

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 8F

〒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

The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

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⁾、新宅典典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 β 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、111HW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、111HW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($\times 1024$)、A24に対して弱い交差反応を示した($\times 16$)。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】111HW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。この方法を骨髓バンクドナーの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。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ーナル抗体 (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(GAC vs GGC)のみならず第199番残基(GCC vs ACC)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グルーの新しいアリル

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グルー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グルーのDRB1遺伝子に特異的なプライマーによるPCRで増幅後、直接シーケンシング法で行った。

【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グルー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関連抗原と相關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エキソンを対象とした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エキソンを対象としたPCR-SSOP法の他に、第2エキソン内の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alkaline phosphatase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 * 1501 が 23 例 (51.1%) vs 12 例 (12.0%) 相対危険度 8.0, D R * 0405 は 2 例 (4.4%) vs 26 例 (26.0%) 相対危険度 0.14, D Q B 1 * 0602 は 22 例 (48.9%) vs 11 例 (11.0%) 相対危険度 8.1, D Q B 1 * 0401 は 2 例 (4.4%) vs 26 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 * 1501 が 15 例 (36.6%) vs 12 例 (12.0%) 相対危険度 4.2, D Q B 1 * 0602 は 14 例 (34.1%) vs 11 例 (11.0%) 相対危険度 4.2, D Q B 1 * 0303 は 4 例 (9.8%) vs 34 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 * 1501 と H L A - D Q B 1 * 0602 が関連すると示唆された。また、H L A - D R B 1 * 0405 と D Q B 1 * 0401 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 β 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⁾ 斉藤正博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とさらに高くなることから、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検索するため、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 (ApaI, 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型の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³、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ブロットによる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ブ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〕サザンブロットによる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は膵癌、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HLA mAb、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

H L A - D R 9 (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H L A - D R 9 (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〕D R 9 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D R 分子を精製、そして酸処理によりD R 分子結合ペプチドを解離した。ペプチド材料を逆相H P L C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D R 9 - L cell transfectant を用いたF A C S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 plastin 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、D R 9 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HLA mAb、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(パニングエルマ-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シーケンシング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、サザン法によらないブタ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シーケンシング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。