

日本人全身性エリテマトーデスにおける
主要組織適合遺伝子複合体の検討

指導教官名 伊藤幸治 教授

昭和63年4月

東京大学大学院 医学系研究科

第3種博士課程（医学）

第一臨床医学専攻 入学

山 田 浩 文

論文題目 Major histocompatibility complex in
Japanese patients with systemic lupus
erythematosus

日本人全身性エリテマ
ト一デスに oike る主要
組織適合遺伝子複合体
の検討

指導教官名 伊藤幸治 教授

昭和63年4月
東京大学大学院医学系研究科
第3種博士課程(医学)
第一臨床医学専攻 入学

氏名 山田 浩 文

Major histocompatibility complex in
Japanese patients with systemic lupus
erythematosus

マ 主 複 子 伝 遺 合 適 組
テ 主 複 子 伝 遺 合 適 組
リ 主 複 子 伝 遺 合 適 組
エ 主 複 子 伝 遺 合 適 組
性 主 複 子 伝 遺 合 適 組
身 主 複 子 伝 遺 合 適 組
全 主 複 子 伝 遺 合 適 組
人 主 複 子 伝 遺 合 適 組
本 主 複 子 伝 遺 合 適 組
日 主 複 子 伝 遺 合 適 組
ト 主 複 子 伝 遺 合 適 組
組 主 複 子 伝 遺 合 適 組

山 田 浩 文

Hirofumi Yamada

目 次

	頁
序	1
〔Ⅰ〕 日本人 SLE と補体 C4 との関連に関する 検 討	
はじめに	4
対 象 お よ び 方 法	7
結 果	8
考 察	1 4
〔Ⅱ〕 日本人 SLE と HLA-DR との関連に関する 検 討	
はじめに	1 7
対 象 お よ び 方 法	1 9
結 果	2 8
考 察	3 8
総 括	4 2
謝 辞	4 4
文 献	4 5

全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) は皮膚、関節、腎臓、中枢神経系、漿膜など全身を広く侵す多臓器障害性の慢性炎症性疾患であり、組織・細胞成分に対する多彩な自己抗体の出現を見る代表的な自己免疫疾患である。そして、その発症には遺伝要因と環境要因の関与があるものと想定されている。

SLE に遺伝的な要因が関与しているという根拠は、①一卵性双生児における SLE の一致率が 69% と二卵性双生児のそれ (3%) よりもはるかに高いこと¹⁾、② SLE 患者の家族に SLE や免疫異常が見られることが多いこと²⁾、③北米インディアンなど特定の人種で SLE の発症率が高いこと³⁾ ④ SLE では特定の Gm (IgG heavy chain allotype) や Km (kappa chain allotype) phenotype との相関がみられたり^{4, 5)}、赤血球の補体レセプター (CR1) が減少している^{6, 7)} などいくつかの遺伝的マーカーが知られていることなどがあげられる。しかも遺伝様式は単純な遺伝形式に則っていないことから、SLE では複数の遺伝子が発症に関与し、各々の遺伝子が相加的あるいは相乗的に作用することにより発症に至るポリジーン疾患と考えられている。

近年免疫応答の個体差を遺伝的に規定している主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) と各種自己免疫疾患との関連についての検討が盛んに行われている。SLE と MHC との関連については、白人 SLE では HLA-B8, DR3, DR2, 補体 C4A null allele (C4A Q0) と⁸⁻¹³⁾、米国黒人 SLE では HLA-DR2, DR3, DR7, C4A Q0 との相関が報告されている^{14, 15)}。また日本人 SLE では HLA-DR2, DR4, DR9, C4AQ0 との相関が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、各人種とも HLA-DR に関しては SLE と相関無しとする報告も多く^{8, 14)}、まだ十分なコンセンサス

が得られていないようである。

MHC class III 領域に属する C4 については、SLE では白人¹⁰⁻¹³⁾、米国黒人^{11, 15)}、香港在住中国人¹⁹⁾、日本人^{16, 17)}など人種を越えて C4AQ0 が高率にみられると報告されている。そして白人^{20, 21)}や米国黒人²²⁾の SLE では C4AQ0 の大半に C4 遺伝子の大きな欠失が見られ、しかも白人では C4 遺伝子の欠失のほとんどが HLA-B8, C4AQ0, DR3 という特定のハプロタイプに乗っているのも、この遺伝子欠失が白人 SLE の遺伝子マーカーとされている。しかし米国黒人以外の黒人や黄色人種ではまだこの遺伝子レベルでの検討はなされていない。そこで私は、白人や米国黒人 SLE で高率に見られる遺伝子欠失が日本人 SLE でも高率に見られるのかを明らかにするために日本人 SLE で C4 タイピングとその遺伝子レベルでの検討を試みた。

また前述の通り SLE と HLA-DR の関連については多数の報告があるにもかかわらず、同一人種でも報告により相関する DR タイプが異なったり相関がみられないことも多い。このように各報告が一致しない一つの要因として SLE では抗リンパ球抗体が高率にみられるなど経験的に HLA の血清学的タイピングが非常に困難であることが挙げられる²³⁾。最近では genomic DNA を用いた MHC class II 領域の DNA タイピングが行われ、その欠点が補われてきたが、PCR (polymerase chain reaction) 法で class II 遺伝子を増幅した後、各タイプ特異的なプローブとハイブリダイズしたり (PCR-SSO (specific sequence oligonucleotides) 法)²⁴⁾、各種制限酵素で処理してその RFLP (restriction fragment length polymorphism) パターンを調べたり (PCR-RFLP 法)²⁵⁾と、多数のサンプルをタイピングするにはやや煩雑な手法である。そこで、私は各 DR タイプ特異的なプライマーを合成し、PCR 法により DR 遺伝子が増幅されるか否かだけで DR のタイピング

を行える手法を確立し、日本人 SLE 患者で DR の DNA タイピングを試みてみた。

[I] 日本人 SLE と補体 C4 との関連に関する検討

はじめに

補体第 4 成分 (C4) は電気泳動で区別される A と B の 2 つのアイソタイプを持ち、今までに C4A には 13 種の、C4B には 22 種のアロタイプが同定されている²⁶⁾。そして C4A と C4B にはそれぞれ対応する C4A と C4B 遺伝子があり、それらは第 6 染色体短腕上の HLA-B と HLA-DR 遺伝子座との間に存在し、C2, factor B, 21-hydroxylase A (210HA), 21-hydroxylase B (210HB), tumor necrosis factor α and β (TNF α , β), heat shock protein 70 (HSP70) 遺伝子とともに MHC class III 領域を形成している^{27, 28)}。C4A, C4B 遺伝子座のすぐ下流域にはそれぞれ 210HA, 210HB 遺伝子座があり、210HA 遺伝子座は C4A と C4B 遺伝子座の間に挟まれる形となっている²⁹⁾ (図 1)。

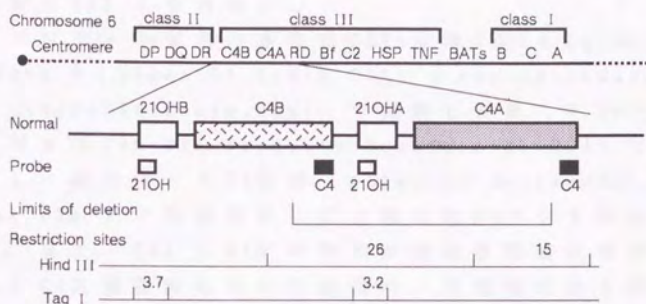
SLE ではしばしば低補体血症が認められることや、先天的補体 C2 および C4 欠損症で SLE 様症状を呈することが多いことなどから以前より補体異常が SLE の病態に深く関わっていると考えられていた。1983 年 Fielder らが白人 SLE 患者の 62% に補体 C4A の部分及び完全欠損 (C4A-null allele; C4AQ0) を認めたと報告し、SLE と C4AQ0 の関連性を指摘して以来同様の報告が相次いだ¹⁰⁻¹³⁾。さらに、米国黒人^{11, 15)}、香港在住中国人¹⁹⁾、日本人^{16, 17)}でも同様に SLE と C4AQ0 との関連が報告されている。

1987 年には Kemp らは cloning された C4 及び 210H の cDNA を利用して遺伝子解析を行い、C4AQ0 の認められる白人 SLE 患者の 50% に C4A 遺伝子の欠失が見られ、この遺伝子欠失は隣接する 210HA 遺伝子を伴った大きな欠失であると指摘するとともに、この遺伝子欠失例のほとんどに HLA-B8, DR3 ハプロタイプが見られると報告した^{20, 21, 30, 31)} (図 1)。それ以来この遺伝子欠失が白人 SLE の遺伝子マーカーとして注目されている。

しかし、まだ日本人を含めた黄色人種や米国以外の黒人についてこの検討はされていない。そこで私はこの遺伝子欠失が人種を越えて広くSLEに見られるものか、人種差による遺伝的バックグラウンドの違いを反映するものであるかを明らかにするために、日本人SLE患者でC4蛋白の多型の解析とC4と210H遺伝子のRFLP解析を行い、C4AQ0とC4A遺伝子欠失の頻度を検討してみた。

また、C4AQ0がSLEの発症・進展に関与しているとする、複数あるSLEの発症要因のうちのC4AQ0を持つSLEと持たないSLEでは臨床的な差異が見られる可能性がある。そこで、C4のタイプによりSLEの臨床像に差異があるかも検討してみた。

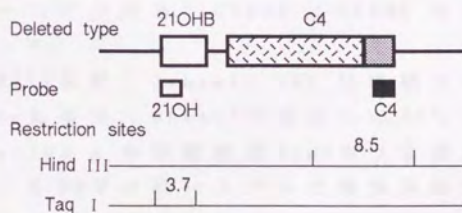
図1. ヒトC4および210H遺伝子の遺伝子地図



これは正常人のC4と210Hの遺伝子地図である。C4と210H遺伝子はMHC class III領域に位置している。図に示したところに遺伝子の欠失が起こりうる。

TNF:tumor necrosis factor, HSP:heat shock protein 70

BATs:B-associated transcripts, restriction mapの数字の単位はkb



これはC4A と210HA 遺伝子欠失例の遺伝子地図である。C4プローブを用いたHind III-RFLP解析で8.5kbバンドが出現する。これが遺伝子欠失のマーカーとされる。

対象および方法

対象：当科外来通院中で1982年のアメリカリウマチ協会のSLE診断基準³²⁾を満たす日本人SLE患者80人と、日本人健常人122人を対象とした。

C4タイピング：C4蛋白の多型はEDTA血漿7 μ lをcarboxypeptidase B (Sigma, St. Louis, USA) とneuraminidase (Type IV, Sigma, St. Louis, USA) で処理した後、0.7%アガロースゲル (FMC Bio Products, Rockland, ME, USA) で電気泳動し、家兎抗ヒトC4血清 (Atlantic Antibodies, Westbrook, USA) で免疫固定して出現したC4バンドから判定した。また、C4AとC4Bの判別が困難な場合は感作羊赤血球とC4欠損血清を用いて溶血バンド形成により判定した³³⁻³⁵⁾。なお、本来C4A、C4Bともに二つずつphenotypeを持つのであるが、電気泳動上C4A、C4Bともに同程度の濃度のバンドが1本ずつ認められた例ではC4AQ0とC4BQ0を同時に一つずつ持つのか、C4A、C4Bともにホモ接合体でそのどちらも欠損していないのかを区別することが出来ない。これらの症例は欠損の有無が不明であるので、possible heterozygousと呼ばれ、欠損は無いものと扱うのが一般的である。そこで今回もこれらの症例のC4 phenotypeはC4A、C4Bともに出現したバンドのタイプを一つずつ持ち、C4AQ0、C4BQ0は持たないものとして扱った。

C4遺伝子のRFLP解析：Genomic DNAは末梢血中の白血球をproteinase処理後、phenolで抽出した³⁶⁾。得られたgenomic DNA 10 μ gを制限酵素HindIII (宝酒造、京都) で切断した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動し、Southern法でナイロン膜 (Zeta-Probe, Bio-Rad, Richmond, USA) に転写する³⁷⁾。そして³²Pでラベルした5'端0.7kbのC4プローブ (Dr. Carroll より供与)³⁸⁾とハイブリダイズした後、ナイロン膜でX線フィルムを感光させてRFLPパターンを解析した。

210H遺伝子のRFLP解析：解析法はC4と同様であるが、210Hプローブは第10回組織適合ワークショップより供与されたものを用い³⁹⁾、制限酵素はTaq I（宝酒造、京都）を用いた。

臨床データの解析：SLE患者をC4AQ0陽性群、C4BQ0陽性群、C4AQ0・C4BQ0ともに陰性の群の3群に分類した。各群間で発症年齢、リウマチ性疾患の家系内発症、予後（死亡率）、臨床症状（習慣性流産、顔面紅斑、ディスコイド疹、光線過敏症、脱毛、レイノー現象、漿膜炎、口腔潰瘍、関節炎、精神神経症状、腎障害、ルポイド肝炎、血管炎、シェーグレン症候群の合併、無腐性骨壊死の頻度）および検査所見（溶血性貧血、白血球減少、リンパ球減少、血小板減少、抗DNA抗体、抗Sm抗体、抗RNP抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体、LE細胞、生物学的偽陽性、Coombs試験、リウマチ因子の頻度およびCH₅₀、C3、C4の最近2年間の最高値と最低値）について χ^2 検定（例数の少ないものはYatesの修正式）とt検定を用い統計学的に有意差を検討した。なお、C4タイプを確定できない症例（possible heterozygous）は除外した。

結 果

C4タイピング：C4タイピングの結果を表1に示した。C4AQ0の頻度はSLE群で32.5%とコントロール群の13.1%に比べ有意に高かった（32.5%vs13.1%, $\chi^2=13.3$, $p<0.005$ ）。そして、この結果は1987年Kempらが白人SLE患者88人中38人の43.2%にC4AQ0を認めたとの報告²⁰⁾と統計学的に有意差を認めなかった。しかし、SLE群、コントロール群とも、C4AQ0はいずれもヘテロ接合体でホモ接合体は1例もなかった。これは、KempらがC4AQ0の見られる白人SLE 38例中9例がホモ接合体であったという報告²⁰⁾に比べ有意に少なかった（0.0%vs23.7%, $\chi^2=5.34$, $p<0.025$ ）（表2）。

C4遺伝子のRFLP解析：C4遺伝子のRFLP解析の結果を図2及び表3に示した。C4Aの遺伝子欠失の頻度であるが、HindIII-RFLP解析でC4A遺伝子欠失に特異的と言われている8.5kbバンドはコントロール群では1例だけに見られたが、SLE群では1例も見られなかった。

210H遺伝子のRFLP解析：210HA遺伝子の欠失はSLE群の全例で検討したが、210HA遺伝子に相当する3.2kbバンド、210HB遺伝子に相当する3.7kbバンドがいずれの症例にも検出され、210H遺伝子の欠失例は1例もなかった。

臨床データの解析：臨床データの解析結果を表4、表5に示す。発症年齢、リウマチ性疾患の家系内発症の頻度に各群間の差はなかった。臨床症状では腎病変がC4AQ0陽性群で77.3%、C4BQ0陽性群で80.0%と高率に認められたが、C4AQ0・C4BQ0陰性群ではそれらに比べ28.6%と有意に低率であった(C4AQ0・C4BQ0陰性群vsC4AQ0陽性群 & C4BQ0陽性群：28.6%vs78.1%, $\chi^2=4.50$, $p<0.05$)。また、検査所見では、C4AQ0陽性群で抗Sm抗体が45.0%と、C4BQ0陽性群の0.0%、C4AQ0・C4BQ0陰性群の14.3%に比べ有意に高率であった(C4AQ0陽性群vsC4BQ0陽性群 & C4AQ0・C4BQ0陰性群：45.0%vs6.3%, $\chi^2=4.86$, $p<0.05$)。

表1. SLEおよびControlのC4 phenotype

C4 type	SLE		Controls	
	No.	(%)	No.	(%)
C4A	1	(1.3)	1	(0.8)
	2	(16.3)	24	(19.7)
	3	(83.4)	100	(82.0)
	4	(26.3)	37	(30.3)
	Q0	(32.5)*	16	(13.1)*
C4B	1	(73.8)	92	(75.4)
	2	(38.8)	49	(40.2)
	5	(16.3)	17	(13.9)
	Q0	(17.5)	15	(12.3)
C4AQ0(+)	26	(32.5)	16	(13.1)
C4AQ0(-)	33	(41.3)	78	(63.9)
不明	21	(26.2)	28	(23.0)
合計	80	(100.0)	122	(100.0)

C4AQ0: $\chi^2=13.3, p<0.005$

不明: possible heterozygous

表2. 日本人及び白人SLEとC4AQ0

	C4AQ0	C4AQ0	C4AQ0(-)	合計
	ホモ接合体*	ヘテロ接合体		
日本人SLE	0 (0.0%)	26 (32.5%)	54 (67.5%)	80 (100.0%)
白人SLE**	9 (10.2%)	29 (33.0%)	50 (56.8%)	88 (100.0%)

*: ホモ接合体, $\chi^2=5.43, p<0.025$

** : Kemp et al (1987)²⁰⁾

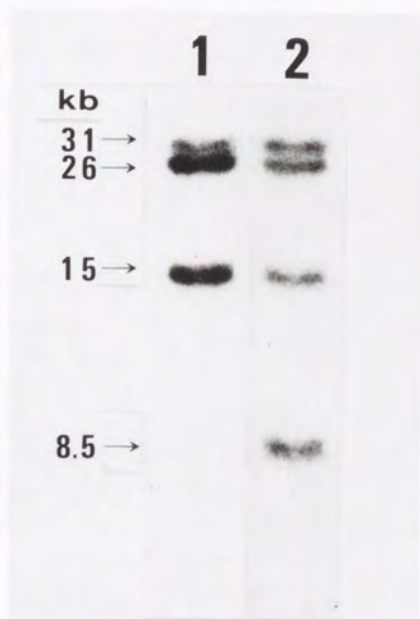


図2. C4ブローブを用いたHindIII-RFLP 解析

レーン1 はC4AQ0 陽性SLE 例のRFLPパターンである。C4A 遺伝子欠失に特異的とされるHindIII-8.5kbバンドはSLE 群では1 例も見られなかった。

レーン2 はコントロール群で1 例のみに見られた8.5kbバンドを含むRFLPパターンである。

表3. SLE およびControl におけるC4A 遺伝子欠失の頻度

	homozygous	heterozygous	non-deleted	total
SLE	0 (0.0%)	0 (0.0%)	80 (100.0%)	80 (100.0%)
Control	0 (0.0%)	1 (0.8%)	121 (99.2%)	122 (100.0%)

表4. SLE における臨床症状とC4 phenotypeとの関連

臨床所見	C4AQ0 (+)	C4BQ0 (+)	C4AQ0 (-)	
			C4BQ0 (-)	合計
発症年齢	25才10カ月	30才0カ月	24才7カ月	26才 8カ月
家系内発症	22.7%(5/22)	10.0%(1/10)	28.6%(2/7)	20.5%(8/39)
予後 (死亡率)	4.5%(1/22)	11.1%(1/9)	14.3%(1/7)	7.9%(3/38)
習慣性流産	9.1%(2/22)	0.0%(0/10)	0.0%(0/7)	5.1%(2/39)
顔面紅斑	90.1%(20/22)	80.0%(8/10)	57.1%(4/7)	82.1%(32/39)
ディスクロイド疹	20.0%(4/20)	30.0%(3/10)	14.3%(1/7)	21.6%(8/37)
光線過敏症	44.4%(8/18)	44.4%(4/9)	50.0%(3/6)	45.5%(15/33)
脱毛	68.2%(15/22)	60.0%(6/10)	71.4%(5/7)	66.7%(26/39)
レイノー現象	54.5%(12/22)	50.0%(5/10)	57.1%(4/7)	53.8%(21/39)
漿膜炎	23.8%(5/21)	30.0%(3/10)	16.7%(1/6)	24.3%(9/37)
口腔潰瘍	21.1%(4/19)	30.0%(3/10)	57.1%(4/7)	30.6%(11/36)
関節炎	88.9%(16/18)	90.0%(9/10)	100.0%(7/7)	91.4%(32/35)
精神神経症状	27.3%(6/22)	30.0%(3/10)	28.6%(2/7)	28.2%(11/39)
腎障害 *	77.3%(17/22)	80.0%(8/10)	28.6%(2/7)	69.2%(27/39)
ルポイド肝炎	4.8%(1/21)	0.0%(0/10)	0.0%(0/7)	2.6%(1/38)
血管炎	4.5%(1/22)	20.0%(2/10)	14.2%(1/7)	10.3%(4/39)
SJS**	26.3%(5/19)	25.0%(2/8)	42.9%(3/7)	29.4%(10/34)
無腐性骨壊死	18.1%(4/22)	40.0%(4/10)	28.6%(2/7)	25.6%(10/39)

*: C4AQ0 (-)・C4BQ0 (-) vs others, $\chi^2=4.50$, $p<0.05$

** : シェーグレン症候群の合併

表5. SLE における検査所見とC4 phenotypeとの関連

検査所見	C4AQ0 (+)	C4BQ0 (+)	C4AQ0 (-)	合計
			C4BQ0 (-)	
溶血性貧血	0.0% (0/20)	10.0% (1/10)	14.2% (1/7)	5.4% (2/37)
白血球減少	71.4% (15/21)	70.0% (7/10)	85.7% (6/7)	73.7% (28/38)
リンパ球減少	71.4% (15/21)	70.0% (7/10)	57.1% (4/7)	68.4% (26/38)
血小板減少	38.1% (8/21)	30.0% (3/10)	14.2% (1/7)	31.6% (12/38)
抗DNA抗体	90.5% (19/21)	88.9% (8/9)	71.4% (5/7)	86.5% (32/37)
抗Sm抗体*	45.0% (9/20)	0.0% (0/9)	14.3% (1/7)	27.8% (10/36)
抗RNP抗体	60.0% (12/20)	50.0% (5/10)	71.4% (5/7)	59.5% (22/37)
抗SS-A抗体	44.4% (8/18)	37.5% (3/8)	60.0% (3/5)	45.2% (14/31)
抗SS-B抗体	9.5% (2/21)	11.1% (1/9)	16.7% (1/6)	11.1% (4/36)
LE細胞	61.5% (8/13)	66.7% (4/6)	20.0% (1/5)	54.2% (13/24)
生物学的偽陽性	33.3% (7/21)	20.0% (2/10)	0.0% (0/7)	23.7% (9/38)
Coombs試験	55.0% (11/20)	50.0% (5/10)	16.7% (1/6)	47.2% (17/36)
リウマチ因子	45.0% (9/20)	44.4% (4/9)	71.4% (5/7)	50.0% (18/36)
CH ₅₀ max	43.2	43.2	39.6	42.6
(U/ml) min	22.6	22.4	26.2	23.2
C3 max	93.5	92.8	88.7	92.5
(mg/dl) min	47.9	43.2	56.3	48.2
C4 max	19.3	26.8	21.3	21.6
(mg/dl) min	12.1	14.0	15.7	13.2

*: C4AQ0 (+) vs others. $\chi^2=4.86, p<0.05$

考 察

今回の日本人 SLE 患者での検討では、C4AQ0 の頻度は白人での報告とほぼ同程度と高率であり、C4AQ0 は日本人でも SLE と強く関連していると考えられた。

白人 SLE と C4AQ0 との関連は 1983 年の Fielder らの報告に始まり¹⁰⁾、その後多くの報告が見られる¹¹⁻¹³⁾。また、米国黒人 SLE^{11, 15)} や日本人^{16, 17)}、香港在住中国人 SLE¹⁹⁾ など人種を越えて広く C4AQ0 が高率にみられると報告されている。

今回の結果も、今までの報告同様 SLE 患者で高率に C4AQ0 が見られ、その頻度は白人 SLE と同程度であり、その病態との関連を強く示唆した。

一方、白人型の大きな遺伝子欠失は日本人 SLE 患者 80 例中 1 例も認められなかった。つまり日本人 SLE 患者では白人 SLE と異なり、C4AQ0 のほとんどが白人型の大きな遺伝子欠失によるものではなく、より微細な遺伝子の変異によるものと想定される。また、白人 SLE でも C4AQ0 例の約半数は大きな遺伝子欠失によるものではないので^{20, 21)}、C4AQ0 のメカニズムはかなり多様性があるものと考えられる。

C4AQ0 が出現するメカニズムは、このような構造遺伝子の大きな欠失^{30, 31)}のほか、C4A 遺伝子の C4B 遺伝子への遺伝子変換、point mutation によるアミノ酸置換、塩基の挿入あるいは欠失による frame shift、promotor 領域の変異、RNA splicing の異常などが想定されており^{29, 40-43)}、おそらくこれらの全てあるいはいくつかは C4AQ0 の原因となっていると考えられる。

このように C4AQ0 出現のメカニズムは 1 種類ではなく、おそらくは多種多様な機序が関与していると考えられ、また人種により遺伝的バックグラウンドはかなり異なっていることから、C4AQ0 陽性 SLE 症例の C4 遺伝子やその近傍遺伝子にはかなり多様性があるものと想定されるの

で、C4A 蛋白の欠損自体がより直接的に病態に関与しているものと考えられる。

また、白人 SLE では HLA-DR3 が高率に見られ、しかも HLA-DR と C4 の遺伝子座が近いので、両者が連鎖しているために見かけ上 C4AQ0 が多いのではないかと考えることもできる。しかし、HLA-DR3 を持たない白人 SLE でも C4AQ0 は増加しているし⁴⁴⁾、HLA-DR3 が少ない中国人でも SLE で C4AQ0 が高率に見られると報告されており¹⁹⁾、C4AQ0 は HLA-DR3 とは独立に疾患と関連しているものと考えられる。

C4AQ0 が SLE の発症・進展にどの様に関与しているかはまだ明らかではないが、最近の報告では① C4A は免疫複合体の処理に重要な働きをしており、その活性は C4B より高いこと²⁶⁾、② C4 あるいは C2 欠損の動物で血中免疫複合体や自己抗体の出現率が高いことなどから C4A の産生低下のために自己抗体の産生を助長したり、血中の免疫複合体除去能が低下し、ついには SLE の発症につながるのであろうと推測されている⁴⁵⁾。

臨床データの解析では、C4AQ0、C4BQ0 の有無で発症年齢、家系内発症の頻度に差はみられなかった。臨床症状では腎病変は C4AQ0 陽性群で 77.3%、C4BQ0 陽性群で 80.0% と高率であり、C4AQ0・C4BQ0 陰性群では 28.6% と低率であった。また、検査所見では C4AQ0 陽性群で抗 Sm 抗体が 45.0% と他群より高率に認められた。このように、C4AQ0、C4BQ0 の有無で臨床像に差がみられることは C4AQ0、C4BQ0 が SLE の病態に関与をしていることを示唆していると考えられる。特に、抗 Sm 抗体は SLE 特異的な自己抗体であり、抗 Sm 抗体陽性は SLE 診断基準の一項目となっている。つまり抗 Sm 抗体は SLE の発症・進展に深く関わっている可能性が高いと考えられており、この抗 Sm 抗体の出現率が C4AQ0 陽性 SLE 群で高率であることから C4AQ0 が SLE の発症・進展に深く関わっていることを示唆し

ているように思われる。またSLEの腎症は免疫複合体によって惹起されると考えられているが、前述の通りC4欠損は血中免疫複合体の処理能を低下させると考えられているのでC4AQ0およびC4BQ0陽性群の方がC4AQ0・C4BQ0陰性群よりも腎症が高率であったのも予想通りの結果と言えよう。

また、白人SLEでは患者の10-15%にC4AQ0のホモ接合体が見られると報告されているが^{20, 21)}、我々の検討では、C4AQ0例は全てヘテロ接合体であった。なぜ日本人と白人でC4AQ0のホモ接合体の頻度に差があるかは明かではない。しかし、報告されている白人SLEのC4AQ0のホモ接合体例はいずれもC4A遺伝子の欠失を伴っている^{20, 21)}、C4A遺伝子の欠失が無ければC4AQ0のホモ接合体が出現しにくい何らかの理由があるのかもしれない。

さらにC4AQ0の白人SLE患者を遺伝子欠失の有無で分けて検討すると、欠失のあるSLEはほとんど全例がHLA-B8, DR3というハプロタイプを持つが、欠失のないSLEではHLA-DR2と相関している例が多いという²⁰⁾。日本人SLEはHLA-DR2と相関しているとの報告¹⁸⁾もある一方、HLA-DR3はほとんど見られないことから、日本人では欠失が見られなかったのもっともなことかもしれない。つまり、欠失の有無は専ら人種差による遺伝的バックグラウンドの違いを反映しているのではなかろうか。

今後、米国以外の黒人や日本人以外の黄色人種のSLE患者についてC4タイピングとC4遺伝子の解析が行われればC4AQ0やC4A遺伝子の欠失に関する見地がより明かになるであろう。また、C4遺伝子の近傍に位置するHLA-DRとC4 phenotypeとの関連についてもより多くの人種での検討が必要と思われる。

[II] 日本人 SLE と HLA-DR との関連に関する検討

はじめに

近年免疫応答の個体差を遺伝的に規定している MHC 領域と各種自己免疫疾患との関連についての検討が盛んに行われている。SLE と MHC との関連については、白人 SLE では HLA-B8, DR3, DR2, C4AQ0 と^{8, 13)}、黒人 SLE では HLA-DR2, DR3, DR7, C4AQ0 との相関が報告されている^{14, 15)}。また日本人 SLE では HLA-DR2, DR4, DR9, C4AQ0 との相関が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、各人種とも HLA-DR に関しては SLE と相関無しとする報告も多く^{8, 14)}、まだ十分なコンセンサスが得られていないようである。

このように SLE と HLA-DR の関連については多数の報告があるにもかかわらず、同一人種でも報告により相関する DR タイプが異なったり相関が見られないことも多い。このように各報告が一致しない一つの要因として SLE では抗リンパ球抗体が高率にみられるなど経験的に HLA の血清学的タイピングが非常に困難であることが挙げられる²³⁾。

一方、近年の遺伝子工学技術の発展、普及により、HLA 領域の塩基配列が決定されるとともに^{46, 47)} PCR 法により特定の遺伝子配列のみを特異的に増幅することができるようになった⁴⁸⁾。そこで最近では genomic DNA を用いた MHC class II 領域の DNA タイピングが行われるようになったが⁴⁹⁾、PCR 法で class II 遺伝子を増幅した後、各タイプ特異的なプローブとハイブリダイズしたり (PCR-SSO 法)²⁴⁾、各種制限酵素で処理してその RFLP パターンを調べたり (PCR-RFLP 法) と²⁵⁾、多数のサンプルをタイピングするにはやや煩雑な手法である。そこで、私は各 DR タイプ特異的なプライマーを合成し、PCR 法により DR 遺伝子が増幅されるか否かだけで DR のタイピングを行える手法を確立し、日本人 SLE 患者で DR の DNA タイ

ピングを試みてみた。

更に、最近DR2に関しては日本人ナルコレプシー患者の全例にDR2サブタイプのDRB1*1501-DRB5*0101というハプロタイプが見られると報告され、このハプロタイプと特定の疾患との強い関連が指摘されている⁵⁰⁾。また日本人SLEではDR2と比較的弱い関連がみられるとの報告も見られるので¹⁸⁾、DR2陽性例についてはそのサブタイプであるDRB1*1501、DRB5*0101の頻度についても同様のDNAタイピングで検討してみた。

一方、HLA-DRに関しては、SLEの発症率だけではなく特定の臨床症状や抗核抗体の出現率などと関連があるという報告も見られる。すなわち、臨床症状では腎障害とDR2との間に正の関連およびDR4との間に負の関連（米国白人・黒人）⁵¹⁾、若年発症例（20才未満）とDRw8（米国黒人）¹⁴⁾、亜急性皮膚型ループスとDR3（白人）⁵¹⁾との間に正の関連が報告されている。抗核抗体抗ではSSA抗体、抗SSB抗体とDR3、抗DNA抗体および抗Sm抗体とDR7、抗RNP抗体とDR4、リウマチ因子とDR2（以上白人）などで正の関連が報告されている^{52, 53)}。そこで臨床症状や検査所見と特定のHLA-DRのタイプとの関連があるかどうかについても検討してみた。

対象および方法

対象：当科外来通院中で1982年のアメリカリウマチ協会のSLE診断基準を満たす日本人SLE 80例と日本人健康人95人を対象とした³²⁾。

C4タイピング：C4蛋白の多型は第一章と同様にEDTA血漿をcarboxypeptidase Bとneuraminidaseで処理した後、0.7%アガロースゲルで電気泳動し、家兎抗ヒトC4血清による免疫固定法及び溶血バンド形成により判定した³³⁻³⁵⁾。また、possible heterozygousの扱いも第一章と同様に、C4A、C4Bともに出現したバンドのタイプを一つずつ持つこととし、C4AQ0、C4BQ0は持たないものとして扱った。

HLA-DRタイピング：Marshら^{46, 47)}が発表したHLA-DRの全塩基配列のうち、各タイプに特異的な塩基配列を選び、DNA合成機(Applied Biosystems社、東京、Model 391 PCR-MATE DNA synthesizer)を用いてプライマーを合成した(表6)。

Genomic DNAは末梢血中の白血球をproteinase処理後、phenolで抽出した³⁶⁾。

合成したプライマーを用いて、血清タイピングが判っているパネルのgenomic DNAをPCR法(反応条件は熱変性94℃、1分、アニーリング58~63℃、1分、DNA合成72℃、2分、サイクル数35回。Taq polymeraseは宝酒造、京都。反応装置はAstec社、東京、Model PC-700)により増幅し、各タイプ特異的な増幅が行われているかアガロース電気泳動により確認し、各DRタイプ特異的にPCR増幅できるプライマーの組合せと反応条件を設定した⁴⁸⁾(表7、8)。また、増幅されたDNAが目的とするDR遺伝子か確認するために、パネルのgenomic DNAを用いて増幅したDNAを制限酵素TaqI、AluI、HaeIII(いずれも宝酒造、京都)のいずれかで切断し、予想される長さ切断されるかアガロース電気泳動により確認した(図3、4)。

そして、設定した条件でSLEおよび健常人 genomic DNA をPCR増幅し、DR遺伝子が増幅されているか否かをアガロース電気泳動で確認してDRタイピングを行った。なお、今回のタイピングでタイプできるDRサブタイプとObataら²⁴⁾によって報告されたPCR-SSO法による日本人健常人の各DRサブタイプの頻度を表9に示した。

またDR2のサブタイプであるDRB1*1501、DRB5*0101についても表6に示したプライマーを合成し、同様にパネルの genomic DNA を用いて各々特異的に増幅されるプライマーの組合せと反応条件を設定し(表7)、DR2陽性例について各々のDNAタイピングを試みた。なお、これらのサブタイプについてもパネルの genomic DNA で増幅されたDNAを制限酵素で切断し、目的とするDNAが増幅されていることを確認した(図5)。

タイピングの結果については χ^2 検定を用いて統計学的に有意差を検討した。また、有意差のみられたものについては修正p値(corrected p value:pc)を以下の式から計算し、相関の強さを検討した。

$$pc = p \cdot n$$

(p: p値、n:タイピングを行ったDRタイプの種類数)

臨床データの解析: SLE患者を各DRタイプで分類した。各群間で発症年齢、リウマチ性疾患の家系内発症、予後(死亡率)、臨床症状(習慣性流産、顔面紅斑、ディスコイド疹、光線過敏症、脱毛、レイノー現象、漿膜炎、口腔潰瘍、関節炎、精神神経症状、腎障害、ルポイド肝炎、血管炎、シェーグレン症候群の合併、無腐性骨壊死の頻度)および検査所見(溶血性貧血、白血球減少、リンパ球減少、血小板減少、抗DNA抗体、抗Sm抗体、抗RNP抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体、LE細胞、生物学的偽陽性、Coombs試験、リウマチ因子の頻度およびCH₅₀、C3、C4の最近2年間の最高値と最低値)について χ^2 検定(例数の少ないものはYatesの修正式)とt検定を用い

統計学的に有意差を検討した。また、有意差のみられたものについては修正 p 値を計算し、相関の強さを検討した。

表 1 1990 年度～1999 年度までの調査結果 (単位: 人)

調査年度	調査対象者数	調査対象者の性別
1990 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1991 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1992 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1993 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1994 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1995 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1996 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1997 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1998 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1999 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人

表 2 1990 年度～1999 年度までの調査結果 (単位: 人)

調査年度	調査対象者数	調査対象者の性別
1990 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1991 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1992 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1993 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1994 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1995 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1996 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1997 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1998 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人
1999 年度	1,000	男性 500 人、女性 500 人

表 6. 合成したプライマーの塩基配列
(5' → 3')

① primer A (sense primer)

name	primer sequences	base position
DRGA	:TTCTTCAATGGGACGGAGCG	:49-68
DR1A	:TTCTTGTGGCAGCTTAAGTT	:19-38
DR2A	:TTCCTGTGGCAGCCTAAGAGG	:19-39
DR3A	:CACGTTTCTTGGAGTACTCTAC	:14-35
DR4A	:GTTTCTTGGAGCAGGTTAAAC	:17-37
DR8A	:GAGTACTCTACGGGTGAGTGTT	:25-46
DR9A	:TATCTGCACAGAGGCATCTAT	:76-96
DR13A	:CATAACCAGGAGGAGAACGT	:94-113
0101A	:TTCTTGCAGCAGGATAAGTATG	:19-40

② primer B (anti-sense primer)

name	primer sequences	base position
DRGB	:GCCGCTGCACTGTGAAGCTCTC	:259-280
DR3B	:GTAGTTGTCCACCCGGCC	:217-234
DR11B	:TGTTCCAGTACTCCTCATCA	:168-187
DR12B	:TCGCTGTCTGAAGCGCAGGAG	:109-128
DR13B	:CCGCTCGTCTTCCAGGATGT	:197-216
DR14B	:GGCTGTTCCAGTGCTCCGCAG	:170-190
DR7B	:ACACGGTGTCCACCTGGC	:218-235
DR8B	:TGTTCCAGTACTCGGCGCT	:169-187
DR9B	:ACACGGTGTCCACCTCGG	:218-235
1501B	:CTGCACTGTGAAGCTCTCCAC	:256-276
0101B	:GTCGCTGTCTGAAGCGCAAGTC	:109-129

表7. 各DRタイプのPCR 反応条件とRFLPパターン

type	primerA	primerB	anneal (°C)	全長 (bps)	制限酵素	断片長 (bps)
DR1	DR1A	DRGB	60	262	Taq I	102+160
DR2	DR2A	DRGB	60	262	Taq I	102+160
DR3	DR3A	DR3B	60	221	Alu I	143+ 78
DR4	DR4A	DRGB	60	264	Taq I	104+160
DRw11	DR3A	DR11B	58	174	Taq I	107+ 67
DRw12	DR3A	DR12B	62	115	Alu I	95+ 20
DRw13	DR13A	DR13B	63	123	HaeIII	72+ 51
DRw14	DR3A	DR14B	62	177	Taq I	107+70
DR7	DRGA	DR7B	61	187	Taq I	72+115
DR8	DR8A	DR8B	62	163	Taq I	96+ 67
DR9	DR9A	DR9B	62	160	Taq I	45+115
DRB1 *1501	DR2A	1501B	69	258	Taq I	102+156
DRB5 *0101	0101A	0101B	60	111	Taq I	102+9

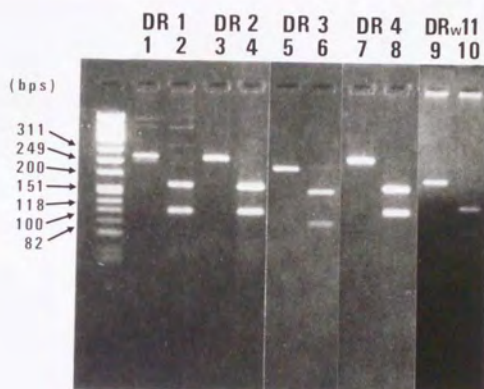
表 8. パネル DNA による HLA-DR の DNA タイピング

氏 名	血 清	DR type										
	type	1	2	3	4	11	12	13	14	7	8	9
N. H	1, 8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
K. Y	2, 14	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S. K	4, 11	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
T. R	4, 13	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
K. A	7, 8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
N. K	9, 12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
COX	3, 3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+: DNA タイピングで 陽 性

-: DNA タイピングで 陰 性

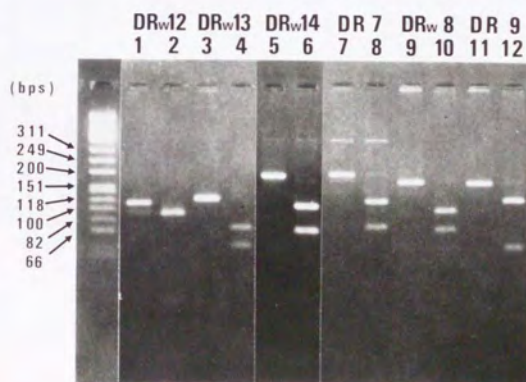
図3. PCR 法によるDRタイピング (1)



レーン1,3,5,7,9は各々DR1, DR2, DR3, DR4, DRw11陽性例である。

レーン2,4,6,8,10 は各々増幅されたDNA を制限酵素で切断したものである。

図4. PCR 法によるDRタイピング (2)



レーン1,3,5,7,9,11は各々DRw12, DRw13, DRw14, DR7, DRw8, DR9陽性例である。

レーン2,4,6,8,10,12 は各々増幅されたDNA を制限酵素で切断したものである。

表9. 今回タイピングされたDR subtypeと
報告されている各タイプの抗原頻度

	DRB1	Freq%*		DRB1	Freq%*
DR1	0101	12.6	DRw12	1201	7.6
	0102	0.0		1202	
	0103	0.0	DRw13	1301	17.0 ⁴⁾
DR2	1501	13.3		1302	
	1502	18.1		1303	0.0
	1601	0.0		1304	
	1602	1.4		1305	
DR3	0301	0.6	DRw14	1401	7.6
	0302	0.0		1402	3.2
DR4	0401	2.2		1403	
	0402	0.0		1404	
	0403	7.6 ¹⁾		1405	
	0404	0.6 ²⁾	DR7	0701	0.8 ⁵⁾
	0405	24.5		0702	
	0406	8.0	DR8	0801	0.0
	0407			08021	8.2 ⁶⁾
	0408			08022	
	0409			08031	
	0410			08032	14.4
	0411			0804	
DRw11	1101	6.1 ³⁾	DR9	09011	26.4
	1102	0.0		09012	
	1103	0.0	DRw10	1001	1.4
	1104	0.0			

XXXX: 今回タイピングされなかったDR subtype

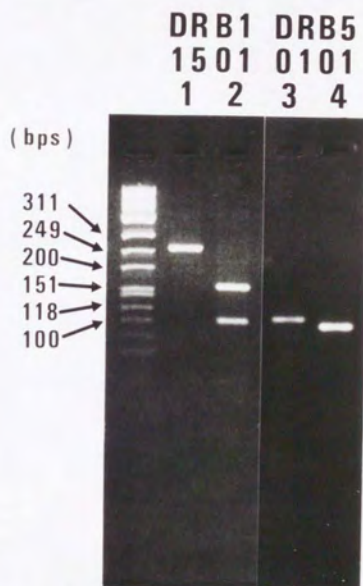
*: DR subtypeの頻度はObataらの報告^{2,4)}による。

1)-6): 以下のsubtype の合計の頻度である。

1): 0403+0407, 2): 0404+0408, 3): 1101+1104

4): 1301+1302, 5): 0701+0702, 6): 08021+08022

図5. PCR 法によるDRB1*1501、DRB5*0101のタイピング



レーン1,3は各々DRB1*1501、DRB5*0101陽性例である。

レーン2,4は各々増幅されたDNA を制限酵素で切断したものである。

結 果

C4タイピング：C4タイピングの結果を表10に示した。C4AQ0はSLE群で37.5%とコントロール群の18.9%に比べ有意に高率であった(37.5%vs18.9%, $\chi^2=9.67$, $p<0.005$)。しかしC4BQ0はSLE群で15.0%、コントロール群で10.5%と両群間で差がなかった。また他のC4タイプについても両群間で差がみられなかった。

HLA-DRタイピング：HLA-DRタイピングの結果を表11、12に示した。まずコントロール群のDNAタイピングの結果は、これまでの日本人健常人での血清タイピングの報告^{54, 55)}と頻度に差はなかった(表11)。次に、SLE群とコントロール群の間では各HLA-DRタイプに有意な頻度の差は見られなかった。しかしこれをC4AQ0の有無で分けて各DRタイプの頻度を検討してみると、C4AQ0陰性のSLEの方がC4AQ0陰性のコントロール群よりDR2の頻度が有意に高かった(58.6%vs29.1%, $\chi^2=6.94$, $p<0.01$) (表12)。そこでDR2陽性例のC4タイプを解析し、DR2陰性群のC4タイプと比較してみると、SLE群、コントロール群ともにDR2陽性例でC4BQ0の頻度が有意に高率であり(SLE群：30.3%vs4.3%, $\chi^2=8.38$, $p<0.005$ 、コントロール群：24.1%vs4.5%, $\chi^2=6.26$, $p<0.025$)、また有意ではないがC4A2も高い傾向にあった(SLE群：24.2%vs6.4%, $\chi^2=3.82$, $p>0.05$ 、コントロール群：27.6%vs10.6%, $\chi^2=3.19$, $p>0.05$)。一方SLE群とコントロール群の間ではC4A2、C4BQ0ともに頻度に有意差はなかった。つまり、DR2とSLEに相関はないが、DR2陽性例でC4BQ0が有意に高率であり、有意差はないがC4A2も多い傾向にあるという結果であった(表13、14)。

次に、DR2のサブタイプであるDRB1*1501、DRB5*0101に関しては、DR2陽性のSLE 33例とコントロールの29例について検討した。その結果、DRB1*1501はSLE 33例中20例(60.6%)、コントロール29例中10例(34.5%)に陽性で、

DRB5*0101もSLE 33例中20例(60.6%)、コントロール29例中10例(34.5%)に陽性であり、DRB1*1501、DRB5*0101ともに陽性例は全て一致していた。そしてDRB1*1501、DRB5*0101の陽性率をSLEおよびコントロール全例中の頻度として計算してみるとSLE群25.0%に対し、コントロール群は10.5%であり、SLE群の方がコントロール群より有意に高率であった(25.0%vs10.5%, $\chi^2=6.41$, $p=0.0118<0.025$) (表15)。しかし修正p値は0.130であった。更にこのハプロタイプが陽性の例をC4のタイプにより分けてみたがSLE群、コントロール群ともに特定のC4タイプとの相関は見られなかった(表16)。

また、DRタイプのヘテロ接合体の組合せについても検討してみたが、SLE群とコントロール群の間で特定の組合せが多いということとはなかった。

臨床データの解析：今回臨床データの解析に用いた症例のデータを表17、18に示した。各DRタイプ間で発症年齢、リウマチ性疾患の家系内発症の頻度に差はなかった。臨床症状では、漿膜炎を伴った例ではDR9の頻度が高く(DR9陽性例vsDR9陰性例：53.8%(7/13)vs16.7%(6/36), $\chi^2=6.77$, $p<0.01$, $pc=0.104$)、光線過敏症の見られる例ではDR9の頻度が低かった(DR9陽性例vsDR9陰性例：7.7%(1/13)vs60.7%(17/28), $\chi^2=8.10$, $p<0.005$, $pc=0.0503$)。検査所見では生物学的偽陽性が見られる症例でDRw13の頻度が高かった(DRw13陽性例vsDRw13陰性例：80.0%(4/5)vs23.3%(10/43), $\chi^2=4.50$, $p<0.05$, $pc=0.396$)。

表 10. SLEおよびControlのC4 phenotype

C4 type	SLE		Controls	
	No.	(%)	No.	(%)
1	1	(1.3)	0	(0)
2	11	(13.8)	15	(15.8)
C4A 3	58	(72.5)	69	(72.6)
4	23	(28.8)	31	(32.6)
Q0	30	(37.5)*	18	(18.9)*
1	52	(65.0)	71	(74.7)
C4B 2	32	(40.0)	45	(47.4)
5	17	(21.3)	18	(18.9)
Q0	12	(15.0)	10	(10.5)
C4AQ0(+)	30	(37.5)	18	(18.9)
C4AQ0(-)	29	(36.3)	55	(57.9)
不明	21	(26.2)	22	(23.2)
合計	80	(100.0)	95	(100.0)

不明 : possible heterozygous

C4AQ0: $\chi^2 = 9.76, p < 0.005$

表11. 日本人健常人におけるHLA-DRの DNA typing と
従来の血清学的タイピングとの抗原頻度の比較

DR type	this study	9th IHW*	3rd AOHW**
DR1	9 (9.5%)	12.0%	12.4%
DR2	29 (30.5%)	28.6%	34.2%
DR3	0 (0.0%)	1.2%	0.0%
DR4	48 (50.5%)	42.7%	41.6%
DRw11	2 (2.1%)	4.5%	6.1%
DRw12	10 (10.5%)	11.2%	7.6%
DRw13	7 (7.4%)	7.6%	6.3%
DRw14	8 (8.4%)	15.2%	5.5%
DR7	0 (0.0%)	0.0%	0.8%
DRw8	16 (16.8%)	17.4%	24.8%
DR9	23 (24.2%)	23.8%	26.2%
例数	95 (100%)	514 (100%)	472 (100%)

*: 9th International Histocompatibility Workshop⁵⁴⁾

** : 3rd Asia-Oseania Histocompatibility Workshop⁵⁵⁾

表12. SLEおよびControlの各DR typeの頻度とC4 phenotypeとの関連

DR type	S L E				controls			
	C4AQ0 (+)	C4AQ0 (-)	unknown*	total	C4AQ0 (+)	C4AQ0 (-)	unknown*	total
DR1	1 (3.3)	4 (13.8)	1 (4.8)	6 (7.5)	2 (11.1)	6 (10.9)	1 (4.5)	9 (9.5)
DR2	9 (30.0)	17 (58.6)**	7 (33.3)	33 (41.3)	4 (22.2)	16 (29.1)**	9 (40.9)	29 (30.5)
DR3	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DR4	18 (60.0)	12 (41.4)	8 (38.1)	38 (47.5)	12 (66.7)	24 (43.6)	12 (54.5)	48 (50.5)
DRw11	1 (3.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	2 (3.6)	0 (0.0)	2 (2.1)
DRw12	2 (6.7)	1 (3.4)	1 (4.8)	4 (5.0)	3 (16.7)	4 (7.3)	3 (13.6)	10 (10.5)
DRw13	2 (6.7)	1 (3.4)	3 (14.3)	6 (7.5)	2 (11.1)	3 (5.5)	2 (9.1)	7 (7.4)
DRw14	0 (0.0)	1 (3.4)	1 (4.8)	2 (2.5)	2 (11.1)	4 (7.3)	2 (9.1)	8 (8.4)
DR7	0 (0.0)	1 (3.4)	0 (0.0)	1 (1.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DRw8	6 (20.0)	5 (17.2)	4 (19.0)	15 (18.8)	3 (16.7)	9 (16.4)	4 (18.2)	16 (16.8)
DR9	9 (30.0)	8 (27.6)	5 (23.8)	22 (27.5)	4 (22.2)	16 (29.1)	3 (13.6)	23 (24.2)
例数	30 (100)	29 (100)	21 (100)	80 (100)	18 (100)	55 (100)	22 (100)	95 (100)

*:possible heterozygous ()内の数字は%

**: $\chi^2=6.94, p<0.01$

表 13. DR2 陽性および DR2 陰性 SLE 群の

C4 phenotype

C4 type	DR2 (+)		DR2 (-)	
	No.	(%)	No.	(%)
1	0	(0.0)	1	(2.1)
2	8	(24.2)	3	(6.4)
C4A 3	25	(75.8)	33	(70.2)
4	7	(21.2)	16	(34.0)
Q0	9	(27.3)	21	(44.7)
1	21	(60.6)	31	(66.0)
C4B 2	13	(33.3)	19	(40.4)
5	7	(15.2)	10	(21.3)
Q0	10	(30.3)*	2	(4.3)*
合 計	33	(100.0)	47	(100.0)

C4A2 : $\chi^2 = 3.82, p > 0.05$

C4BQ0 : $\chi^2 = 8.38, p < 0.005$

表 14. DR2 陽性および DR2 陰性 Control 群の
C4 phenotype

C4 type	DR2 (+)		DR2 (-)	
	No.	(%)	No.	(%)
1	0	(0.0)	0	(0.0)
2	8	(27.6)	7	(10.6)
C4A 3	21	(72.4)	48	(72.7)
4	7	(24.1)	24	(36.4)
Q0	4	(13.8)	14	(21.2)
1	19	(65.5)	52	(78.8)
C4B 2	10	(34.5)	35	(53.0)
5	5	(17.2)	13	(19.7)
Q0	7	(24.1) *	3	(4.5) *
合 計	29	(100.0)	66	(100.0)

C4A2 : $\chi^2 = 3.19, p > 0.05$

C4BQ0 : $\chi^2 = 6.26, p < 0.025$

表15. SLE およびControl におけるDRB1*1501、DRB5*0101の頻度

	DRB1*1501		DRB5*0101		合計
	(+)	(-)	(+)	(-)	
SLE	20 (25.0%)	60 (75.0%)	20 (25.0%)	60 (75.0%)	80 (100%)
Controls	10 (10.5%)	85 (89.5%)	10 (10.5%)	85 (89.5%)	95 (100%)

DRB1*1501 : $\chi^2=6.41, p<0.025, pc=0.130$

DRB5*0101 : $\chi^2=6.41, p<0.025, pc=0.130$

表16. SLE およびControl におけるDRB1*1501-DRB5*0101ハプロタイプと
C4 phenotypeとの関連

	S L E		Controls	
	1501 (+)*	1501 (-)**	1501 (+)*	1501 (-)**
	0101 (+)	0101 (-)	0101 (+)	0101 (-)
C4AQ0 (+)	8 (40.0%)	22 (36.7%)	2 (20.0%)	16 (18.8%)
C4BQ0 (+)	3 (15.0%)	9 (15.0%)	1 (10.0%)	9 (10.6%)
Q0 (-)	5 (25.0%)	12 (20.0%)	4 (40.0%)	41 (48.2%)
不明	4 (20.0%)	17 (28.3%)	3 (30.0%)	19 (22.4%)
合計	20 (100%)	60 (100%)	10 (100%)	85 (100%)

* : DRB1*1501 (+) & DRB5*0101 (+)

** : DRB1*1501 (-) & DRB5*0101 (-)

Q0 (-) : C4AQ0 (-) & C4BQ0 (-)

不明 : possible heterozygous

表17. SLE の臨床症状とHLA-DRタイプとの相関

臨床所見	平均値 及び頻度	HLA-DRタイプ	
		正の相関	負の相関
発症年齢	27才 5カ月		
家系内発症	18.4% (9/49)		
予後 (死亡率)	0.0% (0/49)		
習慣性流産	10.2% (5/49)		
顔面紅斑	73.5% (36/49)		
ディスクイド疹	10.9% (5/46)		
光線過敏症	43.9% (18/41)		DR9 (7.7%) **
脱毛	65.3% (32/49)		
レイノー現象	52.1% (25/48)		
漿膜炎	26.5% (13/49)	DR9 (53.8%) ***	
口腔潰瘍	32.6% (15/46)		
関節炎	91.8% (45/49)		
精神神経症状	28.6% (14/49)		
腎障害	63.3% (31/49)		
ルポイド肝炎	2.1% (1/48)		
血管炎	8.2% (4/49)		
SJS*	25.5% (12/47)		
無腐性骨壊死	24.5% (12/49)		

*: シェーグレン症候群の合併

** : DR9陽性例 vs DR9陰性例 : 7.7% vs 60.7%, $\chi^2=8.10$, $p<0.005$, $pc=0.0503$

*** : DR9陽性例 vs DR9陰性例 : 53.8% vs 16.7%, $\chi^2=6.77$, $p<0.01$, $pc=0.104$

表18. SLE の検査所見とHLA-DRとの相関

検査所見	平均値 及び頻度	HLA-DRタイプ	
		正の相関	負の相関
溶血性貧血	2.1% (1/47)		
白血球減少	77.1% (37/48)		
リンパ球減少	79.2% (38/48)		
血小板減少	31.3% (15/48)		
抗DNA抗体	91.5% (43/47)		
抗Sm抗体	22.9% (11/48)		
抗RNP抗体	47.9% (23/48)		
抗SS-A抗体	37.0% (17/46)		
抗SS-B抗体	10.2% (5/49)		
LE細胞	46.2% (12/26)		
生物学的偽陽性	29.2% (14/48)	DRw13 (80.0%) *	
Coombs試験	43.8% (21/48)		
リウマチ因子	47.8% (22/46)		
CH ₅₀ max	41.6		
(U/ml) min	22.5		
C3 max	90.8		
(mg/dl) min	48.1		
C4 max	22.8		
(mg/dl) min	12.0		

* : DRw13陽性例 vs DRw13陰性例 : 80.0% vs 23.3%, $\chi^2 = 4.50$, $p < 0.05$
pc=0.396

考 察

C4AQ0 の頻度については、SLE 群で 37.5% とコントロール群の 18.9% に比べ有意に高率であった ($\chi^2=9.67, p<0.005$)。これは今までの報告や前章の検討結果と同様の結果であった。

次に各 DR タイプの検討では SLE 群とコントロール群との間で有意な頻度の差はなかった。

これまで HLA-DR と SLE との関連については多数の報告がみられる。白人 SLE では HLA-DR3, DR2 と^{8, 9)}、黒人 SLE では HLA-DR2, DR3, DR7 との相関が報告されている¹⁴⁾。また日本人 SLE では HLA-DR2, DR4, DR9 との相関が報告されている¹⁸⁾。しかし、各人種とも HLA-DR に関しては SLE と相関無しとする報告も多く^{8, 14)}、今回の検討でも相関がみられなかった。

しかし C4AQ0 の有無で SLE 群とコントロール群を分けて比較してみると C4AQ0 陰性の SLE 群の方が C4AQ0 陰性のコントロール群より有意に DR2 の頻度が高かった。しかし、これは検討の結果、DR2 と C4BQ0 が連鎖しているためと考えられた。事実、徳永らが日本人健常者で DR と C4 のタイピングを行いハプロタイプを検討したところ、日本人では C4A2, C4BQ0, HLA-DR2 というハプロタイプが 11.1% と最も多く見られると報告している⁵⁶⁾。今回の検討で、DR2 陽性例では C4A2 も有意差はないものの高頻度であった事からも、今回検討した症例の中にこのハプロタイプを持つ例が多く含まれているものと考えられる。そのため、C4AQ0 陰性群の中で C4BQ0 陽性例の占める割合がコントロール群よりも SLE 群の方が高いので、C4AQ0 陰性の SLE 群の方が C4AQ0 陰性のコントロール群より DR2 の頻度が高い結果になったと考えられる。

また DR2 のサブタイプである DRB1*1501、DRB5*0101 についての検討では、DRB1*1501-DRB5*0101 ハプロタイプが SLE 群の 25.0% に見られ、 χ^2 検定では有意に高率で

あり (25.0% vs 10.5%, $\chi^2=6.41, p<0.025$)、SLE ではこのハプロタイプが高い傾向が認められた。しかし修正 p 値は 0.130 と大きく、強い相関とは言えなかった。

これまで、複数の人種で SLE と DR2 との相関が報告されている。今回の検討では SLE で DR2 のサブタイプである DRB1*1501-DRB5*0101 ハプロタイプが高い傾向がみられたが強い相関はみられず、今後更に検討して相関の有無を明らかにする必要があるものと考えられた。

SLE と HLA-DR との関連については特定の DR と相関があるという報告と相関がないと言う報告がみられる。このように報告により結果が一致しない理由は前述の血清タイプニングの問題とともに以下のような可能性も考えられる。すなわち、SLE は症例によりその臨床像が多彩であるとともに、病因も複数の要因の組み合わせにより発症をみると考えられるので、SLE 集団は不均質な症例の集団である可能性が高いと考えられる。そのため特定の DR タイプが SLE の一部の集団とのみ関連しているとすると SLE 全体で DR との相関を検討した場合、強い相関がみられなかったり相関がみられなくなる可能性がある。そこで、今後 SLE の病態・病因に即した診断が可能となれば、この問題も解決されるかもしれない。

更に C4AQ0 陽性の症例は DRB1*1501-DRB5*0101 ハプロタイプをはじめ特定の DR タイプとの相関がなかった。このことから C4AQ0 は SLE に相関する特定の HLA-DR との連鎖により二次的に増加しているのではなく、C4AQ0 自体が SLE の発症要因として SLE に関連しているものと考えられた。

SLE と特定の臨床症状や抗核抗体の出現率などとの相関についてもいくつかの報告が見られる。すなわち、臨床症状では腎障害と DR2 との間に正の相関および DR4 との間に負の相関 (米国白人・黒人)⁵¹⁾、若年発症例 (20才未満) と DRw8 (米国黒人)¹⁴⁾、亜急性皮膚型ル

ープスと DR3 (白人)⁵¹⁾との間に正の相関が報告されている。抗核抗体では抗 SSA 抗体、抗 SSB 抗体と DR3、抗 DNA 抗体および抗 Sm 抗体と DR7、抗 RNP 抗体と DR4、リウマチ因子と DR2 (以上白人)などで正の相関が報告されている⁵²⁻⁵³⁾。

今回の臨床データの検討では、漿膜炎を伴った例では DR9 の頻度が高く、光線過敏症の見られる例では DR9 の頻度が低く、生物学的偽陽性が見られる症例で DRw13 の頻度が高いと言う結果を得た。しかし各 DR タイプの症例数が有意差を検討するのに十分とは言えず、今後更に症例数を増やして検討する必要があるものと考えられた。またこれまで言われている各 DR タイプと抗核抗体との相関は今回見られなかった。

以上より、日本人 SLE では C4AQ0 が一つの遺伝要因として SLE の発症に関与しており、特定の HLA-DR との相関がないものと考えられた。一方、HLA-DR では DRB1*1501-DRB5*0101 ハプロタイプが SLE で高い傾向にあったが、強い相関はなく、更に検討して関連の有無を明らかにする必要があるものと考えられた。

特定の MHC 領域と疾患との間に相関が見られる場合、その MHC 領域がどのように疾患の発症・進展に関わっているかについては以下の2つの可能性が考えられている。① HLA をはじめ MHC は免疫応答性の個体差を決定している重要な遺伝子群であるので、自己免疫疾患など免疫異常に起因する疾患については特定の MHC 遺伝子が疾患の感受性を決定し、疾患の発症を惹起する可能性。② 特定の MHC 遺伝子の近傍に真の疾患感受性遺伝子または疾患抵抗性遺伝子が存在する場合、染色体の組換えによってその遺伝子が別の MHC 対立遺伝子を乗せた染色体へ移る可能性は低くなり、それらが一組として子孫に遺伝するために患者集団では特定の MHC 遺伝子が増加または減少する可能性である。今後この機序をより明らかにするた

めには既知のMHC産物が如何に免疫応答に関わっている
かについてより詳細に解析を進めるとともに、TNF⁵⁷⁻⁵⁹⁾
やHSP70⁶⁰⁻⁶²⁾、RD⁶³⁾、B-associated transcripts
(BATs)^{64, 65)}など次々発見される新たなMHC領域遺伝子
についても解析を進めていく必要があるだろう。特に、TNF
やHSP70についてはその遺伝子にRFLPが見られると報告
されているので、その近傍であるC4やHLA-B、HLA-DR領
域との関連を早急に検討すべきであろう。

総 括

これまでの検討で明らかになったことを以下に示す。

① C4AQ0 は日本人 SLE でも高頻度に認められた。C4AQ0 は白人、米国黒人、中国人（香港）など複数の人種で SLE に高頻度に見られるので、C4AQ0 は人種を越えて広く SLE の遺伝要因の一つとしてその発症に関与しているものと考えられた。

② C4AQ0 の遺伝子レベルでのメカニズムは、白人や米国黒人ではその大半が C4 構造遺伝子の大きな欠失であるとされるが、日本人 SLE ではこのような大きな遺伝子欠失はみられなかった。このことから、そのメカニズムとして遺伝子欠失以外にも複数のものが想定され、しかも日本人 SLE の C4AQ0 は白人と異なりそのほとんどが大きな遺伝子欠失ではない他のメカニズムによって引き起こされるものと考えられた。

③ C4AQ0 陽性例では腎障害と抗 Sm 抗体の頻度が、C4BQ0 陽性例では腎障害の頻度が高かった。このように C4AQ0、C4BQ0 の有無で臨床像に差がみられたこともこれらが SLE の発症・進展に関与していることを示唆するとともに、SLE にみられる多彩な病態のいくつかの発現にこれらが特に強く関与している可能性が示唆された。

④ 日本人 SLE では白人 SLE でみられるような C4AQ0 と特定の HLA-DR との相関はみられなかった。このことから C4AQ0 は SLE に相関する特定の HLA-DR との連鎖により二次的に増加しているのではなく、C4AQ0 自体が SLE の発症要因として重要と考えられた。

⑤ HLA-DR に関しては、日本人 SLE では DR2 のサブタイプである DRB1*1501-DRB5*0101 ハプロタイプが高い傾向にあったが強い相関はみられず、更なる検討が必要と考えられた。

⑥ HLA-DR と臨床データとの関連では、臨床データのいくつかは HLA-DR との関連がみられたことから、SLE の発

症に特定のHLA-DRが関与する可能性が示唆されるとともに、SLEにみられる多彩な病態のいくつかの発現に特定のHLA-DRが特に強く関与している可能性が示唆された。しかし各DRタイプの症例数が有意差を検討するのに十分とは言えず、今後更に症例数を増やして検討する必要があるものと考えられた。

以上より、日本人SLEではC4AQ0が遺伝要因の一つとしてその発症・進展に関与しているものと考えられた。

今後はさらにMHC classIII領域でRFLPが報告されているHSP70やTNFなどの検討が必要と考えられる。

謝 辞

稿を終えるに当り、御指導、御校閲下さいました指導教官、伊藤幸治教授に厚く御礼申し上げます。C4タイピングの御指導を頂いた谷本潔昭先生、中野啓一郎先生、輸血部徳永勝士先生に深謝致します。C4遺伝子のRFLP解析を御指導頂いた竹内二士夫先生、三森明夫先生に深謝致します。HLA-DRのDNAタイピングを御指導頂いた松多邦雄先生、輸血部桑田昇治先生に深謝致します。最後にC4タイピングに御助力頂きました山内千登世さんに感謝します。

文 献

- 1 Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, d' Angelo WA, Christian CL: Studies of twins with systemic lupus erythematosus: a review of the literature and presentation of 12 additional cases. *Am J Med* 59:533-553, 1975
- 2 Shoenfeld Y, Segol G, Segol O, et al: Detection of antibodies to total histones and their subfractions in systemic lupus erythematosus patients and their asymptomatic relatives. *Arthritis Rheum* 30:169-175, 1987
- 3 Morton RO, Gershwin ME, Brandy C, Steinberg AD: The incidence of systemic lupus erythematosus in North American Indians. *J Rheumatol* 3:186-190, 1976
- 4 Schur PH, Pandey JP, Fedrick JA: Gm allotypes in white patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 28:828-830, 1985
- 5 Hoffman RH, Sharp GC, Irvin W, Anderson SK, Hewett JE, Pandey JP: Association of immunoglobulin Km and Gm allotypes with specific antinuclear antibodies and disease susceptibility among connective tissue disease patients. *Arthritis Rheum* 34:453-458, 1991
- 6 Moldenhauer F, David J, Fieldser AHL, et al: Inherited deficiency of erythrocyte complement receptor type 1 does not cause susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 30:961-966, 1987
- 7 Wilson JG, Wong WW, Murphy EE, et al: Deficiency of the C3b/C4b receptor (CR1) of erythrocytes in systemic lupus erythematosus: Analysis of the stability of the defect and of a restriction fragment length polymorphism of the CR1 gene. *J Immunol* 138:2706-2710, 1987
- 8 Schur PH, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Yunis J, Alper CA: The effect of ethnicity on major histocompatibility complex complement allotypes and extended haplotypes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 33:985-992, 1990
- 9 Reveille JD, Anderson KL, Schrohenloher RE, Acton RT, Barger BO: Restriction fragment length polymorphism analysis of HLA-DR, DQ, DP and alleles in Caucasians with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 18:14-18, 1991

- 10 Fielder AHL, Walport MJ, Batchelor JR, et al: Family study of the major histocompatibility complex in patients with systemic lupus erythematosus: importance of null alleles of C4A and C4B in determining disease susceptibility. *Br Med J* 286:425-428, 1983
- 11 Howard PF, Hochberg MC, Bias WB, Arnett FC, McLean RH: Relationship between C4 null genes, HLA-D region antigens, and genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Caucasians and Black Americans. *Am J Med* 81:187-193, 1986
- 12 Christiansen FT, McCluskey J, Dawkins RL, Kay PH, Uko G, Zilko PJ: Complement allotyping in SLE: Association with C4A null. *Aust NZ J Med* 13:483-488, 1983
- 13 Dahlqvist SR, Beckman L: Serum protein markers in systemic lupus erythematosus. *Hum Hered* 38:44-47, 1988
- 14 Reveille JD, Schrohenloher RE, Acton RT, Barger BO: DNA analysis of HLA-DR and DQ genes in American blacks with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32:1243-1251, 1989
- 15 Wilson WA, Perez MC, Armatis PE: Partial C4A deficiency is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in black Americans. *Arthritis Rheum* 31:1171-1175, 1988
- 16 Tokunaga K, Takeuchi F, Yukiya Y: Polymorphism of class III proteins in Japanese with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. In: Aizawa M (ed) *The 3rd Asia-Oceania Histocompatibility Workshop Conference*. 1986. Hokkaido Univ. Press, Sapporo, Japan pp757-760
- 17 Yukiya Y, Tokunaga K, Takeuchi F, Yoshida K, Miyamoto T: Genetic polymorphism of complement in patients with systemic lupus erythematosus II. The fourth (C4) and the seventh (C7) components of complement. *Jpn J Rheumatol* 1:271-276, 1988
- 18 Hashimoto H, Tsuda H, Matsumoto T, et al: HLA antigens associated with systemic lupus erythematosus in Japan. *J Rheumatol* 12:919-923, 1985

- 19 Hawkins BR, Wong KL, Wong RWS, Chan KH, Dunkley H, Serjeantson SW: Strong association between the major histocompatibility complex and systemic lupus erythematosus in Southern China. *J Rheumatol* 14:1128-1131, 1987
- 20 Kemp ME, Atkinson JP, Skanes VM, Levine RP, Chaplin DD: Deletion of C4A genes in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 30:1015-1022, 1987
- 21 Goldstein R, Arnett FC, McLean RH, Bias WB, Duvic M: Molecular heterogeneity of complement component C4-null and 21-hydroxylase genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 31:736-744, 1988
- 22 Olsen ML, Goldstein R, Arnett FC, Duvic M, Pollack M, Reveille JD: C4A gene deletion and HLA associations in black Americans with systemic lupus erythematosus. *Immunogenetics* 30:27-33, 1989
- 23 Terasaki PI, Mottironi VD, Barnett EV: Cytotoxins in disease: autocytoxicity in lupus. *N Engl J Med* 283:724-728, 1970
- 24 Obata F, Ito K, Kaneko T, et al: HLA-DR gene frequencies in the Japanese population obtained by oligonucleotide genotyping. *Tissue Antigens* 38:124-132, 1991
- 25 Maeda M, Uryu N, Murayama N, et al: A simple and rapid for HLA-DP genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele-specific restriction endonucleases. *Hum Immunol* 27:111-121, 1990
- 26 Schifferli JA, Steiger G, Paccaud JP, Sjöholm AG, Hauptmann G: Difference in the biological properties of two forms of the fourth complement of human complement. *Clin Exp Immunol* 63:473-477, 1986
- 27 Carroll MC, Campbell RD, Porter RR: Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:521-525, 1985
- 28 Moulds JM, Warner NB, Goldstein R: Class III antigens: 21-OH, C4, Bf, C2 and TNF. In Moulds JM, Fawcett KJ and RJ Gardner (Eds.): Scientific and technical aspects of the major histocompatibility complex, Arlington (Virginia), Amer Assoc Blood Banks, 1989:73-99

- 29 Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC: Mutation in the CYP21B gene (Ile-172→Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency.
Proc Natl Acad Sci USA 85:1600-1604, 1988
- 30 Carroll MC, Palsdottir A, Belt KT, Porter RR: Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region.
EMBO J 4:2547-2552, 1985
- 31 Schneider PM, Carroll MC, Alper CA, et al: Polymorphism of the human complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes: restriction fragment length polymorphisms revealing structural deletion, homoduplications and size variants.
J Clin Invest 78:650-657, 1986
- 32 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 25:1271-1277, 1982
- 33 Mauff G, Alper CA, Awdeh Z, et al: Statement on the nomenclature of human C4 allotype. Immunobiology 164:184-191, 1983
- 34 Sim E, Cross SJ: Phenotyping of human complement C4, a class III HLA antigen.
Biochem J 239:763-767, 1986
- 35 Dawkins RL, Christiansen FT, Kay PH, et al: Disease associations with complementotypes. Immunol Rev 70:5-22, 1983
- 36 Patel PI, Nussbaum RL, Framson PE, Ledbetter DH, Caskey CT, Chinault AC: Organization of the HPRT gene and related sequences in the human genome. Somat Cell Mol Genet 10:483-493, 1984
- 37 Southern EM.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98:503-517, 1975
- 38 Belt KT, Carroll MC, Porter RR: The structural basis of the multiple forms of human complement component C4. Cell 36:907-914, 1984
- 39 White PC, New MI, Dupont B: Structure of human steroid 21-hydroxylase genes.
Proc Natl Acad Sci USA 83:5111-5115, 1986

- 40 Braun L, Schneider PM, Giles CM, Bertrams J, Rittner C: Null alleles of human complement. Evidence for pseudogenes at the C4A locus and gene conversion at the C4B locus. *J Exp Med* 171:129-140, 1990
- 41 Partanen J, Campbell RD: Restriction fragment analysis of non-deleted complement C4 null genes suggests point mutations in C4A null alleles but gene conversions in C4B null alleles. *Immunogenetics* 30:520-523, 1989
- 42 Steuer M, Mauff G, Adam C, et al: An estimate on the frequency of duplicated haplotypes and silent alleles of human C4 protein polymorphism. I. Investigations in healthy Caucasoid families. *Tissue Antigens* 33:501-510, 1989
- 43 Coles FS, Whitehead AS, Auerbach HS, et al: The molecular basis for genetic deficiency of the second component of human complement. *N Engl J Med* 313:11-16, 1985
- 44 Batchelor JR, Fielder HL, Walport MJ, et al: Family study of the histocompatibility complex in HLA DR3 negative patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 70:364-371, 1987
- 45 Bottger EC, Hoffman T, Hadding U, Bitter-Suermann D: Guinea pigs with inherited deficiencies of complement components C2 or C4 have characteristics of immune complex disease. *J Clin Invest* 78:689-695, 1985
- 46 Bodmer JG, Marsh SE, Albert ED, et al: Nomenclature for factors of the HLA system, 1990. *Hum Immunol* 31:186-194, 1991
- 47 Marsh SE, Bodmer JG: HLA class II nucleotide sequences, 1991. *Hum Immunol* 31:207-227, 1991
- 48 Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324:163-166, 1986
- 49 Watanabe Y, Tokunaga K, Matsuki K, et al: Putative amino acid sequence of HLA-DR B chain contributing to rheumatoid arthritis susceptibility. *J Exp Med* 169:2263-2268, 1989

- 50 Kuwata S, Tokunaga K, Jin F, et al: Narcolepsy. (letter)
N Engl J Med 324:271-272, 1991
- 51 Fronek Z, Timmerman LA, Alper CA, et al: Major histocompatibility complex genes and susceptibility to systemic lupus erythematosus.
Arthritis Rheum 33:1542-1553, 1990
- 52 Hamilton RG, Harley JB, Bias WB, et al: Two Ro (SS-A) autoantibody responses in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 31:496-505
- 53 Stephens HAF, McHugh NJ, Maddison PJ, Isenberg DA, Welsh KI, Panayi GS: HLA class II restriction of autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. Immunogenetics 33:276-280, 1991
- 54 Baur MP, Neugebauer M, Deppe H, et al: Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In: Albert ED, Baur MP, Mayr WR, eds. Histocompatibility Testing 1984, Berlin: Springer-Verlag 1985, 333-341
- 55 Wakisaka A, Hawkin S, Konoeda Y, Natori T, Aizawa A. Joint report: Japanese. In: Aizawa M, ed. HLA in Asia-Oceania 1986. Sapporo: Hokkaido University Press, 1986:209-211 (Table for gene frequency: pp.1081)
- 56 Tokunaga K, Omoto K, Akaza T, et al: Haplotype study on C4 complement haplotypes, and HLA-complement haplotypes. Immunogenetics 22:359-365, 1985
- 57 Spies T, Morton CC, Nedospasov SA, Fiers W, Pious D, Staminger JR: Genes for the tumor necrosis factors α and β are linked to the human major histocompatibility complex. Proc Natl Acad Sci USA 83:8699-8702, 1986
- 58 Fugger L, Morling N, Ryder LP, et al: Nco I restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF α) region in four autoimmune diseases. Tissue Antigens 34:17-22, 1989
- 59 Jacob CO, Fronek Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO: Heritable major histocompatibility complex class II-associated difference in production of tumor necrosis factor- α : relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. Proc Natl Acad Sci USA 87:1233-1237, 1990

- 60 Minota S, Cameron B, Welch WJ, Winfield JB: Autoantibodies to the constitutive 73-kD member of the hsp 70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 168:1475-1481, 1988
- 61 Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD: Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP 70. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1968-1972, 1989
- 62 Caplen NJ, Patel A, Millward A, et al: Complement C4 and heat shock protein 70 (HSP70) genotypes and type I diabetes mellitus. *Immunogenetics* 32:427-430, 1990
- 63 Levi-Strauss M, Carroll MC, Steinmetz M, Teo T: A previously undetected MHC gene with an unusual period structure. *Science* 240:201-204, 1988
- 64 Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JR: A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243:214-217, 1989
- 65 Fugger L, Morling N, Ryder LP, et al: Restriction fragment length polymorphism of two HLA-B-associated transcript genes in five autoimmune diseases. *Hum Immunol* 30:27-31, 1991



