

原 著

キャピラリー電気泳動法を用いたマイクロサテライト DNA の解析： 輸血後 GVHD 検査への応用

矢作 裕司¹⁾ 渡辺 嘉久¹⁾ 光永 滋樹¹⁾ 佐々木文彦²⁾
藤田 欣一³⁾ 田所 憲治¹⁾ 十字 猛夫¹⁾

¹⁾日本赤十字社中央血液センター

²⁾福井医科大学第三内科

³⁾群馬大学医学部第一外科

(平成 11 年 12 月 27 日受付)

(平成 12 年 4 月 3 日受理)

ANALYSIS OF SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHISMS USING A CAPILLARY ELECTROPHORESIS SYSTEM : APPLICATION TO THE DETECTION OF CHIMERISM IN POST-TRANSFUSION GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE

Hiroji Yahagi¹⁾, Yoshihisa Watanabe¹⁾, Shigeki Mitsunaga¹⁾, Fumihiko Sasaki²⁾,
Kin ichi Fujita³⁾, Kenji Tadokoro¹⁾ and Takeo Juji¹⁾

¹⁾Japanese Red Cross Central Blood Center

²⁾Third Department of Internal Medicine, Fukui Medical School

³⁾First Department of Surgery, Gunma University School of Medicine

Short tandem repeat (STR or microsatellite) polymorphisms were analyzed using automated fluorescence-based capillary electrophoresis and the method was applied to the detection of chimerism in post-transfusion graft-versus-host disease (PT-GVHD). Microsatellite DNAs in five loci (D6S89, INT2, HGH, APOA11 and ACTBP2) were amplified by PCR with fluorescent-dye-labelled primers and electrophoresed. After the electrophoresis, the sizes and signal intensities (peak heights) of the amplified fragments were automatically determined using analysis software. Mixtures of two different DNA samples at varying ratios were analyzed. Their peak height ratios were in good agreement with the ratios of the DNA amount in the D6S89 and ACTBP2 loci, which allows us to measure the degree of chimerism in PT-GVHD cases. Two alleles differing by 2 bp were clearly distinguished by electrophoresis of mixed DNA samples containing these alleles. A population sample of 121 unrelated healthy Japanese individuals were typed and their allele frequencies were calculated. The number of alleles detected, their size distributions and the observed heterozygosity for each locus were similar to those reported thus far in Caucasians except for the HGH locus. Seventeen cases suspected of PT-GVHD were analyzed in 1999, and chimerism was detected in three cases. In these cases, microsatellite analysis by automated capillary electrophoresis was shown to be very valuable in the diagnosis and medical treatment of the disease because the proportion of contaminating lymphocytes from the donor could be clearly determined.

Key words : capillary electrophoresis, chimerism, microsatellite DNA, PT-GVHD

1. はじめに

輸血後移植片対宿主病 (PT-GVHD: Post-transfusion graft-versus-host disease) は輸血された血液に含まれるドナー由来のリンパ球が宿主において排除されずに、生着、増殖し、宿主を攻撃することにより起こる致死率の高い重篤な輸血副作用である。全国の医療施設から日本赤十字社中央血液センター医薬情報部へ各血液センターを通じて1993~1998年の6年間で273例の輸血後GVHD(疑い)の報告があり、その内223例を我々が分析したところ51例で末梢血中にキメリズムが確認された。1998年の4月に放射線照射血液が承認されたことにより、キメリズムが確認された例は1997年の12例から1998年は2例、1999年は3例(いずれも中央血液センターでの分析例のみ)に減少しているが、根本的な治療法が無いこともあり、依然輸血における重大な問題となっている。

PT-GVHD検査ではその病因から明らかな様に、患者末梢血中にドナー由来のリンパ球が存在するキメリズム状態を証明する必要がある。また、キメリズムが確認された場合、病態の把握や治療効果を確認する上で患者とドナーのリンパ球の比率を調べる事が重要であり、我々は患者末梢血中のキメリズムを検出するために、1993年からマイクロサテライトDNA多型を利用した検査を行っている¹⁾。

マイクロサテライトDNA²⁾とはゲノム上に存在する2~6塩基の短い塩基配列が反復している領域である。その反復回数は、個人により異なり、高度な多型性を有している。このため、個人識別、親子鑑定、遺伝病家系の解析、病気の原因遺伝子の染色体マッピング等に利用されている³⁾⁻⁷⁾。マイクロサテライトDNAの多型は、その領域の外側に特異的な塩基配列を持った一対のプライマーを用いるPCR法による増幅と電気泳動により、増幅されたDNA断片の長さの違いとして検出される。一般的には300bp以下の短い領域を増幅するため、保存状態の悪いDNAでもPCRによりマイクロサテライトDNAの検出が可能である場合が多い。我々はこれまでポリアクリルアミドゲル電

気泳動と銀染色の組み合わせで検査を行ってきたが、①10塩基以下の差のDNA断片は識別が非常に難しい、②検出感度が低い(キメリズムが軽度の場合は判定が困難である)、③患者とドナーのDNA量比の推定が難しい、などの問題があった。これらの問題点を解決し、さらに迅速な検査を行うために、キャピラリー電気泳動によるマイクロサテライトDNAの多型解析を検討し、良好な結果を得たので報告する。

2. 材料と方法

2.1 DNAの調製

健康人集団として非血縁健康人121名から10mLの末梢血を採取し、赤血球を溶血後、白血球由来のDNAを抽出した(QIAamp Blood Kit, QIAGEN)。

患者末梢血中のキメリズムの検査には末梢血のCD8陽性T細胞画分を用い、患者自身のマイクロサテライトDNAの遺伝子型の検査には爪由来のDNAを用いた。CD8陽性T細胞由来のDNAは以下の様に抽出した。磁気ビーズ(Dynabeads M-450 CD8, DYNAL)にてCD8陽性T細胞を分離した後、Proteinase K処理を行い、DNA溶液を得た⁸⁾。また患者の爪由来のDNAは以下の様に抽出した。採取した爪25~35mgを細片にした後1.5mLのマイクロチューブに入れ、1mLの0.5M NaOH-0.5% sodium dodecyl sulfateで1回、次に蒸留水で2回洗浄したものを抽出材料とし、DNAを抽出した⁹⁾(QIAamp Tissue Kit, QIAGEN)。

2.2 DNAの増幅

今回解析したマイクロサテライトDNAはD6S89, INT2, HGH, APOA11およびACTBP2の5種類である。反復配列の種類、染色体上の位置、プライマーの塩基配列および白人で報告されている増幅断片の大きさ、対立遺伝子数、ヘテロ接合度等をTable 1に示した。増幅産物をキャピラリー電気泳動で検出するためにforward primerには3種の色素(NED, 6-FAMあるいはHEX, PE Biosystems)のいずれかで蛍光標識したものを用いた。増幅は10mM Tris-HCl(pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 各50μM dNTP, 0.4μM Primer, 1U Taq DNA polymerase (Ampli-

Table 1 Short tandem repeat loci and primer sequences used in this study

Locus	Repeat Unit	Chromosomal Location	Primer		Length* (bases)	N*	H*	Refs.
			Name	Sequence				
D6S89	AC	6p23	D6S89-1 D6S89-2	5'-NED-CTTGTTCATCTGCCTTGTGC-3' 5'-ACCTAAGCGACTGCCTAAAC-3'	199—227	13	0.92	16
INT2	TG	11q13	INT2-1 INT2-2	5'-FAM-TTTCTGGGTGTGTCTGAAT-3' 5'-ACACAGTTGCTCTAAAGGGT-3'	161—177	9	0.846	17
HGH	AAAG	17q22-24	HGH-1 HGH-2	5'-NED-TCCAGCCTCGGAGACAGAAT-3' 5'-AGTCCTTTCAGACGAGGT-3'	201—253	18	0.826	18
APOA11	CTTT	11q23-qter	APOA11-1 APOA11-2	5'-HEX-GGAGCAGTGCTAGGGCCGCGCCGT-3' 5'-GTGACAGAGGGAGACTCCATTAAA-3'	400—450**	11	0.7	5, 19
ACTBP2	AAAG	5	ACTBP2-1 ACTBP2-2	5'-FAM-AATCTGGGCGCACAAGAGTGA-3' 5'-ACATCTCCCTACCGCTATA-3'	234—318	21	0.93	20

N : Number of alleles, H : Heterozygosity, * : Caucasians, ** : amplified with a different primer set

Taq, PE Biosystems), 10~200ng Template DNA の反応液中で総量 50μL で行った。反応はサーマルシーケンサー (TSR-300 岩城硝子) を用い、95 2 分の熱変性の後、95 30 秒、52 30 秒、72 30 秒を 33 サイクル行い、最後に 72 で 5 分間保持した。

2.3 キャピラリー電気泳動

PCR 産物のうち 7μL を 5% ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、マーカーの濃度と比較して増幅された DNA 量を推定した。キャピラリー電気泳動用には peak height (蛍光強度) が 2,000RFU (relative fluorescent units) になるように増幅産物を蒸留水で希釈した。変成剤 (Template suppression reagent, PE Biosystems) 12μL にサイズスタンダード (GeneScan 400HD ROX または GeneScan 500 ROX, PE Biosystems) 0.5μL と希釈した増幅産物 2μL を加え、95 で 5 分間加熱し、氷水中で急冷して泳動サンプルとした。キャピラリー電気泳動は長さ 47cm、内径 50μm のキャピラリーと泳動用ポリマー (Performance optimized polymer 6, PE Biosystems) を用い、キャピラリー電気泳動装置 (Model 310 Genetic Analyzer, PE Biosystems) で行った。サンプルのインジェクションは 7kV で 30 秒、泳動は 15kV、50 で 39 分間行った。泳動後、ソフトウェア (GeneScan Analysis ver. 2.1 PE Biosystems) により DNA の検出と分析 (アリルサイズの推定および定量) を行った。

また定量性および検出感度を検討するために 121 名の健常人集団の DNA から 2 名の DNA サンプルを選び、それぞれ 100ng/μL の濃度に調製し、1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9, 1:20, 1:30, 1:50 および 1:100 の量比で混合した。この混合物を各 3 組ずつ作り、ACTBP2 ローカスについて増幅し、泳動を行った。

3. 結 果

3.1 5 つのローカスにおける DNA 増幅断片の検出

Fig. 1a~1e に 5 つのローカスにおける代表的な泳動パターンを示す。全てヘテロ接合体であり、D6S89 は 194bp と 200bp、INT2 は 167bp と 183bp、HGH は 239bp と 285bp、APOA11 は 280bp と 291bp、ACTBP2 は 269bp と 304bp がそれぞれ検出された。メインピークの左側に小さいピークが出現しているが、これはマイクロサテライト DNA の PCR 産物に特徴的な stutter である¹⁰⁾。

3.2 定量性及び検出感度の検討

定量性を検討する第一段階として各アリルが理論上 1:1 の割合で存在するヘテロ接合体の解析を行った。5 つのローカス各々で stutter の影響を避けるため、サイズ差が 4bp を越える対立遺伝子の組み合わせを持つ個体 (D6S89 : n=71, INT2 : n=44, HGH : n=101, APOA11 : n=82, ACTBP2 : n=99) を選び、DNA 量を反映する Peak height 比とアリルサイズ比間の回帰分析を行った。相関

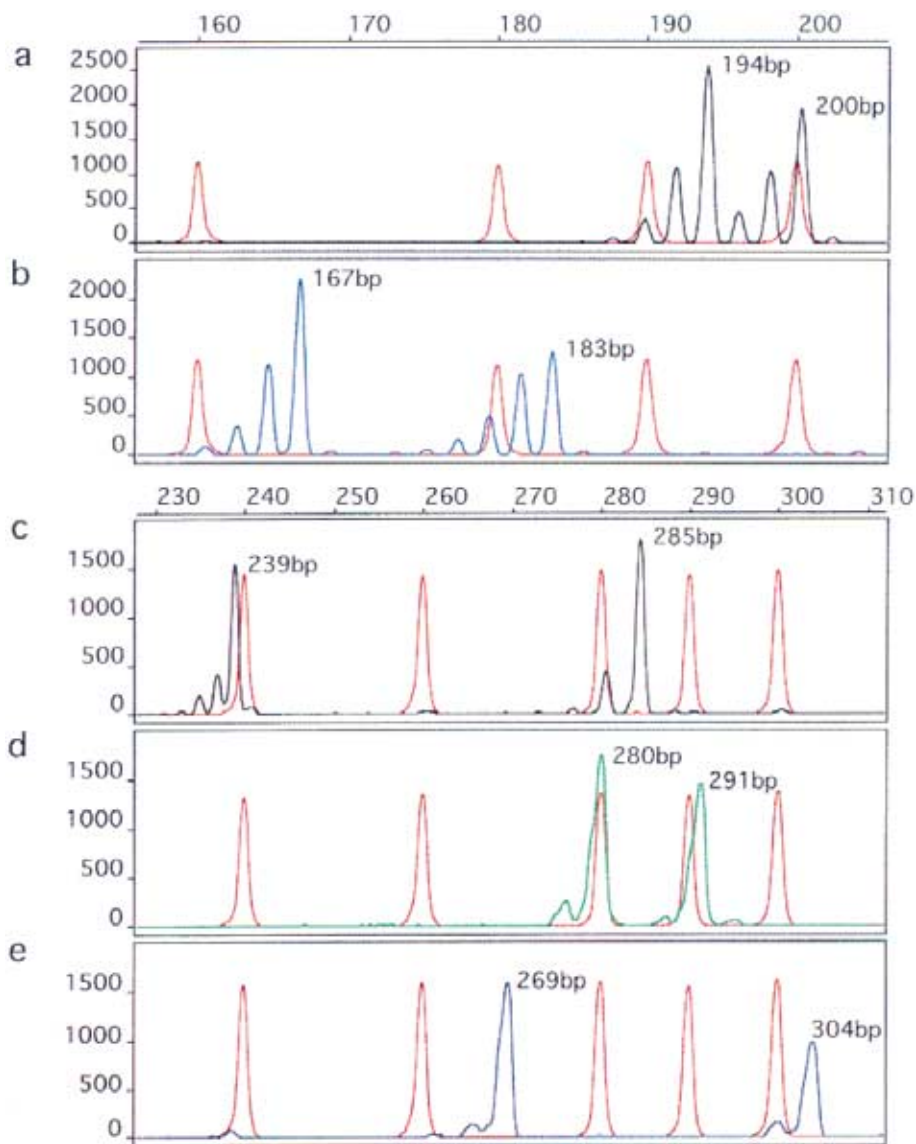


Fig. 1 Representative capillary electropherograms of five short tandem repeat (STR) loci. Peaks represent the fluorescence intensities of dye-labelled STR DNA products and the GeneScan 400HD ROX size standard (red). (a) D6S89 (black) : 194 bp, 200 bp ; (b) INT2 (blue) : 167 bp, 183 bp ; (c) HGH (black) : 239 bp, 285 bp ; (d) APOA11 (green) : 280 bp, 291 bp ; and (e) ACTBP2 (blue) : 269 bp, 304 bp. The vertical and horizontal axes display the peak heights (relative fluorescence units) and sizes in bases, respectively.

は D6S89 と ACTBP2 の 2 つのローカスで認められた (D 6 S 8 9 : $r^2 = 0.86966$, ACTBP 2 : $r^2 = 0.79083$). INT2 , HGH および APOA11 の相関係

数は各々 0.66428 , 0.0057338 と 0.19558 となり相関は認められなかった . Fig. 2 に ACTBP2 の例を示す . この回帰直線により補正し , 2 種類の DNA

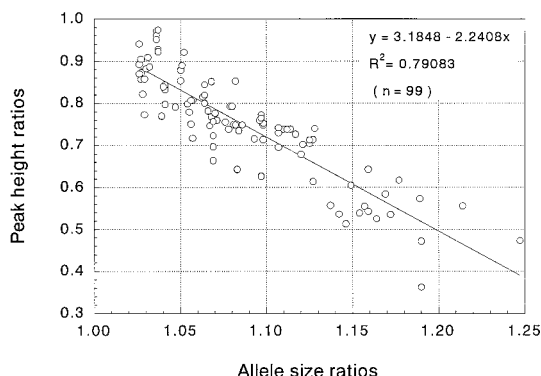


Fig. 2 Peak height ratios versus allele size ratios in the case of ACTBP2. Heterozygous individuals possessing alleles differing by more than 4bp were analyzed.

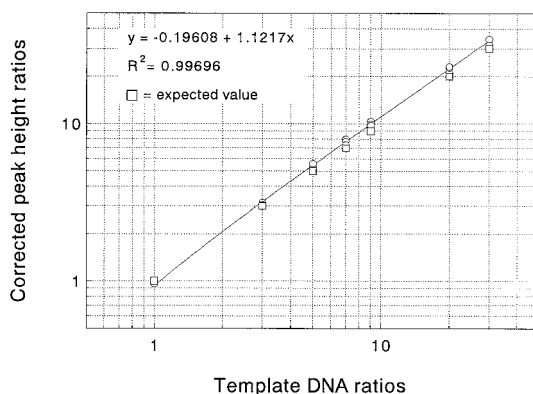


Fig. 3 Peak height ratios corrected by the fragment size versus actual DNA ratios (1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7, 1 : 9, 1 : 20 or 1 : 30) in the case of mixed template DNA.

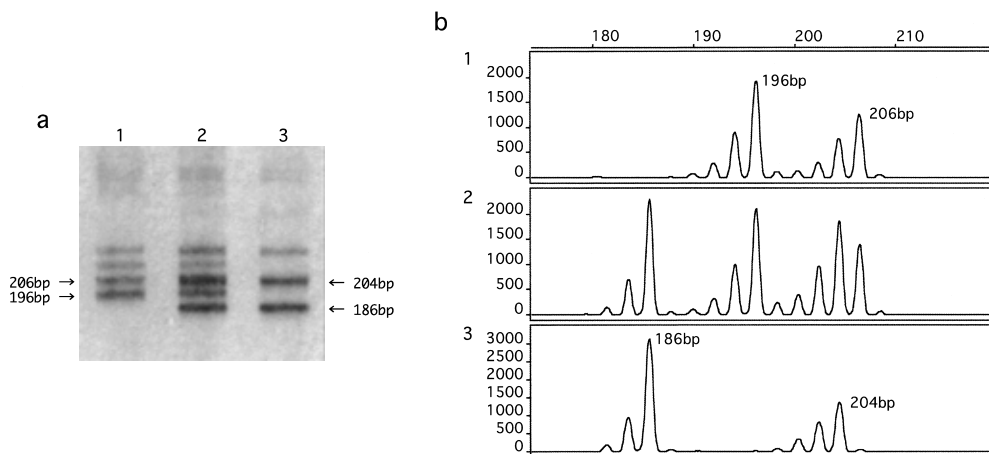


Fig. 4 Comparison of the resolution between 7% non-denaturing polyacrylamide gel (a) and capillary electrophoresis (b) of mixed samples with alleles differing by 2 bp in the D6S89 locus. (1) Sample A : 196 bp, 206 bp ; (2) Mixture of samples A and B ; (3) Sample B : 186 bp, 204 bp.

の混合比を変えて定量性について検討を行った結果を Fig. 3 に示した。キャピラリー電気泳動において補正した peak height 比は元の DNA 量比を反映し、1 : 1 から 1 : 30 までは定量性が認められた。1 : 50 のうち 2 検体で DNA 量の少ないアリルが検出限界 (50RFU) 以下となった。1 : 100 では 3 検体全てにおいて DNA 量の少ないアリルが検出限界以下となった。

3.3 分解能の検討

分解能を調べるために D6S89 ローカスにおいて 204bp と 206bp のアリルをそれぞれヘテロで持つ 2 個体由来の増幅産物を混合してキャピラリー電気泳動と 7% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。キャピラリー電気泳動では 2bp 差断片も明確に識別できたが、ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色の組み合わせでは 204bp と 206bp のバンドが 1 本になり識別が不可能で

Table 2A D6S89 allele frequencies among 121 unrelated Japanese individuals

Locus	Rounded average length (bases)	n	Frequency
D6S89	186	41	0.1694
	188	1*	0.0041
	194	22	0.0909
	196	19	0.0785
	198	35	0.1446
	200	9	0.0372
	202	21	0.0868
	204	18	0.0744
	206	46	0.1901
	208	22	0.0909
	210	3*	0.0124
	212	4	0.0165
	216	1*	0.0041
	*Classes pooled	5	0.0207

Observed heterozygosity, 0.876 ; Expected heterozygosity, 0.876

*all classes with less than four events were pooled

Table 2B INT2 allele frequencies among 121 unrelated Japanese individuals

Locus	Rounded average length (bases)	n	Frequency
INT2	165	3*	0.0124
	167	10	0.0413
	169	96	0.3967
	171	5	0.0207
	173	17	0.0702
	175	38	0.1570
	177	50	0.2066
	179	18	0.0744
	181	2*	0.0083
	183	3*	0.0124
	*Classes pooled	8	0.0331

Observed heterozygosity, 0.736 ; Expected heterozygosity, 0.762

*all classes with less than four events were pooled

Table 2C HGH allele frequencies among 121 unrelated Japanese individuals

Locus	Rounded average length (bases)	n	Frequency
HGH	227	1*	0.0041
	229	3*	0.0124
	231	3*	0.0124
	233	2*	0.0083
	235	15	0.0620
	237	3*	0.0124
	239	19	0.0785
	241	8	0.0331
	243	13	0.0537
	245	18	0.0744
	247	18	0.0744
	249	9	0.0372
	251	12	0.0496
	253	8	0.0331
	254	1*	0.0041
	255	7	0.0289
	257	1*	0.0041
	258	9	0.0372
	260	1*	0.0041
	261	9	0.0372
	265	13	0.0537
	269	15	0.0620
	273	14	0.0579
	277	14	0.0579
	281	11	0.0455
	285	8	0.0331
	289	5	0.0207
	296	1*	0.0041
	312	1*	0.0041
	*Classes pooled	17	0.0702

Observed heterozygosity, 0.934 ; Expected heterozygosity, 0.944

*all classes with less than four events were pooled

あった (Fig. 4)。

3.4 日本人健康人集団 121 名から求めた各ローカスのアリル頻度

Table 2A ~ 2E に各ローカスのアリル頻度を示した。D6S89 ではアリルの数 13, サイズ 186 ~ 216bp, ヘテロ接合度 0.876, ホモ接合体は 15 人で検出された。INT2 ではアリルの数 10, サイズ 165

~ 183bp, ヘテロ接合度 0.736 であり, 121 人中 32 人がホモ接合体であった。HGH ではアリルの数 29, サイズ 227 ~ 312bp, ヘテロ接合度 0.934, ホモ接合体は 8 人であった。APOA11 ではアリルの数 35, サイズ 260 ~ 306bp, ヘテロ接合度 0.884, ホモ接合体は 15 人で検出された。ACTBP2 ではアリルの数 26, サイズ 233 ~ 316bp, ヘテロ接合度 0.959, ホモ接合体は 5 人と 5 つのローカス中最も少なかった。なお, Table 2C ~ 2E で示した 1bp 差のアリルは, 個々に増幅した産物を混合し, 泳動することによりその差を確認している。

Table 2D APOA11 allele frequencies among 121 unrelated Japanese individuals

Locus	Rounded average length (bases)	n	Frequency
APOA11	260	10	0.0413
	271	16	0.0661
	272	1*	0.0041
	273	6	0.0248
	274	3*	0.0124
	275	6	0.0248
	276	2*	0.0083
	277	7	0.0289
	278	9	0.0372
	279	4	0.0165
	280	3*	0.0124
	281	14	0.0579
	282	1*	0.0041
	283	4	0.0165
	284	12	0.0496
	285	9	0.0372
	286	8	0.0331
	287	5	0.0207
	288	9	0.0372
	289	1*	0.0041
	290	25	0.1033
	291	9	0.0372
	292	5	0.0207
	293	3*	0.0124
	294	23	0.0950
	295	13	0.0537
	296	1*	0.0041
	297	1*	0.0041
	298	16	0.0661
	299	8	0.0331
	300	2*	0.0083
	302	3*	0.0124
	303	1*	0.0041
	304	1*	0.0041
	306	1*	0.0041
	*Classes pooled	24	0.0992

Observed heterozygosity, 0.884 ; Expected heterozygosity, 0.940

*all classes with less than four events were pooled

3.5 PT-GVHD 症例の検体での応用

Fig. 5 はタンパク分解酵素阻害剤であるメシル酸ナファモスタット (nafamostat mesilate : MN) 等の治療により回復傾向が見られた症例を示した。輸血後 23 日目における患者の CD8 陽性 T 細胞由来の DNA が 5% 程度しか見られないのに

Table 2E ACTBP2 allele frequencies among 121 unrelated Japanese individuals

Locus	Rounded average length (bases)	n	Frequency
ACTBP2	233	1*	0.0041
	241	6	0.0248
	245	8	0.0331
	249	5	0.0207
	252	15	0.0620
	256	18	0.0744
	260	20	0.0826
	262	1*	0.0041
	263	1*	0.0041
	264	7	0.0289
	266	1*	0.0041
	267	12	0.0496
	269	13	0.0537
	271	3*	0.0124
	273	6	0.0248
	277	18	0.0744
	281	17	0.0702
	285	18	0.0744
	289	14	0.0579
	293	20	0.0826
	296	12	0.0496
	300	16	0.0661
	304	6	0.0248
	308	2*	0.0083
Classes pooled	312	1	0.0041
	316	1*	0.0041
		11	0.0455

Observed heterozygosity, 0.959 ; Expected heterozygosity, 0.939

*all classes with less than four events were pooled

対し、輸血後 35 日目(MN 等で治療 11 日目)では患者由来約 27% , ドナー由来約 73% の DNA 量比となり回復傾向が見られた。Fig. 6 の症例は 2 つのローカス (異なる蛍光標識のプライマーで個々に増幅) の増幅産物を混合して泳動を行ったものである。補正した ACTBP2 ローカスの peak height から輸血後 24 日目では患者由来約 54% , ドナー由来約 46% の DNA 量比であったが、輸血後 32 日目ではドナー由来が検出限界以下となり回復傾向が認められた。しかし、輸血後 55 日目において患者由来約 30% , ドナー由来約 70% の DNA 量比となった。

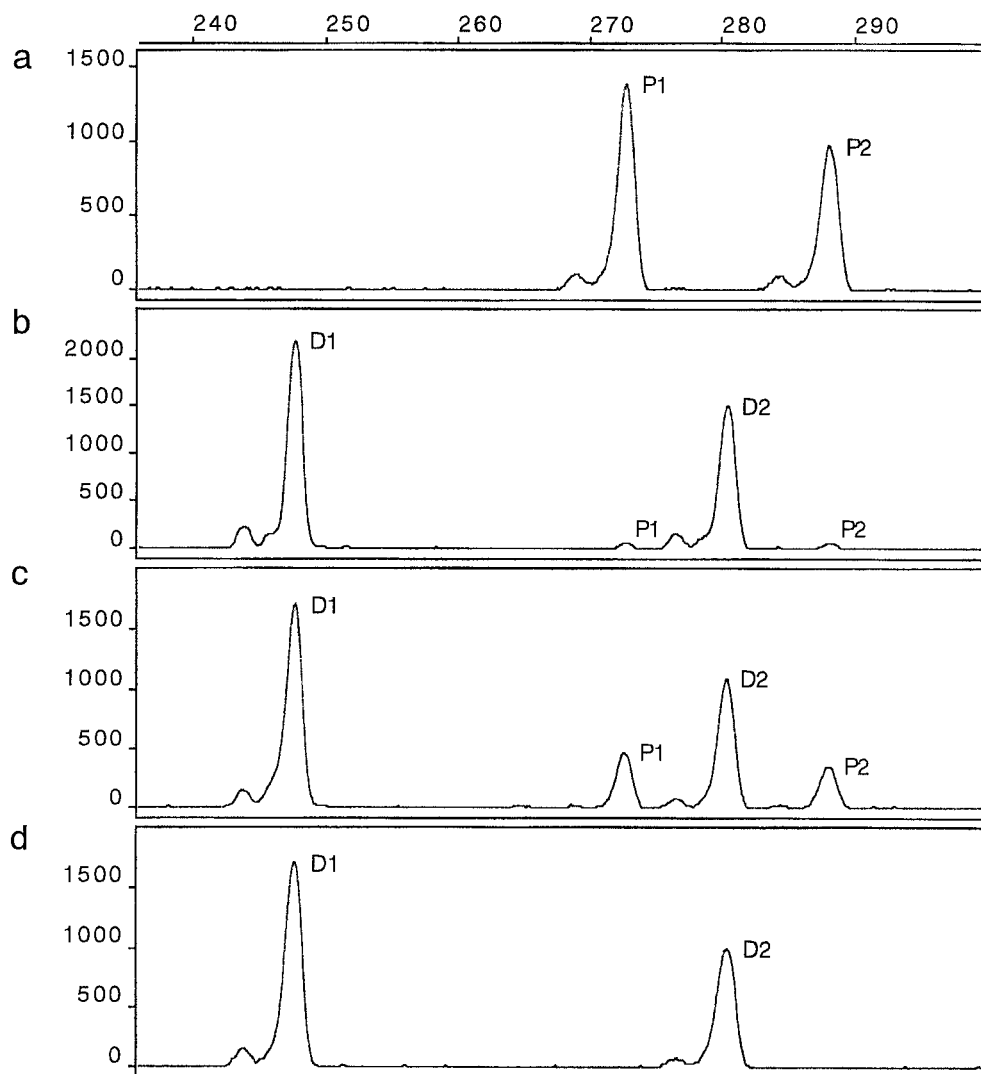


Fig. 5 ACTBP2 electropherograms of a PT-GVHD case. A PT-GVHD case in which the patient recovered after treatment with protease inhibitors. (a) DNA derived from the patient's fingernail : P1, P2 ; (b) DNA derived from the CD8⁺ fraction on day 23 after transfusion (before nafamostat mesilate (NM) administration) ; (c) DNA derived from CD8⁺ fraction on day 35 after transfusion (on day 11 after NM administration) ; (d) DNA derived from the donor blood : D1, D2.

4. 考 察

マイクロサテライト DNA とキャピラリー電気泳動の組み合わせによる解析は高感度，高分解能であるため個人識別，疾患原因遺伝子の連鎖解析および人類学における集団調査等で広く使用されている^{11)~13)}．本研究では DNA mixture サンプル

とキメラにおける 2 個体の識別だけでなく，混合された各 DNA の定量性について検討を行った．

我々は今回の実験において正常な体細胞から抽出した DNA を使用しているので，父親由来のアリルと母親由来のアリルの DNA は理論的に同量存在する．従って，ヘテロ接合体の場合，2 つの断

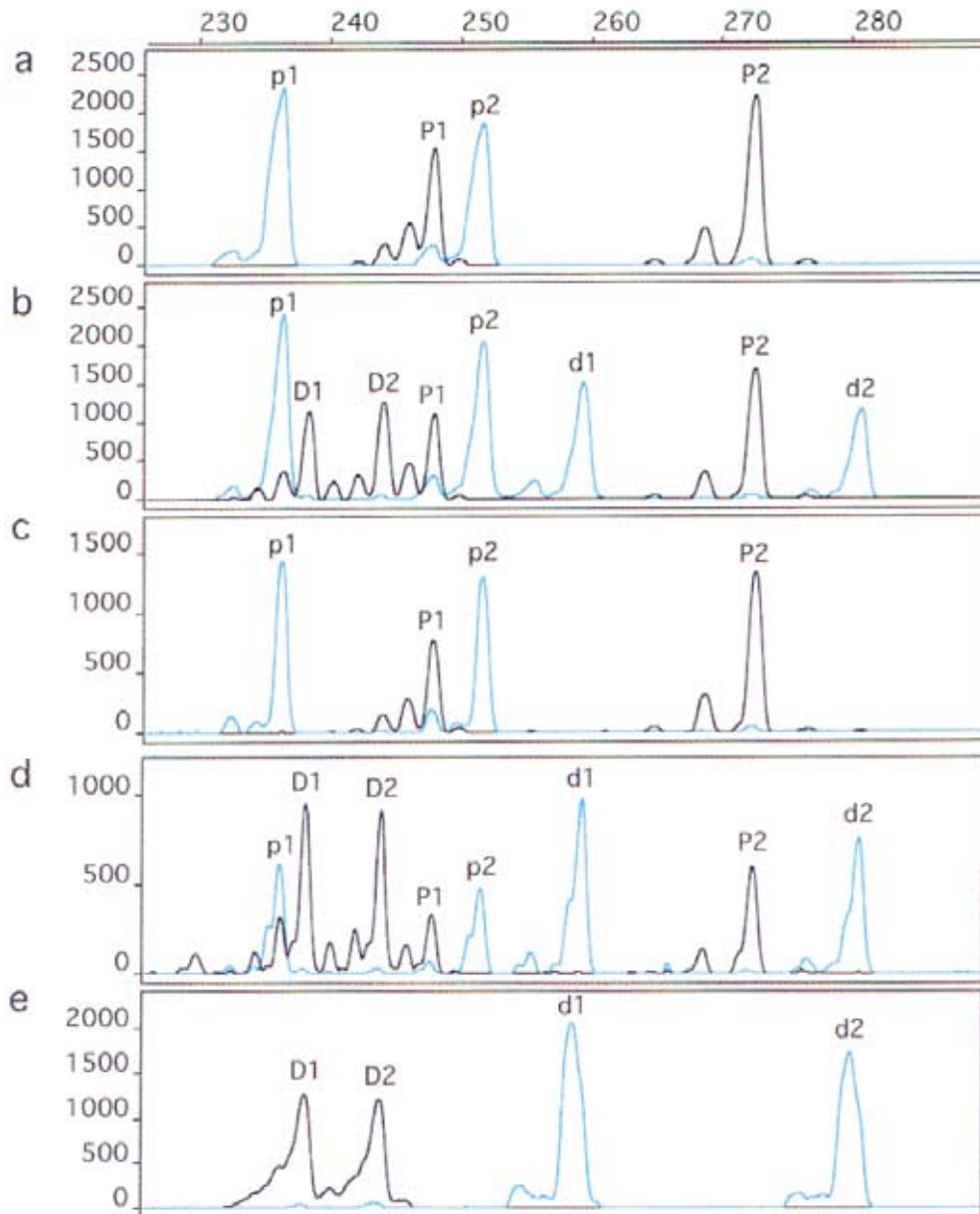


Fig. 6 HGH (black) and ACTBP2 (blue) electropherograms of a PT-GVHD case. (a) DNA derived from the patient's fingernail : HGH (P1, P2), ACTBP2 (p1, p2); (b) DNA derived from CD8⁺ fraction on day 24 after transfusion; (c) DNA derived from the CD8⁺ fraction on day 32 after transfusion; (d) DNA derived from the CD8⁺ fraction on day 55 after transfusion; (e) DNA derived from the donor blood : HGH (D1, D2), ACTBP2 (d1, d2)

片の蛍光強度は等しくなるはずである。しかしながら、サイズの大きいアリルの方が小さいサイズ

のアリルに比べ蛍光強度が小さくなる傾向が見られた。これは小さいアリルの増幅効率が大きいも

のよりも良いことによると考えられる。そこで、我々は peak height 比のサイズ比に対する回帰分析を行い、得られた補正式で定量が可能かどうかを検討した。ACTBP2 と D6S89 については定量性が認められた。しかしながら、残りの3つのローカスではサイズのみで補正で定量性を得ることは困難であった。これは、増幅効率のアリルサイズの違いだけでなく、その領域の塩基配列の組成の違い等も関与していることによると考えられる。

ACTBP2 にはアリルサイズが同じ対立遺伝子でも、多型性領域部の塩基配列が異なるアリルの存在が報告されている^{14,15)}。これらのアリルの識別を行えば、より高度の多型性が得られるが、PT-GVHD 検査では塩基配列の確認は必要になることは少ないと考え、今回はその分析は行わなかった。

検出感度について1:1から1:100のうち1:30(少ないアリルの比率は3.2%, 以下同様)までは検出が可能であった。1:50(2%)で2検体、1:100(1%)で3検体が検出限界以下になった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動と銀染色では1:9でもバンドの確認が困難な場合もあり¹⁾、キャピラリー電気泳動によって検出感度は確実に向上したといえる。泳動するDNA量を増やすことで、ごく少量(2%以下)混在するアリルを検出することが可能になると思われたが、同時に非特異的増幅等によるノイズも大きくなり、たとえレシビエントとドナーのアリルサイズが既知であっても検出しようとするシグナルとノイズの区別が困難になり実用的ではない。

白人と日本人の各ローカスにおけるアリルサイズの分布とアリルの数はHGHとAPOA11を除きほぼ同じであった。HGHのアリル分布は白人201~253bpであるのに対し227~312bpと広く、アリルの数も白人の18に比べ29と多かった。ヘテロ接合度については各ローカスにおいて大きな違いは見られなかった。また、APOA11は用いているprimerが異なるので比較はできなかった。

PT-GVHD 検査における検査上の問題は、患者由来のアリルとドナー由来のものが5種のマイクロサテライトDNAで全て一致してしまう可能性

である。全て一致する最大の確率は、各ローカスにおける genotype が最も出現頻度の高い場合であり、その値を Table 2A~2E のアリル頻度から計算すると 3.30×10^{-8} であった。この値に日本の人口 1.25×10^8 を掛けると、5ローカス全てが一致してしまう人数が得られ、その数は4.13人となる。この値は十分に低いと考えられ、上記の5種類のマイクロサテライトDNAによるPT-GVHD検査の妥当性を支持する。

キャピラリー電気泳動を導入することにより、これまで判定が困難であった近接した断片やごく軽度のキメリズムも検出することが可能になった。また、48時間の連続泳動が可能であり、さらに、サンプルのセット後は装置が自動的に泳動、検出を行うので、検査時間を大幅に短縮することができる。

キャピラリー電気泳動法により日本人集団における5種類のマイクロサテライトDNAを解析し、そのアリル頻度を求め高度の多型性を確認した。この方法はPT-GVHD検査においてキメリズムの証明だけでなく、それを構成しているドナー由来の白血球の量比の推定についても有用であると考えられた。

謝辞：稿をまとめるにあたり、協力していただいた各血液センター医薬情報担当者の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Wang, L., Juji, T., Tokunaga, K., Takahashi, K., Kuwata, S., Uchida, S., Tadokoro, K. and Takai, K.: Polymorphic microsatellite markers for the diagnosis of graft-versus-host disease. *N Eng J Med*, 330: 398—401, 1994.
- 2) Weber, J.L. and May, P.E.: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 44: 388—396, 1989.
- 3) Wenz, H., Robertson, J.M., Menchen, S., Oaks, F., Demorest, D.M., Scheibler, D., Rosenblum, B.B., Wike, C., Gilbert, D.A. and Efcavitch, J.W.: High-precision denaturing capillary electrophoresis. *Genome Res*, 8: 69—80, 1998.
- 4) Fregeau, C.J. and Fournay, R.M.: DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to hu-

- man identification. *Biotechniques*, 15 : 100—119, 1993.
- 5) Kimpton, C.P., Gill, P., Walton, A., Urquhart, A., Millican, E.S. and Adams, M. : Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl*, 3 : 13—22, 1993.
 - 6) Schuster, H., Wienker, T.E., Bahring, S., Bilginturan, N., Toka, H.R., Neitzel, H., Jeschke, E., Toka, O., Gilbert, D., Lowe, A., Ott, J., Haller, H. and Luft, F.C. : Severe autosomal dominant hypertension and brachydactyly in a unique Turkish kindred maps to human chromosome 12. *Nat Genet*, 13 : 98—100, 1996.
 - 7) Weissenbach, J. : Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr Opin Genet Dev*, 3 : 414—417, 1993.
 - 8) Mitsunaga, S., Oguchi, T., Tokunaga, K., Akaza, T., Tadokoro, K. and Juji, T. : High-resolution HLA-DQB1 typing by combination of group-specific amplification and restriction fragment length polymorphism. *Hum Immunol*, 42 : 307—314, 1995.
 - 9) Uchida, S., Wang, L., Yahagi, Y., Tokunaga, K., Tadokoro, K., and Juji, T. : Utility of fingernail DNA for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation and for diagnostic testing for transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood*, 87 : 4015—4016, 1996.
 - 10) Lygo, J.E., Johnson, P.E., Holdaway, D.J., Woodroffe, S., Whitaker, J.P., Clayton, T.M., Kimpton, C.P. and Gill, P. : The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic case-work. *Int J Leg Med*, 107 : 77—89, 1994.
 - 11) Righetti, P.G. and Gelfi, C. : Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis*, 18 : 1709—1714, 1997.
 - 12) Larsen, L.A., Gronskov, K., Norgaard-Pedersen, B., Brondum-Nielsen, K., Hasholt, L. and Vuust, J. : High-throughput analysis of fragile X(CGG)n alleles in the normal and premutation range by PCR amplification and automated capillary electrophoresis. *Hum Genet*, 100 : 564—568, 1997.
 - 13) Klintschar, M., Ebner, A. and Reichenpfader, B. : Population genetic studies on nine tetrameric short tandem repeat loci using fluorescence dye-labeled primers and capillary electrophoresis in the Austrian population. *Electrophoresis*, 20 : 1740—1742, 1999.
 - 14) Möller, A. and Brinkmann, B. : Locus ACTBP2 (SE33) : Sequencing data reveal considerable polymorphism. *Int J Leg Med*, 106 : 262—267, 1994.
 - 15) Urquhart, A., Kimpton, C.P. and Gill, P. : Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. *Hum Genet*, 92 : 637—638, 1993.
 - 16) Litt, M. and Luty, J.A. : Dinucleotide repeat polymorphism at the D6S89 locus. *Nucl Acids Res*, 18 : 4301, 1990.
 - 17) Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Rath, D.S. and Merrill, C.R. : Dinucleotide repeat polymorphism at the int-2 proto-oncogene locus(INT2) *Nucl Acids Res*, 18 : 7468, 1990.
 - 18) Polymeropoulos, M.H., Rath, D.S., Xiao, H. and Merrill, C.R. : A simple sequence repeat polymorphism at the human growth hormone locus. *Nucl Acids Res*, 19 : 689, 1991.
 - 19) Hate, H. and Lalouel, J. -M. : MicroVNTR (CTTT), at the apo C-III locus. *Nucl Acids Res*, 19 : 5098, 1991.
 - 20) Polymeropoulos, M.H., Rath, D.S., Xiao, H. and Merrill, C.R. : Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2(ACTBP2). *Nucl Acids Res*, 20 : 1432, 1992.
-