

**Vol.4 No.2  
1997**

# MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第4巻第2号 平成9年12月1日発行

## Contents

第7回日本組織適合性学会大会のご案内	67
〔原著論文〕PCR-RFLP法によるHLA-C遺伝子のDNAタイピングの開発 .....松澤由美子、成瀬妙子、猪子英俊	69
〔原著論文〕新しい抗血清を用いたHLA-B抗原解析のための等電点電気泳動 .....イムノプロット法の確立 .....古田求、水野伸一、太田浩敏、和田かおる、高橋勲、神谷忠、小澤和郎	74
〔最新情報：“玉手箱”〕最新アリル情報 .....小林賢	80
〔最新情報：“玉手箱”〕MPH法とSSCP法を用いたHLAクラスI抗原のDNAタイピング .....柏瀬貢一	97
〔第6回日本組織適合性学会大会QCワークショップ報告〕 .....小林賢、猪子英俊、大谷文雄、木村彰方、徳永勝士、前田平生	100
〔海外ラボ紹介〕パリ・バスツール研究所、Philippe Kourilsky教授の研究室 .....原田晴仁	110
〔書評〕「ゲノム情報を読む」宮田隆・五條堀孝編 .....福森泰雄	113
Q & A .....秦美暢、小林賢	115
〔第14回近畿HLA研究会〕	117
〈日本組織適合性学会誌MHCの投稿規定〉	128
編集後記	130

Major Histocompatibility Complex  
Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI



*HLA DNA タイピング  
クオリティーコントロールワークショップ*

**参加申し込み書**

FAX 送信先：0463-94-8884  
第7回日本組織適合性学会事務局 宛

どちらかに○をお付けください。

**新規参加**

**継続参加**

切り取り線

申し込み日 \_\_\_\_\_ 年 月 日

施設名 \_\_\_\_\_

代表者氏名 \_\_\_\_\_

連絡先住所 \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

T E L \_\_\_\_\_ 内線 \_\_\_\_\_

F A X \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_

郵送先：

〒259-11

神奈川県伊勢原市望星台  
東海大学医学部分子生命科学系 遺伝情報部門内  
第7回日本組織適合性学会事務局



## 第7回 日本組織適合性学会大会 宿泊・交通のお知らせ

**宿泊日時** // 1998年7月15日(水), 7月16日(木), 7月17日(金)

**宿泊場所** // 箱根 湯本富士屋ホテル

住所: 神奈川県足柄下郡箱根町湯本256-1

電話: 0460-5-6111, FAX: 0460-5-6142

交通: 小田急線箱根湯本駅からタクシーで約5分

**宿泊料金** //

部屋タイプ	利用タイプ	単価
洋室	1名1室利用	@¥23,910-
洋室	2名1室利用	@¥16,200-
和洋室、和室	5~6名1室利用	@¥13,650-

\* 1泊2食付(16日については、1泊懇親会と朝食)税金、サービス料込み1人当たりの料金です。

\* 上記料金の他に、1名につき入湯税@¥150-がかかります。

\* 洋室については、ご希望のお部屋タイプに沿えない場合もございます。

\* 同部屋希望の方は、同一の申込書でお申し込み下さい。特にご希望がない場合は、部屋割りは当社にて行います。

\* 7/16に行われる懇親会の料金は、上記料金にて対応いたしますが、懇親会のみの参加の方の料金は、以下の通りです。

懇親会のみの参加	¥5,000-
懇親会の参加と入浴	¥7,800-

\* 懇親会の参加と入浴の方は、入湯税が含まれております。

**お弁当代** // 7月16日のお弁当代 ¥1,600-

**交通** //

日付	区間	交通(時間帯)	団体料金	記号
7/15	札幌～羽田	航空機(夕頃)	¥20,000-	A1
7/15	大阪～羽田	航空機(夕頃)	¥13,800-	A2
7/15	福岡～羽田	航空機(夕頃)	¥22,000-	A3
7/17	羽田～札幌	航空機(午前)	¥23,000-	A4
7/17	羽田～大阪	航空機(午前)	¥12,000-	A5
7/17	羽田～福岡	航空機(午前)	¥25,000-	A6

\* 上記交通機関の値段は、15名以上の団体料金です。お申し込みの人数が、15名未満の場合は、通常の値段にてご手配申し上げます。

\* 正式な時間、便名については、来年のスケジュールが出てから4月頃のご連絡となりますのでご了承下さい。

\* 上記値段は、1997年11月現在の料金になります。今後、各交通機関に大幅な値段の変更がある場合は、料金が変更になる可能性もございます。

**通信連絡費** // 上記の宿泊、交通のお申し込み1件に対し、¥800-を申し受けます。お取り消しの場合でもご返金できませんので、あらかじめご了承下さい。

### お申し込み、お問い合わせ先

近畿日本ツーリスト株式会社 東京千代田支店 日本組織適合性学会大会係

〒101-0051 東京都千代田区神田神保町2-2 共同ビル6階

TEL: 03-3263-5522 FAX: 03-3263-5961

担当: 高橋(一)、白井

- 別紙、申込書に必要事項をご記入の上、上記担当宛にご郵送又はFAXして下さい。
- 各種費用は、お申し込み受付後、弊社より請求書を発送させていただきますので、請求書の到着後、同封する弊社指定口座宛にお振り込み下さい。
- 申込締切日: 1998年5月29日
- 宿泊及び、交通の取り消し、変更については、以下の通りです。
- 申込書のコピーをおとりになり、お控えとして下さい。

**取り消し、変更について**

~14日前まで	13~4日前まで	前日まで	当日以降
無料	2,000円	50%	100%



&lt;記入例&gt;

## 平成10年 第7回日本組織適合性学会大会

\*弊社記入欄

コピー・FAX可

## 宿泊・昼食・交通手段申込書

受付日		受付番号																	
<table border="1"> <tr> <td>申込代表者氏名 (担当者)</td> <td>近鉄 太 良</td> <td>フリガナ</td> <td>キンテツタロウ</td> </tr> <tr> <td>連絡先 (確認書・請求書送付先)</td> <td>〒101 東京都千代田区神田神保町2-2 共同ビル6F *○をつけて下さい。自宅・<u>所属先</u>その他( )</td> <td>所属先名</td> <td>フリガナ</td> </tr> <tr> <td>確認書・請求書送付先が上記と違う方</td> <td>〒</td> <td>勤務先名</td> <td>キンテツビュウイン</td> </tr> <tr> <td></td> <td>所属先名:</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>				申込代表者氏名 (担当者)	近鉄 太 良	フリガナ	キンテツタロウ	連絡先 (確認書・請求書送付先)	〒101 東京都千代田区神田神保町2-2 共同ビル6F *○をつけて下さい。自宅・ <u>所属先</u> その他( )	所属先名	フリガナ	確認書・請求書送付先が上記と違う方	〒	勤務先名	キンテツビュウイン		所属先名:		
申込代表者氏名 (担当者)	近鉄 太 良	フリガナ	キンテツタロウ																
連絡先 (確認書・請求書送付先)	〒101 東京都千代田区神田神保町2-2 共同ビル6F *○をつけて下さい。自宅・ <u>所属先</u> その他( )	所属先名	フリガナ																
確認書・請求書送付先が上記と違う方	〒	勤務先名	キンテツビュウイン																
	所属先名:																		
部課	検査部	部課	ケンサブ																
TEL	03-3263-5522 内線(123)	TEL	03-3263-5522 内線(123)																
FAX	03-3263-5961	FAX	03-3263-5961																
ご担当者名:		TEL																	
FAX																			

No.	氏名	性別	年齢	喫煙	部屋タイプ	同室希望者名	宿泊希望日 7/15	宿泊希望日 7/16	宿泊希望日 7/17	7/16の 弁当	宿泊しない方 懇親会のみ参加	懇親会と 人浴希望	希望交通手段	備考
1	キンテツタロウ <b>近鉄太郎</b>	(男) 女	30	(有) 無	シンゲル 5~6人部屋		○	○	○					
2		男 女		(有) 無	シンゲル 5~6人部屋		○	○	○					
3		男 女		有 無	シンゲル 5~6人部屋				○	○				
4		(男) 女	40	有 無	シンゲル 5~6人部屋	近鉄太郎	○	○	○					

\*ご注意 : FAXでお申し込みの場合、オリジナルは郵送しないで下さい。

\*申込〆切: \_\_\_\_月\_\_\_\_日



# 平成10年 第7回日本組織適合性学会大会

\*弊社記入欄

コピー・FAX可

宿泊・昼食・交通手段申込書

		受付日		受付番号	
フリガナ	フリガナ				
申込代表者氏名 (担当者)	所属先名 勤務先名	部	課	部	課
フリガナ	フリガナ	内線( )		TEL	
連絡先 (確認書・請求書送付先)	*○をつけて下さい。自宅・所属先・その他( )	FAX		FAX	
〒 確認書・請求書送付先が上記と違う方	〒 所属先名: ご担当者名:	〒		TEL	
コピーレイアウト					

No.	氏名	性別	年齢	喫煙	部屋タイプ	同室希望者名	宿泊希望日 7/15	宿泊希望日 7/16	宿泊希望日 7/17	7/16の 弁当	宿泊しない方 懇親会のみ参加	希望交通手段	備考
1	男・女	有・無	シングル 5~6人部屋	シングル 5~6人部屋									
2	男・女	有・無	シングル 5~6人部屋	シングル 5~6人部屋									
3	男・女	有・無	シングル 5~6人部屋	シングル 5~6人部屋									
4	男・女	有・無	シングル 5~6人部屋	シングル 5~6人部屋									

\*ご注意 : FAXでお申し込みの場合、オリジナルは郵送しないで下さい。

\*申込み切: \_\_\_月\_\_\_日



## Contents

第7回日本組織適合性学会大会のご案内	67
〔原著論文〕PCR-RFLP法によるHLA-C遺伝子のDNAタイピングの開発	
.....松澤由美子, 成瀬妙子, 猪子英俊	69
〔原著論文〕新しい抗血清を用いたHLA-B抗原解析のための等電点電気泳動	
.....古田求, 水野伸一, 太田浩敏, 和田かおる, 高橋勲, 神谷忠, 小澤和郎	74
〔最新情報：“玉手箱”〕最新アリル情報	小林賢 80
〔最新情報：“玉手箱”〕MPH法とSSCP法を用いたHLAクラスI抗原のDNAタイピング	
.....柏瀬貢一	97
〔第6回日本組織適合性学会大会QCワークショップ報告〕	
.....小林賢, 猪子英俊, 大谷文雄, 木村彰方, 徳永勝士, 前田平生	100
〔海外ラボ紹介〕パリ・パスツール研究所, Philippe Kourilsky教授の研究室	原田晴仁 110
〔書評〕「ゲノム情報を読む」宮田隆・五條堀孝編	福森泰雄 113
Q & A	秦美暢, 小林賢 115
〔第14回近畿HLA研究会〕	117
〈日本組織適合性学会誌MHCの投稿規定〉	128
編集後記	130



# 第7回日本組織適合性学会大会のご案内

第7回日本組織適合性学会

大会長 猪子 英俊

会期 1998年7月16日(木)～17日(金)  
会場 箱根 湯本富士屋ホテル  
神奈川県足柄下郡箱根町湯本  
小田急電鉄箱根湯本駅下車 徒歩3分

## I. 開催内容（予定）

1. シンポジウム：HLA クラス I 抗原 DNA タイピングの開発と現状
2. シンポジウム：MHC の進化と多型性の形成
3. ワークショップ：HLADNA タイピングの QC
4. 一般演題

## II. HLA DNA タイピング QC ワークショップ募集要項

第6回大会に引き続き、本大会におきましても標準化委員会（前田平生委員長）が中心となって DNA タイピングのクオリティーコントロール（QC）ワークショップを開催致します。タイピング技術、データの信頼性の向上を目的として、本大会にはさらに多くの施設にご参加頂き、討議を行いたいと考えております。奮ってご参加下さい。

### 1. スケジュール

参加施設には1998年3月中にコントロールDNAを無料で配布致します。データ提出の締切りは5月末を予定しております。

### 2. 参加施設について

第6回大会にご参加頂きました施設につきましては、継続してのご参加をお願い致します。また、今回よりの新規参加も歓迎致します。特に病院検査室、検査センター等のご参加をお待ちしております。なお、一部の施設につきましては、標準化委員会より参加を依頼することがあります。

### 3. 参加申し込み

本誌に綴じ込まれている申し込み用紙に必要事項を記入の上、第7回日本組織適合性学会事務局までFAX、または郵送にてお申し込みください。

### 4. QC ワークショップ申し込み締切日

1998年2月28日(土) 必着

### III. 一般演題募集要項

一般演題は下の事項に従ってご応募下さい。

#### 1. 抄録形式

抄録は、原則として日本語ワードプロセッサーのテキストファイル形式を用い、和文にて作成してください。演題名、演者、所属、本文の順に記載し、発表者には○印を付けてください。本文は800字以内とし、目的、方法、結果、考察等に分類して記載してください。英数字は半角文字を使用し、2文字で1字とします。なお、字数を超えた抄録については、予告なしに変更する場合があります。

#### 2. 応募に必要な書類

応募に必要な書類は以下の通りです。

- 1) A4用紙に印刷した抄録原稿1部+そのコピー2部
- 2) 抄録原稿（テキスト形式）の収められている3.5インチフロッピーディスク1枚（ディスクには所属、氏名、使用した機種名を記載のこと）
- 3) 必要事項と連絡先を記入した通知用はがき2枚（本誌の綴じ込みはがきに50円切手貼付）

#### 3. 演題申し込み締切日

1998年3月14日(土) 必着

#### 4. その他

演題については未発表のものとし、他の学会等での発表と重複されないようにご注意下さい。また、発表の形式につきましては口述講演を予定しています。演題申し込みはE-mailでも受け付けますが、その場合もディスク以外の必要書類一式を事務局まで別送願います。

#### 5. 演題送り先、大会問い合わせ先

〒259-11

神奈川県伊勢原市望星台

東海大学医学部分子生命科学系 遺伝情報部門内

第7回日本組織適合性学会事務局

大会幹事 成瀬 妙子

TEL: 0463-93-1121 内線2653

FAX: 0463-94-8884

E-mail:tnaruse@is.icc.u-tokai.ac.jp

# [原著論文] PCR-RFLP 法による HLA-C 遺伝子の DNA タイピングの開発

松澤 由美子, 成瀬 妙子, 猪子 英俊

東海大学医学部, 分子生命科学

(平成 9 年 2 月 17 日 受付)

## 要約

HLA-C 抗原系は他の HLA 抗原に比べ発現が弱いことなどの理由で、血清学的方法による同定はブランクが多く出現し、精度の高いタイピング法とはいひ難い。そこで HLA-C 抗原の簡便な DNA タイピングを目的として、PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法により、計 11 種の制限酵素を用いて 30 種類の C 抗原対立遺伝子（アリル）を 18 グループに分類する方法を考案した。実際に HLA-C 抗原対立遺伝子が既知の 24 種の HLA-C 抗原ホモ接合体細胞（但し、TUBO の C 抗原は血清学的にブランク）と 2 種のヘテロ接合体細胞を用いて DNA タイピングを行ったところ、正確な対立遺伝子の同定が可能と考えられたことから、本研究で確立した PCR-RFLP 法は、PCR-SSP 法との併用により全てのアリルが識別可能な HLA-C タイピングに有効な方法であることを確認した。

## キーワード：

PCR-RFLP 法, HLA-C 抗原, DNA タイピング

## はじめに

HLA 抗原系のタイピングは今日、移植における組織適合や疾患発症機構の解明などに幅広く活用され、重要視されている。従来の HLA 抗原の検査法は血清学的方法が主流であったが、操作が煩雑な点や数多くのブランクの存在、そして抗血清の恒常的な供給が困難などの問題点が多くあった。特に、HLA-C 抗原系は他の抗原に比べ発現が弱いことなどから良質の抗血清の入手は難しく、また 30 ~ 50 % の遺伝子頻度でいわゆるブランクが存在している(1, 2)。現在 Cw\*0102 ~ Cw\*1801 まで 30 種類の対立遺伝子が公認されている(3)が、HLA-C 遺伝子と相関する疾患の解析や、骨髄移植ドナーのより的確な検索などに、精度の高い HLA-C タイピングの確立が急務と考えられる。

そこで、本研究では、簡便かつ詳細なタイピングが可能な PCR-RFLP 法(4, 5)を用いて、HLA-C 遺伝子の DNA タイピング法の開発を試みた。

## 材料と方法

24 種類の血清学的方法による HLA-C 抗原型あるいは、DNA タイピングによる遺伝子型が既知のホモ接合体細胞（但し、TUBO の C 抗原は血清学的にブランク）と、2 種類のヘテロ接合体細胞を用いた。

HLA-C 遺伝子で最も多型性に富む第 2 エクソンから第 3 エクソンまで、第 2 イントロン領域も含めた 912 ~ 918 bp を、既に報告されている PCR プライマー (5' CIn-61; 5'-AGCGAGGG/TGCCCGCCCCGGCGA, 3' BCIn-12; 5' -

筆頭著者連絡先：〒259-11 神奈川県伊勢原市望星台  
東海大学医学部分子生命科学  
松澤由美子

電話：0463-93-1121  
ファックス：0463-94-8884

GGAGATGGGAAAGGCTCCCCACT) を用いて(6), 変性 94 °C, 22 秒, アニーリング 65 °C, 50 秒, 伸長 72 °C, 30 秒の 30 サイクル行ない, PCR 増幅した。反応液は全量 100 μl とし, PCR バッファー(15 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 μM EDTA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % ゼラチン, 10 mM β-メルカプトエタノール, 1 % DMSO), 0.2 mM dNTP, プライマー 3 種, Taq DNA ポリメラーゼ 2 単位, DNA (100 ng) を加えたものとした(6)。その後, 30 種類の既に明かにされている HLA-C 抗原対立遺伝子の塩基配列をもとに選択した, 各 C 対立遺伝子の多型性を識別することができる 11 種類の制限酵素 (*Apa* I, *Bgl* I, *BsiHKA* I, *Xcm* I, *Bsg* II, *Alw* I, *Ava* I, *BsaA* I, *Rsa* I, *Nla* III, *EcoN* I) を用いて増幅産物の切断を行なった。切断反応液は全量 12 μl で, PCR 産物 7 μl に制限酵素 2 単位を加え, 各々の制限酵素の至適条件下で 3 時間反応させた。*Nla* III は反応後, 0.6 μg のプロテイナーゼ K にて 50 °C 1 時間の処理を行なった。その後, 8 % ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色後, UV 照射で写真撮影後判定した。

## 結果

既に公表されている 30 種類の HLA-C 抗原対立遺伝子の塩基配列をもとに, 制限酵素の検索を行なったところ, *Apa* I, *Bgl* I, *BsiHKA* I, *Xcm* I, *Bsg* II, *Alw* I, *Ava* I の 7 種類の制限酵素を使用して, 先ず 9 グループに分類し, 更に *BsaA* I, *Rsa* I, *Nla* III, *EcoN* I の 4 種類の制限酵素を用いることにより, 18 グループに識別可能であった(表 1, 表

表 1 HLA-C 遺伝子のホモ接合体の判定パターン  
(第 1 段階)

Cw* alleles	<i>Bpa</i> I	<i>Bgl</i> III	<i>BsiHKA</i> I	<i>Hcm</i> I	<i>Bsg</i> I	<i>Alw</i> I	<i>Rsa</i> I	
1781	1	1	0	1	0	-	+	-
1602	1	0	1	1	1	-	+	-
1381	1	0	0	0	0	-	+	-
=02021=02022	1	0	0	0	0	-	+	-
=12021=12022								
0401=0402	0	0	0	1	0	+	-	-
0302=0303=0304	1	0	0	1	0	+	-	-
=1402=1403								
0102=0701=0702								
=0703=1203=1502	1	0	0	1	0	-	+	-
=1503=1504=15051								
=1601								
0501=0801=0802	1	0	0	1	1	-	+	-
=0803								
0602=0704	1	0	0	1	0	-	+	-
	0: 切断されない	1: 切断される		+ : バンドが認められる		- : バンドが認められない		

表 2 HLA-C 遺伝子のホモ接合体の判定パターン  
(第 2 段階)

Cw* alleles	<i>Bsa</i> RI		<i>Rsa</i> I	
	748	653	595	393
02021=02022	+	-	+	-
=12021=12022	-	+	-	+
<i>Rsa</i> I	<i>Bsa</i> RI		<i>Eco</i> NI	
	595	393	708	614
0302	+	-	+	-
0303=0304	-	+	-	+
=1402=1403	+	-	+	+
<i>Rsa</i> I	<i>Bsa</i> RI		<i>Nla</i> III	
	595	393	748	653
0102	+	-	+	-
0701=1504	-	+	-	-
=1502=1503=15051	-	-	+	-
0702=1203=1601	+	-	+	-
=0703	+	-	+	-

2). そこで, 実際に 24 種類のホモ接合体細胞(但し, TUBO の C 抗原は血清学的にブランク)と 2 種類のヘテロ接合体細胞を用いて, 選択した制限酵素を用いた PCR-RFLP 法により DNA タイピングを行なったところ, 26 種のうち 22 種が図 2 からわかるように予想された位置に切断バンドが出現し, 既知 HLA-C 抗原型, あるいは遺伝子型と一致していた(表 3)。残る 4 種のうち, TUBO は血清学的にブランクであったが, Cw\*0702=1203=1601 / 1502 = 1503 = 15051 のヘテロと判定

表 3 HLA-C 遺伝子のホモ接合体細胞を用いた判定結果

HTC	抗原型	遺伝子型	PCR-RFLP
	HLA-C	HLA-C*	
BTB	1	0102 / 0102	0102 / 0102
SPACH	1	01 / 01	0102 / 0102
TABO89	2	0102 / 0102	0102 / 0102
SPOO10	5	05 / 05	0501 = 0802 / 0501 = 0802
JVM	5	05 / 05	0501 = 0802 / 0501 = 0802
QBL	5	05 / 05	0501 = 0802 / 0501 = 0802
DBB	6	0602 / 0602	0602 / 0602
SA	7	0702 / 0702	0702 = 1203 = 1601 / 0702 = 1203 = 1601
SAVC	7	0702 / 0702	0702 = 1203 = 1601 / 0702 = 1203 = 1601
CGM 1	8	0802 / 0802	0501 = 0802 / 0501 = 0802
WT51	8	0802 / 0802	0501 = 0802 / 0501 = 0802
JHAF	8	1502 / 1502	1502 = 1503 = 15051 / 1502 = 1503 = 15051
TOK	-	1202 / 1202	1202 / 1202
AKIBA	-	1202 / 1202	1202 / 1202
WDV	-	1203 / 1203	0702 = 1203 = 1601 / 0702 = 1203 = 1601
DO208915	-	1203 / 1203	0702 = 1203 = 1601 / 0702 = 1203 = 1601
YAR	-	1203 / 1203	0702 = 1203 = 1601 / 0702 = 1203 = 1601
LUY	-	1402 / 1402	1402 = 1403 / 1402 = 1403
KT2	-	1402 / 1402	1402 = 1403 / 1402 = 1403
HOR	14	1403 / 1403	1402 = 1403 / 1402 = 1403
RSH	-	1701 / 1701	1701 / 1701
OLGA	1 / 3	01 / 0302	0102 / 0302
AMALA	9	0301 / 0301	0303 = 0304 / 0303 = 0304
TUBO	-	- / -	1502 = 1503 = 15051 / 0702 = 1203 = 1601
MGAR	7	0702 / 0702	0102 / 0701 = 1504
WT8	7 / 8	0704 / 1502	0702 = 1203 = 1601 / 0702 = 1203 = 1601

された。また、既知 HLA-C 抗原型や遺伝子型との違いが見られた残りの 3 種 (AMALA, MGAR, WT 8) については、報告されている対立遺伝子と異なるバンドパターンが得られた。すなわち AMALA は Cw\*0301/0301 ではなく Cw\*0303=0304/0303=0304, MGAR は Cw\*0702/0702 ではなく Cw\*0102/0701=1504, WT 8 は Cw\*0704/1502 ではなく Cw\*0702=1203=1601/0702=1203=1601 と判定された。これらのうち、MGAR を除く 2 つの細胞については、最近の他研究室からの HLA-C 遺伝子の DNA タイピングの報告があるが、我々の報告はそれらと一致していた (6, 10, 14)。また、OLGA は Cw 1/3 のヘテロ接合体であるがこれについても Cw\*0102/0302 の予想されたバンドパターンが得られた (図 2)。なお、対立遺伝子の判定には影響なかったが、3 種の細胞 (TUBO, MGAR, WT 8) については、Alw I による切断バンドパターンの一部が予想されたものと異なっていた。

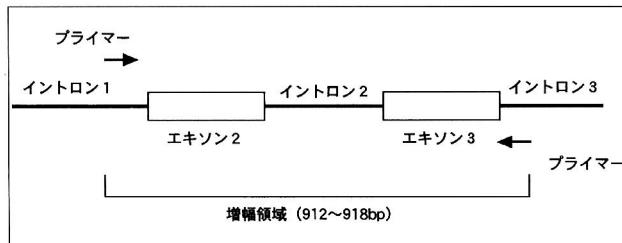


図 1 HLA-C 遺伝子の増幅領域

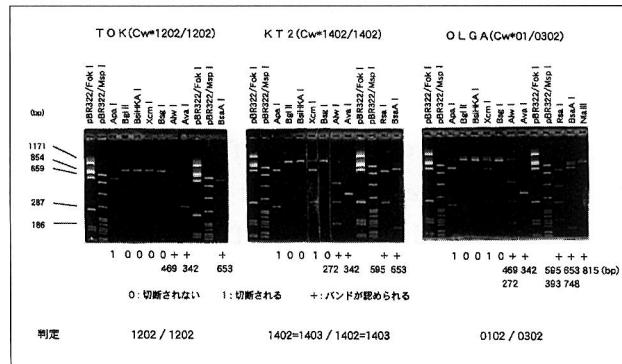


図 2 PCR-RFLP 法による HLA-C 遺伝子のタイピング

## 考察

現在なお、HLA クラス I 抗原のタイピングはリンパ球細胞毒性試験 (lymphocyte cytotoxicity test;

LCT) (7) による血清学的方法が主流であるが、実際面では全てに対応する抗血清を常時入手するのは困難であり、特に HLA-C 抗原については多数のブランク抗原が存在している。しかし今日では、遺伝子工学技術の進歩による塩基配列の解析が進み、PCR 法の発展とともに、DNA タイピングが実施可能となり、その簡便さと高い精度という特徴から HLA クラス II 抗原のみならず、クラス I 抗原についても遺伝子タイピングの確立が急務と考えられる。

今回、本研究で検討を行なった HLA-C 遺伝子タイピングについては、これまで PCR-SSO (6, 8) や、PCR-SSP (8, 9, 10, 11), PCR-SSCP (8, 10, 11, 12) などの方法が検討されているが、我々は放射性同位体元素を用いず、安全で、プライマーの数を最小限に抑えることができ、迅速かつ、簡便な DNA タイピングが可能な PCR-RFLP 法を用いて、HLA-C 遺伝子のタイピングの開発を試みた。

30 種類の HLA-C 抗原対立遺伝子の塩基配列をもとにコンピューター検索を行なったところ、計 11 種類の制限酵素を用いることにより 18 グループに識別可能と予想された。実際に 24 種類の HLA-C 抗原型が遺伝子型既知のホモ接合体細胞（但し、TUBO の C 抗原は血清学的にブランク）と 2 種のヘテロ接合体細胞を用いて、この方法で判定を行なったところ、血清学的にブランクの TUBO は対立遺伝子が判明し、AMALA, MGAR, WT 8 の 3 種を除いて既知の対立遺伝子と一致していた。

また、TUBO, MGAR, WT 8 の 3 種については、Alw I 切断において予想では 469 bp に認められるべきバンドが見られず、実際には 454 bp 上部の位置にバンドが認められた。本研究ではエクソン領域に比べ塩基配列情報が少ないイントロンを含んだ領域を PCR 増幅したため、一部の HLA-C 対立遺伝子では予想される位置とは異なる位置にバンドが認められ、イントロン領域の塩基配列にも多型性が存在すると考えられた。実際、最近報告された HLA-C 遺伝子のイントロン領域の塩基配列 (13) に着目すると、若干の多型性が見られ、増幅の長さが 912 bp ~ 918 bp と変化する。なかでも Cw\*0701 の第 2 イントロンの塩基配列は、他の対立遺伝子と異なり、Alw I 切断により 458 bp のバンドが生じるこ

とにより、上記の3種は、Cw\*07関連の第2イントロン部位に多型性が存在すると考えられた。これらを考慮に入れると、今回 *Alw I* 切断パターンの結果に違いが見られた TUBO, MGAR, WT 8 のそれぞれ一方の対立遺伝子は、TUBO と WT 8 が Cw\*0702 = 1203 = 1601, MGAR は Cw\*0701 = 1504 であると考えられる。さらに、TUBO と WT 8 の2種は Cw\*0702 = 1203 = 1601 と判定されたが、報告されている Cw\*1203 と Cw\*1601 の第2イントロン部分の塩基配列では多型性が認められないことより、Cw\*0702 の第2イントロンの塩基配列は Cw\*0701 と同一である可能性が考えられた。一方、Cw\*0702 を有する SA と SAVC の2種は、*Alw I* 切断によるバンドの違いは見られず、SA と SAVC の2種が血清学的に Cw 7 とされていることから考えると、TUBO, WT 8 の2種、あるいは、SA, SAVC の2種が新しい多型性を有する可能性も考えられた。なお、MGAR については、Cw\*0701 を含む可能性があるので *Alw I* 切断パターンを説明できるが、上述のように MGAR は既知の型 (Cw\*0702 / 0702) と一致しない判定結果であったので、新しい対立遺伝子、特にイントロンの新しい多型性を含む可能性も否定できない。他の HLA-C 対立遺伝子についても予想とは異なるバンドが認められる可能性もあるので、日本人の HLA-C 遺伝子ホモ接合体細胞を含めて、特にイントロンについてより詳細な塩基配列の解析を行なっていく予定である。

また、AMALA, MGAR, WT 8 の3種については既知の対立遺伝子と異なる可能性が示唆された。ただし、最近の報告で、AMALA は、Levin らのグループ(14)が、Cw\*0303 / 0303 であると報告しており、AMALA, WT 8 について Bunce らのグループ(10)が、AMALA は、Cw\*0303 / 0303, WT 8 は、Cw\*0702 / 0702 であると報告している。さらに、WT 8 については、Cereb らのグループ(6)が、Cw\*07 / 07 であると報告している。これらの報告は、我々の結果と一致するので AMALA は、Cw\*0303 / 0303, WT 8 は Cw\*0702 / 0702 であると考えられる。また、TUBO については、Bunce ら(10)と Cereb(6)がそれぞれ Cw\*0702 / 1502,

Cw\*07 / 15 と報告しているので、これについても我々の結果と一致していた。なお、TUBO の一方の対立遺伝子 Cw 7 抗原が何故血清学的にブランクと報告されたかは、今のところ明らかでない。

今回、HLA-C 抗原の DNA タイピングの確立を目指して、PCR-RFLP 法の検討を行ない、実際に HLA-C 抗原型及び遺伝子型既知の 26 種の HLA-C 抗原ホモ接合体細胞の DNA タイピングを行なったところ、1 種の例外を除いて両者の結果が一致したことから、HLA-C 遺伝子に対しても PCR-RFLP 法は有効であると考えられる。また、2 種類のヘテロ接合体についても検討したところ、予想されたバンドパターンが得られた。なお、本研究の PCR-RFLP 法で識別不可能なグループについては、現在では PCR-SSP 法などとの併用で、全ての対立遺伝子について識別が可能となっているが、これについては他の機会に発表の予定である（松澤ら、未発表）。

## 参考文献

1. Aizawa M : *HLA in Asia-Oceania* 1986. (ed. Aizawa M), Antigens and gene frequencies of ethnic groups. Hokkaido University Press, Sapporo, 1986 ; p. 1080-1091.
2. Baur MP, Neugebauer M, Albert ED : *Histocompatibility Testing* 1984 (eds. Albert ED, Baur MP, Mayr WR), Reference tables of two-locus haplotype frequencies for all MHC marker loci. Springer-Verlag, Berlin, 1984 ; p. 677-755.
3. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al. : Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens* 46 : 1-18, 1995.
4. 成瀬妙子, 猪子英俊 : HLA DNA タイピング、日本臨牀, 53 (1995年増刊号, 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査(下巻) - その数値をどう読むか-) : 676-683, 1995.
5. 成瀬妙子, 猪子英俊 : DNA による HLA タイピングの基礎(2)クラス II 抗原の DNA タイピング-1-, *Organ Biology*, 1 : 47-53, 1994.
6. Cereb N, Maye P, Lee S, et al. : Locus-specific amplification of HLA class I genes in the first and

- third introns of HLA-A, -B, and -C alleles. *Tissue Antigens* **45** : 1 - 11, 1995.
7. Terasaki PI, McCell JD : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* **204** : 998 - 1000, 1964.
  8. Wang H, Tokunaga K, Ishikawa Y, et al. : Identification and DNA typing of two Cw 7 alleles (Cw\*0702 and Cw\*0704) in Japanese, with the corrected sequence of Cw\*0702. *Hum. Immunol.* **45** : 52 - 58, 1996.
  9. Ando H, Mizuki N, Ando R, et al. : HLA-C genotyping in the Japanese population by the PCR-SSP method. *Tissue Antigens* **48** : 55 - 58, 1996.
  10. Bunce M, Barnardo MN, Procter J, et al. : High resolution HLA-C typing by PCR-SSP : identification of allelic frequencies and linkage disequilibria in 604 unrelated random UK Caucasoids and a comparison with serology. *Tissue Antigens* **48** : 680 - 691, 1996.
  11. Wang H, Tokunaga K, Ogawa A, et al. : DNA typing of Cw\*14 alleles in Japanese and the corrected sequence of Cw\*1402. *Tissue Antigens* **47** : 442 - 446, 1996.
  12. 王慧茄, 徳永勝士, 中島文明ら : 日本人の HLA-C アリル : PCR-SSCP 法および DNA 塩基配列決定による解析, *MHC*, **3** : 61, 1996.
  13. Cereb N, Kong Y, Maye P, et al. : Nucleotide sequences of MHC class I introns 1, 2, and 3 in humans and intron 2 in nonhuman primates. *Tissue Antigens* **47** : 498 - 511, 1996.
  14. Levine EJ, Yang YS : SSOP typing of the Tenth International Histocompatibility Workshop reference cell lines for HLA-C alleles. *Tissue Antigens* **44** : 174 - 183, 1994.

#### HLA-C middle-high resolution genotyping by PCR-RFLP

Yumiko Matsuzawa, Taeko Naruse, Hidetoshi Inoko

Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Bohseidai Kanagawa-pref, 259 - 11 Japan

#### Summary

Serological typing of HLA-C antigens is rather difficult mainly because HLA-Cw blank antigens are present at the gene frequency of 30 - 50 % in most human races. Here we have established HLA-C middle-high resolution DNA typing as a simple and sensitive technique, using the PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) method, which allows to classify HLA-C alleles into 18 groups by 13 restriction enzymes. HLA-C alleles defined by PCR-RFLP developed here in 26 HLA-homozygous cell lines were in complete agreement with those previously assigned by serological and/or DNA typing except one cell, revealing that this PCR-RFLP method is useful for analysis of HLA-C alleles in HLA-disease association studies and HLA matching for donor selection in unrelated bone marrow transplantation.

#### Key words :

PCR-RFLP method, HLA-C antigen, DNA typing

# 〔原著論文〕新しい抗血清を用いた HLA-B 抗原解析 のための等電点電気泳動 —イムノプロット法の確立

古田 求, 水野 伸一\*, 太田 浩敏, 和田 かおる, 高橋 勲, 神谷 忠, 小澤 和郎

愛知県赤十字血液センター, \*現所属 大同病院

(平成 9 年 4 月 10 日 受付)

## 要約

等電点電気泳動法を用いて HLA-B 抗原を解析するため, HLA-B 抗原に特異性の高いアミノ酸配列 DRETQISKNTNTQTYRE (aa 61 - 76) について Multiple Antigenic Peptide (MAP) を調製, 免疫することにより, “抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清”を調製し, 種々の HLA-A 抗原, -B 抗原との反応性について等電点電気泳動-イムノプロット (IEF-IB) 法にて検討した。その結果, 抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清は, HLA-B 抗原については, 免疫原と同一のアミノ酸配列を有する HLA-B 13, -B 44, -B 48, -B 52, -B 60, -B 61, -B 62 抗原に対し特異的に強く反応したが, 1 ~ 6 個のアミノ酸配列が異なる HLA-B 7, -B 8, -B 14, -B 18, -B 27, -B 35, -B 46, -B 51, -B 53, -B 54, -B 55, -B 70, -B 75 抗原にはほとんど反応しなかった。また, HLA-A 抗原 (8 ~ 9 個のアミノ酸配列が異なる) に関しては HLA-A 2, -A 24 には弱く反応するものの, 他の HLA-A 抗原にはほとんど反応性を示さなかった。従って, HLA-B 抗原に特異的なアミノ酸配列の MAP を合成, 免疫することにより, IEF-IB 法において HLA-A 抗原にはほとんど反応することなく, 免疫原と同一のアミノ酸配列を有する HLA-B 抗原のみと強く反応する抗血清を調製することができた。今後, 本血清は HLA-B 抗原の生化学的解析に有用になると思われる。

## キーワード :

HLA クラス I 抗原, HLA-B 抗原, 等重点電気泳動, イムノプロット, Multiple Antigenic Peptide

## はじめに

現在, HLA クラス I 抗原のタイピングはリンパ球細胞毒性試験 (LCT) (1), DNA タイピング (2) にて行われている。これらの方法以外に等電点電気泳動 (IEF) においても多数のアリルを同定できるが (3), これまで IEF による解析は十分に検討されていない。IEF による HLA クラス I 抗原の解析は初期は<sup>35</sup>S-メチオニンによるラベリング法 (3, 4) を

用いるものが主流であり, 我々もこの方法を用いて日本人の HLA クラス I 抗原を解析した(5)。しかしながら, この方法は RI を用いることから, 測定できる施設が限られ, より多くの施設で採用できる測定法の開発が望まれていた。J. J. Neefjes は抗 HLA クラス I 抗 H 鎖抗体を作製し, 等電点電気泳動-イムノプロット (IEF-IB) 法による解析を報告した (6, 7)。今回, 我々は HLA-B 抗原に特異性が高い

筆頭筆者連絡先 : 〒489 愛知県瀬戸市南山口町 539-3  
愛知県赤十字血液センター研究課  
古田 求

電話 : 0561-85-4292  
ファックス : 0561-84-3912

アミノ酸配列 ( $\alpha 1$  ドメインaa 61 - 76, アミノ酸残基 16 個) のMultiple Antigenic Peptide (MAP) を調製, 免疫することにより抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清を作製し IEF-IB 法の確立を試みた。

## 材料と方法

1) 抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清の作製: HLA-B 抗原に共通性の高いアミノ酸配列 DRETQISKTNTQTYRE (HLA-B 13, -B 44, -B 48, -B 52, -B 60, -B 61, -B 62 に共通のアミノ酸配列 61 - 76) に関してペプチドシンセサイザー Model 432 A Synergy (ABI 社) を用いて Fmoc. 法により MAP を作製した(8). 作製した MAP 0.1 mg を Freund complete adjuvant と共にウサギに 7 回 (1 回/週) 免疫し, 抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清を得た。

イムノプロット(6) : B 細胞株  $5 \times 10^6$  個に溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.5 % Triton X-114) 1 ml を加え, 4°Cで 30 分間静置し細胞を溶解した. 遠心後の上澄液を 37°C で 10 分間加温し, 遠心, 上層の除去により膜タンパク質画分を得た. 膜タンパク質画分についてノイラミニダーゼ処理 (1 U/ml, 5 時間, 37°C) を施

した後, IEF を行い (IEF gel : 4.5 % acrylamide-bisacrylamide, 2 % NP-40, 8.5 M urea, ampholine pH 5 - 7.4 %, pH 7 - 9.1 %, 340 V 13 - 16 hr), タンパク質成分を PVDF 膜に転写し, スキムミルクにてブロッキングした. その後, 抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清 (500 ~ 1000 倍希釈, 一晩, 4°C), ビオチン化抗ウサギムノグロブリン (500 倍希釈, 1 時間, 室温), ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体 (1000 倍希釈, 1 時間, 室温) を順次反応させ, ECL 検出試薬により HLA クラス I 抗原を検出した. また, B 細胞株は第 10 回国際組織適合抗原ワークショップの細胞株 18 種類及び我々が作製した 7 種類の B 細胞株 (HA, NT, TY, AY) を用いた. なお, コントロール抗体として mAb TP 25.99 {Ferrone S.先生 (ニューヨーク医科大学) より分与} を用いた.

## 結果

図 1 (a) には, 5 種類の B 細胞株から調製した HLA クラス I 抗原について SDS-PAGE-IB 法により抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清との反応性を調べた結果を示した. 免疫原と同じアミノ酸配列の HLA-B 52,

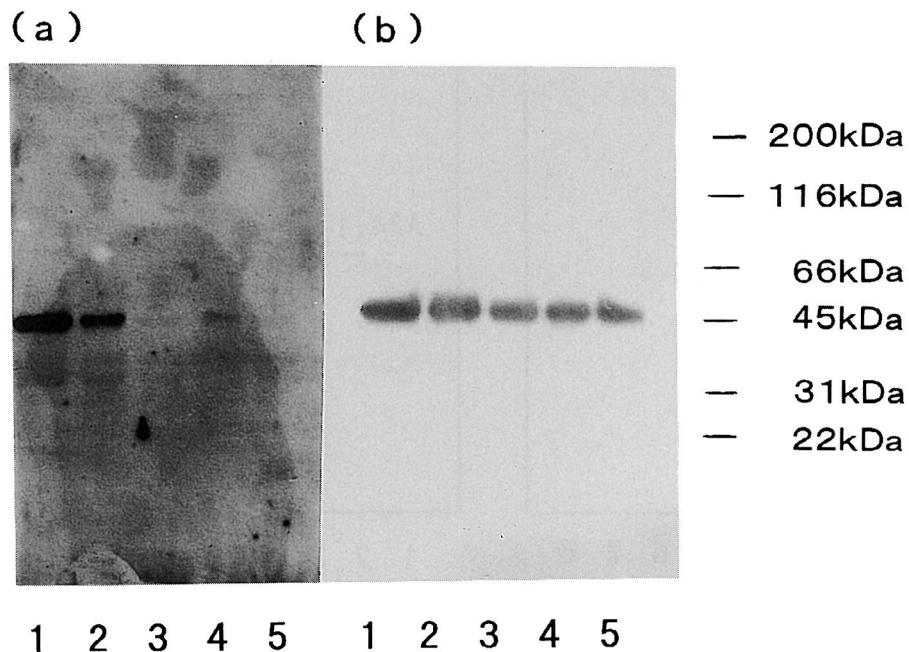


図 1. HLA クラス I 抗原の SDS-PAGE-イムノプロット. 抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清 (a) 及び mAb TP 25.99 (b) によるイムノプロット. Lane 1 : Boleth (A2, -; B62, -), lane 2 : E4181324 (A1, -; B52, -), lane 3 : AMA 1 (A28, -B53, -), lane 4 : VAVY(A1, -; B8, -), lane 5 : JO 5281324 (A1, -; B35, -)

-B62 抗原を有する E4181324, Bolethにおいては分子量 44 KDa のバンドが検出されたのに対し、2~3 個のアミノ酸配列が異なる HLA-B 抗原を有する B 細胞株においてバンドはほとんど検出されなかつた。

図 2 及び表 1 には、25 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-B  $\alpha 1$  MAP 血清との反応性を調べた結果を示した。HLA-B 抗原に関しては、本血清は免疫原と同一のアミノ酸配列を有する HLA-B 13, -B 44, -B

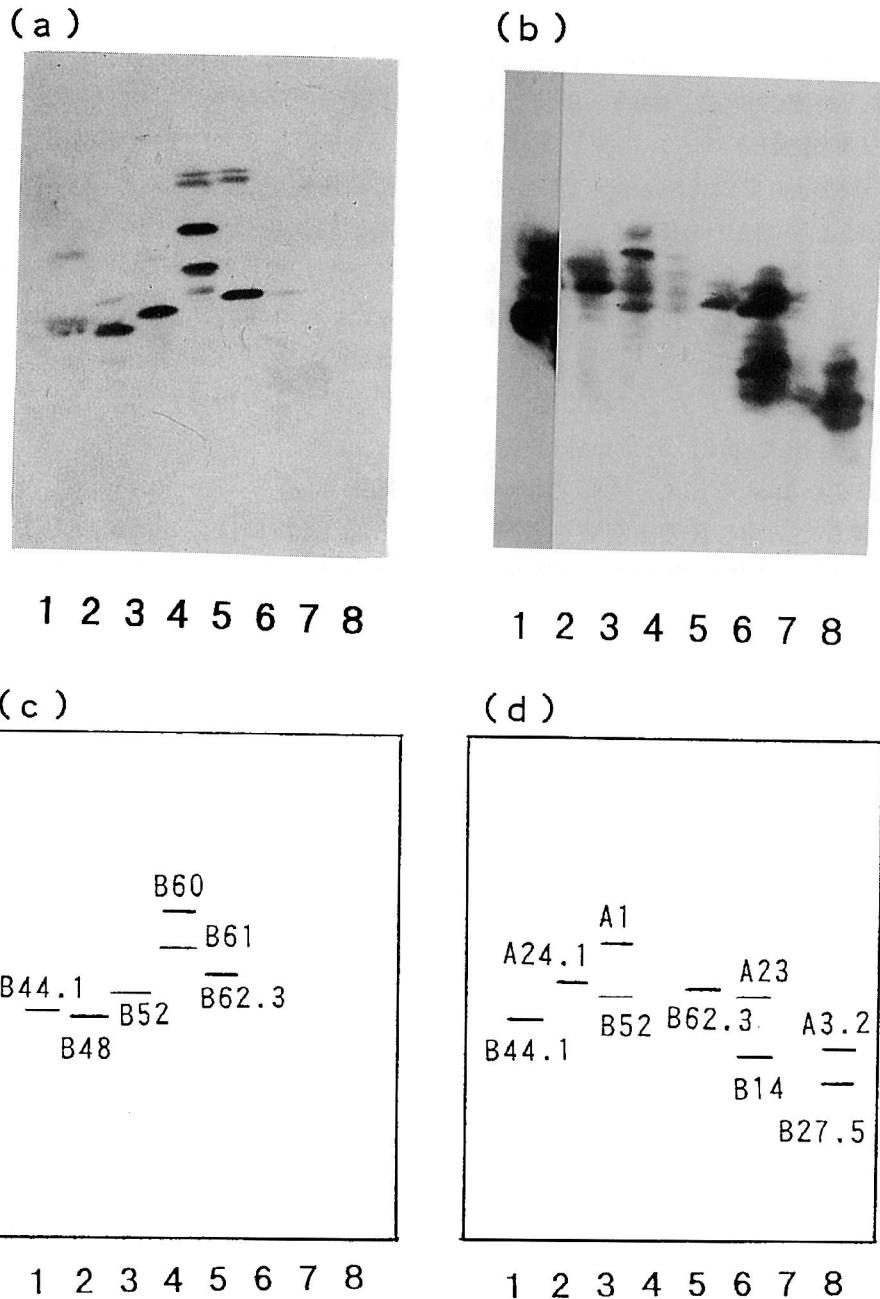


図 2. HLA クラス I 抗原の IEF-イムノプロット。抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清(a), mAb TP 25.99 (b) によるイムノプロット及びそれぞれの模式図(c), (d). Lane 1 : Hor (A 33, - ; B 44, -), lane 2 : TN (A 24, - ; B 48, 75), lane 3 : E4181324 (A 1, - ; B 52, -), lane 4 : HID (A 2, - ; B 60, 61), lane 5 : Boleth (A 2, - ; B 62, -), lane 6 : WT51 (A 23, - ; B 14, -), lane 7 : AMA1 (A 28, - ; B 53, -), lane 8 : HOM-2 (A 3, - ; B 27, -)

48, -B 52, -B 60, -B 61, -B 62 抗原に対し強く反応したが、免疫原とアミノ酸配列が 1~6 個異なる HLA-B 7, -B 8, -B 14, -B 18, -B 27, -B 35, -B 46, -B 51, -B 53, -B 54, -B 55, -B 70, -B 75 抗原にはほとんど反応しなかった。また、HLA-A 抗原に関して、本血清は HLA-A 2, -A 24 に弱い反応性を示したものとの他の HLA-A 抗原に対してはほとんど反応しなかった。

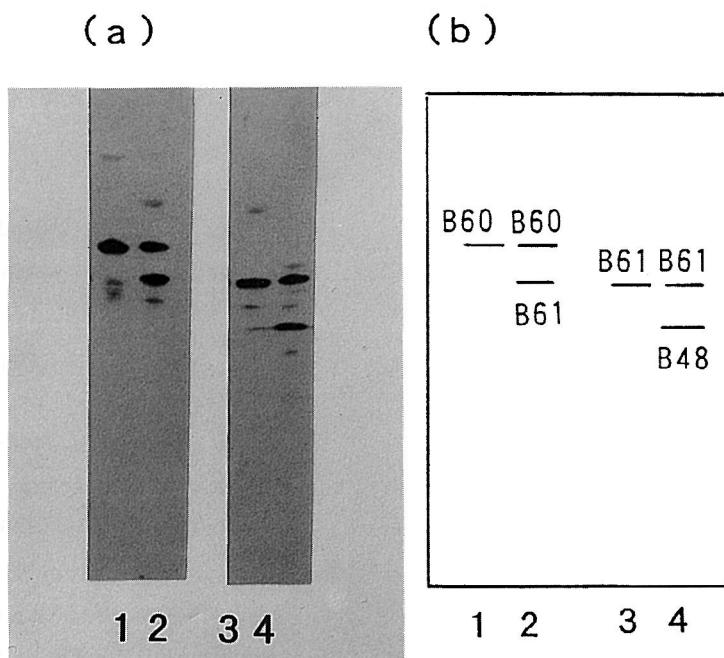
この IEF-IB 法を用いた応用例として LCT では識別が容易でない HLA-B 40 グループの識別を試みた。すなわち、LCT では B 60/- と B 60/B 61, B 60/B 48 との識別、ならびに B 61/- と B 61/B 48 の識別が容易でないため、IEF-IB 法による識別を試みた。その結果、IEF-IB 法により容易に B 60/- と B 60/B 61, ならびに B 61/- と B 61/B 48 を識別することができた（図 3）。

表 1. IEF-IB における抗 HLA-B  $\alpha$ 1 MAP 血清の HLA クラス I 抗原に対する反応性

HLA-A 抗原	反応性*	HLA-B 抗原	反応性*
A 1	±	B 7	-
A 2	± ~ +w	B 8	±
A 3	±	B 1 3	++
A 1 1	-	B 1 4	-
A 2 3	±	B 1 8	- ~ ±
A 2 4	± ~ +w	B 2 7	-
A 2 6	±	B 3 5	-
A 2 8	±	B 4 4	+
A 2 9	-	B 4 6	-
A 3 0	-	B 4 8	++
A 3 1	±	B 5 1	-
A 3 3	±	B 5 2	++
A 6 6	-	B 5 3	-
		B 5 4	-
		B 5 5	-
		B 6 0	++
		B 6 1	++
		B 6 2	++
		B 7 0	-
		B 7 5	-

\* : 反応性は陰性から強陽性まで-, ±, +w, +, ++ の 5 段階に分け判定した。

図 3. 抗 HLA-B  $\alpha$ 1 MAP 血清による HLA-B 40 グループの IEF-イムノプロットによる判別(a)及びその模式図(b). Lane 1 : MT-14B (A 31, -; B 60, -), lane 2 : HID (A 2, -; B 60, 61), lane 3 : CALOGERO (A 2, -; B 61 -), lane 4 : AH (A 26, 31; B 48, 61)



## 考察

現在、HLA クラス I 抗原のタイピングは LCT 及び DNA タイピングにより行われている。LCT は操作が容易でかつ 2~3 時間にて結果が得られるが、

LCT で同一と判定される抗原の中には多数のアリルが存在する。一方、DNA タイピングはアミノ酸 1 個の違いを検出でき、精度及び感度は高いが、PCR-SSOP で HLA-A 抗原をタイピングする場合で

も 51 種類のプローブを組み合わせることによりはじめてタイピングが可能となる(9)ため、すべての HLA クラス I 抗原を DNA タイピングする場合膨大な費用と手間がかかる。

IEF による解析は、抗原性を調べることはできずかつアミノ酸配列が異なっても等電点が同じであれば識別ができないなどの欠点があるが、HLA クラス I 抗原タンパク質そのものを検出できるため、タイピングよりもむしろ確認検査を含めた HLA 抗原の生化学的解析に有用である。これまで HLA クラス I 抗原の IEF-IB 解析用抗体としては抗 HLA-H 鎮抗血清(6), mAb 171.4 (10), mAb TP 25.99 (11) が報告されている。抗 HLA-H 鎮抗血清は精製 HLA-H 鎮を、mAb 171.4 はアミノ酸配列 257-271 の合成ペプチドを、mAb TP 25.99 は human melanoma cells Colo 38 を免疫原として作製され、抗 HLA-H 鎮抗血清及び mAb 171.4 はすべての HLA-A 抗原及び B 抗原と反応するとされている。一般に、膜貫通型タンパク質に関しては合成ペプチドを免疫原として用いた場合、細胞外領域に対する抗体の作製は難しいとされている(12)。今回、我々は MAP を免疫原として抗血清の作製を試み、IEF-IB 法では免疫原と同一のアミノ酸配列を有する HLA-B 抗原のみに特異的な抗血清を作製することができた。従って、今後、膜タンパク質のイムノプロット用抗体を調製する場合には、免疫原として MAP を用いる本法は非常に有用になるものと思われる。この抗血清は免疫原である 16 mer ペプチドと同一のアミノ酸配列を有する HLA-B 抗原には強く反応するが、1 ~ 9 個のアミノ酸配列が異なる HLA クラス I 抗原にはほとんど反応性を示さず、16 個のアミノ酸の中では<sup>63</sup>Glu が抗原性に大きな役割を果たしていると思われた(図 4)。

今回我々が報告した IEF-IB 法を用いると、細胞の膜タンパク画分を調製すれば、免疫沈降することなく直接 IEF を行うことにより、RI を使用することなく採血後 3 日程度で解析することができる。これまで骨髄移植において HLA-B 44 の IEF アリルが異なることにより allograft rejection が起こることが報告されており(13)、非血縁者間骨髄移植において移植を成功させるためのマッチング法の一つとし

	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	抗 HLA-B $\alpha 1$
CONSENSUS	D	R	E	T	Q	I	V	K	A	Q	A	Q	T	D	R	E	MAP 血清と MAP の反応性
B13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
B44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
B48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
B52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
B60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
B61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
B62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	
B18	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	~±	
B75	-	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B35	-	-	N	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B51	-	-	N	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B53	-	-	N	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B70	-	-	N	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B8	-	-	N	-	-	F	-	-	-	-	D	-	-	-	-	±	
B14	-	-	N	-	-	C	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	
B27	-	-	-	-	-	C	-	A	K	A	-	D	-	-	-	-	
B46	-	-	-	-	-	K	Y	-	R	Q	A	-	D	-	-	-	
B7	-	-	N	-	-	Y	-	A	Q	A	-	D	-	-	-	-	
B54	-	-	N	-	-	Y	-	A	Q	A	-	D	-	-	-	-	
B55	-	-	N	-	-	Y	-	A	Q	A	-	D	-	-	-	-	

図 4. HLA-B 抗原の  $\alpha 1$  ドメイン (61-76) のアミノ酸配列と抗 HLA-B  $\alpha 1$  MAP 血清との反応性

て役立つものと思われる。また、新しい HLA-B 抗原遺伝子が発見された場合、本法によりタンパク質レベルで HLA 抗原が発現しているかどうかを容易に確かめることができる。今後、IEF-IB の手法は HLA 抗原の生化学的解析、確認検査などに非常に有用になるものと考えられる。

## 参考文献

1. Terasaki PI and Mc Celland JD : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204 : 998 - 1000, 1964.
3. Yang SY, Doxiadis I, Hajek-Rosenmayr A, et al. : *Immunobiology of HLA*, Vol. 1, (ed. Dupont B), Joint reports : HLA class I polymorphism detected by one-dimensional isoelectric focusing. Springer-Verlag, New York, 1989 ; p. 309 - 355.
4. Yoshida TY, Maeda H, et al. : *HLA 1991* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T) Biochemistry components. Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, 1992 ; p. 821 - 835.
5. 古田求, 水野伸一, 山口博ら : 等電点電気泳動法による日本人 HLA クラス I 抗原の解析, 日本輸血学会雑誌, 37 : 477 - 483, 1991.
6. Neefjes JJ, Doxiadis I, Stam NJ, et al. : An analysis

- of class I antigens of man and other species by one-dimensional IFEF and immunoblotting. *Immunogenetics* **23** : 164 - 171 , 1986 .
7. Frenz G, Doxiadis I, Vogeler U, et al. : HLA class I biochemistry : Definition and frequency determination of subtypes by one-dimensional isoelectric focusing and immunoblotting. *Vox Sang* **56** : 190 - 195 , 1989 .
  8. Tam JP : Synthetic peptide vaccine design : Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 5409 - 5413 , 1988 .
  9. Bugawan TL, Apple R, Erlich HA : A method for typing polymorphism at the HLA-A locus using PCR amplification and immobilized oligonucleotide probes. *Tissue Antigens* **44** : 137 - 147 , 1994 .
  10. Kao KJ, Riley WJ : Genetic predetermination of quantitative expression of HLA antigens in platelets and mononuclear leukocytes. *Hum. Immunol.* **38** : 243 - 250 , 1993 .
  11. Tanbe M, Sekimata M, Ferrone S, et al. : Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the HLA class I  $\alpha$  3 domain. *J. Immunol.* **148** : 3202 - 3209 , 1992 .
  12. 大海忍, 辻村邦夫, 稲垣昌樹 : 細胞工学別冊 抗ペプチド抗体実験プロトコール, 抗ペプチド抗体を得るための合成ペプチドの設計法, 秀潤社, 東京, 1994 ; p. 14 - 24 .
  13. Fleischhauer K, Kernan NA, Bo Dupont, et al. : Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B 44 . *New Engl. J. Med.* **323** : 1818 - 1822 , 1990 .

Establishment of isoelectricfocusing-immunoblot for analysis of HLA-B antiges using new anti-HLA-B antiserum

Motomu Furuta, Sinichi Mizuo, Hirotoshi Ohta, Kaoru Wada, Isao Takahashi, Tadashi Kamiya, Kazuo Ozawa  
Japanese Red Cross Aichi Blood Center, Seto shi, Aichi, Japan

To analyze HLA-B antigens by isoelectricfocusing, multiple antigenic peptide (MAP) of the 16 amino acid sequence specific for HLA-B  $\alpha$  1 domain was prepared and immunized. The reactivity of the anti-HLA-B  $\alpha$  1 MAP serum with HLA-A, -B antigens was examined by isoelectricfocusing-immuno blot (IEF-IB). Of HLA-B antigens, the anti-serum strongly reacted with HLA-B 13, -B 44, -B 48, -B 52, -B 60, -B 61, -B 62 which had the identical amino acid sequence with the immunogen. But it did not react with HLA-B 7, -B 8, -B 14, -B 18, -B 27, -B 35, -B 46, -B 51, -B 53, -B 54, -B 55, -B 70, -B 75 whose amino acid difference from the immunogen was in the range of 1 ~ 6 out of the 16 amino acids. Of HLA-A antigens, it did not react with either of the HLA-A antigens examined, except that it weakly reacted with HLA-A 2, -A 24. Immunization of synthetic MAP was useful to prepare anti-serum specific for HLA-B antigens for IEF-IB. Also, the anti-serum was considered to be an excellent reagent for biochemical analysis of HLA-B antigens.

#### Key words :

HLA class I antigens, HLA-B antigens, isoelectricfocusing immunoblot, multiple antigenic peptide

## 〔最新情報：“玉手箱”〕最新アリル情報

小林 賢

防衛医科大学校、検査部

### はじめに

最新アリル情報も前号でクラスⅡ遺伝子のDNA配列をすべて掲載したことになる。そこで、今回から、クラスⅠの各遺伝子座のDNA配列を掲載していく予定であり、第一回目は、HLA-A遺伝子座のDNA配列を掲載することにした。また、1996年6月、第12回国際組織適合性ワークショップ会議終了後、パリで“*The WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA system*”が開催され、その最終合意が“*Nomenclature for factors of the HLA system, 1996*”として発行された。そのときの主な課題は、①HLA領域内の新しい遺伝子のネーミング、②新しいアリルのネーミング、③発現量に問題のあるアリルのネーミング、④血清学的特異性のネーミング、⑤命名レポートと塩基配列データベースの経済的支援、の5つであった。これらの内容はHLA関連雑誌に掲載されたので、そのうち大切と思われる主な部分だけをピックアップして記述することにした。

### *Nomenclature for factors of the HLA system, 1996*

#### 1. HLA領域における新遺伝子のネーミング

近年、HLAクラスⅠやⅡ遺伝子と関連する新しい遺伝子がHLA領域内に数多く同定されている。これらのネーミングについては、色々な理由から次回の命名委員会まで延期されることになった。

#### 2. 新アリルのネーミング

##### 2.1. 新アリルシークエンスの受理条件

以前のレポートで強調されたように、公認名に対する新シークエンスの受理について以下のような条件が要求される。

- ①. シークエンスがcDNAから得られているか、あるいは、PCR産物をサブクローニング後、複数のクローンからシークエンスされている。
- ②. PCR産物からの直接シークエンスを行う場合、少なくとも2つの独立したPCR反応産物を用いてシークエンスする。
- ③. シークエンスは、両鎖について行う。
- ④. 新しいシークエンスは、PCR-SSOPやPCR-SSPのようなDNAタイピング法によって確認する。
- ⑤. データバンクからアクセス番号を取得する。
- ⑥. 全長シークエンスが望ましいが、必須なものではない。最低限、クラスⅠシークエンスは第2、3エクソン、クラスⅡは第2エクソンがそれぞれ要求される。
- ⑦. 論文が投稿されている。
- ⑧. DNAあるいは他の材料（特に細胞株）が公に利用しやすいような施設に寄託されているか、あるいは、各自の施設で利用しやすいように保管されている。これに関する情報は、将来命名委員会によって文書化される。
- ⑨. 命名委員会に提出するシークエンスは、コンピューターで読み込み可能なコピーとする。また、その提出に際し、命名委員会からのシークエンスに関するアンケートに対する回答、及び既知の関連アリルとのシークエンスに関する情報も提出する。

##### 2.2. 新アリル

A\*2412, A\*3005, A\*31011, A\*3302, Cw\*0101, Cw\*0201, Cw\*1201, Cw\*1401, Cw\*1501,

Cw\*1603はシークエンスミスなどが原因で削除され、それぞれ A\*2408, A\*3004, A\*31012, A\*3303, Cw\*0102, Cw\*02022, Cw\*12022, Cw\*1402, Cw\*1502, Cw\*1403が対応することになった。クラスⅡでは、DRB1\*09011, DRB1\*12031, DRB1\*1606とDPB1\*02011がクラスⅠと同様な理由で削除され、DRB1\*09012, DRB1\*1201, DRB1\*1605とDPB1\*02012がそれぞれに対応することになった。また、DRB4のnull alleleであるDRB4\*0101102Nは、DRB4\*0103102Nに訂正された。

### 3. 発現レベルの異常を伴うアリルのネーミング

以前から、未発現やヌルアリルについては、“N”がアリル名の最後に付加されている。最近、A\*2402アリルに2つのグループが報告され、そのうちの一つは、非翻訳領域に変異があり、発現量が有意に減少しているがヌルアリルのように完全に発現が失なわれてはいない。今後、このような異常発現レベルを伴うアリルについては、アリル名の最後に“L”を付加することになった。A\*2402の場合、正常に発現しているアリルは、A\*2402101、発現減少を伴うアリルは、A\*2402102Lとなる。

### 4. 血清学的特異性のネーミング

今回の会議で新しいHLAクラスⅠの血清学的特異性が4種類(HLA-A80, B2708, B78, B81)命名された。B7801は、血清学的特異性と関連するB\*7802を考慮してB78に縮められた。これらの改訂された血清学的・細胞学的特異性を表1に示した。

近年の国際ワークショップでは、タイピング抗血清の交換を行わなくなっている。そこで、新しい特異性に関しては、Paul TerasakiとMarie Lauによってコーディネートされている“International Cell Exchange”を通じて決めていくことになった。

### 日本組織適合性学会ホームページ

日本組織適合性学会が運用しているホームページ(アドレス：<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>)にもDNA配列のデータベースが掲載されて

いる。これらのファイルは、いずれもテキスト形式で保存されており、コドンごとにスペースで区切られている。Microsoft社のExcel(Windows, Macintosh何れでも可能)に取り込む場合は、ファイルを開き指示に従って操作を進める。表示形式は、文字列を選択する。これでExcelにDNA配列が1セル中に3文字ないし10文字ずつ読み込まれる。最後に、フォントをクーリエなどにすると縦位置がきれいに揃い見やすくなる。

これらのデータベースには、コンセンサスと共通塩基を“-”で示した一般的なalignment(クラスⅡのみ)と、すべての塩基配列を記載したalignment(クラスⅠおよびクラスⅡ)の2種類のファイルが存在する。多型性の全体像をつかみたい場合には、前者のファイルを、RFLP法の制限酵素切断部位を探したいといった場合には、後者のファイルの方が使いやすいと思われる。

### HLA-Aおよび-C遺伝子座の塩基配列

HLA-A遺伝子座の塩基配列を図1に示す。今回掲載した配列は、1997年4月更新分まである。

表1 血清学的・細胞学的 HLA 特異性 (1996)

A	B	C	D	DR	DQ	DP
A1	B5	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	Cw2	Dw2	DR2	DQ2	DPw2
A203	B703	Cw3	Dw3	DR3	DQ3	DPw3
A210	B8	Cw4	Dw4	DR4	DQ4	DPw4
A3	B12	Cw5	Dw5	DR5	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	Cw6	Dw6	DR6	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	Cw7	Dw7	DR7	DQ7(3)	
A11	B15	Cw8	Dw8	DR8	DQ8(3)	
A19	B16	Cw9(w3)	Dw9	DR9	DQ9(3)	
A23(9)	B17	Cw10(w3)	Dw10	DR10		
A24(9)	B19		Dw11(w7)	DR11(5)		
A25(9)	B21		Dw12	DR12(5)		
A26(9)	B22		Dw13	DR13(6)		
A28	B27		Dw14	DR14(6)		
A29(19)	B2708		Dw15	DR15(2)		
A30(19)	B35		Dw16	DR16(2)		
A31(19)	B37		Dw17(w7)	DR17(3)		
A32(19)	B38(16)		Dw18(w6)	DR18(3)		
A33(19)	B39(16)		Dw19(w6)			
A34(10)	B3901		Dw20	DR51		
A36	B3902		Dw21			
A43	B40		Dw22	DR52		
A66(10)	B4005		Dw23			
A68(28)	B41			DR53		
A69(28)	B42		Dw24			
A74(19)	B44(12)		Dw25			
A80	B45(12)		Dw26			
	B46					
	B47					
	B48					
	B49(21)					
	B50(21)					
	B51(5)					
	B5102					
	B5103					
	B52(5)					
	B53					
	B54(22)					
	B55(22)					
	B56(22)					
	B57(17)					
	B58(17)					
	B59					
	B60(40)					
	B61(40)					
	B62(15)					
	B63(15)					
	B64(14)					
	B65(14)					
	B67					
	B70					
	B71(70)					
	B72(70)					
	B73					
	B75(15)					
	B76(15)					
	B77(15)					
	B78					
	B81					
	Bw4					
	Bw6					

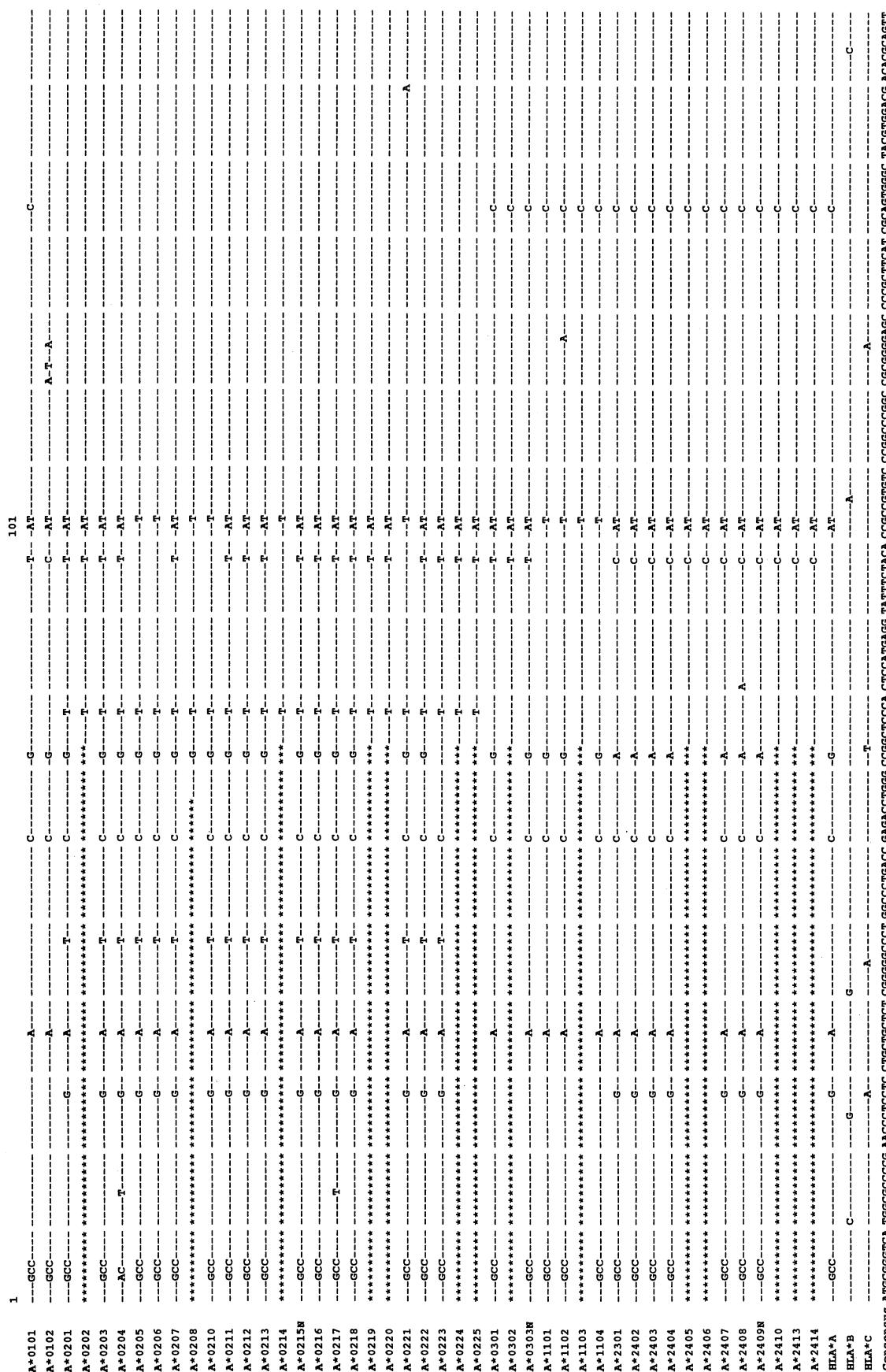


図 1 HLA-A 遺伝子座の塩基配列



171	201	301
A*0101	-C-----	C-A-----
A*0102	-C-----	C-A-A-----
A*0201	-C-----	C-A-----
A*0202	-C-----	C-G-----
A*0203	-C-----	C-A-----
A*0204	-C-----	C-A-----
A*0205	-C-----	C-G-----
A*0206	-C-----	C-A-----
A*0207	-C-----	C-A-----
A*0208	-C-----	C-G-----
A*0210	-C-----	C-A-----
A*0211	-C-----	C-A-----
A*0212	-C-----	C-A-----
A*0213	-C-----	C-A-----
A*0214	-C-----	C-G-----
A*0215N	-C-----	C-A-----
A*0216	-C-----	C-A-----
A*0217	-C-----	C-A-----
A*0218	-C-----	C-A-----
A*0219	-C-----	C-A-----
A*0220	-C-----	C-A-----
A*0221	-C-----	C-A-----
A*0222	-C-----	C-A-----
A*0223	-C-----	C-A-----
A*0224	-C-----	C-A-----
A*0225	-C-----	C-A-----
A*0301	-C-----	C-A-----
A*0302	-C-----	C-A-----
A*0303N	-C-----	C-A-----
A*1101	-C-----	C-A-----
A*1102	-C-----	C-A-----
A*1103	-C-----	C-A-----
A*1104	-C-----	C-A-----
A*2201	-C-----	C-A-----
A*2402	-C-----	C-A-----
A*2403	-C-----	C-A-----
A*2404	-C-----	C-A-----
A*2405	-C-----	C-A-----
A*2406	-C-----	C-A-----
A*2407	-C-----	C-A-----
A*2408	-C-----	C-A-----
A*2409N	-C-----	C-A-----
A*2410	-C-----	C-A-----
A*2413	-C-----	C-A-----
A*2414	-C-----	C-A-----
HIA*A	-C-----	C-A-----
HIA*B	-C-----	C-A-----
HIA*C	-C-----	C-A-----

Consensus CGTAGGTC GCGAGGAG CGCGCGTC GAGGTGAG CCGGGTTT GGCGATAGA GCGCTGGGA GCGACGAGA TCGACGAGC AGCATGAGC TCGACGAGA AACCTGGGA CTCCTGCGC CTCATGAGC CATAGGAGG

171	201	301
A*2501	-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2502	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2503	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2504	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2605	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2606	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2607	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2608	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2609	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2901	-C-T-	-T-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2902	-C-T-	-T-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*2903	-C-T-	-T-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*3001	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3002	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3003	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3004	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*31012	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3201	-C-T-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3202	-C-T-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3301	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3303	-C-C-A-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*3401	-C-C-A-	-A-C-G-AAAG-G-G-C-T-
A*3402	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*3601	-C-C-A-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*4301	-C-C-A-	-T-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*6501	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*6502	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*6503	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*6504	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*6505	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*65011	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*65012	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*6502	-C-C-A-	-A-C-G-ATG-G-G-C-T-
A*7402	-C-T-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*7403	-C-T-	-A-A-G-ATG-G-G-C-T-
A*8001	-C-A-	-A-GA-G-ATG-G-G-C-T-
HLA+A	-C-A-	-A-G-ATG-G-G-C-T-
HLA+B	-A-A-	-A-C-C-A-T-G-
HLA+C	-C-A-	-AG-A-C-G-C-T-G-

Consensus CCGAGGTTT GACAGGACG CGGGAGGATT GGAGCGGA GACGAGATC TCAAGAAC - ACACACAGAC - TGACGAGAG ACCCTGCAGA CCTACTACAC CAGAGGAGG

341 A-A-0101 A-T-A -TA-----T-----T-----CCGG-G  
 A-A-0102 A-T-A -TA-----T-----T-----CGGG-G  
 A-A-0201 T-G-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0202 T-G-----T-----T-----T-----G-----CC  
 A-A-0203 T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0204 T-G-----T-----T-----T-----T-----G-----CC  
 A-A-0205 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0206 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0207 T-G-----G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0208 T-G-----T-----T-----T-----T-----G-----CC  
 A-A-0210 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0211 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0212 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0213 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0214 T-G-----T-----T-----T-----T-----G-----CC  
 A-A-0215N T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0216 T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0217 T-T-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0218 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0219 T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0220 T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0221 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0222 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0223 T-G-----T-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0224 T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0225 T-G-----T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-0301 T-A-----T-----T-----T-----T-----A  
 A-A-0302 T-A-----T-----T-----T-----T-----T  
 A-A-0303N T-A-----T-----T-----T-----T-----T  
 A-A-1101 A-T-A -TA-----T-----T-----CC  
 A-A-1102 A-T-A -TA-----T-----T-----CGGG-G  
 A-A-1103 A-T-A -TA-----T-----T-----CGGG-G  
 A-A-1104 A-T-A -TA-----T-----T-----CGGG-G  
 A-A-2301 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2402 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2403 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2404 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2405 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2406 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2407 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2408 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2409N T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2410 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2413 T-T-----T-----T-----T-----CC  
 A-A-2414 T-G-----T-----T-----T-----CC-G-G  
 HLAB\* A-HLAB\* C-C  
 HLAB\* B C-C  
 HLAB\* C C-C  
 Consensus CGGGTCAG AGGATGATG CACCCCTCA GGCAGCCTAC TGGCTGGTA CATGGATTG GGTCTACAGC GACGCCGGG CTAGATCA CCAGCGAC

	341	401	501
A*2501	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2502	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2601	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2602	A---T-----A	T-----	CC-G-----A-----T
A*2603	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2604	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2605	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2606	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2607	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2608	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2609	A---T-----A	T-----	CC-G-----G-----T
A*2901	-----T-----A	-----C-----T	CGG-----G-----T
A*2902	-----T-----A	-----T-----T	CGG-----G-----T
A*2903	-----T-----A	-----T-----T	CGG-----G-----T
A*3001	-----T-----A	-----TA-----T	-----A-----C-----T
A*3002	-----T-----A	-----TA-----T	-----A-----C-----T
A*3003	-----T-----A	-----TA-----T	-----A-----C-----T
A*3004	-----T-----A	-----TA-----T	-----A-----C-----T
A*31012	-----T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*3201	-----T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*3202	-----T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*3301	-----T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*3303	-----T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*3401	A---T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*3402	A---T-----A	-----TA-----T	CC-G-----G-----T
A*3601	A---T-----A	-----TA-----T	CC-G-----G-----T
A*4401	A---T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*6601	A---T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*6602	A---T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*6603	A---T-----A	-----T-----T	CC-G-----G-----T
A*68011	A---T-----A	-----T-----T	CCGG-----G-----T
A*68012	A---T-----A	-----T-----T	CCGG-----G-----T
A*6802	A---T-----A	-----T-----T	CC-----G-----T
A*6803	A---T-----A	-----T-----T	CCGG-----G-----T
A*6804	A---T-----A	-----T-----T	CCGG-----G-----T
A*6805	A---T-----A	-----T-----T	CCGG-----G-----T
A*5901	-----T-----G	-----T-----T	CC-----G-----T
A*7401	-----T-----A	-----T-----T	CC-----G-----T
A*7402	-----T-----A	-----T-----T	CC-----G-----T
A*7403	-----T-----A	-----T-----T	CC-----G-----T
A*8001	A---T-----A	-----T-----T	CC-----G-----T
HLA*A	-----T-----A	-----T-----T	CC-----G-----T
HLA*B	-----T-----A	-----C-----A-----T	-----A-----C-----G-----C-----
HLA*C	-----T-----A	-----C-----A-----T	-----C-----

Consensus CGGCGCTCA CACCCCTCA AGGATGTTAGG GACGAGGACCC TGCCTCTCTG GACACGGGG CTCAAGATCAC CGAGCGCAG



511 A\*25011 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*25022 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26011 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26012 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26033 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26044 -----A-----A-----A-----TG-----CT-----  
 A\*26055 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26066 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26077 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*26088 -----A-----A-----A-----CG-----  
 A\*26099 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*29011 -----T-----T-----T-----  
 A\*29022 -----T-----T-----C-----G-----  
 A\*29033 -----TG-----T-----T-----  
 A\*30011 -----TG-----T-----T-----  
 A\*30022 -----TG-----T-----T-----  
 A\*30033 -----TG-----T-----T-----  
 A\*30044 -----A-----TG-----T-----  
 A\*31012 -----T-----T-----T-----  
 A\*32011 -----A-----A-----A-----  
 A\*32022 -----A-----A-----A-----  
 A\*33011 -----T-----T-----C-----  
 A\*33033 -----A-----T-----T-----  
 A\*34011 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*34022 -----A-----A-----A-----T-----  
 A\*36011 -----T-----A-----C-----G-----T-----  
 A\*43011 -----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*66011 -----A-----A-----A-----TG-----CG-----  
 A\*66022 -----A-----A-----A-----TG-----GA-----  
 A\*66033 -----A-----A-----A-----TG-----GA-----  
 A\*68011 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68012 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68022 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68033 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68044 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68055 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68066 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68077 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68088 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*68099 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*74011 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*74022 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*74033 -----A-----A-----A-----TG-----  
 A\*80011 -----A-----A-----A-----TG-----  
 HLA\*AB -----A-----A-----A-----C-----C-----  
 HLA\*BC -----A-----A-----A-----C-----C-----  
 Consensus TGGAGCCG CGCGTTGC GGAGCTGT AGAGCTACCA TGGAGGAG ACACAGTGA CCCACACCAC CATCTGATCA GAGACGGAGA TAACTCTGCA CGCTGATGAG

	681	701	801
A*0101	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*0102	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*0201	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0202	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0203	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0204	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0205	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0206	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0207	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0208	*****	*****	*****
A*0210	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0211	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0212	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0213	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0214	*****	*****	*****
A*0215N	A	-	G-C-G-C-G-T-G-G-
A*0216	A	-	G-C-G-C-G-T-G-G-
A*0217	A	-	G-C-G-C-G-T-G-G-
A*0218	A	-	G-C-G-C-G-T-G-G-
A*0219	*****	*****	*****
A*0220	*****	*****	*****
A*0221	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0222	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0223	A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-
A*0224	*****	*****	*****
A*0225	*****	*****	*****
A*0301	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*0302	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*0303N	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*1101	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*1102	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*1103	*****	*****	*****
A*1104	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*2301	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*2402	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*2403	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*2404	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	G-C-G-T-G-G-
A*2405	*****	*****	*****
A*2406	*****	*****	*****
A*2407	-	G-C-G-T-G-G-G-C-	A-G-G-C-
A*2408	-	G-C-G-T-G-G-G-C-	A-G-G-C-
A*2409N	-	G-T-G-C-G-T-G-G-	A-G-G-C-
A*2410	*****	*****	*****
A*2413	*****	*****	*****
A*2414	*****	*****	*****
HLA*A	-	G-C-G-T-G-G-G-C-	C-G-C-
HLA*B	-	-	-
HLA*C	-	X	-

Consensus CTCGCCCTG GGTCTTACCGT CTCGGAGAT CACACTGACC TGTGGAGC TGTGGAGCT GTGGGAGA CCTTCAGAA CAGACAGAC CAGACAGAGA TACACATGC

681	A	701		801	
A*2501	-	-	G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2502	-	A	G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2601	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2602	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2603	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2604	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2605	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2606	*****	*****	*****	*****	*****
A*2607	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2608	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2609	*****	*****	*****	*****	*****
A*2901	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2902	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*2903	*****	*****	*****	*****	*****
A*3001	-	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3002	-	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3003	-	-	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3004	*****	*****	*****	*****	*****
A*31012	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3201	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3202	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3301	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3303	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3401	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3402	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*3601	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*4301	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*6601	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*6602	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*6603	*****	*****	*****	*****	*****
A*68011	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*68012	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*6802	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*6803	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*6804	*****	*****	*****	*****	*****
A*6805	*****	*****	*****	*****	*****
A*6901	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*7401	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
A*7402	*****	*****	*****	*****	*****
A*7403	*****	*****	*****	*****	*****
A*8001	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
HLA-A	-	A	G-C-G-C-G-T-G-G-	-	C-G-
HLA-B	-	-	-	-	-
HLA-C	-	-	-	-	-

Consensus CNGGCCCTG GGCCTCTACC CTGGCGAGAT CAACACTAG CGACCCGCA CGAGATGAA CCTTCAGAA GTGGCAGCT GTCGGCTC CTCCTGAGA AGAGAGAGA TACATGCG

X







1101

A*2501	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2502	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2601	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2602	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2603	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2604	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2605	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2606	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*2607	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2608	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2609	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*2901	-	-	AAG	-T-	A	-	A-----
A*2902	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*2903	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*3001	-	-	-T-A-	-	AAG	-T	T-----
A*3002	-	-	-T-A-	-	AAG	-T	T-----
A*3003	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*3004	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*31012	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3201	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3202	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3301	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3303	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3401	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3402	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*3601	-	-	-T-A-	-	AAG	-T	T-----
A*4301	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*6601	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*6602	-	-	AAG	-T-	A	-	T-----
A*6603	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*68011	-	-	-AAG	-T	-	-	T-----
A*68012	-	-	AAG	-T	-	-	T-----
A*6802	-	-	AAG	-T	-	-	T-----
A*6803	-	-	-AAG	-T	-	-	T-----
A*6804	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*6805	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*6901	-	-	-AAG	-T	-	-	T-----
A*7401	-	-	-AAG	-T	-A	-	T-----
A*7402	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*7403	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****
A*8001	-	-	-A-G-A-	-	C-----G	-T-----CG	T-----
HLA-A	-	-	-AAG	-T	-	-	T-----
HLA-B	-	-	-G-----	-A-----	-A-----	-	*****
HLA-C	-	-	-CC-----	-TC-----	-TC-----	-	*****

Consensus AAAGGAGGA GCTACTCTCA GGCCTCCTCA AGccGAcAGTG CCCAGGGCTC TGTGTTCTC GAAAGGTTG A

## [最新情報：“玉手箱”]

# MPH 法と SSCP 法を用いた HLA クラス I 抗原の DNA タイピング

柏瀬 貢一

日本赤十字社中央血液センター、研究一課

### はじめに

近年、HLA-クラス I 抗原のアリルレベルのマッチングが非血縁者間骨髄移植の予後に重要であることが厚生省の骨髄移植調査研究事業の「HLA 適合に関する研究」班により報告された。このため、ドナーと患者のマッチングの検査として、従来からの血清学的タイピングだけでは十分でないため、クラス I 抗原を対象としたアリルレベルの DNA タイピングが必要となった。日本骨髄バンクでは、1996 年 8 月から日本人において抗原頻度が高く、複数のアリルにコードされている A2, A26, B61, B39 について DNA タイピングを開始した。

本稿では、我々が日常検査に用いている PCR-MPH 法と PCR-SSCP 法を用いた HLA クラス I 抗原のタイピングを紹介する。

### DNA タイピング法の現状

HLA のタイピングとして、PCR を用いた DNA タイピングは急速に普及し、特にクラス II 抗原については、タイピングキットも市販され DNA タイピングが日常的な検査として用いられている。一方、クラス I 抗原の DNA タイピングについては、血清学レベルではあるが PCR-SSP 法(1)などが、既に実用化の段階に入っている。しかし、アリルレベルのタイピングは、多型を示す部分がイントロンを挟んで 2 つのエクソンにまたがるといった理由などから、すべてのアリルのタイピングを行うのは未だ困難な状況にある。

### 各タイピング法の特徴

HLA を対象とした場合、原理的に異なる多くの方法があるが、大きく 3 つに分けられる。

A 群. 塩基配列の変異部分を基に特異的なプローブ、プライマー、制限酵素を用いる方法

- ・プローブ (SSOP : sequence-specific oligonucleotide probe 法) (2)
- ・プライマー (SSP : sequence-specific primers 法) (1)
- ・制限酵素 (RFLP : restriction fragment length polymorphism 法) (3)

B 群. 特異的なプローブなどを使用せず、標準 DNA との違いを検出する方法

- ・DNA の高次構造の違いを検出 (SSCP : single-strand conformation polymorphism 法) (4)
- ・標準 DNA と検体 DNA との優先的 2 重鎖形成を検出する (PHFA : preferential homoduplex formation assay) (5)

C 群. 直接塩基配列を解析する方法

- ・SBT : sequencing based typing 法 (6)

A 群に示した方法は最も普及している方法であるがプローブ、プライマー、制限酵素を設定していない個所の変異は検出できない短所がある。B 群に示

した方法は、原理的には増幅断片中のどの部位の変異でも検出できるという長所を持つが、既知の標準DNAを必要とする制約がある。C群に示したSBT法は究極のタイピング法と考えられるが、現状では多検体処理能力が低いことや、専用のソフトウェアが必要でありクラスIタイピングは未だ困難である。

そこで、A群とB群のタイピング法を組み合わせることでお互いの短所を補い、高い特異性と再現性でタイピングすることが可能である。

我々の施設では、A群の中でリバースのSSOPの原理を用いた、比較的操作が簡便で少数検体、多数検体いずれも適したPCR-MPH法とB群の中で分解能の高いPCR-SSCP法を組み合わせている。また、この組み合わせは、PCR-MPH法で使用したPCR産物がSSCP法に利用できる長所がある。

### タイピングの実際

A2を例にDNAタイピングの流れを示す(図1)(8)。

簡単に操作の概略を説明する。

- ①ゲノムDNAを用いA2に特異的なビオチン標識されたプライマーでPCRを行う(First PCR)。
- ②First PCRの産物を用いてMPHの検査を行う。
- ③First PCRの産物をテンプレートとして、エクソン2およびエクソン3をそれぞれ増幅させる(Second PCR)。
- ④Second PCRの産物を用いて、エクソン2およびエクソン3のSSCP法を行う。

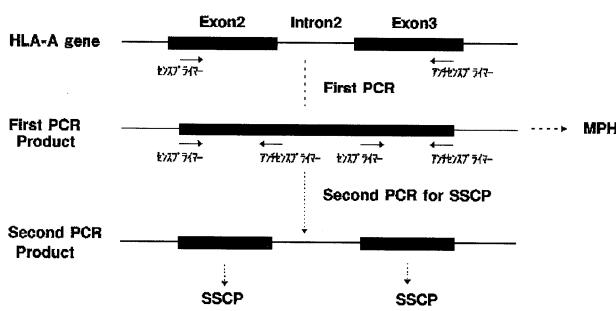


図1 A2のタイピング手順

SSCPは通常複数の標準DNAとの比較によってアリルを決定するため、電気泳動の際に数多くのレーンが必要となる。そこで、予めMPH法によりタイピングを行い、得られたサンプルと対応する標準DNAを並べて泳動すればレーン数を減らすことができる。さらに、僅かな泳動パターンの違いも区別可能になる。

実際に得られたMPH法の結果を表1に、SSCP法を図2に示す。

表1 PCR-MPH法によるA2のタイピング

Allele	Probe						
	F9J	Y9J	C99-NJ	107WJ	107GN2J	W156-SN2J	156F-SNJ
A*0201	<u>2.64</u>	0.16	1.85	0.42	<u>0.91</u>	0.18	<u>4.00</u>
A*0206	0.24	<u>1.54</u>	1.17	0.24	<u>0.50</u>	0.20	<u>2.95</u>
A*0207	<u>2.77</u>	0.13	<u>3.39</u>	0.43	<u>0.91</u>	0.25	<u>3.06</u>
A*0210	0.23	<u>2.95</u>	1.43	<u>2.70</u>	0.19	0.36	<u>3.54</u>
A*0216	<u>2.91</u>	0.16	<u>3.44</u>	0.45	<u>0.96</u>	0.19	<u>2.89</u>

数値は415 nmの吸光度を示した。また、ポジティブ・シグナルは下線で示した。

### おわりに

PCR-MPH法とPCR-SSCP法を組み合わせたタイピング法を概説したが、現状では限られたクラスI抗原が対象で、全てのクラスI抗原のタイピングを行っている訳ではない。今後、SBT法が普及すると共に、SHOM法：sequencing by hybridization to oligonucleotide microchip(数mm四方のガラス板に100種類近いプローブを固定したマイクロチップを用い、シーケンサーを使わずに塩基配列を決める方法)などが、将来的には有望な方法といえる。

本稿は、日本赤十字社中央血液センター検査三課の藤井まり恵、牧原裕子両氏の協力によるものです。

### 参考文献

1. Bunce M, O'Neill C. M, Barnardo MCNM, et al. : Phototyping : comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46** : 335 - 367, 1995.
2. Date Y, Kimura A, Kato H, et al. : DNA typing of the HLA-A gene : population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens*

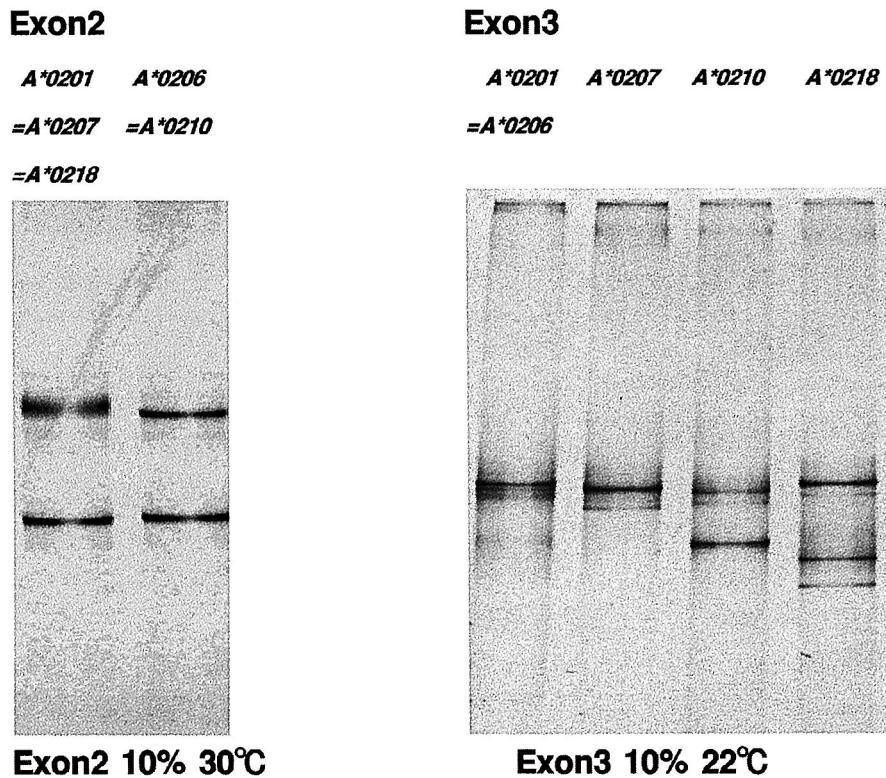


図2 PCR-SSCP法によるA2のタイピング

- 47 : 96-101, 1996.
- 3 . Mitsunaga S, Tokunaga K, Kashiwase K, *et al.* : A nested-PCR-RFLP method for high resolution typing of HLA-A locus (In preparation).
  - 4 . Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.* : HLA-B40, B18, B27, and B37 allele discrimination using group-specific amplification and SSCP method. *Hum. Immunol.* **46** : 107-113, 1996.
  - 5 . Oka T, Mitsunaga H, Tokunaga K, *et al.* : A simple method for detecting single base substitutions and its application to HLA-DPB1 typing. *Nucleic Acids Research* **22** : 1541-1547, 1994.
  - 6 . Kotsch K, Wehling J, Kohler S, *et al.* : Sequencing of HLA class I genes based on the conserved diversity of the noncoding regions : sequencing-based typing of the HLA-A gene. *Tissue Antigens* **50** : 178-191, 1997.
  - 7 . 中野浩美, 川井信太郎, 柏瀬貢一ら : PCR-MPH 法による HLA-A 2, A26 および B61 対立遺伝子のタイピング. *MHC* **3** : 205-212, 1997.

# 第6回日本組織適合性学会大会 QCワークショップ報告

小林 賢<sup>1)</sup>, 猪子 英俊<sup>2)</sup>, 大谷 文雄<sup>3)</sup>, 木村 彰方<sup>4)</sup>, 徳永 勝士<sup>5)</sup>, 前田 平生<sup>6)</sup>

(第6回日本組織適合性学会大会QCワークショップ委員会)

<sup>1)</sup>防衛医科大学校、検査部 <sup>2)</sup>東海大学医学部、分子生命科学 <sup>3)</sup>北里大学医学部、免疫学

<sup>4)</sup>東京医科歯科大学難治疾患研、成人疾患研究部門 <sup>5)</sup>東京大学医学部、人類遺伝学 <sup>6)</sup>埼玉医科大学総合医療センター、輸血部

## はじめに

1990年代に入り、PCR法を応用したDNAタイピングがHLAクラスII遺伝子に適用されるようになり、血清学的手法と比較して、より精度の高い結果が得られるようになってきた。しかしながら、このDNAタイピング法の原理は、1ないし数塩基置換の相違を制限酵素(RFLP)や塩基配列特異的プローブ(SSO)、あるいは塩基配列特異的プライマー(SSP)を利用したPCR法によって区別するものである。その判定は、必ずしも容易とは言えない。DNAタイピングは、得られた結果に全幅の信頼をいだくことが多いが、果たして本当に間違いないのか、もし間違があるとしたら、それはどのような原因で起きているのか、というような検討はほとんど現在までになされていなかった。そこで、今回の大会では、日本の各施設でのDNAタイピング精度の向上と標準化を目指す目的でQCワークショップを行った。

## 方法および材料

### DNAサンプル

DNAタイピングを始めたばかりの施設でも型判定が容易となるように、日本人に高頻度で見られる一般的なタイプのみを採用した。DNAサンプルは、HLAクラスII遺伝子型が既知の健康成人6人のEDTA加末梢血より、チオシアン酸グアニジン法によって抽出した。ここで用いたパネルのHLAタイプは表1に示すように、ホモ接合体が2検体、血清学的にも遺伝子型においてもヘテロ接合体であるも

の2検体と血清学的にはホモ接合体であるが遺伝子型ではヘテロ接合体であるもの2検体である。

これらのDNAサンプル(H0901～H0906)は、分離した翌日に通常の郵便(室温状態)で、参加37施設に送付した。

### タイピング方法

多くの施設が参加できるように、DNAタイピング法は各施設で日常行っている方法を採用することとした。精度については、high resolution, low resolutionを問わず、可能な範囲で実施することとした。また、タイピングする遺伝子座の範囲も、それぞれの施設に任せることとした。タイピング結果は、所定の記入用紙にアリルを書き込み返送することで集計した。さらに、各サンプルの遺伝子型を各施設に送付し、タイピング結果が間違っていた場合、その原因・理由について書面で回答を得た。

### 結果

各施設が採用している方法、PCR装置、Taq DNAポリメラーゼなどをまとめて、集計結果を表3に示す。タイピング方法としては、RFLP法とSSO法がほぼ半数の施設で採用されていた。SSP法に関しては、DRBでは1/3の施設で採用されていたが、DQB1やDPB1での採用率は低かった。また、SSCP法を一部の施設で採用しているが、その目的は、得られた判定結果の確認のために利用しているものが大半であった。Taq DNAポリメラーゼは、パーキンエルマー製と宝酒造製のものがほぼ半数の

表1. 配布 DNA サンプルの HLA クラスIおよびクラスIIアリル

## クラスII

Sample #	DRB1	DRB3/4/5	DQA1	DQB1	DPB1
H0901	*0403 *0406	4*0103	*03011 -	*0302 -	*02012 *0401
H0902	*04051 *0901	4*0103	*0303 *0302	*0401 *03032	*0501 -
H0903	*0406 *0406	4*0103 4*0103	*03011 *03011	*0302 *0302	*02012 *0501
H0904	*1301 *1401	3*0202 3*0101	*0103 *0104	*05031 *0603	*0501 -
H0905	*04051 *08032	4*0103	*0303 *0103	*0401 *0601	*02012 *1901
H0906	*1501 -	5*0101	*0102 -	*0602 -	*02012 -

## クラスI

Sample #	A	B	C
H0901	*1101 *2603	*1501 *3501	*0401 *0303
H0902	*2402 *3101	*1518 *5401	*0102 -
H0903	*2402 *3101	*0702 *5101	*0702 *1402
H0904	*0207 *2402	*1518 *5401	*0102 *0704
H0905	*2402 *3101	*3901 *5101	*0702 *1402
H0906	*0201 *2601	*1501 *4002	*0702 *0304

施設で採用されていた。また、PCR 装置については、ほとんどがパーキンエルマー製またはロシュ製のものであった。

## サンプル H0901 について

このサンプルのアリルは、DRB1\*0403, 0406, DRB4\*0103, DQA1\*03011, DQB1\*0302, DPA1\*0103, DPB1\*0201, 0401であり、DRB1は血清学的にホモ接合体であるが、アリルレベルでヘテロ接合体である。

表4に示すように、DQA1, DQB1とDPA1については何れの施設でも正しくタイプされており、問題点はなかった。しかしながら、それ以外の遺伝子座で、4つのミスタイプが報告された。その内訳は、DRB1\*0403だけしかタイプできなかつた1施設、DRB4で\*0103以外の\*01とタイプした2施設、DPB1\*0402とタイプした1施設であった。DRB1とDPB1の誤判定の原因是、施設からの回答によると、パターンの読み違いなどによるものであった。DRB4については、reverse SSO プローブの偽陽性によるものであった。

## サンプル H0902 について

このサンプルのアリルは、DRB1\*04051, 0901, DRB4\*0103, DQA1\*0303, \*0302, DQB1\*0401, \*03032, DPA1\*0202, DPB1\*0501である。

表5に示すように、DRB1とDPA1については何れの施設でも正しくタイプされていた。それ以外の遺伝子座で、6つのミスタイプが報告された。DRB4のミスタイプは、サンプル H0901と同様、reverse SSO プローブの偽陽性によるものであった。DQA1\*0303を\*0301とタイプした3施設があつたが、DQA1\*0303は、DQA1\*0301と第3エクソンにしか相違が見られないため、通常の第2エクソンを対象とするPCRではタイプできないアリルである。従って、通常のタイプではDQA1\*03と判定すべきものと考えられる。DQB1\*0401を\*0402と判定したのは、施設からの回答によると、RFLPの部分切断による誤判定が原因であった。また、DPB1の誤判定は、反応パターンの読み違えによるものであった。

表2. 参加施設で採用しているタイピング法,  
Taq DNA ポリメラーゼ, PCR 装置の集計

タイピング法

	DR (n = 36)	DQ (n = 28)	DP (n = 17)
RFLP	18	13	10
SSO	1	1	1
rSSO	18	15	7
SSP	12	4	1
SSCP	10	4	2
PFHA	0	1	0

Taq DNAポリメラーゼ

メーカー名	採用施設数
パーキンエルマー	18
宝酒造	14
ベーリンガー	2
ロシュ	2
TOYOB0	1
Gibco BRL	1

サーマルサイクラー

メーカー名	製品名	採用施設数
パーキンエルマー/	9600	21
ロシュ	480	2
	2400	2
	PJ2000	1
アステック	PC800	3
	PC700	1
岩城硝子	TSR300	4
アトー	ザイモリアクターII	2
HYBAID		1
宝酒造	MP	1

サンプル H 0903 について

このサンプルのアリルは、 DRB1\*0406, 0406, DRB4\*0103, \*0103, DQA1\*03011, \*03011, DQB1\*0302, \*0302, DPA1\*0103, \*0202, DPB1\*0201, \*0501である。H 0903は、家系調査の結果から、DR, DQ がホモ接合であることが判明している。また、KT 13と呼ばれるB 細胞株としても利用されているものである。

表6に示すように、DQA1, DPA1とDPB1については何れの施設でも正しくタイプされていた。それ以外の遺伝子座で、7つのミスタイプが報告された。このサンプルは、DPB1\*0406のホモ接合であるので、それほど判定困難な遺伝子型ではないと思われたが、意外にもDRB1で3つのエラーがあった。エラーの原因に関する回答が得られなかつたため、誤判定の経過が明確には分からぬが、SSP 法

を利用した施設では、プライマーの入れ違い、泳動時のサンプル入れ違い、あるいはパターン判定ミスなどが原因として考えられる。また、reverse SSO 法を利用した施設では、SSO の偽陽性または反応パターンの読み違いが誤判定の原因と思われる。DRB4のミスタイプ3つのうち2つについては、サンプル H 0901 や H 0902 と同様、reverse SSO プロープによる偽陽性であった。残りの一つは、SSP 法であり、前述の DRB1の場合と同様なミスが原因であると思われる。DQB1のミスは、判定結果の転記ミスによるものであった。DPB1については、未回答なため明確な原因は不明であるが、RFLP 法を利用していることから、制限酵素の部分切断や判定表の読み違いなどが誤判定の主な原因と考えられる。

サンプル H 0904 について

このサンプルのアリルは、DRB1\*1301, 1401, DRB3\*0202, \*0101, DQA1\*0103, \*0104, DQB1\*05031, \*0603, DPA1\*0202, DPB1\*0501である。

表6に示すように、何れの施設でも正しくタイプされた DPA1 以外の遺伝子座で、13のミスタイプが認められた。DRB1については、このサンプル以外では、high resolution の場合にミスが見られ、2 術の low resolution レベルではほとんど認められなかった。それに対し、このサンプルでは、low resolution レベルでのミスが、4 施設中 3ヶ所で見られた。また、この low resolution レベルでのミスは\*1301のみにみられた。3 施設のうち 2 施設は RFLP 法であり、制限酵素の部分切断や判定表の読み違いなどによる誤判定であった。残る一施設については、未回答なため誤判定の経過が分からぬが、SSO 法であることから、偽陽性反応または反応パターンの読み違いなどが原因と思われる。DQA1\*0104は、エクソン2のみのPCR 増幅では DQA1\*0101と区別できないことがミスの原因であった。DRB4がタイプされていたのは、判定結果の転記ミスによるものであった。DQB1については、SSO 法であることから、反応パターンの読み違いなどが誤判定の原因であった。DPB1のミスのうち 1 施設については、数

回やり直しても同じ結果が得られたということであった。今回配布したDNAには誤判定されたDPB1アリルがないことから、サンプルへのコンタミネーションあるいは取り違えなどが原因であると思われる。

#### サンプルH0905について

このサンプルのアリルは、DRB1\*04051, 08032, DRB4\*0103, DQA1\*0303, \*0103, DQB1\*0401,

\*0601, DPA1\*0202, DPB1\*02012, \*1901である。

表7に示すように、何れの施設でも正しくタイプされた遺伝子座は、DPA1のみであった。それ以外の遺伝子座で、15個のミスタイプが認められた。DRB4とDQA1については、サンプルH0901やH0902と同様な原因によるものである。DRB1については、未回答であるため誤判定の経過がはっきりしないが、プライマーの入れ違い、泳動時のサンプ

表3. DNAサンプルH0901のタイピング結果

H0901	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1		
	Labs	*0403	*0406	4*0103		*03011	-	*0302	-	*0103	-	*02012	*0401
1		*0403	*0406	nt		*03	-	*0302	-	nt		nt	
2		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
3		*0403	*0406	nt		*03011	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
4		*0403	*0406	4*0103		*03	-	*0302	-	nt		*0201/*3201	*0401/*3301
5		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
6		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
7		*04	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
8		*04	-	4*01		nt		nt		nt		nt	
9		*0403	*0406	4*01		nt		nt		nt		nt	
10		*0403	*0406	nt		*0301/2	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
11		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
12		*0403	*0406	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
13		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
14		*0403	*0406	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
15		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
16		*0403	*0406	4*0103		*0301	-	*0302	-	*0103	-	*0201	*0401
17		*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
18		*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
19		*0403	*0406	B4		nt		*0302	-	nt		nt	
20		*04	-	4*01		nt		nt	-	nt		nt	
21		-	*0406	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
22		*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
23		*0403	*0406	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
24		*0403	*0406	4*01011		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
25		*04	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
26		*0403	*0406	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		nt	
27		*0403	*0406	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
28		*0403	*0406	4*0103		nt		*0302	-	nt		nt	
29		*0403	*0406	4*0103		*03	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
30		*0403	*0406	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
31		*0403	*0406	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		*02012	*0401
32		*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
33		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
34		*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0402
35		*0403	*0406	4*0102	4*01011	nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
36		*0403	*0406	4*01		nt		nt		nt		nt	
37		nt		nt		nt		*0302	-	*01	-	*0201	*0401

ル入れ違いや、反応パターンの読み違いなどが原因と思われる。DQB1のミスタイプは、何れも reverse SSO 法であり、SSO プローブ偽陰性と偽陽性に起因するものであった。DPB1については、判定ミスや反応パターンの読み違いによるミスであった。

#### サンプル H0906 について

このサンプルのアリルは、DRB1\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102, DQB1\*0602, DPA1\*0103,

DPB1\*02012 の完全なホモ接合である。

表 8 に示すように、DPB1 のミスタイプ 1つ以外はすべて正しくタイプされていた。DPB1 のミスは、制限酵素の切断パターンの判定ミスであった。

以上の結果をまとめて、表 9 と表 10 に示す。表 9 は、生データでのミスタイプ率を、また、表 10 は、low resolution レベルで見た場合のミスタイプ率をそれぞれ示した。今回の結果では、生データ (high+low resolution) で 1291 タイプ中 67 (5.2

表 4. DNA サンプル H0902 のタイピング結果

H0902	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
Labs	*04051	*0901	4*0103		*0303	*0302	*0401	*03032	*0202	-	*0501	-
1	*0405	*0901	nt		*03	-	*0401	*0303	nt		nt	
2	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		nt	
3	*04051	*0901	nt		-	*0302	*0401	*03032	nt		*0501	-
4	*0405	*0901	4*0103		*03	-	*0401	*0303	nt		*0501/*3801	-
5	*0405	*0901	nt		nt		*0402	*0303	nt		nt	
6	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
7	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*03032	nt		nt	
8	*04	*0901	B4		nt		nt		nt		nt	
9	*0405	*0901	4*01		nt		nt		nt		nt	
10	*0405	*0901	nt		-	*0302	*0401	*0303	nt		*0501	-
11	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		nt	
12	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*03032	nt		nt	
13	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
14	*0405	*0901	nt		*0301	-	*0401	*0303	nt		*0501	-
15	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
16	*0405	*0901	4*0103		-	*0302	*0401	*03032	*0202	-	*0501	-
17	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
18	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
19	*0405	*0901	B4		nt		*0401	*03032	nt		nt	
20	*04	*0901	B4		nt		nt		nt		nt	
21	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*0303	nt		nt	
22	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
23	*0405	*0901	nt		*0301	-	*0401	*0303	nt		*0501	-
24	*0405	*0901	4*01011		nt		*0401	*03032	nt		*0501	-
25	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
26	*0405	*0901	4*01		-	*0302	*0401	*0303	nt		nt	
27	*0405	*0901	nt		-	*0302	*0401	*0303	nt		*0501	-
28	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*0303	nt		nt	
29	*0405	*0901	4*0103		*03	-	*0401	*03032	nt		*0501	-
30	*04	*0901	4*01		nt		*0401	*03032	nt		nt	
31	*0405	*0901	4*01		*0301	-	*0401	*03032	nt		*0501	-
32	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
33	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
34	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
35	*0405	*0901	4*0102		nt		*0401	*0303	nt		*0501	*3801
36	*0405	*0901	4*01		nt		nt		nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0401	*0303	*02	-	*0501	-

%) にミスタイプが認められた。一方、low resolution レベルで見た場合のミスタイプは、1291 タイプ中 20 (1.5 %) のみであった。

## 考察

今回の QC ワークショップで得られた各施設のタピング結果は、概ね正確であった。しかしながら、一部の施設で low resolution レベルでも間違った遺伝子型がタイプされているなど、QC の意義を改めて

感じさせられた。

タピング結果の誤りとしてもっと多かったのは、単純な判定ミスである。RFLP 法の場合は、部分切断によって切れ残りのバンドを陽性にとると全く異なった遺伝子型と判定することになる。これが部分切断なのか否かということを日頃から熟知しておく必要があると思われる。その他にも判定表の読み違いなどの単純なミスがあることから、タピング結果の判定はなるべく二人が独立して行うことが

表 5. DNA サンプル H 0903 のタピング結果

H0903	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1		
	Labs	*0406	*0406	4*0103	4*0103	*03011	*03011	*0302	*0302	*0103	*0202	*02012	*0501
1	0406	-	nt		"03	-	*0302	-	nt		nt		
2	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		nt		
3	0406	-	nt		*03011	-	*0302	-	nt		*0201	*0501	
4	0406	-	4*0103		"03	-	*0302	-	nt		*0201/*3201	*0501/*3801	
5	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		nt		
6	0406	-	nt		nt		"04	-	nt		nt		
7	0403/6	*0404	4*01		nt		*0302	-	nt		nt		
8	04	-	B4		nt		nt		nt		nt		
9	0406	*0403	4*01		nt		nt		nt		nt		
10	0406	-	nt		*0301/2	-	*0302	-	nt		*0201	*0501	
11	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		nt		
12	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt		
13	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501	
14	0406	-	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0501	
15	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501	
16	0406	-	4*0103		*0301	-	*0302	-	*0103	*0202	*0201	*0501	
17	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt		
18	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt		
19	0406	-	B4		nt		*0302	-	nt		nt		
20	04	*13	B4	B3	nt		nt		nt		nt		
21	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt		
22	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt		
23	0406	-	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0501	
24	0403	-	4*01011		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501	
25	*04	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501	
26	0406	-	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		nt		
27	0406	-	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0501	
28	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt		
29	0406	-	4*0103		"03	-	*0302	-	nt		*0201	*0501	
30	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt		
31	0406	-	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		*02012	*0501	
32	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt		
33	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501	
34	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0801	*0501	
35	0406	-	4*01011		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501	
36	0406	-	4*01		nt		nt		nt		nt		
37	nt		nt		nt		*0302	-	*01	*02	*0201	*0501	

望ましいと思われる。SSO 法については、プローブの反応パターンの読み違いによる判定ミスが多く見かけられた。これを予防するためには、結果を必ず記入用紙に書き込んでから、判定表にしたがってアリルを同定すべきである。また、前記と同じように二人が独立にタイピング結果を判定すべきであろう。SSP 法は、プライマーの分注時点での誤り、電気泳動の際に PCR 産物の入れ違いなどによるミスが見かけられた。従って、タイピングミスの多くは、

細心の注意を払えば防げるものである。出された結果に従って移植の選択が行われるわけであるから、どんなに忙しくても、結果判定は、血液型のように二人が独立して行い、最終的に読み合わせるというような方法が望まれる。

今回の結果を見ると、DRB1 \*0406 があるのに DQB1 を\*04 とタイプしていたり、また、DRB1 \*0405, 08032 であるのに DQB1 に\*0601 以外の\*06 タイプを出している施設が見かけられたが、

表 6. DNA サンプル H 0904 のタイピング結果

H0904	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1		
	Labs	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*05031	*0603	*0202	-	*0501	-
1		*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0101/4	*0503	*0603	nt		nt	
2		*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0602	nt		nt	
3		*1301	*1401	nt		*0103	*0104	*05031	*0603	nt		*0501	-
4		*1301	*1401	3*0202	-	*0103	*0101/4	*0503	*0602/3	nt		*0901	*0201/*3201
5		*1201	*1408	nt		nt		*0501	*0602/3	nt		nt	
6		*1301	*1401	nt		nt		*05	not *0601	nt		nt	
7		*03012	*1416	3*02	3*01	nt		*0503	*0603	nt		nt	
8		*13	*14	B4		nt		nt		nt		nt	
9		*1301	*1401	3*01/02		nt		nt		nt		nt	
10		*1301	*1401	nt		*0103	*0101/4/5	*0503	*0603	nt		*0501	-
11		*1301	*1401	nt		nt		*0503	*0603	nt		nt	
12		*1301	*1401	3*02	3*0101	nt		*05031	*0603	nt		nt	
13		*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0603	nt		*0501	-
14		*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0101	*0503	*0603	nt		*0501	-
15		*1301	*1401	nt		nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
16		*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*05031	*0603	*0202	-	*0501	-
17		*1301	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
18		*1301	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
19		*1301	*1401	B3		nt		*0503	*0603	nt		nt	
20		*13	*14	B3		nt		nt		nt		nt	
21		*1301	*1401	3*0202	3*0101	nt		*0503	*0603	nt		nt	
22		*1301	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
23		*1102	*1408	nt		*0103	*0102	*05031	*0603	nt		*0501	-
24		*1301	*1401	3*0201/2	3*0101	nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
25		*13	*14	nt		nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
26		*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*0503	*0603	nt		nt	
27		*1301	*1401	nt		*0103	*0104	*0503	*0603	nt		*0501	-
28		*1301	*1401	3*0202	3*0101	nt		*0503	*0603	nt		nt	
29		*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*01	*05031	*0603	nt		*0501	-
30		*1301	*1401	3*02	3*0101	nt		*05032	*0603	nt		nt	
31		*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0101/4	*05031	*0603	nt		*0501	-
32		*1302	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
33		*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0603	nt		*0501	-
34		*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0603	nt		*0501	*3801
35		*1301	*1401	3*0201	3*0301	nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
36		nt		3*0202	3*0101	nt		nt		nt		nt	
37				3*0202	3*0101	nt		*05032	*0603	*02	-	*0501	-

結果判定の際に DQB1 も含めて DRB3, B4 や B5 との連鎖不平衡を考慮していれば、再検を行うなどの方法により誤判定は防げたと思われる。一般的に報告されている日本人における HLA 遺伝子座の連鎖不平衡を考慮に入れていれば、そのような判定結果に疑問をいだくはずである。また、DNA タイピングに関して一つの方法しか採用していない施設では、仮にデータに疑問を感じても、他の方法で確認することができない。より正確なタイピングを行う

ためには日頃から方法論の異なる DNA タイピング法をバックアップシステムとして採用し、必要に応じて2つの方法を、あるいは常に2つの方法を同時に使う必要があると考えられる。

### まとめ

タイピング精度を上げるために、(1)DNA 抽出、PCR 実施の際におけるコンタミネーション予防策を実施する、(2)それぞれの DNA タイピング法の

表7. DNA サンプル H 0905 のタイピング結果

H0905	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
Labs	*04051	*08032	4*0103		*0303	*0103	*0401	*0601	*0202	-	*02012	*1901
1	*0405	*0803	nt		*03	*0103	*0401	*0601	nt		nt	
2	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		nt	
3	*04051	*08032	nt		*0302	*0103	*0401	*0601	nt		*0201	*1901
4	*0405	*0803	4*0103		*03	*0103	*0401	*0601	nt		*0201/*3201	*1901
5	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		nt	
6	*0405	*08032	nt		nt		-	not*0601	nt		nt	
7	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*06011	nt		nt	
8	*04	*08	4*01		nt		nt		nt		nt	
9	*0405	*0801	4*01		nt		nt		nt		nt	
10	*0405	*0803	nt		*0301/2	*0103	*0401	*0601	nt		*0201	*1901
11	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		nt	
12	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
13	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
14	*0405	*0803	nt		*0301	*0103	*0401	*0601	nt		*0201	*1901
15	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
16	*0405	*08032	4*0103		*0302	*0103	*0401	*0601	*0202	-	*0201	*1901
17	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
18	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
19	*0405	*0803	B4		nt		*0401	*06011	nt		nt	
20	*09	-	4*01		nt				nt		nt	
21	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
22	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
23	*0405	*0803	nt		*0301	*0103	*0401	*0601	nt		*0402	*1901
24	*0405	*0803	4*01011		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
25	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
26	*0405	*0803	4*01		*0302	*0103	*0401	*0601	nt		nt	
27	*0405	*0803	nt		*0302	*0103	*0401	*0601	nt		*0401	*1901
28	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
29	*0405	*08032	4*0103		*03	*0103	*0401	*06011	nt		*0201	*1901
30	*04	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
31	*0405	*0803	4*01		*0301	*0103	*0401	*06011	nt		*02012	*1901
32	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
33	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
34	*0405	*08032	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*0801
35	*0405	*0803	4*01011		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
36	*0405	*0803	4*01		nt				nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0401	*0601	*02	-	*0201	-

特徴を熟知する、(3)HLA アリル間の連鎖不平衡をよく理解し、判定の際に考慮する(疑問があれば、再検する)、(4)結果判定は二人が独立して行う(または、2度繰り返す)、(5)方法論の異なるDNA タイピング法をバックアップシステムとして採用し、必要に応じて2つの方法を、あるいは常に2つの方法を同時に行う、などが必要である。今回のQCではDNA 抽出に関するワークショップを行わなかつたが、DNA 抽出は、タイピング精度の上で重要な

ファクターのひとつであると思われる。すなわち、ID の取り違い、コンタミネーション、回収されたDNA の純度などによって間違った結果をもたらす可能性があるからである。今後のワークショップでは、この問題を含めたQCが必要であると考えている。

表8. DNAサンプルH0906のタイピング結果

H0906	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1		
	Labs	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	*0103	-	*02012	-
1	*1501	-		nt		*0102	-	*0602	-	nt		nt	
2	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		nt	
3	*1501	-		nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
4	*1501/3	-		5*0101		*0102	-	*0602/3	-	nt		*0201/*3201	
5	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		nt	
6	*1501	-		nt		nt		not*0601		nt		nt	
7	*15	-		5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
8	*15	-				nt		nt		nt		nt	
9	*1501	*1501/*1606		5*0101		nt		nt		nt		nt	
10	*1501/3	-		nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
11	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		nt	
12	*1501	-		5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
13	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
14	*1501	-		nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
15	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
16	*1501	-		5*0101		*0102	-	*0602	-	*0103	-	*0201	-
17	*1501	-		nt		nt		nt		nt		nt	
18	*1501	-		nt		nt		nt		nt		nt	
19	*1501	-		B5		nt		*0602	-	nt		nt	
20	*15	-		B5		nt		nt		nt		nt	
21	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		nt	
22	*1501	-		nt		nt		nt		nt		nt	
23	*1501	-		nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	*0402
24	*1501	-		5*0101		nt		*0602	-	nt		*0201	-
25	*02	-		nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
26	*1501	-		5*0101		*0102	-	*0602	-	nt		nt	
27	*1501	-		5*0101		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
28	*1501	-		5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
29	*1501	-		5*0101		*01	-	*0602	-	nt		*0201	-
30	*1501	-		5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
31	*1501	-		5*0101		*0102	-	*0602	-	nt		*02012	-
32	*1501	-		nt		nt		nt		nt		nt	
33	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
34	*1501	-		nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
35	*1501	-		5*0101		nt		*0602	-	nt		*02011/12	*02012
36	*1501	-		5*0101		nt		nt		nt		nt	
37	nt			nt		nt		*0602	-	*01	-	*0201	-

表9. 生データで見た場合の各サンプルDNAのミスタイプ率

Sample #	<i>DRB1</i> (n = 36)		<i>DRB3/4/5</i> (n = 17)		<i>DQA1</i> (n = 11)		<i>DQB1</i> (n = 28)		<i>DPB1</i> (n = 17)		ミスタイプ数
H0901	*0403 1 (35)	*0406 0	4*0103 2 (12%)		*03011 0	-	*0302 0	-	*02012 0	*0401 1 (6%)	4
H0902	*04051 0	*0901 0	4*0103 2 (12%)		*0303 8 (73%)	*0302 3 (27%)	*0401 1 (4%)	*03032 0	*0501 0	-	12
H0903	*0406 1 (3%)	*0406 3 (8%)	4*0103 2 (12%)	4*0103 1 (6%)	*03011 0	*03011 0	*0302 1 (4%)	*0302 1 (4%)	*02012 1 (6%)	*0501 0	9
H0904	*1301 4 (11%)	*1401 3 (8%)	3*0202 2 (12%)	3*0101 1 (6%)	*0103 0	*0104 2 (18%)	*05031 3 (11%)	*0603 1 (4%)	*0501 1 (6%)	- 2 (12%)	19
H0905	*04051 1 (3%)	*08032 2 (6%)	4*0103 2 (1%)		*0303 8 (73%)	*0103 0	*0401 1 (4%)	*0601 1 (4%)	*02012 2 (12%)	*1901 2 (12%)	19
H0906	*1501 0	- 0	5*0101 0	-	*0102 0	-	*0602 0	-	*02012 0	- 1 (6%)	1
正解施設数	28 (78%)		13 (76%)		3 (27%)		23 (82%)		11 (65%)		
ミスタイプ率	15/432 (3.5%)		12/187 (6.4%)		21/132 (15.9%)		8/336 (2.4%)		11/204 (5.4%)		67/1291 (5.2%)

表10. Low resolutionで見た場合の各サンプルDNAのミスタイプ率

Sample #	<i>DRB1</i> (n = 36)		<i>DRB3/4/5</i> (n = 17)		<i>DQA1</i> (n = 11)		<i>DQB1</i> (n = 28)		<i>DPB1</i> (n = 17)		ミスタイプ数
H0901	*04 0	- 0	4*01 0		*03 0	-	*03 0	-	*02 0	*04 0	0
H0902	*04 0	*0901 0	4*01 0		*03 0	- 0	*04 0	*03 0	*0501 0	- 1 (6%)	1
H0903	*04 0	*04 1 (3%)	4*01 0	4*01 1 (6%)	*03 0	*03 0	*03 1 (4%)	*03 1 (4%)	*02 1 (6%)	*0501 0	4
H0904	*13 3(8%)	*14 0	3*02 1 (6%)	3*01 1 (6%)	*01 0	- 0	*05 0	*06 0	*0501 0	- 1 (6%)	8
H0905	*04 0	*08 1 (3%)	4*01 0		*03 0	*01 0	*04 0	*06 0	*02 0	*1901 2 (12%)	6
H0906	*15 0	- 0	5*01 0	-	*01 0	-	*06 0	-	*02 0	- 1 (6%)	1
正解施設数	32 (89%)		14 (82%)		11 (100%)		26 (93%)		11 (65%)		
ミスタイプ率	5/432 (1.2%)		3/187 (1.6%)		0/132 (0.0%)		2/336 (0.6%)		10/204 (4.9%)		20/1291 (1.5%)

# 〔海外ラボ紹介〕パリ・パスツール研究所, Philippe Kourilsky 教授の研究室

原田 晴仁

Unité de Biologie Moléculaire du Génome, Institute PASTEUR

バカヌスシーズン末のダイアナ妃の悲惨な事故死も英国人や（おそらく）日本人が思っているほどには騒がれなかったフランスの初秋、現在私が留学しているパリ・パスツール研究所は、日本人も多くまた高級住宅地で有名な16区のお隣、15区にあり、研究室の窓からはモンパルナスターが間近に見える位置にあります。周辺部には市が立つところもあり、パリ市内としては物価も平均的で、どちらかといえば生活地区です。実際にルイ・パスツールさんはここで生活されたこともあるようで、研究所敷地内にあるかつての自宅の一部が現在パスツール博物館として一般に公開されています。本来このあたりは観光客は比較的少ないところですが、最近は旅行ガイドブックにパスツール博物館が紹介されることもあり、しばしば日本人を含め外国からの観光客も博物館を訪れているようです。ご存知の方も多いと思いますが、パスツール研究所はパリ以外にもフランス国内にはリール、リヨン、日本にも京都にパスツール研究所があります。他にもフランス国外にパスツールの名が付く関連研究所は数多くあります。また一口にパリ・パスツール研究所といっても、病院をはじめ、イムノロジー、バイオテクノロジー、エイズ=レトロウイルス、バイオケミストリー、モレキュラーバイオロジーなどなど9つのデパートメントがあり、全部でおよそ100のユニットからなる巨大な（もちろんアメリカのNIHほどではないのでしょうか）研究所で、約1100人の研究者に加え、これと同等数の多数の大学院生およびテクニシャンが働いていて、全部で2700人近いそうです。研究者のうち、私達のようにフランス国外か

らやってくる研究者は約70国、約600人のことです。

さて、我々のP. Kourilsky研 (Unité de Biologie Moléculaire du Génome) はと言いますと、一番道路側の近代レンガ造りのイムノロジービルディング2階(日本式には3階)にあり、研究者、大学院生、テクニシャン、秘書を含め総勢28人のラボですが、これに加え短期でフランス国内外より研究者が入れ替わり立ち替わりやって来ます。教室の主な行事は、抄読会はありませんが、毎週月曜日に一人ずつデーター発表をかねたセミナーがあり、また毎週金曜日には他のラボや国内外の研究所から演者を招いてのセミナーがあります。いずれのセミナーもかなり活発な討論が毎週のように繰り広げられます（私事で申し訳ありませんが、日本でgeneticsばかりやっていた私にとってはまだ難しいセミナーも多く、また言葉の壁もあり、あまり良く理解できません）。これら二つの全員参加の教室公式セミナーに加え、時々特別セミナー（デパートメント単位）があったり、研究グループ単位でのミーティングが定期的に行われています。

研究グループは大きく5つのグループに分かれています。まずはMHCクラスI重鎖や单鎖MHCクラスI分子 (MHCクラスI分子+ペーター2ミクログロブリン) をCHO細胞や大腸菌で発現させ、精製したこれらの分子とT細胞との相互作用を研究するグループで、单鎖HLA-A2やマウスMHCクラスI H-2K<sup>b</sup>, K<sup>d</sup>やL<sup>d</sup>分子を大腸菌で発現させる試みが現在進行中です。大腸菌での発現系がうまくいけば、短時間でしかも多量の分子を得ることが

できるため、抗原ペプチドと MHC 分子との結合のさらに詳しい解析ができます、また抗原ペプチド特異的 T 細胞ラベリングや、腫瘍浸潤 T 細胞ラベリングなどに大きく貢献できます。またこれら MHC 分子 + 抗原ペプチドが、B7-CD28 分子等の co-receptor を必要としない T 細胞活性化を行うことや、単量体、二量体、多量体での T 細胞に対する働きの違い等も研究されています。これら MHC 分子と結合する抗原ペプチドの研究、及びアナログペプチドを使った腫瘍免疫に関する研究も行われています。

二つめのグループは、T, B, NK 細胞の発生、コミットメントを研究しているグループです。造血幹細胞の同定や幹細胞株の自己複製条件に関する研究や、T, B 細胞系の分子レベルあるいは細胞レベルでの分化過程の研究や、胎生 12 日から 14 日のマウス胎児肝における血液幹細胞に関する研究などが行われています。

三つめのグループは、自己トレランスにおける T 細胞セレクションを研究しているグループです。二ワトリ卵白リゾチーム (HEL) トランスジェニックマウスを使った抗 HEL T リンパ球のレバトアの研究、中枢神経系に特異的に発現される変異 HEL を使ったトレランスの研究、自己と分子相同性を持った外来抗原を使った自己反応性モデルの研究などを行っています。

四つめは、自己免疫疾患や感染症における免疫病理を研究しているグループです。自己免疫疾患マウス (MRL, lpr/lpr) やヒト自己免疫疾患サンプルなどを用いて、T 細胞セレクションや自己トレランス、HLA との関係などを調べたり、まだよく機能が知られていない MHC クラス Ib 分子の研究やガンマ/デルタタイプ T 細胞の分化に関する研究を行っています。腫瘍免疫のグループは、マウス腫瘍において腫瘍による腫瘍浸潤 CTL の活性化や不活性化などの抗腫瘍反応、ヒトメラノーマ抗原と HLA-A2 および A1 に対する T 細胞反応性、T 細胞レバトアに関する研究を行っています。

最近の P. Kourilsky ラボの最も代表的研究の一つといえるのが、イムノスコープを使った T 細胞レセプターレバトア (CDR 3) で V ベータ、C ベータおよび J ベータに特異的なプライマーを用いた

PCR、オートシークエンサーとコンピューター解析を使った方法で、非常に明確に末梢血中や組織浸潤 T 細胞のレバトアを見ることができます。免疫細胞の分化、いろいろな免疫疾患や腫瘍免疫の研究などにおいて極めて応用範囲の広いテクニックであり、いずれの研究グループも何らかのかたちでこのイムノスコープを使った研究を行っています。先に書きましたが、短期で訪れる研究者の多くはこのイムノスコープ目的にやって来ています。ちなみに P. Kourilsky ラボには 2 台の PCR マシン (シータス 9600), 3 台のオートシークエンサーがありますが、イムノスコープをする者と普通のヌクレオチドシークエンスをする者とがいて、使用予約帳はいつも満員御礼状態です。

最近は日本に限らずどこの国のラボも予算に関してはかなり厳しくなってきているようですが、パリ・パストール研究所は違うのか、あるいは Kourilsky ラボだけが違うのか私にはわかりませんが、とにかくお金の心配は全くと言ってよいほどなく、自分の判断で何をいくつ注文しても口を出す人は誰もいません。特別な RI 施設などではなく、普通の実験室でラジオアイソotope は使い放題で、金銭面、施設面いずれをとっても、とても自由に研究できる環境にあります。また他のラボとのコミュニケーションがとてもよくとれていて、何のストレスもなく遠心機を使わせてもらったり、器具や試薬の貸し借りができます。コンピューター関係もとても充実しており、教室には全部で 14 台のマッキントッシュコンピューターがあり、個人のコンピューターを使っている人はまずいません（もちろん皆さん自宅には持っているのでしょうか）。

フランスの研究者達はもっとゆっくりしたペースで研究しているのかなと思っていた私にとっては、驚くほど皆さんよく働きます。また、よく働くかわりにキッチリ「バカンス」も取るし、まさに「よく働きよく遊べ」状態で、研究のみならず生活面でも大変勉強になっています。フランスは四季を通じておいしい食べ物がたいへん豊富で、特にワインとチーズは日本に比べると驚くほど安いものが、これまた驚くほどおいしく、ワイン好きとチーズ好きにはたまりません。パリから車で少し郊外に足を伸ばせ

ばとてもんびりできます。働いて、食べて、のんびり遊んで、「限りある留学の日々を楽しむには非常によいところに来たな」とつくづく思う今日この頃です。ただ一つ長い冬のどんよりした天気を除けば。

# [書評] 「ゲノム情報を読む」

宮田隆・五條堀孝編

福森 泰雄

大阪府赤十字血液センター、研究課

本書は吉川寛監修によるネオ生物学シリーズの中の一冊であり、このシリーズが副題に「ゲノムから見た新しい生物像」とあるように現代分子生物学の成果をもとに分子レベルで明らかにされた生物の構造と機能の全体像から生物とは何かを見直したものである。

最近、新聞やTVにも遺伝子組換え野菜とか遺伝子DNA、ヒトゲノムプロジェクトなどという言葉が現れるようになり、多少なりとも遺伝子とかゲノムの概念が一般社会にも浸透してきた。それでも遺伝学（特にDNAが絡んでくると）は難しいという印象はなかなかぬぐいがたいものがある。思えば、分子生物学とパソコンはなにかしら共通点のようなものを感じる。どちらも今話題となっており、興味を抱いて知りたいなと思う人は多い。しかし、言葉の問題や、概念で、今一つその世界に踏み込めないで躊躇していると言うのが実状であろう。誰か優しく教えてくれればやってみたいなどといった感じはまさに同じなのではないだろうか。しかし、コンピュータ関係は「よくわかる〇〇」「できる××」といった本は多いが、ゲノム学ではまだまだ少ない。

本書も残念ながらやさしくて面白い本とは言い難い、しかし、少しは知っているけど、もっと専門的な話をと言った読者には手軽で読みやすいのではないかろうか。タイムリーな企画であり、生物に興味を持つ人たちの新たな生物像の構築に有益である。

本書は冒頭に、木原均博士の、「地球の歴史は地層に、生命の歴史は染色体に」（但し、現代では「染色体」を「ゲノム」に」と言い換えると著者らはいう）という言葉を引用しゲノムを読む（解析する）

ことの意義を説いている。この言葉の中に本書の言いたいことが凝集されているといつても過言ではない。

さて、本書は7章より構成されており、1章 ゲノム情報とは何か（渡辺日出海、五條堀孝）、2章 ゲノムと塩基組成（金谷重彦、池村淑道）、3章 遺伝暗号の変遷（武藤昱）、4章 ゲノムから進化の情報を読む（宮田隆）、5章 ゲノムから生物の系統進化を推定する（岸野洋久）、6章 ゲノムから推定した生物進化の歴史（長谷川政美）、7章 生物の進化に伴ってゲノムに何が起きたか（宮田隆）。となっており、大きく前半1-3章と後半4-7章に分かれる。前半はゲノム構造学と言った感じで、1章の分子遺伝学の基礎から始まってゲノムの多様性とその意味について述べている。2章ではゲノム上の塩基組成（特にGC%）分布の違いとそれが意味するところの可能性について扱っている。われわれになじみのMHC領域の話も出てくるが、多少難しい。3章は不变と思われていた遺伝暗号であるコドンも変異するといった話である。後半4-7章はゲノム解析の最大の成果である進化系統学あるいは分類学への応用の話である。実際、塩基配列（ミトコンドリアDNAを含む）の比較によって今までの生物分類の常識が覆された例は多く、多くの成果を上げている。それがゲノム解析の社会的コンセンサスを得る結果ともなっている。この後半は全体としてはまとまっているのだが、全部の生き物の進化を対象としているようなスケールの大きな話が多く、われわれのような人類集団のみを扱っているものには多少わかりづらいところもある。しかも、

各章のタイトルにもあまり違いが見うけられず、少々中身にも各章間に重複が見られる。しかし、やはり今、活発にデータがでている最先端の部門らしくわくわくする内容である。特に最後の章に書かれた遺伝子重複のほとんどがいっせいに進化のかなり早い時期（カンブリア紀）に起きたという成果は、まさにゲノム解析の賜物であり、今後の展開が大いに期待される。

## Q & A

秦 美暢, 小林 賢

防衛医科大学校, 検査部

**Q.** PCR-RFLP 法で DNA タイピングをしたところ、既知の切断パターンとは異なる結果が得られました。新アリルでしょうか。

**A.** 新アリルの可能性もありますが、まずはタイピングの過程をもう一度チェックしてみて下さい。タイピング方法のチェックだけでなく、人為的過誤(ヒューマンエラー)にも充分気をつけ、それでも問題がない時に新アリルを疑ってシークエンスやクローニングを考えることにしましょう。

タイピング方法のチェックとして、まずは使用した検体 DNA の質(純度や濃度)に気をつけて下さい。もし、DNA 検体にタンパク質や DNA 抽出試薬などが残留していたら、との反応に影響が出ることもあります。次に PCR 反応では、コンタミネーションの他にも、得られた産物が本当に目的とする遺伝子座のものかどうかも問題となります。たまたま同じサイズで別の遺伝子が増幅しているのではないか、ということです。通常 PCR-RFLP 法ですと、制限酵素の切断パターンによって得られた PCR 産物が目的のものであることを確認しつつ検査を進めていけるわけですが、切断パターンが全く滅茶苦茶な場合には、このような偽増幅の可能性も考えてみて下さい。そして、制限酵素処理のところでは言うまでもなく制限酵素の活性がチェックポイントとなります。各酵素の至適反応温度の確認もお忘れなく。活性低下による部分切断か、ヘテロ接合体かの判別は時として非常に困難なことがあります。

このため、タイピングの全行程は(場合によっては DNA 抽出の部分にも)、コントロール検体と一緒に進めていくことが必要となります。

さて、もうひとつの問題点である人為的過誤ですが、実はこれがやっかいです。たとえ手慣れた人であっても、するはずのない間違いを起こしてしまうから「過ち」と呼ぶのであり、人が行うからには必ず(ごくわずかな確率であっても)つきまと問題点です。検体、プライマー、反応チューブの取り違え、ゲルのレーンの間違い、写真の取り違え、転記ミスや判定表の読み違え、など疑い出したらきりがありませんが、疑ってください。そのために、二人でダブルチェックしたり、再検するのも一法でしょう。

こういった、タイピングの精度のことや人為的過誤の問題がクリアーできたならば、いよいよ本当の新アリルかも知れません。いや、ちょっと待ってください。使用したタイピング法がどれだけのアリルを判定対象としたものであるかを確認してください。膨大な数のアリルの全てに闇雲に対応する必要があるかどうかは別の問題ですが、どの程度まで判定可能な方法を使ったのかを把握した上でタイピング結果を評価することも重要なことです。

とにかく新アリルのようだ、ということになったら、シークエンスやクローニングを行うことになりますが、これは詳しい人に尋ねてください。PCR 産物をダイレクトシークエンスするのが手っ取り早いのですが、複数箇所がヘテロであった場合には、それらの組み合わせ(シスからトランスか)を確認するためにもクローニングまで必要となります。折角ですから新鮮な検体から mRNA を抽出して、RT-PCR で全エクソンを増幅しましょう。これをベクターに挿入して大腸菌に組み込み、増やした大腸菌の中から目的の PCR 産物が入っているものを単離

し、それから再度ベクターの DNA を抽出してシークエンスするのです。ただし、PCR ダイレクトシークエンスでほとんど問題にならなかつた PCR 増幅エラーがクローニングでは無視できなくなりますので、複製エラーの少ない DNA ポリメラーゼを使用したほうが良いでしょう。ミスを最小限にするためにシークエンスは、3つ以上のクローンで確認しなければいけませんし、これらはすべて両方向から行う必要があります。

ここまでできたら、存分に祝杯をあげてください！

## 第14回 近畿 HLA 研究会

会期 : 1997年2月8日(土)  
 会場 : 三和化学研究所 大阪メディカルホール 5F会議場  
 世話人 : 吉田 克法  
           奈良県立医科大学泌尿器科学教室

### シンポジウム

「12th International HLA Workshop, St. Malo, 1996」

1. AHS # 2 (A2/A9)	京都府赤十字血液センター, 研究課	丸屋 悅子
2. AHS # 16 (DR7/DR9/DR53)	東海大学医学部, 分子生命科学	猪子 英俊
3. SBT	東海大学医学部, 分子生命科学	成瀬 妙子
4. AHS # 8 (B15)	日本赤十字社中央血液センター, 検査課	田中 秀則
5. AHS # 18 (DPA1/DPB1)	国立循環器病センター研究所, 実験治療開発部	佐田 正晴
6. AHS # 5 (B7/B22)	防衛医科大学校, 検査部	小林 賢

### 特別講演

### 「人類遺伝学からみた HLA」

東京大学医学系研究科, 人類遺伝学教室 德永 勝士

遺伝学的見地からみた場合, HLA の最大の特徴は複数の類似した遺伝子が染色体上で近接して遺伝子複合体を形成すること, しかもそれぞれの HLA 遺伝子が機能を持つ遺伝子として最高度の多型性を示し, これらの間に強い連鎖不平衡が存在することにある.

PCR 法の登場によって HLA 遺伝子群の DNA タイピングには飛躍的な進歩がみられた. 特にクラス II 遺伝子群についてはすでにいくつかの方法が確立され, 日常検査の場に普及しつつある. 一方, クラス I 遺伝子群については, 変異が集中する部位が二つのエクソンに及ぶこと, 互いの配列の相同性が高く特異的な增幅が困難であること, 塩基配列未決定の対立遺伝子が多く残っていることなどの理由から, 高精度の DNA 検査法の開発が遅れていた. 最近我々は, 典型的クラス I に分類される HLA-A, B, C 座と非典型的クラス I に属する HLA-G 座について, 日本人に存在する主な対立遺伝子の塩基配列の決定をほぼ終了した. 他の研究グループからの報告もあわせると, これまでにそれぞれの座位で 24, 40, 16, 4 種類の対立遺伝子が確認された(1~4).

さらに我々は, 日本人集団試料における典型的クラス I 遺伝子群の高精度 DNA タイピングを終了し, すでに解析済みのクラス II 遺伝子群の結果と合わせていくつかの興味深い知見を得た(1). 遺伝子頻度が 10 % 以上の対立遺伝子は A, B, C 座それぞれ 4, 2, 6 種類みられた. 注目されるのは, A2, A26, B61 グループにおいて血清学的には区別できないが頻度の高いサブタイプ(対立遺伝子)が存在した点である(5~7). また, 従来の血清学的検査から見いだされていた高頻度の A-C-B-DR-DQ ハプロタイプのそれぞれが, 実際に一定の対立遺伝子セットからなることが今回の配列レベルの解析で実証された. これは, 我々が以前より主張してきた HLA ハプロタイプの進化的保存性を支持する結果のひとつであり, また骨髄移植のマッチングや疾患感受性遺伝子の特定にあたって考慮すべき特性でもある.

厚生省骨髄移植研究班による日本人非血縁者間骨髄移植例に関する HLA 遺伝子群の DNA 多型解析の結果によれば, クラス II よりむしろクラス I の HLA-A, B 遺伝子の配列レベルのマッチングが, 急

性 GVHD の発症率や長期生存率に有意に相關していた。上述のように、日本人では主として A2, A26, B61 グループにおいて頻度の高い対立遺伝子が複数存在していたことから、最近我々は、PCR-MPH (microtiter plate hybridization) 法を応用してこれらのグループの DNA タイピングプレートを作成し、日常検査に導入している。

移植に関するもうひとつ注意したい点は、非発現型対立遺伝子 (null allele) の存在である。我々はクラス I の A 座において初めて null allele の存在を報告したが(8), その後国内外でいくつかの null allele が認められている。いずれも頻度は低いがそれぞれ異なるものであったことから、当然これら以外にも我々がまだ見出していない null allele が何種も存在すると推測される。これらは通常の DNA 検査ではごく普通の発現型の対立遺伝子と混同される可能性が高い。その結果だけをもとに移植を行うと拒絶あるいは GVHD (移植片対宿主病) の原因となりうる。血清学的検査によって HLA 分子の発現を確認することの意義がここにある。

また、自己免疫疾患における感受性遺伝子の研究においても、従来の血清学的検査では区別できなかったクラス I 対立遺伝子を解析し、クラス II の解析結果と考え合わせることで新たな展開が期待される。一例として最近我々は、若年性関節リウマチの解析を行っているが、興味深いことに 3 種の疾患サブタイプにおいて関連する HLA 対立遺伝子が異なっており、しかもクラス I 遺伝子とクラス II 遺伝子が互いに独立な危険因子であると推定された。また、以前より知られてきた B27 と強直性脊椎炎の強い関連についても、B27 に多数の対立遺伝子が存在し、それら全てが感受性を示すわけではないことが明らかとなっている(9)。

一方、HLA 遺伝子群の著しい多型性やそのユニークな進化の特徴は、人類集団の起源と形成の研究にも大きく貢献している。第 11 回および第 12 回国際組織適合性ワークショップでは、多くの民族集団について HLA 型の頻度分布が調査された。その結果の一部を紹介するとともに、これらの知見から日本人やその近隣集団の形成について何がいえるのか議論したい。

## 文献

- 1) Tokunaga K, Ishikawa Y, Ogawa A, et al. Sequence-based association analysis of HLA class I and II alleles in Japanese supports conservation of common haplotypes. *Immunogenetics* (in press).
- 2) Bannai M, Tokunaga K, Tanaka H, et al. Five HLA-B 22 group alleles in Japanese. *Tissue Antigens* (in press).
- 3) Wang H, Tokunaga K, Akaza T, et al. : Identification of HLA-C alleles using PCR-single-strand-conformation-polymorphism and direct sequencing. *Tissue Antigens* (in press).
- 4) Yamashita T, Fujii T, Watanabe Y, et al. : Polymorphism of the HLA-G Gene in Japanese. *Immunogenetics* **44** : 186-191, 1996.
- 5) Ishikawa Y, Tokunaga K, Kashiwase K, et al. : Sequence-based typing for HLA-A 2 alleles using a primer with an extra base mismatch. *Hum. Immunol.* **42** : 315-318, 1995.
- 6) Ishikawa Y, Tokunaga K, Lin L, Imanishi T, et al. Sequences of four splits of HLA-A 10 group : Implications for serological cross-reactivities and their evolution. *Hum. Immunol.* **39** : 220-224, 1994.
- 7) Bannai M, Tokunaga K, Lin L, et al. : HLA-B 40, B 18, B 27, and B 37 allele discrimination using group-specific amplification and SSCP method. *Hum. Immunol.* **46** : 107-113, 1996.
- 8) Ishikawa Y, Tokunaga K, Tanaka H, et al. : HLA-A null allele with a stop codon. HLA-A \*0215 N, identified in homozygous state in a healthy adult. *Immunogenetics* **43** : 1-5, 1996.
- 9) Yamaguchi A, Ogawa A, Tsuchiya N, et al. : HLA-B 27 subtypes in Japanese with seronegative spondyloarthropathies and healthy controls. *J. Rheumatol.* **23** : 1189-93, 1996.
- 10) Tokunaga K, Imanishi T, Takahashi K, et al. : On the origin and dispersal of East Asian populations as viewed from HLA haplotypes. *Prehistoric Mongoloid Dispersals*, (eds. Akazawa T, Szathmary EJ) Oxford University Press Oxford, 1996, p. 187-197.

## 一般演題

# 1. 慢性リウマチの重症度と HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度

国立大阪南病院、整形外科 真塚 健夫、脇谷 滋之、井本 一彦、村田 紀和

## 目的

慢性関節リウマチ（RA）の重傷度と HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度との関係を明らかにすること。

## 方法

我々は、関西地区在住の 852 人の RA 患者の HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度を調べた。発症年齢により、高齢発症 RA（発症年齢 60 歳以上）および成人発症 RA（発症年齢 16 歳以上 59 歳以下）に分類した。さらに、成人発症 RA を X 線上の関節破壊数（Steinbrocker 分類で Stage II 以上のレ線変化が見られる関節数）に基づく越智らの RA 病型分類により、小関節の破壊に留まる軽症病型（least erosive subset ; LES），大関節も破壊される重症病型（more erosive subset ; MES），および、発症早期から全身の関節が破壊される最も重症病型であるムチランス型（most erosive subset with mutilating disease ; MUD）に分類し、各病型別に HLA-DRB1 遺伝子表現型頻度を検討した。HLA-DRB1 遺伝子の正常コントロールとして兵庫県立西宮病院腎移植センター、橋本光男先生より頂いた 652 例の DRB1 遺伝子表現型頻度を使用した。

## 結果

RA 全体では、DRB1\*0101 および\*0405 が有意に高頻度であり DRB1\*0701, \*0802, \*1302 および\*0405 の 4 つが有意に低頻度であった。成人発症 RA の軽症病型である LES と DRB1\*0101 が相関した。DRB1\*0405 はすべての病型で高頻度であったが、重症病型である MES および MUD とより強く相関した。また、高齢発症 RA では、DRB1\*0405 よりも\*0101 がより強く相関した。

## 考察

DRB1\*0405 を持つ人は RA を発症しやすいのみならず越智らの RA 病型分類における重症 RA になる危険が高いことが明らかになった。HLA と RA の相関をこのように明らかにしてきたが、実際には DRB1\*0405 を持つ人のほとんどは RA を発症しないし、RA 患者の半数は DRB1\*0405 を持つおらず DRB1\*0405 のみでは RA の発症は説明できない。しかしながら、RA との関連が明らかにされている遺伝子は HLA のみであり、RA の原因を探る有力な手がかりである。

表 1. 日本人 RA 患者およびその 4 つの病型における HLA-DRB1 遺伝子の表現型頻度および相対危険率  
【表現型頻度%（相対危険度）】

HLA-DRB1*	control (N= 652)	total RA (N= 852)	LES (N= 345)	MES (N= 218)	MUD (N= 80)	EORA (N= 120)
0101	8.4%	14.4% (1.8)**	15.1% (1.9)**	12.4% (1.5)	10.0% (1.2)	20.0% (2.7)**
0405	29.0	49.9 (2.4)**	42.3 (1.8)**	61.9 (4.0)**	63.8 (4.3)**	44.2 (1.9)**
0701	2.2	0.2 (.11)**	0.6 (.27)	0.0 (.00)	0.0 (.00)	0.0 (.00)
0802	10.0	2.7 (.25)**	3.2 (.30)**	1.8 (.17)	2.5 (.23)*	4.2 (.39)*
1302	11.7	5.6 (.45)**	6.4 (.52)*	6.0 (.48)*	0.0 (.00)**	5.0 (.40)*
1405	5.4	2.0 (.36)**	1.4 (.26)*	1.8 (.33)*	5.0 (.93)	1.7 (.30)

\* コントロールと比較して、uncorrected P 値のみ統計学的有意差を示す。

\*\* コントロールと比較して、corrected P 値が統計学的有意差を示す。

## 一般演題

## 2. サルコイドーシスと HLA-DQB1, -DPB1

大阪簡易保険総合検診センター 立花 暉夫

大阪府赤十字血液センター 石井 博之, 松山 宣樹, 大谷 智司, 永尾 暢夫

## 目的, 対象, 方法

立花他は、本学会第1回から13回迄主として大阪地区のサルコイドーシス症例とHLAの関連性についての検討成績、外国のサルコイドーシス症例で検討された成績との比較検討も発表してきた。

今回は、立花が初診および経過追求中のサルコイドーシス90症例について、大阪府赤十字血液センターで、PCR-RFLP法により、HLA-DPB1, DQB1 DNA typingを実施し、得られた成績を第11回日本HLA Workshopで集計された健康人の成績と比較検討した。更に、サルコイドーシス経過不良（初診後、5年経過後もサルコイドーシス病変持続）27症例と経過良好（初診後5年以内、著明改善）23症例についてDNA Typingを実施したDPB1, DQB1各allelesについて出現頻度を比較検討した。

HLA-DPB1 DNA Typing成績については、1995年国際サルコイドーシス会議で、ロンドン大学Brompton病院グループが、サルコイドーシス症例と健康人の間で、各allelesについて比較検討し、

前者に高頻度なalleleはないが、HLA-DPB1のアミノ酸sequenseで69番目にGlutamineを有するallelesについて比較検討すると、前者が高頻度であったとの報告があったので、その点も検討した。

## 結果

1. HLA-DQB1 DNA Typingの結果、表1に示す各allelesで、サルコイドーシス、健康人の間で、0301が前者に高頻度であった。臨床経過、臨床像との関連では、0601は経過不良例では経過良好例に比して高頻度であり、発見時年令40才以上症例では40才以下症例に比して高頻度であった。

2. HLA-DPB1 DNA Typingの結果、表4に示す各allelesで、サルコイドーシス、健康人の間で前者に高頻度なalleleを認めなかつた。またHLA-DPB1のアミノ酸sequenseで69番目にglutamineを有するallelesで比較検討しても、英国サルコイドーシス症例で認めた成績は得られなかつた。

表1 サルコイドーシスと HLADQB1

Phenotypic Frequency	
サルコイドーシス N= 90	健康人 N= 1216
0301 31.1 %	21.9 % *
0302 8.9 %	20.0 %
0303 27.8 %	27.6 %
0401 25.6 %	27.3 %
0402 5.6 %	7.6 %
0501 6.7 %	12.6 %
0502 7.8 %	4.9 %
0503 10.0 %	7.9 %
0601 36.7 %	33.0 %
0602 18.4 %	10.0 %
0603 1.1 %	1.6 %
0604 11.1 %	13.3 %

表2 サルコイドーシスと HLADQB1 症例の内訳

HLADQB1 0601
経過良好例 (N= 23) 26.1 % *
経過不良例 (N= 27) 55.6 % *
全症例 (N= 50) 42.0 %

\* P = 0.03

表3 サルコイドーシスと HLADQB1

発見時年令	HLADQB1 0601
40才以下 (N=31)	16.1% *
40才以上 (N=19)	84.2% *
全症例 (N=50)	42.0%

\*P=0.003

表5 サルコイドーシスと HLADPB1

表4 サルコイドーシスと HLADPB1

Phenotypic Frequency		
サルコイドーシス	健康人	
N=90	N=649	
0201	30.0%	37.6%
0202	11.1%	7.3%
0301	11.1%	7.3%
0401	10.0%	7.5%
0402	8.9%	19.7%
0501	72.2%	60.4%
0601	2.2%	1.2%
0901	11.1%	17.4%
1301	4.4%	4.4%
1401	5.6%	3.1%
1701	1.1%	0.5%
1901	2.2%	0.5%

Glu 69 を有する Alleles \* の Allele frequency

サルコイドーシス	32.6%
(N=90)	
健康人	37.0%
(N=679)	

\* : HLADPB1 0201, 0202, 0601, 0901,  
1301, 1701, 1901

### 一般演題

## 3. 無精子症と HLA

国立循環器病センター研究所  
大阪大学医学部、泌尿器科  
東海大学医学部、分子生命科学

佐田 正晴、式田 有里、辻 隆之  
高原 史郎、辻村 晃、奥山 明彦  
成瀬 妙子、猪子 英俊

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

Frequency of HLA.A Antigens between Azoospermia and Healthy Japanese Control

A antigens	Control (n=1216)			Azoospermia (n=45)			p value
	N	PF	GF	N	PF	GF	
A1	15	1.2	0.6	0	0.0	0.0	
A11	215	17.7	9.3	6	13.3	6.9	
A2	507	41.7	23.7	17	37.8	21.1	
A24	745	61.3	37.8	28	62.2	38.5	
A26	252	20.7	10.5	4	8.9	4.6	
A3	15	1.2	0.6	1	2.2	1.1	
A30	5	0.4	0.2	1	2.2	1.1	
A31	206	16.9	8.9	8	17.8	9.3	
A33	175	14.4	7.5	18	40.0	22.5	† <0.0001
BL	15	1.2	0.6	5	11.1	5.7	

の比較検討から、class I 抗原では HLA-A 33 ( $p < 0.0001$ , RR = 4.0), HLA-B 44 ( $p < 0.0001$ , RR = 8.4), B 13 ( $p < 0.007$ , 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。

Frequency of HLA.DR Antigens between Azoospermia and Healthy Japanese Control

DR antigens	Control (n=898)		Azoospermia (n=50)		p value
	N	GF	N	PF	
1	96	5.5	5	10.0	5.1
15	363	17.4	14	28.0	15.1
16	14	0.8	0	0	0.0
17	4	0.2	0	0	0.0
18	0	0.0	0	0	0.0
4	409	22.8	23	46.0	26.5
11	47	2.6	0	0	0.0
12	126	7.0	4	8.0	4.1
13	140	7.8	26	52.0	30.7
14	99	5.5	12	24.0	12.8
7	7	0.4	0	0	0.0
8	239	13.3	8	16.0	6.3
9	233	13.0	8	16.0	8.3
10	11	0.6	0	0	0.0
bk	2	0.1	0	0	0.0

Frequency of HLA.B Antigens between Azoospermia and Healthy Japanese Control

B antigens	Control (n=1216)			Azoospermia (n=24)			p value
	N	PF	GF	N	PF	GF	
B13	35	2.9	1.48	3	12.5	6.5	† 0.007
B14	0	0.0	0.04	0	0	0	
B17	15	1.2	0.58	0	0	0	
B27	10	0.8	0.41	0	0	0	
B35	169	13.9	7.22	3	12.5	6.5	
B37	17	1.4	0.70	0	0	0	
B38	7	0.6	0.29	0	0	0	
B39	100	8.2	4.20	1	4.2	2.1	
B44	174	14.3	7.43	14	58.3	35.4	† <0.0001
B46	100	8.2	4.18	2	8.3	4.2	
B48	58	4.8	2.43	0	0	0	
B49	0	0.0	0.04	0	0	0	
B51	227	18.7	9.81	3	12.5	6.5	
B52	259	21.3	11.31	3	12.5	6.5	
B54	193	15.9	8.27	2	8.3	4.2	
B55	63	5.2	2.63	1	4.2	2.1	
B56	19	1.6	0.78	0	0	0	
B59	46	3.8	1.93	1	4.2	2.1	
B60	135*	11.1	5.72	0	0	0	
B61	291	23.9	12.75	5	20.8	11.0	
B62	165	13.6	7.06	1	4.2	2.1	
B67	28	2.3	1.17	0	0	0	
B7	131	10.8	5.56	1	4.2	2.1	
B70	24	2.0	0.99	1	4.2	2.1	
B75	19	1.6	0.80	1	4.2	2.1	
B58				1	4.2	2.1	
B78				1	4.2	2.1	
BL	45	3.7	1.89	4	16.7	8.7	

Frequency of HLA.DRB1 Alleles between Azoospermia and Healthy Japanese Control

DRB1 allele	Control (n=1216)		Azoospermia (n=23)		p value
	N	AF	N	AF	
0101	141	5.81	4	9.1	
1501	173	7.11	0	0.0	
1502	246	10.13	7	16.5	
1602	25	1.04	0	0.0	
0405	322	13.26	7	16.6	
0410	44	1.79	0	0.0	
0403	51	2.08	0	0.0	
0406	74	3.03	0	0.0	
1101	63	2.59	0	0.0	
1201	89	3.65	1	2.2	
1202	43	1.75	0	0.0	
1301	14	0.59	1	2.2	
1302	166	6.83	13	34.0	† <0.0001
1401	82	3.37	1	2.2	
1405	54	2.22	0	0.0	
1403	47	1.91	1	2.2	
1406	42	1.71	0	0.0	
0803	202	8.29	3	6.7	
0802	102	4.18	2	4.4	
0901	342	14.08	3	6.7	
1001	17	0.70	0	0.0	
bk	21	0.86	0	0.0	

## 一般演題

## 4. 生体肝移植後のGVHDについて

京都府赤十字血液センター、研究部<sup>1</sup>、京都大学医学部、移植外科<sup>2</sup>  
丸屋 悅子<sup>1</sup>、山岡 正暢<sup>1</sup>、池田 忠明<sup>1</sup>、佐治 博夫<sup>1</sup>、横山 繁樹<sup>1</sup>、木内 哲也<sup>2</sup>、田中 紘一<sup>2</sup>

## はじめに

近年、胆道閉鎖症の患者の救命法として生体部分肝移植が行われている。この移植では通常ドナーとして one haplotype identical な親が選ばれている。肝移植において HLA の適合性と graft survival の間にあまり相関がみられないことは死体肝移植のデータからも明らかである。したがって肝移植において HLA 型検査は費用がかさむだけで、恩恵はほとんどないように考えられがちである。我々は親から生体部分肝移植を受けた患者で、重篤な GVHD を起こし死亡した症例より親をドナーとする場合の肝移植における HLA 検査の重要性と必要性を経験したので報告する。

## 対象・方法

患者：9ヶ月の女児、先天性胆道閉鎖症のため母から生体部分肝移植を受け、移植後20日頃より水疱・表皮剥離を伴う発疹、水様下痢と高熱および汎血球減少が出現した。その後 GVHD 重症化3週で敗血症となり、術後43日に死亡した。

HLA typing：両親の血液および移植後30, 33, 34, 37, 43日の各患者血液よりリンパ球を分離し、LCT 法により HLA-class I を検査した。患者の爪由来および両親の有核細胞由来の DNA を用い PCR-LIS-MPH と PCR-LIS-SSCP により HLA-DRB 1, DQB1 を type した。

マイクロサテライトの検査：移植後各採血日の患者血液および爪由来の DNA と両親の血液由来の DNA を用い、human beta-actin related pseudogene および human growth hormone のマイクロサテライトを PCR-LIS-SSCP で検出した。

## 結果・考察

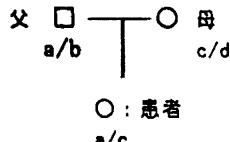
図1に患者家族の HLA type を示す。母は日本人の common ハプロタイプである HLA-A 24/B 52/

氏名	A locus	C locus	B locus	DRB1*	DQB1*
父	2	31	10 -	61 51	0802 1403
母	24	-	- -	52 -	1502 -
患者	2	24	10 -	61 52	0802 1502

## PROBABLE HAPLOTYPE

	A	C	B	DRB1	DQB1
HAPLOTYPE a:	2	10	61	0802	0302
HAPLOTYPE b:	31	-	51	1403	0301
HAPLOTYPE c:	24	-	52	1502	0601
HAPLOTYPE d:	-	-	-	-	-

## FAMILY TREE



○：患者  
a/c

図1. 患者家族の HLA Type

表1. 患者リンパ球の HLA 抗血清に対する細胞障害スコア

Serum Specificity	抗血清との反応スコア				
	採血日	11/	11/	11/	11/
A2	08	11	12	15	21
A2+A28	6	8	8	8	8
A24+A23	6	6	6	8	8
A24	8	8	8	8	8
B61+B60+B48	8	8	8	8	8
B61+B60+B13+B47	6	6	6	8	8
B59+B51+B52+B5102+B5103	6	6	6	8	8
B52	8	8	8	8	8
B52	8	8	8	8	8
B51+B5102+B52+B35+B75+B63+B77	8	8	8	8	8
BW4	8	8	8	8	8
BW4	8	8	8	8	8
BW6	6	8	8	8	8
BW6	6	6	6	8	8
CW9+CW10	6	6	6	8	8
CW9+CW10	4	6	6	8	8

(スコアの説明) 8. ほぼすべてのリンパ球が死細胞である。

6. 50 %～70 %のリンパ球が死細胞である。
4. 30 %以上で50 %以下の死細胞数である。

DRB1\*1502 / DQB1\*0601 のホモザイゴートと考えられる。表1に患者保有 HLA 抗原に対する抗血清と患者リンパ球の細胞傷害スコアの経時変化を示す。図2に両親と患者（経時変化を含め）のマイクロサテライト泳動パターンを示す。これらの結果から、GVHD と診断時の患者末梢血には母の細胞の存在が証明された。また死亡後の剖検報告で皮膚病変の真皮、基底層および腸管粘膜下層に CD

8 陽性 T リンパ球の浸潤がみられた。親子間生体肝移植の重篤な GVHD を起こした事に起因する患者の死亡例に遭遇し、親子間生体肝移植の場合、HLA 検査（ホモザイゴートのドナーを除外するため）の重要性が確認された。現在、移植後 30 日目の患者末梢血に含まれる母の細胞の割合およびその細胞特性を検討している。

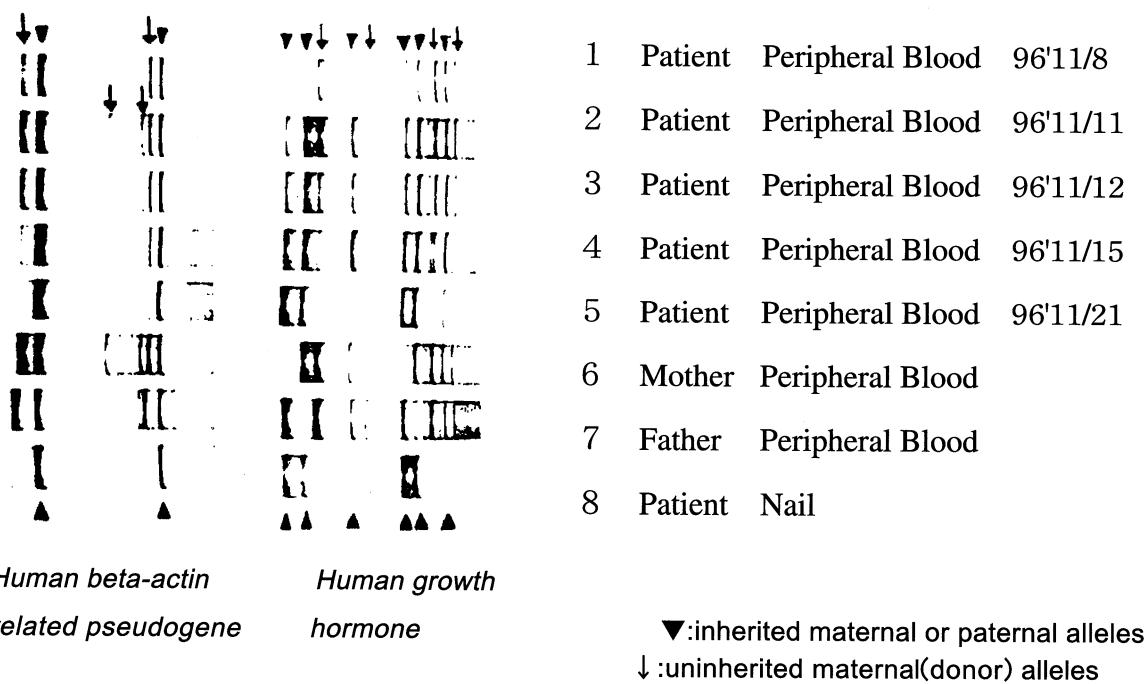


図2. 患者家族のマイクロサテライト泳動パターン

### 一般演題

## 5. 3種の抗 HLA-G および 2種の抗 HLA-E モノクローナル抗体の特異性について

奈良県立医科大学、法医学教室

下嶋 典子、石谷 昭子、長池 知恵子、Daniel E. Geraghty、羽竹 勝彦

### はじめに

HLA-G および HLA-E は HLA クラス Ib 遺伝子のひとつであって、その構造はクラス Ia の conservative sequence と 70 ~ 80 % のホモロジーをもっているが、その多型性は著しく乏しいことが特徴である。

蛋白レベルでの発現については、HLA-G は母児間の接点である胎盤トロホblastのみに発現していることが知られているが、HLA-E については報告はない。

我々はこれまでに、2種の抗 HLA-G 抗体につい

て報告してきたが、今回新たに、1種の抗 HLA-G 抗体および2種の抗 HLA-E 抗体の生産に成功した。これにより HLA-G については、膜結合性抗原 (Gm) のみ、可溶性抗原 (Gs) のみ、および両者 (Gm+Gs) のそれぞれに反応する抗体を得たことになり、これらは HLA-G の発現や機能の解析に非常に有用な手段となると考えられる。また抗 HLA-E 抗体により、これまで膜上への発現が疑問視されていたこの抗原の発現と機能の解析を可能にしうるものと考えられる。これらの抗体の特性について詳しい解析を行った。

## 方法

抗体の作製：87 G と olG については  $\beta$ 2-m と HLA-G 遺伝子を導入したマウス細胞で HLA-B 27 transgenic mice を免疫し、16 Gl については Gs 蛋白の C 末端に位置する 20 アミノ酸（第 4 イントロン）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、3 D 12 および 7 G 3 については HLA-A と HLA-G のハイブリッド細胞から得られた HLA-E 蛋白を W 6 / 32 affinity column で精製したもので HLA-B 27 transgenic mice を免疫し、以下は定法に従って Hybridoma を作製し、抗体を得た。

特異性の検定：各抗体について、FACS, immunoprecipitation, sandwich ELISA, 免疫染色,

Western blot 等により特異性を調べた。ELISA には、抗 HLA class I 抗体 W 6 / 32 と各抗体との組み合わせで、plate に第 1 抗体を結合させ、これに統合した抗原をビオチンラベルした第 2 抗体で検出した。この時、抗原としては affinity 精製した Gm および Gs 蛋白を用いた。免疫組織染色は Histofine SAB・PO キット（ニチレイ）を用いて行った。

## 結果

今回検討した 5 種の抗体の特性を表に示した。特異性の検定の結果、これら 5 種の抗体はすべて、他の HLA との cross reactivity はみられなかった。87 G および olG については、10 th International workshop より得られた 60 種の cell line に対する mirocytotoxicity test をも行い、いかなる HLA とも cross react しないことを確認した。また 3 種の抗 HLA-G 抗体については、ELISA および免疫組織染色により、olG は Gm に、16 Gl は Gs に、87 G は Gm と Gs の両者と反応することが明らかとなった。

これらの抗体を用いて胎盤組織の免疫染色を行ったところ、Gm は母体脱落膜組織に侵入しつつある extravillous trophoblast にのみ発現し、Gs はあらゆる trophoblast に発現し、HLA-E の発現は、HLA-G よりは、一般に弱いが、villous cytotrophoblast および syncytiotrophoblast に弱く、extravillous trophoblast に比較的強く発現していた。

## Monoclonal antibodies

Monoclonal Antibodies	Specificity	Isootype	FACS	precip	ELISA	histology	western
87 G	G (Gm+Gs), nc	IgG 2 a	+	weak	Gs+Gm+	+	+
olG	G (Gm), nc	IgG 2 a	+	weak	Gm+	+	nt
16 Gl	G (Gs), nc	IgGl	nt	+	Gs+	+	+
3D 12	E, nc	IgGl	+	+	nt	+	+
7 G 3	E, nc	IgG 2 b	+	+	nt	+	+

nt, indicates not tested

nt, indicates no crossreactivity with tested HLA-A, -B and -C specificities

## 一般演題

## 6. 脘帯血バンクにおける組織適合性検査法について

京都府赤十字血液センター、研究部

丸屋 悅子、池田 忠明、仁田 浩、佐治 博夫、横山 繁樹

## 目的

近年白血病の治療法として非血縁間骨髄移植が普及し、日本においても骨髄バンクを介した非血縁間骨髄移植が1,000例に達しようとしている。移植成績も欧米の成績とほぼ同等の結果が得られている。非血縁間骨髄移植の場合、ドナーに与える負担は大きい。最近、幹細胞のソースとして臍帯血や末梢血幹細胞も使用可能であることが確認されている。これらの移植法はドナーに与える負担を多大に軽減し得る。臍帯血の場合さらに移植時期の制限からも開放され、患者の移植最適時期に移植できる利点がある。ただし採取量の確保が難しい場合や採取時期が不規則である欠点もある。臍帯血バンキングに不可欠なHLA検査のための血液量（非血縁間骨髄移植の場合10mlの血液）を確保すれば、移植用の臍帯血量がバンクの基準量に満たなくなる場合やHLA検査センターの営業時間に間に合わず検査不能となり、採取した臍帯血が登録できないことなどがある。このような短所を補いうる組織適合性検査法について検討した。

## 方法

## —臍帯血（1ml）からのリンパ球の分離法—

1. 臍帯血1mlに生理食塩水1.5ml加える。
2. フィッシャーチューブに0.5mlのフィコールパックを入れ、1液を0.5ml重層し、10,000g, 5min遠心する。
3. リンパ球層を新しいフィッシャーチューブに入れ、生理食塩水を入れ混合し、3,000g, 1min遠心する。
4. 上清を除き、沈渣を0.7mlのパーコール40で一本のフィッシャーチューブにまとめる。
5. 0.2mlの生理食塩水を重層し、3,000g, 1min遠心する。
6. 上清をすべて除き、RPMI溶液を1ml入れ、や

さしく混和後2,000g, 1min遠心する。

7. 上清を除き、RPMI 1mlに浮遊させ、細胞数を数え、 $2 \sim 3 \times 10^6 / ml$ に調整する。

## —臍帯からのDNA分離法—

1. 臍帯血採取後、臍帯の一部（約2～3cm）を切除し、滅菌チューブに入れ採取場所より持ち帰り4℃または-20℃に保存する。
2. シャーレに滅菌生理食塩水を満たし、臍帯（約0.5mm<sup>3</sup>に切る）を洗う。これを3回繰り返す。
3. エッペンドルフチューブ（2ml）に臍帯を入れDNA抽出液（1×PCR buffer, 0.5% Tween 20, protease K 0.05%）をチューブに満たし、56℃の恒温槽で一夜放置する。
4. フェノール・クロロフォルム抽出を3回行う。
5. エタノール沈殿によりDNAを回収し、洗浄後乾燥しTE buffer（0.5ml）で溶解する。

## 結果・考察

臍帯血1mlより約 $3 \times 10^6$ 個のリンパ球が得られる。今まで15例の臍帯血を分離しているがリリンパ球の収量はほぼ一定であり、HLA-class I typingには十分量であった。残りのリンパ球よりDNAを抽出し、HLA-DRB1 allele typingを行うに十分量のDNAが得られた。小児の血液と同様に臍帯血中のリンパ球数は成人より多く、検査に必要とする血液量は0.5～1mlで十分であることが解った。臍帯からのDNA分離は簡便で、約5mm<sup>3</sup>の臍帯からおよそ30μgのDNAが得られた。今後HLA-class IのDNA typingが可能になれば臍帯のDNAでHLA検査ができる。したがって検査用臍帯血の確保の必要もなくなり、検査時期も制限されず便利な臍帯血バンク組織適合性検査法となり得る。今後この方法でDNAの分離例数を増やし、各条件の最適性を確認する予定である。

## 一般演題

## 7. 血液直接 PCR 法による PCR-RFLP タイピングの検討

東海大学医学部、分子生命科学系遺伝情報部門  
島津製作所、基盤技術研究所

成瀬 妙子、猪子 英俊  
西村 直行

PCR (polymerase chain reaction) 増幅に鑄型として用いる高分子 DNA は、従来より、フェノール抽出法が一般的であったが、抽出までに時間を要するため死体腎移植ドナー検索などには実用的ではない。短時間で DNA を調製する方法として、salting-out 法や煮沸法などがあるがこれらは変性タンパクの混入が多いため、PCR 阻害物質の影響を受け、増幅が困難な場合がある。そこで今回、末梢血より DNA 抽出を行わず、直接血液を添加して PCR 反応を行うことが可能な Ampdirect<sup>TM</sup> を用いて、PCR-RFLP 法による DNA タイピングを試みた。

10 名の健常者より採取した ACD-A 加血液 1  $\mu\text{l}$  に、Ampdirect<sup>TM</sup> 5  $\mu\text{l}$  を添加し、dNTP、プライマー、Taq DNA ポリメラーゼを加えて、全量を 50  $\mu\text{l}$  として 40 ~ 50 サイクルで PCR 反応を行ったところ、全例に明瞭な増幅バンドが確認できた。次にこの検体を用いて PCR-RFLP 法による DQA1, DQB1 遺伝子の DNA タイピングを行ったところ、全例の対立遺伝子の特定が可能で、他法にて精製を行った DNA を用いた場合と結果が一致した。

のことより、Ampdirect<sup>TM</sup> による血液直接 PCR 法は、迅速、簡便な DNA 精製法として期待できると思われた。

# <日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>

## 1. 投稿規定

### 1.1. 原稿様式

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

### 1.2. 原著論文

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

Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR 52-associated DRB1 allele with the DRNJ 25' specificity designated DRB1\*1307.

Toshihiko Kaneshige<sup>1)</sup>, Mitsuo Hashimoto<sup>2)</sup>,

Yayoi Murayama<sup>1)</sup>, Tomoko Kinoshita<sup>2)</sup>,

Tsutomu Hirasawa<sup>1)</sup>, Kiyohisa Uchida<sup>1)</sup>,

Hidetoshi Inoko<sup>3)</sup>

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

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

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

### HLA class II の DNA typing と MLC

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

1) 兵庫県赤十字血液センター, 検査課

2) 東海大学医学部, 移植免疫学

3) 東海大学医学部, 分子生命科学

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

### 1.3. 総説、シリーズその他

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

1. 2. 3. 4. .....

1.1. 1.2. 1.3. 1.4. .....

1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. .....

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

#### 1.4. 校正

校正は編集委員が行い、特別な場合を除き、執筆者は校正を行わない。

#### 1.5. 参考文献

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

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

#### 2. 別刷

原著論文については、別刷は有料とする。その費用は部数、頁数による。

#### 3. 原稿送付先

〒259-11 神奈川県伊勢原市望星台

東海大学医学部 分子生命科学系遺伝情報部門 日本組織適合性学会誌MHC  
編集長 猪子 英俊  
TEL : 0463-93-1121 内線 2312  
FAX : 0463-94-8884  
E-mail : hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp

### 編集後記

月日の流れは早いもので、MHC も Vol. 4, No. 2 まで参りました。

当初は編集作業という初めての経験にとまどいながらも、気がつくと本棚に“MHC”の文字が並んでいます。色々な事があったなあ、と振り返ってみると、この間に臓器移植法案の成立、さらに最近では公的臍帯血バンク設立に向けての運動と、大きく流れが変化しています。HLA, MHC の意義も益々重要になりそうな気配を感じる今日この頃、次はどういう分野で HLA が活躍するのでしょうか？

あらゆる分野での様々なご意見、目から鱗が落ちるようなご投稿をお待ちしております。また、投稿規定には毎回若干の改訂箇所がございますので、最新号をご参照頂きます様お願い致します。

(成瀬 妙子)

---

*MHC*  
Major Histocompatibility Complex  
Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics  
1997年12月1日発行 4巻2号, 1997  
定価 2,000円  
発行 日本組織適合性学会（会長 片桐 一）  
編集 日本組織適合性学会編集委員会（編集担当理事 猪子 英俊）  
平成8年7月24日 学術刊行物認可

---

日本組織適合性学会事務局（事務担当理事 十字 猛夫）  
〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 日赤血液センター内  
印刷・（株）栄文舎印刷所  
〒229 神奈川県相模原市相原2-12-1