

MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第3巻第3号 平成9年3月31日発行

Contents

〔原著論文〕 PCR-MPH 法による HLA-A2, A26 および B61 対立遺伝子のタイピング中野 浩美, 川井 信太郎, 柏瀬 貢一, 小川 篤子, 石川 善英徳永 勝士, 赤座 達也, 十字 猛夫, 山根 明男	205
〔シリーズ：異種の MHC〕 ウシ MHC 遺伝子間 陽子, 長岡 淑子	213
〔最新情報：“玉手箱”〕 PCR-SSOP 法による HLA-DNA タイピング木村 彰方	226
〔最新情報：“玉手箱”〕 最新アレル情報小林 賢	230
〔国際学会印象記〕 第12回国際組織適合性学会小河原 悟	241
〔国際学会印象記〕 第16回国際移植学会 (XVI International Congress of the Transplantation Society) に参加して佐田 正晴	244
〔書評〕 TRANSPLANTATION IMMUNOLOGY Fritz H. Bach, Hugh Auchincloss, Jr. 編佐田 正晴	246
第6回日本組織適合性学会大会プログラム	249
抄録 特別講演	273
シンポジウム	277
ワークショップ	283
ランチョンセミナー I	291
ランチョンセミナー II	295
一般演題	299
〔伝言板〕 第7回日本組織適合性学会大会のお知らせ	327
〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉	328
編集後記	330

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI

Contents

〔原著論文〕 PCR-MPH 法による HLA-A2, A26 および B61 対立遺伝子のタイピング中野 浩美, 川井 信太郎, 柏瀬 貢一, 小川 篤子, 石川 善英 徳永 勝士, 赤座 達也, 十字 猛夫, 山根 明男	205
〔シリーズ：異種の MHC〕 ウシ MHC 遺伝子	間 陽子, 長岡 淑子 213
〔最新情報：“玉手箱”〕 PCR-SSOP 法による HLA-DNA タイピング.....	木村 彰方 226
〔最新情報：“玉手箱”〕 最新アリアル情報	小林 賢 230
〔国際学会印象記〕 第12回国際組織適合性学会	小河原 悟 241
〔国際学会印象記〕 第16回国際移植学会 (XVI International Congress of the Transplantation Society) に参加して.....	佐田 正晴 244
〔書評〕 TRANSPLANTATION IMMUNOLOGY Fritz H. Bach, Hugh Auchincloss, Jr. 編.....	佐田 正晴 246
第6回日本組織適合性学会大会プログラム	249
抄録 特別講演	273
シンポジウム	277
ワークショップ	283
ランチョンセミナー I	291
ランチョンセミナー II	295
一般演題	299
〔伝言板〕 第7回日本組織適合性学会大会のお知らせ	327
〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉	328
編集後記	330

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

J S H I

〔原著論文〕

PCR-MPH 法による HLA-A2, A26および B61対立遺伝子のタイピング

中野 浩美¹⁾, 川井 信太郎¹⁾, 柏瀬 貢一²⁾, 小川 篤子²⁾, 石川 善英²⁾,
徳永 勝士^{2,3)}, 赤座 達也²⁾, 十字 猛夫²⁾, 山根 明男¹⁾

1) 湧永製薬 (株), バイオ研究所 2) 日本赤十字社中央血液センター, 研究一課
3) 東京大学医学系研究科, 人類遺伝学教室

(平成9年1月30日 受付)

要約

我々は HLA の多検体のルーチン検査に適した DNA タイピング法として, Polymerase Chain Reaction-based Microtiter Plate Hybridization (PCR-MPH) 法を用い, HLA-DRB1や DQB1遺伝子のタイピング法をすでに確立した. 今回, 従来の血清学的方法ではタイピングが困難な HLA-A2, A26および B61遺伝子のアレルタイピングを PCR-MPH 法で検討した. それぞれのグループに特異的なプライマーを用いて PCR を行い, A2は日本人に報告されている5種類のアレル (A*0201, *0203, *0206, *0207, *0210) を10プローブが固定されたマイクロタイタープレートを用いてタイピングした. 同様に A26は3種類 (A*2601, *2602, *2603) を5プローブで, B61は4種類 (B*4002, *4003, *4004, *4006) を6プローブでタイピングした. 本法を用いてアレルタイピングを行った結果, PCR-SSO 法などの結果と一致した. 本法は PCR が約3時間, MPH が約2時間の計5時間で終了する. さらに今回報告した HLA-A2, A26および B61遺伝子タイピングの MPH 操作は, HLA-DRB1や DQB1のタイピングと同じ条件なので, これら全てのタイピングを同時に行うことができる.

キーワード:

ルーチン DNA タイピング, PCR-MPH, HLA-A2, HLA-A26, HLA-B61

はじめに

HLA クラス I 遺伝子は HLA-A, B, C からなり, 公的骨髄バンクを通じた非血縁者間骨髄移植はこのうちの HLA-A, B およびクラス II の DR 抗原の血清学的な一致を原則としている.

平成7年度の笹月班のレトロスペクティブな研究(1)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がそれぞれ80%近くを占めていた. その主な原因は, これらの抗原グループが血清学的に判別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 レベルでのマッチングが移植後に重要であることも報告され, HLA-A2および B61のアレルタイピングの必要性が高まった. 更に血清学的に数種に分かれると報告されているにも関わらず, 良い抗血清がないためにルーチン検査では分けることが困難な HLA-A26遺伝子についてもアレルタイピングの必要性が高まった.

HLA クラス I のアレルタイピングは PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) 法(2, 3), PCR-sequence specific primer (SSP) 法(4, 5), PCR-sequence specific

oligonucleotide (SSO) 法 (6-10), ダイレクトシーケンシング法 (11) などで行われている。しかし, これらの方法には一長一短があり, 必ずしも大量に検体を処理するルーチン検査には適していない。我々は HLA の多検体のルーチン検査に用いる方法として PCR-MPH 法を開発した。本法はビオチン標識プライマーで増幅した PCR 産物を, マイクロタイターウェル上でタンデムに連結されたオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイゼーションさせ, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によりタイピングを行うものである。本法は ELISA で用いる汎用機器が使用可能であるため, 大量に検体を処理する場合に適している。

今回我々は HLA-A2, A26 および B61 遺伝子のアリルタイピングを HLA-DRB1 遺伝子のタイピング (12-15) と同様に PCR-MPH 法で検討した。

材料と方法

PCR プライマー

各グループを特異的に増幅する PCR プライマーの塩基配列を表 1 に示す。このうち, B61 を増幅するプライマーは小川ら (4) が報告しているものを用いた。オリゴヌクレオチドは, 自動 DNA 合成機 392 DNA/RNA Synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA) で合成後, 5' 末端をビオチン標識した (16)。ビオチン標識したオリゴヌクレオチドは, HPLC で精製した。

PCR 反応

ゲノム DNA は, 日本赤十字社中央血液センター HLA ワークショップパネルのものを使用した。

PCR 反応液は, 増幅試薬 [80 mM Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 200 μM dNTP, 0.2 μM forward primer, 0.2 μM reverse primer, 2.5 units Taq DNA polymerase (TaKaRa)] に, 200-500 ng のゲノム DNA を加えて全量を 100 μl とした。PCR 反応は GeneAmp PCR System 9600-R (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) を用いて 96°C で 3 分間熱変性させた後, 熱変性: 96°C, 30 秒, アニリング: 62°C, 1 分, 相補鎖合成: 72°C, 1 分で 30 サイクル行った。

プローブの選択と調製

タイピングに用いたプローブの配列は, 基本的に第 12 回 International Histocompatibility Workshop (IHW) で使用されたのものに準じた (17) (表 2)。ただし, 全てのプローブを同一条件でハイブリダイゼーションおよび洗浄を行う必要があるため, プローブの配列には改良を加えた。また, 検出を高感度で行うためにプローブを同一方向にタンデム連結した。プローブをタンデムに連結する方法および各プローブを含む ssDNA の調製は川井らの方法に従って行った (18)。

プローブを導入した ssDNA の固定

50 μl の ssDNA 溶液 (プローブが導入された ssDNA 0.4 μg を 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1

表1 PCR プライマー

Name	Sequence (5' to 3')	Length of product
<i>A2 allele specific amplification</i>		
A2-1	biotin- CAC TCC TCG TCC CCA GGC TGT	854 bp
A2-2	biotin- CGT GGC CCC TGG TAC CCG T	
<i>A26 allele specific amplification</i>		
A26Up	biotin- ACT CCA TGA GGT ATT TCT ACA CCT	770 bp
A26-NM1	biotin- GCG GAG CCA CTC CAC GCA AC	
<i>B61 allele specific amplification</i>		
B61FOg	biotin- CAT GAG GTA TTT CCA CAC CTC CG	775 bp
B40R2Og	biotin- CGG AGC CAC TCC ACG CAC TC	

表2 プローブ配列

(1) A2遺伝子タイピング用プローブ

<i>Name</i>	<i>Sequence (5' to 3')</i>	<i>Specificity</i>
F9J	GTA TTT CTT CAC ATC CGT	A*0201,*0202,*0203,*0204,*0207 *0209,*0211-*0213,*0215N-*0217
Y9J	GTA TTT CTA CAC CTC CGT	A*0205,*0206,*0208 *0210,*0214
C99-NJ	GAG GAT GTG TGG CTG CGA	A*0207,*0215N
107WJ	GTC GGA CGG GCG CTT CCT	A*0210
107GN2J	GTC GGA CTG GCT CTT CCT	A*0201,*0202,*0203,*0204,*0205,*0206 *0207,*0208,*0209,*0211-*0217
149ANJ	GGA GGC GTC CCA TGT GGC	A*0201,*0202,*0204,*0205,*0206,*0207,*0208 *0209,*0210,*0211,*0212,*0214-*0217
T149X3J	GGA GAC GGC CCA TGA TGC	A*0203
W156-SN2J	GCA GTG GAT AGC CTA CCT	A*0202,*0203,*0205,*0208
156F-SNJ	GGA GCA GTT GAT AGC CTA	A*0201,*0204,*0206,*0207,*0209 *0210,*0211,*0214-*0217
HE152-SXJ	GGC CCA TGA GGC GGA GCA	A*0203,*0213

(2) A26遺伝子タイピング用プローブ

<i>Name</i>	<i>Sequence (5' to 3')</i>	<i>Specificity</i>
A26-E21	GAC TGA CCG AGC GAA CCT GG	A*2601,*2602
A26-E22	GAC TCA CCG AGT GGA CCT GG	A*2603
A26-E31	CAG CAG AAC GCT TAC GAC	A*2602
A26-E32	CAT CAG GAC GCT TAC GAC	A*2601,*2603,*2605
common	TGG GAG ACG GCC CAT GAG	A*2601,*2602,*2603,*2605

(3) B61遺伝子タイピング用プローブ

<i>Name</i>	<i>Sequence (5' to 3')</i>	<i>Specificity</i>
B40-E32	TCC AGA GCA TGT ACG GCT	B*4002,*4003
B40-E33	ATG ACC AGT CCG CCT ACG	B*4003
B40-E37	GGG CAT AAC CAG TAC GCC	B*4002,*4004,*4006
B40-E34	TCT CAC ATC ATC CAG AGG	B*4004
B40-E36	ACT TGG CAG ACG ATG TAT	B*4006
common	CGG AAC CTG CGC GGC TAC	B*4002,*4003,*4004,*4006

mM EDTA に溶かしたものと 50 μ l の固定用緩衝液 (1.5 M NaCl, 0.3 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.3 M MgCl₂) を十分に混和し, マイクロタイターウエル Immuno Module MaxiSorp Cl₂ (Nunc, Denmark) に分注した. 37°C で 1 晩放置し, 非特異的に吸着させた. 溶液をアスピレーターで除去後, 37°C で 30 分間風乾した. Stratalinker 2400 (Stratagene, La Jolla, CA) で紫外線を $5 \times 10^5 \mu$ jules 照射後, 200 μ l のプレート洗浄液 (1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 9.3), 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20) で 3 回洗浄し, 再び 37°C で 30 分間風乾した. プロブが固定されたウエルは, 密封した袋に入れて 4°C で保存した. この条件で最低 1 年は安定である.

ハイブリダイゼーションと発色

PCR 反応終了後, PCR 反応液を PCR 装置を用いて 96°C で 10 分間熱変性し, 水中にて急冷した. 5 μ l の PCR 反応液を 100 μ l のハイブリダイゼーション溶液 (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate) があらかじめ分注してあるウエルに添加した. シールした後, 59°C で 60 分間ハイブリダイゼーションを行った.

つぎに, プレートウォッシャー AMW-24 (BioTec, Japan) を用いてハイブリダイゼーション溶液を除去後, あらかじめ 69°C に加温しておいた 200 μ l の TMAC 溶液 (3 M tetramethylammonium chloride, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA) で 3 回洗浄した. その後, 300 μ l のウエルを酵素用希釈液 (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100) で 3 回洗浄した. 100 ml のアビジン標識パーオキシダーゼ (AV-HRP) (Vector Laboratory, Burlingame, CA) を含む酵素液を添加して, 15 分間室温で反応させた. 酵素液を吸引除去後, 300 μ l の酵素用希釈液で 3 回洗浄した. 100 μ l の発色液 {[1.5 mM 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)], 200 mM 酒石酸 (pH 4.4), 0.015% H₂O₂} を添加し, 室温で 15 分間発

色させた. 酵素反応は 100 μ l の停止液 (2% oxalic acid) で停止させた. 各ウエルの 415 nm の吸光度をプレートリーダー M-Vmax (Molecular Devices, CA) で測定し, 基質ブランクの吸光度を差し引いた値を発色値とした.

結果

PCR 反応

PCR 反応はプライマー以外の増幅試薬は A2, A26 および B61 グループすべてに共通な組成で, サイクル条件も同一とした. それぞれのグループに特異的なプライマーで増幅することにより, A2 は 854 bp, A26 は 770 bp, B61 は 775 bp の増幅物が得られた (図 1). ただし, A26 アリルでは reverse primer の A26-NM1 は日本人にまれな A*2604 (1% 以下) (1) を増幅しないため, A*2601, *2602, *2603, の 3 アリルについてタイピングを行った.

図 1 各遺伝子特異的プライマーによる PCR 結果



A2 遺伝子のアリルタイピング

実際のタイピングの結果を表 3 に示す. たとえばサンプル A であれば, プロブ #F9J, #107GN2J, #149ANJ, #156F-SNJ に発色しているので A*0201, *0204, *0209, *0211, *0216, *0217 のいずれかとタイプできた. サンプルが日本人のものであれば, これらの中で A*0201 以外のアリルはこれまで報告がないので, A*0201 の可能性が高いと予想できる.

他のサンプルも同様にタイピングすることができた. サンプル D では A*0206 か *0214 のどちらかであるが, 日本人由来のサンプルであれば, A*0206 であると考えられる. A*0205 と *0208 (サンプル F), A*0207 と *0215N (サンプル E) はどちらのアリルか区別することができな

かった。これらの結果はPCR-SSO法によるタイピング結果と基本的に一致した。

A26遺伝子のアリルタイピング

実際のタイピングの結果を表4に示す。たとえ

ばサンプルAでは#A26-E21, #A26-E32, #commonが発色しているので、A*2601とタイプできた。他のサンプルも同様にタイピングすることができた。これらの結果はPCR-SSO法によるタイピング結果と一致した。

表3 A2遺伝子のタイピング結果

Sample	Absorbance at 415 nm										Predicted type
	probe										
	F9J	Y9J	C99-NJ	107WJ	107GN2J	149ANJ	T149X3J	W156-SN2J	156F-SNJ	HE152-SXJ	
A	<u>1.70</u>	0.09	0.61	0.25	<u>1.38</u>	<u>1.97</u>	0.08	0.19	<u>3.11</u>	0.13	A*0201 or *0204 or *0209 or *0211 or *0216 or *0217
B	<u>2.07</u>	0.09	0.61	0.22	<u>1.29</u>	<u>1.74</u>	0.06	<u>1.81</u>	0.38	0.14	A*0202
C	<u>2.28</u>	0.08	0.94	0.27	<u>1.77</u>	0.13	<u>1.39</u>	<u>1.67</u>	0.25	<u>1.73</u>	A*0203
D	0.13	<u>2.65</u>	1.20	0.33	<u>2.04</u>	<u>2.64</u>	0.09	0.20	<u>3.47</u>	0.20	A*0206 or *0214
E	0.04	<u>2.27</u>	0.41	0.16	<u>0.72</u>	<u>1.40</u>	0.08	<u>1.28</u>	0.31	0.09	A*0207 or *0215N
F	0.09	<u>2.22</u>	0.78	<u>2.79</u>	0.19	<u>2.52</u>	0.10	0.25	<u>3.59</u>	0.16	A*0205 or *0208
G	<u>1.99</u>	0.07	<u>3.46</u>	0.32	<u>1.24</u>	<u>1.92</u>	0.07	0.09	<u>3.21</u>	0.15	A*0210

数値は、基質ブランクの値を差し引いた値を示している。
ポジティブ・シグナルは下線で示した。

表4 A26遺伝子のタイピング結果

Sample	Absorbance at 415 nm					predicted type
	Probe					
	A26-E21	A26-E22	A26-E31	A26-E32	common	
A	<u>>4.00</u>	0.11	1.65	<u>2.71</u>	<u>2.14</u>	A*2601
B	<u>2.88</u>	0.11	<u>2.94</u>	0.14	<u>0.58</u>	A*2602
C	0.11	<u>3.71</u>	1.24	<u>2.41</u>	<u>2.15</u>	A*2603

数値は、基質ブランクの値を差し引いた値を示している。
ポジティブ・シグナルは下線で示した。

表5 B61遺伝子のタイピング結果

Sample	Absorbance at 415 nm						Predicted type
	Probe						
	B40-E32	B40-E33	B40-E37	B40-E34	B40-E36	common	
A	<u>2.66</u>	0.05	<u>2.14</u>	0.03	0.05	<u>1.84</u>	B*4002
B	<u>2.29</u>	<u>3.33</u>	0.02	0.01	0.03	<u>2.93</u>	B*4003
C	0.05	0.12	<u>3.16</u>	<u>>4.00</u>	0.02	<u>2.74</u>	B*4004
D	0.40	0.02	<u>3.26</u>	0.01	<u>2.11</u>	<u>2.91</u>	B*4006
E	<u>2.24</u>	<u>3.05</u>	<u>3.76</u>	0.01	0.07	<u>3.25</u>	B*4002 / *4003

数値は、基質ブランクの値を差し引いた値を示している。
ポジティブ・シグナルは下線で示した。

B61遺伝子のアレルタイピング

実際のタイピングの結果を表5に示す。

たとえばサンプルAでは#B40-E32と#commonが発色しているのでB*4002とタイプできた。他のサンプルも同様にタイピングすることができた。これらの結果はPCR-SSP法によるタイピング結果と一致した。

考察

A2遺伝子のアレルタイピング

今回用いた#C99-NJは他のプローブに比べてクロスの発色がやや強いいため、現在改良中である。

また現在使用している10種類のプローブでは、A2のホモの場合、プローブ#F9J, #107GN2J, #149ANJ, #156F-SNJに発色するとA*0201のホモであるのか、A*0201と*0207のグループ内ヘテロであるのか判定することができない。そこで現在A*0201, *0203, *0206, *0209, *0211-*0213, *0216に反応するプローブを作製中である。さらに、A*0201, *0203, *0204, *0206, *0207, *0209-*0213, *0215N-*0217に反応するプローブも作製中である。この2種類のプローブを加えた合計12種類のプローブを用いることにより、日本人に報告されている(19)A2アレルをタイピングすることが可能である。

A26遺伝子のアレルタイピング

今回用いた#A26-E31は他のプローブと比べてクロスの発色がやや高いため、現在改良中である。

B61遺伝子のアレルタイピング

今回B61アレルのタイピングに用いたプローブ#B40-E34はB*1301に、#B40-E36はB*1302にも反応するため、B13グループ特異的プライマーで増幅することにより、B13アレルのタイピングにも応用している(未発表データ)。

参考文献

1. 笹月健彦：骨髄移植調査研究事業報告書「HLA型適合に関する研究」,平成7年度
2. Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.* : HLA-B40, B18, B27, and B37 allele discrimination using group-specific amplification and SSCP method. *Hum. Immunol.* **46** : 107-113, 1996.
3. Blasczyk R, Hahn U, Wehling J, *et al.* : Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis. *Tissue Antigens* **46** : 86-95, 1995.
4. 小川篤子, 林玲, 柏瀬貢一ら：HLA-B60, B61, B48グループを識別するPCR-SSP法. *MHC* **2** : 6-9, 1995.
5. Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MCNM, *et al.* : Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46** : 355-367, 1995.
6. Oh SH, Fleischhauer K, Yang SY, : Isoelectric focusing subtyping of HLA-A can be defined by oligonucleotide typing. *Tissue Antigens* **41** : 135-142, 1993.
7. Tiercy JM, Djavad N, Rufer N, *et al.* : Oligotyping of HLA-A2, -A3, and -B44 subtypes. *Hum. Immunol.* **41** : 207-215, 1994.
8. Bugaman TL, Apple R, Erlich HA : A method for typing polymorphism at the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* **44** : 137-147, 1994.
9. Date Y, Kimura A, Kato H, *et al.* : DNA typing of the HLA-A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens* **47** : 93-101, 1996.
10. Arguello R, Avakian H, Goldman JM, *et al.* : A novel method for simultaneous high resolution identification of HLA-A,

- HLA-B, and HLA-Cw alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 10961-10965, 1996.
11. Petersdorf EW, Hansen JA : A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing. *Tissue Antigens* **46** : 73-85, 1995.
 12. Kawai S, Yamane A, Tokunaga K, *et al.* : *HLA 1991 Vol. 2* (eds Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), DNA typing for HLA-DRB using microplate hybridization. Oxford University Press. Oxford, 1992 ; p. 350-352.
 13. Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, *et al.* : A simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plate. *Hum. Immunol.* **41** : 121-126, 1994.
 14. 川井信太郎, 前川尻真司, 山根明男ら : PCR-MPH 法による HLA-DRB 遺伝子のタイピング. *今日の移植* **7 suppl** : 50-55, 1994.
 15. Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, *et al.* : Routine low and high resolution typing of HLA-DRB gene using PCR-MPH (Microtiter Plate Hybridization) method. *Eur. J. Immunogenetics* **23** : 471-486, 1996.
 16. Coull, JM, Weith HL, Bischoff R : A novel method for the introduction of an aliphatic primary amino group at the 5' terminus of synthetic oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **27** : 3991-3994, 1986.
 17. Ishikawa Y, Tanaka H, Semana G, *et al.* : *12th International Histocompatibility Workshop and Conference Proceedings. Genetic Diversity of HLA. Function and Medical Implication.* (ed. by Charron D) Alleles and haplotypes society: No.2 (A2, 28, A9) . EDK, Paris, 1997 ; in press.
 18. Kawai S, Maekawajiri S, Yamane A : A simple method of detecting amplified DNA with immobilized probes on microtiter wells. *Anal. Biochemistry* **209** : 63-69, 1993.
 19. 石川善英, 徳永勝士, 小川篤子ら : 日本人の HLA-A, B, C, DR, DQ, DP ローカスのアレルタイピング. *MHC* **3** : 82, 1996.

DNA typing of HLA-A2, A26 and B61 alleles using the PCR-MPH method.

Hiromi Nakano¹⁾, Shintaro Kawai¹⁾, Kouichi Kashiwase²⁾, Atsuko Ogawa²⁾, Yoshihide Ishikawa²⁾, Katsushi Tokunaga^{2,3)}, Tatsuya Akaza²⁾, Takeo Juji²⁾, Akio Yamane¹⁾

- 1) Institute for Biotechnology Research, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroshima, Japan
- 2) The Japanese Red Cross Central Blood Center, Faculty of Research, Tokyo, Japan
- 3) Department of Human Genetics, Graduate School of International Health, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Summary

We have previously described HLA - DRB1 typing using polymerase chain reaction - based microtiter plate hybridization (PCR - MPH) method, which is suitable for routine "mass" DNA typing of HLA. In this study, we have extended this method to allele typing for HLA - class I. Three sets of primers were used for group specific amplification, and then PCR products were typed for five HLA - A2 (10 probes) , three HLA - A26 (5 probes) , and four HLA - B61 (6 probes) alleles, which are unable to be classified by serological techniques. The results in this study were well concordant with those obtained by previous typing using the PCR based SSO method.

In these allele typing procedures, group specific amplifications can be performed by the identical conditions and moreover, all conditions for MPH are exactly the same as those for DRB1 typing. These characteristics are great advantages for a routine typing.

Key words :

routine DNA typing, PCR-MPH, HLA-A2, HLA-A26, HLA-B61

[シリーズ：異種のMHC]

ウシMHC遺伝子

間 陽子, 長岡 淑子

理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター, 安全評価研究室

要旨

ウシMHC (Bovine Leukocyte Antigen: BoLA) 遺伝子は, 第23染色体に位置していて, ヒト・マウスに相同性の高いクラスI, クラスII, クラスIII遺伝子を含んでいる. クラスII領域にはDRA, DRB, DQA, DQB, ヒト遺伝子との対応が不明なDYA, DYB(DIB), DNA, DOB 遺伝子座の存在が推測されていたが, 機能発現可能な遺伝子として, DRA, DRB3, DQA1, DQB1, DQA2, DQB2が同定された. ウシにおいて発現可能な遺伝子DQA2とDQB2は, 興味深いことに, ヒトにおいてはmRNAや蛋白レベルでの発現が確認されていない. 一方, ヒトDR遺伝子座には機能蛋白をコードする複数の遺伝子が存在するが, ウシにおいてはDRB3遺伝子のみである. このように, クラスII遺伝子の構成とその産物には, ヒトとウシの間に大きな相違があることが明らかになった. またウシにおいて, 抗原提示に重要なIi鎖およびDM遺伝子の存在も立証されたことから, ウシもヒトと同様のMHCクラスII抗原を介する抗原提示経路を持つことが強く示唆された.

キーワード:

ウシMHC (Bovine Leukocyte Antigen: BoLA), クラスII, MLR, Ii鎖, DM遺伝子, 疾患感受性

はじめに

主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子は, 脊椎動物の“自己”と“非自己”の認識, および“非自己”の除去という, 生体にとっては重要な現象に関わっている. 従来MHC分子については, 主にヒトおよびマウスで詳細な解析がなされてきたが, 近年, その他の哺乳類, 鳥類, 爬虫類, 両生類および魚類においても存在が証明された. MHCはマウスではH-2, ヒトではHLAと呼ばれるのに対応して, ウシではBoLA (Bovine Leukocyte Antigen)と呼称される. BoLA分子はヒト・マウスのそれと極めて類似したドメイン構造をとり, 免疫学的機能の面でも同様に重要な役割を担っていることが明らかになっている. BoLA遺伝子領域は, 第23染色体短腕に位置し(1, 2), ヒト・マウスと相

同性の高いクラスI, クラスII, クラスIII遺伝子を含んでいる(3, 4).

BoLAクラスI領域は, 1978年にAmorenaとStone(5)ならびにSpoonerら(6)によって明らかにされ, その後の国際BoLAワークショップを通じて国際的な標準化が図られ, 現在までに60種以上のハプロタイプが血清学的に確認されている(7). しかし, それらのほとんどはBoLA-A座にコードされる抗原であり, HLAで見い出されているBおよびC座位に相当する遺伝子座の決定には至っていなかった. しかし最近, クラスI抗原のcDNAクローンが単離された結果, BoLA-A座の他にB座が同定されると同時に, これら以外のクラスI遺伝子の存在も示唆されている(8, 9).

BoLAクラスII領域(BoLA-D座)は, 1977年

に Usinger ら (10) によりリンパ球混合培養反応を指標にして同定され、さらに、ヒトクラス II 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析およびゲノムクローニングの結果から、1つの DRA 遺伝子、3つ DRB 遺伝子、各1つか2つの DQA および DQB 遺伝子、1つの DOB 遺伝子、1つの DNA 遺伝子、そしてヒト遺伝子との対応が不明であり反芻獣に特異的と考えられている DYA, DYB(DIB) の存在を示す証拠が得られてきた(11~18)。ただし、ヒトの DPA, DPB 遺伝子に相当すると考えられる遺伝子は見つかっていない。

一方、クラス III に関する研究はウシでは非常に少なく、補体成分 C4 および B 因子遺伝子が、ヒト・マウスの場合と同様にクラス I および II 遺伝子群の間に位置することが報告されているにすぎない(19, 20)。

このように、現時点では BoLA 研究は歴史が浅く、遺伝子構成、遺伝子産物の同定とその免疫機能の解析はヒト・マウスに比較して著しく立ち後れていると言わざるを得ない。また、BoLA と疾患感受性との相関についても、乳房炎、ウシ白血病等の極めて限られた疾患でいわれているに過ぎない。これらの点を理解するための第一段階として、我々は BoLA クラス II α 鎖および β 鎖、および Ii 鎖の cDNA を単離し、その分子構造、転写、発現および機能について解析してきた。本稿では著者らの知見を交えながら、BoLA の中でも特にクラス II 抗原について概説したい。

1. BoLA クラス II 抗原の分子構造と機能

HLA クラス II 分子は B 細胞、単球、活性化 T 細胞に発現する α 鎖・ β 鎖から成る著明な多型を示す膜蛋白であり、胸腺内での positive/negative selection による成熟 T 細胞のレパートリーの獲得、T 細胞への抗原提示など、生体の免疫応答系に重要な役割を担っている。一方、ウシにおいては、その蛋白化学的および免疫学的機能の解析はほとんどなされていない。即ち、著者らが BoLA 研究を開始した1992年には、BoLA クラス II 遺伝子の一部の塩基配列は決定されていたものの、その遺伝子構成、分子構造、転写、発現および機能についての情

報は皆無といっても過言ではなかった。そこで、ウシ MHC クラス II 抗原の免疫学的機能の解析を最終目標に我々は、ヒト MHC クラス II 遺伝子、HLA-DPA, HLA-DRB および HLA-DQB の cDNA クローンをプローブとするコロニーハイブリダイゼーションおよび PCR によって、ウシ B リンパ腫細胞株 BLSC-KU-1 cDNA ライブラリーから、表 1 に示すような13個の cDNA クローンの単離に成功した(21~25)。これらクローン的全塩基配列を決定した結果、BoLA クラス II 抗原は他動物種のものと同様に、シグナルペプチド、 $\alpha 1 \cdot \beta 1$, $\alpha 2 \cdot \beta 2$, 結合ペプチド、膜貫通領域および細胞内領域の各ドメインから構成されていること、特に細胞外部分である $\alpha 1 \cdot \beta 1$ ドメインにアミノ酸置換が集中していることが明らかとなった。また、これらのうち6個の cDNA クローン、MR1, NR1, MQ9, NQ1, NB17 および NB25 はコード領域全長をカバーするものであった。これまで、ヒトクラス II 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析およびゲノムクローニングから、BoLA クラス II 遺伝子には DRA, DRB, DQA, DQB, そしてヒトの遺伝子との対応が不明な DYA, DYB(DIB), DNA, DOB 遺伝子座の存在が、さらに、DR 遺伝子座には1個の α 鎖遺伝子 (DRA) と3個の β 鎖遺伝子 (DRB1~B3) が、また、DQ 遺伝子座には2個の α 鎖遺伝子 (DQA1~A2) および4個の β 鎖遺伝子 (DQB1~B4) の存在が推測されていた。そこで、得られた cDNA が対応するクラス II 遺伝子を明確にするため、cDNA の塩基配列をもとに算出した系統発生樹 (図 1) とアミノ配列の比較を行った。その結果、各クローンは BoLA-DRA, -DRB3, -DQA1, -DQA2, -DQB1, -DQB2 遺伝子に相当することが明らかになった。また、いずれのクローンもウシと同じ反芻獣であるヒツジ、次にヒトとの間で高い相同性を有していた。

得られた cDNA に対応するクラス II 遺伝子、BoLA-DRA, -DRB3, -DQA1, -DQA2, -DQB1, -DQB2 のウシ末梢血リンパ球における転写レベルでの発現を確認した(26)。各遺伝子の第 2 エクソンを特異的に増幅可能な PCR プライマーを設計し、5種の B リンパ球細胞株および対照の T リ

表1 得られた BoLA クラスII遺伝子の cDNA クローンの性状

抗原	対立遺伝子	クローン ^a	塩基対	参考文献
DR α	BoLA-DRA	KR1	1051	21
		MR1	1240	21
DR β	BoLA-DRB3	NR1465	683	22
		AR4	1038	22
		NR1	801	22
DQ α	BoLA-DQA2	MQ9	1192	24
		AQ16-1	925	24
		AQ16-2	1487	24
		KQ217	1500	24
DQ β	BoLA-DQA1	NQ1	768	25
	BoLA-DQB2	NB17	1094	23
		NB10	1067	23
	BoLA-DQB1	NB25	1365	23

^aクローン MR1, NR1, MQ9, NQ9 および NB25 は BoLA クラス II 遺伝子の全てのコード領域を含む cDNA である。

ンパ球細胞株から抽出した mRNA を用いて RT-PCR を行った (表 2)。DRA-, DRB3-, DQA1-, DQB1- および DQB2- 特異的なプライマーを用いた場合, 全ての B リンパ細胞株において特異的なバンドが検出された。また, DQA2- 特異的なプライマーを用いた場合には KU-17 細胞以外の 3 種の B 細胞株で PCR 産物が確認された。一方, 対照であるウシ T 細胞株では検出されなかった。これらの結果は, ウシにおいて DQA2 および DQB2 遺伝子は, DRA, DRB3, DQA1 および DQB1 遺伝子と同様に転写可能であることが明らかになった。

次に, これら転写レベルでの発現が認められたクラス II 遺伝子の機能的発現を分子レベルで明らかにするため, 単一の BoLA クラス II 分子のみを発現しているトランスフェクタントを用いて解析した (26)。即ち, コード領域全長をカバーする α 鎖および β 鎖の cDNA クローン (DRA/DRB3,

DQA1/DQB1, DQA1/DQB2, DQA2/DQB1, DQA2/DQB2) を COS-1 細胞に一過性に導入し 8 種類の単クローン性抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。DRA/DRB3 cDNA, DQA1/DQB2 cDNA および DQA2/DQB2 cDNA の発現が確認された (表 2)。次にフローサイトメトリーにより細胞表面の発現を調べたところ, DRA/DRB3 cDNA の組み合わせによる DR 分子の発現は, DQ 分子より著しく強かった。さらに, 各トランスフェクタントに対する免疫担当細胞の免疫応答を調べた。X 線照射処理することによって増殖を停止させたトランスフェクタントと 2 頭のウシ末梢血リンパ球を用いた混合リンパ球培養試験 (MLR) を行った。DRA/DRB3 cDNA を導入したトランスフェクタントを刺激細胞として用いた場合, 対照の遺伝子導入されていない細胞と比較して明らかに ³H-チミジンの高い取り込みが観察され, T 細胞増殖を強く

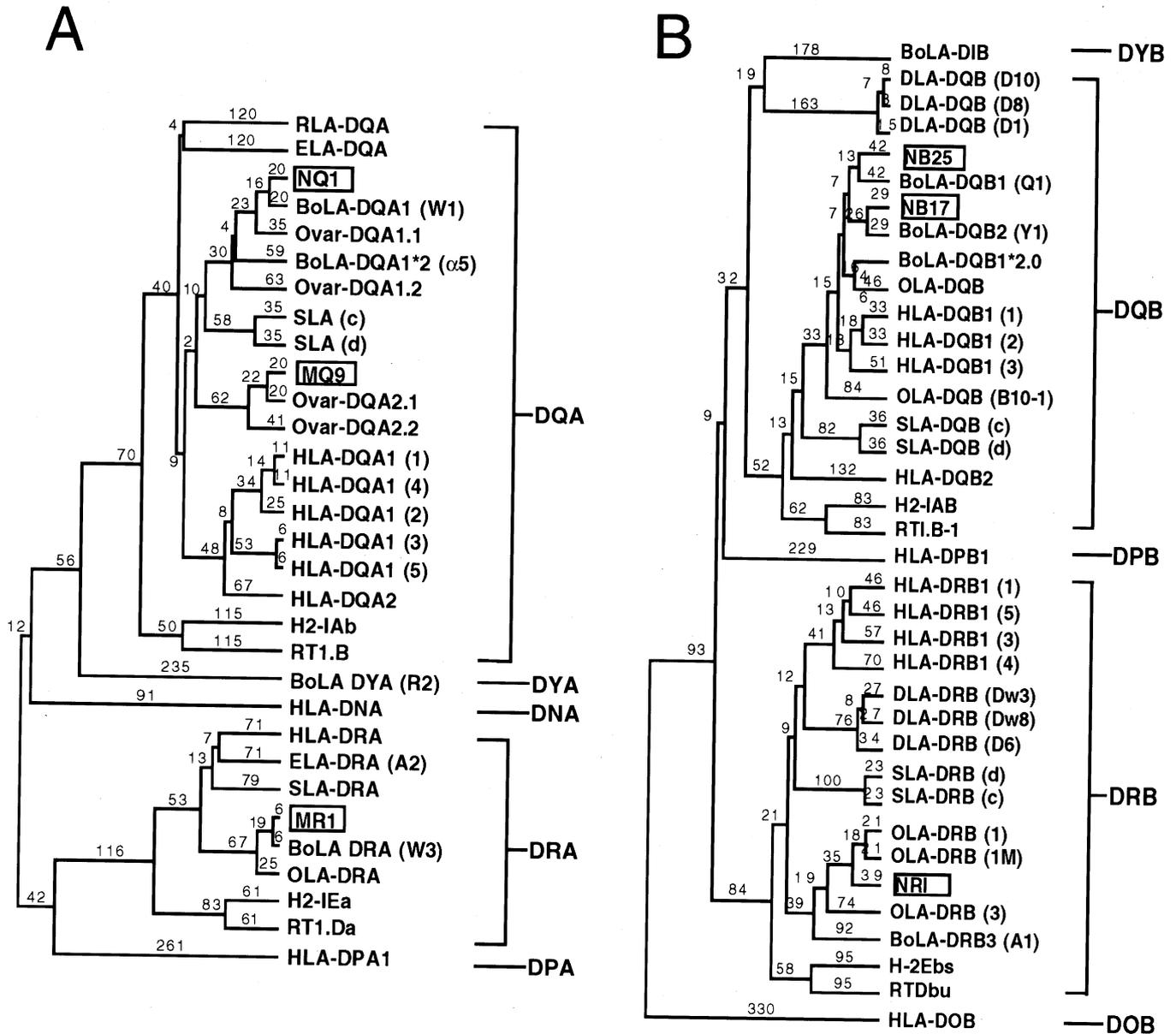


図1 哺乳動物種のMHCクラスII A遺伝子(A)およびB遺伝子(B)の系統樹

ウシ(BoLA), ヒツジ(OLA), ヒト(HLA), プタ(SLA), イヌ(DLA), ウマ(ELA), ウサギ(RLA), ラット(RT), およびマウス(H2)が含まれる。系統樹は α 1または β 1, α 2または β 2, CP, TMおよびCYドメインの予測アミノ酸配列をともに構築された。横線上の数字はあるタンパクと他のものとの遺伝的距離を示している。

誘導したことが示された。同様に, DQA1/DQB2 cDNAを導入したトランスフェクタントを刺激細胞として用いた場合, 弱くT細胞増殖を誘導した。両反応は抗-クラスII抗体の添加によって抑制された。

以上の結果を, 図2にまとめてみた。BoLA-DQ遺伝子座において, 転写および蛋白レベルでの発現が可能な機能遺伝子, DQA1, DQA2, DQB1,

DQB2の存在が明らかになった。また, これらの遺伝子産物は弱いMLR誘導能を持っていた。これに対してヒトにおいてDQA2とDQB2遺伝子はmRNAや蛋白レベルでの発現が確認されていない偽遺伝子である。また, BoLA-DR遺伝子座には, 偽遺伝子であるDRB1およびDRB2遺伝子の他に, DRA遺伝子との組み合わせによって細胞表面への発現とMLRを誘導できるDRB3遺伝子の存在が明らかに

表2 ウシリンパ細胞株における BoLA-DQA1, -DQA2, -DQB1, および-DQB2 遺伝子の RT-PCR 産物の検出

BoLA クラス II gene	B lymphoid cell lines				T lymphoid cell line
	BLSC-KU1	BLSC-KU17	BL2M3	BL312	pr2181
DQA1	+a	+	+	+	-
DQA2	+	-	+	-	-
DQB1	+	+	+	+	-
DQB2	+	+	+	+	-

^a +, RT-PCR 産物の結果が陽性；-, 陰性結果

表3 BoLA クラス II 抗原を発現しているトランスフェクタントの特性

検査方法	トランスフェクタント				
	DRA : DRB3	DQA1 : DQB1	DQA1 : DQB2	DQA2 : DQB1	DQA2 : DQB2
抗-BoLA クラス II 抗体を用いた 間接免疫蛍光染色 ^a	+d	-	+	+	+
抗-BoLA クラス II 抗体を用いた フローサイトメトリー解析 ^b	+	ND	+	ND	ND
リンパ球混合試験 (MLR) ^c	++	ND ^e	+	ND	ND

^a α 鎖および β 鎖の cDNA クローン (DRA/DRB3, DQA1/DQB1, DQA1/DQB2, DQA2/DQB1, DQA2/DQB2) を, COS-1細胞に一過性に導入し48時間後に間接免疫抗体法のために, トランスフェクタントをカバーガラス上に調整し冷アセトンで10分間固定した。さらに8種類の抗-BoLA クラス II 抗体の1つで30分間処理後, FITC-標識抗マウス IgG(ab')₂で30分間インキュベートした。

^b フローサイトメトリーのために, 10⁶個のトランスフェクタントを抗-BoLA クラス II 抗体の1つで15分間処理後, FITC-標識抗マウス IgG(ab')₂と4°Cで15分間染色した。細胞をFACScanで解析した。

^c 2.5×10⁴個のX線照射したトランスフェクタントと4×10⁵個のウシ末梢血リンパ球を3日間混合培養後, 0.5 μ Ciの³H-チミジンを添加し取り込みを調べた。

^d +, 陽性；-, 陰性。

^e ND, 未試験

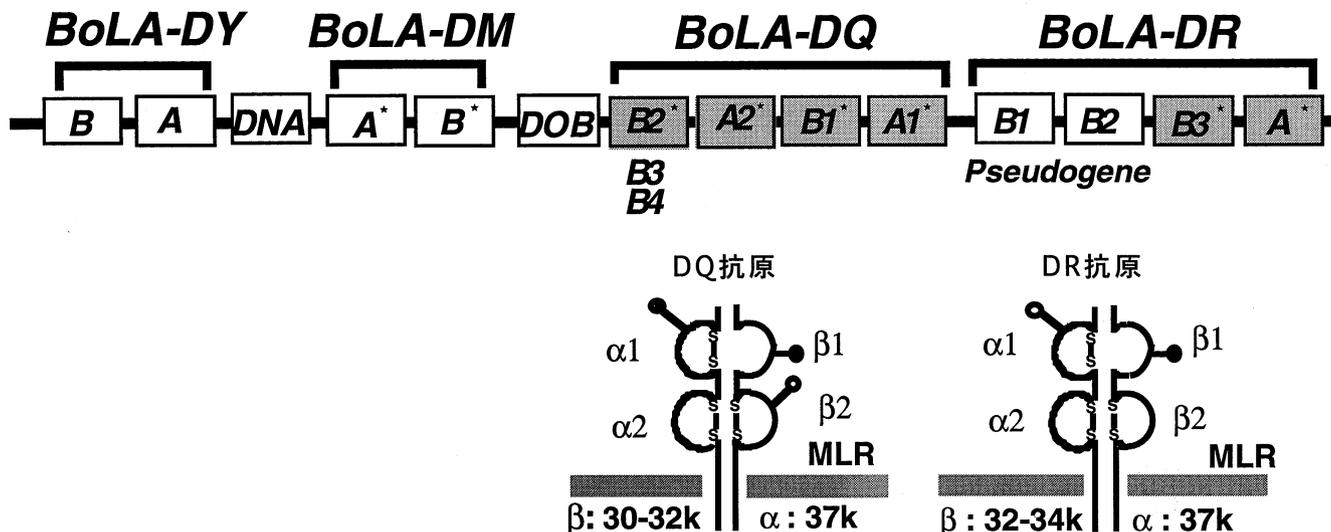


図2 BoLA クラスII 遺伝子領域および構造

これまでの報告および我々のクローニングの結果から、推定される BoLA クラスII 遺伝子の構成と抗原の分子構造を模式図として示した。上流から反芻獣に特異的な DYB および DYA, DNA, 抗原提示課程に關与する DMA および DMA, DOB, その下流に DQ 遺伝子群, DR 遺伝子群が続くと推定される。★印がついている遺伝子は、筆者らが cDNA クローニングに成功したもの。また, mRNA の発現を確認した遺伝子を影付けしてある。DR 遺伝子座において, DRB1, DRB2 遺伝子は偽遺伝子であるが, DRB3 遺伝子と DRA 遺伝子の組み合わせは発現可能であり, また MLR を誘導できる。DQ 遺伝子座において DQA1, DQA2, DQB1 として DQB2 遺伝子は mRNA の発現が確認されていて, 隣り合う遺伝子同士の組み合わせで発現可能であり, 弱い MLR 誘導能を持つ。S-S はジスルフィド結合。黒丸は糖鎖の給合している位置をしめす。ウシを含めた反芻獣では, 他の動物種間で保存されている DR 分子の $\alpha 2$ ドメインの N 型糖鎖給合部位が保存されていない。最下部にウシ末梢血リンパ球において確認された DQ および DR 分子の分子量を記している。

なった。対照的に、ヒト HLA-DRB 遺伝子座には複数の機能遺伝子が存在する。以上の結果は、クラスII 遺伝子の構造、発現および機能に、ヒトとウシの間で明らかな相違が存在することを示している。

以前に、著者らは単クローン性抗体を用いた解析から、BoLA クラスII 抗原は B 細胞、単球、活性化 T および $\gamma\delta$ T 細胞の膜表面に発現している分子量 36,000-37,000 の α 鎖および 30,000-34,000 の β 鎖が非共有結合したヘテロ 2 量体よりなる糖蛋白質であることを同定した(27~29)。しかしながら、単一の BoLA クラスII 分子のみを発現しているトランスフェクタントを用いることによって特異性が同定された単クローン性抗体を用いた免疫沈降反応から、ウシ末梢血リンパ球における BoLA-DR 抗原の分子量は α 鎖が 36,000-37,000 および β 鎖が 32,000-34,000 であること、また、BoLA-DQ 抗原の分子量は α 鎖が 36,000-37,000 および β 鎖が 30,000-32,000 であることを新たに同定できた (図2)。今

後、我々がクローニングした cDNA を用いて、未知である BoLA クラスII 抗原の機能を明らかにしてゆきたい。

2. ウシインバリアント鎖の cDNA クローニングと分子構造

抗原提示細胞上のクラスII 分子が自己抗原を提示しない理由は、クラスII 分子が小胞体で合成されゴルジ体を通ずるまでの間、インバリアント鎖 (invariant chain; Ii) がクラスII $\alpha\beta$ 鎖と結合しクラスII 分子のペプチド結合ポケットをふさぐことによって、小胞体に存在するクラスI 分子に結合すべきペプチドが、クラスII 分子に結合するのを阻止しているからである。さらに Ii 鎖はクラスII 分子をエンドソームに導く役割も果たしている。このようにクラスII 分子を介した抗原提示における Ii 鎖の意義は大きい。そこで著者らは、ウシの抗原提示機序を明らかにする一端として、ヒト Ii 鎖遺伝子

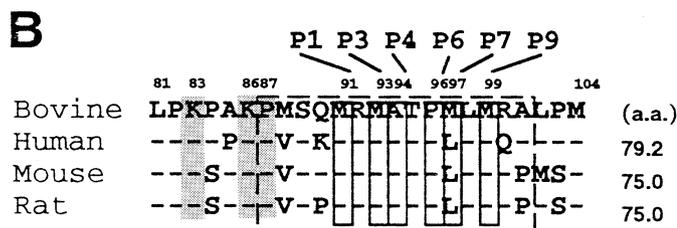
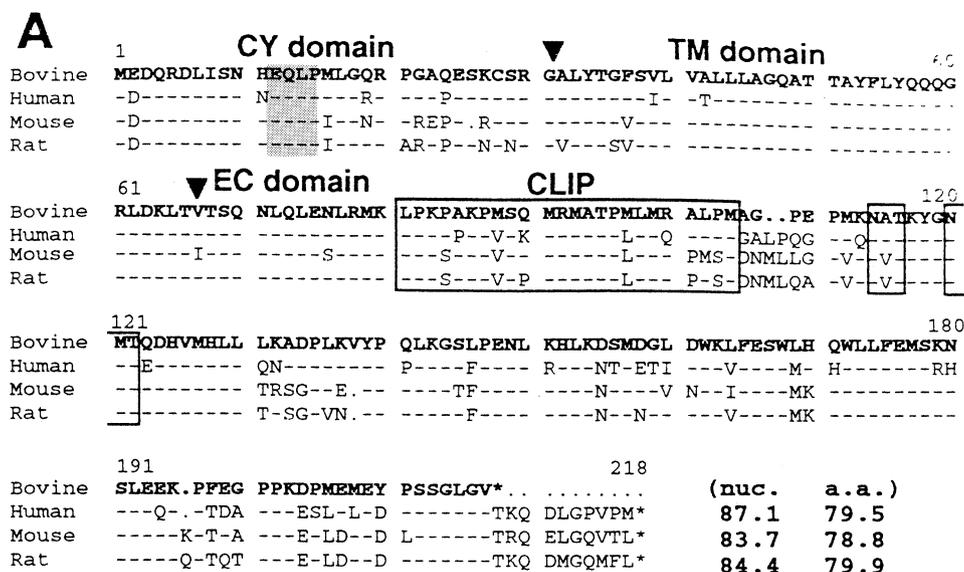


図3 各種動物間のIi鎖のアミノ酸配列の比較

(A) ウシ Ii cDNA クローン, N13 とヒト, マウスおよびラット Ii 遺伝子の予測アミノ酸配列の比較。(A) 数字はアミノ酸の位置を示す。推測される2つのN型糖鎖結合部位およびclass II-associated invariant chain peptides (CLIP) ドメインが四角で囲まれている。エンドソーム移行シグナルは影付けされている。N13と異種のIi鎖遺伝子との相同性を、アミノ酸(右)およびヌクレオチド(左)の総パーセンテージで示す。(B) ウシ Ii 遺伝子とヒト, マウス, およびラット Ii 遺伝子から予測されるアミノ酸配列のCLIP部分の比較。推測されるCLIPの解離部位は影付けによって示される。CLIPとDRの間の水素結合を形成するアミノ酸残基は点線で囲まれている。ペプチド結合ポケットに深く入り込 CLIP 側鎖に相当するアミノ酸残基は四角で囲まれている。P1, 3, 4, 6, 7および9はCLIPと結合するDRのペプチド結合ポケットを表す。アミノ酸の総パーセンテージはウシおよび異種のIi遺伝子によってコードされるCLIP部分の相同性である。

の塩基配列を基にPCR法によって、ウシIi鎖のコード領域全長をカバーするcDNAクローンNI3を単離し全塩基配列を決定した(30)。ウシIi鎖は他の動物種と同様、細胞内領域(CY)、膜貫通領域(TM)、細胞外領域(EC)を含む204アミノ酸からなる膜貫通蛋白質の構造を示し、ヒト、マウスおよびラットのIi鎖とアミノ酸配列で79.5、78.8、79.9%、塩基配列で87.1、83.7、84.4%の高い相同性を有していた(図3A)。また、ウシIi鎖はヒト等と同様の機能を演じる可能性が示唆された、即ち、CYドメインにはMHCクラスII分子の移動に関与するエンドソーム移行シグナル、EQLPという

アミノ酸配列モチーフが、また、ECドメインにはクラスII分子の抗原結合部位を塞ぐ役割を演ずる24アミノ酸からなるCLIP(class II associated invariant chain peptide)領域が保存されていた。一方、ウシIi鎖に特徴的なのはECドメインの末端の10アミノ酸が他の動物種に比較して短いことである。

最近、Gohshら(31)はHLA-DR3-CLIPの結晶X線構造解析によって、CLIPとクラスII分子の結合様式を明らかにした。CLIPはポリプロンII型のコンフォメーションをとり、クラスII分子の抗原を結合する溝、即ち、抗原性ペプチドと同じ位置に挟

まった状態で存在していた。結合部位はCLIP24アミノ酸のうち、MRMATPLLMの9アミノ酸であった。即ち、CLIPの87から101番目のアミノ酸残基は、17ヶ所の水素結合によってクラスII分子と相互作用し、さらに91番目から99番目の9アミノ酸残基の側鎖が、DR分子のペプチド結合ポケットP1, 3, 4, 6, 7, 9に深く入り込んでいることになる。興味深いことに、これらのアミノ酸残基は、ウシにおいてもよく保存されていた(図2B)。ここで、CLIPと相互作用するDR分子上のアミノ酸残基を比較してみた。その結果、CLIPと水素結合によって相互作用するDR α 鎖のアミノ酸残基、 α 9, α 53, α 62, α 69, α 76およびCLIPと結合するDR α 鎖のペプチド結合ポケットを構成するアミノ酸残基の全てが、ウシとヒトの間で完全に一致していることが明らかとなった(30)。次に、このCLIPはDM遺伝子にコードされるexchanger proteinによってクラスII分子からはずされ、本来の外来抗原ペプチドがクラスII分子に結合することになる。この解離に関与するCLIP81から89番目のアミノ酸残基のうち、特に必須といわれている83, 86, 87番目のアミノ酸残基は、ウシ、ヒト、マウスおよびラットにおいて完全に保存されていた(図3B)。

以上の結果から、おそらくウシのIi鎖もヒトのそれと類似の様式でクラスII分子と結合・解離し、同様の機能を発揮している可能性が想像される。

3. BoLA-DM α 鎖および β 鎖のcDNAクローニングと分子構造

上述したように、MHCクラスII抗原を介する抗原提示機序を理解する上で、Ii鎖と同様に重要な分子の一つとしてDM遺伝子にコードされるexchanger protein, DM抗原があげられる。ヒトのHLA-DMおよびマウスのH-2Mは、エンドソームにおいてMHCクラスII分子に結合しているIi鎖由来のペプチドを解離させ、より親和性の高いペプチドのMHCクラスII分子への結合を促進させることが明らかになっているが(32)、一方ウシDM抗原は存在すら不明である。そこで我々は、Ii鎖に続いてDM分子のcDNAクローニングを試みた。HLA-DMの塩基配列を基にPCR法でBLSC-KU

-1 cDNAライブラリーから、全てのコード領域を含むBoLA-DM α 鎖および β 鎖のcDNAクローンの単離に成功した(33)。図4Aと4Bに示すようにこれらのアミノ酸配列をヒトおよびマウスのものを比較検討したところ、BoLA-DM $\alpha\beta$ 鎖はヒト・マウスと同様に、シグナルペプチド、 α 1 \cdot β 1, α 2 \cdot β 2, 結合ペプチド、膜結合領域および細胞内領域の各ドメインから構成されていた。また、ヒトおよびマウスのDM分子と約66-77%のアミノ酸相同性を示したが、一方、既知のBoLAクラスII抗原、BoLA-DR, -DQとは、同様のドメイン構造を持つにも関わらず、アミノ酸レベルでの相同性は低く約30%以下であった。実際、系統発生樹において、BoLA-DMAおよびDMB遺伝子はDR, DQといった既知のBoLAクラスII遺伝子が分化する以前に分かれている(図4C)。

ウシにおいてIi鎖にひき続きDM遺伝子の存在も立証された。これらの結果は、ウシもヒトおよびマウス同様のMHCクラスII抗原を介する抗原提示経路を持つことを強く示唆している。

4. BoLAと疾患感受性

BoLAと種々の疾患感受性との相関性についての研究は、ウシにおける免疫応答遺伝子の存在を証明することに端を発する。まず、ヒト血清アルブミン(HSA)に対する抗体産生能には遺伝的差異があることが発見された(34)。BoLA-W16を持つものはそれが高く乳房炎に易罹患性であること、一方、BoLA-W2を持つものは抗体産生が低く乳房炎に相対的に抵抗性であることが示された。このように乳房炎を初めとして、ウシの疾患は経済形質に直接関わるものであることから、徐々にではあるがBoLA-クラスIおよびクラスIIと関連のある疾患が報告されはじめている。

特にクラスIIとの関連性の解析が進展しているものの一つにウシ白血病ウイルス(BLV)がある。BLVはヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)と最も近縁のレトロウイルスで、Bリンパ腫である地方病性牛白血病(EBL)を誘発する。BLV感染牛は、未発症健康、持続性リンパ球増多症(PL)、さらに長い潜伏期の後白血病を発症するという、3

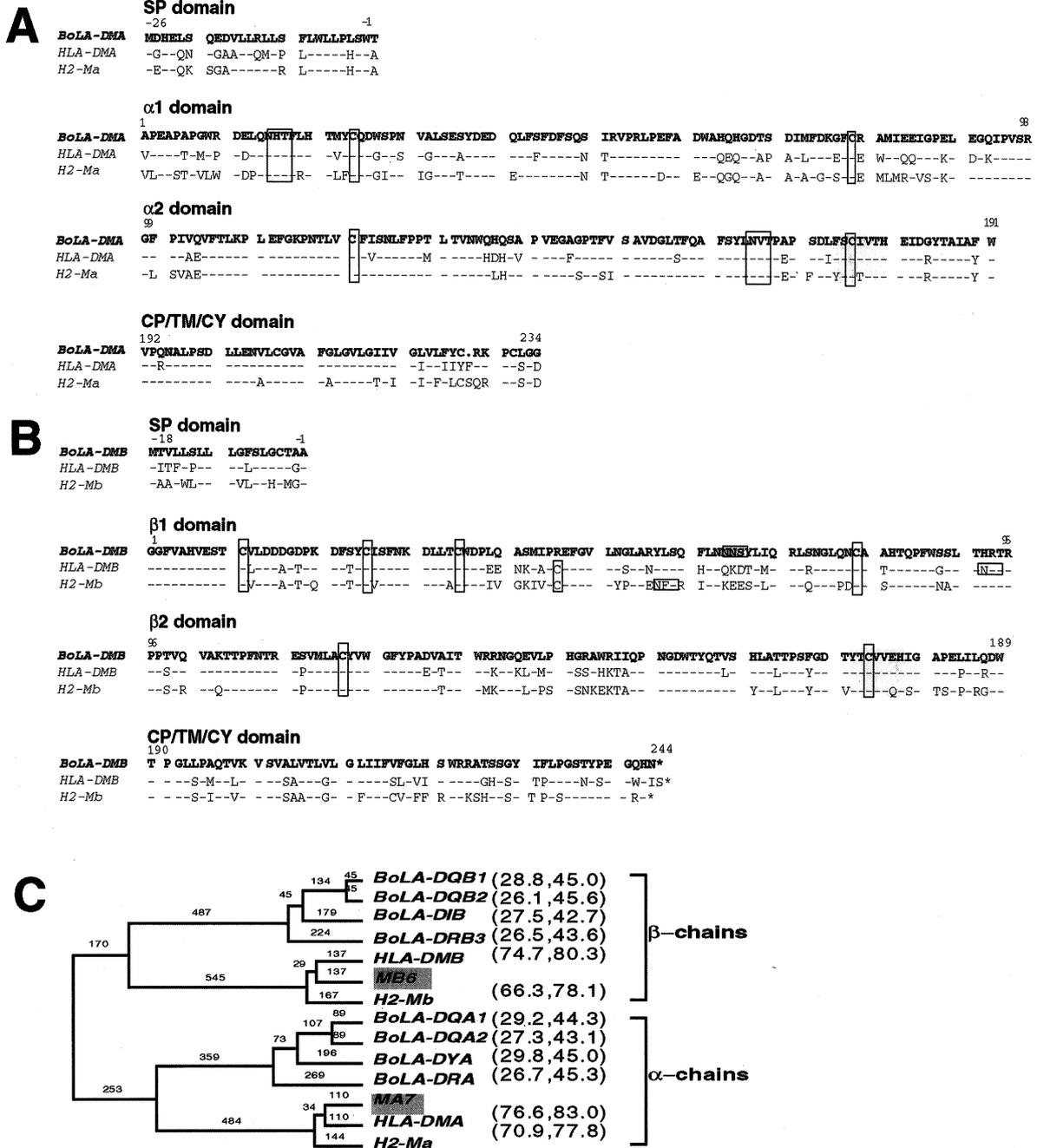


図4 各種動物間のDM α 鎖およびDM β 鎖のアミノ酸配列の比較と BoLA-DM 遺伝子の分子進化の解析

(A) BoLA-DMA cDNA クローン MA7と HLA-DMA および H2-Ma 遺伝子からの予測アミノ酸配列の比較。(B) BoLA-DMB クローン MB6と HLA-DMB および H2-Mb 遺伝子からの予測アミノ酸配列の比較。BoLA-ウシ, HLA-ヒト, H2-マウスを示す。数字は成熟タンパク中のアミノ酸の位置を記す。SP, シグナルペプチド; $\alpha 1 \cdot \beta 1$, 第一ドメイン; $\alpha 2 \cdot \beta 2$, 第2ドメイン; CP, 連結ペプチド; TM, 膜貫通領域; および CY, 細胞質領域を表す。ジスルフィド架橋内に含まれる保存されたシステイン残基および推定される N 型糖鎖結合部位は四角で囲まれている。免疫グロブリン超遺伝子族の共通モチーフの位置, およびインタナリゼーションを誘導するシグナルに関与するモチーフの位置を斜線で示した。(C) BoLA-DM 遺伝子の分子進化。BoLA-DMA (MA7), BoLA-DMB (MB6), BoLA-DRA (MR1), BoLA-DQA1 (NQ1), BoLADQA2 (MQ9), BoLA-DYA (R2), BoLA-DRB3 (NR1), BoLA-DQB1 (NB25), BoLA-DIB, HLA-DMA, HLA-DMB, H2-Ma および H2-Mb 遺伝子がコードする $\alpha 1$ または $\beta 1$, $\alpha 2$ または $\beta 2$, 膜貫通領域および細胞質領域のアミノ酸配列に基づいて構築した系統発生樹。MA7とクラス II A 遺伝子および MB6とクラス II B 遺伝子の相対性を示すアミノ酸 (左) とヌクレオチド (右) の総パーセンテージが括弧内に記されている。

つの病態を示す。しかしながら、その発生機序は未だ不明である。BLV と BoLA との相関性は当初、血清学的に決定される BoLA-A 座位のクラス I 抗原とリンパ球増多症に対する抵抗性・感受性との間で論じられていたが、その後、BoLA-A 遺伝子座よりむしろクラス II 遺伝子、BoLA-DQB, -DRB2 との間により強い相関性が見いだされ(35)、さらに検索した結果、DRB3 との著しい連鎖が明らかになった(36)。即ち、ホルスタイン種において PL 抵抗性と感受性の DRB3 第 2 エキソン (DRB3.2) のハプロタイプを同定した結果、興味深いことに、抵抗性のハプロタイプは全て DRB3 遺伝子 70-71 番目のアミノ酸がグルタミン酸-アルギニンであった。続いて PCR-RFLP 法を用いた解析により、上述のハプロタイプはホルスタイン種以外の他の品種においても同様に PL に対して抵抗性あるいは感受性を示すことが Sulimova ら(37)によって報告された。以上の結果は、DRB3.2 の多型性と疾患感受性の相関性の強さを示唆している。

そこで、著者らは、未だ明らかになっていない BLV による白血病発症と DRB3.2 との相関性について検索を試みた。日本の代表的な高級肉用牛である黒毛和種および日本短角種、ホルスタイン種およびジャージ種の BLV 感染牛の BoLA-DRB3 のゲノム DNA の塩基配列を決定し、予測されるアミノ酸配列を BLV 感染未発症健康群、PL 群、白血病発症群の 3 群に分けて解析した。興味深いことに、白血病発症群では、両対立遺伝子の DRB3 遺伝子 75 から 78 番目のアミノ酸が Val-Asp-Thr-Tyr (VDTY) を有する個体が優位であることが明らかとなった。この部位は HLA-DR1 分子の結晶 X 線解析の結果から(38)、 β 1 ドメインの α ヘリックス上に相当し、抗原ペプチド結合ポケット 4 を形成する部位であることが明らかになっており、T 細胞認識部位として機能すると推測される。従って、DRB3 遺伝子 75 から 78 番目のアミノ酸が VDTY モチーフをホモに有する個体が易病性の可能性が示唆された。この仮説がより多くの個体さらには他の品種にも当てはまるか否かを明らかにするため、今後さらなる解析が必要と思われる。また、この結果は、“MHC の多型と疾患発症との相関”の根本にアプ

ローチするための貴重な知見を提供できるものと期待している。

おわりに

MHC クラス II の遺伝子構造とその産物には、ヒトとウシ等の反芻獣の間で明らかな相違が存在する。おそらく種特異的病原体の歴史が MHC 遺伝子の数と発現に影響を与えたか、あるいは、2 つの種で異なる進化的な経路をたどって、同じ機能的な終着点に到達したのではないだろうか。以上の成果が、ウシの免疫反応と抗原認識機構を解明する突破口になることを期待したい。

また、我々は BoLA クラス II 抗原の中でも最も発現が強く機能的にも重要な DR 抗原が、BLV により誘発される白血病発症のステージに特異的にリン酸化 (セリン残基) を受けることを見いだした(28)。さらに、ペプチドマッピングおよび糖鎖切断酵素処理の結果から、DR 抗原は病気の進行に伴って、アスパラギン結合型糖鎖の付加が増加すること、BLV 感染羊においては B 細胞の癌化に関連して発現が増加することも明らかになっている(28, 29)。このように、BoLA-DR 抗原は正常細胞にも発現するが細胞の癌化に伴って蛋白に修飾が加わることから、腫瘍マーカーの一つであると定義できる。ウシで見いだされたこのクラス II 抗原の特性が、ヒトを始めとする他の動物種の免疫学の進展に役立つことを期待している。

参考文献

1. Fries R, Hediger R, Stranzinger G: Tentative chromosomal localization of the bovine major histocompatibility complex by in situ hybridization. *Animal Genet.* 17: 287-295, 1986.
2. Fries R, Eggen A, Womack JE: The bovine genome map. *Mamm. Genome* 4: 405-428, 1993.
3. Andersson L, Lunden A, Sigurdardottir S, et al.: Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Im-*

- immunogenetics* **27**: 273-280, 1988.
4. Spooner RL, Teale AJ, Cullen P: The MHC of cattle and sheep. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* **4**: 88-107, 1988.
 5. Amorena B, Stone WH: Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science* **201**: 159-160, 1978.
 6. Spooner RL, Leveziel H, Grosclaude F, *et al.*: Evidence for a possible major histocompatibility complex (BLA) in cattle. *J. Immunogenetics* **5**: 335-346, 1978.
 7. Davies CJ, Joosten L, Bernoco D, *et al.*: Polymorphism of bovine MHC class I genes. Joint report of the fifth international bovine lymphocyte antigen (BoLA) workshop, Interlaken, Switzerland, 1 August 1992. *Eur. J. Immunogenetics* **21**: 239-258, 1994.
 8. Bensaïd A, Kaushal A, Baldwin CL, *et al.*: Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. *Immunogenetics* **33**: 247-254, 1991.
 9. Ennis PD, Jackson AP and Parham P: Molecular cloning of bovine class I MHC cDNA. *J. Immunol.* **141**: 642-651, 1988.
 10. Usinger WR, Curie-Cohen M, Stone WH: Lymphocyte-defined loci in cattle. *Science* **196**: 1017-1018, 1977.
 11. Andersson L, Rask L: Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes. *Immunogenetics* **27**: 110-120, 1988.
 12. Muggli-Cockett NE, Stone RT: Identification of genetic variation in the bovine major histocompatibility complex DR beta-like genes using sequenced bovine genomic probes. *Anim. Genet.* **19**: 213-225, 1988.
 13. Muggli-Cockett NE, Stone RT: Partial nucleotide sequence of a bovine major histocompatibility class II DR beta-like gene. *Anim. Genet.* **20**: 361-369, 1989.
 14. Groenen MAM, van der Poel JJ, Dijkhof RJM, *et al.*: The nucleotide sequence of bovine MHC class II DQB and DRB genes [published errata appear in *Immunogenetics* **35**: 290, 1993; **37**: 315, 1992] *Immunogenetics* **31**: 37-44, 1990.
 15. Van der Poel JJ, Groenen MAM, Dijkhof RJM, *et al.*: The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha genes: DRA, DOA, and DYA. *Immunogenetics* **31**: 29-36, 1990.
 16. Stone RT, Muggli-Cockett NE: Partial nucleotide sequence of a novel bovine major histocompatibility complex class II beta-chain gene, BoLA-DIB. *Anim. Genet.* **21**: 353-360, 1990.
 17. Sigurdardottir S, Borsch C, Gustafsson K, *et al.*: Cloning and sequence analysis of 14 DRB alleles of the bovine major histocompatibility complex by using the polymerase chain reaction. *Anim. Genet.* **22**: 199-209, 1991.
 18. Sigurdardottir S, Lunden A, Andersson L: Restriction fragment length polymorphism of DQ and DR class II genes of the bovine major histocompatibility complex. *Anim. Genet.* **19**: 133-150, 1988.
 19. Andersson L, Lunden A, Sigurdardottir S, *et al.*: Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. *Immunogenetics* **27**: 273-280, 1988.
 20. Teutsch MR, Beever JE, Stewart JA, *et al.*: Linkage of complement factor B gene to the bovine major histocompatibility complex. *Anim. Genet.* **20**: 427, 1989.
 21. Aida Y, Kohda C, Morooka A, *et al.*: Cloning of cDNAs and the molecular evo-

- lution of a bovine MHC class II DRA gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**: 195-202, 1994.
22. Aida Y, Niimi M, Asahina M, *et al.*: Identification of a new bovine MHC class II DRB allele by nucleotide sequencing and an analysis of phylogenetic relationship. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**: 981-988, 1995.
 23. Dikiniene N, Aida Y: Cattle cDNA clones encoding MHC class II DQB1 and DQB2 genes. *Immunogenetics* **42**: 75, 1995.
 24. Morooka A, Asahina M, Kohda C, *et al.*: Nucleotide sequence and the molecular evolution of a new A2 gene in the DQ subregion of the bovine major histocompatibility complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**: 110-117, 1995.
 25. Nishino Y, Tajima S, Aida Y: Cattle cDNA clones encoding a new allele of MHC class II DQA1 gene. *Immunogenetics* **42**: 306-307, 1995.
 26. Aida Y: Characterization and expression of bovine MHC class II genes. *Bull. Soc. Fr.-Jpn. Vet.* **6**: 17-24, 1995.
 27. Aida Y, Okada K, Kageyama R, *et al.*: Cross-reactivity between a monoclonal antibody that recognizes a tumor-associated antigen on bovine lymphosarcoma cells with peripheral blood lymphocytes from various mammalian species. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 1988-1991, 1992.
 28. Aida Y, Okada K, Ohtsuka M, *et al.*: Tumor-associated Mr 34,000 and Mr 32,000 membrane glycoproteins that are serine-phosphorylated specifically in bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma cells. *Cancer Res.* **52**: 6463-6470, 1992.
 29. Aida Y, Okada K, Amanuma H: Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. *Cancer Res.* **53**: 429-437, 1993.
 30. Niimi M, Nakai Y, Aida Y: Identification of bovine invariant chain(Ii) gene by nucleotide sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**: 7-12, 1996.
 31. Ghosh P, Amaya M, Mellins E, *et al.*: The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* **378**: 457-462, 1995.
 32. Sloan VS, Cameron P, Porter G, *et al.*: Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* **375**: 802-806, 1995.
 33. Niimi M, Nakai Y, Aida Y: Nucleotide sequences and the molecular evolution of the DMA and DMB genes of the bovine major histocompatibility complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**: 522-528, 1995.
 34. Lie O, Vartdal F, Fundrud S, *et al.*: Immunomagnetic isolation of cells for serological BoLA typing. *Anim. Genet.* **19**: 75-86, 1988.
 35. Van Eijik MJT, Stewart-Haynes JA, Beever JE, *et al.*: Development of persistent lymphocytosis in cattle is closely associated with DRB2. *Immunogenetics* **37**: 64, 1992.
 36. Xu A, Van Eijik MJT, Park C, *et al.*: Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* **151**: 5977-6985, 1993.
 37. Sulimova GE, Undina IG, Orlova AR: BoLA-DRB3 genotyping of Black Pied cattle, aspects of resistance and susceptibility to leukemia. *International Society for Animal Genetics (ISAG), XXVth International Conference on Animal*

Genetics: B018, July 1996.

38. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, *et al.*: Three - dimensional structure of the

human class II histocompatibility antigen HLA - DR1[see comment]. *Nature* **364**: 33-39, 1993.

〔最新情報：“玉手箱”〕

PCR-SSOP 法による HLA-DNA タイピング

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所, 成人疾患研究部門異常代謝分野

はじめに

HLA のタイピング法として, PCR を用いた DNA タイピング法が開発され, クラス II 遺伝子群 (特に DRB1 遺伝子) については既に実用化の段階に入っている. PCR-DNA タイピング法には, 昨年の本学会でもとり上げられたように, 多くの原理的に異なる方法があるが, それぞれに長所・短所があり, 目的に応じて選択すべきである. 本シリーズでは, 塩基配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ (sequence-specific oligonucleotide probe, SSOP) を用いる PCR-SSOP 法を紹介するが, 今回は PCR-SSOP 法の基本原理について述べる.

1. PCR-SSOP 法の原理

PCR 法による遺伝子多型の検出に最も早期から用いられている方法(1)である. その原理は, 図 1 に示すように, SSOP とターゲット遺伝子の PCR 産物との間の水素結合によるハイブリッド形成の安定性の差を検出することにある. すなわち, SSOP を標識して用いることで, 配列が完全に一致した

PCR 産物のみを検出する. 従って, 塩基配列が完全に一致していない場合のハイブリッドの安定性が, 配列の違いの数, 場所, 性質に依存して異なることに注意を要する. このことは, SSOP をデザインする上で重要であるため, 後述する.

ハイブリッドの安定性に影響する要因は SSOP の長さとその塩基構成にある. ハイブリッドの安定性はイオン強度と温度に依存するが, 同一条件下では, SSOP が長い程また G, C 塩基を多く含む (G-C ペアが水素結合を 3 箇所有するのに対して, A-T ペアは 2 箇所である) 程高くなる. PCR-SSOP 法のハイブリダイゼーション溶液にテトラメチルアンモニウムクロリド (TMAC) を用いる(2)理由は, TMAC の存在下では G-C ペアと A-T ペアの水素結合による安定性の差がほとんどなくなる(3)ことにある. 従って, TMAC を使用すれば, ハイブリッドの安定性は主に SSOP の長さに依存することになる. 但し, SSOP の塩基構成による安定性の差は TMAC 存在下でも多少は残るため, GC 含量の異なる SSOP を同一のハイブリダイゼーション条

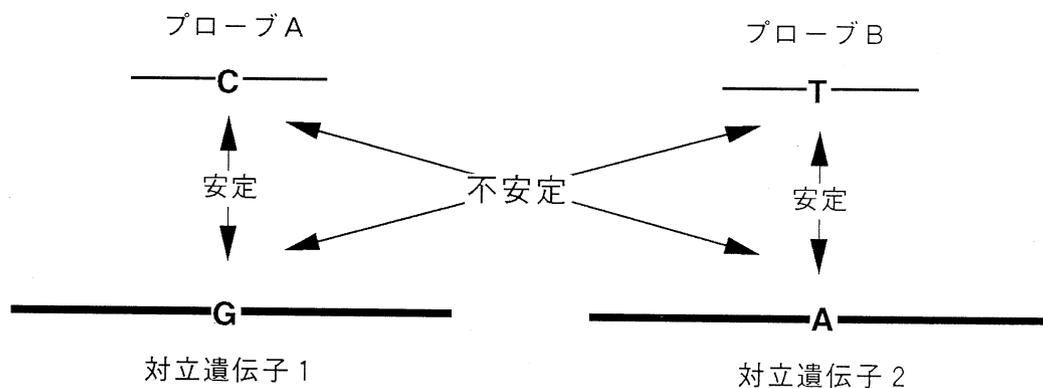


図 1 SSOP による塩基多型検出の原理

件下で用いるために、1～2塩基程の長さの違うSSOPをデザインすることもある。

PCR産物をフィルターに固定して、標識したSSOPによってその多型を検討する方法を一般的にPCR-SSOP法と呼ぶが、SSOPをフィルターに固定して標識したPCR産物をハイブリダイズする方法をreverse-dot法と呼ぶ。

2. PCR-SSOP法の長所と短所

PCR-SSOP法の最大の長所は、多数の検体を一度にタイピングできることにある。また、一般に50検体以上を取り扱う場合は最も低コストである。さらに、いかなる配列にも対応できるSSOPをデザインすることも利点であり、特に新しく発見された対立遺伝子に対応する場合に有利である。また、PCR産物を固定したフィルターは、SSOPを除去することにより、再利用（筆者らの経験では、シグナル強度の低下を考慮すると10回程度）が可能であり、このことも利点のひとつである。これに対して、PCR-SSOP法の短所として、①少数の検体を対象とする場合には労力（但し、この点はreverse-dot法では解消される）とコストの面から不適切であること、②SSOPが対応していない領域の多型は当然検出できないこと、③一部の対立遺伝子のヘテロ接合体（例えばDRB1*1501/DRB1*0405とDRB1*1502/DRB1*0410など）が区別できないこと（但し、グループ特異的PCR法を組み合わせることで、そのほとんどは区別可能である）、④SSOPのデザインによっては交叉ハイブリダイズによる偽陽性が認められることなどがあげられる。

従って、この長所と短所を考慮すると、PCR-SSOPの使用目的は、実用面では移植ドナー・プールのタイピングであり、特定の疾患を対象とした患者・健常者比較研究や人類集団間の比較研究などの多数検体を対象とした研究面への応用である。

3. SSOPのデザイン

クラスII遺伝子のタイピングに用いるSSOPは基本的には確立している(2)が、新たな対立遺伝子を検出しようとする場合にはSSOPを別にデザインしなければならない。同様なことはクラスI遺伝

子のタイピング(4～9)についても言えるため、ここではSSOPのデザイン上の注意点について述べる(図2)。第1点はSSOPそれ自身の二次構造を避けることである。SSOPの自己アニーリングが高効率で起これば、PCR産物とハイブリダイズするSSOP量が減少する可能性（現実には、SSOPが大過剰存在するため、この可能性は低い）があるためでもあるが、この主要な目的は特に放射性同位元素(γ - ^{32}P) ATPでSSOPの5'末端を標識する効率を高くすることである。これは、T4 DNA kinaseの性質（5'末端が突出したDNAは効率良くリン酸化するが、平滑末端および5'陥凹末端のリン酸化効率が低い）に依存した考慮点である。SSOPの標識効率が低いことは偽陰性の原因となる。第2点は、検出しようとする多型塩基をできるだけ中央に持って来ることである。SSOPの末端から2～3塩基以内の多型は、交叉反応（クロスハイブリダイゼーション）のため検出が困難で、偽陽性の原因となる。第3点は、前述のようにハイブリッドの安定性がGC含量に依存するため、多くのSSOP間でGC含量の程度を一定にすることが望ましい。但し、TMAC存在下でハイブリダイゼーションする場合は、この点はあまり考慮しなくても良い。第4点は、水素結合1箇所によるG-Tペアリング形成の可能性を考慮することである。図2に示すように、配列によっては、SSOPをコーディングストランド側かノンコーディングストランド側かのどちらかに設定すれば良いかを考慮しなければならない。

おわりに

PCR-SSOP法によるタイピングの基本概念を概説したが、全てのHLA対立遺伝子型の決定が本法によって行える訳ではない。目的と用途によって、他のDNAタイピング法を組み合わせ使用（特にPCR-SSOP法の原型であるグループ特異的PCRはほぼ必須である）しているのが現状である。

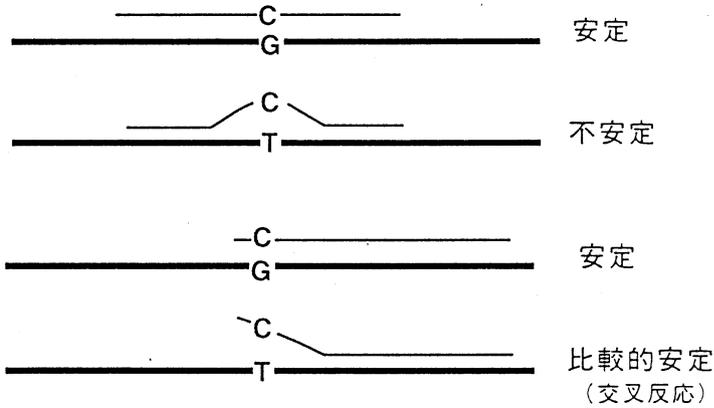
参考文献

1. Saiki, RK, Bugawan TL, Horn GT, *et al.*: Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ α DNA with al-

1. 二次構造を避ける (特に 5' 末端)



2. 多型塩基をできるだけ中央におく



3. GC含量はできるだけ一定にする

$$T_m \approx 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

ただし、TMACを使用すると、 T_m は長さに依存し、GC含量に依存しない

4. GTペアリングの可能性を考慮する

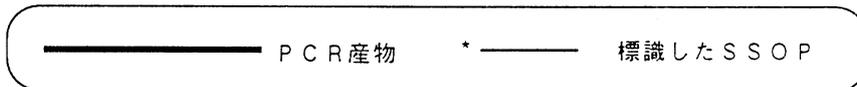
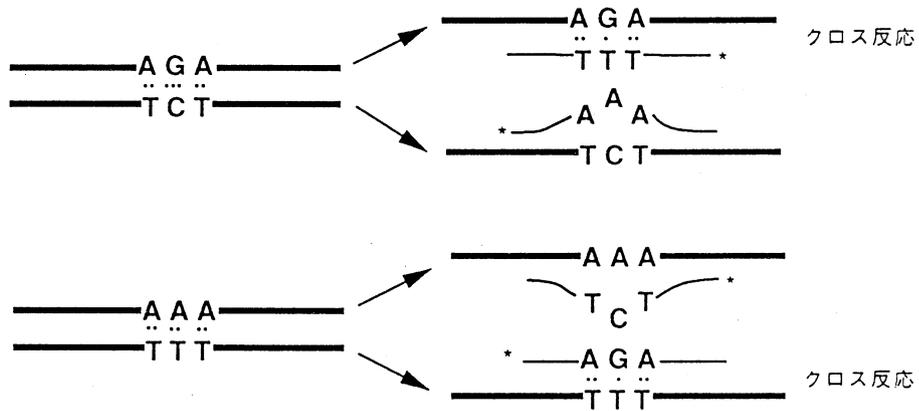


図2 SSOPのデザイン上の注意

- lele-specific oligonucleotide probes. *Nature* **324**: 163-166, 1986.
2. Kimura A, Sasazuki T: *HLA 1991 Vol 1*. (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA DNA - typing technique. Oxford University Press, Oxford, 1992; p. 397-419.
 3. Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, *et al.*: Base composition - independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide an screening of highly complex gene libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 1585-1588, 1985.
 4. Gao X, Jakobson IB, Serjeantson SW: Characterization of the HLA - A polymorphism by locus - specific polymerase chain reaction amplification and oligonucleotide hybridization. *Hum. Immunol.* **41**: 267-279, 1994.
 5. Bugawan TL, Apple R, Erlich HA: A method for typing polymorphism at the HLA - A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* **44**: 137-147, 1994.
 6. Date Y, Kimura A, Kato H, *et al.*: DNA typing of HLA - A gene: population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens* **47**: 93-101, 1996.
 7. Fleischhauer K, Zino E, Bordignon C, *et al.*: Complete generic and extensive fine - specificity typing of the HLA - B locus by the PCR - SSOP method. *Tissue Antigens* **46**: 281-292, 1995.
 8. Fernandez - Vina M, Lazaro AM, Sun Y, *et al.*: Population based diversity of B - locus alleles observed by high - resolution DNA typing. *Tissue Antigens* **45**: 153-168, 1995.
 9. Kennedy LJ, Poulton KV, Dyer PA, *et al.*: Definition of HLA - C alleles using sequence - specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). *Tissue Antigens* **46**: 187-195, 1995.

〔最新情報：“玉手箱”〕

最新アレル情報

小林 賢

防衛医科大学校，検査部

はじめに

HLA アレルの命名は毎月のように更新され、かなりのアレルが公認されている。そのような状況で年3回しか出版されないMHCですべてのアレルを掲載することは困難である。しかしながら、読者の方に最新の情報を提供するのが私に課せられた仕事である。今回は1996年6月までに更新されているDPB1とDPA1遺伝子の塩基配列を掲載する(表1)。また、1996年6月までに公認されているHLA アレル名を表2にクラスIを、表3にクラスIIをそれぞれまとめて掲載する。

前回はマッキントッシュを利用してインターネット経由で塩基配列を入手する方法について記載したが、今回はHLAに関連したインターネットホームページをいくつかご紹介したいと思います。

1. HLA クラスIアレルとアクセス番号

現在までに公認されているHLA クラスIのアレル名を表4, 5, 6, 7にまとめて掲載する。今回は、アレル名だけでなくインターネットを経由してGenBank, EMBL や DDBJ から塩基配列を入手する場合に必要なアクセス番号も併せて掲載した。クラスIIについては次号に掲載する予定である。

2. アレル名の削除

DRB1*1606はDRB1*1605と同一であることが判明したために1995年10月に取り消されている。Cw*0101, Cw*0201, Cw*1201とCw*1501は塩基配列にエラーがあり、これらの名称は1996年2月に削除されている。また、現在までに削除されたアレル名とその理由を表8にまとめて掲載した。

3. インターネットホームページ

前回 HLA の塩基配列を入手する方法について記載した。インターネット上には色々な情報が載っているが、目的とした場所を探し出すのに苦労することがある。そこで、今回は HLA に携わっている方に関連したインターネットウェブサイトをいくつか紹介したいと思う(表9)。まず、HLA 関連の雑誌として Tissue Antigens や Human Immunology があるが、Tissue Antigens に関しては雑誌が手元に届く前に最新号の要約を見ることができるので大変便利である。アメリカの組織適合性学会のホームページが開設されているので、アメリカにおける活動状況などの最新情報を見ることができ、ここでも一部のシークエンス情報を入手することができる。毎月更新される HLA アレルに関する情報は <http://www.icnet.uk/axp/tia/index.html> にアクセスすることによって入手でき、また同時にシークエンス、論文情報などのデータも保存することが可能である。検査・研究を終え、帰宅時の天気が気になるようであったら、日本気象協会のホームページにアクセスすると天気概況を見ることができ、またひまわりの衛星画像も最新のものを見ることができ、安心して帰宅することができる。そういうホームページのアドレスが分からない場合には、<http://www.yahoo.co.jp/> にアクセスすると検索することができる。このサイトは非常に便利で、場合によっては学会の情報、最近話題になった O157 に関する情報、ライフサイエンスに関する日本語入力ソフトの辞書、DNA 実験法などを入手することができるようになる。来年中にはこの MHC もホームページを設けて会員の皆様に最新の情報を

表 1-1 HLA-DPA1 と DPB1 遺伝子の DNA 塩基配列

	10	20	30	40
DPB1*01011	GAG AAT TAC GTG TAC CAG GGA	CGG CAG GAA TGC TAC GCG TTT AAT	GGG ACA CAG CGC TTC CTG GAG AGA TAC	ATC TAC AAC CGG GAG GAG TAC GCG CGC TTC
DPB1*01012	***	---	---	---
DPB1*02011	--- C-T -T	---	---	---A
DPB1*02012	--- C-T -T	---	---	---T -T
DPB1*02013	--- C-T -T	---	---	---T -T
DPB1*0202	*--- C-T -T	---	---	---CT -T
DPB1*0301	---	---TT-	---	---T- -T
DPB1*0401	--- C-T -T	---	---	---T-
DPB1*0402	--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*0501	*--- C-T -T	---	---	---CT- -T
DPB1*0601	*--- TT-	---	---	---T- -T
DPB1*0801	*** C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*0901	*--- C- TT-	---	---	---T- -T
DPB1*1001	*--- C- TT-	---	---	---T- -T
DPB1*11011	*** TT-	---	---	---A
DPB1*11012	*--- TT-	---	---A- C-	---A
DPB1*1301	*--- TT-	---	---	---
DPB1*1401	*--- C- TT-	---	---	---T- -T
DPB1*1501	*--- C- TT-	---	---	---A
DPB1*1601	*--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*1701	*--- C- TT-	---	---	---T- -T
DPB1*1801	***	---	---	---T- -T
DPB1*1901	*--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*20011	---	---TT-	---	---T- -T
DPB1*20012	---	---TT-	---	---T- -T
DPB1*2101	---	---TT-	---	---CT- -T
DPB1*2201	--- C-T -T	---	---	---CT- -T
DPB1*2301	--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*2401	--- C-T -T	---	---	---T-
DPB1*2501	---	---TT-	---	---T- -T
DPB1*26011	***	---	---	---
DPB1*26012	***	---	---	---A
DPB1*2701	---	---TT-	---	---
DPB1*2801	--- C-T -T	---	---	---T-
DPB1*2901	---	---TT-	---	---T- -T
DPB1*3001	---	---C- TT-	---	---T- -T
DPB1*3101	--- C-T -T	---	---	---T-
DPB1*3201	--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*3301	--- C-T -T	---	---	---T-
DPB1*3401	--- C-T -T	---	---	---CT- -T
DPB1*3501	---	---C- TT-	---	---T- -T
DPB1*3601	---	---TT-	---	---CT- -T
DPB1*3701	***	---	---	---T- -T
DPB1*3801	*** C-T -T	---	---C-	---CT- -T
DPB1*3901	--- C-T -T	---	---	---
DPB1*4001	--- C-T -T	---	---	---
DPB1*4101	***	---	---	---T- -T
DPB1*4401	*--- C- TT-	---	---	---CT- -T
DPB1*4501	***	---C- TT-	---	---T- -T
DPB1*4601	*--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*4701	*--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*4801	***	---C-T -T	---	---CT- -T
DPB1*4901	***	---C-T -T	---	---
DPB1*5001	***	---	---	---T- -T
DPB1*5101	---	---C-T -T	---	---T-
DPB1*5201	*--- C- TT-	---	---	---T- -T
DPB1*5301	*--- C-T -T	---	---	---
DPB1*5401	---	---C- TT-	---	---T- -T
DPB1*5501	---	---C- TT-	---	---T- -T
DPB1*5601	***	---	---	---T-
DPB1*5701	***	---C-T -T	---	---T- -T
DPB1*5801	***	---C- TT-	---	---CT- -T
DPB1*5901	*--- C-T -T	---	---	---T- -T
DPB1*6001	---	---C-T -T	---	---T- -T
DPB1*6101N	---	---TT-	---	---T- -T
DPB1*6201	---	---C-T -T	---	---CT- -T
DPB1*6301	***	---C-T -T	---	---CT- -T
DPB1*6401N	***	---A	---GG-	---T- -T
DPB1*6501	---	---C-T -T	---	---
DPB1*6601	---	---C- GG-	---	---T-
DPB1*6701	---	---C- GG-	---	---T- -T
DPB1*6801	---	---C-T -T	---	---T- -T
DPB1*6901	*---	---GG-	---	---T- -T

	10	20	30	40
DPA1*0103	CAT GTG TCA ACT TAT GCC GCG TTT GTA	CAG ACG CAT AGA CCA ACA GGG GAG TTT	ATG TTT GAA TTT GAT GAA GAT GAG	ATG TTC TAT GTG GAT CTG GAC AAG
DPA1*0104	***	---	---	---C
DPA1*0105	***	---	---	---
DPA1*02011	---	---C	---	---CA- -T -A
DPA1*02012	---	---	---	---CA- -T -A
DPA1*02021	***	---AT-	---C	---A
DPA1*02022	---	---AT-	---C	---A
DPA1*0301	***	---AT-	---C	---
DPA1*0401	***	---	---A- -A	---G -T

表 1-2

	50	60	70	80	90
DPB1*01011	GTG ACG GAG CTG GGG CGG CCT GCT	GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAG GAC ATC	CTG GAG GAG AAG CCG GCA	GTG CCG GAC AGG GTA TGC AGA CAC AAC TAC	GAG CTG GAC GAG GCC GTG ACC CTG CAG
DPB1*01012	-----	-----	-----	-----	-----
DPB1*02011	-----	-A- -A-	-----	G- -G-	-G- -G- -A-
DPB1*02012	-----	-A- -A-	-----	G- -G-	-G- -G- -A-
DPB1*02013	-----	-AC -A-	-----	G- -G-	-G- -G- -A-
DPB1*0202	-----	-AG -	-----	G- -G-	-G- -G- -A-
DPB1*0301	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	-----
DPB1*0401	-----	-----	-----	A-G	-G- -G- -A-
DPB1*0402	-----	-A- -A-	-----	A-G	-G- -G- -A-
DPB1*0501	-----	-AG -	-----	A-G	-G- -G- -A-
DPB1*0601	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	-----
DPB1*0801	-----	-A- -A-	-----	G- -	-----
DPB1*0901	-----	-A- -A- -C	-----	G- -	-----
DPB1*1001	-----	-A- -A-	-----	G- -	-----
DPB1*11011	-----	-----	C- -	G- -	A-G
DPB1*11012	-----	-----	C- -	G- -	A-G
DPB1*1301	-----	-----	G- -	A- -	-----
DPB1*1401	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	-----
DPB1*1501	-----	-----	C- -	-G-	A-G
DPB1*1601	-----	-A- -A-	-----	G- -	A-G
DPB1*1701	-----	-A- -A- -C	-----	G- -	A-G
DPB1*1801	-----	-A- -A-	-----	A-G	-T- -G- -C- -A-
DPB1*1901	-----	-AG -	-----	G- -	A- -
DPB1*20011	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	A-G
DPB1*20012	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	A-G
DPB1*2101	-----	-AG -	-----	G- -	A-G
DPB1*2201	-----	-AG -	-----	G- -	A-G
DPB1*2301	-----	-AG -	-----	A-G	-G- -G- -C- -A-
DPB1*2401	-----	-AG -	-----	A-G	-G- -G- -C- -A-
DPB1*2501	-----	-A- -A-	-----	C- -	-----
DPB1*26011	-----	-----	-----	-A	-----
DPB1*26012	-----	-----	-----	-----	-----
DPB1*2701	-----	-----	-----	A-G	-----
DPB1*2801	-----	-A- -A-	-----	C- -	A-G
DPB1*2901	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	G- -
DPB1*3001	-----	-AG -	-----	G- -	A-G
DPB1*3101	-----	-----	C- -	T- -	A-G
DPB1*3201	-----	-A- -A- -T	-----	G- -	T- -
DPB1*3301	-----	-----	C- -	G- -	A-G
DPB1*3401	-----	-----	C- -	T- -	A-G
DPB1*3501	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	A-G
DPB1*3601	-----	-AG -	-----	A-G	-T- -G- -C- -A-
DPB1*3701	-----	-A- -A-	-----	G- -	A- -
DPB1*3801	-----	-AG -	-----	A-G	-----
DPB1*3901	-----	-----	-----	A-G	-G- -G- -C- -A-
DPB1*4001	-----	-----	-----	A-G	-T- -G- -C- -A-
DPB1*4101	-----	-A- -A-	-----	T- -	G- -
DPB1*4401	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	G- -
DPB1*4501	-----	-A- -A-	-----	C- -	-----
DPB1*4601	-----	-A- -A- -C	-----	G- -	A-G
DPB1*4701	-----	-AG -	-----	G- -	A-G
DPB1*4801	-----	-A- -A-	-----	G- -	A-G
DPB1*4901	-----	-A- -A-	-----	G- -	A-G
DPB1*5001	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	A-G
DPB1*5101	-----	-A- -A-	-----	A-G	-G- -G- -C- -A-
DPB1*5201	-----	-A- -A-	-----	C- -	-----
DPB1*5301	-----	-A- -A-	-----	A-G	-T- -G- -C- -A-
DPB1*5401	-----	-AG -	-----	G- -	A- -
DPB1*5501	-----	-----	-----	G- -	A-G
DPB1*5601	-----	-----	-----	C- -	-----
DPB1*5701	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	-----
DPB1*5801	-----	-----	-----	G- -	A-G
DPB1*5901	-----	-A- -A-	-----	C- -	A-G
DPB1*6001	-----	-A- -A-	-----	A- -	A-G
DPB1*6101N	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	T- -
DPB1*6201	-----	-----	-----	A-G	-T- -G- -C- -A-
DPB1*6301	-----	-----	-----	A-G	-----
DPB1*6401N	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	G- -
DPB1*6501	-----	-----	-----	A-G	-----
DPB1*6601	-----	-----	-----	A-G	-G- -G- -C- -A-
DPB1*6701	-----	-----	-----	C- -	-----
DPB1*6801	-----	-A- -A-	-----	-G-	-----
DPB1*6901	-----	-A- -A- -C	-----	C- -	-G-

	50	60	70	80	90
DPA1*0103	TTT GGC CAA GCC TTT TCC TTT GAG GCT CAG GGC GGG CTG GCT AAC ATT GCT ATA TTG AAC AAC AAC TTG AAT ACC TTG ATC CAG CGT TCC AAC CAC ACT CAG GCC ACC AAC GAT CCC CCT GAG GTG ACC				
DPA1*0104	-----	-----	-----	-----	-----
DPA1*0105	-----	-----	-----	G- -	-T- -G- -C- -A-
DPA1*02011	-----	-----	-----	G- -	-T- -G- -C- -A-
DPA1*02012	-----	-----	-----	G- -	-T- -G- -C- -A-
DPA1*02021	-----	-----	-----	G- -	-T- -G- -C- -A-
DPA1*02022	-----	-----	-----	G- -	-T- -G- -C- -A-
DPA1*0301	-----	-----	C- -	-----	-G
DPA1*0401	-----	-----	-----	-G- -GCT	-----

表2 公認されているクラス I アリル名

HLA-A		HLA-B			HLA-C	HLA-E	HLA-G
A*0101	A*3003	B*0702	B*2703	B*4008	Cw*0102	E*0101	G*01011
A*0102	A*3004	B*0703	B*2704	B*4101	Cw*0103	E*0102	G*01012
A*0201	A*31012	B*0704	B*27052	B*4102	Cw*02021	E*01031	G*01013
A*0202	A*3201	B*0705	B*27053	B*4201	Cw*02022	E*01032	G*0102
A*0203	A*3202	B*0706	B*2706	B*4202	Cw*02023	E*0104	G*0103
A*0204	A*3301	B*0707	B*2707	B*4402	Cw*0302		G*0104
A*0205	A*3302	B*0801	B*2708	B*44031	Cw*0303		
A*0206	A*3303	B*0802	B*2709	B*44032	Cw*0304		
A*0207	A*3401	B*0803	B*2710	B*4404	Cw*0401		
A*0208	A*3402	B*1301	B*2711	B*4405	Cw*0402		
A*0209	A*3601	B*1302	B*3501	B*4406	Cw*0403		
A*0210	A*4301	B*1303	B*3502	B*4407	Cw*0501		
A*0211	A*6601	B*1401	B*3503	B*4501	Cw*0602		
A*0212	A*6602	B*1402	B*3504	B*4601	Cw*0701		
A*0213	A*6603	B*1501	B*3505	B*4701	Cw*0702		
A*0214	A*68011	B*1502	B*3506	B*4801	Cw*0703		
A*0215N	A*68012	B*1503	B*3507	B*4802	Cw*0704		
A*0216	A*6802	B*1504	B*3508	B*4803	Cw*0705		
A*0217	A*6803	B*1505	B*35091	B*4901	Cw*0706		
A*0218	A*6901	B*1506	B*35092	B*5001	Cw*0801		
A*0219	A*7401	B*1507	B*3510	B*5002	Cw*0802		
A*0220	A*7402	B*1508	B*3511	B*51011	Cw*0803		
A*0221	A*7403	B*1509	B*3512	B*51012	Cw*12021		
A*0301	A*8001	B*1510	B*3513	B*51021	Cw*12022		
A*0302		B*1511	B*3514	B*51022	Cw*1203		
A*0303N		B*1512	B*3515	B*5103	Cw*1301		
A*1101		B*1513	B*3516	B*5104	Cw*1402		
A*1102		B*1514	B*3517	B*5105	Cw*1403		
A*1103		B*1515	B*3518	B*5106	Cw*1502		
A*1104		B*1516	B*3519	B*5107	Cw*1503		
A*2301		B*1517	B*3701	B*5108	Cw*1504		
A*2402		B*1518	B*3702	B*5109	Cw*15051		
A*2403		B*1519	B*3801	B*52011	Cw*15052		
A*2404		B*1520	B*3802	B*52012	Cw*1601		
A*2405		B*1521	B*39011	B*5301	Cw*1602		
A*2406		B*1522	B*39013	B*5401	Cw*1701		
A*2407		B*1523	B*39021	B*5501	Cw*1702		
A*2408		B*1524	B*39022	B*5502	Cw*1801		
A*2409N		B*1525	B*3903	B*5503			
A*2410		B*1526N	B*3904	B*5504			
A*2411N		B*1527	B*3905	B*5601			
A*2413		B*1528	B*39061	B*5602			
A*2414		B*1529	B*39062	B*5701			
A*2501		B*1530	B*3907	B*5702			
A*2502		B*1531	B*3908	B*5703			
A*2601		B*1532	B*3909	B*5704			
A*2602		B*1533	B*3910	B*5801			
A*2603		B*1534	B*40011	B*5802			
A*2604		B*1535	B*40012	B*5901			
A*2605		B*1536	B*4002	B*67011			
A*2606		B*1537	B*4003	B*67012			
A*2607		B*1801	B*4004	B*7301			
A*2608		B*1802	B*4005	B*7801			
A*2901		B*1803	B*4006	B*78021			
A*2902		B*1804	B*4007	B*78022			
A*3001		B*2701	B*4009	B*8101			
A*3002		B*2702	B*4010	B*8201			

表3 公認されているクラスIIアレル名

HLA-DRA	HLA-DRB			HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DPA1	HLA-DPB1	HLA-DMA	HLA-DMB	TAP1	TAP2
DRA*0101	DRB1*0101	DRB1*11082	DRB1*1420	DQA1*0101	DQB1*0201	DPA1*0103	DPB1*01011	DMA*0101	DMB*0101	TAP1*0101	TAP2*0101
DRA*0102	DRB1*01021	DRB1*1109	DRB1*1421	DQA1*01021	DQB1*0202	DPA1*0104	DPB1*01012	DMA*0102	DMB*0102	TAP1*02011	TAP2*0102
	DRB1*01022	DRB1*1110	DRB1*1422	DQA1*01022	DQB1*0203	DPA1*0105	DPB1*02011	DMA*0103	DMB*0103	TAP1*02012	TAP2*0103
	DRB1*0103	DRB1*1111	DRB1*1423	DQA1*0103	DQB1*0301	DPA1*02011	DPB1*02012	DMA*0104	DMB*0104	TAP1*0301	TAP2*0201
	DRB1*0104	DRB1*1112	DRB1*1424	DQA1*0104	DQB1*0302	DPA1*02012	DPB1*02013				
	DRB1*03011	DRB1*1113	DRB1*1425	DQA1*0105	DQB1*03032	DPA1*02021	DPB1*0202		DMB*0105	TAP1*0401	
	DRB1*03012	DRB1*1114	DRB1*15011	DQA1*0201	DQB1*0304	DPA1*02022	DPB1*0301				
	DRB1*03021	DRB1*1115	DRB1*15012	DQA1*03011	DQB1*0305	DPA1*0301	DPB1*0401				
	DRB1*03022	DRB1*1116	DRB1*15021	DQA1*0302	DQB1*0306	DPA1*0401	DPB1*0402				
	DRB1*0303	DRB1*1117	DRB1*15022	DQA1*0303	DQB1*0401		DPB1*0501				
	DRB1*0304	DRB1*1118	DRB1*1503	DQA1*0401	DQB1*0402		DPB1*0601				
	DRB1*0305	DRB1*1119	DRB1*1504	DQA1*0501	DQB1*0501		DPB1*0801				
	DRB1*0306	DRB1*1120	DRB1*1505	DQA1*05011	DQB1*0502		DPB1*0901				
	DRB1*0307	DRB1*1121	DRB1*1506	DQA1*05012	DQB1*05031		DPB1*1001				
	DRB1*0308	DRB1*1122	DRB1*1601	DQA1*05013	DQB1*05032		DPB1*11011				
	DRB1*0309	DRB1*1123	DRB1*16021	DQA1*0502	DQB1*0504		DPB1*11012				
	DRB1*04011	DRB1*1124	DRB1*16022	DQA1*0503	DQB1*06011		DPB1*1301				
	DRB1*04012	DRB1*1125	DRB1*1603	DQA1*0601	DQB1*06012		DPB1*1401				
	DRB1*0402	DRB1*1126	DRB1*1604		DQB1*0602		DPB1*1501				
	DRB1*0403	DRB1*1127	DRB1*1605		DQB1*0603		DPB1*1601				
	DRB1*0404	DRB1*1128	DRB1*1607		DQB1*0604		DPB1*1701				
	DRB1*04051	DRB1*1201	DRB1*1608		DQB1*06051		DPB1*1801				
	DRB1*04052	DRB1*12021	DRB3*0101		DQB1*06052		DPB1*1901				
	DRB1*0406	DRB1*12022	DRB3*0201		DQB1*0606		DPB1*20011				
	DRB1*0407	DRB1*12031	DRB3*0202		DQB1*0607		DPB1*20012				
	DRB1*0408	DRB1*12032	DRB3*0203		DQB1*0608		DPB1*2101				
	DRB1*0409	DRB1*1204	DRB3*0204		DQB1*0609		DPB1*2201				
	DRB1*0410	DRB1*1301	DRB3*0205		DQB1*0610		DPB1*2301				
	DRB1*0411	DRB1*1302	DRB3*0206		DQB1*0611		DPB1*2401				
	DRB1*0412	DRB1*13031	DRB3*0301		DQB1*0612		DPB1*2501				
	DRB1*0413	DRB1*13032	DRB4*01011				DPB1*26011				
	DRB1*0414	DRB1*1304	DRB4*0101102N				DPB1*26012				
	DRB1*0415	DRB1*1305	DRB4*0102				DPB1*2701				
	DRB1*0416	DRB1*1306	DRB4*0103				DPB1*2801				
	DRB1*0417	DRB1*1307	DRB4*0104				DPB1*2901				
	DRB1*0418	DRB1*1308	DRB4*0201N				DPB1*3001				
	DRB1*0419	DRB1*1309	DRB5*0101				DPB1*3101				
	DRB1*0420	DRB1*1310	DRB5*0102				DPB1*3201				
	DRB1*0421	DRB1*1311	DRB5*0103				DPB1*3301				
	DRB1*0422	DRB1*1312	DRB5*0104				DPB1*3401				
	DRB1*0423	DRB1*1314	DRB5*0105				DPB1*3501				
	DRB1*0701	DRB1*1315	DRB5*0201				DPB1*3601				
	DRB1*0801	DRB1*1316	DRB5*0202				DPB1*3701				
	DRB1*08021	DRB1*1317	DRB5*0203				DPB1*3801				
	DRB1*08022	DRB1*1318	DRB5*0204				DPB1*3901				
	DRB1*08031	DRB1*1319	DRB6*0101				DPB1*4001				
	DRB1*08032	DRB1*1320	DRB6*0201				DPB1*4101				
	DRB1*08041	DRB1*1321	DRB6*0202				DPB1*4401				
	DRB1*08042	DRB1*1322	DRB7*01011				DPB1*4501				
	DRB1*0805	DRB1*1323	DRB7*01012				DPB1*4601				
	DRB1*0806	DRB1*1324					DPB1*4701				
	DRB1*0807	DRB1*1325					DPB1*4801				
	DRB1*0808	DRB1*1326					DPB1*4901				
	DRB1*0809	DRB1*1327					DPB1*5001				
	DRB1*0810	DRB1*1401					DPB1*5101				
	DRB1*0811	DRB1*1402					DPB1*5201				
	DRB1*0812	DRB1*1403					DPB1*5301				
	DRB1*0813	DRB1*1404					DPB1*5401				
	DRB1*0814	DRB1*1405					DPB1*5501				
	DRB1*09011	DRB1*1406					DPB1*5601				
	DRB1*09012	DRB1*1407					DPB1*5701				
	DRB1*1001	DRB1*1408					DPB1*5801				
	DRB1*11011	DRB1*1409					DPB1*5901				
	DRB1*11012	DRB1*1410					DPB1*6001				
	DRB1*11013	DRB1*1411					DPB1*6101N				
	DRB1*1102	DRB1*1412					DPB1*6201				
	DRB1*1103	DRB1*1413					DPB1*6301				
	DRB1*11041	DRB1*1414					DPB1*6401N				
	DRB1*11042	DRB1*1415					DPB1*6501				
	DRB1*1105	DRB1*1416					DPB1*6601				
	DRB1*1106	DRB1*1417					DPB1*6701				
	DRB1*1107	DRB1*1418					DPB1*6801				
	DRB1*11081	DRB1*1419					DPB1*6901				

表5 HLA-A アリル名とアクセス番号

Alleles	Accession number	Alleles	Accession number
A*0101	X55710, M24043	A*2413	U37112, U37113
A*0102	U07161	A*2414	U37114, U37115
A*0201	M32322, K02883, M84379, X02457	A*2501	M32321
A*0202	M17566, M17568, X94566	A*2502	X97802
A*0203	U03862, M17567, M19670, X94567	A*2601	M24095, U03697, D16843, D32130, D32131
A*0204	X57954, M86404, X94568	A*2602	M98453, D14350
A*0205	U03863, X94569, L76290	A*2603	D14351, D32129
A*0206	M24042, X94570	A*2604	D14354
A*0207	D50458	A*2605	D50068, L43536, L43537
A*0208	-	A*2606	L43534, L43535
A*0209	-	A*2607	L48341
A*0210	Z23071, X94572	A*2608	U45480, U52429
A*0211	X60764, M84377, X94573	A*2901	M23739
A*0212	M84378	A*2902	X60108
A*0213	Z27120	A*3001	M30576, M28414, U07234
A*0214	Z30341	A*3002	X61702
A*0215N	D38525	A*3003	M93657
A*0216	Z46633	A*3004	U18988, Z34921, X86770, X83771
A*0217	U18930, X89707, X89708, L43526, L43527	A*31012	M84375, M86405, L78918
A*0218	D83515	A*3201	P10314
A*0219	L76936	A*3202	X97120
A*0220	X96724	A*3301	M3058, M28415
A*0221	U56825	A*3302	L06440
A*0301	X00492	A*3303	U09740, U18990, X83002, X83003
A*0302	U56434, U56435	A*3401	X61704
A*0303N	L77702	A*3402	X61705
A*1101	M16007, M16008, X13111, D16841	A*3601	X61700
A*1102	X13112, D16842	A*4301	X61703
A*1103	-	A*6601	X61711, U17571
A*1104	U50574	A*6602	X61712, X51745
A*2301	M64742, L76288	A*6603	X96638
A*2402	M64740, M84376, L47206	A*68011	X03070, X03071
A*2403	M64741	A*68012	L06425
A*2404	D26550, L43532, L43533	A*6802	I03861
A*2405	X82161	A*6803	U41057, U56436, U56437
A*2406	U18987	A*6901	X03158, X03159
A*2407	U25971, U36914, K92068	A*7401	X61701, U17569, U17570
A*2408	L43528, L43529, D83516	A*7402	X95409
A*2409N	L47231	A*7403	X95561
A*2410	U37110, U37111	A*8001	U03754, M94880, L18898, L19403
A*2411N	L76289		

表5 HLA-B アリル名とアクセス番号

Alleles	Accession number	Alleles	Accession number	Alleles	Accession number
B*0702	M16102, M32317, M35444, P01889, U49904, U49905, U29057, L47338	B*2703	M54883, M37272	B*4010	U58643, U58644
B*0703	X64454, U21053	B*2704	U27608	B*4101	M24035
B*0704	U04245	B*27052	X08945, M12967, L20086, M14013, M12678	B*4102	X81363, U17572, X86704
B*0705	L33922, U21052, U18661	B*27053	X83727, X83737	B*4201	M24034
B*0706	X91749	B*2706	X73578, U35734	B*4202	D50709
B*0707	Z70315	B*2707	M62852	B*4402	M24038, M15470
B*0801	M59841, M24036, M28204, L76093	B*2708	L19223	B*44031	X64366
B*0802	U04244	B*2709	Z33453	B*44032	U58469, U58470
B*0803	U28759	B*2710	L76095	B*4404	X76953, X78425, X78427
B*1301	M24075, D50290	B*2711	D83043	B*4405	X78849, X78850, L31798
B*1302	M19757, M24041, D50291	B*3501	M28109-12, L63544, L57605, U11265	B*4406	X83400-3, L42345
B*1303	U14943	B*3502	M63454	B*4407	X90391
B*1401	M24040, X94574	B*3503	M81798, D50299	B*4501	X61710
B*1402	M59840, M24032	B*3504	M86403, L47986, L40460, U30396	B*4601	M24033
B*1501	M28203, M83193, U03859, L48400, D50292	B*3505	M84385, L76930	B*4701	M19756
B*1502	M75138, M83192, D50293	B*3506	M84381	B*4801	M84380
B*1503	X61709	B*3507	L04695	B*4802	L20089
B*1504	M84382, M86402	B*3508	L04696, Z22651	B*4803	L76931
B*1505	M83191	B*35091	U17107	B*4901	M24037, U11263
B*1506	M83194	B*35092	L76932	B*5001	X61706, U11261
B*1507	M83195	B*3510	L36979	B*5002	U58317, U58318
B*1508	L11666	B*3511	L40699	B*51011	M32319, M21035, M22786-8, M28207, L47985, Z46808
B*1509	L11571	B*3512	L42281, L49342, L76094	B*51012	U52169, U52170
B*1510	L11570, U11262, U11264, U11269	B*3513	X87268	B*51021	M68964
B*1511	L11604, D50294	B*3514	L42545	B*51022	L41925
B*1512	L11603	B*3515	U30904	B*5103	M80670
B*1513	L15005, D50295	B*3516	U29880	B*5104	Z15143
B*1514	L19937	B*3517	U34618, L49341, L57506, L76941	B*5105	U06697
B*1515	L22027, L49343	B*3518	L75742	B*5106	U31334, U32661
B*1516	L09735	B*3519	L76933	B*5107	X94481
B*1517	U01848, U35431	B*3701	M32320, U11267	B*5108	X96473, U52815, U52816
B*1518	U57966, U11266, U11268, D50296	B*3702	U31971	B*5109	U58319, U58320
B*1519	U03027	B*3801	M29864, U40498, L36591	B*52011	M21036
B*1520	U06862	B*3802	L22028	B*52012	L20090, L47984, L76091
B*1521	L32862, D44500, U32678	B*39011	M94052, M29865	B*5301	M33574, M58636
B*1522	U34619, U14756, L42506	B*39013	M94051	B*5401	M77774
B*1523	L37881	B*39021	M94053	B*5501	M77778
B*1524	U16309, L42146	B*39022	U04243	B*5502	M77777
B*1525	U18660, U50710, U52177, U52178	B*3903	L20088	B*5503	X94482
B*1526N	D49824	B*3904	L22549	B*5504	L76225
B*1527	L42144	B*3905	U15638, L36318, L36980	B*5601	M77776
B*1528	D44499	B*39061	U15639, L42024, L76640, L76639	B*5602	M77775
B*1529	D44501	B*39062	U16298, U32660, U29083, L40562	B*5701	X55711, M32318
B*1530	L42296, U49900, U49901, U52171, U52172	B*3907	U15640	B*5702	X61707
B*1531	L42145, L40183, U52173, U52174	B*3908	L42280	B*5703	U18790, U39088
B*1532	X95410	B*3909	U29480, L76088	B*5704	L76096
B*1533	U49898, U49899	B*3910	U56246, U52175, U52176	B*5801	M11799, U52813, U52814, M11799
B*1534	U49902, U49903	B*40011	P01890, U03698	B*5802	L33923, X86703
B*1535	U52167, U52168	B*40012	M95530	B*5901	L07743, D50300
B*1536	U58315, U58316	B*4002	L09736, D14343, L76089	B*67011	L17005, L76252
B*1537	U55022, U55023	B*4003	M84383	B*67012	U18789
B*1801	M24039	B*4004	M84384, L76090	B*7301	U04787, X77658, L24373
B*1802	D25275	B*4005	M84694	B*7801	X61708, M33573
B*1803	X94480	B*4006	M95531	B*78021	L41214
B*1804	U38792, U38793	B*4007	D31816	B*78022	X96534, X96533
B*2701	L76935	B*4008	L41353	B*8101	L37880, U34810, X90390
B*2702	X03664, X03667	B*4009	L76934	B*8201	U29241, U38800, U36492

表6 HLA-C アリル名とアクセス番号

Alleles	Accession number
Cw*0102	M84171, D50852, Z46809
Cw*0103	D64145
Cw*02021	M24030
Cw*02022	M26712
Cw*02023	Z72007
Cw*0302	M84172
Cw*0303	M99390
Cw*0304	M99389, U44064, U31372, U31373
Cw*0401	M84386, X58536
Cw*0402	M26432
Cw*0403	-
Cw*0501	M58630, M34290, L24491, D64148, D83742
Cw*0602	M28206, X70857, Z22752-4
Cw*0701	M28205, Z46810
Cw*0702	D38526
Cw*0703	M11886
Cw*0704	U09853, X83394, D49552
Cw*0705	U38975
Cw*0706	X97321
Cw*0801	M84174
Cw*0802	M59865, M84173
Cw*0803	Z15144
Cw*12021	M28172, M28174, M28176, M28178
Cw*12022	X70856, D83741
Cw*1203	U06695, U06696, X82122
Cw*1301	M58631, M34291
Cw*1402	U06487, D49820, U41386
Cw*1403	D31817, L38251
Cw*1502	L20091, X67818, D83031
Cw*1503	M99388
Cw*1504	X73518
Cw*15051	X78343
Cw*15052	X87841
Cw*1601	M24097, U56259, U56260, U41420
Cw*1602	X76189
Cw*1701	U06835
Cw*1702	D64149
Cw*1801	X96582

表7 HLA-E と G アリル名とアクセス番号

HLA-E	Accession number	HLA-G	Accession number
E*0101	M20022	G*01011	J03027, X17273, L27836, L27837
E*0102	M21533	G*01012	M32800
E*01031	M32507, X87678, X87679	G*01013	L41363, L20777, L41363
E*01032	X87680, X87681	G*0102	S69897
E*0104	M32508	G*0103	M99048
		G*0104	D67006, D67007, D67008

表8 削除された HLA アリル名

削除されたアリル	削除された理由
A*2401	塩基配列エラー
A*3005	A*3004 と同一
A*31011	A*31012 と同一
B*0701	塩基配列エラー
B*27051	B*27052 と同一
B*39012	B*39013 と同一
B*4401	B*4402 と同一
B*7901	B*1518 に名称を変更
Cw*0101	Cw*0102 と同一
Cw*0201	Cw*02022 と同一
Cw*0301	Cw*0304 と同一
Cw*0601	Cw*0602 と同一
Cw*1101	Cw*0102 と同一
Cw*1201	Cw*1202 と同一
Cw*1401	Cw*1402 と同一
Cw*1501	Cw*1502 と同一
Cw*1603	シーケンス・アーチファクト
DRB1*0702	DRB1*0701 と同一
DRB1*1313	シーケンス・アーチファクト
DRB1*1606	DRB1*1605 と同一
DQA1*03012	DQA1*0302 と同一
DQB1*03031	DQB1*03012 と同一
DPA1*0101	DPA1*0103 と同一
DPA1*0102	DPA1*0103 と同一
DPB1*4201	DPB1*3101 と同一
DPB1*4301	DPB1*2801 と同一

表9 HLAに関連したウェブサイトを

アドレス	内容
http://www.nig.ac.jp/	国立遺伝学研究所のホームページ
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Gene Bankのホームページ
http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db/ebi/topembl.html	EMBLのホームページ
http://www.genome.ad.jp/	京都大学にあるGenomeNetのホームページ
http://chipo.chem.uic.edu/~richard/mbdata.htm#A	MHC結合ペプチドのデータベースがある。
http://gdbwww.gdb.org/	染色体マップを見ることが出来る
http://histo.cryst.bbk.ac.uk/	DRアレルのペプチド側鎖を形成する残基を見ることが出来る。
http://www.icnet.uk/axp/tia/index.html	MHCの塩基配列、アッアップデートなどが載っている。
http://www.nature.com/	Nature
http://www.sciencemag.org/science/	Science
http://www.cell.com/	Cell
http://www.elsevier.com/	Elsevierのホームページ (Human Immunology)
http://www.tissue-antigens.dk/	Tissue Antigens
http://www.swmed.edu/home_pages/ASHI/ashi.htm	ASHIのホームページ
http://www.nikkeibp.co.jp/BIO/BIO.html	バイオ関連の最新情報が見られる。
http://www.apple.co.jp/Medical/	アッブルが開設している医学情報サイト
http://www.yahoo.co.jp/	色々なウェブサイトを検索できる。
http://www.shareware.com/	色々なシェアウェアソフトを入手することができる。
http://www.jwa.go.jp/index.html	お天気、ひまわりの映像などが見られる日本気象協会のホームページ

提供したいと考えている。どうか楽しみにしていただきたい。

おわりに

HLA アリルは毎月更新される。DNA タイピングをされている施設では非常に重要なデータだが、

インターネットを利用できないとなかなか入手困難であると思われる。そこで塩基配列の最新データをコンピューターのテキストまたは Excel 形式で保存したフロッピーディスクをご希望される方にはお送りしたいと考えている。次号は残りのクラス II についての情報をお届けする予定である。

〔国際学会印象記〕

第12回国際組織適合性学会

小河原 悟

福岡大学病院, 腎センター

第12回国際組織適合性学会はワークショップが1996年6月3日から8日までフランスのサンマロで、カンファレンスが10日から12日までパリのパレデコングレで開催された。サンマロはTGVアトランティックを乗り継いでパリから西へ3時間のところであり、日本のガイドブックには載っていないような城郭都市の形態をもつ港町である。

さてワークショップといえば電話帳のようなデータブックを片手にそれぞれのワーキンググループでディスカッションを行うイメージがあったが今回のワークショップではそのようなものは用意されず、それではCD-ROMがあるかと思えばそんなものはかけらもなく、それぞれが独自に持ち寄ったデータでディスカッションしているようであった。そんなわけでなかなか全体を掴むことができなかつたが私の独断と偏見で興味を持った点について私見を述べてみたい。

Allele and Haplotype Society (AHS)

AHSはクラスIとII抗原で16のSocietyに分かれて討議された。抗血清の反応パターンから新抗原を探っていた時代は既に去り、ハプロタイプの異なる抗原をSSCP法でスクリーニングして片っ端から塩基配列を同定することにより、特にクラスI抗原で多くのnew alleleが同定された。そのアミノ酸の情報を元にモノクローナル抗体を含めた多くの抗血清がHLA分子のどのエピトープを見ているのかが立体構造上で示され、一アミノ酸残基の違いを認識できる抗血清に生命の神秘を見た思いがした。それにしても赤座先生のセログラムの美しさ、日本人の参加したsocietyには必ずでてくるわけでプロ

ープからalleleまで描ける汎用性の高さ、どこかのオラクルなんかよりもよほど見栄えがしたのは私だけでしょうか。

TAP, LMP, DM

これらの遺伝子は抗原ペプチドの細胞内の輸送や提示に機能し、その点から病気との関連で興味深い。現在TAP1は4 alleles, TAP2は2 alleles, LMP2は60番目のR/Hで2 alleles, LMP7はイントロンに多型性が存在し、DMAは140, 155, 184番目, DMBは144, 179番目のアミノ酸置換でそれぞれ4 allelesが見つかっている。病気との相関としてはHIV感染症のdisease protectionとの関連性、特発性膜性腎症における進行性因子との関連性についての発表があり、TAPやDMに関してはその多様性は病気そのものよりも、経過や予後を規定する可能性が示唆された。

HLAとIDDM

やはりdisease associationといえばIDDM、集積された患者が2,000人以上で迫力が違う。15歳未満の患者が67.6%、家族歴のある患者が20%、自己抗体としてはIslet Ab, LAL, GAD, anti-p37kd Ab, 69kd Ab, iA-2 Abが測定された。従来の報告の通り、DR3, DR4は正の、DR15は負の相関を示し、DR3とDR4のホモよりもヘテロの方がodds比は高く、DR3とDR4で提示される抗原がそれぞれIDDMの発症に関係して相加的に疾患感受性を高めていると考えられる。DR1のX線結晶解析で求められた3Dモデルはダイマーを形成しているが、DR3とDR4のヘテロダイマーになることによって

より感受性が強くなっているのか。RasMac（これはワークショップで友達になったフランス人から教えてもらったインターネットで見ることでできる分子モデルの3Dグラフィックソフト）でDR1をくるくる動かしながら、疾患感受性は対立遺伝子によってどう変化するのかなどいろいろな空想にふけてしまった。

DR4は日本人を含めた多くの人種で相関が報告され、DRB1*04 alleleの詳細が報告された。正相関を示すものとして0405が共通しているが、その他のalleleは人種によって正、負を示すものがあり一定していなかった。

HLA とナルコレプシー

日本人で最初に DRB1*1501との100%の相関が報告されて以来、各人種で HLA との相関が報告されてきた。ナルコレプシーという病気の性格上 HLA 分子自体に関わるよりも、それに強い連鎖不平衡にある未知の疾患感受性遺伝子の存在が予測されているが、今回は DQ 領域のプロモーター領域がタイピングされた。ハプロタイプとして DRB1*1501-QAP1.2-DQA1*0102-DQCAR103-DQB1*0602の強い相関が報告された。しかし黒人では DQCAR103の頻度は91%、白人では61%であり、また黒人では50%ぐらひは DRB1*1503とも相関を示すので、おそらく DQB 領域が最も疾患感受性が高いとされた。このようなプロモーター領域を詳細に検討することによって、プライマリーに相関するのは DR か DQ かを検討する上で今後重要な部位となるであろう。

HLA と DNA タイピング

10th では RFLP 法, 11th では SSOP 法それにその後は SSP 法, リバースドット法, HPA 法と様々な方法があみ出され、一長一短はあるが、各々を組み合わせることにより、クラス II に関してはほぼ完成のいきに達したと思われる。しかし、クラス I ともなるとやはり Sequencing-Based Typing (SBT 法) がやはり究極と言える。ワークショップでは部屋はそう狭い方ではなかったが押すな押すなの大盛況であった。シーケンサーとしてはファルマ

シアや ABI 等が用意されていたが、要は direct sequence の場合、ヘテロ検体をどう読みとるかであり、それぞれコンピューターソフトでの解析に工夫が凝らされていた。しかし allele の組み合わせによってはタイピングできないものもあり、簡単にクローン化できればこの問題は解決するのではないかと感じた。学会から用意されたパリのセーヌ川下り観光でオランダ人のタイパーと船上で話す機会があった。その方は SBT で、非血縁骨髄移植のドナーのクラス I 遺伝子タイピングをおこなっており、コストの問題でかなり苦労されているようであったが、将来的にはルーチン化されていくのではないかと話していた。今年の日本組織適合性学会では SBT 法のセッションが設けられるそうで期待したい。



サンマロ近くのモンサンミッシェルへのツアー風景

最後に

十字先生からワークショップの懇親会で何か芸をやれと言われて、最後の日の懇親会まで憂鬱であったが、幸い当大学にも生きのいいのがおり、密かにサンマロの干上がった海岸縁で日本人がフランスパン片手におもちゃの剣でチャンバラをしている様子を地元の人から奇異の目で見られながら、練習を積み(ウソ!)一発芸を披露したが、予想外にうけてびっくり(次ページの写真)。言葉は通じなくても気持ちちは通じることを肌で感じた。この学会ほど HLA という共通言語で世界のいろんな人々と交流できる学会はなく、我々も居合いでスパッと切れたフランスパンの様には行かなくても、12th の学会

のメインテーマである Genetic Diversity of HLA: Functional and Medical Implications のうち Medical Implication に少しでも今後貢献していきたいという思いを新たにした。



福岡大メンバーによるアトラクション

〔国際学会印象記〕

第16回国際移植学会 (XVI International Congress of the Transplantation Society) に参加して

佐田 正晴

国立循環器病センター研究所, 実験治療開発部

第16回国際移植学会は夏休みも終わりに近づいた8月25日から30日迄の6日間、スペインのバルセロナ市で開催された。国際移植学会は世界各国から移植医療、研究に携わっている超有名人から新進気鋭までが一堂に会する臓器移植領域最大の国際学会で2年に一度開催されてる。今回は1992年のバルセロナオリンピック以来、好景気がつづき観光地としても人気の高いバルセロナ市で開催されるとあって54ヶ国、3000人以上が参加し盛大に行われた。ちなみに4年前にパリで開催された当学会は27ヶ国、2000人が参加し行われたが、この4年間で参加国は2倍に増加し末期臓器不全に対する治療法としての移植医療が急速に確実に普及している感が強い。今回提出された一般演題は2645題で190人の審査員により審査され、最終的に926演題(35%)が採用されたが参加国、施設の増加に伴い年々狭き門になりつつある。日本から提出された演題は353題でそのうち93題(26%)が採用された。国別演題数は移植先進国であるアメリカが773題(29%)と最も多く次いで日本の353題(13%)であったが、中近東、旧東欧、およびアジアからの急増が目立っていた。またスペインがdonationに対し大変熱心であることを反映し各国のorgan procurement centerや骨髄移植のブースが今までになく充実していた。今回の学会で我々HLAを糧としている者達にとって最も嬉しかったのは移植分野のノーベル賞とも言える“Medawar Prize”を、Terasaki, Dausset, Van Roodの3人

が同時受賞したことであろう。博士課程終了後Medawar教授のもとでリサーチフェローをしていたTerasakiにとって大変感慨深いものがあったと推察される(後日バルセロナでMedawar夫人, Parham, Albert, Dupon, Starzl, Rappaport, Monaco, Salvatierraをはじめ多数の人が参加しUCLA同窓会を兼ねた受賞パーティーが盛大に開催された)。

本会議に先立ち前日に、学会主催のシンポジウム(Cadaveric organ procurement)と2つのサテライトシンポジウム(Optimal immunosuppressive regimens for various organ transplantationおよびThe need for microchimerism to produce allograft tolerance)が開催された。本会議は7会場でpreinary sessionを除きparallel sessionの形で行われ、26のトピックスについて活発な議論、討論が展開された。一般演題を大別すると、腎移植の臨床関係、肝移植の臨床関係が最も多く、次いで臨床、動物実験を含む移植免疫関係の発表が上位を占めていたが、最近移植関係者が特に注目している異種移植関係の発表が多かったのも本会の特徴であろう。今春には学会の論文集がTransplantation Proceedingsに掲載されるので、詳細なデータは個々で参照されたい。

“印象記”を依頼された特権を生かし、我々が研究を進めている異種移植に関し興味ある発表について簡単にレビューしようと思う。現在ヒトに対する

異種ドナー源は動物愛護や絶対個数などの問題で霊長類からブタに移行しつつある。異種ドナーとしてブタが一躍注目されたのは、ケンブリッジ大学のWhiteが1993年にヒトの補体活性抑制遺伝子であるDAF遺伝子の導入に成功してからである。今回の学会でもWhiteグループとMGHのSachsグループが大動物を用いた多くのデータを発表していた。WhiteらはDAF transgenicブタ臓器をヒトに移植する前段階として、霊長類(cynomolgus monkey)をrecipientとした異所性心移植を施行し各種免疫抑制剤の拒絶反応抑制効果と血管内皮細胞における血栓形成防止効果の検討を行った。使用した免疫抑制剤はcyclosporin A(CyA), cyclophosphamide(CyP), methylprednisolone(MP)で移植前3剤投与群(n=10)と非投与群(n=5)で生着率および血中C3, C4, C9, IgGの変異について検討を行った。移植前投与群の平均生着率は40日で2頭が拒絶反応により、また非投与群の生着率は平均9日で全例、急性拒絶反応により廃絶した。移植実験に先立って行われたin vitroの抑制試験でCyPが一番抑制率が高かったため、移植実験の際CyPの有効投与量を確認するため2系統の投与実験(21.8 mg/Kg/day, 12.2mg/Kg/day)を行った。高濃度CyP投与群では拒絶反応や感染症また血中補体濃度の上昇、骨髄抑制などの副作用も認めず異種移植においてCyPが最も優れた抑制効果を示すことが示唆された。ヒトDAF transgenicブタ内皮細胞と霊長類(Cynomolgus monkey)の凝固因子との相関関係はin vitro実験において凝固防止効果が認められていたが、移植実験での検討はなされていなかった。異所性心移植を15例施行しdonor心内皮細胞の血栓形成防止効果に対する検討を行った。DAF非導入ブタ(control)では接着因子、凝固系の活性化による超急性拒絶反応が起こったが、DAF導入ブタではdelayed vascular rejectionが起こるものの補体の活性化に伴う内皮細胞の破壊と血栓形成は認められず、discordantの異種移植にとってDAF遺伝子導入donorは有効であることが大動物を用いた移植実験で初めて証明された。

SachsらはNIHミニブタを用いた異種、同種移植で全身x線照射(TBI)、胸腺切除、免疫抑制剤混合投与、donor骨髄移植により特異的な免疫寛容導入やGal- α -1,3 Gal自然抗体の除去についての検討を行った。Concordantな移植実験でTBI, donor骨髄移植、免疫抑制剤の組み合わせにより免疫寛容状態の導入に一部成功したものの、過剰な免疫抑制剤投与など問題が多くヒトへの応用にはほど遠い感強い。Recipient血清中のGal- α -1,3 Gal自然抗体の除去のためaffinity columnを用いた吸着後、移植実験を行い、抗体価の変動について検討を行った。免疫抑制剤投与下で初期の抗体価の30-50%に押さえることができrecipient血清中の自然抗体をコントロールできる可能性が示唆された。

最後に国際学会のもう一つのお楽しみ、entertainmentについて。Welcome partyは会場に隣接したカタルーニャ博物館前の広大な敷地を囲って盛大に行われた。久しぶりに合う留学中の友人や外国の知人と再会しふだんに用意された伝統的な食べ物、ワインを腹一杯押し込み歓談しつつバルセロナの夜はふけていった。翌日の夜はスペインがというよりカタルーニャ地方が世界に誇る3大テナーの一人で骨髄移植を受けながら奇跡のカムバックをはたしたホセ・カレーラスのコンサートが開催された。参加者が予想以上に多く一晩で2回のコンサートがあったにもかかわらず用意した席が不足し、もめる一幕もあった。Farewell partyはバルセロナ市を一望できる山の上にあるTibitabo Amusement Park(巨大な遊園地)を貸し切って開催された。入り口で風船、お揃いのリュックサックをわたされ老いも若きも男も女も、みな子供に戻って深夜まで大いに楽しんだ。

ブタをヒトの異種donorに想定した実験はまだ端緒についたばかりであるが、ヒト遺伝子導入派と免疫寛容導入派に大別されつつある。世界的な同種donor不足が社会問題となって久しいが、これからの移植医療、研究の中心が異種に移行していくことは避けがたい現実であることを痛感した学会であった。

〔書評〕

TRANSPLANTATION IMMUNOLOGY

Fritz H. Bach, Hugh Auchincloss, Jr. 編

WILEY-LISS, Inc. 発行(1995年/¥11,990)

佐田 正晴

国立循環器病センター研究所, 実験治療開発部

本書はハーバード大学のF.H. Bach, H. Auchinclossが編者となりBachをはじめMonaco, Morris, Sachs, Singer, Sutherlandなど移植や移植免疫でお馴染みの人々が共同執筆し平易な文章と図表により移植免疫の入門書として格好の好著である。

近代移植免疫学はMedawarが“同種移植片の認識, 拒絶はリンパ球の関与により行われる”ことを初めて証明したことに端を発し, MLC反応をはじめとする“allograft reaction”の機構が徐々に解明されると共に確立されていった。その後 helper Tリンパ球, suppressor Tリンパ球に代表される免疫担当細胞の相互関係や, それら細胞の分化, 増殖に関与するインターフェロンをはじめ様々なcytokineが発見され移植免疫の概要が明確化されていった。Snellらは近交系マウスを確立し移植実験結果から, マウスのMHCであるH-2抗原系が同種移植片の生着, 拒絶に強く関与するのみならず全ての免疫応答現象を制御していることを証明した。同様な解析は人でも行われ現在のHLA抗原系の基礎が確立されると共に“HLAと移植”, “HLAと疾患”など多くの研究成果が発表されてきた。現在MHCの遺伝子解析やHLA抗原と結合するペプチドの解析が進み移植免疫や疾患発症機構の解明に更なる期待が寄せられている。

HLAを含め移植免疫に関する総論, 総説はサイクロスポリンが移植に導入され移植症例が飛躍的に増加した1980年代には内外を問わず盛んに発行され

ていたが最近あまり発行されていない。発行されている移植関係の本も臓器別になり移植の全体像を把握することは出来ない。

本書は移植医や移植領域の研究者のための入門書として発行され当然ながら全編, 移植医療を取り巻く免疫機構の解説に当てられている。内容は,

- I. Major and minor histocompatibility antigens
- II. Immunobiology of graft rejection
- III. Clinical transplantation
- IV. Frontiers in transplantation

の4章に大別されている。IおよびII章は主要, 副組織適合性抗原系の概要と移植免疫との関連, 移植片拒絶に関する細胞性免疫および液性免疫機構の解説に当てられている。特にI章はHLA抗原の分子構造, 抗原結合部位, HLA遺伝子領域, HLA DNA typing法から副組織適合性抗原系まで最近の知見も含め非常に簡潔に判りやすく解説されている。II章は移植片の拒絶について細胞性免疫, 液性免疫に分類しそれぞれ明快な図表と共に順序立てて解説され拒絶反応の作用機序を理解するうえで大変便利である。III章では同種移植の臨床を中心にまとめられ現在世界中で行われている各種臓器移植の現況が網羅されているのみならず, これまでいわゆる“臓器移植の総説”から除外されていた骨髄移植やラ氏島移植まで解説されている。更に移植前のcrossmatch検査, 術前輸血, ドナー血輸血などの意義が簡潔に論じられると共に, 最後に現在使用さ

れている全ての免疫抑制剤に関する解説がなされ臨床移植の実際を短時間で理解するうえで大変有り難い。IV章は二つに大別されている。最初は同種移植医療のこれからの戦略や夢、すなわちキメリズムの作成、胸腺内細胞移植、モノクローナル抗体処理、ドナー骨髄移植、抗原提示細胞操作などによる免疫寛容の導入が実験データを基に展開されている。後半には移植医療がめざす究極の移植、異種移植における拒絶機構の解説が最近の知見も含め詳細かつ簡潔に記載されている。また現在異種ドナー動物として世界中で注目されているブタのSLA (Swine Leukocyte Antigen) の概略も記載されている。

最後にDNAからsequencing, transgenic動物にいたる理論と方法論の概略が明快なカラー図と簡潔な文章でつづられ本書は締めくくられている。1995年に発行されたにも関わらず1994年代の文献やデータが引用されているだけでなく移植免疫の将来をも予測し単なる入門書で終わらしていないのも本書の特徴であろう。また臨床家を主な対象として書かれてはいるが平易な文章とたくみな構成は、最近発行された移植免疫関係の入門書としては最高位にランクされるべき一冊で学会会員諸氏に是非購読を薦めたい。

第6回 日本組織適合性学会大会

The 6th Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI) Annual Meeting
April 25-26, 1997

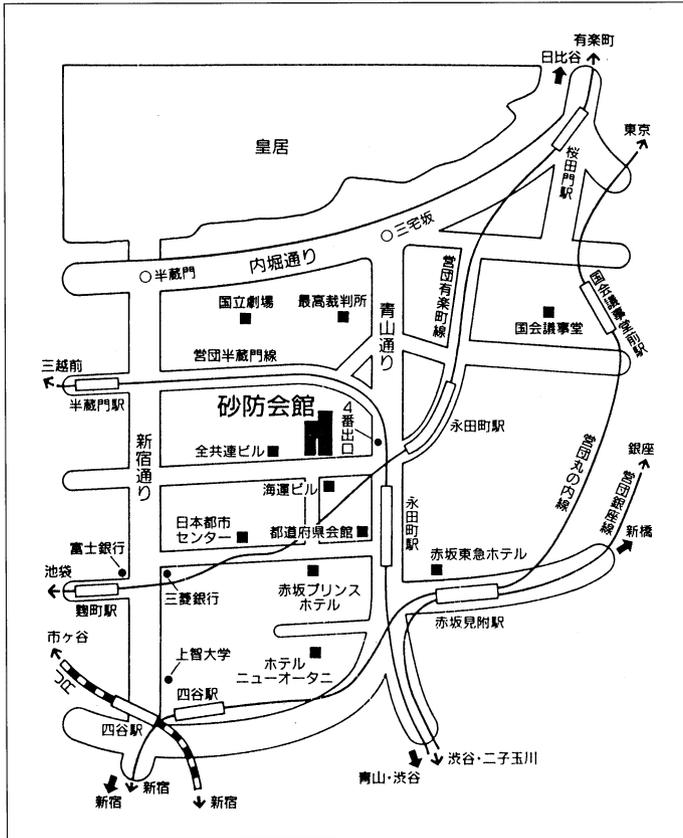
大会長 関口 進 (防衛医科大学校検査部)

会 期 平成9年4月25日 (金), 26日 (土)

会 場 砂防会館別館1階
シェーンバッハ・砂防「淀・信濃」
〒102 東京都千代田区平河町2-7-5
大会本部直通 010-887-3667
会館受付電話 03-3261-8386 (代表)
会館FAX 03-3261-5449

事務局 防衛医科大学校検査部
〒359 埼玉県所沢市並木3-2
事務局直通 010-887-3667
検査部 0429-95-1511 内線3721
FAX 0429-96-5217 (検査部直通)

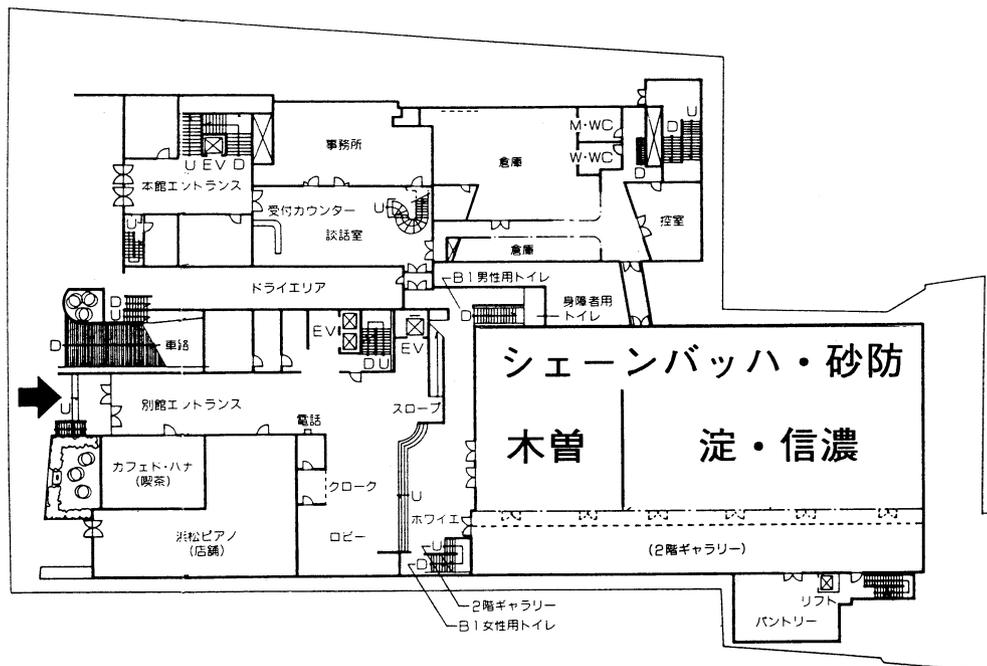
会場への交通案内



■交通のご案内

- 地下鉄〈有楽町線〉〈半蔵門線〉永田町駅・4番出口より徒歩1分
- 地下鉄〈銀座線〉〈丸の内線〉赤坂見附駅より徒歩5分

会場案内図 (シェーンバッハ・砂防)



理事会・評議員会・総会のお知らせ

- 理事会：平成9年4月25日（金）14：00～15：00
砂防会館別館3階「立山」
- 評議員会：平成9年4月26日（土）9：00～10：00
砂防会館別館3階「立山」
- 総会：平成9年4月26日（土）13：00～13：30
砂防会館別館1階，シェーンバッハ・砂防「淀・信濃」

MHC 編集委員会のお知らせ

平成9年4月25日（金）18：00～18：30
砂防会館別館3階「立山」

会員懇親会のご案内

- 日時：平成9年4月25日（金）18：30～20：30
- 会場：日本海運倶楽部，2階大ホール（国際会議場）
〒102 東京都千代田区平河町2-6-4
Tel 03-3264-1825
砂防会館の向かいです。
- 会費：3,000円

陸上自衛隊中央音楽隊（11名）による演奏会を同時に開催します。ふるってご参加ください。

お知らせとお願い

I. 大会参加の各位に

1. 登 録：

- (1) 受付時間：平成9年4月25日（金）8：30～18：10
26日（土）8：30～17：00
- (2) 受付場所：砂防会館別館1階，シェーンバッハ・砂防ロビー
- (3) 参加費：5,000円
参加者は参加費を支払い領収書兼参加証をお受け取りください。

2. 年会費・新入会会員受付：

- (1) 受付場所：砂防会館別館1階，シェーンバッハ・砂防ロビー
- (2) 年会費：5,000円

3. 呼び出し：

呼び出しスライド，または会場の掲示板を使用します。大会本部または総合受付にお申し込みください。

4. 機器・試薬展示：

会 場：砂防会館別館1階，シェーンバッハ・砂防「木曾」

5. ドリンクサービス：

機器・試薬展示場でコーヒー，ジュースなどのサービスを行っておりますのでご利用ください。

II. 発表者の各位に

1. 口 演：

- (1) 一般演題の口演時間は8分，討論時間は2分です。口演時間は厳守してください。
- (2) シンポジウム・ワークショップの口演時間は，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。
- (3) 所定時間1分前に青ランプ，終了時に赤ランプでお知らせします。討論については座長の指示に従ってください。
- (4) 次演者，次座長は所定の席でお待ちください。
- (5) MHC編集委員会では大会の各座長にご担当のセッションでMHCに投稿論文としてまとめていただきたい演題を推薦していただく予定です。推薦状がお手元に届きましたら，ご多忙の処，誠に恐縮ですが，MHCへのご投稿をご考慮くださいますようお願い致します。

2. スライド：

- (1) スライドはすべて35mmライカ判に限定します。なるべく横長のスライドでお願い致します。
- (2) スライドプロジェクターは会場に1台用意します。
- (3) スライド枚数は，10枚以内に限定します。同じスライドを2度以上使用する場合には，別途ご用意く

ださい。なお、シンポジウム・ワークショップについて枚数の制限はございませんが時間内に終わるようご注意ください。

- (4) スライドは各自所定のマウントに入れて、スライド受付にて試写の上提出してください。
- (5) スライドの進行は口頭で指示してください。
- (6) スライドの提出は、口演当日の1時間前までにスライド受付に提出してください。ただし9時30分までの演題については発表30分前で結構です。
- (7) 発表後は各自のスライドを受付にてお引き取りください。

III. 座長の先生へ

- (1) 担当セッション開始30分前までに総合受付に必ず申し出てください。
- (2) 担当セッション開始15分前までに所定の席へお着きください。
- (3) 進行はご一任しますが、時間厳守でお願いします。

第 6 回日本組織適合性学会大会日程表

第 1 日 4 月 25 日 (金)		第 2 日 4 月 26 日 (土)	
主 会 場 (淀・信濃)		展示会場 (木 曽)	
主 会 場 (淀・信濃)		展示会場 (木 曽)	
9:00	開 会 式		
	移植・輸血 (1)	一般演題	クラス I (2)
10:00	移植・輸血 (2)		クラス I (3)
11:00	抗原認識・ペプチド	機器・試薬 展 示	シンポジウム
	疾患感受性 (1)	ドリンク サービス	「日本における組織適合性の展望」
12:00	ランチョンセミナー 「ワンラムダ・マイクロSSPシステム」 Low & High resolution HLA DRB/DQB typing 提供 (株) ベリタス		ランチョンセミナー 「HLA SBT の特徴 と自動化への可能性」 提供 アプライドバイオシステムズ
13:00	特別講演 Paul I. Terasaki 教授 「HLA の現在・過去・未来」		総 会
14:00	クラス I (1)	理事会 3 階 (立山)	一般演題 MIC 遺伝子の構造
15:00	クラス II		クラス II 遺伝子の構造
16:00	クラス I 遺伝子の構造		ワークショップ
17:00	疾患感受性 (2)		「HLA タイピングの QC」 (1) 血清学的タイピング (2) DNA タイピング
18:00	異種MHC (1)		閉 会 式
	異種MHC (2)	編集委員会 (立山)	
19:00	懇 親 会		
20:00	日本海運倶楽部 2 階 大ホール (国際会議場)		

陸上自衛隊中央音楽隊のプロフィール

1951年創立



中央音楽隊は昭和26年6月、現在の陸上自衛隊の前身である警察予備隊の音楽隊として、全国から47名の隊員を選抜して発足しました。以来45年余、現在では隊長以下114名の隊員を有し、日本を代表する吹奏楽団として全国的に演奏活動を行っています。

中央音楽隊は防衛庁長官直轄の音楽隊で、最も重要な仕事は迎賓館赤坂離宮における国賓・公賓の歓迎式典での演奏です。昭和32年10月以降、歓迎式典の演奏は全て中央音楽隊が担当しています。参加する国家的行事も数多く、天皇陛下即位の礼、皇太子殿下御成婚パレードをはじめ、世界的なスポーツの祭典や国際博覧会の華やかなファンファーレと厳粛なセレモニー、世界各国の国歌の演奏まで、中央音楽隊は行事の成功に大きな役割を果たしています。東京都内で開催される年三回の定期演奏会、室内楽演奏会それにオフィス街のランチタイム・コンサートの他に全国各地への演奏旅行など、中央音楽隊の演奏活動は多彩です。また、中央音楽隊には教育部門が設けられており、全国の陸上自衛隊音楽隊員に対する音楽教育も行っています。

Profile of Central Band Japan Ground Self Defense Force

Since 1951

The Japan Ground Self Defense Force Central Band was organized as the National Police Reserve Force Band on June 2, 1951.

At that time the Band consisted of 47 members selected from all over Japan. The name was later changed to the National Safety Force Band, and subsequently to the present one.

The Band is currently stationed at Camp ASAKA, Oizumi Gakuen-cho, Nerima-ward, Tokyo, with 114 members under the commander.

The Central Band directly reports to Director General, Defense Agency. It's most important mission is to play music during special honor guard ceremony. The band has played the music for every national guest who has arrived at Haneda Airport or Akasaka National Guest House since October 1957.

The another important mission for the Band is participation in various national events. The Band performs many important roles such as playing the fanfare and national anthems at ceremonies and parades.

The Band plays at concerts and other activities in excess of 120 times a year. Every performance including regular, family, chamber and lunchtime concert always attracts large audience. The band has traveled to more 900 cities and towns for concerts.

The central Band is also responsible for the music education of GSDF musicians. This education includes basic, intermediate and advanced courses for NCO and basic course for officers.

プログラム

特別講演

4月25日（金） 13:00～14:00

座長 防衛医科大学校検査部 関口 進

「HLAの過去・現在・未来」

カリフォルニア大学ロサンゼルス校外科学 Paul I. Terasaki

シンポジウム

4月26日（土） 10:00～12:00

座長 昭和大学医学部細菌学 吉田 孝人

「日本における組織適合性の展望」

S-1. 移植と組織適合性抗原

北里大学医学部免疫学 柏木 登

S-2. 非血縁者骨髄移植とHLA

日赤中央血液センター 十字 猛夫

S-3. MHC・ペプチド・TCR複合体がもたらすもの

九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門 笹月 建彦

S-4. 組織適合性研究の展望——人類遺伝学の視点から

東京大学医学部人類遺伝学 徳永 勝士

ワークショップ

4月26日(土) 14:40~17:10

座長 防衛医科大学校検査部 関口 進
国立循環器病センター研究所 佐田 正晴

「HLA タイピングの QC」

I. 血清学的タイピング

W-1. The International Cell Exchange

UCLA 外科学 秦 美暢

W-2. Producing and Improving Quality HLA Serological Typing Trays

One Lambda, Inc. Jimmy Loon

W-3. HLA タイピングの品質維持

(株) エス・アール・エル 小川 公明

W-4. 血清学的 HLA タイピングの QC について

日赤中央血液センター 田中 秀則

II. DNA タイピング

W-5. HLA-DNA タイピングにおける QC

東海大学医学部分子生命科学 猪子 英俊

W-6. QC ワークショップ報告

防衛医科大学校検査部 小林 賢

W-7. QC の必要性と今後について

埼玉医科大学総合医療センター輸血部 前田 平生

ランチョンセミナー I

4月25日（金） 12：00～13：00

「ワンラムダ・マイクロ SSP システム」

Low and High Resolution HLA DRB/DQB Typing

- L-I-1. マイクロ SSP DNA タイピングキットを用いた HLA-DRB, DQB アリルタイピング
ワンラムダ社 齊藤 克行

ランチョンセミナー II

4月26日（土） 12：00～13：00

座長 東海大学医学部分子生命科学 猪子 英俊

「HLA Sequencing-Based Typing の特徴と自動化への可能性」

- L-II-1. HLA-DRB Sequencing-Based Typing システムの特徴と利点
アプライドバイオシステムズ事業部 坂部 宗親
- L-II-2. 自動 DNA シークエンサーによる HLA-SBT と PCR-RFLP 法の比較検討
東海大学医学部分子生命科学 成瀬 妙子

一般演題

移植・輸血 (1) 4月25日 (金) 9:30~10:10

座長 福岡大学病院腎センター 小河原 悟

1. ABO 式血液型関連抗原を認識する非 HLA リンパ球細胞障害性抗体の反応性解析
北海道赤十字血液センター ○関本 達也, 森下 勝哉, 芳賀 寛史, 佐藤進一郎
加藤 俊明, 池田 久實, 関口 定美
2. 抗 HLA 抗体消失後も HLA 適合血小板輸血が効果的
福島医科大学輸血部 ○佐藤久美子, 安田 広康, 加藤久美子, 大戸 斉
阿部 力哉
同 第一内科 丸山 幸夫
3. 死体腎移植希望登録患者の HLA 再検査で相違のあった抗原の検討
福岡大学病院腎センター ○栗田 麗子, 渡辺 真穂, 長谷川善之, 田中智一郎
小河原 悟, 兼岡 秀俊, 内藤 説也
福岡赤十字病院 友松 哲夫, 猪口 玉恵
4. 死体腎移植における ABDR ゼロミスマッチ移植症例の成績と最近の変化
UCLA Tissue Typing Laboratory ○秦 美暢, JM Cecka, PI Terasaki

輸血・移植 (2) 4月25日 (金) 10:10~10:50

座長 埼玉医科大学総合医療センター輸血部 前田 平生

5. 日本人の CD31 多型と HLA 一致同胞間骨髄移植の Acute GVHD と CD31 多型の適合性との相関
——CD31 は 'Major' minor histocompatibility antigen か?——
京都府赤十字血液センター ○丸屋 悦子, 佐治 博夫, 横山 茂樹
佐久総合病院内科 関 茂樹
兵庫医科大学輸血部 甲斐 俊朗
山口大学病院輸血部 藤井 康彦
京都大学病院小児科 秋山 祐一

6. 臍帯血リンパ球の HLA 抗原発現およびアロ抗原反応性・刺激能に関する検討

東海大学病院細胞移植医療センター ○土田 文子, 萩原 政夫, 佐藤 忠之, 佐藤 薫
加藤 俊一
東海大学医学部移植免疫学 辻 公美

7. 臍帯血における HLA ハプロタイプの解析

関西医科大学輸血部 ○松崎 龍典, 野村 昌作, 石田 萌子, 福原 資郎
同 小児科 緒方 肇, 小林陽之助

8. The beneficial effect of HLA-DPB1 and HLA-A matching in corneal transplantation

東海大学医学部移植免疫学 ○Batmunkh Munkhbat, 萩原 政夫
Balgansuren Gansuvd, 辻 公美
東海大学病院細胞移植医療センター 佐藤 忠之, 土田 文子, 佐藤 薫
東京歯科大学眼科学 Jun Shimazaki, Kazuo Tsubota

抗原認識・ペプチド 4月25日 (金) 10:50~11:30

座長 東京大学医科学研究所癌体質学 滝口 雅文

9. HLA-E および HLA-G の発現とそれらの結合ペプチドについて

奈良県立医科大学法医学 ○石谷 昭子, 下嶋 典子, 長池智恵子, 羽竹 勝彦
Fred Hutchinson Cancer Research Center Daniel E. Geraghty

10. HLA-DR9トランスジェニックマウスにおけるヒトアセチルコリンリセプターペプチドの反応

旭川医科大学第2病理学 ○小林 博也, 小久保 拓, 佐藤 啓介, 木村 昭治
片桐 一

11. HLA-DR により提示された Ras あるいは p53ペプチドに反応するヒト T 細胞の解析

熊本大学大学院医学研究科免疫識別学 ○西村 泰治, 横溝 博, 藤田 博, 千住 寛
松下 祥
熊本大学医学部第2外科 小川 道雄
同 腫瘍医学 佐谷 秀行
理化学研究所細胞情報伝達 白水美香子
東京大学理学部生物化学 横山 茂之

12. HLA-DR β 37残基の多型が T 細胞による抗原ペプチドの認識に与える影響の解析

熊本大学大学院医学研究科免疫識別学 ○Chen Yu-Zhen, 松下 祥, 西村 泰治

疾患感受性 (1) 4月25日 (金) 11:30~12:00

座長 東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患異常代謝 木村 彰方

13. 日本人 IDDM 患者において GAD65 自己反応性 T 細胞が認識する HLA クラス II・ペプチド複合体の同定
 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学 ○田畑 博己, 金井 隆幸, 松下 祥, 西村 泰治
 同 医学部小児科 西山 宗六, 松田 一郎
 国立都城病院小児科 藤本 茂紘
14. 膵島抗原 ICA69 に対する IDDM 患者リンパ球の反応
 旭川医科大学第 2 病理 ○佐藤 啓介, 荻野 武, 小林 博也, 木村 昭治
 片桐 一
15. サハリン島ニブキ族の HLA タイプ
 鹿児島大学医学部ウイルス学 ○桑山 昌洋, 屋敷 伸治, 楼 宏, 李 洪川
 藤吉 利信, 園田 俊郎
 同 第三内科 末原 雅人, 納 光弘
 京都大学ウイルス研究所病原ウイルス 山下満左裕, 速水 正憲

クラス I (1) 4月25日 (金) 14:00~14:30

座長 日赤中央血液センター 石川 善英

16. 献腎移植全国共通 HLA クラス I タイピング用トレイ (JNOS1.1) の評価
 国立佐倉病院 HLA 検査室 ○山崎 正明, 苅部 正宏, 飯田 好江
 同 臨床研究部 酒巻 建夫
 同 外科 柏原 英彦
 昭和大学医学部細菌学 吉田 孝人
17. 生体血縁間腎移植症例における HLA class I の DNA タイピング
 広島大学医学部第 2 外科 ○新宅 究典, 星野 修司, 田代 裕尊, 古川 雅博
 大段 秀樹, 住元 了, 桜田 瞳, 浅原 利正
 土肥 雪彦
 県立広島病院第 1 外科 福田 康彦
 東京医科歯科大学難治研成人疾患異常代謝 木村 彰方
 久留米大学医学部小児科 伊達 是志

18. Soluble form of HLA class I antigen (sHLA) inhibits the induction of EB virus specific cytotoxic T lymphocytes and suppresses their activity *in vitro*

東海大学医学部移植免疫 ○Balgansuren Gansuud, Batmunkh Munkhbat
 辻 公美
 東海大学病院細胞移植医療センター 萩原 政夫

クラスII 4月25日 (金) 14:30~15:10

座長 防衛医科大学校検査部 小林 賢

19. 死体腎移植オンコール検査に適した PCR-MPH 法の改良

—DRB1 low high および DQB1 low resolution level の同時検査—

虎の門病院輸血部 ○金 信子, 高橋 孝喜
 日本赤十字社中央血液センター 柏瀬 貢一, 赤座 達也
 湧永製薬バイオ研究所 川井信太郎, 加藤 邦樹
 東京大学医学部人類遺伝学 徳永 勝士

20. 直接塩基配列決定法による *HLA-DNA* 遺伝子の多型性解析

東海大学医学部分子生命科学 ○成瀬 妙子, 河田 寿子, 松澤由美子, 猪子 英俊
 横浜市立大学医学部眼科 鍵谷 雅彦
 兵庫県赤十字血液センター 能勢 義介
 ナベヤクリニック 鍋谷 登
 大阪市立大学医学部小児科 一色 玄

21. 血液直接 PCR 法による *HLA-DNA* タイピングの検討

島津製作所基盤技術研究所 ○西村 直行, 中山 知子, 吉田 玲子, 児嶋 浩一
 慶応大学医学部微生物学 加藤 真吾
 東海大学医学部分子生命科学 成瀬 妙子, 猪子 英俊

22. PCR-SSP 用泳動板の改良

国立佐倉病院臨床研究部 HLA 検査室 ○酒巻 建夫, 苅部 正宏, 飯田 好江, 山崎 正明
 柏原 英彦

クラス I 遺伝子の構造 4月25日 (金) 15:10~15:50

座長 北里大学医学部免疫学 大谷 文雄

23. HLA クラス I 領域におけるシーケンシング解析

 1, *IκBL* 遺伝子から *S* 遺伝子間452 kb のシーケンシング解析

東海大学医学部分子生命科学	○	椎名 隆, 田宮 元, 岡 晃, 水木 信久	
		後藤 香, 山形 直美, 吉川 枝里, 木村 穰	
		猪子 英俊	
不二家バイオ研究所		福住 康仁, 菅原 智代, 田口 進, 渡辺 幸治	
		小野 綾子, 山崎 正明, 田代 弘行	
国立遺伝学研究所進化遺伝		山形 哲司, 池村 淑道	

24. HLA クラス I 領域におけるシーケンシング解析

 2, *HSR1* から *HLA-92* 間314 kb のシーケンシング解析

東海大学医学部分子生命科学	○	岡 晃, 椎名 隆, 田宮 元, 山形 直美	
		吉川 枝里, 木村 穰, 猪子 英俊	
不二家バイオ研究所		福住 康仁, 菅原 智代, 田口 進, 渡辺 幸治	
		小野 綾子, 山崎 正明, 田代 弘行	
国立遺伝学研究所進化遺伝		山形 哲司, 池村 淑道	

25. HLA クラス I 領域におけるシーケンシング解析

3, HLA クラス I 領域におけるシーケンシング効率

東海大学医学部分子生命科学	○	山形 直美, 椎名 隆, 田宮 元, 岡 晃	
		水木 信久, 後藤 香, 吉川 枝里, 木村 穰	
		猪子 英俊	
不二家バイオ研究所		福住 康仁, 菅原 智代, 田口 進, 渡辺 幸治	
		小野 綾子, 山崎 正明, 田代 弘行	
国立遺伝学研究所進化遺伝		山形 哲司, 池村 淑道	

26. HLA クラス I 領域におけるシーケンシング解析

 4, *S* 遺伝子から *HSR1* 間における BAC クロンの整列化

東海大学医学部分子生命科学	○	吉川 枝里, 椎名 隆, 田宮 元, 岡 晃	
		山形 直美, 木村 穰, 猪子 英俊	
不二家バイオ研究所		福住 康仁, 菅原 智代, 田口 進, 渡辺 幸治	
		小野 綾子, 山崎 正明, 田代 弘行	
国立遺伝学研究所進化遺伝		山形 哲司, 池村 淑道	
三重大大学生物資源		奥村 克純	

疾患感受性 (2) 4月25日 (金) 15:50~16:30

座長 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学 西村 泰治

27. ANCA 陽性血管炎と HLA

福岡大学病院腎センター ○田中智一郎, 長谷川善之, 小河原 悟, 村田 敏晃
兼岡 秀俊, 内藤 説也
川浪病院腎センター 道永 功

28. HCV 陽性心筋症及び心サルコイドーシスにおける HLA 抗原の多型性解析

東海大学医学部分子生命科学 ○松澤由美子, 成瀬 妙子, 猪子 英俊
京都大学医学研究科循環器病態学 松森 昭
湘南赤十字血液センター 安藤 等
横浜市立大学医学部眼科 石原 麻美

29. 無精子症と HLA

国立循環器病センター研究所 ○佐田 正晴, 式田 有里, 辻 隆之
大阪大学医学部泌尿器科 高原 史郎, 辻村 晃, 奥山 明彦
東海大学医学部分子生命科学 成瀬 妙子, 猪子 英俊

30. グアテマラにおけるシャーガス病の免疫遺伝学的解析

埼玉医科大学医動物学 ○平山 謙二, Sandra Juarez, 菊池三穂子
曾根 敏雄
長崎大学熱帯医学研究所原虫 柳 哲雄, 多田 功
Dept. of Cyto., Facul. of Chem.Scie. and Pharm. Maria Paula de Lopes, Vivian Matta
USAC
国際協力事業団 金子 聡, Oscar Ayau, Julio Argueta
Milta Iraheta, Tamara Obispo
産業医科大学熱帯病 森本 勲, 嶋田 雅暁

異種 MHC (1) 4月25日 (金) 16:30~17:20

座長 東京大学医学部人類遺伝学 徳永 勝士

31. ウズラの MHC 領域におけるシークエンシング解析

——ウズラの Mhc (Coja) クラス I 領域における遺伝子解析——

東海大学医学部分子生命科学 ○椎名 隆, 岡 晃, 猪子 英俊
東京農大農学部家畜生理学 半沢 恵, 渡辺 誠喜

32. ウズラの MHC 領域におけるシーケンシング解析
 ——ウズラ Mhc (*Coja*) クラス II 領域における遺伝子解析——
 東海大学医学部分子生命科学 ○岡 晃, 椎名 隆, 猪子 英俊
 東京農大農学部家畜生理学 半沢 恵, 渡辺 誠喜
33. 少なくとも 2 つ存在する *DLA-DRB* 遺伝子座
 北里大学医学部免疫学 ○伊東 一郎, 渡部 浩二, 柏木 登
 同 泌尿器科 須山 出穂
34. プターヒト MLR で高反応を示す HLA-DR13 抗原の Xeno Tissue Typing (Southern Blot と Xeno-MLR) の解析
 東海大学病院細胞移植医療センター ○佐藤 忠之, 土田 文子, 萩原 政夫
 東海大学医学部移植免疫 バトムンフ・ムンフバト, 辻 公美
 日生研 上田 進
 国立佐倉病院外科 坂本 薫
 聖マリアンナ医科大学難治研センター 増子 佳世
 九州大学生体防御医学研究所 山本 一彦
35. ミニプタの主要組織適合複合体 (SLA) クラス II 抗原 α 鎖 cDNA の分離とその遺伝子解析
 東京農業大学農学部家畜育種学 ○馬場 珠美, 田中 一栄
 東海大学医学部分子生命科学 椎名 隆, 安藤 麻子, 猪子 英俊
 東京医科大八王子医療センター外科臓器移植部 松野 直徒, 桜井 悦夫, 長尾 桓

異種 MHC (2) 4月25日 (金) 17:20~18:00

座長 東海大学医学部分子生命科学 猪子 英俊

36. ウシ MHC (BoLA) クラス II 遺伝子の発現と機能解析
 理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室 ○間 陽子, 井鍋 一則, 西野 佳以, 田島 茂
37. 牛白血病ウイルスによる白血病発症の感受性を規定するウシ MHC クラス II 遺伝子の解析
 理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室 ○竹嶋伸之輔, 長岡 淑子, 間 陽子
 東北大学農学部動物微生物科学 中井 裕
38. ウシ主要組織適合クラス II DM 抗原及びインバリアント鎖の cDNA の分離と分子構造の解析
 理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室 ○間 陽子, 新美 正史

39. ヒツジ MHC (OLA) クラス II 遺伝子多型性と牛白血病ウイルス (BLV) 抵抗性との相関
 理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室 ○長岡 淑子, 飯泉明宮美, 間 陽子
 東北大学医学部付属動物実験施設 笠井 憲雪

クラス I (2) 4月26日(土) 9:00~9:30

座長 日赤中央血液センター 田中 秀則

40. Multiple Antigenic Peptide を用いたイムノプロット用抗 HLA-A 抗原血清の作製
 愛知県赤十字血液センター ○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
41. 日本人の HLA-B58 アリルの同定とそのハプロタイプ
 日赤中央血液センター ○井上 隆弘, 小川 篤子, 柏瀬 貢一, 田中 秀則
 赤座 達也, 田所 憲治, 十字 猛夫
 星薬科大学薬学部生物活性 高橋 朋子
 東京大学医学部人類遺伝学 徳永 勝士
42. 血清学的タイピングを必要としない HLA-B アリルタイピング法
 東京都赤十字血液センター研究部 ○坂内 誠, 三富 斉忠
 東京大学医学部人類遺伝学 徳永 勝士
 日赤中央血液センター 赤座 達也, 十字 猛夫

クラス I (3) 4月26日(土) 9:30~10:00

座長 長野県赤十字血液センター 斉藤 敏

43. Molecular diversity of *HLA-C* gene in a Northern Han population.
 日赤中央血液センター検査3課 ○Huiru Wang, 石川 善英, 田中 秀則
 柏瀬 貢一, 赤座 達也, 田所 憲治, 十字 猛夫
 東京大学医学部輸血部 柴田 洋一
 同 人類遺伝学 徳永 勝士
 Harbin Blood Center, Harbin, China Guanjiun Jia

44. Cw*0403を検出する抗体と PCR-SSP 法での確認

神奈川県赤十字血液センター検査課

○中島 文明, 中村 淳子, 岡野 俊生, 森知 恵子
横田 敏和, 伊藤 仁, 木村亮太郎

45. 顆粒球抽出アロ抗原について

兵庫県赤十字血液センター

○荒木 延夫, 秋田 真哉, 藤原 宝, 合志 博司
能勢 義介, 神前 昌敏

MIC 遺伝子の構造 4月26日 (土) 13:30~14:10

座長 東海大学医学部分子生命科学 安藤 麻子

46. MICA エクソン 5 内 GCT 多型と HLA-B 抗原との相関

信州大学医学部法医学	○太田 正穂
同 病院薬剤部	勝山 善彦
神奈川県湘南赤十字血液センター	安藤 等
横浜市立大学医学部眼科	水木 信久
信州大学医学部臨床検査学	降旗 謙一
東海大学医学部分子生命科学	猪子 英俊

47. 日本人を含めた 9 民族における MICA 遺伝子エクソン 5 内の GCT 多型

信州大学病院薬剤部	○勝山 善彦
同 医学部法医学	太田 正穂
神奈川県湘南赤十字血液センター	安藤 等
横浜市立大学医学部眼科	水木 信久
信州大学医学部臨床検査学	降旗 謙一
東海大学医学部分子生命科学	猪子 英俊

48. MICA 遺伝子多型と高安病

東京医科歯科大学難治研成人疾患異常代謝

○木村 彰方, 大淵 信久, 佐藤 真夏

49. 新しい HLA クラス I 様遺伝子 MICB の多型性解析

神奈川県湘南赤十字血液センター	○安藤 等, 宮田 義久, 脇坂 和男
横浜市立大学医学部眼科	水木 信久
信州大学医学部法医学	太田 正穂
不二家バイオ研究所	山崎 正明, 田代 弘行
東海大学医学部分子生命科学	猪子 英俊

クラスII遺伝子の構造 4月26日(土) 14:10~14:40

座長 国立循環器病センター研究所 佐田 正晴

50. HLA クラスII領域のセントロメア側のシーケンシング解析並びにマウス嚢胞性腎疾患発症関連遺伝子のヒト相同遺伝子の同定と嚢胞性腎疾患患者における発現の解析

東海大学医学部分子生命科学	○安藤 麻子, 菊池イアーラ幸江
	重成 敦子, 河田 寿子, 木村 穰, 猪子 英俊
東京女子医科大学腎臓病総合医療センター	荒井 純子
大阪医科大学泌尿器科	勝岡 洋治
東海大学医学部移植学	平賀 聖悟

51. 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

東海大学医学部分子生命科学	○重成 敦子, 安藤 麻子, 成瀬 妙子, 猪子 英俊
放射線医学研究所	菅谷 公彦
東海大学医学部耳鼻咽喉科学	堀内 正敏
国立遺伝学研究所進化遺伝	池村 淑道
晴和病院	本多 裕
日赤中央血液センター	十字 猛夫

52. HLA 遺伝子群の進化と形成

東海大学医学部分子生命科学	○猪子 英俊
---------------	--------

特 別 講 演

HLA の現在・過去・未来

HLA, past, present and future

Department of Surgery, UCLA Paul I. Terasaki

A review of the colorful 40 year history of HLA will be given in about 1 minute per year. Rapid advances have resulted from the collaborative work throughout the world. In retrospect, there is probably almost no field in Medicine in which new knowledge has accumulated at such a rapid pace. From knowing nothing about HLA 40 years ago, a major field has blossomed. Lessons to be learned from the successes as well as the failures will be highlighted.

To deal with the state of HLA today, I will then attempt to summarize what are the pressing issues for HLA today.

Lastly for the future, and for the young scientists now entering the field, what can be the major rewards in working on HLA? Is it a promising field with more to learn, or is it a field which has reached conclusion, just as the red cell field finished in about 50 years (1900-1950).

シンポジウム

日本における組織適合性の展望

S-1

移植と組織適合性抗原

北里大学医学部, 免疫学 柏木 登

国際組織適合性ワークショップが1964年に発足したのは、1962年より臨床同種腎移植が世界各地で本格化し、移植医としては、当時まだほとんど未知であった HLA の構成と拒絶反応におけるその役割を知ることが急務であったのが最大の契機であった。以来今日まで30年以上の歳月が経過したことになるが、ある見方からするとこの問題は依然として未解決である。周知の通り1990年までは、HLA 抗原同定が血清学的方法あるいは混合リンパ球反応を用いた方法で行われていたのであるが、それから得られた腎移植における組織適合性に関する成果は HLA-A, -B, -DR の計 6 抗原の適合性が拒絶反

応において顕性の役割を發揮するという結論であった。しかしながらこの結論とても完全なものからほど遠く、特に死体腎移植や骨髄移植においてはまったく不十分であるといわざるを得ない。そこで1990年代における努力は2つの面で展開されつつある。1つは HLA の同定を遺伝子レベルで行ってそれに基づく組織適合度から移植の成果を検討しようという方向であり、他はヒトにおける副組織適合抗原の構成とその役割についての研究である。今これらの面でなされている研究から言及に値する成果が得られつつあるため、それについて述べる予定である。

S-2

非血縁者骨髄移植と HLA

日本赤十字社中央血液センター 十字 猛夫

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のに必要な、10万人を目標として1992年1月より始まった。5年たった96年12月末現在で、登録ドナー-85,933名、患者4,728名、移植実施数978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、最近の登録された患者の約2/3が、初回の検索で血清学的なHLA 適合ドナーが見つかり、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。

骨髄バンクのHLA 検査のシステムは、登録時にHLA-A, Bの検査を血清学的タイピングで、登録患者とHLA-A, Bが適合したドナーについてはDRB1の血清学的レベルのDNA タイピングをおこなっている。97年の4月より新たに登録するドナーについては登録時に両方を同時におこなうことになっている。HLA-A, B, DRB1があった患者とドナーについては、さらに詳しい適合性の検査としてDRB1のアリルレベルのDNA タイピングをおこなっている。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、1995年度の厚生省の調査研究班により判明したのを受けて、1996年8月よりHLA-A2, A26, B61, B39についても、アリルタイピングを実施している。

厚生省骨髄移植調査研究事業として、1995年度に続き、96年度も約80の移植例のアリルレベルのDNA タイピングを追加して、計440例について調

査した。ドナー適合の条件としているA, B, DR 座についてみると、血清学的には一致しているにもかかわらず、アリルレベルの不適合の数は、A 座では115 (27%)、B 座では70例 (16%)、DRB1では80例 (18%) に不適合が見られた。適合条件に必須ではないが血清学的に検査できるDQB1についてみると87例 (20%) に不適合がみられた。今年度は新たに338例については、C 座もアリルレベルのDNA タイピングを実施し、101例 (30%) の不適合例が見られた。

各座と移植成績の関係を見ると、昨年の報告と同様にA 座の不適合がもっとも影響がみられ、B 座とともに統計学的な有意差が見られた。C 座は統計学的な有意差が見られなかっただけでなく、逆に不適合群が適合群よりやや高い生存率を示した。クラスIIのDRB1とDQB1について見ると、いずれも統計学的な有意差は見られなかったが、DQB1の方が生存率に影響しているように見られた。DQ 座は血清学的にも適合検索では考慮されていないので、87例のうち、50例が血清学的な不一致であった。このことがDRB1よりDQB1が移植成績に影響を及ぼす原因かもしれない。さらに血小板抗原系のHPA2, 3, 4, 5, 6についてもDNA タイピングをおこなった。この5つの抗原の中で、GP1aに属するHPA5についてのみ差が見られた。今後この抗原系を含め、ヒトマイナー抗原系の骨髄移植に及ぼす影響を調べることが重要になると考えられる。

S-3

MHC・ペプチド・TCR 複合体がもたらすもの

九州大学生体防御医学研究所, 遺伝学部門 笹月 健彦

MHC・ペプチド複合体の結晶構造解析から10年を経ずしてMHC・ペプチド・TCR複合体の結晶構造解析結果が報告され, TCRのCDR1, 2, 3とMHCあるいはペプチドとの接点が明らかとなった。

MHC・ペプチド・TCR複合体がもたらす機能として,

1. T細胞ポジティブセレクションによる自己MHC拘束性の獲得
2. T細胞ネガティブセレクションによる自己反応性の除去
3. ヘルパーT細胞とTh1, Th2の分化の活性化
4. キラーT細胞の活性化
5. アレルギー疾患の発現
6. 自己免疫疾患の発現
7. 臓器拒絶反応の発現
8. GvH病の発現
9. 感染後の重篤疾患の発現
10. 感染防御
11. 抗腫瘍効果の発現

などが考えられる。

このように列挙してみると, MHCが免疫応答の中枢を担っていることが理解できる。しかしまた一方, MHC・ペプチド・TCR相互作用を通して構築した免疫システムとその機能の発現には, 正の部分と負の部分があり, 高次機能システムとして高度の多様性と多型性に富む免疫システムが根源的に持つ限界を見せつけられる。

これらの限界を正當に理解評価し, どのように克服するのが長らくHLAに携わってきた研究者にとってのこれからの大きな問いである。

S-4

組織適合性研究の展望—人類遺伝学の視点から

東京大学大学院医学系研究科, 人類遺伝学教室 徳永 勝士

組織適合性研究の今後の展望について, 人類遺伝学的な視点から4つ指摘したい。

(1) MHC領域の全塩基配列: ヒトゲノム解析計画では, 国際的な協調のもとでヒトの全ゲノムをクローニングし, その塩基配列を全て決定する予定である。4 Mb以上にわたるMHC領域は最も解析の進んだ領域のひとつであり, 猪子ら, Beckら, Geraghtyらなどによって, 今後1, 2年以内に全塩基配列が決定されようとしている。その結果まず, この領域に存在する全ての遺伝子の一次構造がわかる。さらには, 分子生物学のみならず構造生物学やbioinformaticsの急速な発展も相まって, これらの遺伝子の機能が次第に解明されてゆくだろう。果たして我々は, MHC遺伝子群が特定のゲノム領域にクラスターをなして存在する必然性を見出すだろうか。

(2) MHC遺伝子群およびゲノム構成の多型性: HLA遺伝子群は最高度の多型性を示すことで知られている。我々はようやく典型的なHLA遺伝子群について, 一部の人類集団(ヨーロッパ系および日本人)に存在する対立遺伝子とその配列のリストを手に入れたばかりである。他集団には未解析の対立遺伝子が多数残っているはずであるし, またMICなど新しい遺伝子の多型解析はこれから本格化されようとしている。配列の差異がどのような構造と機能の変化をもたらすのか, 関連各分野との連携を強めなくてはならない。一方, 以前より報告してきたように, HLAハプロタイプ間には大規模なゲノムサイズの違いや遺伝子の数の差異が存在する。個々のハプロタイプごとにこの領域の塩基配列を決定することから, ゲノム進化のダイナミックな一側面を学び, ハプロタイプの機能的差異の一因を見い出す

かもしれない。

(3) MHCからみる人類集団の多様性: 個々のHLA遺伝子についても対立遺伝子の頻度分布にはかなりの集団差が認められるが, さらにHLAハプロタイプをマーカーとすれば, 集団差は一層明瞭となることが明らかとなっている。このHLAハプロタイプは全ゲノムの千分の一以上を占め, 二百個に近い遺伝子を含む長大な領域の多型性を代表するわけで, このようなマーカーは他に見られない。しかしながら, ここでも現在までに得られた情報は不十分といわざるを得ない。より多くの集団について, 配列レベルのタイピングに基づく解析が進めば, HLA遺伝子群と自然淘汰の関わりに加えて, ヒトの起源や人類集団の成立過程に関する極めて有用な情報が得られるに違いない。

(4) 多因子疾患の遺伝要因としてのMHC: 自己免疫疾患をはじめ免疫性疾患の多くは, 遺伝学的には, 複数の感受性遺伝子と環境要因が関与して発症にいたる, いわゆる多因子疾患(またはcomplex disease)に含まれる。多数のインスリン依存性糖尿病(IDDM)多発家系から得られた研究成果(Toddら)を例をとると, 遺伝要因が発症の約7割を決定し, その7割のうちの約4割がMHCの寄与であった。その他の感受性遺伝子は10種以上存在するが(染色体上のおおよその位置が推定されているのみ), いずれも1割以下の寄与率と推定されているので, MHCはIDDM発症に関与する主要な感受性遺伝子(群)ということになる。このような視点に立って, 従来よりHLAとの関連が知られてきた疾患における全遺伝要因の比重とその中でMHCの寄与率がわかれば, 発症の予知や予防にもつながることが期待される。

ワークショップ

HLA タイピングの QC

W-1

The International Cell Exchange

UCLA, 外科学 秦 美暢

HLA タイピングでは、国際ワークショップならびに各地域における検査ラボ相互の共同作業を通じて急速な発展を遂げてきたという特徴が認められる。1974年に始められた International Cell Exchange は、これらのワークショップを補う形で、HLA タイピングの国際的標準化や外部精度管理にとって大きな役割を果たしてきた。このプログラムは、サンプルを参加施設に毎月発送し、各々の結果ならびに年間集計を報告しているものである。1974年に毎月4種類のリンパ球をテストする Cell Exchange - Class I serology がスタートして以来、1981年には血清サンプルによる Serum Exchange - Class I antibody identification が追加され、各参加施設の抗体スクリーニングの精度管理にも役に立てられている。更に、1987年に lymphoblastoid cell line による B-cell line exchange - Class II serology, 1990年に同じサンプルを用いた B-cell line exchange - Class II DNA typing, 1994年に Cell Exchange - Class I DNA typing が追加されて、現在では合計5つの部門から構成されており、合衆国内190および日本国内18のラボを含め世界中で292の検査ラボが参加している。

International Cell Exchange の主な目的として、HLA タイピングの進歩の記録、タイピングの国際的標準化、新しい variant や allele の同定、参加施設の外部精度管理、の4点が挙げられる。(1) HLA

タイピングの進歩は、各々の HLA 特異性に関する平均検出レベルの向上や、繰り返し発送されてきた同じドナー由来のリンパ球や同じ B-cell line の検出レベルの向上に反映されている。(2) 世界中の検査ラボに同一サンプルを送ることにより、同じ特異性に異なる名称がつけられていたり、異なる特異性のものが同じ名称で扱われていることが検出できる。(3) あるサンプルの検出レベルがその抗原の平均的な検出レベルよりも低い場合には新しい variant である可能性が疑われ、ワークショップで大規模に調べられたりシーケンスが確認されたりしている。また、Class I および Class II のいずれも、血清学と DNA タイピングの両方に同じサンプルが用いられているため、血清学的な抗原の名称と対立遺伝子の名称とのリンクが確認されると共に、null allele の検出も可能である。(4) Cell Exchange ならびに Serum Exchange のいずれも、各々の検査ラボが、その使用しているタイピングのトレイや手法あるいは血清スクリーニングのパネルや手法に関する問題点を検出することに有効である。また、B-cell line は培養によって維持可能であり、reference cell line としても利用できる。

(詳細の問い合わせ先; Marie Lau, UCLA Tissue Typing Laboratory, e-mail; marielau@ucla.edu, phone; +1-310-206-3333, FAX; +1-310-206-0224)

W-2

Producing and Improving Quality HLA Serological Typing Trays

One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA Jimmy Loon

The criteria for assessing quality of individual HLA typing sera are specificity, strength index, and accuracy of assignment, measured by the R-value. The overall quality of typing trays is judged by lot to lot consistency of serum panel quality and the ability to type currently recognized antigens. Maintenance of lot to lot consistency is difficult due to the limited availability of high grade allosera.

Assessment of serum quality is made first by screening sera against a frozen reference cell panel to determine specificity and accuracy of antigen detection. The cell panel must be well-characterized phenotypically for all known HLA markers and contain representative cells of ethnic groups to be typed, including unique antigens and blanks. Sera selected for typing trays are further tested against fresh cells from donors with known and unknown HLA prior to final selection.

The quality of typing trays is routinely monitored using internal and external quality control. Using the former, samples of typing trays are tested each week using fresh cells from random donors. Problem sera can be rapidly identified and improved upon or replaced. Parti-

cipation in cell exchanges distributed by the UCLA Cell Exchange, ASHI/CAP, and SEOPF serve as means of external control, enabling us to gauge the ability of our typing trays to match the consensus HLA typings.

One Lambda produces HLA specific monoclonal antibodies (mAbs). Allosera have the disadvantages of being limited in supply, possibly containing anti-complement factors, often containing multiple specificities, and being low in titer. In contrast, mAbs have the advantages of being high in titer, being truly monospecific, containing no anticomplementary factors, and being available in virtually unlimited quantities. These advantages made it possible for Lee et al at One Lambda to introduce the Lambda Monoclonal Typing (LMT) method in which 1 μ l of antibody premixed with complement is dotted on the Terasaki tray, eliminating the need for a separate complement adding step and shortening the incubation time. Greater control over lot to lot consistency is achieved. Most of the mAbs used on the LMT trays were tested in the 12th International Workshop, providing data on the specificities. The use of mAbs has significantly improved the quality of HLA typing.

W-3

HLA タイピングの品質維持

(株) エス・アール・エル 小川 公明

HLA タイピングは臨床的意義により決して過ちの許される検査ではない。近年、幾つもの検査方法が考案されてるが、HLA 抗原は細分化されるようになったため以前より難しい検査となっている。このような状況において安定した正確な検査結果を出すためには、多大な努力が必要である。

我々は1979年に HLA タイピングを開始した。現在まで我々が実施している安定した結果を出すための取り組みについて紹介する。

(1) 良い抗血清を使用する。HLA 抗血清には、輸血検査用の抗血清で実施されている国家検定のようなものではなく特異性の決定等はメーカー任せなのが現状である。我々の経験から完璧な抗血清はほとんど存在しない。そのため使用前に HLA 抗原既知のリンパ球を用いた検定により特異性の十分な把握が必要である。ルーチン検査においては、一種類のタイピングトレーでは不十分な場合もあるので、必ずバックアップのトレーを確保して確認した HLA 抗原により使い分けることが大切である。ルーチン検査では家系調査による特異性の確認も大切である。

(2) 良い補体を使用する。補体は、毒性がなく、高力価なロットが良いが、使用しているタイピングトレーと HLA 抗原既知リンパ球により反応に問題のないことを確認しておく必要がある。また、補体は同一ロットが比較的長く供給されることから良いロットが得られても定期的に再検定することが大切である。

(3) 生存率が高く pure なリンパ球を使用する。現在は幾つものリンパ球分離方法があるが、いずれの方法も十分に習熟しておく必要がある。特に血液疾患の患者リンパ球の分離は経験を記録して次に備えることが大切である。

(4) 検査員の技能を統一する。HLA 抗原既知の検体をブラインドとして不定期に流し、受付から報告までの全行程が正確であることの確認が大切である。

タイピングトレーの検定結果を全員が熟知し assignment が一致していることを確認する。HLA に対する十分な知識も必要である。

(5) 人為的ミスを防止する。HLA タイピングは細胞の移し換え行程が多いため間違えのない作業体制をつくることが大切である。また、結果の転記作業も極力減らした体制が望ましい。

(6) 検査項目間の関連を確認する。血清学的タイピング、DNA タイピング、MLC との関連は常に注意して検査室全体の整合性を確認することが大切である。HLA 抗原の連鎖不平衡について確認することは必要であるが、定説どおりにはならない場合もあり得ることを知っておく必要がある。

(7) 外部サーベイへ参加する。我々は"College of American Pathologists"へ参加することにより、外部のラボとの相関を確認している。これは、我々の各種の検定による判断に誤りのないことを直接確認できる最も重要な作業である。

W-4

血清学的 HLA タイピングの QC について

日赤中央血液センター 田中 秀則

HLA 抗原の血清学的なタイピング法のひとつである LCT (Lymphocyte Cytotoxicity Test) 法は、生きたリンパ球と HLA 抗血清を反応させた後、ウサギ補体を加える方法である。この方法で HLA 抗体が反応したリンパ球は、補体による細胞障害が引き起こされ、その程度を読み取ることにより、陽性・陰性の判定が行われる。そのため、信頼性のあるタイピング結果を得るためには、1) 細胞膜の状態が良いリンパ球 (生きたリンパ球) を確実に分離すること、2) 良質の抗血清を使用したタイピングトレイを使うこと、3) 安定した力価の補体を使うことが必要である。また、HLA 抗原は多型性に富み、血清学的に交差反応性を示す抗原も少なくないことから、判定等のデータ処理において間違いを引き起こす可能性が高い。そのため、パソコンを使用することで、その間違いを防ぐ必要がある。ここでは、これらの内容について、現在日赤中央血液センターで行っている作業手順等について紹介したい。

1. タイピング用抗血清の収集と評価: 25才以上の女性献血者および分娩血について、約20~50種類のリンパ球を使用して HLA 抗体のスクリーニングを行っている。ここで得られた抗血清は、100~200種類のリンパ球で抗体同定を行う。その後、19血液センターが参加して行われる HLA ワークショップにおいて、約800種類のリンパ球を使用して再度評価を行い、良質の抗血清は HLA タイピングトレイに使用される。また、市販抗血清については、事前に数種類のロット (在庫がある場合) について、凍結リンパ球約50種類による力価および特異性の検査を行っている。

2. タイピングトレイの評価: ワークショップ等で評価された抗血清を収集してタイピングトレイを作製するが、この際にも200種類程度のリンパ球を反応させ、最終的な反応パターン表やタイプ判定時の注意事項を作成している。稀な HLA タイプをもつ

リンパ球については、UCLA セルエクステンジに参加することにより、日常使用しているタイピングトレイでの反応性について検討を行っている。また、これらの検体については、DNA タイピングを行うことにより、各アリアルにおける反応パターンについても検討を行うようにしている。

3. リンパ球の分離方法: タイピング用のリンパ球分離には、免疫磁気ビーズを使用している。この方法では、試験管への検体の移し替え回数が1回と少なく、分離時における検体の取り違い少なくできる。また、自動洗浄装置 (ビーズウォシャー、バイオテック社製) を使用することにより、大量検体の処理にも対応が可能である。使用する磁気ビーズについては、購入時点において前回使用ロットと、リンパ球の回収率についてチェックを行っている。

4. タイピング結果の判定: LCT 法による反応終了後、蛍光測定装置 (テラスキャン、ミネルヴァテック社製) を使用してタイピングトレイの各ウェルにおける蛍光量を測定している。測定した蛍光量のデータから、パソコンを使用して HLA タイプの判定を行っている。HLA タイプの判定については、2人の判定者が別々に HLA タイプの判定を行い、それぞれの判定結果をパソコンによりチェックをしている。また、チェック後の結果は、手入力をせずに自動的にデータベースに登録するようにしている。

5. ウサギ補体の検定: ウサギ補体については、新規ロットにおいて補体の力価およびタイピングトレイを使った検定試験を行っている。力価試験は、抗血清と補体をそれぞれ希釈して LCT 法を行うことにより、その力価を測定し前回使用していたロットと比較する。また、タイピングトレイを使用した検定では、補体を換えて同じリンパ球をタイピングすることにより、非特異反応およびエクストラ反応について比較検定を行っている。

W-5

HLA-DNA タイピングにおける QC

東海大学医学部, 分子生命科学 猪子 英俊

8 年程前, すなわち HLA-DNA タイピングが着手された頃に行なわれた, DNA タイピングのワークショップでの各ラボの正解一致率は, ローカスにもよるが50-60%程度であった. この数字は, 現在の90%以上の正解率からすれば, 眼を覆うばかりの値であるが, 今から翻って思えば, HLA-DNA タイピングにおける問題点が見事に集約, 浮き彫りされていたように感じられる. もちろん, PCR-RFLP, PCR-SSOP, PCR-SSP, PCR-SSCP, SBT など各 DNA タイピング法の固有な, 注意すべき手順やチェックポイントはあるものの, 技術向上に必要な基本的な点は, 次の3つの項目にあるこ

とが, 当時すでに指摘されていた.

- ① DNA の精製
- ② 良い PCR プライマー設定による, PCR 産物の特異的増幅
- ③ 決定した型について, 頻度, 他のサンプルの反応パターン, 他のローカスとの連鎖, などからみた整合性

本ワークショップでは, これらの項目について具体的に, 諸点を列挙, 整理するとともに, HLA-DNA タイピング習熟のためには, 「習うより慣れろ」でもなく, 「慣れるより習え」, でもなく, 「習って, 慣れろ」が肝要であることを強調したい.

ランチョンセミナー I

ワンラムダ・マイクロ SSP システム

L-I-1

マイクロ SSP DNA タイピングキットを用いた HLA-DRB, DQB アリルのタイピング

One Lambda Inc., USA 齊藤 克行

PCR-SSP (sequence-specific primer) 法は臓器移植のドナースクリーンに幅広く活用されている手法である。同手法は迅速、簡便性に優れている反面、プライマーの調整や分注、そして quality control などに時間と労力を要することも知られている。また、多検体処理の際、多数の PCR 試験管の処理やゲルへのサンプル移動時のエラーの問題などが存在する。

このたび米国ワンラムダ社は PCR-SSP 法の問題点と同手法の全自動化を考慮したキットを開発した。今回紹介するマイクロ SSP キットは DRB1, 3, 4, 5/DQB1 座を 32 種の PCR 反応を用いて low resolution で同定する Generic キットと DRB1, 3, 4, 5 アリルを 96 種の PCR 反応で intermediate から

high resolution で同定する High Resolution キットから成り立つ。本キットの利点はプライマーなどのすべての試薬が調整、分注そして quality control 済みで即使用が可能な点である。

また、同時に 96-well マイクロタイタープレート型のアガロースゲルの作成と電気泳動装置としてマイクロ SSP ゲルシステムも開発された。本システムは手技の簡便化のためマルチチャンネルピペットマンを用いたサンプル処理を可能にし、電気泳動時間も 4 分間に短縮したユニークなシステムである。

本キットの精度と一連の操作手順そして UCLA Cell Exchange 細胞を用いたタイピング結果を発表する。

ランチョンセミナー II

HLA Sequencing-Based Typing の特徴
と自動化への可能性

L-II-1

HLA-DRB Sequencing-Based Typing システムの特徴と利点

(株)パーキン・エルマー・ジャパン アプライド・バイオシステムズ事業部, フィールドアプリケーション 坂部 宗親

現在、臓器や骨髄移植の際、移植組織の適合性を見るために HLA をマーカーにして適合性が調べられています。また、HLA と疾患の関連についての研究もさかに行なわれています。この HLA タイプをよりの確・迅速に測定するため DNA タイピングを用いる手法が登場してきましたが従来の血清学的な分類に比べより正確にタイプが判別できるため、この手法が注目されています。DNA タイピングの方法の中でも DNA プローブをベースにした PCR-SSOP や SSP-PCR の方法と直接シーケンスを行う方法があります。シーケンスを行う方法は最も細かくタイプを分類することができますが、操作、手間などが煩雑な面がありました。

一方、分子生物学の研究では、DNA レベルの取扱が一般的になり、研究機器がめざましく発展し、DNA のシーケンスも非常に簡便に行うことができるようになりました。今回ご紹介するキットは、DNA シーケンスの技術を利用して HLA のタイピングをシーケンスレベルで行わせるものです。簡易に操作できる DNA シーケンサと組み合わせて使用することにより、より詳細で迅速なタイピングが行えるようになります。

HLA-DRB Sequencing-Based Typing キットは SSP-PCR 法と PCR プロダクトのダイレクトシーケンス法を組み合わせた内容になっています。

初めに、SSP-PCR でプレセクションを行います。このキットに付属している PCR プライマーは 12種類で、DRB exon 2の超可変領域のアリルグループ (DR1, DR2, DR3/11/6, DR4, DR7, DR8/12, DR9, DR10, DRB3, DRB4, DRB5, DRB ALL) に特異的な配列を持ち、後に行う Dye Primer シーケンスができるようデザインされています。これら12組のプライマーを用いて PCR を行

い、それぞれ PCR プロダクトの有無をアガロース電気泳動等で確認します (Low Resolution)。

次に、PCR フラグメントが確認されたプロダクトをダイレクトシーケンスします。キットに用意されている AmpliTaq FS とシーケンス用 Dye Primer を用いシーケンス反応を行います。AmpliTaq FS と Dye Primer 法の組み合わせはシーケンスシグナルのピーク高が均一になるため、ヘテロシーケンスの検出に適しています。反応の終わったサンプルは、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer のような自動シーケンサーで処理され、シーケンスデータとして出力されます。得られたそれぞれのデータは、MatchMaker と呼ばれるソフトウェアを用いて解析されます。MatchMaker はシーケンスデータのピークパターンからヘテロピークを認識し、IUB コードに置き換え、Forward および Reverse から得られたシーケンスデータを重ね合わせます。そして、MatchMaker に登録されているデータベースと比較して適合するシーケンスを検索します。Forward と Reverse のシーケンスが一致しない場合などは、正確なシーケンスデータにするため、Sequence Navigator ソフトウェアでピークパターンを見ながら、確認・編集することもできます。こうして得られた結果は、MatchMaker でサブタイプに分類されレポート出力されます (High Resolution)。

このように、HLA-DRB SBT キットは、自動シーケンサ ABI PRISM 310 Genetic Analyzer と MatchMaker, Sequence Navigator などのソフトウェアと組み合わせて使用することにより、簡便で精度の高い DRB タイピングを行うことができるようになります。

L-II-2

自動 DNA シークエンサーによる HLA-SBT と PCR-RFLP 法の比較検討

東海大学医学部, 分子生命科学 成瀬 妙子

HLA DNA タイピングは、それぞれの遺伝子領域に存在する 3～4 つの超可変部領域をいかに短時間で詳細、正確に同定が可能かが重要であり、これまで、主に PCR 法との組み合わせにより、多数のタイピング法が開発されてきた。自動 DNA シークエンサーを使用した直接塩基配列決定法 (Sequencing-Based Typing: SBT) による HLA 抗原遺伝子タイピングもそのひとつとして最近開発され、実用化へ向け検討が行われてきた。SBT の原理は、PCR にて増幅後の DNA を鋳型として、シークエンス用プライマー、DNA ポリメラーゼを用いてシークエンス反応後、ゲル電気泳動により得られた塩基配列情報を専用ソフトに読み込ませて解析を行い、対立遺伝子型の判定を行うものだが、対立遺伝子の塩基配列の違いを比較的短時間に直接検出することが可能な、信頼性の高い方法として注目されている。

SBT によりヘテロ接合体の判定を容易に行うためには、バックグラウンドを低下させることや、異なる塩基の組合せの波形がなるべく均一に出現することが必要で、不純物の少ない鋳型 DNA が必要であったことから、最初はストレプトアビジン付加磁気ビーズを用いて精製を行っていた。その後、PCR 反応用として AmpliTaq Gold、またシークエンス反応用として AmpliTaq FS の 2 種の DNA ポリメラーゼが開発され、現在では PCR 産物を精製することなしに滅菌水で希釈するだけで、異なる塩基の組合せが均一なピークとして容易に検出可能になり、操作が大幅に簡略化され、かつ高精度の結果が期待できるようになった。

このようにして改良が重ねられ、現在ではクラス II 抗原の *DRB1*, *DQA1*, *DQB1*, *DPB1* 遺伝子に加えて、クラス I 抗原の *A*, *B* 遺伝子についても検討が行われている。我々も *HLA-A* 抗原遺伝子について、SBT でのタイピングを試みたところ、GC 含量が比較的多いにもかかわらずほぼ均一な波形を示し、将来の有力なクラス I タイピング法として期待できる良好な結果が得られた。ただし、クラス I 抗原遺伝子については、エキソン 2, 3, 4 の 3 領域について解析を行う必要があることから、判定は多少複雑となる。

SBT の最大の問題点は、塩基の組み合わせにより、識別できないヘテロの組合せが存在することで、これについては制限酵素を用いて切断を行うか、PCR-SSP (sequence specific primer) 法によりグループ特異的な増幅を行うなどの工夫が必要である。そこで今回は、日本においても今春より入手が可能になる DRB の SBT キットを用いて、我々の研究室で開発された PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法との比較、検討を行ってみたい。DRB キットには、Low-resolution タイピングのための SSP プライマーが含まれており、増幅された産物のみをシークエンス反応に使用するため、*DPB1* 遺伝子などに比べて、ヘテロの識別がかなり容易になると考えられる。また、解析ソフトも改良され、新たに "MatchMaker" が使用可能になることから、これらを用いて *DRB1* 対立遺伝子のタイピングを行い、PCR-RFLP 法での判定結果をもとに、その有効性を分析する予定である。

一般演題

1

ABO 式血液型関連抗原を認識する非 HLA
リンパ球細胞障害性抗体の反応性解析

○関本達也, 森下勝哉, 芳賀寛史, 佐藤進一郎
加藤俊明, 池田久實, 関口定美
北海道赤十字血液センター

【目的】 A 型血小板輸血に不応性を示す血小板頻回輸血患者血清中に A 型および AB 型のパネルリンパ球に対する非 HLA リンパ球細胞障害性抗体が検出されたため, この抗体の特異性について解析を行った。

【方法】 患者抗体の特異性については, HLA, ABO, Lewis 式血液型既知のパネルリンパ球を用いて LCT 法, MAILA 法および FCM 法により検査を行った。更に型物質および赤血球を用いた吸着解離試験により解析した。A 型の遺伝子型 (AA or AO) は末梢血単核球の ABO 転移酵素遺伝子タイピングで決定した。

【結果】 患者の血液型は O 型で, HLA 抗体は MAILA 法で陰性, 抗 A 抗体価はクームス法で 8,192 倍を示した。患者血清が LCT 法で陽性を示したのは, A 型 18 例中 12 例, AB 型 6 例中 4 例のパネルリンパ球であり, Lewis 式血液型との関連性は認められなかった。また反応の強さと遺伝子型 (AA or AO) との相関は見られなかった。B 型 19 例および O 型 12 例のパネルリンパ球は全例陰性であった。LCT 法における陽性反応は, A 型物質および A₁ 型赤血球を用いた吸収操作により陰性化した。A 型血小板による吸収は不完全であった。また, A₁ 型赤血球から吸着解離した抗体と A 型パネルリンパ球との反応性は FCM 法により確認された。なお, A 型パネルリンパ球には A 型転移酵素 mRNA が存在し, FCM 法により表面上に A 抗原の発現が確認された。

【考察および結論】 今回, 患者血清から LCT 法で検出された抗体は, O 型並びに B 型リンパ球とは反応せず, 更に MAILA 法でも反応しないことから抗 A の特異性を持つ非 HLA 抗体であった。従って本症例の血小板輸血不応性にリンパ球上および血小板上に発現している ABO 式血液型関連抗原が大きく関与していると考えられた。

2

抗 HLA 抗体消失後も HLA 適合血小板輸血
が効果的

○佐藤久美子¹⁾, 安田広康¹⁾, 加藤久美子¹⁾
大戸 齊¹⁾, 阿部力哉¹⁾, 丸山幸夫²⁾
¹⁾福島医科大学輸血部
²⁾ 同 第一内科

【目的】 HLA 適合血小板を用いている症例で抗体が検出されなくなった場合, 引き続き適合血小板でサポートするのか, それともランダムドナー血小板に切り替えてよいのかについて輸血効果および抗体検出法の両面から検討した。

【対象および方法】 定期的な抗体スクリーニングで, 抗 HLA 抗体が陰性化した 9 例を対象とした。抗体スクリーニングは, 20 種のパネルリンパ球を用いて, STD-LCT で行った。また, 同一パネルから得られたリンパ球および血小板を用いて, STD-LCT, AHG-LCT, MPHA で詳細な検討をした。

【結果】 全症例での HLA 適合血小板の平均輸血量は, 週あたり 2.1 回, 26.9 単位であったのに対し, 抗体消失後, ランダムドナー血小板を用いた 4 症例での平均輸血量は週あたり 3.0 回, 33.2 単位を要した。STD-LCT では検出できない低力価の抗 HLA 抗体の存在が疑われた 5 例について, AHG-LCT 法, 未処理 MPHA 法を用いて STD-LCT 陰性時の血清を検討した。5 例中 3 例は AHG-LCT 法で抗体陽性 (力価 1 倍), 4 例は MPHA 法で抗体陽性 (力価 1~32 倍) であった。

【考察】 MPHA は相対的に抗原量の多い血小板を用いること, 使用する血清量が多いことにより, 最も感度良く低力価の抗体を検出できると思われた。従って, HLA 適合血小板の交差適合試験の際には, 従来法である AHG-LCT に加え, MPHA も併用するのがよいと考える。また, 低力価の抗 HLA 抗体が否定できない場合には, HLA 適合血小板を継続して用いる方が, 臨床効果, 経費の面からも望ましい。

3

死体腎移植希望登録患者の HLA 再検査で相違のあった抗原の検討

○栗田麗子¹⁾, 渡辺真穂¹⁾, 長谷川善之¹⁾
田中智一郎¹⁾, 小河原 悟¹⁾, 兼岡秀俊¹⁾
内藤説也¹⁾, 友松哲夫²⁾, 猪口玉恵²⁾

¹⁾福岡大学病院腎センター

²⁾福岡赤十字病院

【目的】 腎臓移植登録が新ネットワークシステムに移行したため、今回 DR 抗原ブランクであった登録者について HLA 再検査を行った。既登録されていた HLA と比較し、抗原が異なっていたもの、ブランクが埋まったものに関して検討した。

【対象】 福岡大学病院腎センター、福岡赤十字病院で再検査された70例。

【方法】 ダイナビーズを用いた補体依存性微量リンパ球細胞障害試験法によりテラサキ HLA トレー (A, B, C 抗原用, DR 抗原用) を用いて、タイピング操作を行った。

【結果】 DR 抗原については、リタイピングにおいて、DR4が新たにタイピングされたものが39例 (55.7%) と最も多く、次に DR9が15例 (21.4%) と多かった。同時にリタイピングした class I 抗原では、抗原が異なっていたものは A-locus において 8 例 (1.1%) (6 抗原), B-locus で39例 (55.7%) (17抗原) であった。その内スプリットであったものは A-locus で 2 例 (2.9%) (2 抗原), B-locus で18例 (25.7%) (5 抗原) であった。B15→B62と決定されたものが11例 (15.7%) で最も多かった。また、リタイピングでブランクが埋まったものは、A-locus 2抗原, B-locus 14抗原であり、B61が 5 例 (7.1%) と最も多かった。初回登録では存在していた抗原がリタイピングではブランクとなったものは、A-locus 3 例 (0.4%) (3 抗原), B-locus 3例 (0.4%) (3 抗原) であった。

【考察】 DR 抗原ブランク者を埋める目的の今回のリタイピングは、class I タイピングの再確認という点で有意義であったと思われる。初回登録が1983～1985年に集中しており、ほとんどが10年以上も前に行われていた。得られた結果の抗原の相違は、トレイの精度や管理方法、技術的な面でも問題があったとも考えられた。また登録者の中には遠隔地在住もあり、採血からタイピングまでの時間が長いなどが影響を及ぼした例もあった。以上のような問題点を解決し、タイピングミスをも最小限に抑えるため、クオリティー・コントロールの設置が考えられ、また、DR 抗原のタイピングに関しては、DNA タイピングにより正確な結果を得ることが望ましいと思われた。

4

死体腎移植における ABDR ゼロミスマッチ移植症例の成績と最近の変化

○秦 美暢, JM Cecka, PI Terasaki
UCLA Tissue Typing Laboratory

【目的】 近年、死体腎移植成績の向上に伴い、HLA 抗原適合度の差が術後早期の移植成績に及ぼす影響も小さくなりつつある。今回、最近9年間の移植症例を移植時期に従って2群に分け、ABDR ゼロミスマッチ移植例を中心に、HLA 抗原適合度が移植成績に与える影響を比較検討した。

【方法】 UNOS (United Network of Organ Sharing) Scientific Renal Transplant Registry に集積された死体腎移植症例中、多臓器移植症例を除く56,181例を、移植実施時期に従って A 群 (1987年から1990年までの21,266例) および B 群 (1991年から1995年までの34,915例) の2群に分け、HLA 適合度が Graft Survival に与える影響を比較した。

【結果】 A 群の ABDR ゼロミスマッチ移植症例では、再移植症例や sensitized 症例は初回移植症例や non-sensitized 症例よりも低い Graft Survival を示したが、B 群ではそれらの移植成績の改善によって術後1年における差が縮小している。また、高齢者や黒人などの ABDR ゼロミスマッチ症例に関しても、同様の改善が認められた。

【考察】 再移植症例や sensitized 症例など従来ハイリスク症例とされていた症例群でも、HLA 抗原を適合させることによって良好な移植成績が得られるようになってきた。

5

日本人のCD31多型とHLA一致同胞間骨髄移植のAcute GVHDとCD31多型の適合性との相関—CD31はMajor' minor histocompatibility antigenか?—

○丸屋悦子¹⁾, 佐治博夫¹⁾, 関 茂樹²⁾, 甲斐俊朗³⁾
藤井康彦⁴⁾, 秋山祐一⁵⁾, 横山茂樹¹⁾

¹⁾京都府赤十字血液センター

²⁾佐久総合病院内科

³⁾兵庫医科大学輸血部

⁴⁾山口大学病院輸血部

⁵⁾京都大学病院小児科

【目的】 GVHD発症時、傷害を受ける部位は主に血管内皮細胞や皮膚、リンパ節などであり、GVLの対象は血液細胞である。主に血管内皮細胞に存在するCD31 (PECAM-1) のcodon 125に多型性があり、minor histocompatibility antigen (mHa) の有力な候補であることがGrumetらにより報告されている。日本人のCD31多型の検索とHLA一致同胞間骨髄移植に伴うacute GVHDとの相関について検討した。

【対象および方法】 非血縁者214人、28家系(108人)およびHLA型一致同胞間骨髄移植ペア49組を対象とした。CD31の多型はPCR-LIS-SSCP法により、exon 3, 8, 12の各領域につき同定した。

【結果】 Exon 3; codon 80 (Val/Met) と125 (Val/Leu), exon 8; codon 563 (Asn/Gly) および exon 12; codon 670 (Ser/Arg) に多型が検出された。各exonの変異アミノ酸頻度はexon 3 (codon 80/125); Val/Val:0.540, Met/Val:0.007, Val/Leu: 0.453で、exon 8 (codon 563); Asn: 0.484, Ser: 0.516およびexon 12 (codon 670); Gly: 0.484, Arg: 0.516であった。Exon 8のAsnとexon 12のGlyおよびexon 8のSerとexon 12のArgが完全連鎖を示した。Family studyの結果、これらの変異アミノ酸の組合せ(codon 80/125/563/670)により4種のalleleが検出された。日本人のcommon alleleはVal/Leu/Ser/Arg (AF=0.411)やVal/Val/Asn/Gly (AF=0.348)であった。HLA型一致同胞間骨髄移植ペア49組について、変異アミノ酸の適合性とacute GVHDとの相関がみられた($p < 0.025$)。Exon 8または12の適合性がより強い影響を示した。またHLA-A24を保有する患者($n=22$)で、CD31不適合群の患者すべてがacute GVHDを発症した(適合群=29%)。

【考察】 日本人においてもCD31の多型が'major' mHaである可能性が強く示唆された。今後例数を増やし拘束性を示すHLA抗原も含め検討する。

6

臍帯血リンパ球のHLA抗原発現およびアロ抗原反応性・刺激能に関する検討

○土田文子¹⁾, 萩原政夫^{1,2)}, 佐藤忠之¹⁾
佐藤 薫¹⁾, 加藤俊一¹⁾, 辻 公美²⁾

¹⁾東海大学病院細胞移植医療センター

²⁾同 医学部移植免疫学

【目的】 臍帯血(cord blood=CB)は、新たな血液幹細胞移植の供給源として注目を浴びている。今回、CBリンパ球の有する免疫学的な特異性について、明らかとする目的で以下実験を行った。

【方法】 1. Full-term出産のCBより、単核球をFicoll-Conreyにて分離、リンパ球領域について、HLA-class I, DR抗原の発現をFlow-cytometryにて解析した。2. CB血漿中、可溶性HLA-class I (sHLA-I)濃度をELISA法にて測定した($n=43$)。3. CB単核球をIL-2, 5 ng/ml, 0.5 ng/ml添加, Candida, 水痘各不活化抗原液添加各条件下にて7日間培養し、³H-uptakeを測定した($n=8$)。4. HLA不一致のアロ成人(adult=AD)由来単核球および母親単核球との間で一次MLCを行った($n=6$)。コントロールとして、AD単核球および血漿を用いて、同様の検討を行った。

【結果】 1. 2. HLA-class I抗原は、CB, AD同等レベルで高発現しており、sHLA-IもCB; 420 ± 191 , AD; 487 ± 57 と有意差を認めなかった。CBのHLA-DR抗原は、CD4または8陽性T細胞分画では殆ど陰性であったが、non-T細胞分画の発現はADと変わらなかった。3. IL-2への反応性は、5 ng/mlにてADのおよそ1/2, 0.5 ng/mlにて2/3であった。両特異抗原への反応は、全例で陰性であった。4. CBリンパ球のMLC反応性は、成人リンパ球と同等であった。逆に、刺激性も成人リンパ球と同等であった。ただし、母親リンパ球との間の反応は両方向共に陰性であった。

【考察】 CBリンパ球は、特異抗原へ免疫応答性を獲得していない一方で、アロHLA抗原への免疫応答性を既に獲得していた。興味深い点は、母親のアロ抗原に対して不応答性を獲得している点であり、移植ドナーとして、より広い適応の可能性が示唆された。

7

臍帯血における HLA ハプロタイプの解析

○松崎龍典¹⁾, 野村昌作¹⁾, 緒方 肇²⁾, 石田萌子¹⁾
小林陽之助²⁾, 福原資郎¹⁾

¹⁾関西医科大学輸血部

²⁾同 小児科

【目的】 造血幹細胞の新しい供給源として, 最近臍帯血幹細胞が注目されている. 骨髄移植と同様に, 臍帯血バンクを推進するには HLA typing は不可欠な検査である. 今回我々は, 健康人臍帯血および母親血を用いて HLA ハプロタイプを決定し, 第11回日本 HLA ワークショップ (11JWS) のハプロタイプ頻度 (HF) との比較を行ったので報告する.

【対象・方法】 対象は, 平成8年2月から9月までに当院で出産した53例である. 方法は, 末梢血からリンパ球を分離し, 細胞障害試験により HLA class I・HLA class II のフェノタイピングを行った. さらに, HLA class II については, DR ローカスの DNA タイピング (low resolution による DRB1 グループの解析) も実施した. なおハプロタイプは, class I の A および B ローカスと class II の DR ローカスの組み合わせについて検討した.

【結果】 53例中ハプロタイプが決定しえた46例について解析した. 頻度の高いハプロタイプは, A24-B7-DR1 (HF; 10.9%), A24-B52-DR2 (HF; 5.4%), A33-B44-DR6 (HF; 3.3%) であり, A33-B44-DR6 はいずれも母親由来であった. 11JWS において, A-B-DRB1 ハプロタイプの59番目までをメジャーそれ以下をマイナーとすると, 今回検討した92ハプロタイプ中, メジャーは42ハプロタイプであった. また, このメジャーの42ハプロタイプの由来は, 父親と母親で頻度的に差は認められなかった.

【考察】 今回検討した臍帯血の HLA ハプロタイプは, 日本人集団のハプロタイプと若干異なっていた. 今後, DRB1 のサブタイプおよび A-B-DRB1 以外のハプロタイプについても検討を行う予定である.

8

THE BENEFICIAL EFFECT OF HLA - DPB1 AND HLA - A MATCHING IN CORNEAL TRANSPLANTATION

○Batmunkh MUNKHBAT¹⁾, Masao HAGIHARA^{1,2)}
Tadayuki SATO²⁾, Fumiko TSUCHIDA²⁾
Kaoru SATO²⁾, Balgansuren GANSUVD¹⁾
Jun SHIMAZAKI³⁾, Kazuo TSUBOTA³⁾
Kimiyoishi TSUJI¹⁾

¹⁾Dept of Transplantation Immunology Tokai Univ., School of Medicine,; ²⁾Cell Transplantation Center, Tokai Univ, Hospital, Kanagawa,; ³⁾Dept of Ophthalmology, Tokyo Dental College, Tokyo, Japan

The effect of matching for HLA class I and class II alleles on corneal graft outcome was analyzed retrospectively, in a single center study from January 1991 through April 1996.

【Materials and methods】 The study involved 81 transplants at high- and low-risks of corneal graft rejection that were completed at least one-year follow-up period. Typing for HLA-A and HLA-B alleles were performed by PCR-SSOP method. PCR-RFLP method was used for HLA-DRB1, DQB1 and DPB1 genotyping.

【Results】 The analysis for each HLA locus separately, detected that HLA-DPB1 ($p=0.024$) and HLA-A ($p=0.039$) matchings were significantly associated with a higher rate of one-year rejection-free graft survival in high-risk transplants with matching (one or two-alleles matched) compared with those without (none allele matched) matching. The matching for HLA-A was also effective when high- and low-risk groups were analysed together ($p=0.025$). In contrast, there was no significant effect of HLA-B, DRB1 and DQB1 matching. Taking together HLA-A, B and DRB1, DQB1, DPB1 alleles and subdividing transplants into groups with and without matching for HLA class I and HLA class II respectively, revealed that at least one allele matching either for HLA class I ($p=0.022$) and HLA class II ($p=0.033$) was significantly associated with one-year rejection-free graft survival in high-risk transplants. We have shown that the matching for HLA class I allele was beneficial when high- and low-risk groups were analysed together ($p=0.036$).

【Conclusion】 Our findings indicate that HLA class I and class II DNA typing is clinically relevant for corneal transplants and especially the HLA-DPB1 and HLA-A matching have a beneficial effect. It therefore appears advisable to perform corneal transplantation in high-risk cases if at least one HLA-DPB1 or HLA-A allele is compatible.

9

HLA-E および HLA-G の発現とそれらの結合ペプチドについて

○石谷昭子¹⁾, 下嶋典子¹⁾, 長池知恵子¹⁾
Daniel E. Geraghty²⁾, 羽竹勝彦¹⁾

¹⁾奈良県立医科大学法医学

²⁾Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】 我々はすでに、2種の抗HLA-E抗体、および膜結合性抗原(Gm)と可溶性抗原(Gs)のそれぞれに反応する3種の抗HLA-G抗体の作製に成功しており、これら抗体を用いてHLA-EおよびGの胎盤における発現およびそれらHLAの結合ペプチドの解析を行った。

【方法】 抗体の作製: 抗HLA-E抗体についてはHLA-Aと-Eのハイブリッド細胞から得られたHLA-E蛋白で、また抗Gm抗体についてはHLA-G遺伝子導入マウス細胞より産生されたHLA-G蛋白でHLA-B27 transgenic miceを免疫した。抗Gs抗体についてはGs蛋白のC末端に位置する20アミノ酸の配列をもつペプチドを合成し、これにKLHを結合したものでBALB/cマウスを免疫し、以下は定法に従ってモノクロナル抗体を得た。結合ペプチド解析: 上記抗体およびw6/32のaffinity columnを用いて、221-AEHよりHLA-Eを、221-Gs, 221-Gmおよび胎盤よりHLA-Gを抽出し、これらより得られたペプチドをHPLC(140B, ABI)により精製し、pulse-liquid protein sequencer(476A, ABI)によりアミノ酸配列を決定した。

【結果】 胎盤において、Gmは母体脱落膜組織に侵入しつつあるextravillous trophoblast(ext)にのみ発現し、Gsはあらゆるtrophoblastに発現し、HLA-Eは反応は弱いですが、extに比較的強くvillous cytotrophoblastおよびsyncytio trophoblastに弱く発現していた。結合ペプチドについては、HLA-Eの場合は共存する他のクラス1分子のシグナルペプチドであった。HLA-Gの場合、培養細胞ではclass Iaの場合と同様に、各種細胞内蛋白由来のペプチドであったが、胎盤より抽出したHLA-Gの場合は、その結合ペプチドの大部分がcytokine receptorのsignal peptide様のものであった。

10

HLA-DR9トランスジェニックマウスにおけるヒトアセチルコリンリセプターペプチドの反応

○小林博也, 小久保 拓, 佐藤啓介, 木村昭治
片桐 一

旭川医科大学第2病理学

【目的】 若年発症型重症筋無力症(MG)は、HLA-DR9と相関を示すことが知られている。そこでHLA-DR9トランスジェニックマウス(TGM)をモデルとして、MGの標的自己抗原であるヒトアセチルコリンリセプター(AchR)の疾患発症の可能性に関わる、責任抗原ペプチド部位を同定する。

【方法】 AchR α 鎖の全アミノ酸配列をカバーする15残基長からなるオーバーラッピングペプチドを76種類合成し、これらをプールしてHLA-DR9トランスジェニックマウスに免疫した。そして、各ペプチドに対する増殖反応を検討した。更に、反応が認められたペプチドのDR9分子に対する結合能をビオチン化ペプチドを用いて、フローサイトメーターで定量した。

【結果】 5箇所のペプチドに反応が認められ、更にL-DR9細胞をAPCにして解析したところ、131-145番目のペプチドが反応し、この反応は抗DR抗体(L243)によって抑制された。またこのペプチドには、DR9分子結合ペプチドモチーフが存在した。

【考察】 このペプチドは、MG患者PBLを用いた増殖反応においても反応が認められる部位であり、MGの発症に関わる抗原ペプチドの可能性が示唆された。

11

HLA-DRにより提示されたRasあるいはp53ペプチドに反応するヒトT細胞の解析

○西村泰治¹⁾, 横溝 博^{1,2)}, 藤田 博^{1,2)}
佐谷秀行³⁾, 白水美香子⁴⁾, 横山茂之⁵⁾
小川道雄²⁾, 千住 覚¹⁾, 松下 祥¹⁾

¹⁾熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

²⁾同 医学部第2外科

³⁾同 腫瘍医学

⁴⁾理化学研究所細胞情報伝達

⁵⁾東京大学理学部生物化学

【目的】 Rasあるいはp53蛋白を標的とするT細胞性抗腫瘍免疫応答が, ヒトにおいて成立するか否か検討する。

【方法】 変異Rasあるいは正常なp53コアダメインに対応するペプチドを, ヒト末梢血単核球と培養してT細胞クローンを樹立した。

【結果および考察】 胃癌患者の脾細胞より, DRB1*0101拘束性に第12アミノ酸残基のGlyがValに変化した変異Rasペプチド(p3-17 G12V)を認識して増殖し, IFN- γ , TNF- α およびGM-CSFを産生するT細胞クローンを樹立した。T細胞は他の変異Rasペプチドにも反応し, 野生型Rasペプチドに対しても弱い自己反応性を示した。また, それぞれのリコンビナントRas蛋白にも反応した。さらにペプチドの第1DRアンカー残基のTyrをTrpに置換することにより, 抗原性の増強が誘導された。なお患者の癌組織には, Ras遺伝子の変異はなかった。またDRB1*1401拘束性に正常なアミノ酸配列を有するp53-ペプチドp191-204, あるいは野生型ならびに4種類のリコンビナント変異p53蛋白(V143A, R175H, R248W, R273H)に反応して, IFN- γ , GM-CSFおよびTNF- α を産生するT細胞クローンを樹立した。いずれのクローンも, CD4+ $\alpha\beta$ TCR+T細胞であった。変異p53蛋白は, 野生型蛋白がすみやかに分解されるのに対して細胞内に蓄積し, さらに種々のプロテアーゼに感受性を示す。したがってこの観察は, 癌化をもたらす変異p53蛋白に由来する正常なp53-ペプチドを標的として, 抗腫瘍免疫応答が生じる可能性を示唆する。これらの基本的には自己反応性T細胞が正常細胞よりも腫瘍細胞により強く反応し, 抗腫瘍免疫応答を誘導するかどうかは今後の重要な研究課題である。

12

HLA-DR β 37残基の多型がT細胞による抗原ペプチドの認識に与える影響の解析

○Chen Yu-Zhen, 松下 祥, 西村泰治
熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

【目的】 HLA-DRB1*0403と0406との間に観察されるDR β 37残基のTyr \rightarrow Ser多型は, インスリン自己免疫症候群への感受性の形成に大きな影響を与える。本研究はこのようなHLA-DR β 鎖の微妙な多型により生じるDR-抗原ペプチド複合体(TCRリガンド)の微細な変化が, T細胞の応答にどのような影響を及ぼすか検討し, T細胞の抗原認識機構を解析することを目的とする。

【方法】 自己のDRB1*0406により提示された非自己ペプチドMI2p54-68に特異的なT細胞クローンで, DRB1*0403による抗原提示によっても活性化されるYN5-32を用いた。またMI2p54-68上の第57~65の各アミノ酸残基を1個だけ置換した154種のアナログペプチドを抗原として用いた。各種ペプチドをパルスしたDRB1*0406あるいは0403陽性のアロ末梢血単核球を抗原提示細胞(APC)としてT細胞の増殖反応を測定し, アゴニスト活性を調べた。またMI2p54-68を前もってパルスしたAPCに, 可溶性のアナログペプチドを共存させ, T細胞増殖の抑制を観察することにより, TCRアンタゴニスト活性を調べた。

【結果および考察】 YN5-32は, DRB1*0406よりもDRB1*0403により提示されたMI2p54-68により強く反応した。APC上の抗原提示DR分子の種類により, アナログペプチドに対するYN5-32の応答は多様性を示し, 以下のようにまとめられた。つまりDR β 37残基の多型が, 34種類のペプチドに対するT細胞1包応答に大きな影響を与えることが示された。またその影響は, DR β 37残基から離れたペプチド上のN末端側の残基を置換したアナログに対しても観察された。

APC	TCR agonism		TCR antagonism		TCR bifunctional					
0403	+	+	-	-	+	+	-	-	agonism	antagonism
0406	+	-	+	-	+	-	+	-	antagonism	agonism
観察数	46	7	8	93	35	11	2	32	2	4

13

日本人 IDDM 患者において GAD65 自己反応性 T 細胞が認識する HLA クラス II・ペプチド複合体の同定

○田畑博己^{1,2)}, 金井隆幸¹⁾, 西山宗六²⁾
藤本茂紘³⁾, 松田一郎²⁾, 松下 祥¹⁾
西村泰治¹⁾

¹⁾熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

²⁾同 医学部小児科

³⁾国立都城病院小児科

【目的】 インスリン依存性糖尿病 (IDDM) のモデルマウスである NOD マウスの解析結果および IDDM 患者の検査所見より, 膵臓 β 細胞に発現する GAD (glutamic acid decarboxylase) 65 に対する自己反応性 T 細胞の応答に基づく同細胞の破壊が IDDM の病因と考えられている。IDDM では遺伝要因の関与が大きく, その中でも MHC クラス II 対立遺伝子が最も重要な役割を担っている。さらに, NOD マウスの I-Ag7 および白人の患者集団で増加している *HLA-DQ* 対立遺伝子の共通点であるクラス II β 鎖第 57 残基がアスパラギン酸以外のアミノ酸であることの重要性が指摘されている。ところが日本人 IDDM で最も感受性を示す DRB1*0405-DQ4 ハプロタイプに関してはこの仮説は当てはまらない。本研究は, 日本人 IDDM 患者において GAD65 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 による疾患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】 GAD65 のアミノ酸配列に基づいて 70 種のオーバーラッピングペプチドを合成し, IDDM 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 細胞クローンを樹立する。抗原提示分子はアロ抗原提示細胞, HLA クラス II 遺伝子を発現する L 細胞トランスフェクタントによる抗原提示, および, その抗 HLA クラス II mAb によるその阻止を観察して決定する。

【結果および考察】 5 名の患者より樹立した 5 つの T 細胞クローンの抗原提示分子は HLA-DRB1*0101, DRB1*0901, DRB4*0103, DPB1*0201 と多様であり, T 細胞エピトープも多様であった。また, T 細胞クローンは GAD65 蛋白にも反応を認めた。この現象は自己免疫疾患における "epitope spreading" を反映したものと推測された。

14

膵島抗原 ICA69 に対する IDDM 患者リンパ球の反応

○佐藤啓介, 荻野 武, 小林博也, 木村昭治
片桐 一

旭川医科大学第 2 病理学

【目的】 インスリン依存性糖尿病 (IDDM) は日本人では HLA-DR4, DR9, DQ4 等と相関がある自己免疫疾患である。最近, その発症や進展予知マーカーの一つである膵島細胞抗体の標的蛋白として ICA69 蛋白が同定された。今回, この ICA69 蛋白内に存在する責任抗原ペプチド部位を同定することを目的とした。

【方法】 ICA69 蛋白のオーバーラッピングペプチドを合成し, それらを抗原として IDDM 患者 18 人の末梢血リンパ球の増殖反応を検討した。また, 反応のみられたペプチドと HLA-DR 分子との結合をフローサイトメーターにより測定した。

【結果】 HLA-DR9 を有する IDDM 患者と比較して HLA-DR4 を有する患者に強い増殖反応を示すペプチドが数個認められた。それらのうち, 2 種類のペプチド (71-90, 191-210) に HLA-DR4 分子への結合性がみられた。

【考察】 上記の 2 種のペプチドは ICA69 蛋白内では HLA-DR4 によって抗原提示され, また T 細胞を活性化しうる責任抗原ペプチド部位として重要であると思われる。また, このペプチド (191-210) の相同性検索を行なった結果, HCMV, HSV と 6 アミノ酸オーバーラップする配列が存在しており, これらのウイルス蛋白との交叉免疫反応が発症の一つの要因として関与している可能性も考えられる。

15

サハリン島ニブキ族のHLAタイプ

○桑山昌洋¹⁾, 屋敷伸治¹⁾, 楼 宏¹⁾, 李 洪川¹⁾
藤吉利信¹⁾, 末原雅人²⁾, 山下満左裕³⁾
速水正憲³⁾, 納 光弘²⁾, 園田俊郎¹⁾

¹⁾鹿児島大学医学部ウイルス学

²⁾同 第三内科

³⁾京都大学ウイルス研究所病原ウイルス

【目的】 サハリン島の先住民族ニブキ族にHTLV-Iキャリアが局在していることが明らかにされ、南九州、沖縄および北海道アイヌのHTLV-Iキャリア集団との近縁性が注目されている。今回、ニブキ族のHLA-DNAタイピングを行い、これらHTLV-Iキャリア集団の遺伝的近縁性を解析した。

【方法】 ニブキ族の凍結保存リンパ球53例（HTLV-Iキャリア4例、非キャリア49例）からグアニジン塩酸法により高分子DNAを分離精製しDNAタイピングに供した。HLA-ABCアレルはPCR-ARMS法（12IHW）でアレルタイプを決定した。DRB1とDQB1アレルはPCR-SSO（ELPHA）とPCR-RFLP（SMI-TEST）法で決定した。

【結果】 ニブキ族のHLA-ABCアレルはA2（28%）、A24（59%）、B40（46%）、B35（15%）、Cw*0303（22%）、Cw*0304（33%）が検出された。DRB1アレルは*0901（16%）、*1402（15%）、*1401（11%）、*1106（9%）、*1403（8%）、*1406（6%）、DQB1アレルは*0301（42%）、*03032（16%）、DQB1*05031（15%）の他、9アレルが検出された。

【考察】 ニブキ族に高頻度でみられたB40、DRB1*0901、*1402、*1403、*1406は南九州、沖縄、北海道アイヌと南米インディオにも好発しており、特にHTLV-Iキャリア集団に高頻度に検出されるアレルであった。サハリンのニブキ族は南九州・沖縄人、北海道アイヌおよび南米先住民と共通の祖先をもつ民族であり非常に近縁な関係にあると考えられた。今回、ニブキ族から検出されたDRB1*1106は北海道日高地方のアイヌ民族に検出されており、この遺伝子はアイヌとニブキ民族にのみ特発する新しい遺伝子と考えられた。

16

献腎移植全国共通HLAクラスIタイピング用トレイ（JNOS1.1）の評価

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

¹⁾国立佐倉病院 HLA 検査室

²⁾同 臨床研究部

³⁾同 外科

⁴⁾昭和大学医学部細菌学（*研究会代表）

【目的】 JNOS1.1は、（社）日本腎臓移植ネットワークのHLAタイピング共同研究会*が作成し、供給しているクラスI用トレイである。今回、その使用結果をもとに抗血清を解析し、トレイの評価を行ったので報告する。

【方法】 主に献腎移植希望患者と献腎予定者（ドナー）の全血から、ナイロンウールカラム法または免疫磁気ビーズ法により分離したT細胞をパネルセルとして用いた。JNOS1.1と全施設共通のクラスI用補体を使用し、NIH標準法に従って細胞障害性試験（LCT）を実施した。

JNOS1.1は平成8年12月現在、45施設に2,440枚配布された。今回、1,426枚分のデータを回収し、解析を行った。

【結果】 コントロールのNHSとALSを除く、70種の抗血清のR値（R value）とS.I.（Strength Index）の平均は0.90、75.2であった。53種（76%）の血清がR値0.90以上だったが、8種が0.80以下であり、検討が必要となった。実際のタイピングでは、B15とB40関連抗原において判定困難なケースが認められた。また、B（60、61）の時のB61など、一部の抗原でタイプ不可能となる場合があった。なお、タイピングに施設間差があることも、今回の結果により示唆された。

【考察】 通常の日本人のタイピングに関してJNOS1.1は、充分使用に耐え得ると思われた。しかし、一部の抗原が判定できない場合等があり、更なる充実が望まれた。今後も、JNOS1.1を使用した精度管理等を継続し、常に品質管理やタイピング手技の確認を行う予定である。

*HLAタイピング共同研究会委員 ※標記以外
笹木剛志（市立札幌病院）、門伝一江（仙台社会保険病院）、金 信子（虎の門病院）、加村弘美（名古屋第二赤十字病院）、橋本光男（兵庫県立西宮病院）、橋口裕樹（福岡赤十字病院）、前田平生（埼玉医科大学総合医療センター）、奥山正明（愛媛県立衛生研究所）、小河原 悟（福岡大学医学部）

17

生体血縁間腎移植症例における HLA class I の DNA タイピング

○新宅究典¹⁾, 福田康彦²⁾, 木村彰方³⁾, 星野修司¹⁾
伊達是志^{3,4)}, 田代裕尊¹⁾, 古川雅博¹⁾
大段秀樹¹⁾, 住元 了¹⁾, 桜田 瞳¹⁾, 浅原利正¹⁾
土肥雪彦¹⁾

¹⁾広島大学医学部第2外科

²⁾県立広島病院第1外科

³⁾東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患

⁴⁾久留米大学医学部小児科

【目的】 生体血縁間腎移植症例についてクラス I (HLA-A, B) の DNA タイピングを行い, ドナー・レシピエント間の HLA 適合性を再評価し, 従来の血清学的タイピング法に対する DNA タイピング法の有用性を検討した。

【方法】 広島大学医学部付属病院第二外科および関連病院にて移植を行った生体血縁間腎移植症例65ペアを対象とした。検者末梢血より DNA を抽出し, HLA-A についてはエクソン1からエクソン3までを, また, HLA-B はエクソン2を特異的プライマーにてそれぞれ増幅した。HLA-A では91個の, HLA-B では28個のオリゴヌクレオチドプローブを用いた PCR-SSOP 法により, HLA-A および B のタイピングを行った。

【結果】 HLA-A DNA タイピングにより33の血清学的ブランクが解消された。また, HLA-A2, A26, A11などの血清学的特異性をサブタイプすることが可能となった。特に, 血清学的タイピングではサブタイピングが不可能であった HLA-A2 についてはサブタイプされた特異性が56にもおよび, その結果, 血清学的タイピングにもとづいたマッチングカテゴリーの変更となった症例が2ペア認められた。HLA-B については, 17の血清学的ブランクが解消された。またクラスII適合症例において, DNA タイピングにより, HLA-A 適合性の腎移植予後に対する影響がより明らかとなった。

【考察】 HLA-A DNA タイピングにより日本人集団に高頻度に認められる HLA-A2 のサブタイピングが可能となり, 生体血縁間という厳しい条件下においてもマッチングカテゴリーの変更を認めたものがあつた。今後, 献腎移植におけるドナー選択にあたり, HLA クラス I についても DNA 法による正確なマッチングを行い, 移植予後の向上を図ることが重要であると考えられる。

18

SOLUBLE FORM OF HLA CLASS I ANTIGEN (sHLA-I) INHIBITS THE INDUCTION OF EB VIRUS SPECIFIC CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES AND SUPPRESSES THEIR ACTIVITY *IN VITRO*

○Balgansuren GANSUVD¹⁾
Masao HAGIHARA^{1,2)}
Batmunkh MUNKHBAT¹⁾
Kimiyoishi TSUJI¹⁾

¹⁾Dept. of Transplantation Immunology, Tokai Univ., School of Medicine;

²⁾Cell Transplantation Center, Tokai Univ, Hospital, Kanagawa, Japan

The suppressive effects of sHLA-I on the alloreactive T lymphocytes and on the humoral alloimmunization have been reported. Here we demonstrate the inhibitory effect of sHLA-I on the virus specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) *in vitro*.

【Materials and method】 sHLA-I was prepared 1) from culture supernatant (sup) of cell lines, which produce alternative splicing form of sHLA-B7 (sB7), and 2) from sup, of EB virus transformed cells (EB sup). Virus specific CTLs were induced in a 24 well plate (2 ml/well) by 1 week culture with auto EB cells. Exp 1, In the culture, sB7 (124 ng-830 ng in total amount) or EB sup (27.4 ng-254 ng) were added repeatedly from the beginning of CTL induction and CTL activity was measured by ⁵¹Cr release assay. The cell viability was counted by trypan blue staining and the cell lineage (CD4/8 ratio) was evaluated by flow-cytometry.

Exp 2. CTLs, which were established by 1 week culture, were incubated with sB7 (124 ng-830 ng) for 1 hour and CTL activity was measured similarly.

【Results】 1. Both sB7 and EB sup inhibited the generation of CTLs in a dose dependent manner. (sB7; 100% at the concentration of higher 365 ng/well, and 71.7% at 124 ng/well, EB sup; 97% at 171 ng/well, and 76.5% at 27.4 ng/well. The inhibitory effect of sB7 was shown HLA-B7 (+) and HLA-B7 (-) CTLs, which was blocked by anti HLA-I mAb, w6/32. The cell viability has fallen down from 100% to 30.9% and CD4/8 ratio has changed from 1:3 to 3:1 in the culture with sB7.

2. The high concentration (830 ng) of sB7 completely (100%) suppressed CTLs activity, whereas the low concentration did not.

【Conclusion】 Bioengineered or naturally occurred sHLA-I molecules inhibit the induction of EBV specific CTLs and their activity *in vitro*. And their effects were shown in non allo specific manner.

19

死体腎移植オンコール検査に適したPCR-MPH法の改良—DRB1 low highおよびDQB1 low resolution levelの同時検査—

○金 信子¹⁾, 高橋孝喜¹⁾, 柏瀬貢一²⁾, 赤座達也²⁾
川井信太郎³⁾, 加藤邦樹³⁾, 徳永勝士⁴⁾

¹⁾虎の門病院輸血部

²⁾日本赤十字社中央血液センター

³⁾湧永製薬バイオ研究所

⁴⁾東京大学医学部人類遺伝学

【目的】 骨髄バンク・ドナーのHLA DNA typing 検査として、既に実績のあるPCR-MPH法を死体腎移植オンコール検査に適するよう改良した。すなわち、検査を緊急迅速に行なうために、DRB1 low, high resolution level およびDQB1 low resolution level をワンステップで同時にタイピングし、確実にHLA型を決定することを目的とした。

【方法】 抽出DNAをbiotin標識primerを用いて増幅し、probeを固定したmicrotiterplate上でhybridizationさせる。TMAC液で洗浄後、peroxidase-avidin酵素液とincubation, 洗浄を経て基質を添加し、発色を吸光度計で検出する。反応パターン表を参照し、DRB1 low, high およびDQB1 low resolution level のタイプを決定する。従来、上記三者のPCR増幅の条件(温度設定)が各々異なっていたが、オンコール検査に適するよう同一温度で同時に増幅して、検査した。

【結果】 DNA抽出後約4時間でタイピングできた。DRB1 high およびDQB1 low resolution level の結果を照合するため、DRB1 low resolution level のタイピングがより確実に行なわれた。

【考察】 死体腎移植オンコール時の検査は、簡便、迅速、明解、確実で、汎用し得る方法であることが必要である。特に、現状では血清学的レベル相当、DRB1 low resolution level のタイピングを短時間で確実に実施し得る方法が期待される。既に実績のあるPCR-MPH法は比較的DNA解析経験の浅い技師でも習得し易く、DRB1 low, high resolution level およびDQB1 low resolution level をワンステップで同時に検査する本変法が有用と考えられた。

20

直接塩基配列決定法によるHLA-DNA 遺伝子の多型性解析

○成瀬妙子¹⁾, 河田寿子¹⁾, 松澤由美子¹⁾
鍵谷雅彦²⁾, 能勢義介³⁾, 鍋谷 登⁴⁾
一色 玄⁵⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾横浜市立大学医学部眼科

³⁾兵庫県赤十字血液センター

⁴⁾ナベヤクリニック

⁵⁾大阪市立大学医学部小児科

【目的】 HLAクラスIIのDQ-DP間に位置しているHLA-DNA 遺伝子は、1985年に発見された新しい遺伝子である。これまでその機能は不明であったが、最近、DNAがその近傍に位置するDOB遺伝子とヘテロダイマーを形成し、クラスII抗原提示にかかわっているという報告がなされた。そこで今回、HLA-DNA 遺伝子の多型性について検討を行った。

【方法】 HLA-DNA 遺伝子の第2エキソン、第3エキソンを増幅する2組のプライマーを作成し、第10回の国際組織適合性会議で公認されたHLA-D抗原ホモ接合体細胞30例を用いて、PCRにより増幅後、蛍光自動シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した。

【結果】 HLA-DNA における解析は、328番目と520番目の2箇所が多型性が認められ、328番目がCとT、520番目がGとAの2種で、これらの組み合わせにより計4種の対立遺伝子の存在が認められたが、これらはいずれも同義的な変化で、アミノ酸の変化を伴うものはなかった。

【考察】 HLA-DNA 遺伝子はその近傍に位置するDM遺伝子と相互的に機能していると考えられることから、多型性の有無は、抗原提示能の解明に重要と考えられる。今回の解析では、アミノ酸の変化を伴う多型性は検出されなかったが、今後はCY領域やTM領域などの検討を行い、DM遺伝子や他のクラスII抗原遺伝子との連鎖不平衡についても解析を行う予定である。

21

血液直接 PCR 法による HLA-DNA タイピングの検討

○西村直行¹⁾, 中山知子¹⁾, 吉田玲子¹⁾, 児嶋浩一¹⁾
加藤真吾²⁾, 成瀬妙子³⁾, 猪子英俊³⁾

¹⁾島津製作所基盤技術研究所

²⁾慶応大学医学部微生物学

³⁾東海大学医学部分子生命科学

【目的】 現在, PCR 法を用いて末梢血白血球遺伝子の解析を行うためには, PCR 前に白血球から何らかの方法で DNA の抽出を行う必要がある。これは血液中に PCR 阻害物質が存在するためである。我々はこの阻害物質の作用を著しく抑制できる物質を見いだした。今回, 本物質を含有した当社反応液 (Ampdirect™) に血液を直接添加する PCR 系を用いて HLA-DNA タイピングを試みた。

【方法】 抗凝固剤 (ACD) を用いて採血した 6 名の血液を 2% の濃度で Ampdirect™ に直接添加した後, 直ちに *DRB1*, *DQB1* および *DPBI* 遺伝子に特異的なプライマーを加え 40 サイクルの PCR を行った。PCR 産物は 2.5% アガロースゲル中で電気泳動を行った。次に, PCR 産物を HLA-DNA タイピングに必要な制限酵素で 37°C, 1.5 hr 処理し, 反応液を 12% ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。

【結果】 1) *DRB1* 遺伝子の各グループ (DR1-10) のそれぞれの型に特異的なプライマーを用いた血液直接 PCR 法により, 用いたいずれの血液検体からも *DRB1* 遺伝子のグループ型判定を行うことが可能であった。また, この判定結果は精製 DNA を用いた通常の PCR 法を用いた結果と完全に一致した。2) *DRB1*, *DQB1*, *DPBI* 遺伝子特異的なプライマーを用いた血液直接 PCR 法により得られた PCR 産物の RFLP 解析により, いずれの血液検体からもそれぞれの遺伝子座位の遺伝子型が決定できた。また, この結果は精製 DNA を用いた通常の PCR-RFLP 法の結果と完全に一致した。

【考察】 本方法は, 血液を直接 Ampdirect™ に添加して PCR を行えるため, 血液からの DNA 精製の過程をスキップ出来ると共に, DNA 精製に伴う種々の問題 (検体の浪費, 検体の取り違えや検体間のコンタミネーション等) が軽減できる。さらに, 今回の方法では PCR 産物に血液が混入しているにもかかわらず, PCR 産物から直接 RFLP 法が行えた。従って, HLA タイピングのような高度な遺伝子多型の解析には, 本方法は最適であると考えられる。

22

PCR-SSP 用泳動板の改良

○酒巻建夫, 苅部正宏, 飯田好江, 山崎正明
柏原英彦

国立佐倉病院臨床研究部 HLA 検査室

【目的】 PCR-SSP 法は少数の検体を迅速にタイピングできる優れた方法である。献腎移植ドナー発生時にも *DRB1*, *DRB3-5*, *DQB1* のタイピングに利用している。現在増幅バンドの検出に用いている泳動板は, 20 x 25 cm の板に 1 列 30 検体用のコウムを 6 列セットしている。個々に Loading buffer と PCR 後の反応液を混合しゲル溝に注入する。このために一時に操作する検体数は 30 がほぼ限界である。それ以上の検体を扱うためには複数の泳動装置や時間をずらして泳動を行う必要がある。今回多検体処理ができるように, 泳動板に改良を加えた。

【方法】 設計に際し, ゲルサイズは変更せず, 市販マルチチャンネルピペットを利用できるようにした。DRB, *DQB1* のタイピングでは 1 cm ほどの距離を泳動すれば十分であるので, 2 cm 間隔に 12 枚のコウムがセットできるようにした。次に歯のピッチを 9 mm, 厚さを 1 mm, 幅を 4.5 mm とし, 隣同士の歯に 4.5 mm の間隙を設けた。これにより 1 列に 21, ゲル板あたり 252 の検体まで泳動することが可能となる。また, 将来的に, クラス I の大きなサイズの PCR 産物を検出できるように配慮した。そのためにコウムの左右の余白部分を均等には取らず, 左右を逆にすると歯と歯の間隙に次列の歯が来るように設定した。このことにより, 陽極側の第 1 列を除き最大 4cm まで泳動できる。また高温のアガロース溶解液を注いだときに起こるアクリル板の反り防止用に補強材を両端に挿入した。製作は日本エイドー社に依頼した。

【結果】 実際にゲル板を作製すると, 反り防止用の補強材の導入により, 底抜けゲルが解消された。また 8 連のマルチチャンネルピペットを用いることにより, 1 トレイ, 96 検体の PCR も数分間ですべてゲルにロードすることができた。

【結語】 改良ゲル板を用いることにより短時間に, 効率よく簡便に多数検体の泳動が掛けられるようになり, バンドも鮮明になった。

23

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析 1, *IkBL* 遺伝子から *S* 遺伝子間452 kb のシークエンシング解析

○椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾, 水木信久¹⁾
後藤 香¹⁾, 山形直美¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 山形哲司³⁾
福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾, 田口 進²⁾, 渡辺幸治²⁾
小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾
木村 穰¹⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾不二家バイオ研究所

³⁾国立遺伝学研究所進化遺伝

【目的】我々は尋常性乾癬やベーチェット病などの疾患感受性遺伝子の同定をひとつの目的として, HLA 領域のシークエンシング解析を進め, HLA クラス I 領域についても大規模の塩基配列を決定しつつある. 本研究では, まず, *TNFB* 遺伝子のテロメア側に位置する *IkBL* 遺伝子から *S* 遺伝子間の452 kb について, その塩基配列を決定し, 既知の遺伝子とのホモロジー検索を行った.

【方法】YAC クローンには, Boeth 由来の CEPH YAC745D12並びに CGM1由来の Y109を用いた. これより, Super Cos 1あるいは pWE15ベクターを用いてコスミドライブラリーを作成し, コスミドコンティグマップを作成した. シークエンシングテンプレートには, ショットガン法により得られたランダムクローンをを用い, 373S および377 PRISM (ABI 社) を用いて, 塩基配列を決定した. その後, GRAIL gene finding program を用いて, エクソンを予測した後, その領域について BLASTn, BLASTx および FASTA program を用いて, ホモロジー解析を行った.

【結果および考察】*IkBL* 遺伝子から *S* 遺伝子までを含む14個のコスミドクローンの塩基配列を決定した結果, その塩基数は452, 312 bpであった. この領域におけるホモロジー解析を行ったところ, 17個の既知遺伝子および既報の2つの DNA 断片と高いホモロジーを示す領域が存在した. また, EST (Expressed sequence tag) と高いホモロジーを示す領域が7箇所, 一部の領域の RNA プロット解析にて陽性であった領域が4箇所存在したことから, さらに, 新規遺伝子が存在するものと考えられる. この領域内に存在した *HLA-B* と *-C* の下流側30 kb, *MICA* と *MICB* の上流側30 kb において, それぞれ大規模な遺伝子重複が認められ, これらは今後, クラス I 領域における遺伝子重複のメカニズムを追及する上で重要な手がかりになるものと考えられる.

24

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析 2, *HSR1* から *HLA-92* 間314 kb のシークエンシング解析

○岡 晃¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 山形直美¹⁾
吉川枝里¹⁾, 山形哲司³⁾, 福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾
田口 進²⁾, 渡辺幸治²⁾, 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾
田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾, 木村 穰¹⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾不二家バイオ研究所

³⁾国立遺伝学研究所進化遺伝

【目的】これまでに, *HSR1* から *HLA-92* (*HLA-L*) 遺伝子間における構造解析はなされておらず, また, 見いだされている遺伝子も少ない. そこで, 本研究では, この領域の遺伝子構成を明らかにすることを目的として, 全314 kb にわたる塩基配列を決定し, 既知の遺伝子とのホモロジー検索を行った.

【方法】YAC クローンには, Boeth 由来の CEPH YAC 960H11を用いた. これより, Super Cos 1ベクターを用いてコスミドライブラリーを作成し, コスミドコンティグマップを作成した. シークエンシングテンプレートには, ショットガン法により得られたランダムクローンをを用い, 373S および377 PRISM (ABI 社) を用いて, 塩基配列を決定した. その後, GRAIL 並びに HEXON gene finding program を用いて, エクソンを予測した後, その領域について BLASTn, BLASTx および FASTA program を用いて, ホモロジー解析を行った.

【結果および考察】*HSR1* 遺伝子から *HLA-92* までを含む12個のコスミドクローンの塩基配列を決定した結果, その塩基数は314, 391 bpであった. この領域におけるホモロジー解析を行ったところ, 6個の既知遺伝子 (セントロメア側から *HSR1*, *HLA-E*, *TC4*, *MICC*, *HLA-30*, *HLA-92*), 7つの HFE linking fragment (Totaro *et al*, 1995, 1996, Gruen *et al*, 1996) がそれぞれ存在した. また, EST と高いホモロジーを示す領域が *HLA-30* と *HLA-92* 間に2箇所存在した. この内の1つの EST は多発性硬化症患者由来の cDNA ライブラリーより分離されたものであり, この新規遺伝子と多発性硬化症との関連が注目される.

25

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析 3, HLA クラス I 領域におけるシークエンシング効率

○山形直美¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾
 水木信久¹⁾, 後藤 香¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 山形哲司³⁾
 福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾, 田口 進²⁾, 渡辺幸治²⁾
 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾
 木村 穰¹⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾不二家バイオ研究所

³⁾国立遺伝学研究所進化遺伝

【目的】我々は、コスミドあるいはBACクローンから、ショットガン法により調製したシークエンシングテンプレート塩基配列を373Sおよび377 PRISM (ABI社)を用いて決定している。

本報告では、最近シークエンシング解析を終了した3つのコスミドクローンそれぞれの平均した解読塩基数、1シークエンスあたりの解読不能な塩基数、アセンブリの結果から得られたシークエンシングデータの信頼性について述べる。

【結果および考察】3つのコスミドクローン (ue, uf, ug) のサンプル数はそれぞれ656, 753, 616シークエンスであり、そのベクター配列を除去した平均解読塩基数は、468 bp, 537 bp, 530 bpとやや短かった。ところが、1サンプルあたりの解読不能な塩基数はそれぞれ2.03 bp, 0.78 bp, 1.68 bpと少なかったことから、現法のテンプレートの調整法やゲルの作成法に問題はないものと考えられた。また、各コスミドクローンにおけるアセンブリの結果、全サンプル数におけるコンティグに参加しなかったものの割合はそれぞれ13/656, 14/753, 0/616であり、この内訳として、大腸菌ゲノムの混入かあるいはキメラであるものがほとんどであった。さらに、各コスミドクローンの重複度はそれぞれ6.7, 8.0, 7.3と高い値を持って塩基配列を決定しており、その理論的な塩基配列の精度はいずれも99.9n%であった。

従って、これら3クローンの塩基配列はその後の遺伝子の同定や機能などの解析に十分たえうる信頼性の高いデータと考えられる。

現在、シークエンシング解析を終了した全てのクローンについて同様な解析を行っている。

26

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析 4, S 遺伝子から HSR1 間における BAC クローンの整列化

○吉川枝里¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾
 山形直美¹⁾, 山形哲司³⁾, 福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾
 田口 進²⁾, 渡辺幸治²⁾, 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾
 田代弘行²⁾, 奥村克純⁴⁾, 池村淑道³⁾, 木村 穰¹⁾
 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾不二家バイオ研究所

³⁾国立遺伝学研究所進化遺伝

⁴⁾三重大学生物資源

【目的】これまでのHLAクラスI領域におけるYACのマッピング解析より、HLA-Cのテロメア側200 kbに位置するS遺伝子とHLA-Eのセントロメア側50 kbに位置するHSR1間の距離は約400~600 kbであると推定されているがその構造は明かではない。この領域を含むYACクローンには、欠失やキメラなどの組換えを起こしたものが多く、これらをシークエンシング解析の材料に用いるには適していない。そこで、我々はインサートDNAの組換えが起こりにくい大腸菌F因子由来のBAC (Bacteria Artificial Chromosome) システム (平均インサートサイズ: 120 kb) を用いて、S遺伝子からHSR1までのコンティグマップを作成することを目的とした。本実験では、この領域の3つのSTS (sequence tagged site) マーカーを用いてスクリーニングを行い、分離したBACクローンの特徴付けを行ったので、これらについて報告する。

【方法】BACライブラリーには、Research Genetics社のBAC DNA pool (Cat, No.96001p) を用い、PCR法により、スクリーニングを行った。STSマーカーには、S遺伝子、152G3, 188A4を用いた。その後、FISH解析、シークエンシング解析、制限酵素断片長の比較およびサザン解析によりBACクローンの特徴付けを行った。

【結果および考察】スクリーニングの結果、1つのS遺伝子陽性クローン (53L9)、2つの152G3陽性クローン (334H13, 365C15)、1つの188A4陽性クローン (321E19) が分離された。これら4クローンのFISH解析を行った結果、4クローンとも6p21.3に位置していることが明らかとなった。この内、53L9は、S遺伝子のセントロメア側20 kb付近からHSR1の方向に230 kbをカバーするクローンであった。従って、53L9はシークエンシング解析に有用なクローンであるものと考えられた。今後、これら4クローンの関連性について追及するとともに、HSR1を用いたBACライブラリーのスクリーニングを行う予定である。

27

ANCA 陽性血管炎と HLA

○田中智一郎¹⁾, 長谷川善之¹⁾, 小河原 悟¹⁾
村田敏晃¹⁾, 兼岡秀俊¹⁾, 内藤説也¹⁾, 道永 功²⁾

¹⁾福岡大学病院腎センター

²⁾川浪病院腎センター

【目的】急速進行性糸球体腎炎 (rapidly progressive glomerulonephritis, RPGN) は, 血尿, 蛋白尿などの腎炎所見とともに数週から数カ月の経過で急速に腎不全が進行する腎炎の中で最も激しい臨床症候群である。最近 RPGN を呈することが多い特発性半月体形成性腎炎や系統的血管炎の患者血清中に好中球細胞質に対する自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody, ANCA) が発見された。臨床的に重要な p-ANCA は, myelo-peroxidase (MPO) に対する自己抗体で, 顕微鏡的多発動脈炎や特発性半月体形成性腎炎など細い血管の壊死性血管炎に特異性が高い。自己抗体を有する疾患は HLA 抗原型と相関することが多く, この血管炎についても検討することとした。

【対象】 P-ANCA が陽性の血管炎13例。

【方法】 HLA の class I を血清学的方法で, class II を血清学的方法および PCR-RFLP 法でタイピングした。正常日本人の HLA 頻度は, 11th 国際組織適合性学会のデータを使用した。

【結果】 13人の患者のうち有意差を示す抗原は, class I 抗原としては A26 (患者 vs 対照=53.8% vs 20.6%, $P_c=0.03$, $RR=4.5$), class II 抗原としては DR8 (61.5% vs 24.9%, $P_c=0.03$, $RR=4.8$) であった。PCR-RFLP 法では DRB1*0803 (45.4% vs 14.1%, $P_c=0.18$, $RR=3.8$) であった。負の相関を示す抗原はなかった。

【考察】 ANCA 陽性血管炎と HLA との相関は白人で DR13が負の相関にあるとの報告しかない。日本人における頻度の比較において, 血清学的に A26, DR8が有意に高く, その中でも DRB1*0803の頻度が高い傾向にあり, 疾患感受性を有すると思われる。今後症例数を増やし追試を予定している。

28

HCV 陽性心筋症及び心サルコイドーシスにおける HLA 抗原の多型性解析

○松澤由美子¹⁾, 松森 昭²⁾, 成瀬妙子¹⁾
安藤 等³⁾, 石原麻美⁴⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾京都大学医学研究科循環器病態学

³⁾湘南赤十字血液センター

⁴⁾横浜市立大学医学部眼科

【目的】拡張型心筋症の発症について, 松森らは C 型肝炎ウイルス (HCV) との関連を示唆したが, HCV 感染者の肝炎発症には HLA クラス II 抗原の多型性が関与することから, 心筋症の発症にも HLA 抗原が関与している可能性が考えられる。一方, 心サルコイドーシスについては, 眼・肺サルコイドーシスがすでに我々のグループが報告したように, DR52関連の DRB1アレル (DRB1*11, 12, 14, 08) との相関が知られていることから, どのような HLA 抗原と相関するか興味をもたれる。そこで我々は両疾病について患者群の HLA 抗原タイピングを施行し, 一般集団と比較, 検討した。

【方法】 HCV 陽性心筋症患者14例と心サルコイドーシス患者26例を用い, HLA クラス I 抗原は血清学的検査法により, クラス II 抗原は PCR-RFLP 法を用いて DNA タイピングを行い, 健常一般集団136例と比較した。

【結果】 HCV 陽性心筋症患者群では, Cw3の減少と, A11, B67の増加が見られた。また, 心サルコイドーシスでは DQA1*0103, DQB1*0601, DRB1*1502, 0803の増加と DQA1*0101, DQB1*0501, DRB1*0101の減少が認められた。

【考察】今回, HCV 陽性心筋症患者群に A11と B67が認められたことから, 特定の HLA クラス I 抗原の関与が疑われた。さらに, 若干ではあるが14例中6例に DQA1*0103-DQB1*0601ハプロタイプが認められ一般集団と比べ増加していたことから, これらの遺伝子の関与も疑われる。また, 眼・肺サルコイドーシスでは, DR52関連の DRB1アレルとの正の相関, DRB1*0101と DRB1*1302との負の相関が認められているが, 心サルコイドーシスについては負の相関の DRB1*0101が共通に認められるものの, 正の相関に関しては DRB1*1502と0803と両方に連鎖する DQ 抗原 (DQA1*0103-DQB1*0601) が第一義的な相関が認められることから, 心サルコイドーシスと眼・肺サルコイドーシスとは発症機構が異なる可能性が示唆された。

29

無精子症と HLA

○佐田正晴¹⁾, 式田有里¹⁾, 辻 隆之¹⁾, 高原史郎²⁾,
辻村 晃²⁾, 奥山明彦²⁾, 成瀬妙子³⁾, 猪子英俊³⁾

¹⁾国立循環器病センター研究所

²⁾大阪大学医学部泌尿器科

³⁾東海大学医学部分子生命科学

無精子症とは精液検査で精子を全く認めない場合の総称で, その原因は多種に及んでいるが一般に精子形成障害によるものと精子輸送通過障害によるものに大別される。両者は精巣生検と精管造影検査で容易に鑑別可能で, 更に精子形成障害において無精子症と高度乏精子症との区分は精巣生検により容易に鑑別できる。今回我々は不妊外来を受診した無精子症患者を対象に HLA 疾患感受性について検討したので報告する。

【対象および方法】 大阪警察病院, 大阪中央病院および大阪大学病院を受診した無精子症患者のうち, 精巣生検を施行し Johnsen score count で score 7以上を示し精子輸送路通過障害による無精子症および高度乏精子症患者を確実に除外した65症例を今回の対象とした。対象症例の HLA-A, -B 抗原は LCT 法および PCR-SSP 法により同定した。HLA-DR 抗原, DRB1 allele の決定は PCR-LiPA 法および PCR-SSP 法を用いた。

【結果】 健常日本人と無精子症との抗原頻度, allele 頻度の比較検討から, class I 抗原では HLA-A33 ($p < 0.0001$, RR = 4.0), HLA-B44 ($p < 0.0001$, RR = 8.4), B13 ($p < 0.007$, RR = 4.8) で有意に高い相関を, class II 抗原では DR13 ($p < 0.0001$, RR = 5.9) また allele 頻度では DRB1*1302 ($p < 0.0001$, RR = 8.2) で有意に高い相関を認めた。

30

グアテマラにおけるシャーガス病の免疫遺伝学的解析

○平山謙二¹⁾, Sandra Juarez¹⁾, 菊池三穂子¹⁾
柳 哲雄²⁾, Maria Paula de Lopes³⁾, 金子 聡⁴⁾
Oscar Ayau⁴⁾, Julio Argueta⁴⁾, Vivian Matta³⁾
Milta Iraheta⁴⁾, Tamara Obispo⁴⁾
森本 勲⁵⁾, 曾根敏雄¹⁾, 嶋田雅暁⁵⁾, 多田 功²⁾
¹⁾埼玉医科大学医動物学, ²⁾長崎大学熱帯医学研究所原虫,
³⁾Dept of Cyto., Fac. of Chem. Scie. and Pharm. USAC.,
⁴⁾国際協力事業団, ⁵⁾産業医科大学熱帯病

【目的】 シャーガス病は原虫類である Trypanosoma cruzi の感染によって引き起こされる疾患でその患者は, 中南米に広く存在する。急性期において, ヒトの体内に入った原虫は特に心筋に好んで侵入し, 著しく増殖するが, この場合凡心筋炎を引き起こす。慢性期には人によっては, 心筋炎から心不全へ移行し, また, まれには消化管の自立神経系を侵して消化管の巨大拡張による機能不全により死亡することもある。このシャーガス病の慢性期疾患の宿主側の遺伝的要因として HLA-DRB1 について調べた。

【方法】 対象は, グアテマラのサンタマリアイシュアタン村の住民とサカパ地方病院で, 血清学的検査と心電図検査により, 心疾患を伴うシャーガス病と診断された患者40名と, 心疾患はないが血清学的に陽性と診断された患者92名, およびイシュアタン村のランダム集団の212名を対照集団として HLA-DRB1 タイピングを行った。HLA-DRB1 の DNA タイピングは, 1991年 HLA ワークショップの SSO 法を用いて行った。

【結果】 対象集団中には50のアレルがタイプされた。シャーガス病患者群では DRB1*0701 が著しく減少し, DRB1*0401 が増加していた。特に心疾患を伴うシャーガス病患者でこの傾向は顕著であった。

【考察】 トリパノソーマ感染には長い無症状の抗体陽性の時期と, その後の慢性期(心疾患等)が存在し, 自然治癒はないとされている。抗体陽性者においてすでに特定の HLA-DRB1 の増減が認められたことから慢性病変に対する感受性よりはむしろ病原体の排除機構に遺伝的な相違があることが示唆された。現在, HLA-B 遺伝子についても検討中である。

31

ウズラの MHC 領域におけるシークエンシング解析 ウズラの Mhc (*Coja*) クラス I 領域における遺伝子解析

○椎名 隆¹⁾, 岡 晃¹⁾, 半沢 恵²⁾, 渡辺誠喜²⁾
猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾東京農業大学農学部家畜生理学

【目的】我々は、これまでに、ウズラの Mhc (*Coja*) クラス I 抗原 cDNA クロームは 4 つの遺伝子座 (A-D 遺伝子座) に分類されることを明らかにした。また、クラス I 領域のゲノム解析を行った結果、12 個のクラス I 遺伝子座が総計 70 kb により構成されていることを明らかにした。この内、*CojaD1*, *CojaD2*, *CojaB1*, *CojaB2* および *CojaE* は 24.6 kb 内に極めて隣接して存在している。そこで、本研究では、コスミドクローン SW140 内に存在これら 5 つのクラス I 遺伝子座の塩基配列を決定し、それらの構造解析ならびにホモロジー解析を行った。

【方法】塩基配列を決定するためのテンプレート DNA はショットガン法により調製した。塩基配列は自動蛍光シークエンサー (377 PRISM, ABI 社) により決定した。その後のアセンブリーには、Sequencher Software により解析した。ホモロジー解析には、BLASTn Program を、また、各種遺伝子解析には、Genetyx Mac Software を用いた。系統樹は neighbor-joining 法により、 α 1~3 ドメイン領域間について作成した。

【結果】5 つの遺伝子座ともにエクソンがそれぞれ 8 つずつ存在した。また、各エクソン間には、それぞれイントロンが存在し、各イントロンのサイズは 71-229 bp であった。ATG メチオニン開始コドン、翻訳停止コドンおよび GT/AG ルールは 3 つの遺伝子座ともに確認された。これら 5 つの遺伝子座と A~D 遺伝子座とのエクソン領域のホモロジーを検索した結果、*CojaB1* および *CojaB2* と B 遺伝子座とは 98~99%、*CojaD2* と D 遺伝子座とは 99% でともに高い値を示したが、これら 3 つの遺伝子座とその他の遺伝子座とのホモロジーは、86~90% と低かった。これに対して、*CojaD1* および *CojaE* と A~D 遺伝子座とのホモロジーは 86~92% と低かった。

32

ウズラの MHC 領域におけるシークエンシング解析 ウズラ Mhc (*Coja*) クラス II 領域における遺伝子解析

○岡 晃¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 半沢 恵²⁾, 渡辺誠喜²⁾
猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾東京農業大学農学部家畜生理学

【目的】我々は、ウズラの Mhc (*Coja*) クラス I 領域には、クラス II β 鎖遺伝子が含まれていないことから *Coja* クラス I 領域の構成はニワトリのクラス I 領域のそれと異なり、クラス II 領域から独立したクラスターをなしていると考えている。そこで、本研究では、*Coja* クラス II 領域における遺伝子地図を作成するために、ニワトリのクラス II β 鎖 cDNA をプローブに用いて分離した *Coja* クラス II β 鎖陽性コスミドクローンの特徴について検討し、また、1 つのクラス II β 鎖遺伝子座の塩基配列を決定したのでこれについても併せて報告する。

【方法】コスミドクローンの分離には、ニワトリのクラス II 抗原 β 鎖 cDNA (*BL\beta*) をプローブに用いた。サザン解析並びに制限酵素地図の作成は常法に従った。サザン解析の際のプローブには、ヒトの *MOG* 遺伝子と相同性の高いニワトリの *BG* 抗原遺伝子 (*bg8.5*)、ヒトの *NAT* (*RING3*) 遺伝子、HLA クラス II 抗原 α 鎖遺伝子 (*HLA-DRA*, *-DQA*, *-DNA*) を用いた。塩基配列は自動蛍光シークエンサー (377 PRISM, ABI 社) により決定した。

【結果および考察】スクリーニングの結果、11 個の *BL\beta* 陽性コスミドクローンを分離した。これらの *BG* および *NAT* (*RING3*) 遺伝子をプローブに用いたサザン解析の結果、*Coja* クラス II 領域内には、少なくとも 3 つの *BG* 遺伝子座、また、1 つの *NAT* (*RING3*) 遺伝子座がそれぞれ存在するものと考えられた。さらに、クラス II α 鎖遺伝子は独立した複数のクローンにてハイブリダイズしたことから、ウズラのクラス II α 鎖遺伝子は HLA などと同様に β 鎖遺伝子の近傍に位置するものと考えられた。クラス II β 鎖遺伝子座が存在すると予想されたクローン 7 の 3.5 kb (C7-3.5B) における塩基配列を決定した結果、*Coja* クラス II β 鎖遺伝子座 (*CojaLBI*) のメチオニン開始コドンから翻訳停止コドンまでの塩基数は 1190 bp であった。この *CojaLBI* のエクソン領域とニワトリの *B-LBII* とのアミノ酸レベルにおけるホモロジーは 80.6% であった。

33

少なくとも2つ存在する *DLA-DRB* 遺伝子座○伊東一郎¹⁾, 須山出穂²⁾, 渡部浩二¹⁾, 柏木 登¹⁾¹⁾北里大学医学部免疫学²⁾同 泌尿器科

【目的】 これまで、われわれは、イヌ主要組織適合抗原 (*DLA*) の *DRB* 遺伝子の PCR-SSO 法による DNA タイピングを目指し、プローブの改良を行ってきた。

しかし、それら改良されたプローブをもってしても PCR-SSO 法でタイピングできないイヌが多々存在することが判明した。そこで、タイピングできない1匹のイヌにつき、それがもつすべての *DLA-DRB* 遺伝子のヌクレオチド配列決定を実施し、*DLA-DRB* 遺伝子座の実態を解明する試みを行った。

【方法】 本学で自家繁殖している mongrel 犬の両親、仔が確認できる1家系の母親犬について *DLA-DRB* 遺伝子のヌクレオチド配列決定を Dideoxy Sequence 法を用いて行った。

【結果】 われわれの報告した D2, D3, D4, D6.1, D7.1, D8, D9, D15.1 の8種類の *DLA-DRB* 遺伝子のうち、D6.1とD15.1の配列がこのイヌで確認できた。しかしながら、それに加えて、新しいシーケンスも2個確認された。これらの新しいシーケンスについては、クローニング後のDNAを再度シーケンスしたのちも同様の結果であった。この2配列をIT2およびIT6と命名した。

【考察】 上記の結果から、この母親犬には4種類の *DLA-DRB* 遺伝子の存在が認められたので、*DLA-DRB* 遺伝子座は少なくとも2個以上存在することが推定された。現在、この母親犬を含んだ1家系の父親犬および仔犬のもつすべての *DLA-DRB* 遺伝子についてヌクレオチド配列決定を実施中である。

34

ブタ-ヒト MLR で高反応を示す HLA-DR13 抗原の Xeno Tissue Typing (Southern Blot と Xeno-MLR) の解析

○佐藤忠之¹⁾, 土田文子¹⁾, 萩原政夫^{1,2)}バトムンフムンフバト²⁾, 上田 進³⁾坂本 薫⁴⁾, 増子佳世⁵⁾, 山本一彦⁶⁾, 辻 公美²⁾¹⁾東海大学病院細胞移植医療センター²⁾同 医学部移植免疫³⁾日生研 ⁴⁾国立佐倉病院外科⁵⁾聖マリアンナ医科大学難治研センター⁶⁾九州大学生体防御医学研究所

【目的】 我々はこれまでに HLA-DR13 抗原陽性のリンパ球が、*in vitro* においてブタ異種抗原に対して高反応であることを報告してきた。今回は Xeno Tissue Typing (Southern Blot と Xeno-MLR) で、刺激細胞であるブタリンパ球の DNA タイプの違いとそれによるブタ反応性ヒト T 細胞クローナリティーの解析について報告する。

【方法】 Xeno-MLR は刺激細胞としてマイトマイシン C 処理したブタの末梢リンパ球を、反応細胞はボランティアの末梢リンパ球をそれぞれ 1.5×10^5 /well で混合し無血清培地 (AIM-V 培地) で6日間培養後、³H-Thymidine の取り込み量を測定した。ブタの DNA タイピングは Xeno-MLR に用いたブタの末梢白血球から抽出した高分子 DNA を材料としてサザンブロット法によりおこなった。プローブは HLA-DRB および SLA-DRB cDNA を用いた。ヒト T 細胞クローナリティーは、Xeno-MLR 後の反応細胞から mRNA を抽出し、TCR-V β 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。

【結果および考察】 Xeno-MLR で高反応を示す HLA-DR13 陽性リンパ球の MLR 後のヒト T 細胞クローナリティーを解析した結果、特定のクローンの増大を示すバンドの数が HLA-DR13 陰性のそれと比較して全体的に多く、特に V β -1, -8, -9, -10, -19 の V β ファミリーにおいてその傾向が見られた。しかも刺激細胞のブタの DNA タイプが異なった場合でもその傾向が見られる。現在さらに例数を増やして HLA-DR13 抗原陽性リンパ球の反応性を検討中である。

35

ミニブタの主要組織適合複合体(SLA)クラスII抗原 α 鎖 cDNA の分離とその遺伝子解析

○馬場珠美¹⁾, 椎名 隆²⁾, 安藤麻子²⁾, 松野直徒³⁾
桜井悦夫³⁾, 長尾 桓³⁾, 田中一栄¹⁾, 猪子英俊²⁾

¹⁾東京農業大学農学部家畜育種学

²⁾東海大学医学部分子生命科学

³⁾東京医科大八王子医療センター外科臓器移植部

【目的】 ミニブタの主要組織適合複合体 (swine leucocyte antigen: SLA) 領域内に存在する遺伝子の数および多型の程度など, SLA に関する基礎的データは, HLA に比べるとはるかに不足している. 我々はミニブタ (ゲッチングン系) を用い, SLA 領域の遺伝子構成を明らかにすることを目的とし, 本実験では, まずミニブタの cDNA ライブラリーより分離したクラス II 抗原 α 鎖 cDNA クローンから制限酵素地図を作成し, これらの塩基配列決定後, データベースの塩基配列とのホモロジー解析を行ったのでこれらについて報告する.

【方法】 ゲッチングン系の雄ミニブタの脾臓組織より ZAP cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA ライブラリーを作成した. スクリーニングには, HLA クラス II 抗原 α 鎖 cDNA クローン (HLA-DPA1, -DNA, -DQA1, -DRA) をプローブとして用い, 約50万プラークについてスクリーニングを行った. 塩基配列の決定には, 自動蛍光シーケンサー (373S, ABI 社) を用いた.

【結果および考察】 スクリーニングによって得られた9個クローンについて制限酵素地図を作成した結果, その切断部位の差異により, 6つのタイプに分類された. そこでこれらのクローンの5'側ならびに3'側からそれぞれ300 bp について塩基配列を決定した結果, 既知の SLA-DQA 遺伝子や HLA-DNA 遺伝子と高い相同性を示すクローンが得られた. このうち SLA-DQA 遺伝子と高い相同性を示すクローンの内の一つ (c56-2) について全塩基配列を決定したところ, 5'側の ATG メチオン開始コドンから3'側のポリ A シグナルまでを含む ORF が完全長 (塩基数1153 bp) なものであった. この塩基配列は, 既知の SLA-DQA (Accession number, M29939) とアミノ酸レベルで100%の相同性を示したことからミニブタの DQA 遺伝子であることが明らかとなった.

36

ウシ MHC (BoLA) クラス II 遺伝子の発現と機能解析

○間 陽子¹⁾, 西野佳以¹⁾, 田島 茂^{1,2)}
井鍋一則^{1,3)}

¹⁾理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

²⁾東京医科歯科大学医学部感染分子制御学

³⁾北海道大学免疫科学研究所血清学

【目的】 ウシ MHC (BoLA) 遺伝子は, 第23染色体に位置し, クラス I, クラス II, クラス III 遺伝子を含んでいる. ウシクラス II 領域には *DRA*, *DRB*, *DQA*, *DQB*, ヒトとの対応が不明な *DYA* と *DYB*, *DNA*, *DOB* 遺伝子座の存在が推測されている. これまで我々は, BoLA クラス II 抗原の免疫応答における役割を明確にするため, 6種類の BoLA クラス II 遺伝子, *DRA*, *DRB3*, *DQA1*, *DQA2*, *DQB1*, *DQB2* の cDNA クローンを単離している. 今回は, これらの遺伝子の発現と機能について解析した.

【方法】 ウシ末梢血リンパ球における転写を確認するため, 各遺伝子の第2エクソンを特異的に増幅可能な PCR プライマーを設計し, 5種のウシリンパ球細胞株より抽出した mRNA を用いて RT-PCR を行った. また, α 鎖および β 鎖の cDNA (*DRA/DRB3*, *DQA1/DQB1*, *DQA1/DQB2*, *DQA2/DQB1*, *DQA2/DQB2*) を, COS-1 およびマウス L 細胞に導入し単クローン抗体 (8種類) を用いて, 発現, 蛋白化学的性状および混合リンパ球培養試験を行った.

【結果】 *BoLA-DQA1*, *-DQA2*, *-DQB1*, *-DQB2* 遺伝子は, 転写および蛋白レベルでの発現が可能な遺伝子であった. これらの遺伝子産物は MLR 誘導能を持っていたが, DR 分子に比較して弱かった. また, *BoLA-DRB3* と *-DRA* 遺伝子は転写レベルでの発現が可能であり, 二つの cDNA を同時に細胞に導入すると, 細胞表面への強い発現と高い MLR 誘導能を示した.

【考察】 機能発現可能な遺伝子として, *BoLA-DRA*, *-DRB3*, *-DQA1*, *-DQB1*, *-DQA2*, *-DQB2* を同定した. *DQA2* と *DQB2* は, 興味深いことに, ヒトにおいては偽遺伝子である. 一方, *DR* 遺伝子座には, ヒトでは複数の機能蛋白をコードする遺伝子が存在するが, ウシでは *DRB3* のみで, 他は偽遺伝子 (*DRB1* および *DRB2*) である. このように, クラス II 遺伝子の構成と産物は, ヒトとウシの間に大きな相違があることが明らかになった.

37

牛白血病ウイルスによる白血病発症の感受性を規定するウシ MHC クラス II 遺伝子の解析

○竹嶋伸之輔^{1,2)}, 長岡淑子^{1,3)}, 中井 裕²⁾
間 陽子¹⁾

¹⁾理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

²⁾東北大学農学部動物微生物科学

³⁾東北大学医学部附属動物実験施設

【目的】 MHC が種々の疾患と相関を示すことが明らかとなってきた。我々はこれまで、ウシ MHC (BoLA) クラス II 遺伝子, *DRA*, *DRB3*, *DQA1*, *DQB1*, *DQA2* および *DQB2* 遺伝子の cDNA を単離し, それらの分子構造, 転写, 発現および機能について解析してきた (本学会で発表予定)。その結果, BoLA クラス II 遺伝子の中で, *DRB3* 遺伝子が最も多型に富み機能的な蛋白質をコードする事が明らかとなった。そこで, 今回我々は, *BoLA-DRB3* 遺伝子に着目し, HTLV-1 と最も近縁なレトロウイルスである牛白血病ウイルス (BLV) 感染牛における白血病発症と BoLA クラス II ハプロタイプの関連性について検討した。

【方法】 BLV 感染未発症牛, BLV 感染リンパ球増多症牛および白血病発症牛由来の腫瘍組織あるいは末梢血リンパ球より DNA を抽出し, *DRB3* の第 2 エクソン 267 塩基対を PCR 法により増幅後, pBluscript II SK (+) にサブクローニングすることにより, 塩基配列を決定した。

【結果】 DR β ⁷⁸残基が Tyr のホモ接合を有する個体は, 白血病発症牛では 18 頭中 15 頭であるのに対して, 未発症牛では 21 頭中 3 頭のみであった。このように, β ⁷⁸残基が Tyr であるアレルをホモで有する個体は BLV による白血病発症に感受性の可能性が示唆された。一方, 白血病発症牛の残り 3 頭および未発症牛の 19 頭は Val と Tyr のヘテロ接合であった。この 19 頭の未発症牛由来の β ⁷⁸残基に Val を有するアレルは, β ⁷¹残基は Lys または Arg の塩基性アミノ酸, β ⁷⁴残基は Gln であった。以上の結果は, Lys/Arg- β 71, Gln- β 74, Val- β 78 のアミノ酸配列を有するアレルが, BLV による白血病発症に対して抵抗性である可能性を示唆している。これらの 71, 74, 78 番目のアミノ酸残基は β 1 ドメインの α -ヘリックス上に相当し T 細胞認識部位として機能すると推測される。

【考察】 BLV による白血病発症の感受性を *DRB3* 遺伝子が規定している可能性が示唆された。

38

ウシ主要組織適合クラス II DM 抗原およびインバリエント鎖の cDNA の分離と分子構造の解析

○間 陽子, 新美正史

理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

【目的】 近年, 新しく同定された MHC クラス II DM 抗原は, インバリエント (Ii) 鎖と共に MHC クラス II 分子と抗原ペプチドの複合体形成に関与する重要な分子として注目されている。ウシの抗原提示機序の解明のため, ウシ MHC (BoLA) クラス II DM 抗原および Ii 鎖の cDNA を分離し, その分子構造を他動物種のものと比較解析した。

【方法】 ウシ Ii 鎖と DM の cDNA を, ヒトの塩基配列を基にした PCR 法でウシ B 細胞株 BLSC-KU-1 cDNA ライブラリーから分離し, 塩基配列を決定した。

【結果】 コード領域全長を含む BoLA クラス II DM 抗原 α 鎖 (260 a.a.) および β 鎖 (262 a.a.) の cDNA クロンの単離に成功した。ヒトおよびマウスと同様, シグナルペプチド, $\alpha 1 \cdot \beta 1$, $\alpha 2 \cdot \beta 2$, 結合ペプチド, 膜結合領域および細胞内領域の各ドメインから構成されていた。他動物種の DM 分子と約 66-77% のアミノ酸相同性を示したが, 既知の BoLA クラス II 抗原とは相同性は低く約 30% 以下であった。系統発生樹において, *BoLA-DMA* および *-DMB* 遺伝子は既知のクラス II 遺伝子が分岐する以前に分かれたこと, マウスよりヒトの DM に近縁である事が示された。ウシ Ii 鎖のコード領域全長を含む cDNA クロンを単離した。ウシの Ii 鎖は他動物種のものと同様にアミノ酸配列で約 80% の高い相同性を有し, 細胞内領域, 膜貫通領域および細胞外領域を含む 204 a.a. からなる膜貫通蛋白質の構造を有していた。MHC クラス II 分子の移動に関与するエンドソーム移行シグナル, EQLP モチーフおよび CLIP 領域が保存され, 特に, CLIP24 アミノ酸の内, クラス II 分子と水素結合する 87-101 番目, クラス II 分子のペプチド結合ポケットに入り込んでいる 91-99 番目, さらに, クラス II 分子からの解離に関与する 83, 86, 87 番目のアミノ酸残基は良く保存されていた。

【考察】 以上から, ウシもヒトと同様のクラス II 分子を介する抗原提示経路を持つことが強く示唆された。

39

ヒツジ MHC (OLA) クラス II 遺伝子多型性と牛白血病ウイルス (BLV) 抵抗性との相関

○長岡淑子^{1,2)}, 飯泉明宮美^{1,3)}, 笠井憲雪²⁾
間 陽子¹⁾

¹⁾理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

²⁾東北大学医学部附属動物実験施設

³⁾日本大学農獣医学部核酸科学

【目的】 HTLV-I と BLV は最も近縁なレトロウイルスであり、長い潜伏期を経て成人 T 細胞白血病あるいは地方病性牛白血病を引き起こす。その病態と MHC ハプロタイプとの相関が報告されているものの、いずれも白血病発症機構の解明は未だなされておらず、*in vivo* での MHC ハプロタイプと白血病発症をより明確に観察できる系の開発が必要である。ヒツジは BLV 接種により容易に感染し、ウシと比べ短期間で白血病を発症することから、BLV 誘発性白血病発症の有用なモデルとして注目されている。また、ウシとヒツジの MHC は種を越えて非常に相同性が高い。そこで今回我々は、BLV 感染羊の OLA-DRB β 1 ドメインを解析し、白血病発症との相関性を調べた。

【方法】 白血病発症羊 13 頭、BLV 感染健康羊 9 頭の末梢血リンパ球、腫瘍または健康組織のゲノム DNA を鋳型に、OLA-DRB 第 2 エクソンを PCR 法で増幅後、両アリの塩基配列を決定し、さらに予測アミノ酸配列を比較した。

【結果】 両アリの 27-31 位に Leu-Asp-Arg-Tyr-Phe (LDRYF) を含む個体は健康群 9 頭中 6 頭であるのに対し、発症群では 13 頭中 1 頭であった。また 70-71 位については、少なくとも一方のアリが Arg-Lys (RK) である個体は健康群で 7 頭であるのに対し発症群では 3 頭であった。これらの領域は共にペプチド結合ポケットを構成すると考えられる。

【考察】 OLA-DRB 中の LDRYF および RK は白血病発症に対して抵抗性の指標となっていることが推測された。以上の結果から、白血病発症の感受性を MHC ハプロタイプをもとに選抜することにより、レトロウイルス感染に対する免疫応答性の相違を観察できる可能性がある。

40

Multiple Antigenic Peptide を用いたイムノブロット用抗 HLA-A 抗原血清の作製

○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検討されていない。昨年の本学会において、我々は IEF-イムノブロット (IEF-IB) 用抗 HLA-B 抗原血清の作製について報告した。本年度は HLA-A 抗原に特異性の高い Multiple Antigenic Peptide (MAP) を調製し、IEF-IB 用抗 HLA-A 抗原血清を作製したので報告する。

【方法】 1) 抗 HLA-A 抗原血清の作製: HLA-B 抗原とは反応せず HLA-A 抗原のみに対し特異的に反応する抗血清を得るため HLA-A2 の α 1 ドメインのアミノ酸配列 64-79 (TRKVKAHSQTHRVDLG) に相当する 16mer に関して Fmoc 法を用いて MAP を調製し、ウサギに免疫することにより抗 HLA-A2 α 1MAP 血清を調製した。この MAP は 16 ヶのアミノ酸配列の中 HLA-A2 以外の HLA-A 抗原とは 2~5 ヶのアミノ酸が、HLA-B 抗原とは 8~10 ヶのアミノ酸が異なった。イムノブロット (IB): B 細胞株を Triton-X114 にて溶解し膜タンパク画分を調製し、ノイラミニダーゼ処理後 IEF を行い、抗 HLA-A2 α 1MAP 血清を一次抗体として IB を行った。

【結果および考察】 11 種類の B 細胞株から調製した HLA クラス I 抗原について、IEF-IB 法により抗 HLA-A2 α 1MAP 血清との反応性を調べた。HLA-A 抗原に関しては、HLA-A1, -A2, -A3, -A23, -A24, -A25, -A26, -A28, -A29, -A33 抗原について調べた結果、抗 HLA-A2 α 1MAP 血清は HLA-A29 以外のすべての HLA-A 抗原に反応した。一方、HLA-B 抗原に関しては HLA-B7, -B18, -B27, -B35, -B44, -B46, -B47, -B51, -B52, -B53, -B57, -B61, -B62, -B65 抗原について調べたが、この抗血清は HLA-B 抗原には反応を示さなかった。HLA クラス I 抗原の中で HLA-A 抗原に特異性の高いアミノ酸配列に関し MAP を作製、免疫することにより、IEF-IB において、HLA-B 抗原に反応せず、HLA-A 抗原のみに反応する有用な抗血清を作製することができた。

41

日本人の HLA-B58 アリルの同定とそのハプロタイプ

○井上隆弘^{1,2)}, 小川篤子¹⁾, 徳永勝士^{1,3)}
 柏瀬貢一¹⁾, 田中秀則¹⁾, 赤座達也¹⁾, 田所憲治¹⁾
 高橋朋子²⁾, 十字猛夫¹⁾
¹⁾日赤中央血液センター
²⁾星薬科大学薬学部生物活性
³⁾東京大学医学部人類遺伝学

【目的】 日本人における HLA-B58 抗原の遺伝子頻度は 0.7% と低い が, A33, Cw10, DR13 と強い関連を示すことが血清学的解析から報告されている。HLA-B58 抗原については現在までに B*5801~B*5803 の 3 つのアリルが報告されている。そこで, 日本人について B58 をコードするアリルを同定し, さらにその形成するハプロタイプをアリルレベルで考察するため A33, Cw10, DRB1 についても DNA タイピングを行った。

【方法】 健常日本人 (HGN: A24, A33; Cw10; B52, B58; DR13, DR15 および KBM: A24; Cw9, Cw10; B58, B75; DR9, DR13) の末梢血リンパ球から抽出した RNA より cDNA を合成し, B ローカス特異的に増幅後, TA ベクター法により B58 遺伝子の cDNA クローンを得, exon 1~exon 7 までの塩基配列を決定した。

血清学的に B58 陽性の健常日本人 20 人のゲノム DNA を用い A33, B58, Cw10 は PCR-SSOP 法で, DRB1 は PCR-MPH 法によりタイピングした。

【結果および考察】 日本人 2 検体より得られた塩基配列は B*5801 と一致した。また DNA タイピングを行った 20 検体はいずれも B*5801 であり, B58 抗原は B*5801 にコードされることが示された。さらにこの 20 検体のうち, 18 検体は A*3303 を, 20 検体は Cw*0302 を, 17 検体は DRB1*1302 をもち, そのうち 15 検体は A*3303, Cw*0302, DRB1*1302 をあわせもっていた。よって, 血清学的に知られていた B58 に特徴的なハプロタイプは, アリルレベルでは, A*3303-Cw*0302-B*5801-DRB1*1302 であると考えられた。なお, 日本人では Cw10 は主として Cw*0304 にコードされることが知られており, 日本人の中で頻度の低いアリルである B*5801 と Cw*0302 が強い関連を示していることは興味深い。

42

血清学的タイピングを必要としない HLA-B アリルタイピング法

○坂内 誠¹⁾, 徳永勝士²⁾, 三富斉忠¹⁾, 赤座達也³⁾
 十字猛夫³⁾
¹⁾東京都赤十字血液センター研究部
²⁾東京大学医学部人類遺伝学
³⁾日赤中央血液センター

【目的】 HLA のアリルタイピングでは, まず generic typing によるグループ分けによって候補となるアリルを絞り込んだうえで, それに続く fine typing でアリルの特定を行うのが通常である。クラス I の場合, generic typing として血清学的方法が用いられてきたが, 検体によっては血清学的タイピングが不可能な場合もある。このような場合に対処するため, ゲノム DNA のみで HLA-B アリルをタイピングするシステムを構築した。

【方法】 5'-untranslated region とイントロン 3 に設定した 1 組のプライマーにより HLA-B 座特異的な PCR 増幅を行った。プローブをエクソン 2 と 3 に合計 11 種類設定し, PCR-SSO 法で generic typing を行った。プローブの設定には日本人に存在する 33 種のアリルを想定した。SSO 法のタイピング結果を基にグループ特異的な PCR を含む二段階の PCR でエクソン 2, エクソン 3 をそれぞれ増幅し, SSCP 法によってアリルのタイピングを行った。

【結果】 33 種のアリルは, SSO 法の反応パターンにより, 血清学的グループに対応した 19 種のグループに分類された。この 19 種のグループどうしでつくられる 190 種のヘテロの組み合わせから得られるプローブ反応パターンをデータベースにして, 実際のプローブ反応パターンからタイプするシステムを構築した。実際に標準検体を用いて SSO 法を試み, このシステムを用いたところ, 血清学レベルに準じた判定が可能だった。HLA 型未知の検体についても同様に SSO 法による generic typing を行い, この結果を基に各グループごとに SSCP 法によるタイピングを試みたところ, アリルの同定が可能だった。

【考察】 種々の事情により血清学的なタイピングが不可能な検体でも, 今回の方法で HLA-B アリルのタイピングが可能だった。SSO 法で用いたプローブを, より簡便なタイピング法へ応用することも可能と考えられる。

43

MOLECULAR DIVERSITY OF HLA - C GENE IN A NORTHERN HAN POPULATION.

○Huiru Wang^{1,2)}, Katsushi Tokunaga^{1,3)}
Yoshihide Ishikawa¹⁾, Hidenori Tanaka¹⁾
Kouichi Kashiwase¹⁾, Guanjiun Jia⁴⁾
Tatsuya Akaza¹⁾, Kenji Tadokoro¹⁾
Yoichi Shibata²⁾, Takeo Juji¹⁾

¹⁾Department of Research, Japanese Red Cross Central Blood Center; ²⁾Department of Transfusion Medicine and Immunohematology, University of Tokyo; ³⁾Department of Human Genetics, University of Tokyo, Tokyo, Japan; ⁴⁾ Harbin Blood Center, Harbin, China

Alleles encoding HLA-C antigens in a Northern Han population were identified by PCR-SSCP, PCR-SSP and nucleotide sequencing analysis. The results showed that at least twenty-six alleles encode seven serologically detectable antigen groups and undetectable blanks. Cw1 was predominantly encoded by Cw*0102, whereas Cw2 was encoded by Cw*0202 though it was relatively infrequent. One split antigen of Cw3, Cw9 was encoded by Cw*0303, and another Cw3 split, Cw10 was encoded by Cw*0302 and Cw*0304, respectively. Two alleles for each of Cw4 and Cw6 were identified while three Cw*07 alleles, Cw*0701, 0702 and 0704 were detected. At least nine twelfth alleles belonging to five groups, Cw*08, Cw*12, Cw*14, Cw*15 and Cw*16, were found to encode HLA-C 'blanks' in these population samples, among which, several new alleles were identified.

44

Cw*0403を検出する抗体と PCR-SSP 法での確認

○中島文明, 中村淳子, 岡野俊生, 森知恵子
横田敏和, 伊藤 仁, 木村亮太郎
神奈川県赤十字血液センター検査課

【目的】 HLA-Cw2とCw4の hybrid allele である Cw*0403は exon 2の一部に Cw2の塩基配列をもつ Cw4 new allele (Little AM *et al.* Tissue Antigens 48 No.2, 1996) であるが, その特異な塩基配列により serology typing では混乱した判定結果をもたらしていた. 海外から得た数種の Cw2抗体の中に Cw*0403パネルと反応するものが見つかり解析を試みた. また, Cw*0403検出可能な primer set を考案し PCR-SSP 法により確認した.

【方法】 International Cell Exchange に提出された Cw*0403細胞 (#887) と Cw2, Cw4, Cw6関連抗体数本にて血清学的にデータ解析をし, 既タイピングのドナーデータと比較し Cw*0403遺伝子を持つと考えられるパネルを選択した. Cw*0201, Cw*0202, Cw*0401, Cw0402, Cw0403, Cw0602が検出可能な 8種の primer set を用い PCR-SSP 法にて確認した.

【結果】 #887の反応解析で数種の Cw2単一特異性抗体のうち 1本が#887 (Cw*0403/0702) と反応した. これと同一の反応パターンを示したパネルが10例検出できた. 遺伝子タイピングから全例 Cw*0403が検出でき, そのうち 4例は Cw*0401と Cw0403の heterozygote であった. この10例に日本人は含まれず, 中国, ベトナム, フィリピン人であった.

【考察】 Cw*0403遺伝子を持つ細胞は, Cw4単一特異性抗体には反応せず, Cw4+Cw6といった抗体に反応する. また, Cw2抗体には反応するものとししないものがある. したがって, Cw6あるいは Cw2といった判定になり, これら全ての抗体と反応させないと Cw*0403は検出できない. Little AM らの報告は Papua New Guinean の調査であり, Cw*0403の分布は中国から東南アジア, インドネシアにかけて存在すると考えられる.

45

顆粒球抽出アロ抗原について

○荒木延夫, 秋田真哉, 藤原宝子, 合志博司
能勢義介, 神前昌敏

兵庫県赤十字血液センター

【目的】我々は第5回本学会において顆粒球よりアロ抗原が抽出されることを報告した。そこで、今回、我々は抽出されたアロ抗原より若干の知見を得たので報告する。

【方法】純度90%以上の顆粒球を0%, 1%, 3%ショ糖生食水中に各々 3×10^8 コ/ μ lになるように調製し、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た。そして、この抽出抗原をU型テラサキプレートに5 μ lずつ分注後、4°Cで一晩固相した。そして、抽出抗原中のMHCクラスI抗原、顆粒球アロ抗原NA1を検討するために当センターで作製したモノクローナル抗体2種〔クラスIモノモルフィック抗体TOK39-1, クラスIポリモルフィック抗体TOK45-3a (A24+A32+Bw4)〕と市販モノクローナル抗体MG3 (NA1) の計3種を用いて検討した。

【結果】LCT抗体価256倍のTOK39-1に対するインタクトの顆粒球抗原はMPHA法で256倍を示し、0%ショ糖生食水抽出抗原は陰性、2%ショ糖生食水抽出抗原は2倍、そして3%ショ糖生食水抽出抗原は64倍のMPHA法抗体価を示した。そこで、以下の検討は3%ショ糖生食水抽出抗原で検討した。24種の顆粒球抽出抗原をTOK39-1で測定したところ、MPHA法抗体価0~512倍を示した。そして、その反応性はクロロキン処理により消失した。また、A24またはBw4陽性者より抽出した抽出抗原もMPHA法抗体価0~2,048倍を示し、その反応性はクロロキン処理により消失した。

MG38に対するインタクトの顆粒球抗原はMPHA法で4,096倍を示し、0~3%ショ糖生食水抽出抗原は各々1,024倍を示した。24種の顆粒球抽出抗原をMG38で測定したところ、1,024~496倍を示した。これらの結果より顆粒球上のアロ抗原量は個人差があると推察される。

46

MICA エクソン5内GCT多型とHLA-B抗原との相関

○太田正穂¹⁾, 勝山善彦²⁾, 安藤 等³⁾, 水木信久⁴⁾
降旗謙一⁵⁾, 猪子英俊⁶⁾

¹⁾信州大学医学部法医学教室

²⁾同 病院薬剤部

³⁾神奈川県湘南赤十字血液センター

⁴⁾横浜市立大学医学部眼科

⁵⁾信州大学医学部臨床検査学

⁶⁾東海大学医学部分子生命科学

【目的】HLA-B 遺伝子から約40 kb セントロメア一側に位置する最近同定されたMICA 遺伝子は、主に繊維芽細胞、上皮細胞や単球に発現し、T・B細胞には発現していない。MICA 遺伝子はクラスI 遺伝子様構造を持ち、エクソン2, 3, 4に遺伝的多型性が見られ、エクソン5 (TM領域) 内にはGCT (alanine) 繰り返し構造多型があり、今の所この領域内にはA4 (GCT)₄, A5 (GCT)₅, A5.1 (GCT)₄+GGCT, A6 (GCT)₆, A9 (GCT)₉の5種類のアリルが確認されている。今回、このアリルとHLA-B 抗原との相関を10th IWS B cell line および健常人を用いて検討したので報告する。

【方法】72種類の10th IWS B cell line とHLA-B 抗原既知の健常人132人からDNAを抽出し、MICA エクソン5を特異的に増幅するプライマーを用いて、PCRにて増幅した。プライマーは一方に蛍光 (FAM) を標識した。また、B cell line については総てシーケンス解析を行った。(GCT)_n多型の判定は、Genescanソフト672を用いた。

【結果】B cell line と健常人のエクソン5内 (GCT)_n多型とB抗原の相関を見ると、A4はB54, A5はB61とB62, A5.1はB7とB8, A6はB51とB44, A9はB35, B39, B67に強い連鎖不平衡が認められた。

47

日本人を含めた9民族における *MICA* 遺伝子エクソン5内の GCT 多型

○勝山善彦¹⁾, 太田正穂²⁾, 安藤 等³⁾, 水木信久⁴⁾
降旗謙一⁵⁾, 猪子英俊⁶⁾

¹⁾信州大学病院薬剤部

²⁾同 医学部法医学教室

³⁾神奈川県湘南赤十字血液センター

⁴⁾横浜市立大学医学部眼科

⁵⁾信州大学医学部臨床検査学

⁶⁾東海大学医学部分子生命科学

【目的】 1994年 HLA クラス I 遺伝子領域内に新たな遺伝子群が発見され, *MIC* (MHC class I chain-related) 遺伝子と命名された. 中でも *MICA* 遺伝子は最も良く解析されているが, その機能については未だ不明である. *MICA* 遺伝子は class I 様遺伝子構造をしめすが, 最近, 我々はエクソン5内に GCT (alanine) 繰り返し多型を見つけた. 今回, この多型性を日本人, 北方漢民族, 回族, ウイグル族, カザフ族, イラン人, サウジアラビア人, ギリシャ人, イタリア人について検査したので報告する.

【方法】 プライマーの一方に蛍光 (FAM) を標識し, 各民族の健常人 (日本人 $n=352$, 北方漢民族 $n=32$, 回族 $n=44$, ウイグル族 $n=49$, カザフ族 $n=38$, イラン人 $n=18$, サウジアラビア人 $n=18$, ギリシャ人 $n=27$, イタリア人 $n=26$) 総数604人から得た DNA を増幅した. 多型解析は, Genescan 672ソフトを用いた.

【結果】 各民族にそれぞれ5種類のアレル (A4, A5, A5.1, A6, A9) が認められ, それらの遺伝子頻度分布は各民族間で相違がみられた. ウイグル, イラン, サウジアラビア, ギリシャ, イタリア人では A6アレルが最も高い頻度を示したが, 日本人, 北方漢民族, 回族, カザフ族では A5アレルが最も高い頻度を示した. A7, A8アレル (7回, 8回繰り返し構造) は未だ確認されていない.

48

MICA 遺伝子多型と高安病

○木村彰方, 大淵信久, 佐藤真夏

東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患異常代謝

【目的】 HLA に連鎖した高安病への疾患感受性遺伝子のマッピングを目的として, 最近 *HLA-B* 遺伝子の近傍に発見された *MIC* 遺伝子群の多型を解析した.

【方法】 互いに血縁関係のない健常人160名, 高安病患者81名, *HLA* 領域ホモ接合体細胞株を対象として, *MICA* および *MICB* 遺伝子多型を PCR-DCP 法によって解析し, その塩基配列を決定した.

【結果】 *MICA* 遺伝子第5エクソンに (GCT, Ala) リピート数の異なる5種の対立遺伝子 (1.1~1.5) を見出した. リピート数は1.1が9, 1.2が6, 1.3が5, 1.4が4であり, 1.5はリピート数が5で1塩基挿入によるフレームシフトを伴うものであった. *MICA* 対立遺伝子1.1~1.5の健常人集団における頻度は17.5%, 43.1%, 43.8%, 24.4%, 21.3%であり, *HLA-B* 対立遺伝子との強い連鎖不平衡 (1.1= B35, 39, 67, 58, 1.2= B44, 51, 52, 57, 1.3= B46, 61, 62, 70, 75, 1.4= B49, 54, 55, 56, 59, 1.5= B7, 60) が認められた. 高安病患者集団の解析では, *MICA1.1* (28.4%, RR=1.87, $p=0.05$) および *MICA1.2* (79.0%, RR=4.97, $p<0.0001$) 頻度の増加を認めたが, 前者は B39, 後者は B52と完全に連鎖しており, 健常人集団, 高安病患者集団ともに組み換えを認めなかった. また *MICB* 遺伝子第5エクソンにも2多型を認めたが, アミノ酸置換を伴わないものであった.

【考察】 *MIC* 分子は, 上皮系の細胞に特異的に発現する機能不明のクラス I 様分子であるが, その構造上の特徴から慢性炎症に関与する $\gamma\delta$ T 細胞の認識分子の可能性がある. 第5エクソンの解析では組み換えが認められなかったため高安病への感受性が *HLA-B* と *MICA* のいずれに第一義的に相関を示すのかが判定できなかったが, 第2および第3エクソンの PCR-DCP 解析から *MICA* には約20種の対立遺伝子が存在すると推定されるため, それらの塩基配列の決定を行うと共に多数の集団を解析することで, 高安病と *MICA* との相関の意義が解明できると考えられる.

49

新しい HLA クラス I 様遺伝子 *MICB* の多型性解析

○安藤 等¹⁾, 水木信久²⁾, 太田正穂³⁾, 山崎正明⁴⁾
田代弘行⁴⁾, 宮田義久¹⁾, 脇坂和男¹⁾, 猪子英俊⁵⁾

¹⁾神奈川県湘南赤十字血液センター

²⁾横浜市立大学医学部眼科

³⁾信州大学医学部法医学

⁴⁾不二家バイオ研究所

⁵⁾東海大学医学部分子生命科学

【目的】 HLA クラス I 遺伝子領域内に構造がクラス I 遺伝子に類似している新しい遺伝子群 *MIC* (MHC class I chain related genes) が同定されたが、その機能については、未だ明らかにされていない。HLA-B 遺伝子のセントロメア側約155 kb に位置する *MICB* 遺伝子は、単球・マクロファージ、前骨髄球、上皮細胞に発現し、T・B リンパ球には発現していない。今回我々は、*MICB* 遺伝子の多型性を検討したので報告する。

【方法】 10th IWS B cell line と日本人由来ホモ接合体細胞の計44種より高分子DNA を抽出して用いた。*MICB* 遺伝子の exon 2~exon 3 および exon 5 領域を特異的なプライマーを用いて、PCR 法にて増幅した。PCR 産物を精製し、Ampli-Taq Gold を用いて cycle-sequencing を施行後、ABI373S 蛍光自動シーケンサーにて解析した。

【結果】 ホモ接合体細胞44種のゲノム DNA を用いて、*MICB* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、exon 2 と exon 3 領域で多型性が認められ、6 種類の対立遺伝子の存在が確認された。また、intron 2 領域内で1カ所 G から A の置換が認められた (5/44種)。一方、exon 5 領域においては多型性が認められなかった。現在、exon 4 領域についてもシーケンシングを施行しているので加えて報告する予定である。

50

HLA クラス II 領域のセントロメア側のシーケンシング解析並びにマウス嚢胞性腎疾患発症関連遺伝子のヒト相同遺伝子の同定と嚢胞性腎疾患患者における発現の解析

○安藤麻子¹⁾, 菊池イアラ幸江¹⁾, 重成敦子¹⁾
荒井純子²⁾, 勝岡洋治³⁾, 平賀聖悟⁴⁾, 河田寿子¹⁾
木村 稔¹⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾東京女子医科大学腎臓病総合医療センター

³⁾大阪医科大学泌尿器科

⁴⁾東海大学医学部移植学

【目的】 HLA-DP 抗原重領域のセントロメア側についてシーケンシングなどにより構造解析を行い、マウス嚢胞性腎疾患の発症に関与する候補遺伝子のヒト相同遺伝子を同定するとともに、その構造解析と嚢胞性腎疾患患者における発現の解析を行った。

【方法】 HLA-DP 抗原重領域のセントロメア側250 kb の YAC とコスミドの分離とシーケンシングおよび cDNA クローンの構造解析によって、新遺伝子の同定を行った。マウスの H-2K 領域の構造との比較により、これらの新遺伝子のなかで *HKE6* 遺伝子の構造解析、並びにノザンハイブリダイゼーションによる日本人嚢胞性腎疾患患者 (4 例) の腎における発現の解析を行った。

【結果】 HLA-DP 抗原重領域のセントロメア側250 kb の構造解析によって分離した7個の新遺伝子のなかで、マウスの嚢胞性腎疾患の発症に関与する候補遺伝子であるアルコール脱水酸化酵素関連遺伝子 (*Ke6*) のヒトホモログ遺伝子 (*HKE6*) は、*HLA-DP* 遺伝子より100 kb セントロメア側に位置し、9 エキソンから構成され、2.2 kb の領域を占める遺伝子であることが、明らかになった。さらにヒトの B 細胞株 cDNA ライブラリーより得られた *HKE6* cDNA クローンをプローブとしたノザンハイブリダイゼーションの解析から、*HKE6* 遺伝子は、肝、脾で強く発現され、腎、骨格筋では中程度に、心臓、肺、胎盤、精巣、B 細胞では弱く発現され、1.0 kb の mRNA が検出された。さらに同様の解析を嚢胞性腎疾患患者の腎について行った結果、*HKE6* 遺伝子の発現は、正常腎に比較して低い傾向にあることが明らかになった。

【考察】 嚢胞性腎疾患のマウスでは、腎臓における *Ke6* 遺伝子の発現低下が報告されており、嚢胞性腎疾患患者の腎でも、*Ke6* 遺伝子のヒト相同遺伝子である *HKE6* 遺伝子の発現が、正常腎に比較して低い傾向にあり、マウスと同様ヒトでも *HKE6* 遺伝子が嚢胞性腎疾患の発症に関与する候補遺伝子である可能性が示唆された。

51

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¹⁾, 安藤麻子¹⁾, 成瀬妙子¹⁾, 菅分公彦²⁾
堀内正敏³⁾, 池村淑道⁴⁾, 本多 裕⁵⁾, 十字猛夫⁶⁾
猪英俊¹⁾

¹⁾東海大学医学部分子生命科学

²⁾放射線医学研究所

³⁾東海大学医学部耳鼻咽喉科学

⁴⁾国立遺伝学研究所進化遺伝

⁵⁾晴和病院

⁶⁾日赤中央血液センター

【目的】 AT 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 *NOTCH4* 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, *NOTCH4* がその発症に関与している可能性がある耳下腺患者と, 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】 日本人耳下腺腫患者 26 例の腫瘍組織の DNA と, 日本人ナルコレプシー患者 30 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, 日本人健常者の結果と比較検討した. さらにナルコレプシー患者については, PCR-RELP 法による *DRB1* と *DQA1* 遺伝子の DNA タイピングも行い, 日本人健常者の結果と比較した.

【結果】 耳下腺腫患者およびナルコレプシー患者では, CTG 繰り返し配列に顕著な繰り返し配列数の増加は認められなかった. すなわち耳下腺腫患者では, CTG 繰り返し配列に日本人健常者と同様の 4 種類の多型性が認められた. また, ナルコレプシー患者では, 2 種類の多型性のみが認められ, 日本人健常者と比較して, *DRB1**1501, *DQA1**0102 と相関を示す CTG 繰り返し数 9 個のアリルの増加が見られた.

【考察】 今回解析した以上の 2 疾患では, これまでに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. しかし, これらの疾患患者においても *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,

52

HLA 遺伝子群の進化と形成

○猪子英俊

東海大学医学部分子生命科学

我々は, この 10 年来 4000 kb からなる HLA 領域について遺伝子クローニング, cDNA クローニング並びに塩基配列の決定により, 構造解析を進めてきた. この過程で, 最近, HLA 領域内に存在する, 少なくとも 15 個の遺伝子について, それらと相同性をしめす遺伝子が第 9 染色体の 9q33-34 領域にも, 存在していることをみだした. これらのなかには, *TAP*, *LMP*, *HSP70*, *C2*, *C4* など, *HLA* とともに免疫応答に重要な遺伝子も含まれていた. さらに, *HLA* 遺伝子のペプチド結合ドメインは *HSP70* 遺伝子由来であると想像されていることなどから, *HLA* 遺伝子群の原型が, まず脊椎動物出現の直後, すなわち無顎類に進化したのちに遺伝子重複 (duplication) によって形成された後, *HS70* 遺伝子からペプチド結合ドメインの供与をうけて, *HLA* の祖先遺伝子, すなわち MHC 系が軟骨魚類の出現とともに形成された, と推定された. さらに, 9q33-34 領域の他に, 第 1 染色体の 1q21-25 領域, 第 19 染色体の 19p13 領域にも相同領域がみだされた. 特に, 第 1 染色体の 1q21-25 領域には, クラス I 様抗原である *CD1* や *MR1* 遺伝子がマップされていることは, 興味深い. いずれにしても, これらの事実は, *HOX* 遺伝子群と同様に, *HLA* 遺伝子群の原型が, 動物の多くの新種が爆発的に誕生した, 約 4 億年前の進化のビッグバンと呼ばれるカンブリア紀に, 2 回の染色体重複によって 4 倍化したことを示唆し, 大野乾博士による 4 倍化説を支持している, と考えられた.

第7回日本組織適合性学会大会のお知らせ

会員各位

第7回日本組織適合性学会大会を下記のとおり開催致します。会員の皆様には多数ご参加いただきますようお願い申し上げます。

記

会期 1997年7月16日(木)～17日(金)

会場 箱根 湯本富士屋ホテル

神奈川県足柄下郡箱根町湯本

小田急電鉄箱根湯本駅下車 徒歩3分

※なお、詳細につきましては追ってご案内をさせていただきます。

第7回日本組織適合性学会

大会長 猪子 英俊

大会問い合わせ先

〒259-11

神奈川県伊勢原市望星台

東海大学医学部分子生命科学系 遺伝情報部門内

第7回日本組織適合性学会事務局

TEL: 0463-93-1121 内線2653 FAX: 0463-94-8884

〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉

1. 投稿規定

1.1. 原稿様式

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

1.2. 原著論文

会員からの投稿を原則とするが、編集委員会が依頼することもありうる。日本語、英語を問わない。最初の一頁はタイトルページとし、タイトル、著者名、所属、脚注として代表者とその連絡先を記す。タイトル、著者名、所属は次の様式にしたがう。

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

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

1) Shionogi Biochemical Laboratories, Shionogi Company, Osaka, Japan

2) Kidney Transplantation Center, Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital, Hyogo, Japan

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

HLA class II の DNA typing と MLC

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

1) 兵庫県赤十字血液センター, 検査課

2) 東海大学医学部, 移植免疫学

3) 東海大学医学部, 分子生命科学

内容は、二頁目よりはじめ、要約 (Summary)、はじめに (Introduction)、材料と方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、参考文献 (References) の順に記載する。また、要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを加える (英文の場合には英語の Key words を加える)。脚注は適宜、設けてもよい。日本語で投稿の場合には、末尾に英語のタイトル、著者名、所属 (様式は上述に従う)、英語の要約と英語で5語以内の Key words をつける。枚数に特に指定はないが、速報的な短報 (全体で、2,000 ~ 3,000 字、出来上がり A4 版で2~4枚程度) を中心とする。もちろん、フルペーパー (full paper) も歓迎する。なお、参考文献 (References) の記載については、下記1.5を参照すること。オリジナル1部にコピー3部を添えて、編集長宛 (下記3参照) に送付する。

1.3. 総説, シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。タイトル、著者名、所属は上記1.2.の通りにしたが、要約と要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを添える。その他の体裁は自由とするが、構成がいくつかの章、節などから成る場合には、次の番号に従い、適当な見出しを添える。

1. 2. 3. 4.

1.1. 1.2. 1.3. 1.4.

1.1.1. 1.1.2. 1.1.3.

脚注は適宜、設けてもよい。なお、参考文献 (Refer-

ences) の記載については、下記1.5.を参照すること。

1.4. 校正

校正は編集委員が行い、特別な場合を除き、執筆者は校正を行わない。

1.5. 参考文献

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

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

2. 別刷

原著論文については、別刷は有料とする。その費用は部数、頁数による。

3. 原稿送付先

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

編集後記

先日の編集委員会において、本誌のもつ意義とは何ぞや？ という話になり、一同あらためて意見を確認し合うこととなった。

本誌は組織適合性に関する journal であり、投稿原稿と論説のみで構成できるようになることを理想としている。投稿論文は速報を中心として、特に若手の登龍門として利用されることが望ましい。また、今後は臨床とHLAに関する題材が取り上げられればと考えている。

編集委員の顔ぶれが現在のメンバーになって2年になろうとしているが、これまでの方向性が正しかったかどうか、方向修正を踏まえ読者ならびに編集協力者の意見を取り入れる機会を持ちたいと考えている。

(中島文明)

今年は、組織適合性学会が4月に行われるため、従来なら7月頃発行のNo.1に載せる大会プログラムや抄録などを、本号(No.3)に掲載することになりました。そのため大野乾先生の「総説」や赤座達也先生の「HLA研究者の個人史」などを次号にまわさざるをえなくなりました。よろしくご理解下さい。なお、学会参加者は、会場ではプログラム、抄録などは配布されませんので、本号を必ずご持参下さい。(猪子英俊)

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

1997年3月31日発行 3巻3号, 1997

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会 (会長 片桐 一)

編集 日本組織適合性学会編集委員会 (編集担当理事 猪子英俊)

平成8年7月24日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会事務局 (事務担当理事 十字猛夫)

〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 日赤血液センター内

印刷・港北出版印刷株式会社

〒150 東京都渋谷区渋谷2-7-7