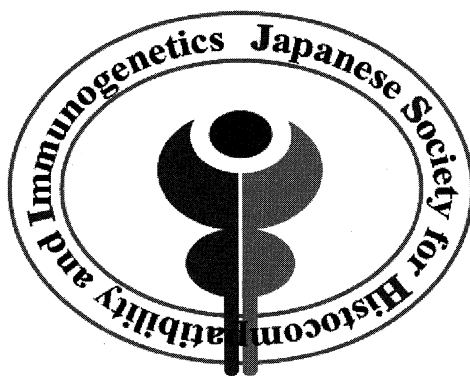


第 17 回 日本組織適合性学会大会

*The 17th Japanese Society for
Histocompatibility and Immunogenetics (JSHI)
Annual Meeting*

「MHC の臨床応用：移植医療から再生医療へ」



大会長 佐田 正晴 国立循環器病センター・再生医療部

会 期 2008 年 9 月 19 日(金)～9 月 21 日(日)

会 場 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)

〒530-0005 大阪市北区中之島 5-3-51

Tel. 06-4803-5555 Fax. 06-4803-5620

<http://www.gco.co.jp/japanese.html>

大会事務局

国立循環器病センター・再生医療部

〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1

TEL: 06-6833-5012(2516), FAX: 06-6835-5496

E-mail: sada@ri.ncvc.go.jp

運営事務局

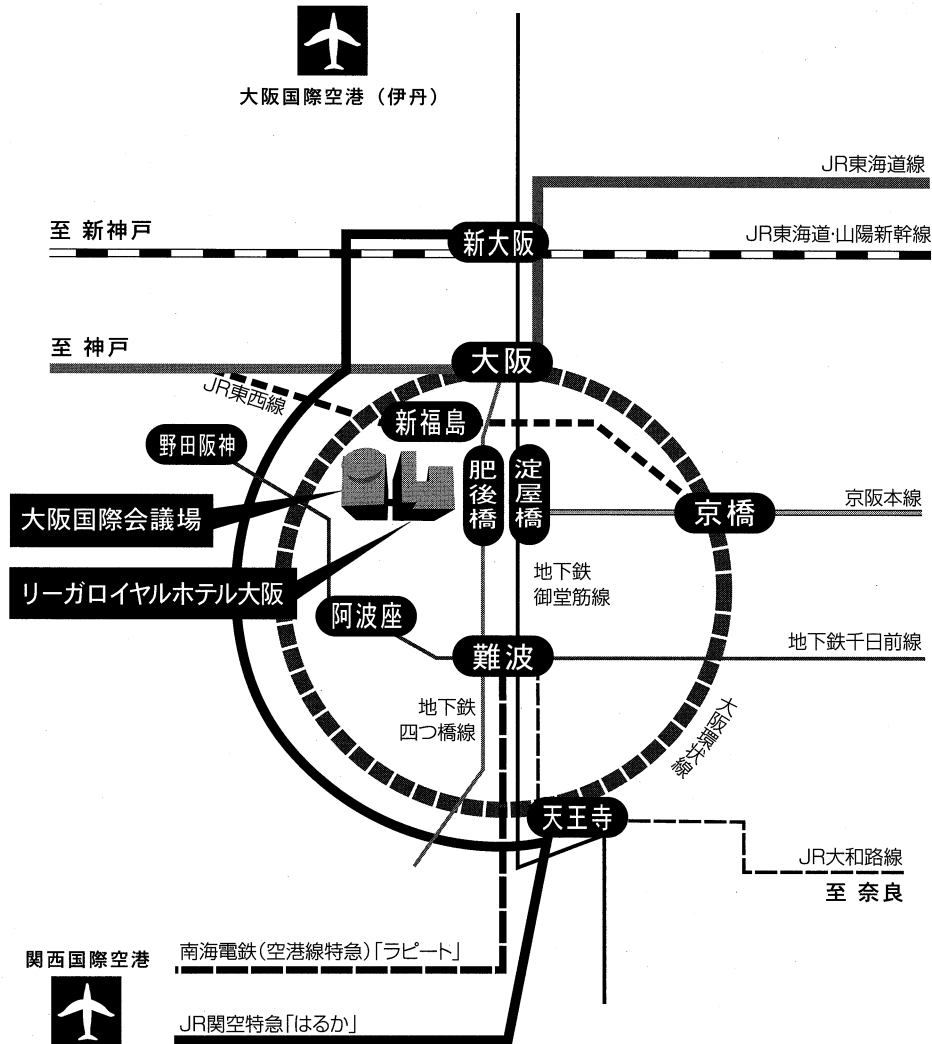
(株)コングレ(第 17 回日本組織適合性学会大会運営事務局：伊藤)

〒541-0047 大阪市中央区淡路町 3-6-13

TEL: 06-6229-2555, FAX: 06-6229-2556

E-mail: 44jst@congre.co.jp

会場案内図



○関西国際空港から

- …JR関空特急(はるか)で「大阪駅」まで約55分
- …南海電鉄特急(ラピート)で「難波駅」まで約30分
- …空港リムジンバスで
「リーガロイヤルホテル大阪」まで約90分

○大阪空港(伊丹)から

- …空港リムジンバスで「大阪駅」前まで約30分

○新幹線(新大阪駅)から

- …JR東海道線で「大阪駅」まで約5分

■お車で…

- ・大阪空港(伊丹)から約30分
- ・新大阪駅から約20分
- ・大阪駅から約7分
- ・難波駅から約15分

■バス…

- ・JR大阪駅前から、53番で約10分
「堂島大橋」下車すぐ
- ・関西国際空港からリムジンバス(無料)で約90分

■徒歩で…

- ・JR東西線「新福島駅(2番出口)」
阪神電鉄福島駅から約8分
- ・地下鉄四ツ橋線「肥後橋」駅から約12分

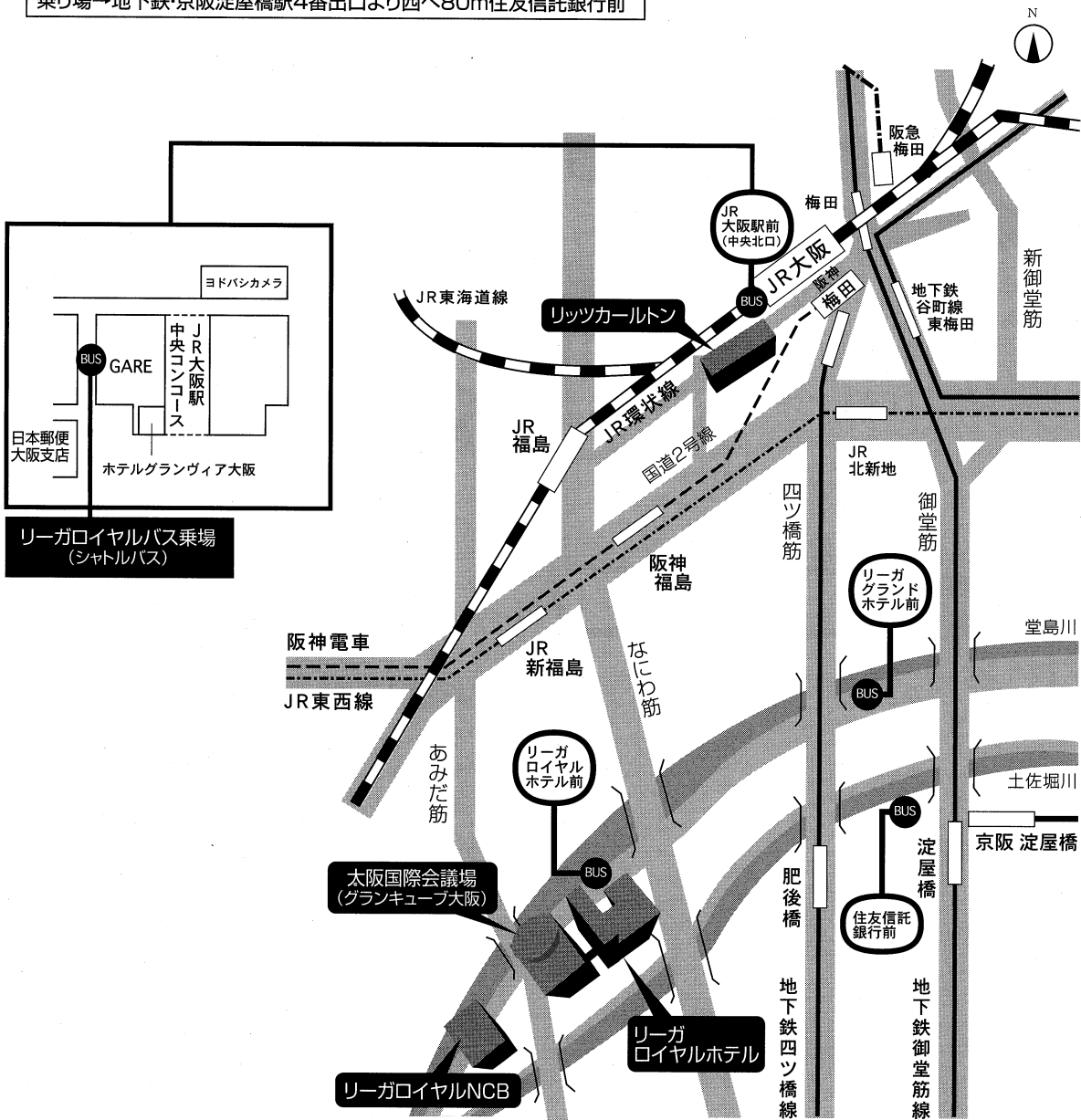
■リーガロイヤルバス(無料)

リーガロイヤルホテル～JR大阪駅を6分間隔で約10分
(JR大阪駅からの始発便は7:45発、最終便は22:15発となります)

乗り場→JR大阪駅中央北口より西へ約20m日本旅行梅田支店横(下記地図)

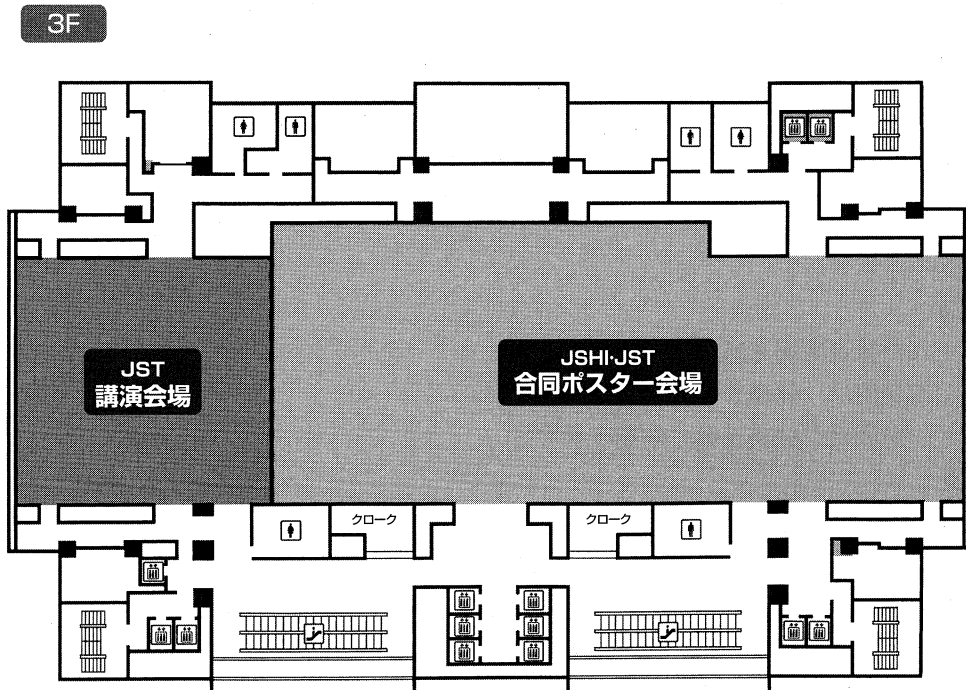
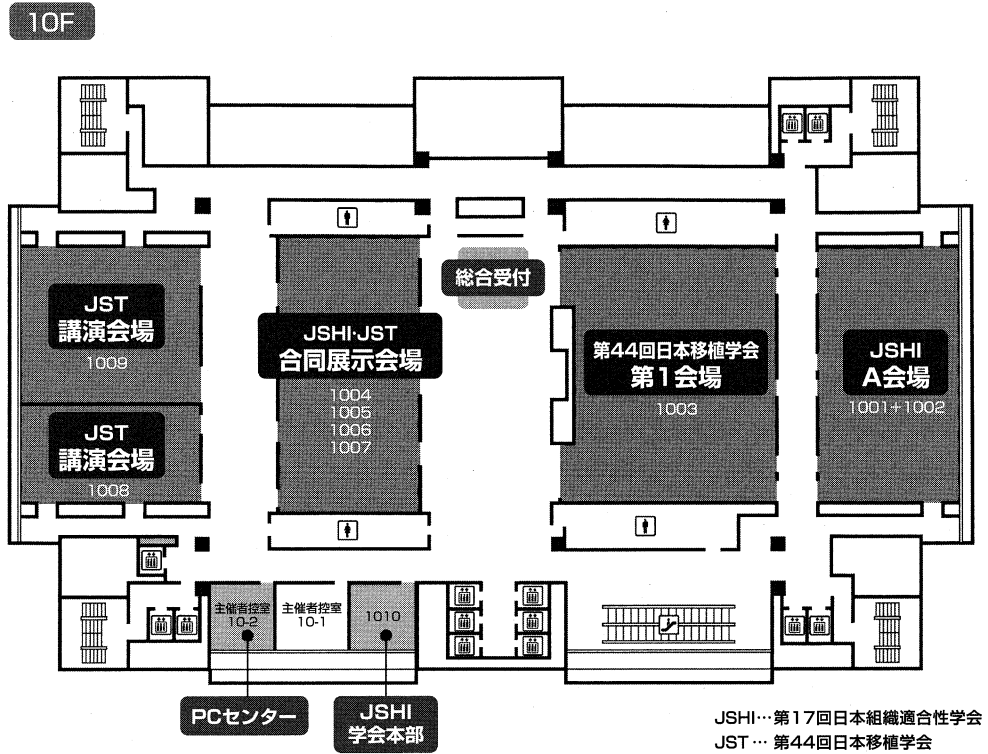
リーガロイヤルホテル～リーガランドホテル～地下鉄・京阪淀屋橋駅を15分間隔で循環
(淀屋橋駅からの始発便は7:55頃、最終便は21:55頃の発となります)

乗り場→地下鉄・京阪淀屋橋駅4番出口より西へ80m住友信託銀行前



会場配置図

■大阪国際会議場



御案内

学会・懇親会参加の皆様へ

1. 参加登録

- 1) 受付は、大阪国際会議場 10 階ホワイエです。
- 2) 受付時間
 - ◆ 9 月 19 日(金) 9:30~18:00
 - ◆ 9 月 20 日(土) 7:30~18:00
 - ◆ 9 月 21 日(日) 7:30~18:00
- 3) 参加費
理事・評議員は 12,000 円、一般会員は 10,000 円です。受付にて参加費をお支払いの上、参加証(ネームカード)をお受け取り下さい。
- 4) 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。なお紛失の際の再発行は致しかねますのでご了承下さい。
- 5) 会期中に同時開催される第 44 回日本移植学会総会、第 4 回世界移植デー、OKTF への参加・聴講にはネームカードが必要ですので会場内では必ず着用下さい。ネームカードの無い方は入場出来ません。
- 6) 学会にはこの抄録集(本号)をお持ち下さい。学会期間中、受付にて一部 2,000 円で頒布も致します。
- 7) 日本組織適合性学会への入会手続き、および年会費の納付は大会会場では行っておりません。

2. 懇親会

日 時： 9 月 20 日(土) 19:15~20:45

会 場： リーガロイヤルホテル 2 階「山楽」

参加費： 無料

日本移植学会との合同懇親会を開催いたします。多数のご参加をお待ちしております。

3. クローク

場 所： 大阪国際会議場 3 階イベントホール ポスター会場に併設します。

開設時間： 9 月 19 日(金) 9:30~19:30

9 月 20 日(土) 7:30~19:30

9 月 21 日(日) 7:30~20:00

演者の皆様へ

1. 発表時間

- 1) 指定された発表時間を厳守下さい。
- 2) 一般口演発表は、**発表 8 分**、**討論 4 分**です。
- 3) ポスター発表は、**発表 5 分**、**討論 5 分**です。

2. 口演発表

- 1) 口演発表は液晶プロジェクターの使用のみに限定します。
- 2) PC アプリケーションは、Microsoft Power Point 2003, 2004, 2007 を使用下さい。
- 3) OS は、Windows (XP, Vista 対応)、Macintosh (MacOS9, X 対応)です。
- 4) USB メモリーで受け付けますが、Macintosh の場合、画格のズレや不具合がありますので PC を持ち込み下さい。

- 5) 発表データファイル名は、「**【演題番号】【氏名】**」として下さい。
- 6) **発表 30 分前までに PC センターにて試写・確認後に USB メモリーを担当者にお渡し下さい。**
- 7) **朝最初のセッションでの発表者は、前日中に USB メモリーを担当者にお渡し下さい。**
- 8) 提出後のデータ変更は出来ません。

3. ポスター発表

- 1) 会場は、大阪国際会議場 3 階イベントホールです。
- 2) 演題番号は事務局で掲示します。
- 3) 演題名、所属、氏名は演者が用意下さい(**縦 20 cm, 横 70 cm**)。
- 4) ポスターパネルのサイズは、**縦 180 cm, 横 90 cm**です。
- 5) ポスター掲示用ピンは、ポスター会場でお受け取り下さい。
- 6) ポスター貼付・撤去は、下記の時間内をお願いいたします。
所定時間内に撤去されないポスターは大会事務局にて処分いたします。

◆ ポスター貼付： 9 月 20 日(土) 7:30~12:00

◆ ポスター撤去： 9 月 21 日(日) 16:30~18:00

- 7) **9 月 21 日(日) 15:10~16:30 にポスター発表を行います。**

演者は所定の発表時間帯に、ご自身のポスター前で待機下さい。

演題の要点を述べ、その後討論・質疑応答を行って下さい。座長の指示に従い、時間厳守をお願いいたします。

お願い

1. 発表時間、質疑応答時間を遵守下さい。
2. 会場内では携帯電話の電源を切るかマナーモードにして下さい。
3. 会員へのメッセージは全て掲示板で行います。

認定制度技術者・指導者筆記試験

日 時： 9 月 19 日(金) 14:15~15:15

会 場： 大阪国際会議場 8 階 803

認定制度模擬試験

日 時： 9 月 19 日(金) 14:15~15:15

会 場： 大阪国際会議場 10 階 A 会場

QCWS 集会

日 時： 9 月 19 日(金) 15:30~17:45

会 場： 大阪国際会議場 10 階 A 会場

参加費： 集会参加には、学会参加証(ネームカード)が必要です。QCWS 事前振込をされている方は、総合受付で学会参加費をお支払いいただき参加証(ネームカード)をお受け取り後、受付で QCWS 参加証をお受け取りご入場下さい。集会のみ参加の方は、総合受付で学会参加費と QCWS 当日参加費 2,000 円をお支払いの上ご入場下さい。

QCWS 参加証、参加領収書は認定 HLA 検査技師、認定指導者の申請・更新の際に必要となります。再発行いたしませんので紛失にご注意下さい。

認定制度講習会 (JSHI 認定制度委員会・教育部会)

日 時： 9月20日(土) 9:00~11:00

会 場： 大阪国際会議場 10階 A会場

テキスト代： 2,000円

参加者は総合受付にて出席確認を済ませてからご入場下さい。

本講習会は事前申込み制です。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-DNA タイピングから個人の全ゲノム情報解読の時代へ

安波 道郎(長崎大学・熱帯医学研究所)

HLA 抗体検出テクニックについて

中島 文明(日本赤十字社中央血液研究所・研究開発部)

腎移植とクロスマッチ・HLA 抗体検査：臨床側からの要望

小林 孝彰(名古屋大学医学部・免疫機能制御学)

認定制度指導者講習会

第17回日本組織適合性学会大会中の下記，特別講演，招待講演，教育講演，シンポジウムの合計7題のうちから4題以上の聴講をもって，指導者新規申請および更新申請に必要な講習を受講したものと認めます。会場入口に用意されている受講者記帳名簿へのサインをもって受講証明といたします。

1. 特別講演：「iPS細胞の展望と課題」(山中 伸弥)
2. 招待講演：「MIC genes: from bench to bedside」(Seiamak Bahram)
3. JSHI/JST 合同教育講演：「臓器移植における既存抗体および新規抗体産生：その診断・治療に対する臨床的意義」
4. JSHI/JST 合同シンポジウム：「抗体関連型拒絶反応と臓器移植：診断と治療に対する戦略」
5. シンポジウム(1)：「医用ミニプタ：移植医療から再生医療への展開」
6. シンポジウム(2)：「造血幹細胞移植：MHCの役割を考える」
7. 教育講演：「組織適合性検査法アーカイブス：その変遷とニーズ」

認定証授与の案内

認定試験合格者ならびに更新者は9月20日(土)午後1時に掲示板に張り出します。認定証は9月20日(土)午後2時から9月21日(日)午後3時までの間に随時授与いたしますので，大会本部(大阪国際会議場10階1010)までお越し下さい。

学術奨励賞授与

学術奨励賞受賞者は9月21日(日)午前12時に掲示板に告知いたします。授与式は9月21日(日)午後1時より大阪国際会議場10階A会場にて執り行います。

会議等日程

1. 理事会 9月19日(金) 9:30~11:15
大阪国際会議場 8階 803
2. QCWS 部会 9月19日(金) 11:15~12:15
大阪国際会議場 8階 803

3. 評議員会 9月19日(金) 13:00~14:00
大阪国際会議場 8階 801/2
4. 認定審査判定会議 9月19日(金) 15:15~17:45
大阪国際会議場 8階 801/2
5. 認定制度委員会 9月20日(土) 8:00~8:50
大阪国際会議場 8階 806
6. 総会・表彰 9月21日(日) 13:00~14:00
大阪国際会議場 10階 A会場

JSHI / JST 合同企業展示

- 日 時： 9月20日(土) 7:30~17:00
9月21日(日) 7:30~15:00
会 場： 大阪国際会議場 10階 合同展示会場

交通・宿泊のご案内について

学会参加のための交通・宿泊については各自にて手配をお願い致します。

【同時開催】

第44回日本移植学会総会

- 会 長： 高原 史郎(大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療)
会 期： 9月19日(金)~9月21日(日)
会 場： 大阪国際会議場

4th World Day for Organ Donation and Transplantation (世界移植 DAY)

- 会 期： 9月20日(土)
会 場： 大阪国際会議場 12階 特別会議場
主 催： 日本移植学会
共 催： WHO, 厚生労働省

Osaka Kidney Transplantation Forum 2008 (OKTF 2008)

- 会 長： 高原 史郎(大阪大学大学院医学系研究科先端移植基盤医療)
会 期： 9月21日(日)
会 場： 大阪国際会議場 12階 特別会議場

市民公開講座

- 会 期： 9月21日(日)
会 場： 大阪国際会議場 3階 イベントホール

プログラム

特別講演

9月19日(金)18:00~19:00

座長 佐田 正晴(国立循環器病センター)

SL-1 iPS 細胞の展望と課題

山中 伸弥 京都大学 iPS 細胞研究センター・センター長

招待講演

9月20日(土)11:00~11:50

座長 木村 彰方(東京医科歯科大学)

SL-2 MIC genes: from bench to bedside.

Seiamak Bahram
Strasbourg University School of Medicine and
Teaching Hospitals, Strasbourg, France**認定制度講習会**

9月20日(土)9:00~11:00

(JSHI 認定制度委員会・教育部会)

座長 西村 泰治(熊本大学大学院)

EL1-1 HLA-DNA タイピングから個人の全ゲノム情報解読の時代へ

安波 道郎 長崎大学・熱帯医学研究所

EL1-2 HLA 抗体検出テクニックについて

中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所・研究開発部

EL1-3 腎移植とクロスマッチ・HLA 抗体検査: 臨床側からの要望

小林 孝彰 名古屋大学医学部・免疫機能制御学

JSHI/JST 合同教育講演

9月20日(土)13:00~14:00

共催: 株式会社リプロセル

座長 杉谷 篤(藤田保健衛生大学)

EL2 臓器移植における既存抗体および新規抗体産生: その診断・治療に対する臨床的意義

小林 孝彰 名古屋大学医学部・免疫機能制御学

教育講演

9月21日(日)10:30~11:50

「組織適合性検査法アーカイブス：その変遷とニーズ」

共催：株式会社ベリタス

座長 赤座 達也 (NPO 法人 HLA 研究所)
成瀬 妙子 (東京医科歯科大学)

EL3-1 HLA 抗原：LCT から SBT へ

中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所・研究開発部

EI3-2 HLA 抗体：LCT からエピトープへ

田中 秀則 日本赤十字社中央血液研究所・中央骨髄データセンター

JSHI/JST 合同シンポジウム

9月20日(土)14:00~15:50

「抗体関連型拒絶反応と臓器移植：診断と治療に対する戦略」

座長 佐田 正晴 (国立循環器病センター)
高原 史郎 (大阪大学大学院)

S1-1 腎移植：FCXM と拒絶診断・治療法

杉谷 篤, 岡部 安博 藤田保健衛生大学・臓器移植再生医学
北田 秀久, 土井 篤, 錦 建宏, 西岡 泰信, 宮本 京子
九州大学腎疾患治療部, 臨床・腫瘍外科, 遺伝子・細胞療法部

S1-2 肝移植：肝移植における alloantibody の臨床的意義

江川 裕人, 宮川 文, 上本 伸二 京都大学臓器移植医療部

S1-3 心移植：既存抗体, 産生抗体のモニタリングと移植後の管理

中谷 武嗣¹⁾, 加藤 倫子¹⁾, 築瀬 正伸¹⁾, 山本 賢²⁾, 瀬口 周²⁾,
船津 俊宏³⁾, 小林 順二郎³⁾, 植田 初江⁴⁾, 佐田 正晴⁵⁾

国立循環器病センター臓器移植部¹⁾, 臨床検査部²⁾, 心臓血管外科³⁾,
病理⁴⁾, 再生医療部⁵⁾

シンポジウム(1)

9月20日(土)16:00~17:30

「医用ミニブタ：移植医療から再生医療への展開」

共催：株式会社ジャパンファーム

座長 小林 孝彰 (名古屋大学)
太田 正穂 (信州大学)

S2-1 クラウン系ミニブタの SLA 遺伝子解析と固定化：その意義と有用性

新村 由佳里 (株)ジャパンファーム品質保証部

- S2-2 ミニブタを用いた前臨床臓器移植実験：同種移植から異種移植へ
山田 和彦 鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター
- S2-3 胎児付属物由来間葉系幹細胞：自己再生医療から同種再生医療への展開
池田 智明¹⁾，石兼 真²⁾，原田 和彦²⁾，山原 研一²⁾，佐田 正晴²⁾
国立循環器病センター周産期科¹⁾，再生医療部²⁾

シンポジウム(2)

9月21日(日)9:00~10:30

「造血幹細胞移植：MHC の役割を考える」

座長 森島 泰雄(愛知県がんセンター)
椿 和央(近畿大学)

- S3-1 造血幹細胞移植と免疫寛容
豊嶋 崇徳 九州大学病院遺伝子・細胞療法部
- S3-2 造血幹細胞移植における HLA 適合性
一戸 辰夫 京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科
- S3-3 臍帯血移植における HLA 適合性
甲斐 俊朗 兵庫医科大学輸血部

ランチョンセミナー(A)

9月20日(土)12:00~12:50

「フロークロスマッチの重要性とその方法」

共催：株式会社ベリタス

座長 小川 公明(株式会社ベリタス)

- LS1-1 フローサイトクロスマッチ用 T, B 細胞分離試薬「EasySep」のご紹介
松本 佳子 株式会社ベリタス技術営業部
- LS1-2 組織適合性検査におけるフロークロスマッチの位置づけ
佐藤 壯 札幌北楡病院臨床検査課

ランチョンセミナー(B)

9月21日(日)12:00~12:50

「臓器移植のモニタリング検査」

共催：ビオテスト株式会社

座長 Elmar Dresbach (ビオテスト株式会社)

- LS2-1 可溶性 CD30 の移植検査への応用
Dr. Daniel Czachurski Biotest Medical Diagnostics

LS2-2 ELISA を使用した HLA 抗体スクリーニング

Dr. Daniel Czachurski Biotest Medical Diagnostics

LS2-3 ドナーリンパ球を用いた患者 HLA 抗体のモニタリング

重田 勝義 ビオテスト株式会社免疫診断グループ

会員研究発表 I

学術奨励賞候補口演

9月20日(土)17:30~18:00

座長 木村 彰方(東京医科歯科大学)

G-1 臍帯血移植におけるレシピエント HLA 抗体と生着の関連性について

○藤原孝記¹⁾, 田中秀則²⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 内川 誠¹⁾, 高梨美乃子¹⁾,
佐竹正博³⁾, 中島一格¹⁾

1) 東京都赤十字血液センター

2) 日本赤十字社中央血液研究所

3) 東京都西赤十字血液センター

G-2 HLA-DQ のトランス型二量体形成能と二量体発現安定性の解析

○宮寺浩子, 徳永勝士

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

会員研究発表 II (口演)

(1) 「疾患・治療」

9月20日(土)18:00~19:00

座長 平山 謙二(長崎大学)

- O-1 HLA-A2, A24 拘束性 Glypican-3 ペプチドを用いた肝細胞癌免疫療法の臨床試験
○西村泰治¹⁾, 小森宏之²⁾, 本村 裕³⁾, 古瀬純司⁴⁾, 馬場秀夫²⁾, 木下 平⁵⁾, 中面哲也³⁾
1) 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野
2) 熊本大学大学院医学薬学研究部消化器外科学分野
3) 国立がんセンター東病院臨床開発センター・先端医療開発室
4) 国立がんセンター東病院・肝胆臓内科
5) 国立がんセンター東病院・上腹部外科
- O-2 免疫細胞療法への応用をめざしたマウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製技術の確立
○千住 覚¹⁾, 春田美和¹⁾, 福島 聡¹⁾, 松永雄亮¹⁾, 平田真哉¹⁾, 池田徳典¹⁾, 高橋和利²⁾, 沖田圭介²⁾, 山中伸弥²⁾, 西村泰治¹⁾
1) 熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野
2) 京都大学再生医科学研究所・再生誘導研究分野
- O-3 口腔扁平上皮癌患者における MICA 遺伝子と病期進行との関連
○玉置盛浩^{1,2,3)}, 川上正良¹⁾, 実藤信之¹⁾, 山中康嗣³⁾, 今井裕一郎²⁾, 山本一彦¹⁾, 中西真里²⁾, 羽竹勝彦²⁾, 桐田忠昭¹⁾, 石谷昭子²⁾
1) 奈良県立医科大学口腔外科学講座
2) 奈良県立医科大学法医学教室
3) 高清会高井病院口腔外科
- O-4 HIV 感染後 AIDS 発症の個体差と KIR 遺伝子多型との関連
○柳田梨沙¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 中島敏晶^{1,2)}, 照沼 裕³⁾, 三間屋純一⁴⁾, 木村彰方^{1,2)}
1) 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部ゲノム多様性
2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
3) 日本バイオセラピー研究所
4) 静岡こども病院
- O-5 日本人サルコイドーシスにおける BTNL2 遺伝子多型の解析
○目黒 明¹⁾, 石原麻美¹⁾, 勝山善彦²⁾, 南場研一³⁾, 蕪城俊克⁴⁾, 安藤靖恭⁵⁾, 森本紳一郎⁶⁾, 岳中耐夫⁷⁾, 大野重昭³⁾, 猪子英俊⁸⁾, 水木信久¹⁾, 太田正穂⁹⁾

- 1) 横浜市立大学医学部眼科学教室
- 2) 信州大学付属病院薬剤部法医学教室
- 3) 北海道大学医学部眼科学教室
- 4) 東京大学医学部眼科学教室
- 5) 慶応大学医学部眼科学教室
- 6) 藤田保健衛生大学医学部循環器内科学教室
- 7) 熊本市市民病院呼吸器内科
- 8) 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

(2) 「移植」

9月21日(日)8:00~9:00

座長 佐藤 壯(札幌北榆病院)

- O-6 多能性幹細胞バンクを構築するための HLA マッチング推計
 ○中島文明¹⁾, 中辻憲夫²⁾, 徳永勝士³⁾
 1) 日本赤十字社中央血液研究所
 2) 京都大学・物質-細胞統合システム拠点/再生医科学研究所
 3) 東京大学医学系研究科人類遺伝学分野
- O-7 造血細胞移植前後における患者血清中の HLA 抗体の推移
 ○高 陽淑¹⁾, 谷上純子¹⁾, 福森泰雄¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田弘俊¹⁾,
 押田真知子²⁾, 富山佳昭²⁾, 前田哲生³⁾, 西澤正俊⁴⁾
 1) 大阪府赤十字血液センター
 2) 大阪大学医学部付属病院輸血部
 3) 大阪大学大学院医学系研究科血液・腫瘍内科
 4) 大阪赤十字病院血液内科
- O-8 臍帯血移植予定患者の抗 MICA 抗体について
 ○荒木延夫¹⁾, 井本しおん¹⁾, 馬淵 理¹⁾, 甲斐俊朗²⁾, 原 宏³⁾
 1) 兵庫県赤十字血液センター
 2) 兵庫医科大学病院輸血部
 3) 樹徳会上ヶ原病院
- O-9 献腎移植希望登録者における抗 HLA 抗体検査と移植前リンパ球クロスマッチ検査
 ○水野美紀子, 黒木聖久, 小原節子
 名古屋第二赤十字病院医療技術部・組織適合検査室
- O-10 可溶性 CD30 の移植検査への応用
 ○重田勝義
 ビオテスト株式会社免疫診断グループ

(3) 「技術・方法」

9月21日(日)14:00~15:00

座長 中島 文明(日本赤十字社中央血液研究所)

- O-11 SBT*excellerator* HLA-DRB1- a novel tool for accurate and reliable high-resolution HLA-DRB1 typing and ambiguity resolution
○Wietse Mulder²⁾, Karsten Ogrzewalla¹⁾, Nienke Westerink²⁾,
Eric Rozemuller²⁾, Birgit Jehn¹⁾, Jürgen Lauber¹⁾
1) QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
2) Genome Diagnostics, Utrecht, the Netherlands
- O-12 蛍光ビーズ法を用いた新しい「HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1」DNA タイピング試薬の評価
○小野明子¹⁾, 池田通代¹⁾, 斎藤 順¹⁾, 石井博之¹⁾, 伊藤早織²⁾, 福島義之²⁾,
東 史啓²⁾, 福森泰雄¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田弘俊¹⁾
1) 大阪府赤十字血液センター
2) 株式会社医学生物学研究所応用技術部
- O-13 蛍光ビーズを用いた HLA クラス II 抗体検査試薬の開発
○直原 寛¹⁾, 北岡 瞬¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 岡 孝紀¹⁾, 関根みゆき²⁾,
藤原孝記²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 内川 誠²⁾, 中島一格²⁾, 宮崎 孔³⁾,
佐藤進一郎³⁾, 加藤俊明³⁾, 池田久實³⁾, 中島文明⁴⁾, 田中秀則⁴⁾
1) 湧永製薬株式会社バイオ事業開発部
2) 東京都赤十字血液センター
3) 北海道赤十字血液センター
4) 日本赤十字社中央血液研究所
- O-14 ドナーリンパ球を用いた HLA 抗体のモニタリング
○重田勝義
バイオテスト株式会社免疫診断グループ
- O-15 抗 HLA 抗体における C4d complex の測定
○水谷一夫¹⁾, ポール・テラサキ²⁾
1) 名古屋大学 医学部 泌尿器科
2) テラサキ フォウンデーション ラボラトリー

会員研究発表 III (ポスター)

「技術・方法 I」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 田中 秀則(日本赤十字社中央血液研究所)

P-1 SBT*excellerator* HLA-DRB1- a novel tool for accurate and reliable high-resolution HLA-DRB1 typing and ambiguity resolution

○Wietse Mulder²⁾, Karsten Ogrzewalla¹⁾, Nienke Westerink²⁾,
Eric Rozemuller²⁾, Birgit Jehn¹⁾, Jürgen Lauber¹⁾

1) QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

2) Genome Diagnostics, Utrecht, the Netherlands

P-2 蛍光ビーズ法を用いた新しい「HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1」DNA タイピング試薬の評価

○小野明子¹⁾, 池田通代¹⁾, 斎藤 順¹⁾, 石井博之¹⁾, 伊藤早織²⁾, 福島義之²⁾,
東 史啓²⁾, 福森泰雄¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田弘俊¹⁾

1) 大阪府赤十字血液センター

2) 株式会社医学生物学研究所応用技術部

P-3 蛍光ビーズ法を用いた HLA クラス II 抗体検査試薬の開発

○直原 寛¹⁾, 北岡 瞬¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 岡 孝紀¹⁾, 関根みゆき²⁾,
藤原孝記²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 内川 誠²⁾, 中島一格²⁾, 宮崎 孔³⁾,
佐藤進一郎³⁾, 加藤俊明³⁾, 池田久實³⁾, 中島文明⁴⁾, 田中秀則⁴⁾

1) 湧永製薬株式会社バイオ事業開発部

2) 東京都赤十字血液センター

3) 北海道赤十字血液センター

4) 日本赤十字社中央血液研究所

P-4 好中球, 単球, T/B リンパ球, 好塩基球, 血小板を解析対象とした 6-cell lineage IFT 法と HNA transfectant 細胞, LABScreen を組み合わせた白血球抗体の検出

○松山宣樹, 保井一太, 高 陽淑, 尼岸悦子, 谷上純子, 古田里佳,
福森 泰雄, 木村貴文, 平山文也, 谷 慶彦, 柴田弘俊

大阪府赤十字血液センター

「技術・方法 II」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 藤原 孝記(東京都赤十字血液センター)

P-5 ELISA を使用した HLA 抗体スクリーニング

○重田勝義

ビオテスト株式会社免疫診断グループ

P-6 ELISA 法によるスクリーニング検査キット「AbScreen HLA classI」の検討

○大久保美里¹⁾, 山本 賢¹⁾, 瀬口 周¹⁾, 角谷勇実¹⁾, 古田賢二¹⁾,
佐野道孝¹⁾, 佐田正晴²⁾, 中谷武嗣³⁾

1) 国立循環器病センター・臨床検査部

2) 同・再生医療部

3) 同・臓器移植部

P-7 ドナーリンパ球を用いた HLA 抗体のモニタリング

○重田勝義

ビオテスト株式会社免疫診断グループ

P-8 抗 HLA 抗体における C4d complex の測定

○水谷一夫¹⁾, ポール・テラサキ²⁾

1) 名古屋大学 医学部 泌尿器科

2) テラサキ フォウンダーション ラボラトリー

「技術・方法 III」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 柏瀬 貢一(東京都赤十字血液センター)

P-9 リコンビナント HLA-A24, A26 の抗原性の評価

○中野 学, 宮崎 孔, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實

北海道赤十字血液センター検査部

P-10 Loop-Mediated Isothermal Amplification 法による ambiguity 解決の可能性

○清水佐良子, 光永滋樹, 吉川枝里, 岡 晃, 猪子英俊

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

P-11 移植医療後の合併症に関する SNPs の High-throughput typing method の開発

○大沼 豪, Milena Ivanova²⁾, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史, 林 晃司,

楠木靖史, 吉田 喬, 川井信太郎¹⁾, 松下正毅¹⁾, 落合直也, 丸屋悦子,

赤座達也, 河賀泰子, 佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) 湧永製薬株式会社

2) Central Laboratory of Clinical Immunology University Hospital
“Alexandzovska”, Sofia, Bulgaria²⁾

P-12 Minor histocompatibility antigen の High-throughput typing method の開発

○林 晃司, 落合直也, 大沼 豪, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史,
楠木靖史, 吉田 喬, 川井信太郎¹⁾, 松下正毅¹⁾, 丸屋悦子, 河賀泰子,
赤座達也, 佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

湧永製薬株式会社

P-13 可溶性 HLA-G 抗原測定法の問題点—卵胞液中の可溶性 HLA-G 抗原の意義—

○下嶋典子¹⁾, 中西真理²⁾, 大村素子²⁾, 川井信太郎³⁾, 永田のぞみ³⁾,
喜多英二¹⁾, Daniel E Geraghty⁴⁾, 羽竹勝彦²⁾, 石谷昭子²⁾

1) 奈良県立医科大学細菌学

2) 奈良県立医科大学法医学

3) 湧永製薬バイオ事業開発

4) Fred Hutchinson Cancer Research Center

「移植」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 久山 芳文(大阪府立急性期総合医療センター)

P-14 骨髄バンク登録ドナーの HLA 型遺伝子頻度と新たに見出されたアリルについて

○加藤和江¹⁾, 盛山芳恵¹⁾, 中島文明¹⁾, 田中秀則¹⁾, 柏瀬貢一²⁾,
福森泰雄³⁾, 石井博之³⁾, 田所憲治¹⁾

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

2) 東京都赤十字血液センター

3) 大阪府赤十字血液センター

P-15 当センターにおける心臓移植 22 症例の経過

○瀬口 周¹⁾, 山本 賢¹⁾, 大久保美里¹⁾, 角谷勇実¹⁾, 古田賢二¹⁾,
佐田正晴²⁾, 佐野道孝¹⁾, 加藤倫子³⁾, 植田初江⁴⁾, 鎌倉史郎¹⁾, 中谷武嗣³⁾

1) 国立循環器病センター・臨床検査部

2) 同・再生医療部

3) 同・臓器移植部

4) 同・病理検査室

P-16 腎移植後のドナー特異的抗体 (DSA) 検出の意義

○黒木聖久¹⁾, 水野美紀子¹⁾, 小原節子¹⁾, 打田和治²⁾, 丹羽 操³⁾,
岩崎研太³⁾, 小林孝彰³⁾

- 1) 名古屋第二赤十字病院医療技術部
- 2) 名古屋第二赤十字病院移植外科
- 3) 名古屋大学医学部免疫機能制御学

P-17 腎移植における DSA (Donor specific antibody) 陽性症例の検討

○橋本光男, 木下朋子, 岸川英史, 吉岡亜矢, 小林泰之, 加藤大悟,
山内洋子, 奥野綾子, 藤井直彦, 徳川茂樹, 西村憲二, 市川靖二
兵庫県立西宮病院腎疾患総合医療センター

「免疫」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 成瀬 妙子(東京医科歯科大学)

P-18 霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択

○中島敏晶^{1,2)}, 大谷仁志¹⁾, 颯田葉子³⁾, 宇野泰広⁴⁾, 明里宏文⁵⁾,
石田貴文⁶⁾, 木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学疾患生命科学部
- 2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
- 3) 総合研究大学院大学生命共生体進化学
- 4) 新日本科学・薬物代謝分析センター
- 5) 医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター疾患制御研究室
- 6) 東京大学大学院理学系生物学科

P-19 ヒトおよびアカゲザルにおける NKG2D レセプター関連遺伝子群の多型解析

○成瀬妙子¹⁾, 柳田梨紗¹⁾, 俣野哲郎²⁾, 森 一泰³⁾, 保富康宏⁴⁾, 宮澤正顕⁵⁾,
木村彰方¹⁾

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態
- 2) 東京大学医科学研究所
- 3) 国立感染研究所エイズ研究センター
- 4) 三重大学医学部
- 5) 近畿大学医学部

P-20 健康女性における HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 ハプロタイプ triplicate の体細胞モザイク

○佐治博夫, 丸屋悦子, 大沼 豪, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史,
林 晃司, 楠木靖史, 吉田 喬, 赤座達也, 坂田尚己¹⁾

- 特定非営利活動法人 HLA 研究所
- 1) 近畿大学医学部

P-21 HLA 抗体エピトープについて

○丸屋悦子, 北脇 城¹⁾, 大沼 豪, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史,
林 晃司, 河賀泰子, Nori Sasaki²⁾, 赤座達也, 佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) 京都府立医科大学産婦人科

2) One Lambda Research II²⁾

「疾患」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 小幡 文弥(北里大学)

P-22 フィブリノゲンアルファー遺伝子多型は慢性血栓栓性肺高血圧症と関連する

○陳 智勇^{1,2)}, 小南聡志³⁾, 田邊信宏³⁾, 中島敏晶^{1,4)}, 巽浩一郎³⁾,
栗山喬之³⁾, 木村彰方^{1,4)}

1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野

2) 同・大学院医歯学総合研究科血管応用外科学

3) 千葉大学大学院医学研究院加齢呼吸器病態制御学

4) 同・大学院疾患生命科学部ゲノム多様性

P-23 HLA-DR15 はアルツハイマー病早期発症のリスクファクターか

○酒巻建夫¹⁾, 大西民子¹⁾, 岡村康子¹⁾, 高橋千尋¹⁾, 飯田好江²⁾, 吉山容正³⁾

1) 国立病院機構千葉東病院研究検査科 HLA 検査室

2) がんセンター東病院臨床検査部

3) 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター神経内科

P-24 原爆被爆生存者における HLA 遺伝子型頻度分

○長村浩子, 森下ゆかり, 林 奉権

放射線影響研究所(放影研)放射線生物学 / 分子疫学

P-25 腸型胃癌とびまん性胃癌のリスクと *IL-10* ハプロタイプとの関係およびそれに対する放射線被曝の影響

○林 奉権, 森下ゆかり, 長村浩子

放射線影響研究所(放影研)放射線生物学 / 分子疫学部

P-26 Polymorphisms of HLA Genes in Western Indonesian: Close affinities to Southern Groups of East Asian

○Rika Yuliwulandari^{1,2)}, Koichi Kashiwase³⁾, Humiaki Nakajima³⁾,
Jurnalis Uddin²⁾, Tri Panjiasih Susmiarsih²⁾,
Abdul Salam Mudzakir Sofro²⁾, Katsushi Tokunaga¹⁾

- 1) Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine,
University of Tokyo
- 2) Faculty of Medicine, Yarsi University, Jakarta-Indonesia
- 3) Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center, Tokyo, Japan

P-27 タイ集団における HLA-A, B, C アリルとマラリア重症化との関連

○平安恒幸^{1,2,3)}, 大橋 順¹⁾, 柏瀬貢一³⁾, 市原孝浩³⁾, 峯元睦子³⁾,
ハナナンタチャイ ハッタイラ⁴⁾, 小川篤子³⁾, 高梨美乃子³⁾, 徳永勝士¹⁾,
パタラポティクル ジンタナ⁴⁾, 屋部登志雄³⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学
- 2) 日本学術振興会特別研究員
- 3) 東京都赤十字血液センター
- 4) マヒドン大学熱帯医学研究所

P-28 Vietnam の Kinh 民族集団に見いだされた新しい DRB1 アリルの解析

○安波道郎¹⁾, Nguyen T. P. Lan¹⁾, 菊池三穂子¹⁾, Vu T. Q. Huong²⁾,
Vu T. T. Ngu²⁾, Hoang N. Dao²⁾, Do Q. Ha²⁾, Tran T. Thuy³⁾,
Ha M. Tuan³⁾, Vo V. Tuong⁴⁾, Cao T. P. Nga⁴⁾, Tran V. Dat⁴⁾,
奥田尚子¹⁾, 堀江仁美¹⁾, 森田公一¹⁾, 平山謙二¹⁾

- 1) 長崎大学・熱帯医学研究所
- 2) スツール研究所(ホーチミン市)
- 3) ホーチミン市第2小児病院
- 4) ヴィンロン県予防医療センター

P-29 Luminex 法により検出された新しい HLA-C 座 (Cw*0102V1) アリルについて

○荒木延夫¹⁾, 西村千恵¹⁾, 稲葉洋行¹⁾, 南 裕史¹⁾, 井本しおん¹⁾,
馬淵 理¹⁾, 市原孝浩²⁾, 田中秀則²⁾

- 1) 兵庫県赤十字血液センター
- 2) 東京都赤十字血液センター

「動物 MHC」

9月21日(日)15:10~16:30

座長 安藤 麻子(東海大学)

P-30 SLA ハプロタイプ固定近交系デュロックブタにおける抗体産生

○安藤麻子¹⁾, 今枝紀明²⁾, 吉岡 豪²⁾, 岡本宏明³⁾, 田中穂積⁴⁾, 河田寿子⁵⁾,
重成敦子¹⁾, 小林英司⁶⁾, 猪子英俊¹⁾, 北川 均⁷⁾

- 1) 東海大・医
- 2) 岐阜県畜産研・養豚研究部
- 3) 自治医大・医
- 4) 自治医大実験医学セ
- 5) 東海大伊勢原研究推進部・教育・研究支援セ
- 6) 自治医大分子病態治療研究セ
- 7) 岐阜大応用生物科学

P-31 ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA)-DQA1 遺伝子の特徴

○竹嶋伸之輔, 陳 晶, 間 陽子
理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット

P-32 ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA)-DRB3 の新 PCR-SBT 法の開発

○間 陽子, 松本有生, 竹嶋伸之輔, 佐藤正明
理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット

P-33 ヘテロ接合による乳房炎発症抑制効果および疾患感受性アレルの同定

○竹嶋伸之輔¹⁾, 松本有生¹⁾, 陳 晶¹⁾, 吉田達行²⁾, 向山明孝²⁾, 間 陽子¹⁾
1) 理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット
2) 日本獣医生命科学大学

抄 録 集

**特別講演
招待講演**

SL-1

iPS 細胞の展望と課題

山中 伸弥

京都大学 iPS 細胞研究センター・センター長

胚性幹細胞 (ES) 細胞はすべての細胞へと分化できる多能性を維持したまま、無限に増殖できる。ヒト ES 細胞は、脊髄損傷、心筋梗塞、I 型糖尿病、筋ジストロフィーなどの疾患に対する細胞移植治療の資源として期待されているが、倫理的課題や免疫拒絶がある。私達は、体細胞から ES 細胞に類似した多能性を持ち、細胞移植治療や、病態解明、有効で安全な薬物の探索に真に応用できる細胞を創出することを目標に研究を行っている。

まず、私たちは、多能性誘導因子の多くは多能性維持因子であると考え、その探索を行ったところ、ES 細胞における多能性の長期維持には、ES 細胞特異的転写因子に加えて、複数の癌関連遺伝子が関与していることを明らかにした。次に、ES 細胞で特異的に発現する遺伝子に薬剤耐性遺伝子をノックインしたマウスを作成し、その胎児由来繊維芽細胞に多能性誘導因子候補をレトロウイルスベクターで導入する実験系を構築した。すなわち、因子導入により繊維芽細胞の核が初期化され、ES 細胞に類似する多能性が獲得された細胞のみ薬剤耐性を獲得する。様々な組み合わせで因子導入実験を行ったところ、Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf-4 の組み合わせの 4 因子導入により、耐性コロニーを得ることができた。コロニーから樹立した細胞は、形態と増殖能において ES 細胞に類似し、Oct3/4 や、Nanog などの ES 細胞マーカーの発現や、ヌードマウス移植実験での三胚葉系組織を含むテラトーマの形成を認めた。このように誘導した細胞を人工多能性幹 (iPS; induced pluripotent stem) 細胞と命名した。iPS 細胞は、成体マウス皮膚に由来する繊維芽細胞からも誘導でき、また、Nanog 遺伝子を指標として樹立した iPS 細胞の Germline transmission, すなわち、成体キメラマウスを経て全身が iPS 細胞に由来するマウスを生むこともできた。さらには、レトロウイルスによる 4 因子導入の方法を工夫することで、ヒト成人皮膚由来の繊維芽細胞からも iPS 細胞を得ることができた。

しかし、これまでの実験で c-Myc 導入に起因するものと考えられる、腫瘍形成がキメラマウスで認められた。将来の臨床応用を鑑みたとき、腫瘍形成は大きな課題となるため、誘導プロトコルを再検討することで、c-Myc レトロウイルスベクターを用いずに、iPS 細胞を樹立することに成功した。新プロトコルにより樹立した iPS 細胞に由来するキメラマウスは、一定期間の観察下では腫瘍形成は認められなかった。また、この方法でヒト繊維芽細胞からも iPS 細胞を誘導することができた。さらに、iPS 細胞の由来や成立の機序を明らかにし、安全性を高めるために、マウス肝臓および胃の細胞から iPS 細胞を誘導した。その結果、iPS 細胞は真に体細胞に由来すること、また、染色体の特定位置への因子導入は不要であることを明らかにした。

SL-2

MIC genes: from bench to bedside.

Seiamak Bahram

Strasbourg University School of Medicine and Teaching Hospitals, Strasbourg, France.

The Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I) chain-related *MIC* gene family defines a distinct lineage of MHC-Is, with seven members (*MICA-G*) interspersed within the 1.8 Mb HLA class I region on human chromosome 6p21.3. Among these, *MICA* and *MICB* encode stress-induced, highly polymorphic, single-chain (beta2microglobulin-independent), membrane-bound glycoproteins which interact with the activatory NKG2D receptor. The latter is widely expressed on NK cells as well as gamma/delta and CD8⁺ alpha/beta T lymphocytes. An early discovery within the field was the recognition of an unusually high number of alleles for both *MICA* and *MICB*. To date over 60 *MICA* and 30 *MICB* alleles have been documented. In conjunction with the identification of anti-MIC antibodies, these data therefore formally define MIC as alloantigens. Both this polymorphism and the existence of anti-MIC antibodies are about to emerge as having a direct role in graft rejection, independently of HLA molecules. This lecture will bring an up-to-date view of MIC genes and molecules stressing the current view of their pathophysiology in human organ transplantation, a prelude to potential diagnostic, prognostic as well as therapeutic value of their assessment in a clinical setting.

**教育講演
シンポジウム**

EL1-1

HLA-DNA タイピングから個人の全ゲノム情報解読の時代へ

安波 道郎

長崎大学・熱帯医学研究所

HLA の型は HLA 分子のアミノ酸の並びによって規定されており，アミノ酸配列はその遺伝子の塩基配列によって決定付けられていることから，個人の HLA 遺伝子 DNA の多様性を明らかにすることで HLA の型を知ることができる。本セミナーでは，HLA の型決定に用いられる代表的なゲノム DNA 多様性の検出法の原理とその特徴を概説し，さらに個人の全ゲノム情報を解読することをも可能とする新世代の塩基配列解析技術について紹介する。

EL1-2

HLA 抗体検出テクニックについて

中島 文明

日赤中央血液研究所・研究開発部

HLA 抗体を捕まえる職務に就く技術者の多くは、如何にして納得した結果を得るか、日々努力していることと思われる。ところが、抗体の検出は非常につかみどころが難しく、特に HLA 分野ではそれが顕著である。HLA 抗原の型であれば、遺伝子を調べ確実な結果を得ることが可能である。しかし、HLA 抗体では様々な方法が混在し、検出感度が高ければ高いほど新たな抗体特異性を拾ってくる。その中には、本来の HLA 分子の免疫刺激と関係ない自己抗体や何らかのクロス反応様の物質も多く含まれる。また、最初に検出した抗体は、新たな感作によって容易に変化する。我々が考える、納得した結果とはどこに目標を置けばいいのだろうか。

HLA タイピングは結果が事実であり、HLA 抗体検出は方法に事実があるという考え方がある。前述のように抗体検出方法は多様で、方法によって結果に差が生じる。これは、根本的に同一の結果であるが、各方法の検出感度と方法論の違いによって結果の表現が異なるという意味である。したがって、同一方法であれば誰が行なっても同一の結果になるというところに、まず目標を設定すべきと考える。現状は、本学会の HLA 抗体 QC ワークショップの結果でも判るように、同一検体・同一方法でも施設によって結果に相違が認められる。そこに求めるテクニックとはどういうことかを考えたい。表題の「HLA 抗体の検出テクニック」には、二つのことが求められる。一つは文字通り操作上のテクニック、もう一つは結果を解釈するための知識と応用力である。

操作上のテクニックでは、試薬、検体、操作器具、操作条件、測定機器、検査記録、作業担当者などを適正に管理するといった、各施設における管理基準が満たされていることが、大前提である。その中から、扱う検体がヒト血清であることと、現在主流の市販試薬の間にある問題点を取り上げたい。

一方、知識と応用力については、HLA システムの特殊性およびエピトープ(抗原決定基)からみた抗体特異性について述べる。HLA 抗原分子には HLA 抗体が反応する部位が複数存在し、一つの HLA 抗原は複数のエピトープの集合体でもある。また、産生される HLA 抗体も多くは複数の特異性を有する。これ以外に自己抗体や何らかのクロス反応も含まれ、極めて複雑な状況にある。我々がこれまでに検証したデータに基づき、普段検出している HLA 抗体がどのようなものであるか示す。そして、これらの情報をいかに正確かつわかり易く伝えられるかがポイントである。

以上、HLA 抗体を検出するには、単に操作テクニックが優れているだけでは不十分で、その結果を解釈して伝えるためのテクニック、すなわち、HLA システムを理解しどのような特性を示すか考える能力も重要であることを、本講習を通じて認識されることを願う。

EL1-3

腎移植とクロスマッチ・HLA 抗体検査：臨床側からの要望

小林 孝彰

名古屋大学医学部・免疫機能制御学

免疫抑制療法の進歩により腎移植の成績は向上した。夫婦間のように HLA 抗原適合性の低い移植も良好な成績を示し、HLA 適合度の意義は以前ほど重要ではなくなった。しかし、ELISA, flow cytometry を利用した高感度の検査法が開発され、従来では検出できなかった微量の HLA 抗体が検出されるようになり、移植前、移植後の HLA 抗体検出の重要性が明らかになった。このように、新しい高精度検査方法の開発、改良により、移植領域における HLA や免疫反応に関する検査の役割は増大している。より安全かつ効果的な移植医療を提供できるように、臓器移植実施施設においては、移植医側と (HLA) 検査室側との密接な連携が必要とされている。

本講演では、クロスマッチ検査・HLA 抗体検査が、下記の臨床腎移植の現場においてどのように利用され、必要とされているか解説する。正確な抗体検査がいかに重要であるか理解していただければ幸いである。

(1) 生体腎移植術前検査：移植前には、クロスマッチ検査によりレシピエント血清中にドナーリンパ球に反応する抗体の有無をチェックしなければならない。また、HLA 抗体かどうか、ドナー特異的抗体であるかどうか、高感度で正確な判定を行い、移植適応の判定や免疫抑制療法の選択に役立っている。

(2) 献腎移植検査：生体腎移植と異なり、献腎ドナー発生時は、緊急でクロスマッチ検査を行う必要がある。ドナーの細胞状態が不良である場合も多い状況下で、正確な判定を行わなければならない。また、移植希望患者登録時には血清を保存するが、必須ではなくなったが PRA 検査は、有用な情報を提供するかもしれない。

(3) 腎移植後の follow up 検査：新規の HLA 抗体産生と慢性拒絶反応との関連が報告されている。対象患者、検査頻度、選択する検査方法、ドナー特性的抗体検出の必要性については、まだ一定の見解が得られていないが、移植後の抗体検査の有用性は明らかになっている。

検査設備(機器)、予算、人員など、現状では多くの問題が存在するが、移植医療をサポートする理想的な(現実的な)検査体制の構築が望まれる。移植医主導型でも検査室主導型でもなく、また検査の依頼と結果報告という一方的な関係ではなく、お互いに意見を交換し、情報を共有することが大切である。

EL2

臓器移植における既存抗体および新規抗体産生：その診断・治療に対する臨床的意義

小林 孝彰

名古屋大学医学部・免疫機能制御学

免疫抑制療法の進歩により、細胞性拒絶反応の頻度は減少し、抗体関連型拒絶反応の克服に関心が集まっている。一つは、ドナーに対する既存抗体の存在する移植(クロスマッチ陽性移植, ABO血液型不適合移植)である。ドナー不足を解決する手段として、従来は禁忌であった移植を執行する試みである。移植適応の判断と免疫抑制療法(処置)の選択が課題となる。もう一つは、移植後維持期における慢性拒絶反応の早期診断と治療である。新規 HLA 抗体産生と移植予後との関連が報告されており、とくに腎移植においては、血清 Cr が上昇する前に診断し、治療(免疫抑制の強化)に結びつけることが期待されている。

このような対策が可能となった背景には、ELISA, flow cytometry, luminex などを用いた高感度、高精度の抗体検査の開発がある。従来では検出できなかったレベルの抗体の検出が可能となっている。さらに、抗体が反応する HLA の特異性まで同定でき、ドナー特異的抗体 (DSA: Donor Specific Antibody) の有無の判別に役立っている。

(1) 生体移植前の抗体検査 (HLA 抗体・クロスマッチ検査結果の解釈と移植適応, 処置の選択), (2) 死体移植システム(事前 PRA の必要性, ドナー発生時の検査体制: クロスマッチ検査の精度), (3) 移植後 follow up 検査(対象患者, 頻度, 検査方法, DSA 判定)において現状及び課題を明らかにし, 次の臓器別シンポジウムでの議論の参考にしていただければ幸いである。

また, 現実問題として, 限られた費用, 人員, 設備での検査には限界がある。これらの検査が保険適応にないことも普及の障壁となっている。費用対効果を考慮し, 効率的な検査を行うにはどうしたらよいか考える必要があろう。移植医療の発展のために, 学会, ネットワーク, 厚労省などの積極的な関与とバックアップを期待したい。

EL3-1

HLA 抗原：LCT から SBT へ

中島 文明

日本赤十字社中央血液研究所・研究開発部

我々の、いわゆる現場の仕事は HLA タイピング、HLA 抗体検出あるいは組織適合性検査が主な内容である。その中で、HLA 抗原に軸を置いて話しを進める。

現在のように DNA タイピングが普及する以前の HLA タイピングは、血清学的検査法である LCT (lymphocyte cytotoxicity test: リンパ球細胞傷害試験)か、細胞学的検査法である MLC (mixed lymphocyte culture: 混合リンパ球培養試験)が主流であった。LCT で検出すると SD 抗原, MLC で検出すると LD 抗原などと総称されていた。また、新たな抗原を証明するため等電点電気泳動の手法も行なわれていた。

中でも、LCT 法は微量検体と簡便な操作性により、国際的に普及していった。LCT でのタイピングには良質な抗血清が不可欠で、各施設で得た抗血清の反応パターンについて国際的に整合性を保つため、国際 HLA ワークショップで討議が重ねられ、現在の HLA 抗原システムの基礎が構築された。LCT の操作は常に改良が重ねられ、免疫磁気ビーズ、蛍光二重染色、自動測定装置、コンピュータ判定等、非常に高水準な域に達していた。この当時のタイピング報告は、当然ながら 2 桁の HLA 抗原名であった。しかも、A9 や Bw52 のように、ブロード型か「w」が付いた表記であった。

一方、1990 年代以降、DNA タイピングが徐々に浸透していった。特に PCR 法の普及は、DNA タイピングを一気に加速させた。当初は研究的に SSP, RFLP, SSO, SSCP など様々な方法が行なわれていたが、次第に市販試薬が充実するようになり、特に Luminex システムを用いた蛍光ビーズ法は解像度とスループットの高さで主流となった。同時に究極のタイピングである直接塩基配列決定法 (SBT) が、キャピラリーシーケンサーと BigDye Terminator の登場でより身近なものとなった。新規アレルの登録増加は SBT 普及によるところが大きい。DNA タイピングの解像度が低い時代は、遺伝子型に対応する 2 桁抗原型で報告することが多かったが、現在では解像度が十分なレベルに達し、4 桁以上の遺伝子型と 2 桁の対応抗原型の併記が通常である。その後、解像度の高度化と相乗して新規アレルの増加が爆発的に進み、このことによる弊害が浮上してきた。いわゆる ambiguity の問題、null allele や遺伝子欠失の存在、命名システムの満杯化等である。現在、我々はこれらの問題と日々戦っているともいえる。

本セミナーでは、その当時のデータを示しながら、現在への変遷をたどり臨床にどのようにフィードバックされてきたか紹介する。

EL3-2

HLA 抗体：LCT からエピトープへ

田中 秀則

日本赤十字社中央血液研究所・中央骨髄データセンター

HLA 抗体の発見は、フランスのドセイが頻回輸血患者の血清中に白血球凝集素を見出したことに始まり、これらの凝集素性を多くの白血球と反応させることにより、異なる反応性を示す凝集素 (HLA 抗体) が確認された。その後、1964 年ポール・テラサキによってリンパ球細胞傷害試験 (LCT 法: lymphocyte cytotoxicity test) が確立され、少量 (1 μ L) の抗血清による抗体検査が可能となった。このことは、国際組織適合性ワークショップにおいて、同一血清での特異性解析を可能とし、このことは同時に HLA 抗原解析を可能にした。

臨床的に LCT 法は、微量検体で簡便な操作で行えることもあり、臓器移植および血小板輸血における HLA 抗体検査および交差適合性試験に幅広く用いられて来た。しかし、一部の症例で、LCT 法による抗体検出感度が不十分であることから、拒絶反応または血小板輸血不応となる場合もあり、交差適合性試験に高感度な検査法 (LIFT 等) を用いる場合も少なくなかった。

一方、HLA 抗原を規定している遺伝子の解析が進み、主要組織適合性複合体 (MHC) のクラス I 領域に HLA-A, B, C 抗原を、クラス II 領域に HLA-DR, DQ 抗原を規定する遺伝子座が確認された。また、1987 年 PCR (Polymerase Chain Reaction) による遺伝子増幅法が開発され、HLA 対立遺伝子の塩基配列の解析が進み、同時に対応する HLA 抗原のアミノ酸配列も明確になり、これまで得られた HLA 抗体の反応性について、分子レベルの抗体反応 (エピトープレベル) を解析することが可能となった。

近年、HLA 抗体検査は、EBV トランスフォームセルラインから抽出した精製 HLA 抗原を用いた検査法が開発され、LCT 法より高感度 HLA 抗体を検出することが可能になった。更に、遺伝子組み換え操作により作製した単一の HLA 抗原を用いた検査法も開発され、各精製 HLA 抗原に対する反応性から HLA 抗体のエピトープの解析が可能となった。

本セミナーでは、HLA 抗体検査法の変遷について紹介し、各検査法での HLA 抗体検査結果の違いと、臨床における必要性について紹介する。

S1-1

腎移植：FCXM と拒絶診断・治療法

杉谷 篤, 岡部 安博, 北田 秀久, 土井 篤, 錦 建宏, 西岡 泰信, 宮本 京子

藤田保健衛生大学臓器移植再生医学

九州大学腎疾患治療部, 臨床・腫瘍外科, 遺伝子・細胞療法部

免疫抑制剤の進歩によって腎移植の術後成績は飛躍的に向上したが、我々は抗体関連型拒絶の診断と治療方針決定に、ベッドサイド所見, 検査所見, 腎生検所見とともに Flowcyte PRA や Flowcyte Crossmatch (FCXM) を重用している。

献腎移植の登録に必須となる HLA typing は、血清学的方法から DNA typing となって精度が向上した。レシピエント選定を行うときには、地域によって LCT 法に相違があり、精度が高い FCXM の結果も考慮した最終判断や移植後抗体価の変動測定は各移植施設に委ねられている。生体腎移植を行うときには、ドナーとレシピエントの HLA typing, DCM, FCXM の方法や考え方は完全に移植施設の裁量に依存している。抗体拒絶の診断には、臨床経過に加えて① Flow-PRA あるいは FCXM による抗ドナー HLA 抗体の検出, ② 病理所見による C4donPTC 沈着の証明が必要で、Chronic allograft nephropathy と総括された中にも、非常に軽微な抗体拒絶が慢性的に持続していることも示唆されている。

本講演では4つの典型例を紹介し、その意義を提示する。1) 生体腎移植後、早期に抗体関連型拒絶を繰り返し機能廃絶となった43歳女性。SLE から慢性腎不全となり実母をドナーとする生体腎移植を受けたが、術後数日で尿量減少、血清 Cr 上昇を認めた。血漿交換, IVIG 療法で軽快したが、その後拒絶を繰り返し、3.5年後に透析再導入となった。HLA typing は 1 haplo 3Ag match, LCT は T, Bcell ともに陰性であったが、Tcell FCXM は術前から陽性、FlowPRA は術前 ClassI 陽性、術後は ClassI, II ともに陽性となっていた。2) 生体腎移植3年後に、抗体産生により拒絶を起こした53歳男性。妻から生体腎移植を受け、移植直後の経過は良好であったが、2年目頃から服薬が不十分であった。血清 Cr 3.8 mg/dl と上昇し、FlowPRA は ClassII が陽性で NDSA となっていた。3) 二次、献腎移植で術前 FlowPRA 陽性であった51歳女性。FlowPRA 陽性は持続し、血小板減少性の抗体関連型拒絶を併発したので、血漿交換, リツキサン投与, 緊急脾摘で改善した。依然として NDSA は残存している。4) 二次、献腎移植で High-risk と考え、術前に血漿交換とリツキサン投与を行った47歳男性。尿量は少ないが、腎生検では拒絶はなく軽度の抗体産生が見られる。Flowcyte を用いた検査は非常に有用であるが、コストが高い、検査方法が異なる、状況により変化していることに注意して、他の所見と共に治療方針を決定することが大切である。

S1-2

肝移植における alloantibody の臨床的意義

江川 裕人, 宮川 文, 上本 伸二

京都大学臓器移植医療部

alloantibody の臨床的意義は腎移植・心移植では一定した認識が確立され治療にも反映されている。しかし、肝移植においては様々な報告がなされ未だ定説はない。抗体検出法の議論は他演者に譲り、当科の経験した alloantibody 陽性症例を術前クロスマッチ陽性と術後陽性それぞれに検討し考察する。

術前クロスマッチ陽性 血液型不適合移植研究会の 2007 年調査では、術前クロスマッチ陽性経験施設がまれであり、ほとんどの施設で何らかの対策が必要としているものの腎臓移植のような具体的なプロトコールは示されていない。抗体の定量的評価も血液型抗体のように標準化されていないこともプロトコール化が困難な原因であると考えられた。当科では 2008 年 4 月までに CDC 法による術前クロスマッチ陽性症例を 21 例経験している。そのなかで血液型一致・適合症例 14 例の臨床経過の検証では成人女性において有意な生存率低下が認められた。また同じく血液型一致・適合症例 15 例の組織学的検証において C4d の門脈領域の間質と内皮における沈着が液性拒絶や死亡に強く関わっていることが示唆された。講演では興味深い症例の臨床経過と病理組織を呈示する。

術後陽性 フローサイトメトリーによる検討では、急性拒絶反応の際に高頻度でクロスマッチ陽性になることが示され、ACR における液性拒絶の関与が示唆された。また、初期の小児における検討で、術前 CDC 陰性で術後 CDC 陽性に転じた 3 例は慢性胆管炎 (1 例)あるいは胆管消失 (2 例)を認め死亡した。

結語 alloantibody の定量評価に基づいた戦略を確立することが必要であると考えられた。

S1-3

心移植：既存抗体，産生抗体のモニタリングと移植後の管理

中谷 武嗣¹⁾，加藤 倫子¹⁾，築瀬 正伸¹⁾，山本 賢²⁾，瀬口 周²⁾，船津 俊宏³⁾，小林 順二郎³⁾，
植田 初江⁴⁾，佐田 正晴⁵⁾

国立循環器病センター 臓器移植部¹⁾，臨床検査部²⁾，心臓血管外科³⁾，病理⁴⁾，再生医療部⁵⁾

【はじめに】 心臓移植では，細胞性拒絶反応とともに抗体関連型拒絶反応 (antibody mediated rejection; AMR) に配慮した管理が重要で，心臓移植前に HLA 抗体を有し %PRA が高値を示す症例は AMR ハイリスク群である。わが国では心臓移植待機期間が長いいため左心補助人工心臓 (LVAS) 装着にて待機する例が多く，LVAS 装着による輸血施行に伴う同種抗原感作機会が多く HLA 抗体保有の危険性が高い。また，心臓移植実施時期の予測が難しく移植前の脱感作療法も困難である。このため既存抗体や産生抗体の推移や特異性を把握することは移植後管理に必須である。当センターでは第 1 例目から既存抗体，産生抗体のモニタリングを行い，移植後管理を行ってきたので，その経験を報告する。

【対象・方法】 当センターでの心臓移植施行例は 22 例 (男 17 例，女 5 例) で，免疫抑制療法は，シクロスポリンまたはタクロリムス，ミコフェノール酸モフェチル，プレドニンの 3 剤併用療法を用いた。HLA 抗体スクリーニング検査は Flow PRA I & II Screening Test (One Lambda) を，HLA 抗体特異性検査は Flow PRA Class I Single Antigen (One Lambda) を用いた。また，移植直前および移植後の donor specific antibody (DSA) を検討した。分析機器は FACS Calibur を，測定解析ソフトは Cell Quest を使用した。心筋生検は国際心肺移植学会の診断基準に従った。

【結果】 移植時平均年齢 40 ± 12 歳，平均待機期間は 867 ± 714 日であった 19 例は LVAS 装着例で，平均装着期間 705 ± 387 日，最長 1444 日であった。1 例が 4 年 2 ヶ月後に感染症により死亡したが，他の 21 例は生存し最長 9 年で外来フォロー中である (95.5%)。HLA 抗体保有例は 11 例 (移植前：5 例，移植後産生：6 例)，抗体陰性例が 11 例であった。2007 年 12 月まで延べ 340 回の心筋生検が実施されたが，治療を要する細胞性拒絶反応が 2.7% に認められ，全例ステロイドパルス療法にて軽快した。なお HLA 抗体保有との関連性は認めなかった。血行動態変化を伴う液性拒絶反応は認めなかった。しかし，移植前 HLA 抗体保有 1 例において免疫組織学的染色にて C4d の沈着を認め，AMR が疑われたが血漿交換および g グロブリン大量療法により C4d の沈着は陰性化した。移植後慢性期合併症としては移植後冠動脈病変が最も多く 36% に認められ，HLA 抗体陽性群 4 例 (移植前保有 1 例，移植後産生 3 例)，陰性群 4 例であった。

【考察・結語】 心臓移植において AMR を回避抑制することは重要で，HLA 抗体保有例への対応策を確立しておくことが必要である。このため Flow PRA により既存抗体の存在や特異性を把握することは，AMR の早期診断を行うための心筋生検施行や脱感作療法の治療効果判定において重要な情報を提供しえる。また，これまでの心臓移植施行例では最長 9 年で生存率 95.5% と予後良好である。しかし，慢性期合併症として移植後冠動脈病変が高頻度に生じており，今後，HLA 抗体と冠動脈病変との関連について経過観察を要する。

S2-1

クラウン系ミニブタの SLA 遺伝子解析と固定化：その意義と有用性

新村 由佳里

株式会社ジャパンファーム 品質保証部

SLA (Swine Leukocyte Antigen) は、ブタの主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC: Major Histocompatibility Complex) であり、外来抗原や移植片の自己-非自己の認識に代表される免疫応答に関与する重要な遺伝子群として知られている。(株)ジャパンファームクラウン研究所では、各種移植試験、薬理・薬効試験などの遺伝的バックグラウンドデータとして、2003年より種豚を中心にクラウン系ミニブタの SLA 解析を PCR-SSP 法・PCR-RFLP 法を用いて実施している。解析座位は、classI 領域 3 座位 (SLA-1, 2, 3) と classII 領域 2 座位 (DRB1, DQB1) の 5 座位で、現在までに 4 系統 (hp-16.16 (旧名称 c1)・hp-17.17 (旧名称 c2)・hp-16.17 (旧名称 c3)・hp-17.16 (旧名称 c4)) のハプロタイプが確認されている。hp-16.16 及び hp-17.17 タイプは、ホモ接合体で多く確認されている 2 系統であり、それぞれのハプロタイプをホモに持つ個体の系統造成・維持を行っている。hp-16.17 及び hp-17.16 タイプは、hp-16.16 及び hp-17.17 タイプの classI 領域間と classII 領域間の交差ハプロタイプであり、これらを保持する個体は、ヘテロ接合体のみであり、遺伝する頻度も少ないことから系統造成までには至っていない。2004年1月より、hp-16.16 及び hp-17.17 タイプの系統造成を開始し、2004年1月～2008年5月までに、hp-16.16 タイプを 392 頭、hp-17.17 タイプを 391 頭生産した。そのうち、hp-16.16 及び hp-17.17 タイプの供給実績はそれぞれ hp-16.16 タイプが 165 頭、hp-17.17 タイプが 155 頭である。2010年には年間でクラウン系ミニブタを 1200 頭供給し、そのうち hp-16.16 タイプは 100 頭、hp-17.17 タイプは 100 頭、計 200 頭の供給を見込んでおり、その後も供給頭数は増加させる計画である。

SLA タイピングされたクラウン系ミニブタは、遺伝的背景が明確な方法にて解析された世界で唯一の実験用大動物として、その利用範囲の拡大が期待され、免疫応答機構の解析、臓器移植のシミュレーションをはじめ様々な研究に応用されている。また、2007年より SPF (Specific Pathogen Free) 化されたミニブタの生産も開始し、同種・異種移植研究のみならず再生医療領域への拡大も期待されている。

S2-2

ミニブタを用いた前臨床臓器移植実験：同種移植から異種移植へ

山田 和彦

鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター(異種移植外科分野)

演者である山田は、米国ハーバード大において外科准教授並びに Transplantation Biology Research Center での大動物免疫寛容プロジェクトおよび異種腎移植プロジェクトリーダーとして、MHC 確立ミニブタを用いた大動物同種移植免疫寛容実験系に加え、異種抗原 Gal をノックアウトした GalKO ブタをドナーとしたブタ・ヒヒ間異種移植を世界で最も多く経験し、世界最長の異種移植腎正常機能日数を 2005 年に報告している (Nature Med 2005)。日本における異種移植センター確立のための第一ステップとして、日本における大動物移植実験の Translational research 拠点形成を目指し、平成 18 年 4 月から鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センターにおいて異種移植外科分野としての活動を開始した。当分野は大動物を用いた同種・異種移植免疫反応メカニズムの解明および異種臓器移植の臨床応用を最たる目的としている。既に国産 MHC 確立クラウン系ミニブタを用いた同種移植実験系(腎臓, 肺, 膵島)を確立し、拒絶病変発症機序の解明及び病変制御に関する研究を進めている。また異種移植実験系の一つとして、既に演者が有する米国での実験で信頼性が確立している GalKO ブタ細胞核に、更に拒絶反応制御に寄与すると考えられる遺伝子を導入することによって、当分野独自の発展型 GalKO ブタの開発を進めている。本講演では現在進行中の実験系から、MHC 確立ミニブタを用いた同種移植実験として、1) HGF による同種腎移植拒絶反応の制御、2) 虚血再灌流障害の軽減、3) 膵島腎として移植する vascularized islets に関する研究成果、及び異種移植実験として、4) 演者独自の免疫寛容誘導戦略である胸線移植を用いた GalKO ブタ・ヒヒ間異種移植の最新データを紹介する。

S2-3

胎児付属物由来間葉系幹細胞：自己再生医療から同種再生医療への展開

池田 智明¹⁾, 石兼 真²⁾, 原田 和彦²⁾, 山原 研一²⁾, 佐田 正晴²⁾国立循環器病センター周産期科¹⁾, 再生医療部²⁾

近年、骨髄などに存在する幹細胞を用いた組織再生療法が注目されており、間葉系幹細胞 (MSC) も細胞ソースの一つとして国内外で心筋血管などの再生を目的として臨床研究が盛んに行われている。しかし、骨髄採取にともなう侵襲性や、得られる細胞数が非常に少ない等の問題点も有している。また、患者年齢や疾患によっては自己細胞移植が困難な場合がある。

そこで我々は、骨髄由来 MSC が有する問題点を克服すべく、新たな移植細胞ソースとして、通常は分娩後に廃棄されている胎児付属物である卵膜に着目した。卵膜は豊富に MSC を含んでいることが報告されており、我々の研究においても一人分のヒト卵膜から、約 6 千人分の移植に必要な細胞数を得ることに成功している。非侵襲的に細胞を得ることができることは卵膜由来 MSC を用いる際の非常に有利な点である。また、一度の採取で大量の細胞が得られるため細胞数の不足といった心配もない。しかし、大きな問題点として、卵膜由来 MSC を細胞移植に用いる場合、自己移植ではなく同種移植が想定されるため、拒絶反応による治療効果の減弱があげられるが、骨髄由来 MSC は免疫抑制効果を有しており、同種移植において拒絶反応を回避し治療効果を示したという報告もされている。そこで我々は、ラット卵膜由来 MSC を用いて下肢虚血モデルラットに対する同種細胞移植による血流改善効果について検討を行い、卵膜由来 MSC は骨髄由来 MSC に匹敵する治療効果を有することを報告した。また、卵膜由来 MSC は下肢筋肉への同種移植において細胞の生着が確認され、リンパ球混合試験ではリンパ球の増殖を誘導しないことが明らかとなった。これらの結果より、卵膜由来 MSC は同種移植において有用な細胞ソースであることが示唆されているが、ラットを用いた実験では拒絶反応や安全性を評価するには不十分である。

そこで、クラウン系ミニブタを用いた卵膜由来 MSC の安全性、ならびに心血管障害に対する治療効果の検討を行うこととした。妊娠ミニブタより卵膜を採取し、羊膜から細胞を分離・培養した。得られた細胞は脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞への多分化能を有しており、細胞表面マーカーは骨髄由来 MSC と同様であった。また、MHC クラス II が発現していないことより、T 細胞による免疫反応を回避する可能性が示唆されている。現在、リンパ球混合試験による評価、心筋梗塞モデルを用いた同種細胞移植による治療効果ならびに安全性の評価を行っている。

本講演では、卵膜由来 MSC を用いた研究結果について紹介するとともに、今後の臨床応用へ向けた将来展望について考察したいと考えている。

S3-1

造血幹細胞移植と免疫寛容

豊嶋 崇徳

九州大学病院遺伝子・細胞療法部

同種造血幹細胞移植は、免疫系そのものも移植されるにもかかわらず免疫抑制を中止できる症例がまれではなく、臓器移植との大きな違いの一つである。このような例の多くは HLA 適合移植例であるが、最近では HLA 不適合にもかかわらず、臍帯血移植や T 細胞除去骨髄あるいは末梢血幹細胞移植例で免疫寛容が成立したと考えられる症例がみられるようになった。寛容の成立していない患者では慢性 GVHD を発症する。かつて急性 GVHD による組織破壊に対する線維化・萎縮によって慢性 GVHD が発症すると考えられていたが、最近では免疫異常によっておこる病態であると考えられるようになった。慢性 GVHD では自己抗体が検出される例もあり、病像も膠原病に類似する。すなわち、あたかも個体発生の過程において自己に対する寛容が成立するように、造血幹細胞移植後の免疫系が正しく再構築されることが寛容成立に重要な役目を果たすのではないかと考えられる。免疫再構築を阻害する原因として、加齢、急性 GVHD、免疫抑制剤の投与が考えられる。本講演では最近明らかになってきた知見からこのような問題点について考えてみたい。

S3-2

造血幹細胞移植における HLA 適合性

一戸 辰夫

京都大学医学部附属病院 血液・腫瘍内科

近代的な同種造血幹細胞移植の確立の歴史は、移植抗原としての HLA の意義が解明されていく歴史でもあったことはよく知られている。1960 年代後半に「HLA の適合性」をはじめて明確に意識した骨髄移植の成功が確認されて以来、この 40 年間に於ける HLA タイピング技術の向上に支えられ、造血幹細胞移植における HLA の役割はますます重要なものと認識されるに至っている。非血縁者間骨髄移植においては、HLA-C を含めた HLA クラス I 分子のアリル型レベルでの適合性が移植成績にきわめて大きな影響を与えていることが明らかにされており、重篤な GVHD が惹起されやすい特定の不適合の組み合わせが存在することも知られるようになってきた。また、HLA クラス I 分子は T 細胞によって認識されるのみならず、NK 細胞上に発現する killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) のリガンドとしても機能しており、ドナー・レシピエント間におけるアロ NK 細胞を介する拒絶や移植片対白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 効果の発現に関与している可能性を示唆する研究結果が蓄積されつつある。さらに、最近では、HLA-DP 分子の適合性と GVHD や GVL 効果との関連を示唆する研究成果も報告されており、同種造血幹細胞移植においては、古典的な HLA 分子のほぼすべてが移植抗原として機能していることが明らかとなりつつある。一方、臍帯血移植に代表される HLA 不適合造血幹細胞移植の実施機会の増加は、固形臓器移植において観察されるような抗ドナー HLA 抗体の移植片生着への影響のみならず、移植後に産生される抗レシピエント HLA 抗体の臨床的意義の検討を新たな課題として迫っている。

ここでは、HLA の適合性が造血幹細胞移植後の生着、GVHD、GVL の各相においてどのような役割を演じているかにつき、現在得られている最新の知見をもとにしてあらためて考察してみたい。

S3-3

臍帯血移植における HLA 適合性

甲斐 俊朗

兵庫医科大学輸血部

臍帯血移植はその多くが HLA 不一致ドナーからの移植であるにもかかわらず、臍帯血中の T 細胞の未熟性の故、GVHD の発症頻度、重症度とも低く、GVHD の制御も容易であるといわれている。しかし、臍帯血移植成績と HLA 適合性に関しては十分解析されていないのが現状である。今回、日本さい帯血バンクネットワークに集積されたデータをもとに臍帯血移植における HLA 適合性の意義について解析したので報告する。

【対象および方法】 HLA-A, B, DRB1 のアレルタイピングが明らかな成人急性白血病初回移植例で骨髄破壊的移植が行なわれた 420 例 (AML 249 例, ALL 171 例) を対象とし、好中球生着、II 度以上の AGVHD 発症、移植後 1 年の移植関連死亡 (TRM)、再発率、無イベント生存率 (EFS) におよぼす HLA 適合度の影響を検討した。移植有核細胞数 (NCC)、CD34 陽性細胞数、移植病期、GVHD 予防法の移植成績への関与も解析した。有意差検定は log-rank test で行い、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。

【結果】 好中球生着に有意な影響を及ぼす因子は、移植 CD34 陽性細胞数だけであり、HLA 適合度と好中球生着には関連を認めなかった。

成人 AML; HLA (GVH 方向) 0-1 不一致 (mm), 2 mm, 3-5 mm の 3 年 EFS はそれぞれ 20%, 38%, 48% であり、3-5 mm は 0-1 mm に比べ有意に、また HLA-A/B + DRB1 不一致群は HLA 一致群に比べ有意に EFS が良好であった。HLA-A, B, DRB1 別に検討すると DRB1 不一致群の EFS は一致群より有意に良好であった。AGVHD II = < の発症、再発率にも HLA は有意な関連を示し、不一致数が多い程、また、HLA-A/B + DRB1 不一致群、DRB1 不一致群で AGVHD II = < の発症率は高く、再発率は低かった (多変量解析)。TRM (1 yr) は単変量解析では HLA-A (HVG 方向) 一致群が不一致群より良好であったが多変量解析では有意な関連は認めなかった。

成人 ALL; HLA と EFS, TRM の間に関連は認めなかった。AGVHD II = < 発症は HLA-A (HVG 方向) 不一致群で高く、再発率は A/B + DRB1 不一致、DRB1 不一致群で有意に低かった (いずれも単変量解析)。

【考察】 成人 AML では、HLA 不一致数が多い臍帯血ドナー、また、HLA-A, B あるいは A/B + DRB1 不一致移植のドナーからの移植で、AGVHD の頻度が高く、再発率が低い。臍帯血移植では AGVHD が発症してもそのコントロールは一般に容易であると言われており、HLA 不一致による AGVHD 発症頻度の増加は TRM 増加に繋がらず、GVL 効果として EFS の上昇に寄与しているものと考えられる。ALL ではその効果が認められなかった。成人臍帯血移植においては、HLA の移植成績に及ぼす影響は疾患により異なっている。臍帯血選択にあたり疾患により HLA 適合度を考慮する必要がある。

學術獎勵賞候補演題口演

G-1

臍帯血移植におけるレシピエント HLA 抗体と生着の関連性について

○ 藤原孝記¹⁾, 田中秀則²⁾, 柏瀬貢一¹⁾, 内川 誠¹⁾, 高梨美乃子¹⁾, 佐竹正博¹⁾, 中島一格¹⁾

- 1) 東京都赤十字血液センター
- 2) 日本赤十字社中央血液研究所
- 3) 東京都西赤十字血液センター

【目的】 臍帯血移植ではその多くが HLA 不適合移植であり、生着不全の危険性が骨髄移植と比較すると高いとされている。近年、患者が HLA 抗体を保有している場合に生着不全を起こす可能性が高いのではないかと問題提起がなされている。我々は、東京都赤十字血液センター臍帯血バンクを介して移植が行われた患者について HLA 抗体検査を行い、臍帯血移植における HLA 抗体と生着(ドナー型好中球の回復)の関連性について解析した。

【対象・方法】 2006年12月までに移植が行われた造血器悪性腫瘍に対する初回単一臍帯血移植患者391例について HLA クラス I, クラス II 抗体の検査を行った。方法は、Flow PRA にてスクリーニングを行い、ヒストグラム解析で陰性と判定できなかった121例について LABScreen PRA および LABScreen Single Antigen にて特異性を同定した。患者が保有する HLA クラス I 抗体が臍帯血の HLA 不適合抗原に反応する特異性を含む場合、昨年我々が開発した ICFA 法にて確認検査を行った。

【結果・考察】 臍帯血 HLA 抗原に反応しないと考えられる患者 HLA 抗体についてはその有無による有意差は認められなかった。患者が保有する HLA 抗体の特異性が臍帯血の HLA 不適合抗原に反応する場合、生着を認めたのは8例中4例で、生着不全が多いことが認められた ($p < 0.0001$)。この8例について ICFA 法にて確認検査を行ったところ、4例で陽性となり生着不全の結果と一致した。以上の結果から、HLA 不適合臍帯血移植前には患者血清中の HLA 抗体を高感度 HLA 抗体検査法で検査し、臍帯血の HLA 不適合抗原がその抗体と反応しないように臍帯血を選択して移植を施行することにより生着不全の危険性を回避することが期待できる。また、ICFA 法は HLA クラス I 不適合臍帯血移植における確認検査法として有用であった。

G-2

HLA-DQ のトランス型二量体形成能と二量体発現安定性の解析

○ 宮寺浩子, 徳永勝士

東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

【目的】 HLA-DQ のトランス型二量体は IDDM などの疾患感受性と関連することが知られている。しかし、安定なトランス型二量体を形成する *DQAI*, *DQB1* アリルの組合せは明らかではない。我々は *DQB1**0602 と強い関連を示すヒトナルコレプシーの病態解明を行う過程で、トランス型二量体形成が疾患感受性・抵抗性に関与する可能性に着目し、主要な *DQAI*, *DQB1* アリルの組合せによる二量体形成能を解析した。

【方法】 *DQAI**0101, *0102, *0103, *0201, *0301, *0401, *0501, *0601 及び *DQB1**0201, *0301, *0401, *0501, *0503, *0601, *0602, *0603, *0604 アリルを解析対象とした。各 *DQB1* アリルをレトロウイルスベクター pMx-puro (東大医科研・北村教授より供与)により NIH3T3 および BCL-1 (マウス B 細胞株)に導入し安定発現株を得た。各安定発現株に各 *DQAI* アリルを一過性発現し、抗 *DQB1* 抗体を用いフローサイトメトリーで HLA-DQ の細胞表面発現量を測定した。発現量はベクター内の IRES 下にある GFP 発現量により標準化し、アリルの組合せ間で比較した。

【結果・考察】 HLA-DQ トランス型二量体は強い連鎖不平衡にある *DQAI*, *DQB1* アリル間で形成されることが報告されているが (Kwok, *et al.* 1993), 本研究では、通常連鎖不平衡にない *DQAI*, *DQB1* アリルの組合せでも安定な細胞表面発現が観察され、発現量はアリル間で著しく異なっていた。これらの結果から、ナルコレプシー抵抗性にトランス型二量体形成が関与することが推測された。同様に、IDDM など他の自己免疫疾患とトランス型二量体との関連を再評価することが可能である。さらに、部位特異的変異体を用いて二量体形成に重要なアミノ酸残基を同定し、これらの残基に着目して哺乳類 *DQAI*, *DQB1* の進化過程を考察した。

口 演 発 表

O-1 HLA-A2, A24 拘束性 Glypican-3 ペプチドを用いた肝細胞癌免疫療法の臨床試験

○ 西村泰治¹⁾, 小森宏之²⁾, 本村 裕³⁾, 古瀬純司⁴⁾, 馬場秀夫²⁾, 木下 平⁵⁾, 中面哲也³⁾

- 1) 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野
- 2) 熊本大学大学院医学薬学研究部消化器外科学分野
- 3) 国立がんセンター東病院臨床開発センター・先端医療開発室
- 4) 国立がんセンター東病院・肝胆膵内科
- 5) 国立がんセンター東病院・上腹部外科

ヒトの肝細胞癌 (HCC) 組織と正常組織における cDNA マイクロアレイ解析により, HCC に高発現する新規癌胎児性抗原 Glypican-3 (GPC3) を同定した。GPC3 は GPI アンカー膜蛋白質であり, HCC 患者の約 40% の血清中に検出され, 腫瘍マーカーとして有用であった (*BBRC* 306: 16, 2003)。さらに, マウスに GPC3 ペプチドを負荷した樹状細胞を投与した後に, マウス GPC3 を発現させたマウス大腸癌細胞株を移植することにより, 自己免疫現象などの有害事象を伴うことなく, 著明な腫瘍の増殖抑制と生存期間延長を誘導できた (*Clin. Cancer Res.* 10: 8630, 2004)。また, ES 細胞から誘導した樹状細胞 (ES-DC) にマウス GPC3 遺伝子させマウスに免疫したところ, GPC3 発現マウス癌細胞株に対する *in vivo* 抗腫瘍効果の誘導が観察された (*Cancer Res.* 66: 2414, 2006)。さらに, HLA-A2 トランスジェニックマウスや, HCC 患者の血液検体を利用して, HLA-A2 あるいは A24 によりヒト・キラー T 細胞に提示される GPC3 ペプチドを 2 種類同定した。これらのペプチドで癌患者のリンパ球を刺激することにより, GPC3 発現ヒト HCC 細胞株を傷害するキラー T 細胞を誘導できた (*Clin. Cancer Res.* 12: 2689, 2006)。これらの HLA 拘束性 GPC3 ペプチドを, 現在までに HCC 進行癌患者 20 症例に接種したが, 免疫局所の発赤, 腫脹, 掻痒感ならびに微熱以外には, 特に重篤な有害事象は観察されず, 全例でペプチド特異的なキラー T 細胞の増加が観察され, 2 症例では接種後に血清腫瘍マーカーの減少と腫瘍の増殖抑制が観察された。今後, 術後患者に GPC3 ペプチドを投与して, 癌再発率に及ぼす影響を検討するための, 臨床第 2 相試験を開始する予定である。

O-2 免疫細胞療法への応用をめざしたマウス iPS 細胞からの樹状細胞の作製技術の確立

○ 千住 覚¹⁾, 春田美和¹⁾, 福島 聡¹⁾, 松永雄亮¹⁾, 平田真哉¹⁾, 池田徳典¹⁾, 高橋和利²⁾, 沖田圭介²⁾, 山中伸弥²⁾, 西村泰治¹⁾

- 1) 熊本大学大学院医学薬学研究部・免疫識別学分野
- 2) 京都大学再生医科学研究所・再生誘導研究分野

【目的】 樹状細胞 (DC) は, 免疫制御機構において中心的な役割を果たしている抗原提示細胞である。遺伝的改変を加えた DC を個体に投与することにより, 免疫応答を抗原特異的に制御する医療技術を開発できる可能性がある。我々は, マウスおよびヒトの ES 細胞を *in vitro* で分化させ, 機能的な DC (ES-DC) を作製する技術を開発した (*Blood* 101: 3501, 2003, *Stem Cells* 25: 2720, 2007)。ES-DC 技術の臨床応用には, 倫理的問題とヒト ES 細胞と治療を受ける患者との間の組織不適合性, という大きな障壁がある。これらの問題は, 自己の iPS (induced pluripotent stem) 細胞から樹状細胞 (iPS-DC) を誘導することにより回避できると予測される。我々は, マウス iPS 細胞から, 免疫機能を有する iPS-DC を分化誘導できるかどうか検討した。

【方法】 京都大学再生医科学研究所で樹立されたマウス iPS 細胞 (Fbx15-iPS および Nanog-iPS 細胞) を, マウスの ES-DC の場合に準じて培養した。その後, 細胞形態観察, FACS による細胞表面分子の発現解析, アロ MLR 刺激活性, サイトカイン産生能の解析などにより DC としての評価を行った。

【結果】 いずれの iPS 細胞からも, DC 様の形態を有する iPS-DC を分化させることが可能であった。iPS-DC は, MHC クラス II, CD80, CD86 の発現, 一次 MLR 反応, IL-12 等のサイトカイン産生, タンパク質抗原の提示能, など抗原提示細胞としての性質を有していた。ES 細胞により近い性質を有する Nanog-iPS 細胞からは, 多くのマウス ES 細胞株よりも, より効率良く iPS-DC を誘導できた。

【考察】 マウスの iPS 細胞を ES-DC 作製法に準じて分化誘導することにより, 免疫機能を有する iPS-DC を分化誘導する方法を確立した。

O-3

口腔扁平上皮癌患者における MICA 遺伝子と病期進行との関連

○ 玉置盛浩^{1,2,3)}, 川上正良¹⁾, 実藤信之¹⁾, 山中康嗣³⁾, 今井裕一郎²⁾, 山本一彦¹⁾, 中西真里²⁾, 羽竹勝彦²⁾, 桐田忠昭¹⁾, 石谷昭子²⁾

- 1) 奈良県立医科大学口腔外科学講座
- 2) 奈良県立医科大学法医学教室
- 3) 高国会高井病院口腔外科

【目的】 The major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related gene A (MICA) は、NK 細胞などの活性化受容体である NKG2D のリガンドとして、免疫活性を上昇させており、MICA タンパクは癌細胞によるストレスで発現し、癌排除免疫の役割を果たしているとしている。しかし、癌細胞上に MICA タンパクが発現しているにもかかわらず、NK 細胞により癌細胞が排除されないのは、癌免疫回避機能が存在するとされている。そこで今回我々は、口腔扁平上皮癌について MICA 遺伝子多型および血漿中の可溶性 MICA 濃度と臨床症状との相関を検討したので報告した。

【対象および方法】 口腔扁平上皮癌と診断した 80 名および健常者 60 名よりインホームドコンセントを得て血液を採取し、血漿および DNA を分離した。血漿を用いて ELSA 法により可溶性 MICA 濃度の測定を行い、PCR 法と DNA シーケンサを用いて MICA 遺伝子のマイクロサテライト多型 (A4, A5, A5.1, A6, A9) を分類した。

【結果】 口腔扁平上皮癌患者は、健常者と比較して MICA-A5.1 型を有する頻度が上昇していた。血漿 MICA 濃度は、MICA-A5.1 型を有する口腔扁平上皮癌患者の血漿 MICA 濃度が上昇しており、さらに癌の病期進行に伴い血漿 MICA 濃度が上昇していた。また累積生存率は、血漿 MICA 濃度の上昇に従い低下していた。

【考察】 MICA-A5.1 型遺伝子は膜貫通領域のマイクロサテライト多型において 1 塩基挿入によりフレームシフトを引き起こし、ストップコドン形成している。その結果 A5.1 型にコードされた MICA タンパクは細胞質領域が無く、疎水性のアミノ酸が低下し、癌細胞上から容易に遊離することで血漿 MICA 濃度が上昇していると思われた。またその可溶性 MICA が NKG2D レセプターをブロックし、癌免疫回避機能を促進している可能性が示唆された。

O-4

HIV 感染後 AIDS 発症の個体差と KIR 遺伝子多型との関連

○ 柳田梨沙¹⁾, 成瀬妙子²⁾, 中島敏晶^{1,2)}, 照沼 裕³⁾, 三間屋純一⁴⁾, 木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部 ゲノム多様性
- 2) 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態
- 3) 日本バイオセラピー研究所
- 4) 静岡こども病院

【目的】 HIV 感染後 AIDS 発症までの経過には個人差がみられ、感染後早期に発症に至る場合もあれば、長期間未発症のまま経過する場合もある。このような感染関連疾患への感受性・抵抗性の個体差形成には免疫応答関連遺伝子群におけるゲノム多様性が関わると考えられる。中でも MHC 遺伝子群は、抗原提示能を介して T 細胞免疫性の制御に関わり同時に、NK 細胞レセプターである KIR のリガンドとして NK 細胞機能の制御に関わっている。そこで、HIV 感染後長期 AIDS 未発症と KIR3D 遺伝子多型およびそのリガンドである HLA-Bw4 多型との関連を検討した。

【方法】 HIV 汚染血液製剤によって感染後 10 年以上 AIDS 未発症で、その後の経過が 5 年以上観察された日本人血友病患者集団を対象とした。経過観察中に CD4 陽性細胞数が保たれている長期未発症群 (long-term non-progressor: LTNP) は 43 例、CD4 陽性細胞数が減少して治療を開始した緩徐進行群 (long-term slow progressor: LTSP) は 42 例であった。対照は日本人一般集団 159 例とした。これらを対象とし、抑制性 NK レセプターである KIR3DL1 およびその対立遺伝子である活性化 NK レセプター KIR3DS1 を PCR-SSP 法にて検出した。得られた結果を HLA-B タイピング結果と合わせて解析した。

【結果と考察】 LTNP 群には KIR3DL1 陽性でかつそのリガンドである HLA-Bw4 Ile80 陽性の頻度が高く、一般集団 (OR = 2.06, p = 0.036) および LTSP (OR = 2.50, p = 0.38) のいずれと比較しても統計学的に有意であった。なお、LTSP 群と一般集団には頻度差を認めなかった。KIR3DL1 は HLA-Bw4 の 77-83 番目のモチーフをリガンドとして認識することが知られており、各種ウイルス感染後の病態進行との関与が報告されている。HIV 感染においても、KIR3DL1 陽性、HLA-Bw4 Ile80 陽性者は AIDS 発症までの期間が有意に長いことが白人集団、黒人集団において報告されており、日本人における本研究の結果とも合致する。KIR3DL1 遺伝子には複数の遺伝子多型が報告されており、発現性やリガンド結合能に影響を与えることが予想されるため、現在さらに KIR3DL1 遺伝子の多型解析を行なっている。

O-5

日本人サルコイドーシスにおける BTNL2 遺伝子多型の解析

○ 目黒 明¹⁾, 石原麻美¹⁾, 勝山善彦²⁾, 南場研一³⁾, 蕪城俊克⁴⁾, 安藤靖恭⁵⁾, 森本紳一郎⁶⁾, 岳中耐夫⁷⁾, 大野重昭³⁾, 猪子英俊⁸⁾, 水木信久¹⁾, 太田正穂⁹⁾

- 1) 横浜市立大学医学部眼科学教室
- 2) 信州大学付属病院薬剤部法医学教室
- 3) 北海道大学医学部眼科学教室
- 4) 東京大学医学部眼科学教室
- 5) 慶応大学医学部眼科学教室
- 6) 藤田保健衛生大学医学部循環器内科学教室
- 7) 熊本市市民病院呼吸器内科
- 8) 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
- 9) 信州大学医学部法医学教室

【目的】 HLA クラス II 領域に位置する BTNL2 (butyrophilin-like 2) 遺伝子内の多型がサルコイドーシスの疾患感受性の危険因子として、複数の民族で報告されている。今回我々は、BTNL2 遺伝子多型と日本人におけるサルコイドーシス疾患感受性について解析を行った。

【材料と方法】 患者 239 例と健常者 287 例の末梢血から抽出した DNA を用いた。BTNL2 遺伝子を網羅する 12 個の SNP の遺伝子型を TaqMan[®] アッセイ法により決定し、アレル頻度および遺伝子型頻度を患者群と健常群で比較した。さらに、BTNL2 遺伝子と近接する HLA-DRB1 および DQB1 遺伝子の多型解析を PCR-SSOP-Luminex 法を用いて行い、各々のアレル頻度を両群で比較した。

【結果と考察】 BTNL2 遺伝子内の 7 個の SNP が疾患と有意な相関を示した。他民族で調査された既報の通り、rs2076530 (A/G) の G アレルが患者群で顕著に増大しており ($P=0.0000065$)、当遺伝子多型が日本人においてもサルコイドーシス発症に関連する可能性が示唆された。また、HLA-DRB1*0803, -DRB1*0901 および -DQB1*0303 のアレル頻度は患者群で有意に高かった (DRB1*0803: $P=0.000011$, DRB1*0901: $P=0.0046$, DQB1*0303: $P=0.0057$)。今後、疾患と真に相関する疾患感受性遺伝子を決定するため、BTNL2, HLA-DRB1 および DQB1 の 3 遺伝子を対象とした連鎖不平衡解析および層別解析を行う予定である。

O-6

多能性幹細胞バンクを構築するための HLA マッチング推計

○ 中島文明¹⁾, 中辻憲夫²⁾, 徳永勝士³⁾

- 1) 日本赤十字社・中央血液研究所
- 2) 京都大学・物質-細胞統合システム拠点/再生医学研究所
- 3) 東京大学・医学系研究科人類遺伝学分野

【目的】 ES 細胞や iPS 細胞は極めて潜在能力の高い医療ソースであり、人工代替物では実現困難な著しい効果が期待できる。本人から採取した iPS 細胞であれば同種免疫の心配もない。社会的な公平性の担保として、多能性幹細胞バンクの構築を考えた場合、その障害となる組織適合性抗原のマッチングでどの程度の規模が必要であるか日本人 HLA 頻度に基づいて推計した。

【方法】 条件として、① 造血幹細胞系は目的としない、② HLA 抗原分子の解像度は血清学ブロード型とする、③ マッチング領域は HLA-A, B, DR ローカスとする。造血細胞移植家系の父母とランダム・ドナー 2,578 例を対象に計算した。0~3 抗原ミスマッチおよび仮想 HLA ホモ接合ドナーで検索を行なった。さらに、HLA ホモ接合ドナー株数と患者適合率について調べた。

【結果】 ランダム・ドナー 200 人規模の場合、1 ミスマッチで約 80%、2 ミスマッチで約 99% の患者に適合した。仮想 HLA ホモ接合ドナーでは、フルマッチでもドナー 200 人で約 97% の患者に適合した。一方、頻度順に種類の異なる HLA ホモ接合ドナー 30 株で患者の 82.2%、50 株で患者の 90.7% に適合した。これら、30 株はドナー約 15,000 人、50 株では約 24,000 人で検出可能と推定した。

【考察】 様々な、組織移植において HLA 抗原解像度と同種免疫の関係は明瞭ではないが、ある程度の HLA マッチングと免疫抑制剤の併用で相乗的に効果をもたらすと考える。仮想 HLA ホモ接合ドナーは当初、単為発生胚由来の ES 細胞の段階で考えていたことであるが、異常なゲノム・インプリンティングの恐れがあった。しかし、臨床的に安全な iPS 細胞を HLA ホモ接合ドナーでバンキングできればそのような問題は解消される。また、50 株以上で出現する HLA ホモ接合ドナーは、非常に低頻度になるため現実的には期待できないが、骨髄バンクのような大規模データでは相当な可能性があると考えられる。

O-7

造血細胞移植前後における患者血清中の HLA 抗体の推移

○ 高 陽淑¹⁾, 谷上純子¹⁾, 福森泰雄¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田弘俊¹⁾, 押田真知子²⁾, 富山佳昭²⁾, 前田哲生³⁾, 西澤正俊⁴⁾

- 1) 大阪府赤十字血液センター
- 2) 大阪大学医学部付属病院 輸血部
- 3) 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科
- 4) 大阪赤十字病院 血液内科

【背景】 PC-HLA 対象患者は血液疾患である場合が多く、造血細胞移植を受ける例も少なくない。しかし、造血細胞移植前後での患者保有抗体の推移についての詳細な報告はない。そこで、PC-HLA 輸血期間中に造血細胞移植を受け、その前後で HLA 抗体の特異性の推移について調べる機会を得たので報告する。

【症例及び経過】 症例 1. 患者は女性で AML。エンドキサン、キロサイド、放射線の前処置による HLA-A, DR 2 座不一致の臍帯血フル移植を施行。移植後キメリズム検査および好中球数で生着が確認され現在に至る。移植から約 1 年後まで調査した。症例 2. 患者は男性で MDS/AML。フルダラビン、アルケラン、放射線の前処置による HLA-DR1 座不一致の非血縁骨髄移植を施行。その後寛解に至り移植後キメリズムは 100% ドナータイプであった。その後の二次性生着不全に起因する再度の臍帯血ミニ移植施行後まで調査した。

【方法】 HLA 抗体スクリーニング検査には LABScreen-PRAI と single antigen (OneLambda), WAKFlowHLA 抗体クラス I (湧永製薬)を用いた。

【結果】 症例 1 は移植前の患者保有の抗体特異性は A31 + Cw7 + α と推定され、移植後 3 週間で A31 抗原に対する抗体は検出感度以下となり、1 年経過した患者血清からは Cw7 + α の抗体のみが検出された。症例 2 は移植前の抗体特異性は A31 + A33 + B44 + α と推定され、1 回目の移植半年後には HLA 抗体が検出感度以下となった。

【考察】 移植後のキメリズム検査で、2 症例共に 100% ドナータイプに変換したが移植後の抗体検査では 2 症例で相反する結果を得た。症例 1 では患者血清中の A31 抗体は移植した臍帯血がもつ A31 抗原に吸収されて減弱したと推測されたが、C 抗原に対する抗体は存続した。しかし症例 2 では移植後 HLA 抗体は消失した。今後は症例数を増やし、HLA 抗体の推移と移植の状況や、可能であればキメリズムとの関連性を解析する必要があると考える。

O-8

臍帯血移植予定患者の抗 MICA 抗体について

○ 荒木延夫¹⁾, 井本しおん¹⁾, 馬淵 理¹⁾, 甲斐俊朗²⁾, 原宏³⁾

- 1) 兵庫県赤十字血液センター
- 2) 兵庫医科大学病院輸血部
- 3) 樹徳会上ヶ原病院

【目的】 MHC class I chain-related gene A (MICA) は HLA クラス I とクラス III 遺伝子の中間に位置し、HLA 遺伝子同様、非常に多型性に富む。MICA 抗原はストレス誘導分子であるが、腎移植において抗 MICA 抗体が拒絶反応の原因となる可能性が示唆されている。今回、臍帯血移植予定患者の抗 HLA 抗体検査に使用している One Lambda 社 LABScreen™ Mixed 新 Lot に抗 MICA 抗体検出試薬が追加されたのでそれらについて検討した。

【材料・方法】 107 症例について、抗 HLA クラス I, HLA クラス II, MICA 抗体の陽性率そして、抗 MICA 陽性群、陰性群の移植生着率を解析した。

【結果】 107 例中抗 HLA クラス I が 11 例 (10.3%), 抗 HLA クラス II が 6 例 (5.6%), 抗 HLA クラス I + II が 1 例 (0.9%), 抗 MICA が 19 例 (17.8%), 抗 HLA クラス I + MICA が 5 例 (4.7%), 抗 HLA クラス I + II + MICA が 1 例 (0.9%) を示し、抗 MICA 陽性例は 25 例 (23.4%) を示した。次に、移植成績が得られた 59 例 (HLA クロスマッチ適合) 中 15 例の抗 MICA 陽性群において生着が 10 例 (66.7%), 拒絶が 2 例 (13.3%), 評価不能が 3 例 (20.0%) を示した。また、44 例の抗 MICA 陰性群は生着が 28 例 (63.6%), 拒絶が 6 例 (13.6%), 自己回復が 2 例 (4.5%), 評価不能が 8 例 (18.2%) を示した。

【考察】 今回の解析は抗 MICA の特異性解析及び、レシピエント、臍帯血の MICA 抗原タイプを実施していないが、日本人の HLA-B 座と MICA の連鎖不平衡の関係から抗 MICA 陽性群の生着 10 例中 8 例が MICA 適合、拒絶 2 例中 2 例が MICA 不適合と推察された。造血細胞移植における抗 MICA 抗体と拒絶の関係について今後の更なる解析が必要と考える。

O-9

献腎移植希望登録者における抗 HLA 抗体検査と移植前リンパ球クロスマッチ検査

○ 水野美紀子, 黒木聖久, 小原節子
名古屋第二赤十字病院・医療技術部・組織適合検査室

【目的】 私たちは日本臓器移植ネットワーク業務として登録希望者の新規・更新検査及び、特定移植検査センターとして臓器提供者(ドナー)発生時には24時間対応で、ドナーのHLAタイピングとリンパ球クロスマッチ検査を実施している。このドナー検査に備え、中日本支部担当(愛知, 三重)の全献腎移植希望登録者を対象に毎年血清保存時に抗HLA抗体検査(PRA検査)を実施している。リンパ球クロスマッチ検査は、検査方法により感度の違いが報告されており、PRA検査の実施については各施設の判断に任されている。今回、当院が行っているPRA検査の必要性、リンパ球クロスマッチ検査の方法について検討した。

【方法】 PRA検査については、2007年度(2007/4~2008/3)の献腎移植希望者(1285例)を対象とした。リンパ球クロスマッチ検査については、2004年3月から2008年4月に発生したドナー検査での検査結果(418例)を検討の対象とした。①PRA検査(ELISA法)LAT Mixed ClassI ②リンパ球クロスマッチ検査(LCT法, AHG-LCT法, FCXM法)③免疫感作歴情報(移植・輸血・妊娠)

【結果】 全登録者のPRA陽性率は11.1%である。移植歴のある登録者の43.9%が、輸血・妊娠歴のある登録者の18.5%がPRA検査陽性である。リンパ球クロスマッチ検査陽性率は、LCT法2.6%, AHG-LCT法4.8% FCXM法8.4%であった。PRA検査陽性者は、リンパ球クロスマッチ検査においても陽性になる場合が多い。

【考察】 血清保存時には全登録者に対しPRA検査を実施することが可能であるため、現状のリンパ球クロスマッチ法がドナー発生時には効果的と判断する。近年、移植歴のある登録者が増加しているため、クラスII抗体の検索を含めたPRA検査の重要性が高まるものと考え。今後は、精度の高いリンパ球クロスマッチ検査法の選択とPRA検査実施に向けた努力が望まれる。

O-10

可溶性CD30の移植検査への応用

○ 重田勝義
バイオテスト株式会社免疫診断グループ

【目的】 CD30LはT細胞が活性化状態の時に検出される。サイトカイン受容体CD30(Ki-1)とリガンドの相互作用は分化、活性化、増殖、細胞死などの多様な生物学的効果を引き起こす。そのため、CD30は免疫反応に不可欠な情報を伝達すると考えられる。可溶性CD30分子(sCD30)は、体内、体外でCD30陽性細胞が産生する。血清中のsCD30量は体内に存在するCD30陽性細胞の量を予測することができる。外国で取ったデータを紹介する。

【方法および結果】

1. 再現性

同一検体を3回同時に測定した。その結果、変動係数は9.2%でした。

同一検体を3日間毎日測定した。日差の変動係数は12.9%でした。

2. 回収率

4種類の量の異なるsCD30を健常な成人のプール血清に浮遊させ、3回測定を行った。プール血清中のsCD30の量は測定値を除去した。回収率は74~111%の範囲で平均値は93%でした。

3. 検体の安定性

1) 凍結、融解の安定性

血清を-20°Cで凍結、融解を数回繰り返した後測定した。5回の凍結融解を繰り返してもsCD30値に変動は認められなかった。

2) 保存安定性

血清検体を-20°C, 2~8°Cおよび室温で保存し、24時間後に測定した。保存中にsCD30量の減少は認められなかった。

4. 血清と血漿の比較

血清, EDTA, ケエン酸およびヘパリン血漿を同時に採血した。sCD30濃度に著しい差異は認められなかった。

5. 正常値

健常な32名の供血者血清でsCD30を検出した。sCD30濃度は平均38.7 U/ml, 標準偏差±28.0 U/mlでした。

6. 臨床的意義

CTS移植共同研究で、45カ国の400以上の施設で約300,000件の腎移植のデータを収集した。sCD30陰性PRA陰性の5年生存率が一番良く、次にsCD30陰性PRA陽性, sCD30陽性PRA陰性, sCD30陽性PRA陽性の順であった。

【まとめ】 sCD30の測定は腎移植時の検査に有用である可能性が示唆された。今後日本人での臨床的意義について検討が必要と思われる。

O-11

SBT*excellerator* HLA-DRB1 — a novel tool for accurate and reliable high-resolution HLA-DRB1 typing and ambiguity resolution

○ Wietse Mulder²⁾, Karsten Ogrzewalla¹⁾, Nienke Westerink²⁾, Eric Rozemuller²⁾, Birgit Jehn¹⁾, Jürgen Lauber¹⁾

1) QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

2) Genome Diagnostics, Utrecht, the Netherlands

【はじめに】 HLA-DRB1 の High-resolution は、造血幹細胞移植だけでなく、HLA に関与する疾病研究(多発性硬化症, 1 型糖尿病感受性, 子宮頸癌のリスク等)に重要な役割を担っている。ダイレクトシーケンシングは目的遺伝子領域 (exon) の詳細かつ正確な情報が得られ、HLA の High-resolution の標準法として SBT (sequencing-based typing) への関心が高まっている。SBT 法による High-resolution DRB1 typing と ambiguity を簡単に判定可能な新しい SBT*excellerator*® HLA-DRB1 Kit を紹介する。

【方法】 様々なアリのルの組合せを持つ 95 検体の全血から QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いてゲノム DNA を精製し、HLA-DRB1 アリのルの増幅とシーケンシングは SBT*excellerator* HLA-DRB1 Kit で行った。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製、DyeEx Kit でシーケンシング反応のクリーンアップ後、ABI3730 Genetic Analyzer で塩基配列を分析し、それらのデータを SBTengine ソフトで解析した。

【結果および考察】 exon2 と exon3 の特異的シーケンシングプライマー、コドン 86 に対する追加シーケンシングプライマーを用いて各検体の増幅産物から初回シーケンシング反応を行い、塩基配列データを SBTengine ソフトで解析した。本ソフトの DART™ (dynamic ambiguity resolving tool) は、ambiguity の自動的認識と解決策対応機能を備え、次に行うべきプライマーを提示する。推奨された Group-specific sequencing primers (GSSPs) を用いて ambiguity 解析が簡単かつ正確にできた。画期的な機能ソフト SBTengine と GSSPs の組合せにより、本キットは、既知/予想された DRB1 の ambiguity の 95% を最高の解像度で効率的に解析できる。また、ユニークで比類のない増幅法を用いた本キットは exon2 と exon3 を同時に増幅できるため、両 exon の全配列情報を提供できる。特に DRB1 の exon3 は、LA-DRB1*1401 や DRB1*1454 で既に証明されているが、予想以上に多様性に富んでいる。exon3 の全配列情報は臓器移植でのドナー/患者の適合性に不可欠であり、疾病と関連する詳細研究や HLA アリのルの革新的な解析に寄与すると考えられる。

O-12

蛍光ビーズ法を用いた新しい「HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1」DNA タイピング試薬の評価

○ 小野明子¹⁾, 池田通代¹⁾, 斎藤 順¹⁾, 石井博之¹⁾, 伊藤早織²⁾, 福島義之²⁾, 東 史啓²⁾, 福森泰雄¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田弘俊¹⁾

1) 大阪府赤十字血液センター

2) 株式会社医学生物学研究所 応用技術部

【目的】 現在、骨髄およびさい帯血などの造血幹細胞提供者の HLA タイピングには、解像度とハイスループット性のバランスに優れた蛍光ビーズ法が広く採用されている。今回、現在の移植現場で特に重要視されている HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 の 3 座を従来の「1 座 1 反応系」ではなく、「3 座 2 反応系」で測定することが可能な HLA DNA タイピング試薬(ジェノサーチ HLA Ver.3 プロトタイプ)を検討したので報告する。

【検体および方法】 検体: 既存法で HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 の DNA タイピング済みの 237 検体。方法: HLA-A と DRB1 の一部, HLA-B と DRB1 の残りをそれぞれ 1 本のチューブで PCR を行った。PCR 産物とビーズミックスとのハイブリダイゼーション反応, 洗浄後, ビーズ上の蛍光標識された PCR 産物を Luminex で測定し, ジェノサーチ HLA 専用解析ソフトで判定した。

【結果】 237 検体の HLA-A と HLA-B は全例, 既存法での測定結果と一致した。HLA-DRB1 は 1 例, PCR 増幅の不良が原因と見られる判定不能例があり, 一致率 99.6% であった。

【考察】 本法では ClassI と ClassII の遺伝子増幅を同一チューブ内で行い, かつ Luminex の「1 反応で 100 種のプローブの同時検出が可能」という性能を最大限に活かし, 移植に必要とされる HLA 3 座を 2 反応系で測定することが可能である。これにより PCR 機と Luminex 1 台での単位時間あたりの処理能力は従来の試薬より 1.5 倍向上する。またその判定結果は既存法と比較し, PCR 増幅不良と推察される検体 1 例を除いてはすべて一致し, HLA-DRB1 座の DNA タイピングで問題となる「cis-trans の Ambiguity」を PCR 反応段階で解決することで, 確実な判定を実現している。今後更に検討数を増やし, 性能を詳細に評価する予定である。

O-13

蛍光ビーズを用いた HLA クラス II 抗体検査試薬の開発

○ 直原 寛¹⁾, 北岡 瞬¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 岡 孝紀¹⁾, 関根みゆき²⁾, 藤原孝記²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 内川 誠²⁾, 中島一格²⁾, 宮崎 孔³⁾, 佐藤進一郎³⁾, 加藤俊明³⁾, 池田久實³⁾, 中島文明⁴⁾, 田中秀則⁴⁾

- 1) 湧永製薬株式会社バイオ事業開発部
- 2) 東京都赤十字血液センター
- 3) 北海道赤十字血液センター
- 4) 日本赤十字社中央血液研究所

【目的】 HLA 抗体検査は輸血・移植分野で広く行われており、臨床成績を向上させる上で重要な検査の一つである。近年、高感度に HLA 抗体を検出する試薬が開発されているが、いくつかの面で課題も残る。昨年、我々は本学会において、日本人の HLA 抗原頻度を基にした HLA クラス I 抗体検査試薬の開発について報告した。今回我々は、日本人の HLA 抗原頻度を基に HLA クラス II 抗体検査試薬を開発したので報告する。

【方法】 HLA-DR 抗原及び DQ 抗原に対する HLA 抗体の検査試薬開発のために、29 種類のヒト B リンパ球細胞株を選択した。この際特異性同定を容易にするために、日本人において出現頻度の高い HLA 抗原をホモ接合で保有する 15 種類の細胞株を選択した。さらに、解像度を上げるために、サブタイプである DR4.1, DR4.2, DR8.1, DR8.2 等を含む細胞株を選択した。

これら細胞株を培養し、膜画分を可溶化した後、アフィニティクロマトグラフィーにより HLA クラス II 分子を精製した。精製したクラス II 分子を Luminex ビーズに固相化した後、被験血清を反応させ HLA 抗体の特異性を同定した。解析は、本試薬の専用ソフトで行った。

【結果と考察】 予め特異性を同定した血清 64 検体 (LCT 法、または既存の高感度試薬で判定) を用いて本試薬の反応性について比較評価した。

53 検体 (83%) が一致 (部分一致を含む) を示し、11 検体 (17%) では乖離した結果であった。乖離 11 検体のうち 7 検体は既存高感度法で弱陽性判定であるのに対し、本試薬では陰性判定となった。3 検体は本試薬で非特異反応が原因で陰性判定となった。1 検体は本試薬で弱陽性判定としたが、既存高感度法で陰性判定であった。

今回の比較検討の結果、弱反応の反応を示す検体では、既存高感度法と結果が乖離する例もあったが、その他の検体については同様の傾向を示した。

O-14

ELISA を使用した HLA 抗体スクリーニング

○ 重田勝義
ビオテスト株式会社免疫診断グループ

【目的】 HLA classI および classII 抗体は輸血、臓器移植、妊娠などにより産生される。HLA 抗体検査は臓器移植の待機患者、血小板無効状態および輸血副作用の検査などに用いられている。ELISA を用いた HLA 抗体スクリーニングは高価な機器が要らず、安価で自動化ができるなど多くのメリットを持っている。今回はドイツおよびアメリカで取得したデータを紹介する。

【測定原理】 AbScreen HLA classI は、白人、黒人、ヒスパニック系のドナーの血小板より精製した HLA 糖タンパク質を使用し、AbScreen HLA classII 抗原は EBV で融合した B 細胞株由来抗原を精製したものをを用いている。

【方法および結果】

AbScreen HLA classI (HLA ClassI 抗体スクリーニング用試薬)

1. LCT 法との比較 (420 例)

AbScreen および LCT 陽性 155 例、陰性 237 例、検査結果の乖離が 30 例に認められ、LCT 陽性 AbScreen 陰性 22 例、LCT 陰性 AbScreen 陽性 6 例であった。

2. LAT 法との比較 (50 例)

AbScreen は 18 例 (36%)、LAT は 24 例 (48%)、LCT は 12 例 (24%) が陽性を示した。

AbScreen HLA classII (HLA ClassII 抗体スクリーニング用試薬)

LCT との比較 (151 例)

AbScreen および LCT 陽性 68 例、陰性 50 例、検査結果の乖離が 33 例に認められ、LCT 陽性 AbScreen 陰性 33 例、LCT 陰性 AbScreen 陽性は認められなかった。

臨床的意義

1. 初回腎移植患者 5319 例で検討を行った。HLA ClassI および ClassII が伴に陽性の患者 169 例 (3.2%) の 3 年腎定着率が一番悪かった。

2. ELISA 陰性の腎移植患者 4217 例で検討を行った。LCT-PRA が 30% 以上陽性 65 例 (1.5%) の 3 年腎定着率が一番悪かった。

【まとめ】 ELISA は安価でどこの施設でも行うことが可能な有効な方法と考えられる。HLA 抗体には IgG 型抗体、IgM 型抗体、自然抗体、自己抗体、類似抗体などが考えられる。今後は日本人で取得したデータによる抗体の分類と臨床的意義についての検討が必要と思われる。

O-15

抗 HLA 抗体における C4d complex の測定

○ 水谷一夫¹⁾, ポール・テラサキ²⁾

1) 名古屋大学医学部泌尿器科

2) テラサキ フォウンデーション ラボラトリー

【目的】 抗 HLA 抗体が腎移植における生着率に影響を与えることは以前より報告され、この抗 HLA 抗体が補体を通じて働くことは知られている。しかし、抗 HLA 抗体の存在やその強さと腎障害の程度についてはまだ明確に究明されているわけではない。Wahrmann らは抗 HLA 抗体と C4d complex を同時に Flow beads を用いて測定する方法とその有用性を最近報告したが、今回の研究では Wahrmann らの方法を用いて抗 HLA 抗体と C4d complex における有用性を Luminex を用いて検討した。

【方法】 LABScreen kit を用い、腎移植患者の血清とのインキュベーション後に補体を追加、再度インキュベーションを行った。その後 C4d 抗体を用いて LABScreen beads 上における抗 HLA 抗体と C4d complex を Luminex を用いて fluorescence intensity (FI) を測定した。

【結果】 抗 HLA 抗体をもった移植患者の血清において抗 HLA 抗体の FI と C4d complex の FI は相関関係があり、抗 HLA 抗体の増加と共に C4d complex も増加していた。

【考察】 Luminex を用いた抗 HLA 抗体と C4d complex の測定は、抗 HLA 抗体のモニターとして抗 HLA 抗体の強さの指標のひとつとなると考えられた。

ポスター発表

P-1

SBT*excellerator* HLA-DRB1 — a novel tool for accurate and reliable high-resolution HLA-DRB1 typing and ambiguity resolution

○ Wietse Mulder²⁾, Karsten Ogrzewalla¹⁾, Nienke Westerink²⁾, Eric Rozemuller²⁾, Birgit Jehn¹⁾, Jürgen Lauber¹⁾

1) QIAGEN GmbH, Hilden, Germany

2) Genome Diagnostics, Utrecht, the Netherlands

【はじめに】 HLA-DRB1 の High-resolution は、造血幹細胞移植だけでなく、HLA に関する疾病研究(多発性硬化症、1 型糖尿病感受性、子宮頸癌のリスク等)に重要な役割を担っている。ダイレクトシーケンシングは目的遺伝子領域 (exon) の詳細かつ正確な情報が得られ、HLA の High-resolution の標準法として SBT (sequencing-based typing) への関心が高まっている。SBT 法による High-resolution DRB1 typing と ambiguity を簡単に判定可能な新しい SBT*excellerator*® HLA-DRB1 Kit を紹介する。

【方法】 様々なアリのルの組合せを持つ 95 検体の全血から QIAamp DNA Blood Mini Kit を用いてゲノム DNA を精製し、HLA-DRB1 アリのルの増幅とシーケンシングは SBT*excellerator* HLA-DRB1 Kit で行った。PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit で精製、DyeEx Kit でシーケンシング反応のクリーンアップ後、ABI3730 Genetic Analyzer で塩基配列を分析し、それらのデータを SBTengine ソフトで解析した。

【結果および考察】 exon2 と exon3 の特異的シーケンシングプライマー、コドン 86 に対する追加シーケンシングプライマーを用いて各検体の増幅産物から初回シーケンシング反応を行い、塩基配列データを SBTengine ソフトで解析した。本ソフトの DART™ (dynamic ambiguity resolving tool) は、ambiguity の自動的認識と解決策対応機能を備え、次に行うべきプライマーを提示する。推奨された Group-specific sequencing primers (GSSPs) を用いて ambiguity 解析が簡単かつ正確にできた。画期的な機能ソフト SBTengine と GSSPs の組合せにより、本キットは、既知 / 予想された DRB1 の ambiguity の 95% を最高の解像度で効率的に解析できる。また、ユニークで比類のない増幅法を用いた本キットは exon2 と exon3 を同時に増幅できるため、両 exon の全配列情報を提供できる。特に DRB1 の exon3 は、LA-DRB1*1401 や DRB1*1454 で既に証明されているが、予想以上に多様に富んでいる。exon3 の全配列情報は臓器移植でのドナー / 患者の適合性に不可欠であり、疾病と関連する詳細研究や HLA アリのルの革新的な解析に寄与すると考えられる。

P-2

蛍光ビーズ法を用いた新しい「HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1」DNA タイピング試薬の評価

○ 小野明子¹⁾, 池田通代¹⁾, 斎藤 順¹⁾, 石井博之¹⁾, 伊藤早織²⁾, 福島義之²⁾, 東 史啓²⁾, 福森泰雄¹⁾, 谷 慶彦¹⁾, 柴田弘俊¹⁾

1) 大阪府赤十字血液センター

2) 株式会社医学生物学研究所 応用技術部

【目的】 現在、骨髄およびさい帯血などの造血幹細胞提供者の HLA タイピングには、解像度とハイスループット性のバランスに優れた蛍光ビーズ法が広く採用されている。今回、現在の移植現場で特に重要視されている HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 の 3 座を従来の「1 座 1 反応系」ではなく、「3 座 2 反応系」で測定することが可能な HLA DNA タイピング試薬(ジェノサーチ HLA Ver.3 プロトタイプ)を検討したので報告する。

【検体および方法】 検体: 既存法で HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 の DNA タイピング済みの 237 検体。方法: HLA-A と DRB1 の一部, HLA-B と DRB1 の残りをそれぞれ 1 本のチューブで PCR を行った。PCR 産物とビーズミックスとのハイブリダイゼーション反応、洗浄後、ビーズ上の蛍光標識された PCR 産物を Luminex で測定し、ジェノサーチ HLA 専用解析ソフトで判定した。

【結果】 237 検体の HLA-A と HLA-B は全例、既存法での測定結果と一致した。HLA-DRB1 は 1 例、PCR 増幅の不良が原因と見られる判定不能例があり、一致率 99.6% であった。

【考察】 本法では ClassI と ClassII の遺伝子増幅を同一チューブ内で行い、かつ Luminex の「1 反応で 100 種のプローブの同時検出が可能」という性能を最大限に活かし、移植に必要とされる HLA 3 座を 2 反応系で測定することが可能である。これにより PCR 機と Luminex 1 台での単位時間あたりの処理能力は従来の試薬より 1.5 倍向上する。またその判定結果は既存法と比較し、PCR 増幅不良と推察される検体 1 例を除いてはすべて一致し、HLA-DRB1 座の DNA タイピングで問題となる「cis-trans の Ambiguity」を PCR 反応段階で解決することで、確実な判定を実現している。今後更に検討数を増やし、性能を詳細に評価する予定である。

P-3

蛍光ビーズを用いた HLA クラス II 抗体検査試薬の開発

○直原 寛¹⁾, 北岡 瞬¹⁾, 川井信太郎¹⁾, 岡 孝紀¹⁾, 関根みゆき²⁾, 藤原孝記²⁾, 柏瀬貢一²⁾, 内川 誠²⁾, 中島一格²⁾, 宮崎 孔³⁾, 佐藤進一郎³⁾, 加藤俊明³⁾, 池田久實³⁾, 中島文明⁴⁾, 田中秀則⁴⁾

- 1) 湧永製薬株式会社バイオ事業開発部
- 2) 東京都赤十字血液センター
- 3) 北海道赤十字血液センター
- 4) 日本赤十字社中央血液研究所

【目的】 HLA 抗体検査は輸血・移植分野で広く行われており、臨床成績を向上させる上で重要な検査の一つである。近年、高感度に HLA 抗体を検出する試薬が開発されているが、いくつかの面で課題も残る。昨年、我々は本学会において、日本人の HLA 抗原頻度を基にした HLA クラス I 抗体検査試薬の開発について報告した。今回我々は、日本人の HLA 抗原頻度を基に HLA クラス II 抗体検査試薬を開発したので報告する。

【方法】 HLA-DR 抗原及び DQ 抗原に対する HLA 抗体の検査試薬開発のために、29 種類のヒト B リンパ球細胞株を選択した。この際特異性同定を容易にするために、日本人において出現頻度の高い HLA 抗原をホモ接合で保有する 15 種類の細胞株を選択した。さらに、解像度を上げるために、サブタイプである DR4.1, DR4.2, DR8.1, DR8.2 等を含む細胞株を選択した。

これら細胞株を培養し、膜画分を可溶化した後、アフィニティクロマトグラフィーにより HLA クラス II 分子を精製した。精製したクラス II 分子を Luminex ビーズに固相化した後、被験血清を反応させ HLA 抗体の特異性を同定した。解析は、本試薬の専用ソフトで行った。

【結果と考察】 予め特異性を同定した血清 64 検体 (LCT 法、または既存の高感度試薬で判定) を用いて本試薬の反応性について比較評価した。

53 検体 (83%) が一致 (部分一致を含む) を示し、11 検体 (17%) では乖離した結果であった。乖離 11 検体のうち 7 検体は既存高感度法で弱陽性判定であるのに対し、本試薬では陰性判定となった。3 検体は本試薬で非特異反応が原因で陰性判定となった。1 検体は本試薬で弱陽性判定としたが、既存高感度法で陰性判定であった。

今回の比較検討の結果、弱反応の反応を示す検体では、既存高感度法と結果が乖離する例もあったが、その他の検体については同様の傾向を示した。

P-4

好中球, 単球, T/B リンパ球, 好塩基球, 血小板を解析対象とした 6-cell lineage IFT 法と HNA transfectant 細胞, LABScreen を組み合わせた白血球抗体の検出

○松山宣樹, 保井一太, 高 陽淑, 尼岸悦子, 谷上純子, 古田里佳, 福森泰雄, 木村貴文, 平山文也, 谷 慶彦, 柴田弘俊

大阪府赤十字血液センター

【はじめに】 白血球上に発現している主な抗原系として、HLA や HNA (顆粒球抗原) がある。HLA クラス I 抗原はほとんどの有核細胞に発現しているが、HNA もまた、顆粒球以外の血液細胞にも発現している。一方、FCM を用いる HNA 抗体検査法には、好中球のみを解析対象とした GIFT 法が広く用いられているが、好中球以外の細胞も解析対象とする方が有利である。そこで、我々は好中球, 単球, T/B リンパ球, 好塩基球, 血小板を解析対象とした 6-cell lineage IFT (6-cell) を樹立し、さらに、HNA-1~5 (HNA-3a は遺伝子が特定されていない為未作製) の各抗原を発現させた transfectant 細胞 (KY 細胞) の作製にも成功している。今回、6-cell と KY 細胞, HLA 抗体検査試薬である LABScreen を併用し、HLA 抗体と non-HLA 抗体の検出・解析を行ったので報告する。

【方法】 非溶血性輸血副作用症例 51 症例 (患者 51 検体, 製剤 60 検体) に対し、LABScreen と 6-cell, KY 細胞を用いて HLA 抗体と白血球抗体の検査を行った。

【結果】 患者検体 38 例, 製剤 11 例から抗体が検出された。患者検体の内訳は HLA 抗体 11 例, 白血球抗体 23 例, HLA + 白血球抗体 4 例であり、それに対して、製剤は HLA 抗体 1 例, 白血球抗体 10 例であった。患者から検出された 27 例の白血球抗体の内、7 例は好中球にのみ反応する抗体であったが、20 例は好中球とそれ以外の細胞、または、好中球に反応しない抗体であった。また、製剤由来の 10 例の白血球抗体においては、それぞれ 7 例と 3 例であり、好中球以外の細胞と反応する抗体は製剤に比して患者で多く認められた。しかし、KY 細胞を用いた検査では、既報の HNA-1~5 の特異性を持つ抗体は HNA-1b 1 例のみで、他は特定できなかった。なお、HNA-3a の可能性は 6-cell の反応性から否定された。

【考察】 白血球抗体の解析に 6-cell lineage IFT, KY 細胞, LABScreen を併用する事により、HLA を含めた白血球抗体を幅広く検出する事が可能となった。また一部は同定も可能であった。今後は特異性不明であった HNA 抗体についてさらに検討する予定である。

P-5 ELISA を使用した HLA 抗体スクリーニング

○ 重田勝義
ビオテスト株式会社免疫診断グループ

【目的】 HLA classI および classII 抗体は輸血、臓器移植、妊娠などにより産生される。HLA 抗体検査は臓器移植の待機患者、血小板無効状態および輸血副作用の検査などに用いられている。ELISA を用いた HLA 抗体スクリーニングは高価な機器が要らず、安価で自動化ができるなど多くのメリットを持っている。今回はドイツおよびアメリカで取得したデータを紹介する。

【測定原理】 AbScreen HLA classI は、白人、黒人、ヒスパニック系のドナーの血小板より精製した HLA 糖タンパク質を使用し、AbScreen HLA classII 抗原は EBV で融合した B 細胞株由来抗原を精製したものをを用いている。

【方法および結果】

AbScreen HLA classI (HLA ClassI 抗体スクリーニング用試薬)

1. LCT 法との比較 (420 例)

AbScreen および LCT 陽性 155 例、陰性 237 例、検査結果の乖離が 30 例に認められ、LCT 陽性 AbScreen 陰性 22 例、LCT 陰性 AbScreen 陽性 6 例であった。

2. LAT 法との比較 (50 例)

AbScreen は 18 例 (36%)、LAT は 24 例 (48%)、LCT は 12 例 (24%) が陽性を示した。

AbScreen HLA classII (HLA ClassII 抗体スクリーニング用試薬)

LCT との比較 (151 例)

AbScreen および LCT 陽性 68 例、陰性 50 例、検査結果の乖離が 33 例に認められ、LCT 陽性 AbScreen 陰性 33 例、LCT 陰性 AbScreen 陽性は認められなかった。

臨床的意義

1. 初回腎移植患者 5319 例で検討を行った。HLA ClassI および ClassII が伴に陽性の患者 169 例 (3.2%) の 3 年腎定着率が一番悪かった。

2. ELISA 陰性の腎移植患者 4217 例で検討を行った。LCT-PRA が 30% 以上陽性 65 例 (1.5%) の 3 年腎定着率が一番悪かった。

【まとめ】 ELISA は安価でどこの施設でも行うことが可能な有効な方法と考えられる。HLA 抗体には IgG 型抗体、IgM 型抗体、自然抗体、自己抗体、類似抗体などが考えられる。今後は日本人で取得したデータによる抗体の分類と臨床的意義についての検討が必要と思われる。

P-6 ELISA 法によるスクリーニング検査キット「AbScreen HLA classI」の検討

○ 大久保美里¹⁾、山本 賢¹⁾、瀬口 周¹⁾、角谷勇実¹⁾、古田賢二¹⁾、佐野道孝¹⁾、佐田正晴²⁾、中谷武嗣³⁾

1) 国立循環器病センター・臨床検査部

2) 同・再生医療部

3) 同・臓器移植部

【はじめに】 HLA 抗体の測定にはヒトリンパ球を用いた LCT (AHG-LCT) 法、プレートに HLA 抗原を固相した ELISA 法、ビーズに HLA 抗原を固相した FCM 法などがあり、当センターでは検出感度が高い FCM 法を用い心移植患者血清中の HLA 抗体スクリーニング検査を実施している。しかし FCM 法は特別な測定機器を必要とし、試薬単価も高額である。ELISA 法は FCM 法に比べ検出感度は劣るものの簡便で測定機器や試薬も安価である。今回、ELISA 法を用いた「AbScreen HLA classI」(ビオテスト社)による HLA 抗体の測定機会を得たので報告する。

【方法】 対象として FlowPRA で陽性となった 12 症例、陰性となった 7 症例及び陰性対照として輸血歴のない男性健常人 7 症例の計 26 症例を用いた。本法の比較対照法として FlowPRA Screening Test を用い、抗体検出率についての比較検討を行った。

【結果】 本法と FlowPRA Screening Test による HLA class I 抗体の一致率は、73% (19/26)。両者の陰性一致率は 100% (14/14) であったが、陽性率は 42% (5/12) と低率だった。

【考察】 低い陽性一致率は、固相に用いられた抗原の精製過程の相違や固相量、抗原特異性などに左右されると考えられる。今後、本法の有用性についてさらに検討を重ねて行く。

P-7

ドナーリンパ球を用いた HLA 抗体のモニタリング

○ 重田勝義

ビオテスト株式会社免疫診断グループ

【目的】 HLA 抗体は輸血、移植などの適否の指標とされてきたが、使用するリンパ球によっては偽陰性や検出しなくても良い抗体を検出することがある。ドナーのリンパ球を使用した HLA 抗体検査は、移植前・後のモニタリングとして役に立つ可能性がある。しかし、リンパ球の保存による生存率の低下など多くの問題を含んでいる。GTI 社製 M-AMS (Micro Antibody Monitoring system) は溶解したリンパ球を用い HLA 抗体の測定が可能である。

【原理】 リンパ球を非イオン界面活性剤で溶解する。HLA class I 又は II (DR) に特異的なモノクローナル抗体が固着してあるマイクロウェルに、溶解したリンパ球を固定し反応プレートを作成する。このプレートに患者血清を反応させ ELISA にて測定する。

【方法】

1. リンパ球溶解液の作成

全血または脾臓などから分離したリンパ球 $10 \mu\text{L}$ ($\approx 30 \times 10^6$ 個) に $100 \mu\text{L}$ のリンパ球溶解剤を加え、リンパ球溶解液を作成する。作成したリンパ球溶解液は凍結保存が可能である。

2. 反応プレートの作成

HLA class I は $2 \mu\text{L}$ (6×10^5 個分), HLA class II は $4 \mu\text{L}$ (12×10^5 個分) のリンパ球溶解液を加える。 37°C に 30 分間加温する。その後、3 回洗浄する。

3. ドナーリンパ球特異的 HLA 抗体の検出

患者検体を分注し、 37°C で 30 分間加温する。その後、3 回洗浄する。アルカリフォスファターゼ標識抗ヒト IgG を添加する。 37°C で 30 分間加温する。その後、3 回洗浄する。PNPP 溶液の添加後、暗所・室温 ($22-25^\circ\text{C}$) で 30 分間放置し、吸光度 (OD 値) を 405 又は 410 nm で測定する。

【性能評価】

1. M-AMS と GTI Antibody Monitoring System (AMS) キットとの比較

1) HLA Class I 抗体は M-AMS 及び AMS が伴に陽性を示したものは 101 検体中 52 例、陰性を示したものは 49 例、乖離例は認められなかった。

2) HLA Class II 抗体は M-AMS 及び AMS が伴に陽性を示したものが 101 検体中 49 例、陰性を示したものが 2 例で乖離例は認められなかった。

2. Abscreen HLA class I および Abscreen HLA class II との比較

HLA class I 抗体は 208 例で検討した。Abscreen および M-AMS 伴に陽性 108 例、陰性 98 例、M-AMS 陰性 Ab-Screen 陽性が 2 例に認められた。HLA class II 抗体は 190 例で検討した。Abscreen および M-AMS 伴に陽性 70 例、陰性 113 例、M-AMS 陰性 Ab-Screen 陽性が 7 例に認められた。

【まとめ】 本試薬を使用することにより、移植時および移植後のドナーに特異的な HLA 抗体の検査が可能であり、移植患者のモニタリングとして、今後検討を重ねる必要があると思われる。

P-8

抗 HLA 抗体における C4d complex の測定

○ 水谷一夫¹⁾, ポール・テラサキ²⁾

1) 名古屋大学医学部泌尿器科

2) テラサキ フォウンデーション ラボラトリー

【目的】 抗 HLA 抗体が腎移植における生着率に影響を与えることは以前より報告され、この抗 HLA 抗体が補体を通じて働くことは知られている。しかし、抗 HLA 抗体の存在やその強さと腎障害の程度についてはまだ明確に究明されているわけではない。Wahrmann らは抗 HLA 抗体と C4d complex を同時に Flow beads を用いて測定する方法とその有用性を最近報告したが、今回の研究では Wahrmann らの方法を用いて抗 HLA 抗体と C4d complex における有用性を Luminex を用いて検討した。

【方法】 LABScreen kit を用い、腎移植患者の血清とのインキュベーション後に補体を追加、再度インキュベーションを行った。その後 C4d 抗体を用いて LABScreen beads 上における抗 HLA 抗体と C4d complex を Luminex を用いて fluorescence intensity (FI) を測定した。

【結果】 抗 HLA 抗体をもった移植患者の血清において抗 HLA 抗体の FI と C4d complex の FI は相関関係があり、抗 HLA 抗体の増加と共に C4d complex も増加していた。

【考察】 Luminex を用いた抗 HLA 抗体と C4d complex の測定は、抗 HLA 抗体のモニターとして抗 HLA 抗体の強さの指標のひとつとなると考えられた。

P-9

リコンビナント HLA-A24, A26 の抗原性の評価

○ 中野 学, 宮崎 孔, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 池田久實
北海道赤十字血液センター検査部

【目的】 PC-HLA 供給に関わる HLA 抗体検査法として湧永製薬と共同開発した HLA 抗体検査用 Luminex 試薬「WakFlow 抗体クラス I MR」は、抗体スクリーニングと同時に HLA 抗体特異性も検出可能なため HLA 抗体陽性患者の許容抗原の設定が可能である。しかし、HLA 抗体の特異性が広範囲に及ぶ患者血清では許容抗原の設定が困難な場合がある。この解決策として、1 種類のビーズに単一の精製 HLA を固相した single antigen 試薬を使用することにより、HLA 抗体の特異性の解析精度が飛躍的に向上する。

我々は日本人に高頻度で認められる HLA (A, B, Cw) 遺伝子のクローニングを行って、single antigen 試薬の開発に不可欠なリコンビナント HLA タンパクの発現細胞株の開発を試みたので報告する。

【方法】 末梢血から total RNA を抽出し、RT-PCR にて cDNA を合成した。その cDNA を鋳型として HLA-A24, A26 の全長 (1098 bp) から一部分を欠いた領域 (1~1062 bp) を PCR にて増幅させた。PCR 産物をクローニング用ベクターに組み込み、目的の塩基配列を確認した。C 末端に V5 認識配列を持った発現用ベクターに PCR 産物を組み換え、プラスミドを作製した。そのプラスミドを HEK293 細胞に導入した後、目的のタンパクの抗原性を確認するために、HLA 特異的な抗血清と抗 V5 抗体で sandwich ELISA を行った。

【結果】 HLA-A24, A26 の発現用プラスミドを導入した細胞を作製した。HLA-A24 または A26 に特異的な抗血清を 3 種類ずつ用いて ELISA を行ったところ、全て特異的な反応を認めた。また、陰性対照として HLA-A24, A26 の特異性を持たない抗血清を用いた ELISA では反応を認めなかった。

【考察】 我々が作成した発現細胞には HLA-A24, A26 の抗原活性を保持したりコンビナント HLA タンパクが発現していることが確認された。また、1063~1098 bp の領域は抗原性の保持に関与しない可能性が示唆された。この系では HLA タンパクに Tag を付加しているため試薬の作製に必要不可欠なタンパク精製も容易と思われる。今後、日本人に高頻度で認められる HLA 遺伝子をクローニングし、single antigen 試薬の開発のために HLA タンパクを安定的に発現する細胞株の樹立を目指す。

P-10

Loop-Mediated Isothermal Amplification 法による ambiguity 解決の可能性

○ 清水佐良子, 光永滋樹, 吉川枝里, 岡 晃, 猪子英俊
東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

【目的】 通常の HLA の DNA タイピング法では, ambiguity として知られている区別できないアレルの組み合わせが存在する。例えば DRB1*0405 + DRB1*1501 と DRB1*0410 + DRB1*1502 のヘテロは区別できない。そのため, SSCP 法, PHFA 法等, 様々な方法が開発されている。しかしいずれも操作が煩雑, 時間がかかる等の問題がある。昨年の本学会で報告した LAMP 法による HLA タイピングは, 6 種類のプライマーを用い同時に複数箇所の多型領域を認識することが可能であるので, ambiguity の組み合わせも区別可能ではないかと考えられた。よってその可能性について検討した。

【方法】 日本人集団で比較的頻度が高いアレルの組み合わせ DRB1*0405 + DRB1*1501 と DRB1*0410 + DRB1*1502 をモデル型として LAMP 法により区別が可能かどうかを検討した。これらのアレル間では 86 番目のアミノ酸が Gly (GGT) と Val (GTG) となり 1 アミノ酸が異なっている。これらの多型を見分けるために LAMP プライマー B3 あるいは B2 の 3' 末端に GT または TG がくるようにプライマーをデザインした。LAMP 反応は HLA-DRB1 の遺伝子型が既知のヒト染色体 DNA 20 ng を用い, SYBR Green I 存在下, 65°C で 60 分行い, 蛍光強度が反応時間とともに増大したものを陽性とした。

【結果および考察】 LAMP プライマー B2 の 3' 末端に多型がくるようにすることにより, DRB1*0410 と DRB1*1502 をそれぞれ特異的に増幅することが可能であった。さらに SSP 法と蛍光プローブ法の組み合わせによりタイピングした DRB1*0410 + DRB1*1502 の検体でも, それぞれのアレルを特異的に増幅することができた。これらにより, LAMP 法によるアレル特異的増幅は ambiguity 解決に有用であることが示された。さらに本法は PCR を使わず, DNA と試薬を混合し等温で反応させるだけであり, 発色による可視化あるいはクロスコンタミの可能性が低い閉鎖系の蛍光検出での可能で, 1 時間以内に反応が終了するので, HLA タイピング法としても優れていると考えられた。

P-11

移植医療後の合併症に関する SNPs の High-throughput typing method の開発

○ 大沼 豪, Milena Ivanova²⁾, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史, 林 晃司, 楠木靖史, 吉田 喬, 川井信太郎¹⁾, 松下正毅¹⁾, 落合直也, 丸屋悦子, 赤座達也, 河賀泰子, 佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) 湧永製薬株式会社¹⁾

2) Central Laboratory of Clinical Immunology University Hospital "Alexandzovska", Sofia, Bulgaria²⁾

【はじめに】 移植医療は臓器移植と造血幹細胞移植に大別されるが, どちらの場合も使用される免疫抑制剤に対するレシピエントの応答性とその薬物副作用の制御に関する SNPs, ドナーとレシピエントの免疫応答性の違いによる移植後合併症に関する SNPs について多くの報告がなされている。しかしながら各報告されている SNPs の検出方法は種々様々で, 多数検体を迅速に安価に検出できる方法とは言いがたいのが現状である。今回我々は多数検体を迅速・安価に検出できる Luminex 法による方法を確立したので報告する。

【材料と方法】

検出対象とする SNPs

SNP の遺伝子名	予後因子	SNP position		
IL-6 promoter	a-GVHD, graft survival	-174	-572	
MBL2 promoter	移植後感染	-619	-290	-66
MBL2 exon 1	移植後感染	cdn52	cdn54	cdn57
CYP3A5 intron 3	免疫抑制剤の副作用	6986		

検出系:

- * 遺伝子増幅: 各 SNP 遺伝子について, 複数箇所 SNPs が存在する場合, multiplex PCR による遺伝子増幅をおこなった。
- * probe: 各 SNP の変異部位を検出する sense 側と anti-sense 側に対する probe, 各 SNP 遺伝子の増幅確認用 probe を設計した。
- * Luminex 検査法: panel DNA を用い, 最適な hybridization 条件を設定し, 自動判定ソフトの作成をおこなった。

検証方法: 各 SNPs につき, 変異部位を認識する制限酵素による検出系を確立し, 50-100 種のパネル DNA をタイプし luminex 法による結果と比較した。

【結果と考察】 パネル DNA での Luminex 法と RFLP 法の結果は全て一致した。Luminex 法は多数検体を精度良

く・短時間・低コストでの実施を可能とする優れた方法である。後方視的に臨床意義を解析し、前方視的に移植後リスク評価の手段として役立てたい。

P-12

Minor histocompatibility antigen の High-throughput typing method の開発

○ 林 晃司, 落合直也, 大沼 豪, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史, 楠木靖史, 吉田 喬, 川井信太郎¹⁾, 松下正毅¹⁾, 丸屋悦子, 河賀泰子, 赤座達也, 佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) 湧永製薬株式会社

【はじめに】 造血幹細胞移植の三大予後要因は ① 年齢, ② 病態 / 病期, ③ 組織適合性である。HLA は最大の組織適合要因とされてきたが, 非血縁間移植のデータが蓄積された結果, HLA 以外の Non-HLA 組織適合性がより重要であることがわかってきた。Non-HLA 組織適合抗原は「マイナー組織適合性抗原 (minor histocompatibility antigens: (mHAs))」と命名され, GVHD の発症により強く影響し, GVL 効果の主因であるゆえに, 造血幹細胞移植の予後に大きく影響し, 現在, 養子免疫療法として臨床応用されようとしている。マイナー抗原群を多数検体の迅速・簡便・低コストなタイピング法の開発は臨床医療上重要である。

【材料と方法】

- 対象とした Minor Histocompatibility antigens: ACC-1, ACC-2, ACC-6, HA-1
- 遺伝子増幅系: ACC-1, 2, 6, HA-1 の各遺伝子を multiplex PCR で増幅した。
- 検出系:
 1. probe: 各 SNP の変異部位を検出する sense 側と anti-sense 側に対する probe, 各 SNP 遺伝子の増幅確認用 probe を設計した。
 2. Luminex 検査法: panel DNA を用い, 最適な hybridization 条件を設定し, 自動判定ソフトの作成をおこなった。
- 検証方法:

Panel DNA を用い ACC-1, ACC-2 は従来法 (PCR-SSCP) により判定された結果と照合し, ACC-6, HA-1 は PCR-RFLP 法による判定結果と照合した。

【結果と考察】 ACC-1, 2, 6, HA-1 について, Luminex 法と別法のタイピング結果は全て一致した。Luminex 法は多数検体を精度良く・短時間・低コストでの実施を可能とする優れた方法である。今後, 他のマイナー抗原についても同様な方法を樹立し, 養子免疫療法の適用範囲の拡大に貢献したい。

P-13

可溶性 HLA-G 抗原測定法の問題点—卵胞液中の可溶性 HLA-G 抗原の意義—

○ 下嶋典子¹⁾, 中西真理²⁾, 大村素子²⁾, 川井信太郎³⁾, 永田のぞみ³⁾, 喜多英二¹⁾, Daniel E Geraghty⁴⁾, 羽竹勝彦²⁾, 石谷昭子²⁾

- 1) 奈良県立医科大学細菌学
- 2) 奈良県立医科大学法医学
- 3) 湧永製薬バイオ事業開発部
- 4) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】 体外受精分野において、確実に着床・妊娠する良好胚選定方法の開発は、必須かつ切望されている。近年、体外受精卵培養上清中に可溶性 HLA-G 抗原が検出され、これが着床率に関連があるという報告が相次いだ。未だコンセンサスが得られていない。我々が体外受精卵培養上 109 例中の可溶性 HLA-G 抗原の有無を検討したところ、体外受精卵培養上清中に可溶性 HLA-G 抗原は検出されず、またその着床率との関連も見出せなかった。我々はこれらの結果の違いが、測定方法の問題点にあると考え、可溶性 HLA-G 抗原測定に影響を与えるのではないかと推測される物質として、可溶性 HLA-Ia 抗原 (HLA-A, -B, -C 抗原) および hCG が測定系に与える影響について検討した。また卵胞液中の可溶性 HLA-G 抗原について検討した。

【方法】 可溶性 HLA-Ia 抗原はヒト B-LCL cell line から、可溶性 HLA-G 抗原は 221-Gs からアフィニティー精製したものを使用した。また ELISA には抗 HLA-G 抗体 MEMG/9, 抗 HLA クラス I 抗体 W6/32, 抗 β_2m 抗体のそれぞれを用いた。

【結果】 hCG が可溶性 HLA-G 抗原検出系に与える影響は認められなかったが、サンプル中の可溶性 HLA-Ia 抗原の存在は、可溶性 HLA-G 抗原擬陽性の原因となりうるということがわかった。

また未受精卵、受精後 3 日目、6 日目の 3 種の卵培養上清には可溶性 HLA-G 抗原は検出されなかったが、卵胞液 211 例中 94 例に可溶性 HLA-G 抗原が検出された。

【考察】 卵胞液中の可溶性 HLA-G 抗原と妊娠の有無に関連はなかった。我々は体外受精卵培養上清や正常成人男性血清中の可溶性 HLA-G 抗原の有無について否定的であったが、今後、卵胞液中の可溶性 HLA-G 抗原について詳細に解析を行うとともに、サンプル中の生体成分に影響をうけず可溶性 HLA-G 抗原を検出する系を確立し、体外受精卵培養上清中の可溶性 HLA-G 抗原の存在をはじめ、体液中の可溶性 HLA-G 抗原の有無を明らかにしていきたいと考えている。

P-14

骨髄バンク登録ドナーの HLA 型遺伝子頻度と新たに見出されたアリルについて

○ 加藤和江¹⁾, 盛山芳恵¹⁾, 中島文明¹⁾, 田中秀則¹⁾, 柏瀬貢一²⁾, 福森泰雄³⁾, 石井博之³⁾, 田所憲治¹⁾

- 1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
- 2) 東京都赤十字血液センター
- 3) 大阪府赤十字血液センター

【目的】 日本骨髄バンクのドナー登録時の HLA 検査は、平成 17 年 3 月に血清学的検査法から DNA 検査法 (Luminex 法) に移行後 3 年余りが経過した。これら DNA 検査結果から得られた HLA 型の対立遺伝子 (アリル) の遺伝子頻度と新たに見出されたアリルについて報告する。

【方法】 DNA 抽出試薬は富士フィルム社製試薬 (QuickGene), HLA タイピング試薬は湧永製薬社製 (WakFlow-HLA-A, -B, -DRB1), 医学生物学研究所製 (ジェノサーチ HLA-A 日赤) 及びワンラムダ社製試薬 (LABType SSO DRB1 Typing Test) を使用して検査を実施し、遺伝子頻度が 0.005% 以下のアリル、または Luminex 法で判定パターンが異なる場合には SBT 法で確認を行った。平成 17 年 3 月から平成 20 年 3 月までに HLA 検査を実施した 126,235 件を対象とし、解析を行った。

【結果】 HLA DNA タイピング用試薬は年々改良が進み、その解像度は高くなっていることや、骨髄バンクに登録する外国人ドナー登録者が近年増加していることから、日本では今まで見られなかった稀なアリルが多数検出されている。さらに、新たなアリルが 43 種類 (内訳 A 座: 10 種類, B 座: 22 種類, DRB1 座: 11 種類) 確認され、現在解析中であり、これらのアリルについては塩基配列を決定後 WHO HLA 命名委員会に登録を行う。

【考察】 現在使用している Luminex 法試薬は、日本国内の遺伝子頻度を基に開発されたものであるが、登録ドナーのアリルの多様性についてもこれらの試薬で確認が可能であった。しかしながら、Luminex 法では判定可能なアリルと同一判定パターンを示す稀なアリルや、exon4 に変異のある Null アリルの検出についても対応していく必要があると思われる。

P-15

当センターにおける心臓移植 22 症例の経過

○ 瀬口 周¹⁾, 山本 賢¹⁾, 大久保美里¹⁾, 角谷勇実¹⁾, 古田賢二¹⁾, 佐田正晴²⁾, 佐野道孝¹⁾, 加藤倫子³⁾, 植田初江⁴⁾, 鎌倉史郎¹⁾, 中谷武嗣³⁾

- 1) 国立循環器病センター・臨床検査部
- 2) 同・再生医療部
- 3) 同・臓器移植部
- 4) 同・病理検査室

【はじめに】 1997年の臓器移植法制定後、当センターにおいて22例の心臓移植が施行された。今回、心臓移植症例の経過、急性および慢性拒絶反応の発生状況について報告する。

【方法】 当センターで心臓移植を施行された22例を対象に後ろ向き調査を行った。心筋生検の評価は国際心肺移植学会 (International Society Heart and Lung Transplantation: ISHLT) の基準に従った。

【結果】 移植時平均年齢40.7歳、日本臓器移植ネットワーク登録後から心臓移植までの平均待機期間は866.7日であった。19例は左心補助人工心臓 (LVAS) 装着にて移植待機を行い、装着期間は平均704.9日であった。現在までに1例が4年2ヵ月後に感染症により死亡したが、21例は生存し最長で9年を経過している。免疫抑制療法はシクロスポリンまたはタクロリムス、MMF、プレドニンの3剤併用療法で行われた。HLA抗体の産生は保有例が11例、陰性例が11例であった。2007年12月までに延べ340回的心筋生検が実施され、ISHLT Grade3A以上の細胞性拒絶反応を示したものが2.65%であったが、ステロイドパルス療法にて軽快した。移植前にHLA抗体を保有した1例において免疫組織学的染色にてC4dの沈着がみられ、抗体関連型拒絶反応が疑われたため、血漿交換およびγグロブリン大量療法後、C4dの沈着は陰性化した。移植後慢性期合併症としては移植後冠動脈病変が最も多く36.4%に認められ、HLA抗体保有群4例、陰性群4例であった。

【考察】 当センターにおける国内心臓移植症例は生存率95.5%であり予後良好である。しかし、慢性期合併症として、移植後冠動脈病変が高頻度に生じており、移植後5年以上経過する症例も増加してくることから、その他の慢性期合併症も含め経過観察の必要がある。

P-16

腎移植後のドナー特異的抗体 (DSA) 検出の意義

○ 黒木聖久¹⁾, 水野美紀子¹⁾, 小原節子¹⁾, 打田和治²⁾, 丹羽 操³⁾, 岩崎研太³⁾, 小林孝彰³⁾

- 1) 名古屋第二赤十字病院 医療技術部
- 2) 名古屋第二赤十字病院 移植外科
- 3) 名古屋大学医学部免疫機能制御学

【目的】 腎移植後に産生された抗ドナー抗体は、慢性拒絶反応を引き起こすことが、知られている。私どもは、慢性拒絶反応の早期診断の目的で、腎移植後の患者全員に対して、年1回、HLA抗体検査を行っている。費用、簡便性を考慮してELISA (LAT-M) を用いて測定している。今回、ELISAにてHLA抗体陽性と判定された血清中にドナー特異的抗体 (DSA) が検出されるかどうか検討した。

【方法】 腎移植患者485症例 (生体371例、死体83例、他院移植31例) について、2006年10月から2007年2月に採取した血清をELISA (LAT-M) にてHLA class I, II抗体を検出した。51例が陽性であり、抗体のHLA特異性をflow PRA Single Antigenにて解析した。

【結果】 移植前のHLA抗体が陰性である新規抗体産生は28例 (Cr 1.97 ± 1.39 mg/dL) であり、移植前から陽性である20例 (Cr 1.27 ± 0.50 mg/dL) に比べCr値は有意に高かった。対象としてHLA抗体陰性434例のCrは、1.37 ± 0.61 mg/dLであった。新規抗体産生28例のうち、A, B, DRのみを考慮したHLA特異性検査においてDSAを確認できたのは1例のみであり、DQB抗体を考慮 (ドナー情報としてDQBタイピングは行ってないので、DRB1型とのリンクにて推定) しても7例 (Cr 1.67 ± 1.45 mg/dL) にしかDSAを検出できなかった。

【考察】 移植後新規HLA抗体産生例での、DSAの検出は困難であった。おそらくグラフトに吸着され、循環血液中では検出されにくいものと考えられる。DQBの抗体まで考慮すれば、DSA検出率は35%まで上昇するが、Cr値との関連は認められなかった。HLA特異性解析は高額な検査費用を必要とする。腎移植後のfollow up検査として、新規HLA抗体産生かどうか判定できれば十分であり、DSA解析を行う必要性は認められなかった。

P-17

腎移植における DSA (Donor specific antibody) 陽性症例の検討

○ 橋本光男, 木下朋子, 岸川英史, 吉岡亜矢, 小林泰之,
加藤大悟, 山内洋子, 奥野綾子, 藤井直彦, 徳川茂樹,
西村憲二, 市川靖二

兵庫県立西宮病院・腎疾患総合医療センター

腎移植において、1969年に Terasaki 等が、レシピエント血清中に抗白血球抗体が存在すると早期グラフトロスの危険因子となることを報告して以来、移植直前にクロスマッチ (XM) が実施されるようになった。そして、XM 陽性は移植禁忌とされてきたが、現在クロスマッチで用いられている LCT 法は抗体検出感度と特異性に関して、偽陰性と偽陽性の反応がみられると指摘されている。近年、脱感作療法を含めた免疫抑制治療が進歩して、XM 陽性症例を全て移植禁忌とすることが疑問視されるようになり、XM 陽性の原因となる因子がドナー HLA に対する抗体であることを証明することが必要になってきた。我々は LCT 法に加えて FCXM 法と Flow PRA を併用して、LCT(-) FCXM(+) FlowPRA(+) を低力価 DSA (Donor specific Ab) 陽性群とし、移植前後との関連性を検討してきた。今回、我々は single Ag beads を用いて DSA を検出し、DSA 陽性症例の移植前後と LCT 法、FCXM 法、Flow PRA の反応パターンを比較検討した。

【材料と方法】 1984年から2008年3月までの HLA 一致とミスマッチ 0 症例を除いた 312 例と過去に早期グラフトロスになった 15 例を加えた 327 例を対象とした。XM は LCT, FCXM, Flow PRA で行い、そのうちの 88 症例について single Ag beads を用いて DSA を検討した。

【結果と考察】 327 例のうち FlowPRA を検査した 318 例の HLA 抗体陽性率を検討した。HLA クラス I 抗体陽性例は 61 例 (19%)、クラス II 抗体陽性例は 16 例 (5%)、クラス I+クラス II 抗体陽性例は 46 例 (14%) で、残りの 195 例は陰性であった (62%)。次に、327 例のうち FCXM を実施した 195 例での FCXM と FlowPRA の反応パターンでは、FCXM(+) PRA(+) は 8 例 (1 例は肝炎で死亡)、FCXM(+) PRA(-) は 37 例、FCXM(-) PRA(+) は 37 例 (1 例は早期グラフトロス)、FCXM(-) PRA(-) は 113 例であった。2 例を除いた 193 例の移植腎は生着している。過去の早期グラフトロス症例を含めた 88 例の DSA を検討した結果、28 例が DSA 陽性症例であった (28%)。28 例の DSA 陽性症例のうち 12 例は早期グラフトロス、残りの 16 例は DSA 陽性でありながら移植腎は生着している結果が得られた (但し、3 例は移植前

脱感作療法症例)。DSA 陽性症例の生着作用機序については、DSA を阻害する抗イデオタイプ抗体、accommodation 等が報告されているが、これらの症例については抗体価、感作歴等を含めて考察する予定である。

P-18

霊長類における Toll-like receptor (TLR) 関連遺伝子の分子進化と自然選択

○ 中島敏晶^{1,2)}, 大谷仁志¹⁾, 颯田葉子³⁾, 宇野泰広⁴⁾, 明里宏文⁵⁾, 石田貴文⁶⁾, 木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学・疾患生命科学研究所
- 2) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子病態
- 3) 総合研究大学院大学・生命共生体進化学
- 4) 新日本科学・薬物代謝分析センター
- 5) 医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター疾患制御研究室
- 6) 東京大学大学院・理学系生物学科

【目的】 感染症は生物進化における最も強い自然選択圧のひとつであり、感染防御に関わる遺伝子の分子進化を解明することにより、生物進化への理解を深めることができる。そこで、自然免疫において重要な役割を担う TLR 関連遺伝子の分子進化を解析し、霊長類の進化における感染症による選択圧を考察することを目的とした。

【方法】 16 種の TLR 関連遺伝子 (*TLR1-10*, *MYD88*, *TILAP*, *TICAM1*, *TICAM2*, *MD2*, *CD14*) の coding 領域塩基配列を、7 種類の霊長類(ヒト, チンパンジー, ポノボ, ゴリラ, オラウータン, アカゲザル, カニクイザル)において決定した。非同義および同義領域の塩基置換率を解析し、強い自然選択の影響下にある領域を絞り込み、霊長類の進化における自然選択の関わりを検討した。

【結果】 7 種類の霊長類において、TLR 関連遺伝子群の coding 領域塩基配列(約 32.7 kb)を決定した。非同義および同義領域の塩基置換率の解析により、負の自然選択の関わりが示唆される 2 つの領域、正の自然選択の関わりが示唆される 1 つの領域を同定した。アミノ酸置換が認められない負の自然選択が示唆される 2 ヶ所の領域 (*MYD88*, *TLR7*) は、情報伝達に関わる TIR ドメインをコードする領域であった。一方、*TLR4* の細胞外ドメインにはアミノ酸置換率の高い領域が存在し(正の自然選択)、LPS が結合する領域と一致していた。18 種の霊長類の塩基配列解析を追加し検討したところ、*TLR4* の自然選択は狭鼻類の分岐以降に認められた。

【考察】 霊長類の進化において、情報伝達に関わる TIR ドメインへの負の自然選択圧、LPS を認識する *TLR4* の細胞外ドメインへの正の自然選択圧の関与が推定された。

P-19

ヒトおよびアカゲザルにおける NKG2D レセプター関連遺伝子群の多型解析

○ 成瀬妙子¹⁾, 柳田梨紗¹⁾, 俣野哲郎²⁾, 森一泰³⁾, 保富康宏⁴⁾, 宮澤正顕⁵⁾, 木村彰方¹⁾

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態
- 2) 東京大学医科学研究所
- 3) 国立感染研究所エイズ研究センター
- 4) 三重大学医学部
- 5) 近畿大学医学部

【目的】 ウイルス感染に対する免疫応答の個体差は免疫応答関連遺伝子遺伝子群におけるゲノム多様性に制御されている。中でも NK 細胞は、ウイルス感染細胞の認識を通じて感染防御機構に深く関わる。我々は、NK レセプターとそのリガンドに着目し、NKG2D のリガンドである ULBP 遺伝子群について、ヒトおよびアカゲザルを対象として遺伝子多型解析を行った。

【方法】 日本人一般集団 96 例、ミャンマーおよびラオス産アカゲザル 6 系統 36 頭を対象とした。レクチン型 NK レセプター NKG2D のリガンドである ULBP 遺伝子群の多型解析は、ヒト ULBP 各遺伝子のイントロン 1 および 4 に設定したプライマーで PCR を行い、 $\alpha 2$, $\alpha 3$ ドメインをコードするエクソン 2~3 を増幅後に直接塩基配列決定法によった。

【結果】 ヒト ULBP1~3, RAET1L 遺伝子について遺伝子多型を検索したところ、4 種の新規多型を含む 10 種の多型部位が検出され、ULBP1, ULBP3, RAET1L 遺伝子で 6 箇所の非同義置換多型を見出した。一方、アカゲザルでは ULBP2 遺伝子に 1 箇所、ULBP3 遺伝子に 2 箇所の非同義置換を検出したが、ヒトよりも個体差が少なかった。アカゲザル ULBP のアミノ酸配列をヒトと比較すると、一般的に 90% 前後の相同性が見られたが、ULBP3 では $\alpha 3$ ドメインに 1 アミノ酸欠失が特徴的に認められた。また、データベースでの解析から、アカゲザル ULBP 遺伝子領域にはヒトと異なる遺伝子重複が生じていることが明らかとなった。

【考察】 NK 細胞はウイルス感染などにより MHC クラス I の発現が欠如した細胞に対し障害活性を示すことが知られていたが、NK レセプターの多くが MHC クラス I およびその関連分子をリガンドとし、NK 細胞の活性化と抑制化の双方に関与することが最近明らかになっている。ワクチン接種モデル動物として用いられているアカゲザルが、MHC 領域のみならず NKG2D リガンド遺伝子領域においてもヒトと異なる遺伝子重複が生じていることが明らかになったことから、今後 NK レセプターとそのリガンド多型が免疫応答に及ぼす影響を明らかにすることが必要である。

P-20

健康女性における HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 ハプロタイプ triplicate の体細胞モザイク

○ 佐治博夫, 丸屋悦子, 大沼 豪, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史, 林 晃司, 楠木靖史, 吉田 喬, 赤座達也, 坂田尚己¹⁾

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) 近畿大学医学部

【はじめに】 HLA タイピングの結果, 1 locus に 3 allele が検出されることがある。これを Triplicate とよんでいる。血液キメリズム(移植, 母児間出血), 双生児キメラ, モザイク, 遺伝子重複, 第 6 染色体トリソミーなどが考えられる。

【方法】 HLA は Luminex 法, クローニングは TOPO TA cloning 法で行い, 各染色体のマイクロサテライト (MS) 多型性を PCR / 電気泳動法で検査した。

【結果】 発端者は 30 才女性, 妊娠中期。健康で移植などの治療歴なし。白血病の妹のドナー候補として HLA 検査が行われ, HLA-A, B, Cw, DRB1, DQB1 座において, Triplicate の結果が得られた。

1. 血液キメラ(母児間出血)と双生(血液キメラ)を否定するために, 体細胞 (buccal) DNA を得て, HLA 検査をしたが, 血液 DNA と同様の結果を得た。
2. 父, 妹, 夫の HLA 検査をしたところ, すべて正常にタイピングされた。発端者の HLA は IMA (inherited maternal allele) ハプロタイプ 1 個と, IPA (inherited paternal allele) ハプロタイプ 2 個から構成されることがわかった。DPB1 は父が homozygote であり, triplicate はなかった。
3. 発端者の血液細胞 DNA と体細胞 DNA の HLA-A, B, Cw, DR 領域をクローニングして, タイピングした。IMA HLA allele と IPA HLA の 2 種の allele をそれぞれにもつクローンがおおよそ, 2:1:1 の割合で得られた。
4. 各染色体ごとに 1-4 種の MS を選択して, 発端者と父の MS 多型性を比較した。その結果, Hetero-diploid (IMA MS 1 種と IPA MS 2 種)が確認されたのは第 8, 18 染色体, 推定できたものが第 6, 11, 20 染色体, 計 5 染色体 (7MS), 正常の diploid と判定されたものが, 第 2, 6, 10, 16, 17, X の 6 染色体 (7MS), 判定不能のものが 10 染色体 (14MS), 未検査 3 染色体であった。なお, 第 6 染色体は hetero-diploid の MS と diploid の MS の双方が見られた。すなわち, 約半数に Hetero-diploid が検出された。染色体検査はできなかったが, XX であり, 正常な女性型であった。

【討論と結論】 血液キメラ, 双生児キメラは否定され, 体細胞キメラ(モザイク)であった。成因として, 大規模遺伝子重複とトリソミーは MS 多型性による検討で否定された。すなわち, 遺伝子の約半数に hetero-diploid が検出された。結局, Dispermy (2 精子症)と判断された。1 個の卵子に 2 個の精子が受精し, それが 1 個体になったと考えられる。Dispermy の報告は多数あるが, すべては血液型のキメリズムが発見の端緒となっている。HLA triplicate から発見された Dispermy はめずらしい。Dispermy は不妊であることが多いが, 本例は正常に妊娠している。

P-21

HLA 抗体エピトープについて

○ 丸屋悦子, 北脇 城¹⁾, 大沼 豪, 二神貴臣, 小島裕人, 辻野貴史, 林 晃司, 河賀泰子, Nori Sasaki²⁾, 赤座達也, 佐治博夫

特定非営利活動法人 HLA 研究所

1) 京都府立医科大学産婦人科¹⁾

2) One Lambda Research II²⁾

【はじめに】 タイピング用 HLA 抗体は主に妊産婦血のスクリーニングにより得られ, 国際 HLA ワークショップにより評価がなされた。HLA 分子の構造やアミノ酸配列が解明された現在, HLA 抗体について HLA 分子のどの部分を認識し産生されたのかについてまだ明らかにされていない。疑問を解く糸口を得るため以下の作業仮説をたてた。

【作業仮説】 妊娠は自然アロ免疫の代表である。児の父由来ハプロタイプ (IPA: inherited paternal antigens) が免疫原となり, 母の液性免疫担当細胞である B リンパ球が自己 HLA との違いを BCR (B-cell receptors) により読み取り, 自己 HLA-classII 抗原に提示する。提示された抗原ペプチドが TCR により認識され, 活性化されたヘルパー T 細胞が細胞表面に CD40L を発現し, B 細胞上の CD40 を介して B 細胞の増殖分化を誘導し, 抗体産生を誘導する。このようにして HLA 抗体は産生されると考えられる。(免疫原である IPA) - (IMA/NIMA) = 抗体産生候補アミノ酸とし, 産生された HLA 抗体の特異性を single antigen beads により解析し, 反応した HLA 抗原群と抗体産生候補アミノ酸に共通するアミノ酸をエピトープと仮定し, 128 組の親子を用い, 母の HLA 抗体のエピトープ解析をおこない, 同じエピトープを認識する異なった血清が複数得られるエピトープ候補は免疫原性の高いエピトープと仮定し解析した。

【材料と方法】

- 128 組(父・母・ベビー)の HLA-A~DP をタイプし, ハプロタイプ解析を実施。
- 各組の母の妊娠 3 ヶ月, 8 ヶ月, 出産後の血清を採取し, スクリーニング・特異性同定を Luminex 法により実施した。
- エピトープの決定: エピグラフより候補アミノ酸群と部位を選択し, 候補エピトープが複数のアミノ酸で構成される場合, その位置が抗体の反応可能距離内に存在する組み合わせをエピトープとした。
- エピトープの命名法: 6 桁(はじめの 3 桁は位置を, 残り 3 桁はアミノ酸の違いを示す)命名法を適用した。

【結果と考察】 HLA-classI 抗体のエピトープとして 38 種の位置が特定され, 同一の位置でアミノ酸の種類が異なるエピトープが 12 種特定された。これらのエピトープ候補の約半数は複数のアロ抗体で検出され, 最大 9 種の抗体が検出されるエピトープがあった。HLA 分子のペプチド結合部位の周辺のアミノ酸がエピトープとして高頻度に検出された。

P-22

フィブリノゲンアルファー遺伝子多型は慢性血栓塞栓性肺高血圧症と関連する

○ 陳 智勇^{1,2)}, 小南聡志³⁾, 田邊信宏³⁾, 中島敏晶^{1,4)}, 巽浩一郎³⁾, 栗山喬之³⁾, 木村彰方^{1,4)}

- 1) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・分子病態分野
- 2) 同・大学院医歯学総合研究科・血管応用外科学
- 3) 千葉大学・大学院医学研究院・加齢呼吸器病態制御学
- 4) 同・大学院疾患生命科学研究所・ゲノム多様性

【目的】 慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTPH) は肺動脈の血栓・塞栓により慢性肺高血圧症を来す病因不明の疾患であるが、欧米の症例では凝固異常症や深部静脈血栓症 (DVT) に続発するため、その病因・病態形成に血栓形成・融解異常が関わると推定されている。しかしながら、わが国の症例の多くは DVT を伴ってはず、欧米人とは異なる疾患背景が存在する可能性がある。また、欧米人 CTEPH と HLA との関連は明確ではないが、我々は日本人 CTEPH と HLA-DPB1*0202 及び B*5201 との強い関連を報告している。一方、凝固因子であるフィブリノゲンアルファー (FGA) の多型は DVT と関連するが、欧米人 CTEPH と FGA 多型との関連が最近報告された。本研究では、日本人における FGA 遺伝子多型および HLA 多型と CTEPH との関連を検討した。

【方法】 CTEPH 患者 160 名 (うち DVT 陽性 60 名, DVT 陰性 99 名) と一般健常者 220 名を対象とした。FGA 遺伝子の -58 G > A 及び 3'-UTR に位置する 28 bp Ins/Del 多型をタイピングし、CTEPH との関連を DVT, HLA-B*5201, DPB1*0202 の有無と合わせて多型頻度を検討した。

【結果と考察】 CTEPH 患者群には -58 A allele (59.0% vs. 47.1%, $P < 0.0013$, OR = 1.62, 95%CI 1.21-2.17) および 28 bp Ins allele (56.9% vs. 46.1%, $P < 0.0035$, OR = 1.54, 95%CI 1.15-2.06) 頻度が有意に高かった。また、この二つの多型は強い連鎖不平衡にあった。HLA-B*5201 および DPB1*0202 と CTEPH との関連は DVT (-) 症例のみで認められた (それぞれ 44.4% vs. 23.7%, $P < 1.4 \times 10^{-5}$, OR = 2.57, 95%CI 1.68-3.92; 19.2% vs. 6.3%, $P < 1.4 \times 10^{-5}$, OR = 3.51, 95%CI 2.01-6.13) のに対し、FGA 多型との有意な関連は DVT, B*5201 及び DPB1*0202 の有無とは関係なく認められた。以上の結果は、CTEPH の病態形成の異質性を示唆し、FGA 多型は HLA-B*5201 および DPB1*0202 とは独立した遺伝要因であると考えられた。

P-23

HLA-DR15 はアルツハイマー病早期発症のリスクファクターか

○ 酒巻建夫¹⁾, 大西民子¹⁾, 岡村康子¹⁾, 高橋千尋¹⁾, 飯田好江²⁾, 吉山容正³⁾

- 1) 国立病院機構千葉東病院・研究検査科 HLA 検査室
- 2) がんセンター東病院・臨床検査部
- 3) 国立病院機構千葉東病院・臨床研究センター神経内科

【目的】 アルツハイマー病 (AD) は脳内にアミロイド沈着を伴う認知症で高齢認知症患者の 40% 以上を占めている。発症年齢が早い常染色体優性の家族性 AD を除くと 50 歳前後から発症が認められる。遺伝的影響因子では ApoEε4 が認められるが炎症機序としての HLA 遺伝子の関与については明らかではない。今回、発症年齢と HLA-DR との関連が認められたので、報告する。

【方法】 本院および関連病院の臨床的に AD 診断した日本人 102 名 (男性 34 名と女性 68 名) の患者を対象とした。発症年齢により患者群を 65 歳までの若年者群 (I 群) 16 名, 66 歳から 75 歳までの群 (II 群) 38 名, 76 歳以上群 (III 群) 48 名の 3 グループに分けた。若年者の発症者は少ないので、精力的に症例を集めたために実際の年齢構成とは異なっている。タイピングには末梢白血球由来の DNA を使用した。A 座, B 座および DRB タイピングには Dynal-Reli キットを用い、補足的な DRB1 と, DQB1 タイピングには自家製 SSP キットを使用した。DNA 型から HLA 型に読み替え、患者 HLA 頻度を本院職員 619 名と HLA 学会 WS の HLA 頻度と比較した。本研究は病院倫理委員会の承認を得、患者家族または軽症患者の承諾を得て実施した。

【結果】 AD 全体では疾患に強く相関する HLA 型は認められなかった。その中で A24, B52, DR15 がやや多く, B61 が少ない傾向が認められた。年齢別では 75 歳までの I+II 群では DR15 が有意に多く, I 群や II 群でもその傾向が認められた。DR13 は II 群ではむしろ少ない傾向が認められた。一方, III 群では HLA 抗原の偏りがほとんど認められなかった。DR15 抗原のうち DRB1*1502 が増加していたが DRB1*1501 も同様に増加していた。

【考察】 A24, B52 抗原が増加しているのは日本人に多い DR15 との連鎖不平衡の影響によると考えられる。若年発症者では DR13 が少ないことと DR15 抗原が多いことを考えると発症に炎症や免疫系の活性化が関与している可能性が推測される。

P-24

原爆被爆生存者における HLA 遺伝子型頻度分布

○ 長村浩子, 森下ゆかり, 林 奉権

放射線影響研究所(放影研)放射線生物学/分子疫学部

【目的】 原爆被爆者から得られた疫学調査の結果は、ヒトの放射線リスクの推定や放射線被曝の許容基準の設定に広く用いられている。しかし、放射線障害発生に関して原爆被爆者の中に感受性の異なる人々が存在したとすると、現在の追跡集団から得られた結果は一般集団への影響を正しく反映していないかもしれない。例えば、特定の HLA 型をもった集団は被爆後感染疾患が致命的となつて早期に死亡し、現在の被爆生存者集団の HLA 型頻度が、非被爆者と比べて異なっている可能性が考えられる。今回、この原爆被爆者の HLA 型の頻度が一般集団に比べて偏っているのかを明らかにするため、被爆者及び非被爆者集団について HLA 遺伝子型の頻度分布を調べた。

【方法】 放影研の成人健康調査のために来所した広島・長崎原爆被爆者 3,075 名(非被爆者 1,225 名, 被爆者 1,850 名)から遺伝子解析の同意を得た後、血液細胞から DNA を抽出した。HLA-DQA1, -DRB1, -A の遺伝子型は PCR-SBT 法を用いて調べた。被爆者は線量の間値 (0.63 Gy) で低線量群と高線量群に分けて非被爆者群との比較を行った。

【結果・考察】 非被爆者の HLA-DQA, -DRB1, -A 型の各頻度分布はこれまでに報告されている日本人集団とはほぼ一致していた。ロジスティック回帰により性、年齢、市差を補正して HLA 遺伝子型分布への放射線被曝の影響について解析した結果、HLA-DRB1 の中で DRB1*080302 で非被爆者に比べ被爆者、特に高線量被爆者群で有意な頻度の減少を認めた。それ以外の型において有意な減少は認められなかった。HLA-DQA1 と HLA-A については同様の統計的解析を行ったが、有意な頻度の偏りは認められなかった。これらの結果は一部の HLA 型が被爆者の放射線被曝後の生存能に影響していたかもしれないことを示唆している。

P-25

腸型胃癌とびまん性胃癌のリスクと IL-10 ハプロタイプとの関係およびそれに対する放射線被曝の影響

○ 林 奉権, 森下ゆかり, 長村浩子

放射線影響研究所(放影研)・放射線生物学/分子疫学部

【目的】 原爆放射線被曝によって胃がんリスクが増加することは、疫学研究によって報告されている。我々は以前、炎症関連サイトカインの一つである IL-10 の遺伝子多型が胃発がん感受性の遺伝的要因の一つであることを見出した。一方、胃がんは腸型とびまん性型によって発がん経路に違いがあると考えられている。本調査では、腸型胃癌とびまん性胃癌のそれぞれについて、放射線被曝と IL-10 ハプロタイプの組み合わせによる胃がんリスクを検討した。

【方法】 放影研の成人健康調査コーホートから 181 症例および対照者 1,576 名を選び解析を行った。腸型胃癌、びまん性胃癌の分類は、地域がん登録データに従った。IL-10 遺伝子の多型部位は、Taqman allelic discrimination 法を用いて調べた。

【結果・考察】 症例における両タイプの割合と被曝線量の関係を見ると、被曝線量が高い群ではびまん性胃癌の割合が増加し、腸型胃癌が減少していた。さらに、多変量解析により、放射線被曝はびまん性胃癌の胃がんリスク増加に関与するが、腸型胃癌のリスクには有意な関連を示さないことが見出された。腸型胃癌では、IL-10 ハプロタイプによって非被爆者の胃がんリスクが大きく異なっていたが、各々のハプロタイプのがんリスクに放射線被曝は大きく影響していなかった。これに対して、びまん性胃癌においては、IL-10 ハプロタイプによるリスクは大きく異なり、放射線被曝によるリスクの増加は特に ATTA/ATTA について著しかった。その結果、高線量の放射線に被曝し変異対立遺伝子 GGCG を持つ対象者では胃がんのリスクが最も高かったが、IL-10 ハプロタイプによるリスクの差異は減少した。以上の結果から、特定のハプロタイプでは放射線被曝によるリスクの増加が顕著であり、放射線関連の胃がん発生に対する遺伝的感受性の高いグループが存在することが示唆された。

P-26

Polymorphisms of HLA Genes in Western Indonesian: Close affinities to Southern Groups of East Asian

○ Rika Yuliwulandari^{1, 2)}, Koichi Kashiwase³⁾, Humiaki Nakajima³⁾, Jurnal Uddin²⁾, Tri Panjiasih Susmiarsih²⁾, Abdul Salam Mudzakir Sofro²⁾, Katsushi Tokunaga¹⁾

1) Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

2) Faculty of Medicine, Yarsi University, Jakarta-Indonesia

3) Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Center, Tokyo, Japan

Identification of Human Leukocyte Antigen (HLA) antigens which are known as highest polymorphic genes has become a valuable tool for tissue transplantation, platelet transfusion, disease susceptibility or resistance, forensic and anthropology studies. In the present study, the allele and haplotype frequencies of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 were studied in 236 unrelated healthy Western Indonesian by the high resolution PCR-Luminex method. A total of 18 A, 40 B and 20 DRB1 alleles were identified. The most frequent HLA-A, -B and -DRB1 alleles were HLA-A*2407 (21.6%), HLA-B*1502 (11.7%) and HLA-B*1513 (11.2%) and DRB1*1202 (37.5%), respectively. The most frequent 2-locus haplotypes were HLA-A*2407-B*3505 (7%) and HLA-B*1513-DRB1*1202 (9.2%), and for 3-locus haplotypes were HLA-A*3401-B*1521-DRB1*150201 (4.6%), HLA-A*2407-B*3505-DRB1*1202 (4.3%) and HLA-A*330301-B*440302-DRB1*070101 (4.2%). Phylogenetic tree and principal component analyses, in addition to particular allele and haplotype frequencies, showed that Indonesian is closest to Southeast Asian populations.

P-27

タイ集団における HLA-A, B, C アリルとマラリア重症化との関連

○ 平安恒幸^{1, 2, 3)}, 大橋 順¹⁾, 柏瀬貢一³⁾, 市原孝浩³⁾, 峯元睦子³⁾, ハナナンタチャイ ハッタイラ⁴⁾, 小川篤子³⁾, 高梨美乃子³⁾, 徳永勝士¹⁾, パタラポティクル ジンタナ⁴⁾, 屋部登志雄³⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学

2) 日本学術振興会特別研究員

3) 東京都赤十字血液センター

4) マヒドン大学熱帯医学研究所

【目的】 マラリアは世界的に重大な感染症であり、年間の患者数は 3-5 億人、死亡者数は 100-300 万人と推定されている。これまでにマラリアの病態について数多くの研究が報告されているが、マラリア重症化に関わる遺伝要因についてはいまだすべて明らかとなっていない。また、西アフリカでは HLA-B53 がマラリア重症化の抵抗因子として報告されておりマラリアにおける HLA 遺伝子の重要性が示唆されているが、HLA クラス I 遺伝子多型の包括的な解析はほとんどなされていない。そこで本研究では、HLA-A, B, C アリルと熱帯熱マラリアの重症化との関連を調べた。

【方法】 タイ人軽症マラリア 203 名、非脳性重症マラリア 165 名、脳性マラリア 109 名について WAKFlow HLA タイピング試薬を用いて HLA タイピングを行った。Ambiguity を示したサンプルは、SBT 法によって HLA 遺伝子型を決定した。フィッシャーの正確確率検定を用いて、HLA アリル陽性率を患者群間で比較した。

【結果】 HLA-A, HLA-B, HLA-C において、それぞれ 34 アリル、62 アリル、23 アリルが検出された。また、新規の HLA-B アリルが見出された。さらに、HLA-B*4601 が脳性マラリアと弱い関連を示すことが明らかとなった ($P=0.01$)。これは、先行研究であるミャンマー集団の結果 (Tokai J Exp Clin Med 23(2): 81-83, 1998) と我々の low-resolution の HLA データの結果 (Jpn J Infect Dis 58: 25-28, 2005) と一致している。さらなる解析を現在進行中である。

P-28

Vietnam の Kinh 民族集団に見いだされた新しい DRB1 アリルの解析

○ 安波道郎¹⁾, Nguyen T. P. Lan¹⁾, 菊池三穂子¹⁾, Vu T. Q. Huong²⁾, Vu T. T. Ngu²⁾, Hoang N. Dao²⁾, Do Q. Ha²⁾, Tran T. Thuy³⁾, Ha M. Tuan³⁾, Vo V. Tuong⁴⁾, Cao T. P. Nga⁴⁾, Tran V. Dat⁴⁾, 奥田尚子¹⁾, 堀江仁美¹⁾, 森田公一¹⁾, 平山謙二¹⁾

- 1) 長崎大学・熱帯医学研究所
- 2) パスツール研究所(ホーチミン市)
- 3) ホーチミン市第2小児病院
- 4) ヴィンロン県予防医療センター

【目的】 デング出血熱の重篤度を左右する宿主側要因を解明する目的で, Vietnam 南部 Mekong 川流域の Ho Chi Minh 市および近郊に在住する5歳から15歳の患児と対照の学童を収集した。HLA-DRB1のSSO法で遺伝子型決定不能の例について当該遺伝子領域をクローン化して, 新しいアリルを見いだすに至った。今回, このアリルの検出法を設計して, 集団内の頻度を推定するとともに, 他法での所見を検討した。

【方法】 DRB1 遺伝子 exon 2 を含む断片をゲノム DNA から単離してプラスミドベクターにクローン化した。塩基配列解析の結果, 超可変領域 HVR3 が DRB3 遺伝子座のアリルと一致していた。この部分に相当するオリゴヌクレオチドプライマーを用いてこの DRB1 アリルを検出する PCR を考案し, 本法で陽性の検体について, Luminex 法によるタイピングを施行して変異部位に相当するピーズの反応性を検討した。

【結果】 新しい DRB1 アリルの塩基配列データから, 本アリルは exon 2 の 5' 部分に DRB1 の Group 3/11/6 に特徴的な配列を持ち, DRB1*14 に分類されると思われる。SSO 法の反応性から DRB1*14 陽性とされた 150 検体について, 本アリルを検出する SSP を施行したところ 7 検体に陽性の結果を得た。このことから集団内での表現型頻度はおよそ 1.0% と推定された。OneLambda 社 LABType SSO (Lot #013) には変異に一致するものは含まないため, 本アリルは検出不能であるが, 当該領域にクロスハイブリダイズによる弱い信号が見られた。

【考察】 民族集団の形成の歴史を反映して各々の民族集団には特徴的なアリルが存在しており, タイピング技術もそれぞれに最適化を要する。新たに見いだした DRB1 アリルは抗原結合に重要な HVR3 領域の変異であり, その免疫遺伝学的意味は大きい。

P-29

Luminex 法により検出された新しい HLA-C 座 (Cw*0102V1) アリルについて

○ 荒木延夫¹⁾, 西村千恵¹⁾, 稲葉洋行¹⁾, 南 裕史¹⁾, 井本しおん¹⁾, 馬淵 理¹⁾, 市原孝浩²⁾, 田中秀則²⁾

- 1) 兵庫県赤十字血液センター
- 2) 東京都赤十字血液センター

【目的】 成分献血登録者の HLA タイピングにおいて Luminex 法を用いた HLA-C タイピングで従来のアリルでは判定不能となる反応パターンを示す新アリルが検出された。これらの解析結果について報告する。

【方法】 成分献血登録者の HLA 型登録用末梢血液由来 DNA を用い Luminex 法 (MBL 社: ジェノサーチ HLA-C Ver.2 lot004) により HLA-C タイピングを実施した。SBT 法によりアリルの確認検査を実施し, 変異部分を含む Exon の増幅産物をクローニング後, 塩基配列を決定した。

【結果および考察】 Luminex 法では Cw*0102 の 1 ピーズ mismatches (ピーズ No. C_25 が陽性化) となった。C_25 は Exon 3 後半部の 156 番目のコドンが L(CTG) であり, 日本人のメジャーアリルでは Cw*0303, Cw*0304, Cw*0702, Cw*0801, Cw*0803, Cw*1502 のその箇所の塩基配列が該当する。登録されている Cw*01 系アリルで C_25 が陽性となるものはないので新アリルの可能性が考えられた。マイクロ SSP 法 (ONE LAMDA 社: SSP1C lot004) では, Cw*0102, Cw*- と判定された。クローニング後の塩基配列による結果は, Cw*010201 / 0102V1 で, 0102V1 は, Luminex 法で予測された通り, コドン 156 の R が L に置換 (CGG → CTG) されていた。この新アリルは, 変異部分が α ヘリックス上にあり, アミノ酸が塩基性から中性に変化しているため, 細胞性免疫および液性免疫に影響を及ぼす可能性があると考えられる。なお, このアリルは現在, 登録中である。

P-30

SLA ハプロタイプ固定近交系デュロックブタにおける抗体産生

○ 安藤麻子¹⁾, 今枝紀明²⁾, 吉岡 豪²⁾, 岡本宏明³⁾, 田中穂積⁴⁾, 河田寿子⁵⁾, 重成敦子¹⁾, 小林英司⁶⁾, 猪子英俊¹⁾, 北川 均⁷⁾

- 1) 東海大・医
- 2) 岐阜県畜産研・養豚研究所
- 3) 自治医大・医
- 4) 自治医大・実験医学セ
- 5) 東海大・伊勢原研究推進部・教育・研究支援セ
- 6) 自治医大・分子病態治療研究セ
- 7) 岐阜大・応用生物科学

【目的】 MHC (SLA) 遺伝子型が固定された近交系ブタは、臓器移植実験や免疫抑制剤の効果判定などに有用な実験動物である。我々は、安価な産業用豚において SLA タイプ固定近交系デュロックブタ(以下, SBD) を作出し、その形態的特徴、並びに 2 種類の SLA ハプロタイプと豚丹毒生ワクチン接種後の抗体価について報告した(第 15 回日本組織適合性学会大会)。今回は、この SBD の免疫学的特性を検討する目的で、豚丹毒不活化ワクチン接種後抗体価並びに E 型肝炎ウイルス (HEV) 自然感染抗体価と SLA ハプロタイプとの関連性を検討した。

【方法】 Hp-27.30 ホモ, Hp-27.30/60.13 ヘテロ, Hp-60.13 ホモ, 及び両ハプロタイプヘテロの SBD 各群、及び同居する一般ブタについて、豚丹毒不活化ワクチン 2 回接種後の抗体価を測定した。また、同様の SBD と一般ブタについて、生後 5~13 ヶ月齢までの HEV 自然感染抗体価を測定した。豚丹毒ワクチン抗体価または HEV 自然抗体価の各群における差は多重比較検定により検定した。

【結果と考察】 豚丹毒不活化ワクチン 2 回接種後 (19 週齢) の抗体価は、Hp-27.30 ホモが最も低く、Hp-27.30/60.13 ヘテロとの間に有意差 ($P < 0.05$) が認められた。5~7 ヶ月齢のブタの HEV 自然感染抗体価は、Hp-27.30 ホモ, Hp-27.30/60.13 ヘテロ, Hp-60.13 ホモの順に高くなり、Hp-27.30 ホモと Hp-60.13 ホモの間に有意差 ($P < 0.05$) が認められた。これらの結果は、Hp-27.30 ハプロタイプの抗体産生能が低いことを示唆している。この SBD は、産業用であるため安価に供給できるばかりでなく、免疫応答性の異なる 2 種類の新しい SLA ハプロタイプを有するため、各種移植や免疫応答性などの研究において広範な利用が期待できる。

P-31

ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA)-DQA1 遺伝子の特徴

○ 竹嶋伸之輔, 陳 晶, 間 陽子
理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット

【目的】 ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA) はウシゲノムの中でも顕著な多型を有する領域である。中でも最も多型性に富む BoLA-DRB3 の多型は乳房炎や牛白血病の発症と相関する事が知られている。一方、DRB3 の近傍に位置し、次に多型性に富む DQA1 遺伝子のタイピング法は未だ確立されておらず、疾患との関連性は不明のままである。そこで我々は、DQA1 の PCR-sequence based typing (SBT) 法を世界に先駆けて開発し、日本に飼育されている代表的なウシ品種のアリル頻度を解析し、さらに、他種の DQA 遺伝子との比較を行った。

【方法・結果】 DQA1 の全アリルを増幅可能で、さらに Direct Sequence 可能なプライマーを設計し、DQA1 の PCR-SBT 法を確立した。この方法を用いて、日本で飼養されているジャージー 64 頭、日本短角 102 頭、黒毛和種 95 頭、ホルスタイン 91 頭、計 352 頭のタイピングを行った結果、2 種類の新規を含む 19 種類の DQA1 アリルが検出され、各々のアリル分布は品種により著しく異なる事が明らかとなった。さらにアリル頻度による系統樹解析から、DQA1 アリル分布の傾向はホルスタインと黒毛和種が最も類似しており、ジャージーが他の 3 品種と比較して異なっている事が示された。さらに、品種ごとに Wu-Kabat Variability Index を計算し、比較解析を行った。その結果、DQA1 アリルの多様度はホルスタインで最も高く、黒毛和種では最も低くなっていることが示された。

次に、反芻動物であるウシ、ヤギ、スイギュウ、ヒツジ、およびブタ、ヒト、イヌの DQA1 遺伝子の系統樹を作成したところ、反芻動物の DQA1 はヒトやイヌよりもブタと近縁であることが示された。また、イヌ DQA 遺伝子を除く全ての種で、アミノ酸残基の多型率は似通っていることが明らかとなった。さらに、アミノ酸残基 52-53 および 65-66 の 2 つの領域は、他種に比べて反芻動物で特に多型的であることが明らかとなった。

【考察】 これら結果から、反芻動物の DQA1 遺伝子は他種と比較して、多型性が高いことが示された。

P-32

ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA)-DRB3 の新 PCR-SBT 法の開発

○ 間 陽子, 松本有生, 竹嶋伸之輔, 佐藤正明
理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット

【目的】 ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA) は高度に多型性に富む領域で, 様々な疾患や経済形質などと相関する事が知られている。我々はこれまで, 最も機能的で, 多型性に富む BoLA クラス II DRB3 を正確・迅速にタイピング可能な PCR-sequence based typing (SBT) 法を開発の開発に成功し, 乳房炎や牛白血病の発症と DRB3 の多型性との相関性を明らかにしてきた。しかしこの方法は一検体で9つのPCRと4回のシーケンスが必要で, 電気泳動による増幅判定が必要となるため, 大規模なサンプルを機械的に処理するには不向きであり, さらなる改良が望まれていた。そこで本研究では, このPCR-SBT法を改良し, 大規模なサンプルに対応可能な新規PCR-SBT法を開発に取り組んだ。

【方法】 はじめに DRB3 の全アレルを増幅可能で, さらに Direct sequence 可能なプライマーを設計するために6通りの1st PCR および4通りの2nd PCR を検討し, 得られた増幅産物の Direct sequence を5通りのプライマーを用いて検証した。得られたシーケンスを AssignSBT ソフトウェアにより解析し, アレルの決定を試みた。

【結果】 1st PCR には ERB3N と HL031, 2nd PCR には ALL と DRB3B, そして両側のシーケンスに M13(-21) と M13rev を用いた場合に最も良好な結果を得ることができた。この方法を用いて14頭のウシサンプルを用いて以前のPCR-SBT法と改良したSBT法の結果を比較したところ, 11頭のサンプルで結果が一致した。タイピング出来なかった3頭はいずれも3bp欠損アレル DRB3*0201 を片方にもつ個体であった。続いて60頭のタイピングを行った。57頭のタイピングに成功し, 14種類のDRB3アレルが検出された。また, 残りの3頭は以前のPCR-SBT法を用いて, いずれも3bp欠損アレルを有する個体である事を確かめた。

【考察】 本研究の結果, 新規PCR-SBTと旧SBTの併用により BoLA-DRB3 のタイピングを効率よく行う事が可能となった。現在, 欠損アレルもタイピング可能な SBT 法の開発を行っている。

P-33

ヘテロ接合による乳房炎発症抑制効果および疾患感受性アレルの同定

○ 竹嶋伸之輔¹⁾, 松本有生¹⁾, 陳 晶¹⁾, 吉田達行²⁾, 向山明孝²⁾, 間 陽子¹⁾

1) 理化学研究所・分子ウイルス学特別研究ユニット
2) 日本獣医生命科学大学

【目的】 乳房炎は乳頭へ細菌が感染し引き起こされる炎症反応で, その疾患感受性には個体差が存在する。本研究では, ウシ主要組織適合遺伝子 (BoLA) クラス II が原因菌の異なる乳房炎の発症にどのように関与しているかを, DRB3 および DQA1 のヘテロ接合度と乳房炎発症との関連性, および発症牛に有意に高頻度または低頻度に検出されるアレルを同定する相関解析の2つの視点から解析した。

【方法】 千葉県内の牧場の乳房炎発症牛120頭を, 原因菌別に, 連鎖球菌由来 (Str) 42頭, 黄色ブドウ球菌由来 (Sta) 11頭, 大腸菌群由来 (Ech) 16頭, コアグラゼ陰性ブドウ球菌由来 (CNS) 23頭の4群に分類し, 各個体の DRB3 と DQA1 アレルを開発した PCR-Sequence Based Typing により同定した。

【結果】 120頭の乳房炎発症牛から104の既知アレルのうち15種類のDRB3アレルと31の既知アレルのうち12種類のDQA1アレルが検出された。原因菌別に分類した集団ごとに DRB3 と DQA1 アレルのヘテロ接合度を算出し, アレル頻度から推定される理論値と比較した。その結果, DRB3 のヘテロ接合度の理論値と実測値は乳房炎発症牛全体においても, 原因菌別に分類した4群においても一致した。一方, DQA1 においては, 4群中 Str 群と Ech 群の2群で理論値 (Str, 76%; Ech, 69%) と比較して実測値 (Str, 57%; Ech, 44%) が大きく下回っていた。以上の結果から, DQA1 のヘテロ接合度が低い事によって特定の原因菌に由来する乳房炎の発症リスクが高くなる事が明らかとなった。

次に, Str 群と Ech 群の2群のDQA1アレル頻度を対照群と比較する相関解析を行った。その結果, Str 群では DQA1*0101 と DQA1*10012 が, また Ech 群では DQA1*10011 が有意に高頻度に検出された。以上の結果から, 乳房炎の発症と相関するアレルの検出に成功した。

【考察】 本研究において, ウシで初めてMHCのヘテロ接合性が疾患の発症リスクの低下を誘発している可能性を示す事が出来た。また, 原因菌別の解析によって, 乳房炎に関与するアレルの同定に成功した。今後, 乳房炎の発症にどのようにDQA1が関与するのか, その作用機序の解明が必要である。

第17回日本組織適合性学会大会
協賛企業一覧

本大会開催に際し、企業展示、協賛金のご寄付を頂きました企業各社に対し、厚く御礼申し上げます。

アステラス製薬株式会社
アボットジャパン株式会社
株式会社医学生物学研究所
株式会社エスアールエル
株式会社キアゲン
株式会社新大阪商会
株式会社ジャパンファーム
株式会社ビー・エム・エル
株式会社ベリタス
株式会社リプロセル
コルベット ライフサイエンス
武田薬品工業株式会社
中外製薬株式会社
ノバルティスファーマ株式会社
バイオテスト株式会社
プロメガ株式会社
ホクユーメディックス株式会社
南出理化商会
八洲薬品株式会社
湧永製薬株式会社

(50音順, 2008年7月現在)