

MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第5巻第3号 平成11年3月31日発行

Contents

| | |
|---|-----|
| 〔原著論文〕 HLA-linked susceptibility and resistance to Buerger's disease in JapaneseMegumi Takahashi, Yasushi Kobayashi, Masataka Ichiki, Hiroshi OuchiFujio Numano, Akinori Kimura | 150 |
| 〔シリーズ：異種のMHC〕 硬骨魚のMHC..... 野中 勝 | 156 |
| 〔シリーズ：血清学〕 血清学によるHLAクラスI抗原のアリルタイピング..... 斉藤 敏 | 163 |
| 〔最新情報：“玉手箱”〕 最新アリル情報..... 小林 賢 | 174 |
| 〔シリーズ：HLA研究者の個人史〕 私とHLA-Dタイピング..... 金子 剛久 | 192 |
| 〔海外ラボ紹介〕 Fred Hutchinson Cancer Research Center, Daniel Geraghty 研究室石谷 昭子 | 203 |
| 〔国際学会印象記〕 第24回アメリカHLA学会 (ASHI) 印象記..... 丸屋 悦子 | 206 |
| 〔書評〕 Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates.斎藤 成也 | 222 |
| <日本組織適合性学会からのお知らせ>..... | 225 |
| <第8回日本組織適合性学会大会のお知らせ>..... 佐治 博夫 | 226 |
| <日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>..... | 232 |
| 編集後記..... | 234 |
| 日本組織適合性学会会員名簿 | |

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

J S H I

Contents

| | |
|---|-----|
| [原著論文] HLA-linked susceptibility and resistance to Buerger's disease in JapaneseMegumi Takahashi, Yasushi Kobayashi, Masataka Ichiki, Hiroshi OuchiFujio Numano, Akinori Kimura | 150 |
| [シリーズ：異種のMHC] 硬骨魚のMHC.....野中 勝 | 156 |
| [シリーズ：血清学] 血清学によるHLAクラスI抗原のアリルタイピング.....齊藤 敏 | 163 |
| [最新情報：“玉手箱”] 最新アリル情報.....小林 賢 | 174 |
| [シリーズ：HLA研究者の個人史] 私とHLA-Dタイピング.....金子 剛久 | 192 |
| [海外ラボ紹介] Fred Hutchinson Cancer Research Center, Daniel Geraghty 研究室石谷 昭子 | 203 |
| [国際学会印象記] 第24回アメリカHLA学会 (ASHI) 印象記.....丸屋 悦子 | 206 |
| [書評] Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates.斎藤 成也 | 222 |
| <日本組織適合性学会からのお知らせ>..... | 225 |
| <第8回日本組織適合性学会大会のお知らせ>.....佐治 博夫 | 226 |
| <日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>..... | 232 |
| 編集後記..... | 234 |
| 日本組織適合性学会会員名簿 | |

〔原著論文〕 HLA-linked susceptibility and resistance to Buerger's disease in Japanese

Megumi Takahashi¹⁾, Yasushi Kobayashi²⁾, Masataka Ichiki³⁾, Hiroshi Ouchi³⁾,
Fujio Numano²⁾, Akinori Kimura^{1,4)}

¹⁾²⁾⁴⁾Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan ³⁾JR Sendai Hospital, Sendai, Japan

(Received September 16, 1998)

Introduction

The HLA system comprises a complex array of genes encoding for polymorphic cell surface glycoproteins that play fundamental roles in immune responses to foreign as well as self antigens and may control the susceptibility and/or resistance to various diseases including autoimmune diseases. There are two distinct types of HLA molecules; class I (HLA-A, B and C) and class II (HLA-DR, DQ and DP). The polymorphisms of the HLA molecules have been analyzed by serological typing system utilizing the complement-dependent cytotoxicity assay and panels of selected antisera. However, recent development of typing technology at the DNA level has revealed that there are many alleles which could not be distinguished by the serological typing (1). Therefore, the associations between HLA and certain diseases are now analyzed in more detail at the DNA level by using PCR-based DNA typing technologies (2).

Buerger's disease (thromboangiitis obliterans) is characterized by thrombotic obstruction of middle- and small-sized arteries with inflammation (3). Its etiology or pathogenesis remains unknown, although smoking is a known risk factor of the disease (4). On the other hand, the incidence of disease is more frequent in Asian countries than in European countries, suggesting that there are ethnic differences in the susceptibility and/or resistance to the disease (5). Because HLA shows ethnic differences in the allele frequencies and is involved in

the inflammatory process, analysis of HLA may be important in understanding the pathogenesis of Buerger's disease. In this respect, serological analysis of HLA in Buerger's disease had been performed and it was reported that HLA-B54 and DR2 were associated with the disease in Japanese (6, 7), while no definite positive association between the disease and HLA was confirmed in Caucasians (8, 9). Because relatively small numbers of patients were analyzed in these serological studies, the association still remains to be confirmed.

To investigate the association between HLA and Buerger's disease in more precise way, we have analyzed polymorphisms of HLA-B, DRB1 and MICA genes in the Japanese patients at the DNA level.

Material and Methods

Subjects

In this study, 72 unrelated patients with Buerger's disease and 224 randomly selected healthy controls were determined for the presence of HLA-B*5401 and genotyped for the DRB1 and MICA genes. All the patients and controls were Japanese resided in Honshu or Kyushu island. DNA was extracted from 7 ml of whole blood by using a standard proteinase K/phenol/chloroform extraction method from each subject.

Methods

HLA-B*5401 genotyping method used in this

Corresponding author: Akinori Kimura, M.D.,
Department of Molecular Pathogenesis, Division of
Adult diseases, Medical Research Institute, Tokyo
Medical and Dental University, Kandasurugadai 2-
3-10, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan,

Tel; +81-3-5280-8056.
Fax; +81-3-5280-8055.
E-mail; akitis@mri1.mri.tmd.ac.jp

study was based on the sequence-specific primer (SSP) method. The primers used were B54SPF (5'-GCCGCGAGTCCGAGG) and B54SPR (5'-CCATACATCGTCTGCCAA). HLA-DRB1 broad-genotyping was performed based on the reverse sequence-specific oligonucleotide probe (rSSOP) method by using Amplicor (Roche inc.) according to the manufacturer's instructions and further DRB1 allelotyping was done by using single-strand conformation polymorphism (SSCP) method by referring standard DRB1 alleles as described previously (10). The DNA region spanning exon 5 of MICA gene was amplified by 30 cycles of PCR from genomic DNA of each subject by using a combination of primers, MIC5F (5'-GCCAGTGTATAACAAGTCC) and MIC5R (5'-GCCTTACCATCTCCAGAAAC), and analyzed for the polymorphisms (11, 12) by the SSCP method as described previously (13).

Statistical analysis

Frequencies of HLA-B*5401, DRB1 alleles and MICA exon 5 alleles in the patients were compared with those in the healthy controls. The strength of statistical association between Buerger's disease and an allele of gene in the HLA region was expressed by odds ratio (OR) calculated by the method of Woolf (14), and the statistical significance was examined by chi-square test with Yate's correction. The corrected *p* value (*pc*) was calculated by multiplying the *p* value by the number of alleles found in the Japanese controls for each marker; 27 for DRB1 and 5 for MICA, while the *pc* value was not calculated for HLA-B*5401 because only B*5401 was tested for the presence, among various B alleles. The OR of risk for panels having one or both of disease-associated alleles was calculated against panels having none of the disease-associated alleles.

Results

HLA-B*5401 genotyping:

Presence of HLA-B*5401 was examined by the PCR-SSP method in 72 patients and 224 healthy

controls. It was found that the frequency of B*5401 was 27.8% in the patients in comparison with 11.6% in the controls. The increased frequency of B*5401 in the patients was statistically significant (OR=2.35, *p*=0.012).

HLA-DRB1 genotyping:

HLA-DRB1 genotyping of each subject was done by the PCR-rSSOP and PCR-SSCP methods. As shown in Table 1, the frequency of DRB1*1501 was significantly increased in the patients (31.9% vs. 9.8%, OR=4.35, *p*=0.000003, *pc*<0.0001). The frequency of DRB1*0405 was increased in the patients, but it was not statistically significant when the *p* value was corrected (33.3% vs. 19.2%, OR=2.10, *p*=0.013, *pc*; not significant). On the other hand, the frequency of DRB1*0101 was decreased in the patients, but it was again not significant when the *p* value was corrected (4.2% vs. 15.6%, OR=0.23, *p*=0.011, *pc*; not significant). The other alleles did not show any significant differences in the frequencies between the patients and controls (Table 1).

Table 1. Phenotype frequencies of HLA-DRB1 alleles in the patients with Buerger's disease and controls

| HLA-DRB1 allele ^{#1} | patients (n=72) | controls (n=224) | OR ^{#2} | <i>p</i> | <i>pc</i> |
|-------------------------------|-----------------|------------------|------------------|----------|------------------|
| *0101 | 4.2 % | 15.6 % | 0.23 | 0.011 | ns ^{#3} |
| *1501 | 31.9 | 9.8 | 4.35 | <0.00001 | <0.0001 |
| *1502 | 19.4 | 21.9 | | | |
| *1602 | 2.8 | 1.4 | | | |
| *0403 | 5.6 | 2.2 | | | |
| *0405 | 33.3 | 20.1 | 2.10 | 0.013 | ns |
| *0406 | 9.7 | 5.0 | | | |
| *0410 | 5.6 | 2.2 | | | |
| *1101 | 2.8 | 6.7 | | | |
| *1201 | 6.9 | 6.7 | | | |
| *1301 | 1.4 | 0.5 | | | |
| *1302 | 5.6 | 14.3 | | | |
| *1401 | 6.9 | 2.7 | | | |
| *1406 | 5.6 | 2.7 | | | |
| *0802 | 6.9 | 4.9 | | | |
| *0803 | 15.3 | 19.2 | | | |
| *0901 | 25.0 | 27.7 | | | |

#1: Only the DRB1 alleles found in the patients are listed.

#2: Odds ratio of risk conferred by each allele was calculated against panels without the allele. ORs are listed only for the alleles showing *p*<0.05.

#3: not significant (>0.05).

MICA genotyping:

Polymorphism in exon 5 of MICA gene was analyzed by the PCR-SSCP method. As shown in Table 2, the frequency of MICA 1.2 allele was significantly

Table 2. Phenotype frequencies of MICA (exon 5) alleles in the patients with Buerger's disease and controls

| MICA allele | (GCT) ^{#1} | patients (n=72) | controls (n=224) | OR ^{#3} | p | pc |
|-------------|---------------------|-----------------|------------------|------------------|-------|------|
| 1.1 | 9 | 29.2 % | 19.6 % | 0.47 | 0.008 | 0.04 |
| 1.2 | 6 | 30.6 | 48.2 | | | |
| 1.3 | 5 | 43.1 | 48.7 | | | |
| 1.4 | 4 | 36.1 | 26.8 | | | |
| 1.5 | 5+i ^{#2} | 27.8 | 23.7 | | | |

#1; number of GCT repeat.
 #2; with 1 base insertion.
 #3; same as in Table 1.

decreased in the patients (30.6% vs. 48.2%, OR=0.47, $p=0.008$, $pc=0.04$). In contrast, the frequency of MICA 1.4 allele was only slightly increased in the patients, and it was not significant (36.1% vs. 26.8%, $p=0.13$).

HLA-B*5401 and DRB1*1501 in the risk of Buerger's disease:

In this study, HLA-B*5401 and DRB1*1501 showed significant positive associations with Buerger's disease in Japanese. Because B*5401 and DRB1*1501 are not in linkage disequilibrium in the Japanese populations, we have calculated odds ratio (OR) of risk conferred by one or both of these 2 different disease-associated alleles against the panels having none of these alleles. As shown in Table 3, B*5401 gave significant high OR in the absence of DRB1*1501 (OR=3.24, $p=0.0009$). On the other hand, DRB1*1501 gave significant high OR in the absence of B*5401 (OR=4.31, $p=0.00003$). In addition, presence of both B*5401 and DRB1*1501 gave a comparative OR (OR=4.48, $p=0.05$) to that given by each allele alone.

Table 3. Odds ratio of risk to Buerger's disease associated with B*5401 and DRB1*1501

| disease-associated allele ^{#1} | | patients (n=72) | controls (n=224) | OR ^{#2} | p |
|---|-----------|-----------------|------------------|------------------|---------|
| B*5401 | DRB1*1501 | | | | |
| + | + | 4.2 % | 0.9 % | 4.48 | 0.05 |
| + | - | 23.6 | 11.6 | 3.24 | 0.0009 |
| - | + | 25.0 | 9.8 | 4.31 | 0.00003 |
| - | - | 45.8 | 65.6 | - | - |

#1; Presence (+) or absence (-) of the disease-associated alleles.

#2; Odds ratio of each group against the panels having neither B*5401 nor DRB1*1501 was calculated and tested by chi-square test with Yate's correction.

Discussion

Previous serological HLA studies have pointed-

out that Buerger's disease was associated with HLA-B54 and DR2 in Japanese and that no positive association was confirmed in Caucasians (6-9). In this study, 72 Japanese patients were analyzed for the alleles of HLA genes, and it was confirmed at the DNA level that HLA-B*5401 and DRB1*1501 (a subtype of DR2) were significantly associated with Buerger's disease in Japanese. An association of B*5401 with the disease was also observed in our preliminary analysis of 36 patients (15). Although an increased frequency of DRB1*0405 was observed in the preliminary analysis (15) and in this study, it was not statistically significant after the correction (Table 1). Because DRB1*0405 is in linkage disequilibrium with B*5401 in Japanese, the increased frequency of DRB1*0405 in the patients may be a reflection of its linkage disequilibrium with B*5401. Because HLA-B*5401 is relatively rare in Caucasians, this might in part explain the less incidence of Buerger's disease in European countries.

One of the most important findings in this study was that HLA-B*5401 and DRB1*1501 were considered to be independent genetic risk factors of the disease, because each of them conferred significant high odds ratio of risk in the absence of the other, and because no further increase of odds ratio of risk was observed in the presence of both disease-associated alleles. Another interesting finding was that MICA 1.4 allele, which is in strong linkage disequilibrium with B*5401 in the Japanese population (12, 13), showed no significant association with the disease, suggesting that the disease-controlling gene linked to B*5401 was not the MICA gene. Therefore, it was suggested that the disease susceptibility to Buerger's disease was controlled by at least two different genes; one is in linkage disequilibrium with B*5401, and the other with DRB1*1501. These observations, in turn, suggest that there may be at least 2 different etiologies of the disease; one is related to the HLA-B gene and the other is controlled by the HLA-DRB1 gene. In this respect, it will be of interest to investigate if there would be any differences in the clinical manifestations or clinical course of the disease

between the B*5401-positive patients and DRB1*1501-positive patients.

On the other hand, a significant negative association of MICA 1.2 allele with Buerger's disease was found in this study for the first time. MICA 1.2 allele is in linkage disequilibrium with HLA-B44, B51, B52 and B57 in the Japanese population (13). In this study, we have not examined all patients for these HLA-B alleles, however our preliminary analysis of HLA-B gene in 38 patients showed that the frequencies of HLA-B*4403, B*5101, B*5201 and B*5701 were not significantly decreased in the patients (data not shown). Therefore, it was suggested that the decreased frequency of MICA 1.2 allele may be primary and not the reflection of its linkage disequilibrium with these HLA-B alleles. This observation implies that a gene controlling the resistance to Buerger's disease might be mapped near the MICA gene, which is completely different from the genes controlling the susceptibility mapped in the HLA-B and DRB1 loci. In this regard, we are now collecting blood samples from more number of patients to further confirm these positive and negative associations. Analysis of various microsatellite markers around the MICA-HLA-B region (16-18) and DRB1-DQA1 region (19) in a large number of patients and controls will enable us to map the susceptibility and resistance genes to Buerger's disease more precisely.

In summary, Buerger's disease in Japanese was found to show significant positive associations with HLA-B*5401 and DRB1*1501, and these positive associations were independent with each other. In addition, a significant negative association of Buerger's disease with MICA 1.2 allele was observed. These observations suggest that there may be at least 2 different genes in the HLA-B and DRB1 loci, respectively, which control the disease susceptibility and that the disease resistance was controlled by another gene mapped near the MICA locus.

Acknowledgments

We thank Dr. Nobuhisa Obuchi for his

contributions in the analysis of MICA gene. This work was supported in part by research grants from the Ministry of Health and Welfare, Japan (to A.K. and F.N.), by a research grant from Japan Society for the Promotion of Science (to A.K.), by a grant from the Uehara Memorial Foundation (to A.K.), and by a grant from the Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University to the Etiology and Pathogenesis Research Unit.

References

1. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, *et al.*: Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens* **49** : 293-321, 1997.
2. Kimura A, Erlich HA, Sasazuki T: *HLA 1991 vol. 1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), DNA typing technical workshop. Oxford University Press, Oxford, 1992 ; p. 496-498.
3. Buerger L: Thrombo-angiitis obliterans: A study of the vascular lesions leading to presenile spontaneous gangrene. *Am. J. Med. Sci.* **136** : 567-580, 1908.
4. Mishima Y: Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). *Int. J. Cardiol.* 54 Suppl. : S185-187, 1996.
5. Shinomiya S, Leu HJ, Lie JT, *et al.*: *Vascular pathology* (eds. Stehbens WE, Lie JT), Buerger's disease (thromboangiitis obliterans). Chapman and Hall, London, 1995 ; p. 657-678.
6. Ohtawa T, Takeo J, Kawano N, *et al.*: HLA antigens in thromboangiitis obliterans. *J. Am. Med. Assoc.* **230** : 1128, 1974.
7. Numano F, Sasazuki T, Koyama T, *et al.*: HLA in Buerger's disease. *Exp. Clin. Immunogenet.* **3** : 195-200, 1986.
8. McLoughlin GR, Evans CC, Chapman D: Association of HLA-A9 and HLA-B5 with Buerger's disease, a distinct clinical and pathological entity. *J. Am. Med. Assoc.* **181** : 5-12, 1962.
9. De Moerloose P, Jeannet M, Mirimanoff P, *et al.*: Evidence for a HLA-linked resistance gene in Buerger's disease. *Tissue Antigens* **14** : 169-173,

- 1979.
10. Kimura A, Hoshino S, Yoshida M, *et al.*: *HLA 1991 vol.1* (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Polymerase chain reaction-single stand conformation polymorphism (SSCP) analysis of HLA genes: a practical HLA-matching system. Oxford University Press, Oxford, 1992 ; p. 511-514.
 11. Mizuki N, Ota M, Kimura M, *et al.*: Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetition with Behcet disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94** : 1298-1303, 1997.
 12. Ota M, Katsuyama Y, Mizuki N, *et al.*: Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uyгур, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* **49** : 448-454, 1997.
 13. Kimura A, Kobayashi Y, Takahashi M *et al.*: MICA gene polymorphism in Takayasu's arteritis and Buerger's disease. *Int. J. Cardiol.*, in press.
 14. Woolf B: On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.* **19** : 251-253, 1955.
 15. Aerbajinai W, Tsuchiya T, Kimura A, *et al.*: HLA class II typing in Buerger's disease. *Int. J. Cardiol.* **54** Suppl. : S197-202, 1996.
 16. Mizuki N, Ando H, Kimura M, *et al.*: Nucleotide sequence analysis of the HLA class I regions spanning the 237-kb segment around the HLA-B and -C genes. *Genomics* **42** : 55-66, 1997.
 17. Shiina T, Tamiya G, Oka A, *et al.*: Nucleotide sequencing analysis of the 146-kilobase segment around the IkBL and MICA genes at the centromeric end of the HLA class I region. *Genomics* **47** : 372-382, 1998.
 18. Tamiya G, Ota M, Katsuyama Y, *et al.*: Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* **51** : 337-346, 1998.
 19. Lin L, Jin L, Kimura A, *et al.*: DQ microsatellite association studies in three ethnic groups. *Tissue Antigens* **50** : 507-520, 1997.

HLA-linked susceptibility and resistance to Buerger's disease in Japanese

Megumi Takahashi¹⁾, Yasushi Kobayashi²⁾, Masataka Ichiki³⁾, Hiroshi Ouchi³⁾, Fujio Numano²⁾, Akinori Kimura^{1,4)}

- 1) Department of Molecular Pathogenesis, Division of Adult diseases, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan
- 2) Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan
- 3) Department of Vascular Surgery, Sendai Hospital of East Japan Railway Company, Sendai, Japan
- 4) Etiology and Pathogenesis Research Unit, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Corresponding author; Akinori Kimura, M.D., Department of Molecular Pathogenesis, Division of Adult diseases, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Kandasurugadai 2-3-10, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan,

Tel; +81-3-5280-8056.

Fax; +81-3-5280-8055.

E-mail; akitis@mri1.mri.tmd.ac.jp

Summary

To investigate the HLA-linked disease-controlling gene(s) for Buerger's disease, we have genotyped 72 unrelated Japanese patients and 224 healthy controls for HLA-B, DRB1 and MICA genes. It was revealed that the frequencies of HLA-B*5401 and DRB1*1501 were significantly increased in the patients (B*5401; 27.8 % in the patients vs. 11.6% in the controls, OR=2.35, $p=0.012$, and DRB1*1501; 31.9% vs. 9.4%, OR=4.53, $pc<0.0001$), while the frequency of MICA 1.4 allele, which is in strong linkage disequilibrium with HLA-B*5401 in the Japanese population, was not significantly deviated between the patients and controls. A comparison of odds ratio for the risk of disease conferred by HLA-B*5401 and DRB1*1501 has suggested that these disease-associated alleles may be independent genetic risk factors of Buerger's disease or that there might be at least 2 different etiologies; one is associated with HLA-B*5401 and the other is associated with HLA-DRB1*1501. On the other hand, the frequency of MICA 1.2 allele was significantly decreased in the patients (30.6% vs. 48.2%, OR=0.47, $pc=0.04$). These observations suggest that both the susceptibility and resistance to Buerger's disease are linked to HLA, but they are controlled by different genes in the HLA region.

Key Words; Buerger's disease, HLA-B, HLA-DRB1, MICA, genotyping

〔シリーズ：異種のMHC〕硬骨魚のMHC

野中 勝

東京大学大学院理学系研究科, 生物科学

要約

近年、MHCの系統発生的な解析が分子レベルで進められた結果、クラスI, II, III遺伝子が連鎖して存在するという基本構造が、哺乳類、鳥類、両生類を通じて良く保存されていることが明らかになった。それに対して、ゼブラフィッシュ、メダカをモデルに進められている硬骨魚類での解析では、この3領域が連鎖せずに別々の染色体に存在すること、ただしクラスIとその抗原提示に重要な役割を果たすTAP, LMPなどの遺伝子は連鎖していることが判明した。この結果はMHCの本来の役割がクラスI抗原提示システムの確立にあったことを示唆している。

1. はじめに

ヒトMHCは第6染色体短腕に存在する約4Mbにわたる領域で、免疫応答を司る遺伝子、何らかの形で免疫反応に関与する遺伝子、及び免疫とは無関係な遺伝子等200以上の遺伝子から構成されている(1)。MHCの遺伝子構成の意義と起源に関しては、1) いくつかの遺伝子間の連鎖には生理的意義が存在し、その遺伝子構成は自然選択により出来上がった、2) 連鎖には生理的意義はなく、その遺伝子構成は偶然の産物である、3) 遺伝子構成は偶然の産物であるが、連鎖には生理的意義がある、等様々な解釈が存在する。近年急速な進展をみせている哺乳類以外の脊椎動物における解析は、MHCの遺伝子構成にも脊椎動物の進化の歴史を通じて良く保存されている部分と、大きく変化している部分とがあることを明らかにし、MHCの意義と起源を考えるうえでの有益な情報を提供している。ここでは硬骨魚

類のMHCの遺伝子構成を哺乳類、鳥類、両生類のものと比較することにより、MHCの意義を系統発生的に考察してみたい。

2. 哺乳類、鳥類、両生類のMHC

図1にヒト、ニワトリ、アフリカツメガエルのMHCの、最も重要な連鎖群と考えられるものの遺伝子構成を模式的にまとめた。この図は主に遺伝子配置の種間比較のために作られたもので、基本的には他種でも確認されている遺伝子のみがとりあげてあり、また遺伝子の大小に関わらず同じ大きさで示してある。さらにここに示した範囲の物理的距離もヒトは約4000 kb、ニワトリは約100 kb、ゼノパスに至っては遺伝学的解析が行われたのみで物理的な距離はまったく不明のまま種間の対応関係はない。以下、種毎に見ていくと、Campbell and Trowsdale (1)に基づく最上段のマップは、一番解析が進んでおり、極めて信頼性が高いヒトのMHCである。実際には200以上の遺伝子の存在が知られており、セントロメア側から3つの亜領域、クラスII、クラスIII、クラスIに分かれており、それぞれ約1000 kb, 1000 kb, 2000 kbの長さを有している。ニワトリのMHCについては以前に本シリーズでも解説されたが(2)、その後主要なクラスターであるB-F/B-L領域の93 kbに及ぶコスミド・コンテイングの全塩基配列が決定された。この結果は論文としてはまだ発表されていないが、データベース上では公開されており (accession number: AL023516)、それに基づいて作成されたのが中段のマップである。100 kb足らずの短い範囲が明らかにされたに過ぎないが、その中に哺乳類のクラスI, II, IIIの全ての領

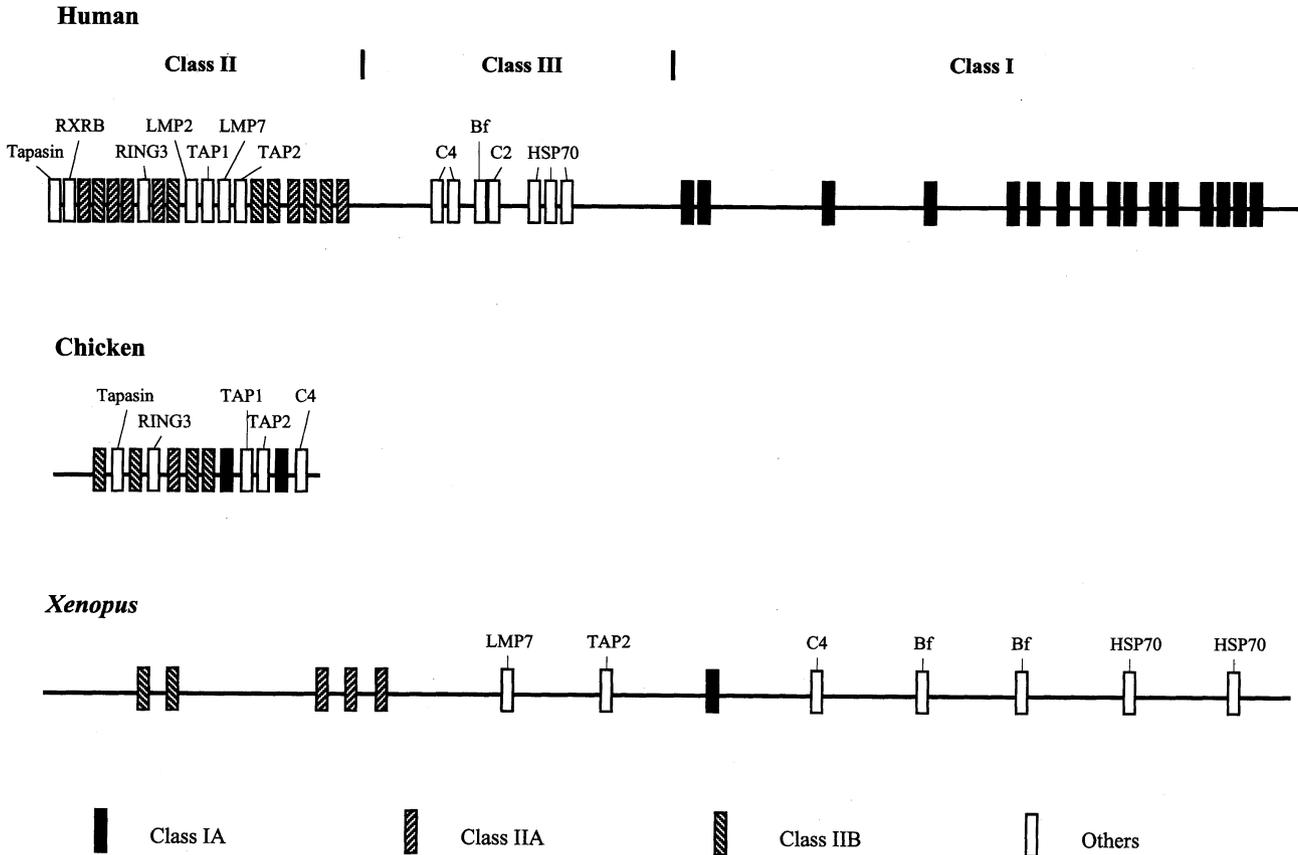


図1. ヒト、ニワトリ、ゼノパスのMHCの遺伝子構成

ニワトリ、ゼノパスについては他の連鎖群の存在も知られているが、主要と思われるもののみ示した。遺伝子の配列順序を比較する為の図であり、縮尺は種間で対応していない。

域の遺伝子が含まれており、ニワトリのMHCにはクラスIII遺伝子は存在しないであろうという従来の予想は覆された。また、最下段はゼノパスMHCの遺伝子地図であるが、これは前二者と異なり、純粋に遺伝学的な解析に基づいたものである。連鎖解析中に見出されたLMP7とクラスI、C4とBfの間で組み換えをおこした二個体に基づくマップで、実際にはゼノパスMHCが3つの領域に分けられ、そのうちクラスI/C4領域が真ん中に存在することが判明しただけで、各領域内の遺伝子配置については情報がなく、ここでは任意に並べてある(3)。また、全体の、及び各遺伝子間の物理的な距離についてはまったく不明のままである。この様に、図1は解析の範囲、程度の全く異なる3種のMHCの乱暴な比較ではあるが、この図からもいくつかの興味ある点を読みとれる。

まず、ヒトのクラスII領域にはクラスI抗原のプロセシングと輸送に関わるTapasin, LMP, TAP遺伝子が存在している。図2に示す如くクラスI分子上に

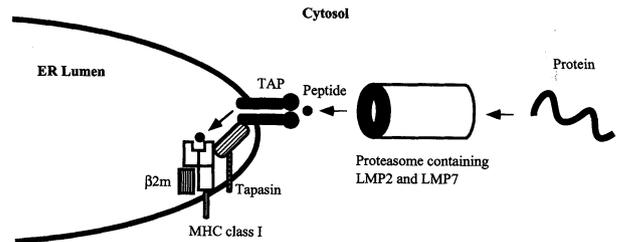


図2. クラスI抗原提示の模式図

細胞内タンパク抗原がクラスI分子上に提示されるまでの過程をMHC内部にコードされている遺伝子を中心に示す。

提示されるウイルス等に由来する細胞内タンパク抗原は、プロテアソームによりペプチドに分解される。プロテアソームは巨大なタンパク分解装置で、プロテアーゼ活性を担う20Sプロテアソームと呼ばれるそのコア部分だけでも分子量3万程度のサブユニット28個からなっている。28のサブユニットは α , β に分類され、それぞれが7種類ずつ存在する。構造上プロテアーゼ活性を有すると考えられるのは β サブユニットのうちの3種類だけであるが、興味深いことにこの3種類にはそれぞれインターフェロン γ によって誘導されるサブユニットが用意されており、インターフェロン γ の誘導によりサブユニットの置換がおこり、プロテアソームの活性が抗原ペプチドの切り出しに有利な方向に変化すると考えられている。サブユニットの置換がおこったものをイムプロテアソームと呼ぶことが提唱されており(4)、置換サブユニットのうちの2つがLMP2とLMP7である。イムプロテアソームで低分子ペプチドに分解された抗原は、TAP1/TAP2のヘテロダイマー型TAP膜トランスポーターによってER内に輸送され、Tapasinを介してTAPと複合体を形成しているクラスI分子(5)と結合し、細胞表面に運ばれてT細胞に提示されることになる。この様にヒトMHCクラスII領域に遺伝子が存在するLMP2, LMP7, TAP1, TAP2, TapasinはクラスI抗原提示の過程で密接に関連した機能を果たしている。興味深いことにLMP, TAP, Tapasinの間には構造上の共通点は全く存在せず、クラスIA遺伝子も含めて機能関連、構造無関係遺伝子の連鎖の例といえる。同様な機能関連、構造無関係遺伝子の連鎖の例はヒトMHCクラスIII領域にも見られる。ここには3種類の補体成分C4, C2, Bの遺伝子が存在している(6, 7)。C2とBはそれぞれ古典経路、第二経路のC3転換酵素のプロテアーゼ活性を担う成分であり、セリン・プロテアーゼ・ドメインを始めとしてドメイン構造が完全に一致しており、遺伝子重複の産物と考えられる。ヒト、マウス共にC2遺伝子の3端からB遺伝子の5端までは500 bpと離れておらず(8)、両遺伝子の連鎖は縦列遺伝子重複の結果を反映したものと考えると不思議はない。それに対してC4はC2, Bとはまったく構造上の共通性がなく、一方機

能面ではC2と密接な関係を有し、C2と分子集合して古典経路のC3転換酵素を形成する。従ってC4, C2も機能関連、構造無関係遺伝子の連鎖の例を提供していることになる。系統発生的な解析は、この様に興味深い連鎖群の起源と進化を明らかにしつつある。

先ず、クラスI抗原提示に関わる遺伝子群では、Tapasin, TAP1, TAP2がニワトリで、LMP7, TAP2がゼノパスでクラスIAと連鎖している。両種共に解析は未だ不完全であるため、今後残りの遺伝子が近傍から発見される可能性は十分に考えられる。ただしゼノパスLMP2に関しては別の染色体に存在することが明らかになっている(9)。これはゼノパスの系統で生じた比較的最近の四倍体化によりMHC領域が重複し、その後二つのMHC領域のそれぞれ異なる亜領域が不活化された結果と解釈されている。図1に示した如く、大部分の遺伝子は一方のMHC領域に存在し、もう一方の領域にはこれまでにLMP2とRING3が確認されている。これは擬四倍体種という特殊な事情に基づく例外的な配置と考えて良いだろう。哺乳類のクラスI抗原提示に関わる遺伝子群について不思議な点は、これら遺伝子がクラスI領域ではなく、クラスII領域に存在することである。しかしながら図1に示される如く、ニワトリではTAP1, TAP2遺伝子は二つのクラスI遺伝子の間に存在し、ゼノパスではLMP7, TAP2がクラスIIとクラスI遺伝子の間に存在するなど、これらの遺伝子は哺乳類以外ではより密接にクラスI遺伝子と連鎖しており、それがMHCの本来の姿であることが示唆された。一方の補体遺伝子間の連鎖については、哺乳類以外では未だにC2が同定されていないことから情報不足であり(10)、その起源は今後古典経路の起源と共に明らかにされなければならない問題である。以上より、クラスI, II, III遺伝子のいくつか互いに密接な連鎖を保ってMHCを形成するという基本的な構造は哺乳類、鳥類、両生類を通じて良く保存されていると言えよう。ここで注目されるのは、連鎖する遺伝子の配置順序に関してはこれら3種間でも大きく異なっている点で、3億年あまりの間にこの領域内でかなりの回数の組み換えが起こったことが示唆される。つまり、これらMHC遺伝

子間の連鎖は、たまたま進化の過程で組み換えが起こらなかった為に保存されているのではない。度重なる組み換えにも関わらず連鎖が保存されているという事実は、それを保つ方向に働く淘汰圧の存在を示唆している。

3. 硬骨魚類のMHC

クラスIA遺伝子：クラスIA遺伝子はこれまでに多数の硬骨魚からクローン化されているが、遺伝子座の数には種差が大きく、コイ、ゼブラフィッシュ、グッピー、サケなど数個のものからシクリド、トゲウオ、タラ、フグのように10を越えるものまである(11、12)。従って、硬骨魚類の進化過程で大幅な遺伝子数の増加が少なくとも2回、ParacanthopterygiiとPercomorphaの系統で起こったと考えられる。コイからはU, Zと名付けられた2種類の遺伝子が単離されたが、前者はclassical class I、後者はnon-classical class Iと考えられている(13)。コイのUはサケのUAとよく似ているが、他のサケの遺伝子A, Bはむしろ高位群の種との共通性を示す。この結果は、高位群の祖先はコイ科よりもサケ科に近いものであったことを示唆している。

クラスIIA遺伝子：硬骨魚の発現しているクラスIIA遺伝子はこれまでにゼブラフィッシュから一つ、四倍体種であるコイから二つ報告されており、バスにも少なくとも二つの遺伝子座が存在することが判明している(14)。しかしながら、クラスIA、クラスIIB遺伝子に比べて解析は遅れており、硬骨魚類の特殊性や脊椎動物の進化における位置づけなどは未だ明らかになっていない。

クラスIIB遺伝子：クラスIIB遺伝子は10種類以上の硬骨魚から単離されており(14)、サケ、ニジマス、バス、ナマズ、ゼブラフィッシュからは唯一の発現する遺伝子座が確認されている。コイ、グッピー、ソードテイルは二つの遺伝子座が確認されており、特に後2種についてはその産物の配列が著しく異なることが知られており、DAB, DXBと名付けられている。DABはこれまでに報告された他の硬骨魚のクラスIIBのorthologueと考えられるのに対して、DXBは特殊化した配列を有する。今の所DAB型/DXB型の分化が何時生じたかは明らかでなく、

その起源は機能分化の可能性と共に興味深い問題を提示している。最近我々はメダカに於いて、2つの遺伝子座に分かれて存在する3つの発現しているクラスIIB遺伝子を確認した。配列はいずれもDAB型に属し、メダカの系統で最近生じた遺伝子重複の産物と考えられる(成瀬ら、未発表)。また、シクリドでは互いに連鎖する17以上のDAB型遺伝子の存在が報告され、個々のハプロタイプはこのうち1から13の遺伝子を有しているという(15)。殆どの遺伝子が発現しているようであるが、これは脊椎動物全体を見渡しても例外的なことである。エクソン-イントロン構造に関してはDXBはゼノパス、ニワトリ、ヒトのクラスIIB遺伝子に類似しており、硬骨魚類のDAB型遺伝子とは異なっている(16)。DAB型遺伝子のエクソン-イントロン構造に関しては、 β 2ドメインをコードするエクソンに余分なイントロンが挿入されていることがシクリドで発見された(17)。 β 2ドメインは硬骨魚以外の全ての脊椎動物では一つのエクソンでコードされており、硬骨魚でもOstariophysi, Protacanthopterygiiに属する種はこのイントロンを有しない。それに対して、メダカを含めたAtherinomorpha, Percomorphaに属する種はこのイントロンを有し、このイントロンの挿入が硬骨魚の進化過程の比較的新しい段階で生じたことが示唆されている(18)。

硬骨魚のMHCの遺伝子構成について先ず特記すべき点は、これまで解析された7種、ゼブラフィッシュ、コイ、サケ、メダカ(19)、グッピー、テイラピア、トゲウオ(20)の全てに於いてクラスIA遺伝子とクラスIIA, B遺伝子の間に連鎖が認められないことであろう。この7種は硬骨魚の中でも系統的に離れた様々なグループを代表しており、クラスIA、クラスIIA, B遺伝子間の連鎖の欠如は硬骨魚に共通の特徴と考えられる。前述の如く、この連鎖は哺乳類、鳥類、両生類では保たれているので、この点に関しては硬骨魚類と両生類の間に大きなギャップがあると言える。ただし、硬骨魚類に見られる遺伝子配置が祖先的なものであるか、派生的なものであるかは未だ明らかでなく、今後軟骨魚類や、ハイギョ、シーラカンス等の解析を通じて明らかにされるべき問題である。クラスIA、クラスIIA, B遺伝

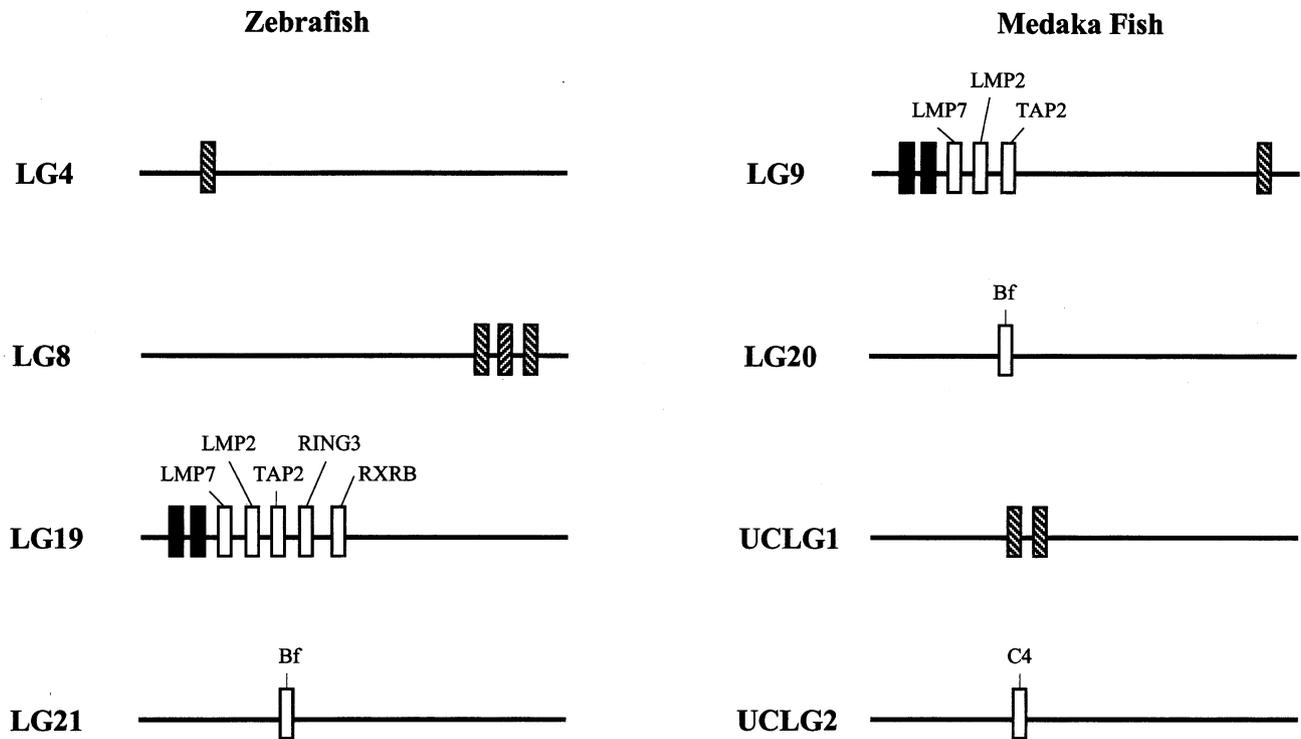


図3. 硬骨魚の分散型MHC

哺乳類MHC遺伝子のゼブラフィッシュ、メダカに於ける分布。LGはリンケージグループを、UCLGは所属不明のリンケージグループを示す。遺伝子のシンボルは図1と同じ。

子以外の哺乳類MHC遺伝子についての連鎖解析は主にゼブラフィッシュ（21～23）とメダカ（24、25、成瀬ら、未発表）で行われているので、図3に現在までの判明状況を示す。両種に共通して言えることは、先ずクラスI, II遺伝子間、及びこれらと補体遺伝子Bfによって代表されるクラスIII遺伝子との間に連鎖が認められないことである。つぎに注目されるのはクラスI抗原の提示に関わるLMP2, LMP7, TAP2遺伝子とクラスIA遺伝子との連鎖で、解析の進んでいるゼブラフィッシュではRING3, RXRBの遺伝子もこれらと連鎖していることが判明している。前述の如く、このような硬骨魚類における遺伝子配置が祖先的なものであるか、派生的なものであるかはさらに他種における情報の集積を待たねば結論出来ない。しかしながら、硬骨魚における遺伝子配置からは、クラスIA及びその抗原提示に関わる一連の遺伝子が進化上最も強く保存されてきたことは明白であり、この部分がMHCの中核であることが強く示唆される。更にメダカでは補体C4遺

伝子の連鎖解析も行われたが、クラスI、クラスII、補体Bf遺伝子の何れとも連鎖していなかった（黒田ら、未発表）。補体系の進化に関しては、硬骨魚類の段階でBf/C2の遺伝子重複と機能分化が完了していたかどうかは未だ明らかではないが、メダカにおけるBf, C4遺伝子間の連鎖の欠如は、硬骨魚が古典経路で機能しうるC2を有することに疑問を抱かせる。

4. おわりに

哺乳類以外のMHCの構造解析が急速に進んでおり、この遺伝子領域が脊椎動物の進化の過程でどのように変化してきたかが明らかになりつつある。これまでに判明した主要な点は、1) 哺乳類MHCに存在する遺伝子の多くはクラスI, II, IIIを問わず鳥類、両生類でも連鎖群を形成しているが、硬骨魚類ではこの連鎖群は崩れ、各遺伝子は多くの染色体に散在している。2) しかしながら、硬骨魚類においても、クラスIA遺伝子とクラスI抗原の提示に関与

しているいくつかの遺伝子は連鎖群を形成している。これらの事実からは以下の様な結論が導かれるであろう。1) MHCの中核部分はクラスI抗原の提示に関与する数種類の遺伝子からなり、これらの遺伝子間の連鎖は脊椎動物の進化の過程を通じて保存されている。2) MHC内部の遺伝子の配置は脊椎動物の系統毎に大きく変化している。従って、連鎖群の保存は進化の過程で偶々この領域で遺伝的組み換えが生じなかったことによるのではなく、連鎖を保つ方向に働く淘汰圧が存在したためであることが示唆される。以上より、MHCの本来の意義とは、クラスI抗原提示に関与する遺伝子群の強固な連鎖により、これら遺伝子の協調進化を保証し、クラスI抗原提示システムを確立することであったと考えられる。

今後解明されなければならない問題としては、両生類以上に認められた集中型MHCと硬骨魚に認められた分散型MHCでは、いずれがMHCの原型に近いのか？ MHCの遺伝子構成は偶然の産物か必然性をもって形成されたか？などが挙げられる。これらの問題に関しては、最近MHCの遺伝子構成は機能的なMHCの出現以前に偶然形成されたとする有力な仮説が提唱されている(26)。これから数年の間に、軟骨魚類を始めとしてより多くの下等脊椎動物で、様々なMHC遺伝子についての連鎖解析が行われることによりこの仮説が検証され、MHCの誕生、発展の様子がより明らかにされて行くものと思われる。

参考文献

1. Campbell RD, Trowsdale J: A map of the human major histocompatibility complex. *Immunol. Today* **18** : supplement, 1997.
2. 椎名隆: トリのMHC, *MHC* **4** : 16-24, 1998.
3. Nonaka M, Namikawa C, Kato Y, *et al.*: Major histocompatibility complex gene mapping in the amphibian *Xenopus* implies a primordial organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** : 5789-5791, 1997.
4. Tanaka K, Kasahara M: The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* **163** : 161-176, 1998.
5. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, *et al.*: A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277** : 1306-1309, 1997.
6. Carroll MC, Campbell RD, Bentley DR, *et al.*: A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* **307** : 237-241, 1984.
7. Chaplin DD, Woods DE, Whitehead AS, *et al.*: Molecular map of the murine S region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** : 6947-6951, 1983.
8. Nonaka M, Gitlin JD, Colten HR: Regulation of human and murine complement: comparison of 5' structural and functional elements regulating human and murine complement factor B gene expression. *Mol. Cell. Biochem.* **89** : 1-14, 1989.
9. Nonaka M, Namikawa-Yamada C, Sasaki M, *et al.*: Evolution of proteasome subunits delta and LMP2: complementary DNA cloning and linkage analysis with MHC in lower vertebrates. *J. Immunol.* **159** : 734-740, 1997.
10. Nonaka M, Kuroda N, Naruse K, *et al.*: Molecular genetics of the complement C3 convertases in lower vertebrates. *Immunol. Rev.* **166** : 59-65, 1998.
11. Miller KM, Withler RE: The salmonid class I MHC: limited diversity in a primitive teleost. *Immunol. Rev.* **166** : 279-293, 1998.
12. Timon M, Elgar G, Habu S, *et al.*: Molecular cloning of major histocompatibility complex class I cDNAs from the pufferfish *Fugu rubripes*. *Immunogenetics* **47** : 170-173, 1997.
13. Stet RJ, Kruiswijk CP, Saeij JP, *et al.*: Major histocompatibility genes in cyprinid fishes: theory and practice. *Immunol. Rev.* **166** : 301-316, 1998.
14. McConnell TJ, Godwin UB, Cuthbertson BJ: Expressed major histocompatibility complex class II loci in fishes. *Immunol. Rev.* **166** : 294-300, 1998.
15. Malaga-Trillo E, Zaleska-Rutczynska Z, McAndrew B, *et al.*: Linkage relationships and haplotype polymorphism among cichlid Mhc class II B loci.

- Genetics* **149** : 1527-1537, 1998.
16. McConnell TJ, Godwin UB, Norton SF, *et al.*: Identification and mapping of two divergent, unlinked major histocompatibility complex class II B genes in Xiphophorus fishes. *Genetics* **149** : 1921-1934, 1998.
17. Ono H, O'hUigin C, Vincek V, *et al.*: Exon-intron organization of fish major histocompatibility complex class II B genes. *Immunogenetics* **38** : 223-234, 1998.
18. Figueroa F, Ono H, Tichy H, *et al.*: Evidence for insertion of a new intron into an Mhc gene of perch-like fish. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **259** : 325-330, 1995.
19. Flajnik MF, Ohta Y, Namikawa-Yamada C, *et al.*: Insight into the primordial MHC from studies in ectothermic vertebrates. *Immunol. Rev.* **167** in press.
20. Klein J, Sato A: Birth of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* **47** : 199-209, 1998.
21. Bingulac-Popovic J, Figueroa F, Sato A, *et al.*: Mapping of mhc class I and class II regions to different linkage groups in the zebrafish, *Danio rerio*. *Immunogenetics* **46** : 129-134, 1997.
22. Takami K, Zaleska-Rutczynska Z, Figueroa F, *et al.*: Linkage of LMP, TAP, and RING3 with Mhc class I rather than class II genes in the zebrafish. *J. Immunol.* **159** : 6052-6060, 1997.
23. Gongora R, Zaleska-Rutczynska Z, Takami K, *et al.*: Linkage of RXRB-like genes to class I and not to class II Mhc genes in the zebrafish. *Immunogenetics* **48** : 141-143, 1998.
24. Kuroda N, Wada H, Naruse K, *et al.*: Molecular cloning and linkage analysis of the Japanese medaka fish complement Bf/C2 gene. *Immunogenetics* **44** : 459-467, 1996.
25. Namikawa-Yamada C, Naruse K, Wada H, *et al.*: Genetic linkage between the LMP2 and LMP7 genes in the medaka fish, a teleost. *Immunogenetics* **46** : 431-433, 1997.
26. Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, *et al.*: Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system. *Trends. Genet.* **13** : 90-92, 1997.

〔シリーズ：血清学〕血清学によるHLAクラスI抗原のアリルタイピング

斉藤 敏^{1), 2)}、大田 智¹⁾、太田 正穂²⁾、福島 弘文²⁾、瀬下 秀幸¹⁾、橋爪 清隆¹⁾、山田 英世¹⁾

1) 長野県赤十字血液センター、検査課 2) 信州大学医学部、法医学教室

要約

血清学タイピングによりHLAクラスI抗原が既知の337パネルのアリルタイピングを、PCR-RFLP、PCR-Lis-MPH、PCR-SSP法により実施し、血清学によるHLAクラスI抗原タイピングの結果とDNAタイピングの結果を比較、検討した。HLA-A座、B座のタイピング結果において、両方法の違いによる血清学レベルでの不一致は全く存在しなかったが、HLA-C座においては12例の不一致が存在した。アリルが規定する抗原に対応する抗血清がないために識別ができなかったケースが4例、抗原を決定するのに1種類の抗血清しか使用しなかったため偽陰性となったケースが3例、それぞれみられた。また、他の抗原により血清学的にマスクされるため識別できなかったケースが5例であった。さらに、血清学レベルタイピングでHLA-A座ホモ接合体と判定されたパネルがアリルタイピングで17例中10例が、HLA-B座で11例中4例が、HLA-C座で22例中9例が、それぞれヘテロ接合体であった。血清学的方法によりHLA-A座で31アリル、B座で47アリル、C座で18アリルが識別可能であった。

キーワード：

血清学、特異性、DNAタイピング

はじめに

HLA抗原の血清学タイピングは、精度や感度の点でDNAタイピングに対して優れているとはいえず、特に生存率の低い細胞を使用した際の偽陽性や、HLA検査が未実施のような人種のタイピングについては、判定不能の反応がしばしば観察されることから、血清学的方法の有効性に問題が生じる場合がある。実際、血清学によるHLAタイピング結果とDNAタイピングによる結果を比較した際に、10%から35%の範囲で血清学の誤判定が認められる(1-7)。しかしながら、両者の方法は全く異なる

原理にもとづく判定法である。すなわち、DNAタイピングはHLA抗原を規定する遺伝子の多型性を決定する検査法であり、一方、血清学によるHLAタイピングは抗血清を使用し細胞表面のHLA抗原蛋白との反応により、その多型性を決定する方法である。したがって、HLAの遺伝子は存在するものの、細胞表面上へのHLA分子が表現されていない、いわゆる、nullアリルに対しては(8-10)、血清学の情報なしに判定することは不可能であることから、血清学の重要性が再認識されつつある、といえる。ところが、増加の一途をたどるHLAの新しい

筆頭筆者連絡先：〒380-0836 長野市南県町1074
長野県赤十字血液センター、検査課
斉藤 敏

電話：026-228-4775
ファックス：026-228-5154
E-mail：s-saito@hia.cbc.jrc.or.jp

アリルはそのアリルとホモロジーの高いアリルとして登録されるので、BN21のように血清学的反応からはB49、B50と同じ交差反応性 (Cross Reactive Epitope Group=CREG) 抗原であるにもかかわらず、そのアリル名がB*4005と命名されたような例も少なくない。さらに、血清学データなしに登録された例も多く、アリルが規定する抗原の血清学的反応が全く不明な場合さえある。そこで本稿では、日本人のクラス I 抗原アリルを中心にそのアリルが規定する抗原の血清学反応にもとづき、血清学によるアリルの識別が可能か否かをDNAタイピングとの比較により調べた。

材料と方法

血清学タイピング

血清学的方法によるタイピングはLCT (lymphocyte cytotoxicity test) 法にて行い、補体はワシラムダ社の同一ロットの検定済みを使用した

(11)。クラス I 抗原タイピングに使用した抗血清はワークショップに提出されその特異性が決定された後、血清交換により得たものと、当センターで特異性を確定した144種である。抗血清に対するリンパ球の反応及び血清の評価は、平成9年度に当センターでタイピングした成分ドナー、患者及びその家族の中で同意の得られた各個人のデータとメルボルン血液センターより提供された外国人由来のデータ、あわせて総数337のデータに基づいて行った。

DNAタイピング

血清学的検討を行った337人分の凍結リンパ球をプロテナーゼKにより消化後、塩析にてDNAを抽出した (12)。HLA-A、B、のアリルタイピングはPCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 法とPCR-Lis-MPH (polymerase chain reaction-low ionic strength-microtiter plate hybridization) 法を併用して、実施した (13、14、15、16)。これらの方法では識別で

Table 1. Alleles observed in this analysis (337 panels)

| HLA-A | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|----|---------|----|----------------------|----|---------|-----|---------|----|---------|-----|---------|----|----------------------|----|
| Allele | N* | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N |
| A*0101 | 12 | A*0201 | 79 | A*0203 | 3 | A*0206 | 56 | A*0207 | 12 | A*0210 | 5 | A*0218 | 3 | A*0301 | 7 |
| A*0302 | 4 | A*1101 | 59 | A*1102 | 3 | A*1104 | 1 | A*2301 | 2 | A*2402 | 198 | A*2403 | 1 | A*2404 | 1 |
| A*2407 | 2 | A*2501 | 3 | A*2601 | 49 | A*2602 | 12 | A*2603 | 12 | A*2604 | 1 | A*2605 | 2 | A*2902 | 4 |
| A*3001 | 3 | A*3002 | 3 | A*3101 | 50 | A*3201 | 4 | A*3303 | 57 | A*3401 | 4 | A*3402 | 3 | A*3601 | 2 |
| A*6601 | 3 | A*6602 | 4 | A*6801 | 9 | A*6901 | 2 | A*7401 | 4 | | | | | | |
| HLA-B | | | | | | | | | | | | | | | |
| Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N |
| B*0702 | 48 | B*0801 | 1 | B*1301 | 11 | B*1302 | 5 | B*1401 | 6 | B*1402 | 2 | B*1501 | 49 | B*1502 | 4 |
| B*1503 | 4 | B*1507 | 2 | B*1511 | 3 | B*1516 | 1 | B*1518 | 10 | B*1525 | 1 | B*1527 | 1 | B*1801 | 1 |
| B*2704 | 4 | B*2705 | 2 | B*2708 | 1 | B*2711 | 2 | B*3501 | 49 | B*3505 | 2 | B*3701 | 8 | B*3801 | 1 |
| B*3802 | 3 | B*3901 | 29 | B*3902 | 5 | B*3904 | 3 | B*3906 | 1 | B*3908 | 1 | B*4001 | 29 | B*4002 | 56 |
| B*4003 | 1 | B*4005 | 2 | B*4006 | 25 | B*4007 | 1 | B*4101 | 2 | B*4201 | 2 | B*4402 | 4 | B*4403 | 51 |
| B*4501 | 1 | B*4601 | 22 | B*4701 | 2 | B*4801 | 20 | B*4803 | 1 | B*4901 | 1 | B*5001 | 3 | B*5101 | 44 |
| B*5102 | 5 | B*5103 | 4 | B*5201 | 65 | B*5301 | 3 | B*5401 | 44 | B*5502 | 16 | B*5504 | 2 | B*5901 | 12 |
| B*5601 | 4 | B*5603 | 2 | B*5701 | 2 | B*5703 | 1 | B*5801 | 8 | B*6701 | 11 | B*7301 | 2 | B*7801 | 2 |
| B*8101 | 1 | B*8201 | 1 | | | | | | | | | | | | |
| HLA-Cw | | | | | | | | | | | | | | | |
| Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N | Allele | N |
| Cw*0102 | 78 | Cw*0103 | 3 | Cw*0202 | 4 | Cw*0302 | 5 | Cw*0303 | 70 | Cw*0304 | 87 | Cw*0401 | 40 | Cw*0402 | 2 |
| Cw*0501 | 3 | Cw*0602 | 19 | Cw*0701 | 10 | Cw*0702 | 108 | Cw*0704 | 7 | Cw*0801 | 50 | Cw*0802 | 8 | Cw*0803 | 11 |
| Cw*0804 | 1 | Cw*1202 | 66 | Cw*1203 [#] | 4 | Cw*1402 | 31 | Cw*1403 | 51 | Cw*1502 | 17 | Cw*1505 | 3 | Cw*1601 [#] | 1 |
| Cw*17 | 4 | | | | | | | | | | | | | | |

*: number of panels

[#]: not assigned by serology

きないアレルとHLA-C座のタイピングにはPCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) 法を実施し、アレルを決定した (17、18、19)。PCRはHYBAIDのオムニジーンを用いた。

結果

表1に解析に使用したパネルのアレルとその数をしめす。表2～表6にHLA-A座アレルのコードする抗原の血清学的反応と抗血清の解析結果をしめす。A*0101、A*3601、A*0301、A*0302、

Table 2. Reactivity patterns of antisera against the A11 CREG antigen.

| Serum name | Specificity* ¹ | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/-* ² | R* ³ | Q score | other* ⁴ |
|------------|---------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-------------------|-----------------|---------|---------------------|
| | A*0101 | A*3601 | A*0301 | A*0302 | A*1101 | A*1102 | A*1104 | | | | | | | |
| MRCWATS | P* ⁵ | | | | | | | 10 | 0 | 0 | 327 | 1.000 | 8.35 | |
| MRCBOYD | P | P | | | | | | 12 | 0 | 0 | 325 | 1.000 | 8.80 | |
| 18-1905 | P | P | | | | | | 58 | 1 | 0 | 276 | 0.990 | 8.57 | A*2601 |
| 21-3943 | | | P | | | | | 7 | 0 | 0 | 328 | 1.000 | 7.84 | |
| 251130D | | | P | P | | | | 10 | 0 | 0 | 325 | 1.000 | 8.61 | |
| 20-5071 | | | P | P | | | | 10 | 0 | 1 | 324 | 0.952 | 8.61 | |
| 24-648 | | | P | P | P | | P | 68 | 0 | 0 | 267 | 1.000 | 10.28 | |
| 17-355 | | | | | P | P | P | 76 | 0 | 1 | 260 | 0.992 | 10.32 | A10 |
| 14F279 | | | | | P | P | P | 125 | 4 | 0 | 208 | 0.975 | 8.33 | A10 |
| 26P652 | | | | | P | P | | 52 | 0 | 0 | 284 | 1.000 | 10.61 | |
| 26P145 | | | | | P | P | | 55 | 0 | 3 | 278 | 0.969 | 10.06 | A*2501 |
| 25-5584 | | | | | | P | | 3 | 0 | 0 | 333 | 1.000 | 7.11 | |

*1: specificity against antigens encoded by respective alleles

*2: + and - refer to the positive and negative, respectively.

The first symbol in each pair refers to the antigen reaction and the second to the serum reaction.

*3: correlation coefficient

*4: additional specificity

*5: positive reaction against cells in category.

Table 3. Reactivity patterns of antisera against the A2 antigen.

| serum name | specificity | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|-------|
| | A*0201 | A*0203 | A*0206 | A*0207 | A*0210 | A*0218 | A*6801 | A*6901 | | | | | | | |
| 26-48 | P | P | P | P | P | | | | 126 | 3 | 0 | 205 | 0.981 | 8.73 | |
| 26-56 | P | P | P | P | P | | | | 126 | 2 | 1 | 203 | 0.981 | 9.92 | |
| 13-201 | P | P | P | P | P | | | | 127 | 2 | 0 | 205 | 0.987 | 9.31 | |
| BB7.2 | P | P | P | P | | P | | P | 129 | 1 | 0 | 203 | 0.994 | 10.16 | |
| P5.1 | P | P | P | P | | P | | P | 129 | 1 | 0 | 203 | 0.994 | 9.83 | |
| 20-1749 | P | | P | P | P | | P | P | 128 | 6 | 0 | 199 | 0.963 | 9.00 | |
| 26-572 | P | P | P | P | P | P | P | P | 139 | 1 | 1 | 192 | 0.988 | 10.18 | |
| 01-445 | | P | | | | | | | 88 | 3 | 0 | 243 | 0.977 | 8.00 | A10 |

Table 4. Reactivity patterns of antisera against the A9 antigen.

| serum name | Specificity | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
| | A*2301 | A*2402 | A*2403 | A*2404 | A*2407 | | | | | | |
| 08-91 | | P | P | P | P | 190 | 0 | 0 | 145 | 1.000 | 10.37 |
| 29-583 | | P | P | P | P | 190 | 0 | 0 | 145 | 1.000 | 11.04 |
| 26-1118 | P | P | P | P | P | 192 | 0 | 0 | 144 | 1.000 | 11.25 |
| 53-674 | P | P | P | | P | 191 | 0 | 1 | 144 | 0.994 | 11.18 |
| 23-346 | P | P | | P | P | 190 | 0 | 0 | 145 | 1.000 | 11.29 |
| 45-134 | P | P | | | P | 190 | 0 | 0 | 145 | 1.000 | 11.41 |

A*1101、A*1102、A*1104由来の抗原を12種類の抗血清を使用することで、100%識別することができた(表2)。A*0201、A*0206、A*0207由来の抗原は識別することができなかったが、A*0203、A*0210、A*0218、A*6801、A*6901由来の抗原は識別可能であった(表3)。A*2402とA*2407由来の抗原は識別できなかったが、A*2301、A*2403、A*2404由来の抗原は識別された(表4)。A*2501、A*2601、A*2602、A*2603、A*2604、A*2605、A*3401、A*3402、A*6601、A*6602由来の抗原を14種類の抗血清を使用することで、100%識別可能であった(表5)。A19CREGについては、A*3001とA*3002由来の抗原の識別ができなかった(表6)。

表7～表14にHLA-B座アリルにより支配される抗原の血清学的反応と抗血清の解析結果をしめす。

B15CREG抗原においては、抗血清のR値、Qスコアともにそれほど高くはないが、これらの血清を使用することで、B*1501、B*1507由来の抗原を除き、識別することができた(表7)。B*1527由来の抗原については、B*1501を同時に保有するパネルであったために血清学的反応が解析できなかった。B5CREG、B12、B13については、B*4402とB*4403由来の抗原が識別できないのを除いて、全て識別された(表8、9、10)。また、B*8201由来の抗原が抗B22および抗B12の一部の血清に反応し、識別された(表10)。B22CREGについては、B*2704とB*2705由来の抗原が識別できないのを除き、識別された(表11、12)。B16CREG抗原の解析においては、B*3801由来の抗原とB*3802由来の抗原、B*3901由来の抗原とB*3906由来の抗原、B*3902由来の抗原とB*3908由来の抗原について、そ

Table 5. Reactivity patterns of antisera against the A10CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|---------|
| | A*2501 | A*2601 | A*2602 | A*2603 | A*2604 | A*2605 | A*3401 | A*3402 | A*6601 | A*6602 | | | | | | | |
| 18-1905 | | P | | | | | | | | | 58 | 1 | 0 | 276 | 0.990 | 8.57 | A*01,36 |
| 67-750 | | P | | | | | | | | | 47 | 0 | 0 | 290 | 1.000 | 9.67 | |
| 26P291 | | P | P | | P | | | | | | 59 | 0 | 0 | 278 | 1.000 | 9.97 | |
| 25-1055 | | P | P | P | P | P | | | | | 73 | 0 | 0 | 264 | 1.000 | 10.35 | |
| 23-147 | | P | P | P | | | | | P | | 73 | 0 | 1 | 262 | 0.991 | 10.47 | |
| 26P786 | | P | | P | | P | | | P | | 63 | 1 | 0 | 273 | 0.990 | 9.95 | |
| 30-640 | P | P | | P | | P | | | P | | 66 | 1 | 0 | 270 | 0.991 | 9.83 | |
| 14F279 | | P | | P | | | P | P | P | | 125 | 4 | 0 | 208 | 0.975 | 8.33 | A*11 |
| 26P233 | | | | P | | | P | P | P | | 22 | 0 | 0 | 315 | 1.000 | 8.89 | |
| 17-355 | | | | P | | | P | P | P | | 76 | 0 | 1 | 260 | 0.992 | 10.32 | A*11 |
| 26-230 | P | P | P | P | | P | P | P | P | P | 91 | 1 | 1 | 244 | 0.985 | 10.09 | A28 |
| 01-445 | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | 88 | 3 | 0 | 243 | 0.977 | 8.00 | A*0203 |
| 26-790 | | | | | | | | | P | P | 106 | 3 | 2 | 217 | 0.966 | 7.91 | A19 |
| 26-409 | | | | | | | P | | | | 57 | 2 | 0 | 255 | 0.979 | 9.49 | A*33 |

Table 6. Reactivity patterns of antisera against the A19 CREG antigen.

| Serum name | Specificity | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|------------|
| | A*3303 | A*3001 | A*3002 | A*3101 | A*7401 | A*2902 | A*3201 | | | | | | | |
| KYO130 | P | | | | | | | 62 | 0 | 0 | 271 | 1.000 | 9.86 | A28 |
| 26-409 | P | | | | | | | 57 | 2 | 0 | 255 | 0.979 | 9.49 | A*3401,A28 |
| 39-417 | P | | | | | | | 62 | 0 | 0 | 267 | 1.000 | 10.62 | A28 |
| 26-407 | P | | | | P | P | | 92 | 2 | 1 | 234 | 0.978 | 9.58 | |
| 26-790 | P | P | P | P | P | P | | 106 | 3 | 2 | 217 | 0.966 | 7.91 | A*34,A*66 |
| 26-68 | | P | P | P | | | | 50 | 0 | 1 | 278 | 0.988 | 9.81 | |
| 26-373 | | P | P | P | | | | 51 | 0 | 7 | 270 | 0.926 | 9.68 | |
| 26-496 | | P | P | P | | | | 50 | 0 | 0 | 279 | 1.000 | 10.06 | |
| B0636 | | P | P | | | | | 5 | 0 | 1 | 320 | 0.911 | 7.24 | |
| 24-648 | | | | | | | P | 68 | 0 | 0 | 267 | 1.000 | 10.28 | A*11 |

れぞれ同じ反応パターンが観察されたが、B*6701由来の抗原、B*3904由来の抗原の反応パターンを含め5パターンに分類することができた(表13)。B40CREG抗原については、B*4002、B*4003、B*4006由来の抗原が同じ反応パターンをしめし、識別できなかつた以外は、すべて識別された(表14)。HLA-A座、B座の血清学レベルでのタイピングにおいては、血清学によるタイピングの判定結果とDNAレベルでのタイピングの判定結果に相違があったものはなかつた。

HLA-C座アレルがコードする抗原の解析結果を表15-表18にしめす。Cw*0302由来の抗原とCw*

0304由来の抗原、Cw*0701由来の抗原とCw*0702由来の抗原、Cw*0802由来の抗原とCw*0804由来の抗原については、識別ができなかつた。Cw*1505由来の抗原とCw*17由来の抗原の判定は可能であつた。HLA-C座においては、12パネルについて血清学的タイピングによる判定結果とDNAタイピングによる判定結果に相違が見出された。すなわち、Cw*1601とCw*1203の2アレル由来の抗原に対応する抗血清がないため、血清学的方法では判定することができなかつた4例、Cw17が存在するときCw7が血清学的にマスクされるためCw7を判定できなかつた2例、Cw704が存在したとき

Table 7. Reactivity patterns of antisera against the B15CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|--------|
| | B*1501 | B*1502 | B*1503 | B*1507 | B*1511 | B*1516 | B*1518 | B*1525 | B*4601 | | | | | | | |
| FOST | | P | | | | | | P | | 44 | 2 | 1 | 287 | 0.962 | 9.05 | B*35 |
| K9591 | | P | P | | | | | | | 48 | 4 | 2 | 281 | 0.931 | 7.26 | B*35 |
| 57-4040 | P | P | P | P | P | | P | P | | 107 | 2 | 7 | 219 | 0.940 | 8.88 | B*35 |
| 26-95 | P | P | P | P | P | | P | P | | 94 | 12 | 4 | 223 | 0.888 | 6.04 | B*5001 |
| 26-489 | | | P | | | | P | P | | 15 | 3 | 8 | 308 | 0.721 | 4.45 | B*5001 |
| 24-957 | | | | | | | P | | | 57 | 1 | 0 | 275 | 0.990 | 9.88 | B*05 |
| 251140D | | | | | | | P | | | 13 | 0 | 10 | 306 | 0.740 | 7.07 | B*35W |
| 39-83 | P | | | P | | | | P | | 43 | 2 | 1 | 287 | 0.961 | 8.93 | |
| 45-7907 | P | | | P | | | | P | | 46 | 0 | 2 | 286 | 0.976 | 10.00 | |
| 24-742 | P | P | | P | P | P | | P | | 52 | 0 | 0 | 283 | 1.000 | 10.38 | |
| 26-987 | P | P | | P | P | P | | P | | 55 | 0 | 1 | 281 | 0.989 | 10.25 | B*57 |
| REGEH | | | | | | P | | | | 4 | 0 | 0 | 331 | 1.000 | 7.02 | B*57 |
| 18K862 | | | | | P | | | | | 3 | 0 | 0 | 332 | 1.000 | 6.93 | |
| 39-357 | | | | | P | | | | | 3 | 0 | 0 | 332 | 1.000 | 6.78 | |
| 25-954 | | | | | P | | | | P | 20 | 0 | 0 | 315 | 1.000 | 9.46 | |
| 64-529 | | | | | | | | | P | 21 | 1 | 0 | 295 | 0.975 | 8.80 | |
| 02-180 | | | | | | | | | P | 21 | 1 | 1 | 292 | 0.951 | 8.29 | |

Table 8. Reactivity patterns of antisera against the B5CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|--------|
| | B*5201 | B*5101 | B*5102 | B*5103 | B*5301 | B*3501 | B*3505 | B*4901 | B*1801 | B*7801 | | | | | | | |
| 26P124 | P | | | | | | | | | | 64 | 0 | 0 | 268 | 1.000 | 10.26 | |
| 53-568 | P | | | | | | | | | | 64 | 0 | 2 | 266 | 0.981 | 9.80 | |
| 63-304 | P | | P | | | | | P | | | 69 | 1 | 0 | 262 | 0.991 | 10.48 | |
| 26-942 | P | P | P | P | | | | P | P | P | 112 | 0 | 2 | 219 | 0.987 | 11.03 | |
| 26-355 | | P | | | | | | | | | 57 | 1 | 0 | 275 | 0.990 | 9.88 | |
| F4985 | | P | | | | | | | | | 41 | 0 | 3 | 288 | 0.960 | 9.63 | |
| 24-957 | | P | P | | P | | | | | | 57 | 1 | 0 | 275 | 0.990 | 9.88 | B*1518 |
| 53-139 | | P | P | | | | | | | | 45 | 0 | 0 | 286 | 1.000 | 10.15 | |
| FOST | | | | | | P | | | | | 44 | 2 | 1 | 287 | 0.962 | 9.05 | |
| K9591 | | | | | | P | | | | | 48 | 4 | 2 | 281 | 0.931 | 7.26 | B*1502 |
| 26-836 | | | P | | P | P | P | | | | 51 | 0 | 1 | 281 | 0.989 | 10.06 | |

Cw803がマスクされ判定できなかつた1例、Cw1があるためにCw1403が判定できなかつた1例、Cw*1202由来の抗原に対する抗血清の反応が弱いため偽陰性となつた3例の計12例である(表19)。

Table 9. Reactivity patterns of antisera against the B59, B8, B37 and B13 antigens.

| serum name | Specificity | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|--------|
| | B*5901 | B*0801 | B*3701 | B*1301 | B*1302 | | | | | | | |
| 24-1118 | P | P | | | | 12 | 0 | 0 | 321 | 1.000 | 8.25 | |
| 26-116 | P | P | | | | 12 | 0 | 0 | 318 | 1.000 | 8.69 | |
| 24-1799 | P | | | | | 11 | 0 | 0 | 321 | 1.000 | 8.09 | |
| B1373 | | | P | | | 8 | 0 | 0 | 307 | 1.000 | 7.93 | |
| B1791 | | | P | | | 8 | 0 | 0 | 307 | 1.000 | 7.97 | |
| 26P277 | | | | P | P | 11 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.10 | |
| 29-514 | | | | P | P | 12 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.23 | B*4007 |
| 26-270 | | | | P | P | 12 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.23 | B40 |
| 20-6487 | | | | | P | 103 | 1 | 2 | 206 | 0.978 | 10.56 | B40 |

Table 10. Reactivity patterns of antisera against the B12CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|--------|
| | B*4402 | B*4403 | B*4501 | B*8201 | B*5701 | B*5703 | B*5801 | B*1401 | B*1402 | | | | | | | |
| 26P432 | P | P | | | | | | | | 55 | 0 | 2 | 256 | 0.978 | 9.91 | |
| 26-798 | P | P | | | | | | | | 55 | 0 | 0 | 258 | 1.000 | 9.67 | |
| 16-816 | P | P | P | P | | | | | | 56 | 0 | 1 | 256 | 0.989 | 10.15 | |
| GAROZ | | | P | P | | | | | | 1 | 0 | 0 | 312 | 1.000 | 5.77 | |
| 26P617 | | | | | P | P | P | | | 11 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.49 | |
| 18K505 | | | | | P | P | P | | | 11 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.74 | |
| REGEHR | | | | | P | P | | | | 4 | 0 | 0 | 331 | 1.000 | 7.02 | B*1516 |
| JORDAN | | | | | P | | | | | 2 | 0 | 0 | 311 | 1.000 | 5.98 | |
| R4-3629 | | | | | P | | | | | 2 | 0 | 0 | 311 | 1.000 | 6.05 | |
| 01-4389 | | | | | | | | P | P | 8 | 0 | 0 | 300 | 1.000 | 7.82 | |
| 20-6712 | | | | | | | | P | P | 8 | 0 | 0 | 310 | 1.000 | 8.02 | |
| BERNAR | | | | | | | | | P | 2 | 0 | 0 | 318 | 1.000 | 5.92 | |
| 26-693 | | | | P | | | | | | 55 | 0 | 0 | 256 | 1.000 | 9.95 | B22 |

Table 11. Reactivity patterns of antisera against the B22CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
| | B*5401 | B*5502 | B*5504 | B*5601 | B*5603 | B*4201 | | | | | | |
| 26P281 | P | | | | | | 38 | 3 | 0 | 269 | 0.957 | 9.27 |
| 34H040 | P | | | | | | 38 | 3 | 0 | 269 | 0.957 | 9.27 |
| 26-693 | P | P | | P | | | 55 | 0 | 0 | 256 | 1.000 | 9.95 |
| 24-940 | P | P | | P | | | 55 | 0 | 0 | 256 | 1.000 | 9.66 |
| 26-306 | P | P | | | | | 38 | 3 | 0 | 269 | 0.957 | 9.27 |
| 45-415 | | P | P | | | P | 15 | 0 | 3 | 293 | 0.908 | 8.63 |
| 20-956 | | P | P | | | P | 14 | 1 | 1 | 295 | 0.930 | 7.58 |
| 20-4499 | | | | P | P | | 6 | 0 | 2 | 303 | 0.863 | 7.63 |
| 26-528 | | | | P | P | | 6 | 0 | 1 | 305 | 0.924 | 7.08 |

Table 12. Reactivity patterns of antisera against the B7CREG antigen.

| Serum name | Specificity | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|-------|
| | B*0702 | B*2704 | B*2705 | B*2708 | B*2711 | B*4201 | B*7301 | B*8101 | | | | | | | |
| 26-217 | P | | | | | P | P | | 45 | 0 | 0 | 270 | 1.000 | 10.36 | |
| 26P654 | P | | | P | | | | P | 43 | 0 | 1 | 271 | 0.987 | 10.25 | |
| 26-199 | P | P | P | P | | P | P | P | 54 | 0 | 0 | 262 | 1.000 | 10.30 | |
| LAROCH | | P | P | P | P | | | | 8 | 0 | 1 | 308 | 0.941 | 7.43 | |
| 67-668 | | P | P | | P | | | | 8 | 0 | 0 | 309 | 1.000 | 7.82 | |
| 26-1081 | | | | | P | | | | 109 | 1 | 1 | 191 | 0.985 | 8.57 | B40 |

Table 13. Reactivity patterns of antisera against the B16CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
| | B*6701 | B*3801 | B*3802 | B*3901 | B*3902 | B*3904 | B*3906 | B*3908 | | | | | | |
| 18-2339 | P | | | | | | | | 9 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 7.86 |
| 26-658 | P | | | | | | | | 9 | 0 | 0 | 303 | 1.000 | 8.02 |
| 23-079 | P | | | | | | | | 9 | 0 | 2 | 302 | 0.902 | 7.01 |
| 26P321 | P | P | P | P | P | P | P | P | 42 | 0 | 2 | 272 | 0.973 | 9.49 |
| 67-813 | | P | P | P | P | P | P | P | 34 | 1 | 2 | 279 | 0.953 | 9.04 |
| 50-2176 | | P | P | P | | P | P | | 29 | 1 | 1 | 286 | 0.963 | 8.45 |
| KYO61 | | P | P | P | | | P | | 27 | 0 | 1 | 289 | 0.980 | 8.56 |
| 14-1685 | | | | P | | | P | | 25 | 0 | 0 | 293 | 1.000 | 9.02 |
| 570920 | | | | P | P | P | P | P | 33 | 0 | 4 | 279 | 0.938 | 10.05 |

Table 14. Reactivity patterns of antisera against the B40CREG antigen.

| serum name | Specificity | | | | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|-------|
| | B*4801 | B*4803 | B*4001 | B*4002 | B*4003 | B*4006 | B*4007 | B*8101 | B*4101 | B*4701 | | | | | | | |
| 18F1001 | P | | | | | | | | | | 19 | 0 | 2 | 293 | 0.948 | 8.57 | |
| 60-647 | P | P | | | | | | | | | 19 | 0 | 2 | 293 | 0.948 | 9.05 | |
| 53-605 | | | P | | | | | | | | 24 | 2 | 4 | 281 | 0.879 | 6.14 | |
| SAVA | | | P | | | | | | | | 25 | 1 | 2 | 282 | 0.938 | 7.89 | |
| 7089022 | P | P | P | | | | | P | | | 45 | 1 | 0 | 265 | 0.987 | 8.41 | |
| 26-1081 | P | P | P | P | P | P | P | P | | | 109 | 1 | 1 | 191 | 0.985 | 8.57 | |
| 20-6487 | | | P | P | P | P | | | P | P | 103 | 1 | 2 | 206 | 0.978 | 10.56 | |
| 26-270 | | | P | P | P | P | | | | P | 12 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.23 | B*13 |
| 12-447 | | | P | P | P | P | | | | P | 98 | 1 | 1 | 213 | 0.985 | 9.07 | |
| 24-302 | | | | P | P | P | | | | P | 72 | 2 | 0 | 227 | 0.982 | 7.14 | |
| 29-514 | | | | | | | P | | | | 12 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 8.23 | B*13 |

Table 15. Reactivity patterns of antisera against the Cw1, Cw3 and Cw14 antigens.

| serum name | Specificity | | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score |
|------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
| | Cw*0102 | Cw*0103 | Cw*1402 | Cw*1403 | Cw*0302 | Cw*0303 | Cw*0304 | | | | | | |
| 29-191 | P | | | | | | | 71 | 0 | 0 | 241 | 1.000 | 9.98 |
| 25-49 | P | P | | | | | | 86 | 3 | 2 | 221 | 0.961 | 7.48 |
| 23-122 | P | P | P | P | | | | 136 | 1 | 2 | 172 | 0.980 | 9.79 |
| 20-3183 | | | | P | P | P | P | 177 | 0 | 0 | 136 | 1.000 | -10.33 |
| 23-826 | | | | | P | P | P | 141 | 1 | 0 | 169 | 0.994 | 10.20 |
| 67-173 | | | | | P | P | P | 142 | 0 | 3 | 165 | 0.981 | 10.44 |
| 26-755 | | | | | | P | | 58 | 2 | 0 | 251 | 0.979 | 8.06 |
| 20-1373 | | | | | | | P | 57 | 3 | 1 | 250 | 0.958 | 6.99 |

Table 16. Reactivity patterns of antisera against the Cw4, Cw6 and Cw15 antigens.

| serum name | Specificity | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score |
|------------|-------------|---------|---------|---------|---------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
| | Cw*0401 | Cw*0402 | Cw*0602 | Cw*1502 | Cw*1505 | | | | | | |
| 26-39 | P | | | | | 31 | 2 | 1 | 279 | 0.949 | 6.63 |
| 11-531 | P | P | | | | 35 | 0 | 0 | 278 | 1.000 | 9.42 |
| 53-705 | P | P | P | | P | 53 | 0 | 0 | 263 | 1.000 | 9.71 |
| 31-761 | | | P | | | 17 | 0 | 1 | 298 | 0.970 | 8.16 |
| DB5424 | | | P | P | | 31 | 0 | 0 | 286 | 1.000 | 9.11 |
| 31-603 | P | P | | P | | 52 | 0 | 0 | 265 | 1.000 | 9.42 |

Table 17. Reactivity patterns of antisera against the Cw2, Cw7 and Cw17 antigens.

| serum name | Specificity | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|---------|---------|---------|-------|---------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|-------|
| | Cw*0202 | Cw*0701 | Cw*0702 | Cw*0704 | Cw*17 | Cw*1505 | | | | | | | |
| JONE | P | | | | P | | 9 | 0 | 0 | 304 | 1.000 | 7.99 | |
| ANDRINI | P | | | | | | 4 | 0 | 0 | 309 | 1.000 | 6.96 | |
| 29-684 | | P | P | P | P | P | 108 | 1 | 0 | 209 | 0.993 | 9.28 | |
| 45-421 | | P | P | P | P | | 105 | 1 | 1 | 211 | 0.986 | 9.22 | |
| 26-1096 | | P | P | P | P | P | 102 | 7 | 0 | 203 | 0.951 | 8.34 | |
| 26-1173 | | | | P | | | 68 | 0 | 0 | 244 | 1.000 | 9.94 | Cw*08 |

Table 18. Reactivity patterns of antisera against the Cw12, Cw5 and Cw8 antigens.

| serum name | Specificity | | | | | | +/+ | +/- | -/+ | -/- | R-value | Q-score | other |
|------------|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|-----|-----|-----|-----|---------|---------|---------|
| | Cw*1202 | Cw*0501 | Cw*0801 | Cw*0802 | Cw*0803 | Cw*0804 | | | | | | | |
| 21-3288 | P | | | | | | 51 | 3 | 0 | 203 | 0.965 | 6.98 | |
| MYON | | P | | P | | P | 11 | 0 | 0 | 302 | 1.000 | 7.78 | |
| ELY | | P | | P | | P | 11 | 0 | 0 | 303 | 1.000 | 8.33 | |
| AY732 | | | P | P | | P | 52 | 0 | 3 | 258 | 0.967 | 9.08 | |
| 26-1173 | | | P | P | P | P | 68 | 0 | 0 | 244 | 1.000 | 9.94 | Cw*0704 |
| 18K1116 | | | P | | | | 43 | 0 | 0 | 270 | 1.000 | 9.45 | |

Table 19. HLA-Cw discrepancies in the assignment between serology and PCR-SSP in HLA-Cw heterozygotes.

| Serology | | PCR-SSP | |
|----------|-----|---------|---------|
| Cw15 | CBL | Cw*1502 | Cw*1601 |
| Cw17 | CBL | Cw*17 | Cw*0701 |
| Cw17 | CBL | Cw*17 | Cw*0701 |
| Cw17 | CBL | Cw*17 | Cw*1505 |
| Cw704 | CBL | Cw*0704 | Cw*0803 |
| Cw9 | CBL | Cw*0303 | Cw*1203 |
| Cw6 | CBL | Cw*0602 | Cw*1203 |
| Cw6 | CBL | Cw*0602 | Cw*1203 |
| Cw1 | CBL | Cw*0102 | Cw*1402 |
| Cw1 | CBL | Cw*0102 | Cw*1202 |
| Cw1 | CBL | Cw*0102 | Cw*1202 |
| Cw9 | CBL | Cw*0303 | Cw*1202 |

% error rate: $12/694 \times 100 = 1.7\%$

考察

抗血清は一般的にはプライベートエピトープを識別する、すなわち単一のアリルに由来する抗原のみに特異的に反応する事は稀であり、多くの場合、複数のHLA分子に共有するパブリックエピトープを認識することから、一方の染色体上のアリル由来抗原が、他のアリル由来の抗原にマスクされるため、その存在が確認できない組み合わせも見出される。本稿の解析のなかでは、HLA-A、B座において識別不可能な組み合わせのパネルが存在しなかったため、血清学レベルの判定結果とDNAタイピングによる判定結果が不一致となった例はなかったが、理論上は例えば、A*0101ホモとA*0101とA*3601ヘテロのような血清学的タイピングでは識別できないような組み合わせがA座、B座においてもいくつか存在する。HLA-C座においては使用した抗血清の数が少ないこともあり、偽陰性による不一致や、他の抗原によって血清学的にマスクされて陰性とタイプされた例が8例存在した。これらについては血清学的タイピングのみでは識別不可能と考えられる。また、血清学的タイピングでホモ接合体と予想されていたA2がDNAタイピングの結果、アリルレベルではヘテロ接合体だったパネルが17例中10例、B62で4例中1例、B61で7例中3例、Cw14で6例中3例、Cw7で11例中4例、Cw3で5例中2例見出された。これらについても血清学的方法のみでは識別できないと考えられる。

現在までのところ、反応する抗血清が見出されていないCw*1203は日本人においてはその頻度はきわめて低い。一方、白人ではMytilinessらによると、Cw*1203の遺伝子頻度は7.3%とされ、その頻度が高いにもかかわらず、このアリル由来の抗原を判別しうる抗血清がないとされている(4)。日本人においても、遺伝子頻度の高いB52と強い連鎖不平衡にあるCw*1202由来の抗原に対する抗血清は、過去長い間見出されていなかった。しかしながら、Cw*1202由来の遺伝子が導入されたトランスフェクタント細胞を使用することにより、血清番号21-3288の特異性が抗B52ではなく、Cw*1202由来の抗原に対する抗体であることが最近確認され

た(20)。この抗血清は、従来Cw*1202と強い連鎖不平衡にあるB52に対して反応すると考えられていたが、おそらく同様の理由で、Cw*1203由来の抗原に対する抗血清もいまだ見出されていないと考えられる。Cw*1203は日本人には稀なB18抗原と強い連鎖不平衡がある(21, 22)。B18を識別する抗血清は良質でモノスペシフィックなものが多いが、今回の解析に用いられなかったそれらのなかに、B18抗原を保有しない11パネルが反応している血清があり、興味あることに、このエクストラ反応を示した11パネルはすべてHLA-C座に血清学的ブランクがあった。そこでこの11パネルのなかでDNA採取が可能であった4パネルにつき、HLA-C座のDNAタイピングを行ったところ、4パネル全てがCw*1203を保有していることが確認された。この事実は、偽陽性、あるいはエクストラ反応と思われていた抗血清に対するパネルの反応が特定のアリル産物に対するものであり、この血清が抗B18の特異性のほかに、Cw*1203由来の抗原に対する特異性を有する可能性をしめしている。また、本研究で血清番号251140D (B*1518がコードする抗原に対する特異性を有する)は、DNAタイピングでB*3501と判定されたB35の約1/3のパネルリンパ球のみに反応した。この特異的反応はアリルレベルの特異性由来する可能性がある。

本稿で我々は血清学的方法によりHLA-A座で31アリル、B座で47アリル、C座で18アリルの識別が可能であったが、1種類のパネルにしか見出されていないアリルについて、その細胞に対する反応性のみで血清学的特異性を決定することが、適切か否かは大問題であり、できうれば1アリルについて3種類以上のパネルとの反応性から結果を出すのが望ましい。また、我々が使用している血清では識別できなかったアリルを識別している他施設もある。木下らは、A*3001とA*3004由来の抗原に対する反応性の違いを第1回日本組織適合性学会において発表し、その後A*3002由来の抗原に対する反応性の相違も見出した(私信)。一方、山崎らは、A*4002とA*4006由来の抗原に対する反応性の違いについて、第2回日本組織適合性学会において発表した。また、中島らのデータによれば、A*3901と

B*3906由来の抗原の識別、B*3902とB*3908由来の抗原の識別が可能である(私信)。血清学によるアレルタイピングは、PCR-SSO法でプローブの数を増やすのと類似した感覚で、血清数を増やし効率よく抗血清を選択することでかなり正確にアレルをタイプすることも可能と思われる。しかしながら、モノクローナル抗体を除く抗血清はその量に限りがあることと、リンパ球の生存率や純度等の要因も考慮しなければならず、また大量検体を処理しなければならない施設においては、使用する抗血清の数が制限され、したがって抗血清の選択に当たっては、CREG全体を認識する血清を使用しなければならないため、アレルタイピングが可能なタイピングトレイを作成することは事実上難しい。

HLAタイピングが血清学的方法からDNAタイピング法に移行し、今後広範囲での血清学によるワークショップが開催されることはないであろう。しかし、血清学の情報なくしては細胞表面に実際にHLA分子が表出されているか否かの確認ができないことも明らかである。細胞表面上の分子検出のみに血清学的方法が必要とされるならば、パブリックエピトープに対する抗血清を使用するだけで十分とする考えも成立するかもしれない。しかしながら、骨髄移植において、HLAクラスI抗原のアレルレベルでの不適合(ミスマッチ)がGVHDや生存率に影響しているという報告があり(23)、そのなかでもHLA-A座のミスマッチが特に急性GVHDの危険因子とされていることと、日本人におけるA2、A26のホモ接合体の比率を考えると、血清学による同一抗原内のアレルの識別が必要になる場合も多いと予想されるので、アレル間を識別可能な抗血清の収集も必要と思われる。また、移植やHLA-PC (platelet concentrate: 濃厚血小板)のドナー選択で完全適合(マッチ)以外のドナーを選別する際、B*4005のようにアレル名とアレルがコードするCREG抗原とが異なる場合、アレルのホモロジーによるマッチングよりも、血清学におけるCREGレベルでのマッチングに基づいて選別する方法が良いと考えられるので、各アレル由来の抗原の血清学的反応も知る必要があると思われる。抗血清のアレル特異性を検討することで、例えば、血清番号26P233

がA*2603、A*3401、A*3402、A*6601由来の抗原に対する抗体であることから、この抗体が認識するエピトープが76V、77D、90Dを含むエピトープであることが推察される。このように、アミノ酸配列と血清学的な反応を比較することで、アレルレベルでのHLAクラスI分子のエピトープを推定することも可能と考えられる。

謝辞

タイピングトレイ作成に当たり貴重な抗血清を提供して下さいました多くの施設の先生方、貴重なタイピングデータを提供して下さいました神奈川県赤十字血液センターの中島先生、国立佐倉病院HLA検査室の山崎先生、兵庫県立西宮病院腎移植センターの木下先生、そして貴重なリンパ球を提供して下さいましたメルボルン赤十字血液センターのDr.Cantwellに心より感謝いたします。

参考文献

1. Yu N, Ohashi M, Alosco S, *et al.* : Accurate typing of HLA-A antigens and analysis of serological deficiencies. *Tissue Antigens* **50** : 380-386, 1997.
2. Bozon MV, Delgado JC, Turbay D, *et al.* : Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. *Tissue Antigens* **47** : 512-518, 1996.
3. Bozon MV, Delgado JC, Selvakkumar A, *et al.* : Error rate for GLA-B antigens assignment by serology: implications for proficiency testing and utilization of DNA-based typing methods. *Tissue Antigens* **50** : 387-394, 1997.
4. Mytilineos J, Christ U, Lempert M, *et al.* : Comparison of typing results by serology and polymerase chain reaction with sequence-specific primers for HLA-Cw in 650 individuals. *Tissue Antigens* **50** : 395-400, 1997.
5. Leorentzen DF, IwanagaKK, Meuer KJ, *et al.* : A 25% error rate in serologic typing of HLA-B homozygotes. *Tissue Antigens* **50** : 359-365, 1997.
6. Sintasath DM, Bei M, Steiner J, *et al.* : Analysis of

- HLA-A and -B serologic typing of bone marrow registry donors using polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotide probes and DNA sequencing. *Tissue Antigens* **50** : 366-371, 1997.
7. Hurley CK, Schreuder GMT, March SGE, *et al.* : The search for HLA-matched donors: a summary of HLA-A*, -B*, -DRB1/3/4/5* alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -DR antigens. *Tissue Antigens* **50** : 401-418, 1997.
 8. Ishikawa Y, Tokunaga K, Tanaka H, *et al.* : HLA-A null allele with a stop codon, HLA-A*0215N, identified in a homozygous state in a healthy adult. *Immunogenetics* **43** : 1-5, 1995.
 9. Lienert K, Russ G, Lester S, *et al.* : Stable inheritance of an HLA-"blank" phenotype associated with a structural mutation in the HLA-A*0301 gene. *Tissue Antigens* **48** : 187-191, 1996
 10. Mine H, Ishikawa Y, Hojo M, *et al.* : An HLA-B null allele(B*1526N) with a stop codon in exon 3 generated by a point mutation. *Tissue Antigens* **50** : 351-354, 1997
 11. Terasaki PI, McClelland JB : Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* **204** : 998-1000, 1964.
 12. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF : A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* **16** : 1215, 1988.
 13. Ogawa A, Mitunaga S, Tokunaga K, *et al.* : A nested PCR-RFLP method for high-resolution genotyping of HLA-B alleles. *MHC* **5** : 4-17, 1998.
 14. Moribe T, Kaneshige T, Inoko H, *et al.* : Complete HLA-A DNA typing using the PCR-RFLP method combined with allele group- and sequence-specific amplification. *Tissue Antigens* **50** : 535-545, 1997.
 15. Nakano H, Kawai S, Kashiwase K, *et al.* : DNA typing of HLA-A2, A26 and B61 alleles using the PCR-MPH method. *MHC* **3** : 205-212, 1998.
 16. Maruya E, Saji H, Yokoyama S : PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single-strand Conformation Polymorphism)- A simple Method for High resolution allele typing of HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1. *Genome Research* **6** : 51-57, 1996.
 17. Bunce M, Barnardo MCNM 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.
 18. Krausa P, Browning MJ : A comprehensive PCR-SSP typing system for identification of HLA-A locus alleles. *Tissue Antigens* **47** : 237-244, 1996.
 19. Mizuki N, Ohno S, Ando H *et al.* : A strong association between HLA-B*5101 and Behcet's disease in Greek patients. *Tissue Antigens* **50** : 57-60, 1997.
 20. Ando H, Miyata Y, Takata H *et al.* : Identification of alloantisera reacting with HLA-C blank (Cx52) using a mouse L-cell transfected with the HLA-Cw*1201 allele. *Hum. Immunol.* **36** : 76-80, 1993.
 21. Bunce M, Welsh KI : Rapid DNA typing for HLA-C using sequence-specific primers (PCR-SSP): Identification of serological and non-serologically defined HLA-C alleles including several new alleles. *Tissue Antigens* **43** : 7-17, 1994.
 22. Cereb N, Choi JW, Lee S *et al.* : Identification of two new HLA-C alleles, Cw*1203 and Cw*1402, from the sequence analysis of seven HLA homozygous cell lines carrying HLA-C blank. *Tissue Antigens* **44** : 193-195, 1994.
 23. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y *et al.* : Effect of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from unrelated donor. *N Engl J Med* **339** : 1177-1185, 1998.

〔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

MHC第2巻、第2号からスタートした“最新アリル情報”は、クラスI (A,B,C) とクラスII (DQ, DQ, DP) 各遺伝子座のシークエンスデータの掲載を一通り終了したが、これ以降にも新しいアリルが続々とWHO命名委員会により更新されている。このような状況下では過去に掲載したシークエンスデータが利用できないこともあることから、新たに最新のシークエンスデータを掲載することとなった。

今回のDRアリルについてはWHO命名委員会が報告している1998年9月更新分までを掲載した。なお、シークエンスデータ中DRA*0101またはDRB1*0101と同じ塩基である場合は、ハイフオン

(-)で、異なっている場合にはその塩基をA (アデニン)、C (シトシン)、G (グアニン)、T (チミン) で示した。シークエンス情報が利用できない部分についてはアスタリスク (*) で示した。また、シークエンス中で欠失などによるギャップが存在している場合には、その箇所をピリオド (.) で示している。

シークエンスにエラーが存在していたことからWHO命名委員会は、DRB1*08031, DRB1*09011, DRB1*12031, DRB1*1606およびDRB5*0201を削除している。

```

      1              10              20              30
DRA*0101 ATC AAA GAA GAA CAT GTG ATC ATC CAG GCC GAG TTC TAT CTG AAT CCT GAC CAA TCA GGC GAG TTT ATG TTT GAC TTT GAT GGT GAT GAG
DRA*0102 *** ** *-----

      40              50              60
DRA*0101 ATT TTC CAT GTG GAT ATG GCA AAG AAG GAG ACG GTC TGG CGG CTT GAA GAA TTT GGA CGA TTT GCC AGC TTT GAG GCT CAA GGT GCA TTG
DRA*0102 -----

      70              80              90
DRA*0101 GCC AAC ATA GCT GTG GAC AAA GCC AAC CTG GAA ATC ATG ACA AAG CGC TCC AAC TAT ACT CCG ATC ACC AAT GTA CCT CCA GAG GTA ACT
DRA*0102 -----

     100             110             120
DRA*0101 GTG CTC ACG AAC AGC CCT GTG GAA CTG AGA GAG CCC AAC GTC CTC ATC TGT TTC ATC GAC AAG TTC ACC CCA CCA GTG GTC AAT GTC ACG
DRA*0102 -----

     130             140             150
DRA*0101 TGG CTT CGA AAT GGA AAA CCT GTC ACC ACA GGA GTG TCA GAG ACA GTC TTC CTG CCC AGG GAA GAC CAC CTT TTC CGC AAG TTC CAC TAT
DRA*0102 -----

     160             170             180
DRA*0101 CTC CCC TTC CTG CCC TCA ACT GAG GAC GTT TAC GAC TGC AGG GTG GAG CAC TGG GGC TTG GAT GAG CCT CTT CTC AAG CAC TGG GAG TTT
DRA*0102 -----

     190             200             210
DRA*0101 GAT GCT CCA AGC CCT CTC CCA GAG ACT ACA GAG AAC GTG GTG TGT GCC CTG GGC CTG ACT GTG GGT CTG GTG GGC ATC ATT ATT GGG ACC
DRA*0102 -----

     220             230
DRA*0101 ATC TTC ATC ATC AAG GGA GTG CGC AAA AGC AAT GCA GCA GAA CGC AGG GGG CCT CTG TAA
DRA*0102 -----

```

図1. DRAアリルの塩基配列

筆頭筆者連絡先：〒159-8513 埼玉県所沢市並木3-2
防衛医科大学校検査部
小林 賢

電話：042-995-1511内線3721
ファックス：042-996-5217
E-mail: kobayasi@ri.ndmc.ac.jp


```

                                160                                170                                180
DRB1*0101  GGA GAT TGG ACC TTC CAG ACC CTG GTG ATG CTG GAA ACA GTT CCT CGG AGT GGA GAG GTT TAC ACC TGC CAA GTG GAG CAC CCA AGT GTG
DRB1*01021 -----
DRB1*0103  -----
DRB1*15011 -----C-----
DRB1*15021 -----C-----
DRB1*16011 -----C-----
DRB1*16021 -----C-----
DRB1*1603  -----C-----
DRB1*03011 -----C-----
DRB1*03021 -----C-----
DRB1*0310  -----C-----
DRB1*04011 -----C-----
DRB1*0403  -----C-----
DRB1*0404  -----C-----
DRB1*0406  -----C-----
DRB1*0411  -----C-----
DRB1*11011 -----C-----
DRB1*1102  -----C-----
DRB1*1103  -----C-----
DRB1*1201  -----C-----
DRB1*1301  -----C-----
DRB1*1001  -----C-----
DRB3*01011 -----C-----
DRB3*01012 -----C-----
DRB3*0201  -----C-----
DRB3*0202  -----C-----
DRB3*0301  -----C-----
DRB4*01011 -----C-----
DRB4*0103101 -----C-----
DRB4*0103102N -----C-----
DRB4*0301N -----C-----
DRB5*01011 -----C-----
DRB5*0102  -----C-----
DRB5*0108N -----C-----
DRB5*0202  -----C-----

```


〔HLA-研究者の個人史〕 私とHLA-Dタイピング

金子 剛久

北里大学医学部, 免疫学

はじめに

「建築は廃墟を指向せよ」とは詩人であり建築家でもあったTMが建築方法論で展開した主題である。この詩人に若い頃かぶれてギリシャ神殿の廃墟を訪れることをずっと夢に見ていた。数年前、休暇をとってイタリアを夫婦で旅行した帰りに、一日だけアテネに寄り道して、アクロポリス丘を訪れ、夢を叶えた(写真1)。たまたま、パルテノン神殿は修



復のさなかで、その作業のための鉄骨がかなり目障りだったが、確かに、柱と屋根の石組みの骨格だけを残す神殿跡を背景に石柱の断片やブロックが無秩序に転がっている風景、それらを緑の蔓草が半分覆い隠している光景は、ため息が出るほど美しく、感動した。以来ギリシャを2度、シチリアを一度旅し、その都度、あちこちのアクロポリスを訪れている。建築学的事は全くわからないが、神殿見るオタクの一人に数えられようか。最近、南イタリアに二階建ての神殿跡が残っているときいて、行ってみたいくうずうずしている。

HLA-D タイピングはHLA研究のなかでは過去の遺跡的存在である。だと思ふ。ギリシャの神殿の廃墟のように。それほど古くはないし、二千年を越えて、世に残るとも思えないが。昨今のHLA class II cDNA sequencingの結果をみると、あちこちに風化の跡がみえ、次世代(この領域解明のための血清学や分子生物学)を牽引する役割を果たし終えたとはいえ、少し寂しい。私は、柏木教授の下で、

HLA-Dタイピングの誕生から、終焉までを国内及び国際組織適合性ワークショップを通してつきあってきた。この間、私が得ためぼしい成果は、DKT2を見つけたこと、Dw23 (DB5) をクラスターしたことくらいである。お恥ずかしいかぎりである。HLA-D ホモザイガス細胞として、私が認定したタイピング細胞は、18種類 (KT1からKT18: EBVにより株化し

たものについては先頭にLをつけ、LKT2、LKT3と命名されている)。ただし、積極的に自分で発掘したといえるものは数えるほどしかない。たとえばKT1からKT6の6種は近親結婚の家族を調査して見つけたタイピング細胞であるが、共同研究であるとはいえ、フィールドは八木禮徳先生(現:野田市民病院)によって開拓された、むしろYYと命名されるべき細胞である。KT14 (Dw23) は、移植のクロスマッチMLCのコントロールとして使っていた際に、HTC様の態度を示したことから見つかった。DKT2はついにDw (official designation) に昇格した

かった。

このDKT2を軸にして、私のHLA-D研究の泥沼の過去をきわめて利己的に振り返ってみたい。

1. 先史

HLA-D抗原は、MLC反応すなわち、血縁関係のない二者の白血球を混合培養した際に生ずるT細胞の強い増殖反応、を惹起する抗原として定義された(1)。

MLCを行う際に、二者の白血球の一方を刺激細胞(マイトマイシン処理等で抗原性を残したまま増殖しないように処理した細胞)、他方を無処置のまま反応細胞として行くと、その刺激細胞のHLA-D抗原に対する反応細胞の増殖だけを検出することができる。これをone way MLCと呼ぶが、そのone way MLCにおいて、HLA-D座に関してホモザイガスなヒトの白血球を刺激細胞として使うのがHLA-Dタイピングである。このMLCでは刺激細胞と同じHLA-Dタイプを持つ反応細胞は原理上増殖しない。HLA-Dホモザイガス細胞はHLA-D タイピングの抗原細胞として収集されたことからHTC(Homozygous Typing Cell)とよばれるようになった。

HTC(そのHLA-Dタイプをaaとする)は、そのタイプをヘテロに持つヒト(ax)をMLCで刺激しないが、axによっては刺激される。この関係を利用して確定するが、aaによるaxの反応は原理上は0であるが0にならない(タイピングレスポンス)ので、通常は、両親と兄弟姉妹(ab,ac,bc)を含めた家族内MLCを行って、総合的に判断する。HTCを子供に含む可能性のある家族では、親と同型の子供(ab,ac)が出現し、この親子同型者間MLCは0となるためである。

いとこ結婚の子供がHTC探しの対象となった。いとこ結婚の子供には、理論上1/16という高い頻度でHTCが出現し、それはHLA-A-B-Dハプロタイプに関してホモザイガスであることからである。当時のMLCは後に述べるが、試験管法という、恐ろしく手間のかかる手法だったために、比較的手間のかからないHLA-A,-Bタイピングをまず行って、HTCをふるい分けてしまうという戦法である。ふるいにかかったHLAホモザイゴートを家族内MLCで検定

する。

2. 胎動

1975年、欧米の研究グループがそれぞれ独自に集めたHTCのD特異性のすり合わせを行うためのワークショップが第6回国際組織適合性ワークショップに登場した。集められたHTCで相互をタイプすること、HTCのパネル細胞に対する反応(相関係数)によるクラスタリングから、6種類のHLA-Dクラスター、Dw1からDw6が公になった。日本では、北里大、札幌医大、愛知ガンセンター、東海大、東京医科歯科大、大阪大等がHTCの収集に着手していた(2)。私が北里大学に就職した年である。

私は、東京大学理学部大学院動物学専攻博士課程を退学して、1975年に、北里大学医学部で、移植免疫学研究室を起ち上げつつあった、柏木教授のもとへ助手として赴任した。大学院時代は、ウニ卵の細胞質DNAの研究をしていた。当時は、ウニ卵でさえ卵細胞質に数百パブロイドを越えるDNAが貯蔵されていて、発生初期の迅速なDNA核合成を支えるために蓄えられたものだ。いや組織化学的には検出されないから、定量方法に問題があってなどと、やかましかった時代である。定量法の改良と初期発生時のDNA合成を³H-チミジンでトレースすることによって、ウニ未受精卵には10ハプロイド程度の細胞質DNAが存在するが、それは卵細胞質には、その容量に見合ったミトコンドリアが蓄積しているため、発生初期の核DNA合成のために蓄えられたものではないという結論を出した(3,4)。

私が参加した当時の柏木教授は二つの研究プロジェクト、「HLAの基礎と臨床」と「ALGの臨床応用」とを進めつつあった。着任すると教授から前者のプロジェクトの基礎の部分で、³H-チミジンを使った新しい測定法(HLA-Dタイピングことだったらしい)が必要なので、その研究に従事するようといわれた。³H-チミジンが扱えるという即戦力が買われたのだと思う。

2-1 MLC

MLCの手技は、先任の二人のスタッフ、八木、久保田両先生に手ほどきを受けた。彼らは、腎臓移

植患者のドナー選択のためのMLCクロスマッチテストとALGのリンパ球刺激力価測定を実施していた。私の習った、当時のMLCは、5mlのテストチューブの中で、反応リンパ球と刺激リンパ球（マイトマイシンC処理リンパ球）とを2mlの培地で培養するという非常にマクロな反応システムである。培地はRPMI1640に非働化ヒト男子血清を15%加えたものを用いる。現在の方法に比べて、非常に手間のかかる原始的な方法だった。培養5日後に、 ^3H チミジンでパルスラベルして、細胞に取り込まれた ^3H を液体レシチレーションカウントする。その際Freeの ^3H を除くのに、遠沈法を使っていた。RIの入ったチューブは素手では持てない。プラスチックまたはゴム手袋をつけて操作した。上清も、安全ピペットで吸い取って廃棄した。さすがにマウスピペティングはできない。大変面倒な実験だった。教授が、この国際WSから帰国する際に、ヨーロッパで販売されていたMASHⅢ (Multiple Automatid Sample Harvester) を持ち帰った。マイクロタイタープレートを使った、micro MLC (従来法の1/10のスケール) に対応した細胞回収装置である。MASHⅢは、一度に2列 (24ウェル) を一度に回収して洗浄してくれた。このときの感動は、後に、私が、マニュアル車から、オートマチック車に買い換えた時と同じくらい大きかった。現在のHarvesterも原理や構造はMASH (MACHという説もある) と変わらない。MLCの手技は、その後全く変わっていない。

3. 初期

3-1 HTCの収集

次回の第7回国際ワークショップに向けて、日本人のHTC探しに教室をあげて取り組んだ。一つはいとこ結婚の家族さがし。20組のいとこ結婚の家族に協力を得て、家族員のHLAを調べさせてもらった。この20家族の中から、3家族4種類のHTCが見つかった (KT1, KT4, KT5, KT6)。このほかに、腎移植患者の兄弟から2種類のHTC (KT2, KT3) を見つけ出した。患者が両親の一方とMLCで反応しない関係がみられたことから、その兄弟を検索した結果である。KT2とKT3の両親はそれぞれ、またいとこ、いとこの関係にあった。

3-1-1 失速

ここでほんのちょっとだけエンストを起こしてしまった。HTC (aa) を刺激細胞 ((aa) m) として、MLCを行うと、HTCと同じDタイプをヘテロに持つ反応細胞(ax)には、増殖反応が起きない。と、信じきっていた。ところが、この ax/(aa)m の反応が0にならなかった。第三者を刺激細胞とする、陽性対照の50%近い反応が、このHTCを証明するための家族内(ax/(aa)m)MLCで出てくる。マイトマイシン処理が不十分なために刺激細胞がxを認識して増殖しているのかと考え、その処理時間をのばしたり、濃度を上げたりしたが、それでは起こるべき反応も一緒に消えてしまった。刺激細胞をmitogenで刺激して、(aa)mは増殖しないことを確かめたりした。貴重なHTCでしか再現できない実験であったために、周囲の冷ややかに感じられる視線が非常に気になった。しばらくして、都内のある会議で、板倉先生 (旭川医大) が、ax/(aa)mは、無反応 (HLA-D同型の親子または兄弟者間の反応を含む) ではない、弱反応 (タイピングレスポンス) なのだということを、話されているのを聞いて、このはまりから一応ぬけだすことができた。まだ、このことについてふれた論文が手に入らなかったのか、あっても読んでいなかったせいだと思う。

3-2 HLA-D タイピングの開始

集められた6種のHTCの特異性の関係を決めるために、ランダムに集めた共通のパネル細胞 (50人) をタイプし反応の相関係数によるクラスタリングを行った。その結果、KT1とKT3が同一の特異性として (後にDw15) クラスタを形成し、他の4種はそのDw15には入らず、互いに独立した関係にあることがわかった。またHTC間で相互をタイプした結果もパネルで得られた結果と整合した。この4種のうち、KT2はDKT2として最初に見つかったHTCである。KT5はDHO (後のDw12) であることが後にわかった。KT4とKT6は、現在のどのような特異性に属するかは、不明のまま消滅した。このHTCをベースにして日本におけるDタイピングの基盤を構築するために、柏木研究室は第7回IHWS cellular typing に参加した。WSに参加することによって、

International standard を利用できる。

3-3 最初の国際組織適合性ワークショップ (IHWS)

この第7回IHWSでは、pre-workshop と唱して、WSに提出するHTCを特異性既知のreference HTC (Dw1-Dw8のkey HTC各2種2vial) であらかじめタイプすることが義務づけられてきた。そのreference HTCで我々のHTCをタイプして、さらに、本番のWSでもう一度タイプして、既知のものとの関係を決めることが出来た。

HTCとしてはKT4 (7W529) を提出した。ストックがあって、他のものよりたくさん提出できたからである。要求されたHTCの量は予想を遙かに超える量だった。1 x 10⁹ cells。まだセントリフュージがなかった時代にである。200mlの採血を2ヶ月間隔で5回しないと確保できない量だ。しかし、order をよく読んでみると、将来のWSに備えて、と小さく書いてあった。WSの要求量は、額面通りでないことを初回でマスターした。結局、60 vial (5 x 10⁶/vial) を出した。さすがにこれでは足りなかったらしくKT4は研究室に送られてきたWSHTCのセットの中には入っていなかった。

本番のWSには、69種類のWSHTCが2 vial ずつ届いた。この1セットを使って、我々のHTCでタイプ済みのパネル30人と我々のHTC自身とをタイプした。残りの1セットは将来に備えてストックした。WSセンターのことを言えない。この当時、私のテストではKT4は、Dw9であることが予想されたが、世界中の様々な人種をタイプしたWSのプールデータで、KT4ほどのHTCともクラスターを作らなかった。技術的に未熟だったようだ。HLA-D 特異性は、分類学の種の同定基準と同じで、2つ以上の血縁関係のない標本 (HTC) が見つからないと、承認されない。だから、仮にKT4がnewであっても、承認はされなかったろう。

3-4 HLA-D タイピングの変法

HLA-D タイピングの最終ゴールは、移植のMLCを、従来クロスマッチテストから、タイピングに置き換えることであった。しかし、HTCをそれほどふんだんに確保できるとは思えず実用化にはその点が

最大の障壁になると心配していた。これを打開するかにみえたが、結局は消えていった新しい手技が2つあった。

ひとつは、Sperm Lymphocyte Culture (5)。SpermはMHCに関して haplotype expression であること、class IIを発現していること、MLCで異者のT細胞を刺激すること等から、HLA-D hetero のヒトの精子でも、一方のハプロタイプをHLA アロ抗血清と補体で除いてしまえば、HTC と同等のタイピング細胞になる。世に生殖可能な成人男子はたくさんいるから、血清タイピングの抗血清集めよりはずっと集めやすいはずだ。とまあこんな未来があった。しかし普及しなかった。普及する前にHLA-D タイピングが消滅したためだろうか。精液でMLCを起こすことができるのは、私もテストして確認したが、私の場合、問題が生じてそれを回避できそうになかったので途中で放棄した。

二つめには、EBV transformed B cell line (B細胞株)。HLA-D タイピングが始まるころより、EBVによってヒトのB細胞が自由に株化できていたようである。起源は知らない。従って、HTCを株化すれば、タイピング細胞の供給に困らないという展望が、この研究には見込まれていたように思う。しかし、そうはならなかった。この株細胞は自他のT細胞に同等の増殖反応を示す。HLA-D タイピングには役立たなかったが、B細胞株化されたHTCはその後、HLA-D領域の免疫生化学的研究、分子生物学的研究におけるクラスIIアロ抗原分子及び遺伝子の基準として、欠くことのできない存在となった。細胞の反応を使って行うHLA-Dのタイピングには、PLT (primed Lymphocyte Typing) と呼ばれるもう一つの流れがあがが、これについての私の関わりは後にふれる (6)。

3-5 第7回 IHWS

第7回IHWS (7) のトピックは、HLA-D タイピングの基礎の上に、DRタイピングが立ち上がったことである。WSHTC自身とそのWSHTCでDタイプされたランダムパネルとを抗Ia血清でタイプすることによって、Dw1からDw7のそれぞれに非常に近い関係にあるDRタイプDRw1~DRw7を決定した。

ただし、DとDRの決定基は同一ではない可能性が、ここで芽を出していた。DR4がDw4とDw10とに共有されることが報告されている。もっともDRがsplitすると問題は解決する。実用化に難点があったにせよ、移植のドナー選択のためのタイピングという観点からみれば、Dタイピングの重要性が非常に高かった時代である。DRが合ってもDが合うとは限らないという事実関係が生じたためである。HLA-Dタイピングの最も幸福な時代の幕開けとでもいえようか。

4. 黄金時代：第8回IHWSから第3回AOHWS

4-1 日本人におけるDKT2とDKT3(DYT→Dw15)

第8回IHWSへの過程で、ナイロンウールカラムとthrombinをつかったB細胞の純化改良法が確立されたことによって、B cell タイピングの精度が飛躍的に高まり、急速に普及した。その結果、我々の発見したKT2のDRタイプは、DR4であること、DKT3クラスター(KT3とKT9)もDR4とタイプされることがわかった。パネル細胞においても同様であった。DKT2とタイプされた細胞もDKT3とタイプされた細胞も例外なくDR4とタイプされた。第8回WSには、HTCとしてKT2を提出し、この成果をWSのHTCと抗血清でreformして、発表した(8)。

4-1-1 活気

この第8回IHWSでDutyとして課せられたWSタイピングは、こども5人以上を含む家族を10家族という日本の現状を無視したきわめて非現実的なものだった。しかし、国内WSの主催者側の経験もあったことから、こういう注文を出すのにも出されるのにも、もう慣れがある。子供の数には目をつむって、すでにDタイプされているパネルの家族を交渉して集めて使った。パネルは学生が主体で、全国に分散していたので、北は北海道、南は鳥取まで、全国を採血に飛び回った。輸血用ガラス採血瓶(200ml)にRPMIを100ml、ヘパリンを加え、採血をその中にいれて運んだ。採血と輸送を先方に依頼するのはできる限り避けた。というのも、たいてい気をきかして冷蔵で送ってくる。理由は不明だが冷蔵した全血はMLCで反応しない。それと宅配制

度が今のように充実していなかったため配送予定が立たなかったこともある。北海道には、3件の採血があって、一日で回りきれないため、初日の採血は、札幌から寝台特急の車掌さんに預けて上野まで送るといった採血のキセル輸送という離れ業までやっていた。活気に満ちた時代だった。

4-1-2 HLA-DKT2

HLA-DKT2は、この第6回IHWSとそのプレWS的役割を担った第1回AOHWSにおいて日本人に由来する新しいDR4関連D特異性の一つとして私が発表した。しかし、このWSはおろか、今に至るまでHLA-Dwとして公認されなかった。その泥沼の経緯を要約すると以下ようになる。はじめにDR4であるDKT2をDw7(DR7)に属するHTCと関連づけるという私のミスリードがあった(8)。次にDR4関連Dタイプの一つとして第6回IHWS後公認されたDw13と類縁関係にあると他者に報告された(9)。DKT2ハプロタイプがコードするDR分子とDw13ハプロタイプがコードするその分子は、二次元電気泳動法上同じだという他者の報告がこれに続き、その結果、DKT2はDw13であると多くの人は思ったに違いない(10)。第三回AOHWSのD-typing studyにおいて、H.Festenstein教授より提供されたDw13HTC(JHA, FLE等)を用いたテストにより、我々は、Dw13とDKT2はMLCにおいて異なることを確認した(11)。

ところがである、その後Dw13をコードするDRB1 alleleが2種類(DRB1*0403とDRB1*0407)あることが解った。両者の産物は、アミノ酸配列上、86番目の一箇所が異なるだけで、他は同一であり、DKT2をコードするDRB1*0406は前者と一箇所(37番)、後者と2箇所だけ異なっていた(12)。3rd AOHでテストされたJHAのDRB1タイプはDRB1*0407で、DKT2(DRB1*0406)とは、二箇所違う。アミノ酸が一箇所違うDKT2(DRB1*0406)とDRB1*0403の関係をはっきりさせるために、私は、DKT2(DRB1*0406)を刺激細胞、DRB1*0403をヘテロ(/DRB1**1201)に持つYANを反応細胞とするMLCのCD4 blastをクローニングした。DRB1*0403 HTCを持っていなかったためHTC間

MLCを手段にできなかったためである。その結果、そのプラストより自己であるDRB1*0403を認識しないが、感作アロ抗原であるDRB1*0406を認識して、増殖するクローンを3種樹立した。

HLA-Dタイプの異なる種々のHLA-DホモザイガスB細胞株に対するこれらのクローンの反応性はクローンごとに異なっており、この間のMLCが、DRB1*0406に対する polyclonal な応答である、つまりDタイプの異なる二者間MLCと変わらないことを証明した(13)。ここでいうDタイプとは、HTCを抗原とするMLCで決められたDタイプのことである。

DRB3 (Dw24, Dw24, Dw26) は除く。また、私のクローンにパネル細胞上のDRB1*0406と過不足なく反応し、1:1の対応関係を示したものは、一つもなかった(13)。従って、これらのPLTクローンでDRB1*0406を正しくタイプすることはできないことがわかった。MLCは allogeneic なDR分子に対する poly clonal な応答であり、poly clonalであるということは、cloneのHLAに対する反応特異性が多様であるということであり、cloneは、刺激DR分子だけ、つまり単一のアリル産物だけを認識するとは限らないということである。

4-2-1 Dw15 subcluster SC1 (HLA-DPw5) と SC2 (HLA-DPw2)

先に、タイピングレスポンスすなわちHLA-D genotype aaによるabの反応が0にならないこと、bbをfullとすると中間的な増殖反応を示すことを述べた。もちろんaaによる自己aaの反応を0としてだ。ところがこのaaによるaaの反応も、両者が非血縁関係にあると0にならないことがあった。私はDYT (Dw15) にクラスターされるHTCを4種 (KT1, KT3, KT3B, KT9) 見つけている。KT1とKT3は、いとこ結婚の子供であり、KT3B (KT3の親) とKT9の両親は非血縁である。このうちのKT3, KT3B, KT9の三者間でMLCを行うとKT3とKT3Bはお互い同士全く反応しなかった (SC1) が、この両者とKT9 (SC2) とにはタイピングレスポンスに相当する中間反応が見られた(14)。このKT3とKT9の間のMLCをPLT (KT9 anti KT3(anti SC1) と KT3 anti

KT9 (anti-SC2)) を作成して解析した。手持ちのHTCやHLA-Dタイプされたランダムパネルを再刺激細胞として、タイプしてみると、これらのPLTの反応はDタイプと全く相関しなかった。間違いなくこのPLTがMLCの抗原 (第二の抗原) に対するものであると確信したのは、DKT2 HTC 二種 (KT2 と KT13) 間のMLCをこのPLTの反応が説明してくれたからである。前者がSC1, 後者がSC1とSC2。MLCではKT13によるKT2の反応がその逆の反応に比べ常に高くなる。ランダムパネルでは、SC1の頻度が60%を越えていた(14)。従って、SC1は日本人におけるこの抗原系の主要なタイプの一つであることがわかった。家系遺伝研究により、これらの抗原はHLAと連鎖していることがわかった(14)。

4-2-2 HLA-DP (SB) タイピング

第9回IHWSのCellular Typing 部門はHTCによる常套的なHLA-DタイピングのWSに加え、PLTをWSに含めてきた。このPLTWSのWS PLT細胞の中に、純正抗SB (DP) 細胞 (抗SB1から抗SB6を各2種) が含まれていた。純正の意味は、SBの発見者であるShawらが、SBを同定した際に使ったPLT細胞そのものという意味である。このWSの dutyとして課せられた4人以上の子供を含む家族を10家族をタイプした結果、我がSC1はSB5 (DPw5) と一致すること、SC2はSB2 (DPw2) となることがわかった(14)。以上、PLTによるSCについての検討の結論としていえることは、DPの不適合は弱いながらもMLCを惹起する。そのDP抗原はPLTでタイプできる。の2点である。

4-3 HTCによるHLA-D タイピング

第9回IHWSのHLA-D typing WSにはWS common HTCとしてKT11 (9w0610:Dw19)、Central Lab. によるFirst level testingにKT3 (DR4-Dw15)、KT2 (DR4-DKT2)、KT13 (DR4-DKT2)、KT14 (DR9-DB5) を提出した。DKT2については、前にも述べたがDw13との間のMLCに依然として、不明瞭な点が残し、承認されなかった。DR9に関連し、特異性未知として提出したKT14は、First level testing において、DB5として提出されたDKB

(8w324) と同一のDB5であることが示されたが、DB5は DB5のまま残された(15)。DKB もKT14も 2nd level workshop study にWS common HTCとしては提出されなかったために、他のWSメンバーの支持が得られなかったためだろう。

4-4 3rd AOH WSにおけるDB5 とDKT2

KT シリーズの中にはDw23(DR9-DB5)とした HTCが2種 (KT12 とKT14) ある。DB5の決着はこの2種のHTCを含めた3rd AOHWSのD-typing studyでつけた。私の担当したこのWSのWSHTC間相互MLCにおいて、DRタイプがDR9である5つの HTC、KT14, KT12, HID, C.Wong, SYM43が、既知のD特異性 (Dw1-Dw19) のどれにも属さない一つのクラスターを形成した(16)。パネルに対する反応の相関係数によってもこの5者が独立したクラスターを形成した。DB5として最初に認定されたDKBがはいっていないけれど、第9回IHWSの検討でKT14がDB5に属すと考えられたので、少し後ろめたかったが、これをDB5クラスターとした(15,16)。5本のHTCによるクラスターは重く認めざるを得なかったようだ(17)。DKT2として提出したKT2とKT13もHTC間相互MLCにおいて、独立したクラスターを形成し、Dw13にはクラスターされなかった。パネル細胞における反応においてもDw13と一致しなかった。しかし、ここで使われたDw13の中にDRB1タイプとしてDRB1*0403 持つものがいたか否かは今になっても不明である。DRB1*0407を持つDw13 (JHA) があったことはわかっている。当時はまだ、DRB1 配列決定が多くのものについてなされていなかった。

5 ハルマゲドン

5-1 10th IHWS

HLA-D領域の研究技法には1980年頃から始まった新しい流れが少なくとも3つある。モノクローナル抗体を用いたHLA遺伝子産物の2D gel analysis、cDNA クローニング、そしてT細胞クローニングである。HTCによる Dタイピングは、DR-DQ垂領域にコードされるT細胞刺激抗原を検出するが、この方法は、原理的にDPをタイプすることはできない

し、DRにコードされるものとDQにコードされるものを、分別してタイプすることもできない。T細胞クローンを用いたタイピングには、この難点を解消する能力が潜在する点に期待があった。10th IHWSは、これらの新技法を主体にして行われた、今までとは違ったスタイルのWSだった。手技の細部を統一するのではなく、分析対象をWSに共通なB細胞株パネルに統一し、そのB細胞株を介して異なる手技や目的で得られたデータを共有できるように設計された。B細胞株パネルは、すべての既知HLA-Dタイプを網羅する107種のHTCをEBVにより株化したものである。このWSにより、HLA-D領域の遺伝子座位の構成と並びがほぼ確定した(18)。細胞部門では、ローカルに樹立されたT細胞クローンをWSB細胞株パネルに当てたデータ、クローンの抗クラスII座位特異抗体による反応阻害テストをまとめることによって、MLCで増殖するT細胞(CD4⁺)の大部分は、DRB1産物を認識すると考えられること、そして、反応特異性において、互いに異なる非常に多数のクローンから成り立っていることを明らかにした(19)。他のクラスII産物 (DRB3, DRB4, DRB5, DQ, DP) も主体にはならないにしろMLCに貢献することがクローンの存在によって確認された。たとえば、Dw24, 25, 26はT細胞クローンによって、検出されるDRw52のサブタイプとして承認され、後に、DRB3*01, 02, 03に対応することがわかった。これらのクローンはDRB3タイプの異なる二者間MLCに由来しているから、DRB3産物がMLCに貢献していることの証拠である。アリルに対応する例はあってもいいし、なくてもいい。その理由については今更言うまでもない。ただ、アリル産物がMLCに寄与することがわかり、そのアリルをDNAタイピングで決められるのならT細胞クローンでタイプする必要はない、と思う。

クラスII構造遺伝子のc-DNA配列決定がこのWSから猛烈なスピードで始まった。WSHTCを主材料にして、DR-DQ垂領域に存在する対立遺伝子の配列がつぎつぎに決定されていった。その結果に基づいて、PCR-SSO法、PCR-RFLP法といった、Class II DNA タイピングが確立されてきた。Class II cDNA配列決定により、HTCにより決定されたHLA-Dタ

イプ (Dw1-Dw23) は、DRB1 アリルとおおむね1対1に対応する関係にあることがわかった。ただし、DR2 関連ハプロタイプの (DRB1 とDRB5の関係) 詳細については知らない。またそれ以外にもいくつかのほころびのような例外がある。たとえばDw14 (DRB1*0404,0408)、Dw13 (DRB1*0403,0407) 等一つのDwに2つのDRB1が対応している。しかもこれらのDw特異性内のDRB1間には、第一ドメインアミノ酸配列上86番目の一箇所だけに違いがある。Dw14内やDw13内の二つのアリルが MLCにおいて、全く反応しない関係にあるのかどうかは、もしかするとわかっているのかもしれないが、私は知らない。しかし、私の例で明らかのように、アミノ酸一カ所の違いがMLCを惹起することがある(13)。

このようにして、はっきりしてきたことは、HLA-D座の領域にはDR, DQ, DPの各重領域が存在し、そこから発現されるクラスII遺伝子産物は、どの座位のものであれ、不適合すると、MLC(強弱は座位によって異なるが)を起す。また、HLA-Dタイピングによって決定されるHLA-Dwタイプ(Dw1-Dw23)は、多くの場合、DRB1産物がMLCの主役を担うことから、DRB1タイプとほぼ整合する。だから、HLA-Dタイピングは移植において、行う必要がなくなったということである。HLA-クラスII DNAタイピングが完璧にそれをカバーし、もっと適切なドナー選択を可能とする。HLA-DタイピングにしろPLTタイピングにしろ、発現され、かつ移植抗原として機能する分子の違いを見分けることが、最終ゴールだから当たり前といえれば当たり前はある。

DB5は、この10thWS B cell line パネルに、DB5として提出された3rd AOHにおけるDB5HTC3種(KT12,KT14,HID)によってDw23として承認された(17)。Dw23はHTCを抗原とするHLA-Dタイピングで決められた最後のDwタイプとなった。

5-2 フィナーレ

5-2-1 確率1/13

私の私自身のHLAタイプに関わる妄想について書いておきます。私はHLA-A3-Cw6-B13-DR7(Dw17-DQ2)というハプロタイプを母親から受

け継いでいる。母側の祖父母はすでに没しているが、母の弟姉妹のHLAをタイプすることで、この祖父母のどちらかからこのハプロタイプを受け継いでいることを確認した。さて、A3にしてもDR7にしても日本人にはまれなタイプである。韓国人や中国人のHLAについての情報が少なかった時代には、これらのHLAタイプは白人に特徴的なタイプで、東洋人にはまれなもの代表だった。だから、わが先祖に白人がいると素直に信じていた。時代が過ぎてDR7やCw6-B13-DR7については、韓国や中国大陸ではそれほど珍しいタイプではないことがわかってきた。つまり、海を渡る技術を持たなかったために、大陸の海岸線で停滞しているタイプというところだろう。最も妥当な線として、そのわずかな漏れが我が祖先ということになる。成書によれば、Cw6-B13-DR7はモンゴルに起源し世界中に広がった(20)。A3は白人に起源し、騎馬民族によって、韓国や日本にもたらされたという(20)。しかしだ。Cw6-B13-DR7は、白人に普通に存在するし、またA3が白人に起源し、韓国におけるA3の頻度は非常に低くCw6-B13-DR7と連鎖不平衡にない。とすると、わたしのA3-Cw6-B13-DR7というハプロタイプは、朝鮮経由ではなく日本にかつて漂着した白人がもたらした可能性だってまだあり得る。私が渡来白人にこだわるのには理由がある。我が母は秋田県出身である。秋田の北の海岸には、復活したイエスキリストが12人の弟子(使徒?)を伴って漂着し、その地で没したという実に奇想天外な伝承が残されている。もしかしたら私は、彼らの子孫かもしれない。そうなれば確率1/13でキリストの血を受け継いでいる。という大法螺がふけるか否かの瀬戸際にあるからだ。3人の我が子供たちは幸いこのハプロタイプを皆が皆受け継いでいる。将来食うに困るようなことになったら、この伝承とこのハプロタイプをネタに新興宗教でも起すように、話して聞かせているが、テンから信じようとししない。ある時、英会話のレッスンを受けていた際に、話題に窮してアメリカ人の先生(軍医)に、この話をした。ただし、祖母(母の母)の実家の姓が、東海林だったので、東海林はジョージから来ているにちがいない、我が祖先はジョージといった、と落ちを付けた。

非常に受けて大成功だった。そして、彼も白人を祖先に持つと信じている日本人を知っているという。その人は天元といい、天元は天狗に由来し、あの鼻と容貌からみて天狗は渡来白人であろうから私の祖先は白人だといっている、と話してくれた。日本について非常によく勉強している先生だとそのときは感心し、私の話もてっきり信じてくれたものだとばかり思っていたが、しばらくして彼の話が全くの作り話で、私の話なんぞ理解も信じてもいなかったことがわかった。それは彼にランチを招待された時である。東京の山の上（軍用）ホテルである。山の上ホテルは天現寺交差点のそばにあった。彼は私の話のジョウジがジョージというところだけが気に入ったらしい。東海林がいけなかった。世は世紀末である。ハルマゲドンを脅しに、「私はイエスキリストの末裔である、救われたければお布施を」と一儲けしたかったところだが、もう遅いようだ。千年に一度のチャンス逃した。東海林の発音は、日本語の音読みにも訓読みにもないからたぶん朝鮮半島か中国に由来するのだろう。東海林はますます私をキリストから遠ざける。

5-2-2 コレクター

クラスII遺伝子の配列決定や、T細胞クローンやアロ抗クラスII血清のHLA特異性決定、ヒトT細胞の *in vitro* 反応解析などに、HLAタイプがきちんと確定されたHTCに由来するB細胞株は、非常に役に立ったし、今後も役に立つと思う。HLA-Dタイピングは消滅しても、HTCは残る。私も、KTシリーズを可能な範囲で株化して保存している。

B細胞株については、非常に恥ずかしい思い出があり、そのために愛着もある。3rd AOH が持たれる数ヶ月前位に、Dr. Margo Honeymanより、DPタイピングを立ち上げたいので、白人には少ないDPw5をホモに持つHTCとそのB細胞株を提供してくれという申し出があった。そこでDPw5に関してホモなHTCであるKT3とKT2を、それらのB細胞株とともに送った。交換に、Dw3HTCを希望した。ところが、なかなか、返送が届かない。AOHの直前になって、ようやく届いた。同封の手紙には、突然マイコプラズマストームに襲われて、その対策

にいままでかかってしまった、という内容の“お詫び”、の文章があって、それはまあ大変だったろうなとその時は同情した。元凶が、我がB細胞株であろうとは、その時には夢にも思わなかった。それから3年後、日本で持たれた11th IHWSで利用するB細胞株の選別と収集を手伝った際、B細胞株のマイコプラズマ汚染が問題となった。日本由来の細胞には、高頻度でその汚染がみられるという。そこで、急遽、手持ちの全B細胞株について、汚染のチェックを行うことになった。LKT2とLKT3は強陽性、そればかりか研究室で株化された国外HTCも軒並み陽性だった。結局言われている通りであることがわかった。Margioが何を言いたかったのか、このとき初めてわかった。3rd AOHWSの際、彼女が素っ気なかった訳だ。汚染源はB95-8(EBV産生細胞)だと思う。hoechst33258で核の周辺が微塵にそれはそれは美しく輝いていた。かなり古い時代に持ち込まれた細胞であるから、汚染していても無理はないところがある。マウスピペティングが原因だろう。今でこそ、電動ピペットが当たり前だが、10年前までは、そんなものは私たちの手元になかった。非常に頑固な汚染で、最新の殺マイコプラズマ剤でたたいてもびくともしなかった。辻先生（東海大）に新しいきれいなB95-8を分けてもらい、KTシリーズや、国外産HTCで、PBLとして手持ちにあったものは、作り直してWSで必要とする施設へ送った。もっとも、化学やDNAの分野の実務者の間ではこの汚染はあまり気にされていなかったようだ。

そんな、こんなで研究室にあるHTCの株のすべては、マイコプラズマチェックのために、いったん解凍して継代し、検鏡(hoechst33258蛍光染色法)している。そのためこれらの細胞には格段の愛着があり、なかなか処分できない。将来ヒトのT細胞の研究がもっと活性化すれば、きっとAPCとして役に立つ(売れる?)ようになると信じて、今も大事に保存している。かつて、知人に、カタツムリのコレクターがいた。同じ種でも生息する地域が違っていると、殻の模様が微妙に変わってくるのだそうで、彼は、あちこち旅行するたびに殻を拾ってきては磨いて保存していた。そのようなたわいのないものに執着している知人の気が知れず、彼を変人だ思っていた。

自分もそんな変人のひとりだったとは、夢にも思わなかった。今にして、彼の気持ちがよく理解できる。手塩にかけた物は、なかなか捨てられないのだ。HLA-Dを神殿にたとえるとして、私のHTCとそのB細胞株は、石器時代の貨幣のようにスライスされた石柱の一つ二つくらいには、将来なっているだろうか（写真2）。

南イタリアの神殿を訪れるのは春が良いらしい。カタバミ科の雑草の菜の花に似た黄色い花が神殿の周囲を覆い尽くすという。

執筆料を楽しみにしています。執筆料でないんですか！ 南イタリアへは行けませんか！

最後の最後に

研究室の方々、他施設の先生やタイピストのなかに、お世話になった方や親しくしていただいた方がたくさんいます。そうした方々を上手に登場させる才能が私にはないようで、本当に申し訳ありません。心よりお詫びいたします。このコーナは何やらHLAを離れていった人達の告別の辞といった雰囲気があります。そこで、私も、私のDKT2研究のために、いつも快く血液を提供してくださった小林賢（防衛医大：KT13）先生、B細胞株のマイコ汚染チェックと除染をほとんどひとりでやってくれた飯塚さん、そしてT細胞クローン（anti-DRB1*0406）のまとめを一緒にやっていただいた小幡文弥先生（現北里大学医療衛生学部）には、特にこの場でお礼を申し上げます。長い間ありがとうございました。余談ですが、なぜか私を含め四者ともDKT2（DRB1*0406）を持っています。私は本当にDKT2と深い因縁がありました。現在の私は、HLAタイピングには直接関わっておりません（タイピングポンスには関わっています）が、ユーザのひとりではあるようです。HLAとは、しばらくつきあいが続くと思いますので、みなさま見かけたら世渡りの下手な変人ですが、邪険にしないよう、何せ確率1/13で、あの方の子孫ですから、よろしく願います。



参考文献

1. Thorsby E, Piazza A : *Histocompatibility Testing 1975*(ed. Nelsen K), Joint report from the Sixth International Histocompatibility workshop Conference II: Typing for HLA-D Determinants. Munksgaard, Copenhagen, 1975 ; p. 414-434.
2. Sasazuki T, Kohno Y, Iwamoto I *et al.* : *Histocompatibility Testing 1977* (eds. Bodmer W F, Batchelor J R, Bodmer J G *et al.*), Japanese regional report the relationship between HLA-D and WIA specificities in the Japanese population. Munksgaard, Copenhagen, 1977 ; p. 489-498.
3. Kaneko T, Terayama H : Quantitative analysis of DNA in sea urchin eggs and subcellular distribution of DNA in the eggs. *Analytical Biochemistry* **58** : 439-445, 1974.
4. Kaneko T : The behavior of mitochondrial DNA and enzyme during the courses of the early development of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Journal of the faculty of science the university of Tokyo Sec. IV.* **13** : 285-290, 1975.
5. Festenstein H, Halim K : HLA-D locus determinants detected by sperm lymphocytes culture. *Transplant. Proc.* **9** : 1239, 1977.
6. Sheehy MJ, Sondel FH 'd Bach FH : *Histocompatibility Testing 1975* (ed. Nielsen K), Rapid Detection of LD

- Determinants: the PLT assay Munksgaard, Copenhargen, 1975; p.569-574.
7. Festenstein H, Oliver R T D : *Histocompatibility Testing 1977* (eds. Bodmer W F, Batchelor J R, Bodmer J G) *et al.* Joint Report 3. Cellular Typing, DRw serology of Homozygous Typing Cells. Munksgaard, Copenhargen, 1977; p.137-138.
 8. Kaneko T, Ishigamori E, Obata F *et al.* : *Histocompatibility Testing 1980* (ed.TerasakiP). Characteristics of DYT and DKT2 Specificities Munksgaard, Copenhargen, 1980; p.891-892.
 9. Reinsmoen NL and Bach FH : Five HLA-D clusters associated with HLA-DR4. *Hum. Immunol.* **4** : 249-258, 1982.
 10. Nepom B S, Nepom G T, Antonelli P *et al.* : The HLA-DR4 family of haplotypes consists of a series of distinct DR and DS molecules. *J.Exp. Med.* **157** : 1689-694, 1984.
 11. Kashiwagi N, Kaneko T : *HLA in Asia Oceania 1986 Proceeding of 3rd Asia Oceania Histocompatibility Workshop Conference* (ed. Aizawa.M), D Workshop Report. Hokkaido University Press, Sapporo, 1986 p.425-435.
 12. Marsh SGE, Mose JH, Bodmer G : *HLA 1991 Volume II* (eds. Tsuji K, Aizawa M and Sasazuki T), HLA class II sequence polymorphism detected by serology. Oxford University Press, Tokyo 1992 : p.610-620.
 13. Kaneko T, Obata F. Allogeneic recognition of HLA-DRB1*0406 by T cells with HLA-DRB1*0403: Role of amino acid residue 37 on the beta sheet in T cell recognition. *Immunobiol.* **195** : 261-270, 1996.
 14. 金子剛久, 大久保みどり, 伊藤巧一, 柏木登 : 日本人のSB抗原について 最新医学, **39** : 2436-2440, 1984.
 15. Olier W, Doxiadis I, Jaraquemada D *et al.* : *Histocompatibility Testing 1984* (eds. Albert E D, Bauer M P and Mayre W R), First level testing of HLA-D"Blank" HTC, Springer-Verlag, New York, 1984 : p.281-285.
 16. Kashiwagi N, Kaneko T : *HLA in Asia Oceania 1986 Proceeding of 3rd Asia Oceania Histocompatibility Workshop Conference* (ed. Aizawa. M), D Workshop Report. Hokkaido Uiniversity Press, Sagporo, 1986 ; p.425-435.
 17. Mickelson E, reinsmoen N, Robbins FM *et al.* : *Immunology of HLA Volime I* (ed. Dupont B), HLA-Dw and DP typing of the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines. Springer-Verlag, New York,1987, p.38-42.
 18. Bodmer WF, Albert E, Bodmer JG *et al.* : *Immunology of HLA Vol I* (ed. Dupont B Nomenclature for factors of the HLA systems 1987. , Springer-Verlag, New York, p. 72-79, 1987.
 19. Flomenberg N: *Immunology of HLA Vol I* (ed. Dupont B), Functional polymorphisms of HLA class II gene products detected by T lymphocyte clones: summary of Tenth International Histocompatibility Workshop Cellular Studies. Springer-Verlag, New York,1987 ; p.532-550.
 20. Park MH, Tokunaga K : *HLA 1991 volume I* (eds. Tsuji K, Aizawa M and Sasazuki T), HLA ethnic study of Japanese and Koreans. Oxford University press ,Tokyo,1992 ; p.674-676.

〔海外ラボ紹介〕 Fred Hutchinson Cancer Research Center Daniel Geraghty 研究室

石谷 昭子

奈良県立医科大学, 法医学教室



Geraghty Labのメンバー。各自の国の国旗Tシャツを着ている。後列中央が Dr. Geraghty

骨髄移植の臨床と研究で世界的に有名なFred Hutchinson Cancer Research Center はアメリカ西海岸ワシントン州のシアトル市にある。シアトルはロッキー山脈と暖かい海に囲まれ、沢山の湖が点在する非常に美しい都市であり、同じく山と海に囲まれ、美港で名高い神戸市と姉妹都市でもある。空港へ降りる直前に上空からこの町を見ると、ここがエメラルド・シティと呼ばれるゆえんがよく理解される。シアトルはカナダの直下であり、緯度は高いが暖流のおかげで気候は温暖で、雪がふることはまれであ

る。夏はカラッとして涼しく、ぬけるように真っ青な空に真っ白な鷗が飛び交う様は日本のいかなる避暑地もおよばないだろう。ただ難点は冬にはしとしと雨の日が多いことと、ここの住み良さのためにアメリカ国内からも移住してくる人が多く、住居費が高いことくらいである。

今、日本でも推進されつつある骨髄移植はこのFred Hutchinson Cancer Research Center のDr. Donnal Thomasにより開発されたものである。このことにより、Dr. Thomasは1990年ノーベル医学賞を、腎

移植のDr. Joseph Murrayと共に受賞している。この研究所は Basic Science Division、Clinical Research Division、Public Health Division、Molecular Medicine Divisionの4部門で構成されており、これらは、South Lake Union、First Hill、Metropolitan Parkの3キャンパスに分かれている。臨床部門はダウントウンに近いFirst Hillに在り、隣接するSwedish Medical Centerの4フロアを含めて、今はすべて骨髄移植専用のもので、ここに世界各国から多くの医師がトレーニングを受けに来ている。Clinical Research Divisionの一部はこのキャンパスにあるが、ここで紹介するDaniel Geraghty ラボや2001年の第13回国際組織適合性ワークショップを主催されるJohn Hansen のラボ等研究部門のほとんどは、多くのヨットハーバーを持つ、美しいユニオン湖の畔 South Lake Unionキャンパスにある。このキャンパスの建物の窓からは、すぐ側の真っ青な湖面の上を真っ白なヨットの帆が滑るように行き交うのが見られる。

私はこのClinical Research DivisionのDr. Daniel Geraghtyのラボに、1989年から1991年の2年間留学して、その後も共同研究を続けていることから、ここではGeraghty ラボについて紹介したい。

Geraghty ラボはヒトゲノムのHLA領域の研究を行っているのであるが、大きく分けて、genome mapping グループと細胞免疫グループの2つに分けられる。genome mapping はさらに2分野に分けられる。

一つは、これまでHLA class I 領域遺伝子の完全な解明をめざし、YAC、BAC、コスミドクローン等を用いてgenome mappingを行ってきた。そして最近、class I 領域の全DNA配列の決定を完了した。そこで次に、この領域にある100個近くの遺伝子の詳細な構造や特性の解析を行い、究極的には免疫に関連する遺伝子の機能を解明しようとしている。この研究は、ワシントン大学ゲノム・センターのDr. Maynard Olson との共同研究として、このセンターにおいて行われている。

もう一つは、これらの遺伝子解析テクノロジーとこれまでに得られたDNA配列の情報を用いて、医学的に重要な問題を解決するため、新しい方法を開発しているところである。DNAの変異には、塩基

の反復配列の繰り返し数多型、塩基の挿入、欠失、置換があるが、なかでも1塩基置換が最も多く存在する。1塩基置換の発現頻度が1%以上のものをsingle nucleotide polymorphism (SNP) と呼び、これは反復配列などより安定した変異であり、非常に多くの部位に存在し、さらにイントロンのみならず遺伝子の中にも存在するため、疾患遺伝子の検索にはより適していると考えられている。またその検出法も、今、世界的に注目され始めたチップを用いた大規模な機械化に適しており、各種疾患の解明に向けて発展が期待される研究である。ここでは、HLA 領域全体のどの部位に1塩基置換の多型性が存在するかを調べた地図 SNP map を作り、その多型性と疾患とにどのような関連があるかを調べている。

とくに、骨髄移植を専門とするハッチンソン研究所において、GVHDや移植骨髄の拒絶に対する解決が重要な問題である。この観点からDr. Geraghty は、骨髄移植の結果におよぼすHLA-A,-B,-C以外の遺伝子の役割についても研究を進めている。確かに骨髄の生着には古典的class I抗原をマッチさせることが重要な要因であるが、血縁と非血縁のドナーにおけるGVHDの発現頻度を比較すると、明らかに何らかの他の遺伝子の多型が関与していると考えられる。従って、HLA class I領域全体の多型部位を明らかにし、(既知のHLA型のマッチした)非血縁ドナーにおける移植の結果との相関を調べようとしているのである。

一方、細胞免疫学的研究としては、Geraghty らがgene mappingの過程で発見した遺伝子HLA -E、-F、-G遺伝子の機能解析を行っている。

HLA-Gは多型性が著しく乏しく、その発現が胎児・母体間の接点である胎盤トロフォブラストのみに限局されていることから、母体の拒絶反応からsemiallograftである胎児を保護する役割に関与しているのではないかと推定されている。トロフォブラストは母体血液に接して、栄養素等を取り込み、また子宮組織内に深く侵入してゆくのであるが、胎児組織であるトロフォブラストをどうして母体免疫細胞は攻撃しないのであろうか。このHLA-Gの機能を解明することにより、移植における拒絶反応の抑制にそれを利用できないかという期待も含めて、こ

の解析が行われている。

またHLA-EについてもHLA-Gと同様に、モノクロナル抗体を作製しその発現や機能について解析が行われてきた。その結果、HLA-Eは人体組織中幅広く発現されており、class I抗原として特殊な機能をもっていることが明らかになってきた。HLA-Eは他のHLAのシグナルペプチドのみをその分子内に結合し、はじめて膜上に発現する。そして、CD94/NKG2 NKレセプターと結合してNK活性の抑制をするが、結合するペプチドによっては、かえってNKを活性化させることを明らかにした。今、HLA-EおよびHLA-Gについては多くの興味ある事実が明らかになりつつある。

Geraghty ラボには、アメリカ、日本、フランス、ベトナム、ロシア、スペイン、台湾、中国、フィンランド、オーストラリア、イングランド等、常に世界各国からポスドクが入れ替わり立ち替わり来ており、写真に示すようにまさしくinternational lab.である。そのためか、Dr. Geraghtyの英語はとてもクリアでわかりやすく、ラボの人達もたどたどしい英語には寛大で、とても明るい。ここでの研究に興味のある方は、このラボでポスドクを経験されることをお勧めしたい。すぐ近くに”タコマ富士”と呼ばれるレニエ山があり、冬にはスキー、夏にはお花畑を楽しむ。またグルメには、蟹、ロブスター、サーモン等海産物がとても新鮮で安いことが魅力であろう。但しDr. Geraghty自身はかなりハードワーカーで、ポスドクにもそれを期待している。これはよい仕事をしようと思えば当然のことと思われる。”よく学び、よく遊べ”で、充実した時を過ごせることと思う。

〔国際学会印象記〕 ASHI 24th ANNUAL MEETING REPORT

Vancouver, British Columbia - October 10-15, 1998

丸屋 悦子

京都府赤十字血液センター, 研究部

第24回American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) 学会が昨年(1997)の10月10日から15日の間、バンクーバー(カナダ)で開催された。会場はバンクーバー港に面したVancouver Trade & Convention Centerで、美しい港の眺めは朝、昼、晩とそれぞれの趣があり、厳しい学会スケジュール(朝、7時に会場オープン、ミーティングは8時から午後6時、日によっては午後7時から10時までにおよんだ。彼らのエネルギーの計り知れないものをいつもながら感じた)を十分癒してくれるものでした。また徒歩で行ける距離にあるスタンレーパークの紅葉の素晴らしさ(wonderfulの一言)、カナディアンギースの美しさ、キュートなりスの行動には目を奪われた。

今年のASHIが選んだRose Payne Distinguished Scientist AwardはDr. J. McMichael (the Head of the Molecular Immunology Group at the Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, England)で、先生はHLAとウイルス学に興味をいただき、T細胞を介したヒトのウイルス認識とそのHLA拘束性について世界ではじめてデータを出した科学者である。最近の仕事ではHLA-Eが提示するペプチドがHLA-class Iのシグナルシーケンス由来であり、これがNK cellによるkillingを防御していることを解明したことである。先生の講演の冒頭、イントロの部分で笹月先生の仕事が引用されていたことが印象深かった。

ASHI Scholars and International Scholar AwardではUtah Univ.のFrank Variが「HLA class II restriction in the binding of a library of HLA-B locus allopeptides

representing the B7 and B12 CREGS」のテーマで、Texas Univ.のRonald H. Kermanが「The Role of Flow Cytometry detected IgG and IgM anti-donor antibodies in cardiac allograft recipients」で、NHLF, Imperial College at Harefield Hospital, UKのJohn D Smithが「Increase in NFkB activity in endothelial cells induces by monoclonal and allospecific HLA antibodies」で、City Hospital, Belfast, N. IrelandのFionnuala Williamsが「HLA-A typing to allele level in different populations」で受賞し、それぞれのテーマでの講演があった。

今年のASHIで私がもっとも興味をもったテーマ「Cell Transplantation」について、以下3題の講演をレポートする。

1. Cord Blood Transplantation for Hematological Malignancies
Joan Kurtzberg, MD, Duke University Medical Center, Durham, NC
2. Allogeneic PBL Stem Cell Transplantation
Richard Champlain, MD, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX
3. Requirements for Allele Matching in Bone Marrow Transplantation
Effie Petersdrof, MD, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA

1. Cord Blood Transplantation for Hematological Malignancies
Joan Kurtzberg, MD, Duke University Medical Center,

Durham, NC

私はDuke University Medical Centerの移植医です。小児におけるrelapse free survivalをHLA identical sibling間のBMTとchemotherapyで比較すると、生存率はBMTのほうがchemotherapyに比べ明らかに高く良い治療法ではあるが、すべての患者にBMTをするにはTable 1のような問題点がある。

Table 1. Barriers to BM Transplantation

- Donor availability
- Regimen related toxicity
- GvHD
- Graft Rejection/ Graft Failure
- Immunodeficiency/ dysregulation
- Relapse

1.1 Umbilical Cord Blood for Stem cell source

Stem cellのソースとしてCord Bloodが考えられたのは1980年代に、T. Boyseらによるネズミを使った実験にはじまり、ついでH. BroxmeyerらによりIn vitro studies、enriched progenitor cells、increased proliferation、more efficient gene transferなどについて研究がなされた。1980年代にUCBについてわかったことをまとめるとTable 2のようになる。

Table 2. Collection of UCB

- HPCs are immobilized throughout pregnancy.
- HPCs are present in UCB regardless of the route of delivery (e.g. vaginal vs. C. Section)
- Mobilization is not due to and effect of labor.

1.2 Related UCB Transplantation

1988年、UCB Transplantationで成功した第1例目の移植が行われた。このケースはファンコニー貧血の10才の男の子にその姉妹の臍帯血を移植した例で、10年後の現在も元気に生存している、とても良い例である。Related Cord Blood Transplantationの特徴について1995年のLancetに掲載されたWignerらの報告がある (Table 3)。子供に適用でき、白血球のrecoveryはBMTに比べ少し遅く、血小板の

recoveryは遅いが、GVHDは起こりにくいなどの特徴があげられる。

Table 3. Related Cord Blood Transplantation

- Engraftment feasible in children
- WBC recovery slightly delayed
- Platelet recovery delayed
- Less GvHD

重症Acute GVHDの発生頻度をHLA identical sibling間のBMTとHLA抗原が6/6または5/6適合のUCBとで比較した場合、BMTが 0.18 ± 0.08 (n=74) でUCBが 0.03 ± 0.02 (n=56) であった。さらに興味深いことに、haploidentical UCB transplantationにおけるGVHD発生をその不適合なhaplotypeが母由来であるか父由来であるかによりGVHD発生の強さに違いがあり、ミスマッチが母由来のhaplotypeのとき発生するGVHDの発生は0またはgrade 1と軽度 (Table 4) であり、なにか防御作用があるように思える。まだ例数も少ないので確かではないが今後も注目すべき現象である。

Table 4. Haploidentical UCB transplantation Risk of GVHD

| | Disparity at NIMA# | Disparity at NIPA## |
|--------------------|--------------------|---------------------|
| GVHD Grade 0 – I | 10 | 1 |
| GVHD Grade II – IV | 0 | 4 |

: not inherited maternal haplotype

: not inherited paternal haplotype

1.3 Unrelated UCB Transplantation

Unrelated Cord Blood Banksは1992年ニューヨーク血液センターのDr. Rubinsteinらにより始められ、現在8,000以上の臍帯血が保存されている。1997年にDuke Univ. & American Red CrossとUCLAとGeorgetownの3施設で採取をはじめ、2001年までに15,000 unitsの臍帯血を採取する予定である。そのうちDukeでは7,500を採取する。Coordinating CenterとしてEMMESがある。

UCBのprocessingは次の3 stepからなる。

1. Volume reduction

2. RBC depletion
3. Cryopreservation Controlled rate vs. Mechanical freezing
DMSO±HES

臍帯血の検査項目をtable 5.に示す。採取に必要な informed consentの方法をtable 6.に示す。

Table 5. Unrelated UCB Transplantation

| | |
|--------------------------------|--|
| Banking | |
| ● Sterility | |
| ● Cell count, HPC, Cd34 | |
| ● ABO/Rh | |
| ● HLA | HLA-class I; serology, HLA-DR; DNA typing |
| ● HEP | |
| ● Viral Serologys (Mother) | IgG class |
| ● CMV Cultures (Infant Saliva) | |
| ● Family History | |

Table 6. Banking of placental Blood
Informed Consent Process

Education

- Literature in new OB packed posters and video
- Talks at Lamaze classes
- Consenting session with collection nurse
- Reaffirmation of consent after delivery

Major points of consenting process

- Donation is voluntary
- No guarantees that unit will be collected banked or present if requested for use by donor's family
- Maternal blood sample (feedback of positive serology results)
- Preview of mother and baby's charts
- Confidentiality

1.4 UCBの移植成績

最近の5年間に165の移植がDuke Univ.とMinnesota Univ.で行われ、移植後6ヶ月以上追跡ができた患者が90人になる。このうち143例の移植に

ついて、患者の病名をTable 7に、Table 8に移植された患者と臍帯血についての情報を、Table 9に移植センターであるDukeとMinnesotaの移植条件の違いを、そしてTable 10にHLAの適合度を示す。

Table 7. Unrelated UCB Transplants

Duke Univ. and Univ. of Minnesota

| Diagnosis | Total (n=143) |
|-------------------------|---------------|
| ● Malignant disease | 97 (68%) |
| ALL | 48 (34%) |
| ANLL | 35 (22%) |
| CML | 6 (4%) |
| JCML | 3 (2%) |
| CLL | 1 (1%) |
| NHL | 2 (1%) |
| Neuroblastoma | 2 (1%) |
| ● Non-malignant disease | 46 (32%) |
| SAA/FA | 13 (9%) |
| BD/Osteopetrosis | 5 (3%) |
| MDS (Refractory Anemia) | 4 (3%) |
| Immune deficiency | 8 (6%) |
| Metabolic disorder | 16 (11%) |

Table 8. UCB Transplantation— 4/98

Duke/ Minn.

Characteristics of Recipients

| | |
|-------------------------------|------------------------------|
| ● Recipient age (years) | |
| Median (range) | 7.2 (0.2- 58) |
| ● Recipient weight (Kg) | |
| Median (range) | 21.6 (4.8-92) |
| ● Recipient of sex | |
| Male / Female | 89(62%) / 54(38%) |
| ● Recipient's CMV serostatus | |
| Negative / Positive / Missing | 68 (48%) / 69 (48%) / 5 (4%) |

Characteristics of UCB Grafts

| | |
|-----------------------------------|----------------|
| ● Volume of UCB collected (ml) | |
| Median (range) | 84 (40-214) |
| ● Cell doses ($\times 10^7$ /kg) | |
| Median (range) | 3.6 (0.7-33.8) |

- CD34 dose ($\times 10^5/\text{kg}$)
Median (range) 7.6 (0.2-105)
- CFU-GM dose ($\times 10^4/\text{kg}$)
Median (rang) 1.3 (0.1-89.1)
- CD3 dose ($\times 10^6/\text{kg}$)
Median (rang) 9.0 (0.0-101)

Table 9. UCB transplantation Duke/ Minnesota Differences

| | Duke | MN |
|---------------|------|----------|
| G-CSF | + | - |
| TBI | +/- | + |
| Steroids | High | Low Dose |
| HLA disparity | 3/6+ | 5/6+ |
| Adults | + | - |
| Chemotherapy | Mel | Cy |

Table 10. Duke/Minnesota UCB transplantation 4/98

| Degree of HLA Match | Number |
|---------------------|----------|
| 6/6 | 15 (10%) |
| 5/6 | 47 (33%) |
| 4/6 | 61 (43%) |
| 3/6 | 9 (6%) |
| 2/6 | 2 (1%) |
| not available* | 9 (6%) |

*DRB1 assignment was not available

HLA typing grade: Serology for HLA-class I (A, B)

High resolution typing for HLA-DRB1

(The results of Unrelated UCB Transplantation at Duke and Minnesota Univ.)

- Neutrophileのengraftmentについては、ANC $\geq 5 \times 10^8/\text{L}$ になるMedianは 25日 (Range: 10-59 days) であり、HLAの不適合度は影響を与えず、CD34陽性の移植細胞数が >16の群と <3 ($\times 10^5/\text{kg}$)の群を比較すると>16の群が早期の生着がみられ、 $p < 0.01$ で有意差があった。複数の要因を総合して解析した結果をTable 11に示す。最も重要な因子は移植されるCD34陽性細胞の数であることが分かった。

Graft failureの各疾患別発生率をTable 12に示す。

Table 11. Multiply Regression Analysis

| | Relative Risk | p value |
|-----------------------------|------------------|---------|
| CD34 dose ($\times 10^5$) | 1.04 (1.02-1.06) | <0.01 |
| GFU-GM ($\times 10^4$) | 1.2 (1.1-1.06) | <0.05 |
| Recipient weight | 1.01 (1.00-1.03) | 0.05 |
| HLA match | | |
| 6/6 and 5/6 | 1.0 | |
| 2/6 and 3/6 | 1.4 (0.6-1.6) | 0.17 |

Table 12. Graft failures of Unrelated UCB Transplantation

| Graft failures | 9 /145 (6%) |
|----------------|--------------------|
| Diagnosis | number of patients |
| CML | 3 (38%) |
| SAA | 1 (12.5%) |
| FA | 2 (25%) |
| ALL (no ATG) | 1 (12.5%) |
| ANLL | 2 (25%) |

- Platelet engraftmentについては、PLT $\geq 5 \times 10^{10}/\text{L}$ となるに要する日数は中央値で 2.7 months (Range 1-8 months) であった。また Neutrophileの場合と同様にHLAの不適合度は影響を与えず、CD34陽性の移植細胞数が >16の群と <3 ($\times 10^5/\text{kg}$)の群を比較すると>16の群が早期の生着を示し、 $p < 0.01$ で有意であった。
- GVHDについて、Acute GVHDの発生率はgrade II-IVが 0.37 (0.29 - 0.45)、grade III-IVが 0.14 (0.08 - 0.20)であり、HLAの適合度とGVHD発生率とはgrade II-IVのGVHDともgrade III-IVのGVHDとも相関はみられなかった。Chronic GVHD (Limited and Extensive) の発生率は 0.11 (0.02 - 0.20)であった。
- Relapse率は0.25 (0.12 - 0.38)であった。
- Survivalは0.44 (0.35-0.53)で、HLAの不適合率とは相関がみられなかった。患者の年齢について < 2 years (n=32)、2-17 years (n=85)、> 18 years (n=26)の3群で比較すると < 2 years (n=32)は他の群に比べ良いsurvival(0.8)であっ

た ($p=0.01$)。移植されたCD34陽性細胞数のDose ($\times 10^5/\text{kg}$) を4群 (≥ 18 ; $n=30$, 7-17; $n=34$, 3-6; $n=32$, < 3 ; $n=26$) に分け、そのsurvivalを比較すると ≥ 18 (0.6) の群と < 3 (0.2)の群の間で有意差 ($p < 0.01$) がみられた。

- Non-relapse Mortalityについて、
 - ✓ 移植CD34陽性細胞数 ($\times 10^5/\text{kg}$) を4群 (≥ 18 ; $n=30$, 7-17; $n=34$, 3-6; $n=32$, < 3 ; $n=26$) に分け、相関を調べると < 3 の群 (0.8) では他の群(ほぼ0.5)に比べ明らかに高かった ($p < 0.01$)。
 - ✓ Grade II-IVのacute GVHD発生率とその予防薬 (Low dose methylprednisone; $n=71$, high dose methylprednisone; $n=52$, other; $n=20$) の違いについて相関はなかったが、予防薬の違いとMortalityについてはhigh dose methylprednisone群のほうがlow dose群に比べ2倍高いmortalityを示した ($p=0.09$)。
 - ✓ その他影響を与える因子として感染があげられる。この原因として以下のような因子が疑われる。
 - ?: Delayed neutrophil recovery
 - ?: Lower neutrophil load
 - ?: Neutrophil defect or immaturity
 - ?: Delayed immune reconstitution

つぎにumbilical cordのexpansion systemについて述べる。我々はクローズドシステムで行えるAstrom cell production systemを用いCord Bloodのexpansionを行っている。実際の移植にはまずcord bloodの一部を移植し、残りをAstrom cell production systemで増殖させ、12日後に再度移植をおこなう。このようなEx vivo expansionによるUCB transplantationにより1998年のsurvivalが他の年に移植したsurvivalと比較して最も良い結果 (0.8) が得られているが、今後どのようなようになるかは解らない。

1.5 Haplo-related UCB Transplants

4人の患者 (年齢2~5才) にhaplo-related UCB transplantsを行った結果について話す。患者の性別

は男性2名、女性2名で疾患はAMT; 2、BDA; 1、FA; 1であった。ドナーは3人がsiblingで1人が27weeksのtwinsのpool UCBである。移植したcell doseは1, 2, 5, $8 \times 10^7/\text{kg}$ である。移植結果は3/4が生着し1例 (5才のFA) がgraft failureであった。副作用は1人が移植7ヶ月後に一過性のITP/AHAになった。このような結果からhaplo-related UCB transplantsについて今のところ以下のようにまとめられる。

- non acute or chronic GVHD
- Full donor hematopoietic
- Normal immune function
- Event free survival 1-3 years

1.6 Discussion

Dr. Rubinsteinよりのコメント：今回のUCB TransplantsについてのDuke/Minnesotaのデータで、我々のデータとの相違はHLAに関することである。我々のHLA matchingの仕方とあなた方のmatchingの仕方には違いがある。例えば、あなた方が6/6 matchとするものでも我々のmatching法ではmismatchとなる。HLAのmatchingを統一して解析する必要がある。我々のデータでは移植成績に影響を及ぼす因子はCD34細胞数とHLAの適合度であった。

2. Allogeneic PBL Stem Cell Transplantation

Richard Champlain, MD, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

2.1 Stem cellとそのSource

Stem cellについてTable 13のようにまとめることができる。stem cellを採取する方法として骨髄液を採取する方法があるが、スライドのように、ドナーに麻酔をかけ、骨盤の両側 (右・左) に百回づつ穴をあけ採取するのである。これはドナーも採取する側も非常に疲れる。一方、末梢血からstem cellを採取するのは次のスライドのごとく、フェレーシスで白血球を採取する簡単な方法でドナーの負担も少なくすむ。またG-CSFをドナーに前もって投与することによりstem cellを誘導し一回のフェレーシスで移植

Table 13. Stem Cell

- Primitive hematopoietic cells capable of self renewal as well as differentiation into mature progeny
- Capable of restoring lymphohematopoietic reconstitution after myeloablative therapy
- Found in bone marrow, peripheral blood, cord blood, fetal liver

に必要な量を採取することができる（この薬を使用するまでは採取に2週間を必要としていた）。

1993年から1996年の間に行われた同種移植で stem cellの由来を調べた（Table 14）。1993年ではほとんどの移植が骨髄を使用していたが、1996年ではallo PBPC (Peripheral Blood Pheresis Cell) が22%も行われるようになった。rG-CSFの連続投与による stem cell (CD34 positive, CD34 positive and Thy dim positive)の増加を調べると、はじめの2~3日は増加がみられないが、5日目でピークを示す。我々は stem cellのマーカーとしてCD34をここ10年あまり用いてきた、試みにCD34 negative細胞を用い血液細胞の再構築を調べたが、CD34 positiveに比べ、再構築されるのが遅延したため、CD34を stem cellの良いマーカーとして今も用いている。G-CSFの連続投与による各細胞の増加率をTable 15に示す。白血球は6倍で、血小板は増加せず、CD34 positive細胞は16倍になり、移植可能な量が確保できる。

Table 14. Source of stem cell for allogeneic transplant

| (1993-1996) | | |
|-------------|----------------------|------|
| 1993 | bone marrow | 99% |
| | peripheral blood | 0.5% |
| | umbilical cord blood | 0.2% |
| 1994 | bone marrow | 97% |
| | peripheral blood | 3% |
| | umbilical cord blood | 0.5% |
| 1995 | bone marrow | 86% |
| | peripheral blood | 13% |
| | umbilical cord blood | 2% |
| 1996 | bone marrow | 75% |
| | peripheral blood | 22% |
| | umbilical cord blood | 3% |

Table 15. PB cell concentrations over pre-treatment level after 3 days of G-CSF treatment fold increase over baseline

| | | |
|---|------|------|
| WBC | 6.4* | n=41 |
| PMN | 8.0 | n=41 |
| Lympho | 2.2 | n=41 |
| Platelets | 1.0 | n=41 |
| CD34+ | 16.3 | n=10 |
| CD34+Thy-1 ^{dim} | 24.2 | n=10 |
| CD34+Thy-1 ^{dim} 38 ⁻ | 23.2 | n=10 |

*: mean

2.2 PBPCの問題点

Allo-PBPCで問題になるポイントのひとつとして、混入しているT細胞によるGVHDである。Table 16はフェレーシスで採取した末梢幹細胞溶液の中にリンパ系の細胞がどれくらい混入しているかを調べた結果である。この問題については後に述べる。

Table 16. Lymphoid subset collection by apheresis from 20 normal HLA-identical relatives apheresis cell/kg recipient

| | | | |
|-----------|------------------|-----|------------|
| CD3 | ×10 ⁶ | 438 | (104-1040) |
| CD4 | ×10 ⁶ | 301 | (100-663) |
| CD8 | ×10 ⁶ | 149 | (22-402) |
| CD19 | ×10 ⁶ | 88 | (35-143) |
| CD56+CD3- | ×10 ⁶ | 79 | (52-193) |

次の問題点は最低限移植に必要な細胞数である。Table 17に今まで行ったallo-PBPCで最小のCD34陽性細胞数の移植成績を示した。2.5×10⁶でも生着には問題がなかった。もっともほとんどのPBPCは多くの細胞数が確保できる。

同種PBPCのドナーについてTable 18にあげた項目について考慮している項目である。その中で

ドナーとしての適格性について、Table 19に具体的に示す。PBPCドナーの中で、重篤な副作用を起こした例を紹介する。

『Case Report』

- 22 yr male, donor for cousin (AML)
- 6 days G-CSF at 10 micrograms/Kg/day
- Peumothorax after removal of pheresis catheter

- Spontaneous splenic rupture 2 days later
- Mild ARDS

このような例を2例経験している。

次にG-CSF投与による副作用をまとめるとTable 20のようになる。最も多発するのが骨痛で次に頭痛や無痛覚症であった。

Table 17. Lowest CD34+ grafting doses and engraftment after allo-PBSC transplantation

| CD34 cells /kg transfused | ANC >0.5 | ANC >0.1 | PLT >20 | PLT >50 | FU days | RFLP |
|------------------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| 1. 2.5×10 ⁶ | 10 | 10 | 11 | 13 | 88 | ND |
| 2. 3.3×10 ⁶ | 9 | 10 | 16 | 19 | 87 | ND |
| 3. 3.9×10 ⁶ | 9 | 9 | 12 | 18 | 200 | 100% |
| 4. 3.9×10 ⁶ | 11 | 12 | 14 | 19 | 85 | ND |

Table 18 . Allogeneic PBPC Donors

- ligibility/ Exclusion----- Donor and Recipient consideration
- Risks of mobilization with G-CSF and collection by apheresis
- Practice guidelines for donor management
- Monitoring----short and long term effects
- Registry for adverse effect

Table 19. Allogeneic PBPC Donor Eligibility

- Same as platelet donor with exception
- Vascular Access-try to avoid central catheter
- Age: pediatric and elderly
- Infections: Hepatitis B and C seropositivity may be acceptable
- ? Exclusion for donor safety
 - Bleeding/clotting disease, cardiovascular disease, auto immune /inflammatory disorder, pregnancy
 - ? Strong family history of leukemia

Table 20. Filgrastim-related adverse events

| Adverse Events | day 4 group (n=44) | day 6 group (n=30) | pvalue |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| Bone pain | 36(81) | 27(90) | 0.5 |
| Headache | 33(75) | 20(67) | 0.44 |
| Nausea | 5(11) | 3(10) | 0.99 |
| Fatigue | 11(25) | 16(53) | 0.01 |
| Grade 2-3 toxicity* | 27(61) | 18(60) | 0.99 |
| Analgesics | 29(65) | 25(83) | 0.11 |

*: NCI CTC

2.3 PBPCのコスト

同種幹細胞移植でBMTとPBPC移植にかかる費用を比較した (Table 21)。PBPCはBMTとほぼ同じくらいかまたはそれより安価で移植できる。

Table 21. The comparison of charge between Apheresis and BM

| | Apheresis | Marrow |
|------------|-----------|--------|
| Misc | 55 | 1081 |
| Surgery | 0 | 2022 |
| Pharmacy | 1907 | 365 |
| Laboratory | 3483 | 2508 |
| Radiology | 115 | 109 |
| Clinic | 182 | 212 |
| Pro Fee | 3416 | 6090 |
| Cell Lab | 3881 | 2362 |
| Total | 1439 | 1513 |

2.4 PBPCによる移植成績

(Neutrophil recovery)

PBPCとBMTのneutrophileの回復を比べるとほと

んど差は見られず、PBPCのほうが若干早く100% recoveryを示す。

(Platelets recovery)

Plateletsの回復はPBPCのほうがBMTに比べ早く回復した。

(Advanced LeukemiaにおけるBMTとPBPCの比較)

Table 22にadvanced LeukemiaにおけるBMTとPBPCによる移植成績を比較する。

Table 22. Results with allogeneic PBPC

| | Advanced Leukemia | | |
|--------------------|-------------------|---------------|----------------|
| | BMT CSA/MTx | BMT CSA/MP | PBPC CSA/MP |
| N | 30 | 19 | 25 |
| Granulocytes > 0.5 | 16 | 9 | 10 |
| Platelets > 50 | 32 | 25 | 18 |
| Grade 2-4 RRT | 90% | 84% | 40% |
| Grade 2-4 GVHD | 49% | 63% | 42% |
| Discharged | 33 | 20 | 16 |
| Day 180 survival | 53% | 32% | 72% |

顆粒球や血小板の回復は前述のとおりで、心配していたGVHD発生頻度の上昇（PBPCではT細胞がBMTに比べ多く移植されることに由来する）は見られなかった。さらに驚いたことに、regimen related toxicity (RRT) がBMTに比べ明らかに低かった。したがってPBPCはtoxicityもGVHD発生も低かった。しかしchronic GVHDの発生頻度を調べると74% (BMTの場合は30%) に発生していた。この原因はまだ不明である。

2.5 HLA-identical sibling間移植でPBPC移植とBMTの比較

ヨーロッパの移植グループの協力により、PBPCとBMTでの移植成績を移植後1年後の成績で比較した。Table 23に患者の情報と移植成績をacute leukemiaとCMLについてまとめた。比較した移植例はPBPCが288例とBMTが536例である。移植成績は患者の疾患別 (acute leukemiaとCMLで20才以上) に比較した。

Acute leukemiaの場合、差がみられたのは

mortalityでPBPCがBMTより低く、良い成績であった。ただしchronic GVHDの発生頻度はBMTに比べ高かった (70% vs. 40%)。全体的な成績はどちらも変わりなかった。

CMLの場合、患者がCPで移植を受けた場合 mortalityも disease free survivalも両移植法で変わりはないが、患者がAPで移植を受けた場合PBPCのほうが明らかに死亡率も低くdisease free survivalも高かった。

このような結果から、PBPCは年齢の高い患者 (70才まで) や虚弱な患者に強い化学療法 (毒性も強くなる) を行うことなく、GVL効果により疾患を治療することができる。例えば以下のような方法で利用できる。

Induction of GVL as primary therapy

Nonablative
Preparative
Regimen to → Allo → Short
Achieve or BMT → GVHD → DLT
Engraftment Prophylaxis

Eligibility: Elderly (up to age 70) or medically infirm patients; potential alternative to ablative regimen in younger patients with indolent diseases.

Table 23. Peripheral Blood Progenitor Cell(PBPC) versus Bone Marrow (BM) Transplants from HLA-identical siblings for Leukemia
-Outcome in First Posttransplant Year (1995-1996)-

[Patients]

- 288 recipient of PBPC transplants
- 536 recipient of BM transplants
- Reported by 105 teams
- North America (N=270)
- Europe (N=378)
- South America (N=62)
- Australia /NZ (N=34)
- Asia (N=80)

[Results]

| | | |
|-------------------------|---|----------------------|
| ● Acute Leukemia | | |
| ◆ Granulocyte (ANC) | | Median |
| | PBPC | 14 days (N=131) |
| | BM | 18 days (N=230) |
| | | (Patients age ≥ 20y) |
| ◆ Acute GCHD | | |
| | PBPC | 40% (N=125) |
| | BM | 40% (N=217) |
| ◆ Chronic GVHD | | |
| | PBPC | 70% (N=108) |
| | BM | 40% (N=185) |
| ◆ Overall outcome: | | |
| | No difference between PBPC (N=129) and BM (N=270) | |
| ◆ Mortality | | |
| | PBPC | 20% (N=159) |
| | BM | 40% (N=258) |
| ◆ Disease free survival | | |
| | PBPC | 70% (N=159) |
| | BM | 60% (N=258) |
| ● CML | | |
| ◆ Mortality | | |
| | CP; PBPC | 30% (N=129) |
| | BM | 30% (N=245) |
| | AP; PBPC | 20% (N=201) |
| | BM | 70% (N=33) |
| ◆ Disease free survival | | |
| | CP; PBPC | 60% (N=101) |
| | BM | 70% (N=245) |
| | AP; PBPC | 60% (N=20) |
| | BM | 30% (N=33) |

このような結果からHLA identical sibling間の同種PBPCについて、Table 24のようにまとめられる。+はメリットと考えられる特徴で-はデメリットである。Survivalについては長期の観察が必要であり、現時点では評価できない (Thank you)。

Table 24. Allogeneic PBPC vs. BM
HLA matched Sibling

- - Requires G-CSF mobilization of donor
- + Higher CD34 dose

- +- Higher T-cell dose
- + Rapid hematological recovery
- + Lower RRT, early morbidity
- +- No change acute GVHD
- - Higher rate chronic GVHD
- + Greater GVL (?)
- ? Survival

2.6 Discussion

- Stem cell移植の方法として、BMT、UBCT、PBPCがあるが、血縁間や非血縁間の移植で、HLAが完全マッチでない場合はどの方法を用いばいいのですか？

<答え>

この質問はいろいろな意味を含んだ、良い質問です。アメリカでは stem cell 移植にほとんど BMT が用いられ、最近臍帯血移植や PBPC が行われるようになった。ヨーロッパではPBPCが主に用いられている。非血縁間の移植でHLAにミスマッチがある場合、PBPCにより造血幹細胞は大量に得られるが、同時に免疫反応細胞も大量に移植されることになるため、重篤な GVHD 発生が考えられる。我々はまず血縁間でデータを得、次に非血縁間でその適用法を考えたいと思っている。例えば、大量の CD34陽性細胞を含む血液から、免疫反応細胞を除いて移植する方法などです。今後、国際的な協力下で検討する必要があると思います。

3. Requirements for Allele Matching in Bone Marrow Transplantation

Effie Petersdorf, MD, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA

3.1 GVHD発生のハイリスクファクター

シアトル、フレッドハッチンソンで行われた血縁間骨髄移植でGVHD発生とHLAの適合度との関係を調べた。その結果、HLAの不適合数がGVHDのリスクファクターであることが解った。ではどのlocusの不適合がもっとも強いGVHDのリスクファクターになるかを調べると、HLA class IIであることが解った。次に非血縁と血縁間骨髄移植でのGVHD発生頻度を比較した。HLA-A, B, DRが血清学的検

査で適合している場合、CMLの患者でCP期に移植を受けた症例のⅢ～Ⅳ度のGVHDを起こした頻度 (matched sibling; 17% {90/526} , unrelated; 38% {69/182}) を比べると、明らかに非血縁間ではGVHDの発生頻度が高かった。

3.2 HLA typing 技術の進歩とその多型性

このようなデータが得られた頃、我々はHLA抗原がタイピング法でより多型性が高くなることを知った。例えばTable 25に示すようにHLA-DRとDQ抗原のタイピングについて、血清学でbroadな特異性の血清を用いたタイピングでDR5抗原を保有する場合、より多くのより特異的な抗血清を用いてタイピングするとDR5抗原の中にDR11とDR12抗原を保

有する細胞があることが解った。1975年、この細胞 (DR11) をHTCを用いたMLC法でタイピングを行うと、DR11の中にDw5とDwJVMという2種類の抗原を保有する細胞があることが解った。その後DNA typingが可能になり、このDw5を保有する細胞がDRB1*1101とDRB1*1104のように分類されることが解った。このようにHLA抗原がさらに多型性に富むことがHLA typing技術の進歩とともにわかってきた。

非血縁間骨髄移植でのHLA-DRB1 & DQB1の適合性とGVHD—

1992年、我々はDNA typingを用い、CMLの患者にCP期で非血縁間骨髄移植を行った症例につき、

Table 25. Typing for HLA-DR and DQ

| Technique | Specificity | Example |
|-----------|-------------|-------------------------|
| Serology | broad | DR5 vs. DR4 |
| Serology | private | DR11 vs. DR12 |
| HTC | > < | Dw5 vs. DwJVM |
| DNA-SSOP | Allelic | DRB1*1101 vs. DRB1*1104 |

Table 2.

HLA-A, B, DR Serologic Matches (1996)
(n=449)

| | DRB1 Matched (n=376) | | DRB1 Mismatched (n=73) | |
|-------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| | DQB1 Matched (n=335) Group 1 | DQB1 Mismatched (n=41) Group 2 | DQB1 Matched (n=48) Group 3 | DQB1 Mismatched (n=25) Group 4 |
| Ⅲ～Ⅳ | 125 | 23 | 24 | 15 |
| aGVHD | 37% | 56% | 50% | 60% |

血清学的タイピングでHLA-A, B, DRが一致している症例で、DRB1 alleleの適合度とⅢ～Ⅳ度のGVHD発生頻度の関係を調べた。GVHDの予防薬はMTXとCSPを用いた。DRB1 allele match群 (127/306, 41%) とDRB1 mismatch群 (38/59, 64%) の間にp<0.01で有意な差が見られた。その当時我々はDR以外のHLA class II抗原 (HLA-DQ) のmismatchについて、おそらく連鎖不平衡があるため不適合は少ないと考えていた。

1996年、我々は今までに行ったHLA-A, B, DRが血清学的タイピングで一致している非血縁間骨髄移植449組について、HLA-class IIの適合度を調べた (Table 26.)。次の4群に分類された。① HLADRB1 alleleとDQB1 allele match群 (335) ② HLA-DRB1 allele matchでHLA-DQB1 allele mismatch群 (41) ③

HLA-DRB1 mismatchでHLA-DQB1 allele match群 (48) ④ HLA-DRB1 mismatchでHLA-DQB1 mismatch群 (25)。

各群でⅢ～Ⅳ度のGVHD発生率を比べると、①群が37% (125/335)、②群が56% (23/41)、③群が50% (24/48)、④群が60% (15/25) となった。HLA-DQB1のアミノ酸レベルのミスマッチ数はHLA-DRB1 allele間 (例えばHLA-DRB1*0401とHLA-DRB1*0402) のミスマッチ数よりはるかに多くのアミノ酸不適合がある。HLA-DQの適合性もGVHDのリスクファクターになり、移植前のHLA-DR, DQ allele typingの必要性が解った。

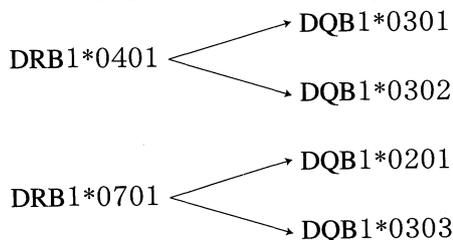
Table 27. HLA-DRB1 Mismatches in HLA-A, B, DR serologically matched Unrelated Marrow Transplants (n=364, North American Caucasian)

| | Frequency in study population | | Number of allele mismatched | |
|----------|-------------------------------|---------|-----------------------------|---------|
| DR1 | 80 | (10.9%) | 4 | (5.0%) |
| DR15 (2) | 109 | (15%) | 3 | (2.5%) |
| DR16 (2) | 3 | (0.5%) | 1 | (33.3%) |
| DR3 | 138 | (19.0%) | 0 | |
| DR4 | 114 | (15.7%) | 18 | (15.7%) |
| DR11 | 65 | (8.9%) | 20 | (30.8%) |
| DR12 | 1 | (0.1%) | 0 | |
| DR13 | 67 | (9.2%) | 10 | (14.9%) |
| DR14 | 24 | (3.3%) | 4 | (16.6%) |
| DR7 | 107 | (14.7%) | 0 | |
| DR8 | 13 | (1.8%) | 3 | (23.1%) |
| DR9 | 4 | (0.5%) | 0 | |
| DR10 | 3 | (0.4%) | 0 | |
| | 728 | (100%) | 63 | |

HLA抗原の重要な特徴、人種によるallele頻度の偏りと連鎖不平衡—

では次にこれらのローカスのミスマッチを詳しく調べる。Table 27に非血縁間骨髄移植を行ったNorth American Caucasian (n=364) のHLA-DRB1 allele頻度とmismatchの数を示した。North American Caucasianの患者の抗原頻度はnormal集団とほぼ同じであるが、ここで注目すべきことは、ミスマッチの抗原に偏りがあることである。すなわち多くのミスマッチがDR4とDR11に起こっている。抗原頻度としてDR3は高いが、ミスマッチは0であった。DQについては連鎖不平衡に起因するミスマッチがみられた (Table 28)。すなわち、HLA-DRB1*0401を保有するハプロタイプにHLA-DQB1がDQB1*0301であるハプロタイプとDQB1*0302であるハプロタイプがある。同様にHLA-DRB1*0701の場合もDQB1*0201とDQB1*0303を保有する2種類のハプロタイプがあり、DRB1が適合でDQB1のミスマッチが起こっている。DQB1のミスマッチのほとんどがこのようなケースであった。

Table 28. Common DRB1-DQB1 Association



非血縁間骨髄移植でのHLA-class I allele mismatchと移植成績の関係—

スチーブンマーシュによりまとめられた1998年10月でのHLA抗原の多型性数をTable 29に示す。ここで、注目したいことはHLA-class Iにも400以上の多型性があることである。このことから以下のような仮説を立て、その検証を行った。

Hypothesis

Donor-recipient disparity for HLA-A, B and C alleles accounts for the increased risks of acute GVHD, graft failure and mortality in unrelated stem cell transplantation

実験計画をTable 30に示す。HLA typing methodは移植ペアのHLA-A, B, C alleleのシーケンスを行った。統計的処理法として、GVHDの発生頻度はカウント法で、生存率はKaplan-Meier法を用いた。Table

31にHLA-A, Bが血清学で適合し、HLA-DRB1とDQB1 alleleが適合している非血縁間骨髄移植 (64ペア) でHLA-A, B, C alleleの不適合ペアの数とその組み合わせを示す。主なミスマッチはHLA-Cで起こっていた。次にHLA-class IとIIのミスマッチの組み合わせで不適合があった非血縁間移植ペア65組の内訳をTable 32に示す。Table 33にシーケンスによるタイピングを行った300ペアの組織適合性抗原の適合度を示す。Table 34にHLA-class Iでのミス

Table 29. HLA Diversity

| HLA Nomenclature Committees | | | |
|-----------------------------|-----|-------------------|-----|
| October 1998 | | | |
| Class I Antigens | | Class II Antigens | |
| HLA-A | 120 | HLA-DRB | 260 |
| HLA-B | 250 | HLA-DQA1 | 19 |
| HLA-C | 70 | HLA-DQB1 | 36 |
| HLA-E | 5 | HLA-DPA1 | 15 |
| HLA-G | 14 | HLA-DPB1 | 84 |
| | 459 | DMA | 4 |
| | | DMB | 5 |
| | | | 425 |

Table 30. Study Design

- 300 patients transplanted from unrelated donors for CML CP1, CP2, AP
- Conditioning Regimen: CY-TBI
- T-replete Done marrow
- GVHD Prophylaxis: CSP-MTX
- Clinical Endpoint: graft failure, GVHD, survival

Table 32. Class I and II Mismatches among Unrelated Donor Transplants (n=65 pairs)

| Class II mismatch | class I mismatch | n | |
|-------------------|------------------|------------|---|
| HLA-DRB1 | None | 9 | |
| n=20 | HLA-A only | 0 | |
| | HLA-B only | 2 | |
| | HLA-C only | 1 | |
| | Combination | 8 | |
| HLA-DQB1 | None | 16 | |
| n=31 | HLA-A only | 0 | |
| | HLA-B only | 2 | |
| | HLA-C only | 7 | |
| | Combination | 6 | |
| | Both | None | 6 |
| | n=14 | HLA-A only | 0 |
| | HLA-B only | 0 | |
| | HLA-C only | 2 | |
| | Combination | 6 | |
| | | 65 | |

Table 31. Class I allele Mismatches Among

| HLA-A, B, DRB1, DQB1 Identical | |
|---|----|
| Unrelated Donor Transplants (n= 64 pairs) | |
| Mismatch | n |
| HLA-A only | 13 |
| HLA-B only | 9 |
| HLA-C only | 26 |
| HLA-A and B | 0 |
| HLA-A and C | 3 |
| HLA-B and C | 9 |
| HLA-A, B and C | 4 |
| | 64 |

Table. 33.

| Histocompatibility Matching | |
|-----------------------------|-----------|
| Allele matching | 142 (47%) |
| Single class I | 55 (18%) |
| Multiple class I | 35 (12%) |
| Single class II | 24 (8%) |
| Multiple class II | 7 (2%) |
| Class I and II | 37 (12%) |
| | 300 |

マッチアリの組み合わせとその数を示す。

HLA-A locusではHLA-A2 alleleのミスマッチが主で、HLA-A26 alleleにはミスマッチが無かった。HLA-B locusではHLA-B35とB44 alleleで起こっていた。HLA-C locusについては抗原間のミスマッチ (例えば0102/02022) も起こっていた。

〈Graft Failure〉

Graft FailureとHLA allele適合度との関係を調べた結果をTable 35に示す。Allele matchとHLA-class I

single mismatchのgraft failure率は変わらなかったが、HLA-class I multiple mismatch (例えばHLA-AとBやHLA-AとCに不適合がある場合) ではgraft failure率が最も高かった (29%)。そしてHLA-class IIの不適合はgraft failureにはおそらく影響を及ぼさないと考えられる。

〈Acute GVHD III～IV〉

Acute GVHDとHLA allele適合度との関係をみると、HLA-allele match群とHLA-class I single mismatch

Table 34. Mismatch of HLA-A , B, C alleles

| HLA-A | Number | HLA-B | Number | HLA-C | Number |
|-----------|--------|-------------|--------|------------|--------|
| 0201/0225 | 1 | 1401/1402 | 3 | 0102/02022 | 8 |
| 0201/0205 | 8 | 1501/1507 | 1 | 0401/1203 | 6 |
| 0201/0206 | 2 | 1501/1518 | 0 | 0303/0304 | 5 |
| 0201/0207 | 0 | 2702/2705 | 3 | 1402/1502 | 4 |
| 0201/0210 | 0 | 2705/2709 | 1 | 0202/1502 | 3 |
| 0201/0211 | 2 | 3501/3502 | 1 | 0304/0702 | 3 |
| 0206/0210 | 0 | 3501/3503 | 10 | 0501/0701 | 3 |
| 0301/0302 | 4 | 3501/3508 | 1 | 0501/1601 | 3 |
| 2402/2403 | 2 | 3502/3503 | 2 | 0701/0702 | 3 |
| 2402/2407 | 1 | 3502/3505 | 1 | 0701/1203 | 3 |
| 2601/6601 | 1 | 3502/3508 | 2 | | 41/93 |
| 2601/2602 | 0 | 3503/3508 | 1 | | |
| 2601/2603 | 0 | 3508/35 new | 1 | | |
| 2602/2603 | 0 | 3901/39062 | 4 | | |
| 2901/2902 | 3 | 3902/3904 | 0 | | |
| 3001/3002 | 4 | 4002/4011 | 1 | | |
| 3301/3302 | 4 | 4002/4003 | 0 | | |
| 6801/6802 | 2 | 4002/4006 | 1 | | |
| | 32 | 4003/4006 | 0 | | |
| | | 4402/4403 | 11 | | |
| | | 4402/4405 | 3 | | |
| | | 4403/4405 | 3 | | |
| | | 5101/5103 | 1 | | |
| | | 5101/5108 | 1 | | |
| | | 5501/5502 | 1 | | |
| | | 2702/270517 | 1 | | |
| | | 0702/07new | 1 | | |
| | | | 55 | | |

群は同程度のa-GVHD発生頻度（約40%）で次に高いのがHLA-class Iのmultiple mismatch群（約50%）で、最も高い群がHLA-class II single mismatch群とHLA-class Iとclass II両方のmismatch群（約60%）であった。Table 36にGVHDについてproportional Hazard Regression Modelの結果を示す。GVHDのリスクファクターとしてHLA-class IIの適合性が重要であることが解る。

〈Survival〉

生存率との関係を調べると、HLA allele match群とsingle class Iまたはclass II mismatch群の生存率はほぼ同じで、HLA-class I multiple mismatch群とclass

Table35. Graft Failure

| HVG | | |
|----------------------|----------------|-------------------|
| Donor Disparity | Number of Pair | Graft Failure (%) |
| Allele Match | 146 | 3(2) |
| Single class I | 50 | 1(2) |
| Multiple class I | 31 | 9(29) |
| Single class II | 24 | 0 |
| Multiple class II | 7 | 0 |
| Class I and class II | 34 | 4(12) |

Table 36. Grade III-IV Acute GVHD

Proportional Hazards Regression Model*

| Disparity + | Number of pairs | Hazard Ratio (95% CI) | p value |
|----------------------|-----------------|-----------------------|---------|
| Allele Match | 142 | 1.0(-) | |
| Single class I | 54 | 1.1(0.7-1.0) | 0.66 |
| Multiple class I | 34 | 1.4(0.8-2.6) | 0.27 |
| Single class II | 24 | 1.8(1.0-3.4) | 0.06 |
| Class I and class II | 35 | 2.0(1.1-3.4) | 0.02 |

*: Adjusted for stage of disease, body weight index, time interval from diagnosis to transplant, pretransplant interferon therapy.

+: Seven patients had multiple class II mismatches, and 5 developed grade III~IV acute GVHD.

Iとclass II 両方のmismatch群が悪い結果が得られた。Table 37にその結果をまとめる。生存率のリスクファクターはHLA-class Iのmultiple mismatchやHLA-class Iとclass IIのcombination mismatchである。いままでの結果をまとめると以下ようになる。

3.3 Summary

Unrelated Stem Cell Transplantation for CML

- HLA class I allele disparity increases the risk of graft failure
- HLA class II allele disparity increases the risk of GVHD
- Single allele disparity is well tolerated
- Avoid multiple allele disparity

今回の解析はCMLの患者に限って行ったものであり、その他の疾患についてはまだ解析されていない。

また以下のような疑問が次に湧いてくる。すなわち、移植を必要とする多くの患者にHLAが完全に適合したドナーを見つけることは、現実問題として困難である。では

Do all mismatches contribute equivalent risk to graft failure, GVHD and mortality?

1. Locus effects?

2. Allele effects?

3. Race/ethnicity of recipient and donor? (Fig. 1)

このような疑問の答えを得るためにJMDFとの共同研究を行った。Table38にフレッドハッチンソンとJMDFで行われた移植で、HLA-A、B allele不適合ペアのallele組み合わせとその数を示している。この比較で明らかなように人種によりミスマッチのallele組み合わせがまったく異なることが解る。(筆者註：ここで光栄にも我々が作成したスライドが使用された。)

3.4 今後の研究課題

これから我々が焦点を絞って取り組む問題は以下のような事項であると考える。

- Effect of class I and II allele disparity in
 - Chronic leukemia

- Acute leukemia
- Marrow failure
- Non-malignant disease

- Importance of non HLA variable which affect outcome

Thank you

—筆者コメント—

講師のEffieとは事前にディスカッションをした。日本人ではclass Iの、白人ではclass IIのミスマッチが臨床的に有意であるという相反する結果について、次のようなアグリーメントを得た。日本人の mismatchの大勢はA*0201 vs. 0206、A*26 alleleミスマッチ、B*4002 vs. 4006であるに対し、白人ではそれ以外例えばB35、B44 alleleミスマッチである。またDR allele mismatchの組合せも異なる（データ省略）。日本人で mismatchの組合せはimmunodominantで白人のその組合せは臨床に影響が少ない（permissible mismatch）ことが考えられる。

Table 37. Mortality

| Proportional Hazards Regression Model* | | | |
|--|-----------------|-----------------------|---------|
| Disparity + | Number of pairs | Hazard Ratio (95% CI) | p value |
| Allele Match | 142 | 1.0(-) | |
| Single class I | 55 | 1.2(0.7-2.1) | 0.4 |
| Multiple class I | 35 | 3.5(2.1-5.9) | <0.001 |
| Single class II | 24 | 1.0(0.5-2.1) | 0.89 |
| Class I and class II | 37 | 3.3(2.0-5.5) | <0.001 |

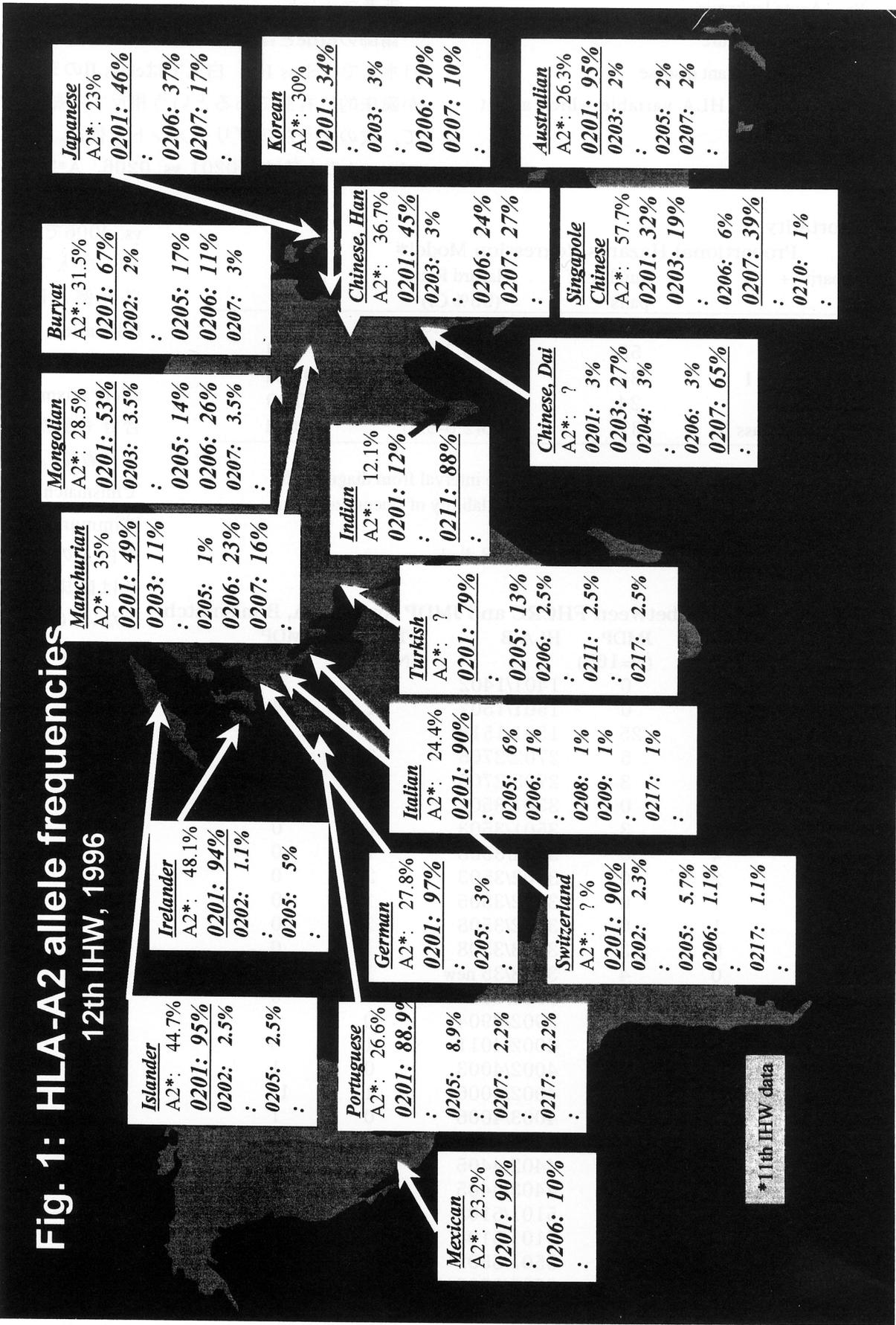
*: Adjusted for stage of disease, body weight index, time interval from diagnosis to transplant, patient age at time of transplant, availability of fluconazole and ganciclovir, and patient CMV seropositivity.

+: Seven patients had multiple class II mismatches, and 3 died.

Table 38. The comparison between FHCRC and JMDP for HLA-A, B mismatch

| HLA-A | FHCRC (N=300) | JMDP (N=165) | HLA-B | FHCRC (N=300) | JMDP (N=165) |
|-----------|---------------|--------------|-------------|---------------|--------------|
| 0201/0225 | 1 | 0 | 1401/1402 | 3 | 0 |
| 0201/0205 | 8 | 0 | 1501/1507 | 1 | 4 |
| 0201/0206 | 2 | 25 | 1501/1518 | 0 | 1 |
| 0201/0207 | 0 | 5 | 2702/2705 | 3 | 0 |
| 0201/0210 | 0 | 3 | 2705/2709 | 1 | 0 |
| 0201/0211 | 2 | 0 | 3501/3502 | 1 | 0 |
| 0206/0210 | 0 | 3 | 3501/3503 | 10 | 0 |
| 0301/0302 | 4 | 0 | 3501/3508 | 1 | 0 |
| 2402/2403 | 2 | 0 | 3502/3503 | 2 | 0 |
| 2402/2407 | 1 | 0 | 3502/3505 | 1 | 0 |
| 2601/6601 | 1 | 0 | 3502/3508 | 2 | 0 |
| 2601/2602 | 0 | 3 | 3503/3508 | 1 | 0 |
| 2601/2603 | 0 | 4 | 3508/35 new | 1 | 0 |
| 2602/2603 | 0 | 2 | 3901/39062 | 4 | 0 |
| 2901/2902 | 3 | 0 | 3902/3904 | 0 | 1 |
| 3001/3002 | 4 | 0 | 4002/4011 | 1 | 0 |
| 3301/3302 | 4 | 0 | 4002/4003 | 0 | 1 |
| 6801/6802 | 2 | 0 | 4002/4006 | 1 | 17 |
| | 32 | 45 | 4003/4006 | 0 | 1 |
| | | | 4402/4403 | 11 | 0 |
| | | | 4402/4405 | 3 | 0 |
| | | | 4403/4405 | 3 | 0 |
| | | | 5101/5103 | 1 | 0 |
| | | | 5101/5108 | 1 | 0 |
| | | | 5501/5502 | 1 | 0 |
| | | | 2702/270517 | 1 | 0 |
| | | | 0702/07new | 1 | 0 |
| | | | | 55 | 25 |

Fig. 1: HLA-A2 allele frequencies
12th IHW, 1996



*11th IHW data

〔書評〕 Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates.
Edited by A. Blancher, J. Klein, and W. W. Socha.
Springer: Berlin, 1997. ISBN 3-540-61636-5

齋藤 成也

国立遺伝学研究所, 集団遺伝系

本書は、ヒト以外の霊長類（サルと類人猿）に存在する血液型とMHCの分子進化を扱ったものである。シンポジウムなどの発表をもとにしたものではなく、血液型を研究しているBlancher氏とSocha氏が、長年MHCを研究しており、最近ABO式血液型遺伝子の進化についても研究を行なっているKlein氏と共同で編集したものらしい。大きく3部に別れており、第1部は霊長類の分類、第2部は血液型、第3部はMHCを扱っている。

脊椎動物は、その免疫システムの一環としてゲノムの中にMHC遺伝子群を有する。なかでももっともよく研究されているのはヒトとマウスである。これらモデル生物の次に研究が進んでいるのが、ヒト以外の霊長類であろう。事実、DDBJ/EMBL/GenBank国際塩基配列データベースのPRI division（ヒト以外の霊長類のデータを格納している）には、多数のMHC遺伝子の塩基配列が登録されている。本書の第3部では、この霊長類におけるMHC遺伝子の進化に関する最近の研究成果が9章にわたって紹介されている。ほとんどの図表は新たに作成されたものであり、中でも遺伝子の系統樹が多数示されている。

私自身が遺伝子の系統樹を作成して議論を進める研究スタイルなので、系統樹に興味がついつい集中するが、たとえば第3部の第2章（Cadavid and Watkins）ではMHCクラスI遺伝子の系統樹が狭鼻猿（旧世界猿と類人猿とヒト）と広鼻猿（新世界猿）に分けて示されているが、後者の場合、ヒトのHLA-Dと系統的に近い遺伝子が新世界猿で多様化している様子が明確に見えて取れる。一方、MHC

クラスII遺伝子群はクラスI遺伝子群よりも種類が豊富で研究も進展しているためか、第3部の第3章がさらに5節に分けられてDR, DQ, DP, DM, DN/DO遺伝子の進化が論じられている。そのなかで、第3章第2節（Klein, Satta, and Gongora）では、塩基配列やアミノ酸配列を多重整列して、そこから系統樹を作成するという通常の方法のほかに、進化上でAlu配列などが挿入や欠失を生じた突然変異が共有されている配列をまとめるという方法も用いて、DRB遺伝子の進化を復元している。しかしここでは各遺伝子の進化と各ハプロタイプの進化が複雑に組み合わさっており、遺伝子の重複と欠失がひんぱんに生じているらしいことがうかがわれる。ちなみに、この節の著者の一人である颯田葉子さんは、現在は葉山の総合研究大学院大学に所属している。

第3章第2節（Grahovac）ではDP遺伝子を取り上げられているが、ヒト、チンパンジー、オランウータン、タマリン（新世界猿）のゲノム地図が比較されている。興味深いのは、イントロンの長さがけっこう種によって異なる点である。DPB2遺伝子のエクソン2と3のあいだのイントロンは、ヒトとチンパンジーでは10 kb近くあるのに対して、オランウータンではその半分くらいしかない。遺伝子間の距離も種によって違いがある。ヒトではDPB2, DPA2, DPB1, DPA1 遺伝子が70 kbくらいの領域に並んでいるのに対して、タマリンではもっと混み合っており、それらが50 kb程度の領域におさまっている。このような違いは、塩基の挿入や欠失、あるいはDNA領域の重複によって生じてくると考えられる。塩基置換に比べてこれらのDNAの変化

パターンはまだ十分に研究されているとは言えないので、このような種間比較がきわめて重要である。

第3部の第4章 (Figuroa) は補体C4遺伝子とその周辺の遺伝子を扱っている。この領域では、ヒトゲノムには珍しく、遺伝子が重なっている部分が一部あることが知られている。この重なりは、細胞外マトリックスタンパク質のひとつであるtenascin-Xの遺伝子と21 hydroxylaseで生じている。さらに、おそらく不等交叉によっていろいろなパターンのハプロタイプが生じている。

蛇足だが、私は本書のMHC遺伝子に関する部分の編集を担当したKlein博士が所長をつとめるマックスプランク免疫学研究所 (ドイツのチュービンゲンにある) を訪れたことがある。この第4章を担当したFelipe Figeroa氏ともそのとき会ったが、ほっそりしたからだにちょびひげをはやしており、ちょうどその時彼が取り組んでいた複雑なSouthern Hybridizationパターンについて解説してくれた。職人肌で、きちっとデータを得てそれを綿密に検討するというタイプだった。

第3部の第5章 (Bontrop) と第6章 (Gaudieri, Kulski, and Dawkins) は、MHCと病気との関係を持ったものである。人間では、詳しく研究されている分野であるが、ヒト以外の霊長類でも、ある程度のことわかっている。たとえば、強直性脊髄炎はゴリラ、テナガザル、アカゲザル、ヒヒでもB27遺伝子と関連していることが知られている。なお、第6章の著者のひとりであるSilvana Gaudieriさんは、現在国立遺伝学研究所生命情報研究センターのポストドクである。

第3部の最後の3章 (第7, 8, 9章) は、ヒト以外の霊長類のMHCの塩基配列をまとめたものである。しかし、塩基配列データは続々と発表されており、またさまざまなタイプのデータベースが現在WWWなどで公開されていることを考えると、このような本の一部で配列を示すことには、もはやあまり意味がないと思われる。

以上、本書の順番とは逆に、最後の第3部の紹介から始めたが、次に第2部の血液型にかんする章の紹介をする。Karl LandsteinerがABO式血液型を発見したのが1900年。それから90年以上が経過し

たが、血液型遺伝子の塩基配列レベルでの研究が本格化したのはここ10年ほどのことである。このためか、MHCに関する第3部では分子データしか議論されなかったのに対して、第2部では血清学的データと分子データの両方が議論されている。しかしこのことは、血液型の分子レベルの研究が今後ますます発展する可能性を秘めていることを示していると言えるだろう。

第2部の編集を担当したのは、Wienerの弟子である米国のSocha氏と、彼と長年共同研究をしているフランスのBlancher氏である。両氏は第1章 (序)、第2章 (糖転移酵素が関係する、糖抗原のABO, Hh, Lewis式血液型)、第3章前半 (MNSs式血液型の血清学)、および第4章 (Rh式血液型) を担当している。

第3章後半 (Blumenfeld, Huang, Xie, and Blancher) はMNSs血液型タンパク質 (グリコフォリン) 遺伝子の詳細な解説がなされている。ヒトではGPAとGPBという機能遺伝子および1個の偽遺伝子 (GPE) が直列しているが、チンパンジーやゴリラでも同様である。ところが、オランウータン、テナガザル、アカゲザルでは機能遺伝子が1個しかないので、遺伝子重複はヒトの系統がオランウータンの系統から分かれた後に生じたと考えられる。第5章 (Pogo and Chaudhuri) はDuffy式血液型が取り上げられている。Rh式血液型のタンパク質が12回膜貫通型であるのに対して、Duffy式血液型タンパク質は、9回膜貫通型である。第6章 (Galili) ではふたたび糖転移酵素が関係する糖抗原 (ガラクトースが端末にくるもの) が取り上げられている。ただし、この酵素遺伝子は、ヒト上科 (ヒトと類人猿) 及び旧世界猿では死んでいる (偽遺伝子化)。第7章 (Socha) はヒト以外の霊長類特有の血液型についてまとめられている。

第2部の第8章 (Edar and Spitalnik) は、血液型遺伝子の進化にとって重要だと考えられる、「病原体のレセプターとしての血液型抗原」という観点で提示されている。最近胃潰瘍の原因として注目されているヘリコバクター・ピロリとLewis式血液型抗原の関係をはじめとして、大腸菌、マラリア原虫、ウイルスなどと血液型抗原との関連が議論されてい

る。ただし、大部分のデータはヒトに関するものである。

第3部の最後である第9章 (Klein, O'hUigin, and Blancher) は、末尾にあるものの、血液型抗原の定義から始まって、糖抗原、タンパク質抗原などを概観しており、むしろ血液型を扱った第3部の冒頭に持ってきたほうがよかったと思わせる濃い内容である。この章の図9でRh式血液型遺伝子の系統樹を、進化速度一定を仮定したUPGMAで示しているが、この系統樹では、ヒトのCE座とD座を生じた遺伝子重複が、チンパンジーの系統と分岐した後に生じたように解釈できる。一方、第3部の第4章では、最尤法を用いて得られたRh式血液型遺伝子系統樹を示しているが、こちらはCE座とD座の遺伝子重複がヒト・チンパンジーゴリラの種分化以前に生じたと解釈できる。このふたつの系統樹の違いは、同一種の異なる遺伝子座のあいだで、遺伝子変換のような現象が生じていることが原因だと考えられる。実際に、われわれはRh式血液型遺伝子の塩基配列を詳細に解析した結果、遺伝子変換がこの遺伝子の進化でかなり生じていることを推定している。

一方、ABO式血液型遺伝子の進化でも、特殊なことが起こっている。この第9章の図1および第2章の図6では、ヒトのB型対立遺伝子がゴリラのB型対立遺伝子と同じ系統であることを示す系統樹が示されているが、われわれは系統ネットワーク解析の結果から、ゴリラのB型とヒトのB型は独立に祖先遺伝子 (A型) から生じたと推定している (1)。第9章を主として担当したKleinのグループも、本章の末尾で触れているように、最近ゴリラのABO式血液型遺伝子のイントロン6領域の塩基配列を決定して、ヒトとゴリラは独立の系統であろうと結論している (2)。いずれにせよ、このような進化パターンは、ABO式血液型遺伝子が非中立進化をしている可能性を示唆している。この問題については、今後より詳細な解析が必要であろう。

さて最後に、最初の部分である第1部について言及することにしよう。第1部は短く第1章 (Groves) だけだが、最近の知見にもとづく霊長類の分類が紹介されている。霊長類 (哺乳類の目のひとつ) は大きく原猿亜目と真猿亜目に分けられるが、従来前者

に分類されていたメガネザルが、分子データに基づいてここでは真猿亜目に入れられている。一方、通常はオナガザル上科とヒト上科に二分される狭鼻猿類に、前者しか上科が設定されていないのがやや不思議である。さらに、類人猿は従来テナガザル科とショウジョウ科に分かれていることが多かったが、これも分子データに基づいて、後者はヒト科に合併され、さらにヒト亜科 (チンパンジーとゴリラを含む) とオランウータン亜科に分類されている。このような、分子データに基づいた新しい分類が徐々に受け入れられているようである。

すべての生物は進化の産物であり、そのゲノム内の遺伝子はみな長い歴史がある。人間のある遺伝子のことをよく知ろうとすれば、人間に近縁な他の霊長類の遺伝子も調べることが必要である。したがって、今後、ヒト以外の霊長類の研究がますます重要になってゆくだらう。この意味で、血液型遺伝子とMHC遺伝子について霊長類とヒトの詳細な解説を、新たに行なった解析を多数取り入れた本書は、タイムリーなものである。特に分子レベルでの血液型遺伝子に関するまとまった書物がこれまでなかったので、その分野に興味のある人にとっては最高の文献である。

引用文献

1. Yamamoto F, Saitou N : Evolution of primate ABO blood group genes and their homologous genes. *Molecular Biology and Evolution*, **14** : 399-411, 1997.
2. O'hUigin C. Sato And Klein J : Evidence for convergent evolution of A and B blood group antigens in primates. *Human Genetics*, **101** : 141-148, 1997.

日本組織適合性学会からのお知らせ

日本組織適合性学会平成9年度会計報告書

自平成9年4月1日
至平成10年3月31日

| 決算 | 予算 | 決算 | 差異 |
|---------------------|-------------|------------|-------------|
| 収入 個人会員年会費 | 2,000,000 | 1,820,000 | △ 180,000 |
| 賛助会員年会費 | 1,400,000 | 1,500,000 | 100,000 |
| 学会誌広告費 | 1,050,000 | 1,030,000 | △ 20,000 |
| 学会誌販売 | 30,000 | 99,500 | 69,500 |
| 利 | 35,000 | 16,902 | △ 18,098 |
| ①当期収入合計 | 4,515,000 | 4,466,402 | △ 48,598 |
| 前年度繰越金 | 6,879,706 | 6,879,706 | 0 |
| ②収入合計 | 11,394,706 | 11,346,108 | △ 48,598 |
| 支出 大会援助金 | 500,000 | 500,000 | 0 |
| 大会誌作成費 | 2,500,000 | 3,086,329 | △ 586,329 |
| 旅 | 200,000 | 0 | 200,000 |
| 通 | 300,000 | 188,042 | 111,958 |
| 事 | 50,000 | 9,577 | 40,423 |
| 会 | 100,000 | 20,000 | 80,000 |
| 予 | 7,744,706 | 461,696 | 7,283,010 |
| ③当期支出合計 | 11,394,706 | 4,265,644 | 7,129,062 |
| *当期収支差額 | △ 6,879,706 | 200,758 | △ 7,080,464 |
| **次期繰越金 | 0 | 7,080,464 | △ 7,080,464 |
| *: ①-③ **: ②-③ | | | |

| 予算 | 内訳 | 平成10年度 | 平成9年度 |
|-----------|------|------------|------------|
| 収入 前年度繰越金 | | 7,080,464 | 6,879,706 |
| 個人会員年会費 | 400件 | 2,000,000 | 2,000,000 |
| 賛助会員年会費 | 11件 | 1,100,000 | 1,400,000 |
| 学会誌広告費 | 30件 | 1,050,000 | 1,050,000 |
| 学会誌販売 | 25冊 | 50,000 | 30,000 |
| 利 | | 16,000 | 35,000 |
| 当期収入計 | | 4,216,000 | 4,515,000 |
| 計 | | 11,296,464 | 11,394,706 |
| 支出 大会援助金 | 第8回 | 1,000,000 | 500,000 |
| 大会誌作成費 | 3号分 | 3,000,000 | 2,500,000 |
| 旅 | | 200,000 | 200,000 |
| 通 | | 300,000 | 300,000 |
| 事 | | 50,000 | 50,000 |
| 会 | | 100,000 | 100,000 |
| 予 | | 6,646,464 | 7,744,706 |
| 当期支出計 | | 4,650,000 | 3,650,000 |
| 計 | | 11,296,464 | 11,394,706 |

第8回日本組織適合性学会大会のお知らせ

世紀末にMHCの混沌を語るまたは再び進化と拡散

サブタイトル

1999年、7の月、天から恐怖の大王がやって来て、アングルモアの大王をよみがえらせ、その前後、Marsが
 幸せのうちに統治するだろう。－ノストラダムス：諸世紀 第10章72－

第8回日本組織適合性学会

大会長 佐治博夫

【プログラム】

シンポジウム「MHC研究の未体験ゾーン」：これからの展望を探る

7月8日 9:45-12:15 –Tissue typerとyoung scholarのためのMHC教室–

座長：猪子英俊（東海大・医・分子生命） & 木村彰方（東京医歯大・難研・分子病態）

葛下典由（阪大・医・一内）

遺伝学的素因から探るC型肝炎発症機序

太田正穂（信大・医・法医）

HLAクラス I 領域のマイクロサテライト多型を用いた疾患遺伝子のマッピング

佐藤昇志（札幌医大・一病理）

がん抗原とHLA

屋部登志雄（中央血液セ・研究部）

HLAクラス I 抗原とNK受容体

丸屋悦子（京都赤十字血液セ）

Immunodominant minor histocompatibility antigensを追って

大野乾シンポジウム 生命進化からみるMHCのアプリオリとアポステリオリ

Keynote：HLA多型性とギリシャ神話のエピメテウスとプロメテウス

7月8日 16:00-18:30 桁違いのスケールで地球46億年の旅をし、世界が広がる

座長：五條堀孝（国立遺伝研・生命情報セ） & 徳永勝士（東大・医・人類遺伝）

大野乾（City of Hope 研究所）

Keynote Address

代表討論者：

the matters：

成松久（創価大・生命科学研）

「糖鎖認識分子の起源と進化」

藤田禎三（福島県立医大・第二生化）

「補体系の起源と進化」

猪子英俊（東海大・医・分子生命）

「MHCの起源と進化」

黒沢良和（藤田保健衛生大・総合医研）

「免疫グロブリンの起源と進化」

P.I.Terasakiシンポジウム－MHCの臨床応用－

Evidence that HLA antibodies cause rejection of organ grafts

7月9日 9:00-11:30 ー臓器移植・造血幹細胞移植でのMHCの徹底臨床応用ー

座長：十字猛夫（中央血液セ） & 前田平生（埼玉医・輸血）

P. I. Terasaki (UCLA)

Keynote Address

笹月健彦（九大・生医研）

BMTとHLA compatibility

木内哲也（京大・移植外科）

生体肝移植とHLA

小林孝彰（名古屋第二赤・外科）

生体、死体腎移植とHLA

教育講演－疾患とMHC－

7月9日 13:20-14:45 ーMHCがいかに疾患に関わるか？そして治療への応用ー

座長：笹月健彦（九大・生医研）

西村泰治（熊大・医研・免疫識別）

HLAクラスII多型と疾患感受性

滝口雅文（熊大・エイズ研）

HLAクラスI抗原とエイズ

HLAタイピングQCワークショップ

7月9日 16:00-17:30 ー組織適合性検査の精度管理について話し合いませんか？ー

座長：佐田正晴（国立循セ） & 小林賢（防衛・医・検）

三石瑤子（UCLA）

米国の組織適合性検査と精度管理

QCワークショップ報告

HLA 標準化委員会報告

ランチオンセミナー・HLA-class I typing Kitコンペ

7月8日と9日の昼：…HLA-class I DNA typing kitが勢揃いして競う…

これからタイピングをしようとする人、もっと良いキットを探している人、HLA-DNA typingに興味のある人、一度に多くのキットを比べ、考えられる絶好のチャンスをお見逃しなく！！

第3回日本組織適合性学会大会日程表

| | 7月8日(木曜日) バッキンガム西 | 7月9日(金曜日) バッキンガム西 |
|----------|--|--|
| 8:00 | 会場 open | 評議委員会 (7:30 - 8:30) |
| 8:30 | 受付開始 | |
| 9:00 | opening remarks | 理事会 (8:30-9:30) |
| 9:40 | | P. I. Terasaki シンポジウム (9:00 - 11:30) 座長：十字猛夫 前田平生 |
| 9:45 | 「MHC 研究の未体験ゾーン」 (9:45 - 12:15) 座長：猪子英俊 木村彰方 | ポスター展示 機器展示 エンジンバラ西 |
| 10:00 | | |
| 12:00 | ランチョンセミナー 会場：バッキンガム東 (12:15 - 13:45) | 11:30 ランチョンセミナー 会場：バッキンガム東 (11:30 - 13:00) |
| 12:15 | | 13:00 総会：13:00 - 13:20 |
| 13:45 | ポスター閲覧 (13:45 - 14:45) | 13:20 教育講演：疾患と MHC (13:20 - 14:45) 座長：笹月健彦 |
| 14:45 | 最優秀抄録口演 座長：南睦彦 (14:45 - 15:45) | 14:45 最優秀ポスター口演 座長：大谷文雄 (14:45 - 15:45) |
| 15:45 | coffee break | 15:45 coffee break |
| 16:00 | 大野 乾 シンポジウム 座長：五條堀孝 徳永勝士 (16:00 - 18:30) | 16:00 HLA Typing QC ワークショップ 座長：佐田正晴 小林賢 (16:00 - 17:30) |
| 18:30 | ポスター討論とパーティ 会場：バッキンガム東 エンジンバラ西 | 17:30 座長 summing-up 司会：佐治博夫 (17:30 - 19:00) |
| 21:00 | | |
| midnight | Jack-in-the box party | |

一般演題公募について

◆抄録様式

提出抄録はA4サイズでプリントアウトした原稿とそのテキストファイルの入ったフロッピーディスク（3.5インチ2HD、1.44MB）の両方を提出して下さい。ファイルについてはE. mailの添付ファイル(maruya@mbox.kyoto-inet.or.jp)でも受付ます。なお、学会ホームページからの抄録受付も準備しています。

フロッピーディスクには使用したワープロソフト名、WindowsまたはMacintosh、所属、氏名を明記して下さい。内容は演題名、発表者名、所属、本文の順に記載し、字体は明朝体でお願いいたします。文字の大きさは演題名を12ptで、それ以外は10ptを使用して下さい。演者の前に○印を付記して下さい。本文は目的・方法・結果・考察に分け、800字以内（25文字×32行）で、英数字は半角文字をご使用願います。

◆演題申込締切り日と申込先

演題締切り日：1999年4月10日

抄録、フロッピーディスクおよび抄録受領証（ハガキ）を下記へ。

申込先：第8回組織適合性学会大会事務局 丸屋悦子宛

住所：〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町644

京都府赤十字血液センター研究部内

◆発表様式

発表は例外（The best abstract, The best poster）を除きポスター形式と致します。なお、ポスター内容を読める程度に縮小しA4用紙サイズで数枚以内にまとめ、51部コピーを学会当日、ポスターと共に持ち下さい。その内1部をポスター受付で大会本部に提出し、残りはポスター掲示版の下の箱にお入れ下さい。また公募演題のうちから一部口演をお願いします。口演はThe best abstract selection committeeにより選ばれた演題（数題を予定、発表は学会第1日目に行って頂きます。6月中に直接発表者宛にお知らせ致します）と学会当日参加者により選ばれたポスター（The best poster数題：発表は学会2日目、OHPでお願い致します）発表者にお願致します。

【新企画1】今回、新しい企画として、ポスター内容のコピーサービスを計画しております。発表者に初めの50部は用意して頂き、不足につきましては学会本部で追加コピー致します。大切な時間を十分な討論に使えるようご協力願います。

【新企画2】ポスターディスカッションは懇親会場でも行えるようにします。アルコールメデイエテッド・ディスカッションがさらに発想を大きくすることを願っています。

展示パネルについて

1. 写真、図表は約2mの距離から十分判読可能なものにして下さい。
2. パネルの大きさは、縦90cm、横180cmです。
3. ポスターは目的、方法、成績及び結論の順に簡潔に構成して下さい。
4. 貼付に必要な画鋏、テープなどはポスター受付に用意してあります。

参加登録費について

事前登録参加費：5,000円

平成11年5月末日までに下記の銀行へ口座振込をお願いします。

懇親会費（5,000円）の同時振込みも可能です。

銀行名：あさひ銀行東山出張所

科目：普通

口座番号：1073704

加入者名：第8回日本組織適合性学会大会事務局幹事丸屋悦子

当日登録参加費：7,000円

前納、当日参加者共に、当日学会受付でネームカード（領収書兼用）をお渡し致します。

懇親会費について

平成11年7月8日（夜）、バッキンガム東とエジンバラ西にて懇親会を開催いたします。

懇親会費：5,000円

学会宿泊の御案内

ゆっくりディスカッションの時間を持って頂くため原則として合宿形式を考えています。学会会場の京都パークホテルとの交渉により、学会割引きで宿泊が準備できます。料金は以下のとおりです。予約は大会事務局幹事（丸屋悦子）まで、FAX(075-541-9485)とじ込みの送信状をご利用下さい、E-mail(maruya@mbox.kyoto-inet.or.jp)または

大会ホームページ (http://square.umin.ac.jp/JSHI/8th_JSHI/8th_JSHI.html) でも申し込みめます。

京都パークホテル宿泊料金（学会割引き）**【ツインルーム・AとB】**

A：ツインルームのシングル使用、朝食付きサービス料込み（税別）一泊：8,500円

B：ツインルームのツイン使用、朝食付きサービス料込み（税別）1人、一泊：7,000円

◆ ツインルームの部屋数 162室

【デラックスツインルーム・CとD】

C：デラックスツインルームのシングル使用、朝食付きサービス料込み（税別）

一泊：15,000円・・・このタイプでダブルベットも有ります。

D：デラックスツインルームのツイン使用、朝食付きサービス料込み（税別）

1人一泊：12,000円

◆ デラックスツインタイプの部屋数 34室

【チョットお得な話】

前々泊や後々泊も同料金でサービスされます。MHCの研究・知識の探求に加え、古都の史跡を訪ね、頭脳や体のリラックスタイムにもご利用下さい。

注意!：部屋数に限りがあります。予約受付は随時行っています。お早めに。

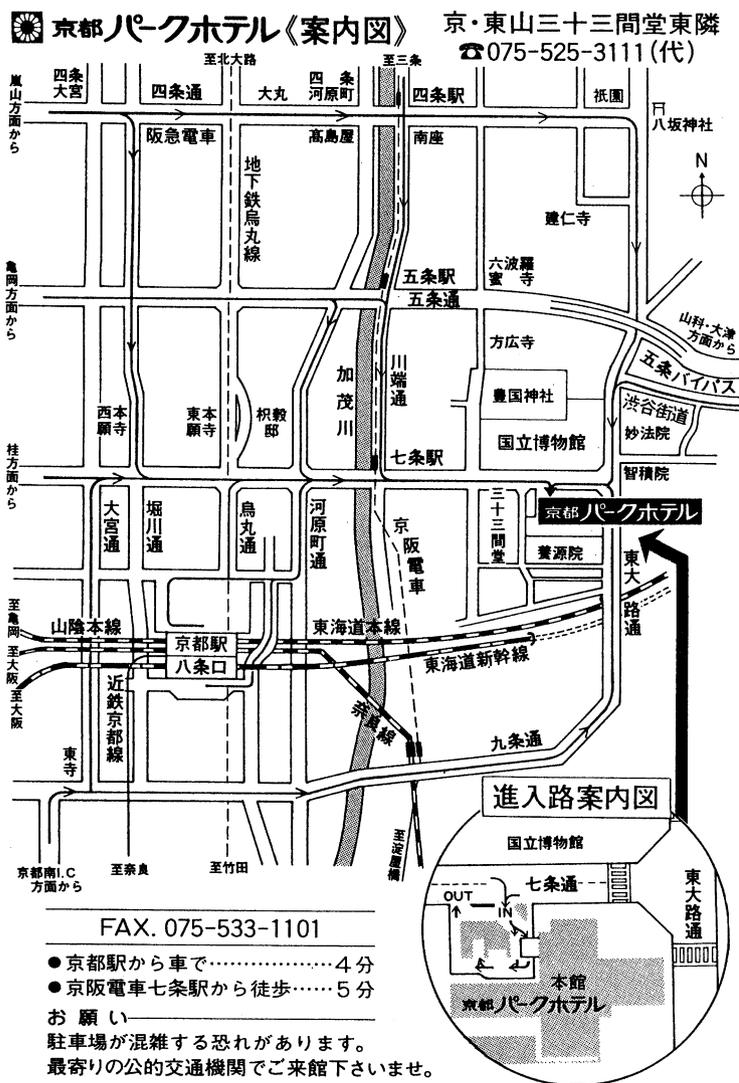
予約締切りは平成11年5月末日予定、ただし満室になりましたらご容赦ください。その場合は近隣のホテルをご紹介します。

ご要望・ご意見・問い合わせなど学会事務局までご連絡下さい。

〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町644
 京都府赤十字血液センター研究部内
 第8回日本組織適合性学会大会事務局
 電話075-531-0111 内線307
 Fax 075-541-9485
 e-mail: maruya@mbox.kyoto-inet.or.jp

大会ホームページ：http://square.umin.ac.jp/JSHI/8th_JSHI/8th_JSHI.html

【会場への交通案内】



＜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 DR52-associated DRB1 allele with the DR'NJ 25' specificity designated DRB1*1307.

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

- 1) Shionogi Biochemical Laboratories, Shionogi Company, Osaka, Japan
- 2) Kidney Transplantation Center, Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital, Hyogo, Japan
- 3) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

HLA class II の DNA typing と MLC

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

- 1) 兵庫県赤十字血液センター, 検査課
- 2) 東海大学医学部, 移植免疫学
- 3) 東海大学医学部, 分子生命科学

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

1.3. 総説、シリーズその他

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

1. 2. 3. 4. ……
- 1.1. 1.2. 1.3. 1.4. ……
- 1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. ……

脚注は適宜，設けてもよい．なお，参考文献 (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 - 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 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

7月に開催される第8回日本組織適合性学会大会は、佐治大会長と丸屋幹事の熱意とアイデアに満ちた企画によって、楽しく刺激的な大会となりそうです。また、会場についても、今年の猪子大会長の画期的な試みを引き継ぎ、ホテルに泊り込んで議論を戦わしたり、懇親を深めたりできるということで、今から待ち遠しい限りです。学会員の皆様には、関係する方々に是非とも大会のことを御紹介くださり、ひとりでも多くの参加があるようお誘いいただきたいと思えます。

2月の18日、19日には、那覇で開かれた九州ブロック赤十字血液センターのHLA検査担当者研修会に参加する機会を得ました。参加者が血清学的タイピングについてもDNAタイピングについても熱心に討論しているのを目のあたりにして、大変心強く思いました。また3月11日、12日には、毎年参加している、日赤中央ブロックのHLAワークショップがあります。十字先生の発案で海外ラボも参加し、興味深いデータに満ちたものです。今後、自己免疫疾患や癌をはじめ免疫系が関与する多くの疾患について複数の感受性遺伝子が解明されていくでしょうが、HLAは多くの場合、その第一の感受性遺伝子であり、従って必ずその検査を行う対象として残っていくと思われまます。その意味でHLA検査法の向上にたゆまぬ努力を払っている方々にエールを送りたいと思えます。

(徳永勝士)

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

1999年3月31日発行 5巻3号, 1999

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)

〒150-0012 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

〒229-1101 神奈川県相模原市相原2-12-1