

Title	Rapid HLA Class I DNA Typing using Microtiter Plate-Reverse Hybridization Assay
Author(s)	森部, 豊輝
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42845
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	もり べ とよ き 森 部 豊 輝
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 6 5 7 号
学位授与年月日	平成12年6月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Rapid HLA Class I DNA Typing using Microtiter Plate-Reverse Hybridization Assay (MRHA) by Simple Thermoregulation : High-Resolution Subtyping of the HLA-A2 and-B40 Antigen Groups (温度制御が簡便なマイクロプレート逆ハイブリダイゼーションアッセイ (MRHA) による迅速な HLA クラス I DNA タイピング : HLA-A2と HLA-B40抗原グループの高精度サブタイピング)
論文審査委員	(主査) 教授 林 紀夫 (副査) 教授 網野 信行 教授 金倉 謙

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

ヒトの主要組織適合性複合体 (MHC) 遺伝子である HLA 遺伝子は宿主の免疫応答に関与する白血球抗原をコードする遺伝子で、ヒト遺伝子の中で最も高度な遺伝的多型性を示すとともに移植における HLA 型適合の重要性や種々の疾患と HLA 多型との相関が報告されている。HLA 分子の遺伝的多型性はこれまで血清学的方法によって解析されてきたが、PCR 法の利用によって DNA レベルでタイピングすることが可能となり非常に多くのアリル (対立遺伝子) が存在することが明らかになった。HLA クラス I ローカス (HLA-A, -B, -C) についても PCR を利用した種々の方法 (PCR-SSP 法、PCR-SSOP 法、PCR-SSCP 法、PCR-RFLP 法、シークエンス法) が開発されてきたが、その遺伝的多型性が著しく高度である上に幾つものエクソンに及んでいるために操作の簡便性、データの正確性、迅速性、検体処理能力に優れた実用性の高い方法がなかった。一方、簡便かつ正確で検体処理能力も高い技術として一般的にマイクロプレートを用いた方法が利用されているが、HLA-DNA タイピングにはほとんど適用されていなかった。本研究では、日本人集団において検出頻度およびアリルバリエーションが最も多い HLA-A2と HLA-B40抗原グループの高精度サブタイピングをモデルとして、マイクロプレートを利用した操作性、正確性、迅速性、検体処理能力に優れた実用性の高い HLA クラス I DNA タイピング法を確立することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

1) HLA-A2と HLA-B40抗原グループ特異的 PCR 増幅

HLA-A2と HLA-B40抗原グループの第2エクソンから第3エクソンに及ぶ領域の増幅を行うため、それぞれに特異的なプライマーセットを用いて PCR 増幅反応を行った。この際、アンチセンスプライマーはあらかじめビオチン修飾しておいた。その結果、HLA-A2抗原グループ特異的な増幅産物と HLA-B40および HLA-B47 抗原グループ特異的な増幅産物が得られた。

2) マイクロプレート逆ハイブリダイゼーションアッセイ (MRHA) の反応条件

水溶性カルボジイミド存在化でアミノ修飾 SSO プローブをカルボキシル修飾マイクロプレートへ共有結合によって固相化した。SSO プローブが固相化されたマイクロプレートにビオチン標識した PCR 増幅産物をハイブリダイズし洗浄後、ハイブリダイズした PCR 増幅産物をストレプトアビジンコンジュゲートアルカリフォスファターゼ/PNPP 発色系によって検出した。発色後、イムノリーダーで吸光度を測定した。通常は高温で実施されているハイブ

リダイゼーション反応と洗浄をそれぞれ37°Cと室温で行うためにハイブリダイゼーション液にホルムアミドを添加し、その最適ホルムアミド濃度を検討した結果、20%ホルムアミド濃度条件で37°Cでのハイブリダイゼーションおよび室温での洗浄が可能であった。すなわち、この条件下で全てのSSOプローブについて陽性シグナルと陰性シグナルが明確に判別可能であった。

3) HLA-A2とHLA-B40抗原グループのサブタイピング

HLA-A2とHLA-B40 (HLA-B47も含む) 抗原グループの高精度サブタイピングのためにそれぞれ21種類 (2種類のプローブを同時に固相化しているウェルが1カ所ある) および15種類のSSOプローブを用意した。HLA-A2抗原を持つ72サンプルとHLA-B40抗原を持つ41サンプルとHLA-B47抗原を持つ6サンプルがMRHAによってタイピングされ、イムノリーダーによって測定された吸光度からアレルが決定された。全ての陽性シグナルの吸光度は1.0以上かつ陰性シグナルの吸光度は0.5未満であり、陽性シグナルと陰性シグナルは明確に判別可能であった。このような陽性および陰性シグナルウェルの反応パターンからアレルが決定され、HLA-A2サブタイピングの結果では、A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A*0205, A*0206, A*0207, A*0210, A*0217が検出された。一方、HLA-B40およびHLA-B47サブタイピングの結果では、B*4001, B*4002, B*4003, B*4006, B*4008, B*4701が検出された。さらに、これらのタイピング結果はPCR-RFLP法およびPCR-SSOP法によってタイピングされた結果と全て一致した。

[総括]

本研究では、マイクロプレートを利用したHLAクラスI DNAタイピング法を確立し、HLA-A2とHLA-B40抗原グループの高精度サブタイピングに適用した。このマイクロプレート逆ハイブリダイゼーションアッセイ(MRHA)は、①全ての反応条件が37°Cあるいは室温であるために温度制御が容易であること、②陽性シグナルが強くバックグラウンドが低いためにcut-off値が明確であることを特長とした、操作性、正確性、迅速性、検体処理能力に優れた方法である。さらにイムノリーダーで測定したデータをもとにタイピングできるのでコンピュータソフトウェアによる自動判定も可能である。今後は、この方法をHLA-A, B, CローカスのDNAタイピングに適用することが課題である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、HLAクラスI DNAタイピング法における操作性、正確性、迅速性、検体処理能力の向上を目指し、新しいタイピング法を確立することを目的としている。本法では、マイクロプレートによるリバースハイブリダイゼーション法を用い、従来法より簡便なものとし、さらにその操作性を向上させるため、通常は高い温度で行われているハイブリダイゼーションとその後の洗浄を、それぞれ37°Cおよび室温で実施できる点において優れている。また、ハイブリダイズしたPCR増幅産物の検出もEIAと同じように発色反応によるため、汎用機器を利用してHLAタイピングを行うことができる。さらに、データ解析においてもイムノリーダーによる測定値を利用することで、コンピュータソフトによる自動判定を可能にした。そのため、複雑で熟練性を要するデータ解析の手間を省くと同時にミスタイピングも最小限に抑えることができるようになった点が非常に価値がある。

以上より、本研究内容は学位に値するものと考えられる。