

# 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)

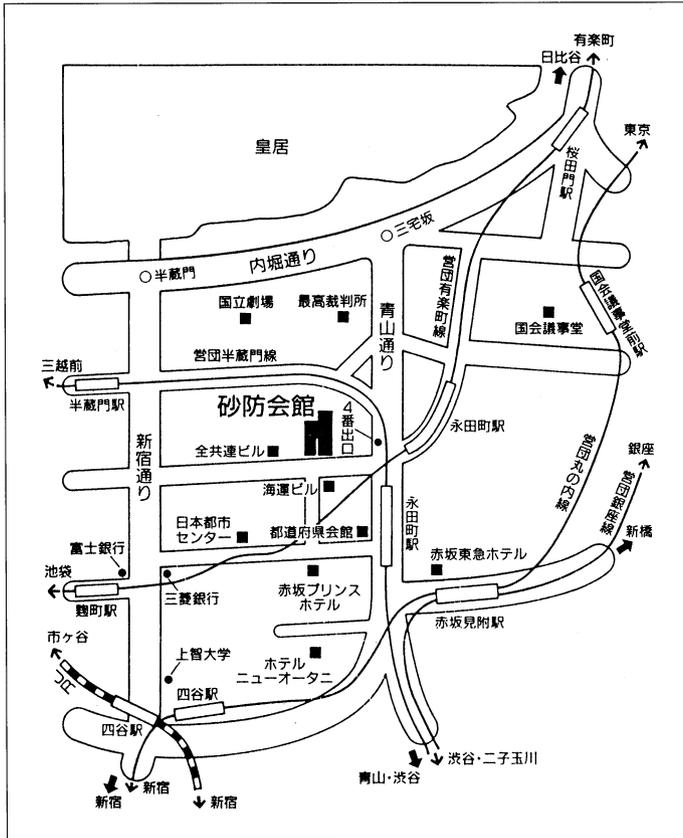
**会 期** 平成9年4月25日 (金), 26日 (土)

**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)



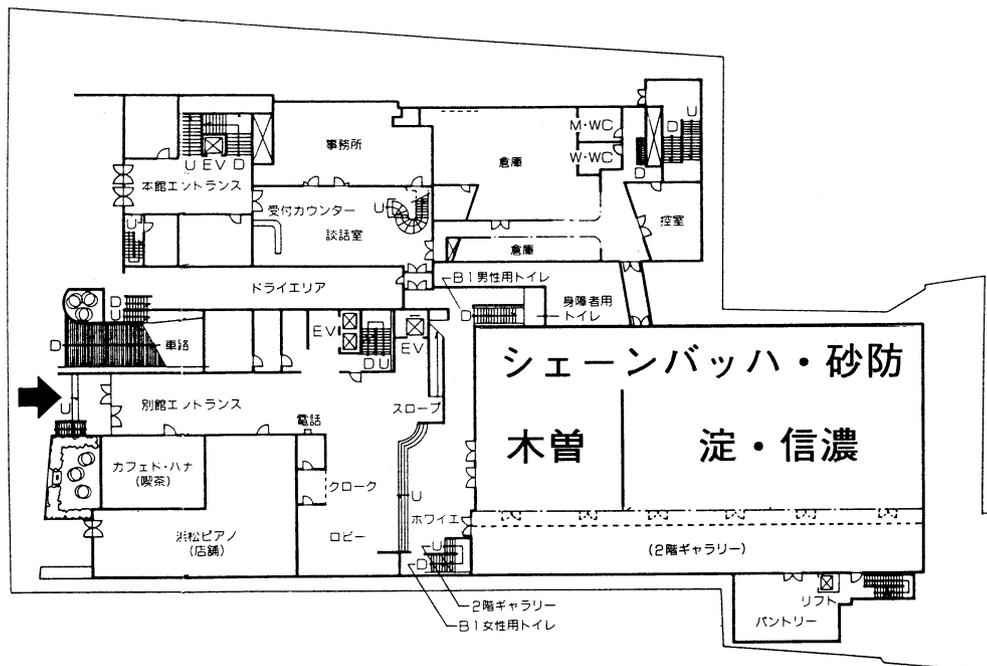
## 会場への交通案内



### ■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，シェーンバツハ・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、時間厳守をお願いします。

## 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 (木曾)	
9:00	開会式		
10:00	移植・輸血(1)	機器・試薬 展示  ドリンク サービス	一般演題 クラスI(2)
	移植・輸血(2)		クラスI(3)
	抗原認識・ペプチド		評議員会 3階 (立山)
	疾患感受性(1)		シンポジウム 「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)ペリタス		機器・試薬 展示
13:00	特別講演 Paul I. Terasaki 教授 「HLAの現在・過去・未来」		ドリンク サービス
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
	クラスII		クラスII 遺伝子の構造
15:00	クラスI 遺伝子の構造		ワークショップ 「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
	疾患感受性(2)		
16:00	異種MHC(1)		
	異種MHC(2)		
17:00			閉会式
18:00		編集委員会 (立山)	
19:00	懇親会 日本海運倶楽部2階 大ホール(国際会議場)		
20:00			

## 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 Gansuud, 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-DRβ37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. 臍島抗原 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, *IkBL* 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 クローンの整列化**

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  $\alpha$  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発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 $\mu$ 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 A<sub>1</sub> 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, A<sub>1</sub> 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<sup>1)</sup>, 安田広康<sup>1)</sup>, 加藤久美子<sup>1)</sup>  
大戸 齊<sup>1)</sup>, 阿部力哉<sup>1)</sup>, 丸山幸夫<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>福島医科大学輸血部  
<sup>2)</sup> 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<sup>1)</sup>, 渡辺真穂<sup>1)</sup>, 長谷川善之<sup>1)</sup>  
田中智一郎<sup>1)</sup>, 小河原 悟<sup>1)</sup>, 兼岡秀俊<sup>1)</sup>  
内藤説也<sup>1)</sup>, 友松哲夫<sup>2)</sup>, 猪口玉恵<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>福岡大学病院腎センター

<sup>2)</sup>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っと抑えるため、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<sup>1)</sup>, 佐治博夫<sup>1)</sup>, 関 茂樹<sup>2)</sup>, 甲斐俊朗<sup>3)</sup>  
藤井康彦<sup>4)</sup>, 秋山祐一<sup>5)</sup>, 横山茂樹<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>京都府赤十字血液センター

<sup>2)</sup>佐久総合病院内科

<sup>3)</sup>兵庫医科大学輸血部

<sup>4)</sup>山口大学病院輸血部

<sup>5)</sup>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<sup>1)</sup>, 萩原政夫<sup>1,2)</sup>, 佐藤忠之<sup>1)</sup>  
佐藤 薫<sup>1)</sup>, 加藤俊一<sup>1)</sup>, 辻 公美<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学病院細胞移植医療センター

<sup>2)</sup> 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、<sup>3</sup>H-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;  $420 \pm 191$ , AD;  $487 \pm 57$ 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<sup>1)</sup>, 野村昌作<sup>1)</sup>, 緒方 肇<sup>2)</sup>, 石田萌子<sup>1)</sup>  
小林陽之助<sup>2)</sup>, 福原資郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>関西医科大学輸血部

<sup>2)</sup>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 MUNKHBAT<sup>1)</sup>, Masao HAGIHARA<sup>1,2)</sup>  
Tadayuki SATO<sup>2)</sup>, Fumiko TSUCHIDA<sup>2)</sup>  
Kaoru SATO<sup>2)</sup>, Balgansuren GANSUVD<sup>1)</sup>  
Jun SHIMAZAKI<sup>3)</sup>, Kazuo TSUBOTA<sup>3)</sup>  
Kimiyoishi TSUJI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Dept of Transplantation Immunology Tokai Univ., School of Medicine,; <sup>2)</sup>Cell Transplantation Center, Tokai Univ, Hospital, Kanagawa,; <sup>3)</sup>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<sup>1)</sup>, 下嶋典子<sup>1)</sup>, 長池知恵子<sup>1)</sup>  
Daniel E. Geraghty<sup>2)</sup>, 羽竹勝彦<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>奈良県立医科大学法医学

<sup>2)</sup>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 $\alpha$ 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<sup>1)</sup>, 横溝 博<sup>1,2)</sup>, 藤田 博<sup>1,2)</sup>  
佐谷秀行<sup>3)</sup>, 白水美香子<sup>4)</sup>, 横山茂之<sup>5)</sup>  
小川道雄<sup>2)</sup>, 千住 覚<sup>1)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

<sup>2)</sup>同 医学部第2外科

<sup>3)</sup>同 腫瘍医学

<sup>4)</sup>理化学研究所細胞情報伝達

<sup>5)</sup>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- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  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- $\gamma$ , GM-CSF および TNF- $\alpha$  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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$  鎖の微小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 $\beta$ 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 $\beta$ 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<sup>1,2)</sup>, 金井隆幸<sup>1)</sup>, 西山宗六<sup>2)</sup>  
藤本茂紘<sup>3)</sup>, 松田一郎<sup>2)</sup>, 松下 祥<sup>1)</sup>  
西村泰治<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

<sup>2)</sup>同 医学部小児科

<sup>3)</sup>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  $\beta$  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  $\beta$  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<sup>1)</sup>, 屋敷伸治<sup>1)</sup>, 楼 宏<sup>1)</sup>, 李 洪川<sup>1)</sup>  
藤吉利信<sup>1)</sup>, 末原雅人<sup>2)</sup>, 山下満左裕<sup>3)</sup>  
速水正憲<sup>3)</sup>, 納 光弘<sup>2)</sup>, 園田俊郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大学医学部ウイルス学

<sup>2)</sup>同 第三内科

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

<sup>1)</sup>国立佐倉病院 HLA 検査室

<sup>2)</sup>同 臨床研究部

<sup>3)</sup>同 外科

<sup>4)</sup>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<sup>1)</sup>, 福田康彦<sup>2)</sup>, 木村彰方<sup>3)</sup>, 星野修司<sup>1)</sup>  
伊達是志<sup>3,4)</sup>, 田代裕尊<sup>1)</sup>, 古川雅博<sup>1)</sup>  
大段秀樹<sup>1)</sup>, 住元 了<sup>1)</sup>, 桜田 瞳<sup>1)</sup>, 浅原利正<sup>1)</sup>  
土肥雪彦<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>広島大学医学部第2外科

<sup>2)</sup>県立広島病院第1外科

<sup>3)</sup>東京医科歯科大学難治疾患研究所成人疾患

<sup>4)</sup>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 GANSUVD<sup>1)</sup>  
Masao HAGIHARA<sup>1,2)</sup>  
Batmunkh MUNKHBAT<sup>1)</sup>  
Kimiyoishi TSUJI<sup>1)</sup>

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

<sup>2)</sup>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 <sup>51</sup>Cr 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<sup>1)</sup>, 高橋孝喜<sup>1)</sup>, 柏瀬貢一<sup>2)</sup>, 赤座達也<sup>2)</sup>  
川井信太郎<sup>3)</sup>, 加藤邦樹<sup>3)</sup>, 徳永勝士<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>虎の門病院輸血部

<sup>2)</sup>日本赤十字社中央血液センター

<sup>3)</sup>湧永製薬バイオ研究所

<sup>4)</sup>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<sup>1)</sup>, 河田寿子<sup>1)</sup>, 松澤由美子<sup>1)</sup>  
鍵谷雅彦<sup>2)</sup>, 能勢義介<sup>3)</sup>, 鍋谷 登<sup>4)</sup>  
一色 玄<sup>5)</sup>, 猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>横浜市立大学医学部眼科

<sup>3)</sup>兵庫県赤十字血液センター

<sup>4)</sup>ナベヤクリニック

<sup>5)</sup>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エクソン、第3エクソンを増幅する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箇所に多型性が認められ、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<sup>1)</sup>, 中山知子<sup>1)</sup>, 吉田玲子<sup>1)</sup>, 児嶋浩一<sup>1)</sup>  
加藤真吾<sup>2)</sup>, 成瀬妙子<sup>3)</sup>, 猪子英俊<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>島津製作所基盤技術研究所

<sup>2)</sup>慶応大学医学部微生物学

<sup>3)</sup>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。*DRB1*, *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<sup>1)</sup>, 田宮 元<sup>1)</sup>, 岡 晃<sup>1)</sup>, 水木信久<sup>1)</sup>  
後藤 香<sup>1)</sup>, 山形直美<sup>1)</sup>, 吉川枝里<sup>1)</sup>, 山形哲司<sup>3)</sup>  
福住康仁<sup>2)</sup>, 菅原智代<sup>2)</sup>, 田口 進<sup>2)</sup>, 渡辺幸治<sup>2)</sup>  
小野綾子<sup>2)</sup>, 山崎正明<sup>2)</sup>, 田代弘行<sup>2)</sup>, 池村淑道<sup>3)</sup>  
木村 穰<sup>1)</sup>, 猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>不二家バイオ研究所

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

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>不二家バイオ研究所

<sup>3)</sup>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

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

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>不二家バイオ研究所

<sup>3)</sup>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ケ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、最近シーケ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シーケンシング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ケ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シーケンシングであり、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、シーケ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 領域におけるシーケンシング解析 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<sup>1)</sup>, 椎名 隆<sup>1)</sup>, 田宮 元<sup>1)</sup>, 岡 晃<sup>1)</sup>  
 山形直美<sup>1)</sup>, 山形哲司<sup>3)</sup>, 福住康仁<sup>2)</sup>, 菅原智代<sup>2)</sup>  
 田口 進<sup>2)</sup>, 渡辺幸治<sup>2)</sup>, 小野綾子<sup>2)</sup>, 山崎正明<sup>2)</sup>  
 田代弘行<sup>2)</sup>, 奥村克純<sup>4)</sup>, 池村淑道<sup>3)</sup>, 木村 穰<sup>1)</sup>  
 猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>不二家バイオ研究所

<sup>3)</sup>国立遺伝学研究所進化遺伝

<sup>4)</sup>三重大大学生物資源

【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、これらをシーケ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、シーケンシング解析、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はシーケ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<sup>1)</sup>, 長谷川善之<sup>1)</sup>, 小河原 悟<sup>1)</sup>  
村田敏晃<sup>1)</sup>, 兼岡秀俊<sup>1)</sup>, 内藤説也<sup>1)</sup>, 道永 功<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>福岡大学病院腎センター

<sup>2)</sup>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<sup>1)</sup>, 松森 昭<sup>2)</sup>, 成瀬妙子<sup>1)</sup>  
安藤 等<sup>3)</sup>, 石原麻美<sup>4)</sup>, 猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>京都大学医学研究科循環器病態学

<sup>3)</sup>湘南赤十字血液センター

<sup>4)</sup>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<sup>1)</sup>, 式田有里<sup>1)</sup>, 辻 隆之<sup>1)</sup>, 高原史郎<sup>2)</sup>,  
辻村 晃<sup>2)</sup>, 奥山明彦<sup>2)</sup>, 成瀬妙子<sup>3)</sup>, 猪子英俊<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>国立循環器病センター研究所

<sup>2)</sup>大阪大学医学部泌尿器科

<sup>3)</sup>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<sup>1)</sup>, Sandra Juarez<sup>1)</sup>, 菊池三穂子<sup>1)</sup>  
柳 哲雄<sup>2)</sup>, Maria Paula de Lopes<sup>3)</sup>, 金子 聡<sup>4)</sup>  
Oscar Ayau<sup>4)</sup>, Julio Argueta<sup>4)</sup>, Vivian Matta<sup>3)</sup>  
Milta Iraheta<sup>4)</sup>, Tamara Obispo<sup>4)</sup>  
森本 勲<sup>5)</sup>, 曾根敏雄<sup>1)</sup>, 嶋田雅暁<sup>5)</sup>, 多田 功<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>埼玉医科大学医動物学, <sup>2)</sup>長崎大学熱帯医学研究所原虫,  
<sup>3)</sup>Dept of Cyto., Fac. of Chem. Scie. and Pharm. USAC.,  
<sup>4)</sup>国際協力事業団, <sup>5)</sup>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<sup>1)</sup>, 岡 晃<sup>1)</sup>, 半沢 恵<sup>2)</sup>, 渡辺誠喜<sup>2)</sup>  
猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>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、 $\alpha$  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<sup>1)</sup>, 椎名 隆<sup>1)</sup>, 半沢 恵<sup>2)</sup>, 渡辺誠喜<sup>2)</sup>  
猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>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  $\beta$  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  $\beta$  鎖 cDNA をプローブに用いて分離した *Coja* クラス II  $\beta$  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  $\beta$  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  $\beta$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  鎖遺伝子は HLA などと同様に  $\beta$  鎖遺伝子の近傍に位置するものと考えられた。クラス II  $\beta$  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  $\beta$  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<sup>1)</sup>, 須山出穂<sup>2)</sup>, 渡部浩二<sup>1)</sup>, 柏木 登<sup>1)</sup><sup>1)</sup>北里大学医学部免疫学<sup>2)</sup>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<sup>1)</sup>, 土田文子<sup>1)</sup>, 萩原政夫<sup>1,2)</sup>バトムンフムンフバト<sup>2)</sup>, 上田 進<sup>3)</sup>坂本 薫<sup>4)</sup>, 増子佳世<sup>5)</sup>, 山本一彦<sup>6)</sup>, 辻 公美<sup>2)</sup><sup>1)</sup>東海大学病院細胞移植医療センター<sup>2)</sup>同 医学部移植免疫<sup>3)</sup>日生研 <sup>4)</sup>国立佐倉病院外科<sup>5)</sup>聖マリアンナ医科大学難治研センター<sup>6)</sup>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  $1.5 \times 10^5$ /well で混合し無血清培地 (AIM-V 培地) で6日間培養後、<sup>3</sup>H-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 $\beta$  鎖の CDR3 領域をコードする遺伝子を RT-PCR により増幅後、非変性ゲル電気泳動で一次構造の違いを検出する RT/PCR-SSCP 法にて検出した。

【結果および考察】 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 $\beta$ -1, -8, -9, -10, -19 の V $\beta$  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  $\alpha$  鎖 cDNA の分離とその遺伝子解析

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

<sup>1)</sup>東京農業大学農学部家畜育種学

<sup>2)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>3)</sup>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  $\alpha$  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  $\alpha$  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<sup>1)</sup>, 西野佳以<sup>1)</sup>, 田島 茂<sup>1,2)</sup>  
井鍋一則<sup>1,3)</sup>

<sup>1)</sup>理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

<sup>2)</sup>東京医科歯科大学医学部感染分子制御学

<sup>3)</sup>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,  $\alpha$  鎖および  $\beta$  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<sup>1,2)</sup>, 長岡淑子<sup>1,3)</sup>, 中井 裕<sup>2)</sup>  
間 陽子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

<sup>2)</sup>東北大学農学部動物微生物科学

<sup>3)</sup>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 $\beta$ <sup>78</sup>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,  $\beta$ <sup>78</sup>残基が Tyr であるアリ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  $\beta$ <sup>78</sup>残基に Val を有するアリルは,  $\beta$ <sup>71</sup>残基は Lys または Arg の塩基性アミノ酸,  $\beta$ <sup>74</sup>残基は Gln であった。以上の結果は, Lys/Arg- $\beta$ 71, Gln- $\beta$ 74, Val- $\beta$ 78 のアミノ酸配列を有するアリルが, 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  $\beta$  1 ドメインの  $\alpha$ -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  $\alpha$  鎖 (260 a.a.) および  $\beta$  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<sup>1,2)</sup>, 飯泉明宮美<sup>1,3)</sup>, 笠井憲雪<sup>2)</sup>  
間 陽子<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>理化学研究所筑波研究センター安全評価研究室

<sup>2)</sup>東北大学医学部附属動物実験施設

<sup>3)</sup>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 $\beta$  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  $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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<sup>1,2)</sup>, 小川篤子<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>1,3)</sup>  
 柏瀬貢一<sup>1)</sup>, 田中秀則<sup>1)</sup>, 赤座達也<sup>1)</sup>, 田所憲治<sup>1)</sup>  
 高橋朋子<sup>2)</sup>, 十字猛夫<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>日赤中央血液センター  
<sup>2)</sup>星薬科大学薬学部生物活性  
<sup>3)</sup>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<sup>1)</sup>, 徳永勝士<sup>2)</sup>, 三富斉忠<sup>1)</sup>, 赤座達也<sup>3)</sup>  
 十字猛夫<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup>東京都赤十字血液センター研究部  
<sup>2)</sup>東京大学医学部人類遺伝学  
<sup>3)</sup>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<sup>1,2)</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>1,3)</sup>  
 Yoshihide Ishikawa<sup>1)</sup>, Hidenori Tanaka<sup>1)</sup>  
 Kouichi Kashiwase<sup>1)</sup>, Guanjiun Jia<sup>4)</sup>  
 Tatsuya Akaza<sup>1)</sup>, Kenji Tadokoro<sup>1)</sup>  
 Yoichi Shibata<sup>2)</sup>, Takeo Juji<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Research, Japanese Red Cross Central Blood Center; <sup>2)</sup>Department of Transfusion Medicine and Immunohematology, University of Tokyo; <sup>3)</sup>Department of Human Genetics, University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>4)</sup> 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 $3 \times 10^8$ コ/ $\mu$ 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 $\mu$ 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<sup>1)</sup>, 勝山善彦<sup>2)</sup>, 安藤 等<sup>3)</sup>, 水木信久<sup>4)</sup>  
降旗謙一<sup>5)</sup>, 猪子英俊<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>信州大学医学部法医学教室

<sup>2)</sup>同 病院薬剤部

<sup>3)</sup>神奈川県湘南赤十字血液センター

<sup>4)</sup>横浜市立大学医学部眼科

<sup>5)</sup>信州大学医学部臨床検査学

<sup>6)</sup>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)<sub>4</sub>, A5 (GCT)<sub>5</sub>, A5.1 (GCT)<sub>4</sub>+GGCT, A6 (GCT)<sub>6</sub>, A9 (GCT)<sub>9</sub>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)<sub>n</sub>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)<sub>n</sub>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<sup>1)</sup>, 太田正穂<sup>2)</sup>, 安藤 等<sup>3)</sup>, 水木信久<sup>4)</sup>  
降旗謙一<sup>5)</sup>, 猪子英俊<sup>6)</sup>

<sup>1)</sup>信州大学病院薬剤部

<sup>2)</sup>同 医学部法医学教室

<sup>3)</sup>神奈川県湘南赤十字血液センター

<sup>4)</sup>横浜市立大学医学部眼科

<sup>5)</sup>信州大学医学部臨床検査学

<sup>6)</sup>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者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の健常者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, 健常者集団, 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<sup>1)</sup>, 水木信久<sup>2)</sup>, 太田正穂<sup>3)</sup>, 山崎正明<sup>4)</sup>  
田代弘行<sup>4)</sup>, 宮田義久<sup>1)</sup>, 脇坂和男<sup>1)</sup>, 猪子英俊<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>神奈川県湘南赤十字血液センター

<sup>2)</sup>横浜市立大学医学部眼科

<sup>3)</sup>信州大学医学部法医学

<sup>4)</sup>不二家バイオ研究所

<sup>5)</sup>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<sup>1)</sup>, 菊池イアラ幸江<sup>1)</sup>, 重成敦子<sup>1)</sup>  
荒井純子<sup>2)</sup>, 勝岡洋治<sup>3)</sup>, 平賀聖悟<sup>4)</sup>, 河田寿子<sup>1)</sup>  
木村 稔<sup>1)</sup>, 猪子英俊<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>東京女子医科大学腎臓病総合医療センター

<sup>3)</sup>大阪医科大学泌尿器科

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

<sup>1)</sup>東海大学医学部分子生命科学

<sup>2)</sup>放射線医学研究所

<sup>3)</sup>東海大学医学部耳鼻咽喉科学

<sup>4)</sup>国立遺伝学研究所進化遺伝

<sup>5)</sup>晴和病院

<sup>6)</sup>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.