

日赤中央血液センター

石川 善英

今回2つのシンポジウム「MHC研究の未体験ゾーン：これからの展望を探る」と「P. I. Terasaki シンポジウム-MHCの臨床応用-」の報告をおおせつかった。組織適合性学会はHLAのタイピングを主なテーマとし、演題もHLAの「型決め」に関したことが中心であった。今回の学会は「型決め」の先にあるものを考え、「型決め」の意義の再確認を意識させる学会であった。大会長の佐治先生のご英断でディスカッションは時間無制限ということもあり、どのシンポジウムも大変な盛り上がりであった。2つのシンポジウムの報告であるが、詳細をご報告するのは能力的にも、紙面の都合上も無理があるので、概略でお話し願いたい。

シンポジウム「MHC研究の未体験ゾーン」：これからの展望を探る

東海大・猪子先生と東京医歯大・木村先生の座長で、疾患の解析・治療につながる可能性を秘めた先進的な研究ということで5演題が選ばれた。

「遺伝的素因から探るC型肝炎発症機序」(葛下典由、阪大・医・内)

C型肝炎は70%~80%が慢性化し、病態の進行がおそく、また肝傷害の機序はよく分かっていない。ウイルス感染後、人により肝炎が発症し、あるいは無症候キャリアとなる。この違いの原因をHCV未感染者、無症候キャリア慢性肝炎患者間でHLA、TAP、LAMPの遺伝子頻度から調べた。背景因子としてHCV genotype、HCV RNA titerに差がないことを確認している。

その結果、肝炎患者ではハプロタイプからは独立してB51が高頻度であり、DRB1*1302、DQB1*0301はキャリア群で高頻度であった。この結果は連鎖不平衡にあるTAP2*0103の影響と考えられた。

つまり、HCVが感染した場合B51陽性では肝傷害を起こしやすく、逆にTAP2*0103を持っていると肝傷害をおこさずキャリアになる可能性が高いということであった。

「HLAクラスI領域のマイクロサテライト多型を用いた疾患遺伝子のマッピング」(太田正穂、信大・医・

法医)

HLAと疾患との関連についてこれまでに多くの報告がなされているが、HLAだけで十分説明できる疾患は少ない。HLAと他のいくつかの遺伝子、あるいはHLA近傍の遺伝子が疾患の原因遺伝子と考えられる。原因遺伝子を絞り込むために、マイクロサテライトを使った解析が紹介された。

ベーチェット病はB51と、尋常性乾癬はCw6と、また慢性関節リウマチはDR4と相関を示すことが知られている。HLAクラスI遺伝子領域1.3Mbには533個のマイクロサテライトがあり、これらのマイクロサテライトアリルと疾患との相関解析を行った。その結果ベーチェット病ではMICAとHLA-Bの間の46Kb、尋常性乾癬ではHLA-Cのテロメア側89Kb-111Kbの間、関節リウマチではTNF領域に相関の高い領域が見つかった。

「がん抗原とHLA」(佐藤昇志、札幌医大・病理)

近年、がん由来ペプチドを用いてがん特異的T細胞を誘導し、がんを治療しようとする試みがなされている。メラノーマでは、メラノーマ特異的ペプチドMAGE-1、Mant-1を用いた成績が紹介された。それぞれHLA-A1、A2拘束性であり32%、64%に有効であった。vitroの系でHLA-A31拘束性の胃がん由来ペプチドを用い、TNFの上昇、cytotoxicityが確認され、これらはA31抗体でブロックされた。またペプチドをまぶした樹状細胞に対し、3から4割の患者の

T細胞が反応した。

しかし、*vitro* で killer 活性を誘導できても実際に *vivo* でがん細胞を殺せる case は少なく、tumor escape の機構、特異的 T 細胞を誘導しやすい抗原ペプチドの同定が必要だとした。

「HLA クラス I 抗原と NK 細胞受容体」(屋部登志雄、中央血液センター・研究部)

NK 細胞は HLA-C をリガンドとし、HLA を発現していない細胞を殺すことは比較的良好に知られている。しかし近年多種多様な NK 受容体が見つかり、複雑な様相を呈している。

NK 受容体には Ig 型とレクチン型があり、それぞれに活性化型と抑制型がある。活性化型と抑制型は細胞質領域が異なり、抑制型には ITIM 配列がある。Ig 型は細胞外 Ig ドメインの数により分類され、HLA-C を認識するのは 2Ig ドメイン型である。HLA-E はレクチン型受容体のリガンドであり、CD94/NKG2A は抑制シグナルを、CD94/NKG2C は活性化シグナルを出す。

NK 受容体の特徴は、1 つの細胞上に複数の種類が発現されており、細胞によっても発現している受容体の組み合わせが異なることである。抑制型と活性化型の両者を発現していることも多い。それでも NK 細胞が暴走しないのは自己を殺さないための抑制型受容体を最低 1 つは発現しているためと考えられている。

NK 細胞は GVHD の発症防止に働いている。ハイブリッドレジスタンスとよばれる現象で、自己の HLA を持たないリンパ球がはいってくると、T 細胞がアロ抗原を認識して働らさず前に NK 細胞が処理してくれる。また HLA ホモのドナーとヘテロの患者間の輸血では T 細胞はドナー T 細胞を非自己と認識できないが、NK 細胞は自己の HLA を持っていないことを認識しドナー T 細胞を排除できる。ホモヘテロ間の輸血頻度にくらべ、GVHD 発症率が著しく低いのはこのためであると考えられている。

「Immunodominant minor histocompatibility antigen(mIHa)を追って」(丸屋悦子、京都赤十字血液センター)

今回の学会はディスカッション時間無制限ということであったがさすがに時間が延びすぎ、このシンポジウム最後の丸屋先生の講演は短縮版となってしまった。その短い期間の中でマイナー抗原研究の夢が語られた。つまり、組織特異的マイナー抗原の同程が進めば、

GVL 効果を利用した腫瘍治療が可能となるということである。この考え方は 2 つ前の佐藤先生の「がん抗原と HLA」と通じる考え方であり、癌抗原ペプチドでなくても癌を発症した組織特異的なマイナー抗原が同定できれば臓器移植を前提とした GVL 治療が可能となる。そこまで行くのは大変な道のりと思われるが、丸屋先生のグループはすでにいくつもマイナー抗原の候補を見つけており今後の研究に期待したい。

P. I. Terasaki シンポジウム—MHC の臨床応用—

中央血液センター・十字先生と埼玉医・前田先生の座長で移植における HLA マッチングについての 4 演題のシンポジウムであった。

Terasaki 先生の名前の付けられたシンポジウムのはじめに Terasaki 先生から先生のかかわってきた HLA の 35 年間の歴史が語られた。先生が 25 年もの長きにわたり、世界の 300 ものラボと続けてこられた Cell Exchange はサンプルの送付だけでも大変な労力を要したことを再認識させられたが、タイピング精度の向上に大きな役割をはたしてきた。B58 などいくつかの抗原を除き、各ラボの正解率はほぼ 100%に近づいている。現在までの 1000 を越える HLA アリルの発見、そして当然のことながら移植成績の向上にも Cell Exchange は大きくかかわっている。

「Evidence that HLA antibodies cause chronic rejection of allografts.」(P.I. Terasaki)

米国では過去 10 年間で 110,000 例の臓器移植が行われた。臓器移植は免疫抑制剤の開発により初期生着率は高くなったが、10 年後の生着率は腎臓、肝臓、心臓いずれも 40%前後であり、あまり改善されていない。HLA 適合同胞間移植では長期生着率が高く、臓器移植でも長期生着には HLA の適合が重要である。ドナーの年齢、臓器の保存期間も生存率に影響するが、抗体産生の有無が生着の大きな影響因子である。各種臓器で抗体産生による生着率が低下した結果が示された。

意味深い発言で真意をとりちがえているかもしれないが、HLA タイピングのクオリティーはドナーがいればマッチングできるレベルに達している。しかし、HLA を正確に決めてもマッチしたドナーが見つからずミスマッチ移植をせざるを得ない。すでにマッチングでできることは終わっており、今後は移植後なにをすべきか考えるべきである。ということであった。

「非血縁者間骨髄移植における HLA-クラス I アリルマッチングの重要性」(笹月健彦、九大・生医研)

厚生省骨髄移植研究班の移植成績の解析結果が紹介された。

440 例の解析の結果、HLA-A.B.C.DRB1 それぞれのアリルミスマッチは20~30%、DPA1.DPB1 では50%以上であった。

GVHD の発症率は A.B.C それぞれのミスマッチで有意に高くなるが、クラス I の中では HLA-A ミスマッチの影響が最も大きい。Cw だけのミスマッチは GVHD に影響しないが、A にもミスマッチがあると大きな影響が出る。クラス I がマッチしていれば、DRB1、DQB1 のミスマッチの影響は有意ではなかった。

4 年後生存率の比較でもやはりクラス I の影響が大きい。Cw だけのミスマッチは生存率が高くなった。しかし A と Cw が共にミスマッチの場合は大きく低下した。

また Cw のミスマッチでは再発率が低く、NK 細胞がかかわっている可能性がある。

つまり、骨髄移植においてはクラス I をアリルレベルで適合させることが重要であり、完全適合ドナーが見つからない場合にはクラス I の適合を優先させるべきである。

「生体肝移植と HLA」(木内哲也、京大・移植外科)

日本国内の生体肝移植はすでに 900 例を超え、これは世界の生体肝移植の約半数にあたる。脳死からの肝移植は世界ではすでに 60,000 例を超えている。

肝臓移植においては HLA 不適合が難治性拒絶を増やすという報告や、HLA 適合がウィルス感染や自己免疫性肝疾患の再発を増やすなどの報告があり、HLA 適合性の意味は統一見解がない。したがって HLA 適合性に基づく臓器配分は行われていない。

肝臓での HLA クラス II の発現は人により異なり、特に死体肝では差が大きい。

HLA の適合度は、脳死からの移植ではそのほとんどが 3~6 抗原のミスマッチ(MM)であるのに対し、生体肝移植では配偶者からの移植が増えているものの 98%が 3MM 以下である。

このような現状ではあるが、HLA 適合度は移植成績に大きく影響する。生着率では 0MM ではほぼ 100% であるのに対し、1-3MM では 80%、4-6MM では 63.6%である。Rejection で見ても、0-3MM ではあま

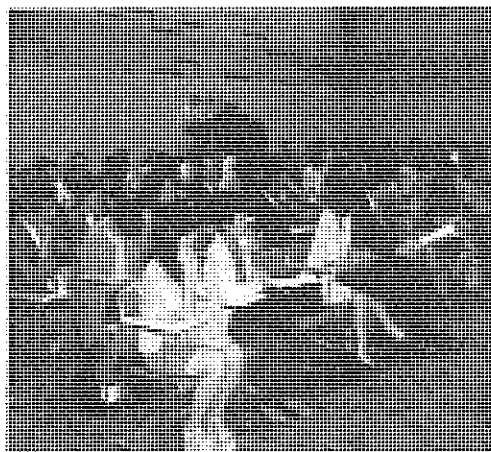
り差がないものの、4-6MM では 90%が拒絶される。また CMV の影響も 3-4MM では大きくなる。クラス I とクラス II の比較ではクラス I の方がミスマッチの影響が大きい。移植前に抗体が産生されている場合は初回拒絶日が早くなり、ステロイドの使用量が増すことになる。

「生体、死体腎移植と HLA」(小林孝彰、名古屋第二赤・外科)

腎移植はネットワーク発足前の 95 年までで 126 例が、現在までで 193 例が実施されている。

腎移植でもやはり HLA の適合度が重要であり、DRB1 アリルの 0MM と 1MM の比較でも生着率、急性拒絶に差がある。したがって、A、B、DR 完全マッチのドナーが見つかった場合は全国シッピングの対象とすべきである。腎移植の課題として、HLA タイピング施設間の差、移植施設間の差があり、組織適合性学会の腎移植ネットワークへの積極的な関与が望まれるということであった。

Terasaki 先生は HLA のマッチングでできることは終わっていると言われたが、HLA を抗原レベルあるいはアリルレベルで正確にタイピングすることが求められることは現在も今後も変わらない。骨髄移植に比べ、臓器移植では HLA の適合度は軽く扱われてきたように思われる。これはドナーが限られていることが大きな原因と思われるが、今回のシンポジウムで HLA の適合が臓器移植においてもやはり重要であることが示された。実際には HLA 適合臓器移植は困難な状況にあるが、HLA の適合度、不適合度を正確に決めることが、移植後の適切なケアにつながると思われた。



東海大学医学部分子生命科学

安藤 麻子

教育講演 (疾患とMHC) と疾患遺伝子マッピング

はじめに

HLA 抗原と自己および外来抗原ペプチドとの相互作用の生化学的研究と HLA 抗原の多型性に関する分子生物学的研究の進展により、近年、HLA 抗原分子・ペプチド複合体の形成と免疫応答機構の解明が急速に進み、教育講演として行われた2演題で紹介されたように自己免疫疾患やウイルス感染における HLA 抗原の役割が分子レベルで理解されつつある。また、昨年末までに、日本を含む3つのグループにより、HLA 遺伝子群がマップされる 3.4 Mb にわたる HLA 全領域の塩基配列が決定され、HLA 抗原と相関を示す疾患について、この領域の塩基配列情報から得られたマイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子の詳細なマッピングが可能となった。HLA 抗原と疾患に関する研究の最近の状況から、本稿では教育講演として行われた2演題 (HLA クラスII多型と疾患感受性: 西村泰治、HLA クラスI抗原とエイズ: 滝口雅文) とともに、最優秀抄録口演 (椎名隆、他) として発表された HLA クラスI全領域の塩基配列解析データから疾患遺伝子マッピングに関連した部分を簡単に述べた後、シンポジウム (太田正穂) や最優秀ポスター口演 (田宮元、他) などで発表されたベーチェット病、尋常性乾癬などのクラスI領域を中心とした疾患感受性遺伝子の探索の現状を紹介する。

1. 教育講演

1) HLA クラスII多型と疾患感受性

西村 泰治

HLA クラスII遺伝子は、高度の遺伝的多型性を示し、ある種の疾患の患者集団では健康対照集団と比較して、特定の HLA クラスII対立遺伝子の頻度に有意の差があり、これまでに自己免疫疾患を中心とした多くの疾患と HLA 対立遺伝子の相関が報告されてきた。特定の疾患と HLA アロ抗原タイプとの相関の分子機構としては、1) 患者集団で相関を示す HLA 対立遺伝子が、特定の抗原に対する免疫応答能の強弱を決定することにより特定の疾患の発症を誘導する場合と、2) 特定の HLA 遺伝子と近接して位置し、連鎖不平衡にある別の遺伝子の異常または欠失が疾患の原因である場合とがある。

体内に侵入する微生物などの外来抗原は、皮膚や粘膜の直下に存在する抗原提示細胞 (APC) に取り込まれ、細胞内のエンドソームで部分消化された 10~20 数アミノ酸残基からなる外来抗原由来ペプチドが HLA クラスII抗原と結合し、細胞膜上に移送される。

インフルエンザヘマグルチニンペプチドを結合した DR1 分子の立体構造から、HLA クラスII分子上にはペプチド上のアンカーとなるアミノ酸の側鎖を収容する複数のポケットをもつ溝が存在し、これがペプチドの結合に重要な役割を果たしていることが明らかになった。HLA クラスII分子の多型は、このペプチド収容溝と隣接するアミノ酸残基に集中しているため、多型によりこのポケットの形状が変化して、結合するペプチド上のアンカー残基の位置や種類の組み合わせである HLA 結合モチーフに影響を与える。このクラスII分子・ペプチド複合体がヘルパーT細胞に認識され、ヘルパーT細胞の活性化が誘導される。したがって、クラスII分子の多型が、抗原ペプチドへの親和性を決定し、特定の抗原ペプチドに対するT細胞応答の有無あるいは強弱を決定する要因となる。さらに、自己免疫疾患やアレルギー性疾患のように、特定の抗原ペプチドにヘルパーT細胞が反応したがために、あるいは反応できなかったがために疾患を発症する場合には、クラスII分子の多型性 (アロ抗原タイプ) は、特定の疾患に対する感受性あるいは抵抗性を決定する要因となると考えられる。たとえば、ブタクサアレルギー

ギー患者群では DRB1*1501 陽性者が著明に増加しているが、この現象は、患者では DRB1*1501 分子に結合したアレルゲンペプチドを認識して IgE 産生を促す Th2 細胞が優位に応答することに起因すると考えられている。

一方、自己免疫疾患においては、特定の HLA クラス II・自己ペプチド複合体に対して CD4+T 細胞が十分なトレランスを獲得しておらず、何らかの要因によってこれに反応性を示し、発症に至ると考えられている。この自己反応性 CD4+T 細胞は、グレーブス病、全身性エリトマトーデス、重症筋無力症 (MG) などでは、上述の B 細胞による抗体産生を促進する Th2 細胞が病因として重要であり、自己抗体が各種のレセプターに結合してその機能を修飾したり、自己抗原・自己抗体の複合体が腎臓などの臓器に沈着して病変が形成される。また、IDDM、慢性関節リウマチ (RA)、多発性硬化症 (MS) などの疾患では、主に炎症反応を誘導する自己反応性 Th1 細胞が病因として重要であり、その免疫応答に起因して組織破壊を伴う炎症性病変が生じる。ここで、ある種の自己ペプチドに対する親和性の異なる 3 種類の HLA クラス II 分子・自己ペプチド複合体の細胞表面における密度と自己反応性 T 細胞の活性化との関係について考えてみると、自己ペプチドに対する親和性の高いクラス II 分子は細胞表面にクラス II 分子・ペプチド複合体が大量に発現しており、胸腺における自己反応性 T 細胞の除去や末梢におけるアナジーの誘導により完全なトレランスが成立している。また、自己ペプチドに対する親和性の低いクラス II 分子はトレランスは成立していないが、細胞表面のクラス II 分子・ペプチド複合体の発現が少ないために、末梢における自己反応性 T 細胞の活性化は生じない。したがって、このようなクラス II 分子は自己免疫疾患を誘導しにくいと考えられる。一方、これら 2 種類の HLA クラス II 分子の中間程度のペプチド結合親和性を示すクラス II 分子では、クラス II 分子・自己ペプチド複合体の発現密度も中間程度であり、これに対してトレランスは完全には成立していない。この場合、通常は末梢において T 細胞が活性化できる密度のクラス II 分子・自己ペプチド複合体は発現していないが、サイトカインなどの刺激により、クラス II 分子、自己ペプチドあるいは costimulatory 分子の発現の増加などに伴い、自己反応性 T 細胞が活性化され、自己免疫疾患の発症に至ると考えられる。このような自己免疫現象の標的となっている抗原ペプチドの同定をこれまでに種々の自己免疫疾患について試みて

おり、最近では DRB1 *0405-DQ4 と強く相関し、ぶどう膜に対する自己免疫疾患と考えられている原田病について解析している。つまり、患者の血清中出现する抗ぶどう膜抗体を利用して、ぶどう膜の cDNA 発現ライブラリーより、患者血清と反応するクローンを単離することにより自己抗原を同定しようとしている。また、クラス II 分子と会合する性質を持つインバリアント鎖上で、クラス II 分子のペプチド収容溝に結合する CLIP と呼ばれるペプチド部分を、多様なペプチドライブラリーで組み換えた変異インバリアント鎖遺伝子を作製し、これをクラス II 遺伝子と共に細胞に発現させて多様なクラス II・ペプチド複合体を発現する抗原提示細胞のライブラリーを構築しつつある。これを用いて疾患の発症に重要な役割を果たしているヘルパー T 細胞が認識するクラス II 分子・ペプチド複合体と、その多様性の程度を解明しようとしている。

2) HLA クラス I 抗原とエイズ

滝口 雅文

エイズは、CD4+T 細胞に HIV-1 感染後、数週間のうち抗体が陽性化し、数年から 10 年以上にわたる無症候性キャリアの時期を経てエイズ関連症候群を発症する。一般にウイルスの感染からの回復に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割を果たしていることはよく知られているが、HIV-1 の感染においても例外ではない。しかしながら、HIV-1 は、巧妙に CTL からの攻撃から逃れていると考えられている。その逃避機序としては、現在二つの可能性が考えられている。第 1 に CTL が認識する HIV-1 の抗原部位 (エピトープ) 上のアミノ酸を変異させることにより、CTL の認識から逃れることである。これには HLA クラス I 分子との結合ができなくなるような変異と T 細胞レセプターの認識を障害する変異が知られている。実際、HIV-1 感染患者の末梢血中の HIV-1 の塩基配列の解析から、このようなエピトープ上の変異が現られ、これらの変異が高頻度で見いだされる HLA クラス I 抗原アレルでは、CTL の攻撃からの逃避が生じやすいと考えられる。

第 2 の機序は、HLA クラス I 分子の細胞表面における発現の低下 (down regulation) である。HIV-1 に感染すると、HIV-1 の Nef 蛋白によって HLA クラス I 分子の細胞表面への輸送が障害され、クラス I 分子はゴルジ装置やクラスリンに覆われた小胞などに蓄積する。その結果、十分な量の HIV-1 由来の T 細胞エピトープペプチドが細胞表面に提示されず、CTL

が認識できなくなる。しかしながら、実際の HIV-1 感染者の体内でこれらの機序が HIV-1 の CTL からの攻撃の逃避にどの程度重要な役割を果たしているのかは、十分に解明されていない。

エイズの免疫学的治療法として HIV-1 は、抗原変異が著しいことから、抗体による感染予防は不可能であり、CTL を誘導するワクチンの開発が望まれている。CTL を誘導するワクチンの開発には、エピトープを同定し、これを用いてワクチンを作製することが望ましいと考えられているが、T 細胞クローンを作製し、エピトープを同定する従来の方法は、複雑な過程を必要とし、現在までに限られた数のエピトープしか同定されていない。そこで Reverse Immunogenetics と名づけた方法によって HLA クラス I 結合自己抗原ペプチドのモチーフから CTL が認識するエピトープを明らかにし、CTL エピトープを同定した。この方法は、まず HLA クラス I 分子に結合している自己抗原ペプチドのモチーフを同定し、アンカーをもったアミノ酸配列を HIV-1 蛋白のアミノ酸配列より選択し、ペプチドを合成する。この合成ペプチドを用いてペプチド結合アッセイによってそれぞれの HLA クラス I 分子結合ペプチドを選択し、さらにこれを用いて HIV-1 感染者末梢血リンパ球を刺激して、CTL エピトープを同定する。この方法によって、12 種の HLA-A*2402、9 種の HLA-B*3501、7 種の HLA-B*5101 の各分子に拘束される CTL エピトープが同定され、さらにこれらのエピトープは、特異的 CTL クローンの作製によって CTL エピトープであることが確認された。この方法により、決定したエピトープを用いて、ペプチドワクチンが開発されることが期待される。

一方、HIV-1 感染後の経過と HLA 抗原アレルとの相関については種々のデータが報告されている。欧米人では、HLA-B*35 の他 HLA-A1-B8-DR3 ハプロタイプを持つ感染者はエイズ発症までの期間が短く、HLA-B*27 を持つ感染者ははその期間が長いことが、1986 年頃から報告され、さらに最近 HLA-B*35 と Cw4 アレルではエイズ発症、死亡までの期間が短いことが明らかになった。また、一つ以上の HLA クラス I 抗原遺伝子座がホモの場合は、ヘテロの場合と比較して発症までの期間が短い傾向にあることが明らかになり、T 細胞エピトープの種類が少ないことは宿主側に不利であると考えられる。

2. HLA 領域における疾患遺伝子マッピングの現状

1). HLA クラス I 領域におけるゲノム解析

塩基配列を決定した結果、MICB 遺伝子から HLA-F 遺伝子までの HLA クラス I 領域は、1,796,938 bp (約 1.8 Mb) であった (図 1)。既存の DNA データバンクとのホモロジー解析の結果、23 個の発現既知遺伝子、12 個の発現新規遺伝子、22 個の EST と一致する領域、67 個の偽遺伝子および、3 個の発現可能な塩基配列の計 127 個の遺伝子あるいは遺伝子候補領域を見出した。したがって、HLA クラス I 領域は 14.1 kb に 1 個という高い遺伝子密度を有することがわかった。この遺伝子密度はクラス II 領域 (25.0 kb に 1 個) より高く、クラス III 領域 (14.3 kb に 1 個) とほぼ同様な値を示した。また、この遺伝子密度は 3 つの各領域における GC 含量と相対的にほぼ比例していた。すなわち、本領域の平均 GC 含量は 45.8% (H1 バンドに相当) であり、これは、L バンドに相当するクラス II 領域 (40%) よりも高く、H3 バンドに相当するクラス III 領域 (53%) よりも低い割合であった。

また、このクラス I 領域におけるマイクロサテライトの分布を塩基配列より検索した結果、5 回以上の反復を有する 135 個の 2 回繰り返し配列、4 回以上の反復を有する 107 個の 3 回繰り返し配列、3 回以上の反復を有する 199 個の 4 回繰り返し配列、2 回以上の反復を有する 114 個の 5 回繰り返し配列、合計 758 個のマイクロサテライト配列を見出した。これらのマイクロサテライトのうち、70 個について多型性を検索した結果、26 個がアレル数 10.9、ヘテロ接合体頻度 7.3% で、遺伝マーカーとして十分な多型性を有していた。これらのマイクロサテライトは繰り返し配列の回数に高度な多型を示し、クラス I 抗原に相関を示す遺伝病の詳細なマッピングに有用な遺伝多型マーカーと考えられることから、以下に示すベアレット病や尋常性乾癬などの疾患感受性遺伝子のマッピングに供した。

Class I

1,796,939bp



図1. HLAクラスI全領域の遺伝子構成とその特徴

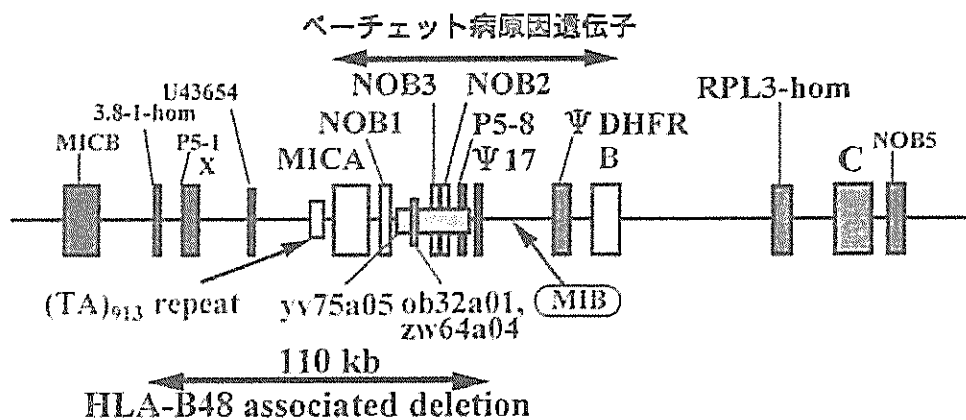


図2. ベーチェット病原因遺伝子候補領域の遺伝子地図

2). ベーチェット病の疾患感受性遺伝子の探索

ベーチェット病は HLA-B51 と相関し、その感受性遺伝子は HLA-B 遺伝子近傍に存在するものと考えられる (図 2) ことから、HLA-B 遺伝子周辺の多型性を示すマイクロサテライトを用いて、ベーチェット病の感受性遺伝子のマッピングを行った。Differentiation test や Hardy-Weinberg 解析の結果から、MICA~HLA-B 遺伝子間 46 kb にベーチェット病の感受性遺伝子の存在が示唆された。この MICA~HLA-B 遺伝子間には、MICA, HLA-B の他に、NOB1, NOB2, NOB3 の計 5 個の遺伝子が見い出されている。また、HLA-B 遺伝子のセントロメア側に位置する MICA 遺伝子の細胞膜通過領域内のマイクロサテライトの GCT (アラニン) 繰り返し 6 回のアリルもベーチェット病と強く相関していた。しかしながら、ハプロタイプや連鎖解析などから、HLA-B51 遺伝子そのものが発症に関与している可能性が強いと考えられた。ただし、NOB1, NOB2, NOB3 遺伝子の関与も否定できないので、今後さらに詳細な遺伝解析が必要である。

3). 慢性関節リウマチ(RA) の疾患感受性遺伝子の探索

RA は DRB1*0405 と相関し、DRB1 遺伝子の 70 と 71 番目が塩基性アミノ酸であることが RA の感受性を規定していることが知られている。そこで、DRB1~TNF 遺伝子間に位置するマイクロサテライトを用いて、RA の感受性遺伝子のマッピングを行った。Hardy-Weinberg 解析の結果から、DRB1 遺伝子周

辺、並びに HSP70 遺伝子のテロメア側に位置する TNF 遺伝子周辺に RA との相関が認められた。特に TNF 遺伝子周辺の多型解析から TNF 遺伝子のさらにテロメア側の遺伝子の関与も示唆されたことから、現在 NB6~MICB 遺伝子間 100 kb の領域内の詳細な遺伝解析を行っている。

4). 尋常性乾癬の疾患感受性遺伝子の探索

尋常性乾癬は HLA-Cw6 と相関することから、その感受性遺伝子は HLA-C 遺伝子近傍に存在するものと考えられた (図 3)。乾癬患者と健康人について HLA-C 遺伝子周辺のマイクロサテライトを用いた詳細な相関解析、Hardy-Weinberg 解析、ハプロタイプ解析を行った。その結果、HLA-C 遺伝子のテロメア側に位置する 5 個のマイクロサテライトについて尋常性乾癬との有意な相関が示された。さらに、HLA-C 遺伝子の 89kb テロメア側に位置するマイクロサテライト (C1_2_6~C2_4_4 間 111kb) について祖先型ハプロタイプの組み換えホットスポットの同定から、A と B の 2 つのハプロタイプを見いだした。さらにハプロタイプ A の共通領域である C1_2_6 ~ C1_3_2 間 54 kb の領域に、OTF3, TCF19 遺伝子の他 4 個の新発現遺伝子 (HCR, SEEK2, SPR1, SEEK1) を同定し、これらの遺伝子の発現組織や塩基配列を解析した。その結果、HCR 遺伝子は皮膚を構成する蛋白質の一つであり、水泡症の原因遺伝子であるプレクチンと相同性を有し、SPR1 遺伝子は、プロリンを多く含む配列を持ち、マウス H2-Q2 領域に存在する MSP1 と 70% のアミノ酸相同性を示した。

また、SEEK1 遺伝子は、プロリンを多く含む配列を持ち、カルシウム結合モチーフを有するが、報告されている既知の塩基配列との相同性は認められていない。これらの 3 遺伝子はすべて、皮膚やケラチノサイトなどに発現が認められたことから、尋常性乾癬の疾患感受性候補遺伝子と考えられる。さらに、これらの新発見遺伝子のなかで SPR1 と SEEK1 遺伝子を含む 15 kb の領域について、祖先型ハプロタイプ A を示す尋常性乾癬患者と健康人のゲノム DNA の塩基配列解析を行った。その結果、50 個余りの 1 塩基置換、挿入、欠失による SNP (single nucleotide polymorphism) を見いだした。これらの塩基配列解析から得られた多型により構成されるハプロタイプを推定したところ、SPR1 遺伝子のイントロン 1 に位置する 1 塩基挿入から 10 kb の領域が祖先型ハプロタイプ A、B 間で共通であった。この領域には、SPR1 遺伝子のエキソン 2 と SEEK1 遺伝子の alternative splicing による 2 つのエキソンが含まれることから、現在、HLA-Cw6 を伝達するハプロタイプ B も含め、この 10 kb の領域を中心に 尋常性乾癬の感受性領域の塩基配列決定

を行い、患者に優先的に伝達されている多型について解析を行うことによって、尋常性乾癬の疾患感受性遺伝子の同定を進めている。

代わりに

古くから MHC 研究の重要なテーマのひとつである HLA と疾患について、自己や外来ペプチドと HLA 抗原との相互作用の解析の進展によって、自己免疫疾患の発症の分子機構の解明や、ウイルス感染におけるワクチン開発への道が拓かれつつあることを実感することができた。また、HLA 全領域の塩基配列の決定は、特定の HLA 抗原との相関が知られている原因不明な多くの疾患について疾患感受性遺伝子の詳細なマッピングを可能にするとともに、この領域に位置する新遺伝子の同定による非 HLA 遺伝子の疾患発症への関与の解明に大きな前進をもたらすと言えよう。この領域にマップされる疾患感受性遺伝子の同定によって、疾患の発症の分子機構の解明、さらには診断や治療への応用へと進展することが望まれる。

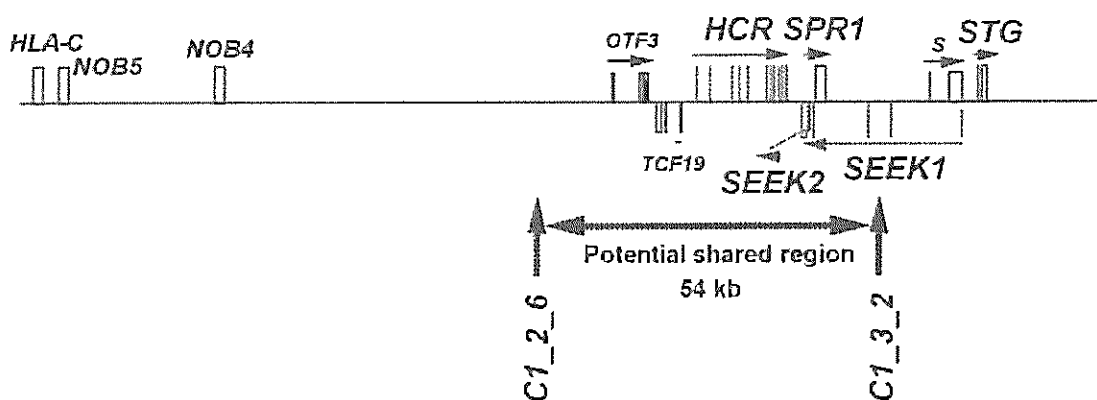


図3. 尋常性乾癬原因遺伝子候補領域の遺伝子地図

東京大学医学部人類遺伝学教室

大橋 順

大野乾シンポジウム

生命進化からみたMHCのアプリオリとアポステリオリ

誠に残念ながら主役である大野先生は御病気のため参加されず、本シンポジウムは大野先生不在で行われた。以下では、各先生方が口演された内容の中からいくつかの点に絞って、本シンポジウムを振り返ってみたい。

「糖鎖認識分子の起源と進化」

成松 久先生 (創価大・生命科学研)

成松先生は、数々の糖転移酵素の遺伝子をクローニングし、その機能を解明してこられた。糖転移酵素の興味深い点は、糖転移酵素自体の多様性と糖転移酵素によって合成される糖鎖の多様性にあると思われる。糖転移酵素が異なれば、付加される単糖は異なるが、さらに単糖のそれぞれの水酸基がグリコシド結合の相手となりうることから、膨大な種類の糖鎖が誕生するわけである。大腸菌の遺伝子数は数千程度であり、ヒトの遺伝子数は多くとも十萬程度と考えられている。わずかに二桁の遺伝子数(タンパク質)の増加でヒトのような複雑な生物が大腸菌から進化したとは考えにくい。成松先生は、タンパク質に糖鎖を付加することでタンパク質機能に影響を与え、また組み合わせによって天文学的な数の糖タンパクをつくりだすことのできる糖転移酵素の発達こそが、高等生物の誕生に必要であったのではないかという仮説を提唱された。糖転移酵素が働く順序と糖転移酵素の生物進化上での出現順序とはよく対応しており、糖転移酵素遺伝子の進化と生物の進化とは密接に関連していると思われる。

糖転移酵素の進化を考える上で重要なのが、それが働く場所であるゴルジ装置の発達である。大腸菌は簡単なゴルジ装置しかもっていない。ヒトは、シス、メディアル、トランスといったより複雑なゴルジ装置をもっている。糖転移酵素が進化するためにはゴルジ装置の発達が必要不可欠なことは明白である。糖転移酵素の種類が増せば、それを順序良くゴルジ装置に留

めておく必要があるからである。しかし、糖転移酵素をゴルジ装置内の適当な位置に停留させる機構については現在のところよく分かっておらず、これからゴルジの時代がくると述べられていた。

成松先生は、糖転移酵素の特殊な進化の具体例として、カタツムリの殻であるキチン(GlcNAc β 1.4GlcNAc)を合成する β 1.4GnTと哺乳類のGal β 1.4GlcNAcを合成する β 1.4GalTをあげられ、両遺伝子の相同性が高いことから、もとは同一な遺伝子であったものが生物種に応じて基質特異性を変化させていったのではと推測されていた。また、同一種内で糖転移酵素遺伝子が変化している例として、ヒトのルイス式血液型抗原を決定する糖転移酵素、 I_e 遺伝子を不活性化させる点変異について述べられた。この点変異はモンゴロイドの誕生後に生じ(コーカソイドでは見つかっていない)、頻度を増加させてきているようである。 I_e 遺伝子が我々にとって重要でなければ、はるか昔に不活化していたであろうし、重要であるのなら不活化させるような変異が集団中に広がることはないように思われる。したがって、不活化することが淘汰上有利になるような環境変化が比較的最近(数万年以内)に起こったのかもしれない。

最後に成松先生は、遺伝子とタンパクでは二次元的な話の生物学しか見えてこないが、そこに post translation, post modification という概念を持ち込むことで、生物の立体像が見えてくるだろうと述べられていた。

「補体系の起源と進化」

藤田 禎三先生 (福島県立医大・第二生化)

藤田先生は、補体系のレクチン経路を研究しておられ、この経路は補体系の第三の活性化経路として注目されている。補体系は様々なタンパクの分解、集合を通じて生体内に侵入してきた微生物を直接攻撃するほか、反応の仮定で生成される C3b が、病原体の表面に結合することで食細胞による食食を助けるオプソニンとして機能するなど、生体防御において重要な役割を担っている。従来よりよく知られているのは、補体系が活性化されるために抗体を必要としない第二経路と、抗体を必要とする古典的経路である。古典的経路では、まず IgG や IgM が病原体表面に結合し、これらの抗体を C1q が認識することで補体系が活性化されるが、近年血清レクチンの一つであるマンノース結合タンパク (MBL) が直接病原体表面の糖鎖 (マンノースや N-アセチルグルコサミン) を認識し、補体系が活性化される第三の経路として、自然免疫に働くレクチン経路の存在が明らかとなった。

MBL はコレクチンと総称されるレクチンのファミリーに属し、分子内にコラーゲン様構造とカルシウム依存性の糖鎖認識ドメイン (CRD) をもっている。ヒト血清 MBL は、分子量 32kDa のサブユニットの三分子が NH₂ 側のシステインを介してジスルフィド結合でつながり、一つのユニットを形成し、さらにユニット同士が架橋してホモポリマーとなっている。当初は、MBL は C1r、C1s と複合体を形成し、C1 と似た機能により C4 と C2 を活性化すると考えられていた。成松先生らは、C1r や C1s とは異なる新たな MBP に会合するセリンプロテアーゼ (MASP1) を 1992 年に報告され、1997 年には別のセリンプロテアーゼ MASP2 の存在も明らかとなった。レクチン経路を古典的経路と比較して理解するために、それぞれの経路で機能するセリンプロテアーゼを表 1 にまとめる。

MASP1 と MASP2 は両者とも C2 分解活性を有するが、これらのセリンプロテアーゼの中で MASP1 のみが C3 分解活性をもっている点が注目になる。なぜなら補体系の中心的役割を担っている成分が C3 であり、C3 を C3a と C3b とに分解するに至る経路が補体活性化経路だからである。遺伝子の構造、活性中心を構成するセリン残基のコドンのタイプ (TCN か AGY)、さらに哺乳類、両生類、硬骨魚類、軟骨魚類、円口類、脊索類 (ホヤ) のセリンプロテアーゼをもとに描いた系統樹などから、MASP/C1r/C1s ファミリーでは、MASP1 のタイプのセリンプロテアーゼが進化上先に出現したと考えられる。軟骨魚類とそれより高等な脊椎動物は獲得免疫において重要な MHC、免疫グロブリン、TCR をもっている。一方、脊索類のホヤは古典的経路はもっていないが (免疫グロブリンをもっていないため)、C3、グルコースを認識する GBL (マンノースは認識しない)、および MASP1 タイプの MASP をもっている。さらに、ホヤでは GBL と MASP によって直接 C3 が分解活性化され、C3b がオプソニンとして機能することが最近明らかとなった。これらの事実は、MBL、MASP、C3 で構成されるレクチン経路が原始補体系であり、これによってオプソニン化された病原体を食細胞が食食する自然免疫システムが、獲得免疫システムが確立する以前の生体防御の中心的役割を担っていたことを示唆すると思われる。

古典的経路はレクチン経路から発達したものと思われるが、レクチン経路と第二経路の関係は未だ明らかになっていない。補体系の進化のみならず、自然免疫や獲得免疫に対する理解を一層深めるためにも、レクチン経路研究の今後の進展が望まれる。

	レクチン経路		古典経路	
	MASP1	MASP2	C1r	C1s
基質特異性				
C4	-	+	-	+
C2	+	+	-	+
C3	+	-	-	-

表1

「MHCの起源と進化」

猪子 英俊先生 (東海大・医・分子生命)

猪子先生は、ヒト第6染色体の短腕に位置するMHC領域のゲノム構造解析を行っておられ、大量の塩基配列情報を公開してこられた。ヒトのMHC領域には数多くの遺伝子、特に免疫関連遺伝子がコードされており、様々な疾患の感受性遺伝子がこの領域に同定されている。また、この領域は分子進化の観点からも大変興味深く、多くの遺伝子が遺伝子重複によって形成されてきたと考えられている。

最近、MHC領域に存在する遺伝子と近縁な複数の遺伝子がMHC染色体とは別の染色体上にクラスターをつくって存在していることが見出され、MHCが染色体重複によって形成された遺伝領域であることが明らかとなった。重複している遺伝領域は、MHCのある第6染色体短腕をはじめ、第1染色体長腕、第9染色体長腕、第19染色体短腕にそれぞれ存在している。このような染色体重複がいつ起こったのかは、興味深い問題の一つである。ヒトのMHC領域(第6染色体)と相同な領域はマウスでは第17染色体上にあり、ヒトの第9染色体と相同な領域はマウスでは第2染色体上にある。このヒトとマウスの両方で染色体重複の痕跡が認められるという事実は、MHC領域の重複が霊長類とげっ歯類の祖先が分岐する以前の段階で起きたことを示唆している。大野先生は、脊椎動物が進化する過程で、性決定機構が統一的であった、魚類あるいは両生類の段階でゲノムの4倍体化が2回起きたという仮説を提唱しておられ(結果的にゲノムは4倍化する)、このゲノム4倍化説で上記の重複が説明できるのかもしれない。しかし、各相同領域内には、遺伝子重複によって独立に出現したと思われる遺伝子も多数存在しており、4倍化が起きてからも多くの変化が起きたと考えられる。

では、MHCの原型はいったいどの分子なのであるうか。MHC以外にも抗原認識及び提示機能を有する分子としてCD1があげられる。CD1はβ₂ミクログロブリンと会合し、外来抗原由来の糖脂質を認識している。おもしろいことに、4つの相同領域全てにおいて多型性を示す赤血球の血液型抗原がコードされており、その多くは糖転移酵素である。猪子先生は、MHCのもつ異物認識の原型においては糖鎖が重要であり、そこからMHCが誕生したのではないかと考えておられた。原始的な免疫系では、異物の認識とその排除が最大の役割であり、その役割を担う最も基本的な分子がいつかに進化してきたのかを探ることは大変

興味深い。ヒトゲノムの中で最も解析の進んでいる領域の一つがMHC領域であるが、ゲノム解析の進行に伴い、MHC領域と相同な領域についても数多くの遺伝子が同定されていくと思われる。今後のこの分野の発展に期待したい。

「免疫グロブリンの起源と進化」

黒澤 良和先生 (鶴田保健衛生大・総合医研)

黒澤先生は、免疫グロブリンにおけるDNA再編成機構の起源と進化に関する研究成果をお話されたが、「演の中で「はじめ」の重要性を強調されていた。DNA再編成を触媒とする中心分子は、トランスポソンのトランスポゼースと極めて似た機能を有するRAG-1、RAG-2であり、ある遺伝子にそれをウイルスが挿入したことにより、DNA再編成機構が動物界において誕生したと考えられている。では、その出現当初に生物学的なアドバンテージがあったのであろうか。遺伝子重複によって多数のV、D、J遺伝子を創り出し、遺伝子再編成機構によってそれらを組み合わせるだけでは、十分な多様性は生じない。そこにterminal transferaseによるランダムプロセスを導入したことが重要であったと黒澤先生は述べられた。terminal transferaseとは、RAG-1、RAG-2によって配列が切断された後に、一本鎖となっているDNAにランダムに塩基をつなげていく鋳型をもたない唯一の核酸合成酵素である。このランダムプロセスは多様性を増すのに優れた機構であるが、非常に危険なやり方でもあり、ほとんどの分子が駄目になってしまう。そのため、優れたセレクションシステムをもってはじめて効果を発揮するとも黒澤先生は指摘されていた。terminal transferaseの出現は免疫グロブリンの誕生に必須であったと思われ、RAG-1、RAG-2の誕生した時点でterminal transferaseが存在したか否かは興味深い問題の一つである。

高等動物の免疫系は、非常に複雑かつ巧妙に発達しており、外来抗原の多様性に応じて多様な分子がそれを構成している。しかし、これほど複雑な機構を最初から獲得できるはずはなく、はじめは簡単なものであったに違いない。ところが不思議なことに、軟骨魚類のMHCは多型的であり、この時期に既に哺乳類のもつ免疫系の基礎は完成しているのだから。大野先生は4倍化によりゲノムに余裕ができたため、複雑な免疫系が発達したと述べられているが、4倍化が起きたのは軟骨魚類以降の時期であるので、その見解には賛成できないと黒澤先生は述べられていた。大野先生

がいらっしゃるればこの点についてもお聞きすることができたと思われ残念である。

DNA 再編成によって生み出される免疫グロブリンの多様性も、軟骨魚が再編成機構を獲得した当初は多様性は生み出されなかったであろうし、そもそも再編成機構を獲得する以前の免疫グロブリンはどのようなものであったのかという点も興味深い問題の一つである。原始免疫系の誕生過程に関しては未だに謎が多いが、数多く存在する遺伝子の中から免疫系の発達に本質的な役割を果たしたと思われる分子を選び出し、解析できれば、免疫系の起源が徐々に解明されていくであろう。

最後に、私見を交えながら、免疫系の起源という観点から本レポートをまとめてみたい。適応免疫系の起源に関し、免疫グロブリン、MHC、T細胞受容体、RAG、LMP、補体の6つの遺伝子に着目すると、円口類は補体しかもっておらず、軟骨魚類とそれより高等な脊椎動物は全ての遺伝子をもっている（ただし、爬虫類と鳥類においてLMPの存在は明らかとなっていない）。また、円口類には補体の古典的経路は存在しないが、軟骨魚類とそれより高等な脊椎動物には古典的経路が存在する。すなわち、円口類から軟骨魚類に移行する過程において免疫系は劇的に進化したと思われる。免疫系がこの時期に急速に進歩したとすると、そのような進化を促した要因は一体何であったのであろうか。新たな環境に適応するために新たな病原体と戦う必要があったからであろうか。進化的な時間スケールで考えると急ではあるが、生物が段階的に免疫系を発達させたのは間違いない。現在、段階的な免疫系を有する生物が観察されないのは、その子孫が絶滅したからである。私はそのような生物は軟骨魚類の誕生時には、ほぼ絶滅していたのではないかと考えている。なぜなら、これほど巧妙な免疫系は偶然によって完成するはずはなく、非常に強い自然選択が働いたからこそ完成したものであり、軟骨魚類の有する免疫系を獲得できなかった中間の生物は種間競争の結果死滅してしまったと思われるからである。しかし、一旦適応免疫系を獲得してしまえば自然選択は弱まり（他の生物種との競争は緩和され）、その後はその枠組みの中で種に応じて多様な進化を遂げることができたのではないであろうか。

分子（遺伝子）の機能が確立してからは、その機能的制約により大部分の分子は中立的に進化する。一方、新たな遺伝子が誕生するためには（新たな機能を

獲得するためには）、その遺伝子を必要とする（もっていると有利である）環境が必須と思われ、そこでは正の自然選択が働く。その結果、分子はより適応的なものへと進化していくのであろう。円口類と軟骨魚類とで決定的に異なる外来病原体を見つけることができれば、正の自然選択の正体が分かるかもしれない。今後、本シンポジウムで各先生が発表された分野の研究が進めば、免疫系に関する理解が深まるだけでなく、分子レベルでの適応進化についても重要な知見が数多く得られると思われる。

学会参加者全員が大変楽しみにしていた「大野先生との討論」が実現されなかったのは残念ではあるが、大変充実していたシンポジウムであった。

神奈川県赤十字血液センター

中島 文明

ランチョンセミナー

～ HLA-class I DNA typing kit コンペ ～

もっと規模の大きな学会で催されるランチョンセミナーでは、会場ごと各社製品の宣伝の場となり、その大会の持つテーマとは無関係に進行し、audienceはただ振る舞われた昼食をむさぼることに専念する。こういった風景は本学会では見られない。というより許されない。ランチョンセミナーも大会長の提起したテーマに支配され、立派にひとつのプログラムとして進行される。今回は「HLA-class I DNA typing kit コンペ」と題され、ユーザーの徹しい意見を取り入れつつ二日間にわたって各社の競演が行われた。

ところで、こういったテーマでcompetitionが行えるようになりユーザーとしては嬉しい限りである。class II の DNA typing kit は豊富にあるのに、class I は無い。しかし、結果が欲しいから自分で SSOP や SSP のセットを作成して、ここ数年は何とか凌いできた。それが現在では市販の製品 kit を、しかも用途に応じ選択して手に入れられるまでになったのである。市販品であるから quality control は万全で(自作品に比べれば)、中には日本人向けに改良した kit まである。

セミナーでは6種類の製品が紹介された。検出方法別では reverse-SSO 法が4題(プローブを membrane strip に固相したもの1題、マイクロプレートに固相したもの3題)、SSP 法が2題で、どれも PCR 産物を検出するかたちとなっている。

INNO-LIPA (INNOGENETICS 社の Line Probe Assay) はプローブを nitrocellulose membrane の短冊に固相したものに reverse hybridization で発色により検出する方法で、HLA-A, B, C 領域(別々の strip)を PCR から検出まで同一の条件で行える。HLA-A, B, C でそれぞれ 36, 62, 28 プローブを使用し intermediate resolution typing が可能である。方

法的に大量検体処理には向いていないが、今回の6種類のなかでは最も解像度が高く、したがって、対価はやや高い。発色が不均一なところが難点であるが、判定用プログラムは優秀であり、scanner を使用した自動化も可能である。この kit は class II の検出条件も同一なので、私は患者およびその家族の検体や臍帯血移植における移植前確認に利用している。

MRHA (シオノギの microtiter plate-reverse hybridization assay)

ELPHA (Biotest 社の enzyme linked probe hybridization assay)

MPH (湧永製薬の microtiter plate hybridization) これらは、PCR～reverse hybridization～ELISA 検出と同一の方法をとる。プローブを 96 穴マイクロプレートに固相し reverse hybridization で発色により検出する(プローブの固相方法、発色は各社異なる)。したがって、大量検体処理が可能で、自動化が容易である。また、既存の検査機器を流用して測定できる利点もある。

MRHA は、HLA-A, B, C 各 22 プローブを使用し medium resolution で検出可能となっている。従来、hybridization には厳密な温度管理が要求されるが、本法では、37°Cでの hybridization と室温での洗浄操作が特徴となっている。現在のところ判定用プログラムは準備中で、class II の kit は無い。

ELPHA は、HLA-A, B でそれぞれ 39, 57 プローブを使用し medium～high resolution typing が可能と考えられる。プローブの固定方法が他社と異なり、Streptavidin をコーティングしたプレートウェルに標識プローブが封入されており、ここに Biotin 標識プライマーで増幅された PCR 産物を加えると、コーティングした Streptavidin と PCR 産物に付いている Biotin が結合しプレートに固定される。そこにプローブが結合するか、しないかで発色の有無を得るという方法である。PCR 産物の分注から測定、および測定後の反応液の中和処理までおこなえる全自動シス

テムがある。

MPH は、HLA-A, B, C でそれぞれ 16, 22, 21 プローブを使用した low resolution typing kit のほか、A2, A26, B15, B40 などグループ別の high resolution typing kit も用意されている。骨髓データセンターでの class II typing に使用され、最も早期から存在する kit で信頼性は高い。この kit も class II の検出条件が同一なので、strip の組み合わせ方で大量検体にも少量検体にも向くが、判定用プログラムがまだ対応できていない。

Micro SSP JPN (One Lambda 社の SSP 日本人キット) は HLA-A, B, C, DR, DQ を 1 回の PCR で typing 可能な kit である。従来の血清学的タイピングをそのまま DNA タイピングに置き換えたような製品で、しかも日本人向けに modify されている。96 ウェルの PCR トレイにそれぞれプライマーセットが乾燥封入されており、付属のパuffer に DNA と Taq polymerase を加え分注するだけである。電気泳動は専用の装置を使用すれば、1 枚のアガロースゲルにアプライでき、泳動時間は約 4 分で済む。したがって、PCR から検出まで 2 時間弱と最も短時間で検出可能な kit であるが、大量処理には向いていない。また、使用する DNA 量は多い。今回の日本人 kit の開発では、quality control の関係で既存のプライマーセットを流用しているため、全体の組み合わせが明確でない点が user friendly でない。例えば、B52 と判定するには 7 ヶ所で増幅バンドが認められ、さらに何カ所かが反応陰性でないと B52 と確定できない。本来 SSP 法は 2 ヶ所の変異部分を挟んで増幅させる方法なので low resolution にしろ high resolution にしろターゲットを絞るやすいことが特徴で、SSO のようなパターン解析が必要となる判定方法ではストレスを感じる。

UniTray (Pel-Freez 社の SSP キット) も前述の SSP kit と同様の内容であるが、こちらには日本人向けの製品は無い。A2 や B15 などの high resolution typing kit が近日発売予定となっている。

以上、ここで紹介された class I DNA typing kit のほかに、PE バイオシステムズ社の SBT kit、日本では新規参人となる Biologica 社の SSP kit、そして最も初期から class I に取り組んできた DYNAL 社の SSP kit、同じく DYNAL 社の RELI (Line Probe Assay kit) などまだまだ選択肢は多い。また、ABI 社の TaqMan PCR kit と SSP 法を組み合わせたシステムや DNA チップを用いた検出 kit など近い将来実現するであろうか。

つまり、我々は、用途に応じ必要な製品を選択し使用すればよいのである。しかしながら、他の検査 kit とは異なり、これらが製品化に至るまで、ユーザーが内容について要望し改良を積み重ねてきたという側面が強い。湧永製薬の MPH や One Lambda 社の Micro SSP JPN などはその良い例である。したがって、メーカーに対し要望をかけた、それが実現する分野であるから、我々ユーザーが求めるものが何であるかを確固として持っていないと、本当に必要な製品はいつまでたっても手に入らない。

会場は各 7, 8 人程度の円卓となっており、どうしても演者に背を向けるひとができてしまう。隣の席に某血液センターの S 氏が背を向ける位置に座っていた。彼は昼食を取ろうと箸を持ったまま終始、演者の方を向いていた。他の大規模学会ランチョンセミナーではあまり見られない光景であり、この企画は大成功であったといえよう。

HLA タイピング QC ワークショップ

QC ワークショップでは、UCLA Tissue Typing Lab. の三石遙子先生から「DNA TYPING における精度管理」についての講演と、本学会標準化委員会による第 3 回 HLA QC ワークショップの報告があった。この企画は ASHI と JSHI の精度管理に対する考え方の違いを認識するものとなり、非常に興味深い内容であった。

まず、三石先生の講演では、NMDP において骨髓ドナーを DNA タイピングする上での精度管理について紹介された。NMDP では Class II に続き Class I も DNA タイピングに移行し、エラーを最小限におさえたシステムが要求されている。その、根幹をなす考え方が、「結果解析は全てのデータが正確でなければならない」ということで、これを、実現すべく ASHI の精度管理プログラムに沿ってラボの機能が構築されている。

1. 試薬、機器の維持・管理
2. QC プログラムの参加
3. 汚染防止
4. 手順書
5. 参考資料の更新・保存
6. 安全管理
7. 人事管理

HLA の DNA 検査ということで、それぞれの項目には、PCR 産物の汚染チェック、HLA 多型性パターンの更新、検体の受理・拒絶、検体スイッチの防止、不十分な自動化への対策などが盛り込まれている。ASHI では、これらの事項について記録を残し、積極的に問題点の改善に努め、2年に1回の定期検査が義務付けられている。

さらに、NMDP では上述の事柄に加え、迅速性と正確性とコストパフォーマンスの向上を要求してくる。SSOP を DNA タイピングの標準法とし、Class I でランダム QC 検体の2%以下、Class II で4%以下の error ratio を目指す。結果報告は Class I で2週間以内、Class II で3週間以内を要求し、現在、A、B、DR で80から100ドルかかる費用を50ドルに押さえる計画とのこと。また、将来的にはなんと生データでドナー検索を行い、過去のデータを更新し sequence に近づける、そのための SSOP ということだそうだ。

一方、我々 JSHI 標準化委員会では、移植医療における HLA 検査の重要性から、医学的見地として移植成績の向上、社会的見地としてマッチングにおいて公平・公正な配分が行えるよう、HLA に関する情報提供、タイピング技術の向上、表記法の標準化、学会認定といったことを活動主旨としている。その一環として、HLA QC ワークショップが実施されている。本年度3回目となり、61施設の参加があった。今回から検査 kit を使用した場合は、試薬の精度管理も可能になるよう、その生データの提出も求めた。検体は再配布可能なようセルラインから抽出している。なお、

詳細な内容については学会誌の方に掲載されるであろうから、そちらに読むこととする。

ASHI が日常検査に混入されたランダム QC 検体で「結果解析は全てのデータが正確でなければならない」とシステム全体からエラーを排除しようとする姿勢に対し、JSHI は定期的な同一 QC 検体で「間違ったら、そこを改善しよう」とする違いがある。しかしながら、その背景が、個性の異なる多数の検査技師で行う米国と、一定の顔ぶれで職人的に仕事をする日本との違いということになるのか。



特集

第8回 日本組織適合性学会報告 (5)

「感謝状を頂いて」

株式会社ベリタス

会長 飯田耕作

感謝状

あなたは株式会社 Veritas 創業以来、その特異なビジネス哲学の実践を通じて、物心両面にわたり、日本における HLA 学の実践に多大の貢献をされました。ここに記念品を添え感謝状を差し上げます

1999年7月8日

第8回日本組織適合性学会
大会長 佐治 博夫



学会の懇親会の席上、突然佐治大会長から壇上に上がるように指示され、何事かと思っていたところ、上記の感謝状と共に立派な花瓶を頂き誠に恐縮した次第です。

そして「その特異なビジネス哲学の実践を通じて」と言って頂いて、更に「会長になったから」と囁かれたことで、佐治さんは私の考えと心境を分かって下さったなという感慨と共に、HLA のグループの方々の今迄の活動は、私の経営理念と同じであったので現在迄一緒に過ごさせて頂いたし、ベリタスの発展も HLA が基幹になっての今日があるわけで、当方こそ皆様の御眷顧を有難いと御礼申し上げたことでした。

1) 特異なビジネス哲学

「特異なビジネス哲学」というのは VERITAS(ラテン語で真理の意)に基づいた経営で会社は利益を目的にするという通念ではなく、社会貢献を目的にすべき存在で、利益はその貢献度により与えられるものだ。そして VERITAS PERSON としかビジネスをしないと言う考え方なわけです。どうしてこういう発想になったかというベリタス設立の昭和 47年 (1972

年) 頃は急激な経済成長による自然環境に対する公害の増大ばかりでなく、人心も非常に汚染されてしまった。これからの世の中は心を大切にしないと駄目だ。ビジネスも物ではなくて知識だと思い、アメリカから新しい技術を導入し国内では異業種間のコーディネーターをやって特許を取ってアメリカへ打ち返す仕事をしようとしたわけです。

その頃はまだ日本ではノウハウは只だと思われていて技術導入では食べられないので新製品を輸入することになり、現在も引き続けている無公害洗剤 パイオセブンとか パイプクリーニングのビッグとか異業種交流による特許製品の赤水対策のオネストライマーや、藻類除去のロータリースピッツを始めました。

2) 生物化学製品取り扱いの発端

当時、当社が扱う製品の評価を THINKTANK GROUP でやらしてもらおうと思い、友人ばかりで 10人それぞれ皆異業種から出してもらい毎週土曜日に海外からの商品の評価と持ち込み先の紹介をしてもらっていました。当時の (昭和 47~50年) 友人達は大会社の者は課長位でしたが後に皆それぞれの会社のトップになって行き、他界した人も出ましたが現在も 7人のメンバーで回数は減りましたが続けています。

昭和 54 年頃生物化学製品をやらないかとアメリカから言ってきて、THINKTANK のメンバーがこれは必ず将来伸びるからやれと言われましたが、私は何も分からず、当時東大小児科教授の小林登君が海軍兵学校（海兵）の同期生で免疫に詳しいからと言われて訪ねました。カタログを見ていた小林君がウサギ補体を見つけて、その頃ウサギ補体の入手で困っているからと言って輸血部の十字先生の所へ連れて行ってくださいました。十字先生から御自身の先生で九大におられる大河内教授を訪ねて見るように言われ、大河内先生も海兵に行っておられたと思うとの事でした。当時九大医学部には海兵（海軍の士官学校）同期の者が何人もおり、中でも循環器の中村元臣教授は教壇も同じ、家内同志も海外の小学校同級で親しかったので大河内先生の紹介を頼んだところ彼は我々が海兵で受けたクラスで親しいからと即座に紹介してくれました。（海兵では3年生が入校してきた1年生を教育させられ、受けることが日常茶飯事でしたがこの関係は却って親しくなった次第でした）大河内先生を紹介して頂いた時もう一人免疫関係で海軍ではないが「酒飲みの豪傑を紹介してやる」と連れて行かれたのが野本先生の部屋でした。さらに教え子で補体関係のことをやっているのが福岡医大にいるから訪ねて見ると言われたのが内藤説也先生でした。また大河内先生の所でお会いしたのが福岡血液センターの徳永さんで、徳永さんから佐治さんを紹介され、HLA のグループの方々を次第に存じ上げるようになりました。

これらの方々が当時市販の補体が 1cc 当り ¥1,500 もしてロット間のばらつきもあるので自分でウサギを飼って補体を取っているが、なかなか良い補体が取れない。そこでロット間のばらつきのない補体を cc 当り ¥300 位で供給してくれと言われました。

私には全く無知の分野だが一般に話半分、と言うが 1/5 という事は無理でしょうと言ったら、ウサギは外国産のニュージーランドホワイトの値段で労務費は助教授の給料で計算して自分で作っている補体の原価を積算し、それを2倍にしても 1cc ¥300 にならない、だから可能ではないと言われる。私も「そういう根拠があるなら実際にやってみないで NO」という訳にもいかないからやってみますが、飛行機でドライアイスで輸入するから量をまとめて下さい」とお願いして各大学や血液センター等で 15L がまとまり、これを輸入したら全然利益は出ないが USER に直売で現金払いであつたら何とか ¥300 で売れることがわか

り、皆さんに使って頂き始めました。

ペリタスの USER 直販はこの時に始まったものです。この時東大の購買から問屋を寄せと言われたが、それでは ¥300 で売れませんと言って何とか直でしかも現金払いでさせて頂いたのも後から考えれば異例の措置でした。

3) TERASAKI HLA TRAY 取り扱いの奇縁

ウサギ補体を各研究所や血液センターにお届けしているうちに DR.TERASAKI, UCLA という話が頻繁に出てくる。ある研究所で UCLA の DR.TERASAKI とはどういう人ですかと聞いたら「なんだウサギ補体を売っていてあの先生の事知らないのか」と笑われて DR.TERASAKI がどういう人か初めて知りました。私は昭和 45 年から 47 年迄吳羽化学のアメリカ会社を任されていて、本社を LOS ANGELES に置いていましたがその時に UCLA の PROFESSOR の DR.TERASAKI を存じていましたが、何の PROFESSOR かは知りませんでした。そこで DR.TERASAKI に手紙を書き、「ウサギの補体の仕事を始めてウサギの補体は UCLA の DR.TERASAKI という人の発明の製品だと聞いたが関係ある人か、ない人か」と聞いたところ「当人である。近く日本に行くから会おう」と返事をくれました。ある日、午後 4 時頃電話がかかってきて「今東京プリンスホテルに着いた。今からなら時間がある」と言われるのですぐ飛んで行きました。会うなり DR.TERASAKI は「君は何でこんな商売始めたか」と言われるので、それはどういう意味かと反問したら「この製品は日本では大きなビジネスにはならない」と言われる。そこで私は海兵同期の友人が医者が多くてその友人達が補体など生物化学製品が日本では高くて困っているの、友人を助ける為に始めたので少しも利益は出ない。SECRETARY と二人だけで別の無公害製品で食べていられるから、大きなビジネスにならないでもよいのだ、と言ったら「君がそういうつもりでやっているなら助けてやる」と言われて、当時 UCLA では市販の補体は当てにならないので自分でウサギを飼って取っていた由ですが DR.TERASAKI はメーカーを訪ねて品質を改良するよう指導し、UCLA もそこから買うようにしてくれました。

そのうち DR.TERASAKI から連絡があつて「日

本から TERASAKI LABO) に HLA の研修に来た人や HLA 関係者に帰国後も UCLA の TRAY を実費で分けているが支払が遅くて出荷後、催促の赤紙を3回出して、これで支払わないと品物送らないと言わないと入金しない。UCLA の会計からいつも文句言われるので、君の所で輸入してすぐ支払をするようにしてくれないか」と言ってきました。殆ど同じ時期に東大医科研の秋山先生から「飯田さん DR.TERASAKI を知っているなら HLA TRAY をベリタスで輸入して、こちらに売ってくれないか。国立病院ではドルの請求書にはお金が出ないので皆ポケットマネーで支払わねばならないので困っている」というお話があり、なぜ日本の研究者の支払が遅いのか分かりました。1981年頃ですが DR.TERASAKI から「実費で分けているので君が損をしないように私がコスト計算するからその値段で日本の皆に売って欲しい」とのことでしたが補体と同じ USER でしょうから構いませんよということで始めることにしました。実際に輸入を始めると全然利益は出ませんでした。補体も同様だからサービスの仕事だと思っていました。

TRAY を扱い出して暫くした頃 DR.TERASAKI から電話があり「ミドリ十字の内藤社長が来て HLA TRAY の日本の販売権を売って欲しい、金はいくらでも出す。と言ってきたのでベリタスにやらせているからベリタスと話せと言っておいたから連絡あると思う」との事でした。間もなく内藤社長から電話で私に会いたいから上京すると言われるので「いや、軍人の大先輩(元陸軍軍医大尉)ですからこちらから伺います」と下返しました。ミドリ十字の内藤社長という方は戦時中、満州で生物化学兵器を研究していたということで戦後有名になり血液銀行を始められ、これがその後血液は民間でやるべきではない、ということで赤十字血液センターに移行して行き血濁関係の新しい仕事を次々にされている方として陰ながら尊敬していました。

応接に通されて開口一番「私は今迄新しい事をいろいろ手がけて来て、新しいことにかけては先を見抜くことでは誰にも負けたいと思っていました。そして TERASAKI HLA の TRAY は素晴らしい製品で将来性があるものと考えて DR.TERASAKI に扱わせてほしいと行ったら既にもう貴方がやっておられると聞いて本当に驚いた。どういう理由で私より先にこの製品に気が付かれたのか」と言う。「私は全くの素人でそ

んな先見の明などは無いし、たまたま医者友人達が日本は生物化学製品は国が狭いから動物をいろいろ飼えず、高くて人手困難なのでバラ付きのない品質の製品を安く供給してくれというのが始まりで TRAY も UCLA の会計課が入金に困らないように、又日本の国立の先生方に日本円の請求書で売れるように実費でサービスする為にやっているのだから、将来性があるのか、ないのかそんなことは私にはわからない」というと安心したような表情をされて「この製品は素晴らしい製品なので全部私にさせる。私の会社の組織で展開したら貴方にも大きな利益があげられるから、是非そうして欲しい」と言われる。正直私は頭にきました。「失礼ですが貴方は元、陸軍軍医大尉でしょう。私は終戦時、海兵の最上級生で軍人の卵です。軍人の卵の私が日本の国のためと思って仕事をしているのに本物の軍人だった貴方が儲けさせるから全部よこせというのはどういう事ですか。そんな人には渡しません」と言ったら不思議な顔をしておられたのが印象的でした。

4) HLA TRAY の厚生省の認可

この仕事をやり始めて医療用の商品には認可が必要なものがあることが分かってきました。DR.TERASAKI とは親しく付き合っていましたが大変偉い人だと分かって偉い人を傷つけてはいけなないと思ひ、厚生省の生物化学製品課に HLA TRAY やウサギ補体は認可があるものか、いらないか確かめておこうと聞きに行きました。すると担当係長がこれは初めての製品なのでわからないからアメリカはどうなっているか調べてくれと言われて次の渡米の折りに調べました。すると当時は TERASAKI LABO) で作って実費で売っていて、また NIH が TERASAKI から教えてもらって作って、これも実費で配布している。NIH は TERASAKI から教えてもらっているのだから、TERASAKI LABO) に認可などの事は言えないとの事でその通りを厚生省に報告し、当方はその発明者から輸入するのだと説明しました。すると係官は「困りましたね。では内部で相談しておきます」ということで暫くすると「相談の結果、事情は分かりましたが SUPPLIER が限定されていることなので HLA TRAY もウサギ補体も申請して下さい」という事になりました。

申請するとなると同じビル内に会社の研究室がなければならぬ。生物化学製品の教育を受けた管理薬剤師がいなければならぬ、などこの分野に初めての私

にとっては、寝耳に水のことばかりでした。同じビルの空室を借り増して研究室にするやら、補体の仕事を始めた時に私はこの分野の知識が何も無いので前田初代に来てもらい、十字先生にいろいろ教えて頂いていたので管理薬剤師として申請を始めました。今でも医薬品の申請は随分改善されたとはいえ大仕事ですが当時は全く大変でした。何しろ厚生省としても初めての製品であるのに従来の製品を基準にしてのデータを揃えろと言われる。UCLA にもないデータをいろいろ要求され、それを取って貰う時間がかかる、やっと持って行くと何日か経って修正要求がある。当時はワープロなどありませんし、コピー数部草案でも印刷したもので持って行かねばならない。とにかく手が届かなくて大変だと思って半年位経った時に係官から呼び出しがあって「せつかく努力して頂いて今になって申し訳ないが、内部会議の結果ウサギ補体は認可必要でなくなりました。すみませんでしたね」との話があり、折角今迄手が掛かってきた事だが、一つだけでも必要なくなることは大変有難いことで、有難うございましたと深く頭を下げたことを覚えています。

その後、大小いろいろ修正要求が出て印刷屋の和文タイプの人には徹夜で仕事をしてもらうような事が何度もあり2年も経過した頃は他の仕事に影響もあり、こんな面倒なこと、しかも TERASAKI のコスト計算には申請に必要な経費、研究室費用や薬剤師費用など入れてくれてありませんから、採算は真っ赤な赤字なので一時この仕事は余程中止しようかと真剣に考えました。しかし2年も苦勞してきている事だし、この請求書を日本円で出さないと困られる先生も多い事だから何とか頑張ろうと思って続けて3年経ってやっと認可されました。

5) ONE LAMBDA の設立

1983年頃 DR.TERASAKI から HLA TRAY の生産販売を始める会社が出てきて、それらが TERASAKI LABO は学校の研究所で作っている TAX 払わないでやってるのは UN-FAIR だと言っているらしいので学校の外に民間会社を作ることになければならないかもしれないと言っていました。遂に総長から HLA の生産と販売は学校の外に出てやって欲しい。研究所の所長として今のままでやって構わないと言うので誰か責任者を決めて新会社を作ってやらざるを得ないと言っていました。そこで私は

「それはいろいろ大変ですが良いチャンスです。研究員が150名もいて、なかには余りまともに仕事をしていない人も見かけるからこの際そういう人間を整理して合理化したら良いでしょう」と言ったら DR.TERASAKI は「私は今迄自分から辞めると言う者は止めないが、こちらから辞めさせた者は一人もない。今回もこちらから辞めるとは一人も言わないつもりだ」と言うので立派な考えだと感心すると共に日本ならともかくアメリカでそういう考えて会社がやれるのかなと思ったものでした。

1984年のいつでしたか TERASAKI LABO を訪ねた日に MR.GEORGE AYOUB が今から DR.TERASAKI から TERASAKI LABO を学校外に出して新会社にするという話がある。と言って全員心配そうな顔をして会議室に集合して行きました。会議が終って帰ってきた GEORGE が、皆 DR.TERASAKI にずっと世話になってきているのに、新会社を作るとなったら自分の身分はどう保証してくれるのだなどと質問するやつがいる、と怒っていました。この時確か GEORGE や DON ARII など7名が新会社に出るように指名されたと思いますが、これからは自分で作って自分で売って食べて行かねばならぬという事であったからでしょう、誰も言葉には言いませんでした。私の目には皆決死隊みたいな顔をしていました。私は製品は UNIQUE だし客先も定まっていることだから銀行は金を貸すだろうし、きちんとした製品さえ出せば心配ないと言っていました。最初に指名された創業のメンバー7人は当時相当な決意をしていただろうことは確かです。

6) ベリタス講演会とテクニカルセミナー

DR.TERASAKI の依頼で HLA の TRAY の販売を始めた頃 USER の方から TRAY の反応がよく出ない、という電話がかかってくる事があると「発明者の TRAY を差し上げているので、やり方が悪いのでしょうか」と、うそぶいていました。社員が社長みたいな凶々しい商売は出来ない、勉強させてほしい、というので翌日先生の LABO へ半年ばかり勉強に出しました。

これらの経緯からこの仕事は製品の品質ばかりでなく、使用者の熟練度で結果に大きな差が出るという事が分かって来ました。そして UCLA が CELL EXCHANGE という SYSTEM をやって、世界中の

HLA LABO の技術の向上と標準化を目指しているという事も知りました。そこでこの仕事は商品売っているばかりでは駄目で技術サービスを充実しないと、まともな仕事にはならないと思い、前田の他に小さな会社としては負担でしたが益尾、引き続いて大澤という技術者を入れて諸先生に HLA の技術を教え込んで頂きサービス態勢を整えました。

この頃 HLA 研究会（日本組織適合性学会の前身）が毎年開かれていましたが、この研究会では偉い先生方の難しいテーマの発表ばかりで実際に現場で TYPING をしている TECHNICIAN の方々の訓練や情報交換の場が必要ではないかと考え、1986 年から TECHNICIAN を対象にしたテーマで日本やアメリカの先生方に講演をして頂き、同時に希望者を募集して 20 名位、実際に HLA TYPING をする TRAINING SEMINAR を実施しました。初回は 50 名を超す応募者で毎回好評を頂いていましたが 5 年程続ける中に大体皆さん技術の習得は終わられたようで、講演会だけにして TECHNICIAN の方に必要な具体的な話を主として ONE LAMBDA の技術者にしてもらうようにしました。そしてその講演会もベリタスが別の機会にやるよりも組織適合性学会と同時にやったら、という事になりベリタス ランチョンセミナーになってきています。

7) その後の HLA の展開

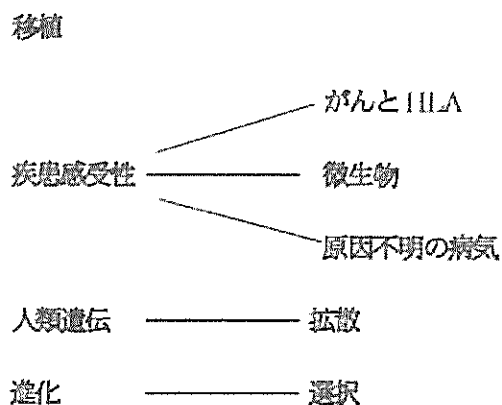
この間日本国内でも HLA 研究会が日本組織適合性研究会になり DR.TERASAKI が 15 年前から日本に移植をすすめているのにさっぱり進展しないと、厚生省にハッパをかけられるなどして、いくらかずつ HLA 及び移植の推進が取り上げられるようになってきました。

腎移植普及会の山川専務理事から臓器移植法を議会上程する動きを手伝ってくれと言われて腎移植普及会の理事を引き受けて、日本臓器移植ネットワークの設立に厚生省と 2 年にわたり各理事の方々と力を尽くしネットワークが軸がりなりにもスタートし、臓器移植法もスタモンの末、手かせ足かせをさせられながら、やっと法制化されてきました。

他方、高久先生、十字先生、佐治さんなどのお力で骨髓バンクがスタートして骨髓移植の道が開かれ、HLA の市場も漸く本格的なものになってきました。

5~6 年前から HLA の TYPING は DNA になるであ

ろうと言われていた DNA TYPING も漸く実用の段階になり、各社が足並みを揃えて来ました。そして今回の組織適合性学会の最後に木村彰方先生が総括された HLA の今後の研究の方向は次のようなものでした。



それに加えて大野 乾先生のお考え（次席され代理の五條堀先生のお話）として「HLA は自己と非自己の区別でよいのか、蛋白として考えた方が意味があるのではないか」と言われました。

専門家諸先生からは笑われると思いますが素人の私は HLA の研究とその意義は新しい段階に入ったような気がします。

即ち「自己と非自己を区別する」ものとしての機能で移植に殆どの役割を求められていた HLA が「自己と非自己を区別する以外の大きな意味を持っていそうだ」という事が分かって来て今迄の移植用という分野は木村先生の分類だと 6 分野の中の 1 つになってしまった。そして移植の分野でも、まだいろいろの改良発展があるのでしょうか他の 5 分野或いはこれから増えるかも知れない研究用途分野はどんどん発展して行って、治療、予防医療の分野に貢献していくことと予想されます。

8) 結語

私の見方は正鵠を得ていないかも知れませんが、HLA の初期の研究者、大学医学部、日赤グループの方々は腎移植、輸血という医療としては新しい分野に対する貢献の HLA という開拓の分野に挑戦されて患者を救うという目的のために医師と検査関係の方々

緒になってその達成に努力をしてこられたと思います。

他方ペリタスは私が企業経験20数年を経て、企業の基本理念はペリタス（真理）でなければならない。そして大切なのは物ではなく心であり、HARD より SOFT が大切だと思って努力して来たことが HLA の研究者の方々のお考えと行動に一致していたので同じ仲間として可愛がって頂いてきたのではないかと思います。

私は世の中というのは真理を皆が希求しながらバーチャルだと思っています。最近のデリバティブなどというのは、その最たるもので、この傾向は21世紀へ向けて更に勢力を増していくと思われます。真理だけを掲げてバーチャルを全部拒否していたら生きて行かれません。バーチャルが巾を利かせてきて毎日に変化であるような世界には機敏な対応と HARD WORK がないと対応出来ません。そういう行動は若い者でないと不可能なので社長を息子に譲りました。若いメンバーで一杯皆様にサービスする筈です。

バーチャルが世の中を支配するようになってもペリタスはあくまでペリタスの理念を忘れません。今後も皆様のお仲間としてお引き立て頂き、新しい HLA の研究にお伴をしながら21世紀の医療に貢献するよう努力致しますのでよろしくお願い致します。

以上



知ってるつもり!?

血清学編 (続編)

HLA-B ローカスの血清学的タイプとアレルについて ②

日本赤十字社 中央血液センター

田中 秀則

HLA-B ローカスのアレル (遺伝子型) は、これまでに 200 種類以上が報告されている。しかし、そのアレル名は HLA 抗原型 (血清学的な型) を重視していない場合も多く、今後その取扱いについては論議される必要がある。

前回は、B22、B5、B35、B44 に関する HLA-B ローカス遺伝子型 (アレル) と HLA 抗原型について紹介を行った。今回は、B16、B40、B7 および B27 関連抗原群について紹介する。

1. B16 関連抗原 (図 1、2、3 参照)

B16 抗原は、Bw4 および Bw6 と相関することにより B38 と B39 に区分された。その後 B39 の一部

に反応する抗血清により、B39.1 と B39.2 に区分することが可能になり、第 11 回国際組織適合性ワークショップでは、それぞれのアレルも判明していたことからこれらの抗原は B3901、B3902 と命名された。

B3901 抗原については、中島 (神奈川センター) らの検討結果から B3901 抗原に特異的と思われた抗血清により 2 種類のグループに区分されることが見出され、頻度が低い抗原を B39N とした。しかし、同氏は B39N 抗原が血清学的に更に区分されることを見出し、B39N と B39N2 とした。その後の DNA タイピングの結果から、B39N は B*3904 に、B39N2 は B*3905 にコードされていることが判明した (図 1 参照)。また、我々が行っているワークショップにお

図 1. Antigens in B16 CREG (1)

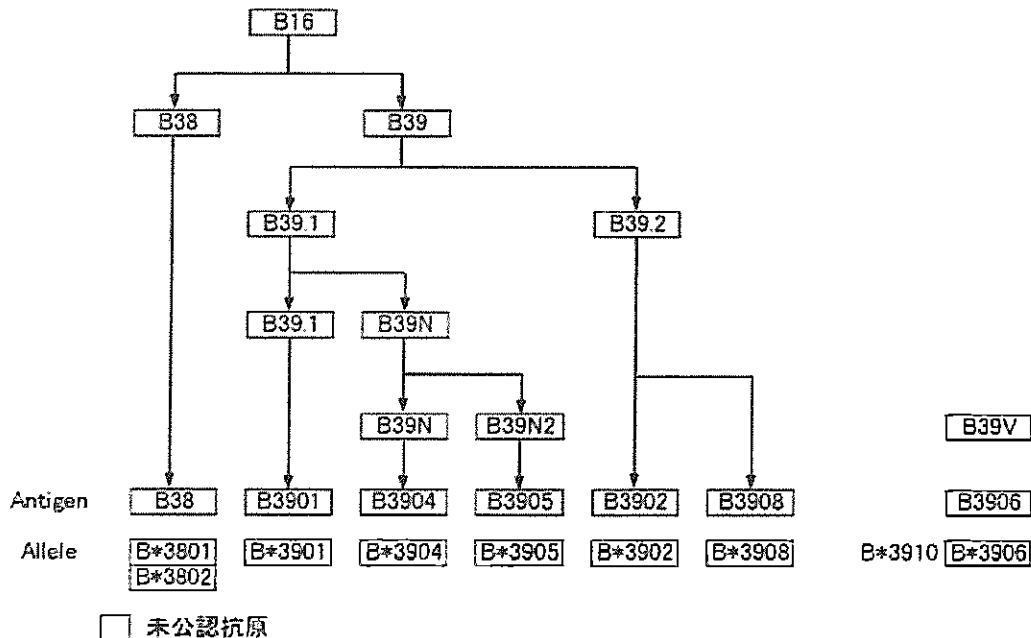


図 2. Amino Acid Sequences of B16 antigens

Con	S	Y	A	V	G	A	D	Q	A	M	E	I	E	Y	R	E	T	Q	I	V	T	N	T	D	E	S	R	N	L	R	G	A	T	L	R	Y	V	L	Y	D	Y	R	T	T	R	W	V	L	A	G	T	E	W	Y	E	T	O
B*3901	--S--S--E--N--C--Y-- N-I ALR-----HNFS-----T-----																																																								
B*3902	--S--S--E--N--C--Y-- N-T ALR-----HNFS-----T-----																																																								
B*3901	--S--S--E--N--C-----Y-----HNFS-----T-----																																																								
B*3902	--S--S--E--N--C--S-----HNFS-----T-----																																																								
B*3903	--S--S--E--N--C-----S-----HNFS-----T-----																																																								
B*3904	- M --S--E--N--C-----Y-----HNFS-----T-----																																																								
B*3905	--S--S--E--N--C--Y-----HNFS-----T-----																																																								
B*3906	--S--S--E--N--C-----W T -----HNFS-----T-----																																																								
B*3908	--S--S--E--N--C--S--Y-----HNFS-----RT-----																																																								
B*3910	--S--S--E--N--Y-----HNFS-----T-----																																																								
Con	S <th>Y</th> <th>A</th> <th>V</th> <th>G</th> <th>A</th> <th>D</th> <th>Q</th> <th>A</th> <th>M</th> <th>E</th> <th>I</th> <th>E</th> <th>Y</th> <th>R</th> <th>E</th> <th>T</th> <th>Q</th> <th>I</th> <th>V</th> <th>T</th> <th>N</th> <th>T</th> <th>D</th> <th>E</th> <th>S</th> <th>R</th> <th>N</th> <th>L</th> <th>R</th> <th>G</th> <th>A</th> <th>T</th> <th>L</th> <th>R</th> <th>Y</th> <th>V</th> <th>L</th> <th>Y</th> <th>D</th> <th>Y</th> <th>R</th> <th>T</th> <th>T</th> <th>R</th> <th>W</th> <th>V</th> <th>L</th> <th>A</th> <th>G</th> <th>T</th> <th>E</th> <th>W</th> <th>Y</th> <th>E</th> <th>T</th> <th>O</th>	Y	A	V	G	A	D	Q	A	M	E	I	E	Y	R	E	T	Q	I	V	T	N	T	D	E	S	R	N	L	R	G	A	T	L	R	Y	V	L	Y	D	Y	R	T	T	R	W	V	L	A	G	T	E	W	Y	E	T	O

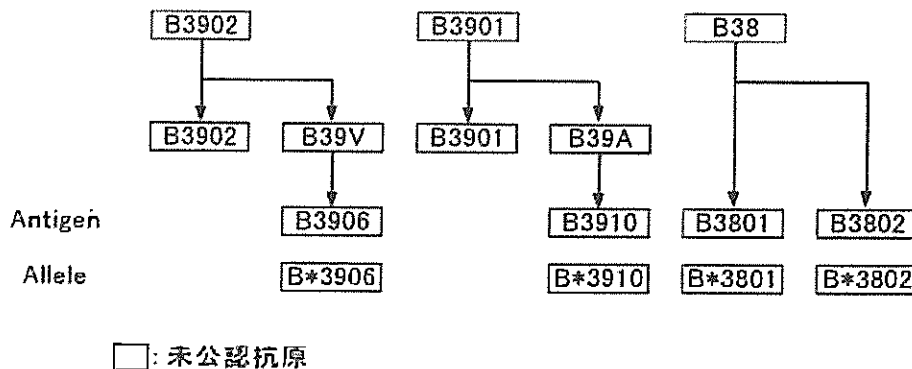
いて、B3901 抗原の一部においてそれまでに見つかっている B3901 関連抗原とは異なる反応パターンを示す抗原 (主に Black 由来) が見出され、その後の塩基配列の解析からこの抗原は B*3910 でコードされていることが判明した。

B3902 抗原については、これまでに血清学的に反応の異なる抗原として B3908 抗原 (図 1)、また我々が行っているワークショップでは、B3902 抗原とは異なる反応パターンを示す抗原 B39V 抗原が見出され、B*3906 でコードされた抗原であることが DNA タイピングで判明した (図 3)。

B3901 と B3902 抗原のアミノ酸配列を比較した場

合、 α 1 ドメインの 63 および 67 番目に違いが見られる。これらの変異が、B3901 および B3902 抗原特異的な抗血清のエピトープの一部であることが推測される。また、B3902 からスプリットした B3908 抗原においても、B3902 と同様のアミノ酸置換が見られ、B3902 に対して特異的な抗血清は、 α 1 ドメイン 63~67 番目のアミノ酸をエピトープする可能性が高い (図 2 参照)。また、B3910 は、B3901 と比較し 67 番目にアミノ酸置換が認められるが、血清学的には B3901 抗原に近い反応性を示すことから、B3902 の反応性は 63 番目のアミノ酸置換が大きな影響を与えていると思われる。

図 3. Antigens in B16 CREG (2)



B38 抗原については、これまで血清学での変異に関する報告はなかったが、最近我々が行っているワークショップにおいて、Bw4 抗原の一部に反応するモノクローナル抗体（特異性：B44+B37+B13+B27+B47）が、B38 パネルの一部と反応を示すことにより区分することが可能であった（図3）。Bw4 抗原の特徴的なアミノ酸配列は、 α 1 ドメイン 77~83 番目に見られる。Bw4 抗原は、80 番目のアミノ酸がスレオニン (T) またはイソロイシン (I) であり、Bw4 抗原の一部に反応するモノクローナル抗体は、スレオニンをエピトープの一部としていると思われる。そのことから、このモノクローナル抗体に反応する B38 抗原は、B*3802 にコードされる B38 抗原であることが推測された（図2参照）。

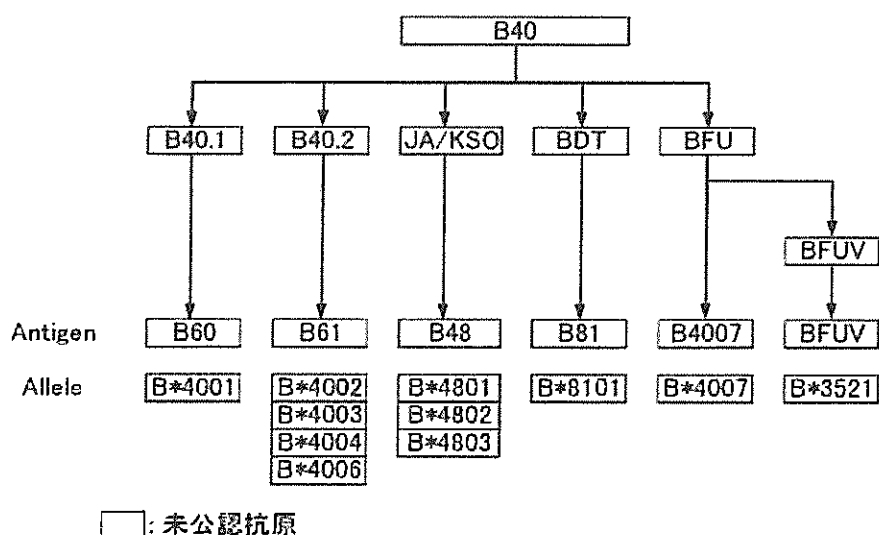
2. B40 関連抗原（図4、5参照）

B40 関連抗原については、当初 B40.1, B40.2 および JA/KSO に区分された抗原がそれぞれ B60, B61, B48 とされた。中でも B48 抗原については、その多くが Oriental 由来のパネルにおいて見出された抗原であった。近年の塩基配列解析において、これらの抗原をコードするアレルとして、B60 抗原は B*4001 に、B61 抗原は B*4002, B*4003, B*4004 または B*4006 であることが判明した。B61 抗原は複数のア

リールに由来する抗原であるが、これまでに血清学的に B*4002, B*4003 および B*4006 でコードされる抗原は区分されていない。しかし、B*4004 にコードされる B61 抗原については、1 例だけではあるが、血清学的に他の B61 抗原とは異なる反応パターンを示すことが確認されている。B48 抗原に関連するアレルは、これまでに3種類報告されている。しかし、B*4801 以外のアレルに由来する B48 抗原については、これまで血清学的な検討を行ったことはない。

これまでに、B60, B61 および B48 抗原以外の B40 関連抗原として、Black 由来の DT 抗原、日本人由来の Fu 抗原が見出されており、遺伝子解析の結果から新たなアレルであることが分かり、それぞれ B*8101, B*4007 と命名された。DT 抗原については、相関するアレルが解析されたこともあって、現在では公認抗原である B81 として取り扱われている。B81 抗原は、B7 の α 1 ドメインと B48 の α 2 ドメインが組み合わさった抗原であることから（図5参照）、血清学的に B7 と B48 両方の血清学的な反応性を示す。Fu 抗原については、B60 と比較して1アミノ酸（67 番目）の置換であるが、血清学的にはかなり異なった反応パターンを示し、血清で他の抗原とは区分可能なタイプであることから、現在ワークショップでは B4007 抗原として扱っている。また B*4008 由来

図4. Antigens in B40 CREG



する B40 抗原については、これまでの検討で B61 抗原の反応パターンより短い反応パターンを示すことが判明しており、血清学的には区分可能な抗原である。

B*4007 および B*4008 でコードされる B40 抗原は、67 番目のアミノ酸において、他の B40 抗原ではセリン (S) であるの対して、共にフェニルアラニン (F) に置換している (図 5 参照)。この置換が B40 関連抗血清に対する反応性に影響を与えていると考えられる。

他の B40 関連抗原として、長谷川 (当時、東京南センター) が Fu 抗原とは若干の反応性が異なる Fuv (Fu Variant) 抗原を日本人より見出し、またワークショップにおいて韓国人に同様の反応パターンを示す抗原があることが判明した。最近、ソウル大学の

Park 教授らは、Fuv 抗原の塩基配列の解析を行い、その結果からエクソン 2 が B*3501、エクソン 3 以降が B*4002 と同様な塩基配列であることが判明した

(長谷川らの見出した Fuv 抗原も同様の塩基配列であることが確認されている)。しかし、このアリアルは B*3531 命名され、エクソン 2 での塩基配列の相同性が命名のグループ区分に使用されているのであろう。Fuv 抗原は、血清学的にも B35 の特異性を含む B5 関連抗血清に交差反応性が見られるが、B40 関連の抗血清に反応を示す確率は高く、通常 B40 関連の抗原として取扱う方が一般的と思われるが、アリアル名にはその情報が含まれないため、血清学でのタイピングでは困惑する可能性がある。

図 5. Amino Acid Sequences of B40 and B7 CREG

Con.	SYAVGADQAMEIEYRETOIVTNTDESRLRGATLRYVLYDYRRTTRWVLAGTEWYETO	Group
B*4001	-H-M-T-LTK-----S---Y-----HN---S-I---E---DKE	B60
B*4002	-HS--T-LTK-----S---Y-----S---HN---E-----	B61
B*4003	-HS--T-LTK-----S---Y-----S---H-S---E-----	
B*4004	-HS--T-LTK-----S---Y-----I-I-HN---E-----	
B*4005	-HS--T-LTK-----S---Y-----S---HN---E---I-----	
B*4006	-HS--T-LTK-----S---Y-----WT---HN---E-----	
B*4007	-H-M-T-LTK-----F---Y-----HN---S-I---E---DKE	4007
B*4008	-HS--T-LTK-----N---F---Y-----S---HN---E-----	4008
B*8101	--S--S--E-----N---YAQA-----S---HN---S-I---E---DKE	B81
B*0702	--S--S--E-----N---YAQA-----S---H-----ER---E---DKE	B7
B*4601	--S--S--E-----S---Y-----S---HN---S-I---E---DKE	B48
B*0703	--S--S--E-----N---Y---S---H-----ER---E---DKE	B703
B*0705	--S--S--E-----N---YAQA-----S---HN-----ER---E---DKE	B705
B*4201	--S--S--E-----N---YAQA-----S---HN-----D---D---E	B42
B*2702	-HS--T-L-E-----CAKA-N-IALR-N---HDS-----E-----	B27(1)
B*2705	-HS--T-L-E-----CAKA-D-T-LR-N---HDS-----E-----	
B*2704	-HS--T-L-E-----CAKA---T-LR-N---HDS---E---E-----	
B*2706	-HS--T-L-E-----CAKA---T-LR-N---S---E---E-----	B27(2)
B*2708	-HS--T-L-E-----CAKA-----N---HDS-----E-----	B7Qui
B*2707	-HS--T-L-E-----CAKA-D-T-LR-S---HN-----E-----	B27KH
B*2711	-HS--T-L-E-----CAKA---T-LR-S---HN-----E-----	
Con.	SYAVGADQAMEIEYRETOIVTNTDESRLRGATLRYVLYDYRRTTRWVLAGTEWYETO	

3. B7およびB27関連抗原 (図5, 6, 7参照)

B7 関連抗原については多型性がほとんど認められていなかったが、稀な抗原 BPOT は血清学的に B7varinat 抗原のひとつである。第 11 回国際組織適合性ワークショップで BPOT 抗原は、血清学的に B7 とは異なることが確認され、その塩基配列も解析されたことから、命名委員会において B703 抗原として公認された。B703 抗原は、B7 (B*0702 にコードされる抗原) と比べて、 $\alpha 1$ ドメイン 69~71 番目のアミノ酸に置換が認められ、B7+B42 抗血清に反応性を欠くものと考えられる。しかし、B7+B27 抗血清には反応が見られることから、この特異性の抗血清のエピトープとして $\alpha 1$ ドメイン 69~71 番目は関与していない可能性が高い。

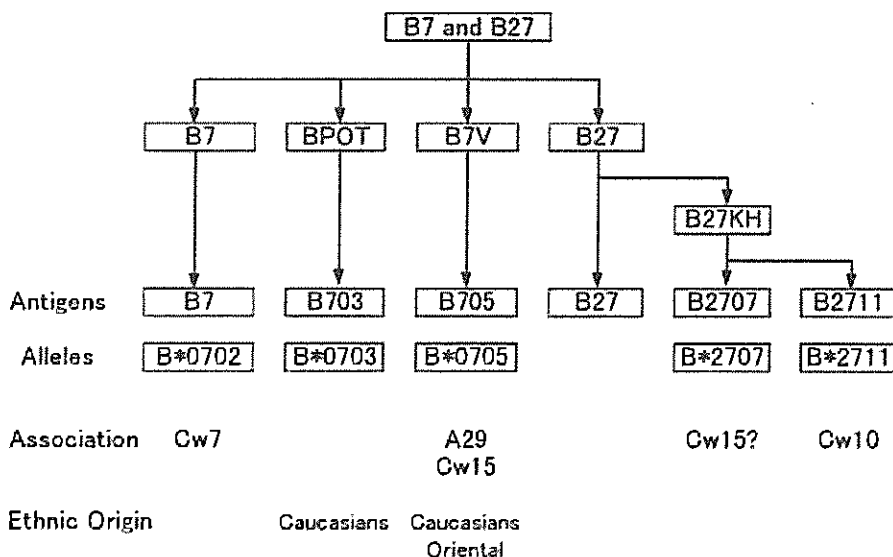
他の B7 関連抗原については、我々が持っているワークショップにおいて B48+B60+B61+ α の抗血清に反応を示す B7 抗原が認められ、この抗原を一時的に B7V とした。塩基配列の解析結果から、B*0705 にコードされている抗原であることが判明し、現在では B705 (未公認抗原) としてタイプしている。この抗原は、B7 (B*0702 に由来する) 抗原と比較して、114 番目のアミノ酸においてアスパラギン酸がアスパラギンに置換 (D→N) している (図 5 参照)。この置換により、B705 抗原が B48+B60+B61+ α の抗血清に反応性が認められることが推測される。B705 抗原は、

韓国の集団に比較的良く見られる抗原で、A29-Cw15-B705 という特徴的なハプロタイプを形成している。もしも日本人で A29 を持つパネルで、B7 抗原が認められる場合は、B705 を疑う必要がある。また、C-ローカスは Cw15 であることから、通常の血清学的なタイピングでは C-ローカスがブランクになることが多い。

B27 抗原については、血清学的なサブタイプに関する報告は少ないが、B7Qui として報告された抗原が塩基配列の解析結果から Bw4 ($\alpha 1$ ドメイン 80~83 番目) のアミノ酸配列が、Bw6 のそれと置き換わった抗原であることが判明し、アリアルとしては B*2708 となった。しかし、この抗原についても B7 のサブタイプでありながら、何故 B27 のアリアルとして区分されたのか？それは、B7 よりも B27 の塩基配列と相同性が高いから。それでは、何故 B7 のサブタイプとしてタイプされたのか？それは、B27 単一特異的な抗血清には反応を示さず、一部の B7+B27 抗血清等に反応を示した為に B7 サブタイプとして区分された。では、何故 B27 単一特異的な抗血清には反応を示さなかったのか？といった疑問が残る。これについては、B27 単一特異的な抗血清のエピトープのひとつに、Bw4 抗原 ($\alpha 1$ ドメイン 80~83 番目) のアミノ酸配列が関わっていることが推測される。

他の B27 抗原については、長谷川らが日本人にお

図 6. Antigens in B7 and B27 CREG

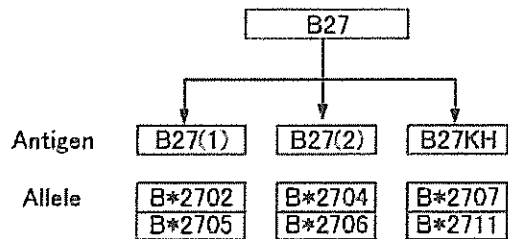


いて B40 関連抗血清と交差反応性を示す B27 抗原として B27KH を見出した。この抗原と同様の反応パターンを示す抗原が、外人パネルから同時に見出され、これらのパネルについて DNA タイピングを行ったところ、外人パネルには B*2707 が、日本人由来のパネルには新たな B27 アリールが認められ、塩基配列決定後 B*2711 と命名された。B*2707 と B*2711 にコードされる B27KH 抗原のアミノ酸配列を、他の B27 抗原と比較すると、97、113、114、116 および 131 番目にアミノ酸置換が見られ、この置換により B27KH 抗原の $\alpha 2$ ドメインは B*4002 由来の B61 抗原と同じアミノ酸配列となる (図 5 参照)。このことから、B27KH 抗原が B40 関連の抗血清の交差反応性があることが分かる。

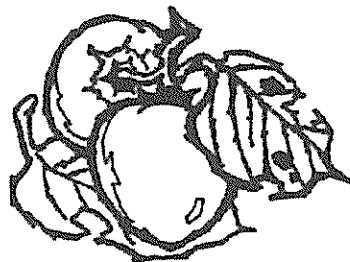
B27 抗原群は、我々がやっているワークショップにおいて、B*2702、*2704、*2705、*2706 でコードされた抗原について血清学的に検討を行っており、大きく分けて 3 グループに区分される。ひとつは、これまで紹介した B27KH 抗原グループであり、他の 2 グループは、B*2702 および B*2705 でコードされる B27(1)グループ、B*2704 および B*2706 でコードされる B27(2)グループである (図 7 参照)。B27KH 抗原グループは、これまでも紹介したように B40 関連の抗血清に交差反応が見られることから区分されるが、B27(1)および B27(2)グループについては、B27 抗血清の一部に B27(2)抗原グループに反応を示すことから区分が可能となる。この B27(2)グループの各抗原に共通して見られるアミノ酸配列は、152 番目のグルタミン酸 (E) であり、他の B27 抗原ではヴァリン (V) となっており、この置換により一部の B27 抗血清での反応性に影響をしているものと考えられる。

今回は、B15 関連抗原群について概説する。

図 7. B27 subtype groups



□: 未公認抗原



前回までに大まかではありますが DNA から mRNA、mRNA からタンパク質というプロセスについて説明しました。今回から数回にわたり DNA の複製 (replication) について説明します。多くの生物にとって DNA は、遺伝子そのものなので DNA の維持・複製と DNA に含まれる情報の発現は生命現象の基本であるといっても良いでしょう。なかでも DNA の維持と複製は細胞や個体の一世代の活動を支えるばかりでなく、細菌のような単細胞生物では細胞から細胞へ、人のような多細胞生物では生殖細胞を介して次の世代へと種の遺伝性を伝達し、生命の連続性を行う過程です。そのために DNA の複製は、正確であるとともに、細胞の増殖と厳密に結びつくように調節されなければいけません。この DNA の複製がどのような過程を経て行われているかを簡単に説明していこうと思います。DNA の複製は細菌と哺乳類ではそれに関わる複合酵素系が違う (基本となるプロセスは類似しています) ので今回はヒトに代表される真核生物の複製について説明します。

哺乳類の DNA 複製におけるヌクレオチドの重合速度は毎秒約 50 ヌクレオチド (細菌は毎秒 500 ヌクレオチド) と言われています。ここに働く複製酵素は正確かつ迅速でなければいけません。この速さと精度は複合酵素系によって行われていて、それらが「複製装置」(レプリソーム: replisome と呼ばれることもあります) を形成しています。DNA の鎖を鋳型にして新たな DNA の鎖を合成する酵素を DNA ポリメラー

ゼ (DNA polymerase) と呼びます。現在では読者の皆さんは、PCR の時に *Taq* DNA polymerase を使用されているので DNA ポリメラーゼという酵素の名前はご存知だと思います。この *Taq* DNA polymerase は、細菌の 1 種である *Thermus aquaticus* の DNA の複製の時に用いられる酵素です。それを PCR に利用しているに過ぎません。原核生物にも哺乳類 (真核生物) にも DNA ポリメラーゼ活性をもつ複数の酵素の存在が知られています。しかし、どちらの生物においてもレプリカーゼ (replicase: 真に複製に関与している酵素) として働くのはただ 1 種類で、それ以外のポリメラーゼは補助的に働くか、DNA の障害を除去する修復合成に働きます。

哺乳類の DNA ポリメラーゼは、表-1 に示すようにミトコンドリアのゲノムの複製を専門とするものも含めると 5 種類同定されています。様々な実験の結果、これら酵素の中で核内のレプリカーゼは、DNA ポリメラーゼ α であると考えられています。複製以外に DNA ポリメラーゼが関与する機能に「修復」があります。これは読んで字のごとく障害を受けた DNA を正しいものに修復することでこの機能については次回に説明します。

では、複製について具体的に説明します。ヒトの染色体 DNA はご存知のように二本鎖で、互いに平行 (この言葉が正しいかどうか分かりませんが) です。各染色体の 2 本の DNA 鎖はヘリカーゼ (helicase) によってほどかれ、それぞれの 1 本がその相補鎖の合成を司令し、親 DNA と同じ娘 DNA 二本鎖を作ります (図-1)。図を見ても明らかなように娘 DNA 二本鎖の

表-1 哺乳類の 5 種類の DNA ポリメラーゼ

	DNA polymerase α	DNA polymerase β	DNA polymerase γ	DNA polymerase δ	DNA polymerase ϵ
局在	核	核	ミトコンドリア	核	核
機能	ラッキング鎖及びプライマーの合成	DNA 修復	ミトコンドリア DNA の複製	リーディング鎖の合成	DNA 修復

2本の DNA 鎖の内1本は親からのもので、他方は新たに合成されたものであるため DNA の複製は半保存的であると言われます。DNA ポリメラーゼは前駆体として4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) を使って DNA を合成していきます (PCR の DNA の伸長と同じですね。PCR の時は4種類のデオキシヌクレオシド三リン酸を dNTP と表わしています)。

DNA の複製は、染色体 DNA の全くランダムな位置から開始されるのではなく、必ず複製開始点 (origin of replication) と呼ばれる位置から始まります (これについては次回に説明します)。隣接する複製開始点間の距離は約 50~300Kb です。複製が開始されると図-1 に示すような複製フォーク (replication fork) が形成され、ここで親 DNA 二本鎖は2つの娘 DNA 二本鎖に分岐します。2本の親 DNA 鎖は逆方向平行であるのでそれぞれ別個に鋳型として使われ、それぞれの鋳型に対して相補的で逆方向平行の娘 DNA 鎖が1本ずつ合成されます。しかし、ここでその合成 (複製) に関して問題が生じてきます。複製フォークが進むにつれてそれぞれの親 DNA 鎖の上で娘 DNA が作られていくわけですがこの複製フォークの動きは一方の鎖にとっては5'から3'の方向、他方の鎖にとっては3'から5'の方向となります。しかし、ご存知のように核酸の合成は5'から3'の方向のみにしか起こりません。ということは、素直に考えると3'から5'の方向の DNA

の複製はできないということになります。しかし、生物は通常では複製できない鎖の複製もやってしまう機構を持っているわけです。つまり、5'から3'方向に短い DNA 鎖が次々と合成され、結果的には3'から5'に進行するという方法で解決しています。具体的には、図-1、2に示す複製フォークのすぐ後の領域を見ながら説明します。一方の鎖では親の二本鎖がほどけるにつれて5'から3'方向に連続的に新しい DNA 鎖の合成が進みます。この鎖のことをリーディング鎖 (leading strand) といいます。他方の鎖では、親 DNA がある程度一本鎖となって露出され複製フォークと逆方向に新しい DNA 鎖の断片が合成されます。この DNA 鎖をラギング鎖 (lagging strand) といいます。このような DNA 断片が5'から3'方向に次々に合成されそれらが互いに連結されラギング鎖が完成します。このような DNA の合成方法を不連続複製 (discontinuous replication) と呼ばれています。このラギング鎖を合成するための DNA 断片 (100~1000 ヌクレオチドの長さ) のことを岡崎フラグメント (Okazaki fragment) といいます。この岡崎フラグメントは、複製している DNA であれば原核生物でも真核生物でも見られます。ご存知のように DNA ポリメラーゼは原核生物、真核生物のいずれにおいても遊離の 3'-OH 末端にデオキシリボヌクレオチド鎖を伸ばしていきますが、まったく何も無いところから合成を開始することは出来ません (PCR の時にプライ

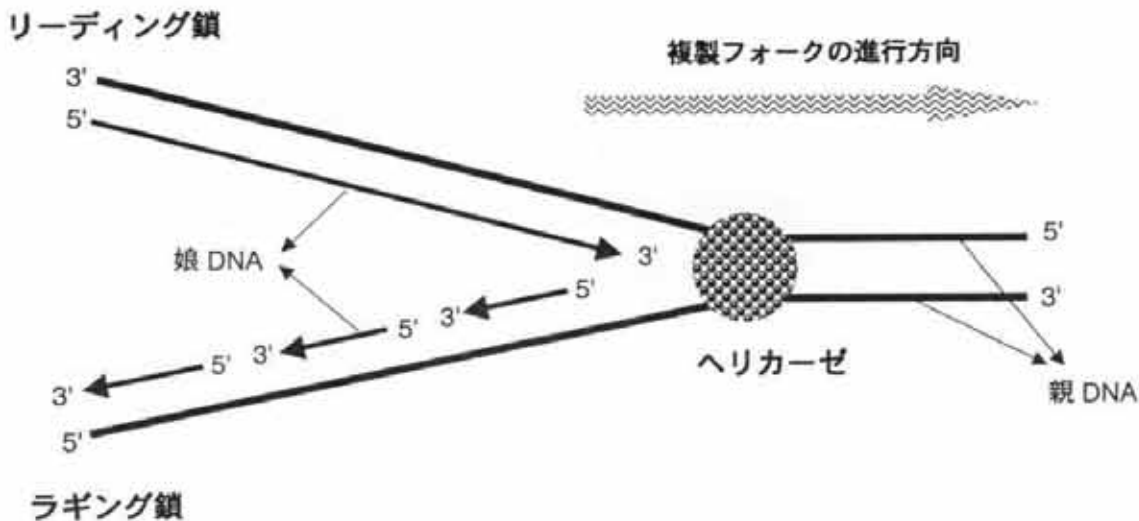


図-1 DNA 複製フォーク

マーが必要なのはその為です)。しかし、ラギング鎖の岡崎フラグメントはそれぞれ新たに DNA 合成を開始しなければいけません。それではどのようにして岡崎フラグメントは合成されるのでしょうか?個々の岡崎フラグメントの合成は 3'-OH 末端を持った 10 塩基ほどの長さの RNA がプライマーとなり合成されていきます。岡崎フラグメントが合成されそれぞれが結合する過程を図-2に示します。まず DNA プライマーゼと呼ばれる酵素がリボヌクレオシド三リン酸を原料として RNA プライマーを合成します。この RNA プライマーがラギング鎖上のところどころで作られて DNA ポリメラーゼがこれを伸長し岡崎フラグメントが合成されます。岡崎フラグメントの合成は、この DNA ポリメラーゼが、その前に既に合成されている DNA 断片の 5'にある RNA プライマーにぶつかるまで DNA は伸長されます。この RNA が、5'3'エキソヌクレアーゼ活性を持つ酵素の働きで除去されます。この除去された部分(ギャップ)は、進行してきた DNA 合成反応で埋められます。つまり、RNA が DNA に置き換えられたわけです。しかしこの RNA の除去と DNA への置換が終わっても、隣接する岡崎フラグメント同士は連結されているわけではありません(隙間が空いているという意味で、この連結されていない部分のことを”ニック”といいます)。このニックを閉じる酵素が DNA リガー

ゼ(DNA ligase)です。この DNA リガーゼが新しい DNA 断片の 3'末端と前の断片の 5'末端をつなぎ全過程が終了します。

このような複雑なプロセスを経て DNA の複製は行われています。DNA 複製は非常に正確に行われ、10⁹塩基対にわずか1個程度のエラーしか起こりません。エラーがおきた場合には、周到に用意された修復過程により修復されます。

次回は、この修復過程、複製に関与するタンパク質、細胞周期と複製開始についてももう少し深く掘り下げたいと思います。

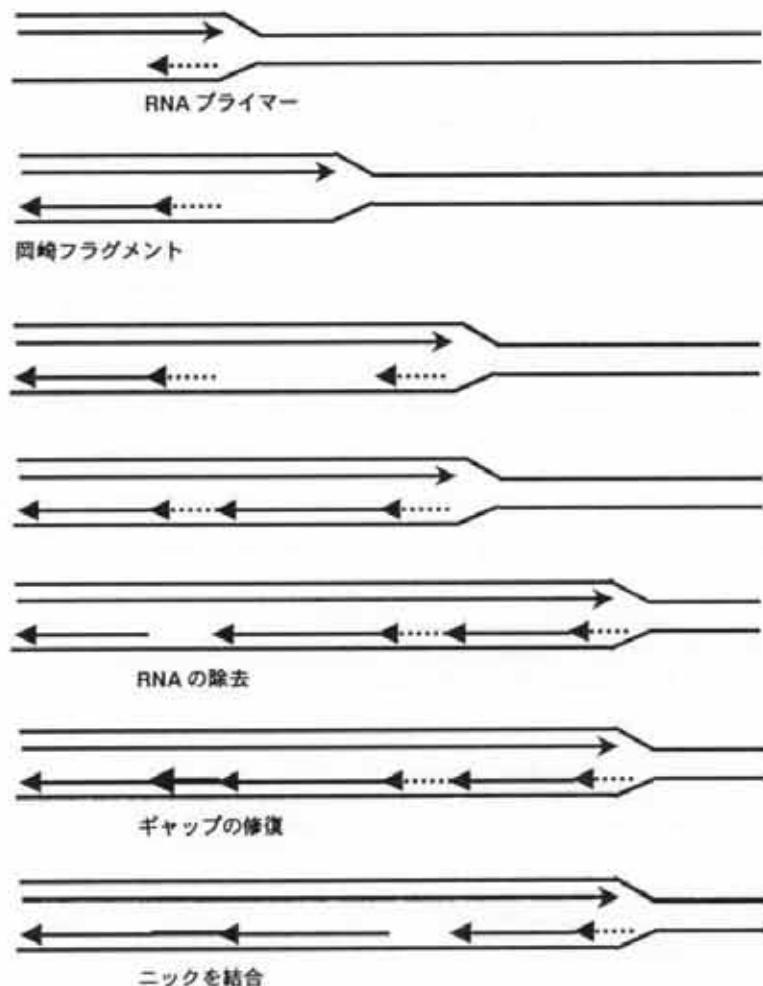


図-2 RNA プライマーと岡崎フラグメント

HLA ところ変われば

ラオスからのメール

「ラオスの血液事業」

「愛されているラオスの犬」

北九州赤十字血液センター

徳永 和夫

「福岡センターの徳永さん」といえばこの業界で知らない人はいない程の有名人ですが、北九州センターに移られた後、なぜか現在はラオスにいらっしゃいます。その徳永さんより楽しいメールが時々届けられ、是非 KAMON に紹介したいとお願いしたところ、ラオスでのお仕事も含めて寄稿して下さいました。相変わらずパワフルに頑張っておられるご様子がうかがえます。

ラオスの血液事業

日本の皆さん

徳永@ピエンチャン/ラオスより

ちょっとご無沙汰しています。南部への出張が 2 週間続いたのでラオス情報を書く時間がありませんでした。また、来週水曜日から北部のルアンプラバンに行きますので、その合間をぬって書いています。今日は私が何故ラオスにいるのかをこちらの血液事業を紹介することで説明したいと思います。今日はちょっと堅い話になりますがお許しください。

ラオスの人口は 485 万人(1997 年)で、まもなく 500 万人になると予想されています。国の面積は本州と同じ位ですので、平方 km 当りの人口は 19 人です。ピエンチャン市に約 1 割の人が住んでいます。

1. 日本赤十字社の係わり

ラオスの血液事業は、当初は国の保健省の監督のもと 1975 年(ラオス人民民主共和国が成立した年)から売血を基本として始められたが、1990 年にラオス赤十字社(ラ赤と略)に委嘱されました。1992 年にラ赤は血液事業の再構築を検討し、国際赤十字連盟(連盟と略)の要請を受けた日本赤十字社(日赤と略)が調査団を派遣し、1995 年にラ赤、日赤そして連盟の 3 者で協定が結ばれ、日赤が 1995 年から 2003 年までラオスの血液事業の再構築を支援することとなりました。

2. ラオス赤十字血液事業を強化するための計画目的

- ①国全体で安全で十分な血液の供給を達成すること。
- ②ラオス赤十字血液センター(BTC と略)が国の血液事業の中心的な機関となること。

戦略

都市から地方へ(徳注:つまり血液センターの有るピエンチャンから始めて地方へと広げて行くこと)

行動計画

- ①国の血液政策を決めること
- ②国全体で血液検査を実施すること
- ③献血者確保事業を確立すること
- ④BTC の機能を強化すること
- ⑤成分輸血を広めること

行動期間

1995 年から 2003 年までを 3 期に分ける。

- ①第 1 期(短期) 1995 年～1997 年
ラオス赤十字による血液事業を県単位に拡大するために事業の強化
- ②第 2 期(中期) 1998 年～2000 年
血液検査の全国的な実施と献血の普及
- ③第 3 期(長期) 2001 年～2003 年
国全体で安全で十分な血液の供給を達成

それで、この計画を実施するために各期間毎に計画と予算が立てられています。また、期間中に適宜三者に

よる中間評価や最終評価が実施され、その結果に基づいて各年度（1月～12月）毎に計画・予算が練り直されています。今年の10月末から第2期の中間評価が予定されています。それでこれからまた忙しくなります。日本の血液センターから技術者を一人ピエンチャンのBTCに派遣し、この計画を実施するに当り必要な血液事業全般にわたる助言、指導を行っています。6ヶ月毎に代わりますので5年目が終わろうとしている私で10人目です。

3. 日赤の援助の内容

①人的なもの

血液事業従事職員の招聘研修
私たちのような専門家の派遣
研修（ドナー募集や検査・採血・製剤技術）の開催、後援等

②機材等の現物

小型遠心器、恒温槽、冷蔵庫、フリーザー、大型遠心器等の援助
車両等の援助
検査試薬、血液バッグ等の消耗品の援助等

③資金による援助

例えば今年のラ赤血液事業の予算の内、75%が日赤、15%がラ赤、10%が国やその他の団体からの資金となっています。ですから2004年以降日赤が手を引いた後、いかに自立してできるかが当初からの課題です。ラオスでは公的な保険制度はありませんので、血液代金を回収するためには患者からいただくしか方法がありません。しかし、血液1本当りの原価（血液バッグや試薬代等）は13ドル（約12万kip）で、一般国家公務員の1ヶ月分の給与程度になります。ピエンチャンでは現在25,000kipの代金を70,000kipに値上げするように国家輸血委員会では国に提案することが決まっています。費用の回収を困難にしているのはkipとドルの為替の変動が激しすぎるからです。とにかくラオス内で製造されている物はほとんどありませんから、試薬、血液バッグ等全て輸入です。課税されて料金は高くなるし、kipが安くなるたびにkipで決められた代金では費用が回収できなくなります。どのくらい変動したかは、最後の署名の所を参照して下さい。

4. 血液センターの紹介

ピエンチャン特別市に血液事業の中心となるBTC(血液センター)が有ります。血液センターの職員は、現在16人です。医師が4人、医療技術者が9人、事務3人です。医師2人と医療技術者9人の計11人から、2人が毎日の検査・採血の当番をします。24時間当番です。ですから血液が足りない時は、昼夜関係無く家族の関係者が供血に来ます。検査して合格した人から採血します。2時間は検査がかかりますので、センターで待つか、一旦帰ってまた来るかどちらかです。献血者は採血してから検査します。



（私が住んでいるゲストハウスから見た血液センターの全景。2、3年前に竣工。正面玄関右側にあるのは移動採血車。）



（正面を入ると右手に受付とその右手奥に問診室。個室になっています。交差試験はセンターで実施しますので患者の検体の受付もここになります。）



(受付の右手奥に採血室があります。採血台が3つ。後方は移動用の簡易ベッド)



(正面玄関左側奥に食堂があります。昼食と宿直者の夕食の際に利用します。外から買ってきて食べるのが多いです。真中の人がテー所長。その隣の空いている椅子が昼食時の私の席です。)



(正面左側に供給室があります。左の冷蔵庫が血液保管庫。右側の窓の所で病院からの職員か患者の家族に手渡す。)



(正面右側 2 階が検査室です。ここは血型検査室。その奥が感染症検査室)



(供給室の左奥に製剤室がある。成分の分離は左手前のプラズマ分離器でします。この部屋の奥の部屋に今年 JICA から供与された生化学分析器があります。)



(今年日本大使の草の根援助で供与された移動採血車。ラオスにはこの一台だけ。採血用ベッドが 2 台。暑い時はクーラーが入るので献血者には楽。)



(正面 2 階の左の奥にある派遣員のための部屋。勿論エアコン付き。)

5. ラオス血液事業の現状

①国の血液事業政策が決まり、BTC のあるピエンチャン市周辺と日赤がてこ入れしている 5 県周辺では、検査した血液を使用するようになりました。しかしこの範囲でラオスの使用血液の大部分を占めると予想されています。

大体全国で 1 年間に必要な血液は一万単位 (本) と予想されています。昨年の採血は BTC が 5,644 単位、5 県が 4,551 単位で合計 10,195 単位でした。因みに日本では年間約 500 万本です。血液は常に足りませんので検査不合格の血液以外はほとんど使用されます。現状では期限がきれることはほぼありません。

②献血率は、BTC だけみると今年は 8 月までで 40%、去年が 20% だったことを考えると評価できる数字です。5 月には 80% まで達成したのですが、6 月～9 月まで学校が休みになると急に献血率が下がります。これが来年の課題です。地方の 5 県ではまだまだです。2000 年までに献血の普及を目指して頑張っています。因みに残りの血液は患者の家族・友人それとプロの献血者からのものです。

③検査は、BTC と 5 県の県立病院で HIV、HBs 抗原、梅毒、血液型 (ABO、RH、不規則抗体試験) を実施しています。HB 抗原陽性率は他のアジアの国と同じで 7% と高いです。今年の 6 月から BTC では正式に HCV 検査を導入しました。5 県には来年から導入予定です。今のところ陽性率は献血者で約 1% 位です。不規則抗体用の O 型パネルがありません。赤血球を冷凍保存するための冷凍庫の整備も検討中です。

④成分献血の普及は進んでいません。今調査中です

が、マラリア汚染地区にいくと血液使用者の大部分が圧倒的にマラリアによる貧血者です。分離した凍結血漿の使い道ありません。検討課題です。

6. ラオスの献血キャンペーン

ラオスではまだ献血思想の普及が進んでいませんので、献血の前に必ず 30 分ほど献血の必要性、安全性等について説明します。その後質疑応答があつてから申込書を希望者に配布し問診、比重測定、採血になります。



(先週視察に行った。南部のカムワン県カムワン市での説明風景。前方の布性の説明用パネルを使う。これは全国統一。ただし、数百人も集まると後ろからは見えない。)



(ピエンチャン市内のお坊さん学校での比重の受け付け風景。右側の職員は Mr. トンファンといい、9 月～10 月にかけて中央血液センターで研修中。)



(カムワン県カムワン市での採血風景。重力式です。採血量は男女とも 350ml。ラオスの人は小柄の人が多いため体重が足りなくて献血できない人が多くいます。年齢は 17~60 歳。体重は 45kg 以上。)

ではピエンチャンの朝日でお別れです。



(私のゲストハウスから見えた朝日。夕日に劣らず綺麗です。)

ラオスの新インフレ抑制委員会の経済政策が効を奏してか kip が値上がりしていました。しかし、……。

	US\$=920-930 Kip (Sep.1996)
	=2500 Kip (May.1998)
	=4200 Kip (Nov.1998)
1 Yen=78 Kip	=9300 Kip (Aug.4th,1999)
=82 kip	=9300 Kip (Aug.29th,1999)
	=8800 Kip (Sep.16th,1999)
	=7800 Kip (Sep.18th,1999)
=54 Kip	=5800 Kip (Sep.24th,1999)
=62.5 Kip	=6710 Kip (Oct.1th,1999)
=76.3 Kip	=8260 Kip (Oct.16th,1999)

愛されているラオスの犬

サバーイディ ポー!

こちらラオスは8月に入って俄然過ごしやすくなりました。雨が多いので少し困りますが、気温が私が来た6月に比べてうんと低くなりました。例えば以前は車に乗ると中は大変暑かったのですが、今はそれほどもありません。夜はクーラーをつけなくても窓を開けていると明け方は寒いくらいです。そんな訳でラオスのピエンチャンは既に秋?に向かっています。12月、1月が一番涼しいそうですが、かなり楽です。日本のメールを見ると極暑や大雨で大変そうですね。中国、韓国等洪水が酷いようですが、今のところラオスには幸い洪水はありません。今日は、本当はラオスの血液事業を何故日赤が応援しているか書きたかったのですが、いまいち勉強不足なので「ラオスの犬の幸せ」について彼等によって報告します。

ラオスには犬が多いです。ほとんどの犬は首輪をしていません。それでも飼い主はいます。99.99%は放し飼いです。猫も鶏もですが。そんな訳で勿論狂犬病の予防注射など犬にはしていません。それで私と瑞江は狂犬病の予防ワクチンをして来ました。しかし犬で噛み付きそうなのはまずいけません。今日初めて一匹の犬が口に噛み付かないように口輪を着けてぶらぶらしていました。

皆、放し飼いのせいか、とっても大人しいしあまり人間に興味ありません。犬もお互いに威嚇したりしません。私が犬に吼えられたのは、朝5時半頃また朝暗き頃にゲストハウスの門が閉まっていたので、扉をよじ登って飛び降りた時です。子犬が吼えました。同じくこの日に国立競技場のエアロピクスをする建物にいる犬にやはり暗いのに変だなと思って吼えられました。それと犬をデジカメで覗いていたら唸られました。つまり通常と違う行動をした時にのみ犬は吼えるようです。通常は人と犬は全く無関心です。

扉で仕切られたレストラン以外では犬が入ってきても追い払いません。店の人もお客も。犬もおねだりをしません。ちょこんと座るか寝そべっています。私が飼っていた犬からは以上の行動は想像が付きません。とにかく犬は人間を信用していて、直ぐ傍を人が歩いても微塵も動かず寝ています。今日は私たちの直ぐ後

ろで寝ていたレストランの犬の映像を送ります。うまくいけば良いのですが。



大体この犬のように毛が短い犬が多いです。ふさふさは少ないです。なんせ暑いですからね。私も寒いところに住んでいたら・・・・・・。とにかく鶏（ひよこも）は追いかけない、人間には敵意を示さない（それでも瑞江は怖がっていますが）、喧嘩もほとんどしないという大変平和な犬たちです。例外はゲストハウスの真向かいに住んでいる、扉に閉じ込められた黒い大きな犬です。よく吼えています。ストレスでしょう。何となく文明社会に住んでいる人間を象徴しているように思えます。

上手に道を横断しますが、中には足に包帯を巻いた犬もいます。痛めた足を庇いながら歩いている犬も見ます。交通事故でしょう。都会は犬にも住みにくくなっているのかもしれませんが。当然ですが人間の交通事故も増えているようでそのために政府の会議が開かれています。交通ルールを守らない20%の運転手によって事故が起こっていると報告されています。道路が悪いのも原因の一つと思いますが、これについてはまた別の機会にお伝えします。

今日はこれにて失礼します。

ポップ カン マイ（ではまた）！

ラオス情報を受信したい方は、次のメールアドレスにご連絡下さい。

徳永 和夫 kbc.tokunaga@fukuoka.email.ne.jp

RNAワールドと利他コンセプト

利他遺伝子の進化

骨髄移植や臓器移植のモチベーションは利他遺伝子の表現であることを繰り返した。単純な自然選択では説明できないが、「血縁淘汰」と「性選択」と、さらにはゲーム理論「囚人のジレンマ」における報復戦略の採用などで、利他遺伝子の進化的な保存が可能であることも既に述べた(KAMON 12号, 1998年, P43)。行動学で観察される多くの生物種の行動から利他遺伝子(複数の)の存在は明らかである。とくに社会構造を営む生物種ではほぼ確実に利他遺伝子が存在する。

RNAワールド

生命の起源には諸説ある。フランシス・クリックはRNAこそ最初に出現した生物高分子であると提唱した。発想は単純である。彼の提唱した「セントラルドグマ」はDNA→RNA→蛋白という生物情報の流れをいうが、そのいずれが生命の起源か?という問に発する。DNAの合成には蛋白酵素が必要であり、蛋白の合成にはその設計図たるDNAが必要となる。「DNAが先か、蛋白が先か」というジレンマが生じる。クリックはそのジレンマを、その中間に位置するRNAに注目してすり抜けた。RNAこそ生物高分子の祖先である、というのである。太古の地球上の原始スープの中に最初の生体高分子であるRNAが出現し、それが自己複製を繰り返しているうちに、様々な機能をもつRNAができたとする。これらのRNAが複製や代謝に必要な多様な反応を触媒するうちに、蛋白やDNAができ、そしてついには細胞が誕生した、というのである。いまや「RNAワールド」はリボザイム(RNA酵素)の発見など実験的証拠の積み重ねあって、生命起源説の主流となった。

ハイパー・サイクル

30年前、RNAワールドの提唱やリボザイムの発見もまた、このころ、分子進化のシステムとして、ある天才が提唱したのが「ハイパー・サイクル理論」であった。その天才とはノーベル化学賞受賞者のマンフレート・アイゲン(独)である。このハイパーサイクルシステムの基本コンセプトは極めて単純である。「自己より他を助けよ」すなわち利他である。原始RNAはその自己複製の速度が最大のものが生き残る。現存する複製酵素が必ず誤りを犯すように、原始的な複製システムも誤りを犯したであろうし、そのエラー率は高いものであったと考えられる。生き残るRNAの周囲を、置換の起こったRNAが取り巻くことになる。このRNA集団は、しかしながらエラー率の高さを次に述べる理由から長いゲノムを複製することはできなかつ

たに違いない。RNAは複製という目的で進化するため、リボザイムに認識される部分以外はどんどん切り捨て、次第に短くなる。ある実験(シュピーゲルマンのQ β レプリカーゼの単純化された実験)で観察されている。RNAは短いほど効率よく複製される。前生物世界で生き残ったのが短いRNAばかりだとすると、とても蛋白を合成するようなRNAは生まれてこない。そこでハイパーサイクルシステムが提唱されることになる。

YOU HAVE TO RESCUE OTHER

ここに「YOU」「HAVE」「TO」「RESCUE」「OTHER」という5種のRNAの集団があったとする。もし同じ環境で複製競争をさせたら、最も短い「TO」のみが生き残るに違いない。しかし「他を助けよ」という基本コンセプトで「YOU」→「HAVE」→「TO」→「RESCUE」→「OTHER」→「YOU」というように自己より他をよりよく複製するとしたらどうか?それらが複製サイクル(ハイパーサイクル)を組むとすると、そのメンバーは、各々の複製効率やエラー率や長さが異なっても、安定した複製を続けるに違いない。それどころか数学的に(生物物理学的な数式は略す)計算するとサイクルのメンバーのすべてが増殖し、RNAのビッグバンが起こるそうである。無関係に単独で複製されるならば「TO」というそれ自体では意味を成さない単語が最後に残るに過ぎないが、ハイパーサイクルを組むことで「YOU HAVE TO RESCUE OTHER」という意味が生じてくる。

これはハイパーサイクルにより、情報が増大していくことを意味し、それが蓄積されることを意味している。それが進化すると遺伝暗号の成立に到達する。そしてついには「翻訳」へのステップが約束される。ハイパーサイクルそのものも進化して「翻訳を伴うハイパーサイクル」になり、RNA1→酵素1→RNA2→酵素2→RNA3→…という「蛋白とRNA」のサイクル、そしてついには「DNAとRNAと蛋白」というハイパーサイクルに到達してセントラルドグマが成立する。

生命現象の基本コンセプトは「利他」

生命起源のキーワードが「自己より他を助けよ」であったことは、その後の種の分化、それらが獲得する利他遺伝子を生物哲学的に見ようとするわたしに大きな示唆を与えてくれた。このころでは生命現象そのものが利他以て成り立っているように見えてしまう。病膏病に入った今日このころである(さ)

コラム 「スタンダードを知る」 東京医科歯科大学 難治疾患研究所

木村 彰方

トルコ、ギリシャ、台湾、メキシコと最近立て続けに大地震が発生した。怖いことに、多くの犠牲者を出している。また被災された方々も膨大な数に上る。先日神戸に行った際に阪神・淡路島大地震からの復興が着々と進んでいることを目にしたが、仮設住宅で暮らしている被災者も多くいらっしゃるのことで、完全な復興までにはまだまだ時間を必要とするようだ。集中豪雨に伴う山崩れなどの土砂災害や台風に伴う高潮による被害なども含めて、天変地異による人的・物的損害は、「天災」によるものであるだけに甚大なものとなる。何とか事前に予知する方法はないものであろうか？

天気予報にしろ地震予知にしろ、天変地異の予測は、「過去のデータの検証」に基づいて「いつ、どの程度の規模のものが生じるのかの確率」を算出することで行われている。従って、いかに多くの過去のデータをいかに正確に収集するかが、予知の確からしさを決定する最大の要因となる。すなわち、データの質(正確性)と量(検証数)の両方が要求されることになる。不正確なデータを用いたり、検証するデータ数が少ない場合には、甚だ心許ない予知しか出来ないのである。さらに、その地域に関するデータが少ない場合には、地震予知の際に用いられるように、類似した地形のある別の地域のデータからの類推が行われることもあるが、この場合の予知の確からしきさはもっと小さくなる。

Evidence-based Medicine という言葉を引き合いに出すまでもなく、このことは医療においても重要な要求事項である。病気の診断、経過(予後)予測、治療方針の決定(治療法の選択)など、いずれの局面においても、過去の同一疾患患者に関するデータから導かれる確率を基礎とした医療が行われる以上、正確なデータをより多く集めて検証することが必要である。ところが、疾患自体が稀である場合や、稀な疾患ではないが特定の治療を受けた症例が少ない場合などは、ある時点で解析するに足る症例数を集めることが困難である。無理に症例を集めようとすると、症状は似ているが異質な疾患の症例が混入しかねず、別物からの予知になってしまう危険が大きい。従って、正確なデータを得ようとするならば、過去に遡って症例を集め、そのデータを検証しなければならないことになる。また、検査所見等のデータについても、検査の方法論(感度や特異性)が異なっていると同一レベルでは論じられないし、そもそも新たな検査項目データを解析しようとする場合には、過去の症例のサンプルが保存されていない限り、少数のデータで考察することになる。そのような方法で何らかの所見が得られたとしても、それは果たして正確な予測をしていることになるのであろうか？

その意味で、特に稀な疾患の場合には、将来を見越したサン

ルの保存が必要であるし、サンプルが保存されている場合には、新たな検査法を用いた過去のデータの再検証などが必要であろう。また当然のことながら、疾患自体の不均一性(同一疾患であっても、必ずしも病因が同じとは限らない)や治療への反応性における個体差の存在は常に念頭に置かなければならない。わが国の医療水準はかなり高いとは言えるが、それでも欧米の後追いをしている感が無きしもあらずである。欧米人と体格の違いは一目瞭然であるから、欧米人で検証された治療薬の投与量を個々の症例の体格に応じて加減することは通常行われているが、そもそも疾患の病因自体にも個体差(さらには個体の集団としての人種差)が存在すると考えるべきであろう。過去の症例のデータを「集団」として解析する事によって得られた確率に基づく医療である以上、わが国独自の解析から世界に向けて発信できるような新たな概念を提唱したいものである。

医療自体は「個」に対して行われるものであるが、その原理や法則は「集団」から導き出される。従って、まず「集団」の「スタンダード」(当然確率的な幅を持っている)を明らかにする事が必要であり、さらにそれを「個」に適用する際には確率的な考えを常に念頭に置かなければならない。このような考え方は検査にも当てはまることであり、QC を通じて集団の「スタンダード」を明らかにすることが、ひいては個の位置を知ることに通じ、そこで初めて新たな発見や応用開発へのスタート地点に立つことが可能となる。大きな集団の「スタンダード」を知らない個や極めて限られた個体数の集団における「原理」は、この数年来世間を騒がしている某宗教団体の例をとるまでもなく、そもそもがサンプリングエラーの結果である危険性をはらんでいる。こと医療においては、それが人の生命に直接関わることであるだけに、個の論理に固執せず、周囲の状況を見渡して集団の「スタンダード」を知ることが必要であろう。

また、いわゆるプロトコールは、その時点での集団の「スタンダード」とすべきものである。もちろんプロトコールは、時代の要請に応じてその妥当性を検証した上で改訂されるべきものであるが、集団のスタンダードである以上、個の判断でプロトコールを逸脱することには大きな危険が付きまとう。東海村の核燃料加工施設での事故のように、何の検証もなくプロトコールを逸脱したために甚大な被害が発生することもあることを認識すべきである。大地震のような天災の発生を正確に予知して被害を避けることは未だ困難かもしれないが、「スタンダード」を知ることで、少なくとも人災は現時点でも避ける。