

ブタ MHC クラス II 遺伝子の DNA タイピングと

梅山豚の免疫特性

小 松 正 憲

独立行政法人農業技術研究機構・近畿中国四国農業研究センター
畜産草地部

1. はじめに

主要組織適合遺伝子複合体（以下 MHC と略）は免疫応答を調節する重要な遺伝子座クラスターである。畜産動物としてブタを捉えれば MHC 遺伝子型の把握は抗病性育種を考える上で重要である。また、ブタをヒトの実験動物として捉えれば、実験結果の信頼性を高める点でも MHC 遺伝子型の把握は必要である。さらに、今後ブタが遺伝子組換え技術を駆使したヒト代替臓器提供動物として生産される場合でも、基礎的情報として MHC 型の把握は必要と思われる。ここでは、著者らが取り組んだ「ブタ MHC クラス II 遺伝子の DNA タイピング法の開発」と「梅山豚の免疫特性の解明」に関する研究を紹介する。

2. ブタ MHC クラス II 遺伝子の DNA タイピング

主要組織適合遺伝子複合体（以下 MHC と略）のクラス II 分子は、生体内に侵入した外因性抗原ペプチドをヘルパー T 細胞に提示する機能を担う免疫系における中心分子の一つである¹³⁾。ブタの MHC クラス II 分子をコードする SLA (Swine leucocyte antigen) クラス II 遺伝子として、現在まで、*SLA-DQA*⁹⁾、*-DQB*⁹⁾、*-DRA*⁹⁾及び*-DRB1*^{1, 7, 28, 29)}、*-DRB2*^{1, 29)}、*-DRB3*⁹⁾の 6 遺伝子座（以下 *DQA*、*DQB*、*DRA*、*DRB1*、*DRB2* および *DRB3* と略）が知られており、各遺伝子座には多型が認められ、特に *DQB* と *DRB1* 遺伝子座に多くの対立遺伝子が報告されてきている^{1, 28, 29, 31)}。

SLA クラス II 遺伝子座は、Chardon ら³⁾の物理地図作製の研究により、第 7 番染色体の長腕部分 (7q1.1) にあり、全体として遺伝子座配列はヒトと似ているが領域の広さはヒトの約 1/2 である。その配置は、セントロメア側からテロメア側に向かい、*DRA* (遺伝子座 1 個) - *DRB* (同 3 個: 1 個のみ機能的 (*DRB1*), 2 個の偽遺伝子座 (*DRB2*, *DRB3*)) - *DQA* (1 個機能的) - *DQB* (2 個: 1 個は機能的 (*DQB*), もう 1 個は偽遺伝子座か *DQB* 関連配列) - *DOB* (遺伝子座数未確定) - *LMP7* - *TAP1, 2* (1 と 2 の

順序は未定) - *DMB* - *DMA* - *DPA* (現在までブタ DP 遺伝子産物は検出されていない) - *COL11A2* - *RXRΒ* - *KE6* - *KE4* - *RING1* の順序になっている³⁾。

DQB と *DRB1* 遺伝子座に多くの対立遺伝子が存在する機構の一つとして、これら分子の β シートの初めの折れ曲がり部分と β シートと α ヘリックス間の境界部分に認められる χ (カイ; chi) - 様配列 (GCGGGT と GCTGGGG) が組換えシグナルとなり、エクソン内遺伝子変換を引き起こし遺伝子の多様性を引き起こしていることが明らかとなった¹⁰⁾。(著者注: χ 配列とは大腸菌 DNA に存在する 8 つの塩基配列 (GCTGGTG) からなるセグメント。RecA タンパク質の関与する遺伝的組換えにおけるホットスポットとして働く。このセグメントはゲノムにおいてほぼ 10kb ごとに見いだされる) なお、基本的には、MHC クラス II 遺伝子の多様性は、Point mutation、選択的有利性や超優勢¹¹⁾による。

SLA 遺伝子型と免疫応答との関連性についての研究は、1995 年以前まで SLA 遺伝子の Polymerase Chain Reaction (以下 PCR と略) 法を用いた簡便な DNA タイピング法は確立していなかったため、血清学的手法を用いて SLA ハプロタイプと免疫応答能との関連性について検討した報告がなされてきた^{18, 19, 20, 21, 22, 23, 27, 30)}。さらに、SLA ハプロタイプが明らかな NIH ミニブタを用いた研究により、SLA ハプロタイプは排卵数^{4, 5, 25)}、産子数^{4, 26)}、着床前の胎子の発達 (Preimplantation embryo development)^{5, 26)}、胎子死滅²⁶⁾に関連することが示唆されている。したがって、SLA 遺伝子型は、今後ブタにおいて抗病性育種のみならず広く育種を進める上で有用な遺伝子型情報になると期待される。また、SLA 遺伝子型は免疫能と深く係わることから、ブタを用いた免疫実験においては供試個体の SLA 遺伝子型の把握は重要である。さらに、実験動物として SLA 遺伝子型ホモ型ブタの作出に際して、SLA 遺伝子型をタイピングすることは必要不可欠である。

PCR法を基本とした簡便なSLAクラスII遺伝子のタイピング法としては、ゲノムDNAを鋳型にしたPCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (以下RFLPと略)法(*DQB*および*DRB*)²⁸⁾および小松らのグループが報告した白血球全RNAを鋳型にしたReverse Transcriptase (以下RTと略)-PCR-RFLP法^{15,16)}(*DQA*, *DQB*, *DRA*, *DRB1*)とPCR-Sequence-Specific-Primers (以下PCR-SSPと略)法¹²⁾(*DRB1*)が報告されている。このうち、小松らは^{15,16)}、RT-PCR-RFLP法がエクソン部分に多型が認められるSLAクラスII遺伝子(*DRB1*, *DQB*および*DQA*)の簡便なDNAタイピング法として有効であることをNIHミニブタの系および各種ブタ品種を用いて示した。ここではその概略を述べる。

RT-PCRのテンプレートに用いた全RNAの抽出は、TRIzol (GibcoBRL社、ライフテックオリエンタルKK)を用いて末梢白血球から行った。具体的には、3%デキストラン添加PBS (pH7.2)を用いて白血球浮遊液100 μ lを得た後、その50 μ lをTRIzol溶液1mlに混合し、ボルテックスで混和した。室温に5分間放置後、クロロホルム0.2mlを加え約15秒間激しく混合し、室温に約3分間放置した。4 $^{\circ}$ Cで遠心分離後(12,000g、15分間)、RNAを含む上清約400 μ lを新しいエッペンドルフチューブに移した。なお、回収RNA量を上げるため、この操作を繰り返し行い、同一サンプルから上清計800 μ lを得た。これに等量のイソプロパノールを加え、混和後、室温に10分間放置し、遠心分離操作(4 $^{\circ}$ C、12,000g、15分)にてRNAペレットを得た。得られたRNAペレットを1mlの75%冷エタノールで洗浄し、4 $^{\circ}$ Cで遠心分離(7,500g、5分間)乾燥後、50 μ lのDiethyl Pyrocarbonate (以下DEPCと略)処理滅菌蒸留水を加え、65 $^{\circ}$ C、10分間保温して溶解した。これを10 μ lずつ分注し、-85 $^{\circ}$ Cで保存した。RT-PCRは、PERKIN-ELMER社 GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kitを使用し、ホットスタート法を用いて行った。なお本方法は、RTから特異プライマーを使用するRT-PCRである。使用したプライマーおよびPCRの条件は、以下の通りである¹⁵⁾。

DRB1 遺伝子;

5' プライマー: 5'-TAGTGGTGGTGCTGAGCCCTCCTCTGGCTTTGGCC-3'
3' プライマー: 5'-GAACCCAGTCACAGAGCAGACCAGGAGTTTGGT-3'

DQB 遺伝子;

5' プライマー: 5'-CTTGACGGTATGCTGGTGGTG-3'
3' プライマー: 5'-CTGCCCTGGATGGGGAGATAGT-3'

DQA 遺伝子;

5' プライマー: 5'-CGTGATGAGCCCTGTGGAGGT-3'
3' プライマー: 5'-CCCCAGTGCTCCACTTTGCAGT-3'

RNAテンプレートは、上述した方法で抽出した全RNA約150 η gを用いた。RT-PCRの温度条件およびサイクル数は*DRB1*、*DQB*および*DQA*遺伝子とも次のような同一条件で行った。RT: 65 $^{\circ}$ C 10分、70 $^{\circ}$ C 15分(1サイクル); PCR: 95 $^{\circ}$ C 2分(1サイクル)、95 $^{\circ}$ C 1分、65 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分(35サイクル)、72 $^{\circ}$ C 7分(1サイクル)。RT-PCR増幅産物のcDNAサイズは、それぞれ*DQA*遺伝子: 534bp (*c*対立遺伝子)または537bp (*d*対立遺伝子)、*DQB*遺伝子: 364bp、*DRB1*遺伝子: 401bpである¹⁵⁾。RT-PCR反応後、産物5 μ lをとり、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下PAGEと略、電気泳動装置: Mupid-2、コスモ・バイオ社)を行って、cDNA増幅とcDNAサイズを確認した。*DRB1*および*DQB*遺伝子のRT-PCRにおいては、サンプルにより200bp以下の非特異的バンドが出現し、それがRFLP分析のノイズとなる場合がある。したがって、5%PAGEによりRT-PCR産物の非特異的バンドの有無とそのcDNAサイズを把握し、RFLP分析によるDNAタイピングの参考とした。RT-PCR産物のRFLP分析は、RT-PCR産物6~10 μ lを直接至適条件下で制限酵素により消化し、5%PAGEにて解析した。なお、*DRB1*および*DQB*遺伝子のRFLP分析には、分離能を上げるため通常のMupid-2のゲルより1.5倍長いポリアクリルアミドゲルを使用した。その際、ゲルフレームは特注し、泳動装置は市販のMupid-2を使用した。電気泳動条件は、50V・135分で行った。これらポリアクリルアミドゲルの長さや電気泳動の条件は、25bp前後のDNAフラグメントの検出に重要である。RFLP分析で使用した制限酵素は、消化パターンから対立遺伝子型グループを推定できる制限酵素を使用した^{15,28)}。すなわち、*DRB1*遺伝子では*Rsa I*および*Msp I*、*DQB*遺伝子では*Ra I*および*Hae III*、*DQA*遺伝子では*c*および*d*対立*s*遺伝子を区別できる*EcoR I*および*Pvu II*を用いた。各遺伝子におけるRFLPタイプの組み合わせの型は、基本的に遺伝関係を参考に推定した。

ブタ8品種55頭を供試してタイピングを行い、55種類のSLA-*DRB1*遺伝子は22種類のグループに、24種類のSLA-*DQB*遺伝子は23のグループに、また、SLA-*DQA*遺伝子は4つのグループに分類した。また、本方法により、新たに3種類の新しいSLA-*DRB1*遺伝子グループならびに9種類のSLA-*DQB*遺伝子グループを分類した。さらに、各SLAクラスII遺伝子の品種による特徴を明らかにした。解析した品種は、北京黒豚(8頭、東京都畜産試

験場)、パークシャー種 (8 頭: 鹿児島県畜産試験場)、中国産香猪由来小型ブタ (9 頭: 茨城県内牧場繋養)、フィリピン在来豚 (イフガオ豚 9 頭)、ランドレース種 (3 頭)、デュロック種 (3 頭)、梅山豚 (14 頭)、ユカタンマイクロブタ (1 頭) (以上、独立行政法人農研機構・畜産草地研究所) であった。

本方法で解析した場合の RFLP パターンと DNA フラグメントのサイズを推定し、*DRB1* 遺伝子については図 1 に、*DQB* 遺伝子については図 2 に各々示した。なお、図 2 において、15bp 以下の DNA フラグメントは、実際の電気泳動では検出不可能なので二重の両カッコで示した。その詳細は、論文¹⁶⁾を参照されたい。なお、(財)日本生物科学研究所で作出された日生研ミニブタ (NIBS 系) (ピットマンムーア系、台湾小耳種およびゲッチンゲン系の三元交雑種起源とし、白色でピットマンムーア系より小型の実験系ミニブタを雄 1 頭雄 1 頭のペアーから確立したものは、本方法により、*SLA-DRB1* 遺伝子は、d/d 型、*SLA-DQA* 遺伝子は d/d 型、*SLA-DQB* 遺伝子は S09/S09 あるいは

S10/S10 のホモ型で固定していることが明らかになった。

3. 梅山豚の免疫特性¹⁷⁾

梅山豚は産子数が多いことで知られるが、通常の飼養条件下では残念ながら疥癬症やアクチノマイセス・ピオゲネス感染症等皮膚疾患も多い。そこで梅山豚はなぜ皮膚疾患が多いのかを明らかにするため、補体活性、抗体産生能等の免疫特性および SLA-クラス II 遺伝子型を調べ、ヨーロッパ系豚のそれらと比較した¹⁷⁾。梅山豚、デュロック種、ランドレース種、大ヨークシャー種の生時から 26 週齢までの血清補体活性 (CH50) と補体第 3 成分 (C3) 濃度を調べた。その結果、梅山豚の CH50 と C3 濃度は生後 4 週齢以降ヨーロッパ系豚より有意に高くなり、26 週齢では梅山豚の CH50、C3 濃度はヨーロッパ系豚の 1.2~1.3 倍になることが明らかになった (表 1 および表 2)。梅山豚とデュロック種の Alum ゲル化 BSA に対する免疫応答能 (血清中全 IgG 濃度) を 4 週齢~22 週齢で調べた。梅山豚およびデュロック種とも加齢と

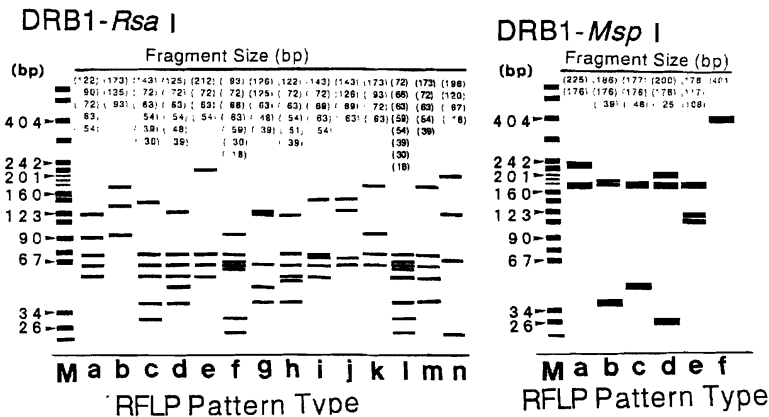


図 1 SLA-DRB1 遺伝子の RFLP パターン

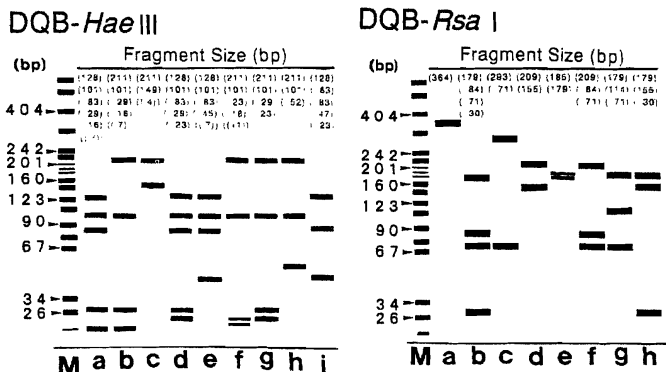


図 2 SLA-DQB 遺伝子の RFLP パターン

表1 梅山豚およびヨーロッパ系豚の血清補体活性 (CH50) (unit/ml)

Breeds	Weeks of age (w)			
	At birth	4 w	14 w	26 w
Meishan	3.6 ^{ac} ± 0.8 (3)	36.5 ^a ± 5.9 (8)	39.4 ^a ± 9.8 (8)	55.5 ^a ± 8.6 (8)
Duroc	3.9 ^a ± 0.3 (4)	28.6 ^c ± 3.2 (6)	27.1 ^b ± 2.5 (6)	27.8 ^c ± 4.4 (6)
Landrace	2.2 ^c ± 0.3 (6)	-----	-----	24.5 ^c ± 3.1 (3)
Large White	-----	-----	-----	28.7 ^c ± 1.9 (4)

(): No. of pigs; ^{a,c}P<.01.

Means with differing superscripts differ significantly within the same age.

表2 梅山豚およびヨーロッパ系豚の血清 C3 レベル (mm²/μl)

Breeds	Weeks of age (w)			
	At birth	4 w	14 w	26 w
Meishan	14.6 ± 3.5 (3)	48.8 ± 11.6 (8)	45.6 ± 8.2 (8)	52.6 ^a ± 12.1 (8)
Duroc	16.6 ± 1.2 (4)	37.8 ± 6.6 (6)	38.2 ± 6.2 (6)	39.2 ^c ± 4.7 (6)
Landrace	15.6 ± 1.1 (6)	-----	-----	39.1 ^{ac} ± 8.1 (3)
Large White	-----	-----	-----	43.4 ^{ac} ± 5.7 (4)

(): No. of pigs; ^{a,c}P<.01.

Means with differing superscripts differ significantly within the same age.

表3 梅山豚およびデュロック種の血清中全 IgG 濃度 (mg/ml)

Breeds	Weeks after birth			
	4w(i)	10w(ii)	16w	22w
Non-immunization				
Meishan	5.0 ± 0.8 (4)	9.4 ± 2.7 (4)	16.9 ^a ± 1.2 (4)	19.5 ^a ± 1.2 (4)
Duroc	5.7 ± 0.3 (3)	6.2 ± 0.4 (3)	10.3 ^c ± 0.9 (3)	14.8 ^b ± 2.9 (3)
BSA-immunization				
Meishan	5.2 ± 1.0 (3)	21.7 ^a ± 5.6 (3)	44.4 ^a ± 22.2 (3)	36.6 ^a ± 7.0 (3)
Duroc	6.0 ± 1.4 (3)	10.4 ^b ± 0.4 (3)	15.1 ^c ± 1.7 (3)	17.3 ^c ± 3.8 (3)

(), No. of pigs; (i), Primary immunization of Alum-BSA; (ii), Booster.

^{a,b}p<0.05, ^{a,c}p<0.01

Means with differing superscripts differ significantly with in the same category and the same age.

表4 Alum-BSA 免疫実験に使用した梅山豚およびデュロック種の SLA-Class II 遺伝子型

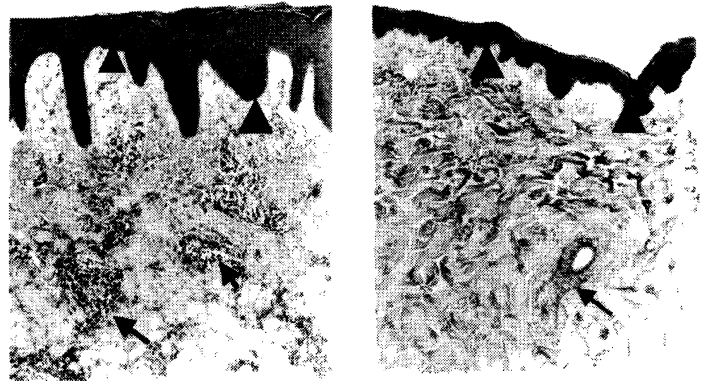
Breeds	SLA-class II loci			Haplotypes ⁴⁾
	<i>DQB</i> ¹⁾	<i>DQA</i> ²⁾	<i>DRB1</i> ³⁾	
Meishan	e-a/e-a (1)	c-d/c-d (3)	j-a/j-f (1)	(e-a) - (c-d) - (j-a)
	e-a/h-h (1)		j-a/g-f (2)	(e-a) - (c-d) - (j-f)
	i-a/h-h (1)			(h-h) - (c-d) - (g-f)
Duroc	i-a/i-a (1)	d-d/d-d (3)	b-a/b-a (1)	(i-a) - (d-d) - (b-a)
	i-a/f-a (2)		b-a/b-e (2)	(f-a) - (d-d) - (b-e)

(), No. of pigs

¹⁾*Hae* III - *Rsa* I combination type; ²⁾*Eco*R I - *Pvu* II combination type;³⁾*Rsa* I - *Msp* I combination type; ⁴⁾*DQB-DQA-DRB1* combination type;

ともに血清中全 IgG 濃度の上昇したが、Alum ゲル化 BSA 免疫後、梅山豚で顕著に血清中全 IgG 濃度は上昇し、16 週齢（二次免疫は 10 週齢）以降デュロック種や非免疫梅山豚の約 2.9~2.6 倍の濃度となった（表3）。また、これら免疫実験で使用した豚の SLA クラス II の DNA タイピングを本方法行い、SLA クラス II のハプロタイプ (*DQB-DQA-DRB1* の組み合わせ型) を推定した（表4）。梅山豚のこのハプロタイプは明らかにデュロック種とは異なり、SLA ハプロタイプ型は明らかに免疫応答に影響を及ぼしていることが確認できた。さらに梅山豚およびデュロック種等ヨーロッパ系豚の皮膚の構造を組織学的に比較検討した。具体的には、日齢を追って皮膚組織を採取し、hematoxylin and eosin (H-E) 染色及び toluidine blue O and Giemsa 染色をして皮膚疾患に関与する好酸球の浸潤の程度を調べた。図3に示すように梅山豚の表皮はデュロック種のものより厚かつ構造が異なることが示された¹⁷⁾。また梅山豚では真皮内毛細血管周囲に浸潤する好酸球の割合は大きく、またマストセルも認められた（表5、図3、図4）。以上のことから梅山豚が皮膚疾患になりやすい素因として、高補体活性 (CH50、C3) と高抗体産生能をもつことにより IgE-好酸球系による I 型アレルギー反応の起こりやすいことが考えられる。

以上、SLA クラス II 遺伝子のシークエンス法以外の簡便な DNA タイピング法は確立され、その応用は可能となった。しかし、SLA クラス I 遺伝子型の RFLP 等による簡便な DNA タ



Meishan

Duroc

図3 153 日齢の梅山豚とデュロック種の表皮の構造 (▲) と真皮内毛細血管周囲に浸潤した好酸球 (↑)

表5 真皮内毛細血管周囲に浸潤する好酸球

Breeds	Days after birth							
	48	63	75	91	124	129	153	420
Meishan	±	nt	±	+	nt	+++	nt	nt
Duroc	nt	nt	±	±	nt	nt	±	±
Landrace	nt	±	nt	nt	±	nt	nt	nt
LWD	nt	nt	nt	±	nt	nt	nt	nt

±, normal; +, extensive; ++, more extensive; +++, severe; nt, not tested.

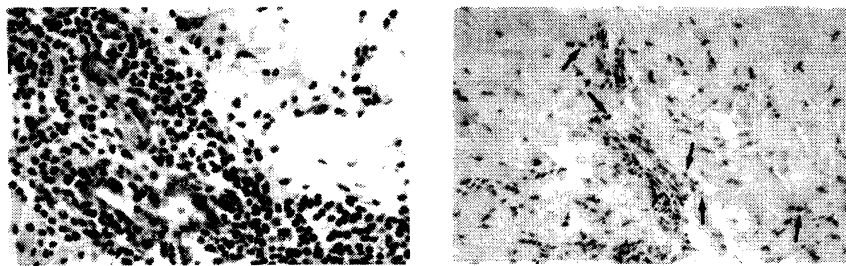


図4 153日齢の梅山豚の真皮内毛細血管周囲に浸潤した好酸球(左)とマストセル(右↑)

イピング法は残念ながら未だ開発されていない。SLA クラス I 遺伝子には偽遺伝子を含む遺伝子座数が多いためである。今後、ブタ MHC クラス I 遺伝子型の簡便な DNA タイピング法の開発が待たれる。

本研究の一部は、農林水産省特別研究「家畜の生体防御機構解明のための MHC 純系ミニブタの開発」(平成 5 年度～平成 8 年度)、および農林水産省畜産試験場、(社)農林水産先端技術産業振興センター・農林水産先端技術研究所の「ゲノム解析交流共同研究」(平成 3 年度～平成 8 年度)の一部として行われたものである。

文献

- 1) Burnsberg U, Edfors-Lilja I, Andersson L, Gustafsson K. Structure and organization of pig MHC class II DRB genes: evidence for genic exchange between loci. *Immunogenetics*, 44:1-8. 1996.
- 2) 鄭 不留. 中国豚の品種資源及びその利用. 日本養豚学会誌, 27:1-16. 1990.
- 3) Chardon P, Rogel-Gaillard C, Peelman L, Yerle M, Velten FW, Renard C, Vaiman M. Physical organization of the pig major histocompatibility complex class II region. *Immunogenetics*, 50:344-348. 1999.
- 4) Conley AJ, Jung YC, Schwartz NK, Warner CM, Rothschild MF, Ford SP. Influence of SLA haplotype on ovulation rate and litter size in miniature pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 82:595-601. 1988.
- 5) Ford SP, Schwartz NK, Rothschild MF, Conley AJ, Warner CM. Influence of SLA haplotype on preimplantation embryonic cell number in miniature pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 84:99-104. 1988.
- 6) Gustafsson K, LeGuern C, Hirsch F, Germana S, Pratt K, Sachs DH. Class II genes of miniature swine. IV. Characterization and expression of two allelic class II DQB cDNA clones. *Journal of Immunology*, 145:1946-1951. 1990.
- 7) Gustafsson K, Germana S, Hirsch F, Pratt K, LeGuern C, Sachs DH. Structure of miniature swine class II DRB genes: conservation of hypervariable amino acid residues between distantly related mammalian species. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 87:9798-9802. 1990.
- 8) Hirsch F, Sachs DH, Gustafsson K, Pratt K, Germana S, LeGuern C. Class II genes of miniature swine. III. Characterization of an expressed pig class II gene homologous to HLA-DQA. *Immunogenetics*, 31:52-56. 1990.
- 9) Hirsch F, Germana S, Gustafsson K, Pratt K, Sachs DH, LeGuern C. Structure and expression of Class II α genes in miniature swine. *Journal of Immunology*, 149:841-846. 1992.
- 10) Hosokawa-Kanai T, Tanioka Y, Tanigawa M, Matsumoto Y, Ueda S, Onodera T, Matsumoto Y. Allelic diversity at class II DRB1 and DQB loci of the pig MHC (SLA). *Immunogenetics*, 50:295-300. 1999.
- 11) Hughes AL, Nei M. Nucleotide substitution at the major histocompatibility complex II loci: Evidence for overdominant selection. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 86:958-962. 1989.
- 12) 川上和夫・武田久美子・大西 彰・中島恵美子・小松正憲. PCR-SSP によるブタ SLA クラス II DRB1 遺伝子の DNA タイピング. 日本畜産学会報, 68:389-398. 1997.
- 13) Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. 423-607. John

- Wiley & Sons, Inc. New York. 1986.
- 14) 小松和英・阿久津裕一・金井朋子・斉藤敏樹・坂本裕二・新海久夫・小松正憲・矢沢肇・水谷 誠. 日生研ミニブタ (NIBS 系) の確立と繁殖成績について. 日本実験動物科学技術大会 2001(平成 13 年 5 月 8 日~12 日).
 - 15) 小松正憲・川上和夫・丸野弘幸・大西 彰・武田久美子. RT-PCR-RFLP 法を用いたブタ主要組織適合遺伝子複合体 (SLA) クラス II 遺伝子の DNA タイピング. 日本畜産学会報, 67:211 - 217. 1996.
 - 16) 小松正憲・野村友宏・丸野弘幸・川上和夫・ジョブ・マナエップ・マチアス. RT-PCR-RFLP 法を用いた各種ブタ品種における SLA クラス II 遺伝子の DNA タイピング. 日本畜産学会報 71(7):J1-J11, 2000.
 - 17) Komatsu M, Yoshihara S, Akita T, Goto N. Immunological characteristics and skin structure of the Meishan pig: serum complement activity, serum C3 level and immune response. *Animal Science Journal*, 70(6):393-398, 1999.
 - 18) Lacey C, Wilkie BN, Kennedy BW, Mallard BA. Genetic and other effects on bacterial phagocytosis and killing by cultured peripheral blood monocytes of SLA-defined miniature pigs. *Animal Genetics*, 20:371-382. 1989.
 - 19) Lumsden JS, Kennedy BW, Mallard BA, Wilkie BN. The influence of the swine major histocompatibility genes on antibody and cell mediated immune responses to immunization with an aromatic-dependent mutant of *Salmonella typhimurium*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 57:14-18. 1993.
 - 20) Lunney JK, Pescovitz MD, Sachs DH. The swine major histocompatibility complex: its structure and function. In: Swine in Biomedical Research vol.3. (Tumbleson ME ed.) 1821-1835. Plenum Press. New York. 1986.
 - 21) Madden KB, Moeller RF, Douglass LW, Goldman T, Lunney JK. *Trichinella spiralis*: Genetic basis and kinetics of the anti-encrusted muscle larval response in miniature swine. *Experimental Parasitology*, 77:23-25. 1993.
 - 22) Mallard BA, Wilkie BN, Kennedy BW. Genetic and other effects on antibody and cell mediated immune response in swine leucocyte antigen (SLA)-defined miniature pigs. *Animal Genetics*, 20:167-178. 1989.
 - 23) Mallard BA, Wilkie BN, Kennedy BW. The influence of the swine major histocompatibility genes (SLA) on variation in serum immunoglobulin (Ig) concentration. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 21:139-151. 1989.
 - 24) Nielsen VH, Thomsen B. Pvu II RFLPs at SLA class II loci:DQA and DRA. *Animal Genetics*, 28:151. 1997.
 - 25) Prather RS, Gibson J, Parry TW, Hoffman KE. Reproductive measurements in Sinclair and NIH miniature pigs: a retrospective analysis. *Theriogenology*, 47:433-440. 1997.
 - 26) Renard C, Vaiman M. Possible relationships between SLA and porcine reproduction. *Reproduction, Nutrition and Development*, 29:569-576. 1989.
 - 27) Rothschild MF, Chen HL, Christian LL, Lie WR, Venier L, Cooper M, Briggs C, Warner CM. Breed and swine lymphocyte antigen haplotype differences in agglutination titers following vaccination with *B. Bronchiseptica*. *Journal of Animal Science*, 59:643-649. 1984
 - 28) Shia YC, Bradshaw M, Rutherford MS, Lewin HA, Schook LB. Polymerase chain reaction based genotyping for characterization of SLA-DQB and SLA-DRB alleles in domestic pigs. *Animal Genetics*, 26:91-100. 1995. 14:191-200. 1983
 - 29) Vage DI, Olsaker I, Lingaas F, Lie O. Isolation and sequence determination of porcine class II DRB alleles amplified by PCR. *Animal Genetics*, 25:73-75. 1994.
 - 30) Vaiman M, Metzger J, Renard C, Vila J. Immune response gene(s) controlling the humoral anti-lysozyme response (Ir-Lys) linked to the major histocompatibility complex SLA in the pig. *Immunogenetics*, 7:231-238. 1978.
 - 31) Zhang X, Rutherford MS, Shook LB. Characterization of SLA-DRB and SLA-DQB alleles distinguished by PCR-RFLP. Proceeding of XXVth International Conference on Animal Genetics, p85. 1996.