

MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第9巻第2号 平成14年8月31日発行

Contents

〔原著論文〕 HLA A19 and B14 frequencies increased among Parsis from Mumbai U. Shankarkumar	71
〔原著論文〕 Gene Kit HLA sequencing Assay (VISIBLE社)と Sequencing based typing Kit (Applied Biosystems社) 法の比較検討 吉川枝里、中島舞子、河田寿子、李 素雲、成瀬妙子、猪子英俊	78
第11回日本組織適合性学会 プログラム	90
シンポジウム	99
一般演題	121
第19回近畿HLA研究会抄録	135
<お知らせ>平成14年度認定HLA検査技術者講習会	147
<お知らせ>平成14年度認定組織適合性指導者講習会	148
<日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>	149
編集後記	151

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

J S H I

Contents

〔原著論文〕 HLA A19 and B14 frequencies increased among Parsis from MumbaiU. Shankarkumar	71
〔原著論文〕 Gene Kit HLA sequencing Assay (VISIBLE社)と Sequencing based typing Kit (Applied Biosystems社)法の比較検討 吉川枝里、中島舞子、河田寿子、李 素雲、成瀬妙子、猪子英俊	78
第11回日本組織適合性学会 プログラム	90
シンポジウム	99
一般演題	121
第19回近畿HLA研究会抄録	135
<お知らせ>平成14年度認定HLA検査技術者講習会.....	147
<お知らせ>平成14年度認定組織適合性指導者講習会.....	148
<日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定>	149
編集後記	151

[原著論文] HLA A19 and B14 frequencies increased among Parsis from Mumbai

U. Shankarkumar

HLA department, Institute of Immunohaematology

(Received January 17, 2002)

Summary

The Parsi community immigrated to India from Iran to avoid religious persecution by Muslims during 715AD. They are a tightly knit isolated community numbering 90,000 living chiefly in Mumbai, India. They have maintained separate identity because of own strict religious tenets and rigidity of caste system prevailing in India. I report here HLA polymorphism in 67 Parsi compared with other populations of India and world. The standard NIH two-stage microlymphocytotoxicity assay was used with a minimum of three sera for a given specificity to define the HLA antigens. The significant observation was, they had the highest percentage gene frequency for HLA B14 (28%) and HLA A19 (41%). The two locus haplotype analysis showed a significant haplotype frequency (HF) and linkage disequilibrium (LD) for HLA A19-B14. This observation was concordant with previous studies on Parsis reported in Third Asia-Oceania Histocompatibility Workshop and conference. Molecular subtyping using reverse line blot technique showed that HLA B*1405 (GF = 19%) and HLA B*1401 (GF = 9.5%) for B14 while A*3001 (GF = 17.6%) and A*3303 (GF = 15%) for A19 were the subtypes present. Haplotypes A*3001 - B*1401 and A*3303 - B*1405 were the significant haplotypes observed among the Parsi community. When the results were compared to other Indian caste groups and major world populations the frequency of HLA B14 was the highest among the populations reported. These observations could be due to selective pressures operating on the highly inbreeding and diminishing parsi population It will be interesting to know how this genetic diversity is maintained and is there any impact of this variation on the health and disease among Parsi community.

Keywords : HLA A19, B14, Parsi, Selection.

Introduction:

Population genetics was sired by an attempt to entwine Mendelism, Darwinism and Biometry in an attempt to determine how the gene could be used to explain the

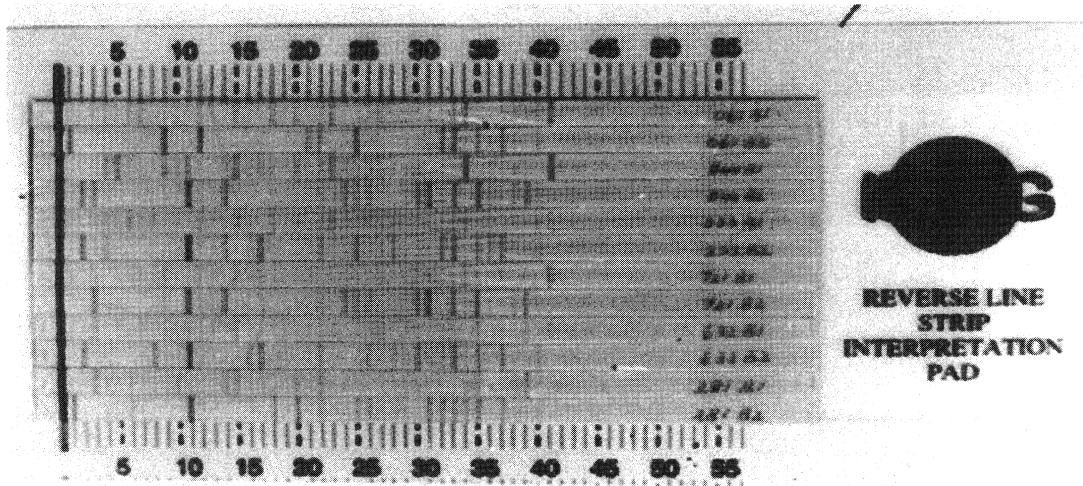
creation, maintenance and distribution of phenotypes in populations 1). Extant human genetic variation is natural, created by mutation and vetted over history by biological, demographic and historical processes.

Corresponding author : **U.Shankarkumar**
HLA department, Institute of Immuno haematology,
13th Floor New Multistoried building,
K.E.M.Hospital Campus, Parel
MUMBAI - 400012. INDIA.

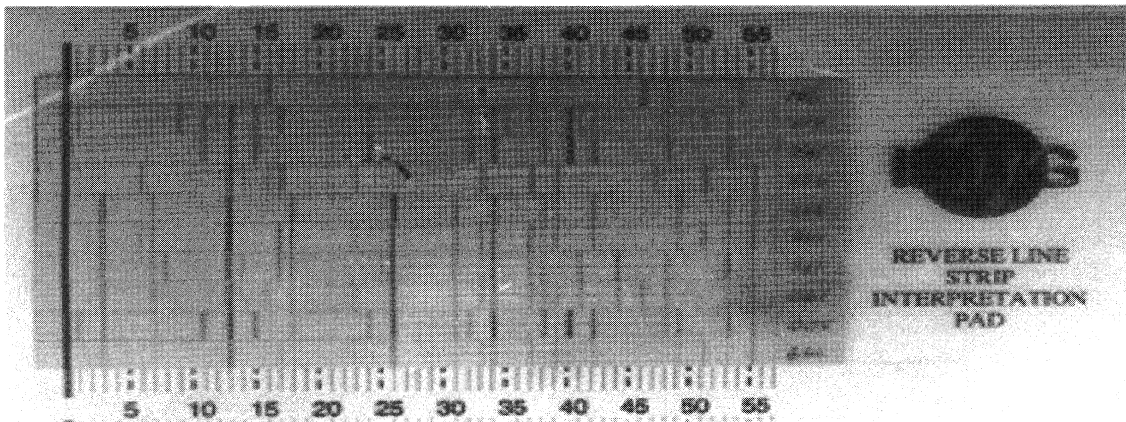
Phone: 91-22-413-8518
Fax: 91-22-413-8521
E-mail: Shankarkumar16@hotmail.com

Notably the sequence variation that has survived in human species is nonrandom; it has been shaped both by chance and natural selection, and by the demic organization and migration of our ancestors²). Perhaps the most popular exploitation of extant genetic variation

has been in the study of human origins and migrations³). Anthropologists and geneticists have long been interested in reconstructing human evolutionary history using quantitative traits, polymorphic blood groups, serum proteins and enzymes; HLA and now, information



The nos. 5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,and 55 denote the position of the probes in the membrane. Each 2 strips (B1, B2) comprise a separate sample(total six B14 positive samples is shown). The Black line indicates the positive probe signals. The genotype software interprets this and the allele is identified.



Each strip denotes a separate sample (total ten A19 positive samples is shown). The Black line indicates the positive probe signals. The genotype software interprets this and the allele is identified.

Figure 1 Hybridized signals of the HLA B & A locus by RLS technique as visualized.

on molecular variation including nucleotide sequence data is quickly becoming the norm 4). The HLA distribution from a highly inbreeding tightly knit isolated Parsi community from Mumbai which has shown remarkable diversity of several genetic markers such as serum proteins 5), enzyme group systems 6), polymorphic frequency of Gm type first reported in the world 7), polymorphism of alpha-1-acid (orosomuroid), alpha-2-HS-glycoproteins and alpha-1-b 8) and a high incidence of factor V leiden mutation 9).

Materials and Methods

Blood samples from 67 healthy unrelated individuals belonging to Parsi community residing in Mumbai, India were studied for their HLA antigen distribution. Ten milliliters of venous blood (in Heparin 50IU/ml) was collected in a sterile tube from each individual after the precoded questionnaire and ethical consent was obtained. The lymphocytes were isolated by density gradient centrifugation on histopaque 10). The HLA antigens were identified by standard NIH two-stage

microlymphocytotoxicity assay 11). The genomic DNA was extracted following the 12th International Histocompatibility Workshop protocol. The Molecular subtyping of HLA B14 was carried out using the reverse line strip hybridization method following group specific amplification of the second and third exon of the HLA A and B loci using the RLS typing method of the 13th IHWC anthropology component protocol. The Reverse Lineblot System (RLS) is an immobilized probe array/reverse Lineblot system developed by Dr. Erlich's laboratory at Roche Molecular Systems, USA. It utilizes an immobilized probe array in which oligonucleotide probes (approximately 56 probes for high resolution HLA-A, 85 probes for high resolution HLA-B and 35 probes for high resolution HLA-C typing) which are deposited in a linear array on a nylon membrane using an IVEK instrument. The PCR product is generated using biotinylated separate primer pair for the second and the third exons of the class I loci. The presence of biotinylated PCR product bound to a specific probe is detected using streptavidin-horseradish peroxidase

Table1 HLA B14 frequencies of Parsis compared with other world populations.

Population	Number studied	Frequency
British	117	5.6
Sardinian	97	5.9
Spanish	264	6.9
Canadian	197	6.5
Mexican	114	6.1
Brazilian	351	5.0
Portugese	125	5.6
Mestizo-venez	25	10.4
Punjabi	24	19.8*
Parsi (3rd AOH)	54	23.0**
Parsi -present study	67	28.0**

* P < 0.001 ** P < 0.0001

(HRP) and a chromogenic, soluble substrate to produce a blue "line" at the position of the positive probe (Figure 1). Genotyping software interprets the probe reactivity pattern as a genotype. The percentage gene frequency (GF), haplotype frequency (HF), coefficient of linkage disequilibrium (LD) and t Values were calculated following standard methods 12).

Results

The HLA B14 allele frequencies observed in the present study compared with the other populations from India and world are presented in Table 1. It is interesting to note that only ten of the total populations studied in the International Histocompatibility Workshop 13) showed an allele frequency for B14 above 5% while the Parsi from India had the highest allele frequency reported in Third Asia-Oceania histocompatibility Workshop 14) as well as in the present study. It was also noticed that the Punjabis from India had increased frequency for B14. Molecular subtyping for currently defined seven HLA B14 subtypes viz. B*1401, B*1402, B*1403, B*1404, B*1405, B*14061 and B*14062 using RLS technique revealed that HLA B*1405 (GF = 19%) and HLA B*1401 (GF = 9.5%) were the subtypes present among the Parsi community. Hardy-Weinberg tests using gene frequencies showed a

significant selective advantage ($\alpha = 0.0618$, over 250 generations; $P < 0.0001$) for B14 when compared with other B alleles tested. Further among the A19 subtypes it was A*3001 (GF = 17.6%) and A*3303 (GF = 15%) the common subtypes identified with high frequency. All the other populations studied either had B14 allele frequency reduced or totally absent. Table 2 shows the significant two locus haplotypes identified among the Parsi population. Analysis showed a significant haplotype frequency (HF) and linkage disequilibrium (LD) for HLA A19-B14 (HF=161/1000; LD=71/1000; $p < 0.001$; T value = 2.8). The Molecular subtyping for A19 and B14 alleles revealed that A*3001 – B*1401 and A*3303 – B1405 were the significant haplotypes with high T value.

Discussion

Population specific distribution of HLA alleles is necessary and interesting in both population genetics and disease association studies 15,16). Anthropological studies have demonstrated that the distribution of HLA alleles differ from one ethnic group to another and more novel alleles may be discovered in population studies 17). Natural selection, acting through diverse mechanisms 18,19,20) is an attractive explanation for the maintenance of genetic variability, but its magnitude

Table 2 Significant two locus haplotypes identified in the present study.

Haplotypes	HF	LD	Ki ²	T value [®]	P value
A19 - B14	160	71	4.92	2.80	0.001
A*3001-B*1401	235	188	13.95	2.68	0.00001
A*3303-B*1405	294	177	5.12	2.13	0.0001

HF = Haplotype frequency per 1000 LD = Linkage disequilibrium per 1000

Ki² = Chi-square with Yates correction ® = > 2 significant indicates positive for LD

is still poorly known. Theoretical studies carried out in the mid 1950s, represented the apogee of this school of thought 21), but Kimura himself declared that much of evolution, at the protein level, is selectively neutral and determined by genetic drift 22). This “Neutralist” theory concedes that the vast majority of new changes are deleterious mutation 23). Molecular data are still largely on the side Kimura’s Neutralist theory 24), while evidence of positive selection is generally rare except at some genes such as HLA 25).

Quantitative analysis of extant genetic variation increasingly supports a single origin, rather than a multi-regional scenario of human evolution. One of the most dramatic ways in which changes in population size influence the genetic variation, when a population experiences a rapid and severe decrease in the number of individuals as in the case of Parsi studied here, perhaps due to migration and inbreeding is known as a “population bottle neck” effect. This effect greatly reduces the amount of genetic variation in a population because only a small number of alleles like A19 and B14 as in Parsi will survive the drop in frequencies. This will also lead to an increase in the amount of inbreeding as observed and in doing so increase homozygosity. However among the random 67 Parsi samples studied in the present study we have not noticed the presence of A19 and B14 homozygotes. Although the occurrence of a bottle neck effect for the increased frequencies of A19 and B14 alleles can be accepted to a certain extent considering the origin, migration, genetic drift, inbreeding, natural selection and declining population size we cannot totally ignore the possibility of a “Founder effect” for the increased frequencies of these HLA alleles among Parsi population.

World population data suggest that a severe population “bottleneck” occurred approximately 100,000 years ago, during which our ancestors numbered only 10,000 breeding adult’s 26). For more than 100 identified genes which are associated with Mendelian disease, the answer seems clear; mutational diversity at each locus is high; each mutation is rare, having occurred in recent

human history (not older than 2000 years); and each mutation is necessary and sufficient to cause the phenotypic change of interest 27). Indeed, we know that different HLA genes show remarkably different rates of variation, but to which general or clinical features are they associated with is still a mystery.

It is known that the major populations of the world differ from one another in their anthropological characters. The frequency of HLA antigens and haplotypes also differ markedly. The presence or absence of specific HLA alleles and haplotypes characterizes each of the major races of the world. Some combinations of haplotypes occur more frequently or less frequently than would be normally expected from their random association. This phenomenon is called linkage disequilibrium and positive linkage disequilibrium is that association which occurs more frequently and negative disequilibrium is that where it is less frequent. Presence of a combination of haplotype may confer susceptibility than an individual allele. HLA B52 - DRB1*1502 - DRB5*0102 - DQA1*0103 - DQB1*0601 - DPA1*02 - DPB1*0901 has been reported to confer susceptibility to Takayasu arteritis, while another haplotype of HLA B54 - DRB1*0405 - DRB4*0101 - DQA1*0301 - DQB1*0401 confer resistance 28). Studies in the Indian populations have reported that the HLA antigens and haplotypes differ from one population/caste to another, from one region to another in the Indian subcontinent 29). However the presence of A1 - B8 the typical Caucasian haplotype is yet to be identified in India. The haplotypes A19 - B14 viz A*3001 - B1401 and A*3303 - B*1405 among Parsi is unique since inbreeding is high among this community. Thus linkage disequilibrium and haplotype associations can be used as perfect genetic markers to study different ethnic groups over the world. The reasons for the distribution of these HLA alleles and haplotypes have been attributed to evolutionary forces like “bottle neck effect” and “Founder effect” that are generally caused due to genetic drift, migration, selection and admixture processes.

Acknowledgements

I wish to place on record with gratitude the suggestions and discussions with Dr.J.V.Undevia, Mumbai, in writing this manuscript. Further I would like to thank Dr.D.Mohanty, Director, Dr.K.Ghosh, Deputy Director, and Prof.R.M.Pitchappan, Madurai Kamaraj University for their constant support and encouragement.

References

1. Provine WB: The origins of Theoretical Population genetics. The University of Chicago press, Chicago. 1971.
2. Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A: The history and Geography of Human genes. Princeton University Press. Princeton. 1994.
3. Seilstad MT, Minch E, Cavalli- Sforza LL:Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nature Genet.* **20**: 278-280, 1998.
4. Chakravarti A: Population genetics- making sense out of sequence. *Nature Genet.* **21**: 56 –60, 1999.
5. Undevia JV, Kirk RL, Mc Dermind EM: Serum protein systems among Parsis and Iranis in Bombay. *Hum.Hered.* **23**: 492-498, 1973.
6. Undevia JV, Blake NM, Kirk RL, *et al.*: The distribution of some enzyme groups systems among Parsis and Iranis in Bombay. *Hum.Hered.* **22** : 275-282,1972.
7. Steinberg AG, Undevia JV, Tepfenhart MA: Gm and Inv studies of Parsi and Irani in India: report of a new polymorphic haplotype Gm. *Am.J.Hum.Genet.* **25**: 302-309,1973.
8. Shaha N, Undevia JV, Juneja RK, *et al.*: Polymorphisms of alpha-1-acid (orosomuroid), alpha-2-HS-glycoproteins and alpha-1-B among the parsis of India. *Hum.Hered.* **42**: 367-371,1992.
9. Aruna P, Ghosh K, Shetty S, *et al.*: High frequency of Factor V Lieden mutation in Parsis – a highly endogamous population in India. *Thromb. Haemostasis.* **83**: 965, 2000.
10. Boyum A: Separation of leukocytes from Blood and Bone Marrow. *Scan.J.Clin.Lab.Invest.* **21(supp)**: 97-100,1968.
11. Terasaki PI, Mc Celland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* **204**: 998-1000,1964.
12. Baur MP, Daniloves JA:Population analysis of HLA A, B, C, DR and other genetic markers. *Histocompatibility Testing 1980*. Terasaki PI (ed). UCLA press, Los Angels. 1980; p.955-1210.
13. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, *et al.*: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. *Tsuji K. Aizawa M. Sasazuki T (Eds.). HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility workshop and conference Vol.1* Oxford University Press, Oxford. 1992; p.1066 –1220.
14. Undevia JV, Bagwe AN, Shan B R, *et al.*: Why the Parsis of India have the highest frequency of HLA B14, A19 related and Cw5 antigen in the world? Third Asia-Oceania Histocompatibility Workshop Conference abstracts 36, 1986.
15. Bodmer WF: The HLA system: Structure and Function. *J.Clin.Pathol.* **40**: 948-958, 1987.
16. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, *et al.*: Nomenclature for factors of the HLA system 1998. *Tissue Antigens* **53**: 47-55, 1999.
17. Munkhbbhat B, Sato T, Hagihara M, *et al.*:Molecular analysis of HLA polymorphism in Khaton-Mongolians. *Tissue Antigens* **50**: 124-134,1997.
18. Fisher RA: The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendas Press, Oxford, 1930.
19. Haldane JBS: The causes of Evolution. Longman's and Green, London, 1932.
20. Wright S: Evolution and genetics of populations. Vol.2: The Theory of Gene frequencies. The University of Chicago Press, Chicago, 1997.
21. Kimura M: Stochastic processes and distribution of gene frequencies under natural selection. *Cold Spring Harbor.Symp.Quant.Biol.* **20**: 33-53,1995.
22. Kimura A: Evolutionary rates at the molecular level. *Nature* **217** : 624-626,1968.
23. Kimura A: The Neutral Theory of molecular

- evolution. Cambridge University press, Cambridge. 1983.
24. Nei M: Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press New York. 1987.
25. Hughes AL, Nei M: Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex Class I loci reveals overdominant selection. *Nature* **335**:167-170,1988.
26. Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, *et al.*: Genetic traces of ancient demography. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **95**: 1961-1967, 1998.
27. McKusick VA: *Catalogs of Human genes and genetic disorders* (12th Ed). Johns Hopkins University Press. Baltimore. 1998.
28. Dong RP, Kimura A, Numano F, *et al.*: HLA DP antigen and Takayasu arteritis. *Tissue Antigens* **39**: 106- 110, 1992.
29. Shankarkumar U, Ghosh K, Mohanty D: HLA Class I antigen profile among Brahmins and related caste groups from Mumbai, Maharashtra, India. *Indian Journal Human genetics* **6** : 12-17, 2000.

〔原著論文〕Gene Kit HLA sequencing Assay (VISIBLE社)と Sequencing based typing Kit (Applied Biosystems社) 法の比較検討

吉川枝里, 中島舞子, 河田寿子, 李 素雲, 成瀬妙子, 猪子英俊

東海大学医学部分子生命科学系

(平成14年6月1日受付)

要約

これまでに開発されてきた数々のタイピング法のなかでも、最も高精度なタイピング法としてSBT (sequencing based typing) 法が挙げられる。現在、数種のシステムでのSBTが可能であり、我々の研究室でも2つのシステム、Gene Kit HLA Sequencing Assay (VISIBLE社) とSequencing Based Typing Kit (Applied Biosystems社) を使用している。今回、高精度といわれているSBT法の信頼性を検討するために、この2種のシステムにおいてそれぞれの特性やタイピング結果などを比較し、その精度について検討した。その結果、両者におけるタイピング結果は矛盾なく一致し、両者ともに、高精度かつ信頼性に優れていることがわかった。

キーワード：SBTタイピング, タイピング精度, 遺伝子型

はじめに

現在開発されているHLA-DNAタイピング法には、PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism)法1, 2), PCR-SSP (sequence specific primers) 法3, 4), PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide)法5, 6), PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法7, 8)などがあり、いずれも簡便かつ迅速なDNAタイピング法として広く利用されている。最近では、最も高精度なDNAタイピング法としてSBT (sequencing based typing) 法9, 10)が開発され、注目されている。SBT法は、実際に塩基配列を決定し、それをもとに対立遺伝子を特定する方法で、現在数種のキットや判定プログラムを含めたタイピングシステムが開発されている。その一方、SBT法には他

法では容易に識別可能なヘテロ接合体も、組み合わせによっては識別が不可能という問題点も認められる。我々の研究室ではそれぞれに特性が異なる、VISIBLE社のLongReadTowerSystem (以下VISIBLE) とApplied Biosystems社のABI PRISM377 (以下ABI) を用いてSBTを行っている。しかしながら、両者のタイピング精度について、詳細な比較検討に関する報告は、殆どされていない。

そこで今回は、我々が用いているVISIBLE及びABIの両システムにおいて、タイピング精度を比較し、SBT法により得られたデータの信頼性について検討した。

材料と方法

材料は、PCR-RFLP法、PCR-SSP法による既知

筆者連絡先 〒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
猪子英俊

TEL: 0463-93-1121内線2653
FAX: 0463-94-8884
E-mail: hinoko @is.icc.u-tokai.ac.jp

HLAタイプの16例を含む日本人一般集団34例を用いた。方法はVISIBLEでは、VISIBLE社より開発されたGeneKit HLA Sequencing Assay を用いて、ダイプライマー法によるタイピングを行った。キットのプロトコールに従い、まず検体より採取したゲノムDNA (300~500 ng) を、第2から第3エキソンの約850 bpを増幅させる添付のプライマーセットによりPCR増幅 (ABI PCRSystem 9700) し、得られた産物について1.0%アガロースゲルにて確認泳動を行った。確認後、第2、3エキソンそれぞれを増幅させる蛍光プライマーでサイクルシーケンスを行い反応液をそのままLong Read Tower Systemにて、35分間泳動し、VISIBLE社の判定ソフトで解析を行った。

一方、Applied Biosystems社については、ABI社のSequencing-Based Typing Kitを用いてダイターミネーター法によるタイピングを行った。キットプロトコールに従い、ゲノムDNA (100 ng) を第2から第4エキソンの約2 kbpを増幅させる添付プライマーセットによりPCR増幅を行い、得られたPCR産物をスピнкаラム (MILLIPORE) にて精製した。つづいて、4種の蛍光で標識されたダイデオキシと第2、3、4エキソンそれぞれを増幅させるシーケンス用プライマーを用いてサイクルシーケンスを行い、エタノール沈殿により産物のDNA濃縮後、ABI PRISM377シーケンサーを用いて、15%ポリアクリルアミドにて5~7時間泳動した。解析は、ABI社のSequencing Analysis, MT Navigator, Match toolの3つのソフトを用いて行った。

結果

1. タイピング結果の比較

両システムによる34検体のタイピング結果について、比較を行った (表1)。両者により得られたタイピング結果は、HLA-A 16例、-B 18例で第4エキソンによる絞り込みや情報量による候補数の違いはあったが、最終的に決定した遺伝子型は、全ての検体において一致し、結果に矛盾を示すものは全くなかった。また、34例中16例については、PCR-RFLP法やPCR-SSP法など他のタイピング法も行ったが、結果は全て一致していた。さらに、高精度タ

イピング不能例は共に0例で、2桁レベルのみの特定しかなかった例はなかった。

2. タイピング精度の比較

タイピング結果34例において、両システムで判定結果の絞り込みに差が認められた検体8例について、表2にまとめた。No.1の結果では、ABIにおいて第2、3エキソンの解析結果が14候補であったが、VISIBLEでは9候補に絞り込めた。また、No.2の結果は、VISIBLEにおいてA*0101と4桁での判定に対しABIではA*01011と5桁での判定が可能であった。更にNo.1及び3では、VISIBLEでは得られなかった新しい遺伝子型候補がABIでは得られた。

考察

SBT法は、第12回国際組織適合性会議 (12th IHWC) において、画期的なタイピング法として検討され11)、これまでにさまざまな改良がなされ、より精度の高いタイピング法として急速に成長してきた。それは本法が直接に塩基配列を決定し、タイピングできるという特性を持つことに由来する。タイピング対象遺伝子座についても、当初はDPB1遺伝子のみであったが、現在ではクラスI、クラスII遺伝子におけるほぼ全ての遺伝子のタイピングが可能になった。我々が用いているSBT法のVISIBLE、ABIの両システムでタイピング可能な遺伝子は、VISIBLEではHLA-A, B, C, DRB1であるが、ABIではHLA-Cのキットが開発されていないため、HLA-A, B, DRのみとなる。シーケンス方法と

表1 VISIBLE, ABI両システムにおけるタイピング精度の比較 34検体 (HLA-A:16,B:18)

	VISIBLE	ABI
高精度(High resolution)タイピング不能例	0	0
遺伝子型が1つに決定された検体	14	19
5桁まで判定された検体	22	25
Exon4データによって遺伝子型が更に絞り込めた検体	0	10
結果の不一致		0

しては、プライマーに蛍光標識するダイプライマー法とダイデオキシに標識するダイターミネーター法の2つがある。しかし、ダイプライマー法は各塩基ごとに反応液を調製し、サイクルシーケンス後ミックスして泳動するなど、手間がかかるため、サンプル調製の簡便なダイターミネーター法が主流となっている。

プライマー及びデオキシに標識する蛍光は、ABIでは4種の蛍光を認識する為4つの塩基を1レーンで泳動することが可能である。これに対し、VISIBLEは2種の蛍光を認識できるが現在のキットには1種類の蛍光のみが標識されているため1塩基1レーンでの泳動となる。その結果、1回の泳動につき1検体の1遺伝子座のみのタイピングとなる

表2 タイピング結果の比較

S.No		VISIBLE	ABI	
		exon2, 3	exon2, 3	exon2, 3, 4
1	A*	02011,2402101 02011,2402102L 0212,2413 02011,2409N 02011,2411N 0209,2402101 0209,2402102L 0209,2409N 0209,2411N	02011,2402101 02011,2402102L 0212,2413 02011,2409N 02011,2411N 0209,2402101 0209,2402102L 0209,2409N 0209,2411N 0236,24031 0243N,2402101 0243N,2402102L 0243N,2409N 0243N,2411N	02011,2402101 02011,2402102L 0212,2413 0236,24031
2	A*	0101 0104N 0101,0105N 0104N,0105N 0101,0104N 0105N	01011 0104N 01011,0105N 0104N,0105N 01011,0104N 0105N	01011
3	B*	07021,3501 0709,3534	07021,35011 0709,3534 0718,3505 0724,3515	07021,35011 0709,3534 0718,3505 0724,3515
4	B*	51011 51011,5111N 5111N	51011 51011,5111N 5111N	51011
5	A*	11011,2402101 11011,2402102L 11011,2409N 11011,2411N	11011,2402101 11011,2402102L 11011,2409N 11011,2411N	11011,2402101 11011,2402102L
6	A*	02012,2402101 02012,2402102L 02012,2409N 02012,2411N	02012,2402101 02012,2402102L 02012,2409N 02012,2411N	02012,2402101 02012,2402102L
7	A*	0206,2402101 0206,2402102L 0206,2409N 0206,2411N	0206,2402101 0206,2402102L 0206,2409N 0206,2411N	0206,2402101 0206,2402102L
8	A*	0206,0207 0206,0215N	0206,0207 0206,0215N	0206,0207

両システムのタイピング結果に違いがあった検体の解析結果をいくつか例に挙げた最終的に決定した候補遺伝子型を太字で示した

が、使用するシークエンスゲルは市販の液体ゲルをUVにより重合するのみで、短時間での準備が可能となり、ゲル準備から泳動終了まで約45分で完了する。これに対しABIでは少数多数検体にかかわらず、5～7時間の泳動が必要なため1検体のタイピングにも時間を要する。よって、1検体1遺伝子座のタイピング全行程に要する時間はABIでは約11時間であるのに対しVISIBLEでは約5時間で終了する。このことから、VISIBLEは少数タイピングに、ABIは他検体タイピングにそれぞれ適しているといえる。

解析ソフトの比較では、ABIではまず得られた波形データを見ながら誤って認識されている塩基配列を修正し、その後解析ソフトにより候補を選出する。このため、ある程度波形が揃ったデータを用いなければ候補タイプすら得られないことがある。これに対してVISIBLEでは、得られた生データのみをもとに、編集作業なしに最初に広範囲の候補タイプがリストアップされ、検体の波形データと塩基配列を候補タイプの塩基配列と比べながら消去法によるタイピング解析を行う。そのためABIよりも短時間で簡単に解析が行える。しかし、VISIBLEは異なる

4レーンでの泳動結果を同一画面上で解析するため、レーンによりズレが生じることがあり、解析ソフトでズレを修正しなければならない場合がある(図1)。

解析結果については、表2のように両システムのタイピング結果に違いがみられた。この大きな理由の第1には、増幅領域の違いが挙げられる。ABIは第2から第4エキソンを増幅するため、第2、3エキソンのみでは決定不可能なタイプについて第4エキソンのデータにより対立遺伝子候補の更なる絞り込みが可能である。No.1のABIによるHLA-Aのタイピング結果を例に示すように(図2)、第4エキソンのデータにより、14候補のうち10候補が消去され、候補を4つに絞り込むことが可能であった。第2の理由には、ABIとVISIBLEにおいて用いている対立遺伝子情報量の差があげられる。ABIの結果において、VISIBLEでは得られなかった候補タイプが得られたり、5桁レベルまでのタイピングが可能であるなど、ABIは新しい対立遺伝子の情報をより早く取り入れ情報量が豊富であるため、両者の判定結果の精度に差が出たと考えられる。

以上の結果から、VISIBLEは、簡便かつ短時間で

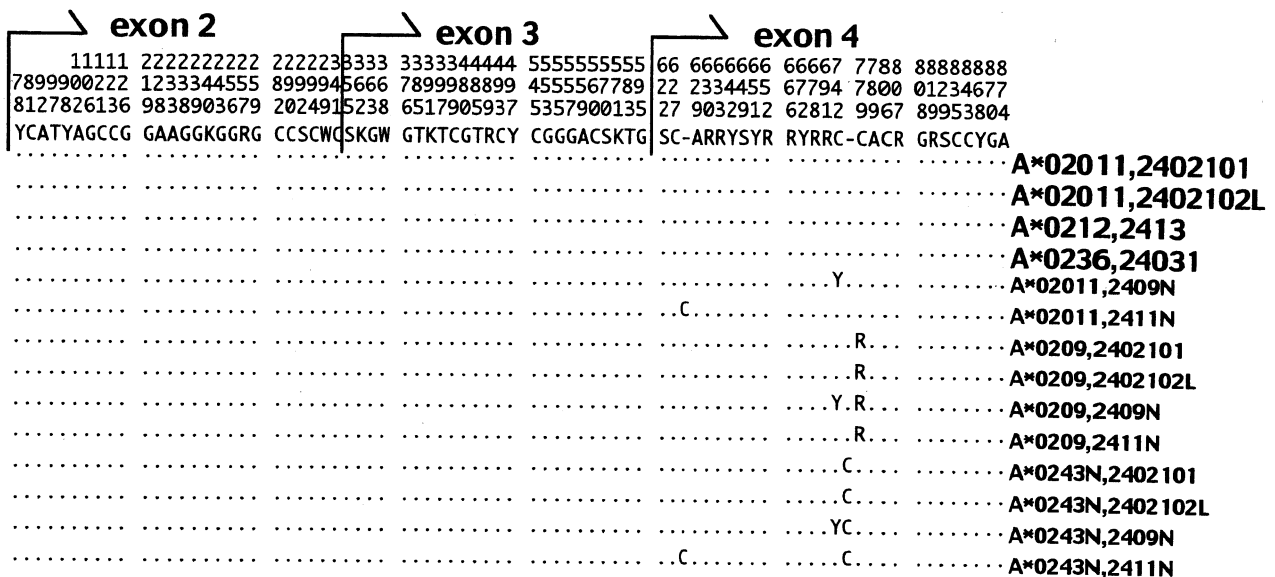


図1 ABIでのシークエンスデータによるHLA-A遺伝子型候補の絞り込み例

上段にNo.1の第2から第4エキソンのシークエンスデータの多型部分を示し、そのデータから割り出された候補タイプを一致度の高い順にそのシークエンスデータと共に並べた。第2、3エキソンのシークエンスデータのみでは、候補タイプが14個だが、第4エキソンのデータにより4つの候補に絞り込めた

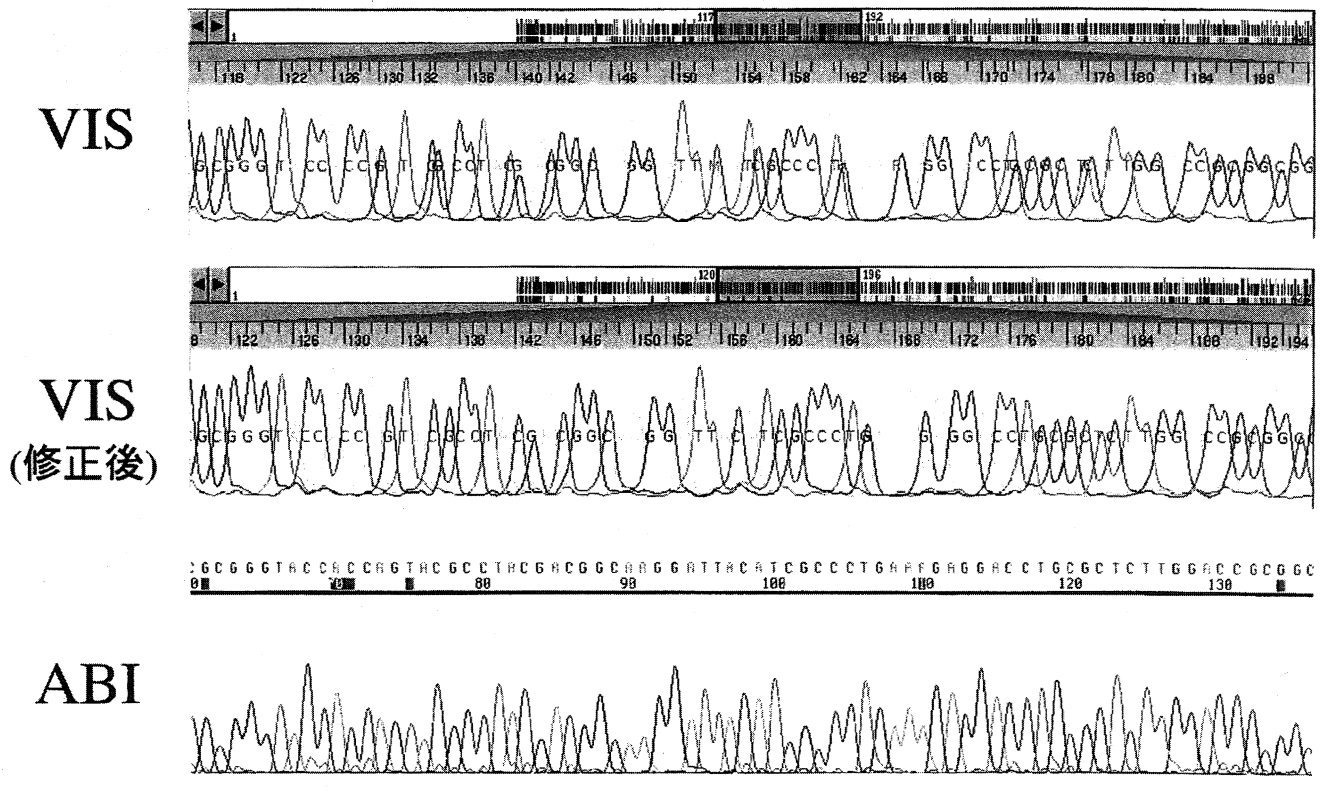


図2 VISIBLEでのシーケンス生データの編集

上段にVISIBLEの生データ、中段に修正後のデータ、下段に参考としてABIの生データをしめた。どれも、同一検体のHLA-A遺伝子第3エクソン上の同一部分をしめた

別々のレーンでのデータを合わせたときのズレは、VISIBLEの解析ソフトにより中段のように修正が可能である

のタイピングが可能であること、解析ソフトが優れているため解析が容易なことなどが利点としてあげられる。またABIでは、少量のDNAでのタイピングが可能であること、4種の蛍光を認識し1検体1レーンでの識別が可能のため複数の検体を一度にタイピングできること、第4エクソンのシーケンスデータにより、詳細な絞り込みが可能であることが利点として挙げられる。一方、問題点としては、VISIBLEでは、1検体を複数レーンで泳動する為バンドのズレが生じることがあるので慎重な解析を行う必要がある点が挙げられ、ABIではサンプルの調製及び泳動に時間がかかり、タイピングにほぼ半日を要するため少数サンプルのタイピングには不向きであることが挙げられる。しかし両システムの結果には全く矛盾がなく、SBT法が高精度で信頼性に優れていることを確認した。今後はそれぞれの機種の特長や利点をいかして、その時の目的に応じた使い

分けをすることでより有意義で効率的なタイピングが可能になると思われる。このように、最も高精度なDNAタイピング法であるSBT法だが、まだその普及率は高くない。1検体1遺伝子座のタイピングに要する価格は、ABIでは約1万円、VISIBLEでは約9,000円と両者での差はほとんどないが、自動シーケンサーが必要であるため、経済的な面での問題もある。しかし、多数のプローブが必要で、フィルターや固相化ウェル等の洗浄作業などの煩雑な操作が多いPCR-SSO法¹²⁾などの他のタイピング法と比べると、SBT法はPCR反応を基本とした比較的簡便な操作で高精度な結果が得られるため、骨髄移植などのドナー検索にこれから益々の応用が期待される。

参考文献

- 1) Mitsunaga S, Tokunaga K, Kashiwase K, *et al.* : A nested PCR-RFLP method for high-resolution typing

- of HLA-A alleles. *Eur. J. Immunogenet.* **25**: 15-27,1998.
- 2) Ota M, Seki T, Fukushima H, *et al.*: HLA-DRB1 genotyping by modified PCR-RFLP method combined with group-specific primers. *Tissue Antigens* **39**: 187-202,1992.
- 3) Olerup O, Aldener A, Fogdell A: HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* **41**: 119-34,1993.
- 4) Bunce M, O'Neill CM, Barnardo MC, *et al.*: Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46**: 355-67,1995.
- 5) Vaughan RW: PCR-SSO typing for HLA-DRB alleles. *Eur J Immunogenet.* **18** : 69-80,1991.
- 6) Kennedy CT, Dodd R, Le T, *et al.*: Routine HLA-B genotyping with PCR-sequence-specific oligonucleotides (PCR-SSO) detects eight new alleles: B*0807, B*0809, B*1551, B*3529, B*3532, B*4025, B*5304 and B*5508. *Tissue Antigens* **55**: 266-70,2000 .
- 7) Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.*: Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. *Eur. J. Immunogenet.* **21**: 1-9,1994 .
- 8) Park MH, Whang DH, Kang SJ : High resolution HLA-DQB1 typing by combination of PCR-RFLP and PCR-SSCP. *Hum. Immunol.* **60**: 901-7, 1999.
- 9) Santamaria P, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, *et al.*: HLA class I sequence-based typing. *Hum. Immunol.* **37**: 39-50,1993.
- 10) Dinauer DM, Luhm RA, Uzgiris AJ, *et al.* : Sequence-based typing of HLA class II DQB1. *Tissue Antigens* **55**: 364-8, 2000.
- 11) Tilanus MGJ, Eliaou JF: *HLA Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication* (eds.Charron D), HLA Sequencing Based Typing. EDK,1997; p.237-238.
- 12) 成瀬妙子, 猪子英俊: 新移植免疫学 (藤原大美編), HLA抗原タイピングと臨床移植における意義, 中外医学社, 2000; p.140-159.

COMPARISON OF SBT SYSTEMS BETWEEN GENETIC KIT HLA SEQUENCING ASSAY (VISIBLE) AND SEQUENCING BASED TYPING KIT (APPLIED BIOSYSTEMS) METHODS.

EF Kikkawa, M Nakashima, H Kawata, Suyun Li, TK Naruse, H Inoko.
Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine.

Summary

The SBT (sequencing based typing) system has many advantages among HLA genotyping methods which have been developed for high resolution typing. At present, several allele detection systems for SBT were developed. Two SBT methods, Genetic Kit HLA sequencing Assay (VISIBLE) and Sequencing-Based Kit (Applied Biosystems) are being used as routine methods in our laboratory. In this study, in order to evaluate them as reliable SBT technique systems, we have compared accuracy and typing results between them. As a result, typing results of both techniques were in agreement with to each other, revealing that both methods were suitable for HLA high resolution typing due to their reliability and high accuracy.

key word : SBT, accuracy of typing, HLA genotyping

第11回日本組織適合性学会大会

The 11th Japanese Society for
Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI)
Annual Meeting

メインテーマ：移植・細胞治療におけるHLAの意義・役割



大会長 前田 平生 埼玉医大総合医療センター 輸血・細胞治療部 教授
会 期 2002年（平成14年）9月24日(火)・25日(水)
9月23日(祝日) HLA-DNAタイピングQCワークショップ
会 場 川越プリンスホテル プリンスホール
〒350-8501 埼玉県川越市新富町1-22
TEL：049-227-1111 FAX：049-227-1110
事務局 埼玉医科大学 総合医療センター 輸血・細胞治療部
〒350-8550 埼玉県川越市鴨田辻道町1981
TEL：049-228-3506 FAX：049-226-3091
e-mail：smchla@saitama-med.ac.jp

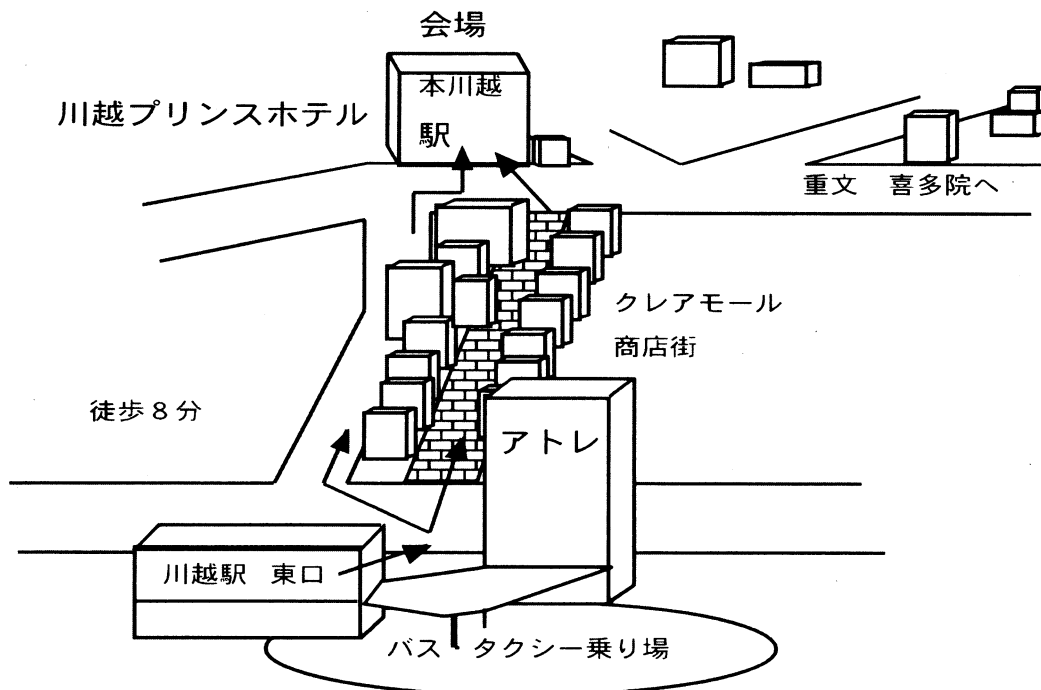
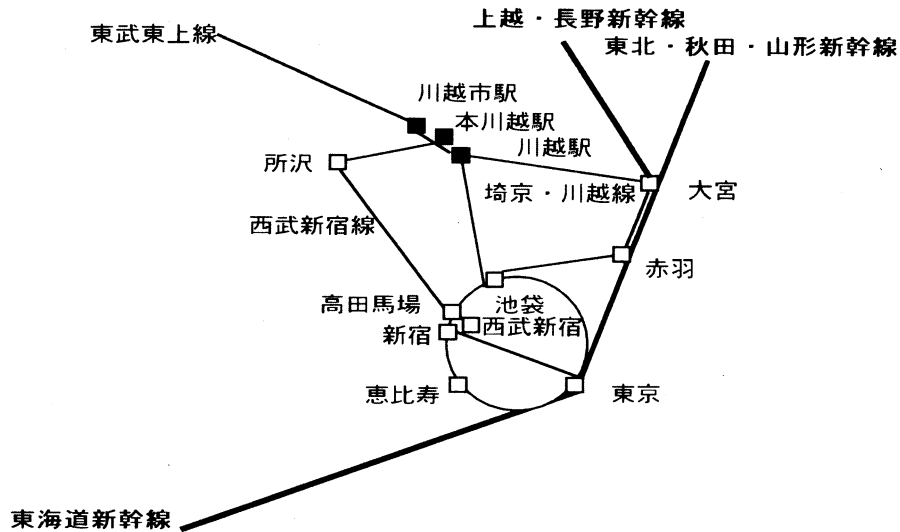
交通案内

JR埼京線・川越線（恵比寿-新宿-大宮-川越駅間 約50分）

東武東上線（池袋-川越市駅間、営団地下鉄有楽町線が乗り入れ 約30～40分）

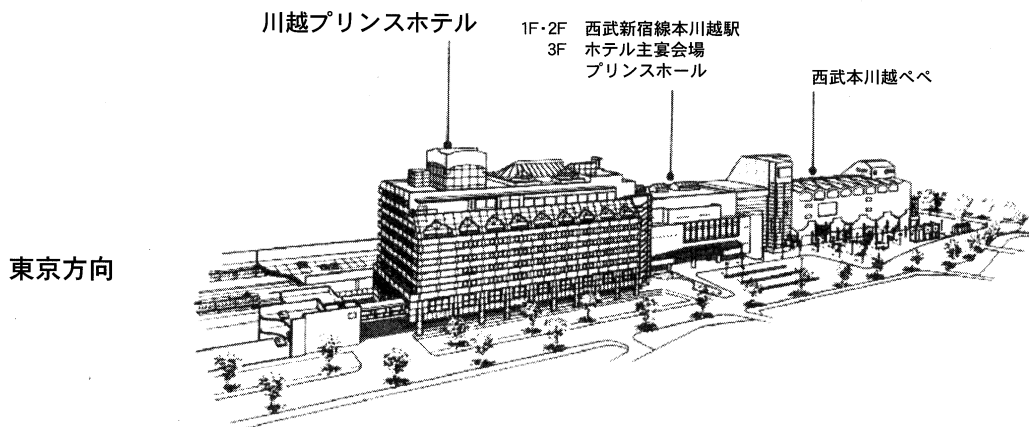
西武新宿線（西武新宿-本川越駅間 約40～60分）

路線案内

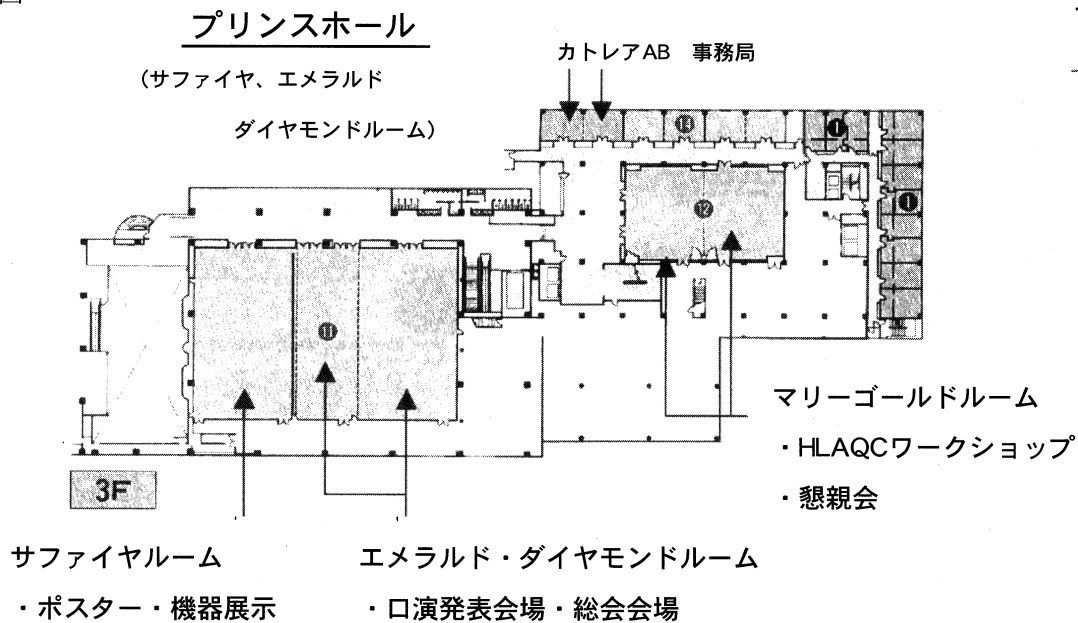


会場案内

会場外観（西武新宿線本川越駅の3Fが会場）



学会場平面図



受付窓口 ダイヤモンドルーム前 参加費等
エメラルドルーム前 一般演題スライド, ポスター受付

御案内

1. 学会・懇親会参加の皆様へ (QCワークショップについては別記)

- 1) 総合参加受付は川越プリンスホテル3Fのプリンスホールロビーです。
- 2) 受付時間は9月24日・25日8:30から16:00(懇親会分は24日のみ)です。
ただし、前日のQCワークショップから御参加の場合には9月23日10:30から16:00の時間帯も大会・懇親会の受付を致します。
- 3) 参加費は大会7,000円,懇親会3,000円です。おつりの必要ないように御協力ください。
- 4) ネームカードが参加証兼領収書になります。会期中は着用してください。
- 5) 参加証は認定HLA検査技術者・認定組織適合性指導者の申請・更新の際に必要となります。
(単位等認定制度に関しては学会誌MHC Vol.8 No.3, 2002を参照)
- 6) 学会にはこの抄録集(本号)をお持ちください。学会期間受付にて一部2,000円にて頒布もいたします。
- 7) 日本組織適合性学会に入会される方,年会費の納付は「学会事務センター」にてお手続きください。大会会場では行っておりません。

2. 演者の皆様へ

- 1) 口演発表は35mmスライド(単映写)を使用し,発表時間に見合う枚数でお願いします。
- 2) 発表時間は,一般演題1題あたり口演時間8分(+討議4分),ポスター発表7分(+討議3分)。ワークショップ1題の口演時間は12分(+討議5分)です。シンポジウムは1題の口演時間は15分(+討議5分)です。その他の講演は別に定めます。
- 3) セッション開始の30分前までに総合受付で試写のうえスライドを預けて下さい。
- 4) 次演者は必ず会場の「次演者席」で待機して下さい。
- 5) ポスター発表者は9月24日午前中に,総合受付で画鋏を受け取り指定の場所に掲示してください。
- 6) ポスターパネルは縦120cm横90cmの掲示スペースがあります。ポスターパネルには演題番号のみ記載されています。演題番名,演者,所属は御自身で御準備ください。
- 7) ポスターの撤去は9月25日のポスター討論終了後をお願いします。

3. お願い

- 1) 発表時間,質疑応答時間を遵守してください。
- 2) 会場内でのポケットベルや携帯電話のご使用はご遠慮ください。
- 3) 参加者の呼び出しは総合案内の掲示板で行います。

4. 懇親会・会議等日程

- 1) 懇親会 9月24日(火) 019:00~21:00 マリーゴールドルーム

- | | | | |
|--------------------------|----------|-------------|---------------|
| 2) 理事会 | 9月23日(月) | 18:00~20:00 | マーガレットルーム |
| 3) 評議員会 | 9月24日(火) | 7:30~ 8:30 | ゴールドルーム |
| 4) 総 会 | 9月25日(水) | 11:30~12:00 | プリンスホール |
| 5) 標準化委員会 | 9月23日(月) | 11:30~12:30 | カトレアABルーム |
| 6) HLA DNAタイピングQCワークショップ | 9月23日(月) | 13:00~16:00 | マリーゴールドルーム |
| 7) 認定制度委員会 | 9月23日(月) | 13:30~14:30 | カトレアABルーム(予定) |
| 8) 認定組織適合性技術者制度・講習会 | 9月23日(月) | 16:00~18:00 | マリーゴールドルーム |

5. 機器展示

9月24日(火) 10:00~18:30, 25日(水) 9:00~16:00 サファイヤルーム(プリンスホール内平面図参照)

6. 企業共催セミナー

- | | | | | | |
|---------------|----------|-------------|----------------------|---------|---------------|
| 1) シンポジウム1 | 9月24日(火) | 13:00~15:00 | 細胞治療:現時点での治療成績と今後の展開 | プリンスホール | 中外製薬 |
| 2) ランチョンセミナー1 | 9月24日(火) | 12:00~13:00 | | プリンスホール | ベリタス |
| 3) イブニングセミナー | 9月24日(火) | 17:30~18:30 | | プリンスホール | アプライドバイオシステムズ |
| 4) モーニングセミナー | 9月25日(水) | 8:00~ 9:00 | | プリンスホール | ティエフビー(TFB) |
| 5) ランチョンセミナー2 | 9月25日(水) | 12:00~13:00 | | プリンスホール | ベリタス |

7. 観光案内等

- 1) 川越市内循環観光バスが本川越駅前から運行されています。
- 2) 川越市観光案内所 TEL049-246-2027
- 3) 食事、御宿泊等のご案内は川越プリンスホテルに直接ご相談ください。

8. 第6回HLA DNAタイピングQCワークショップ参加の皆様へ

HLA DNAタイピングQCワークショップ集会

9月23日(月) 13:00~16:00 マリーゴールドルーム

尚、当日集会参加の場合は参加費2,000円を受付にてお支払い下さい

(QCワークショップに個人・施設参加の方は当日の参加費は必要ありません)

第11回日本組織適合性学会大会プログラム委員(敬称略・順不同)

委員長	前田平生(大会長)	埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療部
委員	安藤麻子	東海大学 医学部 分子生命科学系
	石川善英	東京都赤十字血液センター
	大谷文雄	北里大学 医学部 免疫学
	木村彰方	東京医科歯科大学 難治疾患研究所
	平田蘭子	埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療部
	徳永勝士	東京大学 医学系研究科 人類遺伝学教室
	松下 祥	埼玉医科大学 免疫学講座
	大久保光夫(事務局)	埼玉医大総合医療センター輸血・細胞治療部

第6回HLA-QCワークショップ開催のお知らせ

第6回HLA-QCワークショップを第11回日本組織適合性学会大会前日に開催致します。

多数の会員の皆様の御参加をお待ち致しております。

【日 時】 平成14年(2002年)9月23日(月:祝日) 13:00~16:00

【場 所】 川越プリンスホテル マリーゴールドルーム
350-8501 埼玉県川越市新富町1-22 Tel: 049-227-1111 Fax: 049-227-1110

【交通案内】 1)西武新宿線 本川越駅ビル3F(西武新宿~本川越間約50分)
2)JR埼京・川越線 川越駅下車徒歩10分(大宮~川越間約20分)
3)東武東上線 川越駅下車徒歩10分(池袋~川越間約40分)

【当日参加費】 2,000円(QCワークショップ不参加の会員)

【プログラム】 HLA DNAタイピングQCワークショップ集会 13:00~16:00

日本組織適合性学会標準化委員会 委員長
前田 平生
第11回日本組織適合性学会大会 大会長
前田 平生

プログラム

特別講演

9月24日(火) 15:20~16:20

座長 前田平生(埼玉医大総合医療センター)

SL-1 「DNAからみた日本人の起源」

宝来 聰 総合研究大学院大学

教育講演 I

9月24日(火) 9:00~9:50

座長 木村彰方(東京医科歯科大学)

E-1 癌細胞の排除におけるHLAの役割

講師 西村泰治 熊本大学大学院医学研究科免疫識別学

E-2 HLAテトラマーによる抗原特異的CD8T細胞の解析

講師 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

教育講演 II

9月25日(水) 9:00~9:50

座長 徳永勝士(東京大学)

E-3 HLA分子とT細胞応答

講師 松下 祥 埼玉医科大学 免疫学

E-4 妊娠免疫とHLAクラスIb

講師 石谷昭子 奈良県立医科大学 法医学

シンポジウム 1

9月24日(火) 13:20~15:10 共催 中外製薬株式会社

テーマ 「細胞治療：現時点での治療成績と今後の展開」

座長 西村泰治(熊本大学) 大久保光夫(埼玉医大総合医療センター)

S1-1 腎腫瘍に対する同種細胞療法

高見昭良 金沢大学 大学院医学系研究科細胞移植学

S1-2 固形癌に対するミニトランスプラントの現状と将来

牧本 敦 国立がんセンター中央病院 小児科・造血幹細胞移植部門

S1-3 癌ペプチド療法の現時点での治療成績

山田 亮 久留米大学 医学部免疫学講座
先端癌治療研究センター・がんワクチン分子

S1-4 悪性黒色腫に対するペプチドワクチン療法

角田卓也 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
外科・臓器細胞工学分野

S1-5 WT1をターゲットにした癌の免疫療法

杉山治夫 大阪大学 医学部病態生体情報学

シンポジウム2 テーマ

9月25日(水) 13:10~15:00

「移植医療とHLA」

座長 森島泰雄(愛知県立がんセンター), 福西孝信(兵庫県立西宮病院)

- S2-1 臍帯血移植
加藤俊一 東海大学 細胞移植再生医療科
- S2-2 造血幹細胞移植
森島泰雄 愛知県がんセンター 血液化学療法部
- S2-3 心臓移植とHLA
福寫教偉 大阪大学 臓器制御外科
- S2-4 肝移植におけるHLA適合性,リンパ球クロスマッチ
菅原寧彦 東京大学 医学部人工臓器・移植外科
- S2-5 腎移植
福西孝信 兵庫県立西宮病院 腎移植センター

ワークショップ テーマ

9月24日(火) 10:00~11:50

「HLAタイピング・移植検査の最前線」

座長 斉藤 敏(長野県赤十字血液センター), 橋本光男(兵庫県立西宮病院)

- W-1 蛍光ビーズを用いたリバーSSO法によるHLAタイピング
柏瀬貢一 東京都赤十字血液センター 検査部
- W-2 SBT法による移植時のHLAタイピング
渡辺真穂 福岡大学 医学部第4内科
- W-3 DNAマイクロアレイによるHLAのタイピング
川井信太郎 湧永製薬・創薬研究所
- W-4 移植医療における抗HLA抗体測定の意義
小原節子 名古屋第二赤十字病院組 織適合検査室
- W-5 HLA抗体・クロスマッチ検査:より輸血効果のあるHLA適合血小板を供給するために
斉藤 敏 長野県赤十字血液センター 検査課
- W-6 造血幹細胞移植後の生着確認検査
丸屋悦子 特定非営利活動法人HLA研究所
- W-7 STRを用いた移植後キメリズム解析
白濱秀也 (株)エスアールエル

会員研究発表 I (口演発表)

9月24日 (火)

16:30~17:30

比較ゲノム解析

座長 今西 規 (産業技術総合研究所)

O1-1. MHCクラスI領域(1.8 Mb)におけるヒトとチンパンジーとの遺伝子構成の比較と多様性解析

安西達也¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 木村夏季¹⁾, 柳谷和代¹⁾, 小原栄¹⁾, 重成敦子¹⁾
 成瀬妙子¹⁾, Jerzy K Kulski¹⁾, 福住康仁²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾
 岩本千³⁾, 梅原由美³⁾, 今西規⁴⁾, 池尾一穂³⁾, 五條堀孝³⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学・医・分子生命科学

²⁾ 不二家バイオサイエンス研究所

³⁾ 国立遺伝学研究所生命情報研究センター

⁴⁾ 産業技術総合研究所生物情報解析研究センター

O1-2. ラットMHCクラス I 領域のシークエンシング解析

小原 栄¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 柳谷和代¹⁾, 藤森克史²⁾, 山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾
 Lutz Walter³⁾, Eberhard Gunther³⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医

²⁾ 不二家バイオ研

³⁾ ゲッチングン大・独

O1-3. アカゲザルクラス I 座位Mamu-AおよびMamu-Bの解析

安波道郎, 田中弓子, 本多三男, 森一泰, 俣野哲朗, 木村彰方
 東京医科歯科大学難治疾患研究所, 国立感染症研究所,
 エイズ研究センター, 東京大学大学院 医学研究科

O1-4. アカゲザルMHC (*Mamu*) クラスI領域のシークエンシングとチンパンジー, ヒトとの比較ゲノム解析

椎名 隆¹⁾, 小原 栄¹⁾, 梅原由美²⁾, 大泉ひろこ²⁾, 木村夏季¹⁾, 柳谷和代¹⁾, 安西達也¹⁾
 池尾一穂²⁾, 五條堀孝²⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学 2,

²⁾ 国立遺伝学研究所生命情報 DDBJ 研究センター

9月25日 (水)

10:00~11:00

疾患とHLA

座長 土屋尚之 (東京大学人類遺伝)

O2-1. C型肝炎ウイルスに起因する心筋症の疾患感受性遺伝子マッピング

成瀬妙子¹⁾, 志知大輔¹⁾, 中島舞子¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 太田正穂²⁾, 勝山善彦²⁾
 木村 彰方³⁾, 松森昭⁴⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部分子生命科学系
- 2) 信州大学医学部法医学教室
- 3) 東京医科歯科大学難治疾患研究所疾患医科学研究系
- 4) 京都大学医学研究科循環病態学

O2-2. 帯状疱疹(HZ)および帯状疱疹後神経痛(PHN)における疾患感受性遺伝子解析

杉田法久¹⁾, 佐藤昌子^{3,4,5)}, 安西達也¹⁾, 太田正穂⁶⁾, 馬淵智生²⁾, 小澤明²⁾
屋部登志雄⁵⁾, 石川善英⁵⁾, 花岡一雄⁴⁾, 徳永勝士³⁾, 成瀬妙子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学・医・分子生命科学
- 2) 東海大学・医・皮膚科
- 3) 東京大学・医・人類遺伝学
- 4) 東京大学・医・付属病院麻酔科
- 5) 東京都赤十字血液センター
- 6) 信州大学・医・法医学

O2-3. ヒト6番染色体上のマイクロサテライトマーカーを用いたpooled DNAによるナルコレプシー感受性領域の探索

川嶋実苗¹⁾, 生田智樹²⁾, 田宮元²⁾, 北條浩彦¹⁾, 本多裕³⁾, 徳永勝士¹⁾, 十字猛夫⁴⁾, 猪子英俊²⁾

- 1) 東京大学医学系研究科人類遺伝学
- 2) 東海大学医学部分子生命科学2
- 3) 精神神経センター付属清和病院
- 4) 日本赤十字社中央血液センター

O2-4. ヒトパピローウイルス感染子宮病変をもつ患者とそのHLA DR allele頻度

井奥宏樹¹⁾, 平田蘭子²⁾, 斉藤麻紀¹⁾, 大久保光夫²⁾, 竹田省¹⁾, 前田平生²⁾

- 1) 埼玉大総合医療センター産婦人科
- 2) 同 輸血・細胞治療部

9月25日(水)

16:20~17:10

遺伝子・遺伝子産物の解析

座長 椎名 隆 (東海大学分子生命科学)

O3-1. IKBL(IκB-like)遺伝子の機能解析

柴田宏樹, 安波道郎, 高橋めぐみ, 木村彰方
東京医科歯科大学 難治疾患研究所

O3-2. MICA遺伝子産物(MICA蛋白)の細胞内局在の解析

末水洋志¹⁾, Radosavljevic M²⁾, 木村 穰³⁾, 貞廣荘太郎⁴⁾, 吉村眞一³⁾, 猪子英俊³⁾

- 1) 実験動物中央研究所研究プロジェクト推進センター

2) Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hématologie

3) 東海大学医学部分子生命科学系

4) 同 消化器外科

O3-3. 可溶性HLA-G抗原の検出-T細胞や受精卵は可溶性HLA-G抗原を分泌しうるか

下嶋典子¹⁾, 大村素子¹⁾, 中西真理¹⁾, Daniel E Geraghty²⁾, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

¹⁾ 奈良県立医科大学法医学教室

²⁾ Fred Hutchinson Cancer Research Center

9月25日(水)

17:10~18:00

移植と輸血

座長 能勢義介 (兵庫県赤十字血液センター)

O4-1. Antibody Magnitude Scoreは血小板輸血効果予測の指標となるか: HLA適合血小板輸血効果との関係から

安田広康, 川畑絹代, 大戸 斉

福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部

O4-2. 母児間及び患者・ドナー間のHLA不適合により産生されたHLA抗体の解析

大田智之, 斉藤敏, 瀬下秀幸, 山崎雄一郎, 野村節夫

長野県赤十字血液センター

O4-3. DR抗原特異性と腎移植成績

酒巻建夫¹⁾, 木村彰方²⁾, 山崎正明¹⁾, 飯田好江¹⁾, 野田岳¹⁾

¹⁾ 国立佐倉病院・HLA検査室

²⁾ 東京医科歯科大・難研・分子病態

O4-4. サイトカイン, サイトカイン受容体遺伝子多型の非血縁者間骨髄移植成績への影響

石川善英¹⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 十字猛夫²⁾

¹⁾ 東京都赤十字血液センター

²⁾ 日赤中央血液センター

会員研究発表II (ポスター発表)

9月25日(水)

15:10~16:10

解析手法

座長 佐田正晴 (国立循環病センター)

P1-1. 1分子蛍光分析を用いたハイスループットSNP(単一塩基多型)タイピング法

明坂珠生¹⁾, 堀 邦夫²⁾, 佐藤和久²⁾, 川嶋実苗¹⁾, 武田千恵子²⁾, 牧野 徹²⁾

坂内 誠^{1,3)}, 徳永勝士¹⁾

¹⁾ 東大・医・人類遺伝学

²⁾ ノバスジーン

³⁾ オリンパス光学工業

- P1-2. Use of Combinatorial Peptide Libraries to Identify Sequences Optimized for Binding to MHC and Stimulation of Cytolytic T cells: An Approach to Rapid Vaccine Design.
Keiko Osawa¹⁾, Cesar Boggiano¹⁾, Jennie Chang¹⁾, Kim Schroder¹⁾, Mark Dudley¹⁾
Clemencia Pinilla¹⁾, Steven A. Rosenberg²⁾, Richard A. Houghten, Darcy B. Wilson¹⁾

¹⁾ Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

²⁾ National Cancer Institute, NIH, Bethesda MD, USA

- P1-3. HLA-SPP法を用いたHLAタイピングの有用性

太田正穂¹⁾, 島田和典²⁾, 鈴木千穂²⁾, 勝山善彦³⁾, 福島弘文¹⁾, 佐田正晴⁴⁾

¹⁾ 信州大学医学部法医学教室

²⁾ ゲノムサイエンス研究所

³⁾ 信州大学病院薬剤部

⁴⁾ 国立循環器病センター再生医療部移植外科

- P1-4. 2色蛍光同時検出系を用いたHLAクラスII高精度DNAタイピングTaqMan法の開発
中島舞子, 吉川枝里, 河田寿子, 成瀬妙子, 猪子英俊
東海大学医学部分子生命科学系

9月25日(水)

15:10~16:10

異種遺伝子解析

座長 安波道郎(東京医科歯科大学難治研)

- P2-1. アライグマPLA-DRB遺伝子の解析

松崎雄三¹⁾, 小林 賢²⁾, 阿藤みや子²⁾, 鈴木洋司²⁾, 今井利夫³⁾, 向田政博¹⁾

¹⁾ 防衛医科大学校法医学講座

²⁾ 同輸血部

³⁾ 東邦大学理学部生物学科動物生命機構部門

- P2-2. ペンギン類フンボルト属のMHC領域における多型解析

吉川枝里¹⁾, 成瀬妙子¹⁾, 福田道雄³⁾, 栗田正徳⁴⁾, 村田浩一⁵⁾, 津田道雄¹⁾
津田とみ^{1,2)}, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学

²⁾ 徳島文理大学人間生活学部

³⁾ 東京都葛西臨海水族園

⁴⁾ 名古屋港水族館

5) 日本大学生物資源科学部

P2-3. シークエンシングによるウズラ*Mhc (Coja)*近傍領域の構造解析

清水佐良子¹⁾, 椎名隆¹⁾, 細道一善²⁾, 半澤 恵²⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医・分子生命科学

²⁾ 東京農大・農・家畜生理学

P2-4. SLAクラスI遺伝子領域のゲノム構造解析-HLA-CとHLA-E遺伝子間に相当する領域の構造解析-

重成敦子¹⁾, 安藤麻子¹⁾, 椎名隆¹⁾, Claire Rogel-Gaillard²⁾, Patrick Chardon²⁾

安江博³⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医・分子生命科学

²⁾ Laboratoire mixte INRA-CEA

³⁾ 独立行政法人・農生資源研

P2-5. ブタ同種腎移植例におけるSLAクラスI, クラスII遺伝子のDNAタイピング

安藤麻子¹⁾, 河田寿子¹⁾, 重成敦子¹⁾, 太田正穂²⁾, 勝山善彦³⁾, 小林孝彰⁴⁾, 横山逸男⁴⁾

中尾昭公⁴⁾, 佐田正晴⁵⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・分子生命科学

²⁾ 信州大・医・法医学

³⁾ 信州大病院・薬剤部

⁴⁾ 名古屋大・第二外科

⁵⁾ 国立循環器病センター研究所

9月25日(水)

15:10~16:10

HLA遺伝子解析

座長 石川善英 (東京都赤十字血液センター)

P3-1. HLA領域にハプロタイプとしてLOHが検出された症例

峯元睦子¹⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 植木純一¹⁾, 栗田裕子¹⁾, 清水まり恵¹⁾, 津久井和夫¹⁾

安波道郎²⁾, 木村彰方²⁾, 神谷昌弓³⁾, 香取美津治³⁾, 佐竹正博¹⁾

¹⁾ 東京都赤十字血液センター,

²⁾ 東京医科歯科大学・難治疾患研究所

³⁾ 東京慈恵会医科大学付属柏病院

P3-2. 日常検査で検出されたHLA-B*0705とこれに関連する各ローカスの特徴について

梅津昭子, 中村淳子, 齊藤敏雄, 中島文明, 松原賢弘, 宮田義久, 村田栄二,

諏訪城三

神奈川県赤十字血液センター

P3-3. 尿をDNAの材料としたDNAタイピングの試み

阿藤みや子¹⁾, 小林 賢¹⁾, 鈴木洋司²⁾, 玉井誠一^{1,2)}

¹⁾ 防衛医科大学校検査部

²⁾ 同 輸血部

P3-4. 390家系におけるHLA遺伝子座の組み換え率

荒木延夫, 秋田真哉, 皆森久実子, 能勢義介, 井本しおん, 三戸 壽

兵庫県赤十字血液センター

13thIHWC報告/7thAOH/第12回日本組織適合性学会(次回大会案内)

9月25日(水) 11:00~11:30

座長 猪子英俊 (東海大学医学部)

1. 13th IHWC報告 柏瀬貢一 (東京都赤十字血液センター)
 成瀬妙子 (東海大学医学部)
2. 7th AOH案内 猪子英俊 (東海大学医学部)

企業共催セミナー(ランチョンセミナー等)

- 1) ランチョンセミナー1 24日 12:10~13:10 (株)ベリタス
 1. Flow PRA法によるHLA抗体スクリーニングの有用性
 佐田正晴 国立循環器病センター・再生医療部・移植外科
 2. ワンラムダマイクロSSPシステム-日本人アレルABC/DRDQに対応したタイピング-
 斎藤克行 ワンラムダ社
- 2) イブニングセミナー 24日 17:30~18:30 (株)アプライドバイオシステムズジャパン
 1. AmpFISTR SGM Plus™ PCR Amplification Kit を用いた移植後キメリズム解析
 白濱秀也 エスアールエル遺伝子・染色体解析センター遺伝子検査課
 2. SBT法によるHLAタイピング -現状と課題-
 清水まり恵, 柏瀬貢一 東京都赤十字血液センター 検査部
- 3) モーニングセミナー 25日 8:00~9:00 (株)ティエフビー
 演題未定
- 4) ランチョンセミナー2 25日 12:00~13:00 (株)ベリタス
 1. 蛍光ビーズを用いたリバーSSO法によるHLAタイピング-LAB Type SSOの利点と課題-
 植木純一 京都赤十字血液センター 検査3課
 2. 改良されたLABType SSOについて
 斎藤克行 ワンラムダ社

第11回日本組織適合性学会プログラム

於 川越プリンスホテル

2002年9月24日(火)

2002年9月25日(水)

部屋時間	ダイヤモンド・エメラルド	サファイア
8		
9	開会の辞 8:50-9:00	
10	教育講演1・2 (E1・E2) 9:00-9:50 座長: 木村彰方	展示準備
11	ワークショップ(W1~7) 10:00-12:00 座長: 橋本光男, 斉藤敏	
12	ランチョンセミナー1 12:10-13:10	ポスター展示
13		
14	シンポジウム1 (S1-1~5) 13:20-15:10 座長: 西村泰治, 大久保光夫	機器展示
15		
16	特別講演 宝来聰先生 15:20-16:20 座長: 前田平生	
17	一般演題1 (01-1~4) 16:30-17:30 座長: 今西 規	
18	イブニングセミナー 17:30-18:30	
19		
20	懇親会(別室) マリーゴールドルーム 19:00-21:00	
21		

部屋時間	ダイヤモンド・エメラルド	サファイア
8	モーニングセミナー 8:00-9:00	
9	教育講演3・4 (E3・E4) 9:00-9:50 座長: 徳永勝士	
10	一般演題2 (02-1~4) 10:00-11:00 座長: 土屋尚之	
11	IHWS報告・A0H7案内等 11:00-11:30	
12	総会 11:30-12:00	ポスター展示
13		
14	シンポジウム2 (S2-1~5) 13:10-15:00 座長: 森島泰雄, 福西孝信	機器展示
15		
16		ポスター発表 (P1-1~P3-4) 15:10-16:10 座長: 1: 佐田正晴 2: 安波道郎 3: 石川善英
17	一般演題3 (03-1~3) 16:20-17:00 座長: 椎名 隆	
18	一般演題4 (04-1~4) 17:00-18:00 座長: 能勢義介	
19	閉会の辞 18:00-18:10	

シンポジウム

SL-1

DNAからみた日本人の起原

宝来 聰 (ほうらい さとし)

総合研究大学院大学

アジア大陸から日本列島への人類集団の移住は、大きく分けて少なくとも2回あったと考えられている。縄文人と呼ばれる人々は、今から12,000年以上前に日本列島に渡来したとされているが、正確な移住年代やこの移住者の地理的な起源に関しては、依然謎のままである。一方、弥生時代に渡来してきた集団（弥生人）は北東アジアに起源を持ち、今から約2,300年前に朝鮮半島を通過して日本列島に上陸したと考えられている。日本の先史時代の大きな問題の1つは、先住民である縄文人とその後移住してきた弥生人が、遺伝的にどの程度、現代の日本人集団の形成に寄与したのかということである。

現在の日本には、本土の日本人とは異なる民族成立を果たしたと考えられている2つの日本人グループがある。北海道に住むアイヌの人々と、沖縄をはじめとする南西諸島に住む琉球人と呼ばれる人々である。これら2つのグループは、縄文時代に居住していた先住民（縄文人）の子孫であるとする考えが一般的に認められている。

現代の日本人集団の起源については幾つかの仮説が提唱されており、中には100年以上前に提唱されたものもある。現在では、大きく3つの仮説に分類することが出来る。すなわち、転換説、置換説、混血説である。

転換説は、更新世の終わりに中国南部から移住してきた単一の古代人の集団から、日本人は徐々に進化してきたとするものである。その古代人の集団が縄文人となり、縄文時代には日本列島全体を占有していた。これら縄文人は次第に形態的な特徴を変化させて、現在日本の本土に住む日本人へと小進化した。この説では、弥生時代以降の渡来人は文化的には現代日本人の形成に寄与したが、遺伝的には何の役割も果たしていないこととなる。

一方、置換説では、日本本土の先住集団が弥生時代以降の渡来系集団により完全に置き換わったとする。この説では、日本本土に住む現在の日本人集団は、先住の縄文人集団の遺伝的寄与を全く受けていないことを意味する。混血説は、現代日本人は異なる移住者集団が混じり合った結果形成されたとするものであり、日本人は縄文人と弥生人の両方に由来する遺伝的要素を持つこととなる。

現代日本人の起源に関するこれらの仮説は、主として形態学的な特徴についての研究に基づき提唱されたものであった。従って、遺伝学的研究に基づいて、現代日本人の起源や成立について考察する必要がある。

現代日本人の成り立ちについて研究し、かつ日本人の起源に関する最も適切なモデルを構築するために、我々のグループでは広範に分布するアジアの諸人類集団を対象としたDNA多型分析を行ってきた。本講演では、母性遺伝マーカーであるミトコンドリアDNAのDループ領域の塩基配列の変異、及び父性マーカーのY染色体DNA多型で得られた最新の知見に関して報告したい。

E-1

癌細胞の排除におけるHLAの役割

西村 泰治 (にしむら やすはる)

熊本大学大学院 医学研究科 免疫識別学

HLAは細胞表面の膜上に発現する糖蛋白質であり、抗原が分解されて出来たペプチドを結合して、これをT細胞に見せて活性化する役割を担っている。HLAには形、組織分布および結合する抗原ペプチドの由来を異にする、クラスIおよびクラスIIの2種類がある。T細胞には抗原ペプチドをHLAクラスI分子と結合した形で認識するCD8陽性キラーT細胞と、HLAクラスII分子と結合した形で認識するCD4陽性ヘルパーT細胞とがある。すべての有核細胞および血小板に発現しているHLAクラスI分子と結合して、細胞の表面に発現するペプチドは8~10数個のアミノ酸からなり、通常は細胞質や核の自己蛋白質に由来する。細胞にウイルスが感染したり、癌化に関連して特異な蛋白質が産生されると、これらに由来するペプチドが、HLAクラスI分子に結合し細胞の表面に発現する。CD8陽性キラーT細胞は、これらを識別して感染細胞や腫瘍細胞を破壊する。

この10数年間の研究によりヒトの悪性黒色腫（メラノーマ）の抗原ペプチドがHLAクラスI分子と共にキラーT細胞に認識され、メラノーマ細胞が破壊されることがわかった。これまでに同定されているヒト癌抗原は、1) 癌細胞と精巣にのみ発現するcancer-testis (CT) 抗原、2) 組織特異抗原、3) 変異ペプチド抗原、4) 癌遺伝子・癌抑制遺伝子産物、5) 癌胎児性蛋白、6) 癌細胞で発現が増強している蛋白などに分類される。癌抗原をワクチンとして癌の免疫療法への応用を考える場合には、1) 多くの患者に使えるかどうか、2) 自己の正常細胞を破壊せずに腫瘍のみの破壊を誘導できるか、などを十分に考慮する必要がある。

多くの癌細胞はHLAクラスIを発現するがHLAクラスIIを発現しないので、キラーT細胞だけが癌細胞を認識できる。いっぽうヘルパーT細胞は、キラーT細胞を活性化するため、適切な癌免疫の誘導には両方のT細胞を活性化することが重要である。最近では癌抗原を樹状細胞に取り込ませて患者に投与すれば、癌を攻撃する両方のT細胞を強く誘導できることが報告されている。また抗原ペプチドを結合したHLAクラスI分子の4量体（テトラマー）を用いることにより、癌細胞を攻撃するキラーT細胞を正確に検出できるようになった。このようにHLA分子は、癌細胞の排除に重要な役割を担っている。

E-2

HLAテトラマーによる抗原特異的CD8T細胞の解析

滝口 雅文 (たきぐち まさふみ)

熊本大学エイズ学研究センター ウイルス制御分野

今までの免疫学研究では、細胞傷害性T細胞 (CTL) は、 ^{51}Cr releasing assayによる機能的な方法によって測定されてきた。この方法は、アイソトープが使える施設に限られること、effector: target比やtarget細胞の種類によって得られるデータに差が出ること、実験日や実験者間における誤差などの様々な実験上の問題があった。また、低頻度のCTLを感知できないなど、CTLの研究を制限する要因になっていた。これらの問題を解決する為、エピトープペプチドを結合させたHLAクラスI分子を標識し、これをT細胞レセプター (TCR) に結合させて、フローサイトメトリーで測定する方法の開発が、長い間試みられていた。しかし、HLAクラスI分子とTCRの結合能は、抗原と抗体の結合と比べて1000分の1以下であり、今まではこの方法による測定は不可能であった。最近、CTLエピトープペプチドを結合させたHLAクラスI分子を4つ結合させたAvidin (テトラマー) を用いることにより、これらのエピトープに特異的TCRをもったT細胞をフローサイメトリーで解析できることが可能になった。この方法は従来の ^{51}Cr releasing assayを用いた方法と比べても10倍以上感度がよく、凍結させておいたサンプルをそのまま解凍して測定でき、抗体と組み合わせて多色染色することにより多くの情報を得られ、きわめて有効な手段である。

我々は、多数のウイルス抗原特異的CTLエピトープを用いて、テトラマーを作製した。これらを用いて、それぞれのウイルス感染症において誘導されてくる抗原特異的CD8T細胞を検出した。さらに様々な抗体を使った多重染色解析をおこなって、抗原特異的CD8T細胞を詳細に解析をした。これらの結果から、ヒトの末梢CD8T細胞の分化に関しての知見を得られたので紹介する。

E-3

HLA分子とT細胞応答

松下 祥 (まつした しょう)

埼玉医科大学 免疫学

自己や外来の蛋白は抗原提示細胞により処理され、ペプチド断片としてHLA分子の抗原収容溝内に結合する。この複合体をT細胞抗原レセプター(TCR)によって認識したT細胞が活性化されて抗原特異的免疫応答が始まる。HLAクラスI分子は細胞質内のペプチドを細胞表面へ輸送し、このHLAクラスI・ペプチド複合体はCD8陽性T細胞により認識される。HLAクラスII分子は、小胞区画内のペプチドを細胞表面へ輸送し、このHLAクラスII・ペプチド複合体はCD4陽性T細胞により認識される。一方、T細胞と抗原提示細胞相互作用により誘導される抗原提示細胞側へのシグナリングに関してはCD40に由来するものなどがよく知られているが、HLAそのものも重要な役割をになっているという報告は多い。

ミコール酸やリポアラビノマンナンは、結核菌の生存に必須の脂質・糖脂質であり、病原性とも深く関連している。このような脂質抗原の提示を担っているのがCD1 蛋白である。CD1分子の基本構造はHLAクラスI分子に似ている。ヒトCD1分子は相同性の程度によりグループ1 (CD1a, CD1b, CD1c) とグループ2 (CD1d) に分類される。マウスやラットではグループ2のみが存在している。グループ2は血球系細胞に広く分布し、海綿動物由来の糖脂質である α -ガラクトシルセラミドを結合してナチュラルキラー細胞の表面マーカーを発現したT細胞 (ナチュラルキラーT細胞: NKT細胞) を活性化する。NKT細胞はごく限られた種類のTCRしか発現していないことから、限られた種類の脂質抗原しか認識できないと考えられる。むしろTh1/Th2のバランスやNK細胞の機能をコントロールする役割を担っているらしい。それに対して、グループ1は胸腺外ではおもに樹状細胞に発現しており、自己由来の脂質や結核菌など細菌由来の脂質・糖脂質を効率よくT細胞に提示する。 $\alpha\beta$ 型T細胞 (おもにCD8+T細胞だがCD4-8-やCD4+T細胞の報告もある) だけでなく、 $\gamma\delta$ T細胞 (腸管に存在し、おもにV δ 1型のTCRを発現した $\gamma\delta$ T細胞) のなかにもグループ1 CD1分子によって活性化されるT細胞がある。

TCR遺伝子の再構成を伴う多様な抗原認識機構を支えている抗原提示分子は典型的 (古典的) HLA分子とグループ1 CD1分子 (CD1a, CD1b, CD1c) であると言えよう。

E-4

妊娠免疫とHLAクラス I b

石谷 昭子 (いしたに あきこ)

奈良県立医科大学 法医学

妊娠において胎児は、遺伝子の半分が父親由来で、母体にとっては一種の同種移植片である。臓器移植においては常に拒絶反応が引き起こされ、特に移植片のHLA型がレシピエントのそれと異なる場合等、急激な拒絶反応がしばしばみられる。妊娠においてはHLAの適合性など考慮されているわけではないにもかかわらず、母体は妊娠期間中、胎児を拒絶せず生着させている。この母児の接点における免疫機構の疑問は1950年代から問われ続け、未だに解明されていない。これまで、この免疫機構を解明するひとつの鍵として母児の接点である胎盤トロホブラスト上のHLAについて多くの研究がなされてきた。

この胎盤トロホブラスト上にはHLA分子は、クラスIaとよばれるHLA-A, -BおよびクラスIIは発現しておらず、クラスIbとよばれるHLA-E, -F, -Gが発現している。クラスIbはクラスIaと異なり、著しく多型性に乏しいことが特性である。HLA-Gはその発現が人体組織中、胎盤トロホブラストにのみ限局されており、胎盤における特殊な役割を想定させる。実際これまでに、子宮内のサイトカインバランスの調整とかNK傷害活性の抑制等の機能が報告されてきたが、最近、HLA-G分子がT細胞のアポトーシスを誘導するとか、T細胞のアロ反応を抑制するという報告が相次いでいる。HLA-EもNKレセプターと反応してNK傷害活性を抑制するのであるが、そのHLA分子内に結合している9merのペプチドの種類によりNK細胞の活性化にも働く。HLA-EはクラスIaとは異なり、各種細胞内蛋白由来のペプチドをその分子内に結合することはできない。ただ他のHLAクラスIのシグナル配列由来ペプチドのみを結合するのであるが、胎盤においては主としてHLA-Gのシグナルペプチドを結合しており、この場合のみNK活性化に働く。HLA-Fはほとんどの細胞において細胞膜上には発現していないが、満期胎盤の母体脱落膜に深く進入しているトロホブラストにのみ膜上に発現しているようにみられる。

このように、これら3つのクラスIb分子はなんらかの怪しげなる相互作用により、妊娠維持に向けて、ひたすらその役割を果たしているようである。

S1-1

腎腫瘍に対する同種細胞療法

高見 昭良 (たかみ あきよし)

金沢大学大学院医学系研究科 細胞移植学

腎細胞癌(RCC)は化学療法抵抗性ではあるものの、一部の症例はインターフェロンやインターロイキン2などの免疫療法に反応することから、様々な免疫療法が試みられてきた。しかし転移をともなう末期例に対しては、明らかに有効という治療法はなかった。1999年、血液腫瘍に行われてきた骨髄非破壊的造血幹細胞移植(ミニ移植)がRCCに対しても有効であるという画期的な成績が、アメリカ国立衛生研究所の研究によって初めて報告された。彼らは、前治療に免疫抑制作用の強いフルダラビンとシクロホスファミドを用いて、肺転移をともなう腎細胞患者にミニ移植を行った。その結果、19例中10例に腫瘍の縮小が認められ、3例は完全寛解となった。多くが高齢(37歳~65歳, 中央値48歳)であったが、移植に関連した死亡は急性移植片対宿主病(GVHD)と敗血症の各1例だけであった。我々は彼らの方法にならい、これまで進行性RCC 3例(64歳・男性, 58歳・女性, 56歳・男性)にミニ移植を施行した。3例ともに移植後の血液学的回復は速やかで、重篤な臓器障害や感染症はなかった。ミニ移植直後は3例とも腫瘍は増大し続けたが、初めの症例では移植4か月後頃から進行が止まり、移植6か月後慢性GVHDの出現と同時期に腫瘍が縮小し始めた。2例目では急性GVHDの出現とともに腫瘍の増大は止まったが、全身状態の改善が得られる前の移植2か月後に死亡した。3例目では、移植後3か月頃に慢性GVHDが出現。移植8か月後、慢性GVHDの悪化と同時に腫瘍が縮小し始めた。このような同種免疫効果を利用したRCCの治療に対する期待は大きいですが、課題も少なくない。RCCに対してミニ移植が成功するかどうかは同種免疫効果の発現に依存しており、GVHDがほぼ必発すると予想される。したがって、重症GVHDのためにかえって余命が短くなる危険性や、逆にGVHDの改善とともに抗腫瘍効果が減弱する恐れがある。また、通常は同種免疫効果の誘導に1~3か月以上かかるため、腫瘍が急速に増大する場合にはミニ移植の効果が得られにくい。さらに、clear cell carcinoma以外のRCCには同種免疫効果が誘導されにくい可能性も指摘されている。このような問題点の解決も含め、本邦での腎細胞癌に対するミニ移植の有用性が、大規模な臨床試験によって一日も早く明らかになることを期待したい。

S1-2

固形癌に対するミニトランスプラントの現状と将来

牧本 敦 (まきもと あつし)

国立がんセンター中央病院 小児科 造血幹細胞移植部門

悪性腫瘍に対する同種造血幹細胞移植による治療効果の発現は、移植前処置のもつ抗腫瘍効果によるものよりも、むしろ移植片のもつ同種抗腫瘍免疫によるものと考えられるようになってきた。このような同種抗腫瘍免疫によって移植片対腫瘍効果(GVT効果)が起こることは、造血器腫瘍のみならず、腎癌のような固形腫瘍においても臨床的に証明されている。このような固形癌に対する同種造血幹細胞移植を行う際、移植関連毒性が低いミニトランスプラントが選択される。ミニトランスプラントの安全性の確立に伴い、多くのミニ移植の臨床試験が可能となり、基礎実験における腫瘍抗原等の同定に先んじて臨床研究が進んでいるのが現状である。

国立がんセンター中央病院では1999年に固形腫瘍に対するミニトランスプラントの第一相試験を開始し、これまでに20例の様々な固形腫瘍患者に対するミニトランスプラントを施行した。実際の手技として、移植前処置はフルダラビン、ブスルファン、抗胸腺細胞グロブリンを用い、HLA一致の血縁ドナーからの末梢血幹細胞移植を行っている。8例の転移性腎癌に対しての成績は、部分寛解が一例のみであり、米国の報告に比べて奏功率が低いものの、1年生存率を計算すると60%であり、延命効果が期待できるものと考えられる。米国との異なる治療効果の要因として、元々の腎癌の重症度、移植片対宿主病(GVHD)の頻度の違い、が挙げられる。

腎癌以外の固形腫瘍では、悪性黒色腫、横紋筋肉腫や神経芽腫等の小児固形癌に対してミニトランスプラントを適用しているが、GVT効果の発現は、癌腫の違いよりもむしろ原病の進行速度や残存病変の大きさに左右される印象がある。腫瘍抗原が同定され、免疫療法が効果的とされる悪性黒色腫に対するミニトランスプラントでは、期待されるようなGVT効果を得ることはできなかった。一方で、予後絶対不良が予想される自家移植後再発の神経芽腫の1例では1年半以上にわたって寛解を維持しており、転移性横紋筋肉腫の1例では化学療法・放射線療法による十分な腫瘍減量の後にミニトランスプラントを施行して完全寛解を達成している。今後はミニトランスプラントを一つの治療手段と位置づけ、従来の治療法を組み入れた包括的な治療戦略を、癌腫に応じて最適化していくことが必要であると考えられる。そのために、対象疾患を絞ったミニトランスプラントの第二相試験を計画中である。

S1-3

癌ペプチド療法の現時点での治療成績

山田 亮 (やまだ あきら)

久留米大学医学部 免疫学講座

久留米大学先端癌治療研究センター がんワクチン分子部門

癌細胞は宿主の細胞傷害性T細胞 (CTL) によりHLAクラスI拘束性に認識され傷害される。そこで、癌患者由来CTLにより認識されるHLA結合性癌抗原ペプチドを同定し、これらのペプチドを患者に投与することにより能動免疫を誘導しようという試みがなされている。我々は、gene expression cloning法により約100個の癌拒絶抗原分子、およびこれら由来のHLA拘束性抗原ペプチドを多数同定している。現在、これらの抗原ペプチドを用いた癌ペプチドワクチン療法の第1相臨床試験をHLA-A24もしくはHLA-A2陽性の高度進行癌患者に対し実施中である。従来型の1種類の癌抗原分子に由来するワクチンペプチドを投与する“第1世代の癌ワクチン”の臨床試験では有害事象はワクチン投与部位の腫脹・発赤 (グレード1) のみであった。ワクチン数回投与後の患者末梢血中には約半数の症例において癌特異的CTLが誘導されたが、臨床効果を認めるにはいたらなかった。そこで、個々の患者に最適の複数のペプチドワクチンを同時に投与するテーラーメイド型の“第2世代癌ワクチン”「CTL precursor-orientedペプチドワクチン」へと移行し、臨床試験を現在実施中である。対象症例は肺癌、胃癌、大腸癌、婦人科癌、前立腺癌、メラノーマ、およびその他の癌の7群とし、HLA-A2402分子拘束性にCTLに認識される癌拒絶抗原として同定された7分子由来の14種類ペプチドおよびHLA-A2拘束性癌拒絶抗原として同定された8分子由来の16ペプチドをワクチンとして用いた。事前に患者末梢血T細胞のこれら癌ワクチンペプチドに対する反応性をin vitroで解析し、反応性の認められたペプチド4種をワクチンとして接種した。“第2世代癌ワクチン”では投与部位の炎症に加え、種々の有害事象 (グレード2) が認められているがトレラブルであった。現時点までに7例PR (うち3例はワクチン単独投与) が得られている。また、長期SD症例は9例得られている。抗ペプチド抗体は多くの症例において6回投与以降に誘導され、抗体とCTLともに誘導された症例では予後良好であった。これらのことは抗腫瘍免疫作用発現における抗体の関与を示唆しており、抗体を加味した新しいレジメの開発も現在進行中である。

S1-4

悪性黒色腫に対するペプチドワクチン療法

角田 卓也 (つのだ たくや), 田原 秀晃 (たはら ひであき)

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター外科 臓器細胞工学分野

【目的】 悪性黒色腫は欧米と比して本邦での頻度は少ないが、その予後は不良で特に遠隔転移を有する第IV期症例に対しては有効な治療法が確立されていないのが現状である。一方、悪性黒色腫は免疫原性の高い腫瘍の1つとされており、1994年以来gp100, MART-1, MAGEなどの腫瘍関連抗原が同定されてきている。今回、我々は日本人の60%と最も頻度の高いHLA-A*2402と、日本人の約20%と次に頻度が高いHLA-A*0201に拘束性を示すgp100由来エピトープペプチドおよびgp100由来改変ペプチドを用いたワクチン療法の第1相臨床試験を施行した。

【対象と方法】 適応症例として20歳以上75歳以下で、第IV期もしくは第IV期以外でも手術、化学療法、放射線療法、他の免疫療法など従来の治療法が奏効しないと判断された悪性黒色腫患者を対象とした。投与方法は2週間隔でエピトープペプチドとIncomplete Freund's Adjuvant (Montanide ISA 51)を混和し、腋下あるいは鼠径リンパ節近傍へ皮下注射し、計4回で1サイクルとした。その間、本臨床試験の安全性評価、臨床的評価（CT上計測可能病変はその最大断面における最大径とそれに直交する最大径の積の和と評価した）および免疫学的評価（Tetramer解析など）を行った。

【結果と考察】 4月末日現在、HLA-A*0201, -A*2402ともいずれも4例の第IV期悪性黒色腫患者をエントリーした。安全性に関して、ペプチド接種部位におけるgrade Iの発赤、掻痒感、硬結以外の副作用は認めず、安全に施行できた。一方、臨床効果、免疫学的効果ではHLA-A*2402の1例で、1サイクル投与中から、腫瘍最大断面積の総和および腫瘍マーカーがplateauの状態になり、2サイクル投与後は腫瘍最大断面積の総和および腫瘍マーカーが減少した。また、Tetramer解析ではCD8+Tetramer+細胞の割合がペプチド接種前0.9%から2.7%へと増加していた。また、ワクチン投与中に白斑が出現した症例があった。以上のことから、本臨床試験は安全に施行することができ、かつ臨床効果と共に腫瘍特異的CTLの誘導が可能であったと考えられる。

S1-5

WT1をターゲットにした癌の免疫療法

杉山 治夫 (すぎやま はるお)

大阪大学医学部 病態生体情報学

ウィルムス腫瘍遺伝子WT1は、多くの急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病で高発現しており、慢性骨髄性白血病では、慢性期→移行期→急性転化期→と病状の増悪につれて約10倍ずつ増加する。また、前白血病状態と考えられる骨髄異形成症候群(MDS)では、白血病化に近づくにつれて、末梢血でのWT1レベルが上昇し、WT1はMDSの白血病化の有用な分子マーカーである。さらに、WT1は、肺がん、乳がんをはじめ種々の固形がんでも高発現しており、肺がんでは、ほぼ全例でWT1の発現が見られる。白血病や固形がんが発現しているWT1遺伝子には突然変異は見られず、また白血病細胞や固形がん細胞をWT1アンチセンスオリゴマーで処理すると、細胞増殖が抑制されることから、WT1がこれらのがん細胞の増殖に重要な働きをしていることが示唆される。以上の結果は、WT1が癌抗原になりうる可能性を示唆した。そこで、マウス(C57BL/6)のMHC class I分子に結合しうる9-mer WT1ペプチドやWT1 cDNAで、マウスを免疫すると、WT1発現移植腫瘍を拒絶しうるWT1特異的細胞傷害性T細胞(CTL)が誘導された。WT1特異的CTLが持続的に誘導されているマウスにおいて、WT1を生理的に発現している腎や骨髄などに、病理組織学的異常は見られず、骨髄細胞のコロニーアッセイでも異常が見られず、誘導されたWT1特異的CTLが、autoimmune的に、WT1発現正常細胞を傷害しないことが示唆され、WT1特異的CTLは、正常細胞は無視し、がん細胞のみを攻撃すると考えられる。次に、ヒトのHLA-A*0201(日本人の約20%)分子あるいはHLA-A*2402(日本人の約60%)分子に結合しうる9-mer WT1ペプチドで、健康人の末梢血単核球を刺激すると、HLA-A*0201拘束性あるいは、HLA-A*2402拘束性に働く、WT1特異的CTLが誘導され、このCTLは、WT1発現がん細胞をkillした。以上のデータから、WT1ペプチドを用いた肺がん、乳がん、白血病、MDSに対する免疫療法の第I相臨床試験を開始し、現在、臨床データを集積中である。

S2-1

臍帯血移植

加藤 俊一 (かとう しゅんいち)

東海大学医学部 細胞移植再生医療科

臍帯血移植は骨髄移植、末梢血幹細胞移植につぐ第3の造血幹細胞移植として1990年代後半から実施数が増加し始めている。わが国においては1994年に国内初の同胞間臍帯血移植が東海大学において行われ、1997年には最初の非血縁者間臍帯血移植が神奈川臍帯血バンクを介して行われた。1999年には9つの地域臍帯血バンクをネットワーク化して「日本さい帯血バンクネットワーク」が発足した。2002年4月までの期間に600例を超す非血縁者間臍帯血移植が実施されている。

2001年9月までの非血縁者間臍帯血移植のうちHLAなどの詳細が判明している270例について解析した結果は以下のとおりである。

1. 219例が腫瘍性疾患，51例が非腫瘍性疾患であり，年齢は0～56歳（中央値6歳），体重は4.2～75kg（18.1kg）に分布していた。
2. 移植された有核細胞数は $0.5\sim 19.5\times 10^7/\text{kg}$ ，HLA抗原は血清型で0抗原ミスマッチ39例，1抗原ミスマッチ161例，2抗原ミスマッチ65例であった。
3. 移植後28日以上生存した245例中219例（89.4%）が好中球生着（ $>500/\mu\text{l}$ ）をした。
4. 好中球回復と多変量解析で関連したのは移植細胞数（ $>3.7\times 10^7/\text{kg}$ ， $P<0.0003$ ），HLA 6抗原適合（ $P<0.05$ ），男性（ $P<0.03$ ）の3因子であった。
5. 270例の粗生存率と無病生存率は移植後2年の時点で35.6%，26.6%であった。
6. 腫瘍性疾患で無病生存率と多変量解析で関連したのは，移植時のリスク（時期）とGVHD予防法であった。
7. 年齢，体重，HLAの適合度については多変量解析では無病生存率とは関連しなかった。

以上より，臍帯血移植においてはHLAの適合度は移植後の造血回復速度と関連しているが，現時点では生存率には有意の影響を与えていないことが判明した。なお，欧米では症例数が増加するにつれ，HLAの適合度と生存率との間に有意の相関が観察され始めているので，今後の症例の蓄積により詳細な検討が必要である。

S2-2

造血幹細胞移植

森島 泰雄 (もりしま やすお)

愛知県がんセンター 血液化学療法部

HLA適合同胞からの造血幹細胞移植は1970年代半ばからわが国で実施され、1980年代後半には白血病や再生不良性貧血の標準的治療法の一つとなっている。HLAの適合した同胞が見出せない患者のために1992年に日本骨髄バンク (JMDP) が設立され、JMDPを介した非血縁者間骨髄移植は2002年4月には4000例に達している。非血縁者間骨髄移植にとりドナーと患者のHLA型が重要なのは、同種造血幹細胞移植における移植免疫反応にHLAが大きく関与しており、移植後の生存に大きく影響しているからである。移植片対宿主病 (graft versus host disease : GVHD) と移植片対白血病効果 (graft versus leukemia effect: GVL) は生着したドナー由来の免疫担当細胞が患者の組織や白血病細胞を標的にして傷害を与える反応であり、生着不全 (移植片の拒絶) は患者に残存していた患者由来の免疫担当細胞が移植されたドナー由来の造血幹細胞に傷害を与える反応である。① HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP抗原のなかでどの抗原が移植免疫反応に関与しているか。② HLAの血清型が同じでDNA型の違っている場合に移植免疫反応がどの程度生じるのか。③ HLA型の違いが2抗原以上認められる場合における移植免疫反応。④ 特定のHLADNA型あるいは特定のHLAハプロタイプが移植免疫反応を修飾しているかどうかを解明することが重要である。JMDP発足と同時にHLAの基礎研究者と移植医により研究班が組織され、非血縁者間骨髄移植症例につきレトロスペクティブにHLADNA型と臨床症状との関連が解析された。現在までに得られた知見は、HLA-A, -B, -C, -DRの単独の遺伝子型の違いが急性GVHDの発症に有意に関与し、慢性GVHDにはHLA-A/B型の違いが、生着不全にはクラスI抗原 (HLA-A, -B, -C) の違いが関連していることが明らかになった。HLA-Cは他のHLA抗原と不適合があると付加的に急性GVHDの発症を増加させており、HLA-A, -B抗原とは異なる反応性を示している。これらの移植免疫反応の結果として移植後の生存に関与するHLA抗原としてHLA-A,Bが重要であり、HLA-Cの適合はHLA-DR/DQが異なる場合に生存にのみ影響を与えている。欧米における非血縁者間骨髄移植とHLA適合度との違いの解析ではクラスII抗原やHLA-Cの関与が示されており、JMDPの成績とは異なる。第13回国際組織適合性ワークショップにおいて不適合なHLA遺伝子型のペアーが民族的に異なることが明らかになり、遺伝子型に基づく解析が重要となってきた。

S2-3

心臓移植とHLA

福嶋 教偉 (ふくしま のりひで)

大阪大学 臓器制御外科

我が国でも1999年2月に脳死臓器移植が再開され、これまでに13例の心臓移植が実施された。その内10例が待機中に補助人工心臓が装着され輸血歴があり、PRA陽性症例も認めた。このような状況で3年間死亡はなく、治療を要する拒絶反応は2例しかない。ここでは我が国の心臓移植の実状を紹介すると共に、心臓移植におけるHLAの関与について文献的考察を加えて報告する。

【我が国の心臓移植の免疫抑制】

登録時に血清を東京女子医大又は大阪府立病院に保管してもらい、心臓移植実施時に必ずクロスマッチを行い、T細胞に対するマッチングが陰性のものだけ心臓移植を実施している（海外はretrospectiveがほとんど）。保管血清は登録後半年毎に更新し、輸血時には2週間以降に再度採血をして保管している。移植後の免疫抑制は3施設とも3剤併用療法を基本とし、腎機能障害例では抗胸腺細胞抗体製剤を併用している。阪大と国循はシクロスポリンを、東京女子医大はタクロリムスを基本とし、プレドニゾロンとミコフェノール酸モフェチルを用いている。移植後定期的に心筋生検を行い、国際心肺移植学会の基準を元に拒絶反応のgradeを4段階に分類し、grade 3以上でステロイドパルス（心機能良好例は経口）を行っている。心筋生検がgrade 2以下で心機能が低下している場合には、ドナー特異抗体を計測し、液性拒絶反応と診断した場合にはステロイドパルスに交換輸血、抗胸腺細胞抗体製剤を併用している。

【これまでの我が国の心臓移植】

13例（8～55才：男10例，女3例）。原疾患は拡張型心筋症9例，拡張相肥大型心筋症3例。10例に補助人工心臓が装着され，輸血歴を認めた。移植前にPRA陽性例は2例で，クロスマッチは全て陰性。HLAは3例で0マッチ。2例にgrade 3以上の拒絶反応を認めた。1例はステロイドパルス静脈・経口投与各1回でgrade 2以上が残存するため，シクロスポリンをタクロリムスに変更し改善した。1例は移植後7日目に液性拒絶反応を発症し，左室駆出率が29%まで低下したが，上記治療法で軽快した。その後，2度のgrade 3aを認めたが，何れも心機能は良好でプレドニン100mg 3日間の経口投与で改善した。以上の結果を海外の心臓移植の文献と比較しながらPRA，HLAが心臓移植の拒絶反応・成績にどのように関与するかを報告する予定である。

S2-4

肝移植におけるHLA適合性，リンパ球クロスマッチ

菅原 寧彦 (すがわら やすひこ)，幕内 雅敏 (まくうち まさとし)

東京大学医学部 人工臓器 移植外科

【目的】 成人生体肝移植におけるHLA適合性，リンパ球クロスマッチ試験の意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2002年3月まで当科で施行した成人症例は97例であった。適応疾患は，原発性胆汁性肝硬変や原発性硬化性胆管炎などの胆汁鬱滞性疾患が最も多く35例，ついで，B型肝炎やC型肝炎による肝硬変（肝癌合併例も含む）で33例，劇症肝不全8例，代謝性疾患6例，胆道閉鎖症5例，その他10例であった。このうち死亡退院した5例を除く92例を対象とした。レシピエント選択基準は，年齢は65歳以下で，感染症や肝臓以外の悪性腫瘍を伴わない症例を原則とした。ドナーはレシピエントの3親等以内の親族もしくは配偶者で，自発的な意志を確認できる方で，肝炎ウイルスの有無，肝機能，CTでの肝臓容積などを参考にして適応を決定した。術後の免疫抑制剤はステロイドとタクロリムスの2剤併用とした。HLA抗原（A，B，DR）をレシピエントとドナーで，Tリンパ球およびBリンパ球クロスマッチ試験をレシピエント，ドナー間で全例施行し，急性拒絶反応の有無との相関を調べた。

【結果】 急性拒絶反応は29例（32％）に認めた。うち2症例はステロイド抵抗性であったが，OKT3にて寛解した。HLA抗原（A，B，DR）の完全一致例，Tリンパ球およびBリンパ球クロスマッチ試験の陰性例は各々，39％，24％，22％，94％，70％であった。急性拒絶反応の有無との関係をカイ二乗検定で分析するとP値は各々，0.87，0.60，0.10，0.04，0.99であった。すなわちTリンパ球クロスマッチ試験陽性例で高頻度に急性拒絶反応を認めた。

【結論】 Tリンパ球クロスマッチ試験は急性拒絶反応のハイリスクグループを予測する上で重要である可能性が示唆された。

S2-5

HLAと腎移植

福西 孝信 (ふくにし たかのぶ), 橋本 光男 (はしもと みつお)

兵庫県立西宮病院 腎移植センター

HLAの適合度と腎移植の成績には相関があることはよく知られている。特に、DRB 1 アリルが適合している時は良い結果が得られる。

ここではHLA適合度と腎移植の成績ではなく、クロスマッチを取り上げる。

我々の施設では従来のmicrocytotoxicity法 (LCT法) とflow cytometryによるクロスマッチ (FCXM), flow PRAを行っている。LCT法で陽性を示した症例は14例あり、これらの症例について検討を行った。

その結果は下記の通りである。

	LCT法		FCXM		Flow PRA		症例数	腎拒絶
	T cell	B cell	T cell	B cell	class I	class II		
(1)	-	+/-	NT	NT	+	+	3	3
(2)	+	+	NT	NT	+	-	1	0 (DST)
(3)	(+)	+	+	+	+	+	2	0
(4)	-	+	-	-	-	-	7	0
(5)	+	+	-	-	-	-	1	0

LCT法で陽性であった14症例のうちFCXM, flow PRAも共に陰性であった8症例 (内7例はB cellのみLCT法で陽性) は腎移植の予後は良好であった。

W-1

蛍光ビーズを用いたリバーサSSO法によるHLAタイピング

柏瀬 貢一 (かしわせ こういち)

東京都赤十字血液センター 検査部

【はじめに】 骨髄移植の成績はHLAのマッチングに強く影響されることが明らかになり、HLAタイピングの重要性は高まっている。現在、我々は非血縁者間骨髄移植において骨髄バンク登録時のドナー、移植前の患者およびドナーのHLAタイピングを行っている。以下に移植までの手順を示す。

1) 1次および2次同時検査：1次検査としてHLA-Class I抗原を血清学的方法、2次検査としてDRB1遺伝子をPCR-MPH法によりlow-resolutionレベルで実施（日赤全体で年間約2万件） 2) 患者とドナーのHLA適合検索 3) 確認検査（3次検査）：血清学的方法によるHLA-Class I抗原の検査 (SRL)とHLA-A2, A26, B39, B61, B62およびDRB1遺伝子（東京都赤十字血液センター）をPCR-MPH法およびPCR-SSCP法によりhigh-resolutionレベルで実施（年間約7千件）

確認検査を行うことで、バンク登録時とのHLAデータの相違が認められることがあるが、その原因の中にClass I抗原の血清学的タイピングにおいて、リンパ球の状態および抗血清の特異性の不良、または交差反応性などの原因による検査ミスも少なからず存在する。そのためDNA検査に移行することが必要とされているが、多数検体のタイピングを迅速かつ正確に行える方法は未だ開発されていない。今回、我々が検討を行った蛍光ビーズを用いたリバーサSSO法は現在最も有力なタイピングToolと考えられている。

【蛍光ビーズを用いたリバーサSSO法】 原理はいたって簡単で、担体である直径5.5ミクロンのポリスチレン・ビーズ（赤とオレンジ2種類の蛍光色素で段階的に100種類に色分けされている）にそれぞれ特異的プローブを固定し、PCR反応液との反応を行う。その反応性をフローサイトメトリーと測定原理を共にする専用機器で測定を行う。このシステムの特徴は最大100種類の反応をひとつのチューブ内で一度に行える所である。現在、タイピング試薬として入手可能なキットはOne Lambda社から開発されたLABType™SSOシステムで、HLA-Aが56、HLA-Bが71、HLA-DRB1が54プローブである。操作時間は、各遺伝子座特異的PCRが1時間30分、SSO操作が約1時間、測定は96検体を行った場合約1時間とPCR後の操作時間は他の方法と比べると格段に短縮されている。問題点として、low-resolutionを目指したタイピングでは問題にならないが日本人のhigh-resolutionを対象にした場合、A*0206とA*0210、DRB1*0403とDRB1*0406が区別できないなどプローブ構成が適切ではない点があげられる。またいくつか陽性、陰性の区別の困難なプローブがあり改良が必要である。

【おわりに】 PCR法が開発されたことで遺伝子解析が広く普及し、新しい技術の開発も盛んである。蛍光ビーズを用いたHLAタイピング法はhigh-throughputとhigh-resolutionを兼ね備えた画期的な方法である。

W-2

SBT法による移植時のHLAタイピング

渡辺 真穂 (わたなべ まほ)

福岡大学医学部 第4内科

当施設では、移植時のSBT法 (Sequencing Based Typing法) によるHLAタイピングを骨髄移植時のレシピエント及び血縁ドナーの選択時にSSP法やSSO法でDNA型の4桁が決定できない場合や、生体腎移植時のドナー選択時にDNA 2桁レベルで一致して優劣がつかない場合に限定しておこなっている。

臓器提供が可能な血縁の中からドナーを選択する場合には、脳死、心臓停止者からの臓器提供時とは異なり、検査に要する時間も多少の余裕があるため、HLAを決定するDNAタイピングも多様な方法で行うことが可能である。

SBT法は標的DNAを直接シーケンスし、最も細かくHLAタイプを分類することができ、信頼性の高い方法であるが、操作、解析などが従来煩雑であった。しかし、この数年でSBTキットが多社から販売されるようになり、ゲル作製、泳動、解析時間の短縮等、一連の操作が簡便に行うことが可能になった。しかしSBT法を行うことにより塩基レベルでHLA遺伝子の全領域を解析できるという利点がある一方、ヘテロ接合体、多型の局在を取り扱う実務的な面では問題点も残されている。

各社から販売されているキットの特性や利点を理解したうえで使用し、血縁家族内での移植時のHLA検査を行った例をあげ、操作方法やタイピング精度の比較検討を論じたい。

W-3

DNAマイクロアレイによるHLAのタイピング

川井 信太郎 (かわい しんたろう)

湧永製薬 創薬研究所

DNAマイクロアレイは、ゲノムプロジェクトの成果を飛躍的に発展させる新しい技術として開発され、創薬研究、疾病の診断や予防を初めとする医学、薬学、生物学の分野で役立つものと期待されている。

DNAマイクロアレイとは、オリゴヌクレオチドやcDNAなどのDNA断片を顕微鏡で使用されているスライドガラスやシリコンなどの平面基板に固定（固相化）したもので、一般的なチップの大きさは約1.8cm × 5 cmで、その表面上に数千から数万種類のDNAが固定されている。その上で標識サンプルをハイブリダイズさせ各々のスポットからシグナルを画像として自動検出器で取り込んでコンピュータでデータの解析を行う。本システムを用いることにより任意の細胞、組織における遺伝子の発現プロファイルをマクロ的に解析することができるようになった。最近では、このDNAマイクロアレイのための機器が国内外の企業から発売されるようになってきているが、現在市販されているものは、主に研究用途を目的としたものであり、臨床の現場における検査の使用に耐えうるような高品質・高精度な製品はまだない。

そこで、我々は実際の臨床現場で使用できる信頼性の高いDNAマイクロアレイ技術の確立を目指し、操作性が煩雑であるという通常のスライドガラスでのハイブリダイゼーションの欠点を克服した平板担体上に枠を取りつけてウェルを設けた枠付きDNAマイクロアレイを考案した。これにより、96ウェルマイクロプレートと同様に溶液の分注・排除を行うことができる。さらに工夫すればプレートウォッシャーも利用できると考えている。この枠付きDNAマイクロアレイを用いた新規HLA遺伝子タイピングシステムの開発について昨年の本学会において報告した。現在までにオリゴヌクレオチドプローブの固定化方法などの基礎的研究を行い、さらに平板基板の反りなどに影響されないリーダー（非共焦点型）の開発もオリンパス光学工業（株）と共同で開発した。このDNAマイクロアレイシステムは、マイクロプレート法と比較して新規アレルに対するプローブの追加が容易で、その上プローブ数に制限がなくなるので全人種に対応した詳細な解析も可能となる。さらに短時間で大量検体処理に適した系となることが期待される。

本シンポジウムにおいては、我々の基礎研究も含めたDNAマイクロアレイによるHLAタイピングの現状と将来の展望について紹介する。

W-4

移植医療における抗HLA抗体測定の意味

小原節子 (こはら せつこ)¹⁾, 打田和治²⁾, 小林孝彰³⁾, 水野美紀子¹⁾, 長尾栄子¹⁾

¹⁾名古屋第二赤十字病院 組織適合検査室, ²⁾移植外科, ³⁾名古屋大学 第二外科

抗HLA抗体が移植医療, 特に移植予後に重要な影響を与えることが近年明らかになってきている。

名古屋第二赤十字病院及び名古屋大学第二外科において施行した生体腎移植症例及び死体腎移植施設登録を行なったハイリスク患者について, 従来から行なわれている細胞毒性試験法とFCM (フローサイトメトリー) 法とを用いてダイレクトクロスマッチ (抗ドナーリンパ球抗体) 及び, PRA (既存抗体) の検討を行なっているので, 以下の点につき考察し報告する。

- ①抗HLA抗体はクラス I・II 共に移植後の液性拒絶反応に密接に関与し, 長期生着に影響を及ぼす。
- ②抗ドナー抗体陽性でもnon HLA抗体なら拒絶反応を起こさない可能性がある。
- ③移植後の抗体follow upにHLA抗原を吸着させたBeadsを用いた抗体検査 (Flow-PRA) 法はドナーの負担 (頻回採血など) を軽減できることから非常に有用である。
- ④免疫学的ハイリスク (移植歴, 輸血歴, 妊娠歴を有す) 症例は抗HLA抗体陽性率が高いとされ, 特に移植歴を有する症例はHLAクラス II 抗体陽性になる確率が高く, 輸血歴ではHLAクラス I 抗体陽性になる可能性が示唆される。
- ⑤細胞毒性試験法陽性で移植を断念する症例において抗HLA抗体かnon HLA抗体かを区別することで移植が可能になる。
- ⑥抗HLA抗体陰性ならばリンパ球クロスマッチを省略できる可能性がある。

臓器移植希望者において移植前の抗HLA抗体の解析を特異性の優れた方法で行なっておくことは, 緊急を要するネットワーク臓器移植業務におけるリンパ球クロスマッチの精度を高め, その結果に信頼を与えることになり, 生体腎移植においては術前処置・術後管理の方針を明確にすることが可能となり, 安全な移植医療の提供と移植予後を向上させることになると考えられる。

W-5

HLA抗体・クロスマッチ検査：より輸血効果のあるHLA適合血小板を供給するために

斉藤 敏 (さいとう さとし)

長野県赤十字血液センター 検査課

【はじめに】 これまでMPHA法はAHG-LCT法と比較して、抗HLA抗体検出において数倍から数十倍感度がよいことが証明されているにもかかわらず、HLA適合血小板供給のクロスマッチには、検査時間が長いため使用されていない。本年、磁性粒子を使用したMPHA試作キットが作成され、1時間以内に血小板分離から判定まで行うことが可能となった。このMPHA試作キットがクロスマッチ・抗HLA抗体スクリーニングに有用であるかを確認するため従来法との比較を行った。

【方法】 特異性のわかっている抗HLA-A血清5種類、抗HLA-B血清5種類、抗HLA-C血清5種類の計15血清を使用し、それぞれの血清に対応する抗原を持つドナー各5人ずつからのリンパ球、血小板を用いたAHG-LCT, LSIFT, PSIFT, MPHA (OLYMPUS)と、Flow PRA (One Lambda) による感度試験を実施した。AHG-LCT, MPHAによるクロスマッチが陰性にもかかわらず、血小板増加が認められない輸血例が存在した6症例67輸血につきDuquesnoyにより開発されたエクセルプログラムHLA Matchmakerにより解析を行った。

【結果】 LSIFT, PSIFT, MPHA法ではドナーの違いにより、同じ血清に対する反応において最大で2管差の違いが認められたが、全てにおいてAHG-LCTよりも数倍感度が高かった。個人差が大きいためFlow PRAとの比較は難しいが、抗原、ドナーによってMPHAの感度がFlow PRAを4例で上回った。MPHAはLSIFT, PSIFTより全ての場合で感度が高かった。

HLA MatchmakerによりHLA適合血小板輸血不応答の全症例において2ヶ以上のアミノ酸抗原決定部の違いが認められた。

【考察】 Flow PRAはもっとも感度よくHLA抗体の有無を判定できるが、交差試験はできない。試作MPHAキットは検査時間を大幅に短縮し、Flow PRAと同等の検出も可能である。しかし、血小板上のHLA抗原量は個人差が大きいため、全てのケースで有用ではない。事実、AHG-LCT, MPHAによるクロスマッチ陰性で血小板増加が認められない輸血例に、明らかに抗HLA抗体の関与が疑われる例もあり、検査限界を考えるとHLA Matchmakerにより不適抗原を除くことも一つのクロスマッチと考えられるかもしれない。

W-6

造血幹細胞移植後の生着確認検査

丸屋 悦子 (まるや えつこ)

特定非営利活動法人HLA研究所

【はじめに】

造血幹細胞移植は白血病をはじめとする悪性腫瘍疾患のアロ免疫療法である。生着確認検査は造血幹細胞移植の成否を判断し、その後の治療方針の決定に重要な役割を担っている。臨床現場のあらゆる状態に適応しうる、簡便・迅速・高感度・低コストをめざした生着確認検査法について述べる。

【方 法】

検査の概要：8種のマイクロサテライト (ACTBP2; human beta-actin related pseudogene, HCD4; human CD4, INT2; human int-2 proto-oncogene, TCFIID; human transcription factor II D, D6S89, D11S534, HPG; human preproglucagon gene, F13A1; human coagulation factor VIII) を用いレシピエント (R) とドナー (D) で多型の違うマイクロサテライト (MS) をスクリーニングする。多型検出法は分子篩とSSCPを用いる。R/Dの違いを最もよく表すMSを用い、Rの移植後サンプルで生着確認をおこなう。混合キメラ (RとDタイプの混合型) である場合、1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science™) により両者の混合比を求める。MSのスクリーニングテストと生着確認テストを同時におこなう場合もある。

検査に必要な検体：① 移植前のレシピエントDNA (爪、口腔内粘膜、移植前末梢血または骨髓細胞などをDNAのソースとする) ② ドナーDNA (末梢血・骨髓細胞・爪・口腔内粘膜などをDNAのソースとする) ③ 移植後のレシピエントDNA (末梢血・骨髓細胞など臨床医の要望に応じたもの)

操作法：① 各MSに特異的なプライマーを用い、同一条件でPCR増幅をおこなう。② 15～20%のポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない (分子篩)、サイバークリーン染色 (または銀染色) 後、デジタルカメラに画像を取り込み、データ解析をおこなう。③ ②の解析で最適なMSが検索されなかった場合、各増幅産物をLow Ionic Strength solution (LIS) で希釈し熱変性後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない銀染色により、informativeバンドを検出する (SSCP)。

【結果・考察】

8種のMSから移植ペアに最適なMSを選択する方法で、同胞間 (100例) 全例に差異が検出できた。混合キメラのときは、signal intensity測定により、半定量が可能であった (例示する)。分子篩とSSCPを組み合わせた検出系を用いることにより、感度・精度・迅速性・簡便性を保ちかつコストパフォーマンスの向上が得られた。

W-7

STRを用いた移植後キメリズム解析

白濱 秀也 (しらはま ひでや)¹⁾, 小林 陽子¹⁾, 泉沢 康弘¹⁾, 山本 茂樹¹⁾, 神山 清文²⁾, 東條 有伸³⁾
水野 石一⁴⁾, 村山 徹⁴⁾

¹⁾ (株) エスアールエル, ²⁾ (株) ティーエスエル, ³⁾ 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 分子療法分野

⁴⁾ 兵庫県立成人病センター 血液内科

【目 的】 骨髄移植は造血器疾患に重要な根治的治療法であり, 社会的に広く受け入れられている。最近では適応を拡大するために高齢者白血病に対して前処置(全身放射線照射と大量抗癌剤投与)を軽減したミニ骨髄移植が施行されている。このことから, 骨髄移植の治療の予後診断に移植後のドナー細胞の生着を定量的にモニタリングできる検査が必要とされている。PCRを用いたキメリズム解析は, 従来の方法より簡便で半定量的にドナー細胞の生着を確認できる検査である。われわれは10種類のSTRを使用したAmpFISTR SGM Plus™ PCR Amplification Kit を用いてドナー細胞生着の定量的モニタリングの有用性と末梢血液中の細胞を分画してのキメリズム解析の臨床的意義について検討した。

【方 法】 本検討に承諾を得られた血縁関係のない日本人400名, 親子197組から採血し末梢血液からDNAを抽出した。また, 骨髄移植された患者3名より採血し末梢血液中の細胞をCD3陽性リンパ球, CD3陰性リンパ球, 顆粒球の3種類に分画後DNAを抽出した。10種類のSTRをPCRにて増幅後, ABI 310 Genetic Analyzerで電気泳動した。データをGeneScan 3.1, Genotyper 2.5で解析し, STRの繰り返し数およびピーク面積を算出した。10種類のSTRのヘテロ接合性の頻度, ドナーとレシピエントの識別能, レシピエント混在率の検出感度について検討した。また, 分画した細胞のレシピエント混在率を比較し, 臨床データと比較検討した。

【結 果】 本Kitを用いた10種類のSTRのヘテロ接合性の頻度は69.5~86.0%で個体識別能が高く, ドナーとレシピエントの識別に有用であった。197組の親子は全例識別が可能であった。レシピエント混在率の検出感度は5.0%であった。細胞を分画したキメリズム解析においてCD3陽性リンパ球は他細胞より感度良くレシピエントの混在を確認することができた。

【考 察】 AmpFISTR SGM Plus PCR Amplification Kitは, 骨髄移植のレシピエント混在率を迅速かつ定量的に測定が可能で, 骨髄移植の予後判定や治療方針の決定に有効と考えられる。CD3陽性リンパ球は骨髄移植の経過をより迅速に観察することができる。今後, 治療に応じた細胞を分画したキメリズム解析および高感度なマイクロキメリズム解析などの検討を進め, 臨床に有効な検査系の確立を目指す。

一般演題

O1-1

MHCクラスI 領域(1.8 Mb)におけるヒトとチンパンジーとの遺伝子構成の比較と多様性解析

安西達也¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 木村夏季¹⁾, 柳谷和代¹⁾,
小原栄¹⁾, 重成敦子¹⁾, 成瀬妙子¹⁾,
Jerzy K Kulski¹⁾, 福住康仁²⁾, 山崎正明²⁾,
田代弘行²⁾, 岩本千³⁾, 梅原由美³⁾, 今西規⁴⁾,
池尾一穂³⁾, 五條堀孝³⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学・医・分子生命科学

²⁾ 不二家バイオサイエンス研究所

³⁾ 国立遺伝学研究所生命情報研究センター

⁴⁾ 産業技術総合研究所生物情報解析研究センター

MHC領域はヒトゲノム中でも最も多様性を獲得してきた領域である。本研究では、ヒトの最近縁種であるチンパンジーのMHCクラスI領域の完全配列を決定し、このゲノム情報を用いて比較解析を行うことを目的とする。チンパンジーのBACライブラリーを用いて作製したMHCクラスI領域のコンティグマップから合計14個のBACクローンを選出し、ゲノム塩基配列を決定した。これまでに前大会で報告したHLA-A, -B, -E, -G遺伝子領域を含め、ヒトクラスI領域(1.8 Mb)の95%に相当するチンパンジークラスI領域(1.7 Mb)の配列決定が終了している。その結果、チンパンジーに32個のヒト相同遺伝子が同定された。発現遺伝子であるMICAおよびMICB遺伝子領域と偽遺伝子であるMICF遺伝子領域を除いた遺伝子構成は2種間で共通したものであり、非MHC遺伝子のアミノ酸配列は99.0%から100%と非常によく保存されていた。

また、2種間の多様性解析の結果は、遺伝子領域と同様に非MHC遺伝子が密集している領域では挿入や欠失および塩基置換は少なく、MHC遺伝子(Ia)領域の周辺では、それらの変異が多く検出された。さらに、HLA-A遺伝子を含んだ約110 kbについて、ヒト配列2種とチンパンジー配列の多様性を比較した結果は、生物種の違いよりも対立遺伝子の違いを反映することが示唆される結果が得られた。今後、これまで多型部位について論じられてきたMHC遺伝子の「種を超えた多型」が持つゲノム領域への影響力の強さについて検討を行う予定である。また、現在塩基配列決定中であるHLA-C, -F遺伝子領域を含め、全クラスI領域における2種間の比較ゲノム解析の結果についても併せて報告したい。

O1-2

ラットMHCクラスI 領域のシーケンシング解析

小原 栄¹⁾, 椎名 隆¹⁾, 柳谷和代¹⁾, 藤森克史²⁾,
山崎正明²⁾, 田代弘行²⁾, Lutz Walter³⁾,
Eberhard Gunther³⁾, 猪子英俊¹⁾

1) 東海大・医

2) 不二家バイオ研

3) ゲッチングゲン大・独

【目的】 ヒトゲノムの進化形成機序を効率よく追求するための一つのアプローチとして、我々は様々な生物種におけるMHC領域のゲノム塩基配列を決定し、比較ゲノムマップの作成を試みている。このモデル動物の一つであるラットのMHCクラスI (RT1) 領域、約2.2MbのPACクローンによるコンティグマップは、ほぼ完成されている。そこで本研究では、まず、クラスIII領域のテロメア側に位置する*Ikbl*遺伝子からクラスI遺伝子領域を含む3つのPACクローンならびに1つのBACクローンについて、その塩基配列を決定し、既知の遺伝子との相同性解析を行った。

【方法】 PACクローンのシーケンシングには、ショットガン法を用い、3100 Genetic Analyzerおよび377 PRISM (ABI社)を用いて、塩基配列を決定した。その後、Repeat Maskerプログラムにより反復配列の検索ならびに反復配列を除いた領域について、既知配列との相同性解析を行った。

【結果および考察】 *Ikbl*遺伝子からクラスI遺伝子領域を含む*Sc1*遺伝子までの塩基配列を決定したところ、その塩基数は376,031bpであり、GC含量は48.49%であった。また、相同性解析により、この配列にはセントロメア側より、*Ikbl*, *Atp6g*, *Bat1*, 16個のクラスI遺伝子、*Otf3*および*Sc1*の順で含まれていた。一方、*Tf2h*遺伝子から*Ptd017*遺伝子までの塩基配列を決定したところ、その塩基数は266,056bpであり、GC含量は49.62%であった。16個のクラスI遺伝子の方向は、すべてセントロメア側からテロメア側であり、その他の各遺伝子の方向は、ヒトおよびマウスと同様であった。

現在、これら2つの領域間のギャップにあたる約100kbについて塩基配列の決定を進めており、これが終了するとラットのMHCクラスI領域の約3分の1を決定したことになる。

O1-3

アカゲザルクラス I 座位Mamu-AおよびMamu-Bの解析

安波道郎, 田中弓子, 本多三男, 森一泰,
俣野哲朗, 木村彰方

¹⁾ 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

²⁾ 国立感染症研究所

³⁾ エイズ研究センター

⁴⁾ 東京大学大学院 医学研究科

アカゲザル(*Macaca mulatta*)はヒトに近縁の重要なモデル動物であり, とりわけワクチン開発には不可欠の実験系である。我々は, HIV感染のモデルであるアカゲザルのSimian Immunodeficiency Virus感染の実験系における宿主個体の免疫遺伝学的特性の解明を目的として, クラス I 座位Mamu-A, Mamu-Bの解析を行なった。父親が共通である2個体に由来するBリンパ芽球様細胞株からWatkinsらの方法に準じてcDNAを増幅後, クローン化して塩基配列を決定したが, この反応には複数種のMamu-AおよびBのcDNAが含まれていた。次にこれらの配列および既知のMamu-A, Bの配列をもとにMamu-A, Bそれぞれの座位特異的RT-PCRをデザインした。一方, DSCA(double strand conformation analysis)法はHLAのRSCA typingに応用されているように, 多型を迅速かつ鋭敏に検出できるが, 2種類を越える数のPCR産物が存在しても解析できるのが利点である。このDSCA法を前述の座位特異的RT-PCR産物に適用した結果, いくつかのシグナルピークはクローン化したcDNAに対応しており, また同時にクローン化されていないcDNAの存在も明らかになった。さらに多くの個体についてRT-PCR-DSCA法を用いて解析し, 血縁関係の明らかな個体についてのデータからMamu-A, Bそれぞれのハプロタイプを推定した。その結果1ハプロタイプ上に存在するMamu-A遺伝子は1から2コピー, Mamu-B遺伝子は1から3コピーとなっており, ハプロタイプごとに異なった遺伝子重複が生じたものと考えられた。現在, 代表的なハプロタイプ上のMamu-AおよびBアレルについて塩基配列決定を進めているが, これまでに報告のない新しいアレルを見いだしている。

O1-4

アカゲザルMHC (Mamu) クラスI領域のシーケンシングとチンパンジー, ヒトとの比較ゲノム解析

椎名 隆¹⁾, 小原 栄¹⁾, 梅原由美²⁾, 大泉ひろこ²⁾,
木村夏季¹⁾, 柳谷和代¹⁾, 安西達也¹⁾, 池尾一穂²⁾,
五條堀孝²⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学2

²⁾ 国立遺伝学研究所生命情報DBJ研究センター

【目的】

アカゲザルは約3000万年前にヒトの祖先と種分化した旧世界ザルに属し, 生息頭数が多いことから機能不明遺伝子の発現解析はもとより異種移植への応用や疾患の生成機序の解明などに有効な生物種である。そこで本研究では, アカゲザルのMHC (Mamu)クラスI領域のコンティグマップを作成すること, この領域のゲノム塩基配列を決定すること, ヒトやチンパンジーのゲノム塩基配列と比較解析することを目的とした。

【材料および方法】

BACならびにコスミドライブラリーには, CHORI250シリーズ(RPCI)ならびにcosmid159(ゲッチンゲン大学)をそれぞれ用いた。ライブラリーのスクリーニングには, ヒトのLTBからHLA-F領域間の32箇所設計したプライマーにより増幅させたPCR産物を用いた。ゲノム塩基配列はショットガン法により決定した。

【結果および考察】

ライブラリーのスクリーニングにより, 122個のBACクローンと3個のコスミドクローンを分離した。そこで, これらのクローンのマッピング解析をおこなったところ, MamuクラスI領域の長さは2.4Mbであり, これはヒト(1.9Mb)やチンパンジー(1.75Mb)よりも長いものであった。その理由の一つとして, MamuクラスI領域には少なくとも7個のHLA-B様遺伝子がBAT1~OTF3遺伝子間に存在することなど, MHCクラスI遺伝子やMIC遺伝子の重複の度合いがヒトやチンパンジーよりも高いことが挙げられる。一方, 非MHC遺伝子の位置はヒト, チンパンジーともによく保存されていた。現在, この2.4 Mb についてゲノム塩基配列の決定を進めている。

O2-1

C型肝炎ウイルスに起因する心筋症の疾患感受性遺伝子マッピング

成瀬妙子¹⁾, 志知大輔¹⁾, 中島舞子¹⁾, 吉川枝里¹⁾, 太田正穂²⁾, 勝山善彦²⁾, 木村彰方³⁾, 松森 昭⁴⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学系

²⁾ 信州大学医学部法医学教室

³⁾ 東京医科歯科大学難治疾患研究所疾患医学研究系

⁴⁾ 京都大学医学研究科循環病態学

拡張型、肥大型などの心筋症がC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 引き金となって、発症することが知られている。HCV感染者の肝炎発症の有無には、HLA遺伝子多型が深く関与していることを考慮し、我々は抗HCV抗体陽性の心筋症患者についてHLA遺伝子解析を行い、拡張型(DCM)ではHLA-A*1101, 肥大型(HCM)では-DRB1*0901,-DQB1*0303に有意な相関を見出した。拡張型と肥大型では、相関するHLA遺伝子が異なり、両者の発症機序が異なることが予想されたが、HLA遺伝子の近傍に心筋症に関与する未知non-HLA遺伝子が存在する可能性を追求するため、14種の多型マイクロサテライトを用いて疾患感受性領域の相関解析によるマッピングを行った。その結果、DCM, HCM共にHLAクラスIII領域テロメア側TNFA遺伝子周辺約100kbに最も強い相関を示し、この領域にHCVに起因する心筋症の疾患感受性遺伝子が存在する可能性を見出した。そこでTNFA遺伝子のプロモーター領域多型に着目し、塩基配列多型解析を行ったが、検出された多型部位とその頻度に一般集団との違いは認められず、TNFA遺伝子多型自身が発症に関与している可能性は低いと判断した。今回、TNFA遺伝子の約50 kbセントロメア側に存在している、IkBL, ATP6G, BAT1など、複数の新規遺伝子について、塩基配列多型の解析を行い、患者群に特異的な多型の有無や一般集団との比較を行うことで、HCVに起因するDCM, およびHCMの疾患感受性因子の同定を試みた。これまでに行ったIkBL遺伝子プロモーター領域の4ヶ所の塩基配列多型解析では、DCM患者20例中9例にTの繰り返し数8回から9回への増加 ($p < 0.001$)が、HCMにおいても-263番の一塩基多型に有意な相関($p < 0.005$)が認められ、心筋症発症への関与が示唆された。

O2-2

帯状疱疹(HZ)および帯状疱疹後神経痛(PHN)における疾患感受性遺伝子解析

杉田法久¹⁾, 佐藤昌子^{3,4,5)}, 安西達也¹⁾, 太田正穂⁶⁾, 馬淵智生²⁾, 小澤 明²⁾, 屋部登志雄⁵⁾, 石川善英⁵⁾, 花岡一雄⁴⁾, 徳永勝士³⁾, 成瀬妙子¹⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学 ²⁾ 東海大学医学部皮膚科

³⁾ 東京大学医学部人類遺伝学 ⁴⁾ 東京大学医学部附属病院麻酔科

⁵⁾ 東京都赤十字血液センター ⁶⁾ 信州大学医学部法医学

【目的】

帯状疱疹(HZ)は、後根神経節に潜伏感染していた水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)が再活性化して発症する。帯状疱疹後神経痛(PHN)はHZ治癒後も慢性・難治性神経痛が継続し、特に高齢者に多発する疾患である。

本研究では、HZ罹患後のPHN発症者(HZ+,PHN+)とPHN未発症者(HZ+,PHN-), およびHZ未発症者(HZ-,PHN-)を対象にHLA遺伝子解析を行い、感受性遺伝子の検索を行った。さらに、12種のマイクロサテライトマーカーを遺伝多型マーカーとして用いた相関解析による疾患感受性遺伝子のマッピングを行った。

【対象】

PHN発症者91名, PHN未発症者59名, HZ未発症者55名, および日本人一般集団136名を対象とした。

【方法】

血液より抽出した高分子DNAを用いて、HLAクラスI遺伝子(HLA-A,-B,-C)はSBT法により、HLAクラスII遺伝子(HLA-DRB1,-DQA1,-DQB1)はPCR-RFLP法によりDNAタイピングを行い、各集団において相関解析を行った。さらにHLA遺伝子領域に設定された12種のマイクロサテライトマーカーの多型検索を行い、各集団間の詳細な相関解析によるマッピングを行った。

【結果および考察】

PHN発症群と日本人一般集団との比較では、HLA-A*3303,-B*4403,-DRB1*1302に有意な増加 ($P=0.00142$, $P=0.00005$, $P=0.00005$) がみられた。この結果より、HLA-A*3303, -B*4403, -DRB1*1302はHZ罹患後のPHNへの発症過程において強く関与している可能性が考えられた。また、HZ未発症群には、一般集団との比較においてHLA-B*5101の有意な増加 ($R.R.=5.99$, $P=0.0001$) が認められ、さらにHZ発症群とHZ未発症群との比較では、発症群においてB*5101の有意な減少 ($R.R.=0.11$, $P=0.00001$) が認められた。この結果より、B*5101保有者は、HZに対し疾患抵抗性を示すことが示唆された。

これらの結果をもとに、現在マイクロサテライトマーカーを用いた相関解析を行っているが、それらのなかでHLA-B遺伝子近傍のMIBマーカーに、PHN発症群とHZ未発症群との比較において有意な相関 ($R.R.=0.17$, $P=0.01391$) が認められている。今後、さらに解析を進め、HLA遺伝子領域との相関についてより詳細な検討を行い、報告する予定である。

O2-3

ヒト6番染色体上のマイクロサテライトマーカーを用いたpooled DNAによるナルコレプシー感受性領域の探索

川嶋実苗¹⁾, 生田智樹²⁾, 田宮元²⁾, 北條浩彦¹⁾,
本多裕³⁾, 徳永勝士¹⁾, 十字猛夫⁴⁾, 猪子英俊²⁾

¹⁾ 東京大学医学系研究科人類遺伝学

²⁾ 東海大学医学部 分子生命科学2

³⁾ 精神神経センター附属清和病院

⁴⁾ 日本赤十字社中央血液センター

ヒトのナルコレプシーは、遺伝要因と環境要因とが相互に関与して発症にいたる多因子疾患と考えられている。遺伝要因の一つはヒト白血球抗原(HLA)領域に存在するHLA-DRB1*1501-DQB1*0602ハプロタイプであり、日本人ナルコレプシー集団においては、ほぼ100%の強い関連が知られている。我々は、ナルコレプシーの疾患感受性領域探索のため、3万種類のマイクロサテライトマーカーを確立し、これらを用いたゲノムワイドな関連分析を行っている。マイクロサテライトマーカーはSNPsに比べて多型性に富み、また広い範囲にわたる連鎖不平衡を示す。そのため、マイクロサテライトマーカーはSNPsよりも疾患感受性領域を見つけるより強い検出力があると期待できる。まず始めに我々はモデル実験として、6番染色体上の1265個のマイクロサテライトマーカーを用いたpooled DNAによる関連分析を行った。日本人ナルコレプシー患者のゲノミックDNA110名分を等量ずつ混合したpooled DNAを2セット作成し、それぞれ1stセット2ndセットとした。同様に、対照健常者のゲノミックDNA210名分を等量ずつ混合したpooled DNAを2セット作成した。1stセットpooled DNAは初期スクリーニングのため、また、2ndセットは偽陽性を取り除くために用いた。pooled DNAを鋳型に用いた解析はGeneScanソフトウェアによる自動シーケンサー(ABI Prism 3700 DNA sequencer: Perkin Ermer)によりおこない、それぞれのアリル頻度を波形の高さの比率からもとめ、いくつかの統計量を用いて統計解析を行った。解析の結果、HLA領域において明瞭な関連が認められた。したがって、pooled DNAによるマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな関連分析法は、疾患感受性領域を検出するための効果的な戦略となると考えられる。現在我々は、他の染色体についても同様の解析方法により感受性領域の探索を行っている。

O2-4

ヒトパピローマウイルス感染子宮病変をもつ患者とそのHLA DR allele頻度

井奥宏樹¹⁾, 平田蘭子²⁾, 斉藤麻紀¹⁾, 大久保光夫²⁾,
竹田省¹⁾, 前田平生²⁾

¹⁾ 埼玉医大総合医療センター産婦人科

²⁾ 同 輸血・細胞治療部

【目的】 ヒトパピローマウイルス (HPV) は子宮癌病変から検出され、HPV E7遺伝子はヒト培養線維芽細胞をtransformationすることから、HPVは子宮癌の原因ウイルスと言われている。一方、HPVが感染していても子宮異形成病変の消退する症例も臨床的には観察され、そこには免疫学的機序が働いていると推定されている。そこで、HPV感染子宮病変の病理学的な進行度と免疫学的背景としてのHLAの関係を解析した。

【方法】 対象は埼玉医大総合医療センター婦人科外来を受診し、子宮病変の検査を希望しHLA検査に同意した81名。子宮組織の診断は病理学的に行われた。HPVの存在およびHPVのDNA型についてはL1領域をコンセンサスプライマーにてPCR増幅し、複数の酵素にて処理したものを電気泳動して判別した。HLAは末梢単核球およびそれ由来のDNAを用いてクラスIについては血清学的に、クラスIIについてはDRとDQのDNAタイピングを行った。

【結果】 対象症例のうち81%がHPV陽性で、その44%がHPV16タイプであった。子宮病変を軽度～中等度異形成 (CIN IとII) 群と高度異形成以上の病変 (CIN III, CIS, IC) 群に分け、さらにHPV16感染の有無とHLA allele頻度を解析したところ、クラスIに関しては異形成病変の進行との相関は認められなかったが、DRB1*0401を持つ患者はCIN IとII群よりもCIN III, CIS, IC群で減少傾向 (p=0.0193未補正值) が認められた。また、DRB1*0901を持つ患者のうちHPV16陽性に限定すると、その頻度はCIN III, CIS, IC群で有意な増加 (p=0.0178補正值) が認められた。

【考察】 これらの結果から、HLA DRB1*0901を持つ群にHPV16タイプが感染した場合、DRB1*0401をもつ群と比較してHPVの持続感染から異形成病変の進行を許すことになると考えられる。その機序には、従来想定されてきたクラスI分子を介した細胞性免疫を中心とした機序以外のクラスII分子を介した免疫反応が関与しているものと推定された。

O3-1

IKBL(I κ B-like)遺伝子の機能解析

柴田宏樹, 安波道郎, 高橋めぐみ, 木村彰方

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

IKBL(I κ B-like)遺伝子はゲノムDNAの塩基配列データからHLAクラスIII領域TNF遺伝子群の遠位側に見いだされた遺伝子であり, 蛋白の推定アミノ酸配列に転写因子NF κ Bやその阻害因子であるI κ Bに存在するアンキリンリピートモチーフとの相同性から命名されたが, その機能については全く未知である。我々はこれまでに, I型糖尿病や高安動脈炎など自己免疫機序の関与が考えられる疾患の患者-対照研究により, I型糖尿病ではその疾患感受性がHLA-DR-DQ座位, B座位およびクラスIII領域TNF遺伝子群近傍の座位に, 高安動脈炎ではB座位およびTNF遺伝子群近傍の座位に支配されること, さらにTNF座位近傍の遺伝子の多型を解析して, IKBL遺伝子5'側プロモーター領域に見いだした多型とこれらの疾患との関連を明らかにした。そこで, この多型の疾患成立における意義を解明するために, IKBL遺伝子の発現解析とIKBL蛋白の機能についての解析を行なった。RT-PCR法により種々の組織, 細胞株でIKBL mRNAの弱い発現を検出したが, 調べた限りでは明確な組織特異性は示さなかった。またIKBL遺伝子プロモーターのルシフェラーゼレポータープラスミドを作製してHeLa細胞に導入したが, プロモーター多型はその転写活性に顕著には影響しなかった。一方, IKBL蛋白のN末端にGFPを融合させた蛋白を高発現するプラスミドを導入してその細胞内局在を見ると, 核内に集積する像が認められた。さらに, IKBL蛋白を高発現するプラスミドとNF κ B結合配列を持つルシフェラーゼレポーターを導入してTNF α によって誘導されるNF κ Bの転写活性化能への影響を調べたが, I κ B α のような抑制活性は観察できなかった。このことは, IKBL蛋白がI κ Bと全く異なる機能を持つことを示唆するため, 今後転写活性化作用などについて検討を加える予定である。

O3-2

MICA遺伝子産物(MICA蛋白)の細胞内局在の解析

末水洋志¹⁾, Radosavljevic M²⁾, 木村 穰³⁾, 貞廣荘太郎⁴⁾, 吉村眞一³⁾, 猪子英俊³⁾¹⁾ 実験動物中央研究所研究プロジェクト推進センター²⁾ Centre de Recherche d'Immunologie et d'Hematologie³⁾ 東海大学医学部分子生命科学系⁴⁾ 同消化器外科

【目的】 MHC class I chain-related gene A(MICA)分子はストレスにより誘導される膜結合型の糖タンパク質で, 主に腸管などの上皮性細胞に発現している。近年, MICA分子がナチュラルキラー(NK)細胞や腸管免疫に重要な働きをするgd-T細胞上のレクチン用受容体NKG2Dと作用することが明かとなり, MICA分子は上皮性細胞の抗腫瘍免疫において重要な役割を果たすと考えられるようになった。しかし, これまでMICA分子の細胞内局在に関する研究はなされていない。そこで, 本研究ではMICA分子の細胞内局在を解析し, 細胞内輸送に関わる配列の同定を行った。

【方法】 1) ヒトMICA cDNA (A5) をGFP遺伝子上流に組み込んだベクターを構築し, MDCK細胞にて発現させ細胞内局在をコンフォーカル顕微鏡にて解析した。また, 細胞質領域を欠失させた欠失型MICA-GFP, 細胞質領域の特定のアミノ酸をアラニンで置換した置換型MICA-GFP融合タンパクの発現パターン解析からモチーフ配列の同定を行った。2) フレームシフト変異を起こすA5.1アレルの機能を解析するため, ヒトMICA cDNA (A5 and A5.1)を組み込んだ発現ベクターを構築し, MDCK細胞に発現させ, 抗MICA抗体, コンフォーカル顕微鏡にて解析した。

【結果と考察】 1) 細胞極性を構築した単層培養MDCK細胞にMICA-GFP融合タンパクを発現させたところ細胞の側底面(basolateral)に局在していた。また, 欠失型MICA-GFP, アラニン置換型MICA-GFP融合タンパクの細胞内局在観察から, MICAタンパク細胞質領域内にあるLeucine-Valine di-hydrophobic motifがMICA分子の側底面輸送に必要であることが明かとなった。2) 正常型(A5) MICA分子はMDCK細胞の側底面に局在し, また, ヒト小腸上皮細胞でもMICA分子が実際に側底面に局在することを免疫組織染色により確認した。一方, 変異型(A5.1) MICA分子は正常型MICA分子とは異なりMDCK細胞の頂端面(apical)に局在していた。以上の結果から, 細胞質領域に変異(A5.1等)を起こした異常型MICA分子は, その細胞内局在から機能的に遺伝子欠損と同等の影響を与えるものと考えられる。MICA遺伝子細胞質内領域の変異と上皮細胞の腫瘍化の関連に興味を持たれ, 今後, 大腸がん等を対象に解析を行う予定である。

O3-3

可溶性HLA-G抗原の検出-T細胞や受精卵は可溶性HLA-G抗原を分泌しうるか-

下嶋典子¹⁾, 大村素子¹⁾, 中西真理¹⁾,
Daniel E Geraghty²⁾, 羽竹勝彦¹⁾, 石谷昭子¹⁾

¹⁾ 奈良県立医科大学法医学教室

²⁾ Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】 HLA-Gは多型性に乏しく、その発現は胎盤トロホプラストに限局されており、NK傷害抑制能をもっていることから、胎児を母体の拒絶から保護するための機能を有していると考えられてきた。最近、Lilaら¹⁾は、アロ反応をするCD4+T細胞のあるものは可溶性HLA-Gを分泌していると報告した。またFuzziら²⁾は体外受精卵の培養上清中にHLA-Gが分泌されており、これが妊娠するための必須条件であると報告した。これらのデータが真実であるならば、HLA-Gの機能を考える上で非常に重要であるが、これまでの常識からは、理解しがたいものである。従って我々は、これらのデータの検証を目的として本研究を行った。

【方法】 混合リンパ球培養：正常成人ボランティアより得られた末梢血リンパ球を5日間、混合培養し、培養上清を得た。ELISA：体外受精卵培養上清、あるいは混合リンパ球培養上清中の可溶性HLA-G抗原をsandwich ELISAにより測定した。抗HLA-G抗体である87G, MEMG/9 (EXBIO Praha), 16G1のそれぞれでコーティングしたプレートを作製し、各培養上清と反応させた。これをピオチン化した抗HLA class I抗体W6/32で検出した。

【結果】 87G, 16G1, MEMG19を用いたsandwich ELISAにおいて、体外受精卵培養上清中、可溶性HLA-G抗原は検出されなかった。混合リンパ球培養上清中にも可溶性HLA-G抗原は検出されなかった。現在、さらに検体数を増やし詳細に解析中である。

【参考文献】 1) Lila N, et al. PNAS. 98(21),12150-12155. 2) Fuzzi B, et al. Eur.J.Immunol. 32, 311-315.

O4-1

Antibody Magnitude Scoreは血小板輸血効果予測の指標となるか：HLA適合血小板輸血効果との関係から

安田広康, 川畑絹代, 大戸 斉

福島県立医科大学医学部附属病院 輸血・移植免疫部

【はじめに】 HLA適合血小板輸血不応の原因に、低力価HLA抗体の関与が示唆されているが未だ明かでない。我々が提唱*1,*2するAntibody Magnitude Score (AMS)が、HLA適合血小板輸血効果予測に有用かをレトロスペクティブに検討した。

【対象】 1994年から1997年の4年間にのべ213本のHLA-PC輸血を受けた血液疾患患者13名を対象とし、HLA-PC輸血効果とAMSの関係について検討した。

【方法】 HLA抗体は20名のパネルリンパ球を標的の血球に用いるLCT法により、2週間ごと定期的に検出した。AMS算出法の詳細については既報*2参照とするが、AMSはHLA抗体の強さと広がりを表す指標である。HLA-PC輸血はすべてベッドサイドにて白血球除去フィルターを用いて施行した。

【結果】 HLA抗体保有期間のHLA適合度とHLA-PC輸血効果の関係をみると、適合度A, B, Cでの有効率 (CCI-1時間値が $7.5 \times 10^9/L$ 以上) はそれぞれ100%, 84%, 72%で、適合度が良いほど高かった(P=0.026)。AMSとHLA-PC輸血効果との相関関係は適合度AまたはBでは認められなかったが、適合度Cの輸血ではAMSが高値であるとCCI-1時間値がこれに負相関示し低値となる傾向 (r= -0.332)を認めた。

【考察・結語】 AMSが高値 (200以上) である症例では、random-PC輸血後にinnocent bystanderにより輸血後血小板数が輸血前値よりも低くなる現象を高率に認めた*2。この現象は適合度CのHLA-PCでも観察され、検出限界以下の低力価HLA抗体の関与が示唆された。以上から、AMSは血小板輸血効果の指標となる可能性があり、より高感度なMPHA法による検討を継続している。

【文献】 *1 Transfusion And Apheresis Science, 25:233-234,2001, *2医学検査, 51, 52-56, 2002

O4-2

母児間及び患者・ドナー間のHLA不適合により産生されたHLA抗体の解析

大田智之, 斉藤敏, 瀬下秀幸, 山崎雄一郎,
野村節夫

長野県赤十字血液センター

【目的】母児間においてHLA不適合が2座以上存在した場合、母親はどちらの座の抗原に対する抗体産生をするのか、HLA適合血小板輸血において患者が新たに抗体を産生するのはどのような場合か検討を行ったので報告する。

【方法】HLA抗体を持つ母とその抗体を作らせた子のHLA抗原の比較、HLA適合血小板使用中に新たな抗体を産生した患者13人のHLA型と産生された抗体対応抗原との比較、PRA90%以上で新たな抗体が確認されずに輸血不応答が時々存在する患者6人67輸血の患者とドナーとのHLA抗原の比較をHLA Matchmakerで行った。

【結果】HLA抗体を持つ母33人中、母子間のHLA不一致はABC座不一致14例、AB座7例、BC座9例、A座1例、B座2例であった。産生された座別抗体数はHLA-Aが8、Bが20、Cが4、A+Bが1であった。不一致座が2座以上存在する30例中25例(83%)においてアミノ酸抗原決定部の違いが多い座の抗原に対する抗体が産生されていた。アミノ酸抗原決定部の違いが少ない座に対して産生された抗体は、抗B52が3例、抗B7が1例、抗Cw7が1例であった。全ての母親は自身のHLA型と3ヶ所以上抗原決定部に違いのある抗原に対しての抗体を産生していた。一方HLA-PC使用群では13例中5例で2ヶ所の抗原決定部の違いでも新たな抗体が産生されていた。PRA90%以上の患者6人に対する67輸血において抗原決定部の違いが3ヶ所以上あるドナーの血小板輸血は全く効果がなかった。

【考察】妊婦が抗HLA抗体を産生する際、子との間に不一致HLA抗原が2抗原以上存在した場合、アミノ酸抗原決定部の違いの多い抗原に対して抗体産生する可能性が高いと思われる。輸血不応答のある患者に対してのドナー選択にHLA Matchmakerを使用することで輸血効果を上げることができる可能性がある。

O4-3

DR抗原特異性と腎移植成績

酒巻建夫, 木村彰方¹⁾, 山崎正明, 飯田好江,
野田岳

¹⁾ 国立佐倉病院・HLA検査室

²⁾ 東京医科歯科大・難研・分子病態

【目的】腎移植希望者ではHLA-DR型の頻度が異なるがこれらは原疾患の影響があると推察される。一方、HLA型の適合性が移植成績に影響することが知られているが、個々のHLA-DR型が腎移植にどのような影響を及ぼすかについては必ずしも一定の見解が得られているわけではない。今回、研究班としてネットワークHLA適合性データと移植成績について解析したので、個々のHLA-DR特異性の影響についても検討を加えることにした。

【方法】1995年4月から2000年12月までに行われた日本臓器移植ネットワークの死体腎移植913例のうち透析を離脱した832例を対象にした。ドナーおよびレシピエントHLA型は研究班データで、一部修正した。分析項目はHLA型、ドナー年齢、性別、レシピエント年齢、性別および生着期間等を含めた。解析は主にHLA-DR特異性と移植成績について行った。

【結果・考案】移植生着にはまずドナーおよびレシピエントの年齢、性別が大きく影響した。レシピエントとドナーの平均DR適合数は1.72、ABDR適合数は4.05と全体的にHLA適合性はきわめてよい移植であった。DR型の解析ではDR3,DR7,DR10は移植例が少ないので、分析から除外した。DR15群ではドナーの場合にもレシピエントの場合にもDR15を表現していない群に比べて生着成績はやや低下する傾向を示していた。DR11では移植後早期から移植生着の低下を来たしていた。DR8群では移植後、ドナーおよびレシピエントの場合により成績を示していた。DR4およびDR13群ではレシピエントの場合にややよい傾向が認められた。DR1群ではドナーおよびレシピエント間でDR1でのマッチングの程度が高く、ミスマッチ例が少なかったので刺激側か応答側かの結論は得られなかった。これらの現象が、年齢やHLA適合度によるものではないことが判明した。DR抗原と移植成績の違いについては抗原性の強さや反応性の強さを反映しているものと考えられる。

O4-4

サイトカイン，サイトカイン受容体遺伝子多型の非血縁者間骨髄移植成績への影響

石川善英¹⁾，柏瀬貢一¹⁾，十字猛夫²⁾¹⁾ 東京都赤十字血液センター²⁾ 日赤中央血液センター

【目的】 骨髄移植の成績はHLA抗原の適合度に強く影響されることが明らかとなっているが，抗原不適合の許容度が症例により異なることから，免疫反応の個体差の関与が考えられる。サイトカイン，サイトカイン受容体遺伝子の多型により産生量，免疫反応の感受性が異なることが報告されている。そこで13種類のサイトカイン，サイトカイン受容体遺伝子の22種類のSNPsを解析し，非血縁者間骨髄移植成績への影響を調べた。

【方法】 HLA-A, -B, -DRB1アレル適合移植100症例を対象とした。13th IHW Cytokine Polymorphism Component用PCR-SSP Kitを用い，以下の多型を解析した。IL-1A (-889C/T)，IL-1B (-511C/T, 3962C/T)，IL-1R (1970C/T)，IL-1RA (11100C/T)，IL-4RA (1902A/G)，IL-12 (-1188A/C)，IFN γ (5644A/T)，TGFB1 (869C/T, 915C/G)，TNFA (-238A/G, -308A/G)，IL-2 (-330G/T, -166G/T)，IL-4 (-1098G/T, -590C/T, -33C/T)，IL-6 (-174C/G, 565A/G)，IL-10 (-1082A/G, -819C/T, -590A/C)。

【結果と考察】 各多型のドナータイプ，患者タイプそれぞれについて無病生存率，GVHD (III-IV)発症率，再発率への影響を Kaplan-Meier 法により比較した。TNFA, IL-6, IL-10は遺伝子頻度の偏りが大きいいため移植成績への影響の解析は行わなかった。患者がIL-1B (-511C)を持つ群あるいはドナーがIL-1R (1970C)ホモ接合の群では重篤なGVHDの発症率は低値であった。再発率はIL-1RA (11100C)をホモ接合，IL-4 (-590T, -33T)をホモ接合あるいはIFN γ (5644A)をホモ接合で持つドナーからの移植では再発率は低く，IL-4RA (1902A)をホモ接合で持つドナーからの移植では高値であった。非血縁者間骨髄移植においてサイトカイン，サイトカイン受容体の多型を選ぶことにより，GVHDを抑え，より高いGVL効果を期待できることが示唆された。

P1-1

1 分子蛍光分析を用いたハイスループット SNP (単一塩基多型) タイピング法

明坂珠生¹⁾，堀 邦夫²⁾，佐藤和久²⁾，川嶋実苗¹⁾，武田千恵子²⁾，牧野 徹²⁾，坂内 誠^{1) 3)}，徳永勝士¹⁾¹⁾ 東大・医・人類遺伝学²⁾ ノバスジーン³⁾ オリンパス光学工業

【目的】 蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy: FCS) は，溶液中約10-15 (femto) Lの極微小領域にある，数個の蛍光分子のブラウン運動が作り出す光の揺らぎを測定・解析する方法である。分子の揺らぎの速さは，小さい分子ほど速く，大きな分子ほど遅くなる。また，分子数が少ないと大きな揺らぎとなる一方，分子数が多いと平均化した揺らぎとなる。これを自己相関関数で解析すると，分子の大きさや数を求める事ができる。FCSをPCR-SSP法に応用すると，PCR反応溶液中の小さなプライマー分子と大きなPCR増幅断片の量比が得られ，増幅の有無の判定が可能となる。今回，SNPのアレルタイプがわかっている検体でこのFCS-SSP法の信頼性を検証するとともに，whole genome amplification (WGA)法で増やしたDNA templateを用いて，多種のSNPについてその応用を試みた。

【検体】 PCR-SSCP法によりアレルタイプ既知の250検体とWGAを行った489検体について，それぞれ，4種および40種のSNPタイピングを行った。方法：初めにSNPを含む領域をPCR増幅し，その増幅産物を鋳型としてアレルごとに異なる蛍光 (TAMRA, Cy5) をラベルした2種類のプライマーを混合してPCR-SSPを行った。ガラス底マイクロプレート中で増幅産物を希釈し，1分子蛍光分析装置 (オリンパス) を用いてFCS測定を行った。WGA法はDietmair et al. (1999) に従った。

【結果および考察】 ほぼすべての既知検体でSSCP法と一致したタイピング結果を得た。さらに，WGA templateを用いた場合でも，ほぼすべてのタイピングに成功した。1分子蛍光分析により，洗浄操作や電気泳動を行わずに多数の検体を正確にSNPタイピングする事ができた。競合関係にある2種類のプライマーを，同時にしかも低濃度で用いてSSPを行うため，良好な特異性を得たと思われる。さらに，DNA量が少ない検体に対し，WGA法で増幅した templateを用いたタイピングも可能であった。

P1-2**Use of Combinatorial Peptide Libraries to Identify Sequences Optimized for Binding to MHC and Stimulation of Cytolytic T cells : An Approach to Rapid Vaccine Design.**

Keiko Osawa¹⁾, Cesar Boggiano¹⁾, Jennie Chang¹⁾, Kim Schroder¹⁾, Mark Dudley¹⁾, Clemencia Pinilla¹⁾, Steven A Rosenberg²⁾, Richard A Houghten¹⁾, Darcy B Wilson¹⁾

¹⁾ Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

²⁾ National Cancer Institute, NIH, Bethesda MD, USA

Cytolytic T cells (CTL) reactive to melanoma tumor associated antigens recognize a peptide fragment, 209-ITDQVPFSV-217, of gp100 (p209), a normal protein of the melanin synthesis pathway. We used two melanoma specific human T cell clones to scan large combinatorial peptide libraries to identify (a) the binding motif for HLA-A*0201 and (b) additional sequence alterations for efficient stimulation of CTL. The altered peptides are substantially more immunogenic in stimulating CTL activity and were able to lyse HLA-A2 melanoma cell lines. These results validate the use of peptide libraries as a cost- and time-efficient strategy for defining peptide sequences to be used in the formulation of melanoma vaccines.

P1-3**HLA-SPP法を用いたHLAタイピングの有用性**

太田正穂¹⁾, 島田和典²⁾, 鈴木千穂²⁾, 勝山善彦³⁾, 福島弘文¹⁾, 佐田正晴⁴⁾

¹⁾ 信州大学医学部法医学教室

²⁾ ゲノムサイエンス研究所

³⁾ 信州大学病院薬剤部

⁴⁾ 国立循環器病センター再生医療部移植外科

【目的】 HLA-DNAタイピングにはその目的により、種々の手法が用いられているが、いずれも、検査には良質で比較的多量 (100 ng以上) のDNAが必要である。通常末梢血から抽出したDNAで検査するときには、その目的は充分達成されるが、時に末梢血が得られず、身体組織の一部を試料として使わなければならないときには工夫が必要である。今回、微量血液でもタイピングが可能で、さらにDNA抽出操作がいらぬHLA-DNAタイピングキット (スマイテストHLA-SPP : Sequence Specific Primer and Probe, ゲノムサイエンス社) を用いて、新鮮血以外のサンプル (血痕, 毛髪, 口腔粘膜, パラフィン切片) からタイピングを行い、その有用性について検討した。

【材料と方法】 1 μ lの血液を綿手拭い上に作成した血痕, 口腔粘膜細胞, 20年程以前にガーゼに作成した血痕, 各種条件下で固定後のパラフィン切片を検査試料として用いた。いずれのサンプルも別の方法でHLA型を調べた。各試料は, 0.1% Tween 20に5分間浸漬後, 1st PCRを行い, さらに2nd PCRを行った。PCR産物はマイクロプレートに固相したプローブにハイブリダイズし, 450nmの吸光度を測定して型判定を行った。

【結果と考察】 本キットを用いた各試料からのタイピングは, いずれも良好な結果を示した。特に, 古い血痕, 新鮮血で作成した血痕からのA,B,DRB1の型判定は全て可能であった。SSP法とSSO法を組み合わせたPCR-SPP法を用いた本タイピングキットは非常に鋭敏なことから, 微量なDNAしか得られないときには大変有効であり, low resolution levelであるが, 移植前後で血液が使用できない時のタイピング, 組織標本からのタイピングなど, その有用性は広いと考えられる。

P1-4 2色蛍光同時検出系を用いたHLA-クラスII 高精度DNA タイピングTaqMan法の開発

中島舞子, 吉川枝里, 河田寿子, 成瀬妙子,
猪子英俊

東海大学医学部分子生命科学系

これまで我々は、PCR-SSP法を原理とするリアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いるTaqMan法により、迅速かつ簡便に再現性のあるDNAタイピングが可能であることを報告してきた。今回、従来のTaqMan法市販キットにはなかったDRB1遺伝子middle-high resolutionレベルの、日本人に頻度の高いアレルの検出を目的としたタイピングの系を確立した。さらに、以前から取り組んできたFAM, VICの2色蛍光標識プローブを用いたHLA-DQB1, DRB1遺伝子の同時検出、いわゆるマルチプレックスlow-middle resolution typing についての検討も行ったので報告する。方法は、PCR増幅試薬にTaqMan Universal Master mix, シグナル検出にABI PRISM7700 を用い、B cell line 20種を含む既知HLAタイプのDNAサンプル30種についてタイピングを行い、検討した。結果は、HLA-DRB1遺伝子middle-high resolution typing において、アニーリング温度の調整とgroup specificプローブ作製を行ない、日本人頻度1%以上のDRB1遺伝子を対象とした60組のプライマーセットを用いることにより、PCR-RFLP法で従来判定不可能とされてきたアレルの検出が可能になった。また、HLA-DQB1, DRB1遺伝子の同時検出low-middle resolution typingについては、1チューブ内で同時にPCR反応を行うことにより、最大12サンプルまでマルチプレックスタイピングが可能であることが判明した。今後、解析ソフトなど一連の操作の改良を行い、精度の高いDNAタイピングの自動化に向けて検討してゆく予定である。

P2-1 アライグマPLA-DRB遺伝子の解析

松崎雄三¹⁾, 小林 賢²⁾, 阿藤みや子²⁾, 鈴木洋司²⁾,
今井利夫³⁾, 向田政博¹⁾

¹⁾ 防衛医科大学校法医学講座

²⁾ 同輸血部

³⁾ 東邦大学理学部生物学科動物生命機構部門

【はじめに】 近年、日本各地でアライグマによる移入動物問題が頻発している。これらはペットとして飼育されたが、放逐などにより野生化・繁殖し、栄養段階の上位に位置するため、生態系への影響が危惧されている。また、狂犬病などの人獣共通感染症の媒介動物であるため、家畜等へ影響を及ぼしている。一方、捕獲されるほとんどのアライグマは国内で繁殖したともいわれているが、正確な輸入記録がないため確証を得るには至っていない。われわれは、生態系の保存を目的とし、アライグマの集団分布と繁殖動態を同定するため、アライグマのMHCであるProcyon Leukocyte Antigen; PLAの検索を行った。

【試料および方法】 神奈川県鎌倉市内で捕獲されたアライグマの血液から採取したmRNAからcDNAを合成した。アライグマはイヌ類と近縁な食肉目イヌ上科に分類されるため、イヌのDLA-DRB1遺伝子を基に作製したプライマーを用いてPLA-DRB遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。

【結果および考察】 ホモロジー検索した結果、ネコあるいはイヌのDRB遺伝子と高い相同性を示した。従って、アライグマから検索された遺伝子はPLA-DRB遺伝子であると推定された。アライグマのcDNAから推定されるコード領域は801 bp, 266 aaであった。ここ数年、鎌倉市や横須賀市などでは、アライグマの繁殖による在来種の駆逐や、イヌ等の家畜に対する感染症の媒介、あるいは人家に侵入・居住しヒトへの危害など様々な問題が横行しており、アライグマ駆除の法令化も進められている。これらアライグマの移入経路や繁殖動態を同定するための遺伝的系統分類を行うことは、生態系の保存あるいは環境保全等につながると考える。そのため、PLA-DRB遺伝子の多型性を検索することは遺伝的系統分類を行う上で非常に有用であると判断された。

P2-2

ペンギン類フンボルト属のMHC領域における多型解析

吉川枝里¹⁾, 成瀬妙子¹⁾, 福田道雄³⁾, 栗田正徳⁴⁾,
村田浩一⁵⁾, 津田道雄¹⁾, 津田とみ^{1,2)}, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大学医学部分子生命科学

²⁾ 徳島文理大学人間生活学部

³⁾ 東京都葛西臨海水族園

⁴⁾ 名古屋港水族館

⁵⁾ 日本大学生物資源科学部

【目的】 ペンギン類は約4900万年前に海鳥類から分岐したとされ、現在、6属17種に分類されている。我々は昨年の本学会で、ペンギン類のMHC領域に多型性が認められることを報告した。本発表では、ペンギン類フンボルト属について、MHC領域の塩基配列を決定し、その多型性を明らかにすることを目的とした。

【方法】 飼育下及び野生のペンギン類フンボルト属フンボルトのDNA20検体について、MHCクラスI DRB1遺伝子第2エキソン内の198bpを増幅させるプライマーを用いてPCR増幅し、PCR産物のサブクローニングを行うことによりSNPハプロタイプを特定し、アデリー属3種の既知の塩基配列及びアミノ酸配列との比較を行った。

【結果及び考察】 フンボルト属フンボルトの塩基配列には、26箇所が多型が認められ、少なくとも4種以上の対立遺伝子の存在が示唆された。アミノ酸配列における多型は14箇所、他属と比較すると可変部の配列が類似していた。また、アデリー属との相同性解析ではジェンツーペンギンと89%、続いてヒゲペンギンが84.5%、アデリーペンギンでは80%の相同性が認められた。以上の結果より、フンボルトペンギンのDRB1様遺伝子においても、アミノ酸レベルでの多型が存在することが明らかになった。また、フンボルトペンギンに特異的な配列が得られたことにより、進化の過程においてそれぞれの属や種に特有な多型が存在する可能性が考えられ、進化を考えるうえで、MHCは有用なマーカーとなることがしめされた。

P2-3

シーケンシングによるウズラMhc (Coja)近傍領域の構造解析

清水佐良子¹⁾, 椎名隆¹⁾, 細道一善²⁾, 半澤 恵²⁾,
猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医・分子生命科学

²⁾ 東京農大・農・家畜生理学

【目的】 鳥類のMhc領域は非常にシンプルかつコンパクトに形成されており、生物学的、進化的にも興味深い特徴を有する。我々はこれまでに、ウズラMhc(Coja)クラスIおよびクラスII領域を中心にゲノム解析を行ってきた(2000, 2001年度本学会大会にて発表)。また、ウズラのクラスI, クラスII遺伝子座はウズラと同じキジ目に属するニワトリよりも多数存在し、かつ多様に富んでいることを示した。Kaufmanらの論文(1999)によると、ニワトリのクラスI遺伝子の近傍にはさらに補体遺伝子であるC4やhistone遺伝子、クラスII遺伝子の近傍にはtRNA遺伝子がそれぞれ同定されている。そこで本研究では、ウズラのMhc領域やMhc近傍の遺伝子構成の全体像を明らかにすることを目的として、C4, histoneならびにtRNAをカバーする各コスミドクローンの分離、そのクローンのシーケンシング解析を行なった。

【方法】 スクリーニングに用いるプローブには、ウズラMhcクラスI遺伝子(Coja-E)のプロモーター上流内でニワトリと相同性の高い領域(74%, 616bp)およびB-G遺伝子間で高度に保存されている領域(660bp)を³²Pにて標識したものを使用した。これらプローブを用いて、ウズラのコスミドライブラリーをスクリーニングした。得られた陽性クローンを制限酵素マッピングおよび末端配列の解析により選抜した後、ショットガンライブラリーを作製し、シーケンシング解析を行なった。

【結果】 約62万コスミドクローンのスクリーニングにより、5個のC4陽性クローン、8個のB-G陽性クローンが得られた。制限酵素マッピングおよび末端配列の解析より目的の領域をカバーしている最適なクローン(C4領域はC5クローン、B-G領域はBG18クローン)を選抜し、シーケンシング解析を行なった。すでにC5クローンから、C4遺伝子が見い出され、現在詳細を解析中である。本大会では、C4, B-G遺伝子を中心に報告したい。

P2-4

SLAクラスI遺伝子領域のゲノム構造解析-
HLA-CとHLA-E遺伝子間に相当する領域の
構造解析-

重成敦子¹⁾, 安藤麻子¹⁾, 椎名隆¹⁾,
Claire Rogel-Gaillard²⁾, Patrick Chardon²⁾, 安江博³⁾,
猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・医・分子生命科学

²⁾ Laboratoire mixte INRA-CEA

³⁾ 独立行政法人・農生資源研

我々は、ブタからヒトへの異種移植の可能性の追求するとともに、MHC領域の免疫応答に関与する遺伝子群の比較ゲノム解析を行うため、ブタMHC(SLA)領域のゲノム塩基配列解析をフランスのグループとともに進めている。ブタ(ラージホワイト系)のBACライブラリーのスクリーニングにより、SLAクラスI領域のコンティグマップを作成し、前回の本学会では、古典的SLAクラスI領域を含む2つのBACクローンの塩基配列決定と構造解析について報告をした。今回は、さらにテロメア側のHLA-CとHLA-E遺伝子間に相当する領域に位置する2つのBACライブラリーについてショットガン法によるシーケンシングをおこなった。得られた全塩基配列の約433kbをヒト配列と比較して詳細な解析をおこなった。その結果、HLAクラスI遺伝子領域のS遺伝子からCAT56遺伝子までの領域内に位置する21個の遺伝子が、ブタの配列の中にもすべてヒトと同一の配置で存在することが明らかになり、ブタにおいてこの領域内での遺伝子の挿入や欠損は認められなかった。また、ドットプロット解析の結果より、今回塩基配列解析を行った約433kbのSLAクラスI領域はHLAクラスI領域の約595kbの領域に相当した。162kbの両領域の長さの相違は、繰返し配列の種類や分布の違いによるものと考えられた。さらに、今回解析したクローンよりテロメア側の領域に位置し、ヒトではHLA-E遺伝子を含む領域のBACクローン1個と、クラスI領域のテロメア側に位置し、ヒトではMOG遺伝子を含む領域に相当するBACクローン2個についても塩基配列決定を進めている。

P2-5

ブタ同種腎移植例におけるSLAクラスI, クラスII遺伝子のDNAタイピング

安藤麻子¹⁾, 河田寿子¹⁾, 重成敦子¹⁾, 太田正穂²⁾,
勝山善彦³⁾, 小林孝彰⁴⁾, 横山逸男⁴⁾, 中尾昭公⁴⁾,
佐田正晴⁵⁾, 猪子英俊¹⁾

¹⁾ 東海大・分子生命科学

²⁾ 信州大・医・法医学

³⁾ 信州大病院・薬剤部

⁴⁾ 名古屋大・第二外科

⁵⁾ 国立循環器病センター研究所

【目的】我々はブタのMHC(SLA)遺伝子の多型性の特徴を明らかにするとともに、同種及び異種間の動物移植実験や免疫応答性の研究に有用なSLA-DNAタイピング法の確立をめざしている。本研究では、ドナーとレシピエント間のSLAタイプの相違と拒絶反応との関連性を明らかにするために、異なる2系統間のブタ腎移植例についてSLAクラスI, II遺伝子のDNAタイピングを行った。

【方法】NIBS系ミニブタのドナーと、ランドレースとヨークシャーの交雑種のレシピエントの合計14組のブタ腎移植例について、移植前に摘出した腎組織より、RNAとDNAを精製した。レシピエントは、1例を除きサイクロスポリンAとPSLを投与し、9例についてはさらにミゾリピンの投与を行った。SLAクラスI遺伝子(SLA-1, -2, -3)は、腎組織の全RNA, SLAクラスII遺伝子(DRB1, DQB)は、腎組織のDNAと各遺伝子座特異的に増幅するプライマーを用いてRT-PCRまたはPCRを行い、塩基配列決定により多型性を解析した。

【結果及び考察】SLAクラスI 遺伝子については1組のSLA-3遺伝子座の1アリル, SLAクラスII 遺伝子については7組のDQB遺伝子座の1アリルがそれぞれ一致していたが、その他の組み合わせではいずれの遺伝子座もドナーとレシピエント間で同一のSLAタイプは見られなかった。また、ドナーは、ほとんどすべてのSLAクラスI, またはクラスII遺伝子型をホモに持ち、今回用いたNIBS系ミニブタは、少なくとも4種類の限られたハプロタイプを有していた。これらの移植例では、1組を除きすべての組み合わせで移植後1~11日に拒絶反応が観察され、ドナー脾細胞をターゲットとするクロスマッチで抗ドナー抗体が検出される組み合わせが見られることから、今後SLAタイプと抗ドナー抗体との関連性を解析する予定である。

P3-1

HLA領域にハプロタイプとしてLOHが検出された症例

峯元睦子¹⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 植木純一¹⁾, 栗田裕子¹⁾,
清水まり恵¹⁾, 津久井和夫¹⁾, 安波道郎²⁾,
木村彰方²⁾, 神谷昌弓³⁾, 香取美津治³⁾, 佐竹正博¹⁾

¹⁾ 東京都赤十字血液センター

²⁾ 東京医科歯科大学・難治疾患研究所

³⁾ 東京慈恵会医科大学付属柏病院

【はじめに】固形がんにおいてはHLAのLOH (Loss of heterozygosity ;片側アレルの欠失) が観察される(例えば大腸がんでは10-20%), このことは腫瘍細胞が宿主の免疫監視機構から逸脱するメカニズムのひとつと考えられている。我々は、白血病細胞においてHLAのLOHを起こしていると考えられる4症例を経験したので報告する。

【方法】HLAのDNAタイピングは、末梢血の白血球から抽出したgDNAを用いPCR-MPH法とPCR-SSCP法で行った。片側の発色およびバンドのシグナルが極端に減弱したアレルをLOHとして、PCR-SSP法およびPCR-RSCA法により増幅産物の量的確認を行った。そのうち1症例については、ファミリースタディーによりハプロタイプを決定した。また、この1例は全白血球中の80%がプラスト化した細胞であったため、正常コントロールとして頬粘膜細胞からgDNAを抽出し、末梢血の白血球から抽出したgDNAとの比較を行った。

【結果】HLA-A,B,C,DRB1のいずれかでLOHが観察された4症例は、PCR-SSCP法またはPCR-RSCA法によりHLA-A,B,C,DRB1座位のすべてについてLOH型変異を認めた。また、4症例中3例はB*4002, もう1例はB*4001の欠失であった。ファミリースタディーをおこなった1症例については、欠失アレルは同一のハプロタイプ上に存在した。さらに、頬粘膜細胞のgDNAを解析することで、HLAのLOHが体細胞変異であることを確認した。

【考察】白血病細胞においてもHLAのLOHが生じ、宿主の免疫監視機構から逸脱すると考えられる。LOHが認められた4症例のすべてがB40関連のアレルであったことは、白血病の成立や進展に関与する自己抗原ないし腫瘍抗原がB40で提示されることを示唆する。

P3-2

日常検査で検出されたHLA-B*0705とこれに関連する各ローカスの特徴について

梅津昭子, 中村淳子, 齊藤敏雄, 中島文明,
松原賢弘, 宮田義久, 村田栄二, 諏訪城三
神奈川県赤十字血液センター

【目的】日常のHLAタイピング検査から数例のHLA-B*0705が検出された。これらは通常認められるA24-Cw7-B7-DR1と異なる関連が観察されたことが検出の発端となった。クラスI領域を含めたこれらの遺伝子型を調べ、各ローカスとの関連について検討を試みた。

【方法】血清学的タイピングは日赤共通トレイと自家製のトレイを使用し蛍光2重染色によるLCT法で判定した。残りの細胞からゲノムDNAを抽出し、Innogenetics社のLine Probe Assayキット及び自家製のPCR-SSP法で遺伝子型を決定した。

【結果】成分献血登録者、臍帯血バンク登録者などから7例、アジア系外国人と推測される献血者15例からB*0705が検出された。全22例中20例に、A*2901とCw*1505が、13例にDRB1*1001, 5例にDRB1*0803が認められた。A*2901-Cw*1505-B*0705-DRB1*1001(*0803)とするハプロタイプの保存が考えられ、外国人以外の7例は全てこのタイプを保有していた。

【考察】血清学的手法ではB*0705と一般的なB*0702とは判別が困難なうえ、指標となるA29やCw15にタイピング・トレイが対応していないと検出不可能である。アミノ酸配列ではB*0702と比較しコドン114および282に置換がみられる。ともにB*0705の方がBローカスのコンセンサスな配列であり、このことが血清学的検出を困難にしている理由と考えられる。外国人以外の7例が純粋な日本人であるかどうかについてここでは問題としない。これまでタイピングしてきた成分献血登録者などの集団(約4万人)にB*0705が7例存在する事実が重要と考える。頻度に関しては、この集団に存在するすべてのB*0705を捕らえているとは考えられないので正確に述べることはできない。

P3-3

尿をDNAの材料としたDNAタイピングの試み

阿藤みや子¹⁾, 小林 賢¹⁾, 鈴木洋司²⁾, 玉井誠^{1,2)}¹⁾ 防衛医科大学校検査部²⁾ 同 輸血部

【目的】 DNAタイピングを行うための検体は、一般的に末梢血液から抽出したDNAが利用されている。しかしながら、白血病の治療などで白血球が著しく減少している患者や採血がむずかしい幼児などでは末梢血液から十分量のDNAを抽出するのが困難な場合もある。そこで、我々は末梢血液、あるいは前処理の煩雑な毛髪や口腔粘膜以外からDNAを得るために、尿をその材料として用いることができるかを検討した。

【材料および方法】 尿沈渣に異常を認めない健常成人を対象に検討を行った。尿50 mlを2,000 x gで7分間遠心した後、沈渣を1.5 mlマイクロチューブに移し、PBSで洗浄した。洗浄した沈渣に4M KI溶液(4 M potassium iodide, 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 12 mM EDTA2Na (pH 8.0), 0.5% sodium N-lauroyl sarcosinate)を400 μ l加え、タンパク質を変性・可溶化した後、1 mlのエタノールを加えてDNAを析出させた。70%エタノールで洗浄後、滅菌蒸留水にDNAを溶解した。回収したDNAを用いてHLA-DRB遺伝子を増幅し、DNAタイピングを実施した。

【結果】 尿沈渣に細胞がほとんど認められない成人の尿を材料としても1 から 6 μ gのDNAが回収された。PCR-rSSO法を利用してDNAタイピングを試みた結果、いずれのDNAも末梢血DNAからタイプされたHLAアリルと一致するものであった。尿中のDNase(細菌由来)の影響についても検討したが、問題なくDNAは回収され、DRBアリルがタイプできた。

【考察】 末梢白血球がほとんどない患者や採血が困難な幼児などでDNAタイピングを実施しなければならぬような場合、有意義であると考えられた。また、腎移植後の拒絶反応の診断や親子鑑定における新生児などにおいてDNA抽出のための有用な材料になるものと考えられた。

P3-4

390家系におけるHLA遺伝子座の組み換え率

荒木延夫, 秋田真哉, 皆森久実子, 能勢義介,
井本しおん, 三戸 壽

兵庫県赤十字血液センター

【目的】 組み換えは、減数分裂の際に2本の相同染色体の間で起こる情報の交換であるが、ヒトゲノムは、領域によって組み換え率が大きく異なっている。一般的に染色体の末端(約20Mb)と染色体短腕で高い傾向にあり、染色体1本につき、減数分裂ごとに少なくとも1回の交叉が生じると考えられている。

今回、我々はHLA遺伝子座の組み換え率について日本人集団に関して検討したので報告する。

【方法】 当センターに造血幹細胞移植を目的としてHLA検査依頼のあった390家系(親780人, 子1039人)について調査を行った。対象とした家系は両親が健在で、2人以上の子が存在し、HLA-A, B, C, DR, DQ座haplotypeのsegregationが確認された家系に限定した。内訳は7人兄弟が3家系, 6人兄弟が3家系, 5人兄弟が12家系, 4人兄弟が38家系, 3人兄弟が120家系, 2人兄弟が214家系で、疾患別による内訳はAMLが111例, ALLが97例, CMLが73例, Apla.A.が41例, MDSが26例, AMMoLが8例, 悪性リンパ腫が8例, NHLが7例, APLが5例, その他14例であった。

【結果】 390家系中にHLA-A/C座の組み換えが11例, HLA-B/DR座が4例認められ、その内2家系においては、2人の兄弟に組み換えが認められた(1例は、HLA-A/C座, HLA-B/DR座の組み換え, 2例目は共にHLA-A/C座の組み換え)。また、HLA-A/C座の組み換え11例中3例に患者本人(ALLが2例, AMLが1例), HLA-B/DR座4例中1例に患者本人(ALL)が認められた。

【考察】 HLA-A/C, B/DR (DRA遺伝子)座間はそれぞれ、約1370kb, 約1080kbであることから、理論的には、組み換え率は、1.37%, 1.08%と推定される。しかし、今回の我々の実測値では、HLA-A/C, B/DR座間の組み換え率はそれぞれ0.53%, 0.19%を示した。このことから、HLA遺伝子座の組み換えは起こりにくく、また、HLA-B/DR座間は、HLA-A/C座間以上に組み換え率が低いことから、B/DR座間の連鎖不平衡は非常に維持されやすいと考えられた。

第19回 近畿HLA研究会記録

会期： 2002年2月2日（土）
 会場： 大阪府赤十字血液センター
 世話人： 永尾 暢夫
 大阪府赤十字血液センター

HLA適合血小板

秋田真哉

兵庫県赤十字血液センター

1960年代から可能となった血小板輸血は、血小板減少を伴う造血系疾患や、化学療法時の止血管理にきわめて有効な療法として確立され、今日では国内で年間800万単位前後にまでその需要を伸ばしてきました。その一方で、頻回血小板輸血患者の中に、しばしば非溶血性副作用を伴い、血小板輸血不応状態（platelet transfusion refractoriness；PTR）に陥る患者が報告され、その原因の多くが抗HLA抗体に起因することから、対応と対策が検討されてきました。1973年、Yankeeらによる“患者HLA抗原適合血小板輸血の有効性”が報告され、本邦でも1990年よりドナー確保のための『成分献血登録制度』の確立、そして『HLA適合血小板製剤』の供給が実施されています。

HLA適合血小板は、その有効性が実証されるとともに需要が増大、またレアタイプへの対応をも含めて、登録ドナーの確保が急務でありました。さらに本年度からは、臨床効果や副作用回避の見地から、ABO式血液型の同型供給が原則となり、いっそうの供給努力が必要となるなかで、現在まで順調に登録ドナーは推移し、全国的な需給調整システムも構築され、安定的な供給体制が可能となっています。次に、患者側からみたHLA適合血小板は、1990年

前後に“白血球除去フィルターの使用が、抗HLA抗体産生の抑制・遅延に有効である”との報告が相次ぎ、臨床現場に浸透するとともに、抗体産生患者数の発生率は減少傾向にあると考えられます。そこで今回は、当施設における過去12年間の抗HLA抗体検査を実施した頻回血小板輸血患者を対象として、その抗体産生の傾向と疾患別、HLAタイプ別との相関を検討しました。

疾患においては、近年骨髄異形成症候群に正の相関（ $p=0.0016$ ）がみられ、このことは今後治療経過や輸血量、輸血製剤の種別などを加味した上で検討する必要があると考えます。またHLAタイプについては、HLA-DR2保持者が通年において、疾患、年齢、性別に関係なく高い陽性率（ $p=0.012$ ）を示しており大変興味深い現象です。

HLA-DR2は他の免疫疾患（多発性硬化症、SLE、潰瘍性大腸炎など）とも正の相関が認められ、また近年一部の血小板抗体（HPA-4b）の産生とも有意差が考えられており、今後の免疫応答における“キー”となるHLAタイプである可能性があります。

以上、『HLA適合血小板』の歴史と現状を踏まえて、“白血球除去フィルターの使用を中心とした抗体産生の抑制”、“臨床効果や副作用の評価による病態把

握”，“ドナー登録の推進”を『HLA適合血小板』のより安全で安定した供給のための現状課題とし、

次に“抗体産生における有意差”を医療へ反映させていくことが、将来への課題と考えております。

母児不適合妊娠（新生児血小板減少症）

谷上 純子

大阪府赤十字血液センター 検査二課

血小板型ならびにHLA型の母児不適合妊娠は、赤血球型（Rh, ABO, その他）の不適合妊娠と同様の機序で母児間の血液型が異なることにより起こる。その結果、児の血小板や白血球が母親から移行してきた抗体の攻撃を受け、出生後まもなく出現する新生児の体躯の出血斑から、血小板数の低下に気付かれることが多い。なかでも、血小板数が $1.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以下の症例については臨床症状が重篤な場合が多いことから、速やかな原因究明と対応が求められる。

医療機関から新生児血小板減少症（NAIT）の疑いで精査依頼を受けた101件中、血小板抗体の関与はHPA-3a：3例、-4a：1例、-4b：20例、-5b：2例、-6b：4例であった。

また、妊婦4,586件の抗体スクリーニングで検出した血小板抗体の内訳は、HPA-2b：1例、-4a：1例、-4b：5例、-5b：24例、Naka：3例（HPA-6bについては未検査）であった。

NAITの疑いで精査依頼を受けた症例のうちHPA-3a抗体が検出された3例中2例は姉弟で、元来健康な母親から在胎41週2日、3,222gで出生した第1子が全身に紫斑を認め、血小板数は $0.9 \times 10^4/\mu\text{L}$ と低値であった。出生2日は $0.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ で血小板と赤血球輸血を行うも改善を認めなかった。HPA適合血小板輸血と γ -グロブリン投与等の治療により徐々に回復した。母親の抗体価は512倍、児は128倍であった。第2子は母親の抗体価測定を定期的に行ったが、際だった上昇は認めなかった。しかし、39週0日に行った臍帯穿刺の血小板数は $0.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ と非常に低値であったため、帝王切開による娩

出後直ちにHPA-3a陰性の血小板輸血を行い、その後は3回の適合血小板輸血で順調な回復をみた。

HPA-4b抗体によるNAITの場合も第1子は、出生直後より全身に紫斑を認め、血小板数は $3.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、出生2日目が $0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ と低下。母親の抗体価2,048倍、児は1倍。 γ -グロブリン投与（400mg/kg/day×5日）と血小板輸血を行った。第2子は帝王切開で出生。血小板数 $0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、児血清中の4b抗体価は64倍で適合血小板輸血を開始した。その後、児の抗体価は出生22日目で16倍、41日目2倍であった。

在胎39週、自然分娩で出生したHPA-6(a+b+)の姉妹は、第1子の血小板数 $0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、点状出血斑を認め、血小板輸血と γ -グロブリン等の治療が行われた。しかし、第2子は血小板数 $7.8 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、紫斑は認めず無治療であった。母親の保有するHPA-6b抗体価は第1子出産直後256倍、児は32倍。2年7カ月後（第2子出産直後）は32倍、児1倍であった。

HLA抗体の関与が疑われた症例は第3子で、37週0日、頭位自然分娩、2,862gで出生。血小板数 $3.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、白血球数 $7.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ 。日齢3日目の血小板数は $1.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、白血球数 $5.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ であった。4日目から γ -グロブリン投与（400mg/kg/day×5日）を開始。6日目 $2.1 \times 10^4/\mu\text{L}$ 、 $2.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ となり、その後は徐々に回復をみた。母親の夫リンパ球に対するHLA抗体価は2,048倍、児の血清中にも256倍の抗体が検出された。第2子は9カ月に胎児水腫で死産していた。

NAITは、このような同種免疫抗体によるもの

外に、児の感染や母親の自己免疫疾患など様々な原因で起こるが、平成元年より医療機関の依頼を受け精査した101件の内、約半数にHLA、HPA抗体が存在していた。今回、妊婦の抗体スクリーニングとNAITから検出された抗体について比較を行いまとめた。

① 妊婦の抗体スクリーニングで最も多く検出されるHPA-5b抗体は、NAIT例から2例検出されたが、児の血小板数はともに $7.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ 前後あり、臨床上特に問題にならなかった。妊婦からは24例と高率に検出されたが、臨床では何ら問題にならなかった。このことから

HPA-5b抗体による母子不適合妊娠の重篤例にはあまり遭遇しそうにない。

- ② NAIT例からはHPA-4抗体が21例と最も多く検出されており注意を要する抗体である。また、この抗体を産生しているヒトには従来からの報告通りHLA-DR2を有意に認めた。
- ③ LCT法を用いて行った妊婦のHLA抗体スクリーニングでは約25%が陽性であったが、臨床問題になる症例はなかった。しかし、NAIT例の中には高力価のHLA抗体が母児ともに検出され、治療を要した症例があり、HLA抗体による血小板減少症にも注意を要する。

抗HLA抗体が原因と考えられるNAIT 3例の免疫血清学解析とHLA Matchmakerによる母児HLA型不適合とHLA抗体産生について

齊藤敏^{1,2)}、青木盛³⁾、小池健一³⁾、徳永泉美⁴⁾、津野隆久⁴⁾、鶴田悟郎⁵⁾、久保徹夫⁵⁾、瀬下秀幸¹⁾、山崎雄一郎¹⁾、太田正穂²⁾、福島弘文²⁾、野村節夫¹⁾

¹⁾ 長野県赤十字血液センター、²⁾ 信州大学医学部法医学教室、³⁾ 信州大学医学部附属病院小児科
⁴⁾ 飯田市立病院小児科、⁵⁾ 厚生連北信総合病院小児科

【目的】

抗HLA抗体が原因と考えられる同種免疫性新生児血小板減少症 (NAIT) の3症例について免疫血清学解析を行うとともに、過去のNAITにおける母児HLA型不適合とHLA抗体産生の関係を検討したので報告する。

【方法】

HLAタイピングにはLCT法を用い、HPAタイピングはPCR-SSP法を用いて行った。両親・児のHLA-CタイピングはPCR-SSP法を使用し血清学でタイプできない抗原も判定した。抗HLA抗体検査にはLCT法、AHG-LCT法、クロロキン未処理MPHA法を実施し、抗血小板抗体検査はクロロキン処理MPHA法を実施した。顆粒球抗体検査にはFCM法を実施し、父親、患児の細胞を用いた母親血清とのクロスマッチはLCT法、AHG-LCT法、クロロキン未処理MPHA法、クロロキン処理MPHA法及びFCM法を実施した。更

に父親のリンパ球・血小板を使用し母親血清の吸収分離試験も実施した。

検索可能であった30例の抗HLA抗体が原因と考えられるNAITにおいて、児のHLA型が母のHLA型とアミノ酸抗原決定部がいくつ違うかHLA Matchmakerにより算出し、産生された抗HLA抗体とアミノ酸抗原決定部の違いをHLAの座別に比較検討を行った。

【結果】

すべての症例において抗血小板抗体、抗顆粒球抗体は検出されなかった。症例1において母の血清中にLCT抗体価32倍、MPHA抗体価1000倍以上の抗B5CREG+B40CREG抗体が検出された。一方、患児血清中には抗B5CREG抗体のみが検出され、この抗体は誕生2ヵ月後にも検出された。症例2においては母血清中にLCT抗体価1倍、MPHA抗体価256倍の抗B5抗体が検出された。患児血清中にもAHG-

LCT抗体価1倍, MPHA抗体価1倍の抗B5抗体が検出された。症例3においては母親血清中にAHG-LCT抗体価1倍, MPHA抗体価2倍の抗B39抗体が検出されたが, この抗体は出産1ヵ月後には検出されなかった。症例1, 2において母親血清中のHLA抗体は父親のリンパ球, 血小板により完全に吸収され, そのHLA抗体は解離液中に解離された。

30症例のNAITでの母児間HLA不一致はABC座不一致13例, AB座6例, BC座8例, A座1例, B座2例であった。産生された抗体数は抗HLA-Aが9, 抗HLA-Bが18, 抗HLA-Cが3であり, 不一致座が2座以上あった27例中22例(81%)においてアミノ酸抗原決定部の多い座の抗原に対する抗体が産生されていた。アミノ酸抗原決定部の不一致数が少ないにも

関わらず産生された抗体は抗B5が3例, 抗B7が1例, 抗Cw7が1例であった。

【結論】

NAIT3症例中2例の患児に母親由来のHLA抗体が検出され, うち1例では母親の持つ抗体の一部のみが検出された。この2例は抗HLA抗体によりNAITが起こった可能性が高い。3症例目については臨床所見及び母親が抗HLA抗体を保有することから抗HLA抗体が関与したNAITの可能性があると思われる。

母児間HLA不一致と産生された抗HLA抗体の特异性をHLA Matchmakerにより比較することで, HLA抗体産生のメカニズムの一端を解明できる可能性があると思われる。

ミニ移植について

畑中 一生

りんくう総合医療センター市立泉佐野病院内科

近年, 同種造血幹細胞移植療法の発展により, 免疫療法の意味合いの強いミニ移植が広く施行されるようになってきた。当院でも, 移植適応疾患で, 高齢者や前治療が多い治療関連死のハイリスクの患者さんを対象に, 99年12月よりHLA一致の血縁者間で12例施行している。

(症例1) 62歳/男性。原発性マクログロブリン血症。発症7年後, 化学療法抵抗性, 重症汎血球減少のため実弟よりPBSCT施行。前処置:L-PAM+Flu。GVHD予防:CyA+sMTX。day29に混合キメラでの生着を確認。day45に間質性肺炎, day70に皮膚, 肝臓の「度GVHD出現。day131に完全キメラを確認。Day521現病以外の理由で死亡。(症例2) 61歳/女性。AML(M0)。大量療法後CR維持。17ヶ月後NHL (diffuse mixed B cell) 発症。CHOP無効。非寛解期に実弟よりBMT施行。前処置:L-PAM+Flu。

GVHD予防:CyA単独。day33完全キメラを確認。CT上リンパ節は著明に縮小。day35皮膚, 肝臓「度GVHD出現。Day115にMRSA敗血症にて死亡。病理解剖でも完全寛解を確認。(症例3) 56歳, 女性。H10年3月よりC型慢性肝炎について通院中, H10年9月CML (第一慢性期)と診断。IFN療法では効果不十分であったため, 実兄よりL-PAM+Fluの前処置でH13年6月22日BMTを施行。血型主不適合のため, 採取有核細胞数は 3.2×10^8 /kgであったが, 処理後輸注CD34陽性細胞は 0.5×10^6 /kg。day22に好中球 $>500/\mu\text{l}$ 。day35に生着確認し, 同時にM-bcr-abl(PCR定量)は感度以下。血球回復期にCMV肝炎発症し, GCVにて軽快するも, 血球回復が遅延し, 長期間輸血を要した。GVHD予防はCyA+s-MTXで, day480現在GVHDを認めず, 生存中。(症例4) 44歳男性。H7年5月発症のNHL(Follicular mixed, B cell

type)stage, B. CHOP, ProMACE療法など8コース後, 部分寛解でH8年11月自家PBSCTを施行。H11年10月再発。Flu+L-PAMによる前処置でH13年1月15日HLA一致の弟より同種PBSCTを施行。輸注CD34陽性細胞は 4.94×10^6 /kg。day15に好中球 $>500/\mu\text{l}$ 。day29に骨髓で完全キメラ。GVHD予防はCyA+s-MTX。day55より腸管に「度GVHD。Day390現在, 完全寛解で生存中。(12例の結果)平均年齢51.7歳, 治療関連死3/12, 再発1/7, 急性GVHD5/7, 慢性GVHD4/5, 生着(完全キメラ; 4/7, 混合キメラ; 3/7), VOD1/12, 生着不全1/12,

間質性肺炎1/12, 移植後1年生存率46.3%であった。(まとめ) ミニ移植には前処置の方法により, 様々な違いがあるが, 我々は個々の条件や, 疾患の特性に合わせ異なった前処置を選択している。また, 対象患者の多くは高齢者であったり, 非寛解期であったりと, 移植におけるリスクが高く, 決して簡単な治療法ではない。NIHのBarrettらも, 50歳以上では30%以上の治療関連死と報告している。しかし, 通常の移植を受けることの出来ない患者には, 予後の改善につながる可能性が十分にある。

造血幹細胞移植 (造血幹細胞の数の増幅と生着能亢進という質の向上の試み)

平山 文也

大阪府赤十字血液センター

造血幹細胞移植は今や日常の臨床の中に組み込まれている。造血幹細胞の源として, 骨髓, 末梢血, 臍帯血が挙げられるが, 臍帯血はその採取の安全性, GVHD が軽度であることなどから近年注目を集めている。しかし, 含まれる造血幹細胞の数が少なく, その適応患者は小児や体重の軽い成人に限られることが多いという欠点がある。そのため, 造血幹細胞の数を体外(ex vivo)で増幅する培養法の研究が盛んに行われるようになり, 近年我々を含め, 既に施設でそのような培養系が樹立され, 一部のグループはその臨床応用に着手している。このような増幅方法が臍帯血造血幹細胞だけでなく骨髓や末梢血造血幹細胞にも応用されれば, 採取量が軽減されドナーの負担が緩和され, より安全な造血幹細胞採取が可能となることが期待される。しかし, ヒトの寿命を考えると移植後数年, 数十年の長期に渡り造血能が維持されなければならないが, いずれの報告でも免疫不全マウスである NOD/SCID マウスをレシピエントとした, 2-6ヵ月程度の短期の移植実験から

造血幹細胞の増幅判定を行っているため, 数年ないし数十年に渡る長期造血維持能を持った真の造血幹細胞が果たして増幅されているかは明らかではない。増幅のための一週間前後の培養期間中に長期造血維持能が失われる可能性が危惧される。

NOD/SCID マウスを用いた移植実験により算出された, CD34 陽性細胞中の造血幹細胞の頻度は, 骨髓, 末梢血で低く, 臍帯血ではそれらの約10倍高いと報告されている。しかし, このような移植実験で造血幹細胞として評価されるのは, 骨髓への生着能を有した幹細胞のみであり, 生着能のないあるいは低い幹細胞は評価されない。実際, 造血幹細胞の中で骨髓への生着能を有する細胞はわずか20個に1個程度の低頻度でしか存在しない。従って, 生着能のない造血幹細胞に生着能を付与すること, 即ち数の増幅ではなく, 生着能のない幹細胞を新たにリクルートすることによって造血幹細胞活性の増幅が可能となることが十分考えられる。しかもそれが長期造血維持能に影響を及ぼさない程度の短時間の処

理で実現されるならば、数の増幅よりも安全な方法と考えられる。

本シンポジウムでは、従来の造血幹細胞増幅法と

生着能亢進という質の向上の試みについて、経験を含めて概説したい。

臓器移植ネットワークにおける移植関連検査について

木村 彰方

東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態分野

現状におけるHLAタイピングの応用で最も重要なものは、移植における組織適合の程度をHLA型によって判定することである。このHLAによる組織適合度の判定は、血清学的HLAタイピング手法を用いて、以前より広く行われて来た。しかしながら、HLA型の一致が全ての臓器移植において同等に重要視される訳ではなく、肝移植ではHLA型一致と移植臓器の生着予後にはほとんど関連がないとされ、心臓、肺、小腸などではHLA型一致と生着予後にある程度の関連はあるものの、それほど大きなものではないと考えられている。また、現実問題として、心臓、肺、小腸などの移植では、HLA型の一致するドナー/レシピエントの組み合わせを選択することは極めて困難である。さらに、HLA一致の重要性が特に重要であるとされていた腎移植においても、近年の免疫抑制剤の開発に伴い、HLA型一致の臨床予後における意義が次第に薄れつつある。一方、HLAタイピング技術については、従来の血清学的タイピングに代わって、試薬の安定供給、

タイピング結果の再現性、高精度タイピングの可能性などの観点から、DNAタイピングに比重が移されて来ている。DNAタイピングでは、原理の異なる複数の方法論があるが、それぞれの特徴を生かしたキットが多種市販されているが、これらのキットを適切に選択することで、血清学レベルでのタイピング精度（2桁レベル）から高精度タイピング（4—5桁以上）までのユーザーのニーズに応じたタイピング結果を得ることが可能である。（社）臓器移植ネットワークは脳死移植を含めた臓器移植のあっせん組織であり、公平、公正な臓器配分を行うために、移植ドナーの感染症検査、HLA検査、レシピエントのHLA検査、ドナー/レシピエント間のダイレクトクロスマッチ、レシピエントのPRA検査などの移植関連検査を行っている。本シンポジウムでは、臓器移植ネットワークにおいて行われている移植関連検査のうち、特に腎臓移植におけるHLA検査について、その実施方針やレシピエント選択における意義などについて、その現状を紹介する。

膀胱尿管逆流症におけるHLA抗原の疾患感受性の検討

河内明宏¹⁾、三木恒治¹⁾、高原史郎²⁾、矢澤浩治²⁾、佐田正晴³⁾

¹⁾ 京都府立医科大学泌尿器科, ²⁾ 大阪大学泌尿器科,
³⁾ 国立循環器病センター・実験治療開発部

【目的】

HLA抗原は高度の遺伝的多型性を示し、免疫応答に重要な役割を担っていることから、疾患感受性について多くの検討がなされてきた。今回、膀胱尿管逆流症患者において、HLA-DR抗原の疾患感受性を検討したので報告する。

【対象と方法】

対象は膀胱尿管逆流症患者40例（男性27例、女性13例、平均年齢9.2歳）であった。PCR-SSP法を用いてHLA-DR low-resolutionタイピングを行った。また、PCR-SSP法およびInno-LiPA法を用いてHLA-DRB1 alleleのhigh-resolutionタイピングを行った。以上の結果を健康な日本人493人における報告と比較した。

【結果】

膀胱尿管逆流症患者におけるlow-resolutionタイピングではDR11抗原が、high-resolutionタイピングにおいてはDRB1*1101および1502 alleleが有意に高頻度に出現していた。また腎癬痕がある患者においてはDR11抗原およびDRB1*1101 alleleの頻度が有意に少なかった。尿路感染症を主訴とする患者においてはDR13抗原およびDRB1*1302抗原の頻度が有意に少なかった。

【考察】

膀胱尿管逆流症の一部は、HLA遺伝子かその近くに存在する未知の遺伝子と関係がある可能性が示唆された。

妊娠中毒症胎盤におけるHLA-G発現の消失について

下嶋典子、中西真理、大村素子、石谷昭子、羽竹勝彦

奈良県立医科大学法医学教室

HLA class Ib 遺伝子の一つであるHLA-Gは、多型性が乏しいことと、胎盤トロホプラストに強く発現していることから、妊娠を制御し、その維持に深く関与する分子であると考えられている。さらに、妊娠中毒症胎盤においてHLA-G発現が消失したトロホプラストが見いだされ、HLA-Gが胎盤トロホプラストに発現していないことが、妊娠維持の免疫を

破綻させ、妊娠中毒症などの疾患を引き起こす原因になると考えられるようになった。

しかし、我々もこれまでHLA-Gの胎盤における発現を調べてきたが、HLA-Gの発現が直接的に疾患に関与しているような所見はえられなかった。そこでさらに胎盤トロホプラストにおけるHLA-Gの発現を詳細な検討を行った。

【方法】

インフォームドコンセントを得て採取された正常満期胎盤、妊娠中毒症胎盤を用いた。これらの胎盤について抗HLA-Gモノクロナル抗体87Gを用いた免疫染色、コハク酸デヒドロゲナーゼ (SDH) 活性の検出を行った。また妊娠中毒症胎盤の超薄切切片を作製し電子顕微鏡観察を行った。

【結果】

正常および妊娠中毒症胎盤において胎盤 extravillous trophoblastにHLA-Gは発現していた。しかし正常満期胎盤において一部HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastが存在した。このextravillous trophoblastはサイトケラチン陽性であるが、HE染色において細胞質がエオジン陰性で、ミトコンドリアの呼吸系酵素の一つであるSDHの活性が認められなかった。一方、HLA-Gを発現しているextravillous trophoblastはサイトケラチン陽性で、HE染色において細胞質はエオジン陽性であり、さらにSDH活性も陽性であった。妊娠中毒症胎盤のextravillous trophoblastにも一部HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastが存在し、これらについてもHE染色、SDH活性を調べたところ、正常胎盤

と同様にHLA-Gを発現しているextravillous trophoblastはSDH陽性、エオジン陽性であり、HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastはSDH陰性、エオジン陰性であった。この2種のextravillous trophoblastについて電子顕微鏡観察を行ったところ、HLA-Gを発現しているextravillous trophoblastの細胞質には多くのミトコンドリアが認められ、細胞膜の構造も保持されているのに対し、HLA-Gを発現していないextravillous trophoblastは、ミトコンドリアが膨化し、細胞膜が破壊されているというネクローシスの組織像を示した。

【考察】

extravillous trophoblastにおけるHLA-Gの発現の消失は、ネクローシスあるいは細胞死を起こしている細胞にみられる現象であって、妊娠中毒症胎盤に特異的に存在するものではない。しかし、抗サイトケラチン抗体は生・死細胞のいずれにも反応しうることから、それだけで生細胞か死細胞かを見極めるのは困難である。このような事もふまえた上で妊娠中毒症等におけるHLA-Gの発現の検討を行うべきである。

NIMA同胞間・母子間マイクロキメリズムと HLAミスマッチ造血幹細胞移植

丸屋悦子¹⁾、一戸辰夫²⁾、玉木茂久³⁾、渡辺新⁴⁾、佐治博夫¹⁾

¹⁾ 特定非営利活動法人HLA研究所, ²⁾ 京都大学医学部附属病院第一内科
³⁾ 山田赤十字病院内科, ⁴⁾ 中通総合病院小児科

【はじめに】

同種造血幹細胞移植が悪性腫瘍・白血病の唯一の根治療法である。この治療法には三大予後要因がある。それは病態/病期・年齢・組織適合性で、前者の2要因についてはかえようのない制約条件である。組織適合性については人知が及ぶ範囲の要因と考えられる。適合ドナーが得られない患者には適合

性のより良いミスマッチドナーの選択が必須となる。我々はNIMA (non-inherited maternal antigens) 相補同胞間・母子間マイクロキメリズムを免疫寛容の傍証として、NIMA相補同胞や母 (または子) が最良のミスマッチドナーと考えている。母子・同胞間の相互micro chimerismを検出し、その頻度および持続期間などを検討した結果および移植成績につい

て報告する。

【方法】

標的alleleとして、子の血中にnon-inherited maternal haplotype由来allele (NIMHA)が、また母血中に子に遺伝したpaternal haplotype由来alleleを選択した。子(母)の爪DNAを体細胞コントロールとした。1st PCRは標的に選択したHLA locus specific primerを用い、産物を滅菌蒸留水で $10^2 \sim 10^4$ に希釈し、2nd PCRはallele specific primerを用いて行なった。爪由来DNA陰性で、末梢血由来DNAから特異的増幅産物が得られた場合をmicro chimerism陽性とした。感度は1st PCRにアプライできる鋳型DNA量に依存し、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ であった。

【結果・考察】

52例の母子間・同胞間(132人)を検査した結果、28例(54%)に母児双方向のmicro chimerismが検出された。Micro chimerismが母に検出され子に検出されなかった例が10例(19%)で、その逆が5例(10%)で、双方向とも検出されなかった例が9例(17%)であった。母子では最長50年、同胞では25年間micro chimerismが存続していることが解った。移植成績からNIMA相補同胞・子・母の順でHLAミスマッチ度にかかわりなく、非血縁1ミスマッチドナーより適合性の良いドナーとして選択できる。

兵庫さい帯血バンクにおける移植状況について

国分寺 晃¹⁾、本河亜紀³⁾、谷脇清助¹⁾、甲斐俊朗¹⁾、原 宏^{1,2,3)}
皆森久美子⁴⁾、秋田真哉⁴⁾、荒木延夫⁴⁾、能勢義介⁴⁾、山岡正暢⁵⁾、仁田 浩⁵⁾

¹⁾ 兵庫医科大学病院輸血部、²⁾ 同細胞移植部、³⁾ 兵庫さい帯血バンク
⁴⁾ 兵庫県赤十字血液センター、⁵⁾ 京都府赤十字血液センター

造血幹細胞移植(SCT)による造血器悪性腫瘍の治療は、同種骨髄移植(BMT)として既に確立している。しかし、HLA適合血縁者ドナーがいる患者は約30%であり、骨髄バンクを介した移植を希望しても受けられない患者も多く、移植を待てない場合や造血幹細胞を高頻度に含む臍帯血の有用性から近畿臍帯血バンクが発足(平成9年9月より提供を開始)した。その後、平成11年8月に「日本さい帯血バンクネットワーク」が設立され、近畿臍帯血バンクは、兵庫さい帯血バンクとしてネットワークの参加が認められた。

近畿臍帯血バンクとして約2年間に35標本(33症例)の提供を行い、ネットワーク開始後は、2001年12月現在42標本(42症例)を提供している。また2002年1月現在655標本を公開している。

移植の成否を左右する主な因子は、移植前の患者

の状態、移植細胞数、HLAの一致率などであるが、平成9年9月～平成12年12月までの症例について検討してみると、44標本を提供し、24施設にて42症例の臍帯血移植(CBT)が行われた。年齢は中央値7歳(4ヶ月～36歳)で、男性23症例、女性19症例、体重の中央値は20kgであり、疾患はALL 16症例、AML 11症例、FEL 2例、SCID 3症例、WA-S 2症例、CML、NK-Cell Leukemia、NHL、CGD、CDA、SAA、PRCA、AMT各1症例であった。また、Second SCTとしてのCBTは6症例、Third SCTは2症例であった。

HLAの適合は表1に示したが、輸注量の中央値は79ml(50～145ml)、患者体重あたりの輸注有核細胞数は中央値 3.99×10^7 cells/kg(1.69～ 15.5×10^7 cells/kg)、CFU-GM数は中央値 2.78×10^4 /kg(0.2～ 30.8×10^4 /kg)、CD34陽性細胞数は中央値

1.24×10⁵ cells/kg (0.3~38.3×10⁵ /kg)であった。また、GVHDは表2のような結果であった。

厚生労働省は平成11年度から全国で、5年間に2万件的臍帯血を保存する計画を立てている。これにより、移植を希望する患者さんの90~95%に臍帯血が提供できるとしている。非血縁者間の移植数は平成12年度では、骨髄移植715件(82%)、臍帯血移植160件(18%)であったが、平成13年度の臍

帯血移植は数も比率も伸びている。今後は臍帯血の選択基準(細胞数、HLA適合度等)の明確化、前処置の工夫、ex vivo増幅、複数標本のCBTによる生着不全防止や生着の促進や科学的なデータに基づいたCBTとBMTとの比較、更にPBSCTとの検討を行い幹細胞移植のそれぞれの役割を明確にして行く事が重要と考えられる。

表1 HLA compatibility

(HLA-A, B; serological typing, DRB1; high resolution DNA typing) n=42

	GVH direction	HVG direction
3/6	10	11
4/6	16	15
5/6	13	12
6/6	3	4

(HLA-A, B, DRB1; high resolution DNA typing) n=34

	GVH direction	HVG direction
2/6	3	3
3/6	11	12
4/6	10	9
5/6	8	9
6/6	2	1

表2 Clinical results

Acute GVHD

(HLA-A, B; serological typing, DRB1; high resolution DNA typing) n=42

HLA compatibility	0	I	II	III	IV	NE
3/6	1	2	6	0	0	1
4/6	2	4	6	1	0	3
5/6	2	7	1	1	0	2
6/6	1	1	1	0	0	0
total	6	14	14	2	0	6

(GVHD prophylaxis and AGVHD)

HLA compatibility	GVHD prophylaxis	
	CSA n=27	FK506 n=15
3/6	7	3
4/6	10	6
5/6	9	4
6/6	1	2
AGVHD II ≤	14/25 (56%)	3/11 (27%)

Chronic GVHD

Yes	6
	Extensive type 2
	Limited type 4
No	19
NE	19

血清学的検査でHLA-B座が検出できなかったT-ALLの1症例

皆森久美子, 秋田真哉, 荒木延夫, 能勢義介, 井本しおん, 三戸 壽

兵庫県赤十字血液センター

【目的】

今回、我々はHLA-B座が血清学的検査で検出できなかったT-ALL (L3) の症例に遭遇したので報告する。

【方法】

血清学的検査は、LCT法を用い、日赤共通トレイJRT20, JRT22の2種を用いた。患者検体は化学療法前の検体 (Blast細胞91%, リンパ球7%, 単球

2%)と化学療法後37日目 (Blast細胞0%, リンパ球17%, 顆粒球73%, 単球10%)を使用した。化学療法前の検体からのリンパ球分離は比重液で分離後、リンフォクイックで3回処理し、純度97%のリンパ球分画を得た。DNA検査は、PCR-SSPを使用した。また、患者の父、母、妹の血清学的検査、DNA検査も実施した。

【結果】

血清学的検査では、患者（化学療法前の検体）が A2, A2, B-, B-, Cw10, Cw10, 父がA2, A33, B44, B61, Cw10, Cw-, 母がA2, A24, B48, B61, Cw10, Cw-, 妹がA2, A24, B48, B61, Cw10, Cw-を示し、患者本人のB座が検出されなかった。また、化学療法後の検体では、A2, A2, B61, B61, Cw10, Cw10を示し、B座が検出された。

DNA検査では、患者がA*02, A*02, B*4002, B*4002, Cw*0302, Cw*0302, 父がA*02,

A*33, B*44, B*4002, Cw*0302, Cw:14, 母がA:02, A*24, B*48, B*4002, Cw*0302, Cw:08, 妹がA*02, A*24, B*48, B*4002, Cw*0302, Cw*08を示し、患者本人のB座は、父、母からB*4002(B61)が遺伝していた。

【結論】

今回のT-ALLの症例は、リンパ球分画に腫瘍細胞が存在し、その細胞上にB座が発現されていなかったと考える。

HLA MatchmakerによるHLA適合血小板ドナーの許容抗原選択について —HLA適合血小板輸血において輸血効果を妨げた交差反応抗原

斉藤敏, 瀬下秀幸, 山崎雄一郎, 野村節夫

長野県赤十字血液センター

【目的】

PRA (Panel-reactive activity) 90%以上の抗HLA抗体を保有した患者に、交差反応性からHLA適合血小板ドナーを選択すると、交差試験が陽性になる場合や、輸血効果が得られない場合がある。我々は、Duchesnoyが移植適合ドナー検索を目的として開発したエクセルプログラムHLA Matchmakerを使用することでこの問題が解決できると考え検討を行ったので報告する。

【方法】

HLA MatchmakerはHLA分子の α ヘリックス及びエクソン4上でアミノ酸多型が存在する位置を中心とする連続3個のアミノ酸を一つの抗原決定部と考え、患者のHLA型と比較して、ドナーのHLA抗原にいくつ抗原決定部の違いがあるかを算定するプログラムである。患者のHLA-A, B, Cいずれかの抗原分子上に、ドナーの抗原決定部が存在すれば、その抗原決定部を自分自身と考え、その抗原決定部に対しては抗体を作らないだろうという原理に基づいている。HLA-Aで30か所、Bで24か所、Cで19か所の位

置で172の抗原決定部を比較の対象とする。

このプログラムを使用して、HLA抗体により新生児血小板減少を引き起こさせた母28人とその子（免疫原）のHLA抗原の比較、HLA適合血小板使用中に新たな抗体を産生した血液疾患患者13人のHLA型と新たに産生された抗体に対する抗原との比較を行った。また、AHG-LCT, MPHA, FCMにて保有している抗体がHLA抗体のみであることが確認されているPRA90%以上の患者34人のHLA適合血小板（HLA-PC）輸血効果とドナーのHLA抗原決定部の違いについての検討も行いプログラムの有用性を検討後実際のドナー選択にも使用した。

【結果】

新生児血小板減少を引き起こさせた母28人中25名にA, B, C座のいずれか2座以上の不適合があり、そのうち21例においては、抗原決定部の違いの多い抗原に対する抗HLA抗体が産生されていた。残り4例中2例はA24-B52, 1例はA31-B52, 1例はA24-B7の免疫原に対し抗原決定部の違いがA座抗原の方が多いい関わらず抗B52あるいは抗B7抗体が

産生されていた。一方HLA-PC使用群では2カ所の抗原決定部の違いで新たな抗体が産生されていた。PRA90%以上の患者34人中6人で67輸血中28例のHLA適合血小板輸血不応答が認められ、不応答の全症例において2カ所以上の抗原決定部の違いがあった。これら症例すべてのAHG-LCT, MPHAによるクロスマッチは陰性であったが不応答例にはB61に対するB60, B39に対するB67等の特定抗原が関与し、これら抗原は抗原決定部が患者のHLA型と2カ所以上違っていた。

患者のドナー選択においては交差反応性検索により適合ドナー数が12人しかいない患者のドナー数が40人に増え、検索された新たな抗原を持つドナーを使用しての輸血効果も良好であった。

【考察】

交差反応性からドナーを選択した症例においてAHG-LCT, MPHAによるクロスマッチが陰性であるにも関わらず血小板輸血不応答例が存在した場合や、PRA (Panel-reactive activity) 90%以上でドナー選択が難しい場合にHLA Matchmakerを使用してドナー選択をすることによりHLA適合血小板がより効果的に使用される可能性と、ドナー数を新たなスクリーニングなしで増やすことができる可能性が示唆された。母児不適合妊娠の抗HLA抗体産生においては妊婦のHLA型と免疫原のHLAに不一致抗原が2抗原以上存在した場合、不一致抗原決定部の多い抗原に対する抗体産生が起こる可能性が高いと思われる。今後妊婦と免疫原の比較を多くすることで抗HLA抗体産生の機序の一端を解明できる可能性がある。

<お知らせ>

平成14年度認定HLA検査技術者講習会

下記要領にて平成14年度認定HLA検査技術者講習会を開催いたします。なお、認定HLA検査技術者特例認定申請書を既に提出されている受講者には、受講後の受講者名簿へのサインをもって受講証明といたします。それ以外の受講者には、受講後に受講証明書を発行いたします。

本年度と来年度に検査技術者認定を取得しようとしている方々は、この講習会を受講することが必要です。本年度に申請された方は、必ず受講してください。また、来年度に申請を予定している方についても、申請前に受講することが検査技術者認定の必須条件になっていますので、必ず本年度の講習会を受講し、受講証明書をお受け取りください。本年度の講習会を受講しておかないと、来年度の申請ができませんので、ご注意ください。また、受講証明書は再発行致しませんので、申請時まで大切に保管してください。

講習会の受講は最低1回が申請の必須条件となりますが、必須として受講した分は認定申請の単位に算入できませんので、来年度に申請予定の方はお気を付けください。平成16年度以降に申請される方については、本年度講習の受講を申請時の単位（5単位）として算入することができますが、その場合には申請時に遡る5年間に別途技術者講習の受講が必要となります。

組織適合性技術者認定制度委員会
委員長 佐治 博夫
教育部会長 西村 泰治

記

1. 会期： 2002年9月23日（月：祝日） 16:00～18:00
2. 会場： 川越プリンスホテル
〒350-8501
埼玉県川越市新富町1-22
TEL.049-227-1111, FAX.049-227-1110
*: 第6回HLA DNAタイピングQCワークショップ終了後、引き続き同会場で行います。
3. 講習会参加費： 2,000円
4. 講習会内容

HLA遺伝子領域の構造：	猪子 英俊（東海大学）
HLA分子の機能：	西村 泰治（熊本大学）
HLA遺伝子の連鎖不平衡：	徳永 勝士（東京大学）
HLAタイピングと遺伝子解析ガイドライン：	木村 彰方（東京医科歯科大学）

付記：今回は大会会期中の下記のシンポジウムとワークショップを教育部会推薦講演（聴講することが望ましいが、認定の必須条件ではありません）といたします。

シンポジウム2 「移植医療とHLA」
ワークショップ 「HLAタイピング・移植検査の最前線」

<お知らせ>

平成14年度特例認定組織適合性指導者講習会

第11回日本組織適合性学会大会中の下記の講演等をもって、平成14年度認定組織適合性指導者講習会に代えます。すなわち教育講演中の4つの講演の聴講、あるいは2～5の4つの講演等などのうち少なくとも2つの聴講をもって、指導者認定に必須の講習を受講したものと認めます。なお、受講後の受講者名簿へのサインをもって受講証明といたします。

本年度に指導者認定を申請された方は、必ず指定された講演を受講してください。また、来年度の特例認定を申請する予定の方も必ず指定された講演を受講し、受講者名簿にサインしてください。今年度受講しないと、来年度の指導者特例認定申請ができなくなりますので、ご注意ください。なお、平成17年度以降（平成16年度の認定はございません）に指導者認定の申請を予定している方の講習は、平成16年度の大会時に開催する予定です。今回の講習は特例認定のためのものですから、単位として算入することはできませんことを御留意ください。

組織適合性技術者認定制度委員会
委員長 佐治 博夫
教育部会長 西村 泰治

平成14年度特例認定組織適合性指導者講習会に代える 第11回日本組織適合性学会大会中の講演等

1. 教育講演：
 - 1)癌細胞の排除におけるHLAの役割
 - 2)HLAテトラマーによる抗原特異的CD8 T細胞の解析
 - 3)HLA分子とT細胞応答
 - 4) 妊娠免疫とHLA クラスIb
2. 特別講演 「DNAからみた日本人の起源」
3. シンポジウム1 「細胞治療：現時点での治療成績と今後の展開」
4. シンポジウム2 「移植医療とHLA」
5. ワークショップ 「HLAタイピング・移植検査の最前線」

＜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りますので、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。なお、掲載された論文等の著作権は、日本組織適合性学会に属し、インターネットを通じて電子配信されることがあります。

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*1307 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。また、新対立遺伝子、日本人に認められた希な対立遺伝子に関する報告も受け付ける。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

今号は組織適合性学会第11回大会の抄録号である。大会も既に11回を数えたし、今年度からは組織適合性、特にHLAタイピングの技術と知識に関する学会の認定制度も始まっている。HLAは移植片の生着予後を規定する分子（移植抗原）として発見され、移植における有用さゆえにその多型性が研究対象となり、また種々の疾患（特に原因不明の自己免疫疾患など）の遺伝マーカーとしても解析が進められた。さらに、HLAの本来の役割である微生物感染や悪性腫瘍細胞の除去機能との関連で、HLA研究は多方面への展開を遂げて来た。

HLAはその著明な多型ゆえに、なにやら分りにくい分子として専門外の方々に捉えられているようであるが、このようなHLA研究はヒトゲノムプロジェクトの目的のひとつである「疾患関連多型の同定」の先駆的な研究であるともいえる。疾患関連多型研究を例に取れば、疾患感受性をSNPとの関連として始めて指摘したのは、John Toddらの若年性糖尿病とDQ β 鎖の57番アミノ酸non-Aspとの関連説である。しかしながら、この説は日本人における感受性を説明出来ないことは明白であり、さらには若年性糖尿病の発症頻度が最も高い北欧欧米人でも必ずしも当てはまらない。HLAと若年性糖尿病感受性の相関の分子機構はまだ明らかにはされていないが、DQB1遺伝子が単独で疾患感受性を規定している訳ではなく、HLA領域内の複数の遺伝子における多型の機能的相違の総合として疾患感受性が決まるのではないかと思われる。このことは若年性糖尿病に限ることではなく、HLAとの相関が明らかな慢性関節リウマチについても言える。さらに言えば、乾癬の場合のように、HLA分子の多型との相関は真の疾患感受性遺伝子とHLA多型との連鎖不平衡の結果に過ぎないこともある。

このようにHLA研究のこれまでの歩みは、今後の疾患関連遺伝子探索における研究上の数々の留意点を教えてくれる。疾患感受性研究に限らず、

HLA研究の先駆者達や現在の学会員個々人のこれまでの努力が実り、新たな局面に向かって発展する時代を迎えたのである。「HLA学」をより分かりやすい言葉でより多くの研究者に伝え、より広範かつ詳細なHLA研究の基礎的、臨床的な展開をはかることが、本学会の使命であろう。本年5月には第13回国際組織適合性ワークショップが開催された。また、来年9月には第12回日本組織適合性学会と第7回アジアオセアニア組織適合性ワークショップが合同開催される予定である。このような国際学会は日本からの情報発信の場である。さらに、今号のMHCには海外からの投稿論文が初めて掲載されたが、MHCも日本からのHLA研究に関する情報発信の一手段となった。会員諸兄のなお一層の論文投稿を歓迎する。
(木村彰方)

MHCバックナンバー

一冊¥2,000にて購入可能です。学会事務局までお問い合わせください。発行より2年を経過したものは、在庫が少数になっている場合もありますのでご了承下さい。

入会・変更

新入会、住所変更は学会事務センターまでお問い合わせください。また、日本組織適合性学会ホームページの入会申込書もご利用下さい。

(社) 学会事務センター

〒113-8622

東京都文京区本駒込5-16-9 学会センターC21

TEL : 03-5814-5810

FAX : 03-5814-5825

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報やHLA遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

<http://square.umin.ac.jp/JSHI/mhc.html>

<http://jshi.umin.ac.jp/mhc.html>

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2002年8月31日発行 9巻2号, 2002

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会 (会長 猪子 英俊)

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)

〒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