

MHC

日本組織適合性学会誌

Major Histocompatibility Complex

Vol. 19 No. 2, 2012

Contents

第 21 回日本組織適合性学会大会 プログラム	
ご案内.....	88
特別講演.....	127
シンポジウム.....	131
教育講演.....	141
学術賞ならびに学術奨励賞候補口演.....	147
一般口演発表.....	157
一般ポスター発表.....	177
第 11 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内.....	197
[シリーズ：臓器移植とクロスマッチ]	
第 1 回	
腎移植におけるクロスマッチ.....小林 孝彰	199
[原著論文]	
次世代シーケンサーを用いた HLA-DRB1 遺伝子の超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発尾崎有紀, 鈴木進悟, 吉川枝里, 重成敦子, 岡 晃, 光永滋樹, 椎名 隆, 猪子英俊	211
日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定	223
編集後記.....	226

● Contents ●

日本組織適合性学会誌 第 19 巻第 2 号 平成 24 年 8 月 10 日発行

第 21 回日本組織適合性学会大会プログラム

ご案内.....	88
特別講演.....	127
シンポジウム.....	131
教育講演.....	141
学術賞ならびに学術奨励賞候補口演.....	147
一般口演発表.....	157
一般ポスター発表.....	177

第 11 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内.....	197
--------------------------------	-----

[シリーズ：臓器移植とクロスマッチ]

第 1 回

腎移植におけるクロスマッチ.....	小林 孝彰	199
--------------------	-------	-----

[原著論文]

次世代シーケンサーを用いた HLA-DRB1 遺伝子の超高解像度 DNA タイピング

(Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発

.....尾崎有紀, 鈴木進悟, 吉川枝里, 重成敦子, 岡 晃, 光永滋樹, 椎名 隆, 猪子英俊	211
--	-----

日本組織適合性学会誌 MHC 投稿規定	223
---------------------------	-----

編集後記.....	226
-----------	-----

日本組織適合性学会誌 MHC 編集委員会

編集委員長

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学

編集委員

赤座 達也 特定非営利活動法人 HLA 研究所
一戸 辰夫 京都大学医学部附属病院血液腫瘍内科
江川 裕人 東京女子医科大学消化器病センター外科
木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野
佐治 博夫 特定非営利活動法人 HLA 研究所
佐田 正晴 国立循環器病センター研究所再生医療部移植外科
下嶋 典子 奈良県立医科大学細菌学教室
椿 和央 近畿大学医学部奈良病院血液免疫内科
成瀬 妙子 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野
難波 行臣 桜橋医誠会クリニック

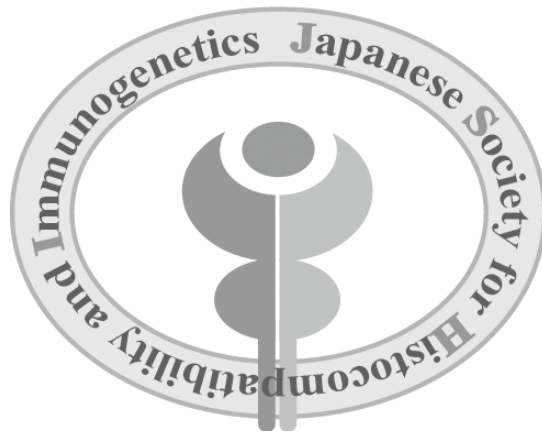
編集協力者

安藤 麻子 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
石川 善英 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所研究開発部
石谷 昭子 奈良県立医科大学法医学教室
猪子 英俊 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門
太田 正穂 信州大学医学部法医学教室
大谷 文雄 北里大学医学部免疫学講座
小河原 悟 福岡大学病院腎臓・膠原病内科
小幡 文弥 北里大学医療衛生学部免疫学
柏瀬 貢一 東京都赤十字血液センター検査部
小林 賢 日本薬科大学 生物学研究室
酒巻 建夫 国立病院機構千葉東病院 HLA 検査室
杉谷 篤 藤田保健衛生大学医学部臓器移植再生医学講座
千住 覚 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野
田中 秀則 東京都赤十字血液センター検査部
田邊 一成 東京女子医科大学泌尿器科
徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野
中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所研究開発部
永尾 暢夫 神戸常盤短期大学衛生技術科
西村 泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学講座
平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門疾病生態分野
森島 泰雄 愛知県がんセンター中央病院
安波 道郎 長崎大学熱帯医学研究所国際連携研究戦略本部
屋部登志雄 東京都赤十字血液センター製剤部

第21回 日本組織適合性学会大会

The 21st Annual Meeting of the Japanese Society for
Histocompatibility and Immunogenetics

異分野研究が拓く
MHC研究の新しい展開



<http://www.hla2012.com/index.html>

大会長 間 陽子 (理化学研究所分子ウイルス学特別研究ユニット)

副大会長 高原史郎 (大阪大学大学院医学系研究科)

丸山公明 (明治大学農学部生命科学科)

幹 事 安藤麻子 猪子英俊 石谷昭子 上西博英

小林孝彰 下嶋典子 椎名 隆 竹嶋伸之輔

中西照幸 成瀬妙子 宮寺浩子 湯沢賢治

(50音順)

会 期 2012年 9月15日(土)~17日(月)

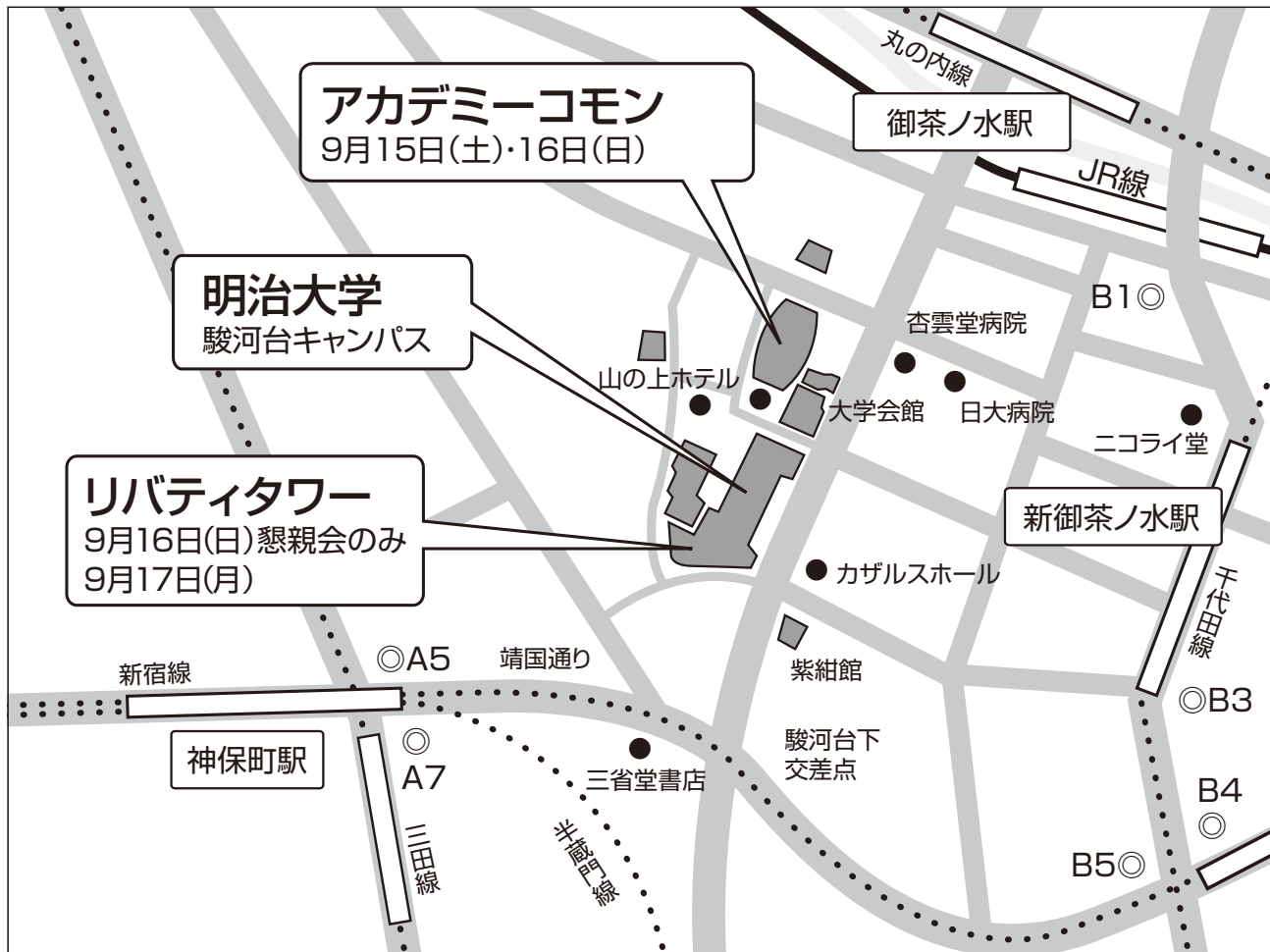
会 場 明治大学 (駿河台キャンパス)

〒101-8301 東京都千代田区神田駿河台1-1

後 援 独立行政法人 理化学研究所

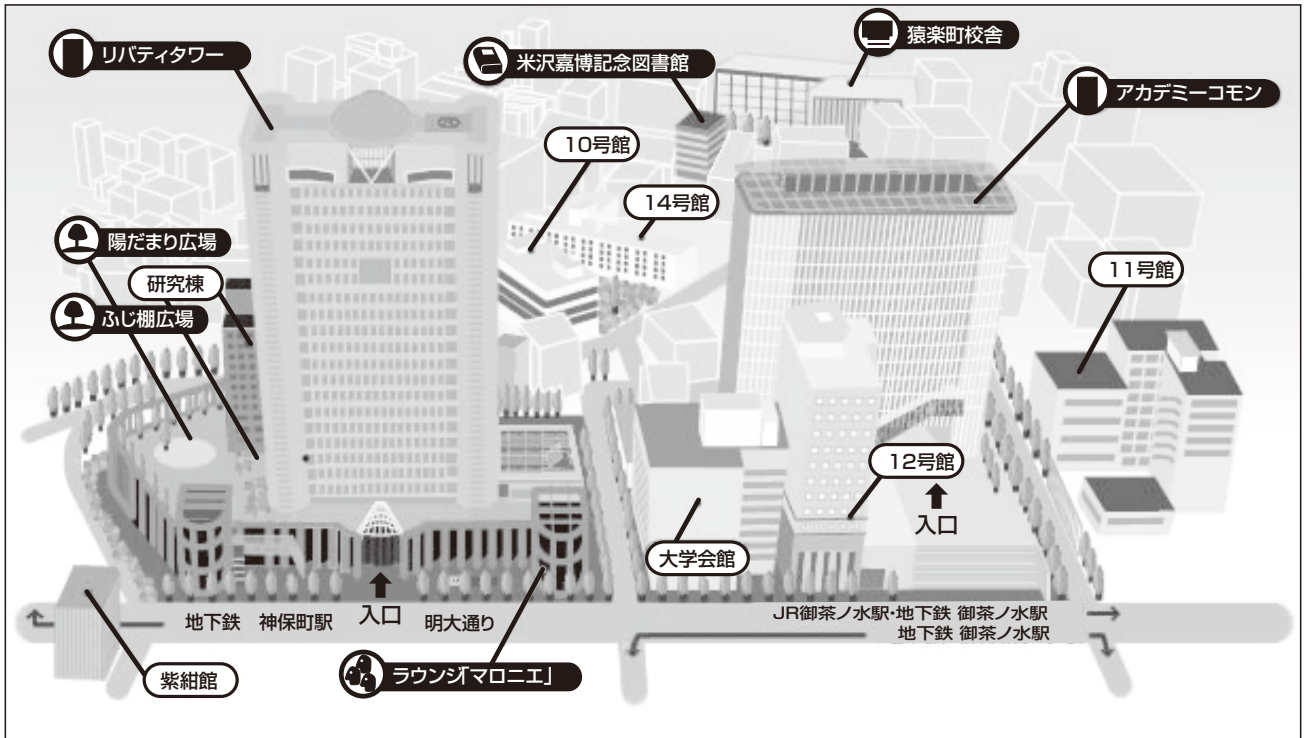
明治大学

会場案内図

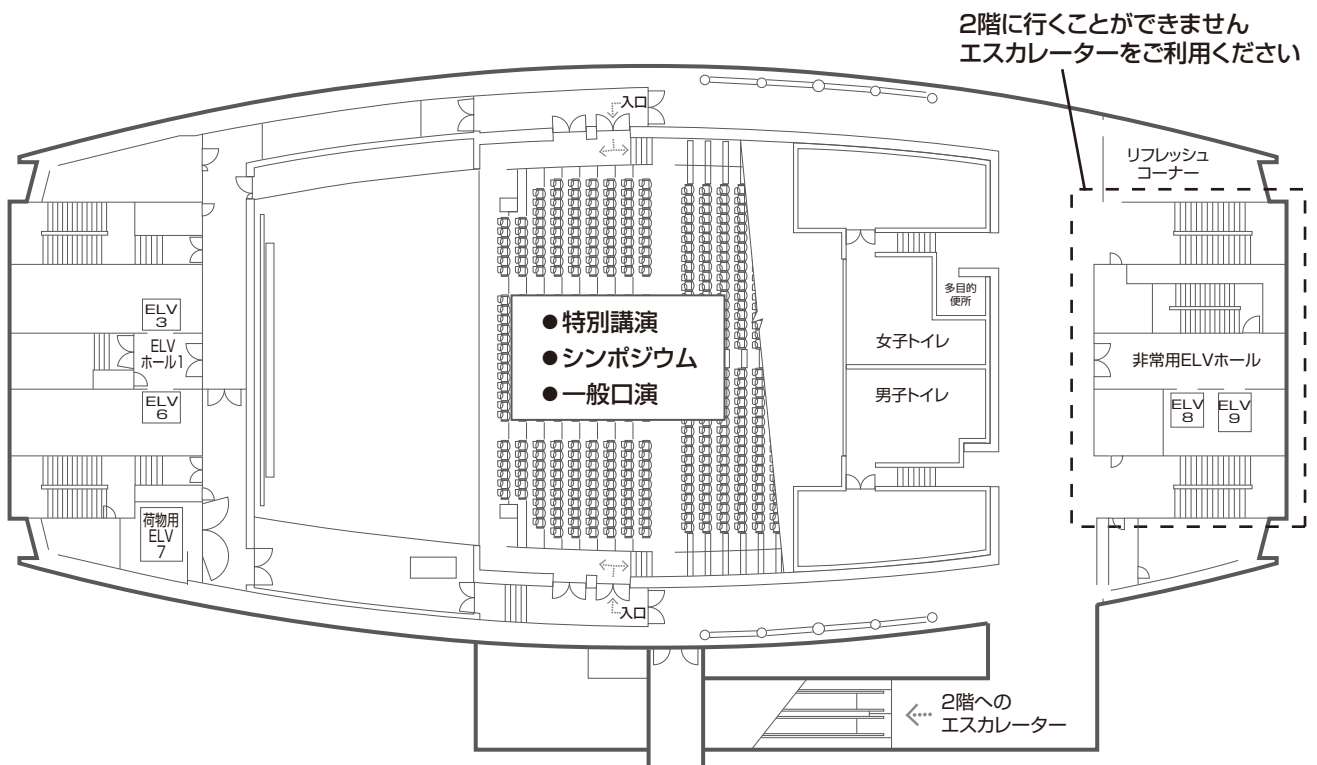


- JR中央線・総武線、東京メトロ丸ノ内線／御茶ノ水駅 下車徒歩 3分
- 東京メトロ千代田線／新御茶ノ水駅 下車徒歩 5分
- 都営地下鉄三田線・新宿線、東京メトロ半蔵門線／神保町駅 下車徒歩 5分

会場図

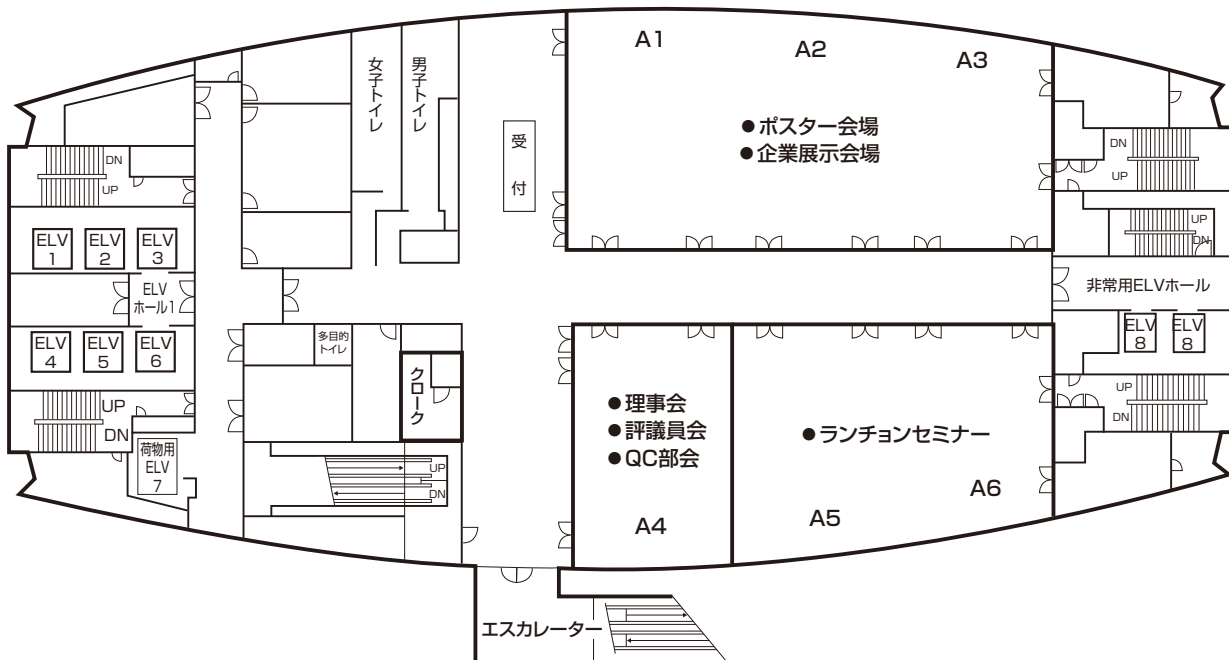


アカデミーコモン3F：アカデミーホール



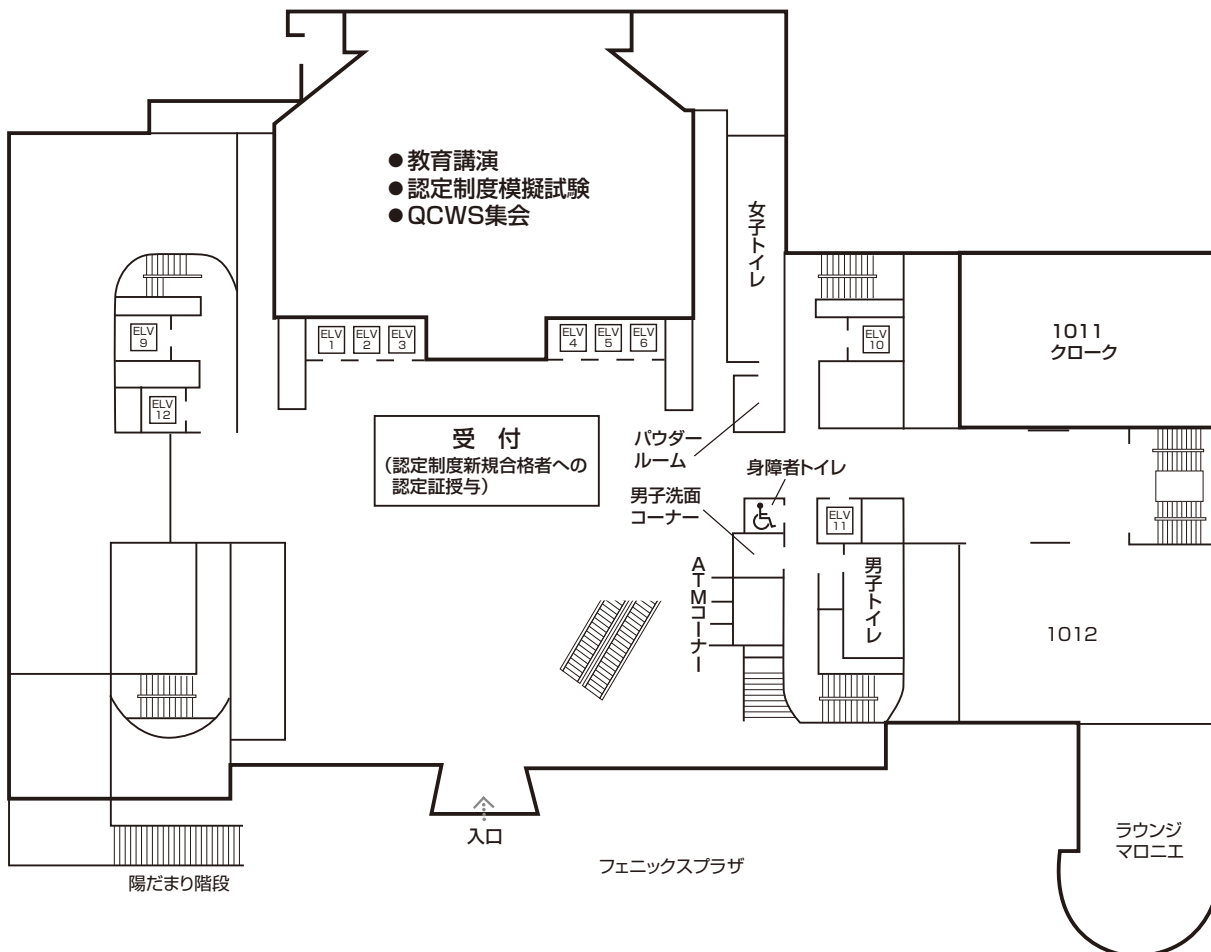
※枠内の箇所は非常用エレベータおよび非常用階段となりますので、使用しないでください

アカデミーコモン2F : A1~A6

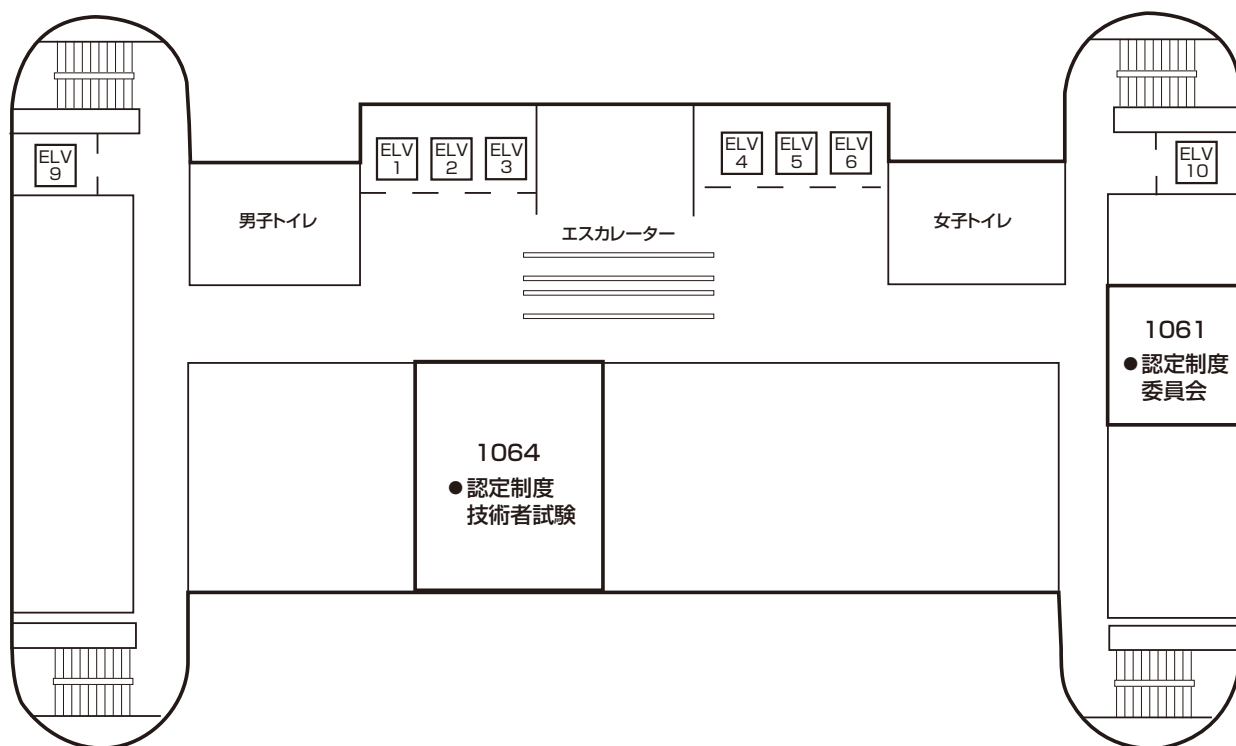


アカデミーコモンでのフロア移動はエスカレーターをご利用ください

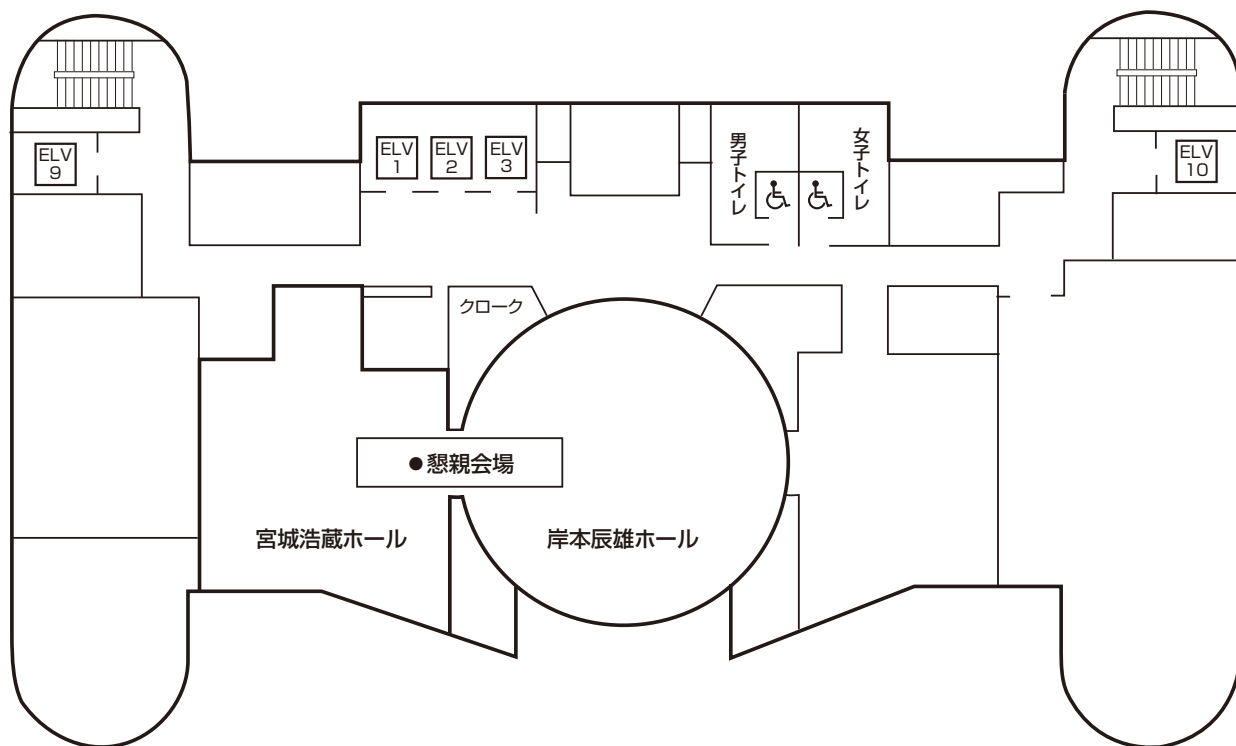
リバティタワー1F



リバティタワー6F



リバティタワー23F



ご案内

【大会参加の皆様へ】

1. 参加手続きについて

●参加登録

当日参加登録は、9月15日、16日はアカデミーコモン2階、9月17日はリバティタワー1階にて行います。

事前参加登録をされた方は受付の必要はありませんので、事前にお送りいたします参加証（名札）をご用意のうえ、そのまま会場へご入場ください。なお、参加証は大会ホームページより事前参加登録を行い、期限内に参加費を振込まれた方へのみお送りしております。登録のみで参加費を振込まれていない方は、事前参加登録扱いにはなりませんので、当日参加登録をお願いします。

●参加登録受付

アカデミーコモン 2階

9月15日(土) 9:30~17:00

9月16日(日) 8:50~17:00

リバティタワー 1階

9月17日(月) 8:50~14:30

●当日参加費

理事・評議員・非会員 12,000円

会 員 10,000円

学 生 6,000円

※現金のみのお取り扱いとなります。

●参加証

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・更新の際に必要なとなりますので、大会後も大切に保管してください。紛失の際の再発行はいたしかねますのでご了承下さい。

●プログラム抄録集

プログラム抄録集は会員および事前参加登録をされた非会員に事前にお送りしております。大会当日はこのプログラム抄録集をお持ち下さい。また、別途ご希望の方には、受付にて一部2,000円で販売いたします。

●年度会費支払い、入会受付

日本組織適合性学会への入会手続きおよび年度会費の納付に関しましては、大会会場では行っておりません。

2. クローク

会場内にクロークを設けます。利用時間は下記のとおりです。最終日（9月17日）は、クロークの場所が変わりますのでご注意ください。貴重品やコンピュータは、紛失や破損の責任を負いかねますので、お預かりできません。

9月15日(土)：アカデミーコモン	2階	9：30～17：30
9月16日(日)：アカデミーコモン	2階	8：50～18：00
9月17日(月)：リバティタワー	1階（1011号室）	8：50～15：30

3. 懇親会

日 時：9月16日(日) 18：10～

会 場：リバティタワー 23階 岸本辰雄ホール・宮城浩蔵ホール

参加費：一般 3,000円 学生 2,000円

※当日の参加受付も行いますので、皆様奮ってご参加ください。

4. その他

- 講演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ください。
- 建物内はすべて禁煙となっております。喫煙は所定の場所をお願いいたします。
- 会員へのメッセージはすべて掲示板で行います。

【座長の皆様へ】

1. シンポジウム

●座長受付

シンポジウム開始前に講演会場内の右前方の「進行席」までお越しください。

●講演時間

講演・討論の時間について変更が生じた場合は、進行係にご指示ください。ご指示がない場合は経過時間を以下のとおり、ベルでお知らせいたします。

ベル1回：講演時間終了2分前

ベル2回：講演時間終了

ベル3回：討論終了（講演者の持ち時間終了）

2. 口頭発表

●座長受付

ご担当のセッション開始15分前までには、講演会場内の右前方に設けております「次座長席」にご着席ください。

●発表時間

発表・討論の時間は、発表7分、討論2分です。経過時間は進行係が以下のとおり、ベルでお知らせいたします。

ベル1回：発表時間終了2分前

ベル2回：発表時間終了

ベル3回：討論終了（発表者の持ち時間終了）

3. ポスター発表

●座長受付

ご担当のセッション開始10分前までに、ポスター受付にお越しください。座長用の青いリボンをお渡しいたします。

●発表時間

発表・討論の時間は、発表5分、討論3分です。

【演者の皆様へ】

1. シンポジウム

●講演方法

パソコンによるプレゼンテーションとなります。ご自身のノートパソコンをご持参ください。必ず下記の「ノートパソコンを持ち込まれる際の留意事項」をお読みください。

※音声の出力には対応していません。

●講演者受付

シンポジウム開始前までに、講演会場内の「PC接続席」にノートパソコン持参のうえお越しください。

●講演時間

あらかじめご連絡いたしました時間をお願いいたします。経過時間は以下のとおり、ベルでお知らせいたします。

ベル1回：講演時間終了2分前

ベル2回：講演時間終了

ベル3回：討論終了（講演者の持ち時間終了）

【ノートパソコンを持ち込まれる際の留意事項】

- 会場の液晶プロジェクターとお持込みのパソコンとの接続は、D-sub15ピンとなります。一部のノートパソコンでは付属のコネクターが必要な場合がありますので、お忘れなくご持参ください。
- バッテリー切れに備え、必ず電源アダプターをご持参ください。
- 発表中にスクリーンセーバーや省電力モードにならないよう、設定しておいてください。
- 演題上には、ディスプレイとマウス、スライド操作スイッチを用意しておりますので、ご自身で操作を行って下さい。

2. 口頭発表

●発表方法

パソコンによるプレゼンテーションとなります。原則としてデータ持込み（USBフラッシュメモリー、CD-R）によるプレゼンテーションに限らせていただきます。会場にはWindowsとMacintoshを用意しております。発表データをUSBフラッシュメモリーまたはCD-Rに保存の上お持ちください。ただし、動画等を使用される場合は、作動保証をいたしかねますのでご了承ください。

【発表データ作成要領】

- アプリケーションソフトはWindows：PowerPoint2003/2007/2010、Macintosh：PowerPoint2004/2008
- フォントは文字化けを防ぐため下記のフォントを使用してください。
日本語：MSゴシック、MSPゴシック、MS明朝、MSP明朝
英語：Arial, Arial Black, Century, Century Gothic, Times New Roman
- 必ず事前にウイルスチェックを行ってください。
- 音声出力には対応していません。
- 発表データファイル名は【演題番号-氏名】としてください。

例：【O10-明治太郎】

●発表者受付

ご自身の発表の45分前までに、講演会場前の「発表者受付」にUSBフラッシュメモリーまたはCD-Rを持参のうえお越してください。なお、16日(日)午前中に講演予定の方は、15日(土)18:00までに発表者受付へお越し下さい。

●発表時間

発表・討論の時間は、**発表7分**、**討論2分**です。経過時間は進行係が以下のとおり、ベルでお知らせいたします。時間厳守でお願いいたします。

ベル1回：発表時間終了2分前

ベル2回：発表時間終了

ベル3回：討論終了（講演者の持ち時間終了）

●ポスター掲示

口頭発表をされる場合でも、所定のパネルにポスターを掲示してください。

3. ポスター発表

●掲示期間

2日間通して掲示してください。

●ポスター貼付、発表・討論、撤去時間

◆貼付：9月15日(土) 10:00~11:00

※押しピンは各パネルにご用意いたしておりますのでご利用ください。

◆発表・討論：9月15日(土) 13:00~13:40

9月16日(日) 13:00~13:40

※口頭発表された方を除き、プログラム（会員研究発表（ポスター））の日程にしたがって、順番にご自身のポスター前で発表していただきますので、座長の指示に従ってください。

◆撤去：9月16日(日) 15:20~18:00

※所定時間内に撤去されていないポスターは大会事務局にて処分させていただきます。ご了承下さい。

●発表者受付

発表開始15分前までに、ポスター受付にお越してください。黄色いリボンをお渡しいたしますので、発表時間中は胸につけておいてください。

●発表時間

発表・討論の時間は、**発表5分**、**討論3分**です。

● 掲示要項

- パネルの左上に演題番号（W25cm×H18cm）が貼付してありますので、所定のパネルに掲示してください。
- ポスターの貼付に必要な押しピンは、各パネルに用意しています。
- ポスターを掲示できるスペースは、およそW90cm×H150cmです。ポスターの上部に、演題名、著者名および所属を記載してください。
- 発表者名の左肩には、○を付けてください。
- 発表内容は2m程度離れた位置からでも読めるように、十分大きな文字を用いて作成してください。図・表もできるだけ大きなものにしてください。

【学術賞ならびに学術奨励賞候補口演】

一般演題に応募された中から、事前にエントリーされた方を対象にした学術賞ならびに学術奨励賞候補口演を行います。特に優秀と認められた演題の筆頭演者に学術賞ならびに学術奨励賞が授与されます。

日 時：9月15日(土) 17:00~19:00

会 場：アカデミーホール

授 与：9月16日(日) 18:10からの懇親会にて選考結果を告知し授与式を執り行います。応募者は全員懇親会にご参加ください。

【大会長賞】

学術賞ならびに学術奨励賞とは別に、一般演題に応募された中から、ユニークで優れた発表をされた団体または個人に対して授与されます。「多様性」、「疾患」、「移植」、「技術」の各分類から若干名選出いたします。選考結果については、懇親会会場にて発表・表彰いたします。

【認定HLA技術者講習会】(大会教育講演を兼ねる)

本講習会は、今後HLA検査技術者認定を取得あるいは更新しようとする方々を対象に実施されます。大会参加者は自由に参加することができます。従来のように、事前に受講希望届けを提出し、事前登録していただく必要はございません。

日 時：9月17日(月) 9:00~11:00

会 場：リバティタワー 1F(リバティホール)

テキスト：テキストは講習会の約1ヶ月前に、学会ホームページ上に掲載します。会場でのテキストの販売はいたしませんので、必要に応じて印刷し、ご持参下さい。

受講証明書：認定制度に関わる受講証明証は、会場入口の受付にて受講者1人につき1枚を発行いたします。各自で所属、氏名を記入していただき、講習会終了時に回収いたします。途中退出、中途入場の場合は受講証明証を発行できませんので、ご注意ください。

内 容：1. 熱帯感染症とHLA

平山謙二(長崎大学熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野)

2. QCワークショップの結果から見たHLA抗体検査の現状

高陽淑(日本赤十字社・近畿ブロック血液センター検査三課)

3. 肝移植における抗ドナー特異抗体の意義

江川裕人(東京女子医科大学・消化器外科)

【認定制度指導者講習会】

第21回日本組織適合性学会大会中の下記の特別講演IおよびIIを含め、合計5企画から、3企画以上の受講をもって、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持って受講証明といたします。

1. 特別講演I：9月15日(土) 14:50~15:30

「HLA-F mediated antigen cross presentation and transplantation」

2. 特別講演II：9月16日(日) 15:20~16:00

「Highlights of the 16th International Histocompatibility Workshop」

3. シンポジウム 1 : 9月15日(土) 15:30~17:00
「HLAとウイルス —新しい臨床展開—」
4. シンポジウム 2 : 9月16日(日) 16:00~18:00
「新しいパラダイムが拓くMHC研究の新展開」
5. 教育講演 (認定HLA技術者講習会を兼ねる) : 9月17日(月) 9:00~11:00

【QCWS集会】

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

日 時 : 9月17日(月) 13:00~16:15

会 場 : リバティタワー 1F(リバティホール)

参加費 : 無料 (集会参加には、学会参加証が必要となります)

QCWS参加証明証の発行が必要な方は、7月27日(金)までにQCWS集会参加 (参加証明書発行)の申し込み (参加費:2,000円)を事前にQCWS事務局までお申し込みください。QCWS参加証は、認定HLA技術者、認定指導者の申請・更新の際に必要となります。事前に申し込みされていない場合にはQCWS参加証明証を発行できませんので、ご注意ください。

【認定制度技術者・指導者筆記試験】

日 時 : 9月17日(月) 11:00~12:00

会 場 : リバティタワー 6F(1064号室)

【認定制度模擬試験】

日 時 : 9月17日(月) 11:00~12:00

会 場 : リバティタワー 1F(リバティホール)

【認定制度面接試験】

日 時 : 9月17日(月) 12:00~12:30

会 場 : リバティタワー 6F(1064号室)

【認定書授与のご案内】

認定試験合格者ならびに更新者は9月17日(月) 14:00頃に受付付近の掲示板に貼り出します。認定更新者については、9月16日(日) 総会終了後に指定の場所 (当日掲示板等にてお知らせいたします) にて授与いたします。合格者については、9月17日(月) QCWS集会終了後、16:30~17:00までに、リバティホール (教育講演及びQCWS集会会場入口) の受付で授与いたしますのでお越しく下さい。

【会議等日程】

理事会	9月15日(土)	9:00~10:30	アカデミーコモン	2F(A4)
評議員会	9月15日(土)	19:00~20:00	アカデミーコモン	2F(A4)
QC部会	9月16日(日)	12:00~13:00	アカデミーコモン	2F(A4)
QCWS集会	9月17日(月)	13:00~16:15	リバティタワー	1F(リバティホール)
認定制度委員会	9月17日(月)	12:00~14:00	リバティタワー	6F(1061号室)
総会	9月16日(日)	13:50~14:40	アカデミーコモン	3F(アカデミーホール)

【企業展示】

日 時：9月15日(土) 10:30~17:00

9月16日(日) 9:00~15:00

会 場：アカデミーコモン 2F

【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お手配をお願いいたします。

第21回日本組織適合性学会 協賛企業一覧

本大会を開催するにあたり、下記の企業より本大会の趣旨にご賛同賜り、展示、ランチョンセミナー、協賛金などのご援助をいただきました。ここに、芳名を記して、深甚なる感謝の意を表します。

(五十音順)

旭化成ファーマ株式会社
アステラス製薬株式会社
株式会社医学生物学研究所
株式会社池田理化
イルミナ株式会社
岩井化学薬品株式会社
HLA研究所
有限会社エムトップJAPAN
株式会社エスアールエル
尾崎理化株式会社
共立製薬株式会社
Gen-Probe GTI ダイアグノスティックス株式会社
動物アレルギー検査株式会社
ネッパジーン株式会社
ノバルティスファーマ株式会社
株式会社ベリタス
株式会社ミクセル
ライフテクノロジーズジャパン株式会社
株式会社理研ジェネシス
湧永製薬株式会社

2012年7月24日現在

プログラム

特別講演 I**9月15日(土) 14:50~15:30**

座長 間 陽子 理化学研究所

- SL-1 HLA-F mediated antigen cross presentation and transplantation
Daniel E. Geraghty The Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center

特別講演 II**9月16日(日) 15:20~16:00**

座長 徳永 勝士 東京大学医学系研究科

- SL-2 Highlights of the 16th International Histocompatibility Workshop
Derek Middleton Royal Liverpool University Hospital

シンポジウム1**9月15日(土) 15:30~17:00****「HLAとウイルス –新しい臨床展開–」**座長 高原 史郎 大阪大学大学院医学系研究科
西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部

- S1-1 HLA研究の臨床応用を目指した8桁レベルHLAタイピング法の開発
椎名 隆 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学
- S1-2 HLAと臨床の臓器移植
湯沢 賢治 国立病院機構水戸医療センター 臨床研究部移植医療研究室
- S1-3 ヒトT細胞白血病ウイルスに対する獲得免疫の臨床への応用
神奈木 真理 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野

シンポジウム2**9月16日(日) 16:00~18:00****「新しいパラダイムが拓くMHC研究の新展開」**座長 猪子 英俊 東海大学医学部
中西 照幸 日本大学生物資源科学部

- S2-1 系統ネットワークを用いた組換えの検出
斎藤 成也 国立遺伝学研究所 集団遺伝研究部門
- S2-2 遺伝子の決定性についての考察
松本 俊吉 東海大学

- S2-3 ヒト免疫不全ウイルスによるMHC-1発現制御機構の分子構造学的解析
明里 宏文 京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター
- S2-4 発症感受性アレル情報に基づく牛白血病ワクチンの開発
間 陽子 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

教育講演(認定制度講習会)

9月17日(月) 9:00~11:00

座長 西村 泰治 熊本大学大学院生命科学研究部

- EL-1 熱帯感染症とHLA
平山 謙二 長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
- EL-2 QCワークショップの結果から見たHLA抗体検査の現状
高 陽淑 日本赤十字社近畿ブロック血液センター 検査三課
- EL-3 肝移植における抗ドナー特異抗体の意義
江川 裕人 東京女子医科大学 消化器外科

16thQCワークショップ集会

9月17日(月) 13:00~16:15

タイピング結果解析

13:00~14:15

座長 山本 賢 国立病院機構大阪医療センター臨床検査科

- 1 Luminex (SSO法) について
石井 博之 日本赤十字社近畿ブロック血液センター
- 2 イノリパ (SSO法) について
安尾 美年子 東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室
- 3 SSP法について
藤井 明美 県立広島病院 臨床研究検査科
- 4 SBT法について
重成 敦子 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学
- 5 HLAタイピング結果の表記法
橋口 裕樹 福岡赤十字病院 検査部HLA検査室

抗体検査結果解析

14:15~15:15

座長 中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所

- 1 FlowPRA法の検査状況の解析
石塚 敏 東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室
- 2 Lab Screenによる抗体検査
二神 貴臣 HLA研究所

- 3 WAK FlowおよびICFA法による抗体検査
高橋 大輔 日本赤十字社北海道ブロック血液センター
- 4 その他検査法およびクロスマッチ
中島 文明 日本赤十字社中央血液研究所

部門別解析及び結果評価**15:15~16:15**

座長 成瀬 妙子 東京医科歯科大学難治疾患研究所

- 1 DNAタイピング
田中 秀則 日本赤十字社中央血液研究所
- 2 抗体検査
高 陽淑 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

ランチョンセミナー1**9月15日(土) 12:00~13:00**

共催：株式会社理研ジェネシス

座長 塚原 祐輔 株式会社理研ジェネシス

- LS-1 医薬品の副作用を回避するためのファーマコゲノミクス研究：重症薬疹とHLA
蒔田 泰誠 理化学研究所ゲノム医科学研究センター

ランチョンセミナー2**9月16日(日) 12:00~13:00**

共催：アステラス株式会社

座長 江川 裕人 東京女子医科大学 消化器外科

- LS-2 腎移植・肝移植の高感度クロスマッチ検査の重要性とタクロリムスの効果
湯沢 賢治 国立病院機構水戸医療センター 臓器移植外科

会員研究発表(学術賞ならびに学術奨励賞候補口演)

学術賞ならびに学術奨励賞候補口演

9月15日(土) 17:00~19:00

座長 木村 彰方 東京医科歯科大学難治疾患研究所
前田 平生 埼玉医科大学総合医療センター輸血部

A-1 (P-40) *NFKB1L1*はヒトおよびウイルス遺伝子のスプライシングを制御する

○安 健博^{1,2)}、中島敏晶^{1,2)}、柴田宏樹^{1,3)}、成瀬妙子¹⁾、有村卓朗¹⁾、安波道郎^{1,2,3)}、
木村彰方^{1,2)}

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所
- 2) 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部
- 3) 長崎大学熱帯医学研究所

A-2 (P-41) RAに伴う間質性肺病変とHLAとの関連

○古川 宏¹⁾、島田浩太^{2,3)}、杉井章二^{2,3)}、松井利浩³⁾、池中達央⁴⁾、橋本篤³⁾、高岡宏和^{3,5)}、
有沼良幸³⁾、岡崎優子³⁾、二見秀一³⁾、小宮明子¹⁾、中村正⁵⁾、右田清志⁶⁾、須田昭子⁷⁾、
長岡章平⁷⁾、土屋尚之⁸⁾、當間重人¹⁾

- 1) 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター
- 2) 東京都立多摩総合医療センター リウマチ膠原病科
- 3) 国立病院機構相模原病院 リウマチ科
- 4) 国立病院機構相模原病院 リハビリテーション科
- 5) NTT西日本九州病院 リウマチ膠原病内科
- 6) 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター
- 7) 横浜南共済病院 膠原病リウマチ内科
- 8) 筑波大学 医学医療系分子遺伝疫学

A-3 (P-42) 原爆被爆者コーホートでみられた肝炎ウイルス感染と肝細胞発がんの免疫遺伝学的要因

○林 奉権¹⁾、大石和佳²⁾、吉田健吾¹⁾、今井一枝¹⁾、林幾江³⁾、梶村順子¹⁾、京泉誠之¹⁾、
楠洋一郎¹⁾、中地敬¹⁾

- 1) 放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部
- 2) 放射線影響研究所 臨床研究部
- 3) 広島大学 歯学部中央研究室

A-4 (P-43) HLA-B35拘束性HIV特異的TCRは野生型抗原に高い特異性を有する

○本園 千尋^{1,2,3)}、John J. Miles¹⁾、宮澤正顯³⁾、上野貴将²⁾、Andrew K. Sewell¹⁾

- 1) Cardiff University, School of Medicine
- 2) 熊本大学 エイズ学研究センター
- 3) 近畿大学医学部 免疫学教室

- A-5 (P-44) HLAクラスI拘束性CTLとHLAクラスII拘束性Th細胞を誘導できる理想的な単一癌抗原ペプチドの同定
 ○富田 雄介^{1,2)}、湯野晃^{1,3)}、入江厚¹⁾、千住覚¹⁾、矢津田旬二¹⁾、黒田泰弘¹⁾、角田卓也⁴⁾、中村祐輔⁵⁾、興梠博次²⁾、吉武義泰³⁾、篠原正徳³⁾、西村泰治¹⁾
 1) 熊本大学院生命科学研究部 免疫識別学分野
 2) 熊本大学院生命科学研究部 呼吸器病態学分野
 3) 熊本大学院生命科学研究部 歯科口腔外科学分野
 4) オンコセラピーサイエンス株式会社
 5) 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター
- A-6 (P-45) HLA領域に位置する新規ベータチェーン病感受性遺伝子の炎症応答に関する機能解析
 ○倉田 里穂^{1,2)}、米沢朋³⁾、猪子英俊¹⁾
 1) 東海大学医学部 分子生命科学
 2) 日本学術振興会
 3) The Scripps Research Institute
- A-7 (P-46) 眼合併症を伴うStevens-Johnson症候群発症におけるHLA-A0206-TLR3遺伝子多型間の相互作用
 ○上田 真由美^{1,2)}、徳永勝士³⁾、外園千恵¹⁾、澤井裕美³⁾、田宮元⁴⁾、稲富勉¹⁾、木下茂¹⁾
 1) 京都府立医科大学 眼科学教室
 2) 同志社大学 生命医科学部
 3) 東京大学 人類遺伝学教室
 4) 山形大学 先端分子疫学研究所
- A-8 (P-47) スギ花粉症とMICA遺伝子の相関—可溶性MICAの花粉症への影響について—
 ○中西 真理¹⁾、芦田恒雄²⁾、井手武¹⁾、井上和也¹⁾、大村素子³⁾、益尾清恵⁴⁾、佐田正晴⁵⁾、Anajane Smith⁶⁾、羽竹勝彦¹⁾、Daniel E.Geraghty⁶⁾、石谷昭子¹⁾
 1) 奈良県立医科大学 法医学教室
 2) 芦田耳鼻咽喉科
 3) 大村内科循環器科クリニック
 4) 株式会社ベリタス
 5) 元国立循環器病センター
 6) Fred Hutchinson Cancer Research Center
- A-9 (P-61) HLA, ABO抗原に対する抗体接着が引き起こす、免疫順応シグナル伝達
 ○岩崎 研太¹⁾、荊萍¹⁾、中島文明²⁾、三輪祐子¹⁾、羽根田正隆¹⁾、小林孝彰¹⁾
 1) 名古屋大学大学院医学系研究科 移植免疫学寄附講座
 2) 日本赤十字社血液事業本部

A-10 (P-82) pH応答性ポリマー修飾リポソームを用いた抗原デリバリーとがん免疫治療への応用

○弓場 英司¹⁾、原田敦史¹⁾、坂西裕一²⁾、渡来仁³⁾、河野健司¹⁾

1) 大阪府立大学大学院 工学研究科 応用化学分野

2) ダイセル化学工業株式会社

3) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻

A-11 (P-83) インシリコ手法によるウシMHCクラスII分子を標的とする抗BLV高親和性ペプチドワクチンの設計

○山岸 純也^{1,2)}、沖本憲明²⁾、竹嶋伸之輔^{3,4)}、金智潤³⁾、萩原恭二³⁾、間陽子^{3,4)}、
泰地真弘人^{1,2)}

1) 東京大学大学院 情報生命科学専攻

2) 理化学研究所 計算分子設計研究グループ

3) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

4) 東京大学大学院 メディカルゲノム専攻

A-12 (P-84) 古典的HLAクラスII遺伝子における超高解像度DNAタイピング法 (SS-SBT法) の開発

○尾崎 有紀、鈴木進悟、吉川枝里、重成敦子、岡晃、光永滋樹、椎名隆、
猪子英俊

東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

A-13 (P-15) 鱗移植片の急性拒絶反応に関わるメダカMHC 遺伝子の同定

○坂内 英美、野中勝

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻

会員研究発表(口演)

口演1 「移植」

9月15日(土) 10:30~11:20

座長 相川 厚 東邦大学 腎臓病教室

安尾 美年子 東京女子医科大学 中央検査部

O-1 (P-56) 非血縁者間骨髄移植におけるHLAハプロタイプ適合性の意義

○森島 聡子¹⁾、小川誠司²⁾、佐藤亜以子²⁾、柏瀬貢一³⁾、笹月健彦⁴⁾、森島泰雄⁵⁾

- 1) 藤田保健衛生大学医学部 血液内科学
- 2) 東京大学医学部附属病院 がんゲノミクスプロジェクト
- 3) 東京都赤十字血液センター検査部
- 4) 九州大学高等研究院
- 5) 愛知県がんセンター研究所 疫学予防部

O-2 (P-57) HLAモノクローナル抗体を用いた末梢血キメリズムモニタリング

○佐藤 壯¹⁾、佐藤蘭子¹⁾、小林良二²⁾、小林直樹³⁾

- 1) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 小児科
- 3) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 血液内科

O-3 (P-58) 移植前脱感作療法は長期のde novo HLA抗体産生を抑制するか？

○黒木 聖久¹⁾、坂本慎太郎¹⁾、井藤聡美¹⁾、渡井至彦¹⁾、片山昭男²⁾、打田和治¹⁾、
小林孝彰³⁾

- 1) 名古屋第二赤十字病院
- 2) 増子記念病院
- 3) 名古屋大学 移植免疫学

O-4 (P-59) 腎移植後のBKウイルス血症は術前の末梢Tリンパ球割合によりリスク予測ができるか？

○酒巻 建夫¹⁾、石川政志¹⁾、高橋千尋¹⁾、岡村康子¹⁾、坪尚武²⁾、丸山通広²⁾、剣持敬²⁾、
北村博司³⁾

- 1) 国立病院機構千葉東病院 臨床検査科HLA検査室
- 2) 国立病院機構千葉東病院 外科
- 3) 国立病院機構千葉東病院 臨床研究センター腎病理研究部

O-5 (P-60) 小児生体肝移植臨床例における免疫寛容

○脇 嘉代¹⁾、菅原寧彦²⁾、オザワミッキー³⁾、水田耕一⁴⁾、平田勝⁵⁾、金子順一²⁾、門脇孝⁶⁾、青木琢²⁾、長谷川潔²⁾、テラサキポール³⁾、國土典宏²⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 健康空間情報学講座
- 2) 東京大学医学部附属病院肝胆膵・人工臓器移植外科
- 3) テラサキファウンダーションラボラトリー
- 4) 自治医科大学 移植外科
- 5) JR総合病院
- 6) 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

口演2「技術(1)」

9月15日(土) 11:20~12:00

座長 中島 文明 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
小林 孝彰 名古屋大学医学部

O-6 (P-70) 臓器移植におけるクロスマッチ検査の外部精度管理方法の検討

○橋口 裕樹¹⁾、小林孝彰²⁾、橋本光男³⁾、久山芳文⁴⁾、黒木聖久⁵⁾、安尾美年子⁶⁾、笹木剛志⁷⁾

- 1) 福岡赤十字病院
- 2) 名古屋大学 移植免疫学
- 3) 兵庫県立西宮病院
- 4) 大阪府立急性期・総合医療センター
- 5) 名古屋第二赤十字病院
- 6) 東京女子医科大学病院
- 7) 市立札幌病院

O-7 (P-71) HLA抗体検査(Luminex法)で自然抗体を判断できるか？

○林 晃司¹⁾、小島裕人¹⁾、二神貴臣¹⁾、辻野貴史¹⁾、楠木靖史¹⁾、藤井直樹¹⁾、末上伸二¹⁾、池田奈未¹⁾、西川美年子¹⁾、小川公明²⁾、赤座達也¹⁾、佐治博夫¹⁾

- 1) HLA研究所
- 2) NPO 白血病研究基金を育てる会

O-8 (P-72) マイクロビーズを用いた第三世代クロスマッチ検査 (ICFA)と臨床経過についての検討

○岸川 英史、木下朋子、秋山幸太郎、吉田康幸、上田倫央、平井利明、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

O-9 (P-73) マイクロビーズを用いた第三世代クロスマッチ検査 (ICFA) の評価

○佐藤 壯¹⁾、佐藤蘭子¹⁾、玉置透²⁾

- 1) 社会医療法人北榆会札幌北榆病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北榆会札幌北榆病院 腎臓移植外科

口演3 「多様性」

9月15日(土) 13:50~14:50

座長 今西 規 産業技術総合研究所
安藤 麻子 東海大学 医学部

O-10 (P-9) HLA遺伝子領域の連鎖不平衡に関する広域マップの作成

○世良 実穂、今西規

産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター

O-11 (P-10) 日本人集団において*DPBI*04:01*に作用した正の自然選択

○川嶋 実苗¹⁾、大橋順²⁾、西田奈央^{1,3)}、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学教室
- 2) 筑波大学医学部 分子遺伝疫学教室
- 3) 国立医療研究センター 肝炎免疫研究センター

O-12 (P-11) アカゲザル*ULBP2/RAET1H*遺伝子の多様性解析

○成瀬 妙子¹⁾、森一泰²⁾、明里宏文³⁾、俣野哲朗²⁾、木村彰方¹⁾

- 1) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野
- 2) 国立感染研究所 エイズ研究センター
- 3) 京都大学 霊長類研究所

O-13 (P-12) 家系分析によるコモンマーモセットMHC領域内マイクロサテライトマーカーのハプロタイプ解析

○高林 秀次¹⁾、加藤秀樹^{1,2)}

- 1) 浜松医科大学医学部附属動物実験施設
- 2) 実験動物中央研究所

O-14 (P-13) 超小型実験動物用ブタのMHCタイプと体重との関連性

○安藤 麻子¹⁾、金子直樹²⁾、今枝紀明³⁾、大島志乃¹⁾、河田寿子⁴⁾、高須正規³⁾、猪子英俊¹⁾、北川 均³⁾

- 1) 東海大学 医学部・分子生命科学
- 2) 富士マイクラ株式会社
- 3) 岐阜大学 応用生物科学部・獣医学講座
- 4) 東海大学 伊勢原研究推進部・教育・研究支援センター

O-15 (P-14) ペンギン類MHCクラスI領域の多型マーカーの確立

○吉川 枝里¹⁾、細道一善²⁾、津田とみ^{1,3)}、炭山大輔⁴⁾、福田道雄⁵⁾、栗田正徳⁶⁾、津田道雄¹⁾、村田浩一⁷⁾、猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学
- 2) 国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門
- 3) 徳島文理大学人間生活学部
- 4) 国際鳥類保全学研究所
- 5) 東京葛西水族館
- 6) 名古屋港水族館
- 7) 日本大学生物資源科学部

口演4「技術(2)」

9月16日(日) 9:00~9:40

座長 高 陽淑 日本赤十字社
小川 公明 株式会社ベリタス

O-16 (P-74) 当院におけるICFA法を用いた移植検査

○平岡 朝子¹⁾、栗田絵美¹⁾、小松真由美¹⁾、河野真由¹⁾、石井睦美¹⁾、山岡愛子¹⁾、廣瀬祥子¹⁾、藤井輝久²⁾、齋藤誠司²⁾

- 1) 広島大学病院 診療支援部
- 2) 広島大学病院 輸血部

O-17 (P-75) LABScreen Single AntigenのSupplementビーズ併用による性能検証

○中村 淳子、中島文明、橋本志歩、鎌田裕美、清水まり恵、岡崎仁、佐竹正博、田所憲治

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

O-18 (P-76) HLA抗体における補体結合性・非結合性についての検討

○安尾 美年子¹⁾、石塚敏¹⁾、石田悠梨¹⁾、中島一朗²⁾、渕之上昌平²⁾

1) 東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室

2) 東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター腎臓外科

O-19 (P-77) 唾液DNA分離の検討

○辻野 貴史¹⁾、小島裕人¹⁾、二神貴臣¹⁾、林晃司¹⁾、楠木靖史¹⁾、藤井直樹¹⁾、末上伸二¹⁾、池田奈未¹⁾、西川美年子¹⁾、小川公明²⁾、赤座達也¹⁾、佐治博夫¹⁾

1) HLA研究所

2) NPO 白血病研究基金を育てる会

口演5「疾患(1)」**9月16日(日) 9:40~10:50**

座長 平山 謙二 長崎大学 熱帯医学研究所
久保田 龍二 鹿児島大学難治ウイルス研

O-20 (P-27) HLA-A24拘束性HTLV-1特異的CTLはHAM発症リスクを下げるか?

○久保田 龍二¹⁾、竹之内徳博²⁾、松崎敏男³⁾、高嶋博³⁾、出雲周二¹⁾

1) 鹿児島大学医学部 難治ウイルス病態制御研究センター

2) 関西医科大学 微生物学講座

3) 鹿児島大学医学部 神経内科

O-21 (P-28) 牛白血病ウイルス(BLV)プロウイルスロードとBoLAクラスII遺伝子多型相関性の解析

○宮坂 卓²⁾、竹嶋伸之輔¹⁾、松本有生¹⁾、神馬繭子¹⁾、小林直彦³⁾、松橋珠子³⁾、泉對博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) 日本大学生物資源科学部 獣医学研究科

3) 岐阜県畜産研究所

O-22 (P-29) ウシレトロウイルスによる白血病発症を規定する感受性MHCアリルに対するGagおよびEnv由来ペプチドのエピトープマッピング

○竹嶋 伸之輔^{1,2)}、的場和弘³⁾、萩原恭二¹⁾、金智潤¹⁾、山岸純也⁴⁾、
William C. Davis⁵⁾、大森崇司⁶⁾、布谷鉄夫⁶⁾、沖本憲明^{4,7)}、間陽子^{1,2)}

- 1) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
- 2) 東京大学新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻
- 3) 畜産草地研究所 草地管理研究領域
- 4) 東京大学新領域創成科学研究科 情報生命科学専攻
- 5) Veterinary Microbiology & Pathology, Washington State University
- 6) 日本生物科学研究所
- 7) 理化学研究所生命システム研究センター 計算分子設計グループ

O-23 (P-30) HIV/AIDS感受性の個体差とKIR、HLA遺伝子多型

○成瀬 妙子¹⁾、小西真紀子¹⁾、柳田梨紗¹⁾、照沼裕²⁾、Gaurav Sharma³⁾、
Gurvinder Kaur³⁾、Narinder K. Mehra³⁾、木村彰方¹⁾

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態分野
- 2) 日本バイオセラピー研究所
- 3) AIIMS India

O-24 (P-31) 霊長類におけるTIM1遺伝子進化とHIV/AIDS

○木村 彰方¹⁾、大谷仁志¹⁾、成瀬妙子¹⁾、Gaurav Sharma²⁾、Gurvinder Kaur²⁾、
Narinder K. Mehra²⁾、明里宏文³⁾、石田貴文⁴⁾、俣野哲朗⁵⁾

- 1) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所
- 2) All India Institute of Medical Sciences
- 3) 京都大学霊長類研究所
- 4) 東京大学 理学部
- 5) 国立感染症研究所 エイズ研究センター

O-25 (P-32) *Actinobacillus pleuropneumoniae* 及び豚丹毒ワクチン接種時の抗体応答とSLA及びTLR遺伝子型との関連

新開浩樹¹⁾、荒川愛作²⁾、松田麻衣子³⁾、奥村華子^{4,5)}、寺田圭⁴⁾、知久幹夫⁴⁾、
河原崎達雄^{4,5)}、安藤麻子⁶⁾、○上西 博英^{1,2)}

- 1) 農業生物資源研究所 動物生体防御研究ユニット
- 2) 農業生物資源研究所 家畜ゲノム研究ユニット
- 3) 農林水産先端技術研究所 畜産研究部
- 4) 静岡県畜産技術研究所 中小家畜研究センター
- 5) 東海大学 農学部
- 6) 東海大学 医学部

O-27 (P-33) フィリピンの若年性住血吸虫性肝線維症とHLA-DRB1*15:01との相関

菊池三穂子^{1,2)}、Lydia R. Leonardo³⁾、千種雄一⁴⁾、Edelwisa M. Segubre-Mercado²⁾、
小林典子¹⁾、林尚子⁴⁾、Napoleon L. Arevalo⁵⁾、Ronald R. Lim⁵⁾、Lea M. Aagsolid⁵⁾、
我妻健⁶⁾、○平山 謙二¹⁾

- 1) 長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
- 2) 長崎大学 国際連携研究戦略本部
- 3) College of Public Health, University of the Philippines
- 4) 獨協医科大学 熱帯病寄生虫病センター
- 5) Provincial Health Team, Sorsogon, Philippines
- 6) 高知大学医学部 環境保健学

口演6「疾患(2)」

9月16日(日) 10:50~11:50

座長 土屋 尚之 筑波大学 医学医療系
安波 道郎 長崎大学 熱帯医学研究所

O-28 (P-34) 原発性胆汁性肝硬変患者が保有するHLA抗体の特異性について

○万木 紀美子¹⁾、平位秀世¹⁾、菱田理恵¹⁾、吉澤淳²⁾、三浦康生¹⁾、芦原英司^{1,3)}、
上本伸二²⁾、前川平¹⁾

- 1) 京都大学医学部附属病院 輸血細胞治療部
- 2) 京都大学医学部附属病院 肝胆膵・移植外科
- 3) 京都薬科大学 病態生理学分野

O-29 (P-35) 日本人集団におけるANCA関連血管炎の遺伝的背景

○土屋 尚之¹⁾、川崎綾¹⁾、長谷部成美¹⁾、井上尚哉¹⁾、伊東郁恵¹⁾、安心院千裕¹⁾、
住田孝之²⁾、古川宏³⁾、當間重人³⁾、小林茂人⁴⁾、橋本博史⁵⁾、山田秀裕⁶⁾、尾崎承一⁶⁾、
佐田憲映⁷⁾、槇野博史⁷⁾、富田誠⁸⁾、宮坂信之⁹⁾、針谷正祥¹⁰⁾

- 1) 筑波大学 分子遺伝疫学研究室
- 2) 筑波大学 内科 (膠原病・リウマチ・アレルギー)
- 3) 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター
- 4) 順天堂越谷病院 内科
- 5) 順天堂大学 医学部
- 6) 聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科
- 7) 岡山大学 腎・免疫・内分泌代謝内科
- 8) 東京医科歯科大学 臨床試験管理センター
- 9) 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科
- 10) 東京医科歯科大学 薬害監視学講座

O-30 (P-36) L-カルニチンのナルコレプシーに対する臨床評価

○宮川 卓¹⁾、川村裕美²⁾、小渕真理子²⁾、池崎飛鳥²⁾、尾崎章子³⁾、徳永勝士¹⁾、井上雄一^{4,5)}、本多真^{4,6)}

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻人類遺伝学分野
- 2) サイトサポート・インスティテュート株式会社
- 3) 東邦大学看護学部 在宅看護学研究室
- 4) 神経研究所附属睡眠学センター
- 5) 東京医科大学 睡眠学講座
- 6) 東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野

O-31 (P-37) 真性過眠症候群を対象としたゲノムワイドCNV解析

○山崎 茉莉亜¹⁾、宮川卓¹⁾、Khor Seik Soon¹⁾、豊田裕美¹⁾、小池麻子²⁾、佐々木司³⁾、本田裕⁴⁾、本田真^{4,5)}、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学医学系研究科 人類遺伝学分野
- 2) 日立製作所中央研究所
- 3) 東京大学教育学研究科 身体教育学コース
- 4) 神経研究所附属睡眠学センター
- 5) 東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野睡眠覚醒制御プロジェクト

O-32 (P-38) HLA-DQタンパク質安定性と一型糖尿病疾患感受性・抵抗性との関連

○宮寺 浩子¹⁾、大橋順²⁾、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野
- 2) 筑波大学医学部 分子遺伝疫学

O-33 (P-39) 日本人HLA汎親和性のHer-2ペプチドによる乳癌患者末梢血単核球反応性の解析

○津田 万里^{1,2)}、亀谷美恵²⁾、吉川枝里³⁾、安藤麻子³⁾、猪子英俊³⁾、徳田裕¹⁾

- 1) 東海大学医学部外科学系 乳腺・内分泌外科
- 2) 東海大学医学部基礎医学系 生体防御学
- 3) 東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学

口演7「技術(3)」

9月16日(日) 14:40~15:20

座長 丸山 公明 明治大学
竹嶋 伸之輔 理化学研究所

O-34 (P-78) SS-SBT法によるAIHおよびPBC疾患感受性遺伝子HLA-DRB1の遺伝子タイピング

○勝山 善彦¹⁾、尾崎有紀²⁾、梅村武司³⁾、鈴木進悟²⁾、椎名隆²⁾、猪子英俊²⁾、太田正穂⁴⁾

- 1) 信州大学医学部附属病院薬剤部
- 2) 東海大学医学部 分子生命科学
- 3) 信州大学医学部 消化器内科
- 4) 信州大学医学部 法医学

O-35 (P-79) 哺乳類細胞を用いたMHCクラスII(DR04:06) テトラマーの発現と調製

○内田 優輝、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

O-36 (P-80) HLA-DR4拘束性CD4⁺Th細胞に抗原提示機能を有するHLA-DR4トランスジェニックマウスの樹立

○入江 厚¹⁾、矢津田旬二¹⁾、道端弥生¹⁾、原田久美子¹⁾、竹田直樹²⁾、澁谷功³⁾、十河真司³⁾、藤木文博⁴⁾、杉山治夫⁴⁾、西村泰治¹⁾

- 1) 熊本大学大学院 生命科学研究部免疫識別学分野
- 2) 熊本大学 生命資源研究支援センター
- 3) 大塚製薬 微生物研究所
- 4) 大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学

O-37 (P-81) 炭酸アパタイトナノ粒子を用いた抗原導入による免疫誘導

○多田 誠一¹⁾、蛇島武久²⁾、竹嶋伸之輔²⁾、間陽子²⁾、伊藤嘉浩¹⁾

- 1) 理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室
- 2) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

会員研究発表(ポスター)

ポスター1-5

9月15日(土) 13:00~13:40

ポスター1「多様性(1)」

座長 大橋 順 筑波大学

P-1 フィリピン固有品種におけるウシMHCクラスII DRB3およびミトコンドリアDNA D-loop領域の解析

○大橋 未来^{1,2)}、竹嶋伸之輔^{1,2)}、宮坂卓¹⁾、松本有生¹⁾、Claro N.Mingala³⁾、小沼操¹⁾、間陽子^{1,2)}

1) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

2) 東京大学新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻

3) Philippine Carabao Center

P-2 数理生物学的アプローチに基づくHLA-DQ遺伝子の分子進化メカニズムの推定

○大橋 順¹⁾、宮寺浩子²⁾

1) 筑波大学 分子遺伝疫学

2) 東京大学大学院医学研究科 人類遺伝学分野

P-3 日本人健常者に見られたDR15新規DRB1アレル

○安波 道郎¹⁾、中村仁美¹⁾、川嶋実苗²⁾、西田奈央²⁾、徳永勝士²⁾、中村稔³⁾

1) 長崎大学 熱帯医学研究所

2) 東京大学大学院医学研究科 人類遺伝学分野

3) 国立病院機構 長崎医療センター

P-4 アジアに棲息するMacaca属霊長類におけるToll様受容体TLR9の種特異的な多様性形成

○安波 道郎¹⁾、川合覚²⁾、高木明子¹⁾、中村仁美¹⁾、保富康宏³⁾、平井啓久⁴⁾

1) 長崎大学熱帯医学研究所

2) 獨協医科大学 熱帯病寄生虫病室

3) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター

4) 京都大学霊長類研究所

ポスター2「疾患(1)」

座長 石谷 昭子 奈良県立医科大学法医学教室

P-16 成人T細胞白血病ウイルス感染者の末梢血T細胞におけるHLA-Fの表面発現分画についての検討

○吉岡 聡¹⁾、一戸辰夫^{1,2)}、下嶋典子³⁾、菱澤方勝¹⁾、大森勝之⁴⁾、Geraghty DE⁵⁾、石谷昭子⁶⁾、高折晃史¹⁾

- 1) 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科
- 2) 佐賀大学医学部 内科学講座 血液・呼吸器・腫瘍内科
- 3) 奈良県立医科大学 細菌学教室
- 4) 京都大学医学部附属病院 検査部
- 5) Fred Hutchinson Cancer Research Center
- 6) 奈良県立医科大学 法医学教室

P-17 慢性B型肝炎感受性・抵抗性に関連するHLA-DPの機能解析

○高柳 彩、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

P-18 V281L of the CYP21 gene causing 21-Hydroxylase deficiency located in the class III region of resistant HLA haplotype in the Chronic Chagas disease

Florencia del Puerto¹⁾、Eiki J. Nishizawa²⁾、菊池三穂子³⁾、Yelin Roca⁴⁾、Freddy U. G. Velarde⁵⁾、Luis A. Renjel⁶⁾、小宮憲洋⁷⁾、前村浩二⁷⁾、○平山 謙二¹⁾

- 1) 長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
- 2) Nishizawa Clinic.
- 3) 長崎大学 国際連携研究戦略本部
- 4) Centro Nacional de Enfermedades Tropicales.
- 5) Hospital Universitario Japonés
- 6) Centro de Enfermedades Cardiovasculares y Hospital.
- 7) 長崎大学医歯薬総合研究科 疾患制御医学循環器内科

P-19 HBV陽性肝癌における感受性候補SNPの東アジア集団での検証

○澤井 裕美¹⁾、西田奈央^{1,2)}、松田浩一³⁾、馬渡頼子^{1,2)}、田中靖人⁴⁾、溝上雅史²⁾、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野
- 2) 国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター
- 3) 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター
- 4) 名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学

ポスター3「疾患(2)」

座長 宮寺 浩子 東京大学医学系研究科人類遺伝学分野

P-20 関節リウマチとHLA 6座との関連解析

○奥平 裕子¹⁾、光永滋樹¹⁾、鈴木康夫²⁾、桑名正隆³⁾、佐藤慎二²⁾、金子祐子³⁾、本間康彦⁴⁾、成田暁¹⁾、柏瀬貢一⁵⁾、井ノ上逸朗⁶⁾、猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部 分子生命科学
- 2) 東海大学リウマチ内科
- 3) 慶応大学医学部
- 4) 東海大学検診センター
- 5) 関東甲信越ブロック血液センター
- 6) 国立遺伝学研究所

P-21 自己免疫性肝炎疾患感受性遺伝子の検索

○梅村 武司¹⁾、勝山善彦²⁾、目黒明³⁾、城下智¹⁾、吉澤要¹⁾、田中榮司¹⁾、益尾清恵⁴⁾、猪子英俊⁵⁾、太田正穂⁶⁾

- 1) 信州大学医学部 消化器内科
- 2) 信州大学医学部附属病院 薬剤部
- 3) 横浜市立大学眼科学
- 4) ベリタス
- 5) 東海大学医学部 分子生命科学
- 6) 信州大学医学部 法医学

P-22 Type 1 diabetes association mechanism among Japanese population

○Cindy Chia-Jung Chen、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

ポスター4「移植(1)」

座長 原田 浩 市立札幌病院腎臓移植外科

P-48 IgM型抗non-HLA抗体陽性の生体腎移植症例

○伊藤 誠¹⁾、櫻澤貴代¹⁾、石岡聡子¹⁾、米岡麻記¹⁾、渡邊千秋¹⁾、重松明男¹⁾、澁谷齊¹⁾、森田研²⁾、岩見大基²⁾、福澤信之²⁾、野々村克也²⁾、清水力¹⁾

- 1) 北海道大学病院 検査・輸血部
- 2) 北海道大学病院 泌尿器科

- P-49 生体腎移植でFXCMとLABScreen検査の結果に乖離が見られた2例
 ○盛 和行¹⁾、對馬優子²⁾、飛澤悠葵³⁾、米山徹⁴⁾、村澤洋美¹⁾、山本勇人¹⁾、岡本亜希子¹⁾、
 今井篤¹⁾、畠山真吾⁴⁾、米山高弘¹⁾、古家琢也¹⁾、神村典孝¹⁾、藤田雄⁵⁾、鳴海俊治⁴⁾、
 大山力^{1, 4)}
 1) 弘前大学大学院医学研究科 泌尿器科学講座
 2) 弘前大学大学院医学研究科 社会医学講座
 3) 弘前大学大学院医学研究科
 4) 弘前大学大学院医学研究科 先進移植再生医学講座
 5) 弘前大学大学院医学研究科 循環呼吸腎臓内科学講座
- P-50 DQ抗原に対する抗HLA抗体による慢性活動性抗体関連拒絶反応を呈した症例の検討
 ○川上 麻衣¹⁾、石田清人¹⁾、笹木剛志¹⁾、高橋智哉¹⁾、高橋俊司¹⁾、藤川正人¹⁾、原田浩²⁾、
 福澤信之²⁾、平野哲夫²⁾
 1) 市立札幌病院 検査部
 2) 市立札幌病院 腎臓移植外科
- P-51 SAFB法により同定された低力価抗ドナー抗体と抗体関連型拒絶反応の関連
 ○平井 敏仁、池宮城雅子、沢田勇吾、公平直樹、古澤美由紀、尾本和也、石田英樹、
 田邊一成
 東京女子医科大学 泌尿器科

ポスター5「技術(1)」

座長 下嶋 典子 奈良県立医科大学 細菌学教室

- P-62 唾液試料から抽出したDNAによるHLAタイピングの検討
 ○東 史啓、小野あいこ、安島潤、大原裕子、柏瀬貢一、小川篤子、高梨美乃子、内川誠、
 南陸彦
 日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター
- P-63 臍帯血のHLAタイピングにおいて判定不能となりキメラを疑った症例
 ○黒田 ゆかり、田原大志、中村仁美、中山みゆき、井上純子、永吉裕二、森鉄男、
 中村功、久田正直、入田和男、清川博之
 日本赤十字社九州ブロック血液センター
- P-64 腎移植に必要な組織適合性検査の検討
 ○坂本 慎太郎¹⁾、黒木聖久¹⁾、井藤聡美¹⁾、渡井至彦²⁾、打田和治²⁾、小林孝彰³⁾
 1) 名古屋第二赤十字病院 組織適合検査室
 2) 名古屋第二赤十字病院 移植外科
 3) 名古屋大学 移植免疫学

- P-65 施設間におけるリンパ球クロスマッチ検査結果 (CDC, FCXM, ICFA) の相違について検討
○矢澤 浩治¹⁾、橋本光男²⁾、久山芳文³⁾、市川靖二²⁾、北田秀久⁴⁾、黒木聖久⁵⁾、小林孝彰⁶⁾、
橋口裕樹⁷⁾、高原史郎⁸⁾、野々村祝夫¹⁾
- 1) 大阪大学医学部附属病院 泌尿器科
 - 2) 兵庫県立西宮病院 腎疾患総合医療センター
 - 3) 大阪府立急性期・総合医療センター
 - 4) 九州大学病院 臨床・腫瘍外科
 - 5) 名古屋第二赤十字病院
 - 6) 名古屋大学 免疫機能制御学
 - 7) 福岡赤十字病院
 - 8) 大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学

ポスター6-9

9月16日(日) 13:00~13:40

ポスター6「多様性(2)」

座長 上西 博英 農業生物資源研究所

- P-5 新規ウシ主要組織適合抗原 (MHC) クラス II 遺伝子ハプロタイプの同定とその分布
○宮坂 卓²⁾、竹嶋伸之輔¹⁾、泉對博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) 日本大学生物資源科学部 獣医学研究科
- P-6 Haplotype determination of upstream regulatory region and the second exon of bovine DRB3 gene
○Ripoli María Verónica¹⁾、Shin-nosuke Takeshima²⁾、Laura Baltian³⁾、
Yoko Aida²⁾、Guillermo Giovambattista¹⁾
- 1) Institute of Veterinarian Genetics (IGEVET), CONICET - FCV-UNLP
 - 2) Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN
 - 3) Dpto de Ciencias Basicas, FCV, UNLPam
- P-7 ペンギンMHC：最も原種に近いとされるコガタペンギンのMHCクラス II *DRB1* 様遺伝子多型
○津田 とみ^{1,2)}、吉川枝里¹⁾、小見山智義¹⁾、津田道雄¹⁾、福田道雄³⁾、栗田正徳⁴⁾、
村田浩一⁵⁾、猪子英俊¹⁾
- 1) 東海大医学部 分子生命科学
 - 2) 徳島文理大学 人間生活
 - 3) 東京都葛西水族園
 - 4) 名古屋港水族館
 - 5) 日本大学 生物資源科学

P-8 ニホンウズラCD1遺伝子の基礎的解析

○横山 佳菜¹⁾、朝治桜子¹⁾、鈴木進悟²⁾、細道一善³⁾、椎名隆²⁾、水谷豊⁴⁾、藤原哲⁵⁾、
原ひろみ¹⁾、吉田豊¹⁾、半澤恵¹⁾

- 1) 東京農業大学
- 2) 東海大学
- 3) 国立遺伝学研究所
- 4) 名古屋大学
- 5) 日本生物科学研究所

ポスター7「疾患(3)」

座長 光永 滋樹 東海大学分子生命科学

P-23 ゲノムワイド関連解析によるナルコレプシー疾患感受性遺伝子の探索

○豊田 裕美¹⁾、宮川卓¹⁾、Khor Seik Soon¹⁾、川嶋実苗¹⁾、山崎茉莉亜¹⁾、小池麻子²⁾、
田中進³⁾、本多裕⁴⁾、本多真^{3,4)}、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野
- 2) 日立製作所 中央研究所
- 3) 東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野 睡眠覚醒制御プロジェクト
- 4) 財団法人神経研究所附属睡眠学センター

P-24 ナルコレプシー発症の分子機構の解明

○陳 萱容、宮寺浩子、徳永勝士
東京大学医学系研究科 人類遺伝学分野

P-25 Synthesis of positively and negatively charged cholesterol-recombinant human gelatins for the cellular uptake of proteins and immune reactions.

○Kadengodlu Pallavi Ananda^{1,3)}、Takeshisa Hebishima²⁾、
Shin-nosuke Takeshima²⁾、Mika Ito¹⁾、Mingzhe Liu¹⁾、Hiroshi Abe¹⁾、
Yoko Aida²⁾、Toshiro Aigaki³⁾、Yoshihiro Ito^{1,3)}

- 1) Nano Medical Engineering laboratory, RIKEN Advanced Science Institute.
- 2) Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN Advanced Science Institute.
- 3) Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University.

P-26 pH応答性ポリマー修飾リポソームによる抗原特異的細胞性・液性免疫の誘導

○弓場 英司¹⁾、蛇島武久²⁾、河野健司¹⁾、伊藤嘉浩³⁾、竹嶋伸之輔²⁾、間陽子²⁾

- 1) 大阪府立大学大学院工学研究科 応用化学分野
- 2) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
- 3) 理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室

ポスター8「移植(2)」

座長 佐藤 壯 札幌北榆病院 臨床検査科

P-52 当院におけるマイクロビーズを用いたHLA抗体検査の現状

○佐藤 壯¹⁾、佐藤蘭子¹⁾、小林良二²⁾、小林直樹³⁾、玉置透⁴⁾

- 1) 社会医療法人北榆会 札幌北榆病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北榆会 札幌北榆病院 小児科
- 3) 社会医療法人北榆会 札幌北榆病院 血液内科
- 4) 社会医療法人北榆会 札幌北榆病院 腎臓移植外科

P-53 移植患者末梢血リンパ球におけるHLA-G、HLA-Fの発現

○下嶋 典子¹⁾、勇井克也²⁾、貝森淳哉³⁾、矢澤浩治³⁾、吉澤淳⁴⁾、一戸辰夫⁵⁾、森井武志⁶⁾、長谷川淳⁶⁾、米田龍生⁷⁾、高原史郎³⁾、上本伸二⁴⁾、吉田克法⁷⁾、Geraghty DE⁸⁾、喜多英二¹⁾、羽竹勝彦²⁾、石谷昭子²⁾

- 1) 奈良県立医科大学 細菌学教室
- 2) 奈良県立医科大学 法医学教室
- 3) 大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学
- 4) 京都大学医学部 肝胆膵・移植外科
- 5) 佐賀大学医学部 内科学講座 血液・呼吸器・腫瘍内科
- 6) 奈良県立医科大学 内科学第二講座
- 7) 奈良県立医科大学 泌尿器科
- 8) Fred Hutchinson Cancer Research Center

P-54 二次移植臍帯血ドナー細胞が一次移植臍帯血ドナー細胞に対してHLA抗体を産生した一例

○佐藤 蘭子¹⁾、佐藤壯¹⁾、小林良二²⁾

- 1) 社会医療法人北榆会札幌北榆病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北榆会札幌北榆病院 小児科

P-55 造血幹細胞移植後のGVH回避は体細胞変化でも起こるか？

○小島 裕人¹⁾、小沼正栄²⁾、浜之上聡³⁾、二神貴臣¹⁾、辻野貴史¹⁾、林晃司¹⁾、楠木靖史¹⁾、藤井直樹¹⁾、末上伸二¹⁾、池田奈未¹⁾、西川美年子¹⁾、小川公明⁴⁾、赤座達也¹⁾、佐治博夫¹⁾

- 1) HLA研究所
- 2) 東北大学医学部附属病院 小児科
- 3) 神奈川県立こども医療センター
- 4) NPO 白血病研究基金を育てる会

ポスター9「技術(2)」

座長 細道 一善 国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門

- P-66 Ion PGMシーケンサーならびにデータ自動解析法を用いたSS-SBT法の開発
○鈴木 進悟¹⁾、尾崎有紀¹⁾、吉川枝里¹⁾、重成敦子¹⁾、光永滋樹¹⁾、田中政之²⁾、林英樹²⁾、
太田正穂³⁾、椎名隆¹⁾、猪子英俊¹⁾
1) 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学
2) 東海大学教育・研究支援センター 情報科学部門
3) 信州大学医学部 法医学教室
- P-67 ロングアンプリコンシーケンスとRead-Backed PhasingによるHLA遺伝子の塩基配列完全決定
○細道 一善、井ノ上逸朗
国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門
- P-68 HLA適合血小板ドナー約5万検体から検出したHLA型同定不能例の解析 (I)
○中島 文明、清水まり恵、岡崎仁、佐竹正博、田所憲治、
血液事業研究研究グループ
日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
- P-69 HLA適合血小板ドナー約5万検体から検出したHLA型同定不能例の解析 (II) - A*02:15Nと同一の塩基置換による Nullアリルについて
○清水 まり恵¹⁾、中島文明¹⁾、柏瀬貢一²⁾、福森泰雄³⁾、田中秀則¹⁾、岡崎仁¹⁾、佐竹正博¹⁾、
田所憲治¹⁾、血液事業研究研究グループ¹⁾
1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所
2) 関東甲信越ブロック血液センター
3) 近畿ブロック血液センター

抄 録 集

特別講演

SL-1

HLA-F mediated antigen cross presentation and transplantation

○Daniel E. Geraghty

The Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center

Peptides that are presented by MHC class I (MHC-I) are processed from two potential sources – newly synthesized endogenous proteins for direct presentation on the surface of most nucleated cells, and exogenous proteins for cross-presentation typically by professional antigen presenting cells. Recent results provide evidence for the uptake and intracellular processing of exogenous protein through a route distinct from the endogenous pathway, and implicate HLA-F and physically associated MHC-I open conformers on activated lymphocytes in this pathway. We present evidence that HLA-F, MHC-I open conformers, and exogenous viral, tumor, and minor histocompatibility polypeptide antigens co-localize on the surface, are co-internalized, and that uptake and subsequent processing for presentation as peptide-MHC-I complexes is dependent on HLA-F and MHC-I open conformers. Our data also directly implicate HLA-F as a ligand for specific MHC-I receptors, and interaction which, in combination with its role in cross presentation, may contribute to the regulation of immune system functions. In that regard, we explore new mechanisms whereby HLA-F expression and receptor interactions affect the immune response in patients after marrow transplant.

SL-2

Highlights of the 16th International Histocompatibility Workshop

○Derek Middleton

Royal Liverpool University Hospital

The 16th International HLA and Immunogenetics Workshop (IHIW) took place in Liverpool from 28th May-30th May 2012, followed by a joint conference of IHIW,EFI and BSHI 1 st June to 3 rd June

Details of the conclusions of the projects will be given in this lecture. It is also intended that proceedings of the Workshop Projects will be given in a special edition of International J of Immunogenetics

The projects can be summarised into 5 categories

- 1.Solid Organ transplantation-many of these projects are concerned with the testing, standardisation and clinical relevance of HLA antibodies detected by the Luminex technique. Other projects involve the role of natural killer cells and MICA/B in solid organ transplantation
2. Stem Cell Transplantation, continuing the work from previous International Workshops.
- 3.Anthropology including KIR and ligand distribution and extended HLA haplotypes
- 4.Bioinformatics These projects deal with the problems we currently face in HLA analysis including epitope analysis, rare alleles and registry diversity
5. New frontiers -a mixed bag. Next generation sequencing, pharmacogenomics, immunogenetics of aging.

All projects and their goals are described at www.l6ihiw.org

シンポジウム

S1-1

HLA研究の臨床応用を目指した8桁レベルHLAタイピング法の開発

○椎名 隆、鈴木進悟、尾崎有紀、吉川枝里、重成敦子、光永滋樹、猪子英俊
東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

HLAアリルを判定するDNAタイピングは、移植の際のドナーとレシピエントの組織適合性の一致や疾患関連解析に必要不可欠である。現在、高精度タイピング法として、SSOP法（主として、Luminex法）とSBT法が主に利用されている。ところが、Luminex法を含むSSOP法やSBT法では、2つの多型部位が同一の染色体上（*cis*）か、異なる染色体上（*trans*）に位置するのかの位置情報が得られない、いわゆるphase ambiguityが生じること、またLuminex法を含むSSOP法では年々増加している新規HLAアリルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足していることから、これら従来法では多くの場合はいくつかのアリル候補が存在し、単一のアリルに絞り込むことができない。また、それらの方法では、遺伝子発現が抑制されるnullアリルの原因となるエンハンサー・プロモーター領域やイントロンにおける多型や変異の検出が不可能である。これまでに7600を超えるHLAアリルがIMGT-HLAデータベースから公開されているが、遺伝子全領域が決定されているHLAアリルは約6%にすぎず、未知のnullアリルや新規HLAアリルの存在が十分に考えられる。したがって、ambiguityを排除するとともに、nullアリルの検出や新規HLAアリルの検出を目指した8桁レベルにおけるDNAタイピング法は将来の目指すべき理想的なタイピング法と考えられる。

近年、次世代シーケンサーを用いたHLA遺伝子のDNAタイピング法が注目を浴びている。その次世代シーケンシングの原理から、1分子のDNAからの塩基配列決定（clonal amplification）が可能のため、*cis-trans*情報が得られ、その結果、phase ambiguityの問題は解決される。さらに検体それぞれに異なるタグ配列（multiplex identifier；MID）配列を付加させることにより、同時に多サンプルの塩基配列を解析するマルチプレックス解析も可能である。すなわち、この方法は、各HLA遺伝子におけるPCR産物の塩基配列を次世代シーケンサーにて決定し、得られたデータを既知配列にマッピングして、比較・検討することにより、単一HLAアリルの8桁レベル判定や新規塩基配列の検出を可能とする。ところが、この方法によるHLA遺伝子のDNAタイピングは特定エクソンのみについて報告されており、エンハンサー・プロモーター領域からすべてのエクソンおよびイントロン領域を網羅するDNAタイピング法に関する報告はない。したがって、次世代シーケンサーを駆使した8桁レベルにおけるDNAタイピング法を開発する絶好の機会である、と言える。

上記の背景から演者グループでは、ambiguityが観察される10検体を用いて、HLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1および-DPB1の遺伝子全領域をそれぞれ特異的に増幅させるPCR条件の設定から、GS Juniorベンチトップシステム（Roche社）ならびにIon Torrent PGMシステム（Life Technologies社）を用いた次世代シーケンシング、塩基配列の編集およびアリル判定までの一連の過程の超高解像度DNAタイピング（Super high resolution Single molecule - Sequence Based Typing；SS-SBT）法を開発を進めている。本シンポジウムでは、SS-SBT法の原理を実際のデータを含めて講演するとともに、本法の自動化や低コスト化などの問題点への取り組みおよび将来への臨床応用について議論したい。

S1-2

HLAと臨床の臓器移植

○湯沢 賢治

国立病院機構水戸医療センター 臨床研究部移植医療研究室

臓器移植の歴史は拒絶反応克服の歴史でもあった。臓器移植における拒絶反応の機序の解明と免疫抑制法の開発が、免疫学の発展に大きく寄与してきたことは周知の事実である。そして、その拒絶反応を抑えるべく発展した研究分野が組織適合性についての研究であり、基礎医学・生物学の分野において、HLAが血清レベル、蛋白レベル、遺伝子レベル、分子レベルでの解析へと進み、その本体が明らかにされてきた。

一方、臨床の臓器移植は、臓器不全患者を救う唯一の手段として、拒絶反応を抑える方法が完璧ではなくとも手探りで進められてきた。唯一、組織適合性、HLAを一致させることにより、拒絶反応を低下させ、良好な移植臓器の生着をはかろうとして、血縁者でHLA一致が選ばれたが、その組み合わせは多くはなかった。亡くなった方からの提供では、多くの待機患者の中から適合者が選ばれ移植されてきた。それでも完全に一致することは少なく、たとえ一致しても拒絶反応に悩まされることも多く、臓器移植の進歩にはつながらなかった。

しかし、1980年代後半から、優れた免疫抑制剤の開発が続き、臓器移植は大きく進歩し、実験的医療から脱却し、臨床的医療になった。現在、全ての臓器移植で5年生着率が70%を越え、特に生体腎移植では5年生着率が95%を越えた。この生体腎移植ドナーの37%が非血縁でHLAが基本的に一致しない夫婦間であること、更に、夫婦間の成績は平均以上であることは、驚愕に値する。

現在、亡くなった方からの提供による臓器移植で、HLAの適合度によって患者選択を行っているのは腎と脾だけで、心、肺、肝、小腸の移植ではHLAの適合度に関係なく患者が選択され、移植されている。この状況でも、全ての臓器の5年生着率が70%を越えているということは、手間がかかるHLA検査や、地道なHLA研究が、もやは不要であるというようにも聞こえる。

だが、そうではない。HLAの完全一致は、生体腎、死体腎とも成績は有意に良い。逆に、死体肝移植では、ドナーのHLAが全てホモ接合体、レシピエントがドナーのハプロタイプを共有するヘテロ接合体である場合、GVHD発症の危険性から禁忌とされ、HLA検査は重要である。さらに最近では、移植後のレシピエントにドナー特異的抗体DSAの存在が検査、同定され、この本体がドナーに対する抗HLA抗体であることが明らかになり、急性、慢性の拒絶反応への関与も示唆されてきた。

これら、臨床の臓器移植におけるHLA検査のかかわりの変遷をのべ、今なお臓器移植の臨床に重要な意味を持つHLA検査と、その臨床的意義、それを支える学問としての組織適合性の重要性について述べる。

S1-3

ヒトT細胞白血病ウイルスに対する獲得免疫の臨床への応用

○神奈木 真理¹⁾、長谷川温彦¹⁾、高森絢子¹⁾、笹田亜麻子¹⁾、玉井洋太郎¹⁾、崔日承²⁾、末廣陽子²⁾、鵜池直邦²⁾

1) 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 免疫治療学分野

2) 国立病院機構九州がんセンター 血液内科

ヒトT細胞白血病ウイルスI型 (HTLV-I) は、感染者の一部に成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATL, Adult T-cell leukemia/lymphoma) を、また別の一部にはHTLV-I関連脊髄症/熱帯性痙性対麻痺 (HAM/TSP, HTLV-I-associated myelopathy/Tropical spastic paraparesis) 等の炎症性疾患を引き起こす。国内のHTLV-I感染者数は100万人以上と推定されており献血者や妊婦への感染告知が開始されている現在、治療はもとより、発症リスク診断、発症予防を視野に入れた対策が必要である。単一のウイルスが全く異なる疾患を別々の集団に引き起こす背景には宿主免疫応答の違いがある。動物モデルでは、T細胞応答の減弱が腫瘍化を促進し、細胞傷害性T細胞 (CTL) の主要標的抗原であるHTLV-I Taxを標的としたワクチンが抗腫瘍効果を示す。ヒトHTLV-Iキャリアにおいても、臓器移植後の免疫抑制剤使用下でATLを発症した例が報告されている。HTLV-I特異的T細胞応答には疾患により差があり、ATL患者では低調であるがHAM/TSP患者では逆に亢進している。これらの観察から、HTLV-I特異的T細胞は生体内で腫瘍の抑止力としての役割を担っていることが示唆される。ATLに対しても造血幹細胞移植が行われるようになり長期寛解を達成する症例がでてきているが、幹細胞移植後に寛解したATL患者ではしばしばTax特異的CTLの活性化が見られる。これは、患者体内に発現しているTax抗原に対してドナー由来T細胞が急性感染に近似した応答をおこした結果と考えられる。このような症例のCTLの解析から、現在までに我々はHLA-A*0201, A*2402, A*1101が提示する主要なCTL認識エピトープを同定した。これらのエピトープ部位のペプチドとHLAの結合体から成る蛍光標識テトラマーを用いて感染者末梢血のCTL応答の解析が可能になった。それまでATL患者のT細胞がHTLV-I抗原に反応しないことが分かっていたが、テトラマーを用いて解析すると、頻度は低いもののTax特異的CTLが検出されるATL症例があることが分かった。しかしATL患者のテトラマー陽性細胞は、Taxペプチドを添加してもIFN γ 産生や増殖応答がほとんど無いアナジーの状態であった。同様の解析をHAM/TSP患者の検体で行うと、調べた全例でテトラマー陽性細胞が検出され、頻度も高く応答性も顕著であった。無症候HTLV-Iキャリアでは調べた87%の被験者にTax特異的CTLが検出された。しかし、残り13%では検出感度以下であり、CTLが検出された中にも極少数ではあるがT細胞不応答を示す個体が存在し、しかもこの不応答はHTLV-I特異的応答に選択的であった。これらの結果は、HTLV-I特異的T細胞応答の低下がATL患者における悪性疾患の結果というだけではなく、無症候期から潜在する生体内環境であり免疫学的なATLリスクである可能性を示唆している。これまでの研究成果を踏まえ、現在我々は「ATLに対するTax特異的T細胞応答賦活化ペプチドパルス樹状細胞を用いた新規免疫療法」の第I相臨床試験 (実施機関: 東京医科歯科大学/九州大学、研究代表: 九州がんセンター鵜池直邦) を進めている。ペプチドには先述の3種類のHLAに提示されるメジャーエピトープを用い、アジュバントとして成熟樹状細胞を用いる。現段階ではATL患者に対する安全性試験の段階であるが抗腫瘍効果を期待し、さらに今後発展させATL高危険群に対する発症予防ワクチンへとつなげたい。(エピトープ詳細文献: J. Virol. 66: 2928, 1992, Cancer Res. 64: 391, 2004, J. Virol. 79: 10088, 2005, Retrovirology 8: 100, 2011)

S2-1

系統ネットワークを用いた組換えの検出

○斎藤 成也¹⁾、北野誉²⁾

1) 国立遺伝学研究所 集団遺伝研究部門

2) 茨城大学工学部 生体機能分子工学科

系統ネットワークは、遺伝子や種の系統関係において、分枝だけを前提とした系統樹の拡張であり、組換えや遺伝子変換、雑種集団などの識別に有効である。我々はこの手法を用いて、ABO式血液型遺伝子において、数百万年前にテナガザルの系統で生じた複数回の組換えを推定することができた(1)。この手法をヒトのABO式血液型遺伝子配列データに適用したところ、200万年ほど前から共存していたと考えられるB型とO型の対立遺伝子の組換えによって、26万年ほど前に現在のA型対立遺伝子が生じたと推定した(2)。この方法の一般性を示すために、さらにいくつかのウイルス(インフルエンザA型、HIV 1、HTLV)について、すでに知られている組換えを容易に検出できることを示し、さらにHLA遺伝子についても、HLA-B*7301がB遺伝子座とC遺伝子座のあいだの不等交叉によって生じたという報告(3)を確認し、その年代も約1100万年前と推定した(4)。

本講演では、このPNarec (Phylogenetic Network for ancient recombination) 法を説明し、MHC遺伝子を中心に具体的な応用例を示す。

1. Kitano, T., Noda, R., Takenaka, O., and Saitou N., 2009. Relic of ancient recombinations in gibbon ABO blood group genes deciphered through phylogenetic network analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 51, 465-471.
2. Kitano, T., Blancher A., and Saitou, N., 2012. The functional A allele was resurrected via recombination in the human ABO blood group gene. *Mol. Biol. Evol.* electrically published on March 8, 2012.
3. Gu, X. and Nei, M. 1999. Locus specificity of polymorphic alleles and evolution by a birth-and-death process in mammalian MHC genes. *Mol. Biol. Evol.* 16, 147-156.
4. Saitou N. and Kitano T. (2012) The PNarec method for detection of ancient recombinations through phylogenetic network analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* (submitted) .

S2-2

遺伝子の決定性についての考察

○松本 俊吉

東海大学

本報告では、「遺伝子」の概念に伴う混乱と曖昧さの原因を分析する。時間の許す範囲で、以下のような論点を提供したい。

①「遺伝的決定論」という表現は、かつての社会生物学論争などでは否定的な含意で語られていたが、現在ではこの表現に違和感抜きに肯定的に言及する生命科学者もいる。では、ある形質が遺伝的に決定されているとはそもそもどういう意味なのか。かつて「遺伝的決定論者」として批判されたE.O.ウィルソンやR.ドーキンスは、実際にはどういう主張を展開していたのか。「統計的な傾向性」と「不可避的な決定性」との相違に対する批判者の無理解だけが混乱の原因だったのか。

②昨今、かつての素朴な遺伝的決定論を回避するという意図もあって、「遺伝子と環境との相互作用」という表現がしばしば用いられているが、これはどこまで実質的な内容を持つものなのか。上記のウィルソンやドーキンスでさえ、すでに1970年代の段階でこうした相互作用を当然の前提として認めているのである。こうした表現を単に「アリバイ証明」のための空虚な言辞にとどめておくのではなく、それに実質的な内実を与えるためには、われわれはこれをどのように解釈すればよいのか。

③そもそも「遺伝子」とは何か。「ある形質が遺伝的にコードされている」という言明の持つ意味は、科学的な文脈においてさえ、必ずしも明確に定義されているわけではない。現在、大まかに二つの異なる遺伝子概念が、ときに混同されつつ流通している。一方は「ヒトの遺伝子は2万数千個である」と言われるときのように、その染色体上の部位が明確に特定されたDNA配列であり（いわゆる「遺伝子D」）、他方は「赤目の遺伝子」「肺ガン遺伝子」（場合によっては「犯罪者の遺伝子」「浮気の遺伝子」）などと言われるときのように、生物体の適応度に差異をもたらすように見える表現型Xの背後にそれをコードする遺伝子が存在するものと想定し、それを「Xの遺伝子」と呼ぶというものである（いわゆる「遺伝子P」）。従来、遺伝的決定論や適応主義をめぐる論争が紛糾した背景事情の一端は、必ずしも遺伝的基礎を有しているかどうかは明確でない—つまり現時点で何らかの適応的（adaptive）な機能を担っているが、それが過去の自然選択によって固定された適応（adaptation）であるとは確定していない—表現型に関して、遺伝子Pの意味でとりあえずその遺伝的基礎の存在を想定するという語用法が幾分乱用される傾向にあり、それを逆に批判者の側が、遺伝子Dの意味であたかもそのDNA上の部位が明確に特定された物言いであるかのように受け取ってしまったという点にあるように思われる。

④対立遺伝子選択説（利己的遺伝子説）の問題。果たしてドーキンスの言うように「自然選択による進化のプロセスはすべて対立遺伝子の〈利益〉のためのものである」と言えるのか。ここでは選択過程において対立遺伝子が果たしうる二つの異なる役割—「選択の因果的な担い手」と「進化の記録係bookkeeper」—の区別を導入する。前者の意味で、実質的に対立遺伝子が選択過程の原因かつ標的であると言えるのは、減数分裂分離ひずみ遺伝子や癌遺伝子などのごく一部の「無法者遺伝子outlaws」に限られる。それに対して、多くの適応的進化は、むしろ対立遺伝子の適応価とは独立に進行し、単にその結果が「集団における対立遺伝子の頻度変化」に反映されるにすぎない。たとえば、MHC遺伝子群の多型も、仮にその維持に自然選択が大きく関与しているとしても、対立遺伝子レベルの淘汰圧だけでは説明できないかもしれない。

S2-3

ヒト免疫不全ウイルスによるMHC-1発現制御機構の分子構造学的解析

○明里 宏文

京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）は後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因ウイルスである。HIV-1は宿主免疫応答を特異的に制御することにより生体内において長期持続感染し、やがてエイズ発症へと至る。この機序として、HIV-1の調節蛋白の一つであるNef蛋白が抗原提示分子MHCクラスI（MHC-I）の細胞表面発現を制御することにより、HIV-1特異的細胞障害性T細胞による認識を回避することが報告されている。またその作用には輸送蛋白の一つであるAP-1複合体が関与していることが示唆されている。しかし、その詳細な分子機構はこれまで長い間未解明なままであった。我々は最近、AP-1複合体のサブユニットであるmu-1 AとNef蛋白間の特異的結合に関する分子構造学的なメカニズムを明らかにした。この成果は、Nef蛋白を持つ霊長類免疫不全ウイルスの宿主免疫制御機構に迫る重要な知見と考えられる。

S2-4

発症感受性アレル情報に基づく牛白血病ワクチンの開発

○問 陽子

理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

人類の難治疾患である成人T細胞白血病（ATL）を誘発する成人T細胞白血病ウイルス（HTLV）の感染者数は全世界で2000万人、日本で100万人を超えると推定されているが、その感染を防御、または発症を阻止するワクチンの開発には至っていない。同様に、HTLVに最も近縁なレトロウイルスである牛白血病ウイルス（BLV）は全世界に蔓延し、地方病性牛白血病（EBL）を惹起することによって畜産界に甚大な被害を与えているが、個体差が原因で一般的に使用可能なワクチンの開発は成功していない。

我々は、この個体差の原因の一つがウシ主要組織適合抗原（BoLA）クラスIIDR分子の多型性であることを突き止め、BLV体内ウイルス量を上昇させ、白血病発症を促進する感受性アレルと、逆の効果を持つ抵抗性アレルを見出した。さらに、短期間でBLV誘発性白血病を発症する牛白血病のモデル動物ヒツジを用いてBLV防御実験を行った。白血病発症に対して抵抗性アレルを有するヒツジは、感受性アレルを持つヒツジと異なり、BLV感染後に強いTh1型細胞性免疫応答が誘導されウイルス増殖が著しく抑制される結果として、最終的に白血病を発症しないとの知見を得た。そこで、このMHCの多型性によるBLVに対する免疫応答性の違いに注目して、感受性BoLAクラスII DR分子に適合した抗原ペプチドを同定し、*in silico*スクリーニングにより、より結合しやすくなるようにペプチドの最適化を図った後、ナノ粒子によるデリバリーシステムを用いてペプチドを抗原提示細胞に効率良く輸送して、Th1型細胞性免疫を強力に誘導できる生分解性ナノ粒子固定化ペプチドの開発を目指している。このワクチンは感染防御を可能とするだけでなく体内ウイルス量の低下によるBLV伝搬の抑制および病態進行の抑制をも可能にすることが期待される。

本シンポジウムでは我々が新たに試みているワクチン戦略の概要と現状を以下のように紹介する。

- 1) 感受性BoLAクラスII DR分子に結合する抗原ペプチドの同定
- 2) *in silico*技術による抗原ペプチドと感受性BoLAクラスII DR分子の複合体構造の構築
- 3) BLV由来Thエpiteープの検索
- 4) 構築した立体構造を利用した*in silico*スクリーニングによる高親和性ペプチドの設計
- 5) 生分解性ナノ粒子の固定化によるペプチドワクチンのデリバリーシステムの確立
- 6) 卵移植により生産した感受性黒毛和種牛への接種実験

本シンポジウムで述べる研究成果が免疫応答の個体差が問題となる他の感染症のワクチン開発の一助となることを期待したい。

本シンポジウムで述べる研究は、多くの共同研究者との共同研究により得られたものであり、心から厚く感謝する。なお、本研究は生研センター・イノベーション創出基礎研究推進事業および科学研究費補助金・基盤研究（A・B）の支援を受けて行っている。

教育講演

EL-1

熱帯感染症とHLA

○平山 謙二

長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野

ヒトが同じ病原体に感染したあと無症状だったり重症化したりという個性があるのはなぜなのか。この個性の大部分は遺伝子の多様性によりもたらされる。感受性の個体差を規定する遺伝子変異を発見することで病態メカニズム解明をめざす。

1. デング出血熱の重症化とHLA

デング熱はネッタイシマカによって媒介されるウイルス感染症である。1980年代より急激に患者数を増加させている。ベトナム南部では、毎年各地で流行し、死亡例も報告されている。

ウイルスが体内に侵入すると5日間の潜伏期の後39度以上の高熱、頭痛、骨痛、などが3-4日続き解熱する。しかし時に解熱時に突然出血やショック症状を呈することがある。増殖したウイルス粒子が免疫系を刺激し炎症性のサイトカインが過剰に産生される、サイトカインストームが重症化の原因と考えられている。

ベトナムで患者対照試験を行い重症化に感受性のHLAについて調べた。患者はホーチミン市内および近郊の二つの病院を訪れ、入院治療した6か月から15歳までのキン族の小児でWHOの診断基準により、デング出血熱(DHF)およびデングショック症候群(DSS)の診断を行った。DSS 420名、DHF 211名、デング熱(DF) 114名、対照群450名のDNA解析を行った。その結果、HLA-A*24の70番アミノ酸がヒスチジングループの頻度がDF、DHFで上昇し、DSSでさらに上昇するという重症化促進因子として働いていた。また、HLA-DRB1*0901がDSSで優位に減少することがわかった。HLAはT細胞の活性化に必須の抗原提示分子であり何らかの特徴的なT細胞応答が病態と関係していると考えられる。

2. シャーガス病の慢性合併症(心筋症、巨大結腸症)抵抗性HLAハプロタイプ

シャーガス病はラテンアメリカに広く分布する細胞内寄生原虫クルーストリパノソーマ感染症である。2009年の報告でも年間30万人が新たに感染している。有効な薬剤がないので、ほとんどが慢性に移行し、生涯原虫を保有して生活する。慢性期の患者は大きく3つの病型に分類され、無症状群、心疾患群、巨大食道結腸症群と呼ばれる。合併症を伴う患者では突然死や急性腹症などが多発するが、慢性患者の3割程度が発症する。

無症候性73名、心疾患81名、巨大結腸症100名についてHLA-A, B, DRB1, MICA遺伝子座のアレルタイピングを行い、合併症に関連するアレルの検索を行った。その結果、DRB1*01-MICA*011-B*14が巨大結腸症に抵抗性のハプロタイプを構成することが明らかとなった。このハプロタイプの機能的な特徴について発現解析や免疫細胞刺激活性などについて今後の研究を展開する。

Nguyen TPL, Hirayama K. et al. (2008) PLoS Negl Trop Dis. 2 (10) : e 304,

del Puerto F, Hirayama K, et al. (2012) PLoS Negl Trop Dis 6 (3) : e1587.

EL-2

QCワークショップの結果から見たHLA抗体検査の現状

○高 陽淑

日本赤十字社近畿ブロック血液センター 検査三課

日本組織適合性学会QCWS部会においては、1997年から実施していたDNAタイピングQC (DNA-QC) に加えて、2005年からは抗体部門QC (抗体-QC) を実施する事になり、2部門での開催となってから今年 (2012年) で8年目となる。

開始当初は、抗体検査の方法論による特異性、精度に関する比較などいわゆる『抗体の検出』をメインテーマとしていたが、バックグラウンドの排除を必要とするサンプルやMIC抗体を含むサンプルなど試料選択の工夫や、2009年からはクロスマッチ、部門別解析の導入など『施設認定』を目指して年々進化してきた。さらに参加者へのアンケート調査を実施するなど参加施設の意思を反映できるような取り組みも行ってきている。

その変遷の根拠は、臓器・造血移植および輸血の医療現場におけるHLA抗体検査の重要性が増してきたことにある。言い換えれば、抗体-QCの結果を解析するということは、日常業務に携わる担当者の技術・知識レベルやその時々抱える問題点の把握だけではなく、その時々に取り囲む医療現場からのリクエストにどうしたら応えられるかという難問へのヒントを探すことに他ならない。

本講演では、過去の抗体-QCを振り返り、①抗体-QCのサンプル、施設参加状況、参加方法、抗体検査のテーマ等の変遷、②参加施設の結果一致率の推移、およびそこから推測される不一致の原因などをレビューしたうえで、抗体検査状況についての考察を試みる。

全体を通して現状での問題点と今後の展望など日常業務に貢献できるような話題を提供したいと考えている。

EL-3

肝移植における抗ドナー特異抗体の意義

○江川 裕人

東京女子医科大学 消化器外科

血液型不適合肝移植は、様々な工夫がなされ、特にリツキサンの登場によりほぼ満足いく成績が、施設間格差なく達成されるようになった。一方で、血液型適合肝移植における抗ドナー特異抗体の臨床的意義についてはいまだ定まった見解がない。術前クロスマッチ陽性がグラフトロスと関連があるとする報告とないとする報告とほぼ同数である。わが国の生体肝移植においては、京都大学から小児症例においては急性細胞性拒絶反応(ACR)には関連するがグラフト生着には関係ないと報告されたが、その後、成人女性症例における術前クロスマッチ陽性症例において生着率が有意に低下することが報告された。一方で東京大学からは成人症例においてもクロスマッチ陽性と陰性の間に生存率に差はないと報告された。

クラスⅠ、クラスⅡ別にスクリーニングし、さらに対象抗原を特定するだけでなく定量評価もある程度可能であるシングルビーズ法が普及したことで、肝移植においても抗HLA抗体の臨床的重要性が注目されるようになった。最近では、クロスマッチ陽性症例や抗HLA抗体陽性症例における難治性胆管炎、慢性拒絶が報告されている。

抗HLA抗体の評価は、シングルビーズのみで評価可能であるが、HLA以外の抗原を標的とするDSAの意義も腎臓では論議されているので、LCTとFCMも平行して測定するのが望ましい。シングルビーズがない施設では、せめてLCTとFCMは必須であるが、外注検査できるようになっている。

陽性症例に対する術前脱感作療法は、血液型不適合肝移植に準じた方法をとっている。リツキサンと代謝拮抗剤とカルシニューリン阻害薬の術前投与と血漿交換の組み合わせである。術中脾摘も有効と考えられる。術後脱感作療法は、代謝拮抗剤、リツキサン、血漿交換、免疫グロブリン大量投与が基本となろう。

術後は、全例DSAをルーチンに測定する必要はないが、術前弱陽性例、夫や子供から妻・母親への移植、中心静脈周囲の反応が強いACRや狭窄が同定し得ない胆管炎を認めたらDSAの有無を検討し陽性であれば、対応すべきであろう。

生体肝移植では、家族であるがゆえに“感作”という落とし穴が存在する。脳死移植では頻度は低いと予想されるが、日本列島の住人に頻度が高いHLAもあるので油断できない。シングルビーズ法で抗HLA抗体陽性率は23%であった。脳死肝移植においても他の臓器と同じくDSAをチェックするシステムが必要である。特に親族優先提供において危惧される。

学術賞ならびに学術奨励賞候補口演

会員研究発表(学術賞ならびに学術奨励賞候補口演)

A-1 (P-40)

*NFKBIL1*はヒトおよびウイルス遺伝子のスプライシングを制御する

○安 健博^{1,2}、中島敏晶^{1,2}、柴田宏樹^{1,3}、成瀬妙子¹、
有村卓朗¹、安波道郎^{1,2,3}、木村彰方^{1,2}

- 1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所
- 2) 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部
- 3) 長崎大学熱帯医学研究所

【目的】*NFKBIL1*は*HLA-B*の約190kbセントロメ側マッピングされ、慢性関節リウマチや高安動脈炎との関連が示されているが、当該遺伝子がコードするI κ BLの機能は不明である。以前に我々はI κ BLにはI κ B活性はないことを報告しているが、酵母2ハイブリッド法を用いてI κ BLが選択的スプライシングに関わるcdc-like kinase 1 (CLK 1) と結合することを見出した。そこで本研究では、I κ BLとCLK 1によるスプライシング制御機構について検討した。

【方法】I κ BLとCLK 1について、全長あるいは部分欠失体を発現ベクターに組み込み、これらを単独あるいは組合せて導入した細胞を用いて、ヒトCD45遺伝子ならびにインフルエンザウイルスM遺伝子の選択的スプライシング効率を検討した。

【結果】I κ BLとCLK 1はSRタンパクと複合体を形成し、核スペックルに局在することを確認した。また、CLK 1はhnRNPLおよびhnRNPLLによるCD45の選択的スプライシングを促進したが、この効果はCLK 1のRSドメインに依存し、kinase活性には依存しなかった。一方、I κ BLはCLK 1によるCD45の選択的スプライシング促進に拮抗した。また、I κ BLはインフルエンザウイルスの複製に重要なM2型選択的スプライシングを抑制した。

【考察】CLK 1は核内スペックルにてSRタンパクと複合体を形成し、種々の遺伝子で選択的スプライシングを制御することが知られている。本研究の結果から、I κ BLはCLK 1とSRタンパクとの複合体形成に拮抗的に作用することで、ヒト遺伝子、ウイルス遺伝子の両者のスプライシング制御に関与すると考えられた。

【結論】I κ BLは、ヒト遺伝子とウイルス遺伝子の両者で選択的スプライシングを制御する。

A-2 (P-41)

RAに伴う間質性肺病変とHLAとの関連

○古川 宏¹、島田浩太^{2,3}、杉井章二^{2,3}、松井利浩³、
池中達央⁴、橋本篤³、高岡宏和^{3,5}、有沼良幸³、
岡崎優子³、二見秀一³、小宮明子¹、中村正⁵、右田清志⁶、
須田昭子⁷、長岡章平⁷、土屋尚之⁸、當間重人¹

- 1) 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター
- 2) 東京都立多摩総合医療センター リウマチ膠原病科
- 3) 国立病院機構相模原病院 リウマチ科
- 4) 国立病院機構相模原病院 リハビリテーション科
- 5) NTT西日本九州病院 リウマチ膠原病内科
- 6) 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター
- 7) 横浜南共済病院 膠原病リウマチ内科
- 8) 筑波大学 医学医療系分子遺伝疫学

【目的】関節リウマチ (RA) にしばしば合併する間質性肺病変 (ILD) は関節外病変の一つであり、生命予後に重大な影響を及ぼしうる病態であるにもかかわらず、その発症機序の解明や治療法の確立に関しては未だ不十分である。また、本邦RA患者では薬剤誘発性ILDの発症頻度が他国と比して著しく高いとの報告もあることから、RAに関連するILD発症機序の解析は極めて重要な研究課題である。RAとHLAアレルとの関連についての研究は多いが、RAに伴うILDとの関連に関する報告は極めて少ない。RAに合併したILDとRA患者における薬剤誘発性ILD発症とに、HLAが関連するかどうかを明らかにすることを目的とする。

【方法】ILDの有無と薬剤誘発性ILD発症歴とが明らかなRA症例のHLAについて、関連解析を行った。

【結果】*HLA-DRB1*04*, shared epitope (SE), *DQB1*04*はILD発症のリスクと負の関連をしめし、*DRB1*16*, DR 2 group (*DRB1*15*, **16*), *DQB1*06*はILD発症と正の関連を示した。薬剤誘発性ILDとの明らかな関連は認めなかった。

A-3 (P-42)

原爆被爆者コーホートでみられた肝炎ウイルス感染と肝細胞発がんの免疫遺伝学的要因

○林 奉権¹⁾、大石和佳²⁾、吉田健吾¹⁾、今井一枝¹⁾、林幾江³⁾、
梶村順子¹⁾、京泉誠之¹⁾、楠洋一郎¹⁾、中地敬¹⁾

1) 放射線影響研究所 放射線生物学/分子疫学部

2) 放射線影響研究所 臨床研究部

3) 広島大学 歯学部中央研究室

【目的】C型肝炎ウイルス (HCV) 感染後の経過 (特に、HCVクリアランスまたは慢性肝炎への移行)、慢性肝炎から肝細胞がんへの進展には一連の宿主免疫反応が関与しており、感染者がどのような経路をたどるかはこの反応の個人差に一部依存していると考えられる。我々はNK細胞、CD8 T細胞などに発現する細胞表面レセプターであるNKG2Dに注目し、NKG2D遺伝子ハプロタイプとHCV持続感染および肝細胞がん発生との関係を検討した。

【方法】HCV持続感染については放射線影響研究所の成人健康調査コーホートで診断されたHCV持続感染群160名とHCVクリアランス群106名のゲノム毎の比較研究を行い、肝細胞がんについては同コーホートで見出された肝細胞がん115症例および2,132名のサブコーホートでのケース・コーホート研究デザインによるゲノム関連解析を行った。

【結果・考察】NKG2Dハプロタイプアレル (高、低NK活性にそれぞれ関係するHNK1、LNK1) の解析に基づき以下の結果を得た。HCVクリアランス群におけるHNK1/HNK1ハプロタイプの割合 (18.0%) は、HCV持続感染群での割合 (8.8%) に比べて約2倍高かった。肝細胞がんについての解析で、対象者を被曝線量3群 (非被曝、0.7Gy未満の被曝、0.7 Gy以上の被曝) とNKG2Dハプロタイプとの組み合わせに分けると、参照群 (HNK1/HNK1で非被曝) に比べ、HNK1/LNK1あるいはLNK1/LNK1を持つ集団の中で最も高い被曝線量群において肝細胞発がんリスクが最大となった (RR = 4.6、95% CI: 1.1-19.2)。これらの結果から、NKG2DハプロタイプがHCV感染後のHCVクリアランスあるいは持続感染後の経過に影響すること、また肝細胞がんにはNKG2Dハプロタイプのみならず放射線被曝も関与することが示唆された。

A-4 (P-43)

HLA-B35拘束性HIV特異的TCRは野生型抗原に高い特異性を有する

○本園千尋^{1,2,3)}、John J. Miles¹⁾、宮澤正顯³⁾、上野貴将²⁾、
Andrew K. Sewell¹⁾

1) Cardiff University, School of Medicine

2) 熊本大学 エイズ学研究センター

3) 近畿大学医学部 免疫学教室

【目的】最近のHIV感染者の集団遺伝学的解析から、T細胞エピトープならびにHIV抗原変異の出現パターンにはHLAアリルに基づいた規則性があることが明らかになった。本研究では、T細胞レセプター (TCR) の交差反応性がHIV変異の形成に関わるのではないかと仮説を立て、HIV特異的TCRの交差反応特性について包括的に解析を行った。

【方法】CTLの交差反応性解析には、自己非自己に関わらず、すべての可能な組み合わせを網羅した抗原ペプチドライブラリー (PS-SCL) を用いた。さらにTCRを細胞表面に再構築し、野生型抗原を1アミノ酸ずつ置換したペプチドに対する交差反応性について解析を行った。

【結果】AIDS病態の早期進行と相関するアリルであるHLA-B35に提示され、複数のHIV感染者で認められるVY8 (VPLRPMTY) 抗原に特異的なCTL応答に着目した。PS-SCLを用いた解析から、解析した6つのCTLクローンはペプチドのどの部位についても、野生型抗原を構成するアミノ酸残基に特に高い応答性を示した。さらに、どのCTLも抗原の中央部分ならびにC末端側のアミノ酸残基の置換で反応性が低下した一方、N末端の複数の残基に対しては野生型から置換しても応答性を維持していた。TCRを再構築した細胞を用いて、VY8から1アミノ酸置換したペプチドに対する応答性を調べたところ、PS-SCLで得た結果と同様の交差反応性が再現され、144個のペプチドのうち、わずか22個のペプチド (15%) にしか応答性を維持できなかった。実際に、HIV感染者から同定した変異エピトープ8F (VPLRPMTE) に対してもTCRは共通して応答性は低かった。

【考察】HIV特異的TCRには、野生型抗原に対する高い抗原特異性が備わっているため、抗原変異に対する交差反応性は共通して低く、結果として、HIV感染者集団の中でTCRの認識を低下させるHIV変異が蓄積していくのではないかと推察された。

会員研究発表(学術賞ならびに学術奨励賞候補口演)

A-5(P-44)

HLAクラスI拘束性CTLとHLAクラスII拘束性Th細胞を誘導できる理想的な単一癌抗原ペプチドの同定

○富田雄介^{1,2)}、湯野晃^{1,3)}、入江厚¹⁾、千住覚¹⁾、矢津田旬二¹⁾、黒田泰弘¹⁾、角田卓也⁴⁾、中村祐輔⁵⁾、興梠博次²⁾、吉武義泰³⁾、篠原正徳³⁾、西村泰治¹⁾

- 1) 熊本大学院生命科学研究部 免疫識別学分野
- 2) 熊本大学院生命科学研究部 呼吸器病態学分野
- 3) 熊本大学院生命科学研究部 歯科口腔外科学分野
- 4) オンコセラピーサイエンス株式会社
- 5) 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター

【目的】多様な癌腫に高発現する癌精巢抗原であるCDCA 1 およびLY 6 K由来の、細胞傷害性T細胞 (CTL) 誘導活性を併せ持つヘルパーT (Th) 細胞エピトープを同定し、癌免疫療法への応用に資する。

【方法】HLAクラスIIに結合するペプチド候補を予測する解析ソフトと、過去に同定したCDCA 1 およびLY 6 K由来のCTLエピトープ配列の情報を基に、CTLエピトープを含むTh細胞エピトープ候補を選定し合成した。健康人由来の末梢血単核球細胞 (PBMC) をペプチドで刺激し、IFN- γ ELISPOT法で特異的Th細胞の免疫応答を観察し、Th細胞エピトープを同定した。またCTLエピトープ配列を含むTh細胞エピトープペプチドを用いて、CTLの誘導を試みた。さらにCDCA 1 およびLY 6 K 由来のCTLペプチドワクチン接種を受けた頭頸部癌患者のPBMCを用いて、同定したTh細胞エピトープ特異的Th細胞の存在の有無を検討した。

【結果】CDCA 1 およびLY 6 K由来の、CTLエピトープを自然配列として含むTh 1 エピトープを同定した。同定したTh 1 エピトープは複数のHLA-DRおよびDP分子に結合し、Th 1 細胞を誘導できた。また、同定したTh 1 エピトープが、樹状細胞において蛋白質抗原よりナチュラルプロセッシングにより産生されることを確認した。同定したTh 1 エピトープペプチドにより、CTLエピトープ特異的CTLをin vitro およびin vivo実験で誘導出来た。さらに、CTLエピトープワクチン接種頭頸部癌患者のPBMC中に、同定したTh 1 エピトープに特異的なTh 1 細胞を検出できた。

【結論】同定した2つの癌精巢抗原由来のTh 1 エピトープは、CTLおよびTh 1 細胞の両者の誘導活性を併せ持ち、理想的な癌免疫療法の治療薬として有望であることが示唆された。

A-6(P-45)

HLA領域に位置する新規ベーチェット病感受性遺伝子の炎症応答に関する機能解析

○倉田里穂^{1,2)}、米沢朋³⁾、猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部 分子生命科学
- 2) 日本学術振興会
- 3) The Scripps Research Institute

【目的】ベーチェット病 (BD) の遺伝的要因として、*HLA-A*26*、*-B*51*が報告されているが、関連の強さを示すオッズ比は2-5程度 (2-5倍発症しやすい) であり、両遺伝的要因は共に発症に必須でないことから、他の遺伝的要因の存在が考えられた。一方、BDの全ゲノム関連解析において、*HLA-A*、*-B*とは別に、*HLA-A*から*-E*の間の領域が有意な相関を示した。そこで、この領域のSNPを網羅的に解析し、新規BD感受性遺伝子の同定を試みた。さらに、同定した遺伝子の機能を予測するために、過剰発現系プロファイルを検討した。

【方法】HapMap計画の日本人データベースを用い、タイピングを行うSNPを135 SNPsに絞った。BD患者と健康者のゲノムDNA384検体ずつタイピングし、関連解析を行った。

C57BL/6マウスのリンパ節由来のCD4⁺T細胞より遺伝子過剰発現系細胞を作製し、マイクロアレイで遺伝子発現解析を行った。さらに、発現量が変動した遺伝子を、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway Databaseに登録されているパスウェイと比較した。

【結果】関連解析の結果、*HLA-A*26*と*-B*51*と独立してBDに感受性を示す (Tripartite motifs 39) *TRIM 39*を同定した。

*TRIM39*過剰発現系のプロファイルを検討したところ、補体および凝固反応系、NK細胞およびタイトジャンクションのパスウェイが予測された。

【考察】マクロファージ、B細胞およびT細胞で働く遺伝子の発現に影響を及ぼしたことから、*TRIM39*は免疫応答に広く関与することが示唆された。タイトジャンクションは、上皮系で働き、皮膚のバリアとして免疫に重要な機構であるが、T細胞においてもそれらの機能が影響する可能性があり、*TRIM39*分子機構の解明がT細胞における新たな免疫機構の発見の手がかりとなるかもしれない。

A-7(P-46)

眼合併症を伴うStevens-Johnson症候群発症におけるHLA-A0206-TLR3遺伝子多型間の相互作用

○上田真由美^{1,2)}、徳永勝士³⁾、外園千恵¹⁾、澤井裕美³⁾、田宮元⁴⁾、稲富勉¹⁾、木下茂¹⁾

- 1) 京都府立医科大学 眼科学教室
- 2) 同志社大学 生命医科学部
- 3) 東京大学 人類遺伝学教室
- 4) 山形大学 先端分子疫学研究所

【目的】 以前、我々は、眼合併症を伴うStevens-Johnson症候群 (SJS) において、HLA-A0206と強い相関があること、TLR3、EP3、IL4Rなど複数の遺伝子多型と強い相関を示すことを報告した。また、TLR3-EP3遺伝子多型間の相互作用がSJS発症に強く関与することも報告した。SJSは、重症薬疹である一方、重篤な眼合併症を伴う患者では薬剤投与の前にウイルス感染を疑わせる症状が約80%に認められる。今回、SJS発症と強い相関を認めかつウイルス認識に関与するTLR3とHLA-A0206の相互作用について調べたので報告する。

【方法】 眼合併症を伴うSJS患者110名と健常コントロール206名のHLA-AならびにSJS発症と相関を認めるTLR3遺伝子多型7種(rs3775296,rs5743312,rs6822014,rs3775290,rs7668666,rs11732384,rs4861699)を解析し、TLR3遺伝子多型間、ならびにHLA-A0206とTLR3遺伝子多型間の相互作用について検討した。

【結果】 TLR3遺伝子多型7種を解析したところ、rs3775296とrs5743312、ならびに、rs7668666とrs3775290には、連鎖不平衡が認められた。TLR3遺伝子多型間の相互作用を解析したところ、rs6822014とrs3775290(rs7668666)の間で、相加効果以上の相互作用が確認された($p=2.0 \times 10^{-6}$, OR=16.1)。HLA-A0206とTLR3遺伝子多型間では、HLA-A*0206とTLR3rs3775296 T/T(rs5743312 T/T)との間で相加効果以上の強い相互作用が確認された($p=6.5 \times 10^{-6}$, OR=47.7)。

【考察】 今後、ヒト疾患の発症において、複数遺伝子間の相互作用は重要であると考えられた。

A-8(P-47)

スギ花粉症とMICA遺伝子の相関—可溶性MICAの花粉尘への影響について—

○中西真理¹⁾、芦田恒雄²⁾、井手武¹⁾、井上和也¹⁾、大村素子³⁾、益尾清恵⁴⁾、佐田正晴⁵⁾、Anajane Smith⁶⁾、羽竹勝彦¹⁾、Daniel E.Geraghty⁶⁾、石谷昭子¹⁾

- 1) 奈良県立医科大学 法医学教室
- 2) 芦田耳鼻咽喉科
- 3) 大村内科循環器科クリニック
- 4) 株式会社ベリタス
- 5) 元国立循環器病センター
- 6) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】 これまでスギ花粉症の感受性遺伝子検索を行う中でMICA近辺のSNPsに強い相関がみられたので、これを確認すべく、MICAのTM型とallele型およびHLA-Bローカスの多型解析を行い、相関を調べた。

【方法】 大阪府在住のスギ花粉症患者(スギ特異的IgE ≥ 2 RASTscore)178名および健常対象者184名より血液を採取し、その血清を用いて、スギ、カモガヤ、ヨモギ、イエダニ特異的IgE抗体をRAST法により定量し、白血球より抽出したDNAを用いて遺伝子多型解析を行った。

【結果】 患者群はすべてスギに対してはRAST score 2以上であるが、健常対照群においても4アレルゲン全てにRAST陰性の群(R(-)Cont)100人と、症状は出ていなくても1~4アレルゲン(スギを含む)にRAST陽性の群(R(+))84人とが存在した。そこで、相関解析においては対照群としてR(-)ContとR(+))Contおよび全対照群(TCont)(184人)の3種の対照について解析を行った。その結果、TContを対照とした場合はあまり明確な相関がみられなかったが、R(-)Contを対照とした場合はTM多型については、A5.1($P=0.0036$,OR=0.5)とA5(有意には至らない)が減少し、A6($P=0.047$,OR=1.50)が増加していた。allele型ではMICA*008($P=0.0036$,OR=0.5),MICA*048(*027を含む)($P=0.016$,OR=0.55)で減少し、B60($P=0.017$,OR=0.42)とB61($P=0.011$,OR=0.53)で減少がみられた。

【考察】 有意に減少のみられたMICA*008(A5.1)とMICA*048(A5)はいずれもMICA-213Ile,251Argのvariantであり、これらa3domainのSNPはその構造上、細胞外領域のsheddingがされやすいと報告されている。特にMICA*008はTM領域で1塩基挿入があり、可溶性MICAの産生に関わっているとされている。この結果はMICAの可溶性分子の花粉尘抑制効果を示唆していると考えられる。このようなMICAとの明確な相関が見いだされたのは、健常対照群であっても特異的IgE抗体を産生している群を分離したことが重要であったと思われる。

会員研究発表(学術賞ならびに学術奨励賞候補口演)

A-9(P-61)

HLA, ABO抗原に対する抗体接着が引き起こす、免疫順応シグナル伝達

○岩崎研太¹⁾、荊萍¹⁾、中島文明²⁾、三輪祐子¹⁾、羽根田正隆¹⁾、小林孝彰¹⁾

- 1) 名古屋大学大学院医学系研究科 移植免疫学寄附講座
2) 日本赤十字社血液事業本部

【背景】 Accommodationとはドナーに対する抗体が存在するにもかかわらず、移植臓器が傷害を受けない状態を指し、抗体関連型拒絶反応の制御に重要な概念である。私どもは、血液型A/B抗原発現内皮細胞株を樹立しIn vitro accommodationモデルを用い、ABO、HLA-不適合移植における相違点を解析している。本研究では、A/B抗体、HLA抗体接着が内皮細胞に及ぼす影響について、特に内皮細胞の活性化や細胞保護に関連するERK/AKTについて検討した。**【方法】** anti-HLA class I・II抗体、anti-A/B抗体接着後の細胞傷害はMTTアッセイで測定した。ERK、AKTなどシグナル伝達分子の活性はウェスタンブロッティングで解析した。**【結果】** 内皮細胞にHLA class I抗体、A・B抗体接着後、細胞を回収しシグナル伝達を解析したところ、低濃度のHLA抗体接着では細胞保護効果があるAKTの活性化が、高濃度では内皮細胞活性化を引き起こすERKの活性化が見られた。一方A/B抗体接着では、濃度に依存してERKの不活性化が見られた。またERKの不活性化と連動して補体制御因子が誘導されており、補体傷害を軽減する細胞保護効果があった。またHLA class IIをIFN γ により誘導させた内皮細胞では、細胞保護シグナル伝達の獲得が困難であった。**【考察】** 慢性期におけるドナーに対するHLA抗体のなかでも、HLA class II抗体は予後不良になるケースが多い。しかしながら、その理由は解明されていない。本研究では、HLA class II抗原が発現している状況では、免疫順応を容易に獲得できない可能性を示した。HLA class I・II抗体、抗A/B抗体接着の相違点を見出し、Accommodation誘導法を開発することがこれからの課題となる。

A-10(P-82)

pH応答性ポリマー修飾リポソームを用いた抗原デリバリーとがん免疫治療への応用

○弓場英司¹⁾、原田敦史¹⁾、坂西裕一²⁾、渡来仁³⁾、河野健司¹⁾

- 1) 大阪府立大学大学院 工学研究科 応用化学分野
2) ダイセル化学工業株式会社
3) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 獣医学専攻

【目的】 我々はこれまで、カルボキシル基を有するポリグリシドール誘導体をリポソームに複合化したpH応答性リポソームを用いて抗原特異的な免疫を誘導できる抗原キャリアを作製してきた。本研究では、このpH応答性リポソームのがん免疫誘導に及ぼすpH応答性ポリマー構造の影響について検討した。

【実験】 線状もしくは多分岐状の主鎖構造を持つpH応答性ポリマーMGlu-LPG、MGlu-HPGを複合化したリポソームに、FITCラベル化オボアルブミン (FITC-OVA) を封入し、マウス樹状細胞由来DC2.4細胞に取り込ませ、細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。リポソーム処理による細胞表面分子発現の変化を調べ、培養上清中の産生サイトカインをELISAにより定量した。また、リポソームをC57BL/6マウスに投与し、脾臓における抗原特異的な免疫誘導を調べた。さらに、担がんマウスにリポソームを投与し抗腫瘍免疫の評価を行った。

【結果】 MGlu-LPG修飾リポソームはMGlu-HPG修飾リポソームよりも効率よく樹状細胞に取り込まれたが、いずれのリポソームでも細胞全体からFITC-OVAの蛍光が観察された。これらのリポソーム処理によって、樹状細胞のMHC class I及びclass II分子の発現が上昇し、サイトカイン産生も促進された。リポソームをマウスに皮下投与したところ、脾臓における強い細胞性免疫誘導が確認された。担癌マウスにMGlu-LPG修飾リポソーム及びMGlu-HPG修飾リポソームを皮下投与したところ、いずれの場合も腫瘍体積が著しく減少し、腫瘍が完全に消失したマウスも見られた。

【考察】 MGlu-LPGもしくはMGlu-HPG修飾ポリマー修飾リポソームは樹状細胞のサイトゾルへ効率良く抗原をデリバリーすることで、抗原提示分子の発現上昇及び、MHC class Iを介した細胞性免疫を強く誘導した。さらにこれらのリポソームの投与によって腫瘍を消滅させるほど強力な抗腫瘍免疫を誘導できることから、これらのpH応答性ポリマー修飾リポソームはがん免疫治療のための抗原デリバリーキャリアとして有望である。

A-11 (P-83)

インシリコ手法によるウシMHCクラスII分子を標的とする抗BLV高親和性ペプチドワクチンの設計

○山岸純也^{1,2)}、沖本憲明²⁾、竹嶋伸之輔^{3,4)}、金智潤³⁾、萩原恭二³⁾、間陽子^{3,4)}、泰地真弘人^{1,2)}

- 1) 東京大学大学院 情報生命科学専攻
- 2) 理化学研究所 計算分子設計研究グループ
- 3) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
- 4) 東京大学大学院 メディカルゲノム専攻

【目的】 地方病性牛白血病は、牛白血病ウイルス (BLV) により惹起される悪性Bリンパ腫で、その病態の進行はウシMHC (BoLA) クラスII *DRB3* 遺伝子の多型による個体差がある。発症に抵抗性、又は感受性を示すアリルは、MHC分子の抗原結合部位で異なるアミノ酸配列をコードする。そのため、抗原分子の各MHC分子に対する結合能の違いが、免疫誘導能の違いの一因になっていると考えられる。

インシリコ手法は生体分子をコンピューター上で自由に構築できるため、感受性アリル *BoLA-DRB3*1601* がコードする感受性MHC分子に対して、強く結合する抗原分子の設計が容易である。本研究ではインシリコ技術を駆使し、既に同定されているBLV Env gp51およびGag p12エピトープを、感受性MHC分子へ強く結合するエピトープへ改変し、Th 1型細胞性免疫を強力に誘導するペプチドワクチンを創出することを目指す。

【方法】 はじめにBLV Env gp51およびGag p12エピトープペプチド-感受性MHC複合体の3次元構造を作成する。ここではHA-HLA DR4複合体の立体構造を基に、ホモロジーモデリング法と分子動力学シミュレーションを用いて立体構造予測を行った。続いて、得られた複合体構造から、アンカー残基を変異した改変ペプチド-MHC複合体の立体構造を生成し、結合エネルギーの予測を行う。

【結果】 インシリコ手法によって、各BLV由来エピトープのアンカー残基に変異を加えたところ、感受性MHCに強く結合する特徴的なアミノ酸残基が得られた。この中から、高い親和性の予測値を示すペプチドを選択し、生化学実験 (免疫応答、結合実験) を行ったところ、より活性の強いペプチドが同定された。

【考察】 計算によるワクチン分子の設計は、コンピューター上で分子を自由に改変できることから非常に効果的である。今回は分子の静的構造情報のみを使用し分子設計を行ったが、今後は分子構造の動的効果を考慮し、さらに高精度な手法を実行する予定である。

A-12 (P-84)

古典的HLAクラスII遺伝子における超高解像度DNAタイピング法 (SS-SBT法) の開発

○尾崎有紀、鈴木進悟、吉川枝里、重成敦子、岡晃、光永滋樹、椎名隆、猪子英俊

東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

【目的】 演者らは昨年の本学会にて次世代シーケンサーを用いた超高解像度DNAタイピング法 (SS-SBT法) の開発について報告した。本研究では、SS-SBT法を用いてHLAクラスII遺伝子 (HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1) のプロモーターから3' UTRまでのHLA-DNAタイピング法を開発することを目的とした。

【方法】 各遺伝子座のプロモーターから3' UTRまでの遺伝子全領域を特異的に増幅させるプライマーはPrimer Expressプログラムにより設計した。PCR条件は、DRB1アリルのホモ接合やヘテロ接合DNAを用いて検討した。PCR増幅はサンガー法によりエクソン2の塩基配列を決定することにより確認した。これらのPCR産物について、次世代シーケンサー (GS JuniorおよびIon PGM) を用いたシーケンシングを行い、アリル判定を行った。

【結果および考察】 HLA-DQA1, -DQB1 および -DPA1 では、それぞれ1種類のプライマーセット (DQA1 : 7.5 kb, DQB1 : 9.1 kb および DPA1 : 9.7 kb)、ならびに比較的遺伝子サイズの大きいHLA-DRB1 および -DPB1 ではそれぞれ2種類のプライマーセット (DRB1 : 6.1 kb~11.2 kbと5.0 kb~6.2 kb, DPB1 : 5.9 kbと7.3 kb) を設計した。これらプライマーセットを用いたPCR増幅ならびにその部分的な塩基配列決定から、目的の遺伝子のPCR産物が得られていることを確認した。次世代シーケンシングによりHLA-DRB1, -DQB1 では8桁レベルのアリル判定が、HLA-DQA1, -DPA1, -DPB1 では6桁レベルのアリル判定がそれぞれ可能であることが示唆された。したがって、これらプライマーセットは今後のSS-SBT法に有用であると考えられた。

会員研究発表(学術賞ならびに学術奨励賞候補口演)

A-13 (P-15)

鱗移植片の急性拒絶反応に関わるメダカ MHC 遺伝子の同定

○坂内英美、野中勝

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻

【目的】 硬骨魚類のMHC遺伝子は、他の有顎脊椎動物とは異なり、別々の染色体上に散在している。したがって、硬骨魚類を用いることで個別のMHC遺伝子について急性拒絶反応への関与を明らかにすることができると考えられる。硬骨魚類のMHC遺伝子はコピー数が多く、ゲノム上に散在していることから、すべてのMHC遺伝子の遺伝子座や発現等の解析が完了している硬骨魚はまだいない。今回、我々はゲノムデータベースおよび近交系が利用でき、すでにMHC class I遺伝子の網羅的解析が完了しているメダカを用い、MHC class II遺伝子を網羅的に同定し、鱗移植における急性拒絶反応の有無とMHC遺伝子型との関係を解析した。

【方法】 近交系メダカHd-rR、HNIのtotal RNA・genome DNAを抽出し、database searchで得た配列情報をもとに設計したプライマーを用いて、PCR・cloning等を行い、遺伝子構造・発現等の解析を行った。また、野生メダカのgenome DNAを用いて、多型解析を行った。Backcross (HNI × (HNI × Hd-rR)) をdonor、HNIをrecipientとして鱗移植を行い、各個体の全MHC遺伝子座のallele typeを調べ、急性拒絶反応との関連を解析した。

【結果・考察】 メダカは5つのclass IIA遺伝子と5つのclass IIB 遺伝子を持ち、すべての遺伝子が発現していた。多型解析の結果、DAA, DABのみがclassical class II遺伝子と認定された。

鱗移植とタイピングの結果、急性拒絶反応が起きなかったすべての例で、MHC class I領域とUGA遺伝子の遺伝子型がdonorとrecipientで一致していた。ヒトやマウスの研究結果ではclass I分子だけでなくclass II分子も急性拒絶反応に重要な役割を果たしていると言われている。今回の結果は、メダカの急性拒絶反応を決定づけている遺伝子は、UAA/UBA遺伝子座とUGA遺伝子座にあることを示し、class II遺伝子は、メダカの急性拒絶反応には関与しないことを明らかにした。

口 演 発 表

O-1 (P-56)

非血縁者間骨髄移植におけるHLAハプロタイプ適合性の意義

○森島聡子¹⁾、小川誠司²⁾、佐藤亜以子²⁾、柏瀬貢一³⁾、
笹月健彦⁴⁾、森島泰雄⁵⁾

- 1) 藤田保健衛生大学医学部 血液内科学
- 2) 東京大学医学部附属病院 がんゲノミクスプロジェクト
- 3) 東京都赤十字血液センター検査部
- 4) 九州大学高等研究院
- 5) 愛知県がんセンター研究所 疫学予防部

【目的】HLA一致非血縁者間骨髄移植 (UR-BMT) において、患者とドナーのHLAハプロタイプ (HP) 上の座の連鎖が異なる場合 (HP不適合)、急性GVHDのリスクが有意に高くなることがシアトルから報告されたが (PLoS Med. 2007; 4: e8)、日本人では不明である。本研究では、multi-SNPによるHLA-HPのlong-range-phasing (LRP) を試み、UR-BMTにおけるHP適合性の意義を検証した。

【方法】JMDPを介した移植例でHLA-A, B, C, DRB1, DQB1一致の患者・ドナー1593ペアについて、Affymetrix 500K arrayによるSNPタイピングを施行後、HLA-AからDQB1までの約3.0 Mbを解析。日本人で高頻度な3つのHLA-HP (P1, P2, P3) のホモ接合体から3.0 Mbのコンセンサス配列 (CS) を決定 (Blood. 2010; 115: 4664)。P1, P2, P3と同じHLA座とCSを有する個人の相を推定 (step 1)。Step 1で推定した対立HPの配列を基に、残りの個人の相を推定 (step 2)。HP適合性と急性GVHDとの関係をCox regression modelで解析。

【結果】3186人中2808人 (88.1%) で3.0 Mb領域の相が推定できた。1593ペアの中で、HP適合ペアは1260、不適合が42、不確定が291であった。急性GVHDのリスクは2-4度、3-4度ともに3群間での有意差は認めなかった。

【考察】UR-BMTの本データセットでは、common HLA-HPの頻度が一般集団より著明に高く、Clark法に準じた方法でLRPが可能となった。日本人のHLA適合UR-BMTではHP不適合の頻度や急性GVHDに対する影響は少なく、人種間で差がある可能性がある。ドナーと患者のHLA-HPの相が推定できたことより今後さらに詳細な解析が可能となる。

O-2 (P-57)

HLAモノクローナル抗体を用いた末梢血キメリズムモニタリング

○佐藤 壯¹⁾、佐藤 蘭子¹⁾、小林良二²⁾、小林直樹³⁾

- 1) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 小児科
- 3) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 血液内科

【背景】造血細胞移植においてキメリズム検査はきわめて重要である。我々はHLAミスマッチ移植におけるHLAモノクローナル抗体を用いた末梢血キメリズムモニタリングを2010年から開始し、8例経験したので報告する。

【症例】患者の年齢は10~60代、原病はALL 5例 (内Ph+ALL 2例)、MDS/AML、AML、CML各1例。移植ソースはCB 6例、PBSC 2例。患者A26とドナーA11のミスマッチ、患者A31とドナーA2のミスマッチ、患者A30とドナーA24のミスマッチ、患者A24とドナーA2のミスマッチの4例は移植2年後も完全キメラでCRを維持している。また、患者A2とドナーA31のミスマッチで他院にて移植され再発疑いで当院にて検査した症例は完全キメラでその後もCRを維持している。患者A24とドナーB51のミスマッチ症例はday19でWBC760がday21で580と減少したため検査したところ単球以外は患者由来で、day27ではどのリネージもほぼ患者由来となり生着不全が確認された。患者HLA-A24-ドナーHLA-A2,24の症例では生着後も患者由来と考えられるHLA-A24単独陽性細胞が、特にT細胞分画に残存していたが徐々に減少しCRを維持していた。しかしその後HLA-A2,24が出現し、移植5か月後に再発した。1例は患者男性HLA-A1,33、ドナー女性HLA-A24,33で生着後ほぼ完全キメラであったが、day60を過ぎて骨髄のFISHでXXが1%弱出現し末梢血でもHLA-A1陽性細胞が同様に出現した。免疫抑制剤を中止して経過を観察していたところXX陽性細胞やHLA-A1陽性細胞は次第に減少し、CRを維持したまま移植後3ヶ月で退院となった。

【考察】HLA抗体を用いた末梢血キメリズム検査は分画毎に結果を出すことができ、取り込む細胞数を増やすことによりその精度を高めることも可能で、染色体や遺伝子など他のキメリズム検査結果と同様の結果が得られている。末梢血で検査するため簡便かつ迅速に結果を出すことができ、症例は限定されるもののきわめて有用であると考えられる。今後モニタリングを継続すると共にさらに症例を重ねて検討していきたい。

O-3 (P-58)

移植前脱感作療法は長期のde novo HLA抗体産生を抑制するか？

○黒木聖久¹⁾、坂本慎太郎¹⁾、井藤聡美¹⁾、渡井至彦¹⁾、
片山昭男²⁾、打田和治¹⁾、小林孝彰³⁾

- 1) 名古屋第二赤十字病院
- 2) 増子記念病院
- 3) 名古屋大学 移植免疫学

【目的】移植後の長期生着を妨げる慢性拒絶反応は、グラフトに対するHLA抗体によって引き起こされる。HLA抗体を産生させないことが長期予後の改善につながる。B細胞をターゲットとするリツキシマブ (RIT) や脾臓摘出 (SPX) が、移植後HLA抗体産生を抑制するか検討した。

【方法】2005年から2009年まで名古屋第二赤十字病院で実施した移植前DSA陰性の生体腎移植320例を対象とした。228例はABO血液型一致・適合 (A群)、92例がABO血液型不適合症例であり、そのうちRIT使用30例 (B群)、SPX実施51例 (C群)、残り11例は抗A/B抗体価が低いためRIT、SPX施行しなかった。これらの症例の予後とHLA抗体陽性率を比較した。

【結果】A群は、3年生着率は100%であり、de novo HLA抗体は13.9%に認められた。B群は、それぞれ96.7%、14.3%であった。C群は、90.2%、13.2%であった。ABO不適合移植は、ABO一致・適合移植に比べて、やや生着率は低くなるが、良好な成績であった。RITを投与、SPXを実施してもde novo HLA抗体産生率の低下は認めなかった。

【考察】移植前RIT投与、SPXは、de novo HLA抗体産生に影響を与えなかった。HLA感作歴のある症例は移植がsecond setの反応となる場合があり、移植直後のT、Bリンパ球の免疫反応を抑制するため、RIT、SPXは有効な方法である。しかし、移植前のRIT投与・SPXは、長期のHLA抗体産生には影響を与えないため、HLA感作歴のない患者にとっては慎重にすべきである。

O-4 (P-59)

腎移植後のBKウイルス血症は術前の末梢Tリンパ球割合によりリスク予測ができるか？

○酒巻建夫¹⁾、石川政志¹⁾、高橋千尋¹⁾、岡村康子¹⁾、坪尚武²⁾、
丸山通広²⁾、剣持敬²⁾、北村博司³⁾

- 1) 国立病院機構千葉東病院 臨床検査科HLA検査室
- 2) 国立病院機構千葉東病院 外科
- 3) 国立病院機構千葉東病院 臨床研究センター腎病理研究部

【目的】ポリオーマウイルス属のBKウイルス (BKV) は10歳頃までに殆どの人に感染し、その後も尿細管に潜伏している。腎移植後強い免疫抑制剤を投与するとウイルスが活性化され移植腎がBKV腎症として傷害される例があることが知られている。拒絶反応が疑われる場合には免疫抑制剤を増量するがBKV腎症の場合にはむしろ減量する必要がある。より重篤なBK腎症の例では末梢血中にウイルスが出現するが、これが腎移植前のリンパ球クロスマッチ検査時の検査データと関連すると思われるので報告する。

【症例及び方法】BKV感染細胞の存在が疑われる場合には尿および血液中のウイルスを検査 (外注) している。ウイルスデータはほぼ1年間の53症例の351検査結果をまとめた。尿中陽性は1万コピー/ml以上を血中は千コピー以上を陽性とした。拒絶反応やBKV腎症が疑われる場合には腎生検を実施している。FCM法による術前のリンパ球クロスマッチはドナー予定者と患者本人の末梢単核球分離後にCD3及びCD19抗体で染め、リンパ球分画中でのT、Bリンパ球割合を測定した。

【結果と考察】経過観察中にはウイルス量が減少したために尿中、血中とも最大検出時を解析対象とした。尿中BKV陰性は26症例、陽性は27症例であった。血中BKV陰性は47症例、陽性は6症例であった。HLAのミスマッチ数と尿中BKV排泄はクラスI及びIIで適合性がよいほうがやや排泄が少ない傾向があるが有意差は認められなかった。血中陰性者47名中赤血球ABO型不適合移植が11名、血中ウイルス陽性者6名では5名がABO型不適合移植であった。不適合移植例のFCM検査でTリンパ球が60%以下のものが血中にもウイルスが検出されやすいことが明らかとなった。移植腎の病理組織学的な診断では5名がBKV腎症と診断された。その内4名が血中にもBKVが検出された。

O-5 (P-60)

小児生体肝移植臨床例における免疫寛容

○脇 嘉代¹⁾、菅原寧彦²⁾、オザワミッキー³⁾、水田耕一⁴⁾、平田勝⁵⁾、金子順一²⁾、門脇孝⁶⁾、青木琢²⁾、長谷川潔²⁾、テラサキポール³⁾、國土典宏²⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 健康空間情報学講座
- 2) 東京大学医学部附属病院肝胆膵・人工臓器移植外科
- 3) テラサキファウンデーションラボラトリー
- 4) 自治医科大学 移植外科
- 5) JR総合病院
- 6) 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科

【目的】小児生体肝移植後の移植免疫寛容において抗HLA抗体が果たす役割については明らかにされていない。

【方法】小児の生体肝移植後の患者を対象に抗HLA抗体と移植免疫寛容の関連性を後ろ向きに検討した。1996年4月から2000年12月までに51例の小児生体肝移植が行われ追跡されている（平均追跡期間 4831.5 ± 479.5 日）。この間に1例（2.0%）のgraft failureが認められ、18例（35.3%）は免疫寛容の状態にあった。血清が保存されていた39名の患者に対して抗HLA抗体が測定された（31例は移植前と移植後の血清、3例は移植前の血清のみ、5例は移植後の血清のみ）。移植後の血清は移植後2-3週間後に採血され保存された。LAB-Screen® single antigen beadsを用いて抗HLA抗体を測定した。

【結果・考察】39名のうち17名（COT）が免疫寛容の状態にあり、22名（Non_COT）は免疫寛容の状態に無かった。COTとNon_COTの2群間でレシピエントの年齢、基礎疾患、急性拒絶反応の既往歴、HLAミスマッチの数、追跡期間に有意差は認められなかった。移植前の血清では、16名のCOTレシピエントのうち7名（43.8%）、また18名のNon_COTレシピエントのうち11名（61.1%）が抗HLAクラスI抗体を有しており2群間で有意差は認められなかった（ $p=0.49$ ）。また、16名のCOTレシピエントのうち2名（12.5%）、また18名のNon_COTレシピエントのうち9名（50.0%）が抗HLAクラスII抗体を有しており2群間で有意差が認められた（ $p=0.03$ ）。更に移植後の血清では、抗HLAクラスI抗体（26.7% vs. 76.2%, $p=0.006$ ）およびクラスII抗体（13.3% vs. 47.6%, $p=0.04$ ）の保有率はいずれもCOT群で有意に低かった。

【結果・考察】移植免疫寛容にある患者ではそうでない患者に比較して移植前の抗HLAクラスII抗体および移植後の抗HLAクラスI、II抗体の保有率が有意に低かった。本研究の結果から小児生体肝移植後における移植免疫寛容と抗HLA抗体の関連性が示唆された。早期の抗HLA抗体の存在は移植免疫寛容の導入の可能性の予測に役立つ可能性があると考えられた。更に症例数を増やして検討する予定である。

O-6 (P-70)

臓器移植におけるクロスマッチ検査の外部精度管理方法の検討

○橋口裕樹¹⁾、小林孝彰²⁾、橋本光男³⁾、久山芳文⁴⁾、黒木聖久⁵⁾、安尾美年子⁶⁾、笹木剛志⁷⁾

- 1) 福岡赤十字病院
- 2) 名古屋大学 移植免疫学
- 3) 兵庫県立西宮病院
- 4) 大阪府立急性期・総合医療センター
- 5) 名古屋第二赤十字病院
- 6) 東京女子医科大学病院
- 7) 市立札幌病院

【目的】臓器移植においてクロスマッチは、不可欠な検査であるが、日本では施設により検査方法が異なり、外部精度管理自体も確立したものがなく、検査の基準となる明確なマニュアルも存在しない。検査施設により結果が違えば、患者にとって不利益となることも予想される。精度管理に必要なQuality Control (QC) サーベイが技術的に可能であるか検討を行った。

【方法】全血（ACD採血管）、室温で福岡より宅配便で全国の5施設に送付した。一番遠方の施設に到着する日（採血2日後）に、全施設がCDCXM, FCXMを各施設の日常方法で行った。

【結果】検体は予定通り到着し、当日中に細胞分離、クロスマッチ検査を実施した。採血後、48時間を経過しての細胞分離であったが、細胞分離法を考慮すれば、検査可能であった。

【考察】今回の全血を用いたQCサーベイは、血液の状態にも左右されるが、48時間以内に搬送可能な地域（ほぼ全国レベル）で可能であると考えられた。海外では、すでに確立されているクロスマッチの外部精度管理システムの導入が日本でも望まれる。

O-7(P-71)

HLA抗体検査(Luminex法)で自然抗体を判断できるか？

○林 晃司¹⁾、小島裕人¹⁾、二神貴臣¹⁾、辻野貴史¹⁾、
楠木靖史¹⁾、藤井直樹¹⁾、末上伸二¹⁾、池田奈未¹⁾、
西川美年子¹⁾、小川公明²⁾、赤座達也¹⁾、佐治博夫¹⁾

1) HLA研究所

2) NPO 白血病研究基金を育てる会

[目的] Luminex法を用いての抗体検査において、検出される陽性反応が、いわゆる「自然抗体」であるかどうかの見極めは重要である。輸血歴・移植歴のない男性を対象にした自然抗体についてNadimらによる報告が過去にあるが、今回我々は患者検体での解析を抗体陽性検出例から試みた。

[材料・方法] 2011年に当研究所においてLABScreen Single Antigenを用いて行った検査結果において、MFI (Median Fluorescence Intensity) $\geq 1,000$ を示した症例 (HLA-class I : 252例, HLA-class II : 147例, いずれも患者の血漿又は血清)。

[結果・考察] 交差反応の影響が少なく陽性Beads数が5以下の群 (class I : 85/252 (34%), class II : 54/147 (37%)) においてA*11:02, C*17:01, B*45:01, DRB1*04:03等が多くみられ、これらはMFI $\leq 3,000$ で高頻度に検出された。この結果は、Nadimらの報告にあった特異性と一致しており、自然抗体である可能性が高い。検出される陽性Beads数とMFIの傾向を合わせて判断することにより自然抗体の推察は可能であると思われる。また、交差反応を考慮に入れることも重要である。今回の例では、陽性Beads数が5以下のものが1/3程度を占めており、そのほとんどが自然抗体と考えられ、HLA陽性と判定されているかもしれない。

O-8(P-72)

マイクロビーズを用いた第三世代クロスマッチ検査 (ICFA)と臨床経過についての検討

○岸川英史、木下朋子、秋山幸太朗、吉田康幸、上田倫央、
平井利明、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

(目的) 当科では腎移植前のクロスマッチ検査としてLCT法、FCXM法に加え、2010年よりICFA法を開始した。今回ICFA法と腎移植後臨床経過との関係を検討した。(方法) 2010年2月以降に当科で腎移植術を施行した27例 (生体腎22例、献腎5例) を対象に、術前のクロスマッチ検査結果と臨床経過、および術後4週で行ったプロトコール生検 (もしくはエピソード生検) 結果を比較検討した。(結果) 術前のクロスマッチ検査では①FCXM, ICFAともに陰性が23例、②FCXM陽性 (T,Bともに陽性1例、Bのみ陽性1例) でICFA陰性が2例、③FCXM, ICFAともに陽性が2例であった。FCXM, ICFAともに陽性の2例ではDSA強陽性であり、脱感作治療のち移植を行った。腎生検組織検査では①のうち2例にACMR (IIA : 1例、IIB : 1例) を認めたが、AAMRの症例は認めず、ABO不適合移植以外の症例ではC4d染色も陰性であった。②の2例ではAAMRやACMRの所見を認めなかった。③の2例では脱感作療法のためか、AAMRやACMRの所見を認めず、C4d染色も陰性であった。(考察) ICFA法ではDSAのみを検出できるため、術後の拒絶反応のリスクをより正確に予測できる可能性があると思われる。

O-9(P-73)

マイクロビーズを用いた第三世代クロス マッチ検査 (ICFA) の評価

○佐藤 壯¹⁾、佐藤蘭子¹⁾、玉置透²⁾

1) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 臨床検査科

2) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 腎臓移植外科

【背景】臓器移植におけるクロスマッチ (XM) 検査は移植前にドナー臓器を傷害する抗体 (既存抗体) を患者が保有しているか検出するもので、その多くはHLA抗体である。現在CDC-XMに加えてFC-XMも普及しているが、ドナーリンパ球と患者血清を反応させるのは同様で、FC-XMのほうが感度は高くなったものの、その分非特異反応も出やすいという問題を抱えている。そこで、非特異反応を少なくしHLA抗体の同定に特化した方法がICFA (Immunocomplex Capture fluorescence Analysis) 法である。今回仮想クロスマッチ検査をICFA法で行い、HLA抗体検査の結果と比較検討したので報告する。

【対象と方法】HLA既知の健常者 (仮想ドナー) 15例とHLA抗体陽性患者 (仮想患者) 11例から様々な組み合わせで40通りの仮想クロスマッチ検査をICFA法で行った。仮想ドナーについてはHLA-A, B, C, DRB1, DQB1についてアレルレベルでHLAタイピングを行った。また、仮想患者についてはLABScreen Single Antigenで抗体特異性を同定した。HLA抗体はMFI5,000以上を陽性、ICFA法は陰性対照との比較で算出されるIndex2.0以上を陽性と判定した。

【結果】Class IではDSA-ICFA+ (偽陽性) は0、DSA+ICFA- (偽陰性) が1例で39例は結果が一致した。Class IIではDSA-ICFA+は0、DSA+ICFA-が3例で37例は結果が一致した。Class IIでDSA+ICFA- 3例中2例がDQ抗体陽性であった。このうち同じ仮想ドナー、仮想患者の組み合わせがClass I、Class IIとも偽陰性となった。

【考察】ICFA法は非特異反応の少なさはもちろんのこと感度、特異性とも優れたクロスマッチ検査法といえる。ただ、偽陰性が計4例あったことから、臓器移植においてはHLA抗原のうちどのアレルを重視すればよいか、LABScreenによる陽性のカットオフラインはどの値が適正か、さらにはIndex>2.0というICFA法のカットオフラインが適切なのか更なる検討が必要である。

O-10(P-9)

HLA遺伝子領域の連鎖不平衡に関する広 域マップの作成

○世良実穂、今西規

産業技術総合研究所バイオメディカル情報研究センター

【目的】HLA遺伝子領域は強い連鎖不平衡を示すことが以前から知られているが、その成因はまだ完全に解明されていない。本研究では、人類集団の大量の多型データに基づいてHLA遺伝子領域の連鎖不平衡の広域マップを作成し、連鎖不平衡の成因を解明することをめざしている。

【方法】HapMapプロジェクトの日本人・ヨーロッパ人・アフリカ人集団のSNPに対し、HaploViewを用いて距離が2 Mb以内となる全てのSNPペアの間で連鎖不平衡D'の値および非常に強い連鎖不平衡を示すゲノム領域 (LDブロック) を算出した。このデータを用いて独自に開発したソフトウェアにより、HLA領域全体の連鎖不平衡の広域マップを作成した。

【結果・考察】HLA遺伝子領域上に日本人とヨーロッパ人およびアフリカ人で共通な4,822個のSNPを抽出し、その連鎖不平衡マップを作成した。ほぼ完全な連鎖不平衡を示すLDブロックのサイズは平均22kbであり、他のゲノム領域と比べて有意な差はなかった。しかし、HLA遺伝子領域では、テロメア側のLRRC16遺伝子からセントロメア側のMLN遺伝子までの約8.5Mbにわたり、LDブロックを超えた広い範囲のSNP間に強い連鎖不平衡がみられた。このような特徴はこの8.5Mbの領域外には全く見られなかった。また、明らかな組換えホットスポットも多数同定された。

LDブロックを超えた広い範囲での連鎖不平衡の成因を調べるため、特に1 Mb以上離れたSNP間での強い連鎖不平衡を長距離連鎖不平衡 (long-range LD) として着目した。long-range LDはHLA領域内に散在しており、ゲノムのその他の領域と比べて約5倍と高い出現頻度を示した。long-range LDのいくつかは既知遺伝子内や転写因子結合部位に当たり、その成因の1つとして遺伝子と離れた位置にあるエンハンサーという可能性が示唆された。

O-11 (P-10)

日本人集団において *DPB1*04:01* に作用した正の自然選択○川嶋実苗¹⁾、大橋順²⁾、西田奈央^{1,3)}、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学教室
- 2) 筑波大学医学部 分子遺伝疫学教室
- 3) 国立医療研究センター 肝炎免疫研究センター

【目的】 *HLA* はヒトゲノムの中で最も多型性に富んだ遺伝子群である。このような *HLA* クラス I 領域および II 領域における多型性は、突然変異率が高いのではなく、長年の平衡淘汰によって維持されてきた。しかしながら、特異的な *HLA* アリルに作用する最近の正の自然選択についてはあまり知られていない。そこで、日本人の *HLA* アリルに作用した正の自然選択について検討した。

【方法】 418人の日本人の *HLA* 6 座位 (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPB1*) の遺伝子型を決定。それぞれのアリルについて *HLA* 領域内 SNP のハプロタイプホモ接合度 (*HH*) を評価した。

【結果と考察】 6 座位全てを合わせると 120 アリル存在し、そのうち 80 アリルは 1% 以上の頻度であった。その中でも *DPB1*04:01* は 6.1% のアリル頻度であり、また、他のアリルに比べて特に高いハプロタイプホモ接合性を示した (0.53)。また *DPB1*04:01* アリルは、418 人の日本人において一番頻度の高かった (4.4%) 6 座位 *HLA* ハプロタイプであり (*A*33:03-C*14:03-B*44:03-DRB1*13:02-DQB1*06:04-DPB1*04:01*)、このハプロタイプは弥生時代に朝鮮半島から日本列島に伝来したと考えられる。また、*DQB1*06:04-DPB1*04:01* 間の強い連鎖不平衡は正の自然選択抜きには理論的に説明することができなかった。更に、コンピュータシミュレーションによって *DPB1*04:01* の淘汰係数を 0.0365 (95% 信頼区間: 0.0254-0.0550) と推定した。

【結論】

日本人集団において *DPB1*04:01* は弥生時代以降に強い正の自然選択を受けてきたことが示唆された。

O-12 (P-11)

アカゲザル *ULBP2/RAET1H* 遺伝子の多様性解析○成瀬妙子¹⁾、森一泰²⁾、明里宏文³⁾、俣野哲朗²⁾、木村彰方¹⁾

- 1) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野
- 2) 国立感染研究所 エイズ研究センター
- 3) 京都大学 霊長類研究所

【目的】 *ULBP* (*RAET1*) はレクチン型 NK 細胞レセプター *NKG2D* のリガンドをコードする遺伝子ファミリーである。なかでも *ULBP2* 遺伝子は、ウイルス感染細胞上に多く発現することが知られている。我々は以前より旧世界ザル *ULBP* 遺伝子領域がヒトと異なる遺伝子重複を起こしたことを報告してきた。今回はアカゲザル *ULBP2* 遺伝子の多様性を解析し、ヒトにおける多様性と比較した。

【方法】 ビルマ由来のアカゲザル 7 系統 38 個体から得られたゲノム DNA を、2 種の *ULBP2* 遺伝子 (*ULBP2.1* および *2.2*) の $\alpha 1, \alpha 2$ ドメインをコードするエクソン 2-3 について、増幅し、PCR 産物を直接塩基配列決定法およびクローニング後の塩基配列決定により解析した。

【結果】 ヒト *ULBP2* 遺伝子では $\alpha 2$ ドメインに 1 箇所の同義置換多型が報告されているが、アカゲザルでは *ULBP2.1* に 21 箇所、*ULBP2.2* に 43 箇所の塩基配列多型が検出され、多型のパターンでそれぞれ 6 種および 10 種のアリルに分類された。また、アカゲザルとヒトの *ULBP2* 相同性は 89.4% であった。

【考察】 ヒト *ULBP2* 遺伝子は多型に乏しいが、アカゲザルでは多型に富むことが明らかとなった。この結果は、以前に我々が報告した *ULBP4* 遺伝子多型のあり方と類似しており、現在解析中のカニクイザルにおいても同様であった。3D モデル解析を行ったところ、アカゲザル *ULBP2.1* 多型のうち 3 種が α ヘリックス表面に存在していたことから、これらの多型は *NKG2D* との結合多様性に影響を与えることが推測された。一方、*ULBP2.2* においては多型は α ヘリックス表面に存在せず、両遺伝子の機能的役割は異なることが考えられた。有胎盤哺乳類 *ULBP* は、MHC より分岐後、種独自に進化したと考えられており、アカゲザルの多型獲得は、ヒト *ULBP* 遺伝子の進化的意義を考察する上で興味深い。

O-13 (P-12)

家系分析によるコモンマーモセットMHC領域内マイクロサテライトマーカーのハプロタイプ解析

○高林秀次¹⁾、加藤秀樹^{1,2)}

1) 浜松医科大学医学部附属動物実験施設

2) 実験動物中央研究所

【目的】 小型霊長類であるコモンマーモセットは取り扱いやすく繁殖性に優れていることから近年、実験動物として注目されている。我々は、マーモセットが将来移植、免疫等の研究に用いられるためには、MHCタイプが明らかな系統を確立する必要があると考えている。そこで本研究では、MHC領域内のマイクロサテライト (MS) マーカーを用いてハプロタイプの推定を行ったので報告する。

【方法】 用いたMSマーカーは、マーモセットのMHC領域のシーケンズをPerlプログラムで検索して得られた102個の中の4個である。ハプロタイプ解析のために当施設で育成している25家系を使用した。爪より抽出した核DNAをtemplateとしてPCRを行い、Genetic Analyzerを用いてフラグメント解析を行った。得られた結果に基づいて各マーカーのアリル数を求め、家系分析の結果を基にハプロタイプを推定した。

【結果および考察】 約4 Mb のMHC領域に平均約40Kbごとに102個のCAリピートが存在した。本研究ではその中から約1 Mbの距離を置いて4つのマイクロサテライトマーカー、D4 Ham11、D4 Ham13、D4 Ham21およびD4 Ham27を選んだ。フラグメント解析の結果、それぞれのアリル数は9 (238-260bp)、9 (252-272bp)、2 (265,267bp) および4 (256-264bp) であった。25家系128個体の親子の検査結果に基づいて推定されたハプロタイプ数は27であり、ヘテロ接合度は0.961であった。最も多いハプロタイプは266-267-258-256であり、頻度は0.15であった。このハプロタイプをホモに持つ個体は雌雄5個体存在したが、他のハプロタイプをホモに持つ個体はなかった。以上の結果から、マーモセットのMHCハプロタイプ解析にMHC内のマイクロサテライトマーカーが有用であると考えられた。

O-14 (P-13)

超小型実験動物用ブタのMHCタイプと体重との関連性

○安藤麻子¹⁾、金子直樹²⁾、今枝紀明³⁾、大島志乃¹⁾、河田寿子⁴⁾、高須正規³⁾、猪子英俊¹⁾、北川 均³⁾

1) 東海大学 医学部・分子生命科学

2) 富士マイクラ株式会社

3) 岐阜大学 応用生物科学部・獣医学講座

4) 東海大学 伊勢原研究推進部・教育・研究支援センター

【目的】 超小型ミニブタであるマイクロミニピッグ (MMPs) は、飼育、管理の容易さや低コスト性、並びに解剖生理学的なヒトとの高い類似性を兼ね備えており、種々の疾患の医用モデル動物などに利用されている。本研究では、MMPsを免疫遺伝学的背景の明らかな実験動物として確立するために、MHC (SLA) 固定MMPs系統の作成を目指したSLAタイプの解析、並びに体重とSLAタイプとの関連性を検討した。【方法】 MMPs (58頭) の末梢血RNAのRT-PCR産物の塩基配列解読により、SLA クラスII-DRB1, DQB1 遺伝子タイプを同定した。さらに、両親と産子のSLAタイプからハプロタイプを推定するとともに、各個体の24ヶ月齢の体重を測定し、SLAタイプ間の差異を多重比較検定により解析した。【結果および考察】 SLAタイプングの結果、解析した集団には、8種類のDRB1アリルと6種類のDQB1アリルから構成される8種類のSLAハプロタイプが見出された。これらのハプロタイプの中で、2ハプロタイプ (Hp-0.23: 37.9%、Hp-0.37: 19.8%) が他のハプロタイプに比べ、高頻度に検出された。また、Hp-0.37をヘテロで保有する個体の交配においてHp-0.37をホモで保有する子供が生まれず、受精または発生の過程に問題がある可能性がある。一方、24ヶ月齢の体重については、Hp-0.23を保有するMMPsは低体重の傾向を示し、Hp-0.23のホモ、Hp-0.23のヘテロ、Hp-0.23以外のハプロタイプの3群間の比較ではHp-0.23のホモの群が最も低体重であり、Hp-0.23のホモの群とHp-0.23以外のハプロタイプの群間で有意差 (P<0.01) が認められた。この結果は、この集団では、SLAハプロタイプが低体重の指標のひとつとして系統選抜に活用できることを示唆している。

O-15 (P-14)

ペンギン類MHCクラスI領域の多型マーカーの確立

○吉川枝里¹⁾、細道一善²⁾、津田とみ^{1,3)}、炭山大輔⁴⁾、
 福田道雄⁵⁾、栗田正徳⁶⁾、津田道雄¹⁾、村田浩一⁷⁾、
 猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学
- 2) 国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門
- 3) 徳島文理大学人間生活学部
- 4) 国際鳥類保全学研究所
- 5) 東京葛西水族館
- 6) 名古屋港水族館
- 7) 日本大学生物資源科学部

【目的】ペンギン類は、現在6属17種(16~20種)に分類されており、寒冷地から温帯までの南半球に広く分布している。その分類や系統関係および種分化については、未だ不明な部分が多い。鳥インフルエンザなどのウイルス性疾患やペンギン類でも感染例のある原虫性疾患の鳥マラリアとMhcクラスI遺伝子との関連が、各種鳥類でいくつか報告されているが、ペンギン類のクラスI遺伝子に関する同様の研究例はない。そこで、本課題に基本情報の蓄積を目的とし、未解明であったペンギン類のクラスI領域の解析を行った。さらに、解析した領域を評価する目的で、特定家系におけるクラスIおよびII領域のタイピングを行った。

【方法】これまでに報告されている鳥類のクラスI領域の塩基配列を基にプライマーを設計し、フンボルトペンギン(*Spheniscus humboldti*)の塩基配列を決定した。その配列を基に特定領域450bpの増幅が可能なプライマーを設計し、フンボルトペンギン属の3家系と8種のペンギン類のクラスIおよびII領域の塩基配列を決定した。

【結果および考察】フンボルトペンギンのクラスI領域1,328bpの塩基配列を決定した。本配列は、アオミズナギドリ(*Halobaena caerulea*)のクラスI遺伝子と94%一致した。またニワトリのクラスI α 鎖をコードするBF2遺伝子と75%一致した。分子系統解析の結果、クラスIIと同様にフンボルトペンギン属4種は遺伝的に近縁であることが示された。家系タイピングの結果、3家系で飼育下観察記録と矛盾のない結果となり、我々が作成した多型マーカーが単一遺伝子を増幅し、またクラスIおよびII遺伝子が連鎖していることが示唆された。

【謝辞】本研究は、日本動物園水族館協会(JAZA)加盟園館の協力により行われた

O-16 (P-74)

当院におけるICFA法を用いた移植検査

○平岡朝子¹⁾、栗田絵美¹⁾、小松真由美¹⁾、河野真由¹⁾、
 石井睦美¹⁾、山岡愛子¹⁾、廣瀬祥子¹⁾、藤井輝久²⁾、
 齋藤誠司²⁾

- 1) 広島大学病院 診療支援部
- 2) 広島大学病院 輸血部

【はじめに】

当院輸血部ではFCM法によるドナーリンパ球交差試験に加え、2010年11月からImmune complex capture fluorescence analysis (ICFA)を導入した。腎、肝移植の移植前後の結果を解析したので報告する。

【結果】

1) 腎移植

当院では2010年から2011年の2年間に22例の腎移植を行った。ICFAで移植前の抗体検査を行ったのは12例であった。すべて生体腎移植で、8例がABO血液型不適合であり血漿交換を行った。拒絶症例はなく、生着日数は114~541日であった。

12症例のうち移植前の抗体検査でクラスI(CI)抗体陽性が2例、クラスII(CII)抗体陽性が2例、CICII抗体ともに陽性の症例はなかった。CI抗体陽性の1例はFCM法での交差試験も陽性であったが、減感作療法によりICFA法よりも早期に陰性化した。

移植後の抗体検査で、CI抗体陽性の2例は、経過中に拒絶を疑う所見もあったが抗体は陰性であった。CII抗体陽性の2症例は陰性化しなかった。

2) 肝移植

肝移植は33例行われ、移植前にICFAを実施した26例を解析した。脳死ドナー1例、ABO血液型不適合は3例であった。全員生着しており、生着日数は31~521日であった。

26症例のうち移植前の抗体検査でCI抗体陽性が1例、CII抗体陽性が1例、CICII抗体ともに陽性の症例はなかった。

移植後、CI抗体陽性の症例は陰性化し、CII抗体陽性の症例は弱くはなったが持続している。

【考察】

移植前の減感作療法によりICFAよりも早期にFCM法が陰性になることから、ICFA法のほうが検出感度は高いと思われる。陽性件数が少ないが、移植前検査でICFAが陽性となった症例は経過観察の必要がある。今後も症例を増やし検討を行いたい。

O-17(P-75)

LABScreen Single Antigenの
Supplementビーズ併用による性能検証○中村淳子、中島文明、橋本志歩、鎌田裕美、清水まり恵、
岡崎仁、佐竹正博、田所憲治

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

【目的】LABScreen Single Antigen試薬（以下、LS-SA）は、HLA抗体特異性を適確に検出する性能を有する。しかし、同種HLA抗体はポリクローナルであり、エピトープに基づく解析ではデータ不足が否めない。Supplementビーズは、それを補う追加形態の抗原ビーズで、その性能を検証した。

【方法】Supplementビーズは、クラスIが14種、クラスIIが4種で構成される。LS-SA測定済みのHLA抗血清を材料とし、Supplementビーズの反応から、エピトープ解析の性能向上及び、抗原型レベルでの特異性の差異を検証した。

【結果】①HLA-A 2陰性の抗血清は、追加のA*02:10ビーズとの反応が認められた。②HLA-B13, B37, B44の特異性を有し、B*38:01ビーズ陰性の抗血清は、追加のB*38:02ビーズとの反応が認められた。③HLA-Cw 3特異性を有し、C*14:02ビーズ陰性の2例は、追加のC*14:03ビーズとの反応が認められた。

【考察】①は、A*02:10が保有するHLA-A 9特異的なアミノ酸配列99Phenylalanineの反応と推測され、A2とA210ヘテロ検体は陽性となることが予測される。②は、B*38:02が保有する80Threonineの反応と推測され、B*38:01はこの配列を持たない。JM DPドナーの遺伝子頻度はB*38:01=0.01%、B*38:02=0.26%で後者の抗体特異性検出は意義がある。③は、C*14:03が保有するHLA-Cw 3特異的なアミノ酸配列21Histidineの反応と推測され、C*14:02はこの配列を持たない。遺伝子頻度はどちらも6%程度である。いずれの場合も、アリルレベルでエピトープ解析を可能とし、抗原グループで表記される抗体特異性に生じる差異を検出することから、Supplementビーズの有用性は高いと思われる。

O-18(P-76)

HLA抗体における補体結合性・非結合性
についての検討○安尾美年子¹⁾、石塚敏¹⁾、石田悠梨¹⁾、中島一朗²⁾、
測之上昌平²⁾

1) 東京女子医科大学 中央検査部移植関連検査室

2) 東京女子医科大学 腎臓病総合医療センター腎臓外科

（目的）近年、臓器移植におけるドナー特異的HLA抗体の検出法はドナーリンパ球を使用しないものも含めて、その種類が増えてきている。通常のリンパ球クロスマッチとしては従来法であるLCT（CDC）法とFCXM法が一般的であるが、この2法については検査結果が乖離することもあり判定が困難となる。LCTのみ陽性の場合にはIgM抗体の可能性もあるが、FCXMのみ陽性では感度の違いと考える場合が多く、Luminex法などでドナー特異性を確認する。

われわれは昨年より、FCXMやLuminexで高い蛍光強度を示すにも関わらず、LCTが陰性であるHLA抗体について、補体結合性HLA抗体検出試薬を用いて、補体結合性の有無を検討してきた。今回はさらに抗体陽性例を追加して検討したので報告する。

（材料および方法）腎移植前または後のリンパ球クロスマッチがLCT法で陰性、FCXM法で陽性を示した患者血清を対象とした。これらの血清よりLuminex法（LABScreen）でHLA特異抗体を検出し、同じくLuminex法の補体結合性HLA抗体検出試薬（C1qScreen）を用いて補体結合性の有無を判定した。（結果および考察）昨年結果ではLABScreenで数多く検出されたHLA特異抗体の約5割は補体結合性の無い抗体であった。今回の追加試験でも同様の傾向ではあるが、個人差もあるためさらに検討中である。このようなHLA抗体はLCT法では陰性であり、FCXMでは陽性を示した。この補体結合性の有無がリンパ球クロスマッチの結果の乖離を引き起こす要因の1つと考えられた。

O-19 (P-77)

唾液DNA分離の検討

○辻野貴史¹⁾、小島裕人¹⁾、二神貴臣¹⁾、林晃司¹⁾、楠木靖史¹⁾、
藤井直樹¹⁾、末上伸二¹⁾、池田奈未¹⁾、西川美年子¹⁾、
小川公明²⁾、赤座達也¹⁾、佐治博夫¹⁾

1) HLA研究所

2) NPO 白血病研究基金を育てる会

【目的】造血幹細胞移植のドナー検索用組織適合性検査の検体採取法として、唾液を用いることで採取も精製も簡便に行える。イギリスのANTHONY NOLAN（骨髄バンク）では、既にドナーの募集に唾液を利用している。当方においても唾液から抽出したDNAを用いてHLAタイピング検査が可能であるか、また唾液の保存期間や方法などの条件について検討を行った。

【方法】1.唾液は自然流下法により採取した。2.唾液はQuick Gene（KURABO）によってDNA抽出した。3.保存期間の検討は、唾液にEDTAを0.005M添加したもの、フィルターに滴下したものを室温（23℃）で、また唾液を冷蔵（4℃）で各々day 2, day 4, day 8の期間で検討した。4.抽出されたDNAがHLA検査に適用できるか、Luminex法（WAKFlow）を用いHLA-A,B,DR座について検討した。

【結果・考察】採取直後の唾液から約3000ngのDNAが回収でき、HLAタイピング検査結果は問題なかった。また、保存期間については唾液を室温保存するとday 4の時点で検査不能となったが、EDTA添加や冷蔵保存、フィルターへ滴下した唾液はday 8でも概ね検査結果を得ることができた。ただし、EDTA 0.005M添加ではHLAタイピング検査の反応値が経時的に少しずつ弱くなる傾向にあり、またフィルター滴下ではDNA量が不十分のときがあるため、これらの改善が今後必要である。

O-20 (P-27)

HLA-A24拘束性HTLV-1特異的CTLはHAM発症リスクを下げるか？

○久保田龍二¹⁾、竹之内徳博²⁾、松崎敏男³⁾、高嶋博³⁾、
出雲周二¹⁾

1) 鹿児島大学医学部 難治ウイルス病態制御研究センター

2) 関西医科大学 微生物学講座

3) 鹿児島大学医学部 神経内科

【目的】HLA-A2は、HTLV-1キャリア（AC）と比べHAM患者に少なく、ウイルス量が少ないことより、HAM発症抑制因子と考えられている。近年、HLA-A24拘束性HTLV-1特異的CTLが同定された。今回、HLA-A24拘束性HTLV-1特異的CTLも、ウイルス量を減らしてHAM発症リスクを下げるのかにつき検討した。

【方法】HAMおよびACのHLA-A24アレル頻度をPCRで測定した。HLA-A2およびHLA-A24陽性のHAM患者のPBMCを用い、HLA-A2拘束性Tax11-19特異的CTL、HLA-A24拘束性Tax301-309特異的CTLの頻度を、テトラマーを用いて測定した。各抗原ペプチドを添加してPBMCを培養し、抗原特異的CTLのIFN- γ 、MIP-1 β 産生能を測定した。細胞傷害能については、CD107a膜表面発現により測定した。各抗原の希釈系列を用いCTLの機能的avidityを測定した。ウイルス量は定量的PCRで測定した。

【結果】HLA-A24の頻度はHAMで72%、ACで59%であり、HAMで優位に多かった。ウイルス量とHLA-A24拘束性CTLの頻度は、HAM、AC、および全体で負の相関が認められた。HLA-A2およびHLA-A24拘束性HTLV-1特異的CTLのIFN- γ 、MIP-1 β 産生細胞の頻度は差がなかった。また、CD107a陽性細胞の頻度も2群間で差はなかった。機能的avidity測定では、HLA-A24拘束性CTLはHLA-A2拘束性CTLより、約50倍低い濃度で抗原を認識した。

【考察】HLA-A24拘束性CTLは、HLA-A2拘束性CTLより優位に感染細胞を認識し、ウイルスを減らす。その一方で、HLA-A24はHAM発症に促進的に働くことより、HLA-A24拘束性CTLは、HAM発症に促進的に働く可能性がある。

O-21 (P-28)

牛白血病ウイルス(BLV)プロウイルスロードとBoLAクラスII遺伝子多型相関性の解析

○宮坂 卓²⁾、竹嶋伸之輔¹⁾、松本有生¹⁾、神馬繭子¹⁾、

小林直彦³⁾、松橋珠子³⁾、泉對博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) 日本大学生物資源科学部 獣医学研究科

3) 岐阜県畜産研究所

【目的】牛白血病ウイルス (BLV) はウシにB細胞性リンパ腫/白血病を引き起こすレトロウイルスである。現在、BLV感染は拡大傾向にあるが、有効な予防・治療法は確立されていない。これまでにウシMHC (BoLA) クラスII遺伝子の多型がBLV感染後の病態進行に深く関与していることが知られている。そこで本研究ではBLVプロウイルスロードとBoLAクラスII遺伝子の多型との関連性を解析した。

【方法】日本国内の黒毛和種の集団からゲル内沈降反応および定量的Real Time PCR法を用い、BLV感染無徴候牛186頭を選出した。PCR-sequence based typing法によりBoLA-DRB3およびDQA1アレルを決定し、BoLAアレルとBLVプロウイルスロードとの相関解析を行った。

【結果】16種類のDRB3アレルおよび48種類の遺伝子型、nullアレルを含む10種類のDQA1アレルおよび28種類の遺伝子型が同定された。DRB3遺伝子とBLVプロウイルスロードとの相関性を解析したところ、*0902および*1101アレルはBLVに対し抵抗性に働き、プロウイルスロードを低く抑える効果があった。一方、*1601アレルはBLVに対し易病性に働き、プロウイルスロードを上昇させていた。DQA1遺伝子については*0204アレルは抵抗性に働くのに対し、*10012アレルは易病性に働いていた。次に、DRB3およびDQA1アレルを含むBoLAハプロタイプについて、プロウイルスロードとの相関性を解析したところ、0902あるいは0902C (DRB3 *0902-DQA1 *0204) および1101A (DRB3 *1101-DQA1 *10011) はプロウイルスロード減少に関与し、1601B (DRB3 *1601-DQA1 *10012) はプロウイルスロードの上昇に関与していた。また、抵抗性アレルおよびハプロタイプはヘテロで効果がみられたが、易病性はホモでのみ効果がみられた。

【考察】本研究により感染牛におけるBLVプロウイルスロードの推移を特定のBoLAクラスIIアレルだけでなく、特定のハプロタイプが制御していることを初めて明らかにした。今後、本研究で同定された抵抗性および感受性ハプロタイプを用いて、免疫応答の差異を詳細に解析することにより、MHCによるレトロウイルスの発症制御機構の解明に大きく近づくものと期待される。

O-22 (P-29)

ウシレトロウイルスによる白血病発症を規定する感受性MHCアレルに対するGagおよびEnv由来ペプチドのエピトープマッピング

○竹嶋伸之輔^{1,2)}、的場和弘³⁾、萩原恭二¹⁾、金智潤¹⁾、

山岸純也⁴⁾、William C. Davis⁵⁾、大森崇司⁶⁾、布谷鉄夫⁶⁾、

沖本憲明^{4,7)}、間陽子^{1,2)}

1) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

2) 東京大学新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻

3) 畜産草地研究所 草地管理研究領域

4) 東京大学新領域創成科学研究科 情報生命科学専攻

5) Veterinary Microbiology & Pathology, Washington State University

6) 日本生物科学研究所

7) 理化学研究所生命システム研究センター 計算分子設計グループ

【目的】牛白血病ウイルス (BLV) が誘発する地方病性牛白血病はウシMHC (BoLA) クラスII DRの多型性によって規定され、特にDRB3*1601をホモで有する個体は白血病を発症しやすい。一方、BLVに対するワクチン開発は、個体間の感受性の違いが大きく、未だ成功していない。本研究では、感受性BoLA DRアレルを有する個体を標的にしたペプチド抗原の同定を試みた。

【方法】CD4 エピトープ探索は、リンパ球からMACSビーズを用いて抗ウシCD4抗体 (ILA11A) 陽性細胞を精製し、増殖を停止させたPBMCまたはCD4陰性細胞を抗原提示細胞として、BLV抗原あるいはBLV EnvおよびGag配列由来ペプチドと共に培養し、[³H]-TdRの取込能により細胞増殖を測定した。

【結果】DRB3*1601ホモのBLV感染性牛を選択し、BLV Env Gp51およびGag 由来p12および p15抗原に対するCD4陽性T細胞の応答性を評価したところ、p12特異的免疫応答が最も高かった。そこで、p12、p15およびp24のオーバーラッピングペプチドを作製し、CD4 エピトープ探索を行ったところ、p12-4が安定してCD4陽性細胞を刺激可能であった。CD4陽性細胞の長期培養株を用いて、Env由来蛋白質のエピトープ探索を行い、gp51p12~p20を得た。これらの中から最もエピトープとなりやすい残基を*in silico*解析により推定し、計7種類のワクチン候補ペプチドを得た。これらのCD4陽性細胞の活性化能を測定し、改変p12-4および改変gp51p18の2種類の感受性BoLA-DRB3*1601を有する個体に最適化したワクチンペプチドの作製に成功した。

【考察】MHCが規定する高発症リスク個体を標的にしたワクチン開発の手法は、同様な特徴を持つ乳房炎や成人T細胞白血病など様々な感染症の治療の道を拓くと期待される。

O-23 (P-30)

HIV/AIDS感受性の個体差とKIR、HLA
遺伝子多型

○成瀬妙子¹⁾、小西真紀子¹⁾、柳田梨紗¹⁾、照沼裕²⁾、
Gaurav Sharma³⁾、Gurvinder Kaur³⁾、
Narinder K. Mehra³⁾、木村彰方¹⁾

1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 分子病態分野

2) 日本バイオセラピー研究所

3) AIIMS India

【目的】 HIV感染やAIDS発症には個体差があり、免疫応答関連遺伝子の多型と関わる。NK細胞には、HLA-Bw 4 をリガンドとするNKレセプター (KIR) が発現している。そこで、HIV/AIDSの病態進行の個体差とKIR 3 D,HLA多型との関連を検討した

【方法】 HIVに感染後10年以上AIDSを発症しなかった長期未発症日本人80例、HIV感染インド人患者248例、日本人対照231例、インド人対照202例を対象とし、*KIR3DL1/SI*型はPCR-SSP法、*KIR3DL1*アリルは直接塩基配列決定法で決定した。

【結果】 AIDS長期未発症日本人患者には、*HLA-B*51* または *-B*58* 陽性かつ *KIR3DL1* ホモ接合体が有意に高頻度であった (OR=2.50, $p=0.015$)。 *KIR3DL1* アリルタイプでは *KIR3DL1*007* が有意に低頻度であった (OR=0.40, $p=0.018$)。一方、インド人患者では、*HLA-B*51*, *-B*57* または *-B*58* 陽性でかつ *KIR3DL1* ホモ接合体の頻度が、要治療群で未治療群より有意に低かった (OR=0.47, $p=0.008$)。また、*KIR3DL1*007* は、インド人対照には存在するが、HIV患者にはなく、有意に低頻度であった (OR=0.05, $p=0.008$)。

【考察】 *HLA-B*51*, *-B*57*, *-B*58* は、いずれもKIRのリガンドであるHLA-Bw 4 (Ile80) を有しているが、これらのHLA-BアリルによるAIDS発症抵抗性はKIR 3 DL 1 の存在下でより強い効果を発揮するものと考えられた。また、*KIR3DL1*007* はHIV感染抵抗性を規定すると考えられた。

O-24 (P-31)

霊長類におけるTIM1遺伝子進化とHIV/
AIDS

○木村彰方¹⁾、大谷仁志¹⁾、成瀬妙子¹⁾、
Gaurav Sharma²⁾、Gurvinder Kaur²⁾、
Narinder K. Mehra²⁾、明里宏文³⁾、石田貴文⁴⁾、
俣野哲朗⁵⁾

1) 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

2) All India Institute of Medical Sciences

3) 京都大学霊長類研究所

4) 東京大学 理学部

5) 国立感染症研究所 エイズ研究センター

【目的】 TIM 1 はT細胞に発現し、Th 2 細胞の誘導を促進する分子である。一方、TIM 1 遺伝子は齧歯類には存在するが、鳥類や魚類には存在しないため、哺乳類に特異的な遺伝子と考えられる。そこで、霊長類におけるTIM 1 進化の特徴を明らかにするとともに、インド人集団を対象としてTIM 1 多型とHIV/AIDSとの関連を検討した。

【方法】 原猿からヒトまでの霊長類24種について、TIM 1 遺伝子配列を決定し、Bn-BsおよびPAMLプログラムを用いて、進化速度と選択圧を検討した。また、旧世界ザルのTIM 1 多型を検討した。一方、インド人HIV感染患者集団 (n=236) を対象として、TIM 1 多型と血中のCD 4 数およびHIV量との関連を検討した。

【結果と考察】 TIM 1 遺伝子は霊長類の進化過程でmucinドメインに正の選択を受けていたが、選択サイトを3Dモデル上にマップしたところ、いずれもがTIM 1 分子表面に存在した。また、旧世界ザル集団におけるmucinドメインの多様性 (Tajima's $D=0.61$) から、種内の多様性形成においても選択圧が示唆された。一方、新世界ザルにおいては、複数の系統で独立してTIM 1 遺伝子が偽遺伝子化していた。また、インド人集団で、D3-Aハプロタイプを有する患者は、CD 4 数が有意に多く、HIV量が有意に少なかった。HIVの起源が旧世界ザルにあることから、TIM 1 の多様性形成にはHIV様ウイルスが関わったと推定された。

O-25 (P-32)

Actinobacillus pleuropneumoniae及び豚丹毒ワクチン接種時の抗体応答とSLA及びTLR遺伝子型との関連

新開浩樹¹⁾、荒川愛作²⁾、松田麻衣子³⁾、奥村華子^{4,5)}、寺田圭⁴⁾、知久幹夫⁴⁾、河原崎達雄^{4,5)}、安藤麻子⁶⁾、○上西博英^{1,2)}

- 1) 農業生物資源研究所 動物生体防御研究ユニット
- 2) 農業生物資源研究所 家畜ゲノム研究ユニット
- 3) 農林水産先端技術研究所 畜産研究部
- 4) 静岡県畜産技術研究所 中小家畜研究センター
- 5) 東海大学 農学部
- 6) 東海大学 医学部

【目的】豚のMHC（豚白血球抗原；SLA）やToll様受容体（TLR）は、個体間で高い多様性が確認されており、感染に対する応答や、ワクチン接種の効果に与える影響が想定される。我々は、SLAやTLRの遺伝子型とワクチン接種後の抗体価との相関を調べることで、これらの病原体認識に関わる遺伝子の多様性が免疫応答に与える影響についての検討を行った。

【方法】SPF環境下で飼養されたデュロック種集団の191頭の豚に対して、豚丹毒菌（*Erysipelothrix rhusiopathiae*；ER）及び豚胸膜肺炎の原因菌（*Actinobacillus pleuropneumoniae*；APP、血清型1・2・5）の不活化ワクチンを2回接種し、ELISA法により抗体価の測定を行った。SLAクラスII遺伝子であるDRB1及びDQB1、さらにTLR1・4・5・6の各遺伝子について、シーケンシングにより遺伝子型を決定し、抗体価との関連を検討した。

【結果】SLAクラスIIハプロタイプはER、TLR1-TLR6ハプロタイプはER及びAPP1・5型、TLR5遺伝子型はAPP2・5型について、抗体価との間に有意な相関が検出された。但し、これらのTLR遺伝子中で検出されたSNPについては、HEK293細胞を用いたレポーターアッセイでは病原体認識能への影響は確認されなかった。

【考察】DRB1やDQB1分子については、ワクチンに含まれるペプチド抗原の提示能に豚集団内で差があることが推察される。TLR遺伝子については、コードする分子の機能そのものではなく、発現量等が病原体由来分子の認識に影響を与えていることも想定される。本研究の結果は、ワクチンへの応答を指標とした豚の遺伝的な改良や、遺伝的背景に影響されない豚ワクチンの開発に資するものと考えられる。

O-27 (P-33)

フィリピンの若年性住血吸虫性肝線維症とHLA-DRB1*15:01との相関

菊池三穂子^{1,2)}、Lydia R. Leonardo³⁾、千種雄一⁴⁾、Edelwisa M. Segubre-Mercado²⁾、小林典子¹⁾、林尚子⁴⁾、Napoleon L. Arevalo⁵⁾、Ronald R. Lim⁵⁾、Lea M. Agsolid⁵⁾、我妻健⁶⁾、○平山謙二¹⁾

- 1) 長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
- 2) 長崎大学 国際連携研究戦略本部
- 3) College of Public Health, University of the Philippines
- 4) 獨協医科大学 熱帯病寄生虫病センター
- 5) Provincial Health Team, Sorsogon, Philippines
- 6) 高知大学医学部 環境保健学

【目的】日本住血吸虫性肝線維症は、寄生性蠕虫である日本住血吸虫に繰り返し感染後に数年を経てから発症する重篤な合併症で、肝臓に沈着した虫卵周囲に形成される肉芽腫が原因である。その重症化にはT細胞依存性の免疫応答性が関連しており、HLA classII遺伝子アレルとの相関が日本や中国ですでに報告されている。フィリピン・ソルソゴン州の我々の調査地域においては肝実質の超音波検査でネットワークパターンを示す患者が10歳代で12.3%、20歳以上では55.3%観察された。この対象集団の日本住血吸虫性肝線維症の感受性/抵抗性に関わるHLA-DRB1アレルの同定を目的とした。

【方法】対象地域で横断的に寄生虫学的検査と超音波診断および採血を行い、抽出したDNAを用いてSSO法（Labtype SSOIB, Veritas）によるDRB1アレルタイピングを施行した。

【結果】288名（15～24歳；52名、24～34歳；45名、35～45歳；56名、45歳以上110名）の対象者で年齢による層別化を行うと、34歳以下の若年層では明らかなDRB1*15:01と肝線維症の相関がみられたが、35歳以上では有意差はなくなった。DRB1*15:01の各年齢層での頻度を見ると24歳以下で42%、25-34歳で38%、35-44歳で24%、45歳以上で25%と35歳を過ぎると抗原頻度が低下することから、何らかの理由でDRB1*15:01陽性者がこの集団から選択的に減少していることが推測された。

【考察】フィリピンの住血吸虫浸淫地において、早期肝線維症発症にはDRB1*15:01が関与していると考えられた。高齢者群でこのアレル頻度が減少することはこの肝病変が不可逆的なものであり重篤なことから、早期の死亡によるものであると考えられた。

O-28 (P-34)

原発性胆汁性肝硬変患者が保有するHLA抗体の特異性について

○万木紀美子¹⁾、平位秀世¹⁾、菱田理恵¹⁾、吉澤淳²⁾、三浦康生¹⁾、芦原英司^{1,3)}、上本伸二²⁾、前川平¹⁾

- 1) 京都大学医学部付属病院 輸血細胞治療部
- 2) 京都大学医学部付属病院 肝胆膵・移植外科
- 3) 京都薬科大学 病態生理学分野

【目的】当院で実施された原発性胆汁性肝硬変 (PBC) 患者に対する肝移植症例のうち、配偶者をドナーとする症例は予後不良であった (5年生存率47.4% vs 84.9% $p=0.01$)。その原因にHLA抗体の関与の可能性を考え、レトロスペクティブにHLA抗体検査を実施し、PBC患者群と他の肝移植患者群が保有するHLA抗体の特異性を比較検討したので報告する。

【方法】2000.1~2009.12に当院で実施されたPBC患者の肝移植は63例あり、うち検討可能であった62例についてLABScreen Mixed Class I & II、LABScreen Class I Single Antigen BeadsによりHLA Class I抗体の検出および特異性の解析をおこなった。また、2009.1~2011.12に実施されたPBC以外の患者218例について同様の検討を行った。【結果】PBC患者の94%が成人女性であったため、non-PBCとPBC患者群のいずれも成人女性に限って検討した。non-PBC患者は66例中12例 (18%) にHLA Class I抗体が検出され、10例 (15%、抗体陽性患者のうち83%) がドナー特異HLA抗体 (DSA) であった。ドナーが夫あるいは子のケース8例は全例DSA陽性で、抗体の特異性もDSAが中心であった。一方、PBC患者群では63例のうち32例 (52%) と高頻度にHLA Class I抗体を検出したが、DSAは22例 (35%、抗体陽性の69%) であった。ドナーが夫あるいは子のケースは27例あったが、non-PBC例とは異なりnon-DSAが8例あった。それを詳細に検討した結果、HLA-B7 CREGに対する抗体が4例、Cw2,5,6,7,15抗体が3例に検出された。

【考察】自己免疫性疾患であるPBCでは、患者が保有する自己抗体がHLA-B7 CREGと交差反応性がある (共通エピトープを有する) 可能性が示唆された。今後症例を重ねHLA抗体の特異性について検討するとともに、その臨床的意義を検討して行きたい。

O-29 (P-35)

日本人集団におけるANCA関連血管炎の遺伝的背景

○土屋尚之¹⁾、川崎綾¹⁾、長谷部成美¹⁾、井上尚哉¹⁾、伊東郁恵¹⁾、安心院千裕¹⁾、住田孝之²⁾、古川宏³⁾、當間重人³⁾、小林茂人⁴⁾、橋本博史⁵⁾、山田秀裕⁶⁾、尾崎承一⁶⁾、佐田憲映⁷⁾、槇野博史⁷⁾、富田誠⁸⁾、宮坂信之⁹⁾、針谷正祥¹⁰⁾

- 1) 筑波大学 分子遺伝疫学研究室
- 2) 筑波大学 内科 (膠原病・リウマチ・アレルギー)
- 3) 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター
- 4) 順天堂越谷病院 内科
- 5) 順天堂大学 医学部
- 6) 聖マリアンナ医科大学 リウマチ・膠原病・アレルギー内科
- 7) 岡山大学 腎・免疫・内分泌代謝内科
- 8) 東京医科歯科大学 臨床試験管理センター
- 9) 東京医科歯科大学 膠原病・リウマチ内科
- 10) 東京医科歯科大学 薬害監視学講座

【目的】ANCA関連血管炎 (AAV) は抗好中球細胞質抗体 (ANCA) によって特徴づけられる難治性全身性血管炎である。ヨーロッパ集団とアジア集団において疾患亜群の罹患率に顕著な差違が存在し、遺伝的背景の重要性が示唆されているが、疾患の稀少性のため、疾患感受性遺伝子は十分解明されていない。われわれは、厚生労働省「難治性血管炎に関する調査研究班」に基づく多施設共同研究により、日本人集団におけるANCA関連血管炎感受性遺伝子の探索を続けている。本演題では、他の免疫疾患における疾患感受性遺伝子であるHLA-DRB1, IRF5, STAT4, BLK, UBE2L3を候補遺伝子として関連を検討した結果を報告する。

【方法】日本人集団においてAAVの大部分を占めるMPO-ANCA陽性血管炎 157例、日本人健常対照群 510例を対象に、HLA, IRF5, STAT4, BLK, UBE2L3について、関連研究を施行した。

【結果】患者群において、HLA-DRB1*09:01陽性率の有意な関連が検出された ($P=0.0016$, OR=2.05, 95%CI 1.31-3.23)。また、STAT4, UBE2L3の有意な関連が検出された。

【考察】HLA-DRB1*09:01は、アジア集団には高頻度に存在し、多彩な免疫疾患に関連するが、ヨーロッパ集団には稀少なアリルである。本研究結果から、HLAが両集団におけるAAVの疫学的差違を説明しうる一因である可能性が示唆された。また、STAT4, UBE2L3とMPO-ANCA陽性血管炎との関連が国内外を通じて初めて示され、AAVが他の免疫疾患と共通の遺伝的背景を有することが明らかになった。

O-30 (P-36)

L-カルニチンのナルコレプシーに対する臨床評価

○宮川 卓¹⁾、川村裕美²⁾、小淵真理子²⁾、池崎飛鳥²⁾、尾崎章子³⁾、徳永勝士¹⁾、井上雄一^{4,5)}、本多真^{4,6)}

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻人類遺伝学分野
- 2) サイトサポート・インスティテュート株式会社
- 3) 東邦大学看護学部 在宅看護学研究室
- 4) 神経研究所附属睡眠学センター
- 5) 東京医科大学 睡眠学講座
- 6) 東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野

【目的】ナルコレプシーは睡眠発作及び情動脱力発作を主症状とする過眠症である。ナルコレプシーはHLA-DRB1*15:01-DQB1*06:02との強い関連が知られているが、HLA以外の遺伝子もその発症に関与することがわかっている。これまでに我々はゲノムワイド関連解析を行い、*CPT1B*遺伝子の近傍に新規ナルコレプシー関連SNPを同定した。*CPT1B*は脂肪酸 β 酸化に関わる律速酵素であり、長鎖脂肪酸から生成されたアシル-CoAとカルニチンを結合させ、アシルカルニチンとする。その後の研究で、ナルコレプシー関連SNPのリスクアレル数の増加につれて*CPT1B*発現量が減少し、さらにアシルカルニチンの異常低値を示すナルコレプシー患者が多いことを見出した。これらのことから、ナルコレプシーにおける脂肪酸 β 酸化の異常を想定し、脂肪酸 β 酸化を促進させる働きのあるL-カルニチンをナルコレプシー患者に経口投与し、その有効性を検証した。

【方法】ナルコレプシー患者30人を対象とし、L-カルニチンを1日510mg投与した際の有効性を評価した。試験デザインは二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験で、投与期間は各8週間とした。居眠り時間、居眠り回数、ESS (Epworth sleepiness scale) 及び健康関連QOL (SF-36) 等を指標に有効性の評価を行った。

【結果・考察】プラセボ投与期に比べてL-カルニチン投与期の居眠り時間（主要評価項目）の有意な減少を確認した ($P=0.048$)。副次評価項目に関しては、統計的な有意差はないが、プラセボ期又はベースラインに比べ、L-カルニチン投与期で改善傾向が認められた。本研究はL-カルニチンがナルコレプシーの治療に有効であることを示すだけでなく、これまでに脂肪酸 β 酸化をターゲットとしたナルコレプシー治療薬はないことから、新たな治療薬の開発に貢献することも期待される。

O-31 (P-37)

真性過眠症候群を対象としたゲノムワイドCNV解析

○山崎茉莉亜¹⁾、宮川卓¹⁾、Khor Seik Soon¹⁾、豊田裕美¹⁾、小池麻子²⁾、佐々木司³⁾、本田裕⁴⁾、本田真^{4,5)}、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学医学系研究科 人類遺伝学分野
- 2) 日立製作所中央研究所
- 3) 東京大学教育学研究科 身体教育学コース
- 4) 神経研究所附属睡眠学センター
- 5) 東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野睡眠覚醒制御プロジェクト

【目的】真性過眠症候群はナルコレプシーと同様に日中の耐え難い眠気を主な症状とする過眠症であるが、情動脱力発作を起こさない点がナルコレプシーとは異なる。真性過眠症候群はナルコレプシーより弱いながらHLA-DRB1*15:01-DQB1*06:02 ハプロタイプとの関連が知られているが、HLA以外の遺伝子もその発症に関与することが示唆されている。そこで、本研究では真性過眠症候群とCopy Number Variation (CNV) の関連を検討した。

【方法】真性過眠症候群患者110名、対照健常者562名のDNA microarray (Affymetrix 6.0) データを用いて、CNV検出ソフトウェアであるBirdsuite 及びPennCNVで、ゲノムワイドにCNVを同定した。頻度が1%以下でサイズが30kb以上のCNVについて、CNVの平均保有数と疾患との関連を検討した。次に特定のCNVと疾患が関連しているか検討した。

【結果】Birdsuiteを用いてCNVの平均保有数と疾患との関連を検討した結果、真性過眠症候群患者において健常者に比べてCNV (頻度 $\leq 1\%$, サイズ $\geq 30\text{kb}$) を多く保有していることが分かった (患者対健常者平均CNV保有比: 1.24, $P = 1.27 \times 10^{-2}$)。さらに、PennCNVを用いた結果、同様な傾向が見られた。次に領域ごとの関連解析の結果、4領域で有意な差が確認された。

【考察】2種類の検出ソフトウェアを活用したことで、本研究の結果は信頼性が高いと考えられ、真性過眠症候群はCNVと関連していることが示唆された。これまでの我々の先行研究において、ナルコレプシーとCNVとの関連性を明らかにしている。さらに、真性過眠症候群と関連したCNVの中には、ナルコレプシーとも関連しているものがあり、複数の過眠症にわたる遺伝的要因となる可能性が示唆された。

O-32 (P-38)

HLA-DQタンパク質安定性と一型糖尿病疾患感受性・抵抗性との関連

○宮寺浩子¹⁾、大橋順²⁾、徳永勝士¹⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

2) 筑波大学医学部 分子遺伝疫学

【目的】一型糖尿病は遺伝要因・環境要因が発症に関わる多因子疾患である。最も強い遺伝要因はHLAクラスII (HLA-DR, -DQ) であるが、その病態発症機構は不明である。我々はHLAタンパク質安定性が疾患感受性・抵抗性に関わる可能性に着目し、HLA-DQタンパク質の安定性を測定した。

【方法】DQAIアレル10種類、DQBIアレル14種類を対象とし、これらのアレルがコードするDQ α 、DQ β サブユニット間で形成されうるヘテロダイマーの相対的安定性を、細胞表面発現量を指標として測定した。欧米人、日本人を対象とした一型糖尿病のケース・コントロールデータを用いてDQタンパク質安定性と一型糖尿病に対する感受性・抵抗性との関連を解析した。

【結果・考察】多種類のDQアレル産物を対象とした安定性解析により、DQタンパク質安定性がアレル産物間で著しく異なることを見出した。また、安定性の制御に関わるアミノ酸多型を部位特異的変異、及びDQタンパク質の結晶構造データを元に同定した。さらに、DQヘテロダイマー安定性が各DQAI-DQBIハプロタイプの一型糖尿病に対する感受性・抵抗性と関連することを見出した。これらの結果は、HLAタンパク質安定性が自己免疫疾患に対する感受性を規定する主要な因子であることを示唆する。

O-33 (P-39)

日本人HLA汎親和性のHer-2ペプチドによる乳癌患者末梢血単核球反応性の解析

○津田万里^{1,2)}、亀谷美恵²⁾、吉川枝里³⁾、安藤麻子³⁾、猪子英俊³⁾、徳田裕¹⁾

1) 東海大学医学部外科学系 乳腺・内分泌外科

2) 東海大学医学部基礎医学系 生体防御学

3) 東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学

【目的】近年乳癌に対するワクチン療法の開発が試みられているが、多くは患者に高頻度のHLA型を指標に作成されており、投与患者が限定され、class-I, IIどちらかにしか提示できない欠点がある。両アンカーモチーフをもつペプチドの作製も試みられているが、更に投与患者が限定され、ペプチド自体に対する抗体が作られる可能性がある。今回我々はclass-I, II双方に提示され、多くの日本人乳癌患者のHLA型に提示能の高い新規Her-2部分ペプチドの患者末梢血反応性を明らかにする。【方法】悪性疾患の既往がなく、術前治療のない、同意を得た200名の乳癌患者の血液を用いた。Her-2発現はHerceptestにて確認した。新規ワクチン候補ペプチド(CH401MAP)はHerceptinとは異なるHer-2抗体(CH401)エピトープを含む20merをマップ化して用いた。同ペプチド存在下で乳癌患者末梢血単核球(PBMC)を培養し、細胞増殖反応の解析とCD4及びCD8 T細胞の動態をFCMにより解析した。HLA型の解析にはLABType SSO Class I A Locus kit (One Lambda)を用いた。HLA提示能はSYFPEITHI scoreを元に推定した。【結果】同ペプチドはHer-2を過剰発現する腫瘍を移植したマウスに抗腫瘍効果を示す事を我々は既に報告している。今回、患者末梢血においてもHer-2発現レベルに依存してPBMCの細胞増殖反応、CD4およびCD8の比率の上昇を認めた。また、乳癌患者群及び健常コントロールのHLA型と同ペプチドの提示能を解析したところ、9割以上の日本人乳癌患者HLA-class I, IIに対し提示能を持つ可能性が示唆された。【結語】CH401MAPはヘルパー及びキラーT細胞を同時に活性化することが可能であり、乳癌の再発予防ワクチンとなりうる可能性が考えられた。

O-34 (P-78)

SS-SBT法によるAIHおよびPBC疾患感受性遺伝子HLA-DRB1の遺伝子タイピング

○勝山善彦¹⁾、尾崎有紀²⁾、梅村武司³⁾、鈴木進悟²⁾、椎名隆²⁾、猪子英俊²⁾、太田正穂⁴⁾

- 1) 信州大学医学部附属病院薬剤部
- 2) 東海大学医学部 分子生命科学
- 3) 信州大学医学部 消化器内科
- 4) 信州大学医学部 法医学

【目的】自己免疫性肝炎 (AIH) は進行すると肝不全となる慢性肝疾患であり、その遺伝的背景としてHLA-DRB1 *04:05が疾患感受性を示し、また、自己免疫性疾患である原発性胆汁性肝硬変 (PBC) もHLA-DRB1 *08:03が感受性遺伝子として報告されている。今回、これらの感受性アリルが特殊な塩基配列を保有しているか否かについて超高解像度DNAタイピング (SS-SBT) を行い、遺伝子内の構造的相違や変異を確認した。

【方法】DRB1 *04:05ホモ接合性を示すAIH患者3名とDRB1 *08:03ホモ接合性を示すPBC患者2名より得たゲノムDNAを解析に用いた。HLA-DRB1 遺伝子全領域のPCR産物をRoche社のGS JuniorおよびLife Technologies社のIon PGMを用いたSS-SBT法で解析した。

【結果と考察】SS-SBT法はイントロン部を含めた遺伝子全領域の新規多型や構造的変化が検出できる優れたタイピング法である。現在、AIHおよびPBCのDRB1 遺伝子領域解析では、新たなSNPやIndelは検出されなく、また疾患感受性DRB1 アリルに特異的な変異も見られていない。今後DRB1以外のクラシカルHLA遺伝子の解析を行う予定である。

O-35 (P-79)

哺乳類細胞を用いたMHCクラスII (DR04:06) テトラマーの発現と調製

○内田優輝、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】MHCクラスIIテトラマーは自己反応性CD4陽性T細胞を同定する方法として非常に有効である。組換えMHCクラスIIタンパク質の発現は一般的には昆虫細胞を用いて行われるが、昆虫細胞発現系では組換えタンパク質が分解されやすいことが知られている。また、糖鎖修飾が昆虫細胞と哺乳類細胞とは異なることによりT細胞との反応性が変化する可能性がある。そこで我々は、哺乳類細胞を用いてMHCクラスIIテトラマーを調製することとした。本研究では、疾患感受性アリルおよび自己抗原ペプチドが既知であるインスリン自己免疫症候群 (IAS) を対象としてHLA-DRA*01:01/DRB1*04:06 (DR04:06) テトラマーを発現、調製した。

【方法】可溶性組換えDR04:06タンパク質をレトロウイルス発現系 (pMXs-puroおよびpMXs-neoベクター、Kitamura *et al.*, 2003) を用いて哺乳類細胞で発現した。安定発現株を高密度培養装置を用いて大量培養し、培養液中のDR04:06を精製した。精製標品のサイズを昆虫細胞発現DR04:06と比較し、ヒトインスリンペプチドとの結合実験を行った。

【結果・考察】哺乳類細胞ではDR04:06の発現量が低かったため、レトロウイルスプロモーターを活性化させる条件を検討した結果、酪酸ナトリウムおよびデキサメタゾンの添加によりDR04:06の発現量が約30倍以上上昇することを見出した。昆虫細胞で発現したDR04:06ではβサブユニットが分解されていたが、哺乳類細胞で発現したDR04:06は分解されていなかった。今後は哺乳類細胞で発現したDR04:06をテトラマー化し、自己反応性CD4陽性T細胞の同定を行う。

O-36 (P-80)

HLA-DR4拘束性CD4⁺Th細胞に抗原提示機能を有するHLA-DR4トランスジェニックマウスの樹立

○入江 厚¹⁾、矢津田旬二¹⁾、道端弥生¹⁾、原田久美子¹⁾、竹田直樹²⁾、澁谷功³⁾、十河真司³⁾、藤木文博⁴⁾、杉山治夫⁴⁾、西村泰治¹⁾

- 1) 熊本大学大学院 生命科学研究部免疫識別学分野
- 2) 熊本大学 生命資源研究支援センター
- 3) 大塚製薬 微生物研究所
- 4) 大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学

【目的】日本人の約25%が所有するHLA-DR4 (*HLA-DRA*01:01/HLA-DRB1*04:05*) を発現するトランスジェニックマウス (Tgm) を作製して、これをHLA-DR4拘束性CD4⁺T細胞が認識する、がん抗原由来のエピトープペプチドのスクリーニングに活用する。

【方法】マウスCD4とHLA-DRとの異種間分子の相互作用による親和性の低下を回避するために、*H2-E^dα*および*H2-E^dβ*の第2エクソンを、それぞれ*HLA-DRA*および*HLA-DRB1*04:05*の相当する塩基配列と置換して、 α 1、 β 1ドメインのみがHLA-DR4に由来し、その他はマウスI-E^dであるキメラ分子をコードするトランスジーンを構築した。これをB6マウス受精卵に導入し、仮親マウスを介して、HLA-DR4陽性ファウンダーマウスを選別した。これらをB6マウスと交配して、*HLA-DR4*遺伝子の発現が安定して子孫に伝わるか否か検討した。また、既知のHLA-DR4結合性ペプチドをHLA-DR4陽性個体に免疫し、HLA-DR4拘束性でペプチド特異的なCD4⁺T細胞が誘導できるか否か検討した。

【結果】HLA-DR4の発現が安定して子孫に伝達される、2系統のTgmを樹立した。FISH法により、それぞれ第3染色体あるいはY染色体への、HLA-DR遺伝子の挿入が確認された。両系統のマウスの末梢血細胞について、フローサイトメトリー法で解析したところ、いずれもB220陽性細胞において、その多くがHLA-DR4陽性であった。CMVあるいはWT1由来のペプチドを免疫したtgmのCD4⁺細胞は、HLA-DR4拘束性かつペプチド特異的な免疫応答を示した。

【考察】独立した2系統のHLA-DR4 Tgmが得られ、今後HLA-DR4拘束性CD4⁺T細胞が認識する抗原ペプチドの迅速な同定に有用であると期待される。

O-37 (P-81)

炭酸アパタイトナノ粒子を用いた抗原導入による免疫誘導

○多田誠一¹⁾、蛇島武久²⁾、竹嶋伸之輔²⁾、間陽子²⁾、伊藤嘉浩¹⁾

- 1) 理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室
- 2) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット

【目的】抗原タンパク質を微粒子キャリアに封入して抗原提示細胞への導入効率を高め、より効果的なワクチンを開発する手法が各所で検討されている。そこで本研究では、タンパク質を細胞内に高い効率で導入できる炭酸アパタイト粒子を用いて抗原タンパク質を導入し、免疫応答を誘導してワクチンとしての有効性を評価した。

【実験】抗原タンパク質としてオブアルブミン (OVA) を用いて炭酸アパタイトとの複合体を調製し、マウス骨髄由来樹状細胞に添加してOVAの細胞内導入効率の評価を行った。次に、OVA/炭酸アパタイト複合体懸濁液をマウス腹腔に注入し、血清中の抗OVA抗体の濃度をELISAによって測定して、液性免疫の誘導能を評価した。また、複合体注入後のマウスから脾臓細胞を回収し、OVA存在下でのインターフェロン γ 産生能と増殖能を評価した。さらに、複合体を皮下に注入後のマウスの足蹠にOVAを注入して炎症反応を誘起させ、遅延型過敏反応の誘導能についても評価を行った。

【結果】炭酸アパタイト粒子は樹状細胞に対し、高い抗原導入効率を示した。また、抗原との複合体を注入したマウスでは抗体産生量が大幅に増加した。複合体による免疫誘導後では、脾臓細胞における抗原刺激時のサイトカイン産生能と細胞増殖能の向上が見られた。遅延型過敏反応の誘導能評価においては、炭酸アパタイトは既存のアジュバントであるアラムと同程度の高い効果を示した。

【考察】マウスへの複合体注入時における抗体産生量の増加、脾臓細胞の抗原への感受性の向上、遅延型過敏反応の効果的な誘導といった結果より、炭酸アパタイト複合体は液性免疫と細胞性免疫の両方の免疫反応を効果的に誘導できることが示された。炭酸アパタイト粒子による抗原の樹状細胞への導入促進が、効果的な免疫誘導に貢献している可能性がある。以上より、抗原/炭酸アパタイト複合体は有用性の高いワクチン製剤であることが示された。

ポスター発表

P-1

フィリピン固有品種におけるウシMHCクラスII DRB3およびミトコンドリアDNA D-loop領域の解析

○大橋未来^{1,2)}、竹嶋伸之輔^{1,2)}、宮坂卓¹⁾、松本有生¹⁾、Claro N.Mingala³⁾、小沼操¹⁾、間陽子^{1,2)}

- 1) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
- 2) 東京大学新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻
- 3) Philippine Carabao Center

〔目的〕世界の家畜牛は*Bos indicus*と*Bos taurus*に分類される。これら2系統は熱帯病や虫害などの風土病に対する抵抗性に違いがあることが知られており、疾患感受性の個体差に関連するウシMHC (BoLA) クラスII遺伝子、中でも多型に富み機能的にも重要なBoLA-DRB3の多型解析が世界的レベルで進められてきた。東南アジア諸国にはこの2系統が交雑した多様な品種が生息している。そこで、本研究では、フィリピン、特に固有品種が多く飼育されているBohol島およびIloilo島で飼育されているウシのミトコンドリア (bmt) DNA およびDRB3遺伝子を解析することで、両島の固有品種の違いを調べた。

〔方法〕

Bohol島およびIloilo島の2島から合計158頭の固有品種のDNAを採集した。DRB3およびbmt D-loopはPCR法で増幅、ダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定した。系統解析にはNeighbor Joining (NJ) およびMedian Joining (MJ) 法を用いた。

〔結果・考察〕

bmtでは7種類の新規を含む13種類のアリルが同定され、うち4種類が高頻度で検出された。NJ法およびMJ法にて系統解析を行った結果、Taurus型とIndicus型の2群に分類され、島毎に頻度の違いが見られたことから、島間のウシの移動がほとんど無いことが予測された。一方、DRB3は8種類の新規を含む34種類のアリルが同定された。bmtによる分類に従ってアリル頻度を計算したところ、DRB3*1501のみに差が見られた。また、島ごとの比較では新規アリルDRB425c1がIloilo島で高頻度に認められた。本研究の結果、フィリピン固有種は、*indicus*型や*taurus*型など、島固有の種類に分岐しているが、MHCの頻度は似通っている事が示された。この事は、MHCが環境に適応して同じような頻度をとったことが考えられる。

P-2

数理生物学的アプローチに基づくHLA-DQ遺伝子の分子進化メカニズムの推定

○大橋 順¹⁾、宮寺浩子²⁾

- 1) 筑波大学 分子遺伝疫学
- 2) 東京大学大学院医学研究科 人類遺伝学分野

〔目的〕HLA-DQ分子はHLA-DQA1遺伝子とHLA-DQB1遺伝子にそれぞれコードされる α 鎖と β 鎖からなるヘテロ二量体である。ともに高度な多型性を示すDQA1遺伝子座とDQB1遺伝子座とは強く連鎖しており、両遺伝子間には強い連鎖不平衡が観察される。トランスの関係にある α 鎖と β 鎖であってもDQ分子を形成するが、 α 鎖と β 鎖の全ての組合せでDQ分子を形成するのではなく、DQ分子を形成しうる α 鎖と β 鎖の組合せ、すなわち2つのリネージが共存している (DQ2、DQ3、DQ4とDQ5、DQ6)。HLA分子の主要な機能が病原微生物からの感染防御であることを考えると、なぜ2つのリネージが進化的に維持されてきたのかは謎である。本研究では、数理生物学的アプローチを用いてその条件を検討した。

〔方法〕DQ分子がペプチドを提示することで抵抗性を示す病原微生物の種類数に着目し、異なるDQ分子間ではその種類が部分的に重なると仮定した簡単な数理モデルを構築し、平均適応度を評価関数として進化的安定性を検討した。ここで、多くの病原微生物に抵抗性を示すことができるほど、個体の適応度が高くなると考えた。

〔結果〕同一グループ内の異なるDQ分子間で病原微生物の種類が重なる割合と、異なるグループ間のDQ分子間で種類が重なる割合を主なパラメタとし、2つのリネージが共存可能なパラメタ条件を見いだした。

〔考察〕DQ分子が結合する外来抗原由来ペプチドレパートリーの実データを基に今回の数理モデルの検証が必要だが、HLA-DQ遺伝子の特殊な進化を数理生物学的に理解することができた。数理生物学的アプローチは、HLA (MHC) の分子進化を解明する上で、有効な手段といえよう。

P-3

日本人健常者に見られたDR15新規DRB1アレル

○安波道郎¹⁾、中村仁美¹⁾、川嶋実苗²⁾、西田奈央²⁾、徳永勝士²⁾、中村稔³⁾

1) 長崎大学 熱帯医学研究所

2) 東京大学大学院医学研究科 人類遺伝学分野

3) 国立病院機構 長崎医療センター

SBT法によるHLAタイピングは、HLA以外の遺伝子の標的リシーケンシング解析と本質的に変わらず、常にある程度の期待値で新規バリエーション配列を見いだす可能性がある。疾患感受性遺伝子座の同定のための健常者対象集団のHLA遺伝子型分析の過程で、DR15群に属する新しい配列を見いだしたので報告する。

主に医療従事者からなる健常者集団300名からインフォームドコンセント取得ののちに末梢血からDNAを調製し、採血場所と年齢・性別の情報のみを残して連結不可能匿名化した。HLA-DRB1座位遺伝子型分析にあたり、exon 2を標的とする8群の群特異的PCRを行ない、PCR陽性産物のシーケンシングデータをConexio genomics社ASSIGN ATF 1.0.2.45を用いて解析した。300名中2名にDRB1*15:01:01:01の配列とcodon 22において1塩基(GAG>CAG)異なる新しい配列を認めた。Agresti and Coull (1998)による推定頻度 $p' = (s+2) / (n+4) = 0.0066$, 95%信頼区間 $p' \pm 1.96 * \text{SQRT}(p' * (1-p') / (n+4)) : (0.00015, 0.013)$ であった。このDRB1*15:01 (Glu22Gln)を有する2名は、HLA-A、-B、-DPB1座において1アレルを共有することから、このHLA-A*26:01 -B*35:01-DRB1*15:01 (Glu22Gln)-DPA1*01:03 -DPB1*02:01ハプロタイプを共有していると推測された。また、6番染色体上の31405座位のSNP genotypeから、この2名は23.4Mb -43.4Mb (NRSN1からDLK2まで)の領域をハプロイド共有していると推定された。

P-4

アジアに棲息するMacaca属霊長類におけるToll様受容体TLR9の種特異的な多様性形成

○安波道郎¹⁾、川合覚²⁾、高木明子¹⁾、中村仁美¹⁾、保富康宏³⁾、平井啓久⁴⁾

1) 長崎大学熱帯医学研究所

2) 獨協医科大学 熱帯病寄生虫病室

3) 医薬基盤研究所 霊長類医学科学研究センター

4) 京都大学霊長類研究所

本州以南の日本列島固有種であるニホンザルはgenus「属」Macacaに分類される。同属内では、アジアの大陸部原産のアカゲザルと近縁であり、次いで東南アジアの島々や沿岸部に分布するカニクイザルと近い関係にある。Macaca属の分布域にはサルマラリアの流行が見られ、ヒト民族集団のゲノム進化での熱帯熱マラリア原虫の影響に似て、その種分化にサルマラリア流行が関与してきたと想像できる。実際、東南アジアに流行し、日本列島では見られないサルマラリア原虫*Plasmodium coatneyi*は、流行地に棲息するカニクイザルでは感染後に宿主の防御系の働きによって自然に排除されるのに対して、自然界では触れることのないニホンザルへの実験感染では例外なく重症化し、抗原療法をしなければ致死的な経過を取る。一方、Toll様受容体TLR9遺伝子は、B細胞や樹状細胞等の免疫担当細胞に発現して、特定の配列モチーフをもつ2本鎖DNAやマラリア原虫の宿主ヘモグロビン代謝産物であるマラリア色素 (Hemozoin) を認識して炎症性細胞応答を惹起するマラリア抵抗性の候補遺伝子である。

Macaca属サル種におけるTLR9の分子進化はマラリア等の感染因子の存在の影響を強く受けていると考えられることから、進化の過程でマラリアへの曝露状況が異なり、感受性の異なる2種における多様性を比較した。飼育環境下にあるニホンザル5個体、カニクイザル6個体について、タンパクコード領域3096bpの塩基配列を明らかにし、非同義置換と同義置換の頻度差をFisher's exact testにより評価した。ニホンザルでは3か所と1か所で頻度差を認めなかった ($p=1.0$) のに対し、カニクイザルでは、非同義置換6か所と同義置換8か所とアミノ酸配列を保存する傾向が認められた ($p=0.011$)。

P-16

成人T細胞白血病ウイルス感染者の末梢血T細胞におけるHLA-Fの表面発現分画についての検討

○吉岡 聡¹⁾、一戸辰夫^{1,2)}、下嶋典子³⁾、菱澤方勝¹⁾、大森勝之⁴⁾、Geraghty DE⁵⁾、石谷昭子⁶⁾、高折晃史¹⁾

- 1) 京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科
- 2) 佐賀大学医学部 内科学講座 血液・呼吸器・腫瘍内科
- 3) 奈良県立医科大学 細菌学教室
- 4) 京都大学医学部附属病院 検査部
- 5) Fred Hutchinson Cancer Research Center
- 6) 奈良県立医科大学 法医学教室

【目的】HLA-Fは非古典的HLAクラスI分子の一つで、HLA-E、-G同様に多型性に乏しく、細胞表面への発現は胎盤トロホプラストと一部の活性化リンパ球にほぼ局限していることが知られている。しかし、その臨床的意義は未だ明らかにされていない。我々は昨年当学会において、成人T細胞白血病ウイルス（HTLV-I）キャリア及び成人T細胞白血病（ATL）患者の末梢血T細胞の一部にHLA-Fが表面発現していることを報告した。今回、新たに検体を追加し解析したので、前回の結果と合わせ報告する。

【方法】対象は、本研究への参加に対する同意の得られたATL患者9例（急性型3例、慢性型6例）、HTLV-Iキャリア3例の計12例。これらの症例から得た末梢血リンパ球分画におけるHLA-Fの発現を抗原認識部位の異なる2種類のHLA-Fに対する抗体（3D11、4A11）を用いたフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】慢性型ATL6例中5例において、CD3陽性細胞の一部にHLA-Fの表面発現を認めた。一方急性型ATLではHLA-Fの表面発現は認められなかった。また今回新たに解析したHTLV-Iキャリア2例でもHLA-Fの表面発現は認められなかった。さらにHLA-F陽性例において、CD4陽性リンパ球、CD8陽性リンパ球におけるHLA-F発現強度に明らかな差は認められなかった。

【考察】末梢血T細胞表面におけるHLA-Fの発現は、慢性型ATLにおいてのみ確認され、HTLV-Iキャリアや急性型症例では認められなかった点から、慢性型ATLの病態形成におけるHLA-Fの意義に興味を持たれる。しかし、CD4陽性分画、CD8陽性分画間におけるHLA-F発現強度には明らかな差を確認できなかったことから、腫瘍クローン特異的にHLA-Fが発現している可能性は否定的と考えられる。

P-17

慢性B型肝炎感受性・抵抗性に関連するHLA-DPの機能解析

○高柳 彩、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】B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染の罹患率は世界的に大きな地域差があり、アジア太平洋地域では全人口の10%以上に及ぶ。日本人・タイ人集団を対象としたゲノムワイド関連解析により、B型肝炎慢性化に関連する最も大きな遺伝要因がHLA-DPA1、DPB1遺伝子領域内の多型であることが報告された（Kamatani, Y. *et al.* 2009）。このことはHLA-DPアレル特異的なHBV由来の抗原提示が、B型肝炎慢性化に関与していることを示唆する。この可能性を検証するため、本研究では慢性B型肝炎抵抗性及び感受性アレルのHLA-DP組換えタンパク質を発現し、HBV由来のペプチド断片との結合能を解析した。

【方法】HLA-DP cDNAのクローニングを行い、バキュロウイルス発現系によりHLA-DP組換えタンパク質を発現した。細胞表面に発現したHLA-DP組換えタンパク質に対するHBV表面抗原（HBsAg）由来のペプチドの結合を、フローサイトメトリーを用いて測定した。

【結果・考察】慢性B型肝炎抵抗性及び感受性アレルのHLA-DP組換えタンパク質を、バキュロウイルス発現系で発現した。細胞表面に発現させたHLA-DPA1*01:03-DPB1*04:02に対するHBsAgペプチド（HBs 19-33; FFLTRILTIPQSLD）の結合を、フローサイトメトリーを用いて測定した。さらに精製HLA-DP組換えタンパク質を調製し、HBs 19-33と、その他のHLA-DPとの結合が示唆されているHBsAgペプチドとの結合能を解析した（Desombere, I. *et al.* 2000）。

P-18

V281L of the CYP21 gene causing 21-Hydroxylase deficiency located in the class III region of resistant HLA haplotype in the Chronic Chagas disease

Florencia del Puerto¹⁾、Eiki J. Nishizawa²⁾、菊池三穂子³⁾、Yelin Roca⁴⁾、Freddy U. G. Velarde⁵⁾、Luis A. Renjel⁶⁾、小宮憲洋⁷⁾、前村浩二⁷⁾、○平山謙二¹⁾

- 1) 長崎大学熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
- 2) Nishizawa Clinic.
- 3) 長崎大学 国際連携研究戦略本部
- 4) Centro Nacional de Enfermedades Tropicales.
- 5) Hospital Universitario Japonés
- 6) Centro de Enfermedades Cardiovasculares y Hospital.
- 7) 長崎大学医歯薬総合研究科 疾患制御医学循環器内科

【目的】Chagas disease is known to display multiple diverse symptoms in the chronic phase, although the responsible pathogenesis factors were not yet to be defined. Recently, we reported the association of the haplotype HLA-B*14-DRB1*01 with the resistance to severe forms of Chagas disease in Bolivia. A non-classical 21-Hydroxylase deficiency is caused by non-synonyms substitution (1683 G>T, V281L) in the exon 7 of the CYP21 gene located in the HLA class III region. The CYP21 V281L mutation was reported to be strongly linked to the HLA-B*14-DRB1*01 haplotype. We performed association analysis for 21-Hydroxylase and the Chronic Chagas disease.

【方法】Two hundred ninety one of the chronic Chagas patients with positive serology for *Trypanosoma cruzi* were examined. Clinical symptoms were diagnosed ECG abnormalities and Colon X-ray with barium enema examination was performed for the detection of megacolon. We analyzed the V281L mutation for CYP21 gene by the RFLP technique.

【結果】The mutation of 281L was identified in 20 of 285. 281L frequency was significantly increased in the chronic Chagas patients. Linkage disequilibrium were observed with 281L and HLA-DRB1*01-B*14 and there was no increased frequency of 281L in the patients without this haplotype.

【考察】281L of the CYP21 was merely related to the HLA haplotype rather than independently associated with Chagas disease. We could not identify the responsible locus in the haplotype.

P-19

HBV陽性肝癌における感受性候補SNPの東アジア集団での検証

○澤井裕美¹⁾、西田奈央^{1,2)}、松田浩一³⁾、馬渡頼子^{1,2)}、田中靖人⁴⁾、溝上雅史²⁾、徳永勝士¹⁾

- 1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野
- 2) 国立国際医療センター 肝炎・免疫研究センター
- 3) 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター
- 4) 名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学

【目的】2010年にZhangらによって実施された中国の5集団におけるB型慢性肝炎患者群と肝癌患者群でのGWASでは、*KIF1B*遺伝子内の一塩基多型 (SNP) が肝癌と関連する事が報告された。本研究では、日本、韓国および香港のケース・コントロール群を用いて、*KIF1B*多型との関連が他の東アジア集団でも見られるか検証を行った。

【方法】独立した2つの日本人サンプル (HBV陽性肝癌患者群179検体とB型慢性肝炎患者群769検体、HBV陽性肝癌患者群142検体とHBVキャリア251検体)、韓国人サンプル (HBV陽性肝癌患者群164検体とB型慢性肝炎患者群144検体) 及び香港人サンプル (HBV陽性肝癌患者群94検体とB型慢性肝炎患者群187検体) を対象として、TaqManアッセイ法を用いて*KIF1B*内のSNP (rs17401966) の遺伝子型を決定した。

【結果】全体としてケース群579検体、コントロール群1351検体について関連解析による検証を行った。その結果、いずれの集団でもrs17401966と肝癌の関連は再現されなかった (日本#1: OR = 1.09, 95% CI = 0.82-1.43、日本#2: OR = 0.79, 95% CI = 0.54-1.15、韓国: OR = 0.95, 95% CI = 0.66-1.36、香港: OR = 1.17, 95% CI = 0.79-1.75)。

【考察】日本人、韓国人および香港人サンプルを用いた解析では、*KIF1B*多型 (rs17401966) と肝癌の関連は再現されなかった。原因としては、日本人や韓国人と中国人では遺伝的多様性に違いがあること、中国集団内での遺伝的背景が均質ではない事などが考えられる。いずれにせよ、アジア系集団での肝癌感受性の遺伝要因を明らかにするにはより広範な調査研究が必要である。

【謝辞】延世大学のSang Hoon Ahn先生、香港大学のMan-Fung Yuen先生にはサンプルを提供して頂きました。

P-20

関節リウマチとHLA 6座との関連解析

○奥平裕子¹⁾、光永滋樹¹⁾、鈴木康夫²⁾、桑名正隆³⁾、
佐藤慎二²⁾、金子祐子³⁾、本間康彦⁴⁾、成田暁¹⁾、柏瀬貢一⁵⁾、
井ノ上逸朗⁶⁾、猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大学医学部 分子生命科学
- 2) 東海大学リウマチ内科
- 3) 慶応大学医学部
- 4) 東海大学検診センター
- 5) 関東甲信越ブロック血液センター
- 6) 国立遺伝学研究所

【目的】 関節リウマチ (RA) 発症の遺伝要因の1/3はHLAであるといわれているが、DRB1以外のHLA遺伝子座についてはRAとの関連がほとんど調べられていない。それで我々はHLA 6座 (HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1, -DPB1) とRAとの関連解析を行った。

【方法】 RA患者622例 (抗CCP抗体陽性488例、陰性103例、不明31例) と1,037例の対象群 (検診センター受診者) のHLAタイピングを行い、RAとの関連を解析した。

【結果および考察】 抗CCP抗体陰性のRA患者とHLAとの関連で、ボンフェローニの補正後に有意なものはなかった。抗CCP抗体陽性の患者ではHLA-DRB1以外の遺伝子座もRAとの有意な関連を示したが、そのほとんどはDRB1アリルとの連鎖不平衡で説明できた。しかし、DPB1*02:01, DPB1*04:01, DPB1*09:01 はDRB1とは独立してRAのリスクあるいは抵抗性を付与した。さらに DPB1*02:01 はより重篤な関節破壊をともなう病型と関連していた。また、日本人集団で最も強いリスクアリルであるDRB1*04:05を含むHLA 4座 (HLA-C, -B, -DRB1, -DQB1) ハプロタイプ間で、オッズ比が1.01~5.58と差があり、ハプロタイプ解析の重要性が示唆された。

P-21

自己免疫性肝炎疾患感受性遺伝子の検索

○梅村武司¹⁾、勝山善彦²⁾、目黒明³⁾、城下智¹⁾、吉澤要¹⁾、
田中榮司¹⁾、益尾清恵⁴⁾、猪子英俊⁵⁾、太田正穂⁶⁾

- 1) 信州大学医学部 消化器内科
- 2) 信州大学医学部附属病院 薬剤部
- 3) 横浜市立大学眼科学
- 4) ベリタス
- 5) 東海大学医学部 分子生命科学
- 6) 信州大学医学部 法医学

【目的】 自己免疫性肝炎 (AIH) は進行すると肝不全となる慢性肝疾患である。発症原因は不明であるが、HLA-DRB1*04:05アレルが疾患感受性に関連することが報告がされている。本研究ではGWASとHLAの関連解析を行った。

【方法】 AIH患者128例と健常者528例を対象とした。GWASはAffymetrix Gene Chip Human Mapping 500K arrayを用い、HLA遺伝子タイピングはLuminex assay法、sequence-based typing法を用いて行った。

【結果】 GWASではHLA-DQ近傍のSNPが最も有意な相関を示した ($P = 4.5 \times 10^{-6}$; OR = 1.90)。HLA解析では患者群はDRB1*04:05-DQB1*04:01ハプロタイプ (31% vs. 12%; $P = 3.6 \times 10^{-10}$; OR = 3.43) が有意に高頻度であり、血清IgG値 (3114 vs. 2640 mg/dL; $P = 0.05$)、抗平滑筋抗体陽性率 (77% vs. 38%; $P = 0.000055$) と相関を認めた。逆にDRB1*01:01-DQB1*05:01 ハプロタイプが患者群で有意に頻度が少なかった (3% vs. 6%; $P = 0.036$; OR = 0.42)。

【考察】 AIH患者におけるGWASでは有意なSNPは同定されなかったが、発症および病態と関連のあるHLAハプロタイプが同定された。

P-22

Type 1 diabetes association mechanism among Japanese population

○Cindy Chia-Jung Chen、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】 Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disorder that mediates destruction of insulin-producing pancreatic cells. Previous genetics association studies reported HLA II to be the major factor for increased susceptibility to T1D. Yet, knowledge remained limited on disease mechanism in the Japanese population. The purpose of this study is to elucidate variable immunologic mechanism of risk and protective alleles and their interactions with auto-antigenic peptides.

【方法】 Risk HLA - DRA*01 : 01- DRB1*08 : 02, -DRB1*04 : 05, -DRB1*09 : 01, DQA*03 - DQB1*03 : 02, DQA*03 - DQB1*03 : 03, DQA*03 - DQB1*04 : 01, protective HLA - DRB1*15 : 01, DQA*01 : 02 - DQB1*06 : 02 were sub-cloned into expression vectors and expressed in mammalian cells.

【結果と考察】 Eight stable cell lines were established in order to be representative of T1D risk and protective alleles. Flow cytometry analysis confirmed the expression of HLAII molecules at varied expression levels. Sufficient quantities of HLA II recombinant proteins are purified for in vitro peptide binding assays utilizing T1D candidate peptide, human insulin : insB (1-20) and insB (9-26). Study results are aiming to reveal the impact of DR and DQ alleles contribute to T1D in Japanese.

P-48

IgM型抗non-HLA抗体陽性の生体腎移植症例

○伊藤 誠¹⁾、櫻澤貴代¹⁾、石岡聡子¹⁾、米岡麻記¹⁾、
 渡邊千秋¹⁾、重松明男¹⁾、澁谷齊¹⁾、森田研²⁾、岩見大基²⁾、
 福澤信之²⁾、野々村克也²⁾、清水力¹⁾

1) 北海道大学病院 検査・輸血部

2) 北海道大学病院 泌尿器科

【緒言】 生体腎移植術前検査として実施しているリンパ球クロスマッチは、レシピエント血清中にドナーリンパ球と反応するドナー特異的抗体 (DSA) の有無を確認することで、移植の適否を判定し、リスクを予測している。当検査室では、補体依存性に反応させる血清学的方法 (CDC-XM) とフローサイトメトリーで高感度に抗体を検出する方法 (FCXM) を導入している。今回我々は、術前検査でリンパ球クロスマッチの結果が乖離し、移植の適否を判定するにあたってIgM型抗体の追加検討が有用であった症例を経験したので報告する。

【症例】 50代女性。妊娠歴あり、輸血歴なし。多発性囊胞腎による慢性腎不全にて、7ヶ月間の血液透析を経て、2011年4月に夫をドナーにドナー血液型A型、レシピエント血液型O型のABO不適合腎移植を施行した。術前検査として実施したリンパ球クロスマッチは、CDC-XM T warm陰性、B warm陽性、FCXM T cell IgG陰性、B cell IgG陰性であった。

【目的】 術前HLA検査においてCDC-XM B warm陽性、FCXM B cell IgG陰性、とリンパ球クロスマッチの結果が乖離したため、リンパ球クロスマッチの結果からIgM型のDSAの存在が疑われたため、検討を行なった。

【方法】 Dithiothreitol (DTT) 処理によりレシピエント血清中のIgMを不活化させ、CDC-XMを実施した。また、補体結合性の抗HLA抗体を検出するC1qScreenを実施した。

【結果】 IgMを不活化したCDC-XMが陰性化したことから、補体結合性のIgM型のDSAの存在が示唆された。C1qScreenでは補体結合性抗HLA抗体を検出しなかった。IgM型のDSAは抗non-HLA抗体であることが示唆された。

【結語】 移植の適否を判定するうえでDTT処理血清を用いたCDC-XMおよびC1qScreenが有用であった。

P-49

生体腎移植でFCXMとLABScreen検査の結果に乖離が見られた2例

○盛 和行¹⁾、對馬優子²⁾、飛澤悠葵³⁾、米山徹⁴⁾、村澤洋美¹⁾、山本勇人¹⁾、岡本亜希子¹⁾、今井篤¹⁾、畠山真吾⁴⁾、米山高弘¹⁾、古家琢也¹⁾、神村典孝¹⁾、藤田雄⁵⁾、鳴海俊治⁴⁾、大山力^{1, 4)}

- 1) 弘前大学大学院医学研究科 泌尿器科学講座
- 2) 弘前大学大学院医学研究科 社会医学講座
- 3) 弘前大学大学院医学研究科
- 4) 弘前大学大学院医学研究科 先進移植再生医学講座
- 5) 弘前大学大学院医学研究科 循環呼吸腎臓内科学講座

【目的】当科では2006年から34例の生体腎移植を実施している。当初からFCXMを導入し、2011年2月からはLABScreenを導入した。今回、FCXMとLABScreen検査の結果に乖離が見られた2例について報告する。

【方法】症例①は2012年4月に生体腎移植を実施したABO適合症例。術前FCXM、LABScreen、及び術後6日にLABScreenを実施した。症例②は2006年11月に生体腎移植を実施したABO適合症例。2012年2月にCr軽度上昇。術前及びCr軽度上昇時にFCXMとLABScreenを実施した。

【結果】症例①は術前FCXM-T、Bいずれも陽性となった。しかし、LABScreenでは異常は見られなかった。リツキサンを投与し、移植直前に再度LABScreenを実施したが陰性であった。術後6日も陰性であった。現在も安定している。症例②は術前FCXMは陰性であった。Cr軽度上昇時、LABScreenを実施したところ、class I、IIは陰性であったが、術前検体では陰性であったMICAが226倍と高値を示した。2012年3月FCXMを実施したところ陰性であり、MICAは214倍であった。現在Cr軽度上昇のまま安定している。

【考察】症例①はFCXM陽性、LABScreen陰性、症例②はFCXM陰性、LABScreen MICA陽性と、結果に乖離が見られた。症例①はnon-HLA抗体の関与、症例②はMICAの関与が考えられた。当科ではFCXM陽性でもLABScreen陽性と陰性はほぼ半々であり、明らかなDSA保持症例がないことが影響している可能性はあるが、さらに多数症例において検討する必要があると思われる。

P-50

DQ抗原に対する抗HLA抗体による慢性活動性抗体関連拒絶反応を呈した症例の検討

○川上麻衣¹⁾、石田清人¹⁾、笹木剛志¹⁾、高橋智哉¹⁾、高橋俊司¹⁾、藤川正人¹⁾、原田浩²⁾、福澤信之²⁾、平野哲夫²⁾

- 1) 市立札幌病院 検査部
- 2) 市立札幌病院 腎臓移植外科

【はじめに】HLA class II 抗原の中でDQ抗原はDR抗原とは異なり多型性を有している。その意義も重要視されるようになってきている。当院の腎移植患者の中で、術後DQ抗原に対するドナー特異的抗HLA抗体(DSA)によると思われる慢性活動性抗体関連拒絶反応(CAAMR)を示した症例を4例経験したので報告する。

【症例1】28歳、男性。原疾患は巣状糸球体硬化症。2005年6月に母をドナーとして腎移植を施行。経過は安定していたが、怠薬による急性拒絶反応を発症し、治療した。その後2008年6月に血清Cr値の上昇を認め、移植腎生検にてCAAMRと診断。

【症例2】68歳、女性。1980年頃、常染色体優性多嚢胞腎を指摘。2005年9月に夫をドナーとして腎移植を施行。その後2008年12月に血清Cr値の上昇と尿蛋白を認め、移植腎生検にてCAAMRと診断。

【症例3】30歳、女性。原疾患はWegener肉芽腫症に合併する腎障害。2003年1月に母をドナーとして腎移植を施行。その後経過は極めて安定していたが、2010年12月に少量の尿蛋白を認め移植腎生検にてCAAMRと診断。

【症例4】28歳、男性。原疾患はGoodpasture症候群。2005年7月に母をドナーとして腎移植を施行。その後2011年5月に少量の尿蛋白を認め移植腎生検にてCAAMRと診断。

【抗ドナーHLA検査結果】手術前はCDC-Xm、Flow T-cell Xm陰性、FlowPRA Screening検査では4例中3例が抗体陰性。1例の陽性者はFlowPRA Single AntigenテストでDSA陽性であった。術後のCAAMR診断時は4例中4例がDQに対するDSA陽性となっていた。

【結語】今回の4例の経験でDQ抗原に対するDSAによりCAAMRが惹起されるということが判明した。腎移植においてDQ抗原もDR抗原と同等に考慮する必要性を感じた。

P-51

SAFB法により同定された低力価抗ドナー抗体と抗体関連型拒絶反応の関連

○平井敏仁、池宮城雅子、沢田勇吾、公平直樹、古澤美由紀、尾本和也、石田英樹、田邊一成
東京女子医科大学 泌尿器科

【背景】近年、術前感作状態の評価にsingle antigen flow beads (SAFB) 法が導入され、従来では同定できなかった術前DSA陽性例が存在することが明らかとなってきたが、これらの低力価DSAの意義は未だ明らかではない。SAFB法の臨床的な意義とその対処法についてretrospectiveに検証した。【方法・結果】2001年から2004年までに当科で施行したABO適合生体腎移植患者152例の血清をretrospectiveにSAFB法にて検査すると、24例で術前DSA陽性であった。この24例 (Group 1) は、DSA陰性群 (Group 2) と比較して、有意に抗体関連型拒絶 (AMR) の発症率が高く (AAMR ; Group 1 25%, Group 2 3.9%, CAMR ; Group 1 33.3%, Group 2 6.3%)、5年生着率も不良であった (Group 1 ; 83.3%, Group 2 93.0%)。2005年から2009年までに施行したABO適合腎移植169例中、SAFB陽性であった52例 (Group 3) には術前にrituximab+DFPPによる術前脱感作療法を施行した。これらの患者群を、同時期のSAFB陰性群117例 (Group 4) と比較すると、AMR発症率 (AAMR ; Group 3 2%, Group 4 6.8%, CAMR ; Group 3 7.7%, Group 4 3.4%)、5年生着率 (Group 3 98.1%, Group 4 94.2%) はともに同等であり、脱感作療法の導入による著明な成績の改善を認めた。【結論】SAFB法にて同定されるDSAは低力価であっても移植腎予後に与える影響は大きい、rituximab+DFPPによる脱感作療法の導入によりこれらの患者のリスクを軽減できると考えられる。

P-62

唾液試料から抽出した DNA による HLA タイピングの検討

○東 史啓、小野あいこ、安島潤、大原裕子、柏瀬貢一、小川篤子、高梨美乃子、内川誠、南陸彦
日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター

【目的】HLA タイピングをはじめとする遺伝子検査には、一般的に末梢血試料から抽出した DNA が用いられるが、穿刺による採血という高い侵襲性が課題である。一方、侵襲性の低い方法としてスワブ等で採取した口腔粘膜から DNA を抽出する方法もあるが、採取手技による収量の差、および採取後保存の不安定性という面で課題がある。今回我々は、市販の唾液採取キットを用いて採取した DNA から HLA タイピングを試み、性能を評価したので報告する。

【方法】「ORAGENE (DNA Genotek 社製)」を用い、健常人ボランティアから唾液を採取した。この試料から DNA を抽出し、収量・精製度、および唾液採取後 DNA 抽出操作まで常温保存した場合の安定性を評価した。さらに、同意の得られた臍帯血移植患者から、末梢血試料とともに本キットで採取した唾液の提供を受け、収量、精製度およびHLA タイピング結果の比較を行った。

【結果】健常人3名の唾液から抽出した DNA は、唾液 2 ml から50~100 μ g であり、末梢血に近い収量を得られた。また、唾液採取後常温1週間の保存でも十分な量の DNA が回収できた。HLA タイピングにおいて唾液由来 DNA では若干の反応抑制作用が見られたため、DNA の抽出・精製方法を検討したところ、収量は低下するが末梢血と同等の精製度の DNA が得られた。臍帯血移植患者の唾液からも DNA の抽出は可能で、白血球が減少し末梢血からの DNA 収量がごく僅かになるような症例からも、末梢血と比較して安定した収量で DNA が回収でき、HLA タイピング結果も問題なく得られた。

【考察】唾液からの DNA 抽出および HLA タイピングは、侵襲性、収量、保存安定性などの面で、末梢血や口腔粘膜と比較しても有用であることが確認された。

P-63

臍帯血のHLAタイピングにおいて判定不能となりキメラを疑った症例

○黒田ゆかり、田原大志、中村仁美、中山みゆき、井上純子、永吉裕二、森鉄男、中村功、久田正直、入田和男、清川博之

日本赤十字社九州ブロック血液センター

【はじめに】今回、臍帯血のHLAタイピングが判定不能となり3種類の遺伝子が検出された症例を経験したので報告する。

【対象・方法】PCR-SSOを原理とした蛍光ビーズ法WAKFlowを用い検査実施した1852例の臍帯血のうち判定不能であった1症例において、SBT法AlleleSEQRを用いて確認検査を行った。

両方法に使用したDNAは、QuickGeneで抽出した同一検体である。

【結果】蛍光ビーズ法ではA,B,C,DR全てにおいてNo Patternとなり判定不能であった。反応プローブからA*02:06,B*51:01,C*15:01,DRB1*08:02の存在が推定され、更にA*11:01,B*54:01,C*01:01,DRB1*01:01およびDRB1:04:10の反応プローブに一部反応が見られた。SBT法ではA*02:06:01/-,B*51:01:01/-,C*15:01:02/-と判定され、DRB1はミスマッチが最低で6箇所であった。ミスマッチ部分を確認すると3箇所て3種の塩基が重なり、全体の塩基配列はDRB1*08:02,01:01および04:10を重ねた場合と酷似していた。ABC座では判定されたタイプ以外の形跡があるようにも見えるが、明確な反応は認められなかった。

【考察】臍帯血採取では母親血液の混入の可能性は低く、今回の臍帯血のタイピング結果では少なくとも3種類の遺伝子を検出し、キメラ様を呈していた症例を経験した。混合細胞の割合やプライマーなどによって判定不一致となることは考えられるが、判定ソフトでの判定においては試薬の特性を熟知し、安易な判定を避けることが正しいタイピング結果に繋がると考える。

臍帯血バンクでは、タイピング不能の場合は移植用としない、さらに保存するものとしてはタイピング可能であったものと規定しており今回の臍帯血は保管対象外とした。

P-64

腎移植に必要な組織適合性検査の検討

○坂本慎太郎¹⁾、黒木聖久¹⁾、井藤聡美¹⁾、渡井至彦²⁾、打田和治²⁾、小林孝彰³⁾

1) 名古屋第二赤十字病院 組織適合検査室

2) 名古屋第二赤十字病院 移植外科

3) 名古屋大学 移植免疫学

【目的】腎移植では、組織適合性検査は必須の検査項目と考えられている。しかし、様々な検査方法があり、施設により実施する検査項目と移植適応判定が異なっている。

【方法】名古屋第二赤十字病院で2009年から2011年に実施した生体腎移植261例を対象とした。全例にクロスマッチ(XM: CDC-T, -WB, FCXM-T, -B)とFlowPRA(class I, II)を実施した。XMまたはFlowPRA陽性例に対してLABScreen SAB(single antigen beads)を行い、DSAの有無をチェックし、CDC-T陰性を移植適応とした。リツキサン(RIT)、二重濾過血漿交換(DFPP)、2週前からのMMF投与を含む脱感作療法をXM結果、DSA量により決定した。

【結果】261例のうちXM(+)は27例。そのうちFCXM-T(+)B(+)5例、T(+)B(-)1例、T(-)B(+)21例であり、DSAは、それぞれ5例、1例、10例に検出された。XM(-)でFlowPRA(+)は25例あり、DSAは7例(class I 4例、I+II 1例、II 2例)検出された。ABO一致・適合DSA(-)例には脱感作療法を試行せず、DSA(+)例には脱感作療法を実施した。XM(+)またはFlowPRA(+)52例のうち3例に急性拒絶反応を認めただけであり、全例生着している。しかしDSA(+)23例のうち7例にプロトコル腎生検で慢性拒絶反応を示唆する所見が認められた。

【考察】FCXM-Bの感度および特異度において改善すべき点が認められるが、FlowPRAによるHLA抗体スクリーニングを併用すれば、効率的にDSAを検出でき、急性拒絶反応を防ぐことが可能であった。しかし、DSA陽性例の長期予後は課題である。

P-65

施設間におけるリンパ球クロスマッチ検査結果 (CDC, FCXM, ICFA) の相違について検討

○矢澤浩治¹⁾、橋本光男²⁾、久山芳文³⁾、市川靖二²⁾、北田秀久⁴⁾、黒木聖久⁵⁾、小林孝彰⁶⁾、橋口裕樹⁷⁾、高原史郎⁸⁾、野々村祝夫¹⁾

- 1) 大阪大学医学部附属病院 泌尿器科
- 2) 兵庫県立西宮病院 腎疾患総合医療センター
- 3) 大阪府立急性期・総合医療センター
- 4) 九州大学病院 臨床・腫瘍外科
- 5) 名古屋第二赤十字病院
- 6) 名古屋大学 免疫機能制御学
- 7) 福岡赤十字病院
- 8) 大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学

【目的】腎臓移植におけるリンパ球クロスマッチ (XM) はCell-based assay, Bead-based assayが存在し、この両者を組み合わせた新しいXM検査として、ICFA法 (Immunocomplex capture fluorescence analysis) が開発された。今回我々は同一検体を異なる3施設においてXM検査 (CDC, FCXM, ICFA) を行い、それぞれの検査結果における施設間の相違について検討した。**【方法】**大阪大学、九州大学、兵庫県立西宮病院から試験参加の承諾を得られた12組のドナー血とレシピエント血清を対象とした。この12組のサンプルを大阪府立急性期・総合医療センター、名古屋第二赤十字病院、福岡赤十字病院の3施設の検査センターにてXM検査を行った。XM検査はICFA, CDC, FCXMにて行い、CDC, FCXMに関する判定基準はそれぞれの施設の基準で評価した。

【結果・考察】12症例のICFAクラスIのうち11例 (92%) は施設間での判定が一致し、1例 (8%) が不一致であった。一致症例の内訳は陽性が6例、5例が陰性であった。ICFAクラスIIもクラスIと同様に11例 (92%) が一致し、判定不一致は1例 (8%) であった。一致症例の内訳は3例が陽性、8例が陰性の結果を示した。一方、FCXM法は、FCXM-Tは12例のうち5例 (42%) が施設間での判定が一致で、残りの7例 (58%) は不一致であった。FCXM-Bで施設間での判定が一致したのは10例 (83%) であったが、その9例は陽性判定であった。CDCに関してもCDC-Tの施設間での判定が一致したのは8例 (67%) で、全てが陰性判定であった。3施設でのXM検査法で最も施設間での判定が一致したのはICFAであり、ICFA > CDC > FCXMの結果になった。施設間での一致率のみを見ればICFAは有効なXM検査法と言える。

P-5

新規ウシ主要組織適合抗原 (MHC) クラスII 遺伝子ハプロタイプの同定とその分布

○宮坂 卓²⁾、竹嶋伸之輔¹⁾、泉對博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) 日本大学生物資源科学部 獣医学研究科

【目的】ウシMHC (BoLA) クラスIIはHLAと異なりDPが存在せず、多型のない1種類のDRA、高度に多型に富むDRB3を含む3種類のDRB、各々多型を有する5種類のDQAおよび5種類のDQBがマップされている。BoLAの多型は牛白血病、ネオスポラ病、乳房炎など様々な感染症の発症と相関することが報告されている。しかし、BoLAハプロタイプはホルスタイン種で一部解析されているのみで、ハプロタイプと疾患との相関性の解析は困難である。そこで、本研究では世界中で広く使用されている乳用牛であるホルスタイン種と国内の肉牛の大部分を占める黒毛和種のBoLAクラスII DQ-DRハプロタイプの解析を行い、その分布調査を行った。

【方法】日本国内の黒毛和種109頭およびホルスタイン39頭、合計148頭を選出した。各BoLA遺伝子をSequence Based Typing (SBT) 法とクローニングを組み合わせてタイピングし、アレルを決定した。

【結果】26種類のDRB3アレル、3種類の新規を含む25種類のDQAアレルおよび6種類の新規を含む30種類のDQBアレルが同定された。DQA遺伝子について、51種類の既知のDQAアレルを含めてアミノ酸配列に基づく系統樹解析を行ったところ、DQA1からDQA5までの5つの遺伝子座に分類されたが、DQB遺伝子座については、既知の72種類のDQBアレルを含めた解析によっても枝分かれしなかった。次に、同定された各遺伝子の組み合わせによりDRB3-DQA-DQBハプロタイプを区分けした。その結果、11種類の既知に加えて31種類の新規ハプロタイプが同定された。次にSBT法でタイピング可能なDRB3-DQA1ハプロタイプについて、黒毛和種507頭およびホルスタイン143頭を解析し頻度を比較した。全39種類のDRB3-DQA1ハプロタイプが同定され、黒毛和種からは29種類、ホルスタインからは22種類のハプロタイプが同定された。また17種類は黒毛和種のみ、10種類はホルスタインのみ、12種類が両品種共通であった。**【考察】**本研究により同定されたBoLAハプロタイプは効果的なワクチン開発および育種戦略による抗病性家畜の作出において重要である。

P-6

Haplotype determination of upstream regulatory region and the second exon of bovine DRB3 gene

○Ripoli María Verónica¹⁾、Shin-nosuke Takeshima²⁾、
Laura Baltian³⁾、Yoko Aida²⁾、
Guillermo Giovambattista¹⁾

- 1) Institute of Veterinarian Genetics (IGEVET), CONICET
- FCV-UNLP
2) Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN
3) Dpto de Ciencias Basicas, FCV, UNLPam

Purpose : The BoLA-DRB 3 gene extended polymorphisms are located mainly in the second exon that encodes the antigen binding site (ABS) of the molecule. Additional variation has also been reported in the promoter and in the third exon. It can be hypothesized that the exon 2 and the promoter (URR) are under different types of natural selection. The aim of the present work was to determine the URR-exon 2 haplotypes of this gene.

Experiment : The URR and the exon 2 of DRB 3 gene were genotyped by Sequencing Based Typing method (PCR-SBT) in 25 DNA samples from Holstein breed. BoLA-DRB 3 alleles were identified using Assign 400 ATF ver 1.0.241 software, while haplotypes were determined by Haploview software.

Results : URR analysis evidenced three polymorphic sites, resulting in four alleles in the studied population. Furthermore, twenty-two exon 2 BoLA-DRB 3 alleles were detected. Linkage disequilibrium analysis showed that each URR alleles was associated with two to seven exon 2 variants. Only three exon 2 alleles were linked with more than one URR haplotypes.

Discussion : The obtained results could increase our knowledge about the co-evolution of two DNA sequences under different type of selection. While, the URR variations are under positive selection, the exon 2 alleles are maintained by overdominance one.

P-7

ペンギンMHC : 最も原種に近いとされるコガタペンギンのMHCクラスII DRB1様遺伝子多型

○津田とみ^{1,2)}、吉川枝里¹⁾、小見山智義¹⁾、津田道雄¹⁾、
福田道雄³⁾、栗田正徳⁴⁾、村田浩一⁵⁾、猪子英俊¹⁾

- 1) 東海大医学部 分子生命科学
2) 徳島文理大学 人間生活
3) 東京都葛西水族園
4) 名古屋港水族館
5) 日本大学 生物資源科学

【背景と目的】 昨年までの本学会で、ペンギン類6属のMHCクラスII DRB1様遺伝子の塩基配列の多型解析とそれを用いた遺伝系統などを報告してきた。アデリーペンギン属(3種)やコガタペンギン属(1種)についてはそれぞれ種に固有の遺伝子型から成り、遺伝子型から属および種を区別することができた。一方、フンボルトペンギン属(4種)では種を越えて共通の多型アリルが存在する(trans-species theory) ことが明らかになったことから、4種が比較的近縁であり、種分岐年代が若いことが推察された。

コガタペンギンは最も原種に近いとされている現存の種であり、近縁の鳥類とペンギン類の類縁関係を解く鍵となる種である。また、コガタペンギン属は一属一種とされているが、一亜種と五地域個体群の、合わせて6つのグループに分かれつつあると解釈されていることから、種の分岐の解析には重要性をもつ属である。

そのような背景から、ペンギン種の成立とMHC多様性の解析を目的として、コガタペンギンについて、エクソン2を含む1.5 kbの比較的長い領域の塩基配列を決定し、他種との比較を行った。

【結果】 コガタペンギン (*Eudyptula minor*) についてMHCクラスII DRB1様遺伝子のエクソン2を含む、5' UTR からイントロン3にいたる約1,500 bpの配列を決定した。これに加えて類縁関係のある海鳥類やその他の鳥類との比較、ペンギン類5属との比較検討した結果について報告する。

【展望】 生息数調査方法が最新の技術を導入して正確さが増すにつれ、今まで考えられていた以上にペンギン類の生息数の減少が明白になってきている。環境要因の悪化を防ぐ方策と並行して生体側の免疫能や遺伝子多様性についての正確な情報も、今後の保全に有用であると考え、我々のMHC研究成果を役立てたいと考えている。

P-8

ニホンウズラCD1遺伝子の基礎的解析

○横山佳菜¹⁾、朝治桜子¹⁾、鈴木進悟²⁾、細道一善³⁾、椎名隆²⁾、水谷豊⁴⁾、藤原哲⁵⁾、原ひろみ¹⁾、吉田豊¹⁾、半澤恵¹⁾

1) 東京農業大学

2) 東海大学

3) 国立遺伝学研究所

4) 名古屋大学

5) 日本生物科学研究所

【目的】ニホンウズラ (*Cj*) の2座位のCD1遺伝子 (*CjI.1* および *I.2*) は、ニワトリ (*Gg*) と同様にMhc領域の近傍に座位し、T細胞に脂質複合体抗原を提示するCD1抗原をコードする。本研究では、*CjI.1*~*I.2*領域の多様性およびmRNAの発現臓器について精査した。【方法】〈実験1〉11系統、321個体の*Cj*を供試し、両遺伝子の部分塩基配列に基づくアレル (AL) とそれらの組合せによるハプロタイプ (HT) を確認した。〈実験2〉*Cj*の各種臓器由来のcDNAを供試し、PCR法によりmRNAが発現している臓器を確認した。【結果】〈実験1〉*CjI.1*は2~12個のSNPs、0~8個のindelにより、*CjI.2*は2~11個のSNPsにより共に8ALに分類され、21種類のHTが推定された。各ALでもっとも頻度の高いHTは8種類であり全体の97%を占めた。〈実験2〉*CjI.1*をPCR増幅したところ、気管、脾臓、BFおよび骨髄で目的サイズにバンドを確認した。【考察】〈実験1〉各アレル間に複数の塩基置換が確認できたことから頻度の低い13HTは組換えに起因するとも考えられる。〈実験2〉*CjI.1*はリンパ組織に加え、抗原の侵入経路でも発現していることが示唆された。

P-23

ゲノムワイド関連解析によるナルコレプシー疾患感受性遺伝子の探索

○豊田裕美¹⁾、宮川卓¹⁾、Khor Seik Soon¹⁾、川嶋実苗¹⁾、山崎茉莉亜¹⁾、小池麻子²⁾、田中進³⁾、本多裕⁴⁾、本多真^{3,4)}、徳永勝士¹⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

2) 日立製作所 中央研究所

3) 東京都医学総合研究所 精神行動医学研究分野 睡眠覚醒制御プロジェクト

4) 財団法人神経研究所付属睡眠学センター

【目的】ナルコレプシーは代表的な過眠症であり、日中の強い眠気と情動脱力発作 (驚くなどの強い感情を契機とした脱力) を主徴とする。ナルコレプシーは複数の遺伝要因と環境要因により発症する多因子疾患として知られる。典型的なナルコレプシー患者の88~100%が *HLA-DQB1*0602* 対立遺伝子をもつことが報告されている。しかしながら、*HLA-DQB1*0602* 対立遺伝子は健常者でも高頻度で見られること (日本人12%、白人22%)、また、これまでの遺伝統計学的な解析からも、HLA領域以外の遺伝的素因の存在が強く示唆されている。そこで本研究では、ナルコレプシーの新たな遺伝的素因の同定を目的とし、ゲノムワイド関連解析を行った。【方法】約90万個の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism ; SNP) について、日本人ナルコレプシー患者425名、健常者1626名の遺伝子型を決定し、関連解析を行った。解析に際して、Eigenstratにより、集団階層化のより少ない均質なサンプル群を抽出した。すでに強い関連が知られている6番染色体上のHLA領域は解析から除外した。さらに、関連解析により得られた候補SNPs周辺のゲノム領域の遺伝子型を、imputationにより推定した。また、遺伝子内にあるSNPの組み合わせによるSNP-SNP相互作用を解析した。

【結果および考察】遺伝子型が決定された90万のSNPsのうち、quality controlの基準を通過したSNPsは545,144個であった。有意水準は、false positive report probabilityにより評価し、 $P = 1.47 \times 10^{-5}$ とした。Allelic trend, dominant, recessive, genotype modelのいずれかにおいて有意水準に達したSNPsを48個、20遺伝子領域同定した。また、imputationにより、元のSNPと同程度、もしくは強い関連を示すSNPsを同定した。同定した遺伝子の中には、免疫関連遺伝子のプロモーター領域で転写因子の結合に影響を与え得るSNPなどがあり、ナルコレプシーの疾患メカニズム解明に貢献できるものと考えられる。現在、候補SNPsの再現性研究のために、異なるサンプルセット (日本人ナルコレプシー) を収集している。

P-24

ナルコレプシー発症の分子機構の解明

○陳 萱容、宮寺浩子、徳永勝士
 東京大学医学系研究科 人類遺伝学分野

【目的】ナルコレプシーに対する疾患感受性はDQAI*01:02-DQB1*06:02と非常に強く関連を示すことが知られているが、その発症機序、関与する抗原ペプチドは不明である。ナルコレプシー患者では脳脊髄液中のオレキシン量が顕著に低いことから、脳視床下部のオレキシン産生細胞が発現するオレキシン、もしくはオレキシン産生細胞特異的に発現している他のタンパク質がT細胞により認識され、オレキシン産生細胞が死滅している可能性が考えられている。本研究では疾患感受性に関連するDQA1*01:02-DQB1*06:02タンパク質に対する、オレキシン産生細胞特異的なペプチドの結合能を測定することで、ナルコレプシー発症の分子機構を解明することを目的とした。

【方法】レトロウイルス発現系を用いて組換えDQAI*01:02-DQB1*06:02遺伝子を哺乳類細胞に導入した。HLA-DQの発現をフローサイトメトリーおよびドットプロット法で確認した。

【結果・考察】フローサイトメトリーにより、HLA-DQ安定発現株が得られたことを確認した。安定発現株からHLA-DQタンパク質をHisタグおよびStrepタグを用いて精製した。今後はHLA-DQの最適な精製条件を決定し、大量の精製タンパク質を得る。その後、オレキシン産生細胞由来のペプチドとの結合実験により抗原ペプチド候補を同定する。

P-25

Synthesis of positively and negatively charged cholesterol-recombinant human gelatins for the cellular uptake of proteins and immune reactions.

- Kadengodlu Pallavi Ananda^{1,3)}、
 Takeshisa Hebishima²⁾、Shin-nosuke Takeshima²⁾、
 Mika Ito¹⁾、Mingzhe Liu¹⁾、Hiroshi Abe¹⁾、
 Yoko Aida²⁾、Toshiro Aigaki³⁾、Yoshihiro Ito^{1,3)}
- 1) Nano Medical Engineering laboratory, RIKEN Advanced Science Institute.
 - 2) Viral Infectious Diseases Unit, RIKEN Advanced Science Institute.
 - 3) Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University.

Purpose : Our aim is to deliver vaccine to immune cells *in vivo* so as to enhance immune reactions. Thus we have synthesized new polymeric micelles derived from recombinant human gelatin (rhG) and cholesterol namely anionic cholesterol-modified gelatin (aCMG) and cationic cholesterol-modified gelatin (cCMG) .

Experiment : aCMG and cCMG were synthesized from cholesterol-isocyanate and amino modified cholesterol, respectively and rhG. Synthesis was confirmed by MALDI-TOF. In aqueous solution, they disperse to form micelles. FITC-OVA was complexed with the micelles. Uptake efficiency as well as uptake mechanism was demonstrated using dendritic cells (DC 2.4) . *In vivo* experiments were carried out using mice to initiate immune response.

Results : It was concluded that out of aCMG and cCMG, cCMG had the ability to be efficiently taken up by DC 2.4 cells and was also able to successfully initiate a strong immune response in mice.

Discussion : The positively charged cCMG, is able to induce efficient antibody production *in vivo* because of the combined effect of size, a strong complex formation with FITC-OVA and efficient release of the protein into the cytoplasm via a caveolin-mediated pathway that is known to avoid lysosomal degradation.

P-26

pH応答性ポリマー修飾リポソームによる 抗原特異的細胞性・液性免疫の誘導

○弓場英司¹⁾、蛇島武久²⁾、河野健司¹⁾、伊藤嘉浩³⁾、
竹嶋伸之輔²⁾、間陽子²⁾

- 1) 大阪府立大学大学院工学研究科 応用化学分野
- 2) 理化学研究所 分子ウイルス学特別研究ユニット
- 3) 理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室

【目的】 新規なワクチン開発のために、抗原を効率良く抗原提示細胞に導入し、抗原特異的免疫を誘導するためのデリバリーシステムが求められている。我々はこれまでに、カルボキシ基を有するポリグリシドール誘導体をリポソームに複合化することでpH応答性リポソームを作製した。本研究ではこのpH応答性リポソームを用いて抗原デリバリーを行い、抗原特異的免疫の誘導を試みた。

【実験】 カルボキシ基を有するポリグリシドール誘導体MGlu-HPGを複合化したリポソームにFITCラベル化オボアルブミン (FITC-OVA) を封入し、マウス骨髄由来樹状細胞と共培養し、細胞への抗原取り込み効率を測定した。OVA封入リポソームで免疫したマウス脾細胞からのサイトカイン産生および増殖能を調べた。また血清中の抗原特異的抗体をELISA法により測定した。さらにリポソームの遅延型過敏症 (DTH) 誘導能を評価した。

【結果】 FITC-OVA内包リポソームは骨髄由来樹状細胞へ抗原の取り込みを促進した。このリポソームでOVAを導入した脾細胞もしくはマウス脾臓から回収された脾細胞について、抗原特異的なIFN- γ 産生と、増殖亢進が確認された。この増殖はMHC特異的抗体によって阻害された。また、ポリマー修飾リポソームで免疫したマウスの血清からは抗原特異的な抗体が検出され、非常に強いDTH反応を引き起こすことが分かった。

【考察】 pH応答性リポソームは樹状細胞へ効率良くOVAをデリバリーすることでOVAに応答したIFN- γ 産生及びT細胞の増殖を誘導した。マウス脾細胞からも同様の応答が見られた。脾細胞の増殖がMHC特異的抗体によって阻害されたことから、これらの応答はMHCを介した免疫応答であると考えられる。マウスへのポリマー修飾リポソームの免疫によって血清中OVA抗体の増加と、強いDTH反応が確認されたことから、このリポソームは液性免疫・細胞性免疫両者を強く誘導できるものと考えられる。以上より、pH応答性リポソームは抗原特異的免疫誘導のための抗原キャリアとして有用である。

P-52

当院におけるマイクロビーズを用いた HLA抗体検査の現状

○佐藤 壯¹⁾、佐藤蘭子¹⁾、小林良二²⁾、小林直樹³⁾、玉置透⁴⁾

- 1) 社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 小児科
- 3) 社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 血液内科
- 4) 社会医療法人北楡会 札幌北楡病院 腎臓移植外科

【緒言】 造血幹細胞移植においてドナー特異的HLA抗体 (DSA) は生着不全に関与すると報告され、近年臍帯血 (CB) 等を移植源とするHLA mismatch移植が増加していることから、移植前HLA抗体検査の重要性が指摘されている。今回我々は造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植 (CBT) において一次移植CBドナー細胞に対して二次移植CBドナー細胞がHLA抗体を産生した症例を経験したので報告する。

【症例】 患者は1歳3ヶ月時にT-ALLを発症。寛解導入療法でCRとなるも再発しnon-CRの状態でのDR 8、DQ 6 mismatchのCBTを行った。DAY15で生着したが2ヶ月後に再発。再寛解導入療法を行うもPRでB62 mismatchの二次CBTを行った。DAY23で生着したが3ヶ月後に再々発。再度寛解導入療法を行い、両親のいずれかからの三次移植を想定し両親のHLA typing、患者のHLA抗体検査を行ったところ患者がClass II抗体陽性と判明した。保存血清検体で後方視的に検査を行ったところ再々発時までHLA抗体陰性であり、再々寛解療法後に抗体が産生されたことが確認された。

【考察】 HLA抗体の特異性はDQ 6、DR 8、DR13、DR12、DQ 5、DR11、DR14、DR17、DR18 (蛍光強度順) で、DQ 6とDR 8を患者は保有していないが一次移植CBは保有しており、DSAであった。HLA MatchmakerによればエピトープはDRB 1では149H、26TED、31YYF、DQA 1では47QRW、DQB 1では52PQ、84EVなどが推測された。HLA抗体検査陽性時の患者のHLAは二次移植CBと同じであったことから、再々寛解療法後二次移植後も残存していた一次移植CBと二次移植CBが共に回復し、いわばdouble unit transplantationの状態となりその過程で二次移植CBが一次移植CBに対して抗体を産生したものと推測された。この患者はDSA陰性の父親から骨髄移植を受けDAY23に生着し経過は順調である。またHLA抗体は徐々に蛍光強度が低下している。

P-53

移植患者末梢血リンパ球におけるHLA-G、HLA-Fの発現

○下嶋典子¹⁾、勇井克也²⁾、貝森淳哉³⁾、矢澤浩治³⁾、吉澤淳⁴⁾、
一戸辰夫⁵⁾、森井武志⁶⁾、長谷川淳⁶⁾、米田龍生⁷⁾、
高原史郎³⁾、上本伸二⁴⁾、吉田克法⁷⁾、Geraghty DE⁸⁾、
喜多英二¹⁾、羽竹勝彦²⁾、石谷昭子²⁾

- 1) 奈良県立医科大学 細菌学教室
- 2) 奈良県立医科大学 法医学教室
- 3) 大阪大学大学院医学系研究科 先端移植基盤医療学
- 4) 京都大学医学部 肝胆脾・移植外科
- 5) 佐賀大学医学部 内科学講座 血液・呼吸器・腫瘍内科
- 6) 奈良県立医科大学 内科学第二講座
- 7) 奈良県立医科大学 泌尿器科
- 8) Fred Hutchinson Cancer Research Center

【目的】HLA-Gは胎盤に強く発現し、母児免疫寛容に寄与していると考えられている。このような免疫寛容の機能から、近年、HLA-Gが移植片生着に寄与しているという報告が多く、移植片生着患者の血漿中や、CD4陽性T細胞、樹状細胞にHLA-Gが検出されたとされている。これが真実ならば移植医療に応用可能な重要な意味をもつ。本研究ではこれら結果の検証を行った。一方、HLA-Fは、まだその機能が解明されておらず、定常状態の細胞表面に発現しないが、活性化すると細胞表面に発現するというを我々はすでに報告している。このHLA-Fの機能解明の一環として、拒絶反応時のリンパ球におけるHLA-Fの発現の検索を行った。本研究ではこれらの目的で、腎・肝・造血幹細胞移植患者末梢血単核球におけるHLA-GおよびHLA-Fの発現を検索した。

【方法】腎移植25例、肝臓移植16例、造血幹細胞移植28例から採取した移植前、移植後の末梢血単核球におけるHLA-G、HLA-Fの発現解析を行った。

【結果】腎移植25例で、このうち1度でもHLA-G陽性細胞が検出されたのは21例、HLA-Fは17例であった。肝移植16例ではHLA-G陽性15例、HLA-F陽性15例であった。造血幹細胞移植25例では、HLA-G陽性18例、HLA-F陽性18例であった。

全移植症例のうち、肝移植において7例が拒絶、このうちHLA-Gのみ陽性1例、HLA-G、HLA-Fいずれも陽性が6例であった。また、造血幹細胞移植において1例GVHDがみられ、HLA-G、HLA-Fいずれも陰性であった。【考察】拒絶の有無に関らずHLA-G、HLA-Fの両方が発現していた症例が多いことから、それぞれが独立して発現している可能性が高い。これらの発現と詳細な臨床症状との関連について現在解析中である。

今後は、症例数を増やすと共に、血漿中のHLA-G抗原の解析を行い、これらの臨床症状との関連についても検討する予定である。

P-54

二次移植臍帯血ドナー細胞が一次移植臍帯血ドナー細胞に対してHLA抗体を産生した一例

○佐藤蘭子¹⁾、佐藤壯¹⁾、小林良二²⁾

- 1) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 臨床検査科
- 2) 社会医療法人北楡会札幌北楡病院 小児科

【緒言】造血幹細胞移植においてドナー特異的HLA抗体(DSA)は生着不全に関与すると報告され、近年臍帯血(CB)等を移植源とするHLA mismatch移植が増加していることから、移植前HLA抗体検査の重要性が指摘されている。今回我々は造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植(CBT)において一次移植CBドナー細胞に対して二次移植CBドナー細胞がHLA抗体を産生した症例を経験したので報告する。

【症例】患者は1歳3ヶ月時にT-ALLを発症。寛解導入療法でCRとなるも再発しnon-CRの状態DR8、DQ6 mismatchのCBTを行った。DAY15で生着したが2ヶ月後に再発。再寛解導入療法を行うもPRでB62 mismatchの二次CBTを行った。DAY23で生着したが3ヶ月後に再々発。再度寛解導入療法を行い、両親のいずれかからの三次移植を想定し両親のHLA typing、患者のHLA抗体検査を行ったところ患者がClass II抗体陽性と判明した。保存血清検体で後方視的に検査を行ったところ再々発時までHLA抗体陰性であり、再々寛解療法後に抗体が産生されたことが確認された。

【考察】HLA抗体の特異性はDQ6、DR8、DR13、DR12、DQ5、DR11、DR14、DR17、DR18(蛍光強度順)で、DQ6とDR8を患者は保有していないが一次移植CBは保有しており、DSAであった。HLA MatchmakerによればエピトープはDRB1では149H、26TED、31YYF、DQA1では47QRW、DQB1では52PQ、84EVなどが推測された。HLA抗体検査陽性時の患者のHLAは二次移植CBと同じであったことから、再々寛解療法後二次移植後も残存していた一次移植CBと二次移植CBが共に回復し、いわばdouble unit transplantationの状態となりその過程で二次移植CBが一次移植CBに対して抗体を産生したものと推測された。この患者はDSA陰性の父親から骨髄移植を受けDAY23に生着し経過は順調である。またHLA抗体は徐々に蛍光強度が低下している。

P-55

造血幹細胞移植後のGVH回避は体細胞変化でも起こるか？

○小島裕人¹⁾、小沼正栄²⁾、浜之上聡³⁾、二神貴臣¹⁾、
辻野貴史¹⁾、林晃司¹⁾、楠木靖史¹⁾、藤井直樹¹⁾、末上伸二¹⁾、
池田奈未¹⁾、西川美年子¹⁾、小川公明⁴⁾、赤座達也¹⁾、
佐治博夫¹⁾

1) HLA研究所

2) 東北大学医学部附属病院 小児科

3) 神奈川県立こども医療センター

4) NPO 白血病研究基金を育てる会

〔目的〕当研究所において、造血幹細胞移植後のRecipient体細胞にHLA LOH / 6 p-UPDがみられた症例を経験したので報告する。また、この症例がなぜ起きたか、臍帯血移植後に体細胞がドナー型に置き変わった症例も考慮に入れてひとつのコンセプトを提案したい。

〔材料・方法〕3rd 移植後 day 289の腫瘍細胞、Buccal、Nail、Hair。Lunimex法 (WAK Flow)、マイクロサテライト多型性検査を行なった。

Recipient : A * 24 : 02 / * 02:06, C * 01 : 02 / * 08 : 01, B * 54 : 01 / * 40:06, DRB 1 * 14 : 03 / * 15 : 01

3rd Donor (父) : A * 24 : 02 / -, C * 01 : 02 / * 08 : 03, B * 54 : 01 / * 48:01, DRB 1 * 14 : 03 / * 15 : 01

〔結果・考察〕3rd 移植後 day 289の腫瘍細胞、Buccal、HairのミスマッチHLA Class IのSignal強度はそれぞれ移植前の1%,1%,10%程度であり、LOH/6 p-UPD現象といえる。Nailにみられなかったことも考慮に入れると、程度に差はあるが、BuccalやHairがDonorのGVH攻撃を受け、(上皮)幹細胞クローンとして存在していたLOH/6 p-UPD細胞が生き残り、進化的に選択されたと考えられる。体細胞がドナー型に置き換わった症例も同様の現象が起きたと考えられ、移植におけるGVH/HVG回避を解明するブレイクスルーとなり得る。

P-66

Ion PGMシーケンサーならびにデータ自動解析法を用いたSS-SBT法の開発

○鈴木進悟¹⁾、尾崎有紀¹⁾、吉川枝里¹⁾、重成敦子¹⁾、
光永滋樹¹⁾、田中政之²⁾、林英樹²⁾、太田正穂³⁾、椎名隆¹⁾、
猪子英俊¹⁾

1) 東海大学医学部 基礎医学系分子生命科学

2) 東海大学教育・研究支援センター 情報科学部門

3) 信州大学医学部 法医学教室

【はじめに】昨年度の本学会にて、8桁レベルの超高解像度DNAタイピング法 (SS-SBT法) の開発について報告した。ところが本法はPCR反応からアリル判定までに複雑な操作過程を踏むことから、その簡略化は臨床応用に必須である。本報告では、本法の実用化に有力な次世代シーケンサーの一機種であるIon PGMを用いたシーケンシング、演者らが開発を進めているデータ自動解析法を用いたアリル判定により本法を簡略化することを目的とした。

【方法】HLA-A、-Bおよび-Cにてambiguityの認められる4検体を用いてPCR増幅させ、それら産物の塩基配列をIon PGMの316 chipを用いて決定した。その後、塩基配列データからリファレンス配列とのマッピングまでの一連の操作を自動化させたデータ解析法によりアリル判定を行った。

【結果および考察】Ion PGMにより得られた522 Mbの塩基配列データを用いた結果、全ての検体においてambiguityの認められない8桁レベルのアリルが判定された。この際、アリル間における平均重複度 (depth) の比 (アリル1の平均depth / アリル2の平均depth) は、0.98~1.06であったことから、両HLAアリルにおける塩基配列はほぼ同等のリード数でマッピングされていることが明らかとなった。さらに、データ自動解析法の使用により、これまで1サンプル1遺伝子のデータ処理に3時間を費やしていたが、わずか30分間で完了させることに成功した。したがって、Ion PGMならびにデータ自動解析法は今後のSS-SBT法に有用であると考えられた。

P-67

ロングアンプリコンシーケンスとRead-Backed PhasingによるHLA遺伝子の塩基配列完全決定

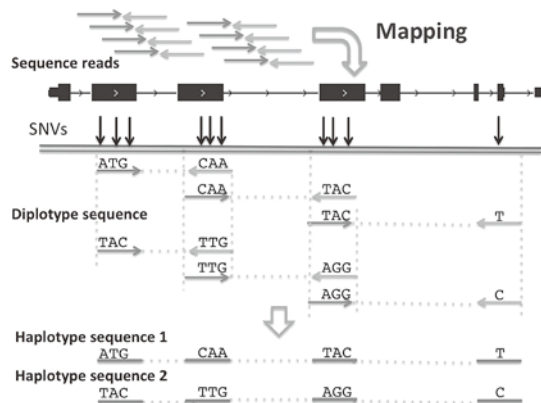
○細道一善、井ノ上逸朗

国立遺伝学研究所 人類遺伝研究部門

【目的】これまでのシーケンスによるHLAタイピング法はIMGT/HLAデータベースに依存し、次世代シーケンサーによるものであってもエクソン間の相の特定はデータベースに基づくみなしタイピングになっている。そこで、我々はHLA遺伝子のアンプリコンシーケンスから、ペアエンドの情報による物理的なハプロタイプの特異とそれに基づくHLA遺伝子配列決定の情報解析手法を確立することを試みた。

【方法】Nextera DNA Sample Preparation Kit (イルミナ)を用いて様々なインサートサイズ(約150bp~1.2kb)で構成されるライブラリを調整し、MiSeq (イルミナ)にて各150bpのペアエンドシーケンスを行った。

【結果・考察】検出されたSNVについてペアエンドの情報に基づき相を特定したところ、x200以上の冗長度で10kb以上の領域のハプロタイプを特定可能であり、挿入・欠失を含む完全なハプロタイプの塩基配列を得ることができた。決定した塩基配列をIMGT/HLAデータベースに検索することで新規および既知HLAアレルの判定も可能であった。本手法は既知のHLAアレルの塩基配列を用いず、2種類のハプロタイプ配列を決定することが可能であり、新規およびrareなHLAアレルの解析にも対応可能である。また、データベースに依存しないことから、情報に乏しい動物のMHC遺伝子の解析にも有用であろう。



P-68

HLA適合血小板ドナー約5万検体から検出したHLA型同定不能例の解析 (I)

○中島文明、清水まり恵、岡崎仁、佐竹正博、田所憲治、血液事業研究グループ

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

【目的】HLA適合血小板ドナーのHLAタイピングは、2010年4月からLuminex (SSO) 法で実施している。同じ検査法の骨髄バンクドナーでは、一定の頻度で新規HLAアレルや同定不能例が検出されているため、同様に調査・解析することとした。

【方法】2010年4月以降、全国の血液センターでタイピングされた49,168検体を調査対象とした。Luminex 法で同定不能となったDNA試料を匿名化収集し、再現性を確認した。さらに、塩基配列を決定し、新規HLAアレルの場合はWHOに登録した。

【結果】同定不能例は212例あり、その中で新規HLAアレルは17例検出された。また、同定不能の既知アレル9例、低頻度アレル (g.f. 0.1%未満) 172例、非特異反応10例、Ambiguityによる抗原型不確定4例が検出された。

【考察】新規HLAアレルの検出頻度は、約2、800例に1例であった。B*40:164、C*01:55など幾つかは、同一アレルが複数例検出され、ある程度の頻度を保って存在することが判明した。注目すべきは、A*02:15Nと同一の塩基置換によるNullアレル、A*24:183N及びA*02:356Nが検出されたことである。

低頻度アレルには、12例のC*03:23 (g.f. 0.012%)、7例のA*02:15N (g.f. 0.007%)など複数例検出されるケースと、1~2例程度のみ検出されるケースがあり、後のケースは外国人由来と思われる。非特異反応10例は、正常な塩基配列でありながら特定のプローブに生じるfalse reactionがもたらす同定不能例である。同一アレルの一部の検体にその現象が認められ、検体特有の相互作用に起因しているか今のところ不明である。

これらの成果はタイピング試薬の精度向上、今後の適合者確保に役立つ新情報として蓄積され、継続的に進める必要がある。

会員研究発表 ポスター9

P-69

HLA適合血小板ドナー約5万検体から検出したHLA型同定不能例の解析(Ⅱ) - A*02:15Nと同一の塩基置換による Null アリルについて

○清水まり恵¹⁾、中島文明¹⁾、柏瀬貢一²⁾、福森泰雄³⁾、
田中秀則¹⁾、岡崎仁¹⁾、佐竹正博¹⁾、田所憲治¹⁾、
血液事業研究グループ¹⁾

1) 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

2) 関東甲信越ブロック血液センター

3) 近畿ブロック血液センター

【目的】 HLA-AのNullアリルA*02:15Nと同一の塩基置換による別のアリルが、HLA適合血小板ドナーのHLAタイピングで、新たに2種類検出されたので報告する。

【方法】 HLA適合血小板ドナー49,168検体のLuminex (SSO) 法によるHLAタイピングにおいて、A*02:15Nの検出プローブが陽性となる2種類の判定不能検体について解析を行った。SBT法により塩基配列の確認を行った後、PCR産物のクローニングにおいて、SBT法で1本鎖DNAにより塩基配列を決定した。

【結果】 2種類の判定不能検体は、それぞれ新たなNullアリルで、A*24:183NはA*24:02:01:01と比較して、またA*02:356NはA*02:01:01:01と比較してエクソン4領域で塩基843番がCからAに置換することにより、コドン257がストップコドンTAAを形成していた。

【考察】 本解析において、A*24:183NとA*02:356Nは、A*02:15Nと同一の塩基置換であることから、Phase ambiguityが生じA*02:15N/A*24:02:01:01orA*02:07/A*24:183Nなどの場合、非発現となる抗原が特定できないことが判明した。さらに、A*02:15NはHLA適合血小板ドナーで49,168検体のうち7検体(0.007%)、骨髄バンクドナーで66,973検体のうち14検体(0.010%)が検出されたことから、日本人集団で約5千人にひとりの割合であることが推察される。

特に、骨髄バンクドナーのHLA遺伝子タイピングでは、Nullアリルを検出することは重要であるが、日常的に実施されている遺伝子によるHLAタイピングでは、すべてのNullアリルを検出することは出来ない。今後Nullアリル検出のタイピング精度の向上が必要と思われる。

第 11 回日本組織適合性学会・近畿地方会のご案内

会 期：2013 年 2 月 2 日（土） 9:30 ～ 17:00

会 場：参天製薬株式会社本社（大阪市東淀川区下新庄 3-9-19）

世話人：椿 和央（近畿大学医学部奈良病院 血液内科）

tubaki@nara.med.kindai.ac.jp

会 費：正会員 2,000 円，学生 1,000 円

共 催：財団法人 大阪腎臓バンク

抄 録：2012 年 12 月 15 日 締め切り

送付先：〒 589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

近畿大学医学部附属病院 輸血・細胞治療センター

日本組織適合性学会近畿支部事務局

金光 靖 宛

yuketsu@med.kindai.ac.jp

本会参加は、JSHI 認定技術者・指導者の新規および更新時の単位となります

● 総 説 ●

[シリーズ：臓器移植とクロスマッチ]

第1回

腎移植におけるクロスマッチ

小林 孝彰

名古屋大学大学院医学系研究科移植免疫学寄附講座

要旨: クロスマッチ, HLA 抗体検査は腎移植医療において不可欠な検査である。移植前では, ドナーに対する HLA 抗体 (DSA: Donor Specific Antibody) の有無 (そして量) を判定することで, 抗体関連型拒絶反応を引き起こすリスクの高い移植を回避することができ, また, 移植を執行する場合にはその準備 (脱感作療法) も可能となる。献腎移植は, 十分な術前検査が可能な生体腎移植とは状況が異なる。日本でも公平, 公正な臓器配分システム (臓器移植ネットワーク) が構築されている。しかしながら, 移植医療が一般的に受け入れられている欧米に比べ日本では, 登録患者に対する検査, ドナー発生時の検査において様々な課題が残されている。また, 新規に産生された HLA 抗体, とくに DSA と慢性拒絶反応との関連は数多く報告されているが, 移植後の HLA 抗体モニタリングの有用性については明らかにされていない。わが国の当面の課題として, (1) DSA 陽性移植に関するガイドラインの作成, (2) 組織適合性検査の標準方法 (マニュアル) の作成, (3) 組織適合性検査の精度管理システムの構築, (4) 献腎移植システムの改良の4つに取り組む必要がある。

1. はじめに

腎臓移植に関連した組織適合検査 (クロスマッチ, HLA タイピング・抗体検査) は必要不可欠な検査として, 各検査施設で実施されている。検査機器の技術進歩など高感度測定方法の開発により, 微量の HLA 抗体の検出, その特異性の判定が可能となり, 抗体関連型拒絶反応のリスク診断と移植適応の判定に有用な情報を提供している。また, HLA 抗体は, 急性および慢性拒絶反応, さらに予後との関連も明確になった。現在, クロスマッチ陽性などドナー特異的 HLA 抗体 (DSA: Donor Specific Antibody) 陽性移植に対して, 脱感作療法を用いて移植を実施

する症例が増加している。しかし, 移植前の検査方法の選択と結果の解釈, 移植適応判定, 脱感作療法の選択など, 施設毎に方針は異なっている。また, 移植後の HLA 抗体検査のモニタリングが, 慢性抗体関連型拒絶反応の早期診断, 治療に有効であるかについても検討が行われている。このように, HLA 抗体の詳細な解析ができるようになった現在, 移植前に組織適合性検査をどのように進め, DSA 陽性の場合にはその移植適応判断, 脱感作療法の選択, そして移植後のモニタリングの具体的な方法など, 安全かつ効果的な移植医療を提供するために明確にしなければならない課題である (表1: 課題1)。

代表者連絡先 〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65
名古屋大学大学院医学系研究科移植免疫学寄附講座
(旧 免疫機能制御学寄附講座)
小林 孝彰

電話 052-744-2303
FAX 052-744-2305
E-mail takakoba@med.nagoya-u.ac.jp

表 1 腎移植における組織適合性検査の課題

-
- 1) DSA 陽性移植に対するガイドラインの作成
 - 2) 標準方法 (マニュアル) の作成
 - 3) 精度管理システムの構築
 - 4) 献腎移植システムの改良
-

また、検査の実施方法は施設間で異なっている。とくに、市販の検査キットとは異なりメーカーによる測定方法の指示書のないクロスマッチでは、検査結果の施設間差を引き起こす可能性もある。今のところ、各検査方法において標準方法が設定されていない。統一した測定方法、判定基準で正確かつ迅速に結果を移植チームに提供するために、検査マニュアルの標準化が望まれている (表 1 : 課題 2)。

通常、臨床検査では施設内で精度管理が行われている。組織適合性検査は、病院での一般的な検査とは異なり、専門性が高く、特殊な技能、技術を要する。日本組織適合性学会では、HLA 検査技術者や組織適合性指導者の認定制度を実施している (<http://jshi.umin.ac.jp/certification/index.html>)。また、施設間での比較検討による精度管理は不可欠であり、現在、日本組織適合性学会主催で QC ワークショップ (Quality Control Workshop) が実施され、HLA タイピング、HLA 抗体検査の精度管理が行われている (<http://jshi.umin.ac.jp/qcws/index.html>)。しかし、造血幹細胞移植、輸血、臓器移植領域では必要とされる検査レベルが異なり、様々なニーズに応える事は困難である。臓器移植領域では、実際の業務通りの QC テストではないこと、検査施設の認定制度が存在しない (義務になっていない) ことから、関連する検査施設全てが参加していない状況となっており、早急な対策が望まれている (表 1 : 課題 3)。

最後に、日本の献腎移植システムの課題である。臓器移植ネットワークは 1995 年に発足し、移植全臓器を公平に分配する組織として大きな役割を担っている。システムの整った欧米と比べ改善すべき点が 2 つある。登録患者全員に対する事前 PRA (Panel Reactive Antibody) 検査、すなわち HLA 抗体スクリーニングと、もう一つはドナー発生時の高感度クロスマッチ (Flow cytometry クロスマッチ) の実施であり、安全な移植医療の提供という観点から早急に対策を

講じなければならない課題である (表 1 : 課題 4)。

2. 組織適合性検査

輸血、妊娠、移植などでは、非自己として認識され、多型性に富む HLA に対する感作 (免疫反応) により抗体が産生され、臨床の細胞、組織、臓器移植に大きな影響を与えている¹⁾。

腎移植では、ドナーに対する HLA 抗体が存在すれば、移植後グラフトの血管内皮細胞に発現する HLA と抗原抗体反応を起こし、補体、凝固系が活性化し、血小板凝集による血流障害を引き起こす。そして、最終的にはグラフト機能廃絶に陥る。そのため、移植前の抗体検査は、腎移植医療において不可欠な検査として広く行われている。抗体検出方法として、クロスマッチと PRA 検査、マイクロビーズを用いた検査がある²⁾。

クロスマッチは、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する検査であり、PRA は Panel Reactive Antibody の略であり、ランダムに選んだ不特定のリンパ球のうち何 % に反応するかを示す (表 2)。血清中の HLA 抗体が反応する抗原の種類が多くなるとこの値が高くなり、

表 2 組織適合性検査に関する略語

-
- > CDC (Complement Dependent Cytotoxicity : 補体依存性細胞傷害)
 - > LCT (Lymphocytotoxicity Test, Lymphocyte Cytotoxicity Test : リンパ球 (細胞) 傷害試験)
 - > AHG (Anti-Human Globulin : 抗ヒトグロブリンによる反応増強)
 - > PRA (Panel Reactive Antibody : パネル反応性抗体)
 - > XM (Crossmatch : クロスマッチ)
 - > CDCXM (CDC クロスマッチ), LCTXM (LCT クロスマッチ)
 - > FCXM (Flow Cytometry Crossmatch : フローサイトメトリークロスマッチ)
 - > DSA (Donor Specific Antibody : ドナー特異的抗体)
 - > NDSA (Non-Donor Specific Antibody : ドナー非特異的抗体)
 - > LATTM, QuickScreen[®], B-Screen[®] (ELISA による HLA 抗体検査)
 - > Flow PRA[®] (Flow cytometry による HLA 抗体検査)
 - > LABScreen[®], WAKFlow[®] (Luminex による HLA 抗体検査)
-

(日本で利用可能な測定キット名も記載した)

移植には要注意とされる。抗体が反応する HLA 型をもつドナーからの移植は拒絶反応のハイリスクであり禁忌とされるため（脱感作療法を用いて移植を実施する場合もある）、抗体の特異性判定が必須となる。

判定方法は、従来は CDC（補体依存性細胞傷害）、または LCT（リンパ球（細胞）傷害試験）と呼ばれる方法を用いて行った。血清とリンパ球を反応させた後にウサギ補体による細胞傷害の程度をエオジンなどの色素を用い判定した（色素排除試験）。一般的に、Class I の発現する T リンパ球、Class I, II の発現する B リンパ球が用いられている。この方法は感度が低い欠点があり、感度を高める目的で抗ヒトグロブリン抗体（AHG: Anti-Human Globulin）が用いられている。現在では、フローサイトメトリーを用いた、さらに高感度の検出法（FCXM）が一般的に用いられている。CDC では抗体接着および補体活性化の両方を加味した判定が可能であるが、FCXM では抗体の接着のみを判定することになる。CDC では、DTT の IgM 処理により IgG, IgM 抗体を判別していたが FCXM では二次抗体に抗ヒト IgG 抗体、IgM 抗体を用いることで判別が容易である。

細胞をターゲットにした方法では、抗体が細胞のどの抗原に反応しているか判定できない。HLA 抗体検査として、細胞由来の様々な型の HLA をコーティングしたマイクロビーズを用いる検査方法が開発され、HLA 抗体のスクリーニング検査が可能となった。細胞を用いた抗体検査では、血小板吸着の有無により Class I 抗体と Class II 抗体を区別していたが、Class I 用および Class II 用のマイクロビーズを用いることで容易に判定が可能となった。さらに、単一の型のリコンビナント HLA をコーティングしたマイクロビーズ（SAB: Single Antigen Beads）も開発され、HLA 抗体の特異性を詳細かつ正確に判定可能となった。そして、蛍光色素で区別可能な 100 種類のマイクロビーズを用いる Luminex システムを応用することで、迅速かつ効率的な HLA 抗体検査が可能となった。

各検査方法の標準方法など検査マニュアルの詳細については、日本移植学会および日本組織適合性学

会の共同作業部会にて、HLA 検査に関するガイドラインを作成中であり、関係各所の承認が得られたら日本組織適合性学会のホームページなどを通して公開する予定である。

3. 腎臓移植におけるクロスマッチ、HLA 抗体検査

クロスマッチが臓器移植（とくに腎臓移植）では不可欠な検査であることを最初に報告したのは、Dr. Terasaki らによる（表 3）³⁾。腎移植直後にグラフト廃絶に陥ったのは、クロスマッチ陽性 30 例中 24 例（80.0%）であったのに対し、陰性 195 例のうち 8 例（4.1%）しかグラフトは廃絶しなかった。腎移植においてクロスマッチは術前に行うべきであり、陽性例は移植すべきでないことを強く主張した。当時は、十分な HLA のタイピングができなかった時代であり、クロスマッチ検査の導入により、抗体関連型拒絶反応による移植後早期のグラフト喪失が減少した。1964 年に開発された Terasaki トレイは、HLA のタイピングにも幅広く用いられ、国際ワークショップなど抗血清を共有することで世界共通の HLA 抗原が同定された。1990 年代からは、HLA タイピングは血清による細胞傷害テスト（LCT）から、DNA タイピングに移行し、正確かつ詳細な分類が可能となった。

腎移植後の急性拒絶反応（主として T 細胞性関連型拒絶反応）が多く（40-50%）観察される 1980、1990 年代には正確な HLA タイピングと適合度が移植後に影響を与えた。2000 年代になり、新しい薬剤の開発など免疫抑制療法の進歩に伴い、T 細胞性拒絶反応は激減し（10%）、移植成績は向上した（5

表 3 PRA, クロスマッチと腎移植直後グラフト機能廃絶との関連

	既存抗体（PRA）			
	陽性			陰性
	クロスマッチ			
	陽性	実施せず	陰性	
移植直後のグラフト廃絶	24/30 (80.0%)	6/23 (26.1%)	4/27 (14.8%)	4/168 (2.4%)

(Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. Patel R, Terasaki PI. N. Engl. J. Med. 1969; 280: 735-9 より引用, 改変)

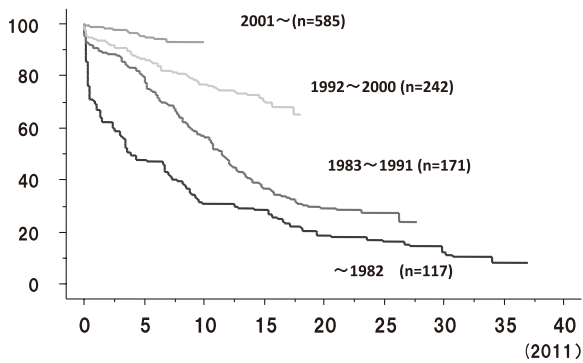


図1 名古屋第二赤十字病院における生体腎移植成績 (n=1115)

年生着率は97%) (図1)。現在は、抗体関連型拒絶反応の対応が、患者の予後を左右する時代となった。直接ドナー細胞との反応する抗体の有無をチェックするクロスマッチは抗体関連型拒絶反応の防止にはとても重要な検査である。CDCクロスマッチの問題は、感度が低い、自己抗体などの影響(とくにB細胞クロスマッチ, IgM抗体)という欠点を持つが、メリットは補体活性化も加味した解析、つまり抗体自身に補体活性化する能力が高いかどうかとも判別可能という点である。そのため、CDCクロスマッチを、移植の適応基準として用いている施設が多い。FCXMは、感度が高いため、微量の抗体を検出でき、IgG, IgMを容易に区別するメリットがあるが、B細胞をターゲットとする場合に、Fc receptorの影響で非特異的な反応(抗体の接着)を引き起こし解析が困難となること、補体活性化については考慮されない欠点がある。Fc receptorについては、Pronase処理にてFc receptorを切断することにより非特異的の反応を軽減することが可能となったが⁴⁾、HLAの発現レベルに影響するためクロスマッチ結果に影響を及ぼす可能性も示唆された⁵⁾。

Luminexは、SABを用いた抗体解析を容易にした。現在ではほとんどの施設でHLA抗体特異性検査に用いられている。このSABを用いた方法は微量のHLA抗体の検出を可能としたが、臨床的に意義のない(予後に影響を与えないレベルの)抗体も含まれる新たな課題をもたらした。

4. 高感度測定方法の課題

マイクロビーズを用いた検査の問題点、臨床応用への改善点も指摘されている(表4)。第1に、マイクロビーズにコーティングしてある単一の抗原(single antigen)型の中には、日本人に比較的多いHLA-A*02:07, A*26:03, B*55:02, DRB1*08:03, DRB1*13:02, DRB1*08:02, DRB1*04:06が作成されていないことである。海外メーカーでは、対応が困難かもしれないが、single antigen beadsの種類を増やす努力をしていただきたい。ただ、2桁レベルでも判定可能であるので、現状では大きな問題はない。第2に、定量性の問題である。HLA抗体の量は臨床的には重要であるが、機器による差、測定者による差は存在し、検査値が標準化されていない現状では、精度の高い定量性は望めない⁶⁾。標準化の一つの方法としてMESF(Molecules of Equivalent Soluble Fluorochrome)⁷⁾が提案されているが、現在は、MFI(Mean Fluorescence Intensity)で表示する報告が多い。第3に、変性した(denatured)HLA分子に対する反応が認められることである。このような抗体は、マイクロビーズには反応しても、リンパ球に発現する抗原には反応しない⁸⁻¹⁰⁾。その一部は、自然抗体であるとも考えられている^{11,12)}。SAB解析結果とFCXMとの乖離が見られる場合には、この可能性がある。

第4に、IgM抗体による阻害がある。通常、IgG抗体が臨床的に意味があると判断しIgG抗体のみを測定している。稀に、IgM抗体が多く存在すると、IgG抗体の接着を阻害して本来の値よりも低めに測定されることがある^{13,14)}。同じように、最近では補体(C1)が二次抗体の接着を阻害して、正確な抗体量を検出できないProzone Effectが報告されてい

表4 Luminex SAB (Single Antigen Beads) 解析の課題

- 1) 日本人に多いHLA型のSABがない
- 2) 標準化されていない(MESF?)
定量性? MFI > 20,000は頭打ち
- 3) Denatured(変性)抗原に反応 自然抗体の一部も含まれる?
- 4) IgMによる阻害
- 5) Prozone効果(C1による阻害)
対応→ DTT, EDTA, 熱処理

表5 HLA 抗体の臨床的意義を明確にするための課題

- 1) 拒絶反応を引き起こす抗体レベル
- 2) IgG subclass (IgG1, 3>IgG2, 4)
- 3) C1q 接着
- 4) Class I (A, B, C), Class II (DR, DQ, DP)
- 5) Accommodation
- 6) Harmful/Harmless Ab?
- 7) 吸着の問題 (DSA より NDSA が検出されやすい)
- 8) nonHLA, 内皮細胞抗体の関与

る¹⁵⁾。本来の値よりも、かなり低い値で測定されるので要注意であるが、FCXM ではそのような阻害効果は見られないので、判別は可能である。対策として、検体の DTT 処理, EDTA 処理, 熱処理 (補体不活化) がある。

HLA 抗体の臨床的意義を検討するにあたり、様々な課題に取り組んでいる (表5)。高感度測定により微量の DSA が検出されるようになり、拒絶反応など予後に影響を与える抗体レベルを詳細に検討する必要がある。DSA が全て同じように予後に影響するのではないことから、IgG のサブクラス (IgG1, 3 は補体活性化する能力が高く、逆に IgG2 は低く、IgG4 は補体をほとんど活性化しないとされている) を解析したり¹⁶⁾、C1q の接着量を評価して¹⁷⁾、拒絶反応と関連性を検討している。また、ターゲットとなる抗原、すなわち Class I である A, B, C, Class II である DR, DQ, DP において、抗体接着後の細

胞傷害を起こしやすさに違いがあるかどうか¹⁸⁻²¹⁾、Accommodation (臨床の ABO 不適合移植で観察されるように、血漿交換などで移植前に抗ドナー抗体量を減少させて移植すれば、その後抗体価が上昇してもグラフトは拒絶されない状態) をグラフト内皮細胞が獲得している可能性²²⁻²⁴⁾ など、グラフトに反応する DSA でも傷害性のある抗体と傷害性ない抗体の鑑別は、治療の必要性を考慮する上で重要である。さらに、移植後には、DSA はグラフト (内皮細胞) に吸着されるため、NDSA のみが先に検出される^{25,26)}。早期に、DSA 産生を検出できるアッセイの確立が課題である。HLA 以外の抗体として、抗内皮細胞抗体、MICA, angiotensin type 1 receptor などに対する抗体も拒絶反応との関連が報告されており、内皮細胞を用いたクロスマッチ検査の有用性が報告されている^{27,28)}。

5. 生体腎移植前の組織適合性検査

生体腎移植前には、抗体検査を確実にを行い、正確な評価を行うことが重要である。緊急の移植ではないので、十分な時間をかけて検査を行う余裕がある。

名古屋第二赤十字病院の例を示す (図2)。全例に対して、HLA-DNA タイピング (A, B, DRB1 は全例, DQB は限定)、クロスマッチ (CDCXM-T, WB, AHG-CDCXM, FCXM-T, B), HLA 抗体スクリーニング (Flow PRA) を実施している。

CDCXM-T が陽性であり、HLA 抗体陽性であれば、

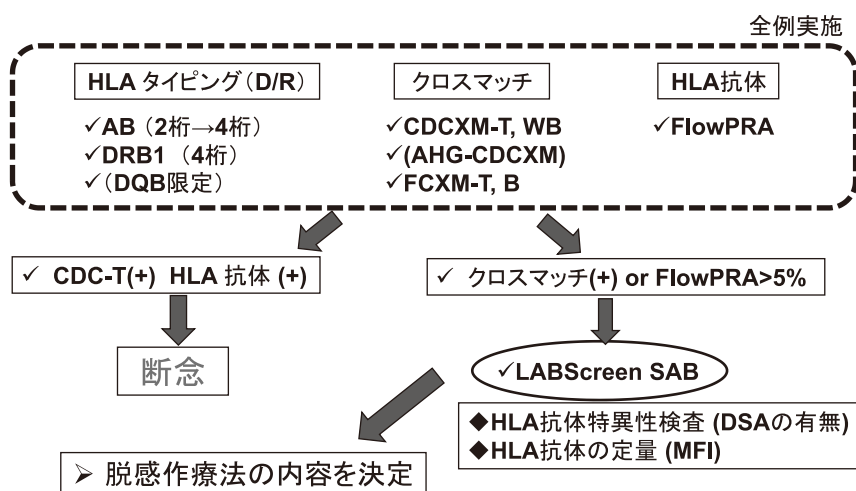


図2 生体腎移植の組織適合性検査の流れ (名古屋第二赤十字病院)

移植は断念する。CDCXM-T 以外のクロスマッチ陽性または FlowPRA>5% であるならば、さらに DSA の有無を LABScreen SAB を用いて行う。クロスマッチ陽性レベル (FCXM-T, B), DSA の量を評価して、脱感作療法の内容を決定している。

DSA 陽性移植, ABO 血液型不適合移植で用いられる脱感作療法は、通常の移植での免疫抑制療法に追加して、リツキシマブ (100–200 mg, 1–2 回), (二重濾過) 血漿交換 (2–4 回), 移植 1 から 4 週間よりミコフェノール酸モフェチル (MMF) の投与がある。ウイルスキャリアなど B 型肝炎の増悪の危険性がありリツキシマブを使用できない場合には、脾臓摘出を行う。それらの投与量, 回数で脱感作療法の強さを決めている。さらに, IVIG (免疫グロブリン静注療法), ボルテゾミブ投与が行われる場合もある。

最近では、移植前検査で全例に SAB による HLA 抗体の解析と特異性検査を行い, DSA の有無と量に関する結果を解析し, クロスマッチ検査を参考にして移植適応, 脱感作療法の選択を行う施設もある。クロスマッチ陰性レベルでも DSA 陽性は検出可能であり, 後述する FCXM 陰性 DSA 陽性症例に処置が必要な場合には有効な検出方法である。しかし, 全例の SAB による解析には, 高額のコスト (3–5 万円) が必要となる。

DSA 量と予後との関係については, 欧米で調査が行われている。抗体価は, 高い方から, (A) CDCXM 陽性レベル, (B) CDCXM 陰性 FCXM 陽性レベル, (C) FCXM 陰性 DSA 陽性レベルの三分類されている (図 3)。

予後については, アメリカでは 5 年生着率が (A) 67%, (B) 77%, (C) 91%²⁹⁾, イギリスでは, (A) 46%, (B) と (C) は 89% と報告されている³⁰⁾。また, 全米の腎移植実施施設調査では, 返答のあった 125

抗体レベル		CDCXM	FCXM	DSA	
高い	(A)	(+)	(+)	(+)	移植適応?
↑ ↓	(B)	(-)	(+)	(+)	長期予後?
低い	(C)	(-)	(-)	(+)	脱感作療法?

図 3 DSA (HLA 抗体) 量, クロスマッチ結果による分類

施設 (84% の生体腎移植例を含む) のうち, (A) は 18% の施設, (B) は 51% の施設, (C) は 70% の施設が実施すると回答している³¹⁾。この数字は, 2010 年にわが国の共同作業部会が実施したアンケート調査 (81 施設より返答) の結果 ((A) は 16% の施設, (B) は 47% の施設, (C) は 67% の施設が実施すると返答) とほぼ一致している。今後, DSA 陽性移植ガイドライン作成にあたり, これらの詳細な解析が必要となる。

6. 献腎移植における組織適合性検査 (欧米)

献腎移植でも基本的には生体移植と同じ検査が必要である。異なるのはドナー発生時には緊急検査を行い, 良好な予後が期待される (公平, 公正な) レシピエント選択を行わなければならないことである。そのためには, 登録 (待機) 患者全員に対して, 事前に HLA 抗体検査を継続的に実施することが必要となる。世界では, 移植結果を詳細に解析し, 選択基準の改正が重ねられている。日本でも 2011 年 3 月から改正されたレシピエント選択基準が用いられている (http://www.jotnw.or.jp/jotnw/law_manual/pdf/rec-kidney.pdf)。

海外との共通する特徴は, 登録患者の待機期間, HLA 適合度, 地域性を重視していることと小児優先制度である。さらに, 欧米では, 過去の移植 妊娠 輸血により HLA に感作されている (PRA 陽性) 患者は, ドナーに対するクロスマッチが陽性である可能性が高く (移植を受けられない), 適合するドナーがみつければ優先的に配分されるシステムがある。公平な移植臓器配分という概念に基づき制定された。具体的には, アメリカでは CPRA (calculated PRA: 患者の HLA 抗体特異性解析結果と HLA の出現頻度に関する全米のデータベースに基づいて, クロスマッチ陽性となる確率を計算) が 80% 以上となれば, HLA に高度に感作された患者と認定されポイントが加算される (http://optn.transplant.hrsa.gov/PoliciesandBylaws2/policies/pdfs/policy_7.pdf)。HLA 抗体ミスマッチの存在しないドナーの発生時には, 配分されやすくなる。EuroTransplant でも同様に PRA が 85% 以上であると Acceptable Mismatch システム (HLA matchmaker を利用して,

受け入れ可能な HLA 型を事前に特定しておき、適合するドナー発生時には優先的に配分)が運用されている (<http://etrl.eurotransplant.org/cms/index.php?page=amprogram>)。

このような HLA に感作された患者を安全に選択するためには、登録患者全員の HLA 抗体スクリーニングと陽性例に対する正確な特異性判定が必要であり、受け入れ不可能な unacceptable HLA 型を事前に特定しておくこと、そしてドナー発生時には緊急にドナーの正確な HLA タイピングが不可欠となる。最近では、HLA-A, B, DR, DQ だけでなく Cw, DP に対する抗体も予後に影響するとされ、これらのタイピングも推奨されている。登録患者の HLA 抗体とドナー HLA タイピング結果から、理論上(仮想)のクロスマッチ(バーチャルクロスマッチ)により、移植臓器配分が決定される。もちろん、移植直前には、原則として全例に、FCXM (T および B) などの高感度のクロスマッチを実施している。

一方、登録患者に HLA 抗体が存在しないと判明していれば、移植直前のクロスマッチ検査を省略している施設も存在する(念のため、移植後には検査を実施している)³²⁻³⁶⁾。このようにクロスマッチを省略することで、総虚血時間の短縮により、移植腎の傷害(虚血再灌流傷害)が減少し、移植後透析期間が短縮されるなど医療費の軽減につながる。

重要なことは、HLA 検査施設が患者の感作状況を把握して、HLA 抗体情報を正確に記録しておくことである。状況により年に3-4回の HLA 抗体検査を実施している施設もある。移植医とこれらの情報を共有しておき、必要時には組織適合性に関する専門家に24時間コンサルトが可能なシステムとなっている。

7. 献腎移植における組織適合性検査(日本)

日本には、欧米のような洗練されたシステムがなく、まずは微量の HLA 抗体によるクロスマッチ陽性例を正確に判定できるシステムの構築が必要である。上述したように、2011年より新しい基準で腎臓移植患者が選択されるようになったが、臓器移植を数多く実施している欧米のシステムと比較して改善すべき課題が2つある。一つは、事前 PRA 検査

であり、もう一つはドナー発生時のフローサイトメトリークロスマッチである。これらは、抗体関連型拒絶反応のハイリスクを除外し、予後の良好なレシピエントの選択には必須事項として、欧米では実施されている。しかし、わが国では今回の見直し基準(2011年3月より改正)でも、これらは盛り込まれず、実施は都道府県(地域)の HLA 検査センターにより判断され、地域による格差が生じている。現在の日本では低力価のドナー特異的 HLA 抗体(DSA)の検出を見逃し、抗体関連型拒絶反応を引き起こす危険性の高いレシピエントを除外できない可能性があり、早急な対策が望まれる。

共同作業部会の2010年の移植施設に対するアンケート調査によると、FCXM を実施しているのは、生体腎移植で88%、献腎移植で41%であり、事前に HLA 抗体検査(スクリーニング)を実施しているのは生体腎移植で90%、献腎移植で50%であった。生体移植で実施されていることが、献腎移植では行われていない、つまり移植前の検査レベルが生体腎と献腎移植では大きく異なることが判明した。さらに、2011年の献腎移植実績調査では、主要 HLA 検査センター10施設のうち6施設はFCXM を実施していたが、4施設はCDC-XM のみの実施であった。FCXM を実施した6施設のうち、2施設はFCXM-T のみであり B 細胞を実施していなかった。登録患者全員に対する HLA 抗体スクリーニングは6施設が実施、4施設は実施していなかった。しかし、ポイントにより上位リストに選ばれた4-5名のみ HLA 抗体検査(FlowPRA)をクロスマッチと同時に実施する施設もあった。登録患者の2%にも満たない患者しか移植できない状況では、登録患者全員の HLA 抗体検査は効率的ではない。ドナー発生時の慌ただしい中で、クロスマッチと同時に(上位に選択された患者のみ) HLA 抗体検査が可能であれば、現実的な対策かもしれない。しかし、将来の移植数増加には対応できない。

今回のレシピエント選択基準の改正における付帯事項として「新ルール実施後1年を目途に運用状況について検討し、PRA 検査についても適宜検討し、必要があれば基準の見直しを行う」と記載されている。海外の移植システムで常識となっている登録患

者全員に対する PRA 検査およびドナー発生時の高感度クロスマッチをわが国の献腎移植システム（臓器移植ネットワーク）に導入する是非について早急に検討すべきである。

8. 移植後のモニタリング

今までに、多くの論文で DSA と抗体関連型拒絶反応の関連が証明されてきた³⁷⁾。しかし、移植後の定期的なモニタリングの意義については明確にされていない。移植後 1 年まで、10d, 20d, 30d, 2M, 3M, 6M, 1Y と定期的に HLA 抗体検査を実施し、de novo HLA の検出は急性拒絶反応発現と同時か、その後であり、移植後 HLA 抗体スクリーニング検査の意義は認められなかった³⁸⁾。

慢性抗体関連型拒絶反応では、腎機能悪化（Cr 上昇、タンパク尿）が見られる前に診断し、治療することが望まれる。定期的な HLA 抗体モニタリングが、慢性拒絶反応の早期診断に有効であるか検討する必要がある。つまり、どれくらいの頻度で、どの患者に対して（または全例に）検査を行い、結果をどのように判定し、治療に結びつけるかを明らかにし、Cost Effectiveness 解析に基づく有用性の評価を行わなければならない。

2010 年アンケート調査では、移植後全例にモニタリングを行っているのは、86 施設中 6 施設のみであった。検査費用が高額であり、保険適用になっていない問題もあり、ほとんどの施設では全例モニタリングを実施せず、拒絶反応発現（疑い）時など必要に応じて検査を行っているというのが現状である。

また、すべての DSA が拒絶反応を引き起こすのではないことは報告されている。抗体のターゲットとなる抗原の種類（Class I と II の違い、DRB と DQB の違い）と量、そして抗体（IgG）サブクラスにより反応性が異なる可能性がある。私どもは年 1 回の Follow-up 患者全員に対する抗体検査（モニタリング）を行い、DSA が検出されれば、腎機能悪化の見られない患者に限定して腎生検を実施し、病理組織の結果により免疫抑制強化または拒絶反応治療を行う臨床研究を実施中である。今のところ、DSA が検出されて行った腎生検で慢性拒絶反応の

所見がみられたのは約 3 割にすぎない。ただ、DSA 陽性で病理所見の見られない症例も綿密な経過観察は必要と考えている。

9. わが国の組織適合性検査の課題：

ネットワークに望むこと、改善すべき点

移植医療では組織適合性検査の結果により、移植の適否、レシピエント選択、治療方法が決定される。患者の一生を左右する重要な検査である。このような検査がはたして正確に行われているか、施設間に差はないか、検査の精度管理は十分に行われているか、総合的な評価が必要なのは言うまでもない。また、一般の臨床検査とは異なり組織適合性検査は特殊検査であるため、標準方法を記載した検査マニュアルが必要である。しかしながら、現状では、このような臓器適合性検査のガイドライン、検査マニュアルは存在しない。現在、共同作業部会にて検査マニュアルを作成中であり、近日中に日本組織適合性学会の HP などで公開する予定である。

QC テストに関しても、わが国は欧米ほど充実していない。アメリカでは、病院の検査データに大きな施設間差があることが判明したため、1988 年に臨床検査室改善法（CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendments）が制定され、検査手技マニュアル、精度管理が徹底された。すべての臨床検査室は、CLIA certificate を取得しなければならない。このライセンス取得のために毎年、Proficiency Test（検定試験）を受けるのが一般的である。CAP サーベイは、米国病理学会（CAP: College of American Pathologists）により毎年実施されている国際的な精度管理プログラムであり、700 以上の検査項目を網羅し検査室の質の向上と維持に役立っている。日本では、NPO 法人日本臨床検査標準協議会が、国際標準化機構（ISO15189）に基づき、臨床検査の標準化と質的改善に取り組んでいるが、厚労省がこの国際規格による認定プログラムの義務化を打ち出していないので、全国で 60 施設程度しか認定を受けていない。

組織適合性検査に関して検定試験を実施しているのは、CAP、AFDT（American Foundation for Donation & Transplantation）、ASHI（American Society for

Histocompatibility and Immunogenetics : アメリカ組織適合性学会)などの非営利団体である。CAPでは、HLA タイピング、抗体スクリーニング、特異性解析の他に、血清と分離したリンパ球を用いたクロスマッチ検査を年3回実施している (http://www.cap.org/apps/cap.portal?_nfpb=true&_pageLabel=accreditation)。AFDTでは、Histocompatibility Testing Programが1969年からスタートし、現在では、年3回のClass I, II typing (serology, DNA)、年2回のクロスマッチ (血清5種類×細胞2種類)、PRA、HLA抗体の特異性検査を実施している (<http://www.amfdt.org/profic.aspx>)。細胞は全血 (ACD液入り)を用いている。これらの参加費用はAFDT memberは年間1000ドル、non-memberは1700ドルである。全血を検体として送付するので細胞分離方法、検体取り扱いの確認もできる。80%以上のコンセンサスが得られたサンプルのみ評価の対象とし、正答率が80%以下であれば、検査室として改善対策をとらなければならない。計画書の提出、コンサルタントの受け入れ、追加テストの実施などを行わなければならない。ASHIでも、検定試験を実施している (<http://www.ashi-hla.org/lab-center/pt-program/>)。年2回抗体スクリーニングと特異性同定、クロスマッチである。クロスマッチは、血清5種類と細胞2種類であり、全血をサンプルとして用いている。一般的な臨床検査全てを扱うCAPでは、クロスマッチは、同一の血清とリンパ球を送付して実施しているが、臓器移植を中心に行っているAFDT、ASHIでは、より実践的に、血清と全血 (ACD液入り)を配布し、リンパ球分離技術も評価の対象としている。EuroTransplantにおいても、検定試験を実施しており、年4回のHLAタイピング、クロスマッチ、年2回の抗体スクリーニングが含まれる (<http://etrl.eurotransplant.org/cms/index.php>)。

わが国では、日本組織適合性学会が、年1回HLA-QCワークショップを実施している。HLA-DNAタイピングと抗体検査、クロスマッチ (仮想)である (<http://jshi.umin.ac.jp/qcws/index.html>)。参加費は、6000円であり、HLA-DNAタイピング、抗体検査を含む。臓器移植に特化した検査ではないことから、より実践的なQCテスト (全血サンプルの

送付など)が望まれる。また、組織適合性検査施設の1/3は参加していない。欧米のように検査施設が毎年認定を受けなければならない制度となれば、参加施設が増加するであろう。厚労省と日本組織適合性学会には検討をお願いしたい。

10. おわりに

腎移植成績のさらなる向上のために、医療現場では移植チームとして、移植医と検査室の密接な情報交換は不可欠である。そして、全国のどこでも同じレベルの医療を提供できるように、安定したシステムの構築が急務である。厚労省、臓器移植ネットワーク、学会 (移植学会、臨床腎移植学会、組織適合性学会など)の緊密な連携による強力な指導体制が望まれる。検査の保険適用についても、議論すべき課題の一つである。移植に携わるもの全員が協力して、より安全、効果的な移植医療を提供していかなければならない。

引用文献

- 1) Scornik JC, Meier-Kriesche HU: Blood transfusions in organ transplant patients: mechanisms of sensitization and implications for prevention. *Am J Transplant* (11): 1785–1791, 2011.
- 2) Bray RA, Tarsitani C, Gebel HM, et al.: Clinical cytometry and progress in HLA antibody detection. *Methods Cell Biol* (103): 285–310, 2011.
- 3) Patel R, Terasaki PI: Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* (280): 735–739, 1969.
- 4) Vaidya S, Cooper TY, Avandsalehi J, et al.: Improved flow cytometric detection of HLA alloantibodies using pronase: potential implications in renal transplantation. *Transplantation* (71): 422–428, 2001.
- 5) Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA, et al.: Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Hum Immunol* (72): 330–336, 2011.
- 6) Archdeacon P, Chan M, Neuland C, et al.: Summary of FDA antibody-mediated rejection workshop. *Am J Transplant* (11): 896–906, 2011.

- 7) Schwartz A, Gaigalas AK, Wang L, et al.: Formalization of the MESF unit of fluorescence intensity. *Cytometry B Clin Cytometry* (57): 1–6, 2004.
- 8) Jacob EK, De Goey SR, Gandhi MJ: Positive virtual crossmatch with negative flow crossmatch results in two cases. *Transpl Immunol* (25): 77–81, 2011.
- 9) Poli F, Benazzi E, Innocente A, et al.: Heart transplantation with donor-specific antibodies directed toward denatured HLA-A*02:01: a case report. *Hum Immunol* (72): 1045–1048, 2011.
- 10) Pereira S, Perkins S, Lee JH, et al.: Donor-specific antibody against denatured HLA-A1: clinically nonsignificant? *Hum Immunol* (72): 492–498, 2011.
- 11) Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vázquez LA, et al.: “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* (86): 1111–1115, 2008.
- 12) 佐治博夫：[シリーズ：各臓器移植についての拒絶反応の解説・移植の新しい治療法の紹介] 第4回 移植における液性免疫制御の重要性とHLA血清学—直接クロスマッチからHLAタイプ&スクリーンへ—。 *MHC* (18): 31–46, 2011.
- 13) Kosmoliaptsis V, O’Rourke C, Bradley JA, et al.: Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum Immunol* (71): 45–49, 2010.
- 14) Zachary AA, Lucas DP, Detrick B, et al.: Naturally occurring interference in Luminex assays for HLA-specific antibodies: characteristics and resolution. *Hum Immunol* (70): 496–501, 2009.
- 15) Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M, et al.: HLA antibody specification using single-antigen beads—a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* (92): 510–515, 2011.
- 16) Lobashevsky A, Rosner K, Goggins W, et al.: Subtypes of immunoglobulin (Ig)-G antibodies against donor class II HLA and cross-match results in three kidney transplant candidates. *Transpl Immunol* (23): 81–85, 2010.
- 17) Yabu JM, Higgins JP, Chen G, et al.: C1q-fixing human leukocyte antigen antibodies are specific for predicting transplant glomerulopathy and late graft failure after kidney transplantation. *Transplantation* (91): 342–347, 2011.
- 18) Süsal C, Döhler B, Opelz G: Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Collaborative Transplant Study report. *Hum Immunol* (70): 569–573, 2009.
- 19) Mujtaba MA, Goggins W, Lobashevsky A, et al.: The strength of donor-specific antibody is a more reliable predictor of antibody-mediated rejection than flow cytometry crossmatch analysis in desensitized kidney recipients. *Clin Transplant* (25): E96–102, 2011.
- 20) Kobayashi T, Maruya E, Niwa M, et al.: Significant association between chronic antibody-mediated rejection and donor-specific antibodies against HLA-DRB rather than DQB in renal transplantation. *Hum Immunol* (72): 11–17, 2011.
- 21) Ntokou IS, Iniotaki AG, Kontou EN, et al.: Long-term follow up for anti-HLA donor specific antibodies postrenal transplantation: high immunogenicity of HLA class II graft molecules. *Transpl Int* (24): 1084–1093, 2011.
- 22) Dehoux JP, Gianello P: Accommodation and antibodies. *Transpl Immunol* (21): 106–110, 2009.
- 23) Chang AT, Platt JL: The role of antibodies in transplantation. *Transplant Rev* (23): 191–198, 2009.
- 24) Iwasaki K, Miwa Y, Ogawa H, et al.: Comparative study on signal transduction in endothelial cells after anti-a/b and human leukocyte antigen antibody reaction: implication of accommodation. *Transplantation* (93): 390–397, 2012.
- 25) Billen EV, Christiaans MH, Lee J, et al.: Donor-directed HLA antibodies before and after transplantectomy detected by the luminex single antigen assay. *Transplantation* (87): 563–569, 2009.
- 26) Marrari M, Duquesnoy RJ: Detection of donor-specific HLA antibodies before and after removal of

- a rejected kidney transplant. *Transpl Immunol* (22): 105–109, 2010.
- 27) Zhang Q, Reed EF: Non-MHC antigenic targets of the humoral immune response in transplantation. *Curr Opin Immunol* (22): 682–688, 2010.
 - 28) Breimer ME, Rydberg L, Jackson AM, et al.: Multicenter evaluation of a novel endothelial cell crossmatch test in kidney transplantation. *Transplantation* (87): 549–556, 2009.
 - 29) Segev D, Garonzik Wang J, Gloor J, et al.: Risks of HLA incompatible kidney transplants by antibody strength: initial results from a national study of 603 patients. *Am J Transplant* (11) Suppl s2: 136, 2011.
 - 30) Higgins R, Lowe D, Hathaway M, et al.: Human leukocyte antigen antibody-incompatible renal transplantation: excellent medium-term outcomes with negative cytotoxic crossmatch. *Transplantation* (92): 900–906, 2011.
 - 31) Garonzik Wang JM, Montgomery RA, Kucirka LM, et al.: Incompatible live-donor kidney transplantation in the United States: results of a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* (6): 2041–2046, 2011.
 - 32) Amico P, Hirt-Minkowski P, Hönger G, et al.: Risk stratification by the virtual crossmatch: a prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int* (24): 560–569, 2011.
 - 33) Morris GP, Phelan DL, Jendrisak MD, et al.: Virtual crossmatch by identification of donor-specific anti-human leukocyte antigen antibodies by solid-phase immunoassay: a 30-month analysis in living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* (71): 268–273, 2010.
 - 34) Taylor CJ, Smith SI, Morgan CH, et al.: Selective omission of the donor cross-match before renal transplantation: efficacy, safety and effects on cold storage time. *Transplantation* (69): 719–723, 2000.
 - 35) Howell WM, Harmer A, Briggs D, et al.; British Society for Histocompatibility & Immunogenetics; British Transplantation Society: British Society for Histocompatibility & Immunogenetics and British Transplantation Society guidelines for the detection and characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. *Int J Immunogenet* (37): 435–437, 2010.
 - 36) Bray RA, Nolen JD, Larsen C, et al.: Transplanting the highly sensitized patient: The emory algorithm. *Am J Transplant* (6): 2307–2315, 2006.
 - 37) Terasaki PI, Cai J: Human leukocyte antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation. *Transplantation* (86): 377–383, 2008.
 - 38) Gupta A, Iveson V, Varaganam M, et al.: Pretransplant donor-specific antibodies in cytotoxic negative crossmatch kidney transplants: are they relevant? *Transplantation* (85): 1200–1204, 2008.

●原著論文●

次世代シーケンサーを用いた HLA-DRB1 遺伝子の 超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発

尾崎 有紀*, 鈴木 進悟*, 吉川 枝里, 重成 敦子,
岡 晃, 光永 滋樹, 椎名 隆, 猪子 英俊

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

(平成 24 年 2 月 20 日受付)

要旨: 著者らは HLA クラス I 遺伝子である HLA-A, -B および -C の全領域をそれぞれ特異的に増幅させる PCR, Roche GS Junior を用いた次世代シーケンシング, 塩基配列の編集およびアレル判定までの一連の過程により, 8 桁レベルの超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法を開発し, これについて報告した。一方, クラス II 遺伝子である HLA-DRB1 について SS-SBT 法を実施するためには, HLA-DRB 亜領域に存在する 5 種類の構造多型が PCR プライマーの設計の際に問題となる。そこで本研究では, HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 6 について, 血清学的グループ特異的に増幅させる PCR 系を開発し, この PCR 産物の次世代シーケンシングにより, HLA-DRB1 について ambiguity を排除した 8 桁レベルの超高解像度 DNA タイピング (SS-SBT) 法を開発することを試みた。その結果, 従来法では単一のアレル判定が困難な 19 検体について次世代シーケンサーを用いた DNA タイピングを行ったところ, 2 つのアレルを除き, 全ての検体について 8 桁レベルの HLA-DRB1 アレルが判定された。また, この過程にて 5 種類の新規 HLA-DRB1 アレルが検出され, それらのうちの 1 種類はエクソン 4 に非同義置換を伴うものであった。したがって, 本法は ambiguity の認められない 8 桁レベルの単一のアレルまで判定が可能な HLA-DRB1 タイピングに有効であるとともに, 新規 HLA-DRB1 アレルや null アレルを効率よく検出するための優れた手法であることが示唆された。

キーワード: HLA-DRB1, 次世代シーケンシング, PCR, DNA タイピング, Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing (SS-SBT)

はじめに

HLA アレル情報は, 移植の際のドナーとレシピエントの組織適合性の一致や疾患関連解析に必要な

不可欠である。現在, HLA 遺伝子における高精度 DNA タイピング法として, SSOP (主として, Luminex 法) 法と SBT 法が主に利用されている¹⁻³⁾。ところが

代表者連絡先 〒 259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143
東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
猪子 英俊

電話 0463-93-1121 (内線 2312)
FAX 0463-94-8884
E-mail hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp

Luminex 法を含む SSOP 法や SBT 法では、2つの多型部位が同一の染色体上 (*cis*) か、異なる染色体上 (*trans*) に位置するのかの位置情報が得られない、いわゆる *phase ambiguity* が生じること⁴⁾、また Luminex 法を含む SSOP 法では年々増加している新規 HLA アリルに対応するためのオリゴヌクレオチドプローブが不足していることから、これら従来法では多くの場合はいくつかのアリル候補が存在し、単一のアリルに絞り込むことができないのが現状である (表 1, 表 2 参照)。また、これまでに 1,067 を超える HLA-DRB1 アリルが IMGT-HLA データベースから公開されているが、遺伝子全領域が決定されている HLA アリルは約 2.4% にすぎず、遺伝子発現が抑制される未知の null アリルや新規 HLA-DRB1 アリルの存在が十分に考えられる⁵⁾。したがって、*ambiguity* を排除するとともに、null アリルの検出や新規 HLA アリルの検出を目指した 8 桁レベルにおける DNA タイピング法は将来の目指すべき理想的なタイピング法と考えられる。

著者らは HLA-A, -B および -C の遺伝子全領域をそれぞれ特異的に増幅させる PCR, Roche GS Junior を用いた次世代シーケンシング, 塩基配列の編集およびアリル判定までの一連の過程により、8 桁レベルの超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法を開発した⁶⁾。一方、HLA-DRB1 遺伝子について SS-SBT 法を実施するためには、HLA-DRB 亜領域に存在する 5 種類の構造多型が存在するため、PCR プライマーの設計がクラス I 遺伝子ほど容易ではない。すなわち、HLA-DRB1 遺伝子と塩基配列の類似性の高い HLA-DRB3, -DRB4 および -DRB5 などの遺伝子や HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 および -DRB9 の偽遺伝子に由来する PCR 増幅を排除し、HLA-DRB1 のみを特異的に増幅させる PCR 系を開発する必要がある。

本研究では、HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 6 について血清学的グループ特異的に増幅させる PCR 系を開発し、従来法では *ambiguity* の

表 1 PCR-Luminex 法による DNA タイピングの結果

サンプル ID	アリル 1	アリル 2	候補アリル数	
			アリル 1	アリル 2
TU1	DRB1*09:01/04/05	DRB1*15:01/13/16/+	3	11
TU2	DRB1*09:01/04/05/+	DRB1*14:05/23/43/+	4	7
TU3	DRB1*01:01/05/07/+	DRB1*14:05/23/45/+	13	4
TU4	DRB1*04:10	DRB1*14:01/26/54/+	1	9
TU5	DRB1*09:01/04/05	DRB1*13:02/96	3	2
TU6	DRB1*04:05/29/45/+	DRB1*13:02/73/96	5	3
TU7	DRB1*04:03/39/41/+	DRB1*08:03/23/27/+	10	7
TU8	DRB1*13:02/73/96	DRB1*16:02	3	1
TU9	DRB1*14:05/23/43/+	—	8	8
TU10	DRB1*09:01/04/05/+	DRB1*12:01/06/08/+	4	5
TU11	DRB1*08:03/23/27/+	DRB1*09:01/04/05	5	3
TU12	DRB1*04:05/28/29/+	DRB1*15:01/07/13/+	6	13
TU13	DRB1*04:05/28/29/+	DRB1*15:02/08/11/+	5	6
TU14	DRB1*04:10	DRB1*15:01/13/16/+	1	12
TU15	DRB1*04:10	DRB1*15:01/13/16/+	1	12
TU16	DRB1*04:05/28/29/+	DRB1*15:02/08/11/+	6	5
TU17	DRB1*04:10	DRB1*15:02/08/14/+	1	4
TU18	DRB1*01:01/05/07/+	DRB1*08:03/23/27/+	13	5
TU19	DRB1*01:01/05/07/+	DRB1*08:02	14	1

表2 PCR-SBT 法による DNA タイピングの結果

サンプル ID	アリル 1	アリル 2	ambiguity の数
TU1	09:01/06	15:01/02	3
TU2	09:01/06	14:05/44	2
TU3	01:01/17/20	14:05/44/100	3
TU4	04:10/11	14:01/32/54	3
TU5	09:01:02	13:02:01	1
TU6	04:05/28/43/+	13:02/36/65/+	5
TU7	04:03/07/11/+	08:03/10/29/+	6
TU8	13:02/29/36	16:02/05/10	4
TU9	14:05:01	—	1
TU10	09:01:02	12:01/06/10/+	4
TU11	08:03:02	09:01:02	1
TU12	04:05/08/10/+	15:01/02/07/+	7
TU13	04:05/28	15:02/11	3
TU14	04:04/10	15:01/12	3
TU15	04:04/10	15:01/12	3
TU16	04:05/28	15:02/11	3
TU17	04:05/08/10/+	15:01/02/07/+	7
TU18	01:01:01	08:03:02	1
TU19	01:01/08	08:02/42	3

認められる 19 検体を用い、それらの PCR 産物について Roche GS Junior による次世代シーケンシングを行うことにより、ambiguity の認められない 8 桁レベルの単一のアリルまで判定可能な HLA-DRB1 の超高解像度 DNA タイピング (SS-SBT) 法を開発したので、これらについて報告する。

材料および方法

(1) 供試検体

PCR 条件の検討には、DR1 型 (HLA-DRB1*01:01), DR2 型 (HLA-DRB1*15:01), DR3 型 (HLA-DRB1*03:01), DR4 型 (HLA-DRB1*04:05), DR5 型 (HLA-DRB1*12:01), DR6 型 (HLA-DRB1*13:02), DR7 型 (HLA-DRB1*07), DR8 型 (HLA-DRB1*08:03:02), DR9 型 (HLA-DRB1*09:01) のホモ接合体ならびに DR2 型 (HLA-DRB1*15:01) と DR10 型 (HLA-DRB1*10:01) のヘテロ接合体である細胞株由来のゲノム DNA あるいは末梢白血球由来のゲノム DNA を供試した。DNA タイピングには、日本人由来の 19 検体 (DNA

sample ID : TU1 ~ TU19) の末梢白血球由来のゲノム DNA を供試した。新規 HLA-DRB1 アリルにおける多型解析は HLA 型が既に明確な日本人由来の 130 検体を用いた。なおゲノム DNA は QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出した。

(2) PCR-SBT 法と PCR-Luminex 法による DNA タイピング法

TU1 ~ TU19 のゲノム DNA を用いて、SBT 法と Luminex 法により HLA-DRB1 遺伝子における DNA タイピングをおこなった (表 1, 表 2)。SBT 法には、AlleleSEQR HLA タイピング試薬 (Abbott 社), Luminex 法には、LABType SSO キット (One Lambda 社) を用いた。

(3) PCR プライマーの設計法

IMGT-HLA データベースに登録されている塩基配列より、HLA-DRB1 におけるエクソン 2 からエクソン 6 の遺伝子領域について、血清学的グループ特異的に、かつ登録されている全ての HLA-DRB1 アリルについて増幅を可能とする PCR プライマーの設計を試みた。PCR プライマーの設計には、Primer Express (Applied Biosystems 社) を用いた。

(4) PCR 法

設計した血清学的グループ特異的な PCR プライマー (表 3) の有効性を検討するため、ゲノム DNA を鋳型として、HLA-DRB1 遺伝子において PCR 増幅をおこなった。PCR 増幅には、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa 社) を用いた。プライマーの特異性の確認には、PCR 反応液の組成を 50 ng のゲノム DNA, 4 uL の 5×PrimeSTAR GXL Buffer (5 mM Mg²⁺), 1.6 uL の dNTPs (各 2.5 mM), 4 uL (1 pmol/uL) ずつの PCR プライマー, 1 unit の PrimeSTAR GXL Polymerase (1.25 U/uL) とし、最終的に 20 uL に調整したものを使用した。プライマーの設計完了後は、PCR 反応液の組成を 50 ng のゲノム DNA, 4 uL の 5×PrimeSTAR GXL Buffer (5 mM Mg²⁺), 1.6 uL の dNTPs (各 2.5 mM), 7 uL の PCR プライマー混合液, 1 unit の PrimeSTAR GXL Polymerase (1.25 U/uL) とし、最終的に 20 uL に調

表 3 HLA-DR 型をそれぞれ特異的に PCR 増幅させるためのプライマー配列と PCR 条件

HLA-DR 型	PCR 増幅長 (bp)	プライマーセット名	プライマー名	プライマー配列 (5' to 3')	プライマーの長さ (mer)
HLA-DR1	5065	DR1	DR-E2-1.1-F	GCACGTTTCTTGTGGCAGCTTAAGTT	26
			DR-E2-1.2-F	GCACGTTTCTTGTGGCAGCTAAAGTT	26
			DR-E2-12-R	ATGCACGGGAGGCCATAACGGT	21
HLA-DR2	5550	DR2	DR-E2-2-F	TTTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG	22
			DR-E2-12-R	ATGCACGGGAGGCCATAACGGT	21
HLA-DR3	5112	DR3568	DR-E2-3568-F	CACAGCACGTTTCTTGGAGTACTC	24
			DR-E2-3568-R	ATGCACAGGAGGCCATAGGGT	21
HLA-DR4	6178	DR4	DR-E2-4-F	AGCACGTTTCTTGGAGCAGGTTAAACA	27
			DR-E2-4-R	ATGCATGGGAGGCAGGAAGCA	21
HLA-DR5	5127	DR3568	DR-E2-3568-F	CACAGCACGTTTCTTGGAGTACTC	24
			DR-E2-3568-R	ATGCACAGGAGGCCATAGGGT	21
HLA-DR6	5141	DR3568	DR-E2-3568-F	CACAGCACGTTTCTTGGAGTACTC	24
			DR-E2-3568-R	ATGCACAGGAGGCCATAGGGT	21
HLA-DR7	5022	DR7	DR-E2-7-F4	CACAGCACGTTTCTTGTGGCAGGG	24
			DR-E2-7-R2	CAGATGCATGGGAGGCAGGAAGCG	24
HLA-DR8	5120	DR3568	DR-E2-3568-F	CACAGCACGTTTCTTGGAGTACTC	24
			DR-E2-3568-R	ATGCACAGGAGGCCATAGGGT	21
HLA-DR9	5062	DR9	DR-E2-9-F	CACAGCACGTTTCTTGAAGCAGGA	24
			DR-E2-9-R	ATGCATGGGAGGCAGGAAGCG	21
HLA-DR10	5354	DR10	DR-E2-10-F	ACAGCACGTTTCTTGGAGGAGGT	23
			DR-E2-10-R	TGGAATGTCTAAAGCAAGCTATTTAACATATGT	33

整したものを使用した。PCR 条件は、いずれも 94°C, 2 分間の熱変性後, 98°C, 10 秒間, 70°C, 5 分間の 2 工程を 1 サイクルとし, これを 30 回繰り返した。PCR 増幅には, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems 社) を用いた。アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の有無を確認した後, QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN 社) のプロトコールにしたがって PCR 産物の精製をおこなった。

(5) サンガー法による直接塩基配列決定法

前述の PCR 条件にて HLA ヘテロ接合体である細胞の両染色体由来の HLA-DRB1 アリルが 1 : 1 で増幅しているか否かを確認するために, HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 に設計されたシークエンシングプライマーを用いて, サンガー法による直接塩基配列決定法により PCR 産物の塩基配列を決定した。塩基配列は, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Ver3.1 (Applied Biosystems 社) な

らびにキャピラリー電気泳動装置 ABI Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems 社) を用いて決定した。得られた塩基配列は Sequencher ver.5.00 (Gene Codes Corporation 社) により解析した。

(6) 次世代シークエンシング法

PCR 産物からのシークエンシング用のライブラリーの調製, エマルジョン PCR (emPCR) ならびにパイロシークエンシングは, GS Titanium Rapid Library MID Adaptor Kit, GS Junior emPCR Bead Recovery Reagents, GS Junior Titanium Pico Titer Plate Kit (Roche 社) のプロトコールに従った。なお, シークエンシングは各サンプルを混合した条件で行う (multiplex) 方が効率的なので, シークエンシング用のライブラリーは, PCR 産物それぞれに 10 塩基からなる 10 種類のタグ配列 (multiplex identifier; MID) を付加させたアダプターをライゲーションさせることにより各サンプルを識別化した。また

emPCR はそれぞれ別に調製したライブラリーを混合してからおこなった。次世代シーケンサーから得られる塩基配列データの解析法ならびに DNA タイピング法は既報に従った。

結 果

(1) PCR 条件の設定

HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 の第 1 超可変領域 (20 番目の塩基 [DR3, DR5, DR6, DR7, DR8, DR9 型] ~ 27 番目 [DR2 型]) からエクソン 6 (終止コドンの下流側 151 番目の塩基 [DR1 型] ~ 493 番目の塩基 [DR10 型]) を含む 5,067 塩基 (DR9 型) ~ 6,218 塩基 (DR4 型) を血清学的グループ特異的 (DR1, DR2, DR3568, DR4, DR7, DR9, DR10) に増幅させる 7 組の PCR プライマーペアを設計した (図 1, 表 3)。これら PCR プライマーセットの HLA-DRB1 特異性を明らかにするために, DR1 型から DR9 型のホモ接合体ならびに DR2 と DR10 のヘテロ接合体のゲノム DNA を用いて PCR 条件の検討を行った。その結果, アニリング温度と伸長反応温度を 70°C で 5 分間に設定した場合, DR1 および DR9 プライマーセットではそれぞれの目的である DR1 型, DR9 型の他に DR2 型や DR10 型, DR4 型においてもそれぞれ少量の PCR 産物が得られた。それに対して, その他のプライマーセットでは目的サイズに HLA-DRB1 特異的な PCR 産物が確認された (図 2A)。なお, DR1 プライマーにおいて DR1 および DR10 アリルの PCR 増幅産物が, DR9 プライマーにおいて DR4 アリルの PCR 増幅産物がそれぞれ含まれていても, DR1, DR10, DR4 の各 DRB1 遺伝子のみからの特異的な増幅であれば, DRB1 遺伝子タイピングには実用上問題ないと考えられる。そこで, 日本人由来の 19 検体 (TU1 ~ TU19) の末梢白血球由来のゲノム DNA を用い, これら 7 組の PCR プライマーペアを混合して PCR 増幅を行った結果, 19 検体ともに目的サイズに単一の PCR 産物を確認した (図 2B)。この際, グループ特異的プライマーにより PCR 効率の差異に起因すると思われる各 PCR 産物量のばらつきが認められたため, プライマーセット DR1, DR4 : DR2, DR3568, DR7, DR10 : DR9 を 1 : 2 : 4 の割合で混

合したものをを用いた。最終的に, HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 においてサンガー法による直接塩基配列決定法によりこれら PCR 産物の精度を確認した結果, 19 検体全てについて HLA-DRB1 遺伝子以外の HLA-DRB 遺伝子の混入は認められず, 両染色体由来の HLA-DRB1 アリルのヘテロ接合体に由来する全ての塩基配列部位において 2 種類の塩基の混在がほぼ 1 : 1 で観察された (図 2C)。したがって, 本研究にて設定した PCR 条件は HLA-DRB1 遺伝子の DNA タイピングに使用可能であると考えられたことから, これら PCR 産物を以降の次世代シーケンシングに供試した。

(2) 次世代シーケンシングにより得られた基本情報

HLA-DRB1 における 19 検体の PCR 産物 (計 19 PCR 産物) から, 各検体を識別するための MID を付加させたシーケンシング用ライブラリー (計 19 ライブラリー) をそれぞれ調製し, emPCR の過程で TU1 ~ TU10 由来の 10 種類の PCR 産物, および TU11 ~ TU19 由来の 9 種類の PCR 産物を混合して, 計 2 回のシーケンシングランを行った。その結果, TU1 ~ TU10, TU11 ~ TU19 にて, 158,292 リードおよび 125,387 リードがそれぞれ得られた。各リードデータにおける QV 値の平均である平均 QV 値はそれぞれ 31.5 および 28.6 であり, それらリードの平均長はそれぞれ 426.3 bp および 420.1 bp であった。これらリードを検体ごとに分類した場合, TU1 ~ TU10 では 9,889 リード (TU1) ~ 24,372 リード (TU4), HLA-DRB1 の TU11 ~ TU19 では 9,135 リード (TU16) ~ 23,071 リード (TU14) が得られた (表 4)。また, 1 つの塩基を決定するために使用したリード数 (重複度; depth) の PCR 全領域における平均値 (平均 depth) は, TU1 ~ TU10, TU11 ~ TU19 にて, それぞれ平均 154.5 ~ 722.6 depth, 平均 125.3 ~ 715.4 depth であり, いずれの検体とも Roche GS Junior ベンチトップシステム使用時に推奨される 30 depth を超えるものであった (表 5)。平均 depth の比 (アリル 1 の平均 depth / アリル 2 の平均 depth) を PCR 産物ごとに算出した結果, その比は 0.5 ~ 1.7 (平均 ± 標準誤差 = 0.95

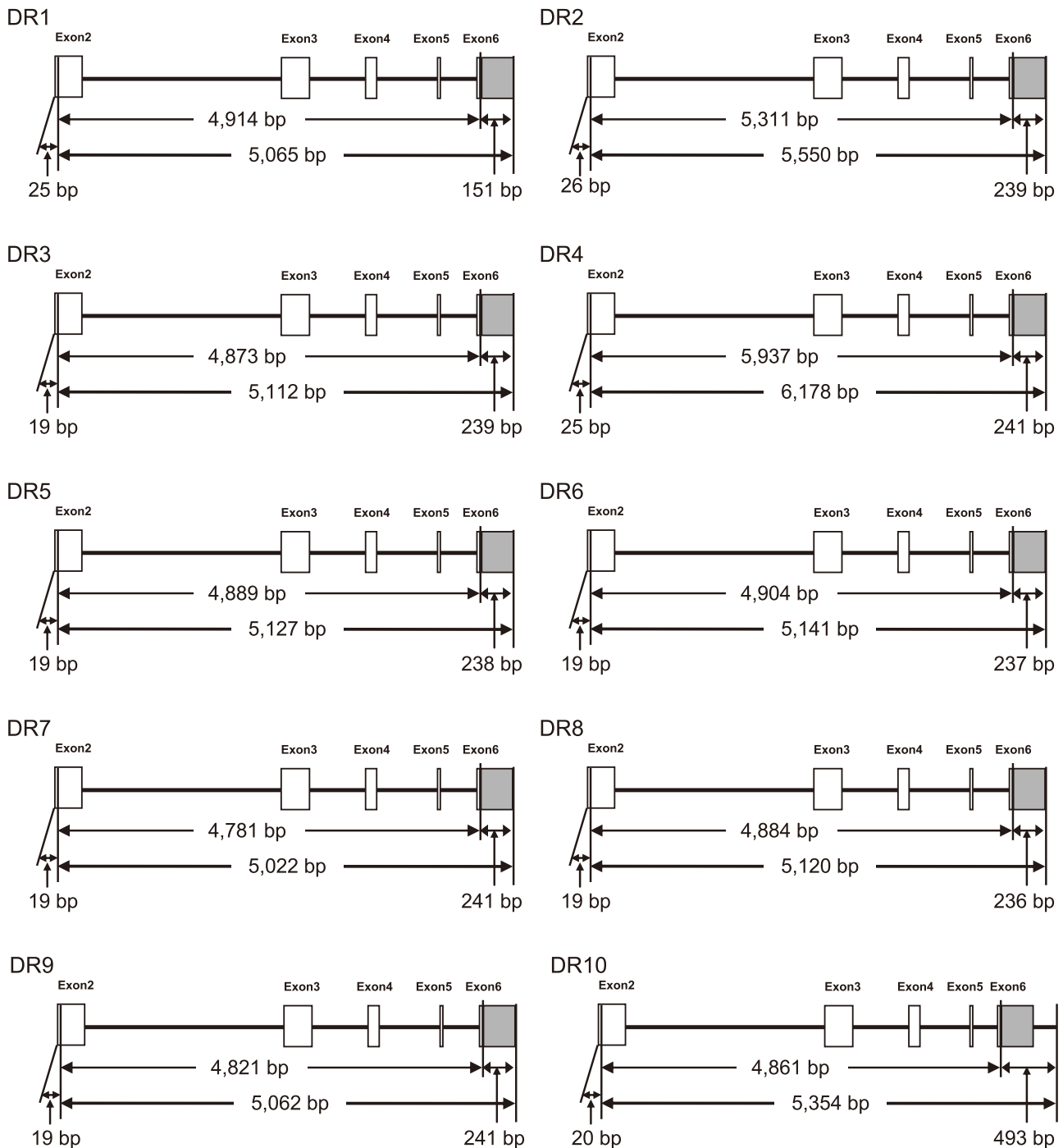


図1 HLA-DRB1 遺伝子における遺伝子構造と PCR 増幅領域
白色と灰色のボックスは翻訳領域と非翻訳領域をそれぞれ示す。

± 0.10) であり、HLA-DRB1 両アレルにおけるリード数に最大 2 倍のばらつきが認められた (TU15, 表 5) が、得られたリードデータは HLA アレルの塩基配列決定に十分に資するものであったことから、これらリードを用いて以降の HLA-DRB1 アリ

ルの判定に進めた。

(3) SS-SBT 法による HLA-DRB1 アレルの判定

得られたリードデータと HLA-DRB1 遺伝子のリファレンス配列とのマッピングにより、計 16 種類

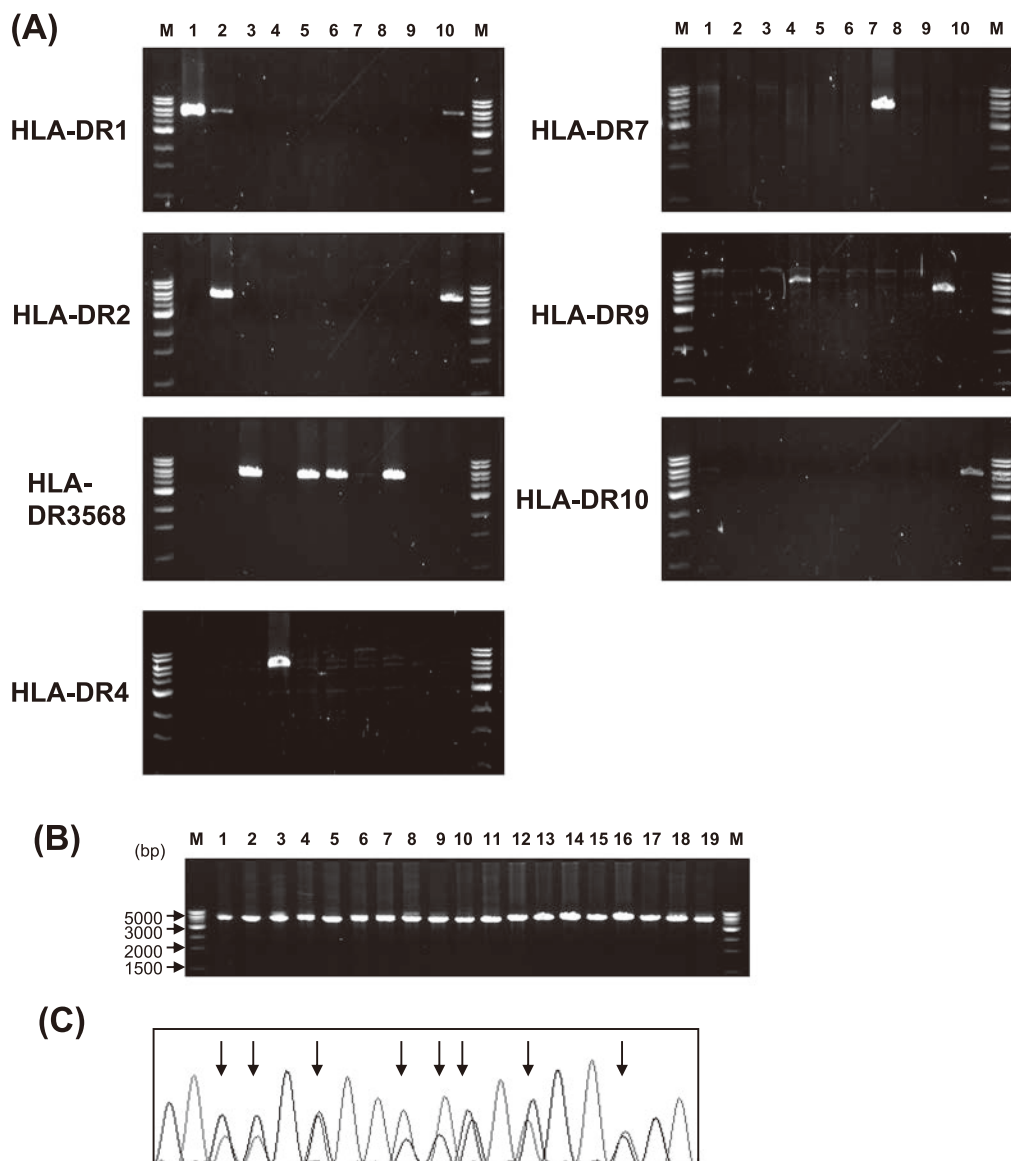


図2 HLA-DRB1 遺伝子における PCR 条件の検討

(A) PCR 増幅の特異性の確認。レーン 1～9 は PCR 条件の検討に用いた DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6, DR7, DR8 および DR9 のホモ接合体, レーン 10 は DR2/DR10 のヘテロ接合体であるゲノム DNA を鋳型に用いた時の PCR 増幅状況を示す。また M は 1 kb DNA ラダーマーカーを示す。HLA-DR 番号は HLA-DRB1 特異的プライマーセットを示す。(B) 19 検体を用いた PCR 増幅の確認。レーン 1～19 は検体番号 TU1～TU19 をそれぞれ示す。M は 1 kb DNA ラダーマーカーを示す。(C) 直接塩基配列決定法による PCR 増幅の確認。矢印は 2 種類の塩基が混在する部位を示す。

の塩基配列が決定された (表 6)。すなわち, 4 種類 (DRB1*01:01:01:01, DRB1*04:03:01:01, DRB1*12:01:01:01, DRB1*14:05:01:01) は本研究前に既に決定されていた 8 桁レベルの HLA-DRB1 アリルであったのに対して, 6 種類 (DRB1*04:05:01:01, DRB1*04:10:01:01, DRB1*08:02:01:01, DRB1*09:01:02:01, DRB1*14:54:01:01, DRB1*

15:02:01:01) は過去に 4 桁あるいは 6 桁レベルにて決定されていた HLA-DRB1 アリルを 8 桁レベルにて決定したもの, 5 種類 (DRB1*04:10:03:01, DRB1*08:03:02:02, DRB1*09:18:01:01, DRB1*13:02:01:02, DRB1*16:02:01:02) はデータベース上には認められない SNP あるいは新規挿入/欠失 (Insertion/Deletion) を含む新規 HLA-

表 4 Roche GS Junior ベンチトップシステムにより得られた塩基配列情報

シークエンスラン 1			シークエンスラン 2		
サンプル ID	MID の種類	リード数	サンプル ID	MID の種類	リード数
TU1	MID1	9,889	TU11	MID1	11,487
TU2	MID2	15,121	TU12	MID3	9,337
TU3	MID3	11,784	TU13	MID4	20,990
TU4	MID4	24,372	TU14	MID5	23,071
TU5	MID5	10,378	TU15	MID6	11,362
TU6	MID6	14,605	TU16	MID7	9,135
TU7	MID7	14,947	TU17	MID8	13,421
TU8	MID8	17,449	TU18	MID9	10,526
TU9	MID9	15,852	TU19	MID10	16,058
TU10	MID10	23,895			
Total		158,292	Total		125,387
Average read length (bp)		426.3	Average read length (bp)		420.1
Quality value (QV)		31.5	Quality value (QV)		28.6

DRB1 アリルと考えられる配列, 1 種類 (DRB1*15:01:01:01:02/03) はイントロン 2 に位置するマイクロサテライト配列 (DRB1*15:01:01:01 では (GT)₂₀(GA)₅, DRB1*15:01:01:02 では (GT)₁₉(GA)₅, DRB1*15:01:01:03 では (GT)₁₈(GA)₅) の繰り返し回数を本研究で用いた Roche GS Junior では正確に決定できず, DRB1*15:01:01:01, DRB1*15:01:01:02, DRB1*15:01:01:03 のいずれかの HLA-DRB1 アリルに判定されたものであった。なお, 上記アリル名の () は WHO の HLA 命名委員会からの正式な命名の承認をまだ得ていないので仮の表記であることを示す。また, 検体 TU10 に検出された DRB1*12:01:01:01 については, DRB1*12:01:01:01 と DRB1*12:10:(01):(01) の違いはエクソン 1 の 1 塩基のみである。そこで, エクソン 1 における PCR プライマーを新規に設計し, 得られた PCR 産物をサンガー法による直接塩基配列決定法を行った結果, DRB1*12:01:01:01 の塩基配列であることが確認された。

新規 HLA-DRB1 アリルと思われる 5 種類の塩基配列のうち, DRB1*09:(18):(01):(01) のエクソン 4 に CAG (Gln) から CGG (Arg) への非同義置換が認められ, DRB1*09 型は DRB1*09:01 から DRB1*09:17 までが IMGT-HLA に登録されていたことから,

表 5 アリル 1 とアリル 2 の平均 depth の比

サンプル ID	アリル 1 の平均 depth*	アリル 2 の平均 depth*	比 **
TU1	216.8	154.5	1.4
TU2	479.6	287.4	1.7
TU3	326.3	224.0	1.5
TU4	383.5	516.7	0.7
TU5	279.5	213.1	1.3
TU6	234.2	313.3	0.7
TU7	258.4	388.6	0.7
TU8	381.9	454.6	0.8
TU9	722.6	—	—
TU10	574.7	527.0	1.1
TU11	228.3	326.6	0.7
TU12	125.3	253.0	0.5
TU13	355.1	569.9	0.6
TU14	394.9	715.4	0.6
TU15	171.5	334.6	0.5
TU16	143.0	251.2	0.6
TU17	193.8	327.7	0.6
TU18	316.5	195.6	1.6
TU19	400.7	257.1	1.6

* アリル 1 とアリル 2 における正式なアリル名を表 6 に示した。** 比はアリル 1 の平均 depth/ アリル 2 の平均 depth を示す。

表 6 HLA-DRB1 における SS-SBT 法による DNA タイピングの結果

サンプル ID	アレル 1	アレル 2
TU1	DRB1*09:01:02:(01) AB698846	DRB1*15:01:01:01/02/03
TU2	DRB1*09:01:02:(01) AB698846	DRB1*14:05:01:01
TU3	DRB1*01:01:01:01	DRB1*14:05:01:01
TU4	DRB1*04:10:(03):(01) AB698844	DRB1*14:54:(01):(01) AB698849
TU5	DRB1*09:01:02:(01) AB698846	DRB1*13:02:01:(02) AB698848
TU6	DRB1*04:05:01:(01) AB698841	DRB1*13:02:01:(02) AB698848
TU7	DRB1*04:03:01:01	DRB1*08:03:02:(02) AB698843
TU8	DRB1*13:02:01:(02) AB698848	DRB1*16:02:01:(02) AB698851
TU9	DRB1*14:05:01:01	—
TU10	DRB1*09:01:02:(01) AB698846	DRB1*12:01:01:01
TU11	DRB1*08:03:02:(02) AB698843	DRB1*09:(18):(01):(01) AB698847
TU12	DRB1*04:05:01:(01) AB698841	DRB1*15:01:01:01/02/03
TU13	DRB1*04:05:01:(01) AB698841	DRB1*15:02:01:(01) AB698850
TU14	DRB1*04:10:(03):(01) AB698844	DRB1*15:01:01:01/02/03
TU15	DRB1*04:10:01:(01) AB698842	DRB1*15:01:01:01/02/03
TU16	DRB1*04:05:01:(01) AB698841	DRB1*15:02:01:(01) AB698850
TU17	DRB1*04:10:01:(01) AB698842	DRB1*15:02:01:(01) AB698850
TU18	DRB1*01:01:01:01	DRB1*08:03:02:(02) AB698843
TU19	DRB1*01:01:01:01	DRB1*08:02:01:(01) AB698845

灰色の背景は新規に検出されたアレル（上段）とその DDBJ accession number（下段）を示す。

HLA の命名法にしたがって便宜的に HLA-DRB1*09:(18) とした。この DRB1*09:(18):(01):(01) の頻度を求めるために、日本人 130 検体を用いて DNA タイピングを行ったが、本研究では DRB1*09:(18):(01):(01) を示唆する多型は SS-SBT 法に用いた検体以外には認められなかった。その他 4 種類 (DRB1*04:10:(03):(01), DRB1*08:03:02:(02), DRB1*13:02:01:(02), DRB1*16:02:01:(02)) には、イ

ントロン領域や 3' 側非翻訳領域に塩基置換や挿入/欠失およびエクソン 4 に同義置換が認められた (表 7)。これら新規多型は、サンガー法による PCR 産物の直接塩基配列決定法により追認されたことから、次世代シーケンシングにより検出された 4 種類の新しい塩基配列は、いずれも新規 HLA アレル配列であることが確認された。

考 察

次世代シーケンサーを用いた HLA-DRB1 遺伝子の DNA タイピング法は既に報告されているが、エクソンの一部 (エクソン 2 とエクソン 3) のみを対象としているので、8 桁レベルの DNA タイピング法ではない⁷⁻⁹⁾。一方、本研究では HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 からエクソン 6 までのエクソンとイントロンを含む 8 桁レベルの DNA タイピングを試みたものである。

用いた 19 検体の 1 つの HLA-DRB1 アレル (DRB1*15:01:01:01/02/03) については、イントロン 2 領域におけるマイクロサテライトの繰り返し多型の塩基配列決定の不確定さにより、次世代シーケンシングならびにその後に行ったサンガーシーケンシングにおいても DRB1*15:01:01:01, DRB1*15:01:01:02, DRB1*15:01:01:03 のいずれかに決定することができなかった。このような問題は今後も頻繁に生じられると思われるが、このマイクロサテライト多型以外では両者間の塩基配列が一致することから、現状ではマイクロサテライトに代表される繰り返し配列のように塩基配列決定は困難な領域は無理に決定せずに DRB1*15:01:01:01/02/03 のように表記すべきであると考えられた。日本人集団にしばしば観察される phase ambiguity の一つである DRB1*04:05/15:01 と DRB1*04:10/15:02 の組み合わせを例とした場合、DRB1*04:05 と DRB1*15:01 (TU12), DRB1*04:10 と DRB1*15:02 (TU17) のように、いずれの検体とも SS-SBT 法にて HLA-DRB1 アレルが明確に判定された。本研究では少数の検体を用いたため、null アレルは検出されなかったものの、実際にエクソン 4 やイントロン領域に新規多型を検出されたことから、設計した PCR プライマーや開発した PCR 系は ambiguity の認められない 8 桁レベル

表 7 新規に検出された HLA アリルの特徴

Sample ID	Reference				Newly identified alleles		Region	Syn or non-syn	AA change
	Allele name	IMGT HLA No.	Position (bp)	Nucleotide	Allele name	Nucleotide			
TU4, TU14	DRB1*04:10:01	HLA00696	3,312	A	DRB1*04:10:(03):(01)	Deletion	Intron 2	Synonymous	
			3,313	T		C	Intron 2		
			4,747	C		T	Exon 4		
TU5, TU6, TU8	DRB1*13:02:01	HLA00798	3,371	C	DRB1*13:02:01:(02)	A	Intron 3		
TU7, TU11, TU18	DRB1*08:03:02	HLA00727	4,234	C	DRB1*08:03:02:(02)	Deletion	Intron 5		
			4,992	G		A	Exon 6 (3'UTR)		
TU08	DRB1*16:01:01	HLA00878	646	G	DRB1*16:01:01:(02)	C	Intron 2		
			647	A		T	Intron 2		
TU11	DRB1*09:01:02	HLA00749	1,730	Insertion	DRB1*09:(18):(01):(01)	T	Intron 2	Non-synonymous Q ⇒ R	
			3,506	A		G	Exon 4		

の DNA タイピングに有効であるとともに、将来的に新規 HLA-DRB1 アリル、null アリルの検出、疾患関連解析および分子進化的研究のための優れた手法であることが示唆された。

臨床現場にて日常的に SS-SBT 法を利用するためには、技術の改善、煩雑さの解消、コストの軽減が課題となる。まず技術面では、検体 TU10 に検出された DRB1*12:01:01:01 と DRB1*12:10:(01):(01) のように、本研究対象としたエクソン 2～エクソン 6 以外の遺伝子領域（プロモーター領域、エクソン 1、イントロン 1）に位置する多型により HLA アリルが判定できない場合が想定される。HLA-DRB1 遺伝子の全領域（プロモーター領域からエクソン 6 まで）の長さは 11 kb～16 kb と長いため、HLA-DRB1 遺伝子全領域における PCR 増幅は、臨床現場におけるゲノム DNA の抽出や PCR 増幅に細心の注意を払う必要が生じるため現実的ではない。一方、新規 HLA-DRB1 アリルや null アリルの検出のためには、この遺伝子領域の PCR 系ならびに同様の次世代シーケンサー用いた HLA-DNA タイピング法の開発が必要である。よって我々は HLA-DRB1 遺伝子のプロモーター領域からエクソン 2 までの PCR 増幅と次世代シーケンサーによる塩基配列決定も行い、HLA-DRB1 遺伝子全領域における 8 桁レベルにおける HLA-DRB1 アリル配列を基礎データとして収集し、これらをリファレンス配列

とした HLA アリル判定ソフトウェアを開発する必要があると考えている。

煩雑さの課題の一つに PCR 増幅から HLA アリル判定までに計 4 日間が必要であることが挙げられる。次世代シーケンシング用ライブラリーや emPCR の自動化、例えば自動サンプル準備システム（Life Technologies 社）などを駆使することにより安定した塩基配列データが得られると考えられ、この問題は近い将来解消されるであろう。費用面では、本研究では 1 検体あたり 2 万 8 千円と現時点では低価とは言えない。この対処法として、1 シークエンシングランあたりの検体数を増やすこと、先に開発した HLA-A, -B, -C および DRB1 の PCR 産物を混合してシーケンシングを行うこと、ランニングコストが安価であるイオンパーソナルゲノムマシーン（Ion PGM）シーケンサー（Life Technologies 社）や 1 分子リアルタイム DNA シークエンサー（Pacific Biosciences 社）を使用することにより、従来の HLA-DNA タイピングのコストより下げることが十分に可能であると考えられた。今後、これらの問題点を解決することにより、より本 DNA タイピング法が普及していくものと考えられる。また、他の HLA クラス II 遺伝子である HLA-DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1 についても SS-SBT 法によるタイピングを開発中である。

謝 辞

次世代シーケンサーのデータ解析をおこなっていただいた東海大学伊勢原研究推進部教育・研究支援センター情報科学部門の林英樹氏ならびに田中政之氏に感謝します。

文 献

- 1) Bettinotti M, Mitsuishi Y, Bibee K, *et al.*: Comprehensive method for the typing of HLA-A, B and C Alleles by direct sequencing of PCR products obtained from genomic DNA. *Journal of Immunotherapy* (20): 425–430, 1997.
- 2) 吉川枝里, 宮原詞子, 成瀬妙子 他: PCR-Luminex 法を用いた, HLA-A, HLA-B および HLA-DRB1 遺伝子の日本人対応 4 桁 DNA タイピング方法の検討. *MHC* 10: 21–31.
- 3) Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, *et al.*: High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics* (57): 717–729, 2005.
- 4) Rozemuller E. Collection and analysis of SBT results data. 13th IHWS Technology Joint Report. *Immunobiology of Human MHC Vol. 1* (ed. Hansen JA), p. 413–416, 2006.
- 5) IMGT-HLA database (Release 3.7.0, 12 January 2012). <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>
- 6) 鈴木進悟, 尾崎有紀, 吉川枝里 他: 次世代シーケンサーを用いた HLA クラス I 遺伝子の超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発. *MHC* 19: 43–54.
- 7) Bentley G, Higuchi R, Högglund B, *et al.*: High-resolution, high-throughput HLA genotyping by next-generation sequencing. *Tissue Antigens* (74): 393–403, 2009.
- 8) Holcomb CL, Högglund B, Anderson MW, *et al.*: A multi-site study using high-resolution HLA genotyping by next generation sequencing. *Tissue Antigens* (77): 206–217, 2011.
- 9) Lind C, Ferriola D, Mackiewicz K, *et al.*: Next-generation sequencing: the solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing. *Human Immunology* (71): 1033–1042, 2010.

Development of Super high resolution Single moleculeSequence Based Typing (SS-SBT) method in HLA-DRB1 gene by next generation sequencing

Yuki Ozaki*, Shingo Suzuki*, Eri Kikkawa, Atsuko Shigenari, Akira Oka, Shigeki Mitsunaga, Takashi Shiina, Hidetoshi Inoko

Department of Molecular Life Science, Division of Basic Medical Science and Molecular Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1143, Japan

Summary: Current HLA-DNA typing methods, PCR-SBT and PCR-Luminex methods, are used for routine testing. However, these methods yield ambiguous typing results because of lack of oligonucleotide probes and phase ambiguity for HLA allele determination. In this paper we described the development and first application of 8-digit level super high resolution single molecule-sequence based typing (SS-SBT) method for HLA-DRB1 loci using next generation sequencer, Roche GS Junior Bench Top System aimed at elimination of phase ambiguity. Seven PCR group-specific primer pairs for HLA-DRB1 were designed to amplify the genomic region from exon 2 to exon 6, and the PCR condition was set to amplify all of the HLA-DRB1 alleles simultaneously in a single tube. By this SS-SBT typing of the HLA-DRB1 loci using 19 samples that were observed with phase ambiguities for HLA-DRB1 when defined by conventional HLA-DNA typing methods, all of them except for two alleles were typed to single HLA alleles at the 8-digit level by next generation sequencing. Therefore, the SS-SBT method is strongly suggested to be a superior HLA-DNA typing method to efficiently detect new HLA alleles and null alleles along with effective 8-digit level DNA typing for HLA-DRB1 without ambiguity.

Key Words: HLA-DRB1, next generation sequencer, PCR, DNA typing, super high resolution single molecule-sequence based typing (SS-SBT)

日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定

I. 投稿について

内容：MHC に関する基礎研究から臨床研究まで全てを対象にし、未発表の論文、他誌に投稿中でないものに限る。

資格：著者（共著者を含む）は原則として本学会会員に限る。

倫理：ヒトおよびヒトの試料を用いた臨床研究・基礎研究の場合、1980年ヘルシンキ宣言（第18回 World Medical Assembly にて採択）に基づくと共に、当該施設の倫理委員会の承諾を得たものでなければならない。また動物を用いた研究については「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」（1980年日本学術会議決議）などを遵守し行われた研究でなければならない。

種類：原著、総説、シリーズ、短報（研究速報、技術速報などを含む）、症例報告などとし、日本語、英語を問わない。

審査：投稿論文掲載の採否は当誌編集委員会において決定し、審査は複数の査読制で行う。審査の結果を踏まえ修正、削除、加筆などをお願いする場合がある。

著作権：本誌に掲載された論文などの著作権は日本組織適合性学会が有し、インターネットを通じて電子配信されることがある。

掲載料：掲載は無料であるが、カラー写真など特別印刷に関わる経費は著者の実費負担とする（カラー印刷を希望の場合にはその旨明記）。

別冊：別冊は有料とし、その経費は別冊部数やページ数による（別冊希望の場合は著者校正の際にその旨明記）。

II. 原著執筆書式

1. 執筆要項

400字詰め原稿用紙換算で30枚（刷り上がり12頁程度）以内とする。図、表、写真は1個につき原稿用紙1枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文は Microsoft Word で作成

し、図、表、写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は全て CD ロムに保存し、CD ロムに A4 サイズでプリントアウトした原稿3部を添えて編集長宛に送付する。

2. 第1頁目

表紙とし「原著」を明記し、日本語と英語でタイトル、著者全員の氏名と所属を記し、脚注として連絡責任者の住所、氏名、電話、FAX、E-mail アドレスを記載する。タイトル、著者名、所属は下記の形式に従う。

Susceptibility gene for non-obstructive azoospermia in the HLA class II region: correlations with Y chromosome microdeletion and spermatogenesis.

Tetsuya Takao¹⁾, Akira Tsujimura¹⁾, Masaharu Sada²⁾, Reiko Goto²⁾, Minoru Koga³⁾, Yasushi Miyagawa¹⁾, Kiyomi Matsumiya¹⁾, Kazuhiko Yamada²⁾, Shiro Takahara¹⁾

- 1) Department of Urology, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan
- 2) Department of Regenerative Medicine, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka, Japan
- 3) Department of Urology, Osaka Central Hospital, Osaka, Japan

心移植における FlowPRA 法を用いた HLA 抗体検出の意義

山本 賢¹⁾, 佐藤 清¹⁾, 佐田 正晴²⁾, 永谷 憲歳²⁾, 中谷 武嗣³⁾

- 1) 国立循環器病センター臨床検査部
- 2) 国立循環器病センター再生医療部
- 3) 国立循環器病センター臓器移植部

3. 本文—1：日本語での投稿

・2頁目に400 words 以内の英文要旨（和文要旨必要なし）、日本語および英語のキーワード（5語以内）を記載する。尚、英文要旨作成については編集委員会による対応も可能（希望の場合、400字以内の日

本語要旨を記載しその旨明記)。

・3 頁目より、「はじめに」、「材料と方法」、「結果」、「考察」、「引用文献」の順に記載する。

- ①専門用語以外は常用漢字，新かなづかいに従い記述する。
- ②本文中の英単語は固有名詞を除き全て小文字で統一する。
- ③地名，人名，学名は原語のまま用い，薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ④単位，数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, µl, %, °C など) を，数字はアラビア文字を用いる。

4. 本文—2：英語での投稿

・2 頁目に 250 words 以内の要旨，キーワード (5 語以内) を記載する。

・3 頁目より，「Introduction」，「Materials and Methods」，「Results」，「Discussion」，「References」の順に記載する。

- ①地名，人名，学名は原語のまま用い，薬品名は一般名を用い商品名は括弧内に記す。
- ②単位，数量は国際単位 (cm, ml, g, Kg, pg, µl, %, °C など) を，数字はアラビア文字を用いる。

5. 引用文献

引用文献は本文中の引用箇所の右肩に片カッコ付きで番号を付し，引用順に一括し記載する。著者名，編集者名は筆頭者から 3 名まで列記し，他または *et al.* とする。

1. Shi Y, Yoshihara F, Nakahama H, *et al.*: A novel immunosuppressant FTY720 ameliorates proteinuria and alterations of intrarenal adrenomedullin in rats with autoimmune glomerulonephritis. *Regulatory Peptides* (127): 233–238, 2005.

2. Tongio M, Abbal M, Bignon JD, *et al.*: ASH#18: HLA-DPB1. *Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication* (ed. Charron D), Medical and Scientific International Publisher, p. 134–136, 1997.

3. 難波行臣，今尾哲也，石黒 伸 他：既存抗体陽性生体腎移植後に生じた抗体関連型拒絶反応に対

して血漿交換および免疫グロブリン大量療法 (IVIG) が奏効した 1 例. *血管外科* 17: 36–40, 2005.

4. 佐田正晴，高原史郎：腎移植—組織適合と拒絶反応. *新図説泌尿器科学講座 6「腎疾患，神経泌尿器科，老年泌尿器科」* (吉田 修 監)，Medical View 社，p. 120–125, 2000.

III. 短報 (研究速報，技術速報などを含む)，症例報告執筆書式

1. 執筆要項

400 字詰め原稿用紙換算で 15 枚 (刷り上がり 6 頁程度) 以内とする。図，表，写真は 1 個につき原稿用紙 1 枚分に該当しタイトルを必ず記載し挿入箇所を本文に明記する。本文は Microsoft Word で作成し，図，表，写真は Microsoft PowerPoint を使用する。原稿は全て CD ロムに保存し，CD ロムに A4 サイズでプリントアウトした原稿 3 部を添えて編集長宛に送付する。

2. 第 1 頁目

表紙とし「短報」「症例報告」を明記し，日本語と英語でタイトル，著者全員の氏名と所属を記し，脚注として連絡責任者の住所，氏名，電話，FAX，E-mail アドレスを記載する。タイトル，著者名，所属は「原著」の形式に従う。

3. 本文 (日本語および英語での投稿)

・2 頁目に，英文要旨 (200 words 以内)，キーワード (3 語以内) を記載。

・3 頁目以降は，原著執筆書式 3. の 3 頁目以降に準じる。

IV. 総説，シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが，会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。総原稿枚数は編集委員会で指定し，原則的に原著執筆書式に準じる。

V. 原稿送付先

〒 565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
 大阪大学大学院医学系研究科 J8
 先端移植基盤医療学
 日本組織適合性学会誌 MHC
 編集長 高原 史郎
 担当 谷本 佳澄 <E-mail: tanimoto@att.med.osaka-u.ac.jp>
 Tel: 06-6879-3746 Fax: 06-6879-3749

	総原稿枚数 (図表, 文献含む)	図表数	文献数	要旨	原稿タイトル 所属, 著者	キーワード 数	査読	著者 校正
原著	30 枚以内	5~10個 以内	20 個以内	英文原著 英文 250 words 以内 和文原著 英文 400 words 以内	和英併記	5 個	有り	1 回
短報, 症例報告	15 枚以内	5 個以内	10 個以内	和文、英文とも英文 200 words 以内	和英併記	3 個以内	有り	1 回
総説, その他	その都度指定	適宜	20 ~ 30 個前後	和文 400 字以内	和英併記	5 個	なし	1 回

編集後記

MHC 19 巻 2 号をお届けする。この 5 月終わりから 6 月にかけてリバプールで開催された 16 回国際 HLA ワークショップ (16th International HLA and Immunogenetics Workshop (IHIW) and Conference) では、HLA 抗体と次世代シーケンサーによる HLA タイピングが二大テーマになったと聞く。いずれ本誌にも参加した一戸辰夫先生らにレポートしていただく予定である。今号は奇しくも原著に「次世代シーケンサーを用いた HLA-DRB1 遺伝子の超高解像度 DNA タイピング (Super high resolution Single molecule-Sequence Based Typing; SS-SBT) 法の開発」が東海大学の猪子グループから報告されている。略語の SS-SBT がそろそろ世間を席卷しそうである。最大のメリットはアンビギュイティ (ambiguity) の解消である。また、家族データを得なくてもハプロタイプが決められる。

HLA 抗体関連として [シリーズ: 臓器移植とクロスマッチ] がはじまったのも時宜を得たと自負している。その第 1 回として、本学会の理事である小林孝彰先生に「腎移植におけるクロスマッチ」を執筆いただいた。世界ではルミネックス法という新しい技術により得られた結果の臨床的解釈が議論され、技術的標準化の波が押し寄せている。ともすれば保守的になりがちな臓器移植界で、斬新な提案が大いに期待される。

MHC の Web 発行について鋭意検討中である。HLA の論文はデータ量が膨大になることが多く、早い Web 化が期待されている。

佐治 博夫

「MHC」バックナンバー

一冊 ¥2,000 にて購入できます。学会事務局までお問い合わせ下さい。なお在庫僅少の号もありますので、万一品切れの際にはご容赦ください。

日本組織適合性学会ホームページ

学会活動に関する情報や HLA 遺伝子の塩基配列情報が利用できます。

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

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

学会事務局からのお知らせ

平成 23 年度総会で承認されました通り、平成 24 年度より、学会事務の一部を外部委託することとなりました。

委託業務は以下の通りです。

入退会手続

届け出事項の変更手続き

年会費請求手続き

学会誌等の発送

本年 5 月より、ご自身で会員情報にアクセスするオンラインシステムの利用が可能となりました。各種申請については、日本組織適合性学会ホームページ URL : <http://jshi.umin.ac.jp/> より行えます。

詳しくは、学会ホームページ URL : <http://jshi.umin.ac.jp/> にアクセスの上、「学会事務局からのお知らせ」をご覧ください。

また、これらに関するお問い合わせ、届け出については、学会事務支局 Email:jshi@nacos.com にて取り扱います。

その他の学会業務に関するお問い合わせは、従来通り学会事務局にて受け付けます。

学会事務局

〒 113-8510

東京都文京区湯島 1-5-45

M&D タワー 22F

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子病態分野内

電話 : 03-5803-4906

FAX : 03-5803-4907

Email : jshijimu.tis@mri.tmd.ac.jp

事務支局

〒 602-8048

京都市上京区下立売通東入ル

中西印刷株式会社 学会部内

日本組織適合性学会事務支局

電話 : 075-415-3662

FAX : 075-415-3661

Email : jshi@nacos.com

MHC

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

2012 年 8 月 10 日発行 19 卷 2 号, 2012

定価 2,000 円

発行 日本組織適合性学会 (会長 木村 彰方)

編集 日本組織適合性学会編集委員会 (編集担当理事 高原 史郎)

平成 8 年 7 月 24 日 学術刊行物認可

日本組織適合性学会 (事務局担当理事 木村 彰方)

〒 113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 医歯学総合研究棟 (II) 22F

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子病態分野内

印刷・中西印刷株式会社

〒 602-8048 京都市上京区下立売通小川東入ル西大路町 146