

Vol.2 No.1
1995

MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第2巻第1号 平成7年7月1日発行

Contents

HLA-Cw8のサブタイプ“Cw8N”の塩基配列およびHLA-B座との関連分析中島 文明, 石川 善英, 中村 淳子, 岡野 俊生, 森 知恵子, 横田 敏和, 林 玲, 徳永 勝士, 十字 猛夫	1
HLA-B60, B61, B48グループを識別するPCR-SSP法 小川 篤子, 林 玲, 柏瀬 貢一, 渡辺 嘉久, 徳永 勝士, 赤座 達也, 田所 憲治, 十字 猛夫	6
日本人におけるHLA-DMB遺伝子の多型性の塩基配列の決定並びにPCR-PFLP法による解析河田 寿子, 成瀬 妙子, 能勢 義介, 安藤 麻子, 猪子 英俊	10
免疫性血小板減少症 (ITP) とHLAの相関について松崎 龍典, 野村 昌作, 石田 萌子, 香川 英生, 福原 資郎	16
第4回 日本組織適合性学会大会 抄録	19
<日本組織適合性学会誌 MHCの投稿規定>	50

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI

Contents

HLA-Cw8のサブタイプ“Cw8N”の塩基配列およびHLA-B座との関連分析中島 文明, 石川 善英, 中村 淳子, 岡野 俊生, 森 知恵子, 横田 敏和, 林 玲, 徳永 勝士, 十字 猛夫	1
HLA-B60, B61, B48グループを識別するPCR-SSP法 小川 篤子, 林 玲, 柏瀬 貢一, 渡辺 嘉久, 徳永 勝士, 赤座 達也, 田所 憲治, 十字 猛夫	6
日本人におけるHLA-DMB遺伝子の多型性の塩基配列の決定並びにPCR-PFLP法による解析河田 寿子, 成瀬 妙子, 能勢 義介, 安藤 麻子, 猪子 英俊	10
免疫性血小板減少症(ITP)とHLAの相関について松崎 龍典, 野村 昌作, 石田 萌子, 香川 英生, 福原 資郎	16
第4回 日本組織適合性学会大会 抄録	19
〈日本組織適合性学会誌 MHCの投稿規定〉	50

〔原著論文〕 HLA-Cw8 のサブタイプ“Cw8N”の塩基配列 および HLA-B 座との関連分析

中島 文明¹⁾, 石川 善英²⁾, 中村 淳子¹⁾, 岡野 俊生¹⁾, 森 知恵子¹⁾, 横田 敏和¹⁾, 林 玲²⁾³⁾, 徳永 勝士²⁾, 十字 猛夫²⁾

1) 神奈川県赤十字血液センター, 検査課, 2) 日本赤十字中央血液センター, 研究一課, 3) 東京大学医学部病院, 輸血部

(平成7年5月13日受付)

要約

我々は HLA-C 抗原がブランクとなるパネルと血清学的に未知の特異性を示す日本人由来のアロ抗血清を数本見いだした。これらの反応が第11回国際組織適合性ワークショップ特異性 Cw8 で提出された血清 BRA207 のテール反応と同一の特異性を示し、また、吸収試験から Cw8 の交差反応であることを確認したことにより、Cw8 のサブタイプの可能性があるととして“Cw8N”と仮に命名した。そして、血清学的に検出できる Cw8N パネルについて、その HLA-C 遺伝子の塩基配列を決定したところ、Cw*0801 と同一であることが判明した。さらに、Cw*0801 と関連する B 抗原対立遺伝子について検討したところ、B61 対立遺伝子のひとつ B*4006 と強い関連を示し、対照的に B*4002 は Cw10 との関連を示した。その他、B*1502 でも Cw*0801 との関連が観察された。

キーワード:

Cw8N, Cw8, Cw*0801, SSCP, 相関

はじめに

従来、Cw8 は日本人には存在せず、主に白人で HLA-B14 と連鎖不平衡を有する HLA-C 抗原として認識されていた。欧米で見つかるアロ抗血清は Cw5 と Cw8 の特異性を有するものがほとんどで、これらは後述の Cw8N とは反応しない。血清 Myon がその 1 例である。一方、血清 20-P248 を発端として日本で見つかった数本のアロ抗血清は C 座にブランクを有するパネルとのみ反応し未知抗原を認識しているものと考えられていた(表 1)。

第11回国際組織適合性ワークショップに提出された血清 BRA207 は Cw8+Cnew と解析され、この Cnew と前述の未知抗原の B ローカスとの関連が同一であることが確認された。我々は吸収試験から Cnew の部分が Cw8 の交差反応であることを確認し Cw8 のサブタイプとして“Cw8N”と仮に命名し、第 2 回日本組織適合性学会において報告した。日本人集団で約13%の表現型頻度で存在する。

今回はこの抗原をコードしている HLA-C 遺伝子の塩基配列を決定して、これまでに報告されている Cw8 アリルとの異同について検討した。同時にこれと連鎖する HLA-B 抗原アリルについて考察を加えた。

材料と方法

日本人から血清学的に検出された Cw8N 抗原を有する 2 パネル (AI および TH) を材料とした(表 2)。末梢血 10ml から mRNA を抽出し、cDNA を合成したのち C 遺伝子特異的プライマー Z00F-5U01 (5'-GGA CTC AGA TTC TCC CCA GAC GCC GAG-3'), CR-3U01 (5'-AGG CTC TTG AAG TCA CAA AGG A-3') にて翻訳域の全領域を増幅後、TA クローニングシステム (Invitrogen) によりプラスミド・ベクターに導入し、C 遺伝子配列を含むクローンを得た。これを SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法

表1 Cw8 関連抗血清の反応パターン
(+ : positive, w : weak, - : negative)

serum ID	Cw8N	Cw8	Cw5	other
20-P248	+	-	-	
20-5254	+	-	-	
20-P1367	+	-	-	DR9
18-K1116	+	-	-	
G-7758	+	-	-	
20-7964	+	+	-	
11W-BRA207	+	+	-	B70
CC744	w	+	-	
G-8246	+	+	+	
Myon	-	+	+	

にて2つのグループに分け、一部のクローンについて第2エクソン171番目に設定したセンス側プライマーで予備的に塩基配列を決定し、Cw1とCw8の配列を有するグループを得た。Cw8のグループからAI, THそれぞれ4クローンを選択し、ジデオキシサイクルシーケンス法と自動シーケンサー (Applied Biosystems: 373A) を用いて塩基配列を決定した。

Cw8N 抗原と関連するB抗原対立遺伝子データは1994年度中央血液センター HLA ワークショップで解析された246パネルを対象にした。

結果

結果として得られた塩基配列はCw*0801と同一であった(図1)。これまでに報告されているCw8グループのアリル間の違いはいずれも第3エキソンでの塩基置換であるが、Cw8NはここでもCw*0801と全く同一であった。

Bローカス遺伝子データとの比較ではDNAタイピングされている246パネル中53パネルがCw8Nを有していた。Cw8NはB抗原と特徴ある関連を持つことが血清学タイピングで判明している。すなわち、B61, B75, B77, B71, B35, B48などである(1)。これらをB抗原のDNAタイピングデータと比較してみるとさらに興味深い結果が得られた。以下、()内にパネル数を示した。

まず、B61に関してはB*4006(24例)がCw*0801(18例)と関連するのに対し、B*4002(33例)はCw10

表2 AIおよびTHパネルのHLAタイプ

AI		TH	
A24	-	A210	A11.1
B35	B46	B61	B54
<i>Cw8N</i>	<i>Cw1</i>	<i>Cw8N</i>	<i>Cw1</i>
DRB1*0405/1201		DRB1*0405/-	
DRB4*0101/3*0101		DRB4*0101/-	
DQA1*0301/-		DQA1*0301/-	
DQB1*0401/0303		DQB1*0401/-	
DPB1*0501/-		DPB1*0501/0201	

抗原(25例)と関連した(表3)。また、B15グループアリルではB*1502(12/12例), B*1513(5/6例), B*1518(6/18例)の一部がCw*0801と関連していた。B35, B48については遺伝子データがなくアリルごとの比較はできなかった。

考察

Cw*0801は、P. Parhamらの報告でCw11抗原のミスシーケンスとされたアリルである。つまり、この塩基配列を決定した細胞がヘテロで持っていた片方のアリルをCw11のアリルと取り違えていたことが判明し訂正したものである。したがって、第11回国際HLAワークショップ後、Cw11抗原はHLAシステムから抹消されている(2, 3)。

表1に示したとおり、Cw8Nは血清学的解析では、それまでのCw8とは明らかに反応パターンが異なり、過去にはこれを検出する抗血清も見つかっていなかったため、そのC抗原はブランクとされていた。これらの血清群には特異性別に次の4パターンがある。i) 20-P248, 20-5254, 20-P1367, 18-K1116, G-7758がCw8N単一特異性, ii) 20-7964, 11W-BRA207, CC744がCw8NとCw8, iii) G-8246がCw8N, Cw8とCw5, iv) MyonがCw8とCw5の特異性である。そして、i)が日本で、iv)が欧米で、ii)とiii)は両方からみつまっている。緒言でも述べたとおり、当初はiv)の血清でCw8抗原が決定されていたため、i)の血清群はCw8とは全く関係のないものと考えられていたが、BRA207をはじめと

EXON 1
 C*0801 ATGCGGGTCATGGCGCCCGAACCCCTCATCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCCT .73
 Cw8N -----

EXON 2
 C*0801 GCTCCCACTCCATGAGGTAATTTCTACACCGCCGTGCCGGCCCGCCCGGGAGAGCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCTG 100.
 Cw8N -----
 C*0801 GCAGTTCGACAGCGACGCCCGGAGTCCAAGAGGGGAGCCCGGGCCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGCCGGAGTATTGGGACCGGGAGACACAGAAGTAC 200.
 Cw8N -----
 C*0801 AAGCGCCAGGCACAGACTGACCGAGTGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAAGAGCGAGGCCG .270
 Cw8N -----

EXON 3
 C*0801 GGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGTATAACCAGTTCGCCTACGACGGCAAGGATTACAT 100.
 Cw8N -----
 C*0802 -----
 C*0803 -----
 C*0801 CGCCCTGAATGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCCGGACACGGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGCCCGTACGGCGGAGCAGCTGAGA 200.
 Cw8N -----
 C*0802 ----- A ----- GA ----- G -----
 C*0803 -----
 C*0801 GCCTACCTGGAGGCGCAGTGCCTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGAAGACCTGCAGCGCGCGG .276
 Cw8N -----
 C*0802 -----
 C*0803 ----- A -----

EXON 4
 C*0801 AACACCCAAAGACACACGTGACCCACCATCCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGAC 100.
 Cw8N -----
 C*0801 CTGGCAGCGGGATGGCGAGGACAAACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACTCCAGAAGTGGGCGAGCTGTGGTGGTG 200.
 Cw8N -----
 C*0801 CCTCTGGAGAAGAGCAGAGATACAGTGCATGTGCAGCACGAGGGGCTGCCAGAGCCCTCACCTGAGATGGG .276
 Cw8N -----

EXON 5
 C*0801 GGCCATCTTCCAGCCACCATCCCCATCGTGGGCATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCTGGCTGTCTAGCTGTCTAGGAGCTGTGATGGCTGTGTGTGAT 100.
 Cw8N -----
 C*0801 GTGTAGGAGGAAGAGCTCAG .120
 Cw8N -----

EXON 6
 C*0801 GTGGAAAAGGAGGAGCTGCTCTCAGGCTGCGT .33
 Cw8N -----

EXON 7-8
 C*0801 CCAGCAACAGTGCCAGGGCTCTGATGAGTCTCTCATCGCTTGTAAAGCCTGA
 Cw8N -----

図1 Cw8N の DNA 塩基配列データ

表3 B40関連アレルタイプとCローカスの比較
 (1994年度中央血液センターワークショップより引用)

抗原名	未公認抗原名	アレル名	n	各アレルごとに有するCローカス抗原数									
				Cw1	Cw2	Cw4	Cw5	Cw6	Cw7	Cw8	Cw8N	Cw9	Cw10
B61		B*4006	24	1	0	3	0	0	6	0	18	4	2
		B*4002	33	7	1	1	0	2	12	0	4	3	25
		B*4003	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
		B*4004	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B60		B*4001	39	6	0	3	0	5	19	0	4	4	15
B48		?	12	3	0	0	0	0	3	0	9	1	1
	Fu	B*4007	2	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0

表4 Cw8N と関連のある B 61, B 75 アリル
(1994年度中央血液センターワークショップより引用)

panel ID	HLA-A alleles		HLA-B (allele)	HLA-C	
J190021	A*0210	A*3302	B61(B*4006)	B44	Cw8N -
J200023	A*0210	A*2402	B61(B*4006)	B7	Cw8N Cw7
J210023	A*0210	A*2402	B61(B*4006)	B3901	Cw8N Cw7
J170015	A*2402	A*2602	B61(B*4006)	B54	Cw8N Cw1
J170002	A*02	A*11	B61(B*4006)	B55.2	Cw8N Cw9
J640001	A*0201	A*2602	B61(B*4006)	B75	Cw8N Cw9
J010001	A*3001	A*2402	B61(B*4002)	B42	Cw10 Cw2
J170022	A*02	A*0101	B61(B*4002)	B37	Cw10 Cw6
J190014	A*2402	A*3101	B61(B*4002)	B51	Cw10 -
J670015	A*2402	A*3101	B61(B*4002)	B7	Cw10 Cw7
PMH806	A*2601	-	B61(B*4002)	B54	Cw10 Cw1
J190005	A*0101	A*3101	B61(B*4002)	B3901	Cw10 Cw7
J010030	A*11	A*0207	B75(B*1502)	B46	Cw8N Cw1
J640014	A*11	A*2402	B75(B*1502)	B61	Cw8N Cw10
MAL0017	A*11	-	B75(B*1502)	B8	Cw8N Cw7
MAL0028	A*11	A*2601	B75(B*1502)	B13	Cw8N Cw10
J200037	A*0203	A*2402	B75(B*1502)	B52	Cw8N Cw7
DCH0031	A*0207	A*0201	B75(B*1502)	B7	Cw8N Cw7

して ii), iii) の血清群の出現が i) と iv) につながりをもたらしした。

今回の塩基配列の決定により, Cw8N は Cw*0801 と同一であることが判明し, Cw8N が Cw8 のサブタイプであることが確実となった。したがって, 他の人類集団に存在する Cw8 の遺伝子型が何であるかが, 今後の検討課題となる。このことにより, それぞれの血清群がどのように抗原分子のアミノ酸配列を認識しているかを解明する手がかりとなる。

B 抗原アリルとの比較では, 血清学タイピングでは全く区別がつかない B*4006 と B*4002 がそれぞれ C 抗原と異なった連鎖不平衡を形成していた。既に Lin et al. によって B*4002 が Cw10 と, B*4006 は C blank と関連することが報告されていたが (4), 今回, この C blank が Cw*0801 (Cw8N) であることが確認された。ただし, これはアジア系集団でのデータであり, Spanish Gypsy では B61-Cw6.2 (C*1502) という報告がある (5)。

これら, B61, B75 のタイピング・データを抜粋した (表 4)。この表から A*0210-Cw*0801-B*4006, A11-Cw*0801-B*1502 といったハプロタイプも推定されるが個々の観察数が少ないので統計学的処理は避けることとする。

参考文献

1. Tongio MM, Betuel H, Gandini E, et al. : *HLA 1991 Vol. 1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Antigen Society no.114 : HLA-C. Oxford University Press, 1992 ; p. 340-345.
2. Zemmour J, Gumperz J, Hildebrand WH, et al. : *HLA 1991 Vol. 1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), HLA-Cw11 is a combination of Cw1 and a public epitope of HLA-Cw3 and HLA-B46 molecules. Oxford University Press, 1992; p.527-529.
3. Zemmour J, Gumperz JE, Hildebrand WH, et al. : The molecular basis for reactivity of anti-Cw1 and anti-Cw3 alloantisera with HLA-B46 haplotypes. *Tissue Antigens* 39 : 249-257, 1992.
4. Lin L, Tokunaga K, Ogawa A, et al. : Genotyping and association analysis of HLA-B61 in Japanese. *Hum. Immunol.* 37 : 94-100, 1993.
5. Vilches C, de Pablo R, Herrero MJ, et al. : Molecular cloning and PCR-SSO detection of the allele encoding the novel allospecificity HLA-Cw6.2 (Cw*1502) in Spanish Gypsies. *Hum. Immunol.* 37 : 259-

263, 1993.

Nucleotide sequence for a Cw8 subtype, Cw8N, and its association with HLA-B alleles.

Fumiaki Nakajima¹⁾, Yoshihide Ishikawa²⁾, Junko Nakamura¹⁾, Toshio Okano¹⁾, Chieko Mori¹⁾, Toshikazu Yokota¹⁾, Ling Lin²⁾³⁾, Katsushi Tokunaga²⁾ and Takeo Juji²⁾

1) Kanagawa Red Cross Blood Center, Kanagawa, Japan

2) Department of Research, Japanese Red Cross Central Blood Center, Tokyo, Japan

3) Department of Transfusion and Immunohematology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Summary

We have found a few alloantisera which react with a serologically undefined HLA - C blank specificity. At the 11th. International Histocompatibility Workshop, the tail reaction of an antiserum "BRA207" defined the identical specificity to our HLA - C blank specificity. We confirmed that this new specificity showed a cross reactivity with Cw8 antigen by means of an absorption test. Thus we tentatively named "Cw8N" as a potential split of HLA - Cw8. The antigen frequency was 13% in the Japanese population. Then, we analyzed the nucleotide sequence of Cw8N. As a result, the allele coding for Cw8N was identical to "Cw*0801". Furthermore, we examined association between Cw*0801 and HLA - B alleles. As for B61 alleles, B*4006 was strongly associated with Cw*0801, whereas B*4002 was associated with a different antigen Cw10. Also observed was an association between B*1502 and Cw*0801.

Key words :

Cw8N, Cw8, Cw*0801, SSCP, association.

〔原著論文〕 HLA-B60, B61, B48 グループを識別する PCR-SSP 法 —血清学的タイピングの補助的方法として—

小川 篤子, 林 玲, 柏瀬 貢一, 渡辺 嘉久, 徳永 勝士, 赤座 達也, 田所 憲治, 十字 猛夫

日本赤十字中央血液センター, 研究一課

(平成7年5月15日受付)

要約

HLA-B40 グループ(B60 および B61)の血清学的タイピングでは, HLA-B61 のみに特異性を持つアロ抗血清がほとんどないために, B60 ホモ接合体と B60/B61 ヘテロ接合体の識別ができな
い. また B48 抗血清は B40 グループと交差反応性を持つ場合があり, この場合 B60/-, B61/-ホ
モ接合体と B60/B48, B61/B48 ヘテロ接合体との判定は難しい. そこで, 血清学的タイピングを
補助する目的で, HLA-B40 (B60, B61)/-と血清学的にタイプされた検体について B60, B61,
B48 の有無を PCR-sequence specific primer (SSP) 法で確定する DNA タイピング法を開発
した. 骨髄バンクドナー64検体についてこの PCR-SSP 法を行い, 血清学的に難しかった B40 グ
ループの判別が明瞭かつ簡便に判定できた.

キーワード:

HLA-B60, HLA-B61, HLA-B48, DNA タイピング, PCR-SSP

はじめに

HLA-B40 グループのスプリット抗原である B60
および B61 は, 日本人では B60 は5.6%, B61 は10.
7%の遺伝子頻度で見られる抗原である. これらを血
清学的にタイピングする場合, HLA-B61 のみに特
異性を持つアロ抗血清がほとんどないために, B60
ホモ接合体と B60/B61 ヘテロ接合体の識別はでき
ない(1). 通常 HLA-B60/B61 を確定するためには
家族調査を必要とするが, 骨髄バンクドナーなど家
族調査のできない場合, DNA レベルで簡便に B60/
B61 の有無を同定できる方法が必要となる. また
HLA-B48 抗原は B40 グループと交差反応性が高
く(1), B48 抗原を識別する抗血清が B40 グループに
も反応する時には, B60, B61 のホモ接合体と, その
B48 とのヘテロ接合体 (B60/B48, B61/B48) との
識別が難しくなる. そこで, 血清学的な HLA タイ
ピングを補完する目的で, 血清学的に HLA-B40
(B60, B61) /-と判定された検体について, B60,
B61, B48 の有無を確定する簡便な DNA タイピン

グ法を開発した.

材料と方法

末梢血リンパ球よりゲノム DNA を抽出した.
HLA-B60, B61 および B48 に特異的な塩基配列に
対応するプライマー(sequence specific primer:
SSP)を設定し(表1), 各アレルグループ特異的
PCR 増幅に用いた. 内部コントロールとして用い
る, 補体 C4遺伝子を増幅するプライマー L3, L4 の
配列は既報(2)に従った. PCR 反応液組成は, 80
mM Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 20 mM
(NH₄)₂SO₄, 0.2 mM dNTP, 5% dimethylsul-
foxide, 0.25 μM の SSP 1組, 0.01 μM の C4 プ
ライマー 1組, ゲノム DNA, および 0.5 units Taq ポ
リメラーゼから成り, 反応液量, 計 10 μl に調製し
た. パーキンエルマー Gene Amp PCR System
9600 を用い, 94°C 5分の後, 94°C 30秒→62°C 30秒
→72°C 60秒を30サイクル行い, 最後に72°C 5分
で PCR を完了した. 反応産物は5%アクリルアミドゲ

表1 プライマーの位置と塩基配列

Name	Position	Sequence (5'→3')
B60 SSP;		
B60F	Exon 2 11-33	CATGAGGTATTTCCACACCGCCA
B40R1	Exon 3 216-231	GCCACTCCACGCACTC
B61 SSP;		
B61F	Exon 2 11-33	CATGAGGTATTTCCACACCTCCG
B40R2	Exon 3 216-235	CGGAGCCACTCCACGCACTC
B48 SSP;		
B48F	Exon 2 117-132	GCCGCGAGTCCGAGAG
B48R	Exon 2 219-235	CGCAGGCTCTCTCGGTA
C4 Primers;		
L3		TGCGGATCCAGCAGTTTCGGAAG
L4		ATAGGATCCTAAGTCCCTGGGCTT

ゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで検出した。

結果および考察

HLA-B60, B61, B48のSSPを設定した。このSSPによりB60, B61では約770 bp, B48では119 bpの特異的PCR増幅産物が得られる(図1)。他のいくつかのアリールグループ(B13, B7, B27, B38, B*1504, B*7901, 図1括弧内に示した)も同じ塩基配列を持つために増幅され得る。しかし、これらの抗原は血清学的に明らかに識別されるので検体として対象にならない。また、B61 SSPはB61とB48の双方を増幅するので、B48ホモ接合体とB61/B48ヘテロ接合体の識別はできない。しかしB48に交差反応を示さないB40特異的アロ抗血清はしばしば見いだされており、B40(B60, B61)陽性の検体を血清学的に確実に抽出できるので、B48ホモ接合体は検体として対象にならない。

これらのプライマーが同一反応条件で特異的にPCR産物を増幅するように、その長さを調節した。例えばB60, B61を増幅する2組のSSPは当初

T_mの計算推定値が等しくなるように20-23塩基で設定したが、B60のリバースプライマーについては特異性を高めるためにより短いプライマーに変更した。また、B48 SSPについては増幅するDNA断片長が短かく、増幅効率が高いのでより短いプライマーを用いてB60, B61の増幅産物と同程度の増幅が見られるように調節した。

PCR反応の内部コントロールに用いた補体成分C4遺伝子はHLAクラスIII領域に存在し、通常はC4AとC4B遺伝子が直列に並んでいるが、ここで用いたC4プライマーによりその両方が増幅され、962 bpの増幅産物が得られる(図2)。

PCRの特異性を確認するために、B60, B61, B48, B13, B35, B44, B7, B27, B38, B39, B46, B51, B52, B54, B70を持つ検体のゲノムDNAについて、B60, B61, B48 SSPを用いてPCRを行った。B60 SSPによりB60, B13を持つ検体で、B61 SSPによりB61, B48, B7, B27を持つ検体で、B48 SSPによりB48, B38を持つ検体で特異的PCR増幅産物が見られ、図1に示した特異性を持つことを確認した。また、C4プライマーにより全ての検体で962 bpのPCR産物が増幅された。

図2に示したように、B60, B61, B48 SSPを用いたPCRにより、順にB60, B61+B48, B48の増幅産物が特異的に明瞭に示され、これらが陰性の場合もC4増幅産物のバンドがみられることで、陰性の判定をより確実に行うことができた。

日赤中央管内の骨髄バンクドナータイピングにおいて、血清学的判定の困難であった64検体について、DNA検査を行った(表2)。血清学的に判定不能であ

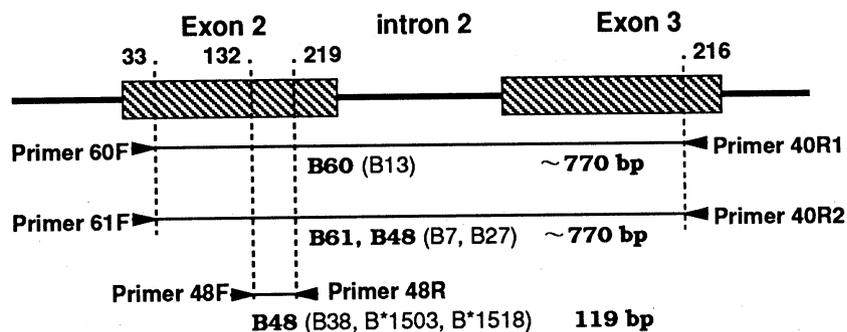


図1 プライマーの特異性と増幅産物。太文字で示してある目的とするアリルに加え、括弧内のアリルも各プライマーにより増幅され得る。図中の塩基番号はプライマーの3'末端の位置を示した。また、増幅されるDNA断片長はプライマーを含んだ塩基数で示した。

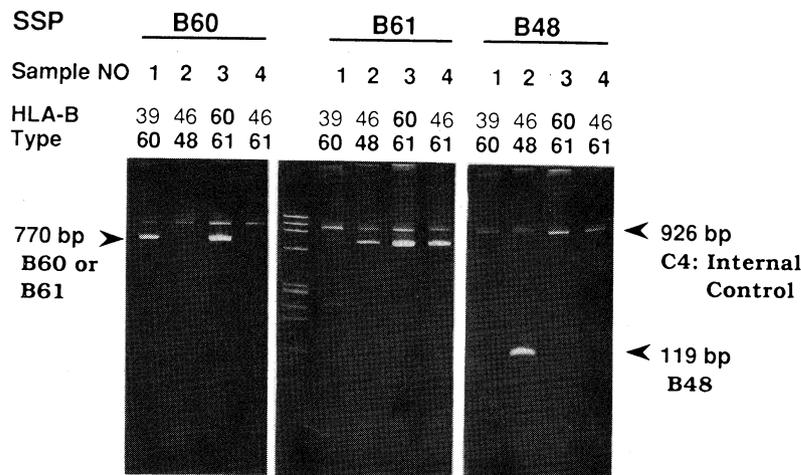


図2 HLA-B60, B61, B48 アリルグループの PCR-SSP による検出。PCR 後、反応液 5 μ l を 5% アクリルアミドゲルで泳動した。

表2 血清学的検査と DNA 検査結果の対比

DNA Typing	Serological Typing			
	B60/bl.	B60/B61	B61/bl.	B60/B48
B60/B60	13 ^{a)}	1 ^{b)}	-	-
B60/B61	38 ^{a)}	6	-	-
B61/B61	2 ^{b)}	-	2	-
B60/B48	1 ^{b)}	-	-	-
B61/B48	-	-	-	1 ^{b)}

a) 血清学的に判別不能な検体

b) 血清学的判別が誤っていたと考えられる検体

った B60/blank の 51 検体は、PCR-SSP 法により、13 検体は B60/B60、38 検体は B60/B61 と判定された。HLA-B48 については特異性の高い抗血清を持つ検査室が多いので、B40/- の検体の中で DNA 検査によって B48 が検出されるものは少なかったが、それでも B60/blank と血清学的に判定されていたもののうち 1 検体は B60/B48 であった。また、B61 を B60 と誤判定していたもの 3 検体、B60 ホモを B60/B61 ヘテロ接合体と誤判定していたものが 1 検体あり、血清学的タイピングを確認する意味からも、PCR-SSP 法が有用であると思われる。

ここでは 1 検体につき B60、B61、B48 増幅用の 3 チューブを使用した。B48 モノスペシフィックなアロ抗血清があり検体から B48 の可能性を除外できる場合は、B60、B61 用の 2 チューブの PCR を行えばよい。また B60 と B48 の 4 つのプライマーを混合して PCR を行うと、770 bp、119 bp に加え、アレルの組み合わせによって 660 bp と 225 bp の

PCR 産物が示されるが、特異的な 770 bp、119 bp の産物の有無から B60、B48 を判定できた。これらの手法によりさらに簡便に検査を行うことができる。

参考文献

1. Hammond M.G, Tokunaga K, Fotino M, *et al.*: *HLA 1991*, Vol. 1. (eds. Tsuji K, Aizawa M and Sasazuki T), HLA - B40 crossreacting group, HLA - B60, - B61, - B47, - B48, - B13. Oxford University Press, Oxford, 1992 ; p.331-334
2. Braun L, Schneider PM, Giles CM, *et al.*: Null alleles of human complement C4 : Evidence for pseudogenes at the C4A locus and for gene conversion at the C4B locus. *J. Exp. Med.* **171**: 129-140, 1990.

Discrimination of HLA-B60, B61, and B48 by PCR using sequence specific primers

Atuko Ogawa, Ling Lin, Kouichi Kashiwase, Yoshihisa Watanabe, Katsushi Tokunaga, Tatsuya Akaza, Kenji Tadokoro, and Takeo Juji

Japanese Red Cross Central Blood Center, Tokyo, Japan

Summary

It is known that HLA-B60/B61 heterozygotes often cannot be distinguished from HLA-B60/B60 homozygotes by serological analysis, because monospecific anti-HLA-B61 serum is seldom available. Moreover, it is sometimes difficult to discriminate B60/B48 or B61/B48 heterozygotes from B60 or B61 homozygotes by serology. In order to overcome these difficulties, we established a system for discriminating HLA-B60, B61, and B48 groups by means of polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP) using genomic DNA. By using this system, all the examined samples were easily judged for positivity of B60, B61 or B48 group.

Key words :

HLA-B60, HLA-B61, HLA-B48, DNA typing, PCR-SSP

〔原著論文〕 日本人における HLA-DMB 遺伝子の多型性の塩基配列の決定並びに PCR-RFLP 法による解析

河田 寿子¹⁾, 成瀬 妙子¹⁾, 能勢 義介²⁾, 安藤 麻子¹⁾, 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, 検査課

(平成7年5月16日受付)

要約

HLA-DM 遺伝子は, HLA-DQ, DP 間に存在することが報告された新しいクラス II 遺伝子であり, クラス II 分子による抗原提示の過程, すなわち外来抗原ペプチドとの結合に重要な機能を担っていることが示唆されている. 本論文では, 日本人の DMB 遺伝子の多型性の解析と, 他のクラス II 抗原遺伝子との相関について検討した結果, 日本人において DMB*0101, *0102, *0103 が確認され, さらに新対立遺伝子 595new が存在することが明らかとなった. また, PCR-RFLP 法での日本人一般集団の解析において, 白人とは異なる遺伝子頻度が観察された. また, 他のクラス II 遺伝子との相関解析より, DMB*0101 と DPB1*0402 および DRB1*1502 に連鎖不平衡が認められた. DMB 遺伝子多型性解析は, クラス II 分子が細胞膜上に発現して賦与される, いわゆる抗原提示能の解析に有用であると考えられ, また, 今後の移植医療や, HLA に相関する疾患のさらなる発症機構の究明に役立つものと期待される.

キーワード:

HLA-DMB, 直接塩基配列決定法, PCR-RFLP, 遺伝的多型性

はじめに

HLA-DQ, DP 間に存在の報告された新しいクラス II 遺伝子である HLA-DM 遺伝子は, 他のクラス II 遺伝子と同様に α 鎖, β 鎖のヘテロダイマーより形成され, mRNA での発現は認められているものの, タンパクレベルでの同定がなされておらず, その機能は不明であった(1). しかしながら最近, DM 遺伝子の欠損により, クラス II 分子による抗原提示能の低下した突然変異細胞に DM 遺伝子を導入すると, 抗原提示能が回復したという報告から, DM 遺伝子それ自身が他のクラス II 分子による抗原提示に重要な機能を担っていることが明らかにされた(2,3).

DM 遺伝子の多型性は, 他のクラス II 遺伝子と異なり, DMA, DMB 遺伝子ともに主として第3エキソンに存在する. 白人の解析では DMA*0101~*0104, DMB*0101~*0104 のそれぞれ4種の対立遺

伝子の存在が報告されているが(4), 日本人での解析は行われていない. そこで我々は, 日本人 HLA-DMB 遺伝子について, その多型性の解析と, 他のクラス II 抗原遺伝子との相関を検討したので報告する.

材料と方法

DMB 遺伝子の多型性は日本人由来 HLA-D 抗原ホモ接合体細胞 (HLA-DHTC) 30例と, 一般集団として日本人非血縁健常者100例について, 検索した.

検体より採取した高分子 DNA100ng, 既に報告されている HLA-DMB 遺伝子の第3エキソンを増幅するプライマー(5)各 20 pmol, dNTP, Taq DNA ポリメラーゼ (WAKO) 1 units を加えて, 全量 100 μ l を反応液とし, 96°C 1分, つづいて, 96°C 1分・60°C 1分・72°C 2分を30サイクル, 最後に72°C

5分 (IWAKI TSR-300) の条件でPCR増幅を行なった。PCR産物をHLA-DHTCについては蛍光直接塩基配列決定法(6)により、一般集団についてはPCR-RFLP法(7)(但し、用いたプライマーと制限酵素では、DRB1*1501=*1503, DQB1*0604=*0609は区別できない)により解析を行なった。直接塩基配列決定法は、373A DNAシーケンサー (ABI) 使用し、スピнкаラム (QIAGEN) で精製したPCR産物200ng, PCR時と同一のプライマー各3.2 pmolとTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) を使用し、96°C 1分、96°C 30秒・50°C 15秒・60°C 4分を25サイクル (PERKIN ELMER CETUS PJ480) でサイクルシーケンシングを行なった。つづいて、50%ウレア変性6%ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、5'側と3'側より両方向について塩基配列を決定した。PCR-RFLP法はPCR反応液7 μ lを採取し、3種の酵素*Apa*LI, *Hin*P1I, *Bsr*Iをそれぞれ3units添加した後、37°C 3時間反応させた。15%ポリアクリルアミドゲルにて泳動後、各酵素のバンドの出現位置により各対立遺伝子を判定

した(図2参照)。他のクラスII抗原対立遺伝子との連鎖不平衡の解析のハプロタイプ頻度(HF), χ^2 値(χ^2), t値(t)の計算方法はMattiuz(8)の方法に従った。

新対立遺伝子と予想される細胞については増幅プライマーの両端に、*Bam*HIと*Pst*Iサイトを付加したものによるPCR産物を、pBluescript II KS⁺にサブクローニングの後、塩基配列の決定を行なった。

結果

日本人由来HLA-D抗原ホモ接合体細胞30例について、DMB遺伝子の第3エキソンのPCR産物を直接塩基配列決定法により、塩基配列を決定したところ、DMB*0101, *0102, *0103の対立遺伝子が検出され、日本人におけるDMB遺伝子の多型性の存在を認めた。さらに、ホモ接合体細胞595については、

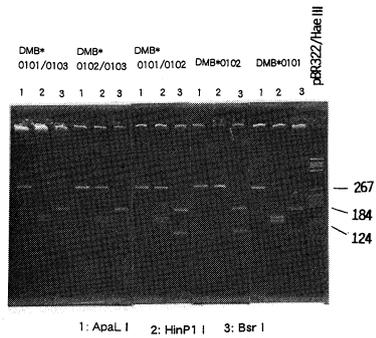
表1 直接塩基配列決定法による日本人由来DHTC30例のDMB遺伝子多型

Cell No.	HLA									
	A	B	C	DRDQ	DRBI	DQA1	DQB1	DPB1	DMB	
1199	24	7	7	1	1	0101	0101	0501	0402	0101/0103
277	24	35	3	2	1	1501	0102	0602	0501	0102
435	24	62	3	2	1	1501	0102	0602	0402/0501	0103
3023	24	52	-	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
3388	24	52	-	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
2220	24	52	-	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
2531	24	52	-	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
3052	24	52	-	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
2043	24	52	-	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
1072	24	52	-	2	1	1502	0103	0601	0901	0101
1092	24	52	-	2	1	1502	0103	0601	0901	0101/0103
1041	24	52	-	2	1	1502	0103	0601	0301/0901	0102
1123	24	52	-	2	1	1502	0103	0601	0901	0101
969	24	52	-	15	1	1502	0103	0601	0901	0101
1586	24	52	-	15	1	1502	0103	0601	0201/0901	0101
2703	24	39	7	-	-	1502	0103	0601	0901	0101
1350	24	54	1	4	4	0405	0301	0401	0501	0101/0103
1815	11	54	1	-	-	0405	0301	0401	0501	0101
605	2	61	3	4	-	0405/0410	0301	0401/0402	0201	0102
3984	24	62	3	-	-	0406	0301	0302	0201/0901	0101/0103
659	33	55	3	11	7	1101	0501	0301	0202	0103
1143	33	44	13	1	1	1302	0102	0604	0201	0101
2109	24	5	-	-	-	1405	0101	0503	0501	0101
2716	2	62	3	-	-	1406	0501	0301	0201/0402	0103
3339	2	61	-	-	-	0901	0301	0303	0501/1301	0103
595	2	61	3	9	3	0901	0301	0303	0201/0501	595new/0101
2692	26	61	3	-	-	0901	0301	0303	1401/0402	0101
3214	26	40	-	-	-	0901	0301	0303	0501	0102
3380	24	35	3	-	-	0901	0301	0303	0501	0101/0103
3084	24	40	4	-	-	0901	0301	0303	0501/0102	0102

報告されている対立遺伝子とは異なる塩基配列を示す新対立遺伝子を一方の染色体に有している(ヘテロ)ことが示唆された(表1)。この結果を確認するため、PCR産物のサブクローニングを行ない、得られたサブクローン3個について塩基配列決定を行なったところ、この新対立遺伝子は第3エキソン内の149番目がT, 254番目がTという塩基配列であり、その結果50番目のアミノ酸がVal, 85番目のアミノ酸がIleという新しい組み合わせを有することがわかった(図1)。そこで、この新対立遺伝子をDMB*595newと呼ぶことにした。図2に示したように、3種の制限酵素を用いてPCR-RFLP法によるDMBタイピングが可能であることがわかった(但し、DMB*0101/0104ヘテロとDMB*0103/595newヘテロは同一のバンドパターンとなるが、*Hin*P1I, *Bsr*Iの二重消化あるいはPCR-SSCP法で識別が可能)。そこで、日本人一般集団100例のPCR-RFLP



図1 HLA-DMB 遺伝子の Exon3 領域の塩基配列



DMB allele	Restriction endonucleases		
	ApaI	HinP I	Bsr I
*0101	0	1	+ -
*0103	0	1	- +
*0102	0	0	+ -
*0104	1	0	- +
595new	1	0	+ -

0: not cleaved 1: cleaved

図2 日本人由来 HLA-DHTC の PCR-RFLP 法による DMB 遺伝子解析
直接塩基配列決定法で塩基配列の確認された日本人由来 DHTC を用いて解析した電気泳動パターン。

表2 日本人一船集団100例における DMB 遺伝子の対立遺伝子頻度 (N=100)

DMB Alleles	n	Phenotype Frequencies(%) n=100	Gene Frequencies(%)	
			日本人 n=100	白人 n=400 (文献5より引用)
*0101	73	73.0	48.0	77.2
*0102	36	36.0	20.0	3.0
*0103	43	43.0	24.5	18.3
*0104	0	0	0	1.5
595new	0	0	0	0

PF=Phenotype Frequencies GF=Gene Frequencies $GF = 1 - (1 - PF)^{1/2}$

法による DMB 遺伝子の多型性の解析を行なったところ、DMB*0101 は73例で遺伝子頻度は48.0%であった。同様に DMB*0102 は36例で20.0%、DMB*0103 は43例で24.5%、DMB*0104 は0例であり、既に報告されている白人の解析(5)とは異なる対立遺伝子分布が観察された(表2)。さらに一般集団についての DMB 遺伝子と他の HLA クラス II 遺伝子

との連鎖不平衡について解析を行なったところ DMB*0101 と DPB1*0402 χ^2 値11.0, DRB1*1502 が χ^2 値8.7を認めたのをはじめ、DMB*0101 と DRB1*0101, DMB*0102 と DRB1*1101, DMB*0103 と DRB1*1405 などに連鎖不平衡が認められた(表3)。

表3 日本人のDMB 遺伝子とHLA クラスII 対立遺伝子の連鎖不平衡

DMB遺伝子	連鎖不平衡が認められた HLAクラスII対立遺伝子	HF	χ^2	t
DMB*0101	———— DRB1*0101	0.089	7.6	4.5
	———— DRB1*1502	0.100	8.7	4.8
	———— DQA1*0103	0.128	5.7	3.0
	———— DQB1*0501	0.080	3.2	2.3
	———— DQB1*0601	0.128	5.7	3.0
	———— DPB1*0402	0.123	11.0	5.4
	———— DPB1*0901	0.074	4.2	2.8
DMB*0102	———— DRB1*1101	0.029	8.1	2.3
DMB*0103	———— DRB1*0406	0.020	5.5	2.1
	———— DRB1*1405	0.025	7.0	2.3
	———— DRB1*1501	0.054	5.0	2.2
	———— DQB1*0602	0.055	6.4	2.4

HF=Haplotype Frequency χ^2 =chi square t=t value

考察

新クラスII 遺伝子であるDMA とDMB は、それぞれに多型性が報告されており、クラスII の抗原提示能を規定していることが推測される。今回の解析により、日本人においてもDMB 遺伝子に多様性が存在することが明らかとなったが、その頻度分布は既に報告されている白人での結果とは異なっていた。特にDMB*0104 は今回日本人には検出されなかったことにより、DMB 遺伝子の多様性にも、他のクラスII 遺伝子と同様に人種差が存在すると考えられた。今回我々が検出したホモ接合体細胞由来595の新対立遺伝子は、第2エキソンはDMB*0101 と同一の塩基配列であったが(未発表)、第3エキソンの2箇所の可変部のうち、50番目がVal, 85番目がIle というこれまでに報告されている対立遺伝子とは異なる組み合わせを示し、このことより日本人に特徴的な対立遺伝子の存在する可能性が示唆された(この新対立遺伝子DMB*595new はDNA データバンクDDBJ にD32055として登録され、さらに現在HLA 命名委員会に命名を申請中である)。このDMB*595new の日本人一般集団での頻度は、現在までタイピングを行なった100例中には検出されなかったので、0.5% 以下と考えられる。

他のクラスII 対立遺伝子との連鎖不平衡につい

ては、日本人においてDR-DQ-DP 間での強い連鎖不平衡が認められているDRB1*0101-DQB1*0501-DPB1*0402, DRB1*1502-DQB1*0601-DPB1*0901の各ハプロタイプ(9)にDMB*0101との連鎖不平衡が認められ、さらに白人でも報告されているDRB1*1501-DQB1*0602のハプロタイプにDMB*0103との連鎖不平衡が認められたが、これらの連鎖不平衡はDR-DQ 間に存在する連鎖不平衡よりも緩いものと考えられた。このように特定のクラスII ハプロタイプにおいて連鎖不平衡を認めたことから、DMB 遺伝子の多様性が他のクラスII 分子の抗原提示能に影響している可能性が推測される。DMB 遺伝子は、クラスII 抗原分子が細胞膜表面に抗原を提示する過程において重要な役割を担っていることが推測されており、DMB 遺伝子の多型性の解析はクラスII 抗原提示機構を解明するために有用であると考えられる。したがってDMB 遺伝子の多型性と疾患との相関解析も、特にクラスII 抗原と強い相関を示す疾患について重要な課題となるであろう。また移植医療においては既知のクラスII 抗原の一致した組合せでの骨髄移植においても拒絶やGVHDをしばしば認めることから、今後はDM 遺伝子のマッチングについて、さらに解析を進める必要があると考えられた。

参考文献

1. Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, *et al.*: A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* **353**: 571-573, 1991.
2. Morris P, Shaman J, Attaya M, *et al.*: An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* **368**: 551-554, 1994.
3. Fling SP, Arp B, Pious D: HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* **368**: 554-558, 1994.
4. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, *et al.*: Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens* **44**: 1-18, 1994.
5. Carrington M, Yeager M, Mann D: Characterization of HLA-DMB polymorphism. *Immunogenetics* **38**: 446-449, 1993.
6. Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, *et al.*: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **21**: 674-679, 1986.
7. Inoko H, Ota M: *Handbook for HLA Tissue Typing Laboratories* (eds. Bidwell J, Hui KM), PCR-RFLP. CRC Press, Boca Raton, 1993; p.1-70.
8. Mattiuz PL, Ihde D, Piazza A, *et al.*: *Histocompatibility Testing* (eds. Terasaki PI), New approaches to the population genetic and segregation analysis of the HLA system. Copenhagen, Munksgaard, 1970; p. 193-205.
9. Naruse T, Nose Y, Tsuji K, *et al.*: Strong and unique association of HLA-DPB1 alleles with other HLA antigens in a Japanese population. *Tissue Antigens* **39**: 276-279, 1992.

Sequencing and PCR-RFLP analysis of HLA-DMB polymorphism in Japanese.

Hisako Kawata¹⁾, Taeko Naruse¹⁾, Yoshisuke Nose²⁾, Asako Ando¹⁾, Hidetoshi Inoko¹⁾

1) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

2) Hyogo Red Cross Blood Center, Hyogo, Japan

Summary

Novel class II genes, DMA and DMB have been mapped recently between the DQ and DP genes within the HLA class II region. It has been suggested that DM molecule functions at an intracellular site to promote class II molecule - peptide association in the antigen presentation pathway. Genetic polymorphisms in the DMB gene are concentrated in the 3rd exon coding the $\beta 2$ domain and 4 alleles (DMB*0101-0104) have been so far identified in Caucasian populations. In this study, we have analyzed genetic polymorphism in a Japanese population by direct automated sequencing and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method and could recognize DMB*0101 (48.0%), DMB*0102 (20.0%), and DMB*0103 (24.5%) . No DMB*0104 was detected. Further, a new allele (DMB*595new) containing Val and Ile at amino acid positions 50 and 85, respectively was identified in a B-lymphoblastoid cell line of Japanese origin. DMB*0101 and DMB*0102 were found to be in linkage disequilibria with DPB1*0402 and DRB1*1502, and with DRB1*1101 and DRB1*1405, respectively. HLA-DMB typing using the PCR-RFLP method established in this study will be useful to analyze the HLA class II - disease association and also to perform the HLA matching for donor selection in unrelated transplantation.

Key words :

HLA-DRB, direct sequencing, PCR-RFLP, genetic polymorphism

〔原著論文〕 免疫性血小板減少症 (ITP) と HLA の 相関について

松崎 龍典¹⁾, 野村 昌作¹⁾²⁾, 石田 萌子¹⁾, 香川 英生²⁾, 福原 資郎²⁾

関西医科大学 輸血部¹⁾, 同 第一内科²⁾

(平成7年5月23日受付)

要約

免疫性血小板減少症 (ITP) の発症に, 特定の HLA クラス I, クラス II 抗原が関与している可能性を解析した. 46例の ITP 患者について HLA クラス I は血清学で, クラス II 抗原については PCR-RFLP 法でタイピングを行った. クラス I 抗原では, HLA-B75, -Cw1 の増加, HLA-B61, -Cw3 の低下を患者群で認めた. クラス II 抗原では, DRB1*0410, DRB1*1301, DQB1*0302, DQB1*0402, DPB1*0202, DPB1*0601, DPB1*1001, DPB1*1901 の増加, DRB1*0405, DQB1*0303, DPB1*0201 の低下を患者群で認めた. しかし, 統計的に有意差を認めたのは, DRB1*0410 と DQB1*0302 の二種類のアリルであった. DRB1*0410 は10例で検出され, そのうち3例がホモ接合体であり, しかもこの3例は, いずれも DQB1 が DQB1*0401 のホモ接合体であった. 残りの7例中5例において, DQB1 が DQB1*0402 のヘテロ接合体であった. 一部の ITP 症例では, 発症のメカニズムに, DR4 関連の遺伝子が重要であると考えられた.

キーワード:

免疫性血小板減少症, HLA クラス II 抗原, PCR-RFLP, DR4

はじめに

特発性血小板減少性紫斑症 (ITP) は, 血小板減少をきたす原因が認められず, また赤血球系や白血球系には本質的な異常がなく, 骨髄における低形成も認められないことを特徴とする疾患である. ITP は急性型と慢性型に分類され, いずれも血小板抗体によって発症する自己免疫性疾患のひとつであると考えられている (1). しかし, 自己抗体の生成機序は不明であり, 抗体生成を誘導する背景原因として, 免疫調節機構に変調を示す遺伝的要因も想定される. そこで今回われわれは, 免疫性血小板減少症とくに成人の慢性 ITP 患者例の HLA タイピングについて検討を行った.

材料および方法

対象は当院で経過観察中の慢性 ITP 46例で ITP の診断は, いずれも厚生省特発性造血障害調査研究

班の診断基準に従った. 年齢は20~79 (中央値44) 歳で, 性別では男性10例, 女性36例である. 血小板抗体 (PAIgG) は, 平均 280ng/10⁷platelets で50以上が36例であった.

末梢血から比重遠心法によりリンパ球を分離し, HLA-A, -B, -C 抗原は Terasaki Oriental HLA-ABC トレイ (ONE LAMBDA) を用いリンパ球細胞障害試験 (LCT) を行った. 続いてスマイテスト DNA 抽出キット (住友金属) を用い添付書に準じて DNA を抽出後, DNA タイピングはスマイテスト遺伝子型判定キット (住友金属) を用いて, PCR-RFLP 法で HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1 の各タイピングを施行した (2). なおプライマーと制限酵素は既報 (2) のものを用いた. 結果はコントロール群と比較し, コントロール群は, HLA クラス I の抗原については, 当院の学生50名の抗原頻度を用い, HLA クラス II のアリルについては, 住友金属より供与された健

表1 ITP患者と正常健康人のHLA抗原とアリル

Antigen& Allele	Frequency(%)		
	ITP	Control (pvalue; pc value)	11th JAP-WS
	n=46	n=50	n=1216(HLA-B) n=1023(HLA-C)
B61	5.43	17.0(p<0.05;NS)	12.75
B75	5.43	0.0(NS;NS)	0.80
Cw1	21.74	19.0(NS;NS)	11.96
Cw3	10.87	16.0(NS;NS)	24.67
	n=46	n=40	n=1216(DRB1,DQB1) n= 649(DPB1)
DRB1*0405	4.35	7.50(NS;NS)	13.26
DRB1*0410	14.13	0.0(p<0.01;p<0.05)	1.79
DRB1*1301	3.26	1.25(NS;NS)	0.59
DQB1*0302	20.65	3.75(p<0.01;p<0.05)	9.32
DQB1*0303	5.43	16.25(p<0.05;NS)	14.86
DQB1*0402	11.96	1.25(NS;NS)	3.98
DPB1*0201	8.69	17.50(NS;NS)	21.02
DPB1*0202	11.96	3.75(NS;NS)	3.66
DPB1*0601	4.35	1.25(NS;NS)	0.62
DPB1*1001	4.35	0.0(NS;NS)	0.23
DPB1*1901	4.35	0.0(NS;NS)	0.39

pc value: 計算されたp値に検索した抗原数を乗じた修正p値 NS: 有意差なし

11th JAP-WS: 第11回国際HLAワークショップの日本人集団におけるHLAの遺伝子頻度

常人40例のアリル頻度を用いた。統計的な解析は、 χ^2 検定およびFisherの直接確率計算法を行った。さらに、参考資料として第11回国際HLAワークショップの日本人集団におけるHLAの遺伝子頻度(3)と比較した。

結果

表1に示すように、クラスI抗原では、4種類の抗原(HLA-B75, -Cw1, -B61, -Cw3)、クラスII抗原では、11種類のアリル(DRB1*0410, DRB1*1301, DQB1*0302, DQB1*0402, DPB1*0202, DPB1*0601, DPB1*1001, DPB1*1901, DRB1*0405, DQB1*0303, DPB1*0201)がコントロールとの間に差がみられた。しかしこれらのうち統計的に有意差が確認されたのは、DRB1*0410とDQB1*0302であった。特に

DRB1*0410は10例で検出され、そのうち3例はホモ接合体であり、しかもこの3例は、いずれもDQB1がDQB1*0401のホモ接合体であった。残りの7例中5例において、DQB1がDQB1*0402のヘテロ接合体であった。

考察

ITPは、現在までのところ遺伝性の疾患とは考えられていない。しかし、時に家族内にITPをはじめとする自己免疫疾患を発症したり、ITPから全身性エリテマトーデスに移行するような症例もみられる。これらの事実より、ITPでは、いずれかの免疫調節機構に変調を示す遺伝的要因があつて、そこに環境因子が加わることによってITPの病型が出現する可能性が示唆され、これまでにHLA抗原との

関連性についてもいくつかの報告がみられる(4, 5). Helmerhorst らの報告(4)では B38 との相関性が示されているが, 同報告での考察では, 特定の抗原との相関性が報告によってまちまちであり, また人種による相異も認められているとしている. 一方, Gaiger ら(5)は, HLA クラス II のアレルについて検討し, DPB1*0402 および DPB1*1501 の重要性を指摘している. 今回のわれわれの検討では, ITP における DRB1*0410 の頻度が健常人に比べてかなり有意に高く, また DQB1*0402 との関連性も示唆された. ただし, 日本人では DRB1*0410 と DQB1*0402 に強い連鎖不平衡があるので, この場合は DRB1*0410 が第一義的に ITP と相関し, 連鎖不平衡から DQB1*0402 が二次的に相関している可能性があると考えられた. 日本人 ITP 症例の発症のメカニズムに関する DR4 関連の遺伝子の重要性については, 今後, 抗体の種類や治療に対する反応性と HLA 抗原との関連性について検討をすすめるとともに, 相関の高い抗原またはアレルのアミノ酸置換の共通性についても注目する必要があると考えられた.

参考文献

1. Karpatkin S: Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood* 56: 329-343, 1980.
2. 大西浩史, 飯田淳子, 田中博ら: スマイテスト HLA タイピングシステム-PCR-RFLP 法を用いた HLA クラス II 抗原の DNA タイピング, 今日移植, 7: 37-41, 1994.
3. 赤座達也, 今西規, 藤原孝ら: 日本人集団における HLA 遺伝子頻度とハプロタイプ頻度, 今日移植, 7: 87-99, 1994.
4. Helmerhorst FM, Nijenhuis LE, De Lange GG, et al: HLA antigens in idiopathic thrombo-cytopenic purpura. *Tissue Antigens* 20: 372-379, 1982.
5. Gaiger A, Neumeister A, Heinzl H, et al: HLA class -I and -II antigens in chronic idiopathic autoimmune thrombocytopenia. *Ann. Hematol* 68: 299-302, 1994.

HLA typing in immune thrombocytopenic purpura

Tatsunori Matsuzaki¹⁾, Shosaku Nomura¹⁾²⁾, Tomoko Ishida¹⁾, Hideo Kagawa²⁾, Shirou Fukuhara²⁾

1) Department of Blood Transfusion, and 2) First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka, Japan

Summary

The lymphocytes of 46 patients with the clinical diagnosis of immune thrombocytopenic purpura (ITP) were typed for HLA class I and II antigens. The B75 and Cw1 antigens were present in an increased frequency, and the B61 and Cw3 antigens in a decreased frequency compared to controls. In HLA class II antigens, DRB1*0410, DRB1*1301, DQB1*0302, DQB1*0402, DPB1*0202, DPB1*0601, DPB1*1001, and DPB1*1901 were present in an increased frequency, and DRB1*0405, DQB1*0303, and DPB1*0201 in a decreased frequency compared to controls. However, only two alleles (DRB1*0410 and DQB1*0302) were significant ($p < 0.05$; X^2 test). In particular, DRB1*0410 was present in 10 of 46 patients, with a significantly increased frequency ($p < 0.05$). Three of these 10 DRB1*0410 patient were homozygous and the remaining 7 ones were heterozygous for DRB1*0410. Furthermore, the heterozygous DQB1*0402 allele was present in 5 of these 7 DRB1*0410 heterozygous patients. These results suggest that there is an association between HLA class II alleles (DR4 and associated antigen) and some ITP patients.

Key words: ITP, HLA class II, PCR-RFLP, DR4

第4回 日本組織適合性学会大会

THE 4th JSHI ANNUAL MEETING

JULY 13~15 1995

FUKUOKA

抄 録

大会長 内藤説也

会期 平成7年7月13日(木)~15日(金)

会場 明治生命ホール 明治生命会館内 8 F

〒810 福岡市博多区中州5-6-20

TEL 092-291-2711 FAX 092-291-8838

大会事務局 福岡大学病院 腎センター内

〒814-80 福岡市城南区七隈7丁目45-1

TEL 092-801-1011

FAX 092-861-7110

シンポジウム 腎移植におけるHLAタイピングの意義(S1～S6)

S1

HLA適合を重視した公正な腎提供・仲介システムの必要性

虎の門病院輸血部

○金 信子、高橋孝喜

サイクロスポリンの登場以降、HLA不適合腎移植の成績、腎生着率も格段に向上した。これを根拠に、“take one, share one”に象徴される、HLAの適合を軽視した“地域的事情による”不適合移植が稀ならず行われた。しかし、米国の報告では、長期的な腎機能がHLAの適合の如何により著しく異なるので、地域内の不適合腎移植より遠方の適合腎移植を追求すべきとされる。再確認されるべきは、死体腎移植が非血縁者間腎移植であり、公平な分配が最重要という原則である。recipient選択は第三者が行うべきで、受持患者を優先すべき移植医が関与すべきでない。患者とドナー間のHLA適合確率は、非血縁者間骨髄移植に準じて、死体腎移植希望登録者数と日本のHLAの頻度・分布から求め得るが、骨髄バンクの移植例数をみても適合度の高い死体腎移植を実施し得ると考える。救命救急医、コーディネータ、HLA検査部門が協力して、公正な腎提供・仲介のシステムを作る必要がある。

S2

死体腎移植におけるHLA-A, B, DRB1適合性の重要性の検討

大阪府立病院・臨検*、阪大・泌尿器科#

○安波礼子*、久山芳文*、船附好子*、松井美智代*、多田正義*、吉原博子*、
小角幸人#、

移植施設(泌尿器科)：阪大、大阪市大、近大、大阪府立病院、大阪医大

【目的】死体腎移植の移植成績向上には、HLA適合性が重要な因子といわれている。今回我々は、HLA-A, B, DRB1適合性と移植予後の関連性を解析した。

【方法】最近3年間に大阪府下で行われた死体腎移植症例73名について、HLA-A, B, DRB1適合性の臓器生着率に及ぼす影響を検討した。DRB1はretrospectiveなタイピングである。生存率の算定にはKaplan-Meier法を、移植腎の生着率の有意差検定にはgeneralized Wilcoxon法を用いた。

【結果】すべてのローカスで、ミスマッチ0の症例の生着率がミスマッチ1のそれを上回っていたが、HLA-A適合性のみに有意差が認められ(p<0.05)、死体腎移植におけるHLA-class Iの適合性の重要性が、改めて認識された。

S3

死体腎移植におけるHLA class II genotypingの意義

国立循環器病センター研究所、兵庫県立西宮病院腎移植センター、大阪府立病院HLA検査室、大阪大学医学部泌尿器科

○佐田 正晴、辻 隆之、橋本 光男、市川 靖二、福西 孝信、多田 正義、園田 孝夫、高原 史郎、奥山 明彦

死体腎移植におけるclass II genotypingの意義を検討するため、阪神地区で死体腎移植を施行したrecipientおよびdonorのclass II genotypingを行い以下の結果を得た。

- 1.血清学的に同定されたDR抗原とgenotypingによるDR抗原との間に20%の不一致を認めた。
- 2.不一致抗原はDR52関連抗原で高率に認められた。
- 3.急性拒絶反応の発生にDP抗原の関与が認められた。
- 4.Recipient/donor間のDR分子上のアミノ酸不一致率と拒絶反応発生に相関を認めた。
- 5.DR分子上のmismatchedアミノ酸グルーピングからpermissible DR groupの存在が示唆された。

Class II genotypingはdonorおよびrecipientのclass II抗原subtype, blankを正確に決定でき、最適な組み合わせで移植可能なことから成績の向上、再移植の防止やrisk factorの軽減に重要と思われる。DR分子のアミノ酸解析から新しいmismatchの概念も示唆され、genotypingが死体腎移植の成績向上に果たす役割は重要で意義深いと考えられる。

S4

ハプロタイプ適合腎移植症例におけるHLA-DNAタイピングの意義

1) 広島大・2 外 2) 東京医科歯科大・難治研

○福田康彦¹⁾、星野修司¹⁾、新宅究典¹⁾、田代裕尊¹⁾、古川雅博¹⁾、桜田 瞳¹⁾、土肥雪彦¹⁾、伊達是志²⁾、木村彰方²⁾

[目的] HLA各locusをDNAタイピングにより、さらに正確なタイピング及びサブタイピングが可能となり、生体血縁間腎移植における各locusでのマッチングの意義をretrospectiveに解析した。

[方法] 1ハプロタイプ適合生体血縁間腎移植症例65ペアの、HLA-A、DRB1、DQB1、DPB1 locusの遺伝子タイピングをPCR-SSOP法により行った。ClassII 3領域に関しては、PCR-DNA conformation polymorphism (DCP)法によるマッチングも同時に行った。

[結果] DRB1 1-ミスマッチ例が54ペアあり、それらを中心に解析を行った。11例のDQB 0-ミスマッチ例のうち7例(64%)がグラフト廃絶に陥っていたのに対して、43例のDQB 1-ミスマッチ例のうちグラフト廃絶例は10例(23%)のみであった(P value=0.0006)。DPB1に関しては有意な移植成績に対する影響は認められず、DQB適合性による悪影響が目立った。ClassI A locusにおけるDNAタイピングでは、血清学データと比較して、約8割の症例でサブタイピングが可能となり、27症例でブランクを明らかにできた。また、2ペアにおいてマッチングカテゴリーも変更され、今後有意義なアプローチであることが示された。

S5

1ハプロタイプ適合間腎移植におけるHLA DRB1とMLR
東京女子医科大学腎臓病総合医療センター、
○安尾美年子、田辺一成、伊藤文夫、東間 紘、太田和夫

(目的) HLA 1ハプロタイプ適合家族間において、DRB1タイピングをドナーの選択基準として用いるために1ミスマッチDRB1各タイプ間のMLRの強さを調べ、これらと腎移植成績との関連についても検討した。(方法) MLRは 5×10^4 個/wellに調製した反応細胞・刺激細胞を用いて、6日培養で行い、DRB1タイピングはmodified PCR-RFLP法により行った。(結果) DRタイプによりMLR S.I.の強さに差が認められた。刺激細胞のDRタイプが1ミスマッチであるMLRにおいて、ミスマッチDRのタイプ別にMLR S.I.を比較検討したところ、DR2 (15) が最も高く、DR14,DR11,DR13,DR12,DR4,DR9,DR8の順に低値であった。このうちDR13,DR14,DR15についてはそれぞれミスマッチDR間の $\beta 1$ ドメインにおけるアミノ酸の相違数とMLR S.I.との間に相関が認められた。また各DRのMLRの強さと移植成績にも関連がみられた。

S6

HLA分子のアミノ酸レベルでの適合度からみた腎移植成績の検討
福岡大学病院腎センター
○小河原悟、道永功、村田敏晃、内藤説也

【目的】 HLA抗原は多くの抗血清や遺伝子の同定により細分化されてきたが、レシピエントの選択はそれだけ狭まる。HLA分子のアミノ酸配列をもとにA、B抗原で10種、DR抗原で5種のグループに分類し、新たに適合度(Residue Matching:RM)を求め、従来のHLA抗原の適合度(Conventional Matching:CM)との移植腎生着率を比較した。

【対象及び方法】 九州腎臓移植研究会で登録された544例(生体)と183例(死体)。AB、DRのCMとRMのミスマッチ数毎に生着率を求めた。【結果】 5年及び10年生着率ではAB-RM-ミスマッチ数0(MM0)(272例)はAB-CM-MM0(116例)と有意差なく、AB-CM-MM1(208例)より有意に高かった。DRについてはミスマッチ数、RM、CMとも有意差はなかった。【結論】 レシピエント選択時にまずCMでミスマッチ数0を選び、該当者なければRMでミスマッチ数0を選択した方が移植成績が改善する可能性がある。

一般演題(1~52)

1

中国シルクロード周辺諸民族のHLA抗原頻度

湘南赤十字血液センター、新疆大学生物学科¹⁾、上海復旦大学生命科学院²⁾、
横浜市立大学医学部眼科³⁾、東海大学医学部分子生命科学⁴⁾

〇安藤 等、水木信久³⁾、庚 燎⁴⁾、李国強¹⁾、庚鎮城²⁾、宮田義久、
脇坂和男、大野重昭³⁾、猪子英俊⁴⁾

我々は中国シルクロード周辺諸民族である北方漢民族、ウイグル族及びカザフ族を対象としてHLAタイピングを行い、日本民族と比較解析するとともに日本民族の起源と日本民族の歩んだ日本列島へのルートを人類遺伝学的に探索を試みたので報告する。HLA抗原解析では日本人の抗原頻度と比較して、北方漢民族はA1, B53, Cw7, DQ3, DQ2抗原頻度の上昇、A2, A24, B52, DQ4抗原頻度の低下、ウイグル族はA11.1, A30, B53, DR3, DR7, DQ2抗原頻度の上昇、A24, A33, B46, B52, DR8.1, DR9, DQ4抗原頻度の低下、カザフ族はB53, DR3, DR7, DQ2抗原頻度の上昇、B52, DQ1抗原頻度の低下を認めた。これらのことからHLA抗原頻度の分布は各民族とも日本人とやや異なっていた。また遺伝子解析も検討したので加えて報告する予定である。

2

オロチョン族のHLA class II allele の特徴

ハルピン医科大学克山病研究所¹⁾、中外製薬診断科学研究所²⁾、浜松医科大学微生物学教室³⁾

武 常莉¹⁾、松原亨一²⁾、小出幸夫³⁾、吉田孝人³⁾

中国東北部の黒河地方に住むオロチョン族で3世代無血縁者75名について、HLA-DRB1、-DQB1、-DPB1 allele のDNA typing をTMA-HPA法を用いて実施したところ特徴ある所見を見い出したので報告する。

この民族は日本人の近縁集団の1つであり、地理的にも北海道、東北地方に近く、民族の移動などを考えながら日本人のallele frequencies(%)と比較して検討した。特徴のあるものをあげると次のごとくである。()内は日本人のallele frequencies %である。

DRB1 allele: *0401: 11.5% (1.8%), *05: 0.6 (12.5), *1101: 8.8 (2.1), *1103: 1.4 (0), *1201: 11.5 (3.9).

DR13: 2.7, DR14: 19.6 は allele を typing で決定できなかったのでnew alleles が予測された。

DQB1 allele: *0201: 4.1 (1.3), *0401: 0.7 (13.2), *0603: 4.7 (20.4).

DPB1 allele: *0401: 17.6 (4.8), *0501: 12.2 (39.0), *0901: 1.4 (8.6), Blank(not detected): 20.3. 日本人の場合、現在用いている16 probes でDPB1 allele typing は可能である。

以上の結果から、オロチョン族には新たなHLA class II allele の存在が予測され、今後、DNA sequencing が必要とされる。

3

コロンビアとジャマイカ黒人のHLAハプロタイプの分布

¹ 鹿児島大学医学部ウイルス学、² 国立遺伝学研究所遺伝情報センター

○Michelle Blank¹、桑山昌洋¹、今西 規²、屋敷伸治¹、藤吉利信¹、園田俊郎¹

「目的」南米、カリブ海沿岸諸国の黒人にはHTLV-Iが浸淫していることが知られている。今回、我々はコロンビアとジャマイカ黒人集団の民族学的遺伝背景を明らかにするために、HLAハプロタイプの分布を解析したので報告する。「方法」78名のコロンビア黒人とジャマイカ黒人の2グループ (Jamaican #1: 51名、Jamaican #2: 47名) について、HLA検査を行いHLA遺伝子頻度とハプロタイプを解析した。「結果と考察」HLA-A,B遺伝子頻度からNeighbour-joining法を用いて系統解析を行った結果、Jamaican #1はコロンビアの黒人と関連性が強く、Jamaican #2はセネガル系およびザイール系黒人と強い関連性を認めた。3座位HLAハプロタイプの分布を解析するとコロンビア人とJamaican #1では、アフリカ系黒人、白色人種及び南米インディアンと同一のHLAハプロタイプが高頻度に認められたが、Jamaican #2ではアフリカ系黒人のHLAハプロタイプが高頻度であった。以上の結果より、コロンビアとジャマイカの黒人は、アフリカ系黒人を起源とし、白色人種および南米インディアンとの混血であることが示された。

4

鹿児島県地域住民HLAハプロタイプの分布と源流

鹿児島大学医学部ウイルス学

○桑山昌洋、屋敷伸治、藤吉利信、園田俊郎

「目的」我々は、これまでに鹿児島県地域のATL患者が平均的日本人と異なるHLAハプロタイプの分布を示すことを明らかにしてきた。この特徴的HLAハプロタイプの背景を解析する目的で、鹿児島県地域住民のHLAハプロタイプ頻度とその分布を解析したので報告する。「方法」鹿児島県地域住民241名とその81家系のHLA検査を行い、HLA遺伝子頻度及びHLAハプロタイプ頻度の分布を解析した。対照として、11HWにおける日本人及び近隣諸国のHLA遺伝子頻度と比較検討した。「結果と考察」鹿児島県地域住民のHLA遺伝子頻度は、本州中央部と北九州地域の日本人集団と比較するとCw1, B54, B59, DR14が高頻度に対し、Cw7, B39, B46, DR8, DR12は低頻度であり、両集団の遺伝背景に差が見られた。5座位HLAハプロタイプ (HLA-A,B,C,DR,DQ) の分布でも、両集団の遺伝背景に差が見られた。3座位のHLAハプロタイプ (HLA-A,B,DR) を、11HWで報告されたモンゴロイド系民族と比較すると北方アジア大陸系、東南アジア系、南方太平洋系及び南米インディオ系の民族のHLAハプロタイプとそれぞれ同一の特徴的なハプロタイプを見いだした。鹿児島県地域住民の民族的背景は、本州中央部と北九州地域の日本人集団とは異なる集団から構成されていることが示唆された。

5

日本人集団にみられた8種類の DRB1*12ハプロタイプ

1)兵庫県立西宮病院、2)シオノギ製薬・診断医学部
 ○橋本光男¹⁾、木下朋子¹⁾、山崎美保¹⁾、市川靖二¹⁾、
 福西孝信¹⁾、兼重俊彦²⁾、森部豊輝²⁾

「目的」東南アジア系集団に特徴的なDR12抗原系について日本人集団でのクラスIIハプロタイプ及び、クラスI抗原との連鎖について検討した。「対象・方法」日本人非血縁者2046名の血清学的及び、PCR-SSOP法によるDNAタイピング(DRB1, DRB3, DQA1, DQB1, DPB1)で検討した。遺伝子頻度、ハプロタイプ頻度はBaur, Dailov等の方法で算出した。

「結果」①DRB1*12の遺伝子頻度は、DRB1*1201:3.3%, DRB1*1202:2.2%, DRB1*1203:0%で、DRB1*1201-B22N (HF:0.01%), DRB1*1202 - B13(HF:1.3%)の連鎖を認めた。②DRB1*1201は4種類、DRB1*1202は3種類のクラスIIハプロタイプを推定できた。③そのうちの6種類は、それぞれ特定のHLA-B抗原と強い連鎖を示し、8種類のDR12ハプロタイプが観察された。「考察」日本人集団に於いて8種類のDR12ハプロタイプを認め、モンゴロイド系民族、集団の移動、拡散を考察するうえでの一つの指標になると考えられる。

6

HLA-B抗原非発現家系について

日赤中央血液センター¹⁾、東京都赤十字血液センター²⁾

○田中秀則¹⁾、澤中一恵¹⁾、坂内 誠²⁾、宮本正樹¹⁾、徳永勝士¹⁾、赤座達也¹⁾、田所憲治¹⁾
 十字猛夫¹⁾

【はじめに】これまで日本人において、2例のクラスI抗原欠損症例が報告されている。今回われわれは、骨髄移植を目的として白血病患者家族のHLAタイピングを行ったところ、HLA-B抗原非発現遺伝子('null' allele)の存在が推定され、その検討を行ったので報告をする。

【方法】患者、同胞及び両親を含む4人のHLAタイピングを、クラスIについては通常のLCT法で、クラスIIについてはMPH法によりDRB1のDNAタイピングを行った。また、HLA-Bの対立遺伝子を確認するためPCR-SSCP法によりHLA-BローカスのDNAタイピングを行った。

【結果】家族のHLAタイピング結果から、父親は a:A2-B62-Cw4-DR4, b:A24-B52-Cblank-DR2 のハプロタイプを有し、母親は c:A24-Bnull-Cblank-DR2, A24-B59-Cw1-DR4 のハプロタイプを有していた。HLA-B抗原非発現を含む母親由来のハプロタイプ A24-Bnull-Cblank-DR2 は患者及び同胞に遺伝していると考えられた。また、HLA-BローカスのDNAタイピングにおいて、母と患者においてB*5201に非常に近いSSCPパターンが確認された。現在、このnull alleleの塩基配列について検討中である。

7

HLA-A2, A23, A28抗原を認識するモノクローナル抗体の作製

愛知県赤十字血液センター

○八子文恵、太田浩敏、水野伸一、加藤道、大矢健一、古田求、村瀬隆治、
倉知透、神谷忠、小澤和郎

【目的及び方法】HLA-A2 transfectantを作製しBALB/cマウスに免疫することによりHLA-A抗原に対するモノクローナル抗体(MoAb)の作製を試みた。PA法, IA法によりHLA-Aのtransfectantとは反応し、HLA-Bのtransfectantとは反応しないクローン(1-145)を確立し特異性を調べた。【結果及び考察】1)1-145は、LCTではHLA-A2, A23, A28に対してのみ特異的に反応した。2)1-145は、PA法ではHLA-A2, A23, A28に対して強く反応し(x1024)、A24に対して弱い交差反応を示した(x16)。次に1-145が単一クローンであることを再確認するために吸収試験を行った。1-145を予めHLA-A2を発現する細胞で吸収させたところ、HLA-A2, A23, A28との反応性はすべて消失した。同様に1-145をHLA-23を発現する細胞で吸収させたところHLA-A2, A23, A28との反応性はすべて消失した。以上のように1-145は、HLA-A2, A28のみならずA23にも反応するMoAbであり、LCTによるタイピングにも利用できる抗体であった。

8

HLA-B5103について(1)

1) 長野県赤十字血液センター、2) 浜松赤十字血液センター

○大田智¹、斉藤敏¹、橋爪清隆¹、山田英世¹、林律子²、高倉清²、
小松考良²

【はじめに】B5103の血清学的な特徴及び性状について発表する。

【坑血清による反応】11IHWのAS105(B5)に提出された50本のB5CRG坑血清中5本(10%)にしかB5103は反応しなかったが、ローカル血清においても88本中13本にしか反応は見られなかった。B5103に反応する坑血清は、全てB51、B52、B18、B7801の特異性も有していた。AHG-LCTによりLCTで反応しなかったB5CRG坑血清21本中5本にB5103の特異性が確認された。

【結語】B5103は日本の中央に位置する5県においてのみ見つかっているが、反応する坑血清が少ないこと、血清に対する反応が弱いことからBブランクとなっている可能性がある。Cw14は日本人でB5103を除きほとんどB51、B44としか連鎖しないので、これら抗原のないときにはCw14の存在がB5103の存在を示唆している。

9

HLA-B5103について(2)

1) 長野県赤十字血液センター、2) 浜松赤十字血液センター

○斉藤敏¹、大田智¹、橋爪清隆¹、山田英世¹、林律子²、高倉清²、
小松考良²

[はじめに] B5103はなぜ反応する抗血清が少なく反応が弱いのかにつき発表する。

[細胞表面上の抗原量] Bw4モノクローナル抗体(Tok453a)を使いFlow Cytometryにより、それぞれ3パネルのB51及びB5103の陽性率を比較したところ、平均で、B51の88.9に対しB5103では12.8であった。

[結語] B5103の細胞表面への抗原の発現の少なさが血清との反応が弱い一つの要因であると思われる。前の演題で発表したB5103と反応する抗血清の特異性から、B5CRG特異的アミノ酸残基は45、67、171と思われ、アミノ酸残基171番目がLCTで反応する抗血清の重要な場所とおもわれる。また力価の同じ血清であってもLCTで反応する血清とAHG-LCTでしか反応しない血清があることから、エピトープによって、抗体のくっつき易い場所とそうでない場所があることが推測される。

10

HLA-B60, B61, B48グループを識別するPCR-SSP法

—血清学的タイピングの補助的方法として—

日赤中央血液センター

○小川篤子・林 玲・柏瀬貢一・渡辺嘉久・徳永勝士・赤座達也・田所憲治・十字猛夫

[目的] 血清学的方法でHLA-Bタイピングを行うとき、HLA-B61のみに特異性を持つアロ抗血清がないために、B60ホモ接合体とB60/B61ヘテロ接合体の識別はできない。またB48特異的な抗血清の質が悪いときにB60, B61のホモ接合体と、そのB48とのヘテロ接合体(B60/B48, B61/B48)との識別の難しい場合がある。そこで、血清学的にHLA-B40(B60, B61)-と判定された検体について、B60, B61, B48の有無を確定するための簡便なDNAタイピング法を開発した。[方法] B60, B61&B48, B48を特異的に増幅する3組のプライマーを用いて検体のゲノムDNAからPCRを同一条件下で行った。PCRの内部標準として、補体成分C4遺伝子を増幅するプライマーを特異的プライマーと共に加えた。特異的増幅産物の有無を電気泳動で検出してタイピングを行った。[結果と考察] PCR増幅産物の明瞭なバンドがグループ特異的に示され、また内部標準(C4増幅産物)を加えたことにより陰性の判定も容易であった。この方法を骨髄バンクドナーのB40陽性検体のタイピングに用いて明瞭な矛盾ない結果を得た。

11

PCR-RFLP法によるDRB1*0405 variant (DRB1*KOM)の同定

1. シオノギ製薬・診断医学, 2. 慶応大学・医・内科, 3. 日本たばこ産業・東京健康管理センター,
4. 東海大学・医・分子生命科学

○森部 豊輝¹, 兼重 俊彦¹, 五十君 裕玄¹, 平形 道人², 三森 経世², 秋月 正史³, 猪子 英俊⁴

目的 PCR-RFLP法によるHLA-DRB1タイピングにおいて既知のアリルとは異なるRFLPパターンを示した試料KOM (; 日本人由来) のDRB1*04アリルについて塩基配列解析を行った。**方法** DR4グループ特異的に増幅したPCR産物の直接塩基配列決定法及びベクタークローニングによる塩基配列解析を行った。**結果と考察** ①塩基配列解析の結果、KOMのDRB1*04アリルはDRB1*0405のコドン39のCGC (Arg) がCGG (Arg) に塩基置換した、すなわち同義置換を伴う新たなDRB1アリル (DRB1*KOM)であることが分かった。②DRB1*KOMはコドン39の塩基置換により制限酵素Hha Iの認識配列 (GCGC) が消失されるためにRFLP解析を行った場合、DRB1*0405とはHha IのRFLPパターンにより判別可能であった。③KOMのDQB1アリルはDQB1*0401とDQB1*0402であり、DRB1*0405と同様のDQB1*0401との連鎖不平衡が示唆された。④現在までに他の日本人からも同一のアリルを検出しているが、遺伝子頻度は0.1%以下と推測される。

12

HLAクラスII-III領域間に位置するCTG繰り返し配列の多型性の解析

1. 東海大・医・分子生命科学, 2. 放医研, 3. 遺伝研・進化遺伝

○重成 敦子¹, 安藤 麻子¹, 菅谷 公彦², 河田 寿子¹, 成瀬 妙子¹, 深川 竜郎³, 池村 淑道³, 猪子 英俊¹

クラスII遺伝子 (DRA) -クラスIII遺伝子 (CYP21B) 領域間450 kb は、AT rich領域からGC rich領域への分岐点が存在することで注目される領域であり、この領域の構造解析から同定された新遺伝子NOTCH3の5'上流領域は、GC含量の大きく変化する部位であり、CTGやATT繰り返し配列がみいだされた。今回は、CTG繰り返し配列を含む領域約520 bpについて5'側または3'側プライマーの5'末端を蛍光アミダイド試薬でラベルし、PCR増幅後、GENESCAN™ 672ソフトウェアを用いた自動シーケンサーによって多型性を解析した。10th WorkshopのHTC21株についてこのCTG繰り返し配列の多型性を解析したところ、4種の多型性が認められ、最長と最短のallele間にはCTGの6個の繰り返し数の差がみられた。現在、日本人のHTCやNOTCH3との関連が考えられる耳下腺腫などの疾患患者についてこの多型性を検討している。

13

新しい HLA-A26 allele (A26KY) の発見と A26 allele typing

京都府赤十字血液センター, *中央赤十字血液センター, **東京医科歯科大学

○丸屋悦子 石川善英* 林玲* 徳永勝士* 木村彰方** 仁田浩 佐治博夫

HLA-A26 は血清学的に 4 つの split 抗原 (A26.1, A26.3, A26.4, A10SA) に分類される。石川らにより, A26.3 が A*2601 に A26.1 が A2602 に, 他の 2 つの抗原は新しい allele A*2603, A*2604 に対応することがわかっている。我々はこれらの allele と異なる新しい A26 allele (A26KY) を木村らが開発した SSOP 法による A locus allele typing により検出し, その塩基配列を決定した。A26KY は A*2601 の 76 番目のアミノ酸が Ala から Glu に変異したものであった。この部位は T cell receptor の認識部位であること, 抗原ペプチド結合ポケット C, F に面していること, その変異が非極性アミノ酸から酸性アミノ酸へと性状が変化していることから T cell receptor の認識とペプチド結合の特異性に影響を与える可能性がある。また nested-PCR-low ionic strength conformation polymorphism (NPCR-LIS-SSCP) 法による HLA-A26 allele typing を開発した。この方法で現在確認されているすべての A26 allele の typing が可能であった。

14

6 種の新しい HLA-A 対立遺伝子の構造解析

東京医歯大・難研・成人疾患¹、九大・生医研・遺伝²、○伊達是志^{1,2}、木村彰方^{1,2}、笹月健彦²

HLA-A 遺伝子の第 1 から第 3 エクソンを PCR 法により特異的に増幅後 84 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う HLA-A 遺伝子の DNA タイピング法を用いて、既知の何れの反応パターンにも当てはまらない新たな対立遺伝子 [A2 サブタイプ 1 種 (2New)、A24 サブタイプ 3 種 (24New-1, 2, 3)、A26 サブタイプ 2 種 (26New-1, 2) の 6 種] を同定した。このうち 2New は南米インディアン由来の 2 種の HTC に、他の 5 種は何れも日本人パネルに認められた。次にこれらの新たな対立遺伝子の第 2 及び第 3 エクソンの塩基配列を決定した。その結果、2New は A*0204 と類似するがコドン 95 に Val から Leu、コドン 99 に Tyr から Phe への 2 箇所のアミノ酸置換を認めた。また、A*2402 と比較すると、24New-1 はコドン 62 に Glu から Gly、コドン 65 に Gly から Arg、24New-2 はコドン 70 に His から Gln、24New-3 はコドン 76 に Glu から Ala、コドン 79 に Arg から Gly へのアミノ酸置換を認めた。一方、26New-1 は A*2603 とコドン 115 に Gln から Arg、26New-2 は A*2601 とコドン 76 に Ala から Glu へのアミノ酸置換を認めた。このことから、A2 に少なくとも 14 種、A24 に少なくとも 6 種、A26 に少なくとも 6 種のサブタイプの存在が確認された。

15

Identification of two Cw7 alleles in Japanese

¹)Japanese Red Cross Central Blood Center, ²)Dept. Transfusion Medicine, Univ. Tokyo, ³)Inst. Medical Science, Univ. Tokyo, Tokyo, Japan

Huiru Wang^{1,2}, Katsushi Tokunaga¹, Masafumi Takiguchi³, Shoji Kuwata², Tatsuya Akaza¹, Kenji Tadokoro¹, Yoichi Shibata² and Takeo Juji¹

Two alleles encoding HLA-Cw7 antigens, tentatively called C7J1 and C7J2, have been identified in Japanese, by means of a PCR-SSCP method and nucleotide sequencing of full length cDNAs. The sequence of C7J1 showed very high homology to that of Cw*0702. Accordingly the WHO Nomenclature Committee requested us to resequence the Cw7 allele carried by the original cell line JY. The results revealed multiple sequencing errors in the original report and identity between the corrected sequence of Cw*0702 and the C7J1 sequence. On the other hand, the sequence of C7J2 was different from those of the previously described alleles Cw*0701-03, and C7J2 was officially named Cw*0704 by the WHO Nomenclature Committee. Furthermore specific substitutions in the sequences of Cw*0702 and Cw*0704 were confirmed using PCR-RFLP and PCR-SSO analyses. Moreover, an association study with other locus antigens showed positive associations of Cw*0702 with B7, B39 and B67 and of Cw*0704 with HLA-B70.

16

血清学的方法でみつけられたHLA-DR8 variantの塩基配列の解析

日本赤十字社中央血液センター

○柏瀬 貢一、徳永 勝士、林 玲、菅原 直子、
宮本 正樹、赤座 達也、田所 憲治、十字 猛夫

日本人健常者集団より血清学的にDR8+DR11+DR13bの特異性をもつモノクロナール抗体 (NDS40) と反応を示さなかったHLA-DR8 variant (仮にDR8.2Vと命名) を見出し、直接塩基配列決定法により塩基配列の解析を行った結果、DR8.2VはDRB1*0809と同一であった。DRB1*0809は、DRB1*08対立遺伝子群のなかでDRB1*0802との相同性が最も高く、32 (T→C), 34 (A→G), 37 (A→T) 番目のコドンに塩基置換が生じ、32番目と37番目のコドンは、アミノ酸の置換が生じていた。NDS40と反応するHLA分子 (DR8, DR11, DR13の一部) が共通して持つアミノ酸配列は、32番目から37番目であることから、NDS40はこの部位を認識していると推測された。DR8.2Vでは、32番目、37番目にアミノ酸の置換が生じているため、NDS40との反応を示さなかったと考えられた。DR8.2Vのハプロタイプは、A2-Cw7-B60-DR*0809-DQA1*0401-DQB1*0402と考えられた。DRB1*0809とDRB1*0802のDQとの連鎖は同様と思われることから、DRB1*0809はDRB1*0802と他のDRB遺伝子 (DRB1*1401, 1405など) 間の遺伝子変換により生じたまれなDRB1対立遺伝子であることが推測された。

17

DR10に連鎖する新たなDQA1対立遺伝子

1) 九大 生医研 遺伝 2) 東京医歯大 難研 成人疾患 (異常代謝)

○ 安永晋一郎¹⁾、木村彰方²⁾、笹月健彦¹⁾

我々は昨年の本学会において、DQA1*0101とDQA1*0104は、第2番残基(GACvs GGC)のみならず第199番残基(GCCvsACC)にも塩基配列の違いを認め、前者は、DRB1*0101,*0102,*0103-DQB1*0501と連鎖し、後者はDRB1*1401-DQB1*0502,*05031やDRB1*1405,*1407-DQB1*05031と連鎖することを報告した。DRB1*1001-DQB1*0501と連鎖するDQA1対立遺伝子は、我々の開発した第3および第4エクソンを対象としたPCR-SSOPによる解析により第199番残基はGCCであることがわかったが、Fogdellらは第1エクソンを対象としたPCR-SSP法による解析で第2番残基はGGCであることを報告した。そこで、新たな対立遺伝子の存在を予想し、全長cDNAの塩基配列を決定した。この新たな対立遺伝子は、第2番残基がDQA1*0104と同じで第199番残基がDQA1*0101と同じであることから、DQA1遺伝子内での遺伝子変換が起こった可能性が示された。

18

日本人で見いだされたHLA-DR11グル-7°の新しいアリル

大阪府赤十字血液センター¹⁾、東京都赤十字血液センター²⁾、日本赤十字社中央血液センター³⁾○ 小西 佳津江¹⁾、高 陽淑¹⁾、大谷 智司¹⁾、永尾 暢夫¹⁾、柴田 弘俊¹⁾、大久保 康人¹⁾、山口 英夫¹⁾、坂内 誠²⁾、森山 哲³⁾、林 玲³⁾、徳永 勝士³⁾、十字 猛夫³⁾

【目的】当センターでは、DRのタイピングをSerologyとPCR-RFLP法で行っているが、今回その結果が不一致となる例に遭遇し精査したところDR11グル-7°の新しいアリルと思われる成績を得、DRB1第2エクソンの塩基配列についても調べたので併せて報告する。

【方法】SerotypingはLCT法で行い、DNAのタイピングはPCR-RFLP法、PCR-MPH法、及びPCR-SSCP法を実施した。また、DRB1遺伝子の塩基配列の決定は、DR52グル-7°DRB1遺伝子に特異的なプライマーによるPCRで増幅後、直接シーケンス法で行った。

【結果】Serotypingでの結果はDR11/14、PCR-RFLP法ではDRB1*14/08、PCR-MPH法ではDRB1*11/08/14のいずれかのタイプ、PCR-SSCP法ではDRB1*1405/11Variantとなった。更に塩基配列決定の結果、現在までに報告されているDR11グル-7°のアリルと異なることがわかった。得られた配列はDRB1*1101と類似するが73番目のコドン内に2塩基の相違GCG→CTG(Ala→Leu)が認められた。

19

日本人を対象にしたHLA-B座のPCR-SSP法によるタイピング

国立佐倉病院 臨床検査科・臨床研究部

○酒巻建夫、山崎正明、前島基志、柏原英彦

目的：HLA-B遺伝子は多型性が強く、部位も第2、第3エクソンにわたり、さらにA、Cや偽遺伝子との類似性が高くDNA法の導入が遅れている。われわれは簡便かつ迅速に検査できるPCR-sequence specific primers(SSP)法を開発してきたが、今回、B座のSSP法を検討したので報告する。方法：B遺伝子の多型性に対応したSSP用のプライマーを合成し、日本人のB座抗原を検出できるように80種類以上の、プライマーの組み合わせを作成した。パネルDNAのPCR増幅の有無を抗血清法のタイプと比較検討した。結果：抗血清レベルで日本人のタイピングに利用できる単一あるいは複合特異性の約60組のプライマーを選んだ。日本人のB61では第2エクソンの配列が異なることを暗示するデータが得られた。結語：B座のDNAタイピングが可能であるが、多数の組み合わせのプライマーを使用するこのSSP法はスプリットの決定や精度管理に対して簡便で有効な方法と考えられた。

20

PCR-SSCP法を用いたHLA-Bアレルの解析

*¹⁾東京都赤十字血液センター, *²⁾日赤中央血液センター○坂内 誠^{*1)}, 林 玲^{*2)}, 徳永勝士^{*2)}, 田中秀則^{*2)}, 小川篤子^{*2)}, 植木純一^{*1)},
藤澤 洵^{*1)}, 十字猛夫^{*2)}

昨年本学会でHLA-B40 group について報告した方法を発展させ、他のHLA-B group についてもアレルタイピングを試みた。exon 2 の 5' 部位の塩基配列を認識する4種類の sense primer と、intron 3 部位の antisense primer により、exon 2 と exon 3 の両方を含む領域(0.8kb)を増幅した(1st-PCR)。このPCR産物を鋳型とし、exon 2 または exon 3 のみを、それぞれ再度増幅(2nd-PCR)し、SSCP法により解析した。これまでB40 group の他、B5, B7, B16, B18, B22, B27, B35, B37, B44, B46, B48, B59, B67 等を試みたが、1st-PCR で、各血清学的 group から予測される primer pair に特異的な増幅が可能だった。標準アレルサンプルや、血清学的 split 抗原を有するサンプルを用い、2nd-PCR の増幅産物を SSCP 法で解析したところ、一部に分離不能なアレルの組み合わせは残るものの、ほとんどのものは区別された。この方法で、血清学的タイプ既知のサンプルについて、ほぼすべてのHLA-B座のアレルタイピングが可能と考えられる。

21

PCR-SSP法によるHLA-C alleleのDNAタイピング

湘南赤十字血液センター、東海大学医学部分子生命科学¹⁾○安藤 等、水木信久¹⁾、山本理絵、宮田義久、脇坂和男、猪子英俊¹⁾

PCR-SSP法によるHLA-C allele遺伝子の遺伝的多型性解析をDNAタイピングで試みた。血清学的にタイプされた96人の健常日本人末梢血より得られたDNAを対象にHLA-C遺伝子の各alleleに特異的な塩基配列のみを特異的に増幅するprimer 20種を用いてPCRを行い、アガロース電気泳動により解析した。HLA-C allele特異的PCR法により、既知の抗原特異性を決定するHLA-C遺伝子は全て増幅可能であった。このうち8タイプは血清学的特異性に対応しており、Cw5とCw8はそれぞれ複数のサブタイプが存在する可能性が考えられた。一方血清学的には困難なタイプの存在がDNAレベルでタイピングできることが明らかになった。

22

PCR-RFLP法によるHLA-DRB4遺伝子のDNAタイピング

1). 東海大・医・分子生命科学、2). 兵庫県赤十字血液センター、3). 大阪市大・医・小児科
○成瀬妙子1)、河田寿子1)、能勢義介2)、一色 玄3)、猪子英俊1)。

HLA-DRB4遺伝子は、DR4, DR7, DR9抗原と連鎖する遺伝子で、血清学的特異性のDR53をコードし、現在までにDRB4*0101, 0102, 0103の3種の対立抗原が公認されている。これまでDRB4遺伝子は詳細な解析が行われていなかったが、DR53関連抗原と相関する疾患は数多く報告されている。そこで今回我々はHLA-DRB4遺伝子の多型性の解析を目的として、PCR-RFLP法によるDRB4遺伝子のタイピングを試みた。2組のプライマーを用いて、既知HLA-DRB4のホモ接合体パネル細胞のDRB4遺伝子の第2エクソン、第3エクソンをそれぞれPCR法で増幅後、第2エクソンはBsp1286I, 第3エクソンはEae Iの制限酵素で切断を行ったところ、3種の対立遺伝子のPCR-RFLP法での判定は、既知の対立遺伝子と一致し、3種の識別が可能であったことから、有用と考えられた。現在日本人における頻度や連鎖などについて解析を行っている。

23

日本人集団におけるDQA1*03アレル関連ハプロタイプの解析

1)シオノギ製薬・診断医学, 2)兵庫県立西宮病院・腎移植センター, 3)東海大・医・分子生命科学
 ○兼重 俊彦¹⁾, 森部 豊輝¹⁾, 五十君 裕玄¹⁾, 橋本 光男²⁾, 木下 朋子²⁾,
 福西 孝信²⁾, 猪子 英俊³⁾

【目的】日本人集団に高頻度に見られるDQA1*03アレル関連のハプロタイプの解析を行った。

【方法】①DRB1、DQB1、DQA1の第2エクソンを対象としたDNAタイピングにはPCR-RFLP法またはPCR-SSOP法を用いた。②DQA1*03011と0302を区別する為にDQA1の第3エクソンを対象としたPCR-SSOP法の他に、第2エクソン内のDQA1*03特異的な配列とコドン160の多型性に対応したPCR-SSP法を便宜的に用いた。

【結果】①DQA1*03011と連鎖不平衡を示すDQB1アレルは全て0302であり、一方DQA1*0302とタイプされたもののDQB1アレルは多様であった。②幾つかのDRB1アレルには2種類以上のDQA1-DQB1ハプロタイプが観察された。詳細な解析の結果、DRB1*0405では高頻度に存在するDQA1*0302-DQB1*0401ハプロタイプの他に、DQA1*03011-DQB1*0302、DQA1*0302-DQB1*0302が少数例ながら観察され、前者のハプロタイプではB35抗原との連鎖不平衡を認めた。【考察】Bローカスとの連鎖不平衡を含めた検討の結果、日本人集団でのDQA1*03関連ハプロタイプの多様性が示され、幾つかの進化系統が存在することが示唆された。

24

INNO-LiPA (Line probe assay) 法を用いたHLA class II alleleの決定

国立循環器病センター研究所、神奈川県赤十字血液センター、東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門、兵庫県赤十字血液センター

○佐田 正晴, 大橋 寿美, 辻 隆之, 中嶋 文明, 成瀬 妙子, 猪子 英俊, 荒木 延夫, 能勢 義介

INNOGENETICS社により開発されたINNO-LiPA DRBおよびDPBキットによりDRB, DPB alleleの決定を行い本法の検討を行った。本法の原理は、ビオチン化されたPCR産物をoligonucleotide probeが平行に固定されたmembrane上で特異的にhybridizeさせるreverse hybridizationに基づいている。Hybridization後streptavidinをラベルしたalkalinephosphataseが結合しBCIP/NBTを基質とした呈色反応により各alleleの決定が行われる。既にPCR-RFLP、PCR-SSCP法によりalleleが決定している細胞を用い本法により決定されたalleleとの一致率およびprobeの検討を行った。DRB1+3+4+5の検討には52細胞を用い他法との一致alleleは96%、DR4-specificでは20細胞、40 allele中39 alleleが一致(98%)、またDPB1では79細胞、158 allele中155 allele(98%)の高い一致率を認めた。本キットには全ての試薬が含まれ、PCR後2時間でassayが完了し、特別な機器も不要で非常に完成度の高いキットと思われる。また専用解析programにより瞬時にしてalleleの決定が可能である。欧米では既に骨髓移植、臓器移植に導入され高い評価を得ており、12th IHWS technology componentの一部門として現在検討が行われている。

25

H T L V - I 関連ぶどう膜炎における H L A - A 2 グループの D N A typing

¹ 横浜市大眼科, ² 鹿児島大ウイルス学, ³ 鹿児島大眼科, ⁴ 兵庫県赤十字血液センター, ⁵ 東海大分子生命科学

○鍵谷雅彦¹, 大野重昭¹, 園田俊郎², 屋敷伸治², 大庭紀雄³, 上永吉達彦³, 石原麻美¹, 能勢義介⁴, 成瀬妙子⁵, 猪子英俊⁵

H T L V - I は A T L、H A M / T S P の他に様々な慢性炎症性疾患を引き起こすが、なかでも眼科領域における H T L V - I 関連ぶどう膜炎 (H A U) は新しい疾患概念として、その発症メカニズムが研究されている。調節因子である tax をはじめとするウイルス蛋白の認識における class I 抗原の関与を考察する上に、class I 抗原遺伝子の D N A typing を施行することは有意義であると思われる。今回我々は、H L A - A 2 グループに対して P C R - R F L P 法による D N A typing を試みた。第 2 exon および第 3 exon を A 2 グループ特異的に増幅する primer を設定し、第 2 exon は一回の P C R で、第 3 exon は nested P C R でそれぞれ理論的に予想された長さの D N A fragment を電気泳動で認めた。第 2 exon は 2 種類の制限酵素で、また第 3 exon は 4 種類の制限酵素を使用することにより理論的に D N A typing が可能であり、現在、症例を増やして検討を進めている。

26

らい患者のぶどう膜炎と H L A - D R B 1, D Q B 1 対立遺伝子

1) 国立療養所多磨全生園・眼科, 2) 東京大・眼科

3) 埼玉医大・医療センター・輸血部

○上甲 覚¹⁾・沼賀二郎²⁾・藤野雄次郎²⁾・増田寛次郎²⁾

平田蘭子³⁾・前田平生³⁾

要約：我々は、日本人らい患者におけるぶどう膜炎と H L A 分子の関与について検討した。対象は、らい患者 85 例で内訳は、ぶどう膜炎の既往のある者 44 例、ない者 41 例で、対照群として正常健康人 100 例を用いた。H L A の D N A タイピングは P C R - S S C P 法と P C R - R F L P 法を施行し決定した。血清学的タイピングにおいてぶどう膜炎の既往群 vs 対照群では D R 2 は 35 例 (79.5%) vs 35 例 (35.0%) 相対危険度 7.1, D R 5 3 は 16 例 (36.4%) vs 69 例 (69.0%) 相対危険度 0.26 と有意な差を認めた。対立遺伝子においてぶどう膜炎の既往群 vs 対照群では H L A - D R * 1 5 0 1 が 2 3 例 (51.1%) vs 1 2 例 (12.0%) 相対危険度 8.0, D R * 0 4 0 5 は 2 例 (4.4%) vs 2 6 例 (26.0%) 相対危険度 0.14, D Q B 1 * 0 6 0 2 は 2 2 例 (48.9%) vs 1 1 例 (11.0%) 相対危険度 8.1, D Q B 1 * 0 4 0 1 は 2 例 (4.4%) vs 2 6 例 (26.0%) 相対危険度 0.14 であった。ぶどう膜炎のない群 vs 対照群では H L A - D R * 1 5 0 1 が 1 5 例 (36.6%) vs 1 2 例 (12.0%) 相対危険度 4.2, D Q B 1 * 0 6 0 2 は 1 4 例 (34.1%) vs 1 1 例 (11.0%) 相対危険度 4.2, D Q B 1 * 0 3 0 3 は 4 例 (9.8%) vs 3 4 例 (34.0%) 相対危険度 0.21 であった。らい患者におけるぶどう膜炎の発症要因の一つとして H L A - D R B 1 * 1 5 0 1 と H L A - D Q B 1 * 0 6 0 2 が関連すると示唆された。また、H L A - D R B 1 * 0 4 0 5 と D Q B 1 * 0 4 0 1 は抵抗因子の一つと考えられた。

27

胃癌患者におけるHLA-DNAタイピング

*¹⁾九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門・*²⁾九州大学第二外科○大森真理子・安永晋一郎・笹月健彦*¹⁾・杉町圭蔵*²⁾

要旨：胃癌患者を対象としてHLA-DNAタイピングを行い、HLAが胃癌発症に影響を及ぼす遺伝因子の一つとなるか否かを検討した。胃癌患者48人を対象とし、HLAクラスII遺伝子群(DRB、DQA1、DQB1、DPA1、DPB1)をPCR-SSOP法によりタイピングした。健常対照群の頻度と比較した結果、胃癌患者群では、DQB1*05031が正の相関を示し、DQA1*0103、DQB1*0601が負の相関を示した。またハプロタイプを検討したところ、DRB1*1401-DQA1*0401-DQB1*05031が正の相関を示した。現在HLA-A遺伝子のタイピングを行っており、今後さらに症例数を増やし組織型、発症年齢等との関連についても解析する予定である。

28

炎症性腸疾患とHLA Class II allele

1)九大 生医研 遺伝、2)東京医歯大 難研 成人疾患(異常代謝)、

3)福岡大学第一内科、4)福岡大学筑紫病院消化器科

○吉武佐枝子^{1),3)}・木村彰方²⁾・安永晋一郎¹⁾・岡田光男³⁾・八尾恒良⁴⁾・笹月健彦¹⁾

要旨：クローン病患者111例および潰瘍性大腸炎患者81例を対象とし、HLA Class II遺伝子群をPCR-SSOP法によりDNAタイピングを行ない、疾患感受性に関する遺伝的要因を比較検討した。クローン病ではDRB1*0410,*0405,*1401,*08032, DQA1*0302,*0401, DQB1*05031,*0401,*0402, DPA1*02022, DPB1*0202,*0501の頻度が増加し、DRB1*0101,*1502,*1302, DQA1*0101, DQB1*0501,*0604, DPA1*01, DPB1*0901の頻度が減少していた。ハプロタイプ解析により、疾患感受性はDQB1*04、抵抗性はDRB1*1502により規定されていると考えられた。一方、潰瘍性大腸炎ではDRB1*1502, DQA1*0103,*0104, DQB1*0601, DPA1*0201, DPB1*0901の頻度が増加し、DRB1*0405,*0901, DQA1*0302, DQB1*03032,*0401, DPA1*01, DPB1*0402の頻度が減少していた。ハプロタイプ解析により、疾患感受性はDRB1*1502、抵抗性はDQA1*0302により規定されていると考えられた。DRB1*0405ハプロタイプとDRB1*1502ハプロタイプは、同じ炎症性腸疾患であるクローン病と潰瘍性大腸炎の両者において感受性、抵抗性でそれぞれ全く逆の相関を示し、異なる病因により発症していると考えられた。

29

HLAタイピングと免疫性血小板減少症

関西医科大学 輸血部¹⁾ 同 第一内科²⁾○ 松崎龍典¹⁾、野村昌作¹⁾²⁾、石田萌子¹⁾、香川英生²⁾、福原資郎²⁾

免疫性血小板減少症(ITP)患者を対象として、HLAの抗血清およびDNAタイピング解析を行ったので報告する。対象はITP患者46例で、リンパ球細胞傷害試験によりHLA-A、-B、-C、-DR、-DQ抗原を検索し、PCR-RFLP法にてHLA-DRB1、-DQB1、-DPB1タイピングを施行した。class Iでは、HLA-B75、-Cw1の有意な上昇、HLA-B61、-Cw3の有意な低下を患者群で認めた。class IIでは、DRB1*0410、DRB1*1301、DQB1*0302、DQB1*0402、DPB1*0202、DPB1*0601、DPB1*1001、DPB1*1901の有意な上昇、DRB1*0405、DQB1*0303、DPB1*0201の有意な低下を患者群で認めた。DRB1*0410は10例で検出され、そのうち3例はホモ接合体であり、しかもこの3例は、いずれもDQB1がDQB1*0401のホモ接合体であった。残りの7例中5例において、DQB1がDQB1*0402のヘテロ接合体であった。一部のITP症例では、発症のメカニズムに、DR4およびDQ4関連の遺伝子が重要であると考えられた。

30

スギ花粉症の遺伝要因の解明

九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門

○ 堀 俊雄、上川路信博、笹月健彦

スギ花粉症の遺伝要因の解明のために、患者72名のHLA-class II領域のPCR-SSO法によるDNAタイピングを行った。患者でDPB1*0501、および、DPA1*02022の頻度が健常人集団と比較し有意に増加していた。(DPB1*0501; 79% vs 61%, R.R. 2.47, p<0.01, DPA1*02022; 83% vs 65%, R.R. 2.74, p<0.01)

そこで、HLA-DPA1*02022, DPB1*0501を含む代表的ハプロタイプであるHLA-DR4-DR53-DQ4-DP5の患者末梢血よりスギ花粉抗原特異的T細胞株を樹立し、その認識するHLA分子、抗原ペプチドを解析した。DR4, DR53, DQ4, DP5の中で、DR53, および、DP5に拘束されたT細胞の存在が明らかになった。さらに、スギ花粉の主要抗原であるCry jI, Cry jIIの全長をカバーするオーバーラッピングペプチドを作成し、スギ花粉抗原特異的T細胞の認識部位を同定した。

31

中国における日本住血吸虫性肝疾患発症メカニズムの免疫遺伝学的解析

1) 埼玉医科大学 医動物学 2) 中国江西省寄生虫病研究所 3) 中国上海医科大学 流行病学

○平山謙二¹⁾、陳紅根²⁾、菊池三穂子¹⁾、伊藤美加子¹⁾、尹東²⁾、張紹基²⁾、袁鴻昌³⁾

中国揚子江流域に広がる日本住血吸虫侵淫地では現在でも多数の住民が感染の危険に曝されている。住血吸虫症は急性期より慢性期に重篤となり、肝硬変を初めとする肝疾患を発症する。これら肝疾患の感受性あるいは抵抗性を規定する遺伝的要因を主にHLAを指標として解析し明らかにすることを目的として研究を行なった。玉山地区の住民で過去10年以上前から住血吸虫症の診断を受けたことがあり慢性住血吸虫症の疑いの濃厚なものを対象に血液検査および超音波検査を施行し、WHOの超音波診断基準を用いて肝病変の重症度(正常、grade I, II, III)を判定し、対象者のうち155名のHLA-DRBタイピングを施行した。また、同地区より対象群と年齢性別を合わせた191名のランダムな集団を対照群とした。その結果、集団中の正常群でDRB1*1101が38.7%で有意に増加し($p < 0.05$)、grade I以上でDRB1*1202が24.6%で有意に増加していた($p < 0.05$)。各アレルについて抵抗性群、感受性群あるいは、中立群の3つのカテゴリーに分類し、アミノ酸配列を比較したところポケットIを形成する86番目のアミノ酸が抵抗性群ではグリシン、感受性群ではバリンとなり86グリシンのホモ接合体が肝疾患に抵抗性となることが強く示唆された。

32

ラット膜性腎症モデルのMHCクラスII遺伝子の解析

福岡大学病院腎センター

○野田律矢、道永功、小河原悟、内藤説也

ヒト糸球体腎炎の発症メカニズムは未解決であるが、私共はヒト特発性膜性腎症とHLAクラスII抗原DR2-DQ1との強い相関を見出し、宿主の免疫応答性が関与することを報告している。ヒト膜性腎症の実験モデルであるHeymann腎炎は、ラットのストレインによりその惹起性が異なることが知られ、宿主要因の存在が示唆されているが、未だラットMHCクラスII遺伝子の塩基配列に関する成績は限られている。そこで、この腎炎の動物モデルを作製するための準備として、この腎炎への感受性また抵抗性に対応するラットよりDNAを抽出後、MHCクラスII遺伝子の $\beta 1$ ドメインを特異的に増幅するプライマーを作製し、PCR法によりラットMHCクラスII遺伝子を増幅し、塩基配列の解析を行っている。この腎炎発症の感受性あるいは抵抗性を示す2群に分類し、それぞれのアミノ酸配列の共通性やヒトのHLAクラスII遺伝子との相違を比較した。

33

習慣性流産の免疫療法によるNK活性とリンパ球サブセットの解析

(株)BML細胞生物学課¹⁾ 埼玉医科大学総合医療センター産婦人科²⁾ 同 輸血部³⁾

○西本徹¹⁾ 五十嵐寛¹⁾ 矢島章宏¹⁾ 齊藤正博²⁾ 木下勝之²⁾ 平田蘭子³⁾ 前田平生³⁾

【目的】習慣性流産に対する免疫療法による妻のNK活性とリンパ球サブセットの変動について検討したので報告する。【対象及び方法】1991年5月から1994年12月の間に免疫療法（2週毎に4回皮下免疫）を施行した反復・習慣性流産25例を対象とした。リンパ球サブセットは免疫前後でその都度測定し、NK活性は凍結リンパ球を解凍し一括して測定した。NK活性の変動は夫婦間のHLA抗原の共有数に応じて比較、検討した。【結果】HLA-DRとBローカスに関しては、抗原を一つ以上共有している場合NK活性値は免疫前から免疫中（4週）にかけて低下し、免疫後（8週）もさらに低下した。共有数0の場合には免疫前から免疫中にかけては低下したが、免疫後には有意に上昇した($p < 0.05$)。リンパ球サブセットは免疫前後で特に有意な変化を認めなかった。【考察】習慣性流産の免疫療法におけるNK活性の変化は妊娠の成否よりむしろ夫婦間のHLA抗原の共有数に影響されると考えられた。

34

H B ワクチンに対する免疫応答性の遺伝子支配

*¹⁾九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門、*²⁾国立小児病院

○峯田 聖*¹⁾、谷村 雅子*²⁾、田名 毅、関 衛平、上川路 信博、
木村 彰方、笹月 健彦*¹⁾

ヒト免疫応答の制御機構を解明することを目的に、九州大学医学部学生339名を対象に組換え沈降B型肝炎ワクチンを計画免疫し、PCR-SSO法によるHLA-DNAタイピングをおこない、RIA法によりHBs抗体価を測定した。HBs抗体価のヒストグラムは対数正規分布を示し、連続形質であることが明らかとなった。HLAとHBs抗体産生との相関を明らかにするために重回帰分析をおこなったところ、HLA各locus毎の重相関係数は、DRB1が0.34と有意に高く、DRのpolymorphismによるregulationがひとつは考えられた。一方で、他のlocusの重相関係数をみるとclass I、class IIのどのlocusもそれぞれが寄与しており、全locusをまとめると重相関係数は0.51とさらなる高くなることから、DRのみならずHLA多重遺伝子族のすべてがdynamicに関わってHBs抗原に対する免疫応答を制御している可能性が示唆された。

35

サルコイドーシスにおけるHSP70-1遺伝子とDMB遺伝子の多型解析

1)横浜市立大学医学部眼科 2)東海大学医学部分子生命科学 3)兵庫日赤血液センター
4)日赤医療センター眼科

石原麻美^{1) 2)} ○山形直美²⁾ 成瀬妙子²⁾ 河田寿子²⁾ 大野重昭¹⁾ 水木信久^{1) 2)} 能勢義介³⁾
石田敬子⁴⁾ 猪子英俊²⁾

慢性肉芽腫性疾患であるサルコイドーシスの発症には、DR3、5、6、8グループ抗原のDRB1遺伝子が関与していることを示唆してきた。さらなる疾患感受性遺伝子を探索するため、クラスII分子の抗原提示への関与も示唆されているHSP70ファミリーの1つであるHSP70-1遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域の-110番目の多型解析を行った。方法は、PCR-SSCP法および直接塩基配列決定法を用いた。2つのアリル、HSP70-1*a1、70-1*a2の頻度は患者、正常人で差はなく、HSP70-1の本症への関与は否定された。さらに、クラスII分子の抗原提示に重要な役割を担っていると示唆されるHLA-DMB遺伝子のアリルタイピングを、PCR-RFLP法 (Apa I, Hinf I, Bsr I)を用いて行い、本症の発症に関与しているか否かを検討している。

36

S遺伝子における遺伝的多型性の検索と尋常性乾癬との関連

1)横浜市立大学医学部眼科 2)東海大学医学部分子生命科学 3)東海大学医学部皮膚科

○石原麻美^{1) 2)} 安藤麻子²⁾ 山形直美²⁾ 小澤 明³⁾ 河田寿子²⁾ 成瀬妙子²⁾ 水木信久^{1) 2)}
大野重昭¹⁾ 猪子英俊²⁾

尋常性乾癬は従来より日本人ではHLA-Cw6、Cw7との関連が指摘されている。近年HLA-C領域から160Kbテロメア側に位置し、表皮顆粒層のケラチノサイトに特異的に発現している遺伝子がクローニングされた。S遺伝子と名づけられたこの遺伝子はケラチノサイトの分化調節に関係していると考えられ、尋常性乾癬の発症に第一義的に関与している可能性が疑われる。我々はS遺伝子の第2エクソンにおける多型性を本症患者および健康人の末梢血より採ったDNAを用い、PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism)法および direct sequenceにより、6か所明かにした。そのうち2か所はアミノ酸の変異を伴うものであった。これらの多型部位の本症患者と健康人の間の差異、HLA-Cとの関連を解析し、S遺伝子が尋常性乾癬の発症に関与しているか否かを検討している。

37

献腎移植希望登録者のDNAタイピングによる再検査結果

市立札幌病院 中央検査部、市立札幌病院 腎移植科*

○笹木剛志、西垣文敬、平野哲夫*、竹内一郎*

〔目的〕昨年、1992年9月以降の献腎移植希望登録者を対象としたHLA-DNAタイピングの導入結果について報告した。今回は、それ以前の登録者について、誤判定・スプリット抗原を明らかにする目的で、DNAタイピングによるDR抗原の再検査を試みたので報告する。〔方法〕DNAタイピング未実施 443名の採血を依頼した。DNAタイピングは市販キット（ダイナル社）を用い、DR1～18として判定した。〔結果〕登録者血液の回収率は74.5%（330/443）であった。330名中、15.8%に誤判定が認められ、33.0%でスプリット抗原が明らかとなった。これらの理由によりHLA-DRデータの変更を必要としたのは、1986年以前の登録者で63.3%（57/90）、1987～1990年で53.5%（68/127）、1991年以降では31.9%（36/113）であり、過去の登録者ほど変更を必要とした（全体で48.8%）。今後は、全国的規模でのDNAタイピングによる再検査が必要と考えられた。

38

非血縁者間骨髄移植におけるHLA-DNAタイピングの意義

東京医歯大・難研・成人疾患¹、九大・生医研・遺伝²、日赤・中央血液センター³、国立佐倉病院⁴、
浜松医大・微生物⁵、東海大・分子生命⁶、東海大・医・小児⁷（厚生省骨髄移植調査研究班）

○木村彰方^{1,2}、伊達是志^{1,2}、安永晋一郎²、徳永勝士³、赤座達也³、十字猛夫³、酒巻建夫⁴、柏原英彦⁴、
松原亨一⁵、吉田孝人⁵、成瀬妙子⁶、猪子英俊⁶、加藤俊一⁷、笹月健彦²

我国の公的骨髄ドナーバンクを介した血清学的A, B, DR一致非血縁者間骨髄移植におけるHLA-DNA型一致の意義を明らかにする目的で、ドナー・レシピエント239ペアについてHLA-AおよびすべてのHLAクラスII遺伝子のDNAタイピングを行い、HLA-DNA型不一致とMLCの程度および臨床予後との関連を検討した。A, DRB1, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1座のDNA型不一致はそれぞれ25, 18, 11, 17, 45, 58%の移植ペアに認められ、調査したすべてのHLA座で不一致を認めない移植ペアは24%であった。MLCの大きさは主にDRB1およびDPB1座不一致との相関を示した。一方GvH病発症率および移植後生存率の比較から、移植予後不良は、MLCの程度とは明確な相関を示さないがAおよびDRB1座の不一致と相関することが示され、DPB1座不一致との関連は少ないものと考えられた。また一部のペアではHLA-B遺伝子のDNAタイピングを行い、HLA-B座の不一致は移植予後不良例に多いことが見いだされた。以上より非血縁者間の骨髄移植においては、A, B, DR座の血清学的一致とともにHLA-DNA型的一致を目指すことが望ましいと考えられた。

39

肝、骨髄、腎移植における血漿可溶性HLA抗原のWestern blotting解析
東海大学移植免疫学¹、同小児科²、同移植学I³、京都大学第二外科⁴

○萩原政夫¹、矢部普正²、加藤俊一²、平賀聖悟³、佐藤威³、
田中紘一⁴、山岡義生⁴、辻公美¹

血漿可溶性HLA(sHLA)-class I抗原には、3種類のmolecule formが存在し、Western blotting法によって検出される。今回は、バンドパターンの解析により移植後同抗原の由来を推測した。〔方法〕4組の生体小児肝移植、3組の同種骨髄移植、4組の腎移植例について移植前後経時的に採取した血漿からsHLA抗原を分離、Western blotting解析を行った。〔結果〕3組の肝移植では、移植1月後には、バンドパターンが劇的にドナー型に変化した。全例でドナー特異的なバンドが移植後2週目より現れ、1例についてはレシピエント特異的バンドが3週目に消失、別の1例では5週目においても残存していた。骨髄移植では、ドナー骨髄の生着した時点で、全例でドナーパターンに置換していた。腎移植例は、常にレシピエントパターンであった。〔結論〕sHLA抗原は、骨髄、肝から移植後活発に産生されていると考えられた。

40

HLA-DRB1*13 陽性者はブタ異種ドナーに対して高応答性である

東海大学病院細胞移植医療センター移植免疫室¹⁾

東海大学医学部移植免疫学²⁾

○佐藤忠之¹⁾、土田文子¹⁾、佐藤 薫¹⁾、竹部兼太郎²⁾、バトムンフムンフバト²⁾、
萩原政夫^{1, 2)}、辻 公美^{1, 2)}

(目的) 我々は、ブタとヒトのサザンプロットによるDNA TypingとXeno-MLRをおこない、ブタのリンパ球に対するヒトのリンパ球の応答性がHLA-DR抗原のタイプにより異なることを見いだしたので報告する。(方法) DNA Typingは、ヒトおよびブタの高分子DNAを制限酵素Hind IIIで消化後HLA-DRB1およびSLA-DRBのcDNAをプローブとしたサザンプロットにておこなった。Xeno-MLRはヒト(7人)の末梢リンパ球 2.5×10^6 cell/mlを反応細胞にして、ブタの末梢リンパ球をマイトマイシン処理後等量混合して無血清培地(AIM-V)で6日間培養後、³H-Thymidineの取り込みを測定した。Xeno-MLRに用いたヒトリンパ球のDR抗原はPCR-RFLP法によりアレルを同定した。

(結果) サザンプロットによるDNA Typingは、バンドパターンの違いからブタの品種を大別すると同時に個体差が判定できた。Xeno-MLRではHLA-DR抗原のDRB1*1301またはDRB1*1302の陽性者3人はProliferation Index (P.I.)が18.6から48.2の高反応を示した。反対に陰性者4人はP.I.が10.0未満の低反応であった。(まとめと考察) DNA TypingとXeno-MLRの双方の結果をもとに、ブタからヒトへの異種移植の高/低応答性を判別し、さらにブタとヒトとのバンドの類似性も判定可能となった。将来の異種移植に対して有効な方法と考える。

41

新しい *TAP2* allele の発見と日本人の *TAP/HLA* haplotype

京都府赤十字血液センター, *中央赤十字血液センター, **神戸大学医学部臨床検査医学講座

○丸屋悦子 石川善英* 林玲* 徳永勝士* 原祐子 熊谷俊一** 佐治博夫

TAP (*TAP1*, *TAP2*) は *HLA-DQ* 座と *DP* 座の間にあり, その産物はヘテロダイマーを形成し, 抗原ペプチドの粗面小胞体への能動的輸送にかかわっている. 健康な日本人 (106) の *TAP1*, *TAP2* アミノ酸変異部 (*TAP1*: 333, 637, *TAP2*: 379, 565, 665, 687) を PCR で増幅し, low ionic strength single strand conformation polymorphism (LIS-SSCP) 法で検出し, その allele 型と *HLA* との連鎖を調べた. *TAP1* allele 頻度は白人とほぼ同程度であった. *TAP2* では *TAP2*0102* が日本人に特徴的で *DRB1*0901* と連鎖があった. また 2 箇所の新しいアミノ酸変異部 (577, 651) を検出した. 577 番は methionine から valine へ, 651 番は arginine から cysteine への変異であり検出頻度はそれぞれ 12.4%, 23% であった. これらの変異により, *TAP2* にさらに 6 種の新しい allele が存在しうることがわかった. 新しい変異を含む allele 型と *HLA* の連鎖は, A2-B46-*DRB1*0803*-*DQB1*0601*-*TAP2*Bky2* (577: Val)-*TAP1*0101*-*DPB1*0501*, A33-B44-*DRB1*1302*-*DQB1*0604*-*TAP2*Aky2* (651: Cys)-*TAP1*0101*-*DPB1*0401* であった.

42

HLA-DR, DQ トランスジェニックマウスにおける

HLA 拘束性抗原特異的 T 細胞の出現

九州大学生体防御医学研究所 遺伝学

石本達郎、山本 健、福井宣規、笹月健彦

HLA-DR および *DQ* 分子が、マウスにおいて種のバリエーションを超え、*MHC* クラス II 分子として機能し得るか否かを検討する目的で *HLA-DR51* および *DQ6* トランスジェニックマウス (TGM) を作製しその発現と機能を解析した。それぞれのマウスはヒトにおいて *DR* あるいは *DQ* 拘束性の抗原として知られるインフルエンザ HA 由来ペプチドあるいは溶連菌 M 蛋白由来ペプチドに対して特異的な T 細胞免疫応答を獲得した。さらに、この反応が抗 CD4 抗体、抗 *DR* 抗体、抗 *DQ* 抗体で抑制されること、マウスクラス II 分子を発現しない L 細胞 (*L-DR51*, *L-DQ6*) を抗原提示細胞にしても TGM より得た抗原特異的 T 細胞株が増殖反応を示すことから、*DR51*, *DQ6* が TGM においてマウス CD4 分子と相互作用し、*HLA* クラス II 拘束性抗原特異的 T 細胞を正に選択したことが示された。以上の結果は *HLA* クラス II TGM が *HLA* の機能を *in vivo* で検討することが可能なモデル動物となり得ることを示唆する。

43

HLAクラスI結合ペプチドの同定、及び高次構造のモデリング

*九大、生医研、遺伝 **東京医歯大、難研、異常代謝 ***九大、農、遺伝子資源
 ◦須藤 徹*、上川路 信博*、木村 彰方**、久原 哲***、笹月 健彦*

HLA-A*0201, A*0204, A*0206, A*0207, B-51, 52 の各アレルについてEB細胞よりクラスI分子を精製し、結合ペプチドを質量分析器ならびにアミノ酸分析器を用いて検討した。各アレルに結合したペプチドはアレル特有の傾向（結合モチーフ）を示しており、HLAクラスI分子一次構造のわずかの違いによる結合ペプチドの違いが明らかになった。さらに結合モチーフの違いとHLAクラスI分子一次構造の違いとの関連を理解する為に、既に報告されているHLA分子の結晶構造をもとにenergy minimizationによるペプチド-HLA複合体のコンピューターモデリングを行った。これにより各アレル間の結合モチーフの違いはHLA分子の高次構造の違いにより説明できた。本学会においては各アレルについて同定された結合モチーフとモデリングされた高次構造を報告する。

44

ファージペプチドライブラリーを用いたHLA-DR9結合ペプチドモチーフの解析

熊本大院医・免疫識別¹⁾、熊本大医・脳神経外科²⁾
 ○藤竿章次¹⁾、松下 祥¹⁾、西 徹²⁾、西村泰治¹⁾

（目的）抗リン脂質抗体陽性SLE、および若年発症型重症筋無力症と相関の高いHLA-DR9分子に結合するペプチドモチーフを同定し、責任抗原上のT細胞エピトープの解析に資する。

（方法）ファージ(fUSE5)ランダムペプチドライブラリーを用い、DR9分子（DR9ホモ接合のBリンパ芽球様細胞株由来）と結合性の高いペプチドを同定した後、アミノ酸を一残基置換したアナログペプチドとDR9分子との親和性を解析することにより結合モチーフを決定した。（結果）DR9結合モチーフはWxxSであり、1stアンカーにW, F, L, 2ndアンカーにS, A, V, Fが許容されることが明らかとなった。他のDR結合モチーフと比較すると、1) 2ndアンカーに親水性のSerが許容される、2) 3rdアンカー部位以降のアミノ酸に制限がない、という点において特徴的であった。抗リン脂質抗体、あるいは重症筋無力症それぞれの標的自己抗原と考えられる β_2 GPI、AChR α , β , γ , δ サブユニット上にはDR9に特徴的な結合モチーフがそれぞれ4,12,12,15,10箇所存在することが明らかとなった。

45

HLA-DR4および-DQ4結合ペプチドモチーフの同定と自己免疫疾患解析への応用
 熊本大学大学院医学研究科・免疫識別学¹⁾、帝人生物工学研究所²⁾
 ○松下 祥¹⁾、米 賢二²⁾、西村泰治¹⁾

(目的と方法) ペプチド-HLA相互作用の法則性を解析し、自己免疫誘発性T細胞エピトープを同定することを目的として、DR分子より溶出し構造決定した自己ペプチドを用いてDRB1*0405と0406に結合するペプチド構造の法則性を比較解析した。DRB1*0405と連鎖したDQ4に結合するペプチドのモチーフは、ファージランダムペプチドライブラリーを用いて決定した。

(結果) DR4の比較解析によりDRB1*0406に特異的なインスリン自己免疫症候群誘発性T細胞エピトープを同定した。一方、慢性関節リウマチ(RA)に於ける自己抗原の第一候補であるII型コラーゲン内にはRA感受性DRB1*0405結合性ペプチド断片が僅か3種類しか存在しなかったが、DQ4結合性ペプチドのモチーフはコラーゲンのGly-X1-X2反復配列にフィットし、94種類ものDQ4結合性断片が確認された。しかし、これらのペプチド断片はRA非感受性DRおよびDQ分子にも結合したことから、HLAに相関したRA感受性は単純なコラーゲン特異的免疫応答遺伝子現象ではないことが推測された。

46

HLA-DR1分子により提示された変異rasペプチドを認識するヒトT細胞クローンの解析
 熊本大院医・免疫識別¹⁾、熊本大医・第2外科²⁾、理研³⁾ 東京大理・生物化学⁴⁾、
 ○横溝 博¹⁾²⁾、藤田 博¹⁾²⁾、松下 祥¹⁾、小川道雄²⁾、白水美香子³⁾、横山茂之⁴⁾、
 西村泰治¹⁾

(目的) K-rasは肺癌、大腸癌等で頻繁に点突然変異を起こしている。この変異p21rasに由来するペプチドを特異的に認識するヒトT細胞クローンを樹立解析して抗腫瘍免疫における意義を検討する。

(方法および結果) 胃全摘術を施行された胃癌患者の脾臓細胞を、rasのコドン12および13に点突然変異を有する合成ペプチドの混合物で刺激することにより、上記ペプチドを特異的に認識するT細胞クローンを樹立した。このクローンはコドン12,13に数種類の点突然変異(12V,12A>12S,12C,13D)を有するペプチドを認識すると同時に変異(12V) ras蛋白に対しても反応を示しIFN- γ およびIL-4を産生した。さらに、高濃度の野生型(12G,13G)rasペプチドおよび蛋白に対しても反応性を示した。抗HLAmAb、アロ末梢血単核球およびDR1を発現したL-cellを用いてDRB1*0101が抗原提示分子であることを同定した。現在、患者の癌細胞におけるrasの変異、T細胞のK-rasのコドン12あるいは13に点突然変異を有する腫瘍細胞に対する応答、およびT細胞受容体の構造を解析中である。

47

HLA-DR14により提示されたp53 cryptic self peptideを特異的に認識するヒトT細胞の解析
 熊本大院医・免疫識別¹⁾、熊本大医・第2外科²⁾

○ 藤田 博¹⁾²⁾、横溝 博¹⁾²⁾、小川道雄²⁾、松下 祥¹⁾、西村泰治¹⁾

(目的) 変異p53蛋白を標的とするT細胞性抗腫瘍免疫応答がヒトにおいて成立するか否かを解析する。(結果と考察) 正常なp53 コアドメインに対応するoverlapping peptidesを合成し、健康人由来の末梢血単核球(PBMC)と培養することによりP53ペプチド特異的なT細胞株並びにクローンを樹立した。抗HLA-mAb、アロPBMCを用いてp53p186-205の抗原提示がDRB1*1401により行われていることを明らかにした。p53蛋白のコアドメインは疎水性に富みプロテアーゼ耐性を示す。腫瘍化をもたらすp53の突然変異はコアドメインに集中し、その多くが蛋白分子の立体構造を変化させ、DNA結合性を失うと共にプロテアーゼ感受性を獲得させる。従って、腫瘍細胞に特異的に正常なアミノ酸配列を有するp53由来のペプチドが出現し、トレランスが生じていないためにこれを認識するT細胞が腫瘍を攻撃する可能性が考えられる。現在、変異p53蛋白あるいはこれを有する腫瘍細胞に対するT細胞の応答を解析することにより、その抗腫瘍免疫応答における意義を検討中である。

48

HLA-DR拘束性T細胞エピトープのアナログを用いたヒトT細胞活性化機構の解析
 熊本大院医・免疫識別

○ Chen Yu-Zhen、松下 祥、西村泰治

(目的) T細胞エピトープを含む抗原ペプチド上の各アミノ酸残基の役割を同定すると共に、T細胞レセプター(TCR)のリガンドの微小な変化がT細胞応答に及ぼす影響を観察しT細胞活性化の機構を解析する。(方法と結果) DRB1*0406により提示された溶連菌M蛋白由来の15個のアミノ酸からなるペプチドを認識して増殖し、大量のIFN γ を産生するヒトCD4⁺T細胞クローンを樹立した。ペプチドのN末端より4番目のアミノ酸残基をP1として、P1-9の各残基を他の19種のアミノ酸に置換した171種のアナログペプチドに関してT細胞の活性化能およびDR結合性を調べた。この結果、P1,4および6がDR分子への結合に、またP2,3,5および7がTCRによる認識に重要であることが明らかになった。後者のアナログペプチドの73.7%が増殖反応を誘導せず、その62.5%がTCRアンタゴニズムを、さらにその25.7%が細胞容積ならびに、CD4, CD11a, CD28 および Fas(CD95)の発現を増大させる部分的アゴニズムを示した。いずれのペプチドもT細胞にアナジーを誘導しなかった。

49

HLA-DR9 (DRB1*0901) 分子結合ペプチドの解析

旭川医大・第2病理

○佐藤啓介、小林博也、岡本美穂、二木 源、木村昭治、片桐 一

〔目的〕白樺花粉症、小児型重症筋無力症と相関を有するHLA-DR9 (DRB1*0901) 分子に結合しているオリゴペプチドのアミノ酸配列を決定し、結合に特異的なアミノ酸配列を推定した。

〔方法〕DR9 homozygous lymphoblastoid cell; Kyを 3×10^{10} 個培養し、その可溶化材料をL243抗体結合カラムを用いてDR分子を精製、そして酸処理によりDR分子結合ペプチドを解離した。ペプチド材料を逆相HPLCを用いて分画し、主要ピークのアミノ酸配列をエドマン分解による自動マイクロシーケンサーを用いて決定した。それらの結合能をDR9-L cell transfectant を用いたFACS解析で測定した。

〔結果・考察〕主要ピークのペプチドを解析し、10-20残基長の互いに異なるアミノ酸配列を得た。由来蛋白の同定できたものは human transferrin receptor、HLA-A11、Neuropeptide Y-like receptor、human apolipoprotein B-100、human elongation factor 2とhuman L platin の一部の長さの異なるペプチドであった。これらのペプチドには、共通してF/W/Y/L--S/Aという配列が認められ、DR9分子との結合に重要なアミノ酸残基と考えられた。

50

HLA-DQ分子により提示されたダニ抗原ペプチドに特異的なヒトT細胞クローンの解析
熊本大院医・免疫識別¹⁾、熊本大医・第1内科²⁾○松岡多香子¹⁾²⁾、松下 祥¹⁾、興梠博次²⁾、安藤正幸²⁾、西村泰治¹⁾

(目的) コナヒョウヒダニ主要アレルゲン(Der f I)に特異的なヒトT細胞クローンが認識するHLA分子と抗原ペプチドを同定し、アレルギー反応におけるT細胞の役割を解明すると共に、アナログペプチドによるT細胞応答の変化を解析する。(方法) ダニアレルギー患者の末梢血単核球(PBMC)を、Der f Iに由来するオーバーラッピングペプチドと培養することにより、特異的なT細胞株ならびにT細胞クローンを樹立し、抗HLAmAb、アロPBMCを用いて抗原提示分子を同定した。ペプチドの各アミノ酸残基を他のアミノ酸に置換したアナログペプチドに対するT細胞応答(増殖反応、リンホカイン産生)を定量した。(結果) T細胞株を3名の患者より多数樹立し、主要なT細胞エピトープを含むペプチドを4種類同定した。これらのT細胞株より得られた多数のT細胞クローンの1つであるDT13.2は、HLA-DQ6分子により提示されたDer f Iペプチドp18-31を認識し、IL-4とIFN- γ を産生した。多数のアナログペプチドに関してT細胞応答の修飾の有無を解析中である。

51

ブタMHCクラスII遺伝子のRT-PCR-RFLP法によるDNAタイピング

*¹⁾ 農水省畜産試験場・*²⁾ (社)農林水産先端技術研○小松正憲*¹⁾・川上和夫*²⁾・中島恵美子*²⁾・武田久美子*¹⁾・大西 彰*¹⁾

演者らは、RT-PCR-RFLP法を用いたブタMHCクラスII遺伝子のDNAタイピングを検討し、満足すべき結果を得たので報告する。既知のブタMHCクラスII遺伝子4種類(DRB, DRA, DQB, DQA)の塩基配列をもとに、第一及び第二ドメインをできるだけ含むようにプライマーを設計し、RT-PCR(パキエルマ-社、rTthキット)を行った。鋳型は、AGPC法により末梢血白血球から調整した全RNAを用いた。RT-PCRにより各遺伝子とも期待されたサイズのDNAが増幅され、少なくともDRB及びDQA遺伝子についてはサイクルクエンソック法により目的遺伝子であることを確認した。多型性に富むDRB, DQB, DQA遺伝子につき、RT-PCR産物あるいは2ndPCR産物を複数の制限酵素で消化し、これらのバンドパターンから遺伝子型の推定が可能となった。以上、RT-PCR-RFLP法により、サソ法によらないブタMHCクラスII遺伝子のDNAタイピングを確立するとともに、対立遺伝子ホモ型個体のPCR産物を直接サイクルクエンソック法で塩基配列を決定することが可能となった。

52

DLA-DRB1遺伝子の解析 — 新しいプローブの作製とその検討 —

北里大学*¹⁾ 医学部免疫学・*²⁾ 医療衛生学部臨床免疫学

○伊東一郎・渡部浩二・須山出穂・石田和己・大谷文雄・角田みさを・

大久保みどり・金子剛久・柏木登*¹⁾・小幡文弥*²⁾

われわれは、本学会で犬の主要組織適合抗原(DLA)DRB1遺伝子のPCR-SSO法によるDNA typingについて報告してきた。今回は、既報のDLA-DRB1の塩基配列9個と、あらたにクローニングして決定した配列2個の計11配列に基づいて、5か所ある超可変域すべてをカバーするSSO probe 22種類を作製した。ついで、国際DLAワークショップで公認されているDLA-DAB1の基準DNAと作製したSSO probeとのhybridizationをおこなった結果、これら22種類のSSO probeが配列特異的に働いてくれることを確認した。さらにこのSSO probeを用いて、ヘテロ接合体であるmongrel犬のfamily studyおよびpopulation studyを現在実施中である。

〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉

1. 投稿規定

1.1. 原稿様式

提出原稿がそのまま電算写植で印刷できるように、原稿は全て、コンピューターのフロッピーディスクとA4サイズでプリントアウトしたものの両者を提出する。一般的なワープロソフトを使用し、ソフト名を明記する。字体、サイズ、行の字数、行間、などの体裁は自由とする。また、図表については、写植でそのまま掲載できるものを提出するが、挿入箇所を本文に指定する。図については天地を明示する。印刷の際に、縮小または拡大する場合があるので、考慮すること。また、図表の題や説明はワープロで、本文とは別頁に添付する。

1.2. 原著論文

会員からの投稿を原則とするが、編集委員会が依頼することもありうる。日本語、英語を問わない。タイトル、著者名、所属は次の様式にしたがう。

Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR52-associated DRB1 allele with the DR'NJ25' specificity. designated DRB1 * 1307.

Toshihiko Kaneshige¹⁾, Mitsuo Hashimoto²⁾, Yayoi Murayama¹⁾, Tomoko Kinoshita²⁾, Tsutomu Hirasawa¹⁾, Kiyohisa Uchida¹⁾, Hidetoshi Inoko³⁾

- 1) Shionogi Biochemical Laboratories, Shionogi Company, Osaka, Japan
- 2) Kidney Transplantation Center, Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital, Hyogo, Japan
- 3) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

HLA class II の DNA typing と MLC

能勢 義介¹⁾, 稲葉 洋行¹⁾, 荒木 延夫¹⁾, 浜中 泰光¹⁾, 阪田 宣彦¹⁾, 土田 文子²⁾, 辻 公美²⁾, 成瀬 妙子³⁾, 猪子 英俊³⁾

- 1) 兵庫県赤十字血液センター, 検査課
- 2) 東海大学医学部, 移植免疫学
- 3) 東海大学医学部, 分子生命科学

内容は、要約 (Summary)、はじめに (Introduction)、材料と方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、参考文献 (References) の順に記載する。また、要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを加える (英文の場合には英語の Key words を加える)。脚注は適宜、設けてもよい。日本語で投稿の場合には、末尾に英語のタイトル、著者名、所属(様式は上述に従う)、英語の要約と英語で5語以内の Key words をつける。枚数に特に指定はないが、速報的な短報 (全体で、2,000 ~ 3,000 字、出来上がり A4 版で2~4枚程度) を中心とする。もちろん、フルペーパー (full paper) も歓迎する。なお、参考文献 (References) の記載については、下記1.5を参照すること。

1.3. 総説、シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。タイトル、著者名、所属は上記1.2.の通りにしたが、その他の体裁は自由とするが、構成がいくつかの章、節などから成る場合には、次の番号に従い、適当な見出しを添える。

1. 2. 3. 4.
- 1.1. 1.2. 1.3. 1.4.
- 1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. 1.1.
4.

脚注は適宜、設けてもよい。なお、参考文献 (References) の記載については、下記1.5.を参照すること。

1.4. 校正

校正は編集委員が行い、特別な場合を除き、執筆者は校正を行わない。

1.5. 参考文献

参考文献は、本文中に数字で、例えば (3), の様に表示し、末尾にまとめて、次のようなスタイルで記載する。ただし、著者名、または編集者名は、筆頭3名まで記載し、以下は省略する。

1. Kaneshige T, Hashimoto M, Murayama A *et al.* : Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR52 - associated DRB1 allele with the DR'NJ25' specificity designated DRB1 * 1307. *Hum. Immunol.* **41** : 151-160, 1994.
2. Inoko H, Ota M : *Handbook for HLA Tissue - Typing Laboratories* (eds. Bidwell J, Hui KM), PCR - RFLP. CRC Press, Boca Raton, 1993; p.1-70.
3. 能勢義介, 稲葉洋行, 荒木延夫ら : HLA class II の DNA Typing と MLC, 輸血, **39** : 1031-1034, 1993.
4. 猪子英俊, 木村彰方 : 岩波講座分子生物学11巻, 生物体のまもりかた (本庶佑編), 自己と他の識別, 岩波書店, 東京, 1991; p.129-194.

2. 原稿送付先

〒259-11 神奈川県伊勢原市望星台
東海大学医学部 分子生命科学系遺伝情報部門 日本組織適合性学会誌 MHC
編集長 猪子 英俊
TEL: 0463-93-1121 内線2312
FAX: 0463-94-8884

編集後記

日本組織適合性学会も第4回大会を迎えた。第4回という数字は一つの転機であるといえよう。詩の構成になぞらえて、「起承転結」を考えるならば、第1回から第3回は「起」に相当するのではないだろうか。そうすると、第4回以降は、いよいよ本論である「承」の部分に入らなければならない。HLA学の「承」来の礎となる活発な議論を期待したい。

(大谷 文雄)

臨床医学から基礎科学にわたるさまざまな分野で、MHCほど広い関心を集めている対象は少ないと思います。本誌がその多様な世界を学会員の方々に提示することで、また新しい仲間を得る一助となれば幸いです。さて、本号では大会抄録に加えて、初めて原著論文が掲載されています。今後も、短報、preliminary report、あるいはちょっとした改良や工夫などから full article まで、会員の方々の積極的な投稿をお願いいたします。(徳永 勝士)

本誌の読者の多くは、いわゆる現場の tissue typer の方々とお見受けします。かくいう私もそのひとりであります。実は、編集後記2回目にして早くもネタ切れ状態に陥っているので、tissue typer 向けに何か連載ものを企て、その場を凌ごうという魂胆です。

そこで取り上げるのが“International Cell Exchange”，いわゆる、テラサキの Cell Exchange です。ちなみに、この UCLA Tissue Typing Lab. 発の企画には他に血清と DNA の exchange もあります。

さて Cell Exchange ですが、世界中で約280の Tissue Typing Lab. が参加しています。毎月、T cell 4本と B cell line 2本が年間10回送られてきて、これらをテクニックと知識を駆使してタイピングし、期間内に報告するわけですが、なかなか競争心をあおる仕組になっています。まず、報告したタイピング結果がすべて名前入で公表されてしまう点です。いいかげんな結果を記入すると「あのひとは

あの程度か」という烙印を押されてしまうし、自分ができて他ができていない時はえも言われぬ優越感を味わえるわけです。そして、1年間のデータをまとめて、全問正解と1問のみ不正解の場合は、年間レポートのトップに大々的に名前が載ることになります。しかし、みなさん勘違いしないでください。Cell Exchange の目的は名を売ることではなく、各 Tissue Typing Lab. の quality control にあります。また、毎月返送されてくるレポートには最新情報が満載されていて、これに刺激を受けさらに向上する努力をするようになります。今回はその内容についてももう少し詳しく触れてみたいと考えていますが、編集後記で勝手にシリーズものをやるなど編集長のお怒りを買うかもしれないので、次回についての保証は何もありません。(中島 文明)

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

1995年7月1日発行 2巻1号, 1995

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会 (会長 吉田孝人)

編集 日本組織適合性学会編集委員会 (編集担当理事 猪子英俊)

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

印刷・港北出版印刷㈱

〒150 東京都渋谷区渋谷2-7-7