

“特集 第5回日本組織適合性学会大会”

クラスIも急速にDNAの時代へ

9月19日～20日 大会長 十字 猛夫

トータルレポート (よもやま話)

埼玉県伊奈赤十字血液センター 榎本 隆行

いつも通勤で林の中へと向かう田舎路から、今日は駅に向かい満員の高崎線、埼京線と乗り継ぎ新宿駅へ、田舎者の私はもうこの段階で既に疲れきってしまっている。

いざ、学会場に着き受付を済ませ会場へ向かうと、ワークショップですっかりお世話になっている中央血液センターの田中さん、京都血液センターの佐治先生(KAMON編集長)が二人仲良く何やら会談中。やおら、佐治先生においでおいでをされ、「なあ～君、KAMONの学会報告をかいてくれへんか?」(え?私ですか?皆さんの様な文章は私には書けませんよ。誰かほかの方に頼んでもらえませんか?)横から田中さん「私が推薦しておきましたから」等々のやりとりがあり、「こいつは赤血球の血液型もHLAもかじっておるからまかせてもええと思うよ」KAMON編集委員の前田さんに過大な紹介をされ、「面白い報告を書いてくれよ」の佐治先生の言葉と共に、教育講演開始の時間になってしまい会場へ入室。

今回の学会参加者は約250名で会場は既に満席状態であった(おお、これはいつもの様に寝ているわけにはいかんぞ、マイッター。まあ起きてはいても、どこまで理解出来ているかにつきましては不問ということにさせていただくということにして)。

教育講演は「非血縁骨髄移植の現在」のテーマでプログラム第一番目は、赤座先生(日赤中央血液センター)の骨髄バンクでの移植実施までのシステムの紹介、移植症例でのHLA適合の状況、第二番目は岡本先生(慶応大学)の各疾患における血縁者間(RBMT)と非血縁者間骨髄移植(UBMT)での成績の比較。第三番目が笹月先生(九州大学)の骨髄バンクを介した骨髄移植例のHLAの遺伝子レベルでの適合の移植予後への影響についての講演で血液センターで骨髄登録ドナーのタイピングと病院からの依頼で移植予定患者の家系のタイピングを行っている私にとって興味ある講演であった。

骨髄バンク登録ドナー数は、1994年2月、3月の3,000人をピークに最近では、1,000人程度で推移し登録数の増加カーブは緩やかとなっている。(そうだなあ、最近の骨髄バンク登録ドナーのタイピング*少ないよなあ)
*我が埼玉県は人口比で登録ドナーの割合が少ないとの批判記事が新聞に掲載された過去がある。

Serologicalな適合率が、10万人のプールで患者の80%、DNAアリルで同様な適合率を得るためには、30～40万人のドナープールが必要。さらに登録の初回検索で適合ドナーの得られる患者は58%で岡本先生の講演にあったようにUBMTの成績がRBMTに比べ劣る要因として移植実施までの待機期間の長さがあるならば、移植の成績を向上させるためには必要とされるドナー数は更に拡大する。(受付場所を増やすことだけでは、ドナー確保の対処はできないなあ。)

1997年3月より登録の1次検査(HLAクラスIタイピング)と2次検査(HLAクラスII DRB1タイピング)を同時に検査を実施し登録のためのドナーの負担を少しでも解消する計画となっている。(そうだなあ、検査のために2日間もこんな不便な所にまで来るのは大変だなあ*我がセンターは埼玉県の中央部にありながらもかなり交通の便が悪い。)

血液センターのHLA検査担当者にとっては、実際にドナーのタイピングを受け持っているので血清学的に一致している条件下でA2,A26,B61抗原に代表されるクラスIのアリル不一致がDRB1の不一致よりも移植成績に影響をしているというレトロスペクティブな研究報告は、DNA検査を行っていない施設の検査能力不足を指摘されているようで、速やかに対応出来ない自施設の現状が嘆かわしく思えた。(これは、あくまで自施設の問題であり、骨髄データセンターとしては、A2,A26,B61抗原について、アリルタイピング検査体制がとられている事を申し付け加えておく。)

今回のワークショップ1「DNAタイピングの実際—入門から今後の展望まで」は、勉強不足とお叱

りを受けるかもしれないがserologicalなタイピングの経験しなくDNAタイピングの各方法の具体的な違いを解っていない私にはDNAタイピング法 (PCR-SSP, -SSO, -reverse SSO, -RFLP, -SSCP, -DCP, -PHFA, -SBT, マイクロプレート法) を取り上げ、方法の実際とその特色を、それぞれの第一人者が解説したこのワークショップが一番興味のあるプログラムであった。

「初心者でもベテランでも同一検体からのDNAの抽出量に大きな差はない。」(一般的にリンパ球からの抽出となるのでリンパ球の数に依存する。) という小林先生(防衛医大)のデータと木村先生(東京医科歯科大)の「血清学のタイピングをやっている人にとって、DNAタイピングは難しいものではない。始める時に求められる結果に合わせた方法を導入する事が大切です。」の言葉に内心ほっとしたが、それぞれの検査法を開発した方々の洞察力と、検査法に誇りを抱くその素晴らしさにただただ感服するばかりであった。

その中で、「きれいな検査結果はきれいなDNAから」は(血液センター内のワークショップに良質な血清を継続して提出してくれる人達が、Serologicalなタイピングでリンパ球を可愛がるのと同じ感覚だな)と妙に納得させられる言葉であった。

佐治先生からの NMDP QC Program の報告で Serologicalなタイピングのみでなく、DNAタイピングを併用してもなお、DRタイピングで12% (SerologicalのみのA-locus, B-locusではそれぞれ、25%、53%) の高率で結果の不一致があったというデータはHLA抗原の多型性が日本に比べ著しいアメリカの成績であるとはいえ、自分の携わっているHLA検査の難しさを再認識しなければならないと考えさせられる問題であった。

ワークショップ[®] II は血小板輸血及び、腎移植に際してのクロスマッチがテーマで、私の日常業務に最も即したプログラムであった。というのも、日赤医薬情報部の輸血副作用報告の収集データによれば、副作用報告の最も多い製剤が血小板製剤(報告例の52%)であり、最も多い副作用が非溶血性副作用(蕁麻疹43%、発熱反応18%など)である。もちろん、その原因はHLA, HPA抗原系の関与ばかりではなく、むしろ血漿蛋白、サイトカインなどの関与が大きいかもしれない。しかし、主に白血球抗原系の関与と思われる呼吸困難(急性肺傷害)の報告もある事に加え、周知のように現在一般に行われているHLA適合血小板供給では約30%もの患者が血小板輸血不応答例となり、この様な現状では、医療機関に対して安全に輸血を行うため品

質の高い製品を供給する義務がありながら検査体制が不十分であるとの指摘に反論ができるとはとても思えない。

今回報告された改良AHG-LCT法(使用する血清量、反応時間を増やす或いは、濃縮 γ グロブリン分画を使用することで感度を良くする。)、MAILA法(抗体検出に使用するリンパ球上のHLA抗原を単離後マイクロプレートに固定し抗体をEIA系で検出する。)、フローサイトメトリーを用いたクロスマッチを導入しようという考えは、輸血副作用防止のための検査法改善として、一部の血液センターの研究的な仕事ではなく、全ての血液センターが行わなければならない業務として捉えるべきであろうと思われた。

今回の一般演題50の中で演者、共同研究者に血液センターが含まれる演題が23題と約半数を占めていることは、血液センターでHLA検査に関わりを持つ者にとって、誇りとすべき事であろうと思うが、一方で、他の学会でも同様ではあるが、学会に演題の参加をする血液センターは一部のセンターに限られメンバーも固定していると思われ(もちろん、その方々はHLA検査をこよなく愛する尊敬すべきすばらし人達であることは、皆様ご承知の通りである。)、その他のセンターは、その一部の人達の努力の成果の恩恵によくすることが多い。(こんな事を書いている私は、HLA検査を担当してから早3年が経とうとしているが、まだHLA関連の演題申し込みをしたことが御座いません。また、いつもK血液センターNさん、C血液センターTさん、Kさん、S血液センターSさんと人に頼って歩いている人生です。従って上記の不届き者は私の事とご理解下さい。)

演題はクラスIにつての発表が11題、クラスIIに関する発表が7題と、ここでもクラスI抗原のDNA検査が急速に進んでいる印象を受けた。

12th IHW報告

第2日目に開催されたシンポジウムでは、KAMON No.7 に京都血液センター丸屋先生の詳しいレポートが掲載されている12th IHWの報告が行われた。内容についてはそちらを参照していただくとして、パネラーの皆さんは、ワークショップのミーティング時にデータが集まっていない、その場で解析しレポートをするといった、日本では想像出来ないご苦労を経験されたそうである。しかし、そこは日本を代表するそうそうたるメンバーであり、自施設のデータからだけでも素晴らしい成果を挙げられたそうである。

その中で、AHS#2(A2/A9)では、A2抗原のアリルでA*0201は頻度に差があるものの各人種でcommonなアリルであるが、他のアリルは人種特有のものがある。

AHS#3(A10/A19)でA34,A66抗原が血清との反応性からアリルとの対応はデータ不十分であるがそれぞれ2パターンに分かれる。(1995年日赤中央血液センター管内HLAワークショップにおける解析データでも、同様にA*3401,A*3402とA*6601,A*6602アリルのパネルについては反応の異なる血清が提出されている。)

AHS#5(B7/B22)のB22関連抗原でB22NはB15系、B*5503はB7系の塩基置換がみられる。等々の解析結果の報告があった。

ベリタス講演会

さて、今回の学会からベリタスの特別講演が、学会中のランチョンセミナーとして同時に開催され、グリコのおまけの様に(ベリタスに失礼?でも、グリコのおまけもマニアの間でかなりのプレミアがついているそうだし、ベリタスの特別講演もHLA関係者の間では参加希望者が殺到している。)1粒で2度おいしい学会形式となった。

1日目のセミナーは「HLAと疾患感受性」のテーマでのパネルディスカッション形式であった。

DNA検査を実際に行っている方々には、既に常識となっていることではあろうが、私には、このテーマではDNAの組み換えが、実際にどのように起こっているのかという点に興味が集まった。

lgene conversion? B46なんて赤血球のGP-A, GP-BにあるMN抗原系(MiltenbergerやSAT等)やGP-CのGerbich抗原のスプライシングそのものみたいだなあ? じゃあcross-overもあるのか? エキソンスキップは? それでこれの組み換えの起きたときの片割れはどこに行ったの? どこまで抗原の発現に影響するの? (以前DNAアリルの話を聞いて、こんな疑問を佐治先生に尋ねたのが面白い事を聞く奴のはじまりだったわけです。)等々)。懇親会で徳永先生に少しだけですが、このことで質問させて頂いた。

徳永先生(東大医科研)の講演では、系統樹に各HLA抗原を表すとクラスII抗原は比較的早い時期から緩やかに? 変異を起こしており、私の持つDR8抗原はゴリラ君が近くにいるようだ。また、B抗原はこの2万年位の間に急激に変異を起こして多型性を獲得したようだ。これって骨髄移植でクラスI抗原のアリルの違いがクラスII抗原(DRB1)の違いに比べ移植後の成績に影響する事と何か関係があるのだろうか?

また、マラリア症とHLA抗原の関係でB53が感染初期

の段階でそのメカニズムに関与しているのではないかとこの滝口先生(東大医科研)、南先生(横浜市立大)のディスカッションとHLA抗原とペプチドのディスカッションは、HLAと疾患感受性が単純な関係ではないと示唆しているように思われた。

申し訳御座いませんが、Non-classical MHCにつきましてはレポートを書くための理解力が私になかったのでお詫し下さい。

第2日目のランチョンセミナーは「モノクローナル抗体はどこまで完成したか」のテーマでMr. Jimmy Loom (One Lambda Inc.)の講演であった。主に12th IHWからのデータを用いた内容であった。ポリクローナル抗体と同様に種々の特異性の抗体を得ることが出来るならば、モノクローナル抗体は赤血球系でも同様であるが、親和力が強く、抗補体性がなく、ほぼ半永久的に確保出来ること等々の理由から、優れた検査用試薬となることは間違いない。

モノクローナル抗体を使用することでSerologicalなタイピングがどこまでDNAタイピングに近づくかという事がHLA検査を担当する我々にとって一番興味のある点ではないかと思うが、これについて、Mr. Jimmy Loomは従来のSerologicalなタイピングとDNAタイピングとの中間ではないかと考えているようであった。私ごときが申し上げるまでもないが、日赤血液センター内のHLAワークショップにおいて、種々のクラスI抗原でDNAアリルと相関する或いは相関すると思われる反応性を示す血清が多数提出されており、全ての抗原群には当てはまらないであろうが、モノクローナル抗体はかなりの可能性を秘めているのではないだろうか?。(しかし、クラスI抗原のDNA検査が開発されつつある状況で実際にアリルレベルのタイピングを血清学で行う必要性はまた別に考える必要があるであろう)

赤血球系においても、モノクローナル抗体の使用に伴い種々の新抗原が発見されると共に、特に、Rh D抗原においてはHLA抗原のDNAアリルの増加の如く、新しいモノクローナル抗体が作製される毎に、反応性の違いからD抗原の細分化が行われている状態にある。(赤血球抗原についてもご承知のようにDNA検査が始まりつつあるので、やがてこの反応性の違いについてDNA解析との検討がなされるであろう。)

ということは、やがて、HLA検査と赤血球検査の担当者間で同じ様なセログラフを見ながらディスカッションをする時がくるかもしれない?。

以上とりとめのない報告となってしまい演者の諸先生方の発言の意図を理解していない点多々あると思

いますが、ここでお詫びを申し上げ、お許し頂きたい
と思います。

最後に、本学会に御参加頂いた皆様、残念ながらご

都合で御参加出来なかった皆様、今後ますますのご活
躍をお祈りいたします。

学会見聞記 ワークショップ I 「DNAタイピングの実際」

マイペンライ・泰雄

あの方が近づいてきた、満面に笑みを浮かべ、「頼む
わな」。わたしは逆らえるはずもなく「いいですよ」と
言ってしまう。本当は、「今、とっても忙しいんだけど」
とか、「それに文章下手だから」なんて言いたかったの
に。

しょーもない前置きをやめて、今回の学会レポート
をさせていただくこととする。

DNAタイピングというからには、DNAをとらないこ
とには何も始まらない。ということでトップを受け持
つ防衛医大の小林先生のテーマはDNA精製。このとき
問題となるのは「如何に手間、ひま、お金をかけずに
安全にかつ効率良くDNAをとるかということ」である。
御自身の作った、DNA精製法について述べられた。詳
しい方法は、これ以上の説明はもう「手取り足取り」
しかないと思われるほどやさしく書かれたマニュアル
が配布されたのでそれを参照していただきたい。ただ
し、最近は何にも多くのDNA精製キットが販売されて
いる。良い血液サンプルが得られる限り、いずれのキ
ットでもそれなりの成果は得られるであろうと思われ
る。しかし、髪の毛、爪、ミイラや溶血した検体のよ
うな変則的な場合、どの方法が良いのか、どういう注
意が必要かという議論もほしかったような気がする。

DNAが取ればタイピングである。いまや、DNAタ
イピング、イコールPCRを用いたタイピングであるが、
次の演者からいろいろなタイピング法の紹介があった。

第1の方法は、さまざまなアレルあるいはグループ
に特異的なプライマーを設計し、PCR増幅の有無で判
定するPCR-SSP法（札幌医大、西崎先生紹介）。PCR-
SSP法はPCRのみで判定ができるため短時間ですむと
いう利点があるが、多くのプライマーを必要とする
という欠点もある。しかし、現在はキットもつくられ、
特に、既知の型の判定には威力を発揮すると考えられ
る。

次の方法はPCR産物とさまざまなプローブとの結合
の有無をみるPCR-SSO(P)法。この方法は世界で最も
普及しているタイピング法であり、さらに、PCR産物

にプローブをくっつけるか（オリジナル法）、プローブ
にPCR産物をつけるか（リバース法）に分けられる。
それぞれ、伊達先生（久留米大）、佐田先生（国立循
環器病C）、屋敷先生（鹿児島大）、柏瀬先生（中央C）、
吉田先生（浜松医大）により紹介された。利点は多量
の検体処理に向いていること。欠点は多くのプローブ
を必要とし、また多少手間を要することであろう。し
かし最も自動化が容易で（特にリバースPCR-SSO法
の場合）、実際、PCR産物さえ得られれば容易にタイ
ピングできるように工夫されたキットが販売されている。
今回、リバースPCR-SSO法については多くのキットが
紹介された（追加発言の多さが各メーカーの思惑を象
徴しているようであったが）。しかし、各キットの有効
性は紹介されたものの、各キット間の比較がなされな
かったので、未経験者にとってはどれを選んでいいの
か、わかりづらいものとなったのではないだろうか。
逆に言えば、どれをとっても似た様なものかもしれな
いが。（吉田先生の紹介した中外のキットは根本的に違
う部分もあるが、紙面の都合上ひとまとめにさせてい
ただいた。）

第3の方法として、PCR産物に対し、アレルあるい
はグループに特異的な制限酵素を用い、制限酵素によ
る切断の有無あるいは切断パターンで判定するPCR-
RFLP法、この法は日本のオリジナルとして世界に誇れ
る方法で、猪子グループを代表してフランス帰りの成
瀬先生が華麗に紹介された。特に少量検体の検査に向
いており、市販の制限酵素があれば、すぐ始めること
ができ、HLA遺伝子の多様性を実感でき、DNAタイ
ピング入門に最適の方法である。こつは如何にきれいな
PCR産物を得るかであろう。

次の2題（PCR-SSCP法：東京都C、坂内先生、
PCR-DCP法：京都C、丸屋先生）も、日本が世界に誇
れるオリジナル法で、タイピング法というよりマッ
チング法であるがリファレンスさえ置けば十分タイ
ピング法として使用可能である。HLAタイピングの目的
として移植が主流を占める以上、マッチングの問題は最
重要課題で、いずれも非常に優れた方法であるといえ
る。しかも簡便な装置さえあればよく、Newアレルの

検出にも威力を発揮し、ぜひとも習得したい技術である。

最後に、まとめ、及びその他の方法ということで、中央C、石川先生よりPCR-PHFAとPCR-SBTが紹介された。前者はリバースPCR-SSO法の亜型と考えてよく、プローブが既知アレルの標準DNAであると思えばよい。後者は究極のタイピング法といえるかどうかはわからないが、塩基配列すべてを調べる点でそれに近いものである。シーケンスの自動化が進んだおかげであるが、費用その他の点で、まだまだ限られた施設しか使えないのではと思う。

なお、ここで報告した方法の詳細については、非常に立派な資料集ができており、そちらを見れば、ほとんど事足りると思われる。したがって、小生は感想にとどめ、細かい内容は省かせてもらった。

全体の総括としては、DNAタイピングは決して難しくない。しかし、HLAタイピングにはHLA遺伝子の特

徴がある。そのことを理解して、少なくとも、自身の使っている方法の長所、欠点やその限界を把握し、できれば1つの施設で、2つ以上の方法に習熟しておくことが望ましいと思われる。特に、その1つにPCR-SSCPあるいはPCR-DCPはお勧めである。あとはシーケンスができれば言うことなし。

勝手ながらペンネームを使わせていただいた。いつもこの名前をつかっている訳ではなく、別の名前であるがそれではまったく誰かわからなくなってしまいそうなので（こんなアホなことする人間はすぐ特定されてしまいそうだが）、一部に本名を残して今回の名前にしてみました。なお、気楽に引き受けたものの、今回の内容を限られた紙面でうまく報告することは、わたしの文章力では不可能に近く、舌足らずなものとなってしまった。ともかく、わたしの文のせいで、発表者の印象が悪くならないことを切に願っております。

ワークショップⅡ「クロスマッチ・最近の話題」

兵庫県立西宮病院・腎移植センター 橋本 光男

第5回日本組織適合性学会大会は、平成8年9月19日から9月20日にかけて十字猛夫会長（日本赤十字社中央血液センター）のもとに東京三省堂新宿ホールで開催された。今回は今までの学会とは異なり、教育講演、ワークショップ、シンポジウムを骨格として一般演題は全てポスター形式といった、まるで海外で行われる国際学会のような企画であった。海外の学会には参加した経験もないのに生意気な事を言うようですが、久しぶりに新宿駅を訪れ西口から宿泊先のホテルまでの景観や雰囲気と違和感を覚えて、「ここは日本ではないで・・・!!」とカルチャーショックに陥ったことを思い出しました。前置きはさておき、特に今回のワークショップは「DNAタイピングの実際—入門から今後の展望まで—」と「クロスマッチ—最近の話題—」の二つのテーマで、実際にHLAタイピングに従事している実務者（血液センターの方はティッシュタイパーといった洒落た呼び方をされますが、腎移植に携わっている我々は何故かこういったお役所言葉を使います）が直面している問題に焦点を合わせ、解決策を模索していこう。といった素晴らしい企画であった。この二つのワークショップのうちの私が担当した「クロスマッチ—最近の話題—」について印象を記す。

臨床検査として行われるクロスマッチは、HLA適

合血小板輸血において患者血清中のHLAクラスI抗体や血小板特異抗体を検出する場合と、腎移植を行う際の受者血清中に提供者のHLAクラスI、クラスII抗原に対する抗体が含まれていないか否かをチェックする検査に大別される。両者共に供血者或いは腎提供者のリンパ球と患者血を用いたリンパ球細胞障害試験（LCT法）で検査を行っているが、必ずしも臨床の成績とは相関していないというジレンマがつきまとい検査終了後の充実感が湧いてこない。この問題点を明らかにするために、まず、HLA適合血小板輸血のクロスマッチで従来のLCT法より高感度の方法を用いて現在も日夜奮闘されている血液センターの、そして、顆粒球抗原に対する抗体の検出法を独自に開発された先生方にご登場して頂こう。但し、何時の頃から、筆者の刎刺の友でもあり、HLAの分野での師と仰いでいるNセンターのS氏の「HLAは夜、作られる」のモットーを忠実に実践していますので、このワークショップの3時間は睡魔との戦いであったことを申し添えておきます。

兵庫血液センターの荒木延夫先生は、従来のLCT法を用いたクロスマッチで反応陰性の血小板を輸血すると、その70%しか良好な輸血効果を得ることができないが、クームス法の原理を利用した抗ヒト免疫グロブ

リンクロスマッチ (AHG-LCT)法では 80%以上の良好な成績が期待できることをエネルギーに報告した。そして、残りの 20%の無効例については AHG-LCT法では検出できないHLA抗体或いは血小板特異抗体の存在が考えられると指摘されて次の演者への橋渡しをしてくださった。

続いて北海道血液センターの三谷孝子先生が、北海道の爽やかな香りを漂わせながら颯爽と演壇に登場された。彼女等が開発した改良AHG-LCT法は、抗体側からだけではなく、抗原の方からも患者血清をγグロブリン分画に濃縮して感度を上げる方法である。この方法を用いることにより、輸血効果は 91.5%と飛躍的に向上したと報告した。さらに、それらの抗体が認識している抗原を明らかにするために、HLA抗体を検出する方法として MAILA (基礎的な質問ですが何の略なのかわかりません)¹⁴⁾、血小板抗体を検出するMAIPA (?)¹⁵⁾法も独自に開発されその有用性について理路整然と発表された。

血小板輸血の最後の報告は今までの趣とは異なり、輸血において供与者の抗顆粒球抗体に起因すると考えられる副作用の問題を取り上げ、検出法についての興味ある演題でした。

東京大学・輸血部の宮本先生は、白亜の殿堂に相応しい重厚な雰囲気をもしながらの発表であった。抗顆粒球抗体を検出するためには標的細胞となる顆粒球が必要であるが、顆粒球は他のリンパ球や血小板に比べて寿命が短く長期保存が困難な細胞である。彼女等は顆粒球細胞を凍結させることによりこの問題を解決し、マイクロプレートに付着させた顆粒球をパラフォルムアルデヒドで固定し、サッカロース液を加え、プレート毎凍結保存させることにより一度に大量の検体を処理することを可能にした。

臨床検査として行われている二つめのクロスマッチは腎移植においてである。腎移植時に行われるクロスマッチも血小板輸血の検査同様、LCT法では検出できない微弱抗体の影響や、特に献腎移植の提供者のリンパ球の状態等の理由により臨床成績との相関が得られていない。そこで、最近、脚光を浴びているクロスマッチの新しい方法であるFCM法 (FACSクロスマッチ)を導入して、この問題に取り組んでおられるのが市立札幌病院の笹木剛志先生と名古屋第2赤十字病院の小原節子先生等である。市立札幌病院でLCT法陰性として腎移植が行われた89例についてFCM法で検討した結果、陽性と判定されたのが5例みられた (5.6%)。そのうち2例は移植後6日以内に拒絶反応を生じ腎機能は回復せず、移植腎機能を失った。一方、名古屋第2赤十

字病院でも、76例のLCT法陰性症例のなかで1例(1.3%)がFCM法陽性で腎移植が行われたとの報告があった。両先生共にFCM法を用いることにより、従来のLCT法で問題とされてきた①感度、②腎提供者の細胞状態、③自己抗体との区別等を解決することができると強調された。LCT法(陰性)/FCM法(陽性)例が予想以上に少ないのには驚かされたが、両施設の陽性と陰性のゲージ設定が正確に行われているためであろうと感心させられた。その余韻に浸っている間もなく、韓国のソウル大学の朴先生から英語での質問があり、「チョット、マッケー、ここは、外国なの?」と最初の新宿の違和感が思い出され、前日の快い酒の相乗効果で悪酔いしそうになってしまった。

最後は、愛媛県立衛生研究所の奥山先生が、「B cell クロスマッチ陽性は移植適応か否か」という大変興味ある症例について報告があった。現在、日本腎臓移植ネットワークの選択基準として、腎移植提供者のT cell クロスマッチが陽性になるケースは移植禁忌であると明確に示されているが、B cell (陽性)/T cell (陰性)のHLAクラスII抗体陽性例については各移植施設の判断に委ねている。そこで、愛媛グループはB cell クロスマッチ陽性症例について、血漿交換を行い再度クロスマッチで陰性になったのを確認して移植を行い良好な成績を得ているとの報告であった。さらに、MLC検査で遮断抗体の存在を確認するなど積極的に移植施設との連携を計り、既存抗体陽性者の移植適応について意欲的に取り組んでおられるのには感心させられた。今回のワークショップに参加して改めて輸血や移植のためのクロスマッチがいかに困難な検査であるのかを再認識させられたが、その問題点を演者の先生方とフロアーのティッシュタイパー、実務者の諸先生方との活発な質疑応答やアドバイスを通じて明らかにすることができたように思われた。

最後に、この手記を書くにあたり血小板輸血に関してレクチャーをお願いした長野血液センターの斎藤敏先生、そして、我々が直面しているテーマをワークショップとして企画していただいた十字猛夫先生並びに日本赤十字社中央血液センターの諸先生方に感謝します。

編集部注)

MAILA:

Monoclonal Antibody specific Immobilization of Lymphocyte Antigens

モノクロナル抗体によるリンパ球抗原の特異的固定

MAIPA:

Monoclonal Antibody specific Immobilization of Platelet Antigens

モノクロナル抗体による血小板抗原の特異的固定

第5回日本組織適合性学会大会印象記

北里大学医学部免疫学 大谷 文雄

第5回日本組織適合性学会大会は日本赤十字中央血液センターの十字猛夫所長の大会長の下、平成8年9月19日と20日の両日、東京新宿の三省堂新宿ホールにおいて開催された。出席者260名余、一般演題50題、ワークショップが二つ、教育講演、シンポジウム、ランチョンセミナーと盛り沢山で実に有意義な大会であった。以下この大会の印象記。ただし、学会に勉強のため参加した方は明朝体の部分を、学会に遊びに行った方はゴシック体の部分のみをお読みください。

学会のプログラムが届いてまずあれっ！新宿駅徒歩20分。ラッシュにもまれて更に20分も歩くなんで、普段の運動不足解消のために事務局が考えてくれたありがたいご配慮かしら？と思ったけれど、行ってみれば、とかくの評判のある例の動く歩道があって、実は徒歩10分程度。なーんだこれならたいしたことはない。

学会は19日9:00より一般演題のポスター掲示、9:50より開会挨拶、10時より教育講演“非血縁者間の骨髄移植の現在”から始まった。まず赤座先生より、現在の骨髄バンクの登録状況とハプロタイプ頻度から計算されるバンク登録者数の目標に関するお話、次いで岡本先生から実際の非血縁者間の骨髄移植の現状特にGVHDや感染症との関係等、最後に笹月先生から研究班で調査された過去の非血縁者間の骨髄移植症例の内、血清学検査上はHLA抗原型が完全にマッチしていたのに、その後のDNA検査でファインタイプに違いがあった症例の解析結果が報告され、この場合にはクラスI抗原の違いの方がクラスII抗原の違いよりも移植成績に関係するとのお話があった。

会場の近くにはレストランも無いようだし、昼食はどうしようと思っていたら、ちょうどよい具合に、お弁当付きのペリタスランチョンセミナー。お弁当を食べるロビーも狭いので結局皆会場でセミナーを聞きながらの昼食。消化に良いかどうかは別にして、お勉強漬けにする環境が整っているのに感心。ランチョンセミナーは佐治先生の軽妙な司会のもとHLAと疾患感受性について5人の先生がほぼ10分づつ最新の研究のさわりとまとめだけのお話。どれもそれぞれ1時

間以上の講演内容に値するお話で、少々もったいない。

午後の最初はポスター発表のフリー討論であった。一般演題50題のポスターそれぞれについて発表者と参加者間での質疑応答だが、この学会の参加者が紳士の過ぎるのかあまり活発な質疑応答とは言い難い。多人数の学会なら個人的な繋がりがないから、辛辣な質問もし易いのかもかもしれないが、小規模の学会ではつつい遠慮してしまうのかもかもしれない。でもそれはこの分野の研究の発展にはマイナスにしか作用しない。もっと活発なやりとりが期待される。

講演会場前のロビーとポスター会場には機器展示。例によってコーヒーサービス付き。展示会社の説明員はさまざまな学会を回っているから種々の学会の雰囲気を知っており、彼らによればこの学会は講演での質疑など気楽に自由に話している雰囲気が良いとのこと。確かに我々研究会時代から長くこの分野に係わってきた仲間の間では自由にものが言える環境があり、それがこの学会の良さなのだけれど、それに比べポスター討論の低調さはどうしたことだろう。あるいは自由な雰囲気は我々中年の間だけであって、若い人たちには話しにくい雰囲気があるのかとちょっと気になった。

14時30分より、ワークショップ“DNAタイピングの実際”。既にこの種のワークショップは数多くなされてきたが、今回はそれぞれの手法の新しい発展についてであった。DNAタイピングのさまざまな手法が話されると決まると出る疑問が“どの方法が最も優れているのか”である。でもこの疑問の解答を会場で得ようとするのは無理と言うもの。それぞれの方法の発表者が自分の方法が優れていると思うから話しているのであって全体的な優劣は付け難い。ここで筆者が個人的に言うならば、広範なスクリーニングにはSSO、マイクロプレート法などに改良してあるほうが使い易い。SSOで区別できないファインな部分が必要ならSSPを併用する。少数の検体を手軽にタイピングするならRFLP。ドナーとレシピエントなど特定の組み合わせの間での異同を問題にするならSSCP、DCPなどと言うのが現状であろう。

夜は懇親会。この学会の良さの一つはこの懇親会。難しいことを話しているグループから、うわさ話に終始しているグループまで。この懇親会、堅苦しい挨拶が少ないのが何といても最高。少人数の学会なのだから、このような懇親会を通じて人と人との繋がりが広がって欲しい。ただ古くからのグループが親密過ぎて新しい人々が入りにくいとの指摘もある。新しい人々、若い人々がこのような懇親会の場で早く気楽な仲間に加わってくれることがこの学会の発展の方向だと思うのだけれど。懇親会は9時前に終了。暗闇の新宿中央公園を横切っても、痴漢に会う人も、痴漢に間違われる人もいなかったようす。

2日目、午前の部はワークショップ“クロスマッチ、最近の話題”。これは本学会員の多くにとって、日々切実な問題であるせいか、参加者も多く非常に熱心に討議された。

昼は学会総会。会計報告だの予算の審議だの一般会員にはどうでもいいことが多いから普段の学会では出

席者がほとんどいないのに、今回は総会に続くランチョンセミナーとの関係でお弁当付き。従ってこの学会始まって以来の多数の参加者。やはり食べ物で釣るのが一番の方法のよう。ランチョンセミナーはモノクロナール抗体についてLeon博士のお話。同時通訳付きとサービスが行き届いている。

午後のシンポジウムは第12回国際組織適合性ワークショップ、カンファレンスの報告。セッションによって解析が進んだ部門とほとんど解析らしい解析ができなかった部門があったようで、部門によっては報告担当者が報告に苦勞される場面もあり、サン・マローの美しい夕日のスライドがことさら印象的であった。

以上のように第5回日本組織適合性学会大会は無事終了。次回は防衛医科大学校の関口先生の大会長の下、来年4月末に東京で開催される予定。以上、今回の学会の、良く言えば“報告”、悪く言えば“かっとな感想”、つまり“印象記”でした。

12th International Histocompatibility Conference Report part II

京都府赤十字血液センター 丸屋 悦子

KAMON No.7でお約束しました続編をお届け致します。

Ir genes from Biology to Medicine

HO. McDevitt (Stanford, USA)

今回のワークショップで27,000のcell lineのデータが得られMHC多型の大きな地図を描くことができるようになり素晴らしいことである。ドミニクより与えられた私のテーマ「Ir genes from Biology to Medicine」は壮大な計画？（典型的なフランス人らしい言い方であるが：観衆ドット笑う）であるので、「The role of MHC class II genes in different Diseases」とタイトルを変えて話す。

疾患とMHCの相関についての研究は1964年のリリーによる「MHC association susceptibility to the Gross leukemia virus」に始まる。現在まで32年経ってもそのメカニズムは明らかではない。私はいつもMHCと疾患の相関について鍵となる説明を求め続けてきた。いまから示す論文でその解決法を思い付き、最終的に本当の答えを得られたと思っている。その論文のタイトル

は「MHC genotype and male ornamentation : genetic evidence for the Hamilton-Zuk model」であり、2~3ヶ月前にだされたもので、MHCの遺伝子型と鳥の羽の発達や男性の飾り立てに強い相関があり、そのことが男性の生存率におおきく関り、次世代への遺伝子の伝播に関っている。これは私が知り得る限りまったく新しいもの（Peter PharamとDominic Carronと時を同じくしたのですが：大きな笑い声が聴衆より起こった）である。では本題に入る。

MHC分子を基礎とした自己免疫疾患との相関についてIDDMを例に説明する。その理由はヒトに関する多くのデータがあり、実験的に多くの異なった男性の糖尿病を研究できるNOD mouse (non-obese diabetic: 牧野らにより開発されたNODマウスで、インスリン依存性糖尿病を自然発症するヒトI型糖尿病の実験モデル)

が使用可能であるためである。NODマウスと女性の糖尿病の間に少しの違いはある。しかし病状からすればヒトとマウスは非常に似ている。ヒトについてHLAと糖尿病の相関について以下のようにまとめられる。

HLA ASSOCIATION IN TYPE I DIABETES MELLITUS	
Haplotype increased in incidence	DR4> DR3>>DR1
Haplotype combinations with increased incidence	DR3/4: 3/3: 4/4
Haplotype decreased in incidence	DR2>>DR5

数年前Toddらによって発表されたことであるが、ヒトのDQβ鎖の57番目のアミノ酸の多型がIDDMの疾患感受性におおきな影響を与え、マウスI-A（ヒトのDQに相当する）の同じ場所のアミノ酸多型も同様にIDDMに影響を与えている。すなわち、ヒトとマウスの57番目のアミノ酸がアスパラギン酸でない場合IDDMにかかりやすく、NODマウスは57番目がセリンで正常マウスはアスパラギン酸である。IDDMにおいてこの多型が主要な遺伝的因子でありおそらく免疫因子である。これは2種類の種において同様な現象がみられたはじめての例である。DQβでみられた現象がDRβについてもみられることがわかった。DRB1*0405は57番目がセリンでDRB1*0401、0402と0403はアスパラギン酸である（DRB1*0405は日本人でのIDDM感受性アリルである）。

それではDQβの57番目のアミノ酸やI-Aの57番目のアミノ酸はいったどのような作用をしているのであろうか。それについて話す前にNODマウスについての予備知識としてNODマウスのislet cell抗原に対する反応について以下にまとめる。

NOD Response to islet cell antigens

1. At 3 weeks of age, NOD spleen cells fail to respond to recombinant islet cell antigens of crude islet cell extract.
2. At 4 weeks of age, NOD spleen cells (spontaneously) responded to 65Kd glutamic acid decarboxylase (GAD) and to islet cell extract.
3. At 6 weeks of age, NOD spleen cells respond to 65Kd and 67Kd GAD, carboxy peptidase H, peripherin, and murine HPS65.
4. BIO.GD, NOD.PD and NOR mice do not respond to any of these recombinant islet cell antigens.

NOD マウスは3週目ではislet cell antigensに対する反応は見られないが、4週、6週、8週とGADや

peripherinやislet extract（おそらくinsulin）に反応するT cellが増加してくる。ではNODマウスにおいてどのような原因で起こるのかを解明しヒトの場合に置き換え考えるため、次のようなトランスジェニックマウスを作った。

Mouse strain	Endogenous β chain	Transgenic β chain	56	57
NOD	Ab ^g	His Ser	None	
NOD.Ab ^d	Ab ^g	His Ser	Ab ^d	Pro Asp
NOD.PD	Ab ^g	His Ser	Ab ^g	Pro Asp

NOD.Ab^dはAb^dのDQβ鎖を入れたトランスジェニックNODマウスで、NOD.PDはsite direct mutationによりAb^gのβ鎖の56と57をプロリンとアスパラギン酸に変えたNODマウスである。前の話しに戻るが、8週目のNODマウスのislet cell antigensに反応するT cellはγインターフェロンを放出し、IL-4やIL-10はほとんど放出していないことよりTh1型のT cellである。Th1型のT cellはdiseaseをtransmissionすることができるが、Th2型のT cell diseaseをtransmissionすることはできない。おそらくTh1型のT cellによって完全にIDDMにたいする抵抗性がなくなってしまうのであろう。NOD.Ab^dはβ鎖は変異型ではなくAb^d型のβ鎖である。すなわちIDDMになりにくい遺伝子を入れたわけであるから、マウスはIDDMに対して抵抗性がある。Fig 1. にtransgenic NODマウスのIDDMの罹患率を調べた結果を示す。

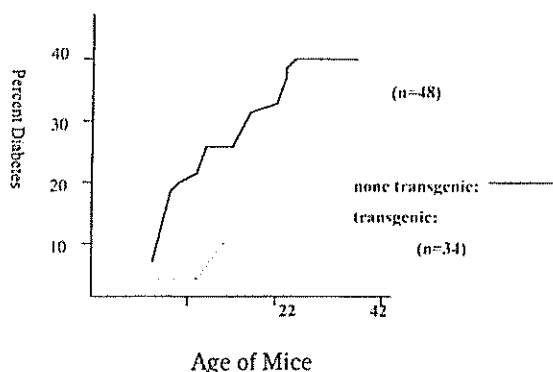


Fig.1 Ab^d protect NOD mice from IDDM

Transgenic miceとnon transgenic miceの間にはTcellの反応性に変化はないが、transgenic miceではあきらかなIDDMの罹患率の低下がみられた。このことからβ鎖を入れ替えることにより、すなわち10個のアミノ酸の違いにより、完全にIDDMにたいし抵抗性を示した。MHC遺伝子のなかでIDDMについて感受性や抵抗性を示す主要遺伝子はマウスではI-A遺伝子であり、ヒトで

はDQβ遺伝子であることが解った。次の疑問はこれらの違いがどのような影響を与えているかである。Diabetesのtransfer実験をした。650Radsを照射したNODマウスに①10⁷個のdiabetic spleen cells、②4×10⁶個のnon transgenic NOD mouse T cell、③4×10⁶個のtransgenic mouse (Ab⁰⁷/Ab⁰⁴のheterozygote) T cellをivした場合の罹患率を調べた。①では25日後には100%のマウスがIDDMになり、②の場合もほぼ①と同じで90%の罹患率を示したが、③は罹患率の低下(35%)を示した。この実験に再現性があることは確認されている。次の実験計画は以下に示すようにIDDMのNODマウス spleen cellをNODマウスに入れると80-90%のマウスがIDDMになる。

Transfer of IDDM		
Donor	Recipient	Diabetes
NOD	NOD	80-90%
NOD-Aβ ^d	NOD-Aβ ^d	10-15%
NOD-Aβ ^d	NOD-Aβ ^d	?
	+ α-IL4	
	α-IL10	

そしてIDDMのNOD-Aβ^dマウスのspleen cellをNOD-Aβ^dマウスに入れると10-15%のマウスがIDDMになる。ではIDDMのNOD-Aβ^dマウスのspleen cellをIL-4やIL-10抗体と共にNOD-Aβ^dマウスに入れるとマウスの罹患率はどうかである。この結果はまだ得られていないが、おそらくTh2型CD4 T cellがIDDMの感染を抑制していると考えている。すなわちAsp positive alleleの抵抗性はTh1の反応よりTh2の反応が優勢であるために起こっているのではないかと考えられる。

次にNOD.PDマウス(56番目と57番目のアミノ酸だけをヒスチジン、セリンからプロリン、アスパラギン酸に変異させたもの)の場合も同様の実験を行った。NOD.PD Transgenic miceについてback groundをまとめると以下ようになる。

1. Transgenic mice do not (9 months) develop IDDM or Intra. Insulinitis, but have mild peri-insulinitis.
2. NOD spleen cells proliferate in response to a panel of 5 islet cell antigens. NOD.PD transgenic spleen cells do not.
3. Nonetheless, transgenic mice produce similar levels of antibody to peripherin, GAD1, GAD2 and carboxypeptidase H.
4. Stalitis incidence and severity is equal in NOD and NOD.PD.

Islet cell antigensに対するT cellの増殖反応をNODマウスとNOD.PDマウスで比べると、NOD.PDマウスは非常に反応性が低い。しかしIslet cell antigensに対する総免疫グロブリン量は変化せず、抗体のisotypeに変化がある (Fig.2)。

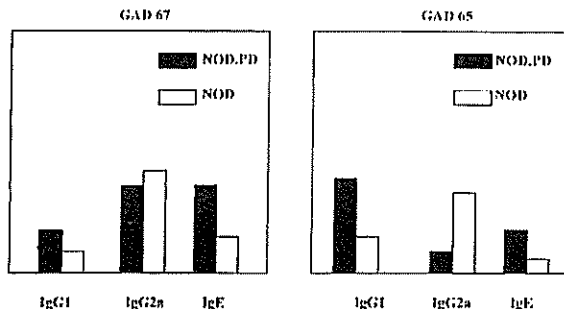
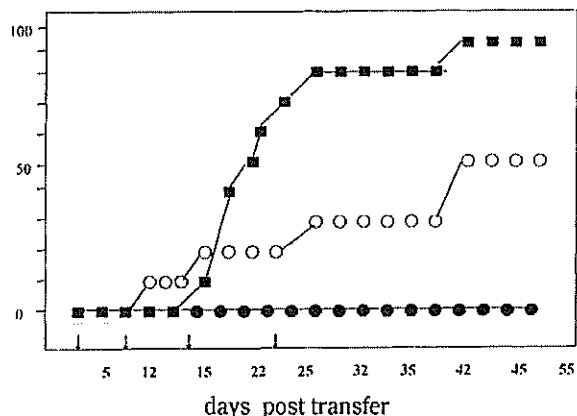


Fig. 2 Isotype of antibodies to GAD 67 and GAD 65

IgGのisotypeからみてNOD.PDはTh2型のCD4 T cellでかつIDDMの発症が抑制されている。Islet cell antigensに対するT cell responseでγ interferonの放出量をみるとNODマウスでは多量のγ interferonが放出されているが、NOD.PDではほとんど放出されていない。つぎにspleen cellの移入実験ではNOD.PDマウスのT cellを移入することにより完全にdiabetesの発症が抑えられる。同じ実験系でanti-IL4やIL10を使用した場合の糖尿病の罹患率を比較するとFig. 3に示すように、NOD.PDマウスのT cellを移入したマウスは100%糖尿病にはかからず、NOD.PDマウスの T cellを移入した後anti-IL4, IL10を投与すると罹患率が増加してゆく。

Fig. 3 Inhibition of transfer diabetes by T cell from PD transgenic mice



● : NOD.PD T cell ○ : NOD.PD T cell + anti-IL4, 10
■ : anti-IL4, 10 : injection anti-IL4, 10

またanti-IL4やIL10の投与によってもNOD.PDマウスの罹率率は増加する。よってanti-IL4やIL10がアンタゴニストとして働きNOD.PDマウスのT cellの移入による発症の完全な抑制を阻害していると考えられる。これらのデータから次に「57番目にアスパラギン酸を持ったアレルまたは持たないアレルにislet cell antigensのどのようなペプチドが提示されるのであろうか」といった疑問が湧いてくる。そしてこの疑問の答えを探すために今までの結果を少しまとめると、

- IDDM susceptible I-A alleles (57: non Asp) support a predominant Th1 response to islet cell antigens.
- IDDM resistant I-A alleles (57: Asp) support a predominant Th2 response to islet cell antigens.

ではその他の自己免疫疾患にかかわるHLA-class IIの多型について調べてみるとTable 1 に示すように疾患によって感受性を示すアミノ酸と抵抗性を示すアミノ酸に共通の特徴は見られないが、アミノ酸のchargeの変化が感受性と抵抗性の違いとなって現れていると考えられる。RAの場合疾患感受性を示すアミノ酸は陽性荷電で感受性を示さないアミノ酸は陰性荷電である。IDDMの場合は疾患感受性を示すアミノ酸は無荷電であるが抵抗性を示すアミノ酸は陰性荷電である。Pemphigus Vulgerisの場合はIDDMの場合と正反対になっている。

Table 1. Class II Sequence Polymorphism in Autoimmunity

Disease	Locus	Susceptible	Non Susceptible
RA	DRB1	70-72 Gln Lys Arg	Asp Glu Arg
IDDM	DQB1	57 Ala Ser Val	Asp
Pemphigus Vulgeris	DQB1	57 Asp	Ala Ser Val

よって疾患に相関する塩基の多型は電荷をおびた塩基の多型が主に関与すると思われる。そして次のような疑問が浮かび上がる。疾患感受性を示すalleleと抵抗性を示すalleleは機能が異なるのかそして結合するペプチドも異なっているのでしょうか？ IDDMにおけるMHC class IIが関与した疾患感受性と抵抗性のメカニズムとして以下の5項目が考えられる。

Possible Mechanisms of class II MHC Mediated Susceptibility or Resistance to IDDM

1. Different Dominant Epitopes.
2. Higher/Lower Peptide/MHC Affinity.
3. Higher/Lower Peptide/MHC Stability.
4. Longer/Shorter Peptide/MHC Cell Surface 1/2 Life.
5. Different TCR Repertoire.

おそらく1から4までのメカニズムと他のメカニズムとして5が考えられる。TCRのレパートリーを調べるのは現時点ではなかなか難しい仕事である。

疾患感受性を示すalleleと抵抗性を示すalleleに結合するペプチドの違いがあるかを知るにはRammenseeのデータが最も良い情報を与えてくれる。

Peptides Bound by DR4 Subtypes						
DR4 allele		Amino Acid (s) at:				
	70	72	P1	P4	P9	
0401	0404	R	R	F, Y, W	F, W, I, L	A, S, Q
					No R, K	
0402		D	E	V, I, L	Y, F, W, I	A, H, G
					No D, E	

DR4のalleleである0401と0402は70と72番目のアミノ酸がR Rであり、このふたつのalleleから溶出されたペプチドモチーフのP4にはR, Kはなく、0402の場合は70と72番目のアミノ酸がD EでありペプチドモチーフのP4にはD Eは検出されない。次にDR4 alleleで0401と0405のペプチド結合の特徴を比べると、

Peptides Bound by DR4 Subtype		
DR4 allele	Amino Acid (s) at:	
	57	P9
0401	D	A, S, Q
0405	S	D, E

DRB1*0401は57番目にアスパラギン酸を保有し、ちょうどDQB1のIDDM抵抗性alleleが保有するアミノ酸と同じであり、このalleleから溶出されるペプチドのP9はA, S, Qであり、DRB1*0405は57番目がセリンでDQB1のIDDM感受性alleleが保有するアミノ酸と同じ

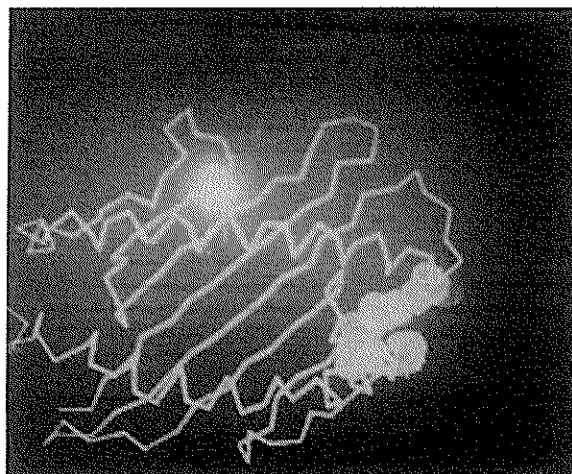


写真 2

でありP9はD, Eである。57番目がアスパラギン酸（陰性電荷）であるモデルとしてHLA-class IIの構造をみるとα鎖の56番目と59番目のアミノ酸はヒトとマウスは同一で、陽性電荷のアミノ酸であるアルギニンであり、陽性電荷と陰性電荷の結合により挟まれるペプチドのC末端の部分が非常に狭まっている（写真2）。一方57番目がセリンである場合はα鎖の56、59番目のアルギニンの陽性電荷は自由にペプチドの陰性荷電のアミノ酸と自由に結合でき、ペプチドのC末端部分がひろがっている（写真3）。これは感受性のalleleと抵抗性の

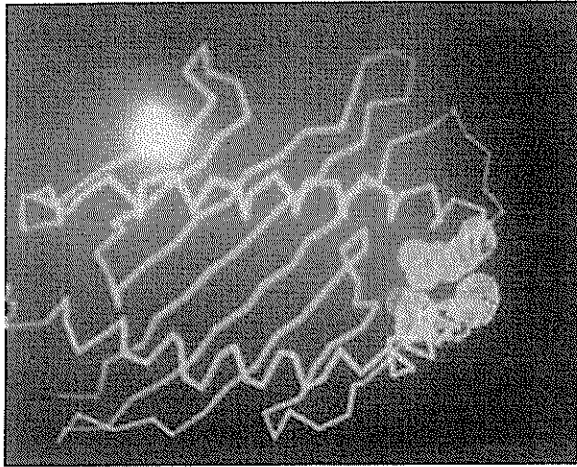


写真3

alleleは違ったペプチドと結合し抗原提示を行うことを意味している。そして疾患感受性MHC分子とペプチドの結合分子は選択的にTh1型のT cellを誘導する。これらを示す他の証拠としてIDDM由来の2種のペプチドに対するDQ8とDQ9の結合能力に著しい違いがあることを示した実験データがある。この実験はcell binding assayで行われた実験であるが、陽性荷電のペプチドとDQ9は強い結合性を示した。alleleにより結合するペプチドに違いがあることが証明できたとして、疾患感受性alleleと抵抗性alleleが異なったペプチドを提示することが証明できるであろうか。例えばRAの自己抗原を調べてみると自己抗原として良い抗原は発見されていない、Table 2に示す自己抗原の候補が知られているが、60~90%の患者が抗体をもちT cellの反応が認められる自己抗原は検出されていない。

Table 2. Potential Autoantigens in Rheumatoid Arthritis

Type II Collagen	Parvovirus
Hsp 60	E. B. V.
Proteoglycans	Metalloproteinase
Rheumatoid Factor	TIMP

よって感受性を示すアリルや抵抗性を示すアリルが免

疫学的に優位に提示するペプチドを見つけるのは難しい。ではIDDMの場合を調べると、Table 3 に示す自己抗原があり、これらの抗原のうちInsulin、GAD 65と67、37Kdなどが良い例と考えられる。

Table 3. Autoantigens in Type I Diabetes Mellitus

Insulin	P69
GAD 65、67	37Kd、40Kd
Hsp 60	38Kd
Carboxypeptidase H	155Kd
Peripherin	Glycolipid

つぎに感受性を示すアリルが提示するペプチドと抵抗性を示すアリルが提示するペプチドの違いがあることを示す証拠を得ることが必要である。我々はマウスで感受性を示すアリルI-Ag²が提示するGAD 65の3種のペプチドを見つけた（Table 4）さらに他に数個のペプチドが最近みつけれられている、しかし抵抗性を示すアリルが提示するインスリンやGADやその他の抗原のペプチドはまだ見つけていない。ここ2~3年マウスや人間に対するこれらのペプチドを計画的に見つけ出すことに専念し、感受性を示すアリルが提示するペプチドと抵抗性を示すアリルが提示するペプチドを解析し、Th1反応を誘導する免疫学的に重要なペプチドのエピトープを決定することが重要である。糖尿病の場合は多くの自己抗原の候補がありそれぞれの利点を持つが、我々はInsulin、GAD 65やHsp 60が良い候補と考える。なぜならこれら3種は疾患の症状が変わるときにみられるからである。しかし最新のデータでもMHCが自己免疫性疾患の感受性にどのように関与するかのはっきりした答えはまだ得られていない。

Table 4. GAD 65 Peptides presented by I-Ag²

247-261
509-523
524-538

12週間のNODマウスに以下に示す抗原を静注するとGAD 65抗原を投与した群の30週後のIDDM発症が20%に抑えられることがわかっている（Table 5）。よってこの処置を繰り返せば発症を100%抑えることが永久にできることを確信している。ただしメカニズムが解明されても、我々に必要なことは免疫学的に有意なペプチドのエピトープを解明することである。すなわち感受性を示すペプチドのエピトープと抵抗性を示すペプチドのエピトープを知ることである。これを解明するための

唯一の方法であると信じる方法は感受性アリルや抵抗性アリルをトランスジェニックマウスにいれ、HLA-DRやDQだけを表現し、まったく他の遺伝子 (I-A) の影響のない状態のノックアウトマウスを作成し、DRやDQの作用を観察できる。たとえばAβゼロゼロノックアウトマウスを作りDRα遺伝子を入れる。このようにすれば32年間で解明できなかった完全なメカニズムすなわち正確な免疫学的に優位なペプチドのエピトープ、感受性を示すものや抵抗性を示すものを知り、Th1やTH2の反応を誘導する正確なメカニズムを知り、ペプチドの結合能力の違いやMHCに表現されるレベルの違いなどを知り、それらを総合することによりT cell (Th1) mediated autoimmune diseaseにおけるMHC関与のメカニ

ズムを解明することがここ3~4年でできると考えている。

Table 5. Multiple intravenous injections of GAD 65 at 12-weeks of age protects from diabetes

injection	Diabetes at 30-weeks
OVA	17/25 (68%)
Peripherin	10/12 (83%)
CPH	5/7 (71%)
GAD 65	4/20 (20%)

12-week-old NOD females recived four I.V. Injections of 200mg of antigen every third day.

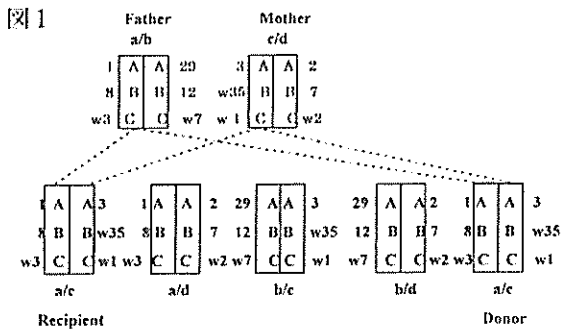
これらの多くのデータを得るために協力した私のスタッフに感謝し、講演を終わる。

HLA Biology in Haematopoietic stem cell transplantation

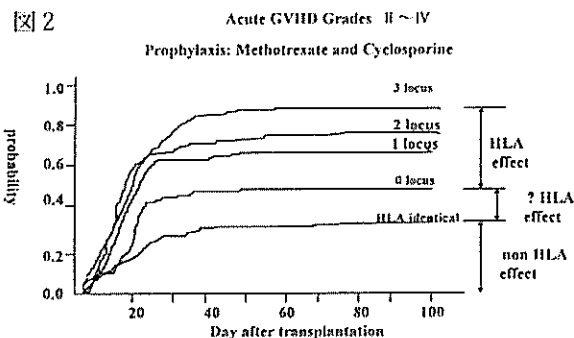
J. Hansen (Seattle, USA)

Related Bone Marrow Transplantation and Acute GVHD

骨髄移植ではHLA-identical siblingが最も良いドナー候補である。図1に示すように患者と同じハプロタイプ

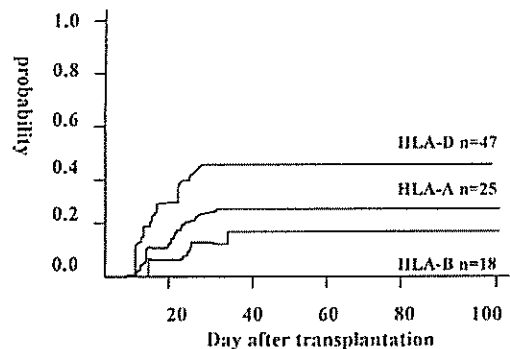


ブを両親から遺伝した兄弟姉妹がドナーとなりうる。しかしHLA identical siblingが得られる可能性は兄弟姉妹の数の減少にともない年々低くなっている。しかし one haplotype identicalなドナーは得やすい。血縁者間骨髄移植におけるacute GVHD (II~IV) とHLA適合性について調べると、図2に示すようにHLA genotype



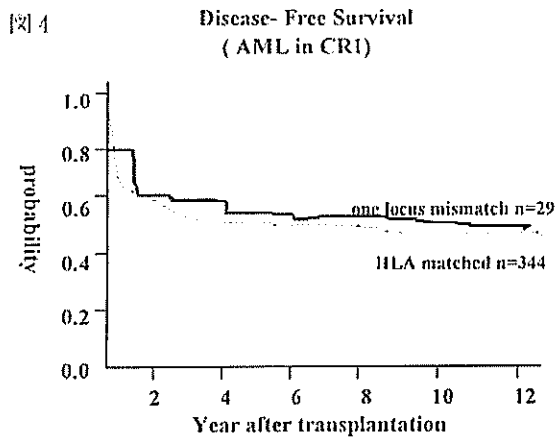
identicalな移植においてもacute GVHDが30%起きている (non HLA effect)。そしてHLAのミスマッチの増加に伴いacute GVHDの発症も増加している。これらのデータはパトリック ビーティーにより発表されたものである。もちろんacute GVHDの診断基準も施設による偏りやその他の要因 (免疫抑制剤の投与方法など) もあり、これらのデータはあくまでも相対的な尺度である。次に acute GVHD (II~IV) と one locus incompatible transplantsとの関係を調べる (予防処置としてmethotrexateとcyclosporineを使用している、図3)

図3 Acute GVHD Grades II~IV : One locus Incompatible Transplants



と、HLA-B locusのincompatibleの場合がGVHDの発症が最も少なく、ついでHLA-A locusのincompatible、HLA-Dのincompatibleの順に増加した。One haplotype identicalなドナーは得やすいがHLAのミスマッチ数が増加するに従いacute GVHD発症の危険率も増加する。しかしここに臨床医にとって良いニュースがある。そ

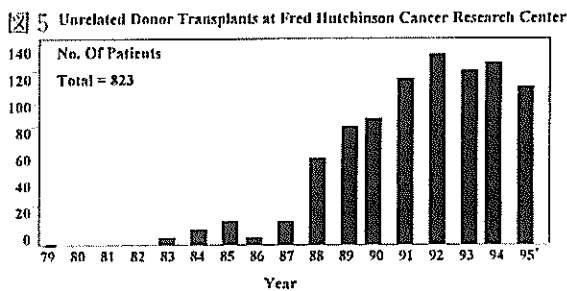
これは図4に示すように、Disease Free SurvivalとHLA



適合度について調べると、HLA single locus mismatchの場合10年後のDisease Free SurvivalがHLA matchedの場合と同じである。この現象を臨床医は十分理解しておくことが重要である。一度GVHDを起こすとコントロールすることはなかなか難しいが、GVL効果も得られることは利点である。したがってGVHDをコントロールしながら、GVL効果を得るための研究が今後重要である。

Unrelated Bone Marrow Transplantation・・・
シアトルの経験からNMDPまで

Fred Hutchinson Cancer Research Center Seattle Veterans Administration HospitalでのUnrelated Donor Transplantsの数を図5に示す。骨髓移植を必要とする



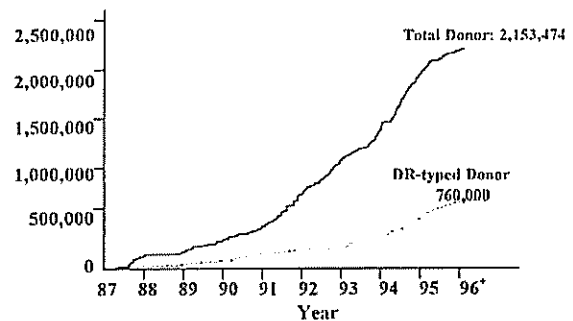
患者で血縁者からドナーが得られない患者のためHLA phenotype identicalな非血縁ドナーの骨髓移植をシアトルで1979年より始めた。これより1987年まではグラフに示す移植例数からもわかるように移植に適するドナーを得ることが非常に難しい時期であった。1988年からは移植例も急激に増加している。これはU.S. National Marrow Donor Program (NMDP) の発足のおかげである。

U.S. National Marrow Donor Program (NMDP)

- Established · October 1986
- First Donor Search · September 1987
- First Transplant · December 1987

アメリカでnational marrow donor programが設立されたのは1986年で1987年の9月、初めてドナーの検索が

図6 Volunteer Marrow Donors of NMDP



なされ同年12月第一例目の移植がなされた。NMDPのドナー数を図6に示す。現在HLA-A, Bがタイプされた総ドナー数は2,153,474でその内HLA-DRがタイプされたドナー数が760,000である。各年のHLA-DRがタイプされたドナーの数と一人の患者に少なくとも

表1 Initial Search Identifying at Least One HLA-A, -B, -DR Identical Match

Year	Number of DR-typed Donor	Total preliminary searched	Preliminary searched with at least One HLA-A, -B & -DR Identical Match
1990	43,995	2,472	31.9 %
1991	91,189	3,067	36.1
1992	151,353	3,552	41.1
1993	234,850	3,930	53.7
1994	438,572	4,760	67.0
1995	666,252	5,366	69.0
1996	769,499	1,999	71.4

一人のHLA-A, B and DR identical matched donorが得られる確率を表1に示す。1990年では31.9%の確立であったが、1996年にはその確率が71.4%に増加している。もちろんHLA-DRがタイプされたドナーも43,995から769,499と増加している。ただしアメリカは多民族国家であるため、すべての人種に同じ確率でドナーが得られるわけではない。人種別ドナー登録数を以下に示す。

Number of Volunteer Marrow Donors in the NMDP Registry by Race

- African America 153,740
- Asian/Pacific Islander 101,084
- Caucasian 1,279,027
- Hispanic 140,554
- Native American 26,436
- Declined to give race 3,059
- Other/Multiple race 11,717
- unknown 442,857

シアトルの移植経験より

次に話をHLAに関する話題にもどす。これからの話は主としてシアトルで行われた非血縁間骨髄移植例についてである。共同研究者であるPetersdorfのデータであるが、血清学でHLA-A, B, DR phenotype identicalな移植ペア364例についてDRB1 allele typingを行った結果、DRB1 allele match が305例、DRB1 allele mismatch が59例であった。このうちallele mismatchの内訳を調べると、mismatch alleleに偏りがみられた。以下に検出されたHLA-DR抗原とmismatch alleleの数および頻度(%)を示す。

HLA-DRB1 minor mismatches in HLA-A, B, DR serologically identical unrelated marrow transplants (n=364)

	Number of DR antigens		Number of mismatched alleles	
		%		%
DR1	80	(11)	4	(6)
DR15(2)	109	(15)	3	(5)
DR16(2)	3	(0.4)	1	(2)
DR3	138	(19)	0	
DR4	114	(16)	18	(29)
DR11(5)	65	(9)	20	(32)
DR12(5)	1	(0.1)	0	
DR13(6)	67	(9)	10	(16)
DR14(6)	24	(3)	0	
DR7	107	(15)	3	(5)
DR9	4	(0.6)	0	
DR10	3	(0.4)	0	
Total	728		63	

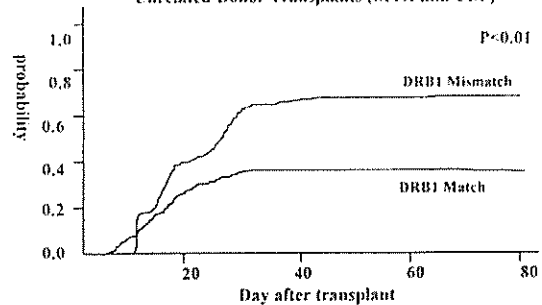
主なmismatch alleleはDR11, DR4およびDR13 groupのalleleであった。このようにmismatch alleleに偏りがあるのはアメリカだけでなく日本においても同じ現象が見られている。もちろんmismatch alleleが属するgroupはアメリカと日本では異なっている。さらに興味深いことは、日本とアメリカでacute GVHDと強い相関を示すHLA locusが異なることである。我々のデータではHLA-DRB1 alleleの適合性が、日本のデータではHLA-class I alleleの適合性がacute GVHDに強く相関するとされている。この違いの理由を解明するにはもう少しばかり時間がかかりそうである。

HLA-DRB1適合性の重要性

次に我々のデータからHLA-DRB1の適合性が移植成

績に与えた影響を示す。acute GVHD (Ⅲ～Ⅳ)とHLA-DRB1の適合性について、図7に示すように、DRB1

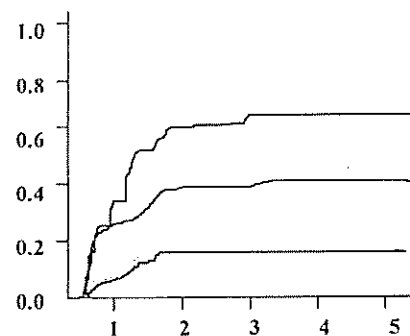
図7 Acute GVHD Grades Ⅲ～Ⅳ in HLA-A, B, DR Identical Unrelated Donor Transplants (MTX and CSP)



matchとmismatchの間に有意な差がみられた。

つぎに死亡率(白血病が死因ではない場合)との関係を調べた結果を図8に示す。この場合DRB1

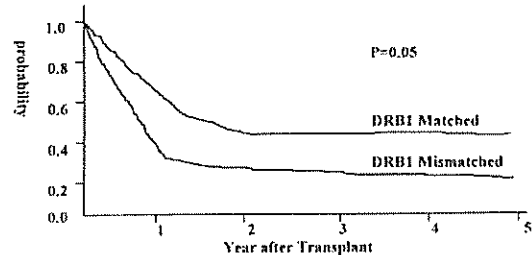
図8 HLA-A, B, DR Identical Unrelated Donor Transplants



mismatchとmatchで有意差が見られるグループと見られないグループに分けられた。この現象の原因については未解決である。

またSurvivalとの関係においても図9に示すように

図9 Survival of HLA-A, B, DR Identical Unrelated Donor Transplants



HLA-DRB1 matchとmismatchで一応有意差がみられる。ただしこのデータはpreliminaryなものであり、解釈には注意を要する。

HLA-DQB1の適合性は重要か?

次にHLA-DQB1の適合性がacute GVHDの発症に関与するかどうかについて述べる。まずHLA-DRB1とDQB1には強い連鎖不平衡が存在する。血清学でidenticalな移植例439についてHLA-DRB1とHLA-DQB1

の適合性を調べた。以下に結果を示す。

HLA-A, B, DR identical unrelated donor transplants
DRB1 and DQB1 allele matching characteristics

	Identity for	Identity for DRB1 alleles		Total
		yes	no	
Identity for	yes	325 (74%)	48 (11%)	373
DQB1 alleles	no	41 (9%)	25 (6%)	66 (15%)
	Total	366	73 (17%)	439

HLA-DRB1とDQB1の強い連鎖により74%がHLA-DRB1 alleleとDQB1 alleleが一致していた。ただしそうでないalleleも存在する。しかし非血縁間骨髄移植のドナープールを広げることで十分カバーできる範囲である。では適合および不適合であった場合のacute GVHDとの相関を調べると表2のような結果が得られた。したがってHLA-DQB1 alleleの適合性もDRB1の適合性と同じく重要である。

表2 DRB1 and DQB1 Mismatching and Risk of Acute GVHD in HLA-A, -B, -DR Unrelated Donor Marrow Transplants

	n	grade III-IV acute GVHD	
		probability	P-value
DRB1 matched			
DQB1 matched	n=325	38%	p=0.03
DQB1 mismatched	n=41	56%	
DRB1 mismatched			
DQB1 matched	n=48	50%	p=0.33
DQB1 mismatched	n=25	60%	

Strafified for DRB1 match status the hazard of DQB1 allele mismatching has a RR=1.6 (1.1, 2.3) and a P value of P=0.02

非血縁間骨髄移植後のGraft Failureについての解析

解析の対象の条件を以下に示す。

- 521人の患者で1985年5月から1994年の10月までに骨髄移植を受け最少28日間生存した患者
- 移植前のクロスマッチ陰性
- 全身照射とcyclophosphamideを含んだ治療を受けた患者
- GVHDの予防にcyclosporineとmethotrexateを使用した患者

Graft failure casesは21例でCase-matched control 42例をコントロール群とする。これらのHLA statusやTBIおよびmarrow cell doseを以下に示す。

HLA status	Graft failure cases	Matched control
	n=21	n=42
A minor mismatch	3 (14%)	6 (14%)
B minor mismatch	1 (5%)	2 (2%)
DR minor mismatch	3 (14%)	6 (14%)
TBI		
1200	10 (45%)	20 (48%)
1320	10 (45%)	19 (45%)
1440	1 (5%)	3 (7%)
Marrow cell dose		
median	2.7×10 ⁴	3.3×10 ⁴
	1.6-3.5×10 ⁴	2.0-5.1×10 ⁴

HLA class I disparityとGraft Failureの関係を表3～5に示す。HLA-Cの適合性とGraft failureに相関があった。

表3 HLA and Graft Failure (I)

class I HLA disparity	Graft Failure Cases	Case-matched Control
none	2 (10%)	19 (45%)
A alone	2 (10%)	5 (11%)
B alone	1 (5%)	4 (10%)
A and B	1 (5%)	0
C alone	5 (24%)	7 (17%)
A and C	2 (10%)	2 (5%)
B and C	6 (29%)	3 (7%)
A, B and C	2 (10%)	2 (5%)

19% (A, B, C alone) and 71% (A and C, B and C, A, B and C) for Graft Failure Cases. 21% (A, B, C alone) and 34% (A and C, B and C, A, B and C) for Case-matched Control.

表4 HLA and Graft Failure (II)

Class I HLA disparity	Graft Failure Cases	Matched Control	P-value	OR
A-locus	7 (33%)	9 (21%)	0.17	3.3
B-locus	10 (45%)	9 (21%)	0.04	4.2
C-locus	15 (71%)	14 (33%)	0.01	5.2

表5 HLA and Graft Failure (III)

Class I HLA disparity	P-value	95%CI	OR
HLA-C	0.04	1.1, 15	4.0
HLA-A and/or B	0.11	0.78, 13	3.1

Multivariable conditional logistic regression model

Unrelated donor Transplants for CML

Fred Hutchinson Cancer Research Center Seattle Veterans Administration Hospital で1985年5月～1994年12月までにおこなわれたCML患者の非血縁間骨髄移植について述べる。まず患者はcyclophosphamideとTBIの治療を受け、unmodified (non T cell depleted) marrowを移植され、GVHDの予防にはMethotrexateとcyclosporineが使用された。Donor selectionの基準は36才以下の患者にはHLA identical またはone HLA-A, B or DRB1 minor mismatchドナーを選び、38～55才の患者

にはHLA-A, B, DRB1 identicalドナーを選んだ。333例中のHLA matchingは以下のとおりである。

HLA-A, B, DRB1 identical	250 (75%)
HLA-A or B minor mismatch	30 (9%)
HLA-DRB1 mismatch	45 (14%)
DRB1 and A or B minor mismatch	6 (2%)
unevaluable	2 (0.6%)

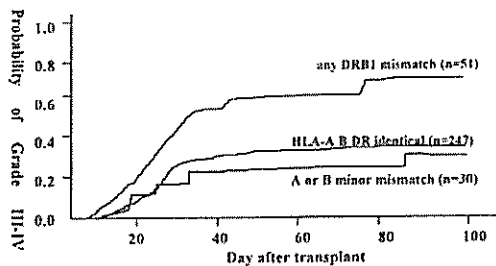
Acute GVHDとHLA適合性については以下のような結果が得られた。

	Grade II~IV	Grade III~IV
HLA-A, B, DRB1 identical	81%	38%
HLA-A or B minor mismatch	77%	33%
any DRB1 mismatch	94%	61%

HLA-DRB1 mismatchの場合が最も高頻度でacute GVHDが起こっている。

図10にacute GVHDとHLA matchingについてのデータ

図10 Unrelated Donor Transplants for CML 1985-1994



を示す。HLA-DRB1の不適合性が強いacute GVHDを引き起こしている確率が高く、HLA-A or Bのminor mismatch (splitの違い)はHLA-A, B, DR identicalな場合とほぼ同じであり影響を与えない。またacute GVHDについてmultivariable analysisを行うと、DRB1 mismatchと患者が男性でドナーが女性である場合において有意差がみられた。

次にCMLの移植例でchronic GVHDとHLAの適合度の関係を調べる。Acute GVHDの場合と同様にHLA-DRB1 minor mismatchの場合chronic GVHDを高頻度で起こす。ただしそのピークは1~3年で4年以降は免疫寛容状態になっている。この現象はHLA-A, B, DR identicalな移植例やHLA-A or B minor mismatchの移植例にも共通している。どのようなメカニズムで免疫寛容を誘導するかについて興味深く、今後の研究が期待される。

CML患者への骨髄移植例で診断から1年以内に移植を受けた50才以下のchronic phaseでのsurvivalを表6に示す。CML患者の場合、良い移植時期に速やかに移植することが最も重要である。

表6 Marrow Transplantation for CML in Chronic Phase Patients < 50 years of Age and Transplanted with One year from Diagnosis

Overall Survival	Transplant Donor	
	HLA Matched Unrelated Volunteer (n=51)	HLA Identical Sibling (n=218)
1 year	82%	86%
2 year	74%	80%
3 year	74%	77%

Life Saving International Cooperation

…国際的な共同研究でより多くの命が救える…

NMDPでは一年間で約1000例の移植、ひと月あたり約90の移植を行っている。また国際的なドナーの交換によりアメリカから477例の骨髄が世界各地に送られ、また572例の骨髄を世界各地から頂いている。このように国際的な共同研究でより多くの命が救えるのである。どうもご清聴ありがとうございました。

…筆者の感想

偉大な骨髄移植の臨床医であり研究者であるA. Hansen. あくまでEVIDENCEを重視した研究の進め方。そしてその研究成果を臨床応用し、より良い移植を望む熱意がひしひしと伝わってくる講演に感動した。



シリーズ: HLA最前線



【HLAの臨床応用編】

『DR2以外のナルコレプシー』

帝京大学医学部附属市原病院 第三内科 桑田 昇治

はじめに

本年フランスで開催された第12回国際組織適合性ワークショップ(12th IHWS)の疾患部門の中のナルコレプシー(Narcolepsy)のテーマは、DR2陰性のナルコレプシーであった。今回のワークショップ全体の構成と同様に、ワークショップ本部からの情報が遅く少ないこともあり、参加施設は少なかったが、同セッションに参加ラボである私の報告を兼ねて、何が問題となっているのか整理しておく。

1. ナルコレプシーとDR2

ナルコレプシーは、カタプレキシー(cataplexy)とよばれる脱力発作を伴う傾眠疾患である。ナルコレプシーとHLAとの相関は、わが国の十字猛夫および本多裕が、1982年に世界で初めて報告した。血清学的HLAタイピングで、患者全例でDR2が陽性であることを見だし、初めての100%の相関を示す疾患の報告であった。その後、白人例においても、イギリス、フランス、ドイツ、カナダ等から、強い相関の確認が報告され、また、1991年横浜で開催された前回の第11回国際組織適合性ワークショップ(11th IHWS)では、東洋人で日本人以外に中国人(漢族)でも100%の相関が確認されている。

ところが、東洋人および白人での、このような強い相関にも関わらず、当初より、これに疑義を唱えてきた研究グループが存在する。Stanford大学のSleep CenterのGrumet等は当初よりDR2陽性のナルコレプシーが存在することを報告してきた。当初のGrumetおよびGuilleminaultの報告でDR2陽性のナルコレプシーが60%程度であった。その後、彼等は、フランスよりMignotを迎えてStanford大学グループもナルコレプシーの診断および解析に正確さが加わるようになり、MignotがSleep Centerの中心となり、混乱が少し整理されてくるようになる。

2. DR2陰性のナルコレプシーは存在するか

日本以外で報告されたナルコレプシー患者群の中にDR2陰性のナルコレプシーが存在することは、当

初より認められており、Stanford大学以外のイギリス、フランス、カナダでの白人患者例で2%から最大10%程度存在する。当初まず考えられたのは精神科領域の疾患でもあり、診断基準の違いにより、ナルコレプシー以外の傾眠疾患の患者が含まれているのではないかという点であった。傾眠疾患に関して必ずしも統一された診断基準が確立されていなかったため、わが国の本多裕および十字猛夫等は、ナルコレプシーの診断基準を提唱した。この診断基準にあてはめてもDR2以外のナルコレプシーが存在し、DR2、DR12、DR17等が報告されている。これらがDQ1であるため、DR遺伝子座よりはDQ遺伝子座が疾患との相関をより反映しているとの仮説が成り立つ。日本人患者例では、300例におよぶ血清学的タイピングで例外が見られないためDR2(DR15)とDQ1(DQ6)はどちらも100%を示し、両者間の差は見つけられない。

3. HLA対立遺伝子からみたナルコレプシー

ナルコレプシーとDR2との相関をさらに複雑にしてくるのは、DR2陽性患者の中でさらに、対立遺伝子の違いが存在することが判明している。日本人および白人での対立遺伝子から見たHLAハプロタイプは、DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602である。ところがDR2陽性患者の黒人例の中に、DRB1*1501ではなくDRB1*1503の対立遺伝子のものが2/3を占めており、DQB1対立遺伝子は0602である。黒人例は、Stanford大学の28例およびカナダのグループ1例の両グループしか患者例がないため確実ではないが、黒人例ではDRB1は1503であり、DQB1は0602であると考えられる。(図1)

4. ナルコレプシーの疾患感受性遺伝子

このようにみえるとDR2陰性のナルコレプシーは確かに存在するようであり、ナルコレプシーと真の相関を示すのがHLA遺伝子そのものか、あるいは周辺領域の別の遺伝子が考えられる。CA repeatsがDQA1とDQB1遺伝子座の間に見い出され、マーカーの一つとして使用できるが、DQB1対立遺伝子との

図1 日本人および黒人ナルコレプシー患者におけるHLAクラスII対立遺伝子

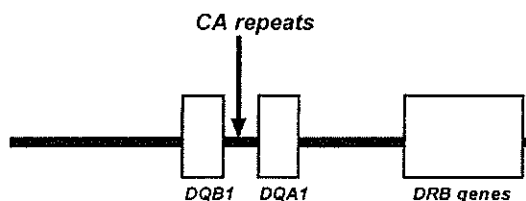
	DRB1	DQA1	DQB1
日本人患者	1501	0102	0602
黒人患者	1503	0102	0602

連鎖不平衡が強いため結果の解釈は慎重に行なう必要がある。(図2) DRB1*1501-DQB1*0602はナルコレプシー以外にも種々の疾患で相関を示すが、わずかに多発性硬化症との合併例の報告が一件あるのみである。また、ナルコレプシーが自己免疫疾患であることは、現在では否定的である。従って、ナルコレプシーの発症にはさらに別の遺伝子が関与するか、HLA遺伝子領域の未同定の遺伝子が関与するかどちらかの可能性が考えられる。

おわりに

アメリカ、イギリスおよび日本で非公式ながら、ナルコレプシーの原因遺伝子をクローニングするためにHLAクラスII遺伝子領域の大規模な塩基配列決定のプロジェクトが進行中であり、今後の成果が期待できる。

図2 HLAクラスII遺伝子領域に存在する CA repeats microsatellite



参考文献

- 1) E. Behar, X. Lin, F. C. Grumet and E. Mignot:
A new DRB1*1202 allele (DRB1*12022) found in association with DQA1*0102 and DQB1*0602 in two black narcoleptic subjects. *Immunogenetics* 41 (1) : 1995.
- 2) Macaubas, J. Hallmayer, J. Kalil, A. Kimura, S. Yasunaga, F. C. Grumet and E. Mignot:
Extensive polymorphism of a (CA)_n microsatellite located in the HLA-DQA1/DQB1 class II region. *Hum Immunol* 42 (3) : 209-20, 1995.
- 3) Shoji Kuwata, Takeo Juji, Tsukasa Sasaki, Yutaka Honda, et al: The first international collaborative study on narcolepsy. In *HLA 1991*, Vol. I, edited by K Tsuji, M Aizawa, T Sasazuki, Oxford, Oxford University Press, pp.730-734, 1992.

【HLAの生物学編】

HLA分子の発現制御（その8）：がんとHLA

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 木村 彰方

前回までに、がんにおけるHLA分子の発現欠損とDNA修復酵素異常との関連について述べた。今回は、がん（特に大腸がん）とHLAとの関係について、もう一度まとめてみる。

一部のがんではHLA分子の発現欠損が報告されているが、大腸がんについても同様であり、その20~30%にHLAクラスI分子の発現欠損が認められる。この場合の発現欠損には、全てのHLAクラスI分子の発現が欠損する場合と、特定の対立遺伝子群のみの発現が欠損する場合とがある。すなわち、 β 2ミクログロブリン遺伝子変異のような場合は、クラスI様分子（MICAやMICB⁽¹⁾を含めて）の全ての発現が欠損するが、これに対して、HLAクラスI分子H鎖遺伝子自体の変異の場合は、一部の対立遺伝子群のみの発現が欠損することになる。

ここで、がん細胞が“非自己”細胞として免疫監視機構に認識される場合を考えてみよう。第1は、がん細胞特異的なCTLによる認識である。この場合に認識されるのは、特定のHLAクラスI分子によって提示された特定の“がん細胞特異的抗原ペプチド”である。すなわち、この場合はHLA側にも抗原ペプチド側にも特異性が存在することになる。第2は、NK細胞によるがん細胞の認識である。この場合の抗原特異性は明らかではなく、HLAクラスI分子の発現が欠損したがん細胞が認識される。第3は、 $\gamma\delta$ T細胞⁽²⁾による認識である。この際の“抗原”として熱ショック蛋白などが考えられているが、これを提示するHLA分子は明らかではない。最近HLA-B遺伝子のすぐ近傍にMICAおよびMICB遺伝子が発見されたが、これらのMIC遺伝子は、その構造上、何らかの抗原ペプチドを結合し得る

がCD8分子との相互作用部位がないと考えられるため、 $\gamma\delta$ T細胞によって認識される可能性がある。第4に、がん細胞特異的CTLを効率良く誘導するためにはヘルパーT細胞が必要であるが、このヘルパーT細胞は、がん病巣局所に浸潤したマクロファージなどの抗原提示細胞によって取り込まれた“がん細胞抗原”の分解産物がクラスII分子によって提示されたものを認識すると考えられる。すなわち、がん細胞自身ではなく、その分解産物を提示する細胞が認識される場合である。

がん細胞の免疫監視機構による認識には、以上の4つの経路が考えられるが、がん細胞にとってみれば、これらの認識から免れることが肝要である。では、がん細胞はいかにしてこの免疫監視機構からエスケープしているのだろうか？

我々は、大腸がんにおける種々のがん関連遺伝子 (Ki-ras^{ras} のようながん遺伝子、p53^{p53} やAPC^{apc} のようながん抑制遺伝子) の変異を解析しているが、一般的に言って大腸がんでは、30~40%にKi-ras変異、30~50%にp53変異、20~30%にAPC変異、30~50%にDCC^{dcc} 変異、30~50%にDPC4^{dpc4} 変異が見出される。逆に言えば、これらのがん関連遺伝子に変異のない大腸がんも多く存在するし、変異が見つかる大腸がんにおいても、そのほとんどは同一の変異ではない。したがって、これらのがん関連遺伝子の中には、大腸がんにおける“共通がん抗原”は存在しないことになる。

一方、HLA分子の発現欠損という観点から見ると、 $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子に変異を有する大腸がんは約6%であり、これに対して、HLA-H鎖領域のLOH (ヘテロ接合性の消失；片側の染色体上の遺伝子の欠損) を認める大腸がんは約16%である。また、解析した限り、 $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子変異とHLA-H鎖領域のLOHとの両者を有する大腸がんは存在しなかった。すなわち、大腸がんは前記の免疫監視機構から免れる術として、異なる経路のいずれかを用いていることになる。なお、HLA-H鎖領域のLOHの範囲を調べてみると、LOHの検出されるほぼ全例にHLA-B遺伝子の欠失を認めるが、その多くは、MICAからHLA-B、HLA-C、HLA-Aに至るまでの広範な領域を欠失していることがわかった。すなわち、大腸がんにも認められるHLA分子の発現欠損の多くはHLA-H鎖領域のLOHに基づくものであり、これは“がん特異抗原”を提示するHLAクラスI分子 (特にHLA-B) を欠損させ、同時に $\gamma\delta$ T細胞による認識に関与するMIC分子の発現を欠損させ、さらに片側の染色体上のHLA-H鎖の発現を残すことでNK細胞による認識からも免れ得るための巧妙な手口であると考えられる。

従って、がん細胞のこのような免疫監視機構からの逸脱策を考慮にいれて、“がん特異的免疫”を成立させなければならないことになる。では、HLA分子の発現欠損のない群と、発現欠損のある群に分けて考えなければならないのであろうか？また、先に述べたように、“がん抗原特異的免疫”のターゲットとなる共通抗原ペプチドを探することは、少なくとも既知のがん関連遺伝子群に注目する限り、それはHLA型特異的であつ抗原ペプチド特異的ということになり、万人に共通の免疫療法の開発は極めて困難であるように思える。次回に、これらを克服するための方策について考察する。

注1) [MICA, MICB]

最近HLA-B遺伝子の近傍に発見されたクラスI類似鎖(MHC class-I like chain)をコードする遺伝子群。2つの遺伝子(AとB)があり、いずれも主に上皮系の細胞に発現する。構造上マウスTL遺伝子等に類似するが、その機能は不明である。

注2) [$\gamma\delta$ T細胞]

T細胞レセプターには $\alpha\beta$ 型(α 鎖と β 鎖)と $\gamma\delta$ 型(γ 鎖と δ 鎖)がある。通常の抗原ペプチドの認識に関わるT細胞は $\alpha\beta$ 型である。 $\gamma\delta$ 型はプリミティブ反応に関与すると考えられている。

注3) [Ki-ras]

細胞増殖シグナルに関連する蛋白で、変異することによって活性化され、細胞の増殖を促進する。

注4) [p53]

癌抑制遺伝子のひとつ。DNAに損傷が生じた場合に活性化し、細胞周期を止めることによってDNAの損傷を修復する時間をかせぐと考えられている。この時間内にDNA修復がうまくいかない場合は細胞は死滅する。しかしながらp53に変異が存在すると、この細胞周期の停止がうまくいかず、DNA損傷の修復異常とも相まって、細胞は増殖制御不能の状態すなわち癌化する。

注5) [APC]

家族性大腸腺腫症の主たる原因遺伝子として単離された。一般の大腸癌でも変異が多く見つかる。細胞接着の情報伝達に関係している可能性が指摘されている。

注6) [DCC]

大腸ガンで見い出されたガン抑制遺伝子の1つ。第18染色体長腕領域にある。正常機能はほとんどわかっていないが、細胞接着分子と類似構造があることから、不活化することで、細胞増殖制御能が失われ、ガン化に進むと考えられている。大腸ガンの悪性化、特に浸潤や転移に関与しているとみられているが、その直接的な証拠はなく、最近ではむしろ癌との関わりに否定的な意見も出されている。

注7) [DPC4]

第18染色体上長腕のDCC遺伝子の近傍にある。正常機能は不明であるが、膵臓癌 (deleted gene in pancreas cancer) において不活化している。大腸癌においても不活化していることが最近報告されており、癌抑制遺伝子のひとつである。

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8 私のたどった研究の道

日本赤十字社中央血液センター 十字 猛夫

昭和38年東大医学部を卒業し、翌年第一内科に入局した時、故吉利和教授より与えられた研究テーマは「薬剤アレルギーによる肝障害」でしたので、私は薬剤としてピリン剤（スルピリン、アミノピリン）とクロラムフェニコールを選び研究することにしました。指導を血清学教室松橋先生にお願いし、まず薬剤を赤血球に化学的に結合して、間接凝集反応法で抗体を測れるかどうか試みました。その頃すでに赤血球に抗原を付けて抗体を測定する方法（PHA（passive hemagglutination））が行われていました。薬剤の分子は小さかったのですが、この方法を利用して測定しようとした。そのためにスルピリンとクロラムフェニコールの構造を少し変化させ、結合しやすい形にしました。結合の方法はベンゼン核にアミノ基が付いていると、そこをジアゾ化（N=N結合）でき（ジアゾカップリン法）、それに蛋白質を加えるとヒスチジンかタイロシンの所に結合します。これにより、蛋白質にも赤血球にも薬剤を結合させることに成功しました。薬剤結合赤血球が反応するかどうかをみるためには、薬剤に対する抗体が必要であり、ウサギのアルブミンに薬剤を結合させウサギに免疫することで、高力価の抗体を得ることができ、ピリン剤とクロラムフェニコールに対する抗体を間接凝集反応で検出できる系を作ることができました。そこでヒトの赤血球にこれらの薬剤を同様に結合させて、これらの薬剤にアレルギー反応を示す患者血清を集め検査しました。しかし薬剤

アレルギーの患者さんの症例は少なく、実際に抗体を測定しても抗体が陽性である患者は一人もいませんでした。今から思えば肝障害等は細胞性免疫の方が主だったと推定できるし、アレルギーをIgGやIgM抗体で検査すること自体が無理であったと考えられます。この時各薬剤だけを蛋白質に結合することなくアジュバントに加えて免疫することによって、ウサギがIgGおよびIgMの抗薬剤抗体を産生することを示すことができました。この一連の実験が私の学位論文でした（まことにさみしいものでした）。

このように血清学教室で薬剤抗体の研究をしていたころ、青年医師連合運動が高まり、昭和42年の卒業生によって次年度の入局拒否闘争が起こってしまい、医局に人手が足りなくなったため、吉利教授より「至急医局に戻って来るように」命令されました。しかしちょうど血清学教室では翌週から学生実習の指導をする予定になっていましたので、戻る時期を延ばしていただくよう吉利教授にお願いに上がりましたが「君だけ勝手な事をさせる訳には行かない。」とのご指摘を受け、結局医局を首になってしまいました（若気のいたりとはいえ、いまだに恥ずかしく思っております）。そこで大学院を内科系から血清学教室に課程を変えて昭和43年の3月に血清学で大学院を卒業し、4月から血清学の助手にいただきました。

昭和43年春から、だんだん大学紛争が激しくなり、血清学教室も学生に封鎖されて研究ができなくなりま

したので、封鎖されていない病院輸血部の大河内先生の所に研究の場所を移させていただきました。大河内先生はそのころHBVのオーストラリア抗原を発見され、臨床的関連について研究されておられました。測定方法として、オクタロニー法と補体を使ったIAHA法を真弓先生が開発中でありましたが、大河内先生に「しっかりした検査法を作れ。」と命令され、オーストラリア抗原が含まれている血清と抗体を含む血清1ℓずつ渡されました。間接赤血球凝集反応を手がけていたので、これを元に何かできないかと考えて、抗原をくっつけて抗体を測るのが普通行われている間接赤血球凝集反応ですが、逆に抗体をくっつけて抗原を測定出来ないか実験してみました。まず一定量ずつの抗原と抗体の血清を混ぜてどの割合が一番免疫沈降物をつくるか（いわゆる最適比）を調べて、ふたつの血清を適量混合して免疫沈降物を作りました。沈降物をよく洗って、次に3 Molのヨードカリウムに溶かして、抗原と抗体を解離させ、3 Molのヨードカリウムに膨潤させたセファデックスG200のカラムにかけて抗原と抗体を分離しました。一番目のフラクションからは抗原が、二番目のフラクションからは抗HB抗体だけがうまく分離出来ました。この特異的抗体を、ホルマリン固定し、タンニン酸処理したヒト赤血球に結合して感作赤血球を作りました。この赤血球をいくつかのAu抗原陽性血清と反応させたところ、きわめて高い希釈倍数の検体でも、強い凝集反応が認められ、興奮したことを思いだします。そこでリューマチの患者血清中にはヒト免疫グロブリンに対する抗体があると言われていたので、リューマチ患者血清を多数集めて検討しましたが、偽陽性反応を示す例はありませんでした。この様にしてまさに"beginner's luck"として逆受け身赤血球凝集法（RPHA reversed passive hemagglutination test）を作ることができました。論文は提出しましたが、私が留学してからは跡を継いでくれる人がいなくて立ち消えてしまいました。私の論文を見たアメリカのアポット社から「製品化したい」との申し入れの手紙を日本経山で留学先にて受け取りました。同社は、確かオウセルという商品名で発売したと思います。（ただし一銭の収入もありません、念のため。）数年後ガンセンターの関根先生達の努力により我国においても広く普及されました。

松橋先生のご紹介で昭和44年9月バッフアロー大学に留学しました。留学先では、血清学の研究のほかに、死体腎が出た時のタイピングの係を命ぜられました。その頃NIHがHLAの抗血清を配っていましたが、

抗血清は（A:A1,A2,A3,A9,A10,A11 B:B5,B7,B8,B12）ぐらいしかなくてテラサキトレーに数分注すれば済んでしまいました。交通事故があり死体腎が出ると、私のところに電話があり、届けられた血液からリンパ球を分離してタイピングをする、といった作業のほか、パネルを用いた抗血清の特異性の検討も行っていました。その頃、リンパ球の分離方法は50 mlの三角コルベンに直径4 mmのガラスビーズを10〜20個入れ、血液を加えグルグルかき回すと血餅が出来てきてガラスビーズに付着してしまい、フィブリンを除いた血液が採れました。それにブラズマジェルというのを混ぜて45°に立てかけた長い試験管に入れ、赤血球を沈降させたあと、白血球を含んだ上部の血漿を分離しました。アラビアゴムとガラスサンド（ガラスの小さな砂）を混ぜて乾燥させると表面にアラビアゴムのついた砂のようなものが出来ます。それをストローのようなものに詰めて、上から先程の血漿を流すと顆粒球が砂粒に引っかかりリンパ球が落ちてくるという仕組みでした。まだFicol-Conrayなどない時代でしたから、このようにしてリンパ球を採取していましたが、交通事故の被害者の血液などは顆粒球が大変多く、十分に除去できずタイピング出来ないこともありました。補体もウサギから自分で採血して作っていました。私のいた所はアメリカとしては遅れていましたが、前任者のアルパート（UCLAのテラサキの所へ移った。現ミュンヘン大学）が位相差顕微鏡などの設備を整えていました（すべてドイツ製品）。その頃大学には日本人のドクターが何人か居られたので、タイピングをして見ましたが、白人と比べてブランクが多い事に気が付きました。私自身のタイプはA2,A11,B51,B62ですが、その時にはA2,B5のみでありました。そのうち東大病院輸血部の大河内先生と萩野先生が日本人の分娩時出血血液を集め始められましたので、その一部を送っていただき、抗体の特異性を調べてみたら、やはり今までブランクだったのが、タイピング出来ることになりましたので、日本に帰ったらきちんとやり直したいと考えました。他には現在東大の柴田先生がおやりになっている血小板特異抗体検出法の基礎的なことをやっていました。また組織特異的な抗原の有無、種特異的な抗原の有無なども調べていました。方法としては色々な培養細胞を試験管の片面に培養増殖させ、そこに抗血清を加えインキュベーションしたあと良く洗浄し、RhC（ラージC）RhD（ラージD）の両方に反応するアンチGという特異性を持ったレプリ（抗体産生者の名前、世界的に有名）という血清を用いて、RhD,C陽性の人の赤血球を感作し、さら

にその上に抗ヒトIgGを過量に加えると、抗体過剰が起こり赤血球は凝集しません。そういう赤血球を加えると、IgG抗体が反応した培養細胞の表面にくっつくというテクニックで、現在オリンパスに居られる狩野先生などが一生懸命におやりになっていた方法です。私はこの方法を血小板を用いて実験するよういわれました。それは試験管の片面にくっついた血小板をホルマリンで固定し、抗血清と反応させた後、感作赤血球で血小板と結合したIgGを検出する方法でした。血小板は取扱にくいもので、遠心しただけでも表面の活性が変化することがあるなど、マテリアルとして非常に難しいものでしたので、柴田先生の御苦労に感謝したいと思います。

また培養細胞のHLAを調べたりもしました。バッファローのロズウエルパーク研究所（ガン研究所として有名）に箕和田先生がおられ、患者さんからリンパ球を採取しリンパ球を増殖させ、もう一度患者さんに戻してガンを治そうとするプロジェクトを行なっておられました。そこでは色々な人からのリンパ球を採取して作ったリンパ球のcell lineを多数お持ちになっておられました。そしてそのような細胞のHLAタイピングをするように言われました。培養細胞はcytotoxicityでみると死細胞に見えるような細胞も多いのでinhibition assayを行ってみました。それは抗血清と培養細胞をインキュベートさせ、その上清のcytotoxicな抗体の有無を調べるという方法でした。

昭和47年春に血清学教室に戻りましたが、位相差顕微鏡がないので輸血部で研究を続けました。大河内先生と萩野先生が集められた分娩血とアメリカから持ち帰ってきました100 μ lづつ数種類の血清とを用いてパネルを作成し、日本人のHLAの反応性をみましたところ、日本人特有と思われるパターンが出てきました。そこで白人や黒人では日本人由来の抗血清がどのように反応するかを調べるため横須賀の海軍病院の輸血部におられた日系の軍医の方の許可を得て、白人と黒人合わせて数十例の献血後の血液（約5ml）をいただきて確かめましたところ、やはり日本人にしか反応しませんでしたので、これをJapaneseの1番でJ-1（現在のHLA-B54）と名付けました。

その年に第一回組織適合性研究会が札幌で開かれ依頼された講演の中で、このJ-1を報告しました。北大の人達からJ-1の血清の要望がありましたので差し上げました。集められた血清で同定された抗原を、J-1と比較され特異性がほとんど同じでしたが、サッポロ1番（実際には少し反応性が広く、現在のHLA-B22）という名前を付けられました。

日本に帰って来て困ったことといえば、お金がなくてトレーが買えないことでした。しかたがないので、使ったトレーを熱湯に浸けておき、亀の子タワシでこすり再利用しました。しかしトレーは固いプラスチックの上に薄い膜を被せてあるので、タワシでこすると剥がれてしまって大変でした。

帰国した翌48年4月から輸血部の助手にしていたきました。ちょうどその時に輸血部の大河内先生は九大教授に転任されました。そして遠山先生が群馬大学から助教授として着任されました。助手には萩野先生、松田先生（現在自治医大）、吉原先生（現在予研）がおられました。まだ大型コンピュータがない時代だったので、 χ^2 の計算をするため血清学教室におられた田村先生にお手伝いいただいてクラスター解析を行い、HLAタイピングに使える抗血清を得ることが出来ました。1975年のInternational WorkshopがF.Kissmeyer-Nielsen会長のもとで行われ、日本からもいくつかの研究室が参加しました。B22,あるいはB54の特異性を持つ抗血清をそれぞれ違う名前で提出したところ、何人かの研究者から「統一した名前を付けてくるように。」と非難されたことを思い出します。

自前の抗血清と交換によって得られた抗血清で、とりあえずHLAタイピングができるようになり、多くの疾患とHLAとの相関を調べる研究を始めました。若年型糖尿病、リュウマチ様関節炎がHLA-B54と、強直性脊椎炎がHLA-B27と有意の相関性を示すことが確かめられました。

そのころ東大精神科の本田先生（現在誠和病院院長）からナルコレプシー患者のHLA検査を依頼されましたが、免疫学的背景はなさそうだったのであまり気が進みませんでした。HLAクラスI抗原の検査をまずやってみたところB35とB67の頻度が少し高い程度でした。その後昭和56年に村上先生の後任として東京女子医大輸血部教授に着任してから、HLA-DRの検査もしてほしいとの依頼を本田先生から受けまして、40例位検査を行いましたところ、全例HLA-DR2が陽性であることを見て衝撃的に驚いたことを思い出します。

私が女子医大から昭和60年に東大病院輸血部に戻りましてから、女子医大の平田先生（糖尿病センターの所長）のご紹介で内潟先生のインシュリン自己抗体産生患者のHLA検査の依頼を受け、検査を行いましたところ、今度はHLA-DR4（DRB1*0406）が調べた患者の100%で陽性でした。バセドウ氏病の患者さんのように治療のため末端にSH基を持つ薬剤を飲んでいる人に、インシュリン自己抗体の人が多いといわれています。インシュリンは二本のペプチドが2ヶ所でS-S結合

により結合していますが、SH基を持つ薬剤により還元され二本鎖がはずれ、DR抗原の抗原ペプチドを結合する溝にはまってしまい、B細胞に抗原提示されて、インシュリンに対する抗体が効率的に作られるのではないかと考えておりました。おもしろいことにDRB1*0406を持っている人は、正常人でも患者さんでも各々のリンパ球とインシュリンを混合培養すると、非常に強い増殖反応を示すことが分かりました。実は私自身もDRB1*0406を持っており、この実験には私のリンパ球も使われておりました、変な薬を飲むと危険であるとまわりの人から冷やかされました。またHLA-DRB1*0406の抗原提示の溝にどんなペプチドが入るかは現在西村先生（熊本大）が詳しくご研究なさっておられます。

1983年私が女子医大にいる時に「第8回日本HLAワークショップ」を主催させていただきました。日本ではファミリーデータが少ないのでfamily studyを企画しました。参加された各研究室に、一つの家族で子供が3人以上いる家系を10家系以上集めていただき、HLA検査をお願いしました。A-Bリコンビナント、B-DRリコンビナント等貴重なデータが得られました。

私は輸血部出身の人間ですので、日赤血液センターとの接点は昔から多くありました。例えば70年代の後半から血液センターでHLA適合血小板輸血を供給していただく事が実現できるように外部からお手伝い致しました。くり返し輸血をされたためHLA抗体を作ってしまった患者さんは血小板輸血をしても、この抗体で血小板がこわされてしまい、輸血の効果を上げることができません。このような患者さんにはHLA適合血小板しか有効となりません。このような輸血ができるようにするため、血小板アフェレーシスにより献血できる人々を多数登録し、HLA検査をしてあげればよいわけです。岩本先生（現東大医科研内科教授）、内川千枝子さん、中居光子さん等の御努力でこのシステムが作り上げられました。日本では供給される血小板の95%以上が成分献血由来となっていますが、世界中でまだこんなに高い比率の所はありません。

また1980年代前半から非血縁者間骨髄移植の必要性が米国で言われ出し、1986年にNMDPという骨髄バンクが発足致しました。1987年の国際HLAワークショップが米国のプリンストンで開かれた時、森島先生、佐治先生、徳永先生と「日本も骨髄バンクを始めなければ、」と話し合いました。骨髄バンクの必要性を広く理解していただくために日本で第1回骨髄バンクのシンポジウムを東京の大手町のサンケイホールで開きました。米国の骨髄バンクNMDPを作ったグレイビス博士

とハンセン教授の二人に来日していただき、講演をお願い致しました。数年後、第2回の骨髄バンクシンポジウムを、東京、大阪、名古屋で開催しました。東京では、改装されたばかりの東大の安田講堂を借りて開きました。この時の演者には、実際に非血縁者間骨髄移植を行った患者と提供者も含まれていて、聴衆に深い感動を与えました。ちょうどこの頃東海地区に東海バンクが全国に先駆けて設立されました。これを契機にしてアメリカに遅れること5年の1991年暮れに日本骨髄バンクがスタートしました。現在までにバンクにより移植を受けた人は800例を超えました、がその割にはドナーが増えてきませんが、現在1ヶ月に20~40件、年間400件程の非血縁者間骨髄移植が行われようになり、今昔の感があります。厚生省研究班笹月班によりバンクによる移植例の内300例程をレトロスペクティブに、DNAタイピングによるアリルレベルでの型の一致と移植成績との関連についての研究が行われました。結果を見るとDPは型が一致しても、しなくても移植の結果に差が出ないことがしめされました。DRについては、型の一致は有利にはたらくが、大きな差ではありませんでした。しかしHLA-A、-B抗原については、アリルレベルの検査が重要であることが示されました。そこで、移植前に（プロスペクティブに）DNAの検査をすることで、移植の成功率も上昇する（タイピングの精度を上げることが移植の成功率も上げることになる）ことが推測出来ました。しかしクラスIのDNAタイピングはクラスIIと比較してタイピングが大変であります。そこで登場したのがMPH（大量検体処理が可能）でした。今回バンク登録の3次検査にA2,B40,A26がとりあえず取り入れられました。次の段階としてB39,B13,B44のアリル検査ができるMPHのトレーを作れば、HLAに関しては一応の満足がえられるものと考えられます。また現在DNAのタイピングにはかならずプローブを用いていますが、プローブ以外の場所でミスマッチがあることも考えられます。これはMPH検査のために作ったDNA産物をSSCPで確認することで可能となります。SSCPで不一致ならばNewアリルである可能性も出てくるわけです。またHLAとは別の移植に関わる抗原型（HLAほど強くないが何らかの意味を持つもの）がマウスではたくさん同定されています。人でもminor histocompatibility antigensはいくつか発表されていますが、まだ移植との関係はよく分かっていません。まだまだ研究すべき課題は山積しております。

1983年当時GVHDは免疫不全の患者にしか起こらない、というのが外国での通説でありました。私が東大

に移った1985年頃「輸血による免疫学的異常」という厚生省の研究班の班長しておりました。榎原先生、井野先生（現在自治医大）が胸部外科でその頃多発していた術後紅皮症の病因がGVHDであるとして証明したい、という希望をお持ちで、患者の末梢血中に供血者由来のリンパ球が存在するというキメリズムを証明する方法等の検討をはじめました。患者さんと家族のHLA検査をしたところ、2家系で患者のHLAが供血者のものになってしまったことを示す結果が得られました。論文を外国の雑誌に投稿しましたが、「免疫不全症ではない人にGVHDが起こった」という論文を認めさせるのが大変でした。その後マイクロサテライトを用いての検査法を確立し、GVHDであると確定することが出来るようになりました。最近はずし手術しなくても輸血だけでGVHDが起きてしまう例もありまして、リスクファクターの解析も容易ではありません。このようにしてGVHDが証明できたケースについてはほとんど供血者があるHLA抗原あるいはハプロタイプ

のホモ接合体で、患者はその抗原あるいはハプロタイプのヘテロ接合体であることが明らかとなっています。しかし免疫不全症の場合はHLAの型には関係なくGVHDが起こる事も明らかになりました。現在はGVHDが起こった患者さんの末梢血からサイトトキニックT cell クローンを作って、どんな特異性を持っているかを調べております。またこれらの細胞系のキリング活性を阻止できるような薬剤がないかどうかを探しております。見つければ将来GVHDの治療に結び付けることも可能と考えております。

日赤血液センターでの研究は臨床的背景のルーチンワークの中で「新しいものを見つけだす」というのが正しい方向性だろうと考えております。アイデアとテクニックが斬新なものであれば、患者のためになる質の高い研究結果は必ず出てくるものと確信しております。

今回は愛知県赤十字血液センターの倉知 透さんをお願いしたいと思います。

日本人に見られるハプロタイプ (I)

日本赤十字社中央血液センター 田中 秀則

現在、日本に在住している人のことを日本人と呼んでいるが、HLAを含むMHC領域を一つのマーカーとしてその分布を日本全体で見た場合、その多様性が明らかになってくる。また、このことをアジア大陸の民族に目を向けると、日本人と他の民族との関わり合い(日本人のルーツ?)を知るための手がかりとなる。

今回、この誌面で連載をさせていただく予定であるが、その中で日本人やアジアの諸民族にみられるハプロタイプを紹介し、その関連性についてまとめることができると考えている。まず、最初に日本人に見られる様々なHLAハプロタイプについて紹介する。ここで、クラスⅢ領域のBF (B因子)、C4 (補体第4因子: C4をコードする遺伝子座は、一般的にC4AとC4Bの二つの遺伝子座がある) のハプロタイプの情報が分かるタイプについては、MHCハプロタイプとして紹介をする。

1. A24-CBL-B52-BFS-C4A3+2-C4BQ0-DR15-DR51-DQ6

このハプロタイプは、現在日本に在住している人(日本人)に一番多くみられるハプロタイプである。各都道府県別のハプロタイプ頻度を計算すると、このハプロタイプ(A24-CBL-B52での頻度)は、ほとんどの都道府県で一番多いハプロタイプであり、その頻度は約10%であった。しかし、高知と沖縄県では、このハプ

ロタイプが一番多いタイプではなく、その頻度は約4%であった。ちなみに、高知と沖縄県で一番多いハプロタイプは、後で紹介するA24-Cw1-B54であった。また、アジアの諸民族の調査で、このハプロタイプと同じタイプが、韓国や北部中国の集団に2%以上の頻度で見られているが、その他の民族では稀なハプロタイプである。

DNAタイピングの進歩にともなって、このハプロタイプの各遺伝子座におけるアレルも同定され、現在ではA*2402-Cw*1202-B*5201-DRB1*1502-DRB5*0102-DQA1*0103-DQB1*0601といったアレル名でこのハプロタイプを表現することができるようになった。この中で、A*2402は様々な民族で見られるタイプであるが、Cw*1202, B*5201, DRB1*1502はこのハプロタイプに特有のアレルと言っても過言ではない。しかし、最近モンゴルの集団(Hoton)を調査したところ、B*5201-DR*1502のハプロタイプが約4%の頻度で観察されており、このハプロタイプと日本人で多く見られるタイプとの異同について興味を持たれているが、これまでの結果では、A-locusのアレルがA*2402ではなくA*1101であるようだ。このようなハプロタイプ(A11-B52-DR15)は、第11回国際組織適合性ワークショップにおいて、ベルギーの集団(Belgians)でみられてい

る。

クラスⅢ領域では、BFローカスのS (slowを意味する、Fはfastを意味する) は一般的なタイプであるが、C4A3+2-C4BQ0ハプロタイプは、このハプロタイプ特有のものである。ここに示したC4A3+2は、C4A-locusの遺伝子座が重複 (2個) しているため、C4A-locusの産物が2種類あることを示し、それぞれの蛋白のタイプがC4A3とC4A2であることを意味する。またC4BQ0は、C4B-locusの産物が欠損していることを意味しており、この場合のC4BQ0は、C4B-locusの遺伝子が欠損している。

2. A33-CBL-B44-BFF-C4A3-C4B1-DR13-DR52-DQ6

このハプロタイプは、日本人で二番目に多いハプロタイプであり、約5%の頻度で分布している。各都道府県別では、中部地域 (愛知、静岡等) で比較的高い頻度に見られ、この地域での頻度は、約7%である。また、このハプロタイプは西日本 (特に中国地方) では、三番目に多いハプロタイプであり、二番目に多いハプロタイプは、A24-Cw7-B7-BFS-C4A3+3-C4B1-DR1-DQ5であった。これまでの他民族の調査では、同じハプロタイプが、韓国の集団に約2%の頻度で見られるだけで、他の集団にはほとんど見られない。また、クラスⅢ領域のBFFは稀なタイプではないが、日本人にみられるBFFのほとんどが、このハプロタイプに由来している。このハプロタイプのDNAタイプは、A*3303-Cw*1403-B*4403-DRB1*1302-DRB3*0301-DQA1*0102-DQB1*0604であることが分かっている。B44を含むハプロタイプは、世界中に様々なタイプで存在する。例えば、韓国、東南アジア、インド等の集団で見られるA33-Cw7-B44-BFS-C4A3-C4B1-DR7-DR53-DQ2、ブリヤート (バイカル湖畔に住むモンゴロイド) やカザフに見られるA23-Cw4-B44-BFF-C4A3-C4B1-DR7-DR53-DQ2、白人 (Caucasoid) によく見られるA29-CBL-B44-BFF-C4A3-C4B1-DR7-DR53-DQ2およびA2-Cw5-B44-DR4-DR53-DQ7、黒人 (South Africa Negroid) に認められるA29-Cw7-B44-DR11等がある。このようにアジアの集団では、B44とDR7を含むハプロタイプが多く、

B44とDR13を含むハプロタイプは比較的珍しい。また、クラスⅢ領域のハプロタイプも、それぞれのハプロタイプで異なっている。

3. A24-Cw7-B7-BFS-C4A3+3-C4B1-DR1-DQ5

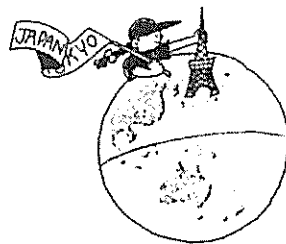
このハプロタイプも、日本人で一般的なハプロタイプであり約4%の頻度で見られるが、特に中国地方に (山口、島根、広島、鳥取) 多く分布するタイプであり、この地域では約6%の頻度で分布している。他民族の調査では、A33-CBL-B44-BFF-C4A3-C4B1-DR13-DR52-DQ6と同様に、韓国の集団に約2%の頻度で見られるだけであり、他の集団にはほとんど見られていない。

DNAタイプは、A*2402-Cw*0702-B*0701-DRB1*0101-DQA1*0101-DQB1*0501と考えられる。B7は様々な民族 (ハプロタイプ) に見られるタイプであり、白人 (Caucasoid) では、A3-Cw7-B7-BFS-C4A3-C4B1-DR15-DQ1、黒人 (Black) では、A43-Cw7-B7-DR4-DQ7、A28-Cw7-B7-BFS-C4A3-C4B1-DR15-DQ1等のハプロタイプにみられる。しかし、DR1との相関がみられるタイプは、日本人と韓国の集団にみられるタイプだけである。

クラスⅢハプロタイプ (BFS-C4A3+3-C4B1) についても、このハプロタイプ特有のタイプで、他のハプロタイプには、ほとんどみられていない。C4A3+3は、C4A-locusが重複 (C4A3遺伝子が2個ある) しているため、その産物が通常の2倍量 (3倍ともいわれている) 産生されている。

以上、今回は日本人に多くみられるハプロタイプ、ベスト3を紹介した。日本人で多くみられるこれらのハプロタイプでも、日本国内での分布がそれぞれ異なっている。このことは、現在の日本人が、数種類の集団により、それぞれ別の場所で発生? (渡来) することによって構成されてきたものと考えられる。このことは、当然であるが“日本人単一民族説”に反するものと考えられる。

次回も日本人に見られるハプロタイプについて紹介したい。



DNA基礎講座；核酸化学の立場から ④

核酸の定量法について

湧永製薬（株）バイオ研究所 山根 明男

浅学の筆者にとっては連載の種もあつと言う間につきてしまい、今回は少し実践的な話題にふれたいと思う。

HLAタイピングもDNAを扱う機会が増え、核酸の定量に接することも多いと思う。核酸の定量と何も身構えることはないが、大学を卒業した若い人に聞くと意外とピンとこなかったり、遺伝子関連のマニュアルにも書いてなかったり、書いてあってもさりと書いてある場合が多い。

核酸はタンパク同様取り扱う量がひじょうに少なく、一般の無機化合物や有機化合物のように重量を測定するわけにはいかない。そこで一般的には、UV吸収を測定してその吸光度からモル濃度や重量を算出することになる。この計算には、当然のことながらランベルトーベールの法則を適用することになり、算出にはモル吸光係数が必要となる $\{\log_{10}(I_0/I) = \epsilon c l, I_0 = \text{入射光強度}, I = \text{透過光強度}, \epsilon = \text{モル吸光係数}, c = \text{mol/l}, l = \text{吸収層の厚さ}\}$ 。核酸を取り扱う場合“O.D.”という単位をよく使うが、これが異分野の人にはなじみにくいようである。O.D.とはOptical Density（光学密度）で実際には吸光度（A:Absorbance）に等しい $\{A = \log_{10}(I_0/I)\}$ 。このO.D.をそのまま量を表す単位として使っているのが話をややこしくしている原因である。たとえば、核酸1 O.D.（正確には1 O.D.ユニットというべき）と言え、吸光度を測定したときの値が1で、その濃度の溶液1 mlの量を表している。つまり、O.D.は濃度とは無関係に絶対量を表す単位として使われている。

さて、核酸の場合、さらに若干複雑な点がある。第一に、核酸のモル吸光係数はモノヌクレオシド（モノマー）の値がわかっているだけで、一般的には長いDNAフラグメントのモル吸光係数などわかりようがな

さて、最後にHLAタイピングで出くわすかもしれない算数の問題を解いてみよう。

い。なぜなら、それぞれが扱うDNAはそれぞれ独自の配列を持っており、同じ鎖長のDNAでも分子量も違えば、モル吸光係数も違っている。ただ、鎖長が長くなれば、平均的な値をとれば実際とそれほど大きく異なることはない。第2に、核酸はポリマーであり、塩基の重なり起因してポリヌクレオチドの塩基当たりの最大吸収波長における ϵ （モル吸光係数）はモノマーのそれより小さくなる淡色現象（hypochromism）がある。さらに2本鎖DNAとなると水素結合により構造が安定化し、塩基の重なりは一段と安定性を増して吸光度はより小さくなる。マニュアル書などに2本鎖DNAは1 O.D. = 50 $\mu\text{g/ml}$ とか1本鎖DNAあるいはRNAは1 O.D. = 40 $\mu\text{g/ml}$ とか書かれているのはこのことに由来する。これらは平均的な塩基組成のDNAやRNAに適用できるが、少々組成が偏っていても一般的な実験で問題になることはない。ただし、PCRのプライマーなどのオリゴヌクレオチドとなると話は少し違ってくる。つまり、オリゴヌクレオチドでは全体の塩基数が少ないために、塩基組成の偏りは定量性に影響を与える。ただ、PCR反応に影響を及ぼすほどのことはなく、15~30 merの鎖長のオリゴヌクレオチドの場合、1 O.D. = 3.3 μg で計算すればよい。塩基組成を気にする場合はTakaRa社のカタログに記載されているような式に従えばよい

[TakaRa社のカタログ M-49(1995-96)]。

ところで、最近では微量の遺伝子を検出する機会が増え、遺伝子の定量的検出に使う標準DNAそのものの定量も重要になってきている。このような厳密な定量を必要とする場合は、核酸を分解して生じたリン酸を定量する方法などがある

[Anal. Biochem. 260, 120-129(1995)]。

“ヒト DNA 100 ng には何コピーのハプロイドゲノムが存在するでしょうか？”

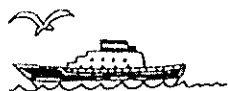
$$\text{答} \quad n = \frac{100(\text{ng}) \times (10^{-9}) \times (6 \times 10^{23})}{(330 \times 2) \times (2.9 \times 10^9)}$$

$\begin{array}{ccc} \text{g 数に換算} & \text{アボガドロ数} & \\ \downarrow & \downarrow & \\ & & \\ \uparrow & \uparrow & \\ \text{1塩基対あたりの平均分子量} & \text{ヒトハプロイドゲノムの塩基数} & \end{array}$

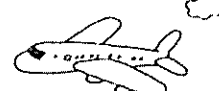
もちろんここで、ヒトDNA 100 ngは、抽出したDNAの吸光度を測定し、重量に換算（1 O.D.= 50 μ g）したものである。PCRには十分な量であることがわかるであろう。

次回はPCRの特異性についてももう少し深く考えてみることにする。

(e-mail:LDV03232@niftyserve.or.jp)



海外移植事情 ③



ニューヨーク移植事情 Organ Harvesting in Midnight Manhattan.

埼玉医科大学総合医療センター第2外科 下村 一之

冬のニューヨークは深く暗い。風はビルの隙間を音を立てて絶えず吹き抜け、真昼間でさえ人々は通りを足ばやに歩いている。ビルの回転ドアの内側では、外に出るため気合いを入れている人と、中にたどり着いて一息入れている人とが交錯している。真冬では、午後3時半頃にはもうあたりは夕暮れどきで、日没の前後から、さらに長い黄昏が始まる。暗くなるに連れ人出はさらに遠のき、人気のない小径には、暮れなずんだ灰色の空が鈍く光っている。気温は夜半には大抵氷点下10度C、時には氷点下15度Cにもなるが、両者の間には大した違いはない。マイナス5度C以下なら、“外気に耐えられない”という皮膚からのサインは、外出後たいてい1分ぐらいでピンピンやってくる。最大限に防寒具を着込んでいたとしても、足下から徐々にあがってくる底冷えの早さは結局同じで、15分位が外歩きの限界だ。ただその限界に至るまでの苦痛の度合いが違うのでみんな相当着込んで外に出る。さらに、夜間の外出となると通常の人にとっては非常事態に近い。しかし若い移植外科医、とりわけ臓器を取りに行くorgan harvesting teamの活動は、日がとつぷりと暮れた後から始まる。それも大抵週末でおまけに真夜中であることが多い。

私は、1992～1995年の間、マンハッタンのコロンビア大学メディカルセンターの外科教授、Dr. Mark A. Hardyのもとで、豚ラ氏島移植の臨床応用に向けて、ヒトpancreasからラ氏島細胞を分離し、ラットやnude mouseに経門脈的に注入した後、そのviabilityを調べる実験を数人で行っていた。実験材料としてヒトから膵臓を集める必要上、私達のグループは常に臓器提供(Donor)が出た際に備えて待機を命ぜられていた。ある

夜、枕元に電話を置いて、休むこと小一時間すると、いつものように電話がやってきた。3日ぶりのことだ。“KAZ (私の愛称),there is a pancreas, are you coming?”いつもと同じバターの短い問いに、私は時間を確認しながら“OK, I'm coming.”とまた同じように答える。いったん電話を切ると、次にタクシー会社へ電話し、あらかじめ教えられている口座番号を伝える。30分ほどすると家の前にいつものタクシーが静かにやってきて1度だけクラクションをならす。運転手は深夜にもかかわらず大抵キチッとスーツを着て良い身だしなみをしている。しかも街中を流しでやっているイエローキャブではなく黒い高級車であることが多い。ジーンズにダウンジャケットという対照的なラフな出で立ちで、私は氷点下の道路に待つ、冷えた後部座席に乗り込む。昼間は大渋滞のニューヨークも夜はすいすいと走り回ることができる。約30分でマンハッタンの中央付近、midtownにあるCornell大学ニューヨークメディカルセンターに到着する。時刻は午前1時半である。すでに同じようなリズムが5台ほど到着しており、運転手達が雑談している。入り口のsecurityでorgan harvestにきた旨を伝える。すると案外なほどあっさりとお部屋まで案内してくれる。通常ニューヨークではまず人を疑ってかかり、たとえ親切や好意による申し出にも、だまされたり、被害に遭うことを恐れて、拒絶する事が多い。特に相手が東洋人であると警戒心はさらに強くなる。しかし深夜の臓器取りに現れるくたびれた日本人には、大抵みんな好意的であり、ID(身分証明)を確かめることもまずない。単に仕事がらなのかとも思うが、アメリカ人は教授秘書でも、大会社の受け付けでも、警備の男性でも、好き嫌いははっきり出しながら仕事の優

先順位をつける。気に入らない相手にはいくら待たせても完全に無視をきめこむ人までいる。やはり臓器を提供する行為を社会的な貢献としてとらえる価値観が定着しており、患者の善意を無駄にしないよう、皆が協力支援するコンセンサスが確立しているのであろうと思われる。

アメリカの家庭が上足であるがるように、病院のオペ室も靴をはきかえることなく、不織布のshoe coverをつけるだけである。また更衣室も大抵個人名で振り分けられてlockされており、私たちは盗難を防ぐために自分の衣類や貴重品一式をビニール袋に入れてope室に中まで持ち込むこともある。ope室内にはすでに、心臓、肝臓、そして私たち脾臓チーム(4人)の他、腎、角膜、軟骨、骨、皮膚の各チームが入っており、オペ室ナースや麻酔科医を含めた20名以上が小振りなオペ室で準備に追われていた。電灯の落ちた薄暗いがらんとしたオペ室のならばの中で、その部屋だけが明るく、活気に満ち、人が盛んに入出入りする。1人の脳死患者を主人公とするまさにoperation "theater"である。

室内にはしばしば顔を合わせるDr達がいる。心臓グループは同じコロンビア大学の心臓外科医(日系2世)、肝臓グループはマンハッタン内で最も数多く肝臓移植を行っている、Mt. Sinai HospitalのDr(ルーマニア人)だ。Hello,と声を掛け合うが、皆harvestingに来てる者同士、あまり余計な口は聞かない。いつもはたいてい協力的に仕事をしているが、どういう訳か今日に限って、手術半ばにして心臓グループと肝臓グループが言い争いを始めた。通常、臓器は最も阻血の影響の大きい心、肝の順番にharvestingを行い、その後脾臓、腎臓グループとなり、最後に他の臓器が取り出される。肝臓グループではすでに本院のrecipientの手術が進んでおり、graft肝が到着したところで、すぐにも悪いrecipient肝を摘出できる状態なのに対し、心臓グループは大学のrecipient手術が手間取り、今ここでdonor心を取り出すと、移植後に血流再開するまでの無駄な阻血時間が増えることになるのだ。このため、donor側が手術の進行に待ったをかけているわけだ。最初に取り出すべき心臓グループの手術が前に進まないため、20数人のDrがオペ室いっぱい手持ちぶさたで、立ったり座ったりしている。心臓グループのチーフDrだけが頻りに携帯電話で大学とやりとりし、その様子をルーマニアの肝臓ドクターがにらんでいる。でも結局、何の作業も行わない妙に暇な時間が30分以上も人口過密状態のオペ室に流れた。ただ心電図モニターと呼吸器のリズミカルな音だけが時間を刻んでいる。

"OK. Thank you Doctors, here we go!" 電話を切った

心臓グループのDrの一言で、ようやく、しかし一斉にみんなが動き始める。腹部大動脈をcross clampしたあと、水づめにしていた組織灌流液のUW solutionを一気に大量に大動脈内に注入する。喉元から下腹部まで正中に大きく切り開かれた手術剣を通して、ピンク色の心臓、褐色の肝、茶色の腎、など、胸腔、腹腔内に見えていた、色鮮やかな各臓器の血の気が一気に失せ、透明感をもつ。どこからともなく、灌流液に押し流された血液と灌流液そのものが、大量に腹腔内に集まり、血だまりを作るとともに徐々に薄まりながら水かさを増してくる。同じころ、オペ台の上で秒単位で声をかけつつ手順を進めるDr達と対照に、麻酔の先生は患者の頭の位置で、物憂げにあとのかたづけを始めている。麻酔科Drは、心停止後、心電図、呼吸器などすべて取り外してスイッチを切り、麻酔関係の書類をいくつか書き込みをしたあと無言のうちにオペ室を出て行くらしい。と言うのは、毎回たいてい皆が忙しくしている間にいなくなり、いつ手術室から退室して行ったか気付くことが少ないからである。

心臓グループが臓器をアイスボックスにつめて手術台から降りると、肝のharvestingが始まる。と同時に待機していた私たち脾臓グループは4人の内2人が手術に入る。次の臓器を採取するグループが前の臓器グループを順番に手伝う習慣が自然に成立している訳だが、私たちの場合それより肝臓のすぐ近くにある脾臓を傷つけられないように見張る意味合いもある。肝臓グループの人にしてみればrecipientに移植する際、吻合すべき肝周囲の血管はできるだけ長く、余裕を持って残しておきたい。とすると門脈および下大静脈を切る位置にちょうど乗っかっている脾臓は、彼らから見れば、ただの脂肪の塊にも等しいモノである。見張っていたつもりでも目の前で脾臓を真っ二つに分断されたこともある。そこで私たちは絶えず、"Dr, don't cut pancreas." と何度も声をかけ、熱くなっている肝臓グループDrの気持ちを落ちつかせる。

肝臓グループが終了し、いよいよ私たちが脾臓を取りにかかると、次の腎臓グループの人が手伝ってくれ、脾臓全体を後腹膜から遊離し、十二指腸の一部を付けて一気に切除する。すぐに冷やしたトレイに入れて手術台の外にいる残り2人のDrに手渡す。2人は脾の動脈からさらに大量のUW Solutionを注射器を用いて圧入し、残った血液を洗い流す。少しばかり残っていたピンクの色調はこの2回目のwash outで完全に消え去り、純白にむしろわずかな青い色調さえ帯びてくる。UW Solutionと空気を入れたビニール袋に脾臓を浮かべ、2重にパックしたあと、水づめのアイスボックスに入れ

て準備が完了である。ちょうど金魚か養殖ウナギの出荷の格好と似ているな、いつも思う。私たちは臓器摘出に引き続いてすぐ患者に移植するわけでもなく、翌朝の実験まで時間的には余裕があるので、臍臓をとった後で彼らと一緒に腎摘出をやる場合もある。

各グループが順番に去っていき、気が付くころオペ室はすっかり静かになっている。通常臍、腎が終了すると、人影は半分以下となる。そして最後のグループが、臓器を摘出した後に下腹から喉元までの長い皮膚創を粗めに縫合していく。手術終了とともに、すでに死体と呼ばれる状態のその患者は、ope台の上で手術布をすべて取り除かれて、全裸となる。静かに休んでいる。これから部屋を出て家族に再会するまでのしばらくの時間を、誰にもケアされることなく過ごすのである。ほとんど何の物音もない手術室の中で、その全身の皮膚の色は、灌流液のために抜けるように白く、生きていた間のすべてのしがらみや汚れを洗い落として、むしろ美しくさえあった。多くのDrは臓器を提供した患者の顔を見ることもなく立ち去るが、私は感謝の意味も込めて、つとめて患者の顔を見ることにしていた。手術室から出たあと家族と再会する様子を想像したり、家族の気持ちの中での死亡時刻は一体いつなのだろう、などと少しセンチメンタルな気分ひたりながら。

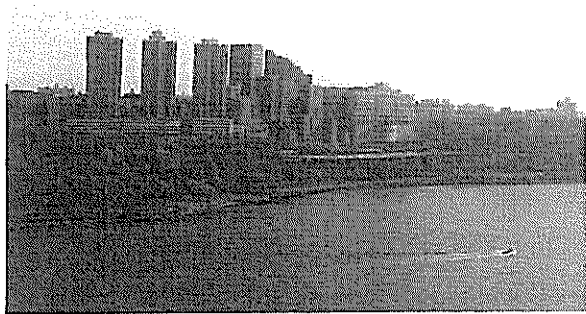
水づめの臍臓を入れたアイスボックスを持って病院の外に出ると、もう午前6時をまわっているが、冬のニューヨークはまだ真っ暗である。たむろしていたリムジンカーの運転手達は、数は減ったものの、まだあれこれ話している。元来た運転手に声をかけ、これから大学に戻る旨を伝える。すると"Man, or, parcel?"と聞かれた。最初何のことか、わからなかったが、運ぶのが人か、臓器の入った箱か、といった意味らしい。大切な臓器だけをタクシーの後部座席に置く事があるのか知らないが、私は"Both."とややぶっきらぼうに答えて、他の3人と一緒にタクシーに乗り込む。約1時間の道のり、臓器のIceBoxを抱えたまま、結局みんな寝てしまった。

このリムジンカーの費用は一回約300ドルという。臍臓グループだけで、行くときは2台、帰りは1台を使い、毎回交通費だけで約9万円近くのお金がかかる計算になる。この経費は、すべて、New York Transplantation Society から出されており、メンバーがorgan harvestingに出かけるときは共同で利用することができる。臓器自体は無償で提供されているはずだ。しかし実際の移植事業には日本人の想像を超える、大きな経済的バックアップがあるような気がした。留学中の居候的身分の私にはそれは何なのかわからない。それは

公的補助であったり、篤志家の寄付であったりするものであろうか。いずれにせよ人種間の断絶、金銭的な問題、システム上の無駄を抱えながら、毎晩こうやって移植医療を強力に押し進めていくバイタリティーがアメリカの医療全般の高い水準を支えているのであることは容易に想像できた。

臓器提供を承諾したときに患者あるいはその家族からとるIC（インフォームドコンセント）には、臓器移植を承諾する旨の内容とともに、各臓器（心、肺、臍、腎、肝、角膜、軟骨、骨、皮膚）ごとに、臨床応用のみの使用を許可するのか、実験的研究にも使用することに同意するかこまかく意志表示する。当然ながら私たちが臍を取りに行くときは、必ず臍臓の実験的利用も家族に承諾されている。私は日本とアメリカとの移植事情の違いにも興味があって、その患者が脳死に至った経過を必ず聞くことにしていた。すると患者(Donor)は麻薬取引で喧嘩となり銃で撃たれたもの、賭け事でピストルを使ったロシアルーレットをやったが、自分には運のなかったもの、ハイウェイわきの自宅前でストリートバスケットボールをやっている、ボールを取りに道路に出たところを自動車にはねられた少年など、一言でいえば余り裕福でない、ニューヨークの目陰ともいえる部分で生活している人が多かった。ところが、その家族が、臓器移植に理解を示し、すべての臓器を実験にまで提供しようとしているわけである。また本人が、(donorとして当たり前の条件ながら)、肝炎も、HIVも、梅毒検査もすべてマイナスで、時にはアルコール歴までないことも多い。つまり身体的には品行方正といえる。この、患者の社会生活上の暗いプロフィールと、検査所見から想像される私生活上の健康的なアウトラインの間のズレが、私の心の中で長い間沈黙していた。その患者と家族がどんな日常生活を送り、どんな会話をしていたか想像しようにもできなかったのである。親父は麻薬の売人でピストルの手入れなんかしながら、“人間は死んだら臓器を提供してヒトの役に立つべきだ”、などと子どもに説教している場面が果たしてあり得るのであろうか。何度か似たようなケースにふれて、しかし私はある時こう思いだした。ロシアルーレットをやる者も、ストリートでdrugの売人をやる者も、結局この大都市の中で生きぬく為に必死でもがいているのではないかと。日頃から良き夫や良きパパでありながら、チャンスの少ない者は、家族を支える為に自ずと社会の日陰に属する色々なことに手を染めているのではないかと。本人と家族との日常は、よく映画に出てくる、悪漢にステレオタイプなすさんだ生活などではなく、ごく一般の家庭と

なんら変わらないナイーブな感性やデリケートな人間関係で満たされており、むしろ父親が職として悪に手を染めざるを得ない強烈な条件づけがこの大都市にあるのではないかと考えたのである。手術室の中で、ギャングに適した頑健そうな筋肉質の身体に一杯の入れ



ハドソン川から見た
コロンビア大学医学部メディカルセンターの全景

墨をして横たわり、自分の身体から臓器を順にとられるのを静かに待っているような脳死患者を見た時には、つい何度もそんな想像をしてしまう私であった。



外科研究室の教授 Dr. Hardy と一緒に
(向かって左端が Dr. Hardy 右端が私、
前列は日本人のスポンサー、後列は研究室の同僚)

佐治博夫の **まかせなさいっ!**

童話「アリス」に見る共生と進化

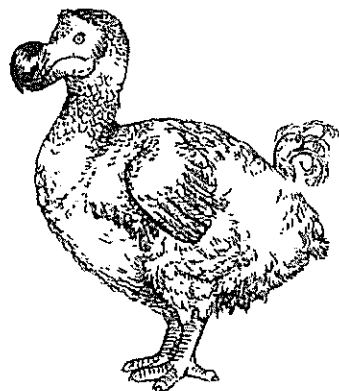
saji@mb.infoweb.or.jp ; saji@jrc.or.jp

種の間で生態的な関わりをもつものを「共生」とよんでいる。共利共生、片利共生、寄生などの有り様を含めて最近ではすべて共生と呼ぶようだ。「不思議の国のアリス」と続編「鏡の国のアリス」は世界のベストセラーである。作者のルイス・キャロルは数学者というだけあって、なかなか示唆に富んだ記述が散見される。ここからふたつの話題を提供する。そのひとつは単に不思議の国のアリスにおける登場動物で、それに関わって最近になって分かった共生の事実、もうひとつは鏡の国のアリスの登場人物とその世界の特異性から採った、粹な命名の仮説の紹介である。(以下、進化や遺伝子が意志を持っているかのような述べかたをしているが、これは記述をアトラクティブにするための文章技術に過ぎない、自然はつねにランダムである)

ドードーめぐり

「不思議の国のアリス」に不思議な鳥が登場す

る。その名をドードーという。くちばしの大きな愛くるしい滑稽なおもむきの鳥で、童話の中の架空の生物と思っていた。ところが、これはインド洋のモーリシャス島という限局された地域に、17世紀末まで実在した鳥だというのだ。近年になってモーリシャス島を調査したところ、この島に特



不思議の国のアリスに登場する「ドードー」。インド洋のモーリシャス島に17世紀末まで実在したという。羽根が退化して飛べないドードーはオランダ人が持ち込んだ犬や猫によって絶滅させられたらしい。

有の樹木「カルバリア・メジャー」についておもしろい、というか恐ろしい事実が分かった。この樹木の若木はおろか新芽もまったく見つからないのである。カルバリア・メジャーはすべてが老木で、樹齢300年を越えるものばかりであった、というのだ。結論はこうである。この樹木の種子は、ドードーに食われて部分消化されて、排泄後に発芽の能力を得ていたらしい。ある種の絶滅の後300年もたったいま、共生関係にあったもうひとつの種の絶滅をわれわれは知らされたのである。これを「ドードーめぐり」としゃれのめしながら、風邪をひいたような薄ら寒い思いをしている。

赤の女王仮説 (Red-Queen Hypothesis)

「鏡の国のアリス」の登場人物のひとりに「赤の女王」がいる。チェスの駒のクイーンである。彼女の世界は、すべてが前へ前へと翔ぶがごとく動いている。女王はアリスに向かっていう「…ここでは、よいかな、おなじ所にとどまっていたければ、力の限り走らねばならぬ。どこかにゆきつこうとおもえば、その2倍の速さで走らねばならぬ」(ルイス・キャロル作、芹生一訳：鏡の国のアリス、完訳版、偕生社)。

パラサイトと宿主は相互に進化する。その一つの道は、歩み寄り、である。パラサイトと宿主はお互いにその存在を危うくしないように妥協的に進化する。第2の道はパラサイトと宿主が果てしない闘いへと踏み出す方向である。パラサイトによって不利益を被った宿主はそれを拒絶または抹殺する方向に、急速に進化する。パラサイトもその宿主の防御機構をかいくぐり、文字どおり必死に変身しようとして進化する。その結果、きわめて短期間(進化生物学上の時間では一瞬)に進化が起こる。それぞれの生物が独立した状態での進化では考えられないほどのスピードで進化を遂げる。このようなパラサイトと宿主の競争的進化のプロセスを「赤の女王仮説」(リー・ヴァン・ヴェーレン、シカゴ大学、1973)とよぶ。人類とマラリアの果てしない闘争が良い例である。HLAの進化は膨大な時間をかけて進化したとする

interspecies theoryがある。しかしこれによって説明できない部分が集積されたHLAのデータに散見される。これらは赤の女王の進化への介入によってもたらされたのかも知れない。

組織適合性学会のペリタス・ランチョンセミナー「HLAと疾患感受性」での、徳永勝士先生のHLAの進化や滝口雅文先生のHLAとマラリア、でのトーク(次号掲載予定)を赤の女王仮説で振り返るのも興味であろう。

性は赤の女王が生み出した?

「性」の誕生にも赤の女王が介入した、とする説がある。利己的な遺伝子が単に自分と同じ遺伝子を増やしたいと願うだけなら、有性生殖は不要なはずである。むしろ無性生殖の方が効率よく遺伝子を増やせるからである。赤の女王仮説では有性生殖を、パラサイトを振り払うための宿主の予防策と、説明する。無性生殖ではパラサイトは接合を通じて瞬く間に種に蔓延する。そこである種はパラサイトにもぐりこまれないように、接合子の一方が細胞質を一切かなぐり捨てて、遺伝子しか持たない配偶子、すなわち精子を造るようになった。

これが卵の起源であり、性の始まりだというのである。そして卵はついには過剰とも思える装飾をするようになる。これもHLAの進化とも関わって赤の女王仮説で説明できるのだが、これはお楽しみにしておこう。

HLAの多様性を追っているわれわれは、有性生殖を有利な突然変異を種の個体群に拡げる、すなわち多様性を獲得し拡散するために有利である、というように理解しがちであった。赤の女王仮説はそういうわれわれには新鮮なインパクトである。(さ)



ダイナミック・ラボラトリー

宮城県赤十字血液センター

このコーナーでは毎回HLAの分野でご活躍目覚ましいラボ、ユニークなご研究をなさっているラボをご紹介させていただきます。

今回は東北ブロックの基幹センターとしてご活躍の宮城県赤十字血液センターにお伺いしました。宮城県赤十字血液センターはJR仙台駅から車で10分程、電車の最寄り駅は仙台駅から1駅隣の北仙台駅、広い道路を曲がると見晴らしの良い住宅地の中に見えてきます。HLAのお部屋に一步入ると、大きな窓から光が降り注いでいて、とても明るく眺めの良いお部屋です。

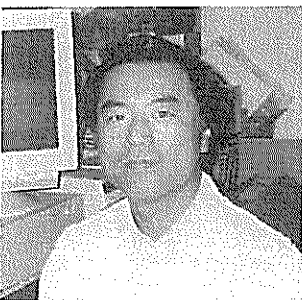


窓が大きく明るい宮城県赤十字血液センター

へ) こんにちは、よろしくお願い致します。

浦) こちらこそよろしくお願い致します。他の者は仕事が一段落してからご紹介させていただくということでよろしいですか？

へ) ええ、もちろん。それではまず浦野さんにお話をおうかがいします。浦野さんがこちらの血液センターに入られたのはいつ頃ですか？



係長の浦野 慎一さん

浦) 昭和56年です。最初からHLAだったのではなく、製品検査、次にウイルス検査をしていました。最初にここでHLAをしていた2人の内の1人は現在検査課長です。僕はもう1

人の方が退職された昭和57年に名前だけはHLA担当になっていたのですが、基幹センターになるまでは北海道ブロックや中央ブロックの中に入って仕事をしていたので、HLAの抗体スクリーニングを少しやっていた位で、仕事のウエイトは製品検査の方にありました。ところが昭和59年にブロックの編成替えがあって「基幹センターになる」ということで、管内の人もまとめて行かなくてはならないのでHLA専任になりました。

浦) 当時は何をどうしたら良いか？全く試行錯誤のスタートでした。それでも色々な所のご指導を受けたり、周りの状況を見ながらワークショップにも参加しましたし、HLA適合血小板も手がけました。これは薬価取裁以前からやっています。しかし東北の中だけで仕事をして外を見ない時期が長かったので東北ブロックとして限界に来ていました。技術面でも、活気の面でも...。それで4年位前に東北の担当者達と「これではいけない。」と話し合い、他のブロックの方に講師をしていただくなど、積極的に外の息吹を受けるよう努力しています。また年1回の技術講習会や東北管内のワークショップなどを通して、HLAの総合的な勉強の場が出来、管内がまとまって来たと思います。基幹センターとして皆をまとめていこうにも自分に力がないと出来ないで、技術レベルをもっと向上させたいと思い、事情が許す限り何でも見聞きしたいと考えています。幸いうちのセンターはHLAの仕事に理解が有るのですが、限られた人数でルーチンの仕事をこなしながらレベルアップをしていくことは、どこのセンターも同じでしょうが難しいことですね。その中でも最近今まで見たり聞いたりしたことが浸透してきて、ようやく外へ向けて仕事をする土台が出来てきたと感ぜられるようになりました。

へ) 「宮城センターはがんばってやっぺらっぺら」

というおうわさは耳に入って来ますもの。

浦) 最近でしょう? やっとルーチン的にも少し余裕が出来てきました。(実情は...?)

べ) これからのご活躍が楽しみです。こちらのラボの人数は?

浦) 検査課全体で14人、そのうち白血球と血小板の仕事として5人が配属されていますので、人数的には恵まれていると思います。もっとも1人は育児休暇中ですが...



育休中の大場 利香さん

(浦島太郎にはならないように祈る...) 現在2人は血清学、2人はDNAの担当で、それぞれルーチンの仕事とそれに派生する発展的仕事を含めてやっています。具体的には血清学では抗体スクリーニング、血清の管理とタイピング、

HLAクロスマッチ、HLA適合血小板輸血を必要とする血液が否かの依頼検査、成分献血登録者および骨髄バンク登録者、抗体スクリーニングで陽性になった血清のプレ同定と、これをワークショップに持っていく仕事、交差試験法の問題、HLA適合血小板輸血後の効果の有無などがあります。血小板では、血小板の抗体スクリーニング、プレートの作製、来年度にルーチンになる予定の成分献血登録者の血小板型検査、その他血小板に関するありとあらゆる仕事です。DNAではルーチンとして骨髄バンクのクラスII検査、血清学的にタイピングしたもののアレルを決定するダブルチェック的な仕事と研究的なものとしてクラスIのDNAタイピングを行っています。心づもりとしては、CローカスのDNA解析をうちのワークショップで取り上げたいと考えています。

べ) 数え上げてみるとずいぶんあるものですね。

浦) 所によってはもっと小人数でこれだけのことをこなしているのでしょうか、やらなければならないことをきちんと整理し、効率的に行うことで、もう1ランク上のラボにしたいと考えています。本当はもう1ランク上のラボになってから「KAMONデビュー」したかったな。(笑)

べ) いつでもまた参りますから。(笑) やっぱりジャンプしようとガンバッテらっしゃるラボは活気がありますよね。

浦) 今ちょうど東北管内のワークショップが始まったところで、昨日トレーの発送をしたばかりです。

これからワークショップのためのデータを作らなければなりません。先程血清とDNAに分かれていますと言いましたが、血清もDNAも両方考えられるようにルーチン的なところはお互い出来るようにしています。

べ) 東北ブロックのDR検体のDNAタイピングは全部こちらでやってらっしゃると伺いましたが、それも大変ですよ。

浦) いえ、他のセンターで出来ない訳ではなく、小さいセンターの予算ではなかなかPCR機器を購入出来ないのですよ。それでも最近はPCRの必要性を感じ、岩手、福島などはPCRを導入する方向だそうです(あくまでもうわさで~す)。

べ) 浦野さんがDNAを始められる時はどなたに教わられたのですか?

浦) うちのセンターの高橋が2年位前に中央血液センターに習いに行きました。私は彼女から教わっています。HLAの方、皆さんおっしゃいますけれど、HLAは本当に人脈ですね。基幹センターになった直後は、タイピングトレーを管内に配らなくてはいけないのに、今まで十分なスクリーニングをしていないので血清がないのですよ。それで神奈川の中島さんをはじめ、いろいろな人から血清交換ではなく血清譲渡をしていただきましたし、抗体スクリーニングでは中央の内川さん(現在ミネルパテック)に、PC-HLAを始める時は北海道がリードしていたので三谷さんにいろいろ教えてもらいました。足を向けて眠れない人が日本国中にいるので、毎晩クルクルまわっています。(笑)

べ) 1カ月の検体数はどのくらいなさっているのですか?

浦) バンク関係では、バンクの検体は最近減っているんだけど、1次検査が県内だけで一月約20~30件、2次検査が東北ブロックで毎月100~150件です。その他に成分登録者等のクラスIタイピングが月に50件、HLAやHPAの抗体のスクリーニングが1,000件以上、その同定作業も同時に行っています。またPCRのダブルチェックが30~40件、病院からのPC-HLAの依頼検体と、骨髄移植がらみの依頼検体が10件前後です。その他に毎月タイピングトレーを約70枚製造し500枚程をブロック内の各センターに供給しています。

べ) やはり色々こなしてらっしゃいますよね。ルーチンだけでも多いのに、これプラス研究的なお仕事

もなさってるんですもの大変ですね。

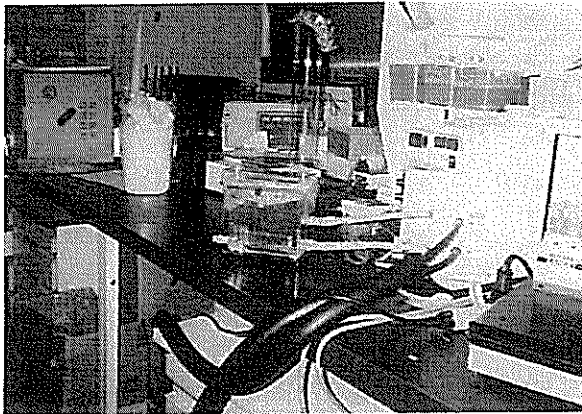
浦) 他で出来ていることが、うちで出来ないというの
はくやしいでしょ。

ベ) そのパワーですね。ここまでやってこられたのは。
(笑い)

浦) ブロック内の各センターでも、技術講習会やワー
クショップにできるだけ多くの人に参加して欲し
いですね。ブロック全体の底上げが大切だと考え
ています。

ベ) これからやって行きたいことは?

浦) 血液を運ぶだけ、検査結果を出すだけではなく、
医者や患者さんのことを考えてデータを集めたり、
結果を基に、ではどうしたら良いのか?を考えら
れるようにしたい。PCR-HLAも先生方の相談
に乗ったりしている間に口コミで広がってきまし
た。HLA適合血小板輸血や骨髄バンクを通して
臨床と密接に繋がるようになり、やりがいも増え
ました。これからダブルチェックやDNAタイピ
ングからシークエンスを取ったり、DNAクロス
マッチなどもやって行きたいです。実際RFLP
法やSSCP法を用いて仕事をしているのですが、
泳動槽はこれ1つで全部やっているんですよ。



貴重な1台 お部屋で唯一の泳動槽

ベ) えーっ、これ1つですか。

浦) もう1つ買ってもらおうよう頼んでいるのですが...。
こわれたら何も出来ないんですよ。今おもしろい
のはクラスIのPCRです。計算式から割り出し
て、試薬を粉末から溶かして、オートクレーブを
かけて...。うまくいかなかった時も、いろいろな
ケースが考えられるわけですよ。

ベ) やり始めると、はまってしまうものですか?

浦) はまっちゃいますねえ。それで仕事ばかりだと運
動不足になるので、今ジョギングをやっています。
仙台市民マラソンを目標にしています。

ベ) パワフルですね。他に趣味は?

浦) ジョギングは趣味ではないんです。必要に迫られ
て...趣味はテニスとスキーです。

ベ) スキー場が近くていいですね。

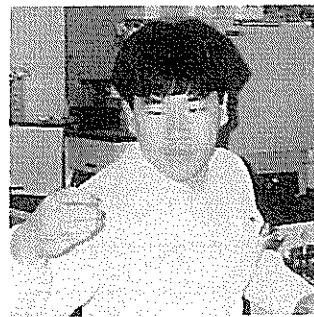
浦) ええ、ところが、スキーの時期とワークショップ
が重なってしまって、やりくりが大変です。(でも、
きっと行くでしょう。)

ベ) それは大変ですね。行かれるようお祈りしてい
ます。(笑い)

浦) やっとメンバーが揃いました。僕はもうしゃべり
過ぎたから、聞いています。

ベ) こんにちは、宜しくお願ひいたします。それでは
皆さん自己紹介をしていただけますか?

佐) 佐藤一弘です。入社12年目、魚座のA型です。



佐藤一弘さん

初めは普通の製剤検査
をやっているHLAに米
て3年目です。

ベ) HLAに移られて
どうでしたか?

佐) 浦野さんのもとで、
楽しく働いていま
す。尊敬できるす
ばらしい係長です。
(笑い)

浦) おいおい、僕席をはずそうか? (笑い)

佐) だいじょうぶです。和気あいあいの楽しい職場で
す。

ベ) それがなによりですね。

佐) でも仕事には厳しい方なので、まじめにやってい
ます。

浦) 血清の担当です。ワークショップのマネージャー
をやっています。東北管内のワークショップは彼
に引っぱって行って欲しいと考えています。

ベ) お仕事をなさる上でのご苦労などはいかがです
か?

佐) すごい係長なのでその下で働くのは結構がんば
っていかないとたいへんだな。というのはあります。

ベ) すごい!とはどんな風に?

佐) 仕事のにも人間的にも...。(小声で) どこまで
KAMONに載るんですか? (笑い)

ベ) これからどんなことをなさりたいですか?

3年目ということで、慣れによるミスをしないよ
うに心がけています。

HLAは奥が深い仕事ですが、自分のポジション
としてはまだ入り口を一步入った所くらいだと思
いますので、もっともっと勉強したいです。

ベ) 最後に読者に一言

佐) 神奈川センターの岡野さんお元気ですか、お互いがんばりましょう。中島さん、僕はがんばっています。あっ、先週せっかく床屋にいったんですけど、あんまり髪がひどかったから、なのに今朝の寝ぐせが取れなくて、写真写りが心配です。(一同大笑い)

ベ) いつもこんな方ですか? (笑い) ところでご趣味は?

佐) 趣味は映画鑑賞、読書、テニス、水泳です。

ベ) 皆さんH L Aのオタクキーだと思っただけですが、多趣味でいらっしゃるんですね。ところで、おとなりのニューフェイスは?

今) 今田 (こんたと読みます) 美千代です。去年の4月に入社しました。すぐにH L Aに配属されました。



今田美千代さん

魚座のO型で、3月11日生まれです。

佐) 僕も3月11日生まれなんです。

浦) 実は僕の奥さんも3月11日生まれなんですよ。

ベ) 3月11日生まれのオンパレードですね。お仕事は何を?

今) DNAタイピングを担当しています。新しい手技が色々出て来ているので、勉強が大変です。

ベ) これからなさりたいことは?

今) H L Aのプロフェッショナルになりたいです。

ベ) 頼もしいですね。

浦) すごいですね。でも実際DNAは僕の先生ですよ。

今) 趣味はあまりないのですが、会社のテニスクラブに入っています。

ベ) KAMON の読者にこれだけはいっておきたいことは?

今) 全国でH L Aをしてらっしゃる方はまだみなさん、私のことをご存じないでしょうが、よろしくおねがいします。未熟者ですがおてやわらかに。(笑い)

浦) 来年中央管内ワークショップで初デビューします。

今) 宮城はまだDNAの分野で遅れていると思いますので、いろいろな方法を取り入れて、たくさん勉強したいと思っています。

ベ) 頑張ってください。おまたせしました。お願いします。

高) 高橋美代子です。さそり座のO型です。数えない

ようにしているんですが、入社して20年と少し、H L Aに配属されて10年と少しです。

ベ) それではこのお部屋を最初から築き上げていらしたのですね。

高) いえ、前任者もいましたし、浦野さんがやっていましたので、ある程度は確立された所に入りました。ただし、まだ文明の利器はありませんでしたが...



高橋美代子さん

ベ) その頃はまだカラム法だったんですか?

高) ええ、エオジンで手を真っ赤にしたりして...(笑い)

高) それまで赤血球しかやってなかったのですが、H L Aをやってみたかったんですが、初めてエオジン染色したトレーを鏡検した時船酔い状態になって、失敗した!って思いました。

ベ) わかります。目をとじてもイクラがいっぱい見えるんですね。

高) そうそう、寝ても残像が消えないの。ああ、やめておけばよかったって思いましたよ。(笑い) とても進歩の速い分野なので、手技的にも知識的にも追い付いていくのが大変です。今は血清学とDNAと両方で成り立っているの、片一方だけ見ているというわけにいかず、結構きついです。

ベ) 現在は主になにを?

浦) 血清学のチーフです。

ベ) お仕事をなさる上のご苦労は?

高) H L Aだけでなく血液センターの組織が変わってきていて、品質管理の仕事などが増えてきて落ち着かない状況です。ワークショップの仕事もありますし...

ベ) これからなさりたいことは?

高) 頭を整理したいです。血清学とDNAとをどんな風にかまらせていけばいいのか分からないのです。どなたか教えてください。

ベ) どなたか教えて差し上げて下さい。(笑い) ところでご趣味はどんなことを?

高) テニスだけだったんですが、ついにテニスエルボにかかってしまったので、少し控えています。今はおいしいものを作ったり、食歩いたり...

ベ) 最後におっしゃりたいことは?



メンバーお揃いで和気あいあい

高) 係長、人は増えないんだから、これ以上仕事を増やさないでえー！

べ) 切実なお声ですね。ところで浦野さんの星座は？

浦) 僕は山羊座のB型です。13星座だとして座になるんだ、詳しいでしょう。毎朝テレビを見ますから。

べ) ああ、B型ですね。納得しました。(笑い) 皆さん

テニスで結ばれていらっしゃるんですね。

今日は長い時間どうもありがとうございました。

最後に何かおっしゃりたいことは？

浦) 東北ブロックの方、見捨てないで下さい。(笑い) 他のセンターは異動が多いので、HLAをやったことがある人が増えるという点では良いのだけれど、ブロックとしてやっていくにはあまり人を変えて欲しくないですね。

べ) そうですよ。異動が多いとやりにくいですよ。

浦) 特徴といったらうちは特にないんだけど、みんな本当にがんばっているの、よろしくお願いします。

(「あとがこわい…」 浦野さんの独り言)

べ) どうもありがとうございました。

パワー全開の浦野さんを中心にやる気マンマン、エネルギーみなぎる、日当たりだけではなくとても明るいラボでした。今後のご活躍を期待しております。



HLAところ変われば



アメリカ留学記 ～僕が触れたアメリカ その2～

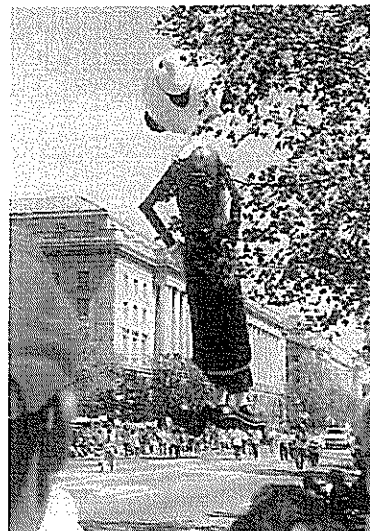
福岡県赤十字血液センター 宮崎 卓

前回の続編であるが、今回も好き勝手なことを書いてしまおうという魂胆である。前編があまりにHLAに関する学術的内容のないものだったので、少々気にしていたのであるが、よく考えてみると、このKAMON、他の先生方の執筆によりそのような情報が満載なのである。そこで僕一人くらい紙面を私してもいいのではないかと居直ることにした。前編にもまして研究的な話題から離れてしまうことをお許し下さい。

○こんなはずではなかったと思っているあなたへ

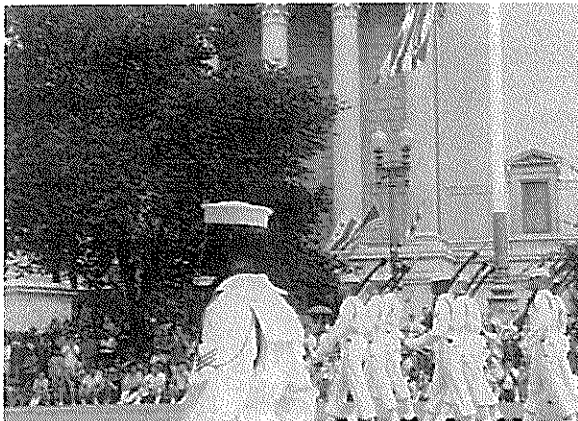
「こんなはずではなかったと思っているあなたに英会話教えます」。これはラボの近所の日本食料品店の掲示板に、実際にあった英会話教室の張り紙である。生活のすべての場面で英語が要求されるので、確かに生活習慣に慣れないと自信を持っていた英語が通じず、こんなはずじゃなかったと思うこともあるのだろう(私の英語はこんなはずだったので特別悩まずに過ごすことができた。不幸中の幸いである)。例えば床屋関係の英語で、「I have my hair cut.」という表現は知ってい

るが、実際バーバーショップの椅子に座ったときに、自分の要求をなんと説明したらいいものだろうか。留学中、夫婦でお互いに髪を切りあっていたという微笑ましい話から、自分で切っていたという器用な話まで聞いていたが(後頭部はどう処理したのだろうか)、な



桜祭りパレード
和服姿のミス桜も登場。桜の開花はほぼ日本と同時期。
キャピトルに通じるDCC中心部の通りでは、よくイベント
が催されている。

ぜか床屋にいったという経験談は聞いたことがない。僕は渡米後4ヶ月間散髪しなかったが、ある日とうとう我慢できずに床屋に行くことにした。アパートから車で5分程の所に床屋があったので、ドアのガラス越しに中を覗いてみた。すぐに回れ右をしてその場を立ち去ろうとした僕だが、ちょうど運悪くドアから出てきた店のおやじに「何してるんだ。入りなよ。開いてるよ。」とつかまってしまったのである。人種差別をするわけではないのだが、黒人の床屋には行かない方がよろしい。なぜなら店員も黒人、お客も黒人の本格的な黒人の床屋では（くどいようだが人種差別のつもり



The Independence Day

7月4日は独立記念日。記念日の性格からか軍人のパレードが多い。

はさらさらない)、いすに座った東洋人は、全員の注目を一身に浴びながら散髪されることになる。おまけに信じられないことに、ほとんどバリカンを使って調髪するのである。4ヶ月伸びた長髪を、バリカンで刈ってまともな髪型にせよという方が間違っているが、帰宅して鏡を覗いた僕は思わずつぶやいた。こんなはずじゃなかった。これに怒った僕は、以後アパートの近くに新装開店した中国系（韓国系？）の床屋で散髪してもらっていた。髪型の注文は未だにできそうにないが、飾ってあるモデル写真の1枚を選んで"like that!"と言う浅知恵だけは身に着けている。うまく断れない気の弱さと語学力のなさ、妙なところで頭をもたげる自分の好奇心を少しだけ恨めしく思った経験でもあった。

ちなみにここに登場する日本食料品店はSAKURAといい、食料品、雑誌、テレビ番組のビデオ等日本モノが揃っているが、値段は日本での約1.5倍で、日本人家庭の財政を圧迫する元凶ともなっている。僕もこの店には大枚をはいたものだ。食料品よりも日本語の活字への飢えの方が我慢できないように思う。

○研究者もまた人生の楽しみを忘れず

ここで少し本筋にもどって研究環境について書いてみたいと思う。と言っても、研究環境は施設毎あるいは研究室単位で大きく異なるようである。日本でも同じ様な事情だと思われるが、ボスの方針、研究費獲得能力等により違いが大きいので、僕はホランドラボ全体に共通することで印象に残っていることを少しだけ紹介することにしよう。

話が少し堅くなるが、日本国内の学会では、参加者はスーツにネクタイが定番であるように思う。国際学会ではかなりラフなスタイルの日本人が見受けられるようだが、それでも日本で開かれる場合には、やはりお堅いスタイルが主流になっているのではあるまいか。ネクタイ嫌いの僕としては、もう少しやわらかい雰囲気や学会を楽しみたいのだが、ホランドラボでも各研究室主催でときおりセミナーが開かれていた。僕も2度程出席したが、特徴的なのはやはり雰囲気だと思う。内容はもちろんまじめなのだが、参加者はコーヒーやドーナツを自由に手にとっているし、服装も椅子に座るスタイルもフリーなのである。しかし、なごやかな雰囲気の中にも参加者は真剣に内容に聴きいていた。お国柄でいろいろなパターンがあるだろうし、日本式が一概に悪いとは思わないが、まねてもいい部分ではないかと思う。

法律、裁判がものを言うアメリカらしく、安全教育等の職員研修？はまったく徹底している。なにしろこれらの仕事に携わるスタッフの数も多く、非常に熱心で感心してしまう。日本では、これらの仕事は体裁だけ整えて、できるだけやらないですまそうとするのが伝統ではないかと思っているが、これだけ徹底したものを見せられると意識革命を迫られてしまう。僕は実験の都合で一度安全教育をさぼったが、さっそくボスのところに連絡が来たらしく、次回はいついつだから必ず出席するようにと、出席の確認の書類にサインをさせられてしまった。もちろんボスのサインも必要なのである。はたして教育内容もそれに見合うだけ豪華なものであった。

人生は楽しむためにある。そう思ってもなかなか思い通りにはいかないものである。しかしできるだけそういう状況をかなえたいと密かに考えている（周りの人たちにはミエミエのようだが）。季節は初夏、6月3日は午後からラボを上げての大ピクニックだった。場所はプールズビルという町のピクニック施設。アメリカは広い。こういうピクニックを楽しむ場所は首都近郊でも事欠かない。皆それぞれ車で出かけるのだが、食料とビールは現地で食べ放題飲み放題であった（も

ちろんビールは量を自分で制限しないと帰れなくなる。ちなみにメリーランド州の道路交通法では飲酒禁止ではなく、量的に規制されている。砂のコートで研究室対抗のバレーボール大会があり、老若男女入り乱れて楽しんでた。人間関係に年齢による壁がないのがアメリカらしく、僕がアメリカを好きな理由の一つでもある。日本人の習性の何とせせこましいことか。このピクニックは大がかりなイベントだったが、小さなランチョンパーティーはしばしば行われていた。食べることで、人生を楽しむことを忘れない。小さなことだが本館の中にフィットネスルームが完備されていた。食べ過ぎの人のアフターケアではあるまいが・・・

○外国人研究者 in the U.S.A.

同じ時期に同じラボにイリナさんと言う名前の女性がいた。ご主人のミランさんと息子さんと一家3人でスロバキアを離れてのアメリカ暮らしである。彼女の英語が非常にきれいで解りやすく、また息子さんが僕の娘と同じ年だったこともあり、よく話をしたものだ。自分の仕事と息子さんの教育とご主人のことをよく話してくれたが、主婦としての悩みは日本と共通のようである（主人が息子の教育を私に押しつけてあまり協力的でないのよetc）。夏休みを利用して家内と娘が長期滞在した折り、彼女のアパートにご招待にあずかった。ミランさんはNIHに勤める研究者で、僕にキリンビールを勧めながら（スロバキアのビールと似ているので愛飲しているそうである）彼の祖国の話をしてくれた。東欧、ロシアにおける社会体制の変化の波は、彼らの生活そのものに深刻な影響を与えている。彼らも自国の情勢が落ちつくまではアメリカで暮らすつもりだと話していた。印象深いのは東欧諸国における礼儀や子供のしつけに関する社会文化が、いわゆる古き良き時代の日本とよく似ていることである。ラボの外でも英語教室でそういう人たちと知り合う機会があったが、僕は彼らに非常に好印象を持った。早く彼らが愛する祖国で安心して暮らせるようになればいいと思う。日本にいても、テレビの画面を通して世界中で起きていることを知識として知ることは容易だ。しかしそれを本当の意味で現実として認識することは難しい。この人たちと出会うまで、東欧諸国、ロシアの人々が生きている人間として僕の中にはいなかった。

僕は留学している（本拠地はあくまで日本）という意識があったので、その分アメリカでは気楽に過ごしてきたが、ミランさんのようにアメリカで暮らす外国人研究者は、僕とは気合いの入りが違っているように思う。彼らにしてみれば、結果が出なければ首が危



ミランさん一家と
シャッターを押した僕は写っておりません。

ない状態なのだから当然だが、アメリカにはきつこういった外国人研究者がたくさんいるのだろう。僕がホランドラボで働きだす前に、最初にHuman Resources（日本で言えば人事部か？）のMr. Jerry Robertに、ホランドラボや自分の身分に関するレクチャーを受けたが、その中で知的所有権に関する会話を交わしたのをよく覚えている。最初意味がつかめず、すぐに理解できなかったが、説明を聞いているうち、ははあなるほどと思った。つまりホランドラボでの研究成果はすべてホランドラボに帰属するというので、納得の上誓約書にサインをしたわけである。概してアメリカの研究施設には外国人の研究者が多いように思うが、このように上手に外国人研究者の受け入れと研究成果を両立させるところが、しっかりしているというか世界的におうか、アメリカの懐の深さだろうと思う。

話は横道に逸れるが、研究者に限らずアメリカという国は外国人の居住に関して寛大であるように思う（たぶん国土の広さが育んだ精神的余裕と無関係ではない）。ワシントンDCは人種差別反対を掲げるアメリカ政府のお膝元でもあり、アメリカでも1、2位を争う人種のルツボ地帯であるから、特にそう感じたのかも知れない。そのかわりといったら変だが英語は必須である。住んでいる以上英語は当然話せるものとして応対されるから、まっとうな職に就きたい外国人は一生懸命英語教室で英会話を勉強するのである。またそのための社会システムがよくできている。英語が話せずまっとうな職に就いた私は幸福者であった。

○英語はてごわくない その1

～胸を張ってお国訛りの英語を話そう！～

アメリカの社会システムで感心したことの一つに、市民のための教育システムがある。外国人のための英語教育もこの一環として含まれている。趣味やスポーツ、語学等何でもござれで、政治的な区域である郡

(COUNTY) が主催するコースのほとんどが無料である。上日や夜、地域の中学校や小学校の教室を解放して授業が行われる。先生はほとんどがボランティア(きちんとした経験や資格を持つ人が多い)でまかなわれていた。僕は土曜日の午前中に行われていた、外国人のための初級英語教室で半年間お世話になり、後半の半年は、担任の先生のアドバイスで、少しレベルの高い有料のコースを受講した。先生がネイティブスピーカーなのは日本の英会話教室でも当たり前になっているが、生徒が世界各国からの様々な人種、さまざまな年代の人たちであるという点が大きな違いである。



Ms. Jennifer Yau

初級英語クラス担任のジェニファーさん。偶然近所にお住まいでした。

特に初級クラスはアンドロメダ小学校で異星人とのコンタクト講座を受講しているようなものである。そこで一番強く感じたことは、何と云っても彼らはよくしゃべるといことである。英語の実力は似たり寄ったりなのだが、とにかく噂の英語でも何でもよくしゃべるのである。自分も含めての話だが、日本人はコミュニケーションに消極的だと思つづく。世界には英語、スペイン語等広い言語圏を持つ言葉がある。中国語も5人に一人は話せる。しかし日本語圏は日本のみ。外から見ると日本が島国だということがよく見える。国際化とは孤立化の対極にある言葉だと思ふ。外の世界とコミュニケーションをとる方法を確保することは、とりわけ日本人にとって必要であるように僕は感じる。

どの国の人も英語をしゃべるときは多かれ少なかれ自分の国のお国訛りになる。僕はヒスパニック系の人たちが話す英語がスペイン語に聞こえてしまい、うまく聞き取れなかったが、他の国の人たちにはちゃんと通じているようなので不思議に思っていた。フランス娘は鼻に抜けるフランス訛の英語を話すし、中国人はアクセントの強弱が強い中国語訛の英語を話す。スロバキアの人たちは非常にきれいな英語を話す僕の知る限り唯一の例外である(スロバキア語は英語とは全然

発音が異なっているのに)。いずれにしてもそれぞれの英語でアメリカ人にはちゃんと通じているのである。必要なのはコミュニケーションをとろうとする意思なのではないかと僕は思っている。自己弁護するわけではないが、日本語訛の英語でも胸を張ってしゃべった方がいい。

○英語はてごわくない その2

～ポストオフィスにて～

ことばの壁のためにずいぶん失敗をしたり、くやしい思いをしたりしたが、最後にひとつだけ自分を営めたいエピソードを書いておくことにする。

夏の終わりとともに帰国していった家族の荷物を荷造りして、最寄りの郵便局から航空便で送った。航空便は船便よりかなり割高だが、速く送りたい荷があったのでそちらを選んだのである。ところが日本の自宅では待てど暮らせど届かない。まず最初に送った郵便局の窓口で問い合わせたところ、係りの女性が、そういう航空便で送るシステムはない、船便の間違いだろうと頑強に否定するのである。何せ日本人が一人も住んでいないような田舎の郵便局である。たぶん彼女は本当に知らなかったのだろう。こちらも引き下がれないので、領収証や送ったときにもらっていた航空便の送貨表のコピーを見せ、ようやく別の係りの人に替わってもらい、話を聞いてもらった。そこで小包がちゃんと送られたかどうかを調査するための調査依頼に記入し、なにがしかの調査料を払って2週間ほど待っていた。返ってきた返事は調査したが不明とのこと。紛失したかもしれないと諦めかけていたころ、ようやく日本から荷が届いたとの知らせ。しかしそれを配達してくれた日本の郵便局に問い合わせたところ、通過した税関の名前と日付とはわかるが、それが航空便で届いたのか船便だったのかは確認できないとのこと。と



ディズニーワールドにて

サマーバケーションを利用して訪れたフロリダ・ディズニーワールドでの1枚。

にかくしょうがないので、その税関の名前と通関の日付のついた荷札を送ってもらって、航空便と船便との差額の払い戻しを掛け合うことにした。窓口で説明すること30分（正確な時間は分からないがおそらくこれくらい）。どうにか船便らしいということを得てもらったが、さて払い戻しできるかどうかは、この町（ゲザスバーグ）の中央郵便局の局長の権限事項だから、彼に相談してくれとのこと。そこで日を改めて、昼休みを利用してゲザスバーグ中央郵便局を訪ねた。行って利用者の列に並び（昼休みは利用者で混雑していて列に並ぶことになる）、やっと窓口までたどり着いて、現在までの経緯を最初から説明。係員は、話はわかったが局長に直接話してくれ、今昼食のため外出中だから局長室で待っていてくれとのこと。ようやく彼が戻ってきて、また最初から説明の繰り返しである。彼は、話は分かった、しかし払い戻しについては自分に権限がないのでワシントン地区のヘッドクォーターに相談しないと（勘弁してよー）……。というわけで長い道のりの末、最終的に航空便と船便との差額を手にすることができたのである。そのお金がオリンピックの金メダルの様に輝いて見えたのは言うまでもな



冬の朝のアパート

記録的な異常気象で気温は毎日 -20°C くらい。朝、車に張り付いた氷を剥がすのに小一時間かかっていた。

い。同じことを何度も繰り返して話していると、英語でも最後には割とすらすら話せるようになり、おまけに説得力まで備わってしまうから怖い。語学学習での反復練習とカルト信仰には相通じるものがあるのかもしれない。

またまた話は横道にそれていくのであるが、僕はアメリカの一般市民については非常によい印象を抱いている。とかく日本では、銃による邦人殺害や、沖縄での米兵の問題など暗いニュースが流れていて、イメージがあまり良くないことと思うが、普通に生活しているいわゆる一般市民は親切で、子供（弱者）に優しく、フェアプレイ精神があると思う。近所づきあいはほとんどなかったのであるが、冬の -20°C の雪の世界で車が動かなくなった時や、アパートで閉め出されてしまった時など（ドアがオートロックだったので）、困ったときに見ず知らずの隣人たちに非常にお世話になった。もちろんマイナスの面もあったのだが、それを補って余りあるほどアメリカは魅力的な国であった。機会があればもう一度住んでみたいと思っている。

終わりに

読み返してみて赤面ものばかりだが、ここに書いたこと以外にも多くのことが思い出されなつかしい限りであった。この記事を書く欄を与えて下さった編集者の前田女史に感謝したい。また僕の留学に際して、表でお骨折りを頂き、裏で糸を引いて下さった京都府赤十字血液センター研究部長の佐治博夫先生に謹んで感謝の意を表すとともに、このような貴重な体験を下さった福岡県赤十字血液センター所長の前田義章先生に感謝しつつ筆を置くことにする。

テクニック

『SSPクイックバッファー攻略Q & A part 2』

防衛医科大学校検査部 小林 賢

前号 (KAMON No.7 P61-P62) に続き攻略法を伝授
します。

質問10 DNAのリンズに70%のエタノールを使用し

ていますが、なぜ100%ではいけないのでしょうか。
70%を利用する理由は何ですか。

答え このDNA抽出試薬にはかなり高濃度の塩が含ま
れています。この塩をそのまま残してしまうとPCRが

うまくかからなくなります。ですから塩を完全に取除かなくてはなりません。そのためにはリンスする溶液に多少水分がないとならないのです。しかしながら、完全に蒸留水にしてしまうと、DNAが溶けてしまいますので、水分が多少あるエタノールを使用するわけです。しかし必ずしも70%である必要はありません。70-80%程度であれば構いません。自分で作るのが面倒な場合には消毒用アルコールを流用することも可能です。

質問11 違う方法でDNA抽出したとき、エタノールを飛ばすために、吸引したことがあるのですが、この方法だと2回目のリンスの後すぐに滅菌蒸留水を入れますが問題はないのですか。

答え エタノールを完全に捨ててあれば全く問題はありません。ただし、多少残っている場合は別です。その場合には、質問9を参照して残っているエタノールを完全に捨てて下さい。また、チューブの壁に残っている場合には細かいペーパー用の綿棒で吸い取ると簡単に取ることができます。

質問12 この方法ですとDNAのOD値はどの位ですか。

答え この方法で回収したDNA溶液のODA260/A280比は1.7-2ぐらいになります。しかし手順が悪くタンパク質の混入が酷い場合には1.6前後になることもあります。この場合でもPCRにはほとんど問題になりません。

質問13 DNAは、抽出ごとにOD値を測る必要がありますか。

答え この方法で回収されるDNA量は末梢白血球数が5000/ μ lで約8 μ gです。ここで得られるDNA量は白血球数に依存しています。ですから回収されるDNA量は、白血球数が高くてせいぜい2倍程度ですし、少なくとも半分強あるわけですから、あまりDNA量を気にして毎回々々測定する必要はないと思います。

質問14 純度の低いDNAを使用した場合、HLA DNAタイピングにどのように影響するのでしょうか。

答え 多少純度の低いDNAであってもほとんどPCR上影響がありません。しかしながらかなり酷いタンパク質などの混入があるようなDNAを使用した場合にはPCR増幅ができなかったり、きれいな増幅像が得られなかったりすることがあります。

質問15 DNAに蒸留水を加えた後、DNAが溶けずに塊になっています。数日後、冷蔵庫から取り出しても同様に塊があるのですがどうしたらよいでしょうか。

答え 遠心してその塊を沈めて下さい。後は通常の方法で実験されても構いません。もし気になるようでしたら、上清のDNA溶液を別なマイクロチューブに移してからPCRなどの実験をして下さい。

質問16 この方法で抽出したDNAはDYNAL SSPキット以外の方法にも使用できますか。

答え もちろんここで抽出したDNAはRFLP, SSCP, SSOなど、どの方法でも利用することができます。

質問17 DNAの保存方法を教えてください。

答え 通常は、冷蔵保存で構いません。室温などに長時間放置しておく、DNAが壊れてしまうおそれがあります。また、10年、20年といった長い期間保存したい場合には-20°Cや-80°Cで貯蔵します。しかし凍結融解をあまり繰り返すとやはりDNAは壊れてしまいますので注意して下さい。

質問18 採血後、何日くらいまでDNA抽出可能ですか。

答え 今までの実験ですと、1月程度冷蔵保存された検体でしたら全く問題はありません。多少それ以上長くてもおそらく問題なく回収することができると思います。また、この方法は工夫次第でホルマリン固定した臓器からでもDNAを回収することができます。ただしホルマリン固定されたDNAは200 bp程度の長さに分断されているため、これ以上長いPCRでは増幅することができません。

質問19 Dynabeadsで採取したリンパ球を使用して、DNA抽出を行う場合はどのようにするのですか。

答え 精製されたリンパ球ですから2回目のCMLBからスタートします。CMLBを入れた後、数回転倒混和し、細胞膜を完全に溶解します。次に、マグネット(MPC-4)をマイクロチューブをあて、ビーズを壁に集めます。それからチューブ内の溶液を別のマイクロチューブに移します。これ以降はマニュアル通りに行ってください。

弾くような感じでチューブの底を叩くとペレットは簡単にはずれると思います。



H L A 散 歩 道



ドイツの歌姫”マリア”日本で歌う！

福岡県赤十字血液センター 徳永 和夫

ドイツの骨髄バンク（DKMR）のコーディネーターであるマリア・フィッシャーさんが、10月12日（土）14：30～17：00横浜のオオハラホールでシュベルトの歌などを独唱されました。マリアさんとは1984年第9回の世界HLAワークショップで出会いました。彼女はその当時は西ドイツのウルム市にある赤十字血液センターのHLAタイパーでした。1992年5月に九州骨髄バンクのコーディネーターとして、デュッセルドルフ在住の18歳の日本人女性に、熊本のドナーからいただいた骨髄を、私が21時間30分かけて持っていった時にウルムの骨髄バンクに寄りました。その時にはもうコーディネーターをしていて世界各国のバンクと連絡調整をしていました。

今回は1979年にザルツブルグで同じ歌の先生（ローレ・フィッシャーさん）からマリアと一緒に指導を受けた日本人数名の方の協力で、初めて日本に来ること、リサイタルを開くことが実現したようです。ウルムで会った時、私は歌の練習に付き合いましたが、教会の2階席から響くマリアのソプラノは素晴らしいです。

今回は”野ばら”など30曲程歌い、その中には日本の歌として”浜辺の歌、さくら、赤と



京都で舞妓さんと一緒に
（マリアの後ろが血小板の研究で有名なトム・クニキさん）

んぼ、待ちぼうけ”もありました。練習の時には全く間違わなかったのに、本番では”待ちぼうけ”の時に途中で黙ってしまったようですが、ニコリ笑ってまた最初からやりなおしたそうです。これですっかり会場は良い雰囲気になったようです。

本番1週間前に京都で私と妻、佐治さん、丸屋さん、トム・クニキさん、それと名古屋第一赤十字病院のNMDP移植コーディネーターの中村さんとで夜の京都のバスツアーに参加しましたが、マリアは翌日、奈良へ行くのをやめて東京へ戻るほど、公演が気になっていたようです。公演終了後のニコリとした笑顔が全てを物語っています（写真参照）。

吉田孝人先生御夫妻も公演にご参加下さったようです。時間があれば、ドイツやヨーロッパの骨髄バンクについて話してもらえたと思いますが、一緒に暮らしている病身のお母さんのことを考えると、2週間の滞在が限度のようでした。

ドイツの南部へ行かれる時はマリアを尋ねよう、皆さん。



公演後のリラックスしたマリア