ヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) 解析による歯周病病態の分子生物学的研究

高 柴 正 悟

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

(指導: 村山洋二教授)

(平成2年1月9日受付)

Molecular Biological Study of Periodontal Diseases by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis of Human Leukocyte Antigen (HLA) Genes

Shogo TAKASHIBA

Department of Periodontology and Endodontology, Okayama University Dental School

2-5-1, Shikata-cho, Okayama 700, Japan

(Director: Professor Yoji MURAYAMA)

The products of human leukocyte antigen (HLA) class II β -chain genes play an important role in the recognition of foreign antigens in immune reactions. The purpose of this study was to explore the possibility of gene diagnosis for periodontitis by the detection of variations in genes. Seventy Japanese patients with periodontitis and 26 healthy individuals were surveyed with respect to HLA phenotypic frequencies, however, no HLA phenotype specific to any type of periodontitis was observed. Therefore, in order to detect differences between some HLA phenotypes, restriction fragment length poly-

morphism (RFLP) analyses were undertaken with HLA-DR β and HLA-DQ β complementary DNA probes in 20 subjects (15 patients and 5 healthy individuals). The RFLP analysis of HLA-DQ β gene digested with *Bam* HI revealed that genetic variation existed in only 4 patients with early-onset periodontitis. This genetic variation was also ascertained to be detectable by analysis using polymerase chain reaction (PCR) method. Thus, these results substantiate the prospect that gene variations are useful as markers for novel gene diagnosis in periodontitis.

Key words: Polymorphism in periodontitis, Disease marker, HLA, RFLP analysis, Gene diagnosis

要旨: 免疫応答に重要なヒト白血球抗原 (HLA) クラス II β 鎖遺伝子の多型解析で遺伝子変異を検出し、それが特定の歯周病のマーカーとなる可能性を探索することを目的とした。

日本人の歯周病患者 70 名および歯周組織が健康な 26 名の HLA フェノタイプを補体依存性細胞障害試験で同定し、HLA フェノタイプの検出頻度を調べた。しかし、患者に特徴的な HLA フェノタイプは見出せなかった。そこで、HLA の微細な差異を検出するため、歯周病患者 15 名および健康者 5 名について、HLA クラス II β 鎖遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) 解析を行なった。その結果、一部の患者に特徴的な HLA-DQ β 鎖遺伝子の変異を検出した。また、ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法を用いて増幅した DNA を用いることによっても、その変異を検出できた。

本論文の要旨は、第 36 回 JADR 総会 (1988 年 12 月 3 日) および第 67 回 IADR 総会 (1989 年 6 月 29 日) において発表した。

以上の結果は、遺伝子変異を歯周病の病態マーカーとして利用し得ることを示唆する。

索引用語：歯周病の多型性，病態マーカー，ヒト白血球抗原，制限断片長多型解析，遺伝子診断

緒 言

同じ外来刺激を受けた場合でも、宿主の応答性は個体によって異なっており、その差異は疾病の発症と進行を担う重要な因子である。また、宿主の個体差を決定する遺伝子は、疾病の病態を説明するひとつの因子であろう。成人の90%以上が罹患すると言われる歯周病は、宿主の個体差の遺伝学的機序を解明するための格好の疾病である。

ヒト細胞表層の主要組織適合性抗原(MHC)は、ヒト白血球抗原(HLA)として知られており、免疫応答に密接に関係している。このHLAは機能の面から2種のクラス抗原に分類されている。クラスI抗原は、細胞障害性T細胞が標的細胞上の非自己蛋白を認識する能力を拘束する役を担っており、HLA-A, HLA-B, および HLA-C と命名される各抗原からなる。また、クラスII抗原は、ヘルパー T 細胞によって抗原が認識される際の拘束因子であり、HLA-DR, HLA-DQ, および HLA-DP 抗原からなっている。HLA システムには、HLA の特定の対立遺伝子間に強い連鎖不平衡が存在するため、HLA と各種疾患との関わりが HLA フェノタイプとの相関において関心がもたれるようになった。遺伝的素因の関与が疑われる疾患では、従来からの疾患マーカーである血液型、酵素、および血清蛋白に加えて HLA が注目されるマーカーとなった。HLA フェノタイプとの強い相関が明らかにされている疾患は、強直性脊椎炎(B27)、リウマチ性関節炎(DR4)、尋常性乾癬(Cw6)、ナルコレプシー(DR2)、天疱瘡(DR4)、およびインシュリン依存性糖尿病(DR3 または DR4) 等である(Tiwari らの総説¹⁾ から引用)。

HLA フェノタイプと疾患の関係も、近年、分子生物学的な観点から説明されるようになった。とりわけ、インシュリン依存性糖尿病、リウマチ性関節炎、および天疱瘡などの疾患では分子生物学的病態解析が進んでいる(Todd ら²⁾および Wraith ら³⁾の総説から引用)。たとえば、インシュリン依存性糖尿病の場合、この疾患の発症が HLA-DR3 または DR4 と相関するとされていた¹⁾。現在では、患者と健康者の間で検出頻度の異なる HLA-DR β 鎖遺伝子の多型が指摘されるようになってきた⁴⁾。最近、さらに研究が進展して、HLA-DQ β 鎖の第1ドメ

インのアミノ酸置換が遺伝子レベルで解析されている⁵⁾。

歯周病患者の HLA フェノタイプを調べた研究は多い^{6~18)}。しかし、それらの研究は、対象被験者が少なかったり^{6~18)}、比較対照とされた健康者の歯周組織の状態が不明であったり^{8,10,11,16~18)}、あるいは、調べた HLA フェノタイプが HLA クラス I 抗原に集中していたりする^{6~12)}。さらに、相関があったと報告している研究であっても、概してその相関は弱いこと^{6~12,14~18)}、ならびに、対象がある人種に特定されていること^{6~18)}にも問題がある。歯周病は、宿主の個体差のために多様な疾患であることに加え、HLA フェノタイプにも多数のタイプがあるために、HLA フェノタイプと歯周病の関係については未だ明確にされていない。

本研究は、HLA のフェノタイプおよび HLA の遺伝子の変異として捉えることができる歯周病を検索することを目的とした。また、そのような歯周病を遺伝子マーカーによって検出する方法を検討した。

材料および方法

1. 被 験 者

岡山大学歯学部附属病院第二保存科を受診した歯周病患者70名(男性16名、女性54名、平均年齢34.9歳;標準偏差10.9)、および歯周組織が臨床的に健康な本学部職員ならびに患者の家族26名(男性16名、女性10名、平均年齢25.5歳;標準偏差8.7)を被験者とした。被験者は、Page と Schroeder の記載¹⁹⁾を改変した Mura-yama らの方法²⁰⁾にしたがって、健康、早期発症型歯周炎(EOP)、および晩期発症型歯周炎(LOP)と臨床診断した。なお、被験者はすべて日本人である。

2. 血清学的 HLA タイピング

HLA タイピングは、特定の HLA フェノタイプに対する抗血清をあらかじめ分注したタイピングトレイを用いて、Terasaki らの記載²¹⁾にしたがって行なった。

HLA-A, HLA-B, および HLA-C 抗原のタイピングには非Bリンパ球を用いた。タイピングトレイには Terasaki first HLA tray (One Lambda, Los Angeles, CA, USA)を使用した。HLA-DR と HLA-DQ 抗原のタイピングにはBリンパ球を用いた。タイピングトレイには Terasaki DRw tray (One Lambda)を使用した。タイピング可能な HLA フェノタイプを表1に一括して示し

表 1 抗血清を用いてタイピング可能な HLA フェノタイプ

HLA 抗原	HLA フェノタイプ										
HLA-A	1	2	3	9	10	11	w 19	23	24	25	
	26	29	30	31	32	w 33	w 34	w 66	w 68	w 69	
HLA-B	5	7	8	12	13	14	16	17	18	21	w 22
	27	35	37	38	39	40	w 41	w 42	44	45	w 46
	w 47	w 48	49	w 50	51	w 52	w 53	w 54	w 55	w 56	w 57
	w 58	w 59	w 60	w 61	w 62	w 63	w 67	w 70	w 73		
HLA-C	w 1	w 2	w 3	w 4	w 5	w 6	w 7	w 8			
HLA-DR	1	2	3	4	5	w 6	7	w 8	9	w 10	w 12
	w 52	w 53								w 13	w 14
HLA-DQ	w 1	w 2	w 3	w 4							

た。

HLA タイピングに用いるリンパ球の調製は以下に述べるように行なった。まず、ヘパリン加末梢血 10 ml から、Hjorth らの方法²²⁾にしたがい、Percoll® (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) 不連続密度勾配遠心法により単核球を分離し、リンパ球画分を得た。リンパ球を 0.5% (v/v) 牛胎児血清を含有する HEPES-McCoy 培地 (Flow Laboratories, Inc., McLean, VA, USA) を用いて洗浄後、B リンパ球と非 B リンパ球を Stocker らの単クローン抗体ロゼット法²³⁾に準じて 10×10^6 個のリンパ球から分画した。なお、ロゼット法に用いるウサギ抗血清 (R 962) に代えて B リンパ球特異的単クローン抗体である H 4 (One Lambda) を、そして牛赤血球に代えて馬赤血球 (日本バイオテスト研究所, 東京) を使用した。また、B リンパ球は 3×10^6 個/ml の濃度の、そして、非 B リンパ球は 2×10^6 個/ml の濃度の懸濁液として実験に供した。

3. HLA クラス II β 鎖遺伝子の解析

染色体 DNA 上の HLA-DR 抗原および HLA-DQ 抗原の β 鎖をコードする遺伝子の RFLP 解析は、Böhme ら²⁴⁾と Wake ら²⁵⁾の方法にしたがった。遺伝子の特定部位の解析は、Saiki らの方法²⁶⁾にしたがって増幅した増幅 DNA を用いた。

1) DNA プローブ

HLA-DR β 鎖遺伝子の complementary DNA (cDNA) である pDR β 134 と、HLA-DQ β 鎖遺伝子の cDNA である pDQ β 155 の 2 種のプラスミドクローン²⁷⁾を DNA プローブとして用いた。両クローンは Japanese Cancer Research Resources Bank を経由して猪子英俊博士 (東海大学医学部移植学教室) の恵与を受けた。cDNA は、

制限酵素 *Pst* I (宝酒造, 京都) を用いてプラスミドから切断抽出したものをを用いた。すなわち、pDR β 134 の場合は、cDNA の内部に *Pst* I 切断部位が 3 ヲ所存在するため、510 および 420 塩基対 (bp) の cDNA 断片を分取して、その 2 種類の断片をプローブとした。pDR β 155 の場合は、プラスミドから切断抽出した 1.1 キロ塩基対 (kb) の cDNA 全長をプローブとした。

2) 制限酵素

制限酵素は、6 塩基認識の *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I, および *Sma* I, ならびに 4 塩基認識の *Msp* I (いずれも宝酒造) を用いた。

3) 染色体 DNA の抽出

染色体 DNA は、末梢白血球からチオシアン酸グアニジウム法²⁸⁾によって抽出した。なお、末梢白血球は Hjorth らの方法²²⁾にしたがい、Percoll® (Pharmacia) 不連続密度勾配遠心法により調製した。

4) DNA の特定部位の増幅

DNA の増幅は、耐熱性の *Taq* DNA ポリメラーゼを用いるポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法²⁶⁾を用いて行なった。すなわち、染色体 DNA (1 μ g) から、2 種の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、GeneAmp™ DNA amplification kit (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) を用いて DNA の特定部位を増幅した。増幅反応は、DNA thermal cycler (Perkin Elmer Cetus) 中で 35 サイクルまで行なった。なお、1 サイクルは、94°C で 1 分間の熱変性、60°C で 2 分間のアニーリング、および 72°C で 2 分間の伸長反応から構成される。増幅した DNA はフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールにより抽出し、エタノール沈殿を行なって精製した。

5) 被験 DNA の切断

染色体 DNA (10 μ g) の切断には、各種制限酵素をそれぞれ 46~48 単位/100 μ l の濃度で、37°C で 12 時間反応させる条件を用いた。また、増幅 DNA の切断には、増幅した DNA 試料の 1/10 量に対し、制限酵素を 30 単位/100 μ l の濃度で、37°C で 12 時間反応させる条件を用いた。

6) HLA クラス II β 鎖遺伝子の検出

被験 DNA 中の HLA クラス II β 鎖遺伝子の検出は、Southern の方法²⁹⁾に準じた。すなわち、被験 DNA を、Maniatis らの記載にある TBE 緩衝液または TAE 緩衝液³⁰⁾中、定電圧 50 V で電気泳動を行ない、0.7% または 2.0% (w/v) アガロースゲル (SeaKem ME Agarose : FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) 上に展開した。泳動時間は、Maniatis らの記載にあるゲルローディング緩衝液³⁰⁾中の bromophenol blue がゲル長の 2/3 に泳動するまでとした。泳動後、DNA をアルカリブロットニング法³¹⁾によってナイロン膜 (Hybond-N または Hybond-N+ : Amersham International plc., Bucks, UK) 上に転写した。

(1) ラジオアイソトープ (RI) 法

DNA プローブと目的の DNA とのハイブリダイゼーションは、Church らの方法³²⁾に準じた。あらかじめ DNA を固定するために 80°C に保って乾燥 (乾熱) させたナイロン膜を、RI 標識した DNA プローブを 1~2 $\times 10^6$ cpm/ml の濃度になるように加えた Church らの緩衝液³²⁾中で、65°C で 20 時間保温した。なお、cDNA の RI 標識は、Feinberg らの方法³³⁾に準じて行なった。すなわち、cDNA を random primer DNA labeling kit (宝酒造) と [α -³²P] dCTP (放射能濃度 110 TBq/mmol : Amersham) を用いて、プローブの比活性が 1~2 $\times 10^9$ dpm/ μ g となるように標識した。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜は、0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む希釈の標準クエン酸ナトリウム緩衝液 (0.2 $\times$ SSC : Maniatis らの記載にある 1 $\times$ SSC³⁰⁾を希釈したもの) を用いて、最終的に 65°C で 20 分間、2 回洗浄した。洗浄後のナイロン膜を増感紙 (Lightening Plus : Dupont, Wilmington, DE, USA) とともに、Kodack XAR-2 film (Eastman Kodack, Rochester, NY, USA) に密着させ、-80°C で 4~7 日間、オートラジオグラフィーを行なった。

なお、DNA プローブを 2 種類用いるため、同一ナイロン膜上でハイブリダイゼーション操作を 2 回繰り返した。すなわち、最初に用いた DNA プローブをオートラ

ジオグラフィー後に取り除き、もうひとつの DNA プローブを用いて再びハイブリダイゼーションを行なった。

(2) 非ラジオアイソトープ (非 RI) 法

非 RI 法のハイブリダイゼーションは、Pollard-Knight らの方法³⁴⁾にしたがった。すなわち、ECL gene detection system (Amersham) を用いて、cDNA を horseradish peroxidase complex で標識した。洗浄後のナイロン膜はケミルミネッセンス発光後、室温下で HyperfilmTM-ECL film (Amersham) に 20~60 秒間露光させた。なお、1 次洗浄緩衝液中の 0.5 $\times$ SSC は原法から 1 $\times$ SSC に変更した。

4. 統計処理

統計処理は、 χ^2 検定または Fisher の直接確率検定によって行なった。

結 果

1. HLA タイピング

1) HLA クラス I 抗原

EOP 患者 17 名と健康者 18 名について、HLA クラス I 抗原 (HLA-A, HLA-B, および HLA-C) の検出頻度を調べた (表 2)。各 HLA フェノタイプの検出頻度の差を EOP 患者群と健康者群間で検定した結果は、これらいずれの HLA フェノタイプの検出頻度に有意な差がないことを示すものであった。

2) HLA クラス II 抗原

EOP 患者 55 名、LOP 患者 15 名、および健康者 26 名について、HLA クラス II 抗原 (HLA-DR および HLA-DQ) の検出頻度を調べた (表 3)。各 HLA フェノタイプの検出頻度の差を、EOP 患者群と健康者群間、LOP 患者群と健康者群間、EOP 患者と LOP 患者を合せた患者群と健康者群の間、EOP 患者群と LOP 患者群間、および、EOP 患者群に対して LOP 患者と健康者を合せた群の間で、検定した。その結果は、どの群間においてもこれらいずれの HLA フェノタイプの検出頻度に有意な差がないことを示すものであった。

2. HLA クラス II β 鎖遺伝子の制限断片長の多型 (RFLP) 解析

RFLP 解析を行なった被験者の病型と HLA フェノタイプを含む背景を表 4 に示した。

1) HLA-DR β 鎖遺伝子の制限断片

HLA-DR β 鎖遺伝子の RFLP 解析において検出された各種制限酵素による DNA 断片のうち、被験者間で異なった大きさとして検出された断片の性状ならびにその

表 2 HLA クラス I 抗原の HLA フェノタイプ別
検出頻度

EOP: 早期発症型歯周炎

A2, A11, A24, Cw1, および Cw3 の検出頻度の
偏りについては χ^2 検定を, その他の HLA フェノ
タイプの検出頻度の偏りについては Fisher の直接
確率検定を, EOP 患者群と健康者群間で行なった。
有意差なし

HLA フェノタイプ	EOP 患者 (N=17)		健康者 (N=18)	
	検出数	割合 (%)	検出数	割合 (%)
A 1	1	5.9	4	22.2
A 2	9	52.9	6	33.3
A 3	2	11.1	1	5.6
A 9	1	5.9	1	5.6
A 11	5	29.4	7	38.9
A 24	7	41.2	5	27.9
A 26	1	5.9	2	11.1
A 31	2	11.8	4	22.2
Aw 33	1	5.9	4	22.2
B 5	2	11.8	5	27.8
B 7	3	17.6	3	16.7
Bw 22	0	0.0	1	5.6
B 35	2	11.8	1	5.6
B 37	1	5.6	1	5.6
Bw 41	0	0.0	1	5.6
B 44	1	5.6	1	5.6
Bw 46	3	17.6	2	11.1
B 51	4	23.5	3	16.7
Bw 52	1	5.9	0	0.0
Bw 54	2	11.8	2	11.1
Bw 56	0	0.0	1	5.6
Bw 58	0	0.0	1	5.6
Bw 59	0	0.0	2	11.1
Bw 60	2	11.8	2	11.1
Bw 61	4	23.5	2	11.1
Bw 62	3	17.6	4	22.2
Bw 67	1	5.6	0	0.0
Cw 1	8	47.1	8	44.4
Cw 3	9	52.9	10	55.6
Cw 6	0	0.0	2	11.1
Cw 7	4	23.5	3	16.7
Cw 8	1	5.9	2	11.1

断片の検出頻度を, 表 5 に一括して表示した。また, そ
の RFLP 像の例を図 1 に示した。

被験者間で多型性であった DNA 断片のうちでも,
Eco RI による 9.4 kb の断片は 1 名の被験者に, 2.0 kb
の断片 (図 1) は 2 名の被験者に, および *Msp* I による

5.0 kb の断片は 2 名の被験者に検出されなかった。それ
らの被験者は, すべて EOP 患者であった。一方, *Pst* I
による 6.0 と 4.8 kb の断片は 2 名の被験者に, および
Msp I による 4.4 と 3.6 kb の断片は 1 名の被験者に検
出された。それらの被験者も, すべて EOP 患者であっ
た。さらに, *Pst* I による 3.8 kb の断片は 1 名の被験者
から検出され, その被験者は LOP 患者であった。また,
Pst I による 3.0 kb 断片は 3 名の被験者に, および *Msp*
I による 3.8 kb 断片は 6 名の被験者に検出されなかつ
た。それらの被験者は, すべて歯周病患者であった。

各 DNA 断片の検出頻度の偏りを調べるために, 各被
験者群間で統計による検定を行なった。EOP 患者群と
健康者群間, LOP 患者群と健康者群間, EOP 患者と
LOP 患者を合せた患者群と健康者群の間, EOP 患者群
と LOP 患者群間, および, EOP 患者群に対して LOP
患者と健康者を合せた群の間で, 多型性を示した DNA
断片ごとに検定した。その結果は, すべての断片でどの
群間にも有意な差がないことを示すものであった。

2) HLA-DQ β 鎖遺伝子の制限断片

HLA-DQ β 鎖遺伝子の RFLP 解析において検出され
た各種制限酵素による DNA 断片のうち, 被験者間で異
なった大きさとして検出された断片の性状ならびにその
断片の検出頻度を表 6 に一括して表示した。また, その
RFLP 像の例を図 2 に示した。

被験者間で多型性があった DNA 断片のうちでも,
Eco RI による 2.3 kb の断片 (図 2) は 3 名の被験者に,
および *Bam* HI による 7.0 と 3.0 kb の断片 (図 2, お
よび 3) は 4 名の被験者に検出された。それらの被験者
は, すべて EOP 患者であった。

各 DNA 断片の検出頻度の偏りを調べるため, 上述の
被験者群間で統計による検定を行なった。*Bam* HI によ
る 7.0 と 3.0 kb の断片については, EOP 患者群と LOP
患者および健康者を合せた群の間で検出頻度に偏りがあ
った ($p < 0.05$)。

3. HLA-DQ β 鎖遺伝子の *Bam* HI による RFLP 解析

DNA 上の HLA-DQ β 鎖遺伝子の *Bam* HI 切断部位
は, Larhammer ら³⁵⁾ および Okada ら³⁶⁾ の解析結果から,
図 4 の模式図として示すことができる。

HLA-DQ β 鎖遺伝子を 7 および 3 kb に切断する *Bam*
HI の非典型的切断部位を推測するために, 同遺伝子の
Bam HI による DNA 断片を *Bam* HI 以外の制限酵素
で処理した。被験者 B, C, L, および S から検出した
HLA-DQ β 鎖遺伝子の *Bam* HI による 10, 7, および

表 3 HLA クラス II 抗原の HLA フェノタイプ別検出頻度

EOP: 早期発症型歯周炎, LOP: 晩期発症型歯周炎

各 HLA フェノタイプの検出頻度の偏りについて、 χ^2 検定を、EOP 患者群と健康者群間、LOP 患者群と健康者群間、EOP 患者と LOP 患者を合せた患者群と健康者群の間、EOP 患者群と LOP 患者群間、および、EOP 患者群に対して LOP 患者と健康者を合せた群の間で行なった。有意差なし

HLA フェノタイプ	EOP 患者 (N=55)		LOP 患者 (N=15)		健康者 (N=26)	
	検出数	割合 (%)	検出数	割合 (%)	検出数	割合 (%)
DR 1	6	10.9	4	26.7	4	15.4
DR 2	16	29.1	3	20.0	10	38.5
DR 4	18	32.7	6	40.0	5	19.2
DRw 6	1	1.8	0	0.0	0	0.0
DRw 8	5	9.1	2	13.3	0	0.0
DR 9	19	34.5	3	20.0	7	26.9
DRw 10	0	0.0	0	0.0	1	3.8
DRw 12	5	9.1	0	0.0	2	7.7
DRw 13	2	3.6	0	0.0	0	0.0
DRw 14	2	3.6	1	6.7	0	0.0
DRw 52	19	34.5	4	26.7	9	34.6
DRw 53	28	50.9	8	53.3	10	38.5
DQw 1	27	49.1	6	40.0	16	61.5
DQw 3	20	36.4	5	33.3	9	34.6
DQw 4	3	5.5	0	0.0	1	3.8

3 kb 断片に関して、それらを *Eco* RI あるいは *Sma* I によって 2 次切断すると、断片長はそれぞれ変化を示した (図 5)。すなわち、10 および 7 kb の断片は *Eco* RI による 2 次切断によってさらに細分されて 7 kb 未満の断片が新生された。*Sma* I による 2 次切断では、3 kb の断片がさらに細断されて検出されなくなり、10 kb の断片はわずかに異なった大きさとして検出されるようになった。しかし、7 kb の断片に限っては 2 次切断による変化が検出されなかった。これらの結果は、*Bam* HI 切断によって生ずる HLA-DQ β 鎖遺伝子の 7 kb の断片上には *Eco* RI の切断部位が存在し、3 kb の断片上には *Sma* I の切断部位が存在することを示している。また、被験者 B, C, L, および S の HLA-DQ β 鎖遺伝子上には、第 3 エクソンの 5' 側付近に *Bam* HI の非典型的切断部位が存在すると推定される (図 4 の矢印参照)。

4. 増幅 DNA を用いた非典型的 *Bam* HI 切断部位の検出

HLA-DQ β 鎖遺伝子上の非典型的 *Bam* HI 切断部を含む 1 kb の DNA 断片 (Larhammer ら³⁵⁾ が解析した HLA-DQ β 鎖遺伝子を含む染色体 DNA の塩基配列上で 4001 番目から 5000 番目の部分) を、PCR 法によって

増幅した (図 6)。増幅 DNA を電気泳動して、アガロースゲル上に展開した (図 7)。主たる断片は 1 kb と 1.2 kb のものであったが、その他に 1.8 kb と約 700 bp の断片も検出された。増幅 DNA を *Bam* HI で処理すると、被験者 B, C, および S では約 350 bp の断片が新たに出現した。検出された DNA 断片が HLA-DQ β 鎖遺伝子由来であることを確認するために、DNA プローブ (pDQ β 155) を用いて非 RI 法によるハイブリダイゼーションを行なった。その結果、新たに出現した約 350 bp の断片を含めて検出された 5 種類の断片は、すべて同 DNA プローブに対して相同性を有するものであることが示された (図 8)。*Bam* HI を用いた RFLP 解析で HLA-DQ β 鎖遺伝子の 10, 7, および 3 kb 断片を検出した被験者 B, C, S, および L のうち、B, C, および S からは約 350 bp の断片を検出したが、L からは検出しなかった (図 7 および 8)。

考 察

歯周病の罹患を HLA フェノタイプとの関係から調べようとする研究が、1975 年以来、着実に増えてきた。

表 4 RFLP 解析を行なった被験者の背景

EOP: 早期発症型歯周炎

LOP: 晩期発症型歯周炎

a: 被験者の相互が血縁関係にあることを示す
(B; 娘, C; 母)b: 被験者の相互が血縁関係にあることを示す
(E; 息子, F; 母, G; 父)

—: 同定不可能なタイプ

被験者	年齢	性	歯周病 の 病型	HLA フェノタイプ					
				DR	DRw	DQw			
A	28	男	健康	2 9	52 53	1 3			
B ^a	16	女	EOP	2 9	52 53	1 3			
C ^a	38	女	EOP	2 9	52 53	1 3			
D	30	女	EOP	2 9	52 53	1 —			
E ^b	22	男	EOP	2 9	52 53	1 —			
F ^b	46	女	LOP	2 9	52 53	1 —			
G ^b	50	男	LOP		未同定				
H	25	女	健康	9 —	53 —	3 —			
I	25	男	健康	9 —	53 —	3 —			
J	18	女	EOP	9 —	53 —	3 —			
K	26	女	EOP	9 —	53 —	— —			
L	27	女	EOP	9 —	53 —	— —			
M	49	男	LOP	9 —	53 —	— —			
N	24	女	EOP	4 9	52 53	— —			
O	38	男	EOP	4 9	52 53	1 3			
P	50	女	LOP	4 9	53 —	— —			
Q	46	女	LOP	4 9	53 —	3 —			
R	26	男	健康	2 —	— —	1 —			
S	25	男	EOP	2 —	— —	1 —			
T	30	男	健康	— —	53 —	— —			

HLA は宿主の抗原提示細胞が提示した歯周ポケット細菌の抗原とともに T リンパ球によって認識され、そして、そのことによって免疫応答が始まるので、免疫応答による宿主防御機能を病態として考える場合、HLA は極めて大切な因子である。一般に、HLA が疾患の発症に関係する生物学的機序には、いくつかの仮説がある¹⁾。HLA 分子が細菌もしくは細菌が産生する諸因子のレセプターとして働き、細菌の侵襲を助長するとするレセプター説³⁷⁾、HLA 分子の構造がある病原体の一部に類似しているため、有効な免疫応答が起こらないとする疑態説^{38, 39)}、そして、感染症の発症と進行に直接関係する免疫応答遺伝子説⁴⁰⁾と免疫応答抑制遺伝子説⁴¹⁾である。若年性糖尿病、リウマチ性関節炎、さらに天疱瘡の患者では、HLA 遺伝子の塩基配列に異常があることが明らかになっている^{3~5)}。すなわち、ある種の HLA クラス II 分

表 5 被験者の HLA-DR β 鎖伝子の制限酵素による DNA 断片

EOP: 早期発症型歯周炎

LOP: 晩期発症型歯周炎

各 DNA 断片を有する被験者数の偏りについて、Fisher の直接確率検定を、EOP 患者群と健康者群間、LOP 患者群と健康者群間、EOP 患者と LOP 患者を合わせた患者群と健康者群の間、EOP 患者群と LOP 患者群間、および、EOP 患者群に対して LOP 患者と健康者を合わせた群の間で行なった。有意差なし

制限酵素	DNA 断片 (kb)	DNA 断片を 有する被験者数 / 被験者数		
		EOP 患者	LOP 患者	健康者
<i>EcoR</i> I	9.4	9/10	5/5	5/5
	2.0	8/10	5/5	5/5
<i>Pst</i> I	9.6	6/10	3/5	4/5
	9.0	6/10	2/5	2/5
	6.0	2/10	2/5	2/5
	6.0 4.8	2/10	0/5	0/5
	5.0	8/10	4/5	4/5
	4.0	7/10	4/5	4/5
	3.8	0/10	1/5	0/5
	3.0	8/10	4/5	5/5
	1.6	4/10	2/5	3/5
	5.0	8/10	5/5	5/5
<i>Msp</i> I	4.4 3.6	1/10	0/5	0/5
	3.8	6/10	3/5	5/5
	3.6	2/10	0/5	0/5
	5.0	2/10	1/5	2/5
<i>BamH</i> I	2.5	1/10	0/5	1/5

子の β I ドメインにおいてアミノ酸配列が一部分異なっている。そして、アミノ酸配列の変化が α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーからなる HLA 分子の構造に変化を与え、Schwartz が提唱した HLA 分子、外来抗原、T 細胞レセプター間の結合⁴²⁾が変化するため異常な免疫応答が生ずると考えられている。したがって、疾患感受性に関する研究は、HLA 分子または遺伝子のレベルで調べなければならないことになる。

歯周病の病型と HLA フェノタイプの関係を調べた研究は、1975 年の Terasaki らの報告⁶⁾ 以来いくつか報告されている^{7~18)}。歯周病に関わる HLA フェノタイプが数多くあるように報告されている事実は、ある意味では歯周病の病態が単純に HLA フェノタイプとの相関だけでは解析し切れないことを示唆するものである。本研究結果では、歯周病患者に特徴的な HLA フェノタイプを

図 1 HLA-DR β 鎖遺伝子の *Eco*RI, *Pst*I, *Bam*HI, および *Msp*I 処理による RFLP

A, B, C, E, H, I, J, K, および L: 被験者

なお, 本アルファベットは表 4 に示した被験者のアルファベットに相応する。

レーン左の数字と矢印 (▶) は分子量マーカを表わす。単位はキログラム塩基対 (kb) で表わした。

検出し得ないとするものであった。

抗血清を用いて同定された HLA フェノタイプがたとえ同一であっても, HLA の分子レベルでは, 抗血清に認識されない部分に当然違いがあると疑われる。HLA 分子を形成するアミノ酸配列, もしくはアミノ酸配列を決定する遺伝子を詳しく解析すると, HLA 分子に機能変化をもたらす分子レベルあるいは遺伝子レベルの変異に基づいて, これまで同じタイプに分類された HLA であっても, さらに細分化されることになる。

本研究では, 被験者の HLA フェノタイプを同一にそろえることなく, HLA 遺伝子の RFLP 解析を行なった。結果は, HLA 遺伝子は HLA フェノタイプの同異にかかわらず, 同一の制限断片長を生ずることがあることを示すものであり, さらに, RFLP 解析が疾病の病態解明上, 有用なものであることを示唆した。たとえば, HLA-DQ β 鎖遺伝子を *Bam*HI によって切断した時に見られる各種制限断片長のうち, 7 および 3 kb の断片は 10 名の EOP 患者のうち 4 名にみられたが (B, C, S, および L; 図 3), それらの患者の HLA フェノタイプはそれぞれ

異なるものであった (表 4)。

RFLP 解析は, 多量の DNA 試料と長時間を要するため, 特定の遺伝子変異をルチーンに検出する方法としては適さない。本研究で得た *Bam*HI による HLA-DQ β 鎖遺伝子の 10, 7, および 3 kb の断片をルチーンに検出する方法としては, その 10 kb の断片を 7 および 3 kb に細分すると考えられる *Bam*HI の非典型的な切断部位を含む DNA 断片を取り出して解析する方法がある。1988 年に発表された PCR 法²⁶⁾によって, 微量な DNA を試料として, 遺伝子の特定部分を含む DNA 断片のみを短時間のうちに増幅して取り出すことが可能になった。HLA-DQ β 鎖遺伝子上にある *Bam*HI の非典型的な切断部位の検出に, PCR 法の応用を試みた。*Bam*HI を用いて行なった HLA-DQ β 鎖遺伝子の RFLP 解析の結果 (図 3) から, すべての被験者に共通して得られた DNA 断片は 10 kb 断片であった。なお, 約 5 kb と 4.4 kb の断片も検出されることが多かった。これらの 5 および 4.4 kb の断片は, HLA-DQ β 鎖遺伝子の RFLP 解析に用いた同じナイロン膜上の DNA と HLA-DR β 鎖

図 2 HLA-DQ β 鎖遺伝子の *Eco* RI, *Pst* I, *Bam* HI, および *Msp* I 処理による RFLP

A, C, H, I, J, L, M, および S : 被験者

なお, 本アルファベットは表 4 に示した被験者のアルファベットに相応する。

レーン左の数字と矢印 (▶) は分子量マーカを表わす。単位はキログラム対 (kb) で表わした。

遺伝子の DNA プローブとのハイブリダイゼーションによって, より明瞭なオートラジオグラム像として検出された。DQ β 鎖遺伝子は DR β 鎖遺伝子に対して高い相同性を有しており, DQ β 鎖遺伝子の DNA プローブが DR β 鎖遺伝子にクロスハイブリダイゼーションしているのであろう。4 名の EOP 患者から検出された *Bam* HI による HLA-DQ β 鎖遺伝子の約 7 および 3 kb の断片は, 10 kb の断片に由来すると考えられるが, 他の被験者の場合と同様に 4 名の EOP 患者から *Bam* HI によって切断されない 10 kb の断片も検出された (図 3)。すなわち, HLA-DQ β 鎖遺伝子には, *Bam* HI によって 10 kb の断片に切断される遺伝子, および, 7 kb と 3 kb の断片に切断される変異遺伝子の 2 種類があると考えられる。そして, *Bam* HI で処理した HLA-DQ β 鎖遺伝子を, *Eco* RI あるいは *Sma* I によって 2 次切断処理した RFLP 解析の結果 (図 5) から解釈すると, *Bam* HI が 10 kb の断片を 7 および 3 kb の断片に切断する部位は図 4 中の矢印 (↑) が示す部位に存在すると推定され

る。

この RFLP 解析の結果と PCR 法を組合せて, HLA-DQ β 鎖遺伝子上の非典型的な *Bam* HI 切断部位を検出することを試みた (図 6)。合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして, PCR 法で増幅した非典型的な *Bam* HI 切断部位を含む 1 kb の DNA 断片を用いて RFLP 解析を行なった結果は, 変異遺伝子を有する 4 名の被験者から得られた RFLP 解析の解釈を大方裏づけるものであった。被験者 L の増幅 DNA のみは *Bam* HI によって切断されず (図 7 および 8), 切断された被験者 B, C, および S のものとは異なっている。さらに, 図 5 では被験者 L の 10 kb 断片が *Bam* HI によって切断されて, 7 kb より少し小さい断片と 3 kb より少し大きい断片に細分されているように読み取ることできる。したがって, 被験者 L に見られた *Bam* HI の非典型的切断部位は, HLA-DQ β 鎖遺伝子上の増幅した部分よりも 3' 側に存在し, 増幅 DNA 断片には, その切断部位が含まれていないものと解釈される (図 4 および 6)。また, 増

幅 DNA から得られた RFLP パターン (図 7) において約 350 bp の断片が検出された被験者 B, C, および S の場合, 増幅 DNA を *Bam* HI で処理すると約 700 bp の断片が量的に増えているように読み取れる。これは, 非特異的に増幅された約 700 bp の断片に, 1 kb の増幅 DNA を *Bam* HI で切断した後の断片が重なっているために生じた RFLP パターンであると解釈することができる。しかし, HLA-DQ β 鎖遺伝子の DNA プローブとハイブリダイゼーションさせても, 700 bp の断片のこのような量的な増加は認められなかったことから (図 8) すれば, 1 kb の増幅 DNA から *Bam* HI によって生じた約 700 bp の断片の大部分は, HLA-DQ β 鎖遺伝子の第 3 エクソンの 5' 側に位置するイントロン部 (図 6) を含んでいると解釈するのが妥当であろう。一方, *Bam* HI の非典型的な切断部位を推察しようとするアガロースゲル電気泳動の結果 (図 7) を考察しても, その切断部位がイントロンに存在するのかエクソンに存在するのか未だに不明である。遺伝子変異の存在場所によって, 遺伝子の発現が影響を受けたり, 生合成された蛋白分子の構造が変化したりするので, より一層の考察を行なうためには増幅 DNA の塩基配列を解析し, この非典型的な切断部位を決定する必要がある。

本研究で検出した HLA-DQ β 鎖遺伝子の変異が, 免疫応答の機能発現の上で果たす役割はまったくわかっていない。被験者 B, C, および S は, DR 2-DQw 1 の HLA ハプロタイプを有し, 特徴的な RFLP パターンを示した。Inoko ら⁴³⁾ および Otani ら⁴⁴⁾ の HLA 遺伝子の

RFLP 解析結果を参考にすると, これらの被験者は DR 2-Dw 2-DQw 1 の HLA ハプロタイプを有していると思像される。Sasazuki ら⁴⁵⁾ は, DR 2-Dw 2-DQw 1 のハプロタイプを有する者は DR 2-Dw 12-DQw 1 のハプロタイプを有する者に比較し, 連鎖球菌の細胞壁抗原に

表 6 被験者の HLA-DQ β 鎖遺伝子の制限酵素による DNA 断片

EOP : 早期発症型菌周炎

LOP : 晩期発症型菌周炎

各 DNA 断片を有する被験者数の偏りについて, Fisher の直接確率検定を, EOP 患者群と健康者群間, LOP 患者群と健康者群間, EOP 患者と LOP 患者を合わせた患者群と健康者群の間, EOP 患者群と LOP 患者群間, および, EOP 患者群に対して LOP 患者と健康者を合わせた群の間で行なった。

* : $p < 0.05$ で有意差あり

制限酵素	DNA 断片 (kb)	DNA 断片を有する被験者数 / 被験者数		
		EOP 患者	LOP 患者	健康者
<i>Eco</i> R I	11.0	7/10	5/5	4/5
	10.0	8/10	4/5	3/5
	2.3	3/10	0/5	0/5
<i>Pst</i> I	9.6	7/10	3/5	4/5
<i>Msp</i> I	4.4	6/10	3/5	2/5
	2.1	2/10	0/5	1/5
<i>Bam</i> HI	7.0 3.0	4/10	0/5	0/5
	4.0	1/10	0/5	1/5

図 3 HLA-DQ β 鎖遺伝子の *Bam* HI による RFLP

□ : 7 kb DNA 断片, ◀ : 3 kb DNA 断片, A~T : 被験者, MW : 分子量マーカー
なお, 本アルファベットは表 4 に示した被験者のアルファベットに相応する。
分子量マーカーの単位はキロ塩基対 (kb) で表わした。

図 4 HLA-DQ β 鎖遺伝子の模式図

Larhammer ら³⁵⁾と Okada ら³⁶⁾から引用, 改変して転載した。

□: HLA-DQ β 鎖をコードし mRNA へ転写される部分 (エクソン)

—: 蛋白をコードしない部分 (イントロン)

↑: *Bam*HI によって 10 kb の断片が 7 kb と 3 kb 断片に切断されると仮定したときの, *Bam*HI の切断部位

図 5 HLA-DQ β 鎖遺伝子の *Bam*HI による断片の *Eco*RI あるいは *Sma*I による 2 次切断

B, C, L, および S: 被験者, MW: 分子量マーカー

なお, 本アルファベットは表 4 に示した被験者のアルファベットに相応する。

分子量マーカーの単位はキロ塩基対 (kb) で表わした。

対する T リンパ球増殖反応が低応答性であり, 日本住血吸虫抗原に対する反応は高応答性であることを報告している。このことを勘案すると, 被験者 B, C, および S は, 歯周病細菌に対して他の被験者とは特に異なった免疫応答をしているのかもしれない。

個体の防御機能の変異は, 遺伝子の mRNA への転写, 蛋白への翻訳, 蛋白の細胞内での修飾, そして, 蛋白の細胞表層への出現のいずれの段階においても起こり得る。したがって, 歯周病の病態を知るためには, HLA フ

ェノタイプとの相関のみにこだわるのではなく, 蛋白および遺伝子の両面から機能分子を解明しなければならない。本研究では, 歯周病患者の HLA 遺伝子の RFLP 解析を行ない, さらに, 検出した DNA の変異を PCR 法を利用して検出し得ることを示唆した。つまり, DNA のある特定の変異を鋭敏に検出し, そして, その変異を解析する方法が確立できたものと考えている。今後, こうした分子生物学的な研究方法を用いて, 歯周病の発症と進行に関わる宿主の様々な機能分子の変異を解析すること

図 6 HLA-DQ β 鎖遺伝子上の増幅部分

→ : 2 種類のプライマーが DNA にアニーリングする位置, ↑ : プライマーと第 3 エクソンの起始点

2 種類のプライマーに挟まれた部分は増幅範囲 (1 kb) を示す。数字 (4,001, 4,771, 5,000) は Larhammer ら³⁵⁾の報告した塩基配列にある塩基の番号を表わす。

Subjects : A R B C S L K Q

BamHI : - + - + - + - + - + - + - + - +

MW(bp)

2,000 →

1,000 →

560 →

350 →

130 →

図 7 HLA-DQ β 鎖遺伝子上の非典型的 *Bam* HI 切断部位を含む増幅 DNA のアガロースゲル電気泳動

A, B, C, K, L, Q, R, および S : 被験者, MW : 分子量マーカー,
- : *Bam* HI 未処理, + : *Bam* HI 処理

なお, 本アルファベットは表 4 に示した被験者のアルファベットに相応する。
分子量マーカーの単位は塩基対 (bp) で表わした。

は, 歯周病の病態の解明, さらに, 歯周病の診断につながるかと考える。

結 論

歯周病の病態を解明する手掛りをヒト白血球抗原 (HLA) に求め, 歯周病患者の HLA フェノタイプならびに HLA 遺伝子を調べ, 次の結果を得た。

1. 歯周病患者または健康者に特徴的な HLA フェノタイプを検出することはできなかった。
2. 制限断片長多型 (RFLP) 解析を用いて, HLA 遺伝子のある変異を検出することができた。
3. 制限酵素 *Bam* HI を用いた RFLP 解析で検出した HLA-DQ β 鎖遺伝子の変異は, ポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法によって増幅した DNA 断片から一層鋭敏に検出できた。

Subjects : A R B C S L K Q

BamHI : - + - + - + - + - + - + - + - +

MW(bp)

1,000 →

350 →

図 8 HLA-DQ β 鎖遺伝子上の非典型的 *Bam* HI 切断部位を含む増幅 DNA の DNA プローブ (pDQ β 155) を用いたハイブリダイゼーション
A, B, C, K, L, Q, R, および S : 被験者, MW : 分子量マーカー,
- : *Bam* HI 未処理, + : *Bam* HI 処理
なお, 本アルファベットは表 4 に示した被験者のアルファベットに相応する。
分子量マーカーの単位は塩基対 (bp) で表わした。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学歯学部歯科保存学第 2 講座, 村山洋二教授に心から感謝いたします。また, 分子生物学の基礎を御教授下さったばかりでなく終始御指導を賜った口腔生化学講座の谷口茂彦教授および野地澄晴博士, ならびに同講座の諸先生方に深く感謝いたします。

さらに, HLA クラス II β 鎖遺伝子の cDNA を快く御恵下さり適切な御助言を下された東海大学医学部移植学教室の猪子英俊助教授, また, HLA タイピングと PCR 法による DNA の増幅に御助力を賜った本学医学部第一外科学教室の折田薫三教授, 坂上賢一助教授, および岡林孝弘博士, ならびに, クラレ中央研究所の中村通宏博士および畑中唯史氏に厚く御礼申し上げます。

最後に, 本研究を行なうにあたり, 終始御指導と御助言を下さいました野村慶雄助教授を始めとする歯科保存学第 2 講座の皆様我心から感謝いたします。

文 献

- 1) Tiwari, J.L. and Terasaki, P.I. : HLA and disease association, 1st ed., Springer-Verlag, New York, 1985, 28-48, 55-68, 185-210.
- 2) Todd, J.A., Acha-Orbea, H., Bell, J.I., Chao, N., Fronek, Z., Jacob, C.O., McDermott, M., Sinha, A.A., Timmerman, L., Steinman, L. and McDevitt, H.O. : A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science*, 240 : 1003-1009, 1988.
- 3) Wraith, D.C., McDevitt, H.O., Steinman, L. and Acha-Orbea, H. : T cell recognition as the target for immune intervention in autoimmune disease. *Cell*, 57 : 709-715, 1989.
- 4) Owerbach, D., Lernmark, Å., Platz, P., Ryder, L.P., Rask, L., Peterson, P.A. and Ludvigsson, J. : HLA-D region β -chain DNA endonuclease

- fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Nature*, 303 : 815-817, 1983.
- 5) Todd, J.A., Bell, J.I. and McDevitt, H.O. : HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 329 : 599-604, 1987.
 - 6) Terasaki, P.I., Kaslick, R.S., West, T.L. and Chasens, A.I. : Low HL-A 2 frequency and periodontitis. *Tissue Antigens*, 5 : 286-288, 1975.
 - 7) Kaslick, R.S., West, T.L., Chasens, A.I., Terasaki, P.I., Lazzara, R. and Weinberg, S. : Association between HL-A 2 antigen and various periodontal diseases in young adults. *J. Dent. Res.*, 54 : 424, 1975.
 - 8) Reinholdt, J., Bay, I. and Svejgaard, A. : Association between HLA-antigens and periodontal disease. *J. Dent. Res.*, 56 : 1261-1263, 1977.
 - 9) Kaslick, R.S., West, T.L. and Chasens, A.I. : Association between ABO blood groups, HL-A antigens and periodontal diseases in young adults. A follow-up study. *J. Periodontol.*, 51 : 339-342, 1980.
 - 10) Cullinan, M.P., Sachs, J., Wolf, E. and Seymour, G.J. : The distribution of HLA-A and -B antigens in patients and their families with periodontosis. *J. Periodont. Res.*, 15 : 177-184, 1980.
 - 11) Marggraf, E., von Keyserlingk-Eberius, H.J., Komischke, B. and Wollert, N. : Die Assoziation von Histokompatibilitätsantigenen (HLA-Antigene) mit profunden Parodontopathien. *Dtsch. zahnärztl. Z.*, 38 : 585-589, 1983.
 - 12) Goteiner, D. and Goldman, M.J. : Human lymphocyte antigen haplotype and resistance to periodontitis. *J. Periodontol.*, 55 : 155-158, 1984.
 - 13) Saxén, L. and Koskimies, S. : Juvenile periodontitis. No linkage with HLA-antigens. *J. Periodont. Res.*, 19 : 441-444, 1984.
 - 14) 足利 照 : 歯周疾患と HLA 抗原との関連性に関する研究. 城西大紀要, 13 : 275-284, 1984.
 - 15) Cogen, R.B., Roseman, J.M., Al-Joburi, W., Louv, W.C., Acton, R.T., Barger, B.O., Go, R.C.P. and Rasmussen, R.A. : Host factors in juvenile periodontitis. *J. Dent. Res.*, 65 : 394-399, 1986.
 - 16) Klouda, P.T., Porter, S.R., Scully, C., Corbin, S.A., Bradley, B.A., Smith, R. and Davies, R.M. : Association between HLA-A 9 and rapidly progressive periodontitis. *Tissue Antigens*, 28 : 146-149, 1986.
 - 17) Katz, J., Goultschin, J., Benoliel, R. and Brautbar, C. : Human leukocyte antigen (HLA) DR α . Posities association with rapidly progressive periodontitis. *J. Periodontol.*, 58 : 607-610, 1987.
 - 18) Amer, A., Singh, G., Darke, C. and Dolby, A.E. : Association between HLA antigens and periodontal disease. *Tissue Antigens*, 31 : 53-58, 1988.
 - 19) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Karger, New York, 1982, 45-57, 222-239.
 - 20) Murayama, Y., Nagai, A., Okamura, K., Kurihara, H., Nomura, Y., Koeguchi, S. and Kato, K. : Serum immunoglobulin G antibody to periodontal bacteria. *Adv. Dent. Res.*, 2 : 339-345, 1988.
 - 21) Terasaki, P.I., Bernoko, D., Park, M.S., Ozturk, G. and Iwaki, Y. : Microdroplet testing for HLA-A, -B, -C, and -D antigens. *Am. J. Clin. Pathol.*, 69 : 103-120, 1978.
 - 22) Hjorth, R., Jonsson, A.K. and Vretblad, P. : A rapid method for purification of human granulocytes using Percoll®. A comparison with dextran sedimentation. *J. Immunol. Methods*, 43 : 95-101, 1981.
 - 23) Stocker, J.W., Garotta, G., Hausmann, B., Trucco, M. and Ceppellini, R. : Separation of human cells bearing HLA-DR antigens using a monoclonal antibody rosetting method. *Tissue Antigens*, 13 : 212-222, 1979.
 - 24) Böhme, J., Owerbach, D., Denaro, M., Lernmark, Å., Peterson, P.A. and Rask, L. : Human class II major histocompatibility antigen β -

- chains are derived from at least three loci. *Nature*, 301 : 82-84, 1983.
- 25) Wake, C.T., Long, E.O., Strubin, M., Gross, N., Accolla, R., Carrel, S. and Mach, B. : Isolation of cDNA clones encoding HLA-DR α chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 6979-6983, 1982.
 - 26) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. : Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 : 487-491, 1988.
 - 27) Inoko, H., Ando, A., Ito, M. and Tsuji, K. : Southern hybridization analysis of DNA polymorphism in the HLA-D region. *Human Immunol.*, 16 : 304-313, 1986.
 - 28) Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. : Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18 : 5294-5299, 1979.
 - 29) Southern, E.M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98 : 503-517, 1975.
 - 30) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. : Molecular cloning. A laboratory manual, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982, 160, 447, 454.
 - 31) Reed, K.C. and Mann, D.A. : Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res.*, 13 : 7207-7221, 1985.
 - 32) Church, G.M. and Gilbert, W. : Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 1991-1995, 1984.
 - 33) Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. : A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132 : 6-13, 1983.
 - 34) Pollard-Knight, D., Read, C.A., Downes, M.J., Howard, L.A., Leadbetter, M.R., Pheby, S.A., McNaughton, E., Syms, A. and Brady, M.A. : Nonradioactive nucleic acid detection by enhanced chemiluminescence using probes directly labeled with horseradish peroxidase. *Anal. Biochem.*, 185 : 84-89, 1990.
 - 35) Larhammer, D., Hyldig-Nielsen, J.J., Servenius, B., Andersson, G., Rask, L. and Peterson, P.A. : Exon-intron organization and complete nucleotide sequence of a human major histocompatibility antigen DC β gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 7313-7317, 1983.
 - 36) Okada, K., Boss, J.M., Prentice, H., Spies, T., Mengler, R., Auffray, C., Lillie, J., Grossberger, D. and Strominger, J.L. : Gene organization of DC and DX subregions of the human major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 : 3410-3414, 1985.
 - 37) Mollick, J.A., Cook, R.G. and Rich, R.R. : Class II MHC molecules are specific receptors for Staphylococcus enterotoxin A. *Science*, 244 : 817-820, 1989.
 - 38) Seager, K., Bashir, H.V., Geczy, A.F., Edmonds, J.P. and deVere Tyndall, A. : Evidence for a specific B 27-associated cell surface marker on lymphocytes of patients with ankylosing spondylitis. *Nature*, 277 : 68-70, 1979.
 - 39) Ogasawara, M., Kono, D.H. and Yu, D.T.Y. : Mimicry of human histocompatibility HLA-B 27 antigens by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 51 : 901-908, 1986.
 - 40) Lehner, T., Lamb, J.R., Welsh, K.L. and Batchelor, R.J. : Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries. *Nature*, 292 : 770-772, 1981.
 - 41) Sasazuki, T., Kohno, Y., Iwamoto, I., Tanimura, M. and Naito, S. : Association between an HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man. *Nature*, 272 : 359-361, 1978.
 - 42) Schwartz, R.H. : T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.*, 3 : 237-263, 1985.
 - 43) Inoko, H., Ando, A., Tsuji, K., Matsuki, K., Juji, T. and Honda, Y. : HLA-DQ β chain DNA restriction fragments can differentiate between healthy and narcoleptic individuals with HLA-DR 2. *Immunogenetics*, 23 : 126-128, 1986.
 - 44) Otani, F., Okuda, M. and Kashiwagi, N. :

- Southern blot analysis of HLA class II β genes in relation to HLA-D, DR specificities. Transplant. Proc., 19 : 817-821, 1987.
- 45) Sasazuki, T., Matsushita, A., Hirayama, K., Kimura, A., Kikuchi, I., Nishimura, Y., Tsukamoto, K., Yasunami, M., Muto, M., Sone, T. and Hirose, T. : HLA-linked immune suppression gene maps within the HLA-DQ subregion, Sasazuki, T., New approach to genetic diseases, Academic Press, New York, 1987, 89-97.
-

連絡先 :

岡山大学歯学部歯科保存学第2講座

〒 700 岡山市鹿田町 2-5-1