〔原著論文〕 PCR-MPH low resolution plateにおいて 未確定となるHLA-DR型についての検討

河賀 泰子, 内田 純子, 徳永 和夫, 佐藤 博行, 前田 義章

福岡県赤十字血液センター, 検査課

(平成9年2月3日 受付)

要約

PCR-MPH (micro plate hybridization) low resolution plate は PCR により増幅された DNA を用い、16 種類のプローブに対する反応パターンにより HLA-DR タイピングを行う方法で、多量検体を短時間で処理できる良い方法である。しかし、DR 13/ー、DR 11/ー、DR 1403/ーと判定された場合、それらの検体においては DR 14 の有無は未確定である事も知られている。

この度 PCR-MPH low resolution plate を用いて1391検体の HLA-DR をタイピングしたが、上述の DR 型は60例(4.3%)存在した。その内訳は DR 13/ーが42検体、DR 11/ーが8検体、DR 1403/ーが10検体であった。PCR-SSCP により、それらの検体における DR 14 の有無の確認及び DRB1 のアレルの判定を行った。その結果、DR 13/ーの検体におけるアレルは DRB1*1302/ー、DRB1*1302/DRB1*1401、DRB1*1302/DRB1*1405、DRB1*1302/DRB1*1406と判定され、各々8例、18例、9例、7例存在した。DR 11/ーの検体は DRB1*1101/ーが1例、DRB1*1101/DRB1*1401が5例、DRB1*1101/DRB1*1405が1例、DRB1*1101/DRB1*1406が1例判定された。DR 1403/ーの検体においては、DRB1*1401/ーが1例、DRB1*1403/DRB1*1401が6例、DRB1*1403/DRB1*1405が3例であった。

結果として DRB1*14 のアレルは、その存在が未確認であった60検体中50検体(83%)に見出された為、確認試験の必要性を認識した。

キーワード：

PCR-MPH, PCR-SSCP

はじめに

PCR-MPH low resolution plate (1) (湧永製薬以下 MPH low とする) は多量検体を短時間で処理できる HLA DR タイピングの為の良い方法で、PCR により増幅された DNA の、16種類のプローブに対する反応パターンにより HLA 型を決定する。しかし DR 13/ー、DR 11/ー、DR 1403/ーの結果が得られた場合は、DR 14 の有無は確認されない。この度 MPH low を用いて HLA-DR をタイピングし、DR 13/ー、DR 11/ー及び DR 1403/ーとタイピングされた検体について DR 14 の存在とアレルの判定を

試みた。

材料と方法

1. 対象

1995年4月から1996年7月までの期間で、1391検体について PCR-MPH low により HLA-DR のタイピングを実施した。うち今回の検査対象となる DR 14の存在が未確認と考えられる DR 型とその検体数は、DR 13/ーが42例、DR 11/ーが8例、DR 1403/ーが10例で計60検体であった。

2. PCR-SSCP法

PCR は 11th IHW で用いられた DRBAMP- 3 と DRBAMP-B のプライマーを使用し、94℃ 5分、(94℃ 30秒-62℃ 30秒-72℃ 60秒)を35サイクル、72℃ 5分、4℃ホールドの条件で行った。

次いで7 μ l のホルムアミドダイに PCR 産物 1. μ l を加えた各々の検体を、96℃で5分間加熱処理後、氷水に5分間浸し、10%ポリアクリルアミドゲル(%C=2%)を用いて30mAで1時間、電気泳動を行った後、ゲルを銀染色(第一化学)し、判定した(2)。

結果

PCR-SSCP 法による判定結果

各アリの泳動パターンを図1に示す。パターンの違いによりアリの判定が可能である事がわかる。DR 13/-の42例について PCR-SSCP 法を用いた検査結果は、DRB1*1302/-は8例、DRB1*1302/DRB1*1401は18例、DRB1*1302/DRB1*

図1 PCR-SSCPによる各アリの泳動パターン

1405は9例、DRB1*1302/DRB1*1406は7例であった(図2)。

DR 11/-の8例については、DRB1*1101/-は1例、DRB1*1101/DRB1*1401は5例、DRB1*1101/DRB1*1405は1例、DRB1*1101/DRB1*1406は1例(図3)、DR 1403/-の10例についてはDRB1*1403/-は1例、DRB1*1403/DRB1*1401は6例、DRB1*1403/DRB1*1405は3例(図4)であった。

図2 DR13/- 検体のPCR-SSCP検査結果

図3 DR11/- 検体のPCR-SSCP検査結果

図4 DR1403/- 検体のPCR-SSCP検査結果

考察

MPH low により DR13/－, DR11/－, DR1403/－の判定が得られた場合, DRB1*14のアリルは, 60検体中 50 検体 (83 %) に見出された為, 確認試験の必要性を認識した.

参考文献

- 1) 前川尻真司, 川井信太郎, 徳永勝士ら : PCR-MPH 法による簡便な HLA class II 遺伝子のタイピング. *MHC & IRS* **1** : 57-58, 1994.
- 2) Bannai M, Mazda T, Tokunaga K, *et al.* : DNA single strand conformation polymorphism method to distinguish DR4 alleles. *Lancet* **341** : 769, 1993.

Analysis of HLA-DR types which were not confirmed by PCR-MPH low resolution plate.

Yasuko Kawaga, Junko Uchida, Kazuo Tokunaga, Hiroyuki Sato, Yoshiaki Maeda
Fukuoka Red Cross Blood Center, Fukuoka, Japan.

Summary

PCR-MPH (micro plate hybridization) low resolution plate provided with 16 SSOs is a convenient DNA-based typing method for HLA-DR. A large number of samples were treated to define their HLA-DR types using this method in a short term.

However it is known that some identifications like DR 13 /－, DR 11 /－ and DR 1403 /－ are unable to ascertain whether DR 14 antigen is present or not. Of 1391 typed samples, we had the 60 samples to be not ascertained (4.3 %). The details of them were 42 DR13 /－, 8 DR11 /－ and 10 DR1403 /－. By PCR-SSCP we confirmed the existences of DR 14 antigens in these samples and their DRB1 alleles consequently. The DR 13 /－ samples were identified with DRB1*1302 /－, DRB1*1302 /DRB1*1401, DRB1*1302 /DRB1*1405 and DRB1*1302 /DRB1*1406. The numbers of them were 8, 18, 9 and 7 respectively. The DR 11 /－ samples were typed to, one DRB1*1101 /－, five DRB1*1101 /DRB1*1401, one DRB1*1101 /DRB1*1405 and one DRB1*1101 /DRB1*1406. The DR1403 /－ samples were defined, one DRB1*1403 /－, six DRB1*1403 /DRB1*1401 and three DRB1*1403 /DRB1*1405.

As a result of this study, DRB1*14 antigens existed in 50 samples (83 %) and we recognized the necessity of further testing in regard to the unconfirmed DR types from the PCR-MPH low resolution plate.

Key words :

PCR-MPH, PCR-SSCP