

## 私の歩んだ研究の道とそこからの教訓②

## 予期せぬことからの展開

矢田 純一\*

私はもともと内科系と思っていたが、内科では根治できる病気は少ない気がし、医師の力で治せる病気が多いと思われる小児科を選択し、昭和35年に東京大学小児科に入局した。したがって、当初は腕利きの小児科医になればよいと考えていたのであるが、皆がそうするように漫然と大学に残ったことで少し思惑が外れた。大学は新しい医療を開拓するための研究も使命としていたのである。1年近くして臨床の経験が少しできた頃、各自いずれかの研究室に属し研究を始めることになっていた。感染症は最も多く遭遇する疾患であるし、そのなかでウイルス感染症は根本的な治療法がなく、どうせ研究するならそれを治せるようにする方策を求めるとをしようと考え、その頃平山宗宏博士（後に母子保健学教授）が率いておられたウイルス研究室を選ばせていただいた。

若気の至りで私は少々我儘だったと思うが、平山先生は懐の深い方で何かと許容してくださり、席を置かせていただけたことを感謝している。当時はポリオが大流行し、病棟には常に10人、20人の患児が入院していた。ところが政府の英断でセービンワクチンを導入したところ、あっという間に流行が沈静化した。ウイルス研究室は別称ポリオ研と呼ばれるくらいだったのに、病気が消滅してしまえば、看板が外れた感じでもあった。

その頃のウイルス疾患の診断は病変部からのウイルス分離か、血清抗体価の上昇をみる方法であって、患者の転帰が定まった頃にやっと結果が得られる状態であった。もっと早期に病原体を同定する方法はないか、研究をしたいと考えた。折しも蛍光抗体法が研究に導入され始めてきてい

た。この方法で病変部の細胞中にウイルス抗原を検出できれば早期診断が可能になるはずである。そこで、蛍光抗体の作製法を取得するため、国立予防医学研究所の伊藤博士の下に弟子入りした。伊藤博士は、入手可能なありとあらゆる蛍光色素をどれが適切か検討しておられた方である。FITC (fluorescein isothiocyanate) が今では中心的に使われているが、それがようやく入手できるようになった時代である。抗体を得るために抗原をフロイントアジュバントに懸濁してウサギを免疫し、抗体の上昇を沈降反応や補結合反応で確かめ、血清から塩析法でγグロブリン画分を得、蛍光色素を結合させるといった手技を教えていただいた。

この間に学んださまざまな実験手技は、その後なにかにつけて役に立つ貴重なものであった。それまで個々の抗体を標識しなければならぬ直接法が主体であったが、ウサギグロブリンに対する蛍光抗体があれば、どのような抗原に対するウサギ抗体にも共通に使える間接法、さらに感度の高い補体法も導入されつつあった。当時蛍光顕微鏡はツアイス製のものしかなく、それをもっている研究室も限られていた。私は東京大学伝染病研究所の川村明義助教授（後に教授）のところのものを使わせていただいた。間もなく国産のものも開発され、それを平山研究室でも購入していただけたので気兼ねせずに存分に使えるようになったことは大変有難かった。しかしながら、肝腎のウイルス感染細胞の検出については、病変部脱落細胞は蛍光抗体法では非特異反応が強く、実用的でないことがわかり挫折することになってしまった。

そうこうするうちに、時代の要請に応じ小児腫

\* 日本小児感染症学会名誉会員

瘍に対する研究を教室の主要なテーマとする方針が定まり、私も免疫学に関心をもつようになっていたので、腫瘍に対する免疫を調べてみたいと思った。もしかしたら、それは腫瘍の免疫療法につながるかもしれないという期待もあった。腫瘍に対して免疫反応が起きるためには、腫瘍細胞は正常組織にはない抗原をもっていないといけない。そのようなものが存在するか調べてみることにした。

ウサギをヒトの腫瘍組織で免疫し、その血清抗体のなかに正常の組織とは反応しないが腫瘍とは反応するというものがないかみる考えであったが、今から思えば無謀な戦略である。異種動物をヒト組織で免疫したら無限に近い種類の抗体ができてしまい、とても解析できたものではない。現在では、患者の血清ないしリンパ球が患者自身の腫瘍細胞と反応するかどうかをみるのが常道である。しかし何も知らずに挑戦してしまった。さすがに単純な方法では収拾がつかなくなるだろうということくらいは頭にあって、新生児期に正常組織を大量に与えてその抗原に免疫トレランスを誘導しておき、成長してから腫瘍組織で免疫したら、引き算の原理で腫瘍に対する抗体だけが作られるだろうという考えに乗ってみた。ウサギの新生児は免疫系がいまだ未熟で、免疫トレランスを誘導しやすい動物であるといわれている。そこでウサギを用い、健康人の白血球と白血病細胞との組合せで、白血病細胞固有の抗原に対する抗体が得られないかと考えた。ところが実は簡単ではない、仔ウサギに人間の匂いがつくと母親はその仔を殺してしまうのである。母親がいるとき仔を捕えるとそうするから、母親を離しておいて子を処置し、そこに親を戻せばよいとの話もあったが、大量のヒトの白血球が注射されたことに気づかない呑気な親はなく、失敗であった。そこで親と隔離し、人工栄養で育てられないかと考えた。しかしウサギの乳が市販されているわけでもなく、牛乳を代用するしかなかったが、本で調べてみると乳汁中の蛋白濃度と成育期間とは反比例していると記されていた。乳汁中の蛋白濃度はウシでヒトの4倍、ウサギでウシの4倍である。牛乳では育たないかもしれないと思い、調製粉乳を用い蛋白濃度

を牛乳より少し高くなるように調整して与えてみた。スポイトの先にゴム片を巻きつけておくと上手に吸ってくれた。育つには育ったが、次第に皮膚がしわしわになり、高張性脱水症になってしまった。牛乳程度にしてみると、今度は大量の尿をするようになった。いずれもある程度まで育つのだけれども、うまくいかない。母乳栄養しかないと考え、子を嘔み殺さないように母親を固定する箱を作り、腹の部分だけ自由にして、そこに子どもを入れて授乳させるという方法がうまくいった。母親は眼球を突出させて怒っていたが、ストレスにもかかわらず母乳がよく出たようである。うまく免疫トレランスにならなかつたり、悪戦苦闘の連続だったが、一つだけ白血病細胞とよく反応する抗血清を得ることができた。正常白血球ではどうかと思い調べてみると、胸腺リンパ球にもよく反応することがわかった。

当初のもくろみと外れてがっかりであったが、マウスでは白血病細胞と胸腺リンパ球とに共通の抗原である TL 抗原の存在が知られていたもので、それと相同のものかもしれないとも思った。末梢血白血球の一部とも反応したので、胸腺由来リンパ球と反応する抗体ではないかとの思いも生まれてきた。後から思うと、免疫源として用いた白血病細胞は、胸腺腫があり末梢血中の白血病細胞が非常に増加していた患者からのものであり、急性 T 細胞性白血病であつたらしい。

T 細胞に対する抗体が作れた理由は、免疫に T 細胞白血球細胞を用いたのでその抗原で強く免疫できたこと、トレランス誘導に用いた白血球は健康成人のもので顆粒球が中心で、その抗原についてはトレランスが誘導できたのに当の T 細胞の抗原については抗原量が不十分でよくトレランスが誘導できなかったか、トレランスになっていたのに後に強力な免疫が行われたため、それが破れたかしたためではないかと推測される。

その頃東京において国際癌学会が開催され、スウェーデンの G. Klein 教授の腫瘍免疫についての特別講演を拝聴した。動物実験では確かに免疫反応によって腫瘍が拒絶されること、ヒトでも Burkitt リンパ腫の患者で血清中に腫瘍細胞に対する抗体が証明されることが示された。その話に

刺激を受けた私は、この人のところで勉強したいと思い、自分の仕事を説明し留学したい旨の手紙を書いた。すると、癌研究について WHO が research training fellow を募集しているから、それに応募し給与が得られるようなら受け入れるという返事をいただいた。この fellow の選考には WHO の試験員がいて各国をまわって選定しているらしく、私も数人の方と一緒に面接を受けた。そんなに競争が激しくなかったのか、私は合格の通知をいただいた。

当時、英国に留学し腎の免疫病理を研究しておられた小林登博士（後に小児科学教授）が帰国され、教室のなかに数多くの免疫学同好の者が生まれた。こうした仲間と勉強会がもたれたが、免疫学を系統的に勉強するよい機会であった。Lancet 誌に連載された ABC of Immunology をテキストとしたと思う。小林先生は人を鼓舞するのがとても上手なお方で、わたしもそのおだてに乗せられて研究を続けてきた気がする。WHO の試験を受けたときも何かとご指導くださり、お世話していただいた。

ストックホルムのカロリンスカ研究所腫瘍生物学部門に留学することになったのであるが、ほとんどの研究員が腫瘍免疫を手がけていた。日本にいるとき、どうせボスが研究テーマの指示を出すのだから白紙の状態で行けばよいと先輩にいられたのに、Klein 教授に会った最初に「どういう研究をするつもりか」といわれ、戸惑ってしまった。何でも自分のしたい研究を自由にしたいというのである。少し相手に頼ろうとしていた甘い自分にとってカルチャーショックであった。個性と自己責任を重んじる欧米流に触れた思いであった。とりあえず、自分の手に入れた抗体の対応抗原の性状を明らかにしたいこと、Burkitt リンパ腫の免疫誘導抗原の研究に参加したいことをお願いした。

ここの研究室ではヒトの腫瘍で初めてそれに対する免疫の存在が証明されたということで、Burkitt リンパ腫の研究が盛んであった。

患者血清を生きたまの腫瘍細胞に反応させ、蛍光抗体法で抗体が結合するのを証明することが行われていた。培養株化された腫瘍細胞も数多く

作られていた。私は、患者血清が反応する相手の抗原について調べてみたいと思った。

培養株を維持するには、週 2 回ほど培養液を新しいものと交換する必要がある。一部の培養細胞について手抜きをしてその交換を怠っていたところ、その培養細胞は著しく抗原量が増えていることに気づいた。もしかしたら、栄養が少なく細胞増殖が抑えられると抗原の表出が増えるのかもしれないと思い、細胞密度をいくつか設定して調べてみた。そうすると、培養開始時の細胞数を少なくして細胞増殖をよくすると抗原表出量が低下し、細胞数を過密にして細胞増殖を悪くすると抗原表出が悪くなることがわかった。

そこで、薬物で細胞増殖を抑制したらどうなるかみることにした。

DNA 複製を抑えるため mitomycin C を、RNA 合成を抑えるため actinomycin を、蛋白合成を抑えるため puromycin を細胞死が起きない程度の少量を用いて調べると、mitomycin, actinomycin 処理で抗原表出が上がるということがわかった。蛋白合成阻害では抗原蛋白の合成も抑えられるわけであるから、当然抗原表出も冒されていた。教授の下で多数の血清の反応性をチェックする仕事がされていたが、それには抗原を良好に表出した培養細胞が必要である。私が培養するとそのような細胞が大量に作れるので、Yata magic といわれた。検討していた抗原は後に腫瘍細胞の抗原ではなく、EB ウイルスの抗原であることがわかったが、細胞の代謝と抗原の合成とが乖離していたのはそのためだったと考えられる。

さて、胸腺リンパ球の抗原のほうについて、当の抗体は偶然作れてしまったものであり、普遍的なものにするには抗原を精製し、それで免疫したら誰でも同じ抗体が作れるようにしなければならなかった。ゲルクロマトグラフィなどさまざまな試みを行ったが、蛋白化学の素人にとっては難題であり、結局成功することはなかった。そんなとき Klein 教授から、その抗体が T 細胞と反応する抗体なのかどうか知りたいのなら、T 細胞が欠損していると考えられる胸腺のない患者、そして胸腺があり T 細胞は存在するが抗体産生不全があり、B 細胞が欠損していると考えられる患者

のリンパ球を調べてみたらどうかという提案があり、当時免疫の二元説（抗体産生系と胸腺・細胞性免疫系の存在）を唱え、それがヒトでもあてはまるとして、数多くの原発性免疫不全症患者を集めて検討している米国ミネソタ大学 R. Good 教授を紹介していただき、検体を送っていただくこととなった。実務にあたってくれたのは、若き日の R. A. Gatti 博士であった。

その結果、DiGeorge 症候群や重症複合免疫不全症のリンパ球では、当の抗体と反応するものは減少しており、一方 Bruton 型無 $\gamma$ グロブリン血症のリンパ球ではそれが十分存在することがわかり、私の抗体はヒト T 細胞と反応する抗体らしいと考えられるに至った。そこでとりあえず対応抗原を HTL (human thymus lymphoid tissue antigen) と名づけた。

留学の期間が終わったが、当時の全国的な大学紛争で古巣に戻ることが困難であった。平山教授のお世話で母子保健学教室に所属させていただいたが、臨床への思い絶ちがたく、翌年、中山健太郎教授の主催されておられた東邦大学小児科に移籍した。その頃、月本一郎博士（後に教授）はちょうど好中球の NBT 試験で学位をとられたところで、さらに研究を続けたいという意向をもっておられた。私は、国立がんセンター研究所の西岡久寿彌部長のグループが Burkitt リンパ腫細胞には補体レセプターがあるということを見つけていたので、顆粒球系細胞がどの程度の分化段階で補体レセプターや Fc レセプターを表現するようになるのかを調べてみたらと提案し、研究所室長でいらした橋武彦博士（後に東北大学教授）のご協力をいただいて仕事を始めた。

当初の目的であるオプソニンレセプターの表出は、骨髄細胞ぐらいの分化段階から始まるのがわかったが、それ以上に面白いことに気づいた。補体レセプターの検出は、ヒツジ赤血球に IgM 抗体を反応させ補体の第 3 成分までを結合させたもの (EAC) が細胞の表面に接着する現象 (EAC ロゼット) で、Fc レセプターはヒツジ赤血球に IgG 抗体を結合させたもの (EA) が接着する現象 (EA ロゼット) で調べるのであるが、リンパ球には補体レセプターがなく、Burkitt リンパ腫細胞はそれ

をもつとして注目されていたのに、正常のリンパ球の一部が EAC ロゼットを作ることを発見したのである。一部のリンパ球には補体レセプターがあるということである。そこでさまざまなリンパ組織のリンパ球について検討したところ、胸腺リンパ球はほとんどが強く EAC ロゼットを形成した。実はそれは、negative control として置いたヒツジ赤血球 (E) 自身とロゼットを形成したことによったのである。これは大変な驚きであった。なぜ、末梢血リンパ球は E ロゼットを作らなかったのであろうか。この反応はリン酸バッファー食水 (PBS) をメディウムとして行っている。T 細胞が成熟して E を結合する力が弱くなると、細胞どうしが荷電により反撥してロゼットを形成できなくなるのかもしれない。そこで、荷電を解消するために反応液に蛋白を加えることにしてみた。実際には胎児ウシ血清を用いた。そうすると、末梢血リンパ球でもかなりの割合のものが E ロゼットを形成したのである。

そこで、HTL 抗原の存在と E ロゼット、EAC ロゼットとの関係を調べたところ、E ロゼット形成リンパ球は蛍光抗体法で HTL 抗原が証明され、EAC ロゼット形成リンパ球は HTL 抗原陰性であった。当時はまだリンパ球は T 細胞、B 細胞の 2 種類しか知られていなかったので、E ロゼットは T 細胞の、EAC ロゼットは B 細胞の性質でないかと考えた。HTL 抗原は偶然の産物であるけれども、E ロゼット、EAC ロゼットは誰にでもできる T 細胞、B 細胞の検出法になる。この方法は一般に広く応用されるようになった。前回同様に原発性免疫不全症で検討してみたところ、おおむね予想と合致したが、B 細胞が欠損していると考えられる Bruton 型無 $\gamma$ グロブリン血症の患者で EAC ロゼットを作るリンパ球が証明され、EAC ロゼットは必ずしも B 細胞のマーカーとはしがないことがわかった。後に第 3 のリンパ球 NK 細胞、第 4 のリンパ球 NKT 細胞の存在も知られるようになったので、それらの細胞をみていたのかもしれない。B 細胞のマーカーとしては表面免疫グロブリンとすべきと考えた。

さまざまな疾患について T 細胞、B 細胞の量的変化を調べてみたが、原発性免疫不全症以外では

明確な変化を示すことは少なかった。

麻疹など急性ウイルス感染で T 細胞が減少することは、この疾患における細胞性免疫不全の一因と考えられた。一方で、伝染性単核症患者では T 細胞の増加があり、異型リンパ球の多くも T 細胞であった。EB ウイルスは補体レセプターに接着して感染し、主に B 細胞に感染すると考えられていたので、興味ある現象であった。私も、臍帯血リンパ球を T 細胞群と非 T 細胞群とに分け、それぞれに EB ウイルスを感染させてみたところ、トランスホームし、EB ウイルスが増殖している細胞が出現したのは非 T 細胞からのみであった。

ヒト T 細胞、B 細胞を同定し、それぞれの細胞を分けて機能を調べることができ、それを駆使して教室員が研究を続けてくれた。

以上述べてきたように、私の研究は常に目的とは異なった実験結果から始まっている。予想外の結果を失敗としてとらえ、無視していたら何事も起きなかったと思う。凡人の知恵は底の知れたものである。よほどの天才でない限り、頭のなかで自然現象の機構を解き明かすことはできないと思う。自然がこっそり示してくれたヒントに気づき、そこから糸口をつかむことが大切なのではないだろうか。“Make hundred tests”は Klein 教授の口癖であったが、実験をしなければ何も起きないのは確かである。しかし、その結果のなかから自然が秘かに示している事象を見落としたら、何回実験を積み重ねても実りはない。実験してみること、そして予断なく起こった現象に気づくこと、それが凡人には大切なのではないかというのが、ささやかな私の経験から得た教訓である。

\* \* \*