

# 〔最新情報：“玉手箱”〕 直接塩基配列決定法 (SBT) によるクラス I 遺伝子タイピング

石川 善英

日本赤十字社中央血液センター，研究部

## 1. はじめに

HLA の DNA タイピングはクラス I もクラス II も原理は同じである。しかし多型領域がクラス II では 1 つのエクソンに局在しているのに対し、クラス I では 2 つのエクソンにまたがっている。このためクラス I のタイピングは方法によってはクラス II の 2 倍の手間がかかる。一方でクラス I の血清学的タイピングはクラス II に比べて容易であるため、現在でもクラス I のタイピングは血清学に大きく依存している。しかしクラス I のタイピングはアレルの決定を迫られている。非血縁者間骨髄移植の retrospective study の結果、移植を成功させるためにはクラス I をアレルレベルで適合させる必要があることが明らかとなった(1)からである。現在日本における骨髄移植を目的としたクラス I のタイピングは日本人のアレル頻度を基に、血清学と DNA タイピングを組み合わせて行われている。しかし頻度の低いアレルや外人の検体ではタイピングが困難であり、すべてのアレルを対象としたアレルタイピング法が求められている。

## 2. クラス I のアレルタイピング

クラス I の DNA タイピング法として PCR-SSP (2)法、-RFLP (3, 4)、-SSOP (5, 6)などが報告されており、これらの一部あるいは全部を使ったタイピングが行われている。SSP 法や RFLP 法は手軽な方法ではある。しかしこれらの方法は必要なプライマーの種類、DNA 量あるいは入手可能な制限酵素の種類などからアレルの決定には限界がある。1994 年に 64 プローブで HLA-C のすべてのアレルを決

定できる SSOP 法が報告されている(5)。また 1996 年に報告された SSOP 法(6)では HLA-A アレルのほとんどを 91 プローブで決めることができた。しかしこれらの方法も現在ではすべてのアレルを決定できるわけではない。1998 年 5 月の段階で A-ローカスは 98、B-ローカスが 213、C-ローカスが 53 アレル報告されている。1996 年当時と比べ A、C アレルは 10 種類以上、B アレルは約 20 種類増えており、今後も増加することは明らかである。

本総説のテーマである SBT 法は数種類のプライマーですべてのアレルを決定でき、アレル数が増えても方法の変更なしに対応できる。しかしこれは方法の原理からの議論であり、原理的には可能だが実際はかなり困難だというのはよくある話である。SBT 法、特にクラス I の SBT 法もそのような例の一つであった。

## 3. クラス I の SBT

シークエンスによるアレル決定法にはクローニングやグループ特異的 PCR 増幅などでアレルを分けてからシークエンスする方法や、他の DNA タイピング法と組み合わせた方法もある。そのような方法が有用な場合もあるが、本総説では SBT 法をヘテロのサンプルを直接シークエンスすることによりアレルを決める方法と定義して話を進める。

### 3-1. mRNA からの SBT

クラス I の多型領域が 2 つあるいは 3 つのエクソンに分かれていることがクラス I の SBT 法の大きな障害であった。エクソン 2 から 4 までを genomic

DNA から増幅すると、約 270 bp のエクソンの間に 300 bp あるいは 600 bp のイントロンが入ってしまう。一度のシークエンスで決められる配列の長さは最大でも 700 bp 程度であり、結局 genomic DNA からではエクソン毎にシークエンスを決めることになる。またエクソン毎のシークエンスが分かっても、エクソン間のつながりの確認が困難である。そのため最初に報告されたクラス I-A, B, C の SBT 法は mRNA を用いた方法であった(7)。この方法では <sup>32</sup>P 標識プライマーとオートラジオグラフィーで配列を決めているが、mRNA から自動シークエンサーを使った SBT 法も報告されている(8)。mRNA であればエクソン 2 から 4 まで合わせて 800 bp 程度であり、片側 2 回のシークエンス反応で配列を決定できる (図 1)。しかし mRNA は調製や取扱いが面倒である。

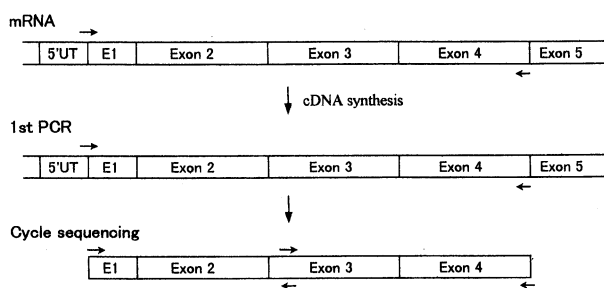


図 1. mRNA からの直接塩基配列決定法

### 3-2. genomic DNA からの SBT

genomic DNA を用いたクラス I の SBT が可能となった 1 つの大きな要因はシークエンスデータからアリルを決定するコンピューターソフトウェアが開発されたことである。各エクソン毎のシークエンスはシークエンス反応が煩雑であるだけでなく、2 つあるいは 3 つのエクソンにあるヘテロの塩基のすべての組み合わせから 2 つのアリルを決定する作業が必要である。この作業はとてもコンピューターなしには考えられない。アリル決定用のソフトウェアでは各エクソン毎別々に得られるシークエンスデータを 1 本につなげ、シークエンスデータベースと対比しながら、可能性の高いアリルの組み合わせをリストアップしてくれる。このソフトウェアとヘテロの配列を確実に検出できるシークエンス化学がそろえばク

ラス I の SBT が可能となる。

自動シークエンサーを用いたシークエンス方法としてはプライマーを蛍光標識した dye-primer 法と DNA 伸長反応のターミネーターであるダイデオキシヌクレオチドを蛍光ラベルした dye-terminator 法がある。dye-primer 法の方がより長くきれいにシークエンスを読むことができるが、各塩基に対応したシークエンス反応液を別々に調製するため、一方方向のシークエンスに 4 本の反応液を調製する必要がある (図 2)。dye-terminator では一方方向一本の反応液の調製ですむが、dye-primer 法と比べ、シークエンスデータは乱れやすい。

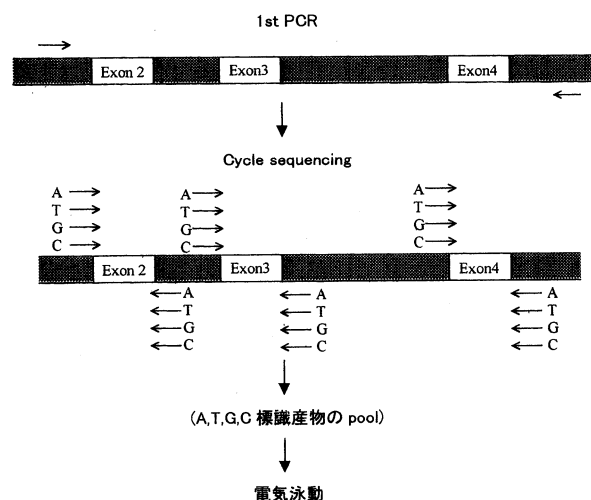


図 2. dye-primer 法によるクラス I の SBT

#### 3-2-1. Dye-primer 法

クラス II の SBT 法と同様、genomic DNA と自動シークエンサー、タイピングソフトウェアを用いた dye-primer 法によるクラス I-A の SBT kit(9)が開発され、第 12 回 国際組織適合性ワークショップで評価された(10)。エクソン 2 から 4 を A-ローカス特異的に増幅し、これを鋳型としてエクソン 2 と 3 の両方向のシークエンスをとるために 16 本のサイクルシークエンシングを行う (図 2)。ABI 方式の自動シークエンサーではシークエンス反応後 4 塩基分を混ぜ 1 つのレーンで泳動する。アリルによってはさらにエクソン 4 も同様に解析する。シークエンスのシグナルピークの高さがきれいに揃っており、ヘテロの箇所ははっきりしたダブルピークになってい

た。しかしこの方法は反応液の調製が複雑であり、あまり普及しなかった。

### 3-2-2. Dye-terminator 法

HLA のタイピングに限らず自動シークエンサーで塩基配列を決める場合、調製が簡単であることから dye-terminator 法が一般的である。しかしヘテロのシークエンスを決めなければいけない HLA の SBT では dye-terminator 法を用いると、各塩基のピークの高さが不揃いであり、ヘテロの2つの塩基に対応する2つのピークも高さが揃わず、場合によってはシングルピークになってしまう。またピーク位置もずれる場合があり、ヘテロのシークエンスは不可能であった。最近になって Applied Biosystems 社より新しい蛍光色素を用いた dye-terminator 法によるシークエンスキットが発売された。このキットによるシークエンスではピークの高さが dye-primer 法ほどではないがほぼ揃っており、ヘテロの箇所では高さの揃ったダブルピークになる。このシークエンスキットに HLA-A ローカス特異的プライマーおよびシークエンス用プライマーをセットとした SBT kit が発売された。HLA-A SBT kit を使ったアリルタイピングの手順を図3に示した。まず genomic DNA から A ローカス特異的にエクソン1-4を増幅する。シークエンス反応に入る前に、増幅に使ったプライマーを除く。dye-primer 法と異なり、dye-terminator 法ではこの操作を怠ると、シークエンス用プライマー以外に増幅用プライマーもシークエン

ス用プライマーとして働いてしまうため、バックグラウンドシグナルが強くなってしまう。精製した PCR 産物を鋳型とし、各エクソン両方向に設定されたシークエンス用プライマーでシークエンス反応を行う。つまり6本のサイクルシークエンシングでエクソン2, 3, 4の両方向のシークエンスをとることができる。シークエンス反応は96穴のPCRプレートでサンプルDNAとシークエンス用プライマーのマトリックスを作れば反応液調製の間違いを防ぐことができる。シークエンサーにかける前に未反応の蛍光色素を除く必要があるが、96穴プレートのままエタノール沈殿を行うことができる。

アリルの判定はアリルの塩基配列のデータベースと専用の判定ソフトウェアで行う。図4にはその一例を示した。このサンプルは HLA Nomenclature にまだ登録されていない新しいアリルを含んでおり、もちろんソフトウェア内蔵の配列データベースにもその情報は入っていない。判定結果として HLA-A の配列で多型のある箇所の塩基情報が得られる。ヘテロの配列はその組み合わせにより K や M で標記される。またこれまで知られているアリルでは変異のなかった箇所つまりすべてのアリルで共通の配列領域に変異があった場合は特別に Warning report としてその変異が表示される。このサンプルのシークエンスは A\*0201 / A\*1103 のヘテロのシークエン스에最も近いという結果である。しかしこのサンプルが A\*0201 / A\*1103 のヘテロだとすると共通領域142番目の変異も含めて4箇所が異なっており、つまりデータベースに含まれていないアリルを含んでいることが分かる。すべての HLA タイピング法に言えることだが、SBT でもすべてのアリルの組み合わせが決定できるわけではない。HLA-A ローカスのアリルの組み合わせのうち SBT で確定できない組み合わせが67種類のアリルを基に調べられている(9)(表1)。どれも片側に希なアリルを含んでおり、どちらが正しいか推定できるが、確定するためにはシークエンスの前にアリルを分ける(10)か、変異が1本のDNA上なのか異なるDNA上なのか判定できるタイピング法を併用する必要がある。

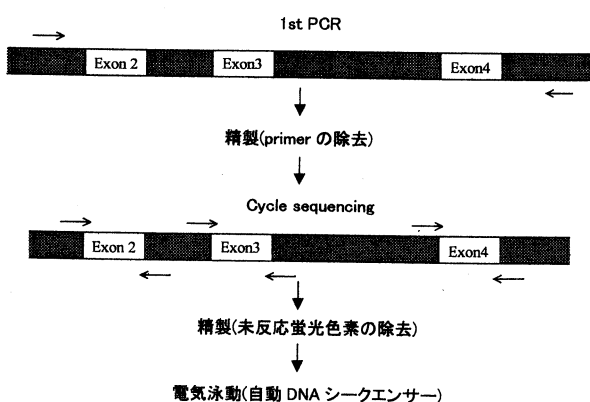


図3. dye-terminator 法によるクラスIの SBT

Sample: 6898 234 Library: A234.L73  
 Allele Report: Exact match to: None. See Warnings Below.  
 Files : 6898 234

Warning #5: Only one sequence orientation is present.

Warning #6: There are unexpected base calls at these 1 constant positions:

1	nucleotide
4	number
2	
G	A234.L73 consensus
K	> Sample

#### Polymorphic Position Report

111111	1111222222	63	4444444444	4455555555	5555555566	6666666666	7778888888	88	nucleotide
7899002222	467800133	499	0111111245	8900122223	3455677822	3344556779	4680001234	67	number
8178261367	436003989	517	2123468383	9726714678	9559001329	0329126281	2296789953	80	
TCTWMGCCGG	MAGCAGG	AGYKT	CCCRSAKCCM	AYARGCAGGY	WCGMSGTTGA	RRTSYRRCGA	CCACGGGCC	YG	<> Sample consensus
Y.....				R. W. ....					A-0201/A-1103

図 4. HLA-A SBT kit およびタイピングソフトウェアによる new allele の解析結果

表 1. SBT 法で区別できない  
 HLA-A アリルの組み合わせ<sup>9)</sup>

A*0201 / 0205 = A*0202 / 0206
A*0201 / 2402 = A*0212 / 2413
A*0205 / 2413 = A*0214 / 2406
A*1101 / 2403 = A*1104 / 2410
A*2301 / 3202 = A*2405 / 3201
A*2402 / 2502 = A*2407 / 2501
A*2402 / 2601 = A*2406 / 2608
A*2402 / 2902 = A*2403 / 2903
A*2402 / 6602 = A*2407 / 6603
A*2402 / 68012 = A*2407 / 6803
A*2501 / 6602 = A*2502 / 6603
A*2501 / 68012 = A*2502 / 6803
A*2502 / 7401 = A*3201 / 6601
A*6602 / 6803 = A*6603 / 68012

67 allele を基に判定

#### 4. 終わりに

クラス I の DNA タイピングはその遺伝子構造によりクラス II に比べ開発が遅れてきた。しかし今回クラス II 用とほぼ同時に HLA-A 用の dye-terminator 法による SBT Kit が発売された。まだ改良の余地はあるが、その目的によっては十分実用的な kit であ

る。dye-primer の kit が紹介された時に dye-terminator kit の開発の予定を聞いたことがあるが、その時は全く予定がないということであった。そのころのシーケンス化学では dye-terminator 法によるヘテロのシーケンスの解析は不可能だったからである。それから約 3 年で dye-terminator の kit が発売された。DNA シークエンサーもキャピラリーの採用により自分でゲルを作る必要がなくなり、またオートサンプラー機能もつくようになった。SBT 法は原理から言えば究極のタイピング法であることは誰もが認めるところであるが、これまで実用性が伴わなかった。しかし状況は急速に変化しており、SBT 法はクラス I も含めた HLA のアリルタイピング法として実用的な方法となっている。ソフトウェア、ハードウェアともに現在改良が進められており、HLA-B 用の SBT キットの発売も決まっている。SBT 法の優れている点はいくつのローカスをタイピングするにしても同じシステムで対応できることである。HLA-A, B, DR をすべて SBT 法だけでタイピングするというのも現実的な選択肢となりつつある。

## 文献

1. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, *et al.* : Importance of HLA-class I allele matching for clinical outcome after unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation. *New England J. Med.* in press.
2. Tonks S, March SGE, Bunce M, *et al.* : *HLA : Genomic diversity of HLA Functional and Medical Implication, Vol. I* (ed. Charron D), HLA class I DNA typing study. EDK, Paris, 1997 ; p. 199 - 215.
3. Mitsunaga S, Tokunaga K, Kashiwase K, *et al.* : A nested PCR-RFLP method for high-resolution typing of HLA-A alleles. *Eur. J. Immunogenetics* **25** : 15 - 27, 1998.
4. 小川篤子, 光永滋樹, 徳永勝士ら : PCR-RFLP法を用いた HLA-B 抗原遺伝子の高精度 DNA タイピング, *MHC* **5** : 4 - 17, 1998.
5. Levine JE, Yang SY : SSOP typing of the Tenth International Histocompatibility Workshop reference cell lines for HLA-C alleles. *Tissue Antigens* **44** : 174 - 183, 1994.
6. 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.
7. Santamaria O, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, *et al.* : HLA class I sequence-based typing. *Hum. Immunol.* **37** : 39 - 50, 1993.
8. Norgaard L, Fugger L, Jakobsen BK, *et al.* : Sequence-based typing of HLA-A locus using mRNA and a single locus-specific PCR followed by cycle-sequencing with AmpliTaq (DNA polymerase, FS). *Tissue Antigens* **49** : 455 - 465, 1997.
9. Scheltinaga SA, Johnston-Dow LA, White CB, *et al.* : A generic sequencing based typing approach for the identification of HLA-A diversity. *Hum. Immunol.* **57** : 120 - 128, 1997.
10. Johnston-Dow L, Bengtson A, Scheltinga S, *et al.* : *HLA : Genomic diversity of HLA Functional and Medical Implication, Vol. I* (ed. Charron D), DNA sequencing based typing of HLA-A. EDK, Paris, 1997;p.250 - 254.
11. Eberle M, Knapp LA, Iwanaga KK, *et al.* : HLA-B typing by allele separation followed by direct sequencing. *Tissue Antigens* **49** : 365 - 375, 1997.

# 〔最新情報：“玉手箱”〕 直接塩基配列決定法 (SBT) による HLA クラス II 遺伝子タイピング

成瀬 妙子、河田 寿子、猪子 英俊

東海大学医学部, 分子生命科学系遺伝情報部門

## はじめに

Sequencing Based Typing (SBT) 法は, PCR 法で増幅された DNA を用いてシーケンス反応を行い, ゲル電気泳動より得られる塩基配列の情報をもとに, 各対立遺伝子間の塩基配列の多型性をシーケンスレベルで直接検出する検査法として, 第 12 回の国際組織適合性会議 (12th IHWS) において検討された(1). その後各国において究極の DNA 診断法として急速に導入され, 発展してきた. 1994 年, 初のテクニカルセミナーが米国において開催され, 我々も参加したが, 当時においてはまだ DPBI 遺伝子のタイピングのみ可能であった. その後各研究施設において独自の方法によって様々な改良が加えられ, 現在ではクラス II 遺伝子領域のほぼすべての遺伝子座についてタイピング可能となっている. 今回は本稿が“最新情報”の項目であることを考慮して, クラス II 遺伝子の SBT 法についての最新の進展状況について述べることにする.

## SBT

SBT 法を最初に学ぶに当たって, SBT の正式名称が sequencing-based typing なのか, sequence-based typing であるかということで悩まれた経験をお持ちの方も多であろう. 本質的には同じ意味ではあるが, 気になるところである. 本年 3 月にフランスで開催された EFI (European Federation for Immunogenetics) の SBT のセッションでも, 最初に触れられたのが名称の呼び方であった. 従来 SBT 法を HLA タイピングに最も早く導入した ABI 社が sequencing-based typing と呼称したのが始まりであ

るが, 現在は両者の呼び方が用いられているようである.

ちなみに, 現在ヨーロッパ地区で SBT 法を導入している施設は 15 施設, 用いられているシーケンサーの機器については, 現在販売している 4 社のうち ABI 10 / 15 施設, ALF (Pharmacia) 5 / 15 施設で, 他 2 社は使用施設 0 と, クラス I 遺伝子 HLA-A のタイピング用キットを発売したこともあって ABI が一歩リードしている感がある. 使用機種が 2 社に限定されているのは, これら 2 社のみよりタイピングキットや付属の解析ソフトが市販され, 普及しているためと考えられる. この両者のタイピング精度については, 12th IHWS において SBT セッションの座長を務めた Utrecht の Tilanus のグループが, 各機種ごとに種々のプライマーと DNA ポリメラーゼを用いて解析を行い, 両者の間で結果に不一致を生じなかったことを報告している(2). ただし, 1 レーンで 4 種の異なる蛍光標識を検出できる ABI 社のシーケンサーの方が, 多検体処理と言う点で現時点では本法に適していると考えられる.

## SBT 法によるクラス II 遺伝子の DNA タイピング

直接塩基配列決定法の常法として, シーケンシングは PCR 産物を用いたサイクルシーケンシング(3)法により行う. 実際に SBT 法を行うにあたっては, マニュアル操作か自動シーケンサーを用いるかに大別されるが, 操作性, 自動判定などの点で優れている自動シーケンサーを選択する機会が多い. シーケンサー専用の解析ソフトには, ライ

ブラリーと呼ばれる、使用するプライマーで増幅される領域に関する各対立遺伝子の塩基配列情報が収められており、シーケンシングにより得られた情報を読み込んで、ライブラリー中の各対立遺伝子の塩基配列との異同を検索することにより、対立遺伝子の同定を行う。クラスII 遺伝子の SBT 法と言っても、手順は他のシーケンシングと同一であるので、自家製のプライマーを用いてタイピングが可能であるが、その場合には結果の判定については手作業で塩基配列を判読するか、自家製プライマーによる増幅領域の塩基配列情報を独自に準備する必要がある。一般的にはタイピングキットを用いて付属の解析ソフトによりタイピングを行うことが多い。我々の使用経験のあるキットは ABI 社より 1997 年に発売された DRB 遺伝子 (DRB1, 3, 4, 5) 領域用キットのみであるが、このキットはグループ特異的 PCR 増幅を行い、その後増幅の認められた産物を直接に塩基配列決定に資する。また、従来のキットは Dye primer 法を使用していたが、最近 Big Dye Terminator 法によるキットが発売された。Dye Terminator 法は、操作法は簡便であるにもかかわらず、プライマー直後の 3' 側より 30~50 bp 付近までの塩基配列が判読困難なことが多く、ヘテロ接合体の場合に表れる波形のずれやピークの高さが不均一になる欠点を有していたため、これまで Dye primer 法が好んで用いられてきた。Big Dye

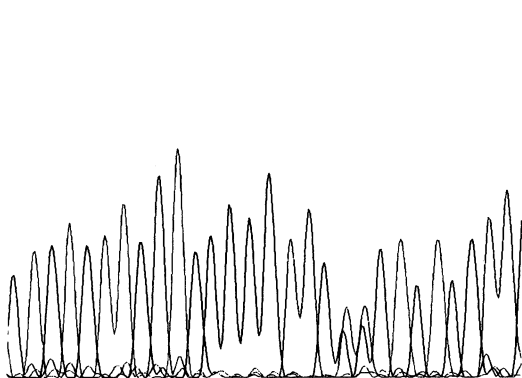
Terminator 法はそれらの問題点を改良し、長い増幅領域でも比較的均一な波形が得られるようになった。販売されているキット以外にも各施設で独自にプライマーセットが開発され、SBT タイピングが試みられているが、現在 DRB1 を中心に、DRB 3, 4, 5, DQA1, DQB1, DPB1 などの領域で SBT 法の報告がなされている(4 - 9)。

### クラスII 遺伝子の SBT 法の実情

SBT 法の他法との大きな違いは、後者が多型性を示す領域の周辺のみを検索するのに対し、前者は PCR 産物のすべての塩基配列を検索、決定できることから、対立遺伝子の識別、判定がより厳密に確定可能な点である。例えば、DRB1 遺伝子などでは DR13, 14 などの対立遺伝子数が多いために、他法でルーチン業務としてすべての対立遺伝子を明確に識別することは容易ではないが、SBT 法は塩基配列の多型性を直接検出可能であることから、希な対立遺伝子や、未知の新対立遺伝子も検出可能である。

タイピングを行うサンプルの多くがヘテロ接合体であることから、SBT 法による DNA タイピングの精度はヘテロ部位での二つのピークをいかに正確に判定するかという点である(図1)。しかしながら、実際には DRB1 遺伝子では、キットを含め多くの方法においてグループ特異的プライマーにより増幅

G A C A C A A C T A C G G G G T T G K K G A G A G C T T C  
240 250 260



3 C A G A C A C A A C T A C G G G G T T G K K G A G A G C T T C  
240 250 260

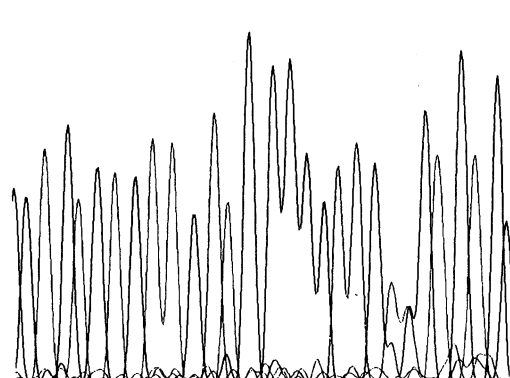


図1. ヘテロの組み合わせのピーク例。左は比較的均一なピークが得られているが、右の例では最初のピークの重なりが不均一なために、解析ソフトでは正しい判定が行えなくなる場合がある。

された DNA を用いてシーケンシングを行うため、2つの対立遺伝子が同一グループで検出されることはあまり多くない。例えば DR 4 / 8 の場合は各々のグループでホモタイプとして検出され、波形の重なりはないので各対立遺伝子の判定は容易である。一方、同一プライマーグループでヘテロの組合

せが出現した場合には、各ピークの高さが均一であり、従ってヘテロの2本のピークがほぼ同じ高さでホモの場合の約1/2であれば、対立遺伝子の識別は容易である。しかしながら、2つのピークの高さが極端に異なる場合には、ホモ接合体と誤って判定される。例えば、表1に示したように、DRB1\*1501 /

表1. 同一プライマーグループでのヘテロ接合体の結果

No.	DRBI typed by PCR-RFLP	SBT		
		Pre report	Allele report	Ambiguities
222	1501/1502	15011/15021	15011/15021	0
042	0403/0405	0403/04051 0404/0417 0407/0410 0408/0411 0417/0423	0403/04051 0404/0417 0407/0410 0408/0411 0417/0423	1
106	1401/1101	11011/1401 11011/1410 11041/1407 11042/1407 1105/1401 1105/1410	11011/1401 11011/1410 11041/1407 11042/1407 1105/1401 1105/1410	5
003	1401/1403	1401/1403 1403/1410 1407/1412	1401/1403 1403/1412 1407/1412	4
113	0802/0803	08021/08032	08021/08032	0
008	1302/1401	?	1301/1407 1302/1401 1302/1410	23
201	1401/1405	?	1401/1405 1405/1410	2



1502, DRB1\*0802 / 0803 などの組合せの場合にはピークが均一な高さを示せば判定は容易に行え、対立遺伝子の特定が可能である。ただし、DRB1\*0403 / 0405 の組合せの場合、超可変部の塩基の組合せが同一な対立遺伝子の組合せは、全部で5通り存在することになり、SBT法のみでは4

桁レベルでの判定は不可能である(図2)。このような場合には、制限酵素によって切断を行う PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法(2つの制限酵素による double digestion 法)や易動度の差を利用した PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法を併用して同定を行

Preliminary Report: Exact match to: 5 types. See Warnings Below.

Files : 97/03/18 11, 97/03/18 12

Warning #6: There are unexpected base calls at these 1 constant positions:

```

| nucleotide
6 | number
3 |

```

```

G DRB1.C155 consensus
S > 97/03/18 11
G < 97/03/18 12

```

Warnings for file: 97/03/18 11.

#12: The mobility file 373DRB.Forward-2 is not valid.

Polymorphic Position Report

```

          1111 1111111111 1111122222 2222222222 2222222222 | nucleotide
4444557778 8889990001 1111456777 7777900011 1111122233 333555567 | number
0268074782 4891472890 2379099013 4589978901 2456801201 234247840 |
GGCTTCGTCG CTATTCAGTA GTCTAGRRYC CGTACGCAGA GCGGCGMGCC TACGTTKCA <> 42-4 consensus
..... > 97/03/18 11
..... < 97/03/18 12
..... 0403/04051
..... 0404/0417
..... 0407/0410
..... 0408/0411
..... 0417/0423
..... R..... 0401/0411
..... ..S..... 0403/04052
..... R..... 0403/0409
..... ..A..... 0403/0417
..... ..C..... 0404/04051
..... ..M..... 04051/0406
..... ..A..... 0407/0411
..... ..C..... 0408/0410
..... ..M..... 0410/0420
..... ..M..... 0411/0419
..... R..... 0413/0417
..... R...C... 0401/0410
..... ..TG.. 0403/0410
..... ..S..... 0404/04052
..... R...C... 0404/0409
..... ..TG.. 0404/0411 ... more .

```

図2. DR4グループでのヘテロの組合わせの判定結果, 今回の結果からは5通りの組合わせが考えられる.

うことが望ましい。

DRB1 以外では DQB1, DQA1, DPB1 などの遺伝子でも SBT 法が導入されているが, DQA1 遺伝子の正確な対立遺伝子の同定には, エキソン 2 以外にエキソン 1, 3, 4 などについても検索を行う必要がある。また, DPB1 遺伝子については従来より generic なプライマーにより検索がなされてきたが, 現在報告されている対立遺伝子はすでに 79 種も存在することから, 理論上これらのヘテロでの識別困難な組み合わせは 160 以上にもなるので, 今後はグループ特異的プライマーの採用を検討しなければならないであろう。

### 鋳型 DNA の調製

キット使用の有無にかかわらず, SBT 法で注意しなければならないもう 1 つの点は, サイクルシーケンシス反応の鋳型として, いかに高品質の DNA を調製するかということである。ヘテロ接合体で低品質 DNA を鋳型に用いた場合, 各塩基の波形が乱れて 2 つのヘテロの対立遺伝子のピークが不均一になることが多く, 前述のように正しい配列を読み取れなくなるからである。また低品質の DNA の場合にはバックグラウンドのピークが高くなる傾向にあり, 解析ソフトが波形を認識できず, 誤った結果を生じることとなる。現在 SBT 法での鋳型とは, 多くの場合 PCR 法で増幅された DNA のことを意味するが, 高品質な鋳型 DNA を得るためには不純物の少ない PCR 産物を得ることが必要となる。

この鋳型となる PCR 産物の精製については, これまでさまざまな精製方法が試みられてきた。以前には, ストレプトアビジン結合の磁気ビーズを用いる方法が最も高品質な鋳型が得られるとされていたが, 操作がやや複雑なことや, 使用する PCR プライマーをビオチン化する必要があり, あまり普及しなかった。その後, 簡便な PCR 産物の精製キットなどがよく用いられていたが, シーケンシス反応用として開発された DNA 合成酵素である Taq FS polymerase が導入されたことにより, 低品質の鋳型 DNA を用いても低バックグラウンドの維持が可能となっている。また PCR 増幅産物を鋳型とする場合, 従来過剰量の残留プライマーを取り除く必要が

あったが, Taq FS polymerase を用いた場合には PCR 産物を 10 倍希釈したものをそのまま使用することが可能であり, 現在では精製にさほど神経質になる必要はなくなった。従って現段階では, PCR での特異的な増幅効率を上げるためには, PCR 産物を得るための鋳型である高品質な高分子 DNA を用いることが肝要である。

また, PCR 増幅産物である鋳型 DNA の精製度に関し, 一部の施設では PCR 産物をクローニングして用いることを推奨しているようである。特に最近では挿入効率のよい簡便な TA クローニングキットが市販され, PCR 産物のサブクローニングが手軽に行えるようになってきている。しかしながら組織適合性検査の場合には時間とコストの削減が要求されるので, 一般的にはクローニング法が有効とはいえない。

### 今後の課題

SBT 法の技術は開発当初より数々の改良が加えられ, 現在では結果判定までの時間も大幅に短縮され, 操作性も向上した。しかしながら, 結果判定までには約 1 日が必要なこと, また, 他法に比してコストが割高なこともあり, 通常検査法としての導入は, いまだ広く普及しているとはいえない。現在 DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DPA1, DPB1 などでは改良が進み, 片鎖のみの解析でも十分信頼性の高い結果が得られるため, コストの低下を考えるに当たっては, 両鎖の解析は必ずしも必要ではないかも知れない。

対立遺伝子の同定については, 次々に報告される新対立遺伝子の情報までをも含めると, 今後はコンピューターソフトを使用しての対応が迫られるであろう。最近の市販の解析ソフトについてはライブラリーが各自書き込み自由となり, 新たに報告された対立遺伝子をユーザー自身で加えることが可能になったことで, 新対立遺伝子への対応が迅速になった。とはいえこの作業は労力を要する為, 可能であれば各販売会社による適時バージョンアップサービスが望ましい。また, 本法の唯一の欠点ともいえるヘテロの識別困難な組み合わせについても, 情報提供を随時行うなど, サポート面の充実も期待したい。本

法は数ある DNA タイピング法の中では最も高精度の結果を期待できる方法であり、今後は骨髄移植などのドナー検索法としての応用が期待される。

#### 文献

- 1) Tilanus MGJ, *et al.* : *HLA : Genetic diversity of HLA functional and medical implication, Vol. I* (ed.Charron D), HLA sequencing based typing. EDK Medical and Scientific International Publisher, Paris, 1997 ; p. 237 - 268.
- 2) Voorter CEM, Rozemuller EH, de Bruyn-Geraets D, *et al.* : Comparison of DRB sequence-based typing using different strategies. *Tissue Antigens* **49** : 471 - 476, 1997.
- 3) Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, *et al.* : DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85** : 9436 - 9440, 1988.
- 4) Mc Ginnis MD, Conrad MP, Bouwens AGM, *et al.* : Automated, solid-phase sequencing of DRB region genes using T 7 sequencing chemistry and dye-labeled primers. *Tissue Antigens* **46** : 173 - 179, 1995.
- 5) Knipper AJ, Hinney A, Schuch B, *et al.* : Selection of unrelated bone marrow donors by PCR-SSP typing and subsequent nonradioactive sequence-based typing for HLA DRB 1 / 3 / 4 / 5, DQB1 and DPB1 alleles. *Tissue Antigens* **44** : 275 - 284, 1994.
- 6) Voorter CEM, de Bruyn-Geraets D, van den Berg-Looenen EM : High resolution HLA typing for the DRB 3 / 4 / 5 genes by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **50** : 283 - 290, 1997.
- 7) Rozemuller EH, Bouwens AGM, van Oort ELF, *et al.* : Sequencing-based typing reveals new insight in HLA-DPA1 polymorphism. *Tissue Antigens* **45** : 57 - 62, 1995.
- 8) Voorter CEM, Emonds M-P, van den Berg-Looen : Identification of a new DRB4 allele (DRB4\* 0105) by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **49** : 662 - 664, 1997.
- 9) Voorter CEM, Kik MC, van den Berg-Looen : High-resolution HLA typing for the DQB1 gene by sequence-based typing. *Tissue Antigens* **51** : 80 - 87, 1998.