

世紀末にMHCの混沌を語る 再び進化と拡散

第8回日本組織適合性学会大会

JSHI 8th ANNUAL MEETING

July 8-9, 1999



会期：1999年7月 8日（木） 9：40～21：00

9日（金） 8：30～19：00

会場：京都パークホテル・バッキンガムおよびエジンバラ

〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町 644-2

Tel：075-525-3111, Fax：075-533-1101

大会長：佐治博夫

事務局：〒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

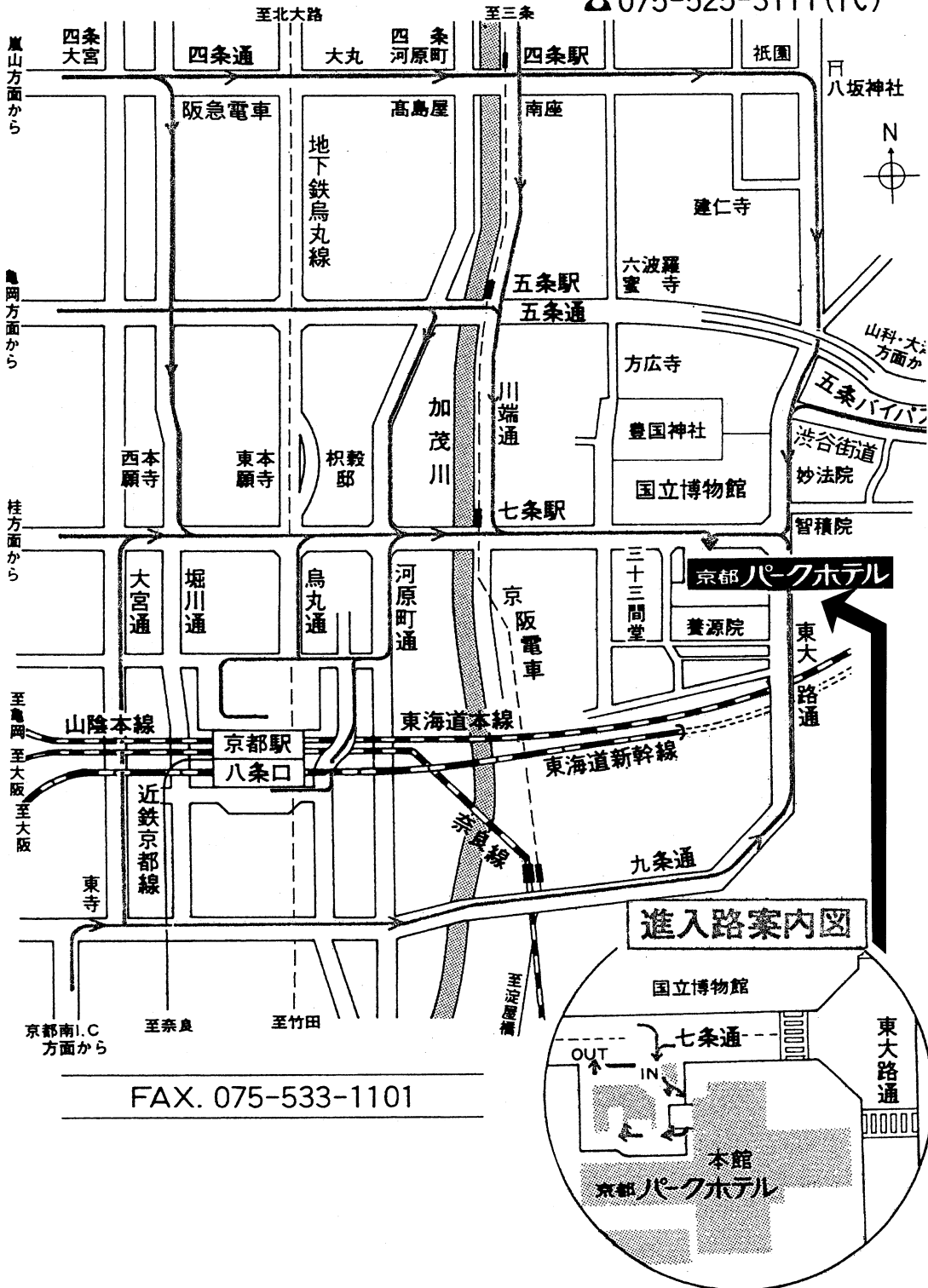
Fax 075-541-9485

e-mail: maruya@mbx.kyoto-inet.or.jp

—会場への交通案内—

- ◆ JR 京都駅から車で5分、市バス； 206または208系統「三十三間堂」下車すぐ。
- ◆ 京阪電車 七条駅から徒歩5分。 名神高速道路 京都東 ICから約10分

京都パークホテル《案内図》 京・東山三十三間堂東隣
 ☎075-525-3111(代)



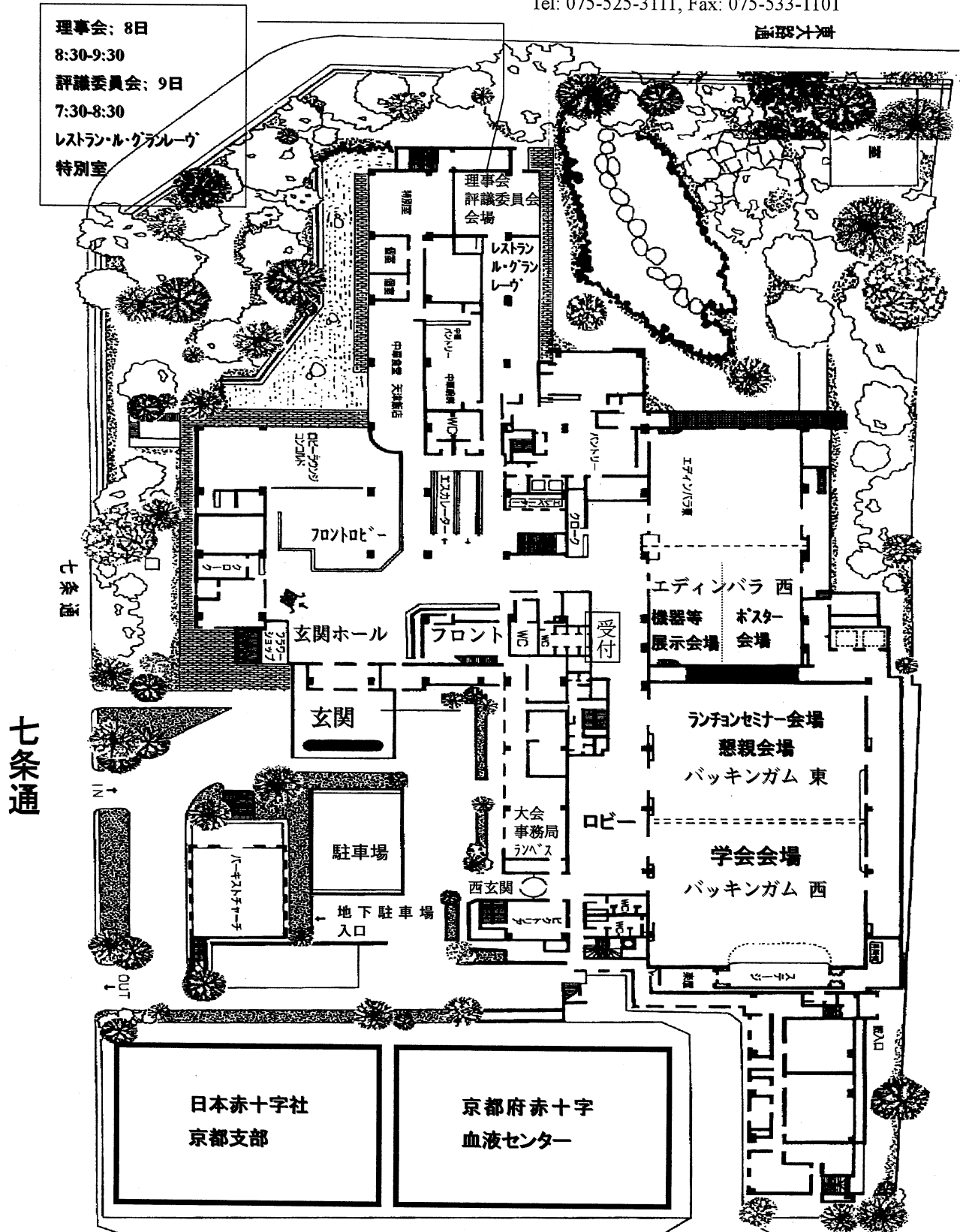
FAX. 075-533-1101

8th JSHI 会場案内図 京都パークホテル

1F 見取り図

〒605-0941 京都市東山区三十三間堂廻り町644-2

Tel: 075-525-3111, Fax: 075-533-1101



理事会・評議委員会・総会のご案内

理事会：1999年7月8日（木）8：30～9：30
 レストラン・ル・グランレーヴ・特別室
 評議委員会：1999年7月9日（金）7：30～8：30
 レストラン・ル・グランレーヴ・特別室
 総会：1999年7月9日（金）13：00～13：20
 バッキンガム西

懇親会のご案内

日時：1999年7月8日（木）18：30～20：30
 場所：バッキンガム東とエジンバラ西
 会費：5,000円

Jack-in-the box partyのご案内

日時：1999年7月8日（木）21:00～midnight
 懇親会の後、湧永製薬株式会社と株式会社ベリタスにより、
 参加者の皆様へ日頃の感謝をこめて送られるカジュアルなパーティーです。
 何が飛び出すか、お楽しみに！
 日頃離れている仲間や先輩・先生とひざをまじえて話すチャンス！、
 ニューフェイスには仲間を作るチャンスです。
 会場は当日発表！！ホテル内にスイートルーム借切り！

参加者へのお知らせとお願い

A) 参加者の方へ

1. 登録

- 受付時間：1999年7月8日（木） 8：30～18：30
 1999年7月9日（金） 8：30～16：00
- 受付場所：京都パークホテル1階
- 参加費：7,000円（当日登録）
- 事前登録者は参加証（領収書兼用）を受付でお受け取り下さい。

2. 年会費・新入会会員受付

- 受付場所：京都パークホテル1階
- 年会費：5,000円

3. 機器展示

ポスター会場（エジンバラ西）で併設

4. ドリンクサービス

テルモ株式会社により「テルモ」のブース（エジンバラ西）でサービスされます。ご利用下さい（コーヒー・各種ジュース・お茶などの予定あり）。

5. 呼び出し・連絡のお申し込み

スライドによる呼び出しや連絡を受付ます。

大会学会事務局（ランベス）まで。

B) 一般演題

- すべての一般演題は原則としてポスター発表とします。演者はポスターを7月8日の午前中に各自の演題番号のある掲示板に掲示をお願い致します。
- **ポスターのコピー配布**： 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部のコピーを学会当日、ポスターと共にお持ち下さい。その内1部をポスター受付（大会学会事務局；ランベス）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。
- **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。
- **The Best Abstract（最優秀抄録）**： 一般演題のうちからThe best abstract selection committeeにより選ばれた演題の口演発表を、学会第1日目、最優秀抄録口演（14：45-15：45）のセッションでお願い致します（該当演題については、6月中に直接発表者宛にお知らせ致します）。
- **The Best Poster（最優秀ポスター）**： 一般演題のうちから、参加者により選ばれた最優秀ポスターの口演発表を学会2日目の最優秀ポスターセッション（14：45-15：45）でお願い致します（発表はOHPでお願い致します）。該当者は学会2日目の朝、スライドでお知らせ致します。午前中にポスターをOHP用紙にコピー（大会学会事務局、ランベスにコピー機有り）して下さい。よろしくお願い致します。

C) 最優秀抄録と最優秀ポスターに選ばれた演者の方へ

発表時間は、口演時間10分、討論時間5分をお願い致します。

次演者は最前列でお待ち下さいますようお願い致します。

スライドの数やOHPの枚数は制限いたしません。

スライド・OHPなどの受付は30分前までにお願い致します。

口演時間の厳守をお願い致します。

D) シンポジウム・ワークショップ発表者へ

スライドの枚数は制限いたしません。

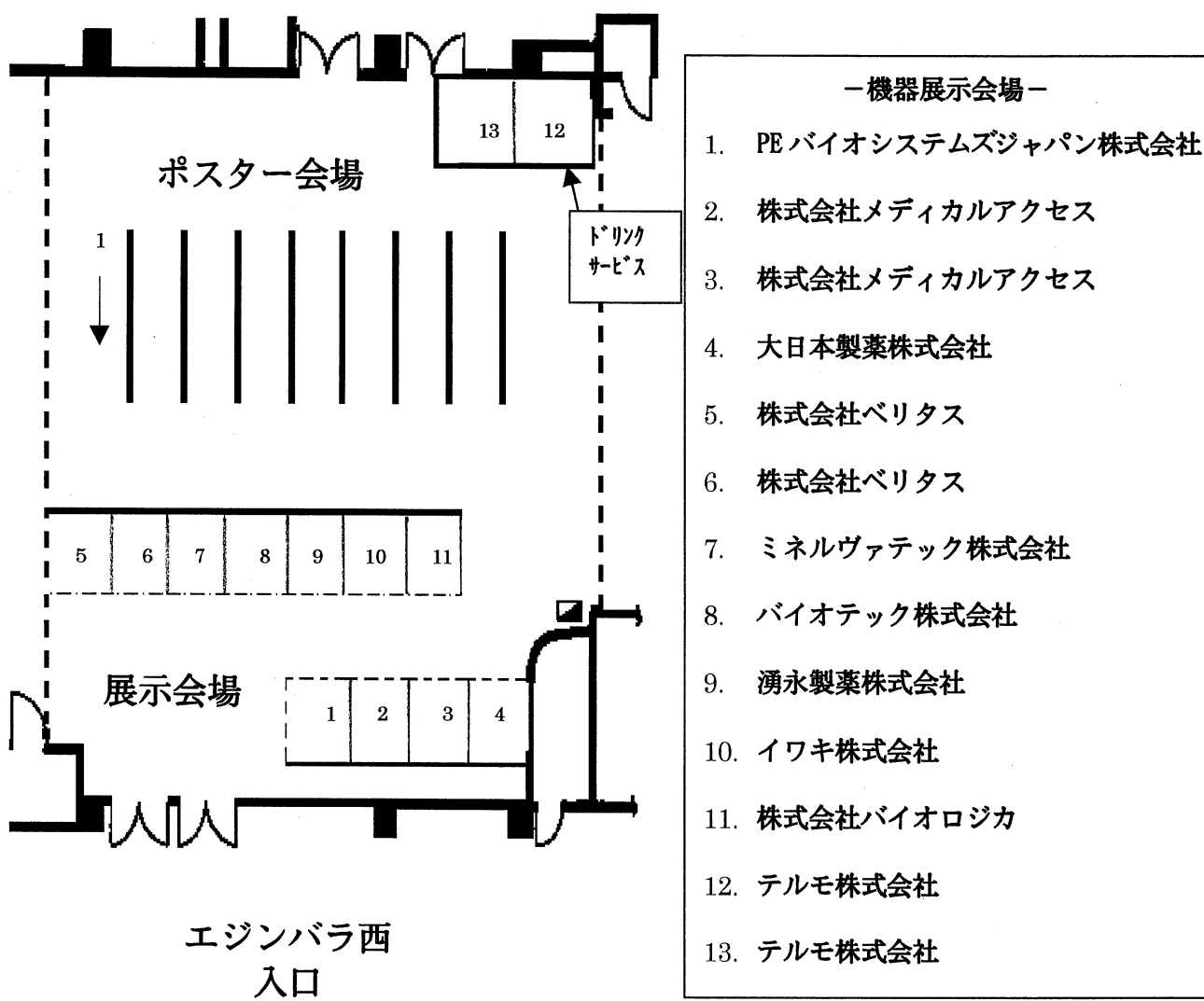
口演時間の厳守をお願い致します。

E) 座長の先生へ

担当セッションの開始10分前には、会場の最前列へご着席お願い致します。

ポスター会場・機器展示会場ご案内

— 京都パークホテル・1F エジンバラ 西 —



第8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		理事会 (8:30-9:30)	ポスター展示 機器展示 エジンバラ西
9:40	opening remarks		
9:45	シンポジウム 「MHC 研究の未体験ゾーン」 (9:45 - 12:15) 座長：猪子英俊 木村彰方	P. I. Terasaki シンポジウム (9:00 - 11:30) 座長：十字猛夫 前田平生	
12:15		11:30	
13:45	ランチョンセミナー 会場：バッキンガム東 (12:15 - 13:45)	13:00	
14:45	ポスター閲覧 (13:45 - 14:45)	13:20	
15:45	最優秀抄録口演 座長：南睦彦 (14:45 - 15:45)	14:45	
16:00	coffee break	15:45	
18:30	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	
21:00	ポスター討論とパーティ 会場：バッキンガム東 エジンバラ西	17:30	
midnight	Jack-in-the box party	19:00	

プログラム

1999年、7の月、天から恐怖の大王がやって来て、
アンゴ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—

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

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

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

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

大野乾シンポジウム

生命進化からみた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

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）	「糖鎖多様性の起源と進化」
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の進化と血液型抗原」
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」



湧永製薬株式会社のご協力により大野乾先生の基調講演をお願いすることができました。紙面をもって感謝致します。

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

P. I. Terasaki シンポジウム－MHCの臨床応用－

Keynote:

Evidence that HLA antibodies cause rejection of organ grafts

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）	非血縁者間骨髄移植におけるHLA-クラス I アレルマッチングの重要性
--------------	--

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
-----------------	--------------



株式会社ベリタスのご協力により、P. I. Terasaki先生の基調講演を
お願いすることができました。紙面をもって感謝いたします。

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

教育講演 ー疾患とMHC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
---------------	-----------------

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

HLAタイピングQCワークショップ

座長：佐田正晴（国立循セ） & 小林賢（防衛・医・検）

三石瑤子（UCLA）	DNA TYPING における精度管理
------------	---------------------

QCワークショップ報告	HLA 標準化委員会報告
-------------	--------------

7月 8日 14:45 -15:45

最優秀抄録口演

座長：南睦彦（横浜市立大学寄生虫学）

7月 9日 14:45 -15:45

最優秀ポスター口演

座長：大谷文雄（北里大学医学部免疫学）

7月 9日 17:30 -19:00 -各座長によるまとめ-

Summing-up of 8JSHI

座長：佐治博夫（京都府赤十字血液センター）

猪子英俊（東海大・医・分子生命） and/or 木村彰方（東京医歯大・難研・分子病態）

五條堀孝（国立遺伝研・生命情報セ） and/or 徳永勝士（東大・医・人類遺伝）

十字猛夫（中央血液セ） and/or 前田平生（埼玉医・輸血）

笹月健彦（九大・生医研）

佐田正晴（国立循セ） and/or 小林賢（防衛・医・検）

ランチョンセミナー・HLA-class I DNA typing Kit コンペ

会場：バッキンガム東

7月8日 12:15-12:45

提供 株式会社ベリタス

- Line Probe Assay (LiPA) 法によるHLAクラス I DNAタイピング
INNOGENETICS Lieve Ongena
- LiPATM HLA-AおよびHLA-B typing kitによるHLAクラス I DNAタイピング
日本赤十字社中央血液センター・研究部 柏瀬貢一

7月8日 12:45-13:15

提供 シオノギ製薬株式会社

- 司会：猪子英俊 東海大学医学部分子生命科学
- シオノギHLA-DNAタイピングキット「HLAクラスI」
塩野義製薬株式会社・診断医学事業部 兼重俊彦

7月8日 13:15 - 13:45

提供 大日本製薬株式会社

- 司会：島岡 宏 ビオテスト
- The Biotest ELPHA , an SSOP system allowing automated HLA-Class I and Class II typing
Biotest AG, Dreieich, Germany Bodo Holtkamp

7月9日 11:30-12:00

提供 湧永製薬株式会社

司会：加藤邦樹

湧永製薬株式会社・創薬研究所

- PCR-MPH法によるHLAクラスIタイピング
湧永製薬(株)・創薬研究所 川井信太郎
-

7月9日 12:00-12:30

提供 株式会社ベリタス

- マイクロSSP日本人キットを使用したABCDRDQの同時タイピング
One Lambda Inc., 斎藤克行
 - PCR-SSP法によるHLA-DNAタイピングーその現状と将来への展望
東京医歯大・難研・分子病態 木村彰方
-

7月9日 12:30-13:00

提供 株式会社メディカルアクセス

司会：

- HLA クラス I DNAタイピングの実用化に向けて
Pel-Freez Clinical Systems, LCC, USA Xiang Jun Liu,
-

モーニングセミナー

会場：バッキンガム東

7月9日 8:30-9:00

提供 PEバイオシステムズ ジャパン株式会社

- HLA Sequencing Based Typing Systemの現状と展望
 1. 新発売のHLA-B, DRB codon 86 Sequencing KitとHigh Throughput HLA Typing
について
 2. User's voice
-

一般演題

HLA血清学

1. ヒト由来HLA及びリンパ球モノクローナル抗体について
○ 田中秀則、豊田智津、伊佐和美、盛山芳恵、田中昌子、礪波秀紀、後藤邦夫、赤座達也、中島一格、十字猛夫
日本赤十字社 中央血液センター

2. 日本人にあらたに見出された血清学的サブタイプHLA-B56Variant “HLA-B56V1” について
○ 猿渡 晃¹、伊藤八重子¹、藤村邦子¹、伊藤圭一¹、藤井まり恵²、田中秀則²、十字猛夫²、平川和也¹
¹ 山口県赤十字血液センター
² 日本赤十字社中央血液センター

3. 日本人で新たに見られたHLA-B15関連抗原について
○ 伊佐和美、藤井まり恵、田中秀則、盛山芳恵、田中昌子、栗田裕子、礪波秀紀、赤座達也、中島一格、十字猛夫
日本赤十字社 中央血液センター

4. 日本人献血者に見出されたB72 (B*1503)
○ 樋口香織¹、小田秀隆¹、藤井実¹、光富吉朗¹、千代田晨¹、藤井まり恵²、田中秀則²、十字猛夫²
¹ 長崎県赤十字血液センター
² 日本赤十字社中央血液センター

Tissue Typing (I) HLA-Class I

5. PCR-SSOP法を用いたHLA-Cローカスのアリルタイピングについて
○ 中村淳子、中島文明、横田敏和、諏訪城三
神奈川県赤十字血液センター

6. PCR-MPH法によるHLA-C抗原遺伝子のlow resolution タイピング法の開発
○ 宮城 徹、松見達也、長門正貴、川井信太郎
湧永製薬・創薬研究所

7. MRHAを用いたHLAクラス I DNAタイピング
○ 森部豊輝¹、兼重俊彦¹、猪子英俊²
¹ 塩野義製薬(株)診断医学事業部
² 東海大学医学部分子生命科学

8. 死体腎移植希望患者のHLA class I のretyping検査に適したDNA検査法
 ○ 金 信子、高橋孝喜
 虎の門病院輸血部
9. 献腎移植希望登録者で血清学的にタイプしたHLAクラスI抗原型とHLAクラスI DNA検査による遺伝子型の相違
 ○ 渡辺真穂、栗田麗子、小河原悟、兼岡秀俊、内藤説也
 福岡大学病院 腎センター

Tissue Typing (II) HLA-Class II

10. Amplicor DRBキットの評価：日本臓器移植ネットワーク関東甲信越ブロックでの使用経験
 ○ 平田蘭子、今井厚子、吉田佐織、仲山節子¹、安尾美年子²、奥田 誠³、櫻井悦夫⁴、
 岩上 薫⁵、岸野光司⁶、川島けえ子⁷、平井洋介⁸、徳竹佐智夫⁹、伊藤たまえ¹⁰、
 本間康夫¹¹、加茂谷邦麿¹²、前田平生
 埼玉医科大学総合医療センター輸血部
¹ 東大医科研病院臓器移植生理学研究部
² 東京女子医科大学腎センター
³ 東邦大学大森病院輸血部
⁴ 東京医科大学八王子医療センターHLA検査センター
⁵ 横浜市立大学医学部附属病院輸血部
⁶ 自治医科大学病院輸血部
⁷ 総合太田病院臨床検査科
⁸ 三恩会島田記念病院検査科
⁹ 長野赤十字病院中央検査部
¹⁰ 新潟県立中央病院検査科
¹¹ 信楽園病院検査室
¹² 立川総合病院臨床検査科
11. High Resolution HLA-DQB1 Typing by Combination of PCR-RFLP and PCR-SSCP
 ○ Myoung Hee Park, Dong Hee Whang, Su Jin Kang
 Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Tissue Typing (III) HLA-Class I and Class II

12. リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた新しいHLA DNAタイピング法の開発
 ○ 河田寿子、成瀬妙子、松澤由美子、猪子英俊
 東海大・医・分生2

13. 臍帯を用いたMHCクラスI、クラスIIのDNAタイピング

○ 荒木延夫¹、秋田真哉¹、合志博司¹、能勢義介¹、神前昌敏¹、三戸壽¹、藤林由佳²、
原 宏²

¹ 兵庫県赤十字血液センター

² 兵庫医科大学輸血部

日本人のMHCアレル・ハプロタイプ

14. HLAクラスIのアレル頻度と連鎖不平衡について

○ 斉藤敏、大田智、瀬下秀幸、橋爪清隆、山田英世

長野県赤十字血液センター

15. 家系からHLA遺伝子タイピングで得たハプロタイプの検討

○ 中島文明、中村淳子、横田敏和、諏訪城三

神奈川県赤十字血液センター

MHC領域の解析 (I) non classical HLA ・ その他

16. 妊娠中のサイトカイン産生におけるHLA-Gの役割

○ 下嶋典子、安藤稔、川崎明彦、岸田学、石谷昭子、羽竹勝彦

奈良県立医科大学法医学教室

17. Bare lymphocyte syndrome患者細胞でのHLA-E抗原発現

古川宏¹、○ 屋部登志雄¹、D.E. Geraghty²

¹ 日本赤十字社中央血液センター研究部

² Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, USA)

18. HLA-DO遺伝子の多型性解析とその意義

○ 成瀬妙子¹、河田寿子¹、安西達也¹、鍵谷雅彦²、巽典之³、猪子英俊¹

¹ 東海大学医学部・分子生命科学

² 横浜市大医学部眼科

³ 大阪市大医学部臨床検査

19. HLAクラスIII領域のマイクロサテライトマーカー

○ 牧野悟士¹、田宮元¹、岡晃¹、富沢麻衣子¹、太田正穂²、勝山善彦³、椎名隆¹、
猪子英俊¹

¹ 東海大学医学部分子生命科学 2

² 信州大学医学部法医学教室

³ 信州大学病院薬剤部

20. HLA-C遺伝子近傍に位置するSC1の多型解析

○ 寺岡佳夏¹、成瀬妙子¹、岡晃¹、松澤由美子¹、椎名隆¹、小澤明²、大城戸宗男²猪子英俊¹¹ 東海大学医学部分子生命2² 東海大学医学部皮膚科**MHC領域の解析 (II) MICA / MICB**

21. MICA遺伝子多型の解析：新たなMICA遺伝子アリルの発見と日本人集団における立遺伝子頻度

○ 大淵信久、高橋めぐみ、有村卓朗、木村彰方

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患分子病態

22. MICA遺伝子座における自然選択と突然変異

○ 大橋 順¹、涌井美紀^{1,2}、Daniel E. Geraghty³、猪子英俊⁴、徳永勝士¹¹ 東京大学医学部人類遺伝学教室² 日本赤十字社中央血液センター³ Human Immunogenetics Program, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, SA⁴ 東海大学医学部分子生命科学

23. MICA-MICB nullハプロタイプと簡便なMICA deletionの検出法

○ 涌井美紀^{1,2}、徳永勝士¹、石川善英²、柏瀬貢一²、安藤等³、中島文明⁴、椎名隆⁵、猪子英俊⁵、十字猛夫²¹ 東京大学医学部人類遺伝学² 日本赤十字社中央血液センター³ 神奈川県湘南赤十字血液センター⁴ 神奈川県赤十字血液センター⁵ 東海大学医学部分子生命科学**MHC領域の解析 (III) 遺伝子構造解析**

24. HLA 領域 6p21.3 上に存在する beta1,3 ガラクトース転移酵素遺伝子シーケンシング解析

○ 吉川枝里¹、椎名 隆¹、金子美華²、成松 久²、猪子英俊¹¹ 東海大学医学部分子生命科学² 創価大・生命研

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

○ 重成敦子¹、安藤麻子¹、数藤由美子²、笠井文生³、椎名隆¹、河田寿子¹、香田淳⁴、奥村克純⁴、添田栄一⁵、池村淑道⁶、猪子英俊¹¹ 東海大学医学部分子生命科学

- ² 日赤中央血液セ・研究部
- ³ 東大・院理・生物科学
- ⁴ 三重大・生物資源
- ⁵ 理研・筑波セ
- ⁶ 遺伝研・進化遺伝

26. HLA クラスI領域の構造と進化

- 椎名 隆¹、田宮 元¹、岡 晃¹、水木信久¹、後藤香織¹、寺岡佳夏¹、瀧嶋伸貞¹、吉川枝里¹、岩田京子¹、富澤麻衣子¹、奥秋記子¹、桑野裕子¹、山形哲司¹、板倉祥子²、福住康仁²、菅原智代²、渡辺幸治²、小野綾子²、山崎正明²、田代弘行²、安藤麻子¹、添田栄一⁴、池村淑道³、木村 穰¹、猪子英俊¹
- ¹ 東海大学医学部分子生命科学
 - ² 不二家バイオ研
 - ³ 遺伝研・進化遺伝
 - ⁴ 理研・ライフサイエンス筑波センター

抗原ペプチド・CTL解析

27. ペプチド結合アッセイを用いたHLA-A33 (A*3303) 結合ペプチドの解析

- 松田智子、富山宏子、滝口雅文
熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野

28. HLA-B5, B35 CREG分子においてBw4/Bw6エピトープがペプチド結合に与える影響

- 曾場尾勇司、滝口雅文
熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野

29. MHCクラスIリガンドを発現するDNAワクチンによるCTLの誘導：リステリアにおける3種のCTLエピトープの比較

- 永田 年¹、山田 孝²、内山 啓³、吉田篤司¹、内嶋雅人¹、小出幸夫¹
- ¹ 浜松医科大学・微生物学
 - ² 国立療養所天竜病院内科
 - ³ 引佐赤十字病院内科

疾患遺伝子マッピング

30 尋常性乾癬感受性領域のマッピング解析

- 岡晃¹、田宮元¹、富沢麻衣子¹、牧野悟士¹、飯塚真利子²、菅井順一²、小澤明²、太田正穂³、勝山善彦⁴、椎名隆¹、猪子英俊¹
- ¹ 東海大学医学部分子生命科学 2
 - ² 東海大学医学部皮膚科学教室
 - ³ 信州大学医学部法医学教室

31. 尋常性乾癬感受性領域のシークエンシング解析

○ 田宮元¹、富沢麻衣子¹、岡晃¹、牧野悟士¹、飯塚真利子²、菅井順一²、
小澤明²、椎名隆¹、猪子英俊¹

¹ 東海大学医学部分子生命科学 2

² 東海大学医学部皮膚科学教室

32. 尋常性乾癬感受性領域の発現遺伝子解析

○ 富沢麻衣子¹、岡晃¹、田宮元¹、牧野悟士¹、飯塚真利子²、菅井順一²、小澤明²、
椎名隆¹、猪子英俊¹

¹ 東海大学医学部分子生命科学 2

² 東海大学医学部皮膚科学教室

⁴ 信州大学病院薬剤部

33. 心サルコイドーシスにおけるTNF周辺遺伝子の検索

○ Nicolette Takashige¹、成瀬妙子¹、松森昭²、篠山重威²、太田正穂³、
勝山善彦³、長井苑子⁴、森本紳一郎⁵、猪子英俊¹

¹ 東海大学医学部分子生命科学

² 京大・医・循環病態学

³ 信州大学・医・法医

⁴ 京大・医・胸部疾患研

⁵ 藤田保健・内科

HLAと疾患

34. IgA腎症におけるHLAをはじめとする細胞表面抗原の発現

○ 田中智一郎、長谷川善之、吉武圭輔、野田律矢、小河原悟、兼岡秀俊、内藤説也
福岡大学病院腎センター

35. 細胞内寄生原虫症-シャーガス病に対する感受性とHLAとの相関

会田かやの¹、Sandra JUARES^{1,2}、菊池三穂子¹、

○ 平山謙二¹、柳哲雄²、Maria Paula de LOPES³、金子聡⁴、Oscar AYAU⁴、
Julio ARGUETA⁴、Vivian MATTA³、曾根敏雄¹、木村彰方⁵、伊東恭悟⁶、
多田功⁷

¹ 埼玉医大・医動物

² 長崎大・熱研

³ Dept. of Cyto., Fac. of Chem. Scie. and Pharm. USAC

⁴ グアテマ 国際協力事業団

⁵ 東医歯大難研

⁶ 久留米大・免疫

⁷ 九大・医・寄生虫

36. 慢性関節リウマチ患者におけるTNFA遺伝子5'領域のPCR-PHFA法による解析
○ 松下正毅^{1,3}、渋江 司²、中山貴博¹、大橋 順¹、塩田倫子¹、松多邦雄⁴、
土屋尚之¹、山根明男³、徳永勝士¹、
¹ 東京大学大学院・医学系研究科・人類遺伝学教室
² 東京大学・医学部・医学科
³ 湧永製薬・創薬研究所
⁴ 松多内科医院
37. 帯状疱疹後神経痛におけるHLA解析
○ 安西達也^{1,2}、成瀬妙子²、Nicolette Takashige²、本間隆夫¹、小澤明³、
大城戸宗男³、猪子英俊²
¹ 東海大・工・工業化学
² 同・医・分子生命科学
³ 同・医・皮膚科
38. Graves病における抗TSHR抗体の産生はHLA-DPB1座によって規定される
○ 高橋めぐみ¹、玉井一²、笹月健彦³、木村彰方¹
¹ 東京医歯大・難研・分子病態
² 隈病院・内科
³ 九大・生医研・遺伝
39. 肝硬変症血液透析患者のHLA抗原型について
○ 吉武 圭輔、田中 智一郎、長谷川 善之、野田 律矢、小河原 悟、兼岡 秀俊、
内藤 説也
福岡大学病院腎センター

移植とMHC

40. 生体部分肝移植におけるHLA適合度の影響
○ 平田 勝、針原 康、久富伸哉、三浦泰朗、吉野浩之、水田耕一、伊東充宏、
佐野圭二、日下浩二、谷合信彦、北 嘉昭、河原崎秀雄、橋都浩平、幕内雅敏
東京大学肝移植チーム
41. PRAとダイレクト・クロスマッチとの関係について：大阪府献腎移植希望登録患者の既存抗体調
査（過去15年間）より
○ 多田正義¹、久山芳文¹、松井美智代¹、小池朋子¹、船附好子²、安波禮子¹
¹ 大阪府立病院 組織適合性検査室
² 同 免疫検査室

人類学・キメラ・マイナー抗原・動物MHC・進化

42. HTLV-Iと古モンゴロイドの民族背景に関する研究

○ 楼 宏¹、李 洪川¹、桑山昌洋¹、屋敷伸治¹、藤吉利信¹、末原雅人²、納 光弘²、
山下満左裕³、速水正憲³、今西 規⁴、園田俊郎¹

¹ 鹿児島大学・医・ウイルス学

² 鹿児島大学・医・第三内科、

³ 京都大学ウイルス研究所・病原ウイルス

⁴ 国立遺伝学研究所・遺伝情報分析研究室

43. HLA-DRB1 Low Resolutionタイピングで検出されたキメラについて

○ 田中秀則、常山初江、盛山芳恵、栗田裕子、藤井まり恵、伊佐和美、赤座達也、
中島一格、十字猛夫

日本赤十字社 中央血液センター

44. 血小板抗原HPA-5bに特異的なCD4陽性インデューサーT細胞の樹立

○ 岡井幹、贅田美江、西村元子、石川善英、赤座達也、十字猛夫

日赤中央血液センター 研究部

45. Immunodominant minor抗原“HA-1”のゲノムタイピング法と日本人における適合性とa-GVHDの 相関

○ 丸屋悦子^{1,13}、吉川枝里²、河田寿子²、椎名 隆²、関 茂樹³、平賀久代³、
甲斐俊朗⁴、藤井康彦⁵、加藤剛二⁶、星 順隆⁷、河 敬世⁸、井上雅美⁸、遠藤文夫⁹、
右田昌宏⁹、塩原信太郎¹⁰、岡本真一郎¹¹、徳永勝士¹²、伊藤和彦¹³、十字猛夫¹⁴、
猪子英俊²、佐治博夫¹

¹ 京都府赤十字血液セ

² 東海大医分子生命2

³ 佐久総合内科

⁴ 兵庫医大輸血

⁵ 山口大医三内

⁶ 名古屋日赤

⁷ 慈恵医大小児

⁸ 大阪府立母子保健総合医療セ

⁹ 熊大医小児

¹⁰ 金沢大医輸血

¹¹ 慶應大医血内

¹² 東大医人類遺

¹³ 京大医輸血

¹⁴ 日赤中央血液セ

46. MHC遺伝子多型によるペンギン類の分類と系統遺伝学的解析

○ 津田とみ¹、津田道雄¹、成瀬妙子¹、河田寿子¹、椎名隆¹、Ivon Le Maho²、
栗田正徳³、福田道雄⁴、猪子英俊¹

¹ 東海大学・医・分子生命科学

² CEPE/CNRS, France

³ 名古屋港水族館

⁴ 葛西臨海水族園

47. ブタDMA遺伝子のcDNAクローニングとDRB, DQB遺伝子の多型性解析

○ 安藤麻子¹、村上珠美¹、河田寿子¹、重成敦子¹、椎名隆¹、佐田正晴²、辻隆之²、
鳥生厚夫³、中西喜彦⁴、三橋忠由⁵、関川賢二⁶、猪子英俊¹

¹ 東海大・医・分子生命科学

² 国立循環器病七

³ 農水省家畜改良七

⁴ 鹿児島大・農

⁵ 農水省畜産試験場

⁶ 農水省家畜衛生試験場

48. 組織免疫－HLAと重力作用

○ 西原克成

東大医学部口腔外科

大野乾シンポジウム

生命進化からみた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

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)

7月8日 16:00~18:30

会場 : バッキンガム西

☺ 協力 : 湧永製薬株式会社

HLAの多型性とギリシャ神話のエピメテウスとプロメテウス

大野 乾

City of Hope 研究所

MHC抗原を通じて自己・非自己識別機構は、世界を相手にしようとする妄想を抱いて架空の抗原に迄反応する脊椎動物独特の免疫機構の副産物であるが、理想的には体液蛋白だけを対照とすれば良いクラスII抗原の場合は良いとして、クラスI抗原を通じての自己・非自己識別は不可能であると思う。

提示すべき自己ペプチド断片の種類が余りにも多い為に正常少量しか生産されない蛋白由来のペプチド断片は提示されても見過ごされるであろう。従って、何かの調子で同蛋白が大量生産されると由来自己ペプチド断片は非自己と誤解され自己免疫の引き金となる。

MHC抗原が著しく多型であると云う事は自己認識の個人差を意味するが、もし斯様な個人差に意義があれば、過去の単一病原体による大疫病 (e.g., 初期梅毒、黒死病) がMHCハプロタイプ頻度を大きく変えた筈である。因みに、超短距離では馬より速いチータは、約一万年前に大変なボトル・ネックを通過したようで、MHC単型で、アフリカ北部、南部チータ間で皮膚移植が可能である。それでも特に疫病に弱い訳では無く、ライオンに目の敵とされ乍ら、棲息し続けて居る。

糖鎖多様性の起源と進化

成松 久

創価大学生命科学研究所

生体高分子のほとんどが糖鎖修飾をうけているが、糖鎖の合成制御機構が未知であった時代には、糖鎖研究は難しすぎるとして看過されてきた。アミノ酸の結合様式はペプチド結合として1種類であるが、単糖-単糖の結合様式は原理的には $2 \times 6 \times 6$ 種類が存在しうる。さらに糖鎖は直鎖状以外にも分岐構造をとりうる。可能性のある構造は天文学的な種類にのぼる。

真核生物の酵母になるとゴルジ装置をもつようになる。ゴルジ装置は、酵母ではまだ未発達であり、種類の少ない糖転移酵素により比較的簡単な構造の糖鎖合成を行っている。種の進化とともに、ゴルジ装置がシスからトランスへ発達するに伴い糖転移酵素の種類も増加し、シスからトランスの位置に順序よく局在することにより、より複雑な糖鎖構造合成をするようになった。糖鎖構造は、種の系統樹をきわめてよく反映している。糖転移酵素の進化があたかも種の進化と連動しているように見える。

進化に伴う遺伝子の増加と変異は、タンパク質の増加と変異に対しては、1 : 1の進化しかおこさない。ところが、遺伝子 vs 糖転移酵素 (タンパク質) vs 糖鎖構造の関係は、次のような理由から、 $1 : 1 : 10^*$ と成りうる。一種類の糖鎖構造が完成されるには、次の要因が必須となる。

- ① 複数 (おそらく数十種) の糖転移酵素の共同作用により1種類の糖鎖構造ができあがる。
- ② 糖転移酵素遺伝子に多型性があり、それが酵素活性に大きく影響する場合がある。
- ③ 類似の糖鎖構造を合成する酵素遺伝子が、複数種類存在することがわかってきた。
- ④ 同一ファミリーに属する酵素の、基質特異性、同じ基質に対する比活性、が微細に異なっている。
- ⑤ 同一ファミリー内のそれぞれの酵素は、組織特異的、発生段階特異的に発現制御されている。
- ⑥ 酵素が細胞内で機能するには、ゴルジ装置の亜分画のどの位置に存在するかにより、合成する構造に影響を与える。

高等生物にまで進化できたのは、遺伝子 : タンパク質 = 1 : 1の増加と変異では到底説明できない。タンパク質翻訳後修飾機能の情報量の指数関数的な増加こそが生物進化を可能にした、と考えている。

補体系の起源と進化

藤田禎三

福島県立医科大学医学部生化学第二講座

動物レクチンは主として細胞接着やエンドサイトーシスに関与しているほか、生体防御でも重要な役割を担っている。抗体が関与しないinnate immunity(自然免疫)では、レクチンは糖鎖を持つ様々な微生物に結合できる優れた生体防御の担い手である。レクチンは最初、微生物に結合することで凝集を引き起こし、単純に増殖を阻止する機能を持った蛋白であったであろう。その後、新たにオプソニンとしての機能を獲得して、食細胞が異物を貪食する働きを助けるように大きく進化したレクチンが考えられ、その例として血清レクチンのマンノース結合レクチン(MBL)やフィコリン(ficolin)が挙げられる。MBLには更に、セリンプロテアーゼが結合して大きな進化を遂げ、その結果、レクチンとセリンプロテアーゼから成る全く異質な性質の蛋白の複合体が、レクチンを介して異物を認識するだけでなく、セリンプロテアーゼが作用して補体系を活性化するという劇的な変化を起こしたと思われる。このMBLによる補体系の活性化経路は近年その存在が確立され、従来の古典的経路や第二経路とは異なる第三の活性化経路としてレクチン経路と呼ばれている。

レクチン経路と古典的経路は、認識成分(C1qとMBL)とセリンプロテアーゼ成分(C1r/C1sとMASP)からなる複合体が構成成分であり、MASP/C1r/C1sファミリーの分子進化および認識機構の特異性の観点から見ると、補体系の進化上レクチン経路がまず出現し、その後古典的経路が発達したと想像される。事実、系統発生的に下等な脊索動物のマボヤには抗体がなく、従って古典的経路も存在しないと考えられるが、マボヤにはMASPの他にMBL様レクチンとC3があることや、C3bがオプソニンとして機能することも明らかとなった。従来、補体系は第二経路が古くから自然免疫に働いていると考えられていたが、その原型はB因子による増幅経路ではないかと思われる。原始補体系はMBL-MASP、C3、およびB因子で構成され、レクチンを認識分子として自己・非自己を識別し、セリンプロテアーゼがオプソニンのC3を活性化し、これが食細胞とリンクした自然免疫のシステムが、進化の過程で、獲得免疫が形成されるまでは、生体防御に重要な役割を果たしていることが推定される。

MHCの進化と血液型抗原

猪子英俊

東海大学 医学部 分子生命科学系遺伝情報部門

ゲノム配列は、機能上の情報の他にも進化系統学に関連した問題において重要な情報を与える。すなわち遺伝子ファミリーの定義、進化の再構成、共通であったであろう祖先の探索、これらすべてにゲノム構造の理解が必要である。我々は、ヒト第6染色体の短腕に位置する4,000kbのMHC領域を構成する遺伝子クローニング、cDNAクローニング並びに塩基配列を決定し、構造解析を進めてきた。本シンポジウムでは、塩基配列の決定と遺伝子データベースの解析により、明らかになりつつあるMHC領域のゲノム構造の進化に関する興味深い知見について述べたい。

初期の解析において TAP、LMP、HSP70、C2、C4などを含むHLAとともに免疫応答に重要な15の遺伝子と相同性をしめす遺伝子が第9染色体の9q33-34領域に存在していることが見い出され、さらに9q33-34領域の他にも、第1染色体の1q21-25領域、第19染色体の19p13領域に、相同領域が存在していた。これらはHLA遺伝子群の原型が、過去の特定時点に、2回の染色体重複によって4倍化したことを示唆しており、大野乾博士によって提唱されたゲノム4倍化説で説明されると考えられた。ところが、さらに個々の遺伝子系統樹の解析をおこなったところ、分岐年代と相同領域の重複の関係は単純ではなく、それぞれの相同領域に位置する遺伝子が、異なる時期に重複したことが示された。これらの結果が示唆するのは、機能的な必然性により進化の過程で各遺伝子が集合した可能性である。ここで集合しなければならない理由は、各遺伝子が多型を示す結果、連鎖によるある特別な allele の組み合わせ (ハプロタイプ) の形成が、各遺伝子産物の協調による機能発現に重要であった為であろう。この意味において、4つの各相同領域に多型性を示す赤血球の血液型遺伝子群が、多数存在していることは極めて興味深い。これらの血液型遺伝子群の多くは糖転移酵素である。現在、我々はMHCの持つ異物認識の原型においては、糖鎖がそのマーカーとしての役割を担っており、重複の結果生じた1領域で、MHCが確立したと考えている。この仮説に関しても上記の分子進化的解析と合わせて紹介したい。

免疫グロブリンの起源と進化

黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究

免疫グロブリンは、T細胞レセプターと共に一本のポリペプチド領内に可変(V)領域と定常(C)領域を有する点で、それ以外のタンパク質と性質を大きく異にする。このV領域のアミノ酸配列の多様性は体細胞レベルで起るV(D)JというDNA再編成機構によって獲得される。このV(D)J DNA再編成を触媒とする中心分子はRAG-1、RAG-2であり、軟骨魚及びそれより高等な全ての脊椎動物に於てその存在が証明されている。抗原の特異的識別能を有する免疫系にとって、免疫グロブリン(H、 κ 、 λ)、T細胞レセプター(α 、 β 、 γ 、 δ)、MHC(クラスI、クラスII α 、 β)、RAG-1、RAG-2が必須分子であり、その全ての存在が軟骨魚で証明されている一方で、それより下等に位置する円口類に於ては一切見い出されていない。そこで円口類から軟骨魚が誕生してくる過程で、ウイルス(又はトランスポゾンやレトロポゾン)が動物界の中にDNA再編成機構を導入し、それを利用して免疫系を誕生させたというのが多くの人の現在考えている免疫系誕生のシナリオである。

今後どのような研究が行われ、何が明らかにされればこのシナリオの正当性が確立するのか、誕生した原始的な免疫系がいかなる機能を果たしたかについて議論したい。

P. I. Terasaki シンポジウム－MHCの臨床応用－

Keynote: Evidence that HLA antibodies cause rejection of organ grafts

座長：十字猛夫（中央血液セ） & 前田平生（埼玉医・輸血）

7月9日 9：00～11：30

会場：バッキンガム西

☺ 協力：ベリタス株式会社

EVIDENCE THAT HLA ANTIBODIES CAUSE CHRONIC REJECTION OF ALLOGRAFTS.

P. I. Terasaki

Chronic rejection is today, the most important problem in organ transplantation. It results in half of the transplants being lost in 10 years. Although the 50% survival at 10 years is a major accomplishment for patients, this is still not satisfactory. HLA antibodies have already been shown to cause hyperacute rejection as well as early anuria and need for dialysis. Thus the antibodies can cause early damage to kidneys. Now, there is accumulating evidence that HLA antibodies is the trigger for the arterial narrowing seen in all solid organ grafts. A total of 25 studies have shown an association of HLA antibodies with acute and chronic rejection and long term survival. These publications will be reviewed.

For heart transplants, HLA antibodies should be useful in replacing the heart biopsies currently used to monitor. Development of HLA antibodies should also be useful in evaluating the efficacy of various immuno-suppressive drugs. Patients who do not develop HLA antibodies could be candidates for reduction in immunosuppression.

非血縁者間骨髄移植におけるHLA-クラスIアリルマッチングの重要性

笹月健彦

厚生省「HLA型適合に関する研究」班(平成3～8年)

骨髄移植においては、移植片の宿主に対する免疫応答が時として致死的なGvH病をもたらす。これまで血清学的にタイプされたHLA抗原の不一致がGvH病の発症に重要であると言われてきた。本邦において、1991年に骨髄バンクが設立され、これを通じた血清学的にHLA-A、B、DRが一致した非血縁者間骨髄移植がスタートした。

HLA-A、B、C、DRB1、B3、B4、B5、DQA1、DQB1、DPA1、DPB1の11遺伝子座におけるアリルマッチングが、骨髄移植後の臨床成績にどのように影響するのかを、移植を行った440組について、国内の30を越える施設の協力の下に検討した。その結果、HLA-A座のアリルの不一致がGvH病の重要な危険因子であること、さらにA座アリルの不一致は、移植後生存に関しても著しい悪影響を与えることを明らかにした。

また、HLA-C座アリルの不一致は、おそらく移植片対白血病細胞(GvL)反応を惹起することによって、白血病の再発を抑える効果があることが判明した。これらHLA-クラスIアリルの不一致の影響に比べて、HLA-クラスIIアリルの不一致は、移植後の臨床経過にそれほど大きな影響を与えないことも明らかとなった。

各遺伝子の発現量、生物学的機能を中心に、骨髄移植とHLAについて総合的に考察する。

生体肝移植とHLA

木内哲也、田中紘一

京都大学移植外科

肝臓は一般に液性拒絶に抵抗性があるとされ、また、移植肝自体がドナー型可溶性HLAを産生するなどの特殊性が指摘されている。死体からの非血縁者間肝移植では、HLA不適合が難治性拒絶を増やし生着率を下げるとの報告がある一方、これを否定する報告もあり、HLA適合性に基づく臓器配分は行われていない。最近では、HLA適合が移植後のウィルス感染や自己免疫性肝疾患の再発を増やすとの報告もあり、肝移植におけるHLA適合性の意味は、欧米でもまだ統一見解に達していない。

死体肝移植では、ドナー/レシピエント間のHLA (A/B/DR locus) 不適合数(MM)が3以下の症例は25%前後であるのに対し、生体肝移植では、配偶者間移植も増えているものの98%が3MM以下であり、共通の基盤の上での議論が難しい。また欧米との疾患背景の違いも考慮する必要がある。当施設でも0MM症例(4%)の生存率は100%で1-3MM症例より20%ほど良く、また4-6MM症例の生存率は有意に劣っているが、肝移植は本来術後早期の合併症の影響を受けやすく、また生体肝ではさらに年齢や移植肝重量の偏りが大きく、一概に議論することは危険である。ただし、MMの少ない症例では、慢性期の維持免疫抑制が少なくできるという傾向がある。一方、本邦のようなHLA類似性の高い民族内で生体肝移植を行う場合には、ホモ接合による一方的適合から生じるGVHDの危険にも留意する必要がある。

ドナーが生存しているという特殊性を利用した生体肝移植前後のT-cell flowcytometry cross match (T-FC XM)では、前感作症例における早期(平均8日)の強い拒絶や初期(1-2か月)の拒絶における抗ドナー抗体の上昇が認められ、これまで判然としなかった液性免疫の関与が示唆されている。しかし、FCXM陽性血清が第三者とも交差反応を起こすことから、HLAばかりでなく他の抗原系の寄与についても今後の検討が必要である。

生体、死体腎移植とHLA

小林孝彰¹⁾

横山逸男¹⁾、加村ひろみ²⁾、小原節子²⁾、打田和治²⁾

¹⁾ 名古屋大学第二外科、

²⁾ 名古屋第二赤十字病院

移植医療に必要な組織適合性検査は、近年、HLA-DNAタイピングの確立、フローサイトメトリッククロスマッチの導入などめざましい進歩を遂げている。さらに、MHC領域全般にわたる遺伝子解析も活発に進められている。移植患者の予後を改善する目的で、これらの多くの情報の中から、より正確に予後を反映する免疫学的予後因子を見出し臨床応用することが、私ども臨床に携わるものの役割である。組織適合性検査は、死体腎移植では、より良好な予後を期待できるレシピエントを選択すること（選択基準の確立）に、生体腎移植では、ドナーが限定されるため、移植前の拒絶反応のおこりやすさの予測、そして免疫抑制療法の決定（免疫抑制療法の個別化）に応用できる。今回は、以下の点に着目して発表する。

(1) HLA適合度と拒絶反応、予後

生体および死体腎移植の自験例を中心に、HLA適合度、とくにDRB1などDNAタイピングの意義について検討する。また、死体腎移植においてネットワーク発足前と後で生着率に変化がみられたか、またそれに影響を及ぼすHLA適合度、虚血時間の長さなどに違いがあったかも調査する。そして、レシピエント選択基準の見直しの必要性について考察する。

(2) クロスマッチと拒絶反応、予後

私どもは、生体腎移植例で通常のLCT、AHG-LCTに加え、フローサイトメリー（FCM）クロスマッチを導入した。T細胞に対するLCT陽性例は、移植適応外であるが、FCMのみ陽性例に対し、移植前に二重濾過血漿交換（DFPP）処置およびサイクロフォスファミド投与により、良好な成績が得られている。移植前クロスマッチの意義について考察する。

(3) HLA以外のMHC領域遺伝子の多型性

生体腎移植では、HLA適合度と関係なくドナーが選ばれる。そのほとんどは親から子への1ハプロタイプ一致例である。成績は死体腎移植に比べ良好であるが、なかには拒絶反応を繰り返す予後不良症例もある。HLA適合度以外での免疫学的予後因子を見出すことが可能ならば、移植前に免疫抑制療法を調節することができる。MHC領域を含めた広範囲の遺伝子解析により、TNFやクラスI, IIの抗原提示に関与する遺伝子群の多型性が明らかにされている。それらの予後因子としての可能性についても報告する。

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

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）

7月8日 9：45～12：15

会場：バッキンガム西

遺伝的素因から探るC型肝炎発症機序

葛下典由¹⁾

佐々木 裕¹⁾、林 紀夫^{1), 2)}

¹⁾大阪大学大学院医学系研究科 病態情報内科学

²⁾大阪大学大学院医学系研究科 分子制御治療学

【目的】 C型肝炎ウイルス（以下HCV）に感染すると高率に慢性化し、持続感染に移行する。さらに、肝炎の慢性化に伴い活動性肝炎、肝硬変へと進展する。一方で、HCV持続感染が成立しているにも拘わらず、長期間にわたり肝機能が持続正常の症例（以下無症候性キャリア）も少ないながら存在することより、HCV持続感染における肝炎発症機序に宿主側の因子の関与も推測される。HLAは免疫応答の個体差に影響を与え、また、class II DQ近傍に位置するTAP, LMPは、ウイルスなどの内在性抗原の抗原提示機構に深く関与している。今回我々は、HLA, TAP2およびLMP7遺伝子多型性とC型肝炎発症との関連について検討した。

【方法】 HCV感染患者145名（無症候性キャリア36、慢性肝疾患患者109）を対象とした。class I (A, B)は血清学的に、class II (DRB1, DQB1), TAP2およびLMP7遺伝子は、末梢血リンパ球より抽出したDNAを用いPCR-RFLP法にてDNA typingした。無症候性キャリア群と慢性肝疾患群とで各々の遺伝子頻度を比較検討した。

【成績】 感染患者のウイルス学的背景において、HCV genotypeの分布、HCV-RNA量に両群間で有意な差異は認められなかった。肝疾患群におけるB54, DRB1*0405, DQB1*0401の遺伝子頻度は、キャリア群に比し有意に高頻度であった($p<0.003$, $p<0.02$, $p<0.02$)。一方、キャリア群においては、DRB1*1302, 1101, DQB1*0604が高頻度であった ($p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.03$)。さらに、これらの遺伝子を含む拡張ハプロタイプで比較すると、B54はDRB1*0405, DQB1*0401と独立して肝疾患群で高頻度であり、DRB1*1302, DQB1*0604はB44と独立してキャリア群で高頻度であった($p=0.0015$, $p=0.0076$)。TAP2*0103はキャリアの44%に認められ、肝疾患群の16%に比し有意に高頻度であった($p=0.00064$)。興味あることに、キャリア群で高頻度であったDRB1*1302, DQB1*0604は、このTAP2*0103と強い連鎖不平衡を呈していた。そこで、DRB1*1302, DQB1*0604陰性患者間でTAP2*0103の頻度を比較したところ、同様にキャリア群で高頻度であった($p=0.0076$, $p<0.05$)。TAP2*0101, *0102, *0201, LMP7-Q, LMP7-Kの遺伝子頻度は両群間で有意な差異は認められなかった。

【結語】 HCV持続感染における肝炎発症、進展には、class I B54あるいはB54を含むハプロタイプが、一方その抑制にはTAP2*0103がprimaryに関与している可能性が示唆された。

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

太田正穂¹⁾

勝山善彦²⁾、田宮元³⁾、岡晃³⁾、椎名隆³⁾、猪子英俊

¹⁾信州大学医学部法医学教室

²⁾信州大学附属病院薬剤部

³⁾東海大学医学部分子生命科学

ヒトゲノム解析の功績によりヒト染色体の全塩基配列のデータが決定されると、機能的な遺伝子の構造・進化の解明はもとより、非機能的なメンバーからなるミニサテライトマーカ―やマイクロサテライトマーカ―も検索可能となるだろう。特に、マイクロサテライトはヒト染色体上に偏りがなくほぼ均一の距離を持って存在していることから、メンデル遺伝様式に従わない複合遺伝性を示すこれまで不明瞭であったヒトの各種疾患遺伝子、疾患感受性遺伝子の検索に大いに期待される。

我々は、HLAクラスI領域の塩基配列を決定した1.3メガベース（IkBL遺伝子からHLA-92/L 遺伝子間）のデータベースから計533個のマイクロサテライト繰り返し配列を見いだした。その中で、遺伝学的情報が豊富で検出容易なマイクロサテライト26種類が多型性解析に有効であることを確認した。今回、我々が見いだしたこれらのマイクロサテライト多型マーカ―とこれまで報告されているマイクロサテライトマーカ―（MIB, D6S273, D6S276）を用いてHLA抗原と相関を示す疾患（ベーチェット病、尋常性乾癬など）について相関解析を行い、疾患感受性における候補遺伝子領域を検索した。ベーチェット病については、MICA遺伝子からHLA-B遺伝子間46 kb に疾患感受性遺伝子が存在することが示唆された。また、尋常性乾癬ではHLA-C遺伝子座のテロメア側側のC1-2-6(HLA-C座のテロメア側側89 kb) からC2-4-4(HLA-C座のテロメア側側200 kb)の111 kb間に疾患感受性遺伝子の存在が示唆された。

現在、クラスIII領域についても塩基配列のデータベースを蓄積しつつある。この領域内におけるマイクロサテライトの検索とその多型性についても検討し、各種疾患との相関解析を行い発症原因遺伝子の同定を試みている。

がん抗原とHLA

佐藤昇志

札幌医大第一病理

長い間、その存在すら疑われ、不明のままであったヒトがん（拒絶）抗原が次第に明らかにされてきている。メラノーマではHLA-A2, A3などが提示するがん抗原ペプチドを利用したクリニカルトリアルもなされ、その大きな期待をいだかせている。

これらの研究の進展は分子生物学や基礎免疫学、とくにHLA研究の進歩によるところが大であった。本シンポジウムでは今日迄に発見されたCD8(+), cytotoxic T lymphocyte (CTL)が認識するがん抗原、およびそれらを用いた治療の現状をまずオーバービューしたい。また、今後、実際に癌ワクチンとして臨床的に用いられる為にどのような課題を克服していかなければならないのか、HLAのどのような研究ががん抗原研究あるいはがんの免疫治療法に大切なのか、などそれらの展望についても述べたい。

HLAクラス I 抗原とNK細胞受容体

屋部登志雄

日本赤十字社中央血液センター研究部

HLAクラス I 抗原は細胞内タンパク質が分解されて生じたペプチドを結合してCD8陽性T細胞に提示することで種々の免疫反応を調節する機能を持つ。近年、T細胞のみならずNK細胞も細胞障害時にクラス I 抗原を識別分子として用いることが判明した。T細胞受容体が基本的には「自己クラス I + 非自己ペプチド」を認識し、反応を引き起こす信号を伝達する活性化型であるのに対して、NK細胞受容体は主に「自己クラス I (+ 自己ペプチド?)」を認識して傷害反応を抑える信号を伝達する抑制型であり、通常はNK細胞が自己の正常細胞に反応しないように働き、腫瘍化や感染などによりクラス I 発現に異常（消失、減少、ペプチドの置換）を生じた自己細胞や異なるクラス I 抗原をもつアロ細胞に対しては抑制性信号を伝達しないために細胞障害が惹起されると考えられる。つまりT細胞が「非自己の存在」を認識して反応するのに対して、NK細胞は「自己の不在」を認識し反応するのである（Missing self説）。ヒトのクラス I 抗原認識NK受容体にはKIRと呼ばれるp58 (KIR2DL)、P70, P140 (KIR3DL) などのIg型と、CD94/NKG2Aヘテロタイマーのレクチン型がある。HLA-A, B, CおよびHLA-G抗原はKIRと結合、HLA-E抗原はCD94/NKG2Aが結合する。非古典的クラス I 抗原の存在意義を考える上でこのNK細胞受容体との反応性は重要と思われる。また抑制性受容体とは細胞質領域が異なり、傷害性促進の信号を伝達する活性化型NK細胞受容体 (p50, KAR, NKG2C) も存在し、やはりクラス I 抗原と結合することが最近明かにされた。Ig型、レクチン型受容体遺伝子はそれぞれ19番、12番染色体上に関連する分子群とともに遺伝子複合体を形成しておりMHC領域との進化上の関連性も興味深い。

Immunodominant minor histocompatibility antigen (mHa)を追って

丸屋悦子^{1), 2)}

佐治博夫¹⁾

¹⁾京都府赤十字血液センター

²⁾京都大学輸血部

【はじめに】

mHaとは何か？そしてmHaを追う原動力になった“夢”について述べ、mHaに関する研究の現況について話す。

【mHaとは】

HLA一致同胞間骨髄移植において起るGraft-versus-Host-Disease (GVHD)の原因となる抗原をmHaと定義している。この抗原の特徴をまとめると、

1. HLA以外の同種多型性であり、
2. 多型がペプチドとしてHLAに表現され、
3. HLA (通常はクラスI) 拘束性があり、T cell receptorによって認識され
4. 自己および同種免疫反応を引き起こすのもであり、
5. 細胞表面への表現を必須とせず、
6. 臓器または組織特異性がある

【mHa追求の原動力となる夢】

Immunodominant mHaが追求できれば、以下の“夢”が実現可能となりうる。

- 重篤なGVHDの予防：血縁・非血縁骨髄移植ドナーの選択肢となる。
- GVL効果を利用した抗腫瘍治療への応用：不適合なmHaを標的とし、ホストの残存または再発腫瘍細胞を攻撃除去する。骨髄移植のドナー選択肢であり、DLI治療に利用できる。
- 自己免疫性疾患の病因解析のキーとなる可能性を秘める。

【ヒトmHaの研究の現況】

Immunodominant mHa探しのstrategyは現在、おおざっぱに分類すると2方法ある。ひとつはDr. Goulmyらの方法で、HLA一致同胞間BMTのGVHD発症例よりCTLを樹立しmHaを検索する (HA-1など6種のmHaを発見している)。他方は我々の方法であり、GVHDやGVLの標的となる細胞に存在する分子の多型性を検索し、アミノ酸多型頻度が有意なものをmHaの候補とし、HLA一致同胞間BMTペア間の多型性を検査し、mHa候補の適合性とGVHD発症率や生存率との相関を検定し、HLA拘束性と多型ペプチドのモチーフを検証する (CD31, CD49b, CD62Lなどの多型性が有力なmHa候補となりうる証拠を掴んでいる)。このような方法で解明されつつあるmHaについて考察する。

教育講演 ー疾患とMHCー

座長：笹月健彦（九大・生医研）

7月9日 13：20～14：45

会場：バッキンガム西

HLAクラスII多型と疾患感受性

西村泰治

熊本大学大学院医学研究科・免疫識別学

HLA遺伝子は高度の多型性を示し、HLA遺伝子領域全体の個体差を識別するための優れたマーカー(遺伝標識)となっている。患者集団と健康対照集団との間でHLA対立遺伝子の頻度を比較することにより、HLA遺伝子領域に疾患感受性遺伝子が存在するか否かを検定することができる。この場合、患者集団で頻度が増加している(正の相関を示す)HLA対立遺伝子そのものが疾患感受性を決定している場合と、HLA対立遺伝子と連鎖不平衡にある別の遺伝子がこれを決定している場合とがある。

外界と接する皮膚や粘膜の直下には、絶えず侵入してくる微生物などの異物を処理して、免疫系のT細胞にその情報を伝える抗原提示細胞(皮膚のランゲルハンス細胞、樹状細胞、単球など)がネットワークを形成している。抗原提示細胞に取り込まれた蛋白質は分解されてペプチドとなり、HLAクラスII分子(HLA-II)に結合して細胞表面に発現する。通常、CD4+ T細胞は自己のHLA-IIと非自己抗原ペプチドの複合体を認識して活性化される。たとえ非自己抗原が存在する状況でも、HLA-IIの大多数は自己の膜あるいは分泌蛋白に由来する自己ペプチドを結合して発現し、これに対してT細胞は免疫寛容(トレランス)を獲得しており反応しない。

近年、HLA-IIの立体構造が決定され、その細胞外の先端部分にはペプチドを収容するための溝が存在することが明らかとなった。さらに、この溝には複数のポケットがあり、その形状(大きさ、疎水性/親水性、電荷)がHLA-IIの多型にもとづいて変化することが明らかになった。またHLA-II結合性自己および非自己ペプチドの解析が進み、ペプチドは通常10~20数個のアミノ酸からなり、そのほぼ中央に位置する9個のアミノ酸からなるペプチドの部分が、HLA-IIの溝に結合することが明らかとなった。このうちの数個のアミノ酸の側鎖は、HLA-IIの溝にあるポケットに食い込むことによりHLA-IIへの結合にあずかるアンカーとなっている。残りの数個のアミノ酸の側鎖は、溝からはみだしT細胞レセプターにより認識される。ペプチド上のアンカー残基の位置および種類の組み合わせをHLA結合モチーフと呼び、これは上記の理由によりHLA-IIの多型の影響を受けて変化する。

したがって、特定の抗原ペプチドを結合して、これをT細胞に見せることが出来るかどうかは、HLA-IIの多型(ペプチド収容溝とポケットの形)に依存することになる。このようにして特定の抗原ペプチドに対するCD4+ T細胞の免疫応答の個体差が、HLA-IIの多型により遺伝的に決定される。さらに特定の抗原ペプチドに対して免疫応答を示したために、あるいは示さなかったがために疾病を発症する場合には、HLA-IIの多型は疾患感受性の個体差をも決定することになる。たとえば、アレルギー疾患の中には、特定のHLA-IIとアレルゲンペプチドとの複合体に対してIgE産生を促す、IL-4産生性Th2細胞が優位に応答することに起因するものがある。また自己免疫疾患に感受性を示す特定のHLA-IIと自己ペプチドとの複合体に対して、T細胞は完全な免疫寛容を獲得しておらず自己反応性を示すものが存在し、自己免疫病が発症することも明らかとなりつつある。本講演では、HLA-II遺伝子の多型にもとづく自己免疫疾患への感受性の個体差の決定機序に関する仮説を紹介し、これをHLA-IIの構造と機能に照らし合わせて解説することにする。

HLAクラスI抗原とエイズ

滝口雅文

熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野

他のウイルス感染症と同様に、HIV-1の感染においても細胞傷害性T細胞(CTL)はその生体からの排除に重要な役割を果たしている。しかしながら、HIV-1はたくみにCTLからの攻撃をかわしていると考えられているが、その巧妙な逃避機序が最近解明されつつある。

第1の機序は、CTLエピトープ上のアミノ酸を変異させる事により、CTLの認識から逃れる事である。これにはHLAクラスI分子との結合が出来なくなるような変異と、T細胞レセプターの認識を障害する変異が知られている。第2の機序はHLAクラスI分子の細胞表面への発現の低下 (down-regulation)である。HIV-1に感染した細胞では、その表面の上でHLAクラスIの発現が低下するが、これはNefという蛋白の作用の結果である。この蛋白はHLAクラスI分子の細胞膜への転送を障害する。この結果、HIV-1由来のT細胞エピトープペプチドが細胞表面に十分に送られなくなり、CTLが認識できなくなる。このような機序によってCTLからHIV-1は逃避している可能性があるか、実際のヒトの体の中でこのような機序がどれだけHIV-1の逃避に重要な役割を果たしているか、まだ十分解明されていない。

一方、あるHLAクラスI抗原のアリールとHIV-1感染者におけるAIDS発症までの期間には相関がある事が知られている。この機序に関しては明らかになっていないが、我々のCTLエピトープの解析から、エピトープの変異性と相関している可能性が明らかになってきた。抗原(HIV-1)の多様性、HLAクラスI分子の多様性、さらにTCRの多様性と複雑なヒトのHIV-1抗原認識について紹介する予定である。

HLAタイピングQCワークショップ

座長：佐田正晴（国立循セ） & 小林賢（防衛・医・検）

7月9日 16:00~17:30

会場：バッキンガム西

DNA TYPING における精度管理

三石瑤子

UCLA Tissue Typing Laboratory

DNA によるHLA-CLASS-II TYPINGが定着してもう6-7年になるが、米国のNational Marrow Donor Program (NMDP)では今年の後半からCLASS-Iの方も全面的に血清学的方法からDNA TYPINGに切り替わることになった。

約1年半にわたり唯一のSSP-CLASS-I Typing Lab として、HLA-CLASS-I DNA TYPINGの標準化のプログラムに、12のSSOPのグループと共に参加してきたが、総数の10%のQC検体の精度は常に98%以上であることという枠は1本スイッチすればアウトで、精度管理の難しさを痛感する経験でもあった。

個性の異なる多くの検査技師が協力し、毎週数百の検体を、自動化しにくい多くのステップをスムーズに行い、データーを間違えずに期限内に報告していく為の精度管理の方法は問題の起こった都度に決まりを作り、何度もプライマーを変え、プログラムを改め、器具を考案して、結論的には常々やや過剰ではないかと思っていたASHIの精度管理法の必要性を再確認する形となった。

ASHIの精度管理の骨子は下記の事等を全部記録に残して月例のQCミーティングを継続し、問題点を早期に解決していくことにある。

- 1) 定期的な機器装置 Primer, Probe, Taq Polymerase, dNTP 等の厳密な品質管理
- 2) 標準化されたQCプログラムに参加し、一定数の既知タイプのQC検体を常に一緒にタイプし、全ての検査技師が月一本のQC検体をタイプして技術管理をする
- 3) データーは必ず二人以上で読み、結果に間違いがあった場合はファイルし、問題を分析し、その原因をなくす為の方法を見つけて実行する
- 4) いくつかの因子をコンピューターに組み込み全てのデーターにおけるパーセントを定期的に出してラボ全体のタイピングがスムーズに行っているかどうかをチェックする
- 5) 多岐にわたるPCRフラグメントによる汚染防止策など。

このデーターは2年に1回のASHI Accreditation Committee の定期的検査で提出を義務付けられている。

これだけのエネルギーを費やしてもまだまだ完全な精度管理は難しいが、これを続けていくことによる質の向上は目に見えるものがある。これからますますアレルの精度向上が要求されていく上で、より能率の良い精度管理の方法を完成していくことは移植の向上に絶対欠かせないことである。

第3回HLA QCワークショップ

前田平生

埼玉医科大学総合医療センター輸血部

(日本組織適合性学会 標準化委員会委員長)

【目的】

HLA検査は、各臨床分野、とくに非血縁者間骨髄移植、臓器移植におけるドナー・レシピエントの選択には必須の検査になっている。しかも、HLA検査は、従来の血清学的方法からDNAタイピングに移行し、HLAアレルの数は年々増加し、表記法についても統一されていない。このような状況において、本学会では、以下にかかげる目的のために、これまで2回のHLA QCワークショップを開催してきた。

- 1) 公認HLAアレルの情報
- 2) 日本人のHLAアレル、ハプロタイプとその頻度
- 3) DNA抽出の精度管理
- 4) タイピング試薬の精度管理
- 5) タイピング技術の向上
- 6) タイピング結果の表記法の標準化
- 7) 標準DNAの配布
- 8) HLA検査担当者、施設の学会認定、など

【方法】

学会会員に対してワークショップ参加を応募し、参加会員施設に対して6種類のDNAサンプルを送付する。参加施設はサンプルのDNAタイピングを実施する。従来は、検査方法、検査結果だけを回答してもらっていたが、今回より、検査キットを用いて検査を実施した場合は、生データをスコア化して回答してもらうことにした。

これにより、各検査キットの精度管理も可能になると思われる。また、今回から、全てのローカスを検査でき、かつ、標準サンプルとして後日利用できるように十分量のDNAの配布を心掛けた。今後、学会としては、日本人のアレルについてはセルライン化して、保存、管理すると共に、会員の要請に応じて再配布していく予定である。

【進行予定】

- ・ 98年12月：ワークショップ参加の案内
- ・ 99年2月：61施設が参加を表明
- ・ 99年3月：6種類のDNAサンプルの配布
- ・ 99年5月：生データ、検査結果の回収
- ・ 99年6月：データの解析
- ・ 99年7月：ワークショップ
 - 1) 各キット別の生データ・検査結果の解析
 - 2) 各ローカス別の検査結果の解析
 - 3) 方法別に表記法の標準化

【考察】

学会主導のHLA QCワークショップを重ねることにより、HLA検査の精度管理、表記法の標準化が達成され、将来的には、目的8)で述べた検査担当者、施設の学会認定が可能になればと願っている。

ランチオンセミナー・HLA-class I DNA typing Kit コンペ

7月8日 12:15~13:45 バックingham東

7月9日 11:30~13:00 バックingham東

出場: INNOGENETICS

シオノギ製薬株式会社

大日本製薬株式会社

湧永製薬株式会社

One Lambda Inc.,

ペルフリーズクリニカルシステムズ

Line Probe Assay (LiPA) 法によるHLAクラス I DNAタイピング

Lieve Ongena

INNOGENETICS

HLA検査は、長い間血清学的方法で行われてきたが、生細胞が必要なことや抗血清のcross-reactivityなどの問題を補うため、DNAタイピングの必要性が生じてきた。HLA クラス II DNAタイピング法は、高度な多型性をもつHLAクラス II 遺伝子領域の塩基配列の解析とともに開発が進み、近年より多くのアレルが存在するクラス I 領域においても考案されるようになった。INNO-LiPAクラス I DNAタイピングキットは、腎臓を始めとする臓器移植や骨髄移植のドナー登録のために、血清学的なスプリットのレベルまたはアレルグループとしてのHLA型判別を目的に開発された。

LiPA (Line Probe Assay) 法の原理は、nitrocellulose stripにsequence specific oligonucleotide probes (SSO) を特殊技術で貼り付けた、reverse hybridization assay法によるものである。HLA-A、HLA-Cでは、ほとんどのアレルグループにユニークなsequence motifsがあり、LiPA HLA-Aキットでは、36種のプローブ、HLA-Cキットでは27種のプローブにより、それぞれ全アレルの97.7%、97.3%をカバーすることができる。一方、HLA-Bでは、アレルグループ特有のsequence motifsが存在しないものが多いため、使用するプローブの種類は多くなるが、LiPA HLA-B キットでは60種のプローブにより全アレルの97.0%をカバーするintermediate resolutionのタイピングが可能である。

既にINNO-LiPA DRB、DQB、DPBのタイピングキットが開発されており、今回開発されたクラス I キットを含め、すべてのINNO-LiPA HLAタイピングキットは、56°C 1温度ハイブリダイゼーションの統一アッセイプロトコールであるため、PCR後のアッセイは、すべてのLiPAストリップの同時多数検体処理が可能である。また、INNO-LiPA HLAタイピングキットは、抗原既知サンプルやリファレンスセルラインを用いた厳しいQCのもとに品質管理されており、自動化アッセイ<オートリパ>にも対応しているため、迅速で再現性に優れたDNAタイピング法として、欧米諸国で広くルーチンタイピングに用いられている。

LiPA™ HLA-AおよびHLA-B typing kitによるHLAクラス I DNAタイピング

柏瀬 貢一

日本赤十字社中央血液センター・研究部

HLAのDNAタイピング法はPCR-SSO法、SSP法、RFLP法、SSCP法、SBT法など様々な方法が開発されている。これらの方法には、それぞれ一長一短があり目的や検体数によって使い分けが必要である。

近年、クラス II のDNAタイピングは日常的な検査法になった。一方、クラス I のDNAタイピングにおいても、PCR-SSP法に基づいたキットが開発されたことにより、日常検査として定着しつつある。しかしながら、この方法は検査に用いるDNA量が比較的多量 (2.5 μg以上) に必要なことから、臍帯血などを対象とした限られた検体量でのタイピングには制約がある。

そこで我々は、ベルギーのINNOGENETICS社により開発された、LiPA (line probe assay) のHLA-A、HLA-B typing kitの検討を行なった。この方法の原理はreverse のSSO (sequence specific oligonucleotides)によるもので、nitrocellulose strip上でhybridizationを行なう。

PCRには、HLA-A、HLA-Bそれぞれ0.25 μgのDNA量を用い、判定に十分な増幅が得られた。PCR後の所要時間は2～3時間、特別な機器を必要とせず、操作も簡便であった。また、専用の解析ソフトを用いて容易に判定できた。

今後、クラス I DNAタイピングの需要が益々高くなると予想される。LiPA HLAタイピングキットはそれに応えるものとして、威力を発揮するであろう。

シオノギHLA-DNAタイピングキット「HLAクラスI」

兼重俊彦

塩野義製薬株式会社・診断医学事業部

HLA検査におけるDNAタイピングの導入は、臨床適応の拡大と検査技法の標準化という点で大きな意義があると考えられます。更に後者については精度面に優れ且つ操作の簡便なキット試薬の供給が日常的な検査を実施する上で重要なポイントとなります。特に今後クラスI DNAタイピングがクラスII DNAタイピングに続き、検査の現場に普及し、従来の血清学的方法との比較において臨床的或いは基礎免疫学的見地から評価がなされるためにも、適当な試薬が必要と思われま

す。
シオノギではこれまで多くの先生方から臨床、基礎研究を目的として「HLAクラスI DNAタイピング」のご依頼を頂き受託検査として実施して参りましたが、この度、これまでに培った技術と情報を元に、新たに開発した「シオノギHLA-DNAタイピングキット HLAクラスI」を発売する予定です。本キットの原理であるMRHA (microtiter plate - reverse hybridization assay) は、マイクロプレートの底面に固定した各種のオリゴプローブに対するPCR産物のハイブリダイゼーションにより可変領域の塩基配列を特定し、プローブセットの反応パターンから、サンプルのクラスI アリルを決定するものです。当社がこの方法を採用した理由としては、

1. 操作が簡単で、標準化が容易であること
2. (高価で) 特殊な装置を必要とせず、通常の検査室で設置される汎用機器で測定ができ、またELISA用の全自動装置を用いればPCR以降は大量処理も可能であること
3. データ精度の面では今後増加が予想される新規アリルの対応がタイムリーに図れることなどです。

発売予定の品目としては、HLA-B40, HLA-A, HLA-B, HLA-Cの4品目で、HLA-B40が2 (16), 他は3 (24)のstrip (well)を使用し、HLA-B40は全てのB40アリルを、またHLA-A, B, Cは日本人で通常観察されるアリルの大部分をmedium / high resolutionで検出することが可能です。また操作面では、全ての品目でPCRやハイブリダイゼーション及びポストウォッシュの温度等を同一の条件で行なえるように設定しています。例えばHLA-A, B, Cを同一操作で同時にDNAタイピングすることができます。また従来の方法ではハイブリダイゼーション及びポストウォッシュの温度を高温で且つ厳密に保持する必要がありましたが、本キットではそれぞれ37℃, 室温で行ない、一般的な日常検査と同等の温度制御でDNAタイピングが行えます。最終的な判定のためのシグナル検出は閾値を基本的に吸光度1.0以上を陽性、0.5未満を陰性になるよう設定していますので、プレートリーダーは勿論のこと、肉眼でも判定が容易に行えます。尚、測定データから自動的に判定できるソフトの提供も準備中です。

シオノギはこの度の「HLA-DNAタイピングキット」の発売を契機として、HLAタイピングに携っておられる皆様に、「検査・試薬・(関連)情報」でトータルサポートをさせて頂きたいと考えております。

The Biotest ELPHA , an SSOP system allowing automated HLA-Class I and Class II typing

Bodo Holtkamp,

Biotest AG, Dreieich, Germany

Serological and cellular HLA typing techniques are progressively replaced by methods derived from molecular biology. The invention of the polymerase chain reaction (PCR) brought about the essential increase in sensitivity and specificity which allowed the development of the two DNA typing techniques most frequently used today. In the first type of assays the presence of a specific sequence in a sample is determined by the generation of a PCR product usually detected by gel chromatography. The initiation of the PCR process depends on the presence of target sequences recognized by sequence specific primers (SSPs). Thus the presence of a combination of sequences characterizing an allele can be analysed by a number of parallel SSP reactions. In the second type of assays the PCR primers are directed to non-polymorphic sequences bordering a fragment comprising the polymorphic areas of a genetic locus. The PCR in this case generates products from any allele. The products, however, show allele-specific differences in their sequence, which are identified by sequence specific oligonucleotide probes (SSOPs). The presence of an allele can be deduced from the combination of reactive and non reactive probes. Single results are obtained faster in SSP assays, but for higher numbers of samples the SSOP technique usually is preferred because of its inherent possibilities to reduce manual work. Pursuing these opportunities led us to the development of the enzyme linked probe hybridization assay (ELPHA), a system combining oligonucleotide probe hybridization with a detection method adapted from the ELISA technique. This system is suitable for manual work as well as fully automated typing on an ELISA processor starting from a PCR product. The ELPHA process consists of three parts, PCR, hybridization and detection.

- In the PCR fragments of HLA genes bearing polymorphic sequences are amplified with biotinylated primers.
- Following denaturation the single stranded, biotinylated PCR products are distributed into streptavidin coated wells of microtiter plates which contain FITC-labeled, sequence-specific oligonucleotide probes and additional reagents required for hybridization in a dried form. Dissolution of the reagents, binding of the biotinylated PCR products to the streptavidin coat, and hybridization of the probes to the target sequences take place in the same step. Imperfectly bound probes are removed in a subsequent stringency wash.
- The hybridization product is then incubated with a conjugate of FITC-specific antibody fragments and the enzyme horseradish peroxidase (POD). After removal of excess conjugate in a washing step and addition of the substrate tetramethylbenzidine (TMB) the complex of target, probe and conjugate is detected by the enzymatic activity of the peroxidase generating a colored product from the TMB substrate. Results can be read visually or by a microtiter plate photometer.

The ELPHA series of typing tools, which all work with the same standard protocol, started with Class II kits. A DQB kit and DRB kits offering low and high resolution are followed by DRB subtyping kits to resolve groups of alleles of the DRB1 (DR2, DR4, DR3,11,6, DR8&12) and the DRB3 gene to the allele level. Kits for the Class I genes HLA-A, -B, and -C are under development. The DRB kit for low resolution and the DQB kit require 3 strips of a microtiter plate corresponding to 24 wells. On a single ELISA processor which can handle 24 microtiter plates in 24 hours 96 samples can be typed for DRB or DQB. The probes for a combined HLA-A/B typing will occupy a complete microtiter plate reducing the number of samples needed to fill the capacity of the same processor to about 20. For interpretation of the data a computer program is available which allows calculation, storage, and export of typing results from raw data directly transferred into the personal computer from a photometer.

PCR-MPH法によるHLAクラス I タイピング

川井信太郎

湧永製薬(株)・創薬研究所

湧永製薬のPCR-MPH法は、プローブをELISA用の96穴プレートに固定しているため、汎用のELISAの機器を使用することにより大量検体を迅速にタイピングすることができます。既に複数の検査室でDRB1遺伝子のタイピング、及び日本人で複数種のアリルの存在が報告されているクラス I 抗原 (A2、A26、B15、及びB40 抗原) のhigh resolutionタイピング法として導入され、一度に百検体近くのタイピングを行っている実績があります。このように、本法は大量検体処理で威力を発揮する方法ですが、少数検体をタイピングする場合でもプローブの固定してあるストリップを自由に組替えることによって試薬の無駄を出さずに検査することができます。

また、PCR-MPH法によるタイピング試薬では、PCRによる遺伝子増幅条件が、クラス I、クラス IIで異なるもののハイブリダイゼーションから発色まではどのタイピング試薬も全て同一条件で行うことができるように設計しておりますので、異なる種類のタイピングを同時に実施することができます。

さて、我々は今年新規の試薬としてC抗原のmiddle resolution タイピング試薬、B5抗原及びB16抗原のhigh resolution タイピング試薬をそれぞれ製品化し、近日中に発売を開始する予定となっております。C抗原は骨髄移植GVHDや白血病再発に関わる重要な因子であるという報告があり、今後タイピングの必要性が高まる可能性があります。PCR-MPH法によるC抗原タイピング試薬は21種類のプローブで構成されており、今まで日本人に報告されたほぼ全てのアリルをタイピングすることができます。このC抗原のタイピング試薬の操作条件(PCR及びMPH)も今までのクラス I 抗原のタイピング試薬と同一となっております。なお、PCR-MPH法によるC抗原のタイピングの詳細については本学会でポスター発表いたしますので興味をお持ちの方は是非お立ち寄りください。

また、前回の本学会で報告し、昨年末から発売を開始したA及びB抗原のタイピング試薬は、検査に有用であるという評価を頂いてはおりますが、検体によってはPCRの増幅が悪い、一部プローブのシグナルが弱い、或いはクロスハイブリダイゼーションしやすいなどのご指摘を頂いていました。この度、皆様のご希望にお応えできるように一部プローブとプライマーの改良及び追加を行い、より明確にタイピングできるようにリニューアルいたしました。これら改良製品は近日中にお届けできる予定です。

このA、B、C抗原のlow resolution タイピング試薬の完成により、それぞれのプレートのストリップを組み合わせることにより、1枚のプレートでA、B、C、及びDR抗原のタイピングを行えるプレート構成も可能となりました。これによって、1検体のA、B、C、及びDRの血清学的レベルのタイピングがプレート1枚でできるようになるわけです。それぞれの発色パターンは、専用のコンピュータによる解析ソフトで行いますので判定にあたっての入力ミスなどの人為的エラーの心配は全くありません。

本学会のランチオンセミナーでは、PCR-MPH法の概要を解説し、その利用方法についても提案させていただく予定です。現在弊社のHLAタイピング試薬をご使用頂いているラボの方、これからDNAタイピングを導入されようとしているラボの方など幅広いラボの方々のお役に立てるような内容にしたいと考えています。

PCR-MPH法は、日本生まれです。だからこそ皆様の声をいち早く取り入れた商品の開発や、迅速な技術サービスが可能で、これらは、日本で生まれた技術だからこそできることです。湧永製薬は精度の高い明日のHLAタイピングに全力投球しています。

マイクロSSP日本人キットを使用したA B C DR DQの同時タイピング

斎藤克行

One Lambda Inc.,

PCR-SSP法は迅速に高精度なHLA遺伝子の解析を行なえる手法である。同手法では短時間検査が可能のため、血清学トレーの補助からアリルタイピングに至るまで幅広く活用されている。しかし一方で、市販キットを使用し日本人集団のタイピングをする際、対象を日本人としてないためPCR反応数が過剰になり、ルーチン検査に適さない場合が多い。そこでこの度、日本人集団のみを検査対象に限定することによりA、B、C、DR、DQの主要HLA Lociの同時タイピングが可能な日本人用SSPキットが開発されたのでその紹介をする。

マイクロSSP 日本人キットは既存のlow resolutionキットから日本人集団をタイピングする際に役に立つprimer setのみを選択し、血清学レベルでのルーチンDNAタイピングをより迅速に行なえるように設計されたものである。精度は既存のマイクロSSP low resolutionキットに等しく、2桁で判別が可能である。(一部のアリルは4桁判別可能) プライマーの数はAローカスに13、Bに42、Cに14、DRBに20、そしてDQBローカスに7の計96個。ネガティブコントロールは含まれていない。尚、本キットでは比較的頻度の低い(0.1%以下)アリルを特異性に持ったprimer setが殆ど除かれているため、一般的に日本人にまれなアリルが存在した場合にはブランクになる。日本人キットのプロトコールは既存のマイクロSSPキットと同様、プライマーが分注されたトレーに検体DNAと酵素を加え、約75分の増幅反応を行ない、ゲル電気泳動で陽性バンドを検出する。

日本人だけを検査対象にしABCDRDQを一回の増幅反応で判定することにより、一般検査室でのSSPタイピングの迅速化に貢献できるものと考えられる。将来、ユーザーの方々からの所見を取り入れ信頼性と精度の向上を目標とする。

PCR-SSP法によるHLA-DNAタイピングーその現状と将来への展望

木村彰方

東京医歯大・難研・分子病態

最近の10年間でHLA領域の遺伝子解析が飛躍的に進み、遺伝子レベルでの基礎研究の成果が臨床にも応用されている。特にHLA分子の多型が遺伝子レベルで次々と明らかにされると同時にPCR-SSO法(MPH法やHPA法を含む)、RFLP法、SSP法、SSCP法、SBT法等原理的に異なった方法によるHLA遺伝子多型の検出法が開発されており、これらの方法論に基づくHLA-DNAタイピングが、基礎研究レベルから臨床研究レベルに至り、さらにキット化を通じて広く臨床応用されているのが現状である。キット化商品の開発ではそれぞれの方法論毎に改良が行われているが、その使用にあたっては、方法論自体の特徴(長所と短所)を踏まえた上で、目的に応じた選択が必要となる。

PCR-SSP法によるDNAタイピングは、比較的手技が簡単であり、短時間で血清学と同等レベルでのHLA遺伝子型を決定出来るため、少数検体のタイピングに有用である。しかしながら、多数のプライマーセットを使用するため比較的少量のDNAを必要とし、また全てのHLAアリルを4桁以上のレベルで決定することは費用、労力、時間等の面から実際上不可能である。このことを逆に言えば、日本人のように遺伝学的に比較的均一な(HLAアリル数が限定される)民族を対象とすれば、比較的少ないプライマーセットで多数のローカスのDNAタイピングを血清学と同等レベルで行うことも可能であると考えられる。

micro-SSPJPNキットはこの観点から日本人向けの多ローカス同時DNAタイピングキットとして開発されたものであるが、その使用経験を紹介し、それに基づく今後の改良点等について議論したい。

Practical Use of ABC SSP UniTray™ in the HLA Laboratory

Dr. Xiangjun Liu

Pel-Freez Clinical Systems, LLC, USA

The matching of Class I HLA alleles in unrelated bone marrow transplantation has significant effect on the transplant outcome.

Molecular based typing by SSP has several advantages compared to serologic typing. The specificity of molecular primers has a much better reproducibility and supply is unlimited. Molecular based typing is also much less dependent upon the viability of the cells, and there are less false negative and false positive reactions. SSP typing can give clear and definitive results regarding the individual genetic identity.

Pel-Freez Clinical Systems has developed SSP kits for Class I ABC typing, which has made Molecular Class I typing feasible in a routine HLA laboratory. With almost 500 different class I HLA alleles registered today, it becomes an increasing challenge to provide a molecular Class I typing product that offers 1) Accurate allele assignment; 2) most updated allele database; 3) minimal ambiguous results; 4) robust reactions; 5) excellent specificity and reproducibility; 6) cost effectiveness and easy of use. At Pel-Freez Clinical Systems, LLC, we have focused our efforts to meet these challenging demands. Since its introduction two years ago, Class I ABC UniTray™ has gained recognition as the most reliable HLA Class I molecular typing product. We would like to share our experience and our commitment with our Japanese friends and colleagues.

モーニングセミナー

7月9日 8:30~9:00

バッキンガム東

HLA Sequencing Based Typing Systemの現状と展望

PE バイオシステムズ ジャパン (株)

1. 新発売のHLA-B、DRB codon 86 Sequencing KitとHigh Throughput HLA Typingについて
2. User's voice

前回、前々回にHLA-DRB 及びHLA-A Sequencing Based Typing Systemを紹介しました。今回は、新たに発売したHLA-B及びHLA-DRB codon 86 Sequencing Kitのご紹介とHLA Sequencing Based Typing Systemの今後の展望として、High Throughput HLA Typingについてお話しいたします。

また、現在HLA Sequencing Based Typing Systemをお使い頂いているユーザーより、現状のご報告をしていただきます。

一般演題

ポスター・エジンバラ西

1 ヒト由来HLA及びリンパ球モノクロナール抗体について

○田中秀則、豊田智津、伊佐和美、盛山芳恵、
田中昌子、礪波秀紀、後藤邦夫、赤座達也、
中島一格、十字猛夫
日本赤十字社 中央血液センター

【目的】

恒常的に良質の抗血清を得ることを目的とし、HLA抗体を産生している献血者のB細胞を用いてHLAモノクロナール抗体作製を試み、昨年の本学会で2種類のモノクロナール抗体について紹介した。今回、HLA-B51関連抗原及びリンパ球抗原(non-HLA)に対するモノクロナール抗体が得られたので報告する。

【方法】

HLA抗体を産生している献血者からB細胞を分離し、EBウイルスでトランスフォームを行った。数週間培養後、培養上清のHLA抗体をスクリーニングし、陽性ウエルのトランスフォーム細胞をミエローマ細胞(JMS-3)とポリエチレングリコールで細胞融合を行った。細胞融合後、HLA抗体産生クローンを限界希釈法によりクローニングした。

HLA抗体スクリーニング及び特異性同定は、通常のLCT法で行った。また、赤血球を用いて生食法、プロメリン法を行い、血小板との反応はMPHA法で検査した。

【結果及び考察】

B51関連抗体及びB75抗体を産生する献血者のB細胞から、それぞれ安定したHLA抗体産生株JRHO4と抗リンパ球抗体産生株JRHO3が得られた。JRHO4株の培養上清では、B51+B14+B18+B75+B78の特異性が見られ、 α 1ドメイン63番目のアスパラギン(Asn)及び171番目のヒスチジン(His)等が反応に影響していると考えられたが、それだけでは説明できない特異性であった。また、抗体産生株JRHO3由来の培養上清は、LCT法による抗体同定において使用したリンパ球に全てに反応を示したが、血小板及び赤血球とは反応しないことから、抗リンパ球抗体と推測された。

2 日本人にあらたに見出された血清学的サブタイプHLA-B56 Variant “HLA-B56 V1” について

○猿渡 晃¹⁾ 伊藤八重子¹⁾ 藤村邦子¹⁾
伊藤圭一¹⁾ 藤井まり恵²⁾ 田中秀則²⁾
十字猛夫²⁾ 平川和也¹⁾

¹⁾山口県赤十字血液センター

²⁾日本赤十字社中央血液センター

【目的】

我々は日本人健常集団よりHLA-B56、B22Nの抗血清群と部分的に反応性を欠くHLA-Class I 抗原を見だし、仮にHLA-B56 V1と称し血清学及び塩基配列の解析を行い更にFamily-Studyを行ったので報告する。

【方法】

血清学的検査はLCT法で日本赤十字社中央血液センターより供給されるタイピングトレイJRT(Lot14-9)で検査を行い、更にLocal-Tray(TT-67、68、ST-10)及びテラサキFirst-Tray各72穴を使用した。塩基配列の解析はダイレクトシーケンシング法を用いて部分的な塩基配列の決定を行った。

【結果と考察】

B56 V1はB22の抗原群全体に反応する血清に反応するが、B56のモノスペシフィックな血清に反応せずB22Nよりも更に短い反応パターンを呈した。また一部のB5関連抗血清にも反応が見られた。塩基配列の解析結果からこの抗原をコードする遺伝子はB*51011のExon2(142番目)からExon2の最後またはIntoron2にまたがった部分にB55またはB56の塩基配列が入り込んだB22関連抗原とのハイブリットであると考えられた。

この抗原はA24-B56 V1-Cw14のハプロタイプを形成し、少なくとも2世代間にわたり遺伝していることも確認された。

3

日本人で新たに見られたHLA-B15関連抗原について

○伊佐和美、藤井まり恵、田中秀則、盛山芳恵、
田中昌子、栗田裕子、礪波秀紀、
赤座達也、中島一格、十字猛夫
日本赤十字社 中央血液センター

【目的】

日赤では、成分献血登録者および骨髄バンク登録者のHLA型試験を行っている。今回、日本人に一般的なHLA-B15関連抗原 (HLA-B62、B75、B70) とは血清学的反応パターンの異なるHLA-B15抗原 (以下、HLA-B15V) が見出されたので報告する。

【方法】

HLA-ABC抗原のHLA型試験は、HLAタイピング用全国共通トレイおよび自家製トレイを使用し、通常のLCT法で行った。リンパ球の分離には、クラスI用ビーズ (ダイナル社製) を使用した。DNAタイピングには、Bローカスに特異的な塩基配列に対するプライマーを使用し、PCR増幅を行い、ダイ・ターミネーター法によるエクソン2およびエクソン3のダイレクトシーケンスを行った。

【結果】

今回、新たに見出されたHLA-B15V抗原は、B62+B76、B75V+B46、B75+B77およびB75Vの抗血清に反応を示さず、B62+B70 (+B75) の抗血清に反応を示したことから、日本人に一般的なHLA-B15関連抗原とは反応パターンが異なった。そこで、ダイレクトシーケンスを行ったところ、この抗原はB*1538でコードされていることが判明した。

【考察】

今回見出されたHLA-B15V (B*1538) のアミノ酸配列は、B62 (B*1501) と比較して1箇所のアミノ酸に置換 (Tyr171→His) が認められるだけであるが、この置換がB62+B76抗血清に対する反応性に影響しているものと考えられた。これまでに、共通トレイ (Lot No. JRT16) を使用してタイピングした2,053例中2例においてB*1538をコードするHLA-B15V抗原が認められた。また、これら2例のHLAタイプからB*1538でコードされるHLA-B15V抗原は、A31-Cw9-B15V-DR11のハプロタイプを形成するものと推測される。

4

日本人献血者に見出されたB72 (B*1503)

○樋口香織¹⁾、小田秀隆¹⁾、藤井実¹⁾、光富吉朗¹⁾、
千代田晨¹⁾、藤井まり恵²⁾、田中秀則²⁾
十字猛夫²⁾

¹⁾長崎県赤十字血液センター

²⁾日本赤十字社中央血液センター

【目的】

現在、日赤では成分献血登録者および骨髄バンク登録ドナーのクラスIタイピングを血清学的検査法で行なっている。今回我々はB62, Bbl (bl=blank) と判定された成分献血登録者について精査を行なったところ、日本人では極めて稀なB72 (B*1503) を持つことを見出したので報告する。

【方法】

血清学的タイピングは日赤共通トレイ (JRT14)、日赤B15サブトレイ、および市販のHLA-ABCプレートHS72 (ヘキスト) と、テラサキHLAトレイABC抗原用ファースト72 (ワンラムダ) を使用し、LCT法で行なった。DNAタイピングはダイナル AllSetTMSSP HLA-B "low resolution" およびワンラムダ マイクロSSP Class I Generic Typing kit を用いた。また、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列の解析も行なった。

【結果】

日赤共通トレイおよび市販のタイピングトレイによるHLAタイプはA2, A26 B62, Bbl Cw7, Cw8と判定されたため、B15関連抗原の詳細がわかる日赤B15サブトレイで検査したところ、抗B70の血清 (B62 (-)) には反応するものの抗B71の特異性をもつ3種類の抗血清に反応を示さず、日本人で一般的なB71の反応パターンとは異なっていた。そこで、PCR-SSP法を行なったところ、B*1503 (B72) であることが判明した。また、ダイレクトシーケンス法によるタイピングでもB*1503であることが確認された。

【考察】

一般的にB72は黒人の集団で多く見られる抗原であり、日本人の報告例はないと思われる。今回見つかった日本人のB72は黒人に見られるA23-Cw2-B72のハプロタイプとは異なっており、Oriental特有のハプロタイプである可能性もある。今回見出されたB72はJRTトレイでB62, Bblと判定されたため、B75およびB70の有無を確認するために精査を行ったが、通常血清学的検査でB70と判定されるパネルの中にB72が含まれている可能性があることが示唆された。

5

PCR-SSOP法を用いたHLA-Cローカスのア
リルタイピングについて

○中村淳子, 中島文明, 横田敏和, 諏訪城三
神奈川県赤十字血液センター

【目的】

1998年度日赤中央血液センター地域内HLAワークショップにおいて, DNAデータでの抗血清解析を目的としHLA-Cローカスアリルタイピングを行った. エクソン2, 3部分に変異のあるHLA-C領域をタイピングするPCR-SSOP法を構築したので報告する.

【方法】

プライマーはHLA-Cローカスのイントロン1部分からイントロン3部分までを特異的に増幅するN.Cerebらの報告したセット (Tissue Antigens 1995: 45: 1-11) を用い, PCR-SSOP法はY.Dateらの報告した方法 (Tissue Antigens 1996: 47: 93-101) に従い, プローブそれぞれを54°Cでハイブリダイゼーションさせ, 68°C TMAC溶液で洗浄し, DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer社) を用いて発色判定した. プローブは55種を18ベースで設定し, エクソン2, 3部分に変異のある既知のCローカスアリルをすべて判別出来るよう検討した.

【結果】

WHOで承認されているCローカスアリルすべてのDNA検体が得られていないが, 概ね4桁もしくは5桁レベルでのCローカスアリルタイピングが可能であった. 今回のワークショップ検体の中で, 既存の反応パターンと異なる新しいアリルと考えられるものがCw*02グループ, Cw*07グループ, Cw*08グループにそれぞれ見いだされた.

【考察】

このCローカスのタイピング方法は, プライマー, プローブともにまだ改善すべき点を残すが, Cローカスを抗血清ですべてタイピングできない状況において有用な方法である. また, 今回は未知のアリルが3検体得られたが, 新しいアリルに対しても塩基配列のデータが得られれば, プローブを新たに設定することにより対応可能である. 今後, Cローカスのアリルデータを蓄積することにより, 移植成績等への関与についての考察や, 抗血清の同定に有用となると思われる.

6

PCR-MPH法によるHLA-C抗原遺伝子のlow
resolution タイピング法の開発

○宮城 徹, 松見達也, 長門正貴, 川井信太郎
湧永製薬・創薬研究所

【目的】

HLA-C抗原は骨髄移植においてGVHDや白血病再発に関わる重要な因子であるという報告があり, 今後タイピングの必要性が高まる可能性がある. しかし, HLA-C抗原は他の抗原と比較して発現量が低いことなどから良質の抗血清の入手が難しく, そのために血清学的タイピング法ではブランクが多く出現し, 正確にタイピングできない場合がある. そこで多検体処理に有効なPCR-MPH法によるDNAタイピング法を開発した.

【方法】

PCRによってHLA-C遺伝子を特異的に増幅した. 日本人において報告されているアリルをタイピングできるように21種類のプローブを用いた. PCR, ハイブリダイゼーション等の条件は既に発表したHLA-A,B low resolution タイピングキットと同一である.

【結果】

本法によるHLA-C遺伝子タイピングの結果はSSO法及びSBT法の結果と一致した.

【考察】

我々は既にHLA-DR, HLA-DQ, HLA-A, HLA-B各抗原遺伝子のPCR-MPH法によるタイピングキットを作製している. いくつかのプローブ改良は必要なものの, 新たにHLA-C抗原遺伝子のタイピングキットが追加されることにより, PCR-MPH法でclassical HLA全てのタイピングが可能となった. これらのMPH法の操作条件は同一であるので, 各キットのマイクロウェルプレートを組み合わせることで複数遺伝子(例えば, A, B, C及びDR)の同時タイピングにも対応できる. 本法は今後HLA-C抗原遺伝子と相関する疾患の解析や, 移植分野において役立つと思われる.

7

MRHAを用いたHLAクラスI DNA
タイピング○森部豊輝¹⁾, 兼重俊彦¹⁾, 猪子英俊²⁾¹⁾ 塩野義製薬(株)診断医学事業部²⁾ 東海大学医学部分子生命科学

【目的】

HLAクラスI DNAタイピングの日常検査への導入には、高精度のデータが得られ且つ操作が簡便な方法の設定が望まれる。我々はマイクロプレートに共有結合で固相化したSSOプローブに対してPCR増幅産物のハイブリダイゼーションを行うことを原理とするMicrotiter plate-reverse hybridization assay(MRHA)をmedium/high resolutionレベルでのHLAクラスI(A,B,C)DNAタイピングへ適用するために諸条件の検討を行った。

【方法】

HLAクラスI DNAタイピングの方法確立のため、①ハイブリダイゼーション条件緩和(37°Cでの実施)のための反応液組成とそれに適合するSSOプローブの設定、②検出感度向上のための酵素及び発色基質の選定、③PCRプライマーの設計について検討した。

【結果】

①ハイブリダイゼーションは反応液にホルムアミドを添加することで温度条件を緩和することができた。更にプローブの長さや位置あるいは固相量を調節することでハイブリダイゼーション反応を最適化することができた。以上の条件検討から、陽性及び陰性シグナルの閾値 (cut-off値) をそれぞれO.D.値1.0以上と0.5未満に設定することができた。②発色系についてはペルオキシダーゼ・TMB発色系が吸光度測定の見出し感度及び肉眼判定の容易さから最も優れていた。この際、9社のペルオキシダーゼについて比較検討したが検出感度・安全性・非特異反応の有無から1社だけが適していた。③既報のものも含め、PCRプライマーの設計によって増幅の偏りやハイブリダイゼーション反応の低下が認められた。

【考察】

MRHAの諸条件を検討し、HLAクラスI DNAタイピングの実用的な方法を設定した。この技法は、①全工程を37°Cあるいは室温で行うことができる、②シグナルの閾値が明確で肉眼判定も容易であるという特長を持つ、簡便性・正確性・安全性に優れた技法である。

8

死体腎移植希望患者のHLA class I の
retyping 検査に適したDNA検査法

○金 信子、高橋孝喜

虎の門病院輸血部

【目的】

昨年の本学会に於いて、死体腎移植の登録患者およびオンコール時のDRB1遺伝子のDNAタイピングについて報告した。今回、同登録患者のclass Iのretyping検査を念頭に、PCR-MPH法によるA座およびB座のlow resolution レベルのDNAタイピング検査を試行したので報告する。

【方法】

既報の如くPCR-MPH法を実施した。すなわち、抽出DNAをビオチン標識プライマーを用いて増幅し、プローブを固定したプレート上でハイブリダイズさせ、ペルオキシダーゼ・アビジンによる発色を吸光度計で測定した。各ウエルの測定吸光度、カットオフ値から陽性陰性を判定し、判定表から抗原を決定した。また、上記の測定吸光度、カットオフ値から、自動的に蓋然性のある抗原を導き出す[MPH自動解析プログラム]を試用した。

【結果】

DRB1検査と同様、一日に数十件の検査が可能であり、DNA抽出後、約4時間で判定できた。B座に関してカットオフ値の設定の関係で自動判定が困難なケースもあったが、PCR-MPH法およびその自動解析プログラムは大量検体処理に有用であった。

【考察】

移植希望患者の登録時の血清学的検査によるHLA class I抗原を見直すため、A座およびB座のlow resolution レベルのDNAタイピングの検討が重要である。

個々の検査に時間的制約は少ないが、大量検体処理が可能で判定が明確な方法が求められる。今回、検討したPCR-MPH法によるA座およびB座のlow resolution レベルのDNAタイピング法および自動解析プログラムは、カットオフ値の設定や蓋然性のある抗原の決定法など一部に改良の余地があるが、複雑な型判定を補助する意味から有用と考えられた。

9

献腎移植希望登録者で血清学的にタイプしたHLAクラスI抗原型とHLAクラスI DNA検査による遺伝子型の相違

○渡辺真穂、栗田麗子、小河原悟、兼岡秀俊、
内藤説也
福岡大学病院 腎センター

【目的】

九州、沖縄ブロックの献腎移植希望登録者でHLA-クラスIのDNAタイピングを行なった。既登録されている血清学的にタイプされたHLA型と比較し、どの程度の相違がみられるかを知る。

【対象】

昨年度、当施設で実施された九州、沖縄ブロック献腎移植希望登録者HLA-DR DNA検査で血清学的にタイプされたHLA型と相違のあった既登録者26名。

【方法】

DNA抽出は中外診断科学前処理試薬を用い、HLA-クラスI DNAタイピングはINNO-Lipa (INNOGENETICS)、Micro-SSP(OneLambda)のキットを用いて操作を行なった。

【結果】

HLA-A locusに関しては抗原が異なっていたもの2例、A9からA*2402にスプリット決定したものの3例。B - locusに関しては抗原が異なっていたもの5例、スプリット決定したものではB15→B*1501 2例、B12→B*4403 1例、B5→B*5101 1例であった。またブランクが埋まったものは3例であった。初回登録では存在していた抗原が今回の検査でブランクとなったものは、A - locusでは2例、B - locusでは無かった。

【考察】

A - locusに関してはミスタイプはほとんどなかったが、B - locusに関しては登録データと異なる例が認められた。今回の検査対象者26名のうち10名が1985年以前に初回登録で、16名が1986年以降の登録であった。登録データとDNAタイピングとの不一致例は初回登録が85年以前の登録者に多く認められた。今後、症例を増やし、HLA-Class IのDNAタイピングを行い、データの再確認の必要性が考えられた。しかし、タイピングに要する時間短縮など方法の改善も必要であった。

10

Amplificor DRBキットの評価：日本臓器移植ネットワーク関東甲信越ブロックでの使用経験

○平田蘭子、今井厚子、吉田佐織、仲山節子¹⁾、
安尾美年子²⁾、奥田 誠³⁾、櫻井悦夫⁴⁾、
岩上 薫⁵⁾、岸野光司⁶⁾、川島けえ子⁷⁾、
平井洋介⁸⁾、徳竹佐智夫⁹⁾、伊藤たまえ¹⁰⁾、
本間康夫¹¹⁾、加茂谷邦彦¹²⁾、前田平生

¹⁾ 埼玉医科大学総合医療センター輸血部、東大医科研病院臓器移植生理学研究部、²⁾ 東京女子医科大学腎センター、³⁾ 東邦大学大森病院輸血部、⁴⁾ 東京医科大学八王子医療センターHLA検査センター、⁵⁾ 横浜市立大学医学部附属病院輸血部、⁶⁾ 自治医科大学病院輸血部、⁷⁾ 総合太田病院臨床検査科、⁸⁾ 三恩会島田記念病院検査科、⁹⁾ 長野赤十字病院中央検査部、¹⁰⁾ 新潟県立中央病院検査科、¹¹⁾ 信楽園病院検査室、¹²⁾ 立川総合病院臨床検査科

【目的】

日本臓器移植ネットワークでは、現在DR抗原についてはDNAタイピングが導入されている。今回、多施設により Amplificor DRBタイピングキットを検討、評価する機会を得たので報告する。

【対象と方法】

関東甲信越ブロックで登録された腎移植希望者で、13HLA検査センター、1917名の患者を対象とした。検査結果は、それぞれ1, 2, 4, 6, 8でスコア化し、反応パターンによりアリル(グループ)を判定した。

【結果】

1. 各プローブの反応性・特異性：各プローブの反応は、基本的にExtraの反応は見られなかった。しかし、反応強度は、プローブおよびラボ間で異なり、陽性中の6,8スコアの%は、80.1%~100%と異なっていた。2. プローブ設計上の問題点：1) DR2, 12とDRB5：DR2に関してはDRB5によってDRB1アリルを推定した。また、DRB1*12がある場合、DRB5*02か*0102かの区別ができなかった。2) DR4, 8：DRB1*04としては、0401, 0403/6/7, 0404/, 0405/10の4つのサブグループの区別ができた。しかし、04, 08のヘテロではサブグループの判定は困難であった。3) DR13, 14：DR13ホモまたは1301/2, 1405か区別できなかった。DR14は、1401/7, 1405/, 1406/2, 1403/12の4サブグループの区別が可能であった。しかし、1401/7の反応パターンは1405を含んでいた。

【考察】

Amplificor DRBタイピングキットは、多くのDRB1アリルについては2桁レベルでは確実にタイプされた。しかし、特定のアリルの組合せでは、判定不能例もあった。当日は、本キットによってタイプされたDRB1アリル頻度についても発表する。

11 High Resolution HLA-DQB1 Typing by Combination of PCR-RFLP and PCR-SSCP

○Myoung Hee Park, Dong Hee Whang,
Su Jin Kang
Department of Clinical Pathology, Seoul
National University College of Medicine,
Seoul, Korea

【Objective】

To develop a reliable method for high-resolution HLA-DQB1 typing using a combination of PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) and PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis.

【Methods】

The second exon of the DQB1 gene was subjected to PCR using generic primers and digested with two restriction enzymes, MspA1I and HaeIII, and the DQB1 alleles were divided into seven groups. According to the RFLP patterns, appropriate group specific primers for DQ5, 6 and DQ2, 3, 4 groups were used to selectively amplify the alleles and the SSCP technique was used to distinguish the individual alleles.

【Results】

A total of 88 quality control samples of various ethnic groups distributed in the International Cell Exchange and HLA DNA Exchange programs and the ASHI/CAP Proficiency Tests were investigated by the PCR-RFLP/SSCP method. The concordance between our typing results and the consensus results of the surveys were 100%, and a total of 14 DQB1 alleles in 49 homozygous and heterozygous combinations were all correctly identified by the method described.

【Discussion】

For these quality control samples, correct DQB1 subtypes at the allelic level were assigned by 80-90% of the participating laboratories. Lower consensus was obtained for a relatively new allele, DQB1*0609 (< 60%) and certain heterozygous combinations of related alleles (e.g., *0602, *0603; *0603, *0604; *0301, *0302). The PCR-RFLP/SSCP method could correctly distinguish these alleles and allelic combinations. This method is accurate, economical and relatively easy to interpret and well suited for routine clinical and research uses.

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

○河田寿子, 成瀬妙子, 松澤由美子, 猪子英俊
東海大・医・分生2

【目的】

PCR-SSP(sequence specific primer) 法は多数の対立遺伝子特異的なプライマーを用いてPCR 反応を行い、標的の領域が増幅されたか否かを確認する方法であるが、多数検体の解析は操作が煩雑で困難である。そこで我々はリアルタイムPCR自動検出機を用い、電気泳動することなしに HLA クラス I、クラス II の SSP タイピングを行う系を確立したので報告する。

【方法】

クラス I の HLA-C 遺伝子については24組、クラス II の DRB1 遺伝子については12組のプライマーセットを用い、増幅領域の中央部に位置する非可変部に蛍光プローブを設定し、ABI社 TaqMan PCR Kit を使用してPCR を行った。PCR 増幅とシグナル検出は ABI 社 PRISM 7700 を使用した。

【結果と考察】

ホモ接合体細胞20種を含む既知 HLA タイプの細胞50種より抽出した高分子DNAについてタイピングを行ったところ、HLA-C、DRB1ともに既知の HLA タイプを検出可能で良好な結果を得た。中~高精度のタイピングが1時間40分で検出可能となった。本法では蛍光標識プローブが加水分解されたか否かを直接検出するため電気泳動を必要とせず、PCR 反応後の操作も不要であり迅速な結果判定が行えることから、従来法に比べ大幅な時間短縮が可能である。現在A、B 遺伝子についても検討を行っており、クラス I 遺伝子の迅速なタイピング法として組織適合性検査や疾患感受性因子の検索に貢献できると考える。また、蛍光標識プローブ作成を必要としない新たな蛍光色素サイバークリーンを用いたタイピング、複数蛍光色素によるタイピングの可能性の検討もおこなっている。

13

臍帯を用いたMHCクラスI、クラスIIのDNAタイピング

○荒木延夫¹⁾、秋田真哉¹⁾、合志博司¹⁾、能勢義介¹⁾、
神前昌敏¹⁾、三戸壽¹⁾、藤林由佳²⁾、原 宏²⁾

¹⁾兵庫県赤十字血液センター

²⁾兵庫医科大学輸血部

【目的】

最近、臍帯血は造血幹細胞の供給源として注目され、本邦においては9カ所の臍帯血バンクが設立されている。このような状況下において、血液センターの協力の役割の一つとしてHLAタイピングがある。我々は臍帯血バンキングに不可欠のHLAタイピング検査用臍帯血の消費量を少なくする試みとして、第20回日本造血細胞移植学会（1997年）にTCGFによる微量臍帯血からのHLAタイピングを報告した。今回、その方法以外に臍帯よりDNAを抽出し、MHCクラスI、クラスIIのDNAタイピングを実施したので報告する。

【方法】

臍帯はDNAの抽出まで-20℃の冷凍庫に保存した。DNAの抽出は臍帯をプロテイナーゼKで処理後、DNA抽出キット（チオシアン酸グアニジン法）を用いて実施した。MHCクラスI、クラスIIのDNAタイピングはワンラムダ社のマイクロSSPを用いた。

【結果】

臍帯血由来リンパ球、TCGF培養細胞、臍帯のMHCクラスI、クラスIIのDNAタイピング結果は100%一致した。

【考察】

現在、臍帯血バンクにおいては、臍帯血移植前の臍帯血のHLAタイピングの再検査（確認検査）用に有核細胞を凍結保存している。しかし、本来処分される臍帯そのものを凍結保存しておくことにより、その代用品となり得、再検査用の有核細胞がすべて移植に供されることとなる。

14

HLAクラスIのアリル頻度と連鎖不平衡について

○斉藤敏、大田智、瀬下秀幸、橋爪清隆、
山田英世

長野県赤十字血液センター

【はじめに】

HLA遺伝子座は第6染色体短腕（6p21.3）に位置しクラスI、クラスII、クラスIIIに大別され多型性に富んでいる。クラスIではHLA-A、B、C座に、クラスIIではDRB1、DQB1、DPB1座に特に多く多型が存在する。日本人におけるクラスIIの遺伝子頻度や、ハプロタイプ頻度についての報告は数多くあるがクラスIについては徳永らの報告を除き報告されていない。今回、これら遺伝子座のアリルタイピングを実施し、HLA-AからHLA-DPB1までのハプロタイプの多型と連鎖不平衡について解析した。

【材料と方法】

非血縁日本人371人の末梢血よりDNAを抽出した。HLA-A、B、DRB1、DQB1、DPB1座のアリルタイピングにはPCR-RFLP法を実施し、PCR-RFLPで識別できないアリルとHLA-C座のタイピングにはPCR-SSP法を実施しアリルを決定した。

【結果と考察】

多型性が最も高かったB座を中心に考えた際、HLA-AからDPB1までそれぞれ特徴ある一つのハプロタイプが非常に良く保存されているB座アリル、数種類のハプロタイプが推定されたB座アリル、特徴あるハプロタイプが推定されなかったB座アリルの存在が推定された。

HLA-B座の同じアリルでの連鎖不平衡の違いや、特徴あるハプロタイプの保持を解析することは、アリル誕生の歴史的背景や、日本人の起源・拡散を知る人類遺伝学的な研究や法医学での個人識別などの有効なマーカーになると考えられる。また、現在骨髄バンクによる骨髄移植は、HLA-A、B、DRB1のフルマッチもしくは1座ミスマッチによりドナーが選択されているが、ハプロタイプの解析により、これら遺伝子座の1ミスマッチがC、DQB1、DPB1の3ミスマッチになる可能性も推定されるため、移植分野においてもハプロタイプ解析は有効なマーカーとなりうる。

15 家系からHLA遺伝子タイピングで得たハプロタイプの検討

○中島文明, 中村淳子, 横田敏和, 諏訪城三
神奈川県赤十字血液センター

【目的】

1984年12月より, 骨髄移植を目的とした334家系のHLAタイピングを行ってきた。1995年4月からは遺伝子タイピングを導入し, 89家系のデータが蓄積された。これを元に日本人に存在する実際のハプロタイプについて検討する。

【方法】

遺伝子タイピングは検査した時期により異なるが, 自家調製試薬ではPCR-SSP法, PCR-SSOP法, PCR-SSCP法, PCR-RFLP法, 市販キットでは湧永製薬のPCR-MPH法, Innogenetics社のLine Probe Assayをそれぞれ組み合わせ, A, B, C, DRB1, DRB345, DQA1, DQB1, DPB1領域を出来得る限り調べた。これらのデータから両親のハプロタイプを組み立て, 実際に存在する各領域の連鎖を検討した。

【結果】

従来から解明されている高頻度なハプロタイプについてはここでは省略する。A*0206-Cw*1402-B*5101 (3例), A*0201-Cw*1502-B*5101 (2例)といった対照的な連鎖, Cw*0801-B*4801 (6例), Cw*0803-B*4801 (3例), Cw*0303-B*4801 (2例)といったB48を中心とする連鎖, Cw*1502-B*4006 (3例), Cw*1502-B*4002 (3例), Cw*1502-B*4001 (2例)といったCw*15を中心とする連鎖など, Cローカスを基点として特徴的なハプロタイプが数例ずつ見いだせた。

【考察】

今回検討した結果は, 家族内に何らかの疾患を持つデータが元になっているため, 必ずしも正常日本人集団のデータとして捕らえられない面もある。しかしながら, 移植医療において, より適確なdonorとrecipientのmatching coordinateを行うためには重要なデータになると考える。最近, CローカスはNK活性に関連があると注目されているが, ハプロタイプを考える上でも重要な位置にある。また, 臍帯血移植では1座不一致が許容されるが, この異なった1座に何が連鎖しているかを把握しておくことは非常に重要なことであると考えられる。

16 妊娠中のサイトカイン産生におけるHLA-Gの役割

○下嶋典子, 安藤稔, 川崎明彦, 岸田学, 石谷昭子,
羽竹勝彦

奈良県立医科大学法医学教室

【目的】

HLAクラスI b遺伝子の一つであるHLA-Gは多型性が著しく少なく, その発現が胎盤トロホブラストに局限されていることから, これが胎児を母体の拒絶から保護しているのではないかと考えられ注目されてきた。さらに最近, 妊娠維持には母体脱落膜におけるサイトカインが重要であるという報告も注目されてきている。そこで, 我々は今回, HLA-Gの発現が脱落膜のサイトカインに及ぼす影響を調べるため, HLA-Gに対する脱落膜単核球, 妊婦末梢血単核球のサイトカイン産生能について検討を行ったので報告する。

【方法】

妊娠7~9週の人工妊娠中絶9症例より患者の同意を得て, 末梢血および脱落膜を得, Ficoll-Hypaque法により単核球を分離し, responder cellとした。γ線照射したK562, 221, 221-G1をstimulator cellとして, responder cellと1:1の割合で48時間混合培養した。その培養上清中のTNF-α, IFN-γ, IL-4, IL-10をImmunoassaykit (BIOSOURCE)を用いてELISA法で測定した。

【結果】

末梢血単核球はHLA-Gと反応することによりTNF-αの産生が抑制され, IL-10の産生は増強される傾向が認められたが, IFN-γ, IL-4については明らかな差はみられなかった。脱落膜単核球ではHLA-GによりIFN-γの産生が抑制され, IL-10さらにTNF-α産生は増強される傾向が認められたが, IL-4については明らかな差が得られなかった。TNF-α, IFN-γはTh1細胞やNK細胞より産生され, 妊娠維持に不利なサイトカイン, IL-4, IL-10はTh2細胞より産生され妊娠維持に有利なサイトカインであるとされている。TNF-αについては, HLA-Gにより末梢血単核球で産生が抑制され, 脱落膜単核球では増強される傾向が認められた。IFN-γでは, 脱落膜単核球で産生の抑制傾向がみられたが末梢血単核球では特に差は認められなかった。これは, 末梢血単核球と脱落膜単核球のサブセットの違いからくるものと考えられる。しかしHLA-Gとサイトカインの関係については, 今後さらに詳細な検討を加えていかなければならないと考えられる。

17

Bare lymphocyte syndrome患者細胞での
HLA-E抗原発現

古川宏¹⁾、○屋部登志雄¹⁾、D.E. Geraghty²⁾

¹⁾ 日本赤十字社中央血液センター研究部

²⁾ Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, USA)

【目的】

非古典的クラスI抗原であるHLA-E抗原は β_2 ミクログロブリンと結合して広範囲の細胞で発現し、その結合ペプチドは他のクラスI分子のシグナルペプチドの一部という特徴をもつ。HLA-E抗原はわずかな多型しか報告されていない。NK細胞受容体のCD94/NKG2複合体は標的細胞表面上のHLA-E抗原を認識する。突然変異細胞株を用いた解析からHLA-E分子の細胞表面発現はHLA-A,B,C抗原と同様にTAP複合体に依存すると報告されている。今回はTAP1遺伝子にスプライス異常を起こす突然変異のためHLA-A,B,C分子が細胞表面未発現のBare lymphocyte syndrome(BLS)患者細胞を解析しHLA-EのTAP依存発現様式について検討した。

【方法】

BLS患者より末梢血単核球層を分離し抗HLA-E抗体3D12で染色しフローサイトメーター解析を行った。また患者よりEBウイルスにより樹立したリンパ芽球様細胞株(EBV-LCL)KMW-B2をHLA-E結合ペプチドおよび β_2 ミクログロブリン存在下、あるいは非存在下で培養後、同様に解析した。

【結果と考察】

BLS患者末梢血T,B,NK,単球細胞いずれにおいてもHLA-E分子の細胞表面発現が検出された。発現量は単球では健常者と同等であり他の細胞群では健常人に較べわずかに低かった。一方EBV-LCLでは健常人由来のH39細胞ではHLA-E分子が表面発現していたが患者由来のKMW-B2細胞での発現は見られなかった。しかしHLA-E結合ペプチドおよび β_2 ミクログロブリン存在下で培養したKMW-B2細胞では表面発現が検出された。以上より(1)HLA-E分子の細胞表面発現にはTAP依存性とTAP非依存性の2つの経路が存在していること、(2)TAP非依存性経路はEBV-LCL細胞中では抑制されている可能性が示された。

18

HLA-DO遺伝子の多型性解析とその意義

○成瀬妙子¹⁾、河田寿子¹⁾、安西達也¹⁾、鍵谷雅彦²⁾、
巽典之³⁾、猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大・医・分子生命科学、²⁾横浜市大・眼科、

³⁾大阪市大・臨床検査

【目的】

HLA-DO遺伝子は、DOA遺伝子とDOB遺伝子より構成され、これまで機能不明のクラスII様遺伝子とされてきたが、両遺伝子がヘテロダイマーを形成し、クラスII抗原提示機構において、複合体としてDM分子の抗原ペプチド選択能を制御している可能性が報告された。そこで今回、HLA-DOA、-DOBの両遺伝子について多型性解析を行い、その意義について考察を行った。

【材料と方法】

材料は、第10回国際組織適合性会議で公認されたHLA-D抗原ホモ接合体細胞と、我々が授立した日本人由来D抗原ホモ接合体細胞計35種より抽出した高分子DNAを用いた。HLA-DOA遺伝子の第2～第5エクソン並びに-DOB遺伝子の第2～第5エクソンを増幅するプライマーセット計8組をイントロン部に設定し、PCR増幅産物を精製後、蛍光自動シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法にて塩基配列を決定した。

【結果】

DOA遺伝子では、8種の多型性が存在し、このうち6種が新たな塩基配列を含んでいることが明らかとなったが、これら8種の多型はいずれもアミノ酸の変化を伴わない同義置換であった。DOB遺伝子では現在までに3種の対立遺伝子が発見されたが、これらもやはりアミノ酸の置換は認められなかった。

【考察】

DO遺伝子においてはDOA,DOB共にアミノ酸の変化を伴う多型は認められなかった。しかしながらDO遺伝子はマウス、ラットをはじめとしてウサギ、ヒツジ、ウシ、クジラなどにも存在することが報告されており、ヒトとの塩基配列レベルでの相同性は80%以上であることから、種を超えてこの遺伝子がよく保存されていることが推測される。以上の結果より、HLA-DO遺伝子はその機能上、非多型性を保つ淘汰が働いていたと想像される。

19 HLAクラスIII領域のマイクロサテライトマーカー

○牧野悟士¹⁾、田宮元¹⁾、岡晃¹⁾、富沢麻衣子¹⁾、
太田正穂²⁾、勝山善彦³⁾、椎名隆¹⁾、猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学2、²⁾ 信州大学医学部法医学
教室、³⁾ 信州大学病院薬剤部

【目的】

我々はこれまでHLAクラスIII領域C2遺伝子からI κ BL遺伝子間の約381kbにおよぶ塩基配列を決定した。この塩基配列中には遺伝的多型を示すことが期待される、数多くの繰り返し配列を含んでいた。本研究ではこれらの繰り返し配列のうち、多型の検出が容易なマイクロサテライト繰り返し配列について着目した。

【方法】

3つのPACクローンからショットガン法によりランダムクローンを調製し、その塩基配列を自動シーケンサー377XLを用いて決定した。得られた配列はコンピュータ上にてGENETYX- Σ /SQを用いてアセンブリした。その後Sputnikプログラムによってマイクロサテライト繰り返し配列の検出と分類を行った。さらに、多型性を示すことが期待されるいくつかのマイクロサテライト繰り返し配列に関しては、蛍光ラベルしたPCRプライマーを設計し、健常人100人を用いて多型性検索を行った。

【結果】

使用した3つのPACクローンがもつインサート長はそれぞれ218,148bp、99,427bp、157,976bpであり、最終的に381,519bpを検索の対象とした。この領域内に38個の2塩基繰り返し、38個の3塩基繰り返し、60個の4塩基繰り返し、31個の5塩基繰り返しの計167個を見いだした。

【考察】

検出されたマイクロサテライト繰り返し配列のうち、10回以上の2塩基繰り返しを持つものは16個存在し、3塩基、4塩基、5塩基の繰り返し配列についても5回以上の繰り返しを持つものがそれぞれ20個、21個、3個であった。現在、これら計60個の繰り返し回数が比較的多いものに関して多型性マイクロサテライトマーカーの設定を試みている。60個すべてにマーカーが設定された場合、6.3kbに一つの平均解像度となるマーカー遺伝子座が得られることになり、疾患との相関解析に有用なツールとなることが期待される。

20 HLA-C遺伝子近傍に位置するSC1の多型解析

○寺岡佳夏¹⁾ 成瀬妙子¹⁾ 岡晃¹⁾ 松澤由美子¹⁾
椎名隆¹⁾ 小澤明²⁾ 大城戸宗男²⁾ 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学 医 分子生命2 ²⁾ 東海大 医 皮膚科

第6染色体短腕21.3に、尋常性乾癬原因遺伝子存在の可能性が示唆されている。多民族にわたってHLA-Cw6とC遺伝子周辺との強い連鎖が認められ、尋常性乾癬患者について我々は、一般健常人とのマイクロサテライト多型の比較より、HLA-Cからテロメア側約100kb付近が原因遺伝子候補領域であることを予測した。この領域にはSC1 (TCF19)、OCT3(POU5F1)、S遺伝子等の遺伝子が存在しているが、S遺伝子に関しては発症と無関係であることを既に報告した。そこで今回、HLA-C遺伝子から120kbに位置するSC1遺伝子の多型解析を行い、HLA-C遺伝子との連鎖解析を行うことにより、SC1遺伝子が乾癬の原因遺伝子であるか否かを決定することを試みた。

SC1はマウスの系では細胞周期調節因子としてよく知られているが、ヒトでは繊維芽細胞で約2.5kb長のcDNAが単離されたとする報告のみである。ヒトSC1多型を検索するため、12種のEBウイルス形質転換細胞株、76人の患者、100人の一般健常人末梢血からDNAを単離精製し、PCRで増幅後、直接塩基配列決定法によるDNA配列の決定と、PCR-SSCP法との組み合わせにより変異多型の有無を調べた。

その結果、既に報告されていたDNA配列に誤りがあることが判明し、SC1は345アミノ酸からなる分子量約38kDaの蛋白質をコードすると考えられた。多型性については、乾癬患者及び一般健常人の双方でイントロン1に1種、エキソン2に3種、イントロン2に1種、合計5種類が検出された。またエキソン2では、2種は非極性アミノ酸間の置換であった。すなわちValからMetへの、また細胞調節因子として重要と考えられるProからLeuへのそれぞれ変換であり、蛋白質として分子構造上機能が保持された構造形成が可能かどうか注目される。またイントロン2に関しては、エキソン3の7塩基上流に4塩基の欠失が見られ、これはスプライシングの際、投げ縄構造に含まれる領域であるために、正常にスプライシングが行われているのかという点でも興味深い。

21

MICA遺伝子多型の解析：新たなMICA遺伝子アリルの発見と日本人集団における対立遺伝子頻度

○大淵信久, 高橋めぐみ, 有村卓朗, 木村彰方
東京医科歯科大学 難治疾患研究所 成人疾患分子病態

【目的】

HLA-B 遺伝子の近傍に位置する MICA 遺伝子は、まだその機能が明らかでないものの、上皮系細胞に強く発現しHLA-class I 遺伝子に類似した構造を持ち、その産物が $\gamma\delta$ T細胞に認識されることから、何らかの免疫学的機能を担っていると考えられる。また、MICA 遺伝子は多型に富むことが報告されている。今回我々は日本人集団における対立遺伝子頻度を明らかにすることを目的として、MICA 遺伝子の多型を解析した。

【方法】

64株の10th HLA Workshop HTC および日本人健康者集団151名について、exon 2, 3, 5 をPCR-SSCP法およびSSOP法にて解析した。また、それぞれのアリルの塩基配列を確認した。

【結果】

HTCには12種のアリルが存在したが、そのうち1種は既報のアリルと異なる新しいもの(MICA new: MICA*002 と第139コドンのみ異なる)であった。また、MICA*008 は exon 5 の違いにより2種のアリル(MICA*008, MICA*008 new)に分類された。日本人集団には9種のアリルが認められ、その頻度はMICA*009 (38.7%), MICA*010 (30.0%), MICA*008 (27.3%), MICA*012 (26.0%), MICA*008 new (20.7%), MICA*002 (18.0%), MICA*004 (16.0%), MICA*016 (4.6%), MICA*007 (3.3%)であった。

【考察】

MICA対立遺伝子はこれまでに60種以上報告されているが、今回新たに1種を同定したため、人類集団としてはかなり多型に富むことが明らかになった。しかしながら、日本人集団では主に7種のMICAアリルが存在するのみであり、これは日本人集団が比較的均一であることに依存するためと思われた。

22

MICA遺伝子座における自然選択と突然変異

○大橋 順¹⁾、涌井美紀^{1,2)}、Daniel E. Geraghty³⁾、猪子英俊⁴⁾、徳永勝士¹⁾

¹⁾ 東京大学医学部人類遺伝学教室、

²⁾ 日本赤十字社中央血液センター、

³⁾ Human Immunogenetics Program, Fred

Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA、

⁴⁾ 東海大学医学部分子生命科学

【目的】

MICA遺伝子は多型性に富んでおり、その遺伝子座はHLA-B遺伝子座から46kbセントロメア側に存在する。最近我々はMICA及びHLA-B遺伝子のアリルタイピングを行い、MICAとHLA-B遺伝子との間に強い連鎖不平衡が存在することを見出した。HLA-B遺伝子座にはある種の平衡選択（自然選択）が働いており、近傍に位置する遺伝子はその影響を強く受けられる。また、MICA遺伝子の第3エクソンでは非同義置換が多数観察されており、MICA遺伝子自身にも自然選択が働いている可能性が考えられる。そこで本研究は、MICA遺伝子座における自然選択の強度（有無を含めて）や突然変異率を推定し、MICA遺伝子の分子進化を解明することを目的とした。

【方法】

最初に、MICAアリル間の関係を検討するため、NJ法を用いた系統樹およびネットワーク図を作成した。次に、HLA-B遺伝子の影響も考慮すべく、2遺伝子座を仮定したコンピュータシミュレーションを行い、MICA遺伝子座における自然選択強度及び突然変異率を推定した。

【結果】

エクソンごとの系統樹から、エクソン間で組換えは起きていないことが確認された。一方、ネットワーク図は、何回かの並行置換または遺伝子変換が起きたことを示した。コンピュータシミュレーションの結果から、MICA遺伝子座には弱い平衡選択が働いており、突然変異率はHLA-B遺伝子座に比べて低い可能性が示唆された。

【考察】

同じリネージに属する複数のHLA-Bアリルは、同じMICAアリルとハプロタイプを形成していたので、大部分のHLA-Bアリルは比較的最近生じたと思われる。シミュレーションの結果はこの観察事実とも符合するものであり、妥当なパラメタ推定が行われたと考えられる。

23

MICA-MICB nullハプロタイプと簡便な MICA deletionの検出法

○涌井美紀^{1),2)}、徳永勝士¹⁾、石川善英²⁾、
 柏瀬貢一²⁾、安藤等³⁾、中島文明⁴⁾、椎名隆⁵⁾、
 猪子英俊⁵⁾、十字猛夫²⁾

¹⁾ 東京大学医学部人類遺伝学

²⁾ 日本赤十字社中央血液センター

³⁾ 神奈川県湘南赤十字血液センター

⁴⁾ 神奈川県赤十字血液センター

⁵⁾ 東海大学医学部分子生命科学

【目的】

我々は、多型性に富むことが知られているMHC class I chain-related gene A (MICA)とHLA-Bとの間に連鎖不平衡が存在することを解析し、報告してきた。その中で同定したB*4801と関連しているMICA-MICB nullハプロタイプの解析と、MICA deletionの簡便な検出方法を検討した。

【方法】

健常者からホモ接合のB*4801の検体を集め、欠失の解析を行った。Mizuki et al. (1998)、Shiina et al. (1998)が報告したHLAクラスI領域の塩基配列を基に、PCRを用いて、欠失の範囲を推定した。次に欠失を起こしたと思われる領域をはさんでロングPCRを行い、その全長をダイレクトシーケンス法により解析した。このシーケンスに基づき3種のプライマーペアーを設定し、日本人集団試料 (N=222) を用いてPCR-SSP法を行い、MICA deletionの検出を行った。

【結果と考察】

MICBとHLA-Bとの間でPCRを行った結果、MICAからセントロメア側に約70 kbとテロメア側に約12 kbの領域に及んでPCRの増幅が得られなかった。次にその欠失を含んでロングPCRを行い約4.1 kbのフラグメントを得た。この全長をダイレクトシーケンスしたところ、中間の約3.2kbの領域のどこかでMICA遺伝子の全長を含み、約100kbにおよぶ大規模な欠失が起こったと考えられた。また、このハプロタイプはMICBもストップコドンが入ったnullアリル (MICB0107N) を持ち、MICA、MICBのどちらも発現していないと考えられた。さらに、3種のプライマーペアーを混合したPCR-SSP法を行った結果、B48を持たない個体からはMICA deletionは検出されず、このハプロタイプがよく保存されたものであることを再確認した。

24

HLA 領域 6p21.3 上に存在する beta1,3 ガラクトース転移酵素遺伝子シーケンシング解析

○吉川枝里¹⁾、椎名 隆¹⁾、金子美華²⁾、成松 久²⁾、
 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医、²⁾ 創価大・生命研

【目的】

糖鎖構造において最もよく知られるアロ抗原はABO式やルイス式などの血液型抗原である。我々はこのABO式やルイス式の血液型を決定している糖転移酵素遺伝子が第6染色体HLA領域6p21.3と相同性(paralogous)を示す第9染色体(9q33-34)および第19染色体(19q13.3)上にそれぞれ存在することを明らかにした。また、6p21.3上にもbeta1,3ガラクトース転移酵素遺伝子(betaGalT4)はHLAクラスIIセントロメア側に位置することを明らかにしている。そこで、本研究では、この遺伝子含む領域の塩基配列を決定することを目的とした。ちなみに、このbeta1,3GalT4遺伝子のラットの相同遺伝子は、GM1合成酵素遺伝子であることが証明されている。

【方法】

6p21.3上に存在するbetaGalT4遺伝子を含むコスミドクローン64(Kikuti et al, 1997)の塩基配列を決定し、既知の塩基配列との相同性解析を行った。

【結果】

betaGalT4遺伝子陽性であったコスミド64の塩基配列を決定した結果、その塩基数は44869bpであり、既知の塩基配列との相同性解析の結果、6つの遺伝子(HKE2, BING4, BING5, betaGalT4, RPS18, ARE1-hom)が見い出された。betaGalT4遺伝子はBING4とRPS18遺伝子間の3kbの狭い領域に存在し、1.5kbの1つのエクソンから構成されていた。

【考察】

betaGalT4遺伝子が存在した領域はマウスの T/t 領域に相当すること、また、ラットのbetaGalT4の発現は胎生期に最も高くなることから、このbetaGalT4は精細胞の分化や発生初期に関わる可能性がある。

25

HLA領域と相同性を示す第1染色体1q22-23領域の遺伝子構造解析

- 重成敦子¹⁾、安藤麻子¹⁾、数藤由美子²⁾、
笠井文生³⁾、椎名隆¹⁾、河田寿子¹⁾、香田淳⁴⁾、
奥村克純⁴⁾、添田栄一⁵⁾、池村淑道⁶⁾、猪子英俊¹⁾
¹⁾東海大・医・分子生命科学、²⁾日赤中央血液セ・研究部、
³⁾東大・院理・生物科学、⁴⁾三重大・生物資源、⁵⁾理研・筑波セ、⁶⁾遺伝研・進化遺伝

我々は、HLA領域の大量シーケンシングと構造解析を進めていく過程で同定した遺伝子のなかで、HLA領域の遺伝子と相同性を有する遺伝子をヒト第1染色体1q21-25、第9染色体9q33-34、第19染色体19p13.3の各領域に多数みいだした。これら3領域のゲノム構造をHLA領域と比較、解析することにより、MHCの起源と進化の過程を解明することを目的として、今回は非古典的MHC遺伝子であるCD1遺伝子が存在する1q22-23領域について、YACとPACとBACクローンを使用し、この領域にマップされると考えられる遺伝子とSTSプライマーを用いたPCR、サザンハイブリダイゼーション、PACクロンの末端シーケンス、FISH解析により、この領域のコンティグを作成し、構造解析をおこなった。

その結果、5個のCD1遺伝子を含む1.8Mbの領域のYACとPACとBACのコンティグを作成した。PACクロンの末端シーケンスとPCR解析からこのコンティグには、セントロメア側からCD1D-CD1A-CD1C-CD1B-CD1E-SPTA1-MNDA-IFI16-FY1-FCERIA-KRTC7-CRP-CRPP1-APCS-KIAA0120の順序に15遺伝子が位置することが明らかになった。これは、PACクローンを用いたFiber-FISH法によっても確認された。また、KIAA0120遺伝子のテロメア側の領域を含むと考えられるYACクローンを用いたPCR解析から、セントロメア側からKIAA0120-ATP1A2-LYAM-(CD48-LY9-PPOX)-USF1-(EAT2-PBX1)-ALDH9-RXRG-SCM-POU2F1-CD3Z-ATAC-(FV-ELAM1-LNHR)-FMO1-FASLの順序で遺伝子が位置していた。

以上の解析から、1q22-23領域には免疫応答に必要な遺伝子が、見いだされた34個のうち、少なくとも21個、存在することが明らかになった。また、現在、このPACコンティグのなかで、CD1遺伝子群を含む1Mbの領域についてショットガン法によるシーケンシングを行っている。

26

HLA クラスI領域の構造と進化

- 椎名 隆¹⁾、田宮 元¹⁾、岡 晃¹⁾、水木信久¹⁾、
後藤香織¹⁾、寺岡佳夏¹⁾、瀧嶋伸貞¹⁾、吉川枝里¹⁾、
岩田京子¹⁾、富澤麻衣子¹⁾、奥秋記子¹⁾、
桑野裕子¹⁾、山形哲司¹⁾、板倉祥子²⁾、福住康仁²⁾、
菅原智代²⁾、渡辺幸治²⁾、小野綾子²⁾、山崎正明²⁾、
田代弘行²⁾、安藤麻子¹⁾、添田栄一⁴⁾、池村淑道³⁾、
木村 穰¹⁾、猪子英俊¹⁾
¹⁾東海大・医、²⁾不二家バイオ研、³⁾遺伝研・進化遺伝、
⁴⁾理研・ライフサイエンス筑波センター

【目的】

我々は疾患感受性遺伝子の同定やHLA領域の構成の機序を明らかにすることを目的として、クラスI全領域1.8Mbについての塩基配列を決定し、新規遺伝子や既知遺伝子を同定した。また、この塩基配列を基にHLAクラスI領域の進化の過程を解明したので、これらの成果について報告する。

【方法】

塩基配列の決定には、ショットガン法により行った。その後、BLASTを用いた相同性解析ならびにGrailおよびGENSCANを用いたエクソンあるいは遺伝子の予測をそれぞれ行い、遺伝子を同定した。また、Dot matrix解析、各遺伝子の遺伝的距離の推定により、HLAクラスI領域の進化を追及した。

【結果および考察】

MICB遺伝子よりHLA-F遺伝子までの塩基数は1,796,938bpであり、この領域内に、53個の既知遺伝子、74個の新規遺伝子の計127個が同定された。したがって、この領域は14.1kbに1個という高い遺伝子密度を有しており、この値は、クラスII領域(25.0kbに1個)より高く、クラスIII領域(14.3kbに1個)とほぼ同様であった。

MICAとMICB遺伝子の上流側50kbに認められた大規模な遺伝子重複はMICD、MICEおよびMICF(新規遺伝子)の上流側にもそれぞれ認められた。さらに、HLA-J~HLA-F間の300kbについては、このMICE領域からMICA領域へのduplication(倍化)を起点として、クラスI遺伝子を含む領域が少なくとも7回の重複を起こして形成されたものと予想された。すなわち、HCGII-HLAクラスI-HCGIV-P5-3.8-1-HCGIX-MICを繰り返し基本ユニットとする倍化がクラスI領域の形成の原動力であると考えられた。クラスII領域ではこのような重複が認められないことから、クラスI領域の形成にゲノム倍化が大きく貢献し、しかもその原型をとどめていること、すなわち、クラスI領域はクラスII領域に比べて、進化的に新しく形成されたことをしめしているのかもしれない。

27

ペプチド結合アッセイを用いたHLA-A33 (A*3303) 結合ペプチドの解析

○松田智子、富山宏子、滝口雅文

熊本大学エイズ学研究センター・ウイルス制御分野

【目的】

HLA-A33 (A*3303) 結合自己抗原ペプチドの解析から、A*3303結合ペプチドのアンカーは2番目(P2)のAla, Ile, Leu, Phe, Tyr, ValとC末端のArgである事が明らかになっている。今回我々は、ペプチド結合におけるこれらのアンカーの役割を調べるために、これらのアンカーを含んだペプチドの結合を、ペプチド結合アッセイを用いて調べた。

【方法】

ヒト(2マイクログロブリン遺伝子を導入したRMA-S細胞(TAP欠損細胞)に、HLA-A*3303を導入してRMA-S-A*3303を作製した。以前に報告した方法(Takamiya et al. Int. Immunol. 8:1027, 1996)を用いて、A*3303とペプチドの結合を調べた。ペプチドはHIV-1 S2株由来のシーケンズからP2とC末端にアンカーをもった8-merから11-merを抜き出し、232個のペプチドを合成した。

【結果】

232個のペプチドのうち、119個(51.3%)がA*3303と結合した。結合ペプチドのうち高結合性、中結合性および低結合性を示したのが、それぞれ17, 37, 65個であった。高、中、低結合性を示したペプチドに、それぞれ3, 2, 1点のスコアを与えて平均値(MBS)を計算し比較したところ、P2にTyr, Pheをもったがペプチドの方が、Ile, Leu, Ala, Valをもったペプチドより高い値を示した。一方ペプチドの長さとの結合を検討した所、9-merが最も結合しやすく、8-merの結合は著しく低下した。

【考察】

51.3%のペプチドが結合した結果から考えて、A*3303結合自己抗原ペプチドの解析から得られたアンカーをほぼ確認できた。しかし、P2ではAla, Ileが他のアミノ酸より強いアンカーとして示されていたが、今回の解析ではむしろ弱いアンカーであった。

28

HLA-B5, B35 CREG分子において Bw4/Bw6エピトープがペプチド結合に与える影響

○曾場尾勇司、滝口雅文

熊本大学エイズ学研究センターウイルス制御分野

【目的】

HLA-B51, -B53, -B35分子はHLA-B5, B35 cross reactive group(CREG)に属すが、HLA-B*5101と-B*3501では結合ペプチドのC末端アンカーや結合親和性が異なると報告されている。HLA-B*3501と-B*5101はFポケットを形成するBw6/Bw4エピトープに加え、 α ドメイン上に8アミノ酸の相違があるが、HLA-B*3501と-B*5301はBw4/Bw6エピトープの5アミノ酸以外は同一である。そこで、これまで不明であったHLA-B*5301結合ペプチドのC末端アンカーを同定して、HLA-B*3501とのペプチドの結合を比較する事により、Fポケットの構造的相違が結合ペプチドのC末端アンカーや結合親和性に与える影響を調べた。

【方法】

HLA-B*5301, -B*3501, -B*5101分子を発現したTAP-2欠損RMA-S細胞を用いたHLA stabilization assayによって、ペプチドのHLA分子に対する結合親和性を解析した。

【結果】

P2にProをもち、C末端にHLA-B*3501結合ペプチドのアンカーと同じTyr, Phe, Met, Leu, Ileをもつ9-merのペプチド62種類のHLA-B*5301への結合親和性を解析した。HLA-B*3501ではC末端にTyrをもつペプチドが最も高い結合性を示すとされるのに対し、B*5301ではPheが最も高い結合性を示し、Ile, Tyr, Leu, Metの順に結合性が減少した。また、HLA-B*5301とB*5101拘束性CTLエピトープはそれぞれのHLA分子に対し同程度の結合親和性を示すが、HLA-B*3501拘束性CTLエピトープよりかなり低いことがわかった。また、同一ペプチドのHLA-B*5301とB*3501に対する結合性を調べたところ、HLA-B*3501に対しての方がHLA-B*5301より著しく高い結合性を示した。

【考察】

Bw6/Bw4エピトープはHLA-B5, B35 CREG分子に結合するペプチドのC末端アンカーだけでなく、結合親和性にも大きく影響していることが示された。

29

MHCクラスI リガンドを発現するDNAワクチンによるCTLの誘導：リステリアにおける3種のCTLエピトープの比較

○永田 年¹⁾、山田 孝²⁾、内山 啓³⁾、
吉田篤司¹⁾、内嶋雅人¹⁾、小出幸夫¹⁾

¹⁾浜松医科大学・微生物学

²⁾国立療養所天竜病院内科

³⁾引佐赤十字病院内科

【目的】

我々は細胞内寄生菌のモデルとしてリステリア (*Listeria monocytogenes*)を用いてCTL誘導型DNAワクチンを作製しその効果を検討している。リステリアの防御抗原であるリステリオリジンO(LLO)及びp60タンパク内のH-2Kd 拘束性のCTLエピトープ(LLO91-99, p60 217-225, p60 449-457)に相当する塩基配列のコドンをもウスに最適化して作製したCTL誘導型DNAワクチンをもウスに免疫し、各CTLエピトープのCTL誘導能及び感染防御誘導能を検討した。

【方法】

1) 各CTLエピトープの翻訳効率を検討するためルシフェラーゼ遺伝子とのキメラ遺伝子を作製しBalb/3T3細胞におけるその発現を検討した。2) 各CTLエピトープのCMV発現プラスミド (DNAワクチン) を作製し、BALB/cマウスに遺伝子銃法で1週毎に3回 (2mg DNA/回) 免疫した後、51Cr遊離法にてCTL活性を測定した。また免疫マウスに1X10⁴ CFUのリステリアを経静脈的に感染させ、2日後の脾臓における菌数を測定することにより感染抵抗性を検討した。

【結果】

1) コドンをマウスに最適化した各CTLエピトープとルシフェラーゼのキメラ遺伝子のマウス培養細胞における発現は、コドンを最適化していない場合と比較して有意に高かった。2) Balb/cマウスにおける各CTLエピトープのCTL誘導能を比較したところ、LLO91-99, p60 217-225で高い活性を認めしたが、p60 449-457では低い活性しか認められなかった。感染抵抗性についても同様の傾向を認めた。また、3種のエピトープを同時に免疫したマウスではLLO91-99, p60 217-225単独で免疫したマウスと同程度のCTL誘導能、感染抵抗性を示し、相加的効果は認められなかった。

30

尋常性乾癬感受性領域のマッピング解析

○岡晃¹⁾、田宮元¹⁾、富沢麻衣子¹⁾、牧野悟士¹⁾、
飯塚真利子²⁾、菅井順一²⁾、小澤明²⁾、太田正徳³⁾、
勝山善彦⁴⁾、椎名隆¹⁾、猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学2、²⁾ 東海大学医学部皮膚科学教室、³⁾ 信州大学医学部法医学教室、

⁴⁾ 信州大学病院薬剤部

【目的】

これまで尋常性乾癬はHLA-Cw6対立遺伝子との高い相関が知られていたが、その相関は完全ではなく、真の感受性遺伝子座はHLA-C遺伝子座の近傍に強く連鎖して存在すると推測されてきた。しかし、HLA-C遺伝子座周辺には多型性マーカーが少なく、高い解像度でのマッピング解析は行われていなかった。そこで、我々は、HLAクラスI領域に多くのマイクロサテライトマーカーを設定し、その多型性をもとに尋常性乾癬の感受性遺伝子座の詳細なマッピングを行うことを目的とした研究を行った。

【方法】

日本人尋常性乾癬患者76人と健康人集団136人を用いて、38個のマイクロサテライトマーカーの多型性検索を行い、患者対象群解析とハーディ・ワインベルグ検定を行った。また、それらのマイクロサテライトマーカーについてハプロタイプを推定し、ハプロタイプ解析を行った。

【結果】

患者対象群解析の結果、HLA-C遺伝子座からテロメア側の約200kbの領域内に存在するいくつかのマーカーが尋常性乾癬との相関をしめした。またハーディ・ワインベルグ検定の結果からも、同じマーカーがハーディ・ワインベルグ平衡からの偏差をしめした。ハプロタイプ解析の結果、HLA-C遺伝子座からテロメア側に約100kbと160kb離れた2つのマーカーに挟まれた約60kbに相当する領域が乾癬患者集団で共通されていると推測された。

【考察】

これらの結果から、尋常性乾癬の感受性遺伝子座は、HLA-C遺伝子座からテロメア側の約200kbの範囲内であることが示唆された。また、ハプロタイプ解析の結果から、乾癬患者集団内で共通して伝達されている可能性のある領域がさらに約60kb以内に絞り込まれた。これらのことから、尋常性乾癬の感受性遺伝子の少なくともひとつが、この領域内に存在する可能性が高いことが示唆された。

31

尋常性乾癬感受性領域のシーケンシング解析

○田宮元¹⁾、富沢麻衣子¹⁾、岡晃¹⁾、牧野悟士¹⁾、
飯塚真利子²⁾、菅井順一²⁾、小澤明²⁾、椎名隆¹⁾、
猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学2、

²⁾ 東海大学医学部皮膚科学教室

【目的】

我々のこれまでの解析から、尋常性乾癬の感受性領域はHLA-C遺伝子座のテロメア側約200kbに存在するという結果が得られており、さらにはこの領域内に7個の新規発現遺伝子を同定し、そのうちのいくつかに関しては尋常性乾癬の候補遺伝子たりうるということが明らかとなっている。そこで、これらの遺伝子の存在する領域に関して、尋常性乾癬発症の原因となっている変異を特定することを目的として、感受性領域の塩基配列を決定し、乾癬患者集団と健常人集団で比較した。

【方法】

尋常性乾癬の感受性領域を5kbずつに分別し、患者集団と健常人集団10人のゲノムDNAからPfuポリメラーゼを用いてLong-PCRで増幅したのち、各5kbの断片内に設計した内部プライマーを用いて直接塩基配列を決定した。このようにして決定された配列を乾癬患者集団と健常人集団で比較した。また、得られた5kbずつのPCR断片をクローニングして、塩基多型が見いだされた際に多型の相を確定し、組み換え型の判定を行った。さらには、統計的に有意な多型が見いだされた場合、その多型を乾癬患者集団76人全員と、健常人集団136人全員のゲノムDNAを用いて検索し、統計検定を行った。

【結果】

現在までのところ、尋常性乾癬感受性領域内に、1塩基置換、挿入を含む多くの多型を見いだしている。それらの多型のうちのいくつかは、エクソンコーディング領域内あるいはその近傍に位置していた。また、いくつかの多型は、乾癬患者集団と健常人集団間で高い統計的有意性を示した。

【考察】

いまだ配列比較の終了していない領域も含め、尋常性乾癬の感受性領域全体の配列を患者集団と健常人集団で比較することによって、乾癬患者集団のみに優先的に伝達されている多型性が特定されると期待される。このような多型性を保持する発現遺伝子が尋常性乾癬の候補遺伝子であることが強く示唆される。

32

尋常性乾癬感受性領域の発現遺伝子解析

○富沢麻衣子¹⁾、岡晃¹⁾、田宮元¹⁾、牧野悟士¹⁾、
飯塚真利子²⁾、菅井順一²⁾、小澤明²⁾、椎名隆¹⁾、
猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学2、

²⁾ 東海大学医学部皮膚科学教室

【目的】

我々のこれまでの解析から、尋常性乾癬の感受性遺伝子はHLA-C遺伝子座のテロメア側約200kbに存在するという結果が得られていた。そこでこの領域内に存在する新規の発現遺伝子を同定し、尋常性乾癬感受性遺伝子を特定することを目的として、RT-PCR、3'RACE、5'RACE、cDNAライブラリースクリーニングおよびエクソントラッピングを行った。

【方法】

まず、HLAクラスI領域のゲノム配列を、GRAILおよびGENESCAN等のコーディング領域予測プログラムにより、発現している可能性のある塩基配列を予測した。また、BLAST等の相同性検索プログラムを用いてEST配列との相同性を検索し、発現遺伝子配列を予測した。これらの情報をもとに、PCRプライマーを作成し、ケラチノサイトを含むさまざまなヒト組織由来のmRNAを鋳型にRT-PCRを行って、発現遺伝子の断片をクローニングした。さらに、その断片を用いて、3'RACE、5'RACE、cDNAライブラリースクリーニングを行い、目的とする遺伝子の全長をクローニングした。コンピュータープログラムによって発現遺伝子が予測されなかった領域に関しては、エクソントラッピングを行って発現遺伝子を同定した。

【結果】

現在までのところ、これらの解析の結果、尋常性乾癬感受性領域約200kb内にこれまで報告されていなかった7個の新規発現遺伝子を同定した。これらの遺伝子のうちいくつかは、ケラチノサイトでも発現していた。さらにいくつかの遺伝子に関しては、ケラチノサイト以外には、調べた組織での発現が確認されなかった。

【考察】

今回の研究によって、これまで報告されていなかった新規発現遺伝子7個を同定する事に成功した。これらの遺伝子のうちいくつかは、その発現パターンおよび推定されるアミノ酸配列から、尋常性乾癬の候補遺伝子となりうるということが示唆された。

33

心サルコイドーシスにおけるTNF周辺遺伝子の検索

○Nicolette Takashige¹⁾、成瀬妙子¹⁾、松森昭²⁾、
篠山重威²⁾、太田正穂³⁾、勝山善彦³⁾、
長井苑子⁴⁾、森本紳一郎⁵⁾、猪子英俊¹⁾

¹⁾東海大・医・分子生命科学、²⁾京大・医・循環病態学、³⁾信州
大学・医・法医、⁴⁾京大・医・胸部疾患研、⁵⁾藤田保健・内科

【目的】

我々は心サルコイドーシスにおけるHLA解析を行い、HLA -B67、-DQB1*0601、-DQA1*0103と相関が認められることを報告してきたが、最近、サルコイドーシス患者において、TNFA (Tumour Necrosis Factor A) 遺伝子の対立遺伝子であるTNFA2が有意に増加しているとの報告がなされた。そこで今回、TNFA及び新たにTNFB遺伝子とその周辺に位置する遺伝子について検討を行った。

【方法】

心サルコイドーシス患者26名と、一般健常者125名の血液より高分子DNAを抽出後、TNFA遺伝子のプロモーター領域とTNFB遺伝子の第1エキソンを増幅する2組のプライマーセットを用いてPCRによる増幅を行い、制限酵素Nco Iにより切断し、15%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、対立遺伝子を同定した。また、TNF遺伝子の周辺のマイクロサテライトマーカー、TNF-a、TNF-d、D6S273及びTAP遺伝子の近傍に位置するTAP1の4種についても多型解析を行った。

【結果】

心サルコイドーシス患者でのTNFA及びTNFB遺伝子の多型性について検討を行ったところ、TNFA2が患者群5例(19.23%)で、対照群2例(1.60%)に比して有意に増加していた($p < 0.00175$, $P_c < 0.003496$)が、すでに報告されている特定のHLA遺伝子との連鎖は認められなかった。マイクロサテライトマーカー4種については、TAP1での繰返し数190において疾患感受性($p < 0.0027$)を認めた。これらの結果より、心サルコイドーシスの発症には、HLA-DQ、TAP周辺に存在する遺伝子、およびTNFA遺伝子の関与が考えられた。

34

IgA腎症におけるHLAをはじめとする細胞表面抗原の発現

○田中智一郎、長谷川善之、吉武圭輔、野田律矢、
小河原悟、兼岡秀俊、内藤説也

福岡大学病院腎センター

【目的】

IgA腎症は糸球体メサンギウム領域へのIgAの沈着を特徴とする一部に予後不良の例もみられる糸球体疾患である。その発症にかかわる免疫反応におけるHLAや接着分子の関与を検討するために、免疫担当細胞上のこれらの分子の発現を解析した。

【方法】

IgA腎症患者30人、膜性腎症患者9人、健常者21人を対象とした。非刺激下と刺激下で解析し、非刺激下では、末梢リンパ球をフィコール比重遠心法によって分離し、蛍光標識モノクローナル抗体を用いた二重蛍光染色フローサイトメトリーによる解析を行い、刺激下では、分離した末梢リンパ球に抗CD3抗体を加え、3日間培養した後に解析した。解析したリンパ球表面抗原は、HLA class I、HLA-DR、CD3、CD4、CD8、CD20、CD11a、CD11b、CD56。

【結果】

1. 非刺激T細胞上においては、健常人、IgA腎症患者、膜性腎症患者の間には、HLA class I、HLA-DR、CD11a、CD11b、CD56の発現に差を認めなかった。
2. IgA腎症の患者においては、抗CD3抗体刺激後CD4陽性細胞上のHLA-DRが健常人、膜性腎症患者に比べて有意に増加していた。
3. IgA腎症でHLA-DR4 (+) 群は、抗CD3抗体刺激後CD4陽性細胞上のHLA-DRがHLA-DR4 (-) のIgA腎症の患者群に比べて有意に増加していた。
4. IgA腎症で1日蛋白尿1g以上の群は、抗CD3抗体刺激後CD4陽性細胞上のHLA-DRが1日蛋白尿1g未満の群に比べて増加傾向にあった。

【考察】

IgA腎症由来のTリンパ球では細胞膜表面のHLA-DR分子の発現が増加しており、このことによりTリンパ球自体に抗原提示機能を獲得し、T細胞の更なる活性化と、これによるBリンパ球の活性化をきたして、免疫グロブリン産生(この場合はIgA)を亢進させる可能性を示した。以上のことがIgA腎症の発症、進展と関連することが推論される。

35

細胞内寄生原虫症-シャーガス病に対する感受性とHLAとの相関

会田かやの¹⁾、Sandra JUARES^{1) 2)}、菊池三穂子¹⁾、
○平山謙二¹⁾、柳哲雄²⁾、Maria Paula de LOPES³⁾、金子
子聡⁴⁾、Oscar AYAU⁴⁾、Julio ARGUETA⁴⁾、Vivian
MATTA³⁾、曾根敏雄¹⁾、木村彰方⁵⁾、
伊東恭悟⁶⁾、多田功⁷⁾

¹⁾ 埼玉医大・医動物、²⁾ 長崎大・熱研、³⁾ Dept. of Cyto., Fac. of
Chem. Scie. and Pharm. USAC、

⁴⁾ グアテマラ 国際協力事業団、⁵⁾ 東医歯大難研、

⁶⁾ 久留米大・免疫、⁷⁾ 九大・医・寄生虫

【目的】

シャーガス病は *Trypanosoma cruzi* の感染症で、その患者は中南米に広く存在する。ヒトに感染した *T. cruzi* は、急性期には心筋内で増殖して心筋炎を引き起こす。一般的には自然治癒することなく、慢性の感染症を呈し中年以降に心疾患等で死亡することがある。この細胞内寄生原虫感染症に対する感受性と宿主遺伝要因の関わりを、HLA-B、DRB1、MICAの相関を検討することにより解析した。

【対象】

グアテマラ共和国のサカパ地方病院で、血清学的検査によりシャーガス病と診断された患者44名、および血清学的に陰性と診断された90名。

【方法】

SSO法を用いてHLA-B、DRB1を、またSSCP法を用いてMICAのタイピングを行い、各群で比較、検討した。

【結果】

HLA-B多型は27のECBとしてタイプされ、シャーガス病患者群では、血清学的陰性者群と比較してHLA-B35の有意な増加を認めた。DRB1遺伝子座については40のアレルがタイプされたが各群で有意差を認めなかった。またMICA-A5はA4、A5、A5.1、A6、A9の5つのアレルがタイプされ、A5が患者群で有意に増加していた。HLA-B35とMICA-A5の間には連鎖不平衡は認められなかったが、HLA-B35とMICA-A5を同時に有する者の頻度が患者群で増加していた。

【考察】

HLA-B35とMICA-A5を同時に有する者の頻度が患者群で増加していたことから、これらがシャーガス病の疾患感受性に対して相乗的に作用していた。HLAクラスI拘束性の細胞障害性T細胞およびMICAに拘束される免疫細胞および(gdT細胞?)がシャーガス病の疾患感受性に関与していることが示唆された。

36

慢性関節リウマチ患者におけるTNFA遺伝子5'領域のPCR-PHFA法による解析

○松下正毅^{1) 3)}、渋江 司²⁾、中山貴博¹⁾、
大橋 順¹⁾、塩田倫子¹⁾、松多邦雄⁴⁾、
土屋尚之¹⁾、山根明男³⁾、徳永勝士¹⁾、

¹⁾ 東京大学大学院・医学系研究科・人類遺伝学教室

²⁾ 東京大学・医学部・医学科

³⁾ 湧永製薬・創薬研究所

⁴⁾ 松多内科医院

【目的】

慢性関節リウマチ(RA)においてTNF α は、1)RA患者の関節における産生、2)ヒトTNFA遺伝子導入マウスにおける関節炎の発症、3)可溶性TNF受容体の治療上の有効性などから重要な役割を果たすことが知られている。RAにおけるHLA-DRB1*0405との関連は確立しているが、他集団において、TNFAプロモーター多型の独立な関与を示唆する報告もみられる。本研究では、最近Higuchiら(Tissue Antigens 51:605-12,1998)により報告されたTNFA遺伝子5'領域における新たな多型(-1031T/C、-863C/A、-857C/T)とRAとの関連を検討するためにPCR-PHFA法によるアリルタイピング法を構築し、RA患者および健常対照者の解析を試みた。

【方法、結果】

日本人健常者110例のゲノムDNAを用いて、PCR-SSCP法およびPCR-RFLP法により各多型部位の遺伝子タイピングを行った結果、これらの多型部位は4種類のアリルとして存在すると予想された。そこで、これら4種類のアリルを想定し、PCR-PHFA法を応用したアリルタイピング法の構築を行い、同じ110例のゲノムDNAパネルを用いてアリルタイピングを行った結果、各多型部位のgenotypeの組み合わせから推定されるアリルとすべて一致した。次に、PCR-PHFA法を用いて、さらに健常対照者161例を追加し、計RA患者506例、対照群271例のアリルタイピングを施行した。健常対照群と比較してRA患者群において-1031T/-863C/-857Tアリル陽性者の有意な増加が認められたが(31.0%vs. 42.3%, p=0.0020)、DRB1*0405と-1031T/-863C/-857Tアリルとの間に強い関連も観察された。そこで、DRB1*0405の存在の有無によって患者群と対照群を層別化し、比較を試みた。DRB1*0405陽性群、陰性群いずれにおいても、-1031T/-863C/-857Tアリルの存在とRAとの有意な関連は検出されなかった。

【結語】

TNFA遺伝子5'領域の多型、-1031T/C、-863C/A、-857C/Tは4種類のアリルとして存在しており、これらはPCR-PHFA法を用いてタイピング可能であることが示された。また、RA感受性において、今回解析した多型がHLA-DRB1と独立な寄与を示唆する結果は得られなかった。

37

帯状疱疹後神経痛におけるHLA解析

○安西達也¹⁾、成瀬妙子²⁾、Nicolette Takashige²⁾、
本間隆夫¹⁾、小澤明³⁾、大城戸宗男³⁾、猪子英俊²⁾
¹⁾ 東海大・工・工業化学、²⁾ 同・医・分子生命科学、
³⁾ 同・医・皮膚科

【目的】

帯状疱疹後神経痛 (PHN)は、水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV)による再帰感染後皮疹は消失するが、特に高齢時において激痛を伴う疾患である。本研究では、PHN患者群を対象にしたHLA遺伝子解析を行い、その疾患感受性について検討した。

【対象と方法】

PHN患者群 (N=39) より抽出した高分子DNAを用いてHLAクラスI遺伝子は血清学的方法、PCR-SSP法、-RFLP法、直接塩基配列決定法の併用で、クラスII遺伝子はPCR-RFLP法によりDNAタイピングを行い、健常日本人集団 (N=136)を対照として相関を検討した。さらに、帯状疱疹罹患後PHN未発症高齢者集団 (N=44)に対しても検討した。

【結果】

HLA-A33、-B44にPHN患者群に有意な増加が見られ、対立遺伝子の同定を行ったところ、B*4406に有意な増加(p=0.014458)が認められた。クラスII遺伝子については相関は認められなかった。また、PHN未発症高齢者群では、DRB1*0405-DQB1*0401、DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501に有意な減少が見られ、DRB1*0406に有意な増加(p=0.014890)が認められた。

【考察】

PHNは、体内に潜伏したVZVが免疫能の低下により再活性化し発症するが、今回の解析からHLAクラスI抗原、特にB*4406との相関が認められた。HLA-A33、-B44は、-DRB1*1302と連鎖する日本人の典型的ハプロタイプとして知られるが、今回、DRB1*1302に有意な増加は見られなかったことより、クラスI、特にHLA-B抗原が、本症の発症機構に深く関わっている可能性が考えられた。また、PHN未発症高齢者群には、この二群と比較して有意な違いが見られたことから、今後、クラスI遺伝子の同定を行い、PHN患者群・健常集団・PHN未発症高齢者群の三群を用いた解析によるPHN発症機序を考察したい。

38

Graves病における抗TSHR抗体の産生はHLA-DPB1座によって規定される

○高橋めぐみ¹⁾、玉井一²⁾、笹月健彦³⁾、木村彰方¹⁾
¹⁾ 東京医歯大・難研・分子病態
²⁾ 隈病院・内科
³⁾ 九大・生医研・遺伝

【目的】

Graves病はTSH receptor (TSHR)に対する自己抗体産生に基く甲状腺機能亢進を主徴とする自己免疫性疾患であり、HLA-A2及びDPB1*0501と相関する。一般に抗TSHR自己抗体はTBII (TSH binding inhibitory immunoglobulin)として測定されているが、5~10%の患者ではTBIIが検出されない。そこで、TBII陰性患者群についてのHLA解析を行い、TBII陽性群と比較した。

【方法】

TBII陰性患者91名、TBII陽性患者135名、健常者317名を対象とし、DPB1遺伝子型をPCR-RFLP法で、A2及びB46をPCR-SSP法で決定した。

【結果】

TBII陰性患者では、HLA-A2、B46、DPB1*0202頻度の有意な増加を認めたが、DPB1*0501頻度の増加は有意ではなかった。一方、TBII陽性患者群ではHLA-A2及びDPB1*0501頻度の有意な増加を確認したが、B46やDPB1*0202頻度の増加は有意ではなかった。

【考察】

HLA-A2はTBIIの有無に関わらず相関を示すことから、Graves病への疾患感受性はHLAクラスI領域の遺伝子によって規定されると考えられた。一方、DPB1アレルとの相関はTBIIの有無によって大きく異なるため、Graves病における抗TSHR自己抗体の産生はHLA-DPB1座によって規定されるが、DPB1アレルの相違によって主に産生する自己抗体の種類が異なると考えられた。

39 肝硬変症血液透析患者のHLA抗原型について

○吉武圭輔、田中智一郎、長谷川善之、
野田律矢、小河原悟、兼岡秀俊、内藤説也
福岡大学病院腎センター

【目的】

血液透析患者のHBVとHCVによる慢性肝炎の罹患率は高いことが知られている。その中から肝硬変になる者とならない者との間でHLA抗原型頻度の差の有無を調べた。

【方法】

当センターならびに関連施設にて血液透析をうけているHBVとHCVによる慢性肝炎患者で肝硬変となった患者35人(平均年齢 60.5±11.8、男 28、女 7)のHLA血清typingを当センターで検査した健康者100人と、またHBVとHCVによる慢性肝炎に罹患しているが肝硬変のない血液透析患者と比較した。

【結果】

現在までのところHLA血清typingでは、肝硬変患者とHBVとHCVによる慢性肝炎患者また健康者の間でHLA-A24とDR4の増加傾向を示した。

【考察】

今後更に症例数を増して、血液透析患者でHBVとHCVによる肝硬変の起こり易いHLA抗原型又は遺伝子型が関係しているかを調査していきたい。

40 生体部分肝移植におけるHLA適合度の影響

○平田 勝、針原 康、久富伸哉、三浦泰朗、
吉野浩之、水田耕一、伊東充宏、佐野圭二、
日下浩二、谷谷信彦、北嘉昭、河原崎秀雄、
橋都浩平、幕内雅敏
東京大学肝移植チーム

【はじめに】

生体部分肝移植では、死体肝移植に比べてHLAの適合度は良好であると考えられる。そこで、生体部分肝移植症例においてHLA適合度の移植成績に与える影響について検討した。

【対象】

1996年1月から1998年12月までに当科で生体部分肝移植を行った症例の内40例を対象とした。

【方法】

移植前にレシピエントとドナーの末梢静脈より採血し、Ficoll Hypaque法により、mononuclear lymphocytesを分離し、血清学的にそれぞれのHLAを決定した。移植後の拒絶反応は以下の基準のどちらかひとつを満たせば拒絶反応があったと定義した。すなわち、1) 病理組織学的に移植肝に拒絶があると診断された場合、および2) 血清total bilirubinの急峻な上昇がみられ、薬剤、肝の虚血障害、胆管炎などの原因が否定され、かつステロイド治療によく反応した場合である。

【結果】

40例のうち、ドナーの組み合わせは母親23例、父親14例、子供2例、祖母1例であった。原疾患は胆道閉鎖症29例、肝硬変症4例、その他7例であった。対象となる40例では、1999年4月までのfollow upにおいて(経過観察期間は3カ月から3年3カ月)、全例生存しており、生存率は100%であった。拒絶反応は12例、30%の症例で認められた。HLA適合度と拒絶反応の有無との関係では、HLA -A, B, DR 6抗原およびHLA-DRでは統計学的に有意の相関は認められなかった。HLA Class I(A+B)のミスマッチ数、症例数、拒絶反応が認められた症例の割合は0: 3, 0%, 1: 13, 23.1%, 2: 24, 37.5%となり、有意な相関 ($p<0.05$) が認められた。

【結論】

HLA Class Iの適合性が移植後の拒絶反応の発生率と相関することが明らかとなった。生体部分肝移植においても、ほぼ同じ条件のドナー候補がいる場合には、HLA Class Iの適合性を考慮して、ドナーを決定することが重要であると考えられた。

41

PRAとダイレクト・クロスマッチとの関係について：大阪府献腎移植希望登録患者の既存抗体調査（過去15年間）より

○多田正義¹⁾、久山芳文¹⁾、松井美智代¹⁾、
小池朋子¹⁾、船附好子²⁾、安波禮子¹⁾

¹⁾大阪府立病院 組織適合性検査室

²⁾同 免疫検査室

【目的】

腎移植患者と移植希望登録患者を対象に、移植腎生着予後に影響すると報告されている広範囲既存抗体の存在について検討した。

【方法】

1982年から1995年までの間で延べ人数5756人を対象に、約60パネルのTリンパ球とBwarmリンパ球（5009人）によるPRA（panel reactive antibody）検査を実施した。感作の状態を調べるため、抗HLA特異性を特定し且つPRA陽性の患者でパネルに対する陽性の割合をL：20%未満、M：20%～49%、H：50%以上に分類した。その上で献腎移植171症例の術前ダイレクト・クロスの結果とPRA検査結果を比較検討した。

【結果と考察】

1. T・Bリンパ球PRA検査陽性患者は各々11.7%・21.8%であった。抗HLA抗体ではA24, A26, B5, B22, Cw7, DR 14（含1403.1406）DR13が多く見られた。パネル数に対する陽性率分類ではTリンパ球でL:5.9%, M:2.4%, H:3.3%、Bリンパ球でL:13.0%, M:4.0%, H:5.0に陽性群が分類された。
2. ダイレクト・T陽性の症例は、みられなかった。ダイレクトT・B陰性のケース（117例）では、PRA・T陽性が5.1%（L:3.4%, M:0.9%, H:0.9%）、PRA・B陽性が16.2%（L:9.4%, M:5.1%, H:1.7%）と、広範囲既存抗体が低値を示した。ダイレクトT陰性・B陽性（13例）の場合PRA・T陽性が30.8%、PRA・B陽性が53.8%とPRA陽性率が高く見られた。統計学的有意差は認められなかったが、ダイレクト・Bwarm陽性群の方がB cold陽性群よりPRAのT・B双方で高い陽性率を示した。

【まとめ】

移植患者でダイレクトT・B陰性の場合、広範囲既存抗体の保有率が低くみられた。今後臨床結果についても検討したい。

42

HTLV-Iと古モンゴロイドの民族背景に関する研究

○楼宏¹⁾、李洪川¹⁾、桑山昌洋¹⁾、屋敷伸治¹⁾、
藤吉利信¹⁾、末原雅人²⁾、納光弘²⁾、
山下満左裕³⁾、速水正憲³⁾、今西規⁴⁾、園田俊郎¹⁾

¹⁾鹿児島大学・医・ウイルス学、

²⁾鹿児島大学・医・第三内科、

³⁾京都大学ウイルス研究所・病原ウイルス

⁴⁾国立遺伝学研究所・遺伝情報分析研究室

【目的】

沖縄、九州、北海道の辺境には成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-I)キャリアが多発している。近年、サハリン島の先住民族であるニブキ族にもHTLV-Iキャリアがいることが明らかにされ、このウイルスのアジアモンゴロイドにおけるの起源を研究するために、ニブキ族、日本人、北海道アイヌ、東北アジアおよび南米先住民のHLAアレルタイプを比較検討した。

【方法】

ニブキ族の凍結保存リンパ球53例（HTLV-Iキャリア4例）からDNAを分離精製しDNAタイピングに供した。HLAアレルはARMS法とPCR-SSO法で決定した。一部のHLAクラスIIアレルはDNAシークエンスにより決定した。HLA-A,Bアレル頻度を用いて、N-J法で系統樹を作成した。

【結果】

ニブキ族HTLV-IキャリアにはA*02, A*24, A*31, Cw*03とDRB1*0901がみられた。ニブキ族のHLAアレルはA*02, A*24, B*27, B*35, B*40, B*48, Cw*0304, Cw*08, Cw*0303, DRB1*0901, *1401, *1201, *1106, DQB1*0301, *0303, *0503, *0201が高頻度に見られた。遺伝系統樹法で五集団を解析し、ニブキ族>オロチョン、ヤクート>南米先住民>日本人、北海道アイヌの関係あることが明らかになった。

【考察】

ニブキ族に多く見られたHLAクラスIIアレルはオロチョン、ヤクートに多く見られ、南米先住民と日本人にも見られるアレルであった。ニブキ族はオロチョンとヤクートに近縁な東北アジアモンゴロイドの一つの民族集団であることが考えられた。ニブキ族に多くみられたHLAクラスIIアレルは北海道アイヌにも多くみられ、特にDRB1*1106は両集団に高頻度に見られるユニークなアレルであったことからこれら二つの集団は近縁な関係にあると考えられた。HTLV-Iの先祖遺伝子が東北アジア先住民族（ニブキ、オロチョン、ヤクート）、日本人亜集団（倭人、北海道アイヌ）、南米アンデス先住民族を含む古モンゴロイドに由来することが示唆された。

43

HLA-DRB1 Low Resolutionタイピングで
検出されたキメラについて

○田中秀則、常山初江、盛山芳恵、栗田裕子、
藤井まり恵、伊佐和美、赤座達也、
中島一格、十字猛夫

日本赤十字社 中央血液センター

【目的】

骨髄バンク登録希望者については、血清学的な方法でHLA-A、-B、-C抗原型のタイピングとDNAによるHLA-DRB1 Low Resolution（血清学レベル）のタイピングを行っている。今回我々は、HLA-DRB1 Low ResolutionタイピングにおいてHLA型キメラを経験したので報告する。

【方法】

HLA-ABCのタイピングは、通常のLCT法で行い、PCR-SSP法（ABC SSP UniTray、ペルフリーズ社製）によるDNAタイピングも併せて行った。HLA-DRB1タイピングは、HLA-DRタイピング試薬（湧永製薬社製）を使用し、通常のPCR-MPH法により行った。また、赤血球抗原については、ABO、Rh、MN、P1、Duffy、Kell、Diego、Xga血液型について検査を行った。また、部分凝集が認められたRh血液型のE抗原およびKidd血液型のJkb抗原については、モノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリーで確認した。また、マイクロサテライトDNA（INT2、D6S89、ACTBP2、HGH、APOA11）を用いた多型分析も併せて行った。

【結果及び考察】

血清学的なHLA-ABC抗原の検査では、HLA-A24、A11、B54、B55、Cw1、Cblと判定されたが、A33、B44の特異的な抗血清に対してスコア2~4で反応を示した。PCR-MPH法では、DRB1*04、08、13の3種類が認められキメラであることが疑われた。クラスI SSP法では、血清学的に検出された型以外に、HLA-A*33及びB*44の存在が確認された。また、赤血球型検査では、D+ C+ c+ E+ e+ ; Jk(b+) (82%)、D+ C+ c+ E- e+ ; Jk(b-) (18%) の割合で赤血球の混在を確認した。さらに、マクロサテライトではACTBP2において、異なるパターンのシグナルが確認された。

44

血小板抗原HPA-5bに特異的な
CD4陽性インデューサーT細胞の樹立

○岡井幹、贅田美江、西村元子、石川善英、
赤座達也、十字猛夫

日赤中央血液センター 研究部

【目的】

HPA-5（human platelet antigen-5）抗原系はaとbからなり、日本人の遺伝子頻度は各々95%、5%である。HLA遺伝子型が適合している骨髄移植で、血小板抗原HPA-5の不適合性により移植後生存率の低下が見られた。そこで、HPA-5抗原がマイナー抗原として働く可能性を検討する為、抗原提示能の最も優れた樹状細胞（DC）を用いてHPA-5bに特異的なT細胞の樹立を試みた。

【方法】

- 1) 移植成績の解析からHLA-A*2402またはB*5201とのbinding motifを有していて、HPA-5bに特異的なアミノ酸配列を持つ3種のペプチドを合成した。
- 2) HPA-5b陰性のdonor（HLA A*2401, B*5201, DRB1*1502陽性）由来DCに上記のペプチドをパルスしたものをStimulator、自己のT細胞をResponderとして、MLRを行った。前述のペプチドをパルスした単球由来のDC（Mo-DC）で繰り返し刺激し、CD4+T細胞とCD8+T細胞を樹立した。特異性は、3H thymidine up takeにより増殖能を、51Cr release assayによりKilling活性能を用いて検討した。

【結果と考察】

- 1) CD4+Tインデューサー細胞が樹立できた。特異性はHPA-5b陰性由来Mo-DCに反応しないが、これにペプチドをパルスすることで増殖すること、またHPA-5b陽性由来のMo-DCにはペプチドをパルスすることなしに特異的に増殖すること、これらの増殖能は抗HLA-DR抗体によって阻害されることにより証明できた。
- 2) CD8+細胞障害性T細胞を誘導できた。特異性はペプチドをパルスしたMo-DC（HPA-5b陰性由来）をKillingすることで確認された。
 - 1)、2)の結果はHPA-5抗原がマイナー抗原として働く可能性を示唆するものである。

45

Immunodominant minor抗原“HA-1”のゲノムタイピング法と日本人における適合性とa-GVHDの相関

○丸屋悦子¹⁾・¹³⁾、吉川枝里²⁾、河田寿子²⁾、椎名隆²⁾、関茂樹³⁾、平賀久代³⁾、甲斐俊朗⁴⁾、藤井康彦⁵⁾、加藤剛二⁶⁾、星順隆⁷⁾、河敬世⁸⁾、井上雅美⁸⁾、遠藤文夫⁹⁾、右田昌宏⁹⁾、塩原信太郎¹⁰⁾、岡本真一郎¹¹⁾、徳永勝士¹²⁾、伊藤和彦¹³⁾、十字猛夫¹⁴⁾、猪子英俊¹⁾、佐治博夫¹⁾

¹⁾ 京都府赤十字血液セ、²⁾ 東海大医分子生命2、

³⁾ 佐久総合内科、⁴⁾ 兵庫医大輸血、⁵⁾ 山口大医三内、⁶⁾ 名古屋日赤、⁷⁾ 慈恵医大小児、⁸⁾ 大阪府立母子保健総合医療セ、

⁹⁾ 熊大医小児、¹⁰⁾ 金沢大医輸血、¹¹⁾ 慶應大医血内、¹²⁾ 東大医人類遺、¹³⁾ 京大医輸血、¹⁴⁾ 日赤中央血液セ

【目的】

Goulmyらにより発見されHA-1はmHaのうち最も免疫原性の強い抗原で、HLA-A*0201に拘束性があり、BMTで重篤なGVHD発症との相関が報告されている。HA-1がKIAA0223遺伝子にコードされ、1アミノ酸置換 {codon 168: His (H, 0.44) vs. Arg (R, 0.56)} による多型性を示すタンパク分子由来であり、cDNAを用いたallele typing法が報告されている(Science 279: 1054, 1998)。我々はゲノムを用いたHA-1 typing法を開発し、HLA-identical sib.間BMT症例を用い、HA-1の適合性とa-GVHDとの相関およびHLA拘束性の検証を試みた。

【方法】

KIAA0223遺伝子を含むPACクローンの塩基配列をショットガン法で決定した。アミノ酸変異を含んだ領域を増幅し、SSCPやRFLPによるHA-1 allele typing法を確立した。健康な日本人 (n=200) のアリルを決定し、その頻度をもとめ、同胞間と非血縁間で起る不適合率を予測した。HLA identical sibling間のBMTペアで、HLA-A2保有ペア (n=63) のHLA-A2アリルを決定し、アリル別とA2全体でのHA-1適合性とa-GVHD発症の相関を調べた。

【結果・考察】

日本人のHA-1 allele 頻度 (H=0.38 R=0.62) はDutchと類似していた。日本人で予測される不適合率は同胞間で13%、非血縁間で23%であった。63例のHLA-A2保有ペアのうち主なA2アリルはHLA-A*0201 (32)、A*0206 (23)、A*0207 (11) であった。HA-1適合性とa-GVHD発症の相関はA*0201保有ペアでオランダのようなデータ (相関あり) は今のところみられなかった。A2全体の場合も同様の結果であった。今後症例を増やし、a-GVHDとの相関と同時にGVL効果との関係も検証する。

46

MHC遺伝子多型によるペンギン類の分類と系統遺伝学的解析

○津田とみ¹⁾、津田道雄¹⁾、成瀬妙子¹⁾、河田寿子¹⁾、椎名隆¹⁾、Ivon Le Maho²⁾、栗田正徳³⁾、福田道雄⁴⁾、猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学・医・分子生命科学

²⁾ CEPE/CNRS, France

³⁾ 名古屋港水族館

⁴⁾ 葛西臨海水族園

【目的】 ペンギン類は南極大陸ばかりでなく温帯から赤道直下までそれぞれ固有の分布域をもって棲息している。それらはおもに形態学的形質から6属16種に分類されているが、それぞれの種は系統の分岐後も異なった環境の下で進化をとげてきたと考えられている。われわれは、6属16種のペンギン類の近縁関係およびペンギンを含む鳥類の進化の過程の詳細を分子進化学的に明らかにするために、遺伝的多型性を示すことが既に他の生物で知られているMHC領域の遺伝子解析を行うことにした。今回はわれわれが決定した各種ペンギンのMHC遺伝子の塩基配列と、それらの相同性についての現在までの結果を報告する。

【方法】 野生あるいは飼育下の5属12種のペンギンの血液あるいは組織から核内DNAを分離した。MHC領域のclass II抗原遺伝子β1ドメインおよびclass I抗原遺伝子α1?α3ドメインをPCRにて増幅し、PCR産物を直接またはサブクローニングし塩基配列を決定した。

【実験結果と考察】 現在までにアデリーペンギン (*Pygoscelis adeliae*)、エンペラーペンギン (*Aptenodytes forsteri*)、フンボルトペンギン (*Spheniscus humboldti*)、ジェンツーペンギン (*Pygoscelis antarctica*) など12種の塩基配列を決定した。塩基配列から、属間での配列差や、各々の種内での多数の対立遺伝子 (allele) がみられることが判明し、相同性の検討からはフンボルトペンギン属のフンボルトペンギンとマゼランペンギン (*Spheniscus magellanicus*) の類縁関係が強いことがしめされた。引き続き、MHC領域の遺伝子を指標としたペンギン類の系統遺伝学的解析のための分子生物学的研究をすすめ、ペンギンを含む鳥類の進化の過程の詳細を分子進化学的に明らかにしていく予定である。また本研究の成果は系統樹の作成のみにとどまらず、塩基配列の差異にもとづく個体判別、亜種識別、雑種の判別などにも利用価値が期待できる。

【謝辞】 ペンギン類の材料収集は、日本動物園水族館協会種保存委員会ペンギン類別調整委員会 (JAZGA Penguin TAG) の協力による。本研究指導中に急逝された故青柳昌宏先生に生前のご指導を感謝する。

47 ブタDMA遺伝子のcDNAクローニングとDRB, DQB遺伝子の多型性解析

○安藤麻子¹⁾、村上珠美¹⁾、河田寿子¹⁾、重成敦子¹⁾、
椎名隆¹⁾、佐田正晴²⁾、辻隆之²⁾、鳥生厚夫³⁾、
中西喜彦⁴⁾、三橋忠由⁵⁾、関川賢二⁶⁾、猪子英俊¹⁾
¹⁾ 東海大・医・分子生命科学、²⁾ 国立循環器病セ、
³⁾ 農水省家畜改良セ、⁴⁾ 鹿児島大・農、
⁵⁾ 農水省畜産試験場、⁶⁾ 農水省家畜衛生試験場

【目的】

我々はブタからヒトへの異種移植の可能性の追求、並びにMHC遺伝子の多型性や免疫応答能との関連性を明らかにするために、ブタのMHC (SLA) 領域のSLA遺伝子並びに、SLAクラスII遺伝子の発現に関与すると考えられるDOやDM遺伝子のcDNAクローニングとSLA遺伝子の多型性解析を行っている。本研究では、DMA遺伝子のcDNAクローニングと種々の系統におけるDRB, DQB遺伝子の多型性を解析した。

【方法】

ミニブタ (ゲッチング系) の脾臓組織より作成したcDNAライブラリーより、ヒトDMA遺伝子のエキソン3をプローブとして、スクリーニングし、塩基配列の決定と相同性解析を行った。また、SLA-DRB, DQB遺伝子の各エキソン2を増幅するプライマーを用いて、ゲッチング系ミニブタ、クラウンミニブタ、梅山豚など6系統のブタのDNAについてPCRを行い、PCR産物の直接塩基配列決定によって多型性を解析した。

【結果】

cDNAライブラリーのスクリーニングの結果、7個の陽性クローンを分離した。これらのクローンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性解析から、エキソン2は、ヒトDMAと64.7%、ウシDMAと71.3%、エキソン3は、ヒトDMAと83.7%、ウシDMAと85.9%の高い相同性を示し、これらのクローンは、ブタDMA遺伝子をコードしていると考えられた。また、6系統のブタのDRB, DQB遺伝子の塩基配列決定による多型性解析から、DRB遺伝子は、4種類のアリルが認められ、このうち1種は、新アリルと考えられた。DQB遺伝子についても数種の新アリルが観察され、現在PCR産物のクローニングと塩基配列解析によって確認を行っている。

【考察】

以上のcDNAクローンの塩基配列解析から、ブタにおけるDM遺伝子の発現の可能性が示唆された。また、SLA-DRB, DQB遺伝子のエキソン2の塩基配列の多型性解析から、これらの遺伝子の新アリルが見いだされた。

48 組織免疫-HLAと重力作用

○西原克成

東大医学部口腔外科

ヘッケルは、「個体発生は系統発生を繰り返す」という有名な生命発生原則を19世紀後半に提唱した。この法則から考えると、哺乳類・鳥類・爬虫類の胎児と原始脊椎動物の成体の組織免疫系は同じはずである。

本研究は、組織免疫系が重力の作用によって、脊椎動物の上陸を機に遺伝子発現により自動的に発生することを検証する目的で行った。

高等動物の胎児は、組織免疫系を持たず、これは免疫寛容と呼ばれている。この免疫寛容のメカニズムは、今日不明のままである。そして今「自己-非自己の免疫学」が隆盛を極めていている。しかしこの「自己-非自己」の考え方は組織免疫だけに限られるもので、いわゆる免疫病とは余り深くかかわらない。著者は、系統発生の過程で、六分の一Gの海中から一Gの世界に上陸した時の重力作用と、個体発生で羊水から破水して生まれ落ちる出産時の重力作用により、系統・個体両発生において組織免疫が発生するという仮説を提唱している。

これらの仮説を検証する目的で、幼形成体のメキシコサンショウウオを上陸させてその変化を観察するとともに、原始型の円口類 (ヌタウナギ) と軟骨魚類 (ドチザメ) の組織を鳥類 (ウズラ) と哺乳類 (ラット、マウス、成犬) に対して種々の器官について異種移植を行ったところごとく成功した。

これらの一連の研究の結論として、MHCの遺伝子の引き金が重力の作用で引かれることが明らかとなった。個体発生と系統発生において共に、造血系の一部が重力の作用によって腸管から骨髓腔に移動する。この時に原始脊椎動物の持つ細胞内の遺伝子が自動的に重力作用で引き金が引かれ、これにより主に血液細胞を中心とした間葉系、上皮系細胞の膜の構造蛋白質が誘導される。これがHLAである。HLAは単なる成体蛋白質の一つにすぎない。重力作用はすべての脊椎動物では血圧の上昇に変換されている。本研究で成体蛋白質の誘導が重力作用に依ることが証された。