

굴응애 과민성 천식에서 HLA-DRB1 유전자좌의 항원형 분포

서울대학교 의과대학 내과학교실¹, 서울대학교 의학연구원 알레르기 및 임상면역연구소²,

울산대학교 의과대학 임상병리학교실³, 제주대학교 의과대학 소아과학교실⁴

김윤근^{1,2}, 오홍범³, 이명현⁴, 장윤석¹, 정재원¹, 손지웅^{1,2}, 지현숙³, 조상현^{1,2}, 민경업^{1,2}, 김유영^{1,2}

Antigenic distribution of HLA-DRB1 locus in citrus red mite (*Panonychus citri*)-sensitive asthma

Yoon-Keun Kim^{1,2}, Heung-Bum Oh³, Myung-Hyun Lee⁴, Yoon-Suk Chang¹, Jae-Won Jung¹, Jee-Woong Son^{1,2}, Hyun-Sook Jee³, Sang-Heon Cho^{1,2}, Kyung-Up Min^{1,2} and You-Young Kim^{1,2}

¹Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine;

²Institute of Allergy and Clinical Immunology, Seoul National University Medical Research Center;

³Department of Clinical Pathology, Ulsan University College of Medicine;

⁴Department of Pediatrics, Cheju University College of Medicine

Background : Specific IgE responses to allergens provide useful models for evaluating the genetic factors that control human immune responses. HLA class II gene products are involved in the antigen presentation of exogenous antigens.

Objective : The aim of this study was to evaluate whether susceptibility or resistance to asthma induced by the citrus red mite (*Panonychus citri*, CRM) was associated with HLA class II gene-encoded antigens.

Methods : Peripheral venous blood samples were collected from two groups of unrelated Korean adults: Ninety-one patients with citrus red mite-induced asthma and 98 exposed, healthy control subjects. The second exon of the HLA-DRB1 genes was selectively amplified by the polymerase chain reaction method. HLA typing was carried out using PCR-sequence specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP).

Results : The frequency of HLA-DR7 was significantly higher among the CRM-sensitive asthmatics than among the controls (17.6% vs 4.1%, RR=3.92, $p=0.01$). Conversely, the frequency of HLA-DR4 was significantly lower among the CRM-sensitive asthmatics than among the controls (19.8% vs 40.8%, RR=0.36, $p=0.01$). No significant difference was found in the distributions of the other HLA-DRB1 gene-encoded antigens between the two groups.

Conclusion : HLA-DRB1 genes may be involved in the development of citrus red mite-induced asthma. In addition, HLA-DR7 may increase, and DR4 decrease, the risk of developing asthma in exposed individuals.

Key words : citrus red mite, asthma, HLA-DR, PCR-SSOP

본 연구는 서울대학교병원 연구비(02-1995-011-0)의 지원에 의하여 이루어 졌음.

통신저자: 서울의대 내과 김유영

접수: 99년 6월 23일, 통과: 99년 8월 5일

서 론

굴옹애(학명: *Panonychus citri*, 영문명: Citrus red mite)는 거미강(Arachnida), 응애목(Acari), 잎응애과(Tetranychidae)에 속하는 응애(mite)로서 감귤잎에 기생하여 해를 입히는 해충으로서 제주도 감귤농사에서 방제 상 가장 문제가 되고 있는 초식성 응애(phytophagous mite)이다¹⁾. 최근 본 연구자 등은 감귤농사에 종사하는 주민에서 굴옹애 항원 추출액으로 기관지 유발시험을 통해 굴옹애에 의한 직업성천식을 세계 최초로 보고하였다²⁾. 이후 제주도지역에 거주하는 성인에서 원인 항원이 불분명한 기관지천식 환자에서 상당수가 굴옹애에 과민한 천식으로 밝혀졌다³⁾.

HLA class II 분자를 부호화(encoding) 하는 HLA class II 유전자는 항원에 의한 면역반응을 조절하는 후보 유전자로 알려져 있다. HLA class II 대립인자(allele)와 특정 항원에 의한 특이 IgE 반응간의 관련성(association)에 대해서는 여러 연구가 있었다³⁻⁷⁾. 이들 연구에서 두드러기 쑥 알레르겐과 같이 매우 단순한 알레르겐에 의한 특이 IgE 반응과 HLA class II 분자와의 관련성은 확인되었으나³⁻⁶⁾, 집먼지진드기 항원과 같이 IgE 항체와 반응하는 알레르겐의 구조가 복잡한 경우에는 항원 특이 IgE 반응과 HLA 형과의 관련성에 대해서는 일관된 연구결과가 없는 실정이다⁸⁾. 특정 항원에 의한 기관지천식과 HLA class II 분자와의 관련성은 아스피린 과민성 천식^{9,10)}, TDI 과민성 천식¹¹⁾ 등에서 보고되었으나 일관된 연구결과는 없는 실정이다.

본 연구에서는 굴옹애에 과민한 기관지천식 환자와 굴옹애에의 노출력은 있으나 천식증상이 없고, 굴옹애 항원에 감작되어 있지 않은 대조군을 대상으로 HLA-DRB1 유전자좌(locus)의 항원형을 결정하여 굴옹애 과민성 기관지천식의 발생에 HLA-DRB1 유전자의 역할을 평가하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

기관지천식으로 진단된 환자 중 천식증상이 감귤 과수원에서 악화되고, 피부단자시험 상 굴옹애 항원에 양성반응을 보인 굴옹애 과민성 천식 환자 91명과 대조군으로 굴옹애에 노출된 적은 있었으나 천식증상이 없고, 피부단자시험상 흡입성 항원에 음성 반응을 보인 99명을 대상으로 HLA-DRB1 locus의 항원형을 결정하였다. 기관지천식은 기침, 호흡곤란, 천명 등의 천식증상이 있었던 환자에서 폐기능이 떨어져 있었던 경우는 천식치료에 의해 FEV₁이 15% 이상 호전되는 경우, 혹은 폐기능이 정상인 경우에는 메타콜린 기관지유발시험을 시행하여 기관지과민성이 증명된 경우(PC20-methacholine < 16mg/ml)에 진단하였다. 굴옹애 과민성 천식 환자의 평균 연령은 36.8 (21-65)세였고, 성비(남/여)는 47/51명이었다.

2. 피부단자시험

굴옹애 항원은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 채집한 굴옹애에서 불순물을 제거한 뒤, modified Coca 용액과 실온에서 24시간 반응시킨 후 원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 상층액을 투석액에 넣고 4°C에서 phosphate buffered saline에 2일간 투석시켰다. 알레르기 피부시험용 시약은 1:10 w/v ratio의 추출액에 동량의 글리세린을 첨가하여 사용하였다.

피부단자시험은 굴옹애 항원을 포함하여 13종의 혼한 흡입성 항원과 양성대조액으로는 히스타민 1mg/ml, 음성대조액으로는 희석액을 사용하여 피부단자시험을 시행하였다. 피부단자시험의 결과는 15분 후에 팽진의 크기와 발적유무를 판독하고, 팽진의 크기는 장경과 단경을 측정하여 평균치(mm)로 구했다. 항원에 의한 팽진의 크기가 4mm 이상인 경우 피부단자시험 양성으로 판정하였고, 팽진주위에 발적이 없으면 음성으로 판정하였다.

3. HLA-DRB1 유전자좌의 항원형 결정

HLA-DRB1 유전자좌의 항원형은 Roche사의 Amplicor HLA test kit (Roche Diagnostic System, USA)를 사용하여 결정하였다. Amplicor HLA DRB test kit는 PCR-reverse hybridization 원리를 응용한 것으로 272bp 크기의 HLA-DRB1 유전자를 포함한 부위를 biotin 표지 primer를 이용해 중합효소연쇄반응에 의해 증폭시킨 후, 증폭된 유전자를 21종의 DRB1 probe가 line 형태로 부착되어 있는 nylon membrane에 반응시켜 hybridization시킨 다음, streptavidin이 결합된 peroxidase 효소와 기질액을 차례로 반응시켜 발색반응으로 결과를 확인하였다. 상기 방법에서 HLA-DR2로 판정된 경우는 HLA-DR15와 DR16을 구별하기 위하여 PCR-SSP 방법으로 항원형을 구별하였다.

1) 말초혈액에서 DNA 추출

피검자의 전주와 정맥 (antecubital vein)에서 5cc를 채혈하여 EDTA tube에 넣은 후 DNA extraction kit (Guachem)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 즉 먼저 5mM MgCl₂, 320mM sucrose, 10mM Tris-HCl, 1% Triton X-100을 이용하여 시약-1을 만들고, 400mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 60mM EDTA, 1% SDS를 이용하여 시약-2를 만들었다. 이후 전혈 0.5cc에 시약-1 1.5cc를 첨가한 후 5분간 혼합하고, 이후 실온에서 5분간 1300g에서 원심분리하였다. 세포부유액을 버린 후 시약-2를 340 μ l를 첨가한 후 잘 혼합하여 1.5ml polypropylene microfuge tube로 옮긴 다음 5M sodium perchlorate 100 μ l를 첨가하고, 이를 20분간 37°C에서 잘 혼합하여 20분간 65°C에서 shaking water에 놓았다. 이후 chloroform 560 μ l를 혼합한 후 20분간 잘 혼합하였다. 이를 microtube로 옮긴 후 1분간 1300g로 원심분리하고, 여기에 silica suspension을 45 μ l 첨가하여 다시 4분간 1300g로 원심분리 하였다. 이후 에탄올 900 μ l를 첨가하여 잘 혼합시키고, 5분간 4000g에서 원심분리하여

DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 260nm에서 UV absorption을 측정하여 DNA 농도를 측정하였다.

2) 중합효소연쇄반응을 통한 HLA-DR 유전자의 증폭

녹인 DNA 1 μ g와 50 μ l extraction reagent를 섞어 100 μ l 30분간 항온한 다음, PCR tube에 25 μ l DNA 용액과 50 μ l master mix, 25 μ l MgCl₂ (1.5mM)를 넣고 혼합하였다. 중합효소연쇄반응은 thermal cycler (Perkin Elmer 9600)를 사용하여 다음의 조건에서 수행하였다. 먼저 50°C에서 2분간 hold 과정 후에, 95°C에서 15초간 denaturation, 60°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 15초간 extension 과정을 35회 반복한 다음에, 72°C에서 5분간 elongation 과정을 거쳤다. PCR이 끝난 다음에 100 μ l의 denaturation 용액을 넣고 실온에 10분간 방치하여 DNA를 denaturation 시켰다.

3) 검출 및 HLA DRB1 형별 판정: PCR-SSOP (Fig. 1)

먼저 SSPE concentrate와 SDS concentrate를 50°C 항온수조에서 항온시켜 침전물을 재 용해시킨 후 hybridization buffer (100ml SSPE concentrate+387.5ml DW+12.5ml SDS concentrate), wash buffer (50ml SSPE concentrate+945ml DW+5ml SDS concentrate), citrate buffer (30ml citrate concentrate+570ml DW)를 준비하였다. 필요한 수만큼의 HLA DRB typing stripes를 typing tray의 각 well에 넣고 미리 50°C로 데운 hybridization buffer를 3ml씩 넣었다. 여기에 denaturation 시킨 PCR 산물을 70 μ l씩 넣고 잘 흔들어 섞어 준 후 tray 뚜껑을 닫고 50°C shaking water bath에서 60rpm 속도로 30분간 hybridization 시켰다. Tray를 water bath에서 꺼내서 각 well의 내용물을 흡입하여 버린 후에 실온에 둔 wash buffer 3ml씩을 각 well에 넣고 수초간 좌우로 기울여 주면서 섞은 후 내용물을 흡입하여

버리는 세척과정을 2회 반복하였다. 50°C의 stringent washing buffer 3ml를 각 well에 넣고 50°C shaking water bath에서 60rpm 속도 15분간 세척하고, 세척하는 동안 working conjugate solution (한 strip 당 10 μ l streptavidin-HRP conjugate + 3.3ml wash buffer)를 준비하였다. Tray를 water bath에서 꺼내서 각 well의 내용물을 흡입하여 버린 다음, working conjugate solution 3ml씩을 넣고 60rpm의 orbitat shaker에서 15분간 실온 반응시켰다. 다시 각 well의 내용물을 흡입하여 버린 후 wash buffer 3ml씩을 넣고 60rpm shaker에서 5분간 2회 세척하였다. 각 well의 내용물을 흡입하고 citrate buffer 3ml씩을 넣고 60rpm shaker에서 5분간 두었다. 그 사이에 substrate A와 B를 섞어 working substrate를 준비하였다. 각 well의 내용물을 흡입하고 working substrate 3ml씩을 넣고 뚜껑을 씌워 빛을 차단한 채로 60rpm shaker에서 10분간 반응시켰다. 다시 각 well의 내용물을 흡입한 다음, 증류수 5ml씩을 넣고 shaker에서 5분씩 세척하는 과정을 3회 반복하였다. Citrate buffer 3ml씩을 각 well에 넣고 양성으로 나온 밴드의 양상을 3일 내에 판독하였다. 같은 제조회사에서 개발한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 양성으로 나온 밴드의 번호를 입력

한 후 가장 가능성이 높은 HLA 형별을 분석하여 항원형을 결정하였다.

4) HLA-DR15와 DR16 결정: HLA-SSP

Primer 제작을 위하여 OLIGO Primer analysis 프로그램 (version 5.0, National Biosciences, MN, USA)를 이용하였다. Sense strand는 DR2에 특이하면서도 DR15와 DR16에 공통부위인 DRB1*15/16 유전자의 20번째에서 39번째 염기서열을 선정하였으며, anti-sense strand는 140번째에서 157번째 염기서열에 상보적으로 택하여 DRB1*15와 DRB1*16에 특이하도록 선정하였다.

DR2: 5' TCCTGTGGCAGCCTAAGAGG 3'

DR15: 5' GCTCCGTCACCGCCCGGA 3'

DR16: 5' GCTCCGTCACCGCCCGGT 3'

상기 primer를 이용한 중합효소연쇄반응을 시행하였다. 먼저 50 μ l 반응을 만들기 위해 genomic DNA 0.5 μ g에 PCR 완충액 (50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 10mM Tris-Cl pH 8.3, 0.1 μ g/ml gelatin) 5 μ l, deoxynucleotide 100 μ mole, primer 10pmol, Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim, CA, USA) 0.25units를 혼합하고 PCR을 시행하였다. GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, CA, USA)을 이용하였으며, 95°C에서 40초, 59°C에서 40초, 72°C에서 40초로 35회 증폭하였다. 증폭산물의 확인을 위하여 ethidium bromide가 들어 있는 2.5% agarose gel에서 전기영동하였으며 138bp 크기의 밴드가 관찰되면 양성으로 판정하였다.

4. 통계처리 (statistical analysis)

HLA 표현형에서 항원빈도는 아래와 같이 계산하였다.

$$AF = n/N$$

AF = antigen frequency

n = number of individuals positive for each antigen

N = total number of individuals tested

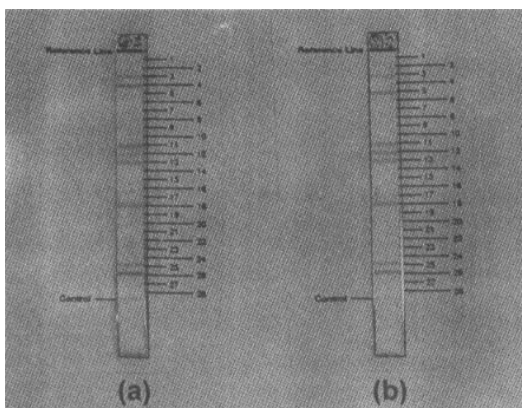


Fig. 1. Antigens of HLA-DR locus by PCR-SSOP
a: HLA-DR4/DR13, b: HLA-DR7/DR13

관련성은 각각의 항원형에 대하여 chi-square test를 시행하여 유의성을 검증하였다.

(19.8% vs. 40.8%, $p=0.001$, Relative risk = 0.36).

연구결과

굴웅에 과민성 천식환자와 대조군에서의 HLA-DRB1 유전자좌의 항원형의 분포를 Table 1에 표시하였다. PCR-SSOP 및 PCR-SSP 기법을 이용한 HLA-DRB1의 항원형인 DR1, DR15, DR3, DR4, DR7, DR8, DR9, DR10, DR11, DR12, DR13, DR14의 분포는 91명의 굴웅에 과민성 천식환자인 경우는 22.0%, 22.0%, 8.8%, 19.8%, 17.6%, 19.8%, 18.7%, 3.3%, 2.2%, 12.1%, 26.4%, 19.8%의 빈도를 보였다. 한편 대조군 98명에서 각각의 항원형 분포는 21.4%, 21.4%, 4.1%, 40.8%, 4.1%, 19.4%, 18.4%, 1.0%, 3.1%, 14.3%, 17.3%, 23.5%의 빈도를 보였다. 따라서 HLA-DR7은 천식환자가 대조군에 비하여 유의하게 빈도가 증가되어 있었다(17.6% vs. 4.1%, $p=0.001$, Relative risk = 3.92). 그러나 HLA-DR4은 천식환자가 대조군에 비하여 그 빈도가 유의하게 낮게 나타났다

고 찰

HLA 유전자는 면역반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당한다. 이 부위의 유전자좌의 다형성(polymorphism)은 류마티스 관절염¹²⁾, 인슐린 의존성 당뇨병¹³⁾ 등의 면역질환의 발생에 관여한다고 알려져 있다. HLA class II 분자(HLA-DR, DQ, DP)는 알파-체인과 베타-체인으로 이루어져 있고, 각각의 체인은 서로 다른 유전자에 의해 부호화된다. 이들 체인을 부호화하는 유전자 중 가장 다형성이 심한 것은 HLA-DR 분자의 베타-체인을 부호화하는 HLA-DRB 유전자이고, 이중 HLA-DRB1 유전자가 가장 다형성이 심하다고 알려져 있다¹⁴⁾. 이에 본 연구에서는 굴웅에 과민성 기관지천식의 표현형을 결정하는 유전자로서 HLA-DRB1 유전자를 설정하고, HLA-DRB1 대립인자에 의하여 결정되는 HLA-DRB1 항원형의 분포를 결정하여 관련성을 평가하였다.

Table 1. Antigenic distribution of HLA-DRB1 locus in citrus red mite-sensitive asthmatics and controls

Antigen	CRM-sensitive asthmatics (n=91)		Controls (n=98)		RR	p-value
	No.	AF(%)	No.	AF(%)		
DR1	20	22.0	21	21.4		NS
DR15	20	22.0	21	21.4		NS
DR16	—	—	—	—		
DR3	8	8.8	4	4.1		NS
DR4	18	19.8	40	40.8	0.36	0.001
DR7	16	17.6	4	4.1	3.92	0.001
DR8	18	19.8	19	19.4		NS
DR9	17	18.7	18	18.4		NS
DR10	3	3.3	1	1.0		NS
DR11	2	2.2	3	3.1		NS
DR12	11	12.1	14	14.3		NS
DR13	24	26.4	17	17.3		NS
DR14	18	19.8	23	23.5		NS

CRM: citrus red mite, RR: relative risk, AF: antigen frequency, NS: not significant.

표현형의 발현을 조절하는 HLA 유전자의 역할을 보고한 여러 논문에서 연구결과를 비교하는데는 인종과 HLA 형의 결정 방법 등의 차이 때문에 많은 어려움이 있다. 과거에는 HLA 형을 분석하는데 혈청학적 방법이 이용되었으나¹⁵⁾, 최근에는 DNA를 이용하여 직접 항원형 혹은 유전형을 결정하는 방법이 널리 이용되고 있다¹⁶⁾. 본 연구에서는 연구대상자의 말초 혈액을 채혈한 후 전형에서 DNA를 분리하여 sequence-specific oligonucleotide probe (SSOP)를 이용하여 항원형을 결정하였다. 이중 HLA-DR2로 판별한 경우에는 이를 sequence specific primer (SSP)로 DR15와 DR16을 여부를 판별하였다.

특정 알레르겐에 대한 HLA의 영향력은 Levine 등³⁾에 의해 처음으로 보고된 후, 두드러기 속 화분 알레르겐에 대한 특이 IgE 반응과는 유의한 관련성이 알려졌다^{4,15)}. 반면, 집먼지진드기 항원 등과 같이 알레르겐이 복잡한 경우에는 이들 항원에 의한 IgE 반응에 HLA의 영향력은 일관된 연구결과가 없는 실정이다⁸⁾.

특정 항원에 의한 기관지천식의 발현에 HLA의 영향력에 대한 연구결과도 그리 많지 않은 실정이다. 기관지천식의 발현에 HLA의 영향력에 대한 몇몇 연구결과를 살펴보면, Aron 등¹⁷⁾은 아토피성 천식의 발생에 HLA-DR4와 DR7 대립인자가 중요하다고 하였고, Caraballo 등¹⁸⁾은 HLA-DPB1*0401 대립인자가 알레르기성 천식의 발생을 억제한다고 보고하였다. IgE 항체에 의해 매개되지 않는 아스피린 과민성 천식인 경우, Mullarky 등⁹⁾은 HLA-DQw2가 아스피린 과민성 천식의 표식자라고 주장하였으나, Lymphany 등¹⁰⁾의 연구에서는 이를 뒷받침할 만한 증거를 찾지 못하였다. TDI에 의한 천식인 경우에도 아스피린 천식과 같이 HLA 형과의 관련성에 대해서 몇몇 보고가 있었으나 일관된 연구결과는 없는 실정이다¹¹⁾.

본 연구결과에서 HLA-DRB1 유전자좌의 항원형의 분포를 살펴보았을 때, 귤응에 과민성 천

식환자는 대조군에 비하여 HLA-DR7 항원형이 유의하게 증가되었었던 반면, DR4는 대조군에 비하여 그 빈도가 유의하게 낮았다. 그러나 DR7와 DR4 이외의 항원형의 분포는 두 군간에 유의한 차이가 없었다. 이는 귤응에 과민성 기관지천식의 발생에 HLA-DRB1 유전자좌에 의해 부호화되는 HLA-DR 분자의 역할이 중요함을 시사하는 소견이다. 즉 HLA-DR7 항원형인 경우에는 귤응에 과민성 천식의 발생에 관여하고, HLA-DR4 항원형인 경우에는 귤응에 의한 천식의 발생을 억제할 가능성이 있음을 본 연구결과는 시사한다.

결론

HLA-DRB1 유전자의 항원형은 귤응에 의한 천식과 유의한 연관성을 보이고, HLA-DR7은 발생에, HLA-DR4는 발생을 억제하는데 관여함을 시사한다.

참고문헌

- 1) Davies FS, Albrigo LG: Mites. In: Davies FS, Albrigo LG., eds. Citrus. UK; CAB International, 172-8, 1994.
- 2) Kim YK, Son JW, Kim HY, Park HS, Lee MH, Cho SH et al. : New occupational allergen in citrus farmers: citrus red mite (*Panonychus citri*). Ann Allergy Asthma Immunol 82:223-8, 1999.
- 3) Levine BB, Stember RH, Fontino M: Ragweed hayfever: genetic control and linkage to HLA haplotypes. Science 178:1201-3, 1972.
- 4) Marsh DG, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Bias WB, Roebber M: Immune responsiveness to *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) pollen allergen *Amb a VI* (Ra6) is associated with HLA-DR5 in allergic humans. Immunogenetics 26:230-6, 1987.
- 5) Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Meyers

- DA, Ansari AA, Bias WB, Marsh DG: Association of HLA-DR3 with human immune response to *Lol p I* and *Lol p II* allergens in allergic subjects. *Tissue antigens* 31:211-9, 1988.
- 6) Fisher GF, Pickl WF, Fae I, Ebner C, Ferreira F, Breiteneder H: Association between IgE response against Bet v I, the major allergen of birch pollen, and HLA-DRB alleles. *Hum Immunol* 33:259-65, 1992.
- 7) Reid MJ, Nish WA, Whisman BA, Goetz DW, Hylander RD, Parker WA Jr: HLA-DR4-associated nonresponsiveness to mountain cedar allergen. *J Allergy Clin Immunol* 89:593-8, 1992.
- 8) Young RP, Dekker JW, Wordsworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F: HLA-DR and HLA-DP genotypes and Immunoglobulin E responses to common major allergens. *Clin Exp Allergy* 24:431-9, 1994.
- 9) Mullarkey MF, Thomas PS, Hansen JA, Webb DR, Nisperos B: Association of aspirin-sensitive asthma with HLA-DQw2. *Am Rev Respir Dis* 133:261-3, 1986.
- 10) Lymphany PA, Welsh KI, Christie PE, Schmitz-Schumann M, Kemeny M, Lee TH: An analysis with sequence-specific oligonucleotide probes of the association between aspirin-induced asthma and antigens of the HLA system. *J Allergy Clin Immunol* 92:114-23, 1993.
- 11) Bignon JS, Aron Y, Ju LY, Kopferschmitt MC, Garnier R, Mapp C: HLA class II alleles in isocyanate-induced asthma. *Am Rev Respir Dis* 149:71-5, 1994.
- 12) Hong HG, Park MH, Takeuchi F, Oh MD, Song YW, Nabeta H: Association of specific amino acid sequence of HLA-DR with rheumatoid arthritis in Koreans and its diagnostic value. *J Rheumatol* 23:1699-703, 1996.
- 13) Chang YW, Lam KS, Hawkins BR: Strong association between DQA1/DQB1 genotype and early-onset IDDM in Chinese: the association is with alleles rather than specific residues. *Eur J Immunogenet* 25:273-80, 1998.
- 14) Kimura A, Sasazuki T: Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA-DNA typing technique. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, eds HLA 1991. Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. 1. Oxford: Oxford University Press. 397-419, 1992.
- 15) Blumenthal M, Marcus-Bagley D, Awdeh Z, Johnson B, Yunis t. tper CA: HLA-DR2, [HLA-B7, SC31, DR21], and [HLA-B8, SC01, DR3] haplotypes distinguish subjects with asthma from those with rhinitis only in ragweed pollen allergy. *J Immunol* 148:411-6, 1992.
- 16) Moraes ME, Fernandez-Vina M, Stastny P: DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification. *Human Immunol* 31:139-44, 1991.
- 17) Aron Y, Desmazes-Dufeu N, Matran R, Polla BS, Dusser D, Lockart A: Evidence of a strong, positive association between atopy and the HLA class II alleles DR4 and DR7. *Clin Exp Allergy*, 26:821-8, 1996.
- 18) Caraballo LR, Marugo J, Jimenez S, Angelini G, Ferrara GB: Frequency of DPB1*0401 is significantly decreased in patients with allergic asthma in a mulatto population. *Hum Immunol* 32:157-61, 1991.