

EFI道中記 (European federation for immunogenetics)

東海大学医学部分子生命科学系

成瀬 妙子

はじめに

第12回のEFI European histocompatibility conferenceは、1998年3月25日～27日の3日間フランスのストラスブールにて開催された。私は12th IHWSに続いて、幸運にも再びフランスを訪れることが出来た。どうやら12という数字に縁があるらしい。少女の頃読んだ萩原朝太郎の詩集に、「ふらんすにゆきたけれども、ふらんすは、あまりにとおし」なんてのがあったけれど、いまやフランスはカルチャースクールのおばちゃん団体まで気軽に行けるところらしく、パリに向かう飛行機の中ではおばちゃんパワーに圧倒されっぱなしの12時間であった。パリから乗り継いで約1時間でストラスブールに到着。機内放送で、気温は1℃と知りびっくり。我々の到着前日には雪が降ったらしい。ストラスブールはstrasse (通り) bourg (街) の名の通り、ドイツとフランスの国境にある街で、今でこそEU本部などヨーロッパ地域の主要な団体が存在しているが、かつてはドイツになったりフランスになったりしていたので外見上はあまりフランスらしくない。会場は趣のある旧市街から約2キロほど離れた、Palais de la Musique et des Congress Entree Schweitzerで行われ(写真1)、カンファレンスの内容は、大きく1. Plenary session, 2. Teaching session, 3. Abstract session の3つに分かれており、さらに移植、疾患感受性、タイピング、遺伝子構造などのサブテーマに分類されている。私もいくつかの情報をゲットしてきたので皆様にご紹介したい。



写真1 学会場の前で、佐田先生と

1. Plenary session

1) "The MHC club" by J. Trowsdale

主にHLAクラスII領域についてのシークエンスを行い、DM, TAP, LMPなど抗原提示に重要な役割を果たしている遺伝子群を発見しているTrowsdaleが、Cambridge大学に移籍してからの仕事も含めて話してくれた中でのトピックスは、TapasinがHLA-DPのセントロメア側に位置することを突き止めたことであろう。Tapasinは、最近その存在が明らかになった物質で、48kDaの糖タンパクである。クラスI抗原提示においてTapasinはTAP1/TAP2複合体に結合して、分子シャペロン様物質として機能することが知られていたが、最近、このTapasinがクラスII領域のHKEのセントロメア側50-100kbのところに存在することが明らかになった。これでTapasinは文字どおりThe MHC clubへの仲間入りを果たした。

2) "The relevance of HLA matching in organ transplantation" by G. Opelz

移植に関するセッションでは、Opelzが1997年末までの非血縁者からの臓器移植施行例について予後調査を行ったところ、肺移植では0～2ミスマッチの患者の3年後の生着率は約60%で、特に大きな差は見られなかったと語った。腎移植では従来通り、A, B, DRB1の一致が重要で、DPB1のミスマッチは予後にはほとんど影響していなかった。ところが、一度移植腎を拒絶した後に再移植を行った場合、5年後の生着率は、DPB1の0ミスマッチが80%であるのに対し、2ミスマッチでは60%に低下しており、再移植の際にはDPB1の一致を考慮する必要があるという。これは一次刺激により感作を受けたDP抗原に対する記憶細胞が、再移植片のDP抗原を認識して増殖を起こしているのではないかと推測できる。

2. Teaching session

1) Class I DNA typing

ここではM. Bunce, K. Gagne, J.D. BignonのPCR-SSO、PCR-SSPスペシャリストが座長となり、クラスIタイピングのテクニックと、現状について討論を行った。現在EFIメンバーの中で最も用いられているクラスIタイピング法は、PCR-SSO、PCR-SSP、SBTなどであるが、SBTについては別のセッションが用意されていたので、ここでは主にSSO、SSPについて述べられた。SSO法では現在、A, B, Cの各領域でのタイピングが可能になっている(表1)。従って一応は

表1 クラスI DNA タイピング PCR-SSO法に用いるプローブ数とその認識箇所

Locus	Number of Probes	Target position
A	37	14
B	37	17
C	22	9

SSO法でのクラスI高精度タイピングが可能になっている。加えてreverse dot blot SSO法によってもタイピングが可能であるが、SSO法はやはりクラスIIと同様に多数検体に向いており、少数検体の高精度タイピングにはコストや時間の面から見て、厳しい状況であるようだ。実際、ヨーロッパで完全に導入している施設はそう多くはなかった（会場に向かって、現在導入している所は?との間に挙手した人は結構少なかった）。

SSP法については、第12回のIHWSでもARMSが導入されたように、ヨーロッパの施設ではすでにおなじみとなっている。タイピングキットなども発売されているので、A、B、Cの各領域で、高精度タイピングが可能となっている。SSP法で問題となったのは、やはり結果がPCRの条件により左右されることである。中でもどの領域においてもfoles negativeがたびたび出現すること、特にコントロールプライマーによるSSPプライマーへの抑制の結果引き起こされるfoles negativeが多々存在する事が問題となった。対策としては、Tween 20の少量添加が有効だそうだ。蛇足ではあるが、このセッションでは、ベリタス社O女史がPCRバッファーについて、私がABI7700を使用した電気泳動いらずのHLA-Cタイピングについて発表した（発表後、Oさんはスターのように皆に取り囲まれ、質問攻めにあっていた）。

2) SBT

SBTのセッションで、最初に触れられたのが名称のよびかたである。SBTがsequencing-based typingなのか、sequence-based typingであるかということで、現在は両方の呼び方が用いられている。もともとはABIからsequencing-based typingとして始まったが、今回の話では、どちらでもよいということであった。なっとく。さて、ヨーロッパ地区でSBTを導入している施設は15施設ある。機器については、現在ある4社のうちABI 10/15施設、ALF 5/15施設で、他2社は使用施設0であった。ABIではクラスIのAタイピング用キットを発売したこともあって一歩リードしている感があるが、各社共に苦勞している点はいかに高品質の鋳型DNAを得るかということである。各塩基の波形は美しくなければ解析ソフトが認識できないため、高品質なPCR産物が必要となる。シークエンス反応の鋳型となるPCR産物の精製については、これまでさまざまな精製方法が試みられてきたが、やはりTaq FSPolymeraseという、シークエンス反応用に開発された酵素を用いることによって、低バックグラウンドの維持が可能となっている。

また、SBTの精度について、一部の施設ではPCR産物をク

表2 PCR-SSP クラスI キットの検討結果 (N=50)

Locus	DYNAL			Pel-freez		
	A	B	C	A	B	C
Discrepancies	1	0	0	2	0	0
Failure	1	6	2	5	7	1

ローニングして用いることを推奨しているようである。が、個人的な意見として述べれば、どのようなタイピング方法も、クローニングすれば良い結果を期待できるわけで、しかしそれをやると時間的な問題が解決できない。特に移植時の組織適合性検査の場合には時間とコストの削減が要求されるので、どのような場合にもクローニングが有効なわけではないであろう。

3. Abstract session

このセッションで目についたのは、クラスI DNA タイピングと血清学的検討である。そのうちほとんどがARMSに関するものであるが、Anthony NolanのF. Jordanは既知血清学的タイピングのパネルを用いて、DYNAL社およびPel-freez社両者のクラスI A,B,Cタイピングキットについて検討を行っていた。結果は表2に示した通りで、特にB遺伝子でのミスが目立つようである。

それから

ディーナーダンスパーティーでは、髪の毛振り乱して踊り続ける他国の人々をよそに、ただひたすらフランス料理を食って、ワインを飲んだくれる日本人となり、現在の体型が彫作られた(写真2)。そして学会終了後、私は少しだけみちくさをくって、バリの美容院で髪の毛を切ることにした。フランス語が話せないで、フランス人美容師と日本人が英語でやり取りをした。鏡を見ながら、途中睡然となる。こんなワカメカットでは、日本に帰れない！だがしかし、それからが素晴しかった。彼は素早い手つきと素晴らしい技術で、私がこれまで見たこともないような美しいカットをしてくれた。あのワカメカットは基礎の土台作りだったなんて！日本の美容院では2回も切るなんてこんな面倒なことはやらないと思いつつ、何事においても、地道な基礎作りが大切ということを実感してきた。さっそく明日の実験に還元せねば。それにしても、アルザス産ワインとともにいただいた生牡蠣は、あまりに美味しくてSt-Maloを思い出してしまった。次回も牡蠣のシーズンをお願いします。次回のEFIはクレタ島だそうだ。果たしてクレタ島に牡蠣はあるのか？

写真2 ダンスパーティーの折、Dr.Marcel Tiranusと



第7回日本組織適合性学会大会 シンポジウム「MHCの進化と多型性の形成」の概説

防衛医科大学校検査部

小林 賢

第7回日本組織適合性学会大会は、平成10年7月16、17日の二日間にわたって開かれ、2つのシンポジウムと1つのワークショップが催された。私の責務は、初日に催された「MHCの進化と多型性の形成」と題するシンポジウムで講演された大野乾先生と根井正利先生の演題について、その内容をまとめることである。大野先生は、MHCの進化で、いつ頃どのようにしてMHC遺伝子を獲得できたのかということ、また、根井先生は、MHCの多型性がどのようにして形成されたのかということ、それぞれ30分ほどで講演された。

まず、最初は大野先生の講演された「なぜ有顎脊椎動物だけが免疫機構を獲得し得たのだろうか」という演題について、その内容をまとめることにする。

液性抗体、T細胞抗原レセプターとMHCクラスI、II抗原をもつ免疫システムは、有顎脊椎動物のみにみられ、脊椎動物でもヤツメウナギ類、メクラウナギ類などといった無顎類にはみられない。ではいったい何故、有顎脊椎動物だけがこのような免疫システムを獲得したのだろうか。有顎脊椎動物以外の生物がどのような生体防御機構を持っているのであろうか、ということについて考えてみたいと思う。

ここで大切なことは、すべての寄生体にとって絶対に犯してはならないことがある。それは宿主を殺してはならないということである。すなわち、宿主を死滅させてしまえば、当然ながら寄生体自身も自滅してしまうからである。寄生体という馬鹿にする傾向があるが、我々動物は、酸素なしでは生きていけない。我々も酸素に寄生して生きているといえる。では、酸素は誰が作っているかという植物である。植物が酸素を産生してくれるから我々は生きていけるのである。熱帯の植物をあまり伐採してしまえば、我々も自滅してしまう可能性があるわけである。

この寄生体のおもしろい例として、肝炎ウイルスのHBVやHCVに感染すると、肝細胞が冒されて肝硬変を起し、その後、肝臓ガンへと移行することになる。このような肝硬変の患者5人に肝臓移植を行った。HLAが違うために、細胞障害性T細胞が肝細胞を殺せないで、これらの患者は肝硬変にならずに生存している。ウイルスは身体全体に蔓延していると思われるが、ウイルスは肝細胞を殺さない。では、いったい誰が肝炎ウイルスに感染した肝細胞を殺すのか。それは、我々の免疫機構が肝細胞を殺しているのである。すなわ

ち、免疫機構は我々の身体にとって必ずしもいいことばかりを行っているとは限らないのである。また、寄生体の方が宿主に適応するから生き続けることができるのである。

次に、植物のことを考えてみると、ニンニクはアデシンという殺菌剤をつくる防御機構はあるようなのだが、いったん植物の中に細菌やウイルスが潜入しても免疫防御機構がまったく存在しない。それでも植物が繁栄しているのは何故かという、ひとつは寄生体の方が共存共栄にあるからであるし、もう一つは、植物独特の構造にあるといわれている。植物は細胞と細胞との間に必ずセルロースの細胞壁が存在している。隣り合わせの細胞とのやり取りは、このセルロースに開いている小さな穴を通じて行われる。そこを細菌やウイルスが通過すると、その穴が詰まってしまう、感染が局所にとどまる傾向にある。植物の感染病としてモザイク病というのがあるが、これは黄色い斑点が局所的に起こるものである。この感染は上記のような理由で感染が局所にとどまり、全体的に広がることはない。

ところで動物になるとどうかというと、動物には、外皮と内皮しかない二葉性動物とそれ以外に間葉をもつ三葉性動物とが存在する。クラゲや海綿といった二葉性動物は間葉を持たないので血液細胞を産生できないと思われていたが、実際にはマクロファージ様、好塩基性顆粒球様、好酸性顆粒球様の血液細胞などがすでに存在していることが分かっている。このような顆粒球やマクロファージは、微生物を貪食したのち、感染した細胞同士が集まりグループを形成し、その周りをメラニンという堅い膜で被い、そのまま体外に排泄されるというのが無脊椎動物のおもな生体防御機構である。第二の機構として、レクチンという特定の糖鎖を認識して、細菌同士を固めてしまうか、それともマクロファージの持つて

いるレセプターで積極的に食食を促す。第三の機能は、細菌に酵素的な機構で穴を開けて殺菌するというものである。これらの三種類の機構でもって無脊椎動物は生体防御を行っている。では、無脊椎動物のウイルスに対する防御機構はどうなっているのだろうか。蚕の例をとると、感染した細胞のウイルスが結晶をつくるような状態であっても、その細胞はなかなか死滅しない。しかし、死滅してしまった細胞はマクロファージのレセプターが感知して食食処理することによってウイルスに対する防御を行っている。

ではいったい何故、有顎脊椎動物だけが免疫システムを獲得したのであろうか。頭索動物から無顎脊椎動物が、そしてそこから有顎脊椎動物が進化してきたと考えられていたが、最近の研究から5億3千年前のカンブリア期に、これらの生物は同時に誕生したと考えられるようになった。この時期に無顎類はすでに頭索類に比べ遺伝子が四倍体であったが、4億2千年から3億5千年前に無顎類から有顎類に進化するときにもう一回、四倍体化が起こったという考え方を1970年代に大野先生は発表している。

ホメオボックスの遺伝子をみても甲殻類は遺伝子が1種類しか存在していないが、顎を持った動物では4カ所の染色体にこのホメオボックスが存在し、遺伝子の数も13種類に増えている。しかしながら、それぞれの染色体でその数は多少異なっている。この頃になってやっと遺伝子の総数が数えられるようになって、無脊椎動物である節足動物のミバエの遺伝子数は、11,360、回虫（線形動物）は、15,900、ホヤ（原索動物）は12,500で、だいたい無脊椎動物の遺伝子数は、一万数百前後である。一方、脊椎動物であるフグでもヒトでも遺伝子の数は約70,000であり、無脊椎動物のおおよそ4倍の遺伝子数になる。

このように全体的に遺伝子数をみると4倍になっているが、個々の遺伝子はどうかという観点からみると、例えばNOTCH遺伝子は、無脊椎動物のショウジョウバエでは1種類しか存在しないのに、脊椎動物であるヒトやマウスでは4カ所の染色体に1種類ずつ存在している。おもしろいことにインテグリンの遺伝子をみても、ショウジョウバエでは α 鎖の遺伝子は一つしかないのに、ヒトやマウスでは3種類存在している。また、 β 鎖の遺伝子はショウジョウバエに2種類存在しているのに対し、ヒトやマウスでは6種類存在している。しかしながら、4つ目が死んでいるのか、未だに見つからないのかははっきりしていない。また、補体遺伝子についてみても、ウニやメクラウナギは補体の第3, 4, 5成分様の遺伝子が1種類しか存在しないが、ヒトでは第2, 3, 4, 5成分の遺伝子が独立した遺伝子からでき、4倍になったものと考えられる。

最後に、最初にできた抗体は何であったのかということを考えてみると、リン酸コリンは細胞の脂質二重層の主成分の一つであるが、細菌では細胞外に突出しているのに対し、動物細胞では内側に表現されている。そのため、このリン酸コリンに対する抗体は、細菌に対しては有効に作用するが、宿主の細胞に対しては全く影響しない。また、多糖の構造はその細胞が持っている転移酵素で決定されるわけであるが、宿主の細胞になくて細菌だけが持っている多糖類、例えば、マンノースを末端に持つ多糖類を我々は持っていないので、これに対する抗体は、細菌だけを死滅させることができる。ということで最初にできた抗体は、レクチンの類ということになる。

では、どうして自己と非自己の認識が必要になったかというと、それは、ウイルスと戦うために用意されたものであったと考えられる。ウイルスは、細胞内に寄生するため、使用している多糖は宿主と同じになってしまう。そのため、ウイルスを死滅させるためにはタンパク質と戦う必要があった。当然、ウイルスタンパク質と戦うためには、自己と非自己の認識が必要になったのであろうと思われる。

以上が大野先生の講演された内容をまとめたものである。

次に、根井先生が講演された「Locus-specific polymorphism and a birth-death process in MHC genes」についてまとめることにする。

根井先生は、1970年頃にMHCに興味をもち、この世界に入ってきたのだそうだが、その当時MHCの多型性について集団遺伝学者の間でだいぶ論争になっていたようである。そのころ、木村資生先生がいわゆる中立説を唱え、色々なタンパク質の変異・進化は中立であるということを発表していた。根井先生もこの考え方に同感し、遺伝子の進化というのを色々なデータを用いて、それが中立であるか否かを研究していた。ただひとつ、根井先生と木村先生の考え方で違っていたのは、木村先生は何でも中立であるという立場を貫いたのに対し、根井先生は、中立な遺伝子もたくさんあるが、選択が働かないとadaptive evolutionは起こらないので、何方であってもよいのではないかと考えられた。ただ主には中立であるが、minorityには選択があってもいいだろうというふう考えられたわけである。

MHCの特徴は、非常に多型性が高いことと、polymorphic alleleが長い間集団中に存在していることである。そしてtrans species polymorphismである。すなわち、ヒトとチンパンジー

で共通のアリルを持っていることである。

MHCに対する根井先生の考え方は、overdominant selectionであって、ヘテロ接合がホモ接合より有利だというものである。MHCの構造が判明してきたので、遺伝子全体を利用して同義置換 (synonymous substitution) と非同義置換 (non-synonymous substitution) の比較を行った。クラスIIでは非同義置換の方が高かったのに対し、クラスIでは有意に高くなかったという結果になってしまった。そのときにNatureにMHCの立体構造が発表されたのでドメインごとに分けて同義置換と非同義置換の比較を行った。抗原結合ドメインは、非同義置換が多く、その他のドメインは同義置換が多いという結果であった。この結果は、ヒト以外のマウスやチンパンジーでも同様な傾向であった。

ではいったいoverdominance、すなわちヘテロ接合になるのが何故都合がいいかという点、ホモ接合では、HLA-A, B, Cそれぞれ1種類の抗原しか用意できないのに対し、ヘテロ接合では各遺伝子座に2種類ずつ、合計6種類の抗原をもてるので、それだけ強くなれるからである。

もし、ヘテロ接合有利であるとアリルは非常に長く集団に存在する。一つのシミュレーションを組んでみると、それは4千万年くらい続いていてもいいという結果が得られた。また、DRB1の多型性は3千万年続いているという結果が得られた。多型性が非常に長く集団中に存在するから、チンパンジーとヒトとで似たようなアリルが存在するし、また、別なアリルでも似たようなものがある。それがまた多型である。つまり、それらはチンパンジーとヒトが分かれる以前から多型性があったということである。MHC遺伝子は、5から6億年前に分かれ、その後MHC特異的な機能を持つようになったのではないかと考えている。

機能遺伝子と偽遺伝子があったとして、それらが重複された場合に機能遺伝子が偽遺伝子化したり、その反対に偽遺伝子が機能遺伝子に変化したりということがかなりの頻度で行われているから、ヒトとマウスでは同じような遺伝子座が存在していないということ考えた。こういうような“Evolution by birth and death process”がMHCで起きているのではないかと考えたわけである。種によって遺伝子構造はだいぶ変化していて遺伝子構造が違っているということは、ゲノ

ムの変化ということは、生物にとってどうでもいいということの意味している。免疫に関与している遺伝子は、どんどん増えているが、一方でかなり死んで偽遺伝子化しているのである。

HLA遺伝子が遺伝子交換 (gene conversion) で起こったとすれば系統樹を作成したときにA, B, Cの各アリルは一つのクラスターを組まずに混在することになるが、実際には、Aの各アリルはAで、BはBで、CはCで、それぞれクラスターを形成する。すなわち、HLAの多型性の形成は、遺伝子座特異的アリル多型であるということである。このことは、ヒトのクラスIIの各遺伝子座でも、マウスのクラスIIの各遺伝子についても同じことがいえる。つまり、遺伝子交換はほとんど起こっていないということである。

現在認められている例外としては、HLA-B*7301アリルで、エクソン3まではB遺伝子座にクラスターされるのに、エクソン4以降はC遺伝子座にクラスターされている。すなわち、エクソン3と4との間で組み替えが起こったことを意味している。言い換えれば、エクソン混成 (exon shuffling) によって形成されたアリルということになる。一方、マウスではクラスI遺伝子座でD, L, Qはそれぞれ一つのクラスターとして形成されるのにH2-Kだけは2つのクラスターに分かれてしまうという結果になった。しかし、この原因については不明である。

遺伝子交換が起きたという報告が複数あるが、それらはいずれも同一の遺伝子座内 (intralocus gene conversion) である。しかし、いくつかの論文でもって、遺伝子座間の遺伝子交換 (interlocus gene conversion) が起きたという報告がマウスなどで出されているが、果たして生き残っていきけるかという問題がある。なぜならば、遺伝子座間の遺伝子交換は、その寿命が短いといわれている。

以上が根井先生の講演内容をまとめてある。大野先生と根井先生は、いずれもNational Academyの会員であり、同時に講演を聴くことができたというのはまったく幸運であったといえる。このようなシンポジウムを企画された猪子英俊先生に深く感謝する次第である。

PCR法を用いたMHC領域のDNAタイピングは、まずHLAクラスII遺伝子群において導入された。HLAクラスII遺伝子群では、ほとんどの場合、可変部がひとつのエクソンに存在すること、また抗原グループごとの増幅部位の設定(プライマー設定)が可能であったことから、高精度のDNAタイピング結果が得られるようになった。そのため、現在では、数多くの施設において、市販キット等を利用したタイピングが実用化されている。一方、クラスI遺伝子群では、偽遺伝子を含む各遺伝子間の相同性が高いこと、また可変部が広範囲に存在すること等から、そのタイピング法としては、開発途上にある。

今回の適合性学会シンポジウム(シンポジウム2)では、「HLAクラスI抗原DNAタイピングの開発と現状」と題し、4人の先生(柏瀬、木村、兼重、成瀬先生)から、各施設で開発または導入しているクラスI DNAタイピング法について、その使用経験と問題点等について報告があったので、以下にその概要を示す。

1. PCR-MPH法とPCR-SSCP法を組み合わせたタイピング

日本赤十字社 中央血液センター
研究部 研究一課 柏瀬 賢一

非血縁者間の骨髄移植では、クラスI抗原のアリールレベルでのマッチングが必要であることが判明した。そのため、非血縁者間の骨髄移植の最終的なタイピング(三次検査)において、日本人において比較的多型性が見られるクラスI抗原(HLA-A2、A26、B39、B61)のアリールレベルでのタイピングを、中央センターで実施することとなった。また、日本人では、HLA-A2、A26、B39、B61及びB62のアリールレベルでのタイピングを行うことにより、Aローカスでは98%、Bローカスでは92%においてアリールレベルでの適合が可能となった。

DNAタイピング法を分類すると以下の3グループに区分される。

A群：塩基配列の変異部分を基に各種試薬を用いてタイピングする方法

PCR-SSOP、PCR-RFLP、PCR-SSP法

B群：標準DNAとの違いを検出する方法

PCR-SSCP、PCR-PHFA、PCR-EMDA法

C群：直接塩基配列を解析する方法

SBT法

現在、中央センターではクラスI及びIIのDNAタイピングには、原理の異なる2法、PCR-MPH(Microtiter Plate Hybridization)法とPCR-SSCP(Single-Strand Conformation Polymorphism)法を使用している。

クラスIのDNAタイピングとして、exon2とexon3を含む領域を、抗原グループ特異的なPCRを行う。ここで得られたPCR産物(1st-PCR)を使用して、さらにexon2、exon3それぞれにおいて、2nd-PCRを実施する。1st-PCRの産物をPCR-

MPH法に、2nd-PCRの産物をPCR-SSCP法に使用している。

(図1参照)

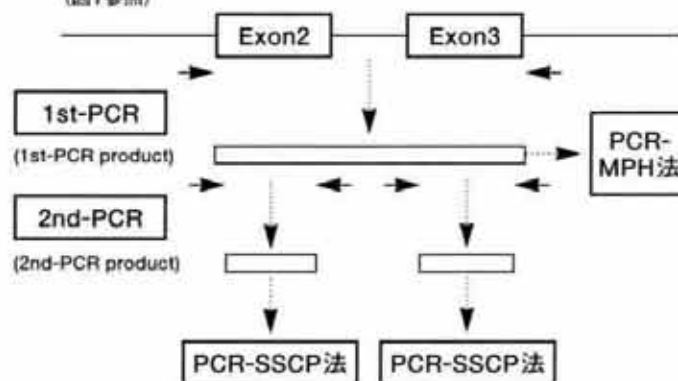


図1 PCR-MPHとSSCP法を併用したクラスI DNAタイピングについて

これまでに行った約5,000件のタイピングにおいて、MPH法では検出することのできなかった新たなアリールがSSCP法で3種類(A2:2種類、B39:1種類)見出されている。

PCR-MPH法とSSCP法を併用することの、長所と短所を以下に示す。

長所：①ミスタイプを防止できる。

②1st-PCRの産物を使用できる。

③新たなアリールの検出が可能である。

短所：①限られたクラスI抗原が対象となる。

②標準DNAは必要となる。

③全ての未知なタイプに対応できない。

今後のDNAタイピング法は、Low Resolutionタイピングでは、少数検体を迅速に判定できるSSP法が有用であろう。また、大量検体については、開発中であるがPCR-MPH法が有用な方法と考える。また、High Resolutionタイピングとして、SBT法がハード及びソフト面での改良が必要であるが、シンプルで簡便な方法と考えられる。

2、HLA-A及びHLA-B遺伝子のDNAタイピング

東京医科歯科大学 医学部 難治疾患研究所
成人疾患 分子病体 木村 彰方

PCR法を利用して増幅したHLA遺伝子群の多型性解析法として、SSOP法、RFLP法SSP法、SBT法などが用いられている。比較的確実に解析できるSSOP法を使用してHLA-A及びHLA-B遺伝子の多型性解析について検討を行った。

SOP法の長所及び短所を以下に示す。

長所：①多数検体のタイピングに最適。

(時間と費用の面)

②あらゆる多型性に対応できる。

(但し、プローブ数が増加する)

③再現性が高い。

(但し、プローブのデザインに依存)

短所：①特定のヘテロ接合体の区別ができない。

(例：DRB1*1501/*0405、*1502/*0410)

(グループ特異的PCRの併用で解決)

②多数のプローブ (SSOP) が必要。

③検査時間が、多少長い。

④少数検体のタイピングには適さない。

(時間と費用の面)

まずHLA-A遺伝子のDNAタイピングについて紹介する。

Exon1とExon3にプライマー (Set1) を設定し、Exon2及びExon3を含む領域についてPCRを行い、91種類のSSOPを使用して多型性解析を行う。また、Exon4の多型性が見られるアレルについてはExon4にプライマー (Set2) を設定し5種類のSSOPによりその多型性解析を行っている。(図2参照)

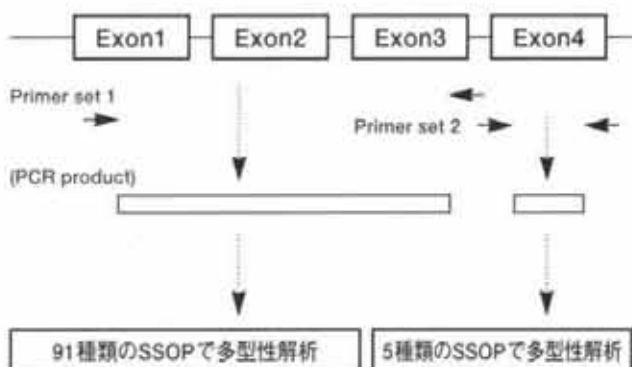


図2 PCR-SSOP法によるA-locusのDNAタイピングについて

日本人におけるSSOP法を使用した多型性解析の結果では、HLA-A2、A11、A24、A26に多型性が見られた。また、A2グループについては、SSPまたはSSCP法を併用することで、A2アレルの確認を行うことができる。

次にHLA-B遺伝子のDNAタイピングについて紹介する。B遺伝子の場合、PCRを一組のプライマーでは増幅することが

できない。そのため、2組のプライマー (Set1、Set2) を設定し、Exon2及びExon3領域をPCRにより増幅し、112種類のSSOPを使用して多型性解析を行う。現状では、これら2種類のプライマーをミックスして使用している。また、前記した2種類のプライマーセットでは、Exon2の多型性が解析できないアレルがあり、これらについては、Exon1とExon2にプライマー (Set3) を設定しPCRを行い、18種類のSSOPにより、その多型性解析を行っている。(図3参照)

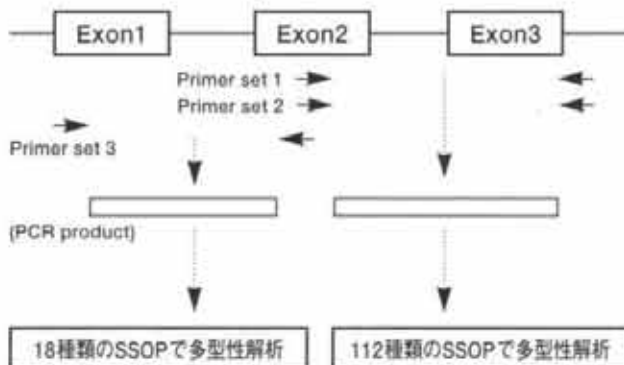


図3 PCR-SSOP法によるB-locusのDNAタイピングについて

以上の方法により日本人検体についてタイピングを行ったところB39、B61、B62抗原群において多型性が多く見られた。また、SSOPとSSCP法の併用で、B62及びB61抗原群の各アレルの確認を行うことができる。

また、これまでにを行った血清学的なタイピングとDNAタイピングの相違については、A、B、DR各ローカスにおいて、それぞれ4.8、12.4、23.5%の相違が見られ、血清学的にブランクとされたが、DNAタイピングでアレルが確認された場合が多かった。

PCR-SSP法については、2社より市販キットが販売されており、これまで検討した結果では、血清学的レベル (アレルで二桁、一部で四桁) のタイピングとして使用可能と思われる。

3、日常検査としてのHLAクラスI DNAタイピングの現状

シオノキ製薬 診断医学事業部
兼重 俊彦

これまでにHLAクラスI DNAタイピングとして下記に示す検査法が報告されており、我々のそれぞれの特徴を検討し、現在、下記に示す方法 (□で示す) を使用している。

A-locus :	SSOP	RFLP	SSP
B-locus :	SSOP	RFLP	SSP
C-locus :	SSOP		SSP

原則的に全ての公認アレルを（A：86種類、B：199種類、C：50種類）をタイピングの対象としている。

A-Locusにおいては、Exon2、Exon3それぞれに対して3種類のグループ特異的なPCR増幅を行い、RFLP法によりタイピングを行っている。また、Exon2、Exon3をそれぞれ独立した、PCR-RFLP法でタイピングすることにより、サンプリング間違い等を防止できる。

B-Locusでは、Intron1～3までのPCRを行い、その産物を使用してSSOP法により多型性の解析を行っている。PCR産物とSSOPとの反応は、目視で行っているが、HLAタイプの判定には、独自に開発した自動判定プログラムを使用し、タイプの確認を行っている。

C-Locusは、Bunceらの報告したSSP法に、24種類のプライマーセットでミディアムなタイピングを、またsupplementとして32種類のプライマーセットを使用している。また、Cw*14、Cw*03 (Cw*0302)、Cw*08については、supplementのプライマーセットでアレルタイピングが可能である。

QC (Quality Control) の側面から、インターネット利用した新たなアレル情報についての情報収集を行っており、その情報から検査法または判定法の改良を行っている。また、外部QCへ参加し、タイピング精度の向上を計っている。さらに、蓄積したタイピングデータを基に、日本人における各アレルの遺伝子頻度、及び各locus間でのアレルの相関性について解析を行っている。これらの解析データは、タイピング (判定) 時に参考資料として使用している。

4、リアルタイムPCR産物自動検出機と蛍光標識プローブを用いた新しいHLAクラスI DNAタイピング法の開発

東海大学 医学部 分子生命科学
成瀬 妙子

PCR-SSP法は、多数の対立遺伝子特異的なプライマーを用いてPCR反応を行い、標的領域が増幅されたか否かを電気泳動で確認する。この電気泳動を行わない方法として、PCR産物自動検出器 (ABI PRISM7700) を使用することにより、PCR増幅産物を確認する方法 (リアルタイムPCR-SSCP法) について検討を行った。これまでHLA-DRB1について検討を行い良好な結果が得られており、今回クラスI遺伝子についても検討を行い改良の余地があるものの、これまでの検討結果について報告する。

PCR産物自動検出器 (ABI PRISM7700) を使用したリアルタイムSSP法の概要を以下に示した。(図4参照)

Step1: 鋳型DNAに、蛍光オリゴヌクレオチドプローブが結合する。このプローブにはリポーター (R) とクエンチャー (Q) がそれぞれ標識されている。

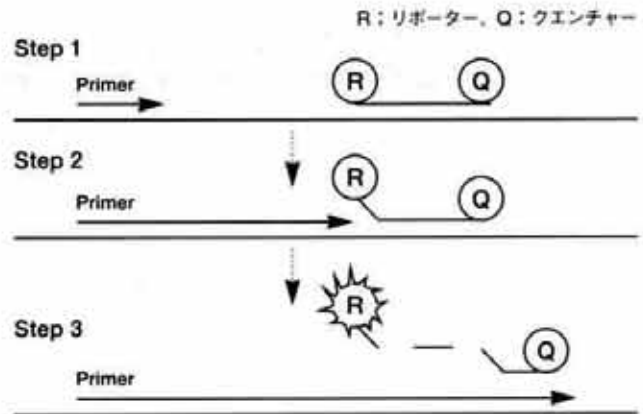


図4 PCR産物自動検出機によるリアルタイムPCR-SSP法について

Step2: PCR反応においてTaqポリメラーゼの伸長により、蛍光オリゴヌクレオチドプローブが加水分解される。

Step3: Taqポリメラーゼの伸長がさらにおこり、蛍光オリゴヌクレオチドプローブが細かく分解され、近い距離にあったリポーター (R) とクエンチャー (Q) が離れる。このことにより、クエンチャー (Q) により抑制されていたリポーター (R) の蛍光が発光する。ABI PRISM7700は、この蛍光強度を読み取ることにより、PCRによる標的遺伝子の増幅の有無について判別する。

これまでの検討では、PCR反応が約10サイクルを上回るところで、蛍光発光量が増加し始め、30サイクルで検出可能である。

C-locusのタイピングについては、日本人に比較的多いアレルを検出するため、24組のプライマーセット (陰性、陽性コントロールを含む) を使用し、C-locusのアレルタイピングを行った。その結果、RFLP法で判定したアレルと一致した。また、他のクラスIローカスについても現在検討しており、その現状は以下のとおりである。

Locus	プライマーセット	解析レベル
C-locus	24組	中～高
A-locus	16組	中 (A33については改良中)
B-locus	開発中	

リアルタイムSSP法の利点は、以下のとおりである。

- ・泳動が不要
- ・100分以内に操作終了
- ・非特異的な増幅産物の存在が結果に影響しない
- ・判定が容易で再現性が高い
- ・自動化が可能

(文責: たけいみち)

京都府赤十字血液センター 検査二課
(京都大学医学部付属病院輸血部 研究生)

沖 学

「今世紀に生まれた輸血医学の21世紀への展望」

第46回日本輸血学会総会が京都大学医学部付属病院輸血部教授、伊藤和彦総会長のもとにゴールデンウィーク直後の風祭5月7日～9日に京都国際会館で開催された。

今年は暖冬のせいもあって、京都のしだれ桜もすっかり夏の装いになってしまっていたが、緑美しく、宝ヶ池の畔は喧騒な都会の中の心休まる空間である。

京都国際会館は京都北山の山懐、15.7万平米の敷地に昭和41年に開館した国際会議場である。阪神大震災後、地盤の沈下による建物への影響が出始めたため、南側の一部を閉鎖し、補修作業に入るため仮の建物アネックスが隣に建てられた。アネックスとメイン会場との行き来は少し利便性を欠いたが、会議場としては、日本有数の設備・環境を有している。本学会の開催が器に負けることなく、内容的にも優れたものにするため努力された。会期中、立ち見が出た会場も一部あったが、概ね聞きたい発表が会場に入れないために聞けないことはなかった。

京大輸血部は大学院生及び研究生を含めて教授以下14名の陣容である。教室員は少ないが、自分たちの手作りで学会運営をしようと、1年半に及び準備した。会場の装飾は必要最小限にし、学会当日の運営についても、放送等での案内アナウンスを廃止して、進行は一切座長に委ねた。

総会初日及び2日目が大阪市で開催された日本臨床衛生検

査学会と重なったために、できるかぎり3日目に検査技師関係の演題をプログラムした。

プログラムは特別講演2題、教育講演12題、シンポジウム3企画15題、輸血問題検討部会5題、一般演題241題の他、サテライトミーティング1企画、サテライトシンポジウム2企画、ランチョンセミナー4企画が催された。

【特別講演2題】

京都大学ウイルス研究所の内山卓教授が「ヒトレトロウイルス感染症」と題して講演された。エイズ研究における最近の知見は1) 逆転写酵素阻害剤とHIV複製阻害剤であるプロテアーゼ阻害剤の三剤併用療法により、エイズ克服の可能性が出てきたこと。2) HIV感染者における無症候期においても、ウイルス粒子の産生と生体の免疫系によるウイルス排除の攻防が繰り返されていること。3) HIVの細胞感染において、CD4レセプター以外にCXCR-4と呼ばれるケモカインレセプターによる細胞感染経路がありこの点について内山研究室の研究成果から説明された。また、ATLについては活性化T細胞及びHTLV-1感染細胞上のOX40とそのリガンドgp34の相互作用によるATL発症機構の知見が紹介された。

もう一つの講演は京都大学分子生物学の本庶佑教授による「分子免疫学の進歩」であった。本庶教授は分子免疫学の分

(表1) 教育講演一覧

演 題	演 者	所 属
C型肝炎ウイルスと肝疾患	下邊野 邦忠	京都大学 ウイルス研究所
HIV感染症におけるウイルスの変化と病態	岩本 愛吉	東京大学 医科学研究所
HIV検査	吉原 なみ子	国立感染症研究所
放射線照射によるウイルスの不活化と活性化	武部 啓	京都大学 放射線遺伝学
血管・血液の初期分化	西川 伸一	京都大学 分子遺伝学
リンパ球の増殖応答とその制御	湊 長博	京都大学 免疫細胞生物学
赤血球型の分子生物学	梶井 英治	自治医科大学 法医学
人工血液	関口 定美	北海道赤十字血液センター
Minor histocompatibility antigen を探る	丸屋 悦子	京都府赤十字血液センター
I & A (Inspection and Accreditation)	星 順隆	東京慈恵会医科大学 輸血部
HPA (血小板抗原)	柴田 洋一	東京大学 輸血部
HLA	佐治 博夫	京都府赤十字血液センター

野ではあの利根川進博士と並び賞される世界的権威である。難解な免疫系の分子レベルでの仕組みについて、今までの知見を説明され、その後、作成した2つの自己免疫病態モデルマウスの解析により自己免疫病発症のメカニズムが解説された。

【朝一番の教育講演大盛況】

会期中3日間、朝9時から10時まで2会場で2題ずつの教育講演が行われた。

教育講演者の顔ぶれ(表1)は錚々たるもので、興味深い演題ばかりであり、収容人数2000名弱の大ホールであるメインホール及びルームAには朝早くから多くの人が詰めかけ、大盛況であった。前夜の夜更かしにもめげずに、皆さん相当勉強熱心でした。

下速野教授の講演はウイルス蛋白が感染細胞の遺伝子発現をも制御しているという知見は興味深い。

また、現在輸血用血液はGVHD予防のため放射線照射を行っているが、混入ウイルスの放射線による変異及び活性化が心配な点である。この点について、京都大学の武部教授は50Gy程度ではウイルスを不活性化することは出来ないが、突然変異を含めて活性化の心配もないことを説明された。

造血幹細胞は血液細胞への分化だけではなく、血管内皮細胞へも分化する。西川教授の講演は造血幹細胞移植におけるpluripotentな幹細胞の重要性を再認識させられる内容であった。

その他、京都府赤十字血液センターの丸屋、佐治両先生による教育講演もあったが、その内容はそれぞれ、またの機会に紹介していただく。

【臓器移植の田中紘一教授もシンポジスト】

総会長シンポジウムは4名のエキスパートが血液事業、同

種免疫、輸血感染症及び実質臓器移植について、現在に至る経緯を踏まえて21世紀への展望を語られた。

血液事業においては、福岡県赤十字血液センターの前田所長がより安全性の高い輸血用血液の選択と末梢血幹細胞及び臍帯血幹細胞を含む造血幹細胞プロセッシングの取り組みを、また同種免疫については日本赤十字社中央血液センターの十字所長が遺伝子解析による細胞性免疫の解析とNK細胞による細胞性免疫の解析の重要性が語られた。

京都大学移植免疫学講座の田中紘一教授は臓器移植のエキスパートで生体肝移植の症例数は既に350症例を超えている。国際学会でも特別講演を依頼されることが多い。先生は21世紀への期待することとして、遺伝子工学に基づく異種臓器移植及び拒絶反応を防ぐ新たな免疫抑制療法、移植免疫寛容の導入をあげられた。

【輸血問題検討部会「血液行政のあり方について」で討論白熱】

最終日の午後から輸血問題検討部会が開かれた。熱心な討論が続き、予定時刻を30分以上過ぎる程であった。

昨年12月、厚生省の「血液行政のあり方に関する懇談会」の最終報告書が提出され、現在これに沿って、血液事業法等の検討がなされている。

本学会では各界からの話題提供者により提供された問題点等について、学会として討議されたことはまことに意義深かった。

【最後に一言】

私は本学会では開催側であったため、個々の講演を落ち着いて聴くことが出来なかった。従って、内容を詳しくレポート出来なかったが、本学会に参加できなかった先生方に少しでも学会の雰囲気伝えられればとレポートした。



第46回日本輸血学会
総会メインホール

HLA最前線

■臨床応用編

安藤 等¹⁾、猪子英俊²⁾

1) 神奈川県湘南赤十字血液センター

2) 東海大学医学部分子生命科学系遺伝情報部門

ベーチェット病の最近の動き：分子遺伝学的発症機序

ベーチェット病は失明率の高い難治性ぶどう膜炎であり、また全身の諸臓器に慢性炎症を生じるため、ともすれば死に至る全身性炎症性の難病であり、昭和47年度の厚生省特定疾患に指定されて以来その成因や治療および予防に関する研究が進められている。ここでは最近の分子遺伝学的発症機序に関する我々の研究について述べる。

ベーチェット病発症に何らかの遺伝的背景(疾患感受性又は原因遺伝子)が関与していることは疑いなく、少なくともその一つは第6染色体短腕上のHLA領域に存在していると考えられる。ベーチェット病は人種を越えてHLA-B51抗原と強く相関していることが明らかにされているが、我々はベーチェット病発症に直接B51抗原が関与していると考えた場合、HLA-B51特異的なHLA溝のBポケットを構成する2つのアミノ酸、63番目アスパラギンと67番目フェニルアラニンが、外来抗原ペプチドとの結合親和性およびT細胞への免疫応答に直接影響を与えてベーチェット病発症に関与している可能性を示唆した。また、B51抗原のサブタイプ(HLA-B*5101~B*5109対立遺伝子)を解析し、ベーチェット病と相関するB51抗原遺伝子はHLA-B*5101対立遺伝子であることを示した。しかしながら、ベーチェット病の原因遺伝子はHLA-B51遺伝子そのものであるのか、それともHLA-B遺伝子近傍の他の遺伝子であるのかは未だ明確にはされていない。したがって、今後の重要な課題はベーチェット病の原因遺伝子を同定することにあると考えられる。

ベーチェット病の原因遺伝子を同定するため、まず、ベーチェット病の原因遺伝子が座位していると考えられるHLA-B遺伝子近傍領域のゲノムの塩基配列を明らかにした(ショットガンシーケンシング)。すなわち、第6染色体短腕のセントロメア側IKBL遺伝子からHLA-92L遺伝子間の約1300kbの塩基配列を決定した。HLA-B、C近傍領域にはベーチェット病、尋常性乾癬等をはじめ、多くの疾患感受性遺伝子の存在が示唆されているが、それらの原因遺伝子がこの膨大な塩基配列の中に座位していることは、マッピングの結果などからほぼ確実と考えられる。

このように、ベーチェット病の原因遺伝子も含む、この領域のすべての遺伝子や遺伝子間領域の全ての塩基配列を決定

したことになる。したがって、この中から未知の新遺伝子を全て洗い出し、ベーチェット病の原因遺伝子を同定することがこれからの研究課題である。まず、この膨大な塩基配列のデータを、既存のデータバンク、特に、最近精力的に塩基配列の決定がなされ、ほぼ終了したとさえいわれているEST (expression sequence tag: cDNAクローンの部分塩基配列)のデータベースとホモロジー解析し、さらにGrail II (エクソンの存在している可能性の高い領域を探索するプログラム)を用いて未知の遺伝子の探索を行い、そして遺伝子の存在が示唆された領域に関しては、RT-PCRおよびノザンハイブリダイゼーションを行って、実際に遺伝子の存在を確かめた。その結果、現在までに、この領域に16個の既存遺伝子、6個の偽遺伝子が同定され、23個の新遺伝子および遺伝子の可能性のある領域が認められた。ノザンハイブリダイゼーションにより見出した5個の新遺伝子NOB1-5 (NOB: new organization associated with HLA-B)に関して、cDNAライブラリーのスクリーニングを行い、数個のcDNAクローンを分離した。また、新しいHLA様遺伝子として注目されているMICA、MICB (MHC class I chain-related gene A, B)各遺伝子のゲノムクローンを各々分離し、その遺伝子構造(エクソン-イントロン構造)を明らかにした。これらすべてが、その染色体上の位置によりベーチェット病の有力な候補遺伝子と考えられ、今後、cDNAの分離・同定が進められていくであろう (NOB1, NOB2遺伝子に関しては、既にcDNAクローンを数個分離しており、現在シーケンシング中である)。

次に、ベーチェット病の候補遺伝子の1つであるMICA遺伝子の解析を行った。我々は、MICA遺伝子のTM領域(第5エクソン)内に反復単位が3塩基(GCT: アラニン)のマイクロサテライト (STR: short tandem repeat: 2-3塩基の反復配列)多型を見だし、5個の対立遺伝子(アリル)を同定した。興味深いことに、その内の1つのアリルはフレームシフト変異を伴い、その結果、TM領域(細胞膜通過領域)の疎水性アミノ酸が減少し、しかもTM領域内で終末コドンが出現することになるため、この対立遺伝子はTM領域と細胞内領域(エクソン6)が存在せず、分泌型のMICA蛋白をコードする可能性が示唆された。そこで、ベーチェット病患者でこのマイクロサテライト多型を検索したところ、反復回数が6回の対立遺伝子が有意に増加しており、ベーチェット病とB51抗原との

相関よりも高かった($P=0.00055$)。また、最近ではコンピュータ解析により、このシーケンシングした1.3Mb領域に反復配列を持つマイクロサテライトを同定し、HLAホモ接合B細胞60種類を用いて、蛍光自動シーケンサーとGenScan672 Software (ABI)によるPCR産物断片長の測定にてそれらのマイクロサテライトの多型性を調べた。その結果、RBL遺伝子からHLA-92L遺伝子間に、2~5塩基の反復配列からなる500個以上のマイクロサテライトリピートを見出した。また、MICBとMICA遺伝子間でMICA遺伝子のわずか12kbセントロメア側に、反復回数が約1,000回にも上るTA配列(約2,000kb)が認められ、遺伝学的な組み換えのホットスポットである可能性が示唆された。これらの内、26個のマイクロサテライトについて多型性を調べたところ、平均9.6個のアリルを持ち、PIC (polymorphism content value)は0.69であった。これらのマイクロサテライトは、Hardy-Weinbergのexact testにより遺伝的マーカーとして有用であることが示唆された。したがって、ベーチェット病の原因遺伝子が座位していると考えられるMICB~HLA-C遺伝子近傍の15種類のマイクロサテライトについて、ベーチェット病患者群74人および対照群132人で多型解析を行い比較検討した。その結果、MICAとHLA-B遺伝子間に存在するマイクロサテライトMIBのアリル348に最も強い相関を認めた($P=0.0000004$)。さらに、患者群と対照群のマイクロサテライトアリル分布の偏りを、Markov chain parameter (Genetop software)で計算したところ、MICA~HLA-C遺伝子間に存在する4つのマイクロサテライト、MICA-TM、MIB、C1-4-1、C1-2-5の多型と有意に相関しており(MIB: $P+S.E.=0.00000 \pm 0.00000$)、これら4つのマイクロサテライトのセントロメア側およびテロメア側のマイクロサテライトではベーチェット病との相関は急激に弱まることが示された。これら4つのマイクロサテライトとベーチェット病との相関は、Markov chain parameterの逆数値による片対数表示ではMIBマイクロサテライトが最も強く相関していた。

以上のことをまとめると、ベーチェット病の原因遺伝子はMICA遺伝子近傍~HLA-C遺伝子近傍の約160kbの領域に存在することはほぼ確実と考えられ、さらに、MICA~HLA-B遺伝子間のマイクロサテライトMIBを頂点とした近傍領域に存在する可能性が高いことが示唆された。

以前、ベーチェット病の原因遺伝子はB51抗原遺伝子そのものよりも、TNF~HLA-B遺伝子間でHLA-B遺伝子近傍の他の遺伝子である可能性が強いことを我々は示唆していたが、これらのマイクロサテライト多型解析はこれを支持していること、またHLA-B~TNF間に位置するMICA遺伝子がベーチェット病の原因候補遺伝子として有力な遺伝子座であることを示している(HLA-B遺伝子の46,455bpセントロメア側に座位する)。MICA分子が $\gamma\delta$ T細胞に抗原提示し、何らか

の特異的免疫反応に関与する可能性が推測されているが、ベーチェット病では $\gamma\delta$ T細胞の機能亢進または異常が以前より報告されている。また、MICA遺伝子は繊維芽細胞、上皮細胞特異的に発現するが、ベーチェット病の病巣はまさに外来抗原に暴露されやすい組織の繊維芽細胞、上皮細胞であると考えられる。さらに、MICA遺伝子5'上流にストレス蛋白である熱ショック蛋白(HSP: heat shock protein)のプロモーターエレメントが見いだされ、MICAは何らかのストレスによりその発現が調節されている可能性が示唆されたが、ベーチェット病はストレスや寒冷前線通過時などによる体調不良時に発作が誘発されるという報告がある。したがって、MICA遺伝子の染色体上の位置、類推される機能および発現・調節様式、そしてこのTM領域に存在する特定のマイクロサテライトアリル(A6)のベーチェット病患者群における顕著な上昇より、MICAがベーチェット病発症に関わる有力な候補遺伝子と考えられた。しかしながら、現段階ではベーチェット病の原因遺伝子がHLA-B51遺伝子そのものである可能性も完全に否定はできず、両面からのアプローチが必要かと考える。したがって、より詳細にマイクロサテライト多型を解析することにより、最近明らかにされたヘモクロマトーシスの原因遺伝子座の決定に関する研究がそうであったように、ベーチェット病の原因遺伝子をより精度高くマッピングを行い、それがHLA-B51遺伝子そのものであるのか、それとも他の遺伝子であるのかが解明されることが期待される。

ベーチェット病の原因遺伝子を決定する研究と並行して、我々はMICA遺伝子のように有力な候補遺伝子に関しては既にトランスジェニックマウスの作成(ベーチェット病の動物モデル作成)を進めている。以前、B51トランスジェニックマウスを用いて解析が行われたが、ベーチェット病に類似の症状はみられず、ベーチェット病の動物モデルには至らなかった経緯がある。現在、我々はベーチェット病患者群で顕著に上昇しているMICA対立遺伝子(A6アリル)のマウスへの導入を行っている。すなわちMICA cDNAを用い、さらにMICA cDNAの上流に強力なサイトメガロウイルス由来プロモーターを配置してマウス受精卵に導入し強制的にMICA蛋白を発現させて、MICA蛋白を発現したトランスジェニックマウスの作成を試みている。しかしながら、MICAトランスジェニックマウスが得られたとしても、それは強力なプロモーターにより全ての細胞に強制的にMICA蛋白を発現させたものであり、言うなれば異常な全身状態に置かれたマウスである。したがって、ヒトにおけるMICA蛋白の発現状態とは当然異なっているが、MICAの機能の解析には非常に有用であると考えられる。今後、ベーチェット病の原因遺伝子が同定され、さらに動物モデルが作成・解析され、免疫遺伝学的発症機序の解明につながることを期待される。

知ってる つもり!?

■血清学編（特別寄稿）

神奈川県赤十字血液センター 検査三課
中島 文明

我々、血液センターHLA担当者は毎年血清学のワークショップを行っている。と書き始めると「それは一体いつの時代の話なの？」と聴かれそうだが、今現在、つまり西暦1998年の今、進行中のお話であります。DNAタイピング隆盛の今日、「赤十字はまだにそんなことしているんだ」と思ったあなたは、この続きを読まなければならないと説明いたします。

1. 骨髄バンク登録者のHLA型検査：現在では、クラスIIはDNAタイピングだが、クラスIは血清学的タイピングで登録している。目標は当初10万人のところ、現在はalleleレベルのマッチングが叫ばれており40万人ともいわれている。

2. HLA適合血小板の供給：我々が日常よく遭遇する、次ようなケースはいかがでしょうか。第2寛解を経て再発をみたAML患者。再度、化学療法を施す予定だが、これまでの度重なる輸血で血小板不応答に陥り、A2-B46ホモタイプのドナーでないと輸注効果は得られず、骨髄抑制から解放される1か月間に週2回の血小板輸血が必要であるといったような場合、治療を支持するためのA2-B46ホモタイプのドナーを得るにはどれほどのドナー・プールが必要か、数万人か数十万人か。これも血清学的タイピングでドナー登録している。

以上の2点を遂行するだけでも、全国で年間6万〜7万枚のタイピング・トレイが必要である。赤十字は人道と博愛の精神にのっとり必要なものは自前で調達することを伝統とし、年間数万枚のタイピング・トレイに打ち込む抗血清(モノクローもある)もほとんど自給自足である。つまり経産婦ドナーから抗血清を採し(モノクローを作っているヒトもいる)、その中で優秀な抗体を用いて共通トレイや自家製トレイを作り、そのタイピング結果の保証を得る手段のひとつとしてワークショップを行っているのである。

血清学のワークショップで重要なのは、抗体を評価するための抗原型の信頼性である。過去には、標準血清でタイピングされたパネル細胞を用いて抗体の特異性を決定していた。標準血清とはワークショップで認知された特異性を有する抗体とでも言いましょうか。それでは、そのワークショップで使用されていたはずのパネル細胞の抗原型はどうやって決めたのか？ ニワトリとタマゴの関係なのか？ いや、そうではなく、特定の細胞と反応する抗体を検出したことが出発点で

ある。そして、それらのパターン解析を重ね、その間、IEFや抗原バプタイトの解析など血清学とは別のアプローチで証明しつつHLAシステムを解明してきた。今日に至って我々はいよいよ決定的な手法を得た。それは、その抗原分子を形成する源、つまり遺伝子の型を直接検出する手法である。ただし、年間で数万件の処理可能なクラスI DNAタイピングの手法は確立していない。したがって、血清学的タイピングが必要であり、抗血清が必要であり、ワークショップが存在しているのである。

我々が毎年行っているワークショップでは、抗体のパターン解析の継承とパネル細胞のリアサインの繰り返しという従来からの血清学的あいまいな世界からの脱却を狙い、パネル細胞のDNAタイピングを出来得る限り行い、抗体特異性の同定をサポートする体制で行っている。また、参加施設は日本の血液センターばかりではなく、韓国、台湾、タイ、中国、南アフリカ、米国と国際的なレベルである。これらのパネル細胞で特異性が決定された抗体は世界に誇れるものである。DNAタイピングで検出されるalleleも非常に幅広く、未知のalleleも多い。抗原型との関係も複雑になってきており、整理していかないと解析もおぼつかない。

そこで、中央血液センター田中氏の発案で、ワークショップ会議のうちにレクチャーを行いたいということになり、私がA,Cローカスを担当することとなった。

ここまで、読んで下さった方には、たいへん申しわけなく思う。いままでの前置きで、しかも、本文はほとんどない。別に掲載してある表をながめていただくだけで済んでしまう。話を元に戻すが、そのレクチャーの内容を紹介することが今回のテーマである。内容は「勝手にやってください(田中)」とのことだったので、特定のalleleは特定のハプロタイプを形成していることが多いことに着目し、これらをまとめることとした。ことわっておくが、それが全てではないということは言うまでもない。

表は、1998年3月付のASHIのホームページに載っていたsequence dataのallele nameをベースに作成してある。この、allele nameはものすごい勢いで増えているが、一方でいつの間にか消えて無くなっているものもあるので、権威のあるASHIのデータをもって現状とすることとした。表はA,Cロ

ーカスそれぞれのalleleを中心に記述してあるので一部重複している。そして、ハプロタイプは我々のデータをはじめとし、International Cell Exchange Report、Tissue AntigensやHuman Immunologyから拾い集めた。したがって、参考文献は膨大になってしまうので今回は割愛する。以下にごく最近のものを示す。

Aローカス

[A*0102] 最近ちょっとだけ話題になったのがA*0102である。もともと、A1=A*0101でA*0102はお目にかかったことがなく例によって実態のないalleleのひとつと思い始めていた。ところが、昨年のTerasaki DNA Exchangeに提出され、今回の我々のワークショップにも見つかった。血清学ではA1単一特異性の抗体とは反応せず、A36に似た反応を示す。

A*0102-Cw0701-B*4901が特徴的ハプロタイプである。

[A*1103] sequence dataから消えたり復活したりしていたalleleだが、我々のワークショップで南アフリカから提出されたパネルにみつけることができた。このラボではSouth African BlackとマダガスカルからインドにつながるのあるBlackの2種類を提出しており、そのどちらであるかは不明である。また、特徴あるハプロタイプも判っていない。

[A*1104] 3年程前のInternational Cell Exchangeに提出されていたA11の亜型であるが、ここれと関連がみられるBローカスに特徴があった。B*1525はB62Vと呼んでいた血清学的にB62と識別可能な抗原で、A*1104-Cw*0702-B*1525といったハプロタイプを組む。A*1104は血清学的にA11を含まないわゆる長い抗体としか反応が見られない。

[A*2410] 東南アジアに存在するB*1802とハプロタイプを

表1-1: Aローカス-1

HLA allele	Specificity	WS name	probable Haplotypes	Race or Ethnic
A*0101	A1			
A*0102	A1		A*0102-Cw*0701-B*4901	Black
A*02011	A2			
A*0202	A2			
A*0203	A203	A25	A*0203-Cw*0702-B38	Chinese
A*0204	A2			
A*0205	A2			
A*0206	A2			
A*0207	A2		A*0207-Cw*0102-B*4601	Oriental
A*0208	A2			
A*0210	A210	A2Lee	A*0210-Cw*0801-B*4006	Oriental
A*0211	A2			
A*0212	A2			
A*0213	A2			
A*0214	A2			
A*0215N	null			Japanese
A*0216	A2			
A*02171	A2			Amerindian
A*0218	A2	A2K	A*0218-Cw*0102-B*4601	Japanese
A*0219	-			
A*0220	A2			Caucasian
A*0221	A2			
A*0222	A2			
A*0224	A2			
A*0225	A2			
A*0226	A2			
A*0301	A3			
A*0302	A3	A3A2	A*0302-Cw*0602-B*1302	Japanese
A*0303N	null			
A*1101	A11	A11.1		
A*1102	A11	A11.2	A*1102-Cw12-B27/Cw7-B60	Oriental
A*1103	A11			
A*1104	A11	A11var	A*1104-Cw*0702-B*1525	Oriental
A*2301	A23			
A*2402	A24			
A*2403	A2403	A9.3	A*2403-Cw*12042-B*51	Caucasian
A*2404	A24	A24AK	A*2404-Cw*0103-B*4601	Japanese
A*2405	A24			Caucasian
A*2406	A24			Aus. Aborigine
A*2407	A24		A*2407-Cw*0801-B*1502	Chinese
A*2408	A24	A9HH	A*2408-Cw10-B35	Japanese
A*2409N	null			

表1-2: Aローカス-2

HLA allele	Specificity	WS name	probable Haplotypes	Race or Ethnic
A*2410	A24		A*2410-Cw*07-B*1802	Japanese
A*2413	A24			Aus. Aborigine
A*2414	A24			(South AM)
A*2501	A25		A*2501-Cw*1203-B*1801	Caucasian
A*2502	A25			
A*2601	A26	A26.3		
A*2602	A26	A26.1	A*2602-Cw*0303-B62-DRB1*1406	Japanese
A*2603	A26	A26.4	A*2603-Cw*0401-B62-DRB1*0406	Japanese
A*2604	A26	A10SA	A*2604-Cw*0702-B*3901	Japanese
A*2605	A26	A26KY		Japanese
A*2606	A26			
A*2607	A26			
A*2608	A26			
A*2609	A26			
A*2901	A29		A*2901-Cw15-B*0705	Oriental
A*2902	A29			
A*2903	-			Caucasian
A*3001	A30			
A*3002	A30		A*3002-B14	Korean
A*3003	A30			
A*3004	A30			Caucasian
A*31012	A31			
A*3201	A32			
A*3202	A32			
A*3301	A33	A33C	A*3301-Cw*0802-B*1402	
A*3303	A33			
A*3401	A34	A3401	A*3401-Cw*0403-B*1521	Aus. Aborigine
A*3402	A34	A3402	A*3402-Cw*1601-B*3505	Black
A*3601	A36		A*3601-Cw*0401-B*5301	Black
A*4301	A43			
A*6601	A66	A6601	A*6601-Cw*1701-B*4102	Hispanic
A*6602	A66	A6602		
A*6603	A66	A10V(96MW)		
A*68011	A68			
A*68012	A68		A*68012-B*1523	
A*6802	A68			
A*68031	A68		A*6803-Cw*0702-B*3805	Hispanic
A*6804	A68			
A*6805	A68			
A*6901	A69			
A*7401	A74		A*7401-Cw*02024-B*1503	Black
A*7402	A74			Oriental
A*7403	A74			Caucasian
A*8001	A80	A36V	A*8001-Cw*1701-B*4201	Black

組むA24で血清学的にA2403と類似した反応を示す。A2403はA9.3と呼ばれていたCaucasianに存在する抗原で、また、B18でもB*1801の方はCw5やCw*1203と関連するHispanicなどに存在する抗原で、血清学的に区別のつかないそれぞれの抗原がalleleレベルでA*2410-Cw*07-B*1802といった特徴的ハプロタイプを組むことが興味深い。

[A*2903] 血清学的な反応パターンの違いから発見されたalleleで、その反応はA36のスプリット抗原に見える。これも、特徴あるハプロタイプは判っていない。

表2: Cローカス

HLA allele	Specificity	WS name	probable Haplotypes	Race or Ethnic
Cw*0102	Cw1			
Cw*0103	Cw1	Cw1N	A*2404-Cw*0103-B*4601-DRB1*0901	Japanese
Cw*02021	Cw2			
Cw*02022	Cw2			
Cw*02023	Cw2			
Cw*02024	Cw2		A*7401-Cw*02024-B*1503	Black
Cw*0302	Cw10		A*3303-Cw*0302-B*5801	Oriental
Cw*03031	Cw9			
Cw*03041	Cw10			
Cw*04011	Cw4			
Cw*0402	Cw4			
Cw*0403	Cw4			
Cw*0501	Cw5	Cw4N	A*3401-Cw*0403-B*1521 A*0301-Cw*0501-B*4402-DRB1*1301	Aus. Aborigine Japanese
Cw*0602	Cw6			
Cw*0701	Cw7		A*0102-Cw*0701-B*4901	Black
Cw*0702	Cw7			
Cw*0703	Cw7			
Cw*0704	Cw7		A2-Cw*0704-B*1518-DRB1*0401	Japanese
Cw*0705	Cw7			
Cw*0706	Cw7			
Cw*0707	Cw7			
Cw*0801	Cw8	Cw8N	B61/B71/B35/B75/B77/B48	Oriental
Cw*0802	Cw8		A*3301-Cw*0802-B*1402-Cw*0802-B*9101	Cauc./Black
Cw*0803	Cw8		A24-Cw*0803-B48-DRB1*1407-A24-Cw*0803-B54	Japanese
Cw*12021	-			
Cw*12022	-	Cx52	A*2402-Cw*12022-B*5201-DRB1*1502	Japanese
Cw*1203	-		Cw*1203-B*1801/Cw*1203-B38	
Cw*12041	-			
Cw*12042	-		A*2403-Cw*12042-B*51	Caucasian
Cw*1205	-			Caucasian
Cw*1301	-			
Cw*14021	-	Cx4451	A*3101-Cw*1402-B5101-DRB1*1403	Japanese
Cw*1403	-	Cx44	A*3303-Cw*1403-B4403-DRB1*1302	Japanese
Cw*1502	-	Cw6.2	Cw*1502-B*4006/Cw*1502-B51	
Cw*1503	-			
Cw*1504	-			
Cw*15051	-		Cw*15051-B*7301	Black
Cw*15052	-		Cw*15052-B*0706	Black
Cw*1601	-			
Cw*1602	-			
Cw*16041	-			Caucasian
Cw*1701	-			
Cw*1702	-		A30-Cw*1702-B42	Black
Cw*1801	-		Cw*1801-B*9101	Black
Cw*1802	-		A30-Cw*1802-B*5703	Black

[A*6803] B*3905はその昔、ST16と呼ばれていたB39初期のスプリット抗原で、これとハプロタイプを組むA28がA*6803である。A*6803-Cw*0702-B*3905となる。

[A74] A19グループ最後の抗原と呼ばれているA74は、以外にも世界中に分布しているようである。さらに、A*7401がBlack, A*7402がOriental, A*7403がCaucasianとalleleごとに見事にすみ分けされている。A*7401-Cw*02024-B*1503は有名なハプロタイプ、その他は不明である。

Cローカス

[Cw*02024] 先ほども登場したA*7401-Cw*02024-B*1503ハプロタイプのCローカスはInternational Cell ExchangeでCw*0202NewとかCw*0202Vとしばらく呼ばれていたが、昨年、Cw*02024と正式名称が付いた。

[Cw*0803] Cw*0803は日本人でB48の一部と関連のみられるalleleだが、A24-Cw*0803-B48ハプロタイプのクラスIIがDRB1*1407であることはあまり知られていない。さらに、B54でCローカス・ブランクとなるものが稀にあるが、このCローカスがCw*0803であることが最近判った。Cw*0801~0803は血清学で全て判別可能である。

[Cw*12042] A9.3=A*2403はB51との関連は確認していたが、そのCローカスがCw*12042であることが判明した。

[Cw*1505] Cw*1505にはふたつの同義置換が存在し、それぞれ、C*15051-B*0703、Cw*15052-B*0706と特徴あるハプロタイプを形成している。どちらも、Blackである。

[Cw18] B81と関連するCローカスはCw6とCw8であったが、Cw6が実はCw*1801であった。塩基配列はCw4に近いが、Cw4単一特異性の抗体と反応せずCw6と誤判定されていた。一方、Cw8はCw*0804と思っていたが、sequence dataから消えているので現在どうなっているのか不明である。

Cw*1802はBlackでA30-Cw*1802-B*5703と特徴あるハプロタイプを形成している。

以上、日本人にはほとんど関係のない抗原・遺伝子が多かったが、最近、話題になったものを一部とりあげた。別掲の表中には日本人由来のハプロタイプが多く示してあるので、そちらを参照願いたい。血清学の話をしているのか遺伝子のお話をしているのか、良く呑みこめなかったかもしれないが、我々はこういった情報を基に、パネル細胞の型決定を確かなものへと近づけ、ワークショップの内容を充実させる努力をしている。

このレクチャー、私がA, Cローカスを担当したが、Bローカスは中央血液センターの田中氏が担当したので、次回は氏の話が期待できるであろう。

DNA 基礎講座

湧永製薬(株)創薬研究所バイオ診断研究室

川井 信太郎

■核酸の生物学 その4

前回、DNAの情報がmRNAに正確に写し取られてそれを元にタンパク質が合成されることを説明しました。今回は、予定でいけばその後の過程である<前駆体タンパク質から成熟タンパクになるまで>を説明するつもりでいましたが、前回書き忘れて最近分かった面白い現象について説明します。このあたりで少し休憩です(休憩になるかどうかわかりませんが)。

今までDNAの情報がmRNAに正確に写し取られてそれを元にタンパク質が合成されると説明していましたが、これを覆す現象があることが分かってきたのです。それは、<RNA編集: RNA Editing>と呼ばれる現象です。このRNA Editingとは、酵素によりRNAレベルでの塩基の挿入や欠失または1塩基置換の現象のことを言います。つまり、DNAの情報にはない塩基がmRNAに存在するようになるわけです。このRNA Editingについて説明しようと思います。

RNA Editingが報告されているものを表-1に示します。この様にRNA Editingには、大別して2つの種類が存在します。1つめは、トリパノゾーマの様な下等動物や粘菌類のミトコンドリアにおいて報告されている塩基の挿入や欠失によるRNA Editingです。最初に見つかったのがこのタイプのRNA Editingでした。これは、トリパノゾーマ(原虫の一種で、アフリカ睡眠病をはじめとするさまざまな病気の原因となることが知られている)のミトコンドリアにある遺伝子cox II (cytochrome oxidase subunit II)の転写産物(transcript)で見つけられました。cox II遺伝子の558番目にUが挿入(insertion)され、そのためにコドンの読みとり枠がずれ(このことをフレームシフト: frameshiftと呼ぶことは既に説明しました)DNAの情

報にはないタンパク質が合成されることとなります。これ以外に、トリパノゾーマにおいて全塩基配列の50%以上がRNA Editingにより挿入されたUをもつmRNAも報告されています。また、トリパノゾーマには、このUの挿入の他にUの欠失(deletion)も報告されています。この場合もフレームシフトが起こることとなります。トリパノゾーマ以外に新たな塩基の挿入が報告されているものはパラミクソウイルスと呼ばれるウイルスでmRNAへのGの挿入が報告されています。

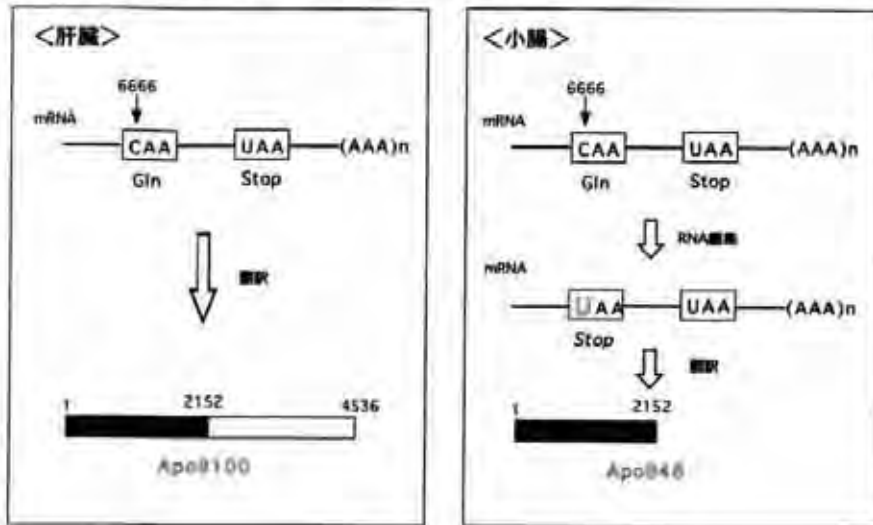
2番目は、ヒト遺伝子において行われている1塩基置換(substitution)によるRNA Editingです。次にこのRNA Editingについて説明します。この1塩基置換によるRNA Editingは、ヒト以外では高等植物のミトコンドリアやクロロプラストにおいて報告されています。まずヒトで行われているRNA Editingについて説明しましょう。ヒト遺伝子では、1塩基置換によるRNA EditingはmRNA上でCがU、UがCあるいはAがI(イノシン)になることが報告されています。このイノシンは翻訳の際にはGと読まれます。このようなRNA Editingが行われている遺伝子は、アポリポタンパク質遺伝子(apoB lipoprotein)、ウィルムス腫瘍感受性遺伝子(WT1)、グルタミン酸受容体遺伝子のサブユニット遺伝子(GluR2)などがあります。これらの中で一番よく研究されているヒトアポリポタンパク質B遺伝子(APOB)について説明します。このAPOBのmRNAのRNA Editingが哺乳類ではじめて発見されたものです。

肝臓においてAPOB遺伝子は図-1に示すように14.1KbのmRNAに転写され、4536アミノ酸からなるapoB100を発現します。このapoB100は、血中のコレステロールの運搬に関与する低比重リポタンパク質のタンパク質成分です。一方これが小腸では同じ遺伝子から7KbのmRNAに転写され、apoB48を発現するようになります。これは当然以前説明したオルターナティブスプライシングによるものでないことは証明されています。このapoB48とapoB100は、最初の2152個のアミノ酸は全く同じです。これは6,666番目の塩基であるCがUに置換されることにより生じたものです。つまり、グルタミンのコドンであるCAAが終始コドンであるUAAに変換されたわけです。apoBは、食事由来の脂質の運搬に関与するカイロミクロンの主要なタンパク質成分で

表-1 RNA Editingの種類

Editingのタイプ	Editingが報告された生物
Uの挿入/欠失	トリパノゾーマのミトコンドリア
Cの挿入	粘菌のミトコンドリア
CからUへの置換	哺乳類のapoB100 mRNA
AからGへの置換	哺乳類のグルタミン酸受容体サブユニットmRNA
CからU及びUからCへの置換	高等植物のミトコンドリア
CからUへの置換	高等植物のミトコンドリア
AからIへの置換	真核生物のRNA
Gの挿入	パラミクソウイルス
Aの付加	脊椎動物のミトコンドリア

図-1 ヒトアポリポタンパク質の組織特異的なRNA編集



す。このRNA Editingは、前述したように組織特異的に行われています。APOBのmRNAは、小腸においては全ての哺乳類ではほぼ100% RNA Editingされて、apoB48のみが発現されています。しかし、肝臓でのRNA-Editingは、種によってその割合が異なっています。ヒトやウサギの肝臓では、RNA Editingは起こりません。したがってこれらの肝臓ではapoB100のみが発現されています。ところがマウスやラットなどのげっ歯類では肝臓においても部分的にRNA Editingされています。つまり、これらの肝臓ではapoB100とapoB48の両方を発現していることとなります。このCからUへの変換は、図-2に示す様なシトシンの脱アミノ化酵素が関与していると思われます。しかし、このapoBの生物学的意義は現在のところ明らかではありません。

次にグルタミン受容体のRNA Editingについてです。哺乳類の中樞神経系のグルタミン受容体サブユニット遺伝子GluR2の転写産物もRNA Editingを受けています。グルタミンは、中樞神経における重要な興奮伝達物質であることが知られています。GluR2のmRNAのエクソン11とイントロンのいくつかのグルタミンをコードするコドンCAGのAがGにRNA Editingの結果アルギニンのコドンCGGとなっています。グルタミンのアルギニンへの変換は、この受容体のカルシウムの透過を著しく低下させます。

アフリカツメガエル(Xenopus)の卵母細胞においては、2本鎖RNA(dsRNA)に存在する多数のAがI(イノシン)に変換さ

れています。これは、dsRNA特異的アデノシンデアミナーゼにより行われています。この反応は、アフリカツメガエルだけでなく多数の真核生物の細胞内で起こっていることが報告されています。この反応の生物学的役割は現在のところ明らかではありませんが、ウイルスに対する防御としてdsRNAの分解のシグナルとして働いているのかもしれない。

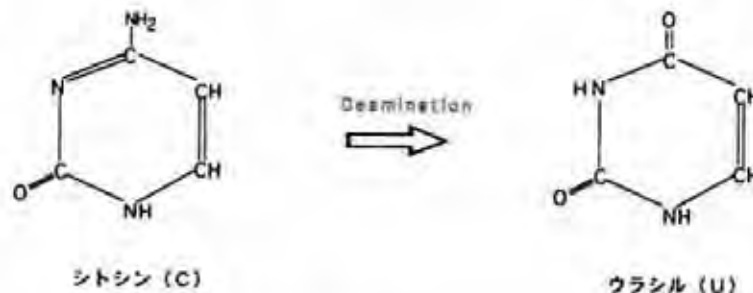
高等植物のミトコンドリアの転写産物においてもCからUに変換されるRNA Editingが報告されています。現在までさまざまな植物の転写産物のEditingに

ついて調べられていて、すべての転写産物中にEditing部位の存在が確かめられています。Editing部位は、植物間で保存されている傾向にあります。タンパク質の翻訳領域内に300以上のEditing部位の存在が報告されています。このEditingのほとんどはCからUへの置換であり(一部逆のUからCへの変換の存在も報告されていますが)、Editingの中には開始コドンや終始コドンを作ったりするものもあります。非翻訳領域内でのEditingも数種類存在します。Editing部位の大多数はコドンの第1、或いは第2番目の塩基に集中しています。つまり、Editingを受けるとほとんどがアミノ酸が変化することになります(コドンの第1、或いは第2番目の塩基が他のものに置き換わるのとアミノ酸が変化することについては前回説明しました)。CからUへの置換は、トウモロコシやタバコのクロロプラスト(葉緑体)のrpl2やpsb1の転写産物中にも報告されています。これら転写産物中においてはスレオニンをコードしているACGが開始コドンであるAUGに変換されています。

この様にトリパノゾーマのような下等動物からヒトまでRNA Editingが存在しています。生物はDNAの情報にのみ拘束されているのではなくRNAをEditingすることによりタンパク質の発現や機能をコントロールしているのかもしれない。それに歯止めが効かなくなった時には、RNA Editingの異常による疾患につながっていくのではないのでしょうか。

今回は、本題に戻して未成熟タンパク質から成熟タンパク質になるまでについて説明します。

図-2 シトシンのdeamination



HLA

From BOSTON

ところ変われば

戸田 佳孝
竹村 清介

1 渡米前 (戸田佳孝)

平成9年3月から慢性関節リウマチとTNF- α の関連性についての研究で有名なJean Mayer United States Department of Agriculture, Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University (以下、HNRCA)の新進気鋭の助教授ルーベンノッブ博士と我々との半年間の第一次共同研究がボストンで開始されました。幾つかあった共同研究候補のなかから彼らを選んだ理由は、この文章の後半執筆する竹村医師の夫人の「ボストンフィルの小沢を毎日、生で聴きたい」という単純な理由であったように記憶しています。テーマは「慢性関節リウマチ患者におけるHLA-DRB1遺伝子型と各種サイトカインの血清濃度」であり、サイトカインについてはタフツ側が計測し、HLAは我々が計測することになりました。竹村医師はそれまでRFLP法でHLA遺伝子の測定を行っていました(私は口を出すだけで実験はしていません)。しかし、RFLP法に必要な道具一式を担いで飛行機に乗ることを考えると、我々はクラクラしてきました。そこで、「なんとか荷物を減らしたい」と考え、思い出したのが、以前関西医科大学輸血部松崎主任技師から聞いていたINNO-LiPAでした。渡米のぎ

りぎりになって、ベリタスに電話をしましたが、医者の悪い癖で薬問屋さんに注文する感覚で「あんたところのキットを使ってやるから、来週の月曜日にうちで取り扱い説明してくれ」という態度で電話をし、迷惑をかけました。それでも、こちらの事情を察して、特別に東京からわざわざ説明にきてくれたベリタスの益尾さんと大澤さんには今も大変感謝しています。

写真1

Jean Mayer United States Department of Agriculture, Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University (タフツ大学アメリカ農務省立老年医療栄養学研究所)は全米で最も古い病院で現在も全米で第5位の規模を誇るNew England Medical Centerと提携し、Bostonのダウンタウンの中心に位置しています。ここでは、アメリカ政府とTufts大学により共同で運営されており、国立大学が少ないアメリカではユニークな施設です。加齢に関する様々な研究が幅広くなされていました。



写真1 全米で第5位の規模を誇る
New England Medical Center

「Terasaki plateは照り焼きとは無関係である。」

2 米国にて (竹村清介)

我々は留学したHNRCの Body Composition Laboratoryは「ボディコン」と呼ばれております。電話がかかってくると、日本で我々は「はい、整形外科研究室です。」と応対していたのが、ここでは「ハイ！ボディコン」となっていました。最初はnice legの女性を連想してしまったのですが、いつの間にか自分も電話と取ると「ハイ！ボディコン」と言っているのに気付きました。

ボディコンではDr. Roubenoffを中心に老人、AIDS患者、慢性関節リウマチ患者の身体組成が解析されています。具体的には種々のサイトカインやビタミンが計測されているのですが、HLAのタイピングなどは行われていなく、一からのスタートでした。私達はリウマチ患者を対象に、Terasaki PlateでHLA-A, B, C lociを、INNO-LiPAとSSPでHLA-DRB1 allelesをタイピングしました。国が変われば風習、常識も異なり色々戸惑うことが多々ありました。

幸いにも、Thermal CyclerはPerkin Elmer 9600があったのですが、電気泳動装置がなく、日本からミュービットを送ってもらいました。皆はミュービットをみてその小ささと値段の安さにひどく感心していました。

最初は、タイピングがうまくいくかどうかを確認するために、laboのメンバーを対象に試験的に行いました。アメリカでは採血をする際にもglovesをつけるのが常識で、義務付けられています。日本では採血をする時にglovesなど着けないと言うと、皆が集まってきてなぜだと尋ねてきました。「日本にはAIDS患者は殆どいない。手術を受ける患者は全員HIVの検査を行っているが、私はこれまでHIV陽性の患者を見たことがない」と言う、「日本のHIVの検査は感度が低すぎるのではないか？」などと言う人すらいました。日本にはdrug userやhomosexualsが非常に少ないからだろうと説明して

も納得していないようでした。

このように感染症に関しては非常に敏感で、予防措置も徹底していました。我々にはもったいないと思うくらいにdisposableをふんだんに使っていました。7月になると医学生がアルバイトとして各研究室に配属されてきました。私がglovesを再利用していると、その医学生が「Dr. Takemura, what are you doing?」と尋ねてきました。挙句の果てに「このglovesはティスポだよ。」と教えてくれる(?)始末でした。

studyを行うにあたり、患者の取り扱いにもアメリカでは大きく日本と異なっていました。informed consentにはさすがに本場だけあってうるさく、何枚にもわたる説明書を書いて大学に申請し、承認を得た書類に患者にサインしてもらわなければなりません。

studyの対象患者(ボランティアといいますが)には、行われる検査の種類によってお礼金が支払われます。採血だけならば\$50、一日入院してもらって畜尿する場合は\$100支払われます。

最初は50人を半年でタイピングする予定だったのですが、外来が完全予約性で週一回の外来に約8人しか診察しないため、なかなか検体が集まらず、結局20人しか集まりませんでした。しかし、私達の帰国後は、PhD課程の学生がひき続き我々のstudyを行ってくれています。現在も進行中で、e-mailでやり取りしていますが、Terasaki PlateのことをいつもTeriyaki plateと書いてくるのに帰国後も驚かされています。



世界移植事情

国立がんセンター中央病院内科
田野崎 隆二

はじめに

ニューヨークはマンハッタン島のアップパー・イーストサイド、イースト・リバーに面して、ロックフェラー大学とコーネル大学医学部、スローンケタリング癌研究所、ニューヨーク市立病院などが隣接して建っている一区画がある。そこから1ブロックほどセントラル・パークの方に歩いたところに4階建の白い建物がある。それが、ニューヨーク血液センターの研究施設であるLindsley F. Kimball Research Instituteである。建物の前には星条旗と白地に赤い三角形の中に1滴の血液をデザインしたニューヨーク血液センターの旗がはためいている。私は1995年の秋から約2年間この建物で研究生活を送った。家は、マンハッタン島の北西部にあるジョージ・ワシントン・ブリッジを渡ったところにあるニュージャージー州のフォートリーという町の歯医者さんのオフィスの2階を借りた。そこから、ジャズや黒人街で名高いハーレム地区を通り抜けるバスか地下鉄で、毎日約1時間かけて通った。この途中、コロンビア大学やマウント・サイナイ病院があり、日本人の知り合いも何人も出来た。時には、タイムズ・スクウェアの近くのポート・オーソリティからリンカン・トンネルを経由するバスを使ったが、夜空に映えるマンハッタンの高層ビル街は絵葉書のそれよりもはるかに美しくロマンチックであった。こじんまりとしたニューヨーク血液センターの建物の中には、私のボスで1昨年のアメリカ血液学会の会長をしたJohn Admsonを筆頭に、肝炎ウイルスの大家であるAlfred M. Prince、造血幹細胞の純化の先駆者であるJan W.M. Visser、血液型物質などで有名なColvin M. Redmanなど、約20もの研究室が比較的ゆったりと陣取っている。1階の玄関を入り突き当たりを左に行くと私のいたLaboがあるが、右に行くと、Pablo Rubinsteinのいる免疫遺伝学のLaboで、そこが、世界で最初でかつ最大の臍帯血バンクの本拠地である。

ニューヨーク血液センターの臍帯血バンクの様子

ニューヨーク血液センターで臍帯血バンクが始まったのは1993年2月で、同年6月に初めてのドナー検索が始まった。その8月には世界で第1例目の非血縁者間臍帯血移植が行われた。その後、臍帯血移植では非血縁者間でHLAが不一致であってもGVHDが少ないことが判明し、バンクに拍車がかかった。1995年12月には100例目の移植が行なわれ、1997年末

「ニューヨーク血液センターの臍帯血バンク」

までには400例以上の移植が施行され、その安全性が確立した。私が留学前に勤務していた慶応大学病院で初めての臍帯血移植をする際に、何か留意点はないかと尋ねたところ、彼は、臍帯血移植がいかに安全なものかを強調し、骨髄と臍帯血の両方を使えるとしたら何故侵襲の少ない臍帯血移植を選択しないのかと私に力説した。お除で、慶大のその症例の経過は彼の言ったとおり極めて順調であった。現在では、日本を含め世界中からの依頼を受け付けている。ニューヨーク血液センターの臍帯血は、マンハッタン北にあるマウント・サイナイ病院付属の産科専門棟から運ばれてきていた(昨年暮れに、どうも、他の病院に変わったらしいが)。そこでは、年6000件位の出産がある。分娩室は同じフロアにいくつもあり、その一角に2~3畳くらいの狭い臍帯血処理の部屋がある。臍帯血バンクのプロジェクトのために雇われた3人の女性の技師が交替制で24時間待機している。従来破棄されていた胎盤と臍帯を造血幹細胞移植の目的に使用してよいことについて文書によって了承を得る必要がある(インフォームド・コンセント; IC)わけだが、これを行うのも彼らの仕事である。彼らは、事前に妊婦のベッドサイドに行き所定の説明を行う。時には出産後に行うこともある。約20%のケースでICが取れないらしいが、その最大の理由は言葉が十分に通じないからという国際都市マンハッタンならではの事情であった。

彼らは基本的に出産の邪魔はしないという方針で、妊婦に



写真1

も産科医にも影響がないように、完全に娩出された胎盤を用いる。分娩の知らせを聞くと、直ちに一人がそこに行き、胎盤を産科医から受け取る。それを処置室に持ってきて予め用意しておいた台の上に置き、そこから臍帯を下に垂らす(写真1)。臍帯は、凝固系を賦活化しないように胎児に最も近い部分で一箇所だけ鉗子で止めただけの状態になっている。臍帯を垂らすと静脈が怒張するので、そこに、400ml用のACD-A液の入った通常の輸血用バッグの穿刺針を十分消毒したうえで刺して臍帯血をバッグに移す(写真2)。このようにして集められた臍帯血は、毎朝ニューヨーク血液センターに届けられる。1件もない日もあれば、10件位の日もあり平均して5検体くらい来る。届けられた臍帯血は、その採取日と重量とともに血液センター内のオン・ライン・システムでつながっているコンピュータに登録され、また、バー・コードで認識できるようにする。ひとつのバッグから、細菌培養、血清学的感染症検査、血球数算定、造血幹細胞数、ABOおよびRh式血型、HLA検査用に少量ずつバー・コードでラベルのしてある所定のバイアルに検体がとられ、それらは研究所内の各専門部署に送られる。その後、臍帯血は1%にな



写真2



写真3

るようにHESが加えられ、50xgで5分間遠心されて赤血球が除かれる。その後、400xgで10分間遠心され、血漿が除去され、最後に、10%DMSO、1%デキストラン40、1%HES存在化で一晩-80℃に入れられ、以後、液体窒素の入ったタンクの液相に移され、保存される(写真3)。臍帯血は、フィコールなどの通常の比重遠心液で分離しようとしても赤血球相がきれいに分離できない。そこで、HESを加えて弱遠心すると効率よく赤血球を分離させられる。また、通常の比重遠心分離では、コロニー形成細胞は下に沈み半分くらいのロスがあることが判明している。このため、採取した臍帯血は分離せずに保存してそのまま移植に用いられることも多いが、解凍時に溶血した赤血球から遊離される大量のヘモグロビンの腎毒性や保存スペースの節約を考慮すると上記のようにバッフィー・コートに分離しておくほうが効率的で、ここでも1994年10月から最終量を25mlにするこの方法を採用した。

患者主治医からの臍帯血の依頼があると、すぐにコンピュータ検索が行われる。臍帯血移植では非血縁者からのものであっても移植片対宿主病(GVHD)の程度が少ないためHLA 1座不一致まで安全に用いることができる。実際の出庫が決定すると、凍結保存してある該当するバッグのパイロット・チューブの部分のみをすばやく切り出してHLAタイピングを再検することも忘れていない。また、Rubinsteinは解凍法についても検討しており、解凍後に急速に体内に輸注される時に生じる急激な浸透圧差による細胞傷害を緩和する目的で、37℃の恒温槽で急速解凍後、アルブミン加10%デキストラン40を等量加えて5分間静置する方法を考案した。この方法は、米国国立科学アカデミー雑誌(PNAS)に詳細に報告されているが、この方法を用いて移植をしているDuke大学のチームの成績では、この方法を用いない従来法に比べて極めて早い移植後の血球回復がみられることがNew England Journal of Medicineにも報告されている。実際のバンクの状況は、正直な印象として、意外と小規模で、うまく効率良く運営され



写真4

ていると感じた。すなわち、RubinsteinのLabo自体決して大きいものではなく、実際の運営は事務職も含めて10人に満たない。臍帯血が保存されている部屋も通常の研究室程度の大きさで、昨年までに6000検体位が集まっていたが、1万検体は保存できる計算である(写真4)。Rubinsteinはかなり高齢に見え、非常に落ち着いた面持ちで、どんな時でもゆっくりとした口調で相手を諭すように話す。私の彼に対する第一印象は、正直なところ、本当に彼がこのバンクの創始者なのだろうかと思いたくるところであったが、こじんまりとしたバンクのシステムの中には、彼の独自の創意工夫が随所に組み込まれていて、徐々に、実際には非常に活動的でやり手であることが分かった。

日本の臍帯血バンク事業に期待すること

私がニューヨーク血液センターに赴任して間もないころに、以前からお世話になっていた、医科学研究所から北海道赤十字に移られたばかりの池淵研二先生が同センターの佐藤先生と一緒にRubinsteinを訪れた。一方、逆に北海道赤十字から医科学研究所に移られたばかりの高橋恒夫先生も足しげく彼を訪れた。また、医科学研究所長の浅野茂隆先生を団長として、東海をはじめとする日本各地の臍帯血バンクの代表の方々も彼を訪れた。現在、我が国でも順調に非血縁者間臍帯血移植が動きだしているが、事前の基盤作りを見る機会を得て、心が踊る想いであった。私は、マウスの骨髓血やヒトの臍帯血を用いて造血幹細胞の研究に取り組んでいたが、成人の造血細胞と胎生期のものとはその性状が大きく違うことがだんだんと実感できるようになった。胎生期には造血幹細胞が多く体内を循環している。妊娠後期になるにつ

れ循環する幹細胞は徐々に減少し、出産直後に激減する。造血幹細胞の造血因子に対する反応性もその増殖能力も、胎生期と成人とは大きく異なる。臍帯血は、その両者の中間に位置するのかもしれない。臍帯血には、理論的には、成人の造血組織を再構築するのに十分量の造血幹細胞が含まれている。小児においても臍帯血移植後の血小板回復が遅いことが指摘されているが、移植後の造血回復が遅いのは臍帯血の細胞が発達学的に未熟で通常の造血環境ではすぐに増殖しえないための可能性がある。私達の研究テーマのひとつは、*ex vivo*で臍帯血の造血幹細胞の半分を巨核芽球系に分化・増殖させて、残りの半分の造血幹細胞と一緒に移植に用いることによって、移植後の血小板回復を早めようとするものであった。

このように可能性に満ちた臍帯血の利用を推進することは、その可能性を更に引き出して行くうえで極めて重要な事である。ニューヨーク血液センターのバンクをみて、日本における臍帯血バンクの在り方を考えるに、バンク自体は日本各地にある赤十字のような部署で行われるのが現実的であり理想的に思う。即ち、小規模ながらも統制がとれたところに10,000件くらいの臍帯血が保存され、HLAが1座不一致でも可能として対応するならば、ある地域の需要に十分対応できるはずであり、必要に応じて、バンク間の相互補充をすればよいのである。一度、臍帯血処理と検査の方法に関して規定を設けさえすれば、後は、通常の献血事業の延長線上にある。一日も早く本邦の臍帯血バンクの統制がとれて、機能的なバンク事業が進むこと、そして、その上で、臍帯血を利用した新しい治療法の開発・確立が望まれる。



生き証人シリーズ

福岡市中央区予防課 健康増進係
医師 武田 淳也

1998年、2月、長野オリンピック大会開催。熱き冬のその大会は、既に歴史の1ページとなってしまった。大会開催約一ヶ月前の1月17日夜、記録的な大雪に見舞われた松本市内の、レトロな雰囲気のスナックのカウンターに私は腰を落ち着けていた。「国立循環器病センター臓器移植研究室室長ですか…」私は隣の先生から戴いた名刺を見ながら眩いた。と同時に、日中、オリンピックのドーピングコントロール研修で御一緒した3人の先生方の会話の中で何度か耳にした「HLA」という単語、私にいろいろなことを想起させる特別なその単語が頭をかすめた。その数分後には、私は初めてお会いしたその先生に、私自身の妻のことを話し始めていた。後日、福岡の私の元にその先生からファックスが届いた。この生き証人シリーズの私の妻への原稿依頼(13号分)である。私がある時、先生に出した返事は以下の通りである。これ自体が、私自身は生き証人でないのに、なぜ今、つたない文章でここに原稿を書かせていただいているかの理由の説明になると思ひ、載せていただくこととした。「佐田正晴先生御机下 前略 昨日、妻に知らせましたところ「私などでよろしければ」と申ししておりました。おもえば、私たちの結婚前、私が医学生の時、腎不全に向かって腎機能が落ちていく妻の傍らにいて、心理的な状況、食事制限のつらさ、移植手術、術後、大腿骨頭壊死、そしてその手術、種々の副作用を目の当たりにしてきました。本当にこれまでいろいろありましたし、また、これからいろいろあるでしょうが、移植医療と移植を受けられた幸運(義母の決意とHLAのタイプとそして今年還暦を迎えた義母がスポーツウーマンですごく健康であったこと)に私たちは感謝しております。私は妻が移植を受ける前に、女子医大の太田先生の講演を妻と妻の母と一緒に聴きに行き、日本は登録臓器が少ないばかりに、移植ができる医療資源全て(臓器と法整備以外は)があるにも関わらず、移植件数が少ないことを知り、市民に向けて、こういった医療保健分野における啓発や広報を上手にしていくことの大切さを痛感致しました(今の私の仕事とも大いに関係しますが…)。また、先日先生に申しましたように、ほんの最近、妻から「他の方々から経験を話すことで人の役に立てれば」という話を聞いたばかりのところでした。手前勝手ながら、そんな折、先生とお会いしこのようなお話をいただき「これも何かの縁かもね」などと妻と話しております。そして、運によらず必要な方々が移植医療を享受できる日が来ればと夫婦共々願っております。草々」

大いなる日常! さらなる移植を!

時は遡って、1992年6月14日、日曜日「あなた、私が我慢しているのを知っててよくそんなことが言えるわね!!」「な、何も俺はそんなつもりで言った訳じゃあ…だから、前もってお腹空いているかどうか聞いたんだよ。お腹空いてないと言ったから…」これは、現在私の妻となっている万紀子との間の喧嘩で私が一番忘れることが出来ない一コマである。同年3月23日の腎生検にて、Ig A腎症からの腎不全と診断され、近い将来透析になるだろうと主治医から告げられて、少しでも腎機能をもたせようと彼女が厳しい蛋白(20g/日)制限食の日々を送っていた頃の話である。朝から人工スキー場に行って、その帰りの途上の車の中でこのような喧嘩となった。もちろん上記から想像がつくように、そうなる前には次のような会話があった。「マコお腹空いてる?」「うん」、「俺、スキーしてお腹がすごく空いたからちょっと焼き肉屋に寄っていいかな」→バ・ク・ハ・ツ!である。以上のような、恥ずかしいことをあえて書かせていただいた理由は、当時、私自身医学生であり、頭の中だけでは既に「腎不全食の蛋白制限=大変」という図式は理解しているつもりであったが、患者のパートナーとして目の当たりにしたその現実、私の甘い考えを見事に叩き潰したからだ。肉や魚などおいしいメインディッシュになるようなものはどうしてあんなに蛋白類が多いのか?ご飯や麺類、芋類、野菜類にまで蛋白はしっかり入ってる!おいしい果物類もカリウムが多い!。我々が日常の中で人と交流する時、一番多い状況は、どこかでおいしいものを食べに行くということだろう。例えば、2人でちょっと焼鳥屋にでも行ってビールを一杯やるかとか、友人と映画を観に行った帰りにスパゲッティを食べるといったことができない生活とは? (ひとりに我慢させて、ひとりだけが楽しむことはできるが…)、半日以上の外出であれば特別のお弁当を持っていく必要があるという生活とは?彼女がその年の9月30日に自身の母からの生体腎移植を受けるまでは、それが私達の毎日であり日常であった。二人で何でも食べれるようになって、外食までも出来るようになって、はや6年近くが経った。今でも、どちらからともなく「こんなおいしいものが何でも食べれるってことは本当に幸せだね」という言葉が食事中によく出て来る。事実私達は、食を大切にすることを学んだだけでなく、人一倍、食に対して精力も注ぐ夫婦になってしまったようだ。私達夫婦は現在、何不自由ない生活を満喫している。月に一回、妻が内科の診察から帰り、一ヶ月分のたくさんの免疫抑制剤を整理する光景や食後の内服は、もうすっかり私たち夫婦の日

常となっている。特別に意識していることをいって言えば、感染症に気を付けること。年に一回くらいの割合で出る不明熱には夫婦ともにヒヤッとさせられるが、それ以外では風邪のシーズンと結核(免疫抑制剤で治療中の人は発病の相対危険度は約12倍、ちなみに人工透析では10~15倍、糖尿病で約3倍。感染性の結核は依然多い。)そして私の水虫(半分冗談半分本気)等は脅威である。今のところ、妻が風邪を引くのは私よりも少ないし、水虫をもっているのは相変わらず私一人のようだ。そして、定期的にガン検診を受けて、バランスのよい食事をして、ウォーキングをはじめよくからだを動かすこと。これらすべてを含めて最近では私達の大きな日常となってきた。写真は、昨年(平成9年)の正月に福岡から車で野沢温泉にスキーに行った時のものである。移植後の副腎皮質ホルモン(コルチゾール)の副作用による右大腿骨頭壊死に対する手術後三年目にして、ビギナークラスのスキーの脚前であった妻が頂上から下まで一気に滑り降りるまでになった。同時期に手術を受けた皆から羨ましがられるくらい歩行もスムーズだ。以前、整形外科にいた私の、リハビリを手伝った私の、またとない自慢の種である。妻の母に感謝、移植医療の発達に感謝の日々である。私達が大変残念に思うことは、今の日本の移植の現状において、私達のような例は、大変幸運な稀な例とされていることだ。平成9年10月に「臓器移植に関する法律」が施行された。現在、三年後の見直しに向けて、脳死判定の基準、15歳以下の子供の移植、点数制による公平な配布等について論議されているようだ。それらは、もちろん必要なことだ。しかし、これらの論議に優先しなければならないものがあるのではないだろうか。いかに医療資源と法が整おうと臓器移植は登録臓器あればこそである。現時点で登録臓器がこんなに少ないのは、脳死判定に不安があるからなのか? 前述のように脳死移植に論議すべき点が多々あり国民の信頼を得られないからか? 果たしてこれらの中に一番の原因があるのか? 答えは否、と私は断言する。死の判定として国民が十分に受け入れている心臓死においても可能な角膜、腎臓の登録さえも少ない国だからである、と私は思う。言わずもがな、上記論議がある脳死移植なんて…というのではないのか。

「死体腎移植が低迷。脳死と混同? 提供者減る」今年、2月のある新聞の記事である。現在人工透析を受けている患者は約17万人、腎移植希望の登録者は約1万5千人。死体腎移植の件数は平成元年度の261件をピークに下降線を辿り、7年度に161件まで落ち込んだ。8年度は広報活動のためか180件に持ち直した。ところが、9年度は移植法が施行され、社会的に関心が高まったはずだがなんと8年度を大きく下回る予想である。以上からわかることは3つ。一つは脳死に対する国民の不安感。もう一つは、法施行前から心臓死による死体腎移植でさえこんなに減少していた、という事実。そして、3つ目はこの増減を論ずる以前の話として、臓器の登録数のベースが欧米と比較し極端に少ないこと。常識的に考えても、心臓死による移植の登録さえしない人が脳死による移植の登録をするとは考え難い。ならば心臓死による登録数のベース自体を増やすことが一番大切ではないのか。そして、その人達の中で脳死移植に理解を示した方に、脳死移植の登録の追加を促してはどうか? 脳死とか心臓死とかでなく自分のドナーカード自体、生まれてこのかた一度も持ったことのない人達に、ドナーカードを持つという行動と経験を一人でも多くにとりあえずしてもらおうこと。「心臓死を死と認める人は臓器登録を!」キャンペーンだ。今の日本の現状では例え心臓死のドナーカードであってもドナーカードを持つこと自体が一番大きなゲートウエーであり、それに脳死を追加する方がはるかに取っつきやすいのでは、と思うのは私だけであろうか? 角膜、腎等と違って、移植をしないと命まで失ってしまう多くの方々がいる。脳死移植でないと救われない方々がいる、といった脳死移植の重要性を十分認識している、自分の仕事に誇りを持っている移植医療関係者には、即座に脳死移植のドナーカードを持っていただきたい。なぜなら、頭では心臓死を死と認めても、臓器移植の重要性がわかっていても、登録するという行動に結びつかないことばかりの心臓死の登録の失敗と同じことを招かないためである。「知っていることと行動することを結びつける」には、移植医療関係者自らの認識を登録するという行動で示さねばならないと考える。

終わりに、私は今、仕事で「生活習慣病」を扱っている。この病気が一番難しいところは「わかっちゃいるけどやめられない」という人の「知と行動」が、結びつかないところである。正しい生活習慣を一番知っているはずの医者に、生活習慣病の者が現実にこれだけ多いこと自体が「知と行動」が結びつくことがいかに難しいことかを如実に現している。「医者が健康行動モデルである必要はない」という時代は終わりつつある現代、「環境学者は自らがエコロジスト」であることを求められる現代、において臓器移植の新しい波を起こすのは、これを読んでいるあなた自身しかない! 私自身は、ドナーカードを携え「高齢化」と「生活習慣病」により、使えない登録臓器が増えることを危惧しつつも、微力ながら協力する所存である。今日もミニドック、ヘルスアップスクールの結果説明で約70人の市民にドナーカードを持っているか聞いた。一人もいない。そして彼らの約8割が既に高脂血症、高血圧、糖尿病である。



野ではあの利根川進博士と並び賞される世界的権威である。難解な免疫系の分子レベルでの仕組みについて、今までの知見を説明され、その後、作成した2つの自己免疫病態モデルマウスの解析により自己免疫病発症のメカニズムが解説された。

【朝一番の教育講演大盛況】

会期中3日間、朝9時から10時まで2会場で2題ずつの教育講演が行われた。

教育講演者の顔ぶれ(表1)は錚々たるもので、興味深い演題ばかりであり、収容人数2000名弱の大ホールであるメインホール及びブルームAには朝早くから多くの人が詰めかけ、大盛況であった。前夜の夜更かしにもめげずに、皆さん相当勉強熱心でした。

下遠野教授の講演はウイルス蛋白が感染細胞の遺伝子発現をも制御しているという知見は興味深い。

また、現在輸血用血液はGVHD予防のため放射線照射を行っているが、混入ウイルスの放射線による変異及び活性化が心配な点である。この点について、京都大学の武部教授は50Gy程度ではウイルスを不活性化することは出来ないが、突然変異を含めて活性化の心配もないことを説明された。

造血幹細胞は血液細胞への分化だけではなく、血管内皮細胞へも分化する。西川教授の講演は造血幹細胞移植におけるpluripotentな幹細胞の重要性を再認識させられる内容であった。

その他、京都府赤十字血液センターの丸屋、佐治両先生による教育講演もあったが、その内容はそれぞれ、またの機会に紹介していただく。

【臓器移植の田中絏一教授もシンポジスト】

総会長シンポジウムは4名のエキスパートが血液事業、同

種免疫、輸血感染症及び実質臓器移植について、現在に至る経緯を踏まえて21世紀への展望を語られた。

血液事業においては、福岡県赤十字血液センターの前田所長がより安全性の高い輸血用血液の選択と末梢血幹細胞及び臍帯血幹細胞を含む造血幹細胞プロセッシングの取り組みを、また同種免疫については日本赤十字社中央血液センターの十字所長が遺伝子解析による細胞性免疫の解析とNK細胞による細胞性免疫の解析の重要性が語られた。

京都大学移植免疫学講座の田中絏一教授は臓器移植のエキスパートで生体肝移植の症例数は既に350症例を超えている。国際学会でも特別講演を依頼されることが多い。先生は21世紀への期待することとして、遺伝子工学に基づく異種臓器移植及び拒絶反応を防ぐ新たな免疫抑制療法、移植免疫寛容の導入をあげられた。

【輸血問題検討部会「血液行政のあり方について」で討論白熱】

最終日の午後から輸血問題検討部会が開かれた。熱心な討論が続き、予定時刻を30分以上過ぎる程であった。

昨年12月、厚生省の「血液行政のあり方に関する懇談会」の最終報告書が提出され、現在これに沿って、血液事業法等の検討がなされている。

本学会では各界からの話題提供者により提供された問題点等について、学会として討議されたことはまことに意義深かった。

【最後に一言】

私は本学会では開催側であったため、個々の講演を落ち着いて聴くことが出来なかった。従って、内容を詳しくレポート出来なかったが、本学会に参加できなかった先生方に少しでも学会の雰囲気や伝えられればとレポートした。



第46回日本輸血学会
総会メインホール

「日本の国際レベル」

サッカーの世界カップでフランスが優勝したことが記憶に新しいが、日本は残念ながらアルゼンチン、クロアチア、ジャマイカのいずれにも負けて予選敗退の成績であった。僅差での敗退であったとの見方もあるが、冷静に見れば、1点差でも負けは負け。逆に言えば、どんなに大差で勝っても、勝ち負けは勝ちである。1点差でも守り切る自信があれば、相手が力を抜いたとしても当然であるから、むしろその一瞬の隙について得点をはかる機会を狙わなければならない。やはり、日本チームの攻撃力の不足が敗因の最も大きなものであろう。そこに日本と外国とのレベルの差を感じた方も多いと思う。

では、なぜ日本と外国で選手の競技レベルに差があったのであろうか？ 日本では選手を育てる際に個人プレーよりチームプレーを優先させるのに対して、外国ではまず個人プレーの力を伸ばすように育てるといわれる。また、裕福ではない国の選手はハングリー精神が日本の選手に比べて旺盛であり、このため個人の競技力がより高まるといわれる。もちろん、サッカーが団体競技である以上、チームプレーがなくては試合に勝てないことも事実であり、実際決勝トーナメントに勝ち進んだチームは、個人技もさることながら、チームプレーにも目をみはるものがあった。そう考えると、日本チームは、選手個人の技量もチームとしての総合力も、結局いずれも国際レベルには達してなかったことになる。

外国チームの出場メンバーを見れば解るように、彼らの中には自国以外のサッカーチーム、それもトップレベルのチームでプレーしている選手が多い。それに比して、日本チームのメンバーは全員が自国でプレーしている選手ばかりであった。つまり、国際的にトップレベルのチームの選手がどのように練習し、試合を組み立てているかを日本の選手は肌で染みて知っていなかったことになる。個人あるいは

集団の技量を磨く上では、国際レベルのトップクラスがどのような位置にあるのかを個々人が身を持って体験しなければならないのではなかろうか？

国際レベルを考えて個人やチームの成績向上を図り、外国に立ち向かう力を付けなければならないのは、サッカーなどの競技に限ったことではない。政治や経済は言うまでもなく、学問や医療もしかりである。外国のまねごとをして後からついて行くだけでは国際社会での生き残りはおぼつかない。国粹主義にこり固まっているわけではないが、外国に先んじてトップを走る日本でありたいとの愛国精神がある。

7月に行われた第7回日本組織適合性学会に参加された読者は御存知と思うが、今日のHLA-DNAタイピングの正解率は全ローカスを合わせて98%以上であった。前回の第6回学会でのQCワークショップもほぼ同様の正解率であったが、今回は前回に比べて参加ラボ数が約2倍になり、また各ラボが解析したローカス数も増えたことを考慮すると、この成績は脅威的である。また、今回はQC初参加のラボを含めて、100%の正解を出したラボが80%を越えており、このことから、日本におけるDNAタイピングのレベルは国際レベルにおいてトップクラスにあると言える。すなわち、HLA-DNAタイピングに関する限り、日本は個人(ラボ)レベルでもチーム(全国)レベルでも世界のトップにいる。このことは世界に誇るべき成果であろう。もちろん、この成績に慢心することなく、個としてはより一層の成績向上を目指すために、全体としてはこのレベルを維持するために、なにが必要であるかを個人個人が国際的視野を持って考えなければならない。個人の技量を高めることこそが、チームの技量を高める上で最も有効であるのだから。

質問?コーナー

回答いただいた先生
東京医歯大・難研・成人疾患・分子病態
木村 彰方 先生

Q : 最近MICAとかMICB遺伝子の名前を見かけますが、その機能や多型性について、文献を含めて教えて下さい。

A : MIC遺伝子はMHCクラスI鎖遺伝子と相同性を有する遺伝子(MHC class I chain-related genes)として、HLAクラスI領域に発見された(Proc Natl Acad Sci USA- 91:6259,1994.)ものです。命名の由来からすれば、MICはエム・ワン・シーと呼ぶのが妥当なのですが、一般的にはミックと呼ばれています。この論文ではHLAクラスI領域に少なくとも5種のMIC遺伝子配列が存在すると報告されていますが、解析が進んでいるのはHLA-B遺伝子の近傍に存在するMICAとMICB遺伝子です。

これらの遺伝子は前述のようにクラスI遺伝子との相同性を有しますが、構造的にはクラスI分子と同様に、抗原ペプチドなどの小さな分子を入れるポケット状の構造を持っています。しかしながら $\alpha 3$ ドメイン部分にCD8結合配列がないため、CD8T細胞への抗原提示をしているのではないと推定されます。また、そのmRNAレベルの発現はクラスI遺伝子とは異なり、一部の上皮系細胞のみに限られます(前記論文)。

MICA分子自体の発現はケラチノサイト、血管内皮、単球、腸管上皮などで確認されています(Proc Natl Acad Sci USA 93:12445,1996., Immunogenetics 47:139,1998.)が、熱ショックなどのストレスに反応してその発現が増強します。また腸管上皮に発現したMIC分子は $\gamma \delta$ T細胞によって認識されることが報告(Science 279:1737,1998)されています。しかしながら、MIC分子が提示する小分子がペプチドであるか否かはまだ不明であり、特にその抗原提示にはクラスI分子とは異なる抗原プロセッシング経路が

関与すると考えられています。

MIC遺伝子群の多型については、最初の報告時に既にMICA遺伝子の細胞外ドメイン部分の多型が示されていますが、その後細胞外ドメイン多型のより詳細な解析(Immunogenetics 44:351,1996.)や細胞内ドメイン多型の解析(Proc Natl Acad Sci USA 94:1298,1997., Tissue Antigens 51:309,19-98.)が報告されており、著明な多型が存在します。さらに人種毎の対立遺伝子頻度の相違(Tissue Antigens 49:448,1997.)や疾患との相関(Proc Natl Acad Sci USA 94:1298,1997., Tissue Antigens 49:503, 1997., Arthritis Rheum 41:68,1998.)が検討されています。

一方、MICB遺伝子にも多型があります(Immunogenetics 46:434,1997., Immunogenetics 46:199,1997., Tissue Antigens 51:649,1998.)が、MICA遺伝子と比較するとその程度は小さいものです。

なお、MICAおよびMICB遺伝子を含めたクラスI領域のゲノム構造解析は東海大学の猪子英俊先生らのグループにより精力的に進められています(Genomics 42:55,1997., Genomics 47:372,1998.)が、KAMON No.12に椎名隆先生と猪子先生が、そして今号に安藤等先生が紹介記事を書かれていますので合わせてお読み下さい。