

〔HLA-研究者の個人史〕 私とHLA-Dタイピング

金子 剛久

北里大学医学部, 免疫学

はじめに

「建築は廃墟を指向せよ」とは詩人であり建築家でもあったTMが建築方法論で展開した主題である。この詩人に若い頃かぶれてギリシャ神殿の廃墟を訪れることをずっと夢に見ていた。数年前、休暇をとってイタリアを夫婦で旅行した帰りに、一日だけアテネに寄り道して、アクロポリス丘を訪れ、夢を叶えた(写真1)。たまたま、パルテノン神殿は修



復のさなかで、その作業のための鉄骨がかなり目障りだったが、確かに、柱と屋根の石組みの骨格だけを残す神殿跡を背景に石柱の断片やブロックが無秩序に転がっている風景、それらを緑の蔓草が半分覆い隠している光景は、ため息が出るほど美しく、感動した。以来ギリシャを2度、シチリアを一度旅し、その都度、あちこちのアクロポリスを訪れている。建築学的事は全くわからないが、神殿見るオタクの一人に数えられようか。最近、南イタリアに二階建ての神殿跡が残っているときいて、行ってみたいくうずうずしている。

HLA-D タイピングはHLA研究のなかでは過去の遺跡的存在である。だと思ふ。ギリシャの神殿の廃墟のように。それほど古くはないし、二千年を越えて、世に残るとも思えないが。昨今のHLA class II cDNA sequencingの結果をみると、あちこちに風化の跡がみえ、次世代（この領域解明のための血清学や分子生物学）を牽引する役割を果たし終えたとはいえ、少し寂しい。私は、柏木教授の下で、

HLA-Dタイピングの誕生から、終焉までを国内及び国際組織適合性ワークショップを通してつきあってきた。この間、私が得ためぼしい成果は、DKT2を見つけたこと、Dw23 (DB5) をクラスターしたことくらいである。お恥ずかしいかぎりである。HLA-D ホモザイガス細胞として、私が認定したタイピング細胞は、18種類 (KT1からKT18: EBVにより株化し

たものについては先頭にLをつけ、LKT2、LKT3と命名されている)。ただし、積極的に自分で発掘したといえるものは数えるほどしかない。たとえばKT1からKT6の6種は近親結婚の家族を調査して見つけたタイピング細胞であるが、共同研究であるとはいえ、フィールドは八木禮徳先生（現：野田市民病院）によって開拓された、むしろYYと命名されるべき細胞である。KT14 (Dw23) は、移植のクロスマッチMLCのコントロールとして使っていた際に、HTC様の態度を示したことから見つかった。DKT2はついにDw (official designation) に昇格した

かった。

このDKT2を軸にして、私のHLA-D研究の泥沼の過去をきわめて利己的に振り返ってみたい。

1. 先史

HLA-D抗原は、MLC反応すなわち、血縁関係のない二者の白血球を混合培養した際に生ずるT細胞の強い増殖反応、を惹起する抗原として定義された(1)。

MLCを行う際に、二者の白血球の一方を刺激細胞(マイトマイシン処理等で抗原性を残したまま増殖しないように処理した細胞)、他方を無処置のまま反応細胞として行くと、その刺激細胞のHLA-D抗原に対する反応細胞の増殖だけを検出することができる。これをone way MLCと呼ぶが、そのone way MLCにおいて、HLA-D座に関してホモザイガスなヒトの白血球を刺激細胞として使うのがHLA-Dタイピングである。このMLCでは刺激細胞と同じHLA-Dタイプを持つ反応細胞は原理上増殖しない。HLA-Dホモザイガス細胞はHLA-D タイピングの抗原細胞として収集されたことからHTC(Homozygous Typing Cell)とよばれるようになった。

HTC(そのHLA-Dタイプをaaとする)は、そのタイプをヘテロに持つヒト(ax)をMLCで刺激しないが、axによっては刺激される。この関係を利用して確定するが、aaによるaxの反応は原理上は0であるが0にならない(タイピングレスポンス)ので、通常は、両親と兄弟姉妹(ab,ac,bc)を含めた家族内MLCを行って、総合的に判断する。HTCを子供に含む可能性のある家族では、親と同型の子供(ab,ac)が出現し、この親子同型者間MLCは0となるためである。

いとこ結婚の子供がHTC探しの対象となった。いとこ結婚の子供には、理論上1/16という高い頻度でHTCが出現し、それはHLA-A-B-Dハプロタイプに関してホモザイガスであることからである。当時のMLCは後に述べるが、試験管法という、恐ろしく手間のかかる手法だったために、比較的手間のかからないHLA-A,-Bタイピングをまず行って、HTCをふるい分けてしまうという戦法である。ふるいにかかったHLAホモザイゴートを家族内MLCで検定

する。

2. 胎動

1975年、欧米の研究グループがそれぞれ独自に集めたHTCのD特異性のすり合わせを行うためのワークショップが第6回国際組織適合性ワークショップに登場した。集められたHTCで相互をタイプすること、HTCのパネル細胞に対する反応(相関係数)によるクラスタリングから、6種類のHLA-Dクラスター、Dw1からDw6が公になった。日本では、北里大、札幌医大、愛知ガンセンター、東海大、東京医科歯科大、大阪大等がHTCの収集に着手していた(2)。私が北里大学に就職した年である。

私は、東京大学理学部大学院動物学専攻博士課程を退学して、1975年に、北里大学医学部で、移植免疫学研究室を起ち上げつつあった、柏木教授のもとへ助手として赴任した。大学院時代は、ウニ卵の細胞質DNAの研究をしていた。当時は、ウニ卵でさえ卵細胞質に数百パブロイドを越えるDNAが貯蔵されていて、発生初期の迅速なDNA核合成を支えるために蓄えられたものだ。いや組織化学的には検出されないから、定量方法に問題があってなどと、やかましかった時代である。定量法の改良と初期発生時のDNA合成を ^3H -チミジンでトレースすることによって、ウニ未受精卵には10ハプロイド程度の細胞質DNAが存在するが、それは卵細胞質には、その容量に見合ったミトコンドリアが蓄積しているため、発生初期の核DNA合成のために蓄えられたものではないという結論を出した(3,4)。

私が参加した当時の柏木教授は二つの研究プロジェクト、「HLAの基礎と臨床」と「ALGの臨床応用」とを進めつつあった。着任すると教授から前者のプロジェクトの基礎の部分で、 ^3H -チミジンを使った新しい測定法(HLA-Dタイピングことだったらしい)が必要なので、その研究に従事するようといわれた。 ^3H -チミジンが扱えるという即戦力が買われたのだと思う。

2-1 MLC

MLCの手技は、先任の二人のスタッフ、八木、久保田両先生に手ほどきを受けた。彼らは、腎臓移

植患者のドナー選択のためのMLCクロスマッチテストとALGのリンパ球刺激力価測定を実施していた。私の習った、当時のMLCは、5mlのテストチューブの中で、反応リンパ球と刺激リンパ球（マイトマイシンC処理リンパ球）とを2mlの培地で培養するという非常にマクロな反応システムである。培地はRPMI1640に非働化ヒト男子血清を15%加えたものを用いる。現在の方法に比べて、非常に手間のかかる原始的な方法だった。培養5日後に、 ^3H チミジンでパルスラベルして、細胞に取り込まれた ^3H を液体レシチレーションカウントする。その際Freeの ^3H を除くのに、遠沈法を使っていた。RIの入ったチューブは素手では持てない。プラスチックまたはゴム手袋をつけて操作した。上清も、安全ピペットで吸い取って廃棄した。さすがにマウスピペティングはできない。大変面倒な実験だった。教授が、この国際WSから帰国する際に、ヨーロッパで販売されていたMASHⅢ (Multiple Automatid Sample Harvester) を持ち帰った。マイクロタイタープレートを使った、micro MLC (従来法の1/10のスケール) に対応した細胞回収装置である。MASHⅢは、一度に2列 (24ウェル) を一度に回収して洗浄してくれた。このときの感動は、後に、私が、マニュアル車から、オートマチック車に買い換えた時と同じくらい大きかった。現在のHarvesterも原理や構造はMASH (MACHという説もある) と変わらない。MLCの手技は、その後全く変わっていない。

3. 初期

3-1 HTCの収集

次回の第7回国際ワークショップに向けて、日本人のHTC探しに教室をあげて取り組んだ。一つはいとこ結婚の家族さがし。20組のいとこ結婚の家族に協力を得て、家族員のHLAを調べさせてもらった。この20家族の中から、3家族4種類のHTCが見つかった (KT1, KT4, KT5, KT6)。このほかに、腎移植患者の兄弟から2種類のHTC (KT2, KT3) を見つけ出した。患者が両親の一方とMLCで反応しない関係がみられたことから、その兄弟を検索した結果である。KT2とKT3の両親はそれぞれ、またいとこ、いとこの関係にあった。

3-1-1 失速

ここでほんのちょっとだけエンストを起こしてしまった。HTC (aa) を刺激細胞 ((aa) m) として、MLCを行うと、HTCと同じDタイプをヘテロに持つ反応細胞(ax)には、増殖反応が起きない。と、信じきっていた。ところが、この ax/(aa)m の反応が0にならなかった。第三者を刺激細胞とする、陽性対照の50%近い反応が、このHTCを証明するための家族内(ax/(aa)m)MLCで出てくる。マイトマイシン処理が不十分なために刺激細胞がxを認識して増殖しているのかと考え、その処理時間をのばしたり、濃度を上げたりしたが、それでは起こるべき反応も一緒に消えてしまった。刺激細胞をmitogenで刺激して、(aa)mは増殖しないことを確かめたりした。貴重なHTCでしか再現できない実験であったために、周囲の冷ややかに感じられる視線が非常に気になった。しばらくして、都内のある会議で、板倉先生 (旭川医大) が、ax/(aa)mは、無反応 (HLA-D同型の親子または兄弟者間の反応を含む) ではない、弱反応 (タイピングレスポンス) なのだということを、話されているのを聞いて、このはまりから一応ぬけだすことができた。まだ、このことについてふれた論文が手に入らなかったのか、あっても読んでいなかったせいだと思う。

3-2 HLA-D タイピングの開始

集められた6種のHTCの特異性の関係を決めるために、ランダムに集めた共通のパネル細胞 (50人) をタイプし反応の相関係数によるクラスタリングを行った。その結果、KT1とKT3が同一の特異性として (後にDw15) クラスターを形成し、他の4種はそのDw15には入らず、互いに独立した関係にあることがわかった。またHTC間で相互をタイプした結果もパネルで得られた結果と整合した。この4種のうち、KT2はDKT2として最初に見つかったHTCである。KT5はDHO (後のDw12) であることが後にわかった。KT4とKT6は、現在のどのような特異性に属するかは、不明のまま消滅した。このHTCをベースにして日本におけるDタイピングの基盤を構築するために、柏木研究室は第7回IHWS cellular typing に参加した。WSに参加することによって、

International standard を利用できる。

3-3 最初の国際組織適合性ワークショップ (IHWS)

この第7回IHWSでは、pre-workshop と唱して、WSに提出するHTCを特異性既知のreference HTC (Dw1-Dw8のkey HTC各2種2vial) であらかじめタイプすることが義務づけられてきた。そのreference HTCで我々のHTCをタイプして、さらに、本番のWSでもう一度タイプして、既知のものとの関係を決めることが出来た。

HTCとしてはKT4 (7W529) を提出した。ストックがあって、他のものよりたくさん提出できたからである。要求されたHTCの量は予想を遙かに超える量だった。1 x 10⁹ cells。まだセントリフュージがなかった時代にである。200mlの採血を2ヶ月間隔で5回しないと確保できない量だ。しかし、order をよく読んでみると、将来のWSに備えて、と小さく書いてあった。WSの要求量は、額面通りでないことを初回でマスターした。結局、60 vial (5 x 10⁶/vial) を出した。さすがにこれでは足りなかったらしくKT4は研究室に送られてきたWSHTCのセットの中には入っていなかった。

本番のWSには、69種類のWSHTCが2 vial ずつ届いた。この1セットを使って、我々のHTCでタイプ済みのパネル30人と我々のHTC自身とをタイプした。残りの1セットは将来に備えてストックした。WSセンターのことを言えない。この当時、私のテストではKT4は、Dw9であることが予想されたが、世界中の様々な人種をタイプしたWSのプールデータで、KT4はどのHTCともクラスターを作らなかった。技術的に未熟だったようだ。HLA-D 特異性は、分類学の種の同定基準と同じで、2つ以上の血縁関係のない標本 (HTC) が見つからないと、承認されない。だから、仮にKT4がnewであっても、承認はされなかったろう。

3-4 HLA-D タイピングの変法

HLA-D タイピングの最終ゴールは、移植のMLCを、従来クロスマッチテストから、タイピングに置き換えることであった。しかし、HTCをそれほどふんだんに確保できるとは思えず実用化にはその点が

最大の障壁になると心配していた。これを打開するかにみえたが、結局は消えていった新しい手技が2つあった。

ひとつは、Sperm Lymphocyte Culture (5)。SpermはMHCに関して haplotype expression であること、class IIを発現していること、MLCで異者のT細胞を刺激すること等から、HLA-D hetero のヒトの精子でも、一方のハプロタイプをHLA アロ抗血清と補体で除いてしまえば、HTC と同等のタイピング細胞になる。世に生殖可能な成人男子はたくさんいるから、血清タイピングの抗血清集めよりはずっと集めやすいはずだ。とまあこんな未来があった。しかし普及しなかった。普及する前にHLA-D タイピングが消滅したためだろうか。精液でMLCを起こすことができるのは、私もテストして確認したが、私の場合、問題が生じてそれを回避できそうになかったので途中で放棄した。

二つめには、EBV transformed B cell line (B細胞株)。HLA-D タイピングが始まるころより、EBVによってヒトのB細胞が自由に株化できていたようである。起源は知らない。従って、HTCを株化すれば、タイピング細胞の供給に困らないという展望が、この研究には見込まれていたように思う。しかし、そうはならなかった。この株細胞は自他のT細胞に同等の増殖反応を示す。HLA-D タイピングには役立たなかったが、B細胞株化されたHTCはその後、HLA-D領域の免疫生化学的研究、分子生物学的研究におけるクラスIIアロ抗原分子及び遺伝子の基準として、欠くことのできない存在となった。細胞の反応を使って行うHLA-Dのタイピングには、PLT (primed Lymphocyte Typing) と呼ばれるもう一つの流れがあがが、これについての私の関わりは後にふれる (6)。

3-5 第7回 IHWS

第7回IHWS (7) のトピックは、HLA-D タイピングの基礎の上に、DRタイピングが立ち上がったことである。WSHTC自身とそのWSHTCでDタイプされたランダムパネルとを抗Ia血清でタイプすることによって、Dw1からDw7のそれぞれに非常に近い関係にあるDRタイプDRw1~DRw7を決定した。

ただし、DとDRの決定基は同一ではない可能性が、ここで芽を出していた。DR4がDw4とDw10とに共有されることが報告されている。もっともDRがsplitすると問題は解決する。実用化に難点があったにせよ、移植のドナー選択のためのタイピングという観点からみれば、Dタイピングの重要性が非常に高かった時代である。DRが合ってもDが合うとは限らないという事実関係が生じたためである。HLA-Dタイピングの最も幸福な時代の幕開けとでもいえようか。

4. 黄金時代：第8回IHWSから第3回AOHWS

4-1 日本人におけるDKT2とDKT3(DYT→Dw15)

第8回IHWSへの過程で、ナイロンウールカラムとthrombinをつかったB細胞の純化改良法が確立されたことによって、B cell タイピングの精度が飛躍的に高まり、急速に普及した。その結果、我々の発見したKT2のDRタイプは、DR4であること、DKT3クラスター(KT3とKT9)もDR4とタイプされることがわかった。パネル細胞においても同様であった。DKT2とタイプされた細胞もDKT3とタイプされた細胞も例外なくDR4とタイプされた。第8回WSには、HTCとしてKT2を提出し、この成果をWSのHTCと抗血清でreformして、発表した(8)。

4-1-1 活気

この第8回IHWSでDutyとして課せられたWSタイピングは、こども5人以上を含む家族を10家族という日本の現状を無視したきわめて非現実的なものだった。しかし、国内WSの主催者側の経験もあったことから、こういう注文を出すのにも出されるのにも、もう慣れがある。子供の数には目をつむって、すでにDタイプされているパネルの家族を交渉して集めて使った。パネルは学生が主体で、全国に分散していたので、北は北海道、南は鳥取まで、全国を採血に飛び回った。輸血用ガラス採血瓶(200ml)にRPMIを100ml、ヘパリンを加え、採血をその中にいれて運んだ。採血と輸送を先方に依頼するのはできる限り避けた。というのも、たいてい気をきかして冷蔵で送ってくる。理由は不明だが冷蔵した全血はMLCで反応しない。それと宅配制

度が今のように充実していなかったため配送予定が立たなかったこともある。北海道には、3件の採血があって、一日で回りきれないため、初日の採血は、札幌から寝台特急の車掌さんに預けて上野まで送るといった採血のキセル輸送という離れ業までやっていた。活気に満ちた時代だった。

4-1-2 HLA-DKT2

HLA-DKT2は、この第6回IHWSとそのプレWS的役割を担った第1回AOHWSにおいて日本人に由来する新しいDR4関連D特異性の一つとして私が発表した。しかし、このWSはおろか、今に至るまでHLA-Dwとして公認されなかった。その泥沼の経緯を要約すると以下ようになる。はじめにDR4であるDKT2をDw7(DR7)に属するHTCと関連づけるという私のミスリードがあった(8)。次にDR4関連Dタイプの一つとして第6回IHWS後公認されたDw13と類縁関係にあると他者に報告された(9)。DKT2ハプロタイプがコードするDR分子とDw13ハプロタイプがコードするその分子は、二次元電気泳動法上同じだという他者の報告がこれに続き、その結果、DKT2はDw13であると多くの人は思ったに違いない(10)。第三回AOHWSのD-typing studyにおいて、H.Festenstein教授より提供されたDw13HTC(JHA, FLE等)を用いたテストにより、我々は、Dw13とDKT2はMLCにおいて異なることを確認した(11)。

ところがである、その後Dw13をコードするDRB1 alleleが2種類(DRB1*0403とDRB1*0407)あることが解った。両者の産物は、アミノ酸配列上、86番目の一箇所が異なるだけで、他は同一であり、DKT2をコードするDRB1*0406は前者と一箇所(37番)、後者と2箇所だけ異なっていた(12)。3rd AOHでテストされたJHAのDRB1タイプはDRB1*0407で、DKT2(DRB1*0406)とは、二箇所違う。アミノ酸が一箇所違うDKT2(DRB1*0406)とDRB1*0403の関係をはっきりさせるために、私は、DKT2(DRB1*0406)を刺激細胞、DRB1*0403をヘテロ(/DRB1**1201)に持つYANを反応細胞とするMLCのCD4 blastをクローニングした。DRB1*0403 HTCを持っていなかったためHTC間

MLCを手段にできなかったためである。その結果、そのプラストより自己であるDRB1*0403を認識しないが、感作アロ抗原であるDRB1*0406を認識して、増殖するクローンを3種樹立した。

HLA-Dタイプの異なる種々のHLA-DホモザイガスB細胞株に対するこれらのクローンの反応性はクローンごとに異なっており、この間のMLCが、DRB1*0406に対する polyclonal な応答である、つまりDタイプの異なる二者間MLCと変わらないことを証明した(13)。ここでいうDタイプとは、HTCを抗原とするMLCで決められたDタイプのことである。

DRB3 (Dw24, Dw24, Dw26) は除く。また、私のクローンにパネル細胞上のDRB1*0406と過不足なく反応し、1:1の対応関係を示したものは、一つもなかった(13)。従って、これらのPLTクローンでDRB1*0406を正しくタイプすることはできないことがわかった。MLCは allogeneic なDR分子に対する poly clonal な応答であり、poly clonalであるということは、cloneのHLAに対する反応特異性が多様であるということであり、cloneは、刺激DR分子だけ、つまり単一のアリル産物だけを認識するとは限らないということである。

4-2-1 Dw15 subcluster SC1 (HLA-DPw5) と SC2 (HLA-DPw2)

先に、タイピングレスポンスすなわちHLA-D genotype aaによるabの反応が0にならないこと、bbをfullとすると中間的な増殖反応を示すことを述べた。もちろんaaによる自己aaの反応を0としてだ。ところがこのaaによるaaの反応も、両者が非血縁関係にあると0にならないことがあった。私はDYT (Dw15) にクラスターされるHTCを4種(KT1, KT3, KT3B, KT9) 見つけている。KT1とKT3は、いとこ結婚の子供であり、KT3B (KT3の親) とKT9の両親は非血縁である。このうちのKT3, KT3B, KT9の三者間でMLCを行うとKT3とKT3Bはお互い同士全く反応しなかった(SC1)が、この両者とKT9(SC2) とにはタイピングレスポンスに相当する中間反応が見られた(14)。このKT3とKT9の間のMLCをPLT (KT9 anti KT3(anti SC1) と KT3 anti

KT9 (anti-SC2)) を作成して解析した。手持ちのHTCやHLA-Dタイプされたランダムパネルを再刺激細胞として、タイプしてみると、これらのPLTの反応はDタイプと全く相関しなかった。間違いなくこのPLTがMLCの抗原(第二の抗原)に対するものであると確信したのは、DKT2 HTC二種(KT2とKT13)間のMLCをこのPLTの反応が説明してくれたからである。前者がSC1, 後者がSC1とSC2。MLCではKT13によるKT2の反応がその逆の反応に比べ常に高くなる。ランダムパネルでは、SC1の頻度が60%を越えていた(14)。従って、SC1は日本人におけるこの抗原系の主要なタイプの一つであることがわかった。家系遺伝研究により、これらの抗原はHLAと連鎖していることがわかった(14)。

4-2-2 HLA-DP (SB) タイピング

第9回IHWSのCellular Typing 部門はHTCによる常套的なHLA-DタイピングのWSに加え、PLTをWSに含めてきた。このPLTWSのWS PLT細胞の中に、純正抗SB (DP) 細胞(抗SB1から抗SB6を各2種)が含まれていた。純正の意味は、SBの発見者であるShawらが、SBを同定した際に使ったPLT細胞そのものという意味である。このWSの dutyとして課せられた4人以上の子供を含む家族を10家族をタイプした結果、我がSC1はSB5 (DPw5) と一致すること、SC2はSB2 (DPw2) となることがわかった(14)。以上、PLTによるSCについての検討の結論としていえることは、DPの不適合は弱いながらもMLCを惹起する。そのDP抗原はPLTでタイプできる。の2点である。

4-3 HTCによるHLA-D タイピング

第9回IHWSのHLA-D typing WSにはWS common HTCとしてKT11 (9w0610:Dw19)、Central Lab. によるFirst level testingにKT3 (DR4-Dw15)、KT2 (DR4-DKT2)、KT13 (DR4-DKT2)、KT14 (DR9-DB5) を提出した。DKT2については、前にも述べたがDw13との間のMLCに依然として、不明瞭な点が残し、承認されなかった。DR9に関連し、特異性未知として提出したKT14は、First level testing において、DB5として提出されたDKB

(8w324) と同一のDB5であることが示されたが、DB5は DB5のまま残された(15)。DKB もKT14も 2nd level workshop study にWS common HTCとしては提出されなかったために、他のWSメンバーの支持が得られなかったためだろう。

4-4 3rd AOH WSにおけるDB5 とDKT2

KT シリーズの中にはDw23(DR9-DB5)とした HTCが2種 (KT12 とKT14) ある。DB5の決着はこの2種のHTCを含めた3rd AOHWSのD-typing studyでつけた。私の担当したこのWSのWSHTC間相互MLCにおいて、DRタイプがDR9である5つの HTC、KT14, KT12, HID, C.Wong, SYM43が、既知のD特異性 (Dw1-Dw19) のどれにも属さない一つのクラスターを形成した(16)。パネルに対する反応の相関係数によってもこの5者が独立したクラスターを形成した。DB5として最初に認定されたDKBがはいっていないけれど、第9回IHWSの検討でKT14がDB5に属すと考えられたので、少し後ろめたかったが、これをDB5クラスターとした(15,16)。5本のHTCによるクラスターは重く認めざるを得なかったようだ(17)。DKT2として提出したKT2とKT13もHTC間相互MLCにおいて、独立したクラスターを形成し、Dw13にはクラスターされなかった。パネル細胞における反応においてもDw13と一致しなかった。しかし、ここで使われたDw13の中にDRB1タイプとしてDRB1*0403 持つものがいたか否かは今になっても不明である。DRB1*0407を持つDw13 (JHA) があったことはわかっている。当時はまだ、DRB1 配列決定が多くのものについてなされていなかった。

5 ハルマゲドン

5-1 10th IHWS

HLA-D領域の研究技法には1980年頃から始まった新しい流れが少なくとも3つある。モノクローナル抗体を用いたHLA遺伝子産物の2D gel analysis、cDNA クローニング、そしてT細胞クローニングである。HTCによる Dタイピングは、DR-DQ垂領域にコードされるT細胞刺激抗原を検出するが、この方法は、原理的にDPをタイプすることはできない

し、DRにコードされるものとDQにコードされるものを、分別してタイプすることもできない。T細胞クローンを用いたタイピングには、この難点を解消する能力が潜在する点に期待があった。10th IHWSは、これらの新技法を主体にして行われた、今までとは違ったスタイルのWSだった。手技の細部を統一するのではなく、分析対象をWSに共通なB細胞株パネルに統一し、そのB細胞株を介して異なる手技や目的で得られたデータを共有できるように設計された。B細胞株パネルは、すべての既知HLA-Dタイプを網羅する107種のHTCをEBVにより株化したものである。このWSにより、HLA-D領域の遺伝子座位の構成と並びがほぼ確定した(18)。細胞部門では、ローカルに樹立されたT細胞クローンをWSB細胞株パネルに当てたデータ、クローンの抗クラスII座位特異抗体による反応阻害テストをまとめることによって、MLCで増殖するT細胞(CD4⁺)の大部分は、DRB1産物を認識すると考えられること、そして、反応特異性において、互いに異なる非常に多数のクローンから成り立っていることを明らかにした(19)。他のクラスII産物 (DRB3, DRB4, DRB5, DQ, DP) も主体にはならないにしろMLCに貢献することがクローンの存在によって確認された。たとえば、Dw24, 25, 26はT細胞クローンによって、検出されるDRw52のサブタイプとして承認され、後に、DRB3*01, 02, 03に対応することがわかった。これらのクローンはDRB3 タイプの異なる二者間 MLCに由来しているから、DRB3産物がMLCに貢献していることの証拠である。アリルに対応する例はあってもいいし、なくてもいい。その理由については今更言うまでもない。ただ、アリル産物がMLCに寄与することがわかり、そのアリルをDNAタイピングで決められるのならT細胞クローンでタイプする必要はない、と思う。

クラスII構造遺伝子の c-DNA 配列決定がこのWSから猛烈なスピードで始まった。WSHTCを主材料にして、DR-DQ垂領域に存在する対立遺伝子の配列がつぎつぎに決定されていった。その結果に基づいて、PCR-SSO法、PCR-RFLP法といった、Class II DNA タイピングが確立されてきた。Class II cDNA 配列決定により、HTCにより決定されたHLA-Dタ

イプ (Dw1-Dw23) は、DRB1 アリルとおおむね1対1に対応する関係にあることがわかった。ただし、DR2 関連ハプロタイプの (DRB1 とDRB5の関係) 詳細については知らない。またそれ以外にもいくつかのほころびのような例外がある。たとえばDw14 (DRB1*0404,0408)、Dw13 (DRB1*0403,0407) 等一つのDwに2つのDRB1が対応している。しかもこれらのDw特異性内のDRB1間には、第一ドメインアミノ酸配列上86番目の一箇所だけに違いがある。Dw14内やDw13内の二つのアリルが MLCにおいて、全く反応しない関係にあるのかどうかは、もしかするとわかっているのかもしれないが、私は知らない。しかし、私の例で明らかのように、アミノ酸一カ所の違いがMLCを惹起することがある(13)。

このようにして、はっきりしてきたことは、HLA-D座の領域にはDR, DQ, DPの各重領域が存在し、そこから発現されるクラスII遺伝子産物は、どの座位のものであれ、不適合すると、MLC(強弱は座位によって異なるが)を起す。また、HLA-Dタイピングによって決定されるHLA-Dwタイプ(Dw1-Dw23)は、多くの場合、DRB1産物がMLCの主役を担うことから、DRB1タイプとほぼ整合する。だから、HLA-Dタイピングは移植において、行う必要がなくなったということである。HLA-クラスII DNAタイピングが完璧にそれをカバーし、もっと適切なドナー選択を可能とする。HLA-DタイピングにしろPLTタイピングにしろ、発現され、かつ移植抗原として機能する分子の違いを見分けることが、最終ゴールだから当たり前といえれば当たり前はある。

DB5は、この10thWS B cell line パネルに、DB5として提出された3rd AOHにおけるDB5HTC3種(KT12,KT14,HID)によってDw23として承認された(17)。Dw23はHTCを抗原とするHLA-Dタイピングで決められた最後のDwタイプとなった。

5-2 フィナーレ

5-2-1 確率1/13

私の私自身のHLAタイプに関わる妄想について書いておきます。私はHLA-A3-Cw6-B13-DR7(Dw17-DQ2)というハプロタイプを母親から受

け継いでいる。母側の祖父母はすでに没しているが、母の弟姉妹のHLAをタイプすることで、この祖父母のどちらかからこのハプロタイプを受け継いでいることを確認した。さて、A3にしてもDR7にしても日本人にはまれなタイプである。韓国人や中国人のHLAについての情報が少なかった時代には、これらのHLAタイプは白人に特徴的なタイプで、東洋人にはまれなもの代表だった。だから、わが先祖に白人がいると素直に信じていた。時代が過ぎてDR7やCw6-B13-DR7については、韓国や中国大陸ではそれほど珍しいタイプではないことがわかってきた。つまり、海を渡る技術を持たなかったために、大陸の海岸線で停滞しているタイプというところだろう。最も妥当な線として、そのわずかな漏れが我が祖先ということになる。成書によれば、Cw6-B13-DR7はモンゴルに起源し世界中に広がった(20)。A3は白人に起源し、騎馬民族によって、韓国や日本にもたらされたという(20)。しかしだ。Cw6-B13-DR7は、白人に普通に存在するし、またA3が白人に起源し、韓国におけるA3の頻度は非常に低くCw6-B13-DR7と連鎖不平衡にない。とすると、わたしのA3-Cw6-B13-DR7というハプロタイプは、朝鮮経由ではなく日本にかつて漂着した白人がもたらした可能性だってまだあり得る。私が渡来白人にこだわるのには理由がある。我が母は秋田県出身である。秋田の北の海岸には、復活したイエスキリストが12人の弟子(使徒?)を伴って漂着し、その地で没したという実に奇想天外な伝承が残されている。もしかしたら私は、彼らの子孫かもしれない。そうなれば確率1/13でキリストの血を受け継いでいる。という大法螺がふけるか否かの瀬戸際にあるからだ。3人の我が子供たちは幸いこのハプロタイプを皆が皆受け継いでいる。将来食うに困るようなことになったら、この伝承とこのハプロタイプをネタに新興宗教でも起すように、話して聞かせているが、テンから信じようとししない。ある時、英会話のレッスンを受けていた際に、話題に窮してアメリカ人の先生(軍医)に、この話をした。ただし、祖母(母の母)の実家の姓が、東海林だったので、東海林はジョージから来ているにちがいない、我が祖先はジョージといった、と落ちを付けた。

非常に受けて大成功だった。そして、彼も白人を祖先に持つと信じている日本人を知っているという。その人は天元といい、天元は天狗に由来し、あの鼻と容貌からみて天狗は渡来白人であろうから私の祖先は白人だといっている、と話してくれた。日本について非常によく勉強している先生だとそのときは感心し、私の話もてっきり信じてくれたものだから思っていたが、しばらくして彼の話が全くの作り話で、私の話なんぞ理解も信じてもいなかったことがわかった。それは彼にランチを招待された時である。東京の山の上（軍用）ホテルである。山の上ホテルは天現寺交差点のそばにあった。彼は私の話のショウジがジョージというところだけが気に入ったらしい。東海林がいけなかった。世は世紀末である。ハルマゲドンを脅しに、「私はイエスキリストの末裔である、救われたければお布施を」と一儲けしたかったところだが、もう遅いようだ。千年に一度のチャンス逃した。東海林の発音は、日本語の音読みにも訓読みにもないからたぶん朝鮮半島か中国に由来するのだろう。東海林はますます私をキリストから遠ざける。

5-2-2 コレクター

クラスII遺伝子の配列決定や、T細胞クローンやアロ抗クラスII血清のHLA特異性決定、ヒトT細胞の *in vitro* 反応解析などに、HLAタイプがきちんと確定されたHTCに由来するB細胞株は、非常に役に立ったし、今後も役に立つと思う。HLA-Dタイプは消滅しても、HTCは残る。私も、KTシリーズを可能な範囲で株化して保存している。

B細胞株については、非常に恥ずかしい思い出があり、そのために愛着もある。3rd AOH が持たれる数ヶ月前位に、Dr. Margo Honeymanより、DPタイプを立ち上げたいので、白人には少ないDPw5をホモに持つHTCとそのB細胞株を提供してくれという申し出があった。そこでDPw5に関してホモなHTCであるKT3とKT2を、それらのB細胞株とともに送った。交換に、Dw3HTCを希望した。ところが、なかなか、返送が届かない。AOHの直前になって、ようやく届いた。同封の手紙には、突然マイコプラズマストームに襲われて、その対策

にいままでかかってしまった、という内容の“お詫び”、の文章があって、それはまあ大変だったろうなとその時は同情した。元凶が、我がB細胞株であろうとは、その時には夢にも思わなかった。それから3年後、日本で持たれた11th IHWSで利用するB細胞株の選別と収集を手伝った際、B細胞株のマイコプラズマ汚染が問題となった。日本由来の細胞には、高頻度でその汚染がみられるという。そこで、急遽、手持ちの全B細胞株について、汚染のチェックを行うことになった。LKT2とLKT3は強陽性、そればかりか研究室で株化された国外HTCも軒並み陽性だった。結局言われている通りであることがわかった。Margioが何を言いたかったのか、このとき初めてわかった。3rd AOHWSの際、彼女が素っ気なかった訳だ。汚染源はB95-8(EBV産生細胞)だと思う。hoechst33258で核の周辺が微塵にそれはそれは美しく輝いていた。かなり古い時代に持ち込まれた細胞であるから、汚染していても無理はないところがある。マウスピペティングが原因だろう。今でこそ、電動ピペットが当たり前だが、10年前までは、そんなものは私たちの手元になかった。非常に頑固な汚染で、最新の殺マイコプラズマ剤でたたいてもびくともしなかった。辻先生（東海大）に新しいきれいなB95-8を分けてもらい、KTシリーズや、国外産HTCで、PBLとして手持ちにあったものは、作り直してWSで必要とする施設へ送った。もっとも、化学やDNAの分野の実務者の間ではこの汚染はあまり気にされていなかったようだ。

そんな、こんなで研究室にあるHTCの株のすべては、マイコプラズマチェックのために、いったん解凍して継代し、検鏡(hoechst33258蛍光染色法)している。そのためこれらの細胞には格段の愛着があり、なかなか処分できない。将来ヒトのT細胞の研究がもっと活性化すれば、きっとAPCとして役に立つ(売れる?)ようになると信じて、今も大事に保存している。かつて、知人に、カタツムリのコレクターがいた。同じ種でも生息する地域が違っていると、殻の模様が微妙に変わってくるのだそうで、彼は、あちこち旅行するたびに殻を拾ってきては磨いて保存していた。そのようなたわいのないものに執着している知人の気が知れず、彼を変人だ思っていた。

自分もそんな変人のひとりだったとは、夢にも思わなかった。今にして、彼の気持ちがよく理解できる。手塩にかけた物は、なかなか捨てられないのだ。HLA-Dを神殿にたとえるとして、私のHTCとそのB細胞株は、石器時代の貨幣のようにスライスされた石柱の一つ二つくらいには、将来なっているだろうか（写真2）。

南イタリアの神殿を訪れるのは春が良いらしい。カタバミ科の雑草の菜の花に似た黄色い花が神殿の周囲を覆い尽くすという。

執筆料を楽しみにしています。執筆料でないんですか！ 南イタリアへは行けませんか！

最後の最後に

研究室の方々、他施設の先生やタイピストのなかに、お世話になった方や親しくしていただいた方がたくさんいます。そうした方々を上手に登場させる才能が私にはないようで、本当に申し訳ありません。心よりお詫びいたします。このコーナは何やらHLAを離れていった人達の告別の辞といった雰囲気があります。そこで、私も、私のDKT2研究のために、いつも快く血液を提供してくださった小林賢（防衛医大：KT13）先生、B細胞株のマイコ汚染チェックと除染をほとんどひとりでやってくれた飯塚さん、そしてT細胞クローン（anti-DRB1*0406）のまとめを一緒にやっていただいた小幡文弥先生（現北里大学医療衛生学部）には、特にこの場でお礼を申し上げます。長い間ありがとうございました。余談ですが、なぜか私を含め四者ともDKT2（DRB1*0406）を持っています。私は本当にDKT2と深い因縁がありました。現在の私は、HLAタイピングには直接関わっておりません（タイピングポンスには関わっています）が、ユーザのひとりではあるようです。HLAとは、しばらくつきあいが続くと思いますので、みなさま見かけたら世渡りの下手な変人ですが、邪険にしないよう、何せ確率1/13で、あの方の子孫ですから、よろしく願います。



参考文献

1. Thorsby E, Piazza A : *Histocompatibility Testing 1975*(ed. Nelsen K), Joint report from the Sixth International Histocompatibility workshop Conference II: Typing for HLA-D Determinants. Munksgaard, Copenhagen, 1975 ; p. 414-434.
2. Sasazuki T, Kohno Y, Iwamoto I *et al.* : *Histocompatibility Testing 1977* (eds. Bodmer W F, Batchelor J R, Bodmer J G *et al.*), Japanese regional report the relationship between HLA-D and WIA specificities in the Japanese population. Munksgaard, Copenhagen, 1977 ; p. 489-498.
3. Kaneko T, Terayama H : Quantitative analysis of DNA in sea urchin eggs and subcellular distribution of DNA in the eggs. *Analytical Biochemistry* **58** : 439-445, 1974.
4. Kaneko T : The behavior of mitochondrial DNA and enzyme during the courses of the early development of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Journal of the faculty of science the university of Tokyo Sec. IV.* **13** : 285-290, 1975.
5. Festenstein H, Halim K : HLA-D locus determinants detected by sperm lymphocytes culture. *Transplant. Proc.* **9** : 1239, 1977.
6. Sheehy MJ, Sondel FH 'd Bach FH : *Histocompatibility Testing 1975* (ed. Nielsen K), Rapid Detection of LD

- Determinants: the PLT assay Munksgaard, Copenhargen, 1975; p.569-574.
7. Festenstein H, Oliver R T D : *Histocompatibility Testing 1977* (eds. Bodmer W F, Batchelor J R, Bodmer J G) *et al.* Joint Report 3. Cellular Typing, DRw serology of Homozygous Typing Cells. Munksgaard, Copenhargen, 1977; p.137-138.
 8. Kaneko T, Ishigamori E, Obata F *et al.* : *Histocompatibility Testing 1980* (ed.TerasakiP). Characteristics of DYT and DKT2 Specificities Munksgaard, Copenhargen, 1980; p.891-892.
 9. Reinsmoen NL and Bach FH : Five HLA-D clusters associated with HLA-DR4. *Hum. Immunol.* **4** : 249-258, 1982.
 10. Nepom B S, Nepom G T, Antonelli P *et al.* : The HLA-DR4 family of haplotypes consists of a series of distinct DR and DS molecules. *J.Exp. Med.* **157** : 1689-694, 1984.
 11. Kashiwagi N, Kaneko T : *HLA in Asia Oceania 1986 Proceeding of 3rd Asia Oceania Histocompatibility Workshop Conference* (ed. Aizawa.M), D Workshop Report. Hokkaido University Press, Sapporo, 1986 p.425-435.
 12. Marsh SGE, Mose JH, Bodmer G : *HLA 1991 Volume II* (eds. Tsuji K, Aizawa M and Sasazuki T), HLA class II sequence polymorphism detected by serology. Oxford University Press, Tokyo 1992 : p.610-620.
 13. Kaneko T, Obata F. Allogeneic recognition of HLA-DRB1*0406 by T cells with HLA-DRB1*0403: Role of amino acid residue 37 on the beta sheet in T cell recognition. *Immunobiol.* **195** : 261-270, 1996.
 14. 金子剛久, 大久保みどり, 伊藤巧一, 柏木登 : 日本人のSB抗原について 最新医学, **39** : 2436-2440, 1984.
 15. Olier W, Doxiadis I, Jaraquemada D *et al.* : *Histocompatibility Testing 1984* (eds. Albert E D, Bauer M P and Mayre W R), First level testing of HLA-D"Blank" HTC, Springer-Verlag, New York, 1984 : p.281-285.
 16. Kashiwagi N, Kaneko T : *HLA in Asia Oceania 1986 Proceeding of 3rd Asia Oceania Histocompatibility Workshop Conference* (ed. Aizawa. M), D Workshop Report. Hokkaido Uiniversity Press, Sagporo, 1986 ; p.425-435.
 17. Mickelson E, reinsmoen N, Robbins FM *et al.* : *Immunology of HLA Volime I* (ed. Dupont B), HLA-Dw and DP typing of the reference panel of B-lymphoblastoid cell lines. Springer-Verlag, New York,1987, p.38-42.
 18. Bodmer WF, Albert E, Bodmer JG *et al.* : *Immunology of HLA Vol I* (ed. Dupont B Nomenclature for factors of the HLA systems 1987. , Springer-Verlag, New York, p. 72-79, 1987.
 19. Flomenberg N: *Immunology of HLA Vol I* (ed. Dupont B), Functional polymorphisms of HLA class II gene products detected by T lymphocyte clones: summary of Tenth International Histocompatibility Workshop Cellular Studies. Springer-Verlag, New York,1987 ; p.532-550.
 20. Park MH, Tokunaga K : *HLA 1991 volume I* (eds. Tsuji K, Aizawa M and Sasazuki T), HLA ethnic study of Japanese and Koreans. Oxford University press ,Tokyo,1992 ; p.674-676.