

Hybridization protection assay with a new amplification method : a simple and practical method for HLA typing on microtiter plates

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1543

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 266号	学位授与年月日	平成 9年12月26日
氏名	小林 明		
論文題目	<p>Hybridization protection assay with a new amplification method : a simple and practical method for HLA typing on microtiter plates (新しい RNA 増幅法による HLA タイピング : マイクロタイタープレート上で行うシンプルで実用的なHLAタイピング法)</p>		

博士(医学) 小林 明

論文題目

Hybridization protection assay with a new amplification method: a simple and practical method for HLA typing on microtiter plates

(新しいRNA増幅法によるHLAタイピング: マイクロタイタープレート上で行うシンプルで実用的なHLAタイピング法)

論文内容の要旨

〔目的〕

HLA class II 遺伝子の塩基配列が明らかになり、DNAタイピングが可能になった。これまでにさまざまなDNAタイピング法が研究されてきた。しかしこれらの方法は、制限酵素処理や電気泳動、DNAプローブ使用後の洗いのステップを含み、複雑で間違いが起りやすく時間がかかるという難点を抱えていた。我々はこれらの点を克服すべく、HPA法 (hybridization protection assay) という、化学発光物質でラベルしたDNAプローブを用いる検出法と、TMA法 (transcription mediated amplification) という、DNAを鋳型として増幅し大量のRNA鎖を得る増幅法を検討して、HLA-DR、-DQ、-DPタイピングに応用することに成功した。また化学発光の検出をマイクロプレート上で行い、大幅な省力化を達成した。

〔方法〕

HPA法の原理は、以下のようである。DNAプローブは、化学発光物質AE (アクリジニウムエステル) を結合しておく。このプローブと増幅されたRNAを液相中で20分間60℃でハイブリダイズさせる。プローブと標的分子が完全に相補的なときは、AEが挟み込まれて安定化する。次に塩基性の加水分解試薬を加えて8分間60℃で加温した後冷却する。最後に化学発光用マイクロプレートリーダーを用い、塩基性条件下で過酸化水素を加えると安定化されて残ったAEは発光する。HPA法は、ほかのDNAプローブ法では必須である複雑な洗いの操作が不要であり、また1塩基のミスマッチを容易に検出できるという際立った特徴を持つ。操作時間は約30分である。DRタイピングに、16種類のプローブを用い、血清学レベルのタイピングを、DQは20プローブ、DPは16プローブでアレルレベルのタイピングを行うことができた。

TMA法では、1対のプライマーと逆転写酵素、RNA合成酵素を使用する。まず、末梢の白血球を集めてグアニジン溶液で溶解し、エタノール沈殿を行ってゲノムDNAを抽出する。このDNAとプライマーそのほかを混合し、逆転写酵素とRNA合成酵素を作用させると大量のRNA鎖ができる。このRNAが、AEラベルプローブの標的分子となる。操作時間は約5時間である。DR用、DQ用、DP用にそれぞれプライマーセットを作り、増幅し、RNAを得て、タイピングに使用した。

〔結果〕

9施設でこの方法を用いて、DR、DQ、DPタイピングを行ったところ、DR、DP、DQともに良好な結果が得られ、DR、DQは、血清学的方法による結果と矛盾なく一致した。今回使用したプローブには、1塩基ミスマッチを識別するためのプローブが含まれていたが、陽性、陰性をはっきり識別できた。DRは、16プローブで、血清学的レベル、DQ、DPでは、アレルを決定できた。DRでも、あと8個のプロー

ブを追加すればさらに詳しいレベルのタイピングが可能となり、グループ特異的な増幅と組み合わせればアレルタイピングも可能となるものと考えられる。また、HPAをマイクロプレート上でを行い、プレートリーダーで自動測定することにより、手作業の部分が大幅に減り、時間も短縮された。また、HPAはマイクロプレートに試薬を順次加えて一定時間一定温度で加温するだけなので、熟練度が関与する余地が非常に小さく、各施設での結果に差はなく、その分データの信頼性が向上した。

〔結論〕

以上、TMA-HPA法による、DRタイピング、DQ、DPアレルタイピングを確立した。この方法によれば、他のDNA法に比べて簡単な操作によって短時間で、再現性および信頼性の高いデータが得られた。また自動機器により省力化されているため大量検体処理が可能だった。よって、骨髄移植、臓器移植の患者やドナーのタイピングまた、HLAと疾患感受性の研究に十分応用できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

HLA (human leukocyte antigen) は高度の遺伝的多型を示すことがよく知られている。HLAクラスII遺伝子のDNAタイピングには、従来PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) が用いられることが多かったが、申請者らは1992年 (Matsubara K, et al. : Human Immunol. 35:132, 1992) にHPA (hybridization protection assay) 法を同遺伝子のタイピングに応用することに成功した。HPA法というのは化学発光物質であるアクリジニウムエステルで標識したDNAプローブと標的DNA (ないしRNA) をハイブリダイズさせたのち、未反応およびミスマッチのある部分をテトラボレート (tetraborate) バッファーで加水分解させ完全にマッチしたプローブのみを発光させるものである。

今回申請者らはさらに1) 検出操作をマイクロプレート上で行う、2) 検体をTMA (transcription-mediated amplification) 法によって増幅するなどの改良を加え、臨床応用の便を図る工夫をした。TMA法というのは、第1、第2のプライマーを用いることによってRNA合成の鋳型となる2本鎖DNAを合成し、これに対して転写を行わせ約 10^7 倍の一本鎖RNAを生成させるものである。これとHPA法を組み合わせたものがTMA-HPA法である。申請者らはこの方法をHLAクラスIIの多型性領域に応用した。血液5試料について1塩基差を検出する16種のプローブを用いてHLA-DRのタイピングを行った結果、検体それぞれに特異的なパターンをえた。20種のプローブを用いてHLA-DQの、16種のプローブを用いてHLA-DPのタイピングを行った結果もそれぞれに異なったパターンを与えた。また、全行程を7時間で終わることが可能であることがわかった。さらに、応用研究として申請者らは本法でサルコイドーシス患者のHLA-DRB1、-DRB1、-DRB1のタイピングを行った。その結果、患者群と健常者群の間に有意の差を認めた。

本論文に関して以下の試問を行った。

- 1) 従来のタイピング法との違いについて
- 2) AE (acridinium ester) 標識プローブの性質と利点について
- 3) タイピングの対象となる試料の調製法
- 4) SSO (sequence-specific oligonucleotide) の種類について

- 5) RLU (relative light unit) の算出法と基準の取り方
- 6) カットオフ値 (cut-off value) とは
- 7) AE発光の測定条件について
- 8) ミスマッチしたプローブの発光の程度について
- 9) 1 アッセイに必要なDNA量について
- 10) 加水分解試薬について
- 11) AEのインターカレーションの機構について
- 12) TMA法の応用の限界について
- 13) 結果の解釈について

これらの試問に対して申請者は適切に解答し、問題点も十分理解していたので、本論文は博士（医学）の学位論文としてふさわしいものであると論文審査担当者全員が一致して評価した。

論文審査担当者	主査	教授	藤田	道也				
	副査	教授	鈴木	修	副査	教授	菅野	剛史
	副査	助教授	小田	敏明	副査	講師	中辻	理子