

第 12 回日本組織適合性学会大会

The 12th Japanese Society for
Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI)
Annual Meeting

大会長 猪子 英俊 東海大学医学部 基礎医学系 分子生命科学 教授

会 期 2003 年 9 月 15 日(月)~9 月 17 日(水)

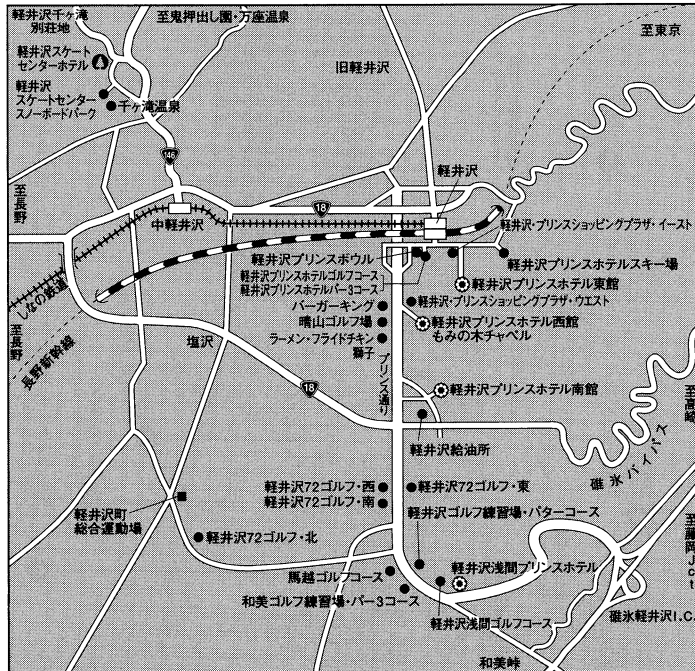
会 場 軽井沢プリンスホテル西館
〒389-0193 長野県北佐久郡軽井沢町軽井沢
TEL: 0267-42-1111 FAX: 0267-42-7139

事務局 東海大学医学部 基礎医学系 分子生命科学
〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台
TEL: 0463-93-1121 内線 2312 FAX: 0463-94-8884
e-mail: tnaruse@is.icc.u-tokai.ac.jp

交通案内

JR 長野新幹線(東京～軽井沢 約 70分)

●交通 車/上信越自動車道碓氷軽井沢I.C.から東館まで12.5Km(平常時14分)、西館・南館まで11Km(平常時12分)。電車/長野新幹線軽井沢駅南口から東館まで徒歩10分、西館までタクシーで2分または徒歩14分、南館までタクシーで5分。



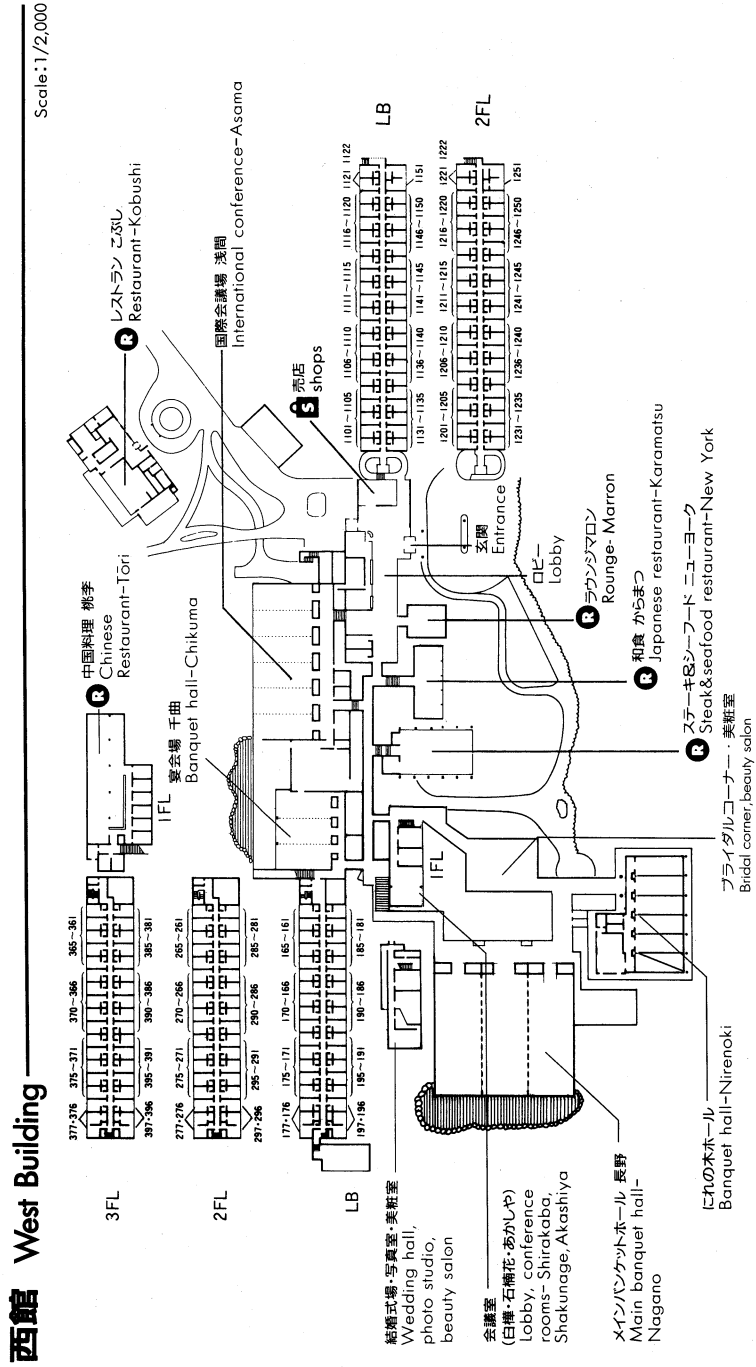
軽井沢プリンスホテル

TEL.(0267)42-1111

長野県北佐久郡軽井沢町軽井沢 ☎389-0193 FAX(0267)42-7139
 Karuizawa, Karuizawa-machi, Kitasaku-gun, Nagano 389-0193
 Phone:0267-42-1111 Facsimile:0267-42-7139

プリンスホテル インターネットホームページ <http://www.princehotels.co.jp/>

会場案内



御案内

開催内容について

本大会第3日(9月17日)は、第7回アジア・オセアニア組織適合性会議(7th AOH)との併催となっております。第3日のプログラムは英語にて行われます。

学会・懇親会参加の皆様へ

1 登録

- 1) 受付時間: 9月15日～17日の8:30～17:00
- 2) 事前登録者: 受け付けにて引換証提示の上、参加証をお受け取り下さい。
- 3) 当日参加費: JSHIのみ参加は15,000円、7th AOHとの共通参加は45,000円です。受け付けにて参加費をお支払いの上、領収証と参加証をお受け取り下さい。
- 4) ネームカードは会期中着用してください。また参加証は認定 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。紛失の際の再発行は致しかねますのでご了承下さい。
- 5) 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 懇親会

日 時: 9月16日(火) 19:00～21:00

会 場: 軽井沢プリンスホテル西館1階 あさま

参加費: 3,000円

多数の御参加をお待ちしております。参加者は登録受付にて参加費をお支払いの上、参加証をお受け取り下さい。

演者の皆様へ

1. 発表時間

- 1) シンポジウム, ワークショップ発表者は、指定された時間内での発表をお願い致します。
- 2) 一般口演発表者は発表10分, 討論3分です。スライドは10枚以内でお願い致します。
- 3) ポスター発表者は発表5分, 討論2分です

2. スライド

- 1) 口演発表は35mmスライドまたは液晶プロジェクターを使用してください。
- 2) スライドは、セッション開始の30分前までに総合受付で試写のうえお預けください。
- 3) 液晶プロジェクター使用者は、必ずパワーポイントにて作成のファイルをフロッピーディスクに入れて、セッション開始の30分前までに総合受付にてお預け下さい。

3. ポスター

- 1) ポスターは英語で作製願います。
- 2) ポスターパネルは縦120cm横90cmです。ポスター発表者は9月15日午後15:00～18:00までの間に、総合受付でピンを受け取り指定の場所に掲示してください。
- 3) 9月16日(火)15:00より、ポスター発表をおこないます。演者は掲示ポスター前にて待機願います。
- 4) ポスターの撤去は9月16日18～19時の間にお願いします。

QC ワークショップ集会

日 時: 9月15日(月) 13:00 ~ 16:00

会 場: 軽井沢プリンスホテル西館1階 長野

参加費: QCWS 参加者で、すでに参加費を振り込んでいる方は受付にて参加証をお受け取り下さい。
集会のみ参加の方は、当日受付にて参加費 2,000 円をお支払いの上ご参加下さい。

認定制度技術者講習会

日 時: 9月15日(月) 16:00 ~ 18:00

会 場: 軽井沢プリンスホテル西館1階 長野

テキスト代: 2,000 円

参加者は受付にて出席確認を済ませてから御入場ください。

* 本講習会は事前申し込み制です。当日参加も可能ですが、テキスト数に余裕がある場合にのみ購入可能です。

内 容: HLA 分子の構造と機能 西村泰治(熊本大学)
HLA 遺伝子のタイピング法 石川善英(東京都赤十字血液センター)
HLA の疾患感受性解析への応用 安波道郎(東京医科歯科大学)

会議等日程

- 1) 理事会 9月15日(月) 11:00~12:00
軽井沢プリンスホテル西館1階 あかしや
- 2) 評議員会 9月15日(月) 18:00~19:00
軽井沢プリンスホテル西館1階 白樺
- 3) 総会 9月16日(火) 17:20~18:00
軽井沢プリンスホテル西館1階 長野
- 4) 認定制度委員会 9月16日(火) 12:00~13:00
軽井沢プリンスホテル西館1階 あかしや
- 5) QCWS 部会 9月15日(月) 12:00~13:00
軽井沢プリンスホテル西館1階 あかしや

機器展示

軽井沢プリンスホテル西館1階 長野

観光・交通案内

本大会、並びに 7th AOH 開催期間中は、JTB の専用デスクを設けております。観光、宿泊、交通等のご案内、ご予約に御利用下さい。

JSHI, 7th AOH スケジュール

9月15日(月)		9月16日(火)		9月17日(水)		9月18日(木)		9月19日(金)	
JSHI		JSHI		JSHI, AOH		AOH		AOH	
8:00							シンポジウム Genome Diversity		シンポジウム Immune Response
9:00	準備 展示搬送	オープニングセレモニー(8:50~) シンポジウム ゲノム多様性を考える	オープニングセレモニー(8:50~) スポンサードシンポジウム (株)ノバルティスファーマ Histocompatibility and Immunology						
10:00									
11:00	JSHI理事会								
12:00	QCWS部会	ランチ 認定制度委員会 TFB学術奨励賞優秀受賞者口演	ランチ 提供 ベリタス			14th IHC アナウンス 11:40-11:55 ランチョンセミナー TFB		ランチ 提供 湧永製薬	
13:00	QCWS	一般口演	Genome Diversity Project WS			ポスター貼り替え TFB学術奨励賞優秀受賞者、 7thAOH Best abstracts 口演		Oral presentaion III	
14:00									
15:00		ポスター発表	コーヒーブレイク 特別講演 PI Terasaki Oral presentation I, II			WS1 Transplantation		シンポジウム MHC Evolution	
16:00	認定制度技術者講習会	HLA タイピング標準化シンポジウム				WS2 Disease			
17:00		総会				WS3 Polymorphisms of MHC and related genes		クロージングセレモニー	
18:00	JSHI評議員会								
19:00		JSHI 懇親会	ウェルカムレセプション						
20:00									
21:00									

プログラム

特別講演

9月17日(水) 15:30~16:30

座長 笹月健彦(国立国際医療センター)

SL-1 Evidence from prospective trials that HLA antibody precedes kidney graft rejection

PI Terasaki Terasaki Foundation USA

シンポジウム 1 「ゲノム多様性を考える」 9月16日(火) 9:00~11:50

座長 猪子英俊(東海大学)

S1-1 ゲノム多様性とオーダーメイド医療

中村祐輔 東京大学医科学研究所

S1-2 比較ゲノム解析とゲノムの多様性

榊 佳之 東京大学医科学研究所

S1-3 HLA 領域におけるゲノム多様性

木村彰方 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

S1-4 マイナー組織適合抗原とゲノム多様性

赤塚美樹 愛知県がんセンター研究所

S1-5 幹細胞移植による神経再生

岡野栄之 慶應義塾大学

シンポジウム 2 「HLA タイピングの標準化」 9月16日(火) 15:50~17:20

座長 佐治博夫(HLA 研究所)

S2-1 HLA タイピングの QC について

田中秀則 東京都赤十字血液センター

S2-2 HLA 試薬メーカーから見た DNA タイピング方法に関する ASHI 認可制度

斉藤克行 One Lambda, USA

S2-3 ISO15189 を中心とした HLA 検査の標準化

小林 賢 防衛医科大学校

S2-4 どこまで判定すれば良いか？

島田 和典 ゲノムサイエンス研究所

S2-5 HLA タイピング製品の製造と品質管理

川井信太郎 湧永製薬

S2-6 使用目的に応じた HLA タイピング法の選択

木村彰方 東京医科歯科大学・難治疾患研究所

スポンサードシンポジウム

9月17日(水) 9:00~12:00

「Histocompatibility and Immunology」(株)ノバルティスファーマ

座長: 吉村了勇(京都府立医科大学)

木村彰方(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

SS-1 HLA と移植

1) 臓器移植-HLA バリアをこえられるか

免疫抑制方法と長期成績

Gerhard Opelz (University of Heidelberg, Germany)

ABO 不適合移植

高橋公太(新潟大学)

2) 細胞移植-HLA と GVHD コントロール

HLA と造血幹細胞移植の現状 US と日本

John A Hansen (Fred Hutchinson Cancer Research Center, USA)

森島泰雄(愛知県がんセンター)

SS-2 HLA と自己免疫疾患

1) 再生不良性貧血

中尾眞二(金沢大学)

2) ベーチェット病

大野重昭(北海道大学)

ワークショップ 「HLA haplotype diversity」 9月17日(水) 13:00~15:00

Stephan Beck (The Sanger Centre, UK)

木村彰方(東京医科歯科大学・難治疾患研究所)

椎名 隆(東海大学)

徳永勝士(東京大学)

会員研究発表

TFB 学術奨励賞最優秀賞受賞者口演 9月18日(木) <7th AOH> 13:30~13:50

座長 猪子英俊(東海大学)

1 Functional analysis of the NFKBIL1 gene product, I kappa B-like (IKBL) protein.

○Hiroki SHIBATA, Michio YASUNAMI, and Akinori KIMURA

Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research

Institute and Laboratory of Genome Diversity, School of

Bioscience, Tokyo Medical and Dental University

TFB 学術奨励賞優秀賞受賞者口演

9月16日(火) 13:00~13:45

座長 猪子英俊(東海大学)

- 2 SLA クラス I 遺伝子領域のゲノム構造解析——TRIM15-UBD 遺伝子間の解析——
○重成敦子, 安藤麻子, 椎名隆, 猪子英俊
東海大学医学部分子生命科学
- 3 Analysis of polymorphisms in the MHC class I genes from rhesus macaques
○Yumiko Takahashi, Michio Yasunami, Akinori Kimura
Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute and
Laboratory of Genome Diversity, School of Bioscience,
Tokyo Medical and Dental University
- 4 Analysis of HLA-DRB1*0901-binding HPV-16 E7 Helper T cell Epitope for Therapeutic Usage of Cervical Carcinoma.
○Mitsuo Okubo, Ranko Hirata, and Hiroo Maeda.
Transfusion Medicine and Cell Therapy, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School

□ 演

9月16日(火) 13:45~14:50

座長 佐田正晴(国立循環器病センター研究所)
石川善英(東京都赤十字血液センター)

- 5 Linkage disequilibrium of genes in the HLA region
○Michio Yasunami¹⁾, Hiroki Shibata¹⁾, Megumi Takahashi¹⁾, Masao Ota²⁾,
Yosihiko Katsuyama²⁾, Akinori Kimura¹⁾
1) Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute and
Laboratory of Genome Diversity, School of Bioscience,
Tokyo Medical and Dental University
2) Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine
- 6 RSCA 法日本人アレル移動度データベースの開発
○辻 博昭¹⁾, 菱田理恵¹⁾, 小山 靖²⁾, 白川義貴²⁾, 高橋めぐみ³⁾,
安波道郎³⁾, 木村彰方³⁾, 前川 平¹⁾
1) 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部
2) (株)テイエフビー事業開発部
3) 東京医科歯科大難治疾患研究所

7 日常検査で検出された HLA-null allele について

○山口恵津子, 松島みどり, 内田純子, 暉本優子, 有竹博子, 吉武国利,
大山政則, 荒添悟, 徳永和夫, 佐藤博行, 柏木征三郎
福岡県赤十字血液センター

8 感作抗 HLA 抗体が患児の血小板上に検出された新生児同種免疫性血小板減少症 (NAIT) の 1 症例

○高橋大輔¹⁾, 森下勝哉¹⁾, 宮崎 孔¹⁾, 佐藤進一郎¹⁾, 佐藤 敬²⁾,
白井 勝³⁾, 加藤俊明¹⁾, 池田久實¹⁾
1) 北海道赤十字血液センター
2) 名寄市立総合病院
3) 旭川厚生病院

9 非血縁者間骨髄移植における白血病患者と骨髄提供者の第 22 番染色体マイクロサテライト多型解析と移植片対宿主病 (GVHD) 発症に関わるマイナー組織適合性抗原遺伝子の検索

○佐々木佳奈¹⁾, 河田寿子¹⁾, 李 素雲¹⁾, 田宮 元¹⁾, 森島泰雄²⁾,
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) 愛知県がんセンター血液化学療法部

ポスター

9月16日(火) 15:00~15:42

座長 前田平生(埼玉医大総合医療センター)

10 日本人由来の抗体を使用した HLAMatchmaker 基本原理の解析

○大田智之, 小松由美, 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

11 PCR-rSSO 法を用いた血清対応型タイピング

○泉澤 康弘¹⁾, 中野浩登¹⁾, 中條 聖子¹⁾, 二瓶文雄¹⁾, 小川公明¹⁾, 山本茂樹¹⁾,
石原義盛¹⁾, 佐治 博夫²⁾
1) エスアールエル遺伝子・染色体解析センター
2) HLA 研究所

12 蛍光ビーズ法を用いた HLA 遺伝子型判定法の検討

○安田広康¹⁾, 渡部和也¹⁾, 中沢なおみ²⁾, 東 史啓²⁾, 原 啓高²⁾,
島田和典²⁾, 大戸 齊¹⁾
1) 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部
2) ゲノムサイエンス研究所 研究開発部

13 キメラ症例の HLA DNA タイピングに及ぼす影響について

○阿藤みや子¹⁾, 小林 賢¹⁾, 玉井誠一¹⁾, 鈴木洋司²⁾, 松崎雄三³⁾

- 1) 防衛医科大学校検査部
- 2) 防衛医科大学校病院輸血部
- 3) 防衛医科大学校法医学講座

14 ペンギン類フンボルト属の MHC 遺伝子における多型解析

○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⁾,

Rory P. Wilson⁶⁾, Yvon LeMaho⁷⁾, 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
- 6) IfM /Kiel, Germany
- 7) CEPE/CNRS, France

15 PLA-DRB1 多型解析によるアライグマの地理的分布

○松崎雄三¹⁾, 小林 賢²⁾, 阿藤みや子²⁾

- 1) 防衛医科大学校法医学講座
- 2) 防衛医科大学校病院検査部

シンポジウム

SL-1

Evidence from prospective trials that HLA antibody precedes kidney graft rejection

Paul I. Terasaki

Terasaki Foundation USA

A prospective trial was performed with the cooperation of 36 international transplant centers over one year to determine whether HLA antibodies is associated with chronic rejection. In May 2002, 2,551 patients with functioning kidney transplants were classified as to their antibody status. There were 567 patients with HLA antibodies and 1,984 patients without antibodies. After a one year follow-up period, 2.0% of those without antibodies had graft failure and 5.6% of those with antibodies had graft failure ($p = 0.000003$). There were 1.1% of patients who died among those without antibodies and 1.9% who died with antibodies ($p = 0.08$). Among patients who made antibodies de novo, and who did not have antibodies before transplantation, 256 had antibodies and 1,469 did not have antibodies. Among those without antibodies 1.9% failed in one year compared to 6.6% failure among those with antibodies ($p = 0.00001$).

On the basis of this prospective trial, we conclude that HLA antibodies are responsible for immunologic chronic rejection. Of course, not all patients who lose a graft chronically is losing them by immunologic reactions. From the limited numbers of patients studied here, roughly 40% of the graft failures are the result of immunologic chronic rejection.

Another important consequence of these studies is that the immunosuppressive drugs used can either be increased or decreased based on the antibody status of patients post transplantation. Certain drugs which are effective in reducing antibodies can be used such as MMF, and reduction of steroids could be performed on patients who do not have antibodies.

S1-1

ゲノム多様性とオーダーメイド医療

中村祐輔

東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター

30億の遺伝暗号からなるヒトのゲノム配列の大半が読み明かされた。また、膨大な遺伝子多型情報や発現情報が蓄積されつつあり、今後ヒトゲノム研究が21世紀の医学・医療に計り知れないくらい大きい影響を及ぼすことは明白である。これらの知見を元に、すぐにでも画期的な薬剤が開発されるとの楽観的な意見が飛びかっているが、実際には、遺伝暗号の並びや基盤情報が収集されただけで、大多数の遺伝子についてはその働きが未解明であり、全遺伝子の機能解明や多くの疾患の原因遺伝子・易罹患性遺伝子の解明には、おそらくあと数十年の歳月を要すると考えられる。

20世紀の疾患遺伝子解析研究は、少数の遺伝子や遺伝子産物を中心にその発症に至る仕組みを説明しようとして（「個の遺伝子研究から疾患をとらえる研究」）進められてきたが、結果的には複雑かつ多彩な病態を理解するには至らず、大きな壁に直面していたと言わざるを得ない。また、糖尿病や高血圧に代表される生活習慣病のような環境要因やライフスタイルも大きく関与する多因子疾患の遺伝的要因にアプローチすることも非常に困難であった。しかし、ゲノム研究の進展により「個の遺伝子研究」ではなく、数万～数十万種類の遺伝子多型や数千～数万種類に及ぶ遺伝子の発現情報を体系的に解析する「ネットワーク的遺伝子研究」を行うことが可能となってきた。これにより、多数(数十～数万)の遺伝子・遺伝子産物の質や量の違いを解析し、これらの情報をもとに多面的に疾患やその病態の分子機構が調べられるようになってきた。

ゲノム的手法による分子病態解析としては、体系的遺伝子多型解析(遺伝子多型と疾患のかかりやすさ、薬剤の効果・副作用などを関連づける研究)と体系的遺伝子発現情報解析(DNAチップなどを利用した数万種類の遺伝子の発現レベルの解析)が2つの大きな柱となっており、最近では網羅的なタンパク解析技術も取り入れられている。今後、次々に病因遺伝子が解明され、エビデンスに基づく形での画期的な新規診断法や治療法の開発が展開されるものと期待される。また、医療のオーダーメイド化(Personalized Medicine)が起こる。発症の詳細な分子機構がわかれば、その背景となる機序の違いを考慮にいれて、個々の患者に最適の治療法を選択することが行われるようになる。さらに、薬剤代謝系に関与するDNA多型を利用して副作用を回避するような薬剤投与方法が標準化されると考えている。時がたてば、治療することを主とした医療から、予防することを主とする医療が重要視されることも確実である。このようなゲノム研究の現状と将来展望を紹介したい。

S1-2

比較ゲノム解析とゲノム多様性

榑 佳之

東京大学医科学研究所

Homo Sapiens is a unique organism characterized by its highly developed brain, use of complex languages, bipedal locomotion, and so on. These unique features have been acquired by a series of mutation and selection during evolution in the human lineage and mainly determined by genetic factors encoded in the human genome. It is of great interest and also of great importance from biological and medical viewpoints to understand what kinds of genetic factors are involved in these complex features and how they have been established during human evolution.

Recent completion of the human genome sequence provided a solid platform for addressing these issues. However, the information obtained from the human genome alone is insufficient to discover genetic changes specific to human. The genomes of several experimental organisms such as mouse, fly and nematode have successfully characterized the human genome, but they are evolutionary too distant to zoom up human-specific changes. We definitely need the genome sequence of the closest organism to human. For these reasons, we conducted a human-chimpanzee whole chromosome comparison at the nucleotide sequence level. We chose human chromosome 21 and its genomic ortholog in chimpanzee, namely chromosome 22, as the first target, because human chromosome 21 is one of the most well-characterized human chromosomes and contains regions and units representing characteristic features of the human genome such as GC-rich/gene-rich regions and AT-rich/gene-poor regions, many repeated structures, duplications, house-keeping genes and tissue-specific genes, genes with a variety of functions.

We paid special attention to obtain high-quality sequence data of the chimpanzee genome assembled independently from the human genome data to precisely discover all the types of genetic changes, and sequence of 32.7Mb of the long arm of chimpanzee chromosome 22 was determined at an accuracy of more than 99.99%. The human chromosome has about 1% longer size, which can be explained by the existence of some unique DNA sequences in human, particularly, the high frequency of some subfamilies of transposable elements such as L1Hs (11 vs 2), MER83B (11 vs 0), AluYa5 (23 vs 3) and AluYb8 (37 vs 2). Rate of overall base substitution (except centromeric and telomeric regions) is about 1.69%, significantly higher than previously reported average substitution rate (1.23%) of the human genome. This is consistent with other study. Comparative analysis using the mouse genome as an outer group showed that among 235 genes reported, 28 have human-specific as substitution only and 23 chimp-specific only. Ka/Ks ratio suggested that most genes are well conserved but about 10% genes seemed to be positively selected during evolution. The results strongly suggest the existence of considerable number of genes free from genetic constrains over the human genome, some portion of which are rapidly evolving under some positive selections. Thus, we initiated a genome-wide study that may tell us more clearly the features of such genes. The progress of such study will be also presented.

S1-3

HLA 領域におけるゲノム多様性

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

HLA 領域は移植における個体差を規定する遺伝子座として発見されたが、そこには HLA 分子をコードする HLA クラス I およびクラス II 遺伝子群以外にも、HLA クラス I 分子で提示されるペプチドの産生に関わるプロテアゾームやトランスポーターの遺伝子、TNF や LT などのサイトカイン、C4 などの補体その他の免疫関連遺伝子や、機能未知の遺伝子を含めた極めて多数の遺伝子が存在する。それらの遺伝子群の多くは、HLA 遺伝子群ほどではないにしろ、著明な遺伝的多型を示す。また、HLA 領域遺伝子には遺伝子重複によって生じたと考えられる遺伝子族を形成するものがあるが、その重複数にも多型がある。さらに HLA の多型性は人種や民族によってその分布がかなりことなると共に、人種や民族に特徴的なアレルの組み合わせ(ハプロタイプ)が存在する。

このように HLA は著明な多型性を示し、また免疫関連遺伝子群が多数存在することから、その発見後間もなくより自己免疫疾患を始めとする種々の疾患との相関が検討され、特定のアレルと特定の疾患との相関が見出されている。このことは、HLA 遺伝子ないし HLA 分子そのものが疾患感受性を規定するものと推定されて来たが、疾患との相関を示すアレルの多くは人種毎に異なること、HLA 領域の座位間には強い連鎖不平衡が存在することから、疾患関連遺伝子のマッピングはそれほど容易ではない。

HLA 領域遺伝子群の解析と合せてマイクロサテライトの多様性を解析することで、HLA 領域内の連鎖不平衡ブロックの長さは一様ではなくハプロタイプ毎にかなり異なること、連鎖不平衡ブロックの構成は集団の歴史的背景(移住)に依存することなどが明らかになったが、このことは、疾患との相関を示す領域があっても、疾患関連遺伝子は全体としての連鎖不平衡ブロック内にあるとは限らないことを示唆する。

本シンポジウムでは、HLA 領域におけるゲノム多様性のあり方と座位間の連鎖不平衡の成立とその特徴などを、疾患原因遺伝子マッピングとの関連で考察したい。

S1-4

マイナー組織適合抗原とゲノム多様性

赤塚美樹

愛知県がんセンター研究所 腫瘍免疫学部

マイナー組織適合抗原は MHC 以外の、移植片の拒絶にかかわるアロ抗原の総称である。MHC と異なり、MHC 分子上にペプチドとして提示された後に特異的 T 細胞により認識されてはじめて免疫反応を惹起する。大部分のマイナー組織適合抗原は、蛋白質の coding 領域に存在する一塩基置換から成るアミノ酸多型部位を含むペプチドである。このような多型性を有する 2 種のペプチドがおのおの MHC に提示された際、一方のみが T 細胞に対して強い抗原性を示すときマイナー組織適合抗原として働くことになる。造血器腫瘍に対する同種造血細胞移植においては、ドナーが抗原性のないアリルについてホモ接合体で、レシピエントが抗原性のあるアリルについてホモもしくはヘテロ接合体であるとき、移植片対宿主病 (GVHD) 方向の不適合が発生する。この場合、もし標的となっているマイナー組織適合抗原が造血器腫瘍細胞を含む血液系細胞に特異的に発現していると、残存する腫瘍細胞を排除するような移植片対腫瘍 (GVT) 効果が期待できる。

HLA 一致同種造血細胞移植においても時に重篤な GVHD が発症する。免疫学的にドミナントなマイナー組織適合抗原の不適合がその一因と考えられるが、これを事前に遺伝子タイピング等で予測するためには抗原遺伝子の同定が必要である。また GVT 効果を期待できるような、マイナー組織適合抗原不適合が存在するドナー・レシピエントの組み合わせを事前に選ぶにも抗原遺伝子が同定される必要がある。ゲノム上に 10 万以上存在するとされる coding 領域内の一塩基置換に比較して、現在までに遺伝子レベルで同定されたマイナー組織適合抗原は 15 種類に満たないのが実情である。また日本人でもっとも多い HLA-A24 によって提示されるマイナー組織適合抗原はこれまで報告がなかった。今回われわれは HLA-A24 に標的を絞ったポジティブセレクション法でまず細胞傷害性 T 細胞を樹立し、これをプローブとしたリンケージ解析法により、初めて A24 拘束性で血液系細胞のみに発現しているマイナー組織適合抗原を同定した。本抗原を中心に、養子免疫療法への応用を含めた、マイナー組織適合抗原の臨床的意義について報告する。

S1-5

幹細胞移植による神経再生

岡野栄之

慶應義塾大学医学部生理学教室, CREST・JST

ヒトを含む哺乳類の中樞神経系は、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトといった多様な細胞集団から構成されている。発生過程において、多分化能と自己再生能力を有する中樞神経系の組織幹細胞である神経幹細胞から、非対称性分裂や分泌性因子を含む巧妙な細胞間相互作用の結果として、これらの多様な細胞系列に属する細胞群が生じてくる。しかしながら、20世紀初頭に Ramón y Cajal が、“once the development was ended, the fonts of growth and regeneration . . . dried up irrevocably”と述べたように、損傷した成体哺乳類の中樞神経系は再生しないものと長い間考えられていた。これは、ニューロンに分裂能(細胞としての再生能)がないことと、成体中樞神経系内においては軸索再生さえできなかったことに起因する。しかしながら、成体の中樞神経系においても、神経幹細胞が存在することが示され、神経軸索伸長阻害因子の分子実体が明らかになってきたことから、この常識は破られつつある。現在では、損傷を受けた中樞神経系の再生の strategy としては、神経栄養因子およびその関連遺伝子導入による neuroprotection, 神経軸索伸長阻害因子の機能抑制による軸索再生、内在性神経幹細胞の活性化、神経幹細胞あるいは胚性幹細胞由来の細胞移植、骨髄間質細胞等の非神経系細胞の分化転換の利用等多岐に渡っている。神経再生を効率よく誘導し、医療として確立するためには、これらの技術を統合的に組み合わせて brush up していく必要がある。これらの点を踏まえて、本講演では脊髄損傷やパーキンソン病の再生医学を目指した我々の最近の研究成果について話したい。

S2-1

HLA タイピングの QC について

田中秀則

東京都赤十字血液センター 検査三課

抗原または遺伝子型を調べる(タイピング)には、調べようとする型に対して特異性を有する複数の試薬を用い、その反応パターンにより型を決定する方法が一般的に用いられている。

HLA 抗原型のタイピングでは特異性既知の HLA 抗血清が、遺伝子型では塩基配列特異的なプローブ、プライマーおよび制限酵素等が、各型に対して特異性を有する試薬として用いられている。また、それぞれのタイピングに使用する試料は、HLA 抗原型では生きたリンパ球 (T 細胞または B 細胞) が、遺伝子型ではタイピングする遺伝子領域の増幅産物または DNA が一般的に用いられる。HLA 型が既知の試料を使用することで、特異性を有する試薬の反応性およびその特異性について評価することが可能となるが、HLA タイピング精度の品質管理 (QC: Quality Control) では、評価に使用する試料の状態も一定に保つことが必要となる。ここでは、現在我々が HLA-A, B, C 抗原型のタイピングに使用している自家製造試薬である HLA タイピングトレイおよび HLA-DRB1 遺伝子座の抗原型レベル (Low Resolution) の遺伝子型タイピングに使用しているタイピングキットの QC について紹介する。

HLA タイピング用試薬の選定、調整および QC を行なうためには、タイピングの対象となる HLA 型(抗原型および遺伝子型)を選択することが必要である。現在、我々の基準では日本人において 0.1% 以上の頻度で見られる HLA 型をタイピングの対象としている。タイピングの対象となる HLA 型に基づき、導入対象キットの選定および自家製造試薬の調製および各種試験(自家検定、評価試験、品質試験)が実施される。

HLA タイピングに市販キットを導入する際は、導入時点で各種市販キットを比較検討する評価試験が行なわれ、この試験で適合したキットから総合的な評価により導入するキットが選定される。導入後は、各製造単位(ロット)毎に品質試験を実施し、各ロットで使用の可否を判定している。一方、自家製造試薬については、製造施設での自家検定で使用可能と判断されたロットは、3 施設で品質試験が行なわれ、適合した場合に全施設で使用可能となる。以上の試験において、HLA タイプの組合せにより HLA 型の判定が困難な場合、「使用上の注意」または再検査基準を作成し、他の方法で確認検査を行なうようにしている。

S2-2

HLA 試薬メーカーから見た DNA タイピング方法に関する ASHI 認可制度

斎藤克行

One Lambda USA

ASHI 認可制度は 1974 年に HLA 検査方法の高水準維持を目的に発足した。1998 年に 4 段階の ARB (Accreditation Review Board) と 6 種の補助役員による認可管理システムに再構築され現在に至っている。認可プログラムは検査ラボのスタッフの資格とトレーニング, プロトコール, そして設備などの面において規定のガイドラインに従っているかどうかを定期的に検査し, 指導, 認可するものである。また会員の教育プログラムやラボ間のコミュニケーションを推進することにより, 各エリアでの不足面の改良と専門的意見の交換などを積極的に実現化している。本年 2 月の時点で認可されたラボの数は米国内で 202, 国外で 21 に達し, 検査官の数も 204 人に達している。

米国では全ての臨床検査ラボは連邦政府の定めた CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendment) の査定を受けその規則に従うことが義務付けられている。HLA 適合性に関する検査分野での ASHI 認可制度は CLIA を初め NMDP, UNOS, CMS の公式認可制度として認められている事実からもその重要性が理解できる。

今回は細かい ASHI のガイドラインの中から DNA タイピングに関する幾つかの規則に関し実際に行われている QC プロトコールなどを事例を挙げその内容と重要性を紹介する。またタイピング試薬メーカーとして各ユーザーのニーズやクレームに対応した製品開発と QC についても簡単に紹介する。

S2-3

ISO15189 を中心とした HLA 検査の標準化

小林 賢

防衛医科大学校 検査部

1994年に国際標準化機構(International Organization for Standardization; ISO)において臨床検査分野を対象とした委員会(ISO/TC212)が設立され、幾多の論議を経て、2003年2月15日付けでISO15189規格が正式に発行された。このISO15189規格は、「臨床検査室—質と適合能力に対する特定要求事項」と題するもので、検査依頼のアレンジ、患者の準備・識別、検体の採取・搬送・保存、臨床サンプルの処理と検査、その後続く妥当性の確認、結果の解釈・報告、およびアドバイスとともに検査業務の安全性と倫理が含まれている。臨床検査分野に関しては、これ以外にも「臨床検査室—安全に対する要求事項(ISO15190)」、「臨床検査—ISO15189の利用のための指導書(ISO22869)」、「POC検査(POCT)—質と能力に対する要求事項(ISO22870)」、「体外診断用医療機器—生物試料中の量の測定—基準測定操作法の提示(ISO15193)」、「体外診断用医療機器—生物試料中の量の測定—標準物質の記述(ISO15194)」、「臨床検査医学—基準測定検査室に対する要求事項(ISO15195)」、「校正用物質と管理物質の表示値の計量学的トレーサビリティ(ISO17511)」、「校正用物質と管理物質の酵素活性表示値の計量学的トレーサビリティ(ISO18153)」、「臨床検査方法に対する分析的及び臨床的性能目標の決定(ISO15196)」、「糖尿病管理での自己検査のための体外血糖モニターシステムに対する要求事項(ISO15197)」、「ユーザ精度管理のための製造業者による提案の妥当性確認(ISO15198)」、「経口抗凝血治療のための体外モニターシステムに対する要求事項(ISO17593)」、「生物学における染色用体外診断薬の製造業者により提供される情報(ISO19001)」の14項目について3つのワーキンググループで討議されている。

ISO15189規格ドキュメント(ISO15189:2003(E))は、5つの章からなり、第1章は「適用範囲」、第2章は「引用規格」、第3章は「用語と定義」、第4章は「マネジメント要求事項」、第5章は「技術的要求事項」である。第4章と第5章についてはさらに節項立てになっている。第4章は、4.1が「組織とマネジメント」、4.2が「品質マネジメントシステム」、4.3が「文書管理」、4.4が「契約内容の見直し」、4.5が「委託検査室による検査」、4.6が「外部サービスと供給」、4.7が「アドバイスサービス」、4.8が「苦情処理」、4.9が「失敗した検査の同定と管理」、4.10が「是正処置」、4.11が「予防処置」、4.12が「継続した改善」、4.13が「品質及び技術上の記録」、4.14が「内部監査」、4.15が「マネジメントの見直し」になっている。また、第5章は、5.1が「人材」、5.2が「施設及び環境条件」、5.3が「検査室の機器」、5.4が「検査前手順」、5.5が「検査手順」、5.6が「検査手順の品質管理」、5.7が「検査後手順」、5.8が「結果報告」となっている。

HLA検査におけるISO15189規格の関わりについてわかりやすく概説する。

S2-4

どこまで判定すれば良いか？

島田和典

株式会社ゲノムサイエンス研究所 研究開発部

現行の HLA 遺伝子型判定方法として、PCR-SSP 法、PCR-SSO 法、PCR-RFLP 法及び SBT 法等がある。これらの方法は、配列上の遺伝子変異を検出する、という点では同様だが、得られる情報は、量、質共に違いがある。

最近、HLA 遺伝子型判定キットに関しては、国内メーカーのみならず、海外メーカーでも「日本人に対応した」製品が話題となっている。HLA には人種間差があることは周知の事実であり、日本人での出現頻度から判定が必要な遺伝子型を選定し、それらを効率良く判定可能な遺伝子変異の組合せを選択しているものや、遺伝子変異の情報による可能性のある遺伝子型の組合せから、「日本人であれば可能性の一番高い遺伝子型」から順番に候補を提示する、という対応がこれにあたる。

この場合、開発メーカー、ユーザー、双方にとって大きな問題の一つは ambiguity (識別不能) である。ヒトゲノムは 2 倍体であるが故に、高解像度の SBT 法であっても ambiguity は存在する。その他の方法ではプライマーやプローブの設定位置や、変異に対応する制限酵素を選択することで、検出すべき遺伝子変異を選択する必要が出てくるが、この選択の方法がキットの特徴であると同時に、多種多様な ambiguity を生み出す。更に、今でも毎月のように Nomenclature には新規配列が登録されている。

もう一つの問題は、どこまでを「日本人」とするかである。現在まで開示されている遺伝子型の頻度調査は、国内での地域差や検査した検体数から、情報が不足していると感じられる。また、今まで「日本人」としては見つかっていないが、「日本人以外」ではある程度の頻度で存在する遺伝子型の取扱いも、国際化社会では問題である。

「どこまで判定すればよいのか？」を解決するキーワードとして、「表記方法」、「頻度調査」、そして「コンセンサス」が必要であると考えられる。

S2-5

HLA タイピング製品の製造と品質管理

川井信太郎

湧永製薬 創薬研究所

我々は1990年から大量検体のHLA遺伝子タイピングが可能なシステムの開発を開始し、95年にマイクロタイタープレートを使用したrSSO法によるタイピング試薬の開発に成功した。その翌年の96年からHLAタイピング製品の製造販売を開始した。さらに99年には体外診断用医薬品として「ジーンカラー HLA-DR」の製造承認許可を取得した。その後、ユーザーからの要望に応じて製品のラインアップを増やし、解像度を上げ、また、試薬性能の向上や操作性の改善など、試薬製品の品揃えや改良に注力してきた。現在では初期試薬の操作性を簡略化した第二世代のタイピング試薬を主体として、全16品目の試薬・診断薬を製造販売している。

HLAタイピング製品は製品構成が比較的複雑であるので、一定の品質の製品を製造し、その製品の性能を保証する為に、当社では製品開発から販売までを以下のような流れで進めている。

- 1) 製品化研究: 研究所が担当。製品コンセプトの構築、プローブのスクリーニング等の製品化研究を行う。
- 2) 製品製造: 製造部が担当。研究所と製造部が共同で作成した製造指示書に基づき、秤量の仕方に至るまで細かく規定されたマニュアル管理を行っている。
- 3) 製品試験: 品質管理部が担当。特異性試験、感度試験、再現性試験及び外観試験を行い、すべての検査に合格したものだけが出荷される。
- 4) 営業販売: 診断薬営業部が担当。受注、納品時期の調整、及び発送作業を行う。
- 5) ユーザー対応: 診断薬営業部が窓口となり、関係部署と連携して対応。判定に支障が生じた場合や、操作法等に関する質問に対応する。これらの情報を新製品の設計、製品改良等に有効に生かす。

このように当社においては複数の独立した部署が互いに情報を交換しながら業務を分担している。このことにより、互いの業務を公平かつ客観的に評価することが可能で、より精度の高い品質管理が可能となると考えている。

本シンポジウムにおいては、約7年間の我々の経験をもとに、当社における製品製造、製品試験、納品後のユーザー対応等について、事例をまじえながら紹介するとともに、さらに高品質の製品を安定供給するための方策等についても紹介したい。

S2-6

使用目的に応じた HLA タイピング法の選択

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

HLA タイピングには、HLA の抗原性の検出を抗血清などを用いて行なう血清学的手法と DNA 多型を検出する DNA タイピング法がある。以前より行なわれて来た血清学的手法は、アロ抗原の多様性を検出するとの意味で生物学的な意義は大きいですが、アロ抗血清収集の困難さ、バイオアッセイに由来する精度管理や結果の再現性、恒常性などの問題から、次第にその使用範囲は狭くなり、現在の HLA タイピングは PCR を用いたゲノム遺伝子増幅とその多型検出をベースにした DNA タイピング法に変わりつつある。

HLA 遺伝子群の多型性は極めて多種多様であるが、DNA タイピングでは、多型が集中するエクソン(クラス I 遺伝子では第 2, 第 3 エクソン, クラス II 遺伝子では第 1 エクソン)をターゲットとした解析が行なわれる。多型の検出法として、SSO, SSP, RFLP, SSCP, DSCA, SBT などの原理の異なる方法があり、それらを応用した DNA タイピングキットが市販されている現状である。これらの手法ないしそれぞれのキットには、方法論自体に由来する長所と短所があり、またタイピングに要する時間, 技術, 労力, 費用でも各々に利点と欠点がある。一方、HLA タイピングの目的としては、移植(骨髄幹細胞移植, 腎移植など)におけるドナー/レシピエント選択, 法医学領域の個人識別, 研究面(疾患感受性研究, 感染症や癌の細胞治療, ワクチン開発, 人類遺伝学的考察)での応用などがあるが、それぞれにおいて求められるタイピング精度は必ずしも同一ではなく、かなり異なっていると言える。

従って、タイピングを行なう際には、その使用目的に適したタイピング精度を保ち、かつコストパフォーマンスを考慮した方法論やキットの選択を行なうべきであり、単一の方法論であらゆる HLA タイピングに対応出来る訳ではない。また、DNA タイピングの結果が及ぼす重要性を考慮しつつ、その精度管理を行なうことが必要である。本シンポジウムではそれらの点について、HLA タイピングの標準化を考察する。

SS-1 1)

CURRENT IMPACT OF HLA MATCHING IN ORGAN TRANSPLANTATION

Gerhard Opelz

Department of Transplantation Immunology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

More than 300 transplant centers in 45 countries are participating in the international Collaborative Transplants Study (CTS) and data on more than 250,000 transplants have been recorded. There has been a remarkable improvement of transplant success rates over time and this has led to speculation that the use of new, improved immunosuppressive medication may have eradicated the effect of HLA matching. This argumentation was further supported by high success rates reported for kidney transplants from live unrelated donors who presumably were not matched for the HLA antigens. As a result, it was even speculated that shorter cold ischemic preservation times of cadaver kidneys would allow the transplantation of HLA well or poorly matched grafts with equivalent success.

An examination of cadaver kidney transplants reported to the CTS study since 1995 shows that HLA matching continues to exert a statistically highly significant effect on graft outcome. Both the rate of acute posttransplant rejection as well as long-term transplant half life are affected. However, the magnitude of impact is reduced compared to results obtained in the 1980s. For transplants done from 1995–2002, we project 20-year graft survival rates of 44% for grafts with 0 HLA-A+B+DR mismatches and 27% for grafts with 6 HLA-A+B+DR mismatches, and corresponding half-life times (for the period following the first posttransplant year) of 17.6 and 11.4 years, respectively. It has long been recognized that the effect of matching is pronounced in patients with high PRA. Importantly, our recent data obtained in approximately 4000 transplants show that, among patients without preformed lymphocytotoxic antibodies, the HLA matching effect is very strong and highly statistically significant in recipients with a high pretransplant sCD30 (soluble CD30) content, whereas the effect is small and only of borderline statistical significance in recipients with low sCD30. Thus, routine pretransplant testing for sCD30 should be performed in all patients on the transplant waiting list. The introduction of molecular HLA typing has resulted in improved typing quality and this can be shown to be clinically relevant especially for HLA-DRB. Moreover, with the aid of molecular typing it has been possible to demonstrate a significant influence of HLA-DPB and of allelic specificities at the HLA-DRB locus on the outcome of kidney retransplants. Even very short cold ischemic preservation of cadaver kidneys does not eliminate the HLA matching effect. Unquestionably, poorly matched kidneys obtained from living donors fare much better than poorly matched kidneys obtained from cadaver donors. The reason for this difference may be related to the fact that all live donors are carefully selected as being healthy with good kidney function, and the absence of a deleterious influence of brain death on kidney function in live donors. Importantly, even in the recent data, the success rate of HLA-identical sibling transplants by far exceeds the success rate of any other type of transplant. Among transplants from unrelated live donors the number of HLA well matched grafts is small; nevertheless, the CTS data show that well matched transplants perform better than poorly matched grafts. In addition to a significant effect of HLA matching in cadaver kidney transplantation, the CTS data show a significant effect in heart and lung transplantation. The situation appears more complex in liver transplantation, where a significant impact of the number of HLA

mismatches is found on the incidence of acute rejection episodes but not on long-term graft survival. There is suggestive evidence that liver graft recipients with certain underlying diseases may be subject to an HLA-restricted mechanism which may favor long-term graft loss, possibly due to virological infection and disease recurrence in HLA well matched recipients.

SS-1 1)

ABO-Incompatible Kidney Transplantation

Kota Takahashi

Division of Urology, Department of Regenerative and Transplant Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

Humans have two major transplantation antigen systems, the ABO and the HLA system. In bone marrow transplantation, the latter is more important than the former. In solid organ transplantation, the ABO system is by far more important while the HLA system plays role.

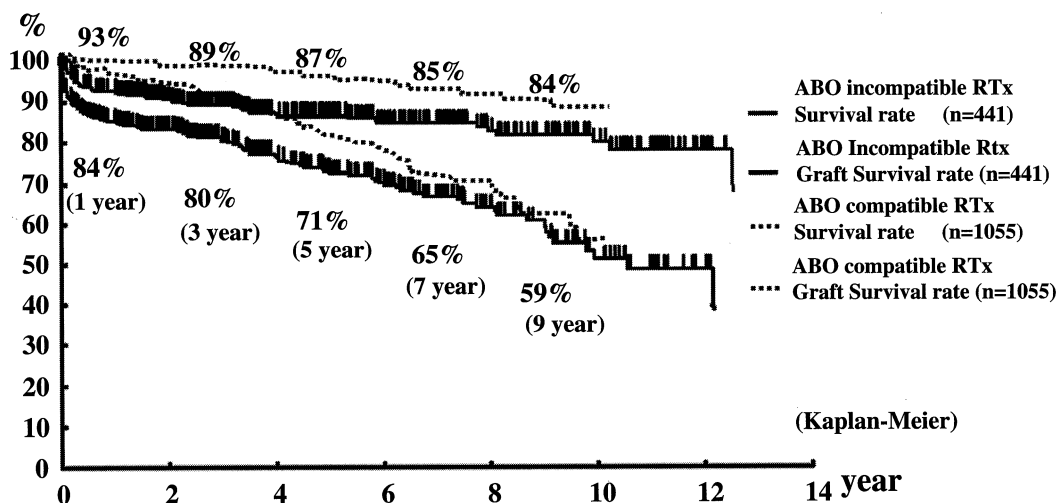
The ABO system has received little attention in organ transplantation to date because ABO-incompatible transplants have been avoided to prevent humoral rejection due to ABO-incompatibility.

As of January 2003, more than 230,000 patients in Japan were receiving hemodialysis, 30% to 50% of whom were waiting for a kidney transplant. However, in contrast to the situation in the United States and Europe, kidney transplantation is uncommon, because of the small number of cadaveric kidneys. As a result, living kidney transplantation is performed in as many patients as possible, even in ABO-incompatible cases.

We statistically analyzed the data for 441 ABO-incompatible living transplantations that were carried out between January 1989 and December 2001 in Japan. The figure indicates the outcome in these patients. The short-term graft survival rate is less favorable than that of ABO-compatible transplants due to graft losses of acute humoral rejection such as delayed hyperacute rejection. Contrary to our initial expectations, however, the 10-year graft survival rate shows no statistically significant differences between ABO-compatible and incompatible cases.

ABO-incompatible transplants do not fail as frequently as was initially expected due to chronic rejection despite the fact that surface blood group antigens from vascular endothelial cells in the graft are constantly exposed to the blood from the recipient. This observation suggests that humoral rejections due to interactions between ABO antigens and antibodies do not occur once accommodation is achieved and that the relative

Patient Survival and Graft Survival Rate



importance of the influence of non-immunological factors vs that effect of immunological factors increases as time goes by after transplantation.

This paper reports some of these new findings which are inconsistent with our earlier expectations and discusses ABO-incompatible kidney transplantation based on these findings.

SS-1 2)

Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Overcoming the HLA Barrier Current Status and Future Directions in the USA

John A Hansen

Fred Hutchinson Cancer Research Center and the University of Washington, Seattle, WA, USA

Major advances have occurred in the field of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) over the preceding 25 years. Improvements in safety and efficacy of transplantation have come from modifications of the pre-transplant conditioning regimen, graft modification, better supportive care and more selective immune suppression therapy. Innovations in the administration of cytotoxic therapy and the development of alternative low intensity conditioning regimens have been successful in reducing toxicity and transplant-related mortality (TRM). These advances include the monitoring of busulfan (BU) plasma levels to target an effective dose and limit unnecessary toxicity and the substitution of fludarabine for cyclophosphamide (CY) as a primary immunosuppressive agent. The introduction of new reduced intensity conditioning regimens capable of achieving sustained donor HSC engraftment without the use of high dose cytotoxic agents and myeloablation has been another important advance. These non-myeloablative regimens have been very successful in further reducing TRM. Their utility has been demonstrated for certain hematological malignancies especially “slow growing” diseases such as lymphoma, chronic lymphocyte leukemia and multiple myeloma. The use of growth factors mobilized peripheral blood cells as a source of larger numbers of HSC has reduced incidence of graft failure, shortened the period of transplant associated pancytopenia and mitigated risk of infection. Survival rates for certain patients with marrow failure syndromes and hematological malignancy approach 90% at five years following PBSCT after conditioning with targeted-BU+CY. These optimal results however have been limited to patients with an HLA matched related or unrelated donor. Current established regimens have not provided adequate immune suppression for patients receiving HSCT from HLA mismatched donors. Transplantation across the HLA barrier is complicated by an increased risk of graft rejection, delayed graft function and more severe graft-vs-host disease. Newer immune modulating agents showing promise in phase I/II clinical trials include mycophenylate mofetil, rapamycin and selected monoclonal antibodies.

Encouraging preliminary results have been recently reported for HLA mismatched HSCT by a few groups. One approach has been the grafting of mobilized PBSC depleted of mature donor T cells. To secure sustained engraftment, patients receive increased intensity conditioning prior to transplantation. Other groups have reported success in transplanting umbilical cord blood cells (UCB) across HLA barriers. These transplants also require more intensive conditioning, as well as the transplantation of relatively large numbers of UCB. The latter is usually possible only in younger patients.

In summary, overall clinical outcome results of HSCT for patients with genetic disease, marrow failure syndromes and certain hematological malignancies have improved dramatically over the past 25 years. Five year survival rates for patients transplanted from an HLA matched sibling or unrelated donor have increased to > 80–90%. These improvements have come from improved supportive care especially better prophylaxis for fungal and

viral disease, and the development of new approaches for mitigating the toxicity of myeloablative conditioning results. More widespread use of HLA incompatible HSC will require access to more selective immune suppressive agents capable of modulating the host and donor alloimmune response, and facilitating immune tolerance without causing broad suppression of immunity. The need to find more safe and effective methods for extending the benefits of HSCT to patients lacking an HLA matched donor is the major current challenge facing immunologists and transplant physicians.

SS-1 2)

The significance of HLA on the control of GVHD in hematopoietic cell transplantation through Japan Marrow Donor Program. — Present status and future prospect in Japan —

Yasuo Morishima

Hematology and Cell Therapy Aichi Cancer Center Nagoya Japan

Hematopoietic stem cell transplantation from an unrelated donor (UR-HST) has been established as one mode of curative therapy for hematological malignancies and other hematological or immunological disorders. Japan Marrow Donor Program (JMDP) facilitated UR-HST in Japan, and more than 4,700 UR-HSTs have been performed through JMDP for these 10 years. The high mortality after UR-HST due to severe acute graft-versus-host disease (GVHD) and its related complications are still barrier to the improvement of patient survival and a cure. The induction of the graft-versus-leukemia (GVL) effect to reduce leukemia relapse is considered one of the advantages of allogeneic HST. These transplant-related immunological events are affected by the disparities of major and/or minor histocompatibility antigens between donor and recipient.

In the analysis of UR-HST through JMDP by the study group for the histocompatibility of UR-SCT, it has become evident that almost half of cases have a difference of HLA at the allele (genotypical) level among serological HLA A, B and DR identical pairs, and that, HLA-A B genotype disparity influenced to acute graft versus host disease (GVHD), chronic GVHD and survival remarkably. HLA-C genotype disparity influence to acute GVHD, and synergistical effect to HLA-A/B or DR/DQ was observed. HLA-DR/DQ genotype disparity showed a minimal effect to acute GVHD and no effect to survival. No significant association of leukemia relapse with HLA disparity was observed, although HLA-C disparity tended to affect to leukemia relapse in some leukemia. Multiple mismatch of HLA locus reduced survival rate in leukemia cases. Thus, the role of HLA class I allele in unrelated BMT was elucidated. Notably, HLA-C alleles had a different mode from HLA-A or B alleles for acute GVHD and survival, and killer Ig-like receptor (KIR) incompatibility in relation to HLA-C epitope matching was related to acute GVHD and survival. This finding suggests that NK cell causes acute GVHD through KIR.

There exists some controversy over the HLA alleles responsible internationally. Non-JMDP groups showed the importance of HLA class II matching for acute GVHD and survival. The study of Hematopoietic Cell Component in International Histocompatibility Workshop (IHWG) elucidated important findings of allele matching in ethnically diverse transplant populations. Firstly, the distribution of HLA-A2 alleles and the combinations of HLA-A2 allele mismatches were not random. This information is useful for international donor searches to find suitable donors for UR-HCT. Secondly, HLA-A*0201/A*0206 mismatched pairs had significantly lower survival than HLA-A*0201 matched pairs. This result suggests a molecular basis of HLA allele matching to transplant-related clinical events. Further identification of permissive HLA alleles or mismatch pairs, non-permissive HLA alleles and minor histocompatibility antigens is essential for understanding transplant-related immunological events and for improving clinical outcome for UR-HCT.

SS-2 1)

Significance of HLA-DR15 in acquired aplastic anemia: its relationship with a slight increase in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type blood cells.

Shinji Nakao

Cellular Transplantation Biology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science

Aplastic anemia (AA) is a syndrome characterized by pancytopenia and bone marrow hypoplasia. Although its etiology is still unknown, immune destruction of hematopoietic stem cells have been considered to be the most important mechanism of AA, mainly based on high response rates to immunosuppressive therapy (IST) such as antithymocyte globulin (ATG) and cyclosporine (CsA). There are two important findings that support immune mechanisms of AA; one is a high frequency of HLA-DR15, and the other is a high prevalence of patients showing an increase of blood cells deficient of glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins such as CD55 and CD59 in AA patients. The presence of a small number of GPI-anchored protein-deficient cells is considered to be derived from a hematopoietic stem cell that has a PIG-A gene mutation and escapes an immune system attack against normal hematopoietic stem cells. However, roles of HLA-DR15 in immune mechanisms of bone marrow failure and in the expansion of such paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH)-phenotype cells remain unclear. To clarify this issue, we recently studied 181 AA patients for the type of DRB1 alleles and relationships of each allele with the presence of a minor population of PNH-type blood cells, and response to IST. Among 26 different DRB1 alleles, only the frequencies of 1501 (15.6%) and 1502 (22.8%) were significantly higher than those of the control population. When the frequencies of each DRB1 allele were compared between 94 patients possessing a minor population of PNH-type cells (PNH⁺ patients) and 62 not possessing such defective cells (PNH⁻ patients), the frequency of DRB1*1502 was significantly higher than the normal control in both PNH⁺ patients (22.8%) and PNH⁻ patients (22.7%). In contrast, the significantly higher frequency of DRB1*1501 was only observed in PNH⁺ patients. In the univariate analysis, both DRB1*1501 and PNH-type cells predicted a good response to IST with an odd ratio of 6.74 and 6.70, respectively while DRB1*1502 did not (odd ratio = 0.65). Multivariate analysis showed that only the presence of PNH-type cells predicted a response to IST including ATG with or without CsA while only DRB1*1501 was a predictor of response to CsA monotherapy. These data indicate that although both DRB1*1501 and DRB1*1502 contribute to the development of AA, their method of contribution may be different, and in fact, it is the presence of a minor population of PNH-type cells rather than the allele type of DRB1 that is essential for the prediction of a good response to IST in AA patients. Possible roles of HLA-DR15 in the development of AA will be discussed.

SS-2 2)

Molecular Genetic Studies on Behcet's disease

Shigeaki Ohno¹⁾, Nobuhisa Mizuki²⁾, Hidetoshi Inoko³⁾

1) Department of Ophthalmology and Visual Sciences, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan, 2) Department of Ophthalmology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama, Kanagawa, Japan, 3) Department of Genetic Information, Division of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa, Japan

Until about 30 years ago, Behcet's diseases was thought to occur accidentally, and nobody suspected the presence of genetic predisposition to this disease. We started our study in 1970 to investigate the responsible genes which predispose the individuals to develop various intraocular inflammatory diseases such as Behcet's disease. Our initial attention was mainly focused on the human major histocompatibility complex genes of which gene loci are located on the short arm of autosomal chromosome 6 (6p21.3).

We found that Behcet's disease is closely associated with HLA-B5 or HLA-B51. This association was later confirmed not only in Japanese but also in other races in the world. The recent molecular genetic studies have revealed the significant association of HLA-B*51011 and/or HLA-B*5108 with Behcet's disease.

Our present studies are now in progress to investigate pangenomic associations with this disease by pooled DNA method by utilizing 30,000 microsatellites in all chromosomes.

In this presentation, the details of our past and recent data on the molecular genetic studies of Behcet's disease will be reviewed.

一般演題

1 Functional analysis of the NFKBIL1 gene product, I kappa B-like (IKBL) protein.

○ Hiroki SHIBATA, Michio YASUNAMI, and Akinori KIMURA

Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute and Laboratory of Genome Diversity, School of Bioscience, Tokyo Medical and Dental University

We have previously mapped an HLA-linked susceptibility locus for Takayasu arteritis (TA) to the class III/class I boundary of the HLA region. A candidate polymorphism screening of the TNF-MICB gene interval revealed four SNPs in the upstream sequence of the NFKBIL1 (IKBL) gene. By a DNA conformation analysis, five alleles (or SNP-haplotypes), IKBLp*01 through *05, were observed in Japanese. Because the association of the allele IKBLp*03 with TA was confirmed, NFKBIL1 might play a role in the onset or progression of the disease. Accordingly, the present study was conducted to examine the function of the gene. IKBL mRNA was found ubiquitously in the human tissue, while it was enriched in the testis. Although IKBL shows amino acid sequence similarity with I kappa B, we could not detect the I kappa B activity of IKBL on the NF kappa B-dependent transcription by luciferase reporter assays. On the other hand, when the fluorescent protein-tagged IKBL was expressed in HeLa cells, it accumulated in nuclear speckles like many other factors involved in RNA processing in clear contrast to that I kappa B is known to be localized in the cytoplasm. We, then, attempted to identify proteins interacting with IKBL by yeast two hybrid screening. One thousand clones appeared positive for interaction with IKBL among 16 million cfu of testis cDNA library. One of the genes isolated repeatedly encodes a nuclear factor involved in the splicing of mRNA, suggesting a role of IKBL in regulation of RNA processing.

2 SLA クラス I 遺伝子領域のゲノム構造解析—TRIM15-UBD 遺伝子間の解析—

Genomic structure analysis of a 238 kb segment Between the TRIM15 and UBD genes in the SLA class I region.

○ 重成敦子, 安藤麻子, 椎名隆, 猪子英俊
東海大学医学部分子生命科学

我々は、ブタからヒトへの異種移植の可能性を追求するとともに、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、1.1 Mb の SLA クラス I 領域のコンティグマップを作成し、過去 2 回の本学会において、古典的 SLA クラス I 領域を含む領域と、HLA-C と HLA-E 遺伝子間に相当する領域に位置する 8 個の 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-J と MOG 遺伝子に相当する領域に位置する 2 つの BAC クローンについてショットガン法によるシーケンシングを行なった。さらに、これら約 238 kb の塩基配列について、HLA クラス I 領域の配列と比較して詳細な解析を行った。その結果、今回解析したブタの塩基配列には、最もセントロメア側の TRIM15 から MOG, GABBR1, UBD までの遺伝子が含まれていることが明らかになった。これらの領域に相当するヒト領域の長さは 640 kb であった。この 640 kb のヒトの領域には HLA-A, HLA-J, HLA-K, HLA-H などの、HLA クラス I 遺伝子が数多く存在しているが、今回解析を行った SLA クラス I 領域にはこれらの HLA 遺伝子並びに SLA クラス I 遺伝子と相同性を示す配列は存在しないことが示された。すなわち、HLA-A 遺伝子を含む約 370 kb の領域がブタでは欠損していることが明らかになった。

3

Analysis of polymorphisms in the MHC class I genes from rhesus macaques

○ Yumiko Takahashi, Michio Yasunami, Akinori Kimura
Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute and Laboratory of Genome Diversity, School of Bioscience, Tokyo Medical and Dental University

Infection of simian immunodeficiency virus (SIV) in rhesus macaques is an experimental model for the development of vaccines against HIV/AIDS. After inoculation of virus, some macaques develop to viremia and T cell depletion, while the others do not. Difference in the susceptibility to the infection may be determined at least in part by class I MHC polymorphism because class I MHC-restricted cellular immunity against the viral antigens is induced during the elimination of the virus. The aim of this study is to characterize the MHC polymorphism in a macaque colony in maintained for experimental analysis in Japan. Because the class I loci have been multiplied during the evolution of the *Macaca* species, we employed a reference strand mediated conformation analysis (RSCA) of cDNA from B-LCL or peripheral blood leukocytes to estimate the number of expressed alleles and to investigate the variations. We detected one to seven Mamu-A signals and two to twelve Mamu-B signals from each individual, indicating the number of alleles was variable among the individuals. Data from a common sire and his offspring revealed the haplotype combinations of alleles were segregated in the pedigree; a haplotype consists of 3 Mamu-A and 4 Mamu-B alleles, and b haplotype consists of 2 Mamu-A and 5 Mamu-B alleles. Sequencing of cDNA clones from a few individuals revealed many new alleles except for one Mamu-A alleles (A*08) and two Mamu-B alleles (B*36 and B*45), suggesting the immunogenetic background of Japanese colony is different from that of US colony.

4

Analysis of HLA-DRB1*0901-binding HPV-16 E7 Helper T cell Epitope for Therapeutic Usage of Cervical Carcinoma.

○ Mitsuo Okubo, Ranko Hirata, and Hiroo Maeda.
Transfusion Medicine and Cell Therapy, Saitama Medical Center, Saitama Medical School.

Objective: Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 proteome was shown to play a critical role in cervical carcinoma, which is considered to be a target molecule for therapy. Although CTL responses to cancer antigens depend upon expression of MHC class I, it is interesting to note that the emerging molecular epidemiological data supports an almost exclusive association of cervical carcinoma with MHC class II genotype. This study sought to determine HPV-16 E7 epitopes that would be presented by HLA-DR to CD4+T cells.

Methods: HLA-DRB1*0901 peptide binding motifs within HPV-16 E7 were predicted based on algorithms. DR-binding assays were performed using HPV-16 E7-derived synthetic peptides with B-lymphoblastoid cell lines which were homozygous for HLA-DR. After incubation with DR-binding peptides, helper T cell frequencies were analyzed in the patients whose HLA and HPV genotypes were confirmed. Also cytokine secretion profile of peptide-stimulated CD4+T cells was analyzed by flow cytometry

Results: We determined that E7d61CDSTLRLCVQ-STHVDIRTL80E was bound by DRB1*0901. An increased frequency (0.3–2.4%) of type 2 helper T cell (Th2) prone responses was found in DRB1*0901-positive patients with cervical carcinoma. In addition, T cells from DRB1*0901-positive patients with cervical dysplasia showed increased frequencies both Th1 and Th2. We found that when IL-12 was combined with E7d-peptide stimulation in vitro, the frequency of Th1 responses also increased in the patients with carcinoma.

Discussion: MHC class II molecules and helper T cells should play an important role in the immune responses that cervical cancer patients make to HPV antigens. We defined the HPV-16 E7d peptide as an HLA-DRB1*0901-restricted helper T cell epitope. This epitope might usefully be incorporated in an HLA-based peptide for prevention of women from carcinoma development.

5 Linkage disequilibrium of genes in the HLA region

○ Michio Yasunami¹⁾, Hiroki Shibata¹⁾, Megumi Takahashi¹⁾, Masao Ota²⁾, Yosihiko Katsuyama²⁾ Akinori Kimura¹⁾

1) Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute and Laboratory of Genome Diversity, School of Bioscience, Tokyo Medical and Dental University

2) Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine

We have mapped susceptibility loci for several diseases such as Takayasu arteritis, type I diabetes and rheumatoid arthritis to a 70kb-long interval between TNF and MICB loci in the HLA region. Recently, it was reported that SNPs within that interval were in nearly complete linkage disequilibrium (LD) forming an LD block, at the boundary of which the strength of LD dropped steeply. This appeared inconsistent with the well-known existence of ethnic-specific HLA-A-B-DR haplotypes due to the strong LD between the HLA alleles extending longer than 2Mb. In the present study, we examined LD between alleles of markers in the HLA region, especially those in the TNF-MICB interval, in Japanese. Polymorphisms of LTA (in IVS A252G) and NFKBIL1 (in the promoter) were chosen as anchors within the TNF-MICB interval. Extent of LD was evaluated by coefficients D' and r^2 which were calculated with estimated haplotype frequencies. The LTA 252G allele showed strong LD with HLA-DRB1*1302, TNFAp*A, TNFa*105, IKBLp*04, IKBLp*05, C1_2_A*236, HLA-B*4403, HLA-B*4601, HLA-B62 (*1501, *1518), HLA-A*3303 and HLA-A*0207, indicating LD in this region extends over 2Mb. Analysis of LD between NFKBIL1 promoter and HLA alleles revealed that the LTA 252G allele was carried by two haplotypes commonly found in the Japanese, HLA-A*3303 — B*4403 — IKBLp*04 — DRB1*1302 and HLA-A*0207 — B*4601 — IKBLp*05 — DRB1*0803, while that the LTA 252A allele was on the other common haplotypes such as HLA-A*2402 — B*5201 — IKBLp*03 — DRB1*1502 etc. The difference in LD coefficients for various HLA alleles suggested that the length of LD block varied depending on the recombination events among the HLA haplotypes during the population history.

6 RSCA 法日本人アレル移動度データベース (MDB) の開発

Development of RSCA Migration Database for Japanese alleles

○ 辻 博昭¹⁾, 菱田理恵¹⁾, 小山 靖²⁾, 白川義貴²⁾, 高橋 めぐみ³⁾, 安波道郎³⁾, 木村彰方³⁾, 前川 平¹⁾

1) 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部

2) テイエフビー事業開発部 MBU

3) 東京医科歯科大難治疾患研究所

【目的】 PCR-RSCA 法キットを用い、日本人の A, B, 及び DRB1 をタイピングする為の基礎となる日本人アレルの移動度測定結果を既存 MDB に組込んで日本人アレル MDB を構築する。

【方法】 既報 1-3) に数値報告された日本人アレル頻度値を基に、希少及び低頻度のアレル型を有するパネル検体、A : 12, B : 15, 及び DRB1 : 10 の計 37 検体を選択し、対照として健常者 59 検体を 2 施設の ALFexpress と同機種用の RSCA-A,-B,-DRB1 キット及び ALFWin を用いて測定後、既存 MDB に未記載の日本人希少及び低頻度アレルの移動度値を求め、また一般的アレルについては HLA-Typer ソフトによりタイピングを行い、実験間差等を検討した。

【結果】 既報のアレル頻度合計値を 100% とした場合、本検討結果を組込んだ日本人用 MDB は、A 及び B は 100%, DRB1 は 99.6% の日本人アレルを網羅出来るが、既存 MDB に記載されているものの該当アレルのパネル検体がなかったために、B 及び DRB1 でそれぞれ約 2% 及び 1% のアレルについて移動度が確認出来なかった。日本人アレルに限定した場合、A*2601/02 及び B*5101/02 は移動度近接により判別が困難であった。また、A*0201 及び A*0207/15N, A*03 グループ及び B*4002/03, DRB1*0403/06, DRB1*1301/02 についても判別困難な場合が観察された。一方、既存 MDB の移動度値と比較し、B*4006, B*1503 及び DRB1*1405 では乖離が観察された。このうち B*4006 及び DRB1*1405 についてはシークエンス結果から、MDB 既収録のものに対し、それぞれ intron2 あるいは exon2 に 1 塩基の挿入あるいは置換されたアレルが日本人では主体であることを確認した。

【考察】 A 及び B 座において、RSCA 法は 1 塩基の差のみではアレル間の移動度値の差が誤差範囲に入ることがあり、中～高解像度の HLA タイピング方法であるが、一方、既存 MDB に収録されているアレルとは異なる移動度値を示すアレルが多数観察されており、本法は新規アレル発見に繋がる有力な方法であると考えられる。

1) Tokunaga K. et al. Immunogenetics 1997; 46 (3) 199-205

2) Tanaka H. et al. Clinical Transplants 1996; 139-144

3) Nakajima, et al., MHC 2001; 8 (1) 1-32

7

日常検査で検出された HLA-null allele について

HLA-null alleles were found out in routine testing

○ 山口恵津子, 松島みどり, 内田純子, 暉本優子,
有竹博子, 吉武国利, 大山政則, 荒添悟, 徳永和夫,
佐藤博行, 柏木征三郎
福岡県赤十字血液センター

【はじめに】 HLA-null allele は HLA 遺伝子自体の異常に基づく HLA 分子の欠損症であり健常人に低頻度で見られる。家族の血清学的タイピングにおいて, HLA ハプロタイプの推測等から抗原が存在するはずであるが同定出来ないことで検出される。我々は HLA-null allele と考えられる 3 例を経験したので報告する。

【方法】 HLA の血清学的タイピングは, 末梢血の白血球を用い日赤共通トレイを使用し 2 重蛍光染色による LCT 法で行なった。また, 血清学的タイピングで同定出来なかった抗原については, 末梢血の白血球又は全血から抽出した gDNA を用い PCR-MPH 法及び PCR-SSP 法により DNA タイピングを行なった。更に SBT 法にて塩基配列の変異箇所を特定し null-allele の成因を調査した。

【結果】 解析の結果, 今回経験した 3 例は A24null, B13null 及び B58null と考えられ, 3 例とも血清学的タイピングでは同定出来なかったが, DNA タイピングでは確認することが出来た。SBT 法においては, それぞれ塩基配列に変異がみられ, B58null は 366 番目の塩基 G が欠失しており, これ以降のアミノ酸置換によって HLA 分子の構造が変化したため null になったと考えられた。A24null 及び B13null の成因については現在調査中である。

【考察】 今般 HLA タイピングは血清学的タイピングから DNA タイピングへ移行する時期に来ているが, DNA だけのタイピングになれば HLA-null allele は見逃される可能性がある。当センターにおいて HLA-null allele は平成 14 年 10 月～平成 15 年 3 月までの 5 ヶ月間に 1140 例中 3 例 (0.26%) 検出されたことは重要であると考え。骨髄移植のドナーや臍帯血に HLA-null allele がある場合は GVHD 方向のミスマッチとなるため, 移植前の患者とドナーの HLA 型確認検査では血清学的タイピングを実施し, 細胞に表在する HLA 分子の確認が必要ではないかと考える。

8

感作抗 HLA 抗体が患児の血小板上に検出された新生児同種免疫性血小板減少症 (NAIT) の 1 症例

Case study of neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) due to platelet associated HLA antibody

○ 高橋大輔¹⁾, 森下 勝哉¹⁾, 宮崎 孔¹⁾, 佐藤進一郎¹⁾,
佐藤 敬²⁾, 白井 勝³⁾, 加藤俊明¹⁾, 池田久實¹⁾

1) 北海道赤十字血液センター

2) 名寄市立総合病院

3) 旭川厚生病院

【目的】 NAIT の原因の 1 つとして母由来の抗 HLA 抗体が考えられているが, これまでに患児血小板上の感作抗 HLA 抗体の特異性を直接証明した報告はない。今回, NAIT と診断された生後 2 日目の患児の血小板上に感作抗 HLA 抗体を検出したので報告する。

【症例】 患児は 36 週 3 日, 1,972 g で早産, 低出生体重児として出生。出生時血小板数が 4.9 万 / μL と低値であった。母に自己免疫疾患などはなく健常で, 患児も感染, 凝固異常など認められなかった。 γ グロブリン投与により児の血小板数は生後 9 日目で 14.0 万 / μL まで増加した。母の HLA 型は, A11.1, A24, B62, B56, Cw4, -, 患児は A11.1, A33, B62, B44, Cw4, - であった。

【方法および結果】 患児(生後 2 日目)及び母血清中の血小板同種抗体検査を MPHA 法と FlowPRA 法により実施した結果, 抗 HLA 抗体が共に陽性でその特異性はいずれも抗 HLA-A33 及び抗 HLA-B44 抗体であった。抗 HPA 抗体は母, 患児共に陰性であった。A33 のパネルを用いた抗 HLA 抗体価は LIFT-FCM 法により, 母は $\times 8192$ (AHG-LCT 法 $\times 2048$), 患児は $\times 16$ (AHG-LCT 法陰性)で, 母血清と児血小板との PSIFT-FCM 法による交差試験は強陽性を示した。また, 患児の PA-IgG は陽性であり, その感作抗体は患児血小板上の HLA-Class I 抗原と反応していることが MAIPA 直接法で確認された。

【考察】 本症例は患児および母血清中に検出された抗 HLA 抗体特異性が同一であること, 患児血小板上の感作抗体が抗 HLA 抗体特異性を示したことから, 母由来の抗 HLA 抗体が NAIT の原因と考えられた。本症例のように患児の血小板数が検討可能なほど多く, かつ生後早期に高感度法の検査法を実施すると, 感作抗体を検出できる場合があると考えられる。

9

非血縁者間骨髄移植における白血病患者と骨髄提供者の第22番染色体マイクロサテライト多型解析と移植片対宿主病 (GVHD) 発症に関わるマイナー組織適合性抗原遺伝子の検索

Analysis of genetic polymorphism between recipient and unrelated donor using microsatellite markers on Chr.22. — Detecting for minor histocompatibility antigens which causes acute graft-versus-host disease (GVHD) —

○ 佐々木佳奈¹⁾, 河田寿子¹⁾, 李 素雲¹⁾, 田宮 元¹⁾,
森島泰雄²⁾, 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) 愛知県がんセンター血液化学療法部

【目的】 骨髄移植は、移植後の拒絶反応や重篤な GVHD (graft-versus-host disease) の発症を防ぐため、患者と骨髄提供者の HLA を適合させて行われる。しかし、実際には HLA が適合している組み合わせであっても重度の GVHD を発症することがあり、その原因として、マイナー組織適合性抗原遺伝子の不適合が考えられている。そこで、本研究ではヒトの全染色体上に存在する約3万個のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子多型解析を行い、両者の多型の差異と、GVHD レベルを統計学的に解析することで、GVHD に関与すると考えられるマイナー組織適合性抗原遺伝子の同定を目的として多型一致度の解析を行っているが、今回は、第22番染色体についての検討を行った。

【方法】 日本骨髄バンクを介して非血縁者間骨髄移植を行った HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ 遺伝子の完全一致、もしくは一遺伝子座不一致である白血病患者と、その骨髄提供者 51 組を対象とした。内訳は、急性 GVHD 発症度の 0 度が 26 組、III 度が 17 組、IV 度が 8 組であった。これらについて第22番染色体長腕上の 13.0 Mb から 15.5 Mb の範囲で設定されたマイクロサテライトマーカー 8 種を用いて、多型解析を行った。FAM と HEX の異なる 2 色の蛍光色で標識した同一のプライマーセット 2 組を用いて、患者と提供者の同一の増幅領域をそれぞれ個別に PCR した。その後、得られた PCR 産物を 1 組とし、等量ずつ混合して ABI PRISM 310 GeneScan を用いて多型の検出を行い、両者の多型の差異の有無と、GVHD 発症度の比較・検討を行った。

【結果および考察】 ヒトの第22番染色体には、機能の特定されていない新規遺伝子が存在しており、その付近のマイクロサテライトマーカー 4 種 (13.0 Mb, 13.3 Mb, 14.4

Mb, 15.0 Mb) について多型解析を行ったが、多型一致度と GVHD 発症度との相関は得られなかった。また、15.5 Mb 付近のマーカーで、患者と骨髄提供者のマイクロサテライト多型の一致が、GVHD 0 度では 18 組 (69%)、III 度では 8 組 (47%)、IV 度では 2 組 (25%) であり、多型一致度が多くなるにつれ、GVHD の発症が軽度になる傾向が認められた。15.4 Mb 付近のマーカーでは、GVHD 0 度が 13 組 (50%)、III 度では 5 組 (29%)、IV 度では 5 組 (62%) であり、傾向が異なるため、さらに 15.5 Mb からテロメア方向に範囲を拡大し、相関を調べる予定である。

10

日本人由来の抗体を使用した HLAMatchmaker 基本原理の解析

The validity of the principle of HLAMatchmaker analyzed by the antibody specificity patterns of sera found in Japanese.

○ 大田智之, 小松由美, 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】 HLAMatchmaker は新たな抗体スクリーニングを実施せずに, 広範囲の抗 HLA 抗体を持つ患者に適合する HLA 許容抗原を選択できるプログラムとして開発された。HLAMatchmaker は PRA 85% 以上の 62 血清に対する反応パターンを基にしているが, 解析血清数を増やすことで許容抗原選択をより有効にすることができる。また, HLA の抗原頻度は民族により異なるため, 日本人が保有する HLA 抗体による比較をすることも重要と考えられる。そこで, HLAMatchmaker の基本原理の一つである“自己の HLA 分子上にあるアミノ酸トリプレット (AAT) に対しては抗体を産生しない”が日本人由来の抗体においても証明されるか, 抗体保有者の HLA 型から許容抗原と推測される抗原が許容されるか検討した。

【方法】 AHG-LCT とクロロキン未処理 MPHA による抗 HLA 抗体スクリーニングを実施し, 2 法とも陽性となった PRA 70% 以上の 56 血清とパネルリンパ球との反応パターンから抗原陽性に関わったと考えられる AAT を推測した。抗体保有者の HLA 型から HLAMatchmaker により AAT ゼロミスマッチ抗原, 許容抗原を選択し, AHG-LCT とクロロキン未処理 MPHA によるクロスマッチを実施した。

【結果】 AAT ゼロミスマッチ抗原を使用した 47 クロスマッチにおいて陽性となる例はなかった。許容抗原を使用した 87 クロスマッチにおいては 24 例が陽性となった (B52 が 13 例, B39 が 7 例)。これらは, 比較的免疫原性が弱いと考えられている 171H, 158T の AAT が原因と考えられる。

【考察】 HLAMatchmaker の基本理念は否定されなかったが, 現在の HLAMatchmaker は β -sheet のアミノ酸変異をまったく考慮に入れていないので, 今後 β -sheet のアミノ酸変異を考慮に入れる必要がある。

11

PCR-rSSO 法を用いた血清対応型タイピング

Serological equivalent typing by PCR-rSSO method

○ 泉澤康弘¹⁾, 中野浩登¹⁾, 中條聖子¹⁾, 二瓶文雄¹⁾,
小川公明¹⁾, 山本茂樹¹⁾, 石原義盛¹⁾, 佐治博夫²⁾
1) エスアールエル 遺伝子・染色体解析センター
2) HLA 研究所

【目的】 現在, HLA タイピング検査は複数の抗血清をもちいてサンプルのリンパ球に対する細胞障害性を指標にして抗原型を決定する血清学的タイピング検査が大多数を占めている。しかしサンプルの viability 低下等の問題より採取から測定にいたるまで迅速に検査が行わなければならないこと, 多くの血液量が必要といった問題がある。少量のサンプルでの検査が可能で, 4°C でのサンプル保存が可能な DNA タイピングが注目されている。近年, Luminex 100 を用いた PCR-rSSO 法による DNA タイピングのキットも発売されるようになった。そこで, 我々は必要な DNA 量が少なく簡便な PCR-rSSO 法: reverse Sequence Specific Oligonucleotide を用いて, 従来法の血清学的タイピング検査と同一サンプルでタイピングを行い比較検討, および PCR-SBT 法との相関について検討を行った。

【方法】 サンプル: エスアールエルの社内ボランティアの血液, および DNA タイピング検査結果既知検体を用いた。

血清学的タイピング検査: Class I については Special Monoclonal Typing Tray HLA Class I (Oriental), Class II については Special Monoclonal Typing Tray Class II (共にワンラムダ社)を用いてタイピングを行った。

DNA 抽出: 使用した機器は QIAGEN Robot 9604, 抽出キットは QIAamp DNA Blood 9604 BioRobot Kit (共にキアゲン社)を用いた。

PCR-rSSO 法によるタイピング検査: Class I については LABType SSO A Locus, LABType SSO B Locus Class II については LABType SSO DRB1 (共にワンラムダ社)を用いた。解析は LABType Visual (Ver.1.0) を使い, 血清対応型でタイピングを行った。

【結果】 100 サンプルを用いた血清学的タイピングとの比較では, PCR-rSSO 法の血清対応型タイピングと血清学的タイピングとの矛盾は認められなかった。また血清学的タイピングにおいては viability の低下が認められるようなサンプルにおいても, PCR-rSSO 法では確実にタイピ

ングが行えた。

また PCR-SBT 法との相関でも血清対応型に関して一致した。

【考察】 多くの工程により検査を行う血清学的タイピングに比して，簡便な作業により迅速で正確なタイピングが行えることから，大量サンプルを扱う検査方法として PCR-rSSO 法の血清対応型タイピングは大変有用であると思われる。

12

蛍光ビーズ法を用いた HLA 遺伝子型判定法の検討

Examination of HLA genotyping method by using PCR-Luminex.

○ 安田広康¹⁾，渡部和也¹⁾，中沢なおみ²⁾，東 史啓²⁾，
原 啓高²⁾，島田和典²⁾，大戸 齊¹⁾

1) 福島県立医科大学 輸血・移植免疫部

2) ゲノムサイエンス研究所 研究開発部

【目的】 多数検体を迅速に HLA 遺伝子型 (4 桁) 検索可能な蛍光ビーズ法 (PCR-Luminex 法) を，従来法 (Dynal RELI 法) と比較検討した。

【方法】 スマイテスト HLA-Luminex (株式会社ゲノムサイエンス研究所) は，担体に蛍光ビーズを用いた PCR-rSSO 法である PCR-Luminex 法により，HLA-A，HLA-B および HLA-DRB1 の遺伝子型を判別するキットである。変異を検出するプローブは，日本人の遺伝子頻度に基づき 0.1% 以上の 4 桁遺伝子型が判別されるように設計されている。本検討には，既にインフォームドコンセントを取得し，Dynal RELI 法により遺伝子型が判明している遺伝子抽出済みの 350 検体を用いた。使用した機械は，蛍光ビーズ測定装置 Luminex1 台，サーマルサイクラー 2 台およびプレート遠心機 1 台である。

【結果】 試験実施者 1 名と上記機械セットで，HLA-A，-B，-DRB1 が同時に 48 検体測定可能であった。判定までの作業時間は約 5 時間であり，作業工程を工夫することで 1 名 / 1 日で最大 96 検体の判定が可能であった。HLA-Luminex キットを用いて解析した 350 検体において，Dynal RELI 法により判定された遺伝子型との乖離は無かった。また，Dynal RELI 法ではスラッシュ表記となる A*0201/07 や A*0206/10 については A*0201，A*0207，A*0206，A*0210 と判別され，同様に A,B,DR 全てにおいてスラッシュ表記が減少した。

【考察】 他の手法でも問題となっている，非常に稀な遺伝子型との ambiguity (識別不能) については解消されていないが，「日本人で 99.9% 程度の確率での 4 桁判定」というコンセプトは有用であると考えられる。今後，更に検体数を増やし，従来法との乖離の有無や，福島地域での遺伝子頻度についても検討する。

13

キメラ症例の HLA DNA タイピングに及ぼす影響について

Effect of a chimera in the HLA DNA typing

○ 阿藤みや子¹⁾, 小林 賢¹⁾, 玉井誠一¹⁾, 鈴木洋司²⁾, 松崎雄三³⁾

1) 防衛医科大学校検査部

2) 同 輸血部

3) 同 法医学講座

【目的】 ABO 血液型検査でキメラが疑われた症例について HLA クラス I およびクラス II DNA タイピングを PCR-SSP 法と PCR-SSO 法で実施し, そのタイピング結果と反応性を検討した。

【症例】 37 歳。男性。二卵性双生児。輸血歴なし。

【方法】 フローサイトメトリー法による ABO 血液型の解析で, B 型の赤血球が 90.0%, AB 型が 10.0% である末梢血からヨウ化カリウム法で DNA を抽出した。HLA クラス I と II を PCR-SSP 法および PCR-rSSO 法をもちいてタイピングを実施した。アレルの判定は, 各メーカーから供給されたアプリケーションを利用しておこなった。

【結果】 PCR-SSP 法によるクラス I タイピングでは, コンピューター判定がなされなかったため, 手作業でアレルを決定した。その結果, A 座では, A24 と A31 が, B 座では B39, B56 と B62 が, C 座では Cw1, Cw4 と Cw7 がそれぞれ同定された。また, HLA-DRB1 では, DR4 と DR14 がコンピューター判定された。一方, PCR-SSO 法では, A と DRB1 座がコンピューター判定できたが, B 座は不可能であった。判定の結果, A 座が A24 と A31, B 座が B39, B62 と B56, DRB1 が DR4 であった。B39 と B56 の反応性にバラツキがあり, 一部で閾値以下と弱かったこと, DR14 が検出されなかったことから, これらのアレルはキメラ細胞に由来すると推定された。

【考察】 キメラ症例の場合, PCR-SSP 法ではわずかの混入でタイピングに影響を受けてしまうと考えられた。PCR-SSP 法をもちいたタイピングで 3 つ以上のアレルが検出された場合には, キメラを考慮し, 家族構成, 血液型検査などを実施し, タイピング結果の正当性を確認する必要があると考えられた。このような症例が移植のドナーとなる可能性があり, その適否など今後の課題として検討する必要があるものと思われた。

14

ペンギン類フンボルト属の MHC 遺伝子における多型解析

Analysis of sequence variations of the MHC class II gene in Genus Spheniscus.

○ 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⁾, Rory P. Wilson⁶⁾, Yvon LeMaho⁷⁾, 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

6) IfM / Kiel, Germany

7) CEPE / CNRS, France.

【目的】 ペンギン類は多様化した海鳥類から約 4,700 万年前に分岐したとされ, 現在, 6 属 16 種に分類されている。我々は昨年の本学会で, ペンギン類フンボルト属について, MHC 領域 DRB 様遺伝子第 2 エキソンの一部の塩基配列を決定し, その多型性を明らかにした。本発表では, 第 2, 及び第 3 エキソン全体を含む更に広いゲノム領域の塩基配列を決定したので報告する。

【方法】 既知の鳥類の塩基配列をもとに, MHC クラス II 抗原 DRB1 遺伝子第 1 エキソン, 第 4 エキソンにそれぞれ設計したプライマーと, 前回使用した第 2 エキシソンのプライマーを組み合わせて, フンボルト属フンボルトペンギンの検体を用いて PCR 増幅させた。得られた複数の PCR 増幅産物のうち目的の産物をゲルより切り出し, サブクローニング後, 塩基配列を決定した。

【結果と考察】 今回我々は, 昨年報告した MHC クラス II 抗原 DRB1 様遺伝子第 2 エキソン内の 198 bp を含む第 1 イントロンから第 3 イントロンの約 1.1 kb の塩基配列を得ることができた。決定された塩基配列は, 第 2 エキソンは 270 bp, 第 3 エキソンは 282 bp, 第 2 イントロンは 255 bp であった。エキソンの長さは他の鳥類と比べ類似しているが, イントロンは鳥類で一番短いとされているニワトリよりも長いものの, 既知の他の鳥類に比べて短かった。また, 相同性解析の結果, 第 2 エキソンは, タシギと 85% (193/227bp), ニワトリと 90% (102/113) の相同性があった。第 3 エキソンは, マガモと 91% (237/259), ニワトリと 88% (254/286) の相同性があった。しかし, 第 2 イントロンについては, すでに報告されている塩基配列と相同性のある配列はなくペンギン特有の配列であると思われる。今後は, 第 2, 3 エキシソンの連続した塩基配列にもとづく多型解析を行う予定である。

15

PLA-DRB1 多型解析によるアライグマの地理的分布

The PLA-DRB1 geographical distribution of Raccoon.

○ 松崎雄三¹⁾, 小林 賢²⁾, 阿藤みや子²⁾

1) 防衛医科大学校法医学講座

2) 防衛医科大学校病院検査部

【はじめに】 アライグマはペットとして意図的に導入された外来移入種であるが、放逐され野生化することで経済被害や生態系の攪乱などの被害を及ぼしている。地理的分布と繁殖状態の実体を調査する目的で mtDNA の D ループを調べた結果、神奈川県内に生息するアライグマは2つのグループに分けられた。一方は鎌倉市を中心とした沿岸部に、他方は内陸部の県境にそれぞれ分布していた。われわれは第11回大会においてアライグマのMHCであるPLA-DRB1の塩基配列を決定し報告した。この配列をもとに mtDNA の D ループ配列が共通するアライグマの PLA-DRB1 多型をエクソン2と3について解析し、地理的分布と繁殖状態の調査を実施した。

【材料および方法】 DNA は、神奈川県内において捕獲され、mtDNA の D ループ配列が同じアライグマ43頭の血液から得た。PLA-DRB1 のエクソン2と3を増幅したPCR産物をサブクローニング後に塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定した。

【結果および考察】 アライグマ43頭のアミノ酸配列は8パターンに分類された。しかし他の哺乳類と同様、エクソン3に多型性はみられなかった。これらのアミノ酸配列はイヌのDRB1と最も高い相同性を示した。アライグマのDRB1パターンからみた出現分布に地理的差異は認められなかった。同一母系と考えられるアライグマからDRB1が8パターンみられたことは、移入初期に少なくとも4頭が存在していたと考えられた。すなわち、鎌倉市を中心とした沿岸部に分布しているアライグマは、単家系で生息域を拡大していったのではなく、異なる家系間で交配を繰り返しながら生息域を拡大していったと推測された。アライグマは狂犬病や回虫症などの感染症を媒介する動物であるため、生態系の破壊やヒトへの被害が危惧されている。これらを防御するためには地理的分布と繁殖状態の把握が重要であると考えられる。現在、MHCクラスIや他の遺伝子マーカーなどを検索し、県境のアライグマを含めた全国的な分布などの詳細な検討を行っている。