

## 臓器移植の新しい展開—異種移植と寛容キメリズム ”第15回国際移植学会世界会議開催される”

平成6年8月28日～9月2日 京都にて

大阪大学 泌尿器科  
高原 史郎

第15回国際移植学会世界会議は平成6年8月28日から9月2日まで京都宝が池の国立京都国際会館で行われた。国内外から2,000人以上が参加し、残暑厳しい京都の外気に負けない熱気に満ちた議論で盛り上がった。

今回の会議での特に注目を集めたのは、異種移植と免疫寛容(特にキメリズム)についての演題であった。

異種移植の第一人者である英国ケンブリッジ大学のD. ホワイト博士は記者会見の場で「我々がめざしているのは臓器不足の解消だけでなく、異種移植においてもヒトからヒトへの移植に劣らない成績を達成することであり、そのためにはまだ多くの問題を克服しなくてはなりません。」と述べた。異種移植の研究の中で、彼の補体抑制の研究が最も臨床に近いものとして注目されている。ブタにヒトの補体抑制遺伝子を組み込むことによって、ブタの血管細胞表面にヒトの補体抑制因子を表現させ、異種抗原に反応する抗体が存在しても、補体の活性を抑えることによって超急性拒絶反応を起こさないようにするものである。In vivo, In vitro の実験で成功し、また実際にヒトの補体抑制因子(DAP)を発現させたブタの交配を進めている段階である。彼自身の予測では、4-5年後には一部実用化できるとのことであった。

今回の学会の演題の中で、異種移植に関する発表は全体の20%以上と多く、この分野への関心の

高さが感じられた。

免疫寛容の新しい概念であるキメリズムの発表も注目を集めた。2年前のバリの国際移植学会では、ピッツバーグ大学のスターツル教授らのグループがヒビからヒトへの異種移植が成功したメカニズムとして提唱したが、まだその当時は現象としてキメリズムが起こっていることは証明できても、実際にどの程度キメリズムが免疫寛容に貢献しているかは不明であった。しかし最近のいくつかの施設の研究によってキメリズムの重要性が証明されるようになった。今回の学会でも、キメリズムの導入に成功した動物では、導入できなかった動物よりも移植した臓器が長持ちすることが報告された。免疫寛容の研究では、胸腺内へのドナー抗原注入によって臓器移植での免疫寛容を導入する報告がいくつかの施設から発表された。この実験は米国フィラデルフィア大学のA. ナジ教授らが最初に報告したものであるが、今回はそのメカニズムの解析報告が多く見られた。

### 提供臓器を有効に生かすHLA適合性

この学会の特徴のひとつは、関心の高い問題点について賛成、反対の両者の代表に議論させることである。そして今回は「HLA型の完全一致を追求すべきか」というテーマが選ばれた。HLA型の適合に固執することは、黒人、小児、糖尿病患者、高齢者に対する救済を放棄するに等しい。これらの

患者に対しては、「移植待機時間の短縮を重視すべきであり、HLAを適合させるために時間を費やしてはならない。」米国ミネソタ大学のJ. ナジャリアン教授はこのように論じた。彼は移植臓器の1年生着率が移植施設によって56~100%と大きく異なることをあげ、臓器がよい条件で移植施設に送られるかどうか、有効な免疫抑制療法が行われるかどうか、手術の熟練度が高いかどうか、注意深いフォローアップが行われるかどうかに依存するとし、「少なくとも6つの抗原型が一致している場合は優先されるべきだが、それ以外はむしろ移植施設の質が重要である。」と述べた。

ナジャリアン教授に反論したのは、ドイツ・ハイデルベルグ大学のG. オヘルツ教授である。彼は、現状ではHLA適合度こそが生着率を左右する最重要因子であると述べた。オヘルツ教授の示した腎移植45,000例の成績によると、適合度を重視した配分による腎移植成績は無視した場合に比べ、9年生着率で10%良好であることを述べた。これから算出される型マッチ有無による生着率の差は、移植臓器10,000例あたり7,000移植臓器・年になるといふ。「7,000移植臓器・年という数字は無視できる数字ではありません。特に、提供される臓器が不足している現状では、供給された臓器を最大限に生かす方策をとるべきであり、それはHLA適合度にほかならないのです。」とオヘルツ教授は強調した。

また今回の学会では、scientific sessionだけでなく、倫理面や臓器提供の不足の問題も論議された。

#### 脳死判定は法律で、倫理委員会勧告

国際移植学会の倫理委員会は、異例のことではあるが「全ての国が脳死の判定基準を法律で定めるべきこと、移植医自身が臓器提供の意志決定に係わるべきではないこと」などの声明を出し、新聞やテレビなどで大きく報道された。臓器提供が不足していることについては、臓器移植があたりまえの医療として定着している欧米では深刻な問題である。米国では、臓器移植に関係する多くの団体や企業が共同して新しい基金を作り、テレビコマーシャルなどの媒体を使って臓器提供への理解を呼びかけている。従来からの単なる提供促進キャンペーンではなく、臓器提供は米国国民一人一人の Top of Mind にすべき重要な事柄である、という強烈なメッセージを伝えようとしている。

臓器提供の不足がいかに深刻な問題であるか伺い知ることができる。また日本の移植関係者の企画もこの学会にあわせて行われた。特に公開シンポジウムや移植者の団体が企画したチャリティー、そして各国の移植者の集いである「Viva Transplantation」などの催しが注目を浴びた。

公開シンポジウムでは「臓器提供とは何か」というテーマで、移植者、臓器提供の経験のある家族、そして多臓器の提供を申し出たにも関わらず出来なかった人達が、わが国での臓器提供に関する問題点を論じ合った。医療従事者ではなく、当事者自身による議論で報道でも大きく取り上げられた。「Gift of Life 生命の贈り物」は日本移植者協議会やトリオ・ジャパンなどの移植者の団体が共同企画したチャリティーで、臓器移植を受けた子供たちの絵画や詩の展示が京都文化博物館で行われた。また東京でも報道関係者を集めての講演会とレセプションが開かれた。

今回は1996年バルセロナで

今回の国際移植学会世界会議は、2年後の1996年8月にスペインのバルセロナで開催される。

わが国でも臓器移植法案がやっと国会で審議されることになった。今回の世界会議では、日本での脳死体からの肝臓、心臓、腎臓そして膵臓移植の発表をしたいものである。

#### ◇学会エピソード◇

##### テラサキの許容抗原移植戦略

京都の国際移植学会をはじめ海外の移植学会（佐田情報）でも、ポール・テラサキのプレナリー・レクチャーの主題は「許容抗原マッチの有用性」によって占められている。これは他ならぬ丸屋悦子（京都府赤十字血液センター）がテラサキラボ留学中にまとめた論文の紹介である。京都では「当地の血液センターの丸屋の業績である」とまえおきして紹介していた。腎移植ではミスマッチHLA組合せが、免疫原性の強い（拒絶にはたらく）ものと、生着がHLAマッチと同等の組合せ（許容抗原）に分類できるというものである。この UNOSのデータを元にした成果は、ユーロトランスプラントでも再確認できたという。この概念の導入で、腎移植のHLAマッチング戦略は「広く」なり、生着の延長が「移植腎の有効利用」「医療費の削減」「患者の苦痛回避」「腎分配の公平性」などに貢献できるという主旨である。

本邦では福岡大学の内藤説也教授が興味をもっているといううわさである。（佐治）

## 臓器移植法案の議論のさなかに関催

## 第30回日本移植学会総会

会長 広島大学第二外科 土肥雪彦教授

9月24, 25日 広島にて

国立循環器病センター研究所  
実験治療開発部 佐田 正晴

第30回日本移植学会総会は、広島大学第二外科土肥雪彦教授を会長とし9月24, 25両日全国から約1600名の移植医、研究者を集め爆心地に近い広島国際会議場を舞台に開催された。本学会の発表内容や印象について、紙面の許す限り紹介しようと思う。

学会前日の23日に市民公開講座が設けられ、医療をテーマに旺盛な執筆活動を続けている渡辺淳一講演会や日本移植者会など、移植医療について市民と医療側との間で意見交換が行われた。

学会では、招待講演5題、シンポジウム2部門、ワークショップ7部門をはじめ401題の口演、ポスター、ビデオ演題が発表された。特に本会ではポスター発表が多数採択され、随所で活発な討論が行われていたのが印象的だった(私見で恐縮ですが、小生個人としてはデータをゆっくり鑑賞でき演者と直接会話できる点からも、口演よりポスター発表の方が充実しているように思えるが如何なものでしょうか?)。

招待講演では現在、基礎および臨床の第一線で活躍中の内外5名の演者より、異種移植、心移植、肝移植、免疫制御の現況と問題点、将来の展望について最新の成果が発表された。

シンポジウム「移植医療における細胞工学の応用」では細胞工学を応用した、遺伝子導入や遺伝子制御による異種移植やハイブリッド型人工臓腑に関する研究成果が発表され、将来の移植医療、研究の可能性に対する一つの方向性を示唆した点で高く評価された。

ワークショップでは肝移植、心および肺移植、HLA-DNAタイピング、再灌流障害、新しい免疫抑制剤、非血縁者骨髄移植、および多臓器移植の7部門が設けられた。本年4月に「臓器の移植に関する法律案」が国会に上程された背景を反映してか、本ワークショップでは昨年までのワ

ークショップと比較し、より臨床色が強い演題が採用され、将来行われるであろう脳死体からの臓器提供を踏まえた実践的な討論が活発になされた。

今回の演題発表の中で、HLA学を生活の糧としている我々にとって興味深い話題、トピックスや印象について2つのワークショップを中心に紹介しようと思う。

## 腎生着はDRB1適合性が寄与するか

「HLA-DNAタイピングの臨床応用」は7人の演者により、腎移植症例に関してHLA class II allele matchingと移植成績およびclass II DNAタイピングの意義についての発表がなされた。生体腎移植の場合、DRB1 mismatch pairの移植においてはDQB1 alleleのmismatchがあるほうがむしろ移植成績が良好で、DQB1 mismatchによりsuppressor T cellが誘導されやすくなり結果的に移植成績が向上するという、興味ある報告がなされた。生体肝移植においても既に同様な結果が出ており、死体腎移植でこの様な現象が当てはまるかの検討が待たれる。死体腎移植においては、ここ数年來、各移植施設からの報告同様、class II DNAタイピングは最適なHLA適合移植を行うために必要かつ不可欠で重要であることが再確認された。しかし全てのデータはretrospective studyによるもので、DNAタイピングに基づき移植実施に際し、方法論の検討など未解決問題が多々ありそうである。

## エピトープグループ適合による腎移植

DRB1 allele matchingから更に一步踏み込みDRB1アミノ酸適合に関する報告が2施設からなされた。DR抗原数に比べ数倍のDRB1 alleleをアミノ酸レベルでグループ化しレシピエント選択の際に応用しようとするこれら試みは、少な

いドナーを有効に利用でき、これからの遺伝子適合性の一指針として評価された。

#### 非血縁者間骨髄移植の最新データ報告

「非血縁者骨髄移植の現状」では骨髄移植推進財団中央調整委員会より、「日本骨髄バンク(JMDP)には発足以来、既に50,000人を超えるドナーが登録され、1993年に施行された第1例以降、現在までに200例の骨髄移植が行われ移植成績も予想以上に良好である」という非常に喜ばしい報告が行われ、更に日本骨髄バンクの国際協力に対する提言もなされた。臨床側からは非血縁者骨髄移植後、早期GVHDの治療にはステロイドの大量投与が、また慢性期GVHDにはシクロスポリン、プレドニゾロンの投与が有効で、MLC陽性例にはT cell除去が有効であることが発表された。PCR法によるマイクロサテライトDNA多型を指標としたドナー細胞生着判定法が確立され、骨髄移植後のキメラリズムの判定に有用との報告がなされた。従来のMLCによる細胞学的クロスマッチに代わり、DNAレベルでクロスマッチが可能なPCR-Lis-DCP (PCR-low ionic strength-DNA conformation polymorphism)法が開発され、有用性について検討された。本法は骨髄移植のみならず他の臓器移植にも応用可能で、大変有効な方法として高い評価を得た。

発足間もない骨髄バンクが確実にドナー登録

者を増やし、国際協力をまで活動範囲を広げようとしているのに対し、臓器移植の歴史は外国と遜色が無いにも関わらず今だに外国の温情にすぎり国内の歩調すら合わせられない臓器移植。このギャップが何に起因するのかを深く考えさせられるワークショップだった。

他の話題としては、異種移植に関する演題が確実に増加しつつあり、この分野での先端的研究成果が期待される。

#### 移植医療における「倫理指針」を承認

最後に、移植学会として以前の「倫理指針」をより具体化した、生体移植、死体移植、異種移植、臓器売買、情報の記録および公開の5項目からなる、移植医療における「倫理指針」が総会議事で承認された。特に異種移植に関しては、本年京都で採択された「国際移植学会倫理指針」にも盛り込まれたことも踏まえ、条件付ながら臨床応用への道を初めて容認した。

今回の会期は例年より1日短い2日間のため、かなりハードスケジュールであったにも関わらず、招待講演、シンポジウム、ワークショップなどの構成や、日本移植学会30年の全成果が凝縮された記念のフロッピーディスクなど、学究肌で名高い土肥教授の配慮が随所に認められ、移植学会発足30周年にふさわしい内容であった。

## 高い評価を得たDNAクロスマッチ法

### "The Meeting of ASEATTA 94"

#### (アデレード)

平成6年9月30日～10月2日

京都府赤十字血液センター  
研究部 丸屋 悦子



photo-1

この会議は Australasian and South East Asian Tissue Typing Association により毎年1回開かれ、組織適合性抗原系について研究している人々による学会です。今年は平成6年9月30日～10月2日までの3日間、アデレードの海岸に面した静かな町GLENELGにあるRAMADA GRAND HOTELで行われました。RAMADA GRAND

HOTEL は Photo-1 に見られますように海岸沿いにあるただひとつの大きなホテルです。その向い側にTownhall (Photo-2)があり、その間にアデレードの中心部と結ぶ路面電車の終着駅があります。この電車(Photo-3)は1929年から運行が開始され今も多くの人に利用されています。



photo-2



photo-3

私も乗ってみました。車内はほとんど木製で吊革は皮の輪だけのシンプルなものですがシルバーシートは用意されていました。乗客は老人から若者まであらゆる年代層の人が利用しているようでした。また車掌も若者から70才はとうに過ぎているとおもわれるかたまで男女ともいらっしゃいました。まるで明治村のチンチン電車に乗っているようでした。またこの町(アデレードの市内および空港でも)はほとんどが白人で黒人はひとりも見かけませんでした。黄色人種も滅多に見かけませんでした。そのせいか車内や、路上で青い目の子供たちによくみつめ

られました。私が話しました町の人びとはどなたも親切で丁寧でした(もちろんオーストラリアなまりの英語ですが、たとえばAはアイと聞こえます)。このように古い小さな美しい町 GLENELG で学会がありました。

学会長はアデレード血液センターの James McCluskey でした。参加者は130名余りで日本人は4名(東海大学、長野血液センター、福岡血液センターと私)でした。日本以外の海外から参加している国はアメリカ、ロシア、ドイツ、フランス、タイ、ニュージーランド、インドでした。会場はひとつのホールで朝の9時から夜の7時頃まで行われました(プログラムの時間は遅延しがちでしたが、時間以内に終わることにこだわらないおおらかさが印象に残りました。これが「オーストラリア時間」ということです)。この学会の主要テーマは ① 主要組織適合性抗原系と臓器移植 ② 主要組織適合性抗原系と骨髄移植 ③ 主要組織適合性抗原系と疾患との相関 ④ 主要組織適合性抗原系と人類学およびその進化について ⑤ 主要組織適合性抗原系の新しい遺伝子について ⑥ 主要組織適合性抗原系と組織型タイピングの方法論についてでした。実際には8つの Session がありそれぞれのテーマについて、まず特別演者からその分野の研究の概要および教育学的講演がなされ、つぎに各演者がそれぞれの研究内容について発表を行い、最後に座長からそのSession のまとめおよび今後の研究方針が話されるといった形式で行われました。各テーマの特別演者は臓器移植では Gerhard Opelz (彼は輸血と腎移植についての研究で有名で、現在ヨーロッパにおける臓器移植研究者の権威者の一人です)。骨髄移植では John Hansen (彼はアメリカで血縁および非血縁間骨髄移植を一番多く行い、それに関する研究では第一人者です。もちろん NMDP の創設者の一人であり、国際移植学会においても、世界の骨髄移植を代表する研究者として認められています)。主要組織適合性抗原系の最新の概要については Roger Dawkins (彼はアジア・オセアニアHLAワークショップのオーガナイザーであり、国際HLAワークショップのカウンセラーです)。主要組織適合性抗原系と人類学およびその進化については Alec Morley (彼はアデレード大学の教授でMHC遺伝子の突然変異による多形性について研究し

ています)。主要組織適合性抗原系と疾患との相関については Pojen Chen (彼はカリフォルニア、サンディエゴのラホヤ研究所でTセルリセプターについて研究しています)。主要組織適合性抗原系と組織型タイピングの方法論については Ekkehart Albert (第9回国際HLAワークショップの会長で、ヨーロッパにおける血清学およびDNAタイピングの第一人者です) および Xiaojiang Gao (キャンベラの John Curtin 大学の人類遺伝学の研究者、おもにHLA-Class Iのタイピング方法の開発にたずさわっています)。これからの組織適合性抗原系の研究方針については Dominique Charron (彼は次期国際HLAワークショップの会長、HLA抗原の生物学的意義に関する研究やHA以外の組織適合性抗原系について研究しています) でした。

その他オーストラリアの骨髄移植の状況について、Sydney の Kerry Atkinson, Marcus Vowels, Jeremy Chapman らによって紹介されました。特別講演を除き29題の演題が発表されその他18題が抄録のみ紹介されました。私は Session 8, Advances & Perspectives in MHC Matching for Bone Marrow Transplantation で発表しました。約10分間緊張の連続でした。4人の先生から質問およびコメントを頂きました。さらにその日の夜の Conference Dinner で Ekkehard Albert 先生から組織適合性抗原の適合性をまったく違った方法で確認できること、およびすべてのローカスについてクロスマッチできることが優れていると賛辞を頂きました。さらに学会長の James McCluskey からも同様な賛辞を頂き、Roger Dawkins からは、学会が終わりしだいパースに来て共同研究しようと申し出てくださいました。へたな日本語での発表であり、身に余る賛辞を頂き今後さらに仕事を進め非血縁間骨髄移植のクロスマッチ法の完全確立をめざさなければならぬと思いました。

#### 意外に多いHLA-A抗原欠損例

学会全体をとおして、特に興味深く聞き、今後我々の仕事にとって重要になると考えられる演題について話します。それは骨髄移植に係わることであります。Session 2, Polymorphism & Mutations in MHC Genes で3題の演題がHLA抗原が細胞表面には発現されていないが、遺伝子としては保有するといった現象について

の報告でした。オーストラリアのクイーンエリザベス病院の Kristin Lienert により発表されたのは、DNAタイピングではHLA-A24の遺伝子が検出されるにもかかわらず細胞表面には発現されていない例です。さらにA3についても同様な現象を見つけているということです。この原因はHLA遺伝子の一部(エクソン3)がmRNAになるときにスプライスされてしまうことによるものでした。さらに彼女は血清学でHLA-A座がホモザイゴートすなわちA座に抗原が一つしか検出されない人のDNAを100例集めDNAタイピングを行いました。結果2例の人にDNAタイピングではA座に2つの違った遺伝子が検出されたと報告しました。これについて座長から参加者にこのような例を知っている人はいないかとの問いかけがありました。ドイツの Ekkehart Albert から1例(B座抗原の欠損)、日本の2例(山口センターで発見されたA座抗原および京都センターで見つけられたB座抗原欠損)をあわせ3例が演題以外の症例としてありました。実際このような例がどれくらいの頻度で起こっているのか、またHLA-CLASS IIの遺伝子座(DR、DQ、DP)でも起こっているのか否かを調べる必要があります。なぜならば非血縁間骨髄移植では家系調査によるハプロタイプでの適合性検査ができないためアレル型によるマッチングが最良の適合性検査とされています。NMDPの非血縁間骨髄移植のデータもHLA-DRB1アレル型を適合させると移植後、強いGVHDを起こさずに移植できることが報告されています。しかしこのような現象が起こっているならばアレル型適合であっても細胞表面では不適合となり、特にこの現象がHLA-DR抗原で起これば確実に患者の死につながります。よってこの現象が実際起こっている頻度を各座について調べ、非血縁間骨髄移植の適合検査にはアレル型適合のドナーとレシピエントについて両方の細胞上に抗原が発現されていることを最終的にチェックするシステムを作る必要があります。このような現象が解明できるのもPCR法の発見および遺伝子のシーケンス法の発達のためものといえます。

さらに面白い演題はインドの Narinder Mchra の UNIQUE AND NOVEL MHC CLASS II HAPLOTYPES IN ASIAN INDIANS でした。彼は192名のアジアインディアンについて調べた結果、

DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0601 (14.3%),  
 DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0502 (20%),  
 DRB1\*1501-DQA1\*0103-DQB1\*0601 (13.5%),  
 DRB1\*1502-DQA1\*0103-DQB1\*05031 (2.4%)という  
 データを発表していました。日本人によくある  
 DRB1\*1502-DQA1\*0103-DQB1\*0601は 30.2%で  
 DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602は 9.5%でした。  
 また オーストラリアのGarland Andrew により  
 日本で発見されたDRB1\*1412 (県立西宮病院 橋  
 本ら) とDRB1\*1403の両方をもつ Korean の家  
 族を見つけたとのレポートです。本当にこれら  
 の抗原があるのだと白人が発表していたのもお  
 もしろかったです。

次にその他の主要なテーマについて話します。  
 骨髄移植ではNMDPが世界のトップクラスの  
 仕事をしていることは言うまでもありません。  
 またオーストラリアの骨髄移植に興味深く思っ  
 たことは、同種骨髄移植や非血縁間骨髄移植で  
 末梢血からの幹細胞輸血を試みていることです。  
 移植成績は今のところあまりよくありませんで  
 した。さらに骨髄移植のドナー登録状況やドナ  
 ーの検索から決定までにかかる日数については、  
 ドナーの登録は1991年から始められ1994年まで  
 で68,192人されているとのことでした。検索か  
 らドナーの決定までに要する日数は平均39日と  
 報告されていました。NMDPでは21日がドナ  
 ー決定までに要する日数とのことでした。どち  
 らも日本に比べ早くできるようです。

次に主要組織適合性抗原系と組織型タイピン  
 グの方法論についてのまとめとして、HLA  
 Class IIのDNAタイピング法はいろいろな方  
 法があるが、ハイレゾリューションタイピングに  
 は一番信頼性の高い方法はPCR-SSOP法  
 であるとのことでした。日本ではPCR-RFLP  
 法も同程度の信頼性のあるデータがでてい  
 ると考えますが、彼らが主張するように制限酵  
 素のクオリティコントロールが難しいという意  
 見には納得させられるところもありました。

このような相違は日本人と欧米人の質や数の  
 考え方の違いによるものではと考えています。  
 この分野の次のテーマはHLA Class IのDN  
 Aタイピング法の確立についてです。これは12  
 回の国際HLAワークショップのひとつのテ  
 マでもあります。

最後にこの学会から将来へむけてのアナウ  
 スメントとして骨髄移植登録制度を世界レベ  
 ルでできるようお互いの国が協力することが一番

大切なことであり協力しましょうということが  
 強調されました。また特別講演者からのこの学  
 会へのコメントはマイナーな組織適合性抗原系  
 についての研究も必要であるとのことでした。

次回は1995年タイ・バンコクで

本学会と日本の学会を比較して私が一番驚い  
 たことは、特別講演の先生方が常に会場にいらっ  
 して、各演題について熱心な質問やコメントを  
 なさり、活発でいらっしやることです。時には  
 演者が気の毒になるくらい追及されることもあ  
 ります。そしてこの学会では昼食も会場のすぐ  
 となりの部屋に軽食が用意され、学会に参加し  
 ている全ての人、もちろん特別講演の先生方も  
 かならず全員出席され、ともに食事をしながら  
 フランクに各研究者からの質問に答えディスカ  
 ションをしていることです。エネルギーにあふ  
 れた生きている会議であったと思いました。

血清学を昔から楽しんでいらっしやる方々  
 には、品質の高い抗血清の保有者として世界的  
 (日赤の世界ではかも) に有名な Judith Hay  
 (オーストラリアのHLAの母) も参加され、  
 現在のHLA学の進歩と変化についての感想を  
 伺ったところ、Just Ignore! (周りはどうあ  
 ろうと私は血清学で行くわ!) と答えられまし  
 た。私達日赤グループが白人由来の血清を頂き  
 たいへんお世話になった大先輩にお会いでき、  
 今も元気で血清学ひとすじに進んでいらっし  
 やる姿と接しほのほとした気持ちになりました。

以上

追記: GLENELG の町の停留所から下側 (Photo-4), 次ページ左側 (Photo-5) を写した写真  
 です。下側の写真には会場である RAMADA  
 GRAND HOTEL が見られます。Photo-5の写真で  
 わかりますようにすぐ緑豊かな郊外になります。  
 あのクラシックな電車に乗ってゆくと20分ぐら  
 いでアデレード市の中心ビクトリアスクエアに  
 つきます。ここがもう一方の終着駅のあるところ  
 です。



photo-4



photo-5



photo-6

Photo-6 はヴィクトリアスクエアで駅とアーモンドの木? (初春で花が咲きはじめていました) を写しました。Photo-7 ~ 11 はアデレードの丘にある WILDLIFE PARK にいるカンガルーの親子 (お腹の袋から子供が足と頭を出しています。)、珍しいアルビノカンガルー (シロカンガルー)、ペリカン (カリフォルニアのペリカンが灰色だったのに驚きましたが、ここのは白色で日本の動物園で見るペリカンと同じでした。)、カンガルーのあどけない表情、アデレード大学の写真など学会以外の知見をあわせ記載しました。



photo-7



photo-9



photo-8



photo-10



photo-11

今回は“学会特集”として昨年秋に相次いで開催されました、国際移植学会世界会議を大阪大学の高原先生に、日本移植学会総会を国立循環器病センターの佐田先生に、オーストラリア・東南アジアティッシュタイパーの会を京都府赤十字血液センターの丸屋先生にそれぞれレポートしていただきました。



## シリーズ 知ってるつもり! ?

## 血清学的に発見されたHLA抗原の歴史

## ～HLA抗原のルーツその2 HLA-A10

長野県赤十字血液センター

斉藤 敏

神奈川県赤十字血液センターの中島さんからたいそう長くて重たいバトンを渡されすぐにも投げ出してしまいたい気持ちではありますが、日ごろ大量に良質の抗血清を分与していただいております手前、たとえ短い距離でも頑張って次の人へバトンを渡したいと思えます。

## A10

HLA抗原の血清学的歴史ということになりますと”第何回のどこそこのワークショップで何という抗原がどの血清を使う事によってこう決められた”というようなことになろうかとは思いますが、あいにく私はHLA抗原の歴史を初めから話せるほど昔からHLAをやっておりません。というようなわけで自分がHLAに興味を持ってから現時点までの思い出話になってしまうかもしれないことを最初にお断りしたいと思います。

私が一番最初にHLAをタイプするのに使用したT1トレイではA10グループをタイプする抗血清は抗A10だけでした。次に使用したKT7では抗A25と抗A26の2種類になり、現在ではA25、A26.1、A26.3、A26.4、A10SA、A34、A66の7抗原に対応する抗血清を使用しております。(現在A34、A66抗原は更にそれぞれ、1と、2の2抗原に分かれますので血清学で区別できるA10関連抗原は9つでしょうか!)日本においてA25、A34、A66抗原は殆どタイプする機会がないので、日本人に見られるA26のサブタイプについて回想してみます。(年齢の増加と記憶力は $Y = a/X$ ですので、若干の不安がありますが・・・)

日本にまずA26がありました。その後、名古屋第二赤十字病院で見つけられたA26の一部と反応する血清AY428(抗A26.1)

とオーストラリアで見つけられたAY428に対する相補的な抗血清(抗A26.2)によりA26が2種類に分離されました。ついで愛知センターで見つけられた31-514(抗A26.3)によりA26.2が更に31-514に反応するA26.3と反応しないA26.4に分類されました。その後しばらくしてA26.3の相補血清が当センターで見つかりました(抗A26.4)。これで日本人のA26抗原は片が付いたかなと思っていたら、石川県出身のSA家系においてこれまでのスプリット抗原とは違い、どのグループにも属していない全く反応パターンの違うA10交差反応抗原が見つかり発端者の頭文字からA10SAと呼ばれました(図1参照)。A10SAのみに反応する抗血清は今までの所見つかっておらず数本の抗血清による反応パターンの違いによってしかタイプすることができません。(世の中には、一生懸命に努力しても報いられない人がいるかと思うと全く努力もせずただ単に親子の絆を確認したくて妻と子供の血液を採って調べたら”新しいHLA抗原を持っていた”と言うような運だけで生きている人もいますよね!)

図1. A26サブタイプ決定用抗血清のセログ



※質問1. セログって何ですか?

(ベリタスを利用している人は全てHLA関係者だから蛇足かもしれませんが!)

\*HLAの抗原と抗血清との反応を模式的に表したもので上段に様々なHLA抗原が記されその抗原の数(N)が棒の長さによって表されます。下段にはそれぞれの抗血清の名前と上段の様々な抗原のN個の一つ一つとその抗血清との反応が線の高さによって表されます。反応が強いと高く弱いと低く反応しないと空白として表されます。(一般的には高さが高くてよい抗原部分との反応がなく反応する抗原部分で空白がない抗血清がよい血清と言うことになります)

※質問2. 相補血清って何ですか?

\*図2を使って回想部分を説明しますと、最初に23-147というA26抗原に反応する抗血清が見つかりこの抗血清に反応する人のHLAがA26とタイプされます。続いてAY428というA26抗原の一部にのみ反応する抗血清と、その部分には反応しない残りのA26に反応するNOS203によりA26抗原を持つ人がA26.1とA26.2にタイプされおします。次にA26.2を持つ人が同様に18-1905と26P233の抗血清によりA26.3とA26.4とに再々タイプされます。このように相対応する部分にそれぞれ反応する抗血清を相補血清と呼ぶようです。DNAにより抗原の塩基配列が決定され公認されるようになるまでは、このような相補血清の存在や、家系での遺伝、2カ所以上の違った施設で3家族以上が存在することがスプリット抗原を決定するための条件であったようです。

図2. A26サブタイプ抗原用セロフ



さて1991年横浜で開かれた第11回国際組織適合性ワークショップのA10グループ検討会(A10アンチジェンサイアティー)においてこれら4抗原が検討されました。その結果、日本人以外の人種においてはA26.4が黒人で一人見つかった他は全てがA26.3でした。ですからA26のサブタイプは日本人特有のものと思われます。またプレワークショップから抗原検討会にわたってUCLAのミンシュ

クバク先生による多大なご指導によりA26のサブタイプを主とするまとめをこのワークショップのプロシーディングへ提出することが出来ました。(この時、中島氏の御自宅に伺わせていただき、まとめを書かせてもらったのですが、家に入りますとお子さんが4人おりました。羨ましいなーと思っていると突然、中島氏が真顔で、”2人は姉の子供ですから!”(私の話に尾ひれが付いてそこら中に広がることを恐れたのですね。たぶん)

ワークショップ終了後中央血液センターの石川さん達のグループによりそれぞれの抗原の塩基配列が決定され血清学とDNAとの対応が明らかになりました。また今年の第11回日本HLAワークショップでは九大の木村先生のSSOP法によりHLA-AのDNAのタイピングを行いました。その結果A26の血清学によるサブタイプとDNAによるタイプとで殆ど食い違いがありませんでした。(図3)より正確なDNA検査がより簡単に行えるようになってきている中、最近世界で抗原遺伝子は存在するものの細胞表面へ抗原の発現がない例が多数報告されています。”家紋”の編集長が前々から言われているようにルーチンにDNAでタイプし血清学で確認(エピトープ抗体?)の時代がすぐそこまできているような気がします。そうすると血清学でサブタイプを決める必要はなくなるのでしょうか?????

この辺で結果オーライがいつまでも続くものではないことを肝に銘じて”努力と熱意”で結果を出している次の人にバトンを渡したいと思います。

図3. 当センターにおける血清学タイプとDNAタイプの比較 (第11回日本組織適合性ワークショップでのSSOPデータとの比較)

血清学タイプ	DNAタイプ			
	A2601	A2602	A2603	A2604
A26.1	0	5	0	0
A26.1V	0	2	0	0
A26.3	6	0	0	0
A26.4	0	0	5	0
A10SA	0	0	0	4

※HLA-B5についても、というお話でしたがA10だけで紙面を使いすぎてしまいましたのでB5についてはB5102を見つけ第10回の日本HLAワークショップでB5を担当し非常にきれいにまとめられた兵庫県立西宮病院の木下さんか上司の心優しい仕事の鬼の橋本先生にお願いしていただけませんか?

## HLAに学ぶ—II.

## 人類の進化

日本赤十字中央血液センター

徳永 勝士

ヒトの先祖は何人いたのか？

前回は、HLA遺伝子が示すユニークな多型の姿を眺め、J. Kleinらが主張するヒトと類人猿の間のTrans-species polymorphismについて紹介した。今回は、このTrans-species polymorphismに基づいたひとつの興味深い推論について触れたい。

さて前回述べたように、われわれの遠い先祖がヒトという種になる(約500万年前)以前から、多くのHLA-DRB1の対立遺伝子が連綿として保たれてきたとなると、そのような対立遺伝子の種類数から逆に人類の先祖集団のサイズを推定することができるであろう。いいかえれば、これだけの数の異なる対立遺伝子が、何万あるいは何十万世代もの長期間、集団中に維持されるためには、少なくともこれだけの人口がなければならぬだろう、という理論的推定が可能となる。

現在でもHLA-DRB1の新しい対立遺伝子が次々に見つかっているのが、人類がはたしてどれだけのDRB1対立遺伝子をもつのかまだわからないが、すでに100種類にも達している。ヒトの誕生以前から現在まで存続してきた対立遺伝子の種類数もやはり正確にはわからないが、仮に内輪の見積もりをとって20種としよう。

そうすると、もし先祖が全員DRB1のヘテロ接合型、すなわち異なる対立遺伝子を2個づつ持っている場合でも最低10人はいないといけない。もちろんこの数は全く現実離れしたものである。人類の結婚形態を考えてみても、また、複数の対立遺伝子が非常に多くの世代を経て残ってくる確率を計算したり、あるいはシミュレーションを行ってみても、20種もの対立遺伝子を五百万年以上にわたって残せる人口は、ずっと大きなものであったと推定される。高畑(総研大)が行った人類の先祖集団の規模についての数理論的な推定によると、HLAの多型に対する自然淘汰を考慮に入れても、人類の先祖はその誕生から今に至るまで、最も人口を減らした時期においても一万人、おそらくは十万人以上いたに違いないという。

興味深いことに、この結果はミトコンドリアDNA多型の解析結果から極めて少数の先祖が推定されているのと好対照をなしている。近年、自然人類学で大きな論争となっている新人(われわれ現代人に直結する先祖)のアフリカ起源説VS. 多地域進化説にも関連して、今後の展開が楽しみな分野である。

HLAからみた東アジア諸集団の類縁関係

次に話題をぐっと現代に近づけ、HLAが人類集団の過去の移動を追跡し、その形成過程を復元するための有力な手がかりとなることを示したい。図1は、1991年に開かれた第11回国際組織適合性ワークショップで集められた諸集団のHLA-A、-B、-DR座の遺伝子頻度データに、92年に筆者らが調査したシベリアのブリアート族のデータを加えて、今西(当時：東京大・理、現在：国立遺伝研)が作成したモンゴロイド系集団の系統樹である。

この図1からいろいろなことが議論できよう。まず、東アジアの集団は大きく南と北の二つに分けられる。北のグループにはシベリアのヤクート族やブリアート族、モンゴル族、中国北部のオロチョン族、満族などが含まれる。日本人は韓国人と最も近い関係にあり、ともにこの北のグループに属する。一方、南のグループにはベトナム人、タイ人や、中国南部の少数民族であるリー族、ブイ族、ミャオ族などが含まれる。

興味深いことに、同じ漢民族という名で呼ばれながら北部の集団は北のグループに含まれ、南部の集団は南のグループに含まれる。言語、習慣といった文化的要素をもとに分類される“民族”と、遺伝的特性による分類が必ずしも一致しない典型的な例といえる。

図の下方では、新大陸に渡ったモンゴロイド系集団、北米あるいは南米のアメリカインディアンやイヌイト(エスキモー)が、アジアのモンゴロイド系集団とは別のグループを形成している。これらアメリカの先住民の間であるいは先にみたアジ

アの諸集団との間で遺伝的距離がかなり大きいことに気づかれると思う。これは、初めて新大陸に人類が移り住んだルートと年代に関する論争の火種のひとつとなっている。

### 参考文献

- 1) Klein J. et al.: The major histocompatibility complex and human evolution. *Trends in Genetics* 6; 7-11, 1990.
- 2) Takahata N.: Trans-species polymorphism of HLA molecules, founder principle, and human evolution. In: *Molecular Evolution of the Major Histocompatibility Complex*, Eds. Klein J and Klein D, pp. 261-286, Springer-Verlag, 1991.
- 3) Imanishi T, et al.: Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: *HLA 1991 Vol. 1*, Eds. Tsuji K, Aizawa M, and Sasazuki T, pp. 1065-1220, Oxford University Press, 1992

- 4) Tokunaga K, et al.: Distribution of HLA antigens and haplotypes in the Buryat population of Siberia. *Tissue Antigens* (in press)

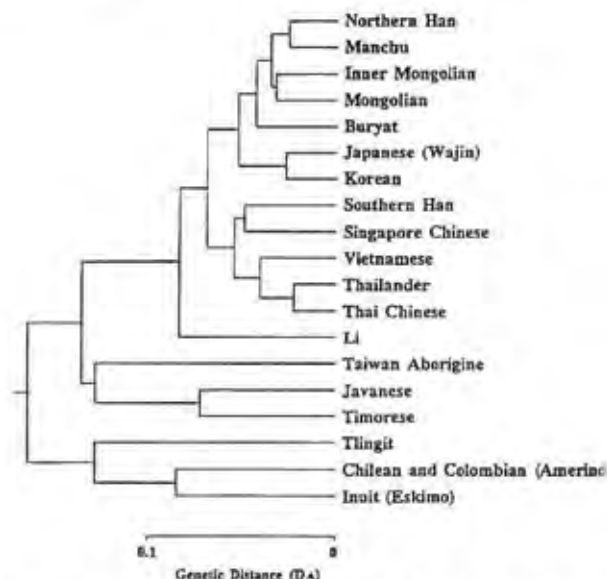


図1 HLA-A, B, DR座の遺伝子頻度に基づくモンゴロイド系19集団の系統樹



佐治博夫のまかせなさいっ！



## HLA血清学は消えてゆくのか？

京都府赤十字血液センター  
研究部 部長 佐治 博夫

PCRがHLAの世界に導入されて、ティッシュタイピングは大きく様変わりした。嘗々とHLA血清学を築き支えてきたティッシュタイパーたちは、城郭が崩れていくさまを傍観するような焦燥感に苛まれた。クラスIIのタイピングについては、もはや血清学の生き残る余地はないように見える。幸い（血清学にとって）クラスI遺伝子は難攻不落の山城の感があり、しばらくは攻防が続きそうである。

クラスIIはその多型性がエクソン2に集中していて、遺伝子の解析もほぼ終了していることから、DNAタイピングが容易であった。クラスII血清学はクラスIのそれに比べて難度が高いことと相俟って、ティッシュタイピングの主役の地位はDNAへ移った。クラスI遺伝子の多型性はエクソン2、3、4にまたがっている。クラスI遺伝子族は10数個が発見されていて、そ

の多くは偽遺伝子でありさらにいくつか発見が予測されている。それらのホモロジーの高さは、座位特異的なPCR増幅を困難にしている。クラスI血清学は確立された手技と精度の高さから、当分は主役の地位を追われそうにない。しかし最近クラスI多型性の分類能力をさらに高度に要求される。骨髓バンクの登場である。抗体の識別能力に比してT細胞のクローンの多様性は桁違いと考えられる。非血縁者間骨髓移植はT細胞の認識レベル、すなわちアリのレベルに近い分類とマッチングを要求する。時代の要求は必ず実現に向かうから、困難なクラスI DNAタイピングもいずれ実際化される日が来る。血清学の出る幕はなくなりそうである。

HLA血清学はその使命を果たし終えたのであろうか？この数年の焦燥感はこの問いによってもたらされた。

## HLA分子欠損例が発見された!

山口県赤十字血液センターにいた田中秀則は、ワークショップのたびにある不思議なパネルを提出していた。B座にB46があるだけで、A座には抗原が検出できないのである。京都でもB座抗原が検出できない例を発見した。骨髄移植を受ける患者の母であった。オーストラリア原住民のHLAを遺伝子タイピングをしていたライナート・クリステインはA24遺伝子はあるのにA24抗原が検出できないのである。白人のA30にも同様の例があった。これらはすべて健康人であった。免疫学的にこれほど重要な分子が欠損しているように見えるのに、である。

さて、これをどう理解し評価すべきか? つぎのようなことが考えられる。

1、突然変異によりエクソン内にストップコドンができる。よってそれ以降の翻訳が行われず不完全分子におわる。

2、mRNAへの翻訳の段階で、異常なスプライシングがおこり、エクソンの欠失がおこりHLA分子が産生されない。

など、である。オーストラリアの例は異常なスプライシング (alternative splicing, exon retention etc.) であることがわかっている。日本の例は発表があるまで詳細を議論できないが、gDNAの存在は確認されている。A座、B座遺伝子が死んだのである (こうして偽遺伝子が蓄積されてきたのであろう、機能遺伝子が偽遺伝子になるのを目のあたりにし

たことになる)。

オーストラリアのASEATTA (丸屋の報告を参照) における報告では、A座ブランク100例をスクリーニングしたところ、2例のHLA分子欠損が検出されたという。いまのところはクラスIに限られているが、いずれクラスIIの分子欠損も報告される可能性が高い。

もし、DNAタイピングだけに頼ったらどうなるか? 賢明な読者はたちどころに理解されるであろう。非血縁者間骨髄移植を例にとると、分子欠損のヒトがドナーになると、強烈なGVHDが生じ、その逆ならば拒絶が起こることになる。すなわち、

HLA血清学は必要である  
という結論である。

HLAマッチングの戦略: HLA血清学はしぶとく生き残る

クラスII抗血清の量的質的不足は今後も深刻である。クラスI抗血清もいずれ底をつく。たよるはモノクローナル抗体である。血清学の命である抗血清はとりあえず確保されるようである。クラスIは血清学であらう分類をしてDNAで細分類をする。クラスIIははじめからDNAで細分類して、血清学で細胞上のHLA分子を確認する。こういう戦略が妥当になる。すなわち、血清学は「細胞上にHLA分子が表現されている」ことの証左を得るための不可欠の方法として生き残るのである。

## HLA最前線

### 骨髄移植に伴う

#### GVHDとHLAとの関連について

名鉄病院 血液内科・骨髄移植センター

森島 泰雄

はじめに

私たちが白血病患者にHLAの適合した兄弟から初めて骨髄移植を実施したのは1976年の5月であったが、この患者は移植後骨髄が生着し白血球が末梢血に出始めた頃から全身皮膚の紅斑が出現し、その後閉塞性のパターンの肝障害が

進行し、腸管の障害も伴うという典型的な重症急性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) が起こり、最後にはサイトメガロウイルスによる間質性肺炎により移植後68日で亡くなった。GVHDとは生着したドナー由来の免疫担当細胞 (主としてリンパ球) が患者の

組織を攻撃する反応である。当時はHLA-A, B型しか同定出来ない時代であったが、ドナーと患者のHLAを合わせたにもかかわらず生じる重症GVHDあるいは間質性肺炎を前に苦闘したのであるが、後記するようにGVHDにたいする予防法が進歩し、1980年代中ごろからは兄弟間移植では重症のGVHDは稀にしか起こらなくなり、移植の成績は向上した。

ところが、数年前から再び骨髄移植を始めた1970年代と同じ様な病態をしばしば経験するようになった。これは、骨髄バンクを介した非血縁ドナーからの移植が行われ、おおよそ20%の非血縁移植症例に重症GVHDが発症しているからである。兄弟間でのHLA適合の場合にはHLA領域は完全に適合しているが、他人間ではHLA-A, B, DR型を適合させたといっても、HLAが違っている可能性があり、このため急性GVHDが兄弟間移植に比べ高頻度に起こるようになり、GVHD対策が必要になってきた。その一つは、非血縁移植におけるより厳密なHLA適合度の判定であり、骨髄移植の臨床においてHLA検査の重要性が再認識されてきた。

1. GVHD予防法とGVHD発症頻度

同種骨髄移植のGVHD予防法<sup>1)</sup>として現在最も多く用いられているのはシクロスポリン (CSP) とメトトレキセート (MTX) との併用療法である。

CSPを移植前1日から3 mg / kg / 日点滴で開始するとともに、MTXを移植後3-4日毎に3-4回の短期間使用する。HLA適合兄弟間移植での急性GVHDの頻度・重症度をこの方法が開発される以前に用いられたMTX単独やCSP単独法と比較した成績を表1に示したが、CSP + MTX法により急性GVHDはほぼコントロールできるようになった。

表1 予防法別急性GVHDの発症頻度

Nagoya BMT Group (1976 - 1987)  
HLA 兄弟間適合同種骨髄移植症例

予 防 法	症 例 数	Grade of A- GVHD (%)	
		1 - 4	2 - 4
MTX (n=37)		62	32
CSP (n=35)		63	26
MTX+CSP (n=29)		45	3

同じGVHD予防法を用いたシアトルのフレッドハッチンソン癌センターにおけるGVHDの発症頻度と比較すると明らかに日本における頻度が低率である(表2)。これは、日本人間の方が遺伝的に均一であり、おそらくはマイナーな組織適

合性抗原 (minor HA) の多様性が少ないためではないかと推測される<sup>2)</sup>。

表2 日本間での急性GVHD(中等症以上)の発症頻度の比較 (MTX+CSP 予防症例)

移 植 の 種 類	日 本	シアトル
HLA 適合兄弟間移植	13%	33%
非血縁者間移植		
HLA-A,B,DR* match	21%	78%
HLA-A,B,DRB1,DOB1,DPB1 matched		
Grade 2-4 GVHD	24%	69%

\* 日本 : MLC negative

慢性GVHDは移植後3カ月頃より肝障害、皮疹、口内炎、唾液、涙液分泌障害などの症状が出現し、自己免疫の機序が関与すると言われている病態であり、重症型の発症は患者の予後を悪くしている。表3に臓器別の発症頻度を示すが、急性GVHDと同じく欧米に比べ低率である。

表3 慢性GVHDの発症頻度

Nagoya BMT Group  
HLA 適合兄弟間骨髄移植例  
MTX + CSP 予防法

	Cutaneous GVHD	Oral GVHD
61 cases *	6 (10%)	16 (26%)

\* 日本 : MLC negative

2. 非血縁者間骨髄移植におけるGVHD

1989年東海骨髄バンクが発足し、55例の非血縁移植を可能にし、1992年には公的骨髄バンクとしての日本骨髄バンクに引き継がれ、200例以上の非血縁移植が実施されている。日本におけるドナーと患者のHLA適合基準はHLA-A, B, DR型が血清学的に完全適合していることであり、最終検査としてリンパ球混合培養試験 (MLC) を実施して最適ドナーを選択する。

1994年7月からはMLCに替えて、HLA-DRB1のDNAタイピングが行われている<sup>3)</sup>。

中等症 (2度) 以上の急性GVHDは約40%の症例に、重症 (3度以上) の急性GVHDは約20%の症例に発症しており、兄弟間移植に比べその頻度・重症度は高くなっている。

非血縁移植においてドナーと患者間の組織適合性抗原の違いを検出する方法として、① MLC、②HLA-DRB1のDNAタイピング、③HLA-DQB1のDNAタイピング、④HLA-DPB1のDNAタイピング、⑤HLAクラスI抗原のDNAタイピング法が現在検討可能である。東海骨髄バンク症例の検討では、MLCの反応性がGVHDの頻度・重症度と良く相関し、HLA-DRB1, DPB1との関連も示唆された<sup>4)</sup>。現在厚生省の骨髄移植HLA研究班 (笹月班) に

において日本骨髄バンク症例の詳細な検討がなされているが、HLA-A座のDNAタイピングの違いが急性GVHD発症に関与している可能性が指摘されており興味深い<sup>5)</sup>。日本人間の非血縁移植における2度以上の急性GVHDの頻度をシアトルでの頻度と比較すると、HLA-A, B, DRB1, DQB1, DPB1適合症例の場合、日本では21%であるのに対し、シアトルのデータ<sup>5)</sup>では69%と高率であり、非血縁移植では兄弟間移植よりも minor HAの違いが大きく影響していると推測される(表2)。

したがって、日本における非血縁移植は兄弟間移植と同じように急性GVHDの発症頻度は欧米に比べ低率で、良好な移植成績が期待できる。東海骨髄バンクにおける白血病スタンダードリスク症例の無病生存率は50%となっている。

### 3. 同種骨髄移植の課題

非血縁者間骨髄移植の成績の向上のためにはGVHDの頻度・重症度を減らすことが重要である。GVHDの予防法として前述したCSP + MTX法では不十分であり、現在いろいろな工夫がされている。一つは、移植骨髄中に混入している T リンパ球を除去する方法である。1980年代に実施された同方法は拒絶や白血病の再発が多く一般的な治療法になり得なかったが、最近ではT細胞の部分的除去法や移植前免疫抑制法を強化するなどして、欠点が克服され米国の非血縁移植では良好な成績がえられている<sup>6)</sup>。また、CSPの投与量を 5 mg /kg /日持続点滴投与に増量したり、新しい免疫抑制剤であるタクロクリムス(FK506)とMTXとの併用療法、あるいは抗胸腺グロブリンの前投与などが試みられている。

さらに、ドナーと患者間の組織適合性の違いとGVHDとの関連をより明確にする必要がある。上述した既知のHLA 抗原の違いの解析の他に、HLA 領域の他の遺伝子(クラスIIIも含めて)との関連やHLAの "ancestral haplo type"<sup>7)</sup>についての解析、GVHDに関連するサイトカインの解明などが課題である。また、たとえばHLAのクラスII抗原が異なる骨髄移植では全例がGVHDを発症しても良いはずなのに半数以下しか発症しないのはどうしてかなど、GVHDの発症機序やHLAとの関連についても今後の検討課題は多い。

### 参考文献

- 1) 森島泰雄：急性移植片対宿主病の診断と対策、治療学 28 (10) 1125-1129, 1994
- 2) Morishima Y. et al. Low incidence of acute GVHD by the administration of methotrexate and cyclosporine in Japanese leukemia patients after BMT from HLA compatible siblings, *Blood* 74 2252-2265, 1989
- 3) 森島泰雄：骨髄バンクと非血縁者間骨髄移植、医学のあゆみ 170 (10) 903-907, 1994
- 4) Morishima Y. et al. Low incidence of acute GVHD in patients transplanted marrow with HLA-A, B, DR compatible unrelated donor among Japanese, *Bone Marrow Transplant* (1995年2月号予定)
- 5) Petersdorf EW, et al. The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation, *Blood* 81 1923-1932, 1993.
- 6) Kernan NA. et al. Analysis of 462 transplantation from unrelated donors facilitated by the National Marrow Donor Program. *N. Engl. J. Med.* 328 593-602, 1993.
- 7) Christiansen FT, et al. Questions in marrow matching : the implication of ancestral haplotypes for routine practice. *Bone Marrow Transpl.* 8 83-86, 1991.



## シリーズ：HLA分子の発現制御（その2）

## HLAクラスII遺伝子の構造と抗原ペプチドの

## 提示及びその発現調節

九州大学生体防御医学研究所

遺伝学 木村 彰方

前回HLA領域の遺伝子マップについて述べたが、今回はHLA分子の発現について紹介する。

HLA分子はクラスI分子とクラスII分子に分類され、いずれもが細胞表面に発現することは周知の事実であるが、その発現の細胞あるいは組織特異性はHLA分子毎に異なる。すなわちクラスI分子はほとんどの有核細胞（例えば顆粒球、B細胞、T細胞のいずれも）に発現するのに対し、クラスII分子は抗原提示細胞（例えばB細胞やマクロファージ）やヒトでは活性化T細胞に発現する。

一方、HLA分子の発現量やサイトカインによる誘導性発現においては、座位毎に多少の差が存在する。すなわち、クラスI分子の中でも、通常はB>A>Cの順に発現量が高いが、インターフェロン $\gamma$ が存在する場合にはAの発現量が著しく亢進するのに対し、BおよびCの発現誘導はたかだか2倍程度である。これに対して、クラスII分子では、通常B細胞における発現量を比較するとDR>DP>DQの順に発現量が高く、活性化B細胞あるいは活性化T細胞ではDR、DP、DQいずれの分子の発現量とも亢進するが、中でもDQ分子の発現亢進は著しく、このためDR>DP=DQのような発現量となる。またマクロファージなどにおいてはインターフェロン $\gamma$ によってDR、DQ、DPいずれの分子とも発現誘導を受けるが、ここにさらに腫瘍壊死因子

(TNF $\alpha$ )が存在するとDR、DPの発現量はあまり変化しないのに対し、DQの発現は著しく亢進する。一方、インターロイキン1や6 (IL1やIL6)が同時に存在する場合は、DRは亢進、DPは不変、DQは減少と全く異なる発現の変化が観察される。なおつけ加えておくと、インターフェロン $\alpha$ および $\beta$ では、クラスI分子の発現誘導は可能であるが、クラスII分子の発現は誘導されないの、同じインターフェロンという名がついていても、主に線維芽細胞で産生される $\alpha$ および $\beta$ と、主にTリンパ球が産生する $\gamma$ とでは、その作用機作が全く異なる。これは、それぞれのインターフェロンのレセ

プターが異なり、従ってレセプターを介する細胞内へのシグナル伝達機構が全く異なることに依存すると思われる。

さて、このようなHLA分子の発現調節は、いかなる機構によって制御されているのであろうか？  
発現制御機構に移る前に、ここでHLA分子の細胞表面への発現について述べておきたい。遺伝子が読まれて（転写されて）最終的に生成されたメッセンジャーRNAは、細胞質内の小胞体に付着したリボソーム上で蛋白に読みかえられる（H鎖、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖）に翻訳されてから後に細胞表面に発現するまでの過程を図1に示す。

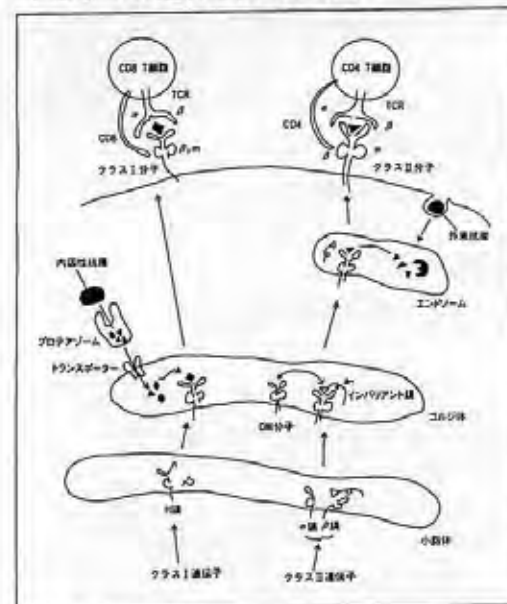


図1. MHC分子の発現経路  
MHC分子の発現は、細胞質内での抗原ペプチドとの結合を必要とする。この過程は、抗原ペプチドの結合にプロテアソームとトランスグルタミナーゼが関与する。

クラスI分子のH鎖は、小胞体からゴルジ体に移行する過程で $\beta_2$ ミクログロブリンと出会うが、安定なクラスI分子となるためにはH鎖のペプチド結合ドメインにペプチドが結合しなければならない。ことペプチドというのは、主にその細胞自身の中で生成された蛋白（ウイルスが感染した細胞ではウイルスの蛋白もこの範疇に含まれる）が、プロテアソームによって分解され、さらにトラン



スポーターによってゴルジ体内に持ち込まれた内因性抗原ペプチドである。このプロテアソームを構成するサブユニットの一部 (LMP 2 と LMP 7) ならびにトランスポーターのサブユニット (TAP 1 と TAP 2) の遺伝子は、いずれも HLA クラス II 領域の DQ 座と DP 座の間に存在することは前回述べたとおりである。さてこのように内因性抗原を結合したクラス I 分子は細胞表面に輸送され、最終的には主に CD 8 分子を発現している T 細胞に認識される。

これに対して、クラス II 分子の場合には、ペプチド結合ドメインに結合するペプチドは細胞外から取り込まれた (細胞表面の構造物もいっしょに取り込まれるので、自己細胞表面に発現するクラス I 分子なども同様に考えてよい) 抗原がエンドソーム内で分解されたもの (外来抗原ペプチド) である。クラス II 分子の  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖は小胞体内で出会うが、この際インバリエント鎖 (以前は  $\gamma$  鎖

とも呼んでいた) が存在すると安定化する。さて、このインバリエント鎖が結合した状態でエンドソーム内の外来抗原ペプチドと出会うわけであるが、この際のインバリエント鎖と外来抗原ペプチドの置き換えに DM 分子の遺伝子も DQ 座と DP 座との間に存在することは前回述べたとおりである。最終的に外来抗原ペプチドを結合したクラス II 分子が細胞表面に発現し、これが CD 4 分子を発現する T 細胞に認識されることになる。

このように、クラス I 分子とクラス II 分子は、細胞内にできた蛋白分解産物 (ペプチド) を細胞外に輸送するシステムであり、これが T 細胞に認識されることによって免疫応答が惹起されるわけである。

今回は HLA クラス II 遺伝子の転写について概説する。

## テックチップ

### DNA 分離のコツ

防衛医科大学校  
検査部 小林 賢

近年、話題のマーフィーの法則をご存じでしょうか。この中に、「失敗する可能性のあるものは、失敗する」、「実験はかならず再現されなければならない。だから実験は、すべて一様に失敗しておくべきである」、それから「課題を研究する最善の方法は、研究を開始する前に課題を完全に理解することである」という法則が書かれています。DNA 分離をうまく行うコツはこの法則に隠されているのではないのでしょうか。DNA 分離や特徴などの知識が不十分であったりすれば、当然正しい結果を得ることはできません。ですから、まず分離などを行う以前に、分離の意味や操作の原理・理論・手順、そこに使われる試薬などの働きなどについてきちんと整理し、頭に叩き込んでおく必要があります。また、実際に分離するときには、失敗を恐れてはいけません。「失敗するかもしれない。」などと思っていると必ず失敗します。ですから自信を持って検査を行ってください。当然、自信を

持つためにはその裏付けとなる知識が必要になってきます。この自信が絶対に必要なのです。それでも失敗してしまったら、次回の操作に役立つよう徹底して原因を追究してください。追求できれば、さらに知識を高めることができます。

さて、実際に DNA を抽出する場合、従来はフェノール・クロロホルム法が中心的に行われてきました。しかしながら、この方法は抽出までに時間がかかること、回収率が低いこと、や有機溶媒の廃棄などといった問題がありました。近年、この方法に代わり、簡単で、迅速に DNA が回収できる方法がいろいろなメーカーから発売されるようになってきています。これらのキットはほとんどが有機溶媒を使用しない方法を採用しています。ですから当然廃液の心配もありません。中でも強力な蛋白変性作用をもつグアニジンを利用したキットは簡単に DNA を回収することができます。各社で発売されている試薬キットの比較を表に示します。現在市

販されている試薬キットでもっとも短時間に DNA を分離できるのが、ベリタス (SSPクイックバッファー) と大日本製薬 (DnaQuick, ドナクイック) から発売される試薬キットです。主婦の方にこの方法で DNA 抽出を実際のためにしてもらいましたが、全く問題なく DNA を取ることができました。それだけ簡単な方法であるということです。しかしながら全く問題がないわけではありません。希に蛋白が残存することがあります。PCR を行う上ではほとんど問題になりません。かなりひどい混入でも PCR はきれいに増幅されます。もし、混入した場合は、15,000 回転で 2, 3 分遠心し、上清を新しいマイクロチューブに移します。

一般的なコツで最低限守ってもらいたいことを以下に述べたいと思います。それは、なるべく新しい血液を使用することです。次に、DNA は DNase にとっても弱く、すぐに壊されてし

まうので、これを混入しないようにします。そのためには、チューブやチップなどはオートクレーブに掛け、DNase を壊してしまう必要があります。チップやチューブは手袋を着用して袋から取り出し、ラックに立てるか、専用の容器に入れてから滅菌してください。それから、手にもたくさんの DNase がありますから、慣れるまでは手袋をして分離作業をした方がよいでしょう。無理にたくさんの検体を処理しようとすると、どうしても手抜きになりがちです。ですから自分の技量以上のことを無闇にチャレンジしないでください。

最後にもう一度繰り返しますが、DNA 分離の正否は、技術の裏付けと自信です。何か DNA の分離・タイピングで質問がありましたら、電話 (0429-95-1511 内線3721) かファックス (0429-95-1540) をください。お待ちしております。

表 市販されている DNA 抽出試薬キットの一覧

キット名	SSP クイック バッファー	DnaQuick	DNA 抽出 キット	SepaGene	IsoQuick	Easy-DNA Kit	QIAamp Blood Kit	インスタジーン DNA 複製 マトリックス	Genomic DNA Isolation system	Genomix
メーカー名	ベリタス	大日本製薬	住友金属	三光純薬	理機器城店	フナコシ	フナコシ	バイオラッド	GibcoBRL	片山化学
有機溶媒	なし	なし	なし	非フェノール性試薬	なし	クロロホルム	なし	なし	なし	クロロホルム
プロテアーゼK	なし	なし	なし	なし	なし	なし	あり	なし	あり	なし
血液サンプル量	100 µl ~	100 µl ~	100 µl ~	0.1 ml	100 µl ~	0.5 µl ~	200 µl	3 ~ 5 µl	5 ml	2.4 ml
所要時間	15 分	15 分	60 分	40 分	30 分	90 分	20 分	180 分	325 分	90 分



## HLA ところ変われば



### — 中国 HLA タイピング旅行記 —

日本赤十字社中央血液センター

柏瀬 貢一

#### \* 出発当日

1994年9月4日午後6時、私達を乗せたUA853便は、成田から空路北京へと飛び立った。出発当日は荷物の梱包などで昼食を摂る間もなかった。半年近くこの日のために色々準備してきたので、通常ならば“やっとこの時が来た”と感激するはずだが、搭乗手続き等のトラブルに見舞われたため、感激に浸る間もなく出国の時間を迎えてしまった。

今回私が訪れたのは、中国東北地方のハルビン市であった。HLA検査の技術援助を目的とし、ハルビン血液センターと共同で中国東北地方におけるHLAの分布調査を行った。調査期間は9月4日から22日までの19日間、日本から同行したのは中央血液センター研究一課長の徳永(勝士)先生、東京大学人類学教室の針原先生と金先生の3人であった。しかし、針原先生と金先生は、他の民族調査のためハルビンの滞在期間は3日間、徳永先生も1週間でハル

ピンを去ってしまい、右も左もわからぬ土地に置いてきぼりにされた私は約2週間1人でハルビンに滞在した。

#### \*ロシアの面影を残すハルビン

人口400万人、黒竜江省の省都ハルビンは、鉄道交通の要所として発展した都市であり、ほぼ稚内と同緯度に位置し大陸性の気候のため冬は凍てつく程寒いが夏はかなり暑くなる。街は19世紀末にロシア人が建設したため、ロシア風の古い建物も残っているが、近年はそれらを取り壊し、現代風の建物が沢山建築されつつある。その名残か繁華街では、買い物をしているロシア人を見かけることができる。また市の北部を流れる松花江の河岸に造られた公園は、市民の憩いの場であると共に、その河で採れる魚や蝦は豊かな食卓の供給源でもある。1925年「ジュネーブ協定」において生物兵器の使用が禁じられたが、ここハルビンは1930年代に家永訴訟で有名な731部隊が編成された事でも知られている。

#### \*難行を極めた現地調査

9月4日出発当日、まず成田空港の航空チケットカウンターで私達のツアー名の代わりに別のツアー名が掲げられていたため、チケットを入手する事ができず1時間位右往左往した。

次に、航空会社のカウンターで今回の調査に使う機器や資材等の荷物計量を行ったがなんと110Kgの超過で、超過料金十数万円。航空会社のカウンター職員とスッタモンダした揚げ句、結局値切って支払った。(中国ではトラベラーズチェックも使えなさそうだし、多額の現金を持ち歩くのも危険そうだし、物価が相当低いと聞いていたので、余り現金を用意していなかった。ここでの超過料金は、その後の中国での生活に大きく響いた)。

さらに成田から約4時間のフライトで北京空港に無事到着したが、日本から持ち込んだ顕微鏡とフィッシャー遠心機が税関で止められた。北京の税関職員の話では、黒竜江省政府の証明書が必要であるとのこと。後日証明書を交付してもらったが、結局機器を手にしたのは、HLA検査も終末に近づいた頃だった。

そんなこんなで、北京市内のホテルに到着したのはPM11時過ぎ。ここでもホテルは予約

してあったはずだが、予約の不手際で針原先生と同室になった(男性?と同室に泊まるのはこれが2度目)。中国ではチップの習慣がないと聞いていたので、荷物を部屋まで運んでくれたボーイが素直に立ち去ると思いきや、ボーイは部屋を去ろうとしない。チップを要求していると思った私は、100円が妥当と推定し、100円玉を渡そうとするとその額が多すぎるのか受け取ろうとしない。理解に苦しんでいると、針原先生が1,000円札を出した。その途端、ボーイは逃げるようにもぎ取って去った(1,000円といえば中国では1週間分の給料に相当するそう)。その夜、2人は日本から持っていったインスタントラーメンをすすって、それぞれのベットに入った。

翌日早朝、北京空港を出発し約1時間半でハルビン空港に到着した。噂によると中国の国内線は、今にも墜落しそうな古いロシア製アエロフロート機を使っているとのことであったが、実際はボーイング社製の最新式ジェット機だった(これで生きて帰れると胸をなでおろした)。ところがここでまた、時間連絡のミスのため空港で2時間待ち。

この夜、ハルビン血液センターによる歓迎会が催された(問題、さてこの中に日本人は何人いるでしょう?またそれはどの人でしょう?答、文書未)。

中国式の宴会は、日本と違って乾杯が十数回。アルコール度約50%の強い酒(白酒=ハイジュー)を誰かが挨拶する毎に、皆で一斉に一気呑みするというものだった。左党の私はいついつい勝手に飲んでしまい、徳永先生に注意される始末だった。また日本文化の影響でしょうか、カラオケが盛んで、私達も歓迎会を催していただいた感謝の意を込めて「北国の春」を日本語で唄った。



photo-1 歓迎会にて

ここまでの話では“仕事もしないで宴会だけ”と思われてしまうので、これから少し仕事の話をしてしまおう。

9月6日、手作業でタイピングトレイ250枚を作製、他の試薬の調製も行った。日本でのトレイ作りは、私がHLAをはじめた6年前には既に自動化されていたので、日本でも余り経験のない作業である。またこの夜、黒竜江省衛生局による歓迎会が催され、連日連夜の中国式乾杯で潰れそうになった（またまた酒の話になってしまうので仕事の話に戻りましょう）

9月7日から下記のクールで5回、合計173人のタイピングを行った。

1日目、4人の採血班で片道約4時間かけ採血に出かける。中国東北地方は今年の日本とは逆に雨が多く、道路が冠水している事もあった。そのため現地付近の道路では自動車を通れず、馬を借りて目的地に向かうという、日本では考えられない事もあった。

2日目、前日に採取した血液から比重法によるリンパ球の分離を行い、Class Iのタイピングを血清学的方法で実施、さらにClass IIタイピング用のDNAの抽出を行う。そして私は1人寂しくホテルに戻り、スコアの書き込まれたマスターシートを眺め、リアサインを行う。



photo-2 ハルビン血液センターにて

今回調査した結果は、Class IIのDNAタイピングが終了後、発表したいと思いますので、それまで楽しみに待っていて下さい。

\*郷愁にかられる天安門広場にて

\*（最後の日、北京で市内観光）

こうして長かったようで短かった中国の生活も終わろうとしていた。夕食の時間にはまだ早かったので、天安門広場で時間を潰していると、西の空では荘厳な日没が始まろうとしていた。

彼方の空が茜色に燃え、それが雲に反射して七色に光り輝いていた。一日たりとも私を心細い思いにさせなかった中国人のホスピタリティーに感謝し、中国での出来事（トラブル）を振り返り、日本に残してきた家族は寂しい思いをしているだろうなどの思いに耽っていると、もう太陽は西に没して、広大な広場に夜が訪れようとしていた。

さっ、そろそろベキングダックを食べに行こう、...

追記 実際は大変苦勞の多い海外調査であったが、編集長の意向により“とにかくおもしろく”との原稿依頼であったため、今回は心に残った楽しい出来事を中心に綴った事を付け加えておきます。

答、徳永先生と右隣の私、2人だけ。他の人は皆中国人です。顔だけでは区別出来ませんね！



photo-3 日没間近の天安門広場にて

## ☆ 新刊紹介 ☆



十字猛夫著「骨髓バンク・「一人のために」から「みんなのために」へ」（中公新書）

10年以上も前に「骨髓バンク」の構想をもった著者が、東大教授退官と日本の骨髓バンク成立を記念して著作した。骨髓、造血、骨髓移植、

骨髓バンクの成立を市民向けにわかりやすく解説したもの。HLA学者らしくHLAの役割やHLAの歴史についても60ページを割いて述べている。HLA初心者必読、中級者にも役に立つ。ベテランには頭の整理にどうぞ

（1994年12月20日発行）

## ”ダイナミック・ラボラトリー”

東海大学・医学部・遺伝情報・猪子ラボ

このコーナーでは毎回HLAの分野で活躍の目覚ましいラボ、ユニークな研究をなさっているラボをご紹介させていただいております。

第2回目はお部屋を模様替えされ、更なる発展を期する！といった感じの東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門教授の猪子英俊先生のお部屋をお訪ねした。もよりの駅は小田急線東海大学前、壁を塗り変えたばかりの教授室と研究室はとても明るく、前途洋々といった感じがした。

真新しい絨緞敷の教授室で猪子先生にお話しを伺った。



photo-1 猪子教授

べ) そもそも猪子先生がHLAに手を染められたのはいつ頃ですか？

猪) 1982年頃まで、慶応大学の渡辺格先生のところでは昆虫の行動遺伝学について研究していた。実際にはカイコを用いて、その行動遺伝学を研究していた。「何故カイコか？」というカイコは日本独特のものだから。そのころ格先生から、厚生省難病研究班から研究費が出るので、「HLAの研究」をやってみないか、といわれた。ほくとしても、最終的には人間の遺伝子がやりたかったし、HLAにはどうして多型性が出てくるのか？多型性にはどんな意味があるのか？といったことに興味があったので、丁度組み換えDNAの技術が確立されてきたこと

もあり、SSOを用いてやることにした。83年に格先生が定年退職され、別のテーマを持った教授が来られたので、お互いの幸せのために教室を出た所を東海大の辻先生が拾ってくれた。84年慶応大から5人が東海大に移り、僕と、安藤先生が辻先生の所へ、他の3人は別のテーマの所へ分かれた。2年前に辻先生から独立し、この11月から部屋も別々になった。場所は今までの所を改装して、はくらが入り、辻先生は3Fに移られた。



photo-2 河田さん

べ) 東海大での初めてのお仕事は？

猪) 最初にやったのは、HLAの遺伝子を取ること、4,000kbの遺伝子配列からHLAの400万個の塩基配列を決定するというプロジェクトを3~4人で始めた。今もまだやっています。現在世界で遺伝子としては40個判かっている。その中20個は外国で見つけられ、20個は我々のオリジナルで僕らが見つけた。我々の仕事は潜んでいる遺伝子を見つけること。僕らはこれを

「遺伝子の森を歩く！」と言っている。

べ) 今までのご研究で、一番思い出に残っておられるのはどんなことですか？

猪) やはり東海大へ移った当初、遺伝子クローンを見つけていた時、競争が激しく、苦しかったけれど充実した日々だった。毎日新しいデータが出て、それは興奮する日々だった。



photo-3 石原さん,山形さん

- ベ) 毎日ですか?それはすごいことですね。  
 猪) そうですね、ここは、そういう分野なんですよ。  
 それとSSOがメインの時にSSOは皆がやっておもしろくないので、PCR-RFLP法について初めて発表した時、論文をいくつも出したのだけれど、それについてレフリーが次々にイチャモンをつけてきた。おもしろくないので、また必死に反論の論文を書いた。結局世の中に認められるのに1~2年かかった。  
 ベ) 現在、こちらのラボには何人いらっしゃいますか?  
 猪) 全部で40人位います。そのうちHLA専任は、12~13人位と少数精鋭です。  
 ベ) 12人もいらっしゃると他のラボから羨ましがられるのではないですか?  
 猪) そうですか?それでも少ないと思っています。



photo-4 成瀬さん,鍵谷さん

- ベ) それぞれどんなご研究をなさっていますか?  
 猪) (1) 1991年にヒトゲノム計画が出来て

ヒトの疾患、ヒトの発生・分化との関連性を調べています。

HLAのタイピング、これはルーチンではなく、疾患感受性などの研究のためのものです。

(2) ヒトの抗体を作るプロジェクト

現在はエイズの抗体をウイルスに作らせているが、将来的にはHLAの抗体を作りたい。HLAの抗体というは何百種類もあるので、遠い将来になるけれど・・・

- (3) ミミズに似た線虫を使って老化や寿命の研究をしている。ネズミだと2年位かかる実験系が線虫だと寿命が1週間なので、短期間で出来る。線虫とヒトは動物の進化からすると随分離れているのに、遺伝子的にはかなり良く似ていて、機能的にヒトに相当する遺伝子があるので、例えば、短命どうし、長命どうし、を掛け合わせ、その遺伝子をとってきて、何が寿命を決定しているか、を調べている。

(4) 発生工学

ジーンターゲットイングマウスを用いて遺伝子機能を探る。塩基配列と、体の機能(表現型)にどんな関係があるか、を探索している。例えば、マウスの遺伝子のある部分を壊すことによって、マウスの表現型にどんな不都合が起こってくるか、を覗いています。



photo-5 新藤さん,安藤さん

- ベ) ラボの皆さんはどのような雰囲気でお仕事をなさっていますか?

猪) 「遊んでますよ、みんな」

そう言えば毎年シルクロードにも行くよ。少数民族のHLAを調べている。

例えばシルクロードに沿ってHLA-B51の伝播と併に日本へペーチエット病が流入した。

HLAを調べることで、日本人のルーツ、疾患のルーツを探れる。

とにかく僕は、最終的にはヒトの遺伝子に興味がある。ヒトの行動とか、記憶、学習といったものが、どんなものによって規定されているか？といったことを解明するのが、目的！

例えば、ある人の前に2本の道があった時、どちらの道を選ぶか？とか、1人の男の目の前に2人の女性が現われた時、どちらを選ぶか？といったことが、DNAを調べることで、分かるといいな。

べ) わあ、現在心理テストで行われているようなことが、DNAでわかってしまうというのは、私達にとっても夢なので、是非解明

して下さい。

今日は色々とお話しをどうも有難うございました。



photo-6 そびえ立つ東海大学病院

\*研究室の皆様、お引越しの忙しい最中に取材に応じて下さり、有難うございました。