

第7回日本組織適合性学会大会

会期：1998年7月16日（木）～17日（金）
会場：箱根湯本富士屋ホテル
大会長：猪子 英俊

第7回日本組織適合性学会大会

The 7th Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI) Annual Meeting

July 16 -17, 1998

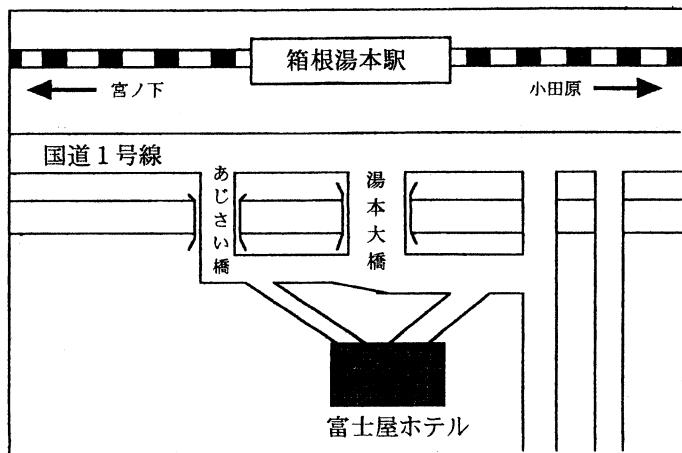
会期：1998年7月16日（木） 10：50～17：15
17日（金） 9：00～16：15

会場：箱根湯本富士屋ホテル
〒250-03 神奈川県足柄下郡箱根町湯本256-1
TEL 0460-5-6111 FAX 0460-5-6142

大会長：猪子 英俊（東海大学医学部分子生命科学系）

事務局：〒259-1193 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
TEL 0463-93-1121 内線2653
FAX 0463-94-8884

会場への交通案内

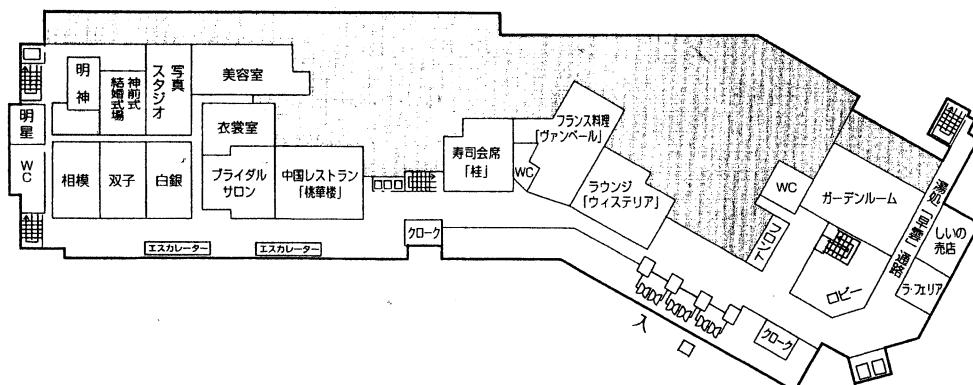


● 小田急電鉄／箱根登山鉄道
箱根湯本駅より徒歩 3 分

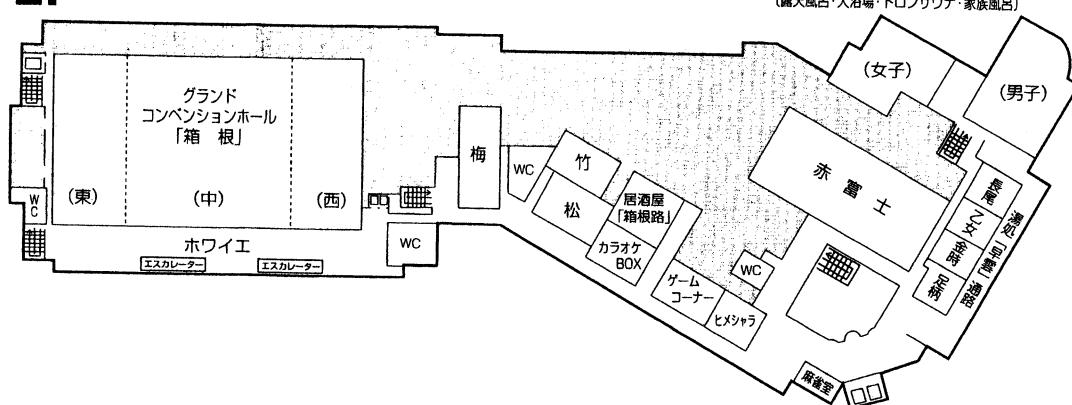
会場案内図

湯本富士屋ホテル

1F



2F



理事会・評議員会・総会のご案内

理 事 会：1998年7月16日（木）9:45～10:45

湯本富士屋ホテル新館1階 白銀

評議員会：1998年7月16日（木）17:15～18:15

湯本富士屋ホテル新館1階 白銀

総 会：1998年7月17日（金）13:00～13:30

湯本富士屋ホテル新館2階 箱根

懇親会のご案内

日 時：1998年7月16日（木）18:30～20:30

会 場：湯本富士屋ホテル新館2階 箱根

会 費：5,000円

（ただし、当日湯本富士屋ホテル宿泊の方は宿泊料金に懇親会費が含まれております）

参加者へお知らせとお願い

1. 登録：

- 1) 受付時間：1998年7月16日（木）9:30～18:00
1998年7月17日（金）8:30～15:00

- 2) 受付場所：湯本富士屋ホテル2階

- 3) 参加費：5,000円

参加者は参加費を支払い、領収証と参加証をお受け取り下さい。

2. 年会費・新入会会員受付：

- 1) 受付場所：湯本富士屋ホテル2階
- 2) 年会費：5,000円

3. 機器展示：

湯本富士屋ホテル2階 箱根

4. ドリンクサービス：

機器展示場にてコーヒーサービスを行っておりますのでご利用下さい。

5. 呼出し：

スライドによる呼出を行います。大会本部にて受け付けます。

発表者へお知らせとお願い

1. 発表時間

- 1) シンポジウム・ワークショップ発表者は、指定された時間内での発表をお願い致します。
- 2) 一般演題の発表時間は、口演時間8分、討論時間2分です。終了1分前になりますと合図を行いますので、発表をおまとめください。
- 3) 次演者は次演者席にてお待ちください。

2. スライド

- 1) すべて35mm版スライドをご用意下さい。
- 2) 一般口演のスライド枚数は10枚以内とします。シンポジウム・ワークショップについては、枚数制限はございません。
- 3) 発表時時間の30分前までに、スライド受付にご提出下さい。

座長の先生へのお願い

1. 担当セッションの開始10分前に、次座長席にお着き下さい。
2. 発表時間厳守で進行をお願い致します。

第7回日本組織適合性学会大会日程表

大会第1日 7月16日 (木)		大会第2日 7月17日 (金)	
9:00		一般演題 (5) 疾患感受性 (2)	機器展示
10:00		理事会	
11:00	開会式	一般演題 (6) 移植	
12:00	一般演題 (1) クラスI抗原、抗原提示	シンポジウム (2) HLAクラスI抗原DNA タイピングの開発と現状	
13:00	ランチョンセミナー (1) 提供(株)ベリタス	ランチョンセミナー (2) 提供(株)パークインエルマーアプライド バイオシステムズ	
14:00	一般演題 (2) 新対立遺伝子	総会	
15:00	一般演題 (3) HLA遺伝子構造	一般演題 (7) DNAタイピング	
16:00	一般演題 (4) 疾患感受性 (1)	一般演題 (8) 人類遺伝	
17:00	シンポジウム (1) MHCの進化と多型性の形成	ワークショップ HLA DNAタイピングのQC	
18:00		閉会式	
19:00		評議員会	
20:00			
21:00		懇親会	



プログラム

シンポジウム 1

7月16日（木） 15:40 - 17:10

MHC の進化と多型性の形成

座長：五條堀 孝（国立遺伝学研究所・生命情報研究センター・
遺伝情報分析）

笹月 健彦（九州大・生体防御医学研究所・遺伝）

S 1-1. 何故有頸脊椎動物だけが免疫機構を獲得し得たのだろうか？

大野 乾（Beckman Research Institute, USA）

S 1-2. Locus-specific polymorphism and evolution by a birth-and-death process in MHC genes.

根井 正利（The Pennsylvania State Univ. USA）

シンポジウム 2

7月17日（金） 10:30 - 12:00

HLA クラス I 抗原 DNA タイピングの開発と現状

座長：猪子 英俊（東海大・医学部・分子生命科学）
片桐 一（旭川医大・第2病理）

S 2-1. PCR-MPH 法と PCR-SSCP 法を組み合わせたタイピング

柏瀬 貢一（日本赤十字社中央血液センター・研究部研究一課）

S 2-2. HLA-A および -B 遺伝子の DNA タイピング

木村 彰方（東京医歯大・難治疾患研究所・成人疾患・分子病態）

S 2-3. 日常検査としての HLA クラス I DNA タイピング

兼重 俊彦（シオノギ製薬・診断医学事業部）

S 2-4. リアルタイム PCR 産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた新しい HLA クラス I DNA タイピング法の開発

成瀬 妙子, 猪子 英俊（東海大・医学部・分子生命科学）

ワークショップ

7月17日（金） 15:00 - 16:00

HLA DNA タイピングの QC

座長：佐田 正晴（国立循環器病センター研究所・実験治療開発部）
前田 平生（埼玉医大総合医療センター・輸血部）

ランチョンセミナー I

7月16日（木） 12:00 - 13:00

L1-1. PCR-SSP 法を利用した HLA クラス I DNA タイピング

斎藤 克行
One Lambda, Inc., U.S.A.

ランチョンセミナー II

7月17日（金） 12:00 - 13:00

座長：徳永 勝士（東京大・医学部・人類遺伝）

L2-1. HLA-Sequencing-Based Typing システムの特徴と利点

晒 美香
(パーキンエルマ-ジャパンアプライドバイオシステムズ事業部・フィールドア
プリケーション)

L2-2. HLA-A Sequencing-Based Typing Kit によるアリルタイピング

石川 善英, 柏瀬 貢一
(日本赤十字社中央血液センター・研究部研究一課)

一般演題

クラス I 抗原、抗原提示 7月16日（木）11:00 - 12:00

座長：佐治 博夫（京都府赤十字血液センター・研究部）

1. ヒト由来 HLA モノクローナル抗体について

○田中秀則¹⁾、豊田智津¹⁾、狩野好彦²⁾、伊佐和美¹⁾、木住野敦子²⁾、後藤邦夫¹⁾、礪波秀紀¹⁾、
亀山憲明²⁾、赤座達也¹⁾、中島一格¹⁾、十字猛夫¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液センター

²⁾ 群馬県赤十字血液センター

2. Epitope tagging をおこなった HLA-A, -E 分子の COS 細胞における発現

○水野伸一¹⁾、杉浦さよ子²⁾、神谷 忠²⁾

¹⁾ 医療法人宏潤会大同病院

²⁾ 愛知県赤十字血液センター

3. HLA class Ib 遺伝子、HLA - G の多型性についての再検討

○石谷昭子¹⁾、岸田 学¹⁾、下鶴典子¹⁾、増田知恵子¹⁾、園田俊郎²⁾、羽竹勝彦¹⁾

¹⁾ 奈良県立医科大学・法医

²⁾ 鹿児島大・医学部・ウイルス

4. MICA 遺伝子の多型解析と HLA-B との関連

○涌井美紀^{1,2)}、石川善英¹⁾、柏瀬貢一¹⁾、森山 哲¹⁾、土屋尚之¹⁾、徳永勝士¹⁾、十字猛夫¹⁾

¹⁾ 東京大・医学部・人類遺伝

²⁾ 日本赤十字社中央血液センター

5. MICB 特異的ペプチドに対するモノクローナル抗体作製

○安藤 等¹⁾、水木信久²⁾、前田雅弘³⁾、太田正穂⁴⁾、田代弘行⁵⁾、山崎正明⁵⁾、猪子英俊⁶⁾

¹⁾ 神奈川県湘南赤十字血液センター

²⁾ 横浜市立大・医学部・眼科

³⁾ 免疫生物研究所

⁴⁾ 信州大・医学部・法医

⁵⁾ 不二家・バイオサイエンス研究所

⁶⁾ 東海大・医学部・分子生命科学

6. 抗原ペプチドで組み換えたインバリアント鎖遺伝子の導入による HLA-DR を介した CD 4⁺T 細胞への抗原提示システムの開発

○藤井慎嗣、千住 覚、Yu - Zhen Chen、西村泰治

熊本大・大学院医学研究科・免疫識別

新対立遺伝子 7月16日(木) 13:00 - 14:00

座長：能勢 義介（兵庫県赤十字血液センター・検査課）

7. 新たに見つかった HLA - A 19 (A 30, A 31, A 33) 関連偽遺伝子

○渡辺嘉久¹⁾, 牧原裕子¹⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 田中秀則¹⁾, 赤座達也¹⁾, 徳永勝士^{1,2)}, 十字猛夫¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液センター

²⁾ 東京大・医学部・人類遺伝

8. 日本人に初めて検出された B*78022

○関本達也, 荒閑みき, 田所明子, 森下勝哉, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, 関口定美
北海道赤十字血液センター

9. HLA-B 39 null 遺伝子の解析

○小川篤子¹⁾, 大熊重則²⁾, 平田康司²⁾, 田中秀則¹⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 石川善英¹⁾, 赤座達也¹⁾,
梶梅輝之³⁾, 吉見昭一郎³⁾, 宮原正行²⁾, 喜多嶋康一²⁾, 滝口雅文⁴⁾, 十字猛夫¹⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液センター

²⁾ 岡山県赤十字血液センター

³⁾ 川崎医大・小児科

⁴⁾ 熊本大・エイズ研究センター・ウイルス制御

10. 新たな HLA - B 62 関連抗原について

○伊佐和美, 藤井まり恵, 柏瀬貢一, 田中秀則, 赤座達也, 中島一格, 十字猛夫
日本赤十字社中央血液センター

11. PCR - MPH 法と PCR - SSCP 法を用いた HLA クラス I タイピングにより新たに見い出されたアリル

○藤井まり恵, 柏瀬貢一, 牧原裕子, 渡辺嘉久, 田中秀則, 赤座達也, 中島一格, 十字猛夫
日本赤十字社中央血液センター

12. DR 2 ES と考えられるパネルの DRB 5 アリルの検討

○河賀泰子¹⁾, 山口恵津子¹⁾, 伊藤八重子²⁾, 神山治郎³⁾, 伊波政治³⁾, 堤 康英¹⁾,
佐藤博行¹⁾, 島袋 剛³⁾, 前田義章¹⁾

¹⁾ 福岡県赤十字血液センター

²⁾ 山口県赤十字血液センター

³⁾ 沖縄県赤十字血液センター

HLA 遺伝子構造 7月16日(木) 14:00 - 15:00

座長：木村 彰方（東京医科歯科大・難研・成人疾患・分子病態）

13. HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

1, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb におけるクローニングの整列化

- 吉川枝里¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾, 牧野悟士¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富澤麻衣子¹⁾, 半戸いづみ¹⁾, 山形哲司²⁾, 板倉祥子³⁾, 福住康仁³⁾, 菅原智代³⁾, 渡辺幸治³⁾, 小野綾子³⁾, 山崎正明³⁾, 田代弘行³⁾, 池村淑道²⁾, 木村 穢¹⁾, 猪子英俊¹⁾
- ¹⁾ 東海大・医学部・分子生命科学
²⁾ 国立遺伝学研究所・進化遺伝
³⁾ 不二家・バイオサイエンス研究所

14. HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

2, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb におけるシークエンシング効率

- 富澤麻衣子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾, 牧野悟士¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾, 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤香織¹⁾, 山形哲司²⁾, 板倉祥子³⁾, 福住康仁³⁾, 菅原智代³⁾, 渡辺幸治³⁾, 小野綾子³⁾, 山崎正明³⁾, 田代弘行³⁾, 池村淑道²⁾, 木村 穢¹⁾, 猪子英俊¹⁾
- ¹⁾ 東海大・医学部・分子生命科学
²⁾ 国立遺伝学研究所・進化遺伝
³⁾ 不二家・バイオサイエンス研究所

15. HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

3, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb における遺伝子解析

- 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾, 牧野悟士¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富澤麻衣子¹⁾, 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤香織¹⁾, 山形哲司²⁾, 板倉祥子³⁾, 福住康仁³⁾, 菅原智代³⁾, 渡辺幸治³⁾, 小野綾子³⁾, 山崎正明³⁾, 田代弘行³⁾, 池村淑道²⁾, 木村 穢¹⁾, 猪子英俊¹⁾
- ¹⁾ 東海大・医学部・分子生命科学
²⁾ 国立遺伝学研究所・進化遺伝
³⁾ 不二家・バイオサイエンス研究所

16. HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

4, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb における EST 解析

- 岡 晃¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾, 牧野悟士¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富澤麻衣子¹⁾, 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤香織¹⁾, 山形哲司²⁾, 板倉祥子³⁾, 福住康仁³⁾, 菅原智代³⁾, 渡辺幸治³⁾, 小野綾子³⁾, 山崎正明³⁾, 田代弘行³⁾, 池村淑道²⁾, 木村 穢¹⁾, 猪子英俊¹⁾
- ¹⁾ 東海大・医学部・分子生命科学
²⁾ 国立遺伝学研究所・進化遺伝
³⁾ 不二家・バイオサイエンス研究所

17. HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

5, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb におけるマイクロサテライトの分布と多型性

○田宮 元¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 岡 晃¹⁾, 太田正穂²⁾, 勝山善彦²⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾, 牧野悟士¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富澤麻衣子¹⁾, 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤香織¹⁾, 山形哲司³⁾, 板倉祥子⁴⁾, 福住康仁⁴⁾, 菅原智代⁴⁾, 渡辺幸治⁴⁾, 小野綾子⁴⁾, 山崎正明⁴⁾, 田代弘行⁴⁾, 池村淑道³⁾, 木村 穂¹⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医学部・分子生命科学

²⁾ 信州大・医学部・法医

³⁾ 国立遺伝学研究所・進化遺伝

⁴⁾ 不二家・バイオサイエンス研究所

18. HLA 領域と相同性を示す第 1 染色体 1q22-23 領域の遺伝子構造解析

- CD 1 遺伝子群周辺の構造解析 -

○安藤麻子¹⁾, 重成敦子¹⁾, 数藤由美子²⁾, 河田寿子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 添田栄一³⁾, 菅谷公彦⁴⁾, 徳永勝士⁵⁾, 奥村克純⁶⁾, 池村淑道⁷⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医学部・分子生命科学

²⁾ 日本赤十字社中央血液センター・研究部

³⁾ 理化学研究所サイフサイエンス筑波研究センター

⁴⁾ 放射線医学総合研究所・ゲノム

⁵⁾ 東京大・医学部・人類遺伝

⁶⁾ 三重大・生物資源学部

⁷⁾ 国立遺伝学研究所・進化遺伝

疾患感受性(1) 7月16日(木) 15:00 - 15:40

座長：西村 泰治（熊本大・大学院医学研究科・免疫識別）

19. HLA クラス I 領域内マイクロサテライトを用いたペーチェット病患者の多型解析

○勝山善彦¹⁾, 太田正穂²⁾, 水木信久³⁾, 安藤 等⁴⁾, 田宮 元⁵⁾, 岡 晃⁵⁾, 椎名 隆⁵⁾, 猪子英俊⁵⁾

¹⁾ 信州大学病院・薬剤部

²⁾ 信州大・医学部・法医

³⁾ 横浜市立大・医学部・眼科

⁴⁾ 神奈川県湘南赤十字血液センター

⁵⁾ 東海大・医学部・分子生命科学

20. 無精子症患者のマイクロサテライト多型解析

○太田正穂¹⁾, 佐田正晴²⁾, 勝山善彦³⁾, 式田有里²⁾, 辻 隆之²⁾, 高原史郎⁴⁾, 辻村 晃⁴⁾, 三浦秀信⁴⁾, 土岐清秀⁴⁾, 奥山明彦⁴⁾, 田宮 元⁵⁾, 椎名 隆⁵⁾, 猪子英俊⁵⁾

¹⁾ 信州大・医学部・法医

²⁾ 国立循環器病センター研究所・実験治療開発部

³⁾ 信州大学病院・薬剤部

⁴⁾ 大阪大・医学部・泌尿器科

⁵⁾ 東海大・医学部・分子生命科学

21. 脊椎後縫靭帯骨化症に関連する MHC 遺伝子群 (MICA gene) の解析

○屋敷伸治, 李 洪川, 桑山昌洋, 園田俊郎

鹿児島大・医学部・ウイルス

22. 高安動脈炎における TNFA 遺伝子プロモーター多型

○木村彰方¹⁾, 関 直子²⁾, 樋口貴文²⁾, 伊藤恭悟²⁾, 沼野藤夫³⁾

¹⁾ 東京医歯大・難治疾患研究所・成人疾患・分子病態

²⁾ 久留米大・医学部・免疫

³⁾ 東京医歯大・医学部・三内

疾患感受性(2) 7月17日(金) 9:00 - 9:50

座長：十字 猛夫（日本赤十字社中央血液センター）

23. Buerger 病における HLA-DRB1 タイピング

○高橋めぐみ¹⁾, 大淵信久^{1,2)}, 小林 靖²⁾, 沼野藤夫²⁾, 大内 博³⁾, 市来正隆³⁾,

木村彰方¹⁾

¹⁾ 東京医歯大・難治疾患研究所・成人疾患・分子病態

²⁾ 東京医歯大・医学部・三内

³⁾ JR 仙台病院

24. アジア型多発性硬化症への疾患感受性と HLA-DPB1 *0501との相関

○西村泰治¹⁾, 伊藤裕志¹⁾, 金井隆幸¹⁾, 吉良潤一²⁾

¹⁾ 熊本大・大学院医学研究科・免疫識別

²⁾ 九州大・医学部・精神内科

25. 血友病患者における HIV 感染長期未発症者の免疫応答遺伝子, HLA クラス I, II ハプロタイプの検索

○吉田孝人¹⁾, 小林 明²⁾, 三間屋純一³⁾, Nicolette Takashige⁴⁾, 成瀬妙子⁴⁾, 猪子英俊⁴⁾

¹⁾ 昭和大・医学部・細菌

²⁾ 中外診断科学(株)

³⁾ 静岡県こども病院・血液腫瘍科

⁴⁾ 東海大・医学部・分子生命科学

26. リウマチ性疾患患者における CTLA - 4 および SHP - 1 の多型解析

○松下正毅^{1,2)}, 土屋尚之¹⁾, 塩田倫子¹⁾, 岡 孝紀²⁾, 山根明男²⁾, 徳永勝士¹⁾

¹⁾ 東京大・大学院医学系研究科・人類遺伝

²⁾ 湘南製薬株式会社・バイオ研究所・診断技術研究室

27. 抗主要組織適合抗原（MHC）モノクローナル抗体を用いた実験的膜性腎症の治療

○長谷川善之, 田中智一郎, 兼岡秀俊, 吉武圭輔, 野田律矢, 松前知治, 小河原悟,

村田敏晃, 内藤説也

福岡大学病院・腎センター

移植 7月17日（金）9:50 - 10:30

座長：福西 孝信（県立西宮病院・腎移植センター）

28. 死体腎移植 HLA 検査に適した DNA typing 法の選択

○金 信子, 高橋孝喜

虎の門病院・輸血部

29. HLA 遺伝子型適合度と長期の腎移植予後との関連について

- HLA - C 遺伝子適合度と腎移植予後 -

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

¹⁾ 兵庫県立西宮病院・腎移植センター

²⁾ シオノギ製薬・診断医学事業部

30. 献腎移植希望登録患者における既存抗体検査

- 過去 10 年間の統計と検討結果 -

○山崎正明¹⁾, 荻部正宏¹⁾, 飯田好江¹⁾, 酒巻建夫²⁾, 柏原英彦³⁾

¹⁾ 国立佐倉病院・組織適合検査室

²⁾ 国立佐倉病院・臨床研究部

³⁾ 国立佐倉病院・外科

31. Immunodominant minor histocompatibility antigen (mHa) を求めて

○丸屋悦子^{1,7)}, 佐治博夫¹⁾, 関 茂樹²⁾, 甲斐俊朗³⁾, 藤井康彦⁴⁾, 加藤剛二⁵⁾,

星 順隆⁶⁾, 伊藤和彦⁷⁾, 横山茂樹¹⁾, 十字猛夫⁸⁾

¹⁾ 京都府赤十字血液センター

²⁾ 佐久総合病院・内科

³⁾ 兵庫医科大・輸血部

⁴⁾ 山口大学病院・輸血部

⁵⁾ 名古屋第一赤十字病院

⁶⁾ 東京慈恵会医科大学

⁷⁾ 京都大・輸血部

⁸⁾ 日本赤十字社中央血液センター

DNAタイピング 7月17日（金）13:40 - 14:30

座長：太田 正穂（信州大・医学部・法医）

32. ヨウ化カリウムを利用したDNA抽出法の開発

○小林 賢¹⁾, 岩崎 誠¹⁾, 鈴木洋司²⁾

¹⁾ 防衛医科大学校・検査部

²⁾ 防衛医科大学校・輸血部

33. PCR-MPH法による HLA-B15,B5,B16,B40 遺伝子のアリルタイピングと、A抗原及びB抗原の血清学的レベルのタイピング

○川井信太郎¹⁾, 中野浩美¹⁾, 松見達也¹⁾, 青池正貴¹⁾, 山根明男¹⁾, 柏瀬貢一²⁾,

小川篤子²⁾, 石川善英²⁾, 赤座達也²⁾, 十字猛夫²⁾, ³⁾坂内 誠, 徳永勝士⁴⁾

¹⁾ 湧永製薬・バイオ研究所

²⁾ 日本赤十字社中央血液センター

³⁾ 東京都赤十字血液センター

⁴⁾ 東京大・医学部・人類遺伝

34. 日本人を対象とした HLA class I PCR-SSP 法について

○中島文明, 中村淳子, 横田敏和, 伊藤 仁, 木村亮太郎

神奈川県赤十字血液センター・検査三課

35. 献腎移植希望登録者の HLA-DR-DNA 検査で相違のあった抗原の検討

○渡辺真穂, 栗田麗子, 小河原悟, 内藤説也

福岡大学病院・腎センター

36. クラス II DNA タイピング自動化の試み

○高田雄三¹⁾, 小林 賢²⁾, 向田政博¹⁾

¹⁾ 防衛医科大学校・法医学

²⁾ 防衛医科大学校・検査部

人類遺伝 7月17日（金）14:30 - 15:00

座長：園田 俊郎（鹿児島大・医・ウイルス学）

37. MHC 遺伝子座における多型を説明するアリル特異的淘汰モデルの構築

○大橋 順¹⁾, 徳永勝士¹⁾, 大塚柳太郎²⁾

¹⁾ 東京大・医学部・人類遺伝

²⁾ 東京大・医学部・人類生態

38. 古人骨を用いた高分子DNA抽出とHLA遺伝子解析

○安西達也¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 徳永勝士³⁾, 本間隆夫¹⁾, 馬場悠男⁴⁾, 赤澤 威⁵⁾, 猪子英俊²⁾

1) 東海大・工学研究科・工業科学

2) 東海大・医学部・分子生命科学

3) 東京大・医学部・人類遺伝

4) 国立科学博物館・人類研究部

5) 国際日本文化研究センター

39. HLAからみる北と南の日本人

○徳永勝士¹⁾, 坂内 誠²⁾, 八田陽子¹⁾, 大橋 順¹⁾, 今西 規³⁾, 神山治郎⁴⁾, 小川篤子⁵⁾, 田中秀則⁵⁾, 伊波政治⁴⁾, 三富齊忠²⁾, 赤座達也⁵⁾, 島袋 剛⁴⁾, 高橋有二²⁾, 五條堀孝³⁾, 尾本恵市⁶⁾, 十字猛夫⁵⁾

1) 東京大・医学部・人類遺伝

2) 東京都赤十字血液センター

3) 国立遺伝学研究所・生命情報研究センター

4) 沖縄県赤十字血液センター

5) 日本赤十字社中央血液センター

6) 国際日本文化研究センター

シンポジウム

S 1-1

何故有頸脊椎動物だけが免疫機構を獲得し得たのだろうか？

大野 乾

Beckman Research Institute of the City of Hope
Duarte, California 91010 U.S.A.

寄生生物にとって最劣の戦略は、自身を養って呉れる宿主を殺すことである。従って病原体といえども、宿主を換えたりした途端に一時猛威を振るひはしても、やがて弱毒化して宿主との共存共栄を計る；過去に猖獗した梅毒がそうでは在ったし、今から10年もすれば、流石のAIDS virus も話題に昇らない程弱毒化して仕舞ってる居るであろう。集団人口の時々の激減を覚悟さえすれば、先駆的には感染防御機構は不必要と言う事になる。事実、植物を宿主とする病原体は、ヴィールス、黴、細菌と無数あるが、植物には感染防御機構其の物は存在しない。数々の感染抵抗遺伝子は存在するが、積極的に病原体と格闘する遺伝子では無い様である。最も、植物の感染病が頻繁にモザイック病と呼ばれる理由は、感染の局在化が起り、正常の緑色部に黄色く病んだ感染部が斑点として現われるからであるが此の感染の局在化も植物細胞壁に存在する情報交換用の穴が填り易いという生理的事実の反映で、宿主植物の防御機構の現れでは無い模様である。

植物とは反対に、動物は二葉性動物に過ぎない海綿、水母迄含めて、全て感染防御機構を持って居るが、其の第一線部隊は遊走出来て、貧食能力に恵まれた顆粒球、マクロファージで編成されて居る。此等細胞の貧食機能の補佐として病原体をタグして貧食を促すオプソニン系統の分子（特定の糖を認識するレクチンも含めて）が生まれたが、特殊オプソニン遺伝子の重複コピーから後に有頸脊椎動物補体反応の根幹を成すC3, C4, C5が発生した。一方で強い殺菌能力を持った各種ペプチドも誕生した。私の知る限り上記が無脊椎動物が持つ感染防御機構の全貌である。

処で、adaptive immune system と定義される個別に諸抗原に対応できる免疫機構の構成諸因子（MHC 抗原を含めて）の全ては、有頸魚類を代表するメクラ・ウナギ・ヤツメ・ウナギの当たりで忽然と姿を消して仕舞う。何故有頸脊椎動物が免疫機構を獲得出来たのかを考える前に、自己・非自己の認識能力無しでも、有効な免疫機構は成立し得る事実を指摘して置こう。

病原体独特で宿主自己との混同の心配の無い抗原は、免疫機構が狙う標的としては絶好であるが、斯様な抗原は可成り存在する。例えば、燐酸コリンは脂質二層細胞膜の主成分の一つであるが、細胞のそれは必ず細胞膜外

に突出して居るのに反し、動物細胞の燐酸コリンは細胞質内面に維持されて絶対に細胞膜外には表示されない。従って、燐酸コリンをハプテンとして認識出来る抗体は、広範な種類の細菌に対して極めて有効であるに関わらず、宿主細胞に害を及ぼす懸念は全く存在しない。次ぎに免疫機構が自己破壊の心配無しに対象として選べる病原体抗原は多糖類である。宿主自身が持てて、蛋白、脂質に付加する多糖類の種は、自身の持つて居る糖添加酵素の種で決まる。従って、自身では使は無い糖鎖末端の糖を標的とした抗体は宿主無害であり乍ら、病原体に対しては極めて有効である。事実マンノースを認識するレクチンは、無脊椎動物で無くメクラ・ウナギ、ヤツメ・ウナギ迄がオプソニンとして感染防御に利用するが有頸脊椎動物で見る抗体と補体の相互作用はヤツメ・ウナギで見られるレクチンと元祖補体との相互作用から出発したのかもしれない。上記から抗体の元祖はレクチンであったと言う可能性が強く浮上して来る。

但し上記の様な抗原を対象とした抗体は病原細菌に対しては極めて有効であるが、細胞内寄生して宿主の糖添加酵素を利用する病原ヴィールスに対して全く有効である。其処で有頸脊椎動物は蛋白表面に露出したアミノ酸配列を認識出来る抗体の生産を試みたのであろう。此処で自己・非自己の認識が初めて必須となり、クラスI及びクラスII MHC 抗原が生まれ、T リンパ球が分化したのであろう。事実 MHC 抗原は、T リンパ球に依る自己・非自己識別の為にペプチド断片を提示するが、糖鎖断片は、私の知る限り、提示し無い。脊椎動物亜門はナメクジ魚に代表される頭索動物亜門、ホヤに代表される尾索動物亜門と共にコルダーク門に属するが、コロニーを造って共生するホヤの類に既に移植拒絶反応が見られる処から、少なくともクラスI MHC 抗原を利用した自己・非自己識別能力は免疫機構獲得の前に既存して居たのであろうと長い間思われて来た。残念乍ら大変な努力にも関わらず MHC 抗原の痕跡はナメクジ魚にもホヤにも見付からない。コロニーを造るホヤ間の自己・非自己識別は多型ではあるが MHC とは全く無関係な別な膜抗原を通じて行われて居るのであろう。私は既述の如く、既存の免疫機構が対象とする抗原の仲間に蛋白を加えた時に、初めて自己・非自己の識別が必要となり、其の為に MHC 抗原は二次的に誕生したものと考えている。

最後の問題は、何故有頸脊椎動物丈が adaptive immune system を持つ事が出来たかと言う疑問への解答であるが、此の解答は非常に簡単である。5億5千万年前カンブリア初期に頭索動物と同時に誕生した最初の脊椎動物としての無頸魚類は、頭索類に較べてすでに四倍体であったが、後3億5千万年前位に無頸魚類が有頸魚類に進化した時に、後者は二番目の四倍体化に成功した。結果として有頸脊椎動物は遺伝子の全てに就いて4コピーを授かって進化のスタートを切った訳である。其の為、有頸脊椎動物丈は、成功率の低い色々な冒険的進化実験が出来たからこそ、免疫機構が獲得出来たのである。免疫機構構成因子は殆ど、俗に言う Ig ドメインの繋がりで出来て居る。此のドメインの基礎構造は 90 から 110 のアミノ酸残基より成る 2 対半のベータ板の塊であるが、其の進化起源は非常に古く、動物王国丈でなく、微生物に属する種の間にもカドヘリンその他の膜蛋白として此のドメイン構造を持った蛋白が見付かる。7 億年位前から存在したドメイン構造と考えて良いだろう。但し Ig ドメインが抗原結合能力を獲得して抗体や T 細胞リセプターの抗原結合部として機能する為には、根本的なドメイン改造が要求され、俗にトリプトファン・ループと呼ばれる更に一対のベータ板が付加されなければならなかつた。MHC 抗原のペプチド提示ドメインに変形する為にも、同程度の大膽な改造が必要で、今迄、二次構造としてはベータ板丈が存在したドメイン中に、新しく一個のアルファ螺旋の創造が要求された。突然変異の蓄積に頼って、上記の様なドメインの大規模構造改変をしようとすると、成功率は極めて低くなり、失敗の繰り返しを覚悟しなければいけない。それぞれの遺伝子が 4 コピーとして存在したからこそ上記の様な成功確率の低い進化実験に成功して adaptive immune system を獲得し得た訳である。

S 1-2

LOCUS-SPECIFIC POLYMORPHISM AND EVOLUTION BY A BIRTH-AND-DEATH PROCESS IN MHC GENES

Masatoshi Nei

The Pennsylvania State University
University Park, Pennsylvania, U.S.A.

A remarkable feature of MHC genes is the extremely high degree of genetic polymorphism within loci, and some allelic lineages apparently have coexisted in the population for a long evolutionary time encompassing several speciation events. To explain the diversity and evolution of MHC genes, a number of authors invoked concerted evolution, in which polymorphism is assumed to be generated by interlocus recombination or gene conversion. However, this view has been questioned on the ground that the member genes of MHC multigene families are not necessarily more closely related to one another than to the genes from different species. Nei and Hughes (1992) and Nei et al. (1977) then proposed the birth-and-death model of evolution to explain the evolution of MHC genes. In this model, new genes are created by repeated gene duplications and some duplicate genes are maintained in the genome for a long time but others are deleted or become nonfunctional by deleterious mutations. One way to resolve this controversy is to examine the pattern of phylogenetic trees of polymorphic alleles from different loci of the MHC. If concerted evolution is the major mechanism for generating MHC polymorphism, one would expect that alleles from the same locus do not form a monophyletic cluster because some alleles at a locus should have been derived from other loci by interlocus recombination or gene conversion. By contrast, if birth-and-death evolution and balancing selection are important mechanisms as claimed by Nei and Hughes (1992), the alleles from different loci are expected to form different clusters. For this reason, we conducted an extensive phylogenetic analysis of MHC class I and class II genes from humans and mice. The phylogenetic tree obtained for 212 complete human class I gene sequences (HLA-A, B, and C) has shown that all alleles from the same locus form a single cluster. In mouse MHC class I loci allelic designations in the literature are confusing, but the allelic sequences from clearly defined loci again show locus-specific clusters. This locus-specificity of polymorphic alleles is also observed in human and mouse MHC class II loci.

Therefore, interlocus recombination or gene conversion does

not seem to be very important for generating genetic diversity at MHC loci. According to the phylogenetic tree of complete coding sequences, we classified human MHC class I (A, B, C) and class II (DRB) alleles into 3-5 major allelic lineages (groups), which were monophyletic with high bootstrap values except in the class I B locus. Most of these allelic groups remained unchanged even in phylogenetic trees based on individual exons. Only a relatively small number of alleles seem to be products of interallelic recombination. These results together with the previous observations that MHC loci are subject to frequent duplication and deletion as well as to balancing selection indicate that MHC evolution in mammals is in agreement with the birth-and-death model of evolution rather than with the model of concerted evolution.

Masatoshi Nei

Institute of Molecular Evolutionary Genetics
Pennsylvania State University
328 Mueller Laboratory
University Park, PA 16802 USA
Tel: 814-863-7334
Fax: 814-863-7336

S 2-1**PCR-MPH 法と PCR-SSCP 法を組み合わせたタイピング**

柏瀬 貢一

日本赤十字社中央血液センター・研究部研究一課

現在、クラス II 抗原の DNA タイピングについてはキット化が進み、日常検査として定着した感がある。一方、クラス I 抗原の DNA タイピングについては、ローカスまたはグループ特異的なプライマーの設定が困難なことや、解析を行うエクソソルがクラス II 抗原では 1 つであるのに対し、クラス I 抗原では 2 つもしくは 3 つについて行う必要があることから、判定が困難なため簡便な方法の開発は未だ発展途上にある。しかしながら、近年、HLA-A, B 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良好な結果をもたらすことが報告されたことにより、クラス I 抗原のアリルレベルの DNA タイピングが必要となった。

DNA タイピング法としては、多種多様の方法が開発されているが一長一短があり、各施設の状況に応じて使い分けているのが現状である。我々は、クラス I 抗原 (HLA-A 2, -A 26, -B 39, -B 61) のアリルレベルの DNA タイピングを、クラス II (DRB1) のタイピングにおいてすでに確立している PCR-MPH (Microtiter Plate Hybridization) 法—既知のアリルの変異箇所をもとに設定したプローブを用いて識別する方法—と PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) 法—標準 DNA との電気泳動パターンの違いを識別する方法—との組み合わせで行っている。今までに約 4,000 件のアリルタイピングを行ったが、MPH 法のみで検出することは不可能であった新たなアリルが 3 種類見い出された。

原理の異なる 2 つの方法を組み合わせることにより、入力や判定の誤りを防げることや、未知のアリルを見出せることが確認された。また、今後普及するであろう SBT (Sequencing-Based Typing) 法も併せて報告する。

文献 MHC Vol. 4 No. 2 : 97-99, 1997

S 2-2**HLA-A および-B 遺伝子の DNA タイピング**

木村 彰方

東京医歯大学・難治疾患研究所・成人疾患・分子病態

PCR 法を利用して増幅した HLA 遺伝子群の多型解析法として、SSOP 法、RFLP 法、SSP 法、SSCP 法、SBT 法などが用いられている。いずれの方法とも長所、短所があり、対象とする検体数や解析の目的に応じて使い分けられるが、各遺伝子の最も多型に富む領域を解析することで、HLA の DNA タイピングが可能となっている。クラス II 遺伝子群については既に市販キットを用いた DNA タイピングが実用化されており、この実用化の波はクラス I 遺伝子群にも及んでいる。

我々は多検体の DNA タイピングを目的とした SSOP 法による HLA-A 遺伝子および HLA-B 遺伝子の多型解析を行っている。いずれの場合とも第 2 および第 3 エクソンを含む領域を増幅し、多数の SSOP (HLA-A は 91 種、HLA-B は 109 種) とのハイブリダイゼーション反応パターンから HLA 遺伝子型を決定したところ、日本人集団においても、A 2, A 24, A 26, B 61 および B 62 に血清学的に区別できない多数のサブタイプが存在することが判明した。特に A 2, A 26, B 61 および B 62 については、それぞれのサブタイプの頻度が高い。非血縁者間骨髄移植では、HLA-A および -B のサブタイプの違いが移植後に影響することが知られており、ドナー選択の際には DNA レベルでの解析が必要であるが、このようなサブタイプの区別には SSP 法と組み合わせた SSCP 法が有用である。

一方、SSP 法は少数検体を対象として血清学レベルと同等ないし多少高い分離レベルでのタイピングを行う場合に有効である。SSP 法を応用した市販キットが既に実用化しているが、我々の使用経験では、多少改良の余地が存在するものの、血清学的なタイピングが困難な場合などには有用と考えられる。

本シンポジウムでは我々の解析を中心に HLA-A および -B 遺伝子の DNA タイピングの現状を紹介する。

S 2-3

日常検査としての HLA クラス I DNA タイピングの現状

兼重 俊彦

シオノギ製薬・診断医学事業部

HLA 検査に導入された DNA タイピングは、HLA 分子の免疫学的機能の解明や臨床診断に有用であると共に、検査に用いる試薬、方法の標準化の面からも有効な手段である。特にクラス II 抗原においては従来法の方法論的な欠点を克服し、且つ高精度のデータを得ることができる DNA タイピングが既に多くの検査施設で一般的な検査として実施されている。一方、クラス I 遺伝子ではクラス II と比べ可変部が広範囲に存在することや pseudogene を含め相互のクラス I 遺伝子間で相同性が高いことなどが、方法設定の大きな障害となっていたが、最近になり日常検査として実用可能な技法が報告された。われわれはこれらの方法を参考として、血清学的データが不要な「クラス I (A, B, C) DNA タイピング (high resolution) 法」を自家設定し、「96 年末に日常検査として開始した。今回これらの方針及び日常的な精度管理などの現状について紹介する。

[方法] A ローカス : 第 2, 3 エクソンそれぞれに対し、グループ特異的な PCR 増幅を用いた PCR-RFLP 法 (Tissue Antigens 50:535, '97), B ローカス : 第 2 ~ 3 エクソンに対する PCR-SSOP 法, C ローカス : Bunce らの方法 (Tissue Antigens 46:355, '95) を high resolution 用に改良した PCR-SSP 法であり、これらを現時点での実用法として使用している。

[対象アリル] われわれは原則的に全ての公認アリル (A : 86 種類, B : 199 種類, C : 50 種類) をタイピングの対象としており、新たに公認されるアリルについても判別が可能のように方法の改良を継続的に行ってい

[精度管理] 日常的には遺伝子頻度やアリル間で認められる連鎖不平衡からのタイピングデータの評価を行っている。また International Cell Exchange などの外部精度管理プログラムに参加することで、日本人集団では稀少なアリルのタイピングを行い、技法の確認をしている。

[今後の展開] クラス I DNA タイピングもクラス II と同様に臨床領域で有効な検査となることが予測される。そのためわれわれは高精度で操作のより簡単な HLA クラス I DNA タイピング法の開発に努めている。

S 2-4

リアルタイム PCR 産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた新しい HLA クラス I DNA タイピング法の開発

成瀬 妙子, 猪子 英俊

東海大学医学部・分子生命科学系遺伝情報部門

PCR-SSP (sequence specific primer) 法は多数の対立遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行い、標的の領域が増幅されたか否かを電気泳動にて確認するのみの、非常に簡便な方法として、死体腎移植などを中心に広く応用されている。しかしながらこの方法で高精度タイピングを行うには多数のプライマーセットが必要とされ、尚且つすべてのプライマーセットに対して電気泳動を行う必要があることから、多数検体を一度にこなすことは実技レベルでは困難であり、血清学レベルでの解像度にとどまっているのが現状である。

今回我々が開発したリアルタイム PCR-SSP 法は、PCR 産物自動検出機 (ABI PRISM 7700) を用いて、多数のプライマーセットを用いた反応を同時に、しかもリアルタイムでモニタリングする方法である。すなわち、鑄型に結合した蛍光オリゴヌクレオチドプローブが、PCR 反応中に Taq ポリメラーゼの伸長に伴って加水分解され、その結果生じる蛍光シグナル強度をモニターすることによって、PCR 反応の有無を確認する方法であり、シグナルを直接検出可能であることから、高い再現性が期待できる。我々はすでにこの方法を DRB1 遺伝子タイピングに導入し、良好な結果を得ていることから、クラス I 遺伝子タイピングへの応用を試みているが、HLA-C 遺伝子タイピングについては、22 組のプライマーセットを用いて中 - 高精度のタイピングが 1 時間 40 分で検出可能となった。本法は電気泳動を必要とせず、PCR 反応後の操作も不要であることから、迅速な結果判定が行え、従来法に比べ大幅な時間短縮が可能となる。さらに現在 A, B 遺伝子についても検討を行っており、確立されればクラス I 遺伝子の迅速な DNA タイピング法として、移植医療に貢献できると考える。

ランチョンセミナー

L 1-1

PCR-SSP 法を利用した HLA クラス I DNA タイピング

齊藤 克行
One Lambda, Inc., U.S.A.

PCR-SSP 法は短時間で高精度な DNA タイピングが可能なため米国では臓器移植ドナーに限らず血液幹細胞とそのドナーのタイピングなどにも幅広く活用されつつある手法である。この度ワンラムダでは既存のクラス II SSP キットに加え、HLA-ABC（クラス I）と ABDR（クラス I & II）をクラス II キットと同様なプロトコールでタイピングするシステムを開発したのでその紹介をする。両キット共、マイクロ SSP クラス II キットと同様な 96 ウェル形式 PCR プレートに調製、分注済みのプライマーセットを使用し、クラス I HLA-A, B, C または HLA-A, B, DR 抗原遺伝子の Low Resolution タイピングを PCR-SSP 法に基き行なうものである。

今回紹介するマイクロ SSP クラス I DNA タイピングキットは HLA-A, B, C 各遺伝子解析用にそれぞれ 24, 53, 18 種の計 95 種と Negative Control プライマーを含み、Serology で定義された ABC 抗原グループと、そのほとんどのコンビネーションの判別が行なえるものである。本キットでは従来の血清学的タイピングでは判別困難である組合せ、B60 と B61, B51 と B52, B55 と B56 などの判別が可能である。ABDR キットはクラス I

キットの A, B プライマーセットとクラス II Low Resolution キットの DR プライマーセットを 96 ウェルのトレーにまとめ、A, B, DR 抗原グループの同時タイピングを可能にした。また、ゲル電気泳動も既存のクラス II キット同様に 96 ウェル形式のマイクロ SSP ゲルシステム、または一般的の電気泳動装置とアガロースゲルを使用し、特異的な増幅バンドの出現有無を検出することができる。

マイクロ SSP クラス I キットの利点としては、(1)オイル無しの PCR とゲルローディング(2)クラス II キット同様に低分子量の増幅バンドを短時間ゲル電気泳動にて解析可能(3)クラス II と同量の Taq ポリメラーゼを使用(96 PCR 反応につき 5.6 μL を使用)(4)Serology で定義された ABC 抗原グループと、そのほとんどのコンビネーションが判別可能(5)ワンラムダ社の血清学スペシャリストによる開発と品質管理、などが上げられる。また、本年発売予定のクラス I と ABDR SSP キットの新ロットではクラス II とまったく同様の短時間 PCR プログラム(約 75 分)を使用したクラス I DNA タイピングが可能になる予定である。

L 2-1

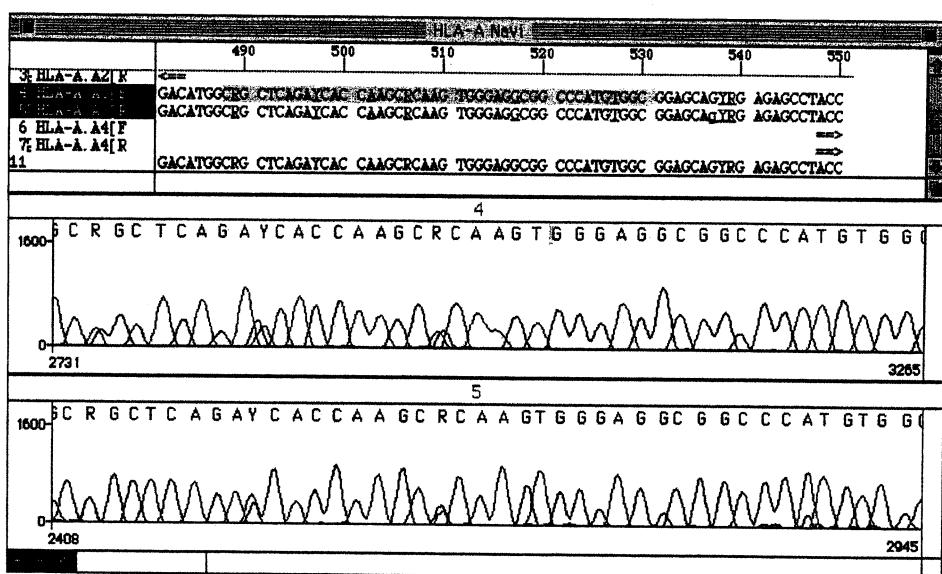
HLA-A Sequencing-Based Typing システムの特徴と利点

晒 美香

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

前回ご紹介した HLA-DRB Sequencing-Based Typing (SBT) キットに引き続き、今回は Class I の HLA-A SBT キットをご紹介いたします。直接 DNA をシーケンスし、その配列とデータベースとを照合することにより HLA のタイプを判別する SBT 法は、血清学的な方法による分類や SSP-PCR による DNA タイピングによる判別方法よりもより細かく分類できるという利点があります。一方、シーケンスまでの操作を行うという煩雑さが問題になります。HLA-DRB キットで紹介したように、PCR したプロダクトを直接シーケンスすることにより大幅に操作や時間を短縮できるようになりました。HLA-A 用のキットでも、この PCR ダイレクトシーケンスを行い、多型を示す領域のシーケンスを最新のシーケンスケミストリーにより、効率良く行えるようデザインされています。HLA のクラス I 分子の A の領域は、EXON 1 から EXON 5 にわたり分布しています。この領域の INTRON 部分を含めると、DNA の長さはおよそ 2 Kbase 以上になります。2 Kbase 以上の領域をシーケンスすることは効率的な作業になりません。このため不必要的インtron 部分のシーケンスを排除するため mRNA をテンプレートとして RT-PCR を行い、cDNA をシーケンスする方法が行われています。しかし、RNA の抽出や取り扱いは慎重に行う必要があるため実際のルーチン作業としては難しい部分が残ります。一方、シーケンスのデータにはヘテロを示す部分も多数含まれているため、ピークの高さが比較的

一定な Dye Primer 法が用いられていました。この方法は 1 つのシーケンスを行う際に 4 本のチューブ (A, C, G, T) を使用するためサンプルの分注作業が煩雑になります。HLA-A SBT キットでは、まず始めに血液等から抽出した DNA を用い、インtron と EXON 2, 3, 4 の領域を含む領域を 1 組のプライマーで PCR を行います。次に、得られた約 2 Kbase の PCR プロダクトをシーケンス用のテンプレートとして使用します。このテンプレート中の EXON 2, EXON 3, EXON 4 の両端から BigDye Terminator 法を用いてシーケンスを行います。従って、それぞれのエクソンについて表裏から、合計 6 つのシーケンスを行うことになります。ここで使われる BigDye Terminator 法は、従来の Dye Terminator 法で欠点とされていたピークの高さのばらつきを解消し、ヘテロシーケンスを読むのに十分なピークパターンが得られるようになっています。しかも、Dye Terminator 法が持つ 1 本のチューブで 1 つのシーケンス反応が行えたり、ストップピークなどのノイズが出ないなどの特徴も生かせます。このようにしてより効率の高いシーケンス法とシーケンスの確認編集 (NT Navigator) やデータベースと照合できるソフトウェア (Match Tool) と組み合わせて使用することにより、簡便で効果的な HLA-A のタイピングが行えるようになります。今回は、この SBT キットの作業内容や手順をわかりやすくご紹介いたします。



L 2-2

HLA-A Sequencing-Based Typing Kit によるアリルタイピング

石川 善英・柏瀬 貢一
日本赤十字社中央血液センター・研究部研究一課

骨髄移植においては、HLA クラス I 抗原の適合は血清学レベルでは不十分であり、アリルレベルでの適合が求められている。HLA の DNA タイピング法は PCR-SSOP 法、SSP 法、RFLP 法、SSCP 法、PHFA 法など様々な方法が考案され実際に用いられている。しかし未登録のアリルも含めてすべてのアリルのタイピングが可能な方法は SBT 法だけである。もちろん他の方法でも必要なプローブや制限酵素がすべてそろっていれば可能ではあるがあまり現実的な選択ではない。しかし従来の SBT 法はサンプル調整、データ解析が煩雑であり、確実なタイピング結果を出すためには熟練が必要であった。

今回試した HLA-A Sequence-Based Typing Kit は次のような操作からなっている。1) HLA-A ローカス特異的 PCR : exon 1 - 5, 2) 未反応プライマーの除去, 3) exon 2, 3, 4 の sense, antisense 用 cycle sequencing : 合計

6 本のチューブ, 4) 未反応 dye の除去, 5) sample sheet の作製: 各 exon と sequence data fail の関連付け, 6) DNA sequencer による電気泳動, 7) アリルの仮判定 (自動), 8) sequence data の確認, 9) exon 2 - 4 が一本につながった data の作成 (自動), 10) 最終判定 (自動)。1) から 6) までの操作は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit とほぼ同様であり、配列がヘテロの個所は見た目にも明らかなダブルピークとなる。7) から 10) は software と内蔵の database を使って、仮判定結果から sequence data を目で確認、修正し、アリルを決定する作業である。いくつか改良が望まれる点はあるが、未登録のアリルでも比較的簡単にタイピングができた。1 日数検体のアリルタイピングが必要なラボでは有用なシステムといえる。

一般演題

1 ヒト由来 HLA モノクロナール抗体について

○田中秀則¹⁾, 豊田智津¹⁾, 狩野好彦²⁾, 伊佐和美¹⁾
 木住野敦子²⁾, 後藤邦夫¹⁾, 磯波秀紀¹⁾, 亀山憲明²⁾
 赤座達也¹⁾, 中島一格¹⁾, 十字猛夫¹⁾

1)日本赤十字社中央血液センター
 2)群馬県赤十字血液センター

【目的】 HLA タイピングに使用する抗血清は、女性献血者及び分娩血の抗体スクリーニングによって得られている。しかし、恒常に良質の抗血清を得ることは困難である。そこで、我々は HLA 抗体を産生している献血者から得られた B 細胞を用いて HLA モノクロナール抗体作製を試み、2種類のモノクロナール抗体が得られたので報告する。

【方法】 HLA 抗体を産生している献血者から B 細胞を分離し、EB ウィルスでトランスフォームを行った。数週間培養後、培養上清の HLA 抗体をスクリーニングし、陽性ウエルのトランスフォーム細胞をミエローマ細胞 (JMS-3) とポリエチレンギリコールで細胞融合を行った。細胞融合後、HLA 抗体産生クローンを限界希釈法によりクローニングした。抗体スクリーニング及び特異性同定は、通常の LCT 法で行った。また、日赤中央血液センター地域内で行われている HLA ワークショップでも、特異性の詳細について検討を行った。

【結果及び考察】 B 7+B 13+B 40 関連抗体及び B 35 抗体を産生する献血者の B 細胞から、それぞれ安定した HLA 抗体産生株 JRH 01 と JRH 02 が得られた。それぞれの株から得られた抗体、01 M 005 と 01 M 012 の特異性は、B 7+B 27+B 13+B 47+B 73+B 60+B 6 1+B 48+BFU+B 81 と B 51+B 5102+B 5103+B 52+B 35+B 53+B 37+B 18+B 78 であった。01 M 005 については、B 40 関連抗原以外に、一部の A 66 (A* 66 02), Cw 2 に反応が認められた。この特異性に共通のアミノ酸配列は、 α 2 ドメイン 158~171 番目に見られ、この領域のアミノ酸置換が 01 M 005 の反応に影響していると考えられた。また、01 M 012 については、 α 1 ドメイン 45 番目のトレオニン (Thr) と 62 番目のアルギニン (Arg) のアミノ酸置換が反応に影響していると考えられた。

2 Epitope tagging をおこなった HLA-A, -E 分子の COS 細胞における発現

○水野伸一¹⁾, 杉浦さよ子²⁾, 神谷 忠²⁾

1) 医療法人 宏潤会 大同病院
 2) 愛知県赤十字血液センター

【目的】 Non-classical な HLA-E 分子のタンパク質レベルでの発現を分析する手段として epitope tagging したリコンビナント遺伝子の作製をおこなう。また、コントロールとして classical な HLA である HLA-A 2 の遺伝子にも同様な tagging を施行し transfection により、両者の発現を解析する。

【方法】 Tagging するアミノ酸配列は flag とよばれる 8 アミノ酸残基 (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys) を選択した。細胞表面に flag 分子を発現させるために、HLA-A 及び-E 分子をコードする cDNA の leader 配列 3' 側直下に flag をコードする配列を挿入した遺伝子を作製した。作製は PCR をもちいた overlap extension 法をもちい、リコンビナント cDNA を発現ベクターである pcDNA 3.1 にクローニングした後 cDNA 部分の全長を dye terminator 法及び dye primer 法で確認した。COS 細胞およびヒト B 細胞株 BOLETH (A* 0201, B* 1501) への transfection は Lipofectamine にて transient におこなった。COS 細胞での発現は flag epitope を認識する mAb を一次抗体とし間接蛍光抗体法をおこない、通常の蛍光顕微鏡および共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。Western blot は transfectant を anti-flag mAb 及び anti-mouse Ig coated Dynabeads にて発現細胞を enrich した分画をもちいておこなった。

【結果および考察】 HLA-E は HLA-A よりは発現効率が低い傾向にあったが細胞表面上および細胞質内において発現が観察された。また Western blot では HLA-E のバンドは 40 kd 前後に 2 本観察された。Allele および locus 相互間で相同性の高い HLA-class I 遺伝子の研究に epitope tagging は今後とも有用である可能性が示唆された。

3

HLA class Ib 遺伝子, HLA -G の多型性についての再検討

○石谷昭子¹⁾, 岸田 学¹⁾, 下嶋典子¹⁾, 増田知恵子¹⁾
園田俊郎²⁾, 羽竹勝彦¹⁾

1)奈良県立医科大学法医学教室

2)鹿児島大学医学部ウィルス学教室*

4

MICA 遺伝子の多型解析と HLA-B との関連

○涌井美紀^{1, 2)}, 石川善英²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 森山 哲²⁾
土屋尚之²⁾, 徳永勝士¹⁾, 十字猛夫²⁾

1)東京大学医学部人類遺伝学

2)日赤中央血液センター

【目的】 HLA-G は多型性が極めて乏しいことが知られている。HLA-G の発現は人体組織中、胎児と母体の接点である胎盤トロホブラストにのみ見られることから、その機能は妊娠中の免疫機構に関連していると考えられている。トロホブラストには、多型性に富む HLA class Ia は発現せず、HLA-G のみが発現していることにより、母体免疫細胞はこれらの胎児細胞を“他”とは認識せず拒絶反応を起こさないと考えられている。ところが近年、van der Ven と Ober は、African Americanにおいては、exon 3において、24種もの nonsynonymous な変異が存在すると報告した。もし、事実このように多型に富んでいるならば、どうして母体 T 細胞は、allo 反応を引き起こさないのだろうか。そこで我々は、この疑問を解くべく、彼らと同様に African American およびアフリカ人（ガーナ）そして日本人について、HLA-G の多型性を再検討した。

【方法】 Japanese, African, African American より得た genomic DNA について、HLA-G 遺伝子の exon 3 部分を PCR 増幅した。この時 primer としては山下らと同じ GE 3 U (5'-GGGGCTGACCGAGGGGGT-3') と GE 3 D (5'-GCTAGGCCAGGCTG (A/G) GAGG-3') および Ober らの用いた GCS 6/5 (5'-GACCCTCTACCTGGGAGAACCCCA-3') と G3 i3 (5'-TCTGTGGAGCCACTCCACGCACGT-3'), G3 i5 (5'-CAGATCTCCAAGCGCAAGTG TGAG-3') と GCS 4/3 (5'-CCTCCACTCCCTCAGAGACTTCATC-3') の 2種類のセットを用いて増幅した。その PCR 産物を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer によって dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit を使用し、Direct sequence を行った。

【結果】 いずれの人種においても、またいずれの primer を用いた場合も nonsynonymous な変異は 110 番のアミノ酸の変異 leu→Ile (CTC→ATC) のみで、Ober らの報告したような多型は検出されず、多型性の乏しさを再確認した。

【目的】 MHC class I chain-related A (MICA) 遺伝子は、HLA-B から 40 kb セントロメア側に位置し、多型性を有することが知られている。その産物は HLA クラス I 分子類似の構造をとると考えられているが、古典的なクラス I 抗原と異なり、主に上皮系細胞に特異的に発現している。

これまでに MICA の exon 5 (膜貫通部) における多型頻度が報告されている。本研究では、同様に多型性を有することが知られている exon 2, 3, 4 について日本人集団試料を解析し、HLA-B との関連を検討した。

【方法】 健常な HLA アリル既知の日本人 114 人のゲノム DNA を用いて MICA の多型解析を行った。MICA の exon 2, 3, 4 をそれぞれ特異的に增幅するプライマーを設定し、これらを用いて増幅された PCR 産物を SSCP 法で段階的にパターン解析し、exon 2, 3, 4 の組み合わせによりアリルを推定した。既報の文献中で解析の対象となつた細胞株のゲノム DNA をスタンダードとして用いるとともに塩基配列を決定した。統計学的解析には maximum likelihood method (Imanishi et al. 1992) を用いて MICA の対立遺伝子頻度および MICA と HLA-B との間の連鎖不平衡を検討した。

【結果】 PCR-SSP 法、PCR-SSCP 法を用いて MICA の多型解析を行った結果、健常日本人集団において exon 2 で 5 種、exon 3 で 6 種、exon 4 で 4 種の SSCP パターンが得られた。それらの組み合わせにより 8 種のアリルの存在が確認され、うち 1 種は既報の MICA アリルと異なり、新しい対立遺伝子であると推定された。MICA と HLA-B との関連を検討したところ、強い連鎖不平衡の存在が示唆された。また、特定の HLA-B アリルと連鎖不平衡の強い null アリルの存在が推定された。

5

MICB 特異的ペプチドに対するモノクローナル抗体作製

○安藤 等¹⁾, 水木信久²⁾, 前田雅弘³⁾, 太田正穂⁴⁾
田代弘行⁵⁾, 山崎正明⁵⁾, 猪子英俊⁶⁾

- 1) 神奈川県湘南赤十字血液センター
- 2) 横浜市立大学医学部眼科
- 3) 免疫生物研究所
- 4) 信州大学医学部法医学
- 5) 不二家バイオサイエンス研究所
- 6) 東海大学医学部分子生命科学

【目的】 MHC クラス I 遺伝子領域内に構造がクラス I 遺伝子に類似している新しい遺伝子群 MIC (MHC class I chain related genes) が同定されたが、その機能についてはまだ明らかにされていないのが現状である。我々は、HLA-B 遺伝子のセントロメア側約 155 kb に位置する MIC 遺伝子群の一つである MICB 遺伝子の多型性解析を行い、昨年の当学会で報告した。今回、MICB 遺伝子をコードするタンパクを解析するために MICB 特異的ペプチドに対するモノクローナル抗体の作製を試みたので報告する。

【方法】 SwissProt データベースとのホモロジー解析にて MICB 特異的領域であるアミノ酸配列 52-60, 61-75, 101-112 番目を選択し、その配列のカルボキシル末端側にシステインを付加した。各ペプチドを固相法で合成し、精製後 MBS 法にてキャリアー蛋白質 (KLH) と結合させ免疫原とした。免疫方法は、上記で得られた乳液を Balb/c マウスに 27 G の注射針にて皮下、皮内注射を行い、7 日毎に 4 回免疫を行った。免疫量は、1 回目：20 μg / 匹、2 ~ 4 回目：10 μg / 匹で行い、4 回免疫後、尾静脈より少量採血し、抗体価を測定した。抗体価の測定は抗原 50 ng/well を固相化したイムノプレートを用いた EIA 法によって行った。細胞融合はマウスの脾臓細胞をミエローマ細胞株 X-63 Ag 8 と PEG を用いた常法により融合した。抗体は免疫原、MBS などを固相化した 96 穴プレートを用いた EIA 法によってスクリーニングを行い、免疫原に特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択した。タンパク解析は各細胞株を用いて WB 法で行った。

【結果】 MICB 特異的なアミノ酸配列 101-112 のペプチドを免疫原としたモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを 2 クローン検出し、反応の強い 1 クローンの上清を WB 法で解析した。その結果、43 ~ 45 kd のバンドが検出した。また各細胞株との反応は、NALM-1, Jurkat, HL-60 細胞に対し反応を認めなかつたが、MKN 45 細胞に対しては反応を認めた。現在、他のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの解析中であり、さらにポリクローナル抗体も作製、解析中であるので、これらの結果も加えて報告する予定である。

6

抗原ペプチドで組み換えたインバリアント鎖遺伝子の導入による HLA-DR を介した CD 4⁺T 細胞への抗原提示システムの開発

○藤井慎嗣, 千住 覚, Yu-Zhen Chen, 西村泰治

熊本大・院医・免疫識別

【目的】 HLA クラス II 分子を介した CD 4⁺T 細胞への抗原提示を効率よく行わせるために、エンドソーム系への標的シグナルと組み換えた抗原遺伝子導入の方法がいくつか考えられている。本研究はインバリアント (Ii) 鎖の遺伝子を組み換えることにより、HLA-DR 拘束性 CD 4⁺T 細胞クローニングへ抗原ペプチドを効率良く提示するシステムを作ることとする。

【方法】 CD 4⁺T 細胞クローニングが認識する非自己抗原ペプチドをコードする遺伝子を Ii p 33 の CLIP 領域 (CLIP 置換型)、あるいは C 末端に組み込んだ (C 末端融合型) 発現ベクターをそれぞれ作製した。リポフェクション法により HLA-DR 拘束分子および組み換え Ii 鎖遺伝子を高発現するマウス L 細胞トランスフェクタントを樹立し、その発現を免疫蛍光染色、免疫沈降で確認した。さらに、これらを抗原提示細胞として T 細胞応答を調べた。

【結果・考察】 組み換え Ii 鎖と HLA-DR を発現するトランスフェクタントは、非自己抗原ペプチドの非存在下でも T 細胞を活性化した。この結果は Ii 鎖の遺伝子を組み換えることにより、目的とする非自己抗原ペプチドをエンドソーム系に運び、HLA-DR を介して CD 4⁺T 細胞へ効率よく提示させうることを示すものである。このシステムを応用することにより多様なエピトープを CD 4⁺T 細胞に提示する抗原提示細胞のライブラリーを作製することが可能であり、T 細胞の抗原特異性の解析に有用であると考えられる。

7

新たに見つかった HLA-A 19 (A 30, A 31, A 33) 関連偽遺伝子

○渡辺嘉久¹⁾, 牧原裕子¹⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 田中秀則¹⁾
赤座達也¹⁾, 徳永勝士^{1,2)}, 十字猛夫¹⁾

1)日本赤十字社中央血液センター
2)東京大学医学部人類遺伝学

【目的】これまで HLA クラス I 関連偽遺伝子としては十数種類が報告されている。これらは主に YAC クローンの解析から同定されており、異なる HLA ハプロタイプ間で偽遺伝子の構成に変異がみられるかについてはほとんど報告がない。私たちはこれまで日本人に特徴的なハプロタイプについて、クラス I 領域の遺伝子構成をパルスフィールドゲル電気泳動で解析してきた。その結果、HLA-A 遺伝子の近傍で、HLA-A 30, A 31, A 33 をもつハプロタイプでは A 2, A 11, A 26などをもつものに比べて約 70 kb の挿入を報告している (Watanabe et al., 1997)。今回、HLA-A 19 (A 30, A 31, A 33) グループにのみ存在し、HLA-A とよく似た配列を持ち、かつ挿入された 70 kb の断片上にあると思われる偽遺伝子を見出したので、報告する。

【方法】 健常日本人 (HLA-A 24, A 31; Cw 1, Cw 4; B 56, B 59) の末梢血リンパ球 DNA より HLA-A 特異的プライマーで増幅された断片のうち HLA-A と異なるサイズのものをクローニングし、その塩基配列を決定した。
【結果および考察】 この遺伝子は HLA-A 19 グループ (A 30, A 31, A 33) をもつ個体のみにみられたが、HLA-A 31 をもちろんこの遺伝子をもたない 2 個体 (14 名中) が確認された。この 2 名については HLA-A 19 グループに特徴的な HLA-A 近傍の 70 kb の挿入をもたないことから、この新たに見つかった遺伝子はその挿入された 70 kb の断片上に存在するのではないかと予想された。塩基配列解析の結果、この遺伝子は HLA-A 遺伝子と比べてイントロン 2 の一部、エクソン 3 全部、イントロン 3 のほとんどを含む約 800 bp の欠失がみられ、またエクソン 4 に 2 塩基挿入によるフレームシフトがみされることから、偽遺伝子となっているものと思われる。

8

日本人に初めて検出された B* 78022

○関本達也, 荒閔みき, 田所明子, 森下勝哉
佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實, 関口定美

北海道赤十字血液センター

【目的】 HLA-B 5 関連抗原で Bw 6 に属する B 35 と B 78 のうち、B 78 は日本人には極めて稀な抗原である。今回我々は、日赤共通トレイによる HLA クラス I タイピングから、母親が A 24, A 31, B 51, Bbl, Cwbl, Cwbl (Bw 4 /Bw 6), 児が A 11.1, A 24, B 48, Bbl, Cwbl, Cwbl (Bw 6) とタイプされた Bbl (bl=blank) が、精査の結果日本人初と思われる B* 78022 であることを見いだしたので報告する。

【方法】 血清学的タイピングは日赤共通トレイ (lot# JRT 12) および市販モノクローナル血清トレイ (LM 172.1 lot# 6, One Lambda 社) を、また DNA タイピングは市販 PCR-SSP キット (UNITRAY.lot#PF-SSP-ABC-001-5, PeL-Freez 社) を使用した。また、プライマー B 16 F-E 203 (5'-CATGAGGTATTTCTACACCGCCA) 及び BCT (GCCACTCCACGCACAG-3') により B 78 の exon 2-3 領域を增幅し、direct sequence による解析を行った。

【結果とまとめ】 日赤共通トレイでは blank とされていた HLA-B 抗原が、市販タイピングトレイにより B 78 である可能性が示唆された。PCR-SSP 法による確認検査で 2 名とも B 78 の存在が確認された。B 78 の genotype を検討するため direct sequence による解析を行い、2 名とも exon 2-3 領域の塩基配列は同一であり、exon 2 の 68 と 219 番目の塩基が共に T であることから B* 78022 であると推定された。

B 78 のうち、B* 7801 は西アフリカで高頻度 (15%) に検出されている。また、B* 78021 および B* 78022 は Caucasian の報告例のみで日本人での報告例はない。本例の B 78 を含め、血清学的同定が極めて困難な抗原は blank と判定される可能性がある。そのような判定は特に非血縁者間の移植のためのタイピングでは無視できない問題と考えられる。

9

HLA-B 39 null 遺伝子の解析

○小川篤子¹⁾, 大熊重則²⁾, 平田康司²⁾, 田中秀則¹⁾
柏瀬貢一¹⁾, 石川善英¹⁾, 赤座達也¹⁾, 梶梅輝之³⁾
吉見昭一郎³⁾, 宮原正行²⁾, 喜多嶋康一²⁾
滝口雅文⁴⁾, 十字猛夫¹⁾

1) 日赤中央血液センター

2) 岡山県赤十字血液センター

3) 川崎医大・小児科

4) 熊本大・エイズ研究センター・ウィルス制御

【目的】 急性骨髓性白血病患者およびその家族の HLA タイピングを行ったところ、患者とその父親に、遺伝子タイピングでは B*3901 と判定されるが血清学的には B 39 の検出されない、B 39 null と考えられる遺伝子が見出され、この遺伝子の解析を行った。

【方法】 HLA ハプロタイプ、A 24-Cw 7 -B blank (B*3901)-DRB1*0803-DQB1*0601/A 24-C blank-B 52-DRB1*1502-DQB1*0601 を持つ SMF (患者の父親) の末梢血リンパ球より mRNA、およびゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を鋳型として、翻訳開始コドンより上流 300 塩基～3' 非翻訳領域まで 3.2 kb を B ローカス特異的に PCR 増幅後、クローニングし、B 39 クローンについてその全長の塩基配列を決定した。また、対照として、B*39011 および B*39013 遺伝子の genomic clone についても塩基配列を決定した。

【結果】 SMF の mRNA より合成した cDNA を鋳型として用いた B 52 特異的 PCR では増幅産物がみられたが、B 39 特異的 PCR では増幅産物はほとんど検出されなかつた。SMF の B 39 クローンの塩基配列を B*39011 および B*39013 遺伝子のものと比較したところ、SMF は B*39011 の配列を持っていた。また、翻訳開始コドンより上流 150 塩基の位置に 2 塩基の欠失がみられ、それ以外は全長にわたりインtron 部分を含めて変異は検出されなかつた。

【考察】 SMF の HLA-B 遺伝子は、B 52 は通常レベルで mRNA へと転写、発現されているが、B 39 の転写はほとんどなくその結果 B 39 発現が見られなかつたものと考えられた。この B 39 null 遺伝子の塩基配列解析より、翻訳開始コドンより上流の 2 塩基欠失が転写活性低下の原因であろうと推察されたが、これについてはさらに解析が必要であると考えられた。

10

新たな HLA-B 62 関連抗原について

○伊佐和美、藤井まり恵、柏瀬貢一、田中秀則
赤座達也、中島一格、十字猛夫

日本赤十字社中央血液センター

【目的】 血液センターの HLA 検査業務に、濃厚血小板 HLA 「日赤」 供給に必要な成分献血登録者および骨髄バンク登録者の HLA タイピングがある。今回、成分献血登録者において、日本人で一般的な HLA-B 62 (B*1501) の血清学的反応パターンとは異なった HLA-B 62 関連抗原が見出されたので報告する。

【方法】 HLA-ABC 抗原のタイピングは、HLA タイピング用全国共通トレイ (Lot; JRT 12) を使用し、通常の LCT 法で行った。また、リンパ球の分離にはクラス I 用ビーズ (ダイナル社製) を使用した。HLA-B 15 関連アリルのタイピングは、PCR-SSCP 法で行った。また、B 15 関連アリルの PCR 増幅には、特異的な塩基配列に対するプライマーを使用した。

【結果】 今回、新たに見出された HLA-B 62 関連抗原は、B 62 + B 70 の抗血清 (17-438) に反応を示さず、日本人で一般的な HLA-B 62 (B*1501) の反応パターンとは異なっていた。また、PCR-SSCP 法による B 15 関連アリルのタイピングでは、エクソン 3 において B*1501 とは異なる泳動パターンが見られた。この泳動パターンは、HLA-B 62 関連抗原をコードする他のアリル (B*1505, B*1507) とも異なっていた。

【考察】 これまでに、B*1507 にコードされる HLA-B 62 抗原が B 62 + B 70 の抗血清 (17-438) に反応しないことが確認されており、エクソン 3 にコードされる α 2 ドメイン上のアミノ酸の置換により反応を示さなくなることが推測されていた。新たに見出された HLA-B 62 関連抗原においても、PCR-SSCP 法によりエクソン 3 において変異が確認されており、現在エクソン 2 からエクソン 3 までの塩基配列について解析中である。

11

PCR-MPH 法と PCR-SSCP 法を用いた HLA クラス I タイピングにより新たに見い出されたアリル

○藤井まり恵，柏瀬貢一，牧原裕子，渡辺嘉久
田中秀則，赤座達也，中島一格，十字猛夫

日本赤十字社中央血液センター

【目的】 我々は日常検査において、日本人の HLA-A, B 座で比較的頻度の高い複数のアリルにコードされる HLA-A 2, A 26, B 39, B 61 のアリルレベルの DNA タイピングを行っている。今回、PCR-MPH 法と PCR-SSCP 法を併用したタイピングにより、3 種類の新たなアリルが見い出されたので報告する。

【方法】 HLA-A 2 (1,929 件), A 26 (882 件), B 39 (266 件), B 61 (1,188 件) について、各グループに特異的な増幅 (1st-PCR, エクソン 2, 3 を含む) を行った。その増幅産物から、エクソン 2 とエクソン 3 のそれぞれの増幅 (2nd-PCR) を行った。1st-PCR の増幅産物を用いて、MPH 法によるアリルの判定を行った。2nd-PCR の増幅産物を用いて、SSCP 法により、MPH 法の判定結果に対応する標準 DNA との電気泳動パターンの比較を行った。SSCP 法で、標準 DNA と異なるパターンを示した場合は、ダイレクトシークエンス法による塩基配列の解析を行った。

【結果】 塩基配列の解析を行った結果、3 種類の新たなアリル（仮に A*0201V1, A*0201V2, B*39022V1 とする）が、見い出された。A*0201V1 と A*0201V2 は、ともに MPH 法の判定結果は A*0201 であり、それと比較して一塩基の変異があった。A*0201V1 は、Exon 3 部分に変異 ($G^{447} \rightarrow A$) が見られ、同義置換であった。A*0201V2 は、Exon 2 部分で変異 (Ala²⁴ : GCA → Ser : TCA) があった。B*39022V1 は、B*39022 と比較して Exon 3 部分で一塩基の変異 (Gln¹⁴⁴ : CAG → Arg : CGG) があり、3 例検出されたが、すべて DRB1*1406 と相關していた。

【考察】 今回見い出された 3 種類の新たなアリルは、MPH 法のみでは検出されなかつたが、SSCP 法を併用することによって検出された。クラス I のアリルレベルのタイピングにおいても、クラス II と同様に、MPH 法と SSCP 法を併用してタイピングを行うことは、有効であることが確認された。

12

DR 2 ES と考えられるパネルの DRB 5 アリルの検討

○河賀泰子¹⁾, 山口恵津子¹⁾, 伊藤八重子²⁾
神山治郎³⁾, 伊波政治³⁾, 堤 康英¹⁾, 佐藤博行¹⁾
島袋 剛³⁾, 前田義章¹⁾

1) 福岡県赤十字血液センター
2) 山口県赤十字血液センター
3) 沖縄県赤十字血液センター

【目的】 九州の赤十字血液センター間で行われている Cell exchange において、沖縄県赤十字血液センターから提出されたパネル NO. 66 は DRB1*1502 と判定されたが、血清学によるタイピングでは DR 51 の血清に反応せず、DR 2 ES であると考えられた。近年、DR 2 ES の DRB 5 のアリルは、*0108N として登録されたので、このパネルの DRB 5 のアリルについて検討した。併せてこの家族について HLA タイピングを行い、これらの抗原が子にも受け継がれているかを検討した。

【材料と方法】 NO. 66, DRB1*1501 及び DRB1*1502 と判定されたパネルの DNA を用い DRB 5 のエクソン 2, エクソン 3 について PCR を行い、各領域におけるシークエンスを調べた。NO. 66 の 3 人の子等についても HLA クラス I, クラス II のタイピングをした。また DRB 5 のエクソン 2, 3 領域における各パネルの PCR 産物を用いて、PCR-SSCP 法を行った。

【結果】 シークエンスの結果から NO. 66 の DRB 5 エクソン 2 の塩基配列は DRB5*0102 で他の DRB1*1502 の DRB 5 と同じ結果であった。しかしエクソン 3 では、162 番目のコドンの一部から 168 番目のコドンまでが欠落し、結果として 174 番目がストップコドンになり、これらの結果は DRB5*0108N と一致した。また NO. 66 の DRB1*1502 は 2 人の子に遺伝していた。DRB 5 のエクソン 2, 3 の領域について、NO. 66 と DRB1*1502 と判定された 2 人の子、及び DRB1*1501, DRB1*1502 のパネルを用い、PCR-SSCP 法を実施し、NO. 66 と 2 人の子の DRB 5 はエクソン 2 では DRB5*0102 と同じであるが、エクソン 3 では明らかに異なるパターンを示す事を確認した。

【結論】 DR 51 の抗血清と反応しなかった DRB1*1502 を持つパネル NO. 66 の DRB 5 は *0108N と判定され、PCR-SSCP 法により容易に識別された。又この抗原は 2 人の子供にも遺伝していた。

13

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

1, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb におけるクローニングの整列化

○吉川枝里¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾
 潑嶋伸貞¹⁾, 牧野 悟¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富沢麻衣子¹⁾
 半戸いづみ¹⁾, 山形哲司³⁾, 板倉祥子²⁾, 福住康仁²⁾
 菅原智代²⁾, 渡辺幸治²⁾, 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾
 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾, 木村 穣¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1)東海大・医, 2)不二家バイオ研

3)遺伝研・進化遺伝

【目的】 我々はこれまでに *IkBL* と S 遺伝子間の 452 kb と HSR 1 と *HLA-92/L* 遺伝子間の 312 kb については、YAC クローニングから作成したコスミドライブラリーを用いてコンティグマップを作成した。しかし、S 遺伝子と HSR 1 間を含む YAC クローニングには、欠失やキメラなどの組換えを起こしたものが多く、これらをシークエンシング解析の材料に用いるには適していない。そこで、我々は BAC (Bacteria Artificial Chromosome) や PAC (P1 Artificial Chromosome) システムを用いて、S と HSR 1 遺伝子間のコンティグマップを作成することを目的とした。本実験では、この領域をカバーする 20 個の BAC/PAC クローニングの特徴付けを行ったので、これについて報告する。

【方法】 BAC ライブラリーには、Research Genetics 社のものを、また、PAC ライブラリーには、de Jong から譲渡されたものをそれぞれ用い、PCR 法により、スクリーニングを行った。STS マーカーには、S 遺伝子、188 A4, HSR 1 遺伝子および 15 個の新たに設計したプライマーを用いた。その後、FISH 解析、制限酵素断片長の比較およびサザンプロット解析により BAC および PAC クローニングの特徴付けを行った。

【結果および考察】 スクリーニングの結果、7 個の BAC と 13 個の PAC の合計 20 クローニングが得られた。これらの内、数クローニングの FISH 解析を行った結果、全てクローニングとも 6 p 21.3 に位置していること、また、20 クローニング間における制限酵素断片長の比較やサザンプロット解析より、かなり重複した領域が存在したことから、S 遺伝子と HSR 1 遺伝子間を複数のクローニングでカバーするコンティグマップを完成することができた。この結果、HLA-C 遺伝子から HLA-E 遺伝子間は 780 kb であった。また、S 遺伝子と HSR 1 遺伝子間のシークエンシングの材料には、53L9, 832F2, 876L4, 321E19 および 280I14 の 5 クローニングが適しているものと考えられた。

14

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

2, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb におけるシークエンシング効率

○富沢麻衣子¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾
 潟嶋伸貞¹⁾, 牧野 悟¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾
 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤 香¹⁾, 山形哲司³⁾
 板倉祥子²⁾, 福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾, 渡辺幸治²⁾
 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾
 木村 穣¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1)東海大・医, 2)不二家バイオ研

3)遺伝研・進化遺伝

【目的】 我々は、コスミド、BAC および PAC クローニングから、ショットガン法により調製したショットガンクローニング（プラスミド）の塩基配列をシークエンサー 373S および 377 PRISM (ABI 社) を用いて決定している。本学会、前回大会においてもシークエンシング効率について報告したが、その後、PCR 自動反応ロボットおよび Big Dye primer 法の導入、シークエンサーの増設並びに 64 レーン化など、よりシークエンシングの高精度化および高速化を目指した。

本報告では、従来用いていた Dye primer 法と Big Dye primer 法との比較、マニュアル（手作業による反応チューブの作製）によるシークエンシング反応と PCR 自動反応ロボットによる反応との比較について、それぞれの平均した解読塩基数、1 シークエンスあたりの解読不能な塩基数、アセンブリの結果から得られたシークエンステータの信頼性について述べる。

【結果および考察】 まず、マニュアルのシークエンシング反応による Dye primer 法と Big Dye primer 法との比較を行った結果、Dye primer 法を用いた場合の平均解読塩基数は 536.1 bp で、1 シークエンスあたりの解読不能な塩基数は 3.4 bp であった。これに対して、Big Dye primer 法を用いた場合はそれぞれ 632.5 bp と 1 bp であり、Big Dye primer 法を用いたシークエンシング法は従来の方法と比較して平均解読塩基数が約 100 bp 伸び、且つ解読不能な塩基数も 1/3 に減少した。さらに、この Big Dye primer 法を用いたシークエンシング反応を PCR 自動反応ロボットにより調製した場合、解読不能な塩基数は 1 塩基と変わらなかったが、平均解読塩基数は 686.1 bp とマニュアルの場合よりもさらに 50 bp 長く読み取ることが可能であった。従って、120 kb の塩基配列を決定する場合、アセンブリに必要なシークエンスすべきショットガンシークエンスは 1567 本から 1224 本に減らすことが出来た。

15

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

3, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb における遺伝子解析

○椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 岡 晃¹⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾
 牧野 悟¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富沢麻衣子¹⁾
 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤 香¹⁾, 山形哲司³⁾
 板倉祥子²⁾, 福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾, 渡辺幸治²⁾
 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾
 木村 穎¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1)東海大・医, 2)不二家バイオ研

3)遺伝研・進化遺伝

【目的】 我々は尋常性乾癬やペーチェット病などの疾患感受性遺伝子の同定をひとつの目的として、HLA 領域のシークエンシング解析を進め、HLA クラス I 領域についても大規模の塩基配列を決定しつつある。本研究では、まず、TNFB 遺伝子のテロメア側に位置する *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間の 1311 kb について、その塩基配列を決定し、既知の遺伝子とのホモロジー検索を行った。

【方法】 YAC クローンより作成したコスミドクローン、PAC および BAC クローンを用いてコンティグマップを作成した。シークエンシングテンプレートには、ショットガン法により得られたランダムクローンを用い、373 S および 377 PRISM (ABI 社) を用いて、塩基配列を決定した。その後、GRAIL, HEXON program を用いて、遺伝子を予測した。また、反復配列を除いた領域について BLAST program を用いて、既知遺伝子とのホモロジー解析を行った。

【結果および考察】 *IkBL* から *HLA-92/L* 遺伝子までを含む 26 個のコスミドクローン、2 つずつの PAC および BAC クローンの塩基配列を決定した結果、その塩基数は 1,311,702 bp であった。この領域におけるホモロジー解析を行ったところ、17 個の既知遺伝子、4 個の新規遺伝子、8 個の偽遺伝子の合計 29 個の遺伝子と、5 箇所の発現可能な領域が見い出された。これらの遺伝子や領域のうち、HLA-E のセントロメア側 100 kb には、TNFa により刺激される ABC 蛋白質をコードする ASAP 遺伝子がマップされた。また、HLA-C のテロメア側 250 kb には、癌抑制因子である p53 により発現調節される receptor tyrosine kinase (DDR) 遺伝子や同じく p53 と関連し、DNA 修復因子を担う TFIIH 遺伝子が互いに近傍に位置していた。これらの遺伝子は HLA クラス I 遺伝子と相関する何らかの癌と関連する可能性が考えられた。

16

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

4, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb における EST 解析

○岡 晃¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 田宮 元¹⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾
 牧野 悟¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 岩田京子¹⁾, 富沢麻衣子¹⁾
 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾, 後藤 香¹⁾, 山形哲司³⁾
 板倉祥子²⁾, 福住康仁²⁾, 菅原智代²⁾, 渡辺幸治²⁾
 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾
 木村 穎¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1)東海大・医, 2)不二家バイオ研

3)遺伝研・進化遺伝

【目的】 現在までに我々は HLA クラス I 領域 1.3 Mb (*IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間) について塩基配列を決定した。この領域には尋常性乾癬やペーチェット病などと相関のある HLA クラス I 遺伝子が存在する。そこで新規の疾患感受性遺伝子の候補となり得るセグメントを検出する目的で、EST (expressed sequence tag) 等を利用し種々の解析を行った。

【方法】 ショットガン法により得られたランダムクローンを用い、373 S および 377 PRISM (ABI 社) を用いて、塩基配列を決定した。その後、この塩基配列を RepeatMasker により反復配列を、また既知遺伝子の配列をアセンブリソフト (GENETYX-Σ/SQ) にてマスクし、BLASTN にて dbEST (GenBank release 105) に対して類似性検索を行った。また、GRAIL 等を用い蛋白質コード領域を予測した。さらに、検出された EST の cDNA clone により Northern および Southern 解析を行った。

【結果および考察】 寻常性乾癬は HLA-Cw 6, Cw 7 と相関があることが知られているが、この HLA-C を含む 300 kb において、15 個のセグメントで 95 %以上の類似性がある EST がヒットした。またこの領域内において GRAIL により予測されたコード領域は 101 箇所であった。さらに、HLA-C の 19,955 bp テロメア側にヒットした EST cDNA クローンは Northern 解析により、心臓および筋肉において発現している遺伝子であることが明かとなり、また、Southern 解析により単一な遺伝子であることが確認された。今後は他の EST cDNA clone についても同様な解析を行うと共に、塩基配列を決定したことにより検出されたマイクロサテライトの遺伝的多型性を検索して、尋常性乾癬の原因遺伝子の絞り込みと同定をめざしていく予定である。

17

HLA クラス I 領域におけるシークエンシング解析

5, *IkBL* 遺伝子から *HLA-92/L* 遺伝子間 1.3 Mb におけるマイクロサテライトの分布と多型性

○田宮 元¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 岡 晃¹⁾, 太田正穂⁴⁾
 勝山善彦⁴⁾, 瀧嶋伸貞¹⁾, 牧野 悟¹⁾, 吉川枝里¹⁾
 岩田京子¹⁾, 富沢麻衣子¹⁾, 半戸いづみ¹⁾, 水木信久¹⁾
 後藤 香¹⁾, 山形哲司³⁾, 板倉祥子²⁾, 福住康仁²⁾
 菅原智代²⁾, 渡辺幸治²⁾, 小野綾子²⁾, 山崎正明²⁾
 田代弘行²⁾, 池村淑道³⁾, 木村 穣¹⁾, 猪子英俊¹⁾

1)東海大・医, 2)不二家バイオ研
 3)遺伝研・進化遺伝, 4)信州大・医

【目的】 HLA 領域は、これまで HLA 遺伝子の多型性をもとに多くの疾患との相関や組み換えホットスポットの存在が示唆されてきたという興味深い領域である。我々が行ってきた 1.3 メガベースに及ぶ HLA 領域のゲノム塩基配列決定によって、多くの新規遺伝子の候補や組み換えを制御し得る配列が同定されているが、配列情報だからこれらを直ちに各種疾患や組み換えホットスポット等の形質と結び付けることは難しい。一方、決定された塩基配列中には、遺伝的多型性を示し得る多くの繰り返し配列が同定されている。本研究では、このうち多型性を検出しやすいマイクロサテライト繰り返し配列に注目した。まずマイクロサテライト繰り返し配列の検出と分類を行い、次にそれらの繰り返し配列のうち多型性を期待できるものに関して多型性の検出を行ったのでそれを報告する。

【結果および考察】 *Sputnik* プログラムを用いて検索した結果、125 個の 2 塩基繰り返し、104 個の 3 塩基繰り返し、198 個の 4 塩基繰り返し、111 個の 5 塩基繰り返しの計 533 個を見いただした。これらのうち、多型性を示すことが期待できる繰り返し数をもつもののうち 27 個の 2 塩基繰り返し、9 個の 3 塩基繰り返し、18 個の 4 塩基繰り返し、1 個の 5 塩基繰り返しに対して蛍光プライマーを作製し（計 54 個）、60 系統の HLA ホモ接合 B 細胞株と 60 人の健常日本人集団中で多型検出を行った。その結果、12 個の 2 塩基繰り返し、4 個の 3 塩基繰り返し、8 個の 4 塩基繰り返し、1 個の 5 塩基繰り返しの計 27 個（50%）が多型を示した。これらの 27 個のうち、すでに知られていた 1 個の 2 塩基繰り返しを除いて、26 個を今回新規に多型性マイクロサテライトマーカーとして設定することに成功した。これらのマーカーは平均で 0.8 前後のヘテロ接合性を示し、平均の対立遺伝子数が 9.6 個と計算された。平均解像度は 51 キロベースにひとつのマーカー遺伝子座と計算された。

18

HLA 領域と相同性を示す第 1 染色体 1q 22-23 領域の遺伝子構造解析-CD 1 遺伝子群周辺の構造解析-

○安藤麻子¹⁾, 重成敦子¹⁾, 数藤由美子²⁾, 河田寿子¹⁾
 椎名 隆¹⁾, 添田栄一³⁾, 菅谷公彦⁴⁾, 徳永勝士⁵⁾
 奥村克純⁶⁾, 池村淑道⁷⁾, 猪子英俊¹⁾

1)東海大・医・分子生命科学
 2)日赤中央血液セ・研究部, 3)理研・筑波セ
 4)放医研・ゲノム, 5)東大・人類遺伝
 6)三重大・生物資源, 7)遺伝研・進化遺伝

【目的】 我々は、HLA 領域の大量シークエンシングと構造解析を進めていく過程で同定した遺伝子のなかで、PBX 2, RXRB, TAP, LMP, HSP 70 など少なくとも 15 個の遺伝子と相同性を有する各遺伝子をヒト第 1 染色体 1q 21-25, 第 9 染色体 9q 33-34, 第 19 染色体 19p 13.3 の各領域にみいだした。HLA 領域と相同性を有するこれら 3 領域のゲノム構造を HLA 領域と比較、解析することによって MHC の起源と進化の過程を解明することを目的として、今回は非古典的 MHC 遺伝子である CD 1 遺伝子が存在する 1q 22-23 領域について YAC と PAC クローンによる構造解析を行った。

【方法】 第 1 染色体 1q 22-23 領域にマップされると考えられる遺伝子と STS プライマーを用いた PCR によって CEPH MEGA YAC と RPCI PAC のライブラリーをスクリーニングし、ザザンハイブリダイゼーション、PAC クローンの末端シークエンス、クロマチンファイバー 標本などを用いた FISH 法により、この領域のコンティグを作成した。

【結果】 5 個の CD 1 遺伝子を含む 1.4 Mb の領域の YAC と PAC コンティグを作成した。PAC クローンの末端シークエンスと PCR 解析からこのコンティグには、セントロメア側から CD 1 D-CD 1 A-CD 1 C-CD 1 B-CD 1 E-SPTA 1 -FY-IFI-16 -FCERIA の順序に 9 遺伝子が位置することが明らかになった。さらにこのコンティグは、PAC クローンを用いた Fiber-FISH 法によっても確認された。また、FCERIA 遺伝子のテロメア側の領域を含むと考えられる YAC クローンを用いた PCR 解析から、セントロメア側から FCERIA- (CRP-CRPP 1 -SAP) -PBX 1 -ALDH 9 -RXRG-POU 2 F 1 -CD 3 Z-ATAC-FV-FMO 1 -FASL の順序で遺伝子が位置していた。

【考察】 以上の解析から、1q 22-23 領域には CD 1 遺伝子のほか、赤血球抗原 Duffy 型をコードする FY が含まれることや、IFI-16 (インターフェロン γ 誘導性蛋白質)、FCERIA (IgE 高親和性 Fc レセプター)、CD 3Z (T 細胞レセプター ζ/η) などの免疫反応に重要な遺伝子が数多く存在することが明らかになった。

19

HLA クラス I 領域内マイクロサテライト
を用いたベーチェット病患者の多型解析

○勝山善彦¹⁾, 太田正穂²⁾, 水木信久³⁾, 安藤 等⁴⁾
田宮 元⁵⁾, 岡 晃⁵⁾, 椎名 隆⁵⁾, 猪子英俊⁵⁾

1)信州大学病院薬剤部

2)信州大学医学部法医学教室

3)横浜市立大学医学部眼科学教室

4)神奈川県湘南赤十字血液センター

5)東海大学医学部分子生命科学

20

無精子症患者のマイクロサテライト多型解
析

○太田正穂¹⁾, 佐田正晴²⁾, 勝山善彦³⁾, 式田有里²⁾
辻 隆之²⁾, 高原史郎⁴⁾, 辻村 晃⁴⁾, 三浦秀信⁴⁾
土岐清秀⁴⁾, 奥山明彦⁴⁾, 田宮 元⁵⁾, 椎名 隆⁵⁾
猪子英俊⁵⁾

1)信州大学医学部法医学教室

2)国立循環器病センター研究所

3)信州大学病院薬剤部

4)大阪大学医学部泌尿器科

5)東海大学医学部分子生命科学

【目的】 HLA クラス I 遺伝子領域の約 1300 Kb 内に新たに見つけたマイクロサテライトを用いてベーチェット病患者の多型解析を行い疾患感受性遺伝子の局在を検索する。

【方法】 日本人のベーチェット患者 74 人と健常人 132 人から得た DNA について、HLA-B ローカスから異なる距離を示す 8 種類のマイクロサテライトで多型解析を行った。

【結果】 クラス I 領域内で新たに見つけた 26 種類のマイクロサテライトのうち 23 種類は、Hardy-Weinberg の exact test で日本人集団において有効なマイクロサテライト多型を示すことが確認された。このうち、HLA-B ローカスから異なる距離を示す 8 種類 (C1-2-A, MICA (GCT)n, MIB, C1-4-1, C1-2-5, C1-3-1, C2-4-4, C3-2-11) のマイクロサテライトを用いてベーチェット病との相関を調べたところ、各ローカスにおいて幾つかの強い相関を示すアリルが認められた。さらに患者群とコントロール群において各ローカスにおけるアリル分布を Markov Chain 法を用いて Hardy-Weinberg の exact test を行ったところ、コントロール群ではすべて正常であったが、患者群では C1-2-A, MICA, MIB, C1-4-1 ローカスで有意差が認められた。また、各ローカスのアリルについて患者群とコントロール群でその頻度の比較を Markov Chain 法を用いて比較したところ、MICA, MIB, C1-4-1, C1-2-5 で有意な違いが認められた。

【総括】 ベーチェット病発症に関わる原因遺伝子は、HLA-B ローカスを挟んだ約 47 Kb のなかに存在することが示唆された。

【目的】 第 6 回組織適合性学会で共同演者である佐田は、HLA 抗原と無精子症患者における疾患感受性について HLA-A 33, -B 44, -DR 13 と強い相関があることを報告した。今回、我々は最近 HLA クラス I 遺伝子領域内に新たに見つけたマイクロサテライトを用いて無精子症患者の多型解析を行い疾患感受性について検討した。

【方法】 大阪大学病院を受診した無精子症患者（精子輸送経路通過傷害および高度乏精子症患者を除外した）64 人から得た DNA を対象として用いた。またコントロールには血縁関係のない健常人 132 人から得た DNA を用いた。検査に用いたマイクロサテライトは HLA-B, -C, -E 遺伝子を含む 1200 Kb のなかに見つかった 8 種類を用いた。各ローカスのプライマー対の一方に蛍光色素 6-FAM, HEX, TET のいずれかを標識し、PCRを行った。その産物を 8 M 尿素を含んだ 5 % 变成ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動 (ABI 377 automated DNA sequencer) を行い、アリル解析は Genescan 672 Software (ABI) を用いて行った。

【結果】 HLA-B ローカスから異なる距離を示す 8 種類 (C1-2-A: 147 Kb, MICA (GCT)n: 46 Kb, MIB: 24 Kb, C1-4-1: 6 Kb セントロメア側, C1-2-5: 62 Kb, C1-3-1: 111 Kb, C2-4-4: 282 Kb, C3-2-11: 767 Kb セントロメア側) のマイクロサテライトを用いて無精子症患者との相関を調べたところ、B 遺伝子座に最も近い C1-4-1 ローカスの allele 217 と 225 に有意な相関があり、それ以外のローカスでは有意な相関は見られなかった。現在更にクラス II 遺伝子領域内のマイクロサテライトを用いた疾患との相関解析を行い、疾患感受性について検討している。

21

脊椎後縦靭帯骨化症に関する MHC 遺伝子群 (MICA gene) の解析

○屋敷伸治, 李 洪川, 桑山昌洋, 園田俊郎

鹿児島大学医学部ウイルス学

【目的】 脊椎後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine, 以下 OPLL) は家族内発症が高率であることより遺伝的要因が関連していることが示唆されていた。我々は HLA ハプロタイプによる OPLL 患者家系分析で、特異な HLA ハプロタイプの遺伝系統が OPLL 家系に好発することを明らかにし、さらに HLA class II 領域の collagen 11a2 遺伝子の特定の多型が OPLL 患者に多発していること、HLA class II 領域では OPLL 患者に特異な HLA-B 遺伝子群が分布していることを明らかにしてきた。本研究では、OPLL 患者の HLA-B 遺伝子に連鎖する MICA 遺伝子の多型を分析し、OPLL 発症遺伝子との関連性を検討したので報告する。

【方法】 OPLL 患者 40 例と健常成人 50 例のリンパ球から DNA を抽出し、MICA 遺伝子（第 5 エクソン領域）の塩基配列を Mizuki らの方法に従って特異的に PCR 増幅した。MICA 遺伝子の多型は Automated DNA Sequencer (SQ 5500, HITACHI) で塩基配列を決定し解析した。

【結果】 OPLL 患者と健常人の MICA 遺伝子（第 5 エクソン）の多型には、完全型遺伝子 (A 9) と欠損型遺伝子 (A 4, A 5, A 5.1, A 6) が同定された。OPLL 患者では A 9 の頻度が健常人に比し有意に減少していた ($P < 0.008$)。A 4, A 5, A 5.1, A 6 の頻度では両者で有意差はみられなかった。HLA-B 遺伝子との連鎖をみると、A 9 は B 35, B 67, A 4 は B 54, A 5 は B 46, B 61, B 62, A 5.1 は B 7, B 60, A 6 は B 44, B 51, B 52 に強い連鎖不均衡がみられたが、OPLL 患者に特異な HLA-B 遺伝子群との相関は認めなかった。

【考察】 以上のことより、HLA-B 遺伝子に連鎖した OPLL 感受性遺伝子の他に、MICA-A 9 遺伝子に連鎖した OPLL 抵抗性遺伝子の存在が示唆され、OPLL の成因にかかる発症遺伝子と抵抗遺伝子が第 6 染色体上の HLA-B 遺伝子の近傍に存在している可能性が明らかになった。

22

高安動脈炎における TNFA 遺伝子プロモーター多型

○木村彰方¹⁾, 関 直子²⁾, 樋口貴文²⁾, 伊藤恭悟²⁾
沼野藤夫³⁾

1) 東京医歯大・難研・成人疾患・分子病態

2) 久留米大・医・免疫

3) 東京医歯大・医・三内

【目的】 高安動脈炎は原因不明の大動脈の炎症とそれに伴う動脈内腔の狹少化ないし閉塞を来す疾患である。我々は本症と HLA (B 52, B 39.2, DRB1*1502 など) との正の相関を報告しているが、本症への感受性遺伝子は HLA クラス II 領域ではなく、クラス I 領域 (HLA-B ないし MICA 近傍) にあると推定される。最近我々はクラス III 領域に存在する TNFA 遺伝子のプロモーター領域を解析し、そこに多型とプロモーター活性の相違が存在することを見出した。そこで高安動脈炎感受性遺伝子マッピングの一環として、本症患者における TNFA 遺伝子プロモーター多型を解析した。

【対象と方法】 日本人高安動脈炎患者 81 名及び健常日本人 575 名を対象とし、TNFA プロモーター多型を PCR-SSOP 法で検討した。なお、プロモーターの多型は -1038 (T vs C), -863 (C vs A), -857 (C vs T), -308 (G vs A), -238 (G vs A) の 5ヶ所に存在する。

【結果と考察】 高安動脈炎病患者では -857 T の頻度がコントロールに比して低かった (13.6 % vs 32.3 %, RR = 0.3, $p < 0.001$) が、その他の多型頻度には有意差がなかった。なお、-857 T は B 54, B 35, B 59, B 56, DRB1*0405 と連鎖不均衡を示す。一方、プロモーター多型を基に類推した TNFA 対立遺伝子の頻度では、基本型である A アリルの頻度が患者群に高かった (75.3 % vs 64.5 %, RR = 1.7, $p < 0.01$) が、これは A アリルと HLA-B 52, DRB1*1502 との連鎖不均衡を反映したものと考えられた。これに対して、-857 T を有する D アリルの頻度は患者群で低値 (6.8 % vs 17.7 %, RR = 0.3, $p < 0.001$) を示した。以上の結果は本症への感受性遺伝子がクラス III 領域にはないことを支持するが、患者群には B 54 や DRB1*0405 の有意の頻度低下は認められないため、TNFA 多型は本症への抵抗性をコントロールする可能性がある。

23

Buerger 病における HLA-DRB1 タイピング

○高橋めぐみ¹⁾, 大淵信久^{1,2)}, 小林 靖²⁾

沼野藤夫²⁾, 大内 博³⁾, 市来正隆³⁾

木村彰方¹⁾

1) 東京医歯大・難研・成人疾患・分子病態

2) 東京医歯大・医・3内

3) JR仙台病院

24

アジア型多発性硬化症への疾患感受性と HLA-DPB1*0501 との相関

○西村泰治¹⁾, 伊藤裕志¹⁾, 金井隆幸¹⁾, 吉良潤一²⁾

1) 熊本大・院医・免疫識別

2) 九大・医・神経内科

【目的】 Buerger は四肢の閉塞性血管炎を来す原因不明の疾患であるが、本症は我国に比較的多く、欧米では稀とされている。血清学的タイピングにより本症と HLA-B 54 及び DR 2 との相関が以前に報告されていたが、少人数の患者を対象とした DNA タイピングを用いた解析で最近 DRB1*0405 との相関が報告され、血清学的タイピングによる報告との不一致が認められる。そこで本症と HLA-DR との相関を明確にすることを目的として、多人数患者を対象とした HLA-DRB1 タイピングを行った。

【対象と方法】 日本人 Buerger 病患者 67 名を対象として PCR-rSSOP 法及び PCR-SSCP 法により DRB1 遺伝子タイピングを行い、健常日本人集団 (n=526) を対照として相関を検討した。

【結果と考察】 本症と HLA-DRB1*1501 (32.8% vs 13.9%, RR=3.0, p<0.0001), *1602 (4.5% vs 0.95%, RR=4.9, p<0.02), *0405 (37.3% vs 24.7%, RR=1.8, p<0.03) との相関を認めこれまでの報告と一致した。さらに、これらの DRB1 対立遺伝子のいずれか 2 者を有する者は、いずれの場合とも、それぞれを単独に有する者より高い発症危険率を示した。例えば、DRB1*1501 単独 (OR=3.4, p<0.001) あるいは*0405 単独 (OR=2.1, p<0.02) を有する場合より、両者を有する場合は高い odds 比 (OR=6.4, p<0.0001) を示す。このことから、本症の感受性遺伝子は上記 3 種の DRB1 遺伝子と連鎖不平衡にあり、それぞれが互いに協調作用を有すると考えられた。今後、症例を増やすと共に、class I 領域を含めたより詳細な検討を加えることで、HLA 領域内の Buerger 病感受性遺伝子(群) のマッピングを行う予定である。

【目的】 欧米白人では多発性硬化症 (MS) と HLA-DRB1*1501-DQ6 (DQA1*0102-DQB1*0602) との相関が報告されている。すでに我々は、日本人の MS を脳内に多発性に硬膜炎を認める西洋型と脳内病変が少なく視神経や脊髄に病変を認めるアジア型に臨床分類すると、西洋型 MS は白人と同様に DRB1*1501 と相関を示すが、アジア型 MS は示さないことを明らかにした。今回はさらに症例数を増やして HLA-DRB1 対立遺伝子との相関を検討するとともに、両型の MS への疾患感受性と相関を示す HLA-DP 対立遺伝子の存在の有無を検討した。

【方法】 日本人の MS 患者 (アジア型 46 名、西洋型 46 名) および健常対照群について PCR-SSOP 法で DRB1, DPA1 および DPB1 のタイピングを行い各対立遺伝子の抗原頻度を比較検討した。

【結果・考察】 西洋型 MS 患者群では症例数を増やしても DRB1*1501 の抗原頻度が有意に高かった (患者群 (n=46) vs 健常群 (n=113)=37.0% vs 14.2%, P<0.05) が、アジア型 MS では相関は認められなかった。いっぽう、アジア型 MS 患者群では DPB1*0501 の抗原頻度が有意に高かった (患者群 (n=46) vs 健常群 (n=92)=89.1% vs 63.0%, P<0.05) が、西洋型 MS では相関は認められなかった。DPB1*0501 がアジア型 MS への感受性と相関を示すことが示され、2 つの MS 病型の免疫遺伝学的背景が異なることがより明確となった。

25

血友病患者における HIV 感染長期未発症者 の免疫応答遺伝子, HLA クラス I, II ハプロタイプの探索

○吉田孝人¹⁾, 小林 明²⁾, 三間屋純一³⁾
Nicolette Takashige⁴⁾, 成瀬妙子⁴⁾, 猪子英俊⁴⁾

- 1)昭和大・医・細菌
2)中外診断科学(株)
3)静岡県こども病院血液腫瘍科
4)東海大・医・分子生命科学

【目的】 HIV 感染血友病患者の HLA を検索し、長期未発症者 (LTNP) の免疫応答遺伝子を明らかにする。

【方法】 SSOP 法, PCR-HPA (hybridization protection assay) で、患者の HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1 allele typing を実施した。更に SSP 法を用い HLA - A, - B, - C allele typing を行った。

【結果】 1. 全く同じ条件で治療した兄弟例 4 組についての HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1 allele typing の結果明らかに AIDS death と LTNP の兄弟患者間に allele の違いが見い出された。

2. 1 の結果を得たので無作為に HIV 感染血友病患者を選び出し、DRB1-DQB1 haplotype を検索したところ 1) AIDS 6 例 (含 ARC 3 例), LTNP 49 例と ACCD 4+500 > 15 例の三者間には全く同じものはなかった。2) 1501-0602 haplotype は LTNP で 49 例中 12 例 (25%), ACCD 4+500 > で 15 例中 2 例 (13%) であり、AIDS 6 例中には見いだせなかった。3) 1502-0601 haplotype は LTNP で 49 例中 8 例 (16%), ACCD 4500 > で 15 例中 1 例 (7%) であり、AIDS 6 例中にも同様に見いだせなかった。

現在、HLA クラス I アリルの検索を実施しているので、これらの結果と合わせて haplotype の探索を行う。

【考察】 既に感染を受けて 10 年から 12 年経過している LTNP 患者が AIDS に転換していくのか、ACCD 4+500 > 患者のみが AIDS に転換していくのか、今後の病態と HLA の関係を追跡することは意義あることと考えられた。更に HLA 遺伝子に連鎖した未発症に関係した遺伝子の探索に役立つものと考えられた。また、これらの基礎データは HIV vaccine をデザインする上で有用になるものと考えられる。

26

リウマチ性疾患患者における CTLA-4 および SHP-1 の多型解析

○松下正毅^{1, 2)}, 土屋尚之¹⁾, 塩田倫子¹⁾
岡 孝紀²⁾, 山根明男²⁾, 徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室
2) 淳永製薬株式会社バイオ研究所診断技術研究室

【目的】 リウマチ性疾患は多くの遺伝要因が発症に関与していると考えられるが、HLA 以外の感受性遺伝子はまだ明らかにされていない。活性化リンパ球において負の制御を担う分子は自己免疫疾患感受性候補遺伝子のひとつと考えられる。今回、我々は慢性関節リウマチ (RA) および全身性エリテマトーデス (SLE) において CTLA-4, SHP-1 が疾患感受性遺伝子である可能性を検討した。

【方法】 日本人 RA, SLE 患者、および健常対照群を用いて CTLA-4 および SHP-1 の多型解析を行い、疾患との関連について解析を行った。また、多量検体を用いた多型解析を行う方法としての PCR-PHFA 法の可能性についても検討を行った。

【結果】 SHP-1 については RA および SLE を含む 96 例を用いて解析を行ったが翻訳領域には多型は見出されなかっただ。すでに多型が確認されている CTLA-4 exon 1 において健常対照群 150 例と比較して RA 患者 46 例で 49 G/G genotype の増加が認められたが統計学的有意差には至らなかった (37% vs. 43%)。また、SLE 患者ではこのような傾向は見られなかった (37% vs. 40%)。RA 患者において DRB1*0405 を持つ場合と持たない場合とで健常対照群と比較したところ、DRB1*0405 陽性者において 49 G allele 陽性率の有意な増加が確認された (71% vs. 87%, p = 0.014, odds ratio = 2.77)。

【結論】 今回の結果から、1) PCR-PHFA 法は多量検体の多型解析を行う方法として応用可能である、2) ヒトの SHP-1 遺伝子は高度に保存されており多型が存在しない、3) 日本人の DRB1*0405 陽性者において CTLA-4 の多型が RA と関連する可能性が考えられることが示唆された。

27

抗主要組織適合抗原（MHC）モノクローナル抗体を用いた実験的膜性腎症の治療

○長谷川善之，田中智一郎，兼岡秀俊，吉武圭輔
野田律矢，松前知治，小河原悟，村田敏晃
内藤説也

福岡大学病院腎センター

【目的】ヒト特発性膜性腎症と主要組織適合抗原（HLA）アロタイプには相関が認められる。ヒト膜性腎症の動物モデルである、ラット Heymann 腎炎（HN）に抗 MHC モノクローナル抗体を投与し治験性の有無をみることを目的とした。

【方法】ルイスラットに、HN 抗原 FX1A を投与して能動型 HN を誘導した。モノクローナル抗体非投与群（I 群）、低用量（ $100 \mu\text{g}$ ）投与群（II 群）、高用量（ $1000 \mu\text{g}$ ）投与群（III 群）、FX1A 非投与群（IV 群）に分け、FX1A 免疫の前日、当日、翌日、1 週間後、2 週間後、3 週間後、及び 4 週間後の追加免疫の前日、当日、翌日にモノクローナル抗体を腹腔内に投与し、それぞれの一日尿タンパク、抗 FX1A 自己抗体腎組織を比較検討した。

【結果】6 週間後の一一日尿タンパクは、III 群は I 群、II 群と比較し有意な低下を認めた ($P = 0.0087$)。また II 群は I 群と比較し統計学的には有意ではないが ($P = 0.1076$)、軽度の低下を示し、その効果は用量依存的であった。また抗 FX1A 自己抗体の産生量も用量依存的に抑制された。I 群、II 群間の基底膜への IgG の沈着は差は無いが、III 群は I 群、II 群と比較し IgG の沈着は軽度であり、更に C3 の沈着は他群に比べ III 群では著明に減少した。

【考察】MHC と抗原ペプチドの複合体及び T 細胞受容体が T 細胞を活性化するが、これをブロックする抗 MHC クラス II モノクローナル抗体は Heymann 腎炎の発症とその進展を抑制すると思われる。

28

死体腎移植 HLA 検査に適した DNA typing 法の選択

金 信子，高橋孝喜

虎の門病院輸血部

【目的】第四回の本学会に於いて、死体腎移植時のレシピエント選択に際し、HLA 適合性をより重視すべきである点を強調した。昨年の本学会では、死体腎移植オンコール時の検査に適した PCR-MPH 法の改良について報告した。今回、登録者の DNA typing および、オンコール時の DNA typing 法について、検討したので報告する。

【方法】移植希望患者の登録時の検査とオンコール時のドナー検査は、時間的条件が異なる。前者は、結果判定まで時間的余裕があり、再検査も可能だが、後者は、短時間で確実な結果判定を要する。いづれの検査も骨髄バンクの DNA typing 検査として既に実績のある PCR-MPH 法を採用したが、後者は、通常の DRB1 low, high resolution level および DQB1 low resolution level の一部を one step で同時に判定する方法を行なった。抽出 DNA を biotin 標識 primer を用いて増幅し、probe を固定した micro-titerplate 上で hybridization させ、peroxidase-avidin 酵素液と incubation した後、基質の発色を吸光度計で検出する。反応パターン表を参照し、判定する。

【結果】登録者の検査は一日に数十件可能であり、オンコール時の検査は DNA 抽出後約 4 時間で確実に判定できた。

【考察】死体腎移植関連の DNA typing 法を選択する際、確認すべき第一点は、登録時の HLA 検査とオンコール時の検査に於ける時間的制約の相違である。第二に、臨床的ニーズを踏まえて typing level を決定する点である。腎移植の生着・予後を左右すると現在確認されている血清学的レベルの適合を追求することが現実的で、より fine な検査など研究的な側面の強い検査は、移植例について retrospective に行なうことが妥当と考えている。

29

HLA 遺伝子型適合度と長期の腎移植予後との関連について

—HLA-C 遺伝子型適合度と腎移植予後—

○橋本光男¹⁾, 兼重俊彦²⁾, 木下朋子¹⁾, 山崎美保¹⁾福西孝信¹⁾

1) 兵庫県立西宮病院・腎移植センター

2) シオノギ製薬・診断医学事業部

【目的】 腎移植の成績を向上させる要因の一つに組織適合性検査があげられる。我々はクラス II 抗原について、血清学的方法で検出される HLA-DR 抗原適合度よりも遺伝子レベルでの HLA-DRB1 遺伝子型の適合度が移植成績に関与していることを報告してきた¹⁾。今回、クラス I 分子の遺伝子型の適合度についても移植予後に影響を与えるか否かを検討する目的で、血清学的にブランク抗原が多い HLA-C 遺伝子型の high resolution レベルのタイピングを行い、HLA-C 遺伝子型の適合度と移植予後について検討を行った。

【対象と方法】 兵庫県立西宮病院、兵庫医科大学、神戸大学で施行した腎移植症例のうちシクロポリンを主免疫抑制剤として投与した 148 症例（生体腎移植：98 例、献腎移植：50 例）を対象とした。移植腎生着率は 1997 年 12 月 31 日で、Kaplan-Meier 法で算出し、有意差検定は Cox-Mantel 法を用いた。HLA-C 遺伝子型の high resolution タイピングは M. Bunce 等²⁾ の PCR-SSP 法を改良した計 47 種類のプライマーペアを用いて、1997 年 10 月 WHO 公認の遺伝子型を対象に行った。

【結果と考察】 148 症例 276 人の血清学と DNA タイピングの結果を比較すると、25.2% (blank-antigen : 23.7%, antigen-antigen : 1.4%) の不一致がみられた。特に血清学的方法でブランクであった Cw*12, Cw*14, Cw*15 が DNA タイピングにより明らかになり、アリル検出率は 99.5% であった。従って、この方法を用いてタイピングした high resolution レベルの HLA-C 遺伝子型適合度と移植予後との関連を解析した。HLA-C 遺伝子型適合群（ミスマッチ 0）の 40 例と不適合群（ミスマッチ 1 以上）108 例の 1 年生着率は、95.0% (37 例), 87.8% (84 例) と有意差は認められなかつたが、5 年での生着率は、それぞれ 95.0% (23 例), 75.0% (50 例) と両群の間に有意差を認めた ($P < 0.05$)。しかし、40 例の HLA-C 遺伝子型適合群のなかに 23 例の HLA-DRB1 適合症例が含まれているので、DRB1 適合症例を除いて解析した。1 年での生着率は、適合群で 94.4% (17 例)、不適合群で 89.0% (71 例) であったのが、5 年生着率は HLA-C 適合群の 94.4% (12 例) に対し、不適合群は 76.8% (41 例) で、いずれの間にも有意差はみられなかつた。しかしながら、HLA-C 不適合群では移植後の期間が長くなると生着率が低下する傾向がみられた。

1) Y. Ichikawa Transplantation 56 : 1368, 1993

2) M. Bunce Tissue Antigens 40 : 355, 1995

30

献腎移植希望登録患者における既存抗体検査

—過去 10 年間の統計と検討結果—

○山崎正明¹⁾, 荻部正宏¹⁾, 飯田好江¹⁾酒巻建夫²⁾, 柏原英彦³⁾

1) 国立佐倉病院組織適合検査室

2) 同 臨床研究部

3) 同 外科

【目的】 当院では、1985 年度より毎年、献腎移植希望登録を行っている全患者（※当院担当分）に対して、既存抗体（panel reactive antibody : PRA）検査を実施している。これは、献腎ドナー発生時に直接リンパ球クロスマッチが不可能であった場合、その代替として取り扱われるものである。今回、過去 10 年間の検査記録をまとめ、興味ある結果を得たので報告する。

【方法】 各年度とも、以下の 2 段階に分けて実施した。
 1. 患者血清トレイの作成。2. パネル細胞との反応：反応には主に健常人から得た T リンパ球を使用し、抗 HLA クラス I 抗体の検出を目的とした（反応数は原則として 50 人）。手技は通常の LCT (lymphocyte cytotoxicity test) 法に従った。反応条件はトレイに細胞分注後 30 分（室温）、クラス I 損傷添加後 60 分（室温）とした。なお、B リンパ球でのクラス II 抗体検査については、必要数の細胞を得難い等の理由により、現在は実施していない。

【結果および考察】 年度別の抗体陽性患者の割合（%）は、'85 年度 : 7.1%, '87 : 12.6, '88 : 14.5, '89 : 13.9, '90 : 16.2, '91 : 10.8, '92 : 13.3, '93 : 14.0, '94 : 10.5, '95 : 9.9 であった。毎年度、全登録患者の 10 ~ 15% に抗体が認められた。また今回、数年に渡って抗体陽性となった約 100 人の患者の追加調査を行い、HLA-A, -B 抗原型と保有抗体特異性の関係を調べた。結果、A11 や B35 抗原の患者は抗体を保有しやすく、また、A2 や A24 抗原の患者は抗 A11 抗体が、逆に A11 抗原では抗 A2 や抗 A24 抗体が出来やすい傾向にあった。今後、性別や輸血との関連等も調べ、更には HLA 分子レベル面からのアプローチを行い、今回のデータが実際の移植時に有用であるかどうか検討したい。

31**Immunodominant minor histocompatibility antigen (mHa) を求めて**

○丸屋悦子^{1,7)}, 佐治博夫¹⁾, 関 茂樹²⁾, 甲斐俊朗³⁾

藤井康彦⁴⁾, 加藤剛二⁵⁾, 星 順隆⁶⁾, 伊藤和彦⁷⁾

横山茂樹¹⁾, 十字猛夫⁸⁾

1)京都府赤十字血液センター, 2)佐久総合病院内科

3)兵庫医科大学輸血部, 4)山口大学病院輸血部

5)名古屋第一赤十字病院, 6)東京慈恵会医科大学

7)京都大学輸血部, 8)日本赤十字社中央血液センター

【目的】 GVHD 発症時の標的となる部位や, GVL 効果の対象となる血液細胞に発現される接着分子の多型性の有無を調べ, その多型性が immunodominant mHa になりうるかを HLA identical sibling 間 BMT での acute GVHD (a-GVHD) 発症率や生存率を用い検証した.

【方法・対象】 多型性検索の対象分子 : CD 2, CD 28, CD 31, CD 34, CD 36, CD 42, CD 44, CD 48, CD 49 b, CD 54, CD 58, CD 62 L, CD 62 E, CD 86, CD 102, CD 106, E-cadherin ; 使用 DNA : ランダム 48 例, パネル 209 例および 118 例の移植ペア ; 多型性の検索法 : 各分子のエクソンを特異的に增幅し LIS-SSCP 法で変異塩基の有無を検索後, direct sequencing 法により変異を同定した. 統計処理法 : 118 例の BMT (Adults : 61, Children : 57) につき, 多型を示す分子の適合性と a-GVHD 発症率との相関を HLA superfamily による拘束性も加味し Fisher の exact test を用い検定した.

【結果】 6 種の接着分子にアミノ酸変異が検出された. それら分子のアミノ酸変異と頻度は CD 2:His (0.68)/Gln (0.32), CD 31: codon 80 Val (0.99)/Met (0.01); codon 125 Val (0.55)/Leu (0.45); codon 563 Ser (0.52)/Asn (0.48); codon 670 Arg (0.52)/Gly (0.48), CD 42:Thr (0.89)/Met (0.11), CD 49 b: Glu (0.97)/Lys (0.03), CD 54: Lys (0.61)/Glu (0.39), CD 62 L Pro (0.8)/Ser (0.2), CD 102: Arg (0.995)/Gln (0.005) であった. A-GVHD と有意な相関がみられた分子は HLA-A 3-like superfamily で CD 62 L ($p = 0.01$) および CD 62 L+CD 49 b ($p = 0.004$) であり, HLA-B 44-like superfamily で CD 62 L+CD 31 codon 563/670 ($p = 0.001$) および CD 31 codon 563/670 (昨年の本学会で報告済みであるが, 移植症例数の増加に伴い相関を再検定した, $p = 0.003$) であった.

【考察】 接着分子に多型性が存在し, immunodominant mHa の候補となることが示唆された. 移植症例を増やし, 相関性の信頼度の向上をはかると共に CTL の樹立や提示ペプチドのアミノ酸配列決定などによる確認が必要と考える. 今後その他の分子についても同様の研究を行い mHa 検索を行う予定である.

32**ヨウ化カリウムを利用した DNA 抽出法の開発**

小林 賢¹⁾, 岩崎 誠¹⁾, 鈴木洋司²⁾

1)防衛医科大学校検査部

2)輸血部

【目的】 近年, HLA の DNA タイピングは, 短時間に結果を出さなくてはならないような腎移植などを中心に広く応用されるようになってきている. そのため, 如何に短時間で, かつ精製度の高い DNA を抽出できるかが重要な鍵となる場合がある. 今回, 我々はこのような問題をクリアし, かつ精製後の DNA 溶解を容易にした方法を開発したので報告する.

【方法】 全血 500 μ l に細胞膜溶解液を 1 ml 加え, 細胞膜を溶解した. 遠心後, 溶血した上清を除去して得られた核ペレットに 4M ヨウ化カリウム変性溶液を 400 μ l 添加し, ポルテックスして核膜溶解・タンパク変性可溶化を行った. この溶液にエタノールを 1 ml 加え, DNA を析出させ, 上清を除去した. 70% エタノールで 2 回リーンスした後, DNA ペレットを滅菌蒸留水に溶解した.

【結果】 この方法を用いて健康成人の EDTA 加末梢血 500 μ l から分離・精製できた DNA 量は 4.6 ~ 13 μ g であり, それに要した時間は約 7 分であった. また, A_{260}/A_{280} 比は, 1.674 ~ 2.2 で平均 1.855 と良好な結果が得られた. この方法で分離した DNA を用いて PCR-RFLP 法, PCR-SSO 法, PCR-SSP 法などをそれぞれ実施したが, 問題なくすべての方法で HLA タイプを同定することができた.

【考察】 この方法で分離した DNA は水に簡単に溶けるため, 短時間で均一なサンプル溶液を準備できるという特徴がある. そのため, SSP 法では陽性バンドに濃淡があまり見られなくなり, 反応結果が見やすくなつた. また, 約 7 分という非常に短い時間でもって DNA を分離できるので, 死体腎移植など検査に要する時間が限られているような場合, 有用な方法となることが期待される.

この方法で変性剤として利用しているヨウ化カリウム以外にもヨウ化ナトリウムが利用可能であるが, 精製した DNA の A_{260}/A_{280} 比や回収率などはほんの僅かであるがヨウ化カリウムの方が良好であった.

33

PCR-MPH 法による HLA-B 15, B 5, B 16, B 40 遺伝子のアリルタイピングと、A 抗原及び B 抗原の血清学的レベルのタイピング

○川井信太郎¹⁾, 中野浩美¹⁾, 松見達也¹⁾, 青池正貴¹⁾
山根明男¹⁾, 柏瀬貢一²⁾, 小川篤子²⁾, 石川善英²⁾
赤座達也²⁾, 十字猛夫²⁾, 坂内 誠³⁾, 徳永勝士⁴⁾

1)湧永製薬・バイオ研究所

2)日赤中央血液センター

3)東京都赤十字血液センター

4)東大・医・人類遺伝

【目的】 多検体の HLA の DNA タイピングに適した方法として、我々は迅速で操作が簡便な方法 PCR-MPH を開発した。既に本方法を用いて HLA-DR, DQ, A 2, A 26, 及び B 61 抗原の DNA タイピングキットをそれぞれ開発した。今回、クラス I 抗原の中で血清学的に困難なアリルに分かれる B 15, B 5, 及び B 16 抗原のアリルタイピングキットを新たに検討した。現行の B 61 抗原用のタイピングキットを B 40 抗原としてタイピングできるようにも改良した。さらに、PCR-MPH 法を用いた A, 及び B 抗原の low resolution タイピングについても検討したので合わせて報告する。

【方法】 B 15 抗原では 12 プローブ、B 5 抗原では 8 プローブ、B 16 抗原では 11 プローブ、B 40 抗原では 8 プローブがそれぞれ固定されたプレートを用いてタイピングした。さらにクラス I の low resolution では、A 抗原が 16 プローブ、B 抗原では 21 プローブをそれぞれ用いてタイピングした。クラス I に関する PCR の条件は全て共通であり、MPH の条件及び操作は HLA-DRB1 遺伝子のタイピングのものと全く同じである。

【結果】 本法を用いてアリルタイピングを行った結果は、PCR-SSO 法、PCR-SSP 法、PCR-SBT 法の結果と一致した。また、A, 及び B 抗原の low resolution タイピングの結果は血清学的方法による結果と一致した。

【考察】 本法を利用することにより従来の血清学的方法ではタイピングできなかった B 15, B 5, B 16, 及び B 40 抗原のアリルタイピングが可能となった。さらに一部改良の必要はあるものの A 抗原、及び B 抗原の血清学的方法レベルの DNA タイピングが可能となった。今回報告したものも含めて MPH の条件は共通であるので PCR 反応以後は同時に進行することが可能である。本法は HLA のタイピング分野でますます威力を發揮すると思われる。

34

日本人を対象とした HLA class I PCR-SSP 法について

○中島文明, 中村淳子, 横田敏和, 伊藤 仁

木村亮太郎

神奈川県赤十字血液センター, 検査三課

【目的】 血清学的タイピングの補助あるいは、その確認を主たる用途として、日本人集団を対象とした HLA class I PCR-SSP 法を構築したので報告する。

【方法】 本法は M.Bunce らが報告した primer set (Tissue Antigens 1995;46:355-367) の内、日本人特有のものを抜粋し、独自に考案した B*1511, B*5504 などが検出可能な primer set を加え、組み合せを検討しつつ、HLA-A, B, C ローカスで 44 primer set に縮小し low resolution で検出可能なシステムとした。5' 側 primer は 32 種、3' 側 primer は 35 種で構成し、internal control は C4 primer を用いた。検出は 10% PAGE (ミニゲル) を用いた。これを骨髄移植予定の患者家系と臍帯血バンクの登録検体で使用した。

【結果】 どの検体も問題なく目的バンドの検出ができた。A 10 および Cw 7 で非特異バンドがみられるので primer の濃度か配列の検討が必要であった。また、C4 primer と競合する primer があり internal control の変更が必要である。処理時間は PCR～電気泳動～判定まで約 3 時間半、また、44 primer set の費用は 1 検体約 200 円であった。

【考察】 本法は、完璧な結果が得られるような組み合わせには対応していない。例えば Korean に存在する B 14 や大陸に広く分布する A 32 などが日本人に混入しても検出できない。これらはブランクとなるが、ブランクであるという認識が本法の結果である。現在、一般検査室レベルにおいて扱える HLA class I 遺伝子タイピングは市販の PCR-SSP キットを導入する以外に選択肢がない。これらは、反応系の数が過剰で日本人を検査対象とする我々にとって妥当な内容とは言い難い。本法は用途を限定することにより縮小が図られ、より扱いやすいものとなつた。HLA 抗原分子を検出する血清学的タイピングとその根拠となる遺伝子タイピングで当施設の HLA タイピング結果はより確実なものとなつた。

35

献腎移植希望登録者の HLA-DR-DNA 検査で相違のあった抗原の検討

○渡辺真穂、栗田麗子、小河原悟、内藤説也

福岡大学病院腎センター

【目的】 献腎移植登録者の HLA-DR に関して血清学的タイピング法及び DNA タイピング法の結果の相違について検討する。

【対象】 九州、沖縄の各県の既登録者 1,153 名。

【方法】 中外診断科学前処理試薬により DNA 抽出を行い、TMA-HPA 法（中外診断科学株式会社）、アンプリコア（ロッシュ）、マイクロ SSP（ワンラムダ）のキットを用いて、タイピング操作を行なった。血清学と相違のあるものに関しては複数の DNA タイピング法で確認した。

【結果】 TMA-HPA 法で 320 例、アンプリコアで 715 例、マイクロ SSP で 202 例タイピング操作を行なった。主として TMA-HPA 及びアンプリコアでタイピングし、再確認をマイクロ SSP で行なった。再検査において、血清学的タイピングと同一データは 805 例（70 %）であった。また、ブランクが埋まつたものは 93 例（8 %）、ブランクになったもの 17 例（1.5 %）、1 抗原違い 73 例（6.3 %）、全く違っていたものは 20 例（1.7 %）であった。そのうち、スプリットが決定したものは 210 例（18.2 %）であった。

【考察】 登録者の 30 %が血清学的タイピング法と DNA タイピング法とで異なっていた。血清学的タイピングによる登録者に関しては年数が経っているのもあり、抗血清及び技術的な問題があった。今回、DNA タイピングを行なうことにより正確なデータを登録することができた。今後は 4 枠レベルまで求めるのが望ましい。

36

クラス II DNA タイピング自動化の試み

高田雄三¹⁾、小林 賢²⁾、向田政博¹⁾

1)防衛医科大学校法医学

2)検査部

【目的】 HLA-DRB や DQB1 遺伝子の DNA タイピングは、近年血清学的方法に代わり日常的に行われるようになってきている。しかしながら、いずれの方法も PCR 増幅を除いて手作業によって行われているのが現状である。腎移植、骨髄移植などのタイピングの際、この手作業で結果が誤ってしまうといったことが起きている。そこで我々は、PCR から結果を出すまでを自動化できるアプライドバイオシステム社の PRISM 7700 を用いて HLA-DRB1 の DNA タイピングを試みたので報告する。

【方法】 HLA-DRB1 タイプが既知の健常人パネルの DNA サンプルを Dynal 社製の SSP プライマーキット、5' 末端を FAM で、3' 末端を TAMRA でそれぞれ標識し、3' 末端をリン酸化した TaqMan プローブ、AmpliTaq Gold と TaqMan PCR Core Reagents とを ABI PRISM 7700 専用チューブに加え、増幅反応を行なった。なお、PCR 条件は、Dynal 社の PCR 手順に従つた。

【結果】 Dynal 社のキットで DR 3 を検出するプライマーセットが今回我々が設計したプローブと位置的関係がずれていたため解析から除外した。これ以外のプライマーセットについては、いずれもパネル DNA がもつ DRB1 アリルとよく一致した結果であった。今回の実験では、血液からの DNA 抽出から結果判定までに要した時間は、約 2 時間であった。

【考察】 通常の PRISM 7700 を用いた DNA タイピング法は、共通プライマーとアリル特異的 SSO とを組み合わせて行なうように想定されているが、我々が今回試したように特異的プライマーと共通プローブとを組み合わせることで既存の SSP キットを使用しても十分にタイピングが可能であり、また、試薬代も安く抑えることができる。解析ソフトが用意されれば、PCR から結果判定まで一切人の手が入らないことから、この方法での単純ミスによる結果判定過誤が回避できるものと考えられる。

37

MHC 遺伝子座における多型を説明するアリル特異的淘汰モデルの構築

○大橋 順¹, 徳永勝士¹, 大塚柳太郎²

1) 東京大学医学部人類遺伝学教室

2) 東京大学医学部人類生態学教室

【目的】 自然淘汰の数理モデルを構築し, MHC 遺伝子座で高度な多型性が維持される条件の検討を行う。また今回のモデルを用いて、超優性淘汰モデルの妥当性を検討する。

【方法】 以下の二つのモデルを仮定する。

アリル特異的淘汰モデル：MHC 遺伝子座の各対立遺伝子は個体の適応度に独立に影響を与えると仮定する。ホモ接合体 $AiAi$ の適応度を $1 + \alpha si$, ヘテロ接合体 $AiAj$ の適応度を $(1 + si)(1 + sj)$ と仮定する。ここで, si は Ai の淘汰係数であり, α は細胞表面上に発現される MHC 分子数を考慮するための係数であり, $\alpha \geq 1$ を想定している。頻度依存性淘汰モデル：アリルの適応度がその頻度によって変化すると仮定し, ホモ接合体 $AiAi$ の適応度を $1 + \alpha si(1 - xi)$, ヘテロ接合体 $AiAj$ の適応度を $(1 + si(1 - xi))(1 + sj(1 - xj))$ とおく。ここで, xi は Ai の頻度を表す。これらのモデルを用いてまず決定論的な計算を行い, 次にいくつかのパラメタセットに対してシミュレーションを行った。

【結果】 1) 無限集団中での各アリルの安定平衡頻度を計算し, 多数のアリルが集団中に保持されるのに必要な淘汰係数の条件を求めた。アリル特異的淘汰モデルは, 頻度依存性淘汰モデルに比べその条件が厳しかった。2) シミュレーションの結果から, 頻度依存性淘汰モデルはより多くの対立遺伝子を維持することが可能で, ヘテロ接合度も大きかった。3) 各アリルの淘汰係数が大きくなると, 両モデルは超優性淘汰モデルに近づくことが確認された。4) 平衡頻度分布は, 頻度 $x = 0.1 \sim 0.3$ に鋭いピークを持つ曲線となったが, 頻度依存性淘汰モデルのほうが顕著であった。

【考察】 超優性淘汰は MHC 遺伝子座の多型を説明する有力だが, 各アリルの適応度が異なると考えると, 必ずしもヘテロ優位性は保証されず, パラメタ条件によって出現するアリル特異的淘汰の一形態であった。我々の頻度依存性淘汰モデルはヘテロ優位性を説明するのに優れており, 頻度依存性淘汰と超優性淘汰が同時に働く可能性が示唆された。

38

古人骨を用いた高分子 DNA 抽出と HLA 遺伝子解析

安西達也¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 徳永勝士³⁾, 本間隆夫¹⁾

馬場悠男⁴⁾, 赤澤 威⁵⁾, 猪子英俊²⁾

1) 東海大学工学研究科工業化学専攻

2) 東海大学医学部, 分子生命科学

3) 東京大学医学部, 人類遺伝学

4) 国立科学博物館, 人類研究部

5) 国際日本文化研究センター

【目的】 HLA は他に類を見ない高度で特徴的な多型性を示すことから, 移植時の組織適合性検査や親子鑑定, 民族調査など幅広く応用されている。今回我々は, HLA 多型の考古学的な応用に着目し, 縄文時代人骨からの高分子 DNA 抽出, 及び, HLA-クラス II 遺伝子の DNA タイピングを行い, 縄文時代古人骨と東アジアの各民族との比較検討を行った。

【方法】 三貫地で発掘された男性の人骨を試料として用いた。骨は外壁付着 DNA の除去後, EDTA による脱灰, Proteinase K, フェノール・クロロホルムを用いた DNA 隔離操作を行い, 脱塩濃縮機 Centricon-30 による DNA 精製を行った。抽出した DNA は PCR-RFLP 法にて, DQA1, DRB1 の各対立遺伝子の同定を行った。また, 塩基配列の確認のため SBT (sequencing based typing) 法を用いた解析も同時に行つた。

【結果】 今回用いた抽出法は, 他方との比較検討の結果, Proteinase K 法が最も DNA 回収率の高い方法として選定され, 約 2000 年前の古人骨から約 $1 \mu\text{g}$ の DNA の抽出が可能であった。また PCR による增幅も DNA 量や PCR 阻害物質のため困難ではあったが, PCR 産物を鑄型とした, 3, 4 回目の反応により増幅が確認できた。その後のタイピング結果から, 縄文時代人骨は HLA-DRB1*1502, DQA1*0103 と判定された。

【考察】 日本人の起源については, 東アジア特に中国地方よりの渡来人が含まれるとの説に基いて, 東アジアでの DQA1, DRB1 遺伝子の頻度と比較すると, 日本および中国の北方漢民族にも DRB1*1502, DQA1*0103 が存在することから, 縄文時代の日本人は, 北東アジア渡来民族である可能性が示唆される結果となった。このように, 古人骨からの HLA タイピングが可能となつたことで, 今後の考古学的な分野での応用が期待される。

39

HLA からみる北と南の日本人

○徳永勝士¹⁾, 坂内 誠²⁾, 八田陽子¹⁾, 大橋 順¹⁾
 今西 規³⁾, 神山治郎⁴⁾, 小川篤子⁵⁾, 田中秀則⁵⁾
 伊波政治⁴⁾, 三富齊忠²⁾, 赤座達也⁵⁾, 島袋 剛⁴⁾
 高橋有二²⁾, 五條堀孝³⁾, 尾本恵市⁶⁾, 十字猛夫⁵⁾

- 1) 東京大・医・人類遺伝学
- 2) 東京都赤十字血液センター
- 3) 国立遺伝研・生命情報研究センター
- 4) 沖縄県赤十字血液センター
- 5) 日赤中央血液センター
- 6) 國際日本文化研究センター

【目的】 HLA 遺伝子群は機能をもつ遺伝子として最高度の多型をしめすことから, mtDNA やマイクロサテライト多型とならんで, 人類集団の遺伝的多様性を解析する有力なマーカーである。今回我々は, 東京大学理学部人類学教室に保存されていた 50 名のアイヌ民族の DNA 試料, および 197 名の沖縄県民の末梢血を得て HLA 遺伝子群に関する集団遺伝学的解析を行い, 既報の本土日本人や東アジアなどの諸集団のデータと比較検討した。

【方法】 アイヌ民族については, HLA-A, B, DRB1, DQB1 座全てを PCR-SSO および PCR-SSCP 法によって塩基配列レベルでタイピングした。沖縄県民の試料については, HLA-A, B, C 座を血清学 (LCT 法), DRB1 座を PCR-MPH および PCR-SSCP 法によってタイピングした。対立遺伝子およびハプロタイプ頻度の推定にはカウント法および最尤法を用い, 類縁関係の推定には DA 距離に基づく近隣結合法および主成分分析法を用いた。

【結果および考察】 アイヌ民族では本土日本人に多い対立遺伝子やハプロタイプがあまり見られず, 他の東アジア諸集団との遺伝距離もかなり大きい。むしろアメリカ先住民族とも部分的に共通するというユニークな特徴がみられた。沖縄集団は近隣結合法では最初にアイヌ民族と連結するが, 遺伝距離では本土日本人に最も近縁であるという興味深い知見が得られた。さらに高頻度ハプロタイプの分布より, 中国南部から南西諸島への遺伝子流入も示唆された。これらの結果をふまえて, アイヌと沖縄両集団の形成過程および日本人の起源論について議論する。

第7回日本組織適合性学会大会

協賛企業

株式会社ベリタス

塩野義製薬株式会社

株式会社池田理化

株式会社エスアールエル

呉羽化学工業株式会社

中外診断科学株式会社

株式会社不二家バイオサイエンス研究所

株式会社免疫生物研究所

湧永製薬株式会社

株式会社PEアプライドバイオシステムズ

科研製薬株式会社

久保田商事株式会社