

# 特集 Flow PRA

## 臓器移植予後に影響を与えるリンパ球交叉試験（クロスマッチ）と PRA(Panel reactive antibody) 検査の三つの要因

－ 移植検査に約四半世紀携わって －

兵庫県立西宮病院・腎移植センター 橋本 光男

移植検査センターの検査に従事する我々にとって、方法論的にもまた検査そのものの意義についても諸家の一致が得られていない検査がある。それはリンパ球交叉試験（クロスマッチ）とPRA(Panel-reactive antibody、既存抗体)検査である。クロスマッチは生体腎移植の提供者或いは献腎移植の受者を最終的に決定するための最も重要な検査の一つである。しかし、ステロイド等の薬剤を長期投与されている献腎提供者から、純粋で細胞状態の良好なリンパ球を分離することが困難な場合があり、判定時に頭を悩ませるケースが多々ある。一方、PRA検査は移植受者の免疫能を知るための一つの指標となる検査であるが、検査に用いるパネルセルの確保が難しく、

結果が出るのに長期の日数が必要である。さらに、検査の意義についても移植予後との相関があるという報告もあれば、逆に移植成績に影響しないとの報告もあり、検査に従事している我々にとっては無力感に陥る時がしばしばある。我が国においても脳死移植が普及し始め、実際にクロスマッチ検査の結果で移植候補者が最終決定されている現状において、臓器移植の成否の重要な要因の一つである感作抗体を検出するこれらの検査を、今までに報告されたデータをもとにもう一度見直して問題点を明らかにする必要があると考えられる。そこで、今までに我々が行ってきた検査で遭遇した三つの問題点、一つは、提供者に特異的な低力価の抗体、二つは、提供者に

反応しない非特異的な抗体、そして最後はそれらの抗体の特異性について臨床経過或いは結果と照らし合わせて考察してみたい。

検査項目	血清	標的細胞	反応時間	反応温度
[1] PBL	患者血清	提供者 PBL	1時間 + 2時間	室温
[2] Bw	患者血清	提供者 B cells	1時間 + 2時間	37℃ + 室温
[3] Bc	患者血清	提供者 B cells	1時間 + 2時間	4℃ + 室温
[4] Tw	患者血清	提供者 T cells	1時間 + 2時間	37℃ + 室温

表(1) LCT法によるリンパ球交叉試験

パターン	PBL	Bw	Bc	Tw	結果	移植
I	-	-	-	-	陰性	可
II	-	+	+	-	クラスII抗体、wkクラスI抗体、自己抗体	可/不可
III	-	-	+	-	冷式抗体(IgM)?	可
IV	-	-	-	+	非HLA抗体?	可
V	+	+	+	+	クラスI抗体、クラスII抗体(?)	不可

表(2) LCT法の反応パターンと評価

急性拒絶反応に陥った症例の悔やまれるクロスマッチ検査

私が県立西宮病院でHLA検査に関わっておおよそ四半世紀が過ぎようとしている。その間

には幾多の挫折と失望を味わってきたが、そのなかでも未だに鮮明に記憶している献腎移植症例がある(腎移植に関わるグループは死体腎移植と呼んでいたが、その言葉は腎移植グループの奢りと、提供者及び受者に対して無神経すぎると指摘して下さったのが佐治編集長であった)。それは1983年2月に当施設で行われた8例目の献腎移植の術前クロスマッチ検査である。腎臓を含めた臓器移植検査は骨髄移植のそれとは異なり、前もって移植希望受者のHLA検査(タイピング)を行い、希望受者のタイピング結果が臓器移植ネットワーク(当時は国立佐倉病院)に登録されるシステムになっている。臓器提供の連絡が入ると、我々は提供者のHLAタイピング等を行い、その結果をネットワークに報告する。ネットワークは、移植希望受者のリストから受者選択基準に則って移植候補者を約5-10名程リストアップして、我々の検査センターに連絡する。それらの候補者から最終的に移植受者を選ぶために、検査センターは候補者と提供者間の術前クロスマッチを行い、候補者の血清中に提供者のHLA抗原に対する抗体が含まれているか否かを検査するのである。当施設で実施している術前クロスマッチの検査項目及びそれらの反応パターンと、移植実施の

是非を表(1)、(2)に示した。腎移植におけるクロスマッチの重要性は1966年、Kissmeyer-Nielsenが提供者に特異的な感作抗体が超急性拒絶反応(hyperacute rejection)を引き起こすことを報告したのを契機に、1970年代に入ると検査項目[1]が陽性の場合には移植禁忌となった(1)。この反応では血管吻合後、約1時間以内に高度の好中球浸潤が起こり、血管は血栓で閉塞し移植腎は不可逆的な壊死に陥るといわれている。検査項目[2]及び[3]のB細胞陽性クロスマッチについては、Ahern等は促進性拒絶反応(accelerated rejection)を誘因すると報告したが、Ettenger等は移植成績の良好な7例のB細胞クロスマッチ陽性症例を、さらにIwaki等は、Bc陽性症例は陰性症例よりも移植予後は良好であると報告している(2, 3, 4)。このようにB細胞クロスマッチ陽性症例と移植予後との関連が明確でないために、移植是非についての諸家の合意は得られていない。我が国においてもB細胞クロスマッチが陽性であっても移植を実施している施設もあれば、我々の施設のように移植を断念する施設もある。そこで話題を前述した私の経験談に戻すが、献腎移植検査も8例目ともなると緊張感も薄れ、余裕をもってクロスマッチ検査を行った。第1候補者の

結果はPBL:0%、Bw:0%、Bc:44%、Tw:0%であったので、当然の如くその人が受者に選ばれるのだと思いながら帰途についた(表3)。この結果を踏まえて第一候補者に移植が実施されたが(症例CD-8)、翌日から移植センター内に重苦しい雰囲気は漂い、気弱な私にはとても耐えられない状況に陥っていった。というのも移植後2日目のレノグラムにて、腎血流は不良で、腎実質内に顕著な出血を認め、non function patternと診断されたからである。組織所見においても腎動脈炎による梗塞が起きているとのことであった。その後も無

## Tissue typing report

To Dr. ○○ ○○ (院内・泌尿器科)

02.06.1983

	1	2	3	4	5
Typ.No	820877	810577	810665	820534	?
Name	○○ ○○	○○ ○○	○○ ○○	○○ ○○	○○ ○○
ABO,Rh	B(+)	B(+)	B(+)	B(+)	B(+)
Subject	献腎提供者	候補者(1)	候補者(2)	候補者(3)	候補者(4)
HLA - A	11, 33	24, 31	11, 24	11, 31	?
HLA - B	44, 51	35, 52	51, 60	54, 62	?
HLA - C	-, -	4, -	-, -	1, -	?
HLA -DR	4, -	2, 4	NT	2, 4	?
HLA -MT	3, 4	1, 3, 4	NT	1, 3, 4	?
XM PBL		0 %	0 %	0 %	0 %
Bw		0 %	0 %	0 %	0 %
Bc		44 %	67 %	43 %	0 %
Tw		0 %	0 %	0 %	0 %

表(3) 自信をもって提出したHLA検査報告書

尿状態が続き、透析から離脱出来ぬままに移植後わずか10日目で腎摘出を行わざるを得なくなった。移植された腎臓は一度もその機能を果たすことなく摘出され、非常にミゼラブルな結末を迎えたのであった。何か居たたまれない気持ちでクロスマッチの再検査を行ってみたが、報告した通りの結果であった。

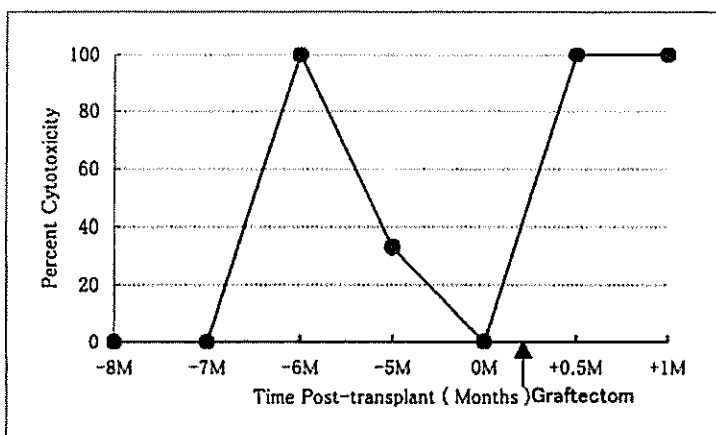
### PRA (Panel- reactive antibody, 前感作抗体) 検査の導入

PRA 検査は、Terasaki 等が唱えている移植希望者の免疫能を調べる一つの指標で、方法はクロスマッチ検査に準ずる。提供者のリンパ球の代わりに HLA 型が偏っていない 50 - 100 人ほどのリンパ球 (パネルセル)

に当て、80%以上のパネルセルに対して陽性反応を示す場合を PRA 80%とし、高度感作患者 (hypersensitized patient) と表現している。腎移植希望者は特に頻回輸血や移植により HLA 抗原に感作される場合が多く、Iwaki 等は 1980 年以降に UCLA で実施された 10,820 例の移植症例のうち、男性で 15%、女性では 40%が、輸血及び妊娠が原因で、移植前に既に HLA 抗原に感作されていると報告している(5)。しかし、抗体産生等の免疫能には個人差があり、例えばわずか1本の輸血で抗体ができる人もいれば (high responder)、頻回輸血を受けても抗体が産生されない人もいる (low responder)。そこで、Terasaki 等は 5 単位以上の輸血を受けた 493 症例を、PRA 10%以下群(non responder)と PRA 10%以上群

採血日	陽性率(%)	SI(%)	特異性	++	+-	-+	--	Total	R	SI(%)
06.30.82	16	63	B7	5	0	3	43	51	0.76	63
07.05.82	24	75	A26+B7	11	1	0	39	51	0.95	75
08.03.82	81	100	A11	7	0	22	7	36	0.24	100
			A2+11+26+B7	28	0	1	7	36	0.92	100
09.14.82	80	41	A11	6	0	38	7	51	0.15	33
			A2+11+26+B7	44	0	0	7	51	1.00	41
02.06.83	30	17	B7+A26	16	6	2	36	60	0.71	17
02.07.83	移植実施									
02.15.83	腎摘出									
02.26.83	83	100	A11	4	0	46	10	60	0.12	100
			A2+11+26+B7	46	0	4	10	60	0.81	100
03.14.83	93	100	A11	10	0	30	3	43	0.15	100
			A2+11+26+B7	40	0	0	3	43	1.00	100

表(4) 症例 CD-8のPRA検査及び特異性検討



図(1) 症例 CD-8血清中のHLA-A11抗体の推移

(responder)に分けて両群の腎生着率を検討した。結果は responder 群の移植予後は不良で、non responder 群のそれは良好であることを報告している(6)。しかし、必ずしも相関を認めないと報告も多く、クロスマッチ検査の Bcell 陽性症例同様、移植予後との関連性は結論が得られていない。CD-8 症例となった患者は 1981 年に家族からの生体腎移植希望で当院を受診されたが、クロスマッチ検査の結果は、表(1)の PBL 陽性であった

ので移植は延期されることになった。その後、定期的にクロスマッチを行ったが、提供予定者に対する抗体が消失しなかったので献腎移植に切換えられたのであった。従って、これらの血清についても PRA 検査を行い、抗体の特異性を検討することにした。その結果を表(4)に示したが、非常に衝撃的な事実が判明した。この候補者は1982年6月まではHLA-B7に対する抗体のみを保持していたが、8月になるとB7以外にA2、A26、さらには献腎移植提供者の持ち込み抗原であるA11に対する抗体も保持するようになっていたのであった。SI値も上昇して100%であった。その後、A2とA11に対する抗体の力価は減少し、献腎移植のクロスマッチを行った1983年2月6日の血清では、B7とA26に反応する抗体は認められたが、A2とA11に反応する抗体は消失していた。移植後これら全ての抗体が再度出現し、SI値も100%に上昇した。図(1)は問題のA11に反応する抗体の力価の推移を表しているが、移植半年前に一過性に出現したA11抗体は、移植前日に行ったクロスマッチ検査の時点では消失していたのである。移植後にA11抗体が再び認められていることから、2次移植免疫反応による急性拒絶反応を引き起こしたものと推測される。LCT法よりもさらに感度が良い別の方法で測定できればと恨めしく思い、そして何もこの時期に消失しなくてもと呆然とした気持ちでデータを恨めしく見つめていたことを覚えている。Cook等は移植後1ヶ月以内の腎機能喪失症例の約半数は、Flow cytometryを用いたクロスマッチ(FCXM)陽性症例であることから、前感作されている

移植受者のクロスマッチにはFCXM法を用いることを奨励している(7)。LCT法よりも50-200倍も感度が良好なこの方法でクロスマッチを実施していれば、A11抗体を検出できていたかもしれない等と愚痴の一つでもこぼしてみたいが後の祭りである。LCT法による直前のクロスマッチ検査だけでは、受者の前感作状態を完全に把握することは出来ないと思われた。提供者に反応する低力価の抗体を検出するためには、経時的に受者から採血した血清のPRA検査を行い、抗体の推移を把握する必要があると痛感した症例であった。その後、この症例を契機に腎移植希望者のPRA用トレイを作製して、タイピング依頼検査がある時には必ずこれらのPRA用トレイも同時に検査することになっている。幸い、西宮病院は開設以来からの移植実施受者の血清を保存しておくことが決められていたので、今までに移植された受者のPRA検査を実施することは可能であった。

#### PRA検査におけるB cell陽性症例は腎移植予後不良?

前述したようにPRA検査の臨床的な意義については明確な結論は未だに得られていない。感作条件や抗体の検出感度、或いはどの抗原に向けられた抗体であるかの相違が、種々の報告を生む原因になっていると推定される。そこで、1980年から1999年2月までに当施設で生体腎移植を行った160例の直前クロスマッチ陰性症例を対象に、PRAと腎移植成績のretrospectiveな解析を行ってみた。方法はLCT法を用いたが、この方法で陽性

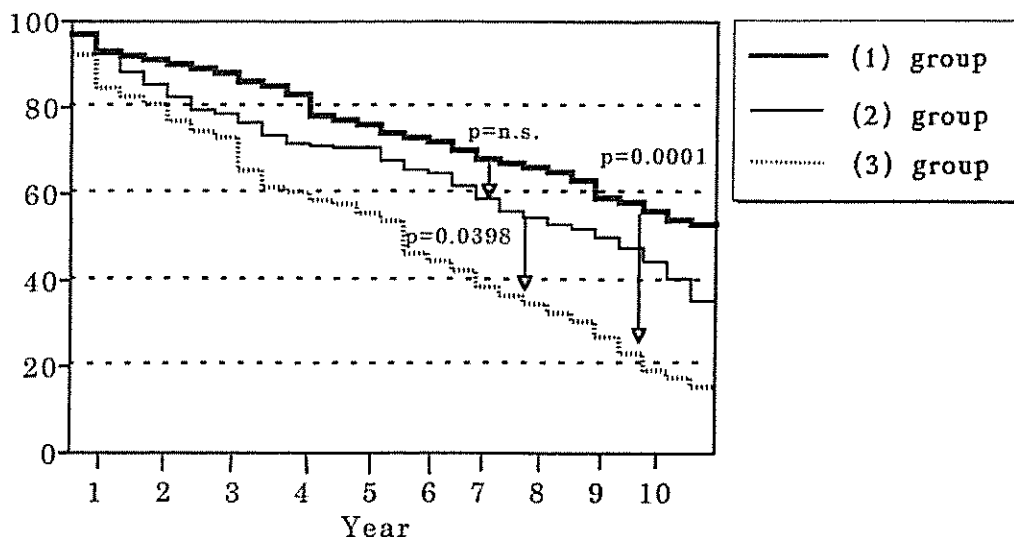


Fig (2) Effect of Panel reactive antibody ( PRA ) on the outcome of the kidney grafts

PRA群	HLA不適合度	HLA-A (%)	HLA-B (%)	HLA-DR (%)	A+B+DR (%)
(1)群	0	50 (50.0)	23 (23.0)	29 (29.0)	13 (13.0)
	≥1	50 (50.0)	77 (77.0)	71 (71.0)	87 (87.0)
(2)群	0	18 (52.9)	11 (32.4)	13 (38.2)	5 (14.7)
	≥1	16 (47.1)	23 (67.6)	21 (61.8)	29 (85.3)
(3)群	0	12 (46.2)	11 (42.3)	14 (53.8)	10 (38.5)
	≥1	14 (53.8)	15 (57.7)	12 (46.2)	16 (61.5)

表(5) PRA各群のHLA不適合度の分布

HLA antibodies		N (%)	rejected (%)
class I	class II		
-	-	19 (32.2)	5 (26.3)
+	-	6 (10.2)	0 (0)
-	+	22 (37.3)	15 (68.2)
+	+	12 (20.3)	7 (58.3)
total		59	27

表(6) Flow PRAで検出されたHLA抗体が腎移植予後に与える影響

HLA antibodies	N	rejected (%)
(-)	19	5 26.3
class I (+)	18	7 38.8
class II (+)	34	22 64.7

表(7) Flow PRAで検出されたHLA抗体が腎移植予後に与える影響

となった症例については、Flow PRA キット(One Lambda, Inc.)でHLAクラスI及びクラスII抗体の有無を検討した。今回検討した160症例全体の1年、5年、10年の腎移植生着率はそれぞれ、86.3%、66.3%、43.1%で、PRAのT細胞陽性は34症例(21.3%)、B細胞陽性は51症例(31.9%)であった。各々の症例の血清をLCT法で検討したが、パネルセルとして用いたランダムな150人のT細胞と、50人のB細胞にそれぞれ2%、4%以上反応する症例を陽性例とした。そして、LCT法によるT及びB細胞の反応パターンより、この160症例を(1)群:T細胞陰性、B細胞陰性、(2)群:T細胞陽性、そして(3)群:B細胞陽性、T細胞陰性の3群に分類し、これらの各群の腎移植生着率をKaplan-

Meier法で検討した。結果は図(2)に示したように、各群の5年生着率は、(1)群で74.0%、(2)群で67.6%、そして(3)群は53.8%であった。さらに、それぞれの群の10年生着率をみると、58.0%、47.5%、23.1%であり、(1)群と(3)群、及び(2)群と(3)群の間にそれぞれ統計的有意差を

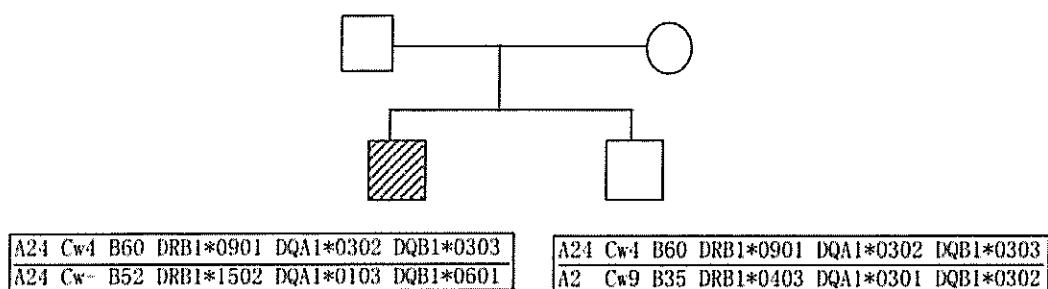
認めた。これらの結果は、当初の予想に反して、(3)群のPRAのB細胞陽性症例は長期の移植予後が不良であることを強く示唆している。しかし、この結果はPRAに因るのではなく、各群のHLA適合度の差を反映している可能性も考えられたので、各群ごとのHLA適合度を検討した(表5)。今回検討した160症例のうち、HLA-A、B、DR適合症例は28例含まれているが、そのうちの40%弱の10例が(3)群に含まれていた。一方、(1)、(2)群に含まれる適合症例はそれぞれ、13例(13.0%)、5例(14.7%)であるので、(3)群にHLA適合症例が偏っていることがわかる。従って、B細胞陽性症例の腎移植予後不良はHLA適合度の影響ではなく、適合度が良くてもB細胞陽性症例は移植予後が不良である結果が得られた。それではB細胞に反応する抗体とはいったい何なのであろうか。クロスマッチの段で述べたように、B細胞に反応する感作抗体は拒絶反応を誘因するといった報告もあれば、また逆に腎移植成績を良好にするとの報告もある。Cross、Ting等は自己抗体によるクロスマッチ陽性症例は移植予後に影響しないことを報告し、さらにMorris等はB細胞に反応する抗体にはheterogeneityがあり、これらの抗体の特異性を明らかにすることが、移植予後に重要であることを強調している(8、9、10)。そこで今回LCT法で陽性となった60症例のうちの59症例について、感作抗体の特異性を明らかにするための一手段として、HLA抗体の有無をFlow PRAキットで検討した。方法を簡単に説明すると、被検血清とHLAクラスI或いはクラスII抗原を結合させたFlow PRA beadsを反応させ、蛍光色素(FITC)標識の2次抗体(抗ヒトIgG)を加えて、ビーズに結合している抗体をFlow cytometryで検出する間接蛍光抗体法である。測定結果は、陰性コントロールから10%シフト未満を陰性、それ以上のシフトを陽性と判定した。結果を表(6)に

示したが、検討した 59 例の LCT 法陽性症例のうち 19 例は HLA 抗体陰性であった。従って、これらの 19 症例の LCT 法による陽性反応は、非 HLA 抗体或いは IgM 抗体によるものと考えられた。19 例の HLA 抗体陰性症例のうち、腎摘出を行ったのは 5 症例で、摘出率は 26.3% であった。一方、他の 40 例のうち HLA クラス I 抗体陽性が 6 例、クラス II 抗体陽性が 22 例、そして残る 12 例がクラス I 及びクラス II 抗体陽性で、それぞれの腎摘出症例と摘出率は 0 例(0%)、15 例(68.2%)、7 例(58.3%) であった。抗体種類別に腎摘出率を比較すると、クラス I 抗体陽性が 18 例で、その 7 例 ( 38.8% )が腎摘出を行ったのに対し、クラス II 抗体陽性例は 34 例でそのうち 64.7%に当たる 22 例が摘出症例であった (表 7)。症例数が少ないので明確な結論を述べることは出来ないが、少なくとも HLA クラス II 抗体陽性症例は、クラス I 抗体陽性例及び HLA 抗体陰性症例よりも移植予後が不良である傾向にあると考えられる。何故、腎提供者に反応しない HLA クラス II 抗体が移植予後に影響を与えるのであろうか。一つの可能性として、HLA クラス II 抗体陽性受者は、既に拒絶反応に関与する T 細胞或いは B 細胞を刺激する種々のサイトカインを分泌している状態にあり、移植後にこれらのサイトカインが作用して拒絶反応を誘導しているのかも知れない (11)。さらに症例を増やして、今回導き出された腎移植における HLA クラス II 抗体の意義を解明していきたい。我が国では、1964 年に最初の腎移植が施行されて以来約 36 年の年月が経ち、1994 年までの統計では 9,801 例の移植が実施されている(12)。今後はこれらの既移植者の再移植症例が増

えていくことが予測され、ますますクロスマッチ及び PRA 検査の意義が問われることになる。我々の施設でも再移植を希望する既移植者が年々増えており、クロスマッチ或いは PRA 検査で陽性となるケースが多くなっている。それらの症例のなかで、LCT 法によるクロスマッチが陰性、FCXM 法が陽性となった症例について、クロスマッチ及び PRA 検査で検出された抗体の推移を臨床経過に照らして確認してみよう。

### 二重濾過血漿交換( DFPP )により拒絶反応を乗り越えた症例

この症例は 1986 年に兵庫医大で、HLA-DR ミスマッチ 0 (但し HLA-A31、B61 のミスマッチ) の献腎提供者から移植を受けたが、3 年後の 1989 年に腎摘出を行わざるを得なかった再移植希望者である。その後、1999 年に、兄弟からの生体腎移植を希望されて兵庫医大を再受診された。クロスマッチ検査の結果は、LCT 法のうち AHG 法(Anti-human globulin test )による弱陽性以外は陰性であったが、Flow cytometry を用いたクロスマッチ (FCXM 法) では FCM-B で 184.3 の弱陽性、FCM-T が 32.8 の陽性を呈していた。FCM-B、FCM-T は、CD19 陽性細胞、或いは CD3 陽性細胞に結合する IgG 抗体量を、陰性コントロールからどれだけシフトしているかで表している。LCT 法による PRA 検査の結果は、PRA-B、-T がそれぞれ、29%、14%であり、Flow PRA についても、クラス I 抗体が 86.3%、クラス II 抗体が 59.7%シフトで陽性であった (図 3)。この抗体の特異性は、LCT 法の PRA 検査より HLA-A31 の抗体を同定す



#### 抗体検査

Date	PBL	AHG	DTT	Bw	Bc	Tw	FCM-B	FCM-T	PRA-B	SI(%)	特異性	PRA-T	SI(%)	特異性	Flow I	Flow II
07.06.99	0	15	0	0	0	0	184.3	32.8	29	71	?	14	82	A31	86.3	59.7
07.17.20	0	20	0	0	0	0	723.4	47.0	17	56	?	16	100	A31	34.1	77.2
07.28.20	0	0	0	0	0	0	437.1	35.2	NT	NT		14	100	A31	34.1	77.2
07.31.20	0	0	0	0	0	0	184.3	37.9	NT	NT		18	75	A31	57.6	54.1

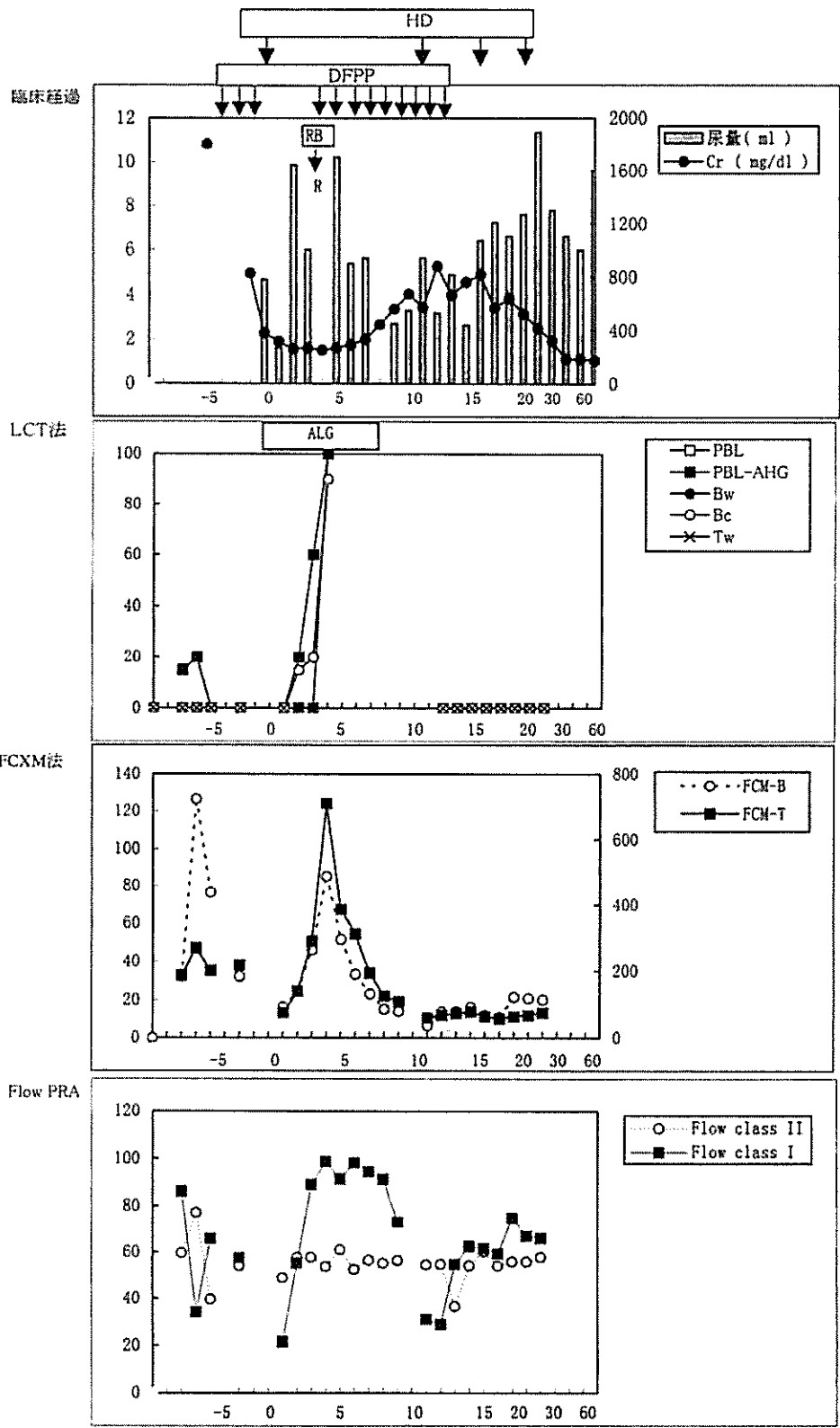
図(3) 家系図と術前の抗体検査

ることが出来たが、B cell に反応している抗体の特異性を同定することは出来なかった。しかし、Flow PRA の結果より少なくとも HLA クラス II 抗体が含まれていることは明らかである。以上の結果より、LCT 法では陰性であるが、FCXM 法による FCM-T が陽性であり、且つ Flow PRA の HLA クラス I 及びクラス II 抗体も陽性であることから、この症例は、A31 の抗体以外に提供者に反応する HLA クラス I 抗体も含んでいると結論した。そして、確信をもってこのクロスマッチの結果を移植医に報告することができたが、家庭の事情により移植を延期する旨の連絡を受けたのであった。それから 1 年後に再受診されたので再検査を行ったが、前回と同様の結果であった。この提供者からの移植は無理ではと心配していたところ、それから 2 週間後の 7 月 28 日の検査では AHG 法も陰性になったのである。通常ではこの段階で移植が実施されるのであるが、FCXM 法と Flow PRA が依然として陽性であることから、DFPP を行い HLA 抗体を除去してから移植を実施する所が下されたのである。兵庫医大の野島先生の御厚意により、この症例の移植後の臨床経過と抗体の推移を提供して頂いたので紹介する(図 4)。移植後 1 日目は超急性拒絶反応を引き起こすこともなく、尿量も 150ml/hr、クレアチニン (CR) も 1.89 に減少して順調な経過であった。拒絶反応の指標としてクロスマッチを行ったが、LCT 法は全て陰性、FCXM 法では弱陽性に低下していた (FCM-T : 13.3、FCM-B : 93.1)。Flow PRA 検査もクラス II 抗体は術前とほぼ同様の値を示していたが、クラス I 抗体は術前の 57.6% から 21.4% に減少していた。しかし、術後 2 日目から尿量が低下し、クロスマッチの LCT-AHG 法で 20%、FCXM 法及び PRA 検査の Flow PRA の値も上昇して、術前の状態と同様の結果になった。そこで、翌 3 日目から DFPP を再開するとともに、腎生検 (RB) を実施することになった。結果は、液性免疫による拒絶反応 (R) と診断された。その後、尿量低下と共に CR 値が上昇し始めたので、さらに DFPP を術後 9 日間繰り返すことになるのである。患者御本人及び野島先生をはじめとする移植医と、拒絶反応との戦いが繰り広げられたのであった。術後 3 日目から CR はさらに上昇し始め、13 日目には CR が 5.39 とピークに達しているところから、この移植後の約 2 週間が最も激しい戦いであったと推測することができる。その間の抗体検査の結果は、術後 4 日目になると LCT 法、FCXM 法によるクロスマッチ、さらには Flow PRA 検査の全項目で今までの最高値を示した。但し、LCT 法ではほぼ 100% の反応結果を示しているのは、これは抗体による反応ではなく、移植当日から

投与されている抗ヒト免疫グロブリン (ALG) の影響と考えられる。翌 5 日目の FCXM 法の結果は、CR はさらに上昇しているにも関わらず、FCM-T、FCM-B は共に減少し始めていた。しかし、Flow PRA の結果は 4 日目と同様の結果であった。その後、FCXM 法による FCM-T、FCM-B はさらに減少し、CR 値がピークとなった 13 日目には、それぞれ 12、80 前後の弱陽性にまで低下した。この時の LCT 法の結果は全て陰性であった。一方、Flow PRA のクラス I 抗体も、FCXM 法同様減少傾向にあったが、クラス II 抗体は移植前の一定レベルを維持していた。移植 2 週間目からの CR は漸進的に下降し初め、術後約 1 ヶ月で 1.95、2 ヶ月目で 1.13 と低下して安定した状態になり、免疫抑制剤、DFPP 等の効果により拒絶反応を乗り切ることができたのである。この臨床経過を見ると、患者さんはもちろん移植に携わった先生方の苦勞が実り、感無量であったのではないかと推測される。この間のクロスマッチ及び Flow PRA のクラス II 抗体は共に変動はなく、術後 13 日目のレベルを維持していたが、クラス I 抗体のみが若干上昇していた。この症例の臨床経過と抗体検査の結果をまとめてみると、拒絶反応の一つの指標となる CR の上昇に先立って、FCXM 法によるクロスマッチが陽性となっていることから、特に提供者の腎臓に向けられた HLA クラス I 抗体が産生されていると考えられる。その後、CR の上昇に反比例して FCM-T 及び FCM-B は減少しているのは、それらの抗体が腎臓に吸着したのか、それとも DFPP により除去されたためであろうか。Flow PRA によるクラス I 抗体の推移も FCXM 法と同様に上昇していたが、減少する時期が移植後 10 目と若干遅れていた。クラス II 抗体に関しては移植前のレベルを維持していた。これらの結果より、この症例の拒絶反応には HLA クラス I 抗体が関与していると考えられる。しかも、FCXM 法と Flow PRA の結果より、多種類の抗体がこの時期に産生されていると推定される。これらの抗体の特異性が明らかになれば、よりはっきりとした結論を得ることができよう。今後さらに検討して行く予定であるが、拒絶反応を乗り切るための方針を決定する一つのデータを臨床医に提供できたと確信している。

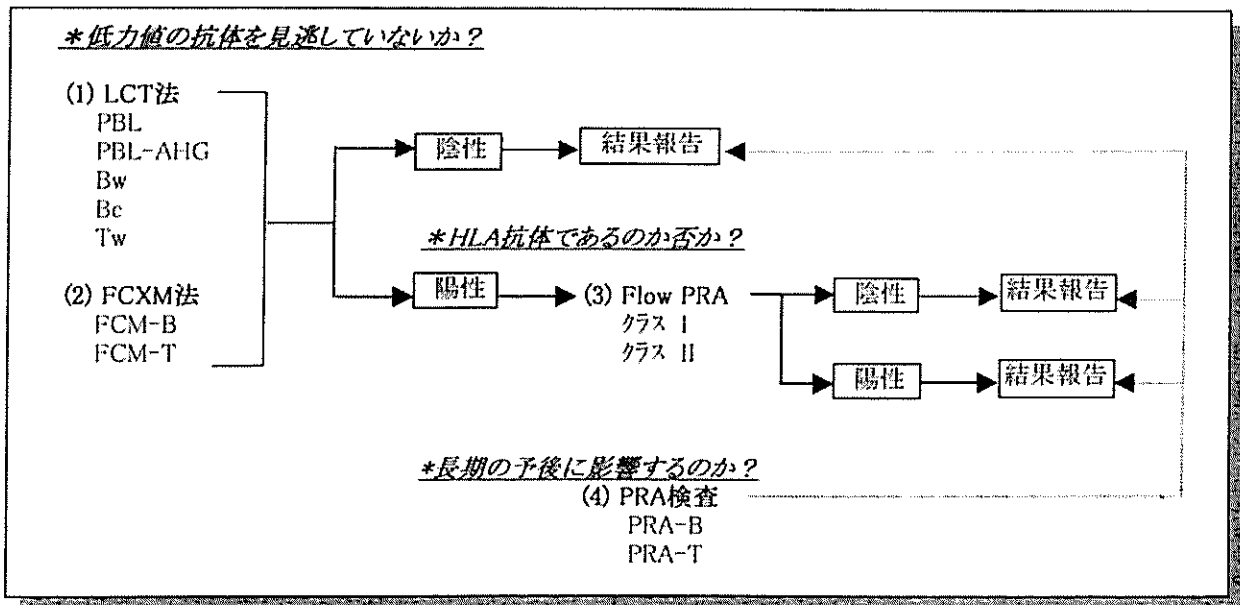
#### 最後に

移植検査を始めて約四半世紀が過ぎようとしている。その間には幾多の失望と挫折を味わってきた。その度、心に過ぎたのは、無償の行為で臓器を提供される提供者及びその御家族の方々であった。そして、これらの人々の善意に少しでも報いるためにも、移植医療に従事する



図(4) 血漿交換で拒絶反応を乗り越えた症例  
(兵庫医大・泌尿器科 野島道生先生の御厚意による)





図(5) 抗体検査の流れ

我々は、より質が高く、より正確な検査を目指さなければならぬと自省してきたのであった。幸いなことに私が従事してきたこの四半世紀は、血清学的方法の全盛期であったし、その後、遺伝子レベルでの検査が一般化された非常に幸運な時期であった。さらに、クロスマッチや PRA 検査も血清学的方法のみであったのが、Flow cytometry を用いた FCXM 法や Flow PRA 検査が開発され、定性的な検査だけではなく定量的に測定できる検査も可能になった時期でもあった。このような環境のもとで試行錯誤を繰り返しながらも、ようやく辿り着いたのが図5に示したような抗体検査の項目とその流れである。今まで述べてきた三つの要因、即ち ① 低力価の抗体を見逃さない、② 提供者に反応しない抗体の有無、③ 抗体の特異性を明らかにする、を特に重点において検討するようにしている。しかし、我々が実施しているこれらの検査は前述したような経験を積み重ねてきたもので、学問的にも体系化されていないし、臨床面においてもまだまだ不備な面が多々ある。今後、各方面の諸先生方にご協力して頂いて、移植医療に少しでも貢献できればと願いつつ筆を置く。

最後に、臨床データを提供して頂いた兵庫医科大学・泌尿器科 野島道生先生、県立西宮病院・腎移植センター 福西孝信先生に感謝いたします。

参考文献

- (1) Kissmeyer-Nielsen et. al. : Lancet 1966, 1: 662
- (2) Ahern, AT. et. al. : Transplantation 1982, 33: 103
- (3) Ettenger, RB. et. al. : Lancet 1976, 2: 56
- (4) Iwaki, Y. et. al. : Lancet 1978, 1: 1228
- (5) Iwaki, Y. et. al. : Clinical Transplants 1986 ed by Terasaki PI. 257, UCLA Tissue Typing Lab.
- (6) Terasaki, PI. et. al. : Clinical Transplants 1986 ed by Terasaki PI. 367, UCLA Tissue Typing Lab.
- (7) Cook, DJ., et.al. : Clin. Transplantation 1987, 1: 253
- (8) Cross, DE., et. al. : Transplantation 1976, 21: 307
- (9) Ting, A., et. al. : Tissue Antigens 1983, 21: 219
- (10) Morris, P.J., : Tissue Antigens 1981, 17: 7
- (11) Shoskes, DA., Immunology Today 1994, 15: 32
- (12) 日本移植学会 : 移植 1994, 30: 428

## 新しい HLA 抗体測定法と測定意義について

森 勝志<sup>1)</sup>、佐田正晴<sup>2)</sup>、宮田茂樹<sup>3)</sup>、米田孝司<sup>1)</sup>、片山善章<sup>1)</sup>、中谷武嗣<sup>4)</sup>

1) 国立循環器病センター・臨床検査部、2) 同・研究所実験治療開発部、3) 同・輸血管理部、  
4) 同・臓器移植部

### 1. はじめに

PRA (panel reactive antibodies) 検査とは白血球抗原 (HLA) が異なる複数の白血球 (パネル抗原) と血清 (抗体) を反応させ、その反応性より HLA 抗体を検出・同定する方法である。

HLA 抗体が産生される機会としては、妊娠や臓器移植、血小板輸血など自己の HLA とは異なるタイプの HLA が侵入した際に産生されることが知られている。すなわち異なる同種抗原が生体内に存在した際に生じた免疫反応 (生体防御反応) の証 (産物) である。HLA 関連の研究報告をみると疾患との関連性や DNA レベルでの多型性解析などが精力的に行われているようである。

一方 HLA 抗体についての報告は、腎臓移植を中心に、輸血を含めた移植医療関連が多くを占め、新たな報告が少ない。HLA 抗体に関する報告例が少ないことの原因としては測定法が煩雑である、疾患特異性という観点では抗原検査ほどの魅力が感じられない、などがあげられるであろう。確かに HLA 抗体の測定法として以前より行われているリンパ球細胞障害試験 (以下 LCT) は新鮮な白血球を用いるので有効期限が短く、操作が煩雑であるなど日常検査として行うには不都合な点が多い。また HLA 抗体は、異なる同種抗原が生体内に存在したからといって必ずしも産生される抗体ではなく、その産生機構には不明な点が多い。

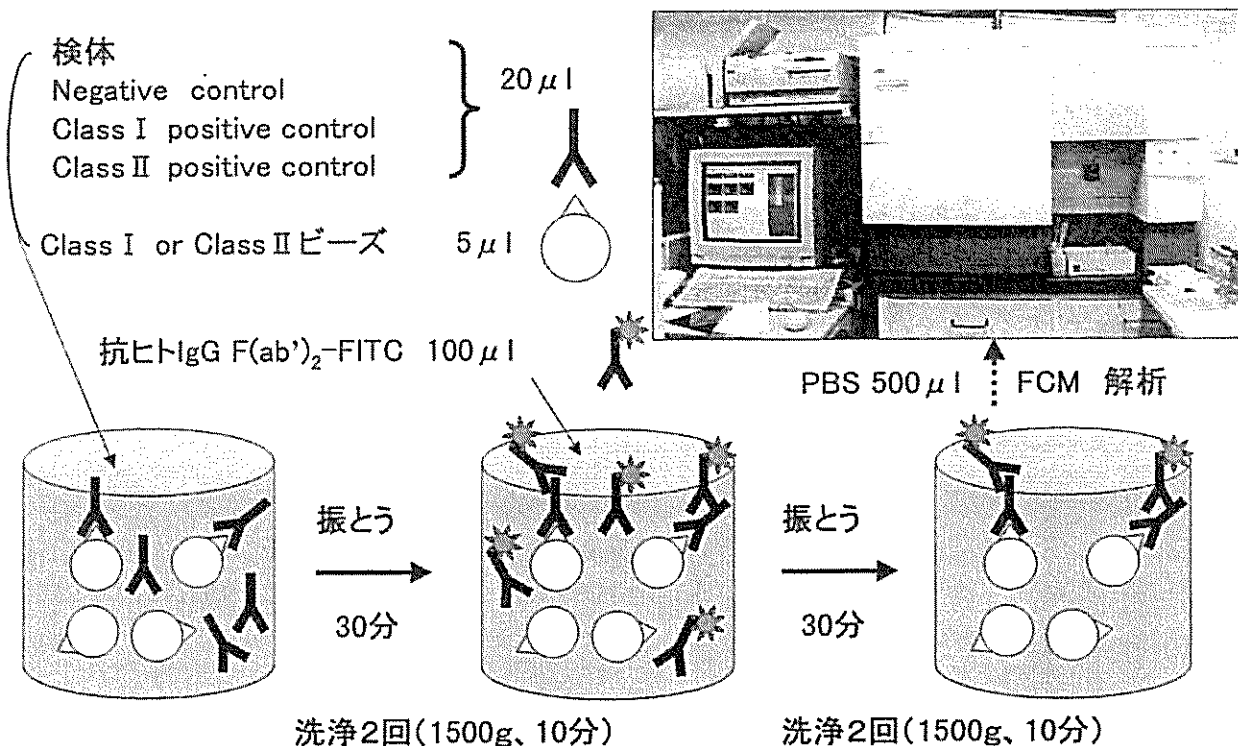


図1. Flow PRA Screening Testの測定原理

しかしながら移植臓器の運命や、移植患者の生命を左右しかねない HLA 抗体を保有しているか否かを把握することは非常に重要なことであるという認識は定着しており、また HLA 抗原に対する免疫応答が High responder であるか Low responder であるかの判別のためにも HLA 抗体の簡便な測定法の開発が望まれていた。

最近になり精製した HLA をマイクロビーズに結合させた PRA 測定試薬が開発された。

この測定試薬はビーズに結合した HLA 抗体をフローサイトメーター (FCM) を用いて検出する方法であり、非常に簡便で且つ再現性も良好なものである。本測定試薬を用いてわれわれが測定したデータについて紹介する。

2. 測定対象

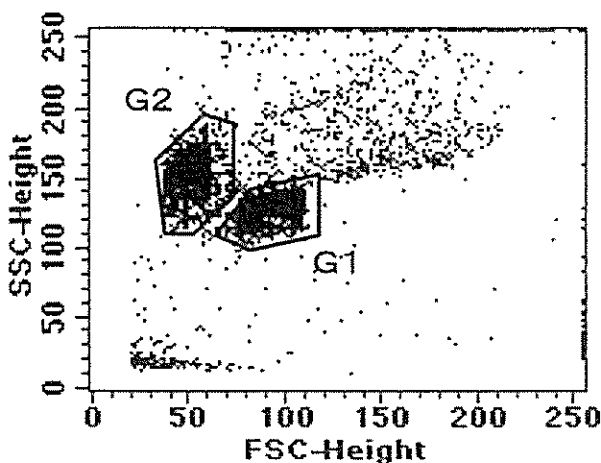
当センターは、心臓移植手術実施施設であり心臓移植待機患者および心臓移植実施患者 (国内・国外) の経過観察を行っている。また腎不全患者に対して血液透析用のアクセスとしての同種血管移植が行われており、これらの症例について HLA 抗体の保有率、経時変化を検討した。一方、日常業務的に輸血医療も行われているため血小板輸血前後での HLA 抗体産生の検討も行った。なお測定対象とした症例に対する輸血については全例白血球除去フィルターが使用された。

3. 測定方法

測定方法は、反作用チューブにクラス I ビーズ・クラス II ビーズをそれぞれ 5 $\mu$ l ずつ分注した後血清 20 $\mu$ l を加え、緩やかに振とうしながら 30 分室温にて反応させた。反応後洗浄し抗ヒト IgG-FITC ( $\times 100$ ) を 100 $\mu$ l 加え、緩やかに振とうしながら 30 分室温にて反応させた。反応後洗浄し PBS にて 500 $\mu$ l に再浮遊した反応後チューブを FCM にて測定した。測定機器は FACSCalibur (BD)、解析ソフトは CELLQuest (BD) を用い (図 1)、以下にはこれらを用いた解析手順を示す。

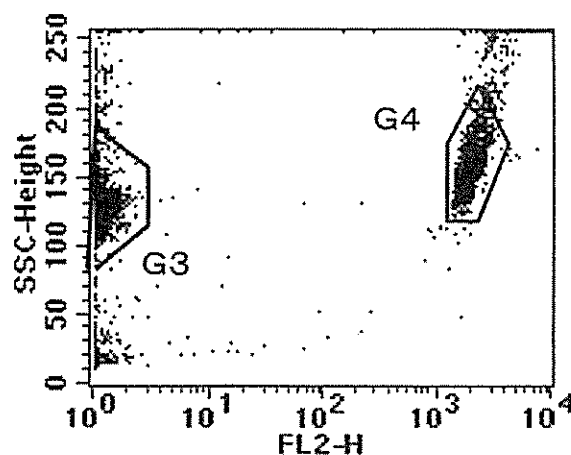
解析方法：はじめに機器の調整を行う。すなわち Detectors/Amps にて FSC の Amp Gain を 9.0、compensation にて FL1-%FL2 を 2.5 に設定する (いずれも検討済み)。反応後チューブを FCM に吸引 (G1 が 10000 個まで吸引するように設定) させると FSC/SSC の Dot Plot として図 2 のように独立した 2 つの集団が認められる。右側の集

団 (G1) はクラス I ビーズ、左側の集団 (G2) はクラス II ビーズであり、それぞれについて FL-1 ヒストグラムを作成し陰性コントロールから右にシフトした領域の % を陽性率として評価した。また別の方法としては、クラス I ビーズは未標識、クラス II ビーズは PE 標識されているので FL-2/SSC の Dot Plot を作成しても図 3



G1: クラス I ビーズの集団  
G2: クラス II ビーズの集団

図2. Flow PRA Screening Test のDot Plot



G3: クラス I ビーズの集団  
G4: クラス II ビーズの集団

図3. Flow PRA Screening Test のDot Plot

のように独立した2つの集団が認められる(左側の集団(G3)はクラスIビーズ、右側の集団(G4)はクラスIIビーズ)。以降それぞれについてFL-1ヒストグラムを作成し陰性コントロールから右にシフトした領域の%を陽性率として評価した。参考正常値は10%以下とした。

#### 4. 測定結果

①症例1. は血小板輸血後にHLA抗体が産生された症例についての経時変化。

血小板輸血後13日目にHLA抗体が検出された。以降陽性を持続するが51日目に陰性化が確認された(図4-a,b)。

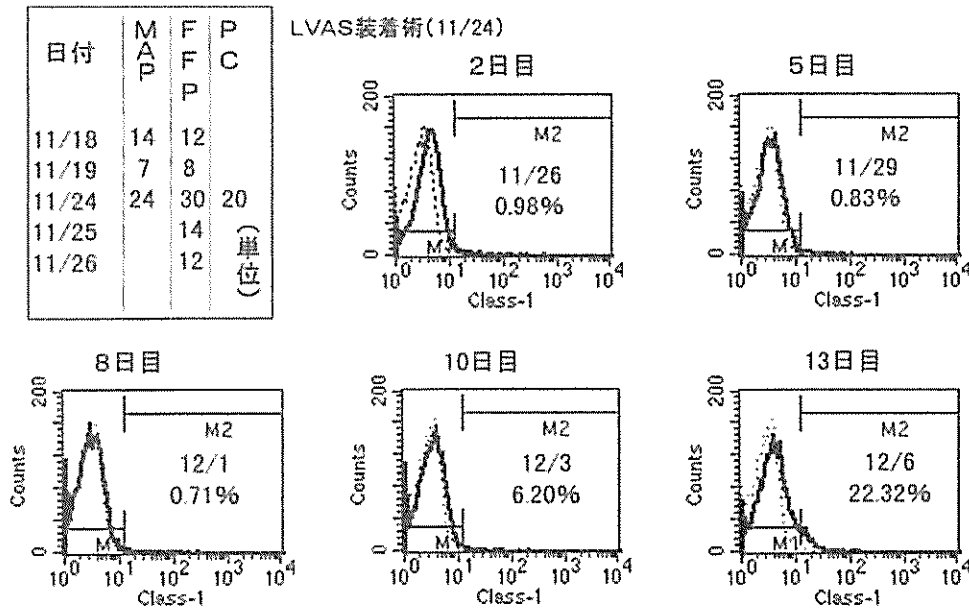


図4-a. 抗HLA抗体の推移(症例1)

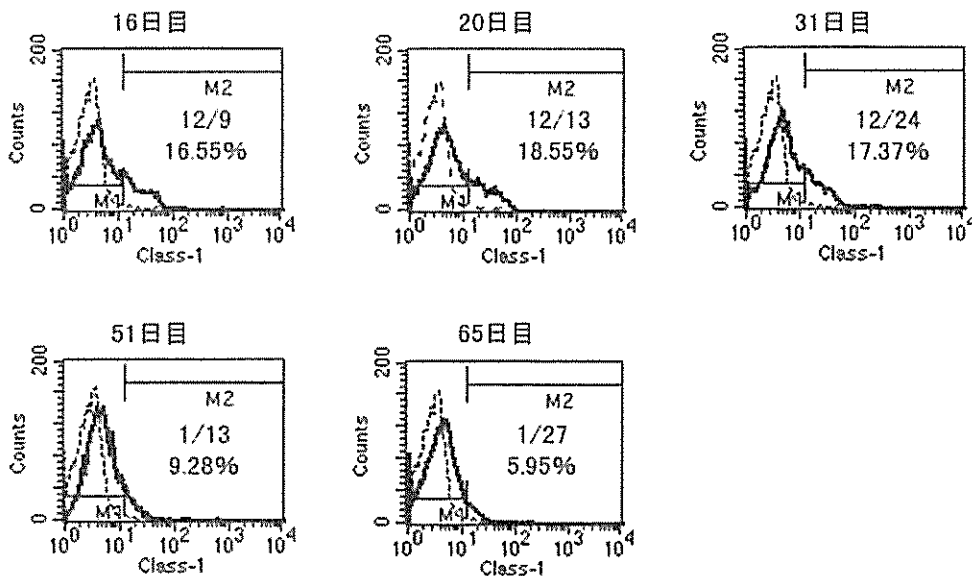


図4-b. 抗HLA抗体の推移(症例1)

②症例 2. は HLA 抗体保有患者で血小板輸血を機に早期に HLA 抗体の再上昇を認めた症例。

手術当日の血小板輸血後、一時陰性化したのが 6 日後、急激に HLA 抗体の再上昇を認め長期間陽性率の低下を認めなかった。(図 5-a,b)

③当センターで施行された心臓移植 2 症例の HLA 抗体

の推移

症例 A は移植前より HLA 抗体が陽性であった。免疫抑制療法として抗リンパ球抗体 (OKT3) とシクロスポリン (ネオーラル) およびステロイドの投与を行い、HLA 抗体は漸次減少し、現在では検出感度以下を維持している (図 6)。

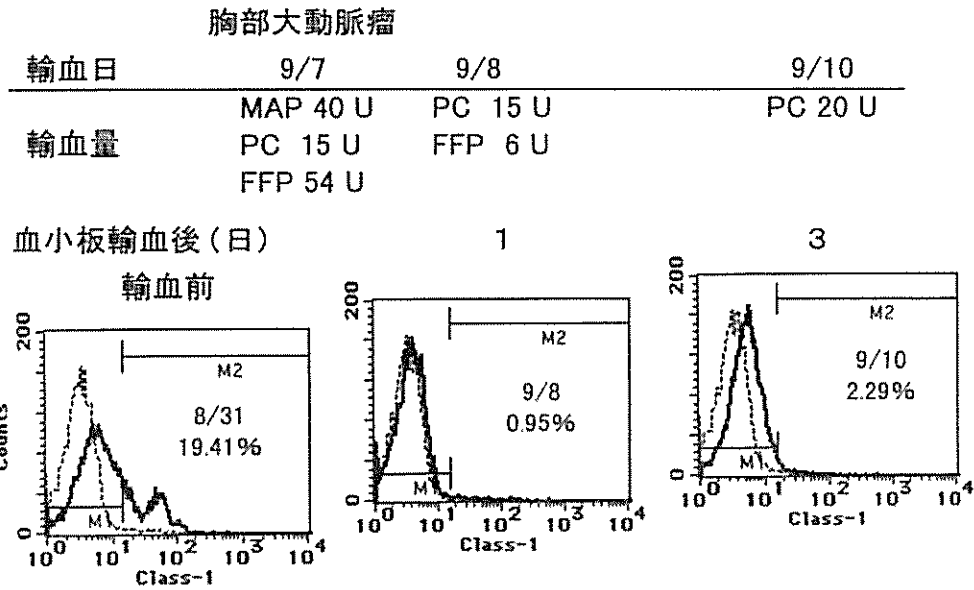


図 5-a. 抗 HLA 抗体の推移 (症例 2)

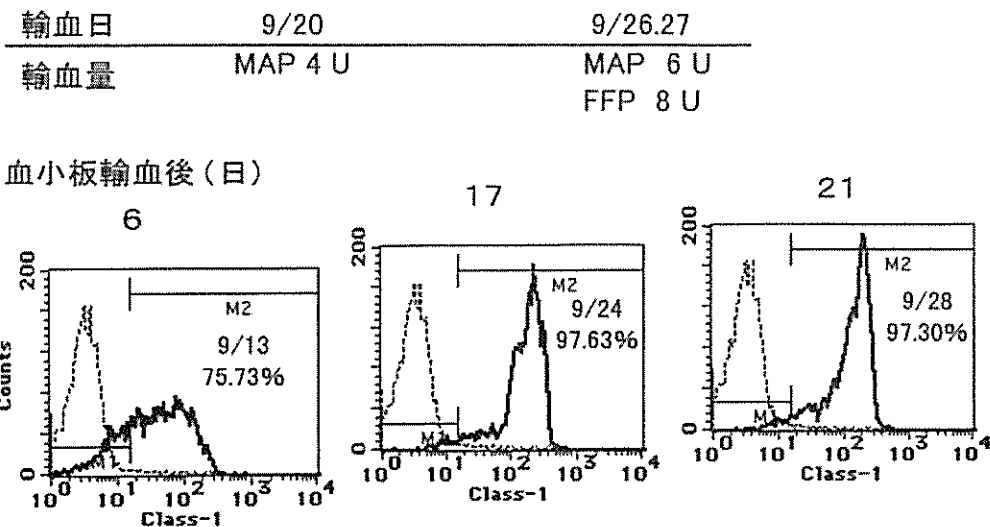


図 5-b. 抗 HLA 抗体の推移 (症例 2)

症例Bは術前のHLA抗体は陰性であった。術後2ヶ月程に陽性化を認めたが、速やかに減少し現在では検出感度以下を維持している(図7)。

④同種血管移植後症例のPRA陽性頻度

スポットで測定した同種血管移植後患者26例(男性16名、女性10名)のうち12例(男性5例:31.25%、

女性7例:70%)がPRA陽性であった(表1)。

⑤HLA-Class I抗体陽性症例でのIgGサブクラス分類  
対象はHLA-Class I抗体陽性であった同種血管移植後症例1例、血小板輸血後PRA産生症例1例、LVAS装着症例2例について行った。同種血管移植後症例はIgG1、G3、G4、血小板輸血後PRA産生症例はIgG1、

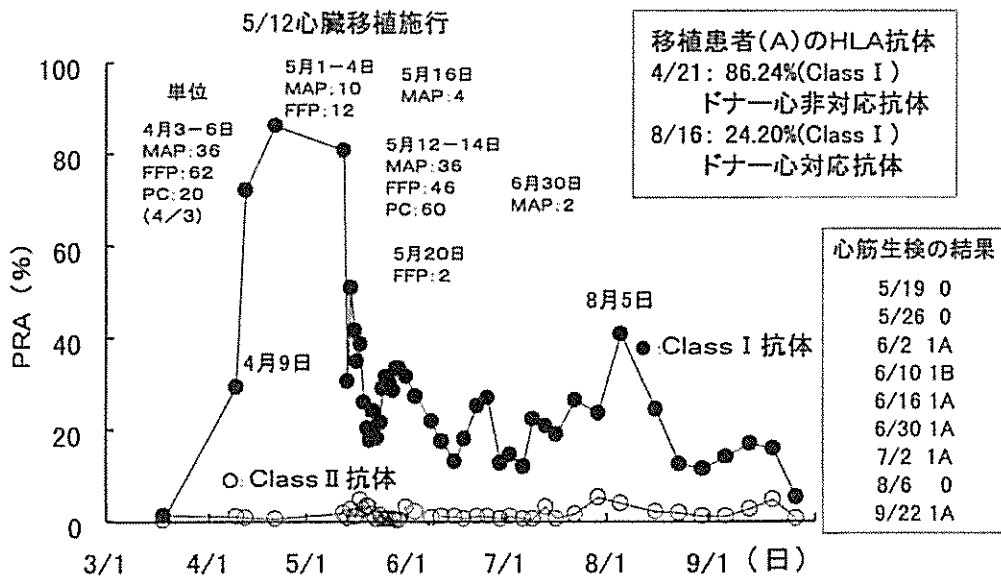


図6. 心臓移植患者(A)の抗HLA抗体の推移

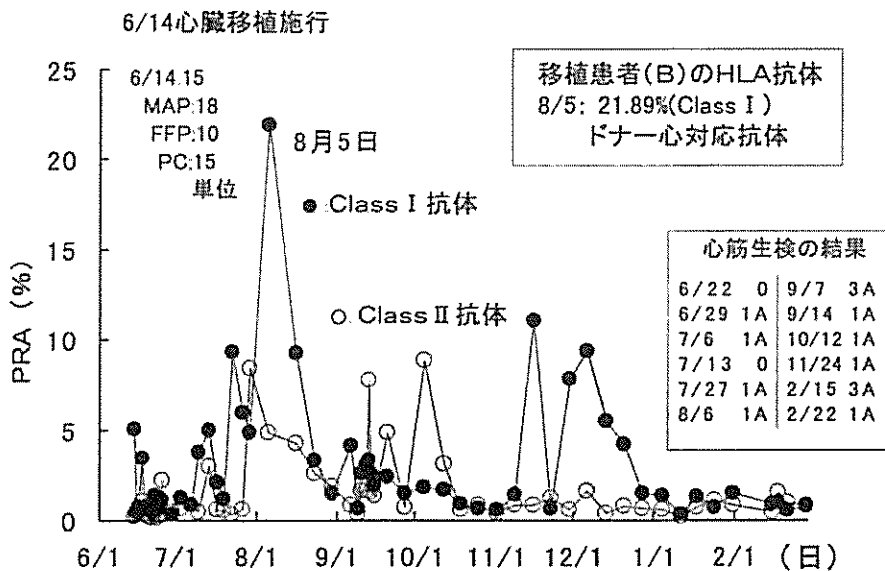


図7. 心臓移植患者(B)の抗HLA抗体の推移

IgG3、LVAS 装着症例 2 例は IgG1 のみ陽性であった (表 2)。

### 5. 考察

これまでの PRA 測定法は煩雑であり日常検査として行われていなかった。本 PRA スクリーニング法は 1 検体につき反応用チューブが 3 本 (陰性コントロール用、陽性コントロール用、検体用)、検体量は 20 $\mu$ l、反応時間は 1 時間であり、2 時間程度で結果を得ることができる。また、%にて客観的に結果が評価できる。呈示した症例で明らかのように抗体価推移の観察が容易に行え

る。すなわち、前回値と比較することで今後起こり得る HLA との反応も予測できるようになる。

さて血小板輸血後の HLA 抗体の産生についてであるが、われわれが経験した抗体産生率はおおよそ 30%である。患者背景については白血球除去フィルターが使用されたこと以外に詳細な検討を行っておらず、二次応答の産物であるかについては不明である。実際には抗体産生率が 10~20%であることが推察されるが、今後十分な調査を行いたいと考えている。

本法の検出系が anti human IgG による間接法であるため、数症例について IgG のサブクラスによるパイロ

ット試験を行った。対象は PRA が 30%以上であった同種血管移植後症例 1 例、血小板輸血後 PRA 産生症例 1 例、LVAS 装着症例 2 例について行った。全例で IgG1 陽性、IgG2 陰性、IgG3 は同種血管移植後症例と血小板輸血後 PRA 産生症例が陽性、IgG4 は同種血管移植後症例のみ陽性となり非常に興味深い結果が得られた。しかし症例数が少ないのでこの意義については今後の課題としたい。

非常に簡素化された測定法が登場したことにより、日常的に行われている輸血を含めた移植医療をより安全に行うための方法として、PRA の測定が LCT では不可能であった至急検査として対応できるようになったことの意義は大きい。今後多くの施設、症例で測定されることにより、HLA 抗体の新たな臨床的意義が発見されることを期待する。

表 1. 同種血管移植後症例の PRA 陽性頻度

	n	PRA < 10%	PRA > 10%	陽性率 (%)
男性	16	11	5	31.25
女性	10	3	7	70.00

陽性症例のうち Class I・II 共に陽性であったものは、男性 1 例、女性 2 例

表 2. HLA-Class I 抗体陽性症例での IgG サブクラスの分類 (陽性率%)

抗体	同種血管移植後症例	血小板輸血後 PRA 産生症例	LVAS 装着症例 1	LVAS 装着症例 2
IgG*	99.94	86.24	43.61	45.53
IgG1	95.74	64.37	37.87	34.87
IgG2	2.89	6.76	0.22	0.45
IgG3	78.94	13.50	2.06	0.46
IgG4	74.24	0.89	1.09	0.73

\* : FlowPRA™ I Screening Test での陽性率

## 第18回 国際移植学会参加記

大阪大学医学部 泌尿器科

土岐 清秀

第18回国際移植学会は、2000年8月27日から9月1日までの6日間、ローマで開催されました。ローマについては、その歴史や町並みなど今更説明の必要もないほど有名であり、世界中の観光客のあこがれの都市です。今年は特に、ミレニアムに向けて行われていた数々の遺跡や美術品の修復もほぼ完了しており、2000年のミレニアム学会としては、このうえない打ってつけの場所でした。私自身ローマを訪れるのは約10年ぶりであり、非常に楽しみにしていた学会でした。特に10年前には、修復中のためトレビの泉には水の代わりに工事用の足場が組まれ、バチカン美術館のシスティーナ礼拝堂も見ることが出来なかったため、それらを鑑賞するのも楽しみでした。

学会はローマ郊外にあるE.U.R.と呼ばれる住宅街の中にある、Palazzo dei Congressiで開催されました。このE.U.R.と呼ばれる地域は、本来1942年の万博のために作られたのですが、結局万博の方は第二次世界大戦勃発で中止となったそうです。この地域には近代的な建物が建ち並び、その脇には人工湖が造られ、雑然としたローマ旧市街とは全く趣の異なる、落ち着いた閑寂な雰囲気のある学会場としては申し分のない場所でした。ローマ市街からは地下鉄で結ばれており、学会場までは地下鉄駅から直通バスが運行しているため、交通の便は非常によいところでした。また学会場周辺には警察が常駐しており、ここもまた非常に厳重な警備が行われていました。

学会場は、十分な広さを持った機能的に造られた無機質な建物であり、いかにも現代のイタリアのデザインという感じの建物でした。ただし、会場内が非常に暑かつ

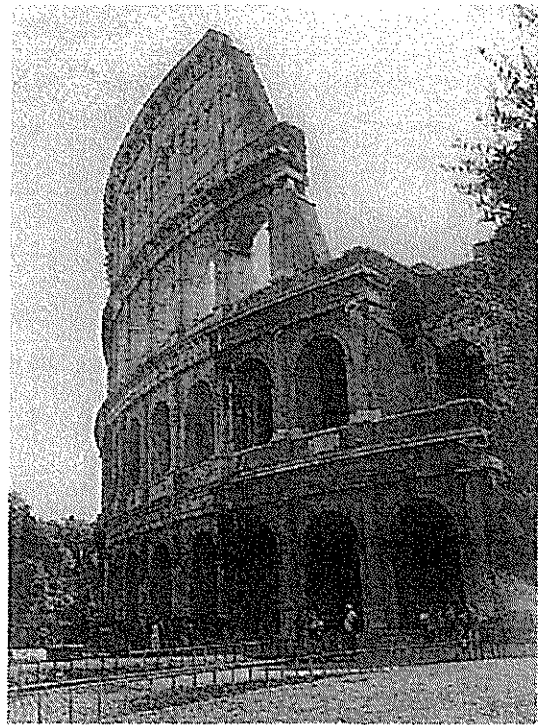


写真1. ローマといえば、やはりコロッセオ

たことや、案内の不備などといった不満もありました。また、階段も奇数階と偶数階にしか行けない階段が交互になっており、逆方向から昇ると目的のフロアに到達できない仕組みになっており、非常に複雑でした。ちなみに私はポスター発表だったのですが、係りの人に訪ねてもはっきりとした解答が得られず、ポスターの掲示スペースを探すのに30分以上費やしてしまいました。(決して私の英語が未熟なためではありません。念のため) また、プロシーディングス用原稿の受付に1時間近くかかる始末でした。



学会内容は、約 3,000 題弱の採択演題に対し、ローマでの開催ということもあり、それを大幅に越える演題応募があり、正確な採択率はわかりませんが、例年に比べ 10%ほど少ないという非常に厳しいものでした。日本からの採択は oral 35 題、poster 83 題と例年より非常に少なく、やはり応募演題が例年に比べ多かったことや、ヨーロッパで開催されるということもあり、非常に厳しいものであったと思われます。

また、参加者もイタリア国内や欧米から多数の参加者があり、学会場内は参加者であふれているといった状況でした。

発表内容については、やはり長期生着に関するトピックスが多く認められましたが、あまり目新しい内容が認められなかったことも事実です。また、special poster session が、New Ventures in Transplantation という題で行われ、新しい実験の試みなどについて、発表が行われていました。

今回の学会は国を挙げての一大イベントとして開催されたらしく、オープニングセレモニーには参加されなかったローマ法皇や、イタリア大統領などといった通常の学会では考えられないような V.I.P. が物々しい厳重な警備のもと、学会場に現れ、学会に参加されていたのには驚かされました。これ以外にも驚かされたことは、学会でもらえるかばんが、若い女性のあこがれのブランドであるフェンディのショルダーバッグであったことでした。

(もちろん市販のバッグと比べると、縫製などの作りはかなり落ちますが。) 私は家内を同行して参加していたのですが、これを見た家内は自分も含め、色違いを一つずつ早くもらってきてくれとせがむ有様でした。しかし残念なことに、同伴者にはこのバッグはなく、家内はかなり落胆していました。

また、今回の学会は social program として盛りだくさんのイベントが用意されており、すべてのイベントが、これも日本では考えられないような歴史的遺産の中で行

われるといった、ミレニアム学会にふさわしいものでした。その中で、私は 8/27 のオープニングセレモニーと 8/29 にかかれたコンサートに参加してきました。

オープニングセレモニーは、バチカン市国内のサンピエトロ寺院で開催されました。ここで驚いたことには、サンピエトロ寺院中央部を完全に学会専用スペースとして仕切ってしまい、他の観光客が入場できないようにしてしまっていることでした。また入場も厳重に一人ずつチェックしていたため、逆に会場に入場するのにイタリア名物の?行列が出来、1 時間近くかかるほどでした。

(ちなみに私は遅れて参加したため、ほとんど待ち時間なしに入場できたのですが。) オープニングセレモニーでは、法皇ヨハネパウロ 2 世がありがたいお話を下さるといふことで、楽しみにしていたのですが、体調不良のため代理の聖職者の方がお話をされたそうです。ちなみに私がそれを知ったのは翌日のことであり、当日はてっきり法皇様であると信じていました。敬虔なカソリ



写真 2. オープニングセレモニー会場となったバチカン市国内のサンピエトロ寺院。

ックの方が聞かれると気を悪くなされるかもしれませんが、クリスチャンでない私には、はっきり言って皆同じ様な顔に見え、法皇様かどうかの区別がつかなかったためです。

サンピエトロ寺院でのセレモニーの後には、オプションとしてバチカンの庭園（普段は入ることの出来ない）でのランチと、バチカン美術館のツアーが組まれていました。しかし、あまりに参加者が多いため、ランチ会場でも一杯のドリンクのためにかなりの時間を要する始末でした。また、バチカン美術館のツアーも行列になってぞろぞろと付いていくという状況であったため、十分に絵画や彫刻を鑑賞できる状況ではありませんでした。しかしながら、システリーナ礼拝堂内だけは冷房が効いており、また驚くばかりの天井画に圧倒され、かなりの時間、ぼーっと鑑賞していました。

8/29 のコンサートは、真夏に野外オペラが開かれることで有名なカラカラ浴場跡で開催されました。私は少し早めに到着したため問題なかったのですが、ここも参加者があまりに多かったため、遅くに到着した人は入場で

きなかったようです。やや遅れて開演したコンサートは、非常にすばらしいものであり、ライトアップされたカラカラ浴場跡の歴史を感じさせる遺跡と、オーケストラの取りなすコントラストが極めて幻想的であり、まるでローマ時代に行われたコンサート会場にいるのではと錯覚を起こしそうな雰囲気味わえました。

また、これ以外にもローマ郊外にある、かつての貴族たちの別荘地であったチボリへのツアーや、ローマ中心地にある噴水で有名なナブォーナ広場での gala パーティーも企画されており、このうちパーティーには参加する予定にしていたのですが、オープニングセレモニーやコンサートでのあまりの人混みにややうんざりしたため、参加を取りやめることにしました。

今回の学会は、ミレニアム学会であったため、どちらかというとお祭りの要素が非常に強いものであり、特に social program では日本では考えられないような場所でのイベントが盛りだくさんであり（いわば京都の金閣寺や清水寺を利用しているようなもの）、非常に印象深いものでした。

### ローマの印象

前述したように、今回約 10 年ぶりにローマを訪れたのですが、10 年前と比較しての印象にちょっと触れてみようと思います。

ローマというと、みなさんはやはりまず映画「ローマの休日」を思い出すのではないのでしょうか。町並みは映画そのままに変わっていないのですが、残念なことに今はオードリー・ヘップバーンがしたようにスペイン階段でジェラートを食べることは出来ません。（10 年前は可能でした。）数年前よりスペイン階段での飲食は禁止されたようです。また、フェリーニの「終着駅」を思い浮かべる方も



写真3. コンサート会場となったカラカラ浴場跡。ライトアップされた遺跡をバックにしたオーケストラの演奏風景。

いらっしゃると思います。その舞台となったテルミニ駅も最近改装され、やや雰囲気が変わって近代化してしまったようです。(ホームの雰囲気は変わっていません。)しかし、残念なことばかりでなく良くなったことも多々見受けられます。まず、両替に時間がかからなくなったことです。以前は町中でも銀行でも両替するだけで1時間近くかかったものですが、現在は町中の至る所に両替所があり、迅速に両替が行えるようになっているのには驚きました。また地下鉄や近代的な地下道なども出来ており、カフェなども冷房の効いた店が増えており、かなり快適になっていました。

また、遺跡群の点在する町並みはまったく変化しておらず、現代社会を離れ、古代の歴史の中にタイムスリップしたような雰囲気を味わえるのはそのままでした。変わったのはその中をぬって走る車が現代車になったことぐらいです。

治安の悪さも相変わらずといったところです。やはりスリは非常に多く、今回幸いにも私は被害に遭わなかったのですが、何人かの方は被害に遭われたようです。学会場およびイベント会場は嚴重すぎるほどの警備が行わ

れていたもので、さすがに被害はなかったようですが、町中の観光地周辺や地下鉄などの混雑するところは危険だったようです。某先生(本人の名譽のため名前はふせておきますが)は不幸なことに、一人で数件の被害を引き受けて下さったようです。まず、空港からのタクシーで150,000 リラ(通常は80,000 リラほど)を請求され、高いとは知りつつも、まっいいかと200,000 リラでお釣りをもらったそうです。その後よく見るとお釣りは、何と5,000 リラしかなかったそうです。その翌日にさらに混雑した地下鉄に乗っていた際、ポケットを押さえていたにもかかわらず、電車が揺れた際にポケットから強引にお金をすられてしまったとのことでした。しかし、その先生はそれに腹を立てるでもなく、飄々と話をされていたのは、さすがと思いました。

また、ある製薬会社の方は、有名なコロッセオの近くで、強引に手を引っ張られたかと思うとそのまま腕時計がなくなっていたとのことでした。

この他にも、地下鉄内で数人のグループに囲まれて気がつけば、鞆が全開になっていたとか、今回の学会だけでも言い出せばキリがないほどのスリの被害があったそうです。

しかし、いわゆる観光スポットと呼ばれる場所には必ずパトカーと警察官が目を光らせており、こういった場所での被害は少ないようです。

こういった治安の悪さを差し引いても、ローマは訪れる価値のある街であり、私もまたもう一度訪れることを願い、トレビの泉にコインを投げ入れたのは言うまでもないことです。

2年後の第19回国際移植学会は、遠く南半球のブエノスアイレスで開催される予定です。



写真4. これも有名なトレビの泉。観光客で一杯でした。

# MHC 遺伝子と進化

## —MHC 遺伝子の分子進化 (2)—

東京大学医学部人類遺伝学教室 大橋 順

前回は中立遺伝子の進化について述べました。今回は MHC 遺伝子座に働く「正の自然淘汰」を中心に、MHC 遺伝子の分子進化について解説したいと思います。

HLA 遺伝子座で観察される最大の特徴は高度な多型性ですが、特に興味深いのは対立遺伝子のリネージ (lineage:血清学的グループにほぼ対応している) が長期にわたり維持されてきた点です。様々な生物種の MHC (ヒトでは特に HLA という) 遺伝子座から複数の対立

遺伝子を選び、その塩基またはアミノ酸配列をもとに系統樹を作成すると、生物種毎に分けられない系統樹が得られます (図1)。例えば、図1の上から4番目と5番目に、原猿亜目に属するガラゴ (モホリ) の対立遺伝子である Gamo-DRB1\*0402 と Gamo-DRB1\*0403 がヒ

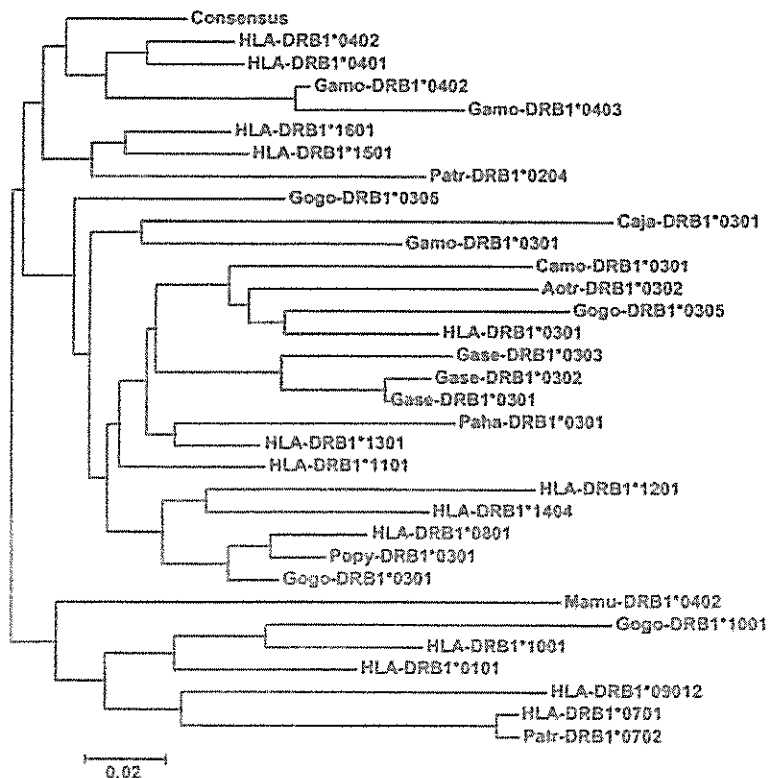


図1. 霊長類のDRB1 $\beta$ ドメインのアミノ酸配列をもとに近隣結合法により作成した系統樹。

HLA: ヒト, Gamo: ガラゴ (モホリ), Patr: テンバングー, Gogo: ゴリラ, Caja: マーモセット, Camo: ティティモンキー, Aotr: ヨザル, Gase: ガラゴ (セネガレンシス), Paha: マントヒヒ, Popy: オランウータン, Mamu: アカゲザル。

トの対立遺伝子である HLA-DRB1\*0401 と HLA-DRB1\*0402 と共に一つのクラスターを形成しています。また、系統樹の中ほどに位置する DRB1\*03 のリネージには、多くの霊長類の対立遺伝子が含まれています。このように、同じリネージに属する対立遺伝子が複数の生物種にまたがって存在しているのです。MHC 遺伝子座で観察されるこのような進化は trans-species evolution と呼ばれていますが、これは対立遺伝子のリネージの分岐が種の分岐のはるか以前に起きたためです。ヒトでは、HLA 以外の一般的な遺伝子座で観察される対立遺伝子多型は大部分がチンパンジーとの分岐後に生じたもので、およそ 40~80 万年も遡れば一つの共通祖先遺伝子にたどり着きます (図 2A)。つまり、種分岐の時点で多型的であっても、長い時間が経過すればほとんどのリネージは消失してしまい、結果として一つのリネージしか観察されないわけです。一方、HLA 遺伝子座の場合は種分岐

以前に誕生したリネージがヒトにもチンパンジーにも伝わり、それが現在まで受け継がれてきているのです (図 2B)。図 1 の観察事実を説明するために、種の分岐後に種毎に同じような MHC 遺伝子が進化したとする「収斂進化説」を唱える研究者もいますが、突然変異は都合よくは起こらないことを考えれば、収斂進化によって MHC 遺伝子の進化を説明することは困難と思われます。MHC 遺伝子座では、突然変異によって誕生した対立遺伝子リネージが長期にわたり集団中で維持されるのです。なぜ MHC 遺伝子のリネージや多型性が長期にわたり維持されるのでしょうか。多型的であることの利点は一体何なのでしょう。

図 3 に HLA-DRB1 遺伝子の  $\beta 1$  ドメインをコードする第 2 エクソンのアミノ酸配列を示しました。 $\beta 1$  ドメインは MHC 分子の機能上重要な、抗原ペプチドを挟み込む部位を形成しています。図 3 をよく見ると、何種類ものアミノ酸置換が観察される多型的な部位と、一種類の

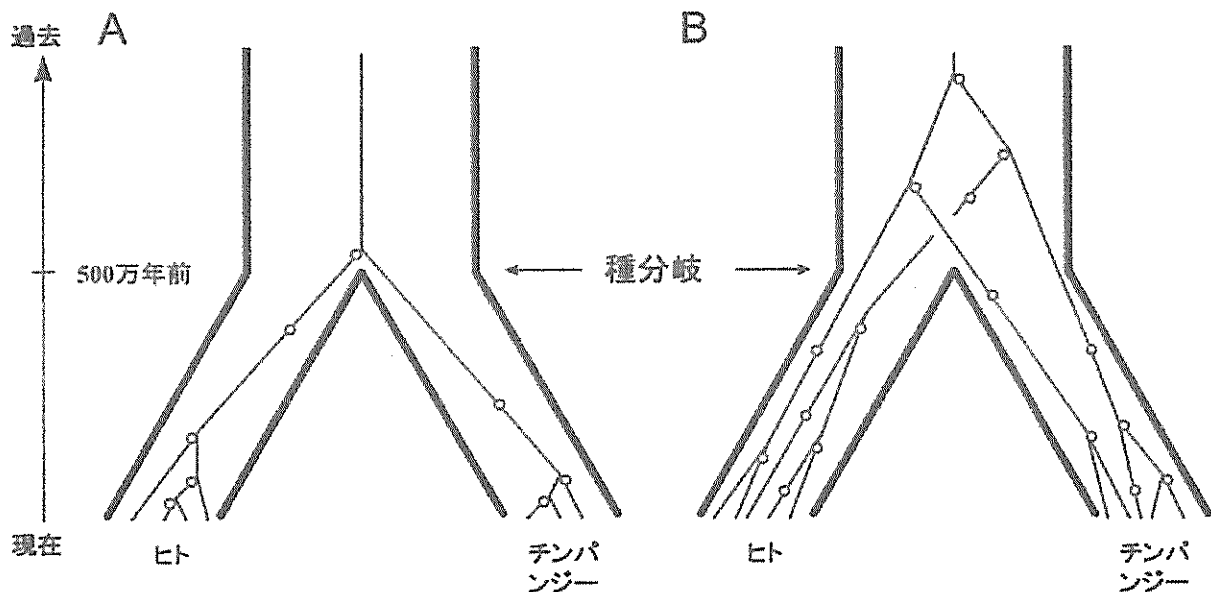


図 2. 一般的な遺伝子座(A)とHLA遺伝子座(B)での対立遺伝子の系図(細線により表示)。太線は種の境界を、○は塩基置換を示している。

アミノ酸しか観察されない部位とが存在することに気が付かれると思います。図中で+の記号は、抗原ペプチドを挟み込む際に特に重要な抗原認識部位 (antigen recognition site) を示しています。興味深いことに、多型的な部位と抗原認識部位とはほぼ一致しています。抗原認識部位は MHC 分子に提示される抗原ペプチドのレパートリーを規定する部位ですので、レパートリーに影響を与える変異が多型となって集団中で維持されてきたと考えられます。木村資生は「機能的制約を強く受けるタンパク質をコードする遺伝子座ほど遺伝的変異が低い傾向を示す」ことを指摘しました。遺伝子もしくは遺伝子中の機能的に重要な部位であれば、アミノ酸の変化を伴わない同義置換は許されても、アミノ酸の置換を伴う非同義置換は淘汰上許されない場合が多いはずであり (淘汰上有利となるアミノ酸置換も起こりうるが、その頻度は無視できるほど低い)、そのような変異が集団中に広がる可能性は極めて低いからです。ところが、HLA 分子の抗原認識部位をコードする部位とそれ以外の部位とで塩基置換数を計算したところ、抗原認識部位におい

て非同義置換の方が同義置換よりも数倍多く起きていることが確認されました (表1)。この観察事実は、MHC 遺伝子座の高度多型性が、アミノ酸置換を起こすことが淘汰上有利になるような「正の自然淘汰」によって維持されていることを示唆しています。「正の自然淘汰」は MHC 分子の機能に基づいて次のように考えることができます。

MHC 分子は、病原体に由来する抗原ペプチドを結合し T 細胞に提示することによって、その後続く抗体産生や感染細胞の除去といった一連の免疫応答を開始させるという免疫系で重要な役割を担っています。脊椎動物は未知の病原体に感染しても即座に対応できるよう、あらかじめ多様な免疫担当細胞を用意しておく免疫防御システムを発達させてきました。T 細胞受容体や B 細胞受容体は遺伝子再編成や体細胞突然変異を通して多様性を確保していますが、HLA 分子は遺伝子再編成などによって多様性を獲得しているわけではありません。一つの HLA 分子が多種類の抗原ペプチドを結合すること、複数の HLA 遺伝子座を用意すること、そして各 HLA 遺

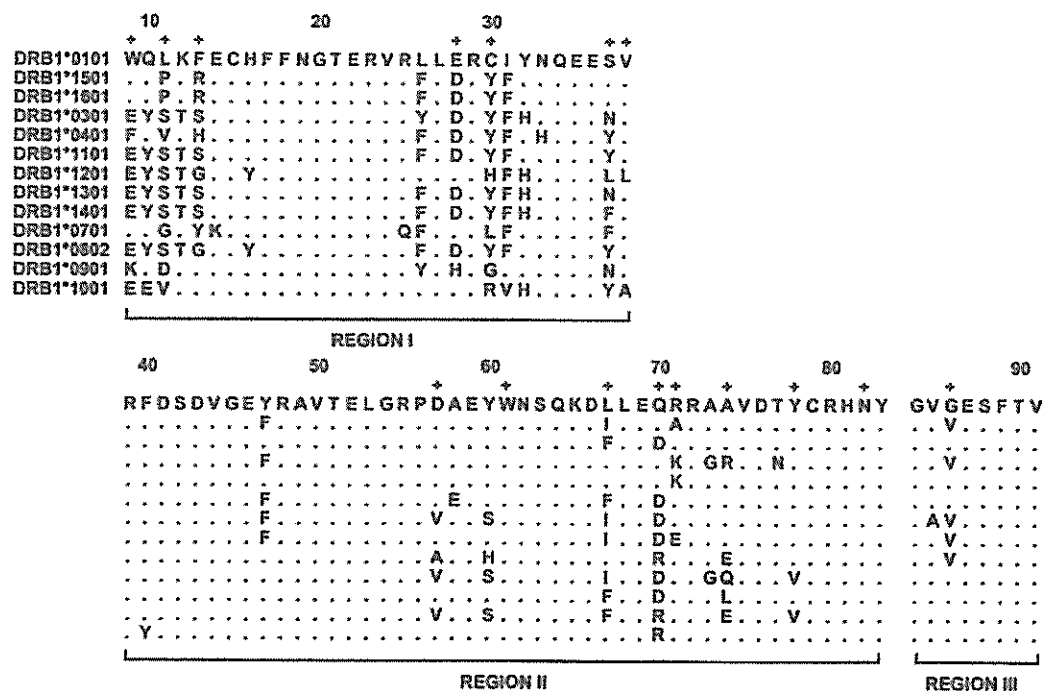


図3. HLA-DRB1のβ1ドメインの9～91番までのアミノ酸配列。\*はDRB1\*0101と同一なアミノ酸であることを示している。+は抗原認識に重要な部位を示している。

表1. HLA遺伝子座における100塩基対当たりの同義置換数と非同義置換数の比較

遺伝子座 (比較に 用いた配列数)	抗原認識部位		抗原認識部位以外	
	同義置換数	非同義置換数	同義置換数	非同義置換数
Class I				
HLA-A (10)	3.5	13.3***	2.5	1.6
HLA-B (6)	7.1	18.1**	6.9	2.4*
HLA-C (3)	3.8	8.8	10.4	4.8
Class II ( $\beta$ chain)				
HLA-DPB1 (3)	3.9	19.0	2.4	2.8
HLA-DQB1 (28)	13.7	26.5	8.5	6.7
HLA-DRB1 (91)	15.0	45.7**	8.0	4.5

有意水準 \*: 5%, \*\*: 1%, \*\*\*: 0.1%

伝子座で多くの対立遺伝子を維持することによって、我々は病原体の侵入に備えているのです。HLA 遺伝子は共優性（ヘテロ接合体が両対立遺伝子の産物を発現できる）であるため、ヘテロ接合体の方がホモ接合体よりも多くの外来抗原ペプチドを結合し T 細胞へ提示できます。したがって、ヘテロ接合体の方がホモ接合体よりも自然淘汰上有利であると考えられています。突然変異により抗原認識部位にアミノ酸置換が起こると、それまで集団中に存在した HLA 分子では結合することができなかった新たな抗原ペプチドをその対立遺伝子は結合できるようになります。その結果、変異遺伝子を持つ個体が持たない個体に比べて生存上有利となれば、アミノ酸置換を伴う突然変異遺伝子が集団レベルで積極的に維持されるわけです。このように、ヘテロ接合体がホモ接合体よりも淘汰上有利である淘汰様式を超優性淘汰といいます。前回、中立遺伝子座で期待される対立遺伝子数に関する定常分布を頻度スペクトルについて説明しました。超優性淘汰の場合は、ホモ接合体とヘテロ接合体の相対適応度をそれぞれ  $1-s$  と  $1$  として（ここで  $0 < s < 1$ ）、頻度スペクトルは

$$\Phi(x) = 4Nu(1-x)^{4N(u+A-AJ)-1} e^{4NAx} x^{-1}$$

であらわれます。ここで、 $A = \frac{s}{1-sJ}$  であり、 $J$  は

この遺伝子座で期待されるホモ接合体度（ホモ接合体頻度）です。また、 $x$  は遺伝子頻度を、 $u$  は突然変異率を表しています。 $\Phi(x)$  は各遺伝子頻度において期待される対立遺伝子数の分布ですので、遺伝子頻度の総和は 1 より  $\int_{1/(2N)}^1 x\Phi(x)dx = 1$  が成立します。この関係式より、 $J$  を求めることが可能となります。すなわち、 $N$ 、 $s$ 、 $u$  を決めれば  $J$  が決まり、 $N$ 、 $s$ 、 $u$ 、 $J$  から  $\Phi(x)$  は決

定されるわけです。図 4 は  $\Phi(x)$  の分布を示しています。

$s=0$  は中立な場合であり、分布は U 字型をしています。 $s$  が大きくなるにつれ、中間的な頻度で存在する対立遺伝子数が大きくなります。また、 $x=1$  では  $\Phi(x)$  はほぼ 0 であり、 $x=0$  で対立遺伝子数の期待値が高くなっています。 $x=1$  の辺りで非常に小さい値をとるのは、頻度が高い遺伝子が存在しないことを意味し、 $x=0$  の辺りで高い値をとるのは、頻度の低い遺伝子が複数存在することを意味しています。すなわち、複数の中間的な頻度をと

る対立遺伝子と、複数の稀な対立遺伝子が存在している状況が、超優性遺伝子座で期待される状態といえます。図4の分布は実際の観察結果とよく一致していると思われます。また、ここで仮定した非常に簡単な数学モデルによって、対立遺伝子リネージが長期間に渡り維持される点や、非同義置換の方が同義置換よりも多く起こる点もうまく説明することができます。長期の進化を実験的に再現することは不可能ですから、以上のような集団遺伝学的解析は分子進化の研究において大変有効な方法といえるでしょう。

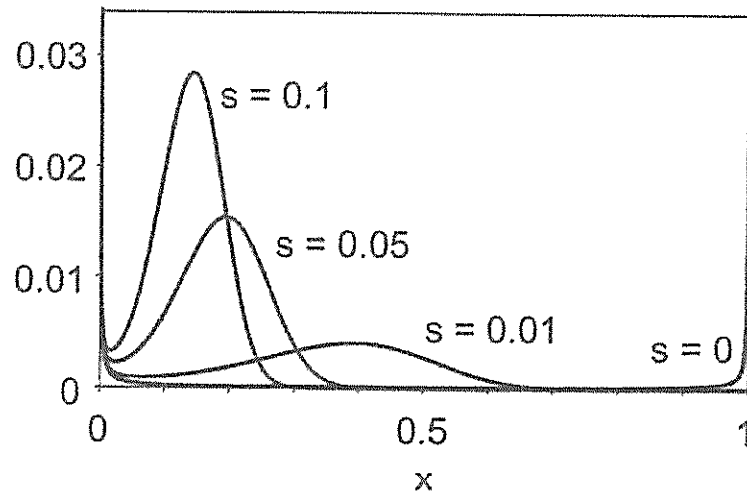


図4. 超優性遺伝子座での対立遺伝子の各頻度における期待数の分布.  $N=1000$ ,  $u=10^{-5}$ を仮定した.

ここまでは多型を維持する

メカニズムとして自然淘汰を考えてきましたが、多型は突然変異によって生み出されます。MHC 遺伝子の突然変異を理解する上で重要なのが点突然変異と遺伝子変換です。遺伝子変換とは1つの遺伝子配列がそれと相同な他の遺伝子の配列で置き換わる現象で、遺伝的組換え現象の一種です。遺伝子変換は異なる遺伝子座間で起こる場合と同一遺伝子座間（対立遺伝子間）で起こる場合がありますが、MHC 遺伝子で主に起こっているのは非常に短い配列（100塩基対以下）が置き換わる対立遺伝子間の遺伝子変換であると考えられています。遺伝子変換がエクソン単位や遺伝子座単位で起これば配列の多様化をもたらしますが、部分的に起これば受け取る側ではドナー側に蓄積していた点突然変異を一度に受けたのと同じことになり、遺伝子の多様性は一気に増大します。遺伝子変換が HLA 対立遺伝子間で起きたという直接的な証拠は未だ得られていませんが、HLA-DRB1 遺伝子のイントロン配列の解析から、HLA-DRB1 遺伝子第2エクソンの $\alpha$ ヘリックスをコードする領域（図3のREGION2）で遺伝子変換が他の領域に比べ高頻度で起こっている可能性が指摘されています。MHC 遺伝子座での遺伝子変換の起きる頻度やその部位は、今後検討すべき課題の一つといえるでしょう。



前回簡単に細胞分裂と細胞周期について説明しました。

今回は、内容が若干前後しますが細胞分裂について説明したいと思います。

細胞分裂とは、その言葉通り、1個の細胞が分裂して2個以上の独立した娘細胞になることで、生命の基本現象の一つです。細胞分裂の形式には、体細胞分裂(体細胞有糸分裂ともいいます)と減数分裂とがあります。それぞれの分裂について説明します。

#### 【体細胞有糸分裂; somatic mitosis】

体細胞分裂のもつ遺伝学的意義は、染色体構成や遺伝情報がもとの細胞と正確に一致した娘細胞を作るという点にあります。一つの受精卵から出発した個体を構成している無数の細胞は、原則として同じ遺伝物質を保持していることになります。つまり、生物は、胚、胎生、幼生、及び成体の各段階を通して、発生、成長するので、非常に多くの細胞を作らなければいけません。その為、体細胞分裂が必要とされています。また、細胞の多くは寿命を持っているので成体においても、体細胞分裂によって常に新しい細胞を作っていかなければいけません。その為の細胞分裂の回数はヒトの一生で、およそ $10^{17}$ 回と言われています。

細胞分裂の分裂期(前回説明したM期)には、前期、前中期、中期、後期、終期と、核分裂期の最終段階に始まる細胞質の分裂期(cytokinesis期)が含まれます。それぞれの過程について簡単に説明します。

#### 《前期; prophase》

細胞周期の間期で分散していたクロマチンが徐々に凝縮し染色糸(chromonema)を形成します。この染色糸は次第に太く短くなり、染色体としての形態を現しはじめます。各染色体は、これに先立つS期に複製されて2本の染色分体(chromatid)となっています。前期の終わりになると間期の細胞骨格の一部をなしていた細胞質微小管が分散し分裂装置の主体である有糸分裂紡錘体(mitotic spindle)が形成され始めます。

#### 《前中期; prometaphase》

前中期は、核膜の分散で突然始まります。動原体(kinetochores)と呼ばれる特殊なタンパク質複合体がセントロメアの両側に形成され、そこに紡錘体微小管の一部が附着します(これを動原体微小管; kinetochores microtubuleと呼びます)。染色体は動原体微小管に引っ張られ、活発に動くようになります。

#### 《中期; metaphase》

紡錘体が完成し、2極間で紡錘形となります。紡錘体は多数の紡錘糸から構成されています。この中期では、紡錘体の中央部の赤道面(metaphase plate)に各染色体の動原体が配列します。動原体と極とは紡錘糸により連結され、紡錘体の極にある中心体のまわりに星状体(aster)が発達します。

#### 《後期; anaphase》

後期は、突然始まります。各染色体で対を成していた動原体が分離し、染色分体はゆっくりと紡錘体極に向かって引かれていきます。分離した染色体が移動する速度はすべて一定で、典型的なもので毎分1 $\mu$ mです。それぞれの染色分体は新しい娘染色体になります。

#### 《終期; telophase》

分離していた娘染色体が極に到達して、動原体微小管が消失します。極微小管は、さらに伸び続け、娘染色体を開いて新しい核膜が再形成されます。凝縮していたクロマチンは再び分散し、核小体も再び現れて有糸分裂が終わります。

#### 《細胞質分裂》

細胞質が二分されます。細胞中央部の膜が、2個の娘核の間で紡錘体の長軸に垂直に内側に向かって陥入し、分裂溝を形成します。この溝は徐々に深くなっていき紡錘体の残存物の細い束に接するようになります。こうしてできた中央体は、しばらくは残っていますが最後には消失し、完全に分離した2個の娘細胞となります。核の分裂と細胞質の分裂は通常連動して起こりますが実は全く別の反応です。正常な場合でも、核が分裂した後細胞分裂のおこらない場合があります。例えばショウジョウバエの初期胚は、細胞分裂をおこさずに18回核分裂を重ね、表面近くに6000個もの核が単層に並んだ巨大な多核細胞を形成し、その後これら核のまわりで細胞質が分裂して単核細胞となります。

細胞分裂の過程では、細胞に不可欠な構成成分のすべてが娘細胞に確実に受け継がれなければいけません。ミトコ

ンドリアや葉緑体などの細胞小器官は個々の成分が自然に集合しているわけではないので、既存の小器官の成長と分裂でしかできないので、娘細胞が細胞小器官を一つも受け継がないとそれらを保持できなくなります。ゴルジ体や小胞体についても同様で、既存の構造体の少なくとも一部分が存在しなかったらこれらの構造を新たに作るのとは不可能です。では、高等真核細胞の分裂では、膜に囲まれたいろいろな細胞小器官がどのようにして分配されるのでしょうか？大量に存在する小器官は、細胞の世代ごとにほぼ倍加してさえすればまず安全に受け継がれていきます。ゴルジ体や小胞体などの小器官は、有糸分裂の際に一旦分散して小断片、小胞になります。このようにたくさんの小胞になることが娘細胞に均等に分配されることを保証しているようです。小胞になった小胞体は紡錘体の微小管と結合して娘細胞に均等に分配されます。

次に減数分裂 (meiosis) について説明しましょう。

【減数分裂；meiosis】

受精後、卵黄嚢から出現した始原生殖細胞 (primordial germ cell) が性腺原基に移動します。性腺原基が精巣 (testis)、或いは卵巣 (ovary) へ分化し始めると、始原生殖細胞も分化し生殖原細胞 (性原細胞；spermatogonium、或いは卵原細胞；oogonium) となります。生殖原細胞は有糸分裂を繰り返してその数を増します。生殖原細胞から配偶子 (精子または卵子) が作られる過程が減数分裂 (meiosis) で、高等生物では精子形成 (spermatogenesis) と卵子形成 (oogenesis) との2つの過程があります。精子形成と卵子形成のそれぞれについて説明します。また、減数分裂と体細胞分裂の相違を表-1に示します。

《精子形成》

性原細胞は、精細管の基底膜に接して存在し、有糸分裂を繰り返して増殖します。その後、できた2細胞のうち一方は静止の状態に留まり、他方はさらに分裂し、最後に増大し染色質に富む大きな核をもった一次母細胞 (primary spermatocyte) となります。ついで成熟期に入り減数分裂を行います。減数分裂は第一分裂と第二分裂の連続した2回の分裂よりなります。第一分裂前期に相同染

色体2対合し (接合期) 2価の染色体を形成します (太糸期)。その後染色体は短縮し、4本の染色分体構造とキアズマ (chiasma) が明瞭になります (複糸期)。さらに、染色体の短縮化が進み (移動期)、続いて中期、後期、終期を経て、2つの娘細胞ができます。これが二次性母細胞 (secondary spermatocyte) で、染色体は半減します。引き続き第二分裂がおこり2つの小さい精細胞 (spermatid) ができます。つまり、1個の一次母細胞から4つの精細胞ができることとなります。精細胞は分裂することなく、形態的に変化して精子 (sperm) となります。

《卵子形成》

卵巣内で、卵原細胞は有糸分裂によって急速にその数を増やし、胎生期の1カ月ごろで  $6 \times 10^6$  個、5ヶ月ごろで  $6.8 \times 10^6$  個ぐらいに発達します。胎生期の2ヶ月ごろから減数分裂の前期に入り始め、細糸期と接合期は2-7ヶ月の間で見出されます。複糸期を経た一次卵母細胞 (primary oocyte) は、細糸期と呼ばれる時期に入ると、減数分裂はこの段階で長年にわたって停止状態になります。出生後、卵母細胞の大部分は退化していき、思春期に達してからいくつかの卵母細胞が成熟をはじめ、第一分裂を完了します。できた2つの二次卵母細胞 (secondary oocyte) の一つは第二分裂に入り、中期まで進みますがもう一つの方は第一極体 (first polar body) となります。この時期に排卵がおこります。受精後、第二分裂は終了し、第二極体 (second polar body) を放出します。半数染色体にはそれぞれ核膜が形成され、精核と卵核になります。数時間後、両者は合体して2倍性の核を持った接合体となり、続いて卵分割が始まります。

この減数分裂のもっとも重要な意義は、相同染色体の組合せの多様性です。23対の染色体をもつヒトの場合には、1つの配偶子における染色体の可能な組合せの数は、 $2^{23} = 8,388,608$  通りとなります。したがって、ある夫婦の子供における染色体の組合せの数は、 $2^{23} \times 2^{23}$  通りとなります。さらに、相同染色体同士の対合の際の交叉によって、相同染色体間の一部の遺伝子が組み換えられることによってもそれぞれの個体の遺伝的変異性を高めているわけです。

今回は、遺伝子の組替えについて説明しようと思います。

表-1 減数分裂と体細胞分裂の相違

	体細胞分裂	減数分裂
場所	あらゆる組織	卵巣と精巣のみ
生成物	2倍体の体細胞	1倍体の卵子と精細胞
DNAの複製と細胞分裂	1回の細胞分裂につき1回の複製	第1減数分裂のとき1回だけ複製するが、細胞分裂は2回おこる
前期の長さ	短い (ヒトでは30分以内)	第1減数分裂は長くて複雑、終わるまでに数年かかることがある
相同染色体の対合	行わない	行う
組み換え	稀かあるとしても異常	それぞれ相同対で最低一回あるのが普通
娘細胞の関係	遺伝的に同一	異なる (組み換えと独立した相同染色体)

## サルでも分かる HLA (6)

### —これからの臓器移植は?—

国立循環器病センター研究所 実験治療開発部・臓器移植研究室 佐田 正晴

#### -同種臓器移植の限界?-

同種臓器移植が難治性臓器不全の治療法として定着してから半世紀が過ぎようとしている。今世紀初頭に Carrel がイヌを用いた腎臓移植で血管吻合法を開発し(その業績により 1912 年にノーベル医学生物学賞受賞)、それ以降、臓器移植の研究や臨床が行われ臓器移植学と移植免疫学の基礎が築かれてきた。現在、臓器移植の施行例は腎移植で 450,000 例、心移植-50,000 例、肝移植-70,000 例以上にのぼり世界 50 ヶ国以上で行われている。1970 年代に開発されたシクロスポリン(サイクロスポリン)の移植への導入により移植成績が飛躍的に向上すると同時に移植例数も増大していった。シクロスポリンをはじめ本邦で新たに開発されたタクロリムス(FK506)など新しい免疫抑制剤の応用や免疫抑制法の確立は、成績の悪かった複合臓器移植や多臓器移植を可能とし recipient に移植の道を開いてきた。更に厳格に行われていた recipient の条件、例えば年齢や原疾患など、が緩和され小児や高齢者、組織適合性不一致症例にも移植の適応が拡大されていった。皮肉なことにこの適応の拡大による移植数の増大と再移植例の増加が慢性 donor 不足を招いてしまった。移植先進国のアメリカを例にとれば、移植希望待機者総数が 60,000 人以上、一方年間総死亡数約 2,000,000 人のうち臓器提供者数は 10,000 人(0.5%)以下で毎年新患を含め多くの recipient が待機組に回されている。移植コーディネーターによる年少期からの教育や donor カードと運転免許証の抱き合わせて積極的に donor 確保を取り組んだり、臓器保存液や保存法の改良をもつてしても慢性 donor 不足には“焼け石に水”、これが現実である。

#### -人工臓器は移植の救世主になり得るか?-

近年の高分子化学の著しい進歩は、生体適合性材料の発展に大きく貢献してきた。各種医療機器、とりわけ人工血管や生体内留置カテーテルをはじめ医療現場では多くの生体適合性製品が活躍している。これら生体適合性材料を用い人工臓器が作れないだろうか?。血液透析装置は慢性腎不全患者のための体外人工腎臓として広く普及している。人工臓器のうち比較的早期から開発が始まっ

たのは人工心臓であろう。人工心臓はもともと人工心肺装置の延長線上で開発されていった。1930 年代にアメリカで人工心肺装置が開発され、日本でも 1950 年代に実用化された。人工心臓は 1950 年代にアメリカで精力的に研究開発され臨床応用されてきた。現在、LVAD(Left ventricle assist device system)は急性心不全や心筋梗塞時に不可欠な生命維持装置として世界中で活躍している。日本でも 400 例以上に装着されている。LVAD は左心系の補助に用いられるだけで心機能の快復、梗塞部位の改善後、除去されるため心臓移植に代わることは出来ない。では心臓移植に代わりうる全置換型人工心臓は? TAH (Total artificial heart)は心臓移植に代わりうる人工臓器で日本、アメリカを中心に開発されてきた。シリコンやポリウレタンなど良質な生体適合性材料と抗血栓材料を用い、多種・多型な人工心臓が作成され臨床応用も行われ、それなりの成績もあげてきた。しかし人工心臓(人工肝臓も同じだが)と心臓移植との最大の相違点は recipient の QOL (Quality of life)にある。人工心臓はその性格上、心臓を動かすための駆動装置や心拍数、心拍出量を調整するための制御装置や電力供給用バッテリーが必要で、現在かなりコンパクトになったとは言え小型のリヤカー(読者の若い諸子にご存じ無いかもしれないが)を引っ張って移動しなければならぬ。また体内外を結ぶラインからの感染症の危険性や形成される血栓など、解決しなければならない問題が山積している。動力に小型原子炉を、という計画もあった。以前、当センターに在職し人工心臓の世界的權威でノーベル賞の候補者にもあげられていた A 先生は、“家庭電気製品や車の動力が全て小型原子炉に置き換わらない限り人工心臓には応用出来ない”、と言われていたが、至極当然な見解だろう。人工臓器と臓器移植は、ほぼ同時期にスタートした。総合評価では臓器移植に軍配をあげざるを得ないが、bridge use として人工心臓や人工肝臓はこれから益々需要が増えるであろう。

#### -21 世紀は異種移植の時代?!

今まで述べてきたように、臓器移植には慢性 donor 不足が指摘され、人工臓器では抗血栓性の問題や QOL の限界が何時も指摘されている。では移植医療の最後の手段と

---

して何が考えられるか？ それはたぶん異種移植に行き着くであろう。異種移植の歴史は以外と古く、1667年に羊の血液をヒトに輸血した異種輸血の記録が残っているが、臓器移植に関しては今世紀初頭から散発的に臨床が行われてきた。殆どの異種移植はチンパンジーやヒヒなど霊長類を donor として行われてきた。異種移植に対してアレルギー反応を示す人は多いが、ブタやウシの心臓弁を用いた心臓弁置換手術は日常行われているため、既に異種移植の時代に突入していると言っても過言ではない。異種移植には同種移植と全く異なり、いわゆる”種のバリアー”が”万里の長城”のように長く高く行く手を阻んでいる。今までの異種臓器移植はこのバリアーを越えられず玉砕した。異種移植にとって最大のバリアーはヒトの血清中に既に存在している異種抗体であり、この異種抗体をいかに除くか、また産生をいかに最小限に抑えるかが最重要課題であった。異種抗体のコントロールのため過剰な免疫抑制剤の投与を余儀なくされ、その結果、感染症で recipient が死亡する例が殆どであった。しかし最近の急速な遺伝子工学の進歩が、異種移植に新たな道を開こうとしている。異種移植を取り巻く環境は必ずしも良好とは言えないが、21世紀に向けゆっくりであるが確実に問題を解決しつつある。異種移植が移植医療の首座を占めるのも、そう先の話ではなくなるだろう。(異種移植を取り巻く環境と問題点については次回掲載予定)

## 佐治博夫のまかせなさい！ HLA 研究所 所長

sajil@mbox.kyoto-inet.or.jp  
hla@hla-labo.org

### ポスト・ゲノム時代の組織適合性

あえて過激に書いてみる。HLA はヒトの MHC であり、メイジャー組織適合性抗原と呼ばれるゆえに、HLA を解明すれば組織適合性のほとんどは解決できると目されてきた。ところが、臓器移植の世界では「免疫抑制」でそのバリアーを超えることが可能になり、HLA 適合はもはやメイジャーなファクターではなくなった。第一期は輸血による免疫抑制が HLA 適合性に優る生着率を達成できる、という知見であった（1980 年代）。第 2 期は免疫抑制剤と投与方法の改善がもたらした。免疫抑制剤の強力な薬理効果は、輸血の免疫抑制効果さえ因子として抽出できない状況を現出した。もはや「拒絶」とくに慢性拒絶は稀有なハザードの部類になっている。ある移植医は「研究するにも慢性拒絶の症例が少なすぎて、解析対象にもならず、その原因を特定できない」といつているほどである。代わって、レシピエントの液性抗体と拒絶の関係が浮上した。いまや、臓器移植の世界では HLA 適合不要論が大勢を占めていて、必要な適合検査は液性抗体のクロスマッチだけになった感がある。日本移植学会における HLA ないし MHC に関する演題は減少の一途を辿り、いまや片隅に数題が提出されている現状である。

#### 臓器移植に HLA は必要か？

鹿児島県の日本組織適合性学会大会のシンポジウム「21 世紀の移植」で、ポール・テラサキは「世界の臓器移植」と言う演題を、直前になって「HLA 適合ドナー・リンパ球輸血による adoptive 免疫療法」へ変更した。さらに吉田孝人先生の「日本の臓器移植」でのディスカッションで「日本の臓器移植を今後どうするつもりですか？ HLA の臓器移植への貢献の今後はどうですか？」という意味の質問をした。わたしは彼独特の反語的表現と理解した。「日本の移植の現状はどうにもならないものでしょ？ HLA 適合性はもう臓器移植へ貢献できないのではありませんか？」。そう聞こえてしまったのはわたしだけであったらうか。

実際、現場の移植医の多くは HLA 不要論者とみてよい。あえていえば「臓器分配の公平を維持するためのツール」に過ぎないと極論する移植医が多くなった。HLA 屋さんはそれを移植医の無知（HLA 理解の困難性）というが、果たしてそうであろうか。生体肝移植ではほとんどが「家族肝」である故に、移植後 GVHD を防ぐ意味で HLA が検査されているようである（ドナーが HLA ホモ接合でないことを検査する）。

読者の多くが臓器移植の世界で HLA 検査に携わる人であることを承知の上での極論である。お許しを乞う。そして紙上での反論をお待ちする。

#### HLA はなぜ主要組織適合性抗原か？

臓器移植界とは逆に、造血幹細胞移植の世界では HLA 適合性が三大予後要因のひとつとして君臨していて、非血縁間骨髄移植の普及は HLA 適合性の臨床意義をますます高めている。では、やはり HLA はメイジャーなのか？ 生物学的には確かにメイジャーである。免疫反応に関わる三大分子のひとつであり、その著しい多様性が種の維持に果たした役割は確かにメイジャーと呼ぶにふさわしい。HLA は TCR のリガンドであり、HLA 多様性に対する TCR クローンが他の抗原ペプチドに対するクローンより、1 桁から 2 桁多く用意されている。ゆえに同種免疫反応では HLA に対するアロ反応がいち早く大きなマグニチュードで起る。結果として主要組織適合性抗原としての性質をあらわす。もともとそれが目的？で進化したのではないにもかかわらず、である。

#### HLA はほんとうにメイジャーか？

HLA 一致同胞間造血幹細胞移植でも II 度以上の GVHD が 21%に起る（日本）。HLA は完全に一致しているから、その原因はマイナー組織適合性抗原不適合によるアロ免疫反応である（マイナー組織適合性抗原は HLA 以外の多型性である）。一方、HLA 不適合同胞間では 32%起る。その差は 10%で、これが HLA の GVHD への関与と考えられる。21%の約半分である。日本造血幹細胞移植学会の全国データ（図 1）から、そのことをまとめると以下の表になる。

表、急性 GVHD における HLA 不適合/ mHa 不適合の貢献度を比較する  
(図1のII度以上の急性GVHD発症率をもとに)

HLA 不適合による急性 GVHD (≥II) 発症 (率)		
(HLA 不適合同胞間) - (HLA 一致同胞間)	=31.2%-21.6%	≒10%
(HLA 不適合非血縁間) - (HLA 適合非血縁間)	=46.5%-37.9%	≒10%
mHa 不適合による急性 GVHD (≥II) 発症 (率)		
(HLA 一致同胞間における GVHD 発症率)	=21.6%	≒20%
(非血縁間 HLA 適合) - (HLA 一致同胞間)	=37.9%-21.6%	≒16%

HLA 不適合による急性 GVHD は、mHa などの適合性が同等の「同胞間」「非血縁間」において、HLA 適合性のみがファクターとなるグループを比較することによって、そのマグニチュードが測れるはずである。一方、HLA 一致同胞間における GVHD 発症率は、mHa 不適合のマグニチュードそのものである。同胞間と非血縁間 (HLA 適合) の違いは mHa 不適合率の差が主因となって、GVHD 発症率の差を生むと考える。

このように、造血幹細胞移植臨床における組織適合性のメジャーはむしろマイナー組織適合性抗原適合性である。

#### マイナー組織適合性抗原の解明のブレークスルー

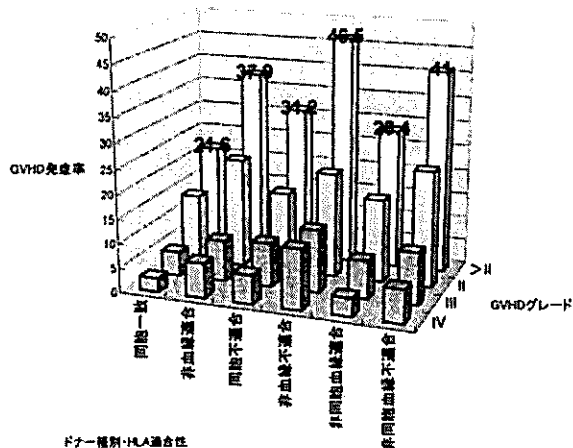
HLA にくらべてマイナー組織適合性抗原の研究は著しく遅れている。いまだに分子として特定できているものは10指に満たない。HLA が血清学的に同定できたのに対して、マイナー組織適合性抗原は細胞免疫学的方法 (CTL) しかなかったこと、ペプチド抗原であること、HLA 拘束性があること、など研究の方法論が桁外れに難しかった。

マイナー組織適合性抗原は HLA 以外の多型性である。よって、ゲノムの観点から言うと第6染色体短腕以外の cSNP (coded single nucleotide polymorphism) であり、とくに非同義置換のもの、ということになる。

ポスト・ゲノム時代はゲノム多様性を精力的に解析することである。すなわち100万以上といわれる SNP (スニップ) の発見であり、50万ともいわれる cSNP を見つけることである。このうちアロ免疫で Immunodominant なものがマイナー組織適合性抗原である。ポスト・ゲノム時代のひとつのテーマとしてマイナー組織適合性抗原の解明が浮上してきた。

マイナー組織適合性抗原は移植医療のみならず、疾患感受性遺伝子や薬物感受性遺伝子としてもはたらく。そして、腫瘍のアロ免疫療法のターゲットである。HLA からマイナー組織適合性抗原へ研究の方向は定まったといつてよい (さ)。

ドナー種別・HLA適合性別 a-GVHD発症率



図、ドナー種別・HLA 適合別 SCT 後 a-GVHD 発症率、血縁とくに同胞において II 度以上 GVHD 発症率が低いことがわかる。mHa 不適合の影響と考えられる (表を参照)「土肥博雄他:日本造血幹細胞移植学会 平成11年度 全国調査報告書,p140,6, GVHD (1991年から1998年までに1回目の移植を受けた症例) ①急性GVHD 重症度、表9、ドナー別急性GVHD 重症度」をもとに作図、一部改変。

# コラム 「生命の進化」

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

木村 彰方

我々医療分野に関連する者にとって、「生命」と言えば、まず「人間」を考えるのが常である。つまり、人間を中心として「生命」を考えているように思う。「生命」を幅広くとらえてみたところで、それはせいぜい「生物」、すなわち DNA という有機体構造物を共有する生命体を思い浮かべる程度ではないだろうか？ 私自身もその程度の認識であったが、数カ月前に宗教家の方々と話す機会があり、「生命やいのちとは何であるのか？ 鉱物のような無機物は生命の成り立ちに直接関連するのであるか？」との話題になった。その際に私は「ウイルスや細菌からヒトにいたるまでの生命体は、すべてがその基本として A、G、C、T の4文字で表わされる DNA を持っています。生物間の違いはその文字配列の違いに過ぎないので、生命の基本は DNA と言えます。また、DNA の特性は、自己複製を可能とする有機体情報とも言い換えられますので、この自己複製をするということこそが生命の必須条件だと思います。この自己複製に鉱物は直接関わっていませんので、生命の成り立ちに鉱物が関わったとは思えません」と話した。

思い返してみると、プリオンのように、蛋白質あるいはポリペプチド自体でも自己複製をすることがあり得る。このため、「DNA ではなく、ポリペプチドこそが生命の基本構造と考えた方が良いかも知れない」とその後考えていた。では、ポリペプチドの成り立ちに鉱物が関わり得るのであるか？ そんなことはまずないだろうと思っていたところに、日仏研究者の集いという会合で、東京工業大学の中嶋悟教授の研究されている内容をお聞きした。F1 レーサーと同姓同名であり、またフランス語が極めて堪能でいらっしゃることでも記憶に残る方であるが、何よりも、その研究の内容と発想に感服した。

中嶋教授のご専門は実験地球物理化学とのことであるが、その研究内容のひとつとして、無機体と有機体の相互進化、つまり、鉱物とポリペプチドとは相互作用の結果として成り立っているのではないかとする説を紹介された。その説の具体的な前提として、(1) 海底火山よりの湧出物として SiOH があり、また地球には SiO<sub>2</sub> (石英) が海底に大量に存在すること、(2) SiOH を SiO<sub>2</sub> に変換する細菌が存在するが、その触媒酵素の活性中心は OH 基を有するアミノ酸 (Ser など) に富んでいること、の2

点をまずあげられた。つまり、SiOH + SiOH → SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O の触媒反応には OH 基を有するアミノ酸 (Ser など) が連続して存在することが必要である。これを逆に考えてみて、この反応を仲介する過程で Ser-Ser の連結、つまりポリペプチドが生成されたのではないかとする説である。

SiOH + SiOH → SiO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O の反応自体はエネルギーがあれば進むものであり、原始地球には雷などのエネルギーも豊富に存在したと考えられる。そこで、これまではそのような高エネルギー下で有機体が生成されるか？ との実験がこれまでに行われていた。しかし、そもそも海底には電気エネルギーは大量には到達しないので、そのような研究にどれだけの意義があるのかには疑問が残る。これに対して、酵素による触媒反応はそれほど高いエネルギーを必要としなくとも充分起こり得ることであるので、中嶋教授の発想には生物学的にも十分な説得力があった。また、実際に支持体の表面に SiOH を結合しておき、そこにアミノ酸の Ser を加えて加熱するとポリ Ser のシートが形成されることをデータとして提示された。もちろん、この反応は側鎖として OH 基を有するアミノ酸の連結だけを説明するものに過ぎないとも言えるが、鉱物の形成過程と生命の進化という思ってもみなかった連結、つまり発想の奇抜さと、その実証を行われたことに驚嘆した。

地球物理学と聞くと、マントル移動だのプレートテクトニクス理論だのを思い出し、地震と結び付けて考えてしまふ。最近鳥取で大きな地震が発生したが、これまでその存在すら知られていなかった断層が動いたためとのことで、全く予知されていなかったものであった。有珠山の噴火はかなりの確に予知されたものではあるが、その後の伊豆新島から三宅島にいたる一連の火山活動の予知はそううまくは行っていない。そこに今度の地震である。現時点での地震予知は、過去のデータ、それもかなりあやふやなデータから統計学的に推定しているに過ぎず、とても科学的論拠に立った予知と呼べる代物ではないと思っていた。そのため、地球物理学という学問そのものに何かあやふやな印象を受けていたし、ましてや生命との接点はほとんどない学問と思っていた。しかしながら、よくよく考えてみると、地球上に既に生命が存在する以上、その誕生と進化は地球環境の中で考えることが必要

---

であり、地球物理学も決して生命と無縁ではないと言える。

鉱物とアミノ酸があればポリペプチドという生命の基本骨格の生成が可能であるとするならば、生命の基本は、鉱物という無機物の助けを借りて誕生し、また鉱物と共に進化して来たとも言えることになる。それではアミノ酸の生成には鉱物は関連するのであろうか？ もちろん有機物は無機物から生成されるのではあるが、その過程にも鉱物の生成が何らかの関係を持っていたのであろうか？

折しもスペースシャトル・ディスカバリーでは若田光一さんがロボットアームを操作している。地球上の生命が宇宙に乗り出すための足掛かりとなる宇宙ステーションの建設も近い将来のことになった。テレビニュースでその映像を眺めながら、「生命とは、いのちとは何か？」との時空を超えた思いを巡らせている。

