

# MHC

Major Histocompatibility Complex

日本組織適合性学会誌 第2巻第3号 平成8年3月31日発行

## Contents

〔原著論文〕 日本人に血清学的に見いだされた新しい HLA-B27サブタイプ .....長谷川 隆, 菅原 裕司, 盛山 芳恵, 南斎 博英, 小川 篤子, 俵 国芳, 徳永 勝士, 十字 猛夫, 近藤 正太郎	109
〔総 説〕 HLA 遺伝子座の多型—集団遺伝学の視点から—.....颯田 葉子	115
〔シリーズ：異種の MHC〕 マウス MHC 内に見出された組換えのホットスポット .....城石 俊彦, 水野 健一	125
〔シリーズ：血清学〕 クラス I 遺伝子型と血清学的反応について—UCLA セルイクスチェンジから— .....田中 秀則	132
〔最新情報：“玉手箱”〕 臍帯血細胞移植療法.....西平 浩一	137
〔最新情報：“玉手箱”〕 最新アレル情報.....小林 賢	143
〔海外ラボ紹介〕 Tissue Typing Laboratory, UCLA—Paul I. Terasaki 教授の研究室— .....三石 瑤子	154
〔国際学会印象記〕 第21回 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) ミーティングに参加して.....丸屋 悦子	156
〔国際学会印象記〕 第5回 AOH ミーティング (1995年).....中島 文明・成瀬 妙子	163
〔書評〕.....光永 滋樹	166
Q & A.....小林 賢	167
〔シリーズ：HLA 研究者の個人史〕 HLA の個人史.....脇坂 明美	168
〔伝言板〕 第5回日本組織適合性学会大会のお知らせ.....	172
〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉.....	173
編集後記.....	175
日本組織適合性学会会員名簿訂正.....	176

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

JSHI



## Contents

〔原著論文〕 日本人に血清学的に見いだされた新しい HLA-B27サブタイプ .....長谷川 隆, 菅原 裕司, 盛山 芳恵, 南斎 博英, 小川 篤子, 俵 国芳, 徳永 勝士, 十字 猛夫, 近藤 正太郎	109
〔総 説〕 HLA 遺伝子座の多型—集団遺伝学の視点から—.....颯田 葉子	115
〔シリーズ：異種の MHC〕 マウス MHC 内に見出された組換えのホットスポット .....城石 俊彦, 水野 健一	125
〔シリーズ：血清学〕 クラス I 遺伝子型と血清学的反応について—UCLA セルイクスチェンジから— .....田中 秀則	132
〔最新情報：“玉手箱”〕 臍帯血細胞移植療法.....西平 浩一	137
〔最新情報：“玉手箱”〕 最新アレル情報.....小林 賢	143
〔海外ラボ紹介〕 Tissue Typing Laboratory, UCLA—Paul I. Terasaki 教授の研究室— .....三石 瑤子	154
〔国際学会印象記〕 第21回 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) ミーティングに参加して.....丸屋 悦子	156
〔国際学会印象記〕 第5回 AOH ミーティング (1995年).....中島 文明・成瀬 妙子	163
〔書評〕.....光永 滋樹	166
Q & A.....小林 賢	167
〔シリーズ：HLA 研究者の個人史〕 HLA の個人史.....脇坂 明美	168
〔伝言板〕 第5回日本組織適合性学会大会のお知らせ.....	172
〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉.....	173
編集後記.....	175
日本組織適合性学会会員名簿訂正.....	176

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of the Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

J S H I



# 〔原著論文〕 日本人に血清学的に見いだされた新しい HLA-B27サブタイプ

長谷川 隆<sup>1)</sup>, 菅原 裕司<sup>1)</sup>, 盛山 芳恵<sup>1)</sup>, 南斎 博英<sup>1)</sup>, 小川 篤子<sup>2)</sup>, 俵 国芳<sup>1)</sup>,  
徳永 勝士<sup>2,3)</sup>, 十字 猛夫<sup>2)</sup>, 近藤 正太郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>東京南赤十字血液センター, <sup>2)</sup>日本赤十字社中央血液センター, <sup>3)</sup>東京大学医学系研究科, 人類遺伝学講座

(平成8年1月8日 受付)

## 要約

我々は日本人献血者の HLA クラス I のタイピングを行うなかで, B27モノスペシフィックな抗血清と反応し, さらに B40グループおよび Bw6抗血清の一部にも反応する抗原を見いだした. この抗原を献血者のイニシャルより B27KH と仮に名づけた. このパネルを1994年度中央血液センター管内 HLA ワークショップに提出したところ, 他の B27抗原とは血清学的に明らかに違う反応パターンであることが確認された. また, ワークショップに提出されていた B27抗原のなかの 2 パネル (外国人献血者) が B27KH 抗原と同様の反応パターンを示していた. PCR-SSOP 法による DNA タイピングの結果, B27KH 抗原と同様の反応をした外国人献血者のアリルは B\*2707 であったが, B27KH 抗原は SSOP の反応パターンより, B\*2707とは異なる新しい B27アリルであることが示唆された.

## キーワード:

B27, B27KH, B\*2707, B40, SSOP

## はじめに

HLA-B27抗原には現在までに B\*2701~B\*2709 のアリルが報告されている (1). 過去においてはそのサブタイプは血清学, CTL クローン, 一次元電気泳動などにより検討され, 報告されてきた (2~6). しかし, 日本人の場合, その遺伝子頻度は0.4%とされ (7), タイピングする機会の少ない抗原でありサブタイプの検討はほとんどなされていない.

我々は日本人献血者の HLA の中に, B27モノスペシフィックな抗血清に反応するが, 通常経験している B27抗原とは血清学的に異なる反応態度を示す抗原を見だし, 仮に B27KH と名づけた. 1994年度中央血液センター管内 HLA ワークショップ (94 CHW) にこのパネル細胞を提出し, 多数の抗血清と B27KH 抗原の反応パターンを解析し, 提出された他の B27パネル細胞の反応性との比較を行った. また, B27アリルの DNA タイピングの結果および抗血清との反応性から B27KH 抗原の構造について

考察を行った.

## 材料と方法

HLA クラス I 抗原 (A 座, B 座, C 座) の血清学的な検査に用いたリンパ球 (ホールリンパ球) は, 比重1.078に調製された Ficoll-Conray 溶液を用い, 末梢血から比重遠心法により分離した. HLA クラス II 抗原 (DR 座, DQ 座) の血清学的な検査用の B リンパ球は, ホールリンパ球から anti-Fab を用いたパンニング法によって分取した. HLA-A 座, B 座, C 座抗原の判定には196種, HLA-DR 座, DQ 座抗原の判定には, 140種の反応特異性既知の HLA 抗血清を用いた. HLA 抗血清とリンパ球の反応は微量リンパ球細胞毒試験を NIH 標準法に従い行った.

B27アリルの DNA タイピングは, 既報(8)に従って PCR-SSOP (polymerase chain reaction - sequence specific oligonucleotide probes) 法で

表1 HLA-B27 アリルタイピングに用いたプローブ

Probes	Position	Sequence(5'→3')
B27F-E20	Exon2 193-210	AGA TCT GCA AGG CCA AGG
B27F-E21	Exon2 226-243	AGA ACC TGC GCA CCG CGC
B27F-E22	Exon2 226-243	AGA ACC TGC GGA TCG CGC
B27F-E23	Exon2 168-185	CCG GAG CAT TGG GAC CGG
B27F-E24	Exon2 223-240	GAG AGA GCC TGC GGA CCC
B27F-E25	Exon2 223-240	GAG AGG ACC TGC GGA CCC
B27F-E26	Exon2 226-243	AGA GCC TGC GGA ACC TGC
B27F-E31	Exon3 66-83	TAC CAC CAG GAC GCC TAC
B27F-E32	Exon3 64-81	GGT ATG ACC AGT ACG CCT
B27F-E33	Exon3 13-30	TCC AGA GCA TGT ACG GCT
B27F-E34	Exon3 66-83	TAC CAC CAG CAC GCC TAC

Allele	Probe										
	E 20	E 21	E 22	E 23	E 24	E 25	E 26	E 31	E 32	E 33	E 34
B*2701	●	●	-	-	-	-	-	●	-	-	-
B*2702	●	-	●	-	-	-	-	●	-	-	-
B*2703	●	-	-	●	-	●	-	●	-	-	-
B*2704	●	-	-	-	●	-	-	●	-	-	-
B*2705	●	-	-	-	-	●	-	●	-	-	-
B*2706	●	-	-	-	●	-	-	-	●	-	-
B*2707	●	-	-	-	-	●	-	-	-	●	-
B*2708	●	-	-	-	-	-	●	●	-	-	-
B*2709	●	-	-	-	-	●	-	-	-	-	●
B27KH	●	-	-	-	●	-	-	-	-	●	-

図1 HLA-B27 アリルに対する各プローブの期待反応パターンと B27KH の示した反応パターンの比較  
● : positive - : negative

表2 B27KH 抗原と B27 抗原の血清学的な反応結果の比較

+ : positive w : weak - : negative  
specificity : あらかじめ同定された抗血清の反応特異性を示した。

抗血清 No.	B27 KH	B27 Specificity	抗血清 No.	B27 KH	B27 Specificity		
18A696	+	+	B27	18K1058	+	-	B60+B61+B48+BFU
670668	+	+	B27	18K972	+	-	B60+B61+B48+B7+BFU
014381	+	+	B7+B27	18K102	+	-	B60+B61+B48+B7+BFU
18K300	+	+	B7+B27+B42	014446	-	-	B60+B61+B48+B7+BFU
18K857	+	+	B7+B27+B42	014478	+	-	B60+B61+B48+B7+BFU +B41+B42+B4005
18K006	+	+	B44+B27+B13+B13N	18K846	-	-	Bw6
18K423	-	-	B7	170199	-	-	Bw6
18K681	-	-	B7+B42	64B021	-	-	Bw6
180801	-	-	B13+B13N	251045	-	-	Bw6
18F1001	-	-	B48	014399	+	-	Bw6
180806	-	-	B60	160557	+	-	Bw6
18K776	-	-	B60+B48+BFU	18K866	+	-	Bw6
18K885	-	-	B60+B48+B7	214618	+	-	Bw6+B13N
120447	-	-	B60+B61	161200	+	-	Bw6+B13N
010175	-	-	B60+B61+B13+B13N+B47	215634	w	-	Bw6+B13N+B38+B59
18K009	-	-	B60+B61+B13+B13N+B41+B47	600441	-	-	Bw6+B38
18K679	-	-	B60+B61+B13+B13N+B48+B47				

通常クラス I タイピングに用いている抗血清70種、B40 グループ抗原確認用抗血清40種、Bw4, Bw6 抗原確認用抗血清16種、クラス I 再検査用抗血清70種から、B27, B40 グループ、Bw6 抗原に関連する抗血清33種について、B27KH と B27 抗原の反応性を示した。なお、表中の specificity にある B13N は神奈川県血液センターの中島らの提唱した抗原で、B\*1302 の産物である(9)。

行った。すなわち、末梢血リンパ球より抽出したゲノム DNA から B27 グループ特異的に PCR 増幅した後、表1 に示したプローブを用いてドットハイブリダイゼーションを行った。各アリルに対する期待反応パターン (図1) に対照してアリルを同定した。

なお、B27KH 抗原と他の抗原の血清学的な比較および B27 アリルの DNA タイピング結果の一部は

1994年度中央血液センター HLA ワークショップ (94CHW) に参加して行った。

結果

献血者 (K.H 日本人) の血清学的な HLA 型の判定において、A 座、B 座の一方、C 座、DR 座、DQ 座の各抗原については矛盾なく決定された (データ

未載)。しかし、B座のもう一方の抗原は表2にあるように、B27モノスペシフィックな抗血清(18A696, 670668)に反応したが、通常B27抗原が反応しない、B40グループのポリスペシフィックな抗血清の一部(18K1058, 18K972, 18K102, 014478)およびBw6抗血清の一部(014399, 160557, 18K866他)にも反応を示した。これらの反応から新しいB27抗原のサブタイプと考え、この献血者のイニシャルからB27KH抗原と名づけた。そして、複数の抗Bw6抗血清と反応したことからB27KHはBw6に属する抗原と判定した。196種のHLAクラスI抗血清と、140種のHLAクラスII抗血清との反応結果から、この献血者のHLA型をA24, A31, B27KH, B51, Bw4, Bw6, Cw10, C4451, DR4.1, DR8.1, DR53, DQ4, DQ6と決定した。

表3はワークショップ(94CHW)に提出されたB27およびB40グループに関連する抗血清と抗原の反応パターンである。94CHWに提出されたB27抗原の中には、B27KH抗原と同様な反応パターンを示すものが他にも2パネル認められた。この2パネルは共に外国人献血者で、B27KH抗原との区別のため仮にB27VR抗原と表記した。この結果からB27KH抗原およびB27VR抗原が、比較的近い関係にある他の抗原とも明かに違うことが確認できた。抗血清の特異性に関しこれまでの経験では、抗血清18K572, PMH91-1のようにB27抗原の反応する抗血清はすべてB27KH抗原に対しても反応していたが、94CHWではB27抗原(+)B27KH抗原(-)の抗血清220612を確認した。抗血清220612はB22+B67+B27という特異性でB27抗原に対して良好な反応をしたが、B27KHおよびB27VR抗原には全く反応を示さなかった。この抗血清が見いだされたことで、B27抗原(-)B27KH抗原(+)とB27抗原(+)B27KH抗原(-)という相補的な抗血清が揃ったことになり、B27KH, B27VR抗原の血清学的な区別はより明確になった。

DNAタイピングによるB27アレルの判定結果は、血清学的にB27抗原とされた15例では、B\*2702(1例), B\*2704(7例), B\*2705(5例), B\*2706(2例)であった。一方、血清学的にB27抗原とは区別されたB27VRおよびB27KH抗原のアリ

ルは、B27VR抗原が2例ともB\*2707と判定されたのに対し、B27KH抗原はプローブE20, E24, E33に反応し、図1のHLA-B27アレルに対する期待反応パターンに一致するものがなく、新しいB27アレルであることが示唆された。

### 考察

我々は、HLA-B27抗原の血清学的なサブタイプ、B27KH, B27VRを見いだした。B27VRとB27KHは血清学的には同様な反応を示したが、DNAタイピングの結果からB27VRはHLA-B\*2707にコードされた抗原(以下B\*2707抗原と略)であり、B27KHは新しい抗原であると考えられた。表4に示したように $\alpha 1$ ドメインの70番目のLys(K)はB27抗原のみにユニークなアミノ酸であり、B27の血清学的特異性を決定していると考えられている(10)。B27KH抗原がB27モノスペシフィックな抗血清と反応すること(表2)、特異的プローブ、E20, E24と反応することから、B27KHの $\alpha 1$ ドメインの70番近傍はB\*2704と類似した配列を持っていると推定された。

B\*2707抗原はB27-HSと報告されていたもので(1, 10)、 $\alpha 1$ ドメインはB\*2705、 $\alpha 2$ ドメインはB\*4002と同じアミノ酸配列を持っている(表4)。B\*2707抗原はB60+B61+B48+B'FU'(+ $\alpha$ )の特異性を持った抗血清(表2, 18K1058, 18K972, 18K102, 014478, 表3, 641698, 1924786, 110950)と反応した。B\*2707抗原, B60, B61, B48, B'FU'は共通して、 $\alpha 2$ ドメインに113His(H), 114Asn(N), 163Glu(E)の特異的アミノ酸を持っている(表4)。また、抗血清110950(表3)はB\*0705抗原[B\*0702と比較して114Asn(N), 282Asp(D)への2アミノ酸変異を持つ]とB7抗原を識別する抗血清であった。よって、113His(H), 114Asn(N), 163Glu(E)のアミノ酸、特に114Asn(N)が特異的抗原決定部位の形成に関与しているものと推察された。

B27KHはB\*2707抗原とB40関連の抗血清に対して類似した反応性を示した。また、特異的プローブ(E33)との反応性から、 $\alpha 2$ ドメインに97Ser(S)を持つことが示された。これらの結果から $\alpha 2$

表3 HLA-B27, B40 グループ関連抗原、抗血清の反応パターン (94CHW より引用)  
+ : positive w : weak - : negative

抗血清 No.	B42	B73	B27	B27	B27	B7	B40	B48	BFU	B13	B13	B41	Other Comment
	KH			VR			N						
18K681	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
18K572	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
DCH6706	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	
DCH6465	-	-	w	w	+	-	-	-	-	-	-	-	
PMH91-1	w	-	+	+	+	w	-	-	-	-	-	-	
110950	-	-	+	w	-	-*	+	+	+	-	-	-	B*0705(+)
601192	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	
641698	-	w	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	
1924786	w	-	+	+	-	+	+	+	+	w	+	w	
220612 <sup>a)</sup>	w	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	B22, B67

a) B22 (B54, B55, B56) 及び B67 抗原に対する特異性も有する抗血清  
\* B\*0705 にのみ反応を示す

表4 HLA-B27 及び B40 グループ抗原のアミノ酸配列の比較

Allele	AMINO ACID POSITION																				Serology												
	α1 domain										α2 domain																						
	9	11	12	24	32	41	45	59	63	67	69	70	71	74	77	79-83	95	97	113-16	131		143	147	152	156	163	177-80						
CONSENSUS	Y	S	V	A	Q	A	M	Y	E	V	A	N	T	D	S	R	N	L	R	Y	D	Q	Y	R	T	W	V	L	T	E	T	L	Q
B*2701	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	Y	N	-	T	A	L	R	-	N	-	H	-	D	S	-	-	-	-	E	----
B*2702	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	N	-	I	A	L	R	-	N	-	H	-	D	S	-	-	-	-	E	----
B*2703	H	-	-	T	L	-	E	H	-	C	-	K	A	-	D	-	T	-	L	R	-	N	-	H	-	D	S	-	-	-	-	E	----
B*2704	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	-	-	T	-	L	R	-	N	-	H	-	D	S	-	-	E	-	E	----
B*2706	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	-	-	T	-	L	R	-	N	-	-	-	S	-	-	E	-	E	----	
B*2708	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	H	-	D	S	-	-	-	-	E	----
B*2709	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	D	-	T	-	L	R	-	N	-	H	-	S	S	-	-	-	-	E	----
B*2705	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	D	-	T	-	L	R	-	N	-	H	-	D	S	-	-	-	-	E	----
B*2707	H	-	-	T	L	-	E	-	-	C	-	K	A	-	D	-	T	-	L	R	-	N	-	H	-	D	S	-	-	-	-	E	----
B*4002	H	-	-	T	L	T	K	-	-	S	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	S	H	-	-	-	-	-	-	-	E	----	
B*4006	H	-	-	T	L	T	K	-	-	S	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	W	T	H	-	-	-	-	-	-	E	----	
B*4001	H	A	M	T	L	T	K	-	-	S	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-	S	L	-	-	-	E	----	
B*4007	H	A	M	T	L	T	K	-	-	F	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-	H	-	-	S	L	-	-	-	-	E	----
B*4801	-	-	-	S	-	-	E	-	-	S	T	-	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	S	H	-	-	S	L	-	-	-	-	E	----
B*0705	-	-	-	S	-	-	E	-	N	Y	-	Q	A	-	-	-	-	-	-	-	-	S	H	-	-	-	E	R	E	E	E	----	
B*0702	-	-	-	S	-	-	E	-	N	Y	-	Q	A	-	-	-	-	-	-	-	-	S	H	-	-	-	E	R	E	E	E	----	

B27, B\*2707, B27KH 抗原の反応する抗血清に関係すると推定されるアミノ酸に陰をつけて示した。

ドメインは B\*2707 抗原に類似していると推察された。

B\*2707 抗原も B27KH と同様に Bw6 抗血清の一部に反応したが、B\*2707 抗原は Bw4 エピトープ [79Arg (R), 80Thr (T), 83Arg (R)] (11) を持つ抗原である。用いた Bw6 抗血清の特異性に問題がある可能性もあり、この結果についてはさらに解析する必要がある。現在、B27KH 遺伝子の DNA 塩基配列決定を進めており、Bw4, 6 の決定を含めて、その構造について明らかになる予定である。

なお、この抗原は血清学的に特徴的な反応パター

ンを持つので、B27 抗原の判定に際して注意をすることで他にも見つかるものと考えられる。

謝辞

本稿にあたり1994年度中央血液センター HLA ワークショップのデータを参考にさせていただきました。ワークショップに参加された各施設の方々にお礼申し上げます。

参考文献

1. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et

- al.*: Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Hum. Immunol.* **43**: 149-164, 1995.
2. Waal LP, Lieder J, Lang GG, *et al.*: *Histocompatibility Testing 1984* (eds. Albert ED, Baur MP, Mayr WR), B27 subtypes, Springer - Verlag, Berlin Heidelberg, 1984; p. 418-419.
  3. Choo SY, John T, Orr HT, *et al.*: Molecular analysis of the variant alloantigen HLA - B27d(HLA - B\*2703) identifies a unique single amino acid substitution. *Hum. Immunol.* **21**: 209-219, 1988.
  4. Youngs DA, Alosco SA, Waal LP: *Immunobiology of HLA*, Vol 1. *Histocompatibility Testing 1987*, (ed. Dupont B), Antigen Society #13 Report (B7, B27, Bw47, Bw73), Springer - Verlag, New York, 1989; p.202-203.
  5. Aparicio P, Jaraquemada D, Castro JA: *Immunobiology of HLA*, Vol 2. *Histocompatibility Testing 1987* (ed. Dupont B), Cellular allorecognition of HLA - B27: clonal heterogeneity and identification of immunodominant sites. Springer - Verlag, New York, 1989; p.112-113.
  6. Yang SY: *Immunobiology of HLA*, Vol 1. *Histocompatibility Testing 1987* (ed. Dupont B), Population analysis of class I HLA antigens by one - dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis: workshop summary report. Springer - Verlag, New York, 1989; p. 309-331.
  7. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, *et al.*: *HLA 1991*, Vol 2. (eds. Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Reference table: allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups, Oxford University Press, Oxford, 1992; p. 1066-1220.
  8. Yamaguchi A, Ogawa A, Tsuchiya N, *et al.*: HLA - B27 subtypes in the Japanese patients with seronegative spondyloarthropathies and healthy individuals. *J. Rheumatol.* in press.
  9. Lin L, Tokunaga K, Nakajima F, *et al.*: Both HLA - B\*1301 and B\*1302 exist in Asian populations and are associated with different haplotypes. *Hum. Immunol.* **43**: 51-56, 1995.
  10. Choo SY, FAN L, Hansen JA: A novel HLA - B27 allele maps B27 allospecificity to the region around position 70 in the  $\alpha 1$  domain. *J. Immunol.* **147**: 174-180, 1991.
  11. Parham P, Lawlor DA, Salter RD, *et al.*: *Immunobiology of HLA*, Vol 2. *Histocompatibility Testing 1987* (ed. Dupont B), HLA - A, B, C: Patterns of polymorphism in peptide - binding proteins, Springer-Verlag, New York, 1989; p.10-33.

A new HLA-B27 variant found serologically in a healthy Japanese.

Takashi Hasegawa<sup>1)</sup>, Yuji Sugahara<sup>1)</sup>, Yoshie Moriyama<sup>1)</sup>, Hirohide Nanzai<sup>1)</sup>, Atsuko Ogawa<sup>2)</sup>, Kuniyoshi Tawara<sup>1)</sup>, Katsushi Tokunaga<sup>2,3)</sup>, Takeo Juji<sup>2)</sup>, Shotaro Kondo<sup>1)</sup>

- 1) Tokyo Southern Red Cross Blood Center, Tokyo, Japan
- 2) Japanese Red Cross Central Blood Center, Tokyo, Japan
- 3) Department of Human Genetics, School of International Health, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

#### Summary

We have found a rare variant antigen (tentatively named B27KH) which reacts with B27-mono-specific antisera, and some B40 group specific and Bw6-specific antisera. The sample with B27KH was submitted to the Japanese Red Cross Central Blood Center HLA Workshop 1994. The reaction pattern of B27KH was clearly distinguished from those of the B27 antigens encoded by B\*2702, 2704, 2705 and 2706. On the other hand, B27KH and B\*2707 antigen (originating from non-Japanese) showed very similar serological reaction patterns. Nevertheless, the B27KH allele was discriminated from B\*2707 by PCR-SSOP typing, suggesting that the allele is a new member of the B27-group alleles.

#### Key words :

B27, B27KH, B\*2707, B40, SSOP

# 〔総 説〕 HLA 遺伝子座の多型 —集団遺伝学の視点から—

颯田 葉子

総合研究大学院大学, 教育研究交流センター

## 要約

HLA 遺伝子座の多型は, 多数の対立遺伝子が長い期間保有されてきたという点で, 他の常染色体上の遺伝子座とは異なる特色をもち, その維持には明らかな自然選択の関与がある. この自然選択の強度は高だか数%にすぎないが, 進化的な時間スケールでは顕著な効果をもたらした. このような多型が数千万年の時間単位で維持され続けてきたことは人類の歴史を推論する手がかりを与える. ここでは HLA 遺伝子座の多型と機能の関連を集団遺伝学の視点から考察するとともに人類進化との関係を述べる.

## キーワード:

平衡選択, 対立遺伝子, 分岐年代, パラサイト, 塩基多様度

## 1. はじめに

MHC 分子は, T 細胞受容体・免疫グロブリンとともに脊椎動物に特徴的な免疫系を構成している (1). MHC 分子の機能は抗原分子(ペプチド)を結合し T 細胞に提示することである. パラサイト由来の非自己ペプチドを結合した MHC—ペプチド複合体を T 細胞受容体が認識すると, 抗体(免疫グロブリン)産生や感染細胞の除去などの免疫応答が開始される. 脊椎動物の免疫系では未知の外来抗原にも適応できるよう, 受容体分子は個体内で多様性を維持しておく必要がある. この多様性は, T 細胞受容体(Tcr)や免疫グロブリン(Ig)では T 細胞や B 細胞が分化しクローン化する過程で起きる遺伝子の再編成によって獲得される. このため異なるクローン細胞は異なる分子を発現している.

MHC 分子はクラス I とクラス II 分子の 2 種類に大別される. 典型的なクラス I 分子はほとんどの体細胞で発現しているが, クラス II 分子の発現はマクロファージや B 細胞などに限られている. しかし, いずれのクラス分子でも Tcr や Ig の様な遺伝子の再編成を起こすことはない. 多様な外来抗原に対す

るしくみは, 個々の MHC 分子が多種類のペプチドを結合すること, および各 MHC 遺伝子座で多数の対立遺伝子を維持することによって成り立っている. MHC 遺伝子座の多型に特徴的な他の性質は, その対立遺伝子の分岐が種の間より古いことである. MHC 分子の機能から類推すれば, この古い多型は特定の寄生サイトとの長い期間にわたる共進化を示唆する.

本稿では, ヒト MHC (HLA) 遺伝子座の多型に関わる自然選択の作用と多型を通して知ることのできる「ヒト集団の歴史」を集団遺伝学の視点から概説する.

## 2. HLA 多型の特徴

### 2.1. 自然選択の強度

表 1 には, 多型的な 9 つの HLA 遺伝子座での対立遺伝子間の同義置換(アミノ酸を変化させない塩基置換)と抗原ペプチド結合領域およびそれ以外の領域での非同義置換(アミノ酸を変化させる塩基置換)の値が示してある. これらの値は塩基多様度( $\pi$ )とよばれ, 1 集団から抽出した二つの相同遺伝子間

表1 HLA遺伝子座の同義座位 ( $\pi_S$ )、ペプチド結合領域非同義座位 ( $\pi_B$ )、ペプチド結合領域外非同義座位 ( $\pi_N$ ) での塩基多様度と非HLA遺伝子座での平均塩基多様度の比較

遺伝子座	$\pi_S$	$\pi_N$	$f = \pi_N / \pi_S$	$\pi_B$	$\gamma = \pi_B / \pi_S$
HLA-A	0.039 (0.012)	0.017 (0.005)	0.44	0.125 (0.031)	3.2
HLA-B	0.034 (0.011)	0.014 (0.005)	0.41	0.145 (0.033)	4.3
HLA-C	0.034 (0.012)	0.016 (0.005)	0.47	0.066 (0.022)	1.9
HLA-DRB1	0.060 (0.011)	0.024 (0.007)	0.40	0.223 (0.063)	3.7
HLA-DRB3	0.029 (0.014)	0.011 (0.005)	0.38	0.104 (0.043)	3.6
HLA-DRB5	0.021 (0.011)	0.007 (0.001)	0.33	0.107 (0.044)	5.1
HLA-DPB1	0.022 (0.011)	0.014 (0.006)	0.64	0.069 (0.036)	3.1
HLA-DQB1	0.070 (0.021)	0.033 (0.009)	0.47	0.300 (0.092)	4.3
HLA-DQA1	0.068 (0.019)	0.031 (0.008)	0.46	0.128 (0.055)	1.9
non-HLA (48遺伝子座)	0.0008 (0.0003)	0.0003 (0.0001)	0.38		

での座位あたりの平均塩基相異数を表わす。また比較のため、常染色体上の48の非 HLA 遺伝子座での同義・非同義置換の塩基多様度 ( $\pi$ ) の平均を示してある。

HLA 遺伝子座での非同義置換を、抗原結合領域とそれ以外の領域とに分けたのは、各々の領域に作用する自然選択が異なるためである。多くの遺伝子に働く自然選択の主な型は、負の自然選択である。タンパク質の機能や構造を損なう様な突然変異は個体の生存に不利であるために、自然選択により集団から取り除かれる。機能的に重要な遺伝子や領域ほどアミノ酸の変化に対して保守的であり、変化に対する制約が強い(2)。逆に、遺伝子の同義座位やイントロンあるいは非翻訳領域などでは、その領域での変化が個体の生存に及ぼす影響は小さい。そのためこのような領域での突然変異は自然選択に関して中立であり、偶然(遺伝的浮動の作用によって)集団中に生き残ることができる(2)。負の自然選択の強度

は、各遺伝子での同義置換多様度に対する非同義置換多様度の比率  $f$  で量的に表わすことができる。 $f$  の値が1に近いほど非同義塩基置換が個体の生存に及ぼす影響が小さい。表1に示した非 HLA 遺伝子座での  $f$  の値は48遺伝子座の平均値であり、遺伝子座ごとの値は0からほぼ1まで大きな幅がある。アミノ酸置換に対する制約は遺伝子座ごとに大きく異なる。非同義塩基置換が個体の生存に及ぼす影響はアミノ酸の座位ごとにも異なる。例えば、酵素の活性中心ではその活性を保つのに必要なアミノ酸はわずかな種類に限られるだろう。一方、 $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの形状を維持するために必要なアミノ酸にはもう少し選択の幅があるに違いない。HLAの抗原結合領域外でのアミノ酸置換は分子の構造に影響を与えるという点で、負の自然選択の対象となる。HLAの抗原結合領域外での非同義置換多様度は遺伝子座によらず同義置換多様度のおよそ40%である。

HLA の抗原結合領域での同義置換多様度に対する非同義置換多様度の比率 (表 1 では  $\gamma$  と表示してある) は 1.8 から 5.1 までと 1 以上であり, 正の自然選択の作用を示している (2, 3). これは個体の生存にとって有利な突然変異は正の自然選択により集団中の個体に速やかに拡がるためである (2, 4). HLA の抗原結合領域でのアミノ酸配列の変化は, 結合できる抗原の種類を変えることにより新たなパラサイトに対する免疫応答を開始させる可能性がある. こうしたパラサイトの存在下では, 突然変異は個体の生存に有利になり, 正の自然選択の対象となる. しかし, HLA の抗原結合領域を構成する 50 余りのアミノ酸座位で起こるすべての変化が正の自然選択の対象となるかどうかは定かではない. クラス I 分子の 57 アミノ酸座位のうち 6 残基 (7Y; 26G; 57P; 59Y; 64T; 159Y) はヒト・マウス・ラットのクラス I 遺伝子座間で保存されており, これらの座位では特定のアミノ酸残基であることが MHC 分子が機能する上で必要である可能性を示している. また, クラス II 分子の  $\beta$  鎖をコードしている霊長類の DRB 遺伝子座でも同様のことが観察されている. DRB 遺伝子の抗原結合領域をコードする 24 コドンの各座位での塩基置換数を比較してみるとコドンの第 1・第 2 座位では完全に保守的な座位が 7~9 個ある一方で, 2 回以上の置換を蓄積している座位もほぼ同数存在する (5). これらの結果は, 抗原結合領域をコードするアミノ酸あるいは非同義座位がすべて同等に変わりうるわけではない可能性を示している.

表 2 HLA 遺伝子座での補正後の  $\gamma$  の値と自然選択の強度

HLA 遺伝子座	補正後の $\gamma$ の値	自然選択の強度 (%)
A	6.3	1.5
B	9.0	4.2
C	3.4	0.3
DRB1	9.3	1.9
DQB1	6.0	0.9
DPB1	4.3	0.1
DQA1	4.5	0.3

また抗原結合領域での  $\gamma$  の値は, 抗原結合領域外の  $f$  の値と異なり遺伝子間での違いが大きい. この

$\gamma$  の値は, 自然選択の強度に比例する (6). しかし, 抗原結合領域の非同義座位では先に述べたように塩基座位ごとの塩基置換率が異なる. この様な領域での塩基置換数は, 一般的な塩基置換の補正法では正しく推定することが難しい (5, 7). 改善した補正法で計算した  $\gamma$  の値とこれを用いて推定した各遺伝子座での自然選択の強度が表 2 である.

自然選択の強度は一般に最も適応度の高い (最適の) 遺伝子型を基準に, 他の遺伝子型の適応度の相対的な低下の程度で表わす. 適応度とはある遺伝子型が次代にどれだけ子孫を残すことができるかを表わす量で, 生存力と妊性の 2 つの要素からなる. Doherty と Zinkernagel が指摘したように, 1 個体の持つ MHC 分子の多様性はパラサイトに対する抵抗性の獲得という点で個体の生存力に影響しているに違いない. HLA 遺伝子座に作用している自然選択の強度はヘテロ接合体の生存力を 1 とした時のホモ接合体の生存力の低下の程度と定義する. 表 2 に示したように, HLA 遺伝子座に作用している自然選択はホモ接合体の生存力を高だか数%低下させる程度のものである. 従って, このようなわずかな生存力の低下を実験や観察により検出するには, 相当のサンプル数を必要とする. しかし, この様なわずかな生存力の差でも進化的時間スケールのなかでは遺伝的な変異の保持に大きな効果を示す (表 1).

遺伝子座ごとの  $\gamma$  の値の差から期待されるように, 自然選択の強度は HLA 遺伝子座ごとに異なっている. その原因が何であるかはまだ明らかではない. しかし一つだけ確かなことは, この  $\gamma$  の値が小さくても必ずしもその遺伝子が機能を失ったことにはならないことである.  $\gamma$  の値が小さい HLA-C と HLA-DPB1 遺伝子座の産物でも他の MHC 分子同様に抗原 (ペプチド) を結合でき (8, 9), また DPB1 遺伝子座の対立遺伝子である DPB1\*0901 と DPA1 遺伝子座の対立遺伝子 DPA1\*0201 からなる HLA-DP9 では, MHC-ペプチド複合体を認識する T 細胞の存在もわかっている (9). また, 非典型的なクラス I 分子は多型的ではなく, 機能を失いつつある遺伝子座であると考えられてきた (10, 11). しかし, この遺伝子座の産物に結合するペプチドが単離されたり (12), ヒトと旧世界猿の間でそのアミノ酸配列がよ

く保存されていることが明らかになる(13)など、非典型的クラス I 分子の機能を示唆する報告が増えている。非典型的クラス I 分子の抗原結合領域での非同義置換多様度は、同義置換多様度より明らかに小さく、むしろ負の自然選択の対象となっていることを示している(13, 14)。このような多型的でない、あるいは多型の程度の低い MHC の由来や機能は興味深い問題である。

## 2.2. 対立遺伝子の分岐時間

MHC 遺伝子座の多型の特徴の一つは、対立遺伝子の分岐時間が長いことである。表 1 に示した塩基置換多様度から、HLA 対立遺伝子の平均分岐時間を推定してみよう。この推定には、突然変異の蓄積する速度が時間に依らず一定であるという仮定を必要とする。この仮定が成り立てば、座位当り、年当りの突然変異率を  $\mu$  として、任意に選んだ相同遺伝子間の同義座位当りの塩基置換多様度 ( $\pi_s$ ) からこの遺伝子の分岐時間  $T$  は  $T = \pi_s / (2\mu)$  で求められる。即ち、分岐時間は同義座位当りの塩基多様度に比例する。非 HLA 遺伝子座の  $\pi_s$  に比べ、HLA 遺伝子座のそれは 30~100 倍程も大きい。このことは HLA 対立遺伝子の分岐時間が非 HLA 遺伝子座よりも 30 倍以上長いことを示している。一方、非 HLA 遺伝子座の同義置換塩基多様度の分散は小さく、特定の遺伝子座の同義塩基置換多様度が平均値の 5 倍以上になる可能性はほとんどない。つまり HLA 遺伝子座での  $\pi_s$  の値は非 HLA 遺伝子座の  $\pi_s$  よりも有意に大きいことを示している。座位当り年当り  $10^{-9}$  という突然変異率の推定値(15)を用いれば、HLA 遺伝子座の多型は 1 千万から 3500 万年以上前にさかのぼることになる。一方、非 HLA 遺伝子座では 40 万年弱となっている。

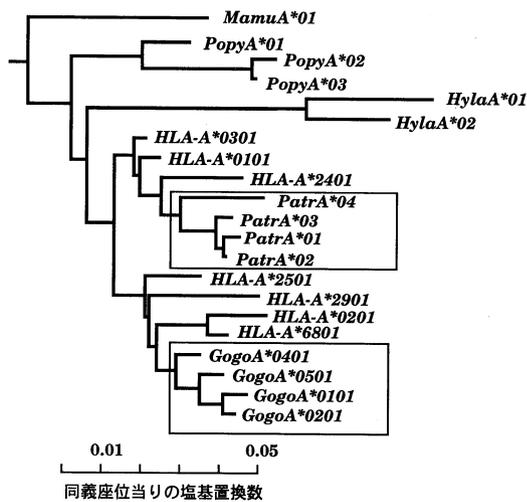
対立遺伝子の分岐時間が長いことは遺伝子の系統樹からも明らかにできる。図 1 には、近隣結合法(16)を用いて作成した霊長類の 6MHC 遺伝子座 (A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1) の系統樹を示してある。クラス I C とクラス II DPB1 遺伝子座以外ではヒトのある対立遺伝子は、ヒトよりも他の近縁種、例えばチンパンジーのある対立遺伝子に遺伝的に近いという trans-specific な多型を示して

いる。

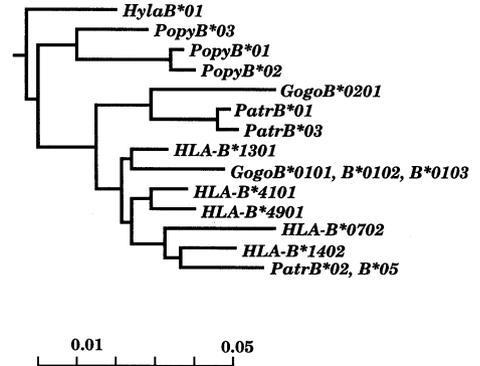
C 遺伝子座と DPB1 遺伝子座では、ヒトの対立遺伝子は 1 つのクラスター(図中で四角で囲んだ部分)を形成している。同様に、A 遺伝子座の系統樹では、ゴリラとチンパンジーの対立遺伝子が各々単一のクラスターを形成している。このような系統樹のトポロジーから、これらのクラスターが各々の種が分化したあとに形成されたと判断され易い。しかし、系統樹のトポロジーのみを判断の基準とするのは正しくない。この系統樹上の各遺伝子間の塩基置換数を調べてみると、例えば 6 個の HLA-C 遺伝子の内で最も遠い関係にある 2 つの対立遺伝子間の同義置換数は座位当りで  $0.061 \pm 0.017$  となる。この値は、現在比較可能なヒトとチンパンジー 23 の非 MHC 遺伝子座での同義置換数の平均値 ( $0.017 \pm 0.011$ ) の 3 倍以上である。このことは、HLA-C 遺伝子座の変異の一部はすでにヒトとチンパンジーの共通祖先集団中に存在していたことを示している。同様のことは、A 遺伝子座でのチンパンジーやゴリラのクラスター、DPB1 遺伝子座でのヒトのクラスターでも成り立つ。各々のクラスター中で最も遠い関係にある 2 つの対立遺伝子を比較すると、どの遺伝子座でも種が分化した時点で既に変異の一部が形成されていたことを示す。

種分化の時点で祖先集団中に存在していた変異が、なぜ子孫種に伝わらなかったかについては種分化のときに偶然ある対立遺伝子が 1 つの子孫種へまた別の対立遺伝子は別の子孫種へ伝わったためかもしれない。特に、種分化の時に集団の個体数が減ったために MHC 遺伝子座での多型が失われたことも考えられる(17, 18)。しかし、もし種分化のときに個体の減少があったのなら多型の減少は、すべての MHC 遺伝子座で観察されるはずである。実際には、少数の対立遺伝子しか子孫種に伝わらなかったのは、1 ないし 2 遺伝子座だけである。他の考え方では、自然選択の作用が種ごとに異なりある種では特定の対立遺伝子だけが今日まで伝達してきたとする。しかし、いずれの説明も遺伝子座ごとの伝達の違いの原因を特定していない点で十分ではない。原因の特定には 1 つ 1 つの MHC 遺伝子座がパラサイトの認識という点でどのように分化しているの

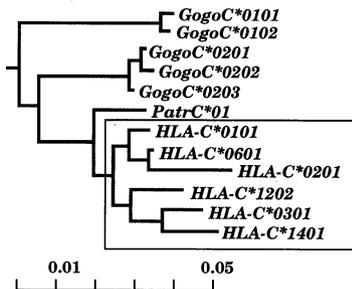
## クラス IA 遺伝子座



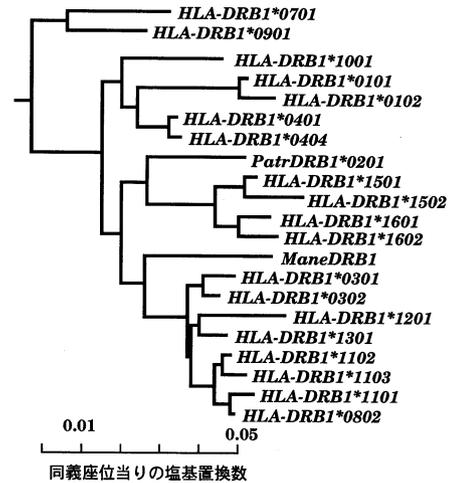
## クラスIB遺伝子座



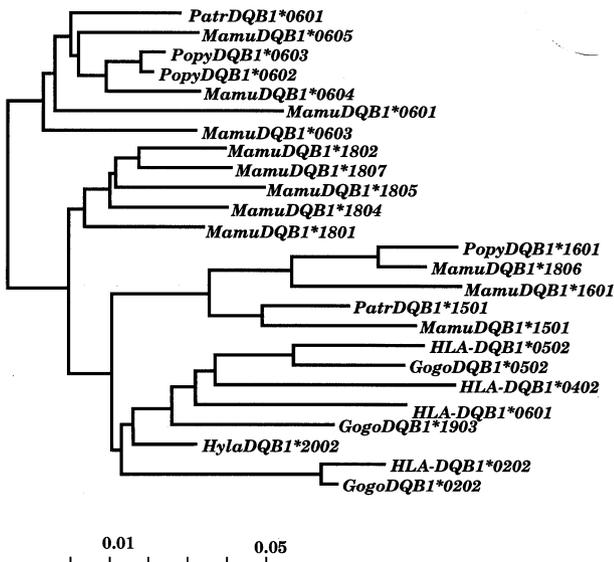
## クラスIC遺伝子座



## クラスII DRB1 遺伝子座



## クラスII DQB1 遺伝子座



## クラスII DPB1 遺伝子座

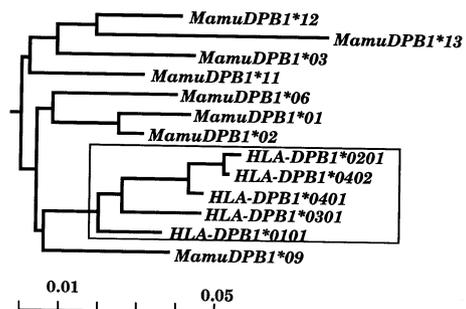


図1 霊長類 MHC 遺伝子座の対立遺伝子の系統樹

クラス I 遺伝子座の系統樹：全翻訳領域での同義塩基置換だけを用いている。系統樹の根元はウサギのクラス I 遺伝子 (EMBL: OCMHI3) を外群として決めた。

クラス II 遺伝子座の系統樹：第 2 エクソンの塩基配列中の全塩基置換を用いている。各々の遺伝子座のマウス相同遺伝子を外群として使った。

系統樹はすべて近隣結合法を用いて構築した。

略号：Patr：チンパンジー、Gogo：ゴリラ、Popy：オラウータン、Hyla：テナガザル、Mamu：アカゲザル

かを明らかにしていくことが必要である。

### 2.3. 対立遺伝子の数と集団の大きさ

図2には、HLA 遺伝子座の中でも特に多型的なクラス I A と B 遺伝子座で翻訳領域全体の塩基配列が入手可能な30と43個の対立遺伝子の同義座位の差異に基づいた系統関係を示した。非 HLA 遺伝子座の対立遺伝子の数は、多くてもたかだか10個に満たない(19)。図に示した対立遺伝子は、抗原結合領域のアミノ酸配列が少なくとも1アミノ酸残基以上違っているものとして定義している。これらの対立遺伝子を同義座位で比較してみると、同義置換を1つも蓄積していない対立遺伝子の組が、A 遺伝子座では5組、B 遺伝子座では6組存在している。これらの対立遺伝子は、新しい突然変異によりつい最近生じたものと類推される。クラス II DRB1 遺伝子座もクラス I A や B 遺伝子座と同程度に多型的である。この遺伝子座では現在までに100近い対立遺伝子が同定されている。しかしこれらの対立遺伝子の多くについては、最も変異に富む抗原結合領域をコードする第2エクソンの塩基配列のみが決定されており、翻訳領域全体の配列が得られるのは19対立遺伝子である。時間をさかのぼっていくつの対立遺伝子が過去に存在したかを知るには、第2エクソンのみのような短い配列は余り有効ではない。対立遺伝子間の分岐時間の推定は、同義座位での塩基置換が手がかりである。短い配列では、観察される同義置換の数が少なく分岐時間の推定にともなう誤差が大きくなるからである。そのため、ここでは翻訳領域全体の塩基配列のデータが多い A と B 遺伝子座に限る。

多数の対立遺伝子の維持もまた自然選択による。抗原結合領域に新しく生じた突然変異は、環境中に存在する新たな抗原を結合することができれば、生き残ることができる。逆に、もし新たな対立遺伝子が生まれてもその MHC 分子が特異性を示すことのできる抗原が存在しなければ、新たな対立遺伝子は個体の生存には有利ではなく集団から消失してし

まう。ある対立遺伝子の存在が個体の生存にとって有利であるためには、少なくともその対立遺伝子のコードする MHC 分子だけが免疫反応を開始させることができるパラサイトの存在が必要である。つまり100近い対立遺伝子が存在すると言うことは、すくなくともその対立遺伝子の数だけのパラサイトが存在していることを示唆している。

集団中に維持される対立遺伝子の数は、その対立遺伝子が維持されてきた期間中の集団の大きさ(N: 集団を構成する生殖個体数)に依存する。このことは、対立遺伝子の数からその集団の大きさを推定する方法を与える。ここでは対立遺伝子の数から過去の集団の大きさを推定する方法の定性的な原理を説明する。図3には、50個の現存対立遺伝子が t 世代前(2N 世代を単位にして計った場合には  $t' = t / (2N)$  世代前になる<sup>1)</sup>)に k 個の親遺伝子に由来する確率を示してある(21)。例えば  $t' = 0.05$  のときには、50個の現存対立遺伝子は22あるいは23個の親遺伝子に由来する確率が最も高いことを示している。実際のデータから n, k, t の値がわかれば、n 個の現存対立遺伝子が k 個の親遺伝子に由来する確率が最も高くなるような  $t'$  の値が決まる。この  $t'$  の値から  $t' = t / (2N)$  を用いて N の値が決まる。この N の値が、t 世代の間での平均的な集団の大きさということになる。

この方法を HLA 遺伝子座に適用するにあたって留意すべき点がある。HLA 遺伝子座のように平衡選択<sup>2)</sup>が作用している場合には、自然選択は N が大きくなった様な効果を及ぼすことである。どの程度 N が大きくなったように見えるかは、自然選択の強度や自然選択の対象となる突然変異の率に依存して決まる(この係数を  $f_s$  とする)。HLA 遺伝子座の様に自然選択の強度が数%の場合にはこの  $f_s$  はだいたい10前後である。従って、 $t'$  と t の関係は平衡選択が作用している場合には  $t' = t / (2f_s N)$ 、特に HLA 対立遺伝子の数から N を推定する場合には  $t' = t / (20N)$  となる。

<sup>1)</sup>生殖個体数 N の集団中では、常染色体上の相同遺伝子の平均分岐時間が 2N 世代となるため、この平均分岐時間を単位にして世代をはかることが多い。なぜ平均分岐時間が 2N 世代になるかについては文献(20)を参照されたい。

<sup>2)</sup>ヘテロ接合体の生存力がホモ接合体よりも高いとする超優性選択も含めて個体間の遺伝的な差異を大きくするように働く自然選択を総称して“平衡選択”とよぶ。

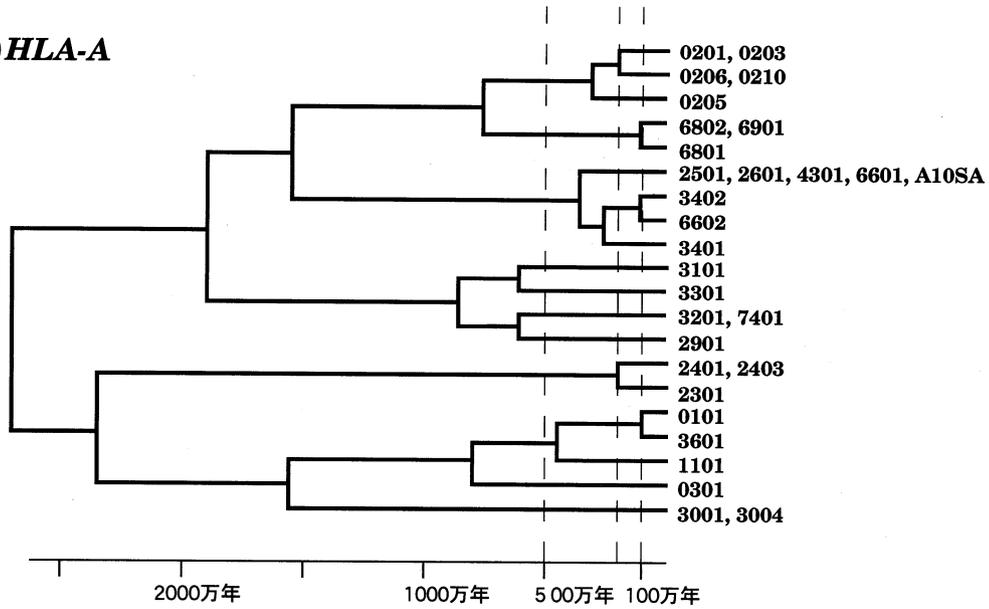
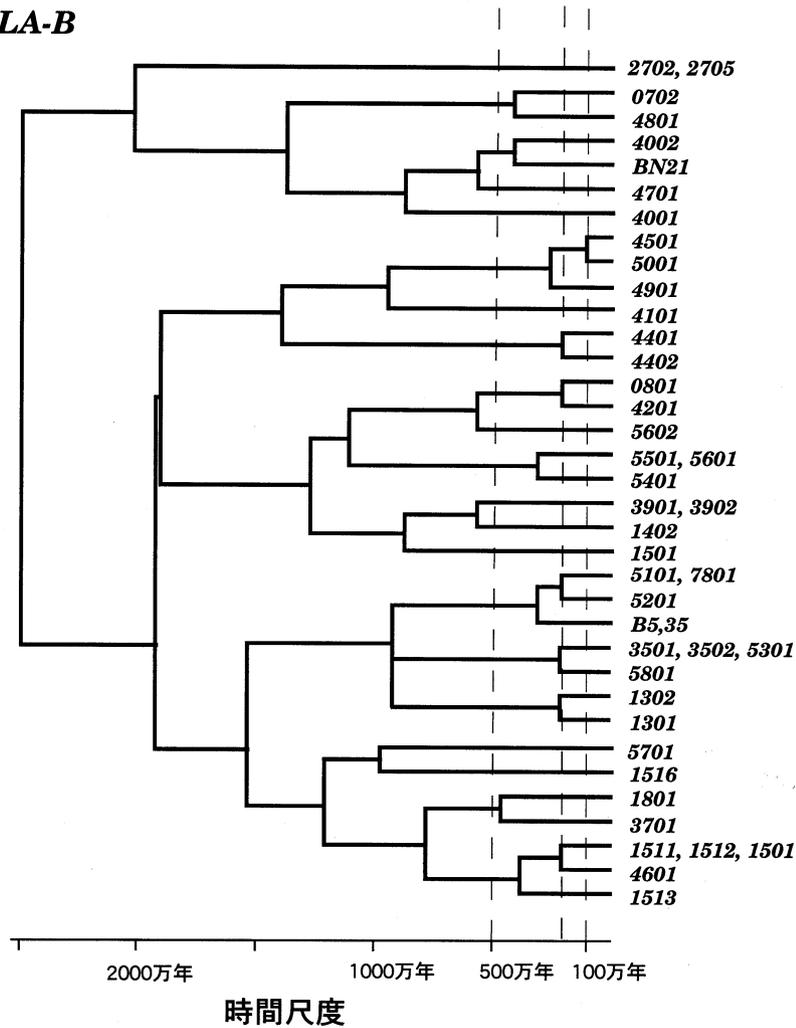
(1) *HLA-A*(2) *HLA-B*

図2 *HLA-A* および *B* 遺伝子座の対立遺伝子系統樹  
 横軸の時間尺度は MHC の同義置換率 $10^{-9}$  (座位当り年当り) に基づき計算してある。

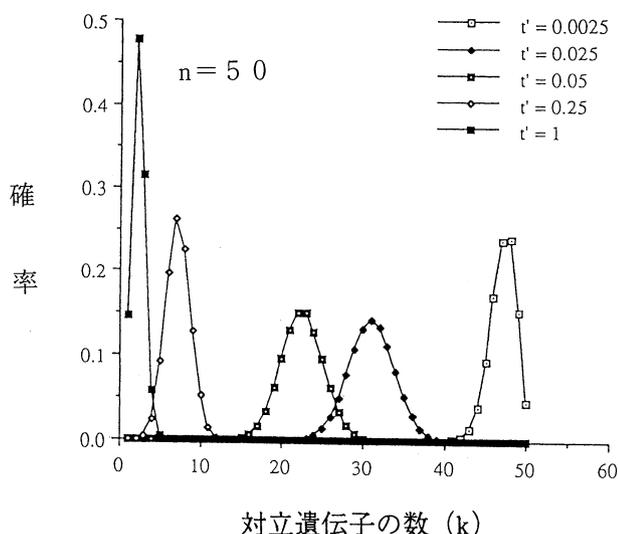


図3 50個の現存対立遺伝子が  $t$  世代前に  $k$  個の親遺伝子に由来する確率  
縦軸には確率を横軸には親遺伝子の数 ( $k$ ) を示してある。  
各々の実線は  $t' = t / (2N)$  世代前に  $k$  個の親遺伝子に由来する確率を示している。

図2では、時間尺度に垂直な点線が数本系統樹を横切っている。この点線と系統樹の枝の交差した点の数を数えることにより、現存の対立遺伝子のうちいくつの系統が過去のある時点の親遺伝子に由来するかを知ることができる。これらの図での垂直な点線は100万年前、200万年前、500万年前に対応する。この様にして得られた過去500万年間の対立遺伝子の数の推移はA遺伝子座では30の対立遺伝子が17、15、11であり、B遺伝子座では43の対立遺伝子が35、29、22となっている。A、Bそれぞれの遺伝子座でのこの様な対立遺伝子数の推移に対する確率分布を求めることができる。A遺伝子座では現在30個の対立遺伝子が100万年の間に17個になり、この17個が次の100万年間で15個に、さら300万年を経た時には15個が11個に成るという条件を満たし、B遺伝子座では現在43個の対立遺伝子が100万年の間に35個になり、この35個が次の100万年間で29個に、さら300万年を経た時には29個が22個に成るという条件を満たす確率である。年単位の時間 ( $y$ ) を世代単位 ( $t$ ) に変換するには、 $y$  を1世代の長さ ( $g$ ) で割ってやればよい。ここでいう1世代の長さとは、個体が子孫を残せる様になるまでの時間である。ヒトの場合  $g = 15 \sim 20$  年と言われている。ここでは  $g = 20$  年とする。従って100万年は、5万世代に相当す

る。A・Bの遺伝子座で最も確率の高くなる  $t'$  の値はA遺伝子座で0.022、B遺伝子座で0.006である。この  $t'$  の値を  $t = 5 \times 10^4$  に対応させる  $N$  の値は、A遺伝子座で  $1.1 \times 10^5$ 、B遺伝子座で  $4.2 \times 10^5$  である。この結果は、ヒト集団は過去500万年の間10万余りの生殖個体から成る集団であったことを示している。

現在のヒト集団に蓄積している非HLA遺伝子座の遺伝的変異は1万の生殖個体の集団(22)に対応する。このことと比較すると、過去数百万年にわたるヒトの祖先集団がいかに大きくまた遺伝的な変異に富んでいたものであるかが実感できる。

### 3. おわりに 一創始者効果とHLA多型一

創始者効果とは、ある集団の個体数が少数になると強い遺伝的浮動が起り、そのためその小集団での遺伝的分化が促進されることによって種分化に至るとする種分化を説明するメカニズムの1つである。

過去数百万年の歴史の中をヒトの祖先集団は10万個体の大集団の中で過ごしている。一方現在のヒト集団の遺伝的多様性は、およそ1万個体から成る集団の変異に等しい。これらのことは現在のヒトの誕生に創始者効果が有効に働いたことを示しているのだろうか。

ここまで見てきたHLAの多型は、創始者効果が有効に働いてはいないことを示している。それは、たとえ変異を保つような自然選択(平衡選択)といえども、遺伝的浮動の効果の大きい小集団では有効に働かないからである。平衡選択の作用のもとでも小さな集団では対立遺伝子の大半が比較的短い期間の内に失われていく(23)。小集団中の対立遺伝子は、対立遺伝子の数が多ければ多いほど、各対立遺伝子が失われる確率は高くなる。従って、複数のHLA遺伝子座で多数の対立遺伝子が数千万年にわたり受け継がれてきたことは、現在のヒトに至る歴史の過程でHLA遺伝子座の多様性を極端に減少させる様な個体数の変化はなかったことを示している。

チンパンジーとわかれてヒト化への道をたどり始めた500万年前、われわれの祖先は10万個体の大集団の中にいた。その中で、どのようにして、どのよ

うな変化を得てヒトはヒトとなったのか。だれもが疑問に思うわれわれ自身の由来について、HLA 遺伝子座を含めた「遺伝子から見たヒトらしさ」の解明がこれからの進化・集団遺伝学の大きな課題である。

#### 参考文献

1. Klein J: *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*, John Wiley & Sons, New York, 1986.
2. Kimura M: *The Neutral Theory of Molecular Evolution*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1983.
3. Hughes AL, Nei M: Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex loci reveals overdominant selection. *Nature* **353** : 167-170, 1988.
4. Takahata N: *New Aspects of the Genetics of Molecular Evolution* (eds. Kimura M, Takahata N), A trend in population genetics theory. Japan Science Societies Press, Tokyo, 1991; p.27-47.
5. Takahata N: MHC diversity and selection. *Immunol. Rev.* **143** : 225-247, 1995.
6. Takahata N: A simple genealogical structure of strongly balanced allelic lines and trans-species evolution of polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 2419-2423, 1990.
7. Satta Y, O'hUigin C, Takahata N, *et al.*: Intensity of natural selection at the major histocompatibility complex loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 7184-7188, 1994.
8. Falk K, Rotzschke O, Grahovac B, *et al.*: Allele-specific peptide ligands motifs of HLA-C molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 12005-12009, 1993.
9. Dong R, Kamikawaji N, Toida N *et al.*: Characterization of T cell epitopes restricted by HLA-DP9 in streptococcal M12 protein. *J. Immunol.* **154** : 4536-4545, 1995.
10. Hughes AL, Nei M: Evolution of the major histocompatibility complex: Independent origin of nonclassical class I genes in different groups of mammals. *Mol. Evol. Biol.* **6** : 559-579, 1989.
11. Klein J, O'hUigin C: The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 6251-6252, 1994.
12. Pamer EG, Wang C, Flaherty L, *et al.*: H-2M3 presents a *Listeria monocytogenes* peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **70** : 215-223, 1992.
13. Boyson JE, McAdam SN, Gallimore A, *et al.*: The MHC E locus in macaques is polymorphic and is conserved between macaques and humans. *Immunogenetics* **41**: 59-68, 1995.
14. Obata Y, Satta Y, Moriwaki K, *et al.*: Structure, function, and evolution of mouse TL genes, nonclassical class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** : 6589-6593, 1994.
15. Satta Y, O'hUigin C, Takahata N, *et al.*: The synonymous substitution rate of the major histocompatibility complex loci in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** : 7489-7484, 1993.
16. Saitou N, Nei M: The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** : 406-425, 1987.
17. Lawlor DA, Edelson BT, Parham P: MHC-A locus molecules in pygmy chimpanzees: conservation of peptide pockets. *Immunogenetics* **42**: 291-295, 1995.
18. McAdam SN, Boyson JE, Liu X *et al.*: Chimpanzee MHC class I A locus alleles are related to only one of the six families

- of human A locus alleles. *J. Immunol.* **154** : 6421-6429, 1995.
19. Nei M: *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia Univ. Press, New York, 1987.
20. Klein J, 高畑尚之, Ayala FJ: MHC 遺伝子の多様性が語る人類の起源, 日経サイエンス, 2月号: 42-50, 1994.
21. Takahata N : *Molecular Evolution of the Major Histocompatibility Complex*, (eds. Klein, Klein D), Trans - species polymorphism of HLA molecules, founder principle and human evolution. Springer-Verlag, Heidelberg, 1991 ; p.29-49.
22. Takahata N, Satta Y, Klein J : Divergence time and population size in the lineage leading to modern humans. *Theor. Popul. Biol.* **48** : 198-221, 1995.
23. Takahata N : Allelic genealogy and human evolution. *Mol. Biol. Evol.* **10** : 2-22, 1993.

# [シリーズ：異種のMHC] マウス MHC 内に見出された組換えのホットスポット

城石 俊彦, 水野 健一

国立遺伝学研究所, 遺伝実験生物保存研究センター

## 要約

マウス MHC 内の組換え型ハプロタイプは、この領域の遺伝的構造や遺伝子機能の研究に大いに役立ってきた。一方、MHC クラス II 領域に含まれる組換え型ハプロタイプの組換え切断部位を詳細にマップしていったところ、組換えがホットスポットと呼ばれる特定部位に限定して集中することが明らかとなった。その分子構造と生物学的意義、特に MHC 遺伝的多型性と組換えの関係について議論したい。

## キーワード：

マウス MHC, 組換え, ホットスポット, 遺伝的多型

### 1. 免疫遺伝学と遺伝的組換え

古典的なメンデル遺伝学では、減数分裂期の組換えに基づいた連鎖解析によって未知の遺伝子の存在を予測したりその遺伝子の染色体上での位置についての情報を得ることができる。今や歴史となってしまった感もあるが、免疫遺伝学においても MHC の存在をはじめその遺伝的構造についての初期の知識は、連鎖解析による古典的な遺伝学によって形成されてきた(1)。マウス MHC に関する初期の研究では、MHC 領域内で組換えを起こした多数の組換え型ハプロタイプが作成され、これらを用いた研究を基にしてクラス I 移植抗原遺伝子や免疫応答を制御するクラス II 抗原遺伝子の存在も明らかとなってきたのである。現在では、いわゆるゲノム解析的手法によってクローン化された DNA 断片から直接新たな遺伝子が見出されるようになってきたが、今でも、古典的な連鎖解析法の有効性は否定されていない。さて、MHC に関する免疫遺伝学は、このように MHC の遺伝的構造についての重要な発見の礎となってきたが、実は、もう一つ思わぬ副産物をもたらした。それは、遺伝学における中心的研究課題でもある減数分裂における組換え機構自体の研究分野に

対するものであった。今から15年ほど前になるが、1982年の暮れに Nature 誌の article に一編の論文が掲載された(2)。それは、当時カリフォルニア工科大学で L. Hood 研究室のポストドクをしていた Steinmetz 博士らの論文である。彼らは、マウス MHC のクラス II 領域内における組換え型ハプロタイプを材料として組換え部位を分子レベルで詳細にマップした。この結果、9つの組換えが全て約9.8 kb のクラス II E $\beta$  遺伝子の第2イントロンの中に存在することを発見した。この報告は、哺乳類における組換えが特定の染色体部位で集中して起こる場合があることを分子レベルで示した最初の論文である。この組換え高発部位は、ホットスポットと呼ばれるようになったが、この論文がまさにマウス MHC 領域内のホットスポットの存在を明らかにした第一報であった。本来、この論文が当時の研究者に衝撃を与えたのは、当時組換え型ハプロタイプを用いた免疫遺伝学的解析によって Eb 遺伝子と Ea 遺伝子の間にその存在が予想されていた抑制性 T-細胞のマーカーである I-J 遺伝子がわずか9.8 kb の Eb 遺伝子の第2イントロン内に存在しなければならないという矛盾 (I-J パラドックスと呼ば

れた)した結論がそこから自動的に導き出されたからである。しかし、それ以上に当時 MHC 内での組換え型ハプロタイプを自ら作成していた私自信を含む少数の研究者にとって組換えがランダムではなく特定の部位に限定されるという報告は驚きであった。同じ1982年に、私達は日本産の野生マウスの MHC 領域を実験用近交系統である C57BL/10マウスに戻し交配によって導入した H-2コンジェニックマウスを使って様々なマウス系統との間で MHC の *H2K-H2D* 遺伝子間の組換え体を取ろうと努力していた。従来、両遺伝子間には、約0.3%の頻度で組換え体が取れると言われていたのが実際にやってみるとその10倍の割合で組換え体を得られ、それらの殆どが MHC のクラス II 領域である *H2K-Ab* 遺伝子間に切断点を持つことがわかった(3)。同様に野生マウス由来の染色体を含む交配によって高頻度に組換え体を得られるということは、当時スイスのバーセル免疫研究所に居た Fischer Lindahl 博士らによっても調べられていた(4)。このような状況下で Steinmetz らの報告は、純粋遺伝学の研究分野にとっても極めて興味深いものだったのである。

## 2. マウス MHC クラス II 領域に見出された組換えのホットスポット

減数分裂期の相同染色体間の組換えに代表されるような相同的組換えでは、一般的に組換えは、場所を選ばずにどこでもランダムに生ずると長い間考えられてきた。また、組換え頻度は、単純に遺伝子間の距離に比例して増加するとされてきた。この前提があってメンデル遺伝学を基にした染色体地図や連鎖解析が行われてきたのである。しかし、Steinmetz らの研究から始まったマウス MHC における組換え部位の分子マッピングの結果、マウス MHC の近位側の約500kb に及ぶクラス II 領域ではこの前提が成立しないことが明らかとなってきた。当時 MHC クラス II 領域は、哺乳類のゲノムの中ではコスミドクローンの Contig によって完全に物理的に連結されている唯一の遺伝領域であった。従って、組換え部位の分子マッピングには、このゲノム情報が遺憾なく利用されたのである。これらの一連の研究から、この500kb の DNA 断片内の組換えは

必ず4カ所のホットスポットのいずれかで起こることがわかった(図1)(5~7)。組換えがどのホットスポットで起こるかは、組換え体を作成するのに用いるマウス交配の MHC のハプロタイプに依存する。例えば、*Pb* 遺伝子座近傍に位置するホットスポットは、アジア産野生マウス由来の *cas4*ハプロタイプを含む交配で、*Lmp2* 遺伝子(抗原プロセッシングに働くプロテアソームをコードする)の3'末端部位に位置するホットスポットは、同じくアジア産野生マウス由来の *wm7*や *cas3*ハプロタイプを用いた交配の組換えで発見された。実験用近交系マウス由来のハプロタイプを用いた交配でも、最初に発見された *Eb* 遺伝子のホットスポットやその後見つかった *Ea* 遺伝子近傍のホットスポットのように組換えは特定部位に集中するが、先に述べたように野生マウス由来の MHC ハプロタイプが含まれる交配では、ホットスポットにおける組換え頻度が断然高くなる。また、特定のホットスポットで組換えを誘発するハプロタイプは、交配の相手を変えてもそのホットスポットにおいて組換えを起こす(8)。このように、組換えを特定のホットスポットで引き起こすという遺伝形質は、起こさないハプロタイプに対して優性である。この性質は、大腸菌で見出されている組換えのホットスポットである *Chi* 配列と似ている(9)。

## 3. ホットスポットの分子構造

MHC クラス II 領域内に明瞭な組換えのホットスポットが発見されると、幾つかの研究室でホットスポットを特徴づける分子構造を明らかにしようという研究が始まった。現在マウス MHC クラス II 領域内の組換えホットスポットのうち、塩基配列レベルまで明らかになっているのは *Eb* ホットスポットと *Lmp2* ホットスポットである。これらのホットスポットの塩基配列を比較すると、相同な配列がいくつか存在する(9,10)。マウスの中程度の反復配列である MT ファミリー配列、TCTG または CCTG の4塩基の繰り返し配列、オクタマー転写因子結合配列、そして B モチーフ様配列である。しかし、塩基配列 *Lmp2* ホットスポットで組換えを起こすハプロタイプと起こさないハプロタイプの間には先の共

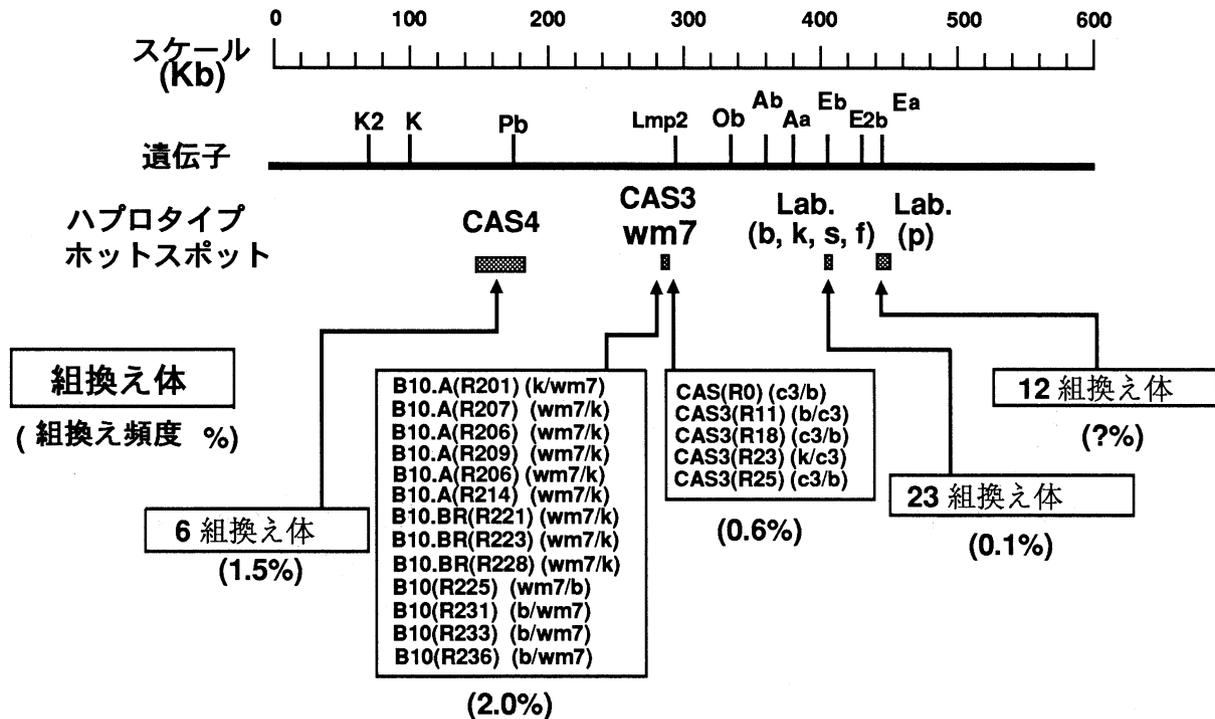


図1 マウス MHC クラス II 領域における組換えのホットスポット。500kb の長さの領域に 4 か所のホットスポットが同定されている。

通配列にほとんど違いが見られない。これらの共通な塩基配列が組換えが起こる位置を決定するシス・エレメントである可能性が考えられているが決定的な証拠はまだない。

組換えのホットスポットは、下等真核生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の減数分裂においても見出されている。この場合には、ホットスポット間には共通な塩基配列が見出されていない。現在、出芽酵母においては組換えのホットスポットの位置は、クロマチン構造によって決定されている可能性が大きくなっている。また、出芽酵母では、減数分裂前期に一時的な二重鎖 DNA の切断 (Double-strand DNA breaks; DSBs) が起こることが知られており、この DSBs の分布が減数分裂期の組換えホットスポットのそれと一致している。また、ある部位における DSB の出現頻度と組換え頻度には相関関係があることも知られている。これらのことから、減数分裂特異的な DNA の切断が組換えの開始シグナルになると考えられている。Wu と Lichten は組換えホットスポット、DSBs と非特

異的なエンドヌクレースである DNase I に対して感受性を示すクロマチンの位置的相関関係について詳しく調べた (11)。その結果、組換えのホットスポットと減数分裂期の DSBs が存在するところは DNase I 高感受性であることを明らかにした。さらに、彼らは、減数分裂期の組換えホットスポットは体細胞分裂時から減数分裂まで構造的に DNase I に対して高感受性のままであることを示した (11)。同様に Micrococcal nuclease を用いた Ohta らの実験によっても、組換えホットスポットは外来のヌクレースに対して高感受性であることが明らかになっている (12)。これらの結果は、出芽酵母では組換えのホットスポットのクロマチン構造が体細胞から減数分裂に至るまで緩んでいて DNA が露出していることを意味している。そして、組換えを担う蛋白質または DSBs を引き起こす因子がホットスポットの DNA に接近しやすくなっていることにより、ホットスポットでの組換え頻度が他の領域よりも高くなると考えられる。

マウス MHC 領域内のホットスポットにおいて

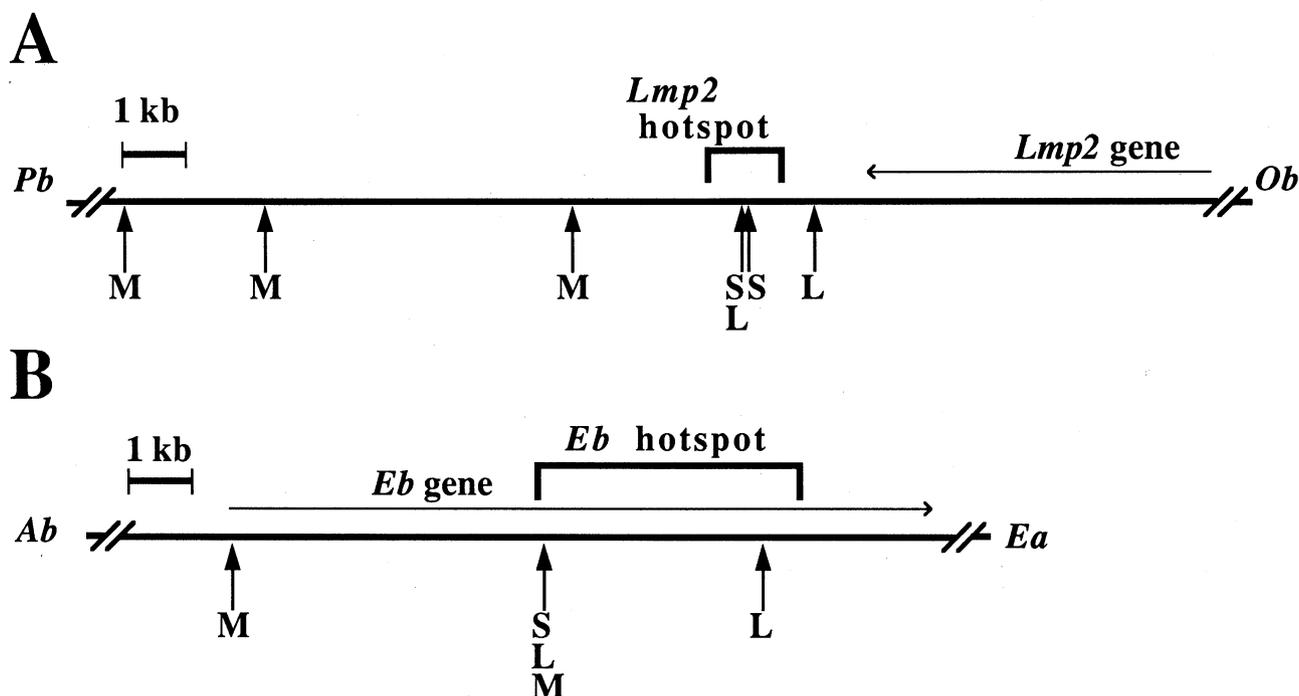


図2 ホットスポット周辺のDNase I高感受性部位。Aは*Lmp2*ホットスポットとBは*Eb*ホットスポット周辺の遺伝子構造とDNase I高感受性部位を示す。矢印はDNase I高感受性部位を示す。矢印の下にある文字は用いた組織または細胞を表わし、Sは脾臓、Lは肝臓、Mは精巣由来の減数分裂前期細胞を示す。括弧はホットスポットの領域を示す。

もクロマチン構造が重要な意味を持っているのだろうか？ 私達は、マウスのホットスポットとクロマチン構造との関係を調べるために、*Eb*ホットスポットと*Lmp2*ホットスポットとそれら周辺のクロマチンのDNase I感受性について解析した。ここでDNase I高感受性部位の解析方法について手短かに紹介する。まず細胞から核を単離し、その核に少量のDNase Iを加え反応させる。その核からDNAを抽出し、サザンプロット解析を行う。一方の制限酵素部位から他方の制限酵素部位までの距離に相当する長さのバンド以外に、DNase Iを加えることによって出現する付加的なバンドがDNase I感受性部位を示す。この様にしてホットスポットおよびその周辺にDNase I高感受性部位が存在するかどうかを検討した。

まず、体細胞について調べたところ、脾臓と肝臓では、ホットスポットの中にDNase I高感受性部位が存在した。一方、精巣から精製した減数分裂前期細胞では、*Eb*ホットスポットの中にDNase I高感受性部位が存在したが、*Lmp2*ホットスポットの中にDNase I高感受性部位を検出されなかった。一方、*Lmp2*ホットスポットの外側のセントロメア

側にいくつかのDNase I高感受性部位が存在することが明らかとなった。このようにマウスでは必ずしも構成的に存在するDNase I感受性のみによってホットスポット位置が決定されていないことが示された(13,14)(図2)。残された可能性としては、減数分裂前期の組換え開始時期のごく短い間だけホットスポットのDNAが露出して他の染色体領域に比べてそこに組換え蛋白質が接近しやすくなっているという可能性やDNase Iに対する感受性ではなく、ある種のクロマチン構造、例えばMAR (matrix associating region) またはSAR (scaffold associating region) などの非常に大きな構造がホットスポットの位置を決定しているのかもしれない。いずれにしても、マウスでは出芽酵母のように構成的に緩んだクロマチン構造によってホットスポットの位置が決定されていないことは明らかであり、単細胞真核生物と哺乳動物における減数分裂期組換えは、その機構になんらかの違いが存在するものと考えられる。

#### 4. 考えられるマウスのホットスポットの位置を決定する他の因子

分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) の *ade6* 遺伝子内のホットスポットでの組換えは塩基配列特異的である。野生型の *ade6* 遺伝子内ではほとんど組換えが起こらないが, *ade6-M26* 変異遺伝子になると約10倍組換え頻度が上昇する。 *ade6-M26* 変異遺伝子の ORF 中の7塩基 (ATGACGT) は *ade6* 遺伝子内の組換え活性を左右する。このシス・エレメントに Mts1 と Mts2 タンパクの複合体が特異的に結合し, この複合体のシス・エレメントに対する結合能と *ade6* 遺伝子内の組換え頻度には相関関係がある(15)。この Mts1 と Mts2 の複合体が *ade6* 遺伝子内の組換え開始を担っていると考えられている。このようにマウスでも, ホットスポット内のある配列が組換えのシス・エレメントとして働いているかもしれない。

ある条件下での大腸菌の染色体やバクテリオファージ T4 の複製には相同組換えが必要であり, それぞれに組換えのホットスポットが存在する。例えば, 大腸菌の染色体の複製終結領域には *chi* 配列と *dif* 座が存在し, 複製終結の際に起こるトポロジーの解消や正確に複製を終結するために相同組換えのホットスポットが存在すると考えられている (16, 17)。マウスの培養細胞では, *Lmp2* ホットスポット付近に一方向性の複製の開始点と終結点が存在する (18)。もしかすると, 減数分裂前複製の開始または終結が組換え開始のシグナルとなっているのかもしれない。

いずれにしても, さらに多くのホットスポットを同定しそれらの中から一般性を見い出すことが減数分裂期の組換えを深く理解するために必要である。

## 5. 組換えと MHC の遺伝的多型性

マウス MHC は, クラス I, クラス II, クラス III の三つの亜領域に分かれている。この内, クラス I, II の二つの亜領域は, 主に免疫応答を制御する細胞表面抗原をコードする遺伝子群が存在する。これらの遺伝子は, 組織片移植の際の自己マーカーとなっていることからわかるようにマウス系統によって異なり遺伝的に極めて多型的である。一方, クラス III 亜領域には, 免疫反応とは必ずしも関係のない遺伝子群が存在し, それらの遺伝子の多型性は他の染

色体領域にある遺伝子と同程度に低い。現在までにわかっている組換えの4つのホットスポットは, 全て多型性の著しいクラス II に見出されている。遺伝的多型性に富む MHC クラス I, II の染色体領域に組換えのホットスポットが存在すると, 高頻度の組換えによってこの亜領域の間で遺伝子群の頻繁な交換が起こりマウス集団全体としての遺伝的多型性 (免疫系の個体間変異) が増大することが予想される。このためホットスポットは適応的な生物学的意義を持っており, その存在はマウスという生物種の存続に有効に働いているという可能性が考えられる。もし, この仮説が正しいとすると遺伝的多型性の低いクラス III 亜領域では組換え頻度も低くまたホットスポットも存在しないと推定される。

そこで, 私達は, クラス III 亜領域を含む約1.5Mb の長さを持つマウス MHC 全領域における組換え頻度と組換え部位の分布について解析を行った。この目的で合計約 20,000頭のマウスからスクリーニングした80個体以上の組換え体を基にして MHC 全領域における組換え頻度を求め次に組換え部位の詳細なマッピングを行った。この結果, クラス I, II 亜領域全体ではホットスポットにおける組換えによって平均値より組換え頻度が高くなっているのに対し, クラス III 亜領域については, マウス全ゲノムにおける平均値と同レベルの組換え頻度を示すことが明らかとなった。また, クラス III 亜領域においては *Hsp70-Bat5* 遺伝子間にホットスポットの存在が示唆されたがそれ以外ではクラス I, II 亜領域に見られるような明瞭なホットスポットは検出されなかった (19)。これらの結果は, クラス I, II 亜領域のホットスポットが遺伝的多型性と関連しており機能的な要請によって出現し維持されているという仮説と矛盾しない。もし, この仮説が本当なら, ヒト HLA クラス I, II 領域においてもマウスと同様に組換えが高発するホットスポットが見出されることが予測される。

クラス III 亜領域における組換え部位の分布の解析からわかったもう一つの事実は, 数百 kb にわたって組換えが起こらない部位が存在することである。即ち, ホットスポットの有無に係わらず組換えはマウス MHC 領域を見る限りランダムでは無い

ことが明らかとなった。

#### まとめ

組換えのホットスポットは、遺伝的多型性の顕著なマウス MHC クラス II 領域に特徴的であることがわかった。この事実は、ホットスポットの存在がマウス集団における MHC 領域の遺伝的多様性を増大する方向に働くこと、言い換えると適応的意義を持って出現し現在でも維持されている可能性を示唆している。また、ホットスポットの分子構造に関する研究からは、マウスのホットスポットでは単細胞真核生物である酵母の場合とは異なったメカニズムで組換えが起こっていることが示された。

#### 参考文献

1. Klein J: *Natural history of the major histocompatibility complex*, A Wiley - International Publication, New York, 1989.
2. Steinmetz M, Minard K, Hoevath S, *et al.*: *Nature* **300**: 35-42, 1982.
3. Shiroishi T, Sagai T, Moriwaki K: A new wild - derived H -2 haplotype enhancing K - IA recombination. *Nature* **300**: 370-372, 1982.
4. Fischer Lindahl K, Hausmann B, *et al.*: A new H - 2 linked class I gene whose expression depends on a maternally inherited factor. *Nature* **306**: 383-385, 1983.
5. Steinmetz M, Stephan D, Fischer Lindahl K: Gene organization and recombinational hot spot in the proximal portion of the murine major histocompatibility complex. *Cell* **44**: 895-904, 1986.
6. Fischer Lindahl K: His and hers recombinational hotspots. *Trends Genet.* **7**: 273-276, 1991.
7. Shiroishi T, Sagai T, Moriwaki K: Hotspots of meiotic recombination in the mouse major histocompatibility complex. *Genetica* **88**: 187-196, 1993.
8. Yoshino M, Sagai T, Fischer Lindahl K, *et al.*: No dose effect of recombinational hotspots in the mouse MHC. *Immunogenetics* **39**: 119-131, 1994.
9. Shiroishi T, Hanzawa N, Sagai T, *et al.*: Recombinational hotspot specific to female meiosis in the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **31**: 79-88, 1990.
10. Ling X, Shenkar R, Sakai D, *et al.*: The mouse Eb meiotic recombination hotspot contains a tissue - specific transcriptional enhancer. *Immunogenetics* **37**: 331-336, 1993.
11. Wu TC, Lichten M: Meiosis - induced double - strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* **263**: 515-518, 1994.
12. Ohta K, Shibata T, Nicolas A: Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *EMBO J.* **13**: 5754-5763, 1994.
13. Shenkar R, Shen M, Arnheim N: DNase I - hypersensitive sites and Transcription factor-binding motifs within the mouse Eb meiotic recombination hot spot. *Mol. Cell Biol.* **11**: 1813-1819, 1991.
14. Mizuno K, Koide T, Sagai T, *et al.*: Molecular characterization of a recombinational hot spot adjacent to Lmp2 gene in the mouse MHC: fine location and chromatin structure. (投稿中)
15. Wahls WP, Smith GR: A heteromeric protein that binds to a meiotic homologous recombination hot spot: correlation of binding and hot spot activity. *Genes & Dev.* **8**: 1693-702, 1994.
16. Asai T, Sommer S, Bailone A, *et al.*: Homologous recombination - dependent initiation of DNA replication from DNA damage - inducible origins in Escherichia coli. *EMBO J.* **12**: 3287-3295, 1993.

17. Nishitani H, Hidaka M, Horiuchi T: Specific chromosomal sites enhancing homologous recombination in *Escherichia coli* mutants defective in RNase H. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 307-314, 1993.
18. Spack E G, Lewis E D, Paradowski B, *et al.*: Temporal order of DNA replication in the H-2 major histocompatibility complex of the mouse. *Mol. Cell Biol.* **12**: 5174-5188, 1992.
19. Yoshino M, Sagai T, Fischer Lindahl K, *et al.*: Recombination in the class III region of the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **40**: 280-286, 1994.

# [シリーズ：血清学] クラス I 遺伝子型と血清学的反応について —UCLA セルイクスチェンジから—

田中 秀則

日赤中央血液センター，検査 3 課

## はじめに

近年，HLA のタイピングにも DNA 検査が導入され，クラス II (DRB1) のタイピングはルーチン化されようとしている。また，クラス I タイピングについても各抗原グループにおいて，遺伝子型（アリル）レベルのタイピングが可能となった。

最近，UCLA Tissue Typing Laboratory が HLA タイピングの精度管理を目的として行っているセルイクスチェンジ (International Cell Exchange) においても，17施設がクラス I の DNA

タイピングに参加している。ここで得られた DNA タイピングの結果より，各アリル産物の血清学的反応について検討することが可能になった。

今回，昨年行われたセルイクスチェンジにおいて，話題となったクラス I アリールの産物とその血清学的な反応について紹介する (表1)。

### 1, A11V (All New Allele)

このタイプは，一部のセルイクスチェンジ参加施設において，A11の変異型として報告されたもので

表1 血清学的 HLA タイプとアリル

Serotype	Allele	Ethnicity	HLA Phenotype by Cell Exchange			Reference
A11V	A*11 new	Oriental	<u>A11V</u> , A33	B58, B62V	Cw3, Cw7	(1)
A66.1	A*6601	Hispanic	A1, <u>A66.1</u>	B50, B58	Cw4, Cw7	(2)
A66.2	A*6602	Black	A23, <u>A66.2</u>	B7, B58	Cw7, -	(2)
		Black	A23, <u>A66.2</u>	B7, B63.1	Cw7, -	(3)
A80	A*8001	Black	A11, <u>A80</u>	B51, B42	Cw2, Cw7	(6)
		Black	A24, <u>A80</u>	B51, B42	Cw7, -	(6)
		Black	A30, <u>A80</u>	B45, B42	Cw7, -	(6)
		Black	A30, <u>A80</u>	B14, B57	Cw7, Cw8	(6)
B15X21	B*new	Caucasian	A2, A30	B55, <u>B15X21</u>	Cw3, Cw6	(2)
		Caucasian	A11, A30	B62, <u>B15X21</u>	Cw4, Cw6	(7)
B63.1, 8w66	B*1516	Black	A2, A30	B70, <u>B63.1</u>	Cw3, -	(3)
		Black	A2, A66.2	B7, <u>B63.1</u>	Cw7, -	(3)
		Black	A3, A30	B42, <u>B63.1</u>	Cw7, -	(10)
B62V	B*1525	Oriental	A11V, A33	B58, <u>B62V</u>	Cw3, Cw7	(1)
B"DT", B7V	B*8101	Black	A33, A34	B53, <u>B"DT"</u>	Cw4, Cw8	(13)
		Black	A30, A32	B13, <u>B"DT"</u>	Cw6, Cw8	(13)
		Black	A23, A29	B53, <u>B"DT"</u>	Cw4, -	(13)
B75V	B*1511	Japanese	A2, A11	B54, <u>B75V</u>	Cw1, Cw3	(1)

あり、東洋人由来の細胞に認められた。

血清学タイピングでは、Bodmer および Phelan らが、通常の A11 より短い反応パターンを示すとコメントしており、Van den Berg らは、A ローカスの新しい抗原型の可能性を示唆した(1)。

DNA タイピングでは、Bunce らが A\*1101 と比べて 2 箇所の塩基置換 (エクソン 3 の 216, 217 番目) を SSP 法で確認した。また、Chopek らは SSOP 法で、Mitsuishi と Bettinoti らは直接塩基決定法で同様の結果を得た。この新しいアレルの塩基配列は、A\*1101 のエクソン 3, 216 と 217 番目の塩基 CG が AC となったものであった(1)。この結果から、A11V のアミノ酸配列は、A11 (A\*1101) の  $\alpha 2$  ドメイン 163 番目のアルギニン (Arg) が、スレオニン (Thr) に置換したものである。

この A11V 細胞と同時に配布された 2 種類の A11 パネル (A\*1101) は、約 100% の施設で A11 とタイピングされたのに対して、このタイプを A11 として報告した施設は、全体の約 60% でしかなかった。

このタイプは、われわれが通常使用している A11 (A11.1 + A11.2) 抗血清 2 種類に対して、ほとんど反応しなかったため、A11 はないと思われた。しかし、サブタイピングトレイに使用している A11 + A26.4 + A34 および A11 + A3 + A32 + A74 抗血清には反応が見られ、一方 A11 + A26 + A25 抗血清には反応が見られなかった。

A11V パネルに反応を示した 2 種類の抗血清の特異性と対応する、共通のアミノ酸配列が  $\alpha 1$  ドメインに存在している (それぞれ、75~96 番目と 56~69 番目)。また、反応しなかった血清の特異性に対応するアミノ酸配列は、 $\alpha 2$  ドメインの 157~165 番目に存在する。A11V は、 $\alpha 2$  ドメイン 163 番目のアミノ酸が置換しているために、この抗血清に反応を示さなかったと考えられる。

## 2, A66 (A\*6601, A\*6602)

A66 抗原は、これまでに 2 種類のアレル (A\*6601, A\*6602) が確認されている。A\*6601 と A\*6602 のアミノ酸配列における違いは、 $\alpha 1$  ドメイン 90 番目のアスパラギン酸 (Asp) がアラニン (Ala) に置換しているだけである。

昨年のセルイクスチェンジでは A\*6601 が 1 パネル (Hispanic), A\*6602 が 2 パネル (Black) 提出された。血清学的なタイピングでは、一部の施設で A66.1 と A66.2 または A6601 と A6602 として判別をしていた(2,3)。

われわれの使用しているタイピングトレイでは、A\*6601 パネルは一部の A11 関連抗血清に反応を示し、A\*6602 パネルは、A31 + A33 + A34 の抗血清に反応することから、これら 2 種類の A66 を判別することが可能であった。A\*6601 でコードされるアミノ酸は、 $\alpha 1$  ドメインの 90 番目のアスパラギン酸 (Asp) を含む 71~96 番目のアミノ酸配列において A11, A34 と、75~96 番目において A11, A34, A26.4 (A\*2603) と同じであった。このことが、A11 関連抗血清に交差反応を示す理由と考えられる。

## 3, A80 (A\*8001)

このタイプの発見は、“A-ローカスの片方がブランクである黒人パネルと反応する抗血清”が見つかったことに始まる(4)。その後、このタイプをコードしている遺伝子の配列が決定され、アレル名は HLA-A\*8001 とされたが、血清学でのタイプは未だに公認されていない(6)。しかし、NMDP ではこのタイプが実務上必要なため、一時的に A80 として使用している(6)。この抗原の頻度は、アメリカのアフリカ人 (African-Americans) で 2%、ヒスパニック (Hispanic) で 0.6% であった(5)。

昨年のセルイクスチェンジでは、このタイプのパネルが 4 種類提出されており、血清学タイピング施設の約 50% においてタイピングが確認されていた(6)。血清学的な反応は、A1 + A36, A1 + A11 + A36 抗血清に対して交差反応を示すとされている(5)。

われわれの使用しているサブタイピングトレイでは、A1 抗血清を 2 種類と A1 + A36 の抗血清を 3 種類使用しているが、A1 の抗血清 1 本と A1 + A36 の抗血清 1 本に反応が認められたが、A1 抗血清に対する反応は弱かった。

A\*8001 のアミノ酸配列を他の HLA 抗原と比較した場合、A1 の配列との相同性が一番高いとされており、このことが、A1 関連抗血清に交差反応を示すことの理由と考えられる(5)。また、 $\alpha 2$  ドメインの前

半部分 (91~150番目) におけるアミノ酸配列は A3(A\*0301)と同じであるが, A3抗血清との交差反応性は認められていない(5).

#### 4, B15X21, B1521(New Allele)

第11回国際組織適合性ワークショップの B15抗原部会において, Bw4関連抗原のなかで B62抗血清に弱く反応し, 一部の B63抗血清および B49抗血清に反応するタイプが, B1521として提唱された. March は, このタイプ(B1521)の表現方法を B\*1521アリールと混同しないようにするため, B15X21というタイプに変更することを提唱している(7).

昨年のセルイクスチェンジにおいて, このタイプをもつ白人由来の細胞が2回配布されているが, 2回目のセルイクスチェンジでは15%の施設で B15X21または B1521としてタイピングをしていた(2). また, これら2パネルのタイピング結果から B15X21 は, A30-B15X21-Cw6ハプロタイプを形成していると考えられた.

DNA タイピング施設のほとんどにおいて, このタイプを新たな変異アリールとタイピングしており, B\*13VAR または B\*15NEW としていた. 一部の施設でこのタイプの塩基配列を決定しており, エクソン2では B\*1301または B\*1302と同様な配列であったが, エクソン3の1~66番目は B\*1302と, 後半67~276番目は B\*1505と同様な配列であった(2, 7).

われわれの使用しているタイピングトレイでは, B15関連の抗原に幅広く反応する抗血清 (例えば, B62+B75+B63+B76+B77のような特異性の血清) を5種類使用しており, そのうちの4種類に反応が見られた. また, B21抗血清(B49+B50)3種類のうち2種類に反応を示したが, B49単一特異性の抗血清には反応を示さなかった. また,  $\alpha$ 1ドメインが B13と同じ配列をもつにも関わらず, B13関連の抗血清には反応が見られなかった.

#### 5, B63.1, 8w66(B\*1516)

このタイプは, 第8回国際組織適合性ワークショップから提唱されている黒人由来の B63サブタイプ (8w66) である. 第10回国際組織適合性ワークシ

ョップでは, 一部の抗血清で従来 (白人由来) の B63 との判別が可能であった(8).

Bryant らは, 黒人由来の B63の塩基配列を決定したが, この B63は血清学的に B63.1 (8w66) とタイプされるものと考えられ, アリール名は B\*1516とされた. また, 白人由来の B63についても塩基配列が決定され, B\*1517とされた(8, 9). これら2つのアリールは, 塩基で13箇所, アミノ酸で6箇所の違いがある. これら6箇所のアミノ酸置換は,  $\beta$ シート上で起こっているため, 抗血清では判別しづらい置換と思われる.

昨年のセルイクスチェンジでも, このタイプの細胞が3回提出されているが, 約80%の施設で B63とタイプされており, B63.1または8w66と判定した施設は, わずか4%であった(3,10). われわれも同様に, 従来の B63との判別はできなかった.

#### 6, B62V(B\*1525)

このタイプは, 一部の血清学タイピング施設において, B62の変異型である可能性が示唆されたものであり, 細胞の由来は東洋人であった(1). DNA タイプの結果では, 3施設で B\*1525とタイプされていた. B\*1525の塩基配列は, エクソン2が B\*1501と, エクソン3が B\*1502と同じ配列をもつものである. われわれが行った SSCP 法でのタイピングでも, 同様の結果が得られた(11). また, 塩基配列を決定した施設でも同様なことが報告されている(1).

これまで塩基配列が決定された B15関連抗原において,  $\alpha$ 1ドメインのアミノ酸配列が B62(B\*1501)と同じ配列である場合, 血清学的には判別されていないものが多い. このタイプ(B\*1525)についてもセルイクスチェンジの結果では, 参加施設の90%が B62とタイプしていた(1).

われわれの結果も同様に, 一般的な B62とほとんど同じ反応パターンを示したが, 一部の B5関連抗血清 (特異性: B5+B49+B75+B77) に反応を示していた. このタイプのパネルは, 昨年のセルイクスチェンジでは1回配布されただけで, 血清学的なタイプについては, 今後の詳しい検討が必要と思われる. また, このタイプをもつ細胞の A ローカスは, 先に紹介した A11V であり, A11V-B62V-Cw7のハ

プロタイプを形成していると考えられた。

## 7, DT, B7V(B\*8101)

このタイプは、1983年にここで紹介しているテラサキのセルイクスチェンジで黒人から見つかったタイプである。最近、Hildebrandらによって塩基配列が決定され、アレル名はB\*8101となった。塩基配列の結果からこのアレルは、エクソン2がB\*0702と、エクソン3がB\*4801と同じで、B7とB48のハイブリッドと考えられている(12)。

このタイプの細胞は、昨年のセルイクスチェンジにおいて3回配布され、約50%の血清学タイプニング施設で、B8101, B81 (未公認抗原名), DT または B7V と報告されていた(13)。

このタイプの血清学的な反応の特徴は、B7の特異性を含むほとんどの抗血清と反応し、B7の特異性をもたないB40関連抗血清に反応を示すと考えられる。Courtesyらが示した反応パターンでは、B7の特異性をもつ8種類の抗血清中、7種類の血清に反応を示しており、反応しない血清の特異性はB7+B73であった。また、B7の特異性をもたないB48及びB40関連抗原に対する抗血清9種類中、5種類の血清に反応を示していた(13)。

われわれは、B7の特異性をもつ抗血清9種類を使用しているが、このタイプは、これら全ての抗血清に反応を示した。しかし、B7の特異性をもたない(特異性：B60+B61+B13+B47+B41)抗血清にも反応が認められた。

## 8, B75V(B\*1511)

このタイプは、日本国内でB75とタイプされたものである。われわれは、セルイクスチェンジや海外への報告については、この表現を使用している。その理由は、中島によって本誌で報告されているように、日本人で一般的なB75(B\*1511)と国際的なB75(B\*1502)は違うので、これら二つのタイプを区別するために使用している(14)。

昨年のセルイクスチェンジでも、このタイプの細胞が配布され、B75とタイプした施設はわずかに約51%であった(1)。また、15%の施設からは、このタイプがB75の変異型であるとの報告がされた(1)。こ

のタイプは、B46抗血清と交差反応性を示すのが特徴であるが、セルイクスチェンジでも10%の施設がB46とミスタイプをしていた(1)。

以前より、日本人のB75は3種類あるとされており、その中の2種類は前示したB75, B75Vである。もう一つのB75については、最近われわれの施設で塩基配列の決定が行われた。その結果をB\*1501(B62)と比較した場合、塩基配列ではエクソン2,263番目の塩基CがTに、アミノ酸配列では $\alpha$ 1ドメイン64番目のスレオニン(Thr)が、イソロイシン(Ile)に置換したタイプであった(15)。これまで報告されたクラスIアレルでは、263番目の塩基に置換がおこったものはなく、大変ユニークな置換であった。

このタイプの血清学的な反応は、B62+B76抗血清には反応せず、B15関連抗原に広く反応する抗血清には反応を示した。しかし、B75V 単一特異性の抗血清およびB75に反応する抗血清には反応しないことから、B75V または B75との判別が可能であった(14)。

## おわりに

昨年行なわれた、セルイクスチェンジ(International Cell Exchange)で話題となったアレルと血清学的反応性について紹介した。これまでは、血清学的にサブタイプと思われるものを中心に塩基配列の決定が行なわれてきた。しかし、DNA タイピングの進歩に伴い、新たなアレルが見つかった後に、血清学での反応性を再検討する機会が多くなると思われる。今回も、新たなアレルについて、再度抗血清での反応について見直すことにより、様々な情報を得ることができた。クラスIのDNA タイピングをルーチン的に行うことは、現時点では困難であり、しばらくの間血清学なタイプニングは必要であることから、セルイクスチェンジから得られる情報の価値は高い。

## 参考文献

1. Lau M, Terasaki PI, d Park MS: Report of the 216th cell exchange.
2. Lau M, Terasaki PI, d Park MS: Report of

- the 212th cell exchange.
3. Lau M, Terasaki PI, d Park MS : Report of the 213th cell exchange.
  4. Speerbrecher LS, Witkowski JA : Evidence for a New A-locus antigen in Black detected by serological technic. *Hum Immunol.* **32** (suppl. 1) : 102, 1991.
  5. Starling GC, Witkowski JA, Speerbrecher LA, *et al.* : A novel HLA-A \*8001 allele identified in African American population. *Hum. Immunol.* **39** : 163-168, 1994.
  6. Lau M, Terasaki PI, d Park MS : Report of the 211th cell exchange.
  7. Lau M, Terasaki PI, d Park MS : Report of the 210th cell exchange.
  8. Hildebrand WH, Domena JD, Shen SY, *et al.* : HLA-B15 : A widespread and diverse family of HLA-B alleles. *Tissue Antigens* **43** : 209-218, 1994.
  9. Bryant GO, Chen M, Lee JH : Molecular and serological characterization of a Bw63 allele. *Hum, Immunol, Supplement* : Abstract. # **17** : 53, 1990.
  10. Lau M, Terasaki PI, d Park MS : Report of the 215th cell exchange.
  11. Petersdorf EW, Hansen JA : A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing. *Tissue Antigens* **46** : 73-85, 1995.
  12. Ellexson ME, Zhang G, Stewart D, *et al.* : Nucleotide sequence analysis of HLA-B\*1523 and A\*8101: Dominant alpha-helical motifs produce complex serological recognition patterns for the HLA-B"DT" and HLA-B"NM5" antigens. *Hum Immunol.* **44** : 103-110, 1995.
  13. Lau M, Terasaki PI, d Park MS : Report of the 214th cell exchange.
  14. 中島文明 : 血清学的タイピングと遺伝子タイピングの異同 (1), *MHC & IRS* (日本組織適合性学会誌), **1** : 11-14, 139-142, 1994.
  15. Lin L, Tokunaga K, Tanaka H, *et al.* : Further molecular diversity in the HLA-B15 group. *Tissue Antigens* (in press).

## 〔最新情報：“玉手箱”〕

## 臍帯血細胞移植療法

西平 浩一

神奈川県立こども医療センター，腫瘍科

## 要約

臍帯血の幹細胞を利用した造血幹細胞移植療法につき概説した。臍帯血細胞移植は分娩後の胎盤臍帯より採取した臍帯血の幹細胞を骨髄細胞の代わりに使用する。一つの胎盤より採取される幹細胞数は体重が20-30kgの小児の骨髄再生に必要な量が得られる。欧米では同胞間および臍帯血バンクを利用した非血縁者で約150例に移植されて、骨髄移植とほぼ同等の成績である。GVHDはきわめて少なく、2 locus mismatchedでも致死的なGVHDは発生してない。本来廃棄処分していたものを利用するので提供者の負担は全くない。われわれも急性白血病の3歳児の同胞間での臍帯血細胞移植に成功し、また神奈川臍帯血バンクも設立し臍帯血を保存している。臍帯血細胞移植は今後幹細胞移植の分野で重要な手段となるであろう。

キーワード：臍帯血，造血幹細胞，胎盤，臍帯血細胞移植，骨髄移植

## はじめに

骨髄移植に代表される造血幹細胞移植療法(以下幹細胞移植)は造血幹細胞を移植し生着させることである(1,2)。同種骨髄移植は白血病，再生不良性貧血などの難治性血液疾患，先天性代謝異常，一部の悪性固形腫瘍等の治療手段の一つとしてその有効性は広く認められている。従来，幹細胞移植の種類はその幹細胞の供給源によって骨髄移植(同種および自家)，自家末梢血幹細胞移植が知られていた。

最近，造血幹細胞の新しい供給源として『へその緒』の血液(臍帯血)にある幹細胞が注目されている。そして臍帯血を骨髄血の代わりに使用した骨髄移植，すなわち臍帯血細胞移植によって白血病や再生不良性貧血などの治療が可能になっている(3~6)。

わが国では1995年12月現在，神奈川県立こども医療センター(3)，東海大学などの数施設で7人の患者に臍帯血細胞移植が実施されている。欧米ではすでに150人以上に実施されており，成功例も増加しています。

そこで臍帯血中の造血幹細胞を利用した移植療法

の有用性，臍帯血バンクの設立の必要性などにつき概説いたします。

## 1. 臍帯血細胞移植療法とは

臍帯血は臍帯の血管の中にある血液であり生直後の新生児末梢血液と同じである。臍帯の血管は胎盤とつながっているため胎盤には臍帯血が含まれています。移植に利用するのは『へその緒』を切ったあと胎盤に残っている臍帯血である。胎盤は分娩後は不要のものであり，廃棄処分されている。しかし，その胎盤に残っている臍帯血を採取し，それに含まれる幹細胞を移植して骨髄造血機能を再生させるのが臍帯血細胞移植療法である。そこで，まず臍帯血が骨髄血の代わりになる理由を述べる。

一般に幹細胞移植療法に際しては移植する幹細胞の質的および量的なことが重要である。臍帯血には増殖能の高い幹細胞が多数あること，量的な面では骨髄ほど多量に採取できないが，一つの胎盤臍帯血管から小児の移植に足りる幹細胞数が採取可能であることがその理由である。以後，その詳細を解説す

ることとします。

幹細胞の種類にはすべての血液細胞(白血球, 赤血球, 血小板)を産生する能力を有する多能性幹細胞や分化の方向が決定されていて1種類の血液細胞たとえば, 顆粒球あるいは赤血球だけしか産生しない単能性幹細胞までさまざまな段階の幹細胞が存在することはよく知られたことである。幹細胞移植では多能性幹細胞が最も重要であるが, この種の細胞は同定することが困難で, 臨床の実際面ではその数を算定して移植を行うまでには至っていない。そのため現段階では試験管内で幹細胞を培養し, 幹細胞コロニー形成法による顆粒球系幹細胞コロニー (CFU-GM: Colony Forming Unit-Granulocyte, Macrophage), 赤血球系幹細胞コロニー (BFU-E: Burst Forming Unit-Erythroid), 巨核球系幹細胞コロニー (CFU-MK: Colony Forming Unit-Megakaryocyte), 混合コロニー (CFU-mix)の数を算定し, 特にCFU-GM数が標準的指標にして移植が成功するだけの幹細胞があることを確認している。そこで臍帯血と骨髄血の中のこれら幹細胞数や幹細胞の質的な違いをコロニー形成法で比較検討した成績を述べる。

## 2. 臍帯血の造血幹細胞の特徴

臍帯血幹細胞は骨髄の幹細胞より質的に優れており増殖能力が高い。

### 2.1. 幹細胞コロニー形成法による検討

幹細胞コロニー形成法により検討した臍帯血幹細胞の特徴は小児や成人の骨髄それに比較し増殖能が著しく高いことである(6, 11)。われわれの検討した成績の概要は次のようである(6)。コロニー形成法はメチルセルロース法で, コロニー形成刺激因子としてG-CSF, エリスロポエチン, インターロイキン-3 (IL-3), Stem cell factor (SCF)を使用した。臍帯血は娩出直後の胎盤臍帯血管より採取した。対象とした骨髄は血液学的に異常のない検体である。図1に培養して2週間後, 臍帯血および骨髄血の幹細胞に由来するコロニー (血液細胞の集団)の位相差顕微鏡写真を示した。図で明らかなように臍帯血由来コロニーは骨髄のそれに比較して, 著しく大きなものが多数を占めており, 顕微鏡を使用しなくてもコロニーの種類がほぼ区別できるほどである。これらのことは増殖能の高い幹細胞が多数存在していることを示唆している。

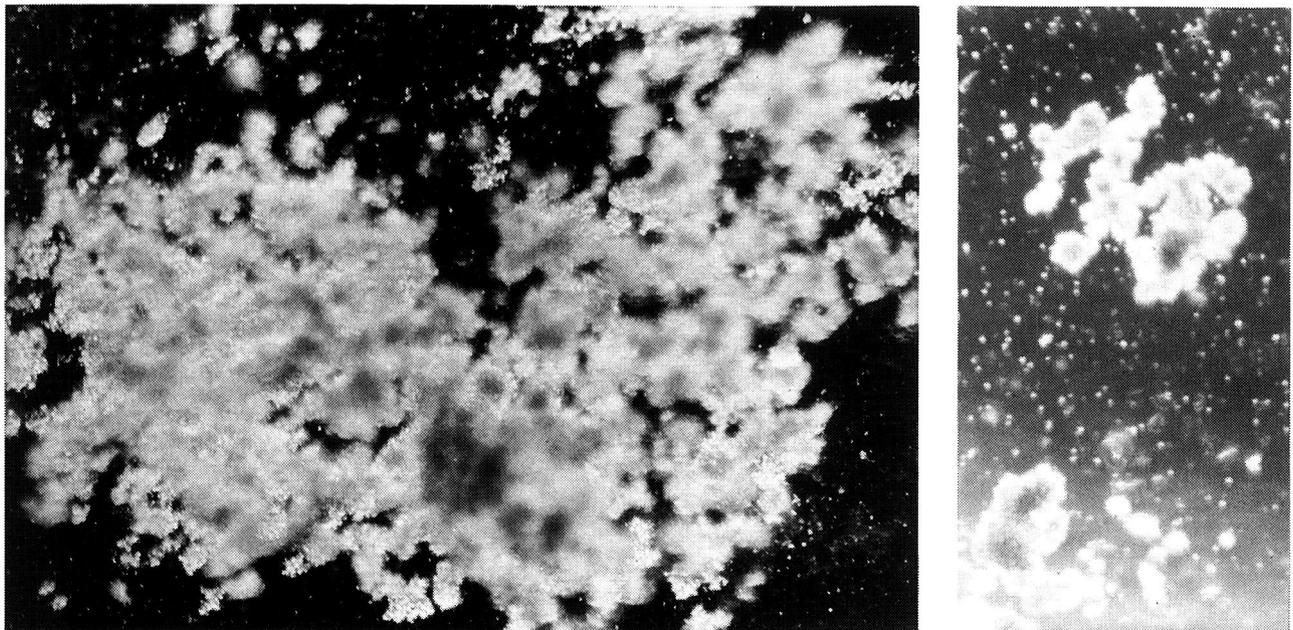


図1 赤血球コロニーの位相差顕微鏡写真  
(Original magnification,  $\times 40$ )  
左: 臍帯血由来; 右: 骨髄由来

## 2.2. 液体培養による幹細胞数の増加率

以上のことを量的に示すために試験管内でインターロイキン-3を添加した液体培養による幹細胞数の増加率につき臍帯血、骨髄を検討したわれわれの成績では、臍帯血では増加率は4.6倍から22.7倍、平均10.7倍であった。一方、骨髄では平均2.6倍であり、臍帯血の幹細胞は成人骨髄の幹細胞よりも約4倍高い増殖能がみられた。その他、国内外の多数の報告でも臍帯血には増殖能の高い未分化な細胞が多く、長期培養が可能で、量的ならびに質的に骨髄よりも幹細胞の供給源として優れていることが述べられている。臍帯血と骨髄細胞を液体培養で比較検討した実験成績では、臍帯血では3カ月以上も顆粒球の増殖がみられたが成人の骨髄や末梢血では2-3週後は増殖がみられなくなったとの報告、臍帯血では液体培養6週後も未分化な幹細胞コロニーをはじめ各種コロニーが検出されたとの報告もある。

このように臍帯血には骨髄に比し増殖能の高い未分化な幹細胞が多数存在していることは移植する細胞数が少なくても移植が成功する可能性が高いことを示唆しており、幹細胞移植に利用するに極めて有利なことである。

以上、幹細胞の質的な面で骨髄より優れていることを述べた。次に幹細胞の量的問題を述べる。

## 3. 臍帯血の幹細胞の密度

臍帯血には成人の末梢血液に比較して幹細胞数は著しく増加していることは以前から知られていた。われわれは18年前に在胎週数の少ない未熟児の臍帯血には成人の約100倍高い濃度で幹細胞が存在することを報告した。最近われわれは在胎週数別の臍帯血の1 ml中に含まれるCFU-GM, BFU-E, CFU-mixの数を検討した結果、在胎週数と相関関係がみられること、また多量の幹細胞が存在しており、臨床的に幹細胞移植への応用が可能であることが明らかになりました(4,7,10)。また、巨核球コロニーも多量に存在していることがrecombinant thrombopoietinを使用した培養方法で明らかになっている(18)。

## 4. 臍帯血の採取法と移植に必要な幹細胞の採取法

これまで述べたように臍帯血の幹細胞は増殖能が著しく高く幹細胞が質的に優れていること、ある一定量の血液中に存在する幹細胞数は成人末梢血液の50-100倍、骨髄移植のとき使用する骨髄血の5-10倍高い密度であることを述べました。しかし、分娩後の胎盤から採取できる臍帯血の血液量は限られているので採取方法を工夫する必要がある。次にわれわれの行っている採取方法を示す。

### 4.1. 胎盤から臍帯血を効率よく採取する方法

臍帯血採取は図2に示した臍帯血採取セットを使用して行った。すなわち、新生児が出産後、臍帯が切断され、次いで胎盤が娩出します。胎盤が出て来たなるべく早く臍帯血の採取を行うことがもっとも重要なことです。胎盤全体を10%イソジン液で消毒し、臍帯の血管にある血液を胎盤の方へ戻し、胎盤に近い部位で臍帯を切断します。臍帯を縛るのは通常分娩と同様に行い、臍帯静脈に7Frのカテーテルを挿入する。抗凝固剤(ACD液)の入った注射器をカテーテルに接続し血液を吸引して採血バックに入れる。これらの採取過程はすべて無菌操作が必要である(9)。

### 4.2. 採取可能な臍帯血液量

#### 4.2.1. 採取された血液量

検討された50個の胎盤では採取できた臍帯血の血液量は30mlから240mlで中央値80mlでありました。有核細胞総数は $1.5-11.6 \times 10^8$ (中央値  $4.15 \times 10^8$ )であった。

#### 4.2.2. 採取された臍帯血幹細胞総数(7)

一つの胎盤から一人の患者の移植に必要な幹細胞が採取可能か否かにつき、胎盤30検体を対象に検討したわれわれの結果を示す。幹細胞数はCFU-GM, BFU-E, CFU-mixの各コロニー数で示した。表1に示したようにCFU-GM数は $1.5 \times 10^5-33.1 \times 10^5$ (median  $5.3 \times 10^5$ )であり、BFU-E数は $1.1 \times 10^5-22.7 \times 10^5$ (median  $5.7 \times 10^5$ )、CFU-mixは $0.15 \times 10^5-2.7 \times 10^5$ (median  $0.72 \times 10^5$ )であった。

すでに多数例について臍帯血細胞移植を実施している Broxmeyer ら(4)の報告では採取されたCFU-

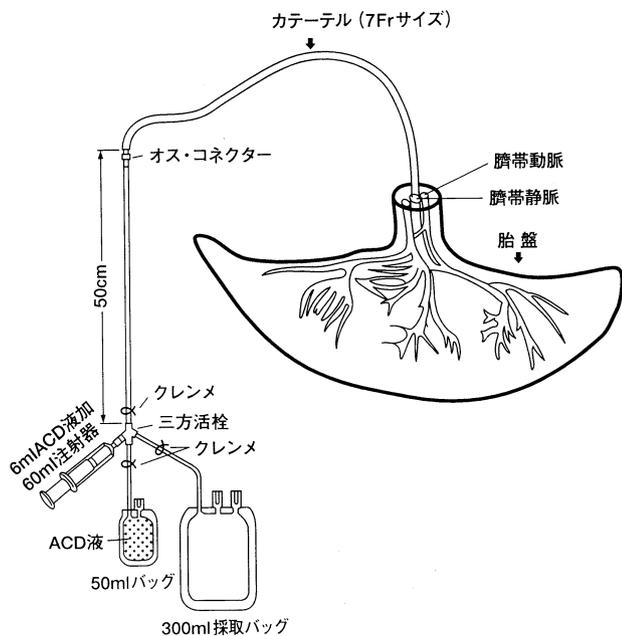


図2 胎盤臍帯血採取法  
(神奈川県立ごとも医療センター方式)

GM コロニー数は平均  $2.4 \times 10^5$  であったので、これとほぼ同程度の採取量であった。

### 5. 幹細胞移植療法に必要な幹細胞数

これまで報告されている臍帯血細胞移植例では移植に必要な CFU-GM 数は体重あたり  $2 \times 10^4$  コ/kg が標準的な数とされている (8)。したがって、今回のわれわれの採取量は体重 20-30kg 以下の患者に対しては移植に必要な幹細胞は得られたと思われる。すでに一般に行われている同種骨髄移植や末梢血幹細胞移植では CFU-GM 数は  $10^5$ /kg が必要とされているので、臍帯血幹細胞移植ではその 5 分のまたは 10 分の 1 で足りることになる。また、有核細胞数で比較しても同種骨髄移植の  $3 \times 10^8$ /kg に対し、臍帯血では  $4 \times 10^7$ /kg と約 10 分の 1 で生着している。このように、小児期における幹細胞移植の対象となる患者では臍帯血でも十分骨髄再構築が可能と思われる。

### 6. 臍帯血幹細胞移植の現状

Gluckman ら (5) は 1988 年に臍帯血幹細胞移植を行った。症例は 5 歳の男児、疾患は Fanconi 貧血、

表1 胎盤臍帯より採取可能幹細胞総数

CB	NCC	Total Number of Colonies		
		CFU-GM	BFU-E	CFU-mix
1.	$3.4 \times 10^8$	$3.5 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$0.55 \times 10^5$
2.	$2.4 \times 10^8$	$3.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$0.34 \times 10^5$
3.	$1.8 \times 10^8$	$4.9 \times 10^5$	$6.8 \times 10^5$	$0.71 \times 10^5$
4.	$10.8 \times 10^8$	$33.1 \times 10^5$	$20.5 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$
5.	$7.6 \times 10^8$	$14.9 \times 10^5$	$11.9 \times 10^5$	$1.07 \times 10^5$
6.	$1.3 \times 10^8$	$11.5 \times 10^5$	$22.7 \times 10^5$	$2.38 \times 10^5$
7.	$3.2 \times 10^8$	$5.9 \times 10^5$	$7.0 \times 10^5$	$0.56 \times 10^5$
8.	$3.6 \times 10^8$	$2.9 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$0.15 \times 10^5$
9.	$2.5 \times 10^8$	$1.5 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$0.23 \times 10^5$
10.	$5.6 \times 10^8$	$5.6 \times 10^5$	$3.0 \times 10^5$	$0.73 \times 10^5$
11.	$6.5 \times 10^8$	$2.2 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$0.31 \times 10^5$
12.	$4.5 \times 10^8$	$2.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^5$	$0.58 \times 10^5$
13.	$9.2 \times 10^8$	$10.2 \times 10^5$	$9.4 \times 10^5$	$1.50 \times 10^5$
14.	$8.1 \times 10^8$	$4.1 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$	$0.40 \times 10^5$
15.	$9.8 \times 10^8$	$5.3 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$0.50 \times 10^5$
16.	$2.3 \times 10^8$	$1.5 \times 10^5$	$2.2 \times 10^5$	$0.35 \times 10^5$
17.	$4.0 \times 10^8$	$1.8 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$	$0.65 \times 10^5$
18.	$13.0 \times 10^8$	$13.5 \times 10^5$	$11.2 \times 10^5$	$4.80 \times 10^5$
19.	$4.6 \times 10^8$	$2.9 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$0.64 \times 10^5$
20.	$4.8 \times 10^8$	$0.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$0.24 \times 10^5$
21.	$11.5 \times 10^8$	$6.4 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$4.95 \times 10^5$
22.	$9.6 \times 10^8$	$3.0 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$1.70 \times 10^5$
23.	$7.4 \times 10^8$	$6.7 \times 10^5$	$5.8 \times 10^5$	$2.07 \times 10^5$
24.	$9.7 \times 10^8$	$5.4 \times 10^5$	$7.3 \times 10^5$	$3.00 \times 10^5$
25.	$12.4 \times 10^8$	$11.7 \times 10^5$	$9.6 \times 10^5$	$3.94 \times 10^5$
26.	$1.6 \times 10^8$	$2.3 \times 10^5$	$1.7 \times 10^5$	$0.51 \times 10^5$
27.	$9.8 \times 10^8$	$3.3 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$1.90 \times 10^5$
28.	$16.3 \times 10^8$	$28.2 \times 10^5$	$35.1 \times 10^5$	$7.23 \times 10^5$
29.	$5.0 \times 10^8$	$5.2 \times 10^5$	$3.1 \times 10^5$	$1.30 \times 10^5$
30.	$19.2 \times 10^8$	$11.8 \times 10^5$	$5.4 \times 10^5$	$4.30 \times 10^5$
Range	1.3~19.2 $\times 10^8$	0.8~33.1 $\times 10^5$	1.2~35.1 $\times 10^5$	0.15~7.23 $\times 10^5$
Median	$5.2 \times 10^8$	$4.5 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$0.57 \times 10^5$

CB:placental cord blood, NCC:nucleated cell count

妹の臍帯血幹細胞を移植し生着が得られ、血も治癒している。その後、臍帯血幹細胞移植の症例は増加し、1995年9月までに欧米では同胞間および非血縁者間移植は150例以上に達している。臍帯血のドナーが同胞であった44例に関する Wagner らの成績は次のとおりである (8)。移植を受けた患者の年齢は 8 カ月から 16 歳であり、対象疾患は白血病などの小児がん 25 例、再生不良性貧血、先天性免疫不全など非腫瘍性疾患 19 例であった。患者の体重は 7kg-50kg、臍帯血と移植を受けた患者の HLA の一致例は 34 例、不一致例 10 例であった。移植された臍帯血の血液量は 42-282ml (中央値 100ml)、有核細胞数は  $1 \times 10^7$ - $33 \times 10^7$ /kg (中央値  $5.2 \times 10^7$ /kg) であり、移植 CFU-GM 数は中央値  $2.42 \times 10^4$ /kg であった。移植幹細胞生着率は約 80% であった。好中球数 500/ul 以上に達した日数は中央値 22 日 (12-46 日) であり、血小板 50,000/ul 以上に達した日数は中央値 49 日 (15-117 日) であった。急性 GVHD (grade II-IV) は 3% にみられ極めて少なかった。生存率は 1

年6カ月の時点で62%であった。死因は原病再発がもっとも多かった。HLAが半分しか一致してない(haplo-identical)臍帯血を移植して生着したとの報告もある(13, 14)。このように、HLAが一致しなくても、致死的なGVHDは現在のところみられていない。これらの報告から臍帯血幹細胞移植は骨髄移植に比較して移植有核細胞数は5分の1から10分の1で生着が得られており、またHLAは一部不適合でも致死的なGVHDは発生は少ないなどの有利な点がある。

## 7. 臍帯血幹細胞移植の利点と欠点

### 7.1. 利点：

- 1) 臍帯血採取は簡単で危険がまったくなく、提供者にたいする負担がない。
- 2) 移植に使用する細胞は凍結保存してあるので、必要なときにすぐに使用できる。
- 3) HLAが完全に一致しない移植でもGVHDが少ない。
- 4) 未分化な幹細胞数の密度が高く、少量の臍帯血(体重1kg当たり3-5ml)で移植が成功する。

### 7.2. 欠点：

- 1) 採取量に限度があり、体重30-40kg程度までの患者にしか移植できない。
- 2) 分娩の時間は決まってないので、臍帯血を採取するスタッフの確保がやや困難である。
- 3) 細胞保存のための費用がかかる。

## 8. 臍帯血バンク

これまで述べたように小児の同胞間では臍帯血幹細胞移植は骨髄移植に劣らない成績が得られている。そこで、次の段階として臍帯血幹細胞バンクを設立し、非血縁者間でも臍帯血幹細胞を利用した移植が可能になるようなシステムが出来れば、骨髄バンクのドナー不足をある程度解消できるものと思われる。欧米では臍帯血バンクを利用した移植が開始されている(15~17)。米国では約5億円の研究費用を政府が拠出しニューヨーク血液センターのRubinstein博士ら中心になり臍帯血を保存している。ヨーロッパではパリのGluckman教授らが中心

になりEUROCORDと呼ばれる臍帯血バンクを設立した。これら臍帯血バンクを利用した非血縁者間の移植はすでに90例に達し成果を上げている。

## 9. 神奈川臍帯血バンクの設立

平成7年9月に神奈川県立こども医療センター、横浜市立大学、横浜市立愛児センター、昭和大学藤が丘病院、神奈川赤十字血液センターなどが中心になり神奈川臍帯血バンクを設立し、臍帯血の保存を開始し非血縁者間でも臍帯血幹細胞移植が出来るように計画している。これを設立するには多くの解決しなければならない問題があり、特に保存、血液検査(HLAなど)に必要な経費がもっとも大きなことである。これは国、地方自治体など公的資金の援助が是非とも必要である。臍帯血を実際に採取するスタッフも問題である。これには産科医の理解と協力が必須条件である。これらの問題が解決出来たら、本邦では1年に約100万件の分娩があるので、その10分の1でも臍帯血が採取でき、保存システムを整備されたら、小児で幹細胞移植を必要としている患者の大部分のドナーの代わりを臍帯血で充足するものと思われる。現在すでに機能している骨髄バンクと連携することにより、造血幹細胞移植療法はさらに完全なものになるものと思われる。したがって今後、臍帯血細胞移植は幹細胞移植療法の分野で重要な地位を占めるものとおもわれる。

## 参考文献

- 1) Thomas ED, Storb R, Clift RA, *et al.* : Bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.* **292** : 832, 1975.
- 2) 西平浩一, 気賀沢寿人, 鈴木信寛ら : 小児がんおよび血液疾患に対する骨髄移植の経験. *日小血会誌* **1** : 112, 1987.
- 3) 大沼圭, 豊田恭徳, 西平浩一ら : 臍帯血幹細胞移植を施行した急性前骨髄球性白血病の一例. 第18回日本骨髄移植研究会抄録, 1996 ; p.89.
- 4) Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, *et al.* : Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA 86 : 3828-3832, 1989.
- 5) Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, *et al.* : Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* **321** : 1174, 1989.
  - 6) 西平浩一, 本多康次郎, 豊田恭徳 : 臍帯血幹細胞移植療法および臍帯血幹細胞バンク. 今日の移植 **7** : 451-460, 1994.
  - 7) 西平浩一, 本多康次郎, 豊田恭徳ら : 臍帯血幹細胞移植療法に関する研究—胎盤臍帯血より採取可能な造血幹細胞総数について. 日本小児血液学会雑誌 **9** : 13-17, 1995.
  - 8) Wagner JE, Ernán NA, Steinbuch M, *et al.* : Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* **346** : 214-219, 1995.
  - 9) 西平浩一, 豊田恭徳, 本多康次郎 : 臍帯血幹細胞移植ならびに末梢血幹細胞移植. 小児科 **36** : 329-338, 1995.
  - 10) 西平浩一, 豊田恭徳 : 在胎週数別の新生児末梢血液および臍帯血の造血幹細胞数ならびに増殖能に関する検討. 日小血会誌 **7** : 558-563, 1993.
  - 11) Nishihira H, Kigasawa H : Growth of human erythroid and erythro-granulocytic colonies in culture without addition of exogenous erythropoietin. *Br. J. Haematol.* **49** : 563-567, 1981.
  - 12) Wagner JE, Kernan NA, Broxmeyer HE, *et al.* : Allogeneic umbilical cord blood transplantation: Report of results in 26 patients. *Blood* **82**(Suppl. 1) : 86a, 1993.
  - 13) Kurtzberg J, Miller S, Ciocci G, *et al.* : Haploidentical transplantation of umbilical cord blood mononuclear cells in a pediatric patient. *Blood* **82**(Suppl. 1) : 634a, 1993.
  - 14) Jouet JP, Noel MP, Facon T, *et al.* : Haploidentical familial cord blood transplantation in a case of refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **86**(Suppl 1) : 3790, 1995.
  - 15) Stone R : Banking on umbilical cords. *Science* **257** : 615-616, 1992.
  - 16) Gluckman E, Devergle A, Thierry D, *et al.* : Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplantation* **9** (Suppl. 1) : 114-117, 1992.
  - 17) Kurtzberg J, Laughlin M, Olsen SJ, *et al.* : Umbilical cord blood : An alternative source of hemopoietic stem cells for bone marrow reconstitution in unrelated donor. *Blood* **86** (Suppl 1) : 1147, 1995.
  - 18) Nishihira H, Toyoda Y, Miyazaki A, *et al.* : Growth of macroscopic human megakaryocyte colony from cord blood in culture with recombinant human thrombopoietin and the effects of gestational age on frequency of colonies. *Brit. J. Haematol.* **92** : 1996 (in press).

## 〔最新情報：“玉手箱”〕

## 最新アリル情報

小林 賢

防衛医科大学校, 検査部

## 1. はじめに

前号では、1995年の命名委員会が発表したHLA命名表などを掲載した(1)。今回は、前号の原稿を書き上げた直後にクラスIおよびクラスIIのDNA塩基配列がTissue Antigensに掲載された(2)ので、それに基づいてDR-Bについての塩基配列を載せることにした。

## 2. 塩基配列の訂正

以前に発表されたclass II塩基配列(3,4)でミスが判明したものの[DQA1\*01021 (DQA1\*0102), DQA1\*0302, DQA1\*05013, DQB1\*06011, DPA1\*02011 (DPA1\*0201)]については修正がなされている。表1にその訂正箇所を示す。

表1. 塩基配列の訂正

アリル	コドン	旧	新
DQA1*01021	134	GAT	GGT
	157	CTT	CTC
	158	CCC	CCT
DQA1*0302	7	CAC	CAT
DQA1*05013	201	GGA	GGG
DQB1*06011	51	ACC	ACG
DPA1*0201	228	ACC	CCC

## 3. 塩基配列およびアミノ酸配列のファイル入手方法

Tissue Antigensに掲載された塩基配列については、インターネットを利用することによりHLA領域の塩基配列およびアミノ酸配列(class I, class

II, TAP)をコンピューターファイル(テキストファイル)として入手することができる。インターネットにアクセスしてファイルをコンピューターに得る(get)には次のような2つの方法がある。

## 3.1. FTP (File Transfer Protocol) と呼ばれるプロトコルを使用する方法

マッキントッシュコンピューターを例にすると、各施設でインターネットに接続している場合には、もっとも一般的なFTPツールであるFetchというアプリケーションをダブルクリックして立ちあげる。これはフリーソフトであるので、インターネット関係の書籍に付属したCD-ROMに収録されているので簡単に入手できる。Fetchが立ち上がると、図1のウインドウが表示される。続いて、Host欄に“ftp.ebi.ac.uk”と入力し、次にDirectory欄に“/pub/databases/hla”と入力する。なお、User IDは“anonymous”のままにしておく。またPasswordは自分のアドレスをフルに入力する。最後にOKをクリックすると、図1の上を示したウインドウに転送できるファイル名が表示される。目的としたファイルをクリックし、“Get file...”をクリックすると自分のコンピューターにファイルが転送・保存される。もし、複数のファイルを同時に転送したい場合は、“shift”キーを押しながら、必要なファイル名をクリックする。ここで保存されたファイルはテキスト形式であるのですべてのマッキントッシュ、ウインドウズを問わず、どのワープロソフトでも開くことが可能である。

今後もアクセスすることがある場合には、ログインしている間に“Add Bookmarks”コマンドでFetchにアドレスを登録しておくことができる。

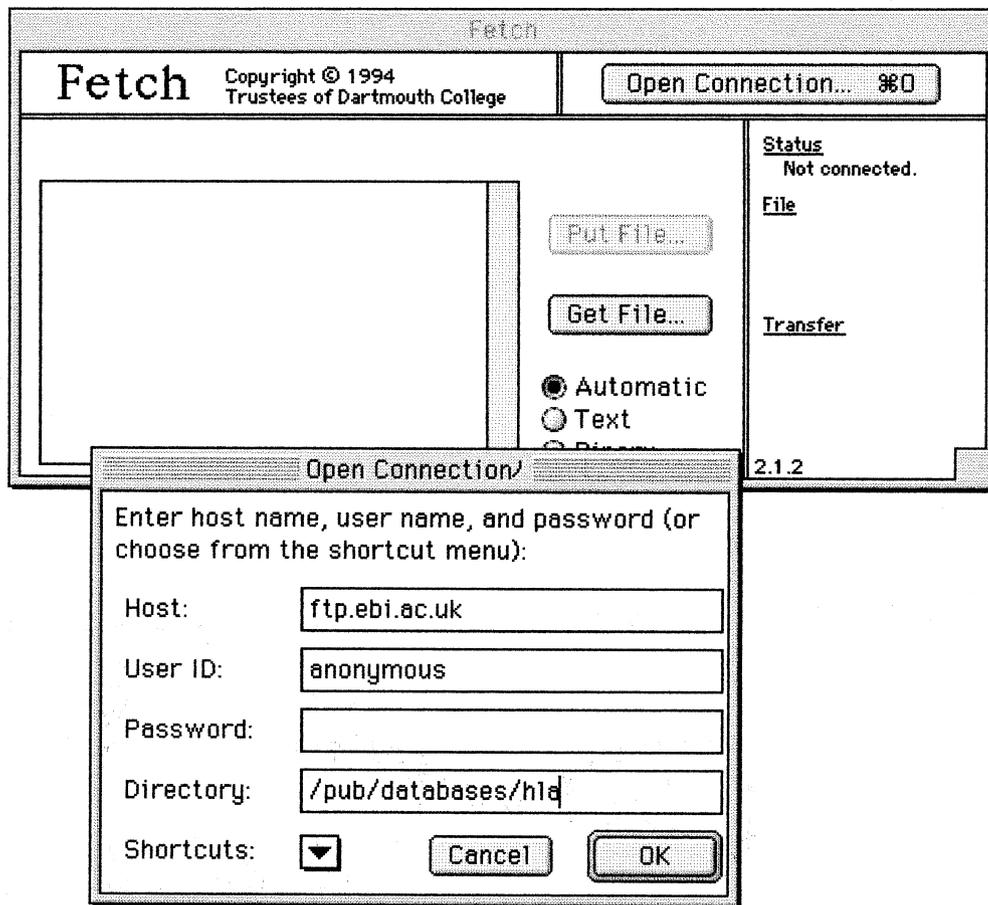


図1. FTPドライバFetchの入力ウインドウ

各自でインターネットプロバイダーと契約している場合には、MacTCPを各自のインターネットサーバに設定し、PPP (Point to Point Protocol) を利用するためのMacPPPドライバ (これは2種類のファイルからなり、ひとつはconfigPPPでコントロールパネル内にある。もう一つはPPPで機能拡張フォルダに納められている) でそのプロバイダーにダイアルアップIP接続する。それ以降の操作方法は全く同じである。MacPPPもインターネット関連書籍の付録として入手できる。なお、MacTCPはMacOS漢字Talk 7.1以上のシステムに含まれている。

### 3.2. e-mail を利用して転送する方法

マッキントッシュを例にすると、Eudora-Jがe-mailアプリケーションとして広く利用されている。初めてEudora-Jを使用する場合は、操作メニューの設定変更を選択し、必要事項を入力する。次にe-

mailの送信アドレスを“Netserv@ebi.ac.uk”に設定し、最初の送信文入力行に“HELP HLA”と入力した後、送信する。すぐに返事が届くのでその内容を開いて、次に行う手順と利用可能なファイル名を確認する。再び、最初の送信文入力行に“GET HLA: xxxx”と入力し、同じアドレスに返信するとそのデータがe-mailで送られてくる。なお、xxxxはファイル名を表す。

### 3.3. インターネットを利用できない方

マッキントッシュ、Windowsのいずれの形式で使用するかを明記して、筆者まで3.5インチ2HDフロッピーディスクを送っていただければ、希望遺伝子座の塩基配列ファイルをコピーして返送する。

## 4. HLA-DRB の塩基配列

DRB 遺伝子座の塩基配列を図2に示す。

DRB sequences

	1	10	20	30
DRB1*0101	GGG GAC ACC CGA CCA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA TGT CAT TTC TTC AAT GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTG CTG GAA AGA TGC ATC TAT AAC CAA			
DRB1*0102	---	---	---	---
DRB1*0103	---	---	---	---
DRB1*0104	---	---	---	---
DRB1*15011	---	---	---	---
DRB1*15012	---	---	---	---
DRB1*15021	---	---	---	---
DRB1*15022	---	---	---	---
DRB1*1503	---	---	---	---
DRB1*1504	---	---	---	---
DRB1*1505	---	---	---	---
DRB1*1601	---	---	---	---
DRB1*1602	---	---	---	---
DRB1*1603	---	---	---	---
DRB1*1604	---	---	---	---
DRB1*1605	---	---	---	---
DRB1*1606	---	---	---	---
DRB1*03011	---	---	---	---
DRB1*03012	---	---	---	---
DRB1*0302	---	---	---	---
DRB1*0303	---	---	---	---
DRB1*0304	---	---	---	---
DRB1*0305	---	---	---	---
DRB1*0401	---	---	---	---
DRB1*0402	---	---	---	---
DRB1*0403	---	---	---	---
DRB1*0404	---	---	---	---
DRB1*0405	---	---	---	---
DRB1*0406	---	---	---	---
DRB1*0407	---	---	---	---
DRB1*0408	---	---	---	---
DRB1*0409	---	---	---	---
DRB1*0410	---	---	---	---
DRB1*0411	---	---	---	---
DRB1*0412	---	---	---	---
DRB1*0413	---	---	---	---
DRB1*0414	---	---	---	---
DRB1*0415	---	---	---	---
DRB1*0416	---	---	---	---
DRB1*0417	---	---	---	---
DRB1*0418	---	---	---	---
DRB1*0419	---	---	---	---
DRB1*0420	---	---	---	---
DRB1*0421	---	---	---	---
DRB1*0422	---	---	---	---
DRB1*11011	---	---	---	---
DRB1*11012	---	---	---	---
DRB1*1102	---	---	---	---
DRB1*1103	---	---	---	---
DRB1*11041	---	---	---	---
DRB1*11042	---	---	---	---
DRB1*1105	---	---	---	---
DRB1*1106	---	---	---	---
DRB1*1107	---	---	---	---
DRB1*11081	---	---	---	---
DRB1*11082	---	---	---	---
DRB1*1109	---	---	---	---
DRB1*1110	---	---	---	---
DRB1*1111	---	---	---	---
DRB1*1112	---	---	---	---
DRB1*1113	---	---	---	---
DRB1*1114	---	---	---	---
DRB1*1115	---	---	---	---
DRB1*1116	---	---	---	---
DRB1*1117	---	---	---	---
DRB1*1118	---	---	---	---
DRB1*1119	---	---	---	---
DRB1*1120	---	---	---	---
DRB1*1121	---	---	---	---
DRB1*1122	---	---	---	---
DRB1*1201	---	---	---	---
DRB1*12021	---	---	---	---
DRB1*12022	---	---	---	---
DRB1*12031	---	---	---	---
DRB1*12032	---	---	---	---
DRB1*1301	---	---	---	---
DRB1*1302	---	---	---	---
DRB1*1303	---	---	---	---
DRB1*1304	---	---	---	---
DRB1*1305	---	---	---	---
DRB1*1306	---	---	---	---
DRB1*1307	---	---	---	---
DRB1*1308	---	---	---	---
DRB1*1309	---	---	---	---
DRB1*1310	---	---	---	---
DRB1*1311	---	---	---	---
DRB1*1312	---	---	---	---
DRB1*1314	---	---	---	---
DRB1*1315	---	---	---	---
DRB1*1316	---	---	---	---
DRB1*1317	---	---	---	---
DRB1*1318	---	---	---	---
DRB1*1319	---	---	---	---
DRB1*1320	---	---	---	---
DRB1*1321	---	---	---	---
DRB1*1322	---	---	---	---
DRB1*0101	GGG GAC ACC CGA CCA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA TGT CAT TTC TTC AAT GGG ACG GAG CGG GTG CGG TTG CTG GAA AGA TGC ATC TAT AAC CAA			

図2-1. HLA-DRB1の塩基配列















## 5. おわりに

今後、組織適合性学会誌では定期的に「最新アレル情報」で HLA の命名や塩基配列を掲載していく予定にしている。今回掲載できなかった DQ, DP や TAP などについては次回に載せる予定である。また、これらのデータはテキストファイルとして必要な方に配布していく予定である。必要な方は、フロッピーディスクを同封し、防衛医大検査部 小林賢までご連絡ください。

## 参考文献

1. 小林 賢：最新アレル情報。 *MHC* 2:71-75, 1995.
2. Marsh SG, Bodmer JG: HLA class II region nucleotide sequences, 1995. *Tissue Antigens* 45: 258-280, 1995.
3. Marsh SG, Bodmer JG: HLA class II nucleotide sequences, 1991. *Tissue Antigens* 37: 181-189, 1991.
4. Marsh SG, Bodmer JG: HLA class II nucleotide sequences, 1992. *Tissue Antigens* 40: 229-243, 1992.

## 〔海外ラボ紹介〕 Tissue Typing Laboratory, UCLA —Paul I. Terasaki 教授の研究室—

三石 瑤子

UCLA, Tissue Typing Laboratory

私が現在勤務している UCLA Tissue Typing Laboratory は今年で設立32年目を迎え、1963年に Dr. Paul I. TERASAKI によりわずか4人で出発して以来、HLA と臓器移植における数々の輝かしい研究業績と数年の滞在の後、世界各国に散らばってそれぞれの分野で活躍している多くの優秀な研究者を育ててきたという意味において、その果たして来た役割は小さいものではないと思います。特に Dr. TERASAKI が日系人であるという意味からも、彼が日本という国と日本人研究者によせる親愛感とは特別のものがあると私には感じられます。研究所は Los Angeles 盆地のやや西北に位置する Westwood Village にあり、州立カリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) のキャンパスに隣接する3つの建物に分かれており、常時約120人の研究者および臨床検査技師が働いています。ウエストウッドといえば、ビバリーヒルズやベルエアなどのいわゆる高級住宅街に近接しており、ロサンゼルスでは唯一夜間でも外出可能な場所で、ご存知の方も多いかと思いますが、最近ではドジャーズの野茂選手や松田聖子のような日本の芸能人も住んでいます。北極海から来る寒流にほどよく冷やされた冷たい風が、雲のない紺碧の空から照りつける強い日差しと調和して、一年中季節知らずの花々が咲き、いささか手塚治虫の物語に登場する疑似自然の世界の中にいる様な錯覚に陥るのは、多分天気というものは1年の半分位は悪いのが当たり前だという私の偏見によるものかも知れません。私がここに移って来てからも随分たくさんの日本のドクターとお付き合いしましたが、カリフォルニアにこの蒼い空があるかぎりどんなことでも我慢できるという一つ言葉があります。この空の事だけは何を言っても書いてお

こうと思った一つの理由です。随分話がそれてしまいました。Terasaki Lab の話に戻りましょう。この研究所は大きくわけて3つのグループに分かれていて、まず、血清学的タイピングのグループ、次は DNA タイピング、そして漸次アップデートされる UNOS のデータベースを元に数十の独自のパラメーターを駆使して腎移植、肝臓移植、心臓移植等の成績の再検討を行い、“Clinical transplantation” を年に一度定例出版しているグループがあります。血清学的タイピングのグループは更に抗体特異性をチェックしてトレイをつくっているグループと一度に千の単位で大量の HLA タイピングを行っているグループに分かれます。DNA タイピングのグループはクラス I とクラス II に分かれ、血清やその他様々の検体から抽出した DNA をもちいてこれも数百のレベルでそれぞれ DNA タイピングを行っています。タイピングの方法も各種のものが用途に合わせて用いられており、たとえば PCR-SSP, PCR-RFLP, PCR-SSCP 等のほか、この研究所特有のものとしてマイクロトレイを用いた方法も試されています。そのほかに NK 活性や CTL 活性を検出する方法としてマイクロトレイで少量の細胞しか使わない実用的な方法を行っているグループや、フローサイトメトリー法でクロスマッチを行っているグループ、サイクロスポリンの血中レベルを測って移植後の患者のフォローアップを行っているグループ、さらに ELISA 法による術後癌患者の癌抗原の動向を調べている小さなグループもあります。年に一回行われる ASHI の定例会には30人からの人がこの研究所から参加し、一大勢力を形成するのを見るたびに、私のようなフランスの小さな研究所に8年も滞在した人間にはふと何か壮絶なものを見てい

るような感慨にふけることがあります。現時点におけるこのラボの研究には次のようなものがあります。まず、HLA クラス I とクラス II の DNA タイピングおよびダイレクトシーケンシングの確立、臍帯血移植のグループとの共同研究、メラノーマ患者にたいしてワクチン療法を勢力的に行っている臨床グループとの共同研究や末期癌患者に対する HLA 半適合の輸血による治療を行っているグループとの共同研究、それからトキソプラスモージスに対する被患性と HLA との相関性を調べる共同研究等が進められています。一方、長年にわたり世界中の HLA タイピングの向上に貢献してきた INTERNATIONAL CELL EXCHANGE は、新しい段階を迎え、昨年のはじめから同じサンプルを血清学的タイピングを行っているグループと DNA HLA-クラス I タイピングや HLA-クラス I シーケンスを行っているグループに同時に送りデータを比較することによって、数多くの新しいサブタイプの発見と今まで曖昧であった幾つかの HLA 抗原たとえば HLA-B15 の正しいタイピングに関しての新しい情報などが蓄積されています。また、DNA EXCHANGE とともに、クラス II の DNA タイピングの標準化にも貢献しています。そのほかにも HLA-G を分子生物学的方法を用いてその発現や機能を調べる実験も進められています。一方、腎移植には HLA の 6 抗原の一致が理想的と考えられていて、現在 ROPA のプログラムで 6 抗原一致のレシピアントが見つかった場合は 2 つのうち 1 つはそこに送ることになっています。これらの例においては、生体移植の移植成績に匹敵する良好な結果が得られていますが、まず、症例数が限られていることと、しばしば遠距離まで輸送する必要から腎機能が低下するという外科医からの批判も多かったのですが、それに代わるものとして提案されている方法が数年にわたりこの研究所で Dr. Takemoto を中心に研究されています。それは、単なる HLA 抗原の一致ではなく生体腎移植によって見いだされたパーミッシブルな抗原を一致させる方法で、パーミッシブルな抗原の一致を目指すことにより 6 抗原一致に準ずる良好な成績が UCLA データのみならずオランダのライデンからのデータにも明らかに表されてい

ます。この研究の発端となったのは 2 年間この研究所に滞在された京都日赤の丸屋悦子さんの素晴らしい研究であり、それををもとにして行われた Dr. Takemoto のコンピューターを駆使した膨大なデータの解析の成果であります。今日の HLA に関わる研究者の大きな課題と思われるのは更なるタイピングの方法の改善によって可能な限り正確に、ありとあらゆるシーケンスされたサブタイプを検出する事だとは思いますが、日々急速な勢いでその数を増している新しいサブタイプを前にいささか途方に暮れている方も多いのではないのでしょうか。今、急務と思われるのは、免疫原性という観点からの新しいヒエラルキーの確立であり、どのエピトープが最も重要でありどれが無視可能かということを見極める段階に入っていると考えられます。

UCLA Tissue Typing Lab もご多分に漏れず経済問題は常に頭を悩ませる大きな課題であります。それは、近年の NIH の急激な財政緊縮に伴うグラントの減少や、移植の世界において、サイクロスポリンや FK504 などによる免疫抑制剤の発達に伴って HLA のタイピングは臓器移植には不必要だと考える外科医も多く、不況と共に医療費を削減しようという社会的要求や大企業の進出に伴う HLA タイピングの過当競争は必然的に急激なコストダウンをもたらす研究所としてはかつて経験したことのない生き残るための体質改善を要求されているように思われます。こういう現象は大なり小なり世界中の多くの HLA の研究所で感じ始められていることではないでしょうか。

人間様の憂鬱をよそに、カリフォルニアの蒼い空は永遠であり、今日もまた楽園のランチタイムの時間を迎えております。

## (国際学会印象記) 第21回 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) ミーティングに参加して

丸屋 悦子

京都府赤十字血液センター, 研究部

### はじめに

第21回 ASHI は1995年10月6日から11日まで、テキサス州、ダラスで開催された。会場の Anatole Hotel は downtown から車でおよそ20~30分くらい離れたところにある。ひときわそそり立つビルディングと数個の建物からなる大きなホテルで、その最上階からは地平線がみえるほど広い平野にポツポツとビルディングが立ち、その間をハイウェイが走っている様子が眺められる、そんなところである。私はこの学会に初めて参加した。まず私の学会に関する印象記を、次に The ROSE PAYNE 賞を受けられた Dr. Peter Cresswell の講演と特に印象に残った演題について話す。

### ASHI 印象記

日本の組織適合性学会と比較して規模の大きさ(ホテル全体が学会場とその宿泊施設)と組織適合性に関する限り、ほとんどすべてを網羅するテーマが扱われる。組織適合性抗原が関与する免疫遺伝学の基礎的研究からその臨床応用にいたるまでが5日間に分配されている。すなわち、大きなテーマごとにほぼ1日が割り当てられ、例えばある日は tolerance について基礎から臨床までの研究発表がなされる。主に Plenary session でその分野の活発な研究者による概論および最新情報について講義され、Abstract presentation でより細部の研究成果が発表される。他方 Workshop でそのテーマの基礎的な解説および現在解明されているところを解りやすく解説する講演がなされる。また Workshop には組織適合性抗原検査法—例えば HLA-class I の DNA typing 法などの検討や、DNA Lab の管理のしかた—DNA コンタミネーションの防止法につい

での指導、組織適合性抗原検査の quality control 法など臨床に应用されている検査技術精度を保つための検討会もある。このように、専門家からビギナーまで幅広く楽しめる学会であると感じた。また、学会での研究成果を次の全体的な進歩に上手に利用している点も印象的であった。例えば、組織適合性抗原の種々の新しい検査法の開発がなされ、それらの検査法により検出される抗原が臨床的に重要である研究成果が得られた場合、参加者により種々の検査法について討論がなされ、最も良い評価をうけた検査法を標準法として決定する。以後この検査については、すべての Lab が決められた方法を行う(もちろん方法が複数ある場合もある)。これは ASHI により認可された方法となり、ASHI が責任をもって QC を行う。ASHI のミーティングでは、この検査法について実施 Lab からの評価と QC の結果から、欠陥がみいだされた場合は改良が加えられより良い方法へと進化させて行く方式がとられている(例えば非血縁間骨髄移植で HLA-class I の allele typing が重要であると結果がでた場合などが良い例)。このように莫大な経費を費やす学会を無駄なく利用するのはアメリカが合理的な社会で、ほとんどが話し合いと契約により成り立っているからであろうか。われわれの組織適合性学会も将来このようなことができるほど、信頼される学会で実際的な一面が持てることを期待する。参加者はもちろんアメリカ人がほとんどであるが、ヨーロッパやオーストラリアの研究者の参加もあり、日本からは6施設、10名ほどの参加者があった。演題数335、10の plenary session があり、各テーマの lecture 総数33、18の Workshop があった。朝8時から夜7時まで Plenary session の lecture と Workshop およ

び abstract presentation, poster session (7日と9日)とびっしり勉強?, 午前, 午後および昼食の3回休憩時間がある。その後, 企業主催の新しい技術のデモンストレーションやユーザーによる使用経験の報告およびそれに関する討論会が催された。日本では経験のない, 連日ハードスケジュールな学会で英語の嵐の中にいたが, そのすばらしさに感激し, 参加できたことに感謝した(早速メンバーに加入してしまった。語学の高い壁があるにもかかわらず)。

### ASHI の Award について

ASHI ミーティングでは3種類のAWARDが送られる。THE ROSE PAYNE DISTINGUISHED SCIENTIST AWARD (Peter Cresswell, PhD), Outstanding Technologist Award (Patric W. Adams, MS, CHS) と335のabstractから選ばれる 'ASHI SCHOLARS'(今年Mayo Clinicの2名の研究者 J Baisch, E Zanelli:後に【印象深い演題】の1番目に紹介する, Columbia大学の研究者 A Colovai および Calgary大学の研究者 P Santamaria の4名)である。このうち The ROSE PAYNE 賞は1985年よりはじめられ, Dr. Rose Payne (HLAの母)は30年にわたり HLA 分野に貢献し他の研究者を助け, 知識の共有をいつも心掛けていた人であった。この賞はそのような研究者に与えられるのである(いままでに Walter Bodmer, Jack Strominger, Hugh McDevitt, Paul Terasaki, Bernard Amos, Henry A. Erlich, Johannes J van Rood, Edmond J. Yunis, Peter R. Parham, Bo Dupontらが受賞している)。今年受賞者である Dr. Peter Cresswell はイギリス生まれの研究者でロンドン大学の Biochemistry/Immunology で PhD. をとり, HLA class I 分子の分離と精製の先駆者の一人である。その後, Dr. Jack Strominger や Dr. Bernard Amos などと仕事をした。彼のおもな研究テーマは抗原提示における MHC 分子の機能解明, MHC の割れ目にどのようにしてペプチドがはいっているのか? HLA-class II の invariant chain の役割, HLA-class I と TAP の関係などについてである。現在 Yale 大学の Immunology の教授であり, Howard Hughes Medi-

cal Institute の研究者である。彼の lecture はいったるところにジョークが入り, 本人もそれを楽しんでいるような明るいドクターであった。

### Peter Cresswell: Antigen Processing mechanism

私の研究グループは“ペプチドがどのようにして MHC 分子の溝の中に入り込むのか”に興味をもって研究している。HLA-class I と II の分子像を眺める (HLA-class I と II の分子全体を側面からとらえた像) と, HLA-class I は大きな蛋白 (heavy chain) と小さな蛋白 ( $\beta$ -microglobulin) が会合し, ペプチドは heavy chain のはじめのふたつのドメインの間に挟まれている。HLA-class II のペプチド結合状態をみると, HLA-class I と同様であるが, これに関わるふたつの蛋白分子 ( $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖) はともに膜貫通分子である。この点が HLA-class I と II で大きく異なるところである。しかし驚くべきことにこのふたつの分子を膜表面からみた構造 (スライドでは上下に  $\alpha$  ヘリックスがあり底面が  $\beta$  シートである構造, およびそれを側面から眺めた構造; HLA-A2 と DR1 をだぶらせて描いている) は驚くほど類似している。ではどのようにしてペプチドが MHC 分子の溝の中へ運ばれるのかといった疑問が生まれる。

### Class I の抗原提示

HLA-class I の場合を図1に示す。Cytosome 内の蛋白は Proteasome (ふたつのサブユニットからなり, 第6染色体の MHC 領域に遺伝子 LMP2, LMP7 が存在する) によりペプチドに分解される。粗面小胞体上にある TAP (TAP1, TAP2 のサブユニットからなる: 遺伝子は MHC 領域にある) が小胞体内へ ATP ハイドロシスを使ってペプチドを運搬する。次に HLA-class I とペプチドがどのように assemble するかをまとめる。小胞体内で合成された heavy chain がシャペロンである calnexin と物理的にむすばれ,  $\beta$ -microglobulin が近づくとも calnexin と heavy chain は物理的に解離し heavy chain と  $\beta$ -microglobulin が結ばれる。一時的に MHC の溝の中は空の状態があり, つぎに HLA-class I 分子は物理的に TAP と結合する。ペプチド

が TAP をかいして MHC 分子の溝にはまる。

**Class II の抗原プロセッシングと提示**

では HLA-class II の場合を考えてみる。HLA-class II はまるで違った方法で antigen processing が行われる。基本的には図 2 に示すように endoplasmic reticulum (ER) で  $\alpha$ ,  $\beta$  鎖と invariant chain (I) が会合し Golgi apparatus をとって trans-Golgi network を介して endosome/lysosome system の early endosome に外来性の蛋白と  $\alpha$ ,  $\beta$ , I の会合体が集まり lysosome で蛋白はペプチドに分解され,  $\alpha$ ,  $\beta$ , I の会合体は invariant chain がはずれ, 何らかの方法で  $\alpha$ ,  $\beta$  鎖とペプチドの complex ができあがる。そしてその産物は lysosome または trans Golgi から plasma membrane に運ばれると考えられている。invariant chain には 4 つの isoform (p33, p35, p41, p43) が

あり, ER では trimer を形成している。図 3 に ER での  $\alpha$ ,  $\beta$ , I の会合の様式図を示す。ではどのようにして空の MHC 分子ができ, ペプチドが挿入されるかが問題となる。これを解明するための証拠を与えた mutant cell (T2) がある。この cell (HLA-A2, B5 gene 以外の MHC 領域の遺伝子が欠損している) に DR 遺伝子を挿入し, MHC class II 分子の溝に挟まれているペプチドを調べると, invariant chain の 81 番目~104 番目のアミノ酸からなる 7 種類の長さ異なるペプチドが検出された。それを CLIP (class II associated invariant chain peptide) と名付けた。ではどのように CLIP が MHC class II 分子の溝に入るのだろうか。図 4 (A, B) に示すようなふたつの方法が考えられるが, A であろうと推測している。つぎにこの cell が外来タンパク由来のペプチド (antigenic peptide) をひとつも MHC class II 分子の溝に提示しなかったの

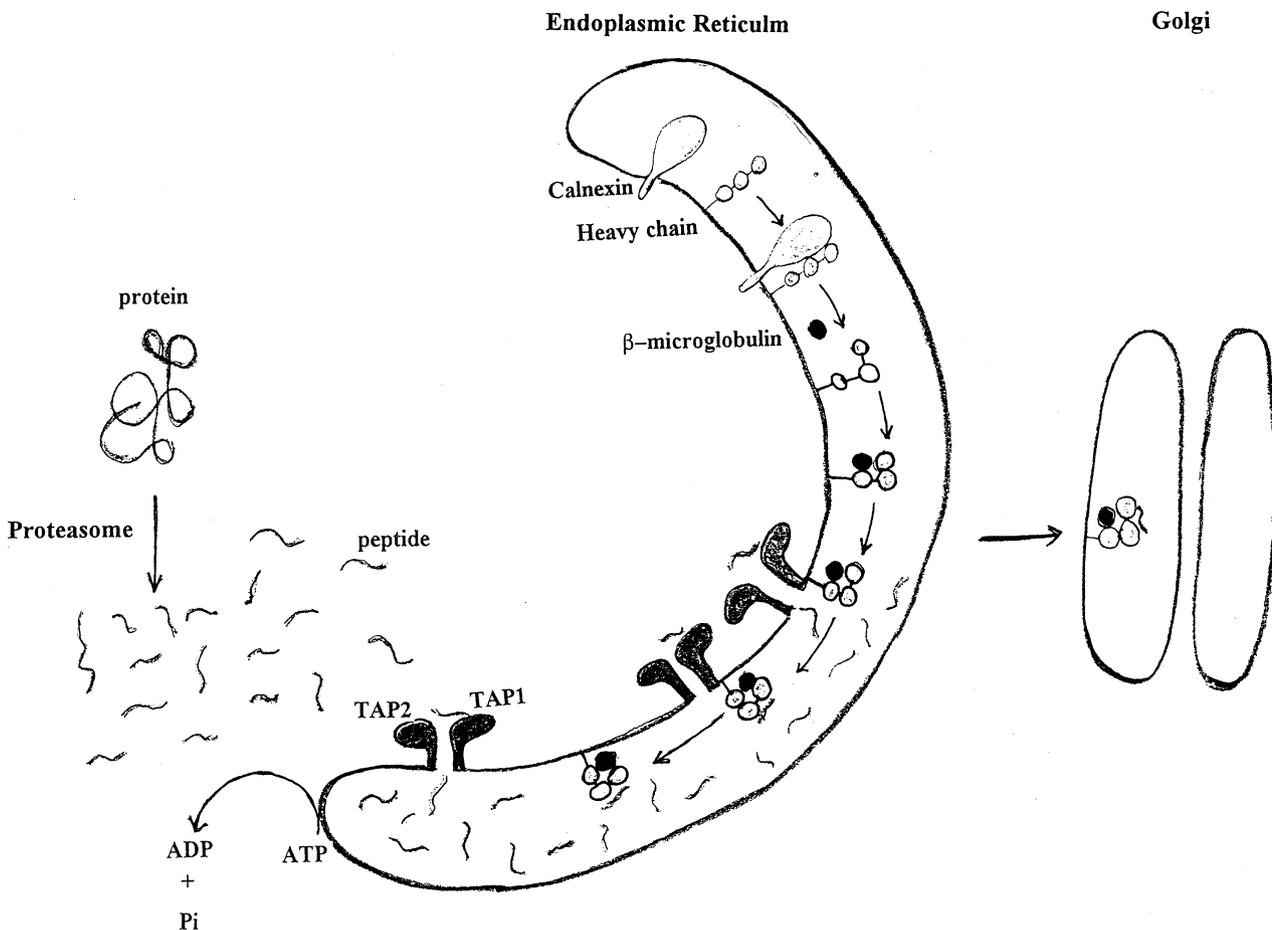


図1 Model of MHC class I peptide loading and transport

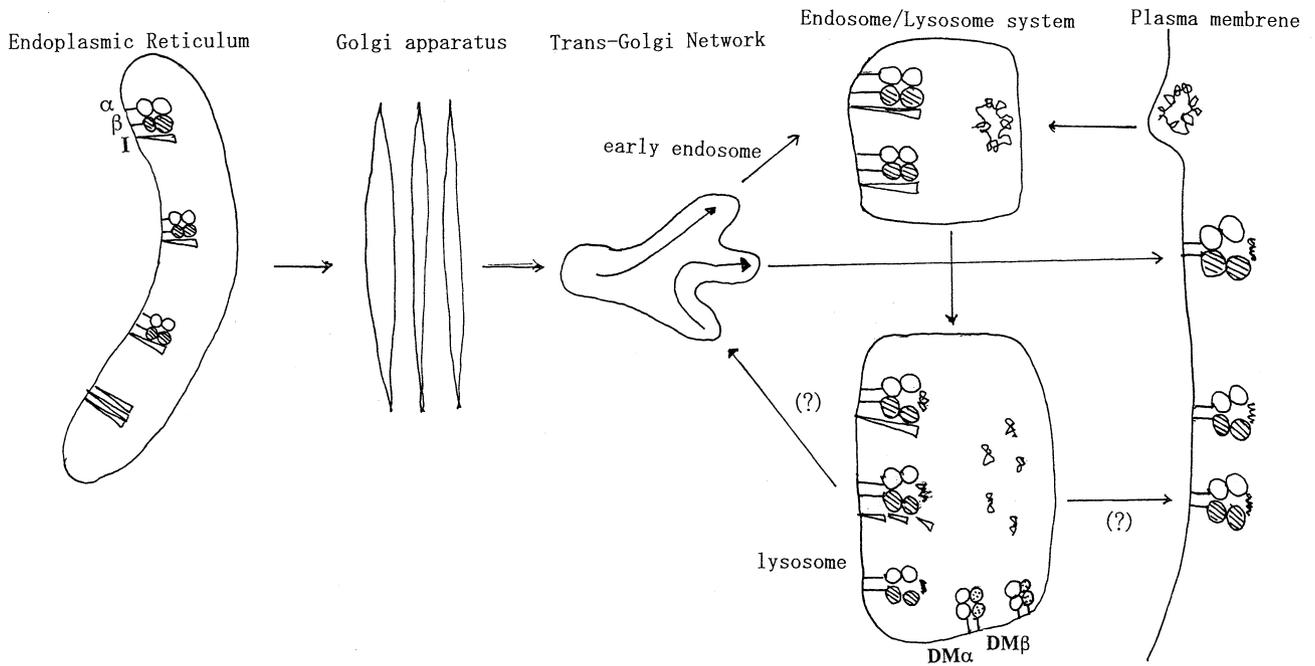


図2 Model of MHC class II transport

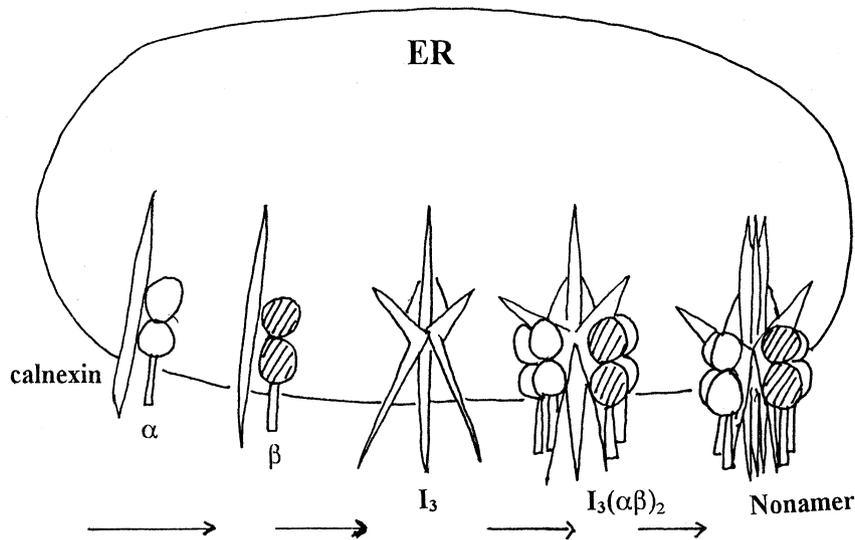


図3 Role of calnexin in the assembly of MHC class II molecules

は、どの遺伝子の欠損によるものであるかが調べられた。そして HLA-DMA と DMB が HLA-class II の antigen presentation に重要な役割を果たしていることが判った。ヒトの DM 遺伝子は J. Trowsdel により発見されている。分子構造は HLA-class II に類似している (ただしまだ不明な点もある)。T2 cell に HLA-DR 遺伝子を挿入した細胞 (T2DR) と T2 cell に HLA-DR, DM 遺伝子を挿入した細胞 (T2DRDM) および正常細胞の

SDS 電気泳動を行った。正常細胞の場合、sample を加熱処理し泳動すると α 鎖と β 鎖のバンドが検出され、非加熱下で泳動すると、αβ dimer のバンドが検出される。T2DR では加熱の有無に関らず α 鎖と β 鎖のバンドと CLIP のバンドが検出され、T2DRDM では正常細胞と同様のバンドが検出された。機能面を調べるため、T2 cell, T2DR cell, T2DRDM cell についてインフルエンザウイルスのペプチド提示能力を T cell の刺激作用により観察し

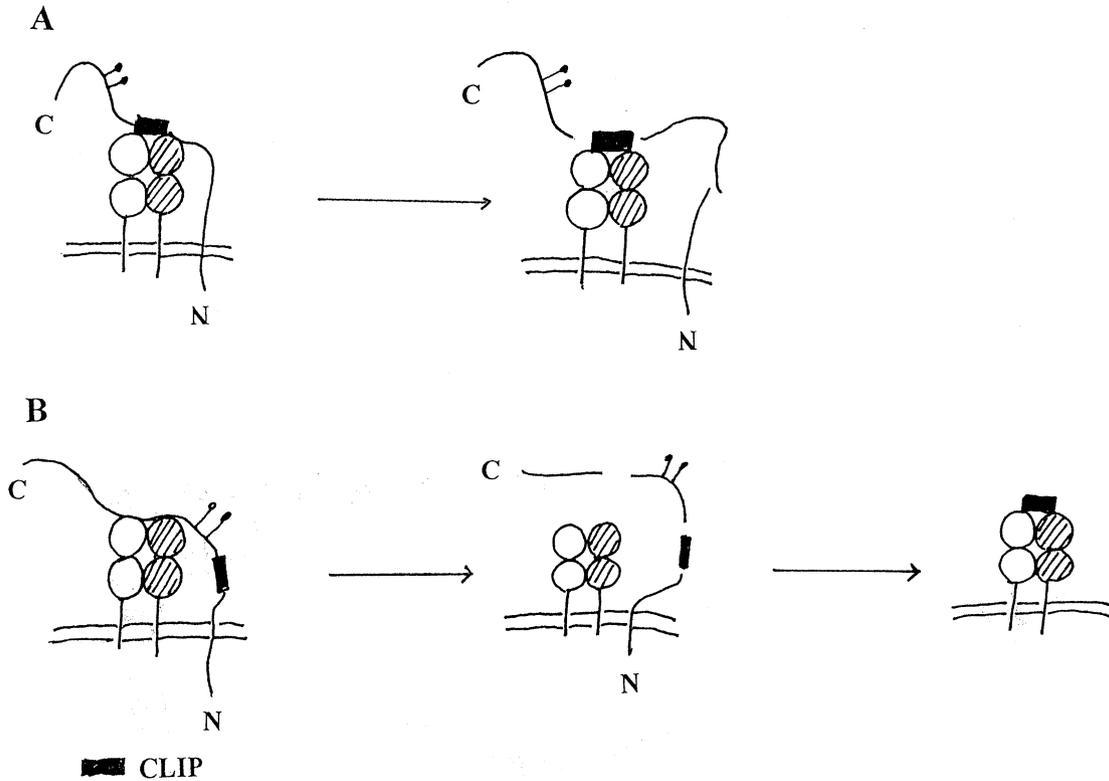


図4 Alternative mechanisms for class II CLIP complex formation

たところ、T2 cell は陰性、T2DR cell が弱く、T2 DRDM cell が強く T cell の刺激作用を示した。また anti-CLIP を用い、各 cell についてフローサイトメトリーを行った結果、T2DR cell は陽性、T2 DRDM は陰性であった。2D analysis で  $DM\alpha$  と  $DM\beta$  がヘテロダイマーを形成していることが判った。次に lysosome 内でどのようにして MHC class II 分子の溝の CLIP とペプチドが入り代わるのかが問題になる。T2DR cell の HLA-class II 分子を精製し HLA-DM 分子とペプチドを加え HLA-class II 分子を SDS 電気泳動した場合、 $\alpha\beta$ dimer のバンドが検出される HLA-class II 分子 (HLA-class II 分子の溝にペプチドが挟まっている状態) に変えることができるかを調べた。答えは“Yes”であった。primary carboxylic acids 存在下で HLA-DM は T2DR cell の HLA-class II 分子から CLIP を解離し  $\alpha\beta$ dimer のバンドが検出される HLA-class II 分子に変えることができた。よって HLA-DM は CLIP を解離しペプチドを結合させる触媒の役割を果たしていることが判った。HLA-

DM の添加量を増加させれば、CLIP の解離量も増加する。では HLA-DM が CLIP と結合することによって空の HLA-class II 分子にペプチドがおさまるのであるか。しかし HLA-DM と CLIP が結合している証拠は得られていない。また HLA-DM が CLIP を分解しているのだろうか。それは HLA-DR3 から CLIP を抽出した elution pattern と T2DR に HLA-DM を加えた場合の CLIP の elution pattern がほぼ同じであることから否定される。なぜなら、CLIP が HLA-DM により分解されているなら上記ふたつの条件で elution pattern に変化がみられるはずである。HLA-DM の作用は pH 依存性である。例えば T2 に HLA-DR3 を挿入し、pH 5.5 で HLA-DM を作用させた場合一番多く  $\alpha\beta$ dimer が作られた。また T2 に DPw4 を挿入した場合、あまり pH 依存性は見られなかった。T2 にマウスの I-A $\beta$  を挿入した場合は非常に強い pH 依存性を示した。つぎに 7 種の CLIP のうちある種類の CLIP に対するモノクローナル抗体を作成し DM 作用の blocking test を行った。結果は CLIP に対するモノ

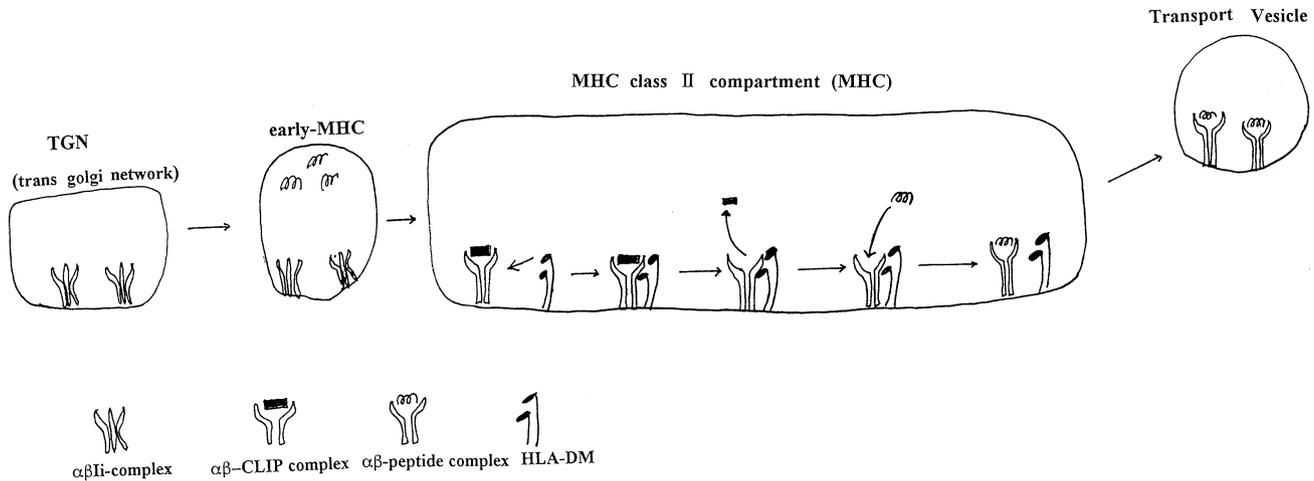


図5 Model of MHC class II peptide loading

クローナル抗体でDMの作用（ペプチド/ $\alpha\beta$ dimerを作成する）をブロックすることができた。このことから HLA-DM と HLA-class II 分子はなんらかの interaction があると考えられる。図5に示すように、HLA-DM は CLIP が挟まった HLA-class II 分子に物理的に interaction し、HLA-class II 分子の conformation を変化させ、CLIP を放出させる。つぎに antigenic peptide が溝に入り HLA-DM は解離する。このように HLA-DM はいっけん酵素のように働く興味深い分子である。

### 印象深い演題

#### Polymorphism in HLA - DQ loci determine susceptibility to experimental arthritis in transgenic mice: implications in human RA.

これは Mayo Clinic の Dr. J Baish らの研究発表である。RA の疾患感受性に関与する遺伝子群として HLA - DR genes の hypervariable region 3 とする “shared epitope” の仮説がある。また HLA-DQ genes が関与するという説もある。彼女らは HLA-DR または DQ のうちどちらの遺伝子がヒトの RA 感受性を決めるかを調べた。Class II が欠損したマウスに HLA-DR4/DQ8/Dw4 (RA 発症に関与するといわれている) と DR2/DQ6/Dw12 (RA になりにくいといわれている) から各抗原遺伝子を別々にトランスフェクトしたマウスと、これらの遺伝子をヘテロに導入したマウスを作成した。これらについて collagen を注射し RA を誘導した。結果

HLA-DQ8陽性マウスに強い RA の発症がみられ、陰性群には1例の発症も見られなかった。また HLA-DQ6陽性のマウスにも一部発症が見られたが、軽症で慢性化はしなかった。HLA-DQ8/DQ6のマウスは高頻度で RA を発症したが、症状は中程度であった。よって RA の疾患感受性遺伝子は HLA-DQ genes であると考えられると報告した。(ASHI SCHOLARS に選ばれた演題のひとつ)

#### HLA class I matching and unrelated donor bone marrow transplantation.

これは The Anthony Nolan Research Center の Dr. I Scott らの研究発表である。彼らは unrelated bone marrow transplantation における HLA-class I の適合性の重要度を調べるため、patient-specific donor CTL precursor (CTLp) の頻度を260例の patient/potential donor pairs について調べた。結果、HLA-A, B mismatch 群に高頻度に CTLp が検出された ( $p=0.01$ )。次に HLA-A2 ( $n=66$  pairs), B35 ( $n=12$ ), B44 ( $n=33$ ) について allele typing を行い、不適合ペアを検出し、CTLp との相関を調べた。HLA-A2 や B35 の mismatch と high CTLp との相関は見られたが、HLA-B44において1例の例外 (HLA-B\*4402 と B\*4403) があった。これらの分子に結合するペプチドが類似しているためと考えられる。PCR-SSP で94ペアの HLA-C 適合性を調べた結果、不適合が36%検出された。また HLA-C 不適合性と high

CTLp との相関はあまりはっきりしないが、移植の結果は一般的に悪かった。よって HLA-C の適合性は重要であることが示唆される。さらに HLA-class I の不適合率は予測されているより多かったと報告されていた。

#### **Locus specific intronic primers for HLA - A, B, and C loci.**

これは American Red Cross の Dr. K. Cao らの研究発表である。彼女らは HLA-class I DNA typing に intron の sequence から locus specific な sequence を見つけ、これを primer として PCR-SSOP 法で allele typing を行った。53 の primer pairs (A; 8 pairs, B; 25 pairs, C; 20 pairs) をテストし、最良の primer pair で HLA-A, C allele typing を約120のプローブを用いた報告であった。intron の sequence データは数少ないにもかかわらず primer をデザインし800以上の allele について調べた、その努力に感心した。

#### **Polymorphism of adhesion molecule CD31**

#### **and its association with graft vs. host disease (GVHD).**

これは Stanford 大学の Dr. S Krishnaswamy らが行った研究発表である。Minor histocompatibility antigens (mHa) が HLA 適合の腎移植で1年後の graft loss が5-10%であることや、HLA identical sib. の bone marrow transplantation (BMT) で20-40%の acute GVHD が起こっていることからその重要性がわかる。彼らは mHa の候補と考えられる vascular endothelial cell (VEC) のアロ抗原のうち CD31 (PECAM-I) の polymorphism について調べた。その多型は codon 125番のアミノ酸 (Leu(Val) に見られ、Caucasian の遺伝子頻度は gf (L)=0.49, gf (V)=0.51であると報告した。また HLA identical sib. の BMT における CD31の適合性と GVHD の発生頻度を調べた結果、不適合群は適合群に比べ5倍以上も多く GVHD を起こしていることを報告した。さらに CD31適合群にも acute GVHD がみられることから additional minor loci の存在を示唆した。

## 〔国際学会印象記〕 第5回 AOH ミーティング (1995年)

中島 文明<sup>1)</sup>, 成瀬 妙子<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>神奈川県赤十字血液センター, 検査課 <sup>2)</sup>東海大学医学部, 分子生命科学系遺伝情報部門

1995年4月, タイから一通のメールが舞い込んできた。“The 5th Asia and Oceania Histocompatibility” - Prof. Pimol Chiewsilp からである。ASEATTA (Australasian and South East Asian Tissue Typing Association) meeting を兼ねて, バンコックで Workshop, 上海で Conference を開催するので invited speaker として参加を依頼したいという内容であった。突然, なぜ, なにをすればいいのか……疑問だらけであった。ワークショップといっても, AOH としてのワークショップ作業や活動はなにもしていないし, そこへ行ってなにを discussion しようというのだろう。そして, なぜ私のところへ依頼がきたのだろうか。そう言えば, 第4回の AOH もいつの間にかオーストラリアで行われていたことを後から知った。どうやら, ASEATTA で主導権を握っているオーストラリアの仕業なのだろうか?

メールには, プログラムが同封されていた。すでにスケジュールが生まれ, 各セクションには高名な先生方の氏名が配されている。アジア・オセアニア地域以外にも, P. Terasaki や E. Albert の名前が見える。これは事後承諾ということなのか。私の名前は2日目の“Workshop VI: Expression & Serology II” のところにあった。Co-ordinator: J. Williamson, これでいままでの疑問が解消した。彼は, 12th International Histocompatibility Workshop の AHS (Allele and Haplotype Society) #6 で chairman を務める男であり, 私はそこに参画しているのである。後になって J. Williamson から FAX が届き, やはり 12th Workshop の preliminary report を AOH meeting でやってほしいという内容であった。

この meeting は 12th Workshop の preliminary report を骨格として, 最近のトピックや free communication を織り込んで展開していくというスタイルをとった。かくして, AOH & ASEATTA meeting は 1995年12月10日から4日間, バンコックのインペリアル・ホテルで開催された。この時点で上海の Conference は中止 (消失?) になっていた。

12月9日午後4時, バンコックのドン・ムアン空港に降り立った。時差は2時間で体調にほとんど影響なく, 気候も思ったより暑くはない。ただ, 街中に独特の匂いがしている。会場には何席ぐらい用意されていたのだろうか, さほど多いとは感じなかった。日本の組織適合性学会程度と申し上げておく。

12th Workshop の pre-report といっても, たとえば AHS では, すべての AHS セクションからの報告があったわけではない。報告があったのは, AHS #3 (A10, A19), AHS #4 (B5, B23, B18), AHS #5 (B7, B27, B22, B42, B47, B703, B73), AHS #6 (B8, B14, B16, B62, B59), AHS #8 (B15, B17, B46, B70) といったところである。名 Society では血清学のデータをベースとして, polymorphism の検討を行った結果 new allele の発見に至ったといった過程が多くみられた。私は AHS #6 での報告であったが, 内容は日本人に認められる HLA-B39N の解析であり, これも前述のことと同じ経緯をとっている。こういった報告の会間に, これらと関連したトピックが織り込まれている。AHS としての報告ではなかったが, Dr. Chandanayingyong は HLA-A2 の遺伝子型と血清学的多型について比較して, そこで使用された遺伝子データが, 昨年の中央血液センター管内のワークショップで私がタイプしたものであったことは非常に喜びであった (Dr. Chandanayingyong

は我々のこのワークショップに参加してサンプルを提供していた)。また、E. Albert は promotor polymorphism について、J. Williamson は HLA-B 分子の発現制御についてといった具合である。

AHS 以外にも、Disease, Anthropology, Soluble HLA antigen や方法論として SBT や、INNO-LIPA の紹介と、12th Workshop の前哨戦として盛り上がりを見せていた。



さて、タイという国について。ラマ王朝のこの国の首都バンコックは大都会である。街中には、そごうや伊勢丹、ケンタッキーフライドチキンやマクドナルド、セブンイレブンまである。ただし、おでんやおにぎりは売っていない。走っている車の8割方は日本製。タクシーは3種類ある。まず、“TAXI METER”と書かれた普通のタクシー。しかし、乗るとメーターがついてなく、運転手と交渉することになる。次が、トゥクトゥクと呼ばれている3輪タクシー(例のミゼットである)。そして、バイクタクシー。これは、ひとりしか乗れない。また、ノラ犬が非常に多い。彼ら?は全くのんびりしていて、踏ん付けでもしない限りヒトに危害を加えることはない。要するに、一年中気候のよいこの街で餌に困らなく住みやすい環境なのである。物価は安く日本の3分の1程度で、日本人にとっても住みやすい環境である。

タイの人は普通タイ語を話す。しかし、かれらは我々を見ると日本語で話しかけてくる。我々が、例えば韓国人をみてもほとんど区別できないのに、どうして彼らには判るのだろうか。そういえば、日本人はアジアの顔をした欧米人であるという悪口をど

こかで聴いた。この、タイ語には日本語と同じく、いわゆる女言葉と男言葉があり、男性と女性とで言葉尻が異なっている。人々は時間に振り回されることなく、ゆったりと自分のリズムで生活しているといった印象を受けた。

首都バンコックを離れると、数々の遺跡やリゾート地がある。写真は釈迦の涅槃像。なんと全長45mある。戦火によりところどころ変色しているが紺碧の空に映えるその表情は我々にやすらぎを与えてくれる。(中島文明)

第5回のAOHミーティングは、去る1995年12月10日から13日までの日程でタイの首都バンコックにて開催された。

12月9日、車で早朝に自宅を出発したにもかかわらず、ひどい渋滞に巻き込まれ出発時刻の45分前に成田に到着し、機内まで走りまくって搭乗。やさしい猪子先生は2時間近くカウンターで待っていてくれた。そしてバンコックに到着。バゲージクレームでうろうろしていると、今回の開催者である Prof. P. Chewsilp (Mahidol Univ., Bangkok) 研究室の Dr. K. Sujirachato が出迎えてくれた。彼女は以前、東海大学の辻公美先生の教室に留学していたこともあり、久々の再会で、この後我々より1つ後の便でバンコック入りした辻先生と徳永勝士先生と共にホテルまで送り届けてくれた。

会場となったインペリアルホテルは、ガーデンプールを備えた近代的で美しい中でも東洋的な雰囲気のあるホテルだった。会場のテーブルやスクリーン、マイクなどが豪華な蘭の花で彩られて、明るく華やかな空気の中でディスカッションが行われた。タイは12月がベストシーズンと言うこともあり、アジア、オセアニア諸国は勿論のこと、ヨーロッパやアメリカなどからも HLA おたくが集った今回のミーティングは、4つのシンポジウム、11のワークショップと一般演題の、大きく3部から構成されていた。主な内容は、血清学、DNA タイピング法とその応用を中心に、移植、疾患感受性、一般集団解析、遺伝子構造などであったが、この会議の性格上、テクニカルな報告は欧米や日本からがほとんどで、アジア諸国からはハプロタイプや抗原遺伝子の多型性

に関する演題が多かった。この中でも大活躍だったのは徳永先生で、ミーティング2日目の午前中にシンポジウムと2つのワークショップで発表され、さらに座長までこなすという忙しさだった。ワークショップでは徳永先生を中心に、クラスIIのDNAタイピング法について、INNO-LIPA法を佐田正晴先生が、TMA-HPA法を松原亨一氏が、SBT法を筆者が紹介させて頂いた。これらの新しい方法やクラスI DNAタイピングについてはアジアではまだ導入されていないところが多く、これを機にどんどん利用していただきたいところである。血清学での報告は、本年6月にフランスで開催される第12回国際HLA会議(12th IHWS)で分担が割り当てられた各グループからの報告が主で、いくつかの地域や人種ではクラスIの中で特にA抗原について遺伝子解析が進んでいるようだったが、抗血清との対応はまだ十分ではないようだった。日本からは中島文明氏がB39抗原について発表を行っていた。

疾患関係では、辻先生が胃癌患者とHLA、TNF遺伝子の相関についての講演をされ、その他IDDMや橋本病などについての解析の報告があった。骨髄移植や腎移植については、適合度の違いによる予後への影響や各国の現状報告が多かった。いずれの報告も地域により進行状況に差があり、情報やテクニカルサポートなどの活発な意見交換が必要ではないかと思われた。また最近の情報として、HLA領域に存在する新たな非HLA遺伝子の解析やその意義についてのワークショップも行われ、日本からは当学会誌の編集長でもある猪子先生が報告を行っていた。

さて、ミーティング最終日の前夜、カンファレンスディナーが催され、タイ料理を頂きながら、民族楽器による演奏と舞踊を楽しみ、ひとときを過ごした。アトラクションの後、今回の開催者であるProf. Chewsilpをはじめとするいくつかのグループが、今回のミーティングでの様々な労をねぎらわれて表彰を受けた(写真1)。拍手のうちにディナーが終了



した……と思ったので会場を後にしたところ、オーストラリアのドン、Dr. Dawkinsが追いかけてきて、連れ戻されると、かたづけの始まった舞台では大勢の参加者がクリスマスソングでHLAのかえ歌を合唱していた。訳の解らないままに徳永先生、猪子先生、そして筆者までが舞台上に上がり、合唱に参加してしまう。さらにこれで終わりかと思っただけで3人で何か歌えという命が下り、にわかにアカペラトリオを結成し、リクエストにお答えして“sukiyaki”をご披露してしまった。こうして思い出深いディナーが終了し、その後は皆、夜のバンコクで数々の思い出作りに励んだが、格調高い当学会誌ではお伝えできないのが残念である。

翌日、好評の内にこのミーティングも幕を閉じたが、その前にまずAOHの提唱者でもある辻先生が、これまでのご尽力と功績を讃えられ、AOHのプレジデントとして就任されること、また、次回の開催者にはインドのDr. NK Mehraが決定し、1998年にニューデリーで開催されるということが報告された。今回のミーティングに当たっては、企画が二転三転し、開催が危ぶまれたようだったが、たくさんの方々のHLAへの熱意により実現したことと思う。そして今後も日本がアジアのリーダーシップを取るための必要性を痛感した4日間であった。

(成瀬妙子)

## 〔書評〕

## PCR STRATEGIES

Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky 編  
Academic Press Inc. 発行 (1995年)

光永 滋樹

日赤中央血液センター, 研究一課

近年, 生命科学にブレイクスルーをもたらしたいくつかの革命的技術が開発されてきたが, PCR 法も間違いなくその中のひとつであろう。HLA の分野でも PCR 法に基づいた様々なタイピング法が開発されている。現在では日常検査にも使われはじめ, 移植成績の向上が期待されている。また, 血清学のレベルだけでなく, 遺伝子のレベルで多型性を論じることが容易になり, HLA に対する理解もより深まってきたと考えられる。

本書は373ページ, 4つのパートから成り, 各パートは2~12の章で構成されている。

- I. KEY CONCEPTS FOR PCR
- II. ANALYSIS OF PCR PRODUCTS
- III. RESEARCH APPLICATIONS
- IV. ALTERNATIVE AMPLIFICATION STRATEGIES

各章はいずれもそれぞれ第一線で活躍している人々により執筆されている。具体的項目を扱ったものでは詳細なプロトコルが記載されており, 非常にわかりやすいし, 実際的である。

Part I では標題にキーコンセプトとあるように PCR の基礎的ことがらが記述されている。例えば DMSO やグリセリン等が DNA の二次構造を“破壊”するためによく使われるが, それらが Tm をどれだけ下げ, Taq ポリメラーゼの活性や安定性にどのような影響を与えるかデータを基に議論されている。また, DNA ポリメラーゼの忠実度の項目は PCR-SSP法のプライマーのデザインに有用である。

Part II は PCR 増幅産物の分析法である。HLA のタイピング法でも使われる SSCP 法やヘテロデュプレックス法についても詳細な議論がなされて

いる。特に前者は新しく実験系を構築する上で有益な示唆を多く含んでいる。

Part III は PCR を用いた様々な実験法の具体的紹介である。特に比較的最近開発された新しい方法が多く紹介されている。通常の PCR 法では難しい長い領域を増幅できる“long PCR”は, MHC 領域の解析に有用かもしれない。その他 DNA, RNA レベルでの多型性や発現の差の解析に用いられる“arbitrary primed PCR”, “differential display”, あるいは GVHD や骨髄移植生着の診断にも用いられている“Y chromosome-specific PCR”等の本学会会員諸氏に関係しそうな項目が詳述されている。

Part IV は PCR 以外の増幅法として ligase chain reaction (LCR) が2項目紹介されている。1塩基の違いを区別するために PCR-SSP 法がよく使われるが, 条件を決めるのが難しい場合も多い。LCR 法が選択肢のひとつとして考慮されてもいいのではないだろうか。

本書は5年前に発行された PCR PROTOCOLS の姉妹編である。PCR PROTOCOLS とは異なり, 本書には HLA の具体的タイピング法に関する記述はないので, 本学会の会員諸氏の仕事に直接的に役立つことは少ないかもしれない。しかし, ふだん用いている PCR 法をより理解する上で有用な資料である。特に Part 1 は興味深い章が多い。他の Part の実験法の紹介は書名のように実験の戦略を考える上で有用であるし, パラパラとページをめくっていると実験のヒントが得られることも多い。前出の PCR PROTOCOLS と併読すれば PCR を用いて何が可能かという全体像を把握することも可能であろう。PCR を用いて仕事をなされている諸兄は手元に1冊置いておかれることをお勧めする。

# Q & A

小林 賢

防衛医科大学校，検査部

**Q.** プライマーや dNTP などを混合した PCR 用のバッファー類を保存して使用することは可能でしょうか？

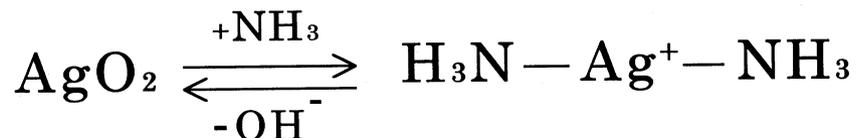
**A.** PCR 用の反応混合液を予め作成し，冷凍保存して使用することは可能です。これにより，PCR 混合液の作成時間が短縮されます。従って，一連の操作時間が非常に短くなると思われます。この混合液を作成するには，PCR 反応バッファー，プライマー，dNTP，蒸留水だけを混合しておいて，使用時に Taq DNA ポリメラーゼと鋳型 DNA を加える方法，鋳型 DNA だけを除いたすべての溶液を混合しておく方法，上流プライマーと下流プライマーに蒸留水を加えたものとそれ以外のものを合わせて別々に保存する方法などが考えられます。全 DRB1 遺伝子などを増幅する場合には，すべての溶液を混合して，保存しておくことが便利です。また，DRB1 group specific や allele specific に増幅する場合には，プライマーとそれ以外の溶液を別々に保存しておくことが楽になると思われます。-20°C で保存してお

けば数カ月は使用可能です。Taq DNA ポリメラーゼの入っていない混合液でしたら +4°C でも一年以上は十分使用可能です。また，Taq DNA ポリメラーゼが入っていても +4°C で一ヶ月ぐらいでしたら使用できると思われます。

**Q.** PCR-SSCP などで使用される銀染色は何処に銀が結合して染色されるのでしょうか？

**A.** 銀イオンは，蛋白質の場合主に SH 基（スルフィドリル基）に結合すると考えられています。それに対して，核酸ではプリン塩基であるアデニンの 6 位，グアニンの 2 位およびピリミジン塩基であるシトシンの 4 位にある NH<sub>2</sub> 基（アミノ基）に結合すると考えられています。

銀染色の原理は，図 1 の反応式で示すように硝酸銀などの銀イオンを還元し，金属銀として析出させ，赤褐色の染色像を得るもので，ほぼ写真の原理と同じです。



(red-black)

(transparent)

図1

## 〔シリーズ：HLA 研究者の個人史〕 HLA の個人史

脇坂 明美

北海道大学医学部，第一病理

大谷編集委員より「雑誌 MHC の中に HLA の個人史というシリーズものの企画があるので書いて欲しい」との電話連絡があった。少し躊躇したが MHC は創刊間もない雑誌で編集委員の先生達が原稿集めに苦労しているであろう事が容易に想像出来たことと、頼まれると中々断れない悪い性格が災いして（それで後からいつも後悔する）引き受けてしまった。その後 2 日程して猪子編集長より正式な依頼の手紙があり、中に前回の能勢先生のを参考にして下さいとあった。早速読んでみて驚いた。私の知っている能勢先生は研究者としての仲間でありライバルであったが、彼にはこんな隠されたドラマがあったのかと感心した。そう言えば以前能勢先生が学位を取られた際にまとめられた業績集を戴き、序文を感動して読んだことを思い出した。能勢先生の文章が人の心を打つのはそれは文章が巧みだからではなく、能勢先生の生き方そのものが感動的だからである。私にはそんなドラマなどあろうはずがありません。医学部卒業時、基礎医学か臨床かで迷ったこと、研究を始めてからも何度か自分の能力に見きりを付け臨床に移ろうと思ったことがあるだけで、ただ何となく大学院に入学し恩師相沢教授のテーマであった組織適合系の研究を始めたに過ぎません。とはいえ 20 年も研究を続けているので「個人史」を書き出してみるととても長くなりました。ドラマの無い長い話しを読まされるのでは堪ったものではありません。そこで 3 つのテーマに絞ってエッセイ風を書いてみることにしました。

### 1. HLA-B54-Dw15-DR4-DR53-DQ4 ハプロタイプ

相沢先生は元々ラットの組織適合系 (RT1) の研

究をなされていたが、私が大学院へ入学した（昭和 49 年）のは HLA の研究をスタートさせて間もない時でした。故板倉克明先生がリーダーとなり中山睿一先生（現岡山大学教授）を指導して新しい HLA 抗原 Sa1（現在の B54）を発見したばかりで、大いに意気が上がっておりました。殆ど同じ時期に十字先生も J-1 としてこの抗原を見出しており、B54 抗原は日本人の手で見出された記念すべき最初の WHO 公認抗原となりました。中山先生は大学院を終えられると直ぐにアメリカへ留学し HLA の研究は入学した直後の私と矢倉英隆先生に引継がれました。私は専ら血清学を、矢倉先生は新しく始まったばかりの MLC をと仕事を分けました。私は最初 Sa1 抗原の更なる解析を続け、これと平行して矢倉先生と共同で MLC のタイピングセル所謂 HTC 探しを始めました。HTC は従妹結婚の子の 1/16 に見出されることが分かっているので専ら従妹結婚を探しました。都会では中々従妹結婚は少ないので、出張で田舎の病院へ行くたびに看護婦さんに誰か従妹結婚の人は知りませんかと尋ねまわりました。そうして鹿追町立病院の出張で兄弟姉妹 3 組が従妹結婚している家系を知り、日本で最初の HTC が見出されました。これが Sh といわれる HTC です。Sh の HLA 抗原は A2-B15-DR12 で、HLA 各遺伝子座間には連鎖不平衡のない組み合わせであった。Sh は従妹結婚による真の HTC でしたが、稀な HLA-D 抗原で HLA-D タイピングにはあまり役立ちませんでした。従妹結婚探しの苦労とは逆に、日本人では連鎖不平衡があるので一般集団の中の方がよりポピュラーな HLA-D 抗原を持つ HTC がいることがその後分かってきました。その一つが何と私の家系でした。私の家系は Sa1 (B54) の家系調査に自分自身で

使っていたため、弟が Sa1 のホモであることが分かっていたのですが、果たして HLA-D 抗原もホモ接合であることが判りました。これを LD-Wa (HLA-D 抗原は当時 LD 抗原と呼ばれていた) と名付けられましたが、現在の HLA-Dw15 です。LD-Wa の発見当時、笹月先生が Stanford 大学で Sa1 (Bw54) と相関する YT という細胞を見つけておりました。私は Wa と YT の異同を調べてもらうために笹月先生に細胞を送り、両者は全く同一の特異性であることが確認されました。私が笹月先生を知ったのはこの時で、以来この縁で公私に渡ってご指導頂いております。弟の細胞はその後 EB ウイルスで transform され、これが有名な EB-Wa となり、Hon 抗原 (DR53) の可溶性、DQ4 (DQ-Wa) 抗原の免疫原、塩基配列決定、最近では西村先生 (熊本大) の DR4 分子の結合モチーフ決定などに用いられており、私よりも遙かにサイエンスに貢献しています。HLA 系の研究は最初 HLA-ABC 抗原から始まり、次いで HLA-D 抗原、DR 抗原へ移り、更に DQ 抗原の解析へと約15年かかって進んできました。この HLA 研究のあゆみに歩調を合わせるように、私は多くの共同研究者に恵まれ、この EB-Wa 細胞のもつハプロタイプ、すなわち B54-Dw15-DR4-DR53-DQ4 抗原を順次明らかにすることができました。EB-Wa が身内と言うことで注意を払っていたおかげです。またこのハプロタイプは日本人の I 型糖尿病や原田病と強く相関することを見出しました。ですから B54-Dw15-DR4-DR53-DQ4 ハプロタイプには私がやってきた研究が凝縮されており、特別な愛着があります。松茸は採られるまでに100人の人が跨いでいると書いてあるのを読んだ事があります。チャンスというものは実は身近にあり、これに気付くかどうかで成否が決まるということですが、B54-Dw15-DR4-DR53-DQ4 ハプロタイプはまさに私自身の中にあった松茸でした。

## 2. 遺伝性脊髄小脳変性症

私は現在遺伝性脊髄小脳変性症の研究を主にやっています。このため「HLA の研究はもう止めたのですか？」と質問されることが多い。確かに HLA の研究ではありませんがしかしこの研究は HLA から

派生したもので私には全く違和感はありません。私は病理学を専攻しており HLA の研究を通じて疾患発症に関する遺伝素因とその機序を明らかにしたいと考えてきました。HLA と相関する疾患で確実なものはそう沢山はありません。うちペーテット病、I 型糖尿病、原田病そして遺伝性脊髄小脳変性症は北大で初めて HLA との関連が見出されました。私はこの中のどれか一つでも単なる相関を越え、何故 HLA が関与するのかその本質的なこと明らかにしたいと考えておりました。そうしてこの4つの中から遺伝性脊髄小脳変性症を選びました。これについて述べてみたいと思います。私が第一病理に入って間もなく(1974年)、日高から藤本先生という精神科の先生が教室に通っておられました。この先生は自分が診ている遺伝性脊髄小脳変性症(マリー病と呼ばれていた)の患者について脳の神経病理を見たいと強く希望し、何と患者が未だ生きているうちに剖検を習いに来ていたのです。その頃私はひたすら HLA タイピングをしており、藤本先生はそれを見て私に自分の患者の HLA のタイピングをして欲しいと頼んできました。私は快諾してその一家6人のタイピングを行ないました。うち父親と5人の子供のうち3人がマリー病の患者でした。HLA タイピングが終わり遺伝子型を組んでそのデータを師匠の板倉先生の所へ持って行きました。板倉先生はそれを見て「患者は全て同一の haplotype を共有している」と言われました。私はその重要性を理解し難かったが、先生は更に「マリー病遺伝子は HLA と連鎖している、マリー病遺伝子は第6染色体短腕にあるかもしれない」と興奮したように言われた。先生は早速この事実を英文にして New Engl J Med へ letter として投稿しました。今考えてみると、家系は小さくとも連鎖を証明したと言えるものではないのですが、運よく掲載されました。私は論文が一つ増えたぐらいに思い騒ぎは納まりました。ところが1976年、1ページにも満たないこの論文を読み、Jackson 等はマリー病の一家系を調査して、HLA との連鎖を確認したのです。この論文で HLA を担当されたのは Terasaki 先生でした。その後私は Terasaki 先生の所へ留学するので何か運命的なものを感じます。これを契機にマリー病と

HLA の連鎖についての追試論文が多数発表され、私達の論文はいつも筆頭で引用されました。現在この遺伝子は SCA1 と名付けられ HLA から末端側へ 19cM も離れたところにあることが判っています。本来ならこの距離は連鎖が殆ど証明できないくらい離れたものです。実際、その後私は SCA1 家系を 11 家系集めて調べましたが、どの家系でも HLA との間に交叉がありました。最初の家系はこれ程の距離があるにもかかわらず、偶々交叉がありませんでした。まるで闇夜に鉄砲を撃ったら獲物に当たった様なもので、bigginer's luck とは言え恐ろしい程運がついていました。またこれに気付いた板倉先生の慧眼には今更ながら驚かされます。HLA と連鎖が証明されたとはいえ、当時はまだ分子生物学も未熟でこの遺伝子の単離は思いもよらぬことでした。しかし時は流れ、逆行遺伝学の時代となりこの事が現実可能となってきました。そこで SCA1 遺伝子を単離したいと思い、1987 年同じ事を考えていた北大神経内科の佐々木秀直先生と 2 人でこの問題に取り組みました。これに本腰を入れてから私の研究は次第に HLA とは離れていきました。残念ながら SCA1 遺伝子の単離は先を越されてしまいました。日本人の SCA1 は約 17 世代前山形県に住む一人の日本人に端を発している事を証明できました。これでマリール病問題は決着し、HLA へ戻ってくることもできたのですが、SCA1 は日本人の遺伝性脊髄小脳変性症の約 20% に過ぎず、大半の家系は SCA1 とは異なる遺伝子異常で起きていることが判ってきました。現在遺伝性脊髄小脳変性症には SCA1 から SCA5 までの 5 型があることが判り、それらは HLA 遺伝子がある第 6 染色体とは全く別の染色体にあります。最初は HLA から 19cM 離れている SCA1 遺伝子を、ついで SCA2, SCA3 を研究するにしたがってその遺伝子の距離に従って HLA を離れていってしまいました。現在 SCA1~SCA5 のいづれでもない未解決の遺伝性脊髄小脳変性症が約 20% 残っています。この問題が解決するとまた HLA の研究に戻るようになるかもしれません。

遺伝性脊髄小脳変性症も私にとって松茸でした。この患者を担当していた藤本先生との偶然の出会いが、また普通なら見過ごしてしまうような些細な事

に板倉先生が眼を向けたことがこの研究のきっかけです。加えて身近に佐々木秀直先生のようなベストパートナーが居てくれてはじめて可能となりました。こういう人との出会いが「何も無い」私の個人史にドラマをなしているのでしょうか。

### 3. do right thing と do it right

1987 年 New York で国際組織適合性ワークショップがありました。私はどういういきさつか定かでないが Terasaki 教授と只二人でとある日本料理店で食事をする事になりました。教授は私が最近あまり熱心に HLA をやっているように見えなくて、今何をやっているのかと尋ねてきました。私は脊髄小脳失調症の遺伝解析をしています。この疾患の遺伝子は HLA と連鎖しているのですと応えました。また現在の教室の体制では共同実験者が少なく、脊髄小脳失調症の研究には競争相手がいないので助かっている旨を話しました。先生はその患者はどの位いるのかと尋ねられ、はっきりしないが北海道で 500 人位だと応えるとそれは minor な病気だ。もっと患者数の多い病気をやらないとサイエンスに対する impact は少ない。そういう病気をやるべきであると言われました。Terasaki 先生の研究に対する姿勢を感じました。またその時にノーベル賞をもらった Dausset 教授を例に出して言われた言葉が「To do right thing is more important than to do it right.」である。Terasaki 教授は「Dausset どうしてノーベル賞を貰ったと思うか？」と尋ねられた。私は「HLA に関しては Terasaki 先生の方が業績があるのではないのでしょうか、やはり最初だと言うことでしょうか」と応えると、次の様に話されました。「Dausset は確かに業績の数はあまり無いかもしれないが、常に HLA における mile-stone を打ってきた。私の方が沢山の HLA 抗原を見つけたが、Dausset は最初の Mac 抗原(現在の HLA-A2)を見つけている。この報告は必ずしも一流の雑誌に載っている訳ではないが、その後の抗原探索の端緒となった。また彼は Mac 抗原が組織適合性として移植に関与するであろう事を既に予測している。HLA と疾患の相関に関してをも最初の報告している(1967年)。白血病が

HLA と本当に相関しているかどうか今となつては怪しいが、これは Lilly 等によって H-2 とマウスの白血病の相関が言われた翌年で、これ以降多くの人々が飛び付いて HLA と疾患の相関をやり始めた。'Everybody follows him', すなわちみんな彼を真似しているにすぎない。実際 Dausset はこれをまとめるために1976年第一回「HLA と疾患」の国際シンポジウムをパリでやっている。HLA 抗原の適合性が移植成績と関係するという最初の話も彼がしている。私の方が遙かに症例数が多く、信頼性の高いデータを出しているが単に真似にすぎない。次に Dausset は2次元電気泳動、そして RFLP によって HLA のタイピングが出来ることを示した。その後皆が真似をして遂に RFLP による HLA タイピングは今回 (New York) の国際ワークショップのメインテーマになってしまった」。確かにそうである。Dausset はその後 CEPH の director として RFLP による多型標識が遺伝性疾患の座位の決定に極めて

有効であることを見抜き、今日の逆行遺伝学の道を開いた。ちなみに私が脊髄小脳変性症の遺伝子単離の研究を始めたのもこれによるところが大きい。彼はこのことについて Workshop の特別講演で遺伝標識の有用性をのべ今後10cM 毎の遺伝標識を開発することを述べました。ちなみに私はそのマーカーを欲しい旨 Dausset に手紙を書き返事を貰いました。ノーベル賞授賞者の直筆のサインが入った手紙で私の宝物になっています。結局 Dausset は常に right thing をやってきて、それら一つ一つが HLA の mile-stone になっています。多くの方は彼を真似して、どちらがよりうまく「do it right」をやっているかどうかを競っているにすぎないのである。私もその一員で、初めてここに Dausset がノーベル賞授賞者たる所以であると理解できた。それから私は do right thing たる仕事をしようと心掛けているが、do it right から逃れられないでいる。

## 第5回日本組織適合性学会大会のお知らせ

### 会員各位

第5回日本組織適合性学会大会を下記のように開催いたします。会員の皆様には多数ご参加くださいますようお願い申し上げます。

演題募集のご案内は直接会員の皆様に大会事務局より直接お送りいたします。

**会期** 1996年9月19日(木) - 20日(金)

**会場** 三省堂新宿ビル(〒160 東京都新宿区西新宿 4-15-3)

(電話 03-3320-2611 FAX 03-3320-2615)

第5回日本組織適合性学会

会長 十字猛夫

### 問い合わせ先

〒150 東京都渋谷区広尾 4-1-31

日本赤十字社中央血液センター内

第5回日本組織適合性学会事務局宛

電話 03-3406-1211 FAX 03-3406-7892

## 〈日本組織適合性学会誌 MHC の投稿規定〉

### 1. 投稿規定

#### 1.1. 原稿様式

提出原稿がそのまま電算写植で印刷できるように、原稿は全て、コンピューターのフロッピーディスクとA4サイズでプリントアウトしたものの両者を提出する。一般的なワープロソフトを使用し、ソフト名を明記する。字体、サイズ、行の字数、行間、などの体裁は自由とする。また、図表については、写植でそのまま掲載できるものを提出するが、挿入箇所を本文に指定する。図については天地を明示する。印刷の際に、縮小または拡大する場合があるので、考慮すること。また、図表の題や説明はワープロで、本文とは別頁に添付する。

#### 1.2. 原著論文

会員からの投稿を原則とするが、編集委員会が依頼することもありうる。日本語、英語を問わない。タイトル、著者名、所属は次の様式にしたがう。

Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR52-associated DRB1 allele with the DR'NJ25' specificity designated DRB1\*1307.

Toshihiko Kaneshige<sup>1)</sup>, Mitsuo Hashimoto<sup>2)</sup>, Yayoi Murayama<sup>1)</sup>, Tomoko Kinoshita<sup>2)</sup>, Tsutomu Hirasawa<sup>1)</sup>, Kiyohisa Uchida<sup>1)</sup>, Hidetoshi Inoko<sup>3)</sup>

- 1) Shionogi Biochemical Laboratories, Shionogi Company, Osaka, Japan
- 2) Kidney Transplantation Center, Hyogo Prefectural Nishinomiya Hospital, Hyogo, Japan
- 3) Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan

HLA class II の DNA typing と MLC

能勢 義介<sup>1)</sup>, 稲葉 洋行<sup>1)</sup>, 荒木 延夫<sup>1)</sup>, 浜中 泰光<sup>1)</sup>, 阪田 宣彦<sup>1)</sup>, 土田 文子<sup>2)</sup>, 辻 公美<sup>2)</sup>, 成瀬 妙子<sup>3)</sup>, 猪子 英俊<sup>3)</sup>

- 1) 兵庫県赤十字血液センター, 検査課
- 2) 東海大学医学部, 移植免疫学
- 3) 東海大学医学部, 分子生命科学

内容は、要約 (Summary)、はじめに (Introduction)、材料と方法 (Materials and Methods)、結果 (Results)、考察 (Discussion)、参考文献 (References) の順に記載する。また、要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを加える(英文の場合には英語の Key words を加える)。脚注は適宜、設けてもよい。日本語で投稿の場合には、末尾に英語のタイトル、著者名、所属(様式は上述に従う)、英語の要約と英語で5語以内の Key words をつける。枚数に特に指定はないが、速報的な短報(全体で、2,000 ~ 3,000 字、出来上がり A4 版で2~4枚程度)を中心とする。もちろん、フルペーパー (full paper) も歓迎する。なお、参考文献 (References) の記載については、下記1.5を参照すること。オリジナル1部にコピー3部を添えて、編集長宛(下記3参照)に送付する。

#### 1.3. 総説、シリーズその他

編集委員会からの依頼を原則とするが、会員からの投稿も大いに歓迎する。日本語を原則とする。タイトル、著者名、所属は上記1.2.の通りにしたが、要約と要約の末尾に日本語で5語以内のキーワードを添える。その他の体裁は自由とするが、構成がいくつかの章、節などから成る場合には、次の番号に従い、適当な見出しを添える。

1. 2. 3. 4. ....
- 1.1. 1.2. 1.3. 1.4. ....
- 1.1.1. 1.1.2. 1.1.3. ....

脚注は適宜、設けてもよい。なお、参考文献 (Refer-

ences) の記載については、下記1.5.を参照すること。

#### 1.4. 校正

校正は編集委員が行い、特別な場合を除き、執筆者は校正を行わない。

#### 1.5. 参考文献

参考文献は、本文中に数字で、例えば (3), の様に表示し、末尾にまとめて、次のようなスタイルで記載する。ただし、著者名、または編集者名は、筆頭3名まで記載し、以下は省略する。

1. Kaneshige T, Hashimoto M, Murayama A, *et al.* : Serological and nucleotide sequencing analysis of a novel DR52 - associated DRB1 allele with the DR'NJ25' specificity designated DRB1\*1307. *Hum. Immunol.* **41** : 151-160, 1994.
2. Inoko H, Ota M : *Handbook for HLA Tissue - Typing Laboratories* (eds. Bidwell J, Hui KM), PCR - RFLP. CRC Press, Boca Raton, 1993; p.1-70.
3. 能勢義介, 稲葉洋行, 荒木延夫ら : HLA class II の DNA Typing と MLC, 輸血, **39**: 1031-1034, 1993.
4. 猪子英俊, 木村彰方 : 岩波講座分子生物科学11巻, 生物体のまもりかた (本庶佑編), 自己と他の識別, 岩波書店, 東京, 1991; p.129-194.

#### 2. 別刷

原著論文については、別刷は有料とする。その費用は部数、頁数による。

#### 3. 原稿送付先

〒259-11 神奈川県伊勢原市望星台  
東海大学医学部 分子生命科学系遺伝情報部門 日本組織適合性学会誌 MHC  
編集長 猪子 英俊  
TEL: 0463-93-1121 内線2312  
FAX: 0463-94-8884

## 編集後記

先日、小林編集委員に教えられ、インターネットを利用してHLA抗原系のDNAシーケンスのデータベースを取り寄せた。本誌本号に、小林編集委員が紹介している“最新アリアル情報”のデータである。このデータベースには、A遺伝子58種、B遺伝子126種、C遺伝子38種、DRA1遺伝子2種、DRB1遺伝子135種、DRB2遺伝子1種、DRB3遺伝子5種、DRB6遺伝子3種、DRB7遺伝子2種、DRB8遺伝子1種、DRB9遺伝子1種、DQA1遺伝子15種、DQB1遺伝子25種、DPA1遺伝子8種、DPB1遺伝子65種のDNA塩基配列が納められている。クラスI抗原の発見から三十余年、クラスII抗原の発見から二十年弱で、よくもこれだけ多くの遺伝的多型の研究が進んだものと、改めて驚かされる。多くの研究者の努力の誇るべき結果である。

このデータを見ているとHLA遺伝子の遺伝的多型の大きさと変異の激しさに今更ながら驚かされる。今後更に発見されるであろう多くの新たな遺伝的多型（マイナーな塩基配列の違いを含めて）を考えると、いったいどれだけの種類のシーケンスが人間の中に存在するのであろうか。ちなみに、遺伝子頻度も、連鎖不平衡も全く無視して、理論上可能なハプロタイプの組み合わせは、A, B, C, DRB1, DPB1遺伝子座の組み合わせで約24億通りとなり、個人が2つのハプロタイプを持つとすると、全く同じ2つのハプロタイプを持つ確率は地球上の全人口を超える数字となる。つまり遠い古代から現在までの間に何らかの血縁関係が全く無い人間どうしが全く同じ二つのハプロタイプを持つ可能性が無いことになる。遺伝子頻度や連鎖不平衡の厳密な考察無しにこのような計算をしてみても単なる机上の空論ではあるが、それにしても大きな遺伝的多型ではある。

最近、一部の移植外科医の間でこのように複雑に細分化されたHLA抗原型をドナーとレシピエント間でマッチさせるのはもはや困難であり、新しい免疫抑制剤の発見もあることから、HLA抗原型のマ

ッチングは必要無いのではないかとの考えも述べられている。組織適合性学会会員としてははなはだ乱暴な、残念な考え方と言わざるを得ないが、遺伝的多型がこのように大きくては、移植外科医の言い分にもまたもっともな部分もありそうである。ここは何とかしてHLA抗原系の遺伝的多型のどこが免疫学上重要で、どこはマイナーな違いなのかを整理する必要があると切に感じた次第である。(大谷文雄)

## MHC Vol.2(2) 掲載名簿訂正

## [追加]

日本組織適合性学会役員名簿  
評議員 平野 哲夫

## [訂正]

- ・家老 仁郎  
北多摩病院 婦人科  
〒182 調布市調布が丘4-1-1  
Tel: 0424-86-8111 Fax: 0424-85-2955
  
- ・佐藤 信也  
駒込赤十字血液センター → 東京都北赤十字血液センター
  
- ・柴 尚子  
葛飾赤十字血液センター → 東京東赤十字血液センター
  
- ・徳永 勝士  
東大医学部保健衛生学人類遺伝学  
→ 東京大学医学部人類遺伝学講座

---

*MHC*

Major Histocompatibility Complex

Official Journal of The Japanese Society for Histocompatibility and Immunogenetics

1996年3月31日発行 2巻3号, 1996

定価 2,000円

発行 日本組織適合性学会 (会長 吉田孝人)

編集 日本組織適合性学会編集委員会 (編集担当理事 猪子英俊)

---

日本組織適合性学会事務局 (事務会計担当理事 十字猛夫)

〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 日赤血液センター内

印刷・港北出版印刷株式会社

〒150 東京都渋谷区渋谷2-7-7