

第5回日本組織適合性学会大会

ワークショップ I

「DNA タイピングの実際」——入門から今後の展望まで——

1. DNA 抽出から PCR まで

防衛医科大学校, 検査部 小林 賢

末梢血からの DNA 抽出

1. 概要

DNA は自己複製と生命活動を司るタンパク質の情報を担っている鎖状の高分子物質で、染色体の主要成分である。ヒトでは、細胞一個当たり46個 (23対) の染色体が核内に存在し、個々の染色体は1分子のDNAである。1個の細胞に存在するDNAの合計は約 6×10^9 塩基対 (分子量 4×10^{12}) からなり、その全長は約2mにも達する。DNAはその他にヒストンと呼ばれるタンパク質など多種のタンパク質やRNAを結合している。

DNAの調製の際に使用する試薬や器具にはDNA分解酵素 (DNase) が混在していることがあるので、オートクレーブなどによりDNaseを失活させておかなければならない。また我々の手にもこのDNaseが存在するので操作中は手袋を着用し、この酵素の混入を防ぐよう心がけなければならない。

細胞は、全体をリン脂質でできた細胞膜でおおわれている。そのため、細胞からの抽出には、細胞浮遊液を陰イオン系の界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で溶解する必要がある。界面活性剤は、DNAに付着しているタンパク質や脂質とミセルを形成し、これを可溶化することによってDNAを遊離させる。界面活性剤としては、SDSのほかに同じ陰イオン系のSarkosyl (N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) や非イオン系のTriton X-100などが用いられる。SDSなどの強力な界面活性剤がDNaseも同時に失活させるので、DNAの分解防止にも役立つ。Proteinase Kなどのタンパク質加水分解酵素で処理すると、DNAが遊離し易くなり、また、水層 (DNA層) とフェノール層の界面に集まるタンパク質分画が減少し、DNAの回収率を高くすることができる。

タンパク質を変性・可溶化することによってDNAを遊離させる一般的な方法は、フェノール処理である。SDSによって破壊された細胞懸濁液に等量のフェノールを加え、穏かに混和した後、遠心すると水層とフェノール層に分けられる。変性したタンパク質はフェノール層および両層の境目に、またDNAは水層に移行する。この方法では、タンパク質の変性とDNAの分別抽出を同時に行なうことができる。フェノールは水を吸い込んでしまうので、フェノール層に水が移行して水層の体積が変化することと、フェノールによる水層のpH変動を防止するために、フェノールを予めトリス塩酸などの緩衝液で飽和させておく。またフェノールは保存中に酸化されるので、酸化防止剤として0.1% 8-ヒドロキシキノリンを加えておく。これを加えると、フェノールは黄色に着色されるので、フェノール層を見分けるのにも便利である。

フェノールの代わりにクロロホルムを用いることもできる。2層分離を早めるためには、クロロホルム24容に対してイソアミルアルコール1容を加える。また、これによって泡立ちも抑えることができる。

フェノール抽出によって得られた水層に、等量のフェノール・クロロホルム (3:1) 混合液を加えて転倒混和する。これにより水層に残存していたタンパク質などの不純物がフェノール・クロロホルム層に移行し、除去される。フェノールが残存しているとDNAを酵素処理する際に酵素タンパクが変性してしまうので、等量のクロロホルムを水層に加えて、水層に残存しているフェノールを抽出除去する。

抽出されたDNA溶液に1価カチオンを最終濃度0.1~0.4Mになるように加えて極性を高めておき、2.5倍量のエタノールあるいは等量のイソプロパノールを加えると、溶解度が下がりDNAが析出する。この操作を

エタノール沈殿と呼ぶ。

近年ではこのような有機溶媒を使用しない抽出法も市販されている。その代表例としてはチオシアン酸グアニジン guanidine thiocyanate を用いる方法である。その原理は、Triton X-100などの界面活性剤により細胞膜を溶解し、強力なタンパク変性剤、可溶化剤であると同時に DNA 分解酵素活性を阻害するチオシアン酸グアニジンと界面活性剤 (Sodium N-Lauroyl Sarcosinate) や還元剤 (Mercaptoethanol) とともにタンパク質および DNA を可溶化した後、エタノールで可溶化した DNA を析出、沈殿させて抽出させる方法である。

今回は迅速的に抽出できるチオシアン酸グアニジン法と DNA 抽出の標準的な方法であるフェノール法について記述する。

II. DNA 抽出の実際

1. チオシアン酸グアニジン法

■ 試薬

試薬類はすべて特級以上のグレードを使用する。

□ 2 M Tris-HCl, pH7.6

TRIZMA BASE (Sigma, T-1503, 500g, MW;121.1)

121.1g の TRIZMA BASE を 400ml 蒸留水で溶かし、塩酸で pH を 7.6 に調整し、全量を 500ml にする。オートクレープ処理し、室温で保存する。

□ 250mM EDTA・2Na

EDTA・2 Na (和光純薬, 345-01865, 500g, MW;372.24)

23.67g の EDTA・2 Na を 200ml の蒸留水で溶かし、10M NaOH で pH を 8.0 に調整し、全量を 250ml にする。

オートクレープ処理し、室温で保存する。

この試薬は、pH が 7 を越えるまで溶けにくい。

□ CMLB (Cell Membrane Lysis Buffer) (I 液)

• 0.32M Sucrose (Saccharose) (和光純薬, 195-07925, 平衡密度勾配遠心用, 500g, MW;342.3)

• 1% (v/v) Triton X-100 (和光純薬, 203-03215, 500g)

• 5 mM MgCl₂

• 12mM Tris-HCl (pH7.6)

4°C 保存

□ NMLB-T (Nuclear Membrane Lysis Buffer T) (II 液)

• 4 M Guanidine Thiocyanate (Fluka, 50990, 250g, MW;118.16)

• 12mM Tris-HCl (pH7.6)

• 12mM EDTA・2 Na (pH8.0)

• 375mM NaCl

• 0.5% Sodium N-Lauroyl Sarcosinate (和光純薬 199-02325 500g, MW;293.39)

• 0.1M β-Mercaptoethanol (和光純薬 137-06862 25g, MW78.14, 比重=1.115 at 20°C)

4°C 保存

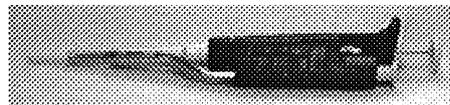
□ 99.5% エタノール

□ 70% エタノール

□ 滅菌蒸留水

■ 実験器具

- 7 ml/EDTA 真空採血管
- 15ml ポリプロピレンチューブ (コーニング15ml 遠心管25317)
ポリスチレン製およびガラス製のチューブは使用しない。
- 1.5ml マイクロチューブ (ロビンス1012-00-0)
- 10ml メスピペット (コーニング7076PIPET 10)
- プラスチックスポイト (株ヤトロンより発売されているサンプラー (RM216-3) が使いやすい。もし入手が困難な場合には、直径 4 mm のストローを半分の長さに切断し、片側をシールして使用する。)
- 連続可変式ピペット (ピペットマン P-200, P-1000, ギルソン)
- イエローチップ
- ブルーチップ
チューブ・メスピペット・チップ類はすべて滅菌した物を用いる。
- (冷却) 遠心機
- (冷却) 微量高速遠心機 (クボタ, モデル1700)
- またはチビタン遠心機 (ミリポア)
- ミキサー
- 試験管立て
- 1.5ml マイクロチューブ立て
- ピンセット
- キムワイプ
- キムタオル
- 廃液用プラスチックビーカー



使用するガラス器具類, チップ, 試薬等には分解酵素が存在していることがあるので事前に滅菌しておく。操作中はできるだけ手袋などをして分解酵素の汚染を防止する。

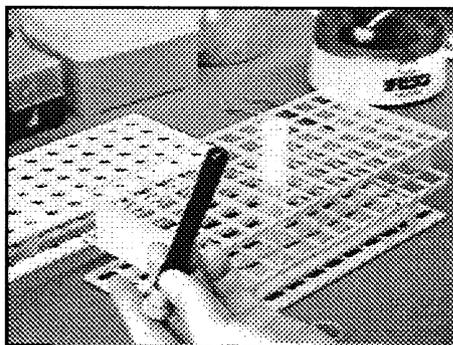
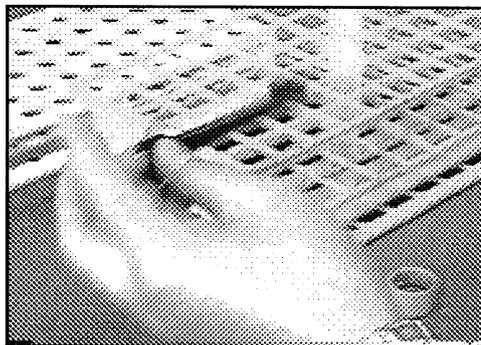
■ 操作法

1. 7 ml/EDTA 真空採血管に採血する。

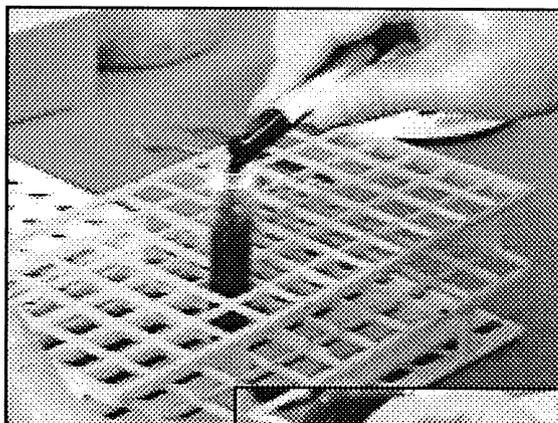


2. 15ml プラスチックチューブに I 液を 10ml 入れる。

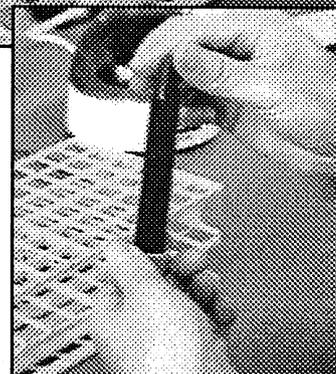




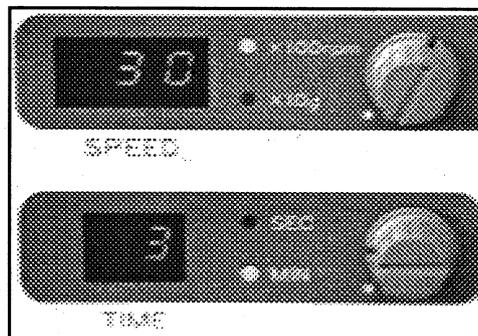
3. EDTA 加血液をよく転倒混和した後、I液の入ったチューブの目盛15まで入れる。



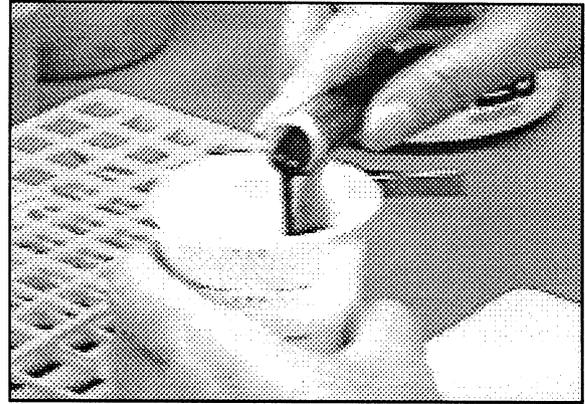
4. キャップを確実にしてから、ゆっくりと10回程度転倒混和する。



5. 3,000回転 3分間 4°Cまたは室温で遠心する。



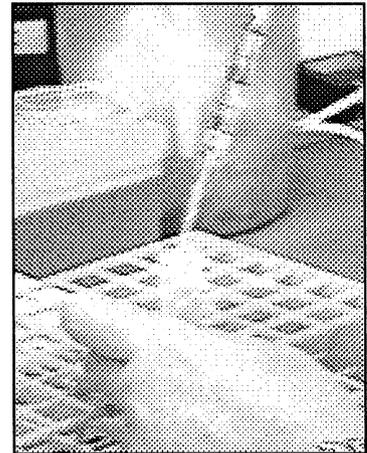
6. チューブを静かに傾け、上清（溶血した赤血球）を廃液入れに捨てる。
 ※沈渣ははがれやすいので、流れないように注意して捨てること。



7. キムタオルにチューブの口を当て、上清を完全に吸い取る。
 ※沈殿が流れ出てこないように注意して行なう。

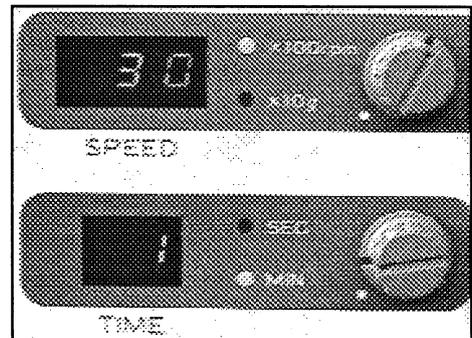


8. I液を5 ml 入れる。
 ※ピペットの先端をチューブにつれないようにして入れる。



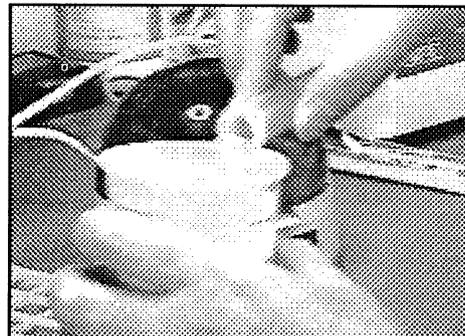
9. 沈殿がチューブからはずれるまでゆっくりと転倒混和する。指で管底をはじくように叩くと簡単にはずれる。

10. 3,000回転1分間4℃または室温で遠心する。



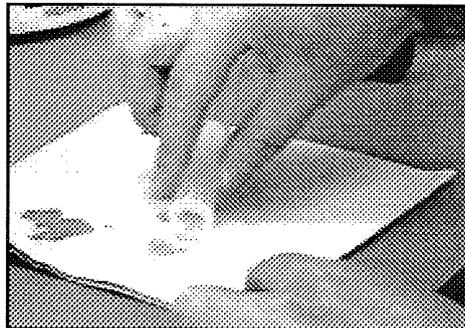
11. チューブを静かに傾け、上清（溶血した赤血球）を捨てる。

※沈殿が流れ出やすいので注意して行なう。



12. キムタオルにチューブの口を当て、上清を完全に吸い取る。

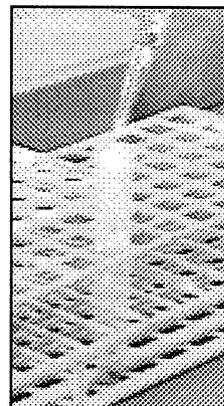
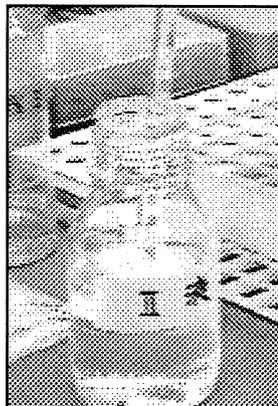
※沈殿が流れ出てこないように注意して行なう。



13. キムワイプを実験台の上に敷き、その上で管底を叩き、ペレットをほぐす。あるいは、指で管底を叩いてペレットをほぐす。

14. II液を2.5ml 加える。

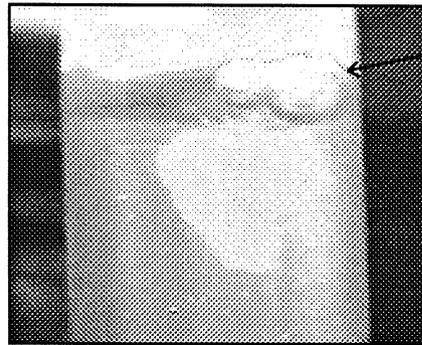
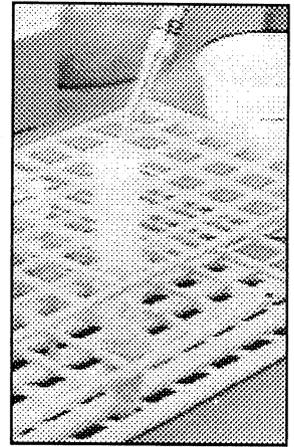
※ピペットの先端をチューブにつれないように入れて入れる。



15. ミキサーで固まりがなくなるまで混和する。



16. 99.5%エタノールを6.25ml 加える。



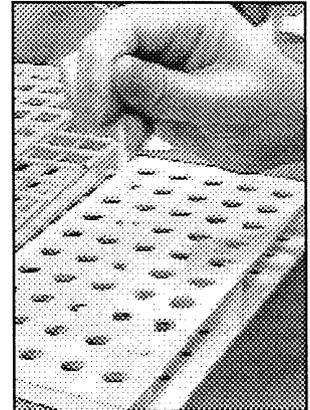
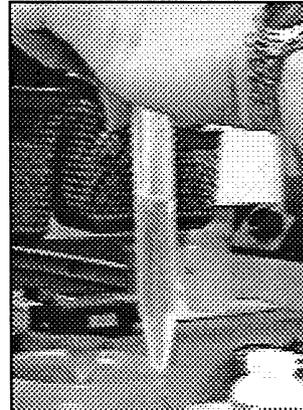
DNA

17. DNA が完全に析出するまでゆっくりと転倒混和する (20回程度)。

18. 析出した DNA をアルコールと一しょにスポイトで吸い、1.5ml のエペンドルフチューブに移す。

※チューブを取るときにはピンセットを用いて取り出す。

※スポイトの先端に DNA が付着することがあるので注意すること。

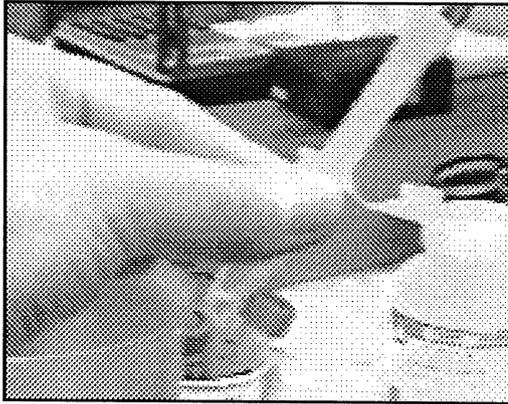


19. 微量高速遠心機またはチビタンを用いて5,000rpm で2, 3秒間遠心する。

※チビタンは蓋をすると遠心を開始し (上図左), 白いボタンを押すと蓋が少し開き遠心を停止する

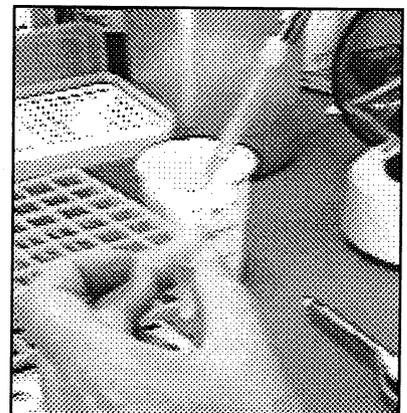
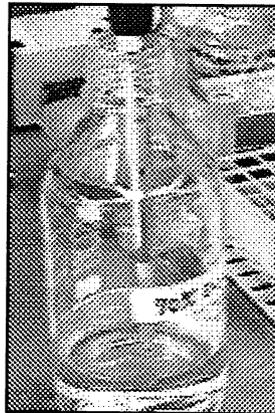
(上図右).

※あまり遠心し過ぎると DNA を溶かすのに時間がかかる。

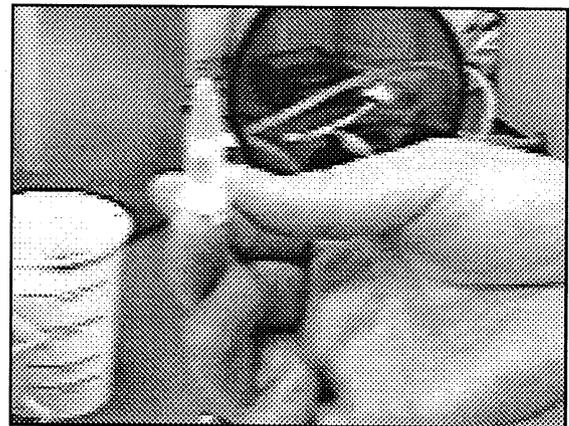


20. 上清をピペットマン P-1000 を用いて完全に捨てる (上図左). 上清が多少残っている場合にはピペットマン P-200 に換えて残りの上清を捨てる (上図右).

21. 沈渣をリンスするためにピペットマン P-1000 を用いて 70% エタノールを 1 ml 加える.

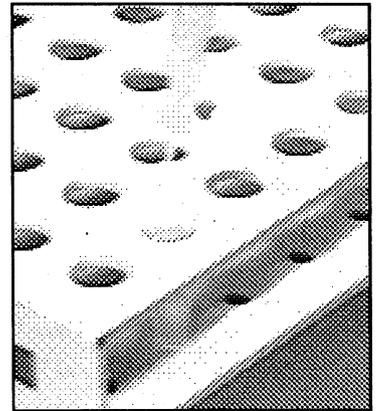


22. 軽く転倒混和し DNA ペレットをはがす. もしはがれない場合は, 軽く指でチューブを叩く.



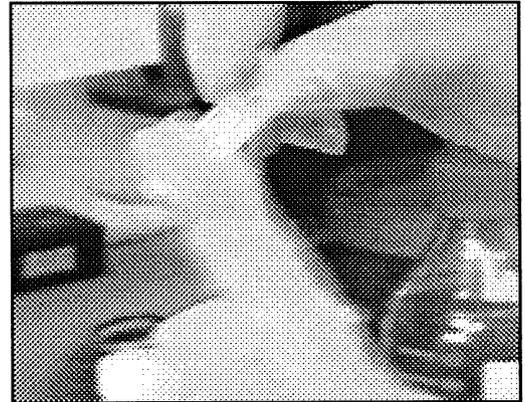
23. 微量高速遠心機またはチビタン遠心機を用いて 5,000rpm で 2, 3 秒間遠心する.
 24. 上清をピペットマン P-1000 を用いて完全に捨てる. 上清が多少残っている場合にはピペットマン P-200 に換えて残りの上清を捨てる.
 25. 21. ~24. の操作をもう一度行う.

26. 1 ml の滅菌蒸留水をピペットマン P-1000を用いて加える。



27. チューブの先をかなり激しく人差し指で擦るような感じで叩いて混和する。

※42°Cの恒温槽に入れて数時間置くと、DNA が早く溶解する。



28. 回収されたDNA は4°Cまたは-20°Cで保存する。

※この方法で末梢白血球数5,000/ μ l からおよそ80 μ g のDNA が回収される。

2. フェノール・クロロホルム法

■ 試薬

- CMLB(Cell Membrane Lysis Buffer)
 - 0.32M Sucrose
 - 1% (v/v) TritonX-100
 - 5 mM Tris-HCl(pH7.6)
 - 4°C保存
- WCLB(White Cell Lysis Buffer)
 - 10mM Tris-HCl(pH7.6)
 - 10mM EDTA(pH8.0)
 - 50mM NaCl
 - オートクレーブ, 室温保存
- 10% SDS, 室温保存

SDS はオートクレーブをかけると沈殿が出るので, 沸騰水浴中で15分加熱処理を行なう。
- Proteinase K (ペーリンガー)
 - 5 mg/ml になるよう蒸留水で溶解する。
 - 37°Cで60分間前処理し, 小分けして-20°Cで保存する。
- CI (クロロホルム・イソアミルアルコール)

24容のクロロホルムに1容のイソアミルアルコールを加え、混和する。

- PCI (フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール)
 1. フェノールを60°C程度の温浴で融解する。
 2. 融解したフェノール3量にCIを1量加える。
 3. 等量の1 M Tris-HCl(pH7.6)を加え、激しく混和する。
 4. 静置し、上層の水層をアスピレータなどで捨てる。
 5. 等量の0.1M Tris-HCl(pH7.6)を加え、酸化防止剤として8-キノリノールを最終濃度0.1%になるように加えてから、激しく混和する。
 6. 静置し、上層の水層をアスピレータなどで捨てる。
- 4°Cで保存すれば6ヶ月間程度は使用可能である。
- イソプロパノール
- 70%エタノール
- 99.5%エタノール
- 滅菌蒸留水

■ 実験器具

- 7 m/EDTA 真空採血管
- 15ml ポリプロピレンチューブ (コーニング15ml 遠心管25317)

※ポリスチレン製およびガラス製のチューブは使用しない。特にポリスチレン製チューブはフェノールにより割れてしまう。
- 1.5ml マイクロチューブ
- 10ml メスピペット
- プラスチックスポイト (吸い口を2 mm 程度に切断する)
- 連続可変式ピペット (ピペットマン, P-200, P-1000, ギルソン)
- イエローチップ, ブルーチップ

※チューブ・ピペット・チップ類はすべて滅菌した物を用いる。
- (冷却) 遠心機
- (冷却) 微量高速遠心機 (クボタ, モデル1700)
- 恒温器 (タイテック, BR-40L)
- ローテータ (タイテック, RT-50)
- 試験管立て
- 1.5ml マイクロチューブ立て
- ピンセット
- キムワイブ
- キムタオル

■ 操作法

1. 7 m/EDTA 真空採血管に採血する。

↓
2. 15ml チューブにCMLBを10ml入れる。

↓
3. EDTA 加血液を2. のCMLBに5 ml 入れる。

- ↓
4. 10回程度転倒混和する。
↓
 5. 3,000回転, 3分間室温または4°Cで遠心する。
↓
 6. チューブを10°程度傾けて上清(溶血した赤血球)を捨てる。
※細胞塊は流れやすいので注意して捨てる。
↓
 7. CMLBを5 ml 入れる。
※ピペットの先端がチューブにつかないようにする。
↓
 8. 沈渣が管底からはずれるまで転倒混和する。
↓
 9. 3,000回転, 1分間室温または4°Cで遠心する。
↓
 10. チューブを10°程度傾けて上清(溶血した赤血球)を捨てる。傾けた状態でキムタオルをチューブの口にあて, 完全に上清を切る。
※細胞塊は流れやすいので注意して捨てる。
↓
 11. チューブ管底を実験台に軽く数回叩いて細胞塊を解す。
※この操作が不十分だと細胞が完全に溶解しない。
↓
 12. WCLBを3 ml 加える。
※ピペットの先端がチューブにつかないようにする。
↓
 13. 5 mg/ml ProteinaseK を100 μ l 加える。
↓
 14. 10% SDS を50 μ l 加える。
↓
 15. ローテーター(42°C恒温器に入れる。)の円盤にチューブをセットする。
※激しく混和するとDNAの機械的切断が起こり, DNAが低分子化するので注意して行う。また不透明な部分が残っていると回収率が悪くなるので, このような部分になるべく残らないように混和する。
↓
 16. 45回転/分程度の速さで1時間から一晩反応させる。
↓
 17. PCIを3 ml 加える。
↓
 18. ローテーターの円盤にチューブをセットする。
↓
 19. 50回転/分程度の速さで室温10分間回転混和する。
※ローテーターの回転数を上げ過ぎるとDNAの機械的切断が起こる。一方低過ぎると除タンパクが充

分に行えない。

↓

20. 3,500回転10分間遠心する。

↓

21. 水層（上層）を吸い口の広いスポイトを用いて注意深くゆっくり取り、別の15ml ポリプロピレンチューブに移す。

※高分子 DNA は粘性が高いため、水層を取るとき中間層（変性タンパク層）やフェノール層を吸い上げないように注意して行う。ガラス製のもので吸うと DNA が付着しやすいのでプラスチック製のものを使用する。

↓

22. 17. ~21. の操作をもう一度行う。

↓

23. CI を 3 ml 加える。

↓

24. ローテーターの円盤にチューブをセットする。

↓

25. 50回転/分程度の速さで室温10分間回転混和する。

↓

26. 3,500回転10分間遠心する。

↓

27. 水層（上層）を吸い口の広いスポイトを用いて注意深くゆっくり取り、別の15ml ポリプロピレンチューブに移す。

↓

28. 5 MNaCl を 60 μ l (1/50量) 加える。

↓

29. 99.5%エタノールを7.5ml (2.5倍量) 加え、羽毛状の DNA が完全に析出するまでゆっくりと20回程度、転倒混和する。

※タンパク質を含まない核酸は白い繊維状に析出するが、無色のゼラチン状になる場合は核酸画分にタンパク質が混入していることを示している。

↓

30. DNA をアルコールといっしょにスポイトで吸い、1.5ml のマイクロチューブに移す。

チューブを取るときにはピンセットを用いて取り出す。

↓

31. 微量高速遠心機を用いて5,000rpm で 2, 3 秒間遠心する。

※あまり遠心し過ぎると DNA を溶かすのに時間がかかる。

↓

32. 上清をピペットマンを用いて完全に捨てる。

↓

33. DNA をリンスするために70%エタノールを 1 ml 加える。

↓

34. 軽く転倒混和し DNA ペレットをはがす。もしはがれない場合は、軽く指でチューブを叩く。

- ↓
35. 微量高速遠心機またはチビタン遠心機を用いて5,000rpmで2, 3秒間遠心する。
- ↓
36. 上清をピペットマンを用いて完全に捨てる。
- ↓
37. 33. ~36. の操作をもう一度行う。
- ↓
38. 滅菌蒸留水を0.7ml 加え、よく混和する。
 ※42°Cの恒温槽に入れて数時間置くと、DNA が早く溶解する。
 ※チューブの先を人差し指で叩くようにして混和する。
- ↓
39. 回収されたDNA は4°Cまたは-20°Cで保存する。
 ※この方法でおよそ50 μ g のDNA が回収される。

III. DNA の定量法

1. 吸光度法

二本鎖DNAの濃度が50 μ g/ml, または、一本鎖DNA40 μ g/mlのときの260nmにおける吸光度は1である。これに基づいて未知のDNA濃度を求めることができる。1 cm light-pathで測定した場合のDNA量は、100 (希釈率) \times 1/20 \times 吸光度 (μ g/ml) で求めることができる。

2. 蛍光法

エチジウムブロマイド結合DNAの蛍光強度からDNA濃度を求めることができる。エチジウムブロマイド(0.5ng/ml)を含むアガロースゲルにDNA検体を滴下し、濃度の対照用として、種々の濃度(50-200ng/ μ l)のDNA溶液を作り、同様にゲルに滴下する。検体が完全にゲル内に染み込んだ後、UVを照射し、検体と濃度対照の蛍光強度を目測で比較して、検体のDNA濃度を求める。

3. 吸光度法の実際

■ 試薬

- 滅菌蒸留水

■ 実験器具

- UVセル
- 連続可変式ピペット (ピペットマン, P-20, P-1000, ギルソン)
- イエローチップ, ブルーチップ
- dual-channel UV spectrophoto-meter
- 1.5ml マイクロチューブ
- 1.5ml マイクロチューブ立て
- ピンセット
- キムワイブ

■ 操作法

1. 25 μ l のDNA溶液に475 μ l の滅菌蒸留水を加え、混和する。

↓

2. UVセルに入れ、波長260nmで測定する。
 ※リファレンスとして滅菌蒸留水を用いる。

1 cm light-path で測定した場合の DNA 量は、 20 (希釈率) $\times 1/20 \times$ 吸光度 (mg/ml) で求めることができる (二本鎖 DNA の濃度が 50mg/ml のとき、その DNA 溶液の 260nm における吸光度 (OD) は 1 である)。DNA 量を $100\text{ng}/\mu\text{l}$ となるように調整する。

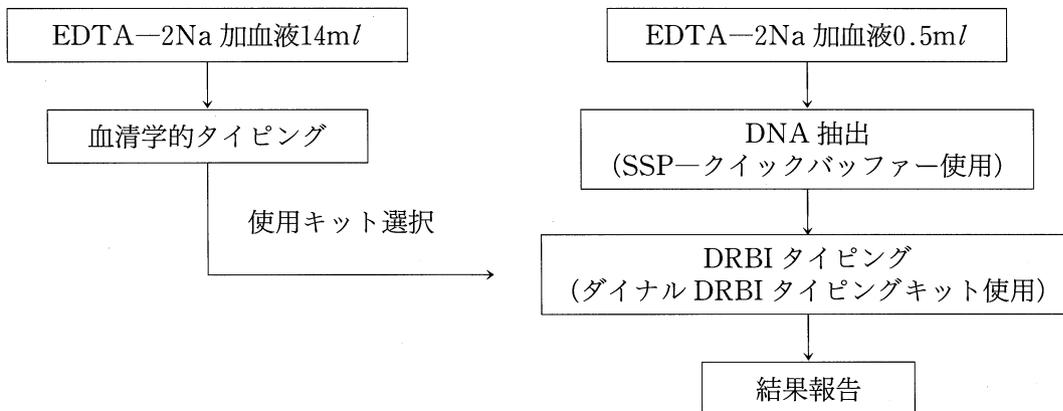
2. PCR-SSP 法

日本腎臓移植ネットワーク 西垣 文敬

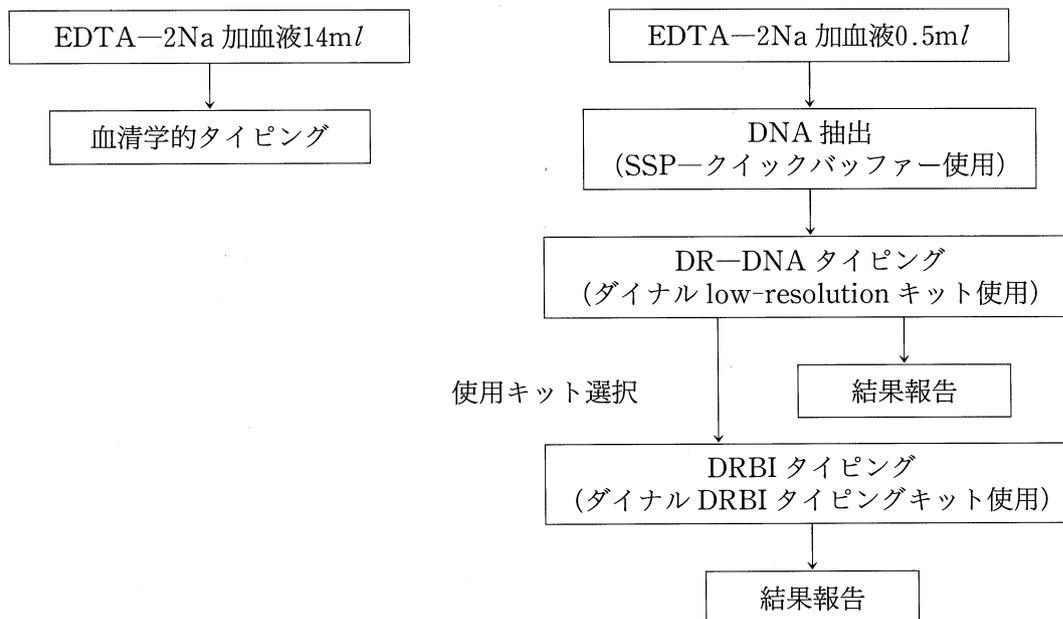
HLA-DNA タイピング (PCR-SSP 法) マニュアル

市立札幌病院 HLA 検査センター

I. 献腎ドナーの以外の検体



II. 献腎ドナーの検体



PCR—SSP 法

1. 試薬

グリセリン	SSPクイックバッファークット内試薬
クレゾールレッド	SSPクイックバッファークット内試薬
滅菌蒸留水	SSPクイックバッファークット内試薬
0.5XTBE 溶液	SSPクイックバッファークット内試薬
Taq ポリメラーゼ	Perkin Elmer 社 (250 Unit)
10XPCR バッファー	Perkin Elmer 社
dNTP	宝酒造社
エチジウムブロマイド	
アガロースゲル	Sea Kem MB, FMC

SSPクイックバッファー：免疫生物研究所（IBL）社

2. 器具

1.5ml マイクロチューブ	ロビンス社
0.6ml マイクロチューブ	ロビンス社
0.2ml/PCR チューブ	ロビンス社
PCR 8 連キャップ	ロビンス社
マイクロピペット P-2, P-20, P-200, P-1000	Gilson, Eppendorf
マイクロピペット用チップ250 μ l 用, 1000 μ l 用	ロビンス社
ボルテックス	
サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600	Perkin-Elmer 社
ミューピッド泳動装置	
トランスイルミネーター	
ポラロイド写真撮影装置	
電子レンジ	

3. 方法

1) 使用キットの選択 (DYNAL SSP キット : DYNAL 社)

- | |
|---------------------------|
| ① DR “low-resolution” SSP |
| ② DRB1* 01-SSP |
| ③ DRB1* 15/16-SSP |
| ④ DRB1* 04-SSP |
| ⑤ DRB1* 11-SSP |
| ⑥ DRB1* 08/12-SSP |
| ⑦ DRB1* 13-SSP |
| ⑧ DRB1* 14-SSP |

献腎ドナー以外の検体の場合

血清学的タイピング結果から上記①～⑧の中から該当キットを使用する。

血清学	選択キット
DR1	②
DR15	③
DR16	③
DR17	①内のプライマー No.6
DR18	①内のプライマー No.7
DR4	④
DR11	⑤
DR12	⑥
DR13	⑦
DR14	⑧
DR7	①内のプライマー No.9
DR8	⑥
DR9	①内のプライマー No.11
DR10	①内のプライマー No.12

* 血清学的結果との不一致が認められる場合は①を使用し再検。

* 1抗原のみの場合は①内のプライマーを使用し、ホモ接合体であることを確認する。

献腎ドナーの検体の場合

low-resolution の結果から上記②～⑧の中から該当キットを使用する。

2) サンプル DNA

末梢血0.5ml から得られた DNA を濃度調整なしで使用する。

理想濃度は50ng/ μ l

3) PCR solution の調整

エッペンドルフチューブに dH₂O を300 μ l、グリセリンを250 μ l、クレゾールレッドを50 μ l、10 XPCR バッファーを500 μ l、dNTP を400 μ l 加え、ボルテックスでよく混和する。

4) PCR reaction mixture の調整

キットの primer solution $5\mu\text{l}$ をそれぞれの PCR チューブへ分注する。

一つのタイピングサンプル（一患者）に行う全 PCR 反応のための PCR solution とサンプル DNA と Taq ポリメラーゼを混和して PCR pre-mixture を調整する。（調整量はキット添付書を参照）

5) ただちに primer solution の入っている各 PCR チューブへ PCR pre-mixture $5\mu\text{l}$ を分注する。
(PCR チューブの管壁にその小滴を置き PCR チューブラックを注意深くたたいて PCR チューブの底へ小滴を滑り落とす。混和不要。)

6) サーマルサイクラーによりただちに PCR 増幅を開始する。

1. 変性 94°C 2分
2. 10回 94°C 10秒（変性）
65°C 60秒（アニーリグと伸長）
3. 20回 94°C 10秒（変性）
61°C 50秒（アニーリング）
72°C 30秒（伸長）
4. 4°C

7) 電気泳動

トレー、作成台を99.5%エタノールで拭き、コームをゲル作成台にセットし、ゲル作成台を水平に置く。0.6gのアガロースゲルに30mlの0.5XTBEバッファーを加える。電子レンジで煮沸して溶かし60°Cに冷やす。10mg/mlエチジウムブロマイド溶液を $1.5\mu\text{l}$ 加え静かに混和する。

3 mm幅の溝をつけた3-4 mmの厚さのゲルとする。ゲルを泡立てないように静かにコームを抜き取り、トレーを泳動槽にセットする。

泳動槽で、ゲルが完全に浸るように0.5XTBEを入れる。

0.5XTBEバッファーの中で100V、15-30分間泳動する。

ゲルをトランスイルミネーターにのせ、UVランプ照射下でPCR産物を確認後、ポラロイド撮影する。

抗原、alleleをキット添付書のSPECIFICITY TABLEにより判定する。

3. PCR-SSO 法

久留米大学医学部, 小児科 伊達 是志

九州大学生体防御医学研究所, 遺伝学 安永 晋一郎, 笹月 健彦

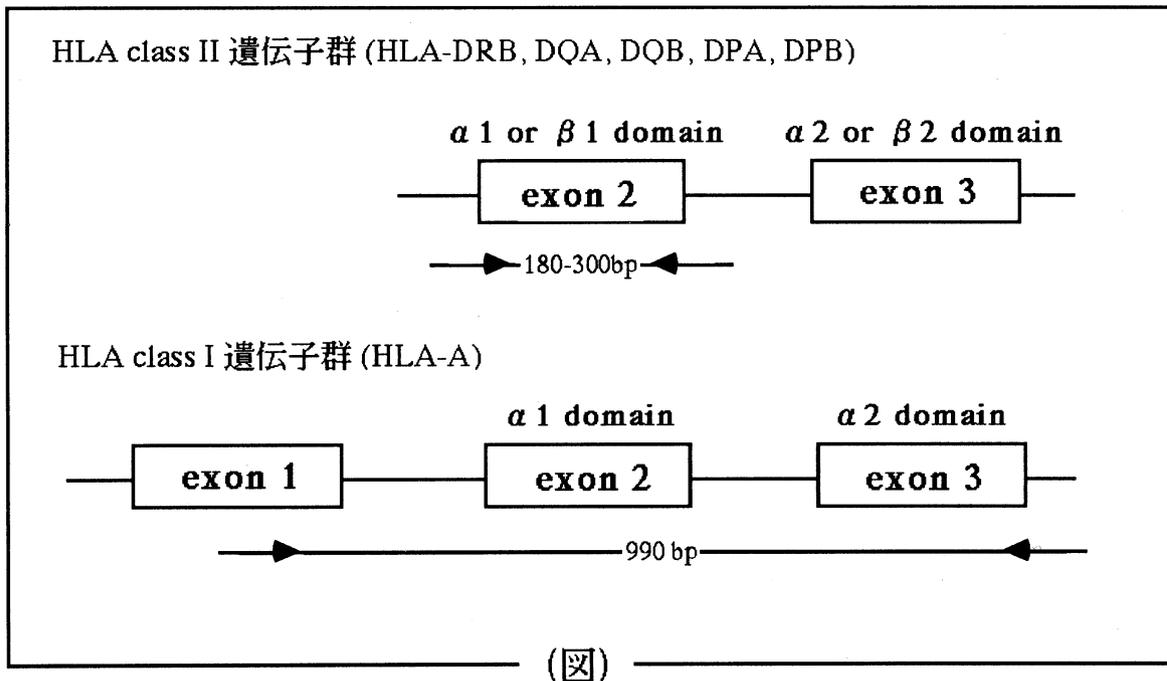
東京医歯大難治疾患研究所, 成人疾患異常代謝 木村 彰方

はじめに

HLA の多型性を解析する方法としての DNA タイピング法のひとつである PCR-SSOP (sequence-specific oligonucleotide probe) 法のうち、現在までに class II 領域 (DR, DQ, DP locus) についてはすでに確立されており、多方面で応用されている。また、class I 領域についても、A locus は近年開発され、さらに、B, C locus についても現在開発中である。ここでは、我々の開発した class II 領域 (DR, DQ, DP locus) および class I 領域 (A locus) について述べる。

1) PCR 法による各 HLA 遺伝子座の増幅

PCR-SSOP 法では、まず各 HLA 抗原をコードする遺伝子のうち特に多型性に富む領域を PCR 法により特異的に増幅する。つまり、class II 領域 (DR, DQ, DP locus) では exon 2 が最も多型性に富むのに対し、class I 領域 (A locus) では、exon 2 と exon 3 の両方に著明な多型性が存在するため、増幅する領域 (PCR 産物) が class II 領域では約 200~300bp であるのに対し、class I 領域 (A locus) では、約 1000bp にもおよぶ (図)。この為、class II 領域に比べ class I 領域の PCR はやや増幅しにくいことがある。この際は、Hot-Start 法を用いると比較的容易に増幅が可能となる。また DQA1 遺伝子の場合、exon 1 や exon 4 の解析も必要な場合がある。



2) PCR 産物のチェック

1%アガロースゲル電気泳動により、PCR 産物 (約 3 μ l) の濃度およびサイズをチェックする。約 50~100ng 程度の量があること、各々の locus に対応した長さの特異的 PCR 産物が得られることを確認する。

3) ドットプロット・ハイブリダイゼーション

a) プレウエット

ドットする前に、ナイロンフィルター (アマシャム社の Hybond N⁺あるいは日本ポール社の Biodyne B など) をプレウエットする。

→フィルターを dH₂O に浸透させる (5分程度)。

→10×SSPE 溶液に15分間浸透させる。

→それぞれのフィルターをろ紙の上に並べ水分を切った後、乾燥させる。

※この乾燥は、次にドットした場合に、スポットが広がり過ぎない程度まで行う。

b) ドットプロット

乾燥させたフィルターに PCR 産物を1.5~2.0 μ l ずつドットする。

※ PCR 産物にあらかじめ少量の Dye を混ぜておくとドットした部分が確認でき、ドットする際のミスを防げる。

→ドットの終わったフィルターを室温で乾燥させる。

→0.4N NaOH 溶液に、フィルターが重ならないよう注意しながら5分間浸透させる (アルカリ変性)。

→10×SSPE 溶液に10分間浸透させる (中和)。

→それぞれのフィルターをろ紙の上に並べ水分を切った後、完全に乾燥させる。

※この乾燥は、室温でオーバーナイトあるいは80°Cで2時間など。

c) プレハイブリダイゼーション

→乾燥させたフィルターを一枚ずつ plastic bag に入れる。

→ plastic bag にハイブリダイゼーション・バッファーをフィルターが十分に浸る程度 (100~200ml/100 cm²) 入れる。

ハイブリダイゼーション・バッファー

50mM	Tris-HCl (pH8.0)
3.0M	Tetramethylammonium chloride
2.0mM	EDTA (pH8.0)
5 ×	Denhardt's solution
0.1%	SDS

→54°Cで Incubate する。

※プレハイブリダイゼーションは長時間 (オーバーナイト) 行ったほうが、バックグラウンドが低くコントラストがしっかりと得られる。

d) ラベリング

放射性もしくは非放射性物質によりプローブをラベリングする。ここでは、放射性物質 (³²P) による標識法を紹介する。(非放射性物質による標識法の場合には、それぞれのプロトコールに従って行う。)

→下記のような組成の反応液を作製する。

Oligonucleotide (SSO)	5 to 10 pmole (1 to 2 μ l)
10 \times Kinase Buffer	2.5 μ l
[γ - ³² P] ATP	60 μ Ci
T4 polynucleotide kinase	10 to 20 units
dH ₂ O	up to 25 μ l

(1個のプロープにつき)

10 \times Kinase Buffer

0.5M	Tris-HCl(pH7.6)
0.1M	MgCl ₂
50mM	DTT
1mM	Spermidine HCl(nuclease-free)

→反応液を37°Cで30分間 incubate する。

→20mM EDTA(pH8.0) 50 μ l を加え、反応を止める。

→ plastic bag の角を切り取り、そこから反応液をハイブリダイゼーションバッファーに混入する。空気が入らないように注意しつつ、plastic bag の切り取った部分をシールする。

※ハイブリダイゼーション・バッファーを替える必要はない。

e) ハイブリダイゼーション

54°C、30min 程度ハイブリダイゼーションする。(water bath 中にて振とうする。)

※特に、フィルターが大きい時 (バッファーが少ない時) はムラができやすいので、十分にフィルターにバッファーが行き渡るよう注意する。

f) フィルターの洗浄 (washing)

以下の洗浄の過程は全て Water bath を振とうさせて行う。

→ plastic bag からフィルターを取りだし、2 \times SSPE+0.1% SDS 溶液で洗浄する。(10分間、室温、2回)

→ TMAC solution で洗浄する。(10分間、室温、1回)

→ TMAC solution で洗浄する。(10分間、56~59°C、2回)

TMAC solution

50mM	Tris-HCl(pH8.0)
3.0M	Tetramethylammonium chloride
2.0mM	EDTA(pH8.0)
0.1%	SDS

※ TMAC solution での洗浄の至適温度は、DR, DQ, DP locus の場合には56~58°Cとしているが、A locus の場合はその多型性が単塩基置換による場合が多いので、やや高い洗浄温度 (59°C) が適当である。

→ 2 \times SSPE 溶液で洗浄する。(5分間、室温、1回)

→フィルターをろ紙の上にならべ、水分を取り除く。

4) オートラジオグラフィーによる陽性シグナルの検出

オートラジオグラフィーは室温30分～1時間で充分であるが、シグナルが弱い場合には適宜延長する。なお、非放射性物質による標識法の場合には、方法毎にシグナル検出の時間設定が必要である。

5) デハイブリダイゼーション

放射性物質による標識法の場合には、デハイブリダイゼーションし、フィルターの再利用が可能である。但し、再利用を考慮する場合には、フィルターが完全に乾燥することを避けなければならない。

以下の洗浄の過程は全て water bath を振とうさせて行う。

→0.4N NaOH 溶液で incubate する。(20分間、42°C、1回)

→過剰な水分を除いた後、デハイブリダイゼーション・バッファーで incubate する。(20分間、42°C、1回)

デハイブリダイゼーション・バッファー

0.2M Tris-HCl(pH8.0)

0.1×SSPE

0.1% SDS

→プローブが完全にフィルターから取り除かれていることを確認するために、1時間から5時間オートラジオグラフィーする。

参考文献

- 1) Kimura A, Sasazuki T : *HLA 1991 Vol 1* (eds., Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T), Eleventh International Histocompatibility Workshop reference protocol for the HLA-DNA typing technique. Oxford University Press, Oxford, 1992; p. 397-419.
- 2) Kimura A, Dong R P, Harada H, *et al.* : DNA typing of HLA class II genes in B-lymphoblastoid cell lines homozygous for HLA. *Tissue Antigens* **40** : 5-12, 1992.
- 3) Date Y, Kimura A, Kato H, *et al.* : DNA typing of the HLA-A gene : population study and identification of four new alleles in Japanese. *Tissue Antigens* **47** : 93-101, 1996.
- 4) Yasunaga S, Kimura A, Hamaguti K, *et al.* : Different contribution of HLA-DR and -DQ genes in susceptibility and resistance to IDDM. *Tissue Antigens*, **47** : 37-48, 1996.

4. PCR-reverse SSO 法

国立循環器病センター研究所 佐田 正晴

[INNO-LiPA HLA DRB, DQB, DPB Typing Manual]

1. INNO-LiPA キットの内容

* 増幅用 primer セット

AB : amplification buffer

PM : primer mix

MS : MgCl₂液

* Allele 同定用セット

[器具]

strip : probe が固定されている nitrocellulose 膜

プラスチックトレイ : 反应用トレイ

プラスチックシート : 陽性 probe #チェック用シート

[試薬 1 : hybridization 用]

C : 100X Conjugate Solution (alkaline phosphatase がラベルされた streptavidin の100倍濃度液)

DS : Denaturation Solution (PCR 後の DNA 変性用液)

HS : Hybridization Solution (PCR 産物と probe との hybridization 用液)

[試薬 2 : 発色用]

SW : Stringent Wash Solution (hybridization 後の strip 洗浄用液)

CD : Conjugate Diluent (100倍濃度 Cnjugate 液希釈用液)

S : 100X Substrate Solution (BSIP/NBT の100X 濃度液)

SB : Substrate Buffer (100倍濃度 Substrate Buffer 希釈液)

RS : Rinse Solution (strip 洗浄用)

2. 実験器具, 試薬類

■ 実験器具

マイクロチューブ (1.5 ml, 0.6 ml) *

0.2 ml/PCR チューブ, チューブキャップ*

マイクロピペット用チップ*

50 ml チューブ*

*チューブ, チップ類は全て滅菌

PCR 装置 (Gene Amp PCR System 9600または2400 : Perkin-Elmer 社)

ミューピッド電気泳動装置

ポラロイド写真撮影装置

トランスイルミネーター (短波長紫外線用 : 254 nm)

電子レンジ

微量高速遠心機

恒温水槽

■試薬類 (試薬類は全て特級, 遺伝子工学用を使用)

アガロースゲル

10 X TBE (stock solution, 作成後滅菌, 室温保存)

108 g : 0.8 M Tris-HCl, 55 g : 0.9 M Boric Acid, 40 ml : 0.5 M EDTA (pH 8.0)

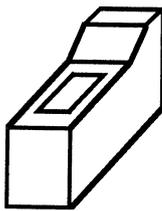
0.5 X TBE(電気泳動 buffer, ゲル作成用 : 10 X TBE を滅菌蒸留水で希釈)

Ethidium bromide(発癌性が高いため取り扱い注意)

滅菌蒸留水

3. INNO-LiPA 法の概要

Step 1. サンプル DNA の増幅 (PCR)



サンプル DNA

AB : amplification buffer

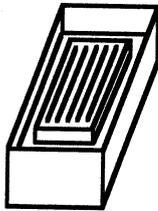
PM : primem mix

MS : MgCl₂ solution

Taq DNA polymerase

(dH₂O)

Step 2. hybridization, strip の洗浄 (waterbath)

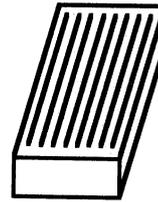


PCR 産物の変性

strip 上で probe と hybridize

strip の洗浄

Step 3.



Conjugate 液

Substrate 液

Step 4. 判定



allele 解析専用ソフト

(INNO-LiPA Expert)

4. サンプル DNA の増幅 (PCR)

[増幅の準備 : 1 サンプル用]

amplification buffer (AB) : 10 μ l

primer mix (PM) : 10 μ l

MaCl₂ solution (MS) : 10 μ l

Taq DNA polymerase (1 unit) : 0.2 μ l

合計量 30.2 μ l

サンプル DNA : X μ l

dH₂O : X μ l

最終合計量 50.0 μ l

1 : 1 サンプルあたり最終合計量50 μ l で増幅

2 : 多検体増幅の場合, サンプル数+1 または+2 サンプル分調製

3 : AB, PM, MS, Taq は解凍後よく混和し遠心後使用

4 : 調製中, AB, PM, MS, Taq は氷中に保管

5 : 調整後, 直ちに増幅操作にかかる

6 : AM, PM, MS, Taq は使用後, 直ちに冷凍庫に戻す

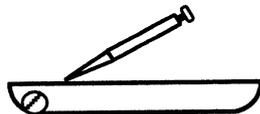
[PCR 条件：Gene Amp PCR Sytem 9600, Gene Amp PCR Sytem 2400共通]

	denaturation	denaturation	annealing	extension	elongate
DRB	95°C, 300sec 1 cycle	95°C, 20sec	55°C, 20sec 30 cycles	72°C, 30sec	72°C, 600sec 1 cycle
DR4	95°C, 300sec 1 cycle	95°C, 20sec	65°C, 20sec 30 cycles	68°C, 30sec	68°C, 600sec 1 cycle
DPB	95°C, 300sec 1 cycle	95°C, 20sec	55°C, 20sec 30 cycles	72°C, 30sec	72°C, 600sec 1 cycle
DOB	95°C, 300sec 1 cycle	95°C, 30sec	58°C, 20sec 35 cycles	72°C, 30sec	72°C, 600sec 1 cycle

[PCR 産物のチェック]

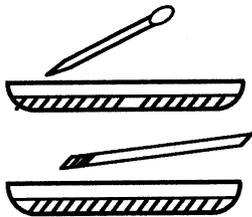
1.5%アガロースゲル電気泳動にて増幅状態をチェック

5. Denaturation (PCR 産物の変性)

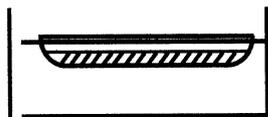


トレーに DS (Denaturation Solution) 10 μ l を入れる
PCR 産物10 μ l を加え泡立たないように良くピペッティング
室温で5分間反応させる (*2本鎖PCR産物が1本鎖DNAとなる)

6. Hybridization (PCR 産物と probe との hybridization)



HS (Hybridization Solution) 2 ml を加えすばやく、ゆっくり混和*
*HS は予め指定温度で暖めておく (キット添付資料参照)
*HS は冷蔵庫から出した直後は沈殿があるが暖めると溶解する
strip を入れすばやく、ゆっくり混和
*strip は素手で持たないように注意



恒温水槽の水面に静かに浮かせる
*水槽内の水がトレーの中に入らないよう注意
30分間反応させる

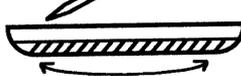
7. Stringent Wash (post wash : mis-hybridize している PCR 産物を洗い流す)



HS (Hybridization Solution) をアスピレーターで吸い出す
*strip を吸わないように注意



SW (Stringent Wash) 2ml を加え、10-20秒ゆっくり混和
*SW は予め指定温度で暖めておく (キット添付資料参照)



SW をアスピレーターで吸い出す
*strip を吸わないように注意

2回繰り返す



SW (Stringent Wash) 2ml を加える





恒温水槽の水面に静かに置く

*水槽内の水がトレーの中に入らないよう注意

10分間反応させる

8. 陽性 probe の発色

*発色は, DRB, DRB1*04-specific, DQB, DPB とともに同じ行程で行われる

*室温で行う

[試薬の調製]

1. Rinse Solution (RS) の調製

RS : dH₂O = 1 : 5 (滅菌蒸留水で希釈)

2. Conjugate Solution (CS) の調製

C : CD = 1 : 100 (Conjugate Diluent で希釈)

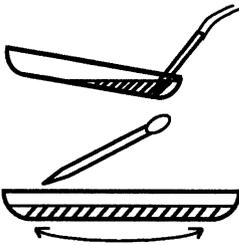
3. Substrate Solution (SS) の調製

S : SB = 1 : 100 (Substrate Buffer で希釈)

[発色の手順]

試薬の調製 → strip の洗浄 (RS) → CS と反応 → strip の洗浄 (RS)

strip の洗浄 (SB) → SS と反応 → 陽性 probe の発色 → 発色停止



SW (Stringent Wash Solution) をアスピレーターで吸出す

*strip を吸わないように注意

RS (Rinse Solution) 2 ml を加え, 1分間ゆっくり混和する

RS をアスピレーターで吸い出す

*strip を吸わないように注意

2回繰り返す



CS (Conjugate Solution) 2 ml を加え, 30分間ゆっくり混和する

CS をアスピレーターで吸い出す

*strip を吸わないように注意

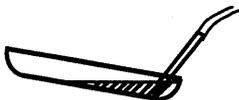


RS (Rinse Solution) 2 ml を加え, 1分間ゆっくり混和する

RS をアスピレーターで吸い出す

*strip を吸わないように注意

2回繰り返す





SB (Substrate Buffer) 2 ml を加え, 1 分間ゆっくり混和する

SB をアスピレーターで吸い出す

*strip を吸わないように注意



SS (Substrate Solution) 2 ml を加え, 30 分間ゆっくり混和する

SS をアスピレーターで吸い出す

*strip を吸わないように注意



dH₂O 2 ml を加え, 5 分間ゆっくり混和する (発色停止)

9. 各遺伝子 allele の決定

*INNO-LiPA キットに添付された陽性 probe チャートによる allele の決定

*allele 解析専用ソフト (INNO-LiPA Expert) による allele の決定

5. マイクロプレート法 ——とくに PCR-MPH 法を中心として——

日本赤十字社中央血液センター，検査3課 柏瀬 貢一

はじめに

マイクロプレート法を用いた HLA タイピングは大きく分けて，I) 検体の調整，II) 目的遺伝子の増幅，III) マイクロプレート上での目的遺伝子の検出に区分される。ここでは，我々が日常検査に用いている PCR-MPH 法を用いた HLA-DRB1 Low resolution タイピングについて DNA 抽出も含めて解説する。

I) 検体の調整(DNA 抽出)

器具および機器

- ・ブロックヒーター:アルミブロック恒温槽 DTU-2B, タイテック社製
 - ・プレートミキサー: Tuple Mixer Twin 3-28, 岩城硝子社製
- ※ Mixer Twin 3-28 は，チューブとプレートの両者のミキシングが行える。

試薬

- ・DNA 抽出液の組成
- 10mM Tris-HCl(pH8.3)
- 50mM KCl
- 1.5mM MgCl₂
- 0.5% Tween20
- 0.5mg/ml Proteinase K

- * 予め上記抽出液を調整後，滅菌済みの試験管に小分けし，-20°Cに保存する。
- 使用直前に検体数に応じた抽出液を 37°Cで溶解し，残った抽出液は廃棄する。

操作法

- ① 10⁶個のリンパ球に DNA 抽出液を 500 μ l 加え，プレートミキサーで混和する。
- ② 56°C 60 分間 ブロックヒーターでインキュベートする。
- ③ 95°C 10 分間 ブロックヒーターでインキュベートする。
- ④ 得られた DNA は使用時まで 4°C保存，長期保存は -20°Cに保存する。

II) 目的遺伝子の増幅(PCR 反応)

器具および機器

- ・反応チューブ: Micro AmpTM Reaction Tubes, N801-0533, Perkin Elmer 社製
- ・反応チューブ用キャップ: Micro AmpTM Reaction Caps, N801-0535, Perkin Elmer 社製
- ・連続分注ピペット: U-528, サワディー・テクノロジー社製
- ・PCR 増幅機: Perkin Elmer 9600, Perkin Elmer 社製

試薬

- ・Taq polymerase: Takara Taq, R001B, 250U \times 4, 宝酒造社製
- ・10 \times PCR Buffer: Taq polymerase (Takara Taq, R001B)に添付の 10 \times PCR Buffer を使用する。
- ・2.5mM dNTP Mixture: Taq polymerase (Takara Taq R001B)に添付の 2.5mM dNTP Mixture を使用

する。

- ・プライマー：タイピングプレートに添付のプライマー B とプライマー C を使用する。
- ・クレゾールレッド液：Cresol Red (2g, Sodium Salt, Product No. C9877), Sigma 社製

PCR 反応液の組成

DNA (0.3~1 μ g)	3 μ l
10 \times PCR Buffer	10 μ l
2.5mM dNTP Mixture	2 μ l
プライマー B	1 μ l
プライマー C	1 μ l
1%クレゾールレッド液	1 μ l
<i>Taq</i> polymerase	0.5 μ l
滅菌蒸留水で100 μ l に調整する。	

* DNA, *Taq* polymerase 以外の試薬を予め大量に混和調整後、小分けして -20°C に保存する。

* クレゾールレッド液は、PCR 産物をプレートのウェルに添加したかを確認するために使用する。

PCR 条件

94 $^{\circ}\text{C}$ /5分 \rightarrow (94 $^{\circ}\text{C}$ /30秒 \rightarrow 55 $^{\circ}\text{C}$ /30秒 \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ /1分) \times 35回 \rightarrow 72 $^{\circ}\text{C}$ /5分

* Perkin Elmer 9600 および PJ2000 以外の機種を使用する場合は、温度および時間の変更が必要な場合がある。

III) 目的遺伝子の検出(ハイブリダイゼーションおよび発色)

器具および機器

- ・自動分注ピペッター：edp plas, RAININ 社製
- ・8チャンネルピペット：プラス 8, eppendorf 社製
- ・プレートシーラー：SJ 103-40, 三光純薬社製
- ・PCR 増幅機：Perkin Elmer 9600, Perkin Elmer 社製
- ・プレート遠心機：KN-70, クボタ社製
- ・プレートミキサー：Tuple Mixer Twin 3-28, 岩城硝子社製
- ・プレートインキュベーター：HBI-24, バイオテック社製
- ・プレートウォッシャー：AMW-24 型, バイオテック社製
- ・プレートリーダー：Immuno-Mini NJ-2300, 日本インターメッド社製

試薬

- ・ハイブリダイゼーション液(5 \times SSC)
 - 20 \times SSC の調整
 - 3M NaCl
 - 0.3M クエン酸ナトリウム
 - 5 \times SSC の調整
 - 20 \times SSC を滅菌蒸留水で 4 倍希釈し 5 \times SSC を調整する。
- ・TMAC 溶液
 - 3M (CH₃)₄NCl

50mM Tris-HCl(pH7.5)

2mM EDTA

• Horseradish Peroxidase Avidin D : A-2004, 41012004 VEC, 5mg, フナコシ社製

• 酵素希釈液

0.1M Tris-HCl(pH7.5)

0.3M NaCl

20mM MgCl₂

0.05% Triton X-100

• ABTS 発色キット(基質, 反応停止液が含まれる): ML-1110A, 住友ベークライト社製

操作法

* ハイブリダイゼーションおよび TMAC 溶液の洗浄の温度を一定に保つことが、よい結果を得るポイントである。

DNA 熱変性

- ① PCR 産物を 95°C で 10 分間 (Thermal Cycler 9600 使用) 加熱する。
- ② 直ちに氷水中 (クラッシュアイス) に 5 分間放置後、スピンドウンを行う。

サンプル分注

- ③ プレートを室温にもどす。
- ④ 8 チャンネルピペットを用いて、100 μ l ハイブリダイゼーション液を各ウェルに分注する。
* 分注の際、チップの先を底に付けない。
- ⑤ 自動分注ピペッターで 4 μ l ずつ②の PCR 産物を別紙「PCR-MPH 法によるプローブの配置とその特異性」に従って各ウェルに添加する。

ハイブリダイゼーション

- ⑥ プレートシーラーを貼り、プレートミキサーで振とう後、58°C で 1 時間ハイブリダイゼーションを行う。

プレート洗浄

- ⑦ プレートウォッシャーで各ウェル内の反応液を吸引除去する。
- ⑧ 次に、67°C に温めておいた TMAC 溶液を 200 μ l ずつ分注する。
- ⑨ 操作⑦⑧を計 3 回行う。
- ⑩ プレートウォッシャーで各ウェルを酵素希釈液を用い、200 μ l 計 3 回洗浄 (室温操作) する。

酵素液添加

- ⑪ 酵素希釈液で 1/2000 に希釈した Peroxidase-avidin (プレート 1 枚当たり 10ml の酵素希釈液に 5 μ l の Horseradish Peroxidase Avidin D を混合する) を 100 μ l ずつ分注し、室温に 15 分間放置する。

酵素液洗浄

- ⑫ 酵素液を吸引除去後、200 μ l の酵素希釈液で 3 回洗浄する。

発色反応

⑬発色剤 100 容量に対し基質を 1 容量の割合で加え発色液とし(プレート 1 組当り発色剤 5ml と基質 50 μ l を混合する), 各ウェルに 50 μ l ずつ分注後, 室温に 15 分間放置する.

* 発色剤を予め室温に戻しておき, 使用直前に基質(4°C)を加え混和する.

⑭反応停止液を各ウェルに 50 μ l ずつ加え, 混和し反応を停止させる.

↓
読み取り

⑮415nm の吸光度をプレートリーダーで測定する.

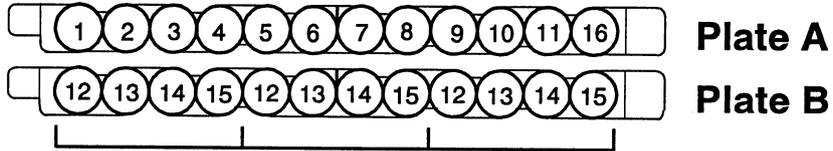
⑯解析ソフトを用いて判定を行う(別紙「反応表」を参照).

参考文献

- 1) Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, *et al.*: A Simple method of HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plate. *Human Immunology* **41**: 121—126, 1994.
- 2) Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, *et al.*: Routine low and high resolution typing of HLA-DRB gene using PCR-MPH (Microtiter Plate Hybridization) method. *European Journal of Immunogenetics* (in press).

PCR-MPH (DRB1 Low resolution)

プローブの配置とその特異性



プレートBは1本が3検体分です。

No.	Probe name	Specificity
1	DRB2801J	DRB1*0101-0103
2	DRB1002J	DRB1*1501-1503, 1601, 1602
3	DRB7004	DRB1*0301-0303
4	DRB1004	DRB1*0401-0412, 1410
5	DRB5703J	DRB1*1101-1104
6	DRB3705J	DRB1*1201, 1202
7	DR10XYJ	DR3, 11, 12, 13, 14, 8
8	DRB1006	DRB1*0701
9	DRB70J	DRB1*0801-0804, 0412, 1403
10	DRB1007	DRB1*0901
11	DRB1008J	DRB1*1001
12	DRB1003J	DRB1*0301-0303, 1101-1104, 1301-1307, 1401-1403, 1405-1409
13	DRB1005	DRB1*1201, 1202, 0801-0805, 1404
14	DRB7003	DRB1*1403, 1602
15	DRB7007	DRB1*1301, 1302, 1304, 1102, 0103, 0402
16	DRBcommon	All allele

判定表

判定できるDRB1 group 及びallele		プローブ番号																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
DR1	*0101/0102	●																	
	*0103																	●	
DR2	*1501-1503/1601		●																
	*1602			●														●	
DR3	*0301-0303			●														●	
DR4	*0401/0403-0411/(1410)				●														
	*0402					●													
	*0412						●												
DR11	*1101/1103/1104					●													
	*1102						●												
DR12	*1201/1202						●												
DR6	*1301/1302/1304							●											
	*1303/1305-7/1401/1402/1405-1409								●										
	*1403									●									
	*1404/(0805)										●								
DR7	*0701										●								
DR8	*0801-0804												●						
DR9	*0901																	●	
DR10	*1001																		●

6. PCR-RFLP 法

東海大学医学部, 分子生命科学 成瀬 妙子

PCR-RFLP 法は、1989年に筆者らの研究室で開発されて以来、簡便、迅速、詳細な DNA タイピング法として普及したが、その背景にはこの方法が PCR で増幅された DNA を市販の制限酵素で切断するという、手軽でかつ経済的、すなわち一般の検査質でもすぐに導入が可能であるという簡便さが挙げられる。この稿では実際の操作に当たって、その手順や注意点、そして判定の仕方などについて述べる。なお、PCR-RFLP 法で使用するプライマー、酵素、判定法の実際については文献(1, 2, 3)を参照されたい。

PCR-RFLP 法の操作は

1. PCR による増幅。
2. 制限酵素による切断。
3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動。

の大きく 3 つに分かれる。これより順に各操作での手順とポイントについて述べる。

1. PCR による HLA 遺伝子の増幅

PCR 法による HLA 遺伝子領域の増幅については、詳細は省略するが、増幅時の非特異的なバンドの存在は、増幅 DNA を制限酵素により切断した後の判定に支障となることから、PCR の条件には十分な検討を行って、単一な増幅バンドが得られるよう工夫する必要がある。ちなみによく総説等で紹介されている PCR の温度条件はあくまでも目安であり、それぞれ使用する増幅機器の機種や、反応条件によって変化するので注意していただきたい。PCR での増幅がうまく行かないということで相談を受けることがしばしばあるが、これらの多くは増幅機器に問題があることが多く、設定温度と実際の温度に差があることが多い。また、最近は多数のメーカーより Taq ポリメラーゼが市販されているが、菌株により反応液の組成が異ったり、アニーリング温度が上下することがあるため、購入の際には確認を行うことをお勧めする。さらに基本的なことであるが、使用するプライマーや塩基、滅菌水などに DNase が混入していたために増幅できないこともあるので、試薬類の取り扱いには特に注意して、可能な限り実験器具や試薬類はこまめに滅菌することが肝要である。

2. 制限酵素による増幅 DNA の切断

PCR による DNA 増幅をポリアクリルアミドゲル電気泳動により確認したのち、制限酵素による切断を行う。制限酵素は増幅した領域に応じたものを用いる。各酵素ごとに 1.5 ml のマイクロチューブを用意し、以下のような反応液を調整する。

反応液

1mg/ml BSA	1.2 μ l
10×制限酵素用バッファー	1.2 μ l
増幅後 DNA	6~7 μ l
制限酵素	2 units
H ₂ O	
計	12 μ l

BSA, 制限酵素用バッファーは市販の制限酵素を購入すると専用のものが添付されているので、それを使

用すると便利である。

反応液を入れたチューブはしっかり蓋をして至適温度で3～6時間反応させ、制限酵素による切断を行う。至適温度は各酵素により差がある(37°Cが一般的)ので購入の際によく確かめる。至適温度が50°C以上のものは蒸発を防ぐため、反応液にミネラルオイル1滴を加え、恒温槽にて反応させると良い。また、制限酵素による切断が完全でないと、切断しきれなかったDNAが残存したまま電気泳動されて、誤判定の原因となるので、このステップは特に注意深く行う必要がある。

一度に多数の検体を反応させたいとき、またチューブの消費を節約したい場合には、テラサキトレイの使用をお勧めする。トレイの使用によりチューブの準備に要する時間を大幅に短縮でき、しかも分注操作も簡便化される。トレイは従来の血清学での反応に使用されているものより、溝の深いものが使いやすい(我々はRobbins社の40 μ l 用トレイ No. 1003-01-3を使用している)。使用法は次のとおりである。

テラサキトレイの使用法

- 1) 縦横どちらかを一系列を1検体分とする。
- 2) 制限酵素の種類の数に応じてチューブを用意し、検体本数分の反応液(DNAは除く)を作製する。
- 3) トレイの各列に反応液を分注後、一列ごとに同一検体の増幅後DNA溶液を、各穴に加えてよく懸濁する。
- 4) 分注が終わったら、周りの溝の部分に少量の蒸留水をたらす。
- 5) 蓋をして周りをパラフィルムでシールし、水平な場所で反応させる※。

※この反応はチューブでの反応に比べてコンタミの可能性が高くなるので、必ず水平な位置で行うこと。また誤って落下、転倒した場合は失敗を覚悟しなければならないので、注意すること。

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

制限酵素による反応終了後、各検体はポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行う。筆者らの研究室では電気泳動装置は簡便なものでも良好な結果が得られることから、簡易型電気泳動装置であるムーピッド(コスモバイオ社)を使用している。添付されているゲル板にポリアクリルアミドゲルを作製するが、ゲル濃度は通常12%のものを用いている。ただし、バンドの長さが20～40 bp前後で判定を行う場合には(DQA 1 遺伝子)、15%程度まで濃度を上げる必要がある。泳動時間はゲルの濃度やバンドの長さにより異なるが、制限酵素反応後の検体は短いバンドを明確に区別することが必要になる場合が多いため、多少長めに泳動する方がよい。また、泳動時間を短縮したいときにはゲル濃度を薄くする。参考までに我々のポリアクリルアミドゲル作製法を紹介しておく。

12%ポリアクリルアミドゲル作製法(40 ml ゲル1枚分)

- 1) H₂O 21.8 ml, 10×TBE 2 ml, 30%ポリアクリルアミドストック16.2 ml をビーカーに調合する。
- 2) 真空デシケーターに入れて脱気する。
- 3) 10%過硫酸アンモニウム 1 ml を加える。
- 4) テトラメチレンジアミン(TEMED)を24 μ l 加え、手早く25～50 ml のディスポーサブルシリンジで混和させ、一気にゲル板に流し込む。このときゲル板に気泡が入らないように注意する。
- 5) 1～2分で固まりはじめるので、完全に重合が完了するまで15分以上静置した後、使用する。

〈材料〉

30%ポリアクリルアミドストック

アクリルアミド29 g にメチレンビスアクリルアミド 1 g を加え、H₂O で100 ml に調整する。遮光して4°Cで保存する。

10%過硫酸アンモニウム溶液

過硫酸アンモニウム(APS)をH₂Oで10%濃度に必要時に調整する。

テトラメチレンジアミン(TEMED)

10×TBE

泳動後, 0.05%エチジウムブロマイド溶液にてゲルを染色し, 紫外線を照射してバンドの観察を行う。バンドパターンはポラロイドカメラにて写真撮影を行い, 得られたバンドパターンをもとに制限酵素による切断, 非切断の判定を行い, 対立遺伝子を同定する。

参考文献

1. Naruse TK, Ota M, Kikuti YY, *et al.* : *MHC & IRS Supplement Vol. 1.* (eds. Sonoda S, Yashiki S, Fujiyoshi T), The PCR-RFLP method for HLA class II genotyping. Nihonigakukan, Japan, 1993 ; p. 65-72.
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. 兼重俊彦, 稲川 明, 福森泰雄ら : 最新 PCR-RFLP 情報. *MHC 2* : 76-84, 1995.

7. PCR-SSCP 法

東京都赤十字血液センター, 研究部 坂内 誠

A. SSCP 法の原理

二本鎖 DNA や変性条件下にある一本鎖 DNA は、ポリアクリルアミドなどのゲル電気泳動で DNA の大きさによって分離される。これは、それらの DNA が塩基配列に関係なく一定の表面電荷密度と形態をとるためと考えられる。これに対し、一本鎖 DNA を非変性条件下で泳動した場合には、塩基配列に依存した特定の折り畳まれた高次構造をとるようになり、同じ長さの DNA でも塩基配列の違いを電気泳動で検出できるようになる(1)。PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法は文字どおりこの原理を用いた方法で、HLA や血液型遺伝子、病原遺伝子などの多型を検出する際に用いられている。

B. PCR-SSCP 法の実際

銀染色を用いた HLA での PCR-SSCP 法の例を記述したい。これまで Hoshino 等(2)が HLA-クラス II の DPB1 遺伝子で、我々もクラス II では HLA-DRB1 (3~5), DRB3(5), DRB5 (6), DQA1(7), DQB1 (5,7) 遺伝子、クラス I では HLA-A (A11)(8), HLA-B (9~11) 遺伝子でそれぞれ PCR-SSCP 法の系を確立している。HLA-B61 のタイピングの例(9)を本マニュアルの最後に示した。

1. PCR

比較するアリルを少なくするため、血清学的検査や low resolution DNA タイピングでグループを絞り込んだ後、グループ特異的な PCR を行う。通常、200-300bp 程度の断片を増幅しているが、さらに長い断片でも SSCP による分離が可能である(8)。経験的には、変異の位置が増幅断片の端に近いとアリルを区別しにくいようである。PCR の段階で目的の増幅断片を特異的に充分量増やすことが、良い結果を得る 1 つの条件なので、アクリルアミドやアガロースの泳動とエチジウムブロマイド染色により増幅の様子を確認することが望ましい。後に示した B61 のタイピングでは、二段階の PCR によって解析する exon 3 の fragment を得ている。

2. SSCP の泳動

PCR 増幅産物 1 μ l とホルムアミド色素液* 7 μ l を混合し、95°C で 5 分加熱後、氷冷し、その 1 μ l を load する。混合する増幅産物の液の割合や load する量が少なすぎるとバンドが薄くなるし、多すぎると 1 本鎖 DNA の conformation が単一でなくなるためか、バンドの数が多くなり、いずれも判定がしにくくなる(3)。2 つのサンプルを混合する時は、増幅産物、各 1 μ l とホルムアミド色素液* 8 μ l を混合する。

ゲルはアクリルアミド：ビスアクリルアミド=49：1 (10%-12.5%) で、グリセロールを 5% 加えると分離が良くなることもあるが、バンドはぼやけてくる。ミニゲルを用い、0.5xTBE** 中で温度を管理した泳動 (アトー社, レゾルマックス, 20mA/ゲル) を行っている。泳動温度を変えるとパターンは大きく変化する。4°C から 37°C で条件を選んでいるが、一般に泳動温度を上げるほど、バンドは sharp になるが、アリル間のパターンの違いは小さくなる。

3. 銀染色

第一化学薬品社製、銀染色「第一」を用いている。このキットできれいな染色を得るコツは、染色液処理と現像液処理の間の水洗で、時間を長くとり過ぎずしかもよく洗うこと、現像では特に最初のうち激しく攪拌し

て、ゲル表面が全体的に染まることを防ぐことなどがあげられる。

C. PCR-SSCP 法の長所と短所

タイピングにはあらかじめ既知の標準検体を入手しておく必要がある他、1つのゲルで比較できるアリル数が限られているため、多くの標準検体との比較は煩雑となる。しかし、他の方法やハプロタイプのパターンから、予想されるアリルをあらかじめ絞り込んでおいた場合には、1サンプルにつき1レーンの電気泳動で判定できるので効率的となる。また、変異の場所と種類は特定できないものの、増幅断片上のほぼすべての変異を認識できるので、未知のアリルの発見に適している。さらに、2つの検体とその混合物を横に並べて比較すれば、移植ペアーなどのマッチングも行える(4)。

D. 経済性

PCRは少量(10 μ l)で充分であり、銀染色以外、特にコストのかかる試薬も使わないので非常に経済的である。

E. 今後の展望

上述したように、HLA領域でも有用な方法であるが、増幅断片さえ得られれば、特に変異の位置や種類などの情報がなくても解析できるので、様々な遺伝子で手軽に多型を解析することができる。すでに病原遺伝子(12~13)や血小板抗原遺伝子(14)、ABO型血液型遺伝子(15~16)などで成果が得られているが、今後さらに多くの遺伝子の多型を解析する手段として利用されていくと思われる。

PCR-SSCP 法手順の例 (HLA-B61) reference 9より

B61抗原を持つ被検検体(血清学検査によって得られた情報)とB61アリル既知標準検体

PCR

1st PCR (exon 2-intron 2-exon 3, 0.8kb)

BEX2-2(5'-GAGGTATTTCCACACCTCCG-3')

BINT3-1C(5'-AGATGGGGAAGGCTCCCCACT-3')

1% DMSO(dimethyl sulfoxide)

94°C 5 min-(94°C 1 min-64°C 1 min-72°C 1 min, 35 cycles)-72°C 5 min

(B18, 27, 37アリルも増幅する)

増幅確認

2nd PCR:(exon3, 317bp)

BEX2-FC(5'-CTCGCTCTGGTTGTAGTAGC-3')

BINT3-1C

1st PCRの増幅産物を蒸留水で100倍希釈して template にする

DMSO なし

94°C 2 min-(94°C 1 min-66°C 1 min, 20 cycles)-72°C 5 min

増幅確認

SSCP

PCR増幅産物(2nd PCR)1 μ l+ホルムアミド色素液*7 μ l

95°C 5 min, 氷冷

1 μ l load (同一ゲルに被検検体と標準検体)

10%アクリルアミド (49:1, グリセロールなし)

30°C, 0.5xTBE**中, 20mA/ゲル, 2時間泳動

銀染色 第一化学

結果の保存 写真撮影やゲル乾燥

ホルムアミド色素液*:

95%ホルムアミド, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue,
0.05% xylene cyanol FF

0.5x TBE**:

45mM Tris-borate, 1 mM EDTA (pH8.0)

References

1. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H *et al.*: Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2766-2770, 1989.
2. Hoshino S, Kimura A, Fukuda Y, *et al.*: Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of polymorphism in DPA1 and DPB1 genes: a simple, economical, and rapid method for histocompatibility testing. *Hum Immunol.* **33**: 98-107, 1992.
3. Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.*: Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. *Eur J Immunogenetics* **21**: 1-9, 1994.
4. Bannai M, Mazda T, Tokunaga K, *et al.*: DNA single-strand conformation polymorphism method to distinguish DR4 alleles. *Lancet* **341**: 769, 1993.
5. Bannai M, Tokunaga K, Imanishi T, *et al.*: HLA class II alleles in Ainu living in Hidaka district, Hokkaido, northern Japan. *Am. J. Physical Anthropol.* **101**: 1-9, 1996.
6. Tanaka H, Bannai M, Tokunaga K, *et al.*: Two rare MHC haplotypes carrying DR2 in the Japanese population. *Tissue Antigens* **43**: 120-123, 1994.
7. Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.*: A new HLA-DR11 DRB1 allele found in a Korean. *Hum-Immunol.* **39**: 230-232, 1994.
8. Lin L, Tokunaga K, Ishikawa Y, *et al.*: Sequence analysis of serological HLA-A11 split antigens, A11.1 and A11.2. *Tissue Antigens* **43**: 78-82, 1994.
9. Bannai M, Tokunaga K, Lin L, *et al.*: HLA-B40, B18, B27, and B37 allele discrimination using group-specific amplification and SSCP method. *Hum Immunol* **46**: 107-113, 1996.
10. Lin L, Tokunaga K, Tanaka H, *et al.*: Further molecular diversity in the HLA-B15 group. *Tissue Antigens* **47**: 265-274, 1996.
11. Lin L, Tokunaga K, Ishikawa Y, *et al.*: A new member of the HLA-B40 family of alleles, B*4007, coding for B'FU' serological specificity. *Tissue Antigens* **45**: 276-279, 1995.
12. 林健志 SSCP法による核酸配列変化の検出. *実験医学* **9**: 281-284, 1991.
13. 林健志 PCRを利用した癌遺伝子活性化の検出. *実験医学* **8**: 1133-1136, 1990.
14. Fujiwara K, Tokunaga K, Isa K, *et al.*: DNA-based typing of human platelet antigen systems by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism method. *Vox Sang* **69**: 347-351, 1995.

15. Ogasawara K, Bannai M, Saitou N, *et al.* : Extensive polymorphism of ABO blood group gene : three major lineages of the alleles for the common ABO phenotypes. *Hum. Genet.* **97** : 777-783, 1996.
16. Ogasawara K, Yabe R, Uchikawa M *et al.* : Molecular genetic analysis of variant phenotypes of the ABO blood group system. *Blood* **88** : 2732-2737, 1996.

8. PCR-DCP 法

京都府赤十字血液センター, 研究部 丸屋 悦子

DNA クロスマッチ法 (LIS-DCP) マニュアル

LIS-DCP (Low Ionic Strength-DNA Conformation Polymorphism) は DNA の融解特性を利用し DNA 溶液のイオン強度を 4~5 倍の LIS 溶液の添加により下げ、95°C 加熱変性後、55°C でアニールすることにより、mismatch hybridization による HDF (Hetero Duplex Formation) と熱変性による SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) の両方を形成しかつ持続させ同時に検出できる方法である。この方法をドナーとレシピエントの MHC 領域の DNA を PCR で増幅し、直接マッチングさせる DNA クロスマッチ法に応用した。

1. **MHC 領域の増幅**: ドナーとレシピエントについて DRB, DQB, DPB の exon2 および class I exon2 と exon3 の 5 対のプライマーを用い、それぞれ PCR を行う。増幅条件は 98°C 5 mins → 35 cycle (95°C 1 min → 59°C 1 min) → 72°C 5 mins (この条件は GeneAmp PCR System 9600-R を使用した場合である)。我々が骨髄移植のクロスマッチに用いているプライマーの塩基配列を Table 1 に示す。

[留意点]

- 精製度の良いプライマー (HPLC 精製) を使用する。
 - 増幅に用いる Taq ポリメラーゼは Accurate Polymerase Chain Reaction が可能な良質の酵素 (例えば Ex Taq や LA Taq など) を使用する。
- これらは非特異的な増幅を最小にするためである。

2. **LIS solution の添加**: ドナーとレシピエントの増幅産物および両者の増幅産物の混合物に LIS solution (10% saccharose, 0.01% bromophenol blue, and 0.01% xylene cyanol FF) を以下の割合で混合する。

- DRB, class I exon3; 3 μ l の増幅産物に 7 μ l の LIS solution を混合。
 - DQB, DPB, class I exon3; 5 μ l の増幅産物に 5 μ l の LIS solution を混合。
- 1 組のマッチングで総計 15 本の LIS 処理産物ができる。

3. **加熱処理**: 上記 LIS 処理産物を 95°C 1 min 次いで 55°C 1 min の処理を行う (当施設では GeneAmp PCR System 9600-R を使用している)。

4. **定温度電気泳動**: 4~5 μ l の LIS 処理産物を 10% ポリアクリルアミドミニゲル [アクリルアミド: ビスアクリルアミド = 49: 1; 120mm(W) x 102mm(H)] にドナー・レシピエント・両者の混合の順に添加し定温度 (22°C) で電気泳動を行う (アトー, AE-6410 を当施設では使用している)。15ウエルの櫛 (特注) でゲルを作成すると 1 枚のゲルで全ての領域のクロスマッチができ便利である。泳動 buffer は 45mM Tris-borate (pH 8.0) / 1mM EDTA を使用し 15mA で約 1.5hrs. 泳動する。

5. **銀染色による SSCP と HDF パターンの検出**: 銀染色を行い、SSCP や HDF をバンドとして検出する。

銀染色液は第一化学のキットを使用。データの保存法はゲルの写真をとるかまたはゲルを洗浄し乾燥後保存する。

6. 判定：ドナーとレシピエントが同じ hetero duplex を形成する（適合）か否（不適合）か。またドナーとレシピエントの混合物において、新規に hetero duplex を形成または消失する（不適合）か否（適合）か。各レーン（ドナー・レシピエント・その混合）が同一の SSCP パターンを示す（適合）か否（不適合）か。不適合の場合は該当領域のアリルタイプの再検査を行う。

7. 増幅領域について：DNA クロスマッチ法は増幅領域の SSCP と HDF によるマッチングをおこなっている。今回使用しているプライマーでの増幅領域の産物は下記ようになる。

- DRB:HLA-DRB1, DRB2 (偽遺伝子), DRB3(DR3,5,6), DRB4(DR4,7,9), DRB5(DR2) および近縁の偽遺伝子などの exon 2領域の混合物。
- DQB:HLA-DQB1, DQB2 (偽遺伝子) の exon 2領域の混合物。
- DPB:HLA-DPB1, DPB2 (偽遺伝子) の exon 2領域の混合物
- HLA-classI exon 2: HLA-A,B,C,E,F,G など HLA クラス I 発現遺伝子および近縁の偽遺伝子の混合物。
- HLA-classI exon 3: 同上。

すなわち、本方法は単なるアリルマッチングではなく、DRB や HLA classI の「領域」マッチングをしていることになる。プライマーを選べば（例えば DRB1, A2などを特異的に増幅する）、単一ローカスのアリルマッチングも可能である。

8. SSCP への応用：蛇足ではあるが LIS solution を増幅産物に大量（例えば増幅産物 1 に20 μ l の LIS solution）に添加し97°C 2 mins の加熱処理を行うと、2本鎖 DNA のほとんどすべてが一本鎖 DNA となり、室温ですくなくとも5時間は一本鎖 DNA を保持することができる。LIS-SSCP 法は SSCP による変異スクリーニングやアリルタイピング及びアリルマッチングにも利用できる。

参考文献

Maruya E, *et al.*: PCR-LIS-SSCP (low ionic strength single stranded conformation polymorphism), simple method for high resolution allele typing of HLA-DRB1, DQB1 and DPB1. *Genome Research* 6: 51-57, 1996.

DNA クロスマッチ (LIS-DCP 法) のフローシート

◇ 準備するもの

- ① ドナーとレシピエントの Genomic DNA
- ② 比較の対象とする領域を増幅するためのプライマー (HPLC 精製)
- ③ Ex Taq や LA Taq またはこれと同等の品質の Taq ポリメラーゼ
- ④ LIS-solution: 10% saccharose, 0.01% bromophenol blue, and 0.01% xylene cyanolFF (室温で作り置き可能, 使用する蒸留水は滅菌済みであること)
- ⑤ 50% (アクリルアミド:ピスアクリルアミド=49:1) ポリアクリルアミド溶液
- ⑥ SSCP 用電気泳動装置 (ミニゲル定温度電気泳動装置:アトー, AE-6410)
- ⑦ 銀染色キット (第一化学)

◇ フローシート

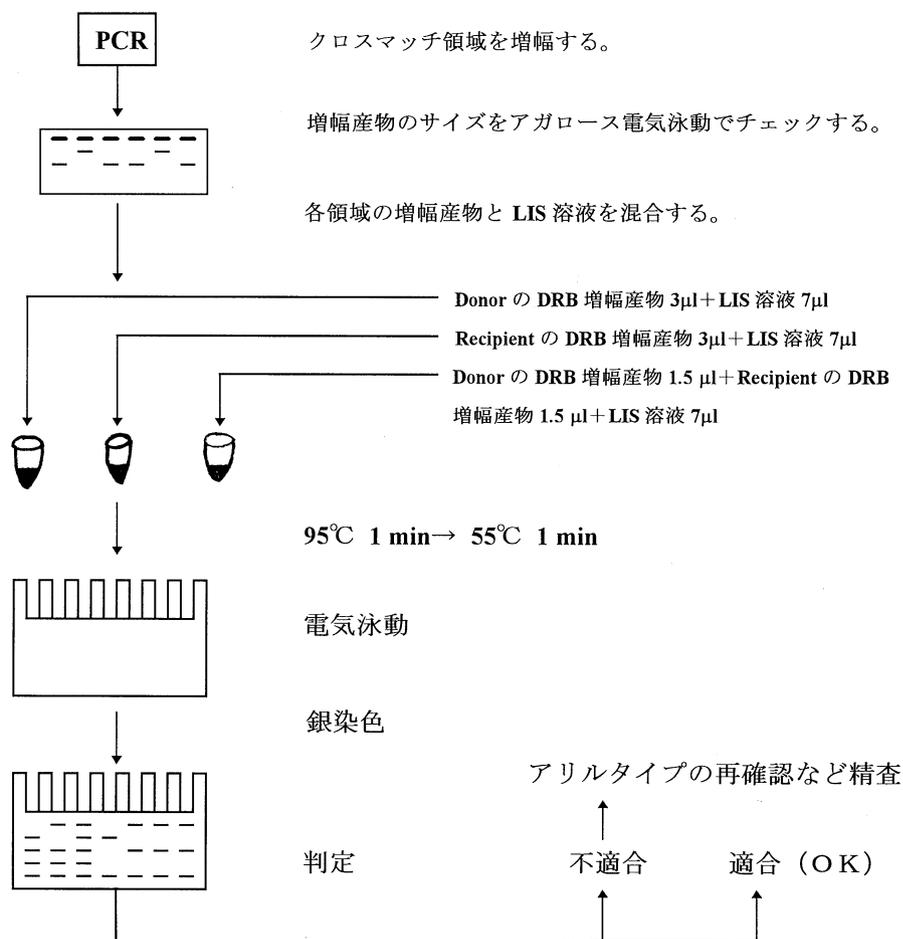


Table 1. DNAクロスマッチ用プライマーの塩基配列および増幅産物のサイズ

Gene	Sense	Anti-sense	Sequences (5' to 3')	Products
DRB	GH46		CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCAGC	279bp
		3' R	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT	
DQA*	GH26		CTCGGATCCGCATGTGCTACTTCACCAACG	242bp
		GH27	CACGGCAGATCCCGCGGTACGCCACCTC	
DQB	GH28		CTCGGATCCGCATGTGCTACTTCACCAACG	232bp
		GH29	GAGCTGCAGGTAGTTGTGTCTGCACAC	
DPB	DB01		CAGGGATCCGCAGAGAATTAC	294bp
		DB03	GTCTGCAGTCACTCACCTCGGCG	
Class I	5' H1E2		CCCACTCCATGAGGTATTTTC	263bp
		3' H1E2	CTCGCTCTGTTGTAGTAGC	
	5' H1E3-2		TCCGGGCCAGGTTCTCACA	271bp
		3' H1E3	TCTCCTCCCGTTCTCCA	

* : オプションとして検査している。

9. DNA タイピングの今後

日本赤十字社中央血液センター，研究1課 石川 善英

I. PCR-PHFA (preferential homoduplex formation assay) 法

〈原理〉

同じプライマーで増幅した2種類のDNAフラグメントを混合し、熱変性により1本鎖にした後、徐冷すると相補的な鎖同士が優先的に結合して二重鎖を形成する性質を利用したものである。

〈準備〉

1. 装置

- 1) サーマルサイクラー
- 2) プレートリーダー
- 3) (プレートミキサー)

2. 試薬

- 1) 標準DNA (アリアル既知のDNA: タイピングするアリアルを揃える)
- 2) ストレプトアビジンコート96穴プレート (湧永製薬)
- 3) 標識プライマー
ジニトロフェニル標識センス (アンチセンス) プライマー
ビオチン標識アンチセンス (センス) プライマー
- 4) 非標識プライマー (標識プライマーと同じ塩基配列)
- 5) プレート洗浄用バッファー (SolutionI)
0.3 M NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5
- 6) 標識抗体液 (Alkaline Phosphatase-conjugated anti-DNP antibody) (アビジンプレートに添付)
- 7) ジエタノールアミンバッファー
0.5 mM MgCl₂, 1 M Diethanolamine (和光純薬) -HCl, pH 9.8
- 8) 発色基質 (pNPP: p-Nitrophenyl Phosphate (GIBCO BRL))
- 9) 調整液
10 x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0)
Dimethylsulfoxide (和光純薬)
Brilliant Blue FCF (和光純薬)

〈操作手続〉

1. PCR 増幅

標準DNAを標識プライマーで、サンプルDNAを非標識プライマーで増幅する。標準DNA増幅産物に非特異バンドがある場合は精製する。

HLA-DPB1タイピング用のプライマーとPCR条件:

DPBAMP-A:5'-CCTCTCCGCAGAGAATTAC-3'

DPBAMP-B:5'-AGCCCTCACTCACCTCGGCG-3'

(96°C, 20sec → 55°C, 30sec → 72°C, 30sec) × 35cycles → 72°C, 5 min

2. ホモデュプレックス形成

- 1) 標準 DNA 増幅産物 (数 ng/ml) : 10 × SSC : DMSO : DDW = 0.5 : 9 : 3 : 7.5 の比率で混合し標準 DNA 溶液とする (蒸留水に溶解した Brilliant Blue をわずかに着色する程度加える : 標準 DNA とサンプル DNA を見た目では区別するため)。
- 2) PCR チューブに標準 DNA 溶液 20 μl, サンプル DNA 増幅産物 10 μl (約 20 ng) を加え, 混合する。サンプル DNA 増幅産物の代わりに蒸留水を加えたものを発色コントロールとする。
- 3) サーマルサイクラーを用いて, 98°C, 10min 熱変性後, 98°C から 68°C まで 1°C/10min で冷却。

3. 発色およびタイピング

- 1) Alkaline Phosphatase-conjugated anti-DNP antibody を Solution I で 100 倍希釈し, 室温に戻しておいたアビジンプレートの各ウェルに 100 μl ずつ加える。
- 2) 2 で調整した DNA 溶液 20 μl を各ウェルに加え, 室温で 30 分間振とうする。
- 3) 液を吸い取り 350 μl の Solution I で 3 回洗う。
- 4) 各ウェルに, 予め室温に戻しておいた Diethanolamine buffer で 100 倍希釈した pNPP 溶液 100 μl を加え発色させる (約 15 分)。
- 5) 405nm の吸光度をプレートリーダーで測定し, Index を計算する。

$$\text{Index} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{空ウェル}}}{\text{OD}_{\text{発色コントロール}} - \text{OD}_{\text{空ウェル}}}$$

～標準 DNA とサンプル DNA が同じアリアルであれば Index は小さく (<10), 異なっている場合は大きくなる (20<)。ただし Index の差は系により異なる。

<トラブルシューティング>

1. Positive サンプルの OD が低い
 - ・ サンプル DNA 増幅産物の濃度が低い。
 - ・ 標準 DNA 増幅産物の純度が低い。
 - ・ 変異がフラグメントの端に位置している。
2. Negative サンプルの OD が低い
 - ・ 試薬の活性低下。
 - ・ 抗体を加えた後の混合が不十分。

II. PCR-SBT(sequence-Based typing) 法

<原理>

cDNA または genomicDNA から多型領域を PCR 増幅し, この塩基配列を DNA シークエンサーにより解析し, アリアルを決める。SBT 法によるタイピングシステム (タイピング用キットとタイピング用 software) は近々 ABI および Pharmacia 社から発売される予定である。これらのタイピングシステムについては詳細な説明書が添付されるので, そちらを参考にしていきたい。ここではマニュアルによる SBT 法について紹介する。マニュアル法ではヘテロのサンプルの 2 つのアリアルを一度に決めるのは困難であり, 確実

にタイピングするためにはグループ特異的プライマーで増幅して1種類のDNAにする必要がある。

〈準備〉

1. 装置

- 1) サーマルサイクラー
- 2) DNA シークエンサー

2. 試薬

- 1) PCR 増幅用プライマー (グループ特異的)
- 2) 5 xTACS バッファー (400 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 100 mM (NH₄)₂SO₄, pH 9.0)
- 3) Dimethylsulfoxide
- 4) シークエンス用プライマー (フラグメントが300bp程度であれば増幅用プライマーがそのまま使える。)
- 5) TE バッファー (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)
- 6) フィルター (pore size 0.025 mm, 直径25 mm, Type VS ; Milipore)
- 7) シークエンス用試薬 (キット : ABI, Pharmacia)

〈操作〉

1. グループ特異的 PCR 増幅

PCR バッファーとして TACS バッファーを用い、DMSO を 5 %加えると比較的特異的な増幅ができる。

2. プライマーの除去

シークエンシングは片側のプライマーのみで行われるため、PCR 産物をテンプレートとして用いる場合は必ずプライマーを除去する。

PCR 反応液の約1000倍量の TE バッファーにフィルターを浮かべ、この上に PCR 反応液を20-30 μ l づつの液滴としてのせ、乾燥しないようにして約2時間静置あるいはゆるやかに振とう後、液滴を回収する。

3. 塩基配列の決定

シークエンシングキット, DNA シークエンサーの説明書の指示通り。

第5回日本組織適合性学会大会

ワークショップII

「クロスマッチ，最近の話題」

1. LCT と AHG-LCT (血小板輸血)

兵庫県赤十字血液センター, 検査課 荒木 延夫

LCT と AHG-LCT は古典的な血清学的検査法であるが臨床的に非常に重要である。以下、血小板輸血患者の非溶血性輸血反応や輸血不応答に陥った原因を調べるときの患者血清中の HLA 抗体スクリーニング、及び HLA 適合血小板供給のためのリンパ球クロスマッチの方法を記述する。

1. HLA 抗体スクリーニング用セルの確保 (リンパ球クロスマッチ用セルにも使用)

- ① 血液成分分離装置 (COBE Spectra) により HLA タイプ既知供血者の血小板成分採血実施後の使用済キットの残存血液 (血球成分が生食液で約10倍に希釈されている) を用いる。
50~70ml の希釈血液が確保され、その白血球成分中のリンパ球の純度は約70~80%あり、個数は約 $2 \sim 3 \times 10^8$ 個程度存在する。尚、BAXTER CS-3000, Hemonetics Multi の使用済キットからのリンパ球の回収は COBE Spectra に比べると比較的少ない (BAXTER CS-3000: リンパ球の純度は約90%以上で約 8×10^7 個, Hemonetics Multi: リンパ球の純度は約40~50%で約 5×10^7 個)。
リンパ球の分離まで室温に保管し、一晚以上室温に保存しても良好なリンパ球の生存率が得られる。
- ② 50ml 試験管に血液を移し、中型遠心機で1500rpm 10分間遠心する。
- ③ 上清を捨て、 Buffy-coat 層を約 3 ml 採取し、生食液で約9ml に希釈する。
- ④ 別の10~15ml 試験管にリンパ球分離液 (Pharmacia 社: Ficoll paque) 3 ml を3本用意し、その上に約等量の③液を静かに重層する。
- ⑤ 中型遠心機で2000rpm 15分間遠心する。
- ⑥ 比重液と生食層との境界面 (リンパ球層) を採取し、別の50ml 試験管1本にまとめて入れ、生食液で40ml に希釈する。
- ⑦ 中型遠心機で1500rpm 10分間遠心する。
- ⑧ 上清を捨て、生食液で40ml に希釈し、中型遠心機で1000rpm 10分間遠心する。
- ⑨ 上清を捨て、20% FBS・McCoy 5A 液を36ml 加え、リンパ球を再浮遊する。
- ⑩ 氷水中で DMSO の最終濃度が10%になるように DMSO を徐々に加え、ベックマンチューブ (Robbins 社: #1009-04-0) 100本に400 μ l ずつ分注する。
- ⑪ -80度に一晚保存後、液体窒素中に保存する。
- ⑫ 使用時は、室温で自然解凍し (すぐに溶ける)、フィッシャーチューブに移し替え、10% FBS・McCoy 5A 液を400 μ l 加え、フィッシャー遠心機で2000g 1分間遠心する。
- ⑬ 上清を捨て、10% FBS・McCoy 5A 液を800 μ l 加え、細胞を再浮遊し、1000g 1分間遠心し、細胞を洗浄する (この操作を2回繰り返す)。
- ⑭ 上清を捨て、3000個/ μ l になるように10% FBS・McCoy 5A 液でリンパ球を浮遊させ、検査に用いる。生存率は我々の経験では95%以上である。

2. HLA 抗体スクリーニングとリンパ球クロスマッチ

項目1で得た対象となるリンパ球 (HLA 抗体スクリーニングの場合はパネル細胞をセレクトして24種使用) と患者血清との反応を LCT, AHG-LCT (LCT では検出不能な補体非結合性抗体や抗体価の低い抗体を検出) でみる。

(1) LCT (図1)

- ① 流動パラフィン (山桂産業：#70) をジェットピペット (ヨーク社) を用いてテラサキトレイ (ロビンス社：1006-00-0) の各穴に $6 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ② 患者血清, NHS (normal human serum: AB型で輸血歴, 移植歴のない男性血清を用いる) をリピーティングマイクロシリンジ (ロビンス社) を用いて $1 \mu\text{l}$ ずつ図2のように分注する。尚, 図2のように triplicate で実施する理由は患者血清と対象リンパ球の反応の再現性を確認するためである。
また, 血清量は $1 \mu\text{l}$ に限る必要はなく, 感度を高めるために $2 \sim 5 \mu\text{l}$ を用いてもよい。
- ③ 項目1で得た対象となるリンパ球をリピーティングマイクロシリンジを用いて $1 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ④ 室温30分間, インキュベートする。感度を高めるために60分間にしてもよい。
- ⑤ ABC用補体 (ワンラムダ社) をテラサキリピーティングシリンジ (ロビンス社) を用いて各穴に $5 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ⑥ 室温60分間, インキュベートする。
- ⑦ 5%エオジンをジェットピペットを用いて $2 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ⑧ 室温2分間, インキュベートする。
- ⑨ 中性ホルマリンをジェットピペットを用いて $8 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ⑩ 30分間以上静置後, カバーガラスをかけて, 倒立位相差顕微鏡を用いて $\times 100$ で各穴中の死細胞の割合を表1の判定基準で判定する。通常, スコア4以上を陽性とする。

(2) AHG-LCT (図1)

- ① AHG-LCT は抗原抗体反応の段階では流動パラフィンを用いないため, 図3のように乾燥させない様に生食液をぬらした濾紙を両側に置く。
- ② 患者血清, NHS, PBS をリピーティングマイクロシリンジを用いて $2 \mu\text{l}$ ずつ図3のようにテラサキトレイに分注する。尚, LCT同様, triplicate で実施する。
また, 血清量は $2 \mu\text{l}$ に限る必要はなく, 感度を高めるために $3 \sim 5 \mu\text{l}$ を用いてもよい。
- ③ 項目1で得た対象となるリンパ球をリピーティングマイクロシリンジを用いて $1 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ④ 室温30分間, インキュベートする。感度を高めるために60分間にしてもよい。
- ⑤ 各穴に生食液 $5 \mu\text{l}$ を加え, プレート遠心機で2000rpm 1分間遠心し, スナッピングにて上清を除去する (この操作を4回繰り返す)。しかし, この遠心して洗浄する操作は熟練を要するので (スナッピングをうまく行わないとリンパ球をかなりロスする) 以下の方法をお薦めする。

遠心操作を用いない洗浄操作法

テラサキトレイの端から静かに生食液を流し入れ, トレイを生食液で満たし, アスピレーターを用いてトレイの端から生食液を吸引して除去する操作を3回繰り返して洗浄後, トレイに残った生食液を濾紙で除く。

- ⑥ 流動パラフィンをジェットピペットを用いてテラサキトレイ各穴に $6 \mu\text{l}$ ずつ分注する。
- ⑦ 抗人L鎖 κ 型と λ 型血清 (ヘキスト社 NA 抗血清: 至適濃度を検定し, PBSにより希釈して使用する。至適濃度の検定は抗体価が分かっているHLA抗体を用い, PBS対象と比較して2管増強が見られる希釈濃度で使用する。その際, NHSが反応しないことを確認する) を図3のように各穴にリピーティングマイクロシリンジを用いて $1 \mu\text{l}$ ずつ分注する。

尚, AHG-LCT に用いられる抗人免疫グロブリン血清に抗人IgGや抗人グロブリンを用いると, リンパ球のキャッピング現象により抗原が膜表面で凝集し, 感度が低下する場合がありますので使用しない方がよ

い。

- ⑧ 室温 3 分間, インキュベートする。
- ⑨ ABC 用補体をテラサキリピーティングシリンジを用いて各穴に 5 μ l ずつ分注する。
- ⑩ 室温 60 分間, インキュベートする。
- ⑪ 5% エオジンをジェットピペットを用いて 2 μ l ずつ分注する。
- ⑫ 室温 2 分間, インキュベートする。
- ⑬ 中性ホルマリンをジェットピペットを用いて 8 μ l ずつ分注する。
- ⑭ 30 分以上静置後, カバーグラスをかけて, 倒立位相差顕微鏡を用いて $\times 100$ で各穴中の死細胞の割合を表 1 の判定基準で判定する。通常, スコア 4 以上を陽性とする。

判定時の注意点として,

- a. NHS と PBS との反応が陽性的の場合, 乾燥などによってリンパ球が死滅したと考えられるので, 再検査が必要である。
- b. NHS と PBS との反応が陰性的で, NHS と抗人 L 鎖血清との反応が陽性的の場合, 抗人 L 鎖血清の至適濃度を再検討する。
- c. LCT 陰性的で患者血清と PBS との反応が陽性的であれば, 洗浄操作により抗補体因子などが除去され感度が上昇したと考える。

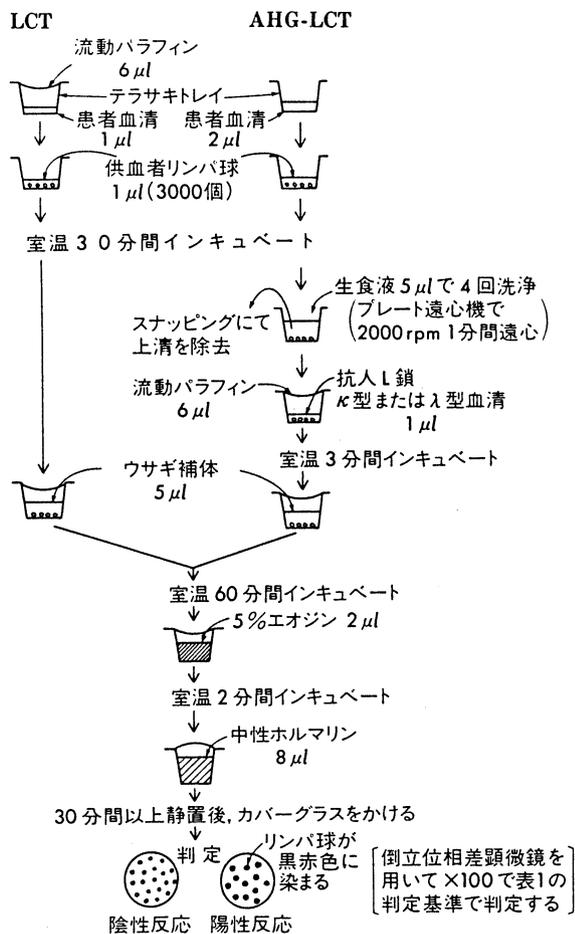


表 1 LCT, AHG-LCT 判定基準

%死細胞	スコア	判定基準
81 ~ 100%	8	強陽性
41 ~ 80	6	陽性
21 ~ 40	4	弱陽性
11 ~ 20	2	疑陰性
0 ~ 10	1	陰性
	0	判定不能

通常、スコア 4 以上を陽性とする

図 1 LCT, AHG-LCT によるリンパ球クロスマッチ

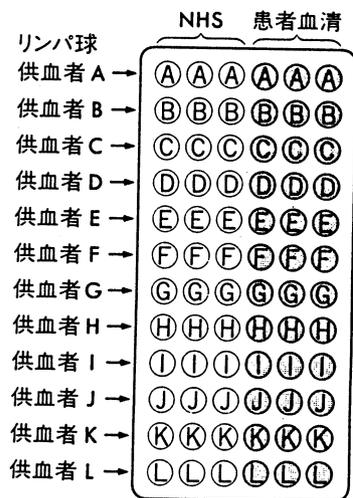


図2 LCTによるリンパ球クロスマッチ

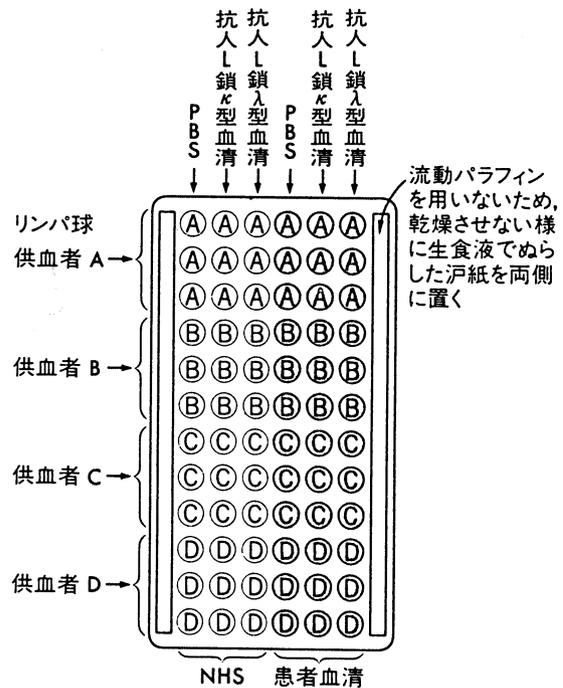


図3 AHG-LCTによるリンパ球クロスマッチ

(図1, 図2, 図3は参考文献より転載)

参考文献

1. 荒木延夫：新輸血医学，改訂2版（伊藤和彦，寮隆吉，岡田浩佑編著），血小板交差適合試験はいかにするか？金芳堂，京都，1993；p.192-196.

2. 改良 AHG-LCT, MAIPA と MAILA (血小板輸血)

北海道赤十字血液センター, 検査課 三谷 孝子, 荒関 みき, 森下 勝哉

MAIPA 法, MAILA 法

1. MAIPA (Monoclonal Antibody specific Immobilization of Platelet Antigens)

1. 試薬

1) Moab : PBS で濃度20mg/l になるように溶解し, 100 μ l ベックマンチューブに分注後凍結保存する.

P2	: 0.2mg 0145	anti-GPIIb/IIIa	Immunotech 社
SZ2	: 0.2mg 0409	anti-GPIb	Immunotech 社
4B4	: 100test PN6603113	anti-GPIa/II a	Coulter 社
OKM5	: (200tests)	anti-GPIV	Ortho 社
w6/32	: 0.148mg	anti-HLA-classI	DAKOPATTS 社

2) Leupeptin (L2884;SIGMA 社) 最終濃度50mg/ml に調整し凍結保存する.

3) Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (1.5mg 115-005-071;Jackson 社)

4) Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG (1.5ml/109-035-098 ; Jackson 社)

Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM (2.0ml/109-035-043 ; Jackson 社)

5) OPD (100錠 S2000 DAKOPATTS 社)

6) BSA (01-2030片山化学社)

2. 試薬調整

1) Coating buffer

Na ₂ CO ₃	1.59g	
NaHCO ₃	2.93g	
NaN ₃	0.2g	
up to distilled water	1000ml	pH9.6 4°C保存

2) PBS-BSA

Dulbecco PBS	0.19g	
BSA	0.4g	
Leupeptin (50mg/ml)	20ul	
up to distilled water	20ml	pH7.2 用時調整

3) TBS Wash buffer

Tris	1.21g	
NaCl	8.0g	
Triton · X-100	5.0ml	
Tween20	0.5ml	
IM CaCl ₂	0.5ml	
up to distilled water	1000ml	pH7.4 用時調整

4) Solubilization buffer

Tris	1.21g	
NaCl	8.0g	
Triton X-100	5.0ml	
up to distilled water	1000ml	pH7.4 4°C遮光保存

5) 0.1M citric acid-phosphate buffer PH5.0

citric acid	7.3g	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	23.88g	
up to distilled water	1000ml	pH5.0 4°C保存

6) Substrate Solution

0.1M citric acid-phosphate buffer pH5.0	1000ml	
30% H ₂ O ₂	200ul	4°C保存

3. 血小板分離

- 1) ACD 採血血液を1500rpm10分間遠心する。
- 2) 上清の PRP を丸底チューブに移す。
- 3) 10mM EDTA-2Na in PBS で2回洗浄する。(3000rpm 5分)
- 4) 上清を完全に除去後、血小板沈査を完全にほぐす。
- 5) PBS-BSA で血小板数 ($4 \times 10^5 / \mu l$) を調整する。

4. 検査方法

1) コーティングプレートを作成する.

- ① Anti-Mouse IgG を Coating buffer で500倍希釈する.
- ② 100 μ l ずつ Microtiter plate (96穴 平底; greiner 社) に分注する.
- ③ 4°C over night で静置する.

2) チューブの準備をする.

マイクロ遠心チューブのふたを切り取り, 必要な本数 {(被検血清+NC)×パネル血小板×モノクローナル抗体} を用意し図1に示すように番号をふる. 陽性コントロールを別に置く.

図1 1血清あたりのチューブの本数

		パネル血小板				
		#1	#2	#3	#4	#5
P2		1	2	3	4	5
MoAb	SZ2	6	7	8	9	10
	4B4	11	12	13	14	15

3) 被検血清及び陽性コントロール, 陰性コントロールを遠心後 (10,000rpm, 5分) マイクロ遠心チューブに25 μ l 入れる.

4) 3. で調整したパネル血小板を50 μ l 入れる.

5) ラップで覆い乾燥を防ぎ, 4°C over night 反応させる. (あるいは37°C, 2時間)

6) PBS で1回洗浄する.

洗浄方法はPBSを加えて高速遠心機で14000rpm, 4分遠心後上清を完全に除去し, 血小板沈査を完全にほぐす. 以下全てこの方法で洗浄を行なう.

7) モノクローナル抗体 (20 mg/l) を PBS-BSA で10倍希釈する.

8) ほぐした血小板沈査に7) で調整したモノクローナル抗体を100 μ l 加える.

9) 37°C, 30分反応させる.

10) PBS で3回洗浄する.

11) 上清を完全に除去後血小板沈査をほぐし, 4°Cで冷やしておいた Solubilization buffer を100 μ l 加える.

12) 4°C, 30分反応させる.

13) コーティングプレートを TBS Wash buffer で4回洗浄し, 乾燥を防ぐためにウエルを buffer で満たし, 抗原-抗体-モノクローナル抗体 complex が調整されるまで放置する.

14) 12) の反応終了後, 高速遠心機で14000rpm, 10分間冷却 (4°C) 遠心する.

15) 遠心後上清50 μ l を別のチューブ等 (マイクロプレートを利用すると便利) に移し, TBS Wash buffer で2倍希釈する.

16) コーティングプレートの buffer を完全に除去し, 15) のサンプルを100 μ l 入れ, IgG 抗体を検出する場合は4°C, 90分, IgM 抗体を検出する場合には4°C, over night 反応させる.

17) TBS Wash buffer で4回洗浄する.

18) Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG は TBS Wash buffer で10,000倍に Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgM は TBS Wash buffer で7,500倍に希釈する.

19) 上記の方法で調整した conjugate を100 μ l 加える.

20) IgG 抗体を検出する場合は4°C, 120分, IgM 抗体を検出する場合は4°C, overnight 反応させる.

- 21) Substrate Solution 6ml に OPD 2 タブレットの割合で発色試薬を必要量調整し、暗所に置いておく
(激しく長時間ふらないと溶解しないので注意する)。
- 22) TBS Wash buffer で 5 回洗浄する。
- 23) 21) で調整した発色試薬を 100 μ l 加える。
- 24) 暗所、室温 5 分から 15 分程度反応させる。
- 25) 4N H₂SO₄ 50 μ l 加えて反応停止する。
- 26) 分光光度計で吸光度を測定する。(Abs 492nm)

〈注意点〉

抗 A 抗体及び抗 B 抗体も陽性反応を示すので、O 型パネル血小板を使用した方が望ましい。O 型パネル血小板を使用しない場合は GPIb, GPIIb/IIIa, GPIa/IIa の反応において特定のパネルにのみ全て反応し抗 A 抗体及び抗 B 抗体と推定される場合は、被検血清の sisorb A 及び B による吸収を行う。

〈Leupeptin の効果について〉

GPIb の α 鎖は血小板由来の Ca²⁺ 依存性プロテアーゼ (カルパイン) によって切断され、保存経過とともに GPIb は失活するので (3 日保存で GPIb は 30~50% 消失) カルパイン阻害剤である Leupeptin の添加によりその失活を防止する。

II. MAILA (Monoclonal Antibody specific Immobilization of Lymphocyte Antigens)

使用パネルを PFA 固定リンパ球、使用モノクローナル抗体を W6/32 とし、試薬、検査方法等は MAIPA 法に準ずる。

1. リンパ球の固定、調整

- 1) PBS 浮遊のリンパ球 (2~4 $\times 10^6$ /ml) 400 μ l に同量の 2% PFA 400 μ l を加える。
- 2) 4°C, 5 分間 固定させる。
- 3) PBS で 2 回洗浄する。
- 4) 2% BSA in PBS でリンパ球数 (4 $\times 10^4$ / μ l) を調整する。

* 2% PFA: 2 g の PFA に 100ml の PBS を加え、70°C の Water bath 中で溶解する。溶解しづらい場合は 2N NaOH を用い、最終的に pH6.8~7.0 に調整する。

◆ MAIPA 法と違う点

4. -3) 被検血清量: 20 μ l
- 4) 濃度調整した固定リンパ球: 30 μ l
- 7) モノクローナル抗体 (W6/32) を 2% BSA-PBS で 10 倍希釈する。
(Leupeptin は GPIb の失活防止に用いるのでここでは不要)

改良 AHG-LCT

被検血清を γ -グロブリン分画に分離・濃縮し、AHG-LCT を行い同種抗体を検出する。

1. γ -グロブリン分画の調整

1. 試薬調整

1) DEAE Affi-Gel Blue

- ① ゲル色素除去: 新しいゲル使用時は使用ゲル量の 12 倍以上の Buffer-b に浮遊させて洗うことでゲ

ル中の余分な色素を除去する。ゲルが沈んできたら上清を除き、使用ゲル量の12倍量以上の Buffer-a (以下 Buffer とする) で洗う。

② ゲルの再生

- a) 使用後のゲルに2M-NaCl in Buffer を加え転倒混和し、2400rpm, 2分遠心後上清を除去する。以降この方法で洗浄操作を行う。
 - b) a) の操作を繰り返す。
 - c) Buffer で3回以上洗浄する。
 - d) 使用時まで4°Cで保存する。
- * 3, 4回使用毎に2M-guanidine HCl in Buffer で2回洗浄後、Buffer で3回以上洗浄し、ゲルを再生させる。

2) Buffer

- a) 0.02M K₂HPO₄ pH8.0 (0.02KH₂PO₄でpH調整)
- b) 0.1M acetic acid containing 1.4M NaCl and 40%(v/v) isopropanol (pH調整不要)

2. γ -グロブリン分画の分離・濃縮

- 1) 血清 1 ml 処理に必要なゲル量を丸底スピッツ (10ml) に分注し、2400rpm, 2分遠心後上清を完全に除去する。
- 2) 血清サンプル 1 ml を添加し、転倒混和させる。
- 3) 2400rpm, 2分遠心後上清を採取し、3倍程度の濃縮を行う。(当センターでは“みずぶとりくん：アトー株式会社”を使用し濃縮操作を行っている。) 以降 γ -グロブリン分画濃縮後血清を γ -血清とする。

II. γ -AHG-LCT の方法

- 1) 被検血清, γ -血清, 陰性コントロールを10,000rpm, 5分遠心後、テラサキトレイの縦2列ずつに2 μ l ずつ分注する。
- 2) 濃度調整したパネルリンパ球をそれぞれ1 μ l 分注する。
- 3) 室温30分間反応させる。
- 4) 生理食塩水をトレイの隅から静かに流し入れ、全てのウェルに生理食塩水を満たし3分間清置する。
- 5) トレイを静かに傾けて生理食塩水を捨てる。
- 6) 4) 5) の操作を繰り返す。
- 7) 濾紙等でウェルに残っている生理食塩水を吸い取る。
- 8) 生理食塩水で至適濃度に希釈した抗ヒト IgG-L 鎖をトレイの A, C, E 列のウェルに、抗ヒト IgG-K 鎖を B, D, F 列のウェルにそれぞれ1 μ l ずつ分注する。
- 9) 家兎補体 5 μ l を分注する。
- 10) 室温で1時間反応させる。
- 11) 5%エオジン溶液を3 μ l ずつ分注し5分間染色する。
- 12) 3倍希釈ホルマリン溶液を8 μ l ずつ分注し、染色を停止させる。
- 13) 30分間静置後、位相差顕微鏡で判定する。

3. MPHA と顆粒球抗原・抗体検査

東京大学医学部, 輸血部 宮本 光子

顆粒球の分離

血液採取は5% EDTA (1:8)/ACD (1:7) で採血をする。
Ficoll-Paque に重層して遠心分離 (3000rpm, 10分)
赤血球層に等量の0.5% EDTA/PBS と6% HES 1 ml をくわえて転倒混和する。
水浴中にて37°C, 30分 incubation したのち顆粒球層を採取する。
Tris-NH₄Cl で混在する赤血球を溶血させる。
0.5% EDTA/PBS にて2回洗浄 (2000rpm, 3分)

顆粒球の分注

顆粒球を1500個/ μ l に調整する。
U型マイクロプレートの各wellに50 μ l ずつ分中
プレート遠心機にて2000rpm, 7分遠心する。
4% PFA (PH6.0) 100 μ l 加え室温60分
生理食塩水で3回洗浄
5% サッカロース/PBS を100 μ l くわえる
-40°C に保存

MPHA

凍結されているプレートを水浴で解凍
被検血清25 μ l 各wellに分注
3~5時間, 室温で感作
0.05% Tween 生食水にて5回洗浄
抗ヒトIgG セル25 μ l 分注
観察

4. フローサイトメトリーを用いた FACS クロスマッチ法

市立札幌病院, 検査部 笹木 剛志

フローサイトメトリークロスマッチテスト

1. 被検血清の他に Positive Control, Negative Control を用意する。
2. 各フィッシャーチューブに30 μ l の2% FCS 加に浮遊させた 5×10^5 個のリンパ球を分注する。
3. 20 μ l の被検血清 (Positive Control, Negative Control) を加え, 充分混合した後, 室温30分間インキュベート。
4. 2% FCS 加 PBS で3回洗浄する (2000G, 1分間)。
5. PBS で50倍に希釈した FITC 標識抗ヒト IgGF(ab)₂抗体50 μ l を加え, 4°C30分間インキュベート (暗所)。
6. 2% FCS 加 PBS で3回洗浄する (2000G, 1分間)。
7. PE 標識抗ヒト CD 3 抗体20 μ l を加え, 4°C20分間インキュベート (暗所)。
8. 2% FCS 加 PBS で3回洗浄する (2000G, 1分間)。
9. 200 μ l のシース液に浮遊させ, 測定用チューブに移しかえてフローサイトメトリーで測定する。

5. フローサイトメトリーを用いたリンパ球 クロスマッチの紹介と臨床成績との 相関について

名古屋第二赤十字病院，組織適合検査センター 小原 節子

フローサイトメトリー法によるリンパ球クロスマッチ

試薬

- ① PBS (-) リン酸緩衝塩類液
- | | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 0.8 (%) |
| KCl | 0.02 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.02 |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.1 |
- ② リンパ球分離液 (Ficoll 比重液)
- ③ 溶血剤 (pH7.3)
- | | |
|--------------------|-----------|
| NH ₄ Cl | 0.826 (%) |
| KHCO ₃ | 0.1 |
| EDTA2Na | 0.0037 |
- ④ 細胞浮遊用メディアム：PBS (*)
- PBS (-) + 0.1% NaN₃ + 2% FCS
- フィルター (0.45μm) を通して使用
- ⑤ FITC 標識 Goat F(ab')₂ 抗ヒト IgG (X40希釈)
- ⑥ PE 標識 CD3 (抗 Leu4)
- @注意：②，④，⑤，⑥は 2～8℃保存

測定法

1. リンパ球 (単核細胞) 浮遊液の調整

——比重遠心法——

検体を等量の PBS (-) にて希釈

↓

Ficoll 比重液に重層

↓

2500rpm 10分 遠心 (室温)

↓

単核細胞を得る

↓

溶血剤にて一回洗う

↓
PBS (*) にて 2 回洗う

↓
細胞を PBS (*) にて $10^6 \sim 10^7 / ml$ 濃度に調整する

2. 抗リンパ球抗体の測定

コントロール 陰性 (NC) : 不活化正常男性 AB 型プール血清
自己 (Auto) : ドナー血漿
陽性 (PC) : 抗 HLA 抗体陽性者の血清

<方法> コントロール (NC, Auto, PC) を受賢者血清と同様に行う
受賢者血清 $20 \mu l$ + ドナー細胞 $20 \mu l$ ($10^6 \sim 10^7 / ml$)

室温 30分

↓ PBS にて 2 回洗う

FITC-F(ab')₂ 抗ヒト IgG $20 \mu l$

4°C 30分

↓ PBS にて 2 回洗う

PE-抗 CD3 $20 \mu l$

4°C 30分

↓ PBS にて 2 回洗う

PBS (*) に浮遊 ($500 \mu l \sim 1000 \mu l$)

フローサイトメトリーにて

Mean Channel Shift 測定

<判定> Auto (NC) に対して 20% 以上を陽性

文献

1. Iwaki Y, Lau M, Terasaki P I : Successful transplant across Twarm-positive cross-matches due to IgM antibodies. *Clin. Transplant.* **2** : 81-84, 1988.
2. Taylor J, Chapman J R *et al.* : Characterization of lymphocytotoxic antibodies causing a positive crossmatch in renal transplantation. *Transplantation* **48** : 953-958, 1989.
3. Spees E, McCalman R : Succesful kidney transplantation with a positive IgM crossmatch. *Transplant. P.* **22** : 1887-1888, 1990.
4. Kerman H, Kimball M, *et al.* : AHG and DTT/AHG procedure identification of crossmatch-appropriate donor-recipient pairings that result in improved graft survival. *Transplantation* **51** : 316-320, 1991.
5. Cicciarell: J, Helstab K, Mendez R : Flowcytometry PRA, a new test that is highly correlated with graft survival. *Clin. Transplant.* **6** : 159-164, 1992.
6. Ogura K, Terasaki P I *et al.* : The significance of a positive flowcytometry crossmatch test in primary kidney transplantation. *Transplantation* **56** : 294-298, 1993.

6. B cell クロスマッチ陽性は移植適応か否か

愛媛県立衛生研究所, 疫学情報科 奥山 正明

リンパ球クロスマッチ検査について

我々が行っている HLA 関係の検査は, 腎移植・HLA タイパー会議が作成した平成 6 年10月発行の「組織適合性検査マニュアル第 1 版 (1994)」に準じていますので, 以下に記すクロスマッチ検査もそのほとんどがマニュアル通りであることをお断りしておきます。

1 T・B 細胞の分離 (省略)

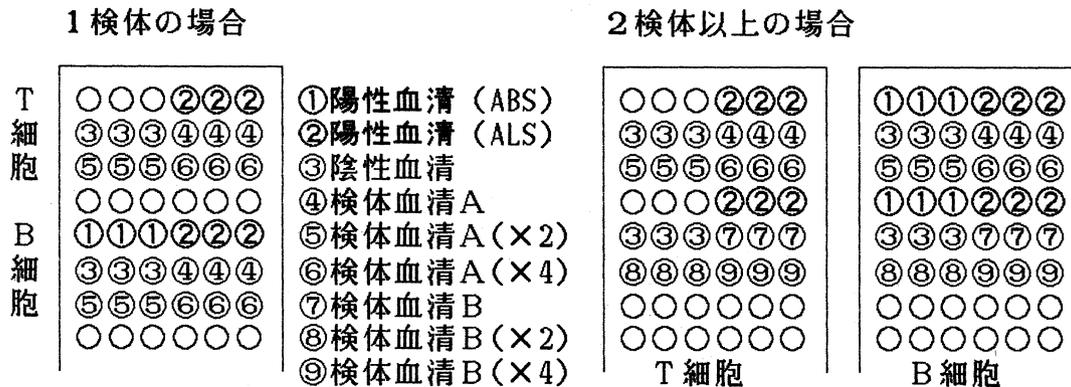
ナイロンカラム法, リンフォイック法, ダイナビーズ法が一般的に用いられている。どの方法を用いるにしてもできるだけ高純度なリンパ球分離が必要である。

我々は, 生体腎移植の直接交叉試験や登録者の既存抗体検査はナイロンカラム法を多用しているが, 献腎検査についてはダイナビーズ法を主としナイロンカラム法を併用している。

2 リンパ球直接交叉試験

(1) エオジン染色法

- ① T 細胞, B 細胞について, 37°C, 室温 (約25°C), 4°Cで 1 次反応を行うため, テラサキトレイに流動パラフィンを分注したものをそれぞれ用意する。
- ② 血清のレイアウト



③ 反応及び判定

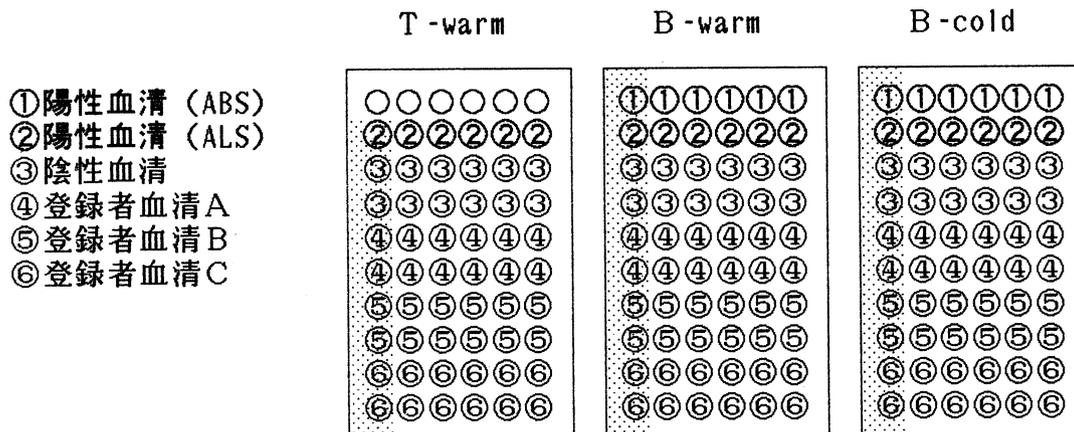
- a T リンパ球 ($2.5 \times 10^6 / ml$), B リンパ球 ($3.0 \times 10^6 / ml$) を各ウェルに $1 \mu l$ ずつ加える。
- b 37°C, 室温, 4°C用のトレイをそれぞれの温度で 1 時間インキュベートする。
- c T 細胞用, B 細胞用のウサギ補体を $5 \mu l$ ずつ加える。
- d 37°C, 室温, 4°C用のトレイを室温で 2 時間インキュベートする。
- e 5%エオジン染色液を $2 \mu l$ ずつ加える。
- f 約 2 分後にホルマリンを $8 \mu l$ ずつ加える。

- g 約30分後に倒立位相差顕微鏡で判定する。
- h 死細胞が10%を越えるものはスコアでなく、割合 (%) を記録する。
- ④ 陽性コントロール血清へのリンパ球や補体の打ち込みは最後に行っている。
- (2) ダイナビーズ法
- ① T細胞, B細胞について, 37°C, 室温 (約25°C), 4°Cで1次反応を行うため, エオジン法と同様に, テラサキトレイに流動パラフィンを分注したものをそれぞれ用意する。
- ② 血清のレイアウトは, エオジン法と同じ。
- ③ 反応及び判定
- a T・Bリンパ球を各ウェルに1 μ l ずつ加える。
(リンパ球数の調整はしていない)
- b 37°C, 室温, 4°C用のトレイをそれぞれの温度で1時間インキュベートする。
- c T細胞用, B細胞用のウサギ補体1 mlに0.03%アクリジンオレンジと0.1%エチジウムブロマイドを各30 μ lの割合で加えたものを5 μ l ずつ加える。
- d 37°C, 室温, 4°C用のトレイを室温・暗所で1時間インキュベートする。
- e クエンチング試薬 (5% EDTA・PBS・0.2%フェノールレッド) を5 μ l ずつ加える。
- f 倒立位相差落射蛍光顕微鏡 (BV 励起) で判定する。
- g 死細胞が10%を越えるものはスコアでなく、割合 (%) を記録する。
- ④ 陽性コントロール血清へのリンパ球や補体の打ち込みは最後に行っている。

3 既存抗体検査

(1) エオジン染色法

- ① T細胞は37°C, B細胞は37°Cと4°Cで1次反応を行うため, テラサキトレイに流動パラフィンを分注したものをそれぞれ用意する。
- ② 複数の登録者血清でトレイを作成し, -80°Cで凍結保存する。
血清のレイアウトを次図に示す。(登録者3人の場合)
このトレイで6種類までのリンパ球と登録者血清とを反応させている。
(例えばリンパ球が6種類用意できれば, 1種類につき2ウェルの登録者血清を使用する。この場合だと網掛け部分にリンパ球を加える。)



③ 反応及び判定

- a タイピングの残りの T・B リンパ球を各ウェルに 1 μ l ずつ加える。
- b T-warm, B-warm, B-cold 用トレイをそれぞれの温度で 1 時間インキュベートする。
- c T 細胞用, B 細胞用のウサギ補体を 5 μ l ずつ加える。
- d T-warm, B-warm, B-cold 用のトレイを室温で 2 時間インキュベートする。
- e 5% エオジン染色液を 2 μ l ずつ加える。
- f 約 2 分後にホルマリンを 8 μ l ずつ加える。
- g 倒立位相差顕微鏡で判定する。
- h 死細胞が 20% 以上を陽性とし, スコアで記録する。

④ 陽性コントロール血清へのリンパ球や補体の打ち込みは最後に行っている。

タイピングの残りのリンパ球を用いて, 既存抗体検査を行っている。

DMSO 等で保存したリンパ球は判定しづらいことが多いので行っていない。

(多分凍結保存の仕方がよくないのだと思う)

30 種類以上のリンパ球と反応させているが, 1 ヶ月以上時間がかかっている。

第5回日本組織適合性学会大会

シンポジウム

第12回国際組織適合性ワークショップ報告

1. Allele and Haplotype Society #2 (HLA-A2/28 and A9)

京都府赤十字血液センター, 研究部 丸屋 悦子

【要約】 HLA-A2/28とA9の抗原についてアロおよびモノクローナル血清による血清学的解析, IEF (Isoelectric Focusing) による抗原タンパク分子の解析と遺伝子解析などが検討された。HLA-A2/28では血清学的に4種のA2 allele (A*0203, 0210, 0217, 0218) を, HLA-A9では3種のA24 allele (A*2403, 2404, 2408) と1種のA2 allele (A*0217) を検出できる血清が存在した。HLA-A2/28のIEF解析により5種のIEFパターンとそれに対応するalleleが分類された。HLA-A2の遺伝子解析によりA2のnew allele, A*0217, がスイス人やトルコ人に存在することや, 人種によりA2 alleleの種類やその頻度に偏りがあった。

〈HLA-A2/28〉

—血清学—

58種のアロとモノクローナル血清が提出され, HLA-A2 alleleがタイプされたパネルを含むセレクトパネル349セルにより血清学的解析がなされた。HLA-A2 alleleのうちHLA-A*0203, 0210, 0217, 0218を区別する血清があった(表1)。

—IEF解析—

前回のワークショップでHLA-A2のIEFパターンは5種(A2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5)に分類された。これらのパネルセルおよびローカルA2パネルセルのIEF解析および遺伝子解析により, 5種のIEFパターンに対応するA2 alleleタイプが分類された(表2)。IEFパターンとalleleはかならずしも1対1の対応を示さなかった。IEF移動度の分離能力の限界が一因と考えられた。

—DNA解析—

PCR-SSOPやSBT(sequence based typing)法によりアジアやヨーロッパ人のHLA-A2 alleleがタイプされた(図1: Workshop Conferenceで発表されたデータも含めて記載する)。HLA-A2 alleleのうちHLA-A*0201は全ての人種に存在し,

最も高頻度のalleleであった(例外: Indian, Dai Chinese)。その他のA2 alleleは人種による偏りがみられ, HLA-A*0205はCaucasianにみられるが, Orientalにはほとんど見られず, HLA-A*0203, 0206, 0207と0210などはOrientalにみられるがCaucasianにはほとんど見られなかった。OrientalにおけるA2の多様性はCaucasianに比べて高く, 非血縁間骨髄移植に主要な因子になる。

〈HLA-A9〉

—血清学—

41種のアロとモノクローナル血清が提出され, HLA-A24 alleleがタイプされたパネルを含むセレクトパネル369セルにより血清学的解析がなされた。HLA-A*2403, 2404, 2408およびA*0217をタイプできる血清が存在した(表3)。

表1 Reaction Patterns of HLA-A2 and A28 Group

No.	A2	A203	A210	A217	A2K	A68	A69	Serum No. (AHS#2)
	(A*0203)	(A*0210)	(A*0217)	(A*0218)				
1	+	+	+	+	+	+	+	16, 17, 28, 89
2	+	+	+	+	-	+	+	87
3	+	-	W/-	+	+	+	+	4, 88
4	+	+	+	-	+	-	+	8, 9
5	+	+	-	-	-	-	+	38, 5
6	+	+	-	-	+	-	+	21, 7, 23, 47, 29
7	+	-	-	-	-	-	+	34
8	+	+	+	-	+	-	-	19, 39
9	-	+	-	-	-	-	-	22, 25, 26 *
10	-	-	-	+	-	-	-	55, 56, 51 **
11	-	-	-	+	-	-	-	57, 100 **
12	-	-	-	+	-	-	-	50, 58 **
13	-	-	-	+	-	-	-	53 **
14	-	-	-	+	-	-	-	54, 59, 60 **

*: Other Specificity; A25, 26, 34

**: Other Specificity; A9

表2 IEF Pattern and Allele type

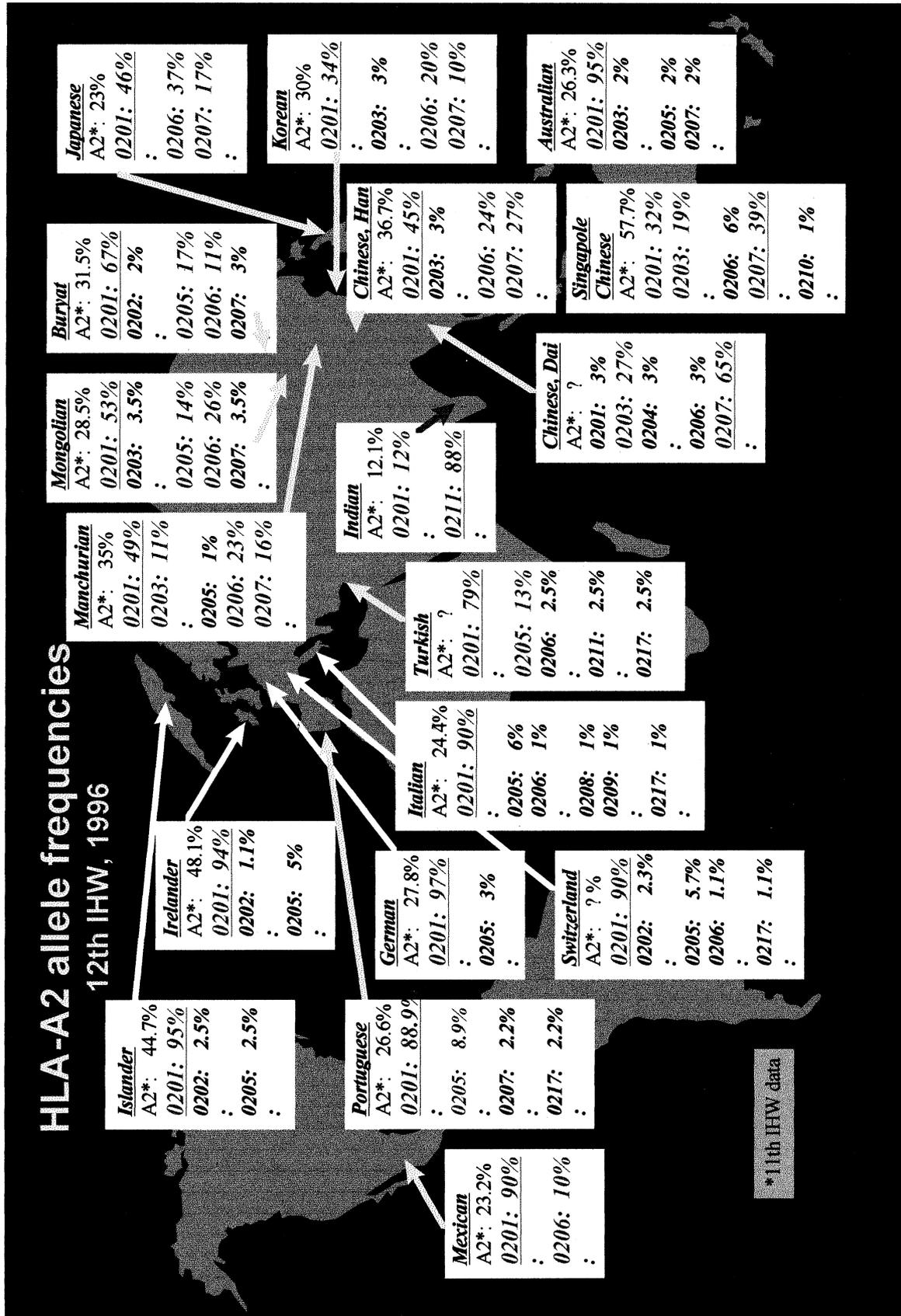
A2.1	A*0202	A*0205		
A2.2	A*0201	A*0207	A*0208	A*0210
A2.3	A*0203	A*0209		
A2.4	A*0204			
A2.5	A*0211			
A28.1	A*6802			
A28.2	A*6801			

表3 Reaction Patterns of HLA-A9 Group

No.	A23	A24	A2403	A24AK	A9HH	A217	Serum No. (AHS#2)
	(A*2403)	(A*2404)	(A*2408)	(A*0217)			
1	+	-	-	-	-	-	77
2	+	+	-	-	-	+	55, 56, 51
3	+	+	-	+	-	+	57, 100
4	+	+	-	w/-	+w	-	70, 101
5	-	+	+	+	+	-	97, 99
6	+	+	+	+	+w	-	62, 63, 64, 68, 69, 67, 93
7	+	+	+	-	+	-	94
8	+	+	+	+	-	-	75, 76
9	+	+	+	-	-	-	72
10	+w	+	+	+	-	-	52, 65, 74
11	+w	+	+	-	-	+	50, 58
12	+	+	+	-	+	+	53
13	-	+	+	+	-	+	54, 59, 60
14	-	+	+	+	-	-	73

Figure legend

☒ 1. HLA-A2 allele frequencies



2. Allele and Haplotype Society #3 (A10/A19)

長野県赤十字血液センター, 検査部 齊藤 敏

日本から AHS #3に参加登録したのは長野県赤十字血液センターだけであったが、葛飾、駒込、埼玉県、山梨県赤十字血液センターから抗血清を、京都府、神奈川県赤十字血液センターからパネルを提出していただいた。

【目的および方法】

血清学とDNAタイピングによりHLA-A10, A19関連抗原のサブタイプを決定するため、参加施設から提出された119種のアロ血清とワンラムダ社からの24種のモノクロナール抗体(M-Ab)を参加24施設に配布した。解析は集計された21民族、集団959パネルデータから反応不良データを削除し、リアサインを行った735, 616のパネルデータをそれぞれアロ血清用, M-Ab用とし、第11回国際HLAワークショップ(11th IHW)の解析プログラムにて行った。

【結果と考察】

A10関連抗原において、A26抗原以外はDNAデータのあるパネルがA*6602の1パネルだけであったため、血清学での反応とアリルとの対応を解析できなかった。

1) モノクロナール抗体での解析

A74以外のA10, A19関連の公認抗原は21種類のM-Abで全て判定することができた。A33に対し特異性を持つ3種類のM-Abのうち2種類に、日本人のA33パネルのほとんどが反応せず、全体でも約1/4のA33パネルが反応しなかったことから、M-AbによりA33のサブタイプが判定し得ることが示唆された。7種類のA10抗原に対するM-Abの中にA34パネルの一部が反応しないM-Abが4種類あった。この4種類のM-Abに反応しないパネルではB13, B62の増加が、反応するパネルではB7, B44, B58の増加が見られ11th IHWの時の報告と同じ結果が得られた。更に、この7種類の中に

A66パネルの一部が反応しないM-Abが3種類あり、反応しないパネルにおいてB58の増加が見られた。A*6602の1パネルもこれらM-Abに反応しなかった。以上の結果よりA34, A66のそれぞれ2つのサブタイプが7種類のM-Abにより判定できると思われる。また、A*2603パネルが反応しないM-Abが1種類見出された。

2) アロ血清の解析

配布された119種類のアロ血清から78種類の血清を選び解析を行った。これらの血清により、A10, A19関連抗原を判定できた。M-Ab同様A34, A66パネルの約1/3が反応しない血清が多数存在し、アロ血清を用いてもこれらのサブタイプを判定できる可能性が示唆された。また、日本から提出された5種類の血清を含む14血清によりA26アリルの一部を判定することが可能であった。この14血清の内訳は、A*2601パネルのみが反応する血清, A*2601, A*2604パネルが反応する血清, A*2601, A*2603パネルが反応する血清, A*2601, A*2602, A*2605パネルが反応する血清がそれぞれ2種類, A*2603パネルのみが反応する血清, A*2601, A*2602, A*2604, A*2605パネルが反応する血清がそれぞれ3種類であった。従ってA*2601からA*2605の5種類のアリルのうちA*2605がA*2602と区別することができない以外は血清学でアリルの判定が可能であった。またA*2606, A*2607, A*2608については情報がなく検討ができなかった。

【謝辞】

ワークショップ終了後の短期間に全てのデータを解析し座長に送付して下さった大田智氏、ならびに御校閲をいただいた兵庫県立西宮病院腎移植センターの橋本光男先生、データ変換をして下さった中央赤十字血液センターの田中秀則先生に感謝します。

3. Allele and Haplotype Society #8 (B15)

日赤中央血液センター, 検査3課 田中秀則

12th I.H.W. AHS #8は, HLA-B15, B17, B46, B70抗原について解析を行う部会であり, 24施設の参加があった。これらの抗原について, 血清学, 次元電泳動 (1D-IEF), DNA および DNA sequencing (SBT: sequencing based typing) によるタイピングを行い, 得られた結果を対比することにより, 各抗原の解析が行われた。また, それぞれのタイピングには, 同一サンプル (パネル) を複数の施設で行うことにより, その結果の確認が行われた。

血清学では, アロ血清168本, モノクローナル抗体59本 (Organizer: 45本, One Lambda: 14本) が提出され, 少なくとも3施設で血清学的検査が行われた63パネルのデータが解析に使用された。その結果, B62とB75でそれぞれ3種類, B70で2種類の反応パターンが認められた。これらバリエーションの可能性がある34パネルを選択し1D-IEF, DNA および DNA sequencing による精査が行われた。1D-IEF では, B62が2種類のタイプ (B62.1, B62.2) に分かれ, B62.2が新たなタイプであった。また, B70も2種類 (B70.1, B70.2) のタイプに分かれた。DNA タイピングでは, The BSHI HLA Class I SSO Kit を使用してタイピングが行われ, B62, B75, B57, B70で, それぞれ4, 5, 2, 2種類の異なる反応パターンが見られ, SBT での確認が行われた。

【B62】

血清学で3種類の反応パターンが見られ, そのひとつはDNA タイピングとSBTでB62 (B*1501) であることが確認され, 1D-IEFではB62.1とタイプされた。1D-IEFでB62.2とタイプされたパネルは, 血清学およびDNA タイピングでもB62 (B*1501) と区分され, SBTでB*1525であることが判明した。また, 血清学的に反応パターンが異なるもうひとつのタイプは, B62のnew allele (B*1532)

であることがSBTで判明した。その塩基配列は, B*1501と比べexon 3の368番目がA→Cに, 369番目がC→Tに置換していた。しかし, 1D-IEFによるタイプはB62.1で, B62 (B*1501) のIEFパターンとは区別できなかった。

【B75】

血清学で3種類の, DNA タイピングで5種類のパターンに分かれたが, SBTで確認した結果B*1502とB*1521の2種類だけであった。われわれは, 日本人由来のB75パネルを2種類 (B75V1, B75V2) 提出し, 他施設でも血清学的反応パターンがB75 (B*1502) とは異なることが確認された。しかし, 1D-IEF, DNA タイピング, SBTを行うため提出したセルラインの状態が悪く, 今回のワークショップでは血清学以外の検討はできなかったが, B75V1はB*1511, B75V2はB*1528にコードされていることは, すでに確認されている¹⁾。

【B70】

血清学, 1D-IEFで2種類の反応パターンがあると考えられたが, 最終的には1種類のB70 (B72; B*1503) だけであった。今回日本人由来のB70は, DNA タイピング等による検討の対象にはならなかったが, B*1518にコードされた抗原であることは確認されている¹⁾。

【B57】

今回のワークショップでは, 血清学的に区分されなかったが, DNA タイピングでB*5701のkey patternと異なる反応パターンが2種類認められ, SBTでも同様に2種類のnew alleleが示唆された。しかし, chairmanのその後の検討では, new alleleの可能性がほとんどないようである (私信)。

References

1. Lin L, Tokunaga K, Tanaka H. *et al.*: Further Molecular Diversity in the HLA-B15 group. *Tissue Antigens* 47: 264-274, 1996

4. Allele and Haplotype Society #15 (DR6)

埼玉医科大学総合医療センター，輸血部 前田 平生

DR6関連ハプロタイプである AHS #15には、18カ国、地域の40ラボラトリーが参加した。AHS #15の目的は、DR6関連で、1) 新しいアレルの発見とシークエンス、2) 稀なハプロタイプの確認、3) 血清学的なサブタイプの同定である。私がチェアマンを引き受けた1993～94年時点では、DRB1*13アレルが13種類、DRB1*14アレルが17種類公認されていた。そこでまず、コントロール DNA としてこれら30種類の DNA サンプルの提供を依頼した。結果的に121の DNA サンプルが提供され、その中に DRB1*1301～*1307, 1310, 1311, 1312, DRB1*1401～*1408, 1410, 1411, 1412, 1417のサンプルが含まれていた。これらのサンプルを参加ラボに配付し、それぞれのラボの方法によってなかばブラインドでタイピングしてもらった。方法は、大きく分けて3種類で、1) ワークショップまたはローカルプローブによる SSO 法、2) RFLP 法、3) Low resolution SSO 法によりグループタイピングを行い、その後 SSCP 法によりアレルを確定する方法である。これらの方法による成績は、RFLP 法で一部多型部位に対して適当な制限酵素がなく、アレルを確定できなかったことを除いて概ね各方法の成績は一致していた。また、DRB1*1301の稀なハプロタイプとして提出されたサンプル (ROO 019) が、DRB1*1301のコードン26番 (TTC) が DRB1*03011と同じ TAC に置換された新しいアレルであることが判明した。これは直ちに DRB1*1327と命名された。こうしてワークショップ中に、残念ながらワークショップとは無関係に、DRB1*13だけでも新しく9個のアレルが追加され、DRB1*14は、*1425まで8個の新しいアレルが加えられた。ワークショップは、サンプル交換、確認検査など時間、労力ともにかかりすぎ、現在のスタディーのスピードについてゆけなく、今後のワークショップの意義、方法などが課題として残された。また、幾つかの稀なハプロタイプが確認されたが、そ

の人種でのポピュレーションデータがなく、どの程度稀な頻度であるか結論が出なかった。

もう一方のワークショップの柱である血清学は、72種類の抗血清、モノクローナル抗体が提出され、約600の DRB1既知のパネル細胞に当てられた。しかし、ワークショップデータ解析チームに解析ソフトがなく、我々は仕方なく日赤中央血液センターの赤座先生にお願いして解析プログラムを拝借し、パネル細胞の DRB1アレルを DR 抗原と読み替えて、抗血清の反応特異性をアレルベースで解析した。その結果、これまで公認された DR1403, DR1404の他に、DR13関連では DRB1*1301/02, DRB1*1303, DRB1*1305が新たに血清学的に区別され、また DR14関係では DRB1*1401/07, DRB1*1405, DRB1*1402/06 (= HR5) と3つの特異性が同定された。このように血清学的に同定されたアレルグループは将来臓器移植などでのマッチングにおいて利用されることが予想される。即ち、将来的には HLA 抗原は DNA タイピングが主流になり、より正確に (細かく) 分類されることになるであろうが、完全一致のドナー/レシピエントを見出すことは困難になり、次善のマッチングとしてこのアレルグループを利用せざるを得なくなるであろう。そのためには、関係者間で使用するプローブを統一し、アレルグループを標準化などして、より適切なレシピエント選択基準を作成する必要がある。

5. Allele and Haplotype Society #16 (DR7, DR9, DR53)

東海大学医学部, 分子生命科学 猪子 英俊

AHS (Allele and Haplotypes Society) #16はDR7, DR9, DR53抗原についての解析を担当した。これらの抗原を構成する機能遺伝子はDRB1とDRB4の2種で、現在までにDRB1遺伝子はDRB1*0701, DRB1*09011, DRB1*09012, DRB4遺伝子はDRB4*0101, DRB4*0102, DRB4*0103の6種の対立遺伝子が公認されている。今回筆者がChairmanを務め、以下の4項目を中心とする解析を行った。

1) DR7, DR9, DR53抗原の標準抗血清の同定とDRB4遺伝子を認識する抗血清の検出

AHS16にはアロ血清16種とモノクローナル抗血清22種が提出され、標準血清として10種の血清が決定された。また、DRB4対立遺伝子を認識する抗血清は今回は検出されなかった。

2) DRB4遺伝子のDNAタイピング法 (PCR-RFLP) の開発

DRB4遺伝子には3種の対立遺伝子が公認されているが、これらを明確に識別するDNAタイピング法の開発を目的として、PCR-RFLP法の確立を行った。DRB4遺伝子の第2エキソン, 第3エキソンをそれぞれ特異的に増幅するプライマーを作製し、PCRにより増幅後、増幅産物が第2エキソンは制限酵素 Bsp1286I, 第3エキソンは EaeI で切断されるか否かにより DRB1*0101~0103の3種を識別することが可能であった。

3) DNAタイピング法と直接塩基配列決定法による、既知DRB1, DRB4パネル細胞のタイピングと

希なハプロタイプの同定

既知DRB4対立遺伝子のHLAホモ接合体細胞9例のDNAを用いて、PCR-RFLP法によるDRB4遺伝子のタイピングを行ったところ、4例は結果が一致したが、3例のDRB4*0101と2例のDRB4*0101102N (null cell) の計5例は、DRB4*0103とタイピングされた。そこでPCR産物の直接塩基配列決定法により塩基配列を確認したところ、DRB4*0101の3例, DRB4*0101102Nの2例ともにDRB4*0103であった(したがって、DRB4*0101102NはDRB4*0103102Nと名称を変更すべきである)。DRB4*0101とDRB4*0103は第3エキソンに多型性が存在するため、以前の方法ではDRB4*0101と誤判定されたと考えられた。さらに今回の塩基配列解析により、DRB1*09011はDRB1*09012に変更すべきことも明かとなった。また、この2法とPCR-SSO法を用いて希なハプロタイプを示す細胞について、解析を行ったところ、DRB1*0701-DQB1*0301, DRB1*0701-DQB1*0302, DRB1*09012-DQB1*0201の3種の希なハプロタイプの存在が確認された。

4) DRB4-DRB1遺伝子間の連鎖不平衡の解析

日本人と白人についてDRB4-DRB1遺伝子間の連鎖不平衡の解析を行ったところ、下表に示すように、DRB4遺伝子の連鎖に人種差が存在すること、また、DRB1 alleleが同一でも必ずしも同一のDRB4 alleleが連鎖しないことが明らかとなった。

HLA-B	DRB1*	DRB4*	HF	n	Ethnic
	0401	0102	0.022	4	Japanese
		0101	0.069	2	Caucasian
		0103	0.034	1	Caucasian
44	0701	0101	0.014	3	Japanese, Caucasian
13	0701	0103	0.010	2	Japanese, Caucasian
61	09012	0103	0.178	33	Japanese
60	09012	0101	0.005	1	Japanese
		0103	0.043	8	Japanese

6. Allele and Haplotype Society #18 (DPA/DPB)

国立循環器病センター研究所 佐田 正晴

AHS #18(DPA/DPB)は、1. New DPA/DPB allele の同定, 2. 最適な DPA/DPB genotyping 法の検討, 3. 同種抗血清および monoclonal 抗体による epitope typing の可能性と特異性の検討, を目的にデータの集積を行い, 6月4日約100名の参加のもとデータ解析と討論が活発に行われた。AHS #18の参加施設は日本からの4施設を含む28施設で531細胞が解析対象となった。

1) DPB1遺伝子解析

DPB1遺伝子の解析はPCR-SSO, PCR-LiPA (INNO-LiPA HLA-DP), PCR-RFLP, PCR-SBT法が採用された。PCR-SBT法はDPB1 reference cellの決定と新しいDPB1 alleleを同定する目的で490細胞のsequencingが施行された。今回の解析から13 allele (DPB1*2101, 2201, 2301, 2801, 3001, 3101, 3201, 3501, 3801, 3901, 4101, 4401, 450)のsequenceが確認され, 8種のnew alleleの存在が示唆された。DPB1*01011のcodon 8, 9が異なるDPB1*6501がnew alleleと確認された。Allele discrepancyは2細胞(0.4%)に認められた。PCR-SSO法は20施設から提出された374細胞を対象に検討され, 40細胞(11%)でallele discrepancyを認めた。New alleleの検討ではDPB1*0801のcodon 69のsequenceが異なるDPB1*6801が認定された。PCR-LiPA (INNO-LiPA HLA-DP)法は23施設, 413細胞を用い解析が施行され, 30細胞(7.5%)にallele discrepancyが認められた。PCR-RFLP法は8施設が149細胞を用いalleleの解析を行った。28細胞(18%)にallele discrepancyが認められたが, 特定の施設にallele discrepancyが頻度が集中していたため原因として技術的問題や制限酵素の誤選択が挙げられた。

2) 同種抗血清および monoclonal 抗体を用いた epitope typing

抗体に含まれる DP 特異性と抗体が認識する DP 分子を解析する目的で同種抗血清と monoclonal 抗体を用いた解析を行った。Lymphocytotoxicity test および MAILA test を用い77種の同種抗血清中に含まれる DP 特異性の検討をなされた。26抗血清に DP 特異性を, 12抗血清に DP および class I 特異性を, また10抗血清に DP および DR, DQ 特異性を認めた。これら抗体が認識する DP 分子上の epitope は codon 55-57, codon 35-36 および codon 84-87であった。Flow cytometry を用いた30種の monoclonal 抗体の解析から, 25種に DP 特異性を認めこれら抗体が認識する epitope は codon 55-57, codon 35-36 および codon 84-87であった。

3) DPA 遺伝子解析

DPA1-DPB1 linkage disequilibrium を検討する目的で PCR-SSO, PCR-SSP (DYNAL DPA-SSP), PCR-RFLP 法を用い367細胞の解析を行った。DPA1 allele と100%相関を示した DPB1 allele は, DPA1*0103-DPB1*0301, DPB1*0601, DPB1*2001, DPB1*2301, DPA1*0201-DPB1*0901, DPB1*1001, DPB1*1101, DPB1*1701, DPB1*2601, DPA1*0104-DPB1*1501, DPA1*0202-DPB1*1901, DPB1*3801, および DPA1*0401-DPB1*2801であった。AHS #18として以下の同意を認めた。1. INNO-LiPA法を最適な DPB1 genotyping 法と認める。採択理由として discrepancy 頻度が低く操作が簡単で時間が短いことが挙げられた。2. PCR-SBT法は新しい allele の決定には有効であるが routine typing には不適。3. 新しい DPB1 allele として DPB1*6501, 6801, および5901が承認された。4. 同種抗血清が認識する DP 分子上の epitope は主に codon 55-57, またモノクローナル抗体が認識する epitope は codon 55-57, codon 84-87であった。5. DPA1と相関する DPB1 allele の集計を行った。

7. Anthropology 部門

東京大学医学系研究科, 人類遺伝学教室 徳永 勝士

第12回国際組織適合性ワークショップにおける Anthropology 部門は Dr. J. Bodmer らが全体の Chairperson となり, さらに世界を12の地域に分けて各地域の Chairperson が1名から3名ずつ指名された。当初は200を優に越える集団の調査が予定され, またクラスIIだけでなく, クラスIについてもDNAタイピングを行う計画であった。しかしながら, サンマロにおいてデータがすでにデータベースにおさまっていた集団は数少なかったうえ, クラスIのDNAタイピングは総じて血清学レベルの精度でしか行なわれず, A2グループについてのみ塩基配列レベルのアリールタイピングが行なわれた。従って最終的な Proceedings にどのような質・量のデータと解析結果が掲載されるのか, 現時点では予想がつかない。ここではサンマロで配られた資料のなかから興味深い点をひろって紹介する。

まずDNAタイピング法については, クラスIではワークショップの標準法であったPCR-ARMS法が多く, 一部のラボがPCR-SSO法を用いた。クラスIIでもワークショップ標準法であったPCR-SSO法が多く用いられ, その他にPCR-SSP法, PCR-RFLP法, あるいはPCR-MPH法も用いられていた。

先に触れたように, 今回のワークショップでは従来あまり報告のなかった集団が多く含まれている。特に目新しいのは, アフリカ中央部から南部にかけて, マンデンカ, ズルー, ソトなどの民族や, セネガル, カメルーン, ザイール, エチオピア, ウガンダなどの国でも調査されたというリストが示され, アフリカにおけるHLAの多様性について初めてまとまったデータが得られるものと想像されるが, ワorkshop期間中にはデータはほとんど示されず Proceedings の出版を期待したい。一方, 中近東から北アフリカにかけては, イラク, リビア, モロッコ, アシュケナージの4つのユダヤ集団についてクラスI血清学, クラスII DNA が解析され, またレ

バノン, エジプト, アルジェリア, チュニジアの集団でクラスII DNA タイピングが行われ, 主成分分析による近縁性の解析結果も披露されていた。なかでも, 最もきめ細かなデータが提示されていたのは東アジア地域 (Chairpersons: T. Juji, L. Fan, P. Chiewsilp) で, クラスI血清学, クラスII DNA, ハプロタイプ, A2アリールの解析結果が, モンゴル人, 中国の満族, 漢族, 朝鮮族, ウイグル族, カザク族, ダイ族, 韓国人, 日本人, タイの中国人, イスラム教徒, 東北部タイ人について発表された。

クラスIのアリール分布データはA2グループでのみ得られたのであるが, 興味深い結果であった。まず全ての集団にA*0201がよくみられた。北部ヨーロッパではこれ以外にはまれなアリールしかないのに対して, サルジニアではA*0205も多く, 東アジアの諸集団ではA*0203, A*0205, A*0206, A*0207といったアリールもそれぞれかなりの頻度で見られ, インド人ではA*0211も高頻度で存在してうることがわかった。このような血清学では知りえなかった集団差のデータは, 人類学だけでなく, 今後の疾患関連研究, 移植のためのマッチングにおいても必須の情報となろう。

8. HLA-G/E 部門

東京大学医学系研究科, 人類遺伝学教室 徳永 勝士

第12回国際組織適合性ワークショップにおける HLA-G/E 部門はスペインの Dr. Arnaiz-Vilena を Chairperson とし, 世界の14ラボが参加して行なわれた。日本からは神奈川赤十字血液センターの中島ラボおよび日赤中央血液センターの十字ラボが参加してデータを提出した。なおこの部門は当初のプランでは new genes をテーマに掲げ, TAP や LMP の多型も解析する予定であったが, 実際には HLA-G と E の多型解析のみが行なわれた。具体的な目的は以下の4点である。1) HLA-G と E 遺伝子の多型を明らかにする。2) 各対立遺伝子の頻度を求め, その集団差を明らかにする。3) HLA-G/E 対立遺伝子と HLA-A, B, C 対立遺伝子との関連分析を行う。4) 新しい対立遺伝子が見出された場合にはその塩基配列を決定する。標準法として, HLA-G には PCR-RFLP 法, E には PCR-SSO 法が採用されたが, 十字ラボでは最近報告した新しい HLA-G 対立遺伝子 (G*0104) の検出のため, PCR-SSCP 法を用いた。調べられた主な集団には, ヨーロッパでスペイン人, イタリア人, ハンガリー人, デンマーク人, アジアではタイ在住中国人, 中国人, 日本人, インド人, そしてアフリカ系の一集団が含まれていた。

HLA-G の多型については, 上記の G*0104 が実はヨーロッパ系集団にもアジア系集団にも高頻度で存在すること (13-54%) を徳永が発表した。すなわち, この対立遺伝子は G*01012 と区別されないで見落とされていたものと考えられた。この他には, コードするアミノ酸配列が共通な G*01011, G*01012, G*01013 のみがいずれの集団においても観察された。また, 他のクラス I との関連分析の結果, HLA-A2 と G*01011, A11 と G*01013, A24 と G*0104 の有意な関連がほとんどの集団に共通して観察された。このことは, A 座と G 座が 6 番染色体上で近接することと対応する。

HLA-E に関しては, E*0101-0104 が主な集団

すべてに観察され, この他にも新しい対立遺伝子の可能性がいくつか観察されたが, まだ塩基配列の決定には至ってなかった。HLA-E の場合, 各対立遺伝子の頻度が集団差を越えて比較的類似することも新しい知見として興味深い。他のクラス I との関連分析では B 座抗原との間に弱い関連が見出された。

このほか, ワークショップ活動の成果ではないがふたつの発表があった。ひとつは習慣性流産と HLA-G/E の多型との間には有意な関連が認められなかったというデンマークからの報告である。ただし, 彼らは G*0104 の判別はしていなかった。もうひとつは Dausset のグループからで, SSCP 法を用いてフランス人家系試料から 7 種の対立遺伝子を見出していたが, それぞれの対立遺伝子間の違いはやはり同義置換である場合が多かった。

9. TCR and HLA 部門

北里大学医療衛生学部, 臨床免疫学 小幡 文弥

【目的】

胸腺における T 細胞の正/負の選択は, TCR と HLA (+ペプチド) との間の親和性によって決定される. したがって同一 HLA 型を持つ個体同士は, 互いに類似した TCR レパートリーを持つことが期待される. このワークショップではそれを実証するため, 家族内同胞について TCRV 頻度を flow cytometry で測定し, HLA double haplo-identical 同胞間とそれ以外の同胞間における TCR の類似性を比較した. またあわせて, 人種間における TCR レパートリーに差異が検出されるか否かも検討した. Cornell 大学の J. Silver が Chairman を務め, 合計 4 つのラボが参加した.

【方法】

1) 家族内同胞の HLA-A, -B, -DR タイピングを行い, HLA ハプロタイプを同定した. 2) FITC 標識した 15 種の抗 V β 抗体 (BV2, BV3, BV5(a)BV5(c), BV6, BV8, BV12, BV13, BV14, BV16, BV17, BV20, BV22) および 2 種の抗 V α 抗体 (AV2, AV12), PE-Cy5 標識した抗 CD4 抗体または抗 CD8 抗体, PE 標識した抗 CD45RO 抗体による three color-flow cytometry を PBL について行った. 3) 各 V segment につき家族内同胞間で pairwise comparison を行い, その差の合計を 2 者間における Δ value として算出した.

【結果】

1) HLA と TCR: ワークショップ全体としては総数 20 家族について解析を行い, この中には 18 組の HLA double haplo-identical な pairs が含まれていた. 各家族内において TCRV 頻度の pairwise comparison を行い, Δ value を算出した. それらのデータをすべてまとめ, HLA identical 群と non-identical 群との間で比較した結果, HLA

identical 群における Δ value は non-identical 群におけるそれよりも有意に小さいことがわかった. すなわち, HLA を共有する同胞は TCR も類似していることを示しており, HLA が TCR レパートリーに影響を及ぼすことが実証された. CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞それぞれにおける解析, あるいは CD45RO 陽性/陰性それぞれにおける解析では, 統計的に有意な知見は検出されなかったが, n 数を大きくして再検証する必要もある.

2) 人種間の比較: 各参加ラボはそれぞれ異なる人種についての解析を行った. HLA identical/non-identical に関わりなく, 得られたデータすべてを CD4 陽性細胞/CD8 陽性細胞ごとにまとめ, 各 TCRV 頻度を人種間で比較した. その結果, CD4 陽性細胞, CD8 陽性細胞とも, 日本人では BV6 および BV20 が他の人種に比較し, 頻度が低いことがわかった. この解釈としては, (1) 日本人に特徴的な HLA 型 (例えば DRB1*0405, DRB1*0901 など) によって TCR selection に偏りが生じた, あるいは, (2) TCR 自身の allele 頻度の差異を検出している, の 2 通りが考えられるが, 後者の可能性が高い. すなわち, BV6 にはワークショップで用いた抗体と反応する allele とそうでない allele が, また BV20 には発現型と非発現型の alleles が存在することが知られており, 上の結果は, それらの allele 頻度の人種間における差異を示していると考えられる.

10. HLA and Disease 部門

鹿児島大学医学部, ウイルス学 園田 俊郎, 屋敷 伸治, 桑山 昌洋

HLA and Diseases Component では, 9 つの疾患 (Juvenile chronic arthritis: JCA, Autoimmune hepatitis, Graves disease, Narcolepsy, Insulin - dependent diabetes mellitus: IDDM, Allergic disorders, Rheumatic fever, HIV disease, HTLV - I associated diseases) について HLA との関連性が検討された. 自己免疫疾患である Autoimmune hepatitis (primary biliary cirrhosis) は, これまでに白人の患者から HLA-B8, DR3, DRB1*0801が報告されていたが, 今回, アルゼンチン, ブラジル, メキシコの Mestizo の患者で DRB1*1301-DQB1*0603ハプロタイプと強い相関が報告された. Graves 病では A1-B8-DRB1*03の増加と A2, DRB1*07の減少が報告された. Narcolepsy 病ではこれまでに DRB1*1501よりも DQA1*0102, DQB1*0602がより相関している可能性が示されていたが, DRB1*1501 and/or DQB1*0602 (negative) の黒人症例の解析から DQB1*0602が Narcolepsy の病態に関連する HLA であることが証明された. IDDM では2390人の患者と2115人の健常人を対照に3つの目的: (1) 感受性および抵抗性における HLA-DR4サブタイプの影響 (2) DQ2, DQ8陰性患者の HLA 関連性 (3) 自己抗体と HLA との相関について解析された. その結果, DRB1*0405, 0402, 0401が感受性, DRB1*0406, 0403, 0404が抵抗性であった. このことは, IDDM 感受性と抵抗性が DQB の異なる対立遺伝子 (57番目のアミノ酸) によって規定されているとする説から, DRB1と DQB1の対立遺伝子がそれぞれ関与しているとする説が有力となった. DQ2, DQ8陰性患者 (DQ4, DQ9) の感受性因子については, 同じハプロタイプ上のいくつかの遺伝子によって置き換わっている可能性が論じられた. また, IDDM 患者の種々の自己抗体と HLA 遺伝子との相関からみて, IDDM の発症は異なった自己抗原を認識する HLA 遺伝子とその免疫応答によって規定されている可能

性が考えられた.

HIV-1感染によって引き起こされるエイズについては, 前回の WS で HLA-B35がエイズ発症のリスク因子との報告がなされている. 今回, USA の363人 (白人) について, 臨床症状と HLA との関連性が解析された. 免疫不全の進行に対し HLA-A32, B27, DRB1*13, DQA1*0103, DQB1*0603は抵抗性であったが, A24, B35, B39, Cw4, DRB1*03, DQB1*0201は促進的であった. A30はエイズ発症のリスクを高め, B8, DRB*03は低リスクであった.

我々が組織した HTLV-I 関連疾患の Component では, 9 つの研究室が参加し973検体について, ARMS, PCR-RFLP, TMA-HPA による DNA タイピングを行った. 1 つのウイルスによって引き起こされる異なる2つの疾患 ATL, HAM/TSP の発症に拘わる HLA 遺伝子の役割が解析された. 日本人の ATL では HLA-A26, B61, DRB1*0901が有意に増加し, HAM/TSP では B7, DRB1*0101が有意に増加していた. カリブ海諸国の黒人 ATL では HLA-DRB1*1101の増加と HAM/TSP では A3が有意に増加していた. さらに, HTLV-I 合成ペプチドを作成し T 細胞が認識する HTLV-I エピトープの同定をおこなったところ, ATL 発症に重要な役割をもつとされる HTLV-I の転写因子である pX 蛋白の抗原エピトープ認識において HLA-A26と B61の認識エピトープが欠如していること, 一方, HAM の HLA-DRB1*0101, 1502, 0803が認識する HTLV-I gp21エピトープは多数存在していた. これらの結果から, ATL と HAM/TSP はそれぞれの HLA クラス I とクラス II 分子が認識する HTLV-I 抗原のエピトープ数によって発症が振り分けられている可能性が示唆された.

今回のワークショップでは, JCA, Allergic disorders, Rheumatic fever の解析は十分ではなかった.

11. Sequencing Based Typing 部門

東海大学医学部, 分子生命科学 成瀬 妙子

Sequencing Based Typing (SBT) は今回より新たに加わったコンポーネントで、オランダの M. G.J. Tilanus が Chairman を務めた。SBT の原理は、PCR で増幅後の DNA を、プライマーと DNA ポリメラーゼを用いてシーケンス反応を行い、ゲル泳動により得られる塩基配列の情報をもとに対立遺伝子型を判定するもので、塩基配列より直接に対立遺伝子が同定できるという利点がある。1994年に初めてテクニカルセミナーが開催され、その後幾度かの改良が加えられたが、今回は以下の3点を中心に各参加施設での検討が行われた。

1) SBT 法の開発と技術の習得

方法としてはマニュアルか自動シーケンサーを用いるかに大別されるが、操作、解析の労力が繁雑であることから、ほとんどの施設が自動シーケンサーを用いた。現在 SBT で使用されている機器は 373A, 377 (ABD), ALF, ALFexpress (Pharmacia), Vista725 (Amersham) の5種で、各機器専用のソフトウェアを用いて対立遺伝子を同定する。現在のところ、373A, 377を用いた場合に、4塩基のピークが最も良好であるという見解が得られているが、比較時の条件が一定ではなく、今後同一条件下での評価を行う必要がある。また、シーケンシングの精度にはテンプレートの純度が影響することから、磁気ビーズなどによる精製が必要である。シーケンス反応に用いる方法は dye primer 法が、DNA ポリメラーゼについては Taq FS が最も評価が高かった。

2) 各遺伝子領域別のプロトコールの確立

現在クラスII領域では DR, DQ, DP 遺伝子が解析可能であるが、DQA1, DQB1, DPA1については開発されて間もないことから、データを検討するまでには至らず、紹介程度に留まった。DRについては現在 DRB1, B3, B4, B5について解析が可能

である。DRB1はグループ特異的増幅を行うため、あらかじめ血清学か他の DNA タイピング法での情報が必要である。DPB1は最初に SBT が検討された遺伝子領域でもあり、最も検討が進んでいる。しかし、65種の対立遺伝子についてヘテロの組み合わせを解析した場合、理論上、147の識別困難な組合せが存在することから、これらの明確な識別法を確立する必要がある。グループ特異的増幅や制限酵素の利用などが考えられた。クラスI領域では A, B, C 遺伝子について複数の施設で開発が行われた。PCR 法は nested PCR, 抗原特異的、グループ特異的増幅、鋳型として DNA を用いる方法と RNA を用いる方法など様々であった。これらのうち A 遺伝子についてはほぼ可能であるが、B, C 遺伝子では一部の方法では困難な場合もあり、各領域に応じて方法を選択する必要がある。いずれにしてもクラスI抗原についてはいまだ実用には至っていないが、本法は少量の全血より、比較的短時間で判定可能なことから、骨髄移植のドナータイピングへの応用を念頭に置いた、早急な確立が期待される。

3) 他法との比較、検討

DRB, DPB1遺伝子での解析を中心に、PCR-SS, PCR-SSOP, PCR-RFLP, INNO-LiPA 法での判定結果と比較が行われた結果、(1) SBT 法の結果は他法でのタイピング結果とよく一致していた。(2) DRB1, DQA1遺伝子ではグループ特異的増幅が必要。(3) DQA1, DQB1, クラスI 遺伝子では両鎖の解析が必要だが、DRB1~B5, DPA1, DPB1では片鎖のみでもよい。(4) クラスI, DQA1, DQB1遺伝子については検討数が少なく、明確な結果を出すにはさらなる検討が必要との結論に達した。

12. Soluble HLA 部門

東海大学医学部, 移植免疫学 萩原 政夫

はじめに; 過去, 2回 (1992年, 1993年) の International soluble HLA Workshop が行われ, 今回12th IHWS に併せて第3回目のWSが予定された。これまでの内容 (第一回; sHLA ELISA 法標準化, 第二回; sHLA を用いたアロタイプング法) に引き続き, 今回は sHLA-class II 検出法や sHLA の臨床的意義等のテーマが候補として挙げられていたが, 主催者側の怠慢かあるいは参加施設の少ないことが原因か, 企画倒れに終わってしまった。従って, 今回サンマロでの分科会は存在しなかった訳であるが, Conference での sHLA 関連の報告について, 内容をまとめて紹介することとする。

参加発表施設; 全体で, 9施設で, その内訳は, 4 oral, 5 poster presentation であった。内容は以下の如く大別した。

- 1) Immunological monitoring としての sHLA の臨床的意義
- 2) sHLA 又は HLA 関連ペプチド分子による免疫抑制機能

1)-1. sHLA-I heavy chain は, 3種類の分子サイズ (45, 39, 35KD) を有するが, Western blotting による移植前後の3分子の変化について, 2施設 (Grosse-Wilde, 辻) から報告された。前者は, 肝移植において, 急性拒絶反応時に35KD form が有意に増加し, その理由としては, proteolysis が亢進することとしていたのに対し, 後者は, 移植前のドナー, レシピエントのバンドパターンが異なる場合の検討で, 移植後明らかにしかも長期に渡って, ドナーサイド由来の sHLA が分泌され続けると報告した。腎移植においては, 免疫抑制療法のプロトコールにより, 血清 sHLA 量の変動パターンが異なり, 特に sHLA 上昇群では, 急性拒絶反応の発症率が有意に低いことが報告された (Ferraris ら)。膀胱腫瘍においては, 血清でなく

尿中の sHLA が高値となり, 癌細胞の turn over による sHLA 産生機序が考えられた (Ferrone)。

2)-1. sHLA は既に, CTL, NK 活性の抑制効果や allo 抗体産生の抑制作用が報告されているが, Francesco らは PHA-activated CD8+T 細胞に sHLA を添加したところ, apoptosis が誘導されることを報告した。又, Scheck らは, H-2Kb/IgG dimeric form を作製し, mouse allo skin graft への効果の検討を行ったところ, donor specific に免疫抑制効果があることを報告した。

2)-2. HLA 分子のアミノ酸配列の中で, TCR との結合に関与する部分を選択, 10ヶ前後のペプチドとして合成し, その免疫抑制効果についての検討も報告された。Giral らは, HLA-B7又は B2702の74-85番アミノ酸ペプチドが, ① mouse, rat model において NK 活性, CTL 活性を抑制し, ② human allo 腎移植においても, NK 活性を抑制することを見いだした。一方で, helper T 機能には影響せず, 又ペプチドに対する抗体産生他の副作用も認めなかった。Carpenter らは, class II (DR, DQ) ペプチドの効果を検討したところ, DQ α が特に human, rat での MLR 活性を抑制し, CTL 生成を抑制すること, この時 IFN γ や IL-2 の mRNA 発現が明らかに低下していることを確かめた。又 PHA, OKT3抗体への反応性には影響なく, さらに, 他の accessory molecule である CTLA4 との相乗効果を認めた。

以上より, sHLA は単なる immunological marker として有用であるのみならず, それ自体免疫抑制効果を有し, 特に TCR との interaction に関与する部分のペプチドは種の違いを越えた免疫抑制活性を有することが判った。