

第7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⁾, 成瀬 妙子²⁾, 柏瀬 貢一³⁾, 木村 彰方⁴⁾, 徳永 勝士⁵⁾,
斎藤 敏⁶⁾, 佐田 正晴⁷⁾, 橋本 光男⁸⁾, 小河原 悟⁹⁾, 前田 平生¹⁰⁾

(第7回日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会)

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⁾日本赤十字社中央血液センター, 検査三課
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⁾長野県赤十字血液センター, 検査課
⁷⁾国立循環器病センター研究所, 実験治療開発部 ⁸⁾兵庫県立西宮病院, 腎移植センター ⁹⁾福岡大学医学部, 腎センター
¹⁰⁾埼玉医科大学総合医療センター, 輸血部

はじめに

昨年度の大会で初めて DNA の QC ワークショップを開催したが, 改めてその意義の重要性が認識されたことは記憶に新しい。DNA タイピングは, 得られた結果に全幅の信頼をいただくことが多いが, 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, というような検討を昨年度の QC ワークショップで解析した。その結果が本大会でどのように反映されているのか, また, 新しく参加した施設の精度はどのようなかということに主眼をおき, 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なるべく型判定が容易にできるように, 日本人に見られるタイプを主に採用した。DNA サンプルは, HLA クラス I および II 遺伝子型が既知の健康成人 6 人の EDTA 加末梢血より, 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 クラス遺伝子のアリルタイプを表 1 に示す。今回配布した DNA サンプルは, 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 (H1001 ~ H1006) は, 分離した翌日に通常の郵便 (室温状態) で, 参加申し込みのあった 61 施設に送付した。タイピング結果が返送された 56 施設のデータについて解析を行った。

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については, DRB1 を必須として, その他の遺伝子は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 PCR 装置, Taq DNA ポリメラーゼなどをまとめた集計結果を表 2 に示す。また, 各施設で採用していたタイピング方法は, 表 3 ~ 表 8 に示すとおりである。DRB1 タイピングデータが返送された 55 施設中 20 施設が一つの方法でアリルをタイプしていた。このような施設では表記ミスも含めてタイピングミスが多く見かけられた。

筆頭筆者連絡先: 〒359 埼玉県所沢市並木 3-2
防衛医科大学校検査部
小林 賢

電話: 042-995-1511 内線 3721
ファックス: 042-996-5217
E-mail: kobayasi@ri.ndmc.ac.jp

表 1. QC ワークショップで使用されたサンプルの HLA アリル

Sample #	#1001		#1002		#1003	
DRB1	*15021	*1602	*1302		*0403	*04051
DRB3/4/5	B5*0102	B5*0202	B3*0301		B4*0103	
DQA1	*0102	*0103	*0102		*03011	*0303
DQB1	*06011	*0502	*0604		*0302	
DPB1	*0202	*0501	*02012	*0401	*02012	
HLA-A	*1101	*2402	*3303		*2402	
HLA-B	*51021	*67011	*44031		*4001	*4002
HLA-C	*1502	*0702	*1403		*0304	

Sample #	#1004		#1005		#1006	
DRB1	*1301	*1401	*0401		*03011	*1302
DRB3/4/5	B3*0101	B3*0202	B4*0103		B3*0202	B3*0301
DQA1	*0103	*0104	*03011		*0102	*05011
DQB1	*0603	*05031	*0302		*0201	*0604
DPB1	*0501		*0401		*0401	*0501
HLA-A	*0207	*2402	*0201		*1101	*3303
HLA-B	*1518	*5401	*1501		*67011	*5801
HLA-C	*0704	*0102	*0304		*0702	*0302

表2. 各施設で使用している Taq DNA polymerase と PCR 装置

Taq DNA Polymerase		<i>n</i>	Thermal Cycler		<i>n</i>
AmpliTaq	Perkin Elmer	27	9600 (R)	Perkin Elmer	41
AmpliTaq Gold	Perkin Elmer	6	9700	Perkin Elmer	1
Takara Taq	宝酒造	10	2000	Perkin Elmer	5
Takara Taq EX	宝酒造	2	2400	Perkin Elmer	1
	Boehringer	2	TSR-300	岩城硝子	4
	Toyobo	1	PC-700	アステック	1
	Promega	1	PC-800	アステック	2
			TP-3100	宝酒造	1
			Personal	宝酒造	1
			ザイモリアクターII	アトー	2
			オムニジーン		1
			サンサーモPCR	三光純薬	1

55 Laboratories

MPHとAmplicorは添付のTaqを使用

表3. 一つの方法で DRB1 をタイプした場合に
利用された方法

Methods	Kits	Companies	<i>n</i>
MPH	DR Allele Typing	Wakunaga	1
			1
RFLP	SmiTest	Sumitomo	6
		自家製	3
			9
SSP	DRB Low Resolution	Dynal	2
	DRB High Resolution	Dynal	1
	Micro SSP	One Lambda	1
			4
rSSO	Amplicor DRB	Roche	2
SSO	ELPHA DRB Low resolution	Biotest	1
		自家製	1
			2
TMA-HPA	HLA-DR	Chugai	1
			20

20 Laboratories

表4. DQB1 をタイプするのに利用されている方法

Methods	Kits	Companies	<i>n</i>
MPH	DQ Typing	Wakunaga	2
	DR Allele typing		1
			3
RFLP	SmiTest	Sumitomo	7
		自家製	10
			16
SSP	DQB low resolution	Dynal	2
	DQB1-SSP 1st & 2nd	Dynal	2
	Micro SSP	One Lambda	1
		自家製	3
			8
rSSO	INNO-LiPA DQB	Innogenetics	7
SSO		自家製	3
SSCP		自家製	5
PHFA		自家製	1
			44

31 Laboratories

表 5. DPB1 をタイプするのに利用されている方法

Methods	Kits	Companies	n
RFLP	SmiTest	Sumitomo	7
		自家製	8
			15
SSP		自家製	2
rSSO	INNO-LiPA DPB	Innogenetics	6
SSCP		自家製	1
PHFA		自家製	1
			25

20 Laboratories

表 7. DRB1 のアレル決定に用いられた方法

19

Methods	Kits	Companies	n
MPH	DR2	Wakunaga	2
	DR4	Wakunaga	3
	DR3/11/13/14	Wakunaga	4
	DR High Resolution	Wakunaga	1
			10
RFLP	SmiTest	Sumitomo	3
		自家製	11
			14
SSP	DRB Low Resolution	Dynal	2
	DRB High Resolution	Dynal	4
	DRB1*04	Dynal	2
	Micro SSO High Resolution	One Lambda	1
		自家製	3
			12
rSSO	Amplicor DRB	Roche	3
	INNO-LiPA DRB1*04	Innogenetics	1
			4
SSO		自家製	1
SSCP		自家製	12
			53

35 Laboratories

我々が昨年のワークショップでも提唱したように、2種類以上の方法論の異なるタイピング法で同定することで、タイピングミスを最低限に抑えることができるようになる。表9～表12にタイピング法を複数採用している施設での組み合わせを示した。

DRB について

今回配布したサンプルの DRB アレルは、#H 1001 が DRB1*1502, *1602, DRB5*0102, *0202, #H

表 6. DRB1 で複数の方法を用いた場合に最初に選択された方法

Methods	Kits	Companies	n
MPH	DR Typing	Wakunaga	12
SSP	DRB Low Resolution ABDR Kit	Dynal	6
		Pelfreeze	1
			7
rSSO	Amplicor DRB	Roche	12
	INNO-LiPA DRB Key	Innogenetics	5
			17
SSO	ELPHA DRB Low resolution	Biotest	1
			2

35 Laboratories

表 8. DRB1 タイピングで利用された方法

Methods	Kits	Companies	n
MPH	DR Typing	Wakunaga	12
	High Resolution	Wakunaga	1
	DR Allele Typing	Wakunaga	1
	DR2	Wakunaga	2
	DR4	Wakunaga	3
	DR3/11/13/14	Wakunaga	4
			18
RFLP	SmiTest	Sumitomo	9
		自家製	14
			23
SSP	DRB Low Resolution	Dynal	10
	DRB High Resolution	Dynal	5
	DRB1*04	Dynal	2
	Micro SSP	One Lambda	1
	Micro SSP High Resolution	One Lambda	1
	ABDR Kit	Pelfreeze	19
		自家製	3
		23	
rSSO	Amplicor DRB	Roche	17
	INNO-LiPA DRB Key	Innogenetics	5
	INNO-LiPA DRB1*04	Innogenetics	1
			23
SSO	ELPHA DRB Low resolution	Biotest	2
		自家製	3
			5
TMA-HPA	HLA-DR	Chugai	1
SSCP		自家製	12
			105

55 Laboratories

表 9. DRB1 タイピングで利用された方法論

DRB1				
Methods	Single <i>n</i>	1st choice <i>n</i>	Determination <i>n</i>	Total <i>n</i>
MPH low	0	12	0	12
MPH high	1	0	5	6
RFLP	9	0	14	23
SSP low	3	7	2	12
SSP high	1	0	10	11
rSSO low	2	17	3	22
rSSO high	0	0	1	1
SSO low	1	1	0	2
SSO high	2	0	2	3
SSCP	0	0	12	12
TMA-HPA	1	0	0	1
	20	37	48	105

55 Laboratories

表 10. DRB1 タイピング法の組み合わせ

Combinations	<i>n</i>	Additions	<i>n</i>
MPH low—MPH high	3	+ SSCP	1
MPH low—RFLP	6	+ SSCP	3
MPH low—SSCP	3		
MPH high—SSCP	1		
RFLP—MPH high	1	+ SSCP	1
RFLP—SSP high	1		
SSP low—RFLP	1	+ SSP high	1
rSSO low—RFLP	5	+ SSCP	1
		+ rSSO	1
		+ SSP high	2
rSSO low—SSP high	5	+ SSP high	1
		+ SSP/SSCP	1
		+ rSSO low	1
rSSO low—SSP low	5		
rSSO low—SSO high	1	+ SSP low	19
19 Laboratories	1	+ SSP low	1
rSSO low—SSCP	1		
SSO low—SSP high	1		
	35		14

1002 が DRB1*1302, DRB3*0301, #H1003 が DRB1*0403, *0405, DRB4*0103, #H1004 が DRB1*1301, *1401, DRB3*0101, *0202, #H1005 が DRB1*0401, DRB4*0103, #H1006 が DRB1*0301, *1302, DRB3*0202, *0301 である。#H1002 と #H1005 が完全なホモ接合体, #H1001 と

表 11. DQB1 タイピング法の組み合わせ

Combinations	<i>n</i>
MPH low—PHFA	1
RFLP—SSP high	3
RFLP—SSCP	3
SSP low—SSO	1
SSP low—SSCP	1
rSSO high—RFLP	1
rSSO high—SSP high	1
rSSO high—SSCP	1
SSO high—SSP high	1
	36

表 12. DPB1 タイピング法の組み合わせ

Combinations	<i>n</i>
RFLP—SSP high	2
rSSO high—RFLP	2
rSSO high—SSCP	1
	5

#H1004 が血清学的にスプリットとなるヘテロ接合体, #H1003 が血清学的にホモでアリルレベルでヘテロ接合体, #1006 が完全にヘテロ接合体である。各施設で報告してきたDRB1 アリルを表 13 に, DRB 3/4/5 アリルを表 14 に示す。

サンプル#1001

DRB1*15 と DRB1*16 のヘテロ接合体であるサンプル#1001 は, Amplicor を使用してタイプした場合, DRB1*02 としか決めることができないが, DRB 5 との連鎖不平衡から DRB1*15 か, DRB1*16 かを推定することが可能である。しかしながら, このサンプルの場合, DRB1*1502 が DRB5*0102 と

表 14. 各施設でタイプされた HLA-DRB3, B4, B5 アリルの一覧

#	#1001		#1002		#1003		#1004		#1005		#1006		Method (1)	Method (2)	Method (3)
	DRB5	DRB3	DRB4	DRB3	DRB4	DRB3	DRB4	DRB3	DRB4	DRB3	DRB4	DRB3			
1	*0102	*0202													
2															
3	*01-02														
4															
5															
6															
7	*0102														
8															
9															
10															
11															
12															
13	*01021														
14															
15															
16															
17	*0102														
18															
19															
20	*0102														
21	*0102														
22	*0102														
23															
24	*0102														
25	*0102														
26	*0102														
27	*0102/02012														
28															
29	*0102														
30															
31															
32															
33	*0102														
34	*0102														
35															
36	51														
37	51														
38															
39															
40	*0102														
41															
42															
43															
44															
45															
46	*0102														
47															
48	*0102														
49	*0102														
50															
51															
52	*0102														
53	*0102														
54	*0102														
55															

* : ミスタイプ

*xxx/ : 表記ミス

連鎖不平衡を示しており、その反応パターンが DRB5*0202 の反応に包含されてしまい、特定することができない。そのため、反応パターンと連鎖不平衡を考慮して判定すると DRB1*16, blank という結果になってしまう。実際、日本人における DRB1*1602 の頻度は 0.8% であり、そのホモ接合の頻度になると計算上 0.0064% となり、ほとんど存在していないことになる。したがって、このような結果は非常に考えにくいので、判定結果に誤りや検出できなかったアレルが存在するかもしれないということも考慮し、判定に使用したタイピング方法とは異なった手法を用いて追加試験を実施することが望まれる。また、タイピングキットの中には DRB5*0201 と DRB5*0202 が同一の反応パターンを示すように記されているものがあるが、現在 WHO の命名委員会で DRB5*0201 にはシークエンスエラーが

表 15. 命名から削除された HLA クラスII アレル

削除されたアレル	対応するアレル
DRB1*0702	DRB1*0701
DRB1*1313	-
DRB1*08031	DRB1*08032
DRB1*09011	DRB1*09012
DRB1*12031	DRB1*1201
DRB1*1606	DRB1*1605
DRB5*0201	DRB5*0202
DQA1*03012	DQA1*0302
DQB1*03031	DQB1*03012
DPA1*0101	DPA1*0103
DPA1*0102	DPA1*0103
DPB1*02011	DPB1*02012
DPB1*4201	DPB1*3101
DPB1*4301	DPB1*2801

あったため、命名表からこのアレル名は削除されている。そのため、このような反応がみられた場合には今後、DRB5*0202 と記すべきである。現在までに命名表から削除されているアレル名を表 15 にまとめた。

サンプル#1002

一施設を除き DRB1*1302 は正しくタイプされていた。しかし、3施設で DR*13 のヘテロ接合が報告されている。その原因として、rSSO の 2施設では、反応の読み間違いと判定の解釈ミスによるものであった。また、RFLP では、結果記入用紙への転記ミスによるものであった。このサンプルを Amplicor でタイプした場合、DRB1*1301, *1302, *1316 とタイプされるが、DRB 3 が *0301 とタイプされることから、これとの連鎖不平衡で DRB1*1301 は否定される。また、DRB1*1316 は日本人において非常にまれなアレルであるから、DRB1*1302 とタイプしてもさほど問題にならないと考えられる。しかしながら、それ以外の市販キットである DYNAL SSP low resolution や One Lambda micro SSP (DR/DQ low resolution) では、DRB3*0301 をタイプできない関係から連鎖不平衡を考慮に入れられないので 2桁レベルのタイプ、すなわち、DRB1*13 としかタイプすることができない。

サンプル#1003

#1003 は、血清学的にはホモで、アレルレベルでヘテロ接合なサンプルである。RFLP 法でのミスが 2施設でみられている。この原因は、泳動された DNA フラグメントの細かいサイズの相違を判定できなかったことによるミスである。このような細かい違いを判定しなくてはならないということは予測がつくわけであるから、ゲルのサイズを大きくして泳動距離を長くするとか、ゲルの種類を変えるとか、濃度を変えるとかという工夫が望まれる。

サンプル#1004

#1004 は #1001 と同様、血清学的にはスプリットであるサンプルである。また、このサンプルは前回の QC ワークショップで #0904 として提出され

たものと同一パネルから採取した DNA である。このサンプルを配布したのは、前回のワークショップでもっとも成績が悪かったのが、今回どれくらいタイピング精度が向上しているかを調査するのに最適であったからである。今回の成績は、全ラボ満点で、昨年の4桁でのミスタイプ率が DRB1*1301 で 11%、DRB1*1401 で 8% であったのが、どちらのアリルについても 0% であった。全体的にも昨年の4桁での DRB1 ミスタイプ率が 3.5% であったのに対し、本年は 2.3% と 1.2 ポイント向上していた。昨年は、2桁レベルでもミスタイプが数パーセント存在していたが、今回は全くミスがみられなかった。

サンプル#1005

この#1005は、DRB1*0401, DRB4*0103 のホモ接合体のサンプルである。DRB1*0401, DRB4*0103 については一施設を除き正しく同定されていたが、一部に余分なアリルの記載がみられた。Amplicor を使用した施設の場合、反応パターンからの判定ミスによるものと考えられる。また、RFLP 法では、切断された DNA フラグメントのサイズを判読するときに見間違えてしまったことが原因であった。一施設では DRB1*0408, blank と報告しているが、その原因もやはり前述と同じように判読ミスによるものと思われる。しかしながら、DRB1*0408 の日本人における頻度は、0.1% 未満であり、これがホモ接合になる可能性は極めて低いことから、このような結果になってしまった場合には、もう一度やり直すか、別の方法で確認試験を実施するべきであると思われる。

サンプル#1006

この#1006は、血清学的にもアリルレベルでも完全にヘテロ接合体のサンプルである。DRB1*0301, DRB1*1302, DRB3*0202 と DRB3*0302 のいずれも正しくタイプされていた。

今回のワークショップでも、前回と同様に完全なヘテロ接合体のタイピング結果は概ね問題なく同定されていた。しかしながら、完全なホモ接合体の場合、余分なアリルの同定が見受けられた。この特徴

として、同定されたアリルの片方は正しいが、もう片方のアリルが必ず2桁レベルで同じアリルになっているということである。そのため、2桁レベルで同じアリルが4桁で2種類が同定された場合には、別な方法などで確認試験を行うことが望まれる。

DQ および DP について

DQA1 (表 16) については、昨年と同様にエクソン2だけのタイピングではそのアリルを特定できないというミスがほとんどであった。例えば、DQA1*0104, *0105 は DQA1*0101 とエクソン1と4に塩基の違いがあるため、エクソン2のみでタイピングを行うと見分けができない。エクソン2のみでタイプした場合には DQA1*0101/4/5 または DQA1*01 と記載すべきである。

DQB1 のタイピング結果 (表 17) については、概ね良好であった。SSP 法を採用している一部の施設で擬陽性の増幅反応がみられたために余分なアリルが報告されている。

DPB1 (表 18) については、昨年の QC ワークショップではかなり成績が思わしくなかったが、今年の結果は、非常に素晴らしいものであった。

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、一部の施設で全く存在しない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。全ミスタイプ率を表 19 と表 20 に示すが、昨年のワークショップと比較して多くの遺伝子座で成績が向上している。特に、DRB3 / 4 / 5, DQA1 と DPB1 などの high resolution の成績の向上が著しかった。Low resolution については、昨年と大差なかったが、DRB1, DRB3 / 4 / 5 と DQA1 は昨年よりも 0.1 ~ 2 ポイントと若干ではあるが、成績が落ちていた。

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。rSSO 法などで、発色されたバンドが非常に薄い擬陽性を

表 16. 各施設でタイプされた HLA-DQA1 アリルの一覧

#	#1001		#1002	#1003		#1004	#1005	#1006		Method (1)	Method (2)
	*0102	*0103	*0102	*03011	*0303	*0103	*0104	*03011	*0102		
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22			*0101								
23				*0301		*0103			*0501		RFLP
24	*01	*0103	*01	*03	*0103	*01			*0501		RFLP
25											
26	*01	*0103	*01	*03	*0103	*01			*05		RFLP
27											
28											
29	*0102	*0103	*0102	*03011	*0303	*0104			*0501		RFLP
30											SSP
31											
32											
33	*01	*0103	*0102	*03	*0103	*01			*05		RFLP
34	*0102	*0103	*0102	*03011	*0103	*0104			*0501		SSP
35											
36											
37											
38											
39	*0102	*0103	*0102	*0301	*0302	*0104			*0501		SSO
40	*0102	*0103	*0102	*03011	*0303	*0104			*05011		SSP
41											
42											
43											
44											
45											
46											
47											
48											
49	*0102	*0103	*0102	*03	*0103	*0101/4			*0501		RFLP
50											
51											
52	*0102	*0103	*0102	*03	*0103	*0101/4/5			*0501/3		RFLP
53											
54											
55											

* : ミスタイプ
 *xxxv/ : 表記ミス

陽性反応として採用したことで異なったアリルになってしまうというケースが見受けられた。これは、SSP 法でも同様で、擬陽性反応なのか真の陽性反応なのか予めプライマーの特性を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や結果記入用紙への転記ミスなどの単純な間違いがあった。出された結果に基づい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うような方法が望まれる。また、転記

した後も記載事項に間違いがないか二人で読み合わせてチェックすべきである。

今回の結果を見ると、サンプル #1002 で DRB1*1301 と DRB1*1302 が同定されているのに DQB1 が *0604 しかタイプされていないという事例があった。DRB1*1302 は DQB1*0604 と連鎖不平衡を示しているが、DRB1*1301 は DQB1*0603 と連鎖不平衡にある。DR と DQ とで結果に矛盾がみられるわけであるから、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

表 17. 各施設でタイプされた HLA-DQB1 アリルの一覧

#	#1001		#1002	#1003		#1004		#1005	#1006		Method (1)	Method (2)	Method (3)
	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302	*05031	*0603	*0201			
1	*0502	*0601									MPH DQ typing		
2	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP スマイトテスト		
3													
4													
5													
6													
7	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	RFLP	
8	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP スマイトテスト		
9	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	MPH DQ typing	PHFA	
10													
11													
12													
13													
14	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP スマイトテスト	住友金属	
15													
16													
17													
18													
19	*05	*06	*06	*03	*05	*06	*03		*02	*06	SSP Micro SSP	One Lambda	
20													
21													
22	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP		
23													
24	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP		
25	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201/2	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	SSCP	
26	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP	SSCP	
27													
28	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	Immogenetics	
29	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP		
30													
31	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	SSO	11thIHW	
32	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP スマイトテスト	住友金属	
33	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	Immogenetics	
34	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	SSO	SSCP	
35													
36	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201/2	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	Immogenetics	
37													
38	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302	*0301	*0201	*0604	RFLP スマイトテスト	住友金属	
39	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302	*0301	*0201	*0604	SSO		
40	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP	SSP	
41	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP スマイトテスト	住友金属	
42													
43	*0502	*0601	*0604	*0302			*0302		*0201	*0604	RFLP		
44	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP		
45	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	Immogenetics	
46	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	SSP DOB low resolution	Dynal	
47	*05	*0601	*06 not *0601	*03 not *0301	*05	*06	*03 not *0301		*02	*06 not *0601	MPH DR allele typing	湧水製薬	
48													
49	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP	SBT	
50	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP スマイトテスト	住友金属	
51	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201	*0604	RFLP	DOB1-SSP 1st & 2nd	Dynal
52	*0502	*0601	*0604	*0302	*05031	*0603	*0302		*0201/2	*0604	RFLP	SSCP	
53	*0502	*0601	*0604	*0302	*0503	*0603	*0302		*0201/2	*0604	rSSO INNO-LJPA DOB	Immogenetics	
54													
55													

※ : ミスタイプ

表 18. 各施設でタイプされた HLA-DQB1 アリルの一覧

#	#1001		#1002		#1003	#1004	#1005	#1006		Method (1)	Method (2)		
	*0202	*0501	*02012	*0401	*02012	*0501	*0401	*0401	*0501				
1													
2	*0202	*0501	*0201	*0402	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP スマイテスト 住友金属	
3													
4													
5													
6													
7	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	rSSO DPB InnoLiPA	RFLP
8	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP スマイテスト 住友金属	
9	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	PHFA	
10													
11													
12													
13													
14	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP スマイテスト 住友金属	
15													
16													
17													
18													
19													
20													
21													
22	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	
23													
24	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	rSSO DPB InnoLiPA	
25	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	rSSO DPB InnoLiPA	
26	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	
27													
28	*0202	*0501	*0201	*0401	*02012	*02011/	*0501		*0401	*0401	*0501	rSSO DPB InnoLiPA	
29	*0202	*0501	*02012	*0401	*02012		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	SSP
30													
31													
32	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP スマイテスト 住友金属	
33	*0202	*0501	*02012	*0401V	*02012		*0501		*0401	*0401	*0501	rSSO DPB InnoLiPA	SSCP
34	*0202	*0501	*02012	*0401	*02012		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	
35													
36													
37													
38													
39													
40	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	SSP
41	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP スマイテスト 住友金属	
42													
43													
44	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	
45													
46													
47													
48													
49	*0201	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	SBT
50	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP スマイテスト 住友金属	
51	*0201	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	rSSO DPB InnoLiPA	RFLP スマイテスト 住友金属
52	*0202	*0501	*0201	*0401	*0201		*0501		*0401	*0401	*0501	RFLP	
53													
54													
55													

■ : ミスタイプ

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が生じたはずである。日本人に見かけられる連鎖不平衡を表 21 にまとめたので、参考にしていただきたい。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。

今回のワークショップで、タイピング結果を記入用紙に書き込む際に、判定表からタイプされるアリルの可能性が複数存在するような場合に、そのグループに書かれているアリル名の一番最初にあるアリル名だけが記載されているという表記ミスが見かけられた。このような場合、#1001 を例にすると、DRB1*15 と DRB1*16 は rSSO 法を利用しているような場合、反応パターンが同じになり、区別することができないので、DRB1*02 と記載すべきである。また、DRB 5 との連鎖不平衡から推定して DRB1*

表 19. DRB と DQA1 タイピングにおける 4 桁と 2 桁でのミスタイプ頻度

DRB1	#1001		#1002		#1003		#1004		#1005		#1006		合計	頻度
	*15021	*1602	*1302		*0403	*04051	*1301	*1401	*0401		*03011	*1302		
4桁でタイプした施設数	43	44	44		42	42	43	43	43		43	43	430	
下2桁で間違えたアレル数	0	1	0		0	0	0	0	1		0	0	4	0.93%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	1	0		0	0	0	0	1		0	0	2	0.47%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	4	0.93%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	0	2	0		0	0	0	0	1		0	0	10	2.33%
表記ミスによる間違え	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
2桁でタイプした施設数	12	11	11		13	13	11	11	12		12	12	118	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	1		0	0	0	0	1		0	0	2	1.69%
タイプされなかったアレル数	1	1	0		3	0	0	0	0		0	0	5	4.24%
間違えの合計数	1	1	1		3	0	0	0	1		0	0	7	5.93%
表記ミスによる間違え	2	1	1		0	0	1	0	0		0	1	6	5.08%
2桁レベルでみた場合	55	55	55		55	55	54	54	55		55	55	548	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	1	0		0	0	0	0	1		0	0	2	0.36%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	1	1	0		3	0	0	0	0		0	0	5	0.91%
間違えの合計数	1	2	0		3	0	0	0	1		0	0	7	1.28%

DRB3/4/5	DRB5	DRB5	DRB3		DRB4		DRB3	DRB3	DRB4		DRB3	DRB3	合計	頻度
	*0102	*0202	*0301		*0103		*0101	*0202	*0103		*0202	*0301		
4桁でタイプした施設数	24	12	26		5		25	20	5		20	27	164	
下2桁で間違えたアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	1		0		0	0	0		0	0	1	0.61%
タイプされなかったアレル数	4	1	0		0		0	0	0		0	0	5	3.05%
間違えの合計数	4	1	1		0		0	0	0		0	0	6	3.66%
表記ミスによる間違え	0	4	0		0		0	3	0		2	0	9	5.49%
2桁でタイプした施設数	3	15	4		23		4	9	23		10	3	94	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
表記ミスによる間違え	0	0	0		2		0	0	2		0	0	4	4.26%
2桁レベルでみた場合	27	27	30		28		29	29	28		30	30	258	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	4	1	0		0		0	0	0		0	0	5	1.94%
間違えの合計数	4	1	0		0		0	0	0		0	0	5	1.94%

DQA1	*0102	*0103	*0102		*03011	*0303	*0103	*0104	*03011		*0102	*05011	合計	頻度
4桁でタイプした施設数	6	9	8		5	5	10	7	5		8	8	71	
下2桁で間違えたアレル数	0	0	1		0	1	0	0	1		0	0	3	4.23%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0	1	0	0	0		0	0	2	2.82%
間違えの合計数	0	0	1		0	1	0	0	1		0	0	5	7.04%
表記ミスによる間違え	0	0	0		0	0	0	1	0		0	0	1	1.41%
2桁でタイプした施設数	3	0	2		5	5	0	3	5		2	2	27	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
表記ミスによる間違え	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
2桁レベルでみた場合	9	9	10		10	10	10	10	10		10	10	98	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0	2	0	0	0		0	0	2	2.04%
間違えの合計数	0	0	0		0	2	0	0	0		0	0	2	2.04%

02を分けられる場合には、DRB1*15とDRB1*16とすることが望ましい。また、仮に区別できたとし、判定表に示されているアレル名の最初のアレル

名だけを記入することは望ましくない。また、タイピング方法によっては、2, 3種類のアレルを区別できないことがある。このような場合には、DRB1*1301/2などと“/”で区切ることを日本組織適

表 20. DQB1 と DPB1 タイピングにおける 4 桁と 2 桁でのミスタイプ頻度

DQB1	#1001		#1002		#1003		#1004		#1005		#1006		合計	頻度
	*0502	*06011	*0604		*0302		*05031	*0603	*0302		*0201	*0604		
4桁でタイプした施設数	29	31	29		29		28	28	29		25	29	257	
下2桁で間違えたアレル数	0	1	0		0		0	2	0		0	0	3	1.17%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	1		1		0	0	2		0	0	4	1.56%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	0	1	1		1		0	2	2		0	0	7	2.72%
表記ミスによる間違え	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
2桁でタイプした施設数	3	1	2		2		2	2	2		6	2	22	
全く異なったアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
表記ミスによる間違え	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
2桁レベルでみた場合	32	32	31		31		30	30	31		31	31	279	
全く異なったアレルのタイプ数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	0	0	0		0		0	0	0		0	0	0	0.00%

DPB1	*0202	*0501	*02012	*0401	*02012		*0501		*0401	*0501	合計	頻度
	4桁でタイプした施設数	21	21	21	21	21		21		21		
下2桁で間違えたアレル数	2	0	0	0	0		0		0	0	2	1.06%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	0	0	0		0		0	0	0	0.00%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0	0	0		0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	0	0	0	0	0		0		0	0	0	0.00%
間違えの合計数	2	0	0	0	0		0		0	0	2	1.06%
表記ミスによる間違え	0	0	0	0	1		0		0	0	1	0.53%

総合	#1001		#1002		#1003		#1004		#1005		#1006		合計	頻度
4桁でタイプした施設数	123	117	128	21	102	47	127	98	103		117	128	1111	
下2桁で間違えたアレル数	2	2	1	0	0	3	0	2	2		0	0	12	1.08%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	1	0	0	0	0	0	1	0		0	0	2	0.18%
余分にタイプされたアレル数	0	0	4	0	1	0	0	4	0		0	0	9	0.81%
タイプされなかったアレル数	4	1	0	0	2	0	0	0	0		0	0	7	0.63%
間違えの合計数	6	4	5	0	3	3	2	7	2		0	0	30	2.70%
表記ミスによる間違え	0	4	0	0	1	0	4	0	0		2	0	11	0.99%
2桁でタイプした施設数	21	27	19		43	18	17	25	42		30	19	261	
全く異なったアレル数	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
全く異なったアレルにタイプされた数	0	0	1	0	0	0	0	1	0		0	0	2	0.77%
タイプされなかったアレル数	1	1	0	0	3	0	0	0	0		0	0	5	1.92%
間違えの合計数	1	1	1		3	0	0	1	0		0	0	7	2.68%
表記ミスによる間違え	2	1	1	0	2	0	1	0	2		0	1	10	3.83%
2桁レベルでみた場合	144	144	147	21	145	65	144	123	145		147	147	1372	
全く異なったアレルにタイプされた数	0	1	0	0	0	0	0	0	1		0	0	2	0.15%
余分にタイプされたアレル数	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0.00%
タイプされなかったアレル数	4	2	0	0	3	2	0	0	0		0	0	11	0.80%
間違えの合計数	4	3	0	0	3	2	0	0	1		0	0	13	0.95%

合性学会 HLA 標準化委員会の見解として提唱している。

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 タイピング法の特徴を熟知する、(3)HLA アレ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因子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。

表 21. 日本人集団に認められる HLA-DR/DQ ハプロタイプ

DR	DRB1	DRB3	DRB4	DRB5	DQ	DQA1	DQB1
1	*0101				5	*0101	*0501
15	*1501			*0101	6	*01021	*0602
15	*1501			*0101	7	*05013	*0301
15	*1502			*0101	6	*0103	*0601
16	*1602			*0202	5	*01022	*0502
3	*0301	*0202			2	*05011	*0201
4	*0401		*0102		7	*0302	*0301
4	*0403		*0103		8	*0301	*0302
4	*0404		*01		8	*0301	*0302
4	*0405		*0103		4	*0302	*0401
4	*0406		*0103		8	*0301	*0302
4	*0407		*0103		8	*0301	*0302
4	*0410		*0103		4	*0302	*0402
11	*1101	*0202			7	*05013	*0301
11	*1101	*0202			8	*05013	*0302
12	*1201	*0101			7	*05013	*0301
12	*1201	*0101			7	*0302	*0301
12	*1201	*0101			9	*0302	*03032
12	*1201	*0101			8	*0301	*0302
12	*1202	*0301			7	*0601	*0301
13	*1301	*0101			6	*0103	*0603
13	*1302	*0301			6	*01021	*0604
13	*1302	*0301			6	*01021	*0609
14	*0401	*0202			5	*0104	*0502
14	*1401	*0202			5	*0104	*05031
14	*1402	*0202			7	*0503	*0301
14	*1403	*0101			7	*0503	*0301
14	*1405	*0202			5	*0104	*05031
14	*1406	*0202			7	*0503	*0301
14	*1407	*0202			5	*0104	*05031
7	*0701		*0101		2	*0201	*0202
7	*0701		*0103		2	*0201	*0202
8	*0801				8	*0301	*0302
8	*0802				4	*0401	*0402
8	*0802				8	*0401	*0302
8	*08032				6	*0103	*0601
9	*0901		*0103		9	*0302	*03032
10	*1001				5	*0105	*0501

第7回日本組織適合性学会大会 QCワークショップ報告 クラス I DNA タイピングについて

柏瀬 貢¹⁾, 小林 賢²⁾, 成瀬 妙子³⁾, 猪子 英俊³⁾, 木村 彰方⁴⁾, 徳永 勝士⁵⁾,
斎藤 敏⁶⁾, 佐田 正晴⁷⁾, 橋本 光男⁸⁾, 小河原 悟⁹⁾, 前田 平生¹⁰⁾

(第7回日本組織適合性学会 HLA 標準化委員会)

¹⁾日本赤十字社中央血液センター, 研究部 ²⁾防衛医科大学校, 検査部 ³⁾東海大学医学部, 分子生命科学
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⁾長野県赤十字血液センター
⁷⁾国立循環器センター研究所, 実験治療開発部 ⁸⁾兵庫県立西宮病院, 腎移植センター
⁹⁾福岡大学病院, 腎センター ¹⁰⁾埼玉医科大学総合医療センター, 輸血部

はじめに

現在, クラス II の DNA タイピングについてはキット化が進み, 日常検査として定着した感がある. 一方, クラス I の DNA タイピングについても, 近年タイピングキットが市販されたことなどから日常検査として導入されつつある. しかしながら, その精度についての QC ワークショップは, 今までに日本組織適合性学会として実施されていない.

昨年行われたクラス II を中心とした QC ワークショップでのタイピング結果の誤りで, もっとも多かったのは単純な判定ミスであった. そこで, クラス I の DNA タイピングにおいても同様の問題はないか, また他の技術的な問題はないのかを調査するため, 今回の QC ワークショップからオプションとしてクラス I も対象に解析を行ったので報告する.

DNA サンプル

クラス I DNA タイピングの QC ワークショップに使用した DNA はクラス II と共通で, 健常人 6 人から抽出した DNA を用いた. 詳細については, 小林らによる第7回組織適合性学会大会 QC ワークショップ報告を参照して頂きたい.

参加施設数

今回の QC ワークショップにおいてクラス I の DNA タイピング実施施設は, 全体では 13 施設の参加で, その内訳は, HLA-A は 12 施設, HLA-B は 11 施設, HLA-C は 11 施設であった.

結果

各施設の結果とタイピング方法を表 1 ~ 表 3 に示す.

表 1. 各施設でタイプされた HLA-A アリルの一覧

施設番号	#1001		#1002		#1003		#1004		#1005		#1006		method(1)	method(2)
	*1101	*2402	*3303		*2402		*0207	*2402	*0201		*1101	*3303		
#22	*11	*24	*33		*24		*02	*24	*02		*11	*33	RFLP	
#24	*11	*24	*33	*24	*24		*02	*24	*02	*24	*11	*33	SSP Dynal	
#26	*11	*24	*33				*0207	*24	*0201		*11	*33	SSP Dynal	MPH A2
#29	*1101	*2402	*3303		*2402		*0207	*2402	*0201		*1101	*3303	RFLP	SSP
#30	*1101	*2402	*3303		*2402		*0207	*2402	*0201		*1101	*3303	SBT	
#40	*1101	*2402	*3303		*2402		*0207	*2402	*0201		*1101	*3303	RFLP	SSP
#42							*0207		*0201				MPH A2	SSCP
#44	*11	*24	*33		*24						*11	*33	SSP Pelfreeze	
#46	*1101/2/3	*24\$	*3301/2/3		*24\$		*02\$		*02\$		*1101/2/3	*3301/2/3	SSP Dynal	
#48	*1101/2/3	*24&	*3301/2/3		*24&		*02&	*24&	*02&		*1101/2/3	*3301/2/3	SSP Pelfreeze	
#49	*11	*24	*33		*24		*0207	*24	*0201		*11	*33	RFLP	SBT
#56	*11	*24	*33		*24	*02	*02	*24	*02		*11	*33	SSP 12thW	SSP Pelfreeze

■: ミスタイプ

24\$: 2402/4/5/9/10

24&: 2402-7/9N/10/14

02\$: 0201-9

02&: 0201-9/11-16/18-22

表 2. 各施設でタイプされた HLA-B アリルの一覧

施設番号	#1001		#1002	#1003		#1004		#1005		#1006		method(1)	method(2)	method(3)
	*51021	*67011	*44031	*4001	*4002	*1518	*5401	*1501		*5801	*67011			
#24	*51	*67	*44	*60	*61	*70	*54	*62	*60	*58	*67	SSP Dynal		
#26	*51	*67011	*44	*4001	*4002	*1518	*5401	*1501		*5801	*67011	SSP Dynal	MPH B61	
#29	*51	*6701	*44031	*4001	*4002	*1518	*5401	*1501		*5801	*67011	RFLP	SSP	
#30	*51021	*67011	*44031	*4001	*4002	*1518	*5401	*1501		*5801	*67011	SBT		
#40	*51021	*6701	*44031	*4001	*4002	*1518	*5401	*1501		*5801	*67011	SSO	SSCP	
#42				*60	*4002	*1518		*1501				SSP	MPH B61	SSCP
#44	*51	*39	*44	*4001/7	*4002	*1518		*1501		*5801	*6701/3910	SSP Pelfreeze	MPH B61	
#46	*51\$	*6701	*44\$	*4001/7	*40\$	*15\$	*5401	*15		*5801/3	*6701	SSP Dynal		
#48	*51&	*6701	*44&	*4001/7	*40&	*15&	*5401	*15&2		*5801	*6701	SSP Pelfreeze		
#49	*5102	*6701	*4403	*60	*61	*15	*5401	*1501		*58	*6701	RFLP	SBT	
#56	*52	*67	*44	*4001		*15(70)	*54	*15		*58	*39	SSP 12thIW	SSP Pelfreeze	

■: ミスタイプ

*51\$: 5101/2/3/5

*44\$: 4402/3/4/5/8

*40\$: 4002-5

*15\$: 1509/10/18

*51&: 5101-3/5-9N

*44&: 4402-5/7/8/10

*40&: 4002/4/6/9

*15&: 1510/18/29/37

*15&2: 1501/4-7/20/25-28/32

表 3. 各施設でタイプされた HLA-C アリルの一覧

施設番号	#1001		#1002	#1003	#1004		#1005	#1006		method(1)	method(2)		
	*0702	*1502	*1403	*0304	*0102	*0704	*0304	*0302	*0702				
#3	*07	*15	*14	*03		*0102	*0704	*03	*03	*07	SSP		
#22	*07										RFLP		
#24	*07		*01	*03		*01	*07	*03	*1403	*03	*07	SSP Dynal	
#29	*0702	*1502	*1403	*0304		*0102	*0704	*0304		*0302	*0702	SSP	
#30	*0702	*1502	*1403	*0304		*0102	*0704	*0304		*0302	*0702	SBT	
#40	*0702	*1502	*1403	*0304		*0102	*0704	*0304		*0302	*0702	SSP	
#44	*0702	*15	*14	*03	*1301					*03	*0702	SSP Pelfreeze	
#46	*0701-6	*1502-5	*1402/3	*0302/4		*0102/3	*0701-6	*0302/4		*0302/4	*0701-6	SSP Dynal	
#48	*0702	*1502-5	*1402/3	*0302/4		*0102/3	*0704	*0302/4		*0302/4	*0702	SSP Pelfreeze	
#49	*0702	*1502	*1403	*0302/4		*0102	*0704	*0302/4		*0302/4	*0702	RFLP	SBT
#56	*07	*15	*14	*0304		*01	*07	*0304		*0302	*07	SSP 12thIW	SSP Pelfreeze

■: ミスタイプ

HLA-A について

12 施設中、すべてのサンプルをアリルレベル（4 桁レベル）でタイプしたのは 3 施設で 2 施設が RFLP 法、1 施設が SBT 法によるものであった。その他の施設は、ほとんどが SSP 法によるもので一部が 4 桁レベルでほとんどが 2 桁レベルのタイプであった。また、施設番号 #42 においては A 2 のアリルのみタイプされていた。HLA-A のミスタイプの 4 個すべてが SSP 法によるものであった。

HLA-B について

11 施設中、すべてのサンプルを 4 桁レベルでタイプしたのは 2 施設で 1 施設が SSO 法と SSCP 法の併用で、1 施設が SBT 法によるものであった。また施設番号 #29 においては DNA# 1001 の B 51 以外すべて RFLP 法と SSP 法の併用により 4 桁レベルがタイプされていた。その他の施設は HLA-A 同様に 2 桁と 4 桁レベルの混在したデータでほとんどが SSP 法によるものであった。また、施設番号 #

42 においては B 15、B 40 のアリルのみタイプされていた。HLA-B において 7 個のミスタイプの内、6 個が HLA-A 同様 SSP 法によるものであった。

HLA-C について

11 施設中、すべてのサンプルを 4 桁レベルでタイプしたのは 3 施設で 2 施設が SSP 法で、1 施設が SBT 法によるものであった。ミスタイプの 5 個の内、4 個が SSP 法によるもので、その内 3 つが施設番号 #24 に集中していた。

考察

今回のクラス I DNA タイピングの 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。特に SSO 法、RFLP 法、SBT 法はミスタイプがほとんどなく、4 桁レベルの高精度のタイピング法であることが確認された。

これに対して、ミスタイプのほとんどが SSP 法であったが、そのほとんどがホモの検体をヘテロと、

あるいはヘテロの検体をホモとしてしまうものであった。但し異なるアリルに判定される例は少なかった。これは増幅の有無で判定する SSP 法の原理上の制約であり、検査に用いる DNA の純度、濃度等について他の方法よりも気を付ける必要があると思われる。表4は今回配布した DNA の濃度を示したものである。この表から読み取れるように、施設番号#24において SSP 法でミスタイプの多かった検体 (#1002, #1005) は、いずれも DNA 濃度の低かったものであり、SSP 法でタイプすることが困難な検体であったと思われる。SSP 法では DNA 濃度に留意すべきであると共に、今後 QC ワークショップを行う場合、クラス I DNA タイピングが十分行える DNA 量を配布する必要があると考えられた。

表4. DNA 濃度と SSP 法によるミスタイプの関係 (施設番号#24)

DNA番号	DNA濃度 (ng/μL)	15μL使用した場合のDNA量(μg)	HLA-A	HLA-B	HLA-C
#1001	411	6.17	○	○	×
#1002	89	1.34	×	×	×
#1003	209	3.14	○	○	○
#1004	117	1.76	○	○	○
#1005	61	0.92	×	×	×
#1006	213	3.20	○	○	○

○: 正解
×: ミスタイプ

一方、RFLP 法におけるミスタイプは B*4002 と B*4006 との非常に相同性の高いアリル間での判定ミスであった。ミスタイプした原因として、この2つのアリルを区別できる制限酵素 NlaIII のバンドパターンが非常に似ている (図1) ためか、制限酵素の劣化によるためと考えられる。なお、SSCP 法により B*4002 と B*4006 は判別が容易なことから (図2)、昨年の QC ワークショップでも提唱されたように、原理の異なるタイピング法を併用することでミスタイプが防げた例と考えられる。

おわりに

今後、さらにクラス I DNA タイピングが日常検査として普及すると考えられる。自施設で用いている技法の確認やタイピング結果の記入法を統一する意味でも、このような外部精度管理プログラムに参加することは意義のあることと考えられる。

Lane 1 2 3 4 5 6 7 8

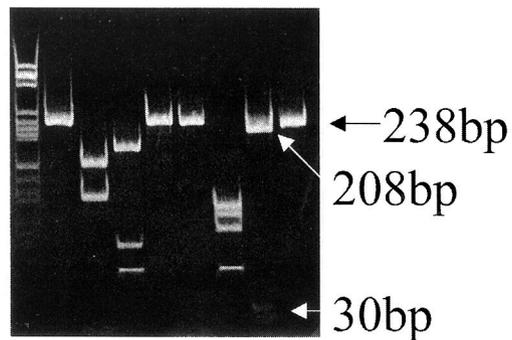


図1 RFLP 法によるミスタイプ例

Lane 7 NlaIII
 実際のタイプ B*4002 (208, 30 bp)
 ミスタイプ B*4006 (238 bp)

小川篤子, 光永滋樹, 徳永勝士ら: PCR-RFLP 法を用いた HLA-B 抗原遺伝子の高精度 DNA タイピング. MHC5:4-17, 1998 による

B*4006 B*4002

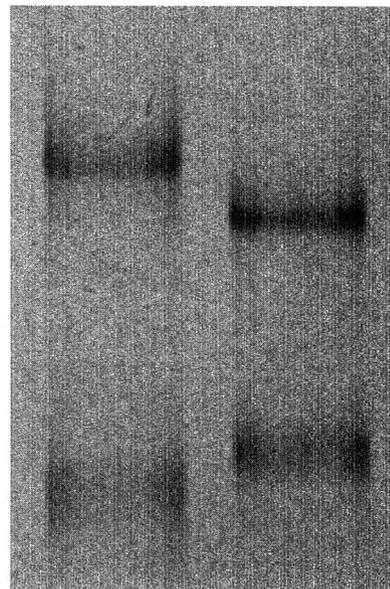


図2 SSCP 法による B*4002 と B*4006 との判別
 泳動条件 10%アクリルアミド 22℃

追記

第6回日本組織適合性学会大会 QC ワークショップにおいて C ローカスの一部に変更があったので報告する。

サンプル番号: H0902

訂正後: Cw*0102, Cw*0801

訂正前: Cw*0102, -