● 原著論文 ●

PCR-MPH2 法を用いた日本人集団における HLA-A, -B, -C, -DRB1 および -DQB1 遺伝子型決定法の確立

松下 正毅¹⁾、小川 貴裕¹⁾、松見 達也²⁾、長門 正貴¹⁾、岡 孝紀¹⁾、川井 信太郎¹⁾

1) 湧永製薬株式会社, 創薬研究所

2) 湧永製薬株式会社, 診断薬営業部

(平成 15 年 9 月 12 日受付)

要約: 我々は、マイクロタイタープレートを用いた新しい HLA タイピング法である PCR-MPH2 法を確立した。この方法では PCR から発色操作までの条件をすべて統一することにより HLA-A, -B, -C, -DRB1 および-DQB1 遺伝子のタイピングを同時に行うことが可能となった。各遺伝子座に対して、日本人に報告されている 2 桁のタイピングを行うために HLA-A 遺伝子用に 24 種類, HLA-B 遺伝子用に 24 種類, HLA-C 遺伝子用に 23 種類, HLA-DRB1 遺伝子用に 24 種類, および HLA-DQB1 遺伝子用に 17 種類の SSO プローブを用いた。各プローブの陽性および陰性シグナルの区別が明確となるようにプローブ配列の最適化を行った。従来のマイクロタイタープレートを用いた方法と比べ、ハイブリダイゼーション温度を 37°C にしたこと, TMAC での洗浄操作が不要となったことで、操作性が大きく向上した。本法は PCR 反応から判定の出力まで約 5 時間半で終了し、一人の検査者が一度の操作で 32 項目のタイピングが可能である。また、少数検体の多遺伝子座を同時にタイピングする必要がある場合にも有用な方法である。

キーワード: HLA 遺伝子タイピング, PCR-MPH

はじめに

PCR を利用した HLA の DNA タイピング法には PCR-sequence specific primers (SSP) 法 (1), PCR-sequence-specific oligonucleotide probe (SSOP) 法 (2, 3), PCR-RLFP 法 (4, 5), PCR-single strand conformation polymorphism (SSCP) 法 (6, 7), および sequence-based typing (SBT) 法 (8, 9) などがある。これらの方法は古典的な血清学的手法で使用する生きたリンパ球や抗血清を必要とせず、物質的に安定な染色体 DNA を試料として使用するため、タ

イピングの正確性、再現性の点で有利である。一方、DNA タイピング法は操作が煩雑であり、手技的な熟練を必要とする場合が多かった。また、陽性・陰性の判断が目視で行われることもあり、客観的な判定ができないためのミスタイピングを起こす危険性を秘めていた。これらを解決するために、以前、我々は HLA タイピングのルーチン検査に適した方法として PCR-MPH 法を開発した (10)。この方法は reverse-SSOP をマイクロタイタープレート上で行う方法である。操作は ELISA で用いる汎用機器を利用

代表者連絡先 〒739-1195 広島県高田郡甲田町下甲立 1624
湧永製薬株式会社創薬研究所
松下 正毅

電 話 0826-45-2331
F A X 0826-45-4351
E-mail matsushita_m@wakunaga.co.jp

することができ、熟練を必要とせず、また、陽性・陰性の判断は発色強度を吸光度により測定した値に基づくため、客観的に判定をすることができる。しかしながら、ハイブリダイゼーション時やTMAC洗浄時の温度が発色結果に大きく影響することがあり、アッセイ間差の原因のひとつとなっている。そこで、今回、我々はPCR-MPH法の操作性を向上させたPCR-MPH-2法を開発し、HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1およびHLA-DQB1遺伝子のタイピングへの応用を検討した。

材料と方法

1. ゲノム DNA の調製

材料はインフォームドコンセントを得た社内ボランティアより採血した血液より分離した末梢血単核球を使用した。DNAの抽出は塩析法(11)により行った。HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1およびHLA-DQB1遺伝子のタイピングはPCR-MPH法(10)または血清学的方法で行った。

2. PCR プライマーとモチーフ配列

各遺伝子座を特異的に増幅するためのPCRプライマーを設計した(表1)。アニーリング効率を標準化し、すべての遺伝子座を同一条件で均等に増幅するために各プライマーの5'側に15塩基の共通配列を追加した。HLA-A, HLA-BおよびHLA-C遺伝子はエクソン2とエクソン3をそれぞれ増幅させ、HLA-DRB1およびHLA-DQB1遺伝子はエクソン2を増幅させるように各々のプライマーを設定した。また、HLA-DR2グループについてDRB1*15とDRB1*1602とを区別するために、イントロン1の一部を増幅するプライマーも加えた。すべてのプライマーは5'末端にビオチン標識を導入したものを使用した。タイピングのために検出するモチーフ配列はHLA-A遺伝子用に24種類、HLA-B遺伝子用に24種類、HLA-C遺伝子用に23種類、HLA-DRB1遺伝子用に24種類、およびHLA-DQB1遺伝子用に17種類の配列をそれぞれ選択した。モチーフ配列とその位置を表2に示す。また、各遺伝子座において日本人で報告されているアレルのモチーフ配列への

表1 プライマー配列

locus	プライマー名	配列(5'→3')	濃度(μM)	増幅物サイズ(bp)
HLA-A exon 2	U15t-5Aint1-S	CSGCCTCTGYGGGGAGAAGCAA	0.4	489
	U15t-3Aint2-72	TCGGACCCGGGAGACTGTGG	0.8	
HLA-A exon 3	U15t-5Aint2-178T	CAGTTTAGGCCAAAAATTCCTCC	0.8	407
	U15t-3Aint3-1	GCCCCGTGGCCCTGCTAC	0.4	
HLA-B exon 2	U15t-5Bint1-46	AGGGGACCGCAGGCGGG	0.2	436
	U15t-3Bint2-33	TACGTGGGGGATGGGGAGT	0.4	
	U15t-3Bint2-46B73	GGAGACCCGGGCGGTACGTC	0.4	
HLA-B exon 3	U15t-5Bint2-142	GGCGAGAGCCCCAGGCGCG	0.4	483
	U15t-3Bint3(+1)	AGGCCATCCCCGGCGACCTAT	0.2	
HLA-C exon 2	U15t-5Cint1-4	GGGCCCCGCCGGCGCA	0.2	438
	U15t-5Cint1-4T	GGGCCCTCCCGGCGCA	0.2	
	U15t-3Cint2-36	GTCCGTGGGGGATGGGGAGG	0.4	
HLA-C exon 3	U15t-5Cint2-100C1	GAGTCTCCCGTCTGAGATCC	0.2	518
	U15t-5Cint2-100G1	GAGTCTCCCGTCTGAGATCC	0.2	
	U15t-3Cint3-3	GAGATGGGGAAGGCTCCCCACT	0.4	
HLA-DRB exon 2	tagDRBAMP-C	TCGTGTCCCCACAGCACGT	0.4	306
	tagDRBAMP-B	CCGCTGCACTGTGAAGCTCT	0.4	
HLA-DR2 intron 1	tag5DR2int1-90	GTGGGTGCTGTTGAAGGT	0.4	227/230
	tag3DR2int1-270	GCGGGAAAACCCCTTCTC	0.4	
HLA-DQB1 exon 2	tagDQB-A1	TGCTACTTCACCAACGGGAC	0.8	260
	tagDQB-B12	AGGATCCCGCGGTACGCCAC	0.8	
	tagDQB-B24	AAGTCGTGCGGAGCTCCAAC	0.8	

反応パターンを表3から表7に示す。増幅産物内のモチーフ配列と相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドをSSOプローブとして使用した。

3. PCRによるHLA遺伝子の増幅

HLA-A, HLA-B および HLA-C 遺伝子の反応液は、クラスI用増幅試薬 [80 mM Tris-HCl (pH9.0), 2 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 200 μM dNTP, 5% DMSO, 2.5U Taq DNA polymerase (TaKaRa), 各遺伝子座特異的プライマーセット] に 200 ng のゲノム DNA を加えて全量 100 μl とした。HLA-DRB1 および HAL-DQB1 遺伝子の反応液は、クラスII用増幅試薬 [10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 2.5U Taq DNA polymerase (TaKaRa), 遺伝子座特異的プライマーセット] に 200 ng のゲノム DNA を加えて全量 100 μl とした。各遺伝子座の使用プライマー濃度を表2に示した。PCR 反応は GeneAmp PCR System 9600-R (Applied Biosystems) を用いて 96°C で 3 分間熱変性させた後、熱変性: 96°C, 30 秒, アニーリング: 62°C, 1 分, 相補鎖合成: 72°C, 1 分で 40 サイクル行った。

4. SSO プローブのマイクロタイターウエルへの固相化

SSO プローブのマイクロタイターウエルへの固相化は UV クロスリンク法 (13) により行った。SSO プローブを 25 μl の TE 溶液 [10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA] に溶解し、25 μl の固定用緩衝液 [1.5 M NaCl, 300 mM Tris-HCl (pH7.5)], 300 mM MgCl₂ を混和し、マイクロタイターウエル Immuno Module MaxSorp (Nunc) に分注し、37°C で一晩保温した。溶液をアスピレーターで除去後、37°C で 30 分間風乾した。紫外線を 5×10^5 μjoules 照射後、300 μl のプレート洗浄液 [1 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH9.3), 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20] で 3 回洗浄し、再度 37°C で 30 分間風乾した。プローブが固相されたプレートは、密封したアルミ袋に乾燥剤とともにいれて 4°C で保存した。

5. ハイブリダイゼーションと発色

100 μl の PCR 増幅物に 325 μl の 50 mM 水酸化ナトリウム溶液を加え室温で 5 分間放置した後、825 μl のハイブリダイゼーション溶液 [72.3 mM Tris-HCl (pH7.5), 18.7 mM HCl, 14.9 mM EDTA, 26.1 mM NaCl] を加えた。この溶液を 50 μl ずつ各マイクロタイターウエルに添加し、プレートシールで密封した後、37°C で 1 時間ハイブリダイゼーションを行った。

次に、プレートウォッシャーを用いてハイブリダイゼーション溶液を除去後、300 μl の洗浄液 (1 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 2 mM MgCl₂, 0.05% Triton X-100) で 3 回の洗浄を行った。50 μl のアビジン標識ペルオキシダーゼ (Vector) を含む酵素溶液を添加し、37°C で 15 分間反応させた。酵素溶液を除去後、300 μl の洗浄液で 3 回の洗浄を行った。50 μl の発色液 (1.5 mM 2,2'-azino-di (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), 200 mM 酒石酸 (pH4.4), 0.015% H₂O₂) を添加し、37°C で 15 分間反応させた。50 μl の停止液 (2% oxalic acid) で反応を停止させ、プレートリーダーで各ウエルの 415 nm における吸光度を測定した。

結 果

PCR 反応

PCR 反応はクラス I とクラス II とで増幅試薬組成が異なるが、温度サイクルの条件を共通とすることで一度の PCR 操作ですべての遺伝子座を増幅し、目的とするサイズのバンドを確認した (図 1)。

SSO プローブ配列の最適化

モチーフ配列を検出するための SSO プローブは陽性シグナルと陰性シグナルの区別が明確にできるような配列を選択する必要があった。そこでプローブごとにモチーフ配列と相補的である部分の長さの最適化を行った。また、プローブの長さだけでは識別能が不十分であったものについてはプローブ配列内に人為的なミスマッチを導入することで、陰性シグナルの低下を試みた。プローブ最適化の一例を表 8 に示す。モチーフ配列 B#12 を検出するためのプローブ B#12-1 では陽性となるアリル B*1501 の発

表2 選択したモチーフ配列

HLA-A			
ID	motif sequence (5'→3')	nucleotide position	location
A#1	aggtatttttccacatccgtg	88-108	exon 2
A#2	aggtatttttccacatccgtg	88-108	exon 2
A#3	gagcaggagagcctgagtat	229-249	exon 2
A#4	ggacgggggagacacggaaagt	252-272	exon 2
A#5	ttgggacccggaaacacacggaa	249-269	exon 2
A#6	tgggacgaggagacaggggaaa	250-270	exon 2
A#7	tcacagattgaccagcctggag	283-303	exon 2
A#8	tcacagactcaccgagtgagac	283-303	exon 2
A#9	actgaccgagcgaacctgggg	289-309	exon 2
A#10	actgaccgagcgaacctgggg	289-309	exon 2
A#11	cacacccctccagaggaatgat	349-369	exon 3
A#12	atccagatgatgtatggctgc	355-375	exon 3
A#13	cgcggggtatgaacagcagccc	400-420	exon 3
A#14	taccacagtagcctacagac	403-423	exon 3
A#15	taccagcaggagcctacagac	403-423	exon 3
A#16	gctcagatcaccaagcgcgaag	490-510	exon 3
A#17	gagacggcccatgagggcgag	514-534	exon 3
A#18	gagcagtgagagcctacctg	532-552	exon 3
A#19	gagcagtgagagcctacctg	532-552	exon 3
A#20	gagcagtgagagcctacctg	532-552	exon 3
A#21	ctggaggccgggtgctggagc	550-570	exon 3
A#22	ctggatgcaacgtgctggagc	550-570	exon 3
A#23	tgcgtggacgggctccgcaga	562-582	exon 3
A#24	tgcgtggagtggtccgcaga	562-582	exon 3

HLA-DRB1			
ID	motif sequence (5'→3')	nucleotide position	location
DR#1	ttgctggaaagatgcatttat	163-183	exon 2
DR#2	tggcagcctaagagaggatgt	112-132	exon 2
DR#3	gagtactctacgtctgagtg	112-132	exon 2
DR#4	ttggagcagggttaaacatgag	109-129	exon 2
DR#5	tctacgggtgagtgattttc	118-138	exon 2
DR#6	tggcagggttaagataagtg	112-132	exon 2
DR#7	ttgaagcaggataagtttgaa	109-129	exon 2
DR#8	ttggagagggttaagtttgag	109-129	exon 2
DR#9	cggttactggagagacacatc	160-180	exon 2
DR#10	cagagagtgctcttggggctc	130-150	intron 1
DR#11	cggcctgatgaggagactgg	250-270	exon 2
DR#12	cggcctgctgaggagactgg	250-270	exon 2
DR#13	cggggcgggtggacacatc	301-321	exon 2
DR#14	gacatcctgaaagcagcg	283-303	exon 2
DR#15	aggcgggcccgtgaggacacc	298-318	exon 2
DR#16	actctgagtgtaattcttc	121-141	exon 2
DR#17	gagcagaggcggggccgggt	292-312	exon 2
DR#18	cagtgctgaaagagatgcac	160-180	exon 2
DR#19	tatcaccaagaggagtagctg	181-201	exon 2
DR#20	accaagaggagtcgtgctg	184-204	exon 2
DR#21	cggtttctgagtagctacac	103-123	exon 2
DR#22	ggacccctcggagagacggcg	282-302	exon 2
DR#23	gtgcgggtatctgcacagaggc	157-177	exon 2
DR#24	caagaggagtagctgcgttc	187-207	exon 2

HLA-B			
ID	motif sequence (5'→3')	nucleotide position	location
B#1	tattttccacacgccatgtcc	91-111	exon 2
B#2	agtcggaggagagcgcgcgg	196-216	exon 2
B#3	agtcggaggagagcgcgcgg	196-216	exon 2
B#4	agtcggaggagagcgcgcgg	196-216	exon 2
B#5	gcccgtgggtggagcaggag	217-237	exon 2
B#6	acacagatctccaagacaaac	262-282	exon 2
B#7	gaccggaaacacacagatctac	253-273	exon 2
B#8	cagaagtacaagcgcacagac	265-285	exon 2
B#9	cagatctacaagcgcacagac	265-285	exon 2
B#10	acacagatctccaagacccag	262-282	exon 2
B#11	acacagatctccaagacccag	262-282	exon 2
B#12	gcacagattacccagagagc	283-303	exon 2
B#13	cggaaacctgcgcgctactac	307-327	exon 2
B#14	ctgtccgcctactacaaccag	313-333	exon 2
B#15	acacacttgcagacgatgtat	349-369	exon 3
B#16	ctccagaggatgtacggctgc	355-375	exon 3
B#17	cataaccagtagcctacgac	409-429	exon 3
B#18	tataaccagttgcctacgac	409-429	exon 3
B#19	gcggcccggtgtggcggagcag	517-537	exon 3
B#20	tacctggaggcgacgtgctg	547-567	exon 3
B#21	ctggaggcctgtgctggag	550-570	exon 3
B#22	ctggaggcagtgctggag	550-570	exon 3
B#23	tggctccgagacacctggag	571-591	exon 3
B#24	ctccaggtagtatggctgc	355-375	exon 3

HLA-DQB1			
ID	motif sequence (5'→3')	nucleotide position	location
DQ#1	ggggggggccggcgctcggtg	301-321	exon 2
DQ#2	cggtatgtgacagatacatc	169-189	exon 2
DQ#3	cgcttctgaaccagacacatc	169-189	exon 2
DQ#4	cgcttctgaaccagatacatc	169-189	exon 2
DQ#5	ggcgggcctgctgcccagtagc	256-276	exon 2
DQ#6	ccgctggggcggttgacgcc	250-270	exon 2
DQ#7	agccagaaggacatcctggag	283-303	exon 2
DQ#8	ctggggcgcctgcccgcgag	253-273	exon 2
DQ#9	ctgtgagcagaagcatctat	172-192	exon 2
DQ#10	ggcgggcctgagcgcgagtag	256-276	exon 2
DQ#11	gggacccagcctgctgggggt	154-174	exon 2
DQ#12	ctgttaaccagatacatctat	172-192	exon 2
DQ#13	gggggttatcgggcggtgacg	229-249	exon 2
DQ#14	gggacccagcgcgctgggggt	154-174	exon 2
DQ#15	gggggttacccggcggtgacg	229-249	exon 2
DQ#16	ggcgggcctagcgcgagtag	256-276	exon 2
DQ#17	ccgctggggcggttgacgcc	250-270	exon 2

HLA-C			
ID	motif sequence (5'→3')	nucleotide position	location
C#1	aagtatttttccacatccgtg	88-108	exon 2
C#2	tacaaccagagcggagcca	325-343	exon 2
C#3	tccacatccgtgctcctggccc	97-117	exon 2
C#4	gtgaacctgcggaaactgcgc	298-318	exon 2
C#5	agtcggaggagagcggcg	196-216	exon 2
C#6	gagacgctgcagcgcag	601-619	exon 3
C#7	gcggagcaggagacagagcctac	529-549	exon 3
C#8	gcggagcagctgagagcctac	529-549	exon 3
C#9	accgctgcggacacggcgct	472-492	exon 3
C#10	ctccagtgatgtttgctgc	355-375	exon 3
C#11	catgaccagttgacctacgac	409-429	exon 3
C#12	gggtatgaccagtagcctac	406-426	exon 3
C#13	gggtataaccagttgacctac	406-426	exon 3
C#14	tacaaccagagcggagcag	325-343	exon 2
C#15	ggtctcacatccctcagag	344-363	exon 3
C#16	aacggggaagaagcgtgcag	592-612	exon 3
C#17	ctggagaacaggagaagacg	586-606	exon 3
C#18	gcggagcagtgagagcctac	529-549	exon 3
C#19	cgcttcatctcagtgaggctac	133-153	exon 2
C#20	gccgcgagtcgagaggggag	193-213	exon 2
C#21	gccgcgagtcgagaggggag	193-213	exon 2
C#22	ctggaggcagtagctggag	550-570	exon 3
C#23	ttctacaccgctgtgtccgg	94-114	exon 2

表 3 HLA-A 遺伝子のプロローブパターン

HLA-A allele	AL#1	AL#2	AL#3	AL#4	AL#5	AL#6	AL#7	AL#8	AL#9	AL#10	AL#11	AL#12	AL#13	AL#14	AL#15	AL#16	AL#17	AL#18	AL#19	AL#20	AL#21	AL#22	AL#23	AL#24
A*01																								
A*02																								
A*03																								
A*11																								
A*24																								
A*26																								
A*29																								
A*30																								
A*31																								
A*32																								
A*33																								
A*68																								

色値 3.66 に対して、一塩基のミスマッチをもつ陰性アリル B*5201 と B*5502 の発色値がそれぞれ 2.91 と 0.96 であり、陽性と陰性の区別ができないプローブであった。そこで、プローブ配列内の 5' 末端から 7 塩基目の T を A に置換したプローブ B#12-2 を作製した。このプローブでは陽性となるアリルも一塩基のミスマッチとなるが、B#12-1 で区別できなかった陰性のアリルは二塩基のミスマッチとなる。このプローブを用いてハイブリダイゼーションおよび発色を行ったところ、陽性アリル B*1501 の発色値が 2.35 とやや低下したものの、陰性アリル B*5201 と B*5502 の発色値がともに 0.50 と大幅に低下したことで陽性と陰性の区別が明確になった(表 8)。このようにしてすべてのモチーフ配列に対する SSO プローブの最適化を行い、HLA-A 遺伝子用に 24 種類、HLA-B 遺伝子用に 24 種類、HLA-C 遺伝子用に 23 種類、HLA-DRB1 遺伝子用に 24 種類、および HLA-DQB1 遺伝子用に 17 種類の SSO プローブの配列を決定した。これらのプローブを用いて遺伝子型が既知である 24 種類のゲノム DNA 増幅物を用いて発色を行った。一例として、各 HLA-A 遺伝子用プローブの発色値分布を図 2 に示す。すべての陽性値は 1.0 から 4.0 の範囲、また、陰性値は 0.5 以下であり、陽性と陰性の区別は明確であった。HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 および HLA-DQB1 遺伝子用プローブの発色値分布も同様であった。

HLA 遺伝子のタイピング

2 種類のパネル DNA を用いて HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, および HLA-DQB1 遺伝子のタイピングを行った。操作条件を共通にすることで PCR から発色まですべて同時に行うことができた。その発色値を表 9 にそれぞれ示す。パネル 1 における HLA-DQB1 遺伝子用 SSO プローブ DQ1-9, DQ10N-6, DQ12N-8 およびパネル 2 における HLA-C 遺伝子用 SSO プローブ C10-38, C22-8 で 0.5 以上の発色値を示したが、陽性・陰性の区別は明確であった。各プローブの反応性から HLA 型の検索を手動で行うことは時間を浪費するだけではなく、誤ったタイピング結果をだしてしまう危険性がある。そこで、発色値から自動的に HLA 型を判定する独

表 4 HLA-B 遺伝子のプロローブパターン

HLA-B allele	BL#1	BL#2	BL#3	BL#4	BL#5	BL#6	BL#7	BL#8	BL#9	BL#10	BL#11	BL#12	BL#13	BL#14	BL#15	BL#16	BL#17	BL#18	BL#19	BL#20	BL#21	BL#22	BL#23	BL#24
B*07																								
*0705																								
B*13																								
*1301																								
*1302																								
B*14																								
*1401																								
B*15																								
*1501/28/60																								
*1502																								
*1503																								
*1507/26N/27																								
*1509																								
*1511/112																								
*1518																								
*1522																								
*1538																								
*1546																								
B*27																								
*2702/05																								
*2704																								
*2711																								
B*35																								
*3501																								
*3510																								
*3521																								
*3531																								
*3535																								
B*37																								
*3701																								
B*38																								
*3802																								
B*39																								
*39011/013																								
*39021/022/23																								
*3904																								
B*40																								
*40012																								
*4002/29																								
*4003																								
*4006																								
*4007																								
B*44																								
*4402/031																								
B*46																								
*4601/02																								
B*48																								
*4801																								
B*51																								
*51011/03																								
B*52																								
*52011																								
B*54																								
*5401																								
*5402																								
B*55																								
*5502																								
*5504																								
*5510																								
B*56																								
*5601																								
*5603																								
*5605																								
B*57																								
*5701																								
B*58																								
*5801																								
B*59																								
*5901																								
B*67																								
*6701																								
B*78																								
*78022																								
B*81																								
*8101																								

表 5 HLA-C 遺伝子のプロローブパターン

	C#1	C#2	C#3	C#4	C#5	C#6	C#7	C#8	C#9	C#10	C#11	C#12	C#13	C#14	C#15	C#16	C#17	C#18	C#19	C#20	C#21	C#22	C#23
Cw*01	*0102																						
	*0103																						
Cw*03	*03021/022																						
	*03031/032/033																						
	*03041/042																						
Cw*04	*0401101/01102/012																						
Cw*05	*0501																						
Cw*06	*0602																						
Cw*07	*0702101/02102																						
Cw*08	*07041/042																						
	*08011/012																						
	*0803																						
Cw*12	*12022/021/022																						
	*12031																						
Cw*14	*14021/022/04																						
	*1403																						
Cw*15	*15021/022/051/052																						

表 6 HLA-DRB1 遺伝子のプロローブパターン

	DR#1	DR#2	DR#3	DR#4	DR#5	DR#6	DR#7	DR#8	DR#9	DR#10	DR#11	DR#12	DR#13	DR#14	DR#15	DR#16	DR#17	DR#18	DR#19	DR#20	DR#21	DR#22	DR#23	DR#24
DR1	*0101																							
DR15	*15011/012/013/021/022/023																							
DR16	*16021/022																							
DR3	*03011																							
	*03012																							
DR4	*04011/031/032/071/072/09/11																							
	*04012																							
	*0404/051/052/10																							
	*0406																							
DR11	*11011/012/013/014/06																							
	*1123																							
DR12	*12011/012/021/022/05																							
DR13	*13011/012/021/022																							
	*13071/072																							
	*1329																							
DR14	*14011/012/071/072																							
	*1402/06/29																							
	*1403/12																							
	*1405																							
DR7	*07011																							
	*07012																							
DR8	*08021/022/023/032																							
	*0809																							
DR9	*09012																							
DR10	*10011/012

(各増幅物 5 μ L を用いた)

図1 遺伝子座特異的プライマーによる PCR 結果

表8 プローブ配列の最適化

A		配列 (5'→3')	
モチーフ配列B#12		GCACAGACTTACCGAGAGAGC	
プローブB#12-1		GCTCTCTCGGTAAGTC	
プローブB#12-2		GCTCTCACGGTAAGTC	

B		吸光度 (OD ₄₁₄)	
評価に用いたアリル	配列 (5'→3')	B#12-1	B#12-2
B*1501	GCACAGACTTACCGAGAGAGC	3.66	2.35
B*5201	GCACAGACTTACCGAAAGAGC	2.91	0.50
B*5502	GCACAGACTGACCGAGAGAGC	0.96	0.50

- typing of HLA-A allele. *Eur J Immunogenet* **25**:15-27, 1998
5. Mitsunaga S, Kuwata S, Tokunaga K, *et al.*: Family study on HLA-DPB1 polymorphism: Linkage analysis with HLA-DR/DQ and two 'new' alleles. *Hum Immunol* **34**:203-11, 1992
6. Bannnai 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**:107-13, 1996
7. Wang H, Tokunaga K, Akaza T, *et al.*: Identification of HLA-C alleles using PCR-single-strand

図2 HLA-A 遺伝子用 SSO プローブのシグナル分布

- conformation polymorphism and direct sequencing. *Tissue Antigens* **49**:134-, 1997
8. Santamaria P, Lindstrom AL, Boyce-Jacino MT, *et al.*: HLA class I sequence-based typing. *Hum Immunol* **37**:39-, 1993
 9. Kotsch K, Wehling J, Kohler S, *et al.*: Sequencing of HLA class I genes based on the conserved diversity of the noncoding regions: sequencing-based typing of HLA-A gene. *Tissue Antigens* **50**:178-1997
 10. Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, *et al.*: Routine low and high resolution typing of the HLA-DRB gene using the PCR-MPH (microtitre plate hybridization) method. *Eur J Immunogenet* **23**:471-86, 1996
 11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 12. Kawai S, Maekawajiri S, Yamane A.: A simple method of detecting amplified DNA with immobilized probes on microtiter wells. *Anal Biochem* **209**:63-9, 1993

表 9 HLA 遺伝子のタイピング

パネル1

HLA-A					HLA-B					HLA-C					HLA-DRB1					HLA-DQB1				
ウェル番号	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定
1	A2-5	0.80	0.25	-	B3-20	0.90	0.90	+	C1-4	0.90	0.14	-	2801tm2	0.80	0.22	-	DQ1-9	0.90	0.80	-	DQ1-9	0.90	0.80	-
2	A3-11	0.70	0.13	-	B5-15	0.80	0.16	-	C3-3	0.60	1.71	+	1002tm1R	0.80	4.00	+	DQ3-7	0.80	3.73	+	DQ3-7	0.80	3.73	+
3	A4-0	0.90	0.95	+	B6-83	0.90	3.02	+	C4-43	0.90	0.21	-	DR3-1	0.70	0.14	-	DQ4-8	0.80	0.17	-	DQ4-8	0.80	0.17	-
4	A5-26	0.70	0.20	-	B7-6	0.90	0.16	-	C5-1	0.70	0.15	-	1004tm1R	0.80	3.53	+	DQ20-6	0.70	0.14	-	DQ20-6	0.70	0.14	-
5	A6-0	0.70	0.10	-	B9-22	0.80	0.15	-	C6-18	0.70	0.16	-	1005-1	0.70	0.15	-	DQ6-49	0.80	0.10	-	DQ6-49	0.80	0.10	-
6	A202T	0.70	3.28	+	B10-21	0.70	3.37	+	C25-3	0.70	0.16	-	1006tm1R	0.70	0.16	-	DQ7-18	0.80	2.23	+	DQ7-18	0.80	2.23	+
7	A12-20	0.80	2.80	+	B13-5	0.80	3.81	+	C8-8	0.80	0.20	-	1007-1	0.70	0.11	-	DQ8-1	0.80	3.77	+	DQ8-1	0.80	3.77	+
8	A13-29L	0.80	0.10	-	B21JW	0.70	0.11	-	C9-79	0.90	2.93	+	1008tm1R	0.70	0.13	-	DQ9-44	0.80	0.14	-	DQ9-44	0.80	0.14	-
9	A15-13	0.70	0.18	-	B21W	0.80	0.10	-	C10-38	0.90	3.14	+	MHD17-4	0.90	0.15	-	DQ10N-6	0.90	0.54	-	DQ10N-6	0.90	0.54	-
10	A16-14	0.70	2.79	+	B2H3TRM	0.80	0.09	-	C11-18	1.10	0.22	-	15mtk1-2	1.00	2.93	+	DQ12N-8	1.40	0.71	-	DQ12N-8	1.40	0.71	-
11	A19-12L	1.00	0.10	-	B20-8	0.80	2.47	+	C12-2	1.10	0.21	-	5703Jm7	0.70	0.21	-	DQ13-9	0.70	0.30	-	DQ13-9	0.70	0.30	-
12	A20-35	0.70	2.06	+	B24-65	0.80	0.89	+	C13-5	0.90	3.58	+	DR22-4	0.80	0.29	-	DQ14-14	0.90	0.23	-	DQ14-14	0.90	0.23	-
13	A22-1	0.80	0.20	-	B25-9	0.80	2.86	+	C14-3	1.30	0.17	-	7004-6	0.80	0.16	-	DQ15-9	0.80	3.21	+	DQ15-9	0.80	3.21	+
14	A24-29	0.70	3.01	+	B27-5	1.20	3.45	+	C15-131	0.70	1.94	+	DR28-22	0.80	0.11	-	DQ16-8	1.00	1.54	+	DQ16-8	1.00	1.54	+
15	A25-14	0.90	2.11	+	B29-3	0.70	2.89	+	C16-70	0.80	0.25	-	DR30-2	0.70	0.14	-	DQ17-13	1.20	0.16	-	DQ17-13	1.20	0.16	-
16	A28-37	1.00	2.97	+	B30-21	0.80	0.26	-	C17-7	0.70	0.16	-	MHD14N-8	0.90	0.16	-	DQ18-12	0.80	0.30	-	DQ18-12	0.80	0.30	-
17	A29-16	0.70	0.18	-	B38-23	1.00	2.87	+	C18-1	1.50	0.12	-	MHD6-210	0.70	1.58	+	DQ19-34	1.20	0.14	-	DQ19-34	1.20	0.14	-
18	A33-14	1.00	0.28	-	B41-5	0.70	0.20	-	C19N-67	0.70	2.87	+	MHD9-4	0.70	0.14	-								
19	A34-36	0.70	3.20	+	B46-241	0.90	2.04	+	C20-7	0.70	0.22	-	MHD11-55	0.70	1.53	+								
20	A35-6	0.70	2.52	+	B51-46	0.80	0.21	-	C21-12	0.60	1.91	+	MHD12-25	0.90	0.31	-								
21	A36-0	0.70	0.18	-	B52-5	0.90	3.73	+	C22-8	0.80	2.99	+	10XYJ-3	0.70	0.12	-								
22	A38-29	0.70	0.16	-	B58B8T	1.00	0.17	-	C23-23	0.80	0.18	-	DR23-32	0.80	0.21	-								
23	A39-7	0.70	1.90	+	B55-5	0.80	2.67	+	C24-8	0.80	1.48	+	MHD13-18	0.70	0.16	-								
24	A40-8	0.90	2.02	+	B57-14	0.90	0.17	-					DR34-116	0.60	3.31	+								

パネル2

HLA-A					HLA-B					HLA-C					HLA-DRB1					HLA-DQB1				
ウェル番号	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定	プロトタイプ	cut-off値	absorbance	判定
1	A2-5	0.80	0.23	-	B3-20	0.90	0.15	-	C1-4	0.90	0.14	-	2801tm2	0.80	2.47	+	DQ1-9	0.90	3.46	+	DQ1-9	0.90	3.46	+
2	A3-11	0.70	2.42	+	B5-15	0.80	3.37	+	C3-3	0.60	0.21	-	1002tm1R	0.80	0.15	-	DQ3-7	0.80	0.11	-	DQ3-7	0.80	0.11	-
3	A4-0	0.90	0.13	-	B6-83	0.90	0.18	-	C4-43	0.90	0.16	-	DR3-1	0.70	0.10	-	DQ4-8	0.80	0.09	-	DQ4-8	0.80	0.09	-
4	A5-26	0.70	0.16	-	B7-6	0.90	1.82	+	C5-1	0.70	0.15	-	1004tm1R	0.80	0.11	-	DQ20-6	0.70	2.99	+	DQ20-6	0.70	2.99	+
5	A6-0	0.70	0.13	-	B9-22	0.80	0.17	-	C6-18	0.70	0.28	-	1005-1	0.70	0.14	-	DQ6-49	0.80	2.51	+	DQ6-49	0.80	2.51	+
6	A202T	0.70	2.99	+	B10-21	0.70	3.00	+	C25-3	0.70	3.04	+	1006tm1R	0.70	0.13	-	DQ7-18	0.80	0.14	-	DQ7-18	0.80	0.14	-
7	A12-20	0.80	0.22	-	B13-5	0.80	2.86	+	C8-8	0.80	0.26	-	1007-1	0.70	0.359	+	DQ8-1	0.80	0.13	-	DQ8-1	0.80	0.13	-
8	A13-29L	0.80	0.23	-	B21JW	0.70	0.15	-	C9-79	0.90	3.38	+	1008tm1R	0.70	0.12	-	DQ9-44	0.80	0.18	-	DQ9-44	0.80	0.18	-
9	A15-13	0.70	0.21	-	B21W	0.80	3.50	+	C10-38	0.90	0.57	-	MHD17-4	0.90	0.22	-	DQ10N-6	0.90	0.14	-	DQ10N-6	0.90	0.14	-
10	A16-14	0.70	2.83	+	B2H3TRM	0.80	0.12	-	C11-18	1.10	0.16	-	15mtk1-2	1.00	0.16	-	DQ12N-8	1.40	0.27	-	DQ12N-8	1.40	0.27	-
11	A19-12L	1.00	0.13	-	B20-8	0.80	0.15	-	C12-2	1.10	0.22	-	5703Jm7	0.70	0.11	-	DQ13-9	0.70	0.11	-	DQ13-9	0.70	0.11	-
12	A20-35	0.70	0.25	-	B24-65	0.80	1.35	+	C13-5	0.90	3.35	+	DR22-4	0.80	0.11	-	DQ14-14	0.90	0.19	-	DQ14-14	0.90	0.19	-
13	A22-1	0.80	0.17	-	B25-9	0.80	3.32	+	C14-3	1.30	0.31	-	7004-6	0.80	0.11	-	DQ15-9	0.80	2.10	+	DQ15-9	0.80	2.10	+
14	A24-29	0.70	3.00	+	B27-5	1.20	0.46	-	C15-131	0.70	3.10	+	DR28-22	0.80	0.09	-	DQ16-8	1.00	1.08	+	DQ16-8	1.00	1.08	+
15	A25-14	0.90	0.23	-	B29-3	0.70	0.10	-	C16-70	0.80	0.26	-	DR30-2	0.70	0.13	-	DQ17-13	1.20	1.28	+	DQ17-13	1.20	1.28	+
16	A28-37	1.00	3.16	+	B30-21	0.80	0.29	-	C17-7	0.70	0.13	-	MHD14N-8	0.90	0.12	-	DQ18-12	0.80	0.13	-	DQ18-12	0.80	0.13	-
17	A29-16	0.70	0.15	-	B38-23	1.00	2.06	+	C18-1	1.50	0.13	-	MHD6-210	0.70	2.14	+	DQ19-34	1.20	1.72	+	DQ19-34	1.20	1.72	+
18	A33-14	1.00	0.19	-	B41-5	0.70	0.16	-	C19N-67	0.70	0.32	-	MHD9-4	0.70	0.12	-								
19	A34-36	0.70	3.39	+	B46-241	0.90	2.74	+	C20-7	0.70	3.30	+	MHD11-55	0.70	0.13	-								
20	A35-6	0.70	0.17	-	B51-46	0.80	0.18	-	C21-12	0.60	2.74	+	MHD12-25	0.90	2.66	+								
21	A36-0	0.70	2.66	+	B52-5	0.90	0.18	-	C22-8	0.80	0.53	-	10XYJ-3	0.70	0.12	-								
22	A38-29	0.70	0.15	-	B58B8T	1.00	3.24	+	C23-23	0.80	0.19	-	DR23-32	0.80	0.13	-								
23	A39-7	0.70	1.63	+	B55-5	0.80	0.23	-	C24-8	0.80	1.35	+	MHD13-18	0.70	2.04	+								
24	A40-8	0.90	2.51	+	B57-14	0.90	0.11	-					DR34-116	0.60	2.87	+								

陽性シグナルを下線で示した。

パネル 1: A *2402/20, A *3101/2, B *3501, B *5201, Cw *0303, Cw *1202, DRB1 *1501/02, DRB1 *0404/05/10, DQB1 *0402, DQB1 *0601

パネル 2: A *1101/02, A *2402/20, B *0702/05//+, B *4002/03, Cw *0301, DRB1 *0101, DRB1 *0901, DQB1 *0303, DQB1 *0501

Simultaneous HLA genotyping using the microtiter plate hybridization-2 method in Japanese population.

Masaki Matsushita¹⁾, Takahiro Ogawa¹⁾, Tatsuya Matsumi²⁾, Masaki Nagato¹⁾, Takanori Oka¹⁾, Shintaro Kawai¹⁾

1) Institute for Medical Research, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroshima, Japan

2) Diagnostic Sales Department, Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd., Hiroshima, Japan

Summary: We have established a simple and economical HLA genotyping method using the microtiter plate hybridization (MPH), which enables us to perform simultaneous DNA typing of HLA-A, -B, -C, -DRB1 and -DQB1 loci using the same PCR parameters and hybridization conditions. To discriminate HLA alleles at serological group existing in Japanese population, 24, 24, 23, 24, and 17 motif sequences were selected for HLA-A, -B, -C, -DRB1, and DQB1 genes, respectively. Using this method, 32 HLA loci can be typed within 5 h by one technologist.