

第6回日本組織適合性学会大会 QCワークショップ報告

小林 賢¹⁾, 猪子 英俊²⁾, 大谷 文雄³⁾, 木村 彰方⁴⁾, 徳永 勝士⁵⁾, 前田 平生⁶⁾
(第6回日本組織適合性学会大会QCワークショップ委員会)

¹⁾防衛医科大学校, 検査部 ²⁾東海大学医学部, 分子生命科学 ³⁾北里大学医学部, 免疫学

⁴⁾東京医科歯科大学難治疾患研, 成人疾患研究部門 ⁵⁾東京大学医学部, 人類遺伝学 ⁶⁾埼玉医科大学総合医療センター, 輸血部

はじめに

1990年代に入り, PCR法を応用したDNAタイピングがHLAクラスII遺伝子に適用されるようになり, 血清学的手法と比較して, より精度の高い結果が得られるようになってきた。しかしながら, このDNAタイピング法の原理は, 1ないし数塩基置換の相違を制限酵素(RFLP)や塩基配列特異的プローブ(SSO), あるいは塩基配列特異的プライマー(SSP)を利用したPCR法によって区別するものである。その判定は, 必ずしも容易とは言えない。DNAタイピングは, 得られた結果に全幅の信頼をい置くことが多いが, 果たして本当に間違いはないのか, もし間違いがあるとしたら, それはどのような原因で起きているのか, というような検討はほとんど現在までになされていなかった。そこで, 今回の大会では, 日本の各施設でのDNAタイピング精度の向上と標準化を目指す目的でQCワークショップを行った。

方法および材料

DNAサンプル

DNAタイピングを始めたばかりの施設でも型判定が容易となるように, 日本人に高頻度で見られる一般的なタイプのみを採用した。DNAサンプルは, HLAクラスII遺伝子型が既知の健康成人6人のEDTA末梢血より, チオシアン酸グアニジン法によって抽出した。ここで用いたパネルのHLAタイプは表1に示すように, ホモ接合体が2検体, 血清学的にも遺伝子型においてもヘテロ接合体であるも

の2検体と血清学的にはホモ接合体であるが遺伝子型ではヘテロ接合体であるもの2検体である。

これらのDNAサンプル(H0901~H0906)は, 分離した翌日に通常の郵便(室温状態)で, 参加37施設に送付した。

タイピング方法

多くの施設が参加できるように, DNAタイピング法は各施設で日常行っている方法を採用することとした。精度については, high resolution, low resolutionを問わず, 可能な範囲で実施することとした。また, タイピングする遺伝子座の範囲も, それぞれの施設に任せることとした。タイピング結果は, 所定の記入用紙にアリルを書き込み返送することで集計した。さらに, 各サンプルの遺伝子型を各施設に送付し, タイピング結果が間違っていた場合, その原因・理由について書面で回答を得た。

結果

各施設が採用している方法, PCR装置, Taq DNAポリメラーゼなどをまとめて, 集計結果を表3に示す。タイピング方法としては, RFLP法とSSO法がほぼ半数の施設で採用されていた。SSP法に関しては, DRBでは1/3の施設で採用されていたが, DQB1やDPB1での採用率は低かった。また, SSCP法を一部の施設で採用しているが, その目的は, 得られた判定結果の確認のために利用しているものが大半であった。Taq DNAポリメラーゼは, パーキンエルマー製と宝酒造製のものほぼ半数の

表1. 配布 DNA サンプルの HLA クラス I およびクラス II アリル

クラスII

Sample #	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPB1	
H0901	*0403	*0406	4*0103		*03011	-	*0302	-	*02012	*0401
H0902	*04051	*0901	4*0103		*0303	*0302	*0401	*03032	*0501	-
H0903	*0406	*0406	4*0103	4*0103	*03011	*03011	*0302	*0302	*02012	*0501
H0904	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*05031	*0603	*0501	-
H0905	*04051	*08032	4*0103		*0303	*0103	*0401	*0601	*02012	*1901
H0906	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	*02012	-

クラスI

Sample #	A		B		C	
H0901	*1101	*2603	*1501	*3501	*0401	*0303
H0902	*2402	*3101	*1518	*5401	*0102	-
H0903	*2402	*3101	*0702	*5101	*0702	*1402
H0904	*0207	*2402	*1518	*5401	*0102	*0704
H0905	*2402	*3101	*3901	*5101	*0702	*1402
H0906	*0201	*2601	*1501	*4002	*0702	*0304

施設で採用されていた。また、PCR 装置については、ほとんどがパーキンエルマー製またはロシュ製のものであった。

サンプル H0901 について

このサンプルのアリルは、DRB1*0403, 0406, DRB4*0103, DQA1*03011, DQB1*0302, DPA1*0103, DPB1*0201, 0401であり、DRB1は血清学的にホモ接合体であるが、アリルレベルでヘテロ接合体である。

表4に示すように、DQA1, DQB1とDPA1については何れの施設でも正しくタイプされており、問題点はなかった。しかしながら、それ以外の遺伝子座で、4つのミスタイプが報告された。その内訳は、DRB1*0403だけしかタイプできなかった1施設、DRB4で*0103以外の*01とタイプした2施設、DPB1*0402とタイプした1施設であった。DRB1とDPB1の誤判定の原因は、施設からの回答によると、パターンの読み違いなどによるものであった。DRB4については、reverse SSOプローブの偽陽性によるものであった。

サンプル H0902 について

このサンプルのアリルは、DRB1*04051, 0901, DRB4*0103, DQA1*0303, *0302, DQB1*0401, *03032, DPA1*0202, DPB1*0501である。

表5に示すように、DRB1とDPA1については何れの施設でも正しくタイプされていた。それ以外の遺伝子座で、6つのミスタイプが報告された。DRB4のミスタイプは、サンプルH0901と同様、reverse SSOプローブの偽陽性によるものであった。DQA1*0303を*0301とタイプした3施設があったが、DQA1*0303は、DQA1*0301と第3エクソンにしか相違が見られないため、通常の第2エクソンを対象とするPCRではタイプできないアリルである。従って、通常のタイピングではDQA1*03と判定すべきものと考えられる。DQB1*0401を*0402と判定したのは、施設からの回答によると、RFLPの部分切断による誤判定が原因であった。また、DPB1の誤判定は、反応パターンの読み違いによるものであった。

表2. 参加施設で採用しているタイピング法,
Taq DNA ポリメラーゼ, PCR 装置の集計

タイピング法			
	DR (n = 36)	DQ (n = 28)	DP (n = 17)
RFLP	18	13	10
SSO	1	1	1
rSSO	18	15	7
SSP	12	4	1
SSCP	10	4	2
PFHA	0	1	0

Taq DNAポリメラーゼ	
メーカー名	採用施設数
パーキンエルマー	18
宝酒造	14
ベーリンガー	2
ロシュ	2
TOYOBO	1
Gibco BRL	1

サーマルサイクラー		
メーカー名	製品名	採用施設数
パーキンエルマー/ ロシュ	9600	21
	480	2
アステック	2400	2
	PJ2000	1
	PC800	3
岩城硝子	PC700	1
	TSR300	4
アトー	ザイモリアクターII	2
HYBAID		1
宝酒造	MP	1

サンプル H0903 について

このサンプルのアリルは, DRB1*0406, 0406, DRB4*0103, *0103, DQA1*03011, *03011, DQB1*0302, *0302, DPA1*0103, *0202, DPB1*0201, *0501である。H0903は, 家系調査の結果から, DR, DQ がホモ接合であることが判明している。また, KT13 と呼ばれる B 細胞株としても利用されているものである。

表6に示すように, DQA1, DPA1 と DPB1 については何れの施設でも正しくタイプされていた。それ以外の遺伝子座で, 7つのミスタイプが報告された。このサンプルは, DPB1*0406 のホモ接合であるので, それほど判定困難な遺伝子型ではないと思われたが, 意外にも DRB1 で3つのエラーがあった。エラーの原因に関する回答が得られなかったため, 誤判定の経過が明確には分からないが, SSP 法

を利用した施設では, プライマーの入れ違い, 泳動時のサンプル入れ違い, あるいはパターン判定ミスなどが原因として考えられる。また, reverse SSO 法を利用した施設では, SSO の偽陽性または反応パターンの読み違いが誤判定の原因と思われる。DRB4 のミスタイプ3つのうち2つについては, サンプル H0901 や H0902 と同様, reverse SSO プローブによる偽陽性であった。残りの一つは, SSP 法であり, 前述の DRB1 の場合と同様なミスが原因であると思われる。DQB1 のミスは, 判定結果の転記ミスによるものであった。DPB1 については, 未回答なため明確な原因は不明であるが, RFLP 法を利用していることから, 制限酵素の部分切断や判定表の読み違いなどが誤判定の主な原因と考えられる。

サンプル H0904 について

このサンプルのアリルは, DRB1*1301, 1401, DRB3*0202, *0101, DQA1*0103, *0104, DQB1*05031, *0603, DPA1*0202, DPB1*0501 である。

表6に示すように, 何れの施設でも正しくタイプされた DPA1 以外の遺伝子座で, 13のミスタイプが認められた。DRB1 については, このサンプル以外では, high resolution の場合にミスが見られ, 2桁の low resolution レベルではほとんど認められなかった。それに対し, このサンプルでは, low resolution レベルでのミスが, 4施設中3ヶ所で見られた。また, この low resolution レベルでのミスは*1301 のみにみられた。3施設のうち2施設は RFLP 法であり, 制限酵素の部分切断や判定表の読み違いなどによる誤判定であった。残る一施設については, 未回答なため誤判定の経過が分からないが, SSO 法であることから, 偽陽性反応または反応パターンの読み違いなどが原因と思われる。DQA1*0104 は, エクソン2のみの PCR 増幅では DQA1*0101 と区別できないことがミスの原因であった。DRB4 がタイプされていたのは, 判定結果の転記ミスによるものであった。DQB1 については, SSO 法であることから, 反応パターンの読み違いなどが誤判定の原因であった。DPB1 のミスのうち1施設については, 数

回やり直しても同じ結果が得られたということであった。今回配布した DNA には誤判定された DPB1 アリルがないことから、サンプルへのコンタミネーションあるいは取り違いなどが原因であると思われる。

サンプル H0905 について

このサンプルのアリルは、DRB1*04051, 08032, DRB4*0103, DQA1*0303, *0103, DQB1*0401,

*0601, DPA1*0202, DPB1*02012, *1901 である。

表7に示すように、何れの施設でも正しくタイプされた遺伝子座は、DPA1のみであった。それ以外の遺伝子座で、15個のミスタイプが認められた。DRB4とDQA1については、サンプルH0901やH0902と同様な原因によるものである。DRB1については、未回答であるため誤判定の経過がはっきりしないが、プライマーの入れ違い、泳動時のサンプ

表3. DNA サンプル H0901 のタイピング結果

H0901 Labs	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
	*0403	*0406	4*0103		*03011	-	*0302	-	*0103	-	*02012	*0401
1	*0403	*0406	nt		*03	-	*0302	-	nt		nt	
2	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
3	*0403	*0406	nt		*03011	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
4	*0403	*0406	4*0103		*03	-	*0302	-	nt		*0201/*3201	*0401/*3301
5	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
6	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
7	*04	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
8	*04	-	4*01		nt		nt		nt		nt	
9	*0403	*0406	4*01		nt		nt		nt		nt	
10	*0403	*0406	nt		*0301/2	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
11	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
12	*0403	*0406	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
13	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
14	*0403	*0406	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
15	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
16	*0403	*0406	4*0103		*0301	-	*0302	-	*0103	-	*0201	*0401
17	*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
18	*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
19	*0403	*0406	B4		nt		*0302	-	nt		nt	
20	*04	-	4*01		nt		nt	-	nt		nt	
21	-	*0406	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
22	*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
23	*0403	*0406	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
24	*0403	*0406	4*01011		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
25	*04	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
26	*0403	*0406	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		nt	
27	*0403	*0406	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
28	*0403	*0406	4*0103		nt		*0302	-	nt		nt	
29	*0403	*0406	4*0103		*03	-	*0302	-	nt		*0201	*0401
30	*0403	*0406	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
31	*0403	*0406	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		*02012	*0401
32	*0403	*0406	nt		nt		nt		nt		nt	
33	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
34	*0403	*0406	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0402
35	*0403	*0406	4*0102	4*01011	nt		*0302	-	nt		*0201	*0401
36	*0403	*0406	4*01		nt		nt		nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0302	-	*01	-	*0201	*0401

ル入れ違いや、反応パターンの読み違いなどが原因と思われる。DQB1 のミスタイプは、何れも reverse SSO 法であり、SSO プローブ偽陰性と偽陽性に起因するものであった。DPB1 については、判定ミスや反応パターンの読み違いによるミスであった。

サンプル H0906 について

このサンプルのアリルは、DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, DQB1*0602, DPA1*0103,

DPB1*02012 の完全なホモ接合である。

表 8 に示すように、DPB1 のミスタイプ 1 つ以外はすべて正しくタイプされていた。DPB1 のミスは、制限酵素の切断パターンの判定ミスであった。

以上の結果をまとめて、表 9 と表 10 に示す。表 9 は、生データでのミスタイプ率を、また、表 10 は、low resolution レベルで見えた場合のミスタイプ率をそれぞれ示した。今回の結果では、生データ (high+low resolution) で 1291 タイプ中 67 (5.2

表 4. DNA サンプル H0902 のタイピング結果

H0902	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
Labs	*04051	*0901	4*0103		*0303	*0302	*0401	*03032	*0202	-	*0501	-
1	*0405	*0901	nt		*03	-	*0401	*0303	nt		nt	
2	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		nt	
3	*04051	*0901	nt		-	*0302	*0401	*03032	nt		*0501	-
4	*0405	*0901	4*0103		*03	-	*0401	*0303	nt		*0501/*3801	-
5	*0405	*0901	nt		nt		*0402	*0303	nt		nt	
6	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
7	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*03032	nt		nt	
8	*04	*0901	B4		nt		nt		nt		nt	
9	*0405	*0901	4*01		nt		nt		nt		nt	
10	*0405	*0901	nt		-	*0302	*0401	*0303	nt		*0501	-
11	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		nt	
12	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*03032	nt		nt	
13	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
14	*0405	*0901	nt		*0301	-	*0401	*0303	nt		*0501	-
15	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
16	*0405	*0901	4*0103		-	*0302	*0401	*03032	*0202	-	*0501	-
17	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
18	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
19	*0405	*0901	B4		nt		*0401	*03032	nt		nt	
20	*04	*0901	B4		nt		nt		nt		nt	
21	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*0303	nt		nt	
22	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
23	*0405	*0901	nt		*0301	-	*0401	*0303	nt		*0501	-
24	*0405	*0901	4*01011		nt		*0401	*03032	nt		*0501	-
25	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
26	*0405	*0901	4*01		-	*0302	*0401	*0303	nt		nt	
27	*0405	*0901	nt		-	*0302	*0401	*0303	nt		*0501	-
28	*0405	*0901	4*01		nt		*0401	*0303	nt		nt	
29	*0405	*0901	4*0103		*03	-	*0401	*03032	nt		*0501	-
30	*04	*0901	4*01		nt		*0401	*03032	nt		nt	
31	*0405	*0901	4*01		*0301	-	*0401	*03032	nt		*0501	-
32	*0405	*0901	nt		nt		nt		nt		nt	
33	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
34	*0405	*0901	nt		nt		*0401	*0303	nt		*0501	-
35	*0405	*0901	4*0102		nt		*0401	*0303	nt		*0501	*3801
36	*0405	*0901	4*01		nt		nt		nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0401	*0303	*02	-	*0501	-

%) にミスタイプが認められた。一方, low resolution レベルで見た場合のミスタイプは, 1291 タイプ中 20 (1.5%) のみであった。

考察

今回の QC ワークショップで得られた各施設のタイピング結果は, 概ね正確であった。しかしながら, 一部の施設で low resolution レベルでも間違った遺伝子型がタイプされているなど, QC の意義を改めて

感じさせられた。

タイピング結果の誤りとしてもっとも多かったのは, 単純な判定ミスである。RFLP 法の場合は, 部分切断によって切れ残りのバンドを陽性にとると全く異なった遺伝子型と判定することになる。これが部分切断なのか否かということを目頃から熟知しておく必要があると思われる。その他にも判定表の読み違いなどの単純なミスがあることから, タイピング結果の判定はなるべく二人が独立して行うことが

表 5. DNA サンプル H0903 のタイピング結果

H0903 Labs	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
	*0406	*0406	4*0103	4*0103	*03011	*03011	*0302	*0302	*0103	*0202	*02012	*0501
1	0406	-	nt		*03	-	*0302	-	nt		nt	
2	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
3	0406	-	nt		*03011	-	*0302	-	nt		*0201	*0501
4	0406	-	4*0103		*03	-	*0302	-	nt		*0201/*3201	*0501/*3801
5	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
6	0406	-	nt		nt		*04	-	nt		nt	
7	0403/6	*0404	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
8	04	-	B4		nt		nt		nt		nt	
9	0406	*0403	4*01		nt		nt		nt		nt	
10	0406	-	nt		*0301/2	-	*0302	-	nt		*0201	*0501
11	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		nt	
12	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
13	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501
14	0406	-	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0501
15	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501
16	0406	-	4*0103		*0301	-	*0302	-	*0103	*0202	*0201	*0501
17	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt	
18	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt	
19	0406	-	B4		nt		*0302	-	nt		nt	
20	04	*13	B4	B3	nt		nt		nt		nt	
21	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
22	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt	
23	0406	-	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0501
24	0403	-	4*01011		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501
25	*04	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501
26	0406	-	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		nt	
27	0406	-	nt		*0301	-	*0302	-	nt		*0201	*0501
28	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
29	0406	-	4*0103		*03	-	*0302	-	nt		*0201	*0501
30	0406	-	4*01		nt		*0302	-	nt		nt	
31	0406	-	4*01		*0301	-	*0302	-	nt		*02012	*0501
32	0406	-	nt		nt		nt		nt		nt	
33	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501
34	0406	-	nt		nt		*0302	-	nt		*0801	*0501
35	0406	-	4*01011		nt		*0302	-	nt		*0201	*0501
36	0406	-	4*01		nt		nt		nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0302	-	*01	*02	*0201	*0501

望ましいと思われる。SSO 法については、プローブの反応パターンの読み違いによる判定ミスが多く見かけられた。これを予防するためには、結果を必ず記入用紙に書き込んでから、判定表にしたがってアリルを同定すべきである。また、前記と同じように二人が独立にタイピング結果を判定すべきであろう。SSP 法は、プライマーの分注時点での誤り、電気泳動の際に PCR 産物の入れ違いなどによるミスが見かけられた。従って、タイピングミスの多くは、

細心の注意を払えば防げるものである。出された結果に従って移植の選択が行われるわけであるから、どんなに忙しくても、結果判定は、血液型のように二人が独立して行い、最終的に読み合わせるといような方法が望まれる。

今回の結果を見ると、DRB1 *0406 があるのに DQB1 を *04 とタイプしていたり、また、DRB1 *0405, 08032 であるのに DQB1 に *0601 以外の *06 タイプを出している施設が見かけられたが、

表 6. DNA サンプル H0904 のタイピング結果

H0904 Labs	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*05031	*0603	*0202	-	*0501	-
1	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0101/4	*0503	*0603	nt		nt	
2	*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0602	nt		nt	
3	*1301	*1401	nt		*0103	*0104	*05031	*0603	nt		*0501	-
4	*1301	*1401	3*0202	-	*0103	*0101/4	*0503	*0602/3	nt		*0901	*0201/*3201
5	*1201	*1408	nt		nt		*0501	*0602/3	nt		nt	
6	*1301	*1401	nt		nt		*05	not *0601	nt		nt	
7	*03012	*1416	3*02	3*01	nt		*0503	*0603	nt		nt	
8	*13	*14	B4		nt		nt		nt		nt	
9	*1301	*1401	3*01/02		nt		nt		nt		nt	
10	*1301	*1401	nt		*0103	*0101/4/5	*0503	*0603	nt		*0501	-
11	*1301	*1401	nt		nt		*0503	*0603	nt		nt	
12	*1301	*1401	3*02	3*0101	nt		*05031	*0603	nt		nt	
13	*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0603	nt		*0501	-
14	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0101	*0503	*0603	nt		*0501	-
15	*1301	*1401	nt		nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
16	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*05031	*0603	*0202	-	*0501	-
17	*1301	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
18	*1301	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
19	*1301	*1401	B3		nt		*0503	*0603	nt		nt	
20	*13	*14	B3		nt		nt		nt		nt	
21	*1301	*1401	3*0202	3*0101	nt		*0503	*0603	nt		nt	
22	*1301	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
23	*1102	*1408	nt		*0103	*0102	*05031	*0603	nt		*0501	-
24	*1301	*1401	3*0201/2	3*0101	nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
25	*13	*14	nt		nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
26	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0104	*0503	*0603	nt		nt	
27	*1301	*1401	nt		*0103	*0104	*0503	*0603	nt		*0501	-
28	*1301	*1401	3*0202	3*0101	nt		*0503	*0603	nt		nt	
29	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*01	*05031	*0603	nt		*0501	-
30	*1301	*1401	3*02	3*0101	nt		*05032	*0603	nt		nt	
31	*1301	*1401	3*0202	3*0101	*0103	*0101/4	*05031	*0603	nt		*0501	-
32	*1302	*1401	nt		nt		nt		nt		nt	
33	*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0603	nt		*0501	-
34	*1301	*1401	nt		nt		*05031	*0603	nt		*0501	*3801
35	*1301	*1401	3*0201	3*0301	nt		*0503	*0603	nt		*0501	-
36	nt		3*0202	3*0101	nt		nt		nt		nt	
37			3*0202	3*0101	nt		*05032	*0603	*02	-	*0501	-

結果判定の際に DQB1 も含めて DRB3, B4 や B5 との連鎖不平衡を考慮していれば, 再検を行うなどの方法により誤判定は防げたと思われる. 一般的に報告されている日本人における HLA 遺伝子座の連鎖不平衡を考慮に入れていけば, そのような判定結果に疑問をいだくはずである. また, DNA タイピングに関して一つの方法しか採用していない施設では, 仮にデータに疑問を感じても, 他の方法で確認することができない. より正確なタイピングを行う

ためには日頃から方法論の異なる DNA タイピング法をバックアップシステムとして採用し, 必要に応じて2つの方法を, あるいは常に2つの方法を同時に行う必要があると考えられる.

まとめ

タイピング精度を上げるためには, (1)DNA 抽出, PCR 実施の際におけるコンタミネーション予防策を実施する, (2)それぞれの DNA タイピング法の

表7. DNA サンプル H0905 のタイピング結果

H0905 Labs	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
	*04051	*08032	4*0103		*0303	*0103	*0401	*0601	*0202	-	*02012	*1901
1	*0405	*0803	nt		*03	*0103	*0401	*0601	nt		nt	
2	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		nt	
3	*04051	*08032	nt		*0302	*0103	*0401	*0601	nt		*0201	*1901
4	*0405	*0803	4*0103		*03	*0103	*0401	*0601	nt		*0201/*3201	*1901
5	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		nt	
6	*0405	*08032	nt		nt		-	not*0601	nt		nt	
7	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*06011	nt		nt	
8	*04	*08	4*01		nt		nt		nt		nt	
9	*0405	*0801	4*01		nt		nt		nt		nt	
10	*0405	*0803	nt		*0301/2	*0103	*0401	*0601	nt		*0201	*1901
11	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		nt	
12	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
13	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
14	*0405	*0803	nt		*0301	*0103	*0401	*0601	nt		*0201	*1901
15	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
16	*0405	*08032	4*0103		*0302	*0103	*0401	*0601	*0202	-	*0201	*1901
17	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
18	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
19	*0405	*0803	B4		nt		*0401	*06011	nt		nt	
20	*09	-	4*01		nt				nt		nt	
21	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
22	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
23	*0405	*0803	nt		*0301	*0103	*0401	*0601	nt		*0402	*1901
24	*0405	*0803	4*01011		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
25	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
26	*0405	*0803	4*01		*0302	*0103	*0401	*0601	nt		nt	
27	*0405	*0803	nt		*0302	*0103	*0401	*0601	nt		*0401	*1901
28	*0405	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
29	*0405	*08032	4*0103		*03	*0103	*0401	*06011	nt		*0201	*1901
30	*04	*0803	4*01		nt		*0401	*0601	nt		nt	
31	*0405	*0803	4*01		*0301	*0103	*0401	*06011	nt		*02012	*1901
32	*0405	*0803	nt		nt				nt		nt	
33	*0405	*0803	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
34	*0405	*08032	nt		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*0801
35	*0405	*0803	4*01011		nt		*0401	*0601	nt		*0201	*1901
36	*0405	*0803	4*01		nt				nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0401	*0601	*02	-	*0201	-

特徴を熟知する, (3)HLA アリル間の連鎖不平衡をよく理解し, 判定の際に考慮する (疑問があれば, 再検する), (4)結果判定は二人が独立して行う (または, 2度繰り返す), (5)方法論の異なる DNA タイピング法をバックアップシステムとして採用し, 必要に応じて2つの方法を, あるいは常に2つの方法を同時に行う, などが必要である. 今回の QC では DNA 抽出に関するワークショップを行わなかったが, DNA 抽出は, タイピング精度の上で重要な

ファクターのひとつであると思われる. すなわち, ID の取り違い, コンタミネーション, 回収された DNA の純度などによって間違った結果をもたらす可能性があるからである. 今後のワークショップでは, この問題を含めた QC が必要であると考えている.

表 8. DNA サンプル H0906 のタイピング結果

H0906 Labs	DRB1		DRB3/4/5		DQA1		DQB1		DPA1		DPB1	
	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	*0103	-	*02012	-
1	*1501	-	nt		*0102	-	*0602	-	nt		nt	
2	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		nt	
3	*1501	-	nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
4	*1501/3	-	5*0101		*0102	-	*0602/3	-	nt		*0201/*3201	
5	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		nt	
6	*1501	-	nt		nt		not*0601		nt		nt	
7	*15	-	5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
8	*15	-			nt		nt		nt		nt	
9	*1501	*1501/*1606	5*0101		nt		nt		nt		nt	
10	*1501/3	-	nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
11	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		nt	
12	*1501	-	5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
13	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
14	*1501	-	nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
15	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
16	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	*0103	-	*0201	-
17	*1501	-	nt		nt		nt		nt		nt	
18	*1501	-	nt		nt		nt		nt		nt	
19	*1501	-	B5		nt		*0602	-	nt		nt	
20	*15	-	B5		nt		nt		nt		nt	
21	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		nt	
22	*1501	-	nt		nt		nt		nt		nt	
23	*1501	-	nt		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	*0402
24	*1501	-	5*0101		nt		*0602	-	nt		*0201	-
25	*02	-	nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
26	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	nt		nt	
27	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	nt		*0201	-
28	*1501	-	5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
29	*1501	-	5*0101		*01	-	*0602	-	nt		*0201	-
30	*1501	-	5*0101		nt		*0602	-	nt		nt	
31	*1501	-	5*0101		*0102	-	*0602	-	nt		*02012	-
32	*1501	-	nt		nt		nt		nt		nt	
33	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
34	*1501	-	nt		nt		*0602	-	nt		*0201	-
35	*1501	-	5*0101		nt		*0602	-	nt		*02011/12	*02012
36	*1501	-	5*0101		nt		nt		nt		nt	
37	nt		nt		nt		*0602	-	*01	-	*0201	-

表9. 生データで見た場合の各サンプル DNA のミスタイプ率

Sample #	<i>DRB1</i> (n = 36)		<i>DRB3/4/5</i> (n = 17)		<i>DQA1</i> (n = 11)		<i>DQB1</i> (n = 28)		<i>DPBI</i> (n = 17)		ミスタイプ数
H0901	*0403 1 (3%)	*0406 0	4*0103 2 (12%)		*03011 0	-	*0302 0	-	*02012 0	*0401 1 (6%)	4
H0902	*04051 0	*0901 0	4*0103 2 (12%)		*0303 8 (73%)	*0302 3 (27%)	*0401 1 (4%)	*03032 0	*0501 0	- 1 (6%)	12
H0903	*0406 1 (3%)	*0406 3 (8%)	4*0103 2 (12%)	4*0103 1 (6%)	*03011 0	*03011 0	*0302 1 (4%)	*0302	*02012 1 (6%)	*0501 0	9
H0904	*1301 4 (11%)	*1401 3 (8%)	3*0202 2 (12%)	3*0101 1 (6%)	*0103 0	*0104 2 (18%)	*05031 3 (11%)	*0603 1 (4%)	*0501 1 (6%)	- 2 (12%)	19
H0905	*04051 1 (3%)	*08032 2 (6%)	4*0103 2 (1%)		*0303 8 (73%)	*0103 0	*0401 1 (4%)	*0601 1 (4%)	*02012 2 (12%)	*1901 2 (12%)	19
H0906	*1501 0	- 0	5*0101 0	-	*0102 0	-	*0602 0	-	*02012 0	- 1 (6%)	1
正解施設数	28 (78%)		13 (76%)		3 (27%)		23 (82%)		11 (65%)		
ミスタイプ率	15/432 (3.5%)		12/187 (6.4%)		21/132 (15.9%)		8/336 (2.4%)		11/204 (5.4%)		67/1291 (5.2%)

表10. Low resolution で見た場合の各サンプル DNA のミスタイプ率

Sample #	<i>DRB1</i> (n = 36)		<i>DRB3/4/5</i> (n = 17)		<i>DQA1</i> (n = 11)		<i>DQB1</i> (n = 28)		<i>DPBI</i> (n = 17)		ミスタイプ数
H0901	*04 0	- 0	4*01 0		*03 0	-	*03 0	-	*02 0	*04 0	0
H0902	*04 0	*0901 0	4*01 0		*03 0	-	*04 0	*03 0	*0501 0	- 1 (6%)	1
H0903	*04 0	*04 1 (3%)	4*01 0	4*01 1 (6%)	*03 0	*03 0	*03 1 (4%)	*03	*02 1 (6%)	*0501 0	4
H0904	*13 3 (8%)	*14 0	3*02 1 (6%)	3*01 1 (6%)	*01 0	-	*05 0	*06 0	*0501 1 (6%)	- 2 (12%)	8
H0905	*04 0	*08 1 (3%)	4*01 0		*03 0	*01 0	*04 1 (4%)	*06 0	*02 2 (12%)	*1901 2 (12%)	6
H0906	*15 0	- 0	5*01 0	-	*01 0	-	*06 0	-	*02 0	- 1 (6%)	1
正解施設数	32 (89%)		14 (82%)		11 (100%)		26 (93%)		11 (65%)		
ミスタイプ率	5/432 (1.2%)		3/187 (1.6)		0/132 (0.0%)		2/336 (0.6%)		10/204 (4.9%)		20/1291 (1.5%)