

## Nomenclature for factors of the HLA system, 2002 を対象とした PCR-RFLP 法による HLA-DRB1, DQB1 遺伝子タイピング

烏谷竜哉 竹内潤子 奥山正明 高見俊才 浅井忠男 井上博雄

### HLA-DRB1 and DQB1 genotyping by PCR-RFLP method - Nomenclature for factors of the HLA system, 2002 -

Tatsuya KARASUDANI, Junko TAKEUCHI, Masaaki OKUYAMA,  
Syunsai TAKAMI, Tadao ASAI, Hiroo INOUE

Twenty-four pairs for DRB1 and six pairs for DQB1 of published PCR primers were evaluated for group-specific PCR-RFLP method of HLA class II genotyping. We present a modified PCR-RFLP method for the HLA-DRB1 and DQB1 alleles reported in Nomenclature for factors of the HLA systems, 2002. DRB1 alleles were amplified using eight primer pairs (DR1/2/7, DR4V, DR4G, DR8, DR12, DR52V, DR9, DR10) located in the second exon, and using one pair (DR52 associated group) located in the third exon. DQB1 alleles were amplified using two primer pairs (DQ1, DQ2/3/4) located in the second exon, and using one pair located in the third exon. Generic RFLP analysis was carried out to distinguish among alleles that were observed in the Japanese population, and then allele specific RFLP analysis was carried out as needed for high-resolution typing. PCR-RFLP remains an effective method for HLA-DRB1 and DQB1 genotyping, which can cover from medium resolution to high resolution.

**Keywords :** PCR-RFLP, HLA-DRB1, HLA-DQB1, genotyping

### はじめに

HLA 抗原は、骨髄移植や臓器移植の際のドナーとレシピエントの組織適合性を評価する因子として、重要な役割を担っている。HLA 検査が開始された当初は、妊婦血清を用いた血清学的手法で検査が実施されていたが、1985 年に PCR 法が開発されて以降、血清学的手法で判定が困難な HLA クラス II 抗原の検索には、他の分野に先駆けて PCR 法が積極的に導入され、PCR-RFLP 法<sup>1,2)</sup>、PCR-SSOP 法<sup>3,4)</sup>、PCR-SSP 法<sup>5,6)</sup>等さまざまな検査法が開発されてきた。現在では、PCR 法を用いてクラス I 及びクラス II 抗原を同時に短時間で解析する検査キットも数多く販売されているが、そのほとんどは血清学的レベル (low-resolution) の解析を目的としたものであり、骨髄移植の際に要求されるアレルレベル (high-resolution) の解析を行うためには PCR-SBT 法<sup>7,8)</sup>や PCR-SSCP<sup>9,10)</sup>法等の複数の方法を組み合わせた高度な解析が必要となってくる。

数ある PCR 法のうち、PCR-RFLP 法は HLA 領域において遺伝子タイピングの普及が始まった当初から簡便で高精度な結果が再現性良く得られることから、特に

クラス II 抗原の解析に多くの研究室や検査室で利用されてきた。しかし、WHO の HLA 命名委員会で公認されているアレル数は年々飛躍的に増加しており、PCR-RFLP 法を用いてアレルレベルのタイピングを行うにはプライマーや使用する制限酵素を随時更新していく必要がある。組織適合性学会では、HLA 検査施設の技術向上を図るため年 11 回 HLA クオリティコントロールワークショップ (QCWS) を開催しており、当所は平成 12 年の第 4 回 QCWS 以降 PCR-RFLP 法の解析を担当しているが<sup>11,12)</sup>、各施設で解析の解像度は様々であり、データのアップデート等の対応に苦慮している状況が伺える<sup>13)</sup>。そこで今回、Nomenclature for factors of the HLA system, 2002<sup>14)</sup>で公認されている DRB1, DQB1 アレルを対象とし、日本人に高頻度に見られるアレルを効率的に解析できるよう、グループ特異的プライマーや制限酵素の組み合わせに改良を加えたのでその概要を報告する。

### 方 法

1. グループ特異的 PCR の比較と使用プライマーの選定

Nomenclature for factors of the HLA system, 2002 で公認されたアレル (DRB1 : 307 アレル, DQB1 :

51 アリルのシーケンスは、European Bioinformatics Institute (EBI) の IMGT / HLA データベースからダウンロードしたものを使用した。

増幅領域の比較を行ったグループ特異的 PCR - RFLP 法は、平成 14 年 HLA - QCWS の参加施設で実際に使用されていた以下の方法<sup>11)</sup>とした。すなわち、DRB1 では Ota ら<sup>1)</sup>の modified PCR - RFLP 法、成瀬ら<sup>15)</sup>、小原ら<sup>16)</sup>の改良法、Mitsunaga ら<sup>17)</sup>の multiplex ARMS - PCR - RFLP 法、兼重ら<sup>18)</sup>の 1995 年版 PCR - RFLP 法を対象とし、DQB1 では Nomura ら<sup>2)</sup>の modified PCR - RFLP 法、Mitsunaga ら<sup>19)</sup>の group specific PCR - RFLP 法、Sengar ら<sup>20)</sup>の comprehensive PCR - RFLP 法を対象とした。

今回新規に作成したプライマーは、Web 上でホワイトヘッド研究所 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) が提供している Primer 3 を利用して選択し、The National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Blast N にて特異性を確認した。増幅の確認に用いたアリル既知のパネルには、過去に提供された HLA - QCWS のパネル DNA を使用し、通常のプロトコール<sup>21)</sup>で良好に増幅されることを確認した。

## 2. RFLP パターンの解析

予想されるグループ特異的 PCR 増幅産物の塩基配列は、フリーソフトの alignment editor である GeneDoc を用い、データベースからダウンロードしたファイルを加工して使用した。各アリルの制限酵素切断部位及びフラグメントパターンの解析には(株)ゼネティックスの GENETYX 6.1 を使用した。ヘテロ接合体の RFLP パターンはマイクロソフト社のエクセル 2000 を用いて解析した。

日本人におけるアリル頻度は奥山ら<sup>22)</sup>の報告によった

が、Hashimoto ら<sup>23)</sup>や中島ら<sup>24)</sup>が報告した稀なアリルも含めて検討を行った。アリルの表記法については、日本組織適合性学会の HLA 標準化委員会が提案する「Ambiguity の記載方法の原則について」<sup>25)</sup>に従うこととしたが、同義置換のアリルが異なる RFLP パターンとなる場合があるため、同義置換のアリルを ( ) 内に記載することとした。(例)DRB1\*04051 と \*04053 を DRB1\*0405 (1,3) と記載した。

## 結果及び考察

### 1. グループ特異的 PCR の比較と使用プライマーの選定

現在、国内の各検査施設で DRB1 及び DQB1 アリルの解析に使用されているグループ特異的 PCR を比較するため、過去に報告された主な PCR - RFLP 法で用いられたプライマーの塩基配列から、各プライマー対の増幅領域を比較検討した。

#### 1) DRB1

DRB1 では DR1, DR2, DR4, DR52 (DR3,5,6,8) 関連, DR7, DR9, DR10 の 7 つのグループに分けて増幅する方法が多数を占めたが、兼重ら<sup>18)</sup>は DR52 関連アリルを更に 2 つのグループに分ける方法を採用していた。

#### a) DR1, DR2, DR7 グループ

DR1, DR2, DR7 の各グループの増幅領域を図 1 に示した。アンチセンスプライマーは各アリルグループについて全ての報告で共通のプライマーが使用されていた。

DR1 (DRB1\*01) グループのセンスプライマーはコドン 25 - 32 を認識するものが 2 種類、コドン 7 - 15 を認識するものが 3 種類あった。日本人においては通常 DRB1\*0101 のみが検出されるが、2001 年に追加された DRB1\*0107 とはコドン 10 で 1 塩基の置換があるのみで、

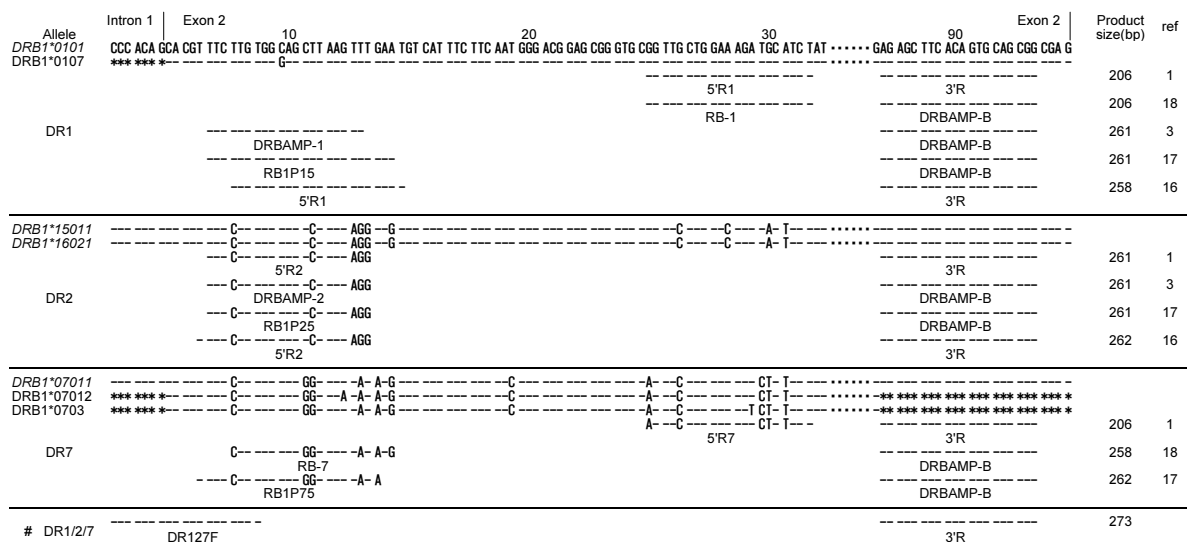


図 1 DR1, DR2, DR7 (DR1 / 2 / 7) グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域  
斜体は日本人に見出されるアリル、#は今回用いたプライマー対を表す。以下の図も同様。

過去に報告のあったプライマーはすべて DRB1\*0101 と \*0107 とが区別できないことがわかった。この塩基置換部位の上流には DR1 グループ特有のモチーフがないので DRB1\*0101 と \*0107 が解析可能な DR1 グループ特異的 PCR は困難と考えられた。

DR2 (DRB1\*15, 16) グループでは全て共通のプライマーが使用されていた。

DR7 (DRB1\*07) グループのセンスプライマーにはコドン 25-32 を認識するものが 1 種類、コドン 6-14 を認識するものが 2 種類あった。日本人に通常見られる DRB1\*0701 にはコドン 12 に同義置換があるが、この置換を特に区別する必要がないことから、どのプライマーを使用しても問題なく解析可能と考えられた。

今回、イントロン 1 からコドン 9 の領域を認識するセンスプライマー DR127F を新たに設計し、DR1, DR2, DR7 (DR1 / 2 / 7) グループを共通に増幅する方法を検討した。このプライマーでは従来の PCR で可能だった血清学的な分類が PCR の時点で判断できない欠点があるが、DR1 グループ特異的 PCR では解析できない DRB1\*0101 と \*0107 の区別が可能となる利点がある。

#### b) DR4 グループ

既報ではセンス、アンチセンスプライマーともにすべて同じプライマーを使用していた(図 2)。DR4(DRB1\*

04) グループには日本人で最も高頻度 (14.0%) に見られる DRB1\*0405 の他に、DRB1\*0406 (4.0%), \*0403 (2.4%), \*0410 (1.7%) 等比較的頻度の高いアレルが多数存在するため、増幅産物がヘテロ接合体となる可能性が他のグループよりも高い。ヘテロ接合体は増幅後の RFLP パターンが複雑となる結果、誤判定を引き起こす大きな要因の一つと考えられていることから、今回、アンチセンスプライマーにコドン 86 の GGT(Val) と GTG (Gly) を区別する 2 種類のプライマー 3'R-86V, 3'R-86G を用いてそれぞれ DR4V, DR4G の 2 つのグループに分ける方法を採用した。また、従来のアンチセンスプライマー及び今回のアンチセンスプライマーともに、日本人でごく稀に見られる DRB1\*0404 と \*0423 とを区別できないため、エクソン 2 の 3' 側末端のコドン 94 に位置するアンチセンスプライマー 3R-268G を新たに設計した。このプライマーは DRB1 の全てのアレルに共通の配列を認識しているため、従来のアンチセンスプライマー 3'R や DRBAMP-B の代わりに使用することも可能であり、DR4 以外の解析にも応用可能と考えられる。

#### c) DR52 関連グループ

DR52 関連グループの増幅領域を図 3 に示した。従来の PCR - RFLP 法では、DR 3,5,6,8 (DRB1\*03,\*08,\*11,\*12,\*13,\*14) を DR52 関連グループとして

Allele	Exon 2	10	90	Exon 2	Intron 2	Product size(bp)	ref
DRB1*0101	CA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA	GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG CCG CGA GGT GAG CGC GGC GCG					
DRB1*04051	-----GA-----G-----A CA-----G						
DRB1*0404	-----GA-----G-----A CA-----G						
DRB1*0423	-----GA-----G-----A CA-----G						
	-----GA-----G-----A C					263	1
	5'R4			3'R			
DR4	-----GA-----G-----A C					263	3
	DRBAMP-4			DRBAMP-B			
	-----GA-----G-----A C					264	17
	RB1P45			DRBAMP-B			
#	DR4V	-----GA-----G-----A C				260	
	5'R4			3'R-86V			
#	DR4G	-----GA-----G-----A C		TG		260	
	5'R4			3'R-86G			
#	DR4	-----GA-----G-----A C				279	
	5'R4			3R-268G			

図 2 DR4 グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

Allele	Exon 2	10	90	Exon 2	Product size(bp)	ref	
DRB1*0101	CA CGT TTC TTG TGG CAG CTT AAG TTT GAA	GTT GGT GAG AGC TTC ACA GTG CAG CCG CGA G					
DRB1*03011	-----GA- T- C TC- -C- -C- -G						
DRB1*11011	-----GA- T- C TC- -C- -C- -G						
DRB1*12011	-----GA- T- C TC- -C- -GG- -G						
DRB1*13021	-----GA- T- C TC- -C- -C- -G						
DRB1*08032	-----GA- T- C TC- -C- -GG- -G						
DRB1*0814	-----GA- T- C TC- -C- -GG- -G						
DRB1*0809	-----GA- T- C TC- -C- -GG- -G						
DRB1*0821	-----GA- T- C TC- -T- GG- -G						
DRB1*14011	-----GA- T- C TC- -C- -C- -G						
DRB1*1439	-----GA- T- C TC- -C- -C- -G						
	-----GA- T- C TC- -C-					265	1
	5'R3568			3'R			
DR52	-----GA- T- C TC- -C-					266	3
	DRBAMP-3			DRBAMP-B			
	-----GA- T- C TC- -C-					266	17
	RB1P35			DRBAMP-B			
DR52A	-----GA- T- C TC- -C-					263	18
	DRBAMP-3			R86-A			
DR52B	-----GA- T- C TC- -C-			TG		263	18
	DRBAMP-3			R86-B			
#	DR8	-----GA- T- C TC- -C- -GG				258	
	DR8, 12F			3'R-86V			
#	DR12	-----GA- T- C TC- -C- -GG				258	
	DR8, 12F			3'R-86G			
#	DR52V	-----GA- T- C TC- -C- -C				260	
	DR356F			3'R-86V			
#	DR52G	-----GA- T- C TC- -C- -C				260	
	DR356F			3'R-86G			

図 3 DR52 関連グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域



図4 エクソン3におけるDR52関連アレル増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

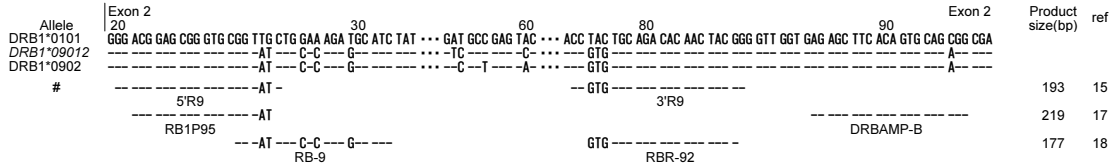


図5 DR9グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

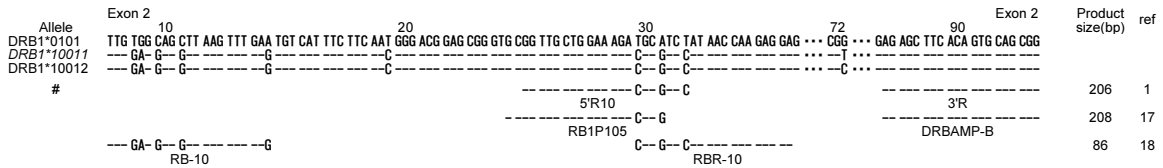


図6 DR10グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

増幅する方法が主流であるが、このグループで増幅されるアレル数は2002年現在で211アレルと極端に増加しており、RFLPパターンの解析は困難を極める。兼重ら<sup>18)</sup>はコドン86の多型に対応した2種類のアンチセンスプライマーを用いて2つのグループに分ける方法を提唱した。我々はコドン13のGGT (Gly) とTCT (Ser)を区別する2種類のセンスプライマーDR8/12FとDR356Fを使用し、DR52関連グループをDR8, DR12, DR52V, DR52Gの4グループに分けるPCR法を実施している。ただし、このプライマーの認識領域であるコドン12に1塩基置換が存在するアレルがいくつか報告されており、DRB1\*08032と\*0814, DRB1\*0809と\*0821は区別できないが、日本人に見られないDRB1\*0814, \*0821はセンスプライマーDRBAMP-3で増幅されないことで除外することができる。また、DRB1\*12011と\*1206とはエクソン3のコドン149に置換があり、通常のPCRでは解析できない。今回DR52関連アレルのエクソン3を増幅するプライマーDRE3-52F及びDRE3-52Rを設計したが(図4), DRB1\*12011と\*1206とを区別する制限酵素がないためSSCP法やSBT法による検討が必要となる。なお、DRB1\*1130はコドン10-12が特有の

配列を持っているため、今回調査したいずれのグループ特異的PCRでも増幅されないと考えられた。また、アンチセンスプライマー3'R-86V, 3'R-86Gの認識部位であるコドン86が異なる配列を持つものがDRB1\*08042, \*08043-TTG (Val), \*1316-GAT (Asp)の3アレル存在し、3'R-86V, 3'R-86Gでは増幅されないで注意を要する。

d) DR9グループ

DR9グループでは図5に示すとおり異なるプライマーセットが報告されているが、いずれを用いてもコドン57, 58の多型部位を増幅しており解析に支障はないと考えられた。

e) DR10グループ

DR10グループにはDRB1\*10011及び\*10012の同義置換しがなく、過去に報告のあったいずれのプライマーでも増幅によってDRB1\*1001と確定できた(図6)。

2) DQB1

DQB1は全ての報告で共通してDQ1(DQB1\*05, \*06)とDQ2,3,4(DQB1\*02, \*03, \*04)の2つのグループに分けて増幅していた。各報告ともセンスプライマーはDQ1とDQ2,3,4とで共通のものを使用し、アンチセンスプ

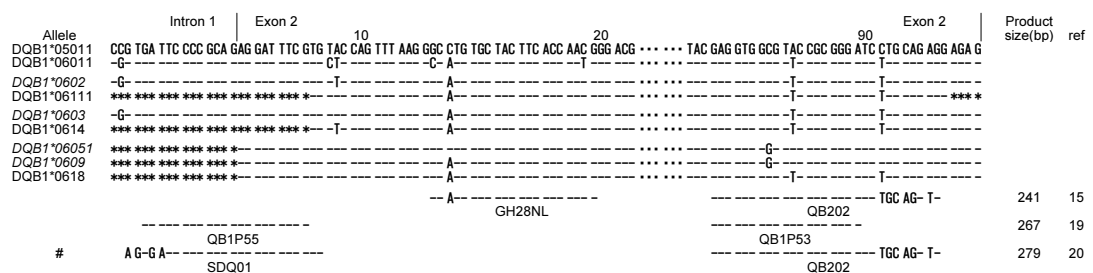


図7 DQ1グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

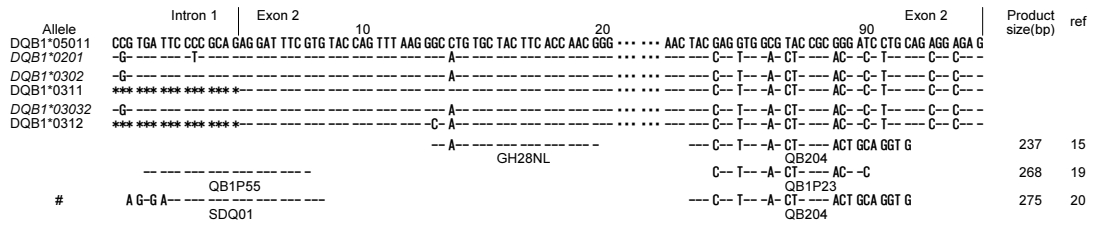


図8 DQ2, 3, 4 グループの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

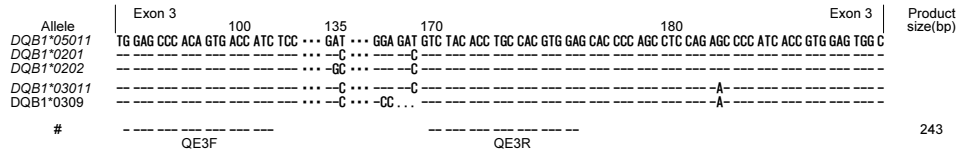


図9 エクソン3におけるDQB1アリの増幅に使用されるプライマー対の塩基配列と増幅領域

ライマーを2種類使用することでグループの振り分けを行っていた。

a) DQ1 グループ

DQ1 グループの増幅領域を図7に示した。アンチセンスプライマーは各報告で共通の領域を使用していたが、センスプライマーはコドン13-20を認識するプライマーとイントロン1からコドン8を認識するプライマーの2種類に大別された。このうち、コドン13-20を認識するGH28NLではDQB1\*0602と\*0611, DQB1\*0603と\*0614, DQB1\*0605と\*0609の3組のアリの多型部位が増幅領域の外側に位置することとなり、high resolution typingには不向きと考えられた。また、各報告でほとんど共通のアンチセンスプライマーでは、プライマーの認識領域にDQB1\*0609とDQB1\*0618の多型が存在する

ので、現行のプライマーでは両者の区別は不可能であった。

b) DQ2,3,4 グループ

DQ1 グループと同様に、GH28NLを使用したPCRではDQB1\*03032と\*0312との区別が不可能であった。他の2組のプライマー対はエクソン2のほとんど同じ領域を使用しており、いずれを使用しても解像度に差はないと考えられた(図8)。ただし、DQB1にはDQB1\*0201と\*0202(コドン135), DQB1\*03011と\*0309(コドン68, 69)等でエクソン3に多型が存在することがわかっており、DQB1のエクソン3を増幅するプライマーを設計し、RFLP解析に用いている(図9)。

2. RFLP パターンの解析

DRB1のRFLPパターンを表1~8に、DQB1のRFLPパターンを表9~11に示した。一般的に、一度のRFLP

表1 DR1/2/7グループのRFLPパターン

Group	Allele	generic			0101		1501,1502	1501,1602	1602	0701		
		MboII	RsaI	FokI+HphI	BbvI	MnlI	BstNI	HhaI	CfrI3I	PstI	HinfI	MspI
1506	1506	273	172,101	178,95	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
	1504	273	172,101	153,120	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
	1505	273	172,101	153,120	240,33	112,71,67,23	102,77,73,21	110,97,66	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	1501(3)	273	172,101	153,95,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	273	173,100	138,135
	1501(1,2)/03	273	172,101	153,95,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
1501	1512	273	172,101	153,95,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,66,56,41	209,64	232,41	173,100	138,135
	1513	270	172,98	153,95,22	237,33	180,67,23	90,77,73,21	110,94,66	206,64	229,41	170,100	135,135
	1509	273	172,101	153,95,25	240,33	183,67,23	77,73,60,42,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	273
	1502(3)	273	172,101	153,84,25	240,33	183,67,23	123,77,73	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
	1502(1,2)	273	172,101	153,84,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
0106	0106	273	133,101,39	153,120	240,33	112,90,71	196,77	110,97,66	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	0102(1,2)	273	133,101,39	153,120	240,33	107,90,71	196,77	163,110	189,64,20	273	173,100	138,135
	0104	273	133,101,39	153,120	240,33	107,90,71	196,77	163,110	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	0107	273	133,101,39	153,109	273	107,90,71	196,77	163,110	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	0101	273	133,101,39	153,109	240,33	107,90,71	196,77	163,110	189,64,20	232,41	173,100	138,135
0105	0105	273	133,101,39	153,109	240,33	90,78,71,29	196,77	163,110	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	1507	273	133,101,39	153,95,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
	1511	273	133,101,39	153,84,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135
	0108	273	103,101,39,30	153,120	240,33	107,90,71	196,77	163,110	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	0703	0703	198,39,36	140,133	153,84,25	273	102,90,81	80,73,59,22,21,18	163,110	210,63	273	169,104
0701(1,2)		198,39,36	140,133	153,84,25	273	102,90,81	80,73,59,22,21,18	163,110	210,63	273	104,89,80	138,135
0705		198,39,36	140,133	153,84,25	273	102,90,81	80,73,59,22,21,18	163,110	210,63	273	104,89,80	135,90,48
0704		198,39,36	140,133	153,84,25	273	102,90,81	80,73,59,22,21,18	163,110	210,63	232,41	104,89,80	138,135
0706		0706	198,39,36	133,101,39	153,84,25	150,123	102,90,81	102,77,73,21	163,110	210,63	273	193,80
	1510	175,62,36	172,101	153,95,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	163,110	209,64	232,41	173,100	138,135
	1601(2)/04	175,62,36	133,101,39	153,109	240,33	183,67,23	102,77,73,21	163,110	209,64	232,41	173,100	138,135
	1603	175,62,36	133,101,39	153,109	240,33	183,67,23	102,77,73,21	163,110	206,67	232,41	173,100	138,135
	1608	175,62,36	133,101,39	153,109	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,99,62	273	232,41	273	138,135
1602	1601(1)	175,62,36	133,101,39	153,109	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,99,62	273	232,41	173,100	138,135
	1602(2)	175,62,36	133,101,39	153,109	240,33	112,67,23	102,77,73,21	163,110	189,64,20	232,41	173,100	138,135
	1602(1)	175,62,36	133,101,39	153,109	240,33	112,67,23	102,77,73,21	110,99,62	189,84	232,41	173,100	138,135
	0103	175,62,36	133,101,39	153,84,25	240,33	183,90	196,77	163,110	209,64	232,41	173,100	138,135
	1607	175,62,36	133,101,39	153,84,25	240,33	183,67,23	102,94,77	110,99,62	273	232,41	173,100	138,73,62
1605	175,62,36	133,101,39	153,84,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,99,62	273	232,41	173,100	138,135	
1508	162,75,36	172,101	153,84,25	240,33	183,67,23	102,77,73,21	110,97,66	209,64	232,41	173,100	138,135	









表 10 DQ2 / 3 / 4 グループの RFLP パターン

Group	Allele	generic			0301		0302	
		HhaI	HaeIII	BsaHI	RsaI	MboII	BsmFI	Acil
0302	0307	206,69	163,112	152,123	96,84,69,26	275	202,73	146,47,44
	<b>0302</b>	206,69	163,112	152,123	96,84,69,26	275	202,73	137,47,44
	0308	206,69	163,112	152,123	96,84,69,26	275	150,73,52	137,47,44
0303	<b>0303(2)</b>	206,69	163,112	152,104,19	96,84,69,26	275	202,73	137,54,44
	0306	206,69	163,112	152,66,57	96,84,69,26	275	202,73	137,99
0301/09	0304	206,69	125,112,38	152,123	96,84,39,30	275	202,73	137,47,44
	0310	206,69	125,112,38	152,104,19	96,84,69,26	275	202,73	137,54,44
	0312	206,69	125,112,38	152,104,19	96,84,69,26	275	202,73	137,54,44
	<b>0301(1)/09</b>	206,69	125,112,38	152,104,19	96,84,39,30	275	202,73	137,54,44
	0313	206,69	125,112,38	152,104,19	96,84,39,30	209,66	202,73	137,54,44
0311	206,69	125,112,38	152,123	96,84,69,26	275	202,73	137,47,44	
0401	<b>0401</b>	158,115	275	152,57,47,19	110,96,69	275	202,73	99,73,64
0201/02	<b>0201/02</b>	158,69,48	275	275	153,96,26	159,116	202,73	137,47,41,25
	0203	158,69,48	275	171,104	153,96,26	159,116	202,73	137,72,41
0402	<b>0402</b>	158,69,46	275	152,57,47,19	110,96,69	275	202,73	99,73,64
	03052	158,69,46	163,112	152,123	96,84,69,26	275	202,73	73,64,47,44
	03051	158,69,46	163,112	152,123	96,84,69,26	275	202,73	73,64,47,44
	03033	158,69,46	163,112	152,104,19	96,84,69,26	275	202,73	137,54,44
	03012	158,69,46	125,112,38	152,104,19	96,84,39,30	275	202,73	137,54,44

表 11 DQE3 グループの RFLP パターン

Allele	generic		supplementary		
	HaeIII	Cac8I	MboI	MnII	MspI
0302/03(2)/04	205,38	243	93,90,60	125,68,28,22	140,103
<b>0301(1)/04/10</b>	205,38	243	93,90,60	125,68,28,22	108,103,32
0309	205,38	216,27	93,90,60	125,68,28,22	108,103,32
<b>0201</b>	205,38	136,107	93,90,60	125,68,28,22	140,103
0502(1)	205,38	136,107	65,60,58	79,68,46,28,22	108,103,32
0501(1)/03(1)	205,38	136,107	65,60,33,25	79,68,46,28,22	108,103,32
0601(3)	153,52,38	136,107	93,90,60	193,28,22	140,103
0601(1)	153,52,38	136,107	93,90,60	125,68,28,22	140,103
0604(1)/09/12	153,52,38	136,107	93,65,60,25	125,68,28,22	135,108
0602/03	153,52,38	136,107	93,65,60,25	125,68,28,22	108,103,32
<b>0202/03</b>	123,82,38	136,107	93,90,60	125,68,28,22	140,103

表 12 Ambiguity が残る組み合わせと原因及び対策

PCRグループ	Ambiguity	エクソン	コドン	原因	対策
DR1/2/7	DRB1*1501/03	2	30	制限酵素なし	他法の併用
DR4G	DRB1*0403/27	2	85	制限酵素なし	他法の併用
	DRB1*0404/23	2	88	アンチセンスプライマー部位に多型	他のプライマーで確認(3R-268G)
DR8	DRB1*0803/14	2	12	センスプライマー部位に多型	他のプライマーで確認(DRBAMP-3)
	DRB1*0809/21	2	12	センスプライマー部位に多型	他のプライマーで確認(DRBAMP-3)
DR12	DRB1*1201/06	3	149	エクソン3に多型	エクソン3の解析
	DRB1*1101/27	2	77	制限酵素なし	他法の併用
DR52V	DRB1*1402/41	2	37	制限酵素なし	他法の併用
	DRB1*1403/40	2	37	制限酵素なし	他法の併用
	DRB1*0301/15/20	2	77,85	制限酵素なし	他法の併用
DR52G	DRB1*1401/39	2	11	センスプライマー部位に多型	(他のプライマーで確認)
	DRB1*1406/20/29	2	37,85	制限酵素なし	他法の併用
DQ1	DQB1*0603/11	2	30	制限酵素なし	他法の併用
	DQB1*0604/09	2	30	制限酵素なし	他法の併用
	DQB1*0609/18	2	86,87,91	アンチセンスプライマー部位に多型	(他のプライマーで確認)
DQ234	DQB1*0201/02	3	135	エクソン3に多型	エクソン3の解析
	DQB1*0301/09	3	168,169	エクソン3に多型	エクソン3の解析

表 13 グループ別アレル数と日本人における出現頻度の比較

従来法			本法			日本人に見出されるアレル
グループ	アレル数	頻度(%)	グループ	アレル数	頻度(%)	
DR1	9	5.3				0101
DR2	26	16.6	DR1/2/7	41	22.3	1501,1502,1602
DR7	6	0.4				0701
DR4	50	23.6	DR4V	27	15.5	0401,0405,0407
			DR4G	23	8.1	0403,0404,0406,0410
DR52	211	43.2	DR8	22	17.8	0802,0803,0809
			DR12	24	5.4	1201,1202
			DR52V	81	8.3	1101,1302,1307,1402,1403,1407
			DR52G	83	11.7	0301,1301,1302,1307,1401,1405,1406,1412,1429
			DR9	2	14.6	0901
DR10	2	0.7	DR10	2	0.7	1001

解析アレル数が減少することに加え、複雑なヘテロ接合体のRFLPパターンを解析する労力から開放される可能性が高くなり、誤判定の防止に十分有用であると考えられた。

近年のアレル数の飛躍的な増加に伴い、HLA タイピングは複数の方法を併用してはじめて高精度の結果が得られるようになってきている。PCR-RFLP法を用いて詳細な解析を行うには定期的なデータの更新や制限酵素の品質管理等かなりの労力が必要となるが、操作が単純で検査結果が明瞭であり、使用する制限酵素の増減で容易に解像度の調整ができるため、同法を引き続き使用する施設も多い。タイピングの目的によって要求される解像度は異なるので、RFLP法の限界を理解した上で数あるタイピング法の1つの選択肢として使用すべきであろう。

## まとめ

1. 過去に報告のあった HLA-DRB1 及び DQB1 の PCR-RFLP 法を比較検討し、エクソン 2 及びエクソン 3 に対して新たなプライマーを含む DRB1 10 組、DQB1 3 組のグループ特異的 PCR を設定した。
2. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002 で公認された DRB1 : 307 アレル、DQB1 : 51 アレルに対する RFLP パターンを解析し、今回検討した PCR-RFLP 法で medium resolution ~ high resolution の結果が得られることがわかった。
3. PCR-RFLP 法単独でのアレルタイピングは不可能であり、RFLP 法の限界を理解した上で、数あるタイピング法の 1 つの選択肢として使用すべきである。

- 1) Ota M. et al.: Tissue Antigens, 39, 187 - 202 (1992)
- 2) Nomura N. et al.: Tissue Antigens, 38, 53 - 59 (1991)
- 3) Kimura A. et al.: HLA 1991, Oxford University Press, 1, 397 - 419, (1992)

- 4) Buyse I. et al.: Tissue Antigens, 41, 1 - 14 (1993)
- 5) Olerup O. et al.: Tissue Antigens, 39, 225 - 235 (1992)
- 6) Bunce M. et al.: Tissue Antigens, 46, 355 - 367 (1995)
- 7) Kotsch K. et al.: Tissue Antigens, 53, 486 - 497 (1999)
- 8) Sayer D. et al.: Tissue Antigens, 57, 46 - 54 (2001)
- 9) Bannai et al.: Eur. J. Immunogenet., 21, 1 - 9 (1993)
- 10) 烏谷竜哉ほか: 愛媛県立衛生研究所年報, 57, 15 - 20 (1995)
- 11) 烏谷竜哉ほか: MHC, 7, 123 - 126 (2000)
- 12) 烏谷竜哉ほか: MHC, 9, 52 - 54 (2002)
- 13) 烏谷竜哉ほか: MHC, 9, 205 - 209 (2003)
- 14) Marsh S.G.E. et al.: Tissue Antigens, 60, 407 - 464 (2002)
- 15) 成瀬妙子ほか: 日本臨床免疫学会会誌, 15, 647 - 655 (1992)
- 16) 小原節子ほか: 今日の移植, 8, 553 - 559 (1995)
- 17) Mitsunaga S. et al.: Eur. J. Immunogenet., 22, 371 - 392 (1995)
- 18) 兼重俊彦ほか: MHC, 2, 76 - 84 (1995)
- 19) Mitsunaga S. et al.: Hum. Immunol., 42, 307 - 14 (1995)
- 20) Senger D.P.S. et al.: Tissue Antigens, 43, 242 - 248 (1994)
- 21) 烏谷竜哉ほか: 愛媛県立衛生研究所年報, 55, 21 - 26 (1993)
- 22) 奥山正明ほか: 愛媛県立衛生環境研究所年報, 4, 19 - 30 (2001)
- 23) Hashimoto M. et al.: Tissue Antigens, 44, 166 - 173 (1994)
- 24) 中島文明ほか: MHC, 8, 1 - 32 (2001)
- 25) 木村彰方ほか: MHC, 9, 29 (2002)