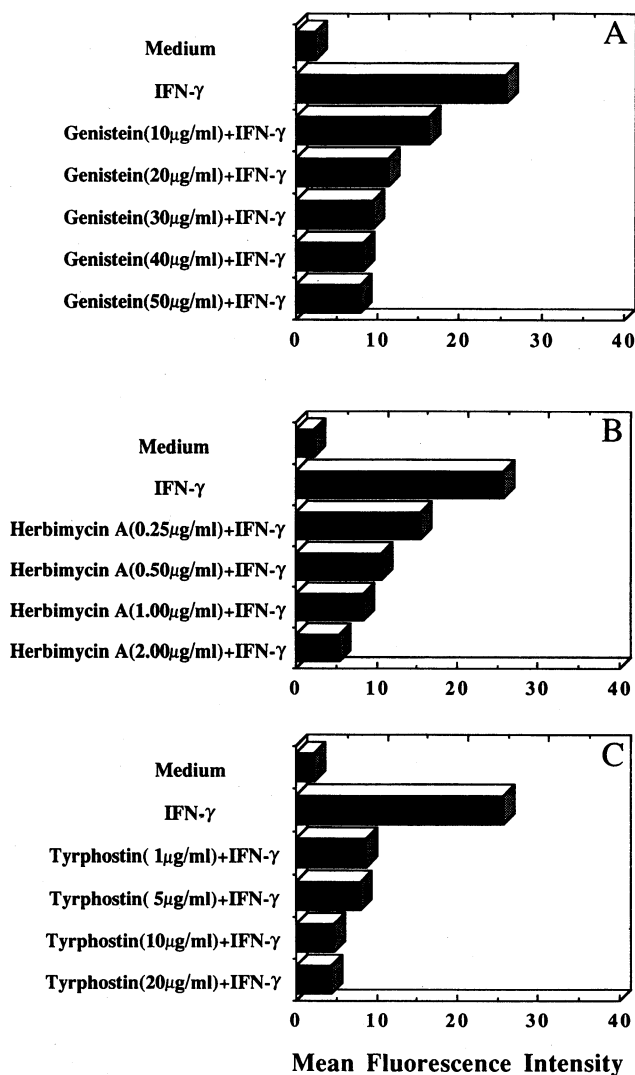


FIGURE 1. Effects of different concentrations of TPK inhibitors on the IFN- γ -induced DR molecule expressions on T98G cells. Cells were pretreated for 1 h with genistein (A), for 16 h with herbimycin A (B), and for 12 h with tyrphostin (C) before the addition of IFN- γ (1000 U/ml). After 1-h incubation with IFN- γ , cells were washed and further cultured for 24 h. DR molecule expressions were analyzed by flow cytometry with EPICS Profile. Mean fluorescence intensity was determined by flow cytometry analysis as described in *Materials and Methods*.

とは、IFN- γ がCキナーゼを活性化していることを示す。また、Cキナーゼの活性化には、PIP₂からのジアシルグリセロールの産生が必要であるが、その時同時に産生されるIP₃の量を測定したところ、IFN- γ 刺激後3分以内に一過性に増加した。HLA-DR抗原はPMA+A23187で誘導できた。これらの全ての事実はIFN- γ によるHLA-DR抗原の発現にCキナーゼが関与していることを示す。

3)細胞内Ca²⁺濃度の上昇の関与：IFN- γ によりIP₃産生が誘導されたことはHLA-DR抗原発現に細胞内Ca²⁺濃度の上昇が関与する可能性を示唆する。そこで、Fura-2を用いて細胞内Ca²⁺濃度を測定したところ、IFN- γ 刺激直後に一過性の上昇が認められた。EGTA(1mM)を培養液に加えてから、IFN- γ 刺激を行なったところHLA-DR抗原の発現は抑えられた。更に、HLA-DR抗原はPMA+A23187の両者で発現誘導された。以上の結果は、細胞内Ca²⁺濃度の上昇がIFN- γ によるHLA-DR抗原の発現に必要であることを示す。

4)チロシンキナーゼ(PTK)の関与：IFN- γ によるHLA-DR抗原の発現は3種の(PTK)阻害剤、genistein、herbimycin A、tyrphostinで量依存的に抑制された(図1)。また、抗ホスホチロシン抗体による免疫プロテイングで、IFN- γ 刺激1分後に106、115、125 kDaのバンドのチロシンリン酸化が認められた。PTK阻害剤はIFN- γ による上記Cキナーゼの活性化、IP₃の産生及び細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑えたこと、更に、PTK阻害剤によるHLA-DR抗原の発現抑制はPMA+A23187で解除されたことより、PTKはCキナーゼ及びIP₃産生の上流に位置することが判明した。

以上より、IFN- γ はそのレセプターに結合するとこれに会合しているPTK分子、恐らくJAK1、2、を活性化し、その後PIP₂の代謝回転を亢進させCキナーゼ及び細胞内Ca²⁺濃度の上昇を来とし、その結果、HLA-DR抗原を発現するものと考えられた。

文献

- 1) Ryu, K., Koide, Y., Yamashita, Y., Yoshida, T.O.: Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents IFN- γ -induced HLA-DR molecule expression. *J.Immunol.* 150: 1253-1262, 1993.
- 2) Nezu, N., Ryu, K., Koide, Y., Yoshida, T.O.: Regulation of HLA class II molecule expression by IFN- γ . The signal transduction mechanism in glioma cell lines. *J.Immunol.* 145: 3126-3135, 1990.
- 3) Koide, Y., Ina, Y., Nezu, N., Yoshida, T.O.: Calcium influx and the Ca²⁺-calmodulin complex are involved in interferon- γ -induced expression of HLA class II molecules on HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 3120-3124, 1988.

Proteasome のインターフェロン γ による調節

田中啓二*

*徳島大学酵素科学研究センター

要旨：最近、内在性抗原のプロセッシング提示機構の解明が進み、この免疫反応システムにおけるプロテアソーム（蛋白質分解酵素複合体）の役割の重要性が明らかになりつつある。ガンマ型インターフェロン（IFN- γ ）はMHCにコードされたプロテアソーム遺伝子LMP2とLMP7をUp-Regulationさせると同時にサブユニットXとYをDown-Regulationさせる。この分子構成の変動は抗原ペプチド生成に適応したプロテアソームの機能変化であることが示唆されている。cDNAクローニングの結果、XはLMP7と69%、YはLMP2と61%のホモロジーを有することが判明し、IFN- γ は通常のX/Y型プロテアソームからLMP2/7型プロテアソームへの構造変換を誘導して大量に侵入してきた非自己抗原のプロセッシングを加速させ、細胞性免疫反応を亢進させると考えられた。これまでIFN- γ の主な作用機構は標的遺伝子の転写促進と考えられてたが、抗原のプロセッシング反応においてはプロテアソームの機能変換という新しい仕組みで応答することが示唆された。 **key words :** antigen processing, interferon- γ , proteasome

はじめに

最近、MHCクラスI拘束性の抗原提示機構の解明が進み、内在性抗原は細胞質の巨大な蛋白質分解酵素複合体であるプロテアソームによってプロセッシングされた後、生じた抗原ペプチドがTAP1/2の異型二量体ペプチド・トランスポーターを介して小胞体内へ輸送される経路が明らかになりつつある（総説：文献1参照）。本研究ではプロテアソームの構造と機能に対するガンマ型インターフェロン（IFN- γ ）の効果を詳細に検討し、IFN- γ の抗原プロセッシング提示反応における新しい作用機構を見出した。

材料と方法

各種ヒト樹立株細胞をIFN- γ （500U/ml）で3日間処理し、プロテアソームの酵素活性を測定した。プロテアソームのサブユニット構成は細胞を ^{35}S -メチオニンで3時間標識した後、抗プロテアソーム抗体で免疫沈降したものを2次元電気泳動で解析した。サブユニットXとYのcDNAクローニングは精製したXとYの部分アミノ酸配列を決定し、PCRを用いてcDNA断片を増幅したのち、全長鎖cDNAを単離して塩基配列を決定した。

結果

我々は種々のヒト培養細胞株を用い主要な免疫調節因子であるIFN- γ のプロテアソームに対する影響を検討し、以下の結果を得た（文献2）。(1)IFN- γ はクラスI分子の細胞表面発現を強く促進した。(2)IFN- γ はMHCクラスII領域にコードされたプロテアソームサブユニットLMP-2/-7の遺伝子発現を強く誘

導し、合成されたこれらの蛋白質は全てプロテアソーム複合体に組み込まれた。(3)IFN- γ は新しく生成されたプロテアソームのサブユニット構成を大きく変化させたが、既存のプロテアソームの分子構成には影響しなかった。この研究の過程で、我々はIFN- γ 処理に反応して消失する二種のサブユニットを発見して、これらをXおよびYと名付けた。(4)IFN- γ はプロテアソームのトリプシン型及びキモトリプシン型活性を著しく増大させ、逆にV8プロテアーゼ型活性を低下させた。このプロテアソームの機能変化はMHCクラスI分子に結合している抗原ペプチドの切断部位の特異性と合致する。

これらの知見に加え、最近、我々は上記のXとYの分子クローニングに成功した。ヒト腎臓から精製したプロテアソームを二次元電気泳動で分析した後、XとYのスポットを切り出し、部分アミノ酸配列を決定した。この蛋白質情報を基にヒトHepG2細胞のcDNAライブラリーからXとYをコードする全長鎖cDNAを単離し、その塩基配列を決定した。その結果、XはLMP7と69%、そしてYはLMP2と61%のホモロジーを有することが判明した。従って、IFN- γ は通常のX/Y型からLMP2/7型プロテアソームへの変換を誘導することが示唆された（文献3及び投稿中）。以上の結果はプロテアソーム複合体が、機能の多様性を獲得するために分子構成を変化させていることを示唆している。我々はこの現象をプロテアソームの「分子適応」と考察し（文献4）、IFN- γ に反応して新たに分子集合したIFN- γ 誘導型のプロテアソームが内在性抗原の加速的なプロセッシングに関与する可能性を推定した。

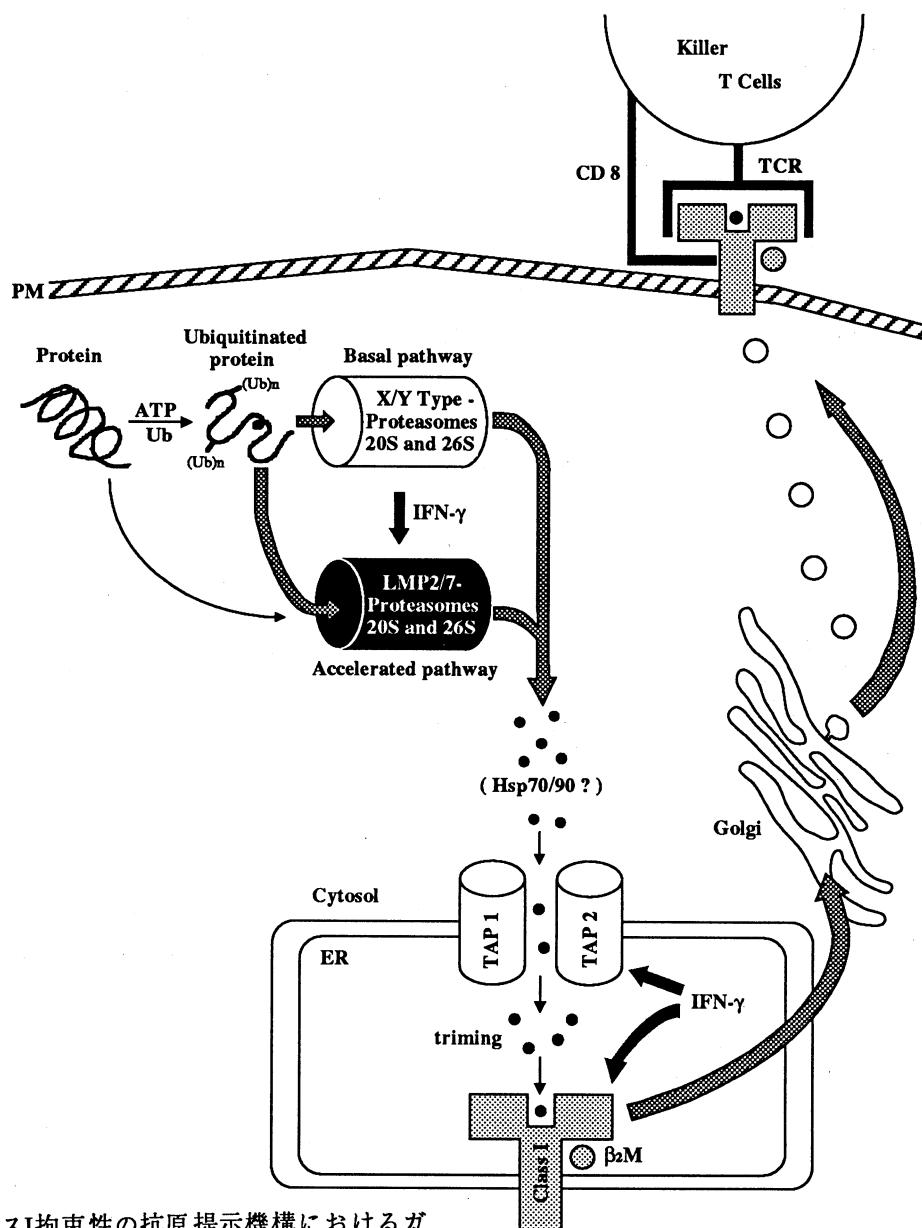


図1 MHCクラスI拘束性の抗原提示機構におけるガンマ型インターフェロンの作用とプロテアソームの役割のモデル。詳細は総説1と4を参照のこと。
Ub, ubiquitin; (Ub)_n, multi-Ub chain; hsp70/90, family of heat shock proteins 70 and 90; ER, endoplasmic reticulum; PM, plasma membrane; β2m, β2-microglobulin; Class I, MHC class I H chain; TCR, T cell receptor.

考察

本研究で得られた結果をもとに内在性抗原のプロセッシング提示機構をモデル化したのが図1である。詳細は総説1及び4を参照のこと。

文献

- 1) 西村千尋、田中啓二、市原明：内在性抗原のプロセッシング、Annual Review 免疫 1994 (中外医学社)，55-67 (1994)
- 2) Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K., Ichihara, A. : Interferon-γ induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes J. Biochem. 115, 257-269, (1994)
- 3) Akiyama, K., Kagawa, K., Tamura, T., Shimbara, S., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K. B., Tanaka, K., Ichihara, A.: Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-γ for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing. FEBS Lett. 343, 85-88 (1994).
- 4) Tanaka, K. : The role of proteasomes induced by interferon-γ in antigen processing. J. Leukoc. Biol. in press (1994).

絨毛癌由来細胞株からの核蛋白と非古典的 クラス I 遺伝子上流域との特異的結合

古山将康・木村俊夫・大橋一友・錦織直子・脇本昭憲・加藤宗寛・筒井建紀・佐治文隆*

*大阪大学医学部産科婦人科

要旨：免疫学的妊娠維持機構において胎盤絨毛に発現する主要組織適合抗原は重要な役割を担っているが、非古典的クラス I 抗原であるHLA-G抗原が胎盤絨毛に特異的に発現することが報告された。本研究では異なるHLAクラス I 抗原を発現する種々の絨毛癌細胞株をモデルとして、抽出核蛋白とクラス I 遺伝子上流域との結合をゲル移動度シフト法を用いて解析した。HLA-Gを発現する細胞株BeWoからの抽出核蛋白中にHLA-G遺伝子の転写開始点から上流120bpから190bpの部位に結合する蛋白をゲル移動度シフト法で確認した。この核蛋白はHLA-A2遺伝子上流域のNF κ Bの結合パターンとは異なり、クラシカルなクラス I 抗原を発現する他の絨毛癌細胞株には同定できなかったことから、NF κ Bとは異なる核蛋白であることが示唆された。**key word:** HLA-G, choriocarcinoma, nuclear protein

はじめに

妊娠現象は父親方の組織適合抗原をもつ胎児が母体の免疫監視機構を免れて発育・分化する現象と考えることができる。母体と接する胎盤絨毛においては、クラス II 抗原の発現は認めないが、クラス I 抗原は絨毛細胞の分化に伴って非古典的クラス I (HLA-G) を含めて抗原性を著しく変化させることによって免疫学的妊娠維持機構に関与している¹⁾。したがって絨毛細胞におけるHLAクラス I 抗原の発現性の解析は免疫学的妊娠維持機構の解明のみならず、HLAクラス I 抗原の発現調節の興味あるモデルを提供すると考えられる。本研究ではクラス I 遺伝子の発現に関与する絨毛細胞由来細胞株の核内転写因子について解析を試みた。

材料と方法

細胞株：妊娠性絨毛癌細胞株 (BeWo, GCH1, NUC1, HCCM5), 非妊娠性絨毛癌細胞株 (SCH) から以下に述べる核蛋白を抽出した。細胞はそれぞれ10%牛胎児血清を含むRPMI1640の培地で継代培養した。

粗核蛋白の抽出：核蛋白の抽出にはDignamらの方法を一部改変して用いた。各細胞株 $\times 10^8$ 個から0.5% TritonXを含む低張液中で核を遠心分離し、420mM NaClの塩濃度で核蛋白を抽出した。抽出液は20mM HEPES, 20%

glycerol, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 0.5mM DTT, 0.5mM PMSFの溶液中で透析後、蛋白濃度をLowry法で測定して実験に供した。

HLAクラス I 遺伝子上流域のDNA断片の調製：

HLA-G遺伝子はOrr博士から、HLA-A2遺伝子はJapanese Cancer Research Resources Bankから供与を受けた。HLA-Gの転写開始点の上流域のXbaI/SacIIの400bp, HLA-A2の上流域のHaeIII/AccIIの116bpの断片をBluescript IIにサブクローニングした。HLA-Gの断片をMung Bean Exonuclease によってさらに200bp, 140bp, 65bpの断片にdeletionし、それぞれのDNA断片の5'断端をT4 polynucleotide kinaseを用いて³²Pでラベルして以下のゲルシフト法のプローブとした。

ゲル移動度シフト法：ラベルされたDNA断片約1 μ gを3-6 μ gの核蛋白, 2-3 μ gの poly (dI-dC) と37℃で20分間反応させたのち、4%のポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。泳動後、ゲルを乾燥しオートラジオグラフィを行なって移動度のシフトしたDNA断片を解析した。

結 果

本研究で用いた細胞株のうちBeWoにはHLA-Gの発現を認め、NUC1, HCCM5, SCHには従来のHLAクラス I

1 2 3 4 5 6

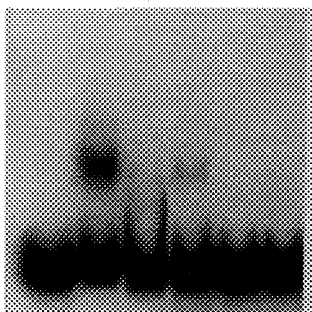


図1.
HLA-G遺伝子上流域(XbaI/SacII)と絨毛細胞株抽出核蛋白との結合: lane 1, 蛋白(-); lane 2, BeWo; lane 3, SCH; lane 4, HCCM5; lane 5, NUC1; lane 6, GCH1

抗原が発現し、GCH1にはクラス I 抗原の発現を認めていない。まず細胞株からの核蛋白とHLA-G遺伝子上流域(400bp, XbaI/SacII)との結合の存在を検討した(図1)。HLA-Gの発現が認められるBeWoからの核蛋白を加えたレーンにはシフトしたバンドが検出され、DNA断片と結合する蛋白の存在が判明した。同様にHLA-A2遺伝子上流域とそれぞれの核蛋白を結合させ移動度の変化を検討した(図2)。細胞株SCH, NUC1にはクラシカルなクラス I 抗原を発現しており、またinterferon- γ (IFN)やtumor necrosis factor- α (TNF)によってその発現が増強される。SCH, NUC1およびIFN, TNFを添加したNUC1からの抽出核蛋白はHLA-A2遺伝子上流域(HaeIII/AccII)との結合が観察され、またIFN, TNFの添加によって結合蛋白の増加が認められた。BeWoからの核蛋白はゆるく結合するバンドが検出されたが、やや移動度が異なっている。これに対してHLA-G上流域のプロープではBeWoからの核蛋白に強く結合し、他の細胞株からの核蛋白には明らかな結合が確認できなかった。HLA-G遺伝子の400bpの断片をdeletion法によって200bp, 140bp, 65bpの断片としてゲル移動度シフト法を行った結果、核蛋白の結合部位は転写開始点の上流120bpから190bpの領域であることが推察された(図省略)。

考 察

絨毛癌細胞株のHLAクラス I 抗原の発現は、著者らの検討や他家の報告から²⁾³⁾、それぞれの細胞株によってその発現量が異なり、またこれまでにHLA-A,B,Cと異なるクラス I 抗原の発現が示唆されていた。近年、そのクラス I 抗原がHLA-Gであることが示され、HLA-G抗原は絨毛や眼球などの非常に特異的な部位に発現することが判明した。本研究で用いた細胞株上のクラス I 抗原の発現の差異は絨毛

HLA-G 200bp

HLA-A2 116bp

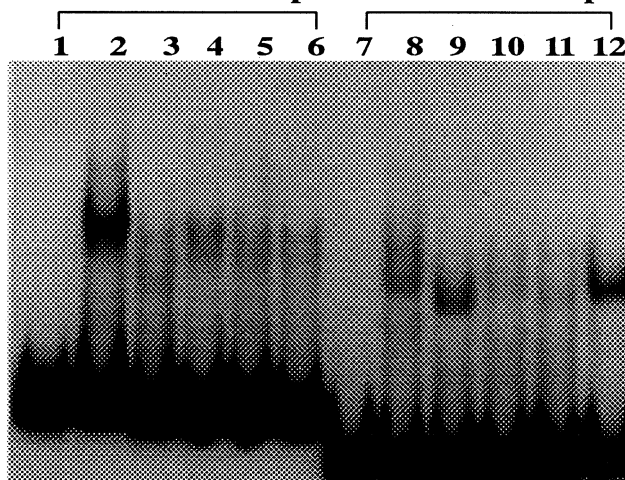


図2.
絨毛癌細胞株抽出核蛋白とHLA-GとHLA-A2遺伝子上流域との結合パターンの比較:

lane 1,7, 蛋白(-); lane 2,8, BeWo; lane 3,9, SCH; lane 4,10, NUC1; lane 5,11, IFN γ 処理NUC1; lane 6,12, TNF α 処理NUC1

細胞の分化を反映した結果と考えられ、これらの細胞株をモデルとすることで絨毛細胞上のクラス I 抗原の発現調節を推定することが可能と考えられる。クラシカルなクラス I 上流域に結合する核蛋白としてNF- κ B様の核蛋白が同定され、サイトカインでその発現が増強することが明らかとなっている⁴⁾。HLA-G遺伝子上流域に結合するBeWoからの抽出核蛋白はHLA-GのmRNAの発現と一致しており、クラシカルなクラス I 遺伝子の結合蛋白とは異なる核内因子である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ellis, S.A., Palmer, M.S., McMichael, A.J.: Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA class I molecule. *J. Immunol.* 144: 731-735, 1990.
- 2) Wakimoto, A., Ohashi, K., Koyama, M., Kato M., Tsutsui, T., Saji, F., Tanizawa, O.: Regulation of HLA-A, B, C genes on trophoblastic cells by nuclear proteins bound to MHC class I regulatory element. *Am. J. Reprod. Immunol.* in press 1994.
- 3) Hunt, J.S., Orr, H.T.: HLA and maternal-fetal recognition. *FASEB-J.* 6: 2344-2348, 1992.
- 4) Lembecher, T., Muller, U., Wirth, T.: Distinct NF- κ B/Rel transcription factors are responsible for tissue-specific and inducible gene activation. *Nature* 365: 767-770, 1993.

ORIGINAL PAPER

Short Communication

1. クラス I 関係

HLA-A2サブタイプの血清学的反応性

柏瀬貢一・石川善英・徳永勝士^{*1)}、橋本正美・大橋初弥^{*2)}
中島文明^{*3)}、赤座達也・田所憲治・十字猛夫^{*1)}

^{*1)}日赤中央血液センター、^{*2)}東京都駒込赤十字血液センター

^{*3)}神奈川県赤十字血液センター

要旨：我々はHLA-A2関連血清の反応パターンの違いによりA2のサブタイプとしてA2S、A2AKおよびA2Kを見出した。A2S、A2AKは、それぞれ第11回国際HLAワークショップに提出されたA2S、A2Leeと血清学的反応性から同一の抗原と考えられたが、A2Kは他のサブタイプとは異なり、新抗原であることが示唆された。一方、A2S+A10の特異性を示す血清が見出された。149および152番のClass I抗原のアミノ酸配列は、A2SとA10関連抗原だけが、それぞれThr、Gluであることから、A2S+A10の特異性を示した血清は、この部位を認識したと推定された。

Key words : HLA-A2 , LCT , epitope

【はじめに】

現在HLA-A2の対立遺伝子として12種類が報告されている¹⁾。また等電点電気泳動法(IEF)によりA2は、5つのサブタイプが報告されている²⁾。一方血清学的には、第10回国際HLAワークショップ(1987)で、CaucasianとOrientalにおいて、各々A2 long, A2 short-a, b, cの反応パターンが提唱された³⁾。その後第11回国際HLAワークショップに提出されたA2SがA203 (A*0203)に、A2LeeがA210 (A*0210)にWHO公認抗原として命名された⁴⁾。我々は、日常検査の中からA2S、A2AKおよびA2Kを見出し検討を行った。

【材料および方法】

血清：当施設で経産婦献血者や分娩血をスクリーニングし得られたA2関連血清と、他施設より供与された抗血清を用いた。

パネル：585パネルを用い、LCT法によりA2関連血清の特異性を検討した。今回の検討に使用した、A2のサブタイプを持つパネルの人種と、Class IのHLA表現型を表1に示した。

【結果】

A2のサブタイプであるA2S、A2AKおよびA2KとA2交差抗原であるA68、A69に対する血清学的反応パターンを図1に示した。

A2Sについて

A2Sは、JR-1749(A2+A2AK+A68+A69)の血清とは反応を示さず、その他のA2関連血清すべてと反応した。そのうちJR-0445、JR-404の血清は、A2S+A10の特異性を有し、他のA2のサブタイプとは反応しなかった。A2Sを持つパネルはいずれも外国人で、9パネル中5パネルがB38またはB15Nを持っていた。

A2AKについて

A2AKは、BD-3001、JR-1142(A2+A2S+A2K+A69)の血清とは反応を示さず、その他のA2関連血清すべてと反応した。A2AKを持つパネルはいずれも日本人であり、4パネル中3パネルがB61を持っていた。

A2Kについて

A2Kは、JR-1749(A2+A2AK+A68+A69)、JR-K249(A2+A2S+A2AK)、JR-5765(A2+A2S+A2AK+A69)、JR-7609(A2+A2S+A2AK+A68+A69)の血清とは反応を示さず、その他のA2関連血清と反応した。A2Kを持つパネルはいずれも日本人であり、4パネル中すべてがB46を持っていた。

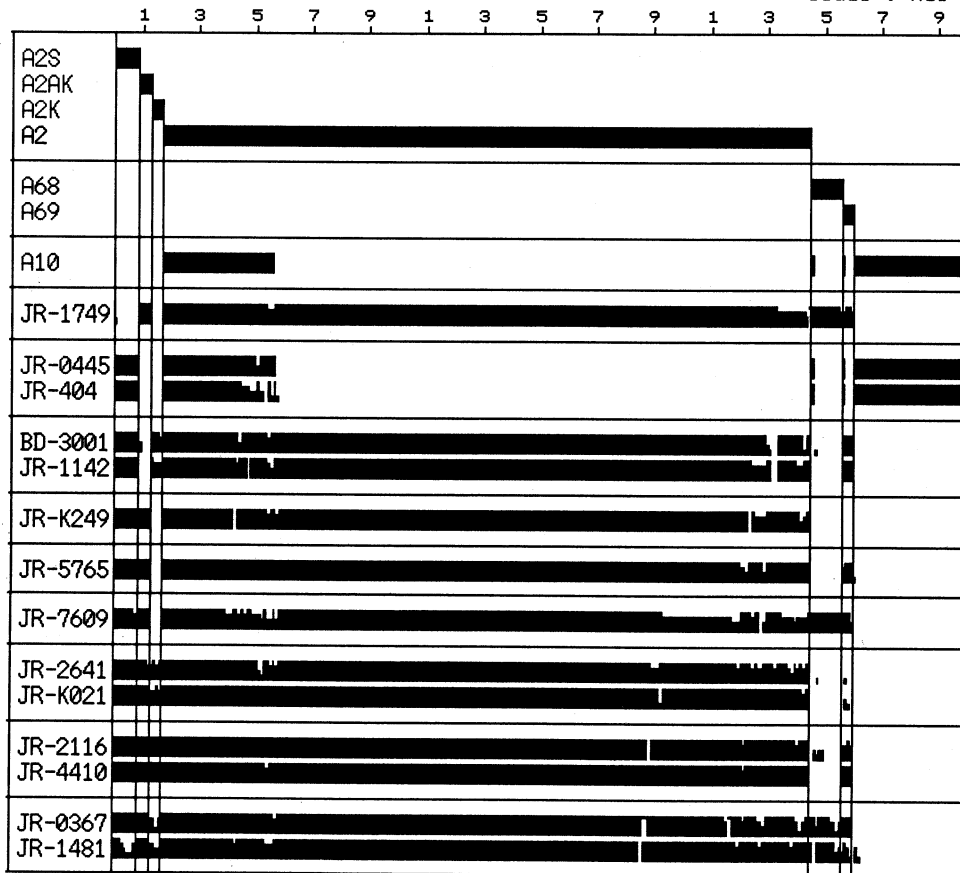
今回検討したA2関連血清の反応パターンは9通り存在し、これらの血清の組み合わせにより、4種のA2サブタイプを決めることが可能であった。

【考案】

従来サブタイプの決定に用いられていた血清は、ショートパターンを示し一部のサブタイプと反応しないことが特徴的であった。しかしA2S+A10の特異性を示したJR-0445、JR-404は、A10とA10抗原と交差反応性のな

図1 A 2 関連血清のセログラフ

Positive Panels : 300
Scale : x10



いA 2 S の特異性をともに持つ興味深い血清であった。一方、1 4 9 および 1 5 2 番のアミノ酸配列は、A*0203 と A 1 0 関連抗原だけが、それぞれ T h r , G l u であることから、A 2 S + A 1 0 の特異性を示した JR-0445、JR-404 はこの部位を認識したと推定され、この血清に反応した A 2 S は、A*0203 と推定された。このことから、今回検討した A 2 S は A*0203 と思われ、第 1 1 回国際 H L A ワークショップに提出された A 2 S と同一の抗原と考えられた。また頻度は低い、日本人においても A 2 S を持つパネルが見つかった。

BD-3001 は、第 1 1 回国際 H L A ワークショップ(1991)において A 2 L e e と反応を示さないモノクローナル抗体であると報告されている。この血清は今回の検討において、A 2 A K とともに反応性を示さなかった。このことから A 2 A K と A 2 L e e (A 2 1 0、対立遺伝子名 A*0210)は同一の抗原と考えられた。

A 2 K の血清学的な反応パターンは、他の A 2 サブタイプと異なるため、B 4 6 と連鎖する新抗原の可能性が示唆された。

文献

- 1) Zemmour, J., Parham, P.: HLA Class I nucleotide sequences, 1992. Tissue Antigens 40: 221-228, 1992.

表1 A 2 サブタイプを持つパネルの H L A 表現型

P-No	人種	A	A	B	B	C	C
PN12616	外国人	A2S	A11.1	B58	B5102	Cw10	
PN9147	外国人	A2S	A11.1	B15N	B51	Cw8N	C4451
PN90821	外国人	A2S	A11.1	B62	B3901	Cw7	
PN7033	外国人	A2S	A74	B60	B15N	Cw6	Cw8N
PN7231	外国人	A2S	A11.1	B38	B62	Cw7	Cw1
PN01134	外国人	A2S	A11.1	B55.1	B60	Cw1	Cw7
PNG11	外国人	A2S	A24	B18	B38	Cw7	
PNG57	外国人	A2S	A11.1	B13	B41	Cw2	Cw6
PN8666	外国人	A2S	A11.1	B38	B60	Cw7	
PN9081	日本人	A2AK	A11.1	B60	B61	Cw7	Cw8N
PN7320	日本人	A2AK	A11.1	B61	B3901	Cw8N	Cw7
PN7324	日本人	A2AK	A24	B61	B7	Cw8N	Cw7
PN00016	日本人	A2AK	A31	B54	B56	Cw1	Cw4
PN3626	日本人	A2K	A11.1	B46	B62	Cw1	Cw4
PN3777	日本人	A2K	A11.1	B46	B54	Cw1	
PN688	日本人	A2K	A33	B46	B44	Cw1	CX44
PN1	日本人	A2K	A11.1	B46	B62	Cw1	Cw4

- 2) Yang, SY.: Population Analysis of Class I HLA Antigens by One-Dimensional Isoelectric Focusing Gel Electrophoresis: Workshop Summary Report: Proceedings of the Tenth International Histocompatibility Workshop and Conference. : Immunology of HLA, Vol. I, 309-331, 1989.
- 3) Kreisler, JM., Morellini, M., et al.: Antigen Society #4 Report: Proceedings of the Tenth International Histocompatibility Workshop and Conference. : Immunology of HLA, Vol. I, 126-127, 1989.
- 4) Bodmer, JG., Marsh, SGE., Alber, ED., et al.: Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. Tissue Antigens 39: 161-173, 1992.

日本人におけるB75の血清学的検討について

大田 智・斉藤 敏・橋爪清隆・山田英世^{*1)}、中島文明^{*2)}

^{*1)}長野県赤十字血液センター

^{*2)}神奈川県赤十字血液センター

日本人におけるB75の多形性については様々な報告があるにも関わらず未だはつきりとした結論が出ていない。今回B75のパネル及び抗B75血清を使用し血清学的に調べた結果少なくとも2つのB75が日本人に存在していることが判明し、それぞれの抗原によりB75-Cw9, B15N-Cw8-DR12の連鎖不平衡のあることが確認された。家族に於いても矛盾なくこれらの抗原は遺伝していた。B15NはB75モノスペシフィック及びB75+B46の様な抗血清との反応が陰性であった。

はじめに

日本で見つけられたTS1は第10回IHWにおいて中国のSH7等と同じ抗原であるとしてWHOによりB75とされた。以前より日本に於いては佐治等によりB75の多様性が示唆され少なくともB75が血清学上3つに分かれる可能性のあることが報告されている。また中島はB75のバリエントを日本人に見つけB15Nと提唱している。インターナショナルセルエクステンジに於いては東南アジアのB75と日本人のB75に反応の違いが見られる。これらを確認するため日本人のB75及び中国人のB75について血清学的な検討を試みた。

材料と方法

パネルはB75とタイプされた成分ドナーを用い反応の違いが認められたものについては家系調査を行った。抗血清については抗B75の特異性を持つ25種類のものを(1)B75, B75+B46, (2)B15+B75, (3)B5+B75の3群に分けLCT法にてディプリケートで行った。また中島の提唱するB15Nを確認するために神奈川センターにてB15N及び関連抗原を同一血清に当ててもらった。中国人のB75及びタイ人のB75についてはオーストラリアのメルボルン血液センターより提供されたものを使用した。クラスI及びクラスIIのタイピングにはローカルトレイを使用し、家系についてはPCR-RFLPにてDNAタイピングを実施した。

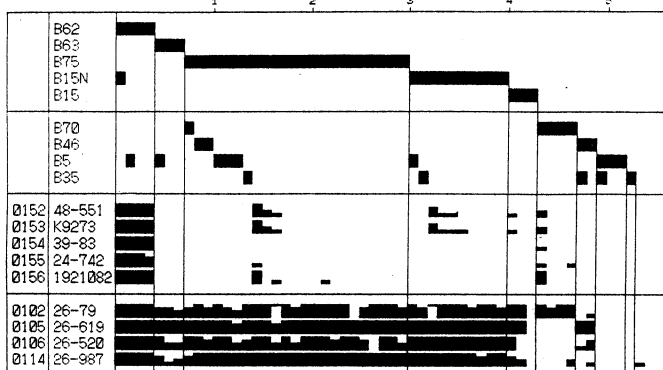
結果

中島の提唱しているB15Nはタイ、中国、フィリピンのB75と反応が殆ど同じであった。当センターの日本人22パネルのB75の中にもB15Nと同じ反応をするものが1パネルあり家系調査の結果母から子へA1101-Cw8-B15N-DRB1*1202-DQB1*0502-DPB1*0402のハプロタイプで正しく遺伝していた。その他に1例、他のB75と違い反応の短いパネルがあったので家系調査をしたところ、姉のB75の反応パターンは同じく短かったにも関わらず母の反応パターンは他のB75と同じであった。B15Nの11パネルにおいては、全例にCw8が確認されDR検査済みの6例中5例にDR12が確認された。血清学的特徴は、B75が両群に反応したのに比べB15Nは1)群に於いては5/6の血清が、2)群に於いては1/9が陰性反応を示した。3)群に於いては、B75の反応がB15Nより弱い傾向にあった。B15Nの頻度はきわめて低いと思われる。

考察

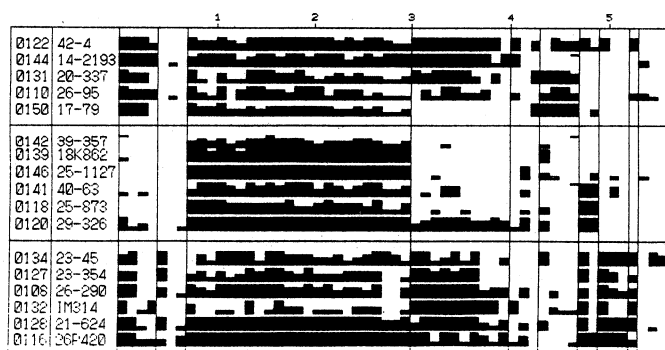
日本人のB75が2つに分かれることが確認され、中島の提唱しているB15Nは中国、タイのB75と同じと思われる。10THで同一と定義されB75とされたSH7, TS1は別の抗原である可能性が高い。姉弟において抗原の抑制作用と思われる現象が確認され現在これについては精査中である。

Positive Panels : 56
Scale : x10



B 7 5 関連抗原原種別内訳

	B 7 5	B 1 5 N	B 1 5
日本人	2 3	2	0
タイ人	0	1	0
中国人	0	3	0
フィリピン人	0	1	0
不明	0	4	3



```

00000 000000000 000000 000000
11111 111111111 111111 111111
55555 000124315 434412 820321
23456 256424100 296180 478286

4K321 222241221 312422 222122
89949 666624067 985059 136M16
-2--2 ----- -K----- --3-P
57871 765942397 381683 422164
53340 9128 1359 561372 559422
1 28 907 97 722 36 40 40
2 3 7

```

```

22 (4586) ) A2 A24 B75 B7 Cw7 Cw9 DR1 DR9 R53 DQ5 DQ3 ..... ****
28 (4606) ) A2 B75 103 Cw9 451 4.1 DR9 R53 DQ3 DQ4 ..... ****
29 (4344) ) A2 B75 103 451 Cw9 4.1 DR9 R53 DQ3 DQ4 ..... ****

37 (4593) ) A2 1.1 15N B54 Cw1 Cw8 122 4.1 R52 R53 DQ5 DQ3 ..... ****
32 (262) ) A24 1.1 B35 15N Cw8 4.1 R12 R52 R53 DQ4 DQ5 ..... ****

31 (7409) ) 203 1.1 B51 15N 451 v8N R12 R14 R52 DQ7 DQ5 ..... ****
32 (262) ) A24 1.1 B35 15N Cw8 4.1 R12 R52 R53 DQ4 DQ5 ..... ****
33 (4779) ) 1.1 A30 15N 13N Cw8 Cw6 ..... ****
34 (4721) ) 1.1 A66 B44 15N Cw8 Cw7 ..... ****
35 (3733) ) A24 B38 15N Cw7 Cw8 ..... ****
36 (4781) ) 335 1.1 15N B38 Cw8 ..... ****
37 (4593) ) A2 1.1 15N B54 Cw1 Cw8 122 4.1 R52 R53 DQ5 DQ3 ..... ****
38 (7415) ) A33 1.2 H44 15N X44 v8N R15 R12 R51 R52 DQ6 DQ7 ..... ****
39 (7188) ) 1.1 1.2 R60 15N Cw7 v8N R14 R15 R51 R52 DQ5 DQ6 ..... ****
40 (7361) ) A2 A24 15N B18 v8N Cw7 R12 R52 DQ7 ..... ****
41 (1519) ) A33 A34 B44 B15 Cw7 Cw6 R15 DR7 R53 DQ1 DQ2 ..... ****
42 (7354) ) A2 5.4 B48 B15 Cw9 R14 R12 R52 DQ5 DQ7 ..... ****
43 (7169) ) A2 A3 13N B15 Cw6 Cw7 R15 4.2 R51 R53 DQ6 DQ3 ..... ****
44 (7437) ) A29 A74 B48 H72 Cw2 Cw6 2LU DR7 DQ6 DQ2 ..... ****
45 (3248) ) A2 B70 B60 Cw1 v10 4.1 DR9 R53 DQ3 DQ4 ..... ****
46 (4397) ) A2 A3 B60 B70 Cw2 Cw3 ..... ****
47 (3148) ) A3 A30 B47 B72 Cw2 Cw6 ..... ****

```

HLA 新抗原 B5103における 当血液センターの血清学的検索の足跡

林 律子・山崎雅子・青山憲一・小松孝良・鈴木六郎・高倉 清*

*浜松赤十字血液センター

要旨：第11回国際組織適合性ワークショップ会議 (11th IHWS:1991, 蘇)に新抗原として提唱し、WHOのNomenclature委員会で、正式にB5103と命名された抗原は、当血液センターにおける通常のHLA血清学的タイピングで見出した3名のDonorの発見が公認される糸口となった。

Key Words : BTA, B5103, New Antigen Study

はじめに

Bw4に属するB5関連抗原の新抗原を発見した過程とB5103と命名された新抗原を保有する4家系の血清学的検索から得た知見を併せて報告する。

方法

血清学的タイピングは、Class I, Class IIともに愛知BC製と自家製タイピングトレイを使用し、NIH標準法にて行ない、T・B分離はナイロンカラム法で行なった。

発見の経緯

1989年3月 (cellname HYS0055, cell line No.30-BY3)、1989年8月 (HYS-0064, 30-B53)、1990年6月 (HYS0058, 30-BYA)に使用したタイピングトレイ (製BCMDTC, 読解HBT-1)ではアサインできないDonor3名を発見した。

これらの反応パターンは、Bw4と反応し、B5関連の多特異性Serum No.31-218, 30-618, 23-531の抗血清に強陽性に反応し、B51, B52, B53, B17, B49, B59の単特異性抗体 (モノクローナル抗体も含む)と、それらの複合抗体には反応しなかった。また、Bw4の抗血清との反応が弱いcellもあったため、Bw6に属するB35, B18, B75などの抗血清との反応も見が陰性であった。(表1)

これらの反応パターンが1988年第12回日本血液事業学会において、斉藤ら (長野BC)が発表したHLA-1-51Bw4 Associateの新しいHLA-BLocus (発端者の名からBTAと呼ぶ) 抗原¹⁾の反応パターンと酷似していたことから、BTAと反応する抗血清を分与していただき精査した結果、同じ抗原であることが判明した。

新抗原公認に向けて

新抗原としての公認のため、3DonorのFamily Studyを開始し、同時に京都BCへcell line作製を依頼した。cell line化された30-BYAは、海藤ら (浜松医大微生物学)によりBiochemistry Studyがなされ、IEFによってB51とは明らかに区別された。一方、HYS0055 (30-BY3) cellは、滝口ら (東大医科学研究所)によってDNA シークエンスが行なわれ、B51と167番目のアミノ酸の塩基配列に相違があることが報告された。また、当BCで行なった3家系のFamily Study血清学的タイピングの結果は図1~図3に示したが、新抗原は矛盾なく遺伝していた。それと並行して、愛知BC、長野BCより分与された11th IHWSトレイの検索を行い、データを提出した。(表2)ワークショップではSerology²⁾とDNA³⁾, Biochemistry⁴⁾の各分野で検討された結果、WHOのNomenclature委員会で正式にB5103と命名された。

その後1993年4月に骨髓移植患者のFamily Studyから30-BH2家系 (図4)を発見した。このFamilyの発端者の父親はB52抗原を保有していたため、血清学的反応パターンからは確認できないが、ハプロタイプよりB5103抗原保有者と推定された。

結果および考察

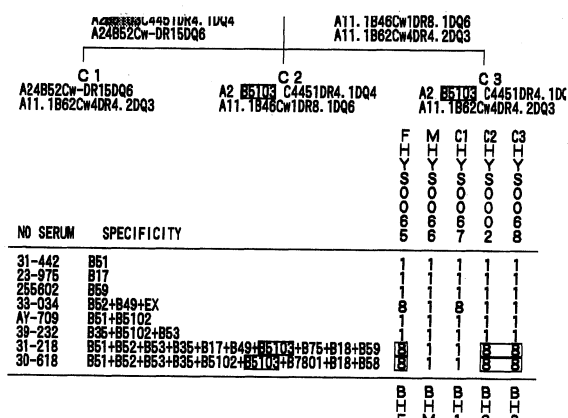
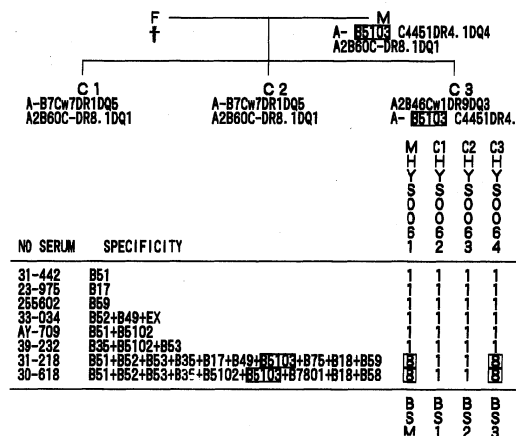
①Family Studyの血清学的タイピングの結果よりB5103抗原保有者は10名ともBw4-C4451-DR4.1-DQ4のハプロタイプを持っており、強い連鎖不平衡を示した。A抗原との関連は、A2-B5103が10名中7名、他の3名はA33-B5103であり、A2とA33の連鎖不平衡が考えられた。また、A2S (A203) 抗体との反応も検査したが、A2-B5103の7名は共に陰性であった。現在、B5103抗原保有者は、長野BC2家系 (5名)、石川BC1家系 (1名) 浜松BC4家系 (10名)が報告されている。この16名のDNAタイピングが長野BCで行なわれ、DR, DQ, DPローカスのDNAハプロタイプは全てDRB1*0405-DQB1*0401-DPB1*0501 (PCR-RFLP法)、Aローカスは、A2が0206、A33が3302 (SSOP法)であると判定された。

②B5103抗体の検索は、B5103抗原と反応した抗血清が全てB5関連で多特異性であったため、始めに当BCでB5関連特異性と同定された60本の抗血清について行なった。結果、B51+B52+B5102+B5103+B7801+B53+B35+B18の特異性を示す血清を3本検出した。しかし、その後の抗体スクリーニングでもB5103単特異性抗体は発見できていない。

③B5103抗原保有者10名 (4家系) 中3名 (2家系)にHCV抗体 (PHA法)が検出された。当BCのDonorのHCV抗体検出率は0.8%であり、それと比較すると疾患との関連も示唆された。そこで、当BCのHCV抗体陽性Donor108名のHLAタイピングを行なった結果、B5103抗原は発見されなかった。しかし、B51, B52抗原を保有する陽性者は40名 (37%)にのぼった。B51抗原の日本人の遺伝子頻度は7.2%、B52抗原のそれは10.9% (第10回日本HLAワークショップで得られたHLAタイプのデータに基づく)であり、それからすると、B5関連抗原とHCV抗体陽性者との相関は高いと思われる。

表1 Reaction pattern with routine typing tray antisera.

Antisera	33	33	2A	2	2	2	33	3	3	3	2
	11	13	4Y	3	2	2	91	1	1	0	3
	45	60	17	9	2	6	26	3	2	6	5
	46	43	70	7	1	0	39	9	1	1	3
	24	44	69	5	1	2	22	6	8	8	1
Antigen	CellName										
B51	++	--	++	--	--	--	++	+	+	+	+
B52	--	++	--	--	--	--	++	+	+	+	+
B5102	--	--	++	--	--	--	++	+	+	+	+
B35	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
B53	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
B17	--	--	--	+	--	--	++	+	+	+	+
B18	--	--	--	+	--	--	++	+	+	+	+
B49	--	+	--	--	--	--	++	+	+	+	+
B59	--	--	--	--	+	--	++	+	+	+	+
BTA	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
BY3	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
B53	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
BYA	--	--	--	--	--	--	++	+	+	+	+
others											
		EX		B			EX	B	B		
				70				75	78		



י"ח תמוז ה'תשנ"ב (1991)

40 *MHC & IRS* Vol.1 No.1 1994

HLA-Cw1のサブタイプ“Cw1N”を認識する アロ抗血清について

中島文明・中村淳子・岡野俊生・森 知恵子・横田敏和*

*神奈川県赤十字血液センター検査課

要旨：HLA-Cw1 抗原のサブタイプを認識すると思われるアロ抗血清を得た。この抗体に反応しない Cw1 を "Cw1N" と仮に呼ぶこととし、血清学的に解析を試みた。頻度は非常にまれで 5/1859 ($p.f=0.3\%$) でしかない。また、A24-Cw1N-B46-DR9-DQ3 となる特徴あるハプロタイプを有し、family study においても確認された。しかしながら、抗体との反応のみで述べていることであり、これが本当に "Cw1N" と呼んでいる新抗原であるのか、あるいは複雑な抗原構造の結果としてこのような反応を示すものかは現在のところ不明である。少なくとも、この HLA-C 領域を code している塩基配列が従来の Cw1 と同一であるか確認する必要があると考える。

key words : serological analysis, association, haplotype

はじめに

HLA-Cw1 は早くから確立された抗原とされてきた。一時期、B46 と連鎖する C ローカス抗原として Cw11 なるものが存在し、塩基配列のデータも公表された。血清学的には、Cw1 と Cw3 の抗体に交差して反応するというもので、Cw1 のスプリット抗原という位置付けにあった。ところが、第 11 回国際組織適合性ワークショップにおいて、サンプル取り違いということで HLA-system から削除されてしまった。現在、allele としては、C*0101, C*0102 の 2 種類が報告されているが抗原としては Cw1 から派生したものではない。

今回、アロ抗血清 206721 によって分離できる Cw1 のサブタイプを "Cw1N" と仮称し解析を試みた。

材料と方法

対照としたパネルは、当施設で登録した成分献血ドナー 639 名と骨髄ドナー 1220 名、それと、1993 年度中央血液センター管内ワークショップの 581 パネルである。前者、登録者で頻度計算をし、後者、ワークショップ・データで抗体の解析をした。また、別に family study を一家系おこなった。タイピングおよび抗体の解析は従来どうり NIH に準拠した Lymphocyte Cytotoxicity Test でおこなった。

結 果

Fig. はワークショップでのセログラフである。206721(-), 202288(+) のパネルを Cw1N と定義してある。202288 は Cw1(-), B46(+) のパネルで反応陰性なので、真の anti-Cw1 抗体といえる。206721 の反応の最後の部分が陰性であるが、他の Cw1 抗体との反応も不良であるため、この部分は Cw1N としなかった。

206721 は $SI=77.8\%$, $r\text{-value}=0.98$, $Q\text{-score}=9.89$ で特異性は Cw1 である。202288 は $SI=93.7\%$, $r\text{-value}=0.99$, $Q\text{-score}=10.79$ で特異性は Cw1+Cw1N となる。

Table 1. は登録者、ワークショップ・データ、family study で得られた Cw1N パネルで、A24-Cw1N-B46-DR9-DQ3 という特徴的なハプロタイプがみえる。

Table 2. が family study でこれを確認したもので、親子間で遺伝しているとともに、ハプロタイプ分析でも上記のハプロタイプが確認された。

Table 3. は登録者のみで計算した表現形頻度と遺伝子頻度で Cw1N は $p.f=0.3$, $g.f=0.1$ と非常に低頻度であった。

考 察

A2-B46 という連鎖が一般的であるなか、稀な A24-B46 という連鎖上に Cw1N がのっていたことが興味深い。また、"A24AK" (日赤中央血液センター：赤座、柏瀬) がこれと同じハプロタイプにのっていることもなおさらである。

Fig. reaction pattern of the HLA-Cw1 related alloantisera. Positive Panels : 298
Scale : x10

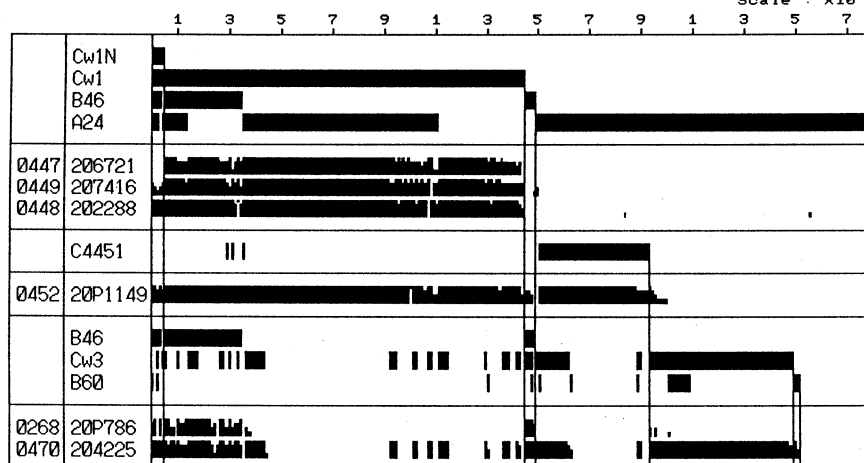


Table 2. family segregation of the "Cw1N" antigen.

F:	a. A31-Cw10-B60-DR8.1-DQ6
	b. A24-Cw1N-B46-DR9 -DQ3
M:	c. A24-Cw10-B60-DR4.1-DQ4
	d. ()-() -()-() -()
C1:	a. A31-Cw10-B60-DR8.1-DQ6
	c. A24-Cw10-B60-DR4.1-DQ4
C2:	b. A24-Cw1N-B46-DR9 -DQ3
	c. A24-Cw10-B60-DR4.1-DQ4

Table 1. serological type with the "Cw1N" panels.

Panel	HLA-A	HLA-B	4/6	HLA-C	HLA-DR	52/53	HLA-DQ
20304	A24 A26	B46 B62	- 6	Cw1N Cw9	HR5 DR8.1	52 -	DQ7 DQ1
207240	A24 -	B46 B27	4 6	Cw1N -	DR9 DR12	52 53	DQ7 -
204741	A24 A31	B46 B60	- 6	Cw1N Cw10	DR9 DR8.1	- 53	DQ3 DQ6
204745	A24 -	B46 B60	- 6	Cw1N Cw10	DR9 DR4.1	- 53	DQ3 DQ4
204951	A24 A33	B46 B44	4 6	Cw1N -	DR9 DR13	52 53	DQ3 DQ6
2013027	A24 A2	B46 B62	- 6	Cw1N Cw9	DR9 DR4.2	- 53	DQ3 -
2013400	A24 -	B46 B51	4 6	Cw1N -	DR9 DR8.1	- 53	DQ3 DQ6
6029	A24 -	B46 B60	- 6	Cw1N Cw8N	DR9 DR4.1	- 53	DQ3 DQ4
631346	A24 -	B46 B7	- 6	Cw1N Cw7	DR9 DR8	- 53	DQ3 DQ4
015744	A24AK A33	B46 B44	4 6	Cw1N -	- -	- -	- -
201168	A2 A33	B46 B44	4 6	Cw1N CX44	DR9 DR13	52 53	DQ3 DQ6
2013155	A31 -	B46 B3902	- 6	Cw1N Cw7	DR9 -	- 53	DQ3 -
7800041	A24 A26.4	B59 B62	4 6	Cw1N Cw9	- -	- -	- -

Table 3. frequency of Japanese HLA-C locus antigens.(n=1859)

antigen	n	p.f	g.f
Cw1N	5	0.3	0.1
Cw1	564	30.3	16.5
Cw2	0	0.0	0.0
Cw3	13	0.7	0.4
Cw4	145	7.8	4.0
Cw5	20	1.1	0.5
Cw6	32	1.7	0.9
Cw7	476	25.6	13.7
Cw8	0	0.0	0.0
Cw8N	228	12.3	6.3
Cw9	456	24.5	13.1
Cw10	343	18.5	9.7
Cx4451	282	23.8	12.7

しかしながら、A24-B46 がすべて A24AK でないのと同じく、A24-Cw1-B46 がすべて Cw1N ではない。これは、今回のワークショップ・データでも 1 対 4 ではほとんど普通の Cw1 であった。また、ハプロタイプが A24-Cw1-B59 と推測される 1 パネルが Cw1N であったことが、このことの逆説的証明になっているのではないだろうか。

今後、遺伝子解析により、この HLA-C 領域の塩基配列を確認する必要がある。

文 献

1. Zemmour J, Gumperz J, Hildebrand W. H, Marsh S. G. E, Ward F. E. Williams R. C and Parham P : HLA-Cw11 is a combination of Cw1 and a public epitope of HLA-Cw3 and B46 molecules. In Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (eds.) : HLA 1991 vol I. London, Oxford University Press, 1992(in press).

2. 今西規, 徳永勝士, 赤座達也, 吉田孝人 : 日本人集団における HLA 遺伝子の対立遺伝子頻度とハプロタイプ頻度. 第 10 回日本 HLA ワークショップ共同報告. 今日の移植 4 : 147-185, 1991

PCR-RFLP 法による HLA クラス I アロ抗原のサブアリルタイピング

大西浩史*

*住友金属株式会社診断薬室

要旨：HLAクラスI抗原を対象としたDNAタイピングのシステムの開発が進んでいる。今回は、PCR-RFLP法をHLAクラスI抗原の解析に応用するにあたり、まずアロ抗原をひとつの単位としてそのサブアリルをタイピングするシステムの開発を、HLA-B44 抗原をそのモデルとして検討を行った。日本人由来の B44 ポジティブ検体を対象にタイピングを実施した結果、その大部分が B*4403 の対立遺伝子であることが明かとなった。

key words: PCR-RFLP, HLA-class I antigens, HLA-B44

はじめに

HLAクラスII抗原の研究分野においては、DNAタイピングの手法の開発が積極的に取り組み、

- (1) [Low-resolution] 抗血清法と同等レベルでのDNAタイピング
- (2) [High-resolution] 対立遺伝子まで完全に決定するDNAタイピング

の2つのグレードでシステム構築が進んでいる。

われわれは、[High-resolution] グレードに対応するDNAタイピングの手法として、PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism)法¹⁾を測定原理とした「スマイテストHLAタイピングシステム」を既に開発し報告している²⁾。このシステムは、日常検査においてHLA-DRB1/DQB1/DPB1の対立遺伝子を完全にタイピングすることを目的としている。

今回、このRFLP法をHLAクラスI抗原のタイピングに応用するための第一段階として、クラスI抗原中の特定のアロ抗原を対象に、そのサブアリルを決定するシステムについての検討を行った。今回は、対象とするアロ抗原としてHLA-B44 抗原を選び、そのサブアリルタイピングのシステムを開発・評価した。

材料と方法

有核細胞から抽出したゲノムDNAを用いて、HLA-B

遺伝子の第3エクソンおよび第4エクソン領域を、B44アロ抗原特異的なプライマーとB抗原特異的なプライマー(B抗原の80%に対応)をそれぞれ使用し個別にPCR増幅した。次に増幅した第3エクソン由来のDNAについては3種類(BsaJI, DdeI, SacII)の制限酵素により、第4エクソン由来のDNAについては2種類(HphI, HaeIII)の制限酵素により、特異的に消化した後、それぞれの制限酵素から得られた切断パターンを解析して対立遺伝子型の決定を行った。

使用したプライマーの塩基配列および制限酵素の認識部位の関係については、HLA-B44 遺伝子の塩基配列と共に図1中に示した。また、タイピングの操作フローについては図2に示した。

結果

HLA-B 抗原は、B*4401, B*4402, B*4403 の3種のサブアリルが現在までに報告されている³⁾。

日本人のB44 ポジティブ検体(30検体)についてのタイピングを行ったところ、28検体がB*4403、2検体がB*4402であった。また、第3エクソン領域でB*4403と判定されたが、第4エクソンがB*4401である自己矛盾の結果を示す検体がいくつか存在した。

一方、B44 関連のパネルセルのタイピングについても行ったところ、B*4402= SPO 010 / EK, B*4403= PITOUT / MOU, の結果を得た。

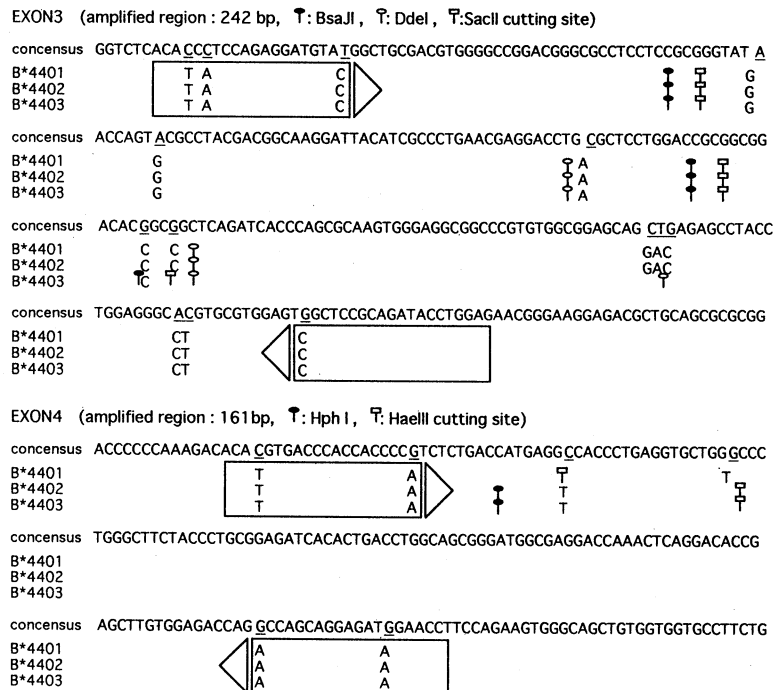


図1. HLA-B 44 の塩基配列とプライマー配列(囲み部分)と制限酵素の切断部位との関係

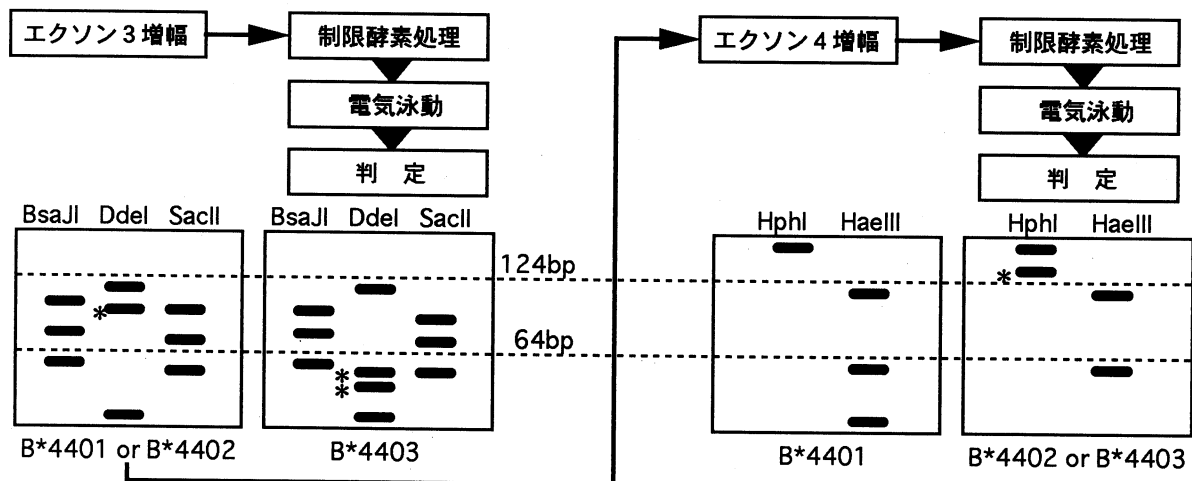


図2. HLA-B 44 サブアレルタイピングの操作フロー (*で示した切断フラグメントに注目する)

考察

今回、RFLP法をHLAクラスI抗原のタイピングに応用するためモデルとして、クラスI抗原中の特定のA抗原のサブアレルタイピングについてB44抗原を選んで検討を行った。その結果、B44抗原のDNAタイピングの場合、複数のエクソン領域の多様性を並列に解析することで複数のサブアレルを同定することが可能であった。

今後、検討に用いる検体の数を増やすと共に、第3および第4エクソン領域での判定結果に整合性がみられなかった検体についてダイレクトシーケンスを含めてその原因について検討をすすめる。

文献

- 1) Ota, M., Seki, T. 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.
- 2) Onishi, H., Iida, J., Tanaka, H., Inoko, H. : SMITEST HLA DNA TYPING SYSTEM : HLA class II typing with PCR-RFLP method. Proceedings of the Eleventh Japan Histocompatibility Workshop : in press.
- 3) Zemmour, J., Parham, P. HLA Class I nucleotide sequences, 1992. Tissue Antigens 40: 221-228, 1992.

肝細胞における内因性胆汁酸の主要組織適合抗原(MHC)class I 遺伝子発現調節機構

平野史倫・田中廣壽・牧野雄一・三浦貴徳・野村嘉伸・牧野 勲*

*旭川医科大学第二内科

要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)治療薬であるウルソデオキシコール酸(UDCA)が肝細胞のMHC class I 抗原を減少させることが免疫組織学的に示されているが、胆汁酸による肝細胞MHC class I 抗原の発現調節機構はいまだ不明である。そこで、今回、(1)UDCA・内因性胆汁酸は肝細胞のMHC class I mRNA、抗原の発現を容量・時間依存性に増加させ、その強さは胆汁酸のhydrophobicityと一致していること、(2)胆汁酸によるMHC class I mRNAの発現はPKC阻害剤により抑制されることを明らかにした。以上より、胆汁酸はMHC class I 発現を正に調節し、PBCの病態進展及び治療に関与している可能性を推測させた。また、胆汁酸によるMHC class I の誘導にPKCを介した細胞内情報伝達系の関与が強く示唆された。

key words : ursodeoxycholic acid, bile acid, major histocompatibility complex class I

はじめに

原因不明の難治性疾患である原発性胆汁性肝硬変(PBC)において、肝・胆管細胞の主要組織適合抗原(MHC) class I 抗原発現量の増加と肝細胞障害との関連が示唆されている¹⁾。近年、胆汁酸製剤であるウルソデオキシコール酸(UDCA)がPBCにおける肝機能障害に対して有効であること²⁾が認められ、病理組織学的にも肝細胞のMHC class I 抗原を減少させることが報告されている¹⁾。かかる臨床的観察は胆汁酸が肝細胞のMHC class I 抗原の発現調節機構に関与していることを強く示唆している。しかし、現在までにUDCAの作用機序として、(1)ケノデオキシコール酸(CDCA)とUDCAとの置換作用³⁾、(2)活性化T細胞のサイトカイン分泌抑制作用⁴⁾等が報告されているが、UDCAや内因性胆汁酸の肝細胞MHC class I 抗原の発現調節機構についてはいまだに不明である。

そこで、肝細胞における内因性胆汁酸のMHC class I 発現調節作用に及ぼす影響を、特にUDCAと対比して解析したので報告する。

材料と方法

ヒト肝癌細胞株HepG2を用い、非必須アミノ酸、10%胎児牛血清加Dulbecco's modified Eagle medium(D-MEM)で培養した。また、内因性胆汁酸であるCDCA、コール酸(CA)、デオキシコール酸(DCA)、

リトコール酸(LCA)、及びUDCAをリガンドとして使用した。Table 1に各種胆汁酸のhydrophobic indexを示した。

(1)Flow cytometry法：各種リガンド存在下で細胞を培養後、一次抗体(anti-human HLA-ABC mouse Ab)および二次抗体(phycoerytherin-conjugated anti-mouse IgG goat Ab)とインキュベートし、EPICS ELITE flow cytometry system (Coulter)でMHC class I 抗原の発現を解析した。

(2)Northern blot hybridization法：細胞からAGPC法によりtotal RNAを抽出した。MHC class I はJapanese Cancer Research Resources Bank(JCRB)より供与されたHLA-B7 cDNA(AK Sood et al)をprobeとした。c-fosはhuman c-fos genomic DNAの第4エクソンの断片(484bp: TaKaRa)を、c-junはsynthetic oligonucleotide(c-jun cDNAのN-末端40 nt: Oncogene Science Inc.)をそれぞれprobeとした。

結 果

(1)CDCA依存性MHC class I の発現：Fig.1にはFlow cytometryを用いてCDCA(100 μ M)によるMHC class I 抗原の発現を解析した結果を示す。CDCAの添加により、MHC class I 抗原の発現は明らかに増加していた。さらに、CDCA 10 μ M、100 μ M及び250 μ M存在下で48時間(hr)培養後、Flow cytometry法、

Table 1 Characteristics of bile acids		
Bile acids	Hydroxyl substituents	Hydrophobic index
Lithocholic acid (LCA)	3 α	1.0
Deoxycholic acid (DCA)	3 α , 12 α	0.59
Chenodeoxycholic acid (CDCA)	3 α , 7 α	0.46
Ursodeoxycholic acid (UDCA)	3 α , 7 β	-0.47
Cholic acid (CA)	3 α , 7 α , 12 α	0

(Hofmann et al)

Northern blot hybridization法による分析を行った。Control (Mediumのみ) のMHC class I発現と比較し、CDCA 100 μ M, 250 μ M添加後ではMHC class IのmRNA・抗原量いずれも有意にしかも容量依存性が増加していた。

(2)CDCAの時間依存性MHC class Iの発現：CDCA 100 μ M存在下で12, 24, 48及び72hr培養した。CDCA添加後、MHC class I mRNAは12hr, MHC class I抗原は24hrより増加していた。

(3)他の胆汁酸によるMHC class I mRNAの発現：CA, UDCA, CDCA, DCA, LCA 100 μ M存在下で48hr培養した。いずれの胆汁酸もcontrolに比較して、mRNAレベルでMHC class Iの発現を有意に増加させた(Fig. 2)。その増加作用の強さはUDCA < CA < CDCA < DCA < LCAの順であり、胆汁酸のhydrophobicityと一致していた(Table 1)。

(4)MHC class I mRNA発現に及ぼすprotein kinase(PK)阻害剤の影響：CDCA 100 μ MとPK阻害剤(H7)あるいはPKA阻害剤(H8)同時存在下で48hr培養した。CDCAにより誘導されるMHC class I mRNAの発現はH7により抑制されたが、H8によっては影響を受けなかった(Fig. 3)。

考 察

内因性胆汁酸及びUDCAはMHC class I発現をmRNA, 蛋白レベルで正に調節することが示された。かかる胆汁酸の作用はhydrophobicityと強く関連し、PBCの病態進展及び治療に関与している可能性を推測させた。また、胆汁酸によるMHC class I mRNAの誘導にPKCを介した細胞内情報伝達系の関与が強く示唆された。

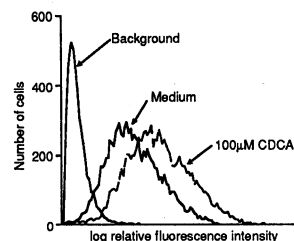


Fig.1 Flow cytometric analysis of MHC class I expression

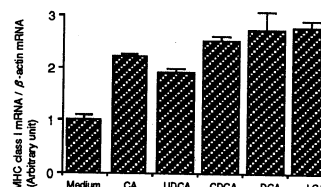


Fig.2 Effect of various bile acids on MHC class I mRNA expression

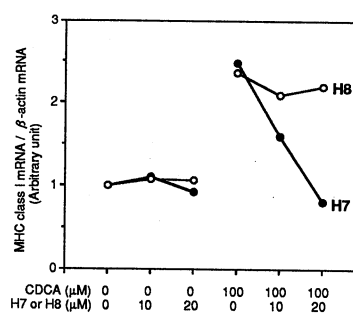


Fig. 3 Effect of H7 and H8 on CDCA-induced MHC class I mRNA expression

文 献

- 1) Calmus, Y., Gane, P., Rouger, P. and Poupon, R. : Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis : Effect of Ursodeoxycholic acid. *Hepatology* 11 : 12-15, 1990.
- 2) Poupon, R.E., Balkau, B., Eschwege, E., Poupon, R. and The UDCA-PBC study group. : A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 324 : 1548-1554, 1991.
- 3) Galle, P.R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G. and Stiehl, A. : Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes : *Hepatology* 12 : 486-491, 1990.
- 4) Menendez, J.L., Giron, J.A., Manzano, L., Garrido, A., Abreu, L., Albillos, A., Durantez, A. and Alvarez-Mon, M. : Deficient interleukin-2 responsiveness of T lymphocytes from patients with primary biliary cirrhosis : *Hepatology* 16 : 931-936, 1992.

1976年から93年までのHLA-B, DR 抗原の推移

小河原 悟・道永 功・内藤説也^{*1)}, 八木美輝子・野田律也・平塚俊樹^{*2)}

^{*1)}福岡大学病院腎センター

^{*2)}福岡大学医学部第二内科

要旨: 1976年から1993年にかけて約7500件のHLA血清学的タイピングを行ない, B, DR抗原について年次毎の抗原ブランクの割合と主要な抗原頻度を第11回国際組織適合ワークショップで示された抗原頻度と比較した. B抗原では1981年まで新抗原のタイピングが可能になり抗原のブランクの割合は減少したが, その後は一定であった. 抗原頻度は年次を経て有意にB39が低く, B54が高く, 九州地方に特有である可能性が示唆された. DR抗原では1990年まで一定の抗原のブランクの割合であったが, その後減少した. 抗原頻度はDR12とDR14が有意に低く, 抗血清に問題があると考えられ, 今後DNAタイピングの必要性が示された.

key words: blank allele, HLA-B antigen, HLA-DR antigen

はじめに

当研究室は1976年から現在までの18年間に約7500検体のHLA血清学タイピングをおこなってきた. 当初はクラスI 抗原A, Bの一部のみであったが, 1979年からはクラスII 抗原の血清タイピング, 1984年からクラスII遺伝子のRFLPタイピング, 1990年からPCR法を用いたクラスII遺伝子タイピングを行なってきた. この18年間に抗血清のスクリーニングとfamily studyにより, 数多くの新抗原やスプリットが発見され, WHOで公認されることにより, 主要な人種のA, B, DR, DQ抗原については一部のスプリットを除きほぼ出尽くした感がある. 今回我々は18年間を振り返って, 実際に抗原のブランクが埋まってきたかどうか, これまでタイピングを行なったものについて, B, DR抗原を中心にその頻度を年毎に算出し, さらに主要な抗原に対しては年によってその頻度に差がないかを検討した.

対象と方法

対象は当研究室で1976年から1993年まで血清学的タイピングがなされた7454検体(健常者, 患者及び家族を含む)でB(B40(60+61), B5(51+52+53), B15(62+63+75), B35, B44, B22(54+55+56), B7, B46, B16(38+39), B48, B59, B13, B70, B67, B37, B17(58), B27, B8)およびDR(DR1, DR2(15+16), DR3, DR4, DR5(11+12), DR6(13+14), DR7, DR8, DR9, DR10)抗

原について年毎の頻度を算出し, 第11回国際組織適合ワークショップ(IW)¹⁾で発表された頻度と比較した. 統計解析は χ^2 検定を行ない, 補正pで0.05未満を有意差ありとした.

結果

主要なB抗原の年次別の頻度を図1に示した. ブランクの割合は1976年から1981年まで減少したが, それ以降はほぼ一定していた. 各B抗原の頻度をIWで示された頻度と比較したものを表に示した. 抗原頻度は有意にB39は低く, B54は高かった(表).

次にDR抗原の年次別の頻度を図2に示した. 1980年からDRタイピングを行なっているのが約20%がブランクなのであった. 90年以降はややブランクが減少している. 各DR抗原の頻度ではDR5特にDR12とDR6特にDR14が一定してIWの頻度と比較して低かった(表).

考察

B抗原については同型接合の頻度が年間を通して一定であると仮定すれば1976年から81年にかけて抗原のブランクが減少したのはそれまでにB46, B59, B67など新たな抗原のタイピングが可能になったことと一致し, その後はブランクを埋める新抗原の発見も少なくなり, 細かく抗原がスプリットしていったことを示唆した. また対象者に健常者, 患者, 家族が含まれており抗原が片寄

年次	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93
B抗原頻度																		
減少			B39				B39		B39							B39	B39	B39
増加			B54	B54			B54	B54					B54	B54				B54
DR抗原頻度																		
減少					DR5	DR5	DR5	DR12	DR12	DR12						DR12		
					DR6	DR6		DR14	DR14	DR14	DR14	DR14	DR14	DR14	DR14	DR14		

表 年次毎の当研究室の抗原頻度と第11回国際組織適合ワークショップで示された抗原頻度との比較

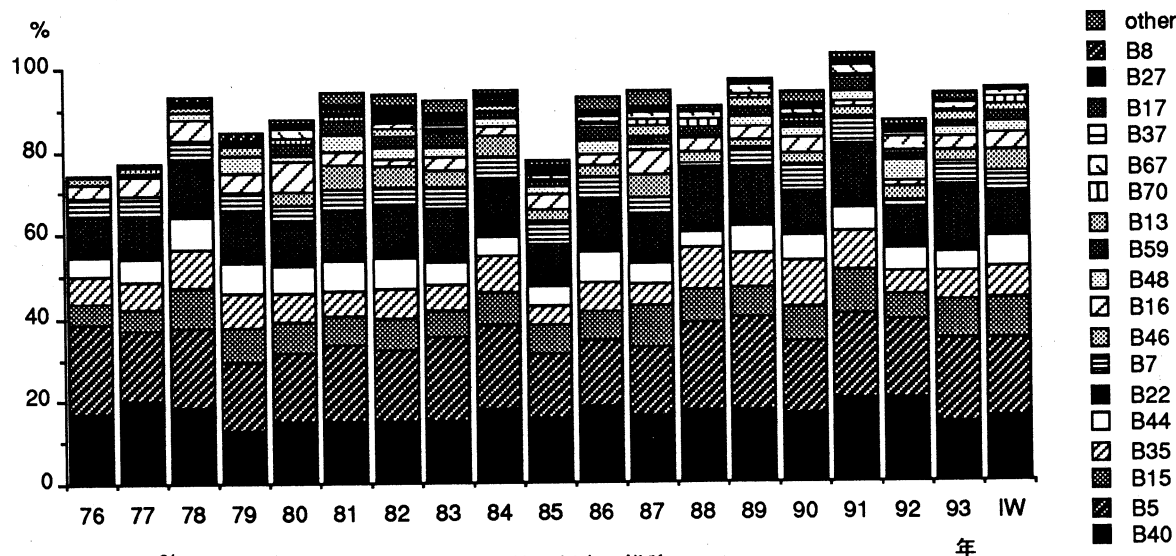


図1 B抗原頻度の推移

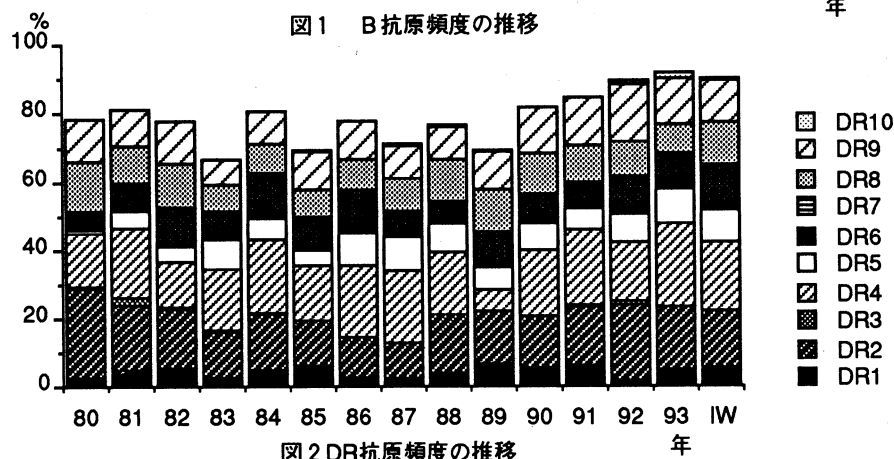


図2 DR抗原頻度の推移

る可能性はあるが、B39やSN-1²⁾としてかつて我々が発見したB54に関しては年次を経ても一定してIWの頻度と有意差があるのは九州地方に特異な傾向である可能性が示唆された。

DR抗原については90年以降抗原のブランクが減少しているのは、血清学的タイピングで判定困難な例に対してDNAタイピングを追加することによってブランクが減少したと考えられた。IWの頻度と比較してDR12やDR14が有意に低く、その他に高い頻度の抗原がないのはDR12やDR14に対するmonospecificな優れた抗血清がないことによるものであり、すべてが正確にタイプできていないためと考えられ、今後はDR抗原については

DNAタイピングを加えることにより、さらにブランクは減少することが考えられる。

文献

- 1) Imanishi, T., Akaza, T., Kimura, A., Tokunaga, K., Gojobori, T. : Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. HLA 1991. 1992, p 1066-1220.
- 2) Saito, S., Naito, S., Toyoda K., et al. : A study on HLA system in Japanese. Tissue Antigens 5: 217, 1975.

Modified regular dot-blot hybridization for HLA-A SSOP

秦 美暢・小林 賢^{*1)}, 阿藤みや子^{*2)}, 玉井誠一・関口 進^{*1)}

^{*1)}防衛医科大学校検査部, ^{*2)}同 輸血部

Summary: PCR-SSOP (regular-dot) による DNA typing では1枚の filter に1種類の probe しか hybridize できず, 少量の検体に対しても使用する probe の数だけ反応を繰り返さなければならない。今回我々は, dot blotter 上で PCR products と SSO probes を反応させる方法を考案した。well 毎に異なった組み合わせの反応を同時に行えるため, 1回の検体処理数や使用する probes の種類と数が自由にデザインできる。感度も従来の regular dot と同程度であり, 特殊な器材を必要としない自由度の高い方法であると思われた。今回, 第11回日本組織適合性ワークショップ後に九州大学木村彰方先生より配布された HLA-A 遺伝子の SSOP 用の PCR primers と SSO probes を用いて本方法を試みたので報告する。

Key Words: DNA typing, SSOP, regular dot-blot

Introduction

PCR-SSOP (regular dot) は比較的安価に大量検体を処理できる方法であるが, 反面, 僅かな検体を処理する場合でも作業量は減らず, 使用するprobeの数だけ反応を繰り返さなければならない。この, 少量検体処理に不向きである点が普及の妨げの一因とも思われる。一方, reverse dotなどを用いてキット化されつつある製品は少量検体処理には適しているものの, probeの変更や半端な数の検体の処理に難点を感じる。

今回我々は, dot blotter上でhybridizationを行なうことにより, PCR productとSSO probeを自由に組み合わせで反応を行える方法を試行したので報告する。

Materials and Methods

DNA samples

Guanidine Thiocyanate法 (小林ら, 1994) により健康人末梢血から抽出したgenomic DNA (防医大DNAパネル) を用いた。

Oligonucleotides

HLA-A SSOP genotyping (regular dot) のために, 第11回日本組織適合性ワークショップ後に九州大学木村彰方先生より配布された PCR primers (ALSP-C, -D)と22種のSSO probes (Fig.1)をDIG-11-ddUTP (Boehringer)で標識して使用した。

PCR amplification

Taq DNA polymerase (Boehringer)を用い,

ASTEC PC-700により, 96°C 1分, 53°C 1分, 72°C 1分30秒の3 stepを30cycles繰り返してHLA-A遺伝子の第2~3 exonを増幅し, 1% Agarose gelでの電気泳動で約600bpの産物を確認した。

Designing for spot and hybridization

dot spottingに先立ち, DNA samplesとSSO probesのdot blotter 上での組み合わせをFig.1のように決めた。

Dot spotting of amplified DNA

prewetted nylon filter (Hybond N+, Amersham)の下に濾紙 (Whatman 3MM)を重ね, dot blotter (Bio-DotTM, BIO-RAD)に挟んで使用した (Fig. 2)。

各wellに, PCR産物3 µlと0.4N NaOH, 25mM EDTA 50 µlを混和して室温10分間のincubateをしたものを50 µl/wellずつspotした。陰圧で吸引後, TE液 100 µl/wellを加えて陰圧で吸引し, wellを洗浄した。

spot後, dot blotterを静かに開くとnylon filterは蓋部に密着しているので, そのまま濾紙のみをはずし, 底部の吸引面をPARAFILM "M" (American CAN Company)またはSaran Wrap (旭化成)で覆い, 再度 nylon filterの貼り付いたままの蓋部を取り付けた。この状態でdot blotterごと, hybridization温である54°Cに加温したincubater内に10分間入れ, spot面を乾燥させるとともにdot blotterを加温した。

Hybridization and washing

加温したdot blotterにhybridization buffer (6xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.1% sarcosine

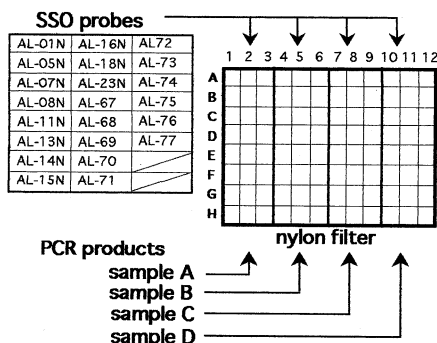


Fig.1 Designing of spot and hybridization

sodium, 0.02% SDS) 100 μ l/wellを加え、乾燥防止のためwellをSaran Wrapで覆い、54°C 20~30分間のprehybridizationを行なった。

dot blotterを転倒し吸水紙に軽く叩きつけて液を捨て、DIG-11-ddUTPで標識したprobeをhybridization bufferで0.5 pmol/mlとした液を100 μ l/wellずつ加え、乾燥防止のためwellをSaran Wrapで覆い、54°C 30分間のhybridizationを行なった。

次いでdot blotterを転倒し吸水紙に軽く叩きつけて液を捨て（ピペットで回収すればprobeの再利用可）、dot blotterを開いてnylon filterを取り出し、post wash以下の操作に進んだ。

post washは第11回国際ワークショップのプロトコル（Kimura and Sasazuki, 1991）に従い、2xSSPE, 0.1% SDSで室温5分間のリンスを2回、TMAC solution (50mM Tris-HCl pH8.0, 3.0M TMAC, 2mM EDTA, 0.1% SDS)で室温10分間の洗浄を1回と59°C 15分間の洗浄を2回（water bathでの加温が望ましい）、2xSSPEで室温10分間のリンスを2回行なった。

Chemiluminescent detection

Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments (Boehringer)とLumigen PPD (Boehringer)を用い、添付のプロトコルに従ってhybridization bag内で反応を行なった。遮光下で37°C 10分間程度のpre-incubationを行ない、X-ray film (Kodak, X-AR)に3~10分間露光し、現像、定着、水洗を行った。

Results

一例をFig. 3に示す。先に同じprobesを用いて当施設で施行したSSOP regular dotでも多少の偽反応が認められたため、本法の正確な評価は困難であったが、regular dotと概ね同等の反応性が認められた。

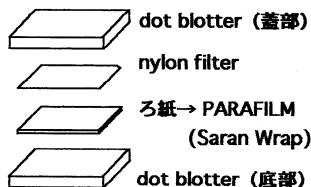


Fig.2 Dot spotting and hybridization

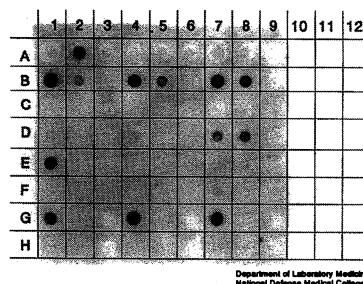


Fig.3 Examples of modified regular dot-blot
No. 1-3; sample #78019 (A2, A26)
No. 4-6; sample #78020 (A2, A24)
No. 7-9; sample #78021 (A2, -)

Discussion

一般に使用されているdot blotterを用い、nylon filterの下に濾紙を重ねてPCR product をspotし、引続き濾紙をPARAFILM（又はSaran Wrap）に代えることによって、dot blotter上でのprobeとのhybridizationが可能となった。これにより、dot blotterのwell毎に異なったPCR productとprobeの組合せを選択できるため、1回の検体処理数と用いるprobeの種類・数を自由にデザインできる。感度も従来のregular dotと同程度であり、特殊な器材を必要としない自由度の高い方法であると考えている。bakingは行わずreprobingによるfilterの再使用は考えていないが、再使用による劣化を考慮する必要がない利点もある。使用するprobeの数に応じて1回の処理検体数は制限されるが、通常1~数検体を、dot spotからchemiluminescent detectionまで約5時間程度で判定可能である。

本法は、PCR-SSP法ほどの迅速性や、キット化されつつあるSSO法製品ほどの簡便性は有していないが、これまでに検討の重ねられてきた信頼性の高いSSO probeを用いて比較的短期間に少量検体を処理でき、コストも低く抑えられることが期待される。また、検体とprobeの組み合わせを自由にデザインできるので、一般検査室への普及だけでなく、研究室における少量の検体の再検査や追加検査などの場合にも有用と思われる。

References

- 小林 賢, 他; グアニジン・チオシアナートを用いた高分子DNA迅速抽出法. 日本輸血学会雑誌 40(2); 413, 1994.
- A. Kimura and T. Sasazuki; W3.3 Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique, In HLA 1991, K. Tsuji, et al., ed, New York, 1992, Oxford University Press Inc., pp396-419.

ORIGINAL PAPER

Short Communication

2. クラスⅡと新しい遺伝子

日本人の DR-NJ25, DR14 特異性の 遺伝学的多型性とハプロタイプの解析

橋本光男・木下朋子^{*1)}, 兼重俊彦^{*3)}, 山崎美保^{*1)}, 市川靖二^{*2)}, 内田清久^{*3)}, 福西孝信^{*1)}

^{*1)}兵庫県立西宮病院腎移植センター, ^{*2)}兵庫県立西宮病院泌尿器科

^{*3)}シオノギ製薬株式会社診断医学部

要旨: DR-NJ25, DR14 特異性は, 日本人に特徴的な抗原系の 1 つであるが, 血清学的には判定が困難であり, クラス I 抗原との連鎖も明確でない. 我々は, 1792 名の日本人非血縁者の血清学的及び, DNAタイピングを行い, 221 名の DR14, 88 名の DR-NJ25 陽性者を認めた. 各抗原の多型性を DNAタイピングで検討すると, DR14 は, DRB1*1401, 1405, 1407 の 3 種類, DR-NJ25 については, DRB1*1307, 1402, 1403, 1406, 1412 の 5 種類の遺伝子型にスプリットされた. 今回の解析で 1 例しか認められなかった DRB1*1402 と 1412 を除いた 6 種類の DRB1*14 遺伝子型は, DPB1 を除く他のクラス II アリル (DRB3, DQA1, DQB1) と強い連鎖を示し, 7 種類のクラス II ハプロタイプを形成した. この 7 種類の DR 14 ハプロタイプは, 全てクラス I 抗原とも有意な連鎖がみられ, 日本人に特徴的な 6 種類の HLA ハプロタイプを推定することができた.

はじめに

現在までに HLA 領域には, 35 種類の遺伝子 (偽遺伝子も含めて) が同定されており, クラス I 分子として 124 種類, クラス II 分子は 107 種類もの対立遺伝子型が公認されている⁽¹⁾. これらの対立遺伝子は各遺伝子間で強い連鎖不平衡を示し, しかも各人種間で遺伝子頻度の偏りがみられることから, 各人種に特徴的なハプロタイプを形成する⁽²⁾. 従って, HLA ハプロタイプの研究はその集団の進化を知る上で重要な手がかりを与えられと考えられる. 今回, 我々は日本人に特徴的と考えられる DR-NJ25 抗原を含む DR14 関連抗原の血清学的な多型性を遺伝子レベルで捉え, 他のクラス II アリル (DRB3, DQA1, DQB1, DPB1) 及び, クラス I 抗原との連鎖を解析し, 日本人に特徴的なハプロタイプについて検討した.

材料と方法

日本人非血縁者 1792 名の血清学的タイピングは NIH 標準法に従った. DNAタイピング (DRB1, DRB3, DQA1, DQB1, DPB1 アリル) は第 11 回国際 HLA ワークショップのプロトコールに従い, ジゴキシゲニン標識プローブを用いた PCR-SSOP 法で検討した⁽³⁾. 遺伝子頻度, ハプロタイプ頻度は Baur, Dailov 等の方法を用いて算出した.

結果

対象とした 1792 名のうち, DR14, DR-NJ25 の遺伝

子頻度は, それぞれ 6.3%, 2.5% であった. 各抗原の多型性を DNAタイピングで検討すると, DR14 は 3 種類 (DRB1*1401, 1405, 1407), DR-NJ25 については 5 種類 (DRB1*1307, 1402, 1403, 1406, 1412) の DRB1 アリルにスプリットされた (表 1). これら 8 種類の DRB1 のうち, 今回の解析で 1 例しか認められなかった DRB1*1402 と 1412 を除く 6 種類は, 他のクラス II アリルと非常に強い連鎖を示し, それぞれに特異的な DRB3-DQA1-DQB1 ハプロタイプを形成した (表 2). DRB1*1401 は DQB1*0502 と DQB1*0503 に強い相関を示し, 2 種類のクラス II ハプロタイプ (DRB1*1401A, 1401B) が見出された. DPB1 アリルと連鎖が認められたのは, DRB1*1407 のみで DPB1*1401 と有意に相関を示した ($p < 0.01$).

表 2 から推定された 7 種類のクラス II ハプロタイプについてクラス I 抗原との連鎖を検討した (表 3). DR-NJ25 関連 DRB1 アリルである DRB1*1307, 1403, 1406 の各ハプロタイプは, (B70), (A31, B51, B35, Cblank), (A26.1, B62, Cw9) の各抗原と有意の相関を示した ($p < 0.01$). DR14 抗原についても, DRB1*1401A, 1401B ハプロタイプは, (B51), (A26, B61) とそれぞれ異なったクラス I 抗原と連鎖が認められた ($p < 0.01$). 同様に DRB1*1405, 1407 ハプロタイプも, (B39), (A26, B48, C blank) の各抗原と強い相関を示した ($p < 0.01$). 以上の結果より 1792 名の日本人集団に於て, 表 4 に示すように DR14 に関連した 7 種類の特徴的なハプロタイプが推定された.

Serological antigens	Number	DRB1 alleles	Number	AF(x100)
DR14	221	DRB1*1401	142	4.04
		1405	72	2.02
		1407	7	0.20
DR-NJ25	88	DRB1*1307	3	0.08
		1402	1	0.02
		1403	37	1.04
		1406	46	1.29
		1412	1	0.02

表1 日本人のDRB1*14遺伝子型の頻度

DRB1 alleles	other class II alleles	Number	HF(x100)	rA(x100)
DRB1*1401	DRB3*0202	144	4.04	100
	DQA1*0101	144	4.04	100
	DQB1*0502	56	1.55	68.09
	DQB1*0503	78	2.14	51.43
DRB1*1405	DRB3*0202	72	2.02	100
	DQA1*0101	63	1.77	85.61
	DQB1*0503	63	1.77	85.61
DRB1*1407	DRB3*0202	7	0.20	100
	DQA1*0101	7	0.30	100
	DQB1*0502	5	0.14	70.76
	DPB1*1401	2	0.06	27.03
DRB1*1307	DRB3*0202	3	0.08	100
	DQA1*0501	3	0.08	100
	DQB1*0301	3	0.08	100
DRB1*1403	DRB3*0101	37	1.03	100
	DQA1*0501	37	1.03	100
	DQB1*0301	37	1.03	100
DRB1*1406	DRB3*0202	46	1.29	100
	DQA1*0501	46	1.29	100
	DQB1*0301	46	1.29	100

表2 DRB1*14遺伝子型と他のクラスII遺伝子型の連鎖(p<0.01)

考察

近年、遺伝子レベルでのHLAタイピングが可能となり、従来の血清学的方法で検討されてきた以上にHLAアレルの多型性が認められ、さらにクラスI、クラスII領域にまたがってより強い連鎖不平衡が存在することがわかってきた(1,4,5)。DR-NJ25, DR14は、日本人に特徴的な抗原系の1つであるが、血清学的に判定が困難であり、クラスI抗原との連鎖が明確でなかった。今回、我々はDNAクラスIIタイピングを行い、日本人集団に於て8種類のDRB1*14遺伝子型の存在を認め、そのうちの6種類の遺伝子型は、それぞれに特徴的なクラスIIハプロタイプを形成していることを確認した。さらに、これらのクラスIIハプロタイプは、日本人に特徴的なクラスIハプロタイプと強い連鎖を示した。DRB1*14遺伝子頻度は人種により偏りがみられ、東北アジア、アメリカ大陸と一部の南アジアのモンゴロイド系民族集団に高頻度に認められている(2)。従って、今回の我々の解析で推定された6種類のDRB1*14ハプロタイプを、他のモンゴロイド系民族集団のそれと比較検討することにより、民族間の移動、拡散に関する情報を提供しようと考えられる。

文献

- 1) Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Dupont, B., Erlich, H.A., Mach,

DRB1-DRB3-DQA1-DQB1	class I	Number	HF(x100)	rA(x100)
1401-0202-0101-0502	A31	16	0.45	13.44 n.s.
	B51	21	0.59	20.07 p<0.001
	Cblank	44	1.24	35.11 p<0.025
1401-0202-0101-0503	A26	30	0.91	14.93 p<0.01
	B61	29	0.81	12.46 p<0.005
	Cw10	20	0.56	7.82 n.s.
1405-0202-0101-0503	A2	36	1.00	33.87 n.s.
	B39	12	0.36	10.84 p<0.001
	Cw7	17	0.48	12.62 n.s.
1407-0202-0101-0502	A26	4	0.11	52.64 p<0.005
	B48	4	0.11	55.75 p<0.001
	Cblank	2	0.06	66.17 p<0.001
1307-0202-0501-0301	B70	2	0.06	66.17 p<0.001
	A31	14	0.39	31.30 p<0.001
	B51	23	0.64	58.23 p<0.001
1403-0101-0501-0301	B35	9	0.25	18.63 p<0.01
	Cblank	33	0.93	81.50 p<0.001
	A26.1	6	0.17	11.83 p<0.001
1406-0202-0501-0301	B62	27	0.76	55.46 p<0.001
	Cw9	28	0.78	55.60 p<0.001

表3 DRB1*14クラスIIハプロタイプとクラスI抗原の連鎖

DRB1-DRB3-DQA1-DQB1	A-C-B	Number	HF(x100)	rA(x100)
1401-0202-0101-0502	31-X-51	12	0.36	10.84 p<0.001
1401-0202-0101-0503	26-10-61	6	0.19	4.94 p<0.05
1405-0202-0101-0503	2-7-39	11	0.36	10.84 p<0.001
1407-0202-0101-0502	26-X-48	4	0.11	55.75 p<0.001
1403-0101-0501-0301	31-X-51	14	0.40	31.30 p<0.001
1406-0202-0501-0301	26.1-9-62	10	0.29	18.14 p<0.001

表4 日本人のDRB1*14ハプロタイプ

- B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, G.M.T., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Terasaki, P.I.: Nomenclature for factors of the HLA system 1991. Tissue Antigens. 39:161-173, 1992.
- 2) Imanishi, T., Akaza, T., Kimura, A., Tokunaga, K., Gojobori, T.: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji, K., Aizawa, M., Sasazuki, T. (eds) HLA 1991, Oxford, Oxford University Press, 1065-1220, 1992.
 - 3) Kimura, A., Sasazuki, T.: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: Tsuji, K., Aizawa, M., Sasazuki, T. (eds) HLA 1991, Oxford, Oxford University Press, 397-419, 1992.
 - 4) Hashimoto, M., Kinoshita, T., Yamasaki, M., Tanaka, H., Imanishi, T., Ihara, H., Ichikawa, Y., Fukunishi, T.: The gene frequency and haplotypic associations within HLA region in unrelated 916 Japanese individuals. Tissue Antigens. In press.
 - 5) Kinoshita, T., Hashimoto, M., Yamasaki, M., Ihara, H., Ichikawa, Y., Fukunishi, T.: Striking conservation of three extended HLA-DR13 haplotypes in Japanese population. Tissue Antigens. In press.

Key word: HLA-DRB1*14 allele, PCR-SSOP

HLA-DNA タイピングの導入と 血清学的タイピング結果との相違

西垣文敬・笹木剛志^{*1)}、平野哲夫・新藤純理^{*2)}、脇坂明美・吉木 敬^{*3)}

^{*1)}市立札幌病院中央検査部、^{*2)}市立札幌病院腎移植科

^{*3)}北海道大学医学部病理学第一

要旨：HLAタイピングは腎移植の際に重要な役割を果たし、特にDR型のマッチングが重要とされているが、血清学的方法とDNAタイピング結果との不一致が指摘されている。そこで、我々は献腎移植希望透析患者 106名を対象に、市販DNAタイピングキットを用い、その結果について検討した。

106名中、不一致が認められたのは8名(7.5%)であった。原因としてはB細胞分離、良質抗血清獲得の困難性が考えられ、DNAタイピングの必要性が示唆された。また今回我々が使用したSSP法によるキットは簡便で短時間で実施可能なことから、新たにDNAタイピングを導入する施設にとってはその導入が容易であると考えられたが、全体の50%の抗原については遺伝子型までは決定できなかった。今後は、全ての遺伝子型をSSP法で判定可能なキットの開発が待たれる。

Key words： DNA typing , renal transplantation , PCR-SSP

はじめに

HLAタイピングは腎臓移植の際に重要な役割を果たし、特にDRタイピングのマッチングが重要である。HLA-DR座のタイピングは大部分の施設においては血清学的方法で行われているが、良質抗血清を得るのがむずかしく、B細胞の分離が困難な場合があることから、必ずしも完全な方法であるとは言えず、DNAによるタイピング結果との不一致が指摘されている。そこで、最近、市販キットが利用可能となり、DNAタイピングを導入し易くなったことから当施設においても市販キット利用によるDNAタイピングを導入したのでその方法、結果について報告する。

材料と方法

1992年9月から1994年5月の間に北海道地方腎移植センターに登録された献腎移植希望透析患者の中で検体が保存されていた106名を対象とした(一部新鮮血由来)。

抗血清：全国共通サブセントラートレイ(JST-6、JST-7)、テラサキトレイ(one lambda社 lot 4~6)を基本にローカルトレイを併用した。

Bリンパ球分離：ラフカラムBクイック法で63件、ダイナビーズ法で43件分離した。

試薬：DNAタイピングは市販キット(ダイナル社、DYNAL DR[®] low-resolution[®]-SSP¹⁾、DYNAL DRB1*

04-SSP)を用い、添付書に準じて実施した(PCR-SSP法)が、使用プライマーは、血清学的タイピング結果を参考にして以下の如く選択した。

1. BLANK がある場合：全プライマー(24種)
2. DR52グループの場合：DR52グループのプライマー(15種)
3. DR52グループ以外の場合：各タイプにより1~3種
4. DR4の場合：DRB1*04-SSPを使用(12種)

DNA抽出：市販キット(蠶三光純薬、セパジーン)を用い、添付書に準じて実施した。

当院におけるHLAタイピング法を図1に示す。

結 果

1. 所要時間は6時間であった(1検体実施の場合、図1)。
2. 血清学的方法とDNAタイピング結果の不一致
各タイピング結果はDR1~DR18で表現した。

106名中、血清学的方法でタイピング不能であったがDNAタイピングで可能となったのが2名、血清学的方法で一抗原のみ検出されたが、DNAタイピングで新たに一抗原検出されたのが1名、血清学的方法で2抗原検出されたが、1抗原がDNAタイピング結果と異なっていたのが5名で、全体で不一致が認められたのは8名(7.5%)であった(表1)。

図 1 DNAタイピング法

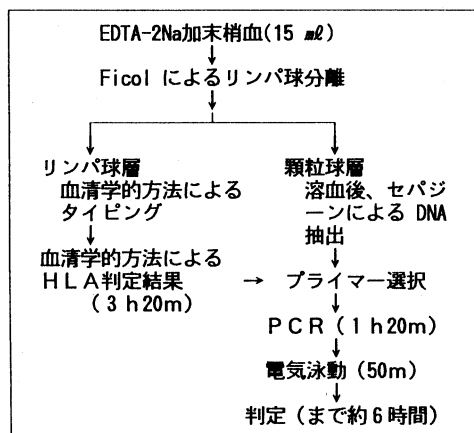


表 1 血清学的タイピングとDNAタイピング結果の相違 n=106

血清学的タイピング	HLA型	数	DNAタイピング	不一致数	率
タイピング不能		2		2	100%
DRX、BLANK		17		1	5.9%
DRX、DRX		87		5	5.7%
合 計		106		8	7.5%

表 2 血清学的タイピングとDNAタイピングとの不一致抗原 n=5

血清学的タイピング	DNAタイピング
DR 5	DR14
DR11	DR 8
DR11	BLANK
DR12	DR14
DR 9	DR 4

表 2 に血清学的方法で 2 抗原検出されたが、1 抗原が DNA タイピング結果と異なっていた 5 名の DR 型を示したが、不一致の 4 抗原は DR 5 2 グループに属していた。

- 今回使用したキットは全ての遺伝子型 (DRB1 型) が決定されるわけではなく、DR 8、11、12、15などは遺伝子型まで決定できない。DR 抗原 BLANK 13件、DRB1*04-SSP 未使用 3 件を除いた 196 抗原中、実際の遺伝子型タイピング可能率は 50.0% (98/196) であった。この中で、DR 4 に属する異なる遺伝子型を保有する 5 名については、DRB1*04-SSP ではその遺伝子型までは決定できなかった。

考 察

最近、血清学的方法と DNA タイピング結果との不一致についての報告^{2) 3)} (10.2~15%) があるが、当院においても同様の結果 (7.5%) となり、DNA タイピングの必要性が示唆された。

今回使用した抗血清は各ロット間の質の差は少ないと考えられ、このことを前提に今回の不一致の原因について考察した。

血清学的方法でタイピング不能であった 2 名と、1 抗原のみ検出された 1 名については B リンパ球の Viability が低かったことが原因と考えられ、HLA クラス I のタイピングは可能であったことから、血清学的方法と DNA タイピングとの結果の不一致の原因の一つは B 細胞分離の困難性のためと考えられた。また、血清学的方法で 2 抗原検出されたが、1 抗原が DNA タイピング結果と異なっていた 5 名の中で 4 抗原が DR 5 2 グループに属していたことから、もう一つの原因としては、特に DR 5 2 グループについて良質の抗

血清を得るのが困難であるためと考えられた。これらのことから、今後は、特に死体腎移植の際には HLA-DR 抗原のタイピングを DNA タイピングで実施する必要があると考えられた。

一方、小林⁴⁾らは、血清学的に DR 抗原が一致している死体腎移植ペアに比べ、DR 遺伝子型が一致しているペアの 5 年生着率は有意に高い (それぞれ 78%、97%) と報告していることから今後は全ての遺伝子型 (DRB1 型) をタイピングする必要があると考えられた。今回我々が使用したキットでは、全検体の 50% の遺伝子型を決定することができたが、現在、残りの 50% については、RFLP 法によるタイピングキットを使用し、タイピングを試みている。今回使用した SSP 法によるキットは簡便で、短時間で実施することができることから、新たに DNA タイピングを導入する施設にとってはその導入が容易であると考えられた。今後は、全ての遺伝子型が SSP 法で判定可能なキットの開発が待たれる。

文 献

- 1) O. Olerup, H. Zetterquist: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 39:225-235, 1992.
- 2) J. Mytilineos, S. Schererard, G. Opelz: Comparison of RFLP-DR beta and serological HLA-DR typing in 1500 individuals. *Transplantation* 50:870-873, 1990.
- 3) 小原節子、加村弘美、小林孝彰他: HLA-DR 抗原判定における血清学的方法の問題点. *移植* 28:98-103, 1993.
- 4) 小林孝彰、加村弘美、小原節子他: 死体腎移植における HLA-DR A タイピングの重要性. *移植* 28:742-748, 1993.

PCR-MPH 法による 簡便な HLA class II 遺伝子のタイピング

前川尻真司・川井信太郎^{*1)}、徳永勝士・宮本正樹・赤座達也・十字猛夫^{*2)}・山根明男^{*1)}

^{*1)}湧永製薬株式会社バイオ研究所

^{*2)}日赤中央血液センター

要旨:大量検体のHLAのDNAタイピングをルーチンとして行うことを目的とし、迅速で操作が簡便、コストが安価なPCR-MPH法を前年度の本学会で報告した。しかし、前回報告した12種のプローブの組み合わせによるDRB1遺伝子のgeneric typingでは、DR3, 11, 12, 8がホモなのか、それらとDR6とのヘテロなのかの判定ができない、或いはDRB1*1403をDR8と判定してしまう、等の限界があった。今回、これらの限界を克服するために4種のプローブを追加した。更にsubtypingに関しても検討し、現在報告されている日本人に存在するほとんどのallele typingが可能になった。また、本法でのDQB1遺伝子のgeneric typingについても検討したので報告する。

key words : HLA-DNA typing, PCR-MPH, ELISA

はじめに

近年、HLAのDNAタイピングは日常的な検査法になり、PCR法を利用した多数の方法が報告されている。大量検体のHLAのDNAタイピングをルーチンとして行うには、①迅速で操作が簡便である、②判定が正確かつ容易である、③コストが安価である、等の条件を満足する方法でなければならない。そこで我々は、これらの条件を満足するPCR-MPH (PCR-microtiter plate hybridization) 法を検討してきた^{1), 2)}。本法はPCRとELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) とを組み合わせた方法である。これまでは操作の簡便性や低コスト化等を考慮して12種のプローブの組み合わせによるDRB1遺伝子のgeneric typingを検討してきた。しかし、alleleの組み合わせによっては、例えばDR3, 11, 12, 8のホモなのかそれらとDR6とのヘテロなのか判定できない、或いはDRB1*1403をDR8と判定してしまう、等の限界があった。今回、DRB1遺伝子のgeneric typingをより詳細に行うために4種のプローブを追加した。更に、DRB1遺伝子のsubtyping、及びDQB1遺伝子のgeneric typingも検討したので併せて報告する。

材料と方法

検体には、PCR-RFLP法、或いはPCR-SSCP法によりallele typingしたゲノムDNAを用いた。5'末端ピオチン標識プライマーを用い、PCR法によりこれらの検体DNA

の増幅を行った。図1に本法の原理を示す。このPCR増幅物を熱変性した後、各々のプローブが導入されたssDNAを予め固定した96穴マイクロプレートに添加し、58℃でハイブリダイゼーションを行った。プレートを洗浄後、酵素(アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼ)標識ストレプトアビジンにより発色させ判定した。

結果

DRB1遺伝子のgeneric typing

より詳細なDRB1遺伝子のgeneric typingをするための4種のプローブ (DRB1003, DRB1005, DRB7003及びDRB7007)をこれまでに報告した12種のプローブの組み合わせに追加した。用いたプローブのallele特異性を表1に、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンを用いたPCR-MPHの結果を図2に示す。例えば、検体Aはこれまでの12種のプローブの組み合わせではDR3のホモなのかDR3/DR6のヘテロなのか判定できなかったが、新しく追加したプローブDRB1003及びDRB7007で陽性のシグナルを示したのでDR3/DR13 (DRB1*1301或いは1302)と判定できた。また、検体BはこれまでDRB1*1403なのかDR8なのか判定できなかったが、プローブDRB7003で陽性のシグナルを示したのでDRB1*1403であると判定できた。しかし、検体Cのようにこれまでと同様、DR11のホモなのかDR11/DR14 (DRB1*1403, 1404以外)のヘテロなのか判定できない場合もあった。

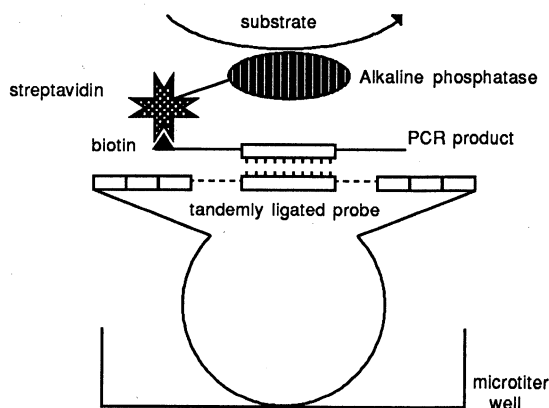


図1. PCR-MPH法の原理

DRB1遺伝子のsubtyping

generic typingの結果, DR2, 3, 4, 11, 12, 6, 或いは8と判定された場合, DR2, DR3/11/6, DR12/8, 或いはDR4の各々のグループに特異的なプライマーを用いてPCRを行い, subtyping用のプレートを用いてMPHを行った. 上述の検体Cのsubtypingを行った結果, DRB1*1101/1405のヘテロと判定できた. これ以外に行った多くの検体のsubtypingの結果はPCR-RFLP法, 或いはPCR-SSCP法の結果と良く一致した.

DQB1遺伝子のgeneric typing

DQB1遺伝子を特異的に増幅するPCRを行い, それらの増幅物に対して5種のプローブを組み合わせた固定プレートを用いてMPHを行った. その結果, 血清学的レベルのDQB1遺伝子のタイピングができた.

考察

今回, これまでに報告した12種のプローブの組み合わせに4種のプローブを追加した. その結果, 本法のDRB1遺伝子のgeneric typingの解析能力は血清学的レベルにほぼ匹敵した. ただし, DR14グループのみに共通な配列が存在しないため, DR3, 11, 13, DRB1*1403のホモなのか, それらとDR14 (DRB1*1403, 1404以外) とのヘテロなのかは, このプローブの組み合わせでは判定できない. このような検体のallele typeまで知りたい場合は, subtypingを行うことにより判定可能である. 今回検討したsubtyping用プローブを用いれば, 現在報告されている日本人に存在するほとんどのDRB1遺伝子のallele typingができる.

また, DQB1遺伝子のgeneric typingも検討した結果, 血清学的レベルのタイピングが可能であった.

表1. DRB1遺伝子generic typing用プローブのallele特異性

Well No.	Probe name	Specificity
1	DRB2801S	DRB1*0101-0103
2	DRB1002N	DRB1*1501,1502,1601,1602
3	DRB7004	DRB1*0301-0303
4	DRB1004	DRB1*0401-0412
5	DRB5703S	DRB1*1101-1104
6	DRB2802	DRB1*1201,1202
7	DR3/5/6/8	DR3,11,12,13,14,8
8	DRB1003	DRB1*0301-0303,1101-1104,1301-1306,1401-1403,1405-1409
9	DRB1005	DRB1*1201,1202,0801-0805,1404
10	DRB7003	DRB1*1403
11	DRB7007	DRB1*1301,1302,1304,1102,0103,0402
12	DRB1006	DRB1*0701,0702
13	DRB8N	DRB1*0801-0805,0412,1403
14	DRB2804	DRB1*0901
15	DRB1008W	DRB1*1001
16	DRBcommon	All

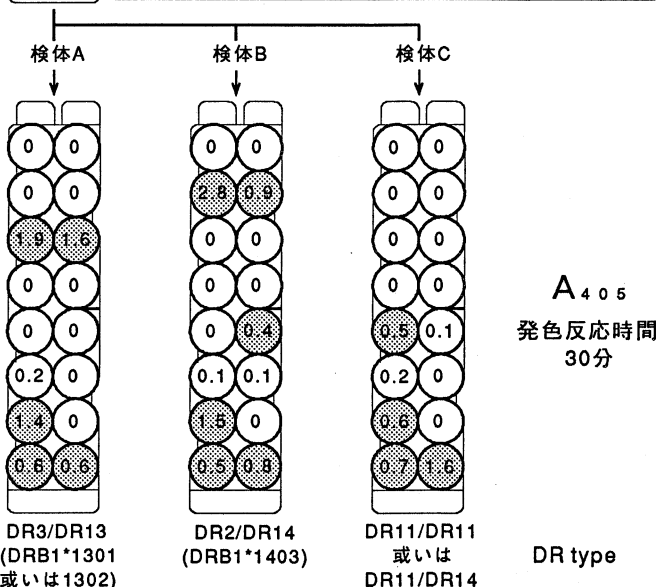


図2. DRB1遺伝子のgeneric typing (PCR-MPH)の結果

今回検討したDRB1遺伝子のgeneric typingの改良及びsubtyping用プローブの拡充, またDQB1遺伝子のgeneric typingの導入により, PCR-MPH法の実用的価値が更に高まったと考える.

文献

- 1) Kawai, S., Mackawajiri, S., Tokunaga, K., Juji, T., and Yamane, A. : A simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plate. Hum. Immunol. 1994 (in press)
- 2) 川井信太郎, 前川尻真司, 山根明男, 徳永勝士, 十字猛夫 : PCR-MPH法によるHLA-DRB遺伝子のタイピング. 第11回日本組織適合性ワークショップ抄録集. 1993, 鹿児島.

HLA 検査における 血清学的タイピングと DNA タイピングの比較

村山敦浩・稲川 明・中谷さやか・辻 敏永・清水喜一^{*1)}、左田正晴・辻 隆之^{*2)}

^{*1)}シオノギバイオメディカルラボラトリーズ

^{*2)}国立循環器病センター研究所

要旨：欧米では血清学的タイピングとDNAタイピングによる結果に約25%の不一致があると報告されている。日本においても若干の不一致が認められるという報告がある。今回著者らは当施設での血清学的タイピングとDNAタイピングによる結果の比較をおこなった。血清学的タイピング318例中10例（3.1%）は検査不可能であったが、DNAタイピングはすべて検査可能であった。それぞれの方法による結果に不一致はなかったが、血清学的タイピングでブランクとしたものの中には血清学的タイプは同じであっても異なる遺伝子型を持つものがあつた。DNAタイピングは試料の反応性に左右されずに検査できる点、検査試薬が安定に供給できる点などから血清学的タイピングに比べて有用であると思われた。

key words: HLA typing, DNA typing, HLA-DR

はじめに

HLAタイピングは臓器移植時のドナーとレシピエントの組織適合性の検索、特定の疾患とHLAの関連性の検索などに利用されている。従来より行なわれている血清学的タイピングは白血病患者、自己免疫疾患患者からの試料に適用できない場合があること、特異性の高い抗血清（特にクラスII）の入手が困難であり、特定の抗原を断定できないことなどの制限がある。近年、DNAレベルでのクラスII抗原の遺伝的多型性を解析することが可能となり、HLA-DR抗原を正確、詳細にタイピングできるようになった。また、DNAタイピングと血清学的タイピングによる結果の不一致例が多数報告され^{1, 2, 3)}、血清学的タイピングの問題点がクローズアップされている。

今回、臓器移植時のマッチングに重要なDR抗原について血清学的タイピングとDNAタイピングによる結果を比較し、DNAタイピングの有用性について検討した。

材料と方法

試料：CPD採血末梢血試料 318例（表1）。

血清学的タイピング：比重遠心法によりリンパ球を分離し、次いでナイロンウールカラム法によってB細胞を分取後、リンパ球障害試験（LCT）を行なった。Terasaki second DRトレイ（ONE LAMBDA）を用いて、DR1か

らDR12に分類した。著しく細胞の生存率が低下しているもの、細胞数僅少または低反応の試料ではビーズ法を併用した。

DNAタイピング：凍結保存したリンパ球よりフェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出し、PCR-RFLP法によりアレルの決定を行なった。特定のアレルが断定できない場合にはReverse Dot Blot法を用いた。1アレルしか検出されない場合にはDQB1タイピングを行ない、DRB1-DQB1のリンケージからホモ接合体であることを確認した。DRB1遺伝子の分類は1991年WHOの命名委員会に従った⁴⁾。

結果

血清学的タイピング：ナイロンウールカラム法では、318例中48例（15.1%）が細胞の生存率低下、細胞数僅少または低反応のためにDR抗原は検出できなかった。これらの検体についてさらにビーズ法で検査したところ38例はタイピング可能であった。

DNAタイピング：回収されたDNA量には差があるが318例はすべてタイピングは可能であった。

タイピング結果の比較：血清学的タイピングとDNAタイピングによる結果は一致した。しかし血清学的タイピングでブランクとしたものの中には血清学的に同じタイプであっても遺伝子型が異なるものがあつた（表2）。血清学的タイピングで検査不可能であった10例うち、家

表1 検査目的と例数

検査目的	例数
疾患関連	135
臓器移植	90
習慣性流産	38
親子鑑定	0
その他	55
合計	318

表2 血清学的タイピングとDNAタイピングの比較

DR抗原	DRB1遺伝子	推定される血清学的データ
2, -	1501, 1502	15<2>, 15<2>
4, -	0405, 0410	4.1, 4.1
4, -	0405, 0406	4.1, 4.2
6, -	1302, 1401	13<6>, 14<6>
6, -	1401, 1403	14<6>, 1403
8, -	0802, 0803	8.1, 8.2

系図から推測されるDR抗原はDNAタイピングの結果と一致した。

考察

DNAタイピングの定着にともない、B細胞分離の問題、DR抗原の発現異常、特異性の高い抗HLA血清の入手が困難などの理由から、血清学的タイピングによる検査は不十分であると言われている³⁾。今回DNAタイピングと血清学的タイピングについて比較したが、血清学的にDR1からDR12までのおおまかな分類ではDNAタイピングとの不一致は見られなかった。しかしながら、ブランクとしたもののなかには血清学的タイプが同じであっても異なる遺伝子型を持つものがあつた。その中にはスプリットする抗原をコードする遺伝子もあり、移植時のマッチングには血清学的データだけでは不十分であると思われた。抗血清によって検査精度が左右される点、特定疾患患者からの試料によっては検査できない点などは血清学的タイピングの欠点であり、この方法の限界と考えられた。一方、DNAタイピングは試薬が安定に供給される点、細胞の反応性に左右されない点など血清学的タイピングに比べて利点が多く、情報交換や技術レベルの標準化が可能と思われる。

両検査法の特性を生かし、目的に応じて利用すべきであるが、臓器移植時のマッチングにはDNAタイピングが日常検査法として有用であると考えられた。

文献

- 1) Sada, M., Hashimoto, M., Ichikawa, Y., Kaneshige, T., Nakamura, S., Suzuki, S., Uchida, K., Fukunishi, T., Amemiya, H. Importance of HLA-DRB1 genotyping in cadaveric renal transplantation. Transplantation Proceeding 24:2443-2444, 1992.
- 2) 小原節子, 加村弘美, 小林孝彰, 折原 明, 横山逸男, 打田和治, 高木 弘. HLA-DR抗原型判定における血清学的方法の問題点-PCR-DNAタイピングとの比較-. 移植 28:98-103, 1992.
- 3) Mytilineos, J., Scherer, S., Opelz, G. Comparison of RFLP-DR beta and serological HLA-DR typing in 1500 individuals. Transplantation 50:870-873, 1990.
- 4) Bodmer, J.G., Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Dupont, B., Erlich, H.A., Mach, B., Mayr, W.R., Parham, P., Sasazuki, T., Schreuder, T. M.Th., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Terasaki, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. Hum Immunol. 34: 4-18, 1992.

日本人を対象にした PCR-SSP 法による DQB1 タイピングの試み

酒巻建夫・前島基志・山崎正明・苅部正宏・柏原英彦*

*国立佐倉病院臨床研究部臨床検査科

要約：DNA配列特異的なプライマーの組み合わせを用いてPCRの成否によりタイプを決定する、迅速、簡便なPCR-sequence-specific primers (PCR-SSP)法を検討した。すでにDRB1, B3-5に関して発表しているが、今回、日本人のDQB1遺伝子を対象としてプライマーの設計を行った。これらのプライマーを用いるとPCR-SSOP法と比較して、DQB1*0201, 0301, 0302, 0303, 0401, 0402, 0501, 0502, 05031, 0601, 0602, 0604, 0605の13種類の同定ができることが判明した。この方法は少数の検体を短時間に処理するのに最適な方法であった。今後、PCR-SSP法を臓器移植のドナーのDRB1, DRB3-5, DQB1タイピングに利用すれば、より適合度の高い移植が可能となると思われる。

key words : HLA-DQB1, PCR-SSP

はじめに

PCR施行後、多型性を同定するために従来オリゴヌクレオチドプローブ(SSOP)を用いたり、制限酵素を用いたりする方法(RFLP)が行われていた^{1,2)}。しかしながらPCR後に処理を加えるために時間短縮には限界があった。一方、日本人のHLA-DRB1, DRB3-5, DQB1などの遺伝子頻度や連鎖不平衡が明らかにされ、使用するプローブや制限酵素を絞り込むことができたようになった。また臓器移植のドナーなど緊急性の高い少数検体に対して、DNA配列の多型性部位対応してプライマーを設定しPCR増幅の成否のみによりタイプを決定するSSP法の開発³⁾、改良が進んだ。われわれは昨年の第2回日本組織適合性学会および第11回日本HLAワークショップにてHLA-DR遺伝子に対する高精度のPCR-SSP法を報告したが、DRB遺伝子と強い連鎖不平衡にあるDQB1遺伝子に対するSSP法を報告する。

材料と方法

PCR-SSOP法によりDRB1, DRB3-5, DQA1, DQB1遺伝子が決定されたDNAをパネルとして利用した。なお検討した特異は、DQB1*0201, 0301, 0302, 0303, 0401, 0402, 0501, 0502, 05031, 0601, 0602, 0604, 0605の13種類であった。

プライマーの設計はDQB1遺伝子の第2エクソンの配列から、PCR-SSOP法で特徴的に反応する部位やGC含量を参考にフォワード側、リバース側とも多型性部位を3'末に配置し、Tmを62℃前後になるように長さを調整しながら行った。PCRは全量を10μlとした。内容として、テンプレートDNAは100ng、プライマーは10μMのものを0.5μl、5mMのdNTPを0.4μl、10xバッファーを1μl、Taq DNAポリメラーゼを0.35U加え、総量を蒸留水で調整した。PCRの機器は3浴槽方式(サーマルシークエンサー、イワキガラス社)を使用した。アニーリングを60-62℃、伸長72℃、変性96℃で50秒づつ、35回の反復を行った。PCR増幅の確認は2%アガロースゲルに5μl泳動して確認した。一部の実験ではPCR産物を蒸留水で1000倍に希釈して次のステップのPCRに利用した。1つのDQB1の組み合わせのプライマーについて最少でも3パネル以上の陽性、20人以上の陰性パネルを当てて検討した。

結 果

DNA配列から特異的な増幅が期待されるのに、実際には無反応であったり、非特異的に増幅してしまった例が認められた。検討した中から特異的なPCR増幅が得られる組み合わせを表1にまとめた。これらのなかには陰性反応の時にサイズの大きな非特異的なバ

表1 PCR-SSP primers for HLA-DQB1

primer mixture secificity	anealing temp.(°C)	amp. codon between	amp. (bp)
QBX 0201	60	30 - 73	131
QBX 0201+0302	60	20 - 63	129
QBX 03	60	32 - 80	146
QBX 0301+0303	60	32 - 63	96
QBX 0301+0304	60	20 - 51	94
QBX 0301+0601	60	20 - 63	131
QBX 0302+0304	60	32 - 63	95
QBX 0303	60	20 - 63	130
QBX 0401	60	17 - 69	156
QBX 0402	60	17 - 69	156
QBX 0501	60	24 - 63	120
QBX 0502	60	24 - 63	119
QBX 05031	60	24 - 63	120
QBX 0601	60	6 - 73	202
QBX 0602	60	21 - 54	100
QBX 0604,5,6	60	21 - 63	127
QBX 0604	62	23 - 63	121

ンドが見られるものがあつた。また一部では他の特異性と弱い交差反応を示すものが認められた。DQB1*0604と0605の同定は、QBX0604,5,6で増幅が陽性の場合に、このPCR産物を1000倍希釈してPCRを施行してQBX0604のプライマーで陽性の時にはDQB1*0604と判定し、QBX0604で陰性の時にDQB1*0605と判定した。実用的にも増幅バンドサイズに留意すれば、活用できるものであつた。DQB1遺伝子の場合には、時間的に抽出時間を含めるとほぼ3時間で完了した。

考 察

多型性部位が実際に存在するのにも拘らず、特異的な増幅が認められない例があつた。その原因として、多型性部位がGCリッチであつたり、偽遺伝子と反応したりするためと考えられた。20-30番目の配列や57番目の配列をうまく利用すると、DQB1遺伝子の特異性に対応した配列に特異的なプライマーの設定が可能となり、PCRを施行するだけでDNAタイピングが行えるようになった。DQB1遺伝子は単独で特異性を調べることは比較的でまれで、DR遺伝子やDQA1遺伝子とともに調べることが多い。しかしDR遺伝子ときわめて強い連鎖不平衡を示すことから、DR遺伝子のDNAタイピングの精度を確認することに利用することができる。またDRB,DQBのどちらかがわかれば、片方が推定できるのでプライマーの数を減らすことができる。このSSP法は少数の検体のタイピングに向く方法であり、迅速性を要求される臓器移植のドナーのタイピングには最適な方法である。

文 献

- 1) Kimura,A., and Sasazuki,T.: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. In: HLA 1991(Tsuji,K. et al eds), Oxford Press, Oxford, vol 1:397-419,1992.
- 2) Nomura,N., Ota,M., Tsuji,K., and Inoko,H.: HLA-DQB1 genotyping by PCR-RFLP method combined with group-specific primers. Tissue Antigens, 38:53-59, 1991.
- 3) Olerup,O., and Zetterquist,H.: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers(PCR-SSP) in 2 hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigen 39:225-235, 1992.

16プローブを用いた PCR-MPH 法による 簡便な DRB1 generic typing

宮本正樹・徳永勝士・赤座達也・田所憲治・十字猛夫^{*1)}、川井信太郎・前川尻真司・山根明男^{*2)}

^{*1)} 日赤中央血液センター

^{*2)} 涌永製薬株式会社バイオ研究所

要旨：抗血清の確保が難しい血清学的なHLAクラスIIタイピングの代わりに、迅速かつ簡便で、多数検体を処理できるDNAタイピング法（PCR-Microtiter plate hybridization (PCR-MPH)法）の開発と検討を行ってきた。12プローブを用いたプレートでは、DR3, 11, 12, 6, 8のミスマッチであるか、DR6とのヘテロ接合であるかの区別と、DRB1*1403がDR8と判定される問題点があった。本研究では、47プローブを追加させた167プローブによる改善を行い、さらに自動化に向けたタイピングシステムの確立を目指した。改良プレートは、従来の操作性を保持したままで、日本人検体の約99.3%が確定可能となり、PCR-RFLP法やPCR-SSCP法による結果と一致した。自動化に際し、ELISAの機器がそのまま代用可能で、一人で一日に100検体程度の判定が実施できた。

Key words: PCR-MPH, HLA-DRB1 generic typing, Routine typing system

はじめに

我々はこれまで、ルーチン検査に適したPCR-MPH法によるHLA-DRB1タイピングを検討してきた^{1)・2)・3)}。本法は、リバーサンドットハイブリダイゼーション法を基本原理とし、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) と類似した操作で行なう、多数検体処理に適した簡便な手法である。ところが、DR6グループの特異的なシグネスがないために、12種類のプローブを用いたプレートでは、DR3, 11, 12, 6, 8のミスマッチとDR6ヘテロ接合の区別ができない。また、DRB1*1403がDR8と判定され、DR11グループの陽性反応（発色）が弱いことも問題であった。これらの課題を解決するために、4種類の新しいプローブを追加し、さらにDR11用プローブに改良を加えた167プローブプレートを作製し、その有効性を検討した。さらに、自動化を目指した自動化システムの確立を試みた。

材料と方法

Generic DR (DR1~DR10) タイピング用プローブを16種類固定させた96穴プレート（縦2列で1検体分）に、ビオチン標識genericプライマーで増幅させたPCR産物を熱変性後加え、58℃でハイブリダイゼーションを行った^{1)・2)・3)}。ELISA用プレートウォッシャーで洗浄後、アビジン結合ホモチンゲンゼンにより発色させ、オートリーダーで測定（415nm）した^{2)・3)}。検

討には、PCR-SSCPまたはPCR-RFLP法でallele typingしたgenomic DNAを用いた。

結果

表1に、167プローブプレートに用いたプローブの種類とそのアレル特異性を示す。追加プローブは、No.8 (DR3, 11, 13, 14用), No.9 (DR12, 8用), No.10 (DR1403用), No.11 (DR13用) の4種類である。また、これまで陽性反応が弱かったDR11プローブを2 base長くし、改善を行った。追加プローブは、陽性および陰性反応が明確であり、そのアレル特異性と有効性が確認できた。さらに、DR11の陽性反応も他のプローブと同程度に高まった。これらの結果から、陽性 陰性反応の発色度 (OD_{415nm}値) をまとめ、カットオフ値を設定した。また、クロスハイブリダイゼーションが認められ（表1）、カットオフ値の高いプローブに対して、commonプローブ（全てのDRB1アレルと反応）との反応比を補足した。そして、これらの結果に基づき自動判定用プログラムを開発した。プレートのデータをリーダーに読ませることにより、自動的に判定ができ、データ管理やプレートの品質管理が容易に行える。一人で一日に100検体程度の判定が可能で、ルーチン検査に向けた多検体処理に有効であった。

Table 1 Specificity and characterization of 16 probes for HLA-DRB1 generic typing by PCR-MPH

Probe No.	Generic Type	DRB1 Allele Specificity	Comment ^b	Cross Hybridization	
				DRB1 or DRB3	Base Mismatch
1	DR1	0101-0103		1001	1
2	DR2	1501-1502, 1601-1602	1503(-) ^c		
3	DR3	0301-0303		DRB3*0101	1
4	DR4	0401-0412	1410(+) ^d		
5	DR11	1101-1104		0401-0408	2
6	DR12	1201-1202		DRB3*0201/0202	1
7	3/5/6/8	0301-0303, 1101-1104, 1201-1202, 1301-1306, 1401-1410, 0801-0804	0805(-) ^c		
8 ^a	3/11/13/14	0301-0303, 1101-1104, 1301-1306, 1401-1403, 1405-1410	1404(-) ^c		
9 ^a	12/8	1201-1202, 0801-0805	1404(+) ^d		
10 ^a	1403	1403			
11 ^a	DR13	1301-1302, 1304, 1102	1303(-) ^c , 0103(+) ^d 0402(+) ^d		
12	DR7	0701-0702			
13	8/1403	0801-0804, 1403	0805(-) ^c , 0412(+) ^d	1101, 1104, 0805 1304, 1306	2
14	DR9	0901			
15	DR10	1001			
16	Common	All			

^aNew probes. ^bThese alleles have scarcely been observed in Japanese.

^cThis allele is not detected by the probe. ^dThis allele is detected by the probe.

考察

ルーチン検査に適したPCR-MPH法の実用性をさらに高めるために、従来12プローブに47プローブを追加させた167プローブ・プレートを作製した。これまで、12プローブ・プレートで確定できなかった検体 (DR3, 11, 12, 8の純接合体, DR1403をもつ検体) は、日本人に約9.3%存在する。今回、改良を加えた167プローブ・プレートでは、約99.3%の検体が確定可能になった。ただし、本プレートでは、DR3, DR11, DR13, DR1403の純接合体であるか、DR14とのヘテロ接合体であるかの区別ができない。これらの純接合体は、日本人での出現頻度が合計0.73%ほど認められる。

167プローブのうち57プローブに、若干のクロス・ハイブリダイゼーションが認められた。これらのクロス反応を起こすプローブとallele, その塩基間のmismatch数を表1に示す。しかしながら、これらのクロス反応は再現性があり、カット値とcommon比を用いることにより容易に区別できた。

本プレートによる判定結果から、97タイプ・プレートをを用いることにより同じ操作と時間でalleleタイプが

実施できる。一方、DQB1タイプ・ングも可能になっている。さらに自動化を進めることにより効率的なタイプ・ング・システムの早急な確立を目指している。

文献

- 1) Kawai, S., Maekawajiri, S., Tokunaga, K., Juji, T., Yamane, A.: A simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plate. Human Immunol., 1994 in press
- 2) 宮本正樹, 森山 哲, 徳永勝士, 赤座達也, 田所憲治, 十字猛夫: ルーチン検査への簡便なHLA-DRB1タイプ・ング法の導入。第2回日本組織適合性学会大会抄録集。1993, p68.
- 3) 宮本正樹, 森山 哲, 徳永勝士, 赤座達也, 田所憲治, 十字猛夫: PCR-MPH法によるHLA-DRB1ルーチンタイプ・ングの実用性。第11回日本組織適合性 ワークショップ。1993, 鹿児島。

Reverse dot blot 法を利用した、ヘテロ接合体からの新たなDPB1アレル(DPB1*JYO)の直接塩基配列決定

兼重俊彦・内田清久^{*1)}、木下朋子・橋本光男・福西孝信^{*2)}

^{*1)}シオノギ製薬株式会社診断医学部

^{*2)}兵庫県立西宮病院腎移植センター

要旨：HLA-DPB1タイピングで既知のアレルと異なるprofileを示した試料JYOの塩基配列解析を行った。塩基配列決定にはPCR産物をプラスミドベクターにクローニングする方法（；常法）と併せ、reverse dot blot法のpositive spotより鋳型を調整し直接塩基配列決定を行う方法を用いた。これらの塩基配列解析によりJYOのDPB1アレルはDPB1*0202と、DPB1*0402のcodon 36がGCG (Ala)に置換した新たなアレル(DPB1*JYO=5101)のヘテロ接合体であることが分かった。今回我々が開発した、reverse dot blot法を利用した直接塩基配列決定法は、クローニングステップを必要とせずヘテロ接合体アレルからも、信頼性の高いデータが短時間の内に得られることから有用である。

はじめに

HLA-DP抗原の遺伝的多型性はPCR法による遺伝子タイピングの実用化に伴い解析が進み、現在までに多くのDPB1遺伝子型の存在が知られている¹⁾。我々は日常のHLA-DPB1タイピングにおいて、新たなアレルを発見し、reverse dot blot法²⁾を利用したヘテロ接合体アレルの直接塩基配列決定法を用いて、その塩基配列の解析を行った。

材料と方法

日常のPCR-sequence specific oligonucleotide probe (SSOP) 法³⁾によるDPB1タイピングで既知のDPB1アレルのものと異なるhybridization profileを示す試料JYO (Korean) を解析の対象とした。DPB1第2エキソンの塩基配列決定には次の2法を用いた。第1の方法としては、PCR産物をプラスミドベクター (Bluescript SK-, 東洋紡) にクローニングしたものをdideoxy法によりシーケンシングをする方法である。第2の方法としては、reverse dot blot法で用いるプローブ固相化メンブレンのpositive signalを呈した箇所をpunch outし、それより再増幅したヘテロ接合体アレルの各々の直接塩基配列決定を行うものである (図1)。

結 果

試料JYOのhybridization profile (表1) からは、DPB1*0202と、DPB1*0401及びDPB1*0402と相同性の高い新アレルの存在が示唆された。クローンの塩基配列決定により、DPB1*0202の他の新アレルは、DPB1*0402の

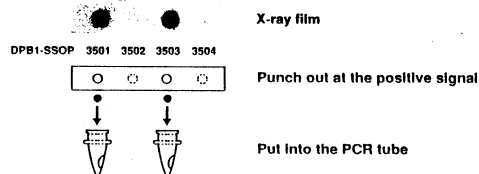
第2エキソン内codon 36のGTG (Val) がGCG (Ala) に置換したアレル (DPB1*JYO) であることを確認した (図2)。このcodon 36の配列はDPB1*0401に特徴的であり、またDPB1*0401とDPB1*0402が東洋人集団では比較的高頻度に見られるアレルであることから⁴⁾、DPB1*JYOはDPB1*0402の点突然変異か、DPB1*0401、DPB1*0402間の遺伝子組み換えにより生じたものと推測される。尚、今回我々が発見したDPB1*JYOはWHO命名委員会よりDPB1*5101の名称が与えられた。

この試料JYOのreverse dot blot法のhybridization profileの内、codon 32～35の配列に対応する4種類のSSOPでは、DPB3501とDPB3503にpositive signalが得られ、従ってJYO由来のヘテロ接合体アレルの配列はそこでoverlappingのあることが分かった。これらのpositive spotの各々を直接塩基配列決定に供したところ、DPB3503由来のアレルがDPB1*0202、DPB3501由来のアレルがDPB1*JYOであった。

考 察

HLA遺伝子タイピングにおいて既知のアレルのものと異なるprofileに遭遇した場合には、新アレルの存在が推測され、その塩基配列の決定が必要となる。通常この解析にはPCR断片をプラスミドベクターにクローニングする方法と、PCR産物を直接塩基配列決定する方法が用いられている。後者の利点は短時間で解析可能なことと信頼性が高い

1. Reverse Dot Blotting



2. Reamplification

PCR-amplification
↓
EtOH-precipitation
↓
Gel-purification of the amplified target sequence

3. Direct sequencing

PCR-amplification using biotinylated primer
↓
Single template preparation using magnetic beads coated with streptavidine
↓
Dideoxy chain termination

図 1. The Protocol of Direct Sequencing from the Reverse Dot Blotting

いことである。すなわちPCRにおいては重合残基の misincorporationにより変異導入のあることが知られており⁵⁾、そのため複数のクローンの解析が必要である。事実今回の我々のクローニングの結果においても、4クローン中1クローンに異なる塩基配列のものがあつた。一方直接塩基配列決定の場合には多くの増幅断片を用いるため、これらの変異が存在するとしても均一化され塩基配列の決定には影響することはない。この直接塩基配列決定ではヘテロ接合体の場合一方のアレルに特徴的な配列に対するプライマー (ex. allele group-specific primer) を用いるが、今回の解析対象となったJYOのように両端の変異領域の配列が同一の場合には、対象領域の全域を一度に解析することは困難である。そこで我々はreverse dot blot法を利用してヘテロ接合体より鋳型を調整し、それを直接塩基配列決定する方法を開発した。この方法ではgeneric primerによるPCR産物も対象とすることができるので変異領域の塩基配列の解析も可能である。PCR-SSOP法の改良法であるreverse dot blot法は、その操作性、迅速性の点で優れたHLA遺伝子タイピング技法として用いられているが、さらにクローニングステップを必要とせず、ヘテロ接合体からの直接塩基配列決定にも応用できる有効な方法である。

文 献

- 1) Marsh, S., G. E., and Bodmer, J., G.: HLA class II nucleotide sequences, 1992. Tissue Antigens 40: 229-243, 1992.

表 1. Hybridization Profile of DPB1*0202, 0401, 0402 and the DPB1 Alleles from Individual JYO

SSOP	A.A.	DPB1 Allele(s)			
		0202	0401	0402	JYO*
3501 3502 3503 3504	32 REEFAR REEFVR REELVR RQEYAR	— — +	— — —	— +	— — +
5501 5502 5503 5504	53 RPAAEYW RPDEEYW RPEAEYW RPDEEYW	— — +	— — —	— +	— — +
6901 6902 6903 6905 6906	64 DILEEK DILEEE DLLEEK DLLEER EEKRAV	— + — — —	— — — — +	— — — — +	— + — — +
8501 8502 8501	82 ELGGPMT ELVGPMT ELDEAVT	— — —	— — —	— — —	— — —

* the heterozygous DPB1 alleles from the individual JYO

DPB1*0401	CC	CTC	CCC	GCA	GAG	AAT	TAC	CTT	TTC	CAG	GGA	CAG	GAA	TGC	TAC	GCG	TTT	AAT	GGG
DPB1*0402	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*JYO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*0401	ACA	CAG	CGC	TTC	CTG	GAG	AGA	TAC	ATC	TAC	AAC	CGG	GAG	GAG	TTC	GCG	CGC	TTC	GAC
DPB1*0402	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*JYO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*0401	GAC	GTG	GGG	GAG	TTC	GGG	GCG	GTG	ACG	GAG	CTG	GGG	CGG	CCT	GCT	GCG	GAG	TAC	TGG
DPB1*0402	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*JYO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*0401	AGC	CAG	AAG	GAC	ATC	CTG	GAG	GAG	AAG	CGG	GCA	GTG	CCG	GAC	AGG	ATG	TGC	AGA	CAC
DPB1*0402	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*JYO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
DPB1*0401	TAC	GAG	CTG	GGC	GGG	CCC	ATG	ACC	CTG	CAG	CGC	CGA	G						
DPB1*0402	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						
DPB1*JYO	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---						

図 2. Alignment of the nucleotide sequence of the DPB1*0401, 0402 and the DPB1*JYO in the DPB1 second exon.

- 2) Kaneshige, T., Murayama, A., Hirasawa, T., Sada, M., Amemiya, H., et al.: Practical and rapid HLA-class II genotyping by reverse dot blotting. Transplantation Proc. 25: 194-198, 1993.
- 3) Kimura, A., Sasazuki, T.: Eleven International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. HLA 1991, vol.1. (Tsuiji, K., Aizawa, M., and Sasazuki, T.), Oxford University Press, Oxford, 1992, 397-419.
- 4) Imanishi, T., Akaza, T., Kimura, A., Tokunaga, K., Gojobori, T.: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. HLA 1991, Vol.1. (Tsuiji, K., Aizawa, M., and Sasazuki, T.), Oxford University Press, Oxford, 1992, 1065-1220.
- 5) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. T., Higuchi, R., et al.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-91, 1988.

Key words : reverse dot blot method, direct sequencing, heterozygous alleles

PCR-RFLP 法による TAP 遺伝子多型の解析

桑田昇治・柳沢雅美・柴田洋一^{*1)}、徳永勝士・田所憲治・十字猛夫^{*2)}

^{*1)}東京大学医学部輸血部

^{*2)}日赤中央血液センター

要旨： TAP分子は、遺伝子座がHLAクラスII領域に存在し、多型を呈することが報告され、抗原ペプチドの粗面小胞体への能動的輸送を行なう。TAP1遺伝子2ヶ所、TAP2遺伝子4ヶ所の多型が報告されている。我々は、PCR-RFLP法にてTAP遺伝子多型を解析し、制限酵素認識塩基配列の存在しない領域については、mismatch-PCR-RFLP法にて解析した。白人では稀なTAP1D対立遺伝子が23%存在し、TAP2対立遺伝子も新たに2種類の存在が明らかとなった。TAP遺伝子の型判定にはPCR-RFLP法による解析法が簡便で確実であると考えられる。Mismatch-PCR-RFLP法は、制限酵素認識塩基配列のない場合でも解析が可能であり、他の遺伝子多型の解析にも応用可能な方法である。

key words: TAP, HLA, PCR

はじめに

TAP分子は、主としてHLAクラスI拘束性の抗原処理に関わり、細胞質内に取り込まれた抗原ペプチドを粗面小胞体に能動的に輸送する機能を有し、TAP1およびTAP2から成るヘテロダイマーを形成している。TAP遺伝子は、遺伝子座がHLAクラスII領域に存在し、また、多型を呈することが報告され、注目される。現在までに、TAP1遺伝子に2ヶ所、TAP2遺伝子に4ヶ所の多型領域が報告されている。現在までの報告は白人集団および株化B細胞での報告に限られており、HLA対立遺伝子と同様に、TAP対立遺伝子頻度が人種により異なるかは明らかでない。今回、我々は、PCR-RFLP法にてTAP遺伝子多型の解析を行なったので報告する。さらに制限酵素認識塩基配列のない領域については、mismatch-PCR-RFLP法を開発し解析を行なった。

材料と方法

51名の日本人よりゲノムDNAを抽出した。いずれも血清学的HLAタイピングおよびHLAクラスIIDRB1, DQA1, DQB1, DPB1のDNAタイピングを、PCR-RFLP法、PCR-SSP法で行なった。TAP1遺伝子2ヶ所、TAP2遺伝子4ヶ所の多型領域は、いずれも、dimorphismを呈しており、各多型領域をPCR法で特異的に増幅後、制限酵素切断部位の有無で判定を行なった。TAP1遺伝子2ヶ所、TAP2遺伝子1ヶ所は、制限酵素Sau3AI, AccI, BfaIま

たはEcoRIIを用いた。制限酵素認識塩基配列のないTAP2遺伝子の3ヶ所は、ミスマッチプライマーを用いて、PCR増幅産物に切断部位を導入し、制限酵素MspI, RsaI, AccIIを用い、解析した。TAP遺伝子各領域でホモ接合体のPCR増幅産物は直接シーケンス法で塩基配列の確認を行なった。

結果

Carrington, Powis等によりTAP1, TAP2各遺伝子多型と対立遺伝子命名が報告されている。我々は、白人では稀だとされている、TAP1D対立遺伝子が23%存在している。TAP2対立遺伝子では、従来、報告のない対立遺伝子が少なくとも2種類確認された。

考察

TAP遺伝子の各多型領域は2種類の変異であり、PCR-RFLP法による解析法が簡便で確実であると考えられる。TAP1遺伝子では、白人では稀なTAP1D対立遺伝子が日本人で確認されたが、TAP2対立遺伝子でも白人での報告がないTAP2対立遺伝子が存在しており直接的な決定法を開発中である。また、制限酵素認識塩基配列のない場合でもmismatch-PCR-RFLP法で解析が可能であり、他の遺伝子多型にも応用可能である。今後、HLAとのハプロタイプの形成の有無等についても検討していく予定である。

図 TAP対立遺伝子頻度

対立遺伝子名はCarrington M, et al¹⁾, Powis SH, et al²⁾等の報告に従った。

		codon 333	637	Japanese
TAP1	A	Ile	Asp	52%
	B	Val	Gly	19%
	C	Ile	Asp	6%
	D	Val	Gly	23%

*TAP1遺伝子コドン333番および637番ともにヘテロ接合の場合にはA-BおよびC-Dの2種類の組合せが考えられるが、現時点では両者の区別はできない。ここでは、頻度の高いA-Bの組み合わせとした。

		codon 379	565	665	687	Japanese
TAP2	A	Val	Ala	Thr	Stop	36%
	B	Val	Ala	Ala	Gln	7%
	C	Ile	Ala	Thr	Stop	8%
	D	Ile	Thr	Thr	Stop	1%
	E	Val	Thr	Thr	Stop	4%

* *TAP2遺伝子では、3ヶ所でヘテロ接合の場合には、現時点では、対立遺伝子を決定できない。2ヶ所でヘテロ接合の場合には、頻度の高い方の組み合わせとした。また、従来まで報告のない379Val-565Ala-665Thr-687Gln等の対立遺伝子が存在しており、確認中である。このため上記のTAP2の対立遺伝子頻度は確認できたもののみを示している。

文献

- 1) Carrington, M., Colonna, M., Spies, T., Stephens, J.C., Mann, D.L.: Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of HLA class II region haplotypes. Immunogenetics 37: 266-73, 1993.
- 2) Powis, S.H., Tonks, S., Mockridge, I., Kelly, A.P., Bodmer, J.G., Trowsdale, J.: Alleles and haplotypes of

the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. Immunogenetics 37:373-380, 1993.

- 3) Beck, S., Kelly, A., Radley, E., Khurshid, F., Alderton, R.P., Trowsdale, J.: DNA sequence analysis of 66 Kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. J. Mol. Biol. 228: 433-441, 1992.

ORIGINAL PAPER

Short Communication

3. 人類学・移植・疾患感受性・免疫応答

ブリヤット族における MHC ハプロタイプの分布

田中秀則・徳永勝士^{*1)}、賛田美江・内川千枝子^{*2)}、伊藤圭一・平川和也^{*3)}、赤座達也^{*1)}、高橋孝喜^{*4)}、田所憲治・十字猛夫^{*1)}

^{*1)}日赤中央血液センター、^{*2)}東京大学医学部附属病院輸血部

^{*3)}山口県赤十字血液センター、^{*4)}虎ノ門病院輸血部

要旨：ブリヤット族のHLA、BF及びC4アロタイピング結果から、BFおよびC4の遺伝子頻度、3座位間(BF-C4A-C4B)の補体ハプロタイプ、5座位(HLA-B、BF、C4A、C4B、HLA-DR)のMHCハプロタイプ頻度を算出し、その分布の特徴について検討を行った。MHCハプロタイプの解析では、欧州の民族と関連性が推定されるタイプ(B13-BFS-C4A3-C4B1-DR7, B44-BFF-C4A3-C4B1-DR7, B50-BFS07-C4A2-C4B1+12-DR7)、東北アジアの民族との関連性が推定されるタイプ(B58-BFF-C4A0-C4B1-DR13, B37-BFF-C4A3-C4B1-DR10)等が認められた。

Key words : Buryat, MHC haplotype, distribution

【はじめに】

HLAアロタイプとMHCクラスⅢ領域で規定される補体成分のアロタイプ(factor B: BF, C4)をマーカーとしたMHCハプロタイプは、様々な民族において特徴的なハプロタイプを形成していることが、すでに報告されている。

我々は、ロシア東部シベリヤ地方のバイカル湖岸に居住するブリヤット族のHLAアロタイプの調査を行った。その結果からブリヤット族におけるHLA遺伝子、およびHLAハプロタイプ頻度について検討を行い、第2回組織適合性学会大会において報告した。今回我々はHLAアロタイプに加えBF、C4のアロタイピングを行いブリヤット族におけるBF、C4A及びC4B、3座位の遺伝子頻度とこれら3座位のハプロタイプ(complotype)頻度を算出した。また、HLAアロタイプのデータを含めた5座位間(HLA-B、BF、C4A、C4B、HLA-DR)のハプロタイプ(MHCハプロタイプ)の頻度を算出しブリヤット族におけるこれらの分布のについて検討を行ったので報告する。

【材料と方法】

材 料

東シベリアのイルクーツクから、アンガラ川に沿って北西約50 kmに、アンガルスクという町があり、この町の近郊にある2つの地区(OdinskとTarase)に居住するブリヤット族を対象に調査を行った。健康人141人より得られた検体について、HLA-A、C、B、DR、DQのアロタ

イピングを行った。また、リンパ球分離時に得られた血漿から、BF及びC4のアロタイピングを行った。

HLAアロタイピング

比重遠心法により分離したリンパ球層を、ナイロンウールカラムによりT・B細胞を分離後、通常のLCT法でクラスⅠ・Ⅱのアロタイピングを行った。また、タイピングトレーとして、ローカルトレーを使用した。

BF・C4アロタイピング

BFアロタイプは、従来のアガロース高圧電気泳動法で泳動後、BF抗血清による免疫固定法により行った。また、C4アロタイピングについても、従来のアガロース高圧電気泳動法でタイピングを行った。

ハプロタイプ頻度の計算

ブリヤット族141検体の、5座位(BF、C4A、C4B、HLA-B、HLA-DR)のアロタイピングデータから、BF、C4A、C4Bの遺伝子頻度、補体ハプロタイプ(complotype)及びMHCハプロタイプ(HLA-B、BF、C4A、C4B、HLA-DR: 5座位)の頻度を計算した。表現型からのハプロタイプ頻度の算出は、今西らの方法に従った。また、ブリヤット民族から算出されたハプロタイプ頻度と、第11国際組織適合性ワークショップで算出された他民族における各タイプの頻

Table 1 Allele frequencies of complement loci in Buryat
(n =141)

BF*F	19.8	C4A*1	0.4	C4B*1	61.7
BF*F1	0.0	C4A*2	3.9	C4B*2	24.8
BF*S	75.9	C4A*3	56.0	C4B*3	1.4
BF*S07	2.8	C4A*4	20.2	C4B*4	0.0
other	1.4	C4A*5	0.4	C4B*5	2.1
		C4A*6	3.5	C4B*1+12	2.8
		C4A*3+2	0.7	other	4.3
		other	0.7	C4B*Q0	2.8
		C4A*Q0	14.2		

Table 2 Complotype Haplotypes (>5.0%)

BFS	- C4A3	- C4B1
BFS	- C4A4	- C4B2
BFF	- C4A3	- C4B1
BFF	- C4AQ0	- C4B1

Table 3 MHC Haplotypes in Buryat (>2.0%)

B13	- BFS	- C4A3	- C4B1	- DR7
B58	- BFF	- C4AQ0	- C4B1	- DR13
B61	- BFS	- C4A4	- C4B2	- DR4
B44	- BFF	- C4A3	- C4B1	- DR7
B37	- BFF	- C4A3	- C4B1	- DR10
B50	- BFS07-	C4A2	- C4B1+12-	DR7
B51	- BFS	- C4A3	- C4B1	- DR9

度を比較した。

【結果及び考察】

B F, C 4 A, C 4 B 遺伝子頻度 (Table 1)

B Fのアロタイプでは、他の民族同様に B F * S, B F * F の頻度が高かった。また、中央アジアからヨーロッパの民族に多く認められる B F * S 0 7 は、ブリヤット族では 2. 8 % 認められた。

C 4 A 座では、C 4 A * 3 が 5 6 % と一般的なタイプであった。また、C 4 A * 4 についても 2 0. 2 % と比較的高い頻度であった。また、C 4 A * 2, C 4 A * 6 についてはそれぞれ 3. 9 %, 3. 5 % の頻度で認められ、ブリヤット族における特徴的なマーカーの一つと考えられた。C 4 B 座では、C 4 B * 1, C 4 B * 2 の頻度が高く、C 4 B * 2 については C 4 A * 4 と共に特有のハプロタイプに由来するものと考えられた。

補体および MHC ハプロタイプ頻度

補体ハプロタイプ (complotype) と MHC ハプロタイプの頻度算出により、ブリヤット族において多く認められたハプロタイプを示す (Table 2, Table 3). complotype は、ほとんどの民族において、BFS - C4A3 - C4B1 の頻度が高く、このことはブリヤット族においても同様であった。また、この complotype は

B13 - BFS - C4A3 - C4B1 - DR7, B51 - BFS - C4A3 - C4B1 - DR9 などの MHC ハプロタイプに含まれていた。2 番目に多く認められた complotype は、BFS - C4A4 - C4B2 でありこのタイプも、MHC ハプロタイプ B61 - BFS - C4A4 - C4B2 - DR4 を形成すると推定された。また、BFF - C4A3 - C4B1 complotype は、B44 - BFF - C4A3 - C4B1 - DR7, B37 - BFF - C4A3 - C4B1 - DR10 2 種類の MHC ハプロタイプに、BFF - C4AQ0 - C4B1 については、B58 - BFF - C4AQ0 - C4B1 - DR13 MHC ハプロタイプに含まれていた。

MHC ハプロタイプの分布では、欧州の民族と関連性が推定されるタイプ (B13 - BFS - C4A3 - C4B1 - DR7, B44 - BFF - C4A3 - C4B1 - DR7, B50 - BFS07 - C4A2 - C4B1 + 12 - DR7), 東北アジアの民族との関連性が推定されるタイプ (B58 - BFF - C4AQ0 - C4B1 - DR13, B37 - BFF - C4A3 - C4B1 - DR10) がそれぞれ認められた。一方、他の 2 種類の MHC ハプロタイプ (B61 - BFS - C4A4 - C4B2 - DR4, B51 - BFS - C4A3 - C4B1 - DR9) については、これまでブリヤット族以外の民族において、高い頻度で認められていない。この B61 - BFS - C4A4 - C4B2 - DR4 については、ブリヤット族の HLA ハプロタイプ解析で認められた A24 - Cw10 - B61 - DR4 - DQ7 に含まれるタイプである可能性がある。

B細胞ラインを用いた腎移植希望登録患者の panel reactive antibody(PRA)検出法の検討

前島基志・苅部正宏・山崎正明・酒巻建夫・柏原英彦*

*国立佐倉病院臨床研究部臨床検査科

要旨：登録患者血清中のPRA検査には、T細胞を用いてclass I (T warm) 抗体の検出を行っているが、class II (B warm) 抗体の検出は、多量の新鮮なB細胞の入手が困難なため、現在当施設では行っていない。今回我々は、日本人由来のLCLを使用して、登録患者血清中のclass I,II抗体の有無を検討した。未吸収登録患者血清とLCLの反応では、T細胞より陽性率が高く、吸収後の反応では末梢B細胞と同程度の陽性率と強い相関を示したことから、LCLはclass I抗体に加えclass II抗体の検出にも使用できると考えられた。LCL細胞は計画的に調整できるので、PRAを継続的に調べる上で末梢血B細胞に代えることができると思われる。

key words: LCL, PRA, Cadaveric kidney transplantation

はじめに

当院では年1回、登録患者の血清を収集してPRAの有無を調べている。無作為に選出した当院職員50名より採血を行いパネルリンパ球とし、通常このうちT細胞を用いてclass I抗体の検出を行っている。多量のB細胞は入手も困難であるため、class II抗体は腎移植成績に影響が大きいと言われているが、PRA検査が行えないのが現状である¹⁾。一方、EBウイルス感染によりB細胞を形質転換させたLymphoblastoid cell line (LCL) は、持続増殖する細胞である。今回、我々はこの培養したLCLを使用して登録患者のPRA検査を行い、class I,II抗体の有無を検討したので報告する。

材料と方法

1 使用リンパ球

T及びB細胞は、日本人に多く見られるclass I,II抗原を網羅するように選出した健康正常人より採血した。

2 LCL作製法

LCL作製には、日本人に多く見られるパネルを網羅するように心がけた。class II抗原の特異性は、PCR-SSOP法²⁾にてタイピングを行った。末梢リンパ球よりB細胞を磁気ビーズ法にて無菌的に分離して、マーマセッ卜B95-8細胞上清を使用して形質転換し、10%FCS添加RPMI 1640培養液にて5%炭酸ガス培養した³⁾。なお、この細胞株よりDNAを抽出し、PCR-SSOP法にて末梢リ

ンパ球と同じタイプであることを確認した。

3 補体調整法

補体は、ペルフリーズ社製のclass II用補体を用い、原液、1×McCoy's 5A Mediumにて2倍及び4倍と希釈した補体、1/20量のプールLCL細胞を補体に加え、氷水中で1時間吸収した補体の4種類を使用した。

4 被検血清

登録患者860名を用い、T細胞50パネルとLCL細胞17パネルを当てた。更に、リンパ球に対する抗体を持つ血清の中から、65名の血清を血小板にてClass I抗体を吸収し、LCL細胞17パネルと末梢B細胞48パネルを当て比較検討を行った。

5 反応時間

被検血清とLCLの反応時間は37℃30分間、補体反応時間は室温にて2時間行った。

6 判定法

トレイ判定は、ライツMPVコンパクトMTを用い、LCLを5(and6)-Carboxyfluorescein diacetate (CFDA) とPropidium iodide (PI) による二重染色を施し、トレイを自動読み取りした。トレイデータ分析プログラムにより、データ者をHLAスコア化し、スコア4以上を陽性として各患者における陽性率を算出した。

7 LCL死細胞除去法、及びLCL濃度調整法

LCLの死細胞除去には、40%パーコール溶液を用いた。自動判定安定化のためにLCL細胞濃度を、 1×10^6 個、

2×10^6 個, 4×10^6 個と3段階に変化させた。

結 果

1 LCL株の樹立

B細胞にEBウイルス感作後, 約2~3週間で増殖が始まり, 約4週間後には安定した増殖となった。

2 補体の検討

LCLと患者血清の反応時に, 補体を原液, 2倍希釈, 4倍希釈, LCLにて吸収した4種類を用いた。原液補体と2倍希釈補体を使用した時, 非特異的に標的細胞が障害されバックグラウンドが上昇した。また, 4倍希釈補体では, バックグラウンドの上昇は認められなかったが, 補体の力価が低下してしまい陽性コントロールが弱くなった。LCL吸収補体では, 非特異的なバックグラウンドの上昇がなく, 陽性反応も保たれた。

3 判定の安定化検討

分注する細胞濃度を 1×10^6 個, 2×10^6 個, 4×10^6 個と変化させた時, 細胞濃度により分注量に差がみられた。最も安定した細胞濃度は 4×10^6 個で, 濃度が低くなるに連れ, 分注量のバラツキが大きくなった。

4 T細胞とLCLのPRA陽性率の比較

1993年度再登録患者860名の未吸収血清に, T細胞50パネルとLCL細胞17パネルを反応させた。陽性率を0%で区切った時, 陰性群(0%)でT細胞610名(70.9%), LCL486名(56.5%), 1%以上ではT細胞250名(29.1%), LCL374名(43.5%)と, T細胞に比べLCLで陽性率1%以上の反応を示した患者血清が有意に多かった($p < 0.01$)。また, PRAが71%以上の強陽性群については, T細胞21名(2.4%), LCL59名(6.9%)と, LCLでは有意に高くなった($p < 0.01$)。

5 65名の吸収血清とB細胞, LCLの反応

T細胞とLCL双方に反応した人や, どちらか片方のみ強く反応した人など, リンパ球に対する抗体を有する65名をランダムに選択し, その血清をプール血小板にて吸収して, 末梢B細胞48パネルおよびLCL細胞17パネルと反応させた。末梢B細胞48パネルと反応させたとき, 陽性率は $31.5 \pm 4.2\%$ (mean $\pm$ SE)であった。LCLでは吸収前は陽性率 $64.5 \pm 4.3\%$ であったのが, 吸収後は $23.8 \pm 3.8\%$ と有意に低下した($p < 0.05$)。また, 末梢B細胞とLCL陽性率との相関は $r = 0.72$ と, 強い相関が認められた。

考 察

LCL使用時は, 増殖が安定した時点で使用したが, 細胞自身が弱い死細胞を40%パーコール溶液にて取り除く必要性があった。また, class II用の補体であっても, LCLに対する非特異的抗体が含まれているために, 補体をLCLにより十分吸収することが肝要であると考えられた。トレイに分注する細胞濃度は, 通常の細胞では 2×10^6 個程度で行うのに対し, LCLでは約2倍の 4×10^6 個程度に調製するとよい結果が得られた。これはLCLが細胞集塊を作り易いため, 低濃度ではバラツキが大きくなるものと考えられた。未吸収患者血清860名を用いてT細胞とLCLの反応を比較したとき, LCLはclass I抗原のみ有するT細胞より陽性率が高くなっていた。更に, 血小板にてclass I抗体を吸収した65名の血清をLCLと反応させると, 陽性率は吸収前より低下したが, 陽性反応が見られた。患者血清は, class I抗体以外にclass II抗体を保有していることが, B細胞との反応より確認されている。LCLでは, 低値ながらほぼB細胞と同程度の陽性率と, 強い相関が認められたことから, class II抗体と反応していることは明かと思われた。今回, 患者血清中のEBウイルス抗体により, LCLが異常反応を起こすようなことは, 我々の検討では確認されなかった。LCLはclass I, II抗原の双方を有し, LCLをPRAの検出に用いることは, T細胞を用いたclass I抗体の検出だけでなく, 同時にclass II抗体も検出できる利点があると考えられた。また, パネル細胞の確保も容易に出来るため, 毎年1回行っている死体腎移植希望登録患者の更新血清に, 同一のLCLを用いる事が可能となり, 患者のHLA抗体変動をより的確にとらえる事ができるものと考えられた。今回使用したLCLは17パネルであったが, 更にパネル数を増やし引き続き検討を行いたい。

文 献

- 1) Omori, K, Sakamaki, T, Aoki, M, Saito, M, Yamada, K, Kashiwabara, H and Yokoyama, T: Alloreactive antibody in kidney transplanted patients. In: Aizawa, M, ed. HLA in Asia-Oceania 1986, Sapporo: Hokkaido Univ. Press, 1986: 1053-1055.
- 2) Kimura, A, and Sasazuki, T: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA-DNA-typing technique. In: Tsuji, K et al eds. HLA 1991, Oxford: Oxford Press, 1992: vol 1: 397-419.
- 3) 千葉丈: ヒトB細胞のEBウイルスによる株化。日本組織培養学会編, 組織培養の技術, 第2版, 朝倉書店, 1988: 187-191.

非血縁間骨髄移植のための DNA クロスマッチ “PCR-LIS-DCP”

丸屋悦子・佐治博夫*

*京都府赤十字血液センター

要旨：非血縁間骨髄移植の HLA 適合検査は PCR-DNA タイピングによるアリル型マッチングにより精度の高い適合性が得られる。この方法による検査過誤の防止と最終確認のためレシピエントとドナー候補者の MHC 領域の DNA を PCR で増幅し、直接マッチングさせる DNA クロスマッチ法として LIS-DCP (Low Ionic Strength-DNA Conformation Polymorphism) 法を開発した。LIS-DCP は DNA の融解特性を利用し DNA 溶液のイオン強度を下げ、94℃加熱変性後55℃でアニールすることにより mismatch hybridization による HDF (Hetero Duplex Formation) と熱変性による SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) の両方を形成しかつ持続させ同時に検出できる。クロスマッチ一致例はすべてアリル型適合例であり、不一致例ではアリル型のミスタイピングが検出された。検査所要日数も2日と迅速かつ簡便で安価なクロスマッチ法である。

Key words: DNA crossmatch, PCR-LIS-DCP, Unrelated BMT

はじめに

血縁間骨髄移植のHLA型検査は家系調査からハプロタイプにより確実に決定できる。しかし非血縁間移植では通常ハプロタイプ解析により確認できるのは患者のタイプだけである。さらに患者によっては血清学でのタイピングやMLRが不可能な場合があり、ドナーとの適合性を決定しにくいことがある。これらの短所を改良しより精度の高い適合性を得るため、DNA タイピングによる遺伝子型マッチングが行われつつある。この方法による検査過誤の防止と最終確認のためのクロスマッチ法としてレシピエントとドナー候補者のMHC領域のDNAをPCRで増幅しそれらを直接マッチングさせるDNAクロスマッチ法としてClay¹やBidwell²がPCR-fingerprinting法を報告している。我々はPCR-LIS-DCP法を開発したので報告する。

材料および方法

DNA samples: 血縁間骨髄移植のドナーとレシピエント9組、非血縁間移植のドナーとレシピエント2組およびパネルDNAより血清学で同一型となる5組、32のDNAを使用した。DNAの分離は全血またはリンパ球よりPhenol-chloroform method³またはTrimethyleammonium bromide salts method⁴により行った。Allele typingはPCR-RFLP, -SSCP, -SSP, -MPH, により行った。

PCR amplification: HLA-class Iはエクソン2 (

263bp) および3 (181bp)を増幅し HLA-class IIはHLA-DRB (DRB1-5 および偽遺伝子, 279bp), -DQA (DQA1, DQA2, 242bp), -DQB (DQB1, DQB2, 230bp), -DPB (DPB1, DPB2, 294bp)をそれぞれ増幅した。Primerは既報のもの(一部改変)および自家デザインのものを用いた。

LIS-DCP (Low Ionic Strength-DNA Conformation Polymorphism): 増幅産物を滅菌蒸留水で希釈し94℃加熱後55℃でアニールさせ8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。泳動装置はアトのAE-6410とAE-6370を使用し、泳動中の温度ができるだけ一定に保たれるようにした。泳動温度は22℃, 泳動bufferは1XTBE (45 mM Tris-borate (pH8.0), 1 mM EDTA)を使用した。泳動後、ゲルを銀染色Kit(第一化学)で染色した。

Crossmatch test: 増幅産物(1. ドナー, 2. レシピエント, 3. レシピエントとドナーの混合)のLIS-DCPを行い検出されるバンドを比較して適合、不適合を判定した。

結果と考察

LIS-DCPはDNAの融解特性を利用し溶液のイオン強度を下げることにより mismatch hybridization による Hetero Duplex Formation (HDF) と熱変性後の Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) の両方を維持できる方法である。通常の HDF, SSCP

および LIS-DCP の比較を Fig. 1 に示す. 各 MHC 領域のクロスマッチ例を Fig. 2 に示す. 1. 2. 3. の順で泳動したバンドがすべて一致すれば適合とすると良いことがわかった. 不適合の場合, レーン 3 が 1+2 のパターンを示す. また HDF ではレーン 3 で新たなバンドの出現や消失も起こる場合がある. SSCP は増幅産物の大きさが 300bp 以上になると塩基置換差が検出されないことがあり, HDF も完全な塩基置換検出法ではなが, この両方の方法で双方の欠点を補うことが可能と考える. よってこの両者の現象を一度に観察できる簡便で安価な LIS-DCP は有用な DNA クロスマッチ法と考える.

文献

- 1) Clay T. M, Bidwell J. L, Howard M. R, Bradley B. A. : PCR-fingerprinting of HLA matched unrelated marrow donors. The Lancet 337, 1050-1052, 1991.
- 2) Bidwell J. L, Hui K. M. : Human HLA-DR/Dw allotype matching by analysis of HLA-DRB gene PCR product polymorphism. A journal of method in cell and molecular biology 2, 93-100, 1990.

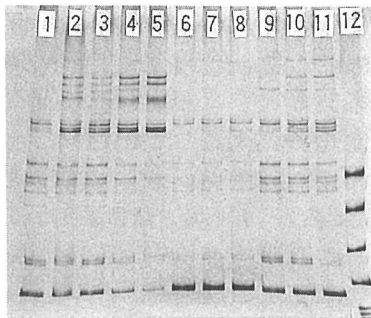


Figure 1. The comparison between HDF, SSCP, and LIS-DCP. Lane 1: HDF, lane 2: SSCP, lane 3: LIS-DCP (diluted 1/2 with H₂O), lane 4: LIS-DCP (diluted 1/4 with H₂O), lane 5: LIS-DCP (diluted 1/8 with H₂O), lane 6: diluted 1/2 with PCR buffer, lane 7: diluted 1/4 with PCR buffer, lane 8: diluted 1/8 with PCR buffer, lane 9: diluted with 1/2 with Saline, lane 10: diluted with 1/4 with Saline, lane 11: diluted with 1/8 with Saline, lane 12: pBR322/Msp I digest, LIS-DCP may depend on low ionic strength and dilution effects.

- 3) Kimura A, Sasazuki T. : Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA-typing technique. Tuji K et al ed. : HLA 1991. Oxford University Press, New York, vol. 1: pp 397, 1992.
- 4) Gustincich S, Manfiolett G, Del Sal G, Schneider C, P Carninci. : A fast method for high quality genomic DNA extraction from whole human blood. Bio Techniques 11: 298-302, 1991.

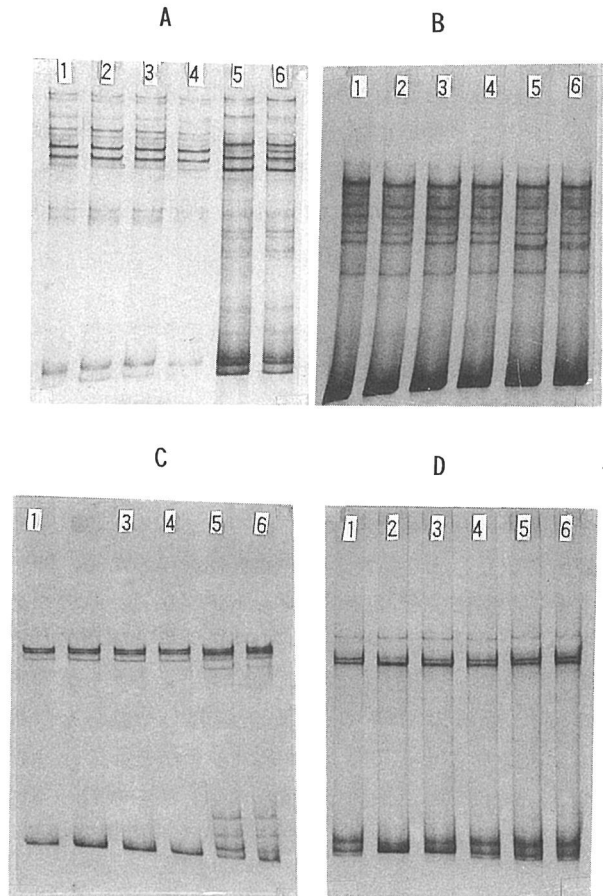


Figure 2. PCR-LIS-DCP crossmatch results.
A: DRB genes crossmatch, B: DQB genes crossmatch, C: DQA genes crossmatch, D: DPB genes crossmatch.
Lane 1: Recipient, lane 2: Donor 1, lane 3: Recipient + Donor1, lane 4: Recipient, lane 5: Donor 2, lane 6: Recipient + Donor2.
Recipient: DRB1*0405/1405, DQB1*0401/0303
DQA1*03/-, DPB1*0201/0501
Donor 1 : DRB1*0405/1405, DQB1*0401/0303
DQA1*03/-, DPB1*0201/-
Donor 2 : DRB1*0405/0101, DQB1*0401/0501
DQA1*03/01, DPB1*0501/0402

成人型多発性嚢胞腎家系における HLA-DRB1, PKD-1遺伝子の解析

李 丹・佐田正晴・辻 隆之^{*1)}, 高原史郎・奥山明彦^{*2)}, 堀江重郎^{*3)}, 村山敦浩^{*4)}

^{*1)}国立循環器病センター研究所, ^{*2)}大阪大学医学部泌尿器科

^{*3)}東京大学医学部泌尿器科, ^{*4)}シオノギ製薬株式会社診断医学部

要旨: 成人型嚢胞腎(以下PCK)家系を対象とし、DRB1 alleleおよび白人PCKの責任遺伝子と考えられているPKD-1遺伝子の解析を行い、疾患感受性遺伝子についての検索を行った。家系内haplotypeの解析において、PCK患者の90%にDRB1*0803, 1302, 1401, 1501いずれかのhaplotypeが認められ、更にその40%は両方のhaplotypeを有していた。PKD-1遺伝子は、日本人PCK患者でも連鎖が認められたが、連鎖率は白人PCKと比較し低率だった。日本人PCKではPKD-1遺伝子よりDRB1遺伝子との連鎖が濃厚で、特定のDRB1 alleleが腎機能の良否を左右する可能性も示唆された。

Key words: PCK, HLA-DRB1, PKD-1

はじめに

腎実質中に大小多数の嚢胞を形成し、進行性の腎機能低下を主な病態とする成人型嚢胞腎(以下PCK)は、先天性腎臓奇形の中で最も遺伝的要因が濃厚で、常染色体単純優性遺伝病と考えられている。最近、白人PCKにおいて第16染色体短腕上のPKD-1遺伝子がPCK発症の責任遺伝子と考えられ、PKD-1遺伝子の連鎖、不連鎖により腎機能の予後が異なることが報告されている¹⁾²⁾。今回日本人PCK家系を対象とし、DRB1およびPKD-1遺伝子の家系内遺伝の解析を行い疾患感受性遺伝子についての検索を行った。

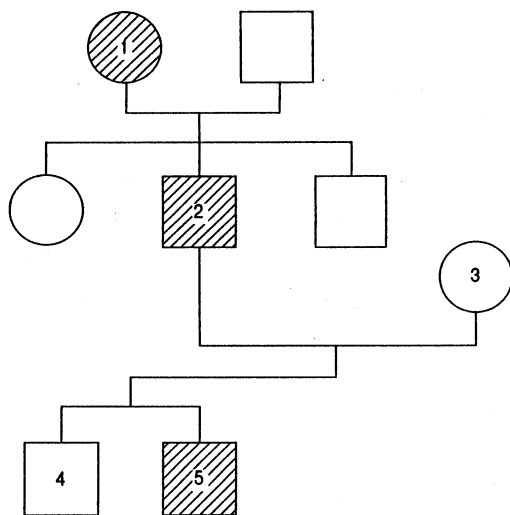
対象および方法

PCK患者55名、3親等以内に2名以上PCK患者を含む15家系60名を対象とした。対象者末梢白血球より高分子DNAを抽出後、PCR-RFLP法を用いDRB1 alleleの決定を行いDRB1 haplotype家系内遺伝の解析と、健常日本人493名を対照としたDRB1 allele頻度の比較検討を行った。PKD-1遺伝子の解析は、PKD-1遺伝子近傍の遺伝子マーカーであるmicrosatellite SM7 (D16S283)の多型性を利用し、家系内遺伝の検討を行った²⁾³⁾。

結果および考察

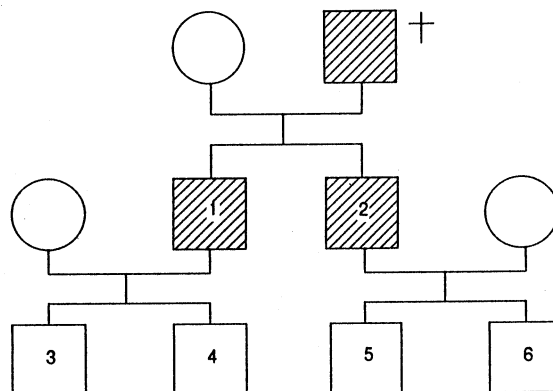
健常日本人493名とPCK患者42名のDRB1 allele頻度の検討において、PCK患者ではDRB1*1501, 1302, 1401, 0803 alleleがcontrolと比較し有意に高い相関を示し($P<0.05$)、DRB1*1502では低い傾向を示した($P<0.01$)。家系内DRB1 haplotypeの遺伝解析において15家系中14家系が、controlと比較し有意に高い相関を示したDRB1*0803, 1302, 1401, 1501 alleleのいずれかを有していた。また家系内PCK患者の90%にDRB1*0803, 1302, 1401, 1501いずれかのhaplotypeを認め、更にそのうちの32%は両方のhaplotypeを有していた。白人PCK患者の90%以上は、PCK発症の責任遺伝子と考えられているPKD-1遺伝子との連鎖が明かとなっている¹⁾²⁾。日本人PCK患者についてはPKD-1遺伝子の検討が行われていないため、5家系についてPKD-1遺伝子の解析を行った。図1は、祖母、父親、次男の3世代にわたってPCKが発症した家系で、PCK患者は全てPKD-1遺伝子およびDRB1*1401 haplotypeを共有し、腎機能も不良であった。図2はPKD-1遺伝子が連鎖していないPCK家系で、2人の父親はDRB1*1401 haplotypeを有していたが腎機能は良好だった。子供全員はDRB1*0803, 1401 haplotypeを有していたがPKD-1遺伝子との連鎖は認められず腎機能も良好であった。子供の年齢がPCK好発年齢に達していな

図1. Pedigree of PKD-1 Gene Linked PCK Family



#	DRB1 allele	PKD-1	PCK	Renal function
1	0901, 1401	(+)	(+)	poor
2	1406, 1401	(+)	(+)	poor
3	0406, 1405	(-)	(-)	good
4	0406, 1406	(-)	(-)	good
5	1405, 1401	(+)	(+)	poor

図2. Pedigree of PKD-1 Gene Non-linked PCK Family



#	DRB1 allele	PKD-1	PCK	Renal function
1	1401 , 0803	(-)	(+)	good
2	1401 , 0803	(-)	(+)	good
3	0405, 0803	(-)	(-)	good
4	0803 , 0803	(-)	(-)	good
5	0803 , 0410	(-)	(-)	good
6	1401 , 0410	(-)	(-)	good

いため将来発症する可能性も否定できない。また腎機能が良好な家系内PCK患者が、DRB1*0803と連鎖している可能性もあり今後の経過観察が必要と考えられた。

まとめ

(1)PCK患者群では、HLA-DRB1*1501, 1302, 0803, 1401 alleleが、controlと比較し有意に高い相関を示した。(2)家系内PCK患者の90%は、DRB1*0803, 1302, 1401, 1501いずれかのhaplotypeを有し、家系内PCK発症にはこれらDRB1 alleleの関与が示唆された。(3)白人PCK発症責任遺伝子と考えられているPKD-1遺伝子は、日本人PCK患者でも連鎖が確認された。(4)家系内PCK患者の腎機能予後とDRB1, PKD-1遺伝子の解析から、DRB1*1401, 1501, 1302 haplotypeおよびPKD-1遺伝子と連鎖したPCK患者の予後は不良であったが、

DRB1*0803 haplotypeを有するが、PKD-1遺伝子と連鎖しないPCK患者の腎機能は良好である可能性が示唆された。

文献

- 1)Harris,P.C.,Thomas,S.,Ratliff,P.J., et al:Rapi genetic analysis of families with p[olycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. Lancet 338:1484-1486,1991
- 2)Germino,G.G.,Somlo,S.S.,Weinstat-Saslow,D., et al:Postional cloning approach to the dominant polycystic kidney disease gene, PKD1. Kidney Int. 43, Suppl.39:20-25,1993
- 3)Reeders,S.T.,Hildebrand,C.E.,Sutherland,G.R:Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 16.Cytogenet Cell Genet 58: 643-645, 1991

HLA-DRB1とサルコイドーシス

安波礼子^{*1)}, 立花日軍夫^{*2)}, 吉原博子^{*1)}

^{*1)}大阪府立病院臨床検査科

^{*2)}大阪府立病院内科

要旨:サルコイドーシスは原因不明の疾患であるが, HLA-DRw52 関連抗原がサルコイドーシス患者に多く見られ, HLA 遺伝子が疾患感受性遺伝子の1つと推定されう。今回サルコイドーシス患者の DRB1-DNA タイピングを行い, 疾患に関連するHLA 抗原の分子レベルでの特定を試みた。正常コントロールに比して患者群では, DRB1-1201と0803が有意に上昇しており, DRB3ではなくDRB1 遺伝子産物の方に関連抗原があると思われた。

key words: sarcoidosis, HLA-DRB1

はじめに

サルコイドーシスは原因不明の疾患であるが, 病巣部にリンパ球の混入を伴う類上皮細胞肉芽腫が認められ, 主として中心部にCD4陽性, 周辺部にCD8陽性リンパ球の集積がみられる。また, 気管支肺胞洗浄液にリンパ球が多数出現し, 疾患の発症や進展に免疫学的機序が関与している可能性が考えられる⁽¹⁾。従って免疫応答調節遺伝子産物である, HLA-class II 抗原の重要性を考慮し, 従来よりHLA-DR タイピングがなされている。我々も以前から抗血清を用いた方法で, DRw52 関連抗原陽性者が多いということを示してきた。今回さらにDRB1 遺伝子タイピングを行い, より細かくサルコイドーシス関連HLA-class II 抗原を特定することを試みた。

材料と方法

サルコイドーシス患者41名の末梢白血球からDNAを抽出し, PCR-SSO法でdigoxigenin をもちいた非アイソトープ法でタイピングをおこなった。プロトコールはDNA抽出, タイピングともに第11回国際HLAワークショップのそれに従った。正常コントロールとしては, 同ワークショップのデーターを用いた。

結果

正常コントロール(n=493)に比して, サルコイドーシス患者群で遺伝子頻度の有意な上昇を認めたのはDRB1-1201と0803であった。DRB1-1201は正常コントロールが3.9%に対してサルコイドーシス群では12.2%, DRB1-0803はコントロール7.3%に比してサルコイドーシスでは12.2%であった。

考察

従来抗血清を用いたHLAタイピングの結果では, サルコイドーシス患者では, DRw52 関連抗原陽性者の頻度が上昇していることが明らかになっている。今回はDRB1のDNAタイピングを行うことにより, とくにDRB1-1201と0803を有する者の割合が高いということが示され, より特定された関連抗原が明らかとなった。

文献

1) 立花 日軍夫: サルコイドーシスの免疫異常。日本胸部臨床 51: 195-202, 1992。

Frequency of HLA-DRB1 in Sarcoidosis patients

DRB1 allele	Control n=493	Sarcoidosis n=41
0101	5.0%	2.4%
1501	6.8	6.1
1502	9.2	6.1
1602	0.7	2.4
0403	2.7	1.2
0405	12.5	13.4
1101	2.1	2.4
1201	3.9	12.2
1202	2.0	2.4
1301	0.7	1.2
1401	3.8	3.7
1403	1.5	2.4
0801	0.4	1.2
0802	3.8	2.4
0803	7.3	12.2
0901	13.7	13.4

同一 DR で DRB1 遺伝子が異なる MLC 反応

能勢義介・荒木延夫・稲葉洋行・浜中泰光・阪田宣彦^{*1)}、鍋谷 登^{*2)}、一色 玄^{*3)}、成瀬妙子・猪子英俊^{*4)}

^{*1)}兵庫県赤十字血液センター、^{*2)}ナベヤクリニック
^{*3)}大阪市立大学小児科、^{*4)}東海大学医学部分子生命科学

要約：MLC 反応により検出される HLA-D 抗原は HLA-DNA 解析による DRB1 遺伝子と最も高い相関を示すことから、主要な MLC 抗原は DR 抗原であると考えられている^{1) 2)}。そこで今回、DR 抗原が同一で DRB1 遺伝子が異なる細胞間の MLC 反応を詳細に検討した。反応細胞を Dw15 (DRB1*0405, 0410) と、刺激細胞を DR4 関連 D 抗原とした MLC 反応は、Dw15 が 75% DNV 値 23.2, Dw14 (DRB1*0404, 0408) が 62.6, Dw4 (DRB1*0401) が 68.6, Dw13 (DRB1*0403, 0407) が 82.0, Dw10 (DRB1*0402, 0414) が 91.4 を示し、DR4 関連 D 抗原の DRB1 遺伝子第 2 エクソンの 37~74 番目が異なるアミノ酸数が多い程、高い MLC 反応を示す傾向を示した。

Key words : MLC (mixed lymphocyte culture), DRB1*alleles, Amino acid

はじめに

DR4 関連 D 抗原の Dw13 が DRB1*0403 と 0407, Dw14 が DRB1*0404 と 0408 に分割されることが明らかにされている。

我々は昨年の当学会で Dw15 が DRB1*0405 と 0410 に分割され、Dw13, Dw14, Dw15 の各抗原の DRB1 遺伝子の第 2 エクソン 37~74 番目のアミノ酸が同一であることより、DR4 関連 D 抗原³⁾ が Dw4 (DRB1*0401, 0413), Dw10 (DRB1*0402, 0414), Dw13 (DRB1*0403, 0407), Dw14 (DRB1*0404, 0408), Dw15 (DRB1*0405, 0410), DKT2 (DRB1*0406), newX (DRB1*0409), newY (DRB1*0411), newZ (DRB1*0412) に分類される可能性を報告 (図 1)⁴⁾ した。

そこで今回、同一 DR で D 抗原が異なる細胞間の MLC 反応性と DRB1 遺伝子のアミノ酸レベルでの関係を検討した。

材料と方法

DR4 が同一で D 抗原が異なる Dw4 (HBM, HIM, JAH, SUD の 4 種), Dw10 (AL10, Leo10, Ts10 の 3 種), Dw13 (PEA

, SSTO の 2 種), Dw14 (Bin40, Ls40, MT, PEM の 4 種), Dw15 (HAS15, YT59 の 2 種) HTC s (homozygous typing cells) を刺激細胞, Dw15 を有するパネル細胞の 8 種を反応細胞として MLC 検査を行った。MLC 検査は第 7 回国際組織適合性会議の方法に準じ、MLC 反応の解析は 75% DNV 値に従い検討した。HLA-DNA タイピングは Modified PCR-RFLP 法に従った。

成績

8 種の Dw15 陽性パネル細胞としての反応細胞と各 DR4 関連 D HTC s を刺激細胞としたときの MLC 反応 (75% DNV 値) は、同一 D 抗原の Dw15 HTC s 2 種が平均 23.2 ± 11.2 を、異なる D 抗原の Dw14 HTC s 4 種が平均 62.6 ± 16.7 , Dw4 HTC s の 4 種が平均 68.8 ± 18.4 , Dw13 HTC s の 2 種が平均 82.0 ± 26.9 , Dw10 HTC s 3 種の平均が 91.4 ± 26.6 を示した。Dw15 は Dw14, Dw4, Dw13, Dw10 の順に高い MLC 反応を認めた。

図1. DR4関連D分割抗原の可能性

DRB1*	D	Amino acids						86
		37	57	67	70	71	74	
0401 0413	w4	Y	D	L	Q	K	A	G V
0402 0414	w10	-	-	I	D	E	-	V G
0403 0407	w13a w13b	-	-	-	-	R	E	V G
0404 0408	w14a w14b	-	-	-	-	R	-	V G
0405 0410	w15a w15b	-	S	-	-	R	-	G V
0406	KT2	S	-	-	-	R	E	V
0409	new	-	S	-	-	-	-	G
0411	new	-	S	-	-	R	E	V
0412	new	-	S	I	D	R	L	V

考 察

DR4のDRB1遺伝子は第2エクソンの37, 57, 67, 70, 71, 74, 86番目のアミノ酸の違いによりDRB1*0401~0414の14種のallelesが認められている。そしてDR4関連D抗原は37~74番目のアミノ酸が同一のときに、同一特異性を示し、さらに87番目のアミノ酸のGlyとValによりD抗原が分割されることが明らかとなった(図1)⁴⁾。

そして反応細胞のDw15とDw14, Dw4, Dw13, Dw10の37~74番目のアミノ酸の違いは、Dw15とDw14が1コ(57番目), Dw4が2コ(57番目と71番目), Dw13が2コ(57番目と74番目), Dw10が4コ(57番目, 67番目, 70番目, 71番目)が異なっている。そして今回の成績でDw15の反応細胞は、Dw14<Dw4<Dw13<Dw10の順に高いMLC反応を示し、異なるアミノ酸の数が多い程MLC反応が高くなる傾向を示した。このことはDR4関連D抗原間のMLC反応性に強弱が存在することを示したもので、そ

の強さは37~74番目のアミノ酸の異なる数により反映されている可能性を示唆したものと考える。

文 献

- 1) 能勢義介, 成瀬妙子: 移植におけるPCR-RFLP法によるHLA-D, DP抗原のDNAタイピング. 今日の移植 6:9-21, 1993
- 2) 能勢義介, 稲葉洋行, 荒木延夫, 浜中泰光, 阪田宣彦, 土田文子, 辻 公美, 成瀬妙子, 猪子英俊: HLA class IIのDNA typingとMLC. 日本輸血学会雑誌 39:1031-1034, 1993
- 3) Nose, Y., Sato, K., Nakagawa, M., Kondoh, K., Inouye, H. and Tsuji, K.: HLA-D clusters associated with DR4 in the Japanese population. Human Immunology 5:199-203, 1982
- 4) 能勢義介, 稲葉洋行, 荒木延夫, 浜中泰光, 阪田宣彦, 土田文子, 辻 公美, 成瀬妙子, 猪子英俊: HLA-Dw15分割抗原のDRB1 alleles (DRB1*0405, 0410)について. 第2回日本組織適合性学会大会抄録集:17, 1993

細菌性スーパー抗原によって誘導されるT細胞アナジー—サイトカイン遺伝子発現に対するアナジー・スペクトラム—

小出幸夫・内嶋雅人・吉田篤司・吉田孝人*

*浜松医科大学微生物学

要旨：T細胞レセプターを介した各種サイトカインmRNAの発現には、カルシニューリン/Cキナーゼ系とこれとは別個のシグナルの少なくとも二種の伝達系が存在することが示唆された。後者のシグナルはSEBによるアナジーの影響を受けず、アナジー耐性サイトカイン群のmRNA発現に関与すると考えられる。

Key words: anergy, cytokine, super antigen

はじめに

免疫学的寛容（トレランス）には、胸腺中で起きる中枢性トレランスと末梢で起きる末梢性トレランスがある。また、トレランスのメカニズムとしては、クローン欠失と不応答性（アナジー）の2種があることが知られている。この両者は中枢性トレランスでも末梢性トレランスでも機能している。末梢性トレランスにおけるクローン欠失は成熟T細胞が抗原刺激によって活性化すると、その後アポトーシスを起こすことで知られている。この活性化によってもたらされる細胞死はactivation-induced cell death(AICD)と呼ばれる。また、末梢性アナジーとしては成熟T細胞が抗原提示細胞からのco-stimulatorなしで、T細胞レセプター(TCR)の刺激を受けるとアナジーの状態に陥ることで知られている。これは主にin vitroで観察されるが、in vivoではスーパー抗原によって容易に末梢性アナジーを誘導できる^{1,2}。アナジーは抗原刺激に対する増殖性反応及びIL-2産生能の不全によって最もよく特徴づけられている。しかしながら、各種免疫反応ではIL-2のみならず、他のサイトカインも重要な働きをしていることは論をまたない。そこで、我々はスーパー抗原としてブドウ球菌腸管毒B(SEB)を用いin vivoで成熟T細胞をアナジーの状態に導入し、その後、in vitroでSEBの刺激を行ない、各種サイトカインmRNAの発現を検討した。その結果、アナジーに感受性と耐性のmRNA発現があることを見いだした。

材料と方法

マウス：C57BL/6(B6)及びVβ8.2トランスジェニックマウス(Tg93)の8～10週齢のものを用いた。

T細胞アナジーの導入とサイトカインmRNAの定量：SEB100μgをマウスに静注し、5日後に更にSEB100μgを静注した。2回目の静注5日後に、脾細胞を回収し、SEB5μg/mlで8～16時間培養した。その後、ナイロンウールカラムと抗Ia抗体+マグネットビーズにて、T細胞を純化した（約95%）。このT細胞より全RNAを抽出し、M-MLV逆転写酵素でcDNAを作製、これを鋳型として定量的RNA-PCRを行なった。PCR産物を泳動後エチジウムブロマイドで染色し、デンストメーターで定量を行なった。

結果と考察

図1Aに示すようにB6マウスの脾T細胞はSEBで8～16時間刺激すると、量依存的にIL-2、IL-3、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-αのmRNAを発現した。SEB100μgを2回静注してアナジーに導入したマウスにおいては、図1Bに見られるように、SEBによって誘導されるIL-2、IL-3、IL-4のmRNAの発現は極度に抑えられていた。しかしながら、IL-6、IL-10、IFN-γ、TNF-αのmRNAの発現はアナジーの影響を受けなかった。CD8⁺細胞はアナジーの影響を受けにくいとの報告³があるため、CD4⁺細胞を純化し同様の検討を行なったが結果は同じであった。

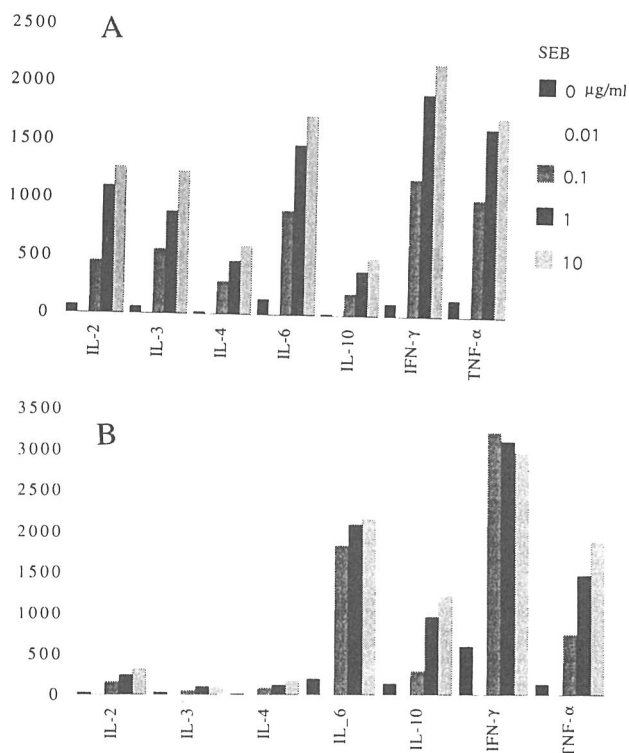


図1. SEBに対するT細胞のサイトカインmRNA発現
A:コントロール、B:SEB誘導アナジー

これらの反応がTCRを介したシグナルによって起きていることを確かめるため、アナジーに導入したマウスのT細胞を固相化抗CD3抗体で刺激したところ、図1Bと全く同じmRNAの反応パターンを示した。このことより、アナジーT細胞によるIL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α のmRNAの発現はTCRを介したシグナルによって惹起されていることが確認された。

SEBによってアナジーに導入したT細胞は、またIL-2レセプター α 鎖のmRNAの発現も抑えられており、IL-2を培養液に添加してもアナジーを解消できなかった。クローン化T細胞においては、アナジーはIL-2の添加により解消できる³⁾ことが報告されているが、SEBを用いた系では結果が異なっていた。

SEBによって全てのT細胞をアナジーに導入することができるV β 8.2トランスジェニックマウス⁴⁾を用いたところ、アナジーT細胞はA23187(1 μ M)でIL-4mRNAの発現を、PMA(100nM)+A23187(1 μ M)によりIL-2、IL-3 mRNAの発現を示すことを認めた。また、カルシニューリンの阻害剤であるFK506を用いた場合、SEBによる未処置T細胞のIL-2、IL-3、IL-4 mRNAの発現は抑えられたが、アナジー耐性のIL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α mRNAの発現は影響を受けなかった。更に、未処置T細胞はA23187またはPMAのどちらでも単独でアナジー耐性のサイトカインmRNAの発現を誘導したが、アナジー

感受性サイトカイン遺伝子発現のうち、IL-2、IL-3はPMAとA23187の両者がmRNA発現に必要であり、IL-4 mRNAはA23187のみで発現され、PMAは無効であった。

以上より、T細胞によるIL-4mRNAの発現には、Ca²⁺-カルシュニユリン系によるNF-ATが関与しており、IL-2、IL-3mRNA発現にはこれに加えて、Cキナーゼの関与が必要と考えられる。アナジーT細胞においては、この両者のシグナル伝達が障害されていると考えられる。アナジー耐性サイトカインmRNAの発現にはこれらと別個のシグナルが関与し、これはSEBによるアナジーの影響を受けにくいと考えられる。

文献

- 1) Kawabe, Y., Ochi, A.: Selective anergy of V β 8⁺, CD4⁺ T cells in staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J. Exp. Med.* 172 : 1065 - 1070, 1990.
- 2) Rellahan, B., Jones, L.A., Kruisbeek, A.M., Fry, A.M., Matis, L.A.: In vivo induction of anergy in peripheral V β 8⁺ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J. Exp. Med.* 172 : 1091-1100, 1990.
- 3) Schwartz, R.H.: A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248 : 1349-1356, 1990.

第3回 日本組織適合性学会大会

THE 3rd JSHI ANNUAL MEETING

JULY 20~22 1994

HAMAMATSU

抄 録

大会長 吉田孝人

会期 平成6年7月20日(水)~22日(金)

会場 FORTE(フォルテ) 地下2階ホール

〒453 浜松市旭町12-3 (JR 浜松駅北口)

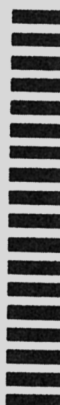
TEL 053-458-2111 (内線2149)

大会事務局 浜松医科大学微生物学教室

〒431-31 浜松市半田町3600

TEL/FAX 053-435-2335

The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics



特別講演

特別講演 1

HLA and marrow transplants from unrelated donors

John A. Hansen, Effie Petersdorf, Paul J. Martin, and Claudio Anasetti*

*Immunogenetics Program, Division of Clinical Research, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA

本文 P 19

HLA plays a critical role in marrow allografting impacting significantly on the risk of graft rejection, the incidence and severity of acute graft-versus-host disease (GVHD), the prevalence of chronic GVHD and the probability of finding adequately matched unrelated donors. In Seattle alternate donor transplants are currently considered according to diagnosis, age of the patient and the degree of HLA mismatching.

MARROW TRANSPLANTATION, UNRELATED DONOR, HLA MATCHING

特別講演 2

Signaling via HLA class II molecules : Cell activation and death

Dominique Charron*

*Laboratoire d'Immunogénétique Moléculaire, Institut Biomedical des Cordeliers, Paris, France. Université Paris VI/INSERM U396

本文 P 21

In addition to their antigen presenting function HLA molecules have been shown to transduce signals in resting and activated B cells. Two different signalling pathways which lead to opposite effector functions were observed. Both cell activation /differentiation and cell death can be induced through HLA class II. The rôle of HLA class II engagement in normal and auto immune response is discussed.

HLA - Signaling - PKC - Cell Death.

シンポジウム I 日本人における DNA タイピングと骨髄移植

S1-1

日本人の HLA 遺伝子とその周辺の話題

徳永勝士*

*日赤中央血液センター研究部

要旨：日本人に存在するHLAクラスII遺伝子群のアリールの検索はこれまでにほぼ終了しているが、一方、クラスI遺伝子群のアリールの解析はまだ不十分である。我々はこれまでにA2、A24、A26、A11、B13、B15、B40などの抗原グループについて、日本人に存在するサブタイプの塩基配列を決定してきた。また、日本人の近隣集団についても、中国北部漢族、韓国人やシベリアのブリヤート族などにおけるHLA抗原およびハプロタイプの分布を調査してきた。本シンポジウムでは、クラスIアリールの解析の現状を報告するとともに、HLA遺伝子群からみた日本人の特徴を概観し、また近隣の諸集団との関係について、いくつかの話題を提供したい。

S1-追加発言

新しい HPA 法(TMA-HPA)による オロチョン族の HLA class II allele

吉田孝人*

*浜松医科大学微生物

要旨：日本人の近隣集団の1つ、中国東北部の黒河地方に住むオロチョン族のHLAクラスI, II, IIIについて検討している。クラスIについては血清学的に、クラスIIについては血清学的とDNAタイピングのPCR-HPA法、新しいTMA-HPA法で検索した。クラスIIIについては complement typingを行った。我々は興味あるHLAハプロタイプと日本人に少ないアリールを高頻度に見いだしているので日本人のHLA遺伝子とその周辺の話題に追加する。

Key Words: DNA typing, TMA-HPA, the Orochi

HLA の DNA タイピングと骨髄移植

笹月健彦*

*九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

要旨：我国の公的骨髄ドナーバンクを介した非血縁者間骨髄移植におけるHLA適合性の意義を検討する目的で、厚生省骨髄移植調査研究班の共同研究として移植ペアのHLA-DNAタイピングを行なった。100例の移植ペアは全例で血清学的にA, B, DR抗原が一致していたが、A, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1のそれぞれについて、22, 18, 8, 14, 41, 53ペアでDNAレベルの不一致が認められ、調査した全てのHLAが一致したペアは29例であった。調査した時点で60日以上経過が観察できた85症例についてDNAレベルでのHLA適合度と臨床予後との関連を検討したところ、30日以内の早期死亡およびII度以上のGVHD発症は、HLA一致で13%および38%であるのに対し、DR不一致ではそれぞれ27%および40%であり、またDPのみ不一致では19%および32%であった。このことはクラスII抗原のうちDP抗原の不一致は臨床予後に大きな影響を与えないことを示す。一方、Aのみ不一致では早期死亡43%およびGVHD発症75%と移植予後が不良であったことから、今後クラスI抗原についてもDNAレベルでの検討が必要となることが示唆された。

白血病と骨髄移植

大野 竜 三*

*浜松医科大学第三内科

本文 P 23

要旨：近年の化学療法と骨髄移植療法の進歩により、白血病は治癒可能な疾患となってきた。骨髄移植療法は現時点での最強の抗白血病療法であるが、graft-versus-host disease (GVHD)のコントロールが最大の課題である一方、GVHDには明らかにgraft-versus-leukemia 効果を示している。

再発した白血病の予後は絶対不良であり、骨髄移植療法が絶対適応となる。慢性骨髄性白血病も骨髄移植が絶対適応と見なされているが、最近、インターフェロンでPh⁺ 染色体が消失する症例長期生存率は骨髄移植例より良好であると報告されており、この様な症例での選択が問題になりつつある。

小児・45歳未満成人急性骨髄性白血病や成人急性リンパ性白血病では、強力な化学療法で治療される患者については、再発までは化学療法を施行し、再発したら骨髄移植を施行するというのがコンセンサスとなりつつある。ただし、化学療法の予後因子不良例では骨髄移植の方がよいと思われる。

key words : bone marrow transplantation, leukemia, chemotherapy

血液疾患に対する遺伝子治療の基礎的研究

谷 憲三郎・日比野 仁・中崎有恒・林 焯唐・高橋圭介
長山人三・高橋 聡・齋藤 泉・浅野茂隆*

東京大学医科学研究所内科

本文 P 25

要旨：血液細胞への効率良い遺伝子導入法としては，レトロウイルスベクターならびにアデノウイルスベクターが挙げられる．われわれは先ずレトロウイルスベクターを用い，FACSソーターにて濃縮したマウス骨髄幹細胞への比較的長期的な遺伝子導入を行うことができた．つぎにアデノウイルスベクターを用い，各種白血病細胞やマーマセツト骨髄細胞に対して短期的に高い効率での遺伝子導入が可能であることも明らかにした．従ってこれら2つのベクター系を用途に応じて使いわけることで血液疾患への遺伝子治療法開発も可能となると考えられた．さらに，われわれはヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子導入線維芽細胞を用いたサイトカイン補充遺伝子治療法の開発基礎研究も行っており，臨床応用への可能性を検討中である．

Key words: Retroviral vector, Adenoviral vector, Hematopoietic cells

シンポジウムⅡ HLA 抗原の発現調節機構

S2-1

HLA クラスII抗原の インターフェロン- γ による発現調節機構

小出幸夫・龍 慶子・根津延和・吉田孝人*

*浜松医科大学微生物学

本文 P27

要旨：我々はインターフェロン(IFN)- γ によるHLA-DR抗原の発現が転写レベルで制御されており、これには新たな蛋白合成が必要でないことを認めた。そこで、このDR抗原の発現に関与するシグナル伝達機構を研究した。IFN- γ はそのレセプターに結合するとこれに会合しているチロシンキナーゼ、恐らくJAK1、2、を活性化し、その後IP₃の産生とCキナーゼの活性化を惹起することが判明した。IP₃による細胞内Ca²⁺濃度の上昇とCキナーゼの活性化がIFN- γ によるHLA-DR抗原の発現に必須であると考えられる。

key words : HLA-DR, signal transduction, IFN- γ

S2-2

Proteasome のインターフェロン γ による調節

田中啓二*

*徳島大学酵素科学研究センター

本文 P29

要旨：最近、内在性抗原のプロセッシング提示機構の解明が進み、この免疫反応システムにおけるプロテアソーム（蛋白質分解酵素複合体）の役割の重要性が明らかになりつつある。ガンマ型インターフェロン（IFN- γ ）はMHCにコードされたプロテアソーム遺伝子LMP2とLMP7をUp-Regulationさせると同時にサブユニットXとYをDown-Regulationさせる。この分子構成の変動は抗原ペプチド生成に適応したプロテアソームの機能変化であることが示唆されている。cDNAクローニングの結果、XはLMP7と69%、YはLMP2と61%のホモロジーを有することが判明し、IFN- γ は通常のX/Y型プロテアソームからLMP2/7型プロテアソームへの構造変換を誘導して大量に侵入してきた非自己抗原のプロセッシングを加速させ、細胞性免疫反応を亢進させると考えられた。これまでIFN- γ の主な作用機構は標的遺伝子の転写促進と考えられてたが、抗原のプロセッシング反応においてはプロテアソームの機能変換という新しい仕組みで応答することが示唆された。 key words : antigen processing, interferon- γ , proteasome

絨毛癌由来細胞株からの核蛋白と非古典的 クラス I 遺伝子上流域との特異的結合

古山将康・木村俊夫・大橋一友・錦織直子・脇本昭憲・加藤宗寛・筒井建紀・佐治文隆*

*大阪大学医学部産科婦人科

本文 P31

要旨：免疫学的妊娠維持機構において胎盤絨毛に発現する主要組織適合抗原は重要な役割を担っているが、非古典的クラス I 抗原であるHLA-G抗原が胎盤絨毛に特異的に発現することが報告された。本研究では異なるHLAクラス I 抗原を発現する種々の絨毛癌細胞株をモデルとして、抽出核蛋白とクラス I 遺伝子上流域との結合をゲル移動度シフト法を用いて解析した。HLA-Gを発現する細胞株BeWoからの抽出核蛋白中にHLA-G遺伝子の転写開始点から上流120bpから190bpの部位に結合する蛋白をゲル移動度シフト法で確認した。この核蛋白はHLA-A2遺伝子上流域のNFκβの結合パターンとは異なり、クラシカルなクラス I 抗原を発現する他の絨毛癌細胞株には同定できなかったことから、NFκβとは異なる核蛋白であることが示唆された。key word: HLA-G,choriocarcinoma, nuclear protein

HLA クラスII遺伝子群の発現調節における 座位特異性と遺伝的多型性

木村彰方*

*九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

要旨：多重遺伝子族であるHLAクラスII遺伝子群は、抗原提示細胞や活性化T細胞などの限られた細胞群に発現しIFNによる発現誘導を認めるという共通性を有しているが、その発現量およびTNFへの反応性は遺伝子毎に異なる。このような発現調節は主に転写レベルで行われており、各遺伝子の転写調節領域に結合する転写因子の種類および結合親和性が座位毎に異なることに依存する。一方、HLAクラスII遺伝子群は、その構造領域の著明な遺伝的多型性に加えて転写調節領域にも多型性を有しており、転写因子との結合親和性が対立遺伝子間で異なり、このため対立遺伝子間で発現レベルの相違が認められる。本シンポジウムでは、転写制御におけるHLAクラスII遺伝子群の特異性を紹介する。

第11回日本HLAワークショップ報告

園田俊郎*

*鹿児島大学医学部ウイルス学

第11回日本HLAワークショップは血清学的タイピングとDNAタイピングとの統合をめざし、既存の日本人パネルセルを用いてHLA-クラスI, II DNAタイピング法の実用性を以下の項目で検討した。本ワークショップには40施設から260名が参加し、日本人のパネルセル1764を用いて、クラスI, II DNAタイピング法の特異性、操作性、迅速性、経済性ならびにアレル特異的抗血清の有無を検討した。その結果、クラスI DNAタイピングではHLA-Bアレルに加えて、HLA-Aアレルの同定が可能となった。クラスIIタイピングでは1216パネルのHLA-DR, DQ, DPのアレルが同定された。抗血清との対応ではアレル特異的血清は見いだせなかった。以上のDNAタイピングでアレルまで確定されたパネルセルによって、日本人のHLA遺伝子頻度と5座位のハプロタイプを解析し、DPとの連鎖の多様性を明らかにした。これによって、腎臓、骨髄移植のドナー選択にあたってのDNAタイピングの重要性が確認された。

一般演題 (1~32)

1.

HLA-A2サブタイプの血清学的反応性

柏瀬貢一・石川善英・徳永勝士^{*1)}、橋本正美・大橋初弥^{*2)}
中島文明^{*3)}、赤座達也・田所憲治・十字猛夫^{*1)}

^{*1)}日赤中央血液センター、^{*2)}東京都駒込赤十字血液センター
^{*3)}神奈川県赤十字血液センター

要旨：我々はHLA-A2関連血清の反応パターンの違いによりA2のサブタイプとしてA2S、A2AKおよびA2Kを見出した。A2S、A2AKは、それぞれ第11回国際HLAワークショップに提出されたA2S、A2Leeと血清学的反応性から同一の抗原と考えられたが、A2Kは他のサブタイプとは異なり、新抗原であることが示唆された。一方、A2S+A10の特異性を示す血清が見出された。149および152番のClass I抗原のアミノ酸配列は、A2SとA10関連抗原だけが、それぞれThr、Gluであることから、A2S+A10の特異性を示した血清は、この部位を認識したと推定された。

Key words : HLA-A2 , LCT , epitope

2.

HLA-A 遺伝子 DNA タイピング法の開発

伊達是志・木村彰方・笹月健彦*

*九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

要旨：PCR-SSOP法によるHLA-A遺伝子のDNAタイピング法を開発した。HLA-A遺伝子の第1から第3エクソン領域をPCR法により特異的に増幅後、77種のSSOPを用いてドットプロットハイブリダイゼーションを行なうことにより、*0201と*0209以外の全ての対立遺伝子が分類可能であった。また*0201と*0209は第4エクソンのPCR-SSOP解析で区別できた。この結果、血清学的に区別の困難なサブタイプ（例えばA2に14種、A26に4種など）および新たな対立遺伝子3種（A2に2種、A24に1種）を含めた全48種のHLA-A対立遺伝子がDNAレベルで同定できた。さらに、特定のHLA-B対立遺伝子との強い連鎖不平衡（A*0207とB46、A*2601とB61など）がサブタイプのレベルで確認された。

3.

PCR-RFLP 法による HLA クラス I アロ抗原のサブアリルタイピング

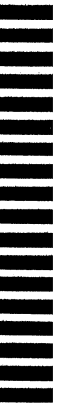
大西浩史*

*住友金属株式会社診断薬室

本文 P 43

要旨：HLA クラス I 抗原を対象とした DNA タイピングのシステムの開発が進んでいる。今回は、PCR-RFLP 法を HLA クラス I 抗原の解析に応用するにあたり、まずアロ抗原をひとつの単位としてそのサブアリルをタイピングするシステムの開発を、HLA-B44 抗原をそのモデルとして検討を行った。日本人由来の B44 ポジティブ検体を対象にタイピングを実施した結果、その大部分が B*44 03 の対立遺伝子であることが明かとなった。

key words: PCR-RFLP, HLA-class I antigens, HLA-B44



4.

PCR-SSCP法による B40 グループのアリル解析

坂内 誠^{*1)}・徳永勝士・林 玲・石川善英^{*2)}、植木純一・大橋初弥^{*1)}、
田中秀則・赤座達也・田所憲治^{*2)}、藤澤 洸^{*1)}、十字猛夫^{*2)}

^{*1)}東京都赤十字血液センター

^{*2)}日赤中央血液センター

要旨：血清学的方法では判定が困難な HLA-B locus のアリルレベルの解析を目的として、HLA-B locus の DNA タイピングを試みた。genomic DNA を用いて、exon 2 の最初の部分を区別する 2 種類の primer group により exon 2 - exon 3 を含む PCR (1st-PCR) を行ったところ、B locus に特異的な増幅が可能だった。さらにこの PCR 産物を鋳型とし、exon 2 または exon 3 のみをそれぞれ再度 PCR (2nd-PCR) により増幅し、SSCP 法により解析した。今回、B40 グループをこの方法で解析したところ、1st-PCR により、B60 (B*4001) と B61 (B*4002 or B*4006) が、また、exon 3 の 2nd-PCR 産物の SSCP で、B*4002 と B*4006 が区別された。今回の方法は、HLA-B locus の他のグループのアリル解析にも応用可能と思われる。

5.

PCR産物の直接塩基配列決定法による HLA-C 抗原対立遺伝子のタイピング

成瀬妙子・河田寿子・増井 理・安藤麻子・木村 穰^{*1)}、能勢義介^{*2)}、一色 玄^{*3)}、猪子英俊^{*1)}

^{*1)}東海大学医学部分子生命科学, ^{*2)}兵庫県赤十字血液センター

^{*3)}大阪市立大学医学部小児科

要約:

我々はPCR産物の直接塩基配列決定法によるクラスI 抗原対立遺伝子のタイピングについて検討を行ってきたが、今回、HLA-C抗原について検討した。有核細胞よりダイナミーズを用いてmRNAを抽出後、RT-PCRでHLA-C抗原遺伝子の第2エクソン～第4エクソンを増幅し、蛍光自動シーケンサーにより直接塩基配列決定法にて解析を行った。また、増幅領域を制限酵素で切断するPCR-RFLP法についても検討を行ったところ、16種の制限酵素を使用して19種の対立遺伝子の識別が可能であった。このようにRNA抽出の操作が簡便になったことで検出までの時間が短縮され、さらにPCR-RFLP法を組み合わせることにより、C抗原遺伝子の詳細なタイピングが可能と考える。

6.

日本人のDR-NJ25, DR14特異性の 遺伝学的多型性とハプロタイプの解析

橋本光男・木下朋子^{*1)}、兼重俊彦^{*3)}、山崎美保^{*1)}、市川靖二^{*2)}、内田清久^{*3)}、福西孝信^{*1)}

^{*1)}兵庫県立西宮病院腎移植センター, ^{*2)}兵庫県立西宮病院泌尿器科

^{*3)}シオノギ製薬株式会社診断医学部

本文 P53

要旨: DR-NJ25, DR14 特異性は、日本人に特徴的な抗原系の1つであるが、血清学的には判定が困難であり、クラスI抗原との連鎖も明確でない。我々は、1792名の日本人非血縁者の血清学的及び、DNAタイピングを行い、221名のDR14, 88名のDR-NJ25陽性者を認めた。各抗原の多型性をDNAタイピングで検討すると、DR14は、DRB1*1401, 1405, 1407の3種類、DR-NJ25については、DRB1*1307, 1402, 1403, 1406, 1412の5種類の遺伝子型にスプリットされた。今回の解析で1例しか認められなかったDRB1*1402と1412を除いた6種類のDRB1*14遺伝子型は、DPB1を除く他のクラスIIアレル(DRB3, DQA1, DQB1)と強い連鎖を示し、7種類のクラスIIハプロタイプを形成した。この7種類のDR14ハプロタイプは、全てクラスI抗原とも有意な連鎖がみられ、日本人に特徴的な6種類のHLAハプロタイプを推定することができた。

7.

HLA-DNA タイピングの導入と 血清学的タイピング結果との相違

西垣文敬・笹木剛志^{*1)}，平野哲夫・新藤純理^{*2)}，脇坂明美・吉木 敬^{*3)}

^{*1)}市立札幌病院中央検査部，^{*2)}市立札幌病院腎移植科

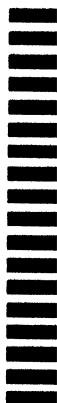
^{*3)}北海道大学医学部病理学第一

本文 P 55

要旨：HLA タイピングは腎移植の際に重要な役割を果たし、特にDR型のマッチングが重要とされているが、血清学的方法とDNAタイピング結果との不一致が指摘されている。そこで、我々は献腎移植希望透析患者 106名を対象に、市販DNAタイピングキットを用い、その結果について検討した。

106名中、不一致が認められたのは8名(7.5%)であった。原因としてはB細胞分離、良質抗血清獲得の困難性が考えられ、DNAタイピングの必要性が示唆された。また今回我々が使用したSSP法によるキットは簡便で短時間で実施可能なことから、新たにDNAタイピングを導入する施設にとってはその導入が容易であると考えられたが、全体の50%の抗原については遺伝子型までは決定できなかった。今後は、全ての遺伝子型をSSP法で判定可能なキットの開発が待たれる。

Key words : DNA typing , renal transplantation , PCR-SSP



8.

PCR-MPH 法による 簡便な HLA class II 遺伝子のタイピング

前川尻真司・川井信太郎^{*1)}，徳永勝士・宮本正樹・赤座達也・十字猛夫^{*2)}・山根明男^{*1)}

^{*1)}湧永製薬株式会社バイオ研究所

^{*2)}日赤中央血液センター

本文 P 57

要旨:大量検体のHLAのDNAタイピングをルーチンとして行うことを目的とし、迅速で操作が簡便、コストが安価なPCR-MPH法を前年度の本学会で報告した。しかし、前回報告した12種のプローブの組み合わせによるDRB1遺伝子のgeneric typingでは、DR3, 11, 12, 8がホモなのか、それらとDR6とのヘテロなのかの判定ができない、或いはDRB1*1403をDR8と判定してしまう、等の限界があった。今回、これらの限界を克服するために4種のプローブを追加した。更にsubtypingに関しても検討し、現在報告されている日本人に存在するほとんどのallele typingが可能になった。また、本法でのDQB1遺伝子のgeneric typingについても検討したので報告する。

key words : HLA-DNA typing, PCR-MPH, ELISA

TMA-HPA 法による HLA タイピング

— 24 medium resolution probes を用いた HLA-DRB1 タイピング —

玖田 孝・松原亨一・小林 明・武田さおり・藤原曜子・達保 宏^{*1)}、小出幸夫・吉田孝人^{*2)}

^{*1)}中外製薬株式会社診断科学研究所

^{*2)}浜松医科大学微生物学

我々は独自の増幅法TMA法(Transcription mediated amplification : DNAを鋳型に用いて大量のRNAを産生させる方法)とHPA法(Hybridization Protection Assay : 化学発光標識DNAプローブを用いたSSOP法)を用いた簡便かつ正確なHLA-class II タイピング法を開発し、報告してきた。今回、DRB1 1st.タイピングにおける解析力を向上させ2nd.タイピングの必要性をなるべく少なくすることを目的に、これまで16種であったプローブを24種に増やす検討を行なった。

健常人由来のDNA100検体をTMA法で増幅し、HPA法で検出した。検出は96穴マイクロプレートを用いて行なった。日本人に適した24種のプローブを組み合わせることで1st.タイピングでalleleまで決定できた検体は約50%であった。さらに、alleleまで決定できなかった検体の多くは2nd.タイピングにおいて1種もしくは2種のプローブでallele タイピングが可能であった。その結果、DRB1 alleleタイピングがより迅速に行なえるようになった。

日本人を対象にした PCR-SSP 法による DQB1 タイピングの試み

酒巻建夫・前島基志・山崎正明・苅部正宏・柏原英彦*

*国立佐倉病院臨床研究部臨床検査科

本文 P 61

要約：DNA配列特異的なプライマーの組み合わせを用いてPCRの成否によりタイプを決定する、迅速、簡便なPCR-sequence-specific primers (PCR-SSP)法を検討した。すでにDRB1, B3-5に関して発表しているが、今回、日本人のDQB1遺伝子を対象としてプライマーの設計を行った。これらのプライマーを用いるとPCR-SSOP法と比較して、DQB1*0201, 0301, 0302, 0303, 0401, 0402, 0501, 0502, 05031, 0601, 0602, 0604, 0605の13種類の同定ができることが判明した。この方法は少数の検体を短時間に処理するのに最適な方法であった。今後、PCR-SSP法を臓器移植のドナーのDRB1, DRB3-5, DQB1タイピングに利用すれば、より適合度の高い移植が可能となると思われる。

key words : HLA-DQB1, PCR-SSP

11.

Reverse dot blot 法を利用した，ヘテロ接合体からの 新たなDPB1アレル(DPB1 * JYO)の直接塩基配列決定

兼重俊彦・内田清久^{*1)}，木下朋子・橋本光男・福西孝信^{*2)}

^{*1)}シオノギ製薬株式会社診断医学部

^{*2)}兵庫県立西宮病院腎移植センター

本文 P 65

要旨：HLA-DPB1 タイピングで既知のアレルと異なる profile を示した試料 JYO の塩基配列解析を行った。塩基配列決定には PCR 産物をプラスミドベクターにクローニングする方法（；常法）と併せ，reverse dot blot 法の positive spot より鋳型を調整し直接塩基配列決定を行う方法を用いた。これらの塩基配列解析により JYO の DPB1 アレルは DPB1 * 0202 と，DPB1 * 0402 の codon 36 が GCG (Ala) に置換した新たなアレル(DPB1 * JYO=5101)のヘテロ接合体であることが分かった。今回我々が開発した，reverse dot blot 法を利用した直接塩基配列決定法は，クローニングステップを必要とせずにヘテロ接合体アレルからも，信頼性の高いデータが短時間の内に得られることから有用である。

12.

日本人における HLA-DMB 遺伝子の多型性の解析

河田寿子・成瀬妙子・許 珊^{*1)}，能勢義介^{*2)}，木村 穰・猪子英俊^{*1)}

^{*1)}東海大学医学部分子生命科学

^{*2)}兵庫県赤十字血液センター

要旨：

HLA-DM 遺伝子は、HLA-DQ, DP 間に存在が報告された新しいクラス II 遺伝子であるが、他のクラス II 抗原による抗原提示の素過程に重要な機能をになっている。そこで我々は、DMB について多型性を検討した。日本人由来 HLA-D 抗原ホモ接合体細胞 27 検体より抽出した DNA の、DMB 遺伝子の中で最も多型性が報告されている第 III エクソンを PCR で増幅し、直接塩基配列決定法で判定した。その結果、日本人においてもすでに公認されている対立遺伝子である DMB*0101 18 例 (67%)、*0102 4 例 (14.8%)、*0103 7 例 (25.9%) を認めた。さらに塩基配列の異なる 2 例 (7.4%) を検出し日本人 DMB 遺伝子に 特有な多型性も認めた。

PCR-RFLP 法による TAP 遺伝子多型の解析

桑田昇治・柳沢雅美・柴田洋一^{*1)}、徳永勝士・田所憲治・十字猛夫^{*2)}

^{*1)}東京大学医学部輸血部

^{*2)}日赤中央血液センター

本文 P 67

要旨： TAP分子は、遺伝子座がHLAクラスII領域に存在し、多型を呈することが報告され、抗原ペプチドの粗面小胞体への能動的輸送を行なう。TAP1 遺伝子2ヶ所、TAP2 遺伝子4ヶ所の多型が報告されている。我々は、PCR-RFLP法にてTAP遺伝子多型を解析し、制限酵素認識塩基配列の存在しない領域については、mismatch-PCR-RFLP法にて解析した。白人では稀なTAP1D対立遺伝子が23%存在し、TAP2対立遺伝子も新たに2種類の存在が明らかとなった。TAP 遺伝子の型判定にはPCR-RFLP法による解析法が簡便で確実であると考えられる。Mismatch-PCR-RFLP法は、制限酵素認識塩基配列のない場合でも解析が可能であり、他の遺伝子多型の解析にも応用可能な方法である。

key words: TAP, HLA, PCR

DP 抗原亜領域のセントロメア側300kb の領域に位置する新しい発現遺伝子の構造解析

安藤麻子^{*1)}、菊池イアーラ幸江^{*2)}、河田寿子・椎名 隆・重成敦子・木村 稯・猪子英俊^{*1)}

^{*1)}東海大学医学部分子生命科学

^{*2)}東海大学医学部移植免疫学

要旨：HLA-DP遺伝子よりセントロメア側の領域、300kbについてcDNAクローニングや塩基配列の決定などの詳細な解析を行い、前年度の結果と併せてこの領域に合計8個の新遺伝子を同定した。この領域のコスミドクローンの解析結果とYACクローンを再クローニングしたコスミドクローンの解析結果から、HSET~COL11A2間300kbのコスミドコンティグを作成し、これまでにバルスフィールド電気泳動によって作成したこの領域の物理地図を確認した。一方、cDNAクローンの塩基配列の解析からHKE3遺伝子は、40SリボソームタンパクS18をコードしていることが明らかになったが、それよりセントロメア側に存在するHKE2遺伝子は、既存の遺伝子とは相同性が認められず、現在のところ機能不明の遺伝子である。

韓国人における HLA-DRB1の 遺伝子頻度について

森山 哲・光永滋樹・徳永勝士・田所憲治・十字猛夫^{*1)}、金 炳哲・朴 明姫^{*2)}

^{*1)}日赤中央血液センター

^{*2)}ソウル大学医学部臨床病理

要約：すでに血清学的タイピングにより class I,II 抗原が判定されている韓国人（ソウル在住の成人）の 214 人について、PCR-SSCP法、及びPCR-RFLP法を用いてHLA-DRの対立遺伝子を決定した。各々の対立遺伝子の遺伝子頻度を第11回国際組織適合性ワークショップ（11IHW）の結果（n=100）と比較するとDRB1*0802の頻度は11IHWでは0.5%であるが、今回の結果は2.6%であり若干の差がみられ、その他の遺伝子頻度についてはほぼ一致していた。また、11IHWでの日本人の遺伝子頻度と比較したところ同様な頻度であることが確認されたが、日本人に9%程存在するDRB1*1502が韓国人ではわずか2%しか確認されないなどの違いが幾つかみられた。さらに、DRB1*1404のような日本人には極めて希な対立遺伝子も観察された。



アジア人における B*1301およびB*1302の確認と そのハプロタイプ

林 玲^{*1,2)}、徳永勝士^{*1)}、中島文明^{*3)}、石川善英・柏瀬貢一^{*1)}、
桑田昇治^{*2)}、赤座達也・田所憲治^{*1)}、柴田洋一^{*2)}、十字猛夫

^{*1)}日赤中央血液センター、^{*2)}東京大学医学部輸血部

^{*3)}神奈川赤十字血液センター

HLA-B13抗原は1D-IEFにより2つのサブタイプ（B13.1, B13.2）に分けられ、それぞれB*1301, B*1302にコードされていることが知られている。YangらはB*1301はアジア人に、B*1302は白人にのみ見いだされると報告している。

ところが、日本人のB13は血清学的にB13とB13Nに分けられることがわかっている。そこでこの2つのスプリット抗原遺伝子の塩基配列を決定したところ、それぞれB*1301, B*1302であることが確認できた。さらにアジア人のB13陽性の54検体をPCR-SSO法により調べたところ、アジア人のB13はその半数以上がB*1302であった。またこの2つのアليلは関連するハプロタイプが異なり、B*1301はA2-Cw10-DR12-DQ7, B*1302はA30-Cw6-DR7-DQ2とハプロタイプを組むことが推定された。さらに、genomic DNAを試料として、PCR-SSCP法を用いたB13のアليلタイピング法を確立した。

ブリヤット族における MHC ハプロタイプの分布

田中秀則・徳永勝士^{*1)}、賀田美江・内川千枝子^{*2)}、伊藤圭一・平川和也^{*3)}、赤座達也^{*1)}、高橋孝喜^{*4)}、田所憲治・十字猛夫^{*1)}

^{*1)}日赤中央血液センター、^{*2)}東京大学医学部附属病院輸血部

^{*3)}山口県赤十字血液センター、^{*4)}虎ノ門病院輸血部

本文 P71

要旨：ブリヤット族のHLA，BF及びC4アロタイピング結果から，BFおよびC4の遺伝子頻度，3座位間(BF-C4A-C4B)の補体ハプロタイプ，5座位(HLA-B, BF, C4A, C4B, HLA-DR)のMHCハプロタイプ頻度を算出し，その分布の特徴について検討を行った．MHCハプロタイプの解析では，欧州の民族と関連性が推定されるタイプ(B13-BFS-C4A3-C4B1-DR7, B44-BFF-C4A3-C4B1-DR7, B50-BFS07-C4A2-C4B1+12-DR7)，東北アジアの民族との関連性が推定されるタイプ(B58-BFF-C4AQ0-C4B1-DR13, B37-BFF-C4A3-C4B1-DR10)等が認められた．

Key words : Buryat, MHC haplotype, distribution

同種角膜移植における HLA クラスII抗原遺伝子のタイピング

佐藤忠之・土田文子・佐藤 薫^{*1)}、竹部兼太郎・バトムンフムンフバト・志村龍男・萩原政夫^{*2)}、島崎 潤・坪田一男^{*3)}、辻 公美^{*1,2)}

^{*1)}東海大学病院細胞移植医療センター移植免疫室

^{*2)}東海大学医学部移植免疫学，^{*3)}東京歯科大学眼科

要旨：角膜移植後の移植片脱落の原因のひとつに拒絶反応がある。提供角膜と患者とのHLAマッチングの重要性については、諸外国の報告があるものの結論は得られていない。今回われわれは実際の角膜移植例において、ドナー角膜辺縁組織とレシピエント角膜組織を材料としたHLAクラスII DNAタイピングを行い、拒絶反応との相関について検討した。クラスII DNAタイピングは、拒絶反応が認められた10組と認められなかった20組を対象としてDQB1とDPB1について行った。その結果タイプのマッチ数が0のグループと1または2のグループに分けた場合、DQB1ではカイ2乗値0.017 ($P \geq 0.1$)で拒絶有り群と拒絶無し群とで有意差はなかったが、DPB1ではカイ2乗値2.829 ($P < 0.1$)で傾向が認められた。

B細胞ラインを用いた腎移植希望登録患者の panel reactive antibody(PRA)検出法の検討

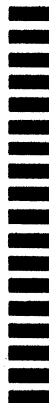
前島基志・苅部正宏・山崎正明・酒巻建夫・柏原英彦*

*国立佐倉病院臨床研究部臨床検査科

本文 P 73

要旨：登録患者血清中のPRA検査には、T細胞を用いてclass I (T warm) 抗体の検出を行っているが、class II (B warm) 抗体の検出は、多量の新鮮なB細胞の入手が困難なため、現在当施設では行っていない。今回我々は、日本人由来のLCLを使用して、登録患者血清中のclass I,II抗体の有無を検討した。未吸収登録患者血清とLCLの反応では、T細胞より陽性率が高く、吸収後の反応では末梢B細胞と同程度の陽性率と強い相関を示したことから、LCLはclass I抗体に加えclass II抗体の検出にも使用できると考えられた。LCL細胞は計画的に調整できるので、PRAを継続的に調べる上で末梢血B細胞に代えることができると考えられる。

key words: LCL, PRA, Cadaveric kidney transplantation



非血縁間骨髄移植のためのDNAクロスマッチ “PCR-LIS-DCP”

丸屋悦子・佐治博夫*

*京都府赤十字血液センター

本文 P 75

要旨：非血縁間骨髄移植のHLA適合検査はPCR-DNAタイピングによるアリル型マッチングにより精度の高い適合性が得られる。この方法による検査過誤の防止と最終確認のためレシピエントとドナー候補者のMHC領域のDNAをPCRで増幅し、直接マッチングさせるDNAクロスマッチ法としてLIS-DCP (Low Ionic Strength-DNA Conformation Polymorphism) 法を開発した。LIS-DCPはDNAの融解特性を利用しDNA溶液のイオン強度を下げ、94℃加熱変性後55℃でアニールすることにより mismatch hybridization による HDF (Hetero Duplex Formation) と熱変性による SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) の両方を形成しかつ持続させ同時に検出できる。クロスマッチ一致例はすべてアリル型適合例であり、不一致例ではアリル型のミスタイピングが検出された。検査所要日数も2日と迅速かつ簡便で安価なクロスマッチ法である。

Key words: DNA crossmatch, PCR-LIS-DCP, Unrelated BMT

HLA-A 遺伝子の DNA タイピングおよび 腎移植マッチングへの応用

新宅究典・福田康彦^{*1)}、伊達是志^{*2)}、星野修司・田代裕尊・古川雅博・土肥雪彦^{*1)}、木村彰方^{*2)}

^{*1)}広島大学医学部第二外科

^{*2)}九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

要約：臓器移植におけるHLAクラスII抗原のマッチングの重要性はDNAレベルでも証明されている。一方、クラスI抗原に関しては血清学タイピングにもとづいた検討が主流であった。今回、我々は、HLA-A遺伝子のDNAタイピングを行ない、腎移植症例52ペアにつき検討を加えた。DNAタイピングにもとづいて移植症例のマッチングを検討したところ、3例において、従来の血清学にもとづいたマッチングとは異なった結果が得られた。うち2例は、サブタイピングが可能となったことによるマッチングカテゴリーの変更によるものである。また、血清学的タイピングではidenticalであったが、DNAタイピングにてはone mismatchと判定した2例は、いずれもgraft lossに陥っていた。今後、HLA-B、Cに関してもDNAタイピングを行ない、より詳細な検討が必要である。

サルコイドーシスの HLA タイピングと TNF- β , HSP70 遺伝子の多型性

石原麻美・水木信久・鈴木克也・大野重昭^{*1)}、石田敬子^{*2)}、
小野弘光^{*3)}、平賀洋明^{*4)}、安藤 等・成瀬妙子・猪子英俊^{*5)}

^{*1)}横浜市立大学医学部眼科, ^{*2)}日赤医療センター眼科

^{*3)}札幌鉄道病院眼科, ^{*4)}札幌鉄道病院呼吸器科, ^{*5)}東海大学医学部分子生命科学

要旨：前回我々は、サルコイドーシスではHLA-DR5、-DR6、-DR8のDRB1遺伝子上の特異的アミノ酸配列に疾患感受性があることを示唆する結果を得た。今回は北海道地方の本症患者30名の血清学的およびクラスII遺伝子タイピングを施行したところ前回（関東地方中心）とほぼ同様の結果であった。次に本症の疾患感受性遺伝子がクラスII領域近傍の非HLA遺伝子である可能性も否定できないため、HSP70およびTNF- β 遺伝子の多型解析を施行した。HSP70-1、70-2の5'untranslated region (+190, +145)の多型性をPCR増幅後のNla IVおよびMbo IIによるRFLP解析で調べた。Hum70tのcoding region (+2437)の多型性およびTNF β の多型性はPCR増幅後のNco I RFLPで調べた。日本人正常人ではHSP70の多型性は非常に低く、かつ患者との間にも相違を認めなかった。HSP70、TNF- β 遺伝子の本症への関与は今のところ否定的である。

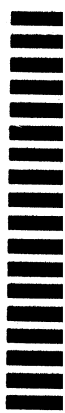
サルコイドーシスと HLA class II allele

豊嶋幹生・早川啓史・吉富 淳・佐藤篤彦^{*1}, 小林 明・松原亨一^{*2},
小出幸夫・内嶋雅人・吉田篤司・吉田孝人^{*3}

^{*1}浜松医科大学第二内科, ^{*2}中外製薬診断学研究所

^{*3}浜松医科大学微生物学

要旨：浜松地区のサルコイドーシス患者 47 例を対象に免疫学的遺伝背景の鍵を握っている HLA クラス II について、そのアレルの DNA タイピングを我々の開発した RNA 増幅 (TMA)-HPA 法で実施したところ、次の如き興味ある結果をえた。HLA-DRB1*0803, $\chi^2=6.82$, $p<0.01$, RR 3.36; HLA-DQB1*0601, $\chi^2=11.87$, $p<0.001$, RR 4.04 と患者集団で高いこと、また HLA-DR - HLA-DQ ハプロタイプ: DRB1*0405 - DQB1*0401 が対照に比して約 3.3 倍、DRB1*0803 - DQB1*0601 が対照に比して約 3.5 倍、DRB1*0802 - DQB1*0402 が対照に比して約 8 倍であった。この患者集団のなかの限られた患者ではあるが肺胞洗浄液中の T cell の TCR mRNA について検索しているのでサルコイドーシスの病態について推論したい。 Key Words: Sarcoidosis, HLA class II allele, Etio-pathogenesis



HLA-DQ 遺伝子座の多型性と インスリン依存性糖尿病

安永晋一郎・木村彰方・笹月健彦*

*九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

要旨：HLA-DQA1 および DQB1 遺伝子の各 13 種類の対立遺伝子の cDNA について全塩基配列を決定し、計 3 種類の新しい対立遺伝子を発見した。この塩基配列に基づき、HLA-DQA1 遺伝子について、エクソン 3 および 4 を対象とした PCR-SSOP 法による新しい DNA タイピング法を確立した。この方法により、従来区別できなかった対立遺伝子が分類でき、HLA クラス II ハプロタイプがさらに詳細に検討できた。ついで、この方法により IDDM と HLA-DQA1 との相関を検討した結果、疾患感受性は、日本人では DQA1*0302 と、ノルウェー人では DQA1*05011 および *0301 と強く相関すること、一方疾患抵抗性は、いずれの人種においても DQA1*01021、*0103、*0104 および *05013 と相関することが明らかになった。DRB1 と DQB1 遺伝子のタイピング結果と総合して解析することにより、IDDM への疾患感受性は DR 遺伝子座が疾患抵抗性は DQ 遺伝子座がそれぞれ規定していると考えられた。

HLA-A DNA タイピング法の臨床解析への応用

木村彰方・伊達是志・笹月健彦*

*九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

要旨：HLA-A DNAタイピング法を用いてHLA-Aと甲状腺自己免疫病との相関を解析した。その結果Graves病とA*0206および*2601との正の相関ならびに橋本病とA*0207との正の相関が明らかとなった。クラスII領域の遺伝子解析とあわせて検討した結果、Graves病への疾患感受性はA*0206+DPB1*0501あるいはA*2601単独により規定されるのに対し、橋本病はA*0207+DRB4*0101によって規定されるものと推定され、両者は病因論的に異なる疾患単位であると考えられた。一方、非血縁間骨髄移植ペアのHLA遺伝子群の解析から、HLA-Aサブタイプ間のミスマッチも移植予後（早期死亡、GVHD発症）と関連することが明らかとなった。

強直性脊椎炎（AS）患者の眼症状と HLA-DR1*0803

沼賀二郎^{*1)}、イスラム S.M.モノワルール^{*2)}、平田蘭子・前田平生^{*3)}、三井 弘^{*4)}

^{*1)}東京大学医学部附属病院分院眼科, ^{*2)}東京大学医学部眼科

^{*3)}埼玉医科大学総合医療センター輸血部, ^{*4)}三井記念病院整形外科

強直性脊椎炎(AS)に眼症状として急性前部ぶどう膜炎(AAU)を併発することは良く知られている。今回、AAUの併発の有無に免疫遺伝学的相違があるかを検討したので報告する。対象はAS患者42例で、内訳はAAU併発例20例、AAU非併発例22例である。HLA-B27陽性はAAU併発例で18例(90%)、非併発例で18例(82%)であった。HLA-DR8.1陽性例がAAU併発例で13例(65%)、非併発例で1例(5%)であり、AAUの併発の有無でHLA-DR8.1に統計的有意差がみられた($P<0.0005$, $RR=39$)。またHLA-DR8.1は全てDRB1*0803であり、これがASの眼症状の発症に関与するものと考えられた。

Key word: Ankylosing spondylitis, Acute anterior uveitis, HLA-DRB1*0803

HTLV-I 関連ぶどう膜炎における HLA クラスII解析

鍵谷雅彦・大野重昭^{*1)}, 上永吉達彦・大庭紀雄^{*2)}, 屋敷伸治・
園田俊郎^{*3)}, 石原麻美・水木信久^{*1)}, 成瀬妙子・猪子英俊^{*4)}

^{*1)}横浜市立大学医学部眼科, ^{*2)}鹿児島大学医学部眼科,
^{*3)}鹿児島大学医学部ウイルス, ^{*4)}東海大学医学部分子生命科学

要旨: HTLV-IはATL(adult T cell leukemia),HAM/TSP(HTLV-I associated myelopathy /tropical spastic paraparesis),HTLV-I関連ぶどう膜炎(HAU)をはじめとする種々の慢性炎症性疾患の原因ウイルスであることが知られている。この様な疾患発現の多様性を説明するものの一つとして宿主側の免疫応答の違いが考えられる。このため、今回我々はHAUの発症に関与する遺伝的背景を解析する目的で、平成4年度文部省科学研究費がん特別研究(大庭紀雄班長)「HTLV-I眼症に関する総合的研究」検討班の各班眼科を受診したぶどう膜炎患者のうちHAU患者37名についてPCR-RFLP法を用いHLA-DQA1,DQB1,DRB1およびDPB1遺伝子のDNAタイピングを行ったが、日本人一般集団との間に統計的有意差はなく、その結果としてHAUに特有なHLAクラスII抗原 alleleを認めなかった。

成人型多発性嚢胞腎家系における HLA-DRB1, PKD-1遺伝子の解析

李 丹・佐田正晴・辻 隆之^{*1)}, 高原史郎・奥山明彦^{*2)}, 堀江重郎^{*3)}, 村山敦浩^{*4)}

^{*1)}国立循環器病センター研究所, ^{*2)}大阪大学医学部泌尿器科
^{*3)}東京大学医学部泌尿器科, ^{*4)}シオノギ製薬株式会社診断医学部

本文 P77

要旨: 成人型嚢胞腎(以下PCK)家系を対象とし、DRB1 alleleおよび白人PCKの責任遺伝子と考えられているPKD-1遺伝子の解析を行い、疾患感受性遺伝子についての検索を行った。家系内haplotypeの解析において、PCK患者の90%にDRB1*0803, 1302, 1401, 1501いずれかのhaplotypeが認められ、更にその40%は両方のhaplotypeを有していた。PKD-1遺伝子は、日本人PCK患者でも連鎖が認められたが、連鎖率は白人PCKと比較し低率だった。日本人PCKではPKD-1遺伝子よりDRB1遺伝子との連鎖が濃厚で、特定のDRB1 alleleが腎機能の良否を左右する可能性も示唆された。

Key words: PCK, HLA-DRB1, PKD-1

白樺花粉症に関わる花粉抗原ペプチドと HLA-DR 分子

植原元晴・種市麻衣子・水本桂子・安部裕介・片桐 一^{*1)}、熊井恵美^{*2)}

^{*1)}旭川医科大学第二病理

^{*2)}旭川赤十字病院耳鼻咽喉科

要旨：我々は以前に日本の白樺花粉症はHLA-DR9と相関し、このDR分子が発症に関与する可能性を報告した。日本産白樺の花粉から抽出した抗原材料の17kDaフラグメントには強い抗原性が認められる。このフラグメント中の抗原活性を有する部位を明らかにすることを目的として、17kDaフラグメントのトリプシン消化物によるリンパ球増殖反応を検討したところ、ヨーロッパ産白樺の17kDa抗原フラグメント *Bet v I* アミノ酸配列の56-66番目に相当する部分が反応を示した。さらに、この部分に相当する各種ペプチドを用いて、DR分子との結合性、及びペプチドのどのアミノ酸がリンパ球増殖反応に重要であるかを解析した。

key words : birch pollen, antigenic peptide, core sequence

同一 DR で DRB1遺伝子が異なる MLC 反応

能勢義介・荒木延夫・稲葉洋行・浜中泰光・阪田宣彦^{*1)}、鍋谷 登^{*2)}、一色 玄^{*3)}、成瀬妙子・猪子英俊^{*4)}

^{*1)}兵庫県赤十字血液センター、^{*2)}ナベヤクリニック

^{*3)}大阪市立大学小児科、^{*4)}東海大学医学部分子生命科学

本文 P81

要約：MLC反応により検出されるHLA-D抗原はHLA-DNA解析によるDRB1遺伝子と最も高い相関を示すことから、主要なMLC抗原はDR抗原であると考えられている^{1) 2)}。そこで今回、DR抗原が同一でDRB1遺伝子が異なる細胞間のMLC反応を詳細に検討した。反応細胞をDw15 (DRB1*0405, 0410) と、刺激細胞をDR4関連D抗原としたMLC反応は、Dw15が75%DNV値23.2, Dw14 (DRB1*0404, 0408) が62.6, Dw4 (DRB1*0401) が68.6, Dw13 (DRB1*0403, 0407) が82.0, Dw10 (DRB1*0402, 0414) が91.4を示し、DR4関連D抗原のDRB1遺伝子第2エクソンの37～74番目が異なるアミノ酸数が多い程、高いMLC反応を示す傾向を示した。

Key words : MLC (mixed lymphocyte culture), DRB1*alleles, Amino acid

31.

細菌性スーパー抗原によって誘導されるT細胞アナジー ーサイトカイン遺伝子発現に対するアナジー・スペクトラムー

小出幸夫・内嶋雅人・吉田篤司・吉田孝人*

*浜松医科大学微生物学

本文 P 83

要旨：T細胞レセプターを介した各種サイトカインmRNAの発現には、カルシニューリン／Cキナーゼ系とこれとは別個のシグナルの少なくとも二種の伝達系が存在することが示唆された。後者のシグナルはSEBによるアナジーの影響を受けず、アナジー耐性サイトカイン群のmRNA発現に関与すると考えられる。

Key words: anergy, cytokine, super antigen

32.

自己免疫疾患とHLA II結合性ペプチド

西村泰治^{*1)}、高橋克史・元木政道・小森谷恵司^{*2)}、五十川修司・松下祥^{*1)}

^{*1)}熊本大学免疫識別学

^{*2)}帝人新薬創製研究所

要旨：HLA-DRB1*0405はインスリン自己免疫症候群(IAS)非感受性慢性関節リウマチ(RA)感受性であり、DRB1*0405とは4個のアミノ酸残基が異なるだけのDRB1*0406はIAS感受性RA非感受性を示す。これらのDR分子に結合するペプチドの構造モチーフを、1アミノ酸置換を有する多数のアナログペプチドの精製DR分子への結合を観察することにより同定し比較した。10数個のアミノ酸からなるDR結合性ペプチドでは、2個および1個のアミノ酸を介在して位置する3個のアミノ酸がDR分子への結合に重要な役割を担っていた。2つのDR分子に結合するペプチドの構造モチーフは、ほぼ同一であったが微妙に異なっていた。この情報をもとにインスリンα鎖分子中に、DRB1*0406に高親和性を、DRB1*0405に低親和性を示すペプチドを同定し、これがインスリン自己反応性T細胞が認識するエピトープとなっていることを明らかにした。II型コラーゲン分子上の自己反応性T細胞エピトープに関しては、現在検討中である。

P33.

新しいHLA-A9サブタイプ(A24AK)の配列決定

柏瀬貢一・徳永勝士・石川善英・林 玲・赤座達也・田所憲治・十字猛夫*

*日赤中央血液センター

要旨: HLA-A9は A23, A24, A2403が WHO公認抗原として認められている。我々は本文P35日本人において、血清学的方法でA23, A24, A2403とは反応パターンが異なる抗原を見出したので仮にA24AKと名付け、家系調査および塩基配列を解析した。LCT法により家系調査を行った結果、A24AKは矛盾なく親から子へ遺伝していることが確認された。また cDNAをクローニングして決定した塩基配列では、A*2402と比較して第2エクソンに 7塩基の変異がみられた。この変異によるアミノ酸置換は α 2ドメインの76, 79, 80, 81, 82, 83番の6残基であった。興味深いことに、これまで報告されたA9グループの抗原は全てこの部分にBw4特異性を決定するアミノ酸を有するのに対し、A24AKはBw4の配列を持たない。

非血縁の健常なドナーにおけるA24AKの抗原頻度は、0.015%であった。(当施設)

Key words : HLA-A24AK , LCT , Bw4

P34.

日本人におけるB75の血清学的検討について

大田 智・斉藤 敏・橋爪清隆・山田英世^{*1)}、中島文明^{*2)}

^{*1)}長野県赤十字血液センター

^{*2)}神奈川県赤十字血液センター

本文P37

日本人におけるB75の多形性については様々な報告があるにも関わらず未だはつきりとした結論が出ていない。今回B75のパネル及び抗B75血清を使用し血清学的に調べた結果少なくとも2つのB75が日本人に存在していることが判明し、それぞれの抗原によりB75-Cw9, B15N-Cw8-DR12の連鎖不平衡のあることが確認された。家族に於いても矛盾なくこれらの抗原は遺伝していた。B15NはB75モノスペシフィック及びB75+B46の様な抗血清との反応が陰性であった。

P35.

HLA 新抗原 B5103における 当血液センターの血清学的検索の足跡

林 律子・山崎雅子・青山憲一・小松孝良・鈴木六郎・高倉 清*

*浜松赤十字血液センター

本文 P39

要旨：第11回国際組織適合性ワークショップ会議 (11th IHWS:1991, 横浜) に新抗原として提唱し、WHOのNomenclature委員会で、正式にB5103と命名された抗原は、当血液センターにおける通常のHLA血清学的タイピングで見出した3名のDonorの発見が公認される糸口となった。

Key Words : BTA, B5103, New Antigen Study

P36.

HLA-Cw1のサブタイプ“Cw1N”を認識する アロ抗血清について

中島文明・中村淳子・岡野俊生・森 知恵子・横田敏和*

*神奈川県赤十字血液センター検査課

本文 P41

要旨：HLA-Cw1 抗原のサブタイプを認識すると思われるアロ抗血清を得た。この抗体に反応しないCw1を“Cw1N”と仮に呼ぶこととし、血清学的に解析を試みた。頻度は非常にまれで5/1859 (p.f=0.3%) でしかない。また、A24-Cw1N-B46-DR9-DQ3 となる特徴あるハプロタイプを有し、family study においても確認された。しかしながら、抗体との反応のみで述べていることであり、これが本当に“Cw1N”と呼んでいる新抗原であるのか、あるいは複雑な抗原構造の結果としてこのような反応を示すものかは現在のところ不明である。少なくとも、このHLA-C領域をcodeしている塩基配列が従来のCw1と同一であるか確認する必要があると考える。

key words : serological analysis, association, haplotype

P37.

1976年から93年までのHLA-B, DR 抗原の推移

小河原 悟・道永 功・内藤説也^{*1)}、八木美輝子・野田律也・平塚俊樹^{*2)}

^{*1)}福岡大学病院腎センター

^{*2)}福岡大学医学部第二内科

本文 P 47

要旨：1976年から1993年にかけて約7500件のHLA血清学的タイピングを行ない、B, DR抗原について年次毎の抗原プランクの割合と主要な抗原頻度を第11回国際組織適合ワークショップで示された抗原頻度と比較した。B抗原では1981年まで新抗原のタイピングが可能になり抗原のプランクの割合は減少したが、その後は一定であった。抗原頻度は年次を経て有意にB39が低く、B54が高く、九州地方に特有である可能性が示唆された。DR抗原では1990年まで一定の抗原のプランクの割合であったが、その後減少した。抗原頻度はDR12とDR14が有意に低く、抗血清に問題があると考えられ、今後DNAタイピングの必要性が示された。

key words: blank allele, HLA-B antigen, HLA-DR antigen

P38.

肝細胞における内因性胆汁酸の主要組織適合抗原(MHC)class I 遺伝子発現調節機構

平野史倫・田中廣壽・牧野雄一・三浦貴徳・野村嘉伸・牧野 勲*

*旭川医科大学第二内科

本文 P 45

要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)治療薬であるウルソデオキコール酸(UDCA)が肝細胞のMHC class I 抗原を減少させることが免疫組織学的に示されているが、胆汁酸による肝細胞MHC class I 抗原の発現調節機構はいまだ不明である。そこで、今回、(1) UDCA・内因性胆汁酸は肝細胞のMHC class I mRNA、抗原の発現を容量・時間依存性に増加させ、その強さは胆汁酸のhydrophobicityと一致していること、(2) 胆汁酸によるMHC class I mRNAの発現はPKC阻害剤により抑制されることを明らかにした。以上より、胆汁酸はMHC class I 発現を正に調節し、PBCの病態進展及び治療に関与している可能性を推測させた。また、胆汁酸によるMHC class I の誘導にPKCを介した細胞内情報伝達系の関与が強く示唆された。

key words : ursodeoxycholic acid, bile acid, major histocompatibility complex class I

P39.

HLA 検査における 血清学的タイピングと DNA タイピングの比較

村山敦浩・稲川 明・中谷さやか・辻 敏永・清水喜一^{*1)}、左田正晴・辻 隆之^{*2)}

^{*1)}シオノギバイオメディカルラボラトリーズ

^{*2)}国立循環器病センター研究所

本文 P 59

要旨：欧米では血清学的タイピングとDNAタイピングによる結果に約25%の不一致があると報告されている。日本においても若干の不一致が認められるという報告がある。今回著者らは当施設での血清学的タイピングとDNAタイピングによる結果の比較をおこなった。血清学的タイピング318例中10例（3.1%）は検査不可能であったが、DNAタイピングはすべて検査可能であった。それぞれの方法による結果に不一致はなかったが、血清学的タイピングでブランクとしたものの中には血清学的タイプは同じであっても異なる遺伝子型を持つものがあった。DNAタイピングは試料の反応性に左右されずに検査できる点、検査試薬が安定に供給できる点などから血清学的タイピングに比べて有用であると思われた。

key words: HLA typing, DNA typing, HLA-DR

P40.

Modified regular dot-blot hybridization for HLA-A SSOP

秦 美暢・小林 賢^{*1)}、阿藤みや子^{*2)}、玉井誠一・関口 進^{*1)}

^{*1)}防衛医科大学校検査部、^{*2)}同 輸血部

本文 P 49

Summary: PCR-SSOP (regular-dot) による DNA typing では1枚の filter に1種類の probe しか hybridize できず、少量の検体に対しても使用する probe の数だけ反応を繰り返さなければならない。今回我々は、dot blotter 上で PCR products と SSO probes を反応させる方法を考案した。well 毎に異なった組み合わせの反応を同時に行えるため、1回の検体処理数や使用する probes の種類と数が自由にデザインできる。感度も従来の regular dot と同程度であり、特殊な器材を必要としない自由度の高い方法であると思われた。今回、第11回日本組織適合性ワークショップ後に九州大学木村彰方先生より配布された HLA-A 遺伝子の SSOP 用の PCR primers と SSO probes を用いて本方法を試みたので報告する。

Key Words: DNA typing, SSOP, regular dot-blot

PCR-RFLP法によるHLA-DRB1のタイピング

光永滋樹・小口 隆・徳永勝士・赤座達也・田所憲治・十字猛夫

*日赤中央血液センター

要約：DRB1遺伝子の群特異的増幅のためのプライマーのTmをほぼそろえることにより，7種類のプライマーを4本のチューブに分け，同一のPCR条件下で増幅する事を可能にした．増幅後，電気泳動により検体に含まれている群を容易に判定することができた．内部コントロールという意味からなるべく複数の切断箇所をもつもの，またより少ない種類で各アリルが区別できるように，という方針でRFLP解析のための制限酵素を各群に対し考案した．DR1/10の群は2種，DR2/7/9の群は3種，DR3/5/6/8の群は7種，DR4の群は5種の制限酵素ではほぼすべてのアリルの同定が可能であった．100人の日本人のタイピングを行ったが，血清学的結果と矛盾したものはなかった．この方法により血清学的情報がない場合でも，比較的簡便にDRB1のタイピングが可能になった．

16プローブを用いたPCR-MPH法による簡便なDRB1 generic typing

宮本正樹・徳永勝士・赤座達也・田所憲治・十字猛夫^{*1)}，川井信太郎・前川尻真司・山根明男^{*2)}

*1)日赤中央血液センター

*2)涌永製薬株式会社バイオ研究所

本文P63

要旨：抗血清の確保が難しい血清学的なHLAクラスIIタイピングの代わりに，迅速かつ簡便で，多数検体を処理できるDNAタイピング法（PCR-Microtiter plate hybridization (PCR-MPH)法）の開発と検討を行ってきた．127プローブを用いたプレートでは，DR3，11，12，6，8の純接合であるか，DR6とのヘテロ接合であるかの区別と，DRB1*1403がDR8と判定される問題点があった．本研究では，47プローブを追加させた167プローブによる改善を行い，さらに自動化に向けたタイピングシステムの確立を目指した．改良プレートは，従来の操作性を保持したままで，日本人検体の約99.3%が確定可能となり，PCR-RFLP法やPCR-SSCP法による結果と一致した．自動化に際し，ELISAの機器がそのまま代用可能で，一人で一日に100検体程度の判定が実施できた．

Key words: PCR-MPH, HLA-DRB1 generic typing, Routine typing system

P43.

北里自家繁殖 mongrel 犬の主要組織適合抗原(DLA)DRB1遺伝子型の解析

伊東一郎・渡部浩二・大谷文雄・角田みさを・小幡文弥・
大久保みどり・金子剛久・柏木 登^{*1)}、鰐川浩司・武藤 健^{*2)}

^{*1)}北里大学医学部免疫学

^{*2)}北里大学医学部実験動物学

要旨：昨年の本学会で、我々は beagle 犬の DLA-DRB1 遺伝子の PCR-SSO 法による DNA typing について報告した。即ち、PCR-primer は、ヒト HLA-DRB typing 用 primer と同じ個所を既報の DLA-DRB1 の塩基配列に基づき合成し、SSO probe は既報の抗原型を識別できるように、11 種を作製して用いた。なお、本 probe は、国際 DLA-WORKSHOP 等で既に公認された基準 DNA との hybridization で確認してある。今回の検索対象は、9 家系を含む 70 頭の mongrel 犬であり、本 probe により DRB1 抗原型の typing が可能であった。今後、beagle 犬の family study も含めてさらに例数を増やし、DLA-DRB1 遺伝子型の typing の完成を期したい。

Key words : mongrel dogs DLA-DRB1 alleles, PCR-SSO

P44.

異種移植における MHC クラス II 遺伝子プローブを用いた Xeno DNA Typing と Xeno MLR の検討

佐藤忠之^{*1)}、竹部兼太郎・バトムンフムンフバト・志村龍男・萩原政夫^{*2)}、辻 公美^{*1,2)}

^{*1)}東海大学病院細胞移植医療センター移植免疫室

^{*2)}東海大学医学部移植免疫学

要旨：近年ヒト臓器移植の実験モデルとして盛んにブタが用いられているが、ブタどうし(Allo)またはヒトとブタ(Xeno)のMHCマッチングはほとんど考慮されていない。われわれはヒトHLAクラスII遺伝子とブタSLAクラスII遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションによるXeno DNA Typingおよびブタとヒトのリンパ球を用いたXeno MLRを行いMHCのマッチングを検討した。HLA-DRB1およびSLA-DRB1をプローブにしたブタのDNA Typingでは、品種ごとに特徴的なバンドパターンが検出された。そしてXeno MLRでは、ヒトのAllo MLRの値(約2～3万cpm)よりも全体に低い値(約3～8千cpm)であったが、ヒト個人ごとに反応の強弱が検出された。

P45.

HLA-DRB1とサルコイドーシス

安波礼子^{*1)}, 立花日軍夫^{*2)}, 吉原博子^{*1)}

^{*1)}大阪府立病院臨床検査科

^{*2)}大阪府立病院内科

本文 P79

要旨：サルコイドーシスは原因不明の疾患であるが，HLA-DRB1 2 関連抗原がサルコイドーシス患者に多く見られ，HLA遺伝子が疾患感受性遺伝子の1つと推定されうる．今回サルコイドーシス患者のDRB1-DNAタイピングを行い，疾患に関連するHLA抗原の分子レベルでの特定を試みた．正常コントロールに比して患者群では，DRB1-1201と0803が有意に上昇しており，DRB3ではなくDRB1遺伝子産物の方に関連抗原があると思われた．

key words: sarcoidosis, HLA-DRB1

P46.

百歳老人における疾患感受性アリの解析

高田 肇^{*1,2)}, 新藤裕実子^{*1)}, 園田 啓^{*3)}, 猪子英俊^{*1)} 秋坂真史・鈴木 信^{*4)}, 多田隈卓史^{*2)}

^{*1)}東海大学医学部分子生命科学, ^{*2)}慶応大学医学部微生物学

^{*3)}慶応大学医学部中央臨床検査部, ^{*4)}琉球大学医学部地域医療

要旨：ヒトの超長寿の達成には、好適な生活環境に加えて、優れた遺伝要因が必要ではないかと考えられている（エリート説）。この観点から、これまでに、沖縄地区在住の90歳以上の超長寿者102名（うち100歳以上82名）を対象としたHLA抗原頻度の血清学的解析を行い、90歳以上生存する確率は、DR1保有者は非保有者に比べて13.3倍高く、DR9保有者は非保有者よりも5.2倍低いことを報告してきた。これは、その後新たに解析した100歳以上の39名の結果によっても確認され、これらの結果から、HLAと相関する様々な疾患を本質的に回避することによって、超長寿が達成されていることが推察された。

そこで他のクラスII抗原についてもさらに追及するため、100歳以上を対象としてDR, DQ, DP抗原のDNAタイピングを実施した。これまでのところ、DPB1*0501を高頻度(18/23)に認めている。さらに彼らのもつアリルについて疾患感受性との関連を解析中である。また、超長寿者ではLAK活性が有意に高いことから、アロNK活性と相関するHLA-Cアリルとの関連についても解析を進行中であり、併せて報告したい。

P47.

夫婦間における HLA-B 抗原の組み合わせ についての検討

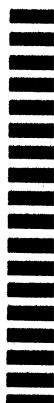
小林 賢・秦 美暢・関口 進^{*1)}, 成瀬妙子・猪子英俊^{*2)}

^{*1)}防衛医科大学検査部

^{*2)}東海大学医学部生命科学

要旨: 夫婦間のHLA抗原が同一でない方が外来抗原に対する適応力がある子供を産むのに適していると考えられる。そこで今回我々は、夫婦のHLA-B抗原を解析し、どのような組み合わせになっているのかを検討した。出産経験のある夫婦477組を対象に実施した。夫婦間で同一抗原をもつ組み合わせでは、B46が3倍、B61が1.7倍程度期待値に比して高かった。それ以外は期待値と実測値がほぼ一致していた。またヘテロの組み合わせも期待値と実測値とがほぼ一致していたが、期待値または実測値が10組以上を対象とした場合、B52-B7 (1.7倍), B52-B62 (1.6倍), B62-B44 (2.2倍) の組み合わせでは期待値に比して低かった。またB35-B62 (1.6倍), B55-B61 (1.9倍) では高い傾向が認められた。10組以下では、B55-B35 (2.4倍), B60-B46 (1.8倍), B67-B62 (2.9倍) が高く、B7-B35 (1.9倍), B60-B35 (1.6倍) が低い傾向を両施設で示された。これらは両施設共に認められた。一部を除き、今の集団が維持されており、改めて異なったタイプを求めて婚姻する必要がないのかもしれない。例外的な組み合わせについては今後詳細な検討を行ない、発表したい。

key words: Mate, HLA-B antigens



P48.

胃、肺癌患者における TNF- β 遺伝子多型性の検討

土田文子^{*1)}, 志村龍男・萩原政夫・竹部兼太郎・
バトムフムンフバト^{*2)}, 加藤治文^{*3)}, 生越喬二^{*4)}, 辻 公美^{*1,2)}

^{*1)}東海大学病院細胞移植医療センター移植免疫室, ^{*2)}東海大学医学部移植免疫学

^{*3)}東京医科大学医学部第一外科, ^{*4)}東海大学医学部第二外科

要旨: 癌患者におけるステージ分類には、宿主因子を反映しているものは少ない。今回、宿主因子の一つとしてTNF- β 遺伝子多型性とHLAタイピングを行った。胃癌患者143人と肺癌患者135人、および正常者165人を対象とした。胃、肺癌患者とHLAとの間には有意差は見られなかった。肺癌患者では、TNF- β 10.5/10.5-kb alleleが38.5%と正常の53.3%に対して有意に低下していた($P<0.05$)。予後との関係では、10.5/10.5-kb alleleが肺癌患者のステージIII+IVで5生率において有意に($P<0.05$)予後良好であり、胃癌においても3生率で87.1%と有意に($P<0.05$)予後良好であった。TNF- β 10.5/10.5-kb alleleは、予後因子の一つとして有用であると思われる。

key words: TNF- β , gastric cancer, lung cancer, prognosis

抗原ペプチドのアナログによる T細胞性免疫応答の修飾

西村泰治・Yu-zhen Chen・五十川修司・松下 祥*

*熊本大学免疫識別学

要旨：本研究は抗原ペプチド上の単一のアミノ酸を置換することにより生ずるT細胞性免疫応答の変化を解析し、これを免疫異常に起因する疾病の治療法の開発に応用することを目的とする。このために溶連菌M蛋白あるいはスギ花粉主要アレルゲン（Cry jI）に特異的なヒトCD4⁺T細胞クローンを樹立し、それぞれの抗原に由来するT細胞エピトープを含むペプチドおよびそのアナログを合成した。さらに HLA-DR分子とペプチドの結合および DR分子により提示されたペプチドを認識したT細胞クローンの増殖応答あるいはサイトカインの分泌パターンを解析した。この結果、以下のことが明らかとなった。1) ペプチド上のDR結合性アミノ酸残基の周囲に、T細胞レセプター(TCR)により認識されるアミノ酸が4個存在する。2) TCRサイトのアナログペプチドの多くがTCRアンタゴニストとしてT細胞の抗原認識を抑制した。3) アナログペプチドの一部には特定のサイトカインの応答のみを変化させるものが存在した。

日本組織適合性学会会報

JSHI ニュースレター

VOL.1 NO.1 1994

刊行に当たって

日本組織適合性学会会長 相 沢 幹

この度、日本組織適合性学会の編集担当吉田孝人理事と編集委員会各位のご協議の結果、本学会の公的刊行物として、プロシーディングスとニュースレターを創刊することとなりました。

顧みますと、本学会の前身である日本組織適合性研究会は、その創設(1973年)以来、“HLA学の勉強会、新情報の交換、新方法の紹介など”を主たる目的として運営されるという性格に則して、常識的な学術団体の歩みと異なっており研究会としては公的な刊行物を持って参りませんでした。もちろん、この間、各研究者の業績は、それぞれ関連の学術誌に公表され、また研究会が後援したワークショップなどの記録は、それぞれの世話人、または組織委員会の責任において公開されてきました。

その研究会が発展的に脱皮して成立した日本組織適合性学会は、その第1回大会(1992年)以来、“科学者集団である本学会は、その良心と責任において、公的刊行物を持つべき”ことが理事会で議論されて、今日に到った次第であります。

学際領域に位置するささやかな本学会がただちに定期刊行の機関誌を持つことは非現実的でありましたが、年々開催される学術大会の公式記録の刊行は、是非、早急に実現せねばなりません。プロシーディングスの創刊はそれに応えるものであります。

また、動きの早い情報化社会では、時宜を得たニュースの入手は欠くべからざるものとなりました。ニュースレターの創刊はそれに応えるものでありましょう。

基本的にはその性格を異にするプロシーディングスとニュースレターが、それぞれたんなる“学会抄録集”と“お便り、お知らせ集”となるかどうかは編集委員会のご苦労とご貢献にかかっていますが、会員一同のご要望やご協力もまた必要であろうと信じます。いろいろな制約がありますが、会員から喜ばれ、愛される刊行物となることを切に祈っております。

JSHI ニュースレター

第3回日本組織適合性学会開催に当たって

大会長 吉 田 孝 人

研究会、ワークショップを経て20年余の歴史を持って発足した当学会が浜松で第3回を迎えることになりました。お世話する私たちは光栄であると同時に身のひきしまる思いであります。

生命現象の中で一つの要として重要な遺伝子群 MHC、そしてその産物の重要性は日増に増大し、医学・医療と直結して参りました。今回の学会の日程を折り込みのごとく企画・編成してみました。国内の会員および非会員の皆さまとともに国際的なネットワークをより強固にしていきたいと願う者でございます。

初日の7月20日(水)は、医療、免疫遺伝学、遺伝子治療の立場から大変に大切な“HLAのDNAタイピングと骨髄移植”を主題としました。

USAからは骨髄移植のメッカ、シアトルからProf.J.Hansenをご招待して“USAでの骨髄移植とHLAタイピング”の特別講演をしていただきます。さらに、パリからは第12回国際組織適合性ワークショップ・カンファレンス(12th IHWC)を主催されるProf.D.Charronに12th IHWC(1996)の進行状況と骨髄移植へのアプローチについてお話していただきます。また、日本の研究の現状として第11回日本HLAワークショップ(1993~94)の報告とシンポジウムI“日本におけるHLAのDNAタイピングと骨髄移植”を開催します。日本人のHLA遺伝子構成をささえる民族も広く捉えて骨髄移植の環を広げる方向性と21世紀医療としての遺伝子治療をとども考えたいと思います。

第2日目は各会員からの多数の演題を口演またはポスター(示説)でご発表いただき交流を図りたいと思います。

第3日目は、ご招待したProf.D.Charronの特別講演“HLA class II Molecules in Cell Activation and cell Death”とシンポジウムII“HLA抗原の発現調節機構”を通してHLAの生体中での意義について深く考え、位置づけたいと思います。

この大会を盛大な学術集會に盛り立てるために、多数の皆さまにご参加いただいて、ご発表、ご討議いただきたく、日本の中心の地：遠州浜松でお持ち申し上げております。

なお、この度、“Proceedings of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1994”(日本組織適合性学会記録1994、仮称)を発刊することになりました。速報(short paper)・原著として認められます。他の学術雑誌にてプライオリティを取りたい方は演題名、氏名、要約のみで結構です。振るってご投稿・ご発表を期待致しております。

第 12 回国際組織適合性ワークショップ担当者一覧

TWELFTH INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP

(開催：パリ 1996 年 6 月 3 日～12 日)

CENTRAL COMPONENTS

Allele and Haplotype Societies (AHS)
Committee
R. Fauchet
I. Schreuder
P. Richardi
S. Marsh

Chairman
Secretary

Anthropology
Committee

J. Bodmer
A. Cambon-Thomsen
J. Hors
A. Piazza
A. Sanchez-Mazas

Chairman

SPECIFIC COMPONENTS

HLA class I DNA Typing
Committee

Chairman

J. Bodmer
M. Browning
H. Erlich
J.M. Tiercy
P. Parham

Sequencing Based Typing
Committee

M. Titani
J.F. Eliasou
L.A. Baxter Lowe
D. Charron

Chairman
Co-Chairman

MHC Recombinant Families
Committee

Chairpersons

R. Dawkins
B. Carpenter
M. Thomsen

HLA class II Promotor Polymorphisms

E. Albert

Chairman

Antibody Specificity Analysis of Highly Sensitized Transplant Patients
Committee

Chairman

R. Duquesnoy
P. Claes
L. Lamm
C. Raffoux
G. Rodey
J. Thompson

HLA and Cancer
Committee

F. Garrido
R. Fauchet
W. Bodmer
S. Ferrone

Chairman
Secretary

HLA and IDDM
Committee

Chairpersons

S. Caillaud/J. F. Bach
C. Boitard
G.P. Bottazzo
N. McLaren
B. Roep
E. Thoraby
J. Timmit

HLA and TCR

J. Silver

Chairman

HLA and Allergy
Committee

Chairman
Co-Chairman

M. Blumenthal
D. Marsh
G. Peltre
A. Ruffilli

HLA and Unrelated Donors Bone Marrow Transplantation (UD-BMT)
Committee

D. Charron
B. Bradley
E. Gluckman
J. Hansen
M. Jeannet

Chairman

HLA and HIV
Committee

Chairman

R. Winchester
F. Arnett
D. Charron
L. Louis
D. Mann
A. Svejgaard

SPECIFIC COMPONENTS IN PREPARATION

HLA and Graves/Hashimoto Diseases (N.R. Farid and G. Semana
Soluble Ag. : P. Poulety and H. Grosse-Wilde
HLA supratypes and CYP21B mutation : M. Cuccia
E. Albert Consultant

HLA Rheumatic Fever : J. Kall
HLA and Narcolepsy : G.M. Eckardt and K.M. Ewert

JSHI ニュースレター

JSHI ANNOUNCEMENT

現在の入会状況 日本組織適合性研究会から日本組織適合性学会に衣替えしてから2年が経過しました。研究会の時には、研究会費を1度でもお支払いいただいた方は、研究会会員として案内をお送りしてきましたが、学会への移行に伴い、新たに入会し直そう2度に渡りお願いして参りました。それでもご連絡のない方は、入会の意志がないものとして、今後学会からの連絡を終了させていただきます。

現在の会員数 1994 年 3 月の会員数は 324 名です。すべてデータベースで管理しており、入会年、所属、地区などで分類してみました。

入会時期	研究会からの継続	200 名	所 属	1992 年入会	76 名	地区別
	1993 年入会	48 名		大学関係者	137 名	
	血液センター	92 名		病院 (大学以外)	57 名	
	その他	38 名				
	北海道	13 名		東北	8 名	
	東京	61 名		関東	68 名	
	中部	31 名		関西	57 名	
	中国四国	42 名		九州	42 名	
	国外	2 名				
						総計 324 名

事務局よりお願い ① 住所、所属等が変更になった場合は速やかにご連絡下さい。② 93 年度分会費を未納の方は早くお振込み下さい。

昨秋3年ぶりに ASHI(American Society for Histocompatibility and Immunogenetics)の大会に参加しました。その規模の大きさに加えて、基礎から臨床まで、また研究者にも技師にも参加者全員に役立つ盛りだくさんのプログラムには圧倒されました。日本組織適合性学会でもさらに多くの仲間を募り、知恵を出しあってユニークな学会に育てられればと思います。なお、この第1号のニュースレターの編集は、もっぱら吉田先生のご尽力の賜であることを申し上げます。(徳永)

JSHI ニュースレター

発行 日本組織適合性学会事務局 〒150 東京都渋谷区広尾 4-1-31 日本赤十字社中央血液センター内
編集委員 吉田孝人 (浜医大)、片桐一 (旭医大)、十字猛夫 (日赤中央血中)、相木登 (北里大医)
辻公美 (東海大医)、笠月健彦 (九大・生体研)
編集幹事 徳永勝士 (日赤中央血中)
1994 年 3 月発行 Printed in Japan

日本組織適合性学会会則

第1章 総則

(名称)

第1条 本会は、日本組織適合性学会(Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 略称 JSHI) と称する。

(事務局)

第2条 本会の事務局は、日本赤十字中央血液センターにおく。

(目的)

第3条 本会は、組織適合性とそれに関する学問の進歩発展に資するため、国内のみならず国外の関連機関とも連絡を密にして研究の促進を図り、その成果の応用を通じて広く人類の健康と福祉に貢献することを目的とする。

(事業)

第4条 本会は、前条の目的を達成するため次の事業を行う。

1. 学術集会(学術集会、講演会、ワークショップなど)の開催
2. 研究資料の刊行
3. 内外関連研究機関および研究組織との連絡
4. HLA タイピングの精度向上に関する事業
5. その他本会の目的を達成するに必要な事業

第2章 会員

(会員の資格)

第5条 本会の会員は次のとおりとする。

1. 正会員：本会の目的に賛同した者で、第6条に定める入会手続きを経て入会し、年度会費を納入した者
2. 特別会員：本会对し特別の功労があり、理事会、評議員会の議を経て会長が推薦し、総会において承認された者
3. 賛助会員：本会の目的に賛同し、本会の事業を援助するために第6条に定める入会手続きを経て入会し、年度会費を納入した団体または個人

(入会)

第6条 本会に入会を希望するものは、所定の入会申し込み書に年会費を添えて申し込むものとする。

(年会費)

第7条 年会費は別途これを定める。既納の会費は返却しない。

(会員の権利)

第8条 会員は本会の事業に関する連絡を受け、学術集会や本会の行う事業に参加することができる。

(退会)

第9条 本人より退会の申し出のあった会員、および年会費を3年以上未納の会員は退会とみなし、学術集会を含む本会の事業の連絡を停止する。

(除名)

第10条 本会の目的に反する行為のあった会員は、理事会および評議員会の議決により、総会の承認を経て除名することができる。

第3章 役員

(役員)

第11条 本会に次の役員をおく。

会長	1名
理事	若干名
監事	2名
評議員	若干名

(選任)

第12条 役員は次の規定によって選任する。

1. 評議員は正会員の中から、附則に定める資格を満たすものと理事会および評議員会の議を経て会長が委嘱し、総会の承認を得るものとする。
2. 理事および監事は、評議員会において、評議員の中から互選により選出する。理事と監事を兼務することはできない。
3. 会長は理事会において、理事の中から互選により選出する。

(職務)

第13条 本会の役員の職務は次のとおりとする。

1. 会長は、本会を代表し、本会の業務を総轄する。
2. 理事は理事会を構成し、この会則に定められた事項を議決する。各理事は、庶務、会計、編集、渉外などの業務を分業する。
3. 監事は本会の業務および経理を監査する。
4. 評議員は評議員会を構成し、この会則に定めら

れた事項を議決する。

(任期)

第14条 会長、理事、監事の任期は2年とする。但し、いづれの役員も再選は妨げない。

(職員)

第15条 本会の事務を円滑に処理するため、事務局に事務局長をおく。事務局長は、理事会において理事の中から互選により選出し、その任期は2年とする。事務局は、必要に応じ事務局職員をおくことができる。職員の任免は会長が行う。

第4章 会議

(学術集会)

第16条 学術集会は、原則として年1回行い、大会長がこれを主宰する。大会長は、理事会および評議員会の議を経て会長が委嘱する。

(総会)

第17条 総会は、年1回学術集会に際して開催し、大会長を議長として以下に述べる事項、ならびに理事会および評議員会において議決された事項を会員に報告し、承認を受けるものとする。

1. 事業報告ならびに事業計画
2. 会計報告ならびに予算
3. その他

(評議員会)

第18条 評議員会は、年1回の学術集会に際して定期的に開催する外、会長が必要と認めた際は、臨時に評議員会を召集して会務の円滑な運営に当たる。評議員会の議長は、定期の評議員会では該当学術集会の大会長が行い、臨時の評議員会では評議員の互選により選出する。

(評議員会の議決)

第19条 評議員会は、別に定める会則改正の場合を除き、評議員の半数以上の出席のもとに、出席者の過半数の賛成がなければ議決することが出来ない。やむおえない事由で評議員が出席できない場合は、議長あるいは他の評議員に委任状を提出し審議を委任することができる。委任状提出者は議決に関し出席者として取り扱われ、その議決権は委任された者が代わりに執行する。

(評議員会議事録)

第20条 評議員会の議事については次の事項を記載した議事録を作成しなければならない。議事録は議

長の責任において作成し、次回の評議会で内容の確認を得るものとする。

1. 会議の日時および場所
2. 出席者の氏名
3. 議決事項
4. 議事の経過

(理事会)

第21条 理事会は会長が主宰する。理事会は、定期理事会および臨時理事会とする。定期理事会は毎年2回会長がこれを召集する。会長は、会長が必要と認めたとき、または3分の1以上の理事から開催が請求されたときは速やかに臨時理事会を召集しなければならない。

(理事会の議決)

第22条 理事会は3分の2以上の理事が出席し、出席した理事の過半数の賛成がなければ議決することができない。監事は理事会に出席して意見を述べるができるが議決には加わらない。

(委員会)

第23条 本会の業務を遂行するのに必要な委員会を設置することができる。委員会の設置および委員の選任は、理事会および評議員会の議を経て会長が行う。

第5章 分科および地方会

(分科会)

第24条 本会に分科会をおくことができる。分科会の設置並びに廃止は、理事会および評議員会の議決を経て会長が決定する。

(地方会)

第25条 本会の下部組織として地方会をおくことができる。地方会の設置並びに廃止は、理事会および評議員会の議決を経て会長が決定する。

第6章 会報

(会報)

第26条 本会是会報を発行する。この内1回は各年の学術集会の予稿集を兼ねる。

(編集)

第27条 会報の編集は、評議員の中から互選によって選出された編集委員が別に定める会報規定に基づいて行う。但し学術集会の予稿集を兼ねる場合には、各大会長に委嘱することかできる。

第7章 会計

(経費)

第28条 本会の経費は、会費、補助金、寄付金、その他で支弁する。

(会費)

第29条 本会の年会費は、次に定める通りとする。

1. 正会員：年額 5,000円
2. 特別会員：免除
3. 賛助会員：年額 100,000円

(会計年度)

第30条 本会の会計年度は4月1日より、翌年3月31日とする。

(会計監査)

第31条 収支決算は監事の監査を受けた後、理事会、評議員会ならびに総会の承認を受けるものとする。

第8章 会則の変更および細則

(会則の変更)

第32条 この会則は、理事会、および評議員会の3分の2以上が出席した評議員会の議決を経て、総会の承認を得なければ変更することができない。

(会則の実施)

第33条 この会則の実施に際し疑義を生じた場合、または会則以外に必要な事項が生じた場合は、理事会および評議員会がこれを処理する。

(細則)

第34条 この会則施行についての細則は、理事会、評議員会の議決および総会の承認を経て別に定める。

(付則) この会則は、平成3年4月8日から施行する。

日本組織適合性学会評議員（会長，理事，監事，幹事）一覧

氏 名	役 員	備 考	所 属 施 設
相沢 幹	会 長		北海道組織病理学センター第一病理
赤座 達也	評議員	事務局・会計幹事	日赤中央血液センター研究三課
秋山 暢夫	監 事		沼津市立病院
雨宮 浩	評議員		国立小児病院小児医療研究センター
池田 久実	評議員		旭川医科大学臨床検査医学
井上 博雄	評議員		愛媛県衛生研究所
猪子 英俊	評議員		東海大学医学部分子生命科学
大谷 文雄	評議員		北里大学医学部免疫学
折田 薫三	評議員		岡山大学医学部第一外科
柏木 登	理 事	庶務・保険担当	北里大学医学部免疫学
片桐 一	理 事	選挙担当	旭川医科大学第二病理
狩野 恭一	評議員		オリンパス光学工業バイオメディカルリサーチセンター
小出 幸夫	評議員	大会幹事	浜松医科大学微生物学
小島 健一	評議員		新潟大学医療技術短期大学部
阪上 賢一	評議員		庄原赤十字病院
笹月 健彦	理 事	渉外担当	九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門
佐治 博夫	評議員		京都府赤十字血液センター
十字 猛夫	理 事	事務局長・経理担当	日赤中央血液センター
白倉 良太	評議員		大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター臓器制御部門 臓器移植学
関口 進	理 事	会則担当	防衛医科大学病院検査部
園田 俊郎	評議員		鹿児島大学医学部ウィルス学
高田 肇	評議員		東海大学医学部分子生命科学 VI
辻 公美	理 事	標準化担当	東海大学医学部移植免疫学
徳永 和夫	評議員		福岡県赤十字血液センター検査課
内藤 説也	理 事	教育担当	福岡大学医学部付属病院腎センター
野本 亀久雄	監 事		九州大学生体防御医学研究所免疫学部門
福田 康彦	評議員		広島大学医学部第二外科
福西 孝信	評議員		兵庫県立西宮病院腎移植センター
前田 平生	評議員		埼玉医科大学総合医療センター輸血部
吉田 孝人	理 事	編集担当	浜松医科大学微生物学
脇坂 明美	評議員		北海道大学医学部第一病理学
徳永 勝士		編集幹事	日赤中央血液センター研究課

編集後記

21世紀は専門があって専門がない時代。分野があって分野がない時代。水から氷へ、水から蒸気へ、この相転移現象がDNAの世界でも起きつつあります。しかし、MHC&IRSは生命がある限りなんらかの必要な形で残るでしょうし、重要な物として機能を持ち続けるでしょう。この視点に立って生命現象を深く、広く研究し、小さいことでもこの学会誌に集録し、オリジナリティを確保して、国内のネットワーク、国際的ネットワークを強くしていきましょう。

さて、本誌 MHC & IRS は大いに継続・発展させていきたいものです。編集委員一同頑張りますので、みなさまがたのご支援をお願い致します。

なお、本誌創刊の経過・目的等につきましては、p41 “第3回日本組織適合性学会大会にあたって—MHC & IRS の創刊を祝う—” に記しましたのでご一読下されば幸甚です。

表紙の図は TMA-HPA 法により HLA-DPB Allele を DNA タイピングした結果を ARGUS-50 で読み取り、パターン化したものです（浜松医大にて）。

（編集理事 吉田孝人）

MHC & IRS

Major Histocompatibility Gene Complex and Immune Response System
Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

1994年7月7日発行 1巻1号, 1994

定価2,000円（本体1,942円） 送料310円

発行 日本組織適合性学会（会長 相沢 幹）

編集 日本組織適合性学会編集委員会（編集担当理事 吉田孝人）

日本組織適合性学会事務局（事務会計担当理事 十字猛夫）

〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 日赤血液センター内

製作・発売 日本医学館

〒112 東京都文京区大塚3-3-6-505 〒03-3942-7631 FAX03-3942-2086