

# 第5回日本組織適合性学会大会

会 期：1996年9月19日(木) ~ 20日(金)

会 場：三省堂新宿ホール

大会長：十字猛夫



# 第5回日本組織適合性学会大会

The 5th Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI) Annual Meeting  
September 19-20, 1996, Tokyo

会 期：平成8年9月19日(木) 9：30～18：00  
20日(金) 9：00～17：30

会 場：三省堂新宿ホール（三省堂新宿ビル内）

〒160 東京都新宿区西新宿4-15-3

TEL 03-3320-2611 FAX 03-3320-2615

大会長：十字猛夫

〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31

日本赤十字社中央血液センター内

第5回日本組織適合性学会大会 事務局

TEL 03 (3406) 1211 内線 251, 231

FAX 03 (3406) 7892



## 理事会・評議員会・総会のご案内

理事会：平成8年9月19日(木) 13:00～14:30

(第5研修室, 三省堂新宿ビル2階)

評議員会：平成8年9月20日(金) 10:00～11:30

(第5研修室, 三省堂新宿ビル2階)

総会：平成8年9月20日(金) 11:30～12:00

(三省堂新宿ホール)

## 参加者へのお知らせとお願い

### 1. 登録：

(1) 受付時間：平成8年9月19日(木) 9:00～18:00

20日(金) 9:00～15:00

(2) 受付場所：三省堂新宿ホール前

(3) 参加費：5000円

(参加者は参加費を支払い領収書と参加章をお受け取り下さい。)

### 2. 年会費・新入会会員受付：

(1) 受付場所：三省堂新宿ホール前

(2) 年会費：5000円

### 3. 懇親会：

(1) 日時：平成8年9月19日(木) 18:30～20:30

(2) 会場：大研修室(三省堂新宿ビル8階)

(3) 会費：3000円(参加費受付でお支払い下さい)

### 4. ポスター展示

(1) 日時：平成8年9月19日(木) 9:00～17:00

20日(金) 9:00～17:00

(2) 会場：第一研修室(三省堂新宿ビル2階)

### 5. 機器展示：

会場：三省堂新宿ホール・ホワイエ(三省堂新宿ビル1階)

### 6. ドリンクサービス：

2階第一研修室でコーヒーサービスを行っておりますのでご利用下さい。

## シンポジウム・ワークショップの発表者へのお知らせ

### 1. 発表時間

座長の指示に従って、指定された時間内でのご発表をお願いします。

### 2. スライド

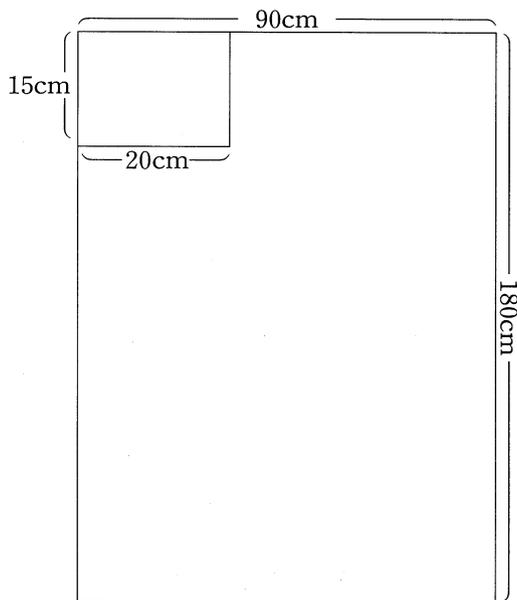
- (1) スライドは、すべて35mm版スライドをご用意下さい。
- (2) スライド受付に、開始30分前までに提出して下さい。
- (3) スライド枚数に制限はございません。

## 座長へのお知らせ

1. 担当のセッション開始10分前までに、座長席にお着き下さい。
2. 発表時間を厳守して、進行をお願いいたします。

## 一般演題の発表者へのお知らせ

今回の一般演題はすべてポスター形式での発表となります。



左記の大きさにポスターを作成して下さい。演題番号の場所には掲示できません。

演題番号の大きさは、縦15cm、横20cmで、大会事務局で用意します。

9月19日(木) 9時30分までに掲示して下さい。

9月20日(金) 16時～17時の間に取り外して下さい。

フリー討論の時間帯はなるべくポスターの前にいてください。

## 第5回日本組織適合性学会大会日程表

第1日 (9月19日(木))			第2日 (9月20日(金))		
主会場 (ホール)	ポスター会場 (第一研修室)	展示会場 (ホワイエ)	主会場 (ホール)	ポスター会場 (第一研修室)	展示会場 (ホワイエ)
9:00		全ポスター掲示			
10:00	開会式		ワークショップII 「クロスマッチャー 最近の話題」		
11:00	教育講演 「非血縁骨髄移植 の現在」	ポスターの展示		ポスターの展示	
12:00	ランチョン セミナー1 「HLAと疾患感受性」		総会		機器の展示
13:00			ランチョン セミナー2 「モノクローナル抗体 はどこまで完成したか」		
14:00		ポスターフリー討論		ポスターフリー討論	
15:00					
16:00	ワークショップ1 「DNAタイピング の実際」 ー入門から 今後の展望までー	ポスターの展示	シンポジウム 「第12回国際組 織適合性ワーク ショップ報告」	ポスターの展示	
17:00				全ポスター撤去	
18:00			閉会式		
19:00	懇親会 (大研修室)				
20:00					

## 教育講演

---

9月19日(木) 10:00-12:00

---

会場：三省堂新宿ホール

### 「非血縁骨髄移植の現在」

座長：十字猛夫（日本赤十字社中央血液センター）

#### 教育講演1

日本骨髄バンクの現況と日本人におけるHLA適合

赤座達也（日本赤十字社中央血液センター）

#### 教育講演2

非血縁者間骨髄移植の臨床

岡本真一郎（慶應義塾大学・医・血液内科）

#### 教育講演3

HLA型適合と非血縁者間骨髄移植成績

笹月健彦（九州大学・生体防御医学研究所・遺伝学）

## ワークショップI

---

9月19日(木) 14:30-18:00

---

会場：三省堂新宿ホール

### 「DNAタイピングの実際」——入門から今後の展望まで——

座長：木村彰方（東京医科歯科大学・難治研・異常代謝）

佐治博夫（京都府赤十字血液センター）

#### W-1. DNA抽出からPCRまで

○小林 賢

防衛医科大学校・検査部

#### W-2. PCR-SSP法

○西垣文敬<sup>1)</sup>，笹木剛志<sup>2)</sup>，平野哲夫<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>日本腎臓移植ネットワーク，<sup>2)</sup>市立札幌病院・検査部，<sup>3)</sup>市立札幌病院・腎移植科

#### W-3. PCR-SSO法

○伊達是志

久留米大学・医・小児科

W-4. PCR-reverse SSO 法 —INNO-LiPA 法を用いた HLA class II DNA タイピング—

○佐田正晴<sup>1)</sup>, 羽鳥基明<sup>1)</sup>, 王 晶釘<sup>1)</sup>, 辻 隆之<sup>1)</sup>, 中野寿彦<sup>2)</sup>, 藤元登四郎<sup>2)</sup>

Marie-Marthe Tongio<sup>3)</sup>, Marcel Tilanus<sup>4)</sup>, Patty Hendrix<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>国立循環器病センター・研究所, <sup>2)</sup>藤元病院, <sup>3)</sup>CRTS, Strasbourg, <sup>4)</sup>Utrecht Univ,

<sup>5)</sup>INNOGENETICS

追加発言 1 : Roche-PCR SSOP Reverse Line Blot 法の検討

○屋敷伸治<sup>1)</sup>, 桑山昌洋<sup>1)</sup>, 李 洪川<sup>1)</sup>, 楼 宏<sup>1)</sup>, 平井慎一郎<sup>1)</sup>, 大野多紀子<sup>2)</sup>, 柳沢浩一<sup>2)</sup>,  
藤吉利信<sup>1)</sup>, 園田俊郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大・医・ウイルス, <sup>2)</sup>日本ロシュ

W-5. マイクロプレート法 —とくに PCR-MPH 法を中心として—

○柏瀬貢一<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>2)</sup>東京大学・医・人類遺伝

追加発言 2 : Biotest DRB-, DQB-ELPHA (Enzyme Linked Probe Hybridization Assay) 法の検討

○屋敷伸治<sup>1)</sup>, 桑山昌洋<sup>1)</sup>, 李 洪川<sup>1)</sup>, 楼 宏<sup>1)</sup>, M. Blank<sup>1)</sup>, 平井慎一郎<sup>1)</sup>, 富田庸助<sup>2)</sup>,  
西永正樹<sup>2)</sup>, 藤吉利信<sup>1)</sup>, 園田俊郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大・医・ウイルス, <sup>2)</sup>大日本製薬

W-6. PCR-RFLP 法

○成瀬妙子, 猪子英俊

東海大学・医・分子生命科学

W-7. PCR-SSCP 法

○坂内 誠

東京都赤十字血液センター

W-8. PCR-DCP 法 HLA マッチング法として

○丸屋悦子

京都府赤十字血液センター

W-9. DNA タイピングの今後

○石川善英<sup>1)</sup>, 森山 哲<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>2)</sup>東京大学・医・人類遺伝

追加発言 3 : TMA/PCR-HPA法の semiautomatic system について

○吉田孝人, 小林 明, 水口義則

浜松医科大学, 昭和大・医・細菌

## ワークショップII

9月20日(金) 9:00-11:30

会場：三省堂新宿ホール

## 「クロスマッチ、最近の話題」

座長：永尾暢夫(大阪府赤十字血液センター)

橋本光夫(兵庫県立西宮病院・腎移植センター)

## 「血小板輸血」

## W-10. LCT と AHG・LCT (血小板輸血)

○荒木延夫

兵庫県赤十字血液センター

## W-11. 改良 AHG-LCT, MAIPA と MAILA (血小板輸血)

○三谷孝子, 池田久實, 関口定美

北海道赤十字血液センター

## W-12. MPHA と 顆粒球抗原・抗体検査

○宮本光子, 柴田洋一

東京大学・医・輸血部

## 「腎移植」

## W-13. フローサイトメトリーを用いた FACS クロスマッチ法

○笹木剛志<sup>1)</sup>, 西垣文敬<sup>2)</sup>, 平野哲夫<sup>3)</sup><sup>1)</sup>市立札幌病院・検査部, <sup>2)</sup>日本腎臓移植ネットワーク, <sup>3)</sup>市立札幌病院・腎移植科

## W-14. フローサイトメトリーを用いた FACS クロスマッチの紹介と臨床成績との相関について

○小原節子<sup>1)</sup>, 加村ひろみ<sup>1)</sup>, 打田和治<sup>2)</sup><sup>1)</sup>名古屋第二赤十字病院・組織適合検査センター, <sup>2)</sup>同・移植外科

## W-15. B cell クロスマッチ陽性は移植適応か否か

○奥山正明<sup>1)</sup>, 烏谷竜哉<sup>1)</sup>, 青木里美<sup>1)</sup>, 井上博雄<sup>1)</sup>, 坂本尚穂<sup>2)</sup>, 大岡敬二<sup>3)</sup>, 濱田 齊<sup>3)</sup>, 岩田英信<sup>3)</sup>, 竹内正文<sup>3)</sup><sup>1)</sup>愛媛県立衛生研究所, <sup>2)</sup>愛媛県松山中央保健所, <sup>3)</sup>愛媛大学・医・泌尿器科

## シンポジウム

9月20日（金） 14：30－17：00

会場：三省堂新宿ホール

### 「第12回国際組織適合性ワークショップ報告」

座長：辻 公美（東海大学・医・移植免疫）

吉田孝人（（社）日本腎臓移植ネットワーク・組織適合性委員会）

1. AHS #2 (A2 / A9) を中心として  
○丸屋悦子  
京都府赤十字血液センター
2. AHS #3 (A10 / A19) を中心として  
○斎藤 敏  
長野県赤十字血液センター
3. AHS #5 (B7 / B22) を中心として  
○小林 賢  
防衛医科大学校・検査部
4. AHS #8 (B15) を中心として  
○田中秀則  
日本赤十字社中央血液センター
5. AHS #15 (DR6 / DR52) を中心として  
○前田平生  
埼玉医大総合医療センター・輸血部
6. AHS #16 (DR7 / DR9 / DR53) を中心として  
○猪子英俊  
東海大学・医・分子生命科学
7. AHS #18 (DPA1 / DPB1) を中心として  
○佐田正晴  
国立循環器病センター・研究所
8. Anthropology  
○徳永勝士  
東京大学・医・人類遺伝

9. HLA-E/G

○徳永勝士  
東京大学・医・人類遺伝

10. TCR and HLA

○小幡文弥  
北里大学・医療衛生・臨床免疫

11. Disease Component

○園田俊郎  
鹿児島大学・医・ウイルス

12. Sequencing Based Typing

○成瀬妙子  
東海大学・医・分子生命科学

13. Soluble HLA

○萩原政夫  
東海大学・医・移植免疫

## 一般演題

---

9月19・20日(木・金)      ポスターフリー討論    13:00-14:30

---

会場：2F 第一研修室

---

### クラス I

---

1. HLA-B27抗原の血清学的サブタイプ B27KH をコードする新しい B27アレル

○長谷川 隆<sup>1)</sup>, 小川篤子<sup>2)</sup>, 南斉博英<sup>1)</sup>, 俵 国芳<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>2,3)</sup>, 十字猛夫<sup>2)</sup>, 近藤正太郎<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>東京南赤十字血液センター, <sup>2)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>3)</sup>東京大学・医・人類遺伝

2. Multiple Antigenic Peptide を用いたイムノプロット用抗 HLA-B 血清の作製

○古田 求, 太田浩敏, 和田かおる, 高橋 勲, 水野伸一, 神谷 忠, 小澤和郎  
愛知県赤十字血液センター

3. PCR-MPH 法による HLA-A2 および B61 遺伝子のタイピング

○中野浩美<sup>1)</sup>, 川井信太郎<sup>1)</sup>, 柏瀬貢一<sup>2)</sup>, 小川篤子<sup>2)</sup>, 石川善英<sup>2)</sup>, 徳永勝士<sup>2,3)</sup>, 山根明男<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>湧永製薬・バイオ研究所, <sup>2)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>3)</sup>東京大学・医・人類遺伝

4. 日本人の B (40,-) 抗原の DNA タイピングとマッチングの検討  
○酒巻建夫, 柏原英彦, 山崎正明, 苅部正宏, 飯田好江  
国立佐倉病院・臨床研究部, 同・外科, 同・HLA 検査室
5. PCR-SSOP 法による HLA-B 遺伝子の高精度アレルタイピング  
○稲川 明<sup>1)</sup>, 兼重俊彦<sup>1)</sup>, 平井博美<sup>1)</sup>, 伊藤要一<sup>1)</sup>, 寺岡 宏<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>2)</sup>,  
木下朋子<sup>2)</sup>, 福西孝信<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>シオノギ製薬・診断医学部, <sup>2)</sup>兵庫県立西宮病院・腎移植センター
6. HLA-B 抗原遺伝子タイピングのための PCR-RFLP 法  
○光永滋樹<sup>1)</sup>, 小川篤子<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>1)</sup>東京大学・医・人類遺伝
7. PCR-RFLP 法による HLA-C 抗原遺伝子の DNA タイピングの確立  
○松澤由美子, 成瀬妙子, 猪子英俊  
東海大学・医・分子生命科学
8. 日本人の HLA-C アリール: PCR-SSCP 法および DNA 塩基配列決定による解析  
○王 慧茹<sup>1,2)</sup>, 徳永勝士<sup>1,3)</sup>, 中島文明<sup>4)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 柴田洋一<sup>2)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>日赤中央血液センター, <sup>2)</sup>東大・医・輸血部, <sup>3)</sup>東京大学・医・人類遺伝,  
<sup>4)</sup>神奈川県赤十字血液センター
9. PCR-SSP 法による HLA-C 対立遺伝子の DNA タイピング  
○安藤 等<sup>1)</sup>, 水木信久<sup>2)</sup>, 橘川 薫<sup>1)</sup>, 金子博美<sup>1)</sup>, 宮田義久<sup>1)</sup>, 脇坂和男<sup>1)</sup>, 猪子英俊<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>神奈川県湘南赤十字血液センター, <sup>1)</sup>横浜市立大学・医・眼科  
<sup>3)</sup>東海大学・医・分子生命科学
10. HLA-Class I 抗原を認識する抗血清を用いたウェスタンブロットによる HLA typing  
○太田浩敏, 古田 求, 和田かおる, 水野伸一, 神谷 忠, 小澤和郎  
愛知県赤十字血液センター
11. MICA クラス I 遺伝子エクソン5における STR 多型  
○太田正穂<sup>1)</sup>, 水木信久<sup>2)</sup>, 勝山善彦<sup>1)</sup>, 安藤 等<sup>3)</sup>, 福島弘文<sup>1)</sup>, 猪子英俊<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>信州大学・医・法医学, <sup>2)</sup>東海大学・医・分子生命科学, <sup>3)</sup>神奈川県湘南赤十字血液センター

---

## ク ラ ス II

---

12. DLA-DRB 遺伝子の DNA タイピングに用いる SSO プローブの有効性について  
○須山出穂<sup>1)</sup>, 伊東一郎<sup>1)</sup>, 渡部浩二<sup>1)</sup>, 柏木 登<sup>1)</sup>, 鱈川浩司<sup>2)</sup>, 光岡伸昌<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>北里大学・医・免疫学, <sup>1)</sup>同・実験動物学

13. DR2グループ DRB1対立遺伝子の mismatch-PCR-RFLP 法による解析  
○桑田昇治<sup>1)</sup>, 柳沢雅美<sup>1)</sup>, 光永滋樹<sup>2)</sup>, 宮本光子<sup>1)</sup>, 本多 裕<sup>3)</sup>, 十字猛夫<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>東京大学・医・輸血部, <sup>2)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>3)</sup>晴和病院
14. MPH low resolution 法における問題点  
—DR14グループのアリルタイピングの必要性について—  
○河賀泰子, 内田純子, 徳永和夫, 佐藤博行, 前田義章  
福岡県赤十字血液センター
15. PCR-PHFA 法による HLA-class II (DQA1, DQB1および DPB1) のアリルタイピング  
○森山 哲<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 光永滋樹<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 岡 孝紀<sup>3)</sup>, 前川尻真司<sup>3)</sup>, 山根明男<sup>3)</sup>,  
十字猛夫<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>2)</sup>東京大学・医・人類遺伝学, <sup>3)</sup>湧永製薬
16. HLA-DQB1の新しいアリル DQB1\*0306について  
○大田 智<sup>1)</sup>, 斉藤 敏<sup>1)</sup>, 橋爪清隆<sup>1)</sup>, 山田英世<sup>1)</sup>, 兼重俊彦<sup>2)</sup>, 木下朋子<sup>3)</sup>, 橋本光夫<sup>3)</sup>, 小口弘子<sup>4)</sup>,  
石井栄三郎<sup>4)</sup>  
<sup>1)</sup>長野県赤十字血液センター, <sup>2)</sup>シオノギ製薬, <sup>3)</sup>兵庫県立西宮病院, <sup>4)</sup>長野県立こども病院
17. 単一細胞に対する HLA-DNA タイピング  
○大谷文雄, 金子剛久, 大久保みどり, 柏木 登  
北里大学・医・免疫学
18. Dynabeads DNA DIRECT™ Large Scale キットによる高分子 DNA 抽出の試み  
○成瀬妙子, 安藤理絵, 猪子英俊  
東海大学・医・分子生命科学

---

単 球 ・ 顆 粒 球 抗 原

---

19. 顆粒球抽出抗原を用いたマイクロ MPHA 法による抗顆粒球抗体スクリーニング法の開発とその応用  
○荒木延夫<sup>1,2)</sup>, 稲葉洋行<sup>1)</sup>, 藤原宝子<sup>1)</sup>, 浜中泰光<sup>1)</sup>, 能勢義介<sup>1)</sup>, 神前昌敏<sup>1)</sup>, 阪田宣彦<sup>1)</sup>, 伊藤和彦<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>兵庫県赤十字血液センター, <sup>2)</sup>京都大学・医・輸血部

---

移 植 ・ 輸 血

---

20. HLA と死体腎移植成績  
○久山芳文<sup>1)</sup>, 船附好子<sup>1)</sup>, 松井美智代<sup>1)</sup>, 多田正義<sup>1)</sup>, 安波礼子<sup>1)</sup>, 伊藤喜一郎<sup>2)</sup>, 小角幸人<sup>3)</sup>, 仲谷達也<sup>4)</sup>,  
国方聖司<sup>5)</sup>, 吉田克法<sup>6)</sup>, 上田陽彦<sup>7)</sup>, 金 卓<sup>8)</sup>  
<sup>1)</sup>大阪府立病院・HLA, <sup>2)</sup>同・泌尿器科, <sup>3)</sup>大阪大学・医・泌尿器科, <sup>4)</sup>大阪市立大学・医・泌尿器科,  
<sup>5)</sup>近畿大学・医・泌尿器科, <sup>6)</sup>奈良医大・泌尿器科, <sup>7)</sup>大阪医科大学・泌尿器科,  
<sup>8)</sup>大阪市立総合医療センター・泌尿器科

21. 献腎移植全国共通 HLA タイピングトレイ (JNOS1.1 & JNOS2.1) の検討  
 ○山崎正明<sup>1)</sup>, 苅部正宏<sup>1)</sup>, 飯田好江<sup>1)</sup>, 酒巻建夫<sup>2)</sup>, 柏原英彦<sup>3)</sup>, 吉田孝人<sup>4)</sup>  
<sup>1)</sup>国立佐倉病院・HLA 検査室, <sup>2)</sup>同・臨床研究部, <sup>3)</sup>同・外科,  
<sup>4)</sup>(社)日本腎臓移植ネットワーク・組織適合性委員会
22. HLA 1-ハプロタイプ適合間腎移植における DR・DRB1と MLR  
 ○安尾美年子, 小林博人, 田辺一成, 伊藤文夫, 東間 紘, 太田和夫  
 東京女子医大・腎臓病総合医療センター
23. 腎移植における TNF typing  
 ○小林孝彰<sup>1)</sup>, 加村ひろみ<sup>2)</sup>, 小原節子<sup>2)</sup>, 打田和治<sup>2)</sup>, 横山逸男<sup>1)</sup>, 高木 弘<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>名古屋大学・医・第二外科, <sup>2)</sup>名古屋第二赤十字病院
24. Xeno Tissue Typing とブタ反応性ヒト T 細胞クローナリティー (TCR-V $\beta$ ) の解析  
 ○佐藤忠之<sup>1)</sup>, 土田文子<sup>1)</sup>, 萩原政夫<sup>1,2)</sup>, バトムフ・ムンフバト<sup>2)</sup>, 上田 進<sup>3)</sup>, 坂本 薫<sup>4)</sup>,  
 増子佳世<sup>5)</sup>, 山本一彦<sup>6)</sup>, 辻 公美<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>東海大学・医・細胞移植医療センター, <sup>2)</sup>同・移植免疫, <sup>3)</sup>日生研, <sup>4)</sup>国立佐倉病院,  
<sup>5)</sup>聖マリアンナ医科大学・難治研セ, <sup>6)</sup>九州大学・生医研
25. NK 細胞が担うアロ特異的細胞障害活性の測定法の検討  
 ○斉藤彰一, 西村元子, 伊佐和美, 田中秀則, 赤座達也, 中島一格, 田所憲治, 十字猛夫  
 日本赤十字社中央血液センター
26. 輸血後 GVHD 発症患者末梢血より得られたリンパ球クローンの解析  
 ○西村元子<sup>1)</sup>, 内田茂治<sup>1)</sup>, 矢作裕司<sup>1)</sup>, 光永滋樹<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 中島一格<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>,  
 十字猛夫<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>2)</sup>東京大学・医・人類遺伝
27. 輸血後 GVHD 症例と HLA の組合せ  
 ○矢作裕司, 内田茂治, 光永滋樹, 森山 哲, 徳永勝士, 中島一格, 田所憲治, 十字猛夫  
 日本赤十字社中央血液センター

---

## 疾 患

---

28. HIV-1感染血友病患者の HLA タイプ  
 ○屋敷伸治<sup>1)</sup>, 桑山昌洋<sup>1)</sup>, 藤吉利信<sup>1)</sup>, 園田俊郎<sup>1)</sup>, 宇宿功市郎<sup>2)</sup>, 丸山芳一<sup>2)</sup>, 納 光弘<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>鹿児島大学・医・ウイルス学, <sup>2)</sup>同・第三内科
29. ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) に対する抗体反応と HLA クラス I 抗原  
 ○瀬下 敏, 松山雄一, 植野正秋, 増井富雄, 小島健一  
 新潟県赤十字血液センター

30. 日本人 AS 患者の HLA-B27対立遺伝子とハプロタイプ  
○今野泰宏<sup>1)</sup>, イスラム SM モノワール<sup>1)</sup>, 沼賀二郎<sup>1)</sup>, 増田寛次郎<sup>1)</sup>, 織田弘美<sup>2)</sup>, 三井 弘<sup>3)</sup>,  
上甲 覚<sup>4)</sup>, 平田蘭子<sup>4)</sup>, 前田平生<sup>4)</sup>  
<sup>1)</sup>東京大学・医・眼科, <sup>2)</sup>同・整形外科, <sup>3)</sup>三井記念病院・整形外科  
<sup>4)</sup>埼玉医科大学・総合医療センター・輸血部
31. 各種腎炎における糸球体基底膜障害と HLA-DRB1\*1501との相関  
○小河原 悟, 野田律矢, 長谷川善之, 田中智一郎, 平塚俊樹, 道永 功, 兼岡秀俊, 内藤説也  
福岡大学・医・腎センター
32. 免疫性血小板減少症における HLA-DRB1\*04アレルの意義  
○松崎龍典<sup>1)</sup>, 野村昌作<sup>1,2)</sup>, 石田萌子<sup>1)</sup>, 香川英生<sup>2)</sup>, 福原資郎<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>関西医科大学・輸血部, <sup>2)</sup>同・第一内科
33. サルコイドーシスにおける TAP 遺伝子の多型解析  
○石原麻美<sup>1)</sup>, 大野重昭<sup>1)</sup>, 成瀬妙子<sup>2)</sup>, 鍵谷雅彦<sup>1)</sup>, 石田敬子<sup>3)</sup>, 桑田昇二<sup>4)</sup>, 猪子英俊<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>横浜市立大・眼科, <sup>2)</sup>東海大・医・分子生命科学, <sup>3)</sup>日赤医療センター・眼科,  
<sup>4)</sup>東京大学・医・輸血部
34. 日本人でも西洋型多発性硬化症は DRB1\*1501と強い相関を示す.  
○金井隆幸<sup>1)</sup>, 吉良潤一<sup>2)</sup>, 小林卓郎<sup>2)</sup>, 西村泰治<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>熊本大学・医・免疫識別, <sup>2)</sup>九州大学・神経内科
35. アトピー性角結膜炎における HLA クラス II 抗原解析  
○鍵谷雅彦<sup>1)</sup>, 大野重昭<sup>1)</sup>, 池澤善郎<sup>2)</sup>, 成瀬妙子<sup>3)</sup>, 能勢義介<sup>4)</sup>, 石原麻美<sup>1)</sup>, 安藤理恵<sup>3)</sup>, 猪子英俊<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>横浜市立大学・医・眼科, <sup>2)</sup>同・皮膚科, <sup>3)</sup>東海大学・医・分子生命科学,  
<sup>4)</sup>兵庫県赤十字血液センター
36. Association of HLA-DR with Progressive Systemic Sclerosis in Koreans  
○Myoung Hee Park<sup>1)</sup>, Yeong Wook Song<sup>2)</sup>, Fujio Takeuchi<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>Departments of Clinical Pathology, <sup>2)</sup>Internal Medicine, Seoul National University College  
of Medicine, Seoul, Korea, <sup>3)</sup> Department of Medicine and Physical Therapy, Faculty of  
Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan
37. ナルコレプシー患者における 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  
○重成敦子<sup>1)</sup>, 安藤麻子<sup>1)</sup>, 成瀬妙子<sup>1)</sup>, 菅谷公彦<sup>2)</sup>, 池村淑道<sup>3)</sup>, 本多 裕<sup>4)</sup>, 十字猛夫<sup>5)</sup>, 猪子英俊<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>東海大学・医・分子生命科学, <sup>1)</sup>放医研, <sup>3)</sup>遺伝研・進化遺伝, <sup>4)</sup>晴和病院,  
<sup>5)</sup>日本赤十字社中央血液センター

38. 肺癌と HLA, TNFB-locus の関連に関する地域差の検討  
○萩原政夫<sup>1,2)</sup>, バトムフ・ムンフバト<sup>1)</sup>, 辻 公美<sup>1)</sup>, 佐藤忠之<sup>2)</sup>, 土田文子<sup>2)</sup>, 佐藤 薫<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>東海大学・医・移植免疫学, <sup>2)</sup>同・細胞移植医療センター
39. 乳幼児発症重症筋無力症における抗 AChR 自己反応性 T 細胞が認識するエピトープの同定  
○金井隆幸<sup>1)</sup>, 野村芳子<sup>2)</sup>, 瀬川昌也<sup>2)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>, 西村泰治<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>熊本大学・医・免疫識別, <sup>2)</sup>瀬川小児神経学クリニック
40. 実験膜性腎症モデルの MHC クラス II 遺伝子の解析  
○野田律矢, 小河原悟, 兼岡秀俊, 内藤説也  
福岡大学・医・腎センター

---

### 結 合 ペ プ チ ド

---

41. HLA-Bw4 エピトープ形成における結合ペプチドの役割  
○高宮裕児<sup>1,2)</sup>, 坂口 隆<sup>1)</sup>, 三輪清志<sup>3)</sup>, 滝口雅文<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>東京大学・医科研・癌体質, <sup>2)</sup>オリンパス光学・BRC, <sup>3)</sup>味の素中央研
42. HLA-ペプチド-TCR 相互作用による APC 内へのシグナル伝達とその変化  
○松岡多香子<sup>1,2)</sup>, 興梠博次<sup>2)</sup>, 安藤正幸<sup>2)</sup>, 西村泰治<sup>1)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>熊本大学・医・免疫識別, <sup>2)</sup>同・第1内科
43. HLA-DR1 分子拘束性に変異 Ras ペプチドを認識するヒト T 細胞クローンの解析：アナログペプチドによる免疫応答の増強  
○横溝 博<sup>1,2)</sup>, 藤田 博<sup>1,2)</sup>, 小川道雄<sup>2)</sup>, 白水美香子<sup>3)</sup>, 横山茂之<sup>4)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>, 西村泰治<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>熊本大学・医・免疫識別, <sup>2)</sup>同・第2外科, <sup>3)</sup>理研, <sup>4)</sup>東京大学・理・生物化学
44. 新しい HLA-ペプチド結合アッセイの開発と詳細な HLA-DR9 結合ペプチドモチーフ決定への応用  
○藤竿章次, 西村泰治, 松下 祥  
熊本大学・医・免疫識別
45. HLA-DQ $\beta$ <sup>57</sup> 残基の多型が結合ペプチドの構造に及ぼす影響  
○大磯正剛, 松下 祥, 西村泰治  
熊本大学・医・免疫識別
46. HLA-DR53 (DRB4\*0101) 分子結合ペプチドのモチーフの同定  
○小林博也, 小久保拓, 佐藤啓介, 片桐 一  
旭川医科大学・第2病理

---

 人 類 学
 

---

## 47. HLA class II gene polymorphism in Hoton mongolians

○Munkhbat B<sup>1)</sup>, Hagihara M<sup>1,2)</sup>, Sato T<sup>2)</sup>, Tsuchida F<sup>2)</sup>, Sato K<sup>2)</sup>, Tsuji K<sup>1)</sup><sup>1)</sup>Dept. of Transplantation Immunology, Tokai University, School of Medicine,<sup>2)</sup>Cell Transplantation Center, Tokai University Hospital, Isehara, Kanagawa,

## 48. 日本人の HLA-A, B, C, DR, DQ, DP ローカスのアリアルタイプング

○石川善英<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 小川篤子<sup>1)</sup>, 王 慧茹<sup>1)</sup>, 光永滋樹<sup>1)</sup>, 森山 哲<sup>1)</sup>, 林 玲<sup>1)</sup>, 坂内 誠<sup>3)</sup>,  
渡辺嘉久<sup>1)</sup>, 柏瀬貢一<sup>1)</sup>, 田中秀則<sup>1)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup><sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>1)</sup>東大・医・人類遺伝, <sup>3)</sup>東京都赤十字血液センター

## 49. 日本人を含む東北アジアの7民族集団, およびスペインジプシー集団における HLA-B61アリアル分布

○小川篤子<sup>1)</sup>, 林 玲<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 王 慧茹<sup>1,3)</sup>, 田中秀則<sup>1)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 朴 明姫<sup>4)</sup>,  
賈 冠軍<sup>5)</sup>, Carlos Vilhes<sup>6)</sup>, Chimge Nyam-osor<sup>7)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup><sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>2)</sup>東京大学・医・人類遺伝, <sup>3)</sup>同・輸血部,<sup>4)</sup>ソウル大学・医・病理, <sup>5)</sup>ハルビン赤十字血液センター, <sup>6)</sup>Puerta de Hierro 病院,<sup>7)</sup>モンゴル医科大学・人類学研究センター

## 50. 移住, 拡散ルートが異なると推定される B62に連鎖している2つの DR4ハプロタイプ

○木下朋子<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>, 兼重俊彦<sup>2)</sup>, 山崎美保<sup>1)</sup>, 福西孝信<sup>1)</sup><sup>1)</sup>兵庫県立西宮病院・腎臓移植センター, <sup>2)</sup>シオノギ製薬・診断医学部

# 教 育 講 演

非血縁骨髄移植の現在



## 教育講演 1

## 日本骨髄バンクの現況と日本人における HLA 適合

日本赤十字社中央血液センター 赤座 達也

日本骨髄バンクは、日本人の90%の患者に1名以上のHLA-A, B, DR 適合ドナーを見つけるに必要な10万人を目標として1992年1月より始まった。4年半たった96年6月末現在で、ドナー78,769名、患者4,201名、移植実施数800例に達している。特定のハプロタイプ頻度が高いという日本人のHLAの頻度を反映して、最近登録された患者の約2/3が1回目の検索で、血清学的なHLA 適合ドナーが見つかった。しかしながら適合ドナーが1名も見つからない患者が、現時点でも600余名残っている。

バンクが始まった時点では、検査のシステムとして、登録時にHLA クラスI型(A, B)の検査を(1次)、登録患者とクラスIが適合したドナーについてはHLA クラスII(DR)の検査を(2次)、いずれも血清学的方法でおこなっていた。さらに詳しい適合性の検査としてHLA-A, B, DR 適合した患者とドナーについてMLC 検査(3次)もおこなわれていた。DNA タイピングが普及するに伴って、MLC 検査に代ってDRB1のアリルレベルのDNA タイピングが94年7月に採用された。96年の3月以後はHLA-DR 検査(2次)は血清学的なレベルのDNA タイピングに変更された。さらにクラスIのアリルレベルの一致が移植の成績に関係することが厚生省の調査研究班により判明したのを受けて、96年後半よりクラスIの一部のHLA型についてアリルレベルのタイピングを、3次検査で実施することが決まった。

厚生省の平成7年度骨髄移植調査研究事業として、移植363例について、10種類のローカスについてアリルレベルのDNA タイピングがおこなわれた。ドナー適合の条件としている血清学的なHLA-A, B, DR 一致についてみると、アリルレベルの不適合の

数は、A ローカスでは102例で、そのうちA2が80例、A26が20例あった。B ローカスでは51例で、B61が40例で、他にB39, B13, B44にも数例見られた。DRB1では75例に不適合が見られ、DR4で32例、DR14で13例、DR8で13例、他にDR15, DR12, DR13に数例見られた。適合条件に必須ではないが血清学的に検査できるDQについてみると、DQA1で51例に、DQB1で70例に不適合がみられた。血清学的に検査の困難なローカスについては、DRB1と連鎖の強いDRB3, DRB4, DRB5ではそれぞれ9, 0, 9例に不適合がみられ、連鎖のあまりないDPA1, DPB1でそれぞれ220, 291例の不適合がみられた。

アリルレベルでの適合を調べるために、DNA タイピングの早急なルーチンレベルでの検査が望まれているが、クラスIIのDNA タイピングについては、ほぼ確立されてきたのに比べ、クラスIの全面的なDNA タイピングの導入には、しばらく時間がかかることが予想される。当面、血清学と併用していかざるをえないが、両者の関係を日本人に限定してみると、一致していて当面DNA タイピングを必要としない抗原、良好な血清がないため、DNA タイピングの必要な抗原(B75, B60/B61)、およびサブタイプのある抗原(A26, A11, B13, B39)、血清学的には1つであるがアリルでは分かれる抗原(A2, B61, B44)でDNA タイピングが必要な抗原がある。全面的なクラスIのDNA タイピングが実現するまでは、上記のことを考慮しながら、検査の臨床的な必要性と、実際にルーチン検査としてできるかの検討も加えて、抗原別に順次導入していくのがもっとも現実的と考えられる。

## 教育講演 2

## 非血縁者間骨髄移植の臨床

慶應義塾大学医学部血液内科 岡本 真一郎

同種骨髄移植は予後不良の造血器疾患に対する有力な根治療法のひとつであり、疾患によっては70-80%の治癒率を期待し得る。従来、骨髄ドナーとしてはHLA型が完全にあるいはほぼ完全に一致した血縁者が選ばれてきたが、必ずしも移植が必要なすべての患者にHLA適合ドナーが見出されるわけではない。この家族内にHLA適合ドナーが得られない患者に対しても同種骨髄移植の可能性を拡大しようとする試みが非血縁者間骨髄移植 (unrelated bone marrow transplantation: UBMT) であり、心暖かいボランティアの骨髄を中立な立場で患者に提供する機構が骨髄バンクである。現在、全世界には既に40以上の骨髄バンクが設立され、約270万人のドナーがHLA検査を済ませて登録されている。我国においても1991年に公的骨髄バンク (Japan Marrow Donor Program: JMDP) が設立され、1996年4月末日までに約7万2000人のドナーが登録を済ませ739例のUBMTが施行されている。

症例数が少く観察期間が短いことより、本邦のUBMTの成績を現時点で評価することは難しいが、欧米の成績との対比においては、同等かそれを上回る成績が得られている。しかし一方で、血縁者間骨髄移植 (RBMT) の成績と比較した場合には、すべての疾患においてUBMTで同等の成績が得られている訳ではない。急性白血病においては、骨髄性、リンパ性いずれの病型においても、第一寛解期の移植で約70%、第二以降の寛解期で骨髄性白血病で60%、リンパ性白血病で30%の2年無病生存率が得られ、同病期に施行されたRBMTのそれとほぼ同等の成績となっている。しかし、重症再生不良性貧血、骨髄異形成症候群に対するUBMTの成績は、RBMTのそれと比較して明らかに不良である。

UBMTが最も盛んに行われている慢性期慢性骨髄性白血病 (CML) においても、RBMTでは60-70%の無病生存が得られているのに対し、UBMTでは41%とその成績は必ずしも満足いくものではない。

この様にUBMTの成績がRBMTに比して劣る要因として、ドナー検索から実際の移植までに時間を要し、この間に施行される治療によって臓器傷害の程度が増すこと、RBMTと比較してUBMTではGVHDの頻度・重症度が増すこと、さらに免疫系の再構築が遅れ、これに付随した感染症の頻度・重症度が増すことなどがあげられる。現在、重症GVHD (Grade $\geq$ III) は全UBMT症例の約20%で認められ、その症例の予後は軽症~中等症GVHD症例のそれと比較して明らかに不良である。一方、進行病期の白血病でRBMTとほぼ同等の成績が得られているのは、移植免疫反応によるGVHD等の合併症が増す一方でこれに付随する移植片対白血病効果 (GVL effect) によって、移植後の再発が減少することが関与していると思われる。

今後のUBMTの成績向上には、鏡面像としてのGVL効果を失うことなく同種免疫反応を選択的に制御する免疫抑制療法、および感染 (特にウイルス) に対する防御機構の再構築を促進する方法の開発が必須である。またドナー検索より移植までの期間を短縮する様にシステムの改善を図ることが必要であることはいうまでもない。この点に関して、最近では臍帯血を用いた非血縁者間の造血幹細胞移植も注目を集めている。また今後最も重要なことは、適切な統計解析の手法を用いて、UBMTの成績を他の造血幹細胞移植や移植以外の治療法とtimelyに比較し、UBMTの各疾患の治療戦略上への位置づけを明確にしていくことである。

## 教育講演 3

## HLA 型適合と非血縁者間骨髄移植成績

九州大学生体防御医学研究所 遺伝学 笹月 健彦

厚生省骨髄移植調査研究事業の一環として、1992年から1995年5月までに、骨髄バンクを介して施行された HLA-A, B, DR が血清学的に一致した非血縁者間の骨髄移植のうち、363例につき、HLA クラス I 遺伝子 (HLA-A, B) およびクラス II 遺伝子 (DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1) の DNA タイピングを行い、HLA の遺伝子レベルでの一致が予後に及ぼす影響につき調査検討した。

その結果、HLA クラス I 遺伝子の一致がⅢ度以上の急性 GvH 病発症、一年生存率、および35ヶ月

の生存曲線を指標にした場合、いずれにおいても予後に良好な結果をもたらすことが判明した。

これに対して HLA-クラス II 遺伝子の一致は、すでに血清学的に HLA-DR が一致しているという条件のもとで、ほとんど予後に影響を与えないことが判明した。

以上の結果は、調査研究の中間段階の中間報告であり、より例数を増やし、より詳細な検討を加えることによって、最終的な recommendation を提出することが必要と思われる。



# ワークショップ I

DNA タイピングの実際  
—入門から今後の展望まで—



## W-1

## DNA 抽出から PCR まで

○小林 賢

防衛医科大学校検査部

近年, DNA を用いた HLA タイピングが色々な検査施設で実施されるようになってきている。そのほとんどが polymerase chain reaction (PCR) 法を応用したものである。これらには制限酵素を利用した PCR-RFLP 法と特異的プライマーを用いた PCR-SSP や特異的プローブでタイプする PCR-SSO などが主に実施されていると思われる。ここではタイピングの過程でもっとも基礎となる DNA の抽出法から PCR 法までについて述べることにする。まず臨床検査に HLA の DNA タイピングを応用するに当たり, 短時間で誰でもが簡単に実施できる方法が望まれる。数年前まで DNA 抽出は何時間かかかる大変な仕事であったが, 最近では色々なキットが市販され, 非常に短時間で精度の高い DNA が抽出できるようになった。また, 従来からの方法は有機溶媒を利用したものであったので実施環境や廃液などの問題もあったが, キット化されるようになってこれらの問題も解決され, どこでも気軽に実施できるようになってきている。またその反面, 全く分子生物・遺伝子工学の知識がない人でも利用できるのでは今までは考えられなかった問題も発生してきている。PCR についても色々キットが市販されるようになり, マニュアルをみながらそのまま実施できると考えてきている人も少なくなく, 様々な問題を生じているというのが現状である。そこで現在どのような問題が実際にあり, それを解決するためにはどのようにしたらよいかということワークショップでは述べたいと思う。たとえば, DNA 抽出のこつや DNA にタンパク質がどのくらい混入してもよいか。また, 採血から抽出までの期間, 保存方法など具体的に述べる予定である。PCR についても, たとえばマニュアル通りに実施しても思うような結果がでないような場合に考えられる原因, 解決法などを考えられる範囲で紹介したいと思う。

## W-2

## PCR-SSP 法

○西垣文敬<sup>1)</sup>, 笹木剛志<sup>2)</sup>, 平野哲夫<sup>3)</sup><sup>1)</sup>日本腎臓移植ネットワーク<sup>2)</sup>市立札幌病院検査部<sup>3)</sup>市立札幌病院腎移植科

市立札幌病院は平成6年から HLA タイピング法として, 国内で最も早く市販された PCR-sequence specific primers (PCR-SSP) 法によるキット (Dynal 社) を用いて DNA タイピングを導入した。

【PCR-SSP 法】 DNA 配列特異的なプライマーの組み合わせを用いて増幅産物の有無によりタイプを決定する方法。

【方法】 死体腎移植希望者は, 血清学的タイピング結果により使用する high resolution キットを選択し, 遺伝子型まで判定する。EDTA-2Na 加末梢血 0.5~1ml から Guanidine Thiocyanate 法により DNA 抽出 (20分), PCR (1時間20分), 電気泳動 (30分), ポラロイド撮影。判定まで3時間以内。死体腎提供者は low resolution キットを用い (現在, レシピエント選択は HLA 抗原型で行われるため), 血清学的タイピングと平行して実施し, 遺伝子型は後日タイピングしている。

【コスト】 血清学的タイピング結果を利用した場合, 遺伝子型タイピングまで1検体7,000円以内 (アガロース, Taq ポリメラーゼを含む)。

【利点】 短時間で判定可能 (3時間以内), DR 型と遺伝子型を同一方法で判定可能。

【欠点】 DR 型ホモ接合体の一部などで増幅パターンにより遺伝子型に複数の可能性が生じ, 遺伝子型が判定できない場合がある。市立札幌病院の検討では250名中18名 (7.2%)。

PCR-SSP 法は, 死体腎移植において HLA 抗原型でレシピエントを選択する場合は, 最も簡便かつ短時間で判定可能な方法であると考えられる。

## W-3

## PCR-SSO 法

○伊達是志

久留米大学医学部小児科

PCR-SSOP (Sequence-specific oligonucleotide probe) 法では、まず各 HLA 抗原をコードする遺伝子を PCR 法により選択的に増幅する。次に、この PCR 産物をナイロンフィルターにドットプロットし、これとそれぞれの遺伝子内の多型配列に特異的なプローブ（放射性ないしは非放射性物質により標識したもの）をハイブリダイズさせた後、その標識の有無を検出し、そのパターンから対立遺伝子型を決定する方法である。プローブの標識法には放射性と非放射性（発色法と発光法）があるが、放射性標識は、非放射性標識に比べ特異性および検出感度が高く、フィルターの再利用が可能であるという利点を有するが、取扱いに注意を要し、また特殊な施設が必要という欠点を有する。

PCR 法を用いた他の HLA-DNA タイピング法と比較すると、SSOP 法の特に優れている点は、現時点において最も確立されており、正確性が高く、技術的に容易であり、かつ多数の検体を一度にタイピングできることにある。また、あらゆる多型配列に対応するプローブを作製することが可能なため、いかなる対立遺伝子も区別できること、多くの検体のタイピングでは、1 検体あたりの検査コストが低くなることも利点である。逆に、少ない検体をタイピングすると、1 検体あたりの検査コストは相対的に高くなる。また、検査に要する時間が他のタイピング法よりも多少長いこと、特定の対立遺伝子の組み合わせを持つ場合に区別できないことがあること、SSOP の配列によってはクロスハイブリダイズがみられ対立遺伝子型の判定が困難な場合があるといったことは SSOP 法の欠点である。

従って、この方法は、骨髄移植などの臓器移植におけるドナーバンクのタイピング、疾患と HLA との相関解析等の多数の検体を対象としたタイピングに最も適した方法である。

## W-4

## PCR-reverse SSO 法

## —INNO-LiPA 法を用いた HLA class II DNA タイピング—

○佐田正晴<sup>1)</sup>、羽鳥基明<sup>1)</sup>、王 晶釘<sup>1)</sup>  
辻 隆之<sup>1)</sup>、中野寿彦<sup>2)</sup>、藤元登四郎<sup>2)</sup>  
Marie-Marthe Tongio<sup>3)</sup>  
Marcel Tilanus<sup>4)</sup>、Patty Hendrix<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>国立循環器病センター研究所、<sup>2)</sup>藤元病院、  
<sup>3)</sup>CRTS, Strasbourg、<sup>4)</sup>Utrecht Univ.,  
<sup>5)</sup>INNOGENETICS

INNO-LiPA (Line probe assay) HLA class II DNA typing キットは 1993 年ベルギーの INNOGENETICS 社により開発され、PCR-SSP 法と共に現在欧米の臓器移植、骨髄移植施設の 80% 以上で class II DNA typing の標準法として採用されている。INNO-LiPA 法は reverse hybridization の原理に基づいた方法で、5' 側を biotin でラベルした primer を用い PCR を行い、PCR 産物を allele specific oligonucleotide probe が予め平行に固定された nitrocellulose strip 上で特異的に hybridize させ、hybridization 後 alkaline phosphatase をラベルした streptavidin を加え BCIP/NTB を基質とした呈色反応により各遺伝子 allele の決定を行う。INNO-LiPA キットには sample DNA, Taq DNA polymerase 以外のタイピングに必要な全ての試薬類が含まれている。PCR 産物の denaturation, hybridization, stringent wash (strip washing), および発色反応はキットに添付されている専用プラスチックトレー内で行われるため操作が簡便で PCR 後 3-4 時間以内に全行程を終了することが可能である。各遺伝子の allele, allele combination は、allele 解析専用ソフト (INNO-LiPA Expert) を用い瞬時に決定可能で、入力ミスや misjudgement についても適切なコメントが表示される。本キットの特長として、(1) low resolution (抗原レベル)、high resolution (allele レベル) タイピングが可能、(2) PCR 後 3-4 時間以内に判定可能なことから緊急時のタイピングに有効、(3) 専用解析ソフトによる省力化とミスタイピングの回避が可能、(4) 大量検体処理が可能、(5) 最小限の機器 (PCR 装置, water bath) によりタイピングが可能、(6) Eurotransplant を中心に厳格な QC を受けているため信頼性が高い、等が挙げられる。本ワークショップで実際の方法、長所、短所、有効性、最適分野等について検討すると共に第 12 回国際 HLA ワークショップ AHS #18 (INNO-LiPA HLA DPB) についても報告する。

## 追加発言 1

Roche-PCR SSOP Reverse Line Blot  
法の検討

○屋敷伸治<sup>1)</sup>, 桑山昌洋<sup>1)</sup>, 李 洪川<sup>1)</sup>, 楼 宏<sup>1)</sup>,  
平井慎一郎<sup>1)</sup>, 大野多紀子<sup>2)</sup>, 柳沢浩一<sup>2)</sup>,  
藤吉利信<sup>1)</sup>, 園田俊郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大・医・ウイルス

<sup>2)</sup>日本ロシュ

【目的】 アメリカのロシュ社グループにより開発された従来のドットプロット法に変わるシングルハイブリダイゼーションでスクリーニングできる PCR SSOP Reverse Line Blot 法による DRB1 (low resolution) タイピングキット (Amplificor HLA DRB Test) について検討したので報告する。

【方法】 解析用の DNA 検体は PCR-RFLP, TMA-HPA 法により high resolution レベルでタイプされた日本人パネルセル (50検体) の凍結保存リンパ球からグアニジン塩酸法により high molecular genome DNA を分離精製しタイプングに供した。タイプング法は添付されたマニュアルに従っておこない、既知パネルセルの low resolution type で比較検討した。

【結果】 50パネルセルのうち DRB1\*0803/1405の2パネルが4通り、DRB1\*0803/1401の1パネルが3通りの組合せで判定されたほかは、すべて血清学的タイプと同等の DRB1タイプが同定できた (一致率94.0%)。なお、DRB1\*04, \*11, \*13, \*14, \*08タイプは、それぞれ2, 2, 2, 3, 2つのサブタイプに分類可能であった。

【考察】 ロシュの Reverse Line Blot 法は、15種類の DRB1特異的 SSO プローブと5種類の DRB3, DRB4, DRB5特異的プローブがナイロン膜に固定されており、ビオチン標識したプライマーで増幅された PCR 産物を変性後、プローブとハイブリダイゼーションをおこない洗浄の後、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼと結合させ、ペルオキシダーゼ活性をテトラメチルベンジジンを用いた発色反応で検出するものである。DNA 抽出を含まない操作時間は、3時間半以内に20検体のタイプングが可能であった。この方法の必要機器は、サーマルサイクラー (Perkin-Elmer, 9600型又は2400型)、ウォーターバスのみであり、また本キットには DNA 抽出試薬、PCR 増幅試薬が含まれており操作性が簡便で経済的にも安価であり、多数検体の検査に有用な方法と考えられる。

## W-5

## マイクロプレート法

—とくに PCR-MPH 法を中心として—

○柏瀬貢一<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>  
田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター

<sup>2)</sup>東京大学医学系研究科人類遺伝学教室

近年、PCR 法を利用した DNA タイピングがクラス II 検査においては日常的な検査法になった。また、クラス I においてはいくつかの報告がみられるがいまだ発展途上にある。多型性の検出としては色々な方法が開発されているが、日常的に多数の検体をタイプングする場合にはマイクロプレートを用いた方法が有効と考えられる。海外では、Biotest 社、Fresenius 社 (ドイツ)、Gen Trak 社 (アメリカ)、bioMerieux 社、GENSET 社 (フランス)、国内では、PCR-PHFA (PCR-preferential homoduplex formation assay) 法が湧永製薬から、TMA-HPA (transcription mediated amplification-hybridization protection assay) 法が中外製薬から報告されている。

我々は、湧永製薬と共に開発した PCR-MPH (PCR-microtiter plate hybridization) 法を主に日常検査に導入している。本法は PCR と酵素抗体法 (ELISA) を組み合わせた方法で、リバーシ・ドット・ハイブリダイゼーション法をマイクロプレートに応用したものである。現在までに DRB1 の generic typing, DRB1-DR1, -DR2, -DR4, -DR8/12, -DR3/11/13/14各グループの sub typing, DQB1 の generic typing, A2 の sub typing, B61 の sub typing 用プレートを開発した。以上を中心に、我々が今までに経験した Biotest 社の DRB SSO-typing kit, PCR-PHFA 法, TMA-HPA 法も含めて報告したい。

迅速で多量検体処理能力に優れたマイクロプレートを用いた方法は、大幅に省力化が可能なることから、今後さらに HLA の DNA タイピングの分野では威力を発揮するものと考えられる。

## 追加発言 2

## Biotest DRB-, DQB-ELPHA (Enzyme Linked Probe Hybridization Assay)法の検討

○屋敷伸治<sup>1)</sup>, 桑山昌洋<sup>1)</sup>, 李 洪川<sup>1)</sup>, 楼 宏<sup>1)</sup>,  
M. Blank<sup>1)</sup>, 平井慎一郎<sup>1)</sup>, 富田庸助<sup>1)</sup>,  
西永正樹<sup>1)</sup>, 藤吉利信<sup>1)</sup>, 園田俊郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大・医・ウイルス

<sup>2)</sup>大日本製薬

【目的】 ドイツのビオテスト社が従来のドットプロット法に準じたDRB タイピングキット (PCR-SSO法) に加え, 今回, 新たに開発されたELISA法に準じたPCR-SSOによるDRB (low resolution) とDQB (high resolution) タイピングキット (Biotest DRB-, DQB-ELPHA) について検討したので報告する。

【方法】 DNA検体はPCR-RFLP, TMA-HPA法によりhigh resolutionレベルでタイプされた日本人パネルセル (122検体) の凍結保存リンパ球からグアニジン塩酸法によりhigh molecular genome DNAを分離精製しタイピングに供した。タイピング法はPCRの温度条件を一部変更した他は, 添付されたマニュアルに従っておこなった。

【結果】 24種類のSSOプローブによるDRB1 (low resolution) タイピングは, 122パネルセルのうちDRB1\*0405/\*1405とDRB1\*0803/\*1405のパネルのみ2つの組合せで判定されたほかは, すべて血清学的タイプと同等のDRB1タイプが同定できた (一致率98.4%)。DRB1\*02タイプは添付のSSP試薬を用いることによって, DRB1\*15と16のアリルが同定できた。DRB1\*04, \*11, \*13, \*14, \*08タイプは, それぞれ4, 2, 4, 5, 2つのサブグループに分類できた。2種類の特異的プライマーと22種のSSOプローブによるDQB1 (high resolution) タイピングは, すべてRFLP法およびHPA法と一致していた (一致率100%)。

【考察】 このELPHA法はPCR-SSOとELISA法とを組合せた方法であり, FITC標識特異的プローブをマイクロプレート上に固定し, ビオチン標識したプライマーで増幅されたPCR産物を変性後, プローブとハイブリダイゼーションをおこない洗浄の後, 酵素標識抗FITC抗体を用いて発色させ検出するものである。DNA抽出を含めた操作過程を6時間以内に終えるためには1人で1日24検体のタイピングが可能であった。この方法の必要機器は, サーマルサイクラー (Perkin-Elmer, 9600型又は2400型), ウォーターバス, ELISAリーダーのみであり, HLA-DR, DQタイピングにおける血清学的方法に変わる有用な方法と考えられる。

## W-6

## PCR-RFLP 法

○成瀬妙子, 猪子英俊

東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法は, 1989年に我々の研究室で開発されて以来, 幾度かの改良を重ねながら, 簡便, 迅速, 詳細なDNAタイピング法として急速に普及したが, その背景にはこの方法が特に少数検体について, 手軽でかつ経済的であり, 一般の検査室でもすぐに導入が可能であるという簡便さが挙げられる。このPCR-RFLP法が他法と最も異なる点は制限酵素を使用することであり, HLA抗原遺伝子の多型性部位の塩基配列について, 制限酵素によって認識される塩基配列を持つ対立遺伝子は切断され, 認識されない対立遺伝子は切断されない, という原理に基づく。したがってタイピングは制限酵素反応後のDNAサンプルをアクリルアミドゲルで電気泳動することにより, 容易に判定しうる。現在ではクラスII抗原のDRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA1, DQB1, DPA1, DPB1, DMA, DMB遺伝子, さらにクラスI抗原のC遺伝子とA2抗原について, PCR-RFLPでのタイピングが可能になっており, 特にクラスII抗原遺伝子については骨髄移植を中心とした移植時の組織適合性遺伝子の検査法として多くの検査室で用いられている。A抗原, B抗原遺伝子についても開発を行う予定であるが, 今後の課題としては次々に報告される新対立遺伝子に, どのように対応するかであろう。我々は, 適当な制限酵素の識別部位が見あたらない部位について, 人工的に制限酵素部位を導入したプライマーを用いた mismatched-PCR法により, 解決している。今回は判定時のポイントを中心に, データの読み方と応用についても考える予定である。

## W-7 PCR-SSCP 法

○坂内 誠

東京都赤十字血液センター・研究部

【原理】二本鎖DNAや変性条件下にある一本鎖DNAは、ポリアクリルアミドなどのゲル電気泳動でDNAの大きさによって分離される。これは、それらのDNAが塩基配列に関係なく一定の表面電荷密度と形態をとるためと考えられる。これに対し、一本鎖DNAを非変性条件下で泳動した場合には、塩基配列に依存した特定の折り畳まれた高次構造をとるようになり、同じ長さのDNAでも塩基配列の違いを電気泳動で検出できるようになる。PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法は文字どおりこの原理を用いた方法で、HLAや血液型遺伝子、病原遺伝子などの多型を検出する際に用いられている。

【方法】我々のHLAタイピングを例にとると、血清学やlow resolution DNAタイピング法などでグループを絞り込み、その情報からグループ特異的なPCRを行っている。増幅産物 $1\mu\text{l}$ にホルムアミド色素液 $7\mu\text{l}$ を混合し、 $95^{\circ}\text{C}$ で5分加熱後水中で急冷する。その $1\mu\text{l}$ をアクリルアミド：ビス=49：1のゲルで $0.5\times\text{TBE}$  buffer中で電気泳動した後、銀染色でバンドを検出する。泳動の際の温度、ゲル濃度、ゲル中グリセロールの有無などにより条件をコントロールし、各グループでアレル間の識別が可能な条件を設定している。

【結果と考察】約200~300塩基の増幅断片を用いて、多くの場合1塩基のみの変異でも区別が可能である。タイピングにはあらかじめ既知の標準検体を入手しておく必要がある他、1つのゲルで比較できるアレル数が限られているため、多くの標準検体との比較は煩雑となる。しかし、他の方法やハプロタイプのパターンから、予想されるアレルをあらかじめ絞り込んでおいた場合には、1サンプルにつき1レーンの電気泳動で判定できるので効率的となる。また、変異の場所と種類は特定できないものの、増幅断片上のほぼすべての変異を認識できるので、未知のアレルの発見に適している。さらに、2つの検体とその混合物を横に並べて比較すれば、移植ペアなどのマッチングも行える。

## W-8 PCR-DCP 法 —HLA マッチング法として—

○丸屋悦子

京都府赤十字血液センター・研究部

骨髄移植の成否をきめる3大要素は年齢・病態・HLAであるとされている。血縁間骨髄移植は血清学レベルのHLA検査で十分に精度の高いHLAマッチングをおこなうことができた。それはHLAの遺伝関係からハプロタイプを特定できたからである。骨髄バンクを介した非血縁間骨髄移植は、ハプロタイプ一致の保証が得られないため、血縁間骨髄移植よりさらに精度の高いHLAマッチが要求される。現在DNAタイピングにより、その目的が達成されつつある。DNAタイプは分類能力の高さに反比例して検査過誤が増え得る。またすべての座位についてDNAアレルタイピングが行われているわけではない。そして、MLCの精度上の問題から直接クロスマッチは行われないことが多い。これらの点を補うためPCR-LIS-DCP (low ionic strength-DNA conformation polymorphism) によるDNAクロスマッチ法を開発した。DRB領域(1, 3, 4, 5およびpseudo-)、DQB領域、DPB領域、class I領域のexon 2, exon 3 (A, B, C, E, F, Gおよびpseudo-)を別々に増幅する。増幅DNA溶液のイオン強度を調節し、熱変性後PAGEを行い、SSCPとHeteroduplex formation (HDF) polymorphismを同時に検出し、ドナーとレシピエントのバンドパターンを比較し適合性を調べる方法である。非血縁および血縁間骨髄移植60組について、アレルとDNAクロスマッチの相関を調べた。Class IIのDNAクロスマッチとアレルマッチングは高い相関を示し、クロスマッチにより、60組中3例のアレルタイピング過誤を検出した。さらにDRB1\*1501におけるDRB5欠損例も検出した。一方class Iクロスマッチとアレルマッチングの相関は弱く、特にA\*0201とA\*0206の区別がクロスマッチで困難であり、C座のアレルも含め、詳しい検討が必要である。

## W-9

## DNA タイピングの今後

○石川善英<sup>1)</sup>, 森山 哲<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>日赤中央血液センター

<sup>2)</sup>東京大学医学系研究科人類遺伝学教室

ここ数年でDNA タイピングが特別な技術ではなくなり、実用的な方法として検査室でも使われている。様々なDNA タイピング法が開発されているが、手軽さ、タイピングできる検体数、分解能などにおいて、それぞれ長所、短所があり、目的により方法を選択する必要がある。

現在使われているDNA タイピング法では効率良く、高い信頼度でアリアルを決めるためにはlow resolutionとhigh resolutionの2段階の検査が必要であるが、PCR-PHFA (preferential homoduplex formation assay) 法とPCR-SBT (sequence-based typing) 法では一段階の検査でアリアルを決めることができる。

PCR-PHFA 法は少数検体にも多量検体にも使えるアリアルタイピング法である。DNAを熱変性により一本鎖にした後、ゆっくり温度を下げると相補的な鎖同士が優先的に二重鎖を形成する。この性質を利用しアリアルを決定することができる。この方法ではタイピングしたいアリアルの標準DNAをすべてそろえておく必要があるが、比較的短時間で手軽に行える方法である。

PCR-SBT 法は塩基配列を解析してアリアルを決定する方法である。以前は塩基配列を決めるためにはクローニングが必要であり、とても日常の検査で使える方法ではなかった。しかし酵素、ソフトウェアの改良により、ヘテロのサンプルでも直接塩基配列を解析しアリアルを決定できる方法が開発されている。DNAシーケンサーを必要とし、多量検体のタイピングは困難であるが、用意するものは数種類のプライマーだけであり、新しいアリアルにもそのまま対応できる。

また数mm四方のガラス板に100種類近いプローブを固定したマイクロチップを用い、シーケンサーを使わずに塩基配列を決める方法 (SHOM法: sequencing by hybridization to oligonucleotide microchip) についても紹介する予定である。

## 追加発言3

## TMA/PCR-HPA法の semiautomatic systemについて

○吉田孝人, 小林 明, 水口義則

浜松医科大学, 昭和大・医・細菌

【目的】96穴プレートを用いて、HLA allele typingを自動化することによって多数の検体を正確、迅速にhigh resolutionのレベルでHLA DRB1, DQB1, DPB1を測定出来るTMA/PCR-HPA法のsystemを確立することを目的とした。

【方法・結果】今回はこのsemiautomatic systemの最後のステップ3の部分であるプレートリーダーが自動化し、第一号機で、実際にDRB1は24~30probes, DQB1は20probes, DPB1は16probesを用いて測定してみると、この部分が今までのリーダーと比較すると3倍の速度で測定し、リーダーの一部のコンピューターにデータが記憶され、自由に測定後でも分析可能になった。このことによってパターン化、等々とDRB1を一度に測定してhigh resolutionレベルで測定することが簡単になったなどの利点が出てきた。

更にHLAクラスIのallele typingがこのリーダーを用いることによって正確、迅速に出来る可能性が生まれてきたのである。

# ワークショップII

クロスマッチ——最近の話題



## W-10

## LCT と AHG-LCT (血小板輸血)

○荒木延夫

兵庫県赤十字血液センター

血小板輸血は血小板減少症を伴う疾患などの止血管理にきわめて有効な療法として用いられ、その需要は増加している。しかし、血小板を大量に繰り返し輸血すると、患者体内に HLA 抗体が産生され、血小板輸血不応答 (PTR; Platelet Transfusion Refractoriness) に陥ることがある。このような患者に HLA 抗原の適合、あるいは近似したタイプの供血者のリンパ球と患者血清を用いたリンパ球細胞毒性試験 (LCT; Lymphocytotoxicity Test) でクロスマッチを行い、反応陰性の血小板を輸血すると、70%に良好な輸血効果が得られるが、残りの30%は無効である。その原因の1つとして、通常の LCT 法では検出できない HLA 抗体の存在が考えられる。すなわち、LCT 法は補体を用いた血清反応であるため、補体非結合性あるいは、補体結合性 IgG 抗体であっても抗体価の低い LCT 抗体で、細胞表面の抗原分布状態により抗原に結合した抗体によって補体が活性化されない場合は、抗体 (CYNAP; Cytotoxicity Negative, Absorption Positive) を検出することは不可能である。したがって、HLA 抗体を検出できる最も信頼できる方法は、より高感度のクロスマッチ法としてクームス法の原理を用いた LCT 法 (AHG-LCT; Anti-human Immunoglobulin-LCT) といえる。AHG-LCT 法に用いられる抗ヒト免疫グロブリン血清は、抗ヒト L 鎖  $\alpha$  型と  $\lambda$  型血清を用い至適濃度を検定し、PBS により希釈して使用する。そして、LCT 法と AHG-LCT 法を併用したクロスマッチの結果、HLA 適合度 (近似したタイプの割合) が高いほど有効な輸血効果が得られる (90%以上) が、適合度が低いと有効な輸血効果は約80%である。この差については従来の AHG-LCT 法では検出不能な HLA 抗体の存在が示唆される。また、PTR の原因として血小板特異抗体の存在もあり、それらの点については以降の演者に譲りたい。

## W-11

改良 AHG-LCT, MAIPA と  
MAILA (血小板輸血)

○三谷孝子, 池田久實, 関口定美

北海道赤十字血液センター

HLA 適合血小板輸血におけるクロスマッチは、その結果が血小板輸血効果と相関することが第一条件となり、その他特異性、簡便性および迅速性等が要求される。今回、クロスマッチとしてわれわれが改良 AHG-LCT および MAILA, MAIPA を紹介し、併せてこれらのクロスマッチが輸血患者中の同種抗体をほぼ検出可能でありかつ特異性に優れた方法であることを報告する。

【改良 AHG-LCT】改良 AHG-LCT は従来の AHG-LCT と検査方法は同一であるが、被検血清として患者血清の濃縮  $\gamma$  グロブリン画分を使用する点が異なる。AHG-LCT と改良 AHG-LCT の HLA 抗体検出率を比較すると、AHG-LCT の72.6%に対し改良 AHG-LCT は96.5%と高く、また実際の PC-HLA 輸血のクロスマッチとして使用した場合、その輸血無効率率は AHG-LCT の27.5%から改良 AHG-LCT の8.5%と減少した。これらの結果から改良 AHG-LCT は AHG-LCT に比べ、より高感度かつ輸血効果と相関する方法であると推定される。

【MAILA】MAILA において HLA 抗体を検出する場合は、リンパ球上の HLA 抗原分子を MOAB (w6/32) により単離後マイクロプレート上に固定し、これを抗原として患者血清中の HLA 抗体を EIA の系で検出する方法である。MAILA は改良 AHG-LCT においても検出不可能な輸血効果に影響する HLA 抗体を検出でき、また、改良 AHG-LCT で検出される non-HLA リンパ球抗体は検出されず、HLA 抗原に特異的である。

【MAIPA】MAIPA は血小板抗体を検出する系で、HPA 抗原をはじめ血小板上の抗原が局在する各糖蛋白を各 MOAB により単離後マイクロプレート上に固定し、これを抗原として患者血清中の血小板抗体を EIA の系で検出する方法である。MAIPA は各糖蛋白上の抗原に特異的な抗体を検出するため、MPHA では検出困難とされている複合の抗原感作も、それらを分離して検出できる利点がある。また、結果は数値 (吸光度) により出力されるため、その判定は客観的かつ容易である。

## W-12

## MPHA と顆粒球抗原・抗体検査

○宮本光子, 柴田洋一

東京大学医学部附属病院輸血部

輸血時に, Donor 血液中の抗顆粒球抗体に因るとおもわれる重篤な輸血副作用をおこすということが, 問題になってきている。しかし, 顆粒球の寿命がリンパ球や血小板にくらべて短く長期に保存ができないということなどから, 抗顆粒球抗体検索の即時対応において問題があった。

そこで我々は, 柴田らが開発した抗血小板抗体検出法である MPHA 法を利用して抗顆粒球抗体の検索法の開発を試みた。

顆粒球細胞を凍結させることによって顆粒球抗原の長期保存ができ, なおかつ検出法が簡便であることなどから抗顆粒球抗体検索のために一度に大量の検体処理も可能となってきた。

5% EDTA 添加ヒト末梢血より比重遠心法で分離した顆粒球細胞を U 型マイクロプレートに付着させ, 4% パラフォルムアルデヒド溶液で固定した後 5% サッカロース溶液を加えて -40°C で凍結保存し用時解凍して検査に使用する。

凍結保存することによって多種の顆粒球抗原細胞が保存され, 臨床症例にも即時対応することが可能となった。

micro-aggglutination test 法や fluorescein test 法との比較検討もおこなった。

## W-13

フローサイトメトリーを用いた  
FACS クロスマッチ法○笹木剛志<sup>1)</sup>, 西垣文敬<sup>2)</sup>, 平野哲夫<sup>3)</sup><sup>1)</sup>市立札幌病院検査部<sup>2)</sup>日本腎臓移植ネットワーク<sup>3)</sup>市立札幌病院腎移植科

市立札幌病院では日常検査として腎移植のためのクロスマッチとしてフローサイトメトリーを用いた T リンパ球クロスマッチ (以下 FACS クロスマッチ) を実施しているその臨床成績と合わせて報告する。

【方法】 T リンパ球浮遊液 ( $5 \times 10^5$  個)  $30 \mu\text{l}$  に被検血清  $20 \mu\text{l}$  を加え, 25°C 30 分間反応。2% Alb. 加 PBS で 2 回洗浄。50 倍希釈 FITC 標識抗ヒト IgG F(ab)'<sub>2</sub> 抗体  $50 \mu\text{l}$  を加え, 氷中 30 分間反応。2% Alb. 加 PBS で 2 回洗浄。PE 標識抗ヒト Leu4 (CD3) 抗体  $20 \mu\text{l}$  を加え, 氷中 20 分間反応。2% Alb. 加 PBS で 2 回洗浄。シース液で 1 回洗浄後, B.D. 社 FACScan にて測定。

【判定】 陽性は, ノーマルコントロール血清の mean channel と比較して +10.0 以上シフトする場合を原則的に陽性とした。

【感度】 当院の検討で, FACS クロスマッチは LCT 法の 32~64 倍感度が高いと考えられる。

【臨床成績との相関】 市立札幌病院, 北大泌尿器科で移植した LCT 法による T リンパ球クロスマッチ陰性 89 例を対象とした。

FACS クロスマッチ陽性 5 例中, 移植後 6 日以内に拒絶反応を生じたのは 3 例 (60.0%), 陰性 84 例では 7 例 (7.1%) で, 両者間に統計学的有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。FACS クロスマッチ陽性 5 例中, 移植後 6 日以内に拒絶反応を発生し, 回復せずに移植腎機能を失ったのは 2 例 (40.0%), 陰性 84 例では 1 例 (1.2%) で, 両者間に統計学的有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

FACS クロスマッチは高感度であり, 移植後早期の拒絶反応の回避, 予知に有用と考えられる。

## W-14

フローサイトメトリーを用いたFACSクロス  
マッチの紹介と臨床成績との相関について

○小原節子<sup>1)</sup>, 加村ひろみ<sup>1)</sup>, 打田和治<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋第二赤十字病院組織適合検査センター,

<sup>2)</sup> 同 移植外科

腎臓移植における予後に重要な影響を及ぼす免疫学的要因の一つとして, Recipient 血清中の Donor Specific Antibody (Warm T, Warm B) がある. この血清中の抗体をより感度よく検出し, さらに抗体の特性を解明することは腎臓移植の適応を拡大し, 有効な免疫抑制療法の選択を可能とし, 移植予後を向上することができると考えられる.

従来より Donor-Recipient のリンパ球クロスマッチは, LCT 法と AHG-LCT 法にて行われているが, 細胞の純度および自己抗体の存在等に起因する判定困難という問題がある. これらの欠点を補うことができると考えられる Flow Cytometry (FCM) 法を採用してその有効性を検討した.

今回は1993年8月以降, 現在までに名古屋第二赤十字病院移植外科で施行された生体腎移植70症例 (ABO-不適合症例9例を含む) と, 死体腎移植の一部について移植前のリンパ球クロスマッチと, 移植後の拒絶反応の Monitoring としての Donor Specific Antibody の検索を FCM 法, LCT 法, AHG-LCT 法の3法にて施行し比較した. FCM 法は FITC-Anti human IgG, IgM と PE-CD3 を用いて mean channel shift によって T-cell 抗体を解析した.

これらの3法による感度の比較および特性についての検討と臨床的経過を報告する. さらに FCM 法の臨床的意義とその応用性, 特に死体腎移植における実用性について述べる.

## W-15

B cell クロスマッチ陽性は移植適応か否か

○奥山正明<sup>1)</sup>, 烏谷竜哉<sup>1)</sup>, 青木里美<sup>1)</sup>

井上博雄<sup>1)</sup>, 坂本尚穂<sup>1)</sup>, 大岡敬二<sup>3)</sup>

濱田 齊<sup>3)</sup>, 岩田英信<sup>3)</sup>, 竹内正文<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>愛媛県立衛生研究所

<sup>2)</sup>愛媛県松山中央保健所

<sup>3)</sup>愛媛大学医学部泌尿器科

愛媛県の慢性透析患者数は, 平成7年末で1,990人に達しており, 毎年100人程増加している. 腎移植はこれらの患者の根治療として, また QOL 向上の面から行われているが, 親族からの腎提供が中心となっている. 一方, 慢性透析患者は, 輸血などにより抗リンパ球抗体が陽性となる例もかなりみられ, 我々が行った既存抗体検査では175人中 T warm 抗体が22人 (12.5%), B warm 抗体が59人 (33.7%) に検出されている. これらの症例については, 死体腎提供者との HLA 適合度が高くてもクロスマッチ検査で不適切となり, 移植機会を失う場合もあり, 今後解決されなければいけない問題となりつつある. 将来, 血漿交換などにより前感作抗体を陰性化して死体腎移植を行うために, 生体腎移植での症例の検討が必要と思われる.

今回, B warm 抗体陽性者に血漿交換を行い良好な成績を得ている生体腎移植の症例について移植後の免疫学的モニタリングを行う機会があったので報告する.



# 一般演題



## 1

HLA-B27抗原の血清学的サブタイプ B27KH  
をコードする新しい B27アレル

○長谷川 隆<sup>1)</sup>, 小川篤子<sup>2)</sup>, 南斉博英<sup>1)</sup>  
俵 国芳<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>2,3)</sup>, 十字猛夫<sup>2)</sup>  
近藤正太郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京南赤十字血液センター

<sup>2)</sup>日赤中央血液センター

<sup>3)</sup>東京大学・医・人類遺伝

【目的】我々は、B40グループの抗血清の一部に反応を示す HLA-B27サブタイプ、B27KH を見出し、B27グループ特異的な PCR-SSOP 法により、このサブタイプのアレルは、B\*2707 または新しい B27アレルであることを同定し、学会誌 MHC (Vol.2, No.3) に報告した。今回、この新しいアレルのエクソン 1~7 の塩基配列を決定したので報告する。

【方法】健常日本人 (A24, A31, B27KH, B51, Cw10, CX4451) の末梢血中のリンパ球から得た RNA より合成した cDNA を B ローカス特異的プライマーで増幅後、T ベクター法により cDNA クローンを得た。これらのクローンから、B27 の配列を有する 6 クローンを SSP 法で選択し、ジデオキシサイクルシーケンス法と自動シーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

【結果】得られた塩基配列は、既知のアレルに一致せず、血清学的に同じ反応性を示した B\*2707 に最も相同性が高かった。その違いは 2 塩基で、77 番目のコドンにおいて B\*2707 の GAC (アスパラギン酸) に対して、この新しいアレルは AGC (セリン) の配列を持っていた。

【考察】新しいアレルと B\*2707 はともに B\*4002 と等しいエクソン 3 の塩基配列を持っており、そのために、B40グループの抗血清と反応したものと考えられる。日本人の B27アレルは B\*2704 が多く B\*2707 は見出されていない。発端者の HLA 型から、B 座-C 座ハプロタイプは B27KH-Cw10, B51-CX4451 と予想される。B\*4002-Cw10 の関連はよく知られており、これらを考えあわせると、この新しいアレルは、B\*2707 から形成されたというよりも、B\*2704 と B\*4002 の組み換えにより生じた可能性が考えられた。

## 2

Multiple Antigenic Peptide を用いた  
イムノプロット用抗 HLA-B 血清の作製

○古田 求, 太田浩敏, 和田かおる, 高橋 勲  
水野伸一, 神谷 忠, 小澤和郎  
愛知県赤十字血液センター

【目的】HLA クラス I 抗原は通常 LCT, DNA タイピングにてタイピングされている。これらの方法以外に等電点電気泳動 (IEF) においても多数の allele が存在することが知られているが、これまで IEF によるタイピングは十分にはなされていない。今回、我々は HLA-B locus に特異性の高い Multiple Antigenic Peptide (MAP) を調製し IEF-イムノプロット (IEF-IB) 用抗 HLA-B 血清の作製を試みた。

【方法】1) MAP の合成: HLA-A locus とは反応せず HLA-B locus のみに対し特異性を示す抗血清を得るため B locus のアミノ酸配列 61-76 (DRETQISKTN-TQTYRE) に相当する 16 mer に関して Fmoc.法を用いて MAP を調製しこれを免疫原として抗 HLA-B (61-76) 血清を調製した。この MAP は HLA-B15, B40, B52 等多くの B locus に共通であるが A locus とは 16ヶ中 8~9ヶアミノ酸配列が異なった。イムノプロット (IB): B 細胞株を Triton-X114 にて溶解し、膜画分を調製し、SDS-PAGE および IEF を行った後、抗 HLA-B 血清を一次抗体として IB を行った。

【結果および考察】6 種類の B 細胞株について SDS-PAGE-IB を行った結果、抗 HLA-B 血清は免疫原と同じアミノ酸配列の B52, B62 を有する E4181324, Boleth には強陽性を示すのに対し、16ヶ中 2~3ヶのアミノ酸配列が異なる B locus を有する 4 種類の B 細胞株には弱陽性を示した。さらに E4181324 (A1, B52), VAVY (A1, B8) について IEF-IB を行った結果、免疫原と同じアミノ酸配列の B52 を示すバンドのみが検出された。従って、HLA-B locus に特異性の高い MAP を作製、免疫することにより HLA-B locus に高い特異性を示す抗血清を調製することができたと思われた。また、調製した抗血清は IEF-IB に用いることができる有用な抗血清であると考えられた。

## 3

## PCR-MPH 法による HLA-A2 および B61 遺伝子のタイピング

○中野浩美<sup>1)</sup>, 川井信太郎<sup>1)</sup>, 柏瀬貢一<sup>2)</sup>  
小川篤子<sup>2)</sup>, 石川善英<sup>2)</sup>, 徳永勝士<sup>2,3)</sup>  
山根明男<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>湧永製薬・バイオ研究所

<sup>2)</sup>日赤中央血液センター

<sup>3)</sup>東京大学・医・人類遺伝

【目的】 多検体の HLA の DNA タイピングに適した方法として、我々は迅速で操作が簡便、コストが安価な PCR-MPH 法を開発した。

骨髄バンクを通じた非血縁者間骨髄移植は HLA-A, B, DR 抗原の血清学的な一致を原則としているが、平成7年度の笹月班のレトロスペクティブな研究によればクラス I におけるアレルレベルでのミスマッチは A 抗原で A2 が、B 抗原で B61 が 80% 近くを占めていた。その主な原因は、それぞれが血清学的にタイピングが困難な数種のアレルに分かれるためである。同時にクラス I 抗原の DNA レベルのマッチングが移植予後に重要であることも報告され、HLA-A2 および B61 遺伝子のアレルタイピングが強く望まれている。そこで今回我々は、PCR-MPH 法による HLA-A2 および B61 遺伝子のアレルタイピングについて検討を行ったので報告する。

【方法】 A2 では日本人に報告されている 5 種類 (A\*0201, \*0203, \*0206, \*0207, \*0210) のアレルを 7 プローブが固定されたプレートを用いてタイピングした。同様に B61 では日本人に多く存在する 3 種類を含む 4 種類 (B\*4002, \*4003, \*4004, \*4006) のアレルを 4 プローブを用いてタイピングした。PCR 反応以後の MPH の条件および操作は HLA-DRB1 遺伝子のタイピングのものと全く同じである。

【結果】 本法を用いて DNA タイピングを行った結果、それぞれ PCR-SSO 法および PCR-SSP 法の結果と良く一致した。

【考察】 本法により従来の血清学的方法ではタイピングできなかった HLA-A2 および B61 遺伝子のアレルタイピングが可能となった。HLA-DRB1 と MPH の条件は同じなので、条件の変更という煩わしさがなく、A2 と B61 の MPH は DRB1 と同時に行うことが可能である。本法は今後更に HLA の DNA タイピングの分野で威力を発揮するものと考えられる。

## 4

## 日本人の B (40, -) 抗原の DNA タイピングとマッチングの検討

○酒巻建夫, 柏原英彦, 山崎正明, 苅部正宏  
飯田好江

国立佐倉病院臨床研究部, 外科, HLA 検査室

【目的】 日本人で HLA-B40 抗原は、B60, B61 に分けられ、少なくとも DNA レベルでは B60 は 1 つ、B61 は 3 つに細分化される。一方、B61 抗原にモノスペシフィックに反応する抗血清が得られ難く、B60 と B61 抗原が共存する場合に判別が困難となる。我々は DNA 法にてアレルレベルでのタイピングを行い、適合割合を検討したので報告する。

【方法】 抗血清法を施行してある国立佐倉病院職員、関係者 384 名を対象に、PCR-SSP 法によりタイピングを行なった。アレルレベルで 1 抗原のみ検出されたものはホモザイガスとして取り扱った。

【結果】 アレルレベルから抗血清レベルに読み替えた B60, B61 の遺伝子頻度は、4.9%, 14.5% で、第 10 回 JHWC 報告の頻度 5.72%, 12.75% とほぼ一致していた。我々の通常の検査トレイでは B (60, -) とタイプされている検体は B (60, 60) のホモと B (60, 61) の場合があるが、これらの頻度を推定すると 0.24% と 1.43% になった。また B (61, 61) の頻度は 2.1% と考えられた。これらの推定頻度は実測値と極めてよく一致した。一方、アレル頻度は B\*4001, B\*4002, B\*4003, B\*4006 がそれぞれ 4.9%, 9.5%, 0.5%, 4.4% であった。B40 遺伝子レベルでのマッチングを考えるとドナーとレシピエント間での B (X, 60) の組み合わせでは 100% 適合すると考えられるが、B (X, 61) の場合は 53% が適合すると推定できる。B (60, -) の場合には、B (60, 60) 同士で適合する場合と B (60, 61) 同士で適合する場合を含めて約 60% で遺伝子レベルでの適合が期待される。さらに B (61, -) を B (61, 61) と見なすと、アレルレベルでの適合率はほぼ 36% と推定された。

【考察】 B40 抗原の遺伝子レベルでのタイピング結果が、抗血清法での頻度や、遺伝子レベルの多型性の実測値と期待値で一致したことは、PCR-SSP 法によるタイピングがほぼ正確に行われていることと、正常人の発現に、組み合わせに偏りが無いことを示している。また、適合予測は今後、適合者検索や移植成績の分析にも役立つものと思われる。

## 5

PCR-SSOP 法による HLA-B 遺伝子の  
高精度アリルタイピング

○稲川 明<sup>1)</sup>, 兼重俊彦<sup>1)</sup>, 平井博美<sup>1)</sup>  
伊藤要一<sup>1)</sup>, 寺岡 宏<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>  
木下朋子<sup>1)</sup>, 福西孝信<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>シオノギ製薬・診断医学部

<sup>2)</sup>兵庫県立西宮病院・腎移植センター

【目的】 PCR-SSOP (sequence-specific oligo-nucleotide probe)法による HLA-B 遺伝子の高精度アリルタイピングについて検討を行った。

【方法】 HTC (homozygous typing cell) およびクラス I 血清タイピングを行った日本人由来のゲノム DNA に対して, 第 2~第 3 エクソン内の B 遺伝子 (B54 は除く) に特異的な PCR を行い, 得られた産物 (740 bp) を更にコドン 45~46 の可変部に対応した 4 種類のセンスプライマーと, コドン 163 の可変部に対応した 3 種類のアンチセンスプライマーの組み合わせで 10 種類のアリルグループに分けて PCR 増幅 (659 bp) した。各グループの PCR 産物に対し 9~35 種類 (合計 61 種類) の<sup>32</sup>P 標識 SSOP (18mer) を用いて, ドットプロットハイブリダイゼーションを行い, その反応パターンから HLA-B 遺伝子の高精度アリルタイピングを行った。また B54 (B\*5401) については B54+C 遺伝子特異的 PCR を行った後, 制限酵素処理により解析を行った。

【結果】 ①本法により, 増幅領域内で区別できないアリル (8 種類) を除き, 全てのサンプルにおいて B ローカス遺伝子の高精度アリルタイピングが可能であった。またこれらは血清タイピングのデータと整合した。② HTC の内, 既に報告のあるもののアリルタイプと本検討のデータは一致した。

【考察】 本法は 130 種類以上の存在が知られる HLA-B 遺伝子を 10 種類のアリルグループに区分し, それぞれのグループ毎に SSOP タイピングを行うため, 信頼性の高い HLA-B 遺伝子のアリルタイピングが可能である。これまでの検討で, 異なるハプロタイプに連鎖不平衡を示す同一の B 抗原のアリルタイピングを行ったところ, アリルレベルでは異なっているものが観察されており, 更に詳細なハプロタイプの解析を進行中である。

## 6

HLA-B 抗原遺伝子タイピングのための  
PCR-RFLP 法

○光永滋樹<sup>1)</sup>, 小川篤子<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>  
赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター

<sup>2)</sup>東京大学・医学部・人類遺伝

【目的】 比較的少数の検体の HLA-B 抗原対立遺伝子の同定, タイピングに有用な nested PCR-RFLP 法を開発した。

【方法】 HLA-B 座特異的プライマー [Cereb N et al., Tissue Antigens (1995) 45:1-11] により exon 2, intron 2, exon 3 を含む領域を増幅し (1st PCR), その増幅産物をテンプレートとして exon 2, 3 をそれぞれ特異的に増幅した (2nd PCR)。解析を容易にするために, 2nd PCR では exon 2 は 2 群, exon 3 は 3 群に分け, 群特異的増幅を行った。塩基配列の情報が入手可能な 143 種類の対立遺伝子を対象として, 増幅される領域の制限酵素認識部位をコンピューターにより解析し, RFLP 法のための制限酵素を決定した。

【結果および考察】 2nd PCR が群特異的であることは, 血清学的タイプが分かっている検体の増幅により確認した。塩基配列から exon 2 は 47 種類と 96 種類の対立遺伝子の 2 群に分かれると予想された。さらにコンピューターによる解析からそれらは 9 種類の制限酵素を用いて 21 種類, 10 種類の制限酵素を用いて 33 種類の PCR-RFLP のパターンにそれぞれ分かれることがわかった。exon 3 では 31, 32, 80 種類の 3 群に分かれ, 8, 5, 10 種類の制限酵素により 19, 14, 40 の PCR-RFLP のパターンに分かれると考えられた。さらにこれらの PCR-RFLP のパターンを組み合わせることにより, 143 種類の HLA-B 抗原対立遺伝子は 122 種類のパターンにわかれ, 大部分の対立遺伝子が同定可能であった。Terasaki P (UCLA) の研究室で行われている cell exchange の検体をこの方法でタイピングした結果は, 他の研究室でのタイピング結果とよく一致していた。また, 輸血後 GVHD のような血清学的タイピングの情報が無い場合の検体でも対立遺伝子の同定が可能であった。これらのことから我々が開発した方法は有用な方法であると考えられた。

## 7

## PCR-RFLP 法による HLA-C 抗原遺伝子の DNA タイピングの確立

○松澤由美子, 成瀬妙子, 猪子英俊  
東海大学医学部分子生命科学

【目的】 HLA-C 抗原のタイピングは, 血清学的方法では同定が他の抗原に比べ困難であり30~40%のブランクが存在している. しかし, HLA-C 抗原が, 関与しているとされる疾患も多数報告されており, より詳細な DNA タイピング法が必要である. そこで我々は, PCR-RFLP 法を用いて, より簡便で詳細な HLA-C 抗原遺伝子タイピングの検討を行った.

【方法】 HLA-C 抗原遺伝子で最も多型性に富む第2-第3エクソンのイントロン部分を含む領域904 bp を, プライマー (5' CIn -61; 5'-AGCGAGGG/TGCCCGCCCGGCGA, 3' BCIn -12; 5'-GGAGATGG-GGAAGGCTCCCCACT) を用い, 変性94°C, 22秒, アニール65°C, 50秒, 伸長72°C, 30秒の30サイクルで PCR を行い, 増幅した. その後, 既に明らかにされた HLA-C 抗原遺伝子の塩基配列30種の対立遺伝子をもとに, コンピュータにより検索した制限酵素で切断した. まず7種類の制限酵素 (*ApaI*, *BglIII*, *BsiHKAI*, *XcmI*, *BsgI*, *AluI*, *AvaI*) を用いて9グループに分類し, 更に4種類の制限酵素 (*BsaAI*, *RsaI*, *NlaIII*, *EcoNI*) を用いて18グループに分類した.

【結果】 22種類の既知 HLA-C 抗原遺伝子ホモ接合体細胞を用いて PCR-RFLP 法による DNA タイピングを行った所, Cw\*0102が3種, Cw\*0303, Cw\*0304が1種, Cw\*0501, Cw\*0802が5種, Cw\*0602が1種, Cw\*0702, Cw\*1203が5種, Cw\*1202が2種, Cw\*1402, Cw\*1403が3種, Cw\*1502, Cw\*1503, Cw\*15051が1種, Cw\*1701が1種を検出し, その結果は全て一致した.

【考察】 本実験における DNA タイピングの結果が, 既知 HLA-C 抗原遺伝子ホモ接合体細胞と全て一致したことから, PCR-RFLP 法による HLA-C の DNA タイピングが有効であると考えられた. 更に, 第2エクソンと第3エクソン間に存在するイントロンでの切断部位に細胞間で違いが認められたことから, 今後, イントロンの配列についても解析を行う予定である.

## 8

## 日本人の HLA-C アリール: PCR-SSCP 法および DNA 塩基配列決定による解析

○王 慧茹<sup>1,2)</sup>, 徳永勝士<sup>1,3)</sup>, 中島文明<sup>4)</sup>  
赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 柴田洋一<sup>2)</sup>  
十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日赤中央血液センター

<sup>2)</sup>東大・医・輸血部

<sup>3)</sup>東大・医・人類遺伝

<sup>4)</sup>神奈川県血液センター

【目的】 日本人集団において HLA-C 抗原はその70%が Cw1, 2, 3 (Cw9, 10), 4, 5, 6 あるいは Cw7 として血清学的に同定される. しかし, それらをコードするアリールとして Cw7 以外は報告されていない. また, 30%を占める HLA-C ブランクについても Cw\*1202, 1402, 1403 が日本人において報告されているが, このほかにも未同定のアリールがあるものと考えられる. そこで, C ローカスについて PCR-SSCP 法でアリールを判別し, それぞれのアリールについて DNA 塩基配列決定を行った.

【方法】 いろいろな HLA-B 抗原と関連を示す C 抗原を持つ健康な日本人30人の末梢血よりゲノム DNA を抽出した. ヨーロッパ人由来の標準 DNA も加え, PCR-SSCP 法を行ったところ, 異なる21種類のパターンに分かれ, 日本人検体については15種類に分かれた. 各パターンを示した検体について, ゲノム DNA または cDNA から直接塩基配列を決定するか, またはクローニング後, 塩基配列を決定した.

【結果および考察】 日本人に16種の C ローカスアリールが確認された. 各抗原をコードするアリールは Cw\*0102 (Cw1), Cw\*0103 (Cw1N), Cw\*0303 (Cw9), Cw\*0304 (Cw10), Cw\*0401 (Cw4), Cw\*0501 (Cw5), Cw\*0602 (Cw6), Cw\*0702 (Cw7), Cw\*0704 (Cw7) と決定された. また, C ブランクアリールとして Cw\*0801, Cw\*0803, Cw\*12022, Cw\*1203, Cw\*1402 (CX51), Cw\*1403 (CX44), Cw\*1502 が検出された. なお, これまで報告されていた Cw\*0501 および Cw\*1201 の塩基配列の誤りを訂正した. 本研究で開発された PCR-SSCP 法は集団における HLA-C アリールの同定法として有用であり, また, ゲノム DNA を用いた直接塩基配列決定法とクローニング後の塩基配列決定法は, cDNA を得られない場合の塩基配列決定に有用であると思われた.

## 9

## PCR-SSP法によるHLA-C対立遺伝子のDNAタイピング

○安藤 等<sup>1)</sup>, 水木信久<sup>2)</sup>, 橘川 薫<sup>1)</sup>,  
金子博美<sup>1)</sup>, 宮田義久<sup>1)</sup>, 脇坂和男<sup>1)</sup>,  
猪子英俊<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>神奈川県湘南赤十字血液センター

<sup>2)</sup>横浜市立大学医学部眼科

<sup>3)</sup>東海大学医学部分子生命科学系遺伝子情報部門

HLA-C座抗原は他のHLAクラスI抗原に比べて血清学的に同定が困難であり、遺伝子頻度のうえからもブランクの多いことに注目し、昨年の当学会において、PCR-SSP法によるHLA-C対立遺伝子の遺伝的多型性を19種類のグループ特異的プライマーを用いてDNAタイピングを試みた。さらに今回、同様の方法でアレル特異的プライマーを14種類用いて、HLA-C対立遺伝子の遺伝的多型性をDNAタイピングで試みた。

その結果、血清学的にタイピング可能なHLA-C抗原(Cw1-Cw10)はすべてPCR-SSP法により、簡単かつ迅速にDNAタイピングが可能であった。また良質な抗血清がないため血清学的にタイピング不可能な、いわゆるHLA-Cブランク(Cw12-Cw17)となるHLA-Cアロ抗原型に関しても、PCR-SSP法により簡単にタイピングが可能であった。さらに、プライマーの数を14種類増やすことによりグループ内の各対立遺伝子のDNAタイピングも可能となった。

現在、HLA-C対立遺伝子は32種類の多型が報告されている。今回プライマー32種類用いることによって、PCR-SSP法でHLA-C対立遺伝子32種類すべてDNAタイピングが可能であった。

## 10

## HLA-Class I抗原を認識する抗血清を用いたウェスタンブロットによるHLA typing

○太田浩敏, 古田 求, 和田かおる, 水野伸一  
神谷 忠, 小澤和郎  
愛知県赤十字血液センター

【目的】 HLA-Class I抗原について血清学的検査ではHLA-B60/-とB60/B61, B60/B48また, B61/-とB61/B48などのように識別が困難なタイプがある。更にHLA-Class IのDNA typingが行われ始めているが、対象となるalleleが多いため、HLA-Class IIのように簡単にDNA typingが出来ないのが現状である。そこで、我々は既にウィルスの確認検査等で用いられているウェスタンブロット法(WB)を利用したHLA typingを行うため、WBに使用することが可能なHLA-A, Bに対する抗血清を作製し、HLA typingに使用可能であるかを検討した。

【方法】 1) HLA-Class I抗原において多くの共通部分を持つ $\alpha$ 3ドメイン部位のFusion Proteinを作製した。このFusion proteinをウサギに免疫することによりHLA-A, B抗原に対する抗血清を作製した。2) 既知のB-Cell lineをTriton-X114にて溶解し膜成分を得た。得られた膜成分について等電点電気泳動(IEF)を行い、その後得られた抗血清を一次抗体として用いてWBを行った。

【結果および考察】 1) HLAの分かっているホモタイプの5種類のB-Cell line (AMA1, Boleth, E4181324, VAVY, WT51)にてIEFを行いWBを行った結果、A-Locus (A1, A2, A23, A28, A33), B-Locus (B8, B15, B52, B53, B65)それぞれの判定が可能であった。2) また、ヘテロタイプのB-Cell line (A2/A33, B55/B70)を用いて同様に行ったところ、A, B-Locusともに判定することが出来た。

以上の結果から得られた抗血清はIEF後のウェスタンブロットにおいてA-Locus, B-Locus抗原の両方に反応しており、ウェスタンブロットによるタイピングに使用できる抗血清であると思われる。

## 11

## MICA クラス I 遺伝子エクソン 5 における STR 多型

○太田正穂<sup>1)</sup>, 水木信久<sup>2)</sup>, 勝山善彦<sup>1)</sup>  
安藤 等<sup>3)</sup>, 福島弘文<sup>1)</sup>, 猪子英俊<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>信州大学法医学

<sup>2)</sup>東海大学分子生命科学

<sup>3)</sup>湘南赤十字血液センター

【目的】 HLA クラス I 遺伝子領域内に最近新しい遺伝子群 MIC (MHC class I chain related genes) が同定された。これらの遺伝子は構造がクラス I 遺伝子に類似しているが、その機能についてはまだ明らかではない。なかでも MICA 遺伝子は古典的クラス I 抗原同様エクソン 2 と 3 で最も多型性示すが、その正確なアレル数は不明である。今回、我々は MICA 遺伝子クローンのシーケンス過程で、エクソン 5 内に (GCT)<sub>n</sub> 繰り返し構造を持つ STR (short tandem repeat) 多型を見つけたので報告する。

【方法】 5'プライマーは蛍光 (FAM) 標識した MICA5 F: CCTTACCATCTCCAGAACTGC を、3'プライマーは MICA5R: CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC を用いて健康人血液より得た DNA を増幅した。Template DNA は 50ng~100ng で、94°C 1 分、55°C 1 分、72°C 2 分、30 サイクルの PCR を行い、6% ポリアクリルアミドゲル (8 M Urea) を用いた ABI DNA Sequencer Model 373A で多型検出をした。内部マーカーとして GS350 を用い、Genescan 672 ソフトにより自動解析をした。

【結果】 PCR で 179 bp, 182 bp, 183 bp, 185 bp, 194 bp の 5 種類の増幅バンドが見られ、これらのアレルをそれぞれ R4, R5, R5.1, R6, R9 と命名した。日本人を含んだ 9 民族約 900 人のタイピングでは、この 5 種類以外のアレルは見られなかった。R5.1 は、GCT の 5 繰り返しに G が 1 塩基挿入し GGCT となりフレームシフトを生じ、細胞膜貫通(TM)領域で stop codon となるアレルである。日本人 352 人におけるアレル頻度は、R4=0.1563, R5=0.2926, R5.1=0.1335, R6=0.2585, R9=0.1591 であった。

## 12

## DLA-DRB 遺伝子の DNA タイピングに用いる SSO プローブの有効性について

○須山出穂<sup>1)</sup>, 伊東一郎<sup>1)</sup>, 渡部浩二<sup>1)</sup>  
柏木 登<sup>1)</sup>, 鱈川浩司<sup>2)</sup>, 光岡伸昌<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>北里大学医学部 免疫学

<sup>2)</sup>同 実験動物学

【目的】 我々は、本学会でイヌの主要組織適合抗原 (DLA) DRB の DNA の PCR-SSO 法による DNA タイピングについて報告してきた。今回、既報のプローブに改良を加え、8 種類の DLA-DRB の DNA をサンプル DNA として、その有効性を検討した。

【方法】 プローブの改良にあたり、8 種類のサンプル DNA のシーケンスを Dideoxy Sequence 法を用いて確認し、それに基づいて 3ヶ所の超可変域のうち 2ヶ所の超可変域を含むようにそれぞれのサンプル DNA に対応する SSO プローブを 19 種類作製した。プローブの長さは基本的には 18 bp の長さで作製したが、3 種類のプローブは 16 bp の長さで作製し、5 種類のプローブについては、非コード鎖に対して SSO プローブを作製した。ポリメラーゼ連鎖反応で増幅し、ドットプロットした 8 種類のサンプル DNA と <sup>32</sup>P にて標識した 19 種類のプローブのハイブリダイゼーションを行った。

【結果】 今回作製した 19 種類のプローブで 8 種類のサンプル DNA の識別が可能であった。

【考察】 今回、サンプル DNA のシーケンスを確認して SSO プローブを作製した。3 種類のサンプル DNA についてシーケンスが報告と異なっており、今回作製したプローブで正確に識別が可能となった。また偽陽性を呈したプローブについては、5'-末端の 2 個の塩基を除去した 16 bp のプローブを作製することおよび非コード鎖に対しての SSO プローブを作製することによって良好な結果を得ることができた。かくして、これらのプローブを用いたイヌの DR 抗原系に関する DNA タイピングに道を開く可能性が生まれた。

## 13

## DR2グループ DRB1対立遺伝子の mismatch-PCR-RFLP 法による解析

○桑田昇治<sup>1)</sup>, 柳沢雅美<sup>1)</sup>, 光永滋樹<sup>2)</sup>  
宮本光子<sup>1)</sup>, 本多 裕<sup>3)</sup>, 十字猛夫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学輸血部

<sup>2)</sup>日赤中央血液センター

<sup>3)</sup>晴和病院

【目的】 私達は、PCR-RFLP 法を用いて HLA クラス II 対立遺伝子の解析を行なっている。DR2グループに属する DRB1対立遺伝子の中で DRB1\*1501と\*1503は、第2エクソン内コドン30番の1塩基のみの違いであるが、Tyr (TAC) (\*1501) と His (CAC) (\*1503) を区別する制限酵素が存在しない。このため、ミスマッチプライマーを用いた mismatch-PCR-RFLP 法にて両対立遺伝子を、制限酵素 *RsaI* を用いて区別した。さらに DRB1\*15011と\*15012の両対立遺伝子の判別も、mismatch-PCR-RFLP 法にて解析を行なったので報告する。

【方法】 ゲノム DNA を用いて DR2グループ DRB1遺伝子第2エクソンをPCR法で増幅 (DR2AMPA-DRBAMPB) 後、ミスマッチプライマーを用いた PCR-RFLP 法を行なった (DR2MAMPA-DRBAMPB)。制限酵素は、*RsaI*, *HphI*, *XmnI*, *Sau96I* の4種類を用いた。また、DRB1\*15011と\*15012の区別のためには、さらに別のプライマーセットを用いた mismatch-PCR-RFLP 法で解析した (DR2MAMPA-DR2MAMPB)。制限酵素は *FokI* を使用した。

【結果】 今回は、従来の PCR-RFLP 法あるいは SSO 法で DRB1\*1501と判定されていた例について解析の対象とした。対照12例とナルコレプシー患者78例の計90例の解析を行なったが、90例全員が DRB1\*15011であった。

【考察】 黒人等で報告された DRB1\*1503あるいは DRB1\*15012対立遺伝子は、現在までの解析では、日本人においては存在しない。Mismatch-PCR-RFLP 法は、従来の PCR-RFLP 法の欠点を補完し、今後、広く遺伝子多型の解析に応用できると考えられる。

## 14

## MPH low resolution 法における問題点 DR14グループのアリルタイピングの必要性について

○河賀泰子, 内田純子, 徳永和夫, 佐藤博行  
前田義章

福岡県赤十字血液センター

【目的】 HLA-DR タイピングの方法として、MPH low resolution 法は多量検体を短時間で処理できる良い方法であり、現在当施設ではこの方法を用いてタイピングを行っている。しかし、DR13/-、DR11/-、DR1403/-の判定が得られた場合、DR14の有無は確認できない。また血清学で判定し得ていた DRHR5も DR14として判定される。以上の事から、DR13/-、DR11/-、DR1403/-、および DR14とタイピングされた検体についてアリルタイピングを試みた。

【方法】 MPH low resolution 法実施後、目的に該当する355検体について、PCR-SSCP 法により DRB1のアリルを判定した。判定不可の場合は、MPH high resolution キット (湧永製薬) あるいは DRB1の第2エクソン部分のダイレクトシーケンスを試みた。

【結果】 355検体において、DRB1\*1302/-は30例、DRB1\*1101/-は5例、DRB1\*1403/-は4例であったが、PCR-SSCP 法の実施により内32例に DR14グループの抗原が認められた。また DR14と判定された検体において、DRB1\*1401は154、DRB1\*1402は1、DRB1\*1405は101、DRB1\*1406は60、DRB1\*1407は2、DRB1\*1307は1であった。但し DRB1\*1407と DRB1\*1307については、PCR-SSCP 法に次いで MPH high resolution 法を実施、確認を行った。また1例において、PCR-SSCP 法で他の DR14グループと異なったパターンを示したが、MPH 法では DRB1\*1406と判定された。DRB1の第2エクソン部分のダイレクトシーケンスを行い、目下精査中である。

【考察】 MPH low resolution 法により DR13/-、DR11/-、DR1403/-の判定が得られた時、その約80%において他の検査法により DR14グループの抗原が確認された。また DR14と判定された検体においても種々のアリルが含まれていた。MPH low resolution 法の問題点を認識し、他の検査法による確認が必要と考える。

## 15

## PCR-PHFA 法による HLA-class II (DQA1, DQB1 および DPB1) のアリアルタイピング

○森山 哲<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 光永滋樹<sup>1)</sup>  
田所憲治<sup>1)</sup>, 岡 孝紀<sup>3)</sup>, 前川尻真司<sup>3)</sup>  
山根明男<sup>3)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日赤中央血液センター

<sup>2)</sup>東大医人類遺伝学

<sup>3)</sup>湧永製薬・バイオ研究所

【目的】我々が新たに開発した PCR-PHFA (Preferential Homoduplex Formation Assay) 法を用いて HLA-class II の DQA1, DQB1 および DPB1 対立遺伝子のタイピングを日本人について行った。本法によるルーチン検査における有用性について検討したので報告する。

【方法】DNP とビオチンで標識されたプライマーで増幅した標準 DNA と、同じ配列の非標識プライマーで増幅した検体の増幅産物を 1:20 の割合で混合した。これを熱変性後、ゆっくりと 98°C から 68°C まで 1°C/10 分間の温度勾配で冷却することにより完全に相補的な 2 本鎖を形成させ、再構成された 2 重標識 2 本鎖 DNA を酵素免疫測定法によりマイクロプレート上で定量した。検体が標準 DNA と同じ塩基配列を持つ場合には、残存する 2 重標識 2 本鎖 DNA が、減少し発色がみられない。

【結果】PCR-PHFA 法により DQA1 および DQB1 対立遺伝子のアリアルタイピングを日本人 100 名について、DPB1 対立遺伝子のタイピングでは、日本人 374 名についてタイピングを行った結果、PCR-RFLP 法によるタイピング結果とよく一致した。

【考察】本法により DQA1, DQB1 および DPB1 対立遺伝子のアリアルタイピングを行うことができた。本法は、操作が簡単な上にヘテロ接合体の判定も容易で再現性のよい結果を得ることができた。また、従来の酵素免疫測定法に類似した方法により検出を行うため専用の特別な機械を揃える必要がない。従って、大量検体を処理する施設に限らず検体数の少ない施設においても有用な検査法となると思われる。我々は、DRB1 対立遺伝子については、既に PCR-MPH 法を用いて大量検体のタイピングを行っているが、比較的検査依頼の少ない DQA1, DQB1 および DPB1 対立遺伝子のタイピングについては、本法を用いて日常検査を行っている。

## 16

## HLA-DQB1 の新しいアリアル DQB1\*0306 について

○大田 智<sup>1)</sup>, 斉藤 敏<sup>1)</sup>, 橋爪清隆<sup>1)</sup>  
山田英世<sup>1)</sup>, 兼重俊彦<sup>2)</sup>, 木下朋子<sup>3)</sup>  
橋本光夫<sup>3)</sup>, 小口弘子<sup>4)</sup>, 石井栄三郎<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>長野県赤十字血液センター

<sup>2)</sup>シオノギ製薬

<sup>3)</sup>兵庫県立西宮病院

<sup>4)</sup>長野県立こども病院

【はじめに】現在 HLA-DQB1 ローカスには 25 のアリアルが報告されている。骨髄移植のため、患者およびその家族の HLA タイピングを実施した際、新しい HLA-DQB1 のアリアルが見つかったので報告する。

【方法】血清学タイピングは NIH 標準法にて実施し、B セル分離はビーズ法にて行った (ダイナビーズ HLA クラス II, ダイナル)。DNA タイピングは PCR-RFLP, PCR-SSOP をそれぞれ成書に従い実施した。

【結果】新アリアルは祖母より父親、二人の子どもへと遺伝していた。血清学の反応は、父親および二人の子どもで DQ3 陽性、祖母で DQ6 陽性となった。PCR-RFLP のフラグメントパターンおよび PCR-SSOP のハイブリダイゼーションパターンはそれぞれに今までにないパターンを示した。新アリアルの塩基配列は、5' からコドン 57 番目までが DQB1\*03032, 0302 と同じで、58 番目から 3' までが DQB1\*04 と同じであった。この DQB1 の新アリアルは、1995 年 11 月に WHO の命名委員会により DQB1\*0306 と公認された。

【考察】HLA-DQB1\*0306 は、DQB1\*03032 もしくは 0302 と DQB1\*04 との間で交差が起こったと考えられるが、DQB1\*0306 の遺伝ハプロタイプは A26.3-B35-Cw9-DRB1\*0901-DQA1\*0302-DQB1\*0306-DPB1\*0201 であり、DRB1\*0901-DQA1\*0302-DQB1\*03032 が日本人に特異的なハプロタイプであること、DRB1\*0901-DQB1\*04 が日本人に見出されていないことから、DQB1\*0306 は、DQB1\*03032 をレシピエントとし、DQB1\*0401 か 0402 のいずれかのアリアルをドナーとして交差によって生じたものと推察される。

## 17

## 単一細胞に対する HLA-DNA タイピング

○大谷文雄, 金子剛久, 大久保みどり  
 柏木 登  
 北里大学医学部免疫学

【目的】 単一細胞に由来する極微量の DNA を材料とした PCR 法は成功率が低く, 実際の臨床検査への応用には至っていない。我々は, Primer Extension Pre-amplification (PEP) 法を用いて, 単一細胞より調製した DNA に対する HLA-DR 遺伝子の DNA タイピングを試みた。本法は将来, 出生前 DNA 診断に実用することを目的としている。

【方法】 ヒト末梢血リンパ球に CD2 をコートしたイムノビーズを加え, 顕微鏡下でのシングルセルマニピュレーション法で単一 T 細胞を得た。アルカリ法により DNA を溶解し, ランダムな塩基配列を持つ 15 mer のプライマーを用いて 92°C, 37°C, 55°C の PCR を 50 サイクル繰り返した (PEP 法)。本法により増幅した DNA に更に HLA-DR タイピング用プライマーを加え, 通常条件にて HLA-DRB1 遺伝子を増幅した。HLA-DRB1 遺伝子の増幅を電気泳動にて確認し, 通常の SSO 法によりタイピングした。

【結果】 既に報告されている PEP 法の条件をそのまま応用した場合, HLA-DRB1 遺伝子の増幅の成功率が低く, PEP 法自体の改良が必要であった。種々の改良法を試みた結果, 33 $\mu$ M プライマー, 500 $\mu$ M dNTP, 25 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 80mM トリス塩酸 (pH 8.3) で PEP を行った時の DRB1 遺伝子の増幅成功率は約 60% となった。増幅された DNA は SSO 法でタイピングできた。

【考察】 胎児の出生前 DNA 診断において, 母体末梢血中に存在する胎児赤芽球を用いることが検討されている。しかし, 微量しか無い胎児赤芽球の調製時に混入してくる母体リンパ球との識別が難しく, 実際に調製した DNA が胎児由来であることの確認の為に, 遺伝的多型の大きな遺伝子で, この DNA を直接タイピングすることが必要となる。本法は胎児赤芽球の DNA タイピングに応用できるものと考えられる。

## 18

## Dynabeads DNA DIRECT™ Large Scale キットによる高分子 DNA 抽出の試み

○成瀬妙子, 安藤理絵, 猪子英俊  
 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

【目的】 DNA タイピングの試料となる高分子 DNA の抽出は, 従来よりフェノール抽出法が用いられてきたが, 抽出までに時間を要するため死体腎移植ドナー検索などには実用的ではない。短時間で DNA を調製する方法として, salting-out 法や煮沸法などがあるが, これらは変性タンパク質の混入が多く, PCR での増幅が困難な場合がある。今回, Dynabeads DNA DIRECT™ Large Scale キットの磁気ビーズを用いて少量の検体より高分子 DNA を抽出し, PCR-RFLP 法, PCR-SSP 法による DNA タイピングを試みた。

【方法】 健常者 10 名より採取した ACD-A 加血液 100 $\mu$ l に, 本キットに添付の赤血球溶解液 1ml を加えて混和後, 上清を除き, DNA DIRECT™ ビーズ 200 $\mu$ l を加えてよく混和, 5 分間静置のち磁石でビーズを集め上清を除き, 洗浄液にて 3 回洗浄後に Tris 緩衝液に溶解させて高分子 DNA を抽出した。この方法で得た DNA 1 $\mu$ l を用いて PCR による増幅を行い, PCR-RFLP 法, 並びに PCR-SSP 法でのタイピングを行い, 結果を比較した。

【結果】 10 例の血液より DNA DIRECT™ ビーズを用いて抽出した DNA は, 全例 PCR で増幅され, 電気泳動にて明瞭な増幅バンドが確認された。さらに PCR-RFLP 法, PCR-SSP 法を行ったところ, 両者共に明確に判定が行え, 結果が一致した。また, 採血後 3 カ月を経過した血液 5 例を用いて検討を行ったところ, 同様の結果が得られた。

【考察】 DNA DIRECT™ ビーズによる高分子 DNA 抽出は, 約 10 分で比較的少量の DNA 試料を得ることができた。PCR の操作や制限酵素での切断が行えたことから, 磁気ビーズ存在下でも酵素の活性に影響を及ぼさないことが確認された。さらに, 1 回の操作で PCR 50~100 回分の高純度な DNA が採取可能で, 増幅時の非特異的反応が削減されることから, 簡便で精度の高い DNA 抽出法として期待できる。

## 19

## 顆粒球抽出抗原を用いたマイクロMPHA法による抗顆粒球抗体スクリーニング法の開発とその応用

○荒木延夫<sup>1,2)</sup>, 稲葉洋行<sup>1)</sup>, 藤原宝子<sup>1)</sup>  
 浜中泰光<sup>1)</sup>, 能勢義介<sup>1)</sup>, 神前昌敏<sup>1)</sup>  
 阪田宣彦<sup>1)</sup>, 伊藤和彦<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県赤十字血液センター

<sup>2)</sup>京都大学医学部附属病院輸血部

【目的】 抗顆粒球抗体は同種免疫性新生児好中球減少症, 自己免疫性好中球減少症, 輸血副作用の原因となる。抗顆粒球抗体を検出するためには顆粒球抗原パネルを必要とするが, 我々は顆粒球抗原を3%シヨ糖生食水を用いて顆粒球より抽出し, これをU型テラサキプレートに固相する方法を開発し, この固相プレートを用いて頻回血小板輸血患者の抗顆粒球抗体スクリーニングをMPHA法により実施した。

【方法】 顆粒球の分離はMono-Poly Resolving Medium (大日本製薬) により実施し, 90%以上の純度の顆粒球を得た。得られた顆粒球を3%シヨ糖生食水(0.1%窒化ソーダ含有)中に $3 \times 10^3$ コ/ $\mu$ lになるように調整し, 4°Cに3日間放置後, 10,000×gで5分間遠心し, その上清を顆粒球抽出抗原として使用した。そして, この抽出抗原をU型テラサキプレートに5 $\mu$ lずつ分注後, 4°Cで一晩固相し, 零下80°Cで保存した。そして, スクリーニング時に自然解凍し, 0.8 M クロロキン溶液で22°C 3時間処理後使用した。

【結果】 顆粒球抽出抗原中には好中球特異抗原 NA1, NA2, NB1, 5b, Sar, そしてCD11a, CD11b, CD13, CD16, CD18抗原, HLA クラスI抗原が存在した。一方, 抽出抗原をクロロキン処理することによりCD11b, HLA クラスI抗原が除去された。また, クロロキン処理顆粒球抽出抗原パネル(N=8)による頻回血小板輸血患者の抗顆粒球抗体スクリーニングは79名中24名(30.4%)が陽性を示した。抗体の特異性は不明であるが8種類の反応パターンを示した。

【考察】 顆粒球抽出抗原は零下80°Cの保存で少なくとも1年間は安定して保存可能であり, 生きた顆粒球抗原パネルよりも扱いが容易である。

## 20

## HLA と死体腎移植成績

○久山芳文<sup>1)</sup>, 船附好子<sup>1)</sup>, 松井美智代<sup>1)</sup>  
 多田正義<sup>1)</sup>, 安波礼子<sup>1)</sup>, 伊藤喜一郎<sup>2)</sup>  
 小角幸人<sup>3)</sup>, 仲谷達也<sup>4)</sup>, 国方聖司<sup>5)</sup>  
 吉田克法<sup>6)</sup>, 上田陽彦<sup>7)</sup>, 金 卓<sup>8)</sup>

<sup>1)</sup>大阪府立病院 HLA, <sup>2)</sup> 同 泌尿器科, <sup>3)</sup>大阪大 医・泌, <sup>4)</sup>大阪市大医・泌, <sup>5)</sup>近畿大医・泌, <sup>6)</sup>奈良 医大・泌, <sup>7)</sup>大阪医大・泌, <sup>8)</sup>大阪市立総合医療セ ンター・泌

【目的】 大阪, 奈良地区では従来よりレシピエントプー ル約3000人からDR抗原を優先して受者の選択を実施し ている。この様な条件下で1992年1月より実施された死 体腎移植100症例の内, 感染症による死亡例等7例を除 いた93症例の生着率についてHLA適合効果を検討した。

【方法】 DRB1タイピングはPCR-SSOP法を, 生着率 はKaplan-Meier法を用い, 有意差検定はlogrank検 定を使用した。

【結果】 93症例の4.3年生着率は85.7%であった。93症 例には急性拒絶反応および慢性拒絶反応により再透析導 入が各々5例であった。A, B, DRB1ミスマッチ数0 の7症例の中には拒絶は見られなかった。HLA-A, B, DR, DRB1各々, およびこれらの組み合わせにおける ミスマッチ数と移植生着率には有意の差は見られなかつ た。また, 3年以上生着している症例39例の最新のCr 値は平均1.8mg/mlと良好であった。

【考察】 DR抗原を含めたHLA抗原の重要性を支持す る結果がえられた。今回の生着率は約3000人という大き いレシピエントプールをバックにしている事も銘記され るべきである。大阪, 奈良地区ではHLA適合度を基に 医学的所見を加味して複数の候補の中から受者が選択さ れてきた。この選択方法が今回の結果につながったと考 える。

## 21

## 献腎移植全国共通 HLA タイピングトレイ (JNOS1.1 &amp; JNOS2.1) の検討

○山崎正明<sup>1)</sup>, 苅部正宏<sup>1)</sup>, 飯田好江<sup>1)</sup>  
酒巻建夫<sup>2)</sup>, 柏原英彦<sup>3)</sup>, 吉田孝人<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>国立佐倉病院・HLA 検査室

<sup>2)</sup>同・臨床研究部

<sup>3)</sup>同・外科

<sup>4)</sup>(社)日本腎臓移植ネットワーク・組織適合性委員会

【目的】 以前より献腎移植実施施設では、HLA 検査結果統一のため全国共通のタイピングトレイ (JST) を使用してきた。昨年4月に発足した(社)日本腎臓移植ネットワークと当院の共同研究事業として、この度、新しいタイピングトレイ (クラスI用をJNOS1.1, クラスII用をJNOS2.1と命名) を作成し、本年5月中旬より全国のHLA 検査センターに配布を開始した。今回、トレイの使用データを回収・分析し、その検討結果について報告する。

【これまでの流れ】 JNOS1.1については、昨年7月より抗血清の収集を始め、腎移植関係6施設からと市販品の、計133種類の抗血清を用意した。これを使用して2種類のテストトレイを約200枚ずつ作成し、主なHLA 検査センター7施設と大学2施設、日赤血液センター1施設の計10施設で検討した。この結果を吟味して使用する抗血清を選出し、その後、日赤血液センター5施設より不足血清を補い、実際に使用するトレイを本年3月末日に作成した。なお、JNOS2.1についてはアロ血清を使用したトレイを当初予定し検討したが、満足の行く結果が得られなかったため、市販のモノクローナルトレイと同様なものをメーカーに作成依頼し、それを購入して使用することとなった。

【方法】 JNOS1.1, JNOS2.1とも通常のLCT法に準じてタイピング操作を行った。なお、T・B細胞の分離はナイロンウール法と磁気ビーズ法の施設があり、染色もエオジン法、蛍光法と一定していない。クラスI用補体は全施設同一なものを使用した。

【結果】 5月下旬現在、まだトレイ配布を開始したところであり、実際のデータは数多く集まっていないが、以前のJSTと比較し、稀な抗原 (B5102, B75V等) や反応性の弱かったDR5, 6関連抗原との反応も良好な結果が出ている。

【まとめ】 今後も定期的に返送されたトレイ反応データを見ながら、各抗血清の特異性の変更や血清自体の入れ替え等を実施し、また、稀な特異性の抗原パネルとの反応性を常にチェックし、実際の検査時に生かせるデータを迅速にユーザー施設に返すようにして行きたい。

## 22

## HLA 1-ハプロタイプ適合間腎移植におけるDR・DRB1とMLR

○安尾美年子, 小林博人, 田辺一成, 伊藤文夫  
東間 紘, 太田和夫

東京女子医大腎臓病総合医療センター

【目的】 生体腎移植のドナーの多くはHLA1-ハプロタイプ適合家族の中から選択されるが、異なるDRタイプ1-ミスマッチの中からドナーを選択する際には、各DR抗原の相違により生じるMLRの強さを知る必要があると考えられる。そのためわれわれは以前より、1-ハプロタイプ適合間MLRのDRB1タイプを調べ、これらと移植予後との関連について検討している。

【方法】 MLRは末梢血リンパ球より作製した反応細胞および刺激細胞を、それぞれ $5 \times 10^4$ 個/wellに調製し、96ウェルマイクロテストプレート中で混合して、6日間培養で行い、DRB1タイピングはmodified PCR-RFLP法により行った。

【結果】 DRタイプが1ミスマッチのMLR S.I.を刺激細胞側のミスマッチDRタイプ別に比較検討したところ、各S.I.の平均はDR1が $91.5 \pm 20.4$  (n=4), DR15が $90.6 \pm 28.7$  (n=18)と高値を示し、つづいてDR14, DR13, DR11, DR4, DR12の順で低値となり、DR8が $24.6 \pm 10.7$  (n=15), DR9では $23.9 \pm 8.9$  (n=16)と明らかに低値であった。またミスマッチのDRタイプ別に急性拒絶反応の有無を調べたところ、DR1の100% (n=7)に拒絶反応が認められ、DR14では86% (n=7), DR15が85% (n=13), DR4が73% (n=11), DR12が60% (n=5), DR8が56% (n=9), DR13が50% (n=6), DR9が42% (n=19)となり、MLRとの関連が認められた。DR4についてはDRB1のミスマッチサブタイプによりMLRに差がみられ、1-サブタイプミスマッチドナーからの移植予後はその89% (n=9)に急性拒絶反応が認められた。

【考察】 DRタイプが1ミスマッチであっても、DRタイプおよびDRB1サブタイプによりMLRの強さが異なり、移植予後にも影響をおよぼすことが示唆される結果であった。

## 23

## 腎移植における TNF typing

○小林孝彰<sup>1)</sup>, 加村ひろみ<sup>2)</sup>, 小原節子<sup>2)</sup>  
打田和治<sup>2)</sup>, 横山逸男<sup>1)</sup>, 高木 弘<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>名古屋大学第二外科

<sup>2)</sup>名古屋第二赤十字病院

ヒト TNF (tumor necrosis factor) locus は MHC (major histocompatibility complex) の HLA-B と class III 遺伝子の間に位置する。TNF $\alpha$  は proinflammatory cytokine として知られており、非特異的な炎症反応に関与するが、移植後の拒絶反応発現時にもその血中レベルが上昇すると報告されている。

最近、TNF 遺伝子における point mutation, Microsatellite sequence の多型性が明らかにされてきた。TNF $\alpha$  の promoter 遺伝子の position-308において G から A に point mutation した TNF2型は TNF $\alpha$  産生が高く、また TNF microsatellite 遺伝子の多型性と TNF 産生レベルとの関連を指摘する報告もあり、ある種の型は移植における high responder である可能性がある。

腎移植においては HLA の適合度が重要であるが、生体腎移植では親から子への 1 ハプロタイプ一致がほとんどであり、その約 2 割にステロイド抵抗性の拒絶反応が認められる。

今回、1 ハプロタイプ一致腎移植を対象として TNF typing (PCR-RFLP 法および Gene Scan 解析) を行い、予後との関連を検討する。

## 24

Xeno Tissue Typing とブタ反応性ヒト T 細胞クローナリティー (TCR-V $\beta$ ) の解析

○佐藤忠之<sup>1)</sup>, 土田文子<sup>1)</sup>, 萩原政夫<sup>1,2)</sup>  
バトムフ・ムフバト<sup>2)</sup>, 上田 進<sup>3)</sup>  
坂本 薫<sup>4)</sup>, 増子佳世<sup>5)</sup>, 山本一彦<sup>6)</sup>,  
辻 公美<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学病院・細胞移植医療センター, <sup>2)</sup>東海大学・移植免疫, <sup>3)</sup>日生研, <sup>4)</sup>国立佐倉病院, <sup>5)</sup>聖マリアンナ医科大学・難治研セ, <sup>6)</sup>九州大学・生医研

【目的】 異種移植 (Pig to Human) におけるマッチングを検討するために SLA および HLA プローブを用いたサザンプロットと Xeno-MLR による Xeno Tissue Typing をおこなった。また、ブタ反応性ヒト T 細胞クローナリティーを解析した。

【方法】 サザンプロットは10品種のブタおよびヒトの末梢血から抽出した DNA を材料として常法によりおこなった。プローブは SLA-DRB および HLA-DRB cDNA を主に用いた。Xeno-MLR は Stimulator cell にブタの末梢リンパ球を用いた。Responder Cell は 7 人のボランティアの末梢リンパ球を用いた。Responder Cell の反応性は培養 6 日後の <sup>3</sup>H-Thymidine の Uptake を測定した。同様に抗 HLA-DR 抗体および抗 HLA-DQ 抗体によるブロッキングテストをおこなった。ヒト T 細胞クローナリティーは、Xeno-MLR 後の反応細胞より RNA を抽出し、TCR-V $\beta$  鎖の CDR3 領域をコードする遺伝子を RT-PCR により増幅後、非変性ゲル電気泳動で一次構造の違いを検出する RT/PCR-SSCP 法にて検出した。

【結果と考察】 サザンプロットによる DNA タイピングの結果、ブタは品種ごとにバンドパターンの違いが見られ品種および個体の同定に有効であった。Xeno-MLR の反応性を測定した結果、HLA-DR13陽性の Responder (n=3) は proliferation index (P.I) = 30.2 $\pm$ 9.1 の高反応を示し、HLA-DR13陰性者 (n=4) は P.I < 10 の低反応であった。ブロッキングテストでは、抗 DR 抗体で 84.1 $\pm$ 9.0% 抑制され、抗 DQ 抗体で 51.8 $\pm$ 16.3% 抑制された。高反応を示した HLA-DR13陽性者 (DR 13/9) と低反応を示した HLA-DR13陰性者 (DR 4/8) の Xeno-MLR 後の T 細胞クローナリティーを検索した結果、HLA-DR13陽性者の TCR-V $\beta$  バンドが V $\beta$ -1, -2, -8, -9, -10, -13.2, -14, -15, -17, -19, -20 の V $\beta$  ファミリーにおいて HLA-DR13陰性者より増加していた。RT/PCR-SSCP 法によりブタ反応性ヒト T 細胞の TCR-V $\beta$  ファミリーが詳細に解析できた。

## 25

## NK細胞が担うアロ特異的細胞障害活性の測定法の検討

○斉藤彰一, 西村元子, 伊佐和美, 田中秀則  
赤座達也, 中島一格, 田所憲治, 十字猛夫  
日本赤十字社中央血液センター

【目的】 NK細胞がHLAクラスI分子を認識し, negative signalを伝達すると考えられるnegative receptorを持ち, T細胞とは異なったアロ抗原認識機構を担っていることが明らかにされた。また輸血もしくは移植後の免疫応答へのNK細胞の関与も示唆されている。本実験は, NK細胞のアロ特異的細胞障害活性の測定条件を確立することを目的とした。

【方法】 抗CD3, 抗CD8, 抗CD19, 抗CD14抗体およびダイナビーズを用いてPBMCsのネガティブセレクションを行いNK細胞を得た。NK細胞は分離直後, あるいは100 U/mlのrIL-2を含む培地にて1~3日間, またはrIL-2に加えて10% conditioned mediumを含む培地にて3週間以上培養しエフェクター細胞として用いた。cFDAで標識したK562, Daudi, B-LCLsもしくはPHA-ブラストをターゲットとして細胞障害活性を測定し, それぞれNK活性, LAK活性, アロ特異的細胞障害活性とした。

【結果】 分離直後のNK細胞では細胞障害活性の低下が観察された。3日間の培養で細胞障害活性は上昇したが, 多くの死細胞が観察された。ここで用いたNK細胞は自己のターゲット細胞も含め全てのターゲット細胞に対して細胞障害活性を示し, 非特異的な細胞障害活性が誘導されたことが示唆されたが, 自己に対する反応はやや低く, 一部のターゲット細胞に対しても若干の低下が観察され, アロ特異性を示しているものと考えられた。長期培養したNK細胞は一部のターゲット細胞にのみ細胞障害活性を示した。

【考察】 培養したNK細胞はアロ特異的と考えられる細胞障害活性を示した。長期培養することにより, 障害できるターゲット細胞の種類が限定される傾向がみられたが, これはアロ認識に関するNK細胞のポピュレーションに偏りが生じたためと考えられた。しかしながら短期培養のNK細胞を用いることにより, 広い範囲のアロ特異性を測定できることが示唆された。

## 26

## 輸血後GVHD発症患者末梢血より得られたリンパ球クローンの解析

○西村元子<sup>1)</sup>, 内田茂治<sup>1)</sup>, 矢作裕司<sup>1)</sup>  
光永滋樹<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>2)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>  
中島一格<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日本赤十字社中央血液センター

<sup>2)</sup>東京大学医学部人類遺伝

【目的】 輸血後Graft-versus-Host Disease (PT-GVHD)は重篤な輸血副作用であり致死率は極めて高い。輸血された血液中に存在するドナーリンパ球が自己と異なる宿主HLAをallo抗原として認識し宿主の各種臓器や組織を攻撃すると考えられている。しかしながらその発症の詳細に関しては不明な点が多い。我々はPT-GVHD発症に関わるエフェクター細胞の実体を明らかにし宿主側の標的抗原を同定する事を目的として, PT-GVHD発症患者末梢血リンパ球よりリンパ球クローンを樹立しこれを解析した。

【方法】 PT-GVHD発症時患者末梢血よりリンパ球(PBL)を分離し20 $\mu$ g/ml IL-2, 10 $\mu$ g/ml PHA存在下で10-14 days培養しcell lineを得た。その後IL-2存在下で限界希釈法に従いクローニングを行った。HLAのDNAタイピングは, 患者の爪および末梢血より抽出したDNAを用い, 前者で患者HLA後者でドナーのそれを判定した。標的抗原の同定は, 患者HLAと少なくとも一つのHLAを共有するEB-virus transformed lymphoblastoid cell lines (B-LCLs)を<sup>51</sup>Cr標識し標的細胞とし通常4-hour <sup>51</sup>Cr-release assay法により cytotoxic 活性を測定する事により行った。

【結果】 今まで5症例について検討し, それぞれcell line, cytotoxic T cell (CTL)クローンを樹立でき, さらに患者HLAのいずれかが標的抗原として同定し得た。この中の一つの症例についてはB cellクローンも同時に樹立された。このB cellクローンはCTLと同一の標的HLAを持つ細胞を特異的に障害する細胞障害性IgGを産生している事が解った。

【考察】 PT-GVHDの発症に関わると考えられるエフェクタークローンを樹立し標的抗原を同定し得た。またCTLのみならず細胞障害性IgGを産生するB cellも発症に大きく関わっている事を示唆する結果が得られた。

## 27

## 輸血後 GVHD 症例と HLA の組合せ

○矢作裕司, 内田茂治, 光永滋樹, 森山 哲  
徳永勝士, 中島一格, 田所憲治, 十字猛夫  
日本赤十字社中央血液センター

【目的】 輸血後移植片対宿主病 (PT-GVHD) は輸血血液中に含まれるリンパ球が生着増殖し, 受血者組織を非自己として認識して攻撃することによって発症する。そして供血者・受血者の HLA がホモ/ヘテロの組み合わせになっていることが発症に関連していると考えられている。我々はマイクロサテライト多型解析により PT-GVHD と診断された37例中14例で HLA のタイピングを行い, PT-GVHD 発症との関連について検討した。

【方法】 爪または輸血前血液から抽出した DNA (患者本来の DNA 型) と PT-GVHD が疑われてからの末梢血 DNA を5種のマイクロサテライト DNA で増幅し, ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりその移動度を比較した。末梢血 DNA 型が患者本来の型と矛盾する場合は PT-GVHD と判断した。HLA のタイピングは PCR-RFLP 法または PCR マイクロタイタープレート法により行った。14例中7例はクラス II のみを, 残りの7例はクラス I およびクラス II のタイピングを行った。

【結果】 1. HLA-DR は14例全例がホモ/ヘテロの関係であった。2. クラス I, II のタイピングを行った7例中6例はクラス I, II ともに違いが認められたが, DR のみがホモ/ヘテロ (A, B は共通) の発症も1例認められた。しかし, クラス I のみの違いによる症例は認められなかった。3. クラス II のみの違いによる症例は白血球減少症が認められない (但し, ほとんどがリンパ球) 非典型症例であった。

【考察】 マウスでは, ドナー細胞が宿主のクラス I, II の両方を認識しないと致死性 GVHD が発症しないと言われている。クラス I および II のタイピングを行った7例中6例ではマウスの系と同様な結果が得られたが, クラス II の違いのみによる発症も1例確認された。また, クラス II の違いは14例全てに認められ, PT-GVHD の発症には HLA クラス II の違いが必要と考えられる。

## 28

## HIV-1感染血友病患者の HLA タイプ

○屋敷伸治<sup>1)</sup>, 桑山昌洋<sup>1)</sup>, 藤吉利信<sup>1)</sup>  
園田俊郎<sup>1)</sup>, 宇宿功市郎<sup>2)</sup>, 丸山芳一<sup>2)</sup>  
納 光弘<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大学医学部ウイルス学

<sup>2)</sup>鹿児島大学医学部第三内科

【目的】 HIV-1は主に CD4細胞とマクロファージに持続感染し, 免疫不全をおこし AIDS を発症させるが, その発症経過には個体差がみられる。HIV-1感染者の中には10年以上の長期にわたり無症候性に経過する者もあり, HIV-1に対する免疫応答の個体差が注目されている。演者らは1986年以来, 鹿児島県在住の血友病患者で HIV-1汚染血液製剤を輸注された33症例を対象として追跡調査を行ない, HIV-1感染と AIDS 発症との関連などを研究してきた。本研究では, HIV-1感染と AIDS 発症の宿主要因を HLA の遺伝的多型と免疫応答の個体差で明らかにすることを研究目的とした。

【方法】 本学第三内科外来で過去10年間血友病患者を追跡し, 同意を得てリンパ球と血清を収集凍結保存してきた。この検体を用いて HIV-1のウイルス分離と抗体検査を行い HIV-1感染患者を同定した。HLA タイピングは血清学的法と DNA タイピング法で実施し, 一般健康人を対照として HLA の特異性を解析した。

【結果と考察】 HIV-1汚染血液製剤の輸注により HIV-1感染を受けた血友病患者と非感染の血友病患者を10年間追跡し臨床経過と HLA 型との関連性を解析した結果, 以下の3群の患者が確認された。① HIV-1感染後 AIDS および ARC に高リスクの患者 (A24, B7, DRB1\*0403, DQB1\*0302保有群) ② HIV-1感染後も AIDS を発症しない患者 (B35/48, DRB1\*1501, DQB1\*0602保有群) ③ HIV-1に暴露されたにも拘わらず HIV-1感染が成立しなかった患者 (B52, DRB1\*1502, DQB1\*0601保有群)。以上により HIV-1感染と AIDS 発症のリスクが宿主の HLA 遺伝子の多型と免疫応答機能で決定される可能性が明らかになった。この HLA 情報は HIV-1感染血友病患者の健康管理と保健指導において有用な指針になると考えられる。

## 29

## ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) に対する抗体反応と HLA クラス I 抗原

○瀬下 敏, 松山雄一, 植野正秋, 増井富雄  
小島健一  
新潟県赤十字血液センター

【目的】日本人の成人の大半が HCMV 抗体陽性であるが, 陰性者も存在する. この事実は, 外来抗原の侵襲に対する宿主の抗体反応性の違いを反映したもので, 免疫応答の個体差を規定する HLA 抗原の関与が考えられる. そこで, HCMV 抗体の有無 (陽性群と陰性群) と HLA 抗原クラス I の出現頻度を調べ, 比較した.

【方法】HCMV 抗体は PA 法, EIA 法で検査した. 対象者は重複のない献血者 2091 名で, 内訳は陽性群 1764 名, 陰性群 327 名である. 統計解析は独立 2 標本の比率の差を  $2 \times 2$  の  $\chi^2$  乗検定し,  $P < 0.05$  を有意差ありとした. さらに正常な日本人の HLA 抗原頻度の比較対照として, 第 11 回日本ワークショップ (11JWS) データと新潟県内献血者データ (NBC = 9585) も使用し, 年齢別, 性別頻度も検討した.

【結果】陰性群の A2 抗原出現率は 17.9% で, 陽性群の 23.7% (11JWS 23.7%, NBC 22.8%) に比べ有意に低い ( $P < 0.01$ ). 年齢別にみた CMV 抗体陽性率は, 加齢にともない上昇するが, 10~20 歳代では, A2 抗原保有者の抗体陽性率が有意に高く, 30 歳代以降になると有意差が見られなくなった. A33 抗原は陰性群で 11.8% であり, 対照群の 8% 程度に比べ高い傾向があったが, 有意差はなかった. これ以外に HLA 抗原頻度に有意差を認めるものはなかった.

【考察】HCMV 感染に対し, A2 抗原保有者は非保有者と比べて, 10~20 歳代の若年層では有意に抗体陽性率が高く, A2 抗原は high responder であると考えられた.

今後 A2 抗原の DNA サブタイピングを検討し, さらに明確にしたい.

## 30

## 日本人 AS 患者の HLA-B27 対立遺伝子とハプロタイプ

○今野泰宏, イスラム SM モノワールル  
沼賀二郎, 増田寛次郎<sup>1)</sup>, 織田弘美<sup>2)</sup>  
三井 弘<sup>3)</sup>, 上甲 覚, 平田蘭子,  
前田平生<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学 眼科, <sup>2)</sup>同 整形外科

<sup>3)</sup>三井記念病院 整形外科

<sup>4)</sup>埼玉医大総合医療センター 輸血部

【目的】HLA-B27 は強直性脊椎炎 (AS) を代表とする炎症性疾患との相関が知られている. しかしこの抗原は日本人では稀であることから本邦でのクラス II 抗原との連鎖に関する報告は少ない.

【対象と方法】対象は東京大学附属病院 (本院および分院), 三井記念病院にて診断された日本人 AS 患者 41 例 (男性 36 例, 女性 5 例) である. HLA の血清学的タイピングは補体依存性細胞障害試験にて, HLA-B27 のエクソン 2 および 3 の DNA タイピングは PCR-SSCP 法, クラス II の DNA タイピングは PCR-SSCP 法および PCR-RFLP 法にて施行した.

【結果】HLA-B27 は AS 患者群の 34 例 82.9% にみられ, 対照群と比べ有意に高頻度であった. HLA-B27 を持つ 34 例のうち, B\*2704 は 28 例, B\*2705 は 5 例, その他が 1 例を占めていた. HLA-B27 と DR 抗原との連鎖を対立遺伝子ごとに検討すると, B\*2705 を持つ 5 例には DR1 が 4 例 (80%) にみられ, かつ DR1 と連鎖不平衡にある HLA-B7 はみられないことから, HLA-B\*2705 は HLA-DR1 と連鎖不平衡にあると推定される. B\*2704 を持つ 28 例には DR12 が 9 例 (32%) にみられ, また DR8 が 11 例 (39%) にみられ, かつ HLA-B46 は 1 例のみであることより, HLA-B\*2704 は HLA-DR12 および DR8 と連鎖不平衡にあると推定される.

【考察】B\*2705 を多く持つ欧米など多くの民族では DR1 との連鎖の報告が多く, この連鎖は民族の差を越えて同様の傾向があると推定される. DR8 との連鎖はこれまでウラル地方の民族だけにしかみられず民族学的に興味深い.

## 31

各種腎炎における糸球体基底膜障害と  
HLA-DRB1\*1501との相関

○小河原 悟, 野田律矢, 長谷川善之  
田中智一郎, 平塚俊樹, 道永 功  
兼岡秀俊, 内藤説也  
福岡大学病院腎センター

【目的】 免疫複合体が関与する糸球体腎炎において病理学的には主としてメサンギウム領域または糸球体基底膜の障害をおこす腎炎に分類される。糸球体基底膜が主に障害される腎炎として特発性膜性腎症, ループス腎炎 V (膜) 型および抗糸球体基底膜抗体陽性型糸球体腎炎, メサンギウム領域が主に障害される腎炎として IgA 腎症, ループス腎炎の II, III, IV 型があるが, これらの疾患について HLA-クラス II-DNA タイピングを行い, 特定の HLA が糸球体障害部位と相関するかどうか検討する。

【対象と方法】 腎生検にて確診された特発性膜性腎症30例, ループス腎炎 V 型13例, II, III, IV 型36例, 抗糸球体基底膜抗体陽性型糸球体腎炎4例, IgA 腎症105例。HLA-クラス II-DNA タイピングは SSOP 法および RFLP 法で行った。正常対照者として第11回国際組織適合性ワークショップの日本人データ493名を使用し, HLA 遺伝子頻度を求め,  $\chi^2$ 検定を行った。

【結果】 有意に高頻度 ( $P < 0.05$ ) の HLA-クラス II 遺伝子 (gene frequency, odds ratio) は DRB1\*1501 で特発性膜性腎症 (0.80, 26.3), ループス腎炎 V 型 (0.69, 14.8), 抗糸球体基底膜抗体陽性型糸球体腎炎 (1.0, 58.9)。特発性膜性腎症ではそのほか DQA1\*0102 (0.87, 21.0), DQB1\*0602 (0.80, 34.4) が有意に高頻度であった。IgA 腎症, ループス腎炎の II, III, IV 型は有意に高頻度の遺伝子はなかった。

【考察】 糸球体基底膜が主に障害される腎炎として特発性膜性腎症, ループス腎炎 V (膜) 型および抗糸球体基底膜抗体陽性型糸球体腎炎はすべて DRB1\*1501 が強く相関するがメサンギウム領域が主に障害される腎炎として IgA 腎症, ループス腎炎の II, III, IV 型は DRB1\*1501 との相関は認められなかった。つまり抗原刺激がなんであれ糸球体基底膜に障害を来す疾患を発症する人に共通する特定の遺伝子は HLA またはこれに強く連鎖する未知の遺伝子として存在する可能性が示唆された。

## 32

免疫性血小板減少症における  
HLA-DRB1\*04アレルの意義

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

【目的】 免疫性血小板減少症 (ITP) は, 血小板自己抗体によって引き起こされる自己免疫疾患であると考えられているが, 発症の原因については不明のままである。我々は第4回日本組織適合性学会において, 一部の ITP 症例で発症のメカニズムに, HLA-DR4 関連の遺伝子が重要である可能性を報告した。今回は, DR4 をもつ ITP 症例の特徴を解析する目的で, 原田病における DR4 と比較検討を行ったので報告する。

【方法】 対象は ITP 患者70例と原田病患者31例である。まず, 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, 続いて, PCR-RFLP 法にて HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1 の各タイピングを施行した。

【結果】 DR4 関連抗原をもっている患者は, ITP で30例 (42.9%), 原田病で28例 (90.3%) であった。DRB1\*04アレルは, 二つのサブタイプグループ (DR4.1 と DR4.2) に分類されるが, ITP・原田病ともに DR4.1 の頻度が DR4.2 の頻度の3倍以上であった。しかも, 両疾患ともに DRB1\*0405 と DRB1\*0410 の二つを合わせたアレル頻度が非常に高値であった (ITP; 36.6%, 原田病; 48%)。ただし, 原田病では DRB1\*0405 のアレル頻度が高値であったが, ITP では逆に DRB1\*0410 のアレル頻度が高い傾向がみられた。一方, DQB1 との推定ハプロタイプでは, 原田病で DRB1\*0405-DQB1\*0401 が多いのに対し, ITP では, DRB1\*0410-DQB1\*0402 が多く認められた。

【考察】 ITP・原田病ともに DR4.1 グループが発症感受性を示すと思われたが, 責任遺伝子に関連する DRB1\*04アレルは両者では異なると考えられた。

## 33

## サルコイドーシスにおける TAP 遺伝子の多型解析

○石原麻美<sup>1)</sup>, 大野重昭<sup>1)</sup>, 成瀬妙子<sup>2)</sup>  
 鍵谷雅彦<sup>1)</sup>, 石田敬子<sup>3)</sup>, 桑田昇二<sup>4)</sup>  
 猪子英俊<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>横浜市立大・眼科

<sup>2)</sup>東海大・分子生命科学

<sup>3)</sup>日赤医療センター・眼科

<sup>4)</sup>東大・輸血部

【目的】 Transporter associated with antigen processing (TAP) 遺伝子は HLA クラス I 抗原による抗原提示のプロセッシングに関与していることが知られており, HLA-DQ 座と DP 座間に位置する. HLA-DRB1 遺伝子が関与すると考えられるサルコイドーシスでの TAP 遺伝子の多型性を検討した.

【方法】 サルコイドーシス患者82例, 健康成人92例について TAP1 (codon 333, 637) および TAP2 (codon 565, 651, 665, 687) の多型性を PCR-RFLP 法および mismatched PCR-RFLP 法を用いて検討した.

【結果】 TAP1 および TAP2 アリル頻度は患者, 対照群間で差が見られなかった. サルコイドーシスと相関のみられる HLA-DR5, -DR6 および -DR8 をもつ患者では TAP2\*0103 頻度の低下がみられた. HLA-DR5, -DR6 および -DR8 をもたない患者では TAP2\*0201 頻度の低下がみられた.

【考察】 サルコイドーシス患者における TAP2\*0103 および TAP2\*0201 頻度の低下は TAP2\*0103-DRB1\*1302-DQB1\*0604, TAP2\*0201-DRB1\*0101-DQB1\*0501 との連鎖不平衡のためと考えられた. サルコイドーシスの発症には TAP 遺伝子の多型性は関与していなかった.

## 34

## 日本人でも西洋型多発性硬化症は DRB1\*1501 と強い相関を示す.

○金井隆幸<sup>1)</sup>, 吉良潤一<sup>2)</sup>, 小林卓郎<sup>2)</sup>  
 西村泰治<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>熊大・院医・免疫識別

<sup>2)</sup>九州大・神経内科

【目的】 以前より西洋人では, 多発性硬化症 (MS) と HLA-DRB1\*1501 との強い相関が報告されているが, 日本人における MS と DRB1\*1501 との相関については, 必ずしも見解の一致を見ていない. 本研究は, 日本人の MS を病変の性状に関して分類し, 臨床型と HLA との相関の有無について検討することを目的とする.

【方法】 57例の日本人 MS 患者集団を, 臨床的に病巣が視神経と脊髄索に限られ, 脳病巣が比較的小さく, 数も少ない特徴を有するアジア型 (Asian type) と, 中枢神経系に多発的に病巣が存在する西洋型 (Western type) の二つのグループに分類した. それぞれのグループについて, 脳脊髄 MRI 検査および PCR/SSOP 法による HLA-DRB1, DRB3, DRB5 対立遺伝子の DNA タイピングを行ない, 両者の関連について検討した.

【結果と考察】 MS 患者57例中, アジア型が23例 (40%), 西洋型が34例 (60%) であった. アジア型は西洋型と比べ, 脳 MRI 上の病巣数は少なかった (5.7個 vs 13.4個) が, ガドリニウム造影による脊髄 MRI 上の病巣数は多かった (47% vs 17%). DRB1\*1501 ならびに DRB5\*0101 の頻度は, 健康対照群の14.2%, アジア型の0%と比べ, 西洋型では41.2%と有意 (それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ) に増加していた. いっぽう両型をまとめると24.6%で, 健康対照群との間に有意差は認められなかった. またアジア型と相関を示す DRB 対立遺伝子は存在しなかった. つまり従来の解析では, 二型の MS を区別することなく統計処理を行っていたために, 両型の比率によっては DRB1\*1501 との有意の相関が出たり, 出なかったりしたものと推定される.

## 35

アトピー性角結膜炎における  
HLA クラス II 抗原解析

○鍵谷雅彦<sup>1)</sup>, 大野重昭<sup>1)</sup>, 池澤善郎<sup>2)</sup>  
成瀬妙子<sup>3)</sup>, 能勢義介<sup>4)</sup>, 石原麻美<sup>1)</sup>  
安藤理恵<sup>3)</sup>, 猪子英俊<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>横浜市大眼科

<sup>2)</sup>横浜市大皮膚科

<sup>3)</sup>東海大分子生命科学

<sup>4)</sup>兵庫県赤十字センター

【目的】 アトピー性皮膚炎に、白内障、網膜剝離および角結膜炎などの眼疾患が合併する場合のあることが知られている。今回、我々はこの中でアトピー性皮膚炎患者に発症するいわゆるアトピー性角結膜炎に關与する遺伝学的背景を明らかにするため HLA class II 抗原を解析した。

【方法】 平成7年9月～12月に横浜市大皮膚科を受診したアトピー性皮膚炎患者のうち、角結膜炎罹患群27例(男14例, 女13例, 年齢 $22.4 \pm 9.9$ 歳)および角結膜炎非罹患群20例(男8例, 女12例, 年齢 $18.9 \pm 10.5$ 歳)の47例を対象とした。これらに対して HLA-DRB1, -DQA1 および -DQB1 遺伝子の HLA-DNA タイピングを PCR-RFLP 法で行った。対照群として健康成人136例を同様にタイピングした。

【結果】 アトピー性皮膚炎患者47例では HLA-DRB1\*1502 ( $p < 0.026$ ), -DRB1\*1406 ( $p < 0.016$ ), -DQA1\*0103 ( $p < 0.033$ ), -DQB1\*0302 ( $p < 0.033$ ) および -DQB1\*0603 ( $p < 0.016$ ) が有意に増加していた。一方, HLA-DQB1\*0303 ( $p < 0.037$ ) が有意に減少していた。また角結膜炎罹患群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。これに対して、角結膜炎非罹患群では対照群と比較して HLA-DRB1\*1406 ( $p < 0.007$ ), -DRB1\*1301 ( $p < 0.016$ ) および -DQB1\*0603 ( $p < 0.016$ ) が有意に増加していた。

【考察】 アトピー性皮膚炎の発症には、特定の HLA class II 抗原が關与していることが示唆された。また、角結膜炎罹患群と非罹患群では遺伝学的背景が異なることが示唆された。

## 36

## Association of HLA-DR with Progressive Systemic Sclerosis in Koreans

○Myoung Hee Park<sup>1)</sup>, Yeong Wook Song<sup>2)</sup>  
Fujiro Takeuchi<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Departments of Clinical Pathology and

<sup>2)</sup>Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea;

<sup>3)</sup>Department of Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

【Objective】 To clarify the contribution of HLA-DR to the susceptibility to progressive systemic sclerosis (PSS) in Koreans.

【Methods】 HLA-DR typing was carried out in 44 Korean patients with PSS and 120 healthy subjects by the polymerase chain reaction (PCR) and reverse oligonucleotide hybridization using the Roche Amplicor DRB test (21 probes).

【Results】 HLA-DR2 (DRB1\*15/\*16) was significantly increased in PSS patients compared with healthy control subjects (43.2% vs 20.8%, RR=2.9,  $p < 0.005$ ). There was no significant difference in the frequencies of other HLA-DR specificities including HLA-DR8 and DR11 (associated with Caucasian PSS).

【Discussion】 Our observations show the marked difference of genetic background of PSS, with regard to HLA-DR, between Koreans and other ethnic groups including Caucasian and American black people. The increase of DRB1\*1502-DRB5\*0102 haplotype in Japanese PSS patients has been recently reported. These findings suggest that Koreans might have similar genetic background in PSS susceptibility as Japanese, with regard to HLA-DR. This is in accord with the fact that Koreans are most close to Japanese among east Asian ethnic groups as viewed from HLA gene and haplotype distribution.

## 37

## ナルコレプシー患者における 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

○重成敦子<sup>1)</sup>, 安藤麻子<sup>1)</sup>, 成瀬妙子<sup>1)</sup>  
菅谷公彦<sup>2)</sup>, 池村淑道<sup>3)</sup>, 本多 裕<sup>4)</sup>  
十字猛夫<sup>5)</sup>, 猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大・医・分子生命科学  
<sup>2)</sup>放医研  
<sup>3)</sup>遺伝研・進化遺伝  
<sup>4)</sup>晴和病院  
<sup>5)</sup>日赤中央血液センター

【目的】 AT rich 領域から GC rich 領域への分岐点が存在するクラス II 遺伝子 (*DRA*)-クラス III 遺伝子 (*CYP21B*) 領域間の構造解析から同定された *INT3* 遺伝子の5'上流領域に CTG 繰り返し配列をみだし、日本人健常者では、4種類の多型性が存在することを報告した(第4回日本組織適合性学会)。本研究では、DR2と高い相関を示す神経性疾患であるナルコレプシー患者について、このCTG繰り返し配列の多型性を検討した。

【方法】 日本人ナルコレプシー患者36例の末梢血DNAについて、CTG繰り返し配列を含む領域をPCR増幅後、多型性を解析した。さらに、PCR-RFLP法によるDRB1とDQA1遺伝子のDNAタイピングを行い、日本人健常者の結果と比較検討した。

【結果】 ナルコレプシー患者では、CTG繰り返し配列にDRB1\*1501とDQA1\*0102に高い相関を示すR9のアリル頻度(88.9%)が日本人健常者(56.0%)と比較して有意に増加していたが、顕著な繰り返し配列数の増加は認められなかった。また、HLA-DNAタイピングの結果から、ナルコレプシー患者のCTG繰り返し配列の多型性は、日本人健常者と同様にDRB1やDQA1アリルとの相関が認められた。

【考察】 ナルコレプシー患者では、CTG繰り返し配列に2種類の多型性のみが認められ、いくつかの神経性疾患で報告されているような繰り返し数の顕著な増加は認められなかったが、健常者の場合と同様、ナルコレプシー患者においてもDRB1やDQA1アリルに相関を示す多型性が認められたことから、クラスII抗原と相関を示す種々の疾患のマーカーとして有用であると考えられる。

## 38

## 肺癌とHLA, TNFB-locusの関連に関する地域差の検討

○萩原政夫<sup>1,2)</sup>, バトムンフ・ムンフバト<sup>1)</sup>  
辻 公美<sup>1)</sup>, 佐藤忠之<sup>2)</sup>, 土田文子<sup>2)</sup>  
佐藤 薫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学移植免疫学  
<sup>2)</sup>同 大学病院細胞移植医療センター

【目的】 肺癌とHLA/TNF-Bに関連について、地域別の影響を検索した。

【方法】 肺癌患者(沖縄98人, 関東135人, 川崎38人, 東北50人)と正常健康者(沖縄75人, 他3地域は165人)を対象として、HLA抗原およびTNF-B allele cytotoxicity test (HLA) およびDNA-PCR-RFLP法(DRB1\*04, TNF-B)で検査した。

【結果】 沖縄肺癌ではHLA-Cw3が有意に高頻度(cP=0.014), HLA-DR4が有意に低頻度(cP=0.001)であった。また、後者は、特定のDRB1\*04alleleの偏りは無かった。また、関東肺癌ではTNF-B 10.5 kb homoが低頻度(cP=0.03)であった。さらに東北地域では、ヘビースモーカー肺癌のHLA-Cw7が有意に高頻度(cP=0.05)であり、非喫煙者肺癌ではHLA-B51抗原が有意に高頻度(cP=0.02)であった。組織型別では、沖縄の扁平上皮癌のCw3が高頻度(cP=0.0372), 同肺癌のDR4が低頻度(cP=0.0124)であった。また、東北の扁平上皮癌ではDQ3が高頻度(cP=0.007)であった。予後との関連では、沖縄のstage III+IV肺癌における10.5 kb homo群の5年生存率が高く、10.5/5.5 kb homo群より有意(cP=0.015)であった。

【考察】 1) 日本人肺癌では有意な頻度差を示すHLA抗原, TNF-B alleleに地域差があることを観察した。即ち、組織型・病型分類が同一であっても、何か地域毎の別の因子が存在する可能性が示唆された。2) 肺癌に罹り易い(感受性)またはかかりにくい(抵抗性)HLA抗原/TNFBの可能性が示唆された。後者はさらに予後とも強い関連を有し、肺癌の予後因子としても有用であると考えられた。

## 39

## 乳幼児発症重症筋無力症における抗 AChR 自己反応性 T 細胞が認識するエピトープの同定

○金井隆幸<sup>1)</sup>, 野村芳子<sup>2)</sup>, 瀬川昌也<sup>2)</sup>  
 松下 祥<sup>1)</sup>, 西村泰治<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>熊大・院医・免疫識別

<sup>2)</sup>瀬川小児神経学クリニック

【目的】 乳幼児発症重症筋無力症(乳幼児 MG) 患者集団では, HLA-DR9-DQ9, DR13-DQ6ならびに, HLA-DR9/DR13ヘテロ接合体の頻度が有意に増加していることが松木らにより報告されている。本研究は, 乳幼児 MG 患者における AChR 自己反応性 T 細胞が認識する T 細胞エピトープ, ならびに抗原提示分子を同定し, HLA による疾病感受性の決定機序について解明することを目的とする。

【方法】 MG 発症に関わる自己抗原と考えられている, アセチルコリンレセプター  $\alpha$  鎖 (AChR $\alpha$ ) のアミノ酸配列に基づいて, 33種のオーバーラッピングペプチドを合成した。これらの合成ペプチドを乳幼児 MG 患者の末梢血リンパ球と共培養することにより, ペプチド特異的自己反応性 T 細胞株を樹立した。

【結果と考察】 樹立した T 細胞株には, HLA-DQ6分子により抗原提示を受けるものと, 患者本人の抗原提示細胞による抗原提示は受けるが, 一方の HLA ハプロタイプのみを共有する他人の抗原提示細胞による抗原提示は受けないものが存在した。また, これらの T 細胞株を活性化できる抗原ペプチドのコアエピトープを, AChR $\alpha$  鎖中に特定したが, その位置は 2 種類の T 細胞株において同一であった。T 細胞株は, 大量の IFN- $\gamma$  と少量の IL-4 を産生する Th1 細胞様の性質を有していた。これは, 乳幼児 MG 患者血清中の抗 AChR 抗体の陽性率が, 成人発症 MG と比べ低いという事実を裏付ける結果とも考えられた。

## 40

## 実験膜性腎症モデルの MHC クラス II 遺伝子の解析

○野田律矢, 小河原悟, 兼岡秀俊, 内藤説也  
 福岡大学病院腎センター

【目的】 実験膜性腎症モデル Heymann 腎炎はラットストレインにより腎炎惹起性が異なることが知られている。そこで昨年の本学会にて, この腎炎に感受性または抵抗性を示すラットストレインの MHC クラス II 遺伝子の塩基配列を調べ, 本症感受性との関連について報告した。今回, ラットストレイン数を増やし, その塩基配列の相違, 更にヒトの膜性腎症患者に強い相関を示す HLA クラス II 遺伝子, またマウス H-2 遺伝子と比較検討した。

【方法】 ラット腎臓より DNA を抽出し, MHC クラス II 遺伝子の  $\beta$  1 ドメインを独自に作製したプライマーで PCR 法により増幅し, 得られた PCR 産物を直接シーケンス法により塩基配列の決定を行った。

【結果】 独自に設定した PCR 法によりラット MHC クラス II 遺伝子の特異的増幅が得られ, PCR 産物を直接シーケンスすることができた。ヒトやマウスと同様にラット MHC クラス II 遺伝子はストレイン間で多型性を呈しており, その多型性はランダムな変異によるものではなく, いくつかの多型性のある領域の組合せとして存在していた。腎炎感受性群と非感受性群との間での相違は 3 カ所認められたが, このうち感受性群は全て  $\beta$  1 ドメインの第 38 番目がロイシンであった。

【考察】 結果の最後に記したことは白人と日本人の膜性腎症患者で強い相関を認めた HLA ハプロタイプで共通する部位と同じ位置でかつ同じアミノ酸であった。またマウスの腎炎と H-2 タイプも同様な結果であった。ヒト, マウスとラット MHC クラス II 遺伝子と比較すると種を越えて高い相同性があり, この領域が T 細胞による抗原認識の場であることを考えれば MHC クラス II 遺伝子の特定のタイプが種を越えて膜性腎症の疾患感受性を提示している可能性が示唆された。

## 41

## HLA-Bw4エピトープ形成における結合ペプチドの役割

○高宮裕兎<sup>1,2)</sup>, 坂口 隆<sup>1)</sup>, 三輪清志<sup>3)</sup>  
滝口雅文<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東大医科研・癌体質

<sup>2)</sup>オリンパス光学 BRC

<sup>3)</sup>味の素中央研

【目的】 HLA-B-Locus上の共通抗原の一つであるBw4は、77-83番アミノ酸残基によって特異性が決定されると考えられている。また、NK細胞のMHCクラスI分子に対するinhibitory receptorが認識している部位もこの部分であることがわかってきている。本研究では、Bw4特異的抗体が、クラスI分子と結合ペプチドのアミノ酸残基を特異的に認識していることを明らかにした。

【方法】 RMA-S細胞にHLA-B\*5101遺伝子を導入して発現させた細胞を用いて、HLA-B5101分子に抗原ペプチドを結合させ、抗Bw4モノクローナル抗体(TU48, TU108)との結合を抗HLA class I $\alpha$ 3ドメインモノクローナル抗体(TP25.99)との結合と比較して検討した。

【結果】 TU48と比べて、TU109のB5101分子との結合は、結合ペプチドによって変化することがわかった。9残基のペプチドのうち、8残基目のアミノ酸が負電荷を持っている時(Glu)または、小さいアミノ酸(Pro, Gly, Ala)のとき、TU109の結合力は著しく低下した。

【考察】 Bw4エピトープはクラスI分子の77-83番残基のアミノ酸によって形成されていると考えられてきたが、TU109はその部位だけでなく、結合ペプチドも認識していることが明らかになった。結合ペプチドの8番残基とクラスI分子の77-83番残基は近い位置関係にあり、TU109は抗原ペプチドの8番残基とHLAクラスI分子の77-83番残基で形成される三次構造を認識していると考えられた。さらに、このアミノ酸残基の部位は、NK細胞のクラスIレセプターの認識部位と考えられており、NK細胞が抗原ペプチドを含めた三次構造を認識しているか可能性が示唆された。

## 42

## HLA-ペプチド-TCR相互作用によるAPC内へのシグナル伝達とその変化

○松岡多香子<sup>1,2)</sup>, 興梠博次<sup>2)</sup>, 安藤正幸<sup>2)</sup>  
西村泰治<sup>1)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>熊本大院医免疫識別

<sup>2)</sup>熊本大医第1内科

【目的】 コナヒョウダニ抗原(*Derf1*)に特異的なヒトT細胞クローンを用いて、抗原ペプチドのアナログを認識したT細胞と抗原提示細胞における応答の変化とその機序を解析する。

【方法】 我々が樹立したTh0クローンDT13.2は、HLA-DQ6拘束性に*Derf1* p18-31を認識する。第21残基RをKに置換したアナログペプチド(R21K)でDT13.2を刺激すると増殖反応、IL-4、IL-5産生は不変のままIFN- $\gamma$ 産生が増強し、これが抗IL-12抗体で抑制されることを報告してきた。今回は、野生型ペプチドとアナログペプチドの刺激によって誘導される抗原提示細胞側の反応を比較した。

【結果と考察】 抗IL-12抗体は、R21KによるIFN- $\gamma$ 産生の増強は抑制したが増殖反応や野生型ペプチドによるIFN- $\gamma$ の産生には影響を及ぼさなかった。DT13.2をR21Kで刺激すると野生型ペプチドで刺激するよりも抗原提示細胞からのIL-12産生が増強されたが、DT13.2のCD40L発現には差が認められなかった。さらに抗IFN- $\gamma$ 抗体+抗IFN- $\gamma$ R抗体は、IL-12の産生に影響を与えなかった。すなわちHLAはペプチドの「受け皿」としてのみならず、アナログペプチドを介したTCR-HLA相互作用によってAPC内に異なるペプチドを伝達しており、これがT細胞応答の変化(IFN- $\gamma$ 増強)を誘導したと考えられた。

## 43

HLA-DR1分子拘束性に変異 Ras ペプチドを認識するヒト T 細胞クローンの解析：アナログペプチドによる免疫応答の増強

○横溝 博<sup>1,2)</sup>, 藤田 博<sup>1,2)</sup>, 小川道雄<sup>2)</sup>  
白水美香子<sup>3)</sup>, 横山茂之<sup>4)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>  
西村泰治<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>熊本大院医・免疫識別

<sup>2)</sup>熊本大医・第2外科

<sup>3)</sup>理研

<sup>4)</sup>東京大理・生物化学

【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 由来のペプチドを認識するヒト T 細胞クローンの免疫応答を増強するアナログペプチドを同定する.

【方法および結果】 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しこれらを認識する T 細胞クローン C27 を樹立した. C27 は数種類の変異 p21Ras ペプチドおよび変異 Ras 蛋白を DR1 拘束性に認識し, IFN- $\gamma$ , GM-CSF および TNF- $\alpha$  を産生した. また C27 の認識する最小のコアペプチドは15個のアミノ酸からなる Rasp3-17 G12V; <sup>3</sup>EYKLVVVVGAVGVGKS<sup>17</sup> であり, その DR1 分子への結合に重要な第一アンカーは<sup>4</sup>Tyr と推測された. DR1 分子の  $\beta$  鎖の第86残基は Gly なので第一アンカーとしては Tyr よりも Trp の方が親和性が高いと考えられた. そこでアナログペプチド Rasp3-17Y4W-G12V; <sup>3</sup>EWKLVVVVGAVGVGKS<sup>17</sup> に対する C27 の反応性を G12V と比較したところ, 前者は後者に比べてより大きな増殖反応および IFN- $\gamma$ , GM-CSF 産生を誘導した.

【考察】 観察された免疫応答の増強は抗原ペプチドの DR1 分子への結合が第一アンカーの置換により強化されたためと推測された. このような腫瘍特異的ペプチドのアナログにより抗腫瘍免疫応答が増強される可能性が示唆された.

## 44

新しい HLA-ペプチド結合アッセイの開発と詳細な HLA-DR9 結合ペプチドモチーフ決定への応用

○藤竿章次, 西村泰治, 松下 祥  
熊本大・院医・免疫識別

【目的】 我々は, フェージランダムペプチドライブラリーを用いて HLA-DR9 結合ペプチドのアンカーを決定し, 本学会で報告した. 今回は, 放射性同位体を用いず, しかも精度, 簡便さにおいて現在のアッセイ法に勝る方法を樹立し, これを HLA-DR9 分子に結合するペプチドモチーフの詳細な決定に応用することを目的とした.

【方法】 (1) ELISA 用プレートを protein A でコートしたのちに腹水型抗 HLA 抗体とインキュベートし, これを固相化する, (2) 精製 HLA 分子+ビオチン化した標準結合性ペプチド+テストすべき非標識ペプチドを別の tube でインキュベートしておき, これを (1) に apply する, (3) avidin-phosphatase, phosphatase 基質を用いて well を発色させ, ELISA reader にて検出する, (4) 同時にテストすべき非標識ペプチドの代わりに非標識標準結合性ペプチドを各種濃度で加えた反応系も作製しておき, これを用いて標準曲線を描く, (5) テストすべき非標識ペプチドと HLA との親和性を (4) を用いて定量化する.

【結果と考察】 複数のサンプルの親和性を従来法と新法で決定し比較したところ, tight な正の相関を示した. この方法により DR9 結合性ペプチドの第1アンカーと第2アンカーを全てのアミノ酸に置換したペプチドの親和性を定量し, 詳細なモチーフを決定した. 従来法は radioactive で煩雑であった. L cell transfectant とビオチン化ペプチドを用いて FACS で解析する方法も用いられてはいたが, 高濃度のビオチン化ペプチドを必要とするために inhibition assay を組み立てることが困難で定量性に問題があった. 本法は non-radioactive なうえに従来法よりも定量性がよくしかも簡便であり, extensive な親和性の決定に適している.

## 45

HLA-DQ $\beta$ <sup>57</sup>残基の多型が結合ペプチドの構造に及ぼす影響

○大磯正剛, 松下 祥, 西村泰治  
熊本大・院医・免疫識別

【目的】 IDDM 患者集団では, DQ $\beta$ <sup>57</sup>残基が Asp 以外のアミノ酸である DQ 対立遺伝子に関するホモ接合体の頻度が, 有意に増加しており, 逆に DQ $\beta$ <sup>57</sup>残基が Asp である DQ 対立遺伝子の頻度が減少している. 本研究は, DQ $\beta$ <sup>57</sup>残基のみが異なる DQ8 (DQA1\*0302-DQB1\*0302: DQ $\beta$ <sup>57</sup>Ala) と DQ9 (DQA1\*0302-DQB1\*0303: DQ $\beta$ <sup>57</sup>Asp) で結合親和性の異なるペプチドの構造を同定することを目的とした.

【方法】 ファージランダムペプチドライブラリーを精製 DQ9 分子との結合性で選択することにより, DQ8 と DQ9 の両方に高親和性に結合するペプチドを同定した. これをもとにアンカー残基を決定し, 最も C 末端寄りのアンカーを置換したアナログペプチドの親和性を決定して DQ8 と DQ9 の間で比較した.

【結果と考察】 DQ8 と DQ9 分子に共に高親和性を示すペプチド KDYVLWSSSTV を同定した. N 末端側の第 1DQ アンカー残基の位置を P1 とすると, 下線で示した P1, P4 および P8 が, DQ アンカー残基と考えられた. DQ-ペプチド複合体において, 空間的に DQ $\beta$ <sup>57</sup>残基に最も近い P8 残基の Thr のみを他の 19 種類のアミノ酸に置換し, これらアナログペプチドの DQ8 および DQ9 分子への結合親和性を比較した. その結果, Thr を Arg 以外の親水性アミノ酸, つまり Lys, His, Glu, Asp, Gln, Asn あるいは Ser に置換したアナログペプチドは, DQ8 分子には高親和性を示したが, DQ9 分子には結合しなかった. P4 と P8 の間に 1 残基挿入した KAYA-AWAAAAT の P9 を置換しても同様の結果が得られた. これらの結果より DQ $\beta$ <sup>57</sup>残基の多型による結合ペプチドの構造の違いを生む要因として, 水素結合の関与が考えられた.

## 46

## HLA-DR53 (DRB4\*0101) 分子結合ペプチドのモチーフの同定

○小林博也, 小久保拓, 佐藤啓介, 片桐 一  
旭川医大・2 病理

【目的】 免疫応答を制御する HLA クラス II 分子のうち, 比較的発現量が少なく, いまだ結合ペプチドのモチーフが明らかにされていない HLA-DR53 (DRB4\*0101) 分子に着目し, この分子に結合するペプチドの重要なアミノ酸残基を同定する.

【方法】 HLA-DR9/DR53 分子から酸で溶出して得られたペプチドを基に, ビオチン化ペプチドを作成し, L cell に DR53 分子を発現させた, L-DR53 cell に結合するペプチドをフローサイトメーターによる結合アッセイにて同定した. そして, このペプチドのアミノ酸をアラニンに 1 残基ずつ置換したアナログを合成し, 抑制試験を行い, 結合に重要なアミノ酸残基を決定した.

【結果】 ① DR9/DR53 分子から溶出されたペプチドのうち, ヒト L プラスチン由来からのペプチドが, DR9, DR53 分子の両方に結合可能であった. ② このペプチドを用い, 置換アナログとの親和性の抑制試験の結果, DR53 分子との結合に重要なペプチドのアミノ酸残基は, K--I---RKI と考えられた. ③ N 末, C 末側のアンカーに塩基性アミノ酸が許容されることは, DR53 分子結合ペプチドモチーフに特徴的であると考えられた.

## 47

HLA CLASS II GENE POLYMORPHISM  
IN KHOTON-MONGOLIANS

○Munkhbat B<sup>1,2)</sup>, Hagihara M<sup>1,3)</sup>, Sato T<sup>3)</sup>,  
Tsuchida F<sup>3)</sup>, Sato K<sup>3)</sup>, Munkhtuvshin N<sup>2)</sup>,  
Tsuji K<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Dept. of Transplantation Immunology, Tokai  
University, School of Medicine.

<sup>2)</sup>Institute of Clinical Pathology, Ulaanbaatar,  
Mongolia

<sup>3)</sup>Cell Transplantation Center, Tokai University  
Hospital, Isehara, Kanagawa

The genetic polymorphism of HLA class II loci was investigated in Khoton- and Khalkh-Mongolians for the first time by DNA PCR-SSO and PCR-RFLP methods. The results were compared with those obtained from other Mongoloid populations.

**【Materials and Methods】** Eighty-five healthy individuals from Khoton and 41 healthy unrelated individuals from a Khalkh population were enrolled in the present study. Genomic DNAs were isolated from peripheral blood cells by isopropanol precipitation. HLA typing for HLA-DRB1, -DQB1, -DQA1 and -DPA1 were performed by PCR-SSO according to the 12th IHW reference protocol. HLA-DPB1 typing was performed by PCR-RFLP.

**【Results】** The most prevalent alleles were DRB1\*0301 with an allelic frequency at 13.5%, DQB1\*0201 (30.0%), DPB1\*0401 (34.1%) and DQA1\*0301 (28.2%) in Khoton-Mongolians and DRB1\*0401 (9.8%), DQB1\*0301 (29.3%), DPB1\*0201 (26.8%) and DQA1\*0301 (23.2%) in Khalkh-Mongolians. The comparison of HLA class II allelic frequencies between two populations showed significantly higher frequency of DQB1\*0201, DPB1\*0401 and DQA1\*0201 and significantly lower frequency of DRB1\*1101, DQB1\*0603, DPB1\*0201, DPB1\*1701 and DQA1\*0103 in Khoton ( $p<0.05$ ). In comparison with other Mongoloid populations, the HLA-DR3, DQ2 antigen frequencies were significantly higher in Khoton-Mongolians ( $p<0.05$ ).

**【Discussion】** The comparison of HLA class II allele frequencies in Khoton with those in other Mongoloid populations revealed some significant differences and genetic divergence between them.

## 48

日本人の HLA-A, B, C, DR, DQ, DP  
ローカスのアレルタイピング

○石川善英<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 小川篤子<sup>1)</sup>  
王 慧茹<sup>1)</sup>, 光永滋樹<sup>1)</sup>, 森山 哲<sup>1)</sup>  
林 玲<sup>1)</sup>, 坂内 誠<sup>3)</sup>, 渡辺嘉久<sup>1)</sup>  
柏瀬貢一<sup>1)</sup>, 田中秀則<sup>1)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>  
田所憲治<sup>1)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日赤中央血液センター・研究部

<sup>2)</sup>東大・医・人類遺伝

<sup>3)</sup>東京都血液センター・研究部

**【緒言】** 骨髄移植においては HLA のアレルレベルでの適合が必要であることが報告されている。また同じ抗原グループでもアレルにより疾患感受性が異なることが知られており、アレルタイピングの必要性が高まっている。しかし日本人のクラス I アレルについては十分な知見が得られていない。そこでクラス I のアレル構成、さらにクラス II アレルとの関連を明らかにする目的で HLA-A, B, C, DR, DQ, DP のアレルレベルでの多型を調べた。

**【方法】** 健常な日本人115人の全血から Proteinase K 処理法により genomic DNA を調製した。クラス I のアレルタイピングは血清学タイピングの結果をもとに抗原グループ特異的 PCR 増幅後、PCR-SSOP 法 (A2, A24, B38, B39, B67, B13, B40, B51, B52, B57, B58), -SSCP 法 (A11, B7, B37, B44, B48, B54, B55, B56, B59, B15, B46, all Cw), -SSP 法 (A26, Cw8) および-RFLP 法 (Cw3) を用いて行った。クラス II は PCR-MPH 法 (DRB1), -SSCP 法 (DRB1), -RFLP 法 (DQB1, DPB1) および-PHFA 法 (DQB1, DPB1) によりアレルを決定した。

**【結果と考察】** 日本人の A2, A26, B61 は、血清学的には区別困難な、比較的頻度の高い複数のアレルにコードされていた。その他の A, B-ローカス抗原は頻度の低いアレルを除けば1つの抗原が1つのアレルに対応していた。アレルレベルでの A-C-B 3座位の強い関連が確認された。A-C-B-DR-DP の5座位ハプロタイプでは A\*3303-Cw\*1403-B\*4403-DRB1\*1302-DPB1\*0401, A\*2402-Cw\*1202-B\*5201-DRB1\*1502-DPB1\*0901 が高頻度であった。

## 49

日本人を含む東北アジアの7民族集団, およびスペインジプシー集団における HLA-B\*61アレルの分布

○小川篤子<sup>1)</sup>, 林 玲<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,2)</sup>, 王 慧茹<sup>1,3)</sup>  
田中秀則<sup>1)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>  
朴 明姫<sup>1)</sup>, 賈 冠軍<sup>5)</sup>, Carlos Vilhes<sup>6)</sup>  
Chimge Nyam-osor<sup>7)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>日赤中央血液センター, <sup>2)</sup>東大・医・人類遺伝  
<sup>3)</sup>東大・医・輸血部, <sup>4)</sup>ソウル大・病理, <sup>5)</sup>ハルビン  
赤十字血液センター, <sup>6)</sup>Puerta de Hierro 病院,  
<sup>7)</sup>モンゴル医科大学人類学研究センター

【目的】 B61抗原のアレルとして HLA-B\*4002, B\*4003, B\*4004, B\*4006の4種がこれまで報告されているが, 血清学的手法からは単一な抗原とされており, これらを識別することはできない。そこで, 日本人を含む東北アジアの7民族集団および, スペインに住むジプシー集団について, B61アレルの分布を調べた。

【方法】 日本人, 韓国人, 中国人(北部漢民族, 満民族, 北部朝鮮民族), モンゴル人, ブリヤット族(ロシア, バイカル湖近傍に住むモンゴル民族), スペインのジプシー集団(各112-212検体)のうち血清学的にB61抗原陽性の検体(各23-54検体)を対象とした。ゲノムDNAを用いてPCR-SSOP法にてDNAタイピングを行った。

【結果】 日本人, 韓国人, 中国人ではHLA-B\*4002とB\*4006が共にほぼ同頻度でみられたが, モンゴル人, ブリヤット族ではB\*4002が高頻度であった。これらの民族に共通してB\*4002はHLA-Cw10抗原と, B\*4006はHLA-C blank抗原と関連を示した。日本人ではこのC blankはCw\*0801であった。B\*4003は低頻度ながら, 日本人, 中国北部漢民族, 中国北部朝鮮民族, モンゴル人で見出され, Cw10抗原との関連を示した。B\*4004は今回調査した民族集団には見出されなかった。ジプシー集団のB61抗原はすべてB\*4006でありCw15と強い関連が見られた。

【考察】 (1) HLA-B\*4003, B\*4004は南アメリカンディアン固有のアレルとされていたが, B\*4003は東北アジアの民族にも存在することが示された。(2) 白人のB61はB\*4002にコードされ, またCw2と関連することが報告されている。今回調査した東北アジアの民族ではB\*4002はCw10抗原との関連を示し, 白人とは異なるハプロタイプを形成することが示唆された。同様にジプシー集団のB\*4006と日本人のB\*4006も異なるハプロタイプを形成することが示唆された。

## 50

移住, 拡散ルートが異なると推定される B62に連鎖している2つのDR4ハプロタイプ

○木下朋子<sup>1)</sup>, 橋本光男<sup>1)</sup>, 兼重俊彦<sup>2)</sup>  
山崎美保<sup>1)</sup>, 福西孝信<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>兵庫県立西宮病院・腎臓移植センター  
<sup>2)</sup>シオノギ製薬・診断医学部

【目的】 我々はHLA遺伝子座間の強い連鎖不平衡とそれにより形成されるハプロタイプが様々な民族の集団によって異なる点に注目しHLAハプロタイプが人類集団の移住拡散ルートの痕跡を調べる指標になると考えてきた。今回はDRB1\*0403, \*0406遺伝子型のハプロタイプについて解析を行ったので報告する。

【方法】 2219人の日本人非血縁者を対象とした。クラスI抗原は血清学とPCR-SSP法でタイピングを行った。クラスIIに関しては, 第11回国際組織適合性ワークショップに準じたPCR-SSOP法とPCR-SSP法を併用した。遺伝子型, ハプロタイプ頻度は, Baur, Danilov等の方法で解析した。

【結果】 2219人のクラスII遺伝子タイピングを行ったところ, 7種類のDRB1\*04遺伝子型が検出され, それらは全て特定のHLA-B抗原と強い連鎖を示した。特に, DRB1\*0403と\*0406はB62と, DRB1\*0403と\*0410はB35が共通して連鎖が認められた。さらに, B35, B62に連鎖するC抗原を加味して検討したところ, A2-Cw9-B62-DRB1\*0403-DQA1\*0301-DQB1\*0302, A\*1101-Cw4-B62-DRB1\*0406-DQA1\*0301-DQB1\*0302の2種類のハプロタイプが存在することがわかった。

【考察】 日本人以外の民族の集団で, Cw4, Cw9に連鎖するB62の頻度は, Cw9-B62が白人系とイヌイット等の北方に居住する集団に多くみられるのに対し, Cw4-B62ハプロタイプは, パプア・ニューギニアをはじめとした南方系モンゴロイドに特徴的である。従って, 日本人集団にみられた2つのB62-DRB1\*04ハプロタイプは, それぞれ異なった地域から移住, 拡散してきたものと推定される。