

## HLA クラス I 領域におけるシーケンス解析 —はるかかなたの秘宝を求めて—

東海大学医学部 分子生命科学II 椎名 隆・猪子 英俊

### はじめに

HLA 遺伝子群は、第6染色体短腕部 (6p21.3) の4,000 kb (400 万塩基対) から構成されており、1997 年現在 208 個の遺伝子が同定されているという遺伝子の密な領域であります。ところが、その密な領域にあるクラス I 領域には、クラス I 遺伝子をはじめ、P5, MIC, HCG など類似した遺伝子が数多く存在するためにクローニング解析が遅れ、その結果、遺伝子のマッピングや同定に困難を極めているのが現状です。実際、HLA 領域の遺伝子地図を見たことのある人は、クラス II, クラス III 領域に比べてクラス I 領域だけポッカリ穴が空いている感じがすると思います。そこで、我々のグループでは、クラス I 領域のクローニング並びに塩基配列を決定することにより、穴の空いているクラス I 領域の遺伝子地図を完成させることを第一の目的にしています。その他にも B51 抗原と相関が認められるベーチェット病、Cw6, Cw7 と相関が認められる尋常性乾癬などの疾患発症に関係する遺伝子の同定、遺伝的多型性の生成の機序の解析、遺伝子間領域の遺伝的機能、ヒトの遺伝子構成、MHC 領域の進化の過程なども明らかにしたいと考えています。

遺伝子を構成している塩基配列を明らかにするシーケンシング解析には、次の3つの過程があります。1つ目は、塩基配列を決定する材料となるクローンの整列化を行うこと、2つ目は塩基配列を決定すること、そして3つ目は決定された塩基配列を基に遺伝子の同定や機能解析を行うことです。この3つの仕事を例えると、HLA クラス I 領域という山の地図を手に入れ、そこにトンネルを掘り、トンネルの先にある宝物を見つけるようなものでしょう。“遺伝子の森を散歩する”という大変ロマンチ

ックな表現もありますが、ここでは、シーケンシング解析の汗臭さ、泥臭さを実感していただくため、あえて“宝物”に固執したいと思います。それでは、我々がこれまでに試行錯誤の結果、習得した宝物の見つけ方やこれまでに発見した宝物の数々について紹介していきましょう。

### 1. クローンの整列化

#### —宝物への地図作りは完成に近い?—

まず、塩基配列を決定するには、その材料となるコスミド、BAC(bacterial artificial chromosome) および PAC (P1 artificial chromosome) クローンをを用い、整列化を行わなくてはなりません。いずれの材料とも環状のDNAですが、インサートDNAのサイズに差があって、コスミドクローンで30~40kb程度、BACやPACクローンではこれよりも長く、60~300kb (平均130kb) のDNA断片をクローニングすることができます。このBACやPACクローンを利用するメリットとして、YAC(yeast artificial chromosome)クローンと比べて人工産物で実際のゲノムを正確に反映していないキメラクローンが少ないこと (経験上約1%) や取り扱い方も通常のプラスミドとほぼ同じであることです。従って、このBACやPACクローンを用いたクローンの整列化やその後のシーケンシング解析という流れが、YACシステムに代わり、世界中でメジャーになりつつあります。

次に整列化の方法ですが、図1 (次ページ) を参照してください。

まず、コスミドクローンをを用いた領域 (IkBL-S 遺伝子間: 450 kb、およびHSRI-HLA-92/L 遺伝子間: 350 kb) については豊富でユニークな配列やAlu配列をプローブに

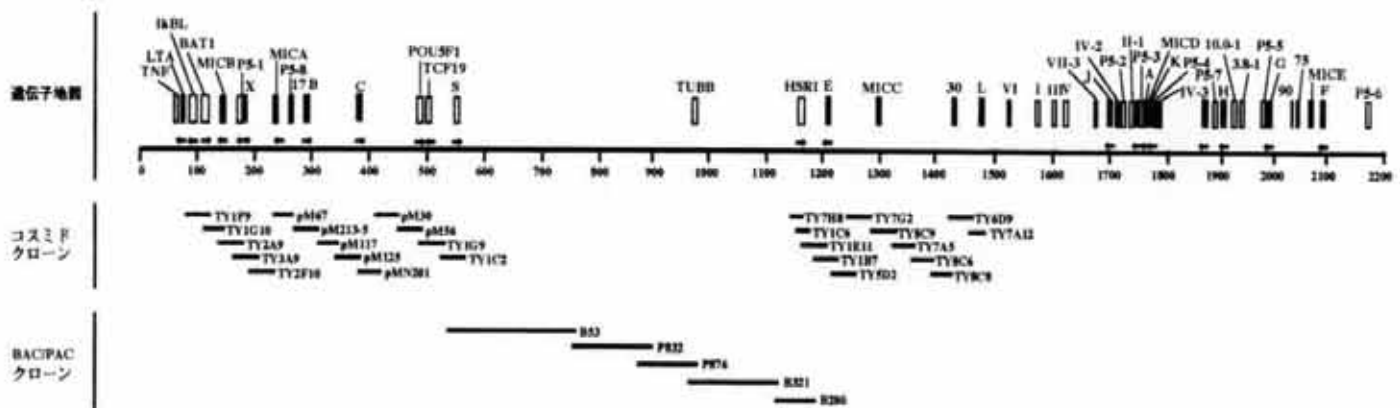


図1 コスミドクローン、BAC、PAC クローンを用いた HLA クラス I 領域の整列化  
HLA クラス I 領域、IKBA から HLA-92/L 遺伝子間 1.4 Mb (1,400kb) をカバーされた 26 個のコスミドクローン、PAC、BAC クローンを示す。

用いてサザンブロット解析を行い整列化を進めていきました。しかし、BACやPACにて整列化した領域（S～HSRI 遺伝子間：600kb）につきましては、位置が不明確な TUBB、P5-1、HLA-X という3つの遺伝子と 152G3、188A4 という2つのYACシークエンスしか存在しないことから、まず、S遺伝子と HSRI 遺伝子より設計したプライマーを用いて BAC および PAC ライブラリーをスクリーニングしました。続いて、分離したクローンの両末端の塩基配列より新たにプライマーを設計し、再度ライブラリーをスクリーニングするといういわば PCR-walking 法を主流にスクリーニングを行い、目的のクローンを分離していきました。その後、FISH 解析による位置の同定やカメラ判定、制限酵素断片長の比較およびサザンブロット解析による各クローンの特徴付けも忘れずに行っています。幸い、この原稿の執筆中に、IKBL 遺伝子から HLA-92/L 遺伝子間、1.4Mb (1,400kb) の整列化を無事に終了することが出来ました。この1.4Mbは26個のコスミドクローンと5個のBAC/PACクローンでカバーされ、いずれ、これら全てのクローンの塩基配列を解読していくわけです。ちなみに、S～HSRI 遺伝子間に存在するであろうと考えられていた P5-1、HLA-X、152G3 はこの領域には、存在していませんでした。現在は HLA-92/L から HLA-A までの300kbについてクローンの整列化、つまり、食欲に宝物への地図作りに汗水流しているところです。

## 2. シークエンシング法

### — 安くて丈夫なトンネルの掘り方 —

大量の塩基配列の決定法には図2に示しました様に、塩基配列の決定を全体の中のどの部分を今、解析しているのかを同時に理解しながら進めていくウォーキング法とデリーション法、そして、我々が日頃使っているショットガン法に大別することが出来ます。

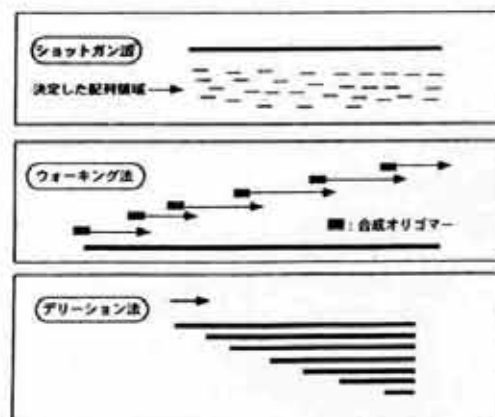


図2 代表的なシーケンシングストラテジーショットガン法(A)、ウォーキング法(B)およびデリーション法(C)の概念を示す

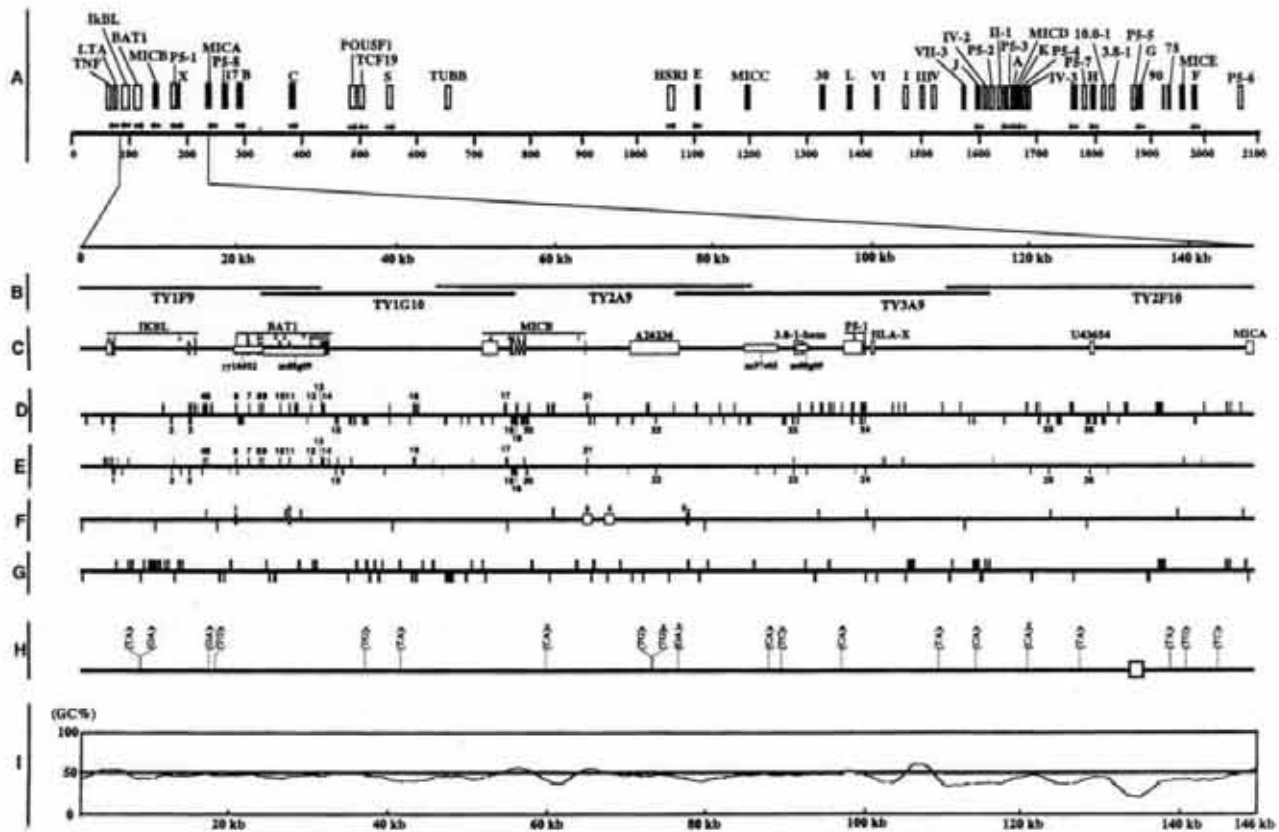


図3 IKB L～MICA 遺伝子間 146 kb における各種遺伝子解析遺伝子地図

(A)、シーケンシング解析に用いたコスミドクローンの整列化 (B)、相同性解析による遺伝子地図 (C)、GRAIL 遺伝子検出プログラムによるコーディング領域の予測 (D)、HEXON 遺伝子検出プログラムによるエクソンの予測 (E)、CpG アイランドや poly (A) シグナルの位置 (F)、Alu 配列や LINE 配列の位置 (G)、反復配列の位置 (H) そして、GC 含量 (I) を示す。なお、(D) と (E) 上に示した数字は Graill/HEXON 解析にて、オーバーラップした領域を示し、(H) に示したボックスは 195 回の反復配列の位置を示す。

この方法は、各クローンより超音波などでランダムに生成させた DNA 断片 (1-2 kb) をシーケンシング用ベクター、pUC19 にサブクローニングした後、挿入断片末端部の塩基配列を決定する方法であります。また、この方法は全体の 5-10 倍量の配列を決定しなくてはならないことから、テンプレートの数は、総塩基数が 30kb のクローンとすると約 350 個、150kb のもので約 1000 個必要となるのです。そして毎日、377PRISM (ABI 社) 自動蛍光シーケンサーを用いて 36-128 サンプルづつ塩基配列を決定しているのです。そして、毎日、前日にシーケンシングを行ったサンプルの平均解読塩基数、1 シークエンスあたりの解読不能塩基数について算出し、常に 1 塩基でも正確で長く解読可能な方法を追及しています。現在シーケンシングを行っているクローンでは、370 シークエンスの平均解読塩基数は 711.3bp、1 サンプルあたりの解読不能塩基数は 1.8 個と大幅に初期の頃のクローン (468bp、2.0 個) より改善されています。平均解読塩基数

が 245bp も長く解読されていることから、解読するサンプル数が少なくすみ、その結果、シーケンシングコストを低減させることが出来ました。今後、さらに、シーケンシング技術を向上させることで、シーケンシングコストやシーケンシング日数を削減させなくては！と自分に言い聞かせています。

その後のシーケンシングデータの編集は、ワークステーション上で ATSQ アセンブリーソフトウェアを用いて、ランダムクローンの整列化を行っています。ギャップが生じた領域についてはギャップの両末端にカスタムプライマーを設計し、プライマーウォーキングによりカバーして、1 クローンの塩基配列を完全決定しています。ここまでの操作でなにも問題がなければ、150kb のクローンを我々は 2-3 ヶ月で決定する能力を秘めています。図 3 は IKB L～MICA 間 146kb の解析結果を示しましたが、その後、決定された塩基配列データをもとに、BLASTn、BLASTx および FASTA プログラムによる DNA データバンクとの

相同性解析 (図3-C)、GRAIL並びにHEXON 遺伝子検出プログラムによるエクソン-イントロン構造の検出と解析 (図3-D, -E)、CpG アイランドや poly (A) シグナルの位置 (図3-F)、Alu 配列や LINE 配列の位置 (図3-G)、反復配列の位置 (図3-H) そして、GC 含量 (図3-I) など併せて解析し、遺伝子の同定や機能解析を行っています。

### 3. IkBL から S 遺伝子間、452kb における

#### シーケンシング解析—97' 宝物コレクション—

IkBL 遺伝子から S 遺伝子までを含む14個のコスミドクローンの塩基配列を決定した結果、その塩基数は452,312 bp でした。この領域におけるホモロジー解析を行ったところ、図4に示しました様に、17個の既知遺伝子 (セントロメア側より IkBL、BAT1、MICB、3.8-1-hom、P5-1、HLA-X、MICA、P5-8、HLA-17、DHFR、HLA-B、RFL3-hom、HLA-C、NOB5、OTF3、TCF19 and S gene)、DNA データバンク上に登録されている3つの DNA 断片 (セントロメア側より A26236、U43654、U27933)、および、8箇所の EST (Expressed sequence tag) と高いホモロジーを示す領域が見い出されました。さらに、一部の領域の RNA プロット解析にて陽性であった4つの領域 (NOB1、NOB2、NOB3、NOB4) が見い出されたことから、図4に示されるように、シーケンシング解析前と比べていかに多くの宝物が埋っていたか!ということが皆様にもよく分かるかと思えます。本章では、この宝物の特徴について概説しましょう。

### 3.1. BAT1 遺伝子

ATP 依存性 RNA helicase の DEAD 族に属する BAT1 遺伝子は IkBL 遺伝子の 6 kb テロメア側に位置し、これまでに、10 個のエクソンから構成されていると報告されていましたが、今回のシーケンシング解析により、5' 上流にもう一つのエクソン (5'UT 領域) が存在し、合計11個のエクソンから構成されていることが明らかとなりました。また、この BAT1 遺伝子には、2つの DNA データバンクに登録されている EST (Expressed sequence tag) クローンと高いホモロジーを示す領域が存在し、一方では胎児の心臓由来のもので BAT1 遺伝子のエクソン領域に存在しましたが、他方ではメラノサイト由来のもので、その一部は BAT1 遺伝子のイントロン領域にも存在していました。つまり、この遺伝子はスプライシングの違いにより2種類の異なる mRNA を転写させるといういわば alternative splicing を起こしていることが考えられました。

### 3.2. 3.8-1-hom 遺伝子

機能不明である 3.8-1 cDNA クローンと 99.7% のホモロジーを持つ領域が MICB 遺伝子の 27kb テロメア側に同定され、これを 3.8-1-hom 遺伝子と命名しました。3.8-1 は HLA-54/H と HLA-G との間に位置する 3.8 kb の EcoRI 断片を用いて分離されたものですが、今まで、同源の遺伝子がサザンプロット解析により HLA-B ~ TNF 領域間の 6.8kb Taq I 断片上に存在することが考えられてきました。実際、この解析により、MICA と MICB 間の 6,424bp Taq I 断片上に存在していたことや1つの胎児肝臓と脾臓由来の EST と約 96% のホモロジーが認められたことから、これまでに分離されていた 3.8-1 mRNA はこの領域から発現している可能性もあると考えられました。

### 3.3. P5-1 と HLA-X 遺伝子

従来、P5-1 と HLA-X 遺伝子は HLA-C ~ HLA-E 間にマッピングされていましたが、P5-1 は TNF ~ HLA-B 間の 18 kb の Hind III 断片上に存在することが示唆されたことや前述したように、HLA-C ~ HLA-E 間について整列化した BAC / PAC 並びにコスミドクローンには、P5-1 遺伝子が存在しなかったことから、最近、P5-1 遺伝子の位置が疑問視されていました。我々の解析により、P5-1 遺伝子と 98.3% のホモロジーを持つ配列や HLA-X と 91.4% のホモロジーを持つ配列が MICB 遺伝子の 35kb テロメア側の 18,815bp の Hind III 断片上に同定され、これらをそれぞれ P5-1-hom、HLA-X-hom 遺伝子と命名しました。

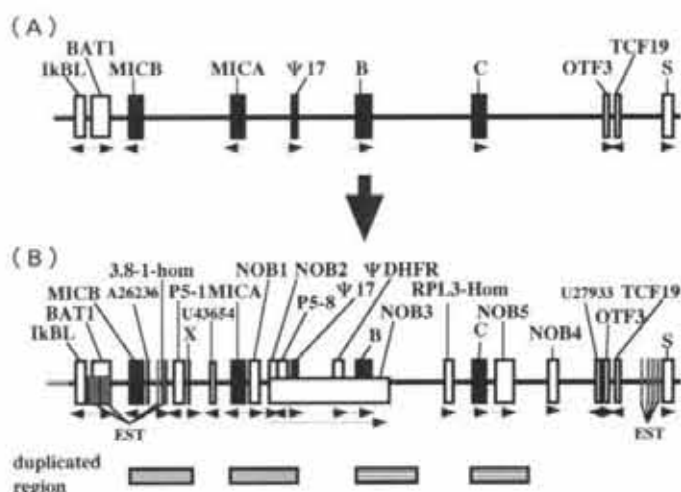


図4 IkBL ~ S 遺伝子間 452 kb における遺伝子地図 シーケンシング解析前 (A) と解析後 (B) の遺伝子地図を示す。

我々は、これらの遺伝子こそが本物の P5-1 や HLA-X であるものだと考えています。この P5 族の遺伝子はクラス I 領域に 8 つ同定されており、これまでに塩基配列が明らかにされている P5-3 (HLA-80 と HLA-A 間に存在) や P5-8 (MICA と HLA-B 間に存在) 遺伝子とは、それぞれ約 75% のホモロジーを持っていました。

### 3.4. NOB1, NOB2, NOB3, NOB4 遺伝子

図 3 に示しました Y109 YAC クローンから決定した 237 kb の領域については、Alu 配列や LINE 配列およびその他の反復配列を除いた DNA 断片をプローブに用いて、RNA プロット解析を行いました。その結果、4 つの領域が陽性であったことからこれらの領域より未知の mRNA が発現しているものと考えられ、それぞれ NOB1 (new organization with HLA-B associated gene 1)、NOB2、NOB3 および NOB4 遺伝子と命名しました。NOB1 では、RNA プロットした 8 つの組織すべて (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓および脾臓) に 10 kb、骨格筋に 2.1 kb、脾臓に 0.8 kb の発現が確認されました。また、NOB2 では、脾臓のみ 1.1 kb、NOB3 では、骨格筋に 7 kb、1.4 kb、1.2 kb、0.9 kb、さらに、NOB4 では、胎盤より 6 kb の mRNA の発現が確認されました。従って、NOB1 はあらゆる組織に発現するいわゆる housekeeping gene であるものと考えられましたが、NOB2、NOB3 および NOB4 はそれぞれ組織特異的な発現様式を示したことから、これらの遺伝子に対する cDNA クローンを分離しています。

### 3.5. 大規模な遺伝子重複

この領域内に存在する HLA-B と HLA-C 遺伝子の下流側 30 kb、MICA と MICB 遺伝子の上流側 30 kb におきまして、図 5 に示しましたように、それぞれ大規模な遺伝子重複が認められました。いずれの領域とも、Alu 配列や LINE 配列の入り方に違いが認められましたが、ホモロジーは約 85% と高く、特に、HLA-C の下流側に存在する NOB3 遺伝子に対して、HLA-B の下流側に存在する NOB3 の偽遺伝子である NOB5 遺伝子が、MICA の上流側に存在する NOB1、NOB2、P5-8、HLA-17 遺伝子に対して、MICB の上流側に存在する NOB1、NOB2 とホモロジーの高い領域と P5-8、HLA-17 遺伝子がそれぞれ同様の位置に認められました。クラス I 領域には、各クラス I 遺伝子をはじめ、P5、MIC、HCG など重複した遺伝子も多く存在しますが、この様な大規模な遺伝子重複は

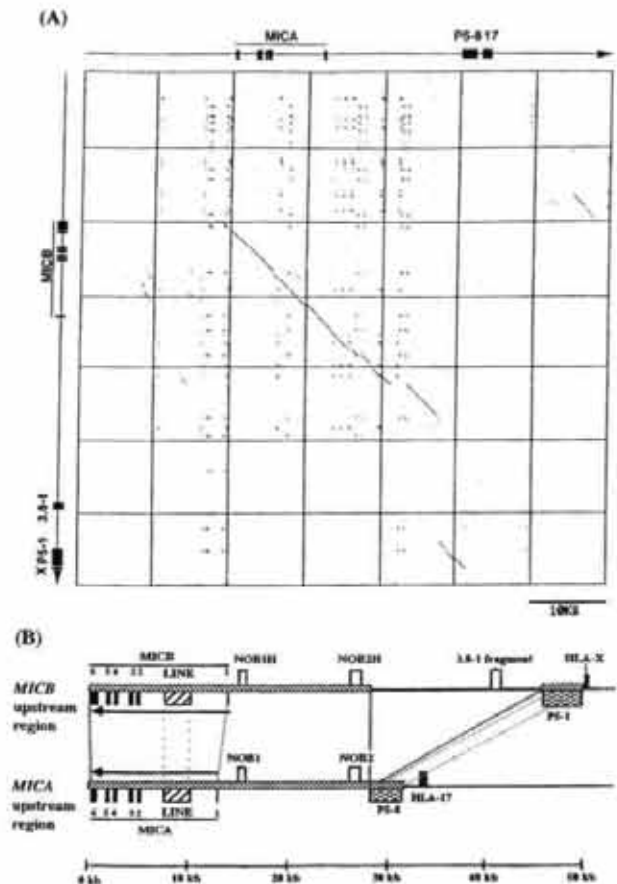


図 5 MICA と MICB 遺伝子領域の比較

MICA (横軸) と MICB 遺伝子 (縦軸) の下流側 20 kb と上流側 50 kb におけるハープロット解析を (A) に示す。線が出現している領域はホモロジーが高いことを示す。また、MICA (横軸) と MICB 遺伝子 (縦軸) の下流側 50 kb における遺伝子地図を (B) に示す。

過去に見つかっていない、今後、クラス I 領域における遺伝子重複のメカニズムを追及する上で重要なキーポイントになるものと考えられます。さらに、MICA と MICB 遺伝子間の MICA 遺伝子より 10 kb セントロメア側には、GAATATATATATA という配列が 195 回も繰り返している領域が認められました。この領域の GC 含量が 11.5% と他の領域に比べて低いこと、また MICA と MICB の多型に連鎖不平衡が認められないことから、この反復配列が MICA と MICB 領域の遺伝子重複が行われた組み換えホットスポットであるものと考えています。



### 3.6. 反復配列

この452kbには、3.5. で示しました195回の反復配列の他に、2~5回を1単位とした反復配列 (short tandem repeat : STR) がなんと170個も見い出されまして、実に2.6kbに1個という高い割合で存在していました。これらの内、IkBL~MICA間、146kbの2塩基反復配列のみを図3に示しました。これらの反復配列はパーチェット病、尋常性乾癬などの疾患発症に関係する遺伝子の同定や遺伝的多型性の生成の機序の解析に多いに役立つものと考えています。

### 3.7. EST 解析

OTF3からS遺伝子間の約40kbにおけるホモロジー解析の結果、4つのESTクローンが95%以上のホモロジーを持ってマップされました。また、Grail/HEXONプログラムを用いてエクソンを予測した結果と各ESTクローンの方向性、つまり遺伝子の向きから、この領域には、4つの独立した新規遺伝子が存在するものと考えています。これらの内、1つのESTクローンはケラチノサイト由来のもので、尋常性乾癬の感受性遺伝子がHLA-CからS遺伝子間に存在する可能性が高いことから、現在、このESTクローンを含めた4つクローンの特徴付けを行っています。

### おわりに

本稿では、452kbの塩基配列を解析して直接的に得られました結果について概説しました。今後、これらの結果をもとにしてパーチェット病、尋常性乾癬などの疾患発症に関係する遺伝子の同定、遺伝的多型性の生成の機序の解析、遺伝子間領域の遺伝的機能、ヒトの遺伝子構成、MHC領域の進化の過程などを明らかにしたいと考えています。現在もワシントン大学などで、ESTプロジェクトが進められていますことから、DNAデータバンク上に放出されます大量のESTシーケンスとこの領域とのホモロジー解析を定期的に行い、新規遺伝子は存在しないかと常に目をキラキラさせています。まだまだ宝物は眠っているかもしれません。

### メンバー紹介

我々が所有するシーケエンサーの一台(1号機)はまる2年間ほぼ毎日働いていたんですが、今年に入って別の部屋にもう一台のシーケエンサー(2号機)がやってきたせいか、1号機が時々、発狂するようになったんです。かと思えば、逆に意識不明に陥ることもあって、必死になだめても看病しても直らない時があるんです。

「2号機に恋をしているのかもね!」と某女子研究員1。  
「今日はもういいや、明日からちゃんと働くんだぞ!」と私。  
結局、その日のrunをあきらめて、翌日、test runを行ったら、これまでにない上等なデータが得られました!  
「昨日、2号機とデートしたのかなあ」と某女子研究員2。  
「シーケエンサーのヤツもズル休みしたくなるのね」と某女子研究員3。

こんなくだらないことを考えてしまう程、シーケエンサーに愛着が湧いている我々“treasure hunters”のメンバーを最後に紹介します。



写真説明、HLAシーケエンシング解析チームの面々

最前列、岡研究員

2列目、右から木村先生、山形研究員、猪子先生

3列目、右から牧野研究員、富沢研究員、岩田研究員

4列目、右から瀧嶋研究員、横名研究員、田宮研究員、半戸研究員、吉川研究員

# 知ってる つもり!?

..... 日本人の成り立ち 1

## —日本人に多く見られるハプロタイプから—

日本赤十字社中央血液センター 検査三課 田中 秀則

これまでに、日本人及びアジアの民族に見られるハプロタイプについて紹介してきた。特に様々な民族との関わり合いを示唆するハプロタイプを中心に紹介してきたつもりではあるが、アジアの民族全体で見るとその一部でしかないのは事実である。しかし、これらのハプロタイプから日本人と他の民族との関わり合い、または日本人の成り立ちを知るための手掛かりとなると思っている。まず、日本人に多く見られるハプロタイプから、日本人の成り立ちについて推察をしてみたい。

当然ではあるが、各民族において頻度の高いハプロタイプが存在する。では、頻度の高いハプロタイプは、何を意味しているのだろうか。集団（民族）において、その内部または外部の一集団がその勢力を大きく広げた（人口が増加した）場合、その一集団に特有なハプロタイプの頻度が高くなることが考えられる。また、逆に頻度の低いハプロタイプは、先住集団の特徴を示している場合もある。日本人で比較的頻度の高いハプロタイプ7種類（表1）について見ると、北東アジア、特に韓国・北部中国の集団に由来すると考えられる3種類のハプロタイプ（①A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6、②A33-CBL-B44-DR13-DR52-DQ6、③A24-Cw7-B7-DR1-DQ5）と、東南アジア、南部中国または琉球（沖縄）の集団に由来または関連すると思われる4種類のハプロタイプ（①A2-Cw1-B46-DR8-DQ6、②A24-Cw1-B54-DR4-DR53-DQ4、③A11-Cw4-B62-DR4-DR53-DQ3、④A24-Cw1-B59-DR4-DR53-DQ4）に大別できる。これら2系統に由来するハプロタイプに、様々な情報を付け加え日本人集団の成り立ちについて考察を始めたい。

### 1. 北東アジアに由来するハプロタイプについて

北東アジア、特に韓国・北部中国に由来する3種類のハプロタイプ（①A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6、②A33-CBL-B44-DR13-DR52-DQ6、③A24-Cw7-B7-DR1-DQ5）は、他のアジア集団では、それほど多く見られないタイプであり、韓国・北部中国及び日本人に特有のハプロタイプと言っても過言ではない。これらのタイプは、弥生時代に大陸から渡来した人（渡来人）がもっていたハプロタイプと推察される。現在、これら3種類のハプロタイプ頻度の合計は、本土日本人（ここでは琉球・アイヌと区分するためにこの言葉を使用する）で約20%であり、約40%の本土日本人がこれら3種類のタイプの何れかを持っていることになる。また、ミトコンドリアDNAにおける多型性の調査でも、本土日本人が北東アジアから渡来したことが確認されており、本土日本人の約50%が中国・韓国人の特異性を示すクラスターに分類される。また、埴原の頭骨研究でも、本土日本人は北アジアの特徴が見られており、特に近畿を中心とする地方でその傾向が強いとしている。

表1 日本人に多く見られるハプロタイプ

1. A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6
2. A33-CBL-B44-DR13-DR52-DQ6
3. A24-Cw7-B7-DR1-DQ5"
4. A2-Cw1-B46-DR8-DQ6"
5. A24-Cw1-B54-DR4-DR53-DQ4"
6. A11-Cw4-B62-DR4-DR53-DQ3"
7. A24-Cw1-B59-DR4-DR53-DQ4"

しかし、これら3種類のハプロタイプが同一の集団として、同時に日本に渡来したと考えるのは難しい。なぜなら、これら3種類のハプロタイプの分布が、日本の各地域で異なった分布をしているからである。日本人で二番目に多いハプロタイプ (A33-CBL-B44) が近畿中部地方に多く、また、三番目に多いハプロタイプ (A24-Cw7-B7) が、中国地方 (特に鳥取・島根) に多い。しかし、一番頻度の高いハプロタイプ (A24-CBL-B52) は、東北地方及び南四国でその頻度が低い傾向にあるが、本土日本人においてはほぼ同じ頻度で広く分布している。もし同一集団が、同一時期に日本に渡来したならば、これら3種類のハプロタイプの比率は、日本の各地域においてはほぼ同じになるはずである。

また、韓国におけるこれら3種類のハプロタイプ頻度は、A33-CBL-B44またはA33-B44-DR13が約4.5%、A24-CBL-B52またはA24-B52-DR15が約2.0%、A24-Cw7-B7またはA24-B7-DR1が約1.5%であり、日本人における頻度とは異なっている (表2参照)。このことは、3

表2 日本人に多く見られるハプロタイプの頻度

	Japanese	Korean
1. A24 B52 DR15	8.2 %	2.3 %
A24 CBL B52	9.3 %	1.9 %
2. A33 B44 DR13	5.2 %	4.5 %
A33 CBL B44	5.7 %	4.9 %
3. A24 B7 DR1	3.6 %	1.7 %
A24 Cw7 B7	4.1 %	1.4 %
4. A2 B46 DR8	2.2 %	1.3 %
A2 Cw1 B46	3.1 %	2.6 %
5. A24 (A2) B54 DR4	2.3 (0.5) %	1.1 (2.3) %
A24 (A2) Cw1 B54	2.8 (0.9) %	2.4 (3.2) %
6. A11 B62 DR4	1.6 %	1.7 %
A11 Cw4 B62	2.0 %	1.6 %

種類のハプロタイプを特徴とする集団は、それぞれ別の集団で、北アジアからの異なった時期に渡来した可能性が高い。そこで、本土日本人におけるこれら3種類のハプロタイプの分布が異なっている理由を明らかにすることにより、日本人の成り立ち、特に弥生時代以降の成り立ちを解明することが可能と思われる。

まず、一番頻度の高いハプロタイプ (A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6) が、本土日本人に広く分布するためには、先住者以上の定住能力 (生活力) が必要である。それが、コメ (稲作) と考えている。しかし、最近、稲作が日本で初めて行われていた時期は、弥生時代ではなく、縄文晩期にはすでに行われていたことが分かってきた。それは、岡山県の南溝手遺跡、福田貝塚から発見された縄文晩期 (約3500年前) の土器から、プラントオーバー (稲の葉に含まれる微量な珪酸粒子) が検出されたためである。

このように、渡来人が、最初に稲作を日本にもたらしたのではなく、それ以前に日本には稲作があった。それでは、渡来人がもたらした稲作は、稲作文化と考えるべきなのかもしれない。渡来人は、稲とその稲の栽培法、青銅器、磨製石器など、それまで日本ではなかった新しい文化要素を、セットとして日本に持ち込んだと考えられる。福岡県福岡市の板付遺跡及び佐賀県唐津市の菜畑遺跡からは、灌漑用水施設、石包丁、木鎌等を含む水田跡が発見され、日本で最初に水稲を行ったとされ、弥生の起源は北部九州と考えられている。縄文末期、気候の変動 (寒冷化) 等により縄文人の人口は減少傾向にあり、同時期稲作文化を伴った集団が、中国の戦乱 (春秋戦国時代) 及び韓国の動乱を逃れて日本に渡来し、稲作を北部九州で開始した。稲作文化を伴った集団の渡来については、縄文末期における気温低下もその理由と考えられている (太陽の黒点が増え、寒冷化が進んだともいわれている)。これまでの遺跡の調査から、稲作文化は短期間 (約200年) で日本を縦断し、青森県 (垂柳・砂沢遺跡) まで到達していたようだ。稲作文化は、1,000年の単位で蓄積してきた縄文文化を、約1/10の速さで吸収 (駆逐) してしまった。稲作文化の急速な伝播に伴い、西日本で人口が急増した。小山修二は、遺跡数やその規模から、コンピュータ・シミュレーションを使って縄文から初期歴史時代にかけての人口推計を行っており、縄文晩期に日



本の人口は約7万、弥生時代に約60万、古墳時代には540万になったとしている。稲作文化を携えた渡来人（ここでは、前期弥生人とする）は、西日本で人口増加に伴い、また稲作が可能な土地を求めて、九州から東に移動したものと考えられる。前期弥生人の移動により、各地域で縄文人（先住民）との争いはなかったとは考えられないが、生活用式の違う縄文人とは比較的温和に交流ができたと推察される。なぜなら、前期弥生人と縄文人の生活用式、特に食料を得る場所が異なっていたと考えられるからである。前期弥生人は、稲作を中心としていたことから、湿地帯が生活の中心であったのに比べ、縄文人は野山での狩猟採取生活を行っていた。縄文人にとって、湿地帯はほとんど無用の地であり、弥生人が何故あんな何もない、しかもじめじめしたところで生活するのか、不思議だったのかもしれない。しかし、稲作文化により、安定した主食であるコメが得られるようになり、これまで縄文人が主食としていたクリやドングリと比べれば、美味しい主食であったに違いない。そのため、縄文人も徐々に稲作文化に取り込まれていったと推察される。

稲作文化の本土日本への浸透と西日本で人口の増加に伴い、前期弥生人は本土日本全体に広く拡散して行った。この時（約2,500年前）の前期弥生人集団が、現在本土日本人で一番頻度の高いハプロタイプであるA24-CBL-B52-DR15-DQ6ハプロタイプを、その特徴として持っていたのではないかと考えている。現在の本土日本人では、このハプロタイプの頻度が東北地方及び南四国で、低い傾向にある。このことは、約2,500年前に渡来した前期弥生人集団が、稲作にあまり適していない地域への進出をしなかったか、またはこの地域の縄文人勢力との融和が計れなかったことを示唆する。特に南四国（高知）では、A24-Cw1-B54-DR4-DR53-DQ4ハプロタイプの頻度がA24-CBL-B52-DR15-DQ6より高く、A24-Cw1-B54-DR4-DR53-DQ4を特徴とした集団を縄文人（または琉球人）の勢力とした場合、前期弥生人の勢力がこの地へは及ばなかったことを推察させる。それでは、A24-CBL-B52-DR15-DQ6を特徴とする前期弥生人集団がどこから渡来したのか？という疑問に対しては明確な答えはできない。

しかし、北東アジアに由来すると思われる3種類のハプロタイプ、①A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6、②A33-

CBL-B44-DR13-DR52-DQ6、③A24-Cw7-B7-DR1-DQ5については、その分布が若干異なっている。A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6については、韓国及び北部中国に見られるが、他の2種類のハプロタイプは、ほぼ韓国にだけ見られると良いだろう。また、渡来人と関わり合いの深い集団は、おそらく中国北東地方の森林地帯に住み、やがて朝鮮半島に南下したツングース系の人々だとされている<sup>2)</sup>。では、韓国及び日本におけるこれら3種類のハプロタイプの頻度及び分布が異なることから、韓国を経由し日本に渡来したツングース系集団は、数種類の集団が存在した可能性がある。A24-CBL-B52-DR15-DR51-DQ6を特徴とする前期弥生人集団は、中国北東部から朝鮮半島かけて比較的広範囲に居住していた。中でも、朝鮮半島、中・南部地方に居住していた集団は、紀元前8-7世紀には揚子江下流地域から伝来した稲作文化を取り入れ、コメやムギを主食とした農耕社会を営んでいた。しかし、紀元前400年地球の寒冷化に伴い、暖かい土地を求めざるを得なくなりムラをあげて渡来を果たすと推察される。以上が、渡来の第一波、前期弥生人の渡来に関する推察である。この後、第二、第三の渡来の波が日本に押し寄せてくる。この続きは次号で。

#### 参考文献

- 1)宝来 聰 「DNA人類進化学」岩波科学ライブラリー、岩波書店（1997）
- 2)埴原 和郎「日本人の成り立ち」人文書院（1995）
- 3)出口 宗和「古代遺跡発掘105の謎」二見書房（1997）
- 4)李 進熙、姜 在彦「日朝交流史」有斐閣（1996）



## 未成熟mRNAから成熟RNAができるまで

湧永製薬(株) DNA診断薬研究所 川井 信太郎

前回、DNAから未成熟mRNAができるまでについて説明しました。今回は未成熟mRNAから成熟RNAができるまでについて説明します。

### 2. 未成熟mRNAから成熟mRNAへ

前回、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)と、コードしない領域(イントロン)が存在することを説明しました。一般に、哺乳類の遺伝子は平均16kb程度あり、その中に7~8個のエクソンが存在しています。イントロンはエクソンとエクソンの間に存在していて、成熟mRNA(mature mRNA)になるためには、イントロンを切り取りエクソン同士を再結合する必要がありますが、この過程をスプライシングと呼びます。16kbの遺伝子から未成熟mRNA(pre-mature mRNA)が転写され、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(Dystrophin)タンパク質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2,000,000塩基で、60個以上のエクソンからなるような巨大な未成熟mRNAの存在も知られています。このスプライシング、前回説明した5'末端のキャッピングおよび3'末端のポリアデニレーション等をRNAのプロセッシングと呼び、今回は、このプロセッシングの中でスプライシング

について説明します。

スプライシングには、スプライスされる(切り出される)イントロンの種類により下に示すように大きく3種類に分けられます。

- ①未成熟mRNAのスプライシング
- ②前駆体tRNAのスプライシング
- ③自己スプライシングによる未成熟RNAのスプライシング

これらの中で、今回はHLAを研究する中で最も出会う回数が多いと思われる①の未成熟mRNAスプライシングについて説明します。

図1に示すように真核生物は、その名のとおり細胞の中に核を持ち、その核の中に遺伝子が大切に納められています。この核内で遺伝子はイントロンを含んだ未成熟mRNAに転写され、3'末端にポリアデニレーションを受け、5'末端にキャッピングという修飾を受けます。さらに、スプライシングを受けて成熟mRNAとなります。ここまでの過程、核の中で起ります。次にこの成熟mRNAは、核膜を通り抜けて細胞質に移行し、リボソーム上でタンパク質に翻訳されます。この過程については、次回に説

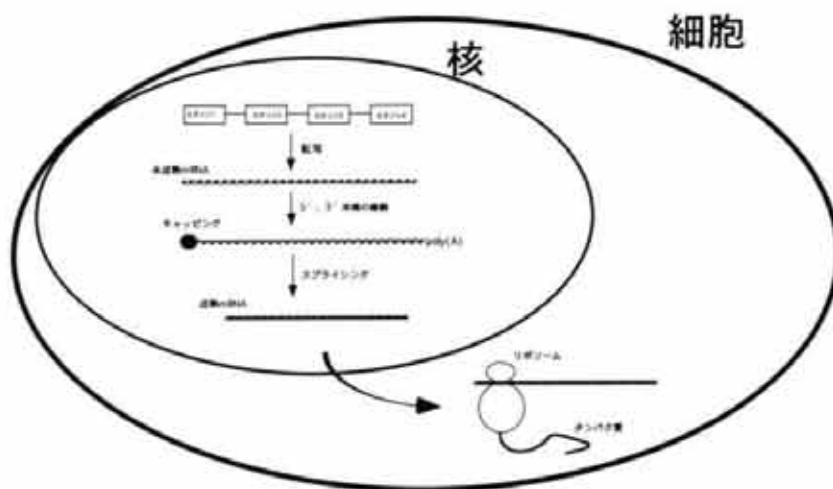


図-1 真核生物の遺伝子の転写と翻訳

明します。

さて、このスプライシングは、未成熟mRNAのどこの部位でもおこるわけではなく、例えば、先程説明した60個以上のエクソンを持つディストロフィンの未成熟mRNAでさえも、正確にイントロンを切り出してエクソン同士をつなぎあわせなくてはなりません。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特徴的な配列があります。



図-2 切断点の塩基配列

す。それを、図2に模式的に示します。

イントロンの5'側の配列はGT (mRNA上ではGU)、3'側はAGというコンセンサス配列(全ての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) といいます。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います。更にイントロンには、コンセンサスなGT-AGほど保存はされていませんが、図2に示すように5'側のGTのすぐ下流の配列にはA (62) A (68) G (84) T (63) の存在が多く、また、3'側のAGのすぐ上流にはC

(65) の存在が多い傾向にあります (カッコ内は出現する頻度 (%) を示しています)。また、エクソンの3'末端 (つまり、5'スプライス部位のGTのすぐ上流) は、A (64) G (73) の存在が多い傾向にあります。さらに、これら以外に、イントロンには3'スプライス部位から18~40塩基上流に8塩基程度で構成されているランチと呼ばれる箇所があり、この中にアデニン (A) があります。このランチ配列は人では完全に保存されているというコンセンサス配列はありません (ただし、Py (80) NPy (80) Py (87) Pu (75) APy (95) という配列が多い傾向にあります。Py=C,T ; Pu=G, A ; N=何でもよい) が、同じ真核生物の酵母ではTACTAAC (mRNA上ではUACUAAC、) というランチ配列の存在が知られています。この酵母のランチ配列は、その配列からタックタックボックスと呼ばれています。

スプライシングにおけるイントロン、エクソン側の役者は揃いましたので、次にスプライシングが起るメカニズムを図3に従って説明します (今回は、エクソン1とエクソン2の間にあるイントロンのスプライシングを例に説明します)。スプライシングは、大きく分けて3つのステージからなっています。まず、未成熟mRNAのエクソン1が折れ曲り、ランチ部分と対をなす形成がおき、エクソンの3'末端とイントロンの5'末端のGとの間が切断されてエクソン1が切り離されます (ステージ1)。それと同時に切り離されたイントロンの5'末端のGとランチ内のAとの間でリン酸エステル結合を形成し、いわゆるラリアット (lariat: 投げ縄) 構造を持つイントロンとその下流のエクソンからなる中間体を形成します (ステージ2)。さらに、次の反応で、イントロンの3'末端のAGの

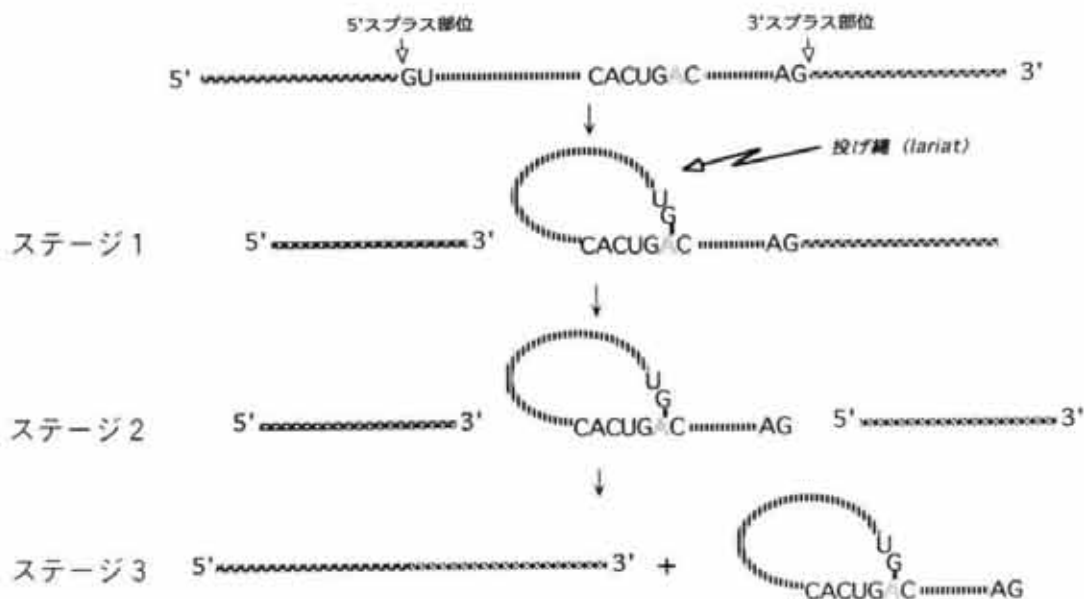


図-3 スプライシングのメカニズム

後ろで切断が起り、前後のエクソンが連結されます（ステージ3）。このスプライシングの反応はスプライセオソーム（spliceosome）と呼ばれるRNAとタンパク質の巨大複合体において行われます。スプライセオソーム上での詳しいスプライシングは、とても複雑なので今回は省略します。

少し横道にそれてしまいますが、よくcDNAという言葉を目にすると思います。このcDNAとは、スプライシングを受けた成熟mRNAを鋳型にして、逆転写酵素（reverse transcriptase：RTとも略される。RNAを鋳型としてDNAを合成する酵素のこと）を働かせて合成した相補鎖DNA（complementary DNA）のことです。この逆転写酵素を用いて得られたcDNAをプラスミドなどのベクターに組み込むことをcDNAのクローニングと呼びます。また、cDNAライブラリーとは、細胞内で転写される約20万分子にもなる成熟mRNAをcDNAの状態にして集めたものことです。

その他知っておくと便利なスプライシングに関する言葉について説明します。

#### 選択的スプライシング（一般的にはオルターナティブスプライシング（alternative splicingと呼ばれる方が多い。）

同じ遺伝子から転写・翻訳されたにも関わらず、そのアミノ酸配列が異なっている場合があります。特に発生や分化の諸段階、あるいは組織特異的な発現においてみられる現象で、図4に組織特異的な選択的スプライシングの例を模式的に示しました。このように、エクソンの特定

のもの同士がつながり合わされたり、あるいはエクソンの中の特定の部位だけが選択的に選ばれて成熟mRNAを作り出しています。このスプライシングの有名な例としては、ショウジョウバエ（*D.melanogaster*）のオスとメスの性の決定は、ある遺伝子のオルターナティブスプライシングによりなされています。

#### セルフスプライシング（self splicing）（前述③）

スプライセオソームのようなタンパク質の関与なしにRNA自身が自分で自分を切断することにより成熟RNAをつくることで、この発見によりスプライシングにはタンパク質が必要であるという常識が根本から覆されました。セルフスプライシングを説明し始めると、それだけで本連載の1回分使ってしまうので詳しくは説明しません。このセルフスプライシングは原生生物であるテトラヒメナのrRNA（リボソームRNA）の研究から発見されました。このほかに、ある種菌類のミトコンドリア、植物のクロロプラスト、藍菌などからセルフスプライシングイントロンが見つかっています。最近、ウイルスの治療の分野で話題となっているので聞いたことがあるかも知れませんが、セルフスプライシング作用を持つRNAのことはリボザイムと呼ばれています。リボザイムに関しては、詳しい本、文献等が多数あるので興味がある方はそちらをお読み下さい。リボザイムは、今後医学への更なる貢献が期待できると思います。

今回は、細胞質に移行した成熟RNAから未成熟タンパク質が合成（翻訳：translation）されるまでを説明します。

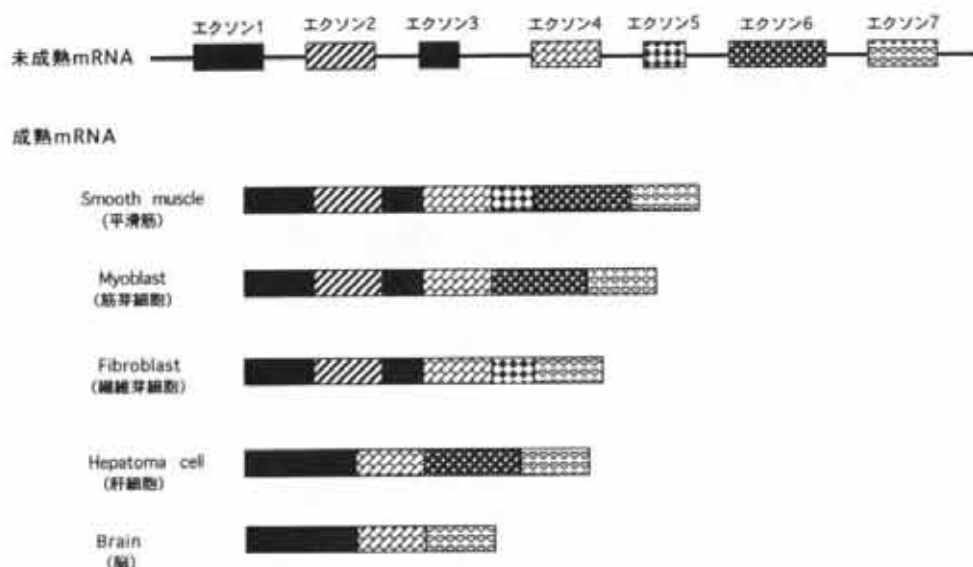


図-4 組織特異的な選択的スプライシングの模式図

## Kidney and liver transplantation in New York

～ A case of Japanese patient K ～ Part2

### 肝移植・・・

「K氏がliver tumorの為に、戻ってくる。今度は肝移植が必要だ。I'm afraid he can't make it this time.」渡米後1年半、仕事は回りはじめ、毎週水曜日の朝7時からラボにいる研究者7～8人が集まってカンファレンスをしていた。何とか自分のいいたいことを英語で表現できるようになっていた私は、Hardyのそのことば(he can't make it)に今度は助からない、というニュアンスを感じとることができた。肝移植が必要ということは外科的には切除不能の進行肝癌ということだ。1年の間にこれだけ進行する癌は移植手術後に使用する免疫抑制剤の影響があったと考えて良い。肝移植の段取りもまだ決まらない1994年6月、K氏は奥さんと年下の従弟(60才)をつれて再びニューヨークへやってきた。マンハッタンのホテルを常宿とし、そこから肝移植では最も実績のあるMt. Sinai Hospital(シナイ山病院)へ通うことになった。とはいえ検査が一通りすんでしまえば、あとは肝移植のドナーが現れるのを待つ毎日となる。ウェイティングリストには、通常肝移植を受けるまでには半年から1年以上の待ち期間、と記されている。この長い時間を本当にホテル住まいで待てるのか、そして果たしてK氏の病状で手術に間に合うのか、K氏には伝えられない不安を僕は感じた。余った時間をK氏は買い物、観光、食事と費やしていく。ラボはその経済的事情から、何人もがフルに活動できるだけの資金が無くなっていて、僕も空いた時間の気晴らしのようなつもりでお見舞いに行くことが多かった。K氏はいつもにっこりとしながら迎えてくれ、「今日はどこへ行こうか?」と聞いてくれた。K氏は、自分が続けられなかった勉強を自分の代わりにがんばってほしいといい、私が20才で父を亡くした話をした後は、父親的存在であろうとしてくれた様子でもあった。一方で私は長い苦勞の人生に果てに糖尿

病、腎不全となり、腎移植を耐え、そして今67才で肝移植のためにニューヨークへ再び出向いてくるK氏の人生を、最後まで見届けてやろうという気持ちになっていた。

K氏は早くもその2か月後夜間に肝移植のため、Mt. Sinai Hospitalへと移った。私は出先から急速病院へおもむき、準備室のベッドで手術時間のくるのを待っているK氏に会うことができた。「おめでとうございませう、がんばって下さい。」「おう。」すでに前投薬されているためか、緊張よりむしろうつろな表情でK氏は答える。奥さんの方が思い詰めた顔をしている。みんなと一人ずつ握手をして、K氏は長い廊下を手術台へと運ばれていった。午前2時45分頃である。

### 運命・・・

翌日午後病院を訪問すると、K氏はICUに入れられていた。驚いたことにK氏はその晩、2回肝臓を入れ替えたのだ。前日見送った後最初に移植した肝臓は、primary graft failure、つまり移植後全く機能しない肝臓であった。執刀医は、その場で同日同時進行で行われる予定であった別の肝移植を中止し、その患者のために用意されていたドナー肝をK氏に再移植したのだ。長時間の手術のあとK氏は人工呼吸器に乗せられていた。何という強運であろう！肝臓のない時間、いわゆる無肝期が数時間続くだけで、それは患者の死を意味する。このニューヨークで、同じ日にたまたまドナー肝がほとんど同時に二つ出て、その肝臓がくしくも同じ病院に運ばれ、殆ど同時に手術が進行し、もう一方の手術がキャンセルされてK氏の体に2番目の肝臓が入れられた。私が夜眠っている間K氏も手術台の上で眠り、私が夢を見ている間に、K氏は人生最大の危機を乗り切ったのだ。殆ど細い糸1本で釣り下げられていた自分のほかない命をK氏は自ら力強



くたぐり寄せ、戦いに勝ってそこで眠っているのである。ICUのナースに聞くと、このように2回連続して肝移植を受ける例はほとんど無いということであった。またウェイトिंगリストに乗ってから手術まで2カ月というのもごく少数であり、たまにアラブのお金持ちなどで聞いただけだという。しかしそれが金の力であれ、運であれ、そのどちらかが欠けていればK氏はもう確実にこの世に存在しない人であったのだ。彼の緊張に満ちた戦いの人生は、この日の手術のためのトレーニングであったのではあるまいか、そう思えるほどのすさまじいのちの総力戦が真夜中に繰り広げられていたのであった。

K氏の回復は早かった。ほぼ2日おきに訪問した私は、赤いジャンパーの宅配ピザ屋が、ICUのK氏に特大ピザを届けるのを見て驚いた。ベッドサイドまで兄さんが運んでくるのである。それを本人、奥さんそして私で分けて食べて、その日の夕食とする。腹部の創のあとはステープラーで留めてあり、ガーゼを付けるでもなく皮膚はむき出しである。厳しく人を入場制限したり、1日何回もガーゼを交換する日本のICUでやっていることは一体何なんなのだろう。日本では全く非常識とされることが、ここでは日常的に行われているのを見て、私は目を見張った。K氏は数日後にICUから出て一般の病室に移った。

## 当直・・・

K氏は調子良く回復していった。しかし彼は夜間一人で病室で過ごすのをいやがり、奥さん、従弟、そしてあの老商社マンに交代で病室に泊まるよう要求した。そしてしばらくすると私にもそのローテーションに加われというのである。私は召使いでも社員でもない。私は彼のわがままのほとんどを好意的に見ていたが、付添婦よろしくK氏の体の向きを変えたり、トイレにつき従ったりすることには強い嫌悪感を覚えた。さらにK氏は1晩につきいくらかうとまで言うのである。私はいやだと言ったものの、他の3人が、日中はエンドレスにK氏につきあい、3日に1回夜通し看護して疲労困憊しているのも分かっていた。この3人にも頼み込まれ、またK氏がこのまま短期間に退院してくれることを期待しつつ、結局私はお金はいらぬ、ボランティアなら協力しましょう、と申し出た。

しかしその後K氏の容態は芳しくなく、むしろゆっくり下り坂となった。夜間2～3回トイレに行くのにも、一人でベッドからは立ち上がれなく、私にしがみつく力も弱々しく、体重をしっかりと預けるような形で、個室内のトイレに移動するようになった。私の役目と言えば、彼が小用を足している間、便器を汚さないよう体の向きを定めて、後ろから腰を両手で支えるのである。そして下半身を露出したままのK氏をまたベッドへと連れ帰る。そして着物の裾を整え、トイレの水を流し、吸い飲みから少量の白湯を口に含ませてまた眠らせるのである。毎度自分の番にあたるたびに、今晚でやめさせてもらおうと思いつつ、3か月間ほどが経過していった。また今晚も当番かと思いつつ、病院へ出向いたある日、K氏は個室を出ていた。しかし退院したのではなく、容態の悪化の為再びICUへと移されたのだった。

この2日前急激に呼吸状態が悪化したK氏は、ICUで再び人工呼吸にのせられていた。むしろ手術直後より全身がむくみ、調子悪そうである。その晩に主治医から容態の説明を受けたが、見通しは暗かった。拒絶か何かははっきりしないが、移植した肝が機能なくなっているということであった。同じ会社の部下でもある従弟は、万一の時のため大阪の会社へ連絡を取り、応援の人員を頼んだ。奥さんは放心状態となり、「なにが悪かったんやろ。」と繰り返してつぶやいている。

病院の玄関で、従弟に呼び止められた。K氏が20歳以上年の離れた若い奥さんとこれまで10年以上暮らしてきたが入籍したのは2年前、つまり初めて渡米する直前であったこと、前妻とは長く別居状態だったが、相手の拒否により長くけじめが付けられない状態であったこと、K氏は自分の死ぬ場合のことをすでに考えており、その後の細かい指示をすでに従弟に出していること、今の奥さんはK氏だけを頼りに生きており、万一の時の奥さんの方が心配なこと、奥さんが会社の役員の人にもなっており、K氏亡きあとは親族からの相当な攻撃が予想されること、それを守るための盾となる役目を自分はK氏から指示されていることなど話は2時間以上にわたって続いた。K氏はこれまでの人生を清算し、長く献身的に尽くしてくれた今の奥さんを入籍させ、新しい人生へ出発を期して、移植を受けにアメリカに渡ってきたのであった。

## そして・・・

12月も半ばをすぎると、私が日本へ帰る日も近づいていた。研究は他の研究者が資金不足にあえぐ中、K氏のバックアップで順調にまともにかけていた。「12月26日に帰国します。」言いにくいけれどK氏の家族にはそう告げるしかなかった。見届けられない寂しさと、下り坂のK氏を置き去りにする後ろめたさのため、自然とうつむき加減になる。奥さんも不安そうな目で、元気にやってくださいね、と返事を返した。「帰国まで7日間、毎日来させてもらいます。」そう言って病院を出て、帰国の荷造りの続きをするために自宅へ向かった。ニューヨークの街は派手なイルミネーションで、今年もまた例年と同じくクリスマス祝っている。2年前リムジンでマンハッタンの中を移動しながらK氏の腎移植成功のお祝いをしたことを思い出していた。

K氏はその日の晩になくなった。

結局あの日の挨拶がK氏の顔を見る最後だった。K氏死亡の報は翌日研究室で最後のデータをあわただしくまとめているときに、Hardy教授から聞かされた。お葬式は明日だという。電話で従弟に連絡すると、あつと言う間に血圧が下がり、そのまま逝ってしまったという。葬式の手配をしているが、お経を読んでもくれる日本人のお坊さんはいませんか、と言う。ニューヨーク便利帳という日本人向けの生活マニュアルを荷物の中から引っ張りだし、市内のいくつかのお寺を紹介した。

翌日のお葬式には日本からの社員も何人か駆けつけていた。お坊さんが日本語と英語を交互に交ぜながらお経を唱えるなか、Hardy教授夫妻はじめ私たちのラボのアメリカ人研究者たちも順番に慣れない焼香をしてまわった。

お骨は茶毘に付されたあと、26日に大阪に帰ると言う。「なんや、一緒の日なんやね。」奥さんがわざと明るく言いながら、涙をポロポロと流した。奇しくも同じ日にアメリカを離れることになってしまった。私は留学という非日常的な環境でK氏と出会い、色々体験した。結果的に彼の最期を見届けることになったが、私の心は無常感で一杯だった。最後まで迫力ある人生を続けたK氏の一等最後の部分に立ち会ったのは



はたして幸せであったか。一人の人生を急ぎ足で一通り見てしまったという思いは、留学生活の終わりという感傷と一緒にあって、私をセンチメンタルな気分させた。苦勞して入ったタウンハウスも今日でおわり、来た年と何の変わりもなく灰色の空に枝を突き出しているハドソン河畔の木立を見、見慣れたマンハッタン風景にひとつづつ別れを告げながら、私は帰国のため空港へ向かった。私の手元にはK氏の寄付金のおかげで完成した、移植に関する大部の論文ひとつと、お供して出かけた先で買ってもらったベルト、靴などの細々したものが残った。

日本での生活が再び始まり、K氏の四十九日も終わった1995年3月、私は仏前にお焼香に出かけた。「先生は勉強だけしとき、日本に帰ったらな、ワシの持つてる上等なお皿の中から一番ええやつ、一つ好きに選んでもっていきや。」K氏には何度かそう言われていた。しかし、美術館を開くほどあると聞かされていた何百というお皿、壺の類は、私たちの帰国直後の神戸の大震災の直撃を受け、ほとんどすべてが壊れ去り、何一つ完全なものも残っていなかった。「なんやあの人全部あの世に持っていったような気がして、かえって気分がすっきりしました。」奥さんのことばに私はつい声を出して笑ってしまった。そういう私につられてか、少し明るさのもどったまなざしで、奥さんも小さく笑いかえした。

## 利己的遺伝子が「利他行動」を進化させた？

— 献血と骨髄と臓器提供のモチベーション

### 「セルフイッシュ・ジーン」

ドーキンスの利己的遺伝子の概念は生物学界に衝撃を与えた。もはや新古典となった彼の発言はこうである（日高敏隆他訳：利己的な遺伝子、紀伊国屋、1991）。ダーウィニズムは自然選択による適者生存を謳い上げたが、その適者とは、その主体はなになのか？ 視点の転換を彼は求めた。生存を争っているのは、実は種ではなく、遺伝子ではないのか？ 遺伝子の本性は、自らのコピーを増やし、自分を生き延びさせようとするところにある。その遺伝子が自分にとって有利なヴィークル（乗り物）として作り出し、進化させてきたのが生物であり種なのである。擬人化すれば、遺伝子は自己の生き残りのみを目的として進化を続けてきたといえる。徹底的に利己的なのである。ドーキンスはオックスフォード大学の動物学教室にデスクをおいている。この教室は多くの進化学者を輩出し、世界をリードし続けた。利他行動の研究はこの教室のメインテーマの一つであり、ドーキンスも利他行動の進化を行動学から研究してきた。

### 利他行動とは

古典的ダーウィニズムが抱えた難問の一つは「利他行動」であった。自然選択は厳格で、わがままで、容赦がない。弱者をいたわらず、苦痛に無関心で、頑健で、元気な、健康なものだけが選択されていく。そのような淘汰圧力によって作り出された生物はその刻印を遺伝子にとどめることになる。その遺伝子が翻訳するものは、闘いに明け暮れ、常に保身と利己を追求し、他人のことなどかまわない、そんな生物像がイメージされる。自然選択では自己犠牲の遺伝子は早くに消えてしまうように見える。自己犠牲は子孫を残す確率を減少させるからである。しかし自然界や人間社会を普通に観察すると、常にそうとはいえない現象をいくつも挙げることができる。動物たちは同種の個体に対して、非常に非利己的に振る舞うことが観察される。生物がなぜ利他的に行動するのか、他個体を助けるために自分の時間や食物、テリトリー、配偶者、ときには自分の命までも捨てるのはなぜか？ 自然選択説では説明が困難であるように見える。集団遺伝学、行動学はその問題を解いた。遺伝子中心に見ていくのである。

### 血縁淘汰

一つは、血縁淘汰である。動物は血縁を見分ける能力を有している。たとえば体臭である。これによって近親交配を避け、前にも書いたようにMHCの多様性を獲得し、かつ利己的遺伝子の存続を意図するために、近縁の遺伝子を共有するものを助けるのである。ビル・ハミルトンによれば利他行動の対象の近縁係数が高いほど自己犠牲の損失が多くと、遺伝子はその子孫を残すことができる。嗅覚を失った人間は近縁関係を認知するために家紋と姓をもつに至った。

### 「囚人のジレンマ」に勝つ戦略：上品、報復、そして広い心

血縁以外の利他行動は互恵的利他行動による遺伝子の伝達によって説明できる。協力が双方に利益をもたらす場合である。そのようなルールは一見、成立しないように見える。利己的ダーウィンの戦略者はそのルールを

守らないかもしれない。その時にはルールを守らない裏切者が最大の利益を得るはずで、その遺伝子が蓄積されることになる。協力は進化せず、裏切りが進化によって定着するはずである。アクセルロッド（なんと政治学者である）とハミルトン（前出、集団遺伝学者、1993年京都賞受賞）が「囚人のジレンマ」というゲーム理論でこれを覆した。詳しいことは成書に譲るが、有名なハミルトンの「報復理論」である。共犯の囚人の双方の裏切りは双方の損失になるが、片方の裏切りは片方の最大の利益と最大の損失を生み、双方の協力はかなりの利益を生む、というゲーム理論である。再会を条件としてゲームを繰り返すと次のような戦略に落ち着き、その場合には協力は進化できる。それが「報復戦略」である。最初は協力し、次は相手の直前の手を真似て報復し、次は水に流して・・・というものである。これを繰り返すと当初は裏切りの犠牲になるが、それでも進化すると同時に、進化的な安定な戦略（メイナード・スミス）になるのである。アクセルロッドの記述がおもしろい。報復戦略の性質に関してであり、それは獲得された性質でもある。

「上品さ=決して最初は裏切らない」「馬鹿にされたら怒る=裏切りに報復する」「心が広い=あとは水に流して協力を再開する」この繰り返しの戦略が最終的には必ず利益をもたらす、というのである。

#### その他の理論

血縁淘汰と互恵的利他行動による選択が、利他遺伝子の進化を説明する2大理論であるが、行動学からさらに二つの理論が提案されている。一つはアモツ・ザハヴィのハンディキャップ・モデルである。簡単に言うと（間違えるかもしれないが）「目立ち屋」さんの自己顕示が結果として利他行動になる、とする。自然界での「目立ち屋」はハンディキャップである。警戒音を発し、敵を引き付け、力と勇気を誇示する、これが結果的に自己犠牲として利他行動になる。このような自己犠牲は性選択の有利性から遺伝子が維持される。

もう一つはドーキンスの拡張表現型としての操作理論である。自己犠牲がその個体の利益にならないように見える真の利他行動もときには観察される（たとえば、カッコウの卵の宿主）。その行動は他個体（カッコウ）の操作によって、'踊らされる' がごとくに表現される。これを拡張表現型の利他行動と定義している。この行動は受益者の遺伝子によって起されるので、当然、遺伝子は利益を得て進化できる。

このように利他遺伝子（複数）は生物に普遍的に獲得されているようである。しかし、同じ種において、その「量」は当然多様である。その量的多様性に応じてドナー・リクルートメントはなされるべきであり、多数派工作は無意味である。ドナーは少数派であり、その少数派のモチベーションを理解したうえでの戦略が必要になる。前にこの欄で書いたように、移植医療の国民的コンセンサスなどというものはナンセンスかもしれない（さ）





# ダイナミック・ラボラトリー

関西医科大学病院 輸血部



福原 資郎部長

—関西医大輸血部は、一口に言ってどんなところですか。

**福原** 私は第一内科教授と輸血部部長を兼任していますが、輸血部は一つの領域の担当部門というよりは中央診療部の中核機関として現在機能しており、Para-Medicalという立場ではなくCo-Medicalという位置付けで発展していくべきだと考えています。輸血部の仕事も最近かなり多様化してきていますが、21世紀に向かって、その中でも一番重要なのは、白血球の問題であり、移植は避けて通れません。当院の輸血部は基幹病院の医療業務の中核となるようその分野を充実していきたいと思っています。

—具体的に移植といえますか？

**福原** 現在は内科での同種骨髄移植ですが、末梢血幹細胞移植を含めて小児科の領域、また、肝移植や腎

本日は、大阪府守口市にあります関西医科大学輸血部にお邪魔しています。関西医大は、早くからHLAを導入され、国際ワークショップに血清提出し、多くの研究発表や、骨髄移植を通じての臨床との深い関わりをもって仕事をしてられる活発なグループです。輸血部部長の福原資郎先生、輸血部主任医師の野村昌作先生、副技師長の石田萌子先生、HLAを現場で担当されている松崎龍典主任にお話を伺います。

移植も視野に入れていきます。全国的に見ると、移植部門や無菌診療部門が独立する傾向にありますが、医者や病棟だけ独立しても進歩は限られています。やはり輸血部を中核にした一本化した形が世界の趨勢として取り入れられていくと信じています。

—大学病院の輸血部として何か特徴はありますか？

**福原** 私は当院に着任してまだ数年であり、現在の時点では、輸血部の医師は野村君だけですが、将来は大学院の学生が輸血部の優秀な技師の人々と交流しながら研究をし、先端医療と研究を共に切り開いて行けたらと思っています。

—この輸血部の素晴らしいところは、それが単なる夢でなく、現実に血小板輸血の際のドクターへのアドバイスといった形で実際の物となっており、また、臨床データを元にした研究発表も多いという点ですね。

**福原** 今は学生に血液学の20単位の中の5単位を輸血学にして、輸血部のドクターや技師さんの協力の元、講義並びに実習をしています。卒業すると専門に別れて行くので、学生の内によく輸血の重要性を理解して貰おうと考えています。また重要なのは、石田副技師長が臨床との接点を常に求めて、それを輸血部の現場にフィードバックするという方針を貫いていることです。これは、当輸血部発足当



初からの方針というか哲学みたいなものなので、その考え方は、技師の人を含めて輸血部全体に脈々と流れています。中央検査部はどんどん自動化され、マニュアル化されて、技師さんや医者が考えることがなくなりつつありますが、疾患というのはそれでは済まないところがあり、検査データをもとに色々な方面から解釈を加えるのは、輸血部の仕事になるのではないかと思います。特に難病と言われる病気や遺伝子治療などに能動的に参加していくのは輸血部の仕事だと考えています。

—では、現場の先生方のご意見を少し伺わせてください。

**野村** 福原部長が全部紹介されたので、何かもう終わったような気分です。(笑い)

**石田** 本当にみんなおっしゃって下さいました。少し歴史をお話しします。当院では1974年11月に輸血部が開設されました。病院は輸血事故から患者さんを守ることを第一目標として、しっかりした組織で始められました。当初より輸血副作用の関係からHLAを重視していましたが、環境が整って検査を開始したのは1977年10月からです。当時はHLA抗体のスクリーニング検査を主に行っていましたが、そこへ第一内科から主任医師として東海大学の辻先生のところでHLAの研究をされていた曾和先生が赴任され、アジアオセアニアワークショップへの参加など、活動が活発化されました。当初は市販の抗血清も少なく婦人科にお願いして、全出産例の分娩血を頂いてHLA抗体のスクリーニングを行って、抗血清としてしようできる抗体を探していました。その頃は輸血副作用の一因とし



石田 萌子先生

てHLA抗体をみる位しか臨床的には貢献しておらず、努力とは裏腹に臨床的应用は長く低迷していました。野村先生が来られた最近になって移植が注目され始め、やっと必要性が認められて使われるようになってきました。

—低迷していたとおっしゃる間にも、第1回アジアオセ



野村 昌作先生

アニアワークショップに始まり、第7回日本HLAワークショップ、第9回国際組織適合性ワークショップ、近畿HLA研究会、等々重要な学会には全て血清提出を含む積極的な参加をされ、ダイナビーズ法やDNAタイピングの導入も早かった。

**石田** 野村先生の前任者の大久保先生が、技師もただ単にルーチンをすれば良いというのではなくて、仕事に興味を持って積極的にやって行くようにとの方針でした。そして、野村先生が来られた頃からHLAの臨床からの要望も増えてきて、より力が入るようになりました。当院では、93年12月に骨髄移植が始まって、DNA検査の重要性も認識されました。臨床からの要望が仕事において何よりも助みになります。

—ここの輸血部の特徴の一つは、技師の方が臨床的にきちっとコンサルテーションされている事ですね。

**石田** 試験管の中だけみていたのでは駄目だというのが私達の考え方で、それには技師の方も、しっかり勉強しなければなりません。当輸血部ではすべての業務がコンピューターで行われているため、医師へ送るコメントも20文字の文章で100種以上用意してマスター登録しています。入職後1年位経つと自分の出したデータに責任を持ち、医師に対しどのようなコンサルテーションが必要かを考え、まずコンピューターに登録されたコメントの中から最も適した文章を選びます。このような練習を積み重ねることで、技師の責任範囲や的確な言葉使いを習得し、自分でコメントの文章を書いたり、本番のコンサルテーションにおいての言葉使いに慣れるようにしています。

—輸血部の人員はどの位ですか？

**石田** 部長を入れて医師2人、技師8人、検査助手1人、事務員1人です。

—この人数の中でルーチンと研究をされるのですね。

**野村** 輸血部としては、研究目的という研究はしてなくて、あくまで輸血業務の副産物として研究として評価できるということをやっています。臨床の側から要望が出て、整理してみると面白い結果があったという物が多いです。

—では、そのようなこちらでのHLAの臨床研究の成果を少しお話し頂けますか？

**野村** まず、疾患感受性で一番早く成果が出たのは原田病です。関西医大の眼科には多くの原田病の患者さんが治療を受けていますので、その検査をしていてデータが集まってきました。原田病は自己免疫疾患でHLAのDR4との相関が有名です。当院での結果もそれをサポートしています。骨髄移植のDNA検査もHLA業務の中心でありまして、症例数が増えてきました。膠原病を中心にした自己免疫疾患では、溶血性貧血を来す症例があり、輸血部の赤血球業務の方のクームステスト等赤血球に対する抗体を持っている症例が増えて、そのHLAはどうなっているのだろうかという事からデータが増えて行きました。また免疫性の血小板減少症についても、少しずつルーチンの合間にやってデータが増えていきました。血小板減少は免疫的なことが原因として言われていますが、明確な原因はまだよく解っておりません。HLAとの関係も言われていますが、以前はフェノタイプで海外のデータしかなく、ABCもDRも日本人にはあてはまらなかったようです。B38やDR2、DR4あるいはDP5などが人種によっては、相関が見られていますが、最近DNAで調べられるようになって、ようやくはっきりした事が言えるようになってきたと思います。これからは、疾患感受性の研究だけでなく、治療に役に立つかどうか重要で、その点では漢方やステロイド、免疫抑制剤とHLAの関係があるかどうか調べられたら役に立つと思います。

—成果は如何ですか？

**野村** 免疫性血小板減少症の患者の中で加味帰脾湯という漢方薬が効くグループと効かないグループのHLAを調べたところ、DR4の中の\*0410に無効の症例が多いという結果を得ました。ただ、もっと症例数を増やさないといけないと思っています。ステロイドの方も\*0410のタイプが効きにくいようです。漢方薬の成分の中にはステロイドと同じような作用メカニズムを示すものがありますので、免疫性血小板減少症では\*0410に治療抵抗性があるかもしれません。

—幹細胞移植はどのような状況ですか？

**野村** 現在当院で行っておりますのは、主に同種骨髄移



松崎 龍典先生

植ですが、最近注目されております臍帯血に関しましても、近畿臍帯血バンクに加入し前向きの方で検討を行っております。もし、臍帯に由来する造血幹細胞がうまく増殖が可能になりましたら、将来的には骨髄移植に代わる方法として期待しています。末梢血幹細胞移植もこれまでは白血病や悪性リンパ腫などの血液疾患が主な対象でしたが、最近はこちらに加えて泌尿器科の精巣腫瘍や婦人科の卵巣腫瘍、あるいは内科の肺癌などの固形腫瘍に対象が広がっています。現在当院では、輸血部統括方式により、セルセパレーターを用いた幹細胞採取から、CFU-GMのコロニーアッセイやフローサイトメトリーによるCD34の測定、そして幹細胞バッグの保存まで業務の一環として行っております。今後は、自己のPBSCTのみならず同種のPBSCTも実施する方向で考えております。

—幹細胞移植に関することはすべてやっております。現場は大変ですね。

**松田** 移植が増えて来たので、より生着率を上げる為に、より細かく分類できるサテライトDNAをもう少し充実させたいと思っています。移植後の生着をより細かくフォローして、GVHDとの関係も含めて臨床の方へ情報を与えて行きたいと考えています。移植以外では、輸血副作用の方で、HLA抗体や顆粒球抗体を調べ、血小板についてはHPAのジェノタイプの解析も行っています。年間約400例のHLAタイピングを行います。内容は血清学的検査からDNAタイピングまで千差万別です。機械的にやるのではなく、臨床側からの要求に応じて一つずつ細かくやっているわけです。大部分が骨髄移植に関連したのですが、腎移植の症例などの検査依頼も来るようになりましたので、病院内の様々な要望に応えているのが現状です。

—現場の工夫やご苦労を話して頂けますか？

**松田** 初めてタイピングプレートをみた時は、美味しそう  
なイクラを思い浮かべました。そのような印象で始  
めたHLAの血清学的検査でしたが、初期の頃は  
DRをストローカラムで苦勞し、その後ベリタスか  
らダイナビーズを紹介され、ようやくうまく行くよ  
うになりました。DNAタイピングにつきましては、  
骨髓移植が病院で開始する一年ぐらい前から準備  
を始めました。現在でもセロでミスタイプがあっ  
て、DNAで確認するケースがやはりいくつかあり  
ますね。とくにDRの5、6が多いようです。うちの  
輸血部では検体がほとんどの場合患者ですから、  
健康人に比べて表面抗原の発現が不十分なために、  
フェノタイピングが困難な場合が多く、どうして  
もDNAの確認が必要となってきます。分離したリ  
ンパ球にリンフォクイックT/Bを使い、ダイナビ  
ーズクラスIIでBセルを取った残りをABCタイピ  
ングに使用しています。この方法だとバックがきれい  
で、レシピエントに適しています。ABCは血清学  
的検査を蛍光で行っています。また、最近A2と  
A24について、ダイナルSSPでDNAタイピングを  
しており、うまくいっています。ビーズを導入した  
ときも、正立の蛍光顕微鏡しかなく、メデイウム  
を吸い取ったりいろいろ苦勞していました。しか  
し、現在のリンフォクイックとビーズに落ち着い  
てからは、だいぶ良くなりました。かなり程度の悪い  
検体でもうまくいくので御勧めです。DNAの方はと  
にかく慎重にかつ正確に抽出するのが大切です。と

にかく粘稠度のあるDNAがよく増幅がかかりますね。  
——どうすれば、そのようなDNAになるのですか？

**松田** 洗浄を丁寧にやって、粗雑に扱わないことですね。  
とにかくDNAのフワフワした状態を崩さないよ  
うに慎重に扱うことが大切です。

——これからGVHD予防の為の放射線照射も含めて、業  
務内容は影らむ一方ですが、ますます多様化し、忙  
しさを増す今後の輸血部の将来について一言お願い  
します。

**松田** やはり、赤血球系は人工血液とかになって行くだ  
ろうし、移植の割合が増えていくでしょう。HLA  
は臨床に直接役に立つデータを出さないと将来は  
ないと思います。

**石田** 赤血球系、白血球系にかかわらず、輸血、移植関  
連検査の全てを輸血部は責任をもってやってい  
かなければならないのですが、要するに輸血医療と  
いうチーム医療の一員として、しっかりと地道な  
勉強と努力によって責任のある仕事をしていき  
たいと思っています。ここ2～3年で輸血部も大きく  
変わってきていますし、専門的な知識を持った技  
師がチーム医療に参加する必要性を強く感じてい  
ます。

——皆さんたくさんのルーチンの仕事をかかえながら、そ  
れでいて勉強を必須と考えていらっしゃる。身体をこ  
わさないように頑張ってください。本日は長時間有  
難うございました。

関西医大輸血部の皆さんは、「病院の輸血部の確かな位置付け」「明確な方針を持った責任者」「臨床と  
検査現場の解る指導者」「目的意識を持って実務をこなす管理者」「優秀で良く働く技師」と、大変素晴  
しい医療チームを編成されています。輸血部24年の歴史を感じました。歴史の中で、情熱をもって組  
織と人を作ってこられた関西医大輸血部の益々のご発展をお祈り申し上げます。







# HLAところ変われば

## マッキー記念病院でのHLA研究

マッキーメモリアル記念病院 (台湾) マリー・リーン



マッキー記念病院は、台湾にあるキリスト教系の私立総合病院で、ベッド数2000床を持ち、現在ではメディカルセンターとして位置付けられています。1872年に台北(タイペイ)地方の淡水(タンシヨイ)に聖ジョージ レスリーマッキーが上陸し、病院を設立してから125年になり、私たちの病院はちょうどその式典を行ったばかりです。

現在まで、台湾ではほぼ全てのHLAタイピングを、輸入した市販のタイピングトレーを用いて行ってきました。1960年から国立科学協議会や保健省により、ローカルの台湾人用HLAタイピングトレーを作製する努力を重ねて来ましたが、台湾には最近まで独自のローカルトレーはありませんでした。アメリカ赤十字や台北血液センターの協力により、血小板フェレーシスドナーのタイピングだけに使用するHLA Class I タイピングトレーが1990年初めに作製されました。

1980年以前は、台湾では少数の国立大学病院が主に腎移植のためにHLAタイピングを行っていました。1988年にマッキー記念病院血液銀行が、腎移植の患者とドナーのHLAタイピングを開始しました。しかしHLAタイピングはすぐに親子鑑定によく使われるようになりました。というのは、親子鑑定では赤血球マーカーだけは不確かな認定となるからです。1988年から1993年の間に調査した169組の親子鑑定で認められた、合計432のHLAハプロタイプが我が国の住民のハプロタイプ頻度を計算するのに適していました。

最も一般的なハプロタイプの頻度と、HLA抗原の頻度を表にまとめました(表1)。連鎖不平衡が最も認められたのは、A2-B46-Cw1、A33-B58-Cw3、A39-B13-Cw6のハプロタイプでした。

表1

HLA class I haplotype and gene frequencies in Taiwan

Haplotype	NO	%	HLA-A	Gf	HLA-B	Gf
A2B46CW1	27	7.9	A11	0.336	B60	0.250
A11B60CW7	20	4.6	A2	0.257	B46	0.134
A33B58CW3	15	3.5	A24	0.167	B58	0.104
A11B60CW3	11	2.5	A33	0.083	B13	0.081
A2B60Blank	9	2.1	A26	0.037	B51	0.049
A11B46CW1	9	2.1	A31	0.032	B62	0.044
A2B60CW7	7	1.6	A30	0.019	B38	0.035
A11B58CW3	7	1.6	HLA-C	Gf	B75	0.032
A2B13CW3	6	1.4	CW1	0.248	B27	0.028
A2B51Blank	6	1.4	CW3	0.215	B35	0.028
A11B27Blank	6	1.4	CW7	0.164	B54	0.028
A11B75Blank	6	1.4	Blank	0.153	B52	0.023
A2B38CW7	5	1.2	CW9	0.122	B55	0.021
A2B38Blank	5	1.2	CW4	0.053	B57	0.019
A11B13CW3	5	1.2	CW6	0.044	B56	0.016
A11B60Blank	5	1.2			B48	0.016
A24B60CW3	5	1.2			B64	0.014
A24B60CW9	5	1.2				
A33B58CW9	5	1.2				
A30B13CW6	5	1.2				

1993年台北で開催されたHLAの国際シンポジウムの期間中に、十字先生やChandanayingyong先生に、市販トレーを使用したHLAタイピングに加えて、HLA抗体スクリーニングを行うようアドバイスを受けました。その時以来、献血センターで女性の献血者からの検体に対して、HLA抗体のスクリーニングを実施しています。将来的には、地域の臨床や研究用の良いタイピングトレーを作製するため、献血者からの血清と共に胎盤血清からもタイピングトレーを作製できることを期待し、胎盤血清を集めることも決定しました。胎盤血清からHLAタイピングトレーを作製するこのプロジェクトに関して、我々は十分な供給源を持っているという点で非常に幸運でした。例えば、我々の病院は年間約4000件の分娩が行われています。また、研究部門も設立されると同時に余分に人々を雇う特権が与えられています。そして、我々のラボは国立健康研究協会と国立科学協議会の両方から継続的に補助金を受けています。しかし、我々の仕事に対して最も手助けとなったのは、日本赤十字社中央血液センターの十分な援助です。抗体スクリーニング用のパネルセルの準備を赤座先生に手伝って頂きました。先生は、1994年の暑い夏、我々のラボで1週間滞在してくれ、過去数年間、我々を訓練して、HLA workshopに出席するよう招待してくれました。

現在、Dr.Chuと研究助手のMiss LeeとMiss Changの3人がHLA専任で働いています。Dr.Chuはコンピューターにも熟練しているので、我々はHLA抗原や抗体特異性を図式や図表で簡単に解析出来る日本赤十字社血液センターのコンピュータープログラムの使用法を最近理解しました。

台湾人には多様性があり、17世紀に到着した福建省や広東省からの移民、第二次世界大戦後に中国本土の全ての省から移住してきた人々、そして、比較的少人数の先住民グループで構成されています。福建省や広東省からの移民の子孫は、主にMinnan ChineseとHakka Chineseの2つのグループに分けられます。台湾の現在の人口は2100万人で、73.5%がMinnan Chineseで17.5%がHakka Chineseです。また、第二次世界大戦後に渡ったChineseは17.5%、先住民グループが1.5%です。台湾の先住民は平地人と山岳人の2つの主なグループに分かれます。平地人は少なくとも10の民族で構成されており、一般的にChineseと結婚してきたと考えられています。山岳人は平地人よりも純血であると考えられ、Ami, Yami, Atayal,

Saisiat, Bunun, Tsou, Paiwan, Rukai, Puyumaの9つの民族グループで構成されています。

これらの民族グループに対して我々が行った赤血球研究の結果から、先住民グループはChineseと全く別個のものと考えられています。1995年に我々はBunun部族の100人の成人の表現型を調べ、その結果を1995年日本赤十字社中央ブロックのワークショップにパネルセルとして提出しました。昨年はAmi, Rukai, Atayal部族のそれぞれ50人の成人の表現型を調べ、同様に1996年日本赤十字社中央ブロックのワークショップにパネルセルとして提出しました。それぞれの部族には次の(表2)に示したような3つの共通のハプロタイプが見られました。

表2

Bunun	Ami
A24 B48 Cw8N	A24 B48 Cw8N
A24 B13 Cw10	A34.1 B56 Cw1
A26 B3901 Cw7	A24 B60 Cw10

Rukai	Atayal
A24 B13 Cw10	A24 B60 Cw10
A24 B61 Cw9	A24 B48 Cw8N
A24 B60 Cw10	A24 B3901 Cw7

今年には1997年のワークショップのために、Yami, Tsou, Paiwan, Puyuma部族から50パネルを集める計画です。

台湾での異民族グループのHLAタイピングに加えて、我々は過去2年間で約5000の胎盤血清をスクリーニングしました。いろいろな特異性の良い血清が同定されました。最近予備的なHLA Class Iタイピングトレーを作成しましたが、まだまだ先は長くなりそうです。SSP法によるHLA Class II遺伝子のDNAタイピングも最近確立しましたので、特定のHLA遺伝子といろいろな疾病との関連に関して興味ある発見があることを期待しています。





## でも分かる **HLA** (3)

### HLAタイピング法の変換と進歩、過去の技術を将来に生かす?!

国立循環器病センター研究所 実験治療開発部 佐田 正晴

1950年代、Daussetらにより輸血患者や経産婦血清中に白血球や血小板の凝集素が発見されてから血液型以外の同種抗原の検索が精力的に行われるようになった事は前号で述べた。しかし当時の白血球あるいは血小板を用いた凝集反応は反応性が非常に不安定で再現性が乏しいという欠点があり、Mac抗原に代表されるような強い抗体以外のセログラムは信頼性が低かった。この技術的不安定さを打ち破ったのがUCLAのTerasakiにより開発された補体依存性細胞傷害試験法で1964年、Nature誌に掲載されて以来、NIHの標準法に採用され全世界に広まっていくことになる。本法はそれまでの技術的不安定さや再現性の乏しさを払拭したが最大の恩恵は、従来の試験管によるタイピング法をマイクロトレイへ移行させることにより血清量や細胞数を微量化し一日のタイピング処理能力を飛躍的に向上させた事にある。その後セミオートメーション化されたマイクロトレイ法は1960年代好景気に湧くアメリカの風に乗る間に世界中に普及し、Terasaki ラボはnew抗原や臓器移植研究の発信基地のみならずHLA学の総本山として現在に至っている。

#### 初期のタイピングってどんなやりかた?

小生がHLAタイピングを始めた1970年代前半は当然の事ながらT/Bリンパ球の分離など行われず、wholeリンパ球を用いたクラスI抗原の同定が行われていた。と言うより当時のHLA業界用語に“クラスI”という言葉が存在せず1975年に開催された第6回国際組織適合性ワークショップで公認された抗原数はHLA-A locus 20種、HLA-B locus 20種、HLA-C locus 5種、HLA-D locus 16種の計51種のみであった。当時、HLA抗血清はUCLAのTerasakiより直接送ってもらっていた。今とは違い抗血清

など個人名義で輸入する人も少なく書類審査などに数日を要し、その間のドライアイス補給などを巡り羽田の税関役人とよく喧嘩をした(役人の頭の固さと融通の無さは何時の時代も同じ)。実際には2mlの末梢血をフィッシャー遠心器で遠心しbuffy coatを回収し抗A、B血液型判定用血清を添加し赤血球を凝集させた後、フィッシャーチューブを用いた比重遠心によりwholeリンパ球を回収するという、非常に短時間かつシンプルな方法でリンパ球浮遊液が調整できた(図1)。あとの過程は通常皆さんが行っているタイピング法と同様に行われる。

#### HLAクラスII抗原の登場

##### 方法と解析はますます複雑化へ

1963年、Bainらは非血縁のリンパ球を混合し培養すると5~6日後にリンパ球由来の巨大な幼若細胞(lymphoblastoid cell)が出現することを見出し、この反応をリンパ球混合培養法(Mixed lymphocyte reaction: MLR)と名づけた。その後Bachらは一方のリンパ球を放射線照射あるいはマイトマイシンで処理したone way MLR法を確立し、同時に非血縁および血縁の組み合わせによる反応性を解析した(図2)。さらに実際の移植症例を用いドナー・レシビエント間でMLRを行いリンパ球の幼若化率と生着率に強い相関があることを示すと同時に、MLRにより刺激される抗原系が血清学的に同定されたハプロタイプと連鎖していることを証明した。ここにMLRで決定される新たなHLA抗原系が登場し、1975年の第6回国際HLAワークショップで6種のHLA-D抗原が承認された。同時にHLA抗原系の解析は複雑化し、その後、日夜われわれを悩ませることとなる。

図1. 1960年代のリンパ球分離法 (UCLA法)

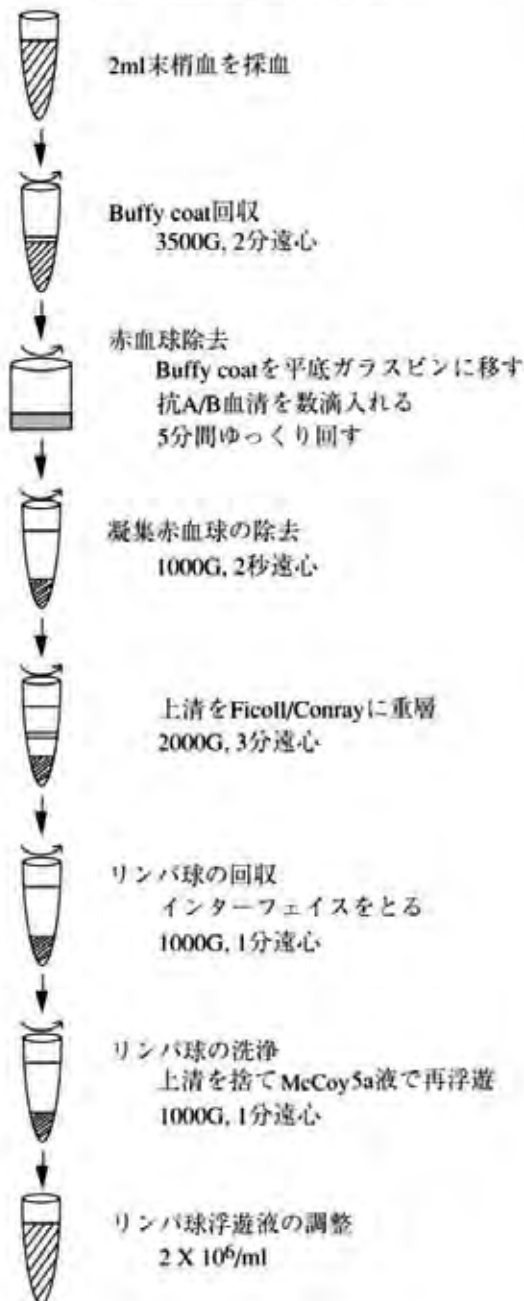
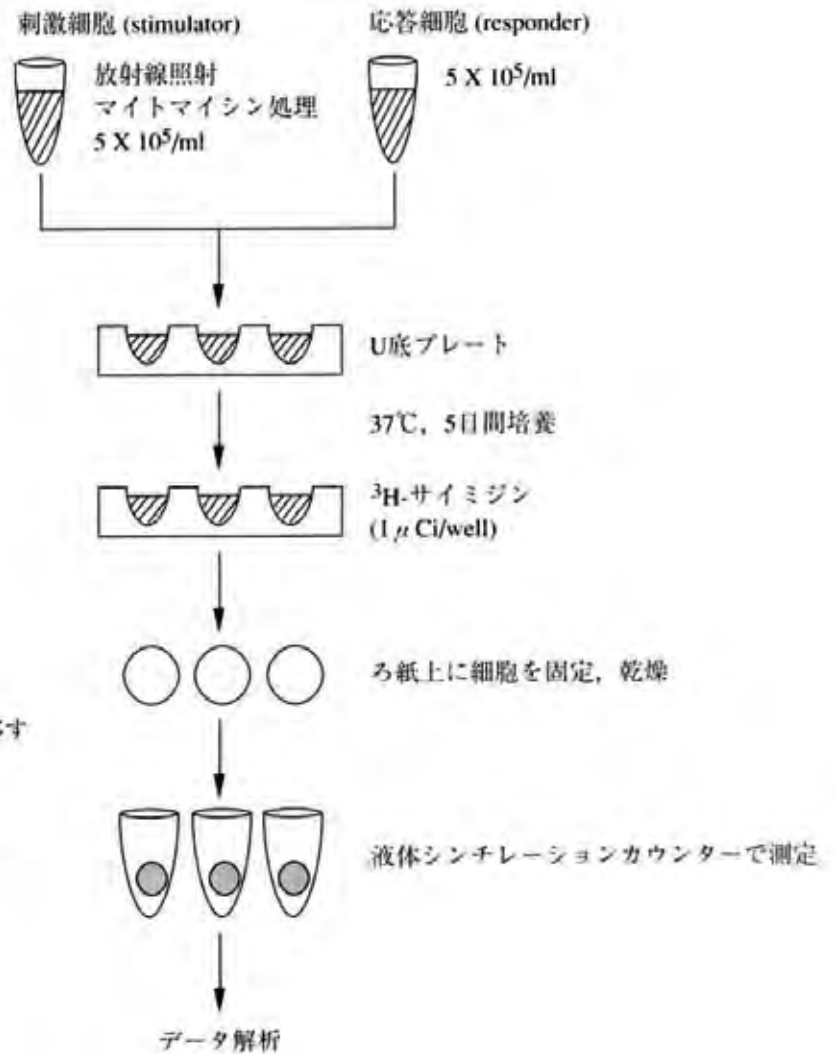


図2. リンパ球混合培養試験 (MLR)



## HLA クラスII抗原の血清学的同定 方法の多様化と精度管理へ

HLA-D抗原の解析に伴いHLA 業界は2つの方法、すなわち血清学的タイピング(serological defined antigens : SD)グループとMLRによる細胞学的タイピング(lymphocyte defined antigens : LD)グループに大別されることになる。この頃になるとD抗原を規定している遺伝子がマッピングされ、MLRの刺激細胞(Bリンパ球)に反応しMLRを阻害する抗体の存在が明らかとなり、抗体を用いたBリンパ球タイピングの可能性が現実となってきた。そしてクラスI抗血清を血小板で吸収してクラスI抗体を除去し、MLRによりD抗原が決定されたBリンパ球を用いることでクラスII抗原の血清学的タイピング法の基礎が確立した。当時はDR抗原とは呼ばれずマウスのIa抗原に相当する抗原としてIaと呼ばれていた。1977年の第7回国際HLAワークショップで初めてDR(HLA-D antigen related antigen)と命名された。このワークショップは日本全体が一致団結し血清の収集やデータ解析を行い“極東に日本あり”を明確にすると共に、それまでの“白人主体型”ワークショップに強烈な楔を打ち込み国際舞台に打って出た記念すべきワークショップとなった。しかしこのワークショップは定員制で行われ、各ラボ2~4名の参加が認められていたが、日本の枠は日本全体で数席しか与えられなかった(この屈辱と、しかし世界最高水準のデータを出せた自信が起爆剤となり、多くの成果が輩出されることとなる)。当時のBリンパ球分離法は羊赤血球を用いたEロゼット形成法(E-rosette formation)が世界の主流で、Eロゼットを形成したTリンパ球を比重遠心法で分離しBリンパ球を、またEロゼットTリンパ球を溶血させTリンパ球を回収していた。当然のことながらBリンパ球の純度は低く常にブライントコントロールを置き精度管理を行っていたが、ロゼット形成は羊赤血球に左右されデータの再現性も悪く、今では考えられないがr valueが0.3-0.5など当たり前であった。再現性の悪さとアッセイ時間の長さに業を煮やした小生は、早々にロゼットに見切りを付けナイロンウールを5mlの注射器に充填しT/Bリンパ球を分離する方法を考案し、ワークショップもただ一人この方法でタイピングを行った。やがてこの方法は1978年にUCLAで開発された“ストローカラムを用いたT/Bリンパ

球分離法”へ発展していくこととなる。現在はリンホティック法やダイナビーズ法をはじめ短時間で非常に純度の高い分離法が開発されタイピングに用いられているのは周知の事実である。抗血清側も従来の同種抗血清に加え特異性の高いモノクローナル抗体も供給され、特にクラスII抗原の同定では完成度の高いDNAタイピングキットが容易に入手可能となり、この業界の技術革新の早さには目を見張るものがある。

## 過去の技術を将来に生かせるか?

第1回国際HLAワークショップが開催されたのが今から丁度30年前の1967年、その時に公認された抗原数はたったの6種であった。この30年で抗原数、特にDNAタイピングが導入されてからallele数ともに天文学的に跳ね上がりつつある。この超加速度的な進歩はHLA抗原系が臓器移植と密接な関係があったことや、HLAが免疫応答の根幹を担っていることが明確にされたことなど、周辺医学領域からのバックアップが背景となっている。HLA領域の技術革新の特徴は実務者自身(HLAテイッシュタイプャー)が必要に迫られ全てを開発してきた、すなわち“必要は発明の母”をまさに地でいっているところが他業種と異なっている。しかし反面、膨大な時間と金をかけた技術も進歩と共に“お蔵入り”の運命にある(事実、上述の技術の大多数はお蔵入り、またはお蔵入りの運命にある)。つい最近まで生体腎移植の重要な検査であったMLRを行っている施設は現在殆ど見あたらないし、DNAタイピングの普及にともないDP抗原が簡単に同定されるようになりPLT(Primed lymphocyte test)は影を潜めてしまった。

“ローマは一日にして成らず、されど崩壊には一日を要さない”感である。8000年の樹齢を誇る縄文杉でも、切り倒すのに数分とかからない。小生この頃思うに、これらお蔵入りした技術をこれからの実験や研究に生かせないか考えている。新しい研究を企画するとき実験技術が確立していればその研究の8割は完成で、あとはそれに則り実験しまくればデータは自然に出てくる。個人的には現在研究している異種移植の実験など良い例で、ヒト-異種ドナーとの免疫反応や異種抗体の解析など“お蔵入り”した技術が活躍している。皆さんも“温故知新”に考えを巡らせるのも一考ではないだろうか。

# 生き証人シリーズ 第3回 “シャントは命のつな”

平川 政江

皆さん、お褒りございませんでしょうか

私は家で暮せる生活がいかに幸せなことかとおつくづく感じております。昭和60年10月2日に初めてシャント手術を受けて11月から透析を始めてからは、幾度入退院を繰り返したか解りません。入院をすれば必ず手術という痛い思いをさせられます。最近では一度手術室に入れば2～3カ所は切るという有様です。段々とシャントを作りにくい所に作らなければならなくなって来たのと血管が細くなって来ているからです。やっと作れたシャントも透析中に静脈圧が上がり、取れも悪く、何とか透析が出来ているという様な状態でした。血液検査データも悪く全身がかゆくて背中などは掻きむしってシャツに血がつく位でした。痒くなってくるとイライラして夜中も起きて掻きむしっておりました。すぐに目が覚め、ぐっすり眠りたいと思っても、眠ることが出来ない日々が続いておりました。

そして、平成7年の1月20日又シャントがつまりました。早速入院です。透析のためのWプーメンを入れなくてはなりません。何人もの先生が来て下さり、やっとの思いで入ったWプーメンも内出血で首が丸太棒の様に腫れ上がってしまいました。それでもシャント手術が行われ、また3カ所切りました。ひどい腫れが少し引いてからは、1kgの砂袋を使って、腕の運動を2ヶ月間続けましたが、そのシャントは一度も使うことなくつぶれてしまいました。それで次に受けた手術は人工血管をうめ込む手術でした。人工血管をうめ込むとあとの腫れがひどく使えるようになるまでまた2ヶ月ほどかかりました。これでしばらく家に居られると喜んでおりましたが1ヶ月も保たずにつぶれてしまい、透析が出来なくなりました。また入院です。今度はWプーメンが入れられず左足に外シャントを作り歩くことが出来なくなりました。それで透析は出来るようになりましたが、シャント手術がなかなかしてもらえません。

そんなある日、井上病院の院長先生から血管移植の話を知りました。私と同じB型の血管があるという事で7月27日循環器病センターで手術を受けることになりました。

血管移植という言葉も初めて聞く言葉ですし、どんな手術なのか解らずとても不安な気持ちでした。センターへ入院すると高本先生が来て下さり、いろいろ説明して下さいました。私が日本で3人目の血管移植者であることとか、今は保険もきかず先生方の熱意で支えられているということ、また、血管の入手が難しいこととか、分りやすく話して下さいまして安心して手術を受けることが出来ました。

あれから2年、アログラフトは元気に流れております。透析患者にとってシャントは命のつなです。辛い透析でも穏やかに時間を過せます。しみじみと血管移植を受けられたことを感謝いたしております。私のように、いや私以上にシャントに悩み苦しんでおられる方がたくさんおられます。私の「血管移植の会」にもたくさんの方が申し込まれて順番を待っておられます。保険がきくようになって、誰もが1日も早くシャントの悩みから救われることを願っております。

そんな願いから「血管移植の会」を結成しました。メンバーは、シャントでさんざん悩み苦しんだ末、血管移植に巡り会えた人達です。私たちメンバーは微力ながら血管移植手術がますます増えて、たくさんの方が救われるようになることを祈って、力を合わせて歩んでいます。

体は病んでいても、心まで病んではいけないというのが私の心情です。家族にはこれからは幾度となく心配をかけるかもしれませんが、私は私の命がある限り、生かされる限り、精一杯、頑張って幸せな人生を送りたいと思っております。そして、その命の尽きるときが来たら、世間の皆さんと主人に“ありがとう”と行って去って行きたいのです。ですから、今は思い出をいっぱい作りたいのです。今苦しいことも思い出になる一コマと自分に言い聞かせて、出来る限り笑顔で暮して行くことを心がけております。何事も一生懸命の人生でありたいと願っております。病を持つが故に、人の痛みや苦しみが解ると人が言います。私もそのようにありたいものです。

合 掌

## DYNABEADS を用いたcrossmatching について

東邦大学医学部附属大森病院 輸血部 奥田 誠

腎移植に携わっている施設であれば、移植前検査のリンパ球交差試験を行った経験があると思います。腎提供者から大量の血液を採取して、リンパ球を分離するのでありますが、失敗が許されずかなり緊張されているテクニシャンの方も大勢いることと思われます。一つの判定および技術のミスが、提供者および患者さんに直接影響してしまう検査だからです。

検査を行う際には、いかに良質にかつ細胞数も十分に分離することに注意を払う必要があると思われます。細胞数を多く分離することは、採血量にも依存しますが、提供者にかなりの負担をかけることにもなります。また、良質の細胞を採取するためには、手技的にもかなり熟練が必要とされます。我々の施設では、比較的早期にDYNABEADSを採用し、HLA typing や、リンパ球交差試験（以下crossmatching）にも応用しており、患者さんおよび提供者からの採血量の減少と、分離後の細胞のviability 保持、検査時間の短縮を目的に行っております。

### DYNABEADS とは

皆さんご存じの通り、DYNABEADS は、均一なポリスチレンビーズで可磁化物質 ( $Fe_3O_4$ ) が親水性ポリマーで覆われています。直径  $4.5 \mu m$ 、CV5% 以下、比重 1.5、磁性率  $10^{-3} cgs \text{ units}$ 、表面積  $3.5 m^2/g$  であります。HLA class I ビーズは、ビーズ表面に CD8 モノクローナル抗体をコーティングしてあり、HLA class II ビーズには、 $\beta$  鎖モノクローナル抗体がコーティングしてあります。それぞれビーズの粒子数は HLA class I ビーズが  $1.64 \times 10^6$  個/ml、HLA class II ビーズは  $3.98 \times 10^6$  個/ml に調整されています。

### リンパ球の回収率について

CPD 加採血 10ml よりナイロンウールを用いた T、B 細胞分離後および HLA class I ビーズ、HLA class II ビーズを用いた場合の回収率を求めました。

CPD 加採血 10ml より得られたリンパ球は、平均  $4.97 \times 10^6/ml$  でありました。ナイロンウールを用いて分離された T 細胞は  $32.3 \pm 9.5\%$ 、B 細胞は  $2.5 \pm 0.9\%$  でありました。

DYNABEADS を用いた場合は、T 細胞 (CD8+) は  $9.4 \pm 1.5\%$ 、B 細胞は  $4.1 \pm 1.9\%$  でありました。(図1)

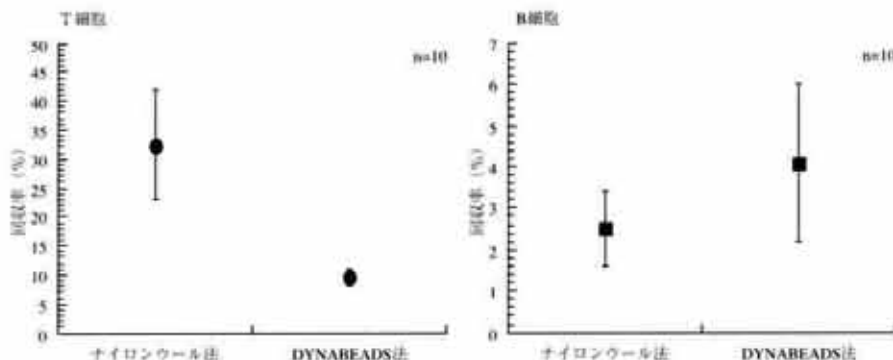


図1 リンパ球の回収率の比較



### 分離法による感度の比較

CPD加採血10mlよりナイロンウールを用いたT、B細胞分離後およびHLAclass I ビーズ、HLAclass II ビーズを用いた場合の感度について比較しました。

T細胞には、人由来のHLA陽性血清、B細胞には、人由来のDR陽性血清を用いて抗体価を比較しました。

T細胞はナイロンウールを用いた分離法で、平均力価が50.3倍、HLAclass I ビーズを用いた分離法では、平均力価61.7倍でありました。B細胞は、ナイロンウールを用いた分離法で、平均力価が27.6倍、HLAclass II ビーズを用いた分離法では、平均力価28倍でありました。(図2)

### 分離直後のリンパ球viabilityの比較

ナイロンウール法で分離された細胞のviabilityは、T細胞97.7±1.24%、B細胞92.6±3.1%でありました。DYNABEADSを用いて分離した場合は、T細胞98±1.9%、B細胞95.7±3.3%でありました。(図3)

### 当院でのDYNABEADSを用いたcrossmatching

上記に記載した検討結果より、リンパ球回収率、反応性、viability、経済性などを考慮し、当院では、CPD加血液10mlよりB細胞のcrossmatchingとしてHLAclass II ビーズを用いてポジティブセレクションし、残った細胞をT細胞としてcrossmatchingを行っております。(図4) (表1) (次ページ)

従来ナイロンウール法で分離反応させ、判定に至るまでの所要時間は約330分必要としていましたが、DYNABEADSを用いることで分離時間および反応時間が短縮出来、所要時間は約195分で行うことが可能になりました。(当院マニュアルにて)

分離作業を行うことで注意すべき点は、HLAclass II ビーズを添加する際リンパ球を十分氷冷中で冷やすことが重要になるかと思えます。十分に冷却することでモノクローナル抗体とリンパ球の反応性の向上が認められ、また

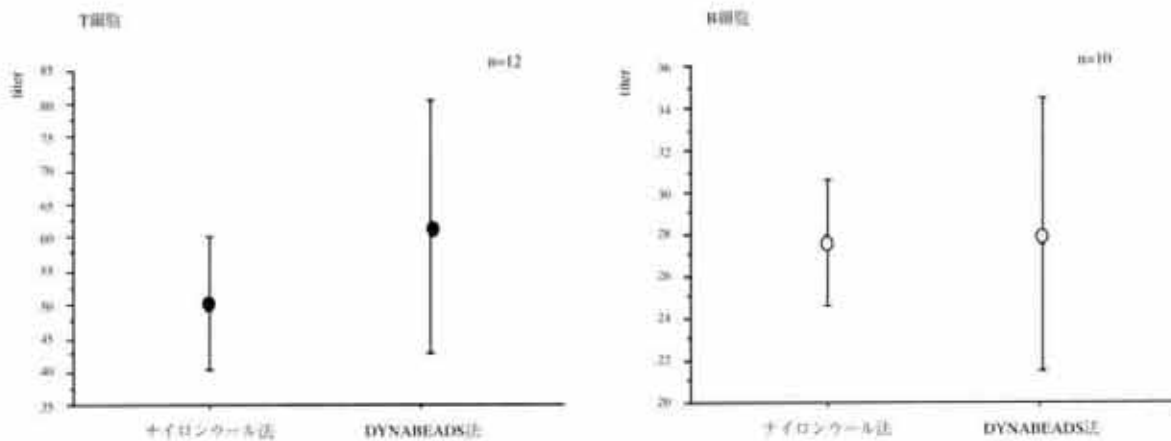


図2 感度の比較

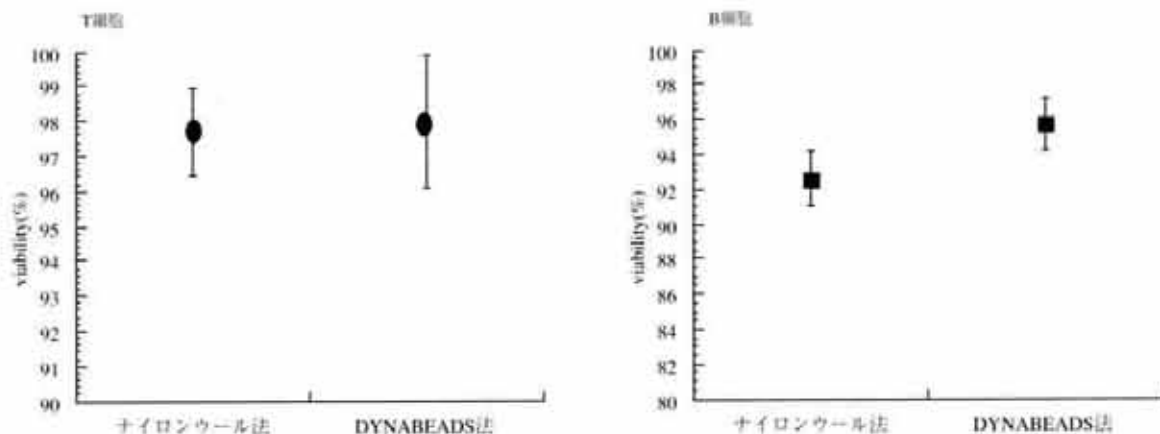


図3 viabilityの比較

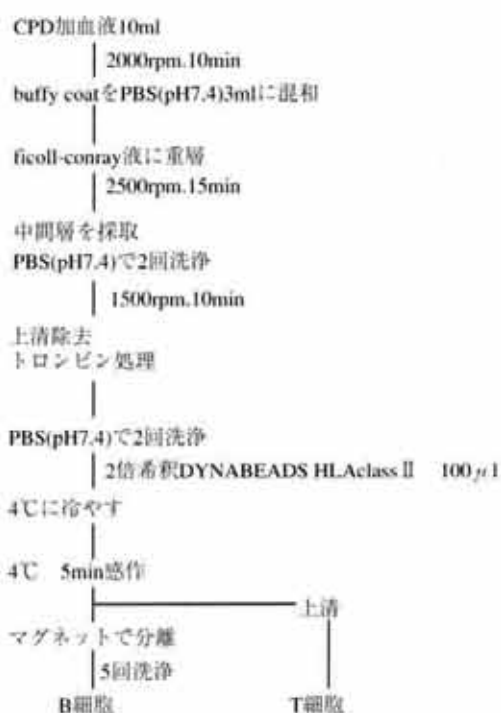


図4 当院DYNABEADS法

標的以外の細胞の取り込み現象の防止にもなります。

氷冷中約5分間リンパ球にHLAcass II ビーズを反応結合させますが、その際、静かにローリングさせ物理的な衝撃を与えないように注意します。反応後、冷却されたPBS (pH7.4) によりビーズを十分に洗浄する必要があります。この操作により標的以外の細胞が取り込まれた場合にも除去が可能となり非特異的な反応を防止することができます。洗浄の際にもビーズに衝撃を与えないよう静かに行うようにします。

リンパ球の絶対数が少ない場合には、HLAcass II ビーズは特に粒子数が多いため、反応後鏡検の際、視野をフリーなビーズが妨げる場合があります。患者さん、および提供者の細胞数を事前に把握することが必要で、反応させるビーズの濃度も各施設で考慮し検討する必要があります。

以前「DYNABEADSを用いたcrossmatchingは、判定の際、弱い反応を取り難いのでは？」と言う質問がありましたが、蛍光二重染色 (A.O, E.B) を用いることで反応性が明確となりますし、またリンパ球とビーズを反応させた後、十分にPBSを用いて洗浄することで非特異的な反応は回避出来ると思われまます。また、また先にも述べたようにフリーのビーズによる視野の障害にならないよう細胞数とビーズの濃度を考慮すべきであると思われまます。

表1 3法の消耗品などの費用の比較

	当院DYNABEADS法	ナイロンウール法	DYNABEADS法
採血用ガラス管	1本 (30円)	3本 (90円)	1本 (30円)
分離用ガラス管	4本 (92円)		2本 (46円)
ファルコンチューブ		10本 (680円)	
フィッシャーチューブ	5本 (110円)	6本 (132円)	2本 (44円)
ナイロンウール		40mg (14.4円)	
ストロー		1本 (20円)	
マッコイ5a メディウム	400 $\mu$ l (6円)	78ml (1170円)	400 $\mu$ l (6円)
フィコールコンレイ比重液	3ml (114円)	9ml (342円)	
pH7.4 PBS	40ml		32ml
100単位トロンビン	1滴	1滴	
蛍光色素 (A.O, E.B)	各20 $\mu$ l*		各20 $\mu$ l*
エोजン、中性ホルマリン	T細胞のみ	T細胞、B細胞	
カバーガラス	1枚 (9.5円)	2枚 (19円)	
クエンチング液	使用		使用
ダイナビーズclass I 用			100 $\mu$ l (1000円)
ダイナビーズclass II 用	50 $\mu$ l (1125円)		100 $\mu$ l (2250円)
合計	1486.5円	2467.4円	3376円

( ) 内は市販価格より算出  
\*補体1mlあたり

# 質問?コーナー

回答いただいた先生

国立循環器病センター研究所

佐田 正晴

## Q1. 毛髪、爪からのDNA抽出法について詳しく教えてください。

国立・病院 匿名希望さん

通常我々は白血球、培養細胞や臓器、組織細胞などに代表される有核細胞を用い高分子DNAを抽出しHLA DNA typingやウイルス診断などに用いています。しかし毛髪や爪からもDNAを抽出し検査や研究などに用いることが出来ます。以下に毛髪および爪を用いたDNA抽出法の原法を示します。原則的には細胞、組織からのDNA抽出法に準じています。

### 1. 毛髪からのDNA抽出法

#### 1) 試薬

- Digestion buffer
  - 10mM Tris-HCl (pH 8.0)
  - 10mM EDTA
  - 50mM NaCl
  - 2% SDS
- 1M DTT (dithiothreitol)  
1mM酢酸ナトリウムに溶解しpH 5.2に調整後、凍結保存
- 10mg/ml Proteinase K
- 25:24:1=Phenol/Chloroform/Isomyl alcohol
- 5M NaCl
- 100% Isopropanol
- 70% Ethanol

#### 2) 抽出法

- 毛根付き毛髪を採取する
- 毛髪を滅菌蒸留水で洗浄する
- 毛髪をエタノールで洗浄後、滅菌蒸留水で再度洗浄する
- 20 $\mu$ l DTT溶液、15 $\mu$ l Proteinase K溶液を添加した0.5ml Digestion bufferに毛髪を入れる
- ウォーターバスで56 $^{\circ}$ C、数時間反応させる
- 高速微量遠心器で10,000G、1分遠心する
- 上清を新しいチューブに移す
- 以下の操作は第11回国際HLAワークショップ法に準じるPhenol/Chloroform/Isomyl alcohol処理、IsopropanolによるDNA析出、抽出されたDNAの洗浄と処理

### 2. 爪からのDNA抽出法

#### 1) 試薬

- Digestion buffer

10mM Tris-HCl (pH 8.3)

50mM KCl

0.45% NP-40

0.45% Tween 20

0.01% Gelatin

- 1N NaOH
- 10mg/ml Proteinase K
- 10% SDS
- 25:24:1=Phenol/Chloroform/Isomyl alcohol
- 5M NaCl
- 100% Isopropanol
- 70% Ethanol

#### 2) 抽出法

- 爪を採取する
- 採取した爪を1x2mm片に細切する
- 細切した爪を1N NaOHで洗浄後、滅菌蒸留水で洗浄する
- 7.5 $\mu$ l Proteinase K溶液、25 $\mu$ l 10% SDS溶液を添加した0.5ml Digestion bufferに爪を入れる
- ウォーターバスで37 $^{\circ}$ C、12-24時間反応させる
- 以下の操作は第11回国際HLAワークショップ法に準じるPhenol/Chloroform/Isomyl alcohol処理、IsopropanolによるDNA析出、抽出されたDNAの洗浄と処理

尚、抽出したDNA中のRNAを除去したい場合には下記方法により行います。

- 1.10mg/ml RNase A溶液を最終濃度100 $\mu$ g/mlになるようにDNA溶液に加える
- 2.ウォーターバスで37 $^{\circ}$ C、30分-2時間反応させる
- 3.再度DNAを抽出する

毛髪、爪を用いる最大のメリットは被検者に全く侵襲を与えずに検体を採取できることです。特に新生児や乳児など採血量が限られている場合に有効と思われます。毛髪は犯人が現場に残した有力な遺留品として今や犯人同定には欠かせないものとなっています。最近、7000年前の古代人やエジプト、奥州伊達家3代のミイラより採取された毛髪や皮膚の一部を用いHLA抗原が同定されました。欧米では“前生体材料”を用いた遺伝子解析が盛んに行われ“Ancient DNA”なる本まで出版されています。これからは毛髪、爪をはじめ口腔内粘膜など簡単で非侵襲的なサンプリングによる検査や研究が益々重要になってくるでしょう。