

## ASHI 27th Annual Meeting に出席して

HLA 研究所 丸屋 悦子

Hyatt Regency San Francisco で 10 月 13 日から 17 日まで開催された American Society for Histocompatibility and Immunogenetics 27th Annual Meeting に出席した。

Kamon の編集者より巾広く簡潔なレポートを依頼され、できる限りこのご要望にお答えしたいと思っている。今回は少し趣向を変えたレポートにしたいとも思う筆者である。日本組織適合性学会(当時は研究会)に参加してから 25 年が過ぎ、このミーティング(アメリカ版組織適合性学会)に出席するようになっておよそ 10 年が過ぎた。米国と日本の組織適合性学会の違いをこの学会のレポートを通し、読者(おそらく組織適合性になんらかの意味で関わっている)の方々にお伝えできたらと願い筆をとる。

【テロから約1ヶ月後のアメリカ】

まるで映画のようなシーン、超悲惨な出来事、あの 9 月 11 日より1ヶ月後のアメリカ、サンフランシスコで開催される学会、ささやかれる X day、今度は西海岸の有名な橋がターゲットとか? などなど。日本の旅行会社も騒然とし、やたら注意事項の追加発行をしていた。日本からの出席者も私と所長(HLA 研究所)の2名のみ(他の方はすべてキャンセルされたとか??)との噂の中、関空より飛び立った。飛行機は乗客も比較的少なく快適、サンフランシスコ空港でも、別段物々しい様子もなく入国し、空港をあとに Hyatt へと向かった。町を走る自動車のなかに星条旗を掲げている車をしばしば見かけた。

### Overview

【会場: Hyatt Regency San Francisco】

写真のように会場のすぐそばが海で見晴らしも良く、快適な所であった。



【出席者】

日本からの出席者は4人(我々とABIの浅井さん、湧永の加藤さん)であった。

ヨーロッパからの参加者もやや少なく、スピーカーであった Dr. Goulmy もテロが心配で欠席されたことを、Dr. Class から聞いて残念であった。しかし毎年お目にかかるイスラエルの Dr. Brautobal やドイツの Dr. E. D. Albart、オランダ、ライデン大学の Dr. Doxsiadis、イギリスの Dr. W. F. Bodmer、Dr. S Marsh などの顔が見られ、活発なディスカッションがかわされていたのは例年どおりであった。(写真)

【プログラム】

学会初日(13日): ABHI (American Board Histocompatibility and Immunogenetics) Laboratory Director's Examination, ABHI CHT / CHS (Certified Histocompatibility Technologists / Certified

Histocompatibility Specialists) Examinations, ASHI Committee Meeting, Accreditation Inspectors' Workshop, Registration, Welcome Reception などが行われた。この日はおもに組織適合性検査をする技術者の資格試験・組織適合性検査の専門家の資格試験・組織適合性検査をする施設の指導者としての資格試験をおこなっていた。

2日目(14日): オープニングは Beyond Sequencing of the Human Genome: Where do the New Opportunities for Medical Advances

Really Lie? (Dr. Olson, University of Washington School of Medicine) と Human Genetic Diversity: Reconstructing the Past (Dr. Stoneking, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Germany) についての講演であった。ヒト遺伝子の塩基配列解析からどのようなことが解明され、将来どのように応用できるかについての魅力的な講演であった。

### Plenary Session 1: *EMERGING TECHNOLOGYS*

1. Gene Expression Profiling of Allograft Rejection using cDNA Microarrays
2. Molecular Mechanisms and Diagnosis of Allograft Rejection

マイクロアレイを使った新しい技術をこの分野にどのように応用できるかをテーマに上記のような講演があった。ひとつの内容をごく簡単に述べると、移植片拒絶のメカニズムについて全体的な理解はまだできていない。これを解明するための強力なツールとして cDNA Microarray を用い急性拒絶をおこした小児腎移植患者の末梢血と拒絶のない小児腎移植患者の末梢血で検討した。結果急性拒絶では既知遺伝子のうち T cell Receptor alpha, MHC class II DP beta, CD8alpha, IL-2R が増加し、重要な要素であることがわかった。また未知遺伝子でより強く影響するものは NKG5/granulysin であることも解明された。Granulysin は末梢血での急性拒絶のマーカーとして使用可能と考えられている。この方法は拒絶にかかわる重要な遺伝子や主要な pathway を解析するための助けとなるツールである。 **Basic Science Session: *New Technology In Major Histocompatibility Complex(MHC) Studies***, Flow SSO (A new Reverse SSOHLA DNA typing method using fluorescently Labeled Microspheres and Flow Analyzer) の原理・方法・利点・弱点についての講演があり、 **Clinical Science Session: *Molecular Applications in Clinical Testing***, では RSCA (Reference Strand-Mediated Conformation Analysis) の原理・方法・応用法についての講演があった。

3日目(15日):この日は Stem Cell Transplantation に関する研究テーマがまとめられていた。 **Plenary Session 2: *Hematopoietic Stem Cell Transplantation***; シアトルの Effie Petersdorf により骨髄移植成績がまとめられ、Eliane Gluckman により臍帯血移植の成績がまとめられ、最後に Stella Davies により骨髄移植と臍帯血移植の使い分けかた、そ

の違いがまとめられた。これらのデータは以前から述べられている結果とほとんど変りないものであった。新しい点は骨髄移植で拒絶と HLA Class I のミスマッチが強く相関することが報告されたことである。 **Symposium 1** では GVHD についての研究がまとめられた。GVHD を起こすイニシエーターについて、およびドナー T 細胞反応を引き起こすホストの抗原提示細胞の役割について Michigan Cancer Center の James Ferrara による講演があった。 **Symposium 2** では Minor Histocompatibility Antigens について、このマイナーが Allogeneic Stem Cell Transplantation ではメイジャープレイヤーになったことを告げる講演(GVL effects と GVHD との関りについて)があった。これも日本の造血幹細胞移植学会のデータをもとに佐治博夫先生が分析され、得られた結果と同じであった。 **Basic Science Session: *Engraftment and Tolerance***; SCT 移植における生着と寛容についての講演がまとめられた。ここでもマイナー抗原が慢性拒絶反応に関っていることや mini Transplantation で混合キメラの誘導は抗ドナー TH2 CD4 細胞を増加させ、抗ドナー TC1 CD8 細胞が存在しないことに相関していることが報告された。 **Clinical Science Session: *New Insights on Factors affecting Bone Marrow/ Stem Cell Transplantation***; 非血縁間骨髄移植で血清学的クロスリアクティブグループの抗原は許容抗原とはならないことが報告された。HLA mismatch 移植の可能性が追求され続けていた。また KIR 遺伝子多型と骨髄移植成績との関係についてもまとめられた。GVHD が起こっている組み合わせではすべてのレシピエントの KIR 遺伝子型がドナーの KIR 遺伝子型に含まれていた(HLA ではドナーとレシピエントがホモザイゴウト対ヘテロザイゴウトのときに、KIR ではその組み合わせが反対)と報告された。



4 日 目 ( 16 日 ) : **Plenary Session 3: Xenotransplantation**; 異種移植ではミニブタ移植の是非について討論された。 **Basic Science Session: MHC and Disease Association-I**; 6題の講演があったが、あまり目新しいテーマはなかった。 **Clinical Science Session: Humoral Immunity of Allografts**; 臓器移植片に関する研究で、許容ミスマッチ抗原を探し、多くの患者によりマッチしたドナーを供給することを目的とした研究成果の報告であった。 **Plenary Session 4: AutoImmunity: HLA Association in Autoimmune Disease-Gene Involved and Their Possible Functions**; 多くの自己免疫疾患のイニシエーターとなり得るものは活性化した dendritic 細胞表面の疾患に相関する HLA 分子により提示される修飾された自己タンパク由来のペプチドであろうと Dr. Thorsby が話された。

5 日 目 (17 日) : **Plenary session 5 : NK Cells** ; 今までに解明された NK Cell についての成果とその応用を、 Dr. Parham, Dr. Lanier, Dr. Velardi により詳しく報告された。臨床応用として期待される点は Donor-vs-Recipient NK alloreaction を応用した GVL 効果が得られ、GVHD を起こす心配が無い。なぜならば標的となるものがレシピエントのリンパ系と造血細胞系に限られているからである。これは移植後の GVHD 予防用の免疫抑制剤なしに移植ができる利点があると報告された。 **Basic Science Session: Immunologic Factors in Transplantation and Disease, Clinical Science Session : MHC and Disease Associations-II, Symposium 3** として Classical NK Recognition, **Symposium 4** で Non-Classical Class I and NK Recognition と盛り山なメニューである。この部分は紙面の都合でタイトルの紹介だけとする。

[ハプニング]

学会、4日目の昼、我々が Workshop; Engraftment Testing に参加している最中に緊急連絡: サンフランシスコ空港が封鎖された - 爆発物が発見されたらしい: 一瞬がワメキが会場中を被った。しかし誰一人、会場から退席する人はなかった。翌日; 爆発物ではなかったことがわかった。とんだハプニングで当日帰る予定の人々には気の毒な出来事であった。

[Contributor's]

Abbott Diagnostics, Biotest Diagnostics Corporation, Dynal Biotech, Inc.UK, GenoVision, INC., Genra Systems, Inc., Lifecordes Corporation, Pel-Freez Clinical System の7社のサポートがあり、Educational Grants を次の3社が提供していた。

Abbott Diagnostics, GenoVision, Inc., One Lambda, Inc.

学会員はこれら協力企業に感謝の意を表しましょうとの呼びかけがなされた。

[開催地の予告]

28Th Annual Meeting: October 19-23, 2002 Opryland Hotel Nashville, Tennessee

29Th Annual Meeting: October 28-November1, 2003 Fontainebleau Hilton Resort and Towers Miami Beach, Florida

[つづき]

ASHI ミーティングの企画のされかたにご注目あれ。学会のテーマとして選ばれているものは、コンテンポラリーなテーマばかりで、そのひとつひとつにはっきりした目標が設定されている。今回取り上げられたテーマを研究することにより人類が得られうる恩恵をできる限り平易に説明し、その必然性を明確にしている。基礎的な研究と臨床応用がつねに一体となるよう計画されている。参加者には組織適合性に関するいろいろな分野のスペシャリスト(研究者)もいれば臨床医・技術者と多様なわけである。その多様な参加者が同じ空間を共有しながら、それぞれの立場で楽しむ(学び・討論し・共同研究のチャンスを生み出す)ことができるよう企画されている心配りがすばらしい。合体形式の学会と感じられる。基礎研究者と臨床応用者とその媒体者(医療技術者)が共に会し、同一のテーマ、ゴールに向かいそれぞれの立場から意見を交換しうる場を作りえるのが ASHI ミーティングである。日本の場合はそれぞれの分野ですばらしい学会が開催されているように感じる。この2つのミーティングを「生きた人間と完璧な人間の部品」に喩えられると感じるのは私だけでしょうか?

学会中、モーニングビジネスミーティングに初めて参加した。この会議の目的は組織適合性検査をできる限り正確におこなうため、学会としてどのようなことをどのような方法でおこなえば良いかを考え、実行に移そうとする会議であった。患者さんに正確な組織適合性検査を提供する為、世界中が同等のレベルで検査がおこなえるようにするため ASHI ができることを追求しているのである。マンネリ化を防ぐため、常に計画・実行・反省を繰り返している ASHI メンバー達であった。日本では、組織適合性検査の資格制度を定めようという提案がなされたとき、委員の中からこのような意見がでた。「そのような資格を作ってメンバーにどのようなメリットがあるのですか? 皆そんな資格取らないですよ」。ユーザーである患者のメリットは考慮されていなかったことを思い出し、日本とアメリカの意識の違いをまざまざと感じた。グローバリゼーションが囁かれているこの頃、島国人である私達ももう一度、開眼する必要を強く感じたミーティングであった。

## 第10回日本組織適合性学会大会を終えて

東海大学医学部分子生命科学 2 清水 佐良子 椎名 隆

第10回日本組織適合性学会大会が平成13年11月1日(木)、2日(金)の2日間にわたり福岡のシーホークホテル&リゾートにて開催されました。盛り沢山の内容に広い会場を埋め尽くした多数の参加者は、モーニングセミナーから、イブニングセミナーまでどっぷりとMHC漬けとなられたことと思います。このレポートでは、総てをお伝えすることはできませんが、いくつか我々が印象に残っていることを中心に紹介させていただきます。本学会大会の雰囲気少しでも感じとってくだされば幸いです。

### はじめに

本大会の構成はシンポジウム、特別講演、口演発表、ポスター発表に分けることができ、特にシンポジウムに比重をおくプログラム構成であった。他にも空いている時間を活用して、モーニングセミナー、ランチョンセミナー、イブニングセミナーが開催され、参加者は朝早くから熱心に演題を聴かれ、活発な討論が行われていた。ただし、討論が過熱しすぎるあまり、帰りの飛行機の時間を心配する先生方も少なくはなかった。

### シンポジウム

まず、このシンポジウムについて報告する。シンポジウムは、以下の5つの大きなテーマに沿って行なわれた。

- 1、 Non-classical MHC
- 2、 MHC - 免疫システムの中心に据えて
- 3、 MHC と移植
- 4、 多因子疾患の遺伝要因としての HLA
- 5、 MHC - 総合ゲノム科学の視点から

これらのテーマは、MHC に関する研究が多方面において science の中心的な役割を担っていることを物語っている。また、MHC 研究の今後の方向性を示唆する素晴らしいシンポジウムでもあった。



### シンポジウム1 Non-classical MHC

松浦晃洋(藤田保健衛生大学)、橋本敬一郎(藤田保健衛生大学)、石谷昭子(奈良県立医科大学)、猪子英俊(東海大学)、大久保岩男(滋賀医科大学)、小幡裕一(理化学研究所)

よく解明されている MHC クラス I およびクラス II 遺伝子などの古典的 MHC 遺伝子以外に存在している非古典的 MHC 遺伝子 (HLA-E, -F, -G, CD1, MR1, MIC, Zn- $\alpha$ 2-glycoprotein, マウス TL 抗原)の構造、機能、多様性について論じられた。まず、MHC 領域のパロガス領域 (1q21-q22) に存在する CD1 遺伝子群は、古典的 CD1 と CD1d クラスの2つのグループに分けられる。その内、ヒト、マウス、ウシ、ブタなど哺乳類において種を超えて保存されている CD1d クラスの遺伝子群は、合成糖脂質や GPI を TCR レポートリーが均一である NKT 細胞へ提示することが解明されている。このラット CD1d 遺伝子の発現は mRNA レベルの発現およびタンパクレベルでの発現の局在が異なることから、細胞の分化にしたがい CD1d の発現も細胞内(細胞質)発現から、細胞表面発現へと移動していること、その発現移動機構には、b2m の発現が必要であることが報告された。同じく MHC 領域のパロガス領域 (1q25) に存在する非古典的 MHC 分子である MR1 は MHC クラス I 抗原や CD1 と同様に b2m と結合すること、分子の発現は細胞表面に見られず、未成熟な糖鎖を有し細胞内に留まっていることが報告された。さらに、妊娠時に semiallograft である胎児が母体に拒絶されない現象に HLA-G の他に多型性の乏しい HLA クラス Ib (HLA-E, -F) も関わるということが示唆された。HLA-G、-Eは胎盤においてNK細胞を抑制したり活性化することにより、傷害活性抑制、サイトカインの分泌制御、妊娠維持に働いている機構の存在が示唆された。これに対して、母体と胎児の接点である胎盤トロホプラストでは、多型性を有する HLA クラス Ia、II の発現は確認されていない。一方、ゲノム進化の観点より、HLA クラス I 領域

1.8Mbのゲノム塩基配列解析の結果、祖先的なクラスI遺伝子の基本ユニットは<HLA-F-MICE>であり、数回の遺伝子重複をへて、現在のHLA領域が完成したことが推測された。また、HLAクラスI関連遺伝子であるMIC遺伝子は、HLAクラスI領域中に7個(MICA, MICB, MICC, MICD, MICE, MICEF, MICG)存在しており、MICA、MICBの発現が認められている。これらの遺伝子はMICEが祖先であると推測されている。以上のように、不明な点の多いnon-classical MHCであるが、一部においては古典的MHCと構造的に類似している半面、発現、機能においては、新奇性も見られた。このように、non-classical MHCのさらなる解明はMHC遺伝子ファミリーの全体像を機能的に、また分子進化学的に理解する上でも重要であることが示された。

### シンポジウム2 MHC - 免疫システムの中心に据えて

松下祥(熊本大学)、小園晴生(東京理科大学)、稲葉カヨ(京都大学)、福井宣規/笹月健彦(九州大学)、中野直子(東京理科大学)

MHCには、1)胸腺内において、T細胞分化過程に自己抗原ペプチドを未成熟胸腺細胞上のTCRへ提示することで、末梢で免疫応答に寄与するTCRレパトリーの形成をおこなう、2)末梢において、外来抗原ペプチドをTCRへ提示し免疫応答を誘導する、という大きくわけて2つの役割がある。このように、すべての現象においてみられる<TCR-MHC-ペプチド複合体>の相互作用について、胸腺内でのT細胞レパトリー形成、樹状細胞による抗原プロセッシング、エネルギー論的に見る細胞内でのペプチド交換反応、MHCを介した抗原提示細胞側のシグナル伝達機構、自己抗原変異ペプチドを用いた自己免疫応答の制御と様々な観点から論じられた。例えば、HLAクラス分子(HLA-DP, -DQ, -DR)を介したシグナルによる免疫応答制御については、DR分子における、MAPK/p37、MAPK/Erkの活性化、炎症性モノカイン(IL-1b)の産生増強、他方、DP、DQ分子における、MAPK/p37の活性化、抗炎症性モノカイン(IL-10/12)の産生増強が認められた。このように、多様性に富むHLAクラス分子はシグナル伝達機構も多様性に富み、異なる機能を担うことで、免疫応答の質に影響を与えていることが示唆された。

### シンポジウム3 MHCと移植

JOHN HANSEN (Fred Hutchinson Cancer Res. Ctr.)、笹月健彦/山本健(九州大学)、Paul Terasaki (Terasaki Foundation Lab.)、宇高恵子(京都大学)、前仲勝実(国立遺伝学研究所)、十字猛夫(日赤中央血液センター)

移植医療の現場において、ドナーと患者のHLA適合は、移植後の拒絶反応の緩和、臓器生着率の上昇において、極めて重要であることが指摘されている。本シンポジウムでは、実際の臨床データを中心に論じられた。ドナー-患者間のHLA-A、-B、-C、-DRB1、-DQB1のアリルミスマッチと移植された臓器への拒絶反応との統計学的解析から、勿論、すべてのアリルが適合していることが最適であるが、一つのアリルミスマッチはトランスを起すこと、しかし2つ以上のmultipleアリルにおけるアリルミスマッチは避けるべきであることが示された。一方、HLAが同一である兄弟間やHLA適合である非血縁者間の造血幹細胞移植においても、GVHD (graft-versus-host disease)を発症する症例、逆にHLA不適合であっても移植が成功する症例が挙げられた。これらの症例では、HLA以外の多型遺伝子の関与が考えられ、マイナー組織適合性抗原(minor histocompatibility antigen; mHA)の多型性が及ぼす影響が論じられた。さらに、腎臓、心臓、肝臓移植において、抗HLA抗体価は拒絶反応や生着率に相関し、また移植臓器が機能している患者においても抗HLA抗体は検出されることが示された。したがって、慢性拒絶反応の予防、予測において、血清中の抗HLA抗体価の測定の有用性が提唱された。このように良好な移植予後の達成において、解決すべき問題点が示された。

### シンポジウム4 多因子疾患の遺伝要因としてのHLA

猪子英俊(東海大学)、徳永勝士(東京大学)、西村泰治(熊本大学)、有波忠雄(筑波大学)、塩沢俊一(神戸大学)、白澤専二(国立国際医療センター研究所)/笹月健彦(九州大学)

自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)、I型糖尿病(IDDM)、慢性関節リウマチ(RA)などの多因子疾患は、連鎖解析および相関解析より、HLAと相関することが知られている。本シンポジウムでは、これら疾患の感受性遺伝子を探るべく、1)感受性遺伝子のマッピングと同定において、SNP(単一ヌクレオチド多型)に比べて、より高度な多型性を有するマイクロサテライトマーカーを用いた有効性、2)HLA領域の遺伝子に加えて、疾患と関連性が見いだされたnon-HLA遺伝子の相互効果の解析、3)疾患発症機構の解明において、IDDM患者由来T細胞が認識する抗原エピーブの同定から、自己抗原であるGAD65(グルタミン酸脱炭酸酵素65)とウイルスタンパク間の各エピーブ分子擬態(molecular mimicry)の関与について論じられた。HLA遺伝子とnon-HLA遺伝子の相互効果は、遺伝子の組み合わせごとに相違がみられることから、多因子疾患感受性遺伝子の同定には、HLA遺伝子領域からさらに広い

領域にわたってのゲノムワイドなマッピング、多型解析の必要性が示唆された。そして、これら絞り込まれた候補遺伝子の遺伝的多型性が疾患発症に与える影響の機序を明らかにすることの必要性が示された。

#### シンポジウム5 MHC - 総合ゲノム科学の視点から

五條掘孝(国立遺伝学研究所)、笠原正典(総合研究大学院大学)、猪子英俊(東海大学)、野中勝(東京大学)

MHC 遺伝子や抗体遺伝子などのゲノム領域はどのような過程を経て高等な免疫系を獲得してきたのだろうか。本シンポジウムでは、この疑問に答えるために、比較ゲノム解析の重要性、ゲノムパラロジ、様々な生物種の MHC 領域の比較ゲノム解析について論じられた。比較ゲノム解析とは、様々な生物種間の塩基配列を比較することにより、ゲノムの形成過程や遺伝子の機能の推移を明らかにする解析法である。まず、HLA 領域の特徴を分類すると、HLA 領域に見られる超多型は他のゲノム領域には認められない非典型である。ところが、遺伝子密度の高低、様々な疾患との相関、レトロポゾンの挿入、重複の痕跡については他のゲノム領域にも見られる典型である。このような HLA 領域の特徴から、超多型を除けば、他のヒトゲノム領域と同様に典型的な領域であるといえる。したがって、HLA 領域は比較ゲノム解析に絶好のゲノム領域であり、HLA ハプロタイプ間およびヒトと他の生物種間の MHC 領域の比較ゲノム解析を進めることは、ヒトゲノムの構造を理解するに等しいと考えられる。この比較ゲノム解析は様々な疾患の原因遺伝子の同定とともに、総合ゲノム科学の中心課題であると言える。野中勝先生はメダカ、ゼブラフィッシュ、フグ間の硬骨魚類における比較ゲノム解析について論じられた。では HLA 領域はどのような過程を経て誕生したのであろうか。この謎を解く鍵として MHC 祖先領域の genome duplication (倍化) が挙げられる。HLA 領域の遺伝子のなかで、MHC、TAP、LMP、HSP70 など少なくとも 15 個の遺伝子と相同性を有する各遺伝子が、ヒト第 1 染色体 1q21-25、第 9 染色体 9q33-34、第 19 染色体 19p13.3 の 3 領域にも見いだされた。この画期的な事実、この 4 つの領域が起源を一にし、ゲノム進化の過程で 2 回の倍化によって形成されたことを示している。この倍化は、様々な進化学的な証拠から脊椎動物誕生時に起きた、全ゲノムの 2 回の倍化による 4 倍化に相当すると考えられる。すなわち、MHC 領域は MHC 抗原の抗原提示としての機能に必要な TAP、LMP、HSP70 などを含む遺伝子を取りこみながら、MHC 遺伝子の誕生を伴いながら無脊椎動物と脊椎動物が分岐した時期にゲノム倍化した結果、倍化、形成、進化したと予想される。

#### 一般演題

続いて、一般演題について簡単に報告する。一般演題は前回、前々回と同程度である 52 演題について報告され、この内、18 演題は口演発表であり、残りの 34 演題についてはポスター発表であった。これらの演題は分子遺伝学 (I, , , IV, V)、疾病 (I, , )、移植 (I) のいずれかのセッションに分類され、いずれの内容も非常にレベルの高いものであった。

疾病セッションでは、主に HLA 遺伝子と相関する疾患についての免疫学的解析やマイクロサテライトマーカーを用いたより詳細な HLA 領域との相関解析について報告された。とりわけ後者の高精度な相関解析により、I 型糖尿病を含む数多くの疾患は HLA クラス II 領域の TNFA から BAT1 遺伝子間と強く相関するようである。この領域には、これまでに TNFA、ATP6G、IKBL、BAT1 の 4 つの遺伝子が同定されていることから、上記の疾患原因遺伝子が決定される日も近いものと思われる。また、HLA 領域はこれまでに 100 を超える疾患 (I 型糖尿病、リウマチ、ベーチェット病など) と相関することが知られているが、今回紹介された膵管狭細型膵炎など私自身が初めて耳にする疾患も HLA 領域と相関する。一体どのくらいの数の疾患が HLA 領域と相関するのか非常に興味深いところである。

分子遺伝学セッションでは、主に新しい HLA 遺伝子のタイピング法、多型解析、様々な生物種における遺伝子解析について報告された。ここで印象に残った演題の一つとして、HLA 遺伝子のタイピングの手法の進歩が挙げられる。すなわち、SSOP 法による日本人の多数検体における DNA タイピング法が開発されたこと、リアルタイム PCR 産物自動検出機 Long Read Tower TM System、MALDI-TOF/MS、DNA マイクロアレイなどの最新のハードウェアを用いて DNA タイピング法が開発されつつあることである。これらの方法によりこれからますます DNA タイピングの自動化や大規模化が進むことは間違いないであろう。一方では、HLA-B 遺伝子のプロモーター領域から全てのエクソン、イントロン領域を含む 4.6 kb を PCR 増幅させ、この塩基配列を解読し、タイピングや進化解析に応用するという斬新な試みも報告された。この演題は遺伝子全体の塩基配列を利用して DNA タイピングを議論する時代が到来したことを示唆する。今後はさらに安い DNA シークエンサーやシークエンシング試薬の開発、普及により、この方法も一般化するものと考えられる。印象に残った演題の二つ目としては日本人ハプロタイプを用いた HLA クラス I 領域のシークエンシングが挙げられる。背景として、1999 年に報告された HLA 領域の全塩基配列は、欧米人に頻度の高いいくつかの HLA ハプロタイプからなるモザイク配列であることから、単

一のハプロタイプで決定された塩基配列情報は今後の解析に必要不可欠であると考えられる。本演題は日本人ハプロタイプ間や民族集団間におけるゲノム構造の差異や1塩基多型 (SNP) を見い出すため、日本人に多くみられる1つのハプロタイプ (A24,B54,DR4) を有する細胞株 DNA を用いて HLA クラス およびクラス 領域 1.9 Mb のゲノム塩基配列を決定することを目的としている。結果として、HLA-F から LTB 遺伝子間に存在する 50 発現遺伝子のうち、このハプロタイプに欠落していると考えられる HCG - 7、HCG - 6 遺伝子を除く 48 遺伝子について合計 437 kb の塩基配列を決定した。そこで、この 437kb の内、多型を有する HLA クラス I 遺伝子や MIC 遺伝子を除く 379 kb について 1999 年に決定された塩基配列と比較すると、253 箇所 SNP が見い出された。つまり、1.5 kb に1個の割合で SNP が見い出されたのである。エクソン領域に限って見てみると、2.9kb に1個、イントロン領域では 1.3 kb に1個の割合で SNP が検出された。これらの値は一般的に報告されている値と矛盾しない。また本研究にて設計した 83 セットのロング PCR プライマーや 3549 個のシークエンシングプライマーは他の HLA ハプロタイプのシークエンシングへの適用が可能であることが示唆された。

ヒト以外の生物種における MHC 領域の遺伝子解析に関する演題が 14 演題と大会を大いに賑わせた。これらの演題にて報告された生物種は、チンパンジー、ゴリラ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ラット、ウズラ、ペンギン、サメと多種に及んでいる。まず、理化学研究所では、ウシとヒツジの MHC クラス 遺伝子と牛白血病発症に着目した5演題が報告された。すなわち、ウシのクラス 遺伝子の構造解析から、DRB3 遺伝子が牛白血病発症の感受性を規定している可能性を見出した。その後、400 頭を超える牛を用いて、この DRB3 遺伝子の多型解析をおこなった結果、38 種類のアリルを見出した。これらの中で発症牛には DRB3\*1601 が、一方未発症健康牛には DRB3\*14011 が有意に多かったとしている。これと類似したことは同じ偶蹄目であるヒツジの DRB1 遺伝子にも牛白血病ウイルスに対する抵抗性と感受性アリルが見い出されたことも報告された。同様の異種生物における MHC 遺伝子と疾病との関連性はウズラについても東海大学から報告された。すなわち、クラス B 遺伝子領域のハプロタイプが、ニューカッスル病に対する抵抗性や感受性を規定すること、特に抵抗性を持つハプロタイプのクラス B 遺伝子の発現量は有意に高いのに対し、感受性の個体については発現量は低いことを明らかにした。このように、将来的にヒトと同様に異種生物についても MHC と病気との関連性が明らかにされていくものと考えられる。

それ以外の生物種については総合ゲノム科学の中心課

題の一つである比較ゲノム解析である。MHC 領域における比較ゲノム学とは、様々な生物種間の塩基配列を比較することにより、MHC 領域の形成過程や遺伝子の機能の変化を明らかにする学問である。この学問は将来的に日本組織適合性学会のメインテーマになっていくものと思われるので、若干説明を加えたいと思う。東海大学チームはこれまでに合計 2530 kb (サメ: 110 kb、ウズラ: 200 kb、ラット: 550 kb、ブタ: 300 kb、アカゲザル: 80 kb、チンパンジー: 890 kb) のゲノム配列を決定した。そしてこれらのゲノム配列をもとに既知の塩基配列データと比較解析をおこなった結果を一言でまとめると、生物種間における基本的な遺伝子構造は大まかには保存されているが、それぞれの生活環境に適応するための MHC や MHC 関連遺伝子の birth and death により形成されてきたことが示唆された。また、サメは、クラス I 遺伝子、RING3、TAP2 など塩基配列を決定したすべての遺伝子について遺伝子サイズがヒトの3~5倍長いなどその生物種独自に持つ特徴も明らかとなった。これも何らかの生活環境が関与しているのかもしれない。さらに、チンパンジーでは、BACクローンをを用いて、MHCクラスI領域の約1.6 Mb をカバーするコンティグマップを作成し、シークエンシング解析を進めている。これまでに BAC 4 クローン、660 kb を決定した。HLA 遺伝子族の一つである MIC と HLA-B 遺伝子間においてチンパンジーには ヒトと比べて約 95 kb の欠失が存在する。また、欠失や挿入を除けば、ヒト MHC 領域の遺伝子構造と一致しており、ヒトゲノム配列との多様性は既報どおりに 1.5% であると報告された。チンパンジーは、種々のヒト感染ウイルスが共通して感染する唯一のモデル動物であることが知られており、MHC 領域との相関が示されているヒト感染ウイルスには、HCV (C型肝炎ウイルス) をはじめ、ヒトとチンパンジー間で同様の症状を示すものと HIV (ヒト免疫不全ウイルス) のように感染はするものの、その後の発症経過が異なるものがある。これらのウイルスに対する感受性の少なくともその一部は MHC 領域が決定している。したがって、チンパンジーの MHC 領域のゲノム配列を解明し、ヒトの配列と比較することは、このようなウイルス感染に対する免疫能の差異を明らかにするとともに発症過程における機序の考察を可能とするだろう。これらの生物種の塩基配列データの受け皿として、MHC 統合データベースの開発も着々と進んでいる。このデータベースを用いて MHC 祖先領域の推定や MHC 抗原の起源を解明することは遠い未来ではない。

来年度の大会は埼玉医大総合医療センターの前田平生先生の主催で平成 14 年 9 月 23 ~ 25 日埼玉県川越市の川越プリンスホテルで開催される。すでに演題提出まで半年程しかないが、次回も衝撃的な演題に期待したい。

## HLA SBT の方向性

## 検査室で出来る SBT (VGI SBT システムについて)

東海大学医学部 分子生命科学系 遺伝情報部門 成瀬 妙子

## はじめに

HLA 対立遺伝子の塩基配列多型を直接検出可能な検査法として、Sequencing Based Typing (SBT) 法が登場してから7年が経過しました。1994年、我々は幸運にも、米国で開かれた第一回の SBT テクニカルセミナーに参加させて頂く機会に恵まれたことがきっかけで、こうして SBT に関わるお仕事させて頂いております。この間にも様々な改良が加えられ、また、新たなシーケンサーの開発、新技術の導入、さらには試薬キットや解析ソフトの充実といった面に支えられ、SBT によるタイピングの精度は大きく向上しました。

こうした進歩に合わせ、いよいよ SBT においてもその方向性を選択する時期が到来していると考えます。すなわち、目的、用途に合わせて、異なるシステムの SBT を選択、あるいは使い分けることが、HLA SBT の精度向上につながると考えられるのです。

当教室においても、従来より使用しております ABI 社製に加え、昨年度より VISIBLE GENETICS 社 (以下 VGI) の SBT システムを導入し、研究の効率化を図っております。去る11月2日、日本組織適合性学会において開催されたベリタスランチョンセミナーでは、我々の SBT システム活用法をご紹介させて頂くことが出来ましたので、本稿ではその際にお話しした内容を中心にまとめてみました。

## SBT とはなにか

SBT とは塩基配列決定法を基本とした、HLA タイピング法です。本法が他方と画期的に異なる点は、個々の対立遺伝子について、塩基配列の違いを直接検出可能ということです。従って、職人芸的なフィルターの洗浄操作も、プローブや制限酵素の“非特異的反応”を考慮する必要もなく、また HLA に関する連鎖不平衡や遺伝子頻度などの知識やタイピングの経験が浅い人でも比較的誤判定の少ないよい結果が得られます。

しかしながら従来は SBT の“S”に重点を置かなければ、正しい結果が得られませんでした。つまりシーケンス結果を判定ソフトに読み込ませたり、目読での判定を行うには、バックグラウンドの低い均一な塩基配列波形を得なければならず、そのためにはサンプル DNA の

純度、濃度を均一にし、PCR 終了後やシーケンス反応終了後には、サンプル精製の作業を丁寧に行わなくてはなりません。また、機種によっては塩基配列を読み取るための泳動に7時間を要し、コストの面でも決して安価ではありません。従って、SBT とは誰もが認める“究極の高精度タイピング”法でありながら、すぐには導入できないのが現状です。

## VGI を用いて手軽に SBT

さて、筆者らは、もっと手軽に SBT を行うために VGI SBT システムを導入し、以来「超高精度タイピング法」として活用していますが、その最も大きな理由は以下の通りです。

## 1. 迅速、簡便

サンプル DNA を PCR で増幅後、シーケンス反応の鋳型として用います。シーケンス反応の終了後は即座にサンプルを泳動でき、この間の精製はまったく不要です。さらに泳動の結果を左右するゲルはカートリッジから注入して数分で出来上がり、泳動は30分で終了します。こうした操作は他法での DNA タイピングとほとんど同じ感覚で行え、特別な手技は不要です。

## 2. 少数検体 向き

一回の泳動で、クラス II では2検体、クラス I では1検体がタイピング出来ます。これは他社から見れば同時に最大の欠点でもありますが、再検査や確認用など少数の検体を扱う場合には最適です。1検体のために大きなゲルを調整することも不要ですから省コストにつながります。また、機械もコンパクトなので場所の確保に困りませんし、使用電圧は100Vなので高圧電源の設置も不要、省エネで、しかもいつでも器機の移動が可能です。

## 3. 解析ソフトの操作性

実は VGI システムの一番大きな魅力は、判定ソフトの操作性のよさにあります。本システムは面倒な塩基配列生データの編集を自動で行うため、いわゆる研究領域の「シーケンシング」に精通していない人でも手軽に塩基配列情報を得られます。また、この生データにほとんど手を加えることなく、ライブラリーとの照合、対立遺伝子候補の絞り込みが可能で、判定に要する時間を大幅に短縮できます。

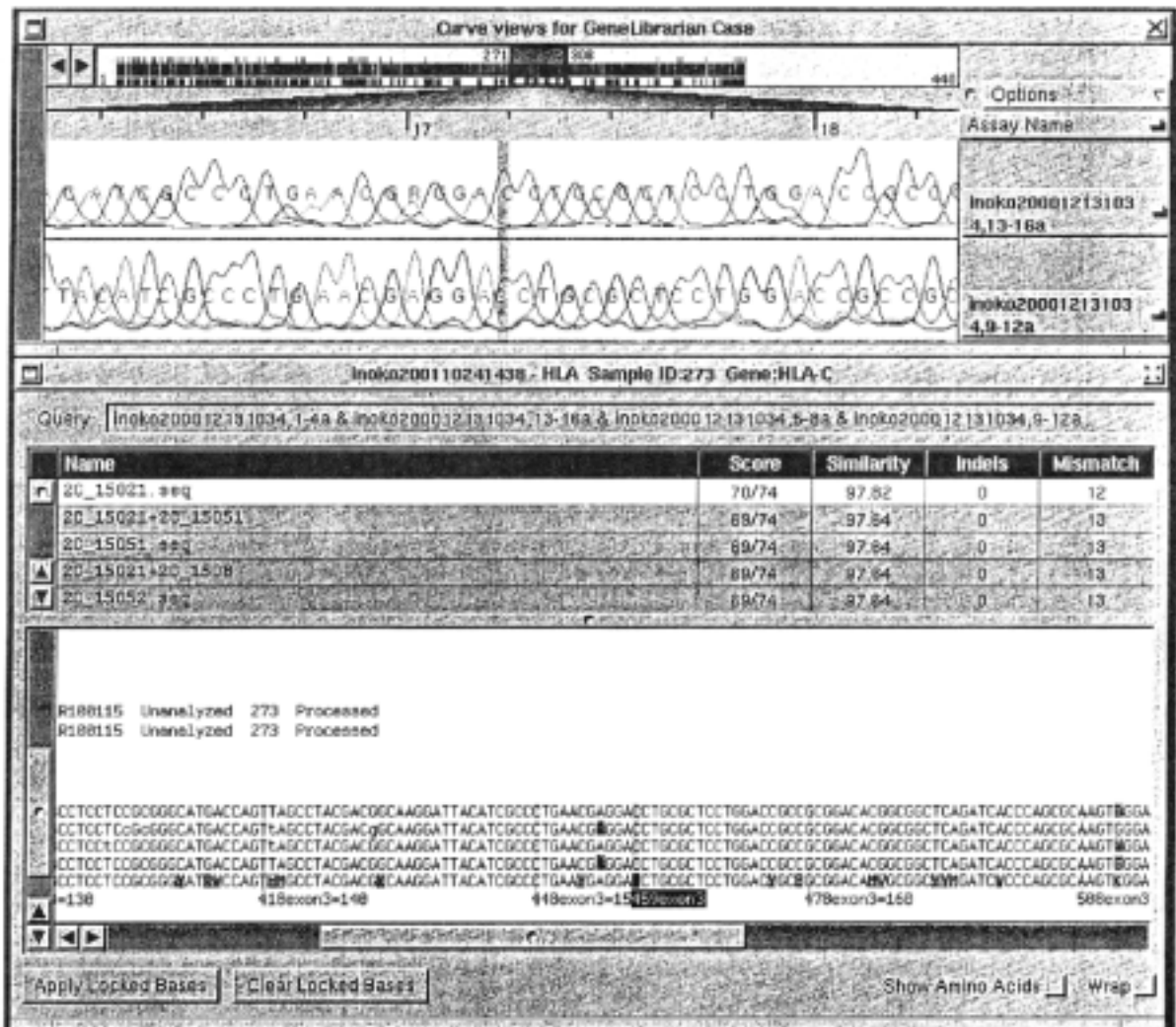


生データを基に割り出された候補対立遺伝子の組み合わせは、一致度の高い順からすべてリストアップされ、塩基配列、波形データ、候補遺伝子との不一致部分などと共に、同一解析画面上に表されます(図1)。例えば、塩基配列部分は、多型を示す配列部位をオレンジで示しているのので、その部分の波形を重点的にチェックし、逆に非多型配列部分は、波形の乱れを修正せずとも候補遺伝子が得られます。実はこのことが、本ソフトの優れた点であり、我々は画面を見ながら識別に必要な塩基配列部分のみに焦点を当て、消去法による解析を行うことで非常にスピーディーにタイピングを行っています。

### 検査室でできる SBT

こうして御紹介した条件は、HLA タイピングをルーチンワークとする検査室などで、少数検体について手軽に SBT を行うには最適です。また一部のサンプルのみをさらに詳細に解析する場合や、候補遺伝子の絞り込みが必要な場合には有用と考えられます。これまで、大掛かりな SBT システムが導入不可能だった検査室などで、今後本システムが活用されることを期待しています。

図1



## SBT 試薬の最新版 Forensic 社製 SBT 試薬 AlleleSEQR

東海大学医学部 分子生命科学 河田 寿子

蛍光シークエンサーの開発により、シークエンスは難しい技術ではなくなりました。また、シークエンスを利用した HLA タイピング法も開発され、試薬、機器、解析ソフトを使用した、HLA SBT (sequencing based typing) 法として確立されております。プロトコルどおりにすすめてゆけば、初心者でも簡単に HLA 遺伝子型の決定ができるシステムになっています。この SBT 法を迅速におこなうためには、解析に使用するシークエンスデータが、解析ソフトの認識しやすい美しいデータであることが重要です。そして、蛍光試薬を使用した解析には操作するときいくつかの注意すべき点があります。

今回検討を行ったフォレンジック社製 AlleleSEQR SBT kit は操作が簡単で、蛍光試薬検出におこりやすい障害を取り除くような試薬、プロトコルを用い、解析しやすいシークエンスデータを得られる方法であると考えられますので紹介していきたいと思ひます。

## シークエンスのポイント

HLA 解析のみならず、シークエンス解析を行うためには決まった操作の流れがあります。目的遺伝子の増幅、増幅確認の電気泳動、PCR 産物の精製、サイクルシークエンスの PCR、エタノール沈澱、蛍光シークエンサーによる電気泳動、解析。順番に並べてみましたが、この中に、シークエンスデータに大きな影響を与えるステップが 3 箇所あります。それは、1) 目的遺伝子の増幅、2) PCR 産物の精製、3) エタノール沈澱です。

なぜなら、市販されているシークエンスキットは蛍光 PCR 用の試薬のみ供給されており、その他の必要な操作に関する試薬は別に用意しなければならず、内容などをそれぞれ検討する必要があります。従来の SBT kit も目的遺伝子増幅用のプライマーミックス、蛍光 PCR 用の試薬は入っていますが、やはり精製、エタ沈用の試薬は含まれていません。

表 1 目的遺伝子の増幅

	A社	B社	Forensic社
<b>Class-I</b>			
長さ	約2kb	約1kb	約1kb
解析領域	ex2 ex3 ex4	ex2 ex3	ex2 ex3
サンプル量	100ng	500ng	<u>60ng</u>
<b>Class-II</b>			
DR			
Primer試薬数	12本	8本	<u>1本</u>
サンプル量	400ng	1ug~1.7ug	<u>40ng</u>
確認泳動	必要	必要	<u>必要なし</u>

それゆえ、どのような操作、試薬を選択するかによって、シーケンスデータの検出結果や、操作性が変化します。

AlleleSEQR SBT kit は、目的遺伝子増幅から、蛍光 PCR 産物のエタノール沈澱までの必要な試薬、プロトコールが用意されており、購入してすぐにエタノール沈澱までが完了し、試薬などを新たに用意する必要がありません。また、使用蛍光色素も蛍光強度にばらつきが少ないものであるため、ヘテロ接合体の検出が容易であるという特徴を持っています。

### 1) 目的遺伝子の増幅

ここから実際の操作について説明していきます。この、最初の PCR 増幅が成功しないと SBT は先に進むことができません。一番重要なのが、抽出された DNA サンプルが pure でコンタミを含まず、正確な濃度がわかっていて量が十分あることです。しかしそのようなサンプルは、どのタイピング法を用いても結果は得られるものであります。それでは、PCR がかからないサンプルとはどのようなものでしょうか。最初の PCR がうまくいかない理由としては、1、DNA の抽出がうまくいっていない。2、DNA の濃度が薄いということが多いようです。

表 1 に、当研究室で使用した 3 つの SBT kit の比較が書いてあります。AlleleSEQR に特徴的なのは PCR に使用するサンプル量が少なく済むということです。クラス I タイピングは解析領域が exon2 と exon3 なので、増幅の長さが約 1kb、そして必要な DNA サンプル量は一番少ない 60ng となっています。他社の 2kb のものと比較して 1kb のものは増幅領域が短いために PCR がかかりやすい、といった感触を得ています。

そして、クラス II タイピングでは、増幅試薬を 1 種類で行うため前もって SSP 法を行う必要がなく、そのため非常に少ないサンプル量で解析ができるということです。また、クラス I クラス II 共に電気泳動による確認を行いません。ここで、操作が 1 つ簡略化されています(表 1)。

少ないサンプル量は DNA 中の PCR 反応阻害物質の混入をおさえ、増幅しやすいという利点もあります。試薬反応量は決まっているので、濃度が薄くてもサンプル量を増やすことはできません。少量で確実に増幅するものであれば、濃度の問題を解消することができます。

### 2) PCR 産物の精製

第一次 PCR により目的遺伝子を増幅したら、第二次 PCR、すなわちシーケンシングプライマーと蛍光 ddNTP を用いたサイクルシーケンシングですが、そのままの状態では PCR がかかりません。最初に使用したプライマーと dNTP

が反応を阻害するからです。チューブの中にプライマーが複数だと複数のシーケンスを検出してしまいますし、過剰な dNTP は蛍光試薬中の dNTP の取込みを減少させてしまう可能性があります。

PCR 産物の精製法は 2 種類あります。カラムを使用するものと酵素反応を利用するものです。AlleleSEQR は酵素法を採用しており、kit の中に Exo/SAP 試薬が入っています。最初の PCR 反応チューブに直接試薬を分注し、サーマルサイクラーで 37°C 15 分の酵素反応、80°C 15 分での酵素の失活、合計 30 分で終了です。Exonuclease が 1 本鎖 DNA(Primer) を分解し、SAP(Shrimp Alkaline Phosphatase)が dNTP を分解し、PCR 産物の精製が完了します。最初の PCR チューブに試薬を分注するだけなので、この方法は操作が楽で、検体の取り違えや、操作ミスによるサンプルのロスが少なくなりますし、特別用意する物もありません。

### 3) エタノール沈澱

蛍光 PCR が終了したら、PCR 産物のエタノール沈澱を行います。ここが最も重要なステップです。試薬をいれて遠心するだけなのですが、シーケンスデータを美しくするためにはここを慎重に行わなければなりません。なぜなら、PCR 産物をたくさん沈澱させるような方法をとると過剰な未反応の蛍光色素がノイズとなって解析を阻害しますし、沈澱させないような方法をとると短い方のシーケンスの蛍光シグナルが低くなりヘテロ接合体の識別が難しくなります。

AlleleSEQR SBT kit が使用している方法は、ET Terminator 反応です。この、ET Terminator 反応のエタノール沈澱を行うときは、kit に入っている EDTA 試薬を使用します。EDTA が未反応の蛍光色素を取り除きやすくし、シーケンスのノイズを減らす働きをします。EDTA は蛍光試薬と結合しやすく、シーケンスの際に蛍光シグナル値が低くなる結果が得られております。我々の研究室では、最初の DNA サンプルを TE Buffer で溶解してあるものを使用した場合、水で希釈したサンプルの蛍光強度と比較すると約 1/3 のシグナル値が検出されます。ですから、我々はシーケンスのためのサンプルは TE Buffer では希釈しないようにしています。別の試薬のプロトコールでは TE Buffer の EDTA 濃度を変えているところもあるようです。しかしここでは、それを逆に未反応蛍光を除去するために使用しています。

最初に EDTA で蛍光を除去しながら、リンス時にエタノールの濃度をあげて、さらに反応した産物をおとす、というわけです。少しくらい蛍光を除いても感度の良いわずかな蛍光 PCR 産物で検出をおこなうということでしょうか。

## シーケンスデータとタイピング

実際の解析データを2種類示しました。今年のQCワークショップで使用したDNAサンプルの、従来のSBT kitと、AlleleSEQRを使用したものの、HLA-Bのシーケンスデータです。上がForward、下がReverse方向のexon2のシーケンスです。HLA解析ソフトで処理されていますので、Reverse側はForward側と同じ方向から読んでいる形になっています。

最初に、図1で示したDye terminatorでの解析ですが、黒い矢印の部分がヘテロ解析部分です。HLA解析ソフトはヘテロ部分のピークの重なりが40%以上のものをヘテロとして解析するように設定されています。ですから、左から2

本目の矢印のように半分以下のピークであるときはヘテロと認識されません。この場合、反対鎖の相当塩基部分にヘテロのピークが観察される場合、自分で修正してヘテロと解析します。左から3本目と6本目の矢印は一見ヘテロのようなピークにみえながら反対鎖にはヘテロの結果がでていない、ノイズピークであると判定します。このように、機械で判定したものの正解を人間の目で確認しながら解析していくわけです。

シーケンスデータは出ているのに、なぜ解析ソフトにかからないのか？それはこのノイズピークが原因なのです。次に図2で示した、AlleleSEQRでの解析です。上がForward、下がReverseのexon2の解析で先ほどシーケンスデータと全く同位置を示しています。この解析データを

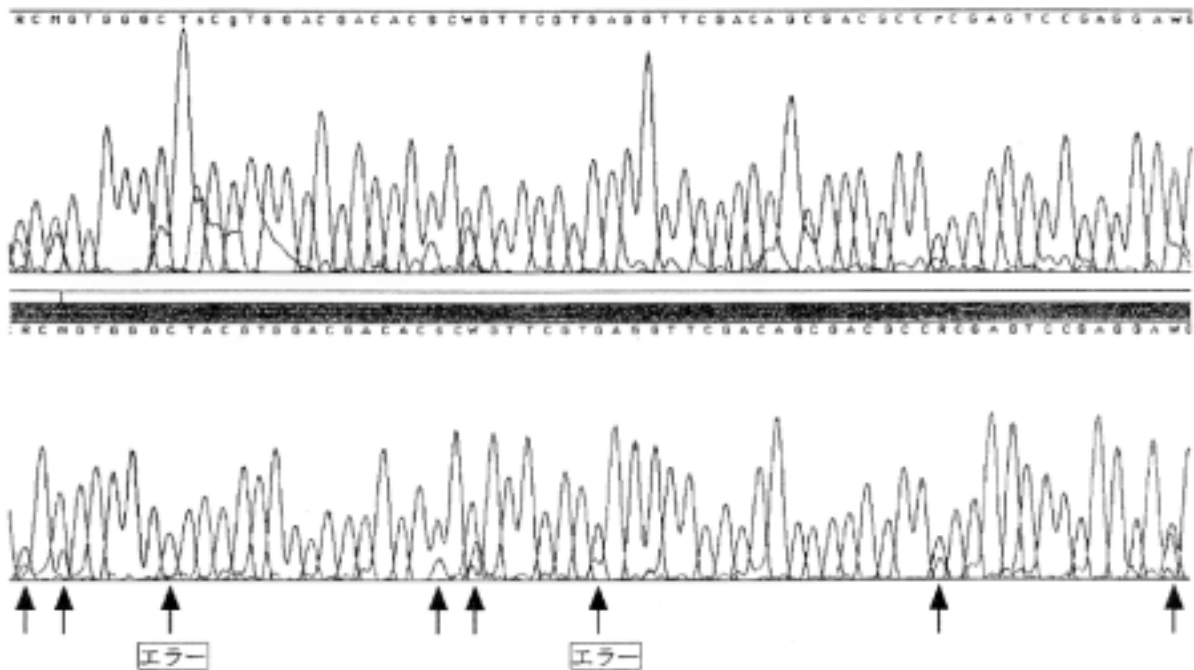


図1 SBT Class I -B kit Dye terminator 解析画面

みると、ヘテロと間違えてしまうようなノイズピークがみられず、きれいなバンドパターンが得られています。また、ヘテロのピークの高さがほぼ同じか、または半分以上重なっていることが確認されます。全体の高さとしては低いけれども、2本のピークは確実に重なっている。これは、解析ソフトが確実にヘテロと認識するものですし、修正作業においてもヘテロピークは黒くつぶれて目立ちますので確認しやすく、解析が早く終了します。今回の結果でもクラスIは exon2, 3での解析なので絞り込めないものも一部ありましたが、結果は同じで解析ソフトでの作業は AlleleSEQR 試薬の方が早く終了するという、結果になりました。

SBT はシーケンスを使用したタイピング法でありますので、HLA の知識も必要ですが、シーケンスの知識も必要です。ですが、HLA タイピングを SBT で行う技術者のほとんどはシーケンスの経験のない方が多いのではないのでしょうか。シーケンス技術と HLA タイピングの解釈、この2つがあつて、正確な HLA SBT が完成されると思いますので、ワークショップなどでどんどん問題をディスカッションしましょう。実は、シーケンスは仕事をしている人に聞いた方が早く問題解決するんですよ。

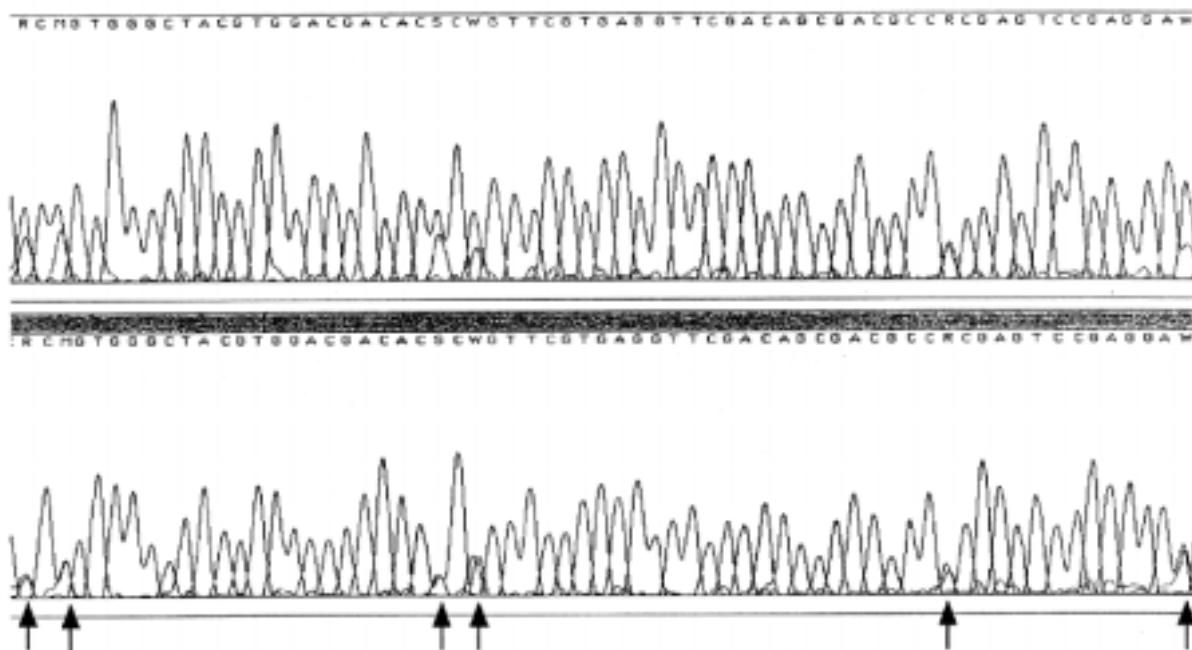


図2 AlleleSEQR Class I-B Typing kit

ET terminator 解析画面

## LABType SSO を使用した HLA タイピング

HLA 遺伝子型タイピングで PCR-rSSO 法をメソッドとする場合、プローブの支持体に何をを用いるかが操作性や解像度に影響を与えてきた。エライザ用マイクロプレートを用いれば操作全般の自動化が可能で迅速性に優れ大量処理が可能となるし、メンブランを用いれば多くのプローブを貼り付けられ解像度の高い結果が得られる。しかしながら、これらの特徴を同時に充たすことは困難であった。

今回、One Lambda 社から提供される LABMAS (Lambda Array Beads Multi-Analyte System) というシステムはこれらの特徴を充たすことは勿論のこと、想像を越えた可能性を秘めているようだ。

このシステムのプラットフォームとなる機器が、Luminex 社 (テキサス州オースチン) が開発した LABScan100 システムである。

原理はフローサイトメトリーと同じであるが、細胞膜上のレセプターを染め分けて測定する従来のフローサイトメトリーとは異なる。直径  $5.5 \mu\text{m}$  のポリスチレン・ビーズを赤とオレンジ 2 種類の蛍光色素で段階的に 100 種類に色分けして測定仕分ける装置である。

LABType SSO では、この色分けされたビーズごとに異なるプローブを結合させ、混合してひとつの反応液?とする。言い換えると、ひとつの反応で最大 100 プローブ同時アッセイが可能である。これにビオチン標識プライマーで増幅した PCR 産物を混合ハイブリダイズし、未結合の PCR 産物を洗浄後、ストレプトアヴィジンでラベリングし、各ビーズの発する蛍光シグナルを測定する。装置では、100 種類のビーズの蛍光シグナル (Classification) とプローブとハイブリダイズした PCR 産物の蛍光シグナル (Reporter) をそれぞれ別の波長で同時に測定する。各色のビーズは均等に混合されているがバラツキは避けられないため、最も少ないビーズを 100 カウントしたところで測定は終了する。

そして、得られた蛍光シグナルの平均値を専用の判定ソフトにインポートし、その反応パターンからタイピング結果を導くことになる。

操作時間は 50 検体の場合、PCR が 1 時間 20 分、SSO の操作が 1 時間 15 分、測定が 25 分、判定が 30 分、合計 3 時間 30 分ほどである。装置のウォームアップはこの間に行える。

処理可能数は 96 ウェルマイクロプレートで測定するため、プレート遠心のことなども考え、偶数枚で行うとすると 1 日 4 枚、慣れれば 8 枚くらいはひとりで処理できるのではないだろうか。8 枚処理で 768 検体である。メンブランを使用するレギュラー SSO で 60 プローブ位の系ではどんなに効率よくおこなっても 700 検体処理するには 3~4 週間はかかるであろう。ただし、768 検体の判定は相当キツイと考えられる。

製品のラインナップは HLA クラス I の A、B、C、HLA クラス II の DRB、DRB1、DQB1 ということだが、クラス I、クラス II で PCR の条件、SSO の操作などは全く同一に設計されている。

一部はまだ製品化されておらず、本セミナーでは HLA-B と DRB1 が紹介された。HLA-B が 68 プローブ、DRB1 が 46 プローブである。検体は日本人に通常みられる HLA 遺伝子型のホモタイプと同一グループ内ヘテロである。これらは血清学的タイピングではもとより DNA タイピングでも判定を誤りやすいタイプである。

ところで、この米国産のタイピング・システムは多種多様な米国人に対応した 6,000 通り以上ある NMDP コードに変換された結果がでてくる。我々、日本人に NMDP コードは膨大過ぎるので、日常見られる日本人特有の HLA 型が問題無く導かれるかが興味のあるところである。

表1は HLA-B の結果で、表2は DRB1 の結果が示されている。オリジナルアサインの右横に本キットの結果を 3 通りまで示し、それ以上の組み合わせが存在する場合は、Adjustment の項目に " >" を付してある。また、cut-off 値を調整した場合は、そのプローブ番号と ↑ ↓ で示してある。

先ほど述べたとおり、結果は NMDP コードに変換されてくるので、一見わかりにくいのが、斜体太字で示した結果がオリジナルアサインにヒットしている組み合わせとなる。個々の NMDP コードについては、ここでは省略する。

HLA-B では 16 検体のみの検討ということで、すべてのプローブについて反応性のチェックができていないが、全てオリジナルアサインと同一の結果を得ている。

DRB1 でもほとんど問題なく結果が得られているが、DR15 と 16 の一部のアルルで Ambiguity な組み合わせになるため、DR15 の方が 2 桁までの結果にとどまる。DR4 グループでは現在のプローブの組み合わせでは、日本人に多い DRB1\*0403 と 0406 の区別ができない。また、

DRB1\*0405 がらみも弱い。しかし、2 桁にとどめれば何ら問題は無いだろう。その他、DRB1 の Cell No.40 のプローブ 59 に偽陰性が1例生じたが判定に支障はないようだ。

さて、ここまでの説明でこのシステムの凄さがご理解いただけたであろうか。操作性、迅速性、大量検体処理、高解像度という相反する条件をどれも現実のものとしている。今回取り上げている LABType SSO はHLAタイピング・キットで

あるが、実はLABScreenというHLA抗体検出キットもある。LABScreen は B Cell Line から得た抽出抗原をビーズに結合したものであり、HLA抗体のスクリーニングは勿論、特異性の同定も可能である。これまで、同一のシステムでタイピングと抗体検査ができるとは想像もしていなかった。また、この 100 色のビーズは 1,000 色位までに拡大可能だそうである。さらに、開発担当者は SSP 法との組み合わせで何かを考えているようである。

表1. LABType SSO HLA-B の結果

HLA Group	Cell No.	Original Assignment	Conclusion of LAB Type SSO (NMDP code)			Adjustment (Probe No.)
			HLA-B-1	HLA-B-2	HLA-B-3	
B5	6.	*5101 -	<b>*51 *51</b>	*51 *51AUX	*51 *5306	>
	4.	*5201 -	<b>*5201 *5201</b>	*5201 *52012		
	12.	*5201 -	<b>*5201 *5201</b>	*5201 *52012		02 ↑
	15.	*5101 *5201	<b>*51 *5201</b>	*51012 *5201	*5201 *5302	>
	8.	*5101 *5901	<b>*51 *5901</b>	*51012 *5901	*5112 *5901	33,73 ↓
	16.	*5102 *35	<b>*51021 *35</b>	*51021 *35ABN	*51022 *35ABN	>
B35	3.	*35 -	<b>*35 *35</b>	*35 *3536	*35 *3529	>
	14.	*35 *1518	<b>*35 *15BHJ</b>	*35 *3536	*3529 *15BHJ	>
	10.	*39 *1518	<b>*39 *15BHJ</b>	*3905 *15BHJ	*39 *3919	
B22	2.	*5401 *5502	<b>*54AB *55AA</b>			01 ↑ 17 ↓
	13.	*5401 *55	<b>*54AB *55AA</b>			01 ↑ 17 ↓
	1.	*6701 *5502	<b>*6701 *55AA</b>	*6701 *5507		30,67,33 ↓
B40	5.	*4001 -	<b>*40AEK *40AEK</b>	*40AEK *40	*40AEK *4014	
	7.	*4002 *4801	<b>*40HDW *4801</b>	*40DVD *4801	*40 *4801	> 30 ↓
	9.	*4006 *07	*07EH *40HDW	<b>*07EH *40DVD</b>	*07EH *40	>
	11.	*07 -	<b>*07 *07</b>	*07 *07022	*07 *0726	>



表2. LABType SSO HLA-DRB1 の結果

HLA Group	Cell No.	Original Assignment	Conclusion of LAB Type SSO ( NMDP code )			Adjustment ( Probe No. )
			DRB1-1	DRB1-2	DRB1-3	
DR1, 10	1.	*0101 -	<i>*01KJ *01KJ</i>	*01KJ *0107		
	2.	*1001 -	<i>*1001 *1001</i>			
	3.	*1001 *0101	<i>*1001 *01KJ</i>			
DR2	4.	*1501 -	<i>*1501 *1501</i>	*1501 *1503	*1501 *15FH	>
	5.	*1502 -	<i>*1502 *1502</i>	*1502 *1508	*1502 *15012	>
	6.	*1602 -	<i>*16021*16021</i>	*16021 *1603		26,37 ↑
	7.	*1502 *1501	<i>*1502 *1501</i>	*1502 *1503		
	8.	*1501 *1602	*16021 *1502	*16021 *15012		26,37 ↑
DR8	9.	*1502 *1602	*16021 *1502	*16021 *15012		
	10.	*0802 -	<i>*0802 *0802</i>	*0802 *08AS	*0802 *0804	>
	11.	*0803 -	<i>*08CNB *08CNB</i>	*08CNB *0814	*08CNB *0819	>
DR5	12.	*0803 *0802	<i>*0802 *08CNB</i>	*0802 *0814	*08CNB *0804	>
	13.	*1101 *0401	<i>*04 *11</i>	*0435 *1137		
	14.	*1501 *1101	*1502 *11	<i>*11 *15012</i>		
	15.	*1201 -	<i>*12GW *12GW</i>	*12GW *1205	*12GW *1207	>
	16.	*1202 -	<i>*1202 *1202</i>	*1202 *1207		
DR6	17.	*1201 *1202	<i>*12GW *1202</i>	*1202 *1205		
	18.	*1301 -	<i>*13AMF *13AMF</i>	*13AMF *1335	*13AMF *1322	>
	19.	*1302 -	<i>*1302 *1302</i>	*1302 *13GHN	*1302 *13JEX	>
	20.	*1301 *1302	<i>*1302 *13AMF</i>	*1302 *1335		17 ↓
	21.	*1401 -	<i>*14DPJ *14DPJ</i>	*14DPJ *1432	*14DPJ *1426	>
	22.	*1501 *1405	<i>*1501 *14EK</i>	*1503 *14EK	*15012 *14EK	
	23.	*1502 *1407	<i>*1502 *1407</i>	*1407 *15012		
	24.	*1405 *1401	<i>*14DPJ *14DPJ</i>	*14DPJ *14EK	*14DPJ *1426	>
	25.	*1407 *1401	<i>*1407 *14DPJ</i>	*1407 *1432	*1407 *1426	>
	26.	*1403 *1406	<i>*1403 *1406</i>	*1402 *1412	*0107 *1412	
	27.	*1501 *1403	*1403 *15022	*1403 *1502	<i>*1403 *15012</i>	02 ↓
	28.	*1406 -	<i>*1406 *1406</i>			
	29.	*1412 *09012	<i>*09012 *1412</i>			31,37 ↑
DR4 (Homo)	30.	*0803 *1307	*1347 *0818	<i>*13071 *08CNB</i>	*1313 *0824	>
	31.	*0301 -	<i>*03NNN *03NNN</i>	*03NNN *03VG	*03NNN *0316	>
	32.	*0401 -	<i>*04 *04</i>	*04 *0434	*04 *04	>
	37.	*0405 -	<i>*04GKA *04GKA</i>	*04GKA *0424	*04GKA *0430	>
	34.	*0410 -	<i>*04KM *04KM</i>	*04KM *04KNT		
	35.	*0404 -	<i>*04 *04</i>	*04 *0432	*04 *04KNT	>
	36.	*0403 -	<i>*04 *04</i>	*04 *0432	*04 *04KNT	>
DR4 (Hetero)	33.	*0406 -	<i>*04 *04</i>	*04 *0432	*04 *04KNT	>
	38.	*0407 -	<i>*04 *04</i>	*04 *0107	*04 *04072	>
	39.	*0405 *0410	<i>*04GKA *04KM</i>	*04GKA *04KNT		> 17 ↓
	40.	*0405 *0401	<i>*04 *04GKA</i>	*04 *0430		59fn
	41.	*0403 *0406	<i>*04 *04</i>	*04 *0432	*04 *04KNT	
	42.	*0403 *0407	<i>*04 *04</i>	*04 *0432	*04 *04KNT	> 17 ↓
	43.	*0405 *0406	*04 *04KM	*0107 *04KM	*04072 *04KM	> 17 ↓
DR7, 9	44.	*0405 *0403	*04 *04KM	*0107 *04KM	*04072 *04KM	>
	45.	*0410 *0406	<i>*04 *04KM</i>	*0432 *04KM	*04KM *0439	
	46.	*0410 *0403	<i>*04 *04KM</i>	*0432 *04KM	*04KM *0439	01,17 ↓
	47.	*0701 -	<i>*07MV *07MV</i>	*07MV *0703	*07MV *07012	>
DR7, 9	48.	*0901 -	<i>*09012 *09012</i>			26,37 ↑
	49.	*0901 -	<i>*09012 *09012</i>			26,37 ↑
	50.	*0701 *0901	<i>*07MV *09012</i>			31,37 ↑



# DNA基礎講座

湧永製薬（株）

創薬研究所バイオ診断研究室

川井 信太郎

KAMON に“核酸の生物学”を書かせて頂くようになって随分経ちました。この辺でまとめをしたいと思います。今まで書いてきたことを、特に重要であると思われる項目について、まとめとおさらいをしようと思います。

## 1. 遺伝子の構造と DNA の RNA への転写

セントラルドグマ(central dogma)という言葉が聞かれたことのある人も多いと思います。これは 1958 年に F.クラックが提唱したもので図 - 1 に示すように遺伝情報は、<DNA RNA タンパク質>というように一方通行で流れる、というものです。しかし、後になって HIV (human Immunodeficiency Virus;いわゆるエイズウイルス)のような RNA ウィルスは、RNA から DNA を合成する逆転写(reverse transcription)を行うことが発見されたので一部修正(RNA DNA の流れが追加された)されましたがこのセントラルドグマの基本はまったく変わっていません。

一般に DNA 上の情報は RNA へと転写(transcription)され、さらに細胞質内でタンパク質へと翻訳(translation)されます。遺伝子の転写には非常に多くのタンパク質が関与しているので(いまだすべてが解明されたわけではありません)とても複雑ですのでここでは簡単に説明します。ヒトをはじめとする真核生物の一般的な遺伝子構造を図 - 2 に示します。これが、大切な一般的な構造ですのでこれを忘れないようにしてください。DNA からメッセンジャー RNA (mRNA) へのプロセスをコントロールする領域はプロモーターと呼ばれます。プロモーターには、CAAT ボックス(キャット・ボックス;CAAT の

塩基配列があるのでそう呼ばれます)、GC ボックス、及び TATA ボックス(タタボックス;TATA の塩基の配列がありません)と呼ばれる領域があります。それぞれの領域は、転写の際にさまざまなタンパク質が結合して転写を調節しています。さらに、プロモーター活性を増加させるものとしてエンハンサーというエレメントが存在します。ウィルスの中には転写効率を 1000 倍も増加させるものもあります。

このプロモーターの下流(3'側)に転写される遺伝子が存在します。転写開始点(initiation site)から転写された mRNA はどこかで終了(termination)しなければいけません。しかし、転写の終了に関しては現在のところ転写開始に関する情報ほどは得られていません。通常の遺伝子の場合、転写は成熟 mRNA (次の項で説明します)の 1000 塩基以上の下流で終了します。現在のところ真核生物の転写終了配列は明らかにされていません。スプライシング(これも次の項で説明します)を受けていない未成熟 mRNA は、mRNA の下流にある 5'-AAUAAA-3'配列を認識するエンドヌクレアーゼによりその配列から 11 ~ 30 塩基下流で切断され、ポリ A ポリメラーゼによりアデニンが付加されます(ポリAデ

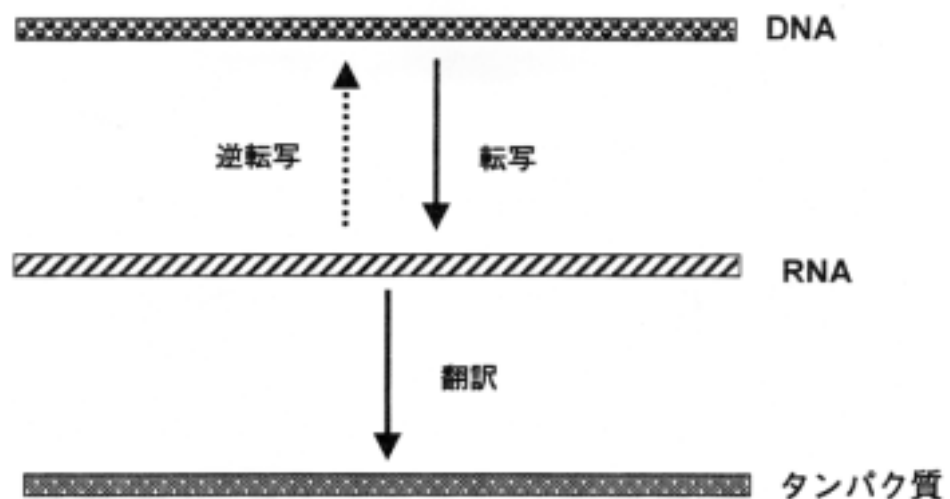


図-1 セントラルドグマ

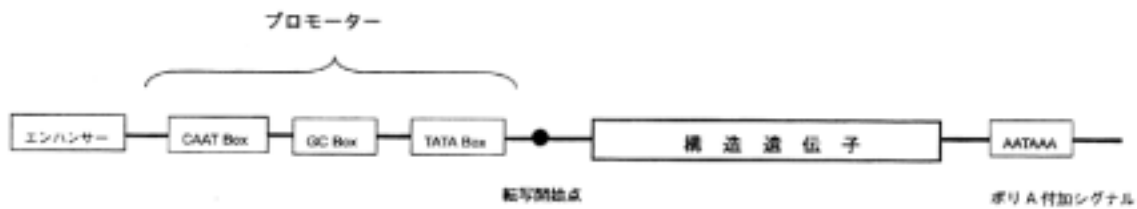


図 - 2 遺伝子の構造

エンハンサーは、上流に存在するとは限らないが紙面の都合上上流側に描いた。

ニレーションと言います)。このアデニンの付加は多いものでは200個ぐらいになります。しかし、このポリアデニレーションが何故なされるのかは明らかにされていません。mRNAの安定性に関与しているという報告もあります。繰り返しますが、遺伝子の基本ユニットは、5'側から<プロモーター・構造遺伝子・ポリA付加シグナル>と言うことになります。これを忘れないでください。この基本ユニットからまず、未成熟なmRNAが作られます。しかし、タンパク質に翻訳されるためにはまだまだ不十分で、この後更なる加工が必要です。その加工については次の項で説明します。

## 2. 未成熟mRNAから成熟RNAへ

真核生物の遺伝子にはタンパク質をコードする領域、エクソン(exon)とコードしない領域、イントロン(intron)が存在します(図-3)。一般に(あくまでも平均です)哺乳類の遺伝子は平均16Kb(16000塩基)程度あり、その中に7~8個のエクソンが存在します。イントロンは成熟mRNA(mature mRNA)になるためには、切り取られそしてエクソン同士は再結合されなければいけません。この過程をスプライシング(splicing)と呼びます。先ほどの例で言えば、16Kbの遺伝子から未成熟mRNA(premature mRNA)が転写され、スプライシングを受けて、約2.2Kb程度の成熟mRNAになります。中にはディストロフィン

のタンパクをコードしている遺伝子から転写されるmRNAのように、長さが約2000Kb(2,000,000塩基)で60個以上のエクソンからなる巨大な未成熟mRNAの存在も知られています。このスプライシングは、未成熟mRNAのどの部位でも起こるわけではなく、例え先ほど説明したディストロフィンのmRNAでさえも正確にイントロンを切り出してエクソン部分を正確につなぎ合わせなければいけません。そのために、スプライシングを受けるイントロン部分には図-3に示すような特徴的な配列があります。

イントロンの5'末端の配列は5'-GT(mRNAではGU)、3'末端は5'-AGというコンセンサス配列(consensus sequence; 遺伝子間で共通に一致している配列のこと)があります。これをGT-AGルール(GT-AG rule)と言います。また、スプライシングを受ける場所(スプライス部位)のうち、イントロンの5'末端側に存在する部位をスプライス供与部位(donor splice site)、あるいは単純に5'スプライス部位、3'末端側に存在する部位をスプライス受容部位(acceptor splice site)あるいは3'スプライス部位とそれぞれ呼ばれて

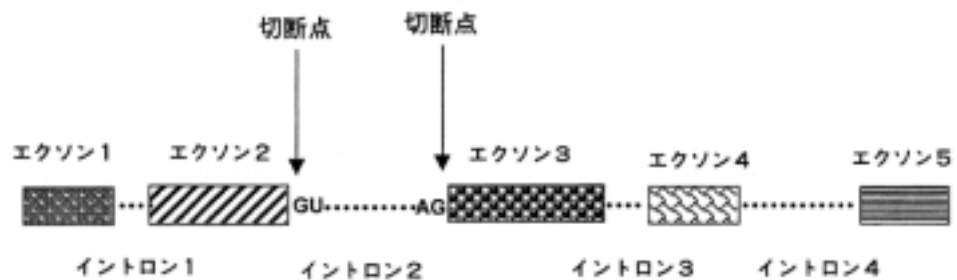


図-3 エクソンとイントロン

います。これら配列(実際にはこれ以外にブランチ配列の存在が報告されています)を認識して、スプライソソーム (spliceosome)と呼ばれる RNA とタンパク質の巨大複合体においてスプライシングの反応は行われます。このスプライシングまでは核内で行われ、成熟 mRNA は細胞質に移行します。

### 3. 成熟 mRNA からタンパク質へ

細胞質に移行した成熟 mRNA は、細胞質にあるリボソーム(ribosome)に結合します。リボソームとは DNA からの情報を受け取った mRNA の指令をもとにタンパク質を組み立てていく工場です。このタンパク質が合成されるプロセスのことを翻訳(translation)と言います。成熟 mRNA の持つ DNA からの情報と言っても、A、G、C、及び U の 4 種類の塩基の並びでしかありません。この 4 種類塩基で 20 種類あるアミノ酸を指令しなくてはなりません。そのために生物はこの 4 種類の塩基の中から 3 種類使用して 1 つのアミノ酸を指令しています。このアミノ酸を指令する 3 種類の塩基のことをコドン(codon)と言います。各アミノ酸をコードしているコドンを表 - 1 に示します。この様に、3 種類の塩基を使用することにより全部で 20 種類のアミノ酸をすべてカバーしています。3 種類のアミノ酸をコードしていないコドン(UAA、UAG 及び UGA)が存在しますがこれらコドンのことをストップコドンあるいはナンセンスコドンと言います。この表にある各コドンがコードしているアミノ酸は大腸菌からヒトに至るまですべての生物に共通です。翻訳の工程に必要なものはリボソームともう一つ tRNA (トランスファー RNA あるいは転移 RNA)と呼ばれる 75 ~ 79 塩基からなる RNA が必要です。tRNA は、コドンをアミノ酸に翻訳するために必要なアダプター分子です。この tRNA は、コドンと相補的な配列(アンチコドン)を持つ部分があり、さらに tRNA にはアミノ酸が結合されています。つまり、mRNA 上のコドンに対応したアンチコドンを持つ tRNA がもってこられてその tRNA はあるアミノ酸を運んできます。その後、リボソームがスライドして次のコドンに対応する tRNA をもってきてそれには、またあるアミノ酸が結合して最初アミノ酸とペプチド結合をします。この繰り返しでタンパク質が合成されていくわけです。この繰り返しは、ナンセンスコドンが現れるまで繰り返されます。アンチコドンが現れると、リボソームは mRNA から遊離してタンパク質の合成は終了します。

こうして合成されたタンパク質は、まだ未成熟で例えば糖タンパクである場合は糖により修飾(glycosylation)されます。また、分泌タンパク質の場合は、様々なプロセッシングを受けてそのタンパク質が働く場所に移行します(局在化)。この様にタンパク質レベルでの修飾も数多く知られています。

今回の講座ではタンパク質の修飾については解説することができませんでした。この分野も勉強するととても面白いと思います。

ともかく、< DNA RNA タンパク質 >の流れをおさらいしてみました。これが基本なので忘れないようにしてください。

核酸の生物学についてわかりやすく書こうと思いましたが難しい内容になってしまったかもしれません。しかし、核酸(DNA や RNA)は皆さんが思われているくらい難しいものではないと思います(奥は深いとは思いますが)。これからも、もっと、もっと DNA、RNA というものに興味を持って拒絶しないで勉強してください。私もさらに核酸、タンパク質の研究をやりたいと思います。長い間、ありがとうございました。最後に、この機会を与えていただいた KAMON 編集長をはじめ編集委員、ベリタスの皆様ありがとうございました。

編集部 注：このシリーズによる川井先生の連載は今回で終了致します。

川井先生、長い間ありがとうございました。

表 - 1 遺伝暗号表

		2 番目の塩基							
		U		C		A		G	
1 番目の塩基	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	stop	UGA	stop
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	stop	UGG	Trp
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
	A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
		AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
		AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	

## サルでも分かる HLA 番外編

### - ヒト MHC から動物 MHC へ、そしてヒトへ -

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

前号で「サルシリーズ」に終止符を打ったつもりだったが、刷新「KAMON」が出来上がるまでのツナギで、番外編を、との要求に屈してまた登場してしまった。サルでもわかる HLA(8)で、21 世紀に向けて MHC を取り巻く環境を書いてしまったので、視点を少し変えて別の角度から MHC を見てみようと思う。

遺伝子解析は、当然、ヒトのみならず様々な動物にまでおよんでいる。この数年、日本の HLA 学会だけでなく外国の HLA 学会や移植学会でも各種動物の MHC 遺伝子解析が盛んに発表されつつある。ほ乳類で MHC を中心に遺伝子解析が圧倒的に進んでいるのは、ウシであろう。ウシとヒトとの関わりは有史以前からずっと続いているわけで、家畜として飼いや食用の重要な供給源とされてきた。世界各国で品種改良が競ってなされてきたが、今まで行われてきた改良点は、病気に強く味に優れ性格が穏和で飼いや食用の中心に行われてきた。優秀な種を掛け合わせながら、経験的に改良されてきたわけである。日本が世界に誇る和牛はその頂点と言っても過言ではない。最近の遺伝子工学的手法は、定性的な掛け合わせ経験を定量的に行い改良効率を著しく進歩させてきた。ウシの MHC は BoLA と呼ばれ現在、class 分子のうち多型性を示す DRB3 遺伝子を中心に解析が進んでいる。HLA allele の解析と同じく、PCR-RFLP, PCR-SSO 法等により allele 解析と allele 名が決められ 100 種類以上が報告されているが、new allele の発見のため SBT 法も積極的に取り入れられている。ウシの MHC 解析で特記すべき点は、ヒトと同様に国際 BoLA ワークショップが開催されていることで、国際ワークショップにより各種ウシの MHC 解析と allele 名が決められている。

次に MHC を中心に遺伝子解析が精力的になされているほ乳類は、ウマであろう。ウマもウシと同様にヒトと密接な関係を築いてきた。ウマの場合、その昔には有力な武力と考えられ、優秀なウマのために城と交換したり、戦争を仕掛け力づくで奪い取ったりしてきた。戦争の形式が変わってしまった現在、ウマは武力では無くなったが、昔から行われてきた優秀な種の保存理論は、競走馬に受け継がれている。ある意味では、多額な金銭と大いなる名誉が交錯する競走馬業界で優秀なウマを所有することは、戦争よりシビアかもしれない。各国の競馬協会

は、優秀なウマの確保と種の改良と保存のため遺伝子研究に多大な資金援助を行っている。

ブタも家畜として重要な位置を占めているが、現在ヒトに対する異種移植の最有力ドナー候補として特に注目されつつある。

動物の遺伝子解析は、動物間の遺伝的多型性の相違や進化に対する興味と、錬金術的興味に大別されるかもしれない。錬金術的興味、ちょっと生臭いので、人類に対する貢献、に置き換えたほうが良いか。従来、家畜の品種改良は経済形質、すなわち肉質・脂肪厚・体毛・産子数・病気に対する抵抗性などを中心に農学分野で行われてきた。最近の MHC 遺伝子の解析から、これら経済形質を司る遺伝子群が MHC あるいは MHC 近傍に位置していることが明らかになり、よりよい品種を作り出すため遺伝子レベルでの掛け合わせを行う計画も進行しつつある。MHC 遺伝子の解析と応用は、最小限の投資で最大限の利益を生み出す無限の可能性を秘めている。ほ乳類の遺伝子解析は、遺伝子組み換えや改変によるワクチン製造やゲノム創薬作成にも応用されるだろう。特にウシ、ブタなどの大型動物では大量の血清からワクチンや薬を得ることが出来ることから、非常に経済効率が良いと考えられている。世界的に畜産業界は飼育費と販売価格の不均衡による行き詰まり状態と言われている。この現状打破のため畜産系が医学系に急速に接近し、異種ドナーや薬剤の製造工場としての家畜改良に取り組みつつある。21 世紀の家畜は、人類に対する単なる食糧供給源から脱皮し、人類の健康や生命の維持にとって非常に重要な役割を果たすようになるであろう。



## 佐治博夫のまかせなさい！ HLA研究所 所長

[saji@mbx.kyoto-inet.or.jp](mailto:saji@mbx.kyoto-inet.or.jp)

[hla@hla-labo.org](http://hla@hla-labo.org)

日本社会を覆う閉塞感ってなんだ？

いま日本の世の中を覆っている閉塞感は何によるか？と問われると、ひと言では答えられない。複合要因であろう。朝日新聞の田辺功編集委員と論議をして得た結論「一億総官僚化」も一因である。その遠因となった規制の細かさ、手続き重視、それに伴う責任回避傾向は、行為や制度の目的そのものを希薄にしよう。

提案をする。対する発言はまず問題点の掘り起こしで始まる。そのほとんどが手続き論であったり、規制との関わりであったりする。提案の目的は散漫にされ、提案のもつ利点はいつのまにか薄められる。日常にある現実である。それらが密室で行われ、根回しが横行する。ヴィジョンより、根回しと手続きの技術に長けるものの意見が通ってしまう。その典型を某公益団体に見ることができる。

不景気というムードがそれに拍車をかける。でも日本のそれは飢えない不景気である。飢えている国の人が日本の不景気論議を聞いたらあきれられるに違いない。悪くすると恨みに転ずるかもしれない。

技術の蓄積を阻害するものは

官主導のサイエンスが要因であり、もう一つはコストの高さであろう。読売新聞の取材を受けた。母児免疫寛容コンセプトとマイナー組織適合性抗原適合性の有利性から、血縁間 HLA ミスマッチ移植を 6 年前から提案している。その成果を取材してくれた。ある患者さんが 3 年間も骨髄バンクに適合者を求めつづけて待っていた。自ら特定非営利活動法人 HLA 研究所へ接触して、検査を受け母親からの 2 座ミスマッチ移植を決意し、主治医を説得して母子間移植を受けた。成功して社会復帰を待っている。原稿には HLA 研究所とわたしの名前があった。記者の上司は「いち民間研究所を紹介することは、…」と削除した。ジャーナリズムでさえお上崇拜と官優待、民間軽視がある。ジャーナリズムは民間であるにもかかわらず、である（某公益団体もよく似たものだが）

税金のサイエンスの投入を否定するものではないが、投入先が限定されているところが問題である。巷間という国立の特定大学重視のことである。モチベーション軽

視で形の整った官僚的機関重視になっている。そして官僚寄りの大物フィクサーが暗躍する。コンセプトやモチベーションよりエスタブリッシュメントに好感をもたれるように学者は働く。コストパフォーマンスはなきが如くである。その結果、サイエンスのコストは非常に高くなってしまった。

要因の一つは機器と試薬の国産品がほとんどないことによる。サイエンス業界では平均の為替レートが \$ 1 が ¥360 ぐらいである。人件費も高い。結局、投入資金の実働は 1/3 にしかならない。遠因は規制の壁と、リスクレス・シンドロームともいえる社会構造が技術開発の速度を制限し、コストを上げてしまったことによるのだろう。開発より輸入が有利になったのである。サイエンスのための技術の蓄積はもう 20 年以上止まっているのかもしれない。

リスクレス・シンドローム

例えば、ドナー・リクルートをする。最初の質問は「危なくない？」が多い。例えば、治療の選択肢を提案する。「リスクの高さは？」と質問される。例えば、母児免疫寛容コンセプトをもとに NIMA 相補同胞間ミスマッチ移植（註）を移植医に提案する。コンセプトに賛同してもなお「アメリカ（外国）でやっていますか？」と訊かれる。「いえ」と答えると「大丈夫かな」と躊躇される。選択肢が他にないときでさえ。医師は治療方針に関して上司の許諾がいるようである。上司はエスタブリッシュメントであり、リスクを負いたくないがゆえに、許可は得られないだろうと医師は考えてしまう。

臍帯血バンクに NIMA 許容抗原システムを提案する。臍帯血の母親の HLA をタイプするだけで、いわゆる GVHD 許容ミスマッチ抗原を登録できるというシステムである。大手の臍帯血バンクはコストを理由に、あるいは他国が採用していないことを理由に採用しない。コストをかけるリスクを負えないという。

狂牛病一頭で 2,000 億の巨費が投じられても国民は納得している。血液事業に 30 億円以上/年といわれる NAT 検査が導入されてもだれも意見をいわない。リスクを低減する事業ならコストパフォーマンスは問われない。

めずらしくネガティブな記述になった。佐治博夫はこ

---

れで降壇し、木村彰方先生が続けられる。ポジティブな視点に期待する(さ)

註：NIMA ; non-inherited maternal antigens. IPA ; inherited paternal antigens.

父由来 HLA (IPA) ハプロタイプを共有し、NIMA 非共有の同胞を NIMA 相補同胞という。児は胎児期に大量の NIMA に接触し、免疫寛容が誘導され、成長後も維持される。よって、子はミスマッチ NIMA に寛容である。すなわち母のミスマッチ HLA に寛容であるから、子から母への造血幹細胞移植は GVHD のリスクが低いと考える。よって、NIMA 相補同胞間には相互のミスマッチ HLA に対して寛容が成立していることになる。HLA identical sibling が得られる確率は同胞数  $\times 1/4$  であり、NIMA 相補同胞はさらに  $1/4$  の確率であるから、同胞ドナーの availability を 2 倍にすることができる。

2 億年前、ジュラ紀のはじめに哺乳動物が分岐したとき、必須の条件は母児免疫寛容であった。母児免疫は自然アロ免疫現象であり、2 億年の進化を経て哺乳動物に定着した必須の現象といえる。



# コラム 科学技術振興を考える

東京医科歯科大学 難治疾患研究所

木村 彰方

2001年は激動の年であった。4月に小泉内閣が誕生して以来、行政改革論議が高まり、特殊法人を始めとする政府関連機関の整理・統合の道筋がつけられた。行革の波は大学にも及んでおり、平成16年度からの国立大学の独立法人化はほぼ既定の路線となった。また、数年前から続けられて来た国立大学の大学院重点化は最近一段落したが、今度は公私立大学をも巻き込んだTop30構想が始まる。

景気の冷え込みで税収の大幅な減少となっている国家としては、歳出は出来るだけ抑制したいところであるが、資源の乏しいわが国が国際社会の中で生き残って行くためには、科学技術立国を目指すしかないとの数年前よりの既定路線に従って、科学技術関連予算は削減を受けずに、むしろ年々増額が続けられている。つい先頃に発表された平成14年度予算案によれば、科学振興費はゲノム創業を始めとするバイオサイエンス関連の180億を含め、前年度比約28%の増額となっている。

わが国の景気の落ち込みを回復させるためのひとつの手として、バイオサイエンス関連やIT関連への重点的な資本投下が行われているわけであり、産官学が一体となって、新しい産業の創設に努めなければならないとされる。お金を出す産業界や政策を立案する政界、さらに施策を実施する官界にとってみれば、これだけの集中的資本投資を行う以上、当然成果を期待することになる。

建物や道路を作る場合は成果が目に見えるが、科学技術の進歩の場合はそうとも言えない。もちろん基礎研究の成果を生かした疾患の解析技術や治療技術の応用開発などではその成否がはっきりすることもあるが、こと基礎研究に限って言えば、10年後は言うに及ばず、50年、100年先にならないと成否がはっきりしないこともある。果たして産、政、官はそのことを充分理解しているのだろうか？ それに対して、学は何が期待されているのかを充分認識しているのだろうか？

「研究はアイデアの勝負であるから、多額の研究費など不要である」などと言うつもりは毛頭ない。よほ

どの天才でない限り、アイデアだけで勝負するのは至難の業であり、着実なデータの積み重ねがあつてこそ、ほんの少しの思考の転換や飛躍によって新発見、つまり科学技術の進歩が生まれると思う。現代の科学においては、「一割バッターにはホームランは打てない」のが実情であろう。

それでは未来を開く科学技術をどうやって産み出せば良いのであろうか？ まわりにおもねることなく、我が道を進むのも一興であるが、それでは単なる独りよがりになりかねない。自分が周囲から何を期待されているかを充分認識した上で、自分に出来ることは何であるかを考え、自分でこのあたりまでと思うレベルのほんの少しでも上を狙うことが必要であろう。要は自覚の問題である。

