



A Rapid and Sensitive Method for HLA-DRB1 Typing by Acridinium-Ester-Labeled DNA Probes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松原, 亨一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1418

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 141号	学位授与年月日	平成 5年 3月 2日
氏 名	松 原 亨 一		
論文題目	A Rapid and Sensitive Method for HLA-DRB 1 Typing by Acridinium-Ester-Labeled DNA Probes (アクリジニウムエステルラベル DNA.プローブによる迅速高感度 な HLA-DRB1 タイピング法)		

医学博士 松原 亨 一

論文題目

A Rapid and Sensitive Method for HLA-DRB1 Typing by Acridinium-Ester-Labeled DNA Probes

(アクリジニウムエステルラベル DNA プローブによる迅速高感度なHLA-DRB1 タイピング法)

論文の内容の要旨

近年、優れた免疫抑制剤が開発され、臓器移植の成功率が飛躍的に高まっている。しかし、移植においてはドナーとレシピエントのヒト主要組織適合抗原 (HLA) の一致が必要で、特に HLA-DR 抗原の一致が重要である。DR 抗原のタイピング法としては、細胞表面に発現している DR 抗原を抗血清により識別する方法が一般的ではあるが、正確性や解析力が十分とはいえず新しい方法が望まれている。

一方、ここ数年 DR 抗原を規定する遺伝子の差異を直接解析しタイピングを行う試みがなされてきたが、まだ実用には至っていない。我々は、DNA プローブに化学発光物質であるアクリジニウムエステル (AE) をラベルして、迅速高感度な HLA-DR タイピング法の確立を目指して検討を行った。

AE は、強い発光能を持つと同時に DNA の二重螺旋のなかで安定化する性質がある。プローブにラベルされた AE はターゲットが相補的な場合、二重螺旋中で安定化するが、相補的でない場合は二重螺旋に歪みが生じその中には入らない。この状態で加水分解液を加えると前者は二重螺旋の間で保護されるが、後者はエステル結合が切れ発光能を失う。一定時間後に過酸化水素を加え、残存する化学発光量を測定すると前者と後者の間に明らかな差が生じる。このことから本法は HPA 法 (hybridization protection assay) と呼ばれる。我々は、HPA 法が HLA-DR のタイピングに適していると考え、この方法により一塩基のミスマッチの検出が可能か検討した。

まず、血清学的方法では型判定の不可能である DR4 のサブタイピングが HPA 法で行えるか検討した。すなわち DR4 のサブタイプであり一塩基しか差異のない Dw4 と Dw14 がこの方法で識別できるか検討した。Dw4 に特徴的な配列の相補鎖を DNA 合成機で合成し AE ラベルした。これを各々の配列をもつ合成オリゴヌクレオチドと一定時間ハイブリダイズさせた後加水分解液を加え、各々の化学発光の減衰速度を比較した。その結果、プローブと完全に相補的なオリゴヌクレオチド Dw4 の化学発光の半減期は25分、一塩基違う Dw14 は7分と、一塩基の違いで化学発光の減衰速度に大きな差が認められた。さらに B cell lines から抽出増幅したターゲットを用いた検討から、HPA 法によりこの二種のサブタイプが明瞭に識別できた。加えて、ハイブリダイズ10分、加水分解10分で陽性と陰性の差が十分識別できることが確認された。

次に一般的なプローブ法である dot blotting 法と感度の比較を行った。健康人末梢血より抽出した DNA を PCR 法で増幅し、その増幅プロダクト 1 μ l を2段階希釈して、本法と dot blotting 法を同時に行ったところ、二法の感度はほぼ同程度であった。以上の基礎検討から本法は HLA-DR のタイピングに応用可能であることが示唆された。

そこで、DR の全てのタイプを網羅するプローブを作製し、DR 遺伝子をホモにもつ B cell lines の DNA を PCR 法で増幅したプロダクトを用いて評価を行った。すなわち100種類以上にのぼるプローブの検討を行い、陽性と陰性の発光量の差が10倍以上になるプローブを13種選定した。この13種のプローブを用いることで血清学的方法に比べ、より詳細な DR のタイピングが可能となった。

さらに、この13種のプローブを用い健康人80人の DR のタイピングを行った。その結果を PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法の結果と比較したところ100%一致していた。

以上、化学発光物質標識 DNA プローブによる HLA-DR のタイピング法を確立した。この方法により、従来の血清学的方法では不可能であった型判定が詳細にできかつ、精度も格段に向上した。さらにこの方法は、dot blotting 法と同等の高感度を有し、増幅後30分以内に DR の型判定を行うことが可能である。したがってこの方法により、一般の検査室での DR の型判定が正確かつ迅速に行え、特に死体腎移植などの緊急の場合には有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

シクロスポリン等の優れた免疫抑制剤が開発されたことより、各種臓器移植が世界的に盛んに行われる様になってきた。

臓器移植の成功の鍵となるのが HLA タイプの一致であり、特に HLA の A、B ならびに DR タイプが一致する必要がある。それにはまず、それらの HLA 各タイプの判定を正確かつ迅速に、しかも非アイソトープ法により手軽に行う必要がある。従来 DR 抗原を抗血清により判別する方法が行われてきたが、サブタイプを判別する正確さに問題点があり、その判定には熟練を要し、しかも操作に長時間を要する。

それらの問題点を解決するため、申請者が本研究で開発した方法の原理は、DNA プローブに化学発光物質であるアクリジニウムエステルをラベルし、最終的にはルミノメータで測定するもので、操作の概略は次のとおりである。

ヒト白血球から常法により DNA を抽出し、PCR 法にて HLA 遺伝子部分を増幅する。その試料を予めアクリジニウムエステルでラベルしたプローブとハイブリダイズし、さらにアルカリ処理により、ミスマッチしているプローブや未反応のプローブのアクリジニウムエステル結合を切断し失活させる。この試料に化学発光検出試薬を加え、ルミノメータで検出し減衰を測定する。プローブが完全にマッチした部分に挿入されたアクリジニウムのみが化学発光を生じ、HLA 遺伝子のタイピングを可能にするものである。本法では PCR 増幅後30分以内に型判定を行うことが可能である。

このようにして確立した測定法を用い、DR 4 のサブタイプであり一塩基しか違いのない Dw 4 と Dw 14 が識別できるか否かを検討した。その結果、プローブと完全に相補的なオリゴヌクレオチド Dw 4 の化学発光の半減期は25分で、一塩基しか違わない Dw 14 は7分であり、減衰速度に大きな差が認められ両タイプが明瞭に識別できた。

次に、一般的なアイソトープを用いるプローブ法である dot blotting 法と感度の比較を行ったところ、本法の感度はそれと同等か、それ以上であった。さらに、DR の全てのタイプを判定するために100種類以

上にのぼるプローブを作製し、陽性と陰性の発光量の差が10倍以上になるプローブを13種選定し、健常人80人のDRのタイピングを行った。その結果をPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法と比較したところ、完全に一致することを確認した。

本研究の独創性は、1989年に Arnold らによって開発された HPA (hybridization protection assay) 法を HLA-DR 遺伝子タイピングに初めて応用し、高感度で、高精度しかも迅速な DR 型判定法を確立したことにある。この方法を用いれば一般の検査室での DR 各サブタイプの判定が可能となり、その有用性は大変高いものとして評価された。

以上の研究発表に際し、次のような質疑が行われた。

- 1) T細胞とB細胞の分離方法と分離のメカニズム
- 2) 本法における化学発光測定の実理
- 3) アミノリンカはプローブ構造中のどこに入れるか
- 4) プローブの長さは何故20～25塩基であるか
- 5) false positive 反応が起こる原因について
- 6) 本法は爪や毛髪に適用可能か
- 7) 本法の改良点について

これらの質問に対し申請者の回答は適切であり、問題点も充分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 助教授 鈴木 修

副査 教授 瀧川 雅浩 副査 教授 山下 昭

副査 助教授 小田 敏明 副査 講師 中辻 理子